

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 μm 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 (β -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 μm 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

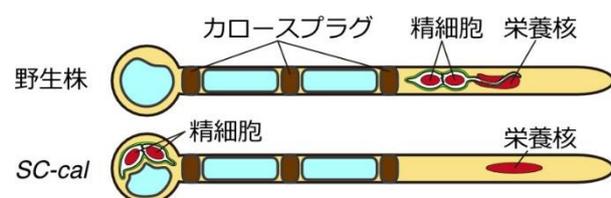


図 1. 野生株と *SC-cal* 形質転換体の花粉管

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 Ca²⁺ 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