

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660017

研究課題名(和文)花粉培養系を利用した雄性配偶子のシングルセル・オミクスによる受精因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of male gametes during pollen tube growth by single cell omics with in vitro pollen culture system

研究代表者

星野 洋一郎 (HOSHINO, Yoichiro)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：50301875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：二細胞性花粉を持つアルストロメリア、ペチュニア、ボタンを用いて、液体花粉発芽培地を用いた花粉管伸長の観察と花粉管内の核相の変化を解析した。これらの植物は、発芽培地中でも雄原細胞が分裂して精子細胞を形成することが分かった。また、アルストロメリアの花粉および発芽培地で発芽させた花粉を供試して、質量分析装置を用いてプロテオーム解析を行った。花粉管伸長過程におけるタンパク質の消長について考察を行った。

研究成果の概要(英文)：Alstroemeria, Petunia and Paeonia, which have bicellular pollen, were used for analyzing pollen tube development and nuclear phase change in liquid pollen culture medium. The pollen grains of these plant species could germinate in vitro and produce sperm cells through mitosis of generative cell. Proteome analysis was applied to pollen grain and in vitro grown-pollen tubes in Alstroemeria. During pollen tube growth, some proteins were identified with mass spectrometry.

研究分野：園芸学

キーワード：花粉 花粉管

1. 研究開始当初の背景

高等植物は花粉管内の二つの精細胞が関与する重複受精を行う。このプロセスは、二つの精細胞が卵細胞と中央細胞とそれぞれ融合して胚と胚乳を形成するものである。二つの精細胞と卵細胞・中央細胞は巧妙に互いを認証し、重複受精を達成する。同一花粉管内に形成される二つの精細胞が同質なものであるか、また、どちらが卵細胞と融合し、また中央細胞と融合するのか、それが運命づけられているのかどうかはよく分かっていない。受精直後に卵細胞と中央細胞はそれぞれ胚と胚乳に分化し、大きくその姿を変えていく。しかしながら、重複受精に寄与する二つの精細胞の差異についてはまだほとんど解明されていない。

雄性配偶子研究の最近の話題として、花粉管内の核を一体のものとして捉える male germ unit (MGU) のコンセプトが提唱され (Dumas et al. 1984) さらに、二つの精細胞の差異について dimorphism (二型性) を示す例が報告されている (Russell 1991)。申請者は、アルストロメリアにおいて単細胞単離操作技術とフローサイトメトリーを組み合わせた手法でこの二型性を見出した (Hirano and Hoshino 2009)。さらに、キルタンサスにおいても同様な手法で二型性を見出し、さらに間接蛍光抗体法において微小管の蓄積の差異が二型性の要因であることを示した (Hirano and Hoshino 2010)。本申請ではこれらの知見を基盤に、花粉管伸長過程のダイナミクスを解析する研究計画を立案した。

2. 研究の目的

花粉発芽から花粉管伸長を経て受精に至る過程は、雌ずい内で進行するため直接解析することが困難である。そこで、人工培地で花粉を発芽させて解析する手法を開発し、雄原細胞から精細胞が形成されるプロセスに

ついて研究を行ってきた。高等植物は一对の精細胞が卵細胞と中央細胞にそれぞれ融合して重複受精を行う。本研究提案では、重複受精のプロセスを解明するために、一对の精細胞の差違・運命決定に着目し、一つの花粉管内の一对の精細胞をターゲットとしたシングルセル・オミクスの解析手法を開発する。また、花粉管伸長過程の核相の変化についても同時に追究を行う。

高等植物の花粉は、二細胞性 (二核性) 花粉と三細胞性 (三核性) 花粉の二つのタイプがある。二細胞性花粉は成熟時に栄養核と雄原細胞の二つの核を含み、柱頭上で発芽した後に花柱内で雄原細胞が分裂して精細胞を形成する。その後、子房内に達した花粉管は珠孔から胚珠に侵入して卵細胞と中央細胞に精細胞を運搬する。これらのプロセスは巧妙に制御されている。本研究では二細胞花粉を持つアルストロメリア、ボタン、ペチュニアを材料に用い、成熟花粉および花粉発芽過程のダイナミクスを明らかにするために、これまで開発してきた液体培地による花粉発芽系を用いて花粉および花粉管のオミクス解析および核相の変化について調査を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

花粉発芽、花粉管伸長を観察するために、高頻度で同調的に花粉発芽を誘導する液体培地の開発を行ってきた (Hirano and Hoshino 2009)。この培地組成を利用し、ボタン、ペチュニアの花粉を用いて花粉発芽、花粉管伸長の観察とフローサイトメトリーによる核相変化の解析を行った。

開薬直前の薬を採取し、実験室内で開薬させた薬の花粉、もしくは花粉を凍結保存していたものを用いて実験を行った。液体培地を 3.5 cm シャーレに 1.5 ml 入れ、花粉を培養した。倒立顕微鏡で花粉発芽の様子を観察し、発芽率の測定を行った。経過時間毎に、DAPI

(4',6-diamidino-2-phenylindole)による核染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて核の挙動を観察した。DAPI染色により、雄原細胞の分裂(精細胞の形成)を確認した。また、花粉発芽の経過時間毎に、フローサイトメトリーによる核相の変化を解析した。花粉管をフィルターで回収し、核単離用のバッファー中で花粉管をカミソリで切断して核を遊離させた。このバッファー液をフィルターに通して残渣を取り除き、核染色用のDAPI液を添加してフローサイトメトリーで解析した。対照として解析する植物種の葉を用いて倍数性を判定した。

液体花粉発芽培地と花粉培養系を用いて、アルストロメリア(*Alstroemeria aurea*)を供試してオミクス解析を行った。成熟花粉(100粒、500粒、1000粒)、発芽花粉(発芽直後、培養開始6、12、18時間後)を供試し、質量分析装置を用いたプロテオーム分析を行った。花粉は顕微鏡下でマイクロキャピラリーを用いて回収し、その後、タンパク質の抽出と精製、還元アルキル化およびトリプシン処理を行い、FT-MSとIT-MS/MSの組み合わせで測定を行った。データ取得後、NCBI nr, Swiss-Prot, *Arabidopsis thaliana* (NCBI), *Oryza sativa* (NCBI)の四つのデータベースを使用して解析を行った。

4. 研究成果

ペチュニア8品種('F1 ロンド・ピンクインプ'、'F1 ロンド・パープル'、'ローズスター'等)を供試して花粉発芽率の比較を行った。花粉発芽率の高い品種('F1 ロンド・ピンクインプ')を用いて、花粉管伸長過程における核相の変化について顕微鏡観察を行った。花粉発芽の経過時間毎にDAPIによる核染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、培養開始12時間後から雄原細胞の分裂(精細胞の形成)が観察された。雄原細胞の分裂は、核相の変化としてフローサイト

メトリーでも確認することができた。

ボタンについても8品種('連鶴'、'ハイヌーン'、'新国色'、'天衣'、'紅輝獅子'、'新七福神'、'島錦'、'島大臣')を供試して花粉発芽率の比較を行った。発芽率の高い品種'新国色'を用いて、核相の変化を解析した。DAPI染色による蛍光観察の結果、培養15時間以降に雄原細胞の分裂(精細胞の形成)が観察された。フローサイトメトリーでも雄性配偶子の動態を検出することができた。培養を24時間まで継続して観察したところ、2Cのピークを構成する核数が減少したが、0になることはなかった。これは、全ての花粉管内で精細胞形成が行われぬか、もしくは、1Cの精細胞どうしの結合または精細胞と花粉管核の結合などの可能性が考えられる。DAPI染色による花粉管の蛍光顕微鏡による観察では、これらの核と核との結合を示すものが見られた。

以上の結果から、すでに報告しているアルストロメリア、キルタンサスに加え、ペチュニア、ボタンにおいても花粉発芽培地中で花粉管伸長を行い、雄原細胞が分裂して精細胞を形成することが分かった。これらの二細胞性花粉は、培地中でも花粉管伸長を行い、雄原細胞が分裂することが示された。また、アルストロメリア、キルタンサスで観察されたMGM(フローサイトメトリーで3Cのピークとして検出され、二つの精細胞と花粉管核が結合したものと考えられる)が、ペチュニア、ボタンについても観察された。フローサイトメトリーで3Cのピークとして検出されるものが低頻度ながら検出され、このピークはMGUの形成を示唆していると考えられた。MGUについては、全ての花粉管で見られないことから、受精にどの程度に寄与するものか不明である。本研究で供試した全ての植物種で見られたことから普遍的な意義を持つ可能性があり、今後、詳細な解析が待たれるところである。

アルストロメリアの花粉を供試して、オミクス解析を行った。シングルセル・オミクスの技術を確立するために、花粉数を変えてタンパク質を抽出し、質量分析装置によるプロテオーム解析を行った。花粉 1000 粒では約 690、500 粒では 680、100 粒では約 600 のタンパク質が検出された。花粉 1 粒では約 20 のタンパク質が検出された。発芽培地で発芽させた花粉を供試した際には、発芽直後の花粉で 106、6 時間後に 93、12 時間後に 87、18 時間後に 86 のタンパク質を検出することができた。また、花粉の発芽・花粉管伸長に伴い同定されるタンパク質に変化が見られた。花粉管伸長の過程で、18 個のタンパク質が消失、9 個のタンパク質が新たに出現、42 個のタンパク質が常に存在していた。本研究において、アルストロメリアの少数の花粉および発芽花粉からタンパク質を同定することができた。花粉数を増やすことで検出されるタンパク質の数も増えることから、シングルセル・オミクスのためには抽出効率や測定の検出感度を改良する必要があると考えられる。

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

平井涼太・加藤淳太郎・星野洋一郎：液体花粉発芽培地を利用したボタンの花粉管伸長過程の核相変化の解析：園芸学会（平成 28 年度春季大会） 東京農業大学（神奈川県厚木市） 2016 年 3 月 26 日～27 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fsc.hokudai.ac.jp/farm/>

6．研究組織

(1)研究代表者

星野 洋一郎 (HOSHINO, Yoichiro)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授