

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06704

研究課題名(和文) LINC複合体によるシロイヌナズナ有性生殖過程の核融合の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of nuclear fusion by the LINC complex during sexual reproduction of Arabidopsis

研究代表者

西川 周一 (Nishikawa, Shuh-ichi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10252222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：LINC複合体は核内膜のSUNタンパク質と核外膜のKASHタンパク質によって形成され、核の移動や位置決定などで機能するタンパク質複合体である。本研究では雌性配偶体特異的な遺伝子発現誘導系を改良し、これを用いて、シロイヌナズナ有性生殖過程の核融合(極核融合と精核融合)におけるLINC複合体の役割の解析を行った。解析の結果、SUNタンパク質は極核融合には必要であるが、精核融合には関与しないことを示唆する結果を得た。また、雌性配偶体で発現するKASHタンパク質の特定とその機能解析、核膜融合に必要な核膜タンパク質GEX1の機能領域の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製した改良型の雌性配偶体特異的な遺伝子発現誘導系は、雌性配偶体形成初期過程からの遺伝子機能の解析を含め、利用可能な範囲が広がったといえる。また、極核融合と精核融合のメカニズムの違いを示唆する結果は、2種類の核融合を区別する機構の探索への展開が期待できる。本研究によって特定したKASHタンパク質やGEX1を足がかりとした解析によって、有性生殖過程の核膜融合の分子機構の理解が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The LINC complex is a protein complex formed by the SUN protein in the inner nuclear membrane and the KASH protein in the outer nuclear membrane. The LINC complex functions in various processes including nuclear migration and positioning. In this study, we improved our female gametophyte-specific gene induction system. Using the improved system, we analyzed the roles of the LINC complex in nuclear fusion (polar nuclear fusion and sperm nuclear fusion) during sexual reproduction in Arabidopsis thaliana. Our results suggested that the SUN protein is required for polar nuclear fusion but not for sperm nuclear fusion. We identified a KASH protein expressed in the female gametophyte and analyzed its functions in nuclear fusion. We also analyzed the functional domains GEX1, a nuclear membrane protein required for nuclear membrane fusion.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：核膜融合 雌性配偶体 重複受精 シロイヌナズナ 核膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

細胞核の融合は、2個の核の融合によって1個の核が形成する過程であり、様々な生物の有性生殖で必須の役割をはたしている。被子植物では、重複受精における2回の核融合と雌性配偶体形成時の中央細胞における極核融合の、合計3回の核融合が観察される(図1)。シロイヌナズナなどの植物の有性生殖過程で観察される核融合は、哺乳動物の受精時の核融合とは異なり、核膜の崩壊を伴わずに2つの核が直接融合する。このため、核膜の融合が核融合で必須となっている。

われわれは、小胞体の分子シャペロン Hsp70 である BiP と、その制御因子である小胞体 J タンパク質が、極核の核膜融合に必要であることを明らかにした(1,2)。核膜は小胞体膜の特殊化した領域であり、小胞体の分子シャペロン Hsp70 は核膜局在の膜融合タンパク質をクライアントとすることで、核膜融合を制御していると考えられる。われわれは、シロイヌナズナ有性生殖過程の核融合に必要な核膜タンパク質として、GEX1 および SUN タンパク質を同定した(3)。SUN タンパク質は核内膜の膜内在性タンパク質であり、SUN ドメインという機能領域を有する。SUN タンパク質は、SUN ドメインで核外膜の KASH タンパク質と結合して LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton: 細胞骨格と核骨格をつなぐ) 複合体を形成して核の移動や形態維持などで重要な機能を果たしている。LINC 複合体に着目した解析によって、植物有性生殖過程の核融合機構の足がかりが得られると期待される。

われわれは、植物有性生殖過程の核融合機構の新たな解析系として、雌性配偶体特異的な遺伝子発現誘導実験系を構築した。この実験系では、短時間の熱ショックによって雌性配偶体中で外来遺伝子の発現を効率良く誘導することが可能である。この実験系を用いることで、雌性配偶体形成過程の特定の時期や細胞における核融合因子の機能解析が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、われわれが構築した雌性配偶体特異的な遺伝子発現誘導実験系を利用して、有性生殖過程の核融合過程における LINC 複合体の役割を明らかにすることを目的とする。また、極核融合におけるアクチンフィラメントの役割の解明も目指す。このため、1) 有性生殖過程の核融合で機能する KASH タンパク質の探索と機能解析、2) 精核融合過程における SUN タンパク質の機能解析、3) 極核融合におけるアクチンフィラメントの役割の解析を進める。また、極核の核移動から核融合までの解析に対応可能な、遺伝子発現誘導実験系の改良も行う。

3. 研究の方法

(1) 雌性配偶体特異的な遺伝子発現誘導実験系

本研究で用いた遺伝子発現誘導系では、配偶体特異的 ES2 プロモーターと、熱ショックプロモーター (pHSP18.2) による Cre-loxP 部位特異的組換えを利用している。構築した形質転換植物では、ES2 プロモーターによって Histone H2B-GFP が4核期以降の雌性配偶体で発現し、核が GFP で可視化される。この植物の花芽を短時間熱処理 (35°C、5分) すると Cre-loxP 部位特異的組換えが誘導され、ES2 プロモーターによって標的遺伝子が発現する(図2)。極核融合への影響を検討する場合は、発達中の雌性配偶体(4核~8核期)をもつ雌しべを熱処理し、40時間後に固定、ClearSee で透明化後、共焦点顕微鏡観察を行った。精核融合への影響を検討する場合は、同様の熱処理を行った雌しべを受粉し、8時間後に固定、ClearSee で透明化後、共焦点顕微鏡観察を行った。

(2) 雌性配偶体特異的な KASH タンパク質の探索

研究協力者である須崎大地博士(横浜市立大学) および東山哲也博士(名古屋大学) との共同研究により、雌性配偶体の各細胞(卵細胞、助細胞、中央細胞)のトランスクリプトームデータを解析し、卵細胞と中央細胞で発現する KASH タンパク質遺伝子を探索した。

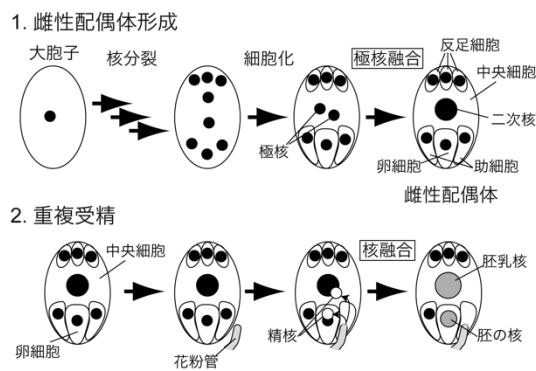


図1 シロイヌナズナの有性生殖過程で観察される核融合

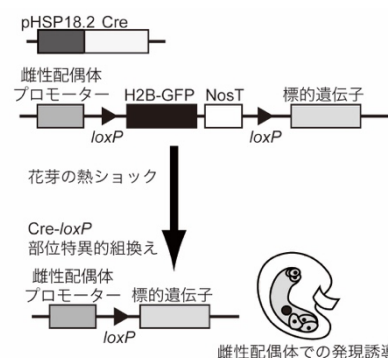


図2 雌性配偶体特異的な遺伝子発現誘導系
熱ショック前は Histone H2B-GFP (H2B-GFP) で雌性配偶体の核が可視化される。熱ショックにより Cre が発現し、Cre-loxP 部位特異的組換えがおこり、雌性配偶体で標的遺伝子の発現が誘導される。

(3) 精核融合欠損株における初期種子形成過程の解析

胚発生と胚乳形成の解析は、受精後 2~4 日の種子を固定し、透明化後に微分干渉顕微鏡観察により行った。また、ライブイメージングを用いた解析では、受精 1 日後の雌しべから胚珠を摘出して胚珠培養培地に入れ、Leica TCS-SP8 共焦点顕微鏡を用いて 48 時間のタイムラプス撮影を行った。

4. 研究成果

(1) 改良型遺伝子発現誘導系の構築

当初作製した遺伝子発現誘導系では、*Cre-loxP* 部位特異的組換えによって Histone H2B-GFP 遺伝子を除去することで目的遺伝子の発現が誘導される。Histone H2B-GFP は雌性配偶体の核動態の解析にも利用できるが、発現誘導のための熱処理を早期に行うと、Histone H2B-GFP によって雌性配偶体の核を可視化する前に Histone H2B-GFP 遺伝子が除去される。このため、極核の移動開始前に遺伝子発現誘導すると、その後の核動態の解析が困難であるという問題があった。このため本研究ではまず、遺伝子発現誘導系の改良を行った。改良型の遺伝子発現誘導系では、GUS 遺伝子で Histone H2B-GFP 遺伝子を置き換えるとともに、RPS5A-Histone H2B-GFP を同一の T-DNA 内に持つコンストラクトを構築した。RPS5A-Histone H2B-GFP を用いることで、雌性配偶体形成のすべての過程で核を可視化するとともに、このコンストラクトをホモに持つ個体の選抜も容易に行うことができた。

まず、発現誘導によって極核融合が阻害することが示されている SUN タンパク質に関する優性欠損変異体 (SUNDN) を用いて、新たな実験系の評価を行った。熱処理によって SUNDN の発現を誘導した雌性配偶体では極核融合欠損が観察されたことから、新たな実験系も従来の実験系と同様に利用可能であることが示された。

(2) 受精時の精核融合における SUN タンパク質の機能の検討

本研究では、SUNDN の発現を誘導した雌性配偶体が、極核融合だけでなく受精時の精核融合も欠損するかを検討した。このため、SUNDN の発現誘導後、精核を Histone H2B-mTFP1 または Histone H2B-mTurquoise2 で可視化した花粉を用いて受粉し、精核融合欠損の有無を検討した。これら蛍光タンパク質のシグナルは、花粉や *in vitro* 伸長した花粉管では検出可能であったが、受精後の雌性配偶体におけるシグナルが弱く、解析が困難であった。そこで、極核の移動開始前に SUNDN の発現誘導を行うことで Histone H2B-GFP による雌性配偶体核の標識を抑制し、精核を Histone H2B-GFP で可視化した花粉で受粉を行うことで精核融合に対する SUNDN の発現誘導の影響を検討したが、SUNDN を発現している雌性配偶体で明確な精核融合欠損が観察されなかった。SUN タンパク質の機能は精核融合過程には必須でないことが示唆される。極核融合は核の接触から核融合の完了まで 5~9 時間かかるのに対し、精核融合は受精後数分間で完了するという違いがある。この違いが、核融合における SUN タンパク質依存性の違いと関連するのか、今後の検討が必要である。

(3) 核融合で SUN タンパク質とともに機能する KASH タンパク質の探索

① 雌性配偶体で発現する KASH タンパク質の探索と機能解析

極核融合で SUN タンパク質とともに機能する KASH タンパク質は、中央細胞をはじめとする雌性配偶体細胞で発現していると考えられる。そこで、横浜市立大学の須崎大地博士、名古屋大学/東京大学の東山哲也博士との共同研究で、雌性配偶体の各細胞のトランスクリプトームデータを解析した。その結果、雌性配偶体での発現が見られる KASH タンパク質の候補として WIP1 を特定した。

極核融合における WIP1 の役割を検討するため、雌性配偶体において WIP1、SUN タンパク質との相互作用領域を欠失した WIP1 変異体、および、膜貫通領域を欠失した WIP1 変異体の発現を誘導可能な形質転換植物を作製した。WIP1 およびその変異体の発現の検出は N 末端側に tagRFP を融合することで行った。作製した形質転換植物を用いて、花芽の熱ショックによってこれらタンパク質の発現誘導を行った。SUNDN と同様の条件で発現誘導を行ったが、WIP1 及びその変異体の発現誘導効率は低かった。用いるタンパク質ごとに誘導条件の最適化が必要と考えられる。WIP1 関連タンパク質の発現誘導条件が決まり次第、極核融合への影響を検討する予定である。

② 核膜タンパク質 GEX1 の機能解析

われわれは、シロイヌナズナ有性生殖過程の核融合に必要な核膜タンパク質として GEX1 を同定した(4)。GEX1 は出芽酵母接合時の核融合に必要な核膜タンパク質 Kar5 のホモログと考えられる。出芽酵母では、Kar5 が SUN タンパク質である Mps3/Nep98 と相互作用することが報告されている。このため、GEX1 が核膜融合特異的な SUN タンパク質の相互作用相手となっている可能性が考えられる。GEX1 は 3 回膜貫通型の膜タンパク質であり、N 末側に約 400 残基からなる内腔側領域をもつ。GEX1 の内腔側領域には GEX1/Kar5 ファミリーで共通に存在するシステ

インリッチドメイン (GEX1-CRD) と、2 箇所のコイルドコイルドメイン (CC) が存在する (図 3)。本研究ではまず、核融合における

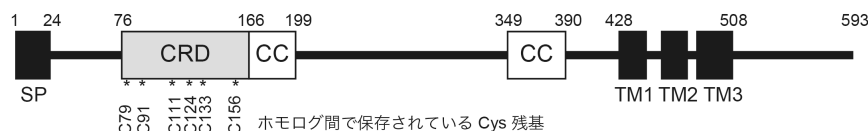


図 3. シロイヌナズナ GEX1 の構造

SP、CRD、CC、TM1~3 はそれぞれ、シグナル配列、システインリッチドメイン、コイルドコイルドメイン、膜貫通領域 1~3 を表す。数字は残基数を表す。GEX1 ホモログ間で保存されているシステイン残基の位置を図の下に示す。

これらの機能領域の役割の解析を行った。GEX1/Kar5 ファミリーで保存されているシステイン残基をセリン残基に置換した変異体は、*gex1* 変異株の極核融合欠損を相補しなかった。この結果は、GEX1-CRD が GEX1 の機能に必須の役割を持っていることを示している。GEX1 の配列は被子植物ホモログ間でもそれほど高くなく、保存性の高い GEX1-CRD においても、シロイヌナズナとイネの GEX1 ホモログ間で保存されている残基は 50% 程度である。一方でわれわれは、イネの GEX1 ホモログの発現によってシロイヌナズナ *gex1* 変異株の核融合欠損が完全に抑圧されることを見いだした。このため、被子植物ホモログ間で保存されている残基が GEX1 の機能に重要であることが示唆される。現在、GEX1-CRD 中の被子植物ホモログ間で保存されている残基の変異体を作製し、その機能解析を進めている。また、GEX1 と SUN タンパク質との相互作用についても、GEX1-CRD に着目した解析を進めている。

本研究ではまた、種子形成に対する受精時の精核融合欠損の影響についても検討した。種子形成過程の解析の結果、*gex1* 変異体の種子では胚発生と胚乳核分裂の両方が異常となることが示された。ここで観察された胚乳核分裂の異常は、小胞体分子シャペロン Hsp70 に関する変異株の場合(5)と同様に、最初の胚乳核分裂の際に凝縮したままの精核が中央細胞核と融合した結果と考えられる。*gex1* 変異体の種子で観察された胚発生異常について、ライブイメージング解析によってさらに検討した。解析の結果、*gex1* 変異体の種子の受精卵では、融合しなかった精核は胚発生が始まる受精 1 日後でも融合していないままであった。また、精核が融合しなくても胚発生が開始すること、最初の体細胞分裂の際に精核と卵細胞核が融合することが示された。胚発生の場合においても、凝縮したままの精核が卵細胞核と融合することが、細胞分裂異常を引き起こすと考えられる。

(4) 極核融合におけるアクチンフィラメントの役割の検討

本研究ではまず、極核融合、特に極核の移動におけるアクチンフィラメントの役割の検討を目指して、形成過程の雌性配偶体でアクチンに関する優性欠損変異体の発現 (ACTIN-DN) を誘導する実験系を構築した。ACTIN-DN としては、シロイヌナズナ ACT8 E272K 変異体を用いた。Lifeact-mRuby3 を ACTIN-DN と共発現するように設計することで、ACTIN-DN を発現する雌性配偶体を特定するとともに、アクチンフィラメントの形態を解析できるようにした。本研究で個体作製した改良型遺伝子発現誘導系を用いて、Lifeact-mRuby3-ACTIN-DN コンストラクトの発現を誘導可能な形質転換植物を構築した。作製した植物の花芽を熱処理することで、Lifeact-mRuby3 の発現を指標に、目的遺伝子の発現誘導を確認した。極核融合への影響について検討を進めている。

<引用文献>

- (1) Maruyama, D., Endo, T., and Nishikawa, S. (2010) BiP-mediated polar nuclei fusion is essential for the regulation of endosperm nuclei proliferation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 1684-1689
- (2) Maruyama, D., Yamamoto, M., Endo, T., and Nishikawa, S. (2014) Different Sets of ER-Resident J-Proteins Regulate Distinct Polar Nuclear-Membrane Fusion Events in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **55**: 1937-1944
- (3) Hwang, D., Wada, S., Takahashi, A., Urawa, H., Kamei, Y., and Nishikawa, S. (2019) Development of a Heat-inducible Gene Expression System using Female Gametophytes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **60**: 2564-2572
- (4) Nishikawa, S., Yamaguchi, Y., Suzuki, C., Yabe, A., Sato, Y., Kurihara, D., Sato, Y., Susaki, D., Higashiyama, T., and Maruyama, D. (2020) *Arabidopsis* GEX1 Is a Nuclear Membrane Protein of Gametes Required for Nuclear Fusion During Reproduction. *Front. Plant Sci.* **11**: 548032. doi: 10.3389/fpls.2020.548032
- (5) Maruyama, D., Higashiyama, T., Endo, T., and Nishikawa, S. (2020) Fertilization-Coupled Sperm Nuclear Fusion is Required for Normal Endosperm Nuclear Proliferation. *Plant Cell Physiol.* **61**: 29-40

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishikawa Shuh-ichi, Yamaguchi Yuki, Suzuki Chiharu, Yabe Ayaka, Sato Yuzuru, Kurihara Daisuke, Sato Yoshikatsu, Susaki Daichi, Higashiyama Tetsuya, Maruyama Daisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Arabidopsis GEX1 Is a Nuclear Membrane Protein of Gametes Required for Nuclear Fusion During Reproduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 548032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.548032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Masaya, Uji Shuhei, Sugiyama Tomoyuki, Sakamoto Tomoaki, Kimura Seisuke, Endo Toshiya, Nishikawa Shuh-ichi	4. 巻 182
2. 論文標題 ERdj3B-Mediated Quality Control Maintains Anther Development at High Temperatures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1979 ~ 1990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.01356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hwang Dukhyun, Wada Satomi, Takahashi Azusa, Urawa Hiroko, Kamei Yasuhiro, Nishikawa Shuh-ichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Development of a Heat-Inducible Gene Expression System Using Female Gametophytes of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2564 ~ 2572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Daisuke, Higashiyama Tetsuya, Endo Toshiya, Nishikawa Shuh-ichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Fertilization-Coupled Sperm Nuclear Fusion Is Required for Normal Endosperm Nuclear Proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 29 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林那奈美
2. 発表標題 有性生殖過程の核融合を阻害する化合物の探索
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢部あやか
2. 発表標題 核膜融合因子GEX1の被子植物ホモログの機能解析
3. 学会等名 北陸植物学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川周一
2. 発表標題 シロイヌナズナ核融合欠損株で観察される受精後の胚発生異常の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuh-ichi Nishikawa
2. 発表標題 Proteins involved in nuclear membrane fusion in plant reproduction.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川周一
2. 発表標題 シロイヌナズナ新規核膜融合因子Gex1の細胞内動態の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuh-ichi Nishikawa
2. 発表標題 Machineries of nuclear membrane fusion during plant reproduction
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川周一
2. 発表標題 シロイヌナズナ核融合欠損株で観察される受精後の胚発生異常の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林那奈美
2. 発表標題 有性生殖過程の核融合を阻害する化合物の探索と解析
3. 学会等名 新潟生化学懇話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川周一
2. 発表標題 核融合因子GEX1の陸上植物ホモログの機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川周一
2. 発表標題 植物有性生殖過程の核膜融合の分子機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林那奈美
2. 発表標題 テッポウユリ花粉管の発芽と伸長に対するポアシン酸の影響
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤イヴ
2. 発表標題 核膜融合タンパク質シロイヌナズナGEX1の機能領域の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生殖過程の核融合の鍵となる、進化的に保存された核膜タンパク質を同定しました
<https://www.niigata-u.ac.jp/news/2020/78597/>
植物の配偶体を用いた新たな遺伝子機能解析系を開発しました
<https://www.niigata-u.ac.jp/news/2019/59352/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	東山 哲也 (Higashiyama Tetsuya)		
研究協力者	亀井 保博 (Kamei Yasuhiro)		
研究協力者	丸山 大輔 (Maruyama Daisuke)		
研究協力者	須崎 大地 (Susaki Daichi)		
研究協力者	矢部 あやか (Yabe Ayaka)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 那奈美 (Kobayashi Nanami)		
研究協力者	佐藤 譲 (Sato Yuzuru)		
研究協力者	加藤 イヴ (Kato Ibu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関