

平成 30 年 5 月 13 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14541

研究課題名(和文)二本目の花粉管誘引を利用する多精拒否機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of polyspermy block system based on multiple pollen tube attraction.

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・助教

研究者番号：80724111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物は稀に侵入する2本目の花粉管によって受精卵が重ねて受精をしないよう、精細胞を拒絶する仕組みを持つ。この多精拒否の仕組みを調べるため、2本目の花粉を高頻度に誘引するシロイヌナズナ変異体で精細胞を含む花粉管内容物の挙動を調べた。その結果、花粉管内容物が受精領域に留まるという予想に反し、約5%という高い割合で胚乳まで到達している様子が観察された。この多精の回避に有効と思われるユニークな現象について様々な変異体を用いた解析を行ったところ、受精した胚珠における助細胞と胚乳の融合を必要とすることが推測された。これを検証するため、助細胞胚乳融合に欠損を示す変異体を探索、その分離に成功した。

研究成果の概要(英文)：Zygote of flowering plants prevents multiple fertilizations caused by additional pair of sperm cells from second pollen tube. To examine the mechanism of polyspermy block, we analyzed patterns of released pollen tube contents (PTC) including sperm cells in an Arabidopsis mutant that frequently attracts second pollen tube. Contrary to our expectation, fluorescent signals from the PTC were frequently found in the endosperm but not in the fertilization zone. As this unique phenomenon seems to avoid polyspermy through a rerouting of sperm destination, we further analyzed other mutants that attract multiple pollen tubes and found possible involvement of synergid-endosperm fusion (SE fusion) during early embryogenesis. To prove the relevance of SE fusion in the unusual PTC reception, we tried to isolate mutant plants defective in the SE fusion and finally obtained one.

研究分野：植物生殖

キーワード：重複受精 花粉管 卵細胞 中央細胞 多花粉管拒否 多精拒否

1. 研究開始当初の背景

(1) 他の真核生物と同様、被子植物の卵細胞が複数の精細胞と受精しないように制御する多精拒否の仕組みを備えていることが、多数の精細胞をもつ花粉管をつくるシロイヌナズナ変異体の解析から示唆されていた。しかしながら、通常の花粉管は重複受精に必要な2個の精細胞のみを胚珠へと届けるため、そもそも野生株において多精が起こっているかどうかはわからず、その分子メカニズムを研究することも困難であった。

(2) われわれは胚珠がどのような条件において2本目の花粉管を誘引するか研究してきた。そして、卵細胞や中央細胞の受精がきっかけとなって、花粉管誘引能をもつ助細胞の不活性化が進行することを明らかにしてきた。そのときの助細胞核の崩壊過程には、胚乳におけるポリコム抑制複合体2 (FIS-PRC2) やエチレンシグナル経路が重要な役割をはたしていることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では被子植物における多精拒否機構のメカニズム、具体的には受精卵と精細胞の細胞膜融合を防ぐ仕組みの解明を目的としていた。これは単純に低頻度で誘引される2本目の花粉管によって供給される精細胞との受精を防ぐ現象の研究という意味合いだけではなく、2個1組になって供給される精細胞によって同時に卵細胞が2回受精することを防いでいる重複受精の長年の謎の解明に繋がるものであった。

3. 研究の方法

重複受精後も高頻度に2本目の花粉管の誘引が起こる変異体では、受精卵へ2本目の花粉管由来の精細胞が供給されると推測される。これを利用し、順遺伝学的な手法によって細胞膜融合の過程における多精拒否のメカニズムを解析する研究を計画した。まず、*ein3 eil1* 変異体を変異原処理して得た M1 個体の雌しべに対して、多精検出マーカーラインの花粉を授粉する。多精検出マーカーラインとは、遺伝子をコードしていない同一のゲノム領域において T-DNA の挿入をもつ2種類のラインを交配して作製したラインである。それぞれの T-DNA には BASTA 耐性遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子がコードされている。花粉には BASTA 耐性遺伝子をもつアレルかカナマイシン耐性遺伝子をもつアレルのどちらかが確実に分配されるため、通常の重複受精が起こって得られた種子はどちらか片方の薬剤耐性を示す。しかし、仮に変異原処理の結果、多精が高頻度で起こるようになった M1 個体では、BASTA 耐性とカナマイシン耐性の両方を示す三倍体の F1 個体を得られるはずである。この変異体から同定する原因遺伝子を解析の起点として、多精拒

否に必要な因子の組織特異的な発現やコードされるタンパク質の機能解析を計画していた。

4. 研究成果

(1) 多精検出マーカーラインの構築

シロイヌナズナのリソースセンターからカナマイシン耐性遺伝子の挿入を持つラインを6種類、BASTA 耐性遺伝子の挿入を持つラインを5種類取り寄せて、それぞれの薬剤耐性と種子形成能力について解析した。その結果、7つのラインが十分な薬剤耐性を示し、種子形成異常も見られないことが示された。このうち、SAIL_1214_D08 と SALK_11914 を交配することで、多精検出マーカーラインの作出を行った。

(2) エチレンシグナル欠損変異体における2本目の花粉管放出の観察

受精卵がさらに受精を重ねる状況が生じるためには、2本目の花粉管内容物が卵細胞と中央細胞の間に存在する受精領域へと運ばれることが重要な条件になる。そこで、多精検出マーカーラインを用いた変異体のスクリーニングを開始する前に、エチレンシグナル欠損変異体である *ein2-5* や *ein3 eil1* 変異体に対して花粉管のプラストドや精細胞を蛍光タンパク質でラベルした植物を掛け合せ、2本目の花粉管放出後の蛍光パターンを解析した。すると、予想に反して花粉管内容物が受精領域ではなく、胚乳で観察される胚珠が多数出現した。この結果はこれらエチレンシグナル欠損変異体の受精後の胚珠が誘引する2本目の花粉管内容物が多精可能な場所に運ばれていなかったことを示唆する。

(3) 受精欠損変異体における2本目の花粉管放出の観察

エチレンシグナル欠損変異体が示した胚乳への花粉管内容物の放出は、本研究の目的である多精拒否欠損変異体を阻害する現象ということが明白であった。当初の計画を遂行するためにはこの新奇の現象のメカニズムを突き止める必要があった。われわれはまず、2本目の花粉管を高頻度で誘引する別のタイプの変異体について花粉管内容物の放出先を解析し、エチレンシグナル欠損変異体と比較することにした。精細胞の形成に必須の転写因子 DUO1 をコードする遺伝子を欠損する変異体は受精能を持たない。そのため、*duo1* 変異体の花粉管を受入れた胚珠は花粉管誘引停止のプロセスが起動せずに高頻度で2本目の花粉管を受入れる。花粉管内容物のマーカーラインに対して DUO1 を標的とする CRISPR/CAS9 コンストラクトを導入することで、約90%の花粉が *duo1* 欠損の表現型を示す植物を作出した。この植物を解析したところ、花粉管内容物が胚乳へと移行する現象はほとんど観察されなかった。さらに、*duo1* 変異体の花粉を *ein3 eil1* 変異体の雌しべ

に受粉したところ、この現象の出現率は非常に低くなることも示された。以上の結果から、胚乳が花粉管内容物を受入れるためには、胚珠が予め重複受精をすることが必要であることが示唆された。

(4) 変異体を助細胞胚乳融合

花粉管誘引の機能を持つ助細胞は胚珠に2つ存在し、受精の前後で大きく変化することが近年の研究で明らかとなった。その変化でも特に顕著なものが、われわれが2015年にCell誌に報告した助細胞胚乳融合である。これは巨大な体積をもつ胚乳が助細胞を細胞融合によって取り込み、花粉管誘引停止を誘導する仕組みである。細胞の構造的にこの助細胞胚乳融合を完了した胚珠が花粉管誘引を停止しきれずに2本目の花粉管を受容することがあれば、その花粉管内容物は助細胞を通過して胚乳まで到達するはずである。実際、エチレンジナル欠損変異体が助細胞胚乳融合には欠損を示さないものの花粉管の誘引停止が遅延するという点、また *duo1* 変異体のような受精欠損変異体では花粉管を受容した胚珠は助細胞胚乳融合が起こらないという点とも合致する。

そこでわれわれは助細胞胚乳融合のメカニズムを理解する必要があると考えた。まず、助細胞胚乳融合が重複受精後に起こる様々な過程でも、どのような現象とリンクしているのか調べることにした。受精後の胚珠でも早期からみられる顕著な変化として、胚乳核の分裂が挙げられる。ポリコーム抑制複合体2(FIS-PRC2)の構成因子であるMSI1を欠損する変異体は受精をしていない胚珠でも時間が経つと自律的に胚乳発達を示すことで知られている。この自律的胚乳発達を示す種子において助細胞のサイトゾルを観察したところ、胚乳発達に伴って助細胞が胚乳と融合する様子が示された。したがって、助細胞胚乳融合が胚乳の発達に強く依存する現象であることが強く示唆された。この成果は2016年にCell Structure and Function誌に報告した。

(5) 阻害剤を用いた助細胞胚乳融合の解析

助細胞胚乳融合とリンクしている細胞現象が他にも存在するかどうか調べるため、様々な阻害剤を処理したときの影響を解析した。まずはアクチンフィラメントや微小管の形成を阻害する薬剤で処理したところ助細胞胚乳融合の誘導率に有意な差は観られなかった。しかしながら、転写や翻訳を阻害する試薬や、サイクリン依存キナーゼの阻害剤を処理したとき、助細胞胚乳融合の誘導率に低下がみられた。これらの結果は、受精後の新規遺伝子発現とともに、胚乳核分裂に伴うG2期からM期への細胞周期の転換が助細胞胚乳融合において重要な役割をはたすことを示唆している。これらの成果は2018年のJournal of Cell Science誌に掲載された。

(6) 助細胞胚乳融合の変異体分離

さらに助細胞胚乳融合のメカニズムを分子レベルで解析するため、助細胞で特異的にmTFP1を発現するマーカーラインを作成し、助細胞胚乳融合を欠損する変異体の選抜を試みた。2213個のM1世代の授粉後の雌しべを解剖し、最終的に約25%の助細胞胚乳融合率を示すラインを分離した。これについては現在、原因遺伝子のマッピングの準備を開始したところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

Daisuke Maruyama, Ronny Voelz, Hidenori Takeuchi, Toshiyuki Mori, Tomoko Igawa, Daisuke Kurihara, Tomokazu Kawashima, Minako Ueda, Masaki Ito, Masaaki Umeda, Shuh-ichi Nishikawa, Rita Gross-Hardt, Tetsuya Higashiyama, Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism. *Cell*, 査読有, 161 巻, 2015, 907-918
DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.018

Daisuke Maruyama, Tomokazu Kawashima, Tetsuya Higashiyama, Selective Elimination in Multinucleate Cells. *Oncotarget*, 査読有, 6 巻, 2015, 30447-30448
DOI: 10.18632/oncotarget.5450

Daisuke Maruyama, Toshiya Endo, Shuh-ichi Nishikawa, BiP3 supports the early stages of female gametogenesis in the absence of BiP1 and BiP2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 査読有, 10 巻, 2015, e1035853
DOI: 10.1080/15592324.2015.1035853

Ryushiro D Kasahara, Michitaka Notaguchi, Shiori Nagahara, Takamasa Suzuki, Daichi Susaki, Yujiro Honma, Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama, Pollen tube contents initiate ovule enlargement and enhance seed coat development without fertilization. *Science Advances*, 査読有, 2 巻, 2016, e1600554
DOI: 10.1126/sciadv.1600554

Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama, The end of temptation: the elimination of persistent synergid cell identity. *Current Opinion in Plant Biology*, 査読有, 34 巻, 2016, 122-126
DOI: 10.1016/j.pbi.2016.10.011

Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama,

Cell fusion and nuclear fusion in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 査読有, 60 巻, 2016, 127-135
DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.07.024

Kazuki Motomura, Frederic Berger, Tomokazu Kawashima, Tetsu Kinoshita, Tetsuya Higashiyama, Daisuke Maruyama, Fertilization-independent cell-fusion between the synergid and central cell in the polycomb mutant. *Cell Structure and Function*, 査読有, 41 巻, 2016, 121-125
DOI: 10.1247/csf.16010

Mina Ohtsu, Yoshikatsu Sato, Daisuke Kurihara, Takuya Suzaki, Masayoshi Kawaguchi, Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama, Spatiotemporal deep imaging of syncytium induced by the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Protoplasma*, 査読有, 254 巻, 2017, 2107-2115
DOI: 10.1007/s00709-017-1105-0

Zhao, X., Bramsiepe, J., Van Durme, M., Komaki, S., Prusicki, M.A., Maruyama, D., Forner, J., Medzihradzky, A., Wijnker, E., Harashima, H., Lu, Y., Schmidt, A., Guthorl, D., Logrono, R.S., Guan, Y., Pochon, G., Grossniklaus, U., Laux, T., Higashiyama, T., Lohmann, J.U., Nowack, M.K., Schnittger, A. RETINOBLASTOMA RELATED1 mediates germline entry in *Arabidopsis*. *Science*, 査読有, 356 巻, 2017, eaaf6532
DOI: 10.1126/science.aaf6532

Motomura, K., Kawashima, T., Berger, F., Kinoshita, T., Higashiyama, T., Maruyama, D. A pharmacological study of *Arabidopsis* cell fusion between the persistent synergid and endosperm. *Journal of Cell Science*, 査読有, 131 巻, 2017, jcs204123
DOI: 10.1242/jcs.204123

〔学会発表〕(計 8 件)

第 67 回日本細胞生物学会大会
第 27 回高遠シンポジウム
日本植物形態学会第 27 回大会
日本植物学会第 79 回大会
BMB2015 シンポジウム
第 68 回日本細胞生物学会大会
日本植物学会第 81 回大会
第 59 回日本植物生理学会年会

〔図書〕(計 1 件)

Susaki, D., Maruyama, D., Yelagandula, R., Berger, F., Kawashima, T. Humana Press, New York, NY, *Plant Germline Development*, 2017, 47-54

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
植物の受精における細胞融合による残存助細胞の迅速な排除
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/10061>.

6. 研究組織

(1) 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・助教
研究者番号: 80724111

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

東山 哲也 (HIGASHIYAMA, Tetsuya)
河島 友和 (KAWASHIMA, Tomokazu)
Frederic Berger (Frederic Berger)