

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21112008

研究課題名(和文)植物と動物の配偶子融合における中核機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating the central gamete fusion mechanism, conserved in plants and animals

研究代表者

森 稔幸(Mori, Toshiyuki)

早稲田大学・高等研究所・助教

研究者番号：00462739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 61,100,000円、(間接経費) 18,330,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、精子と卵の間に存在する受精の分子機構解明を目的としている。当該研究期間の前半においては、動植物・原生生物に保存された配偶子融合因子GCS1の分子機能ドメイン解析を行った。その結果、GCS1の機能ドメインは同分子のN末端側にあり、膜貫通ドメインのC末側は機能していないことが分かった。また、研究期間の後半では新規に同定した植物受精因子GEX2の機能解析を行った。その結果、GEX2遺伝子を破壊された精細胞は雌性配偶子と接着できないことがわかり、この結果からGEX2は配偶子間の接着因子であることが解明された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is elucidating the molecular mechanism of sperm-egg fusion. In the first half of the period, the analysis of functional domains in GCS1 protein, which is a gamete fusion factor conserved in plants, animals and protists, was performed. As a result, it was found that the functional GCS1 domain resides only in the N-terminus, and that the C-terminus following the transmembrane domain is dispensable for GCS1 function. Besides, in the last half, the functional analyses of GEX2, which was newly identified as a plant fertilization factor, was performed. As a result, it was found that Arabidopsis GEX2 mutant sperm cells could not be attached with female gametes, suggesting that GEX2 functions in gamete attachment for successful fertilization.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学、発生生物学

キーワード：受精 有性生殖 動植物共通機構 花粉 GCS1 GEX2 膜タンパク質 雄性配偶子

### 1. 研究開始当初の背景

動物と同様に、植物も雌雄配偶子（精子、卵）の融合（受精）を基盤とした有性生殖を行う。これまでの研究成果から、受精を制御する分子的因子は種特異的なものが多かったため、受精の分子機構は、動植物・原生生物といった生物の系統によって全く別物と考えられてきた。そのような中、報告者らは植物の雄性配偶子細胞から、動植物・原生生物に保存された雄性配偶子側受精因子 GCS1 (GENERATIVE CELL SPECIFIC 1) の発見に成功した。この発見は生物の系統間で保存された受精機構の存在を示唆しており、その中核メカニズムが注目されることとなった。

### 2. 研究の目的

#### (1) GCS1 の分子機能の解析

GCS1 は動植物・原生生物の共通機構の一部であるが、既知の機能ドメインが検出されない新規の膜貫通タンパク質であり、その分子機能がまったく分かっていない。そこで、本項目では GCS1 の特徴的ドメインに注目し、受精機能の探索を目的とした。

#### (2) 新規受精因子の探索と機能解析

GCS1 は動植物・原生生物の共通受精機構の存在を示唆する世界で1つめのタンパク質分子であり、今後 GCS1 を取り巻く関連因子の発見・解析によって、GCS1 を基盤とした受精メカニズムが見えてくるものと期待できる。そこで、本項目では、GCS1 の次なる受精因子の同定・機能解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) GCS1 の分子機能ドメイン解析

シロイヌナズナ GCS1 タンパク質の様々なドメインを GFP 配列で分断・置換し、部分欠損 GCS1 遺伝子コンストラクト mAtGCS1 を作製した (図 1)。これらのコンストラクトを個別に GCS1 変異株に導入し、どの欠損が受精機能に影響するかを解析した。同様の解析はマラリア原虫 GCS1 についても行った。マラリア原虫は相同的組換えによる遺伝子破壊の実験系が確立されており、部分的に欠損を持つ

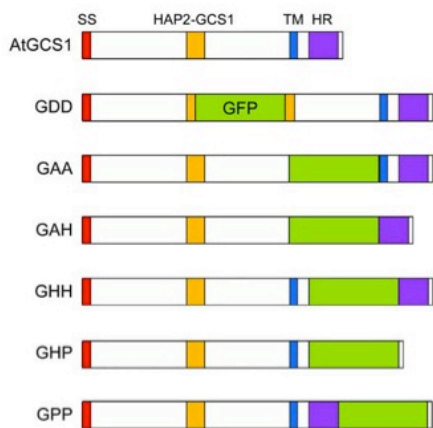


図1 シロイヌナズナ部分欠損GCS1

GCS1 遺伝子を導入することで遺伝子の部分破壊を行った。

#### (2) 新規受精因子の探索と機能解析

シロイヌナズナの雄配偶子の細胞核を赤色蛍光タンパク質 RFP、雌性配偶子の1つである中央細胞を緑色蛍光タンパク質 GFP で標識し、その種子を突然変異を誘発する変異源で処理した。さらに、受粉後の雌しべを顕微鏡観察することで、受精に異常が見られる株をスクリーニングした。その結果、精細胞が中央細胞などと融合できない新規受精異常株 Y47 が得られたので、その原因遺伝子を同定し、分子機能を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) GCS1 の分子機能ドメイン解析

シロイヌナズナ GCS1 分子において、N 末中央の高保存性ドメイン (HAP2-GCS1 ドメイン)、膜貫通ドメインを破壊すると、受精機能が著しく損なわれることが分かった。一方、膜貫通ドメインより C 末側はどのように修飾しても機能阻害は確認されなかった (図 2)。同様の結果はマラリア原虫 GCS1 においても確認された。この結果から GCS1 の機能中心は N 末側に集約されており、C 末側は受精機能に貢献していないことが示唆された。本研究成果を米科学誌 PLoS One に論文発表した。

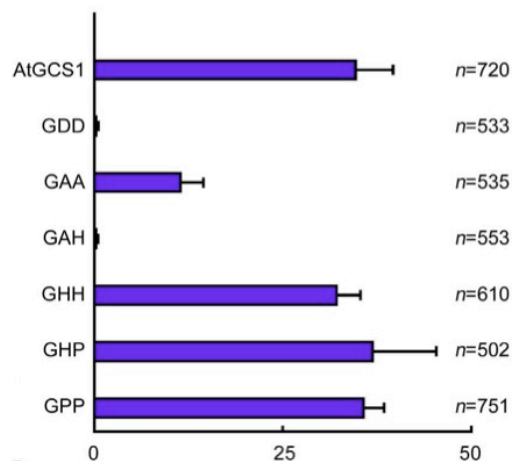


図2 シロイヌナズナ部分欠損GCS1の受精機能 (GCS1変異株の相補性)

#### (2) 新規受精因子の探索と機能解析

シロイヌナズナ新規受精異常株 (Y47 株) の原因遺伝子をマッピングしたところ、精細胞特異的遺伝子 GEX2 に変異が確認された (図 3)。GEX2 は新規の膜タンパク質であり、GEX2 と GFP を融合した GEX2-GFP 遺伝子導入株を用いた解析から、その発現は精細胞表面にあることが分かった (図 4)。また、雌性配偶子が存在する胚珠を細胞壁分解酵素で処理し、胚珠内での Y47 株 (GEX2 遺伝子破壊) 精細胞の挙動を詳細に観察したところ、卵細胞に接着できず、脱落する精細胞が頻繁に確認された

(図 5)。この結果から、GEX2 は受精に先立つ雌雄配偶子の接着に働く分子であることが分かった。本研究成果を米科学誌 Current Biology に論文発表した。

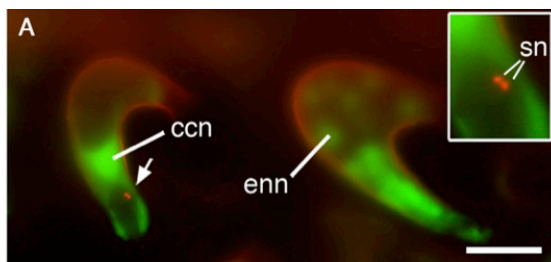


図3 シロイヌナズナGEX2変異株の受精異常  
受精が完了できない胚珠ではGFP標識された中央細胞(ccn)とRFP標識された未受精精細胞(sn)が観察される。受精が正常に行われた胚珠では胚乳発達(enn)が観察される。

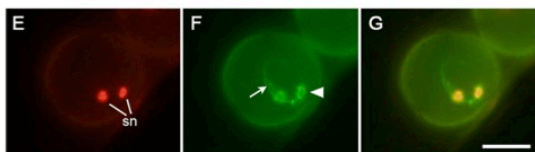


図4 シロイヌナズナGEX2の発現局在  
精細胞の核をRFP標識した株(左)において、GEX2-GFPを発現させたところ、シグナルは精細胞の表面に特異的に検出された(中央、矢頭・矢印部分)。右は左と中央の像を重ねたもの

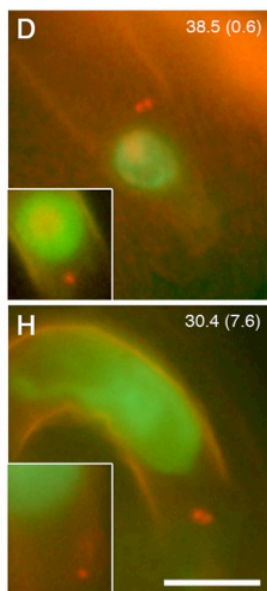


図5 シロイヌナズナGEX2変異株における精細胞の挙動  
胚珠内の細胞において、細胞壁を分解する酵素で処理したところ、卵細胞(上段、緑色の細胞)と中央細胞(下段、緑色の細胞)のプロトプラスト化に成功した。GEX2変異株の花粉を受粉後に観察すると、卵細胞や中央細胞に接着できない精細胞が頻りに観察された(赤い輝点)。

## 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 12 件)

1) 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.* *Eukaryot. Cell*, 13(5): 648-656. 査読有り

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) Itoh, K., Izumi, A., Mori, T., Dohmae, N., Yui, R., Maeda-Sano, K., Shirai, Y., Kanaoka, M. M., Kuroiwa, T., Higashiyama, T., Sugita, M., Murakami-Murofushi, K., Kawano, S., and Sasaki, N. (2011). DNA packaging proteins Glom and Glom2 coordinately organize the mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum*. *Mitochondrion*, 11 (4), 575-586. 査読有り

7) Mori, T., Hirai, M., Kuroiwa, T., and Miyagishima, S. Y. (2010). The functional domain of GCS1-based gamete fusion resides in the amino terminus in plant and parasite species. *PLoS One* 5 (12), e15957. doi: 10.1371/journal.pone.0015957. 査読有り

8) Hirai, M., and Mori, T. (2010). Fertilization is a novel attacking site for the transmission blocking of malaria parasites. *Acta Trop.* 114 (3), 157-161. 査読有り

9) Mori, T. (2010). Elucidating the molecular mechanics of the final stages of double fertilization. *Plant Morph.* 22 (1), 9-13. 査読有り

10) Hirooka, S., Misumi, O., Yoshida, M., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F.,

Yoshida, Y., Fujiwara, T., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. (2009). Expression of the Cyanidioschyzon merolae stromal ascorbate peroxidase in Arabidopsis thaliana enhances thermotolerance. Plant Cell Rep. 28 (12), 1881-1893. 査読有り

11) Itoh, K., Izumi, A., Mori, T., Dohmae, N., Yui, R., Sano, K., Kanaoka, M.M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., Higashiyama, T., Murakami-Murofushi, K., Kawano, S., and Sasaki, N. (2009). New protein Pmn34 with an exonuclease motif localizes in the mitochondrial nucleoid periphery of Physarum polycephalum. Cytologia 74 (4), 401-407. 査読有り

12) Okazaki, K., Kabeya, Y., Suzuki, K., Mori, T., Ichikawa, T., Matsui, M., Nakanishi, H., and Miyagishima, S.Y. (2009). The PLASTID DIVISION1 and 2 components of the chloroplast division machinery determine the rate of chloroplast division in land plant cell differentiation. Plant Cell 21 (6), 1769-1780. 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1) 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) (招待講演)

2) 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 : 札幌)

3) 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 : 日本・名古屋)

4) 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 : 姫路)

5) 森 稔幸 「植物受精の研究から配偶子融合の共通機構を見出す」(シンポジウム ; オーガナイザーとしても参加) 日本植物学会第 75 回大会 (2011 年 9 月 18 日 : 東京)

6) 森 稔幸、黒岩晴子、黒岩常祥、宮城島進也「配偶子融合因子 GCS1 の分子構造・機能解析」日本植物学会第 74 回大会 (2010 年 9 月 9 日 : 春日井)

7) 森 稔幸「植物受精の解析から配偶子融合の共通機構を探る」日本分子生物学会第 32 回大会 (2009 年 12 月 10 日 : 横浜) (招待講演)

8) 森 稔幸「植物と動物に共通な配偶子融合機構にせまる鍵分子"GCS1"」日本生化学会第 82 回大会 (2009 年 10 月 23 日 : 神戸) (招待講演)

9) 森 稔幸「重複受精最終ステージを謎解く : 植物受精決定因子の発見とその後」日本植物学会第 73 回大会 (2009 年 9 月 19 日 : 山形) (招待講演)

[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/to-kushu/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](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)

早稲田大学高等研究所・助教

研究者番号 : 00462739