

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657030

研究課題名(和文)花粉母細胞の減数分裂時に見られる特異な細胞質分裂のライブイメージング

研究課題名(英文)Live imaging of unusual behaviors of tapetal cells in Arabidopsis

研究代表者

石黒 澄衛 (Ishiguro, Sumie)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50260039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タペート細胞は葯壁の最内層を構成し、発達中の花粉が必要とするさまざまな物質を供給する哺育細胞である。この細胞の特徴は核を2個ずつ持つことである。我々はシロイヌナズナを用いたライブイメージングに取り組み、この二核化は葯内のタペート細胞で同調的に進行することを明らかにした。このとき前期前微小管束や隔膜形成体が正常に形成されておらず、これが有糸分裂は進行するのに細胞質分裂が起こらない原因であると推定した。一方、葯の発達後期では、タペート細胞はその崩壊に先立ってプロトプラスト化し、葯室内に潜り込むことがわかった。全ての花粉に均一にポレンコートを形成するのに寄与していると推定される。

研究成果の概要(英文)：Tapetal cells are nursery cells for developing pollen grains in anthers. One of the most characteristic features of the cells is binucleation. Live imaging revealed that the binucleation proceeds synchronously in tapetal tissue. During the process, we found that spindles formed normally but phragmoplast disappeared without producing cell plates. In the late stage of anther development, we observed tapetal cells become protoplasts and migrate interstitially through pollen grains in locules. Then they collapse and release their components to the surroundings of pollen grains. It may contribute to form uniform pollen coats on the surface of all pollen grains in locules.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物 生殖 花粉 有糸分裂 タペート細胞 イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

タペート細胞は被子植物の雄しべの葯内で小孢子（発達中の花粉）を取り囲んで存在する一層の細胞である。葯の発生過程では、タペート細胞と花粉母細胞は同一の細胞（胞原細胞）に由来するが、減数分裂を経て小孢子になる花粉母細胞に対し、タペート細胞は小孢子的哺育細胞として働くようになる。タペート細胞には興味深い構造上の特徴が二つある。一つはエライオプラストおよびタペートソームというタペート細胞にしか見られないオルガネラが発達することで、両オルガネラに蓄積する多量の脂質やタンパク質はポレンコートとなって花粉の表面を覆い、花粉を乾燥から守ったり、柱頭が花粉を認識するのを助けたりする。両オルガネラの発達過程は主に透過型電子顕微鏡で調べられてきたが、生きた細胞内ではどのような形態であるのか、どのような過程を経て発達してくるのかは全くわかっていなかった。もう一つの特徴は核で、タペート細胞は細胞内に核を2個ずつ持つという極めて特異な性質を持つ。これは、核分裂が正常に起きたあとの細胞質分裂で何か特別なことが生じていることを意味する。この二核化は花粉母細胞の減数分裂と相前後して起きることから、両者には何らかの関係がある可能性も考えられる。しかし、これがどのようなしくみで起きるのか、その意義は何か、詳しいことは全くわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、タペート細胞が二核化する過程をライブイメージングし、通常の細胞分裂と何が異なるのか、特に核分裂だけが起きて細胞質分裂が起きないのはどうしてなのか、またそこにはどのような意義があるのかを明らかにすることを目的とする。また、エライオプラストやタペートソームのライブイメージングを行い、両オルガネラがいつどのように発達するのかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 二核化のライブイメージング

核と染色体を可視化するため、花粉母細胞期から小孢子期の初期にかけてタペート細胞で特異的に発現するプロモーターにヒストン H2B と GFP の融合遺伝子を連結してシロイヌナズナに遺伝子導入した。微小管も観察する際はチューブリンと GFP の融合遺伝子とヒストン H2B-RFP 融合遺伝子を同時に遺伝子導入した。

形質転換シロイヌナズナのステージ 8 の蕾の葯をショ糖を含む MS 培地とともにプレパラートに封入し、タペート細胞内の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。

### (2) エライオプラストとタペートソームのラ

### ライブイメージング

やや遅い時期のタペート細胞で特異的に発現する GRP17 プロモーターに GRP17 と GFP の融合遺伝子を連結してシロイヌナズナに導入し、GRP17-GFP が蓄積して蛍光を発するタペートソームが形成される過程を観察した。同様に、FIB1a プロモーターに FIB1a-GFP を連結し、FIB1a-GFP で可視化されたエライオプラストを観察した。

## 4. 研究成果

(1) タペート細胞の二核化は同調的に起きることがわかった

ヒストン H2B-GFP で可視化された核が顕微鏡下で有糸分裂する様子をライブイメージングすることに成功した。有糸分裂にかかる時間は 30 分程度であり、隣接した細胞の核は同調的に分裂することが明らかになった。

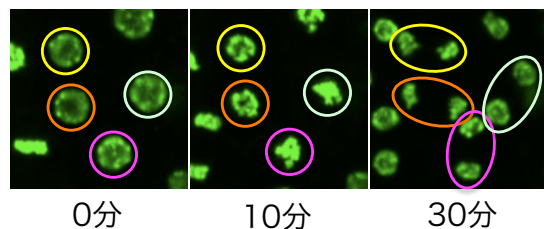


図1 隣接する4個のタペート細胞の同調的な核分裂  
0分、10分、30分に撮影した同視野の連続写真。  
それぞれの写真で、4個の細胞は同調的に前期(0分)、  
前中期(10分)、終期(30分)と変化した。

(2) 二核化ののちタペート細胞の染色体はさらに倍加することがわかった

ヒストン H2B-GFP で可視化された核の蛍光量を測定した結果、二核化してできた核の一部ではその後さらに蛍光量が倍増していた。そこでセントロメアを可視化して数えてみると、これらの核ではセントロメアの数（染色体の数）が倍加していた。以上の結果より、シロイヌナズナのタペート細胞は発達過程で全てが二核化し、その一部ではさらに染色体の核内倍加が起きることが明らかになった。

(3) 二核化の過程では前期前微小管束や隔膜形成体が正常に形成されないことがわかった

一般的な植物の細胞分裂では、有糸分裂に先立って微小管などからなる前期前微小管束が細胞表層に形成され、これが有糸分裂後に現れる隔膜形成体の形成位置（すなわち細胞質分裂の分裂面の位置）を規定すると考えられている。したがって、二核化は起きるが細胞質分裂が起きないタペート細胞では、これらの構造が正常に形成されていない可能性がある。そこで微小管を可視化して調べてみた結果、前期前微小管束は全く形成されることがなかった。さらに、隔膜形成体はいつたん形成されるものの遠心的に広がることなく消失してしまうことがわかった。

(4) タペート細胞の二核化を阻害すると花粉に異常が生じることがわかった

二核化の意義を調べるため、細胞終期を負に制御する因子をタペート細胞で発現させる実験を行った。その結果、花粉の形態に異常が生じる様子が観察された。このことより正常な花粉の発達にはタペート細胞の二核化が必要であることが明らかになった。

(5) エライオプラストの形成過程をライブイメージングで追跡することができた

エライオプラストは二重膜に囲まれるプラスチドの一種であり、内部にプラストグロビュールと呼ばれる油滴構造が多数発達するため、電子顕微鏡ではザクロの実のように見える。プラストグロビュールに蓄積するFIB1a タンパク質と GFP との融合タンパク質を FIB1a 自身のプロモーターを用いてタペート細胞で発現させた結果、二核化が起きた直後から GFP で光るエライオプラストが観察されるようになり、やがてその内部に粒状のプラストグロビュールの蛍光が明るく観察できるようになった。しかし、小胞子が細胞分裂を迎える頃には蛍光は徐々に弱くなり、エライオプラストがもっとも発達するステージ 12 中期には蛍光がほぼ消えてしまった。内在性の FIB1a もタペート細胞が崩壊してポレンコートができるまでには分解されてしまうことから、成熟したエライオプラストにはプロテアーゼ活性があるのかもしれない。

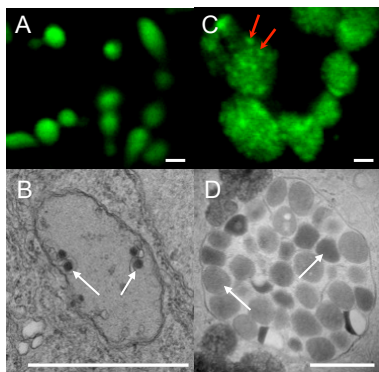


図2 エライオプラストの発達

シロイヌナズナのタペート細胞中に発達するエライオプラスト。(A, B) 花の発達ステージ 9。(C, D) ステージ 12 中期。(A, C) FIB1a-GFP でライブイメージングしたエライオプラスト。(B, D) 透過電子顕微鏡で観察したエライオプラスト。矢印はプラストグロビュール。スケールバーはいずれも 1  $\mu\text{m}$ 。(Suzuki et al., Plant Sci. 207, 25-36 (2013) より一部改変)。

(6) タペートソームの形成過程をライブイメージングで追跡し、成熟期のタペート細胞の挙動に関する新知見を得た

タペートソームはタペート細胞のみに見られる脂質蓄積性の特殊なオルガネラである。タペートソームの主要タンパク質であるオレオポレニンの一つ GRP17 に GFP を連結し、GRP17 自身のプロモーターを用いて発現させ

たところ、生きているタペート細胞の中でタペートソームの形成をライブイメージングできることがわかった。タペートソームはエライオプラストよりも少し遅れてステージ 10 (小胞子が四分子から遊離する時期) から観察できるようになり、徐々に明るさと大きさを増し、電顕観察で最もよく発達した像が観察できるステージ 12 中期には、ライブイメージングでも非常に明るい蛍光顆粒として観察された。

タペート細胞は非常に薄い細胞壁しか持たないため生組織の状態ではほぼ無色透明であり、通常の植物細胞のように細胞壁を視認することで細胞の大きさや形を認識することができない。しかし、GRP17-GFP が蓄積するタペートソームは多数の小顆粒としてタペート細胞全体に分散しているため、その蛍光を観察することで生きているタペート細胞の挙動を追跡することができる。大型の葯を持つセイヨウナタネでこの実験を行い、成熟期のタペート細胞の変化を観察した結果、タペート細胞はその崩壊に先立って葯壁細胞から遊離してプロトプラスト状になり、花粉の隙間を縫って葯室内部に潜り込んでいくことがわかった。タペート細胞が葯壁周辺だけでなく葯室内部に潜り込んでから崩壊することで、全ての花粉の表面にまんべんなくタペート細胞の内容物が付着し、ポレンコートとなるのであろう。全ての花粉に均一にポレンコートを形成させるための巧妙なからくりであると考えられる。シロイヌナズナでも同様のことが起きているのかもしれないが、小さすぎて観察は難しい。大型の形質転換植物を用い、タペート細胞をイメージングすることで初めて明らかにすることができた知見である。

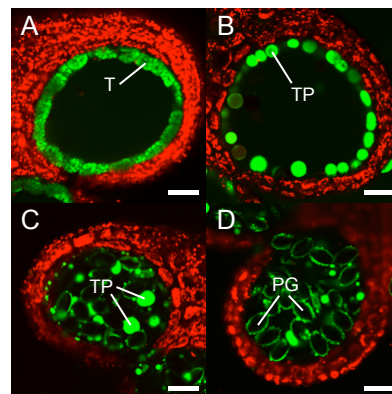


図3 タペート細胞が崩壊し、中身が花粉表面に沈着してポレンコートが形成される過程のイメージング (A) 葯壁に貼り付いて存在しているタペート細胞 (緑色)。(B) プロトプラスト状になったタペート細胞。(C) 葯室内部へ潜り込んだプロトプラスト状タペート細胞。(D) タペート細胞が崩壊して中身が花粉表面に沈着し、ポレンコートが形成された様子。T: タペート細胞、TP: プロトプラスト状タペート細胞、PG: 花粉、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。材料はセイヨウナタネ。(Suzuki et al., Plant Sci. 207-25-36 (2013) より一部改変)。

## 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 3 件)

- ① Toshiya Suzuki, Sonomi Tsunekawa, Chie Koizuka, Kanta Yamamoto, Jun Imamura, Kenzo Nakamura, Sumie Ishiguro  
Development and disintegration of tapetum-specific lipid-accumulating organelles, elaioplasts and tapetosomes, in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Science* **207**, 25-36 (2013). 査読有  
DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.02.008

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 鈴木俊哉「シロイヌナズナを用いた葯壁タペート細胞の二核化機構の解明」第 77 回日本植物学会大会 2013. 9. 13-15 北海道大学 (北海道・札幌市)
- ② 鈴木俊哉「シロイヌナズナを用いた葯壁タペート細胞の二核化機構の解明」第 54 回日本植物生理学会年会 2013. 3. 21-23 岡山大学 (岡山県・岡山市)

〔その他〕

ホームページ

<http://tabacum.agr.nagoya-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石黒 澄衛 (ISHIGURO, Sumie)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号：50260039

### (2) 連携研究者

東山 哲也 (HIGASHIYAMA, Tetsuya)  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：00313205

### (3) 研究協力者

鈴木 俊哉 (SUZUKI, Toshiya)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・研究員