

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25840113

研究課題名(和文) 重複受精を制御する雌性配偶子膜局在因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel double fertilization regulators locating on the female gamete surface

研究代表者

井川 智子 (Igawa, Tomoko)

千葉大学・大学院園芸学研究科・助教

研究者番号：00360488

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)：卵細胞膜を特異的にGFPで標識したシロイヌナズナ形質転換体(EC-PM-GFP)を作成し、雌ずい組織を回収した。回収した雌ずい組織から界面活性剤に可溶性の画分を抽出し、GFP抗体による免疫沈降を行った。比較対象として野生型でも同様の実験を行った。これらの精製タンパク質に対してプロテオーム解析を行った結果、形質転換体において特異的なタンパク質が同定され、その中にはGFPも含まれていた。この結果より、本研究で行った方法では卵細胞を単離することなく、雌ずい組織を材料として、卵細胞特異的なタンパク質を単離できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis transgenic plant (EC-PM-GFP), where the egg cell plasma membrane is specifically labeled with GFP, was produced. The protein extract derived from collected pistils was subjected to immunoprecipitation using anti-GFP antibody. As a result, specific proteins such as GFP were successfully identified only in the proteins from transgenic pistils, but not in those of wild type pistils. It was indicated that egg cell proteins within the pistil cell population were successfully isolated by our method. This method has a great advantage of avoiding laborious work to handle the egg cell.

研究分野：植物生殖学

キーワード：卵細胞 プロテオーム 膜タンパク質 被子植物

1. 研究開始当初の背景

(1) 被子植物は、2 個の雄性配偶子 (精細胞) が 2 種類の雌性配偶子細胞 (卵細胞と中央細胞) とそれぞれ融合する「重複受精」を行う。重複受精は配偶子細胞膜上に存在する分子によって正確に制御されると考えられる。これまでに、植物の精細胞膜に局在する GCS1 が、雌性配偶子との融合に関与する因子として同定されている。しかし GCS1 の発見は重複受精制御の分子メカニズムのごく一端を明らかにしたばかりである。重複受精制御の全容を明らかにするためには、さらなる受精因子の探索・同定が求められている。

(2) また、GCS1 については重複受精時の配偶子融合への関与に加えて、花粉管ガイダンスへの関与も報告されている。しかし後者の機能については相反する知見も報告されており、未だに花粉管ガイダンスへの関与については明確な決定が成されていない。

2. 研究の目的

(1) ①本研究ではまず雌性配偶子、特に卵細胞の細胞膜に局在する受精因子の発見を最終目標とし、それらを可能とするツールおよびタンパク質精製法の開発をおこなった。②同定されたタンパク質の中から候補因子を選出し、機能解析を経て新規受精因子の同定を目標とした。

(2) 既知の受精因子である GCS1 の花粉管ガイダンスにおける機能を明確にすることを目的として再検証研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ①これまでに申請者が作出した卵細胞膜 GFP マーカーライン pDD45::GFP-AtPIP を用いた (Igawa et al. 2013)。成熟しているが未受精の卵細胞を得るために、開花前日に除雄して翌日雌ずい組織を回収した。回収した雌ずい組織はタンパク質抽出時まで -80℃ で保存した。比較対象として、野生型雌ずいも同様の手順で回収した。

約 200 個の雌ずい組織を界面活性剤を含むバッファー中で破砕し、粗タンパク質抽出液を得た。さらに抗 GFP 抗体による免疫沈降を行い、精製されたタンパク質の質量分析を行った。

②同定されたタンパク質のうち、推定膜貫通領域を有する因子を解析候補として選出した。候補因子の遺伝子破壊株を取り寄せ、種子稔性を調査した。種子形成に異常を示した遺伝子破壊株について表現型調査および分子生物学的解析を行った。

(2) *quartet* (*qrt*) 変異体をバックグラウンドとする *gcs1* 欠損変異体の花粉を用いた。*qrt* 変異体では花粉母細胞が減数分裂を経て四分子を形成した後、各々の小胞子が分離せずに結合したままとなる。その結果花粉が 4 粒結合したテトラッド構造体が形成される。さらに、テトラッドのうち 2 つは野生型、2 つ

は *gcs1* 変異の遺伝子型の花粉となるため、テトラッド単位で受粉を行った場合、野生型と *gcs1* 変異の花粉が必ず 1:1 の比率で含まれることになる。また、*gcs1* 変異は GUS 遺伝子と連鎖しており、*gcs1* 花粉および花粉管は GUS 染色によって青色を呈する。*gcs1* 花粉管が必ず含まれる条件下において、胚珠への進入率に関して統計学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ① pDD45::GFP-AtPIP において特異的に同定されたタンパク質の中には、GFP および AtPIP が含まれており、本研究で行った方法により雌ずい組織から卵細胞特異的な膜タンパク質を精製することに成功した。被子植物卵細胞は胚珠組織に囲まれているため、単離操作が難しい。本研究ではこの単離操作を経ることなく、卵細胞タンパク質精製を可能とした。本成果については現在学術誌に投稿して minor revision を要求され、修正原稿を再提出中である。

② pDD45::GFP-AtPIP において特異的に同定されたタンパク質のうち、推定膜貫通領域を有する因子を解析候補として選出した。これらのうち、Toll-interleukin-1 receptor-like domain-Nucleotide binding site-Leucine rich repeat (TIR-NBS-LRR) クラスに属するタンパク質をコードする遺伝子破壊株において、稔性の低下が観察された。この遺伝子破壊株と野生型の相反交雑を行った結果、雄側に変異があるときに著しく種子形成率が低下した (図 1)。



図1:野生型 (w)と変異体(m)における胚珠発達の様子(♀×♂)

a 野生型自殖 b 変異体自殖
c 野生型×変異体 d 変異体×野生型 bar = 1mm

種子形成異常の原因を追及するため、花粉管伸長について調査した。その結果、花粉親に遺伝子破壊株を用いたときに、花粉管が雌ずい下端まで伸長せずに途中で停止する様子が観察された (図 2)。

さらに、遺伝子破壊株の花粉管は胚珠に誘引されない頻度が高かった (図 3)。

本研究ではこの遺伝子破壊株を種子形成に異常を示す変異体として *asf* (abnormal seed formation) と仮名を付けた。*asf* で破壊された遺伝子座を確認したところ、ABRC に登録されている TIR-NBS-LRR クラス遺伝子には異常がないことが判明した。

そこで名古屋大学の鈴木孝政博士の協力により *asf* の全ゲノムシーケンス解析を行った結果、2 箇所の遺伝子座に T-DNA が挿入

図2：受粉24時間後の花粉管伸長の様子（アニリンブルー染色）
w; 野生型、m; 変異体、bar = 500µm 矢印は最も伸長した花粉管の位置

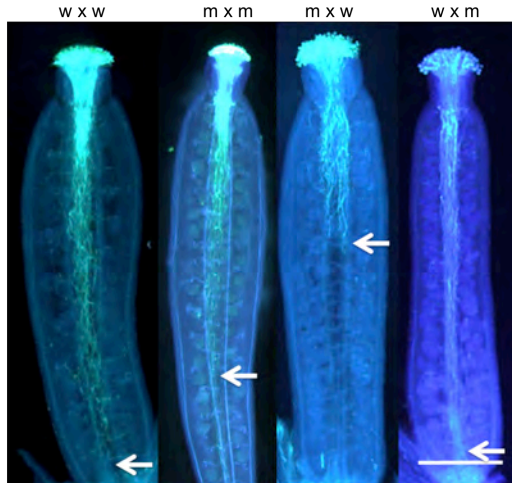
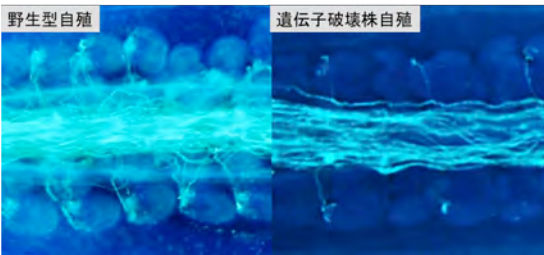
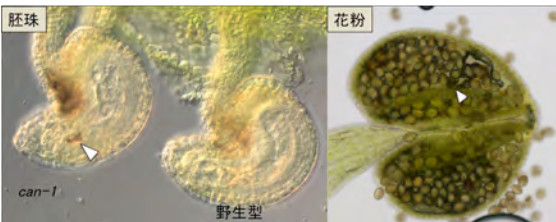


図3：受粉24時間後の花粉管伸長の解析



されていることが判明した。また、多数のギャップが存在することも判明した。まず、2つの破壊遺伝子座について *can-1* (*candidate-1*) および *can-2* とし、改めて各々の遺伝子破壊株について稔性を調査した。その結果、両者において種子形成の異常が観察された。さらに、胚珠を観察したところ、花粉発生に加えて胚のうの珠孔側に発生異常があることが示唆された(図4)。この観察結果から、*asf* の花粉管誘引における異常は助細胞の発生異常に起因することが推測された。さらに解析を進めるため、*can* 変異体と野生型との戻し交雑を行い、BC1世代を自殖したが、その後代には、同様の表現型を示す個体が含まれなかった。そのため、上記表現型の原因遺伝子特定にはまだ至っていない。

図4：*can*変異体における配偶体発達異常
矢頭は異常を示す配偶体を示す



(2) まず、*gcs1* 変異体のテトラッドを受粉した雌ずいにおいて、GUS とアニリンブルーの二重染色を行った。その結果、GUS 染色される *gcs1* 変異体の花粉管も正常に胚珠へ誘引されていた(図5)。

さらに、*gcs1* 変異体テトラッドを1セット受粉し、アニリンブルー染色により花粉管の動態を観察した結果、発芽した4本全ての花

図5：*gcs1*変異体テトラッドを受粉した雌ずいのGUSおよびアニリンブルー染色
矢印のGUS染色を示す胚珠は、*gcs1*花粉管を受け取ったと判断される。アニリンブルーで染色された花粉管像は、*gcs1*変異が花粉管ガイダンスに影響を及ぼしていないことを示す。

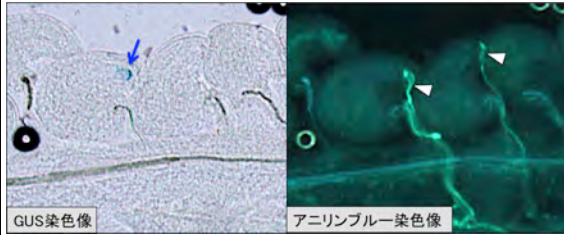
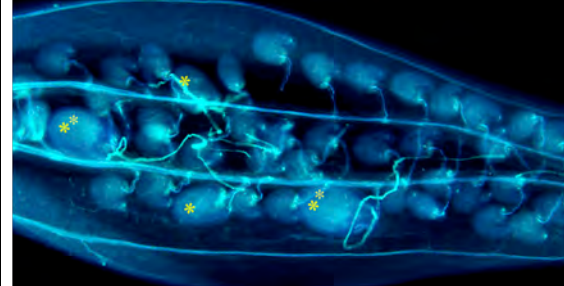


図6：*gcs1*変異体テトラッド1セットを受粉した雌ずいのアニリンブルー染色
4つの胚珠が花粉管を受け取っている。胚珠のサイズより、**は野生型、*は*gcs1*花粉管を受け取っていると推測される。



粉管が胚珠に誘引されていた(図6)。1つの *gcs1* テトラッドから発芽した花粉管が3本以上雌ずい中で確認できれば、そのうち少なくとも1本は *gcs1* 変異体花粉管となる。この条件下において、*qrt* テトラッドを受粉した場合と比較を行った。発芽した花粉管のうち、正常に胚珠に進入した花粉管の割合を計測して統計解析を行った結果、*gcs1* 花粉管と *qrt* 花粉管間で有意な差は検出されなかった。従って、本研究では *GCS1* の欠損が少なくとも胚珠への進入段階での花粉管ガイダンスに影響を及ぼさないことが示された。本研究成果は、現在学術誌に投稿中である。

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 6 件)

① Mori T., Kawai-Toyooka H., Igawa T., Nozaki, H. Gamete dialogs in green lineages. *Mol. Plant*, 査読有, 2015, 8, 1442-1454
doi: 10.1016/j.molp.2015.06.008

② Maruyama D., Mori T.(4 番目), Igawa T. (5 番目), Higashiyama T. et al. (計 14 名) Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism. *Cell*, 査読有, 2015, 161, 907-918
doi: 10.1016/j.cell.2015.03.018

③ Mori T., Igawa T. Gamete attachment process revealed in flowering plant fertilization. *Plant Signal Behav.* 査読有, 2014, 9, e977715
doi: 10.4161/15592324.2014.977715

④ Mori T., Igawa T., Tamiya G., Miyagishima S., Berger F. Gamete attachment requires GEX2

for successful fertilization in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 査読有, 2014, 24, 170-175
doi: 10.1016/j.cub.2013.11.030

⑤ Igawa T., Mori T. Gamete membrane dynamics during double fertilization in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* 査読無, 2013, 8, e24512
doi: 10.4161/psb.24512

⑥ Igawa T., Yanagawa Y., Miyagishima S., Mori T. Analysis of gamete membrane dynamics during double fertilization of Arabidopsis. *J. Plant Res.*, 査読有, 2013, 126, 387-394
doi: 10.1007/s10265-012-0528-0

[学会発表] (計 6 件)

① 「新規雄性配偶子膜特異的タンパク質 AtLGM1 の機能解析」
高橋太郎、森稔幸、上田健治、豊岡博子、山田力志、澤田均、野崎久義、井川智子
第 79 回日本植物学会大会、2015 年 9 月 6-8 日、朱鷺メッセ

② 「精細胞特異的タンパク質 GCS1 欠損変異体の花粉管ガイダンスにおける表現型解析」
柳瀬俊吾、本田健、高橋太郎、森稔幸、井川智子
第 79 回日本植物学会大会、2015 年 9 月 6-8 日、朱鷺メッセ

③ 「新規植物受精因子単離を目指した新たな研究展開」
森稔幸、井川智子、野崎久義
日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12-14 日、明治大学

④ 「新規雄生配偶子特異的膜タンパク質 LGM1 の発現解析」
井川智子、上田健治、高橋太郎、豊岡博子、山田力志、澤田均、野崎久義、森稔幸
日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12-14 日、明治大学

⑤ 「胚乳との細胞融合による急速な助細胞排除機構の発見」
丸山大輔、武内秀憲、井川智子、西川周一、森稔幸、東山哲也
第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド

⑥ 「新規植物有性生殖制御因子の特徴解析」
森稔幸、井川智子、Frederic Berger、宮城島進也
日本植物学会第 77 回大会、2013 年 9 月 13-15 日、北海道大学高等教育推進機構

[図書] (計 1 件)

① 「動植物の受精学」
澤田均 編 (井川智子、他 37 名)

2014 年、化学同人 (第 7 章 ‘被子植物の受精 2 ; 配偶子の融合’ p108-112 執筆担当)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.h.chiba-u.jp/lab/saiboko>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井川 智子 (IGAWA, Tomoko)
千葉大学・園芸学研究科・助教
研究者番号 : 00360488

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

森 稔幸 (MORI, Toshiyuki)
山田 力志 (YAMADA, Lixy)