

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14741

研究課題名(和文)雌雄のクロストークによる花粉管誘引のON/OFFスイッチの解明

研究課題名(英文)The study on the molecular mechanism of pollen tube attraction and preventing polyspermy by male and female cell communication

研究代表者

水多 陽子(MIZUTA, YOKO)

名古屋大学・高等研究院(WPI)・特任助教

研究者番号：70645142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物の花のなかでは、花粉がめしへの先端に付着し、花粉管と呼ばれる管状の細胞を伸ばすことで受精が起き、種子が作られる。このように、花粉管が将来種子となる胚珠へたどり着く仕組みは花粉管ガイダンス(誘引)と呼ばれる。本研究では、花粉管が胚珠へと一対一誘引される仕組みを解明するため、イメージングと発現解析を組み合わせて研究を行った。細胞動態を生きたまま観察するため、カルシウムを可視化する蛍光タンパク質を発現するシロイヌナズナを作出し、蛍光顕微鏡で観察したところ、花粉管の伸長に伴い蛍光強度が変化する様子が観察された。また、大規模発現解析を行い、一対一誘引に関わる候補遺伝子を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉管ガイダンスが成功し、種子が正常に作られることは、種子繁殖を行う被子植物にとって必須のプロセスである。本研究では、雌雄組織のカルシウム動態を可視化可能なマーカーラインを作出した。また、花粉管の伸長に伴い、雌側組織のカルシウムイオンが変動することも明らかとなった。種子ができる仕組みを知ることが、米や麦、豆類といった、種子が食料となる作物で種子生産数を増加させるなど、農業分野においても重要である。本研究にて得られた成果は、今後、植物の生殖を知る上で重要なツールや知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In flowering plants, pollen adheres to the stigma and germinates pollen tube to fertilize and produce seeds under the reproductive process. Pollen tube guidance is a navigating system that is required for the successful sexual reproduction of plants. In order to elucidate the molecular mechanism of the pollen tube guidance in a one-to-one manner, imaging and expression analysis were performed. In order to observe cell dynamics in a flower, marker lines of *Arabidopsis thaliana* expressing the calcium indicator were developed. Changing fluorescence intensity were observed in these marker lines. Expression analysis using a next-generation sequencer suggested some candidate genes involved in the pollen tube guidance.

研究分野：植物生殖

キーワード：花粉管 受精 花粉管ガイダンス カルシウムイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

被子植物の有性生殖は、花粉がめしべに受粉することで始まる。花粉は植物のオスの配偶体であり、花粉がメスの組織であるめしべに受粉すると、花粉管と呼ばれる管状の細胞がめしべ内を伸長する。その花粉管の中を通過して、オスの配偶子である精細胞が、胚珠と呼ばれる組織内のメスの配偶体である胚のうへと運ばれ、卵細胞と中央細胞と受精することで種子が作られる。このように花粉管がめしべの中を伸長し、胚珠へと正確にたどり着く仕組みは花粉管ガイダンスと呼ばれ、胚珠の助細胞から分泌される花粉管誘引ペプチド (Okuda et al. 2009 Nature; Zhong et al. 2019 Science) や、花粉管の細胞膜に局在する受容体 (Takeuchi et al. 2016 Nature; Wang et al. 2016 Nature) などが同定され、花粉管が胚珠へとたどり着く分子メカニズムの一端が明らかとなってきた。その一方で、未解明の謎も存在する。モデル植物の一つであるアブラナ科のシロイヌナズナでは、通常、受粉後のめしべは数十～百本の花粉管と、50 個前後の胚珠を含んでいる。種子は胚珠と花粉管が 1 対 1 で受精することで形成されるが、できるだけ多くの胚珠が受精し、種子となるには、花粉管は一つの胚珠に群がらず、それぞれの胚珠に誘引されなければならない。実際に、シロイヌナズナではほとんどの胚珠で花粉管は一本ずつ誘引される。つまりシロイヌナズナのめしべには、胚珠に花粉管を一本だけ誘引する一方で、他の花粉管は拒否するという、二律背反の仕組みがあると考えられる (図 1)。

この誘引と拒否については、一本目の花粉管が受精すると胚珠内の花粉管誘引物質が急速に薄まり、二本目が誘引されなくなることが知られている (Maruyama et al. 2015 Cell)。このように、誘引と拒否を複数の雌雄細胞間で制御する仕組みを解明するには、多数の花粉管と胚珠を生きたまま、リアルタイムで解析できる方法が必要と考えた。しかし、一連の現象はめしべの奥深くで起きるため、解剖や固定による解析がほとんどであった。よって、本研究では胚珠などの雌性組織や花粉管のカルシウム動態をライブイメージングし、発現解析と組み合わせることで、胚珠と花粉管が一対一で受精する仕組みを解明することを目指した。

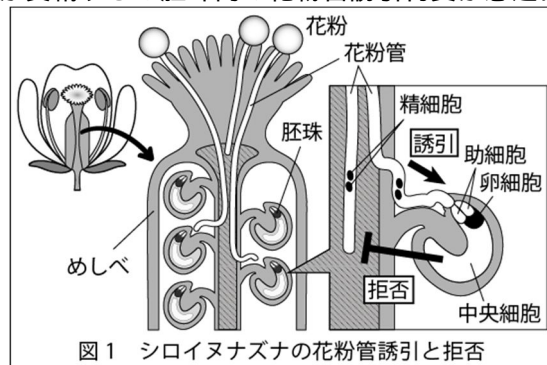


図 1 シロイヌナズナの花粉管誘引と拒否

## 2. 研究の目的

胚珠や花粉管のカルシウム動態について、蛍光顕微鏡および二光子顕微鏡を用いてライブイメージングし、胚珠と花粉管が一対一で受精する分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### アニリンブルー染色による 1 対 1 の受精に異常を示す変異体の表現型の解析

受粉後 6～18 時間のめしべを採取し、エタノールと酢酸を混合液に浸漬し固定した。その後、花粉管の可視化が可能なアニリンブルー色素を用いて、受粉後のめしべを染色した。植物材料には野生型と、一対一受精に異常を示す複数の変異体を用いた。撮影した画像は ImageJ を用いて解析を行った。

### カルシウム動態を観察可能なマーカーラインの整備と二光子励起顕微鏡を用いた花粉管と胚珠のライブイメージング

カルシウム動態を観察するため、花粉管と胚珠を可視化するマーカーラインの作出を行なった。カルシウムインジケータの一つである GCaMP6 を用いて、花粉管や胚珠、メス側組織など、各細胞組織特異的に発現するプロモーターを用いたプラスミドを構築した。次に、作製したプラスミドを、アグロバクテリウム法を用いてシロイヌナズナの野生型や一対一受精に異常を示す変異体に感染し、形質転換体を作出した。二光子励起顕微鏡はこれまでの研究で用いたもの (Mizuta et al. 2015 protoplasma) を使用し、作製したマーカーラインの細胞内のカルシウム動態を観察した。得られたデータは NIS-Elements (Nikon) と ImageJ にて解析を行った。

### 一対一受精に関する遺伝子の探索

花粉管と雌性組織から mRNA を抽出し、次世代シーケンサーによる遺伝子の発現解析を行った。植物材料には、野生型と一対一受精に異常を示す複数の変異体を用いて、花粉管や雌性組織など、上記ライブイメージングにて影響が示唆された細胞を単離した。それぞれの組織・細胞は 2 回以上サンプリングし、反復試行した。

## 4. 研究成果

受粉後 6~18 時間のめしべをサンプリングし、アニリンブルー色素を用いて花粉管を染色したところ、受粉後 6 時間の野生型で花粉管誘引が見られた胚珠は、全て花粉管を一本のみ誘引する一対一受精を示した。一方、一対一受精に異常を示す雌雄変異体では、受粉後 6 時間の時点で、一つの胚珠に複数の花粉管を誘引する様子が観察された。次に受粉後 18 時間のめしべを同様に観察したところ、野生型で複数の花粉管を誘引する胚珠の割合は 6%であった。一方、一対一受精に異常を示す雌雄変異体では、野生型よりも多く複数誘引を示す胚珠が観察された。これらの結果は、胚珠に花粉管を何本誘引するかを決めるタイミングは、受粉後の比較的早い段階で制御されていることを示している。一方で、花粉管と胚珠の様子をリアルタイムで解析するためには、生きたまま両者の形態や細胞動態を観察する必要がある。よって次に、花粉管とメス側組織のカルシウム動態を観察可能なマーカーラインを作成し、受粉後 1~10 時間の花粉管伸長と花粉管ガイダンスのライブイメージングを行なうこととした。

カルシウムインジケータである GCaMP6 発現するマーカーラインを作成し、T3 世代の観察を行ったところ、マーカー遺伝子をホモ接合で持つ個体でも、ラインによって蛍光強度に差が見られた。よって、観察に適切な蛍光を示すラインを選抜し、以降の実験に用いた。蛍光顕微鏡と二光子励起顕微鏡を用い、めしべ内の花粉管を観察したところ、非常に強い蛍光が観察された。めしべに付着させる前の成熟花粉の状態の時よりも、花粉がめしべに付着し、花粉管を発芽してからの蛍光強度の方が高かった。同じプロモーターを用いて、GFP などの蛍光タンパク質を発現させた場合はこのような蛍光強度の顕著な変化は見られなかったことから、花粉管がめしべ上で発芽した後は、花粉管内にカルシウムイオンが顕著に増加することが示唆された。また、様々なメス側組織や細胞で GCaMP6 を発現するめしべを用い、受粉後の様子を観察したところ、花粉管の伸長に伴い、蛍光強度が変化の様子が観察された。この変化は、花粉管を用いない場合には観察されなかったことから、観察されたカルシウムイオンの変動は花粉管と雌性組織の相互作用により引き起こされていることが示唆された。

GCaMP6 の蛍光強度の変化は、細胞内のカルシウム濃度が変化している、または、細胞内の GCaMP の発現量が変化していることを示唆していると考えられる。しかし、今回の方法では、光強度の変化がどちらに起因するのかわからないため、今後は MatryoshCaMP (Ast et al. 2017 Nature Commun.) など、カルシウムイオンの濃度を定量可能なインジケータを使用したマーカーラインを作成し、観察を行う必要があると考えられた。

次に、一対一受精に関与する遺伝子を探索するため、次世代シーケンサーを用いて大規模発現解析を行った。野生型、および一対一受精に異常を示す雌雄変異体について、花粉管や雌性組織の遺伝子発現を比較したところ、一部の遺伝子において、変異体で有意に発現が減少しているものが複数見つかった。花粉管をサンプルとして用いた場合は、雌性組織をサンプルとして用いた場合と比較して、発現が有意に減少している遺伝子の数が限られており、変異体において影響を受けている機能は限定的であることが示唆された。

今後は、これらの結果を論文にまとめるとともに、一対一受精に関わる候補遺伝子について、変異体を用いた遺伝子の機能解析や、表現型の観察を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamoto Nozomi, Pino Del Carpio Dunia, Hofmann Alexander, Mizuta Yoko, Kurihara Daisuke, Higashiyama Tetsuya, Uchida Naoyuki, Torii Keiko U., Colombo Lucia, Groth Georg, Simon R?diger	4. 巻 -
2. 論文標題 A peptide pair coordinates regular ovule initiation patterns with seed number and fruit size	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/736439	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Mizuta Y and Tsuda K	4. 巻 1
2. 論文標題 Three-dimensional multiphoton imaging of transcription factor by ClearSee. Plant Transcription Factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Springer protocols. Yamaguchi N (Ed.)	6. 最初と最後の頁 257-268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8657-6	査読の有無 無
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 Mizuta Yoko, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 131
2. 論文標題 Chemical signaling for pollen tube guidance at a glance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 208447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.208447	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水多陽子, 永原史織, 栗原大輔, 東山哲也
2. 発表標題 花粉管をベクターとした生殖細胞の遺伝子改変と植物生殖機構の解明
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会 シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 二光子励起顕微鏡で解く植物生殖の謎
3. 学会等名 第7回 植物イメージングの会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水多陽子、永原史織、東山哲也
2. 発表標題 花粉のゲノム編集
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水多陽子、永原史織、東山哲也
2. 発表標題 花粉のゲノム編集法
3. 学会等名 日本植物形態学会第30回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuta Y, Kurihara D, Nagahara S, Higashiyama T.
2. 発表標題 Two-photon imaging reveals spatio-temporal regulation on the one-to-one pollen tube guidance.
3. 学会等名 The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (ICSPR2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水多陽子、永原史織、皆川吉、東山哲也
2. 発表標題 花粉管をベクターとして植物を変える。
3. 学会等名 第4回農学中手の会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五郎丸輝明, 東山哲也, 水多陽子, 長江拓也
2. 発表標題 花粉管破裂制御におけるCa <sup>2+</sup> 動態と種認証機構の関係
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水多陽子, 栗原大輔, 東山 哲也
2. 発表標題 深部イメージングで探る植物生殖の謎
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水多 陽子, 栗原 大輔, 東山 哲也
2. 発表標題 二光子イメージングによる一対一受精機構の解明
3. 学会等名 日本植物形態学会第31回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水多陽子, 永原史織, 東山哲也
2. 発表標題 花粉管をベクターとした生殖細胞の遺伝子改変
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 植物ゲノム編集法	発明者 栗原(水多)陽子、 永原史織	権利者 東海国立大学機 構 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6614622号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----