

ステロールがタペータム脂質系オルガネラとポーレンコート形成に果たす役割：ステロールメチルトランスフェラーゼ遺伝子欠損変異体の超微構造学的解析

鈴木英理子¹, 鈴木 優志², 大山 清², 村中 俊哉^{2,3}, 永田 典子¹

¹日本女子大・院理・物質生物機能科学

²理研・植物センター

³横浜市大・木原生研

(2007年12月21日受理)

要 旨 成熟した雄性配偶体の表面を覆うポーレンコートは、タペータム内に存在するエライオプラストとタペトソームという特殊に分化した脂質系オルガネラから形成される。これまでに、これら脂質系オルガネラやポーレンコートの形成に、ステロール類が関係している可能性が示されていた。そこで我々は、ステロール合成の鍵酵素ともいえるステロールメチルトランスフェラーゼ (SMT) に着目し、シロイヌナズナ *SMT1* 及び *SMT2* の欠損突然変異体を材料に用いて、透過電子顕微鏡で詳細な観察を行った。その結果、両変異体とも、タペータム内のエライオプラストの変形、及びポーレンコート内の空胞の減少という同じ形態異常を見せた。両変異体で共通に減少しているのはシトステロールやスチグマステロールであることから、これらのステロールが脂質系オルガネラやポーレンコートの形成に関与していることが示唆された。

キーワード：ステロールメチルトランスフェラーゼ (SMT), エライオプラスト, タペトソーム, ポーレンコート, ステロール, メバロン酸 (MVA)

序 論

被子植物の雄性配偶体形成は、葯の中で孢子体細胞が小孢子母細胞とタペータムの始原細胞に分裂するところから始まる。小孢子母細胞の減数分裂により生じた4つの小孢子は、2回の体細胞分裂を行う。最初の分裂（花粉第一分裂）は非対称分裂であり、大きな栄養細胞と小さな雄原細胞が形成される。2回目の分裂（花粉第二分裂）は雄原細胞でおこり、2つの精細胞が生じる。一方、タペータムは、小孢子集団を取り囲むように存在している葯室の最内層の組織であり、小孢子に様々な物質を提供する役目を担っている。成熟した雄性配偶体の表面構造は、エキシンとよばれる特有の網目様構造と、その間を埋めるポーレンコートからなる。このエキシン及びポー

レンコートは、タペータムから分泌される物質によって形成される¹⁾。タペータム内には、小孢子の花粉第一分裂の時期に、エライオプラストとタペトソームという特殊に分化した脂質系オルガネラが出現するが、これら脂質系オルガネラがポーレンコートを形成すると考えられている。エライオプラストは色素体の一形態であり、タペトソームは小胞体由来のリピッドボディで小胞体膜を巻き込んだ複雑な構造をもつ²⁾。透過電子顕微鏡では、両オルガネラとも内部に電子密度の高い脂質系物質を大量に含むことが観察され、タペータムの崩壊後にこれらオルガネラ内の脂質がポーレンコートとしてエキシンの間を埋めるように見える。

ポーレンコートは、乾燥・病原体・UVからの保護や自家不和合性決定及び水和作用などに関わると言われている³⁾。超長鎖脂肪酸成分を欠如したシロイヌナズナ *cer1* 及び *cer6* 変異体では、ポーレンコート形成が不完全

Contribution No.: CB 07-3

ステロールがタペータム脂質系オルガネラとポーレンコート形成に果たす役割
：ステロールメチルトランスフェラーゼ遺伝子欠損変異体の超微構造学的解析

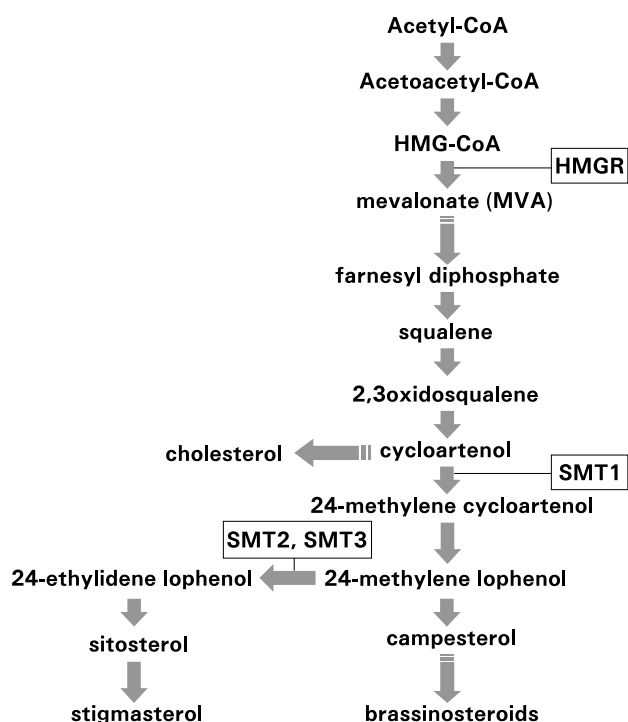


図1 シロイヌナズナ細胞質内のメバロン酸経路

であり、受粉後の水和作用がおこらず雄性不稔になることが示されている⁴⁾。シロイヌナズナのポーレンコートには、脂肪結合ドメインをもつグリシンリッチオレオシンタンパク質、リパーゼ、長鎖脂肪酸及び短鎖脂肪酸などが含まれる⁵⁾。Hernández-Pinzón ら⁶⁾は、ナタネを材料にして、ポーレンコート、エライオプラスト及びタペトソームの詳細な脂質成分分析を行い、エライオプラストとポーレンコートの成分が酷似していること、またその成分には特徴的なステロールが含まれることを報告した。

植物は植物特有の多様なステロールを有し、それらステロールはメバロン酸経路で合成される(図1)。植物ステロールはC₃₀ステロールであるシクロアルテノールを出発点とし、C₂₉ステロールであるシトステロールやスチグマステロール、C₂₈ステロールであるカンペステロール、C₂₇ステロールであるコレステロール等を含む多様なステロールが合成される。ステロール合成における鍵酵素ともいえるのが、ステロールメチルトランスフェラーゼ(SMT)である。シロイヌナズナでは3つのSMT遺伝子が存在している。SMT1は酵母のERG6と相同性があり、シクロアルテノールから24-メチレンシクロアルテノールへのメチル化を触媒する遺伝子である⁷⁾。SMT2及びSMT3は24-メチレンロフェノールから24-エチリジノロフェノールへのメチル化を触媒する遺伝子であり⁸⁾、SMT2とSMT3では発現パターンが違うこと

などが報告されている⁹⁾。また、SMT1とSMT2についてはシロイヌナズナにおいて欠損変異体が単離されており^{7, 10)}、それらの遺伝子発現は植物ホルモンによって制御されること、ステロール合成とSMT活性の間にフィードバックメカニズムが存在することなども報告されている⁹⁾。

メバロン酸経路上の酵素遺伝子を欠損させた突然変異体には、雄性不稔を示すものが多く存在する¹¹⁾。シロイヌナズナhmg1変異体はHMG-CoAレダクターゼの欠損変異体であり雄性不稔形質を示すが、その異常の原因はステロール含量の低下であると報告されている¹²⁾。SMT1欠損であるsmt1-3変異体やSMT2欠損であるfrl1変異体も、不稔性を示すと報告されている。また、SMT2の形質転換体を用いた実験により、キャンペステロールとシトステロールのバランス比が稔性の有無に大きな影響を及ぼすとの報告もある¹³⁾。ポーレンコートとエライオプラストに特有のステロールが含まれていたとの報告⁶⁾からも、ステロールがポーレンコート成分として稔性に重要な役割を果たしている可能性が高い。そこで我々は、ステロールが雄性配偶体形成に果たす役割を探るために、ステロール合成の鍵酵素ともいえるSMTの欠損変異体を用いて、ステロール量の減少や成分比の変化がポーレンコートやタペータムに与える影響を調べることを目的とした。

材料及び方法

SMT1欠損であるsmt1-3変異体の種子をマサチューセッツ工科大学GRフィンク教授から、またSMT2欠損であるfrl1変異体の種子を日本原子力研究開発機構の長谷純宏教授から譲り受けた。WT(野生型)には、Wsを用いた。

透過電子顕微鏡用サンプルはシロイヌナズナの花序を用い、前固定には4%グルタルアルデヒド・4%パラホルムアルデヒド溶液を、後固定には2%四酸化オスミウム酸溶液を用いた。エタノールシリーズを用いて脱水し、プロピレンオキシドに置換後、スパー樹脂で包埋した。超ミクロトームで超薄切片を作成し、酢酸・鉛染色を施した後、透過電子顕微鏡観察を行った。

結 果

雄性不稔を示すという報告がされていたsmt1-3変異体とfrl1変異体ではあったが、稔性の低下はシビアではなく、特にfrl1変異体の稔性の低下はわずかであった。花粉第一分裂前を1細胞期、花粉第一分裂後を2細胞期、花粉第二分裂後を3細胞期とし、タペータムの観察においても雄性配偶体の細胞期を基準にステージを分けた。本研究では、透過電子顕微鏡を用いて葯内の微細な観察

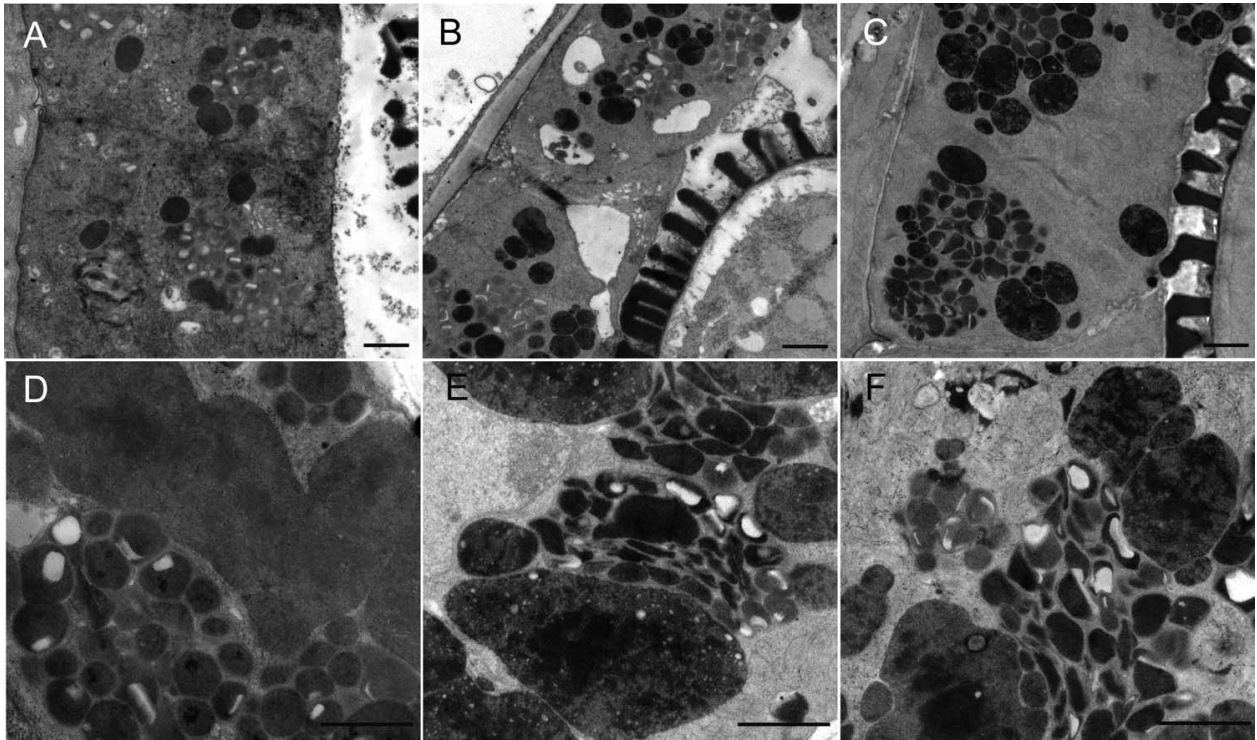


図2 *smt1-3* と *frl1* 変異体タペータムの透過電子顕微鏡像

A-Cは二細胞期初期のタペータム

D-Fは二細胞期中期のタペータム内オルガネラが発達した段階

A, DはWT, B, Eは *smt1-3* 変異体, C, Fは *frl1* 変異体を示す

スケール=1 μm

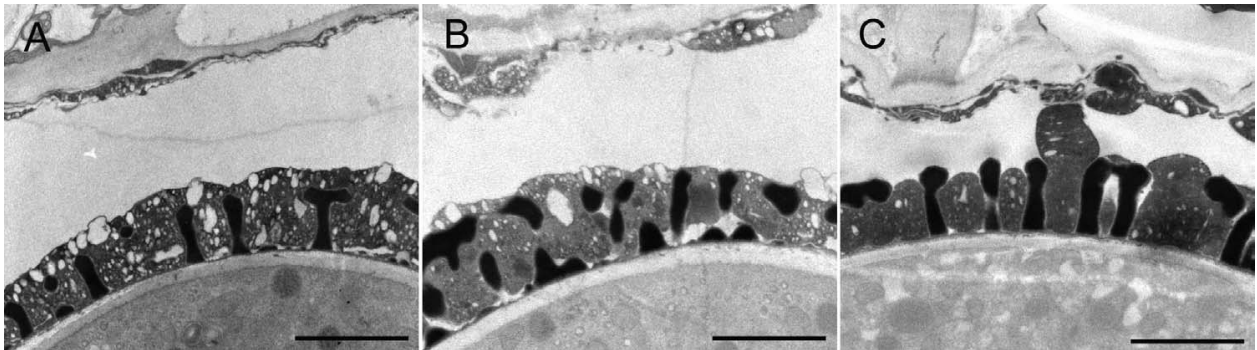


図3 WTと *smt1-3*, *frl1* 変異体ポーレンコートの透過電子顕微鏡像

AはWT, Bは *smt1-3*, Cは *frl1* の三細胞期の成熟花粉形成後の様子

スケール=1 μm

を行った。

1細胞期にはWT(野生型), *smt1-3* 変異体, *frl1* 変異体のすべてに共通してタペータム内にエライオプラストとタペトソームが観察された。2細胞期前期においても, *smt1-3* と *frl1* のタペータム内様子はWTと同様であった(図2A-C)。2細胞期中期には, WTのエライオプラスト内の脂質顆粒が大きくなり, タペトソームも肥大し

ている様子が観察された(図2D)。一方, 2細胞期中期の *smt1-3* 及び *frl1* では, エライオプラストが変形するという異常が見られた(図2E, F)。

図3は3細胞期の観察結果を示す。タペータムは崩壊しており, エキシンの隙間を埋めるようにポーレンコートが形成され, WTのポーレンコートには空胞と微小小滴が多数見られた(図3A)。*smt1-3* では, WTと同様

にエキシンを覆うようにポーレンコートが形成されていたが、ポーレンコート内の空胞が **WT** より減少していた (図 3B)。 *frl1* 変異体では、空胞がほとんど見られなかった反面、微小小滴は多数観察された (図 3C)。また、**WT** や *smt1-3* 変異体に比べ、ややエキシンの間に空隙が見られた。

考 察

SMT1 の欠損変異体である *smt1-3* 変異体と *SMT2* の欠損変異体である *frl1* 変異体は、葯内で同じような異常を示すことが明らかとなった。すなわち、両変異体とも、2 細胞期中期ではエライオプラストの変形がみられ、3 細胞期ではポーレンコート内の空胞の減少がみられた。

過去の報告で、両変異体においてステロール量が定量されており、*smt1-3* 変異体ではコレステロール量が増加し、24-メチレンシクロアルテノール以下の下流ステロール産物が減少すること、*frl1* 変異体では 24-メチレンロフェノール経路が優位になりカンベステロール等が増加したことが示されていた^{7, 10)}。なお、これらの報告は芽生えまたは植物体全体を材料に用いたものであったため、今回我々は花序を用いて同様のステロール定量実験を行ったが、その結果は過去の報告と一致した (未発表データ)。両変異体に共通するのは、24-エチリジンロフェノール経路が劣勢になり、シトステロールやスチグマステロールが減少することである。これまでに、シトステロールがセルロース合成に関わり原形質膜の機能を調節すること¹⁴⁾ や、スチグマステロールが原形質膜の **H**(+)ATPase の活性調節を担っていること¹⁵⁾ などが報告されており、両ステロール共に何らかの膜機能に関連することが予想されている。*smt1-3* 変異体と *frl1* 変異体において観察されたエライオプラストの変形は、これらのステロールの減少によって正常な膜構造を保てなくなったことを反映しているかもしれない。また、両変異体において、ポーレンコート内に存在する空胞の減少・消失が観察されたことから、この空胞成分がシトステロールやスチグマステロールに由来するものである可能性がある。

HMG-CoA レダクターゼ (**HMGR**) 欠損である *hmg1* 変異体では著しい不稔が確認されているが¹²⁾、今回我々が用いた *SMT* の欠損変異体では稔性の低下が顕著ではなかった。その 1 つの理由としては、複数の酵素遺伝子が存在するため、これらの変異体では完全に生合成経路が遮断されておらず、そのために表現型が顕著でなかったのかもしれない。しかし、今回ポーレンコート内の空胞が著しく減少するという表現型が得られたことから、ステロールがポーレンコートの一成分であるなど、ポーレンコート形成に何らかの機能を果たしている可能性を

示すことができた。また、もう 1 つの理由としては、メバロン酸経路の下流産物のうち、ステロール以外の *SMT* の上流に位置する何らかの代謝産物が、配偶体形成に必要な役割を果たしているということも考えられるだろう。

謝 辞

突然変異体の種子をお譲りくださった、マサチューセッツ工科大学 **GR** フィンク教授と日本原子力研究開発機構の長谷純宏教授に、深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Scott, R.J., Spielman, M., and Dickinson, H.G.: Stamen structure and function. *Plant Cell*, **16**, S46-S60 (2004)
- 2) Hsieh, K., and Huang, A.H.C.: Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiol.*, **136**, 3427-3434 (2004)
- 3) Doughty, J., Hedderson, F., McCubbin, A., and Dickinson, H.: Interaction between a coating-borne peptide of the Brassica pollen grain and stigmatic S (self-incompatibility)-locus-specific glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 467-471 (1993)
- 4) Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., and Davis, R.W.: A conditional sterile mutation eliminates surface components from Arabidopsis pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes*, **7**, 974-985 (1993)
- 5) Edlund, A.F., Swanson, R., and Preuss, D.: Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *Plant Cell*, **16**, S84-S97 (2004)
- 6) Hernández-Pinzón, I., Ross, J.H.E., Barnes, K.A., Damant, A.P., and Murphy, D.J.: Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta*, **208**, 588-598 (1999)
- 7) Diener, A.C., Li, H., Zhou, W., Whoriskey, W.J., Nes, W.D., and Fink, G.R.: Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell*, **12**, 853-870 (2000)
- 8) Schrick, K., Mayer, U., Martin, G., Bellini, C., Kuhnt, C., Schmidt, J., and Jurgens, G.: Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of Arabidopsis. *Plant J.*, **30**, 61-73 (2002)
- 9) Carland, F.M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshido, S., and Nelson, T.: The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning. *Plant Cell*, **14**, 2045-2058 (2002)
- 10) Hase, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Sun, G., Umeda, M., and Tanaka, A.: Ectopic endoreduplication caused by sterol alteration results in serrated petals in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, **56**, 1263-1268 (2005)
- 11) Shaller, H.: New Aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **42**, 465-476 (2004)
- 12) Suzuki, M., Kamide, Y., Nagata, N., Seki, H., Ohyama, K., Kato, H., Masuda, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yoshida, S., and Muranaka, T.: Loss of function of 3-

- hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 (HMG1)* in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. *Plant J.*, **37**, 750-761 (2004)
- 13) Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P., and Schaller, H.: The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by *STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1*. *Plant J.*, **25**, 605-615 (2001)
- 14) Schrick, K., Fujioka, S., Takatsuto, S., Atierhof, Y.D., Stransky, H., Yoshida, S., and Jurgens, G.: A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **10**, 1365-1374 (2004)
- 15) Grandmougin-Ferjani, A., Schuler-Muller, I., and Hartmann, M.A.: Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol.*, **113**, 163-174 (1997)

The Roles of Sterols on Formation of Lipid-rich Organelles in Tapetum and Pollen Coat : Ultrastructural Analysis of Mutants Exhibiting Deficiency of Sterol Methyltransferase

Eriko Suzuki¹, Masashi Suzuki², Kiyoshi Ohyama², Toshiya Muranaka^{2,3}, Noriko Nagata¹

¹Division of Material and Biological Science, Graduate School of Science, Japan Women's University

²RIKEN Plant Science Center

³Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University

(Received December 21, 2007)

Abstract: The pollen coat is made up of substances secreted or released in the locule when tapetum cells disintegrate, and it fills the cavities between the baculae of the exine. The tapetum is characterized by the accumulation of lipid deposits in tapetosomes and elaioplasts. We tried to know the roles of sterols for the formation of tapetum and pollen coat. We observed in detail the anther structure of the *smt1* and *frl1* mutants, defects sterol methyltransferases *SMT1* and *SMT2* of downstream of the MVA pathway. Both these mutants exhibited the skewness of elaioplasts and the decrease of vesicles of the pollen coat. We expect that sterols function for formation of organelles in tapetum and pollen coat.

Key words: sterol methyltransferase (SMT), elaioplast, tapetosome, pollen coat, sterol, mevalonic acid (MVA)

