

## シロイヌナズナを用いた受精初期過程の分子機構の解析

名古屋大学 西川 周一

派遣期間 2001年5月1日～2003年3月31日

研究機関 Department of Molecular Genetics and Cell Biology, The University of Chicago, 1103 East 57th Street, Chicago, Illinois 60637 USA

研究指導者 Assist. Prof. Daphne Preuss

### 1. 研究の背景

被子植物の受精の過程は、雄しべから放出された花粉が、雌しべ柱頭へ接着することから始まる。雌しべ柱頭に接着した花粉は吸水し、発芽した後、花粉管が雌しべ花柱内を通過して胚珠へと誘導される。その後、花粉由来の精核が卵核と融合して受精卵が形成する。このような受精の過程が正常に進行することは、植物が子孫に遺伝情報を正確に伝えていく上で必須であり、高い精度で受精反応を進行させる機構が存在すると考えられている。

受精の初期過程である、柱頭への花粉の接着は種特異的であり、たとえばシロイヌナズナの柱頭にはシロイヌナズナの花粉が他種の花粉よりも強い親和性をもって接着する。このような種特異的な花粉-柱頭間相互作用は、種間交雑を防ぐのに重要な役割をはたしており、これには種特異的な花粉-柱頭間の接着分子が関与していると考えられている。柱頭への花粉の接着は数秒以内に完了する早い反応であることから、柱頭や花粉の細胞外マトリクスに接着分子が存在することが予想されている。

シロイヌナズナの花粉の細胞外マトリクスは、intineとexineという2層の細胞壁とそれを覆うpollen coatという構造からなる。これまでに、シクロヘキサン処理によってpollen coatを除去した花粉でも柱頭への結合能が観察されること、精製したexine画分が接着能を持つことから、接着分子はexineに存在することが示されている。exineは主に、sporopolleninと呼ばれる長鎖脂肪酸やフェノール類の重合体と考えられている物質によって形成されている。sporopolleninは物理的、生物学的分解に抵抗性を持っている非常に安定な物質であり、exine層は花粉内部の保護という役割も持っている。しかし、その安定性ゆえに、

sporopollenin構造の生化学的解析は困難であり、その構造や生合成過程についてはほとんどわかっていない。

本研究では、遺伝学的アプローチにより、exine形成の分子機構を明らかにすることを目標とした。訪問先のDaphne Preuss研究室では、花粉-柱頭間接着の定量的アッセイ法が開発され、これを用いて柱頭への花粉の接着に欠損を示す*lap1* (less adherent pollen)変異株が分離されている。また、電子顕微鏡観察によって、*lap1*変異株はexine層による花粉表面の模様形成に欠損を示すことが明らかとなっている。そこで本研究では、*LAP1*遺伝子の同定とその機能解析を行なうとともに、exine形成の様々な過程に関与する因子の同定を目的として、*lap*変異株の大規模スクリーニングを行なった。

### 2. 結果と考察

#### 2.1 *lap*変異株の大規模スクリーニング

Preuss研究室で開発された花粉-柱頭間接着のアッセイでは、シロイヌナズナ雌しべ柱頭に花粉をまぶした後、バッファーを用いて洗浄し、柱頭に残存した花粉の数を計測する。花粉は柱頭への接着後10分程度で発芽し、柱頭内を花粉管が伸長するため、このアッセイでは、花粉をまぶした後直ちに柱頭を洗浄する必要がある。このため、アッセイ前に未受粉の雌しべを用意する必要があり、突然変異株の大規模スクリーニングには適していなかった。

Preussによって分離された*cer6-2*変異株は、花粉の吸水・発芽の過程に必須な花粉コート層の形成に欠損をもち、通常の栽培条件である低湿度条件下では、花粉は柱頭に接着した状態で受粉の過程が停止する。一方、花粉-柱頭間の接着は*cer*

6-2変異によって影響を受けない。また、*cer 6-2*変異株は高湿度条件下では空気中の水分を吸収することによって稔性が回復する。突然変異株分離の親株として*cer 6-2*変異株を用いることによって、自家受粉した花の雌しべを用いた花粉-柱頭間接着のアッセイが可能となり、このため、1日に100株程度をスクリーニングすることが可能となった。

*ethyl nitrosourea*によって変異原処理した*cer 6-2*変異株を元に作製した、約6700株のM2植物を花粉-柱頭間接着アッセイを用いてスクリーニングし、単一の遺伝子の変異によって欠損を示す変異株を9株分離した。相補性試験および変異部位のマッピングによって、6つの相補性群に分けられた。また、これら変異株の欠損は*cer 6-2*変異の有無に依存しないことが、戻し交雑によって*cer 6-2*変異を除くことによって示された。

## 2.2 *lap*変異株は花粉細胞壁のexine層の形成に欠損を示す

既に得られていた*lap 1-1*変異株および今回のスクリーニングで得られた*lap*変異株の花粉細胞壁の状態について、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡、およびexine特異的に結合する蛍光色素であるauramine O染色と共焦点顕微鏡を用いた解析を行なった。この結果、*lap*変異株はすべてexine層の形成に欠損を示すことが明らかとなった。以下に、各変異株で観察された欠損について、変異株ごとにまとめた結果を示す。

*lap 1*変異株：シロイヌナズナ野生株の花粉表面には、exine層の規則的な網目模様の構造が存在する。*lap 1-1*変異株および今回のスクリーニングで分離された新規アレル、*lap 1-2*変異株とともに、花粉表面の模様の形成に欠損を示していた。これら変異株では、exineは網目模様を形成せず、パッチ状に花粉表面に分布していた。*lap 1-2*変異株のexineのパッチは小さく、ほぼ大きさがそろっていたのに対し、*lap 1-1*変異株のexineのパッチは非常に大きいものから小さいものまでが混在していた。

*lap 2*変異株；今回のスクリーニングでは、*lap 2-1*変異株と*lap 2-2*変異株の2つのアレルが得られた。どちらの変異株も、花粉細胞壁に関して同様の欠損を示した。この変異株では、減数分裂の結果生じたと考えられる4つの花粉がexine層によっ

てつながった表現型を示した。この表現型は、Preussによって分離された*quartet*変異株の表現型と似ているが、*lap 2*変異株ではつながった4つの花粉の組(テトラド)同士が接着してさらに大きな花粉凝集体を形成しているのに対し、*quartet*変異株ではテトラド間の接着は観察されなかった。また、*lap 2*変異株では花粉表面のexineの模様の線が野生株のものよりも太いという表現型も観察された。

*lap 3*変異株、*lap 4*変異株；電子顕微鏡解析によって、これら変異株では花粉のexine層の形成に欠損が観察された。野生株の花粉では、exine層の厚さは約1  $\mu\text{m}$ であるが、これら変異株の花粉のexine層の厚さは野生株の約半分程度であった。一方、花粉表面のexine層の模様形成の欠損は観察されなかった。

*lap 5*変異株；走査型電子顕微鏡を用いた観察を行なうと、*lap 5*変異株の花粉表面はスムーズであり、野生株のような明確なexineの模様は観察されなかった。一方、auramine O染色ではexineの模様が観察されたため、透過型電子顕微鏡観察を行なったところ、この変異株の花粉では網目状模様を形成しているexine層が肥厚していることが示された。

*lap 6*変異株；走査型電子顕微鏡観察では、野生型と同様のexineの模様が花粉表面に観察された。しかし、透過型電子顕微鏡観察を行なったところ、この変異株の花粉では、intineのすぐ外側の層にあたるnexineとよばれるexine層が欠失していることが示された。

## 2.3 LAP2遺伝子の同定

マッピングの結果、*lap 2*変異は4番染色体上の遺伝マーカー *ciw 7*の近傍にマップされた。さらに詳細なマッピングの結果、変異部位を約30 kbの領域にまで絞った。この領域に存在する10遺伝子について、その塩基配列を野生型のものと比較したところ、1つの遺伝子にのみ*lap 2-1*変異株と*lap 2-2*変異株の両方で野生型の配列との違いが見られた。この遺伝子に関するT-DNA挿入欠損株をSalk研究所より入手し花粉形態を調べたところ、*lap 2*変異と同様の欠損が観察された。また、この遺伝子を含むDNA断片をpGreenII 0229プラスミドにクローン化し、*lap 2-1*変異株に導

入したところ、得られた形質転換体の花粉は野生型の表現型を示した。以上の結果から、この遺伝子がLAP2遺伝子であると結論した。

LAP2遺伝子は481アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており、N末端にシグナル配列となりうる疎水性アミノ酸に富んだ領域が存在する。また、膜貫通領域となりうる疎水性領域がC末端側から約1/3の部分に1つ存在する。ノザンプロットによる解析の結果、LAP2遺伝子は蕾でのみ発現しており、芽生え、葉、花ではその発現は検出されなかった。この結果は、LAP2遺伝子の変異によって花粉形成の過程に欠損が生じることとよい一致を示している。

LAP2遺伝子と相同性を示す遺伝子を検索したが、シロイヌナズナに1つ見つかった以外は相同遺伝子は確認されなかった。このため、相同性からはLAP2遺伝子の機能を推測はできなかった。シロイヌナズナの相同遺伝子に関するT-DNA欠損変異株をSalk研究所より入手し、その表現型を解析したが、*lap 2*変異株のような花粉細胞壁形成の欠損は観察されず、また、その他の判別可能な表現型も観察されなかった。以上の結果は、花粉細胞壁の形成にはLAP2遺伝子の機能のみが必要であることを示している。

#### 2.4 LAP1遺伝子の同定とその機能解析

マッピングの結果、*lap 1*変異は2番染色体上の遺伝マーカー*ciw 3*近傍の135 kbの領域にマップされた。この領域の塩基配列を野生株のものと比較したところ、 $\beta$ -グルカン合成酵素に相同性をもつ遺伝子にのみ*lap 1-1*変異株と*lap 1-2*変異株の両方で野生型の配列との違いが見られた。この遺伝子に関するT-DNA挿入欠損株をSalk研究所より入手し花粉形態を調べたところ、*lap 1*変異と同様の欠損が観察された。以上の結果から、この遺伝子がLAP1遺伝子であると結論した。

LAP1遺伝子は1923アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており、C末端側に $\beta$ -グルカン合成酵素と相同性をもつ領域が存在する。シロイヌナズナゲノム上には12個の $\beta$ -グルカン合成酵素遺伝子が存在しており、これらは $\beta$ -1,3グルカンポリマーであるカロース層の形成を行なっている。LAP1遺伝子と他の11個の $\beta$ -グルカン合成酵素遺伝子との間で、 $\beta$ -グルカン合成酵素ドメイン間の相同性を比較したところ、どの遺伝子との間でも59~69%の相同性を示した。また、ノザンプロットによる解析の結果、LAP1遺伝子は

蕾でのみ発現しており、芽生え、葉、花ではその発現は検出されなかった。この結果は、LAP1遺伝子の変異によって花粉細胞壁のパターン形成に欠損が生じることとよい一致を示している。

花粉細胞壁のexineの模様は、減数分裂によって花粉母細胞から4つの小胞子が形成された直後に確立する。減数分裂に先立ち花粉母細胞の周囲にカロース層が形成され、減数分裂はカロース層の内側で進行する。exine層の形成は小胞子がカロース層に囲まれている時点で開始し、カロース層が消失して小胞子が葯腔中に放出される時点では、exineの模様の基本的な構造は確立している。LAP1遺伝子が花芽中で発現していたことから、LAP1遺伝子産物が花粉母細胞周囲のカロース層の形成に関与していることが予想された。そこで、減数分裂直後の葯中におけるカロース層の形成を*lap 1*変異株と野生株との間で比較した。

減数分裂期前後に相当する蕾を固定・脱水後、LR White樹脂に包埋し、切片を作製後、アニリンブルーを用いてカロース層の染色を行なった。野生株では、減数分裂後の小胞子の周囲にカロース層が明瞭に観察されたが、調べたすべての*lap 1*変異株で、カロース層の形成に欠損が観察された。特に、4つの小胞子を囲むカロース層の欠損が顕著であった。また、*lap 1*変異株では、小胞子が葯腔中に放出される時点ですでにexineの模様形成の欠損が観察された。以上の結果は、花粉母細胞と小胞子を囲むカロース層が花粉細胞壁のexineの模様決定に関与していること、LAP1遺伝子によってコードされる $\beta$ -グルカン合成酵素が、このカロース層の形成を行なっていることを示している。

カロース層は、花粉母細胞以外にも植物の様々な組織や発生の過程で形成されることが知られている。花粉が発芽し、花粉管の伸長にともない花粉管の表面にカロース層が形成される。また、花粉管内にはカロースプラグとよばれる構造が形成され、これによって花粉先端部の領域に原形質がまとめられている。*lap 1*変異株の花粉管におけるカロース形成をアニリンブルー染色によって調べたところ、*lap 1-1*変異株の花粉管は、花粉管表面のカロース層とカロースプラグの両方の形成に欠損を示した。特に、カロースプラグに関しては、その構造自体が形成していないことが微分干渉顕微鏡を用いた観察によって明らかとなった。この結果は、LAP1遺伝子によってコードされる $\beta$ -グルカン合成酵素は花粉管におけるカロース合成に

も関与していることを示している。

*lap 1-1* 変異株の花粉管はカロース形成が観察されないにもかかわらず、*lap 1-1* 変異株は不稔ではなく、花粉の発芽率も野生株と同程度であった。また、自家受粉した*lap 1-1* 変異株の雌しべを切り開き花粉管の挙動を調べたところ、花粉管の胚珠へのガイダンスに異常は観察されず、花粉管は雌しべ基部にまで到達していた。

以上の結果は、シロイヌナズナにおいては花粉管におけるカロース形成は受精には必須ではないことを示している。