

## 植物細胞の分化運命の制御と可塑性

丸山 大輔<sup>1</sup>, 水多 陽子<sup>2</sup>, 山岡 尚平<sup>3</sup>

<sup>1</sup>横浜市立大学木原生物学研究所  
〒244-0813 横浜市戸塚区舞岡町 641-12

<sup>2</sup>名古屋大学 高等研究院 トランスフォーマティブ生命分子研究所  
〒464-8601 名古屋市千種区不老町

<sup>3</sup>京都大学 大学院生命科学研究科 分子代謝制御学分野  
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

## Regulation and plasticity of cell fate in plant cells

Daisuke Maruyama<sup>1</sup>, Yoko Mizuta<sup>2</sup>, Shohei Yamaoka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University,  
641-12 Maioka-cho, Totsuka-ku, Yokohama, 244-0813, Japan

<sup>2</sup>Institute for Advanced Research, Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

<sup>3</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku,  
Kyoto 606-8501, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.14a1.00236

世にある多様な生物学の研究のなかで植物学の魅力のひとつは、植物たちが一見何もしていない様子でありながら、根気強くこちらが観察をしてやると、ふとした瞬間に健気にせっせと動いている姿を見せてくれるところではないでしょうか。そのような気づきは、細胞、組織、そして個体などあらゆる階層に溢れています。解析技術の向上でますます広がりを見せる研究分野の中で、私たちが今回掘り下げたのが植物のもつ可塑性です。器官の発生が進んで成熟したと思われる組織であっても、物理的な刺激や環境、微生物との相互作用など、外的な要因が刺激となって細胞や組織の形態や機能が大きく変化する例は珍しくありません。これら植物細胞の可塑性に焦点を当てた標題のシンポジウムを、私たちは2022年9月、日本植物学会第86回大会において主催しました。オンラインを含め多くの方の参加を頂き、植物生殖、微生物間相互作用や根毛形成を含む6演題の研究発表を通じ、植物細胞の分化運命や可塑性の制御について活発な議論をしました。シンポジウムが大きく賑わった背景には、「細胞運命操作による植物生殖システムのリモデリング」および、「植物と微生物の共創による超個体の覚醒」という2つの学術変革領域研究(B)(以下、学変B)の共催であったことも大きく影響したと思われます。コロナ禍の真っ只中で始まった新しい科研費の枠組みである学変Bは、情報発信の機会も限られてきました。これら2領域の実体を知りたいというばかりでなく、両者に共

通する「植物を変えていく」コンセプトの潜在性を見極めたいという参加者も多かったのではと推察します。本総説集はシンポジウムの講演者の寄稿によって構成されています。その内容は一部差し替えを含むものの、いずれも植物細胞の分化運命の制御に深く関わるものです。シンポジウムの様子を思い描きながら本総説集をご覧いただくことで、植物細胞が大きく変わる場面で展開される生物学の魅力を、一人でも多くの方が感じ、共鳴する助けとなれば幸いです。最後に、シンポジウムの開催にご尽力された大会実行委員会の先生方、ご参加くださった皆様に感謝致します。また、本総説集の出版の機会をくださった電子出版物編集委員の先生方にも、深く御礼を申し上げます。

# 精細胞が輸送されない花粉管の作出

丸山 大輔

横浜市立大学木原生物学研究所  
〒244-0813 横浜市戸塚区舞岡町 641-12

## Generation of pollen tube defective in the apical transport of sperm cells.

Daisuke Maruyama

Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University  
641-12 Maioka-cho, Totsuka-ku, Yokohama, 244-0813, Japan

Keywords: pollen tube, sperm cell, vegetative nucleus, male germ unit (MGU), double fertilization,

DOI: 10.24480/bsj-review.14a2.00237

### 1. はじめに

花粉管は活発に先端成長を続けながら2つ1組の精細胞を輸送する被子植物の雄性配偶体である。葯から採取される均質な花粉を寒天培地で培養するだけで比較的簡単に観察が可能であり、花粉管は優れた先端成長のモデル系とされてきた。また、シロイヌナズナによる分子生物学的研究によって、メス側の組織とコミュニケーションをとりながら伸長方向を決めている精緻な仕組みもわかってきた (Higashiyama and Yang 2017)。その一方で、花粉管の内部での精細胞の先端輸送機構はほとんど解析が進んでいない。本稿では精細胞の輸送欠損を示すシロイヌナズナ花粉管の作出と応用的価値について解説する。さらにこれを例に、植物の生殖システムを作り替える植物生殖改変の構想を紹介する。

### 2. 花粉管の構造と精細胞輸送

花粉管は先端成長を続けながら、2つ1組の精細胞を輸送する被子植物の雄性配偶体である。花粉管の成長は活発で、シロイヌナズナの場合は培地上で1分あたり数 $\mu\text{m}$ 伸長する (Boavida and McCormick 2007)。花粉管の伸長に伴って細胞体積は急激に増大し、花粉管の基部側を占める液胞は細胞壁成分カロース ( $\beta$ -1, 3-glucan) に富んだ細胞壁の隔壁であるカロースプラグで堰き止められる (図1)。花粉管の伸長に合わせて要所要所でカロースプラグが形成される結果、精細胞を含む細胞質の多くは先端側に局在することになる。1対の精細胞の細胞膜のすぐ外側は単膜である内部形質膜が覆っている。そのため、花粉管の大部分を構成する栄養細胞にとっては、精細胞は特殊な二重膜のオルガネラのような存在なのかもしれない。精細胞の一端はしっぽのように伸びて栄養核の深い溝に挟まれた状態になっており、しっかりした接続構造を形成する。精細胞と栄養核を合わせた細胞構造は雄性生殖単位 (Male Germ Unit: MGU) とよばれている。シロイヌナズナの花粉管でMGUは、常に栄養

核を先頭にし、精細胞 2 つを連ねた状態で先端側へ移行する。そこで MGU は小刻みに前後しながら、花粉管先端から約 100  $\mu\text{m}$  離れた位置に観察される (Zhou and Meier 2014)。

花粉管には長軸方向に並ぶ短い微小管束が存在する。微小管のプラス端に局在する End-binding protein 1 (EB1) の GFP 融合レポーター系では点状の蛍光シグナルが観察されているものの、その配向パターンは未だ詳しく解析されていない (Cheung et al. 2008)。その一方で花粉管を縦走する長いアクチン繊維束は、花粉管先端のフォルミンの作用でプラス端を花粉管先端側に向けている (Cheung and Wu 2004; Cheung et al. 2010)。現在、精細胞を駆動するモーター分子の候補として花粉管で発現するキネシン 14 サブファミリーに属する Kinesin with calponin homology domain (KCH) が挙げられている。イネの OsKCH1 は *in vitro* 実験によって、微小管とアクチン繊維の両方と相互作用し、素早い動き (平均  $69.17 \pm 14.77 \text{ nm s}^{-1}$ ) とゆっくりとした動き (平均  $24.2 \pm 13.42 \text{ nm s}^{-1}$ ) の 2 種類の滑り込み運動を駆動することが示されている (Schattner et al. 2020; Walter et al. 2015)。これらは同一の微小管をレールとするアクチン繊維断片で同時に出現することから、一方が微小管とアクチン繊維の配向が並行の場合の挙動で、もう一方が逆並行の場合に対応すると推測されている。速度の異なる両方向への運動が精細胞の動きと類似することから、KCH を介した綱引きモデルが提唱された (Schattner et al. 2020)。これによると、プラス端を花粉管先端側に向けたアクチン繊維束を足場に KCH1 が結合し、さらに、精細胞を囲むようにランダムに配向した紡錘形バスケット状の微小管と相互作用することで、精細胞の前後運動が説明可能とされる。

少数の因子で構築された精細胞輸送の綱引きモデルは魅力的であるものの、これは複数の点で問題を抱える仮説である。1 つは Schattner らの主張する精細胞の紡錘形バスケット状の微小管パターンは花粉管栄養細胞で発現する微小管レポーター系では観察されておらず、おそらくは精細胞の内側に局在している構造である点である (Cheung et al. 2008)。もう 1 つは、我々がオリザリン処理によって微小管脱重合を誘導した花粉管で、精細胞の示す両方向への運動が失われなことを観察しており、精細胞の主要な先端駆動力の微小管非依存性が示唆される点である (未発表データ)。一方で、マツユキソウやタバコでは薬剤による微小管重合阻害によって MGU 輸送が妨げられることも報告されている (Heslop-Harrison et al. 1988; Joos et al. 1994; Åström et al. 1995; Laitinen et al. 2002)。微小管に焦点を当てた精細胞輸送の研究では、モデル植物ごとに慎重な解析が必要だろう。

### 3. 精細胞が輸送されない花粉管の作出

細胞骨格とモータータンパク質が協調する実体は未だ明らかになっていない状況で、精細胞の輸送力について調べるには、単純な逆遺伝学ではない別のアプローチが必要と思われた。我々は、精細胞が花粉管栄養細胞のオルガネラ様の性質をもつなら、その輸送には栄養細胞と精細胞の間の相互作用が必要ではないかとの仮説を立て

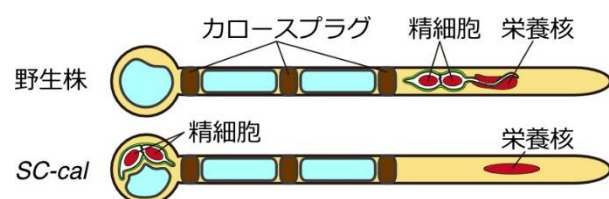


図 1. 野生株と *SC-cal* 形質転換体の花粉管

水色は液胞、精細胞を包む緑色は内部形質膜を示す。

た。その仮定的相互作用を妨げる遺伝学的ツールとして、カロース合成酵素である CALLOSE SYNTHASE3/GLUCAN SYNTHASE-LIKE12 の顕性機能亢進型変異体 *cals3m* に着目した。栄養組織で *cals3m* を発現させると、少なくとも原形質連絡を介した細胞間コミュニケーションを阻害できることがわかっている (Vatén et al. 2011)。精細胞特異的に発現する *HTR10* のプロモーター下流に *cals3m* 遺伝子を導入した融合遺伝子 *SC-cal* をもつ形質転換体を作製した。その花粉を解析したところ、通常は細胞壁がほとんど検出されない精細胞の周辺に、過剰なカロースが蓄積することを確認した。さらに、花粉管を伸長させると精細胞が花粉管の基部側に止まり、MGU の接続構造が切れて栄養核のみが先端へと輸送される様子が観察された (図 1) (Motomura et al. 2021)。

我々が作出した *SC-cal* 形質転換体で、精細胞の輸送欠損が引き起こされる具体的なメカニズムについてはよくわかっていない。これまで精細胞を覆う内部形質膜のレポーターとして複数の研究で、動物の脂質ラフトへの局在シグナルを融合させた蛍光タンパク質が使われてきた (Li et al. 2013; Wudick et al. 2018)。*SC-cal* 形質転換体を解析すると、レポータータンパク質の内部形質膜局在の頻度が低下することがわかった (Motomura et al. 2021)。最近の研究によって内部形質膜はアニオン性のリン脂質に富んだ特殊なアイデンティティを持つことが明らかになっている (Gilles et al. 2021)。おそらく、*SC-cal* の発現は精細胞からの相互作用を阻害することで内部形質膜を変質させ、花粉管での輸送駆動力の発生に必要な分子のリクルートに影響を及ぼしたと推測される。

#### 4. *SC-cal* による POEM 誘導

*SC-cal* 形質転換体の花粉を授粉した雌しべでは、ほとんどの花粉管が胚珠へ到達して内容を放出していたものの、精細胞が輸送されないため受精の失敗が観察された。このとき、胚珠は花粉管挿入のない未受精胚珠と比較すると、やや肥大することも明らかとなった

(Motomura et al. 2021)。同様の胚珠肥大は Pollen tube-dependent Ovule Enlargement Morphology (POEM) として、受精能力を持たない精細胞を作る変異体花粉管を受容した胚珠の観察で報告されている (Kasahara et al. 2016)。POEM したシロイヌナズナの胚珠には胚も胚乳も無く、珠孔近傍の種皮の発達のみが誘導される。しかし、ポリコム抑制複合体 2 の構成因子をコードする *MEDEA* 遺伝子の変異体で POEM を誘導すると、未受粉の場合に観察される自律的な胚乳核分裂の頻度が上昇する (Kasahara et al. 2016)。そのため、POEM は受精に依存しない種子発達 (アポミクシス) を双子葉植物で実現するための手がかりとして期待されている。シロイヌナズナの POEM は胚珠のわずかな肥大を誘導するに過ぎなかったが、イネの場合は胚珠が大きく肥大して、中央細胞内部に高純度のショ糖を蓄積することが示されている (Honma et al. 2020)。用途は限られるが POEM によるショ糖生産は植物生殖の新たな利用法として注目に値する。

笠原らは、受精に必須の精細胞膜タンパク質である GENERATIVE CELL SPECIFIC1/HAPLESS2 の遺伝子を破壊することで POEM 誘導をしてきた。*SC-cal* 形質転換体の結果が示唆する通り、精細胞に異常を示す既知の多様な変異体でも、同様の POEM 誘導効果が期待できるだろう。例えば、配偶子系列の細胞運命決定を調節する転写因子をコー

ドする *BONOBO1* (*BNB1*) および *BNB2* の二重欠損や、その同経路で機能する *Lj-RHL1-LIKEs* (*LRL1*)/*DROPI* および *LRL2*/*DROP2* の二重欠損は、精細胞形成異常を引き起こし、栄養核のみもつ花粉を形成させる (Zhang et al. 2017; Yamaoka et al. 2018; Hisanaga et al. 2019)。これら精細胞の欠損は花粉管の伸長などにはほとんど影響しない (Zhang et al. 2017; Motomura et al. 2022)。ただし、遺伝子破壊を利用する POEM 誘導では、対象とする植物が変わるたびに、標的オルソログの検索と破壊が必要となる。対して *SC-cal* ならば、形質転換技術が確立している植物種に容易に POEM を誘導できるかもしれない。

## 5. おわりに –精細胞輸送欠損で体現する植物生殖改変–

植物生殖の細胞生物学は 19 世紀末の重複受精の発見から考えると長い歴史をもつ。しかし、解析系の障壁のためか参入する研究者も少なく、栄養組織では解明済みの細胞現象も生殖細胞では手つかずという場合も多い。精細胞輸送機構は未解決事項の典型的な例であるが、細胞骨格の配向やモーター分子の遺伝子破壊表現型を丹念に調べることで徐々に明らかになるだろう。一方で、*SC-cal* 形質転換体の研究は内部形質膜の重要性を示す道標の 1 つになる知見である。最近の我々の研究では、内部形質膜が受精前後に安定性を急激に変化させる動的な挙動を明らかにしており、精細胞輸送における足場の膜構造という以上の役割をもつことが示唆された (Sugi et al. 2023)。今後、局在タンパク質や膜脂質の解析を通じて、内部形質膜が花粉管学の重要な地位を占める研究対象へと成長することが期待される。

*SC-cal* で誘導される POEM の仕組みは未だわかっていない。最近、未受精の胚珠肥大の誘導が可能な転写因子の同定の報告や、卵細胞と中央細胞の片方だけが受精した場合の遺伝子発現解析が発表され、胚珠肥大の解明に必要な基礎的データが蓄積している (Takasaki et al. 2022; Zhang et al. 2023)。これらのデータを活用することで、胚珠肥大の鍵刺激を含め POEM の実体解明が進むだろう。通常デンプンが作られるイネの胚乳でショ糖を作らせる POEM は、植物生殖分野の持つ潜在性を示唆する。我々は配偶体を構成する細胞運命や機能を改変することで、既存の重複受精を超えた生殖システムを構築する植物生殖改変を掲げ、その概念実証を試みてきた。本稿では精細胞の輸送欠損にのみ焦点を当てたが、精細胞や栄養核が移動せず、先端が無核状態の花粉管の作出にも成功している。この試みから、細胞核に依存しない自律的な花粉管の伸長能力が示された (Motomura et al. 2021; Motomura et al. 2022)。精細胞輸送欠損の研究はこのような植物生殖の基礎研究への貢献に留まらず、今後、アポミクシスやショ糖生産へも貢献するかもしれない。そこから、植物生殖改変の試みが拡大することを期待する。

## 謝辞

本稿執筆にあたり、日本学術振興会の科学研究費補助金 (JP20H05778, JP20H05781) によるご支援を頂きました。また、筆者の共同研究者である立命館大学の元村一基博士には数々のご助言を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

## 引用文献

- 元村一基, 丸山大輔 (2022) シロイヌナズナ花粉管の核排除とそれを利用した花粉管伸長制御能力の発見までの道のり. *Plant Morphology* 34: 69–76.
- Åström H, Sorri O, Raudaskoski M. (1995) Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in tobacco pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 8: 61–69. doi: 10.1007/BF00230890
- Boavida LC, McCormick S. (2007) Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 52: 570–582. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03248.x
- Cheung AY, Wu HM. (2004) Overexpression of an *Arabidopsis* formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell* 16: 257–269. doi: 10.1105/tpc.016550
- Cheung AY, Duan QH, Costa SS, De Graaf BH, Di Stilio VS, Feijo J, Wu HM. (2008) The dynamic pollen tube cytoskeleton: live cell studies using actin-binding and microtubule-binding reporter proteins. *Mol. Plant* 1: 686–702. doi: 10.1093/mp/ssn026
- Cheung AY, Niroomand S, Zou Y, Wu HM. (2010) A transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 16390–16395. doi: 10.1073/pnas.1008527107
- Gilles LM, Calhau ARM, La Padula V, Jacquier NMA, Lionnet C, Martinant JP, Rogowsky PM, Widiez T. (2021) Lipid anchoring and electrostatic interactions target NOT-LIKE-DAD to pollen endo-plasma membrane. *J. Cell Biol.* 220: e202010077. doi: 10.1083/jcb.202010077
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y, Cresti M, Tiezzi A, Moscatelli A. (1988) Cytoskeletal elements, cell shaping and movement in the angiosperm pollen tube. *J. Cell Sci.* 91: 49–60. doi: 10.1242/jcs.91.1.49
- Higashiyama T, Yang WC. (2017) Gametophytic Pollen Tube Guidance: Attractant Peptides, Gametic Controls, and Receptors. *Plant Physiol.* 173: 112–121. doi: 10.1104/pp.16.01571
- Hisanaga T, Yamaoka S, Kawashima T, Higo A, Nakajima K, Araki T, Kohchi T, Berger F. (2019) Building new insights in plant gametogenesis from an evolutionary perspective. *Nat. Plants*, 5: 663–669. doi: 10.1038/s41477-019-0466-0
- Honma Y, Adhikari PB, Kuwata K, Kagenishi T, Yokawa K, Notaguchi M, Kurotani K, Toda E, Bessho-Uehara K, Liu X. et al. (2020) High-quality sugar production by *osgcs1* rice *Commun. Biol.* 3: 617. doi: 10.1038/s42003-020-01329-x
- Joos U, Van Aken J, Kristen U. (1994) Microtubules are involved in maintaining the cellular polarity in pollen tubes of *Nicotiana sylvestris*. *Protoplasma*, 179: 5–15. doi: 10.1007/BF01360732
- Kasahara RD, Notaguchi M, Nagahara S, Suzuki T, Susaki D, Honma Y, Maruyama D, Higashiyama T. (2016) Pollen tube contents initiate ovule enlargement and enhance seed coat development without fertilization. *Sci. Adv.* 2: e1600554. doi: 10.1126/sciadv.1600554
- Laitiainen E, Nieminen KM, Vihinen H, Raudaskoski M. (2002) Movement of generative cell and vegetative nucleus in tobacco pollen tubes is dependent on microtubule cytoskeleton but

- independent of the synthesis of callose plugs. *Sex. Plant Reprod.* 15: 195–204. doi: 10.1007/s00497-002-0155-3
- Li S, Zhou L-Z, Feng Q-N, McCormick S, Zhang Y. (2013) The C-terminal hypervariable domain targets *Arabidopsis* ROP9 to the invaginated pollen tube plasma membrane. *Mol. Plant* 6: 1362–1364. doi: 10.1093/mp/sst098
- Motomura K, Takeuchi H, Notaguchi M, Tsuchi H, Takeda A, Kinoshita T, Higashiyama T, Maruyama D. (2021) Persistent directional growth capability in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes after nuclear elimination from the apex. *Nat. Commun.* 12: 2331. doi: 10.1038/s41467-021-22661-8
- Motomura K, Sugi N, Takeda A, Yamaoka S, Maruyama D. (2022) Possible molecular mechanisms of persistent pollen tube growth without de novo transcription. *Front. Plant Sci.* 13: 1020306. doi: 10.3389/fpls.2022.1020306
- Schattner S, Schattner J, Munder F, Hoppe E, Walter WJ. (2020) A Tug-of-War model explains the saltatory sperm cell movement in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes by kinesins with calponin homology domain. *Front. Plant Sci.* 11: 601282. doi: 10.3389/fpls.2020.601282
- Sugi N, Izumi R, Tomomi S, Susaki D, Kinoshita T, Maruyama D. (2023) Removal of the endoplasmic membrane upon sperm cell activation after pollen tube discharge. *Front. Plant Sci.* 14: 1116289. doi: 10.3389/fpls.2023.1116289
- Takasaki H, Ikeda M, Hasegawa R, Zhang Y, Sakamoto S, Maruyama D, Mitsuda N, Kinoshita T, Ohme-Takagi M. (2022) Elongation of Siliques Without Pollination 3 regulates nutrient flow necessary for embryogenesis. *Plant & Cell Physiol. In Press.* doi: 10.1093/pcp/pcac151
- Vatén A, Dettmer J, Wu S, Stierhof Y-D, Miyashima S, Yadav SR, Roberts CJ, Campilho A, Bulone V, Lichtenberger R. et al. (2011) Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Dev. Cell* 21: 1144–1155. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.006
- Walter WJ, Machens I, Rafieian F, Diez S. (2015) The non-processive rice kinesin-14 OsKCH1 transports actin filaments along microtubules with two distinct velocities. *Nat. Plants* 1: 15111. doi: 10.1038/nplants.2015.111
- Wudick MM, Portes MT, Michard E, Rosas-Santiago P, Lizzio MA, Nunes CO, Campos C, Santa Cruz Damineli D, Carvalho JC, Lima PT. et al. (2018) CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Science* 360: 533–536. doi: 10.1126/science.aar6464
- Yamaoka S, Nishihama R, Yoshitake Y, Ishida S, Inoue K, Saito M, Okahashi K, Bao H, Nishida H, Yamaguchi K. et al. (2018) Generative cell specification requires transcription factors evolutionarily conserved in land plants. *Curr. Biol.* 28: 479–486. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.053
- Zhang J, Huang Q, Zhong S, Bleckmann A, Huang J, Guo X, Lin Q, Gu H, Dong J, Dresselhaus T, Qu L-J. (2017) Sperm cells are passive cargo of the pollen tube in plant fertilization. *Nat. Plants* 3: 17079. doi: 10.1038/nplants.2017.79
- Zhang Y, Maruyama D, Toda E, Kinoshita A, Okamoto T, Mitsuda N, Takasaki H, Takagi MO. (2023) Transcriptome analyses uncover reliance of endosperm gene expression on *Arabidopsis* embryonic development. *FEBS letters. In Press.* doi: 10.1002/1873-3468.14570



Zhou X, Meier I. (2014) Efficient plant male fertility depends on vegetative nuclear movement mediated by two families of plant outer nuclear membrane proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 11900–11905. doi: 10.1073/pnas.1323104111

# 花粉とコケ植物配偶体の発生における配偶子前駆細胞の分化

山岡 尚平

京都大学 大学院生命科学研究科 分子代謝制御学分野  
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

## **Gamete progenitor differentiation during development of pollen and bryophyte gametophytes**

Shohei Yamaoka

Graduate School of Biostudies, Kyoto University  
Kyoto, 606-8501, Japan

Keywords: gametophyte, generative cell, gametangium, bHLH,  
alternation of generations

DOI: 10.24480/bsj-review.14a3.00238

### 1. はじめに

陸上植物は、約5億年前に緑藻類から分岐して誕生した単系統群である。その特徴の1つとして、生活環の単相 ( $n$ ) と複相 ( $2n$ ) の両方において多細胞体 (配偶体と孢子体) を形成する、いわゆる「世代交代」を行うことが挙げられる。配偶体は、その細胞の一部を配偶子の前駆細胞 (gamete progenitor) に分化させることで配偶子形成を行う (Hisanaga et al. 2019b; Rensing and Weijers 2021)。このプロセスは、ヒトをはじめとする後生動物には見られない。後生動物では、減数分裂で生じた単相の細胞が、多細胞化することなく直接的に配偶子へと変化する。

植物の配偶子形成の発生様式は、系統間で大きく異なっている。コケ植物の配偶体は茎葉体・葉状体であり、造卵器・造精器 (配偶子器 gametangium) を発生させてその中に配偶子を形成する (図1)。一方、被子植物の配偶体は、受精と胚発生のために特化したわずか数細胞の組織である。その発生は孢子体に依存し、発生パターンは他の組織と比べてひとときわ特異である。雌性配偶体 (胚嚢) は、減数分裂で生じる大孢子が多核化し、それぞれの核が細胞化することで形成される。雄性配偶体である花粉は、減数分裂で生じる小孢子が2回だけ有糸分裂することで形成される。1回目の分

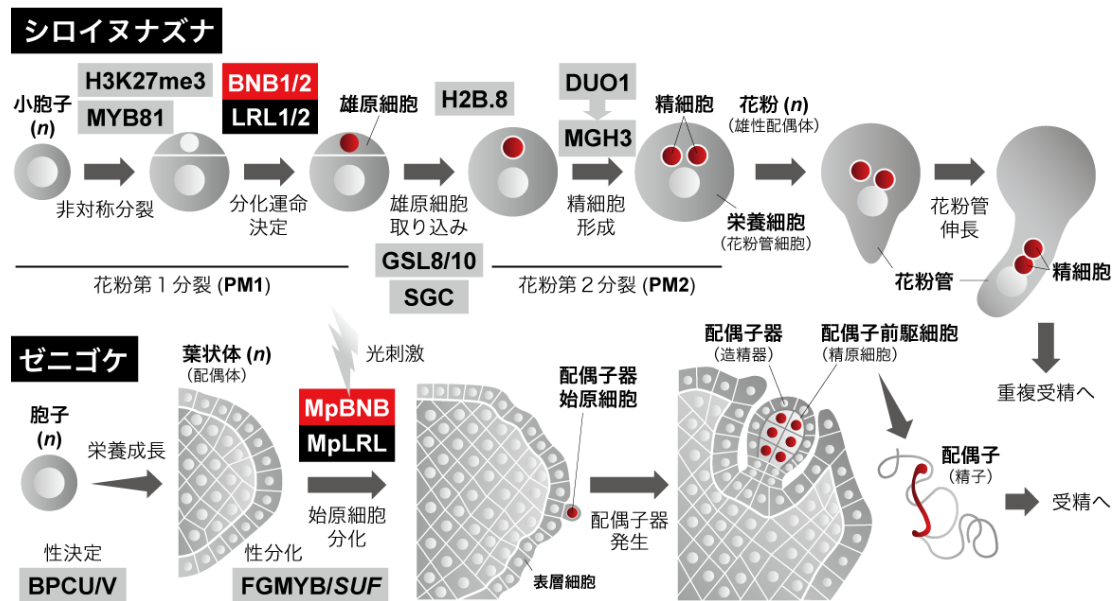


図1. シロイヌナズナの花粉発生とゼニゴケの葉状体の生殖成長 各制御因子等は本文にて説明する。

裂（花粉第1分裂，PM1）は非対称であり，小さい方の娘細胞である雄原細胞は，栄養細胞（花粉管細胞）の細胞質中に取り込まれ，「細胞の中の細胞」という特異な構造をつくる。2回目の分裂（花粉第2分裂，PM2）は，取り込まれた状態の雄原細胞に特異的な等分裂であり，2つの精細胞が生じ，重複受精が可能となる（図1）。

陸上植物の配偶体と配偶子形成の研究の歴史は長く，分子レベルでも既に多くの知見が示され，最近も数多くの優れた総説がある（たとえば Hackenberg and Twell 2019; Hater et al. 2020; Hafidh and Honys 2021）。そこで本稿では，配偶体における配偶子形成の初期過程，特に，花粉における雄原細胞の分化と栄養細胞への取り込み，そしてコケ植物の配偶子器発生の初期過程に関して，最近明らかにされた分子機構を紹介するとともに，今後の研究について展望したい。

## 2. 花粉第1分裂における細胞運命決定

PM1 において雄原細胞が分化するには，分裂の非対称性が重要であることが様々な解析で示されてきた。英国の David Twell らのグループは，タバコ小胞子をコルヒチンで処理すると，等分裂して2つの栄養細胞様の細胞が生じ，それらは花粉管を発芽できることを示した。このことから，花粉のデフォルトは栄養細胞であり，分裂の非対称性により雄原細胞の運命が決まることが分かった（Eady et al. 1995）。その後の分子遺伝学研究もこれを支持し，微小管動態制御（Park et al. 1998）および細胞周期制御の変異によって細胞運命決定の異常が生じることが示された（Glöckle et al. 2018）。最近では，PM1を制御する転写因子 MYB81 が同定された。*myb81* 変異をもつ小胞子は，核の極性移動はみられるが，細胞分裂が阻害され，成熟花粉の核のほとんどは栄養細胞の性質をもつ。

しかしながら、ごく一部の核はしばしば栄養細胞と精細胞の両方の性質をもち、細胞分裂も進行する。このことから、PM1における細胞運命決定は、MYB81とは別の因子により制御されていると考えられる (Oh et al. 2020)。

筆者らは、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の変異株の分子遺伝学解析から、生殖成長を統御するマスター転写因子 MpBONOBO (MpBNB) を同定した (後述)。MpBNB は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子の1種であり、陸上植物で進化的に保存されたサブファミリーに属していた (Yamaoka et al. 2018; Bowman et al. 2017; Catarino et al. 2016)。被子植物のBNB オルソログは2つのサブクレードに分かれ、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の2つのオルソログ BNB1 と BNB2 はそのうちの一方に属していた。GFP 標識した BNB2 (GFP-BNB2) は、PM1 直後の雄原細胞で一過的に発現した。*bnb1 bnb2* 二重変異をもつ花粉は、PM1 は正常に進行するが、その雄原細胞は PM2 のマスター転写因子 DUO1 とその標的の精細胞特異的ヒストンバリエント MGH3/HTR10/H3.10 を発現せず、本来のアイデンティティを失っていると考えられた。さらに、この二重変異型の雄原細胞は栄養細胞へ取り込まれず、「細胞の中の細胞」の構造を形成しなかった。成熟した花粉では精細胞が失われ、栄養細胞様の核1つのみをもっていった。これらの変異表現型は、BNB1 と BNB2 のいずれか一方、もしくは MpBNB によって機能的に相補できた。これらのことから、シロイヌナズナの PM1 における雄原細胞の分化運命決定は、BNB1 と BNB2 により冗長的に制御されており、その機能は陸上植物種間で保存されていることが示唆された (Yamaoka et al. 2018; 山岡ら、論文未発表)。

BNB とは別のサブファミリーに属する bHLH 転写因子 *Lotus japonicus* ROOTHAIRLESS1-LIKE 1 (LRL1) /DEFECTIVE REGION OF POLLEN 1 (DROP1) と LRL2/DROP2 の二重欠損変異株も、*bnb1 bnb2* 二重変異株と同様、精細胞を失った花粉を生じる (Zhang et al. 2017)。筆者らは、シロイヌナズナとゼニゴケの BNB と LRL/DROP (以下 LRL) は、いずれもヘテロ二量体を形成することを示した (山岡ら、論文未発表)。両者は C 末端領域に、進化的に保存された機能未知のドメインをもっている (Breuninger et al. 2016) (図 2 A)。立体構造予測によれば、BNB と LRL の二量体化には、bHLH ドメインだけでなく、これらのドメインも関わる可能性がある (図 2 B)。シロイヌナズナの *lrl1/drop1 lrl2/drop2* 二重変異は、*bnb1 bnb2* 二重変異と同様、雄原細胞の分化運命決定に異常をもたらした。さらに、この二重変異型の雄原細胞では GFP-BNB2 の発現が見られないことから、LRL は BNB とのヘテロ二量体形成だけでなく、BNB タンパク質の安定な蓄積自体にも必要であることが分かった (山岡ら、論文未発表)。LRL は、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) で最初に同定され、根毛形成の制御にも関わっている (Karas et al. 2009; Lin et al. 2015; Breuninger et al. 2016)。最近では、別のサブファミリーに属する bHLH 転写因子 PERICYCLE FACTOR TYPE-A 1 (PFA1) や PFA2 とヘテロ二量体形成し、側根原基の形成に関わることが示された (Zhang et al. 2021)。

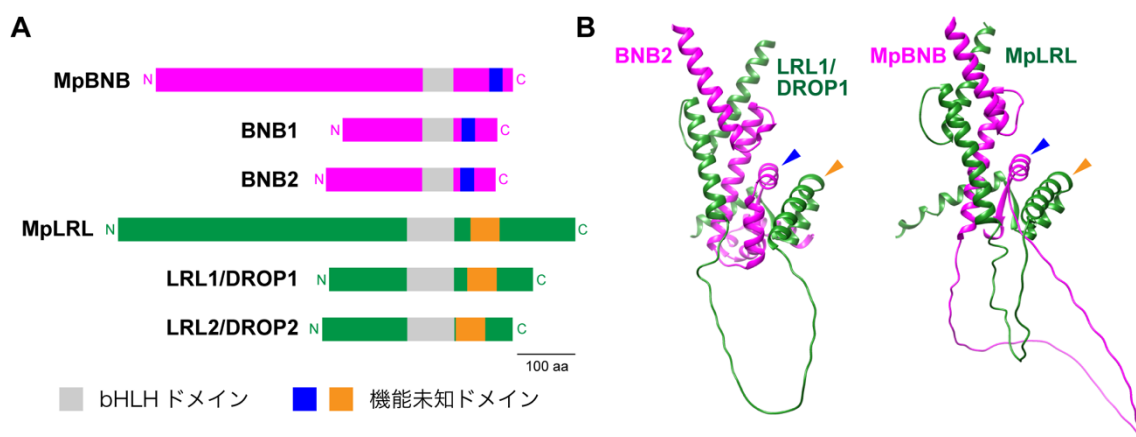


図 2. シロイヌナズナ・ゼニゴケの BNB・LRL/DROP タンパク質の構造

(A) タンパク質一次構造。スケールバーは 100 アミノ酸残基長 (aa) を示す。(B) BNB-LRL/DROP ヘテロ二量体の立体構造予測。bHLH ドメインから C 末端までの部分の相互作用を ColabFold (Mirdita et al. 2022) を用いて予測した。矢じりは BNB (青) と LRL/DROP (橙) の機能未知ドメインを示す。

*LRL* は緑藻類の一部と陸上植物において進化的に保存されており、コケ植物では仮根の形成に関わる (Tam et al. 2015; Breuninger et al. 2016)。これらのことから、*LRL* は多様なパートナー分子が機能するためのプラットフォームとしての役割を持ち、植物の生活環全般において細胞分化や器官形成に関わること、そして *BNB* は *LRL* のパートナーの 1 つであり、ヘテロ二量体形成により雄原細胞の運命決定を行うと考えられる。

一般に、細胞の分化にはエピゲノムの変化が伴う。最近、*BNB* 発現のエピジェネティック制御の可能性が示された。ヒストン H3 のリジン 27 番目残基のトリメチル化修飾 (H3K27me3) は、PM1 後、栄養細胞では維持されるが、精細胞ではほとんど消失する (Borg et al. 2020; Huang and Sun 2022)。栄養細胞で発現する H3K27me3 メチル基転移酵素遺伝子 *SWINGER* (*SWN*) のノックアウトでは、栄養細胞の H3K27me3 は完全に消失せず、細胞分化にも影響がなかった。そこで、H3K27me3 脱メチル化酵素 *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6* (*REF6*) を栄養細胞で過剰発現させたところ、H3K27me3 はほとんど除去され、*DUO1* が異所的に発現して、生殖細胞の性質をもつようになった。*BNB1* と *BNB2* の遺伝子座はいずれも、栄養細胞においては H3K27me3 が蓄積しており、また転写関連因子が接近しにくい「閉じた」クロマチン状態にある。*REF6* 異所発現により、これらは解除される傾向が見られ、それが *DUO1* 活性化につながることを示唆された。したがって、*BNB* の活性化には H3K27me3 の除去が必要であると考えられる (Huang and Sun 2022)。

しかしながら、PM1 の細胞運命決定のメカニズムは、依然として不明の部分が多い。前述のように、分裂の非対称性が雄原細胞の運命決定に必要とされるが、*BNB* 発現との関係は分かっていない。また、雄原細胞の染色体は著しく凝縮することが知られている。栄養細胞のクロマチンは、花粉発生のあいだ広がったままであるのに対し、雄原細胞のそれは、PM1 と同時に著しく凝縮する (田中, 2017)。最近の研究により、このク

ロマチン凝縮の一部は被子植物に特異的なヒストンバリエント H2B.8 が担うことが示されたが (Buttress et al. 2022), メカニズムの全容は明らかでない。BNB-LRL ヘテロ二量体とクロマチン凝縮の関係について、今後の研究が待たれる。

### 3. 花粉の「細胞の中の細胞」構造の形成

PM1 直後に起こる栄養細胞への雄原細胞の取り込みは、動物細胞の貪食作用 (phagocytosis) に似た、「飲み込み (engulfment)」と呼ぶべき特異な現象である。これにより、雄原細胞は「細胞の中の細胞」となり、PM2 を経て精細胞となることによって、花粉管受精が可能になる。この現象は半世紀以上にわたって様々な植物種で観察され (たとえば Angold, 1968), 最近では、ヤブラン (*Liriope muscari*) にて詳細な解析が行われた。それによると、PM1 では、雄原細胞と栄養細胞の間にはカロースとペクチンに富む細胞壁が生じる。しかし、雄原細胞が栄養細胞の細胞質中に入り込む頃には、カロースとペクチンは消失する。このことから、これらの細胞壁成分の蓄積と分解が雄原細胞の取り込みに関わる可能性がある (Hiratsuka and Terasaka 2021)。シロイヌナズナでは、カロース合成に関わる *GLUCAN SYNTHASE-LIKE (GSL)* 遺伝子のうち、*GSL8* か *GSL10* のいずれかが欠損すると、小孢子核の極性移動は正常なままだが、PM1 に異常が生じる。これらのホモ接合変異株の花粉は、約半数は成熟して野生型と同様になるが、残りの多くは致死となった。また *gsl10* の欠失変異をもつ花粉は、しばしば雄原細胞の取り込みが見られなかった。その PM1 では、カロースの異所的な蓄積と分裂面の構造異常がみられた。これらのことから、*GSL8* と *GSL10* はカロースの生合成を介して PM1 に寄与すると考えられる (Töller et al. 2008)。また、機能未知の小胞体局在型タンパク質をコードする *STICKY GENERATIVE CELL (SGC)* 遺伝子を欠失した花粉は、*bnb1 bnb2* 二重変異と同様に、PM1 は正常だが、雄原細胞の取り込みがみられない。しかしながら、その雄原細胞では精細胞特異的ヒストンバリエント MGH3/HTR10/H3.10 が発現することから、分化運命決定は正常であると考えられる。また、変異型の雄原細胞の周囲には、カロースの異所的な蓄積が見られた。*SGC* タンパク質は、カロース分解酵素スーパーファミリーに属する *thaumatin* 様タンパク質の 1 種と結合することが示唆された。これらのことから、*SGC* はカロース分解を介して雄原細胞取り込みに関わる可能性がある (Oh et al. 2021)。これらのことから、雄原細胞の取り込みには、カロースをはじめとする細胞壁成分の動態が重要な役割を果たすことが分かってきた。BNB-LRL ヘテロ二量体は、こうした細胞壁成分の動態を制御することで、雄原細胞の取り込みを促進しているのかもしれない。

### 4. コケ植物における配偶子前駆細胞の分化

コケ植物では、配偶体である茎葉体・葉状体の表層から始原細胞が分化し、それらが配偶子を内包する配偶子器へと発達する。蘚類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrium patens*)

は、低温・短日条件の下で茎葉体の頂端部に配偶子器をつくる。茎葉体の頂端幹細胞はまず造精器の元となる始原幹細胞へと変化する。次に、それが分裂して造精器頂端幹細胞をつくり、そこから造精器が発生する。その発生初期には、原基の中で精子の前駆細胞である精原細胞が分化する (Kofuji et al. 2018; 長谷部, 2020)。造精器の周囲には造卵器が発生する。造卵器の頸部構造の発生や卵の形成にはオーキシンが寄与することが示唆されている (Landberg et al. 2013)。

苔類ゼニゴケは雌雄異株であり、造卵器・造精器のどちらを形成するかは、配偶体 (葉状体) の性、ひいてはその性染色体により決まる。最近、雌の性染色体には、性決定因子として転写因子 BASIC PENTACYSTEINE ON THE U CHROMOSOME (BPCU) がコードされていることが分かった。BPCU は常染色体にコードされる転写因子 FEMALE GAMETOPHYTE MYB (FGMYB) の発現制御を介してゼニゴケの性分化を制御していた。FGMYB はシロイヌナズナの雌性配偶体の形成に不可欠な MYB64 と MYB119 のオルソログであった。雄はゼニゴケの性のデフォルトであり、雄個体の FGMYB は、逆鎖にコードされた非コード RNA である SUPPRESSOR OF FEMINIZATION (SUF) の転写により発現抑制されている。雌では、BPCU が SUF の転写を抑制するために、FGMYB の発現抑制が解除されて葉状体が「雌化」する。雄の性染色体には BPCU のホモログ BASIC PENTACYSTEINE ON THE V CHROMOSOME (BPCV) がコードされていた。性決定の活性は BPCU に特異的であったが、BPCU と BPCV はいずれも生殖成長に必要な不可欠であった (Iwasaki et al. 2021; Hisanaga et al. 2019a)。ゼニゴケの生殖成長は、配偶子器の始原細胞の分化と密接な関わりがあることから (後述)、BPC-FGMYB 経路はその制御にも関わる可能性が考えられる。

ゼニゴケの生殖成長は、主に遠赤色光により促進され (Inoue et al. 2019)、その制御には被子植物の日長判別機構と相同な分子機構も関わる (Kubota et al. 2014)。生殖成長は、葉状体の頂端ノッチの表層から配偶子器の始原細胞が分化することで始まる。同時に、ゼニゴケ亜綱 (Marchantiidae) に特有の組織である生殖器托 (雌器托・雄器托) の原基がノッチに生じ、それがやがて傘状の組織へと成長する。この間、生殖器托の表層からは配偶子器始原細胞が分化し続けるため、成熟した生殖器托は多数の配偶子器を内包する (Durand 1908; Shimamura 2016; Yamaoka et al. 2018)。筆者らは以前、遠赤色光を含まない光の下でも恒常的に生殖成長を行うゼニゴケ変異株を単離した (Yamaoka et al. 2004)。この変異株のゲノムには 400 kb 以上にわたる逆位と欠失が生じており、MpBNB はそのゲノム領域内にあつて過剰発現していた。MpBNB をノックアウトすると生殖成長が失われ、人為的に活性化させると変異株と同様に恒常的に生殖成長がみられたことから、MpBNB はゼニゴケの生殖成長のマスター制御因子であると考えられた。相同組み換えにより蛍光タンパク質 Citrine の配列を MpBNB 遺伝子座へ挿入した株 (ノックイン株) を作出し、MpBNB-Citrine 融合タンパク質の発現を調べたところ、配偶子器始原細胞で著しく発現したのち、発生初期の配偶子器ではほぼ消失した。これらのことから、

MpBNB は主に配偶子器始原細胞の分化を制御するとともに、生殖器托を発生させる機能をもつと考えられた (Yamaoka et al. 2018)。

ゼニゴケの唯一の LRL/DROP オルソログである MpLRL は、仮根形成を制御している (Breuninger et al. 2016)。蛍光タンパク質を用いた観察によると、MpLRL は、葉状体と生殖器托の表層で広く発現し、配偶子器始原細胞において MpBNB と共局在していた。ゲノム編集による MpLRL のノックアウトでは、仮根形成と生殖成長が失われた。また、そのノッチでは MpBNB の蓄積と配偶子器始原細胞の分化が見られなかった。したがって、シロイヌナズナの場合と同様に、MpLRL は MpBNB とヘテロ二量体形成するだけでなく、MpBNB タンパク質の安定な蓄積に必要であると考えられる。BNB-LRL ヘテロ二量体形成の制御機構は、陸上植物全体で保存されている可能性がある (山岡ら, 論文未発表)。

ヒメツリガネゴケにおいても、BNB オルソログである PpBNB1 と PpBNB2 が冗長的に配偶子形成に関わっている。レポーター解析によると、これらはいずれも、造卵器では卵と造卵器頸部の内部の細胞 (腹溝細胞・頸溝細胞) で、また造精器では精原細胞で発現していた。ゲノム編集による PpBNB1 と PpBNB2 の二重変異株は、造卵器・造精器ともに発生を開始することができたが、いずれも発生の途中で配偶子の前駆細胞の分化がみられず、最終的に異常な形態を示した。こうしたことから、PpBNB1 と PpBNB2 は配偶子器発生の開始にはほとんど影響しないが、配偶子前駆細胞の分化に関わると考えられる (Sanchez-Vera et al. 2022)。

## 5. おわりに

花粉の雄原細胞の分化と、コケ植物の配偶子器発生の知見から、BNB-LRL ヘテロ二量体は、配偶体から配偶子の前駆細胞を分化させるための制御因子であると考えられる。BNB の属する bHLH サブファミリーは陸上植物特異的である一方、LRL/DROP のサブファミリーは緑藻類にもみられることから (Bowman et al. 2017; Catarino et al. 2016; Nishiyama et al. 2018), 陸上植物の共通祖先は BNB を獲得することにより、陸上環境での配偶子形成を可能にしたのかもしれない。

LRL/DROP は配偶体で広く発現し、様々な細胞分化・器官形成のための「場」をつくりだしている、と考えられる。そして BNB は、発生制御因子による内生の刺激、あるいは光などの環境刺激を受けて発現し、LRL/DROP とヘテロ二量体化することで、配偶体の体細胞を配偶子前駆細胞へと分化させ、配偶子を形成させる。配偶子は、遺伝情報を次世代に伝えるための特殊な細胞であり、ゲノムの大部分が不活化され、エピゲノムの大部分もリセットされるため、植物個体の発生と維持とは相容れない。したがって、陸上植物は BNB を少数細胞でのみ発現させるメカニズムをもつはずであり、それは花粉における PM1 の非対称性や、コケ植物配偶体における配偶子前駆細胞の分化パターンと表裏の関係にあると思われる。今後、BNB の発現制御と標的・下流の分子機構が



明らかになることにより、陸上植物の「世代交代」を駆動する基本メカニズムが解明されると期待できる。

## 謝辞

本稿で紹介した研究について、河内孝之（京大）、荒木崇（京大）、中島敬二（奈良先端大）、西浜竜一（東京理科大）、上田貴志（基生研）、光田展隆（産総研）、Frédéric Berger（GMI）、久永哲也（GMI）、丸山大輔（横浜市立大）、水多陽子（名古屋大）、海老根一生（基生研）の各氏と、ご協力いただいた皆様に感謝申し上げます。これらの研究は、科研費・学術変革領域研究(B)「植物生殖改変」（丸山大輔代表）計画研究 20H05780、科研費・新学術領域研究「植物新種誕生原理」（東山哲也代表）公募研究 19H04860、武田科学振興財団研究助成、旭硝子財団研究助成のサポートを受けて行われました。

## 引用文献

- Angold RE (1968) The formation of the generative cell in the pollen grain of *Endymion Non-scriptus* (L). *J Cell Sci* 3(4): 573-578. doi:10.1242/jcs.3.4.573
- Borg M, Jacob Y, Susaki D, LeBlanc C, Buendia D, Axelsson E, Kawashima T, Voigt P, Boavida L, Becker J, et al. (2020) Targeted reprogramming of H3K27me3 resets epigenetic memory in plant paternal chromatin. *Nat Cell Biol* 22(6): 621-629. doi: 10.1038/s41556-020-0515-y
- Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, Jenkins J, Shu S, Ishizaki K, Yamaoka S, Nishihama R, Nakamura Y, Berger F, et al. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell* 171(2): 287-304.e15. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030
- Breuninger H, Thamm A, Streubel S, Sakayama H, Nishiyama T, Dolan L. (2016) Diversification of a transcription factor family led to the evolution of antagonistically acting genetic regulators of root hair growth. *Curr Biol* 26: 1622-1628. doi: 10.1016/j.cub.2016.04.060
- Buttress T, He S, Wang L, Zhou S, Saalbach G, Vickers M, Li G, Li P, Feng X. (2022) Histone H2B.8 compacts flowering plant sperm through chromatin phase separation. *Nature* 611(7936): 614-622. doi: 10.1038/s41586-022-05386-6
- Catarino B, Hetherington AJ, Emms DM, Kelly S, Dolan L. (2016) The stepwise increase in the number of transcription factor families in the Precambrian predated the diversification of plants on land. *Mol Biol Evol* 33(11), 2815-2819. doi: 10.1093/molbev/msw155
- Durand EJ. (1908) The development of the sexual organs and sporogonium of *Marchantia polymorpha*. *Bull Torr Bot Club* 35(7): 321-335. doi: 10.2307/2485335
- Eady C, Lindsey K, Twell D. (1995) The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. *Plant Cell* 7(1): 65-74. doi: 10.1105/tpc.7.1.65
- Glöckle B, Urban WJ, Nagahara S, Andersen ED, Higashiyama T, Grini PE, Schnittger A. (2018)

- Pollen differentiation as well as pollen tube guidance and discharge are independent of the presence of gametes. *Development* 145(1): dev152645. doi: 10.1242/dev.152645
- Hackenberg D, Twell D. (2019) The evolution and patterning of male gametophyte development. *Curr Top Dev Biol* 131 257-298. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.10.008
- Hafidh S, Honys D. (2021) Reproduction multitasking: the male gametophyte. (2021) *Annu Rev Plant Biol* 72:581-614. doi: 10.1146/annurev-arplant-080620-021907
- 長谷部光泰 (2020) 陸上植物の形態と進化. 裳華房 pp.38-43.
- Hater F, Nakel T, Gross-Hardt R. (2020) Reproductive multitasking: the female gametophyte. *Annu Rev Plant Biol* 71:517-546. doi: 10.1146/annurev-arplant-081519-035943
- Hiratsuka R, Terasaka O. (2021) Dynamics of cell membrane and cell wall development during generative cell engulfment by the pollen tube cell in *Liriope muscari*. *Cytologia* 86(3), 225-233. doi: 10.1508/cytologia.86.225
- Hisanaga T, Okahashi K, Yamaoka S, Kajiwara T, Nishihama R, Shimamura M, Yamato KT, Bowman JL, Kohchi T, Nakajima K. (2019a) A *cis*-acting bidirectional transcription switch controls sexual dimorphism in the liverwort. *EMBO J* 38(6):e100240. doi: 10.15252/embj.2018100240
- Hisanaga T, Yamaoka S, Kawashima T, Higo A, Nakajima K, Araki T, Kohchi T, Berger F. (2019b) Building new insights in plant gametogenesis from an evolutionary perspective. *Nat Plants* 5(7): 663-669. doi: 10.1038/s41477-019-0466-0
- Huang X, Sun MX. (2022) H3K27 methylation regulates the fate of two cell lineages in male gametophytes. *Plant Cell* 34(8):2989-3005. doi: 10.1093/plcell/koac136
- Inoue K, Nishihama R, Araki T, Kohchi T. (2019) Reproductive induction is a far-red high irradiance response that is mediated by phytochrome and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol* 60(5): 1136-1145. doi: 10.1093/pcp/pcz029
- Iwasaki M, Kajiwara T, Yasui Y, Yoshitake Y, Miyazaki M, Kawamura S, Suetsugu N, Nishihama R, Yamaoka S, Wanke D, et al. (2021) Identification of the sex-determining factor in the liverwort *Marchantia polymorpha* reveals unique evolution of sex chromosomes in a haploid system. *Curr Biol* 31(24): 5522-5532.e7. doi: 10.1016/j.cub.2021.10.023
- Karas B, Amyot L, Johansen C, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M, Szczyglowski K. (2009) Conservation of lotus and Arabidopsis basic helix-loop-helix proteins reveals new players in root hair development. *Plant Physiol* 151(3): 1175-1185. doi: 10.1104/pp.109.143867
- Kofuji R, Yagita Y, Murata T, Hasebe M. (2018) Antheridial development in the moss *Physcomitrella patens*: implications for understanding stem cells in mosses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 373(1739): 20160494. doi: 10.1098/rstb.2016.0494
- Kubota A, Kita S, Ishizaki K, Nishihama R, Yamato KT, Kohchi T. (2014) Co-option of a

- photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution. *Nat Commun* 5: 3668. doi: 10.1038/ncomms4668
- Landberg K, Pederson ER, Viaene T, Bozorg B, Friml J, Jonsson H, Thelander M, Sundberg E. (2013) The moss *Physcomitrella patens* reproductive organ development is highly organized, affected by the two SHI/STY genes and by the level of active auxin in the SHI/STY expression domain. *Plant Physiol* 162(3):1406-1419. doi: 10.1104/pp.113.214023
- Lin Q, Ohashi Y, Kato M, Tsuge T, Gu H, Qu LJ, Aoyama T. (2015) GLABRA2 directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. *Plant Cell* 27(10): 2894-2906. doi: 10.1105/tpc.15.00607
- Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 19(6):679-682. doi: 10.1038/s41592-022-01488-1
- Nishiyama T, Sakayama H, de Vries J, Buschmann H, Saint-Marcoux D, Ullrich KK, Haas FB, Vanderstraeten L, Becker D, Lang D, et al. (2018) The *Chara* genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization. *Cell* 174(2): 448-464.e.24. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.033
- Oh SA, Hoai TNT, Park HJ, Zhao M, Twell D, Honys D, Park SK. (2020) MYB81, a microspore-specific GAMYB transcription factor, promotes pollen mitosis I and cell lineage formation in *Arabidopsis*. *Plant J* 101(3):590-603. doi: 10.1111/tpj.14564
- Oh SA, Park HJ, Kim MH, Park SK. (2021) Analysis of *sticky generative cell* mutants reveals that suppression of callose deposition in the generative cell is necessary for generative cell internalization and differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J* 106(1):228-244. doi: 10.1111/tpj.15162
- Park SK, Howden R, Twell D. (1998) The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation *geminipollen1* disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* 125(19): 3789-3799. doi: 10.1242/dev.125.19.3789
- Rensing SA, Weijers D. (2021) Flowering plant embryos: How did we end up here? *Plant Reprod* 34(4): 365-371. doi: 10.1007/s00497-021-00427-y
- Sanchez-Vera V, Landberg K, Lopez-Obando M, Thelander M, Lagercrantz U, Muñoz-Viana R, Schmidt A, Grossniklaus U, Sundberg E. (2022) The *Physcomitrium patens* egg cell expresses several distinct epigenetic components and utilizes homologues of *BONOBO* genes for cell specification. *New Phytol* 233(6): 2614-2628. doi: 10.1111/nph.17938
- Shimamura M. (2016) *Marchantia polymorpha*: taxonomy, phylogeny and morphology of a model system. *Plant Cell Physiol* 57(2): 230-256. doi: 10.1093/pcp/pcv192
- Tam TH, Catarino B, Dolan L. (2015) Conserved regulatory mechanism controls the development of cells with rooting functions in land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(29): E3959-3968.

doi: 10.1073/pnas.1416324112

田中一朗 (2017) 花粉の科学. 横浜市立大学論叢自然科学系列 65(1): 11-23. doi: 10.15015/00001192

Töller A, Brownfield L, Neu C, Twell D, Schulze-Lefert P. (2008) Dual function of Arabidopsis glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth. *Plant J* 54(5): 911-923. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03462.x

Yamaoka S, Nishihama R, Yoshitake Y, Ishida S, Inoue K, Saito M, Okahashi K, Bao H, Nishida H, Yamaguchi K, et al. (2018). Generative cell specification requires transcription factors evolutionarily conserved in land plants. *Curr Biol* 28(3): 479-486.e5. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.053

Yamaoka S, Takenaka M, Hanajiri T, Shimizu-Ueda Y, Nishida H, Yamato KT, Fukuzawa H, Ohyama K. (2004) A mutant with constitutive sexual organ development in *Marchantia polymorpha* L. *Sex Plant Reprod* 16(5): 253-257. doi: 10.1007/s00497-003-0195-3

Zhang J, Huang Q, Zhong S, Bleckmann A, Huang J, Guo X, Lin Q, Gu H, Dong J, Dresselhaus T, et al. (2017) Sperm cells are passive cargo of the pollen tube in plant fertilization. *Nat Plants* 3: 17079. doi: 10.1038/nplants.2017.79

Zhang Y, Mitsuda N, Yoshizumi T, Horii Y, Oshima Y, Ohme-Takagi M, Matsui M, Kakimoto T. (2021) Two types of bHLH transcription factor determine the competence of the pericycle for lateral root initiation. *Nat Plants* 7(5): 633-643. doi: 10.1038/s41477-021-00919-9

## 一過的導入による花粉の可視化とゲノム編集

水多 陽子

名古屋大学 高等研究院 トランスフォーマティブ生命分子研究所  
〒464-8601 名古屋市千種区不老町

## Biolistic-delivery-based pollen visualization and genome editing

Yoko Mizuta

Institute for Advanced Research, Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM),  
Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

Keywords: Pollen, Fertilization, Transient expression, Fluorescent protein, Live-imaging

DOI: 10.24480/bsj-review.14a4.00239

## 1. はじめに

花を咲かせる植物を被子植物と呼ぶ。花は被子植物の生殖器官であり、オスのゲノムを運ぶ細胞は花粉と呼ばれ、配偶子である精細胞を含む。一方でメスのゲノムを持つ細胞は卵細胞と呼ばれ、胚珠と呼ばれる母体組織のなかに埋め込まれている。種子をつくるには精細胞と卵細胞が出会い受精する必要があるが、精細胞は自力で卵細胞へと辿り着く能力を持たない。そこで、花粉は花粉管と呼ばれる管状の細胞を伸ばし、卵細胞に配偶子を届けることで受精をおこなっている。すなわち、花粉はオスのゲノムをメスの細胞へと運ぶのに特化した植物独自の生殖細胞といえる。本稿では花粉を一過的に可視化し、花粉が発芽し花粉管を伸長させ、受精に至るまでの過程を生きたまま観察する手法について、最新の成果を交えつつ紹介する。また、一過的導入によって花粉をゲノム編集する手法についても併せて紹介する。

## 2. 被子植物の花粉と生殖過程

被子植物の花粉は、精細胞の分裂時期によって二細胞性花粉（二核性花粉）と三細胞性花粉（三核性花粉）の2つに分類される（図1）。二細胞性花粉では、花粉内に雄原細胞と呼ばれる精細胞の前駆細胞が内包された状態で葯から放出される。すなわち、二細胞性花粉は花粉の栄養細胞の核である栄養核と雄原細胞の核、あわせて2つの核を持つ（二核性）。その後、二細胞性花粉は受精過程において雄原細胞が分裂し、2つの精細胞を形成する。一方で三

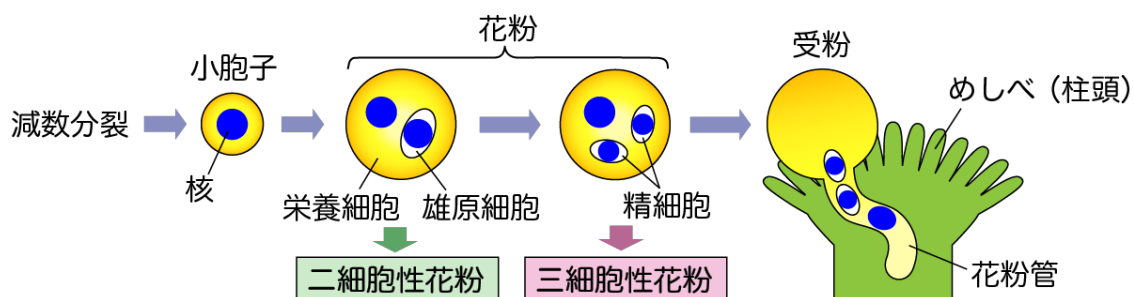


図1. 被子植物の花粉の発生

細胞性花粉では花粉がまだ葯内にある時期に雄原細胞が分裂し、2つの精細胞を形成する。すなわち、三細胞性花粉は栄養核と2つの精細胞の核、合わせて3つの核を持つ(三核性)。二細胞性花粉と三細胞性花粉は精細胞への分裂時期が異なるだけで、両者の間に本質的な違いはないと考えられている(岩波1980)。被子植物において二細胞性花粉と三細胞性花粉を同時に生産する種は稀であり、ほとんどはどちらか一方のタイプの花粉を産生する(Lora et al. 2009)。被子植物の7割程度が二細胞性花粉を持つ種であり、ナス科やユリ科、バラ科、ゴマノハグサ科などが該当する一方で、残りの3割程度は三細胞性花粉を持ち、アブラナ科やイネ科、キク科、シソ科などが該当する(図2)(Williams et al. 2014)。どちらのタイプでも、花粉の寿命は花粉内部に含まれる水分量に依存する。通常、成熟した花粉内の水分含有量が少ないほど長い寿命を持つ(Ettore et al. 2016)。水分含有量が少ない花粉は、葯から出たあと受粉するまでの時間が長い他家受粉の種に多く見られ、逆に水分含有量が多い花粉は自家受粉の種に多い。イネやコムギは三細胞性花粉を持ち、かつ水分含有量も多いことから花粉の寿命が短く、取り扱いが難しい。特にイネでは、15分程度で花粉発芽率が3分の1以下に低下してしまうなど、数分から数十分で発芽能力を失ってしまう品種も存在する(Koga et al. 1971)。このような種の花粉は取り扱いが難しく解析が制限されるため、生殖の研究を妨げる一つの要因となっている。一方で、二細胞性花粉を持つユリのように花粉の寿命が長い種では、温度や水分量を適切に保つことで数週間から数ヶ月発芽能力を保持した花粉を保存することができる(Niimi et al. 1992)。このような種は花粉の取り扱いが容易であり、花粉や生殖過程の研究に適している。また、二細胞性花粉は精細胞への分裂を終了していないため、花粉管発芽とともに花粉の成熟過程や精細胞への分裂も解析できるというメリットがある。このような背景から、私たちは花粉への一過的導入には、主に二細胞性花粉を持つ種を用いて研究をおこなっている。そのうち本稿では、栽培や花粉の採集が比較的容易で、ゲノム情報が公開されている種であるタバコ属のベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)とタバコ(*Nicotiana tabacum*)を用いた研究について紹介する。

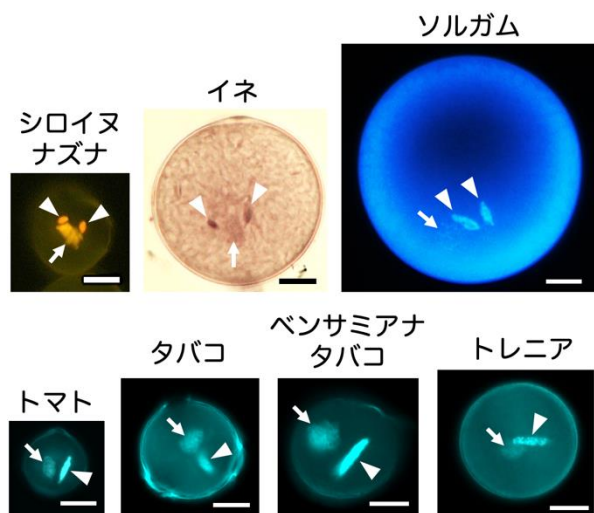


図2. 様々な被子植物の花粉

(上段) 三細胞性花粉(下段) 二細胞性花粉。シロイヌナズナは形質転換体、イネはヘマトキシリン染色、その他は DAPI 染色により核を可視化。矢じりは精細胞または雄原細胞の核。矢印は栄養核。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。一部の写真は Nagahara et al. (2021)から改変して転載。

### 3. 植物細胞への遺伝子導入

蛍光顕微鏡が開発された1900年代初頭から、特定の組織や細胞を可視化するために様々な蛍光物質が用いられてきた。植物細胞においても形態や構造、オルガネラ、タンパク質など、目的の物体のみを生きのまま可視化する方法として蛍光色素や蛍光タンパク質が広く用いら

れている。緑色蛍光タンパク質 (GFP) が 1962 年にオワンクラゲから発見 (Shimomura et al. 1962) され、分子生物学とバイオイメージング研究は飛躍的に発展した。蛍光タンパク質を用いて目的の物体を可視化するには、蛍光タンパク質の遺伝子配列を含むプラスミド DNA を細胞内に導入し、発現させる方法が広く用いられている。ところが植物細胞は乾燥や外部の刺激から身を守るために、セルロースやヘミセルロース、ペクチン、リグニンなどの多糖類や構造タンパク質から成る非常に堅固な細胞壁を持つ (Ortiz-Matamoros et al. 2017)。そのため、プラスミド DNA を植物細胞内に導入するのは容易ではない。そのような中、これまでに植物細胞に物質を導入する様々な方法が考案されてきた。植物細胞に遺伝子を導入する方法は、生物的手法、化学的手法、物理的手法の大きく 3 つに分類される (Newell 2000)。生物的手法の一つであるアグロバクテリウム法では、土壌細菌のアグロバクテリウム (*Agrobacterium* spp.) に目的遺伝子を取り込ませ、植物細胞へ感染させることで遺伝子を細胞内に導入し、形質転換体の作出を可能とする (Zaenen et al. 1974)。この方法はモデル植物では広く用いられている方法である。しかし、アグロバクテリウムが感染できるのは一部の植物に限られ、形質転換体の作出には時間や手間のかかる組織培養の工程が必要なことも多い。また、例えば花粉や受精過程を観察する場合は、形質転換体を作成し、さらに花が咲いて観察できるようになるまで時間がかかるといった問題点もある。

このような背景から、形質転換体を作成せずに遺伝子を一過的に導入し、細胞を可視化することができる方法が検討されてきた。物理的導入法の一つであるエレクトロポレーション法や、化学的導入法の一つであるプロトプラスト-ポリエチレングリコール (PEG) 法も、一過的導入による観察に良く用いられる方法である。エレクトロポレーション法は電気パルスによって細胞膜に小さな孔をあけ、物質を導入する手法である (Neumann et al. 1982)。一方で、化学的導入方法の一つであるプロトプラスト-PEG 法は高分子化合物である PEG を細胞に作用させ、核酸などの分子を細胞内に取り込ませる手法である (Krens et al. 1982)。どちらも様々な種において高効率に細胞への導入が可能である。しかし高効率に細胞に物質を導入するには、いずれも酵素によって細胞壁を取り除いたプロトプラストと呼ばれる状態の細胞を用いる必要がある。プロトプラストは細胞壁が取り除かれているため、そのままでは個体へと発生することができない。個体を得るには細胞壁を再構築させ、再分化させるなどの組織培養の工程が必要となるが、上述したように多くの植物種では組織培養が困難であり、時間と手間も必要となる。また、花粉の場合は細胞壁が無いと発芽できないため、受精することは不可能である。すなわち、細胞壁を保持したままの植物細胞に簡便にプラスミド DNA などを導入し、その後の成長を生きたまま迅速に解析できるような方法が必要である。

以上のように、植物細胞への遺伝子導入には、植物自身の特性による導入自体の難しさや形質転換体の作出や組織培養における問題点が存在し、細胞動態の観察や植物生殖の研究が進まない原因の一つとなっている。

#### 4. ボンバードメント法による花粉の一過的可視化と受精過程のライブイメージング

物理的な一過的導入方法の一つであるボンバードメント法は、パーティクルガン法、また

は遺伝子銃法とも呼ばれる (Klein et al. 1987)。形質転換体を作らずに植物細胞を可視化することができるため、古くから様々な植物細胞において用いられてきた (Luthra et al. 1997)。ボンバードメント法では、色素や核酸、タンパク質など導入したい分子を金粒子に付着させ、ガス圧を利用して高速で射出し細胞へ導入する (図 3A)。簡便な操作で固い細胞壁を貫通して分子を導入することができることから、花粉のみならず様々な細胞種で用いられてきた (Sanford et al. 1993)。ボンバードメント法では、表面に裸出した細胞であればプロトプラストを調整しなくとも葉や根、花粉など様々な細胞にそのまま分子を導入することができる。そこで我々は、この方法を用いて蛍光タンパク質の配列を含むプラスミド DNA を培地上でベンサムアナタバコまたはタバコの花粉に導入し、一過的発現によるライブイメージングが可能かを調査した (Nagahara et al. 2021)。導入するプラスミド DNA は細胞質で蛍光タンパク質を発現するプラスミド (*AtUBQ10p::tdTomato*, *LAT52p::mApple*, または *AtUBQ10p::sGFP*) と、核を標識するプラスミド (*AtUBQ10p::H2B-mClover3* または *35Sp::H2B-tdTomato*) をそれぞれ混合したものをを用いた。その結果、導入からわずか 2~3 時間後から蛍光タンパク質のシグナルを検出できることが明らかとなった (図 3B)。また、導入後の花粉を培地上で培養したところ花粉が発芽し、花粉管の内部を栄養核と雄原細胞が運ばれていく様子も観察された (図 3C)。同様に、プラスミド DNA を導入したタバコ花粉を除雄しためしべに受粉したところ、めしべ内部を花粉管が伸長し (図 3D 左), 胚珠へと到達する様子 (図 3D 右) が観察された。このように、細胞内を蛍光タンパク質によって一過的に可視化すれば、花粉や受精過程を生きのまま迅速に観察することが可能となる。ボンバードメント法はモデル植物だけでなく、例えば樹木など開花までに時間がかかる種や形質転換体の作出が困難な種においても、遺伝子の働きや細胞機能を調べるのに有効な方法といえる。

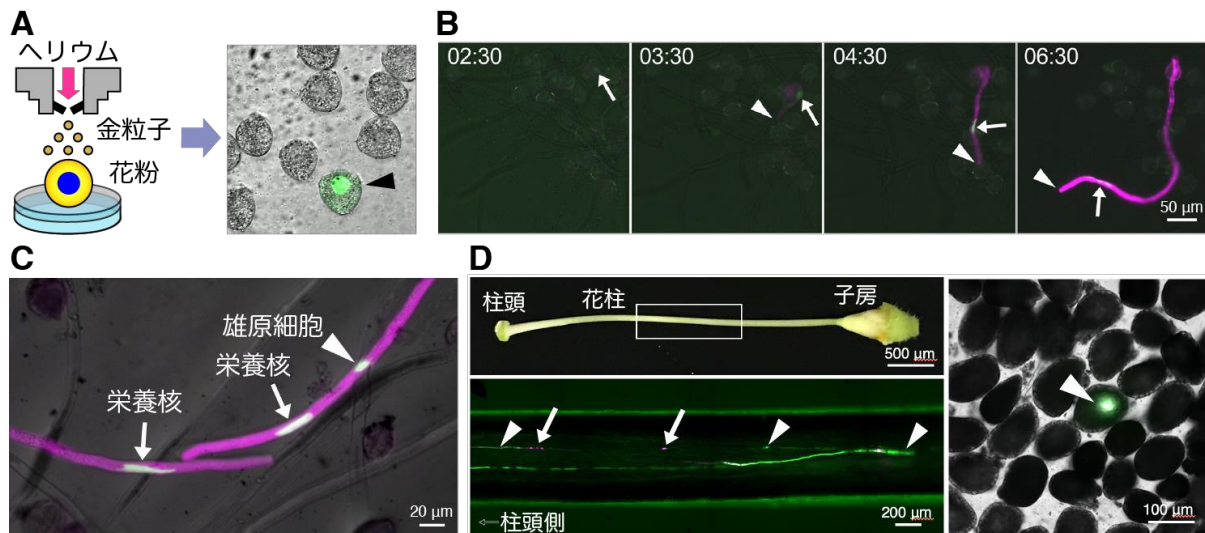


図 3. 花粉への導入と一過的発現

(A) ボンバードメントの概要と核が標識された導入花粉 (矢じり)。 (B) 導入花粉からの花粉管伸長。矢印は栄養核, 矢じりは花粉管先端を示す。数字は導入からの時間 (時:分)。 (C) 導入 8 時間後の花粉管。 (D) 導入花粉を受粉しためしべ (左上) と花柱内部 (左下), および培地上に取り出した種子 (右)。矢じりは花粉管の細胞質の蛍光を, 矢印は核の蛍光を示す。Nagahara et al. (2021) から改変して転載。



## 5. 花粉での一過的発現に最適なプロモーター

遺伝子や蛍光タンパク質を目的の細胞や組織で発現させるには、適切なプロモーター配列を持つプラスミドを用いる必要がある。そこで我々は、花粉へのボンバードメントにおいて、安定的に高発現するプロモーターの探索をおこなった。検討にはベンサミアナタバコ、タバコ、トレニア (*Torenia fournieri* ‘Blue and White’), トマト (*Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’) の4つの被子植物の花粉を用いた。プロモーターは、全身で発現する強制発現プロモーターとして知られているカリフラワーモザイクウイルス由来の *35S* プロモーター (*35Sp*), シロイヌナズナのリボソームタンパク質プロモーター (*AtRPS5A*), およびシロイヌナズナのユビキチンプロモーター (*AtUBQ10p*) の3つを検討した (図4)。これらのプロモーター下で、花粉の細胞質または核で蛍光タンパク質を発現するプラスミドを構築し、それぞれ花粉に導入した。その後、導入花粉から発芽・伸長した花粉管の蛍光のシグナル強度を指標にプロモーター活性を評価した。その結果、*AtUBQ10p* を用いた場合は4種全ての花粉の栄養細胞の細胞質と核、および雄原細胞の核にシグナルが観察された (図4)。一方で *35Sp* を用いた場合は、トレニアとトマトでは雄原細胞の核にシグナルが観察されたが、花粉の栄養細胞の核と細胞質ではシグナルが観察されなかった。また、*AtRPS5A* を用いた場合はベンサミアナタバコとタバコでは花粉の栄養細胞の細胞質にシグナルが検出されなかった。これらの結果から、*AtUBQ10p* は広く複数の植物種において最も安定的に花粉で高発現させることが可能なプロモーターであることが明らかとなった (Nagahara et al. 2021)。葉や根などでの強制発現には *35Sp* を用いることが多いが、形質転換体の場合、*35Sp* はタバコ花粉では発現するのに対し、シロイヌナズナ花粉では発現しない (Wilkinson et al. 1997)。これらの結果は、花粉における *35Sp* の活性は種によって異なり、一口に全身で発現する強制発現プロモーターと言っても組織や種によってその発現は異なることを示している。一方で *AtUBQ10p* には、様々な種の花粉での発現を可能にする恒常的なプロモーター活性を持つ配列が含まれているのかもしれない。

		<i>35Sp</i>	<i>RPS5Ap</i>	<i>UBQ10p</i>
栄養細胞 (細胞質)	ベンサミアナタバコ	+	-	+
	タバコ	+	-	+
	トレニア	-	+	+
	トマト	-	+	+
	ベンサミアナタバコ	+	+	+
栄養細胞 (核)	タバコ	+	+	+
	トレニア	-	+	+
	トマト	-	+	+
雄原細胞 (核)	ベンサミアナタバコ	+	+	+
	タバコ	+	+	+

図4. ボンバードメントに適した強制発現プロモーターの探索

蛍光タンパク質のシグナルの有無をプラスとマイナスで示す。

## 6. 花粉での一過的発現に最適な蛍光タンパク質

バイオイメージングの分野では、この数十年で実に多くの種類の蛍光タンパク質が報告されており、目的や用途に応じて適した色 (波長) や種類を選択することが可能となっている (Miyawaki et al. 2015)。植物においても蛍光タンパク質の選択は重要であり、波長以外にも安定性、蛍光強度、自家蛍光との兼ね合いなどの様々な要素を考慮する必要がある。また、葉緑体を含む葉などの組織の場合、葉緑体に含まれるクロロフィルが赤色の強い自家蛍光を

発するため、波長によっては赤色蛍光タンパク質を観察するのは困難である (Mizuta et al. 2015)。一方で、多くの花粉は葉緑体を持たないため、赤色蛍光タンパク質の観察はより簡単である。しかし、種によっては細胞壁成分や細胞質の構成要素が自家蛍光を示すことがある (Mitsumoto et al. 2009)。例えば同じ花粉でもシロイヌナズナは黄緑色の自家蛍光を発し (Mizuta et al. 2015)、ベンサミアナタバコは青色の自家蛍光を発する (Kaneshiro et al. 2022)。よって、それぞれの自家蛍光を考慮しつつ蛍光タンパク質を選択することが重要となる。

ボンバードメントによる一過的発現では、tdTomato や mClover3 などの蛍光タンパク質を用いた場合、最短で導入 2~3 時間後から蛍光タンパク質のシグナルが検出可能であることを上記に述べた。このような一過的発現においては、自家蛍光以外にも蛍光タンパク質の蛍光強度や、蛍光タンパク質自身の成熟が問題となってくる。蛍光強度が高いほどバックグラウンド光の影響が小さくなり、一過的導入からシグナル検出までの時間が短くなるため、より迅速な観察が可能となる。また、蛍光タンパク質は種類によって成熟にかかる時間が異なることが知られている。大腸菌内での発現ではあるが、同じ緑色蛍光タンパク質でも wtGFP と mNeonGreen では、mNeonGreen の方が約 1/3 以下の時間で蛍光タンパク質が成熟する (Balleza et al. 2018)。例えば花粉の発芽など、導入後できるだけ早くに細胞動態や細胞内を可視化したい場合には蛍光タンパク質の蛍光強度ができるだけ高く、早く成熟するような蛍光タンパク質を選択するのが望ましい。他にも観察が長時間にわたる場合や、例えば酸性オルガネラなど特定の細胞や器官を観察する場合は、蛍光タンパク質の光安定性や pH 安定性なども重要な要素となってくる (Lambert 2019)。このように、効果的なイメージングには植物の細胞や遺伝子自体の性質に加え、目的にあわせて蛍光タンパク質の特徴も考慮し検討することが必要である。

上記のような検討をもとに、花粉に一過的にプラスミドを導入した蛍光像を紹介する。図 5 左はベンサミアナタバコの花粉に、核を緑色に標識するプラスミド (*AtUBQ10p::H2B-mClover3*) を導入し、共焦点顕微鏡で観察した像である。栄養細胞の核と雄原細胞の核が緑色で標識されていることがわかる。また、図 5 右はシロイヌナズナの液胞膜に局在する *VAM3* を緑色で標識するプラスミド (*35Sp::sGFP-AtVAM3*; Uemura et al. 2004) とセントロメア特異的なヒストン H3 である

*HTR12* を赤色蛍光タンパク質で標識するプラスミド (*35Sp::tdTomato-HTR12*; Kurihara et al. 2008) を混合し導入した花粉である。動原体と核質に赤色のシグナルが観察され、花粉の細胞質内に存在する液胞の複雑な構造も観察することができる。これらの導入花粉が発芽し、花粉管が伸長すれば、精細胞への分裂や花粉管伸長時の液胞動態も生きたまま観察すること

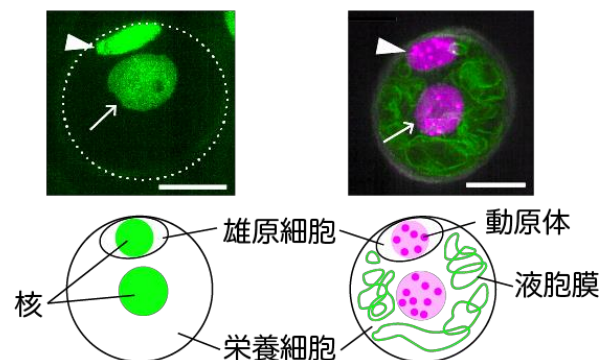


図 5. ベンサミアナタバコ花粉への一過的導入と可視化

左は核が緑色蛍光で標識されている。右は核質と動原体が赤色で、液胞膜が緑色で標識されている。矢じりは雄原細胞の核、矢印は栄養細胞の核を示す。

ができる。以上のように、細胞や蛍光タンパク質の特徴を良く理解し、一過的発現とうまく組み合わせれば、迅速なバイオイメージングも可能となるのである。

## 7. 一過的導入による花粉のゲノム編集

筆者らは一過的導入による可視化だけでなく、ボンバードメント法で花粉に CRISPR-Cas9 の配列を含むプラスミド DNA を導入し、花粉をゲノム編集する取り組みも進めてきた。上述のように、プラスミド DNA を導入した花粉は培地上だけでなく、めしべの上でも花粉管を伸長させることができる (Nagahara et al. 2021)。花粉への一過的導入後、花粉管がゲノム編集された精細胞または CRISPR-Cas9 などを胚珠へと送達すれば、組織培養などの過程を経ることなくゲノム編集個体を作成することが可能となる。我々はボンバードメントによる花粉のゲノム編集を調査するため、*AtUBQ10* プロモーター下で Cas9 を発現するプラスミドをベンサミアナタバコの花粉に導入し、翌日、花粉管を採取しゲノム編集の有無を調査した (図 6)。その結果、標的配列である *NbPDS3* 遺伝子上に変異を持つ花粉が複数検出された。これにより、ボンバードメント法を用いて花粉のゲノム編集が可能であることが示唆された (Nagahara et al. 2021)。

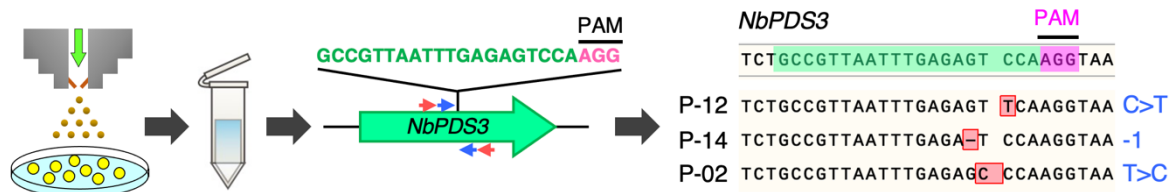


図 6. ベンサミアナタバコ花粉への一過的導入によるゲノム編集

一方で、ボンバードメント法にも細胞への導入効率が低いという短所が存在する。ベンサミアナタバコの花粉を用いた場合、花粉への導入効率は 1~2%程度であり、残りの 98~99% の花粉は何も導入されていない非導入花粉である。導入後の花粉集団から発芽し、伸長した花粉管のほとんどは非導入花粉由来となるため、培地上での花粉管の観察や、めしべ内で伸長する花粉管の観察など生殖過程の解析の際に妨げとなる。そこで、我々はボンバードメント後の花粉集団内から導入花粉を半自動的に識別し、近赤外レーザーを用いて導入花粉を選抜する方法を報告した (Kaneshiro et al. 2022)。この方法を用いることで、遺伝子が導入されていない花粉を排除し、導入花粉を 3 倍以上に濃縮した細胞集団を調整することが可能となった。

このように、一過的導入と複数のアプリケーションの組み合わせは従来の観察だけでなく、種子作出や生殖過程の解析などさらに新しい研究へと繋がる可能性を秘めている。

## 8. おわりに

本稿では植物細胞への一過的な導入方法を用いた花粉や生殖過程の観察、および花粉のゲノム編集について紹介した。ボンバードメント法による花粉への一過的導入は、単なる細胞内の観察にとどまらずその後の花粉管動態の解析、そして受精と種子作出の研究へと発展しつつある。これらの方法はモデル植物だけでなく、形質転換体の作出が困難な植物にも適応

可能である。今後は植物生殖分野を含む植物研究を促進する上で、有用な手法となることが期待される。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり東山哲也教授には多大なるご助言を頂いた。液胞膜を可視化するプラスミドは基生研の海老根一生博士，核を標識するプラスミドは東北大の植田美那子博士と名古屋大の栗原大輔博士，ソルガムの花粉は名古屋大の佐塚隆志博士に分与いただいた。本稿で紹介した研究は科研費（20H05778, 20H05779, 22K19328），JST A-STEP（JPMJTR194H），およびJST さきがけ（JPMJPR15QC）の研究助成による支援を受けておこなったものである。この場を借りて感謝申し上げる。

## 引用文献

- Balleza E, Kim JM, Cluzel P (2018) Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nat methods* 15: 47-51. doi: 10.1038/nmeth.4509
- Ettore P, Rudy D (2016) The trials and tribulations of the plant male gametophyte — understanding reproductive stage stress tolerance. In: Shanker A, Shanker C (eds.) *Abiotic and Biotic Stress in Plants — Recent Advances and Future Perspectives*. IntechOpen, London.
- 岩波洋造 (1980) 花粉学. 講談社, 東京.
- Kaneshiro I, Igarashi M, Higashiyama T, Mizuta Y (2022) Target pollen isolation using automated infrared laser-mediated cell disruption. *Quant Plant Biol* 3: e30. doi: 10.1017/qpb.2022.24
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70. doi: 10.1038/327070a0
- Koga Y, Akihama T, Fujimaki H, Yokoo M (1971) Studies on the longevity of pollen grains of rice, *Oriza sativa* L. *Cytlogia* 36: 104-110. doi: 10.1508/cytologia.36.104
- Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982) In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74. doi: 10.1038/296072a0
- Kurihara D, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K (2008) Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol* 49: 1256–1261. doi: 10.1093/pcp/pcn098.
- Lambert TJ (2019) FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nat methods* 16: 277-278. doi: 10.1038/s41592-019-0352-8.
- Lora J, Herrero M, Hormaza JI (2009) The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): Implications for pollen evolution. *Am J Bot* 96: 802-808. doi: 10.3732/ajb.0800167.
- Luthra R, Varsha, Dubey RK, Srivastava AK, Kumar S (1997) Microprojectile mediated plant transformation: A bibliographic search. *Euphytica* 95: 269-295. doi: 10.1023/A:1002957229911.
- Mitsumoto K, Yabusaki K, Aoyagi H (2009) Classification of pollen species using autofluorescence image analysis. *J Biosci Bioeng* 107: 90-94. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.10.001.
- Miyawaki A, Niino Y (2015) Molecular spies for bioimaging—fluorescent protein-based probes. *Mol Cell* 58: 632-643. doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.002.

- Mizuta Y, Kurihara D, Higashiyama T (2015) Two-photon imaging with longer wavelength excitation in intact *Arabidopsis* tissues. *Protoplasma* 252: 1231-1240. doi: 10.1007/s00709-014-0754-5.
- Nagahara S, Higashiyama T, Mizuta Y (2021) Detection of a biolistic delivery of fluorescent markers and CRISPR/Cas9 to the pollen tube. *Plant Reprod* 34: 191-205. doi: 10.1007/s00497-021-00418-z.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1: 841-845. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x.
- Newell CA (2000) Plant transformation technology. *Mol Biotechnol* 16: 53-65. doi: 10.1385/mb:16:1:53.
- Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982). *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74. doi: 10.1038/296072a0
- Niimi Y, Shiokawa Y (1992) A study on the storage of *Lilium* pollen. *J Japan Soc Hort Sci* 61: 399-403. doi: 10.2503/jjshs.61.399.
- Ortiz-Matamoros MF, Villanueva MA, Islas-Flores T (2017) Genetic transformation of cell-walled plant and algae cells: delivering DNA through the cell wall. *Brief Funct Genom* 17: 26-33. doi: 10.1093/bfpg/elx014.
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* 217: 483-509. doi: 10.1016/0076-6879(93)17086-k.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the Luminous Hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239. doi: 10.1002/jcp.1030590302.
- Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH (2004) Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* 29: 49-65. doi: 10.1247/csf.29.49.
- Wilkinson JE, Twell D, Lindsey K (1997) Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot* 48: 265-275. doi: 10.1093/jxb/48.2.265.
- Williams JH, Taylor ML, O'Meara BC (2014) Repeated evolution of tricellular (and bicellular) pollen. *Am J Bot* 101: 559-571. doi: 10.3732/ajb.1300423.
- Zaenen I, Van Larebeke N, Van Montagu M, Schell J (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol* 86: 109-127. doi: 10.1016/s0022-2836(74)80011-2.

## シストセンチュウの植物細胞リモデリング機構解明を目指して

大津 美奈<sup>1,2</sup><sup>1</sup>奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域<sup>2</sup>科学技術振興機構 さきがけ

〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

## Toward to understand how cyst nematodes remodel host plant cells

Mina Ohtsu<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Division of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology<sup>2</sup>JST, Sakigake

Takayama 8916-5, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

Keywords: Cell wall, cyst nematode, plant-microbe interaction,  
plant parasitic nematode, 3D imaging

DOI: 10.24480/bsj-review.14a5.00240

## 1. はじめに

自身が芽吹いた場所から移動することのない植物は、外部環境からの様々な刺激を柔軟に受け入れ、時には反抗しながら生活している。中でも、微生物による刺激は植物に大きな変化をもたらす。宿主植物に組織変化が起こす微生物として、植物の様々な部位に『こぶ』の形成を誘導する根頭がんしゅ病の原因となる細菌、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が良く知られる (De Cleene and De Ley 1976)。菌類だけでなく、動物が植物に顕著な形態変化を引き起こすことがある。その一例として、植物寄生性線虫のシストセンチュウ (*Globodera* and *Heterodera* spp.) が誘導する『シンシチウム』が挙げられる。シンシチウムは、シストセンチュウが感染した宿主植物の細胞同士が細胞融合を繰り返すことによって形成される多核の巨大な細胞である (Golinowski et al. 1996)。この細胞融合という現象は、多細胞生物において非常に重要な役割を持つ。動物では、卵子と精子が融合する受精の他に、骨格筋や胎盤の形成など様々な現象に細胞融合が関与していることが知られている (Aguilar et al. 2013; Rochlin et al. 2010)。動物細胞において、細胞融合は触れ合っている膜間での融合因子のやりとりを介して細胞融合が起こる。しかし、一つ一つの細胞が分厚い細胞壁で覆われている植物細胞では、細胞膜同士が接触しないため、細胞融合が起こることはほとんどない。これまでに報告のある植物における細胞融合は、重複受精の過程とシストセンチュウの引き起こすシンシチウム形成過程のみであり非常に珍しい現象である (Maruyama et al. 2016)。

これまでの研究では、シストセンチュウは細胞融合を起こすために、細胞融合の障壁となる宿主植物の細胞壁を無作為に壊していると考えられていた。しかし、筆者らによるシンシチウムの 3D ホールマウントイメージング (以下、3D イメージング) から、細胞融合の繰り返

返しによって形成されるシンシチウムは、多数の柱状の構造を持つユニークな細胞壁を形成していることがわかった (Ohtsu et al. 2017)。この発見から、シストセンチュウは、宿主植物の細胞内構造を無作為に「破壊」するのではなく、秩序立って「再構築」することによって感染細胞を形成することが明らかとなった。本稿では、シストセンチュウが細胞融合によって宿主の組織を変化させて作り出す巨大な感染細胞、シンシチウムの構造や成り立ち、特徴についてクラシカルな切片観察と近年の 3D イメージングの知見を合わせて抱括的に考察したい。

## 2. 多核な巨大細胞シンシチウム

シストセンチュウの幼虫は、宿主である植物の根端付近から根の内部に侵入し、植物の細胞と細胞の隙間を通りながら維管束付近まで移動する。そして、シンシチウムの起点となる一つの細胞 (ISC: Initial syncytium cell) を選び、頭部にある注射針のような Stylet を差し込む。Stylet は口のような役割を持っており、差し込んだ Stylet からエフェクターと呼ばれる病原性タンパク質を分泌する。そして、植物細胞の形態や二次代謝を変化させることで、Stylet を差し込んだ細胞を感染細胞、シンシチウムへと作り変える (大津 2019; 図 1)。ISC を選択すると、24 時間以内に宿主細胞の細胞質の体積が増加し、それと同時に液胞の体積が減少する。そして、細胞壁の部分的な分解や、細胞膜の融合が引き起こされ、隣接する細胞がシンシチウムに取り込まれる (Golinowski et al. 1996)。

筆者らの行ったダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) のシンシチウムの 3D イメージングでも同様に、感染から 48 時間後 (ISC 決定から 24 時間前後) には、すでに細胞壁の多数の穴や、シンシチウム形成の特徴の一つである核の肥大化が観察されている (図 2a)。また、3D 構築した感染 14 日後のシンシチウムの画像から、皮層細胞に形成された感染後期のシンシチウムは、多数の柱状の構造を持つ、パルテノン神殿様のユニークな細胞壁を形成していることが明らかになった (図 2b)。シンシチウムは、寄主植物の多数の細胞 (最大で 300 細胞ほど) が融合したものであり、肥大化した核やプラスチドに溜まったデンプン粒、細胞質の増加など (Hofmann and Grundler FMW 2006; Ohtsu et al. 2017)、通常の植物細胞とは大きく異なる特徴を持つ。また、シンシチウムでは

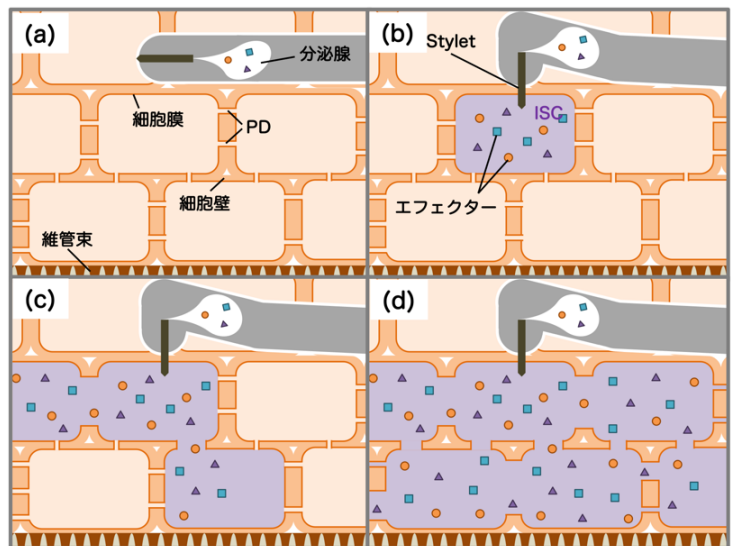


図 1. シストセンチュウ感染のモデル

(a) 根端から侵入したシストセンチュウは、宿主根の維管束付近まで侵入する。(b) シンシチウムを誘導する細胞 (ISC; Initial syncytium cell) を選び、その細胞に Stylet を突き刺し、エフェクターを分泌する。(c) シストセンチュウが分泌する細胞壁分解酵素などのエフェクターにより、細胞壁が部分的に分解され、隣り合う細胞同士が細胞融合を起こす。(d) 細胞融合を繰り返すことで、多核の巨大なシンシチウムが宿主組織内に形成される。PD; プラズモデスマータ

シヨ糖輸送体や、デンプン代謝関連遺伝子の発現が上昇していることが知られている

(Juergensen et al. 2003; Hofmann and Grundler FMW 2006)。シンシチウムはシストセンチュウの唯一の栄養源であるため、上記のように、形態的にも性質的にも、シストセンチュウの成長に必要な養分を貯蔵するために最適な組織へと変化しているのである。

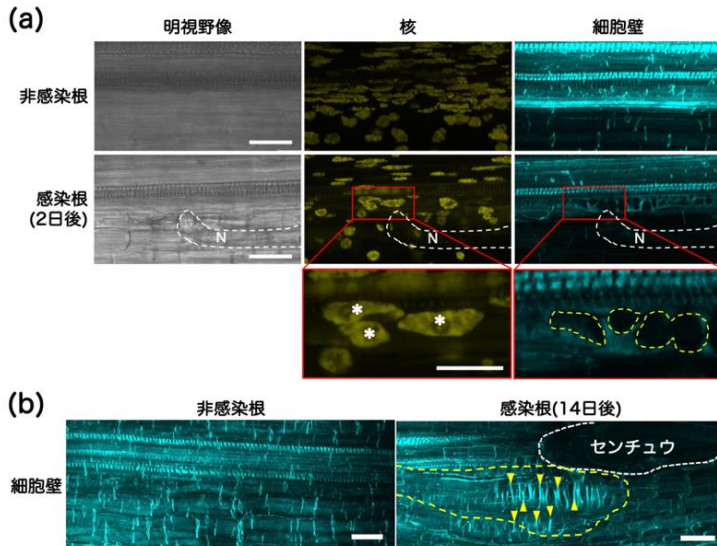


図 2. ダイズシストセンチュウによって誘導される細胞構造変化

(a), (b) 透明化したダイズシストセンチュウ接種 2 日および 14 日後の感染根および非感染根の核を SYTOX Orange, 細胞壁を Fluorescent Brightener 28 でラベルし、二光子顕微鏡を用いて観察した。白い点線はシストセンチュウを示している。アスタリスク(\*)は肥大化した核, 黄色の点線は細胞壁上の穴を示している。スケールバーは, 50  $\mu\text{m}$ 。(Ohtsu et al. 2017 より改変して抜粋)

### 3. シンシチウムは形成位置によってその形態が異なる

シストセンチュウは、根の様々な細胞を起点にシンシチウムを形成することが知られている。起点となる細胞はシストセンチュウ種によって様々であり、ダイズシストセンチュウは、宿主植物の根の皮層細胞の他に、維管束内部の柔細胞を起点としてシンシチウムを形成することが知られている (Endo 1971; 図 3a)。筆者らが確立した 3D イメージング法を使用して、根の内部におけるシンシチウムの形成位置とシンシチウムの形態に関係があるかどうか調べたところ、皮層細胞を起点に形成されたシンシチウムの細胞壁では、多数の穴と細い柱状のバルテノン神殿様の細胞壁がシンシチウムの全ての細胞において観察された (図 2b)。さらに、シンシチウムの細胞壁を様々な角度から観察したところ、シストセンチュウによって誘導される柱状の細胞壁は、ある一定の方向にのみ観察されることがわかった (図 3b; Ohtsu et al. 2017)。一方で、維管束内部に形成されたシンシチウムの細胞壁では、多数の穴は観察されるが、皮層細胞を起点として形成されたシンシチウムで観察された細い柱状の細胞壁はほとんど見られず、板状に広がった細胞壁がみられた (図 3c)。これらの知見から、シンシチウムの誘導される位置によって、シンシチウムの細胞壁の構造パターンに違いがあることがわかった。また、細胞壁のパターンだけでなく、シンシチウム形成位置によって、根の内部でのシンシチウムの広がり方にも違いが見られる。皮層細胞を起点として形成されたシンシチウムは、一部分のみが木部に接している一方で、柔細胞を起点に形成されたシンシチウムは維管束に沿って広がっており、どの部分も木部に接していた。シストセンチュウは、栄養を効率よく獲得できるように、シンシチウムを維管束に向かって拡大させることが報告されている (Jones 1982)。また、メスのシストセンチュウは卵を生産するため、オスと比べてより多くの栄養を取り込む必要があり、1日にシンシチウムの質量の 4 倍に相当する



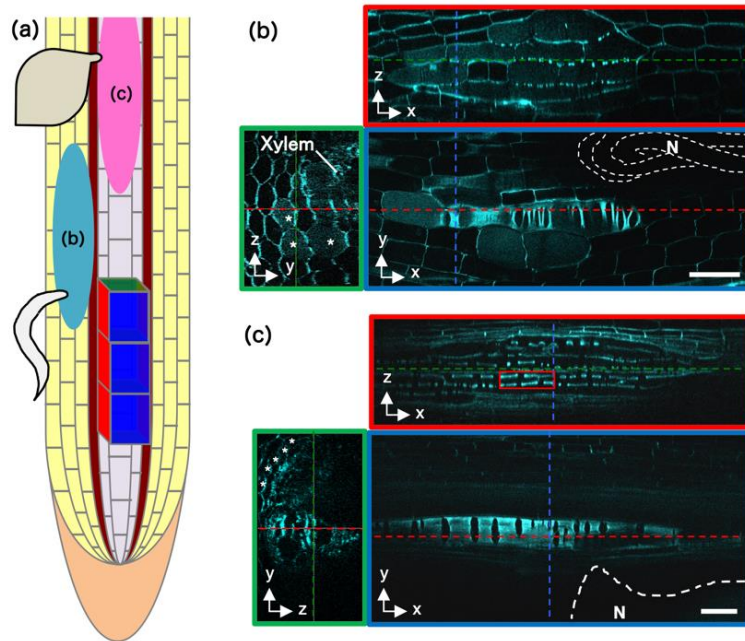


図 3. 皮層および維管束内部に形成されたシンシチウム細胞壁の 3D イメージング

(a) ダイブシストセンチュウの誘導するシンシチウムの位置および細胞壁の方向 (x-y 平面; 青, x-z 平面; 赤, y-z 平面; 緑) を示す模式図。皮層細胞 (b) および維管束内部 (c) に形成されたシンシチウムの細胞壁 z スタック画像の x-y, x-z および y-z 平面の投影像。白い点線 (N) はシンシチウムを形成するシストセンチュウ, アスタリスク (\*) は皮層細胞を示す。スケールバー (b) および (c) は 50  $\mu\text{m}$ 。

量のシンシチウム内容物を体内に取り込むと考えられている (Sijmons et al. 1991)。テンサイシストセンチュウ (*Heterodera schachtii*) では、オスが内鞘細胞を ISC として選び、シンシチウムを誘導する一方で、メスは形成層または前形成層の細胞を ISC に選び、維管束に沿ってシンシチウムを誘導すると報告されている (Golinowski et al. 1996; Sobczak et al. 1997)。また、近年、ムギシストセンチュウ (*Heterodera avenae*) によって誘導されるシンシチウムの形態と広がり方が、抵抗性品種に寄生した場合と罹病性に寄生した場合では異なることが明らかになっている。罹病性品種のシンシチウムは、後生木部に接するように形成されており、複雑な網目状構造の細胞壁を持つ一方で、抵抗性品種に形成された場合は、シンシチウムが原生木部に接することはない (Levin et al. 2021)。以上のことから、シンシチウムの形態と宿主植物内部での広がり方は、抵抗性や罹病性、または雌雄の決定といったシストセンチュウの感染や形態形成に非常に密接に関与することが示唆される。

#### 4. シンシチウムは植物の様々な細胞の特徴を併せ持つ

シンシチウムに似た特徴的な細胞壁パターンを持つ植物細胞として木部の導管細胞や仮導管といった管状要素の細胞壁が挙げられるが、管状要素の網目状やリング状の独特なパターンは表層微小管によって決定されている (Paredez et al. 2006)。これまでに、シストセンチュウ非感染根と比較して、シンシチウムの内部では  $\alpha$ -tubulin と  $\beta$ -tubulin 遺伝子、シンシチウムの周辺では  $\gamma$ -tubulin 遺伝子が高発現していることが明らかになっている。また、微小管の重合阻害剤であるタキソール処理によって、シンシチウムの形成が抑制されることがわかっており (de Almeida Engler et al. 2004)、シンシチウムの特殊な細胞壁の形成には微小管のリアレンジメントが関与することが示唆される。さらに、ムギシストセンチュウの形成するシンシチウムの 3D イメージングから、シンシチウムに隣接する後生木部は、通常の伸長方向である長軸方向ではなく放射状に細胞が拡張していること、そしてそれらの細胞はリグニン化が遅延することが明らかになっている (Levin et al. 2020)。これらの知見から、シストセンチュウは、シンシチウムの細胞壁形成に管状要素の細胞壁パターン制御メカニズムを利用するだ

けでなく、シンシチウムに接する宿主植物の木部の発達も同時に制御していることが示唆された。

また、シンシチウムにみられる一次細胞壁の内側突出や、原形質の増加、核の肥大化といった特徴は、篩部の伴細胞など植物の輸送細胞の特徴とも類似しているといわれている (Rodríguez et al. 2014)。さらに、シロイヌナズナにおいて篩部で高発現するショ糖トランスポーターをコードする *SUC2* 遺伝子の発現量が、テンサイシストセンチュウの誘導するシンシチウムで非常に高いことも報告されており (Juergensen et al. 2003)、シストセンチュウがシンシチウムの形成の際に、植物の持つ篩部の形態形成メカニズムも利用している可能性が示唆された。これらのことをふまえると、シンシチウムは非常に緻密なコントロールによって、植物の木部と篩部の両方の形態的・機能的な特徴を併せ持つユニークなキメラ組織であることが示唆される。

## 5. シンシチウムの細胞壁は緻密な制御によって再構築されている

これまでの報告から、シストセンチュウは *Stylet* を介して、細胞壁を分解する酵素を植物体内に送り込むことが明らかになっている (Bohlmann and Sobczak 2014)。さらに、宿主植物が持つ細胞壁分解酵素等の遺伝子発現もシストセンチュウの感染によって上昇することから、シストセンチュウと宿主植物、両者の分泌する細胞壁分解酵素の働きによって寄主植物も細胞壁が分解されることが知られている (Bohlmann and Sobczak 2014)。一方で、興味深いことに、シストセンチュウの誘導する特徴的な細胞壁のセルロース含有量は通常の細胞壁よりも増加している (図 4; Ohtsu et al. 2017)。また、シンシチウムの細胞壁から通常の一次細胞壁には含まれていないメチル化ペクチン-ホモガラクトンやアラビナン、アラビノガラクトタンタンパク質が検出されることも報告されており (Davies et al. 2012; Zhang et al. 2017)、シンシチウムにおける柱状細胞壁の形成過程では細胞壁成分の分解だけでなく、新たな細胞壁成分の合成が行われていることが示唆される。植物では、細胞壁は体を支持するために重要な役割を持つ。

細胞融合を繰り返したシンシチウムは、栄養を溜め込んで肥大化するが、そのためには細胞壁をなくす(緩める)ことが必要である。しかし、シンシチウム内部では膨圧が 10,000 hPa にも達することが示されており

(Böckenhoff and Grundler 1994)、シンシチウムの細胞壁はこ

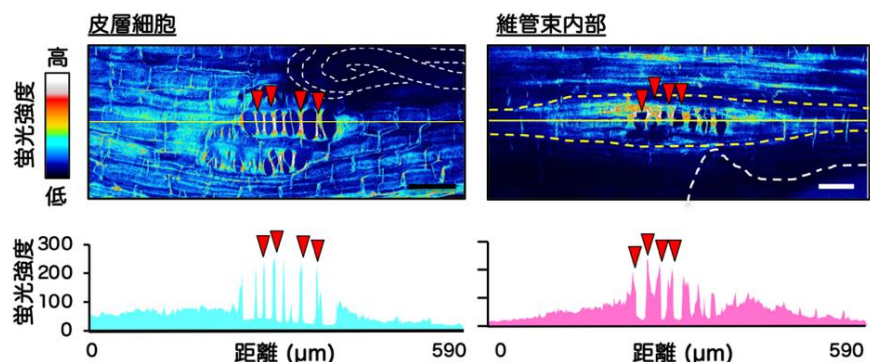


図 4. 異なる組織に形成されたシンシチウムの特殊な細胞壁の蛍光強度

カラースケールは、蛍光強度を示している。下のグラフは、Fluorescent Brightener 28 染色された細胞壁の蛍光強度を画像解析ソフトウェアによって数値化したもの。赤色の矢印は、シンシチウムに見られる特殊な細胞壁を、黄色の矢印は正常な細胞壁を示している。白い点線はダイズシストセンチュウを示している。スケールバーは、50  $\mu\text{m}$ 。

の圧力に耐える強度が必要となる。細胞壁に無作為に大きな穴を無数に開けてしまうと、肥大化した際に細胞の形を保つのが困難になると考えられる。そこで、シストセンチュウは、パルテノン神殿の支柱のように、柱状に細胞壁を残し、それらを新たに合成した細胞壁成分でコーティングすることで強化し、肥大化したシンシチウムの形態を保持していると考えられる。

## 6. 展望

1990年台に盛んに行われていた電子顕微鏡を用いた切片観察と、近年確立された植物専用の透明化試薬を用いた3Dイメージングによって、シストセンチュウが形成するシンシチウムの形態や詳細な内部構造についての全容が明らかになりつつある。また、ダイズシストセンチュウ (*H. glycines*)、ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*)、テンサイシストセンチュウ (*H. schachtii*) といった主要なシストセンチュウ種の全ゲノムがここ数年で解読され (Masonbrink et al. 2021; Van Steenbrugge et al. 2021; Siddique et al. 2022)、シストセンチュウに関する研究はますます加速することが予想される。ゲノム情報を利用した今後の研究によって、シンシチウムの伸展方向をどのように定めているのか、複雑な細胞壁構造を生み出しているのかなど、これまで謎に包まれていたシストセンチュウが誘導するシンシチウムの形成メカニズムの全容が明らかになるだろう。そして、シストセンチュウによる植物細胞のリモデリング機構が明らかになれば、植物の発達において見落とされてきた知られざる細胞融合現象の発見につながることを期待される。

## 引用文献

- Aguilar PS, Baylies MK, Fleissner A, Helming L, Inoue N, Podbilewicz B, Wang H, Wong M (2013) Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet.* 29: 427–437. doi: 10.1016/j.tig.2013.01.011.
- Bohlmann H, Sobczak M (2014) The plant cell wall in the feeding sites of cyst nematodes. *Front. Plant Sci.* 5: 89. doi: 10.3389/fpls.2014.00089.
- Böckenhoff A, Grundler FMW (1994) Studies on the nutrient uptake by the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by in situ microinjection of fluorescent probes into the feeding structures in *Arabidopsis thaliana*. *Parasitology* 109: 249–254. doi: 10.1017/S003118200007637X.
- Davies LJ, Lilley CJ, Knox PJ, Urwin PE (2012) Syncytia formed by adult female *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis thaliana* roots have a distinct cell wall molecular architecture. *New Phytol.* 196: 238–246. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04238.x.
- de Almeida Engler J, Van Poucke K, Karimi M, De Groodt R, Gheysen G, Engler G, Gheysen G (2004) Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant J.* 38:12-26. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02019.x.
- De Cleene M, De Ley J (1976) The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42: 389–466
- Endo BY (1971) Synthesis of nucleic acids at infection sites of soybean roots parasitized by *Heterodera glycines*. *Phytopathology* 61: 395–399.

- Golinowski W, Grundler FMW, Sobczak M (1996) Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* 194: 103–116. doi: 10.1007/BF01273172.
- Hofmann J, Grundler FMW (2006) Females and males of root-parasitic cyst nematodes induce different symplasmic connections between their syncytial feeding cells and the phloem in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 44:430–433 doi: 10.1016/j.plaphy.2006.06.006.
- Jones MGK (1982) Host cell responses to endoparasitic nematode attack: Structure and function of giant cells and syncytia. *Ann. Appl. Biol.* 97: 353–372
- Juergensen K, Scholz-Starke J, Sauer N, Hess P, van Bel AJ, Grundler FMW (2003) The companion cell-specific *Arabidopsis* disaccharide carrier *AtSUC2* is expressed in nematode-induced syncytia. *Plant Physiol.* 131: 61–69. doi: 10.1104/pp.008037.
- Levin KA, Tucker MR, Bird DM, Mather DE (2020) Infection by cyst nematodes induces rapid remodelling of developing xylem vessels in wheat roots. *Sci. Rep.* 10: 9025. doi: 10.1038/s41598-020-66080-z.
- Levin KA, Tucker MR, Strock CF, Lynch JP, Mather DE (2021) Three-dimensional imaging reveals that positions of cyst nematode feeding sites relative to xylem vessels differ between susceptible and resistant wheat. *Plant Cell Rep.* 40: 393–403. doi: 10.1007/s00299-020-02641-w.
- Masonbrink RE, Maier TR, Hudson M, Severin A, Baum T (2021) A chromosomal assembly of the soybean cyst nematode genome. *Mol Ecol Resour.* 21: 2407–2422. doi: 10.1111/1755-0998.13432.
- Maruyama D, Ohtsu M, Higashiyama T (2016) Cell fusion and nuclear fusion in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 60:127–135. doi: 10.1016/j.semcd.2016.07.024.
- Ohtsu M, Sato Y, Kurihara D, Suzaki T, Kawaguchi M, Maruyama D, Higashiyama T (2017) Spatiotemporal deep-imaging of syncytium induced by the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Protoplasma* 254: 2107–2115. doi: 10.1007/s00709-017-1105-0.
- 大津 美奈 (2019) 線虫の感染戦略に迫る新たな植物の深部イメージング アグリバイオ 3 (2)
- Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312:1491–1495. doi: 10.1126/science.1126551.
- Rochlin K, Yu S, Roy S, Baylies MK (2010) Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev. Biol.* 341: 66–83 doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.024.
- Rodiuc N, Vieira P, Banora MY, de Almeida Engler J (2014) On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Front. Plant Sci.* 5: 160. doi: 10.3389/fpls.2014.00160.
- Siddique S, Radakovic ZS, Hiltl C, Pellegrin C, Baum TJ, Beasley H, Bent AF, Chitambo O, Chopra D, Danchin EGJ et al. (2022) The genome and lifestage-specific transcriptomes of a plant-parasitic nematode and its host reveal susceptibility genes involved in trans-kingdom synthesis of vitamin B5. *Nat. Commun.* 13: 6190. doi: 10.1038/s41467-022-33769-w.
- Sijmons PC, Grundler FMW, Vonmende N, Burrows PR, Wyss U (1991) *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. *Plant J.* 1: 245–254. doi: 10.1111/j.1365-313X.1991.00245.x

- Sobczak M, Golinowski W, Grundler FMW (1997) Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* roots induced during development of males of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *European Journal of Plant Pathology* 103: 113–124.
- van Steenbrugge JJM, van den Elsen S, Holterman M, Sterken MG, Thorpe P, Goverse A, Smant G, Helder J (2021) Comparative genomics of two inbred lines of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* reveals disparate effector family-specific diversification patterns. *BMC Genomics*. 22: 611. doi: 10.1186/s12864-021-07914-6.
- Zhang L, Lilley CJ, Imren M, Knox JP, Urwin PE (2017) The Complex Cell Wall Composition of Syncytia Induced by Plant Parasitic Cyst Nematodes Reflects Both Function and Host Plant. *Front. Plant Sci.* 21:1087. doi: 10.3389/fpls.2017.01087.

## 環境変動がもたらす植物根圏微生物の集団・個体レベルでの動的変化

椎名 昭斗<sup>1</sup>, Yuniar Devi Utami<sup>2</sup>, 晝間 敬<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学教養学部統合自然科学科

〒153-8902 東京都目黒区駒場 3 丁目 8-1

<sup>2</sup> 東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

〒153-8902 東京都目黒区駒場 3 丁目 8-1

### Transitions in plant-associated microorganisms at the population and individual level induced by environmental changes

Akito Shiina<sup>1</sup>, Yuniar Devi Utami<sup>2</sup>, Kei Hiruma<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Integrated Sciences, School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

3-8-1 Komaba, Meguro-ku, 153-8902, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences,

The University of Tokyo

3-8-1 Komaba, Meguro-ku, 153-8902, Tokyo, Japan

Keywords: Plant-Microbe interactions, Endophytes, Environmental changes, Microbiome, Rhizosphere

DOI: 10.24480/bsj-review.14a6.00241

#### 1. はじめに

土中に根を張る植物は、さまざまな土壌微生物と絶え間ない相互作用をしながら生息する。微生物が存在する領域は、土壌、根からの様々な影響を受ける根圏土壌や、根の表層・内部等多様であり、主に真菌、卵菌、細菌、古細菌が集団を形成している。これらの微生物は植物の成長を促すなどの共生性を示すものから、植物の成長を阻害し最悪の場合死滅させる病原性を示すものまで多彩であり、植物の生存および生育に非常に大きな影響を与える。病原菌は作物に深刻な被害を及ぼす可能性があり、植物に対する感染様式や病原性の発揮に重要な遺伝子などの理解や植物の病原菌に対する免疫応答の理解が進んできた。一方、共生性を示す微生物は窒素固定を介して窒素源を植物に供給する根粒細菌や菌糸を介してリンなどの栄養素を植物へと供給する菌根菌などがよく研究されてきた。これらの研究の多くは特定の制御された環境条件での単独の微生物の振る舞いを対象としているが、実際の自然環境において

植物と微生物はあらゆる環境変化に晒されているとともに多種多様な微生物集団が共存している。また、最近の研究から植物—微生物相互作用の実態は環境の変化に応じて動的かつ連続的に変化していくことがわかってきた (Cheng et al. 2019)。そこで、本稿では、環境変動に応じて微生物が集団と個体という二つの次元で動的に変化することを紹介し、変動する環境下の植物—微生物相互作用を研究する意義を考える。

## 2. 集団の組成の変化

植物は土中に根を張り固着した生活を営んでおり、様々なストレスに晒されている。気候変動による熱ストレスや乾燥ストレスは植物に致命的となりうるが、植物は有益な微生物と協力することで種々のストレスに対する耐性を強化している (Kumar and Verma 2018)。さらに植物と共生する微生物の一部は植物の栄養吸収にも寄与しており、植物の生育における重要な役割を果たしている (Vandenkoornhuyse et al. 2015)。しかし、これらの微生物集団(微生物集団)も環境変動の影響を受け、時に不可逆的な変化を起こすことがわかってきた。微生物集団の研究は第二世代シーケンサーの登場により活発化し、様々な植物種や環境における微生物カタログ情報やメタゲノム情報が蓄積されてきている。これらの情報を比較することで、環境変動による微生物集団の組成の変化や、さらには、その変化が植物に与える影響との関連性についての解析が可能となる (Cheng et al. 2019)。これらの解析の結果、環境変動によって母集団である土壌微生物集団の組成が変化し、さらに環境変動に植物が応答することでも根圏や根内部に存在する微生物集団が変化することがわかってきた。

### 2-1. 環境変動による土壌微生物集団の変化

土壌微生物集団は環境変化によってその組成が変化し、その結果植物との相互作用が異なる様相を呈することがある。熱は自然環境下において普遍的なストレスであり、土壌微生物集団の組成を変化させる重要な要素の一つである。Mendes らは病原糸状菌である *Rhizoctonia solani* の病原性発揮が、特定の土壌で植物を栽培した場合に抑制されるが、50°C及び80°Cで1時間処理した土壌では病害耐性が低下することを発見した (Mendes et al. 2011)。van der Voort らはこのデータを解析することで、短時間の比較的低温の熱ストレスにより土壌の微生物集団の素性が劇的に変化すること、および、熱ストレスによりその存在量が低下した細菌の一部は、病害耐性に寄与することが知られている共生菌であることを明らかにした (van der Voort et al. 2016)。したがって、短時間の熱ストレスであっても根の微生物集団を劇的に変化させ、その結果、土壌が持つ病害耐性の度合いが変化することがわかった。このような熱ストレスとして、自然環境下では山火事が発生し、土壌微生物集団の多様性を大幅に減少させ、その組成も変化させることが知られている (Nelson et al. 2022)。

植物にとって水分は生育に必要不可欠であるため、乾燥ストレスは植物の生存や生育に甚大な影響を及ぼす。そこで、共生性の微生物が浸透圧の調整や水の吸収効率を上昇させることで、植物の乾燥耐性を向上させている (Poudel et al. 2021)。しかし一方で、乾燥ストレスは根における微生物集団の組成やその機能にも影響を及ぼすことがわかってきた (Naylor and

Coleman-Derr 2018)。例えば、乾燥した夏を経ると、土壌細菌集団の多様性は変わらないものの、集団内の *Actinobacteria* の相対的な存在比が上昇し、*Acidobacteria* の存在比が減少する (Barnard et al. 2013)。さらに、この土壌を再び湿らせることで集団の組成が乾燥前と同様に戻ったことから、土壌微生物集団は乾燥に対して頑健性を持つことが示唆された (Barnard et al. 2013)。しかし一方で、植物における微生物集団は乾燥に対して必ずしも頑健性は示さない可能性がある。Santos-Medellín らは、一時的に灌漑を止めることでイネに乾燥ストレスを一過的に与えた後に、乾燥ストレスが微生物集団の組成に与える時系列変化について解析した (Santos-Medellín et al. 2017)。その結果、より長期間の乾燥ストレスを受けたイネの根の内部に存在する微生物集団では、様々な植物の病害耐性を向上させる *Actinobacteria* の占める割合が高まっていたことを明らかにした。一方で、給水により乾燥ストレスを解除した後においても、乾燥ストレスで変化した微生物集団の組成は通常時のものには戻らないことを発見した。水を通常量与えているイネの微生物集団の組成はその他の生育環境に依存することなく一定で安定していることが明らかになっているが、乾燥ストレスはその微生物集団の組成に不可逆的な大きな影響を与えることを示唆しており、それが乾燥ストレスの緩和後にどのような影響を植物に与えるかについてさらなる研究が望まれる。

さらに詳細な集団変化として、種内集団の変化が考えられる。パンゲノムは、種内の多様性を表す言葉として登場した (McCarthy and Fitzpatrick 2019)。様々な微生物の同種内での比較ゲノム解析より、どの株も保存しているコア領域に加えて、特定の株が特異的に持つアクセサリー領域に分けられることが分かってきており (Ma et al. 2010)、パンゲノムは、種内株でのコア領域と各株のアクセサリー領域のセット全体を表していると言える。植物と相互作用する微生物の一部は、同種と言っても植物感染戦略の異なる様々な株が存在する (Badet and Croll 2020; Alouane et al. 2021)。例えば、我々が研究対象としている糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) は世界中の幅広い植物種から様々な株が単離されており、シロイヌナズナの植物成長に与える影響は共生性から病原性まで多様であるとともに、シロイヌナズナに対してそれぞれ病原性および共生性を示す菌株が同一環境下で生育する同じ植物種から単離されている (Hiruma et al. 2022)。この発見は、植物の環境においては、複数の同種株が共存・競合している可能性を示唆する。故に、様々な性質を持つ株の総体として微生物種を捉える必要があると考えている。そこで、分岐群内の全ての株からの遺伝子セット全体であるパンゲノムに注目することで、さらに詳細な植物-微生物相互作用を捉えることができる。例えば、同じ種の中である環境では共生性の株が支配的な効果を発揮する一方で、別の環境では病原性の株が支配的になる可能性もある。さらには、ある環境では、単独の株の解析からは想像できないような新たな効果が発揮される (創発現象の検出の) 可能性もあるのではないかと考えている。我々は現在、感染戦略の異なる Ct 株を同時に植物の根に接種した際の植物への影響を様々な栄養環境や植物の遺伝子型で調査しており、そのモデルを起点に、種内での動的変化とそのメカニズムを捉えたいと考えている。

## 2-2. 環境変動に対する植物応答がもたらす微生物集団の変化



植物は周囲の環境変動に対して応答し、その構造や代謝を変化させる。この応答の一環として、根の微生物集団も変化させていることがわかってきた。例えば、成長に欠かせない物質であり三大栄養素の一つであるリンが不足している時、植物の根の微生物集団の組成が変化することが明らかになっている (Castrillo et al. 2017)。他にも窒素や鉄の栄養環境によって根の微生物集団の組成が変化することがわかっている (Ikeda et al. 2014; Harbort et al. 2020)。また、上で説明した乾燥ストレス時の微生物集団組成の変化は、土壌と比較して根圏や根の内部にてより顕著に観察されたことも、植物由来の応答が微生物集団の組成の決定に重要な役割を果たしていることを示唆する (Santos-Medellín et al. 2017)。

植物は免疫応答を介して微生物集団の組成を変化させていることがわかってきており、環境変動に対する植物応答の一部ではこの経路に則っているようだ。植物は微生物関連分子パターン (Microbe-associated molecular patterns, MAMP) を感知することでパターン誘導性免疫 (Pattern-triggered immunity, PTI) を誘起させ、様々な抗菌物質を産生するなどして抵抗性を発揮する。サリチル酸 (SA), ジャスモン酸 (JA), エチレンは PTI を制御する植物ホルモンとして知られているが、Lebeis らはこれらの経路に関する遺伝子を欠損した *dde1 ein2 pad4 sid2* 変異体や SA 経路の免疫が過剰に機能している *cpr5* 変異体などにおける根の内生細菌集団の組成が野生型のそれに比べ、界から科まで様々な分類階級において変化していることを明らかにした (Lebeis et al. 2015)。また、SA 自体を代謝する微生物が存在することも示唆されており、植物の免疫機能は根の細菌集団に多様な影響を及ぼしていることが考えられる (Lebeis et al. 2015)。リン環境の変動に植物が応答して微生物集団を変化させる時、免疫機能を低下させることで微生物集団を変化させていることが近年の研究によって明らかになった (Tang et al. 2022)。PSR の制御やリンの吸収・輸送に関するシロイヌナズナの遺伝子が欠損した変異体では、根の微生物集団が野生型と大きく変化する (Castrillo et al. 2017)。一方で、根の微生物集団は植物の PSR 関連遺伝子の変異と比べると土壌のリン濃度の変化による影響はあまり受けなかったという報告も存在している (Finkel et al. 2019)。これは、植物体内のリンの蓄積量に応じて植物が PSR 応答を介して根の微生物集団を変化させていることを示唆している。PSR 応答の中核を担う制御因子である PHR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1) は細菌の鞭毛構成タンパク質フラジェリンにより誘起される PTI を負に制御することがわかっており (Castrillo et al. 2017), その分子の経路の一端も明らかになっている (Tang et al. 2022)。MAMP を感知し PTI を活性化させるパターン認識受容体 (Pattern recognition receptor, PRR) は共受容体と複合体を形成し、シグナル伝達を行う。FERONIA (FER) は受容体キナーゼであり、ペプチドホルモンである RALF (Rapid Alkalinization factors) の一部と結合すると PRR と共受容体の複合体形成を妨害し、免疫を低下させることが知られている (Stegmann et al. 2017)。Tang らはリン欠乏環境下で PHR1 が RALF の転写を活性化し、RALF が FER に結合することでフラジェリンを認識する受容体キナーゼである FLS2 とその共受容体である BAK1 の複合体形成を阻害し、免疫を抑制することを明らかにした (Tang et al. 2022)。さらに、免疫の抑制により植物のリン欠乏を緩和する機能を持つ微生物の感染を促進したことから、植物はリン欠乏環境下において、リン欠乏を緩和する微生物集団を免疫機能の抑制を介して構築することが示唆された (Tang et al. 2022)。同様に、熱、乾燥、栄養枯渇などの環

境変動を植物は感知して、その結果、植物免疫機能は変化するため(Saijo and Loo 2020)、微生物集団に何らかの影響を与えると考えられる。

植物が微生物に影響を与える化学物質を分泌することにより微生物集団を変化させることもわかってきた (Pascale et al. 2019)。そのような化学物質の一つに、植物が分泌する二次代謝物であるクマリン類がある。クマリン類は周囲に鉄が欠乏している際に分泌され、周囲の鉄を利用可能な状態に直接変化させる (Schmid et al. 2014)。しかし最近の研究によって、この二次代謝物は微生物集団を操作する役割も果たしていることがわかってきた (Stringlis et al. 2018; Voges et al. 2019; Harbort et al. 2020)。調査された限りは病原菌に対して抗菌活性を特に示したため、結果的に、クマリン類存在下では、クマリン類に非感受性であり、植物の鉄吸収を助ける有益な微生物が選択的に根圏に定着する。このように、植物は抗菌活性を持つクマリン類化合物を用いることで鉄欠乏環境下で有益な微生物をおそらく優先的に誘因している。他にもベンゾキサジノイドやカマレキシン、トリテルペンなど様々な二次代謝物が様々な作用で微生物集団の組成に影響を与えることがわかっている (Hu et al. 2018; Huang et al. 2019; Koprivova et al. 2019)。

### 3. 微生物個体が植物に及ぼす影響の変化

微生物集団の組成（構成員）が変化するだけでなく、微生物それ自体の生育や植物感染能、感染戦略も環境に依存して変化しうる。病原菌は植物も含めた環境に依存して病害を発露することはよく知られており、そのメカニズムも研究が進んできた (Velásquez et al. 2018) が、共生菌でも同様に環境依存性が認められることがわかってきた。例えば、植物の共生菌としてよく研究されているアーバスキュラー菌根菌 (AMF) は、地球温暖化で予測される現状よりも若干高い温度と高 CO<sub>2</sub> 濃度の条件下では、通常環境と比較して、菌糸が長くなり、植物感染能力も上昇する (Compant et al. 2010)。植物微生物相互作用において、植物に及ぼす効果に変化する微生物も存在する。例えば、*Colletotrichum tofieldiae* はリン十分条件では植物の成長を促さないが、リン欠乏条件では植物の成長を促進する (Hiruma et al. 2016)。さらには、植物のトリプトファン由来の二次代謝物の合成能が欠損した植物変異体に対しては病原性を示し植物を枯死させる。さらに日本で単離された *Colletotrichum tofieldiae* 3 (Ct3) は、接種した植物を 22°C で栽培した場合には植物の成長を阻害するが、26°C で栽培した場合には植物の PSR の制御因子 PHR1 と PHL1 に依存する形で植物の成長を促進する (Hiruma et al. 2022)。一方で、微生物そのものではなく微生物から作られる物質の植物の作用が環境条件に応じて変化する例も報告されている。根圏細菌である *Bacillus amyloliquefaciens* は揮発性物質を介して植物の成長を促進することが知られていたが、Morcillo らはこの揮発性物質がリン十分条件では植物の成長を促進する共生性を示すが、リン欠乏条件では植物に過敏反応を起こし、その結果、植物に対してストレス症状を誘導することを明らかにした (Morcillo et al. 2020)。以上のことから、微生物の成長やそれに伴って植物に対して示される共生性や病原性の仕組みは多様であることが伺えるが、いずれの場合においても環境や植物に依存して連続的に変化しうるということが推察される。

微生物個体が植物への振る舞いを変化させる遺伝子レベルでのメカニズムも一部明らかになりつつある。Ct3 は温度依存的に共生性から病原性まで植物に与える影響を変化させるが、Ct3 のゲノム上の同一領域にクラスターとして存在する植物ホルモン ABA および類縁代謝物である Botrydial の合成酵素遺伝子群の発現が、病原性を発揮する 22°C で有意に上昇していたことがわかった。これらの遺伝子を破壊した菌変異体をシロイヌナズナに接種したところ、22°C でも植物の成長を促進することがわかった (Hiruma et al. 2022)。これは、単一の遺伝子クラスターが Ct3 の性質を決定していることを示唆している。二次代謝物クラスターはどのように微生物の植物に対する振る舞いを対照的に変化させるスイッチとして働いている可能性があるが、多くの二次代謝物産生遺伝子クラスターは通常の実験室条件では休眠状態である (Brakhage 2013)。これらの遺伝子は特定の環境の刺激によって発現することが考えられており、植物-微生物相互作用における二次代謝物クラスター遺伝子の役割の解明が待たれる。

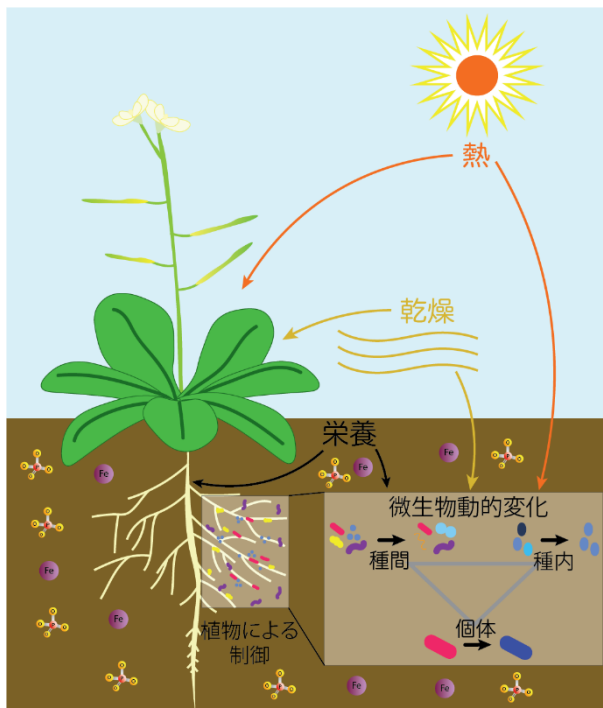


図. 土壌や植物圏での微生物集団の組成や微生物個体の行動およびそれが植物に及ぼす影響は環境（熱、乾燥、栄養）変動によって直接的、もしくは植物を介して変化する。微生物集団の組成の変化は、種間および種内での変化に大別される。一方で、個体レベルでも、環境変動により、その個体の行動が遺伝子発現変動を介して動的に変化しその結果植物に及ぼす影響も連続的に変化する。

#### 4. 展望

微生物は宿主の植物の熱や乾燥などの環境ストレス耐性を向上させ、さらに栄養吸収にも寄与しており、植物の生存や生育に重要である。そして、環境変動によってその微生物集団の組成が変化することがわかってきた (図)。しかし、微生物集団の組成の変化が植物に及ぼす

影響とそのメカニズムは今後明らかにすべき課題である。例えば、熱や乾燥などのストレスを受けることで植物根に存在する微生物集団の構成は変化するが、この変化が植物のストレス耐性を向上させるのか、さらにはそのメカニズムを解明する為にはさらなる研究が必要であろう。この時、微生物個体の動態も変化しうることで、さらにパンゲノムの挙動を考慮する必要がある。AMFの生育や植物感染能力は温度によって変化するが、一方で植物成長促進効果は菌株によって異なることから、微生物の生育と植物に与える影響は単純な相関関係にあるわけではないことが示唆されている (Compant et al. 2010)。さらに、個体を集団化した際には、微生物間相互作用も起きうるため、植物への影響は独立に起きるわけではないかもしれない。複雑な動的振る舞いを見せる植物—微生物相互作用についての理解を深める為には、これらの個体・集団レベルでの動的変化の遺伝的メカニズムを明らかにしていくと同時に、集団レベルでの組成の変化のデータを蓄積することが重要になるだろう。

一方で、将来的にこれらの知見を応用することで、微生物を植物に成長促進効果やストレス耐性を与える資源として利用できると考えられる。持続的な農業を実現する上で、化成肥料の使用量の縮小は必要不可欠である。土壌微生物は化成肥料の代替としての潜在能力を秘めているが、実用に向けて解決すべき問題がある。その一つはその成長促進効果が化成肥料（植物が直接吸収できる可溶性の栄養素からなる）を通常量施肥した際と比べると小さいことであり、かつ、現代の農業において行われている化成肥料の大量施肥が共生性を示す微生物の感染を阻害する例や、阻害につながる植物応答を誘導する例も知られており (Kobae et al. 2016; Hacquard et al. 2016) , しばしば同時に活用できない点が挙げられる。したがって、化成肥料の施肥を減らすとともに、微生物による植物の成長促進効果を最大限まで引き出し活用する方策を考えるべきである。その際に考慮すべき点として、上記のように微生物は集団と個体の二つの次元で動的であることが挙げられる。環境に応答して生じる微生物集団の変化や、その内部で起きているであろう微生物個体の性質の変化に対する深い理解をそれが及ぼす植物の変化の理解に加えて得ることが、微生物の農業利用実現への第一歩となるだろう。

## 謝辞

本研究は、科研費 JP21B307, JP21H05150, および、JST の JPMJFR200A の助成を受けたものです。

## 引用文献

- Alouane T, Rimbart H, Bormann J, González-Montiel GA, Loesgen S, Schäfer W, Freitag M, Langin T, Bonhomme L (2021) Comparative Genomics of Eight *Fusarium graminearum* Strains with Contrasting Aggressiveness Reveals an Expanded Open Pangenome and Extended Effector Content Signatures. *International Journal of Molecular Sciences* 22:6257. doi: 10.3390/ijms22126257
- Badet T, Croll D (2020) The rise and fall of genes: origins and functions of plant pathogen pangenomes. *Curr Opin Plant Biol* 56:65–73. doi: 10.1016/j.pbi.2020.04.009
- Barnard RL, Osborne CA, Firestone MK (2013) Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *The ISME Journal* 7:2229–2241. doi:10.1038/ismej.2013.104
- Brakhage AA (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* 11:21–32. doi:10.1038/nrmicro2916

- Castrillo G, Teixeira PJ, Paredes SH, Law TF, de Lorenzo L, Feltcher ME, Finkel OM, Breakfield NW, Mieczkowski P, Jones CD, et al. (2017) Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature* 543:513–518. doi: 10.1038/nature21417.
- Cheng YT, Zhang L, He SY (2019) Plant-Microbe Interactions Facing Environmental Challenge. *Cell Host Microbe* 26:183–192. doi: 10.1016/j.chom.2019.07.009.
- Compant S, van der Heijden MGA, Sessitsch A (2010) Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiol Ecol* 73:197–214. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00900.x
- Finkel OM, Salas-González I, Castrillo G, Spaepen S, Law TF, Teixeira PJ, Jones CD, Dangl JL (2019) The effects of soil phosphorus content on plant microbiota are driven by the plant phosphate starvation response. *PLoS Biol* 17:e3000534. doi: 10.1371/journal.pbio.3000534.
- Hacquard S, Kracher B, Hiruma K, Münch PC, Garrido-Oter R, Thon MR, Weimann A, Damm U, Dallery JF, Hainaut M, et al. (2016) Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat Commun* 7:11362. doi: 10.1038/ncomms11362.
- Harbort CJ, Hashimoto M, Inoue H, Niu Y, Guan R, Rombolà AD, Kopriva S, Voges MJEE, Sattely ES, Garrido-Oter R, et al. (2020) Root-Secreted Coumarins and the Microbiota Interact to Improve Iron Nutrition in Arabidopsis. *Cell Host Microbe* 28:825–837.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.09.006.
- Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, Nakano RT, Hacquard S, Kracher B, Neumann U, Ramírez D, Bucher M, O'Connell RJ, et al. (2016) Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* 165:464–474. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.028.
- Hiruma K, Aoki S, Utami YD, Okamoto M, Kawamura N, Nakamura M, Ohmori Y, Sugita R, Tanoi K, Sato T, et al. (2022) A fungal secondary metabolism gene cluster enables mutualist-pathogen transition in root endophyte *Colletotrichum tofieldiae*. *bioRxiv* 2022.07.07.499222. doi: 10.1101/2022.07.07.499222.
- Huang AC, Jiang T, Liu YX, Bai YC, Reed J, Qu B, Goossens A, Nützmann HW, Bai Y, Osbourn A (2019) A specialized metabolic network selectively modulates root microbiota. *Science* 364. Doi:10.1126/science.aau6389
- Hu L, Robert CAM, Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, Manzo D, Chervet N, Steinger T, van der Heijden MGA, et al. (2018) Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nat Commun* 9:2738. doi: 10.1038/s41467-018-05122-7.
- Ikeda S, Sasaki K, Okubo T, Yamashita A, Terasawa K, Bao Z, Liu D, Watanabe T, Murase J, Asakawa S, et al. (2014) Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microbes Environ* 29:50–59. doi: 10.1264/jsme2.me13110.
- Kobae Y, Ohmori Y, Saito C, Yano K, Ohtomo R, Fujiwara T (2016) Phosphate Treatment Strongly Inhibits New Arbuscule Development But Not the Maintenance of Arbuscule in Mycorrhizal Rice Roots. *Plant Physiol* 171:566–579. doi: 10.1104/pp.16.00127.
- Koprivova A, Schuck S, Jacoby RP, Klinkhammer I, Welter B, Leson L, Martyn A, Nauen J, Grabenhorst N, Mandelkow JF, et al. (2019) Root-specific camalexin biosynthesis controls the plant growth-promoting effects of multiple bacterial strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:15735–15744. doi: 10.1073/pnas.1818604116.
- Kumar A, Verma JP (2018) Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiological Research* 207:41–52. doi: 10.1016/j.micres.2017.11.004.
- Lebeis SL, Paredes SH, Lundberg DS, Breakfield N, Gehring J, McDonald M, Malfatti S, Glavina del Rio T, Jones CD, Tringe SG, et al. (2015) Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science* 349:860–864. doi: 10.1126/science.aaa8764.
- Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, et al. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464:367–373. doi: 10.1038/nature08850.
- McCarthy CGP, Fitzpatrick DA (2019) Pan-genome analyses of model fungal species. *Microb Genom* 5. doi: 10.1099/mgen.0.000243.
- Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, Schneider JH, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PA, et al. (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332:1097–1100. doi: 10.1126/science.1203980.
- Morcillo RJ, Singh SK, He D, An G, Vilchez JI, Tang K, Yuan F, Sun Y, Shao C, Zhang S, et al. (2020)

- Rhizobacterium-derived diacetyl modulates plant immunity in a phosphate-dependent manner. *EMBO J* 39:e102602. doi: 10.15252/embj.2019102602.
- Naylor D, Coleman-Derr D (2018) Drought Stress and Root-Associated Bacterial Communities. *Frontiers in Plant Science* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.02223.
- Nelson AR, Narrowe AB, Rhoades CC, Feghel TS, Daly RA, Roth HK, Chu RK, Amundson KK, Young RB, Steindorff AS, et al. (2022) Wildfire-dependent changes in soil microbiome diversity and function. *Nat Microbiol* 7:1419–1430. doi: 10.1038/s41564-022-01203-y.
- Pascale A, Proietti S, Pantelides IS, Stringlis IA (2019) Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. *Front Plant Sci* 10:1741. doi: 10.3389/fpls.2019.01741.
- Poudel M, Mendes R, Costa LAS, Bueno CG, Meng Y, Folimonova SY, Garrett KA, Martins SJ (2021) The Role of Plant-Associated Bacteria, Fungi, and Viruses in Drought Stress Mitigation. *Front Microbiol* 12:743512. doi: 10.3389/fmicb.2021.743512.
- Saijo Y, Loo EP-I (2020) Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol* 225:87–104. doi: 10.1111/nph.15989.
- Santos-Medellín C, Edwards J, Liechty Z, Nguyen B, Sundaresan V (2017) Drought Stress Results in a Compartment-Specific Restructuring of the Rice Root-Associated Microbiomes. *mBio* 8. doi: 10.1128/mBio.00764-17.
- Schmid NB, Giehl RF, Döll S, Mock HP, Strehmel N, Scheel D, Kong X, Hider RC, von Wirén N (2014) Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in Arabidopsis. *Plant Physiol* 164:160–172. doi: 10.1104/pp.113.228544.
- Stegmann M, Monaghan J, Smakowska-Luzan E, Rovenich H, Lehner A, Holton N, Belkhadir Y, Zipfel C (2017) The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* 355:287–289. doi: 10.1126/science.aal2541.
- Stringlis IA, Yu K, Feussner K, de Jonge R, Van Bentum S, Van Verk MC, Berendsen RL, Bakker PAHM, Feussner I, Pieterse CMJ (2018) MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E5213–E5222. doi: 10.1073/pnas.1722335115.
- Tang J, Wu D, Li X, Wang L, Xu L, Zhang Y, Xu F, Liu H, Xie Q, Dai S, et al. (2022) Plant immunity suppression via PHR1-RALF-FERONIA shapes the root microbiome to alleviate phosphate starvation. *EMBO J* 41:e109102. doi: 10.15252/embj.2021109102.
- Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* 206:1196–1206. doi: 10.1111/nph.13312.
- van der Voort M, Kempenaar M, van Driel M, Raaijmakers JM, Mendes R (2016) Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. *Ecol Lett* 19:375–382. doi: 10.1111/ele.12567.
- Velásquez AC, Castroverde CDM, He SY (2018) Plant-Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Curr Biol* 28:R619–R634. doi: 10.1016/j.cub.2018.03.054.
- Voges MJEEE, Bai Y, Schulze-Lefert P, Sattely ES (2019) Plant-derived coumarins shape the composition of an synthetic root microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:12558–12565. doi: 10.1073/pnas.1820691116.