

8. 被子植物重複受精の解析による配偶子膜融合分子制御メカニズムの 解明

千葉大学大学院園芸学研究院 准教授 井川 智子

概要

本研究は被子植物重複受精の分子制御メカニズムの解明を最終目標として、配偶子膜融合因子として機能する精細胞膜タンパク質 GCS1 と相互作用する新規因子の同定研究を進めている。これまでに GCS1 と相互作用するタンパク質のプロテオーム解析を行い、同定されたタンパク質種の一つである GAH について機能解析を行った。まず Yeast Two-Hybrid アッセイにより、GAH と GCS1 の相互作用が支持された。シロイヌナズナゲノムには計4つの GAH パラログタンパク質が存在するが、このうち GAH3 と GAH4 はともに花粉の精細胞を覆うような局在パターンを示し、これは主に peri-germ cell membrane への局在であることが分かった。続いてゲノム編集によって GAH3 および GAH4 の個別の欠損変異体と二重欠損変異体を、更に GAH1,2,3,4 の四重欠損変異体を作成し、受精への影響を観察評価したが、いずれの変異体系統においても受精異常は観察されなかった。しかし GAH4 を花粉栄養細胞で過剰発現させた組換え体の花粉を授粉した場合に、導入 GAH4 遺伝子が後代に遺伝しないことが明らかになった。本研究では精細胞膜タンパク質である GCS1 と相互作用し且つ peri-germ cell membrane に局在する新たなタンパク質として GAH を同定した。今後は GAH タンパク質の peri-germ cell membrane での機能意義について追究をさらに進める。

これら詳細な局在及び挙動解析は本財団からの助成によって推進できましたこと、感謝申し上げます。

背景および目的

生物の受精ではオスとメスの配偶子が出会うと、細胞膜間の接着・膜融合が起こり、細胞質融合、核融合を経て受精卵が誕生する。この一連の過程は配偶子細胞膜上のタンパク質によって制御される。GCS1 (Generative Cell Specific 1) は植物で最初に報告された受精因子である (Mori et al., 2006; vonBesser et al., 2006)。GCS1 はオスの精細胞の原形質膜上に局在し、メスの配偶子である卵細胞および中央細胞との融合を制御する膜融合因子でもある。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のゲノムには GCS1 遺伝子がシングルコピーで存在し、GCS1 欠損変異体では重複受精（被子植物特有の受精様式で、精細胞と卵細胞、精細胞と中央細胞間での2つの受精が同時に起こる）が阻害され、受精必須因子として機能する。GCS1 は原生生物から無脊椎動物まで広く機能保存されており、動植物で共通する受精の中核機構を担う因子としても注目されてきた。しかしながら、GCS1 と相互作用して融合を制御するタンパク質の存在が示唆されているものの、いずれの生物種においても同定されていない。既知受精因子の相互作用因子を同定し、その協調性を明らかにすることによって、重複受精分子メカニズムのシナリオを追究することができる。本研究では GCS1 相互作用因子を捕捉する系を作製し (Shiba and Takahashi et al. 2023)、精製後のプロテオーム解析によって複数種のタンパク質を同定していた。これらのうち膜局在および配偶子での発現可能性をデータベースで照合し、解析対象として選抜された GAH の機能評価を行った。

方法

【相互作用解析】

Yeast Two-Hybrid System により GCS1 と GAH の相互作用を解析した。

【発現及び局在解析】

GAH をコードするパラログ遺伝子はシロイヌナズナゲノム中に 4 つ存在し (GAH1/GAH2/GAH3/GAH4)、ファミリーを構成している。植物体における発現細胞と亜細胞局在を解析するため、各 GAH1-4 の遺伝子について 5' 非翻訳領域 (プロモーター) から ORF Reading Frame までをクローニングし、C 末端側に mNeongreen (mNG) 遺伝子を融合した発現コンストラクトを作製後、シロイヌナズナ精細胞核 RFP マーカー株 HTR10mRFP (Ingouff et al., 2007) に導入した組換え体での発現と局在を解析した。さらに *GAH3* と *GHA4* のプロモーターで核標識遺伝子発現を制御した組換え体を作製し、発現細胞を特定した。

【表現型解析】

ゲノム編集により、*gah3* および *gah4* 変異体をそれぞれ作出した。さらに二重変異体 *gah3/gah4* と四重変異体 *gah1/gah2/gah3/gah4* を作製した。さらに、栄養細胞特異的な発現を示す遺伝子のプロモーターで *GAH3* 及び *GHA4* をそれぞれ発現させた組換え体を作製した。これら組換え体について受精、種子発達、花粉管伸長について観察を行った。

結果および考察

Yeast Two-Hybrid によって GAH4 と GCS1 の生化学的な相互作用が示され、GCS1 相互作用因子のプロテオーム解析結果を支持した。

GAH3-mNG 及び GAH4-mNG の観察を行った結果、どちらも成熟花粉において精細胞を覆うような mNG 蛍光シグナルを示した。そこで GAH3-mNG および GAH4-mNG の花粉を発生ステージごとに観察したところ、2 細胞期の栄養細胞細胞質でシグナルが検出されはじめ、3 細胞初期の精細胞でその周縁部にシグナルが集積し、成熟期でも維持される、という挙動が明らかになった (図 1)。

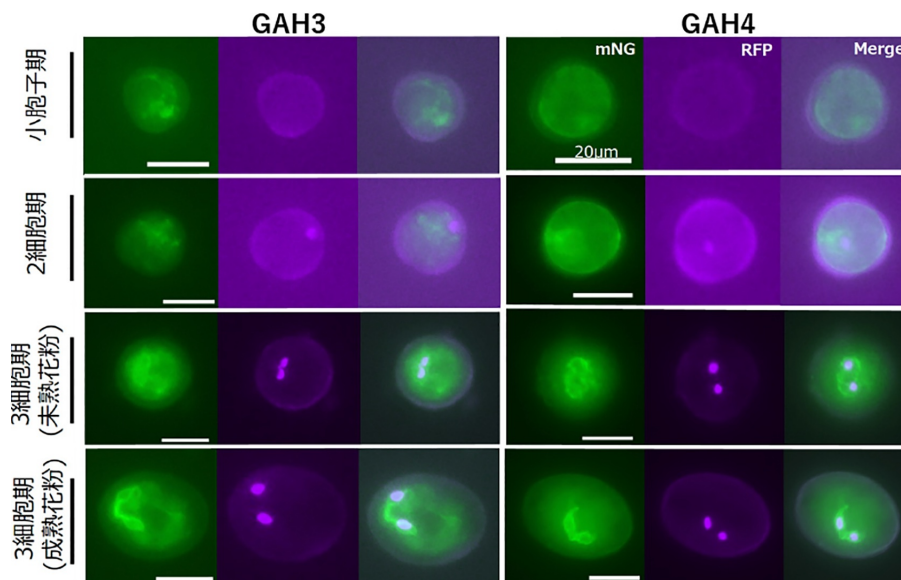


図 1. 花粉発生過程における GAH3 及び GAH4 の局在

花粉発生ステージは上段 (小孢子期) から下段 (3 細胞期) の順で進行する。GAH3 及び GAH4 の各パネルの左は GAH3-mNG または GAH4-mNG 写真を、中心は精細胞核 RFP 写真を示し、右側はこれらの重ね合わせ写真を示す。

花粉での発現に関して、プロモーター活性解析では栄養細胞核と精細胞核の両方で核蛍光シグナルが検出された。しかし、栄養細胞核シグナルの強度が顕著に強く、これらの結果から、精細胞を覆うような mNG シグナルは栄養細胞で発現した GAH3 および GAH4 に由来することが分かった。このような局在パターンから、花粉内の GAH3 及び GAH4 は peri-germ cell membrane (Sugi and Calhau et al., 2024) に局在することが判明した。peri-germ cell membrane の存在は半世紀以上前から知られているものの、その生物学的意義はまだ明らかになっていない。本研究で作製した *gah3*、*gah4*、*gah3/gah4*、*gah1/gah2/gah3/gah4* 株では野生型と比較して有意な表現型の変化は観察されなかった。しかし、*GAH3* および *GAH4* を花粉栄養細胞で特異的に過剰発現させた組換え体は雄性伝達異常を示した。これらの結果から、GAH タンパク質は peri-germ cell membrane で機能するが、その存在量が正常な花粉機能の維持に重要であることを示唆した。また、GCS1 との相互作用が示された結果から、精細胞膜と peri-germ cell membrane の間で何らかの相互作用が存在することも示唆された。今後さらに追究を進め、被子植物の新たな生殖調節機構について解明を進める。

(完)

発表論文

- 1) Shiba Y., Takahashi T., Ohashi Y., Ueda M., Mimuro A., Sugimoto J., Noguchi Y., Igawa T.
Behavior of male gamete fusogen GCS1/HAP2 and the regulation in Arabidopsis double fertilization.
Biomolecules 13(2) 208-208 (2023). doi: 10.3390/biom13020208
- 2) Sugi, N., Calhau, A.R.M., Jacquier, N.M.A. et al.
The peri-germ cell membrane: poorly characterized but key interface for plant reproduction.
Nature Plants 10, 1607–1609 (2024). doi: 10.1038/s41477-024-01818-5

引用文献

- 1) Mori T., Kuroiwa H., Higashiyama T., Kuroiwa T.
GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization.
Nature Cell Biology 8:64–71 (2006). doi:10.1038/ncb1345.
- 2) von Besser K., Frank A.C., Johnson M.A., Preuss D.
Arabidopsis HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization.
Development 133:4761–4769 (2006). doi:10.1242/dev.02683.
- 3) Ingouff M., Hamamura Y., Gourgues M., Higashiyama T., Berger F.
Distinct dynamics of histone3 variants between the two fertilization products in plants.
Current Biology 17:1032-1037 (2007). doi: 10.1016/j.cub.2007.05.019
- 4) Shiba Y., Takahashi T., Ohashi Y., Ueda M., Mimuro A., Sugimoto J., Noguchi Y., Igawa T.
Behavior of male gamete fusogen GCS1/HAP2 and the regulation in Arabidopsis double fertilization.
Biomolecules 13(2) 208-208 (2023). doi: 10.3390/biom13020208
- 5) Sugi, N., Calhau, A.R.M., Jacquier, N.M.A. et al.
The peri-germ cell membrane: poorly characterized but key interface for plant reproduction.
Nature Plants 10, 1607–1609 (2024). doi: 10.1038/s41477-024-01818-5