

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03280

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) A study of plant polyspermy using Arabidopsis mutants defective 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・准教授

研究者番号：80724111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物では精細胞が花粉管によって胚珠へ輸送され、花粉管誘引物質を分泌する2つの助細胞の片方に精細胞を放出する。すると、2つある精細胞は卵細胞と中央細胞という2つの雌性配偶子と融合し、重複受精を達成する。一方で精細胞以外の花粉管内容物は雌性配偶子の内部へ進入しないと考えられていた。ところが、我々は花粉管内容物が受精した中央細胞にあたる初期胚乳へと進入する新規の受精現象、「DEAD-End」を発見した。本研究では、受精後胚珠で生じる現象「助細胞胚乳融合」がDEAD-Endにおいて必須であり、卵細胞の複数回の受精を防いでいるという仮説を立て遺伝学的アプローチから検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の生殖では、卵に対して多くの精子が同時にアクセスするため、雌雄の配偶子が1対1で受精できるように保証する多精拒否のメカニズムが存在する。被子植物にも同様の仕組みが存在することが示唆されていたが、実態は明らかとなっていない。本研究によって植物の多精拒否のメカニズムの一端が明らかになることで、生物の多様な生殖機構の理解に貢献するとともに、多精を利用した新規の育種技術の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In flowering plants, immotile two sperm cells are delivered by a pollen tube and finally released into one of the two synergid cells secreting pollen tube attractant peptides in the ovule. During pollen tube discharge, sperm nuclei enter the egg cell and the central cell by double fertilization, while the other pollen tube contents (PTC) remain outside of those female gametes. However, we found unusual PTC entry named DEAD-End in fertilized central cell through the observation of thousands of ovules. Non-receptive persistent synergid is absorbed by early endosperm in fertilized ovules (SE fusion). DEAD-End can be caused by reception of second pollen tube by the inactivating persistent synergid after SE fusion. We identified a key factor of SE fusion and demonstrated its prerequisite role in DEAD-End. These results indicate novel polyspermy blocking mechanism in flowering plants and provide molecular insight of unique cell fusion mechanism and morphological plasticity in plant cells.

研究分野：植物生殖学

キーワード：花粉管 助細胞 細胞融合 多精 被子植物 重複受精 卵細胞 胚乳

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 被子植物の有性生殖では、花粉管によって運ばれた2つの精細胞が胚珠の内部で卵細胞と中央細胞と融合する重複受精が起こり、種子が発達する。一方、精細胞以外の花粉管内容物は卵細胞や中央細胞の周りに取り残されるが、雌性配偶子の内部へと進入することはないと考えられていた。ところが、我々は花粉管内容物が受精した中央細胞にあたる初期胚乳へと進入する新規の受精現象、「DEAD-End」を発見した。

(2) 2015年、我々は受精後間もない胚珠で、花粉管を受け入れなかった方の助細胞が、受精後の中央細胞にあたる初期胚乳と細胞融合することによって吸収される「助細胞胚乳融合」という新現象を報告した(引用文献1)。この現象は、受精後の胚珠にとって必要がなくなった2本目以降の花管誘引を防ぐため、花粉管誘引物質を分泌する機能をはたす助細胞を速やかに排除するメカニズムと考えられてきたが、この仮説の実験的な証明はされていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究ではDEAD-Endが、助細胞胚乳融合によって胚乳の一部となった花粉管誘引能を失いつつある残存助細胞に対し、2本目の花粉管が進入して内容物を放出することで起こる現象ではないかという仮説を立てた。本研究はシロイヌナズナの助細胞胚乳融合欠損変異体をツールとすることで、この仮説を検証するとともに、被子植物に独自の多精拒否機構についての知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 助細胞胚乳融合に欠損を示すシロイヌナズナ変異体の原因遺伝子の同定

助細胞のミトコンドリアで蛍光タンパク質 mTFP1 を発現する株をもとに変異原処理することで、ホモ接合時に70%の胚珠で助細胞胚乳融合欠損を示す変異体を得ていた。この変異体を5回戻し交配した後に自家交配してホモ接合体を取得し、ゲノムDNAを次世代シーケンサーで解析することで、アミノ酸置換を引き起こす塩基多型を調べる。さらに、候補遺伝子の野生型遺伝子をクローニングして変異体に導入する相補実験、および、CRISPR/CAS9を用いた遺伝子破壊によって原因遺伝子の同定を試みた。

(2) DEAD-End の解析

2本目の花粉管誘引が頻繁に生じる変異体として、エチレンシグナルを制御する転写因子を欠損する *ein3 eil1* 二重変異体の存在が知られている。この変異体はDEAD-Endの頻度も上昇していることが予備実験から明らかになっていた。*ein3 eil1* 二重変異体と助細胞胚乳融合欠損変異体を交配して得られる三重変異体について、DEAD-Endの出現頻度を調べる遺伝学的相互作用解析を行った。

(3) 多精の解析

種子において黄色蛍光タンパク質 VENUS を蓄積する株と赤色蛍光タンパク質 mCherry を蓄積する株を用意する。それぞれの花粉を採取して同時に授粉を行い得られた種子から、多精によって両方のマーカー遺伝子を発現する三倍体種子がどれだけ出現するかを解析する。助細胞胚乳融合欠損変異体を対照サンプルと比較することで、DEAD-Endが多精の回避に対してはたす役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 助細胞胚乳融合に欠損を示すシロイヌナズナ変異体の原因遺伝子の同定。

変異体シリーズの中でも最も高頻度に助細胞胚乳融合欠損を示す系統の原因遺伝子を調べた。*synergid-endosperm fusion 17(sef17)*と名付けられたこの変異体のゲノムDNAを解析したところ、5番染色体に座上がることが明らかとなった。アミノ酸置換を引き起こす塩基多型から7つの候補遺伝子まで絞り込みを行った後、*sef17* ホモ接合体に形質転換を行う相補実験を行った。その結果、C末端側にRING-H2ドメインをもつE3ユビキチンリガーゼをコードする *CTL17* 遺伝子を導入したときのみ、助細胞胚乳融合欠損を回復させることが明らかとなった。また、*CTL17* を標的としたCRISPR/CAS9による遺伝子破壊によって、助細胞胚乳融合欠損率が上昇した。したがって、*CTL17* が *sef17* の原因遺伝子であったことが証明された。この成果は、重複受精以外の植物の発生過程で見つかった、最初の細胞融合因子の発見といえる。また、*ctl17* 変異体では残存助細胞は胚乳に吸収されることがなかったのにもかかわらず、助細胞不活性化異常の指標である表現型の2本目以降の花管の誘引率上昇が認められなかった。これは、現象の発見当初では予期されていなかった、助細胞不活性化以外の生理機能を、助細胞胚乳融合が持っていることを示唆する結果といえる。

(2) DEAD-End の解析

DEAD-End の出現率を解析するにあたり、雌側の植物として、野生株と *ein3 eil1* 二重変異体、*ctl17* 単独変異体、*ein3 eil1 ctl17* 三重変異体の 4 種類を用意した。*ein3 eil1* 二重変異は当研究室における植物栽培条件によって高い致死性を示したことから、材料の調製には予想外の困難が伴った。DEAD-End を検出するためのオス側のマーカーラインとしては、色素体 (プラスチド) に局在する蛍光タンパク質を発現する花粉管を用いた。*ctl17* 単独変異体は半顕性の性質を示しており、助細胞胚乳融合欠損が DEAD-End に与える影響を解析するためには、雌雄ともに *ctl17* 単独変異を導入する必要があったため、上記マーカーラインに *ctl17* 単独変異体を交配し、マーカー遺伝子と *ctl17* 変異体がともにホモ接合になった株も用意した。野生株と *ein3 eil1* 二重変異体の雌しべに *CTL17* 野生型の花粉管プラスチドマーカーの花粉を授粉したところ、*ein3 eil1* 二重変異体では DEAD-End 出現率が上昇することが確認された。これに対して、*ctl17* 単独変異体、および、*ein3 eil1 ctl17* 三重変異体の雌しべに、*ctl17* 変異体をもつ花粉管プラスチドマーカーの花粉を授粉したところ、これらの胚珠ではほとんど DEAD-End が生じないことが示された。これらの結果は、助細胞胚乳融合で初期胚乳とつながった残存助細胞に対して、2 本目の花粉管が内容物を放出したことで DEAD-End が引き起こされるという、当初の仮説を裏付けるものであった。

### (3)多精の解析

当初は多精を検出する方法として、同一のゲノム領域に挿入された独立 2 系統の T-DNA 挿入ラインを交配して得られた F1 植物を用い、薬剤耐性遺伝子を指標とした選抜を行う予定だった。しかし、先行して被子植物の多精を研究する海外のグループから、減数分裂による組換えで両方の T-DNA を含む花粉の出現が避けられないと指摘されたため、上記の異なる種子蛍光マーカー系を利用した実験系へと変更した。代わりに、黄色蛍光タンパク質 VENUS を蓄積するマーカー遺伝子、赤色蛍光タンパク質 mCherry を蓄積するマーカー遺伝子をもつ野生株および *ctl17* 単独変異体を雄側植物として用意した。まずはパイロット実験として、野生株と *ein3 eil1* 二重変異体について、野生株 2 種の花粉を用いた二重授粉実験を行い、多精種子の出現頻度を調べた。その結果、野生株を雌側に用いた場合の多精率が 0.031% (n = 12,889) だったのに対し、*ein3 eil1* 二重変異体は 0.143% (n = 4,210) と 3 倍ほど高い値を示すことがわかった。現在では、*ctl17* 単独変異体、*ein3 eil1 ctl17* 三重変異体の雌しべに対し、上記の種子蛍光マーカー遺伝子をもつ 2 種の *ctl17* 単独変異体の花粉を使った二重授粉が完了し、種子の採取を継続している。

### (4)まとめと展望

新たな因子が同定されたことによって、植物の細胞融合の分子機構解明に向けた足掛かりができた。特に、得られた因子がコピキチンリガーゼであったことから、その基質タンパク質がさらなる融合機構を解き明かす鍵となると期待される。新しく見出した受精現象 DEAD-End は、今回の結果によって、助細胞胚乳融合に依存して起きる現象であることが示された。DEAD-End が被子植物の独自の多精拒否機構である可能性については、あと一歩で証明できるところまでたどり着いた。助細胞胚乳融合の欠損を通じた DEAD-End 阻害の条件で多精率の有意な上昇がみられた場合、当初の仮説支持される。助細胞胚乳融合自体は現在のところシロイヌナズナでしか詳細な報告はない。しかし、ナズナやコムギでは同様の形態変化を示すような報告もあり、他の植物においても保存されている可能性がある。今後は他の植物でも DEAD-End が起きているかどうかを含め、解析が進むと思われる。他の作物においても、助細胞胚乳融合の抑制を通じて多精が誘導できれば、遺伝的に異なる 2 種の父親のゲノムを引き継いだ次世代を容易に作出することが可能になり、新たな育種法の開発につながると期待される。

### <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. Rapid Elimination of the Persistent Synergid through a Cell Fusion Mechanism. *Cell*, 161, 907-918. DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0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
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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