

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05781

研究課題名（和文）助細胞から胚への細胞運命転換の誘導を通じた多胚性種子の研究

研究課題名（英文）Induction of non-gametic embryo derived from the synergid cell.

研究代表者

丸山 大輔 (Maruyama, Daisuke)

横浜市立大学・木原生物学研究所・准教授

研究者番号：80724111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,500,000円

研究成果の概要（和文）：高等植物では、種子前駆組織の胚珠に存在する2つの助細胞が、花粉管を誘引して2つの精細胞を放出させることで卵細胞と中央細胞というメスの配偶子を受精させる。この重複受精で種子は発達を開始する一方、全ての助細胞が細胞死を遂げる。ところが、一部の植物では助細胞が受精後も死なず、胚へと発生する例が報告されている。本研究では助細胞死に関わる転写因子と細胞融合因子の変異に加え、胚発生を促進する因子の異所発現によって、シロイヌナズナで人為的な助細胞由来胚を作らせる生殖改変に挑戦した。助細胞由来胚を含む多胚性種子は未だ得られていないが、次の課題に加え、植物細胞融合の分子機構の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵細胞の姉妹細胞にあたる助細胞から胚を作成することは、近年需要が高まっているDouble Haploid (DH) 技術、すなわち、半数体を介して全ての遺伝子をホモ接合とする形質固定法の開発に貢献する。本研究結果は今後の助細胞胚の作出に役立つと期待される。また、助細胞不活性化のツールとしての位置づけであった助細胞と胚乳の細胞融合機構については、融合制御因子であるCTL17の同定や機能解析を通じて多様な知見が得られた。この結果は被子植物の体づくりの可塑性を新たな視点から考えさせるような研究に繋がる発見といえる。

研究成果の概要（英文）：In flowering plants, two female gametophytic accessory cells play pivotal roles in pollen tube guidance and double fertilization. In most species, the synergid cells are thought to be eliminated after double fertilization, however, a few exceptions reported polyembryony due to the production of synergid-derived embryo. I thus tried to generate polyembryonic Arabidopsis by preventing synergid cell death and ectopic expression of transcription factor related to the somatic embryogenesis. Although polyembryony was not observed in the synergid elimination mutants expressing embryo-inducible RKD1 transcription factor in the synergid cell, this study illuminated next step toward formation of the synergid-derived embryo and brought novel insight on molecular mechanism of non-gametic cell fusion in plants that occurs in inactivating synergid cell after double fertilization.

研究分野：植物生殖学

キーワード：重複受精 花粉管 助細胞 多胚性種子 助細胞胚 助細胞胚乳融合

1. 研究開始当初の背景

(1) 被子植物の受精は受粉後の花粉から発芽した花粉管という管状構造が、雌しべの奥深くまで伸長して 2 つの精細胞を届けることから始まる。精細胞は種子前駆組織の胚珠に存在するメスの配偶子、卵細胞と中央細胞を受精させる。この重複受精と呼ばれる現象で、受精卵からは次世代の植物体である胚が生じ、受精した中央細胞は胚への栄養を貯める胚乳を形成する。これにより、胚と胚乳を備えた種子は生育に適した環境になるまで、乾燥や高温ストレスにも耐えることができ、地上における被子植物の繁栄には欠かせない器官である。

(2) 我々は、重複受精が起きた後のシロイヌナズナの胚珠において、花粉管誘引の機能をもつ卵細胞の近傍の細胞である助細胞が、初期胚乳と細胞融合することを発見していた(引用文献 1)。助細胞胚乳融合と命名したこの現象について分子機構を明らかにするため、2016~2018 年度に行った若手研究(A) 16H06173「新規植物細胞融合現象の必須因子の同定と分子メカニズムの解析」では、遺伝学的アプローチによる解析を行った。具体的には、助細胞のミトコンドリア特異的にシアン蛍光タンパク質 mTFP1 を蓄積するマーカーラインを作出し、ゲノムに傷をつける変異原処理を施した当代で助細胞胚乳融合が起こらなくなる変異体を分離した。すると、細胞融合によって胚乳へと取り込まれなくなった変異体の助細胞が、発達種子中で膨張するような形態変化を示すことが明らかとなった。

(3) エチレンシグナルを制御する転写因子として知られる EIN3 と EIL1 を欠損するシロイヌナズナは、受精後に起こる助細胞の核崩壊が抑制され、種子初期発達の間に核分裂を開始することが報告されていた(引用文献 2)。

(4) コムギやイネでは、受精卵からではなく、助細胞がそのまま細胞分裂を開始して胚となる特殊な種子形成の例が報告されていた。助細胞は減数分裂後に作られる大孢子(胚のう細胞)から作られる半数体の細胞である。そのため、これらの植物からは受精卵由来の二倍体胚と助細胞由来の半数体胚が共存した多胚性種子が作られる。メス側のゲノムのみをもつ半数体種子の形成は、半数体を介して全ての遺伝子をホモ接合とする形質固定法である Double Haploid (DH) 技術の初期過程として、近年、開発の需要が高まっていた。

2. 研究の目的

助細胞胚乳融合に欠損を示すシロイヌナズナ変異体で助細胞が膨張する表現型や、エチレンシグナルを欠損する植物の助細胞核分裂、そして、助細胞に由来する胚を形成する植物の存在は、卵細胞の姉妹細胞である助細胞自体が胚を形成する潜在能力もつことを示唆する。助細胞のプログラム細胞死を抑制したうえで、さらに不定胚形成誘導活性が知られている因子を導入することで、通常の野生株ではみられない多胚性種子が形成できる可能性が考えられた。被子植物の生殖システムを大きく転換することを試みる領域研究「植物生殖改変」のコンセプトのもと、本研究では助細胞胚乳融合因子の基本的な性質を明らかにした上で、シロイヌナズナにおける多胚性種子形成への挑戦することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 助細胞胚乳融合因子の解析

シロイヌナズナの助細胞胚乳融合に欠損を示す変異体は複数系統得られており、親株系統との戻し交配を続けていたが、最も高い頻度で助細胞胚乳融合に欠損を示した系統(当時は *sef17* と呼称)の原因遺伝子を最初に突き止めることにした。原因遺伝子の同定については本研究と同年度に始動した研究である、基盤研究(B)、20H03280「助細胞胚乳融合の変異体を利用したシロイヌナズナ多精拒否機構の研究」において報告されているため、本報告書では割愛する。得られた *sef17* 変異体の助細胞胚乳融合欠損が、細胞機能の低下などによる二次的な原因ではなく、直接的に細胞融合機構に関わる特異性の高い表現型であるかどうか調べるための機能解析を行った。具体的には、*sef17* の原因遺伝子として同定された *CTL17* 遺伝子の発現部位を明らかにするため、*CTL17* 遺伝子のプロモーターによって緑色蛍光を発する mNeonGreen と *CTL17* の融合タンパク質 (mNG-CTL17) を発現するレポーター系を作製して、受精前後の共焦点顕微鏡観察を行った。また、E3 コピキチンリガーゼである *CTL17* が基質タンパク質をポリコピキチン化した後に、どのように細胞融合を実行するか調べるため、ポリコピキチン化タンパク質の分解を担うプロテアソームの阻害剤処理実験を行った。さらに、細胞間の原形質連絡を阻害する細胞壁多糖カロースの過剰合成変異体 *cals3m* の発現する実験や、中央細胞に特異的なプロモーターによって mNG-CTL17 を発現させる異所発現実験を行った。

(2) 多胚性種子作製の挑戦

助細胞胚乳融合を阻害する *ctl17* 変異および、助細胞核の崩壊を抑制するエチレンシグナルの因子、*ein2*、*ein3*、*eil1* の欠損を重ねた変異体を作製する。これによって、助細胞のプログラム細胞死を阻害した状態を作り出す。この多重変異体に対して、体細胞胚の誘導活性において実績のある転写因子 RKD1 を助細胞特異的に発現させて、助細胞胚の誘導を試みた。

4. 研究成果

(1) 助細胞胚乳融合因子の解析

mNG-CTL17 のレポーター系を解析したところ、mNeonGreen 蛍光は受精前の花粉や胚珠の細胞ではほとんど観察されなかった。しかし、自家受粉して 8 時間後には初期胚乳において強い mNeonGreen 蛍光が観察され、受粉後 1~3 日後の種子でも蛍光が継続的に観察された。助細胞胚乳融合が中央細胞の受精に強く依存した現象であることを考えると、このレポーター系の観察結果は CTL17 が助細胞胚乳融合のタイミングを制御する可能性が示唆された。そこで、未受精の中央細胞で発現する *DD65* 遺伝子のプロモーターを用いて mNG-CTL17 を発現する異所発現実験を行った。すると、高効率で助細胞と中央細胞の内容物が入り混じる表現型を示す胚珠が観察され、受精していなくても CTL17 が胚珠で細胞融合を誘導する活性を十分に有していることが証明された。さらに、助細胞特異的に発現する *MYB98* 遺伝子のプロモーターを用いて mNG-CTL17 を発現させると、本来発現しない細胞であるにもかかわらず、助細胞と中央細胞の融合が誘導された。これらの結果は、CTL17 が少なくとも複数の胚のうの細胞で細胞融合を誘導する潜在的な能力をもつことを示唆する。

プロテアソーム阻害剤処理実験では、助細胞胚乳融合の阻害が起きることがわかった。CTL17 の基質はポリユビキチン化修飾を受けてからプロテアソーム依存的に分解されることで、助細胞胚乳融合を調節するようである。さらに、中央細胞で特異的に *cals3m* を発現させた実験では、*DD65pro:mNG-CTL17* 株の異所的な細胞融合がほぼ完全に抑制されることが示された。この結果は、CTL17 依存的な細胞融合には、融合する 2 細胞の間に物理的な接触を妨げる細胞壁が存在しない状況が重要であることを示唆する。もしくは、原形質連絡などの連結構造が拡張するなどの変化が融合メカニズムの可能性の 1 つとして想定された。

(2) 多胚性種子作製の挑戦

まずは、*ctl17 ein3 eil1* 三重変異体の作製を試みたが、当研究室の植物栽培条件では *ein3* と *eil1* を共にホモに持つ個体の生存率が低く、選抜が困難で構築に時間がかかった。また、*ein3 eil1* 変異を持つ植物は花序浸し法による形質転換の効率が悪いこともわかってきた。そこで、*ein3 eil1* と同様に助細胞核崩壊異常を示すことが報告されている *ein2-5* 変異体を用い、*ctl17 ein2-5* 二重変異体を作製する計画に切り替えた。この二重変異体を培地上で発芽させても、単一の種子から複数の芽生えが現れる多胚性種子は出現しなかった。助細胞特異的に mNeonGreen を融合した *RKD1* を発現する遺伝子を導入した。この変異体に形質転換した *mNG-RKD1* 遺伝子は助細胞形成よりも前の胚のう発生の途中から発現を開始する *MYB98* プロモーターと、助細胞の形成直後から発現を開始する *AtLURE1.2* プロモーターの 2 つを用いた。mNeonGreen の蛍光を指標に形質転換体の選抜を行なったが、得られた植物の自殖種子をプレートに播いて芽生えの観察をしたところ、多胚性種子は出現しなかった。

(3) まとめと展望

我々が基盤研究(B)20H03280 の成果でも報告している通り、*ctl17 ein3 eil1* 三重変異体は高頻度で 2 本目の花粉管誘引するため、受精後における残存助細胞の花粉管誘引活性の低下が阻害されているといえる。これは、*ctl17 ein3 eil1* 三重変異体、ひいては *ctl17 ein2* 二重変異体で、残存助細胞は助細胞のアイデンティティが維持されたままであることが示唆される。例えば、助細胞の主要な遺伝子の発現を制御する転写因子 *MYB98* を欠損する変異体では、助細胞が卵細胞様の発現パターンを示すことが報告されている(引用文献 3)。受精後に *MYB98* の発現レベルを低下させるような機構を組み込むことで、助細胞の胚への転換を促すことができるかもしれない。また、期間中にシロイヌナズナで転写因子の *BBM* を過剰発現することで、未受精の卵細胞で胚形成を誘導可能であることが報告された(引用文献 4)。しかし、この報告も胚誘導はまだ低頻度でしか起こせていない。助細胞の胚への転換の実現には、受精による卵細胞の胚への転換機構の基礎的研究も必要と考えられる。

一方で、CTL17 に依存した細胞融合現象については、遺伝子発現のタイミングや場所を始め、ユビキチン-プロテアソーム分解系を必要とするなどの分子機構の重要な手がかりが得られた。被子植物のゲノムを比較すると、CTL17 オルソログはアブラナ科にのみ検出される。しかし、CTL17 とアミノ酸配列が類似した *BIG BROTHER (BB)/CTL19* は被子植物全体に存在すると目されている(引用文献 5)。BB を欠損するシロイヌナズナは花器官の肥大など特徴的な発生異常を示すことが報告されており、BB と CTL17 の細胞機能の比較解析や、被子植物全体における体細胞組織の融合現象の存在を確かめる検証実験を進める必要がある。細胞融合を介した細胞の多核化は植物の発生において稀な現象であるが、細胞質分裂を伴わない核分裂や染色体の核内倍化の例をみると、細胞内の倍数性上昇に応じて代謝も活発になる傾向がある。CTL17 を介した細胞融合機構が明らかとなり、組織特異的な細胞融合を誘導できるようになれば、植物組織を改変する新たなツールになると期待される。

<引用文献>

- Maruyama, D., Volz, R., Takeuchi, H., Mori, T., Igawa, T., Kurihara, D., Kawashima, T., Ueda, M., Ito, M., Umeda, M., Nishikawa, S., Gross-Hardt, R. and Higashiyama, T. (2015). Rapid Elimination of the Persistent Synergid through a Cell Fusion Mechanism. *Cell*, 161, 907-918. DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.018.
- Volz, R., Heydlauff, J., Ripper, D., von Lyncker, L. and Gross-Hardt, R. (2013). Ethylene signaling is

required for synergid degeneration and the establishment of a pollen tube block. *Dev. Cell*, 25, 310-316. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.04.001.

Susaki, D., Suzuki, T., Maruyama, D., Ueda, M., Higashiyama, T. and Kurihara, D. (2021). Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in Arabidopsis. *PLoS Biol.* 19, e3001123. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001123.

Chen, B., Maas, L., Figueiredo, D., Zhong, Y., Reis, R., Li, M., Horstman, A., Riksen, T., Weemen, M., Liu, H., Siemons, C., Chen, S., Angenent, G. C. and Boutilier, K. (2022). BABY BOOM regulates early embryo and endosperm development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2201761119. DOI: 10.1073/pnas.2201761119.

Disch, S., Anastasiou, E., Sharma, V. K., Laux, T., Fletcher, J. C. and Lenhard, M. (2006). The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls arabidopsis organ size in a dosage-dependent manner. *Curr. Biol.* 16, 272-279. DOI: 10.1016/j.cub.2005.12.026.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Motomura Kazuki, Takeuchi Hidenori, Notaguchi Michitaka, Tsuchi Haruna, Takeda Atsushi, Kinoshita Tetsu, Higashiyama Tetsuya, Maruyama Daisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Persistent directional growth capability in Arabidopsis thaliana pollen tubes after nuclear elimination from the apex.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22661-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Susaki Daichi, Suzuki Takamasa, Maruyama Daisuke, Ueda Minako, Higashiyama Tetsuya, Kurihara Daisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in Arabidopsis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3001123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishikawa Shuh-ichi, Yamaguchi Yuki, Suzuki Chiharu, Yabe Ayaka, Sato Yuzuru, Kurihara Daisuke, Sato Yoshikatsu, Susaki Daichi, Higashiyama Tetsuya, Maruyama Daisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Arabidopsis GEX1 Is a Nuclear Membrane Protein of Gametes Required for Nuclear Fusion During Reproduction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 548032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.548032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugi Naoya, Izumi Rie, Tomomi Shun, Susaki Daichi, Kinoshita Tetsu, Maruyama Daisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Removal of the endoplasmic membrane upon sperm cell activation after pollen tube discharge.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1116289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2023.1116289	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Motomura Kazuki, Sugi Naoya, Takeda Atsushi, Yamaoka Shohei, Maruyama Daisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Possible molecular mechanisms of persistent pollen tube growth without de novo transcription.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1020306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.1020306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Motomura Kazuki, Maruyama Daisuke	4. 巻 34
2. 論文標題 シロイヌナズナ花粉管の核排除とそれを利用した花粉管伸長制御能力の発見までの道のり	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 69 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.34.69	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Yilin, Maruyama Daisuke, Toda Erika, Kinoshita Atsuko, Okamoto Takashi, Mitsuda Nobutaka, Takasaki Hironori, Ohme Takagi Masaru	4. 巻 597
2. 論文標題 Transcriptome analyses uncover reliance of endosperm gene expression on Arabidopsis embryonic development.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 407 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takasaki Hironori, Ikeda Miho, Hasegawa Reika, Zhang Yilin, Sakamoto Shingo, Maruyama Daisuke, Mitsuda Nobutaka, Kinoshita Tetsu, Ohme-Takagi Masaru	4. 巻 64
2. 論文標題 Elongation of Siliques Without Pollination 3 Regulates Nutrient Flow Necessary for Embryogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 117 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugi Naoya, Maruyama Daisuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Exploring Novel Polyubey Reproduction Pathways Utilizing Cumulative Genetic Tools.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 454 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Susaki Daichi, Izumi Rie, Oi Takao, Takeuchi Hidenori, Shin Ji Min, Sugi Naoya, Kinoshita Tetsu, Higashiyama Tetsuya, Kawashima Tomokazu, Maruyama Daisuke	4. 巻 35
2. 論文標題 F-actin regulates the polarized secretion of pollen tube attractants in Arabidopsis synergid cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1222 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山大輔
2. 発表標題 受精依存的に発現するシロイヌナズナの細胞融合因子の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山 大輔, 須崎 大地, 太田 かおる, 木下 哲
2. 発表標題 シロイヌナズナの生殖に伴う非配偶子融合の意義
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山大輔
2. 発表標題 死を回避した助細胞は新たな運命を手に入れられるか
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会・関連集会「植物生殖改変ワークショップ」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山大輔、太田かおる、須崎大地、木下哲
2. 発表標題 助細胞の細胞融合現象に異常を示すシロイヌナズナ変異体の解析
3. 学会等名 日本植物学会第 84回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山大輔
2. 発表標題 植物受精の動態をライブイメージングで観察する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山大輔
2. 発表標題 シロイヌナズナの非配偶子性の細胞融合の意義を理解する
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物の精細胞が「一皮むけた」瞬間を撮影 -重複受精の精巧な仕組みの一端を明らかに- <https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2022/20230131maruyama.html> ア
クチン繊維が花粉管の誘引を制御する -助細胞による誘引ペプチド分泌のメカニズムを解明- <https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2022/202301susaki.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------