

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21432

研究課題名（和文）精細胞を覆う機能未知の膜構造の崩壊制御に着目した植物受精メカニズムの解明

研究課題名（英文）Unraveling the fertilization mechanism focusing on a removal of the of an unusual membrane enclosing sperm cells in flowering plants.

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） 4,100,000円

研究成果の概要（和文）：被子植物の精細胞は花粉管と呼ばれる細い管状構造の内部を通り、胚珠の中にある卵細胞まで届けられることで受精を行う。花粉管伸長の間、精細胞は2つ1組が内部形質膜とよばれる栄養細胞の単膜で花粉管栄養核とつながった雄性生殖単位として共に行動する。花粉管から精細胞が胚珠に放出された瞬間に内部形質膜が崩壊して細胞膜を露出させることが受精において必須の過程と推測されていたが、その動態や分子機構は不明だった。本研究ではシロイヌナズナを用いたライブイメージング系と遺伝学や阻害剤を用いたアプローチによって、内部形質膜動態を観察するとともに、膜崩壊に必要な因子を複数同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの生活を支える穀物や果実を収穫するためには多くの場合受精が必要となる。また、有用なゲノムを組み合わせることで臨んだ形質の植物を作出する際も植物の受精は欠かせない。精細胞を覆う内部形質膜は適切なタイミングで崩壊することによって重複受精に必須の役割を果たすと考えられている。本研究によって明らかとなった花粉管放出時の精細胞が示した内部形質膜崩壊の動態や、崩壊に必要な因子の知見は、重複受精を理解するための基礎的な知識として植物発生学における普遍的な重要性をもつ。

研究成果の概要（英文）：In flowering plants, sperm cells are delivered to the egg cell within the ovule through a narrow tubular structure called the pollen tube, facilitating fertilization. During pollen-tube growth, a pair of sperm cells are enclosed by the Inner Vegetative Plasma Membrane (IVPM) and connected with the pollen tube vegetative nucleus to form a functional assemblage termed Male Germ Unit (MGU). It has been hypothesized that immediate IVPM removal from the sperm cells plays a crucial role in double fertilization via exposing the surface of sperm cell upon pollen tube discharge into the ovule. However, the dynamics and molecular mechanisms underlying this process were not well understood. In this study, we successfully observed the dynamics of the IVPM removal and identified several factors necessary for its IVPM fragmentation using a combination of live imaging techniques in *Arabidopsis thaliana*, genetic approaches, and the use of inhibitors.

研究分野：植物生殖学

キーワード：シロイヌナズナ 花粉管 精細胞 内部形質膜 栄養核

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

被子植物の精細胞は花粉管と呼ばれる細い管状構造の内部を通り、胚珠の中にある卵細胞まで届けられることで受精を行う。花粉管伸長の間、精細胞は2つ1組が内部形質膜とよばれる栄養細胞の単膜花粉管栄養核とつながった雄性生殖単位として共に行動する。これまで、シロイヌナズナの重複受精のダイナミクスの *semi-in vivo* 受精系を用いた観察から、胚珠に到達した花粉管から放出された精細胞は、すぐに卵細胞と中央細胞の境界面まで運ばれ、その場で受精をすることが示された。この観察から、放出された精細胞から速やかに内部形質膜が崩壊し、精細胞膜表面を露出させることが、スムーズな雌雄の配偶子相互作用において重要であり、重複受精において必須の役割を果たすことが推測されていた。しかし、その内部形質膜崩壊の動態については解明されておらず、崩壊の促進に必要なシグナル分子も判明していなかった。

2. 研究の目的

本研究では、重複受精時における内部形質膜の動態を明らかにするとともに、内部形質膜の崩壊に必要なシグナル分子の解明を目指した。特に、内部形質膜崩壊シグナルの候補として、胚珠内に精細胞が放出された瞬間に発生するカルシウム濃度の一過的上昇(カルシウムスパイク)や卵細胞から分泌されるペプチドの役割を検証することにした。

3. 研究の方法

重複受精時における内部形質膜の動態を明らかにするため、内部形質膜に局在するシグナルを融合した蛍光タンパク質を発現するレポーター系を作製し、*semi-in vivo* 受精系による観察を行った。花粉管の放出と内部形質膜崩壊のタイミングはほぼ同時に起こることが推測されることから、それぞれのイベントを制御するシグナル経路も協約している可能性がある。そこで、細胞壁の状態をモニタして花粉管の放出を制御している細胞膜局在性の受容体キナーゼ ANX1 と ANX2 を欠損する二重変異体において、内部形質膜崩壊の様子を観察した。また、内部形質膜の破れを高感度に検出するマーカーライン(内部形質膜インテグリティマーカー)を確立し、崩壊の促進に必要なシグナル分子の探索を行った。具体的にはカルシウム欠乏条件における精細胞の放出誘導で、内部形質膜の安定性を検証した。また、卵細胞から分泌されるペプチドをコードする遺伝子の変異体の雌しべに対して内部形質膜インテグリティマーカーの花粉を掛け合わせ、精細胞放出後にも内部形質膜が安定しているかどうか調べた。

4. 研究成果

受精直前における内部形質膜崩壊の動態を調べるために、内部形質膜マーカーを検討したところ、2013年に海外のグループが報告していたマウス由来 Lyn タンパク質の24アミノ酸残基を蒸した緑色蛍光タンパク質、Lyn24-mNeonGreen を発現させることで、明るく内部形質膜がモニタできるシロイヌナズナが得られた。このマーカーラインを用いた *semi-in vivo* 受精系による観察を行ったところ、胚珠内で精細胞の放出が起きてから1分以内に素早く内部形質膜が精細胞から剥がれることが明らかとなった。また、Lyn24-mNeonGreen でラベルした *anx1 anx2* 二重変異体を観察したところ、培地上で自動的に起こる早期の花粉管破裂により、内部形質膜崩壊が誘導されることがわかった。この結果は、花粉管内容物放出を制御するシグナル系と内部形質膜崩壊の誘導を制御するシグナル系の切り分けには貢献しなかったものの、雌側のシグナルがない状態でも花粉管側の自律的なイベントとして内部形質膜崩壊を誘導できることが明らかとなった。また、*anx1 anx2* 二重変異体の花粉管はサイトゾルの漏出が起きた一方で、精細胞が培地中へだなかった場合、内部形質膜崩壊を示さないこともわかった。これは、精細胞が細胞外環境に触れることによって内部形質膜崩壊が進むことを示唆している。以上の結果は2023年の *Frontiers in Plant Biology* に論文として報告した。また、Lyn24-mNeonGreen は内部形質膜のアイデンティティ確立をモニタする材料としても優れており、精細胞の輸送について解析した2021年の *Nature Communications* の論文でも活用された。

次に、我々は基礎生物学研究所の海老根博士から分与された、内部形質膜と精細胞の間に蓄積する多糖分解酵素を蛍光タンパク質でラベルした融合タンパク質をコードする遺伝子を観察し、これが内部形質膜崩壊による漏出に伴ったシグナル低下を指標に内部形質膜の完全性(インテグリティ)を感度良くモニタできるレポーターとして機能することを見出した。この内部形質膜インテグリティマーカーを利用してまず、カルシウムが内部形質膜の安定性に影響するシグナルかどうかを調べた。その結果、カルシウム欠乏培地に精細胞が放出されたときに、内部形質膜が無傷のまま単離できる率が上昇することが見出された。無傷の精細胞を顕微操作によってカルシウム添加培地へと移すと、培地に放出された瞬間に内部形質膜崩壊が誘導されることがわかった。したがって、少なくとも花粉管の外へと放出された精細胞は細胞外環境における高濃度のカルシウムイオンへの曝露によって、内部形質膜崩壊を引き起こすことが示唆された。さら

にシロイヌナズナの卵細胞分泌ペプチドの変異体の雌しべに内部形質膜インテグリティマーカ-の花粉を受粉後、胚珠における蛍光を観察した。その結果、この変異体では 20%程度の頻度で内部形質膜の崩壊が抑えられることがわかった。これにより、卵細胞から分泌されるシグナルペプチドが内部形質膜崩壊を誘導する可能性を見出した。この結果より、シロイヌナズナの内部形質膜崩壊は、精細胞の放出とともに発生するカルシウムスパイクに加え、卵細胞分泌ペプチドの作用によっても、時空間的に厳密に制御された仕組みを用いていることが示唆された。この仮説については現在論文の投稿準備中である。本研究を実施するにあたり、当研究室では青色光の照射による花粉管破裂の誘導という現象を見出した。この成果は 2024 年の Plant and Cell Physiology に論文として報告した。この青色光の照射による花粉管破裂誘導を応用することで、放出直後の精細胞動態を高い時間解像度で観察することができるようになり、今まで見過ごされてきた被子植物の精細胞の活性化という現象の新しい側面が明らかになった。

放出直後の精細胞の膜動態変化は研究開始当初よりも迅速で、どのような実行因子によって制御されているのかについてはまだわかっていない。また、カルシウムや卵細胞由来のペプチドがどのようにそれら実行因子を活性化するかなど、解明すべき課題が未だ多く残されている。本研究の成果は当研究室の杉直也博士の科研費若手研究 (2023~2025 年度)「精細胞を包む特殊膜構造の無傷単離系を基盤とした膜局在因子の解析」および、日本学術振興会特別研究員の研究課題 (2024~2026 年度)「精細胞を包む生体膜 IVPM の選択的崩壊の理解を通じた重複受精機構の研究」へと引き継がれた。内部形質膜崩壊を中心とする精細胞活性化の研究が進展することにより、今後、被子植物の重複受精の分子メカニズムに対する理解が深まるだろう。本研究期間中に公開された内部形質膜局在を示すトウモロコシ由来のホスホリパーゼ NLD は、機能欠損によって重複受精の異常とともに次世代に半数体を出現させる。内部形質膜の重複受精における役割の解明と、その機能異常を人為的に利用する知見は、近年利用が広まりつつある半数体誘導技術の発展へつながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sugi Naoya, Izumi Rie, Tomomi Shun, Susaki Daichi, Kinoshita Tetsu, Maruyama Daisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Removal of the endoplasmic membrane upon sperm cell activation after pollen tube discharge	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1116289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1116289	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 Motomura Kazuki, Sugi Naoya, Takeda Atsushi, Yamaoka Shohei, Maruyama Daisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Possible molecular mechanisms of persistent pollen tube growth without de novo transcription	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1020306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.1020306	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 Motomura Kazuki, Maruyama Daisuke	4. 巻 34
2. 論文標題 シロイヌナズナ花粉管の核排除とそれを利用した花粉管伸長制御能力の発見までの道のり	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 69 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.34.69	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 Sugi Naoya, Maruyama Daisuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Exploring Novel Polytubey Reproduction Pathways Utilizing Cumulative Genetic Tools	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 454 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad021	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 杉直也、丸山大輔	4. 巻 32
2. 論文標題 内部形質膜から見る植物受精	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 318
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 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 2331
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 Goto Chieko, Tamura Kentaro, Nishimaki Satsuki, Maruyama Daisuke, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 71
2. 論文標題 The nuclear envelope protein KAKU4 determines the migration order of the vegetative nucleus and sperm cells in pollen tubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 6273 ~ 6281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa367	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 Sugi Naoya, Susaki Daichi, Mizuta Yoko, Kinoshita Tetsu, Maruyama Daisuke	4. 巻 65
2. 論文標題 Letter to the Editor: Blue Light Irradiation Induces Pollen Tube Rupture in Various Flowering Plants	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 704 ~ 707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcae018	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 Motomura Kazuki, Tsuchi Haruna, Komojiri Marin, Matsumoto Ayumi, Sugi Naoya, Susaki Daichi, Takeda Atsushi, Kinoshita Tetsu, Maruyama Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Microtubules ensure transport of vegetative nuclei and sperm cells by fine-tuning their home positions	5. 発行年 2024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) 10.1101/2024.01.31.578224	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 Susaki Daichi, Izumi Rie, Oi Takao, Takeuchi Hidenori, Shin Ji Min, Sugi Naoya, Kinoshita Tetsu, Higashiyama Tetsuya, Kawashima Tomokazu, Maruyama Daisuke	4. 巻 35
2. 論文標題 F-actin regulates the polarized secretion of pollen tube attractants in Arabidopsis synergid cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1222 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac371	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 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山大輔
2. 発表標題 シロイヌナズナの非配偶子性の細胞融合の意義を理解する
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山大輔
2. 発表標題 植物受精の動態をライブイメージングで観察する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉直也、木下哲、丸山大輔
2. 発表標題 Semi dry花粉管伸長系を基盤とした環境ストレス依存的な細胞内驚動の発見
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 元村一基、武内秀憲、野田口理孝、土春菜、竹田篤史、木下哲、東山哲也、丸山大輔
2. 発表標題 シロイヌナズナ花粉管は無核の状態でも正常に伸長して胚珠へ到達する能力を保持している
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>植物の精細胞が「一皮むけた」瞬間を撮影 ~ 重複受精の精巧な仕組みの一端を明らかに ~ https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2022/20230131maruyama.html</p> <p>花粉管は核がなくても胚珠に辿り着く ~ 世界で初めて核を持たない花粉管の作出に成功 ~ https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2021/202104maruyama_NatCommun.html</p> <p>植物の精細胞放出を制御する簡便な方法を開発 &#12316; 重複受精における精細胞活性化機構の解明に期待&#12316;; https://www.yokohama-cu.ac.jp/res-portal/news/2023/20240318sugi.html</p>
--

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
研究協力者	元村 一基 (Motomura Kazuki) (50844049)	立命館大学・総合科学技術研究機構・准教授 (34315)	

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			
米国	ケンタッキー大学			