

令和元年6月1日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06173

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Analyses of molecular mechanisms in the synergid-endosperm fusion.

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) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：生殖の過程でオスとメスが1対1の関係で結びつくことは動植物を問わず、重要な仕組みである。被子植物のシロイヌナズナでは、受精後の胚珠がすぐに精細胞を運ぶ花粉管の誘引を停止することで、複数回の受精をする危険性を回避する。その素早い花粉管誘引停止を支える仕組みとして、当研究室は花粉管誘引ペプチドを分泌する助細胞と胚乳との細胞融合現象に着目している。様々な阻害剤を加えたときの反応を調べたところ、この助細胞胚乳融合には、受精後の新規の遺伝子発現や胚乳における分裂期への移行が必要とされることがわかった。また、助細胞胚乳融合を欠損する変異体を分離し、原因遺伝子を解析する準備を整えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

助細胞胚乳融合は被子植物の成長の過程でも珍しい細胞融合現象である。その仕組みの一端を示すととも今後詳しい解析につながる本研究は、植物が細胞を融合するために細胞壁や細胞膜をどのように制御するかを理解するために役立つ。また、花粉管誘引停止の制御を理解する基礎的な研究として、本研究成果は将来的に、卵細胞を2つの精細胞で受精させたり、卵細胞と中央細胞を別々の精細胞で受精させる技術の開発の発展に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell-fusion between the persistent synergid and the endosperm (Synergid-Endosperm fusion, SE fusion) appears to be one of the important events in the cessation of pollen tube attraction in fertilized ovule. To elucidate molecular mechanism, we performed a pharmacological analysis and forward genetics.

Transcriptional or translational Inhibitors severely impaired induction of the SE fusion in fertilized ovules. Frequency of SE fusion also reduced by a treatment of roscovitine, an inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases (CDKs). These data indicates an importances of post-fertilization de novo gene expression as well as mitotic entry in the induction of SE fusion.

In the forward genetics approach, we generated a reporter line that labels mitochondria and nucleus of the synergid cells with different colors, and induced point mutations by an EMS treatment. We isolated eight mutants that frequently showed a defect in SE fusion among 2,201 M1 individuals.

研究分野：植物生殖学

キーワード：花粉管 卵細胞 重複受精 細胞融合 シロイヌナズナ 助細胞 胚乳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 被子植物の胚珠は必要以上に卵細胞へと精細胞が送り込まれないよう、受精後に花粉管の誘引を担う助細胞を素早く不活性化させる。われわれはライブイメージングを用いて、受精後の胚珠の助細胞が胚乳と細胞融合することを示し、この現象を助細胞胚乳融合と名付けた。

(2) 助細胞胚乳融合は全体を丈夫な細胞壁で囲まれた植物細胞が示す珍しい細胞融合である。その他の細胞融合は受精に伴う配偶子同士の融合しか知られていなかったため、助細胞胚乳融合を引き起こす仕組みは全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

助細胞胚乳融合の仕組みを理解することは、植物における細胞膜や細胞壁の柔軟な制御の仕組みを明らかにすることにもつながる。また、助細胞の不活性化を自在に制御することができれば、卵細胞を複数の精細胞で受精させた多精種子や、胚と胚乳の遺伝子型がことなるヘテロ受精種子を作出することができ、育種分野においても貢献することが期待された。そこで、本研究ではシロイヌナズナを用いて助細胞胚乳融合を引き起こす分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胚乳の発達と助細胞胚乳融合の開始との関係を明らかにするため、逆遺伝学的なアプローチとして、胚乳が受精に依存せず自律的に発達をする *msi1* 変異体の胚珠における助細胞胚乳融合を観察した。

(2) 取り出した受精後の胚珠を液体培地中で培養しながら助細胞胚乳融合を観察する系を利用し、助細胞胚乳融合を阻害する活性を示す薬剤の探索を行った。

(3) 助細胞胚乳融合が起きたかどうかを確実に判断できるレポーターラインを開発し、これを変異原処理することによって、種子発達には影響しないが助細胞胚乳融合のみ高頻度に欠損を示す変異体の分離を行った。

4. 研究成果

(1) 助細胞胚乳融合は重複受精のなかでも胚乳形成の起点になる中央細胞の受精によって誘導されることが示されていた。しかし、その開始シグナルとしては、中央細胞の受精に伴って発生する様々な刺激、例えば、花粉管の内容物との接触や物理的な衝撃である可能性の他、胚乳発達に伴う細胞のアイデンティティーの変化の可能性が考えられた。そこで、受精に依存せずに胚乳が発達を開始する *msi1* 変異体に対して、助細胞特異的に GFP を発現させる遺伝子を導入し、その助細胞胚乳融合を観察した。*msi1* 変異体の胚珠は成熟してから未受精の状態でも 2.5 日経つとほとんどが自律的な胚乳核の分裂を開始したが、それに伴って助細胞と細胞融合することがわかった。これにより、助細胞胚乳融合を開始するメカニズムが、中央細胞が受精によって胚乳へと分化していく発生過程の一部にあることが推測された。この成果は 2016 年に Cell Structure and Function 誌に報告した。助細胞胚乳融合の分子メカニズムを研究する上で、原因となる細胞の変化を突き止めた意義は大きい。今後、受精後の中央細胞や自律的な発達を始めた *msi1* 変異体の胚乳の遺伝子発現プロファイルを明らかにすることで、それら遺伝子の変異体の表現型解析から、助細胞胚乳融合を誘導する情報伝達系の因子が同定されると期待される。

(2) 助細胞胚乳融合は中央細胞の受精に強く依存した細胞融合現象であることから、細胞膜や細胞壁の制御、受精後の中央細胞が胚乳へと転換する細胞内シグナル伝達、そして、その他の生物にみられる細胞融合過程において重要な役割をはたす細胞骨格系の関与などが予測された。これら植物細胞において普遍的に存在する細胞機能が、助細胞胚乳融合においてどれほど貢献をしているのか解明するため、これらを阻害する薬剤を加えた液体培地中で受精後の胚珠を培養し、助細胞胚乳融合が誘導されなくなるかどうかを観察した。まず、緑藻類のクラミドモナスの接合突起に存在し、動物の骨格筋細胞の融合においても必須の役割をはたすアクチンの役割について、アクチン重合阻害剤の Latrunculin A 処理によって調べた。その結果、驚いたことに助細胞胚乳融合の率が低下することはなかった。したがって、助細胞胚乳融合はアクチンに依存しない細胞融合であることが示された。また、細胞膜の供給や細胞壁の合成と分解など、細胞膜同士の融合には重要と思われたタンパク質の分泌経路を、Brefeldin A の処理によって阻害した影響を調べたところ、助細胞胚乳融合の誘導率に変化はなかった。これは、胚珠が受精の前からあらかじめ細胞融合しやすいように、細胞膜や細胞壁を調節する因子を細胞表面に局在させている可能性を示唆する。続いて、助細胞胚乳融合において必要と考えられる中央細胞から胚乳への分化において、新規の遺伝子発現が要求されるかどうかを調べるため、転写阻害剤である Cordycepin および、翻訳阻害剤である Cycloheximide 処理の影響を観察した。その結果、これらの薬剤によって助細胞胚乳融合の誘導が強く妨げられることが明らかとなった。転写や翻訳の阻害は胚乳特異的に発現する遺伝子の供給を阻止するだけでなく、胚乳核の分裂の阻害などの広範な影響をもたらす。そこで、様々な有糸分裂阻害剤を用いて、助細胞胚乳融合にお

ける胚乳核分裂との因果関係を解析した。その結果、Oryzalin のような分裂中期で分裂を停止させるような薬剤では助細胞胚乳融合の誘導率に変化は見られなかったが、サイクリン依存キナーゼ (CDK) の阻害剤である Cordycepin 処理によって分裂前期での停止を誘導すると、助細胞胚乳融合が起きる率が低下した。したがって、助細胞胚乳融合を誘導するシグナルの一部は CDK の下流によって支配される細胞分裂機構を利用している可能性が示唆された。以上の結果は 2017 年に Journal of Cell Science 誌に報告した。これらの成果は前項の *msl* 変異体の解析で得られた成果と同様、今後の助細胞胚乳融合の制御因子の逆遺伝学的な解析に役立つだけでなく、シロイヌナズナ以外の植物においても応用が可能な細胞融合阻害技術への発展が期待される。

(3) 細胞膜同士の融合する膜局在タンパク質など、助細胞胚乳融合を直接進行させるような因子の同定を目指し、助細胞胚乳融合のみが特異的に誘導されなくなる変異体の分離を試みた。助細胞胚乳融合をきっかけに種子が致死となる植物の作出や、胚乳特異的に GFP を発現する植物を利用した変異体の選抜など、様々な実験系を模索した末、最終的に、助細胞胚乳融合が起きたかどうか種子の発達が進んだ状態でも判定できる植物の作出に成功した。この植物には助細胞特異的な *MYB98* のプロモーター制御下でミトコンドリ移行型の *mTFP1*、および *Histone H2B-tdTomato* をそれぞれ発現する遺伝子を導入してある。この種子に変異原処理を行い、2,201 個の M_1 個体から 8 個の変異体を分離した。未発表のこの成果は、今後の助細胞胚乳融合の実行因子の同定の研究において基盤となるものである。また、助細胞胚乳融合が受精後の種子においてどのような役割をはたすか、生理学的に解析するツールとしても重要となる。例えば、代謝の活発な助細胞からエネルギー物質やミトコンドリアなどが胚乳へと移行して再利用されることで種子発達が促進するのかどうか、それに助細胞胚乳融合が花粉管誘引停止において主要な役割をはたすののかなどの解析が可能になるだろう。また、研究期間中において当研究室が発見した現象の解析にも利用が可能かもしれない。それは花粉管の内容物が胚乳の内部に放出される現象で、われわれは DEAD-End とよんでいる。DEAD-End の原因として、現在、助細胞胚乳融合が起きて胚乳と一続きになった不活性化しつつある助細胞への、花粉管の放出を想定している。本研究で分離した助細胞胚乳融合欠損変異体において DEAD-End が起こるかどうか、野生株との比較解析によって明らかになると期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

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, 査読あり、131巻、2017、jcs204123

DOI: 10.1242/jcs.204123

Maruyama, D., Higashiyama, T., The end of temptation: the elimination of persistent synergid cell identity., Current Opinion in Plant Biology, 査読あり、34巻、2016、122-126

DOI: doi.org/10.1016/j.pbi.2016.10.011

Maruyama, D., Higashiyama, T., Cell fusion and nuclear fusion in plants, Seminars in Cell & Developmental Biology, 査読あり、60巻、2016、127-135

DOI: doi.org/10.1016/j.semcd.2016.07.024

Motomura K., Berger, F., Kawashima T., Kinoshita T., Higashiyama T., Maruyama D., Fertilization-independent cell-fusion between the synergid and central cell in the polycomb mutant., Cell Structure and Function, 査読あり、41巻、2015、121-125

DOI: doi.org/10.1247/csf.16010

〔学会発表〕(計 3件)

Maruyama, D., Susaki, D., Higashiyama, T., Kinoshita, T., Reception of pollen tube contents by the endosperm., 25th International Conference on Sexual Plant Reproduction, 2018年 6月

須崎 大地、東山 哲也、木下 哲、丸山 大輔 助細胞は精細胞の放出先の位置を制御する微小流路として機能する、日本植物学会第81回大会 2017年 9月

丸山大輔、東山哲也 植物システムを支える生命の分岐点、日本細胞生物学会、2016年6月

〔図書〕(計 1件)

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

<http://epigenome.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。