

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15223

研究課題名(和文)非還元性雄性配偶子を用いた重複受精機構の解析

研究課題名(英文) Establishment of analysis method for double fertilization process using unreduced male gamete

研究代表者

平野 智也(Hirano, Tomonari)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80455584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の植物材料であるキルタンサスでは、突然変異育種に有用な重イオンビーム変異誘発技術を用いることで、本来2つ形成される精細胞が、分裂前の雄原細胞に似た非還元性の1つの精細胞となることが明らかとなった。この雄原細胞様精細胞の受精過程を明かすために、重イオンビームを照射した花粉を人工授粉し受精後の胚および胚乳を調査したところ、胚を形成しないが胚乳のみを形成する異常な胚嚢が観察された。卵細胞と胚乳の核DNA量の相対値から、異常胚嚢形成は雄原細胞様精細胞が中央細胞の極核と受精することで形成されることが示唆された。今後、この受精現象を園芸作物の育種に利用する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、多様な倍数性を有する胚および胚乳が得られたことから、今後胚珠培養や胚培養、胚乳培養を行うことで、倍数性の多様化法として雄原細胞様精細胞が利用できる可能性が示された。キルタンサスのような二細胞性花粉を持つ園芸作物では、雄原細胞様精細胞が誘発可能と考えられることから、新たな育種法として迅速な染色体添加、染色体欠失系統の作出や倍数性育種への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have successfully induced unique male gametes in *Cyrtanthus mackenii* by using heavy-ion beam irradiation; the sperm cell formation is prevented and the generative cells are not divided into two sperm cells. The male gametes are called generative-cell-like sperm cells (GC-like SCs). In this study, we analyzed embryogenesis after pollination of the irradiated pollen grains to reveal behavior of the GC-like SCs during the double fertilization. When the irradiated pollen grains were crossed, few embryo sacs contained endosperm and undivided egg cell. From the results by nuclear DNA fluorescence analysis in the abnormal embryo sac, it is suggested that the abnormal embryo sacs were formed by fusing GC-like SC with polar nuclei. This phenomenon will be utilized for ornamental plant breeding.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：雄性配偶子 花粉 重イオンビーム 重複受精

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

園芸作物における育種や種子、果実生産を行う上で、その受精機構の詳細を明らかにすることは極めて重要である。近年、植物の受精機構解明に向けた研究では、*in vivo* 実験系に加えて *in vitro* 実験系をうまく活用することで著しい進展が見られている。我々もアルストロメリア (*Alstroemeria aurea*) およびキルタンサス (*Cyrtanthus mackenii*) において、液体培地を用いた *in vitro* 実験系を確立し、さらに微細操作による花粉管からの雄性配偶子単離法および単一雄性配偶子解析系を開発した (Hirano et al. 2009, 2010)。キルタンサスにおいて上記の実験系による雄性配偶子解析を行った結果、雄原細胞および精細胞は、花粉管内で栄養核と結合し (male germ unit の形成) さらに一組の精細胞が形態的に異型化することを発見した。雄原細胞は不等分裂を行わず、分裂直後から核の形態および微小管の蓄積に差異が生じることが明らかになっている。セイロンマツリ (*Plumbago zeylanica*) では、異型化した (二形性を示す) 2 つの精細胞が卵細胞および中央細胞と選択的に重複受精を行うことが報告されている (Russell 1985)。しかし、モデル植物の多くでは精細胞の異型化は見られず、またシロイヌナズナでは 2 つの精細胞がランダムに受精することが報告されている (Hamamura et al. 2011)。本研究では、モデル植物では見られない特徴的な雄性配偶子を持つキルタンサスを受精機構研究に用いることとした。

重イオンビームは、変異原として植物に限らず微生物、微細藻類等で広く用いられており、育種技術としての有用性が広く認識されている。さらに、重イオンビームに用いるイオンの核種等を変えることで誘発する突然変異が変化することが明らかにされた。キルタンサス花粉への重イオンビーム照射も試みており、雄性配偶子が花粉管伸長過程で DNA 損傷を修復することが初めて明らかにされた (Hirano et al. 2013)。キルタンサスは二細胞性花粉を持ち、花粉管伸長過程で精細胞を形成する。重イオンビームを一定量以上照射した雄原細胞では、染色体異常があるために核の分裂は生じないが細胞周期は進行し、非還元性の雄原細胞様精細胞を高頻度に形成することが明らかとなった。この非還元性精細胞を活用することで、園芸作物における受精機構研究が発展することが期待された。

### 2. 研究の目的

キルタンサスの精細胞は異型化しているが、それらの精細胞が卵細胞、中央細胞のどちらと融合するのかを追うことは極めて困難である。そこで花粉管中に 1 つの雄原細胞様精細胞が形成する現象を利用し、この雄原細胞様精細胞が融合相手を選択するの可否を明らかにする。この結果から、キルタンサスにおける選択的受精に関する知見を得る。また、受精後の胚発生過程の観察を試みることで、育種への応用の可能性を評価する。

上記の解析を行う上では、より効率的かつゲノム上の遺伝子を可能な限り破壊しない方法で雄原細胞様精細胞を得ることが必要とされる。これまでの研究で用いた炭素イオンビームは、小規模の欠失を多く誘発する特徴を持つ。重イオンビーム育種技術の一番の特徴である誘発する変異を変えることが出来る点を活かし、染色体再編成をより多く誘発する照射条件に焦点を絞り、雄原細胞様精細胞の誘導効率を精査する。複数の誘発法を比較することで、最適化を目指す。

雄原細胞様精細胞が異型化した 1 組の精細胞のうちどちらに近い性質を持つかは、現在不明であることから、異型化過程をさらに精査し、雄原細胞様精細胞の特性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 重イオンビーム照射および花粉培養

本研究に用いたキルタンサスの成熟花粉は、開葯後に回収し  $-20^{\circ}\text{C}$  で実験に用いるまで保存した。1.5 ml チューブに入れた成熟花粉に、炭素イオンビーム (線エネルギー付与; 22.5 keV/ $\mu\text{m}$ ) を 10 - 80 Gy、またはアルゴンイオンビーム (線エネルギー付与; 290 keV/ $\mu\text{m}$ ) を 2.5 - 40 Gy 照射し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。花粉発芽および花粉管伸長は、液体発芽培地 (Hirano and Hoshino 2009) に花粉を飛散させ、暗黒下  $25^{\circ}\text{C}$  で培養を行った。

#### (2) 雄性配偶子単離および免疫染色

伸長した花粉管を 2% Tween 20 を添加した固定液中でチョッピングすることで、雄性配偶子の単離および固定を同時に行なった。30 分間固定した後に細胞分取装置を用いて倒立顕微鏡下で雄性配偶子を回収し、免疫染色に用いた。ブロッキング処理を行った後に、DNA 損傷を検出には Hoechst 33258、抗 H2AX 抗体および抗  $\gamma$ -チューブリン抗体による 3 重染色を行い蛍光顕微鏡下で観察を行った。また、異型化過程を精査するためには、ブロッキング後に Hoechst 33258、抗  $\gamma$ -チューブリン抗体および抗  $\alpha$ -チューブリン抗体による 3 重染色を行った。

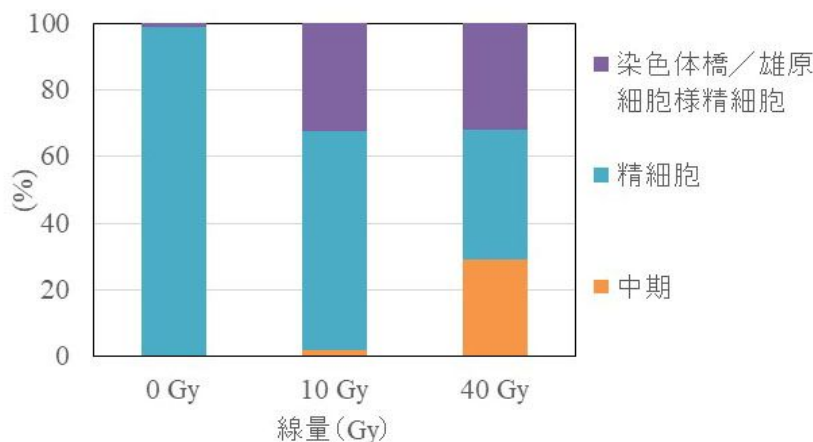
#### (3) 胚発生過程の観察

未照射および各照射花粉をキルタンサスに授粉させ、交配 3 日後および 14 日後に子房を FAA で固定した。固定後の子房をパラフィン切片法によって、厚さ  $10\ \mu\text{m}$  に切り出し胚珠を観察・撮影した。さらに 4%パラホルムアルデヒドで固定した子房より実体顕微鏡下で胚珠を取り出し、ガラス針を用いて胚珠内から胚と胚乳を単離した。単離後に Hoechst 33258 による染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて画像を取得し、胚および胚乳の核蛍光強度の測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) アルゴンイオンビーム照射花粉における雄性配偶子

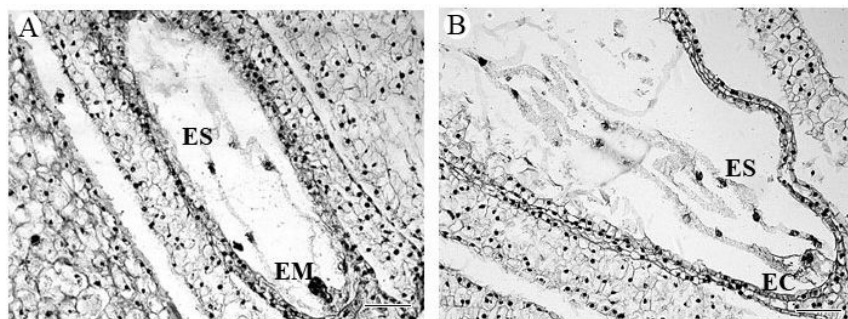
重イオンビームを一定量以上照射した雄原細胞では、染色体異常があるために核の分裂は生じないが細胞周期は進行し、非還元性の雄原細胞様精細胞を高頻度に形成する。より DNA 損傷が少ない状態で雄原細胞様精細胞を誘導する条件を検討するために、これまで使用していた炭素イオンビームに加え、アルゴンイオンビームを使用した。アルゴンイオンビームを 2.5 - 40 Gy 照射した花粉において精細胞形成率を調査したところ、20 Gy および 40 Gy 照射時には精細胞形成率の低下が見られ、それら高線量照射区において雄原細胞様精細胞形成が確認された。40 Gy 照射では、炭素イオンビーム照射の方が染色体再編成を有する精細胞の形成割合が高かったが、アルゴンイオンビームでは精細胞形成過程の分裂中期で停止する細胞の割合が高かった (Hirano et al. 2013, 第 1 図)。両ビームの線エネルギー付与の値から、炭素イオンビームでは DNA 二本鎖切断がゲノム DNA 上に比較的広く分布し、アルゴンイオンビームではより局所的に密集すると言われている。このため、炭素イオンビームの方が染色体各所の DSB が修復される際に染色体異常を多く引き起こしたと考えられる。さらに、アルゴンイオンビーム照射では 24 時間後に残存する DNA 二本鎖切断が多いことが示された。従って、アルゴンイオンビーム照射の方が炭素イオンビームに比べて修復が困難な DNA ダメージが誘発されたと考えられる。分裂中期で停止したものの、あるいは DNA 二本鎖切断が残存する雄性配偶子の重複受精時の挙動は異なる可能性があるため、受精後の胚発生過程の調査には炭素イオンビームおよびアルゴンイオンビーム照射花粉の両方を使用して比較することが必要と考えられる。



第 1 図 アルゴンイオンビーム照射花粉における 24 時間培養後の雄性配偶子形成割合

##### (2) 雄原細胞様精細胞の重複受精過程における挙動

炭素イオンビームを 40 Gy 照射して形成される雄原細胞様精細胞が、卵細胞、中央細胞のどちらと融合するのかを調査するために、人工授粉後 3 日の子房を固定し、ClearSee (Kurihara et al. 2015) および TOME1 (Hasegawa et al. 2016) を用いて胚嚢の観察を行った。しかし、キルタンサスの胚珠が大きく、さらに珠皮および珠心細胞が密になっているため、胚嚢の細胞観察は困難であった。このため、詳細な細胞観察のためにパラフィン切片を作成し胚嚢内の観察を行った。交配後 3 日の胚嚢を観察した結果、未照射花粉交配個体の胚嚢では、二つの助細胞のうち一つが崩壊している胚嚢と、助細胞の崩壊が見られない胚嚢が確認された。助細胞の崩壊は、花粉管の到達によるものであり、崩壊が見られない胚嚢は花粉管が到達していないものと考えられる。また、助細胞の崩壊が見られた胚嚢においても、卵細胞、極核の分裂は見られないため、交配 3 日は受精の直前または直後と考えられる。炭素イオンビーム 10 Gy および 40 Gy 照射花粉交配個体においても、花粉管の到達した胚嚢が確認された。交配後 14 日の胚嚢を観察した結果、未照射花粉交配個体の胚嚢では、胚と遊離核段階の胚乳の形成が確認された (第 2 図 A)。



第 2 図 未照射花粉 (A) および炭素イオンビーム 40 Gy 照射花粉 (B) を授粉させ 14 日後の胚嚢  
EM: 胚  
EC: 卵細胞  
ES: 胚乳  
Bar s = 100 μm



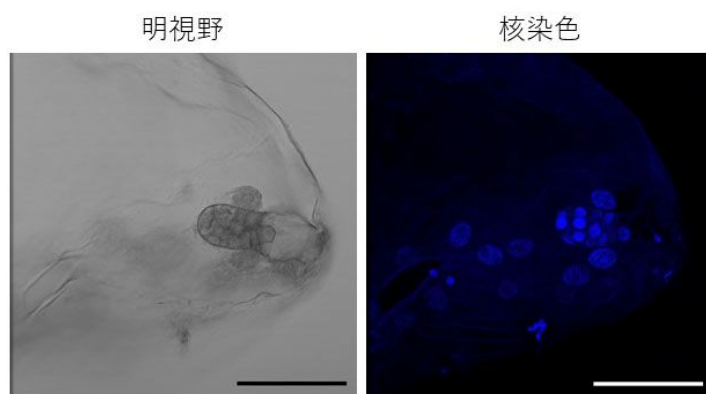
10 Gy および 40 Gy 照射花粉交配個体においても、同様に正常発達した胚と胚乳を持つ胚嚢が見られたが、一方で胚を形成しないが胚乳のみを形成する異常胚嚢が観察された(第2図B)。さらに、10 Gy 照射花粉に比べ 40 Gy 照射花粉のほうが、異常胚嚢形成率が高かったことから、雄原細胞様精細胞が異常胚嚢形成に関与している可能性が示唆された。雄原細胞様精細胞の受精様式および異常胚乳形成過程として、下記 から の仮説が考えられる。いずれの場合においても、多様な倍数性を示す胚乳および卵細胞(受精卵)が得られると考えられる。

雄原細胞様精細胞(推定核 DNA 量:2C)は、卵細胞と受精するが分裂せず、受精の刺激によって自律的に胚乳が形成する(推定核 DNA 量:受精卵 3C、胚乳 2C)

雄原細胞様精細胞が中央細胞とのみ受精し、胚乳を形成する(推定核 DNA 量:卵細胞 1C、胚乳 4C)

雄原細胞様精細胞は受精せず、花粉管内容物が胚嚢に到達することで、極核が自律的に分裂し、胚乳を形成する(推定核 DNA 量:卵細胞 1C、胚乳 2C)

上記の仮説 から のうち、どの機構で胚乳のみ発達しているのかを検証するために、胚(卵細胞、受精卵)および胚乳を胚珠から単離する手法を確立した(第3図)。核染色後の胚と胚乳の蛍光強度の比を調査すると、未照射花粉を授粉させることで形成した胚核の蛍光強度の平均を 100 としたときに胚乳核の平均は 187 であった。S 期の核も存在していると考え、胚が 2C、胚乳が 3C の核を有していると考えられた。炭素イオンビーム 40 Gy 照射花粉を授粉させて形成した胚嚢には、卵細胞と思われる細胞と胚乳が形成されていた。従って、切片観察で見られた異常胚嚢が形成されていることが確認された。異常胚嚢において、卵細胞の蛍光強度を 100 とすると胚乳核は 621 であった。卵細胞が半数体であると仮定すると、胚乳は少なくとも 4 倍体以上の核 DNA 量を持つと考えられる。このことから、雄原細胞様精細胞は中央細胞と受精した可能性、つまり仮説の を支持する可能性が示唆された。異常胚嚢では常に胚乳は形成されていたため、雄原細胞様精細胞が常に中央細胞と胚乳と受精しているのか否かは今後さらに多くの胚嚢を測定することで明らかになると考えられる。一方で、炭素イオンビーム 40 Gy 照射花粉を授粉し、胚と胚乳が形成した胚嚢においては、胚核の蛍光強度の平均を 100 としたときに胚乳核の平均は 280 であった。炭素イオンビーム照射花粉における雄性配偶子では、精細胞形成時に不等分裂した精細胞も確認されるため、核 DNA 量が小さな精細胞が卵細胞と核 DNA 量が大きな精細胞が中央細胞と受精した可能性が示唆された。胚を形成している胚嚢においても、さらに多くの胚嚢観察が必要である。



第3図 単離した胚嚢における核染色

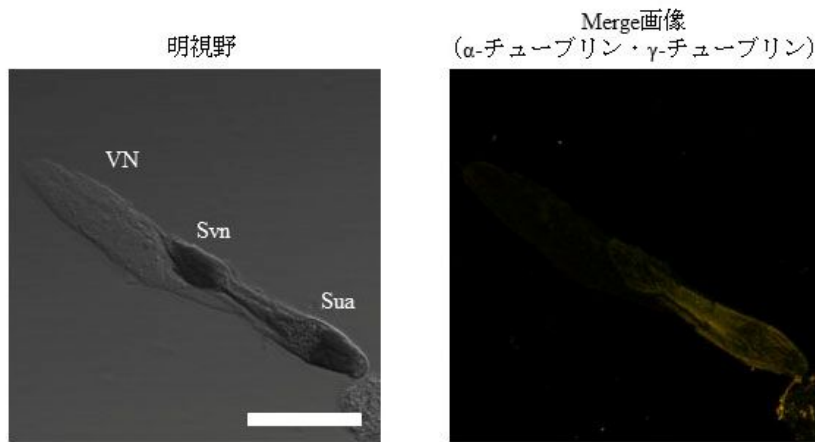
明視野では画像中央に胚が形成され、その上下に胚乳核が確認される

核染色画像は共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像の Z-stack を示す

Bars = 100  $\mu$ m

### (3) 精細胞異型化の素過程の精査

雄原細胞様精細胞の特性の特性として、異型化した 1 組の精細胞のうちどちらに近い性質を持つかを明らかにすることを目的とした。そのために、精細胞異型化の素過程の精査を行った。栄養核と結合しない側の精細胞(Sua)では栄養核と結合する側の精細胞(Svn)よりも微小管の蓄積が早く起こっており、それに伴い微小管の蓄積量が増加すること、Sua では Svn と比較して広い細胞質領域が存在していることが明らかになった(第4図)。表層微小管の重合や微小管の構造の編成に重要な役割を果たす  $\alpha$ -チューブリンの特徴的な分布の差は確認されなかった。Russel (1984) や Saito ら (2002) の報告によって精細胞間において細胞内小器官の分布に差異が生じることが明らかになっていることから、キルタンサスにおいても 2 つの精細胞間で細胞内小器官の分布に差があり、今回観察された Sua の広い細胞質領域に特定の細胞小器官が局在し、分布の差が生じているという可能性が示唆された。今後その領域に含まれている細胞質内容物の調査を行うこと、さらに雄原細胞様精細胞における調査を進めることで重複受精における機能との関係を明らかにする必要がある。



第 4 図 花粉管より単離した精細胞における免疫染色

Merge 画像は、 $\alpha$ -チューブリン(疑似カラー赤)と  $\gamma$ -チューブリン(疑似カラー緑)

Bar = 20  $\mu$ m

#### (4) まとめ

本研究により、炭素イオンビーム照射により形成された雄原細胞様精細胞の受精機構について中央細胞と受精する可能性、また、正常に胚と胚乳を形成している胚嚢においても多様な倍数性が生じている可能性が示された。今後、胚珠培養や胚培養、胚乳培養を行うことで、これまで行われてきた偽受精胚珠培養法と、雄原細胞様精細胞を介した倍数性の多様化法がどのように違うのかが明らかになることが期待される。二細胞性花粉を持つ園芸作物では、雄原細胞様精細胞が誘発可能と考えられることから、新たな育種法として迅速な染色体添加、染色体欠失系統の作出や倍数性育種への応用が期待される。

#### 引用文献

- Kurihara D, Mizuta Y, Sato Y, Higashiyama T (2015) ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* 142: 4168-4179.
- Hamamura Y, Saito C, Awai C, Kurihara D, Miyawaki A, Nakagawa T, Kanaoka M, Sasaki N, Nakano A, Berger F, Higashiyama T (2011) Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 21: 497-502.
- Hasegawa J, Sakamoto Y, Nakagami S, Aida M, Sawa S, Matsunaga S (2016) Three-Dimensional Imaging of Plant Organs Using a Simple and Rapid Transparency Technique, *Plant and Cell Physiology*, 57: 462-472.
- Hirano T, Hoshino Y (2009) Detection of changes in the nuclear phase and evaluation of male germ units by flow cytometry during in vitro pollen tube growth in *Alstroemeria aurea*. *Journal of Plant Research*, 122: 225-234.
- Hirano T, Hoshino Y (2010) Sperm dimorphism in terms of nuclear shape and microtubule accumulation in *Cyrtanthus mackenii*. *Sexual Plant Reproduction*, 23: 153-162.
- Hirano T, Takagi K, Hoshino Abe. T (2013) DNA damage response in male gametes of *Cyrtanthus mackenii* during pollen tube growth. *AoB PLANTS*, 5: plt004.
- Russell SD (1984) Ultrastructure of the sperm of *Plumbago zeylanica*. II. Quantitative cytology and three-dimensional organization. *Planta* 162:385-391.
- Saito C, Nagata N, Sakai A, Mori K, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2002) Angiosperm species that produce sperm cell pairs or generative cells with polarized distribution of DNA-containing organelles. *Sexual Plant Reproduction*, 15:167-178.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 T. Hirano, Y. Watarikawa, Y. Hayashi, T. Abe, H. Kunitake	4. 巻 52
2. 論文標題 Effects of carbon-ion irradiation to male gametes on double fertilization in <i>Cyrtanthus mackenii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RIKEN Accelerator Progress Report 2018	6. 最初と最後の頁 214
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 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. Hirano, A. Hanada, Y. Hayashi, T. Abe, H. Kunitake	4. 巻 51
2. 論文標題 Analysis of DNA damage response in <i>Cyrtanthus</i> pollen after Ar-ion beam irradiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RIKEN Accelerator Progress Report 2017	6. 最初と最後の頁 240
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 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 平野智也、市田裕之、阿部知子	4. 巻 55
2. 論文標題 重イオンビームで広がる花きの新品種作出	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 775-782
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 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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野智也、國武久登、阿部知子
2. 発表標題 重イオンビーム誘発変異を利用した新規育種法開発に向けて
3. 学会等名 理研シンポジウム「重イオンビーム育種技術の実用化20年」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田宗謙, 渡川友里恵, 林依子, 阿部知子, 國武久登, 平野智也
2. 発表標題 重イオンビーム照射雄性配偶子が重複受精と胚発生に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野智也, 花田安那, 林依子, 阿部知子, 國武久登
2. 発表標題 アルゴンイオンビーム照射したキルタンサス花粉におけるDNA損傷応答
3. 学会等名 園芸学会平成29年度秋季大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宮崎大学農学部応用生物科学科植物遺伝育種学研究室 <a href="https://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/plantbreeding/">https://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/plantbreeding/</a>
---

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