

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770062

研究課題名(和文) 雄性配偶子の細胞膜分子構造が制御する重複受精機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the double fertilization mechanism controlled by sperm membrane structures

研究代表者

森 稔幸 (Mori, Toshiyuki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：00462739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、被子植物に特有の重複受精における配偶子間相互作用を分子細胞生物学的に解析することを目的としており、特に雄性配偶子で同定された膜タンパク質の分子機能解明を目標としてきた。テッポウユリの雄性配偶子細胞(雄原細胞)で発現する遺伝子を網羅的に解析したRNAseqデータベースを基に、同細胞の膜タンパク質プロテオーム解析をおこなったところ、新規の膜タンパク質分子LGM1の同定に成功した。LGM1は4つの膜貫通ドメインを持つ低分子タンパク質であり、被子植物のみならず藻類、コケ植物、小葉類にも保存されていることが分かった。分子細胞生物学的解析の結果、LGM1は雄性配偶子特異的な発現を示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze gamete interaction during double fertilization specific to flowering plants using molecular cell biological strategies. Especially, this study focused on elucidating the molecular functions of transmembrane proteins identified in male gametes. When a proteomics analysis of Lilium generative cell membrane was performed based on the RNA sequencing data, a novel transmembrane protein named LGM1 was newly detected. LGM1 proved to be a small molecule, which possesses four transmembrane domains and conserved in algae, moss and lycophytes. As a result of molecular cytological analyses of LGM1, it was found that LGM1 is expressed specifically in male gametes.

研究分野：植物生理学

キーワード：重複受精 配偶子 有性生殖 花粉 被子植物 GCS1 GEX2 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

被子植物を中心とする陸上植物は、食糧となる農作物から森林資源に至るまで我々人類の生活を支える重要な資源となっている。遺伝的多様性に富んだ植物資源を維持するためには、それを保証する有性生殖の仕組みの理解が重要な鍵と考えられる。近年、研究代表者は被子植物受精を制御する雄性配偶子分子 GCS1 の単離に成功した。GCS1 は雄性配偶子表面で配偶子融合を決定づける分子であり、本成果は被子植物の受精が配偶子表面のタンパク質分子によって制御されることを示す初のものとなった。加えて、ごく最近研究代表者はシロイヌナズナの受精異常株スクリーニングによって、雄性配偶子側で特異的に発現する配偶子接着因子 GEX2 の同定にも成功した。以上の成果は、配偶子表面で発現するさらなる因子の存在を期待させる。

2. 研究の目的

本研究では、被子植物の受精(重複受精)において、雌雄の配偶子(精細胞・卵細胞)を融合へと導くタンパク質分子群を明らかにし、それらの分子機能を突き止めることによって、被子植物の繁殖を根底から支える重複受精の分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

テッポウユリ花粉から単離された雄性配偶子細胞(雄原細胞)から細胞膜成分を抽出し、花粉の細胞膜成分とタンパク質構成を比較するプロテオーム解析を行った。タンパク質の分子同定には、事前に完了したテッポウユリ雄原細胞 RNA sequencing のデータベースを用いた(図1)。

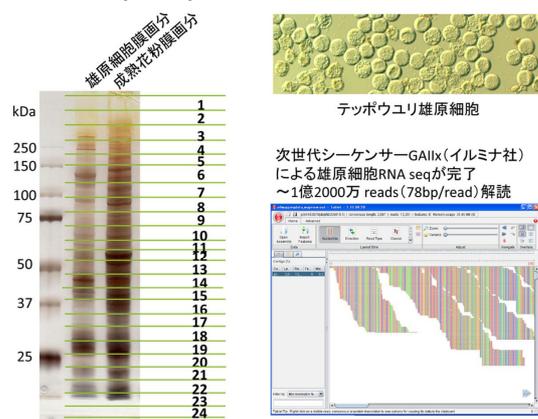


図1 雄原細胞膜タンパク質のプロテオーム解析

テッポウユリ雄原細胞と成熟花粉の細胞膜成分を抽出し、SDS-PAGE 後に分子量ごとのタンパク質構成比較を行った。

4. 研究成果

(1) 雄原細胞プロテオーム解析の結果、花粉側と比較して雄原細胞側で顕著に存在する新規の分子 LGM1 の検出に成功した(図2)。(2) RNA sequencing data 上の配列を基にして、LGM1 遺伝子の完全長塩基配列を決定したところ、LGM1 は4つの膜貫通ドメインを有する新規の膜貫通型タンパク質であることが分かった(図2)。また、被子植物のみならず、藻類、コケ植物、小葉類(広義のシダ植物)にも保存されていることが分かった

LGM1 (Lilium Generative cell Membrane 1)

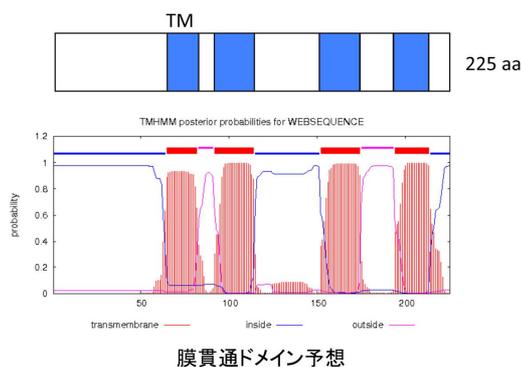


図2 新規膜タンパク質 LGM1 の同定

雄原細胞プロテオーム解析の結果、新規膜タンパク質 LGM1 が検出された。LGM1 は4つの膜貫通ドメイン(TM)を有することが分かった。

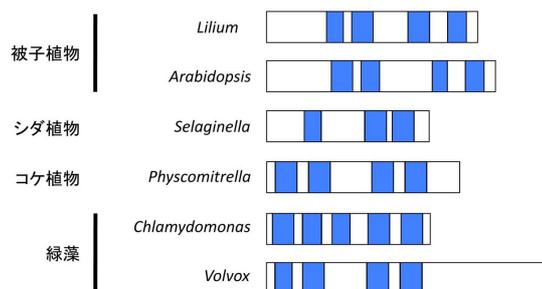


図3 LGM1 を有する生物種

LGM1 と相同性のあるタンパク質分子はシダ植物、コケ植物、緑藻にも存在することが分かった。

(図3)

(3) テッポウユリの様々な組織間で半定量的 RT-PCR を行ったところ、LGM1 の発現は花粉特異的であり、花粉発生過程においては雄原細胞形成後に発現が見れることが分かった(図4)。

(4) テッポウユリ花粉の in situ hybridization 解析の結果、*LGM1* は花粉内の雄原細胞で特異的に検出された (図 5)。

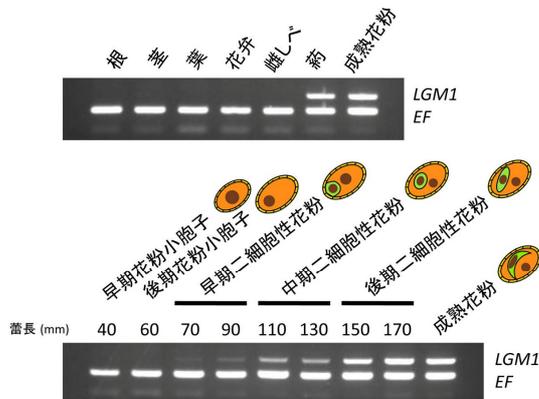


図 4 *LGM1* 遺伝子の発現比較

半定量的 RT-PCR によって、テッポウユリの各器官間で *LGM1* 遺伝子の発現比較を行った (上段)。コントロールとして、ペプチド重合因子遺伝子 *EF* を用いた。同様の解析は、花粉発生過程についても行った (下段)。その結果、*LGM1* 遺伝子の発現は花粉特異的であり、雄原細胞形成時に発現が生じることが分かった。

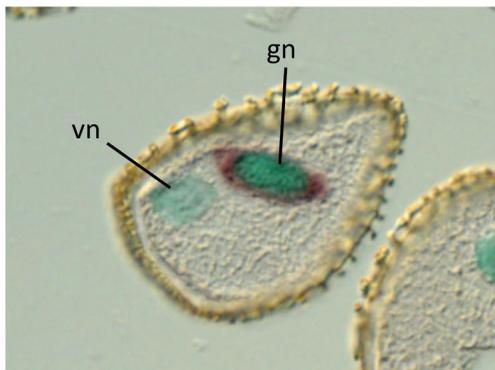


図 5 花粉内における *LGM1* 遺伝子の発現

テッポウユリ成熟花粉内における *LGM1* 遺伝子の発現局在を in situ hybridization 法によって解析した。*LGM1* mRNA と相補的な配列を持つアンチセンスプローブを用いたところ、雄原細胞の細胞質に特異的に発現していることが分かった (赤いシグナル)。vn および gn はそれぞれ、メチルグリーンで染色された栄養細胞と雄原細胞の核。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1) Maruyama, D., Völz, 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. (2015). Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism. *Cell*. 161(4), 907-918. 査読有り (2014 年度に受理決定)

2) Mori, T., and Igawa, T. (2014). Gamete attachment process revealed in flowering plant fertilization. *Plant Signal. Behav.* 9(12), e977715. doi: 10.4161/15592324.2014.977715. 査読有り

3) Ebchuqin, E., Yokota, N., Yamada, L., Yasuoka, Y., Akasaka, M., Arakawa, M., Deguchi, R., Mori, T., Sawada, H. (2014). Evidence for participation of GCS1 in fertilization of the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*: implication of a common mechanism of sperm-egg fusion in plants and animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451(4), 522-528. 査読有り

4) Kawai-Toyooka, H., Mori, T., Hamaji, T., Suzuki, M., Olson, B.J., Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A., Toyoda, A., Fujiyama, A., and Nozaki, H. (2014) Sex-specific Post-translational Regulation of the Gamete Fusogen GCS1 in the Isogamous Volvocine Alga *Gonium pectorale*. *Eukaryot. Cell*, 13(5), 648-656. 査読有り

5) Mori, T., Igawa, T., Tamiya, G., Miyagishima, S.Y., and Berger, F. (2014) Gamete attachment requires GEX2 for successful fertilization in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 24 (2), 170-175. 査読有り

6) Igawa, T., and Mori, T. (2013) Gamete membrane dynamics during double fertilization in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 8 (6), e24512. doi: 10.4161/psb.24512. 査読無し

7) Igawa, T., Yanagawa, Y., Miyagishima, S.Y., Mori, T. (2013) Analysis of gamete membrane dynamics during double fertilization of *Arabidopsis*. *J. Plant Res.* 126 (3), 387-394. 査読有り

8) Mogi, Y., Hamaji, T., Suzuki, M., Ferris, P., Mori, T., Kabeya, Y., Miyagishima, S., and Nozaki, H. (2012). Evidence for tubular mating structures induced in each mating type of heterothallic *Gonium pectorale* (Volvocales, Chlorophyta). *J. Phycol.*, 48(3), 670-674. 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 森 稔幸 「植物受精の分子機構解析から曝かれた配偶子融合の共通因子」第 84 回寄生虫学会サテライトシンポジウム・第 27 回分子生物学・生理生化学研究会 (2015 年 3 月 20 日: 杏林大学、東京)(招待講演)

2) 森 稔幸、井川智子、野崎久義「新規植物受精因子単離を目指した新たな研究展開」日本植物学会第 78 回大会(2014 年 9 月 12 日: 明治大学、川崎)

3) 森 稔幸 「動植物で保存された配偶子間クロストーク」日本分子生物学会第 36 回大会(2013 年 12 月 4 日: 神戸国際会議場、神戸)(招待講演)

4) 森 稔幸、井川智子、Frederic Berger、宮城島進也「新規植物有性生殖制御因子の特徴解析」日本植物学会第 77 回大会(2013 年 9 月 13 日: 北海道大学、札幌)

5) Mori, T. Elucidating the GCS1-based gamete fusion mechanics shared by plants, animals and protists.(口頭発表)International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants(2012 年 11 月 15 日: ホテル名古屋ガーデンパレス、名古屋)

6) 森 稔幸、井川智子、Frederic Berger、宮城島進也「シロイヌナズナ新規受精異常株の同定と解析」日本植物学会第 76 回大会(2012 年 9 月 12 日: 兵庫県立大学、姫路)

〔その他〕

1) 森 稔幸「植物の精子を足掛かりに生物の受精機構解明へ」特集記事; 研究者訪問 (naturejapanjobs)
<http://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/tokushu/detail/289> (2013 年 5 月 23 日)

2) 森 稔幸「生物の受精メカニズムを分子レベルで謎解く」 知の共創—研究者プロフィール—(読売新聞)
http://www.yomiuri.co.jp/adv/wol/research/kyoso_130423.html (2013 年 4 月 23 日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 稔幸 (MORI, Toshiyuki)

東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員

研究者番号: 00462739