

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840106

研究課題名(和文)植物の新奇現象、受精非依存的胚珠肥大現象を利用した受精因子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors required for plant fertilization by using a new phenomenon, fertilization independent ovule enlargement.

研究代表者

笠原 竜四郎 (Kasahara, Ryushiro)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・招へい教員

研究者番号：40467270

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)：植物の受精に関する変異体は現在までにほんのわずかな数の報告がなされているのみであり、そのメカニズムを分子生物学的に理解するためには受精因子を一つでも多く獲得することが必要不可欠である。そこで私は自らが考案したバニリン染色スクリーニング法で受精に失敗していると考えられる変異体をスクリーニングした。現在までに13698個体のスクリーニングが終了し、382個の変異体が獲得できた。このうち9つについて精査した結果、雌性配偶体の変異を持つものが7つ、雄性配偶体の変異があるものが2つ単離できた。このようにバニリン染色法を用いると受精に関する変異体を効率良く獲得できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Very few genes required for plant fertilization are known and to understand the molecular mechanism of it, I need to obtain the factors required for plant fertilization. To obtain the factors, I started a screening by using a very effective 'vanillin staining method' to distinguish fertilized ovules from unfertilized ovules. I have already screened 13698 plants and identified 382 mutants. Of these mutants, I observed and checked 9 mutants and identified 7 female gametophytic mutants and 2 male gametophytic mutants. It is clear that the 'vanillin staining method' is very efficient to identify mutants defective in plant fertilization.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物の受精 受精不全変異体 バニリン染色 受精非依存的種子肥大 雌性配偶体 雄性配偶体

### 1. 研究開始当初の背景

被子植物の雌性配偶体は花粉管を正しく迎え入れ、管内の2つの精細胞を確実に卵細胞と中央細胞へと受精させる、種子形成に不可欠な役割をもつ。しかしながら、研究開始当初は受精の際に直接働く必須因子はたった1つしか知られておらず、受精の機能を分子レベルで理解することは不可能であった。受精因子の報告が欠如していた理由として挙げられるのがその変異体単離法であった。当時の単離法として主要であったのはさやを開けて種子が形成されているか否か、つまりさやの中の稔実率を判断する方法であった。確かにこの方法で見出された変異体は存在したが、雌性配偶体自体が形成不全である変異体が圧倒的多数であり、受精が起こるか起こらないかを議論できるような貴重な変異体の獲得は非常に困難であった。こうした背景により、植物の受精に直接関わるような変異体を獲得するためには、スクリーニング自体の技術革新が必要であった。

### 2. 研究の目的

(1) 植物の受精の際に、直接雄側と雌側で相互作用するような細胞膜タンパク質は現在までに雄側の因子であるGCS1(Mori *et al.*, 2006, *Nat. Cell. Biol.* 8: 64-71)が同定されているのみである。このことから、分子レベルで植物の受精を理解するには他の受精因子を同定することが急務であり、これが本研究最大の目的である。ただし、現在までに行っていた種子形成率と蛍光分子マーカーに頼る方法では、雌性配偶体形成不全のものや、蛍光分子マーカーの不具合による一時的な異常を示す変異体など、ターゲット以外の変異体が多数取れてきてしまうので非効率的であった。そこで、申請者が新たに発見した「受精非依存的胚珠肥大」を巧みに利用することで効率的に受精因子の変異体を獲得する方法を考案した。受精非依存的胚珠肥大とは、受精してもいないのに花粉管を受け入れただけで胚珠が肥大してしまう現象のことである。更に興味深いことに、受精に失敗した胚珠は、種皮の形成も始めてしまうことが明らかとなった。この方法を利用すれば、花粉管を受け入れるにもかかわらず受精に失敗している変異体のみをターゲットに確実にスクリーニングが可能であるとの着想に至った。

(2) 次に、受精必須因子を多数同定し、植物の受精メカニズムの分子基盤を整えることを第二の目的とした。現在までに動物でも雌性側、つまり卵細胞側の受精因子は同定されていないことから考えると、卵細胞の受精因子の獲得は生物学全体の課題である。本研究のスクリーニングは花粉管受け入れ後に受精に異常を生じる変異体獲得にターゲットを絞った方法であるので卵細胞側の必須因子が獲得できる可能性は非常に高い。また、この方法では2つの精細胞のうちどちらか1つのみ

が卵細胞か中央細胞に受精する、すなわち、「単独受精」を起こすような変異体も原理的に獲得可能であり、2つの精細胞の機能の違いや、卵細胞、中央細胞の受精機構の相違にも迫ることができると考えた。

### 3. 研究の方法

方法として野生型の植物にEMSで変異を誘起し、胚珠肥大により種皮を形成している変異体植物を選抜し、それを多数ストックする。まず、シロイヌナズナの種子にEMS処理を施し、変異を誘発する。M1をそのままポットに展開し、各変異植物から受粉後2-3日後のさやを採取する。ここまでは現在までに行われていたさやを解剖したあとの種子形成率低下をスクリーニングの指標とする方法と同一であるが、本研究ではさやを開くことなしに直接バニリン染色を行う。さやを開いて種子形成率を調べるかつての方法では、配偶体致死や、染色体相互転座といった、目的とする受精欠損に関するもの以外の変異体が多数出現するため、非効率的であった。しかしながら、この直接バニリン染色法は、不要な変異体を効率よく除外し、受精に欠損のある変異体に絞ってスクリーニングできるという点で非常に強力な方法である。また、この方法は作業効率的にも優れており、さやを開く方法と比べて全く手間がかからない。採取したさやにバニリン処理をし、その後透明化液を加えるだけで観察することができる。この方法は、熟練者の特別な技術介入なしに誰でも実行することができる。さらに、かつての蛍光マーカーを用いたスクリーニングでは、さやの中の一部の胚珠で生じている受精欠損を観察し判断していたため、スクリーニングの精度が低かったが、本方法ではさやを解剖しないので胚珠の損失は起こらず、全ての胚珠の受精状態を把握することができるという利点もある。

この方法により出現する植物は、(a)内種皮が完全に染色されているもの、(b)完全に染色されている種子と全く染色されていない胚珠が混在しているもの、(c)完全に染色されている種子と一部だけが染色されている胚珠が混在しているものの3つである。(a)は受精が確実に行われているので対象としては除外する(WT型)。(b)は半数の胚珠に花粉管が入っていないと考えられる。このような胚珠は受精に欠損が生じる以前の変異体(*myb98*型;花粉管ガイダンス異常を示す変異体など)と考えられるので除外する。(c)は受精に失敗している変異体である可能性が高く、対象としてストックする。こうして得られた変異体は次世代シーケンサー及びエコタイプマッピングにより順次責任遺伝子を同定していく。さらに、これまでの結果によると、雄側が原因で2つある精細胞のうち1つだけ卵細胞や中央細胞に受精する、つまり、「単独受精」することがある変異体*kpl* (Ron *et al.*, 2010, *Genes*

Dev. 24: 1010-21) をバニリン染色して観察したところ、卵細胞とのみ受精して胚を形成した胚珠はどちらとも受精できなかった胚珠に比べ、種皮形成している領域が拡大していることがわかった。このことから、バニリン染色法を用いることで、2つの精細胞が全く受精出来ていない変異体と、2つの精細胞のうちどちらかだけ受精している変異体を観察するだけでより分けることができる事もわかった。

#### 4. 研究成果

上記の実験方法に従い、まずシロイヌナズナの種子合計13698粒をEMSにより変異源処理を行った(図1)。次に変異源処理した種子を播種し、種皮が部分的に染色されているかどうかをバニリン染色法により観察した。その結果、部分染色している胚珠をもつ植物を382株単離することができた。次に、その382株から種子を回収し播種した105株のM2種子についてM1世代に観察された部分染色が再現するかどうかをバニリン染色により確認した。その結果、69株でバニリン染色による部分染色が再現された。

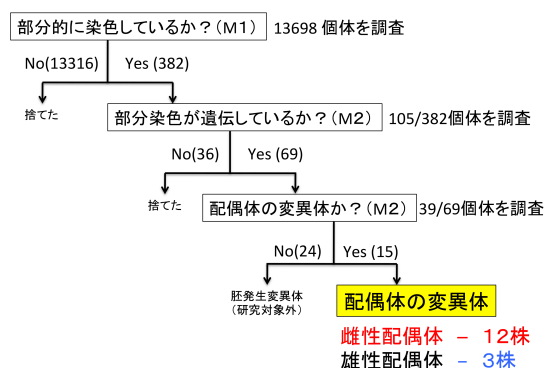


図1. 変異体単離までのストラテジー

次に、その69株について、真に配偶体の変異体であるかどうかを判別する必要があった。ここまでの解析を通過してきた植物は部分染色をしていることから、胚珠には少なくとも花粉管が挿入されており、挿入されてからのイベント、つまり内容物を放出したり、受精したり、胚を発生させていくまでのいずれかの段階で欠損が生じていると考えられる。相互交配実験を行えば、その変異が受精後の胚発生の段階で生じているのか受精時の雌性配偶体の機能欠損により生じているのか受精時の雄性配偶体の機能欠損により生じているのか判別できるので、39株について掛け合わせ実験を行った。まず、変異体を雌親、野生型を雄親として掛け合わせを行った結果、12株で部分染色が観察できた。また、変異体を雄親、野生型を雌親として掛け合わせ実験を行った結果、3株で部分染色が観察できた。両方の掛け合わせ実験で部分染色が確認できないものも24株得られた。これらの実験により、雌性配偶体が原因で受精不全となっている変異体が12株、雄性配

偶体が原因で受精不全となっている変異体が3株獲得できた。また、残りの24株は雌雄2つの変異アリルがホモになった時のみ表現型として現れることから、受精後の胚発生変異体であることがわかった。同定された変異体は現在遺伝子同定に向けて解析中であり、各段階で調査の済んでいない変異体は順次バニリン染色にて解析中である。

今回のスクリーニングでは、実験計画通り雌性配偶体の形成に関わるような受精の変異以前の変異体は全く出現しなかった。なぜなら、雌性配偶体が形成されない場合は花粉管を誘引する機能のある助細胞も形成されないため、花粉管が胚珠の中に入ることはなく、種皮も形成されないため部分染色されないからである。過去になされていたさやを開いて稔実性を確認するスクリーニングではこの雌性配偶体形成不全の変異体が大半を占め、このような変異体に埋もれていたために受精のみに関与するようなピンポイントに雌性配偶体内で機能する遺伝子を同定するのは極めて難しかった。このために、現在までにこのような遺伝子はあまり同定されてこなかったと予想される。しかしながら、今回のスクリーニングは雌性配偶体の形成に必要な因子はバニリン染色でネガティブということでことごとく除去されることから、非常に効率の良いものであったことがわかった。また、変異体の獲得のみならず、雌性配偶体で機能する重要な因子のスクリーニング法を確立したという点でも植物の生殖の分野に大きく貢献することができた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計6件)

1. Ryushiro Kasahara, Challenging to establish the rice apomixes system by analyzing and manipulating mechanisms of rice reproductive molecules. 23<sup>rd</sup> International Congress On Sexual Plant Reproduction. 2014. 7. 12. Porto, Portugal

2. 笠原 竜四郎 植物の受精学 静岡大学理学部 集中講義(招待講演) 2015. 10. 17. 静岡大学 静岡

3. Ryushiro Kasahara, Discovery and Application of the POEM phenomenon. University of Utah (招待講演) 2015. 2. 18. Utah, USA

4. Ryushiro Kasahara, Female (Female Gametophyte) and Male (pollen tube) Interaction in Plants. Colorado State University (招待講演) 2015. 2. 23. Colorado,

USA

5. Ryushiro Kasahara, Imaginary Pregnancy in Plants. University of Montreal (招待講演) 2015. 2. 27. Montreal, Canada

6. 笠原 竜四郎 POEM 現象は花粉管内容物によって引き起こされる植物の新現象である。第 55 回日本植物生理学会年会 2015. 3. 18. 東京農大 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕  
ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 竜四郎 (KASAHARA, Ryushiro)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命

分子研究所・招へい教員

研究者番号：40467270