

陸上植物の配偶子形成の分子メカニズムとその進化

山岡 尚平, 河内 孝之, 荒木 崇

1. はじめに

すべての陸上植物の卵と精子は、単数体の多細胞組織「配偶体」から分化する。そして受精によって二倍体の「孢子体」となり、一部の細胞の減数分裂により孢子を経て再び配偶体を形成する。配偶体は、生殖細胞を生み出すためだけの組織ではなく、体細胞も分化させ、ときに栄養成長する。一方、我々ヒトを含む後生動物は、胚発生とともに分化する生殖細胞系列が体細胞と分離されており、明確に区別できる。単数体である配偶体の発生は、陸上植物の大きな特徴の一つである。

「世代交代」と呼ばれるこの生活環の様式は、陸上植物の系統間で大きく異なっている。現生の陸上植物およそ30万種のうち、約9割は被子植物であり、我々がふだん目にする植物のからだは孢子体である。配偶体は、数細胞の「胚嚢」と3細胞の「花粉」という極端に小さな組織でしかない。一方、約2万種とされるコケ植物では、成熟植物体である茎葉体や葉状体が配偶体であり、その上に造卵器・造精器を形成して卵と精子を作る（図1）。孢子体は配偶体上の小さな器官として発生し、その中に孢子を形成する。すべての陸上植物は、現生の車軸藻類との共通の祖先から約5億年前に陸上に進出し、進化してきた。コケ植物は、陸上進出後に最も早く分岐した系統（基部系統）であり、祖先の特徴を残している（図2）。配偶体は進化の過程で、栄養成長も有性生殖も担う生活環の主役から、配偶子形成に機能の大半を捧げる微細な器官へと縮退したと考えられる¹⁻³⁾。

配偶子形成の分子メカニズムは被子植物モデルの研究によって理解が進んだが^{2,3)}、遺伝的冗長性の高さなどのためにいまだ説明されていない部分も多い。一方、最近の研究で、配偶体が生活環の大半を占めるコケ植物を研究し、被子植物と比較することによって新たな知見が得られてい

る。本稿では、それら最新の知見を紹介し、陸上植物の配偶子形成の中核メカニズムは進化的に保存されており、コケ植物から被子植物まで統一的に理解できる可能性について述べる。

2. 配偶体の発生とその進化

コケ植物を含め、多くの生物の精子は鞭毛による運動を行うが、被子植物の精子は鞭毛を持たず、「精細胞」として花粉の栄養細胞（花粉管細胞）の細胞質に取り込まれ、「細胞の中の細胞」という特徴的な構造をとる（図1）。受精では、栄養細胞は急激な細胞伸長を行って花粉管を形成し、精細胞は伸長する花粉管によって受動的に運ばれて卵へ到達する。こうした仕組みは、固着型の生活を営む植物が、乾燥など強いストレスに絶えずさらされる陸上の環境で、受精を確実にを行うために進化させたものであろう¹⁾。花粉（雄性配偶体）の発生は、雄蕊（おしべ）の葯の原基の中で胞原細胞が分裂したのち、花粉母細胞と、花粉成熟を補助するタペート細胞へと分化することで始まる。花粉母細胞は減数分裂によって四つの孢子（小孢子）を生み出す。それぞれは非対称分裂し、小さい娘細胞が生殖細胞である雄原細胞へと分化する。雄原細胞は直ちに栄養細胞の細胞質へと取り込まれ、花粉として成熟する。この間、雄原細胞は等分裂し、二つの精細胞へと分化し、重複受精が可能になる（図1）。

胚嚢（雌性配偶体）には、種によってさまざまな発生パターンがあるが、その約7割はタデ（Polygonum）型と呼ばれ、7細胞で構成される^{1,3)}。シロイヌナズナの胚嚢を含むこのタイプでは、雌蕊（めしべ）の胚珠の原基の中で、胞原細胞が有糸分裂することなく大孢子母細胞へと分化し、減数分裂する。生じた四つの孢子（大孢子）は、うち三つがプログラム細胞死により消失する。残る一つは2回の核分裂で多核細胞となり、3回目の核分裂で8核となると同時に、それぞれの核の周囲に細胞壁が形成される（細胞化）。各細胞は機能分化し、1個の卵、2個の助細胞、2核を持つ中央細胞、3個の反足細胞からなる7細胞8核の胚嚢が形成される（図1）。

被子植物の配偶体の発生パターンは、どのようにして誕生したのだろうか。シダ植物も、比較的大きな、独立生活を営む配偶体を発生させ、造卵器・造精器を形成して有性

京都大学大学院生命科学研究科（〒606-8502 京都市左京区北白川追分町）

Molecular mechanism and evolution of gametogenesis in land plants

Shohei Yamaoka, Takayuki Kohchi and Takashi Araki (Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910534

© 2019 公益社団法人日本生化学会

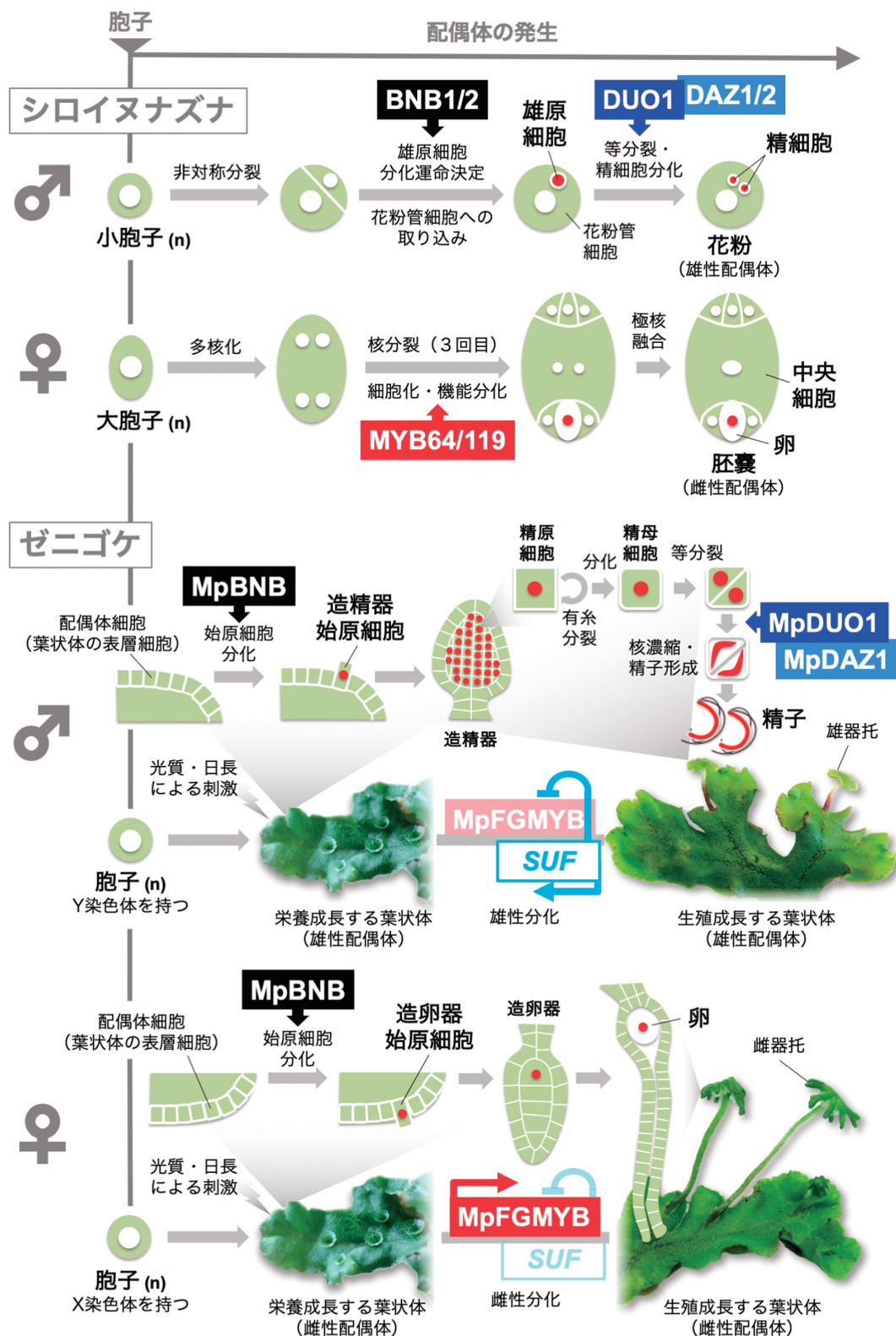


図1 シロイヌナズナとゼニゴケの配偶体発生

胞子からの雄性・雌性配偶体の発生のプロセスとそれに関わる因子 (本文中で説明したもの) を示す。配列・機能的に相同性の高い因子を同じ色で示す。赤丸・白丸は生殖系列細胞とその他の配偶体細胞の核 (ゼニゴケでは省略) を示す。

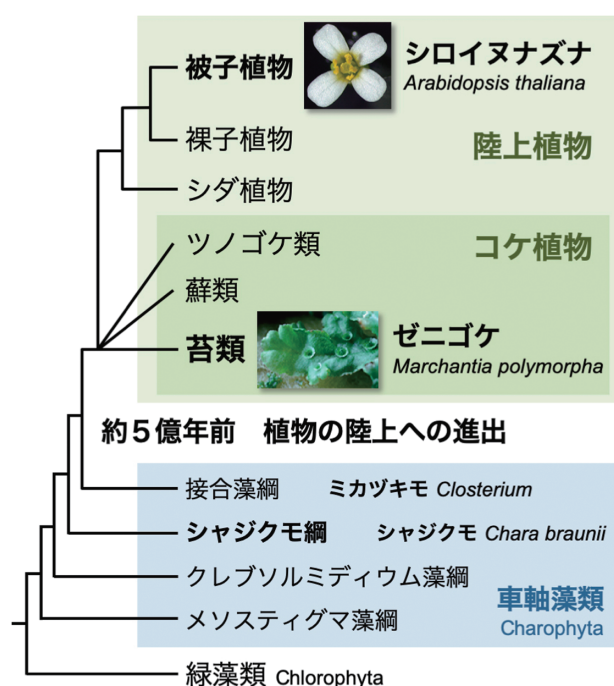


図2 植物の系統関係と進化

生殖を行う。ただしコケ植物と異なり、胞子体の方がはるかに大型で、葉や茎などの器官を作る。裸子植物は、被子植物と似た生活環を持ち、花粉と雌性配偶体を形成する。しかし雌性配偶体は胚嚢と比べ著しく巨大である。その発生では大胞子が多数の核分裂を繰り返し、数百～数千個以上の核を作る。それらの細胞化の際、一部の種では造卵器始原細胞が分化し、造卵器を形成する。花粉の発生では、小胞子は複数回の分裂によって雄原細胞（とその後の精細胞）と花粉管細胞に加え、被子植物にはない複数個の栄養細胞を作る。つまり、造卵器・造精器は進化的に保存されてきた器官であり、陸上植物の進化の中で縮退していき、被子植物の誕生とともに消失した。配偶体はその進化のなかで、細胞の分裂回数が大きく減少し、その機能も簡略化され、被子植物ではほぼ生殖のためだけの数細胞のみで構成される組織へと変貌した、と考えられる¹⁾。

3. 生殖細胞の分化運命を決定する転写因子 BONOBO

花粉の雄原細胞の分化運命を決める因子は、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の分子遺伝学研究がきっかけとなって同定された。ゼニゴケは19～20世紀には発生学や遺伝学の材料として注目され、ゼニゴケ目 (Marchantiales) 特有の生殖組織である傘状の「生殖器托」の発生の過程も詳しく調べられた⁴⁾。最近では、筆者らにより全ゲノム解析が行われ⁵⁾、CRISPR/Cas9によるゲノム編集⁶⁾をはじめとして各種の分子遺伝学解析が可能なコケ植物苔類の

モデルとなっている。

ゼニゴケは長日かつ遠赤色光に富む光の下（自然界では春から秋にかけての日中）で、造卵器・造精器とそれを内包する生殖器托を発生させる。筆者らは光刺激なしに生殖器托を形成し続けるゼニゴケ変異株を単離した⁷⁾。原因遺伝子は生殖成長期特異的に発現しており、機能未知の basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子をコードしていた。この遺伝子を野生株で過剰発現させると、光刺激なしに生殖器托が形成された。またノックアウトすると生殖器托形成がみられなくなった。過剰発現の表現型を性的行動により社会を育む類人猿ボノボ (*Pan paniscus*) になぞらえ、この遺伝子を MpBONOBO (MpBNB) と命名した。MpBNB の発現は、造卵器・造精器の始原細胞で主にみられ、成熟期の造卵器・造精器では消失した。またその発現は葉状体が遠赤色光の刺激を受けた直後から始まり、生殖器托形成の間次々と形成される始原細胞で常にみられた。これらのことから、MpBNB は始原細胞の分化と生殖器托形成を統御するマスター転写因子と考えられた (図1)⁸⁾。

興味深いことに、BNB のオルソログは陸上植物に広く保存されており、シロイヌナズナのゲノムにも3遺伝子が見つかった。このうち、BNB1とBNB2の二つを欠く二重変異体では花粉の精細胞が欠失した。この変異体の花粉は、小胞子の非対称分裂は正常だが、娘細胞は雄原細胞へと分化せず、栄養細胞に取り込まれることなく成熟期に失われた。さらにBNB2は雄原細胞（もしくはその前駆の娘細胞）で一過的に発現していた。これらのことから、BNB1とBNB2は冗長的に雄原細胞の分化に必要であること、また雄原細胞が栄養細胞の中に取り込まれるには、BNBによる分化運命決定が必要であることがわかった。さらに、この二重変異体の表現型はゼニゴケの MpBNB をシロイヌナズナ BNB2 のプロモーターで発現させることでほぼ完全に相補できた。このことから、BNB ファミリーは進化的に保存された生殖細胞分化の制御因子であり、被子植物では雄原細胞分化を、コケ植物では生殖器官の分化と発生を制御していることがわかった (図1)⁸⁾。

シロイヌナズナでは、別の bHLH ファミリーに属する LRL/DROP も精細胞形成に必要であることが報告されている⁹⁾。LRL/DROP も植物で広く保存されており、根毛やコケ植物の仮根など、根系の発生の制御に関わっている¹⁰⁾。bHLH はヘテロ二量体を形成して機能することから、LRL は多面的な機能を持っており、BNB は LRL と二量体を形成して生殖細胞分化を制御すると考えられる⁸⁾。

4. 雄性配偶子形成を制御する転写因子 DUO1

花粉形成の最終段階である、雄原細胞の等分裂と精細胞分化を制御するマスター転写因子として Myb 転写因子

DUO1が知られている¹¹⁾。この転写因子の主たる機能も進化的に保存されていることがわかってきた。コケ植物の精子形成は、まず未成熟の造精器の中で精原細胞が分化し、有糸分裂してその数を増やす。それらは精母細胞へと変化したのち、それぞれが等分裂して2個の精細胞（精子の前駆細胞）を生じる。精細胞はその形態を大きく変化させることで精子として分化する（精子形成）（図1）。このように細胞分裂と細胞分化のイベントが明確に区別できることから、コケ植物の精子分化は植物の配偶子形成を研究するためのよいモデル系である。筆者らはゼニゴケのオルソログMpDUO1の機能を調べた。MpDUO1は精母細胞と精細胞で特異的に発現し、そのプロモーターはシロイヌナズナ花粉の精細胞でも活性があったことから、DUO1の転写に関わる制御配列は陸上植物進化の中で保存されてきたと考えられる。MpDUO1のノックアウト変異体は造精器形成を開始でき、雄原細胞の等分裂に相当する、精母細胞の等分裂にも異常がみられなかった。しかし生じた2個の精細胞では、鞭毛や運動装置の形成や核凝縮など、精子形成のための細胞の形態変化が進行せず、MpDUO1は精子形成に必要であることがわかった（図1）。このMpduo1変異体の表現型はシロイヌナズナDUO1によって不完全ながら相補された。またduo1変異体の花粉にみられる精細胞分裂不全の表現型もMpDUO1によってほぼ相補できた。ゼニゴケは、シロイヌナズナDUO1が直接制御する転写因子DAZ1・DAZ2のオルソログMpDAZ1も持っている（図1）。これらのことから、DUO1はDAZと進化的に保存されたモジュールを構成し、進化の中で連続と精細胞分化の機能を保持し続けてきたと考えられる¹²⁾。

では、鞭毛を持つ精子から運動性のない精細胞への進化はどのように起こったのだろうか。ゼニゴケのMpDUO1は、シロイヌナズナDUO1が直接制御する精細胞特異的ヒストンH3.10/HTR10/MGH3や配偶子の融合に関わる膜タンパク質GCS1/HAP2のオルソログを標的としておらず、一方で鞭毛や運動装置の主要構成因子や精子核凝縮に関わるプロタミン様タンパク質などの遺伝子の発現を制御していた。こうした制御標的遺伝子の変化が、精子から「精細胞」への変化の一端を担ったと考えられる¹²⁾。

陸上植物に至る系統では、精子は車軸藻類（Charophyta）の一部で獲得された。これと一致してDUO1オルソログはシャジクモ綱植物（Charophyceae）にはあるが、精子を形成しない進化的により基部に位置する車軸藻類には存在しない。シャジクモ属の一種*Chara braunii*のCbrDUO1のMYBドメイン（DNA結合領域）とMpDUO1のC末端側にある転写活性化領域の配列を融合したものをMpDUO1のプロモーターで発現させると、Mpduo1変異体の表現型を相補した。興味深いことに、ミカヅキモ（*Closterium*）など、二次的に精子と卵の形成をやめた接合藻類では、

DUO1のMYBドメインのアミノ酸配列は大きく変化し、DUO1としての機能は失われていた。これらを含むいくつかの知見から、DUO1は祖先の車軸藻類で獲得され、精子形成を制御するようになったと考えられる¹²⁾。

5. 配偶体の性分化を制御する転写因子FGMYB

配偶体の性はどのように分化するのだろうか。ゼニゴケは雌雄異株であり、その性はX・Yの性染色体（単数体生物ではU・V染色体だが、ここでは便宜上このように呼ぶ）により決まる。筆者らはゼニゴケ配偶体の性分化を制御する遺伝子FEMALE GAMETOPHYTE MYB（MpFGMYB）を同定した。X染色体を持つMpfgmyb変異株は、本来は雌であるはずだが、造精器と雄器托を発生させ、ほぼ正常な形態を示す精子を形成した。しかしこの精子は運動性を持たず、それはY染色体上の鞭毛関連遺伝子がないためと考えられた。このことから、ゼニゴケのデフォルトの性は雄であり、MpFGMYBは性染色体の下流で配偶体の雌化を促進する遺伝子と考えられた（図1）¹³⁾。

MpFGMYBは常染色体上にあるが、その発現は雌特異的であった。一方、雄株ではMpFGMYB遺伝子の逆鎖から長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）が発現していた。このlncRNAだけをノックアウトすると、変異株ではY染色体を持つにもかかわらずMpFGMYBが発現して雌器托と造卵器を形成したことから、lncRNAは雌化を抑制する因子と考えられ、SUPPRESSOR OF FEMINIZATION（SUF）と名づけた（図1）。ただし変異株の造卵器では卵が形成されなかったため、卵形成に関わる遺伝子がX染色体上にあると考えられる。さらに、雌株でのSUF過剰発現はMpFGMYBの発現を抑制できず、また雄株でのMpFGMYB過剰発現は内在性のSUFによって発現が抑制されなかったことから、SUFによるMpFGMYBの抑制は*in cis*で起こると考えられた¹³⁾。

MpFGMYBは陸上植物で保存されたMyb転写因子をコードしていた。シロイヌナズナのオルソログMYB64・MYB119は、胚嚢の細胞化と細胞機能分化に関わっている¹⁴⁾。同じファミリーのMYB98は、助細胞の分化と機能発現に関わる¹⁵⁾。これらのことから、FGMYBファミリーの本来の機能は雌性配偶体の発生制御であり、コケ植物では配偶体の雌化に、被子植物では胚嚢の発生に関わるようになったと考えられる（図1）。被子植物ではSUFのようなlncRNAが見つかっておらず、その発現調節は主に転写レベルで行われるとみられる¹³⁾。

6. おわりに

BNBとDUO1の研究から、陸上植物の配偶子形成の中

核メカニズムは、少なくとも雄側では保存されていることがわかった。また、花粉の雄原細胞での分化過程は、コケ植物の造精器の始原細胞から精母細胞までの分化過程が縮退したものであることも分子レベルで示唆された。一方で、被子植物の雌側の配偶子形成のメカニズムについては未知の部分が多い。シロイヌナズナの第三のBNBにその機能があるか、今後の検証が待たれる⁸⁾。またFGMYBの研究から、配偶体の性決定と性分化のメカニズムについても明らかになってきた。ゼニゴケの性決定遺伝子として、X染色体上に優性の「雌化因子」が存在するといわれている⁵⁾。この因子を同定するとともにMpFGMYBとの関係を明らかにすることで、配偶体の性分化と進化について新しい知見が得られると期待される。

謝辞

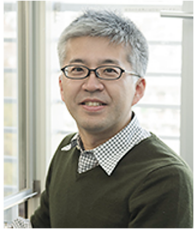
本稿で紹介した研究について、中島敬二（奈良先端大）、Frédéric Berger、久永哲也（オーストリア・Gregor Mendel Institute）、大和勝幸（近畿大）、西浜竜一（京都大）、光田展隆（産総研）、嶋村正樹（広島大）、石崎公庸（神戸大）、重信秀治（基生研）、David Twell（英・Leicester大）、John L. Bowman（豪・Monash大）の各氏に御礼申し上げます。なお、山岡は文科省科研費・新学術領域「植物新種誕生の原理」（東山哲也代表）公募研究JP17H05841・JP19H04860、JSPS科研費JP18K06285、河内はJP17H07424、荒木はJP19H03244のサポートを受けています。

文 献

- Gifford, E. M. & Foster, A. S. (1988) Morphology and Evolution of Vascular Plants, 3rd Ed., W. H. Freeman and Company. [邦訳：長谷部・鈴木・植田監訳（2002）維管束植物の形態と進化（原書第3版），文一総合出版]
- Berger, F. & Twell, D. (2011) Germline specification and function in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 461–484.
- Schmidt, A., Schmid, M.W., & Grossniklaus, U. (2015) Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. *Development*, **142**, 229–241.
- Durand, E.J. (1908) The development of the sexual organs and sporogonium of *Marchantia polymorpha*. *Bull. Torrey Bot. Club*, **35**, 321–335.
- Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., 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**, 287–304.
- Sugano, S.S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K., & Kohchi, T. (2018) Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS ONE*, **13**, e0205117.
- Yamaoka, S., Takenaka, M., Hanajiri, T., Shimizu-Ueda, Y., Nishida, H., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., & Ohyama, K. (2004) A mutant with constitutive sexual organ development in *Marchantia polymorpha* L. *Sex. Plant Reprod.*, **16**, 253–257.
- 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.e475.
- 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.
- 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.
- Borg, M., Brownfield, L., Khatab, H., Sidorova, A., Lingaya, M., & Twell, D. (2011) The R2R3 MYB transcription factor DUO1 activates a male germline-specific regulon essential for sperm cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **23**, 534–549.
- Higo, A., Kawashima, T., Borg, M., Zhao, M., Lopez-Vidriero, I., Sakayama, H., Montgomery, S.A., Sekimoto, H., Hackenberg, D., Shimamura, M., et al. (2018) Transcription factor DUO1 generated by neo-functionalization is associated with evolution of sperm differentiation in plants. *Nat. Commun.*, **9**, 5283.
- Hisanaga, T., Okahashi, K., Yamaoka, S., Kajiwar, T., Nishihama, R., Shimamura, M., Yamato, K.T., Bowman, J.L., Kohchi, T., & Nakajima, K. (2019) A cis-acting bidirectional transcription switch controls sexual dimorphism in the liverwort. *EMBO J.*, **38**, e100240.
- Rabiger, D.S. & Drews, G.N. (2013) MYB64 and MYB119 are required for cellularization and differentiation during female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.*, **9**, e1003783.
- Kasahara, R.D., Portereiko, M.F., Sandaklie-Nikolova, L., Rabiger, D.S., & Drews, G.N. (2005) MYB98 is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 2981–2992.

著者寸描

●山岡 尚平（やまおか しょうへい）



京都大学大学院生命科学研究科分子代謝制御学分野准教授。博士（農学）。

■略歴 1997年京都大学農学部卒業。2003年同大学院農学研究科にて学位取得（大山莞爾教授）。同大学医学部附属病院，鳥取大学，英国Oxford大学，石川県立大学，東京大学，京都大学大学院理学研究科，同大学院生命科学研究科を経て，18年より現職。

■研究テーマと抱負 陸上植物の配偶子形成・有性生殖の分子メカニズムの全体像と進化を明らかにするとともに，育種・バイオテクノロジーの発展に役立つ研究も目指しています。

■ウェブサイト <http://www.plantdevbio.lif.kyoto-u.ac.jp>

■趣味 旅行・映画鑑賞。

●河内 孝之（こうち たかゆき）

京都大学大学院生命科学研究科教授。農学博士。

●荒木 崇（あらき たかし）

京都大学大学院生命科学研究科教授。博士（理学）。