

## 重複受精のライブイメージング Live Imaging of Double Fertilization

永原史織<sup>a</sup>, 東山哲也<sup>a, b, c</sup>  
Shiori Nagahara and Tetsuya Higashiyama

<sup>a</sup>名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM)

<sup>b</sup>科学技術振興機構 ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト

<sup>c</sup>名古屋大学大学院・理学研究科・生命理学専攻

**要旨** 被子植物の重複受精では、2つの精細胞が異なる2つの受精相手である卵細胞および中央細胞とそれぞれ融合し、次世代を担う胚およびその栄養組織となる胚乳を形成する。重複受精は、現在陸上において繁栄している被子植物が獲得した受精戦略として興味深い。その詳細な機構は未だほとんど明らかになっていない。その理由として、重複受精が花器官の中の雌しべの奥深くで行われており、その過程を生きたまま直接観察することが困難であったことが挙げられる。近年、重複受精のライブイメージング技術の開発および様々な細胞操作技術との組み合わせにより、ダイナミックな重複受精の実態が徐々に明らかになりつつある。本稿では、ライブイメージング技術を基盤とした重複受精研究の現状と今後の展開について詳細に議論したい。

キーワード：重複受精、ライブイメージング、細胞操作、シロイヌナズナ

### 1. はじめに

植物の生殖過程には、生殖細胞に特徴的な細胞の伸長や融合、ダイナミックな細胞運命決定など、細胞生物学的に興味深い現象が多く存在する。1900年代の中頃より、花器官の電子顕微鏡観察によって生殖過程の様々なステージが捉えられはじめたものの、固定サンプルを用いた解析では、この過程を網羅的に追うことは困難であった。

まず、本稿で紹介する被子植物の受精について、その概略を説明したい。陸上植物のなかで現在最も種数が多いのが、被子植物である。被子植物が乾燥した陸上の環境において繁栄できた要因として、水を必要とせず、次世代を担う胚とその栄養組織となる胚乳とを素早く形成することのできる独自の受精戦略を獲得したことが挙げられる。この受精様式は、「重複受精」と呼ばれる。重複受精では、雄性配偶体である花粉の中に含まれる2つの雄性配偶子（精細胞）が、花粉から発芽した花粉管と呼ばれる管により、将来種子となる胚珠組織へと運ばれる。胚珠の中には、2つの異なる雌性配偶子である卵細胞および中央細胞と、2つの助細胞が含まれる。花粉管は助細胞から分泌される分泌タンパク質 LUREs によって正確に胚珠へと導かれる<sup>1,2)</sup>。助細胞に到達した花粉管が破裂することで、2つの精細胞は胚珠内へと放出され、卵細胞および中央細胞とそれぞれ受精する（図 1A, B）。卵細胞と精細胞の受精により胚が、中央細胞と精細胞の受精に

より胚乳がそれぞれ形成され、胚珠は種子へと発達する。このように、被子植物では、花粉管が精細胞を直接受精の場で待つ卵細胞と中央細胞のもとへと放出することで、水の少ない環境でも次世代を作ることができる。

重複受精の場である胚珠組織は、植物の花器官の中でも雌しべの子房に覆われた深部に存在しており、この一連の過程を生きたまま観察することは困難であった。近年、顕微鏡技術の発展と顕微鏡下で受精を再現する実験系の開発により、重複受精のライブイメージング解析が盛んに行われはじめた。本稿では、モデル植物シロイヌナズナを用いたライブイメージング解析によって明らかとなった、ダイナミックな重複受精の仕組みを中心に、最近の研究のトピックスと今後の展開について論じたい。

### 2. ライブイメージング解析により解き明かされた重複受精の動態

近年、卵細胞、中央細胞、精細胞といった重複受精に関わる雌雄生殖細胞で特異的に発現する遺伝子が報告され、蛍光タンパク質でこれらの細胞を特異的に標識することが可能となった。浜村らは、変異体などのリソースも多く、植物の研究分野で広く用いられているモデル植物シロイヌナズナを用い、培地上で花粉管と胚珠を共培養することにより、重複受精を顕微鏡下で再現できる系の開発を行った<sup>3)</sup>。高効率で受精を観察するために雌しべの一部を用いているこの系は、*semi-in vivo* 重複受精系と呼ばれる（図 1C, D）。蛍光観察にはスピニングディスク型の共焦点レーザー顕微鏡と高感度

<sup>1</sup> 〒464-8601 愛知県名古屋市中種区不老町名古屋大学ITbM棟5階  
2016年8月15日受付, 2016年10月19日受理

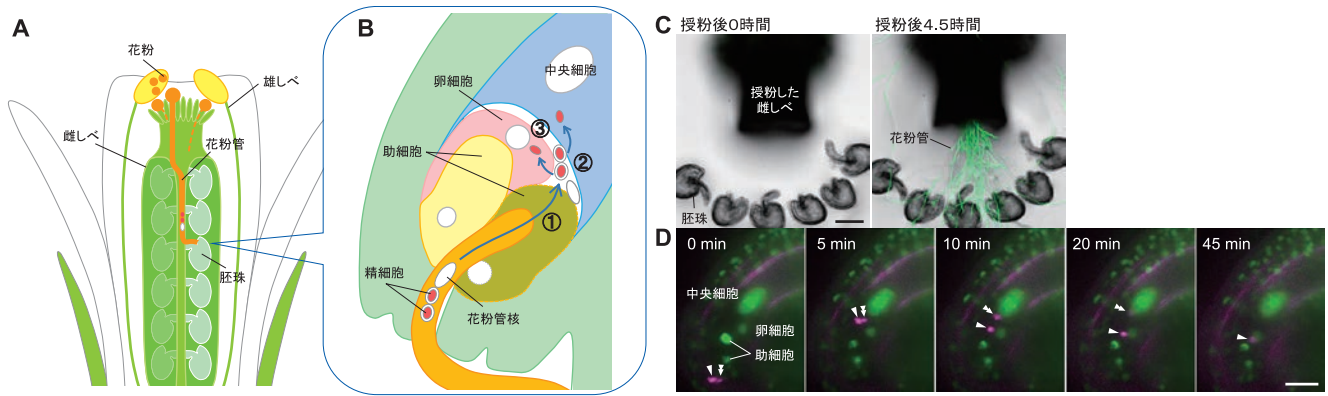


図1 シロイヌナズナの重複受精過程および semi-*in vivo* 重複受精系によるライブイメージング解析

- A. シロイヌナズナの花器官の模式図。雄しべから雌しべに付着した花粉から花粉管が発芽し、胚珠へと伸長する。
- B. 胚珠組織内における重複受精過程の模式図。重複受精過程は、精細胞の動きから、①花粉管からの放出、②2つの受精相手である卵細胞および中央細胞との接着、③各受精相手との膜融合、の3つの過程に大別される。
- C. 培地上で共培養された胚珠および花粉管。花粉管の細胞質がGFPで標識されている。授粉後4.5時間では、授粉した雌しべの切り口から花粉管が胚珠の方へと伸び出している。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。
- D. Semi-*in vivo* 重複受精系による精細胞のライブイメージング。雌性配偶体の細胞核がGFPで、精細胞核がmRFPで標識されている。胚珠内へと放出された2つの精細胞核がそれぞれ卵細胞(矢尻)と中央細胞(二重矢尻)へと受精していく様子が見られる。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。文献15)より、一部改変して転載。

CCDカメラを採用し、励起光による細胞への悪影響を最小限に抑えることで、重複受精時の精細胞のダイナミクスを初めてライブで捉えることに成功した。重複受精は、精細胞の動きの観点から3つの過程(放出・接着・膜融合)に大別されることが示された(図1B, D)。放出の過程では、花粉管から勢いよく放出された2つの精細胞が、どちらも卵細胞および中央細胞と密接するような場所まで運ばれる。放出された精細胞は卵細胞と中央細胞に接着し、それぞれの受精相手と膜融合するまでに、平均7.4分間とどまっていることが分かった。この接着・融合という重複受精に関わる雄性配偶子膜特異的な因子として、それぞれ GAMETE EXPRESSED 2 (GEX2)<sup>4)</sup> および GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 (GCS1)/HAPLESS 2 (HAP2)<sup>5,6)</sup> が同定されている。Semi-*in vivo* 重複受精系による *gex2* 変異体または *gcs1* 変異体の解析では、胚珠内に放出された2つの精細胞が膜融合することなく放出位置にとどまったままの様子もライブで捉えられている。

さらに浜村らはこの系を用い、重複受精時のカルシウムイオン濃度の変化を捉えることに成功している<sup>7)</sup>。カルシウムイオンは、動物の受精および胚発生過程に関わることが知られており、海生動物などでは、2つ以上の精子の侵入を素早く防ぐ「多精拒否機構」にも関与していると言われていた。植物においては、トウモロコシの単離卵細胞および精細胞を培地中で電気融合させる *in vitro* 受精系による解析から、カルシウムイオンが受精卵における細胞壁の新生など、受精直後の現象に関わっていると考えられてきた<sup>8)</sup>。細胞内でのカルシウムイオン濃度変化の検出には、カルシウムイオン濃度に依存して、同一の励起波長に対する蛍光が蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により変化するカルシウムセンサーの Yellow Cameleon (YC) 3.60 が用いられた。卵細胞特異的に

YC3.60 を発現させ、受精時のカルシウムイオン濃度の変化が解析された。その結果、卵細胞内カルシウムイオン濃度の変化には2つの上昇のピークが存在することが明らかとなった。1つ目のピークは花粉管からの精細胞の放出のタイミングと、2つ目のピークは卵細胞と精細胞の膜融合のタイミングとそれぞれ一致しており(図2)、動物と同様に被子植物の受精においてもカルシウムイオンが重要な役割を担っていることが示唆された。同様の成果は、異なるカルシウムセンサーを用いた解析においても報告されている<sup>9)</sup>。

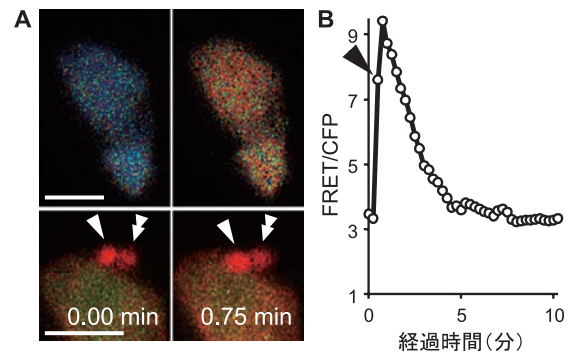


図2 受精時の卵細胞カルシウムイメージング

- A. 精細胞の放出直後(左)および膜融合の瞬間(右)の卵細胞内カルシウムイオン濃度。上のパネルはカルシウムイオン濃度の変化を、下のパネルはそのときの精細胞の挙動を示す。FRET/CFPの値が高いほど赤くなるようヒートマップで表示されている。矢尻と二重矢尻はそれぞれ卵細胞と中央細胞に受精した精細胞を示す。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。文献7)より、一部改変して転載。
- B. Aで観察された卵細胞のFRET/CFPの値の経時変化。矢尻は卵細胞の受精のタイミングを示す。文献7)より、一部改変して転載。

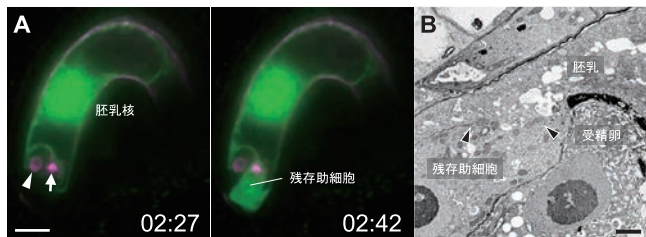


図3 助細胞胚乳融合のライブイメージングおよび電子顕微鏡観察

A. 受精後の胚乳から残存助細胞への蛍光タンパク質の移行。花粉管核と精細胞核が赤色蛍光タンパク質 tdTomato で標識された花粉をかけ合わせた受精直後の胚珠の様子をタイムラプス観察した。胚乳特異的な GFP のシグナルが残存助細胞に移行する様子が捉えられた。矢尻は精細胞核由来の tdTomato が確認される受精卵核を、矢印は花粉管核を、時間は経過時間 (時:分) を示す。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。文献 12) より、一部改変の上、許可を得て転載。

B. 電子顕微鏡による胚乳と残存助細胞の間の細胞壁の観察。矢尻は細胞壁が崩壊し、胚乳と残存助細胞が融合している部分を示す。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$ 。文献 12) より、一部改変の上、許可を得て転載。

*gcs1* 変異体など受精能が欠損した変異体を用いた解析から、1本目の花粉管によって運ばれた精細胞との受精に失敗した胚珠は、残ったもう1つの助細胞によって2本目の花粉管を呼び続ける「受精回復機構」をもっていることが明らかとなった<sup>10,11)</sup>。この現象は、実際に *semi-in vivo* 受精系においても再現された。受精回復機構は、受精に失敗した場合には極めて合理的であるが、受精が成立した胚珠においては、残った助細胞が過剰な花粉管を誘引することにより多精のリスクを大きくする要因になりかねない。では受精後の胚珠は、どのように2本目の花粉管の誘引を抑えているのか。丸山らは、受精直後の胚珠を用いたライブイメージングにより、中央細胞(胚乳)特異的な蛍光タンパク質が残存助細胞へと移行する様子を捉えた(図3A)<sup>12)</sup>。さらに電子顕微鏡を用いた観察により、胚乳と残存助細胞の間では細胞壁の境界がなくなっていることが分かり(図3B)、「助細胞胚乳融合」現象の存在が明らかとなった。この成果により、受精に成功した胚珠が受精後に残存助細胞を積極的に機能停止させることにより、2本目以降の花粉管を呼び込まない仕組みを保障していることが明らかとなった。

### 3. ライブイメージング解析と細胞操作技術の融合

最近のライブイメージング解析は、ただ単に観察するだけにはとどまらない。ここからは、ライブイメージングに様々な細胞操作を加え、重複受精およびそれに続く初期胚発生の機構に迫った研究について紹介したい。

膜融合後には、精細胞核が卵細胞核または中央細胞核とそれぞれ合一する核融合過程がある。河島らは、中央細胞のF-アクチンの動態に着目したライブイメージング解析を行い、膜融合後の精細胞核がアクチン線維に取り巻かれながら中央細胞核へと移動していく様子を捉えた<sup>13)</sup>。F-アクチンの

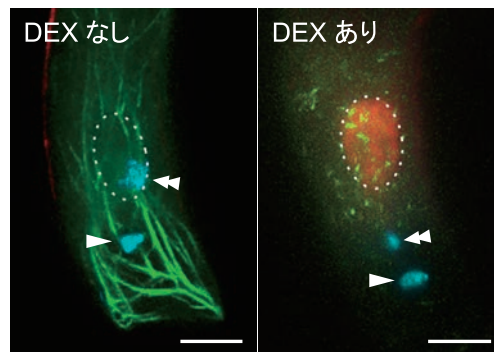


図4 DEX 依存的に F-アクチンを崩壊させた胚珠内における精細胞核の挙動

中央細胞の F-アクチンが蛍光タンパク質 Venus で標識されている。DEX (デキサメタゾン) 処理により *DN-ACTIN* が発現した胚珠内ではアクチン線維が崩壊し、発現誘導の指標として中央細胞核で mCherry が発現している。点線は中央細胞核の位置を、矢尻と二重矢尻はそれぞれ卵細胞または中央細胞と膜融合(受精)した精細胞の核を示す。DEX 処理した胚珠では、精細胞核が中央細胞核まで移動せずクロマチンの脱凝集も見られない。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。文献 13) より、一部改変して転載。

核融合過程への関与を調べるために、中央細胞特異的にドミナントネガティブ変異型の F-アクチン (*DN-ACTIN*) を発現させ、アクチン線維の形成を阻害する実験が行われた(図4)。このとき著者らは、*DN-ACTIN* をデキサメタゾン依存的に誘導発現させることで、中央細胞の発生には影響を与えずに核融合過程を解析する実験系を確立した。*DN-ACTIN* が発現した胚珠においては、アクチン線維が崩壊しており、膜融合により中央細胞の細胞質内に入った精細胞核が中央細胞核まで移動しないことが観察された。さらに精細胞核のクロマチン

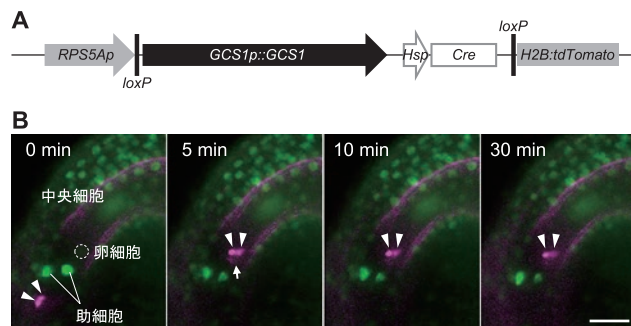


図5 *gcs1* ホモ接合変異体の作出およびライブイメージング

A. *gcs1* ヘテロ接合変異体の相補に用いたコンストラクトの配列。ヒートショックプロテインプロモーター (*Hsp*) の制御下で熱誘導的に *Cre-loxP* 部位特異的組換えが起こると *loxP* 配列で挟まれた野生型 *GCS1* 遺伝子の配列が除去され、tdTomato が植物体全体の細胞核で発現するよう設計した。

B. *Semi-in vivo* 重複受精系による *gcs1* ホモ接合変異体の精細胞を用いたライブイメージング解析。雌性配偶体の細胞核が GFP で標識されている。矢尻は mRFP で標識された2つの精細胞核を示す。矢印は、配列除去により tdTomato が発現した花粉管核を示す。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。文献 15) より、一部改変して転載。

は脱凝集せず、正常に核融合が起こらなかったことから、F-アクチンが核融合時の精細胞核の輸送に関与していることが明示された。動物の受精においては、精核は中心体から形成される微小管に沿って卵核へと運ばれることが知られているが、中心体を持たない植物においては、動物とは異なり、受精時の核融合にアクチンが利用されていることが示された。

核融合が完了した受精卵は胚珠組織の中で分裂を繰り返し、種子の中で次世代の芽生えを形成する。初期胚発生過程は、頂端基部軸に沿ってダイナミックに細胞運命の決定が行われるが、胚珠に覆われた胚の分裂様式を鮮明に長時間観察することは困難であった。牛王らは、深部観察に適した多光子レーザー顕微鏡の使用および取り出した胚珠の長時間培養に適した培地条件の検討により、初期胚発生過程の詳細なライブイメージングを可能にした<sup>14)</sup>。また、高密度の光子をフェムト秒パルスとして対物レンズ焦点に照射することのできる多光子レーザーの特徴を利用し、厚い胚珠組織の中に存在する初期胚の単一細胞のみをレーザー破壊することに成功した。これにより、受精卵の不等分裂により生じる頂端と基部の2つの細胞のうち、頂端細胞を破壊すると、残った基部細胞から分裂により生じた頂端側に位置する細胞が、頂端細胞へと細胞運命を転換する、という非常に興味深い知見が得られている。

ここまで、重複受精過程で起こる複雑で多様な現象をライブイメージングにより解き明かした例を紹介してきた。しかし、重複受精に関わる因子は未だほとんど知られていない。重複受精の分子機構の解明には、雌雄配偶子の機能に必須な因子の解析が不可欠である。しかしながら、*gcs1* 変異体のように、雄性または雌性配偶子に異常を示す変異体の中には、ホモ接合変異体が得られないものが存在する。ヘテロ接合変異体を用いて解析を行うことは可能であるが、ヘテロ接合変異体では半数は野生型の配偶子を含んでいるため、生理学的解析の効率が半減してしまうだけでなく、観察された表現型が実際に異常な配偶子に起因しているかどうかを区別することが困難である。そこで著者らは、動物の胚性致死遺伝子の組織特異的レスキューに広く用いられている *Cre-loxP* 部位特異的組換えを応用した以下の手法により、*gcs1* 変異体をモデルにホモ接合変異体の作出を試みた<sup>15)</sup>。まず、熱誘導的に発現するサイズのヒートショックプロテインプロモーターの下流に *Cre* 遺伝子の配列をつないだフラグメント、および、野生型 *GCSI* 遺伝子が2つの *loxP* 配列で挟まれたコンストラクトを作製し (図 5A)、*gcs1* ヘテロ接合変異体に導入した。導入した *GCSI* 遺伝子により変異が相補されることで、次世代において内在性の *gcs1* 変異をホモ接合でもつ個体が得られた。この形質転換体に対し、精細胞が形成される前の種子や芽生えの段階で熱処理を行ったところ、*Cre-loxP* 部位特異的組換えにより *loxP* 配列で挟まれた野生型 *GCSI* 遺伝子を含む配列が完全に除去された植物体を得られた。この熱処理個体は、種子がほとんど形成されない雌しべをもっていた。この個体の花粉を用いて *semi-in vivo* 重複受精系による

ライブイメージングを行い精細胞の挙動を観察したところ、観察したすべての胚珠内において放出された精細胞が受精しない、*gcs1* 変異体の表現型が捉えられた (図 5B)。ここで得られた *gcs1* ホモ接合変異体を用いることで、未受精の胚珠や正常な重複受精が行われた胚珠と、*gcs1* 変異体の精細胞を受容するが受精を完了しない胚珠の比較ができると考えられる。これにより、精細胞の放出から受精直前までに起こる胚珠内の変化、例えば遺伝子発現の変化などを調べることが可能である。このような解析は、ホモ接合変異体の作出によりすべての胚珠内で膜融合欠損が起こるような状況を作り出すことで初めて可能となった。また、熱誘導により受精に必須な遺伝子の発現を自在に操作する系は、様々な受精異常突然変異体への応用が期待され、分子機構の解明を含む生殖研究の進展に貢献できると考えている。

#### 4. おわりに

ここまで、ライブイメージングと細胞操作技術で重複受精機構に迫った最新の研究を紹介してきた。しかしながら、2つの精細胞がどのように異なる受精相手へと正確に分配されるのか、という重複受精の根本的な機構は未だ明らかになっていない。放出された精細胞が卵細胞と中央細胞の間で一時的にとどまっていることから、受精相手の決定はこの領域内での雌雄配偶子間コミュニケーションによりなされているのではないかと考えられている。今後、初期胚発生過程の解析に用いられたレーザー細胞破壊技術を応用し、胚珠内の卵細胞または中央細胞の受精能を阻害したときに2つの精細胞がどのような挙動を示すか観察することにより、複雑な2対2の雌雄コミュニケーションを2対1にするなどといった解析ができると期待される。

また、雄側の受精因子である *GCS1* の局在変化に関与する雌側の因子として、卵細胞から分泌される複数の *EC1* ペプチドが同定されている<sup>16)</sup>。この *EC1* 遺伝子群の変異体の胚珠では、放出された精細胞が膜融合できないという、*gcs1* 変異体と同様の現象が観察される。今後、*EC1* ペプチドの分泌の時空間的制御や、それに対する精細胞の応答など、受精関連因子の挙動を交えたライブイメージング解析により、膜融合など重複受精時のダイナミクスをさらに調べることができると考えられる。

#### 謝 辞

本稿をまとめるにあたり、理化学研究所の浜村有希博士、横浜市立大学の丸山大輔博士、グレゴール・メンデル研究所の河島友和博士に写真をご提供いただいた。また、本稿の執筆に際し、グレゴール・メンデル研究所の武内秀憲博士にご助言いただいた。この場をお借りし、厚く御礼申し上げたい。

#### 文 献

- 1) Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., Kasahara, R.D., Hamamura, Y., Mizukami, A., Susaki, D., Kawano,

- N., Sakakibara, T., Namiki, S., Itoh, K., Otsuka, K., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Kuroiwa, T., Nakano, A., Kanaoka, M.M., Dresselhaus, T., Sasaki, N. and Higashiyama, T.: *Nature*, **458**, 357–361 (2009)
- 2) Takeuchi, H. and Higashiyama, T.: *PLoS Biol.*, **10**, e1001449 (2012)
  - 3) Hamamura, Y., Saito, C., Awai, C., Kurihara, D., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Kanaoka, M.M., Sasaki, N., Nakano, A., Berger, F. and Higashiyama, T.: *Curr. Biol.*, **21**, 497–502 (2011)
  - 4) Mori, T., Igawa, T., Tamiya, G., Miyagishima, S.Y. and Berger, F.: *Curr. Biol.*, **24**, 170–175 (2014)
  - 5) Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T. and Kuroiwa, T.: *Nat. Cell Biol.*, **8**, 64–71 (2006)
  - 6) von Besser, K., Frank, A.C., Johnson, M.A. and Preuss, D.: *Development*, **133**, 4761–4769 (2006)
  - 7) Hamamura, Y., Nishimaki, M., Takeuchi, H., Geitmann, A., Kurihara, D. and Higashiyama, T.: *Nat. Commun.*, **5**, 4722 (2014)
  - 8) Antoine, A.F., Dumas, C., Faure, J.E., Feijó, J.A. and Rougier, M.: *Sex. Plant Reprod.*, **14**, 21–26 (2001)
  - 9) Denninger, P., Bleckmann, A., Lausser, A., Vogler, F., Ott, T., Ehrhardt, D.W., Frommer, W.B., Sprunck, S., Dresselhaus, T. and Grossmann, G.: *Nat. Commun.*, **5**, 4645 (2014)
  - 10) Kasahara, R.D., Maruyama, D., Hamamura, Y., Sakakibara, T., Twell, D. and Higashiyama, T.: *Curr. Biol.*, **22**, 1084–1089 (2012)
  - 11) Beale, K.M., Leydon, A.R. and Johnson, M.A.: *Curr. Biol.*, **22**, 1090–1094 (2012)
  - 12) Maruyama, D., Völz, R., Takeuchi, H., Mori, T., Igawa, T., Kurihara, D., Kawashima, T., Ueda, M., Ito, M., Umeda, M., Nishikawa, S., Groß-Hardt, R. and Higashiyama, T.: *Cell*, **161**, 907–918 (2015)
  - 13) Kawashima, T., Maruyama, D., Shagirov, M., Li, J., Hamamura, Y., Yelagandula, R., Toyama, Y. and Berger, F.: *Elife*, **3**, e04501 (2014)
  - 14) Gooh, K., Ueda, M., Aruga, K., Park, J., Arata, H., Higashiyama, T. and Kurihara, D.: *Dev. Cell*, **34**, 242–251 (2015)
  - 15) Nagahara, S., Takeuchi, H. and Higashiyama, T.: *Plant Reprod.*, **28**, 33–46 (2015)
  - 16) Sprunck, S., Rademacher, S., Vogler, F., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U. and Dresselhaus, T.: *Science*, **338**, 1093–1097 (2012)