

主論文

花粉管に誘引物質応答能を与える雌性因子  
AMOR の同定

名古屋大学大学院

理学研究科 生命理学専攻

水上 茜

# 目次

1. 要旨	• • • • • 3
2. 序論	• • • • • 5
3. 結果	• • • • • 21
4. 考察	• • • • • 29
5. 結語	• • • • • 37
6. 材料と方法	• • • • • 38
謝辞	• • • • • 45
参考文献	• • • • • 49
図表	• • • • • 59

## 1. 要旨

被子植物の受精が達成されるには、雌蕊の柱頭に受粉した花粉から発芽・伸長した花粉管が、雌蕊組織の中を迷うことなく通過し、胚嚢へと到達することが必須である。雌蕊を通過している間に花粉管は、脂質、植物ホルモン、ペプチド、糖タンパク質等さまざまな雌性分子を受け取る。この時、花粉管の遺伝子発現は段階的に変化しており、これは胚嚢による花粉管の誘引と受容を含む配偶体間の相互作用を促進していると考えられる。

当研究室において、胚嚢が胚珠から裸出しているという特徴をもつ植物トレンニア (*Torenia fournieri*) を用いて、胚嚢において卵細胞の両側に位置する2つの助細胞から分泌される花粉管誘引物質 LURE ペプチドが同定された。この時、切断された花柱内を伸長した花粉管は、切り口から培地上に出て伸長を続け (semi-in vitro)、助細胞から分泌される LURE ペプチドによって胚嚢へと誘引される。さらに、先行研究により、培地上で花粉管を胚嚢へ誘引・受精させるためには、まず花柱組織の中を伸長し、さらに胚珠組織からの滲出成分を受けるという制御が必要であることが明らかになった。胚珠組織からの第二段階の制御を担う因子が見出され、花粉管に誘引シグナル応答能を与える因子であることから、AMOR (Activation Molecule for Response-capability) と名付けられた。

本研究では、花粉管が胚嚢からの誘引物質に対する応答能を獲得する分子メカニズムの解明をするために、AMOR の同定を目指した。最初に、花粉管が誘引物質応答能を持つ割合を顕微操作により定量的に評価できる AMOR アッセイ系を開発した。この系を用いることで、AMOR は濃度依存的に作用し、組織特異

性があることが明らかとなった。さらに胚珠を含む子房の培養液から AMOR の精製をおこない、その性質を解析した。その結果、AMOR は熱耐性で、タンパク質分解酵素耐性の分子であることが明らかとなった。さらに解析の結果、AMOR を植物特有のアラビノガラクトン糖鎖として同定し、その末端の 4-O-メチル-グルクロノシル残基がその活性に必須であることを明らかにした。さらに、化学的に合成した 2 糖メチル-グルクロノシルガラクトースの  $\beta$  異性体 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal が AMOR 活性を有することを示した。化学合成による誘導体解析により、この 2 糖構造 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal の GlcA のメチル基修飾と  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)結合とが AMOR 活性に必須であることを明らかにした。子房内の AMOR 糖鎖が LURE ペプチドによる最終的なガイダンスに先駆けて花粉管の LURE 応答能を変化させている可能性が考えられる。

本研究によって初めて植物の細胞外基質を構成している特定の糖鎖構造が細胞間コミュニケーションを担う生理活性物質として同定された。今後花粉管による AMOR の受容機構や他種における普遍性を解析することで、LURE ペプチドによる花粉管ガイダンス機構の解明に貢献するだけでなく、植物の糖鎖生物学に大きく貢献するものと期待できる。

## 2. 序論

被子植物の受精において、雌蕊の柱頭に受粉した花粉が花粉管を伸長させ、確実に胚嚢へ到達することは必須である (図 1). この花粉管を精確に目的の胚嚢へと誘導する仕組みを花粉管ガイダンスと呼ぶ. これまでの遺伝学および生理学的研究により、この花粉管のガイダンスは、孢子体 (核相が  $2n$  の柱頭、花柱など) と雌性配偶体 (核相が  $n$  の胚嚢) の両方により制御されていることが示されてきた (Higashiyama *et al.*, 2003). 孢子体に由来する因子としては、方向性制御を担う物質 (誘引物質) の候補として、ユリの柱頭で働く低分子量タンパク質のケモシアニン (Kim *et al.*, 2003) やシロイヌナズナの子房内で働く GABA (Palanivelu *et al.*, 2006) が報告されている. また、方向性制御とは異なり、ユリの花粉管と花柱の接着を担う因子として低分子量タンパク質である Stigma/stylar Cysteine-rich Adhesin (SCA) (Park *et al.*, 2000) が、タバコの花柱で働き花粉管伸長を促進するアラビノガラクトナンタンパク質 (AGP) である Transmitting Tissue-Specific (TTS) タンパク質 (Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995) などが報告されている.

花粉管が子房に入ると、花粉管の走性パターンに変化が見られ始める (Higashiyama and Takeuchi, 2015). 子房に入るまでの花粉管は、孢子体のみによりガイドされ、複数 (多数) の花粉管の束となって集団で子房に向かう. 一方、子房に進出した花粉管は、1 本ずつ個別に標的である胚珠 (ovule) による制御を受け始める. 花粉管ガイダンスは多段階のプロセスであるが、この胚珠によるガイダンスを境に、大きく pre-ovular ガイダンスと ovular ガイダンスの 2 つに分

けることができる(Higashiyama and Takeuchi, 2015). 胚珠によるガイダンスにおいて、孢子体とともに重要な役割を果たすのが、雌性配偶体である胚嚢である。

胚珠は受精後に種子となる組織であるが、古くから花粉管は胚珠に対して「化学屈性」と考えられる挙動を示すことが知られてきた (Higashiyama *et al.*, 2003; Higashiyama and Hamamura, 2008). 19 世紀後半から胚珠に由来する誘引物質の存在が提唱され、花粉管ガイダンスの研究の中心は、常にこの同定を目指す試みであった (Higashiyama *et al.*, 2003; Higashiyama and Hamamura, 2008). 近年、胚嚢が拡散性のガイダンス分子を分泌していることが、胚嚢が裸出するユニークな植物であるトレニア (*Torenia fournieri*) の *semi-in vitro* 受精系で、初めて実験的に示唆された (Higashiyama *et al.*, 1998). さらに、トレニアでは胚嚢の助細胞が花粉管誘引物質を分泌していることが示され (Higashiyama *et al.*, 2001), また、シロイヌナズナにおいても助細胞が珠孔ガイダンスを制御していることが明らかとなった (Kasahara *et al.*, 2005). そして、トレニアにおける胚嚢への最終的な花粉管誘引物質として、助細胞から分泌されるペプチドである LURE1 と LURE2 が同定された (Okuda *et al.*, 2009). LURE はシステインに富む抗菌ペプチドであるディフェンシンに類似するペプチドであり、同様の構造を示す LURE ペプチドがトレニア近縁種 (Kanaoka *et al.*, 2011) ならびにシロイヌナズナ (Takeuchi and Higashiyama, 2012) においても同定された。また、トウモロコシにおいて助細胞から分泌される異なるタイプのペプチド ZmEA1 が、誘引物質として報告された (Márton *et al.*, 2012). これらの誘引ペプチドの活性は、種の特異性／選択性が高く、異種への遺伝子導入により生殖隔離障壁の主要なステップの一つが打破される (Márton *et al.*, 2012; Takeuchi and Higashiyama, 2012).

このように胚嚢の助細胞が分泌する誘引物質や、花柱において花粉管伸長に関わる因子などが同定されてきている一方で、これまで想定されていなかった胞子体組織による新たな花粉管ガイダンスの制御機構が、トレニアの *semi-in vitro* 受精系により明らかになってきた (Higashiyama *et al.*, 1998). トレニアでは、花粉管が胚嚢に培地中で誘引されるために、花柱を通過する必要があったのである. *semi-in vitro* もしくは *semi-in vivo* と呼ばれるこの方法では、花粉管は授粉後に切り取られた花柱内を伸長し、切り口から培地上に出てさらに伸長を続ける. この花粉管誘引に対する花柱の効果は、花柱が花粉管の単なる通り道ではなく、花粉管が花柱を伸長する間に生理状態を変え、最終的に胚嚢への誘引シグナルに応答できるようになるという、言わば受精能獲得のような機構の存在を示唆している. シロイヌナズナにおいても、花柱を通過した花粉管において、胚珠に誘引される率が上昇することが観察された (Palanivelu and Preuss, 2006). また以前から、花粉管が伸長している花柱を胚珠のついている胎座へ直接つなぐと、受精率が上昇することが示されている (Janson, 1993; Vervaeke *et al.*, 2002). これらのことから、被子植物を通じて、胞子体組織による、花粉管の誘引シグナルに対する応答能制御 (competency control) の機構の存在が示唆されるようになった (Higashiyama *et al.*, 2003; Higashiyama and Takeuchi, 2015).

実際に、花柱を通過して *semi-in vitro* で伸長する花粉管は、培地上で発芽した花粉管と比べて、大きく遺伝子発現プロファイルを変える (Qin *et al.*, 2009; Okuda *et al.*, 2013). トレニアでは、花柱を通過した花粉管はまず LURE ペプチドが花粉管の先端に局在できるようになり、その後に LURE に対する応答能を獲得する (Okuda *et al.*, 2013). シロイヌナズナでは、胚珠からの誘引シグナルに対

する応答能が向上することに加え、花粉管が胚嚢に到達したあとに内容物を放出するのに必要な遺伝子の発現上昇も見られる (Leydon *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013).

胚珠からの誘引シグナル応答能制御に関わる花粉管側の候補因子として、小胞体局在の  $K^+$  輸送体 CHX21 および CHX23 (Lu *et al.*, 2011) や、MAP キナーゼの MPK3 および MPK6 (Guan *et al.*, 2014) がシロイヌナズナで同定されている。しかし、雌蕊から花粉管に作用する直接的な細胞間シグナリング分子は全く同定されておらず、その同定は花粉管の応答能制御のメカニズム解明に対して不可欠である。

トレニアを用いた当研究室の先行研究において、まず、花粉管の誘引物質への応答能獲得のタイミングを決定するため、*semi-in vitro* 花粉管誘引アッセイ系を元に、花粉管の応答能のアッセイ系が構築された (図 2)。ガラス針の先端を珠皮に突き刺してマイクロマニピュレータで操作した胚珠を、培地上の花粉管の先端に対して様々な位置に置いて誘引率を調べたところ (図 3)、花粉管の先端から胚嚢の珠孔側の先端が 30  $\mu\text{m}$  以内に存在した場合、常に胚嚢へと誘引されることが明らかとなった (図 4)。このアッセイ系を用いることで、花粉管に対する誘引物質応答能の獲得について定量的に評価できるようになった。

そこで、次に花粉管の培養時間がどのように花粉管の誘引能獲得に影響を与えるかについて解析が行われた。すると、授粉後 6 時間で花柱 (15 mm) の切り口から培地上に出たばかりの花粉管は、胚珠に対して誘引されなかったのに対し、授粉後 6 時間経過して培地上で 4 時間以上伸長した花粉管は十分に誘引されることが示された (図 5)。これは、伸長する花粉管が、誘引物質への応答能

を獲得するためには、少なくとも 4 時間は培地上を伸長することが必要ということを示唆している。この誘引能の獲得に必要な培養時間において培地に予め加えていた胚珠の役割について検討するため、培地に胚珠を入れずに解析を行った。授粉後 12-14 時間で胚珠と共培養しなかった花粉管は、興味深いことに、マニピュレーティングによって花粉管の先端の近傍に配置された胚珠へと誘引されることはなかった (図 5; 12-14 胚珠-)。このことは花柱を伸長した花粉管の誘引物質への応答能獲得が胚珠由来の未知の因子に強く依存することを示している。

この胚珠由来の因子がいつ作られるか検討するため、花粉管との共培養において成熟した胚珠の代わりにまだ胚嚢が裸出していない未成熟な胚珠 (胚嚢は 4 核期以前) が用いられた。すると、花粉管は近傍におかれた胚珠に対して誘引されなかった (図 6; 未成熟胚珠)。このことから、花粉管に誘引物質への応答能を与える胚珠由来の因子は、胚珠が成熟してから培地に滲出することが示唆された。次に、共培養に用いる成熟胚珠に対してレーザーを用いて特定の細胞を破壊することで、花粉管に誘引能を与える部位の特定が試みられた。その結果、助細胞を破壊した場合だけでなく、胚嚢全体を破壊した場合にも、花粉管の誘引能の獲得に欠損は見られなかった (図 6; 助細胞破壊胚珠, 胚嚢破壊胚珠)。さらに、減数分裂異常により胚嚢形成に欠損を示すトレニアの交雑種の *Torenia hybrida* (Summer Wave, Suntory Flowers Co.) の胚珠を共培養に用いた場合にも、花粉管は応答能を獲得した (図 6; *T. hybrida* (Summer Wave) 胚珠)。したがって、胚珠のなかでも胚嚢を包む孢子体組織から、花粉管に応答能を付与する因子が浸出することが示された。

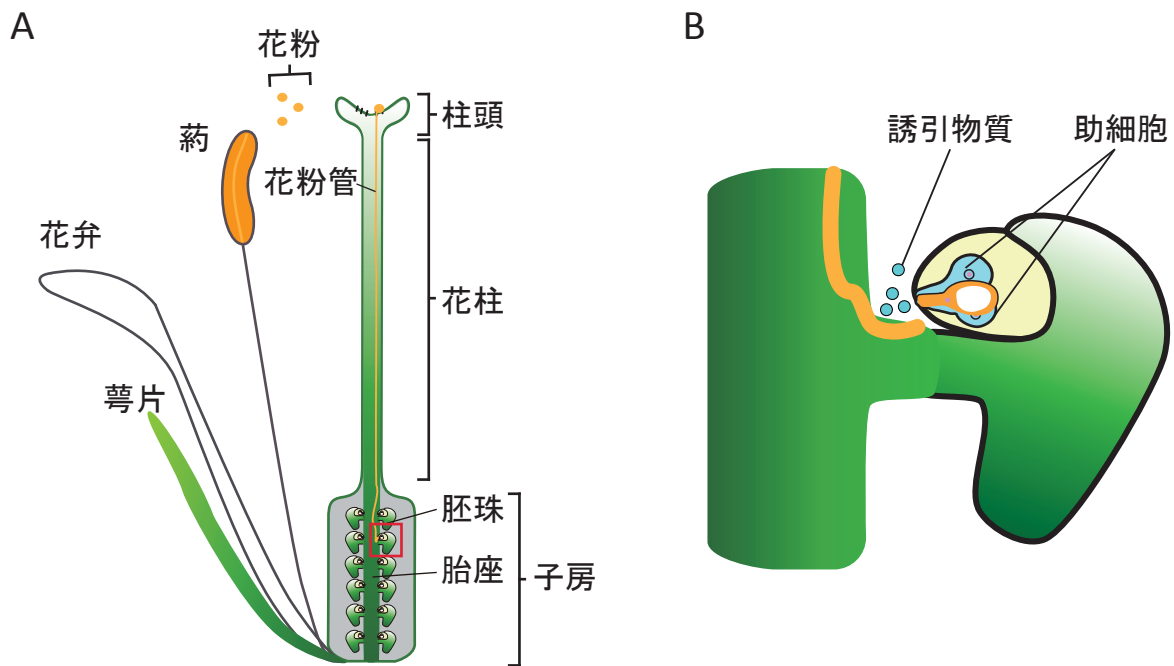
花粉管誘引物質である LURE ペプチドは高い種特異性を示し、トレニア (*T. fournieri*) に非常に近い近縁種のオルソログの精製ペプチドを用いても、トレニアの花粉管は誘引されない。同様に、成熟胚珠から分泌される花粉管への誘引能を獲得させる活性に種特異性が存在するかどうか検討するため、トレニアと同じアゼトウガラシ科で属が異なる *Lindernia* 属 (*Lindernia crustacea* および *Lindernia setulosa*) の成熟胚珠を共培養の相手として用い、トレニアの花粉管に対してトレニアの胚珠を顕微操作して誘引アッセイが行われた。その結果、いずれの成熟胚珠を共培養に用いた場合においても、花粉管は十分に誘引応答能を獲得することが明らかとなった (図 6; *L. crustacea* 胚珠, *L. setulosa* 胚珠)。この結果、花粉管に誘引応答能を付与する胚珠由来の因子に LURE ペプチドにみられるような強い種特異性が存在しないことが示唆された。

胚珠由来の拡散性の因子が花粉管の応答能獲得に必須なのかどうか、胚珠付きの胎座を 1 ディッシュ (培地 200 $\mu$ l) あたり 2 個 (胚珠約 800 個分) をあらかじめ一晩培養した前培養培地が用いられた (図 7)。前培養培地と共培養した花粉管について、これまでと同様にマニピュレータによって操作された胚珠を用いて、応答能が調べられた。その結果、前培養培地と共培養した花粉管でも誘引物質を獲得することが明らかとなった (図 8; 胚珠培養液)。さらに、切断した花柱を通過した後に培地のみで 2 時間培養した花粉管が、10 分間胚珠の前培養培地に浸され、培地のみで 2 回洗浄された。この一過的に胚珠の滲出成分に触れた花粉管は誘引物質応答能を獲得した (図 8; ウォッシュアウト)。花粉管が助細胞からの誘引物質に誘引される場に胚珠由来の因子は必須でないことから、この因子が助細胞からの誘引シグナルに直接働くものではなく、花粉管が助細

胞の誘引シグナルに対して反応できるよう前もって生理活性を変化させる役割を持つと考えられた。花粉管に対して誘引物質への応答能を獲得させるこの因子は, Activation Molecule for Response-capability の頭文字から AMOR と名付けられた。

本研究の目的は, こうした先行研究を基盤に, トレニアの胚珠組織が花粉管に誘引シグナル応答能を与えるメカニズム, 特に胚珠由来の生理活性分子の実体を解明することである。そのために AMOR の精製を進め, その活性を担う分子の同定を目指した。

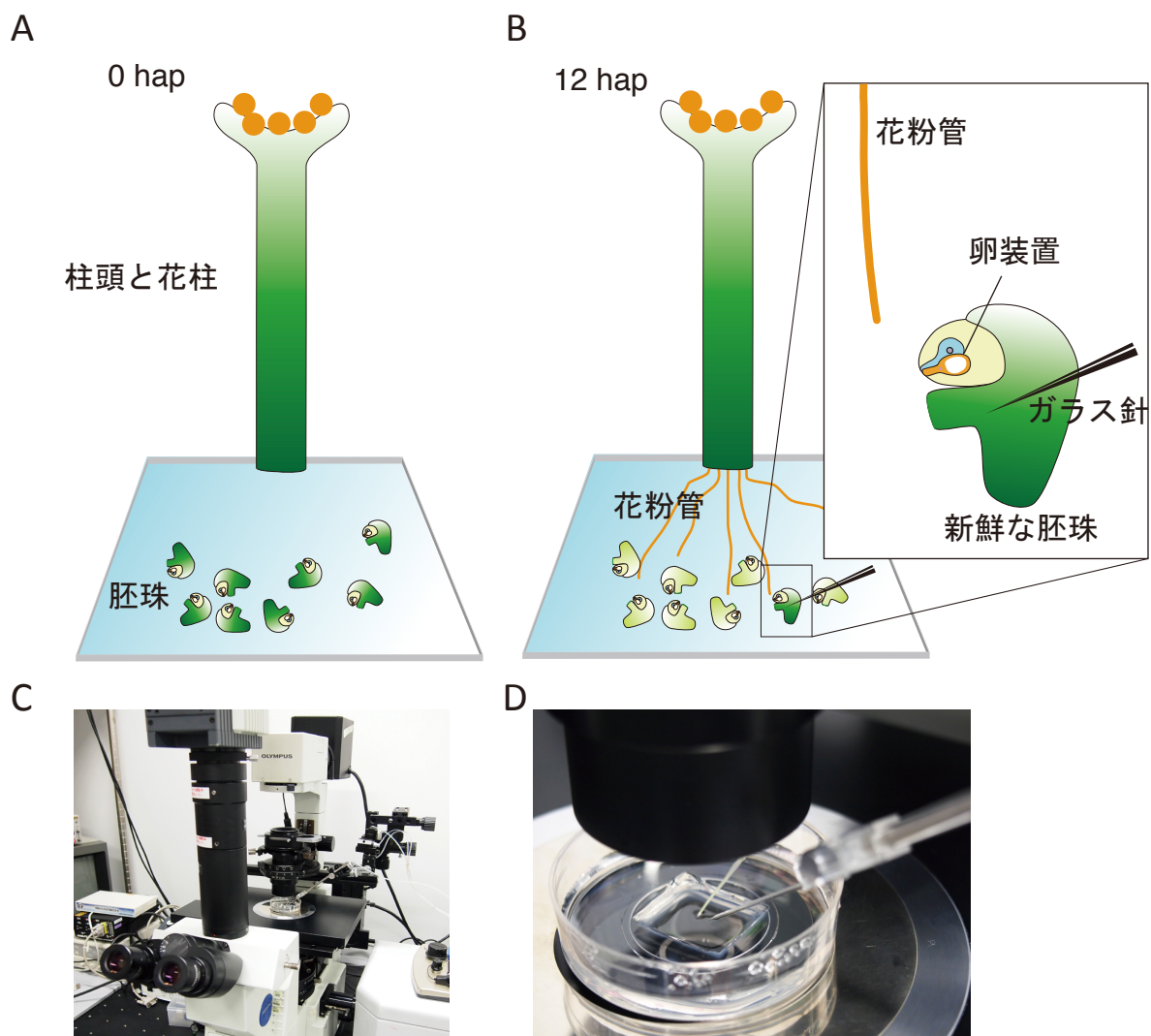




**図 1. 花の構造と花粉管ガイダンス**

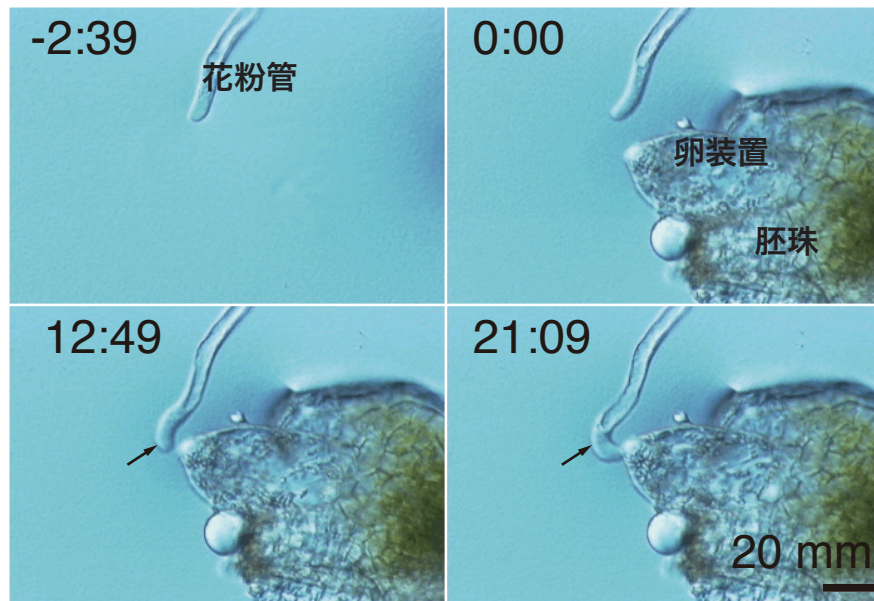
A. トレニアの花の模式図

B. 裸出した胚嚢の助細胞から分泌される誘引物質に反応して胚嚢側へと向かう花粉管を示す.



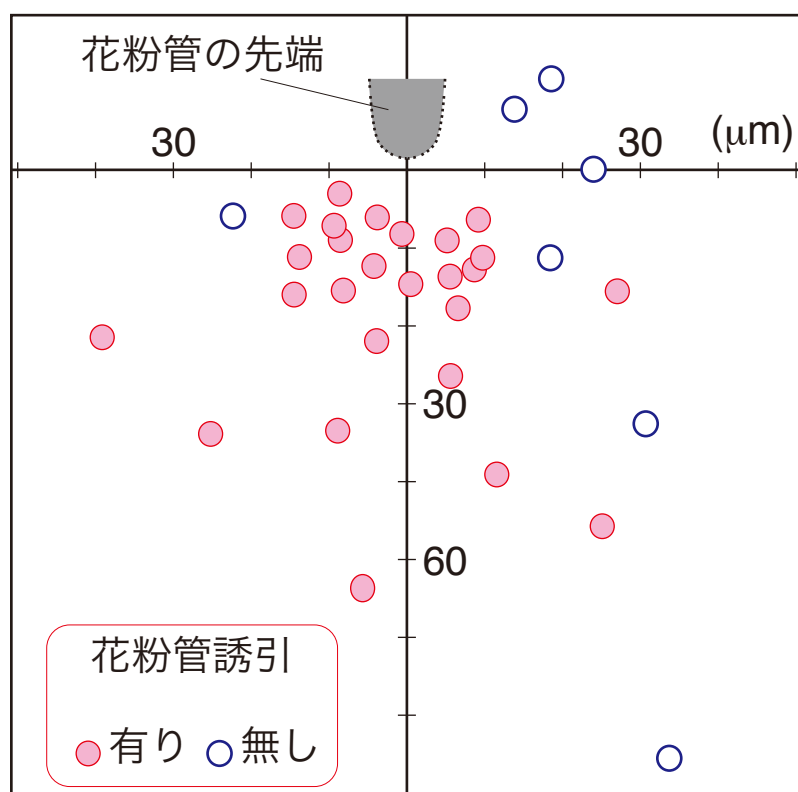
**図 2. トレニアを用いた *in vitro* 花粉管誘引アッセイ系**

- A. 授粉させた花柱を柱頭から 15 mm の位置で切断し、培地に花柱の切断面を接着させる。花 1 個分から取り出した胚珠と培地上で共培養する (0 hap) (hap、hours after pollination).
- B. 授粉後 6 時間から培地上に伸長してきた花粉管の先端の近傍に、新たな胚珠マニピュレーターで配置する (12 hap).
- C. 実験に用いられた OLYMPUSIX71 倒立システム顕微鏡.
- D. 誘引アッセイ中の顕微鏡のステージ上の写真.



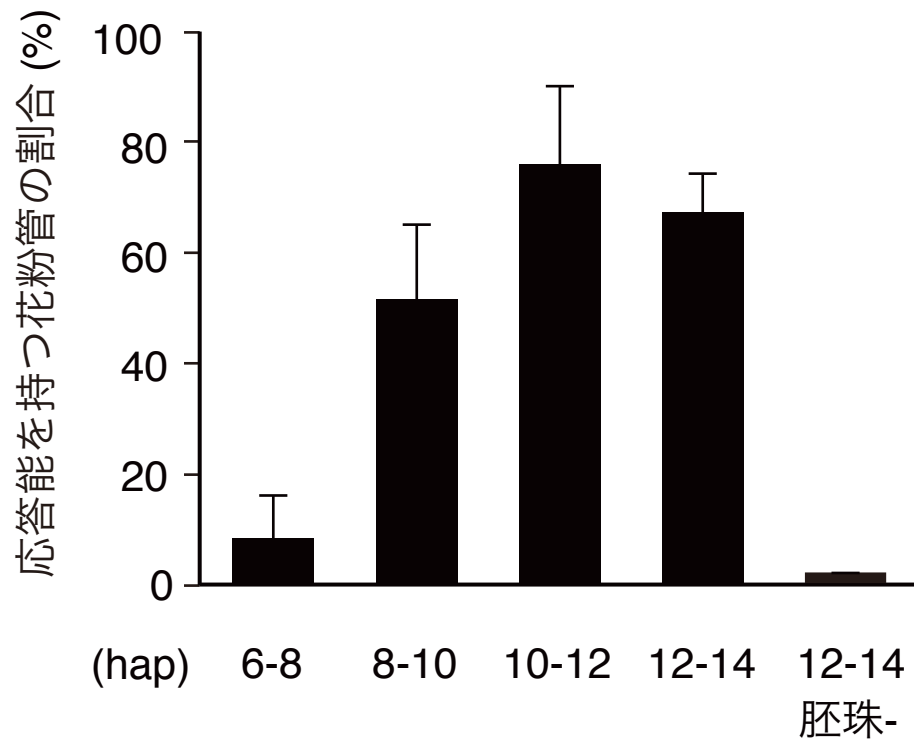
### 図 3. *semi-in vitro* 受精実験における花粉管の挙動

授粉後 12 時間後の培地上を伸長している花粉管に (-2:39), 胚珠を胚嚢の珠孔側の先端を向けて配置する (0:00). 花粉管は徐々に伸長方向を変え (12:49), 胚嚢の珠孔側の先端に到達する (21:09). 括弧内には胚珠を配置したときを起点とした時間 (分:秒) を示す. スケールバー, 20  $\mu\text{m}$ .

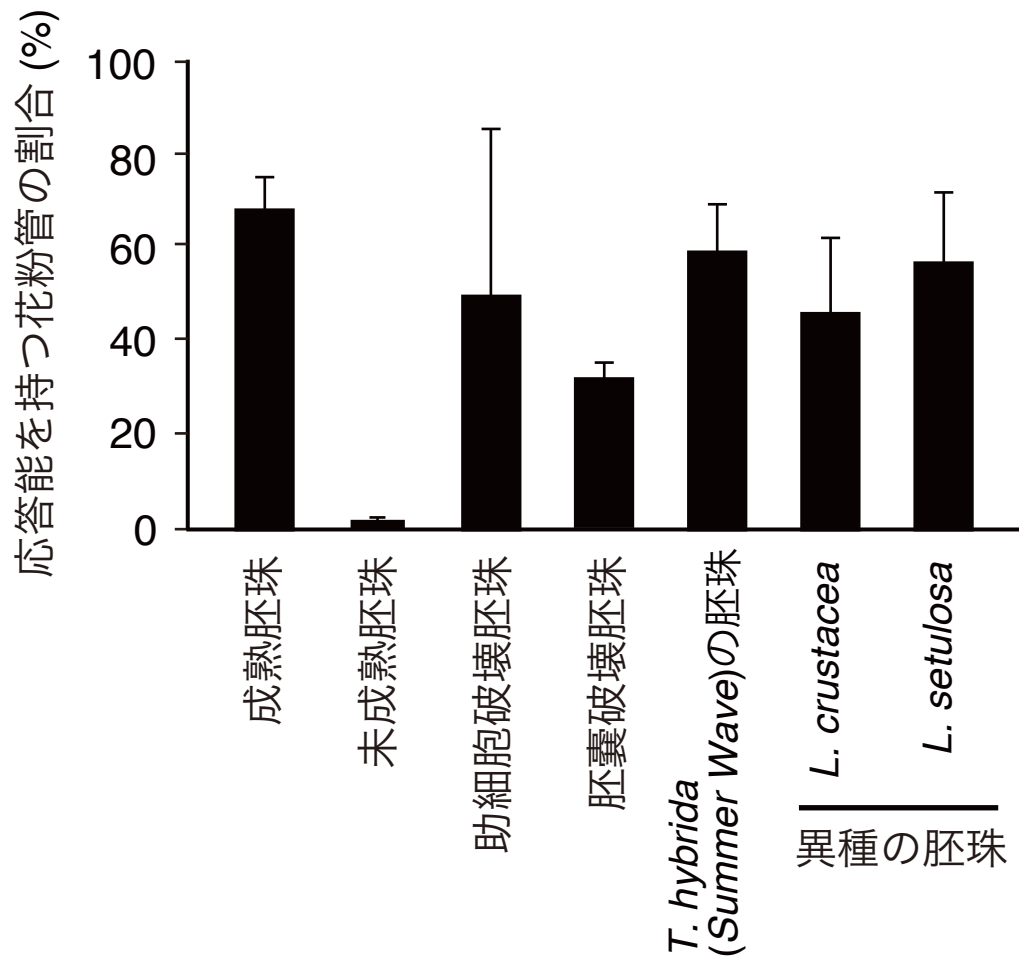


**図 4. 胚珠の位置と花粉管誘引の相関関係**

semi-*in vitro* 受精実験における，花粉管の先端と胚珠との相対的な位置関係とそのときの誘引の成否を示す．花粉管の先端は点線，花粉管を誘引した胚珠の先端の位置を赤円で，誘引しなかった胚珠の先端の位置を青円で示す．

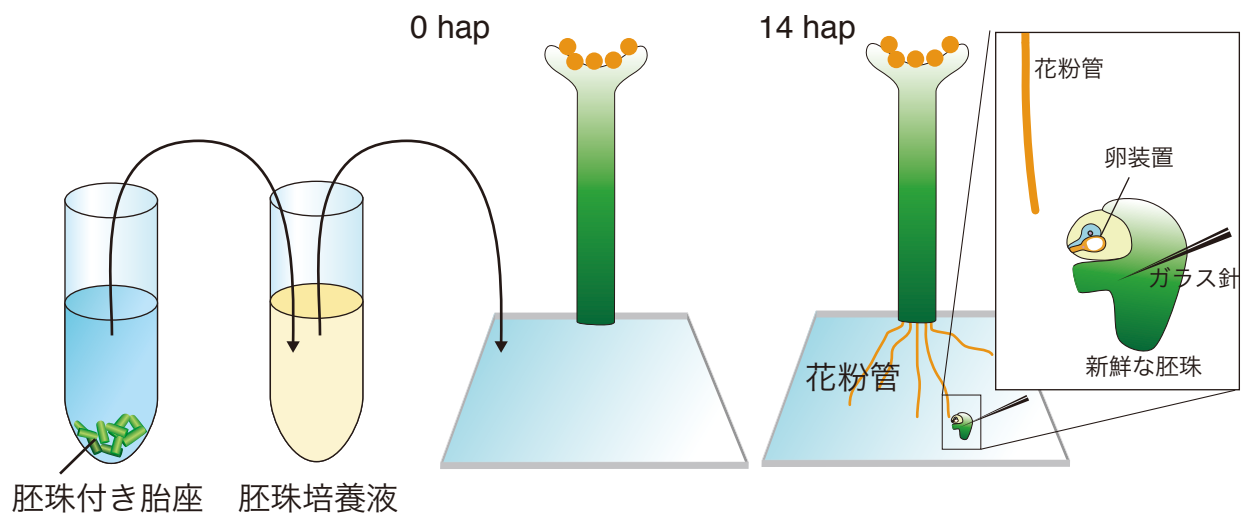


**図 5. 花粉管が誘引物質応答能を獲得するまでの時間の解析**  
semi-*in vitro* 受精実験で、培養時間のさまざまな花粉管に対して胚珠へと誘引される割合を調べた結果を示す。in *vitro* 花粉管誘引アッセイ系においては授粉後 6 時間は通常、花粉管が花柱の切断面から培地上に現れる時間に相当する。コントロールとして、アッセイを行う培地に胚珠を加えず、授粉後 12 時間のアッセイの結果 (胚珠-) も同時に示す。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。hap, hours after pollination.



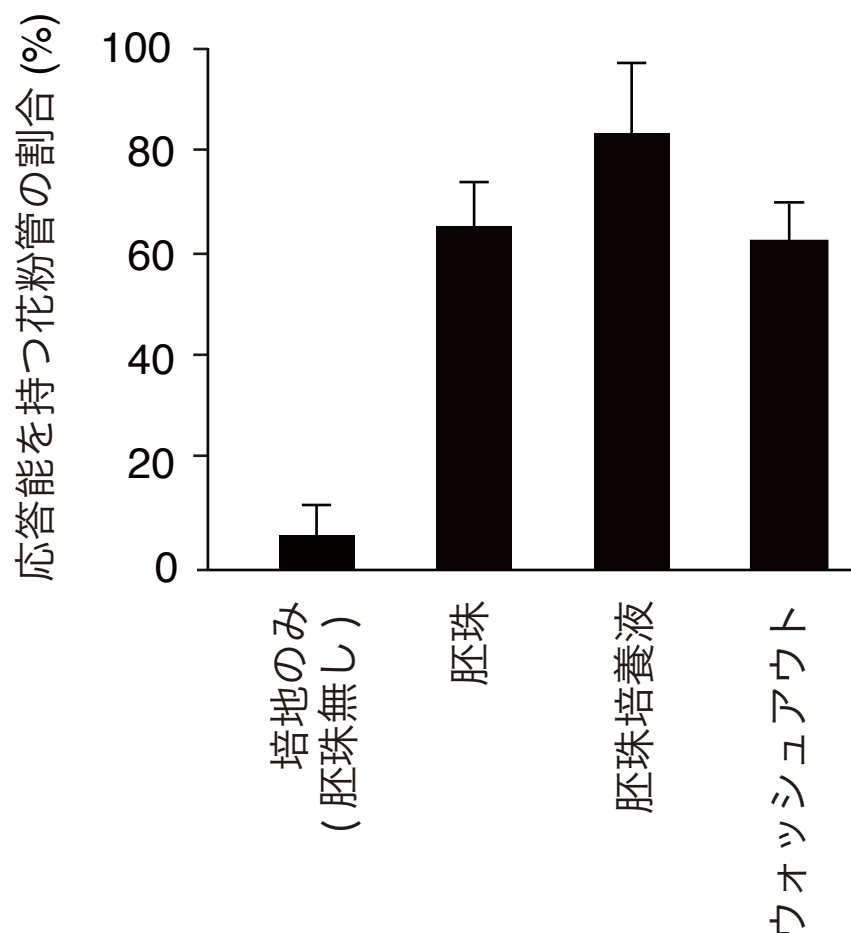
**図 6. 花粉管との共培養に用いる胚珠の種類を検討**

semi-*in vitro* 受精実験で花粉管との共培養に用いる胚珠として、開花後 2 日 -3 日目の胚珠（成熟胚珠）、胚嚢が裸出していない 4 細胞期以前の胚珠（未成熟胚珠）、レーザーにより助細胞を破壊した成熟胚珠（助細胞破壊胚珠）、レーザーにより胚嚢を破壊した成熟胚珠（胚嚢破壊胚珠）、さらに胚嚢形成に欠損を示すトレニアの混合種の成熟胚珠（Summer Wave）や異種の成熟胚珠（*L. crustacea* および *L. setulosa*）を用い、それぞれにおける胚珠への花粉管誘引の割合を調べた結果を示す。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。



**図 7. AMOR アッセイ系の模式図**

トレニアの子房から取り出した胎座を胚珠ごと培養した培地を遠心し、その上清画分（胚珠培養液）を調整する。これを *in vitro* 花粉管誘引アッセイ系の培地に入れる胚珠の代わりに添加する。授粉後 14 時間の時点で、培地中を伸長している花粉管の前に新鮮な胚珠をマニピュレータで配置し、胚嚢の珠孔側の先端へと誘引される花粉管の割合を計測する。hap, hours after pollination.



**図 8. 胚珠培養液における花粉管への誘引応答能を与える活性の検討**  
*in vitro* 花粉管誘引アッセイ実験により，花粉管に対して何も加えない培地のみを与えた場合（胚珠無し），胚珠を共に培養した場合（胚珠），胚珠培養液を加えた場合（胚珠培養液），授粉後 10 時間の時に胚珠培養液を 10 分だけ処理した後に培地で洗い流した場合（ウォッシュアウト），授粉後 14 時間の時点で胚珠への誘引を示す花粉管の割合を計測した．各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い，得られた値の平均と標準偏差を示す．

### 3. 結果

#### AMOR の精製と性質決定

培養液や精製物と花粉管を一晩共培養し、マイクロマニピュレータによって一つの胚珠に対する花粉管の誘引物質応答能を計測するバイオアッセイを AMOR アッセイと呼称する。また、AMOR アッセイの結果、胚珠に誘引された花粉管の割合によって示される誘引応答能を付与する生理活性を AMOR 活性と定義する。

はじめに、胚珠の前培養培地における AMOR 活性の濃度依存性を調べた(図 9)。希釈系列を作製して AMOR アッセイを行ったところ、花粉管は培地 200  $\mu$ l あたり花 2 個に由来する胎座付き胚珠を前培養した場合に、十分な活性を示した。この条件(図 8 の実験にも用いられた通常の実験条件)における胚珠培養液の相対濃度を 1 とした。また、この時に応答能を持つ花粉管の割合は、約 80% だった。前培養培地を希釈すると濃度依存的に AMOR 活性が低下することがわかった。相対濃度 0.1 で、応答能を持つ花粉管の割合は約 30%に低下する。この濃度依存性の結果をもとに、精製を進めた。

AMOR の同定に向けて、AMOR の組織特異性を調べることで、AMOR の精製に用いる出発材料を検討した。トレニア (*Torenia fournieri*) の葉、がく、花柱と胚珠 (子房)組織をそれぞれ前培養した培養液を用いて、AMOR 活性を計測した(図 10)。その結果、胚珠の培養液が最も高い活性を持っていた。ここでは胎座付きの胚珠だけを取り出さずに、子房の上下を切ることで、子房壁を含む子房ごと胚珠を培養した。胎座付きの胚珠だけを培養した場合と同程度の十分な活

性が確認できたため、回収の簡便さという観点からも、以降の AMOR の精製操作の出発材料には子房を前培養した培養液を用いた。

初めに子房培養液を、陰イオン交換カラムを用いて精製をした (図 11). 得られたすべての画分に対して AMOR アッセイを行ったところ、画分 11 から画分 22 にかけて AMOR 活性が検出された。このことは、前培養培地に存在する条件において AMOR の正味の電荷が負に帯電していることを示唆する。なお、陽イオン交換カラムでは、画分に AMOR 活性は検出されていない(水上, 修士論文)。陰イオン交換カラムによって、AMOR 活性の高い単一のピークが得られたため、このピーク画分 (画分 20) を更なる精製に用いた。AMOR を 3 種のレクチンカラムを用いて精製した結果、AMOR は Wheat Germ Agglutinin (WGA) レクチンカラムならびに Concanavalin A (ConA) レクチンカラムに結合した (図 12 A, B)。このことは、AMOR は糖鎖を含んでいることを示唆している。一方、Peanut Agglutinin (PNA) レクチンカラムには十分な結合を示さなかった(図 12 C)。陰イオン交換カラムに続いて WGA レクチンカラムで精製した単一のピーク画分 (溶出糖濃度 0.08 M の画分) を、さらにゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製した (図 13)。その結果、AMOR 活性を単一のピークとして得ることができた。タンパク質分子量マーカーによるピーク画分 (画分 24) に対する見積もりでは、AMOR は分子量約 15, 000 – 25, 000 の分子であることが推測された。この 3 つのカラム精製を経て得られたピーク画分について希釈系列を作製して AMOR 活性を調べると、子房培養液に含まれる AMOR 量を 100 とした場合、比活性にして約 62.5 %の AMOR が一つの画分に回収したことが示された。他に AMOR 活性のピークが検出されなかったことから、AMOR が単一の因子である

可能性が示唆される。

次に、AMOR の物理化学的特性について調べるため、精製 AMOR の熱処理 (100°C, 10 min) と、タンパク質分解酵素 (Proteinase K) 処理をおこなった。その結果、いずれの処理によっても AMOR 活性に有意な低下がみられなかった (図 14)。これらの結果は、AMOR 活性を担う分子がタンパク質ではないことを示唆している。レクチンカラムへの結合と熱安定性を示す AMOR の特性から、非タンパク質性の分子として糖鎖が AMOR の候補として想定された。糖鎖分子は被子植物においても様々な種類が存在する (Talmadge *et al.*, 1973; Bauer *et al.*, 1973; Keegstra *et al.*, 1997)。中でも水溶性の糖で、生理活性分子として花粉管に作用する分子として、植物の細胞壁に多く存在しているアラビノガラクトタンパク質 (AGP) が知られる。例えば、タバコの雌蕊の伝達組織に存在し花粉管伸長を促進する AGP である TTS タンパク質がある (Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995)。そこで、AMOR が AGP を修飾するアラビノガラクト糖鎖 (AG 糖鎖) である可能性について検討した。II 型 AG 糖鎖である AGP の糖鎖のなかでも、主鎖である  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-ガラクトンはヤリブ試薬 ( $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬;  $\beta$ -GlcY) と特異的に結合する。精製 AMOR を  $\beta$ -GlcY、および AGP に結合しない不活性型アナログである  $\alpha$ -galactosyl Yariv 試薬 ( $\alpha$ -GalY) と混合する沈降実験をおこない、その沈殿画分を AMOR アッセイにより解析した (図 15)。その結果、 $\beta$ -GlcY の沈殿画分に AMOR 活性が見られる一方 ( $46.7 \pm 5.8 \%$ ,  $n = 3$ )、 $\alpha$ -GalY の沈殿画分には AMOR 活性がほとんど見られないことがわかった ( $10.0 \pm 10.0 \%$ ,  $n = 3$ )。以上の結果は、AMOR が  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-ガラクトン主鎖を含む AG 糖鎖を持つことを示唆している。

## AG 糖鎖の末端の二糖構造が AMOR 活性を担っている

AMOR に含まれる AG 糖鎖がその活性を担うのか、もし担うのであれば AMOR 活性に必要な糖鎖構造は何か、解析を進めた。そのために、AG 糖鎖に特異的に作用する分解酵素で精製 AMOR 画分を処理した後、AMOR アッセイを行った (図 16)。AGP の糖鎖は II 型 AG 糖鎖であり、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-ガラクトン主鎖に  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトン側鎖が付加した構造からなる。 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトン側鎖は  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-L-アラビノシル残基 (Ara) や  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-L-フコシル残基 (Fuc)、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-グルクロノシル残基 (GlcA)、4 位の酸素がメチル化された  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-グルクロノシル残基 (4-Me-GlcA) などによって、部分的に修飾されている (図 16A)。 $\beta$ -glucuronidase は  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトン側鎖から GlcA および 4-Me-GlcA を切断する加水分解酵素である。精製 AMOR 画分を  $\beta$ -glucuronidase で処理すると、その AMOR 活性は著しく減少した ( $5.0 \pm 5.0\%$ ,  $n = 3$ ) (図 16B)。一方で、endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-galactanase と  $\alpha$ -L-arabinofranosidase を同時に処理して、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトン側鎖と側鎖を修飾する  $\alpha$ -L-アラビノシル残基の加水分解を行った場合の AMOR 活性は、加熱処理して失活させた酵素を用いた対照試料 ( $53.3 \pm 6.9\%$ ,  $n = 3$ ) と比べても顕著な減少はみられなかった ( $66.7 \pm 10.2\%$ ,  $n = 3$ ) (図 16 B)。これらの結果から、AMOR 活性を AG 糖鎖が担うことと、AG 糖鎖における  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトン側鎖の末端に位置する  $\beta$ -グルクロノシル残基が AMOR 活性に必要であることが示唆された。

AMOR 活性に必須の AG 糖鎖の末端構造を決定するため、共同研究者の小竹敬久博士 (埼玉大学) らによって調整された、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトン側鎖の末端糖

鎖 (GlcA もしくは 4-Me-GlcA) を含むオリゴ糖を AMOR アッセイに用いた。上の酵素処理の実験結果 (図 16) からは、末端の 2 糖構造 (GlcA-Gal) が重要であることが示唆される。実験に用いた種々のオリゴ糖は、ダイコン (*Raphanus sativus*) の根から抽出した AGP を各種の糖分解酵素で処理した後、カラムクロマトグラフィーによって精製されたものである。まず、驚くべきことに 4-O-メチル-グルクロノシルガラクトース [4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal] の 2 糖の画分 [メチル基のない GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal も含む] が AMOR 活性を示した (図 17. 2 糖のみを含む画分だけでなく、さらにガラクトースを多く持つ 3 糖の 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal や 4 糖の 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal を含むオリゴ糖画分でも、同濃度 (1 mg/ml) で同程度の AMOR 活性が得られた (図 17)。一方で、2 糖でも末端にグルクロノシル残基 (GlcA) を持たない Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal を含む画分を調べると、AMOR 活性を全く示さなかった (図 17)。これらのことから、AG 糖鎖の末端にある 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal の 2 糖構造が AMOR 活性を担うことが示唆された。

この精製した末端糖の AMOR アッセイから、4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal を含む画分が AMOR 活性を示したものの、この画分にはメチル基修飾を持たない GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal が含まれている。天然の糖の精製ではこれらを分離することが困難であったため、名古屋大学の伊丹健一郎博士との共同研究として化学合成された GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal の AMOR 活性を調べた (図 18)。その結果、メチル基修飾を持たない GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal では著しく AMOR 活性が低いことが明らかとなった ( $3.3 \pm 5.8\%$ ,  $1.35 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ) (図 19)。続いて、4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal

とこれに対するアノマー炭素の立体化学異性体の AMOR 活性を調べた。図 18 で示す通りに合成された 4-Me-GlcA-Gal の  $\alpha$ - と  $\beta$ 異性体 (エピマー) を AMOR アッセイで解析したところ、精製した 4-Me-GlcA-Gal の  $\beta$ 異性体は高い AMOR 活性を持ち ( $76.7 \pm 15.3 \%$ ,  $0.135 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ), 一方で  $\alpha$  異性体の AMOR 活性は有意に低い ( $33.3 \pm 5.8 \%$ ,  $1.35 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ) ことが明らかとなった (図 19). 合成した 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal を  $\beta$ -glucuronidase で処理すると AMOR 活性が失われることが確認された (図 20). さらに、この 2 糖を構成している単糖であるメチル基修飾された GlcA も Gal も、またメチル基修飾を持たない GlcA も AMOR 活性を示さなかった (図 21). 以上の解析から 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal が AMOR 活性の中心を担う部分であり、その  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) 結合と GlcA のメチル基修飾が活性において重要であることが示された。

**AMOR の活性には GlcA のメチル基修飾とその 1 位の炭素が  $\beta$ 結合していることが重要である**

AMOR の活性の中心をこの 2 糖構造のどの部分が担っているかをより詳細に解析するために、4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal 誘導体を合成し、その活性を計測することで、構造活性相関 (Structure-Activity Relationship) を解析した。最初に、2 糖間の  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)結合が重要かどうかを 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal を合成することで解析した (図 22). 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal はある程度の AMOR 活性を示した ( $45.0 \pm 10.0 \%$ ,  $1.35 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ). 次に、Me-GlcA の結合相手の重要性を解析するために、Me-GlcA と  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)結合したグルコース (Glc), ピラン(Pyran), Me-GlcA と  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)結合したキシロース (Xyl) を合成し、いくつかの濃度で

AMOR 活性を計測した (図 23). その結果, それぞれ  $56.7 \pm 15.3 \%$  ( $1.35 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ),  $83.3 \pm 11.5 \%$  ( $1.35 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ),  $60.0 \pm 20.0 \%$  ( $13.5 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ )と, 比較的高い AMOR 活性を示した. 特に 6 員環のエーテル化合物で, 糖ではない Pyran を結合させた場合では, コントロールである 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal と同様の活性を示した. したがって, 2 糖の AMOR 活性において, 4-Me-GlcA の 1 位の炭素と結合する相手は重要ではなく, Gal 以外でも十分な活性が見られる場合があることがわかった.

4-Me-GlcA と結合する糖の選択性は低いものにも関わらず, 4-Me-GlcA のみでは機能しない AMOR 活性の特徴を説明する仮説として, 溶液中における 4-Me-GlcA の構造的性質が考えられた. すなわち, 他の糖と重合して閉環構造で固定された 4-Me-GlcA が AMOR 活性において重要であり, 溶液中ではその多くが開環状態となる 4-Me-GlcA は活性を示さないという可能性があった. そこで, 分子量への影響が最小となるように 4-Me-GlcA の閉環構造を固定化した 4-Me-GlcA-Me を用いて AMOR アッセイを行った. 4-Me-GlcA-Me の AMOR 活性は 4-Me-GlcA と同様, ほとんど活性を示さなかったことから ( $23.3 \pm 5.8 \%$ ,  $1.35 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ) (図 24), AMOR 活性に必要とされるのは, 4-Me-GlcA の閉環構造自体ではなく,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)結合によって他の糖と重合した構造であることが示された. 4-Me-GlcA と結合する糖の選択性は低いことが示されたことから, 4-Me-GlcA の選択性を解析した. メチル基を持たない GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal の活性は低く (図 19), メチル基修飾の重要性は示されていたことから, 4-Me-GlcA ではなく, 4-Me-Glc に Gal を  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)結合させた 4-Me-Glc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal と, 4 位と 6 位にメチル基修飾をつけた 4,6-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal を合成し, AMOR 活性を

計測した (図 25). その結果, それぞれ  $13.3 \pm 11.5 \%$  ( $1.35 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ),  $0.0 \pm 0.0 \%$  ( $1.35 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ )と, AMOR 活性をほとんど示さなかった. このことから, AMOR 活性における 4-Me-GlcA の選択性は二糖構造の相手となる糖と比較して非常に高いことが明らかとなった.

## 4. 考察

本研究では、助細胞による花粉管の誘引に先立ち、花粉管が胚珠に由来する因子 AMOR によって誘引シグナルに対する応答能を獲得する現象について解析した。花粉管の応答能変化を定量的に解析する系を確立し、生化学および合成化学の手法と組み合わせることにより、この AMOR の実体が、植物の細胞壁に多く存在するアラビノガラクトタン糖鎖 (AG 糖鎖) であることを明らかにした。特にその末端の 2 糖構造 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal が活性を担うことを突き止め、化学合成した 2 糖が、AMOR 活性を持つことを示した。

**植物生殖において花粉管の応答能獲得を制御する分子 AMOR の実体は AG 糖鎖であった**

有性生殖過程において、メス側の因子によりオスの細胞が活性化するという現象は、動物において「受精能獲得現象」として Chang (1951) と Austin (1951) によって初めて報告された。現在では、マウスにおいてメス側のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) による精子細胞膜上の GPI アンカータンパク質 TEX101 の GPI アンカーの切断が、子宮から輸卵管への精子の移行に必要であることが示されており、受精能獲得現象の分子メカニズムの理解が進んでいる (Kondoh *et al.*, 2005; Fujihara *et al.*, 2013)。一方、植物においても、トレニアの *semi-in vitro* 受精系の確立 (Higashiyama *et al.*, 1998) に端を発し、精細胞を運搬する花粉管が胚珠を目指すよう活性化させる、いわば花粉管の誘引物質応答能の獲得というべき現象が報告されてきた。シロイヌナズナの *semi in vitro* 花粉管誘引実験におい

でも、培地上で発芽させた花粉管よりも、花柱を通過した花粉管の受精率の方が胚珠に対して高い誘引率を示す (Palanivelu and Preuss, 2006). モクマオウ科の *Casuarina equisetifolia* などで見られるように、花粉管が伸長中に柱頭内で停止し、胚珠の成熟に伴って伸長を再開する現象も、広い意味でメス側の因子によるオスの細胞の活性化と捉えられるかも知れない (Sogo *et al.*, 2004). ところが、動物の受精能獲得の研究に比べて、花粉管の応答能獲得の研究は生理学的な解析に留まっており、その分子メカニズムについては全く明らかになっていなかった. 本研究では、雌性因子の実体を AG 糖鎖として初めて同定し、さらにその活性を担うのが末端の特定の 2 糖鎖構造であることを明らかにした. このことは、植物における花粉管ガイダンスの研究をさらに深める知見であるとともに、植物とは異なるシステムではあるものの細胞表面に様々な糖鎖をもつ動物の受精においても、示唆的な発見である. 動物の生殖において重要な役割を担うことが知られるシアル酸と同様に、植物の生殖でも酸性多糖であるグルクロン酸修飾された AG 糖鎖が機能していることも興味深い.

本研究で明らかになった AMOR 活性を担う分子である AG 糖鎖は、糖鎖が構造の大部分を占めるプロテオグリカンである AGP の糖鎖である. これまで、AGP は植物の細胞壁に多く存在し、様々な細胞内シグナリング経路に関与していることが明らかになっている. 例えば、組織の発達に関与している AGP としては、ヒャクニチソウで道管の分化の促進をしている xylogen と、オーキシシン / サイトカイニンシグナル伝達経路と協調して機能するトマトの AGP1 が知られている (Motose *et al.*, 2001; Motose *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2004). また、生殖に関与している AGP として、タバコの花柱で働き花粉管伸長を促進す

る TTS (Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995), タバコの花柱で自家不和合に関係している 120kD (Hancock *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008), シロイヌナズナで花粉粒の形成と花粉管の伸長に機能している AGP6 と AGP11 (Coimbra *et al.*, 2009), シロイヌナズナで受精後の残存助細胞の不活性化と多花粉管拒否に関わる AGP4 (Pereira *et al.*, 2016) といったタンパク質が知られている。

このように多くの AGP が同定されているものの、AG 糖鎖が生理活性に重要であるのか、長い間明らかではなかった。近年、シロイヌナズナにおいて AG 糖鎖の生合成を担う酵素の同定が進み、AG 糖鎖が植物の発生や生殖などにおいて重要な役割を担うことが示された (Ogawa-Ohnishi and Matsubayashi, 2015)。しかしながら、AGP に特有の多種多様な糖鎖構造が機能解析を困難にしており、活性において必須の糖鎖構造はこれまで不明であった。本研究では、各種の糖鎖分解酵素を用いたアプローチだけではなく、合成糖を用いたケミカルバイオロジーの手法を導入することで AG 糖鎖における機能部位を初めて示すことができた。同様の手法は、生理機能が明らかになっている既知の AGP の糖鎖の機能解析においても応用することが可能であろう。

糖鎖は核酸やタンパク質と同様に低分子化合物が重合したポリマーである。これらを情報伝達の役割をもつ分子として考えたとき、AGP を修飾する糖鎖は典型的な構造が存在するものの、特定の一次配列を持たない点において、他の二つとは大きく異なる。そのため、糖鎖を用いた情報伝達は複雑な一次配列には依存せず、その特異性も低いものと考えられる。実際、AMOR 活性を示す 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal は AG 側鎖において普遍的にみられる単純な末端構造である。このような AMOR の特徴は、二次構造もしくは三次構造が機能に重要と

なる核酸やタンパク質よりも、オーキシシンやエチレンなど低分子の植物ホルモンに通じるものがある。これらのホルモンで調節される作用、例えば発生や分化は、シグナルを受容する組織や細胞によって様々である。植物の細胞壁に普遍的に存在する AGP の糖鎖のシグナルもまた、低分子の植物ホルモンのように、組織ごとに固有の生理作用を示すのかもしれない。仮にそうであれば、本研究に例示される AG 側鎖の合成糖を野生型あるいは AG 糖鎖の減少した変異体の植物に処理する実験は、単に既知の AGP の機能構造を決定するだけでなく、AGP の糖鎖によるシグナルの多様性の謎を解明する基盤的情報をもたらすだろう。

#### **AG 糖鎖のメチルグルクロノシル修飾が AMOR 活性の制御に重要である**

AMOR 活性を担うのは、AG 糖鎖の中でも、特に側鎖末端に存在する 2 糖構造 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal であった。メチルグルクロノシル修飾は AG 糖鎖に広く見られる構造である。このことから、AMOR 活性の制御を理解するには、特定の AGP に注目した解析よりも、AG 糖鎖におけるメチルグルクロノシル修飾の制御を理解することが重要であろう。

シロイヌナズナにおいて、近年、AGP の糖鎖修飾酵素の研究が進展している。ペプチド骨格への AG 糖鎖付加を担う hydroxyproline O-galactosyl 転移酵素の HPGT1, HPGT2, HPGT3 の同定に加え (Ogawa-Ohnishi and Matsubayashi, 2015), AG 糖鎖末端の GlcA を付加する  $\beta$ -glucuronosyl 転移酵素 (AtGlcAT14A-C; Knoch *et al.*, 2013; Knoch *et al.*, 2014) が同定された。これらの酵素の機能欠損変異体は、AGP に固有の糖鎖構造を欠損する変異体となり、機能的重複が指摘される AGP の活性をおしなべて欠損させると期待される。実際、HPGT1, HPGT2, HPGT3 の

変異体は、発生や生殖において多様な表現型を示す。β-glucuronosyl 転移酵素の変異体に興味を持たれるが、多重遺伝子であるため解析が進んでおらず、単独の遺伝子の欠損で胚軸の伸長が報告されているのみである。今後、多重変異体の解析や、トレニアの相同遺伝子の変異体に興味を持たれる。

また、AG 糖鎖が AMOR 活性をもつには、GlcA の付加に加えて、4-*O*-メチルが極めて重要であることが、本研究から明らかとなった。この修飾を担う酵素はまだ同定されていない。シロイヌナズナにおいて、グルクロノシルキシランに対して 4-*O*-メチル付加を担う酵素 glucuronoxylan methyltransferase (GXMT) が同定されており、この酵素がグルクロノシルガラクトースに対しても 4-*O*-メチル付加を行う可能性が議論されている (Urbanowicz et al., 2012)。

今後、こうしたメチルグルクロノシル修飾に関わる酵素がシロイヌナズナおよびトレニアで網羅的に同定され、その時空間的な制御が明らかになることで、AG 糖鎖の生理活性制御という、植物の糖鎖生物学における新しい知見が得られると期待される。

## 花粉管ガイダンスにおける AMOR の役割

AMOR は花粉管ガイダンスにおいて、どのような役割を果たしているだろうか。トレニアの雌蕊において糖の分析が進められ、次のことが明らかとなっている (Mizukami *et al.*, in revision). (1) ヤリブ試薬を用いた染色により、胚珠の  $2n$  組織、胚嚢の繊維形装置（助細胞の特殊な細胞壁）、胎座組織の表面の細胞層に多くの AG 糖鎖が存在する、(2) 水に溶出する糖の質量分析から、胚珠組織（胎座を含む）は、雌蕊の中でグルクロン酸およびメチルグルクロン酸を含む糖を多

く存在する，(3) 胚珠に由来する可溶性糖の質量分析において，4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal の存在が確認された．本研究において，胚珠の培養液は調べた中で最も高い AMOR 活性を示したことを合わせて考えると，子房内にあ  
る胚珠付近では，4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal をもつ AG 糖鎖である AMOR が多く  
存在していることが示唆される．

また，化学合成した二糖 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal (合成 AMOR) と，精製した  
LURE を用いたアッセイにより，他の胚珠因子が一切ない状態で，花粉管の誘引  
が起こることが示された(Mizukami *et al.*, in press). このことは，AMOR が花粉管  
の LURE 応答能を制御していることを示している．また，この際，花粉管は花  
柱を通過する必要がある，花柱を高濃度の合成 AMOR では代替できていない  
(Mizukami *et al.*, in press). 花柱には別の因子が存在する可能性が示唆される．

以上のことから，トレニアの花粉管ガイダンスにおける AMOR の役割は，次  
のように考えられる．まず，受粉ののちに花柱内を伸長する花粉管は，花柱か  
ら第一段階の応答能制御をうける．花柱の因子は明らかではないが，花粉管に  
は遺伝子発現プロファイルの変化や，先端部での LURE への親和性の変化が起  
こるようになる (Okuda *et al.*, 2013). 花柱内での第一段階の活性化を受けた花粉  
管が子房内に進入し，十分量の AMOR を受けて，LURE ペプチドに対する応答  
能を獲得する．短距離誘引ペプチドである LURE の分布範囲に花粉管が進むと，  
花粉管は誘引をうけ，標的である胚珠の助細胞に到達し，受精が達成される．  
なぜこのような花粉管の応答能制御が必要なのかは不明であるが，動物におけ  
る精子の受精能獲得のように，受精に至る多段階のプロセスにおいて適切なタ  
イミングでオスの細胞が活性化されることは，効率のよい生殖に重要なのかも

知れない。AMOR は花粉管が活性化する位置・タイミングを制御していると想定される。

AMOR がいかにして花粉管に LURE 応答能を与えているのか、その分子メカニズムの解明に興味を持たれる。AMOR の作用点が LURE のシグナル経路のどこなのか、AMOR にふれることで花粉管にはどのような変化が起こるのか、解析が待たれる。例えば、AMOR に対する受容体が存在するのか、細胞の膜表面に存在するレクチン等の受容体などの探索が挙げられる。そのために、合成 AMOR に対し、さらに化学合成によりリンカーを導入し、蛍光標識した AMOR を作製するアプローチも可能と考えられる。本研究による構造活性相関の結果が役立つと期待される。また、合成 AMOR を処理した花粉管としていない花粉管で、遺伝子発現やリン酸化の変化を調べることも重要であろう。

天然の AMOR の解析を進めることも重要である。タンパク質分子量マーカーを用いることで、AMOR は分子量約 15,000 – 25,000 と見積もられ、複雑な多糖構造が予想される。AMOR にペプチドが含まれるか否かも明らかではない。多くの AGP は GPI アンカーにより細胞膜に係留され、ペプチドがついた状態で細胞外に遊離される。前述の分子量から、比較的小さいペプチドをもつ AG ペプチドは一つの候補であろう。トレニアのゲノム情報や、胚珠の遺伝子発現プロファイルはすでに得られており、これらの情報をもとに胚珠で発現する AGP を解析するアプローチも考えられる。これらの解析から、いかにして雌蕊内で AMOR が作られ、花粉管に作用するか、明らかになることが期待される。

また、本研究で明らかになった、花粉管の誘引物質への応答の獲得における AG 糖鎖の役割は、トレニアだけでなく他の植物においても存在するのだろうか。

シロイヌナズナの場合，*semi in vitro* 花粉管誘引系において花柱を通過した花粉管を胚珠と共培養しなくても，大腸菌で発現と精製を行った花粉管誘引ペプチド（AtLURE1）に対して応答能をもつようになる（Takeuchi and Higashiyama, in revision). 少なくともシロイヌナズナでは，花粉管の誘引応答を活性化させる組織は花柱（伝達組織）だけで十分なようである．様々な糖鎖構造に対する組織免疫染色の実験から，シロイヌナズナの AGP は胚珠や花柱の伝達組織に多く分布することが知られる（Coimbra et al., 2007). このため，わずか 1 mm に満たない花柱を通過する間に花粉管が誘引物質に対する応答能を獲得している可能性がある．シロイヌナズナにおいて花粉管の誘引応答を活性化する分子がトレニアと同じなのか，活性化が起こる場は花柱なのかどうか，今後の解析が期待される．これにより，応答能獲得という植物において一般的と思われる現象が，共通の分子で制御されるか否かが明らかになると期待される．

## 5. 結語

花粉管に対して誘引応答能を与える分子「AMOR」の探索として始まった本研究は、最終的に AG 側鎖にみられる末端の二糖構造にたどり着いた。先行研究では生化学的および逆遺伝学的手法によって AGP の重要な生理作用が示されていたが、活性を持つと考えられていた糖鎖部位の解析法が確立されておらず、その作用メカニズムは未だわかっていなかった。本研究で行った合成糖を用いる解析は、糖鎖の機能構造を解明する実験手法として、AGP 研究の歴史においてブレイクスルーの 1 つとなるだろう。これを契機に、植物分野においても未解明の部分が多い、糖鎖を介した細胞間情報伝達の仕組みも理解が進むと期待される。その先駆けとして、本研究の AMOR も重要な位置を占めることになるはずである。トレニアでは AMOR 以外にも花粉管ガイダンスを制御する因子として、胚珠近傍における誘引ペプチドである LURE1 や LURE2, そして、さらに胚珠から遠距離に向けて作用すると考えられる CALL1 (葛谷, 修士論文) が同定されている。今後、これらの誘引物質の解析に平行して、AMOR による花粉管の遺伝子発現の変化やリン酸化の解析などといったシグナル伝達経路の解明が進むことで、被子植物における花粉管ガイダンスの仕組みの全体像が見えてくると期待している。

## 6. 材料と方法

### 植物材料と生育条件

*Torenia fournieri* の栽培品種である‘blue and white’, *Lindernia crustacean*, *Lindernia setulosa* と Summer Wave® (サントリーフラワーズ)を用いた.

植物は土壌を用いて 28°C, 16 時間光周期( $150 \mu\text{mol} / (\text{m}^2\text{s}^{-1})$ )の条件下で生育させた.

### 組織滲出液の調整

開花 2-3 日目花 10 個分の胚珠がついた胎座または子房, またはそれと同等の重さの組織 (葉, 萼片, または花柱)を使用した. 胚珠がついた胎座は, 実体顕微鏡下で一つ一つ子房から取り出した. 子房は花柱側と萼片側の上下を切り落とした. 葉, 萼片は 0.5 mm 四方に切り刻んだ. 花柱は, 1 本の花柱を 3 等分に切断した. それぞれを 1 ml の伸長培地 (13% polyethylene glycol 4000 (w/v) と 1% sucrose (w/v) を含む改変 Nitsch 培地) 中に加えた. 子房を含んだ培地は, エバポレータを用いて 20 分脱気した. 培地を 28°C で 20 時間暗条件で培養した. 滲出液を含む培地を回収し, さらに 4 °C, 20,000 g で 30 分間遠心し, 上清を回収した.

### AMOR アッセイ

AMOR 活性の測定は semi-*in vitro* 受精系(Higashiyama *et al.*, 2006)を改変して行った. 最初に, ガラスボトムディッシュ (D210402; 松浪硝子) に作製した改変

Nitsch 平板培地の中央部を 18 x 22 mm<sup>2</sup> の大きさでくり抜いた。この場所に注ぐ 220  $\mu$ l の培地は、5 倍に濃縮した改変 Nitsch 培地と AMOR 活性を測定したいサンプル (植物抽出物や合成糖など) を加えた後、改変 Nitsch 培地の濃度が等倍となるように滅菌水で調整し、1.5%となるように低融点アガロース (agarose type IX-A; Sigma) 加えて作製した。合成糖のアッセイでサンプルが pH 6.0 以下になる場合は加える培地の体積を調整するものとして、滅菌水ではなく、20mM MES / KOH (pH 6.8)を用いた。これらの培地をハイブリオーブン (HB-100, TAITEC) 内に取り付けたマイクロチューブキット (M-1596, TAITEC)を用いて毎分 3 回転させながら、96  $^{\circ}$ C, 15 分加熱してアガロースを溶かした。加熱した培地をガラスボトムデッシュに注いだ後、授粉した花柱を柱頭から 15 mm 長で切断して挿し、4 $^{\circ}$ C で 2 分間静置して培地を固化させた。さらに、ガラスボトムデッシュに蓋をしてパラフィルムで密閉し、28 $^{\circ}$ C, 暗条件で 12 時間から 16 時間培養した。花柱の切断面から出てきた花粉管に対する誘引は以下のように行った。まず、乾燥による組織の損傷を防ぐために、水飽和シリコンオイル (KF-96-100CS; 信越化学) を伸長培地と花柱の上に重層した。シリコンオイル中で花柱から離れた位置で子房を解剖し、胚珠を取り出した。倒立顕微鏡下 (OLYMPUS IX-71) で新たに解剖した胚珠の一つに glass needle puller (PC-10; Narishige) で作製したガラス針を刺し、マニピュレータ (MMN-1, MMO-202N, MMO-220A; Narishige) によって花粉管の前に胚珠を配置した。1 回のアッセイにつき花粉管 10 本に対して胚嚢へと誘引される割合を計測した。花粉管を胚珠培養液で一時的な処理した影響を見る実験は次の通りに行った。授粉した花柱を 15 mm 長で切り取り、伸長培地中に花柱の切断面を加えて 28 $^{\circ}$ C で 10 時間培養した。花柱の切断面か

ら伸長した花粉管を花柱とともに胚珠培養液に移して、10 分間静置した。その後、花粉管を新鮮な伸長培地に移してさらに 2 時間培養した、*in vitro* 花粉管誘引アッセイを行った。

### 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

上述のように調整した子房培養液を 4 °C, 20,000 g で 20 分遠心し、上清を回収した。回収した上清を 0.22  $\mu$ m の Millipore フィルター (Millex<sup>R</sup>-GP)を用いてフィルター滅菌した。Buffer A (20mM MES / KOH, pH 6.8) で平衡化した HiTrap Q HP カラム (1.6 x 2.5 cm, GE) に、滅菌した培養液を加えた。溶出は 0-400 mM NaCl の直線濃度勾配で溶出し、1 画分あたり 1 ml 回収した。回収した全 39 画分において花 2 個分に相当する量を換算し、AMOR アッセイに用いた。

### レクチンカラムクロマトグラフィー

Wheat germ agglutinin (WGA), concanavalin A (ConA) , peanut agglutinin (PNA) レクチン-アガロースカラム (コスモバイオ)を用いた。各カラムを buffer A (20 mM MES/KOH, pH 6.8)で平衡化し、上記の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで得られた画分のうち、最も高い AMOR 活性を示した画分をカラムに添加した。Buffer A を 3 ml 流し、非吸着画分を回収した。0.02-0.2 mM の溶出糖 (N-acetyl-D-glucosamine (WGA), D-glucose (ConA), D-galactose (PNA)) を含んだ buffer A を 0.02 mM 毎に 1 画分あたり 3 ml で段階的溶出した。最後に 0.5 M NaCl / 20 mM MES を 3 ml 添加し、非特異的結合画分を溶出して、0.02 % NaN<sub>3</sub>/PBS でカラム内を満たし、カラムを保存した。回収した全画分において花 2 個分に

相当する量を換算して，AMOR アッセイに用いた．

### ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーと WGA レクチンカラムクロマトグラフィーによって得られた高 AMOR 活性画分 2.5 ml を凍結乾燥機 (VD250R, TAITEC) で凍結乾燥した後に，150  $\mu$ l の 20 mM MES / KOH (pH6.8) に再溶解した．Buffer A (20 mM MES / KOH, pH 6.8)で平衡化した Superdex 75 10/300 GL (GEヘルスケア) にサンプル 100  $\mu$ l を添加した．Buffer A を流速 0.5 ml/min で 滴下し，各画分 0.5 ml ずつ溶出した．回収した全画分において花 2 個分に相当する量を換算して，AMOR アッセイに用いた．

### AMOR 精製画分の熱処理

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーと WGA レクチンカラムクロマトグラフィーによって得られた高 AMOR 活性画分を，ヒートブロックで 100°C で 10 分間加熱した．花 2 個分に相当する量を換算して，AMOR アッセイに用いた．

### AMOR 精製画分のタンパク質分解酵素処理

陰イオンカラムクロマトグラフィーと WGA レクチンカラムクロマトグラフィーによって得られた高 AMOR 活性画分に，最終濃度で 600mU / ml Proteinase K (Roche), 20 mM MES / KOH (pH 6.8)になるように加えた．37 °C で 3 時間処理したサンプルに，complete EDTA-free プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche)錠剤 1 つを 2 ml の水に溶かしたものを，反応液量の 25 分の 1 量を加えて反応を停

止した．花 2 個分に相当する量を換算して，AMOR アッセイに用いた．

### Yariv 沈殿

陰イオン交換カラムと WGA レクチンカラム，ゲル濾過カラムによって精製した AMOR 画分に対して，半量の  $1 \text{ mg/cm}^3$   $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬 (1,3,5-tris (4- $\beta$ -D-glucopyranosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene,  $\beta$ GlcY) または， $\alpha$ -galactosyl Yariv 試薬 (1,3,5-tri (4- $\alpha$ -D-galactosyl-oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene,  $\alpha$ GalY) (共に Bio Supplies Australia)と最終濃度 170 mM の NaCl を加え，4°C で 8 時間ローテーターを用いて攪拌した．その後，4°C，20,000 g で 30 分遠心して上清画分と沈殿画分に分けた．得られた赤色の沈殿を 25 mM NaCl に再溶解し，再度 4°C，20,000 g で 30 分遠心を行い，上清画分と沈殿画分を得た．1 回目の遠心で得られた上清と，2 回目の遠心で得られた沈殿を AMOR アッセイに用いた．

### AG 分解酵素反応

$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ,  $\beta$ -glucuronidase (EC 3.2.1.31) , endo- $\beta$ -(1,6)-galactanase (EC 3.2.1.164)は以前に報告された方法 (Takata *et al.*, 2010; Konishi *et al.*, 2008; Kotake *et al.*, 2004)により，共同研究者の小竹敬久博士 (埼玉大学)が調製したものを使用した．酵素反応は以下のように行った．まず，陰イオン交換カラムと WGA レクチンカラム，ゲル濾過カラムによって得られた精製 AMOR 画分に，各酵素を最終濃度で 10 munit/ml, 0.5 M 酢酸ナトリウム (pH 4.5)を最終濃度で 50 mM になるように加えた．これらを 37°C で 1 時間静置して

反応させた後、100°C で 2 分処理することで反応を停止させた。また、ネガティブコントロールのための酵素失活処理として 100 °C で 10 分間の加熱処理を行った。

### 合成糖の調整

本研究で用いた合成糖はすべて焦佼博士と山口潤一郎博士（共に名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所）に合成していただいた。合成した糖を 1mg/ml になるように滅菌水を加え、よく混合した。各糖は最終濃度が 0.135  $\mu\text{M}$ , 1.35  $\mu\text{M}$ , 13.5  $\mu\text{M}$  のいずれかになるように調整し、アッセイに用いた。糖を滅菌水に溶解させると pH が 6 以下になる場合は、滅菌水の代わりに 20 mM MES / KOH (pH 6.8)を用いて希釈をした。



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導と恵まれた研究環境とを与えてくださり、名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻/ ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト/名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 東山哲也教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行と本論文、投稿論文の作成にあたり熱心なご指導ご鞭撻を賜りました名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 / 名古屋大学高等研究員 丸山大輔 YLC 特任助教に心より感謝申し上げます。

AMOR の先行研究者であり、AMOR の研究を進めるにあたって多くのアドバイスを賜りました、チューリッヒ大学 清水 (稲継) 理恵博士に厚く御礼申し上げます。

生化学的な実験全般について熱心にご教授賜りました名古屋大学大学院生命農学科生命技術科学専攻 森仁志教授に感謝申し上げます。

非常に難しい糖の合成に成功し、種々の糖を合成して下さった名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻/名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の焦佼博士、山口潤一郎准教授に感謝申し上げます。

AG 特異的な酵素や Radish 由来の AGPs を提供していただいただけでなく、本研究についてさまざまな的確なアドバイスを頂いた埼玉大学理工学研究科生命科学部門 小竹敬久准教授、円谷陽一教授に厚く感謝申し上げます。

糖鎖に関する解析方法等ご教授賜りました名古屋大学生物機能開発利用研究センター動物細胞機能研究分野 Estelle Garenaux 博士、佐藤ちひろ准教授、北

島健教授に厚く御礼申し上げます。

糖鎖の質量分析解析をおこなってくださった名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 桑田啓子特任助教に深く感謝いたします。

糖鎖構造について重要な助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻 五十嵐圭日子准教授に厚く御礼申し上げます。

糖鎖の精製方法をご教授賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科環境バイオマス共生学専攻 岩井宏暁准教授、鎌田志保美さんに厚く御礼申し上げます。

本研究のご指導ご鞭撻を賜っただけでなく、アウトリーチ活動を始めのきっかけを下さり、また常に温かく的確な言葉で励ましてくださった名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 佐々木成江准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するに際し、ご指導ご鞭撻を賜りました名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻金岡雅浩助教に感謝申し上げます。

論文の作成の仕方を教えていただいただけでなく、生活全般について多くのご助言を賜りました名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 生殖分子情報学講座 由比良子博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行する上で顕微鏡観察において多くのご協力を賜りました名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 生殖分子情報学講座 浜村有希博士に深く感謝申し上げます。

本研究に関してたくさんのアドバイスとディスカッションをしていただき、常にエンカレッジしていただきました名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 植田美那子特任講師、栗原大輔特任助教、水多陽子博士に感謝申

申し上げます.

本研究を遂行する上で、会計事務や書類申請手続きなど事務仕事を一手に引き受けてくださっていた名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 生殖分子情報学講座秘書 梅本秋子さんに深く感謝申し上げます.

本研究において統計に関するアドバイスを賜りました高知県立牧野植物園 水上元園長に御礼申し上げます.

AMOR に関する研究を続けてくださっている名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 大谷健登さん, Subramanian Sankaranarayanan 博士に感謝申し上げます.

研究生生活を共に過ごし、多くのご助言とご協力を賜りました、名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 生殖分子情報学講座 伊藤喜重博士, 笠原竜四郎博士, 高梨秀樹博士, 角井宏行博士, 筒井大貴さん, 杉本渚さん, 塚本涼子さん, 藤田真由美さん, 河野直さん, 榊原卓さん, 出口恭子さん, 後藤宏旭さん, 西巻萌さん, Kozugunova Elena さん, 永原史織さん, 佐々木妙子さん, 鶴田朋子さん, 葛谷元規さん, 牛王啓太さん, 柴田美紀さん, 青木優里さん, 山田佳歩さん, 谷口純一さん, 山本昂生さん, 木下佳裕さん, 岸本真理子さん, 多賀優さん, 有賀花奈さん, 神谷直さん, 木全裕資さん, 寺島彰さん,

ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト 服部洋子博士, 辻芳樹さん, 深津美紀子さん, 鈴木孝征特任准教授, 加地 範匡准教授, 新田英之特任講師, 柳沢直樹博士, 小笠原希実博士, 田中順子さん, 深田初美さん, 品川智美さん, 西井照美さん, 那須智子さんに感謝申し上げます.

日頃から多くの助言とご協力を賜りました、名古屋大学大学院理学研究科生

命理学専攻 生殖分子情報学講座 技術補佐員 並木祥子さん, 岩田尚子さん,  
南條美晴さんに深く御礼申し上げます.

学部 4 年生から多くの事を助け合い, 話し合い, 切磋琢磨し合い, 成長し合い  
ながら研究生活を共にした名古屋大学大学院理学研究科命理学専攻 生殖分  
子情報学講座 奥田哲弘博士, 椎名恵子さん, 須崎大地博士, 武内秀憲博士に深  
く御礼申し上げます.

長い間常に見守り, 励まし, 支え続けてくれた家族に心より感謝申し上げま  
す.

## 参考文献

水上 茜 (2010) 花粉管の応答能獲得制御の鍵因子 AMOR の解析, 名古屋大学  
修士論文

Austin, C. (1951). Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg. Aust J Biol Sci n.d. 4, 581–596.

Bauer ,WD., Talmadge, KW., Keegstra, K., Albersheim, P. (1973). The Structure of Plant Cell Walls: II. The Hemicellulose of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells. PLANT Physiol . 51, 174–187.

Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, CT., Jedrzejczak, RP., Joachimiak, A., Stacey, G. (2014). The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. eLife 3, e03766.

Chang, MC. (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. Nature. 168, 697–698.

Cheung, AY., Wang, H., Wu, HM. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. Cell. 82, 383–393.

Coimbra, S., Almeida, J., Junqueira, V., Costa, ML., and Pereira, LG. (2007). Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction. J. Exp. Bot. 58, 4027–4035.

Coimbra, S., Costa, M., Jones, B., Mendes, A.M., Pereira, L.G. (2009). Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis* agp6 agp11 null mutants. J Exp Bot. 60, 3133–3142.

Dresselhaus, T., and Franklin-Tong, N. (2013). Male-female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. *Mol. Plant* 6, 1018–1036.

Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C.J, Bacic, A. (2010). Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiol.* 153, 403–419.

Fujihara, Y., Tokuhira, K., Muro, Y., Kondoh, G., Araki, Y., Ikawa, M., Okabe, M. (2013). Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8111–8116.

Gao, M., Kieliszewski, M.J., Lamport, D.T., Showalter, A.M. (1999). Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the LeAGP-1 gene. *Plant J.* 18, 43–55.

Geshi, N., Johansen, J.N., Dilokpimol, A., Rolland, A., Belcram, K., Verger, S., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Kaneko, S., Tryfona, T., Dupree, P., Scheller, H.V., Höfte, H., Mouille, G. (2013). A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 76, 128–137.

Guan, Y., Lu, J., Xu, J., McClure, B., Zhang, S. (2014). Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 165, 528–33.

Hancock, C.N., Kent, L., McClure, B.A. (2005). The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43, 716–23.

Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., Kuroiwa, T. (1998). Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of *torenia fournieri*. *Plant Cell* 10, 2019–32.

Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. (2001). Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293, 1480–1483.

Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. (2003). Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. *Curr Opin Plant Biol.* 6, 36–41.

Higashiyama, T., Inatsugi, R., Sakamoto, S., Sasaki, N., Mori, T., Kuroiwa, H., Nakada, T., Nozaki, H., Kuroiwa, T., Nakano, A. (2006). Species preferentiality of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of *Torenia fournieri*. *Plant Physiol.* 142, 481–491.

Higashiyama, T., Hamamura, Y. (2008). Gametophytic pollen tube guidance. *Sex Plant Reprod.* 21, 17–26.

Higashiyama, T., Takeuchi, H. (2015). The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 393–413.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11086–11091.

Kanaoka, M.M., Kawano, N., Matsubara, Y., Susaki, D., Okuda, S., Sasaki, N., and Higashiyama, T. (2011). Identification and characterization of TcCRP1, a pollen tube attractant from *Torenia concolor*. *Ann. Bot.* 108, 739–747.

Kasahara, R.D, Portereiko, M.F, Sandaklie-Nikolova, L., Rabiger, D.S., Drews, G.N. (2005). MYB98 is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2981–2992.

Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D., Albersheim, P. (1973). The Structure of Plant Cell Walls: III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components. *Plant Physiol.* 51, 188–197.

Kitazawa, K., Tryfona, T., Yoshimi, Y., Hayashi, Y., Kawauchi, S., Antonov, L., Tanaka, H., Takahashi, T., Kaneko, S., Dupree, P., Tsumuraya, Y., Kotake, T. (2013).  $\beta$ -Galactosyl Yariv reagent binds to the  $\beta$ -1,3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiol.* 161, 1117–1126.

Kim, S., Mollet, J-C., Dong, J., Zhang, K., Park, S-Y., Lord, EM. Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 16125–16130.

Knoch, E., Dilokpimol, A., Tryfona, T., Poulsen, C.P., Xiong, G., Harholt, J., Petersen, B.L., Ulvskov, P., Hadi, M.Z., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Pauly, M., Dupree, P., Geshi, N. (2013). A  $\beta$ -glucuronosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* involved in biosynthesis of type II arabinogalactan has a role in cell elongation during seedling growth. *Plant J.* 76, 1016–1029.

Knoch, E., Dilokpimol, A., Geshi, N. (2014). Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. *Front. Plant Sci.* 5, 198.

Kondoh, G., Tojo, H., Nakatani, Y., Komazawa, N., Murata, C., Yamagata, K., Maeda, Y., Kino shita, T., Okabe, M., Taguchi, R., Takeda, J. (2005). Angiotensin-converting

enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat Med.* 11, 160–166.

Konishi, T., Kotake, T., Soraya, D., Matsuoka, K., Koyama, T., Kaneko, S., Igarashi, K., Samejima, M., and Tsumuraya, Y. (2008). Properties of family 79 beta-glucuronidases that hydrolyze beta-glucuronosyl and 4-*O*-methyl-beta-glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein. *Carbohydr. Res.* 343, 1191–1201.

Kotake, T., Kaneko, S., Kubomoto, A., Haque, M.A., Kobayashi, H., Tsumuraya, Y. (2004). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Trichoderma viride* endo- $\beta$ -(1→6)-galactanase gene. *Biochem. J.* 377, 749–755.

Lee, CB., Swatek, K.N., McClure, B. (2008). Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana glauca* pistil arabinogalactan proteins. *J Biol Chem.* 283, 26965–26973.

Leydon, A.R., Chaibang, A., Johnson, M.A. (2014). Interactions between pollen tube and pistil control pollen tube identity and sperm release in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 340–345.

Liang, Y., Tan, Z-M., Zhu, L., Niu, Q-K., Zhou, J-J., Li, M., Chen, L-Q., Zhang, X-Q., Ye, D. (2013). MYB97, MYB101 and MYB120 function as male factors that control pollen tube-synergid interaction in *Arabidopsis thaliana* fertilization. *PLoS Genet.* 9. e1003933.

Liu, J., Zhong, S., Guo, X., Hao, L., Wei, X., Huang, Q., Hou, Y., Shi, J., Wang, C., Gu, H., and Qu, L.J. (2013). Membrane-bound RLCKs LIP1 and LIP2 are essential male factors controlling male-female attraction in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23, 993–998.

Lu, Y., Chanroj, S., Zulkifli, L., Johnson, MA., Uozumi, N., Cheung, A., Sze, H. (2011). Pollen tubes lacking a pair of K<sup>+</sup> transporters fail to target ovules in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 81–93.

Majewska-Sawka, A. (2000). The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.* 122, 3–10.

Márton, M.L., Fastner, A., Uebler, S., and Dresselhaus, T. (2012). Overcoming hybridization barriers by the secretion of the maize pollen tube attractant ZmEA1 from *Arabidopsis* ovules. *Curr. Biol.* 22, 1194–1198.

Mizukami, G.A., Inatsugi, R., Jiao, J., Kotake, T., Kuwata, K., Ootani, K., Okuda, S., Sankaranarayanan, S., Sato, Y., Maruyama, D., Iwai, H., Garenaux, E., Sato, C., Kitajima, K., Tsumuraya, Y., Mori, H., Yamaguchi, J., Itami, K., Sasaki, N., Higashiyama, T. (2016). The AMOR arabinogalactan sugar chain induces pollen-tube competency to respond to ovular guidance. *Curr. Biol.* *In press*.

Motose, H., Sugiyama, M., Fukuda, H. (2004). A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* 429, 873–878.

Motose, H., Sugiyama, M., Fukuda, H. (2001). An arabinogalactan protein(s) is a key component of a fraction that mediates local intercellular communication involved in tracheary element differentiation of zinnia mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* 42, 129–137.

Ogawa-Ohnishi, M., Matsubayashi, Y. (2015). Identification of three potent hydroxyproline *O*-galactosyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant J.* 81, 736–746.

Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Kasahara, R.D., Hamamura, Y., Mizukami, A., Susaki, D., Kawano, N., Sakakibara, T., Namiki, S., Itoh, K., Otsuka, K., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Kuroiwa, T., Nakano, A., Kanaoka, MM., Dresselhaus, T., Sasaki, N., Higashiyama, T. (2009). Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458, 357–361.

Okuda, S., Suzuki, T., Kanaoka, MM., Mori, H., Sasaki, N., Higashiyama, T. (2013). Acquisition of LURE-binding activity at the pollen tube tip of *Torenia fournieri*. *Mol. Plant* 6, 1074–1090.

Oxley, D., Bacic, A. (1999). Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14246–14251.

Palanivelu, R., Preuss, D. (2006). Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in vitro. *BMC Plant Biol.* 6, 7.

Palanivelu, R., Tsukamoto, T. (2012). Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 96–113.

Park, S-Y., Jauh, G-Y., Mollet, J-C., Eckard, K.J., Nothnagel, E.A., Walling, L.L., Lord, E.M. (2000). A Lipid Transfer-like Protein Is Necessary for Lily Pollen Tube Adhesion to an in Vitro Stylar Matrix. *Plant Cell* 12, 151–64.

Pereira, A.M., Nobre, M.S., Pinto, S.C., Lopes, A.L., Costa, M.L., Masiero, S., Coimbra, S. (2016). “Love is strong, and you’re so sweet”(ω): JAGGER is essential for persistent synergid degeneration and polytubey block in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*. doi:10.1016/j.molp.2016.01.002.

- Pereira, A.M., Pereira, L.G., Coimbra, S. (2015). Arabinogalactan proteins: rising attention from plant biologists. *Plant Reprod.* 28, 1–15.
- Qin, Y., Leydon, A.R., Manziello, A., Pandey, R., Mount, D., Denic, S., Vasic, B., Johnson, M.A., Palanivelu, R. (2009). Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet.* 5, e1000621.
- Seifert, G.J., Roberts, K. (2007). The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 137–161.
- Sogo, A., Noguchi, J., Jaffré, T., Tobe, H. (2004). Pollen-tube growth pattern and chalazogamy in *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae). *J Plant Res.* 117, 37–46.
- Sun, W., Kieliszewski, M.J., Showalter, A.M. (2004). Overexpression of tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *Plant J.* 40, 870–81.
- Susaki, D., Takeuchi, H., Tsutsui, H., Kurihara, D., Higashiyama, T. (2015). Live imaging and laser disruption reveal the dynamics and cell-cell communication during *Torenia fournieri* female gametophyte development. *Plant Cell Physiol.* 56, 1031–1041.
- Takata, R., Tokita, K., Mori, S., Shimoda, R., Harada, N., Ichinose, H., Kaneko, S., Igarashi, K., Samejima, M., Tsumuraya, Y., Kotake, T. (2010). Degradation of carbohydrate moieties of arabinogalactan-proteins by glycoside hydrolases from *Neurospora crassa*. *Carbohydr. Res.* 345, 2516–2522.
- Talmadge, K.W., Keegstra, K., Bauer, W.D., Albersheim, P. (1973). The Structure of Plant Cell Walls: I. The Macromolecular Components of the Walls of

Suspension-cultured Sycamore Cells with a Detailed Analysis of the Pectic Polysaccharides. *PLANT Physiol.* *51*, 158–73.

Takeuchi, H., Higashiyama, T. (2012). A species-specific cluster of defensin-like gene s encodes diffusible pollen tube attractants in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* *10*, e1001449.

Tryfona, T., Liang, H.C., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Stephens, E., and Dupree, P. (2012). Structural characterization of *Arabidopsis* leaf arabinogalactan polysaccharides. *Plant Physiol.* *160*, 653–666.

Urbanowicz, B.R., Peña, M.J, Ratnaparkhe, S., Avci, U., Backe, J., Steet, H.F., Foston, M., Li, H., O'Neill, M., Ragauskas, A.J., Darvill, A.G., Wyman, C., Gilbert, H.J, York, W.S. (2012). 4-O-methylation of glucuronic acid in *Arabidopsis* glucuronoxylan is catalyzed by a domain of unknown function family 579 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 14253–14258.

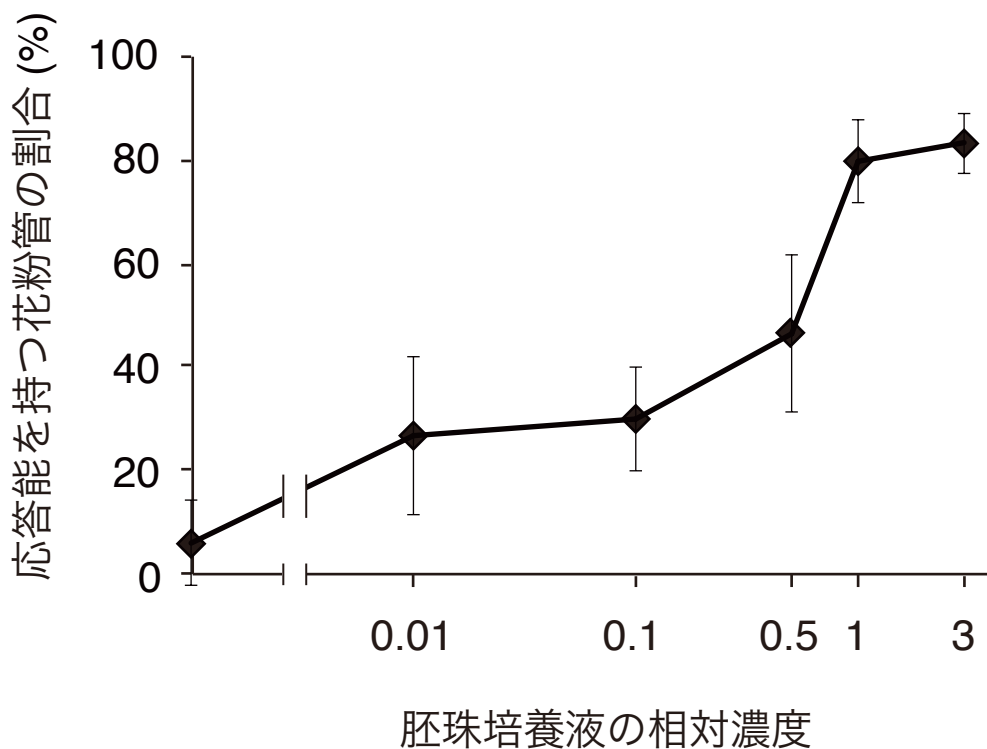
Vaid, N., Macovei, A., Tuteja, N. (2013). Knights in action: lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses. *Mol. Plant* *6*, 1405–1418.

Van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., de Vries, S.C. (2001). N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* *125*, 1880–1890.

Weis, W.I., Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* *65*, 441–473.

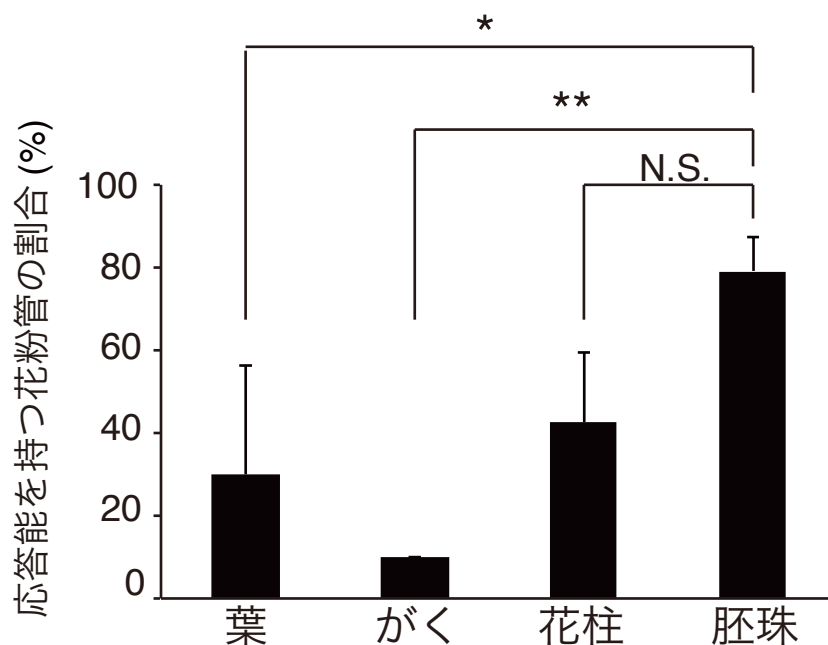
Wu, H.M., Wang, H., Cheung, A.Y. (1995). A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* *82*, 395–403.

Yariv, J., Lis, H., Katchalski, E. (1967). Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem. J.* *105*, 1C–2C.



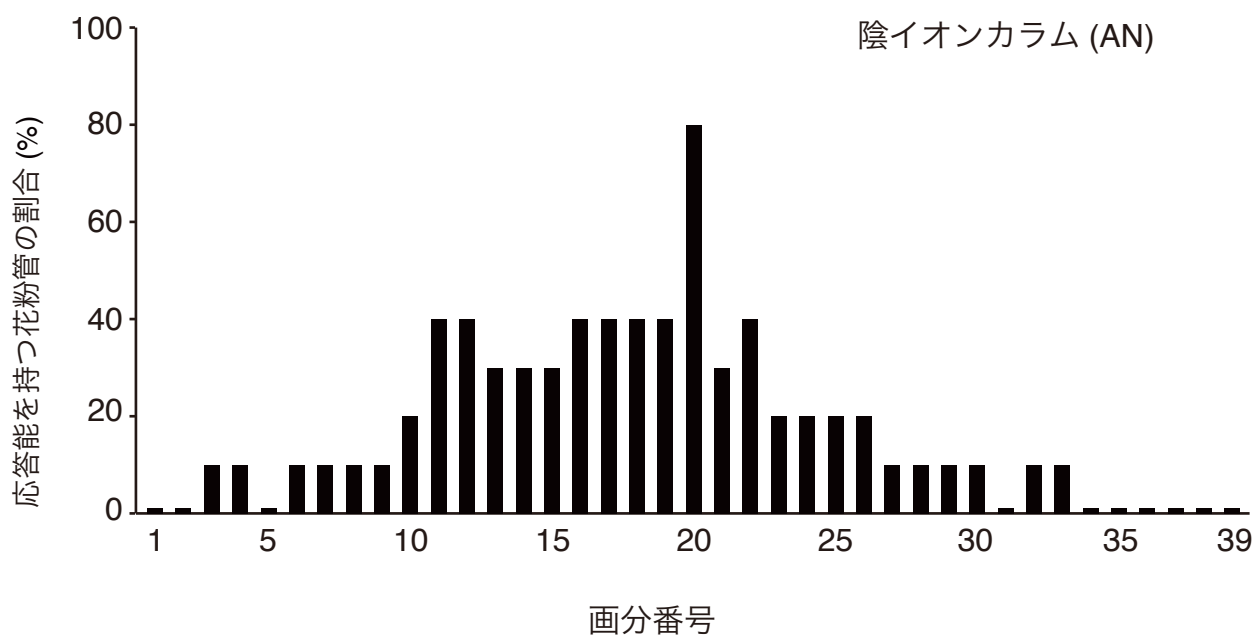
**図 9. AMOR の濃度依存性についての解析**

胚珠培養液の希釈系列を作製し、それぞれの AMOR 活性を調べた。相対濃度“1”は AMOR アッセイにおいて通常用いる胚珠培養液の濃度に相当し、200  $\mu$ l の培地中に花 2 個分の胚珠を培養して得られたものである。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。



**図 10. AMOR の組織特異性の検討**

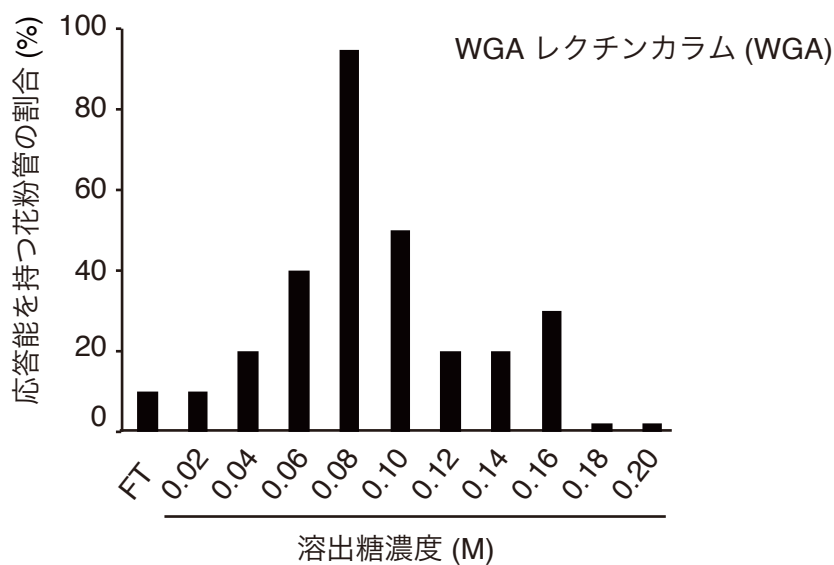
トレニアの葉，がく片，花柱，胚珠を入れて静置することで得られた培養液を用い，授粉後 14 時間経過した花粉管に対して胚珠への誘引率を調べることにより，それぞれの AMOR 活性を計測した．各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い，得られた値の平均と標準偏差を示す．各群間比較には、一元配置分散分析法と Bonferroni/Dunn 法を用いた (N.S.: 有意差無し，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ ).



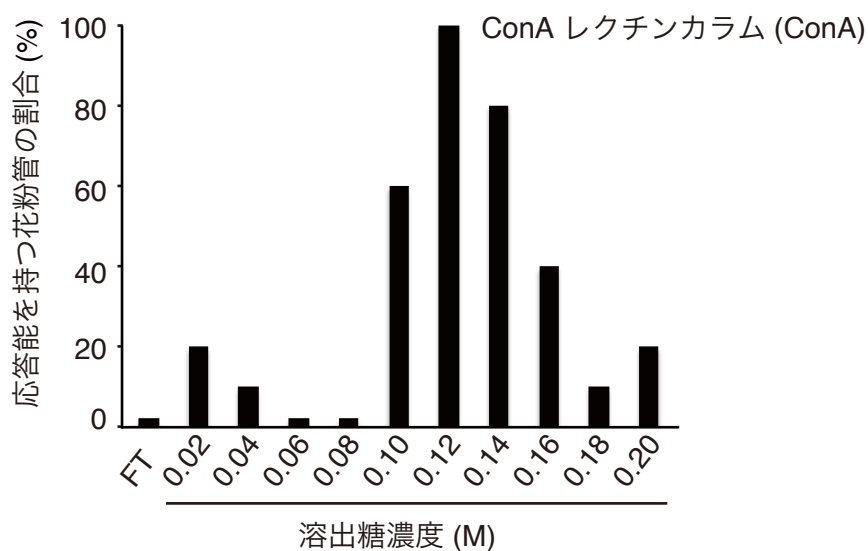
### 図 11. 陰イオン交換カラムを用いた AMOR の精製

胚珠培養液と同程度の AMOR 活性を持つ子房培養液を陰イオンカラムクロマトグラフィーで分画し，各画分に対してアッセイを行ってそれらの AMOR 活性を調べた．

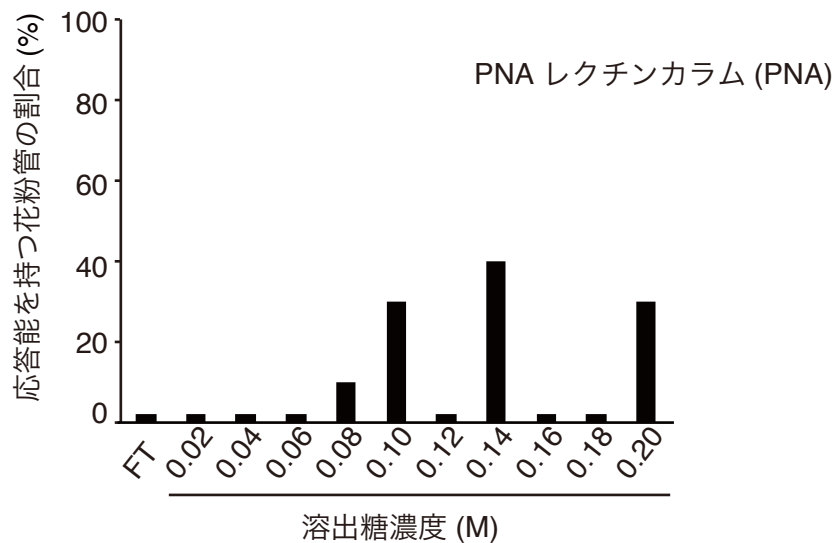
A



B

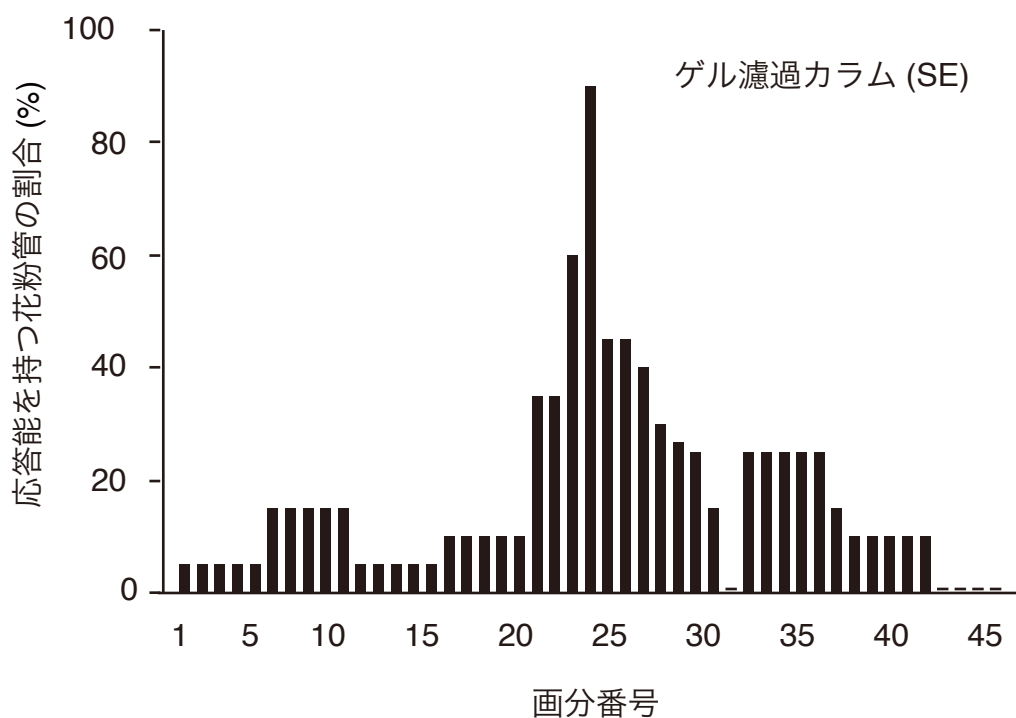


C



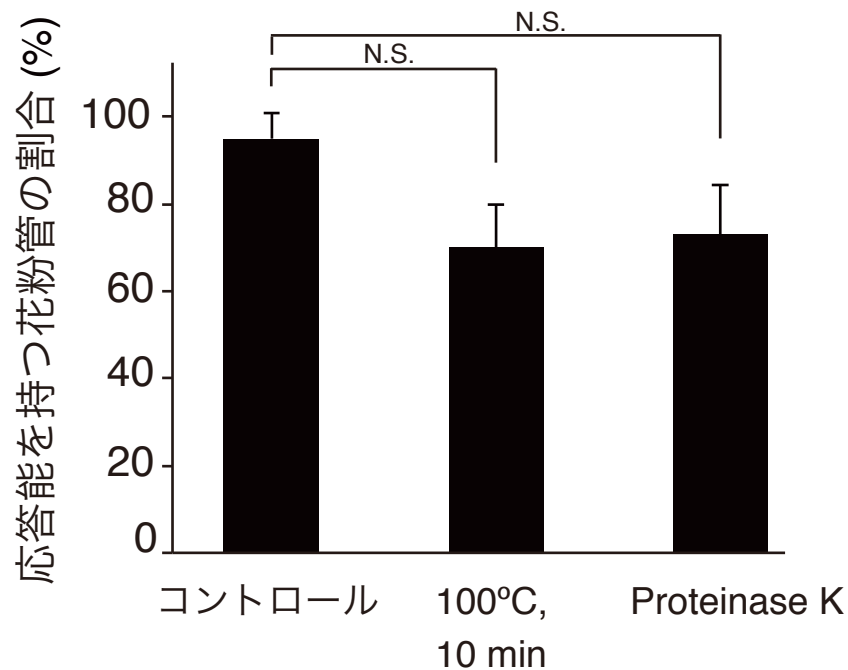
## 図 12. レクチンカラムを用いた AMOR の精製

陰イオン交換カラム精製により最も高い AMOR 活性を示した画分について WGA レクチンカラム (A) , ConA レクチンカラム (B) , PNA レクチンカラム (C) を用いて精製を行った。精製で得られた各画分についてアッセイを行い、それらの AMOR 活性を調べた。

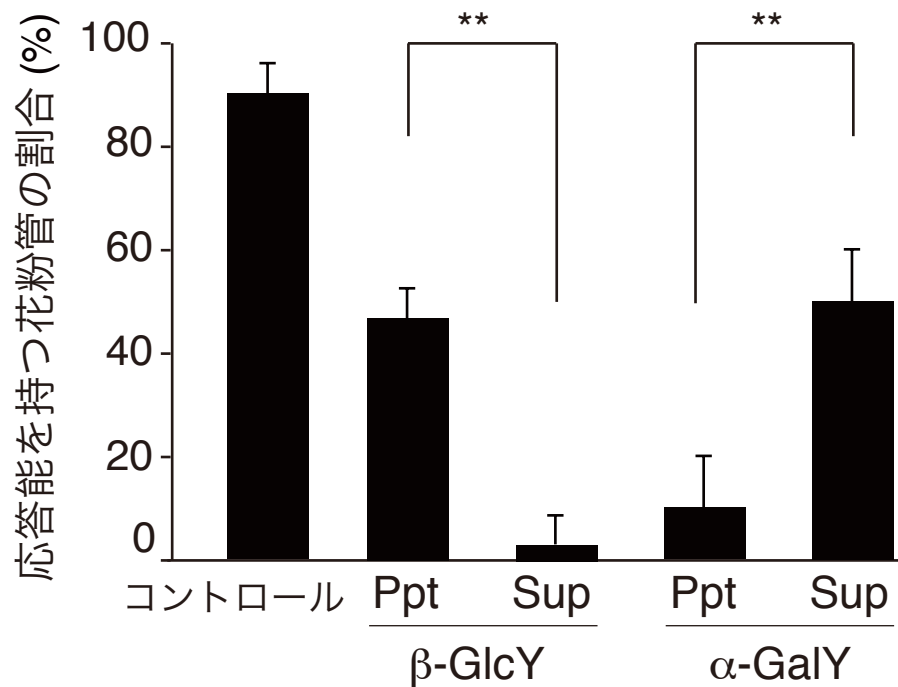


**図 13. ゲル濾過カラムを用いた AMOR の精製**

陰イオン交換カラム精製に続く WGA レクチンカラム精製により最も高い AMOR 活性を示した画分についてゲル濾過カラムを用いた精製を行った。精製で得られた各画分についてアッセイを行い、それらの AMOR 活性を調べた。

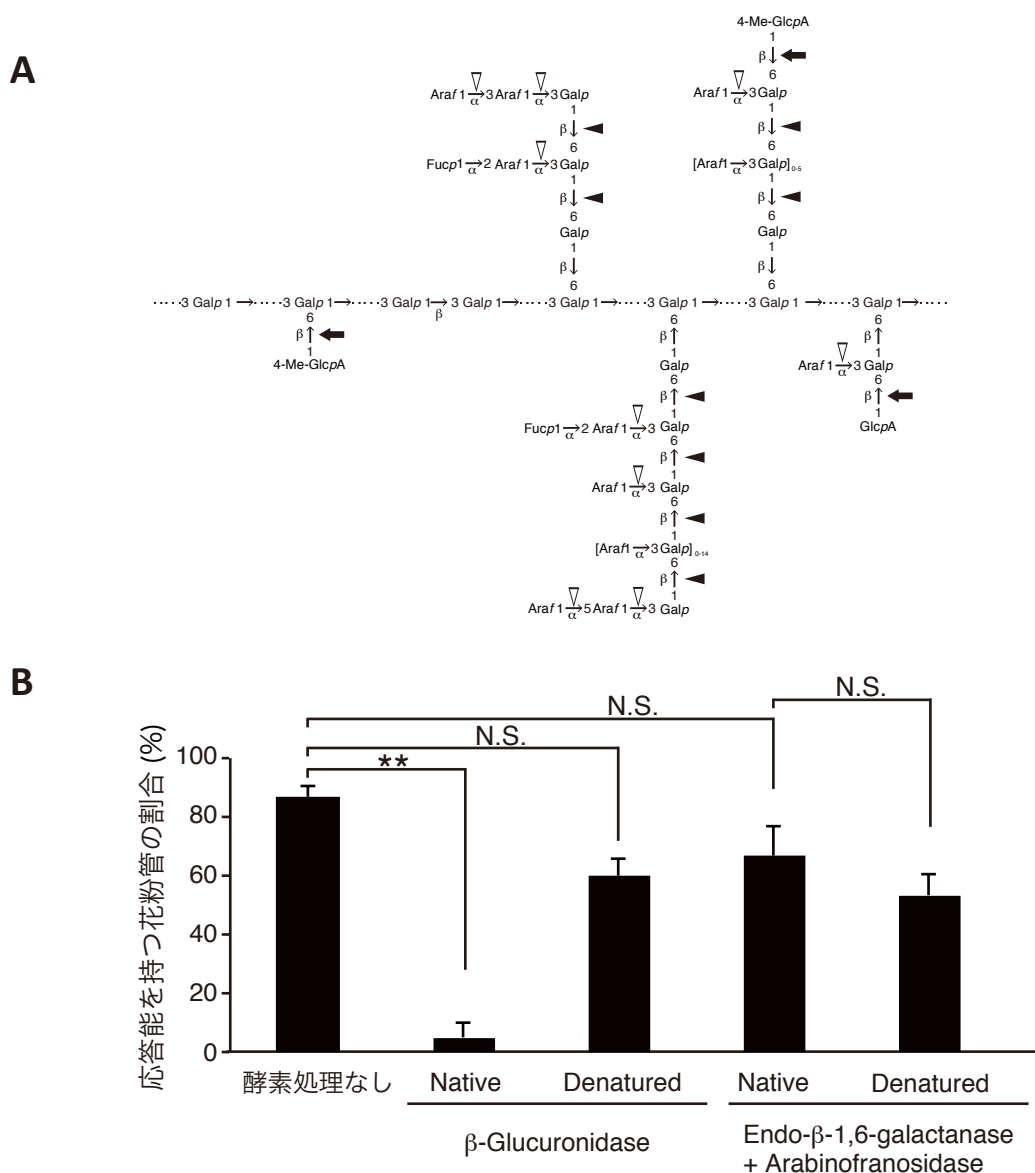


**図 14. AMOR は活性にタンパク質性の因子を必要としない**  
 子房培養液を陰イオンカラムクロマトグラフィーと WGA レクチンカラムクロマトグラフィーによって得られた AMOR 画分に対して、直接アッセイに用いた場合（コントロール）、熱処理を行った場合（100°C, 10 min）、Proteinase K 処理を行った場合（Proteinase K）の AMOR 活性を調べた。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。各群間比較には、一元配置分散分析法と Bonferroni/Dunn 法を用いた (N.S.: 有意差無し)。



**図 15. AMOR 画分は AG 糖鎖を含んでいる**

子房培養液の陰イオンカラムクロマトグラフィーと WGA レクチンカラムクロマトグラフィー，ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって得られた AMOR 画分に対して，直接 AMOR アッセイを行った場合（コントロール），AG 糖鎖と結合する  $\beta$ -GlcY を使用した沈降実験の上清画分と沈殿画分を用いた場合（ $\beta$ -GlcY），AG 糖鎖と結合する  $\alpha$ -GlcY を使用した沈降実験の上清画分と沈殿画分を用いた場合（ $\alpha$ -GlcY）の AMOR 活性を調べた． $\alpha$ -GalY， $\alpha$ -galactosyl Yariv 試薬； $\beta$ -GlcY， $\beta$ -glucosyl Yariv 試薬；Sup，上清画分；Ppt，沈殿画分．各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い，得られた値の平均と標準偏差を示す．統計的有意差はスチューデントの t 検定を用いて解析した (\*\*P < 0.01)．

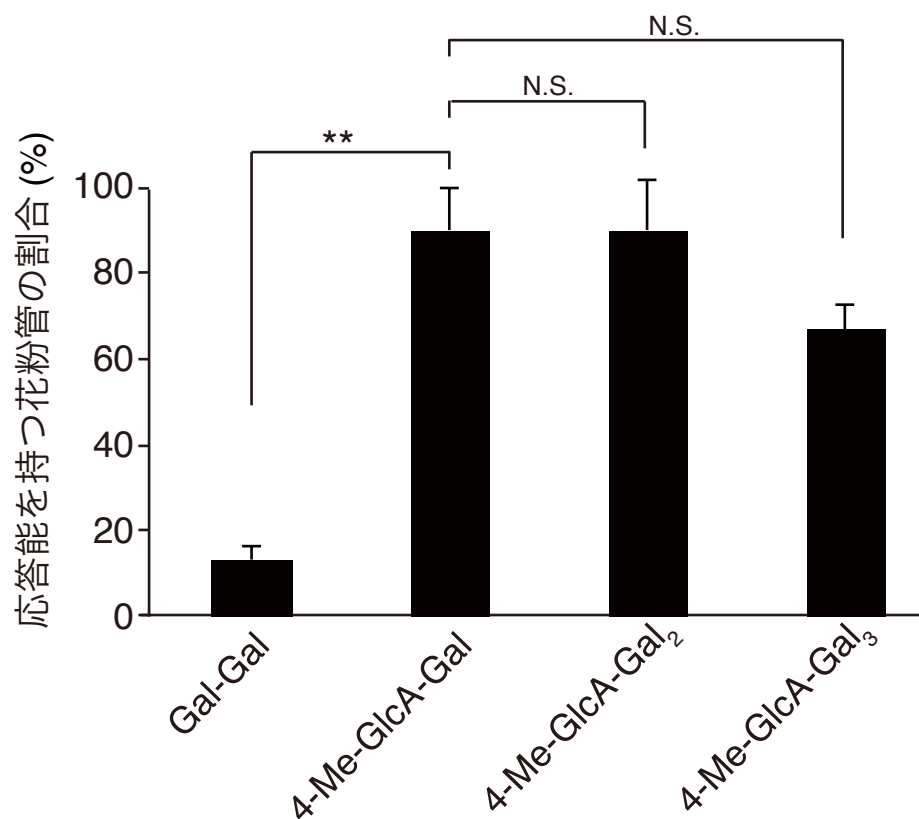


## 図 16. AMOR の糖分解酵素の感受性の解析

A. AG 糖鎖の典型的な構造と、本論文で使用した糖分解酵素の切断部位. AGP の糖鎖構造は、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-galactan 主鎖 (点線) と  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-galactan 側鎖 から成っている. これらはさらに、l-Ara, l-Fuc, GlcA, と 4-O-methyl-GlcA (4-Me-GlcA) によって修飾されている.

$\alpha$ -L-arabinofuranosidase, endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-galactanase, と  $\beta$ -glucuronidase, によって切断される糖鎖の結合部位をそれぞれ白抜き矢尻, 黒矢尻, 黒矢印で示している. この AG の構造は, Arabidopsis の葉の AG 多糖の平均的な構造を示している (Tryfona et al. 改変).

B. 精製で得られた AMOR 画分を用いて, 酵素処理を行わなかった場合,  $\beta$ -glucuronidase で処理した場合,  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase と endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-galactanase の共処理をした場合について AMOR 活性の測定を行った. AMOR 活性の変化が酵素反応に依存したものか簡便に調べるため, 本実験では酵素を 100 °C で 10 分間加熱処理したもの (Denatured) と, していないもの (Native) で比較を行った. 各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い, 得られた値の平均と標準偏差を示す. 各群間比較には, 一元配置分散分析法と Bonferroni/Dunn 法を用いた (N.S.: 有意差無し, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01).



**図 17. ダイコンの根の AGP から精製した 4-O-Me -glucuronosyl-galactan (オリゴ糖) 画分は AMOR 活性を持つ**  
 ダイコンの根から精製した AGP を酵素で処理し，カラムクロマトグラフィーで分画することにより得た AG 糖鎖のオリゴ糖を AMOR アッセイした。4-Me-GlcA-Gal 画分は、メチル基修飾無しの GlcA-Gal も含んでいる。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。各群間比較には、一元配置分散分析法と Bonferroni/Dunn 法を用いた (N.S.: 有意差無し，\*\*P<0.01)。

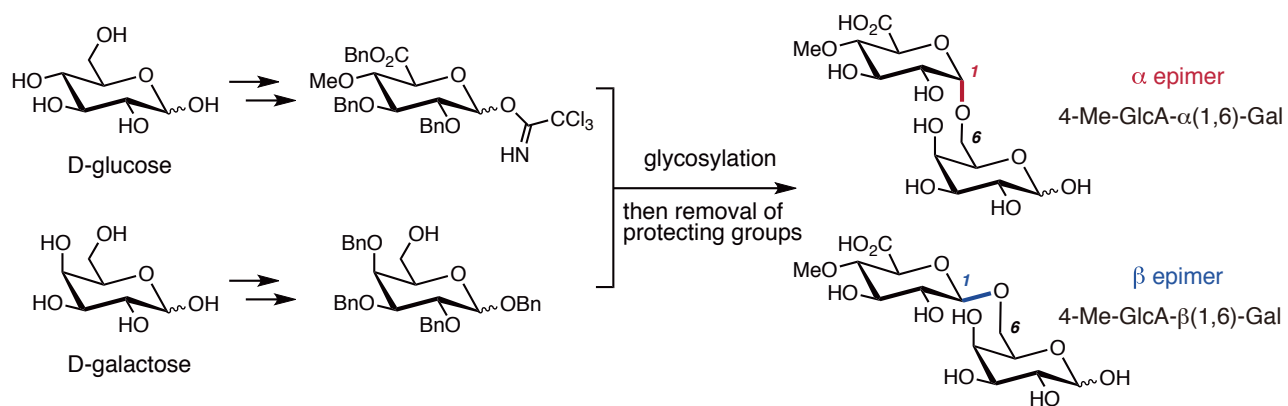
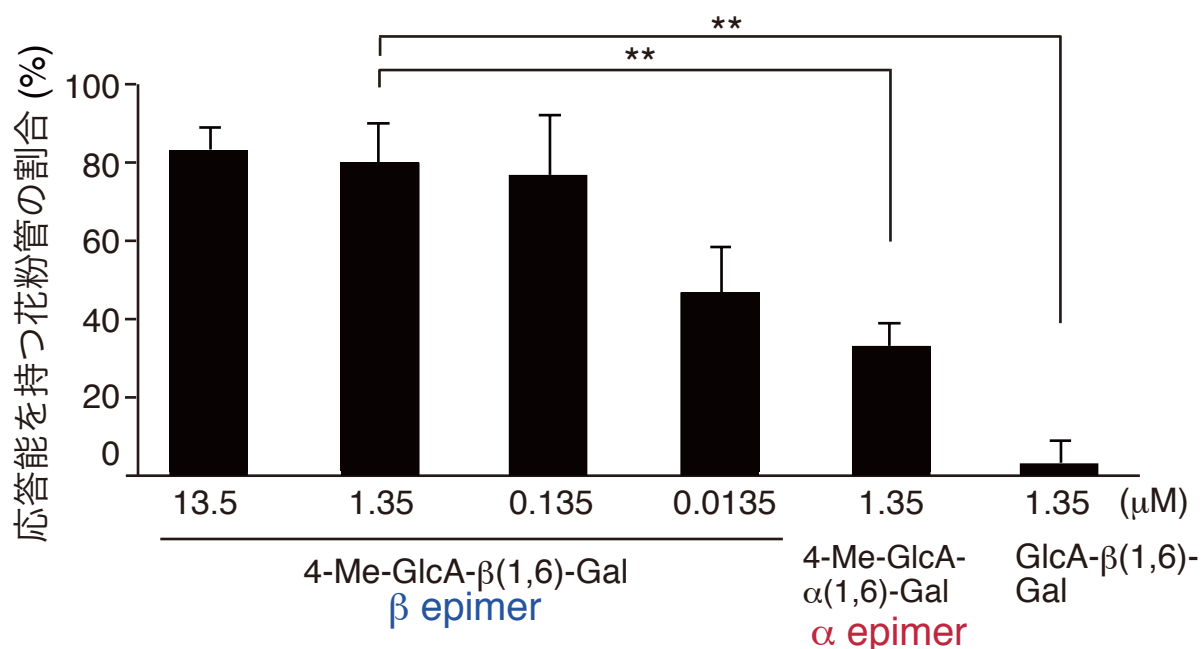
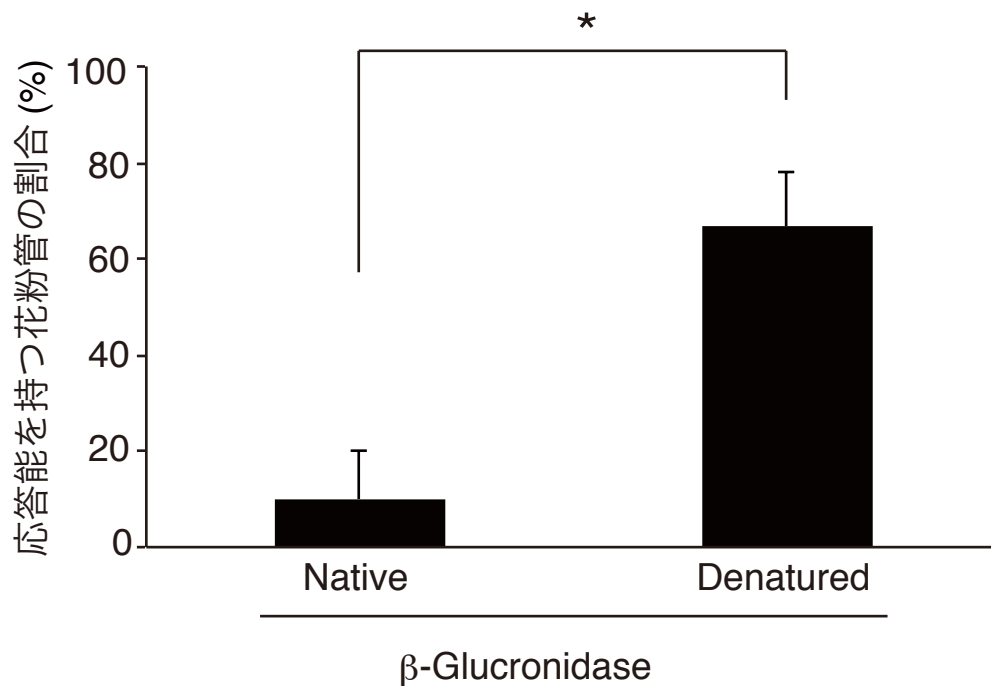


図 18. 4-Me-GlcA-Gal の合成スキーム



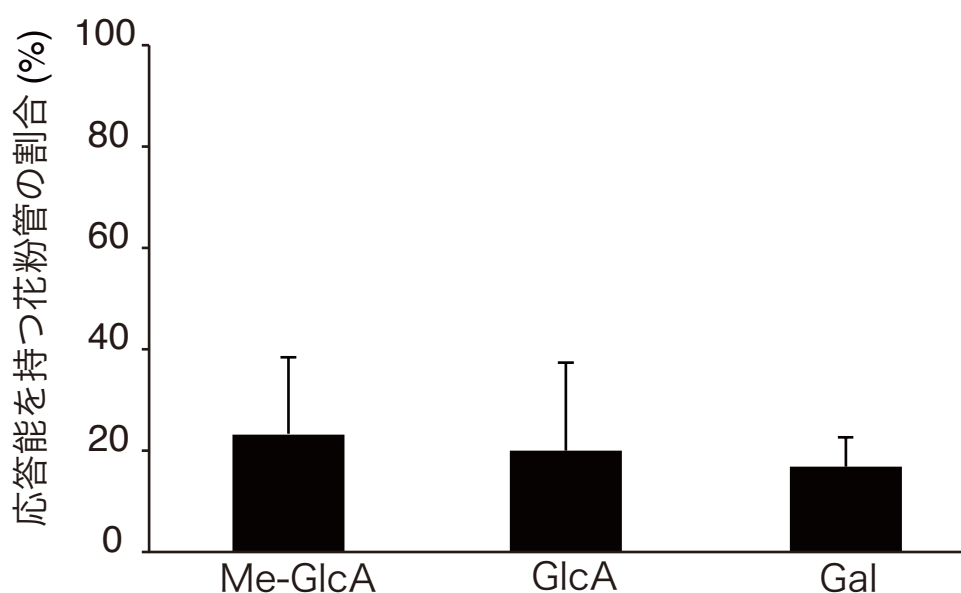
**図 19. 合成糖 4-Me-GlcA-Gal の AMOR アッセイ**

4-Me-GlcA-Gal と 4-O-Me 修飾を持たない GlcA-Gal について、 $\alpha$ と $\beta$ それぞれのエピマーの AMOR 活性を計測した。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。各群間比較には、一元配置分散分析法と Bonferroni/Dunn 法を用いた (\*\* $P < 0.01$ )。



**図 20. 化学合成で得られた 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal を  $\beta$ -glucuronidase 感受性の検討**

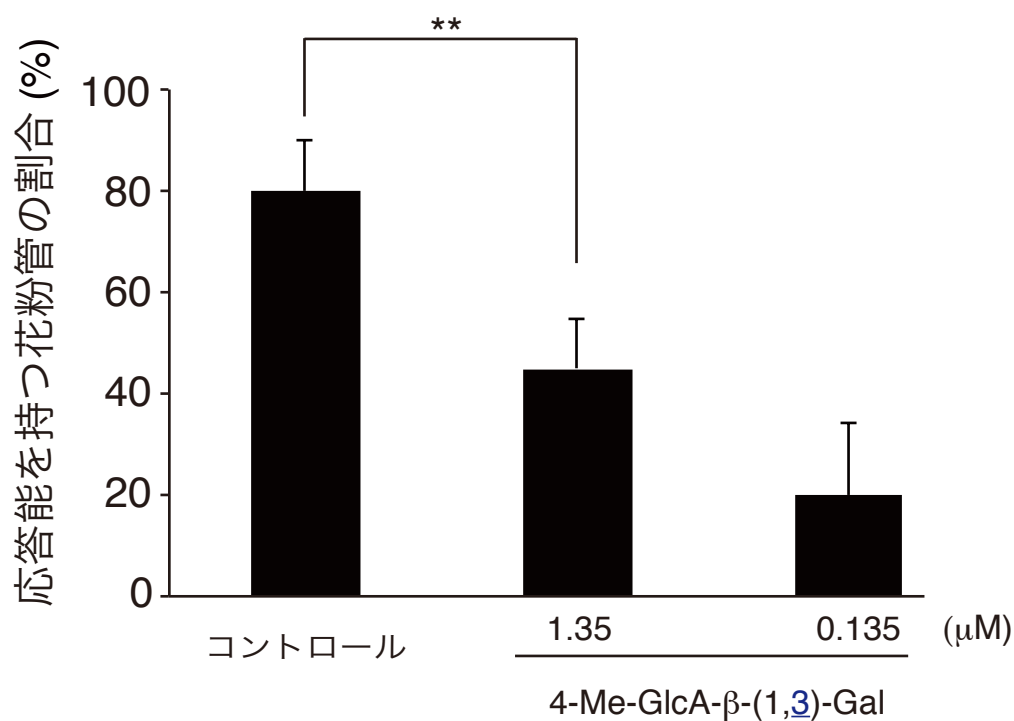
AMOR アッセイは酵素を 100 °C で 10 分間加熱処理をした場合と、していない場合の 2 条件行った。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。統計的有意差はスチューデントの t 検定を用いて解析した (\*\*P < 0.01)。



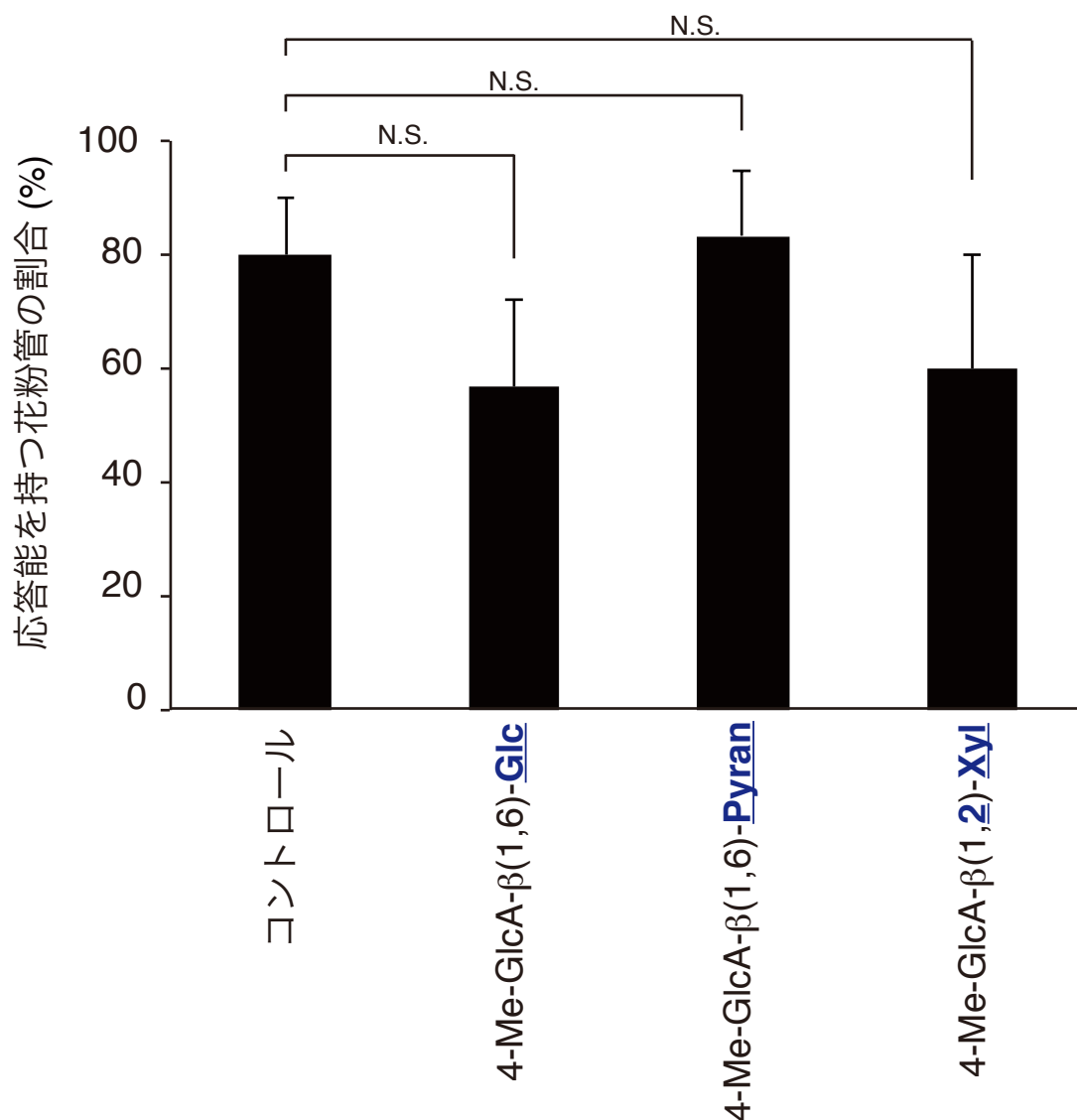
**図 21. 4-Me-GlcA-Gal の構成単糖の AMOR アッセイ**

AG 糖鎖に含まれる単糖 (4-Me-GlcA, GlcA, Gal) の AMOR 活性を計測した. 濃度はそれぞれ  $1.35\mu\text{M}$ .

各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い, 得られた値の平均と標準偏差を示す.

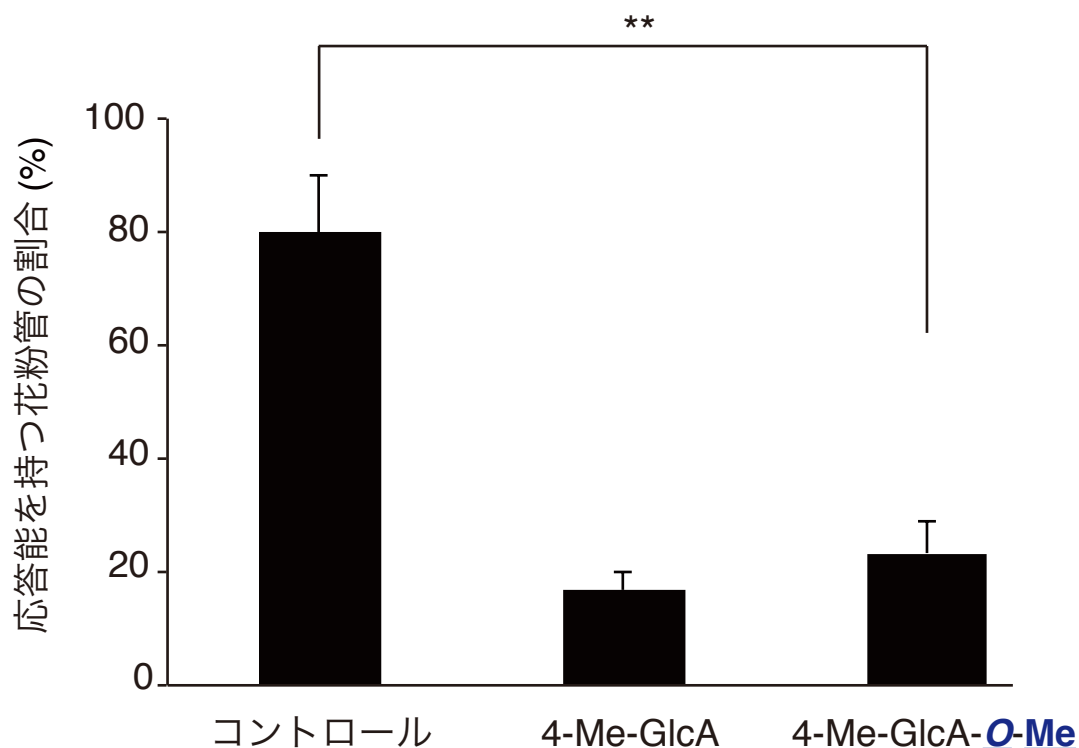


**図 22. 化学合成で得られた 4-Me-GlcA-β-(1→3)-Gal の AMOR 活性**  
 図 19 における 1.35μM 4-Me-GlcA-β-(1→6)-Gal の AMOR 活性をコントロールとして示す。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。統計的有意差はスチューデントの t 検定を用いて解析した (\*\*P < 0.01)。



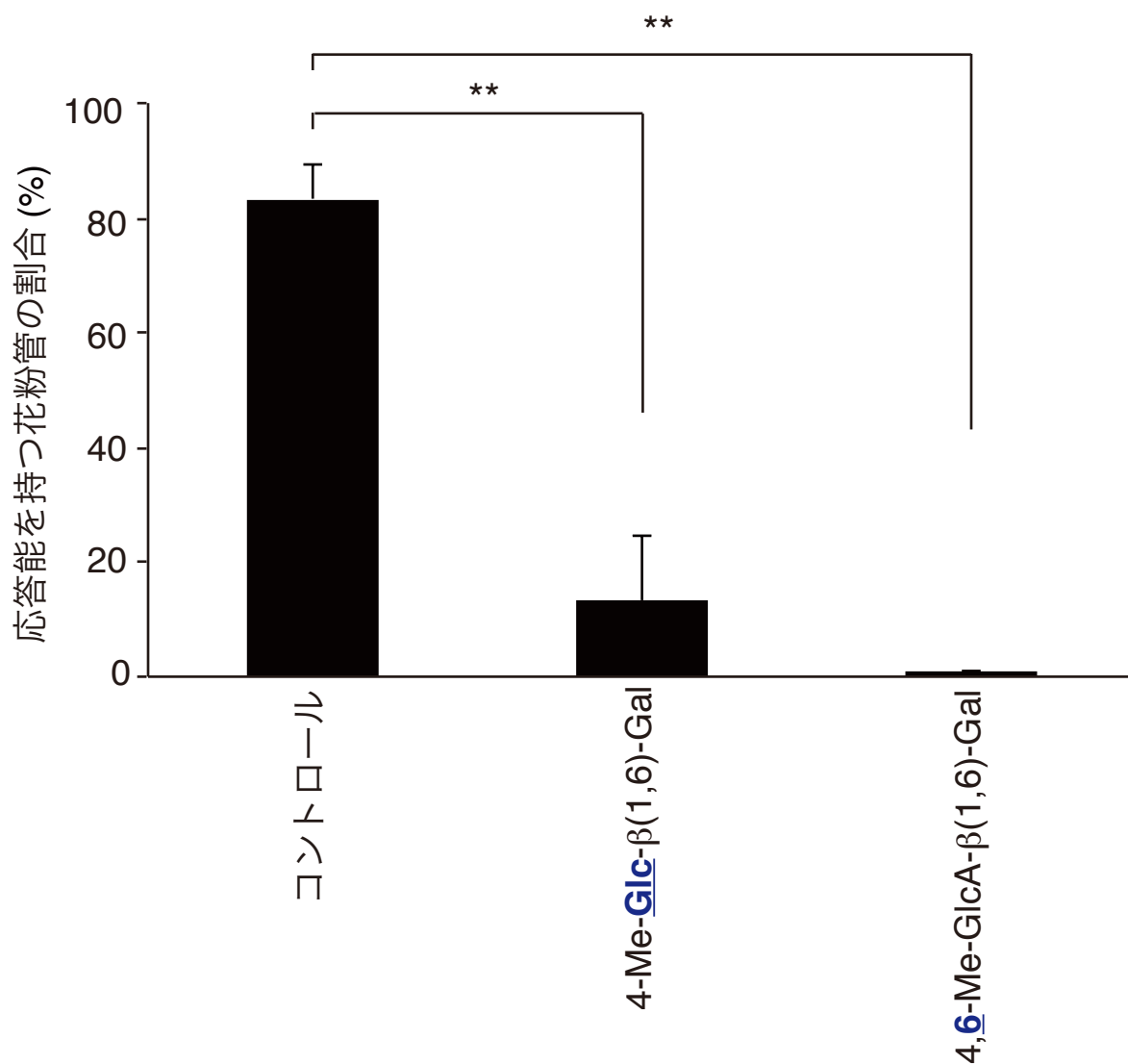
**図 23. 合成二糖の AMOR 活性**

化学合成で得られた 4-Me-GlcA-β-(1→6)-Glc, 4-Me-GlcA-β-(1→6)-Pyran, 4-Me-GlcA-β-(1→2)-Xyl の AMOR 活性を示す。また, 図 19 における 4-Me-GlcA-β-(1→6)-Gal の AMOR 活性をコントロールとして示す。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い, 得られた値の平均と標準偏差を示す。各群間比較には、一元配置分散分析法と Bonferroni/Dunn 法を用いた (N.S.: 有意差無し)。



**図 24. 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-O-Me の AMOR 活性**

化学合成で得られた 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-O-Me および 4-Me-GlcA の AMOR 活性を示す。また、図 19 における 4-Me-GlcA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Gal の AMOR 活性をコントロールとして示す。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。統計的有意差はスチューデントの t 検定を用いて解析した (\*\*P < 0.01)。



**図 25. 4-Me-GlcA の選択性**

化学合成で得られた 4-Me-Glc-β(1→6)-Gal と 4,6-Me-GlcA-β(1→6)-Gal の AMOR 活性を，図 19 に示した 4-Me-GlcA-β(1→6)-Gal の AMOR 活性と比較した。濃度はそれぞれ 1.35 μM。各条件において 10 本以上の花粉管に対するアッセイを独立に 3 回行い、得られた値の平均と標準偏差を示す。各群間比較には、一元配置分散分析法と Bonferroni/Dunn 法を用いた (\*\*P<0.01)。