

研究種目： 基盤研究(B)  
研究期間： 2007 ~ 2010  
課題番号： 19370017  
研究課題名(和文) レーザーインジェクションによる標的真核細胞およびオルガネラの遺伝子発現制御  
研究課題名(英文) Regulation of Gene Expression in Targeted Eukaryotic Cells and Organelles by Laser-assisted Injection  
研究代表者  
東山 哲也 ( HIGASHIYAMA TETSUYA )  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号： 00313205

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 基礎生物学 ・ 植物分子生物 ・ 生理学

キーワード： ①レーザーインジェクション②細胞③オルガネラ④遺伝子発現制御⑤顕微操作

### 1. 研究計画の概要

マイクロインジェクションは、狙った細胞に核酸、タンパク質、薬剤など様々な物質を導入するための、重要な細胞工学技術である。しかし、従来法では、対象となる細胞が、大型の動物卵細胞やディッシュに接着した培養細胞などに限定されなど、技術的な制約が大きかった。研究代表者は、レーザー光を熱源とし、レーザー吸収剤の熱膨張圧によりマイクロインジェクションを行う方法を発明した。これにより、従来法では難しかった微小な細胞、多糖質の堅い細胞壁をもち内部には高い膨圧を保持する植物細胞、そしてそのオルガネラに至るまで、インジェクションに成功した。このような精密なインジェクションを簡便に行える方法・装置は、世界的にも実用化に至った例がない。本研究では、任意の細胞系で、狙った個々の細胞で確実に遺伝子の発現制御を行う技術の開発を目指す。これにより、細胞工学的に遺伝子発現制御を行うための基本原理を解明する。このために、遺伝子発現制御を、外来遺伝子の発現と、標的遺伝子の機能発現阻害の2つに大きく分けて研究を進める。

### 2. 研究の進捗状況

まずレーザーインジェクター装置について、実用化に成功し、販売開始に至った。その装置を用いて、さまざまな細胞系での実験を進めてきたが、特に植物の雌性配偶体細胞(トレンシアの裸出胚嚢)へのモルフォリノアンチセンスオリゴのインジェクションによる遺伝子発現阻害実験を中心に進めた。レー

ザーマイクロインジェクション法の評価・最適化を進めた結果、標的とした花粉管誘引物質の候補遺伝子の遺伝子発現阻害に成功し、候補遺伝子が真の花粉管誘引物質であることを証明できた。同定した遺伝子は2種あり、それぞれ *LURE 1* および *LURE 2* という、ディフェンシンに類似した低分子量タンパク質である。そのそれぞれの遺伝子に対する特異的なアンチセンスオリゴを導入した場合、アンチセンス特異的に花粉管誘引が阻害された。また、それぞれのアンチセンスオリゴ単独で、誘引が阻害されたことから、それぞれの遺伝子が異なる機能を持つ可能性も考えられる。その成果は、*Nature* 誌に掲載され、表紙を飾った。植物細胞においてモルフォリノアンチセンスオリゴの初めての使用例としても、メーカーから紹介された。さらに、リアルタイム RT-PCR 解析の条件検討を進めた結果、細胞 2 個に由来する mRNA から、安定した定量解析が行えるようになった。アンチセンスオリゴ特異的に、また標的遺伝子特異的に、発現が検出できないほどに減少していることが示された。このことは、この実験系が遺伝子発現抑制のモデル系として利用できることを示唆しており、ユニークな解析が展開されることが期待される。

### 3. 現在までの達成度

区分：②

発現・機能阻害実験については、モルフォリノアンチセンスオリゴや抗体などを用いた系で、植物細胞において計画通りの良好な結果が得られている。遺伝子の発現実験については、現在適切な条件を検討している。

#### 4. 今後の研究の推進方策

計画の変更はない。レーザーインジェクションを用いて、細胞種を選ばず、外来遺伝子を発現させる方法について開発し、研究計画を達成する。具体的には、GFP 遺伝子の植物細胞における発現や、近縁種において同定した *LURE* ホモログをトレニアにおいて発現させて生殖隔離を打破できるかなどについて、試みる。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 14 件)

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., Higashiyama T.: “Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells”, *Nature* 458, 357-361. (2009) 査読あり

筒井大貴、東山哲也: 「植物生殖 140 年の謎—花粉管誘引物質の同定とレーザーマイクロインジェクション法による解析—」、*バイオインダストリー* 26, 37-43. (2009) 査読なし

[学会発表] (計 70 件)

筒井大貴、奥田哲弘、椎名恵子、須崎大地、河野 直、金岡雅弘、佐々木成江、東山哲也: 「レーザーインジェクション法を用いた助細胞特異的遺伝子群の機能解析」日本植物生理学会年会 (熊本) (2010)

Higashiyama T.: “Pollen tube guidance by

defensin-like polypeptide LUREs”, 9th IPMB Congress (St. Louis, USA) (2009)

筒井大貴、金岡雅浩、佐々木成江、東山哲也: 「レーザーマイクロインジェクション法を用いた花粉管誘引物質 LUREs の解析」日本植物学会大会 (山形) (2009)

村田隆、野中茂紀、東山哲也、佐野俊夫、馳澤盛一郎、長谷部光泰: 「2 光子顕微鏡を用いた 3 次元トラッキングによる微小管形成の解析」生体運動研究合同班会議 (東京) (2009)

Higashiyama T.: “Pollen tube attractants derived from the synergid cell”, *Frontiers of Sexual Plant Reproduction III* (Tucson, USA) (2009)

[図書] (計 2 件)

東山哲也、澤進一郎: 「植物の発生と形態形成」、*バイオサイエンス*、115-121 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし。

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし。

[その他]

日本植物学会賞特別賞 (技術)、「植物の受精メカニズムの可視化技術」(2007)

日本植物形態学会平瀬賞、(Okuda et al., *Nature*, 2009 の論文に対して) (2009)

日本学術振興会賞、「花粉管ガイダンスをはじめとした植物生殖の動態および分子機構の解明」(2010)