

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14630

研究課題名(和文) 分化初期における植物生殖細胞の単離法の確立

研究課題名(英文) Towards establishment of the isolation method of nuclei from plant germ cells in early developmental stages

研究代表者

野々村 賢一 (Nonomura, Ken-ichi)

国立遺伝学研究所・実験圃場・准教授

研究者番号：10291890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生殖器官を構成する生殖細胞と体細胞は、互いに異なる遺伝子発現パターンを示すが、その原因究明には特定細胞の抽出が必要となる。そこでイネ生殖細胞遺伝子のプロモーター(MEL1p)を用い、DNA・RNAを濃縮する技術の開発を目指した。MEL1pおよび核膜局在蛋白質遺伝子、蛍光蛋白質遺伝子(GFP)を利用して、葯の細胞のうち生殖細胞の核のみがGFP蛍光を発する植物体の作出に成功した。その後の核の濃縮には課題を残した。一方、GFPと翻訳装置の融合蛋白質の発現は、イネの育成阻害から実験を中止した。今回の知見は、更なる条件検討により植物生殖細胞から核を単離できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The gene expression pattern of plant germ cells is different from that of somatic cells in reproductive organs. To explore the difference, a special technique to distinguish and isolate specific cells or nuclei from reproductive somatic cells is required. This study aims to establish the method to enrich DNAs and RNAs from germ cells of rice reproductive organs, using the promoter of germ-cell specific rice gene MEL1 (MEL1p). We succeeded to mark germ cell-nuclei specifically with the fluorescent protein GFP in rice anthers, while the following steps for nuclei and DNA enrichment have required further consideration. For isolation of cell-type specific RNAs, the expression of the ribosomal protein-GFP fusion was toxic in transgenic plants, and then the experiments were canceled. The knowledge obtained in this study shows a possibility that further examinations of conditions will enable us to establish the method for isolation of specific cell-type nuclei from plant reproductive organs.

研究分野：植物生殖遺伝学

キーワード：植物生殖 イネ 核単離

## 1. 研究開始当初の背景

被子植物の始原生殖細胞は、花メリステムが終結した直後の雌雄生殖器官原基の皮層直下から分化する。始原生殖細胞の分化・発生には、植物ホルモンの信号伝達系に加え、単子葉植物では葉鞘内の低酸素環境が重要との報告があるが、その分子機構はほとんど未解明である。また、生殖細胞の分化に引き続き起こる植物の減数分裂進行に關与する遺伝的メカニズムも、その多くが未解明である。これらメカニズムの包括的な理解には、生殖細胞のみを正確に単離し、DNA や RNA、蛋白質の抽出に供試する技術が必要なのは明らかである。

進展著しい減数分裂後の花粉・胚のう形成過程の研究に比べ、減数分裂以前の発生過程の研究は遅れている。その原因の一つとして、減数分裂以前の生殖細胞を、周辺の体細胞から単離することが難しいことが挙げられる。加えて本課題の研究対象であるイネでは、減数分裂以前の生殖細胞は、微小な生殖器官の中で何層もの体細胞で包まれており、さらに生殖器官が何層もの葉鞘に包まれているため、手作業により機械的に抽出するには不向きな細胞群である。

研究開始当初、植物、特にイネでは顕微鏡下で組織切片から目的細胞を切り出すレーザーマイクロダイセクション(LMD)が主流であった。しかし RNA など細胞成分のレーザー照射あるいは切片からの回収・抽出過程における損傷、顕微鏡の機種によっては切断した細胞クズのサンプルへの混入などが常に問題となる。そこで LMD 法に代わる、細胞成分の損傷が比較的少ない方法の開発が望まれていた。そこで本課題では、イネの減数分裂期の生殖細胞を単離し、各種のゲノムワイドな解析に資する新たな技術開発を目的とした。

本課題申請当初は、減数分裂前の生殖細胞特異的に発現するイネ MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE1 (MEL1) と蛍光蛋白質 GFP の融合遺伝子を MEL1 プロモーターで発現させた形質転換イネを利用して、生殖細胞を蛍光標識し、前減数分裂期の葯を構成する細胞を酵素処理によりスフェロプラスト化して単離してから、細胞回収用マニピュレーターを装着した蛍光倒立顕微鏡あるいはセルソーターにより生殖細胞のみを単離する計画であった。しかし採択後にさらに検討を重ねた結果、マイクロマニピュレーターでは、細胞への損傷という点で LMD と類似の問題が懸念された。またセルソーター解析では、細胞壁の部分分解によるスフェロプラスト化が必須だが、カルスを用いた予備実験でスフェロプラストがしばしば細胞塊を形成し、セルソーターのノズルづまりなどのトラブルが懸念された。

## 2. 研究の目的

本課題では、上記の状況に鑑み Isolation of Nuclei Tagged in specific Cell Types (INTACT) 法および Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP) 法のイネ生殖細胞への適用を試みた。

INTACT 法の特徴的な点は第一に、特定の細胞/組織での遺伝子発現を誘導するプロモーターを利用する点である。第二に、核蛋白質の核輸送を促進する RanGAP 蛋白質の部分ペプチド配列を利用して細胞質側の核膜(核膜孔)を標識できる点である。両者を組み合わせることで、特定細胞の核膜をペプチド標識することが可能となり、標識ペプチドに対する抗体を用いて、試験管内で特定細胞核のみを濃縮することが可能となる(図1左)。

TRAP 法は、特定の細胞/組織での遺伝子発現を誘導するプロモーターを利用する点は INTACT 法と共通である。異なるのは、プロモーターに繋ぐ遺伝子がペプチド標識されたリボソームサブユニット RPL18 である点である。リボソーム複合体は、細胞質中で翻訳途中の mRNA と結合しているため、RPL18 のペプチド標識に対する抗体を用いて、試験管内で特定細胞に蓄積する mRNA を網羅的に濃縮することが可能となる(図1右)。

本課題は、代表者が以前に同定したイネ生殖細胞特異的 Argonaute 蛋白質をコードする MEL1 遺伝子のプロモーターを利用して、INTACT 法を用いたイネ生殖細胞の核単離法、および TRAP 法を用いた生殖細胞特異的 mRNA ライブラリー作成法の確立を目的とする。

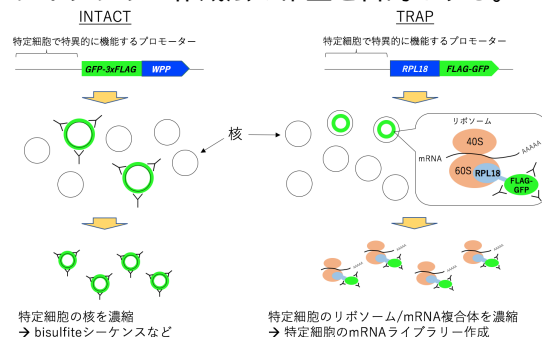


図1. INTACT 法および TRAP 法のイメージ図

## 3. 研究の方法

### 3-1. INTACT 法

GTPase 活性化因子である RanGAP は核膜孔の細胞質側に偏在し、Ran のグアニンヌクレオチド交換因子 RCC1 が核内側に偏在することで、GTP 結合型 Ran の細胞質-核間濃度勾配が保たれている。この濃度勾配により核蛋白質の核輸送の方向性が保たれている。

RanGAP は核膜孔の細胞質側に結合するため、核単離のための標識として利用可能であることが知られる (Deal and Henikoff 2011)。また、植物の RanGAP 様蛋白質は、N 末端に植物固有の WPP モチーフをもつ。WPP は、シロイヌナズナ細胞で蛋白質の核膜への結合を促進するモチーフとして知られる (Patel et al. 2004)。本課題では、核膜との結合が報

告されるシロイヌナズナ RanGAP 様蛋白質のイネオルソログ蛋白質 (OsRanGAP) をコードする遺伝子の WPP モチーフ配列を利用した。

イネの生殖細胞で特異的に発現する遺伝子として *MEL1* 遺伝子を用いた。今回は上流配列も含めた約 16kbp の *MEL1* ゲノム領域の翻訳開始点の直前に、WPP モチーフ配列・GFP 遺伝子・3xFLAG タグ遺伝子・Nos ターミネーターの 4 者を直列に繋いだ配列 (*WGF*) を挿入した (*gMEL1-WGF*)。Nos ターミネーターの挿入により、*MEL1* コード領域自体は転写単位には含まれず、*WGF* mRNA のみが *MEL1* プロモーターにより生殖細胞で特異的に転写・翻訳を受けると期待される。*gMEL1-WGF* 配列を大腸菌-アグロバクテリウムのバイナリーベクター-pZP-2H-lac に挿入した (図 2A)。*gMEL1-WGF* プラスミドはアグロバクテリウム法により、イネのカルスに形質転換し、実験に用いた。

GFP シグナルの観察には、共焦点レーザー走査顕微鏡 FV300 (オリンパス) を用いた。

### 3-2. TRAP 法

シロイヌナズナの 60S リボソーム蛋白質 L18 (RPL18) に FLAG ペプチドタグをつけた融合蛋白質は、FLAG タグ抗体による免疫沈降によりリボソーム複合体を効率的に単離することができる (Jiao and Meyerowitz 2010)。本課題ではイネ *RPL18* 遺伝子 (*OsRPL18*) を利用した。

INTACT 法と同様に、16kbp の *MEL1* ゲノム領域の翻訳開始点の直前に、3xFLAG タグ遺伝子・GFP 遺伝子・*OsRPL18* 遺伝子・Nos ターミネーターの 4 者を直列に繋いだ配列 (*FGR*) を挿入し (*gMEL1-FGR*) (図 2B)、INTACT 法と同様の方法でイネのカルスに形質転換した。

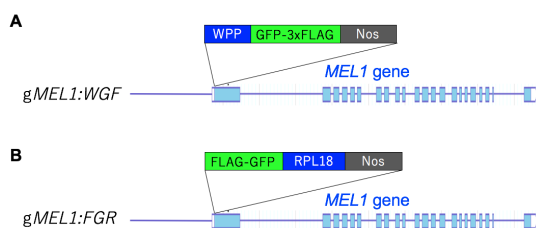


図 2. 本課題で用いたコンストラクト

- (A) INTACT 用コンストラクト。  
(B) TRAP 用コンストラクト。

## 4. 研究成果

### 4-1. INTACT 法

イネカルスに *gMEL1-WGF* プラスミドを導入して再分化処理を行ったところ、*gMEL1-WGF* を保有する植物体が 16 個得られた。形質転換体であるためグロスチャンバー内で植物体を育成し、出穂前の幼穂から減数分裂期の葯を採取して観察に用いた。導入当代植物 ( $T_0$  植物) では顕著な生育異常は見られなかったことから、*gMEL1-WGF* は栄養成長期のイネの発育には特段の影響を及ぼさないと考えられる。

*WGF* の細胞内局在を蛍光顕微鏡で調べたところ、3 系統で期待通り減数分裂細胞で核膜周縁に GFP シグナルが検出された (図 3A-C)。減数分裂細胞を囲む葯の体細胞組織ではほとんどシグナルが見られなかったことから、*MEL1* プロモーターはイネの生殖細胞特異的なプロモーターとして利用できることが改めて示された。

注意すべき点として、葯以外に穎花の基部に強いシグナルが検出された (図 3A)。*mel1* 突然変異体の解析では、この領域に形態異常など表現型は報告されていないため原因は不明だが、*MEL1* プロモーターを生殖細胞核単離のための INTACT 法に用いる際には、葯のみを採取するなど、この領域を回収しないよう工夫する必要があることがわかった。

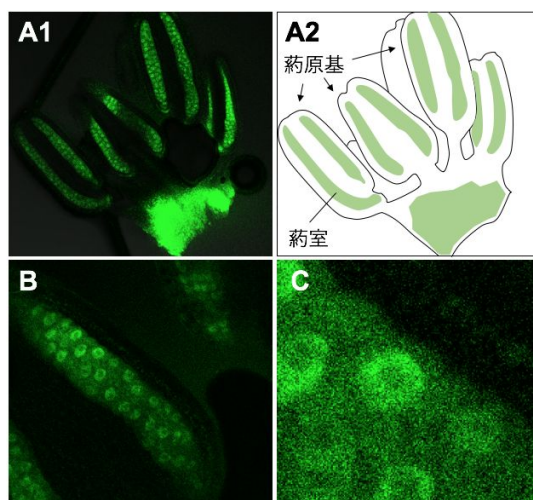


図 3. INTACT 法によるイネ生殖細胞核の標識

- (A) *gMEL1-WGF* プラスミドを導入した形質転換イネから採取した減数分裂前の穎花の共焦点レーザー走査顕微鏡イメージ。葯原基の細胞のうち、葯室に含まれる雄性生殖細胞のみで強いシグナルが検出された。  
(B) 葯室の拡大写真。  
(C) 雄性生殖細胞の拡大写真。細胞のうち、特に核で強いシグナルが検出された。

形質転換当代 ( $T_0$ ) 植物の自殖で得られた  $T_1$  植物でも、 $T_0$  植物と同様に生殖細胞の核膜で GFP シグナルが検出された。そこで、シロイヌナズナ先行研究の方法 (Deal & Henikoff 2011) を参考に、 $T_1$  植物から ~2.0mm 長の穎花あるいは ~0.5mm 長の葯を採取して INTACT のイネ生殖細胞への適用を試みた。まず、2mL チューブに 50 個程度の穎花およびステンレスビーズ 2 個を入れ、1000rpm で 1 分間凍結粉砕した。核単離バッファーを加えて得られた遊離核の懸濁液は、孔径 50 $\mu$ m メッシュフィルターを通したのち、市販の抗 GFP 抗体および Protein A 結合マグネットビーズを加えて遠心 (1000rpm, 1min) し、ペレットを 2 回洗浄して蛍光顕微鏡下で単離核を観察した。なお、INTACT 条件の検討のため、純粋に生殖細胞核が単離できる葯ではなく、より GFP 標識核が得られる穎花を用いた予備実験を行なった。

しかし期待に反し、上記条件では構造を保った遊離核が低頻度でしか抽出されなかった。また抗体による GFP 陽性核の濃縮過程で、マグネットビーズに非特異的な吸着と思われる多くの細胞片が付着し、目的とする GFP 陽性の細胞核はほとんど観察されなかった。原因のひとつとして、イネはシロイヌナズナよりも核のサイズが大きいいため、単離過程で核構造が崩壊する可能性が考えられる。

そこでよりマイルドな単離方法として、乳鉢を用いて液体窒素中で組織を穏やかに破碎した。すると期待通り、核単離処理後に多くの核が構造を保ったまま抽出された。多くは体細胞由来と思われる核だったが、中には明らかに体細胞核よりも大きい、生殖細胞由来と思われる核も存在した(図4)。

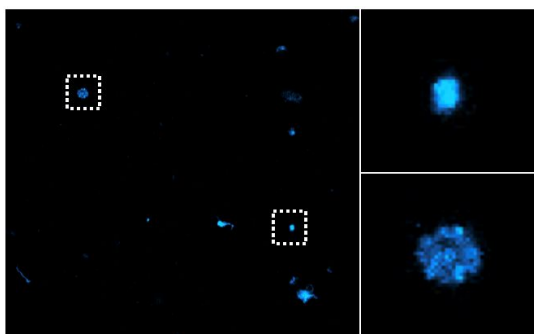


図4. イネ穎花由来の単離細胞核  
乳鉢を用いてイネ穎花を凍結粉碎し、核単離バッファー中の核を DAPI 染色して蛍光顕微鏡で観察すると、構造を保った核が多数観察された(左)。穎花を構成する細胞のうち、体細胞由来と思われる小さい核(左上)に加え、生殖細胞由来と思われる大きい核(左下)も観察された

そこでステンレスビーズ破碎のときと同様に、抗 GFP 抗体による GFP 陽性核の濃縮を試みた。しかしここでもマグネットビーズには非特異的な細胞片が大量に付着し、GFP 陽性核の単離には至らなかった。細胞片の付着を抑えるため、遠心後のマグネットビーズの洗浄を2回から5回に増やすなどしたが、状況は改善されなかった。

#### 4-2. TRAP 法

イネカルスに *gMEL1-FGR* プラスミドを導入し、再分化処理を行ったところ、38 個体の *gMEL1-FGR* を保有する植物体を得られた。しかし、これらの系統はいずれも生育が悪く、出穂した3個体も不稔であった。本研究とは別件で作成していたカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで FGR を過剰発現させた植物も、同様の発育異常を示したため、おそらく GFP 融合型 RPL18 タンパク質が、植物の生育に害を及ぼしていることが考えられ、*gMEL1:FGR* を用いた TRAP 法の適用は残念ながら中断せざるを得ない状況となった。

#### 4-3. まとめ

本課題の成果から、(1) *MEL1* 遺伝子のプロモーターが、生殖細胞特異的プロモーター

として利用可能なこと、(2) *MEL1* プロモーターを用いた INTACT 法により、将来的にタグ抗体を用いた生殖細胞核の単離が可能なこと、(3) *MEL1* プロモーターは穎花基部の体細胞でも転写活性を有するためサンプリングの際に注意を要すること、などが示された。

一方 TRAP 法については、残念ながら *MEL1* プロモーターとの組み合わせでは植物体の生育に影響を及ぼすことが判明し、計画を途中で断念した。

プロジェクト開始当初は、単離核から抽出した DNA・RNA が、確かに生殖細胞に由来することを確認する作業も計画に含まれていたが、開始当初に単離法の見直しを行ったこと、その後の単離条件の検討に手間取るうちに課題研究期間が終了することとなり、慚愧の念に堪えない。しかしながら本研究で得られた知見は、更なる条件検討を重ねることでイネ生殖細胞から核を単離できる可能性が十分にあることを示すものであり、今後、植物の生殖細胞初期発生過程における細胞自律的な因子の特定への貢献が十分に期待できる。

最後に、本課題を支援して頂いた国民の皆様、学術振興会、採択・評価に関わった先生方に感謝の意を表す。また、国立遺伝学研究所野々村研のメンバー、特に実験全般に尽力して頂いた連携研究者の津田勝利助教に感謝する。

#### < 引用文献 >

- Dean and Henikoff (2011) The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Protoc* 6: 56-68.
- Jiao and Meyerowitz (2010) Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control. *Mol Syst Biol* 6: 419; doi:10.1038/msb.2010.76
- Patel et al. (2004) *Arabidopsis* WPP-Domain proteins are developmentally associated with the nuclear envelope and promote cell division. *Plant Cell* 16: 3260-3273.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- Ono S, Liu H, Tsuda K, Fukai E, Tanaka K, Sasaki T, Nonomura KI (2018) EAT1 transcription factor, a non-cell-autonomous regulator of pollen production, activates meiotic small RNA biogenesis in rice anther tapetum. *PLOS Genetics* 14 (2): e1007238. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007238.

〔学会発表〕(計 3 件)

野々村賢一 (2016) 植物の減数分裂特異的 small RNA の鍵穴は何? 文科省科研費新学術領域「新種誕生原理」若手の会(招待講演), 11月2日, 大学セミナーハウス, 八王子.

劉華・小野聖二郎・平塚理恵・出村拓・大谷美沙都・深井英吾・野々村賢一 (2016) Subcellular localization and function of a germline-specific Argonaute protein MEL1 during rice meiosis, 日本植物学会第80回大会, 9月16日, 沖縄コンベンションセンター.

野々村賢一 (2016) 減数分裂初期に特異的かつ大量に生産されるイネ small RNA の役割, 植物育種繁殖学セミナー, 9月14日, 大阪府立大学.

〔図書〕(計 1 件)

Nonomura KI, Ono S, Ueda K (2018) Genetic and Epigenetic Regulation of Meiotic Fate Decision and Gametophyte Specification in Rice. In: Sasaki T, Ashikari M (eds) Rice Genomics, Genetics and Breeding. Springer, Singapore, p. 69-95.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

[http://nonomuralab-nig.sakura.ne.jp/top\\_j.html](http://nonomuralab-nig.sakura.ne.jp/top_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野々村 賢一 (NONOMURA, Kenichi)  
国立遺伝学研究所・実験圃場・准教授  
研究者番号: 10291890

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

津田 勝利 (TSUDA, Katsutoshi)  
国立遺伝学研究所・実験圃場・助教  
研究者番号: 30756408

(4) 研究協力者

深井 英吾 (FUKAI, Eigo)  
新潟大学・農学部・助教