

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06728

研究課題名(和文)花粉形成過程における新規のオルガネラ授受・分解システムの解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel organelle transference and degradation during the pollen formation process

研究代表者

永田 典子(NAGATA, Noriko)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：40311352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：花粉形成過程でみられるオルガネラ授受・分解現象に着目した。電子顕微鏡を用いて詳細な広域・三次元画像を取得し、以下の成果を得た。

1) 雄原/精細胞周囲へのリピッドボディの集積と新規のマイクロリポファジー現象を見出した。2) スポロポレニン生合成欠損変異体の解析により、タペータムからスポロポレニンが放出されるプロセスの詳細と、その機能を示した。3) タペータム内の脂質系オルガネラからポーレンコートが形成されるプロセスを捉えた。4) タペータムにおいて、小胞体膜と色素体包膜に密接な接触があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の花粉形成過程には細胞をまたいだ種々のオルガネラ授受・分解現象が存在し、これは動物には見られないユニークなものである。本研究は、植物に秘められた高度なオルガネラ制御機構の実体に迫るものである。さらに本研究は、広域及び三次元の電子顕微鏡技法を駆使することにより、細胞をまたぐような広範囲での現象を捉えることに成功した。これは異分野にも応用可能な本技術の有効性を示すものといえる。

研究成果の概要(英文)：We focused on organelle transference and degradation during the pollen formation process. Detailed wide-range and three-dimensional images were obtained using electron microscopy, and the following results were obtained.

1) We found accumulation of lipid bodies around generative/sperm cells and a novel microlipophagy; 2) Using sporopollenin biosynthesis-deficient mutants, we showed the details of the process of sporopollenin release from tapetum and its function; 3) We captured the process of pollen coat formation from lipidic organelles within tapetum; 4) We found that in tapetum, there is close contact between the endoplasmic reticulum membrane and the plastid envelope.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：電子顕微鏡 花粉 タペータム 雄原細胞 精細胞 オルガネラ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1980~1990年代にかけて、Mogensen や Russell は、植物の花粉精細胞からミトコンドリアが取り除かれるというモデルを提唱した(図1)。しかし、それらの報告では限られた観察像しか示されず、この時点では想像の域を出ないモデル図が提示されたに過ぎなかった。この現象は当時、ミトコンドリアや色素体の母性遺伝を説明づけるものとなると期待された。しかしその後、母性遺伝のしくみは、物理的に精細胞からオルガネラを排除することではなく、オルガネラ内のDNAを選択的に分解することにあるとの見解が主流となった(Nagata et al. 1999)。そのこともあり、この精細胞からのミトコンドリア排出に関する研究は進展することなく、ほぼ放置されていた状態であった。しかし、細胞をまたいでオルガネラを授受・分解するというこの特異な現象が真実であるならば、そのしくみにはおそらく存在意義があるはずである。近年、細胞内のオルガネラ分解システムに注目が集まっているが、このような細胞をまたいで行われるオルガネラ分解という現象は、他に報告の例がほとんどない。

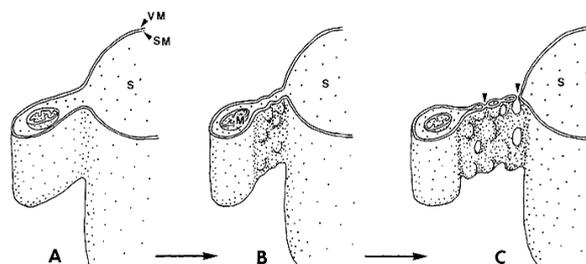


図1. 精細胞から栄養細胞にミトコンドリアが排出されることを描いた過去のモデル図 (Mogensen and Rusche 1985 より引用)

細胞をまたいでオルガネラを授受・分解するという観点で言うならば、葯タペータム細胞から、花粉壁が形成されるプロセスもまた、ユニークであり興味深い(図2)。花粉の固い殻状の部分はエキシンと呼ばれ、その主成分であるスポロポレニンはタペータム細胞から花粉(雄性配偶体)に供給される。エキシンの隙間に沈着するポーレンコートは、花粉の接着・吸水や細胞認識に重要な役目を果たすが、そのポーレンコートもまたタペータム細胞から供給される。タペータム内のエライオプラスト(色素体の一形態)とタペトソーム(リピッドボディの一形態)が、何らかのしくみによって融合し、タペータムから放出されるはずだが、そのプロセスについては未だほとんどわかっていない。

以上のように、植物の花粉形成過程には、細胞をまたいだオルガネラ授受・分解の現象が存在する。これらは通常の細胞生物学的知見からは考えにくいユニークな現象であり、生物には未だ知られていない高度なオルガネラ制御機構が存在することを予感させるものである。

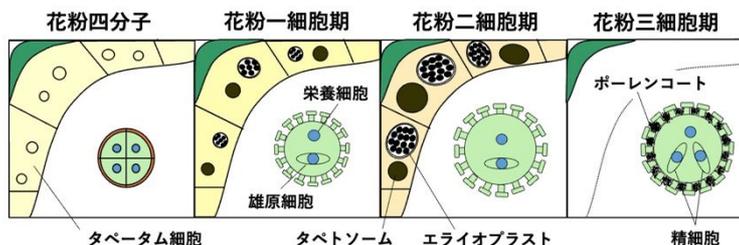


図2. 花粉形成過程の模式図: タペータム細胞から花粉壁(エキシン及びポーレンコート)が形成される

2. 研究の目的

本研究では、花粉形成過程にみられる、細胞をまたいでおこるオルガネラ授受・分解という新しいオルガネラ制御機構が実在することを示し、この現象のメカニズムを明らかにするとともに、この現象の存在意義を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

透過電子顕微鏡(TEM)は、高解像だが広い面積を撮影することが不得手であり、画像取得に時間がかかる欠点をもつ。そこで、全自動で広域TEM画像を得る、簡便かつ高速なシステムが開発された(豊岡ら 2014)。近年、走査電子顕微鏡(SEM)を用いて、TEMのような切片画像を取得する技術が台頭してきた。連続切片SEM法(アレイトモグラフィ法)は、TEMの試料作製時の困難を軽減しシワや欠落のない連続像を得る新手法である。本研究では、これらの最新のTEM法及びSEM法を用いて、大量の電子顕微鏡画像を得るところに独自性がある。数枚の写真を示すだけの過去の報告とは異なり、統計学的に処理できる画像データを取得することで、データの信頼性を増し、現象を詳細・確実に示すことができる。さらに種々の画像解析も行い、連続切片の三次元構築法を取り入れ、オルガネラ授受・分解の現場を時空間的に正確に捉える。また、突然変異体を利用した観察により、本現象に関わる因子を探索し、オルガネラ授受・分解のメカニズムの実体に迫る。

4. 研究成果

(1) 精細胞周囲へのリピッドボディの集積とマイクロリポファジー

花粉の成熟過程では、雄性配偶体内の様々なオルガネラがその分布や機能を変化させる。二細胞期の花粉では、雄原細胞の周囲に栄養細胞のリピッドボディが並び、三細胞期の花粉では、精

細胞の周囲を液胞が取り囲むことを見出した。雄原/精細胞の周囲においてオルガネラがどのように置換するのかを明らかにするため、連続切片 SEM 法による詳細な観察と三次元再構築を行ったところ、リピッドボディに接着した小さな液胞が、リピッドボディの一部を取り込みながら分解し始めることが示された(図3)。この観察結果から、花粉成熟過程においては、マイクロオートファジーによりリピッドボディが液胞に分解されていることが明らかとなった。また、オートファジー関連遺伝子の1つを欠失した *atg2-1* 変異体を観察したところ、野生株と比較して精細胞の周囲に集積する液胞はまばらであった。ATG2 の欠損は、オルガネラ間の接着には影響しないが、脂質分解の阻害や遅延を引き起こす可能性が示唆された。今回新たに花粉内で見つかったこのマイクロリポファジーの現象は、これまで知られていなかった細胞内分解機構の存在を示唆するものとなった(主要な発表論文:Akiita et al. 2021)。

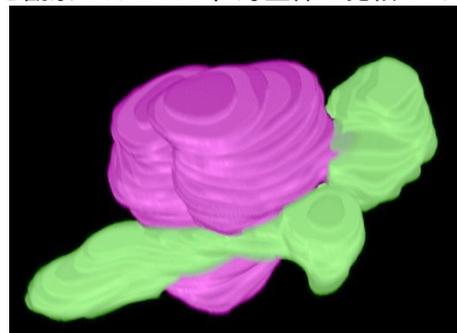


図3. 三次元再構築像: 雄原/精細胞の周囲において見られる、リピッドボディ(マゼンタ)を分解する液胞(緑)(マイクロリポファジー)

雄原/精細胞の周囲をリピッドボディや液胞が取り囲む理由は現時点で不明である。しかし、上述した「精細胞からのミトコンドリア排出」に引き続いて起こる現象であると想定しており、ミトコンドリア(もしくはその分解産物)が雄原/精細胞から排出され、最終的には雄原/精細胞を取り囲む液胞によってそれらが分解されるものと考えている。

(2) 葯タペータムからのスポロポレニンの放出とエキシン形成

花粉壁(エキシン)は、花粉を環境ストレスから保護する役割を果たし、タペータムで生合成されるスポロポレニン前駆体から作られる。スポロポレニンの生合成に関与するいくつかの突然変異体はエキシンを欠損することが知られており、本研究ではその1つである *cyp704b1* に着目した。*cyp704b1* 変異体は、正常なエキシンを持たなかったが、エキシンが存在すべき場所に異常な高電子密度の顆粒が局在しており、その輸送においても異常を示すことが示唆された(図4)。一方で、タペータム細胞中の脂質系オルガネラやポーレンコートは正常な形態を示し、ポーレンコートは稔性において十分に機能することが示された。このことから、タペータム細胞からスポロポレニン前駆体が放出されるプロセスと、脂質系オルガネラからポーレンコートが生じるプロセスは、同じ細胞をまたぐオルガネラ授受のように思えるが、それぞれは独立しており、別の機能を果たすことが明確となった(主要な発表論文: Kobayashi et al. 2021)。

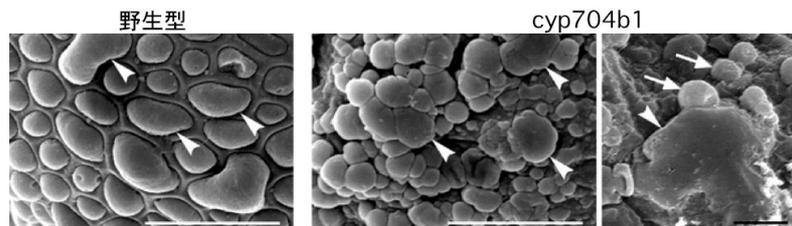


図4. SEM 観察像: スポロポレニン生合成異常変異体 (*cyp704b1*) では、エキシン(矢印)の形成が異常だが、ポーレンコート(矢頭)は正常に作られる

(3) 葯タペータムの脂質系オルガネラの放出とポーレンコート形成

葯タペータム内の脂質系オルガネラ(タペトソームとエライオプラスト)が葯内にて速やかに融合した後にはポーレンコートを形成するプロセスを、電子顕微鏡レベルで捉えることに成功した(未発表)。

(4) 葯内における小胞体と色素体の相互作用と脂質輸送

葯タペータムのエライオプラストは原色素体から分化するが、小胞体で生合成されるはずのステロールエステルがどのように色素体に運び込まれるのか、具体的なメカニズムは不明だった。このたび、小胞体膜と色素体包膜に密接な接触があることや、その脂質輸送の道筋と思われる内膜構造を見出すことに成功した(未発表)。

<引用文献>

Mogensen HL, Rusche ML (1985) Quantitative analysis of barley sperm: occurrence and mechanism of cytoplasm and organelle reduction and the question of sperm dimorphism. *Protoplasma* 128, 1-13

Nagata N, Saito C, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T (1999) The selective increase or decrease of organellar DNA in generative cells just after pollen mitosis one controls cytoplasmic inheritance. *Planta* 209, 53-65

豊岡公德、佐藤繭子、朽名夏磨、永田典子 (2014) 高圧凍結技法を取り入れた広域透過電顕像自動取得システムの開発とその応用, *Plant Morphology* 26, 3-8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Uchiyama Takeshi, Saito Shunya, Yamanashi Taro, Kato Megumi, Takebayashi Kosuke, Hamamoto Shin, Tsujii Masaru, Takagi Tomoko, Nagata Noriko et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 The HKT1 Na ⁺ transporter protects plant fertility by decreasing Na ⁺ content in stamen filaments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adg5495	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 Yoshihara Akiko, Kobayashi Keiko, Nagata Noriko, Fujii Sho, Wada Hajime, Kobayashi Koichi	4. 巻 194
2. 論文標題 Anionic lipids facilitate membrane development and protochlorophyllide biosynthesis in etioplasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1692 ~ 1704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiad604	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 Suetsugu Kenji, Sugita Ryohei, Yoshihara Akiko, Okada Hidehito, Akita Kae, Nagata Noriko, Tanoi Keitaro, Kobayashi Koichi	4. 巻 238
2. 論文標題 Aerial roots of the leafless epiphytic orchid Taeniophyllum are specialized for performing crassulacean acid metabolism photosynthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 932 ~ 937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.18812	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 T. Honda, M. Kobayashi, K. Kobayashi, K. Akita, N. Nagata	4. 巻 30
2. 論文標題 An improved fixative method for transmission electron microscopy observation of organelles in Arabidopsis seeds.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Jpn. Women 's Univ. Fac. Sci.	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Fukushima Saki, Akita Kae, Takagi Tomoko, Kobayashi Keiko, Moritoki Nobuko, Sugaya Hajime, Arimura Shin-ichi, Kuroiwa Haruko, Kuroiwa Tsuneyoshi, Nagata Noriko	4. 巻 259
2. 論文標題 Existence of giant mitochondria-containing sheet structures lacking cristae and matrix in the etiolated cotyledon of <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 731 ~ 742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-021-01696-0	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 Yoshihara Akiko, Nagata Noriko, Wada Hajime, Kobayashi Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Plastid Anionic Lipids Are Essential for the Development of Both Photosynthetic and Non-Photosynthetic Organs in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4860 ~ 4860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094860	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 Kuroiwa Tsuneyoshi, Yagisawa Fumi, Fujiwara Takayuki, Misumi Osami, Nagata Noriko, Imoto Yuuta, Yoshida Yamato, Mogi Yuko, Miyagishima Shin-ya, Kuroiwa Haruko	4. 巻 86
2. 論文標題 Smooth Loop-Like Mitochondrial Nucleus in the Primitive Red Alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> Revealed by Drying Treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 89 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.86.89	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 Kobayashi Keiko, Akita Kae, Suzuki Masashi, Ohta Daisaku, Nagata Noriko	4. 巻 38
2. 論文標題 Fertile <i>Arabidopsis cyp704b1</i> mutant, defective in sporopollenin biosynthesis, has a normal pollen coat and lipidic organelles in the tapetum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.1214b	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 Endo Kaichiro, Abe Masato, Kawanishi Nobumasa, Jimbo Haruhiko, Kobayashi Koichi, Suzuki Tomoko, Nagata Noriko, Miyoshi Hideto, Wada Hajime	4. 巻 1867
2. 論文標題 Crucial importance of length of fatty-acyl chains bound to the sn-2 position of phosphatidylglycerol for growth and photosynthesis of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 159158 ~ 159158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2022.159158	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 Akita Kae, Takagi Tomoko, Kobayashi Keiko, Kuchitsu Kazuyuki, Kuroiwa Tsuneyoshi, Nagata Noriko	4. 巻 258
2. 論文標題 Ultrastructural characterization of microlipophagy induced by the interaction of vacuoles and lipid bodies around generative and sperm cells in <i>Arabidopsis</i> pollen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 129 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-020-01557-2	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 Kuroiwa Tsuneyoshi, Yagisawa Fumi, Fujiwara Takayuki, Inui Yayoi, M. Matsunaga Tomoko, Kato Shoichi, Matsunaga Sachihiko, Nagata Noriko, Imoto Yuuta, Kuroiwa Haruko	4. 巻 85
2. 論文標題 Mitotic Karyotype of the Primitive Red Alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> 10D	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.85.107	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 Kuroiwa Tsuneyoshi, Ohnuma Mio, Imoto Yuuta, Yagisawa Fumi, Misumi Osami, Nagata Noriko, Kuroiwa Haruko	4. 巻 257
2. 論文標題 Evolutionary significance of the ring-like plastid nucleus in the primitive red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> as revealed by drying	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 1069 ~ 1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-020-01496-y	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 Nagata Noriko	4. 巻 32
2. 論文標題 The world of plant organelles opened by serial section SEM	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 11～17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.32.11	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 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林啓子、秋田佳恵、鈴木優志、島田貴士、永田典子
2. 発表標題 ステロール過剰蓄積変異体における花粉形成過程の超微構造学的解析
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023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
---------	---------