

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 月 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22657017

研究課題名（和文）

重複受精における新規受精因子の発見；配偶子融合の制御機構を探る

研究課題名（英文）

Identification of new determinants for double fertilization

研究代表者

井川 智子 (IGAWA TOMOKO)

千葉大学・大学院園芸学研究科・助教

研究者番号：00360488

研究成果の概要（和文）：本研究では配偶子膜を特異的に蛍光タンパク質（GFP）で可視化したシロイヌナズナ受精マーカーラインを作成した。卵細胞膜マーカーラインの雌ずい組織を材料として、GFP抗体を用いた pull-down 法（免疫沈降反応）によって膜タンパク質を精製し、プロテオーム解析を行った。同定されたタンパク質のうち、推定膜貫通領域を持ち、さらに遺伝子が破壊されると種子稔性が低下する因子を見出した。

研究成果の概要（英文）：Arabidopsis marker lines, where gamete membrane was specifically visualized with fluorescent protein (GFP), were produced. Membrane proteins were purified from pistil tissue of the egg cell membrane- marker line by pull-down strategy using anti-GFP antibody. Among the identified proteins with putative trans-membrane region, one protein was found to be involved in seed fertility.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	480,000	3,580,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：重複受精・配偶子細胞・ライブイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

被子植物の配偶子は細胞壁を持たないため、雌雄の配偶子は細胞膜上に存在する分子を介して相互作用することで、重複受精を制御していると考えられる。しかし、配偶子膜上に存在する受精決定因子は、雄性配偶子で1例報告があるのみで、雌性配偶子で発現する受精因子はまだ発見されていなかった。重複受精は厚い胚珠組織の中で行われるために、分子解析の障害ともなっていた。

### 2. 研究の目的

被子植物では、2個の雄性配偶子（精細胞）が2種類の雌性配偶子（卵細胞と中央細胞）とそれぞれ受精する。この受精様式は重複受精と呼ばれ、被子植物特有の生殖現象である。2個の同一の精細胞がどのように卵細胞と中央細胞を識別して融合に至るのか、その制御機構は未だ不明である。本研究では、配偶子細胞膜上に局在するタンパク質の精製と同定を行い、配偶子の融合に関与する新規因子の発見と機能解析を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) マーカーラインの確立

免疫沈降反応 (pull-down) を利用した GFP タグタンパク質精製ツールが市販されているので、これを利用することを視野に入れ、配偶子膜蛍光タグマーカーラインを作成する。既に配偶子特異的発現が報告されている遺伝子のプロモーターを利用する。

配偶子の細胞膜特異的に蛍光タンパク質を発現させるために、上記プロモーターの下流に原形質膜局在アクアポリンである AtPIP2a 遺伝子と GFP または RFP 遺伝子を融合させた遺伝子発現カセットを構築し、シロイヌナズナに導入してマーカーラインを作製する。

#### (2) マーカーラインの評価；重複受精時の配偶子膜ダイナミクス解析

作製したマーカーラインはプロテオーム解析の材料のみならず、機能解析にも利用できる。本研究では作製した配偶子膜マーカーラインを用いて、重複受精時における配偶子膜ダイナミクスの解析を行う。

#### (3) 配偶子膜タンパク質の精製・プロテオーム解析

雌性配偶子膜タンパク質の精製を試みる場合は雌ずい組織を、雄性配偶子膜タンパク質の精製を試みる場合は、花粉をサンプリングする。

回収した組織を非変性条件で破碎した後、弱い遠心分離を行い、上清を回収する。上清に GFP 抗体磁気ビーズを混合し、pull-down を行い、最終的に抗体に結合した膜タンパク質を精製・溶出する。精製したタンパク質は SDS-PAGE で展開後、マーカーラインに特異的なバンドまたは分子量ごとにトリプシン消化を行い、ショットガン解析による質量分析を行う。

同定されたタンパク質については、推定膜貫通領域が存在するものについて優先的に解析候補として選抜していく。解析候補として選抜したタンパク質のコード遺伝子についてシロイヌナズナ遺伝子破壊株を取り寄せ、表現型を調査する。また、遺伝子破壊株が存在しない場合は、RNAi など遺伝子発現を低下させた植物体を作製し、表現型を調査する。

### 4. 研究成果

#### (1) 配偶子マーカーラインの作出

本研究では、雌性配偶子の細胞膜を蛍光タンパク質で特異的に標識したシロイヌナズナマーカーラインを作出した。卵細胞および

中央細胞特異的発現をもたらすプロモーターとしてそれぞれ DD45、FWA 遺伝子の 5' 非翻訳領域をクローニングし、下流には原形質膜局在をもたらす AtPIP2a の遺伝子に GFP または RFP を融合させた遺伝子連結させて遺伝子発現カセットを構築した。これらを野生型シロイヌナズナ Col-0 に導入し、最終的に各ラインについてホモ系統を確立した。

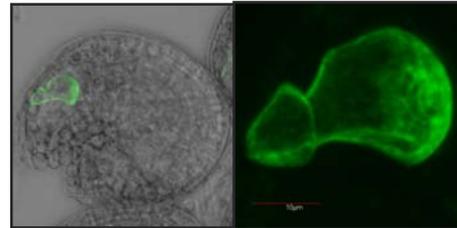


図1 本研究で作製した卵細胞膜マーカー

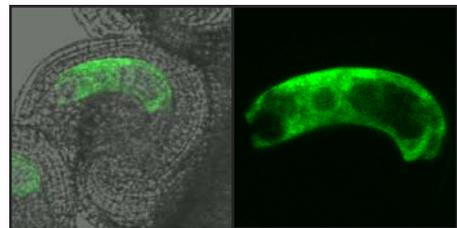


図2 本研究で作製した中央細胞膜マーカー

#### (2) 配偶子マーカーラインを用いた重複受精時配偶子膜ダイナミクスの解析

本研究では、作製されたマーカーラインを用いて、重複受精時の配偶子膜のライブイメージング解析を行った。

#### ① 雄性配偶子マーカーラインの作製

被子植物の精細胞は能動性を持たないが、胚のう内では雌性配偶子を目指して移動する。重複受精時の配偶子膜ダイナミクスを詳細に解析するために、精細胞の膜を GFP で標識した GCS1-GFP マーカーライン (Mori et al. 2010) と、核を標識した HTR10-mRFP マーカーライン (Ingouff et al. 2007) を掛け合わせ、精細胞ダブルマーカーラインを作製した。

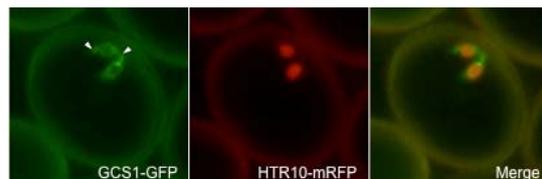


図3 精細胞ダブルマーカーライン

② in vivo での重複受精時配偶子膜動ダイナミクスの解析

精細胞ダブルマーカラインの花粉を卵細胞膜 RFP 標識マーカラインに受粉して、7-8 時間後に胚珠組織を雌ずいより摘出し、受精中の卵細胞と精細胞を観察した。その結果、受精が起きる直前の段階では、精細胞膜を示す GFP シグナルが精細胞核周辺に顕著に観察された。これに対し、受粉後に精細胞核が雌性配偶子内へ移動している段階では、雌性配偶子との境界部に GFP シグナルが広がるように観察され、精細胞核周辺の GFP シグナルはまれに観察されるか、微弱なシグナル強度を示した。

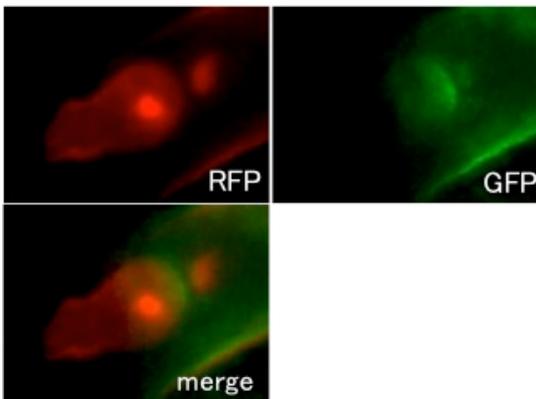


図4 重複受精直後の卵細胞膜 (RFP)、精細胞核 (RFP) および精細胞膜 (GFP) シグナル

③ semi-in vitro 重複受精のタイムラプスイメージング解析

in vivo 観察では捉えることのできない重複受精の瞬間における配偶子膜ダイナミクスを観察するために、semi in vitro 条件下で重複受精を再現して、観察を行った。

その結果、花粉管破裂後の精細胞膜 GFP シグナルは雌性配偶子内へ進入していることが示された。

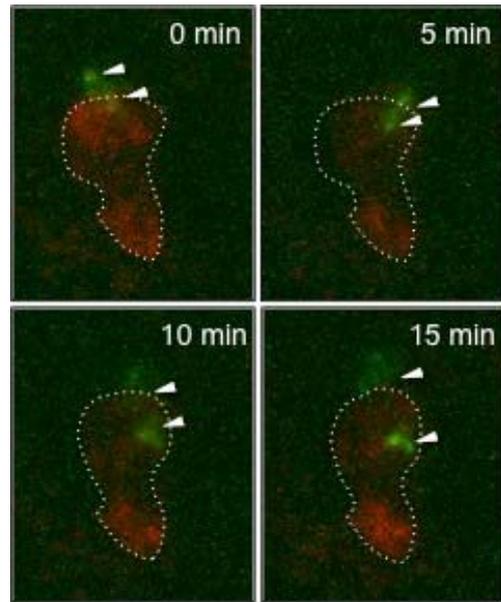


図5 雌性配偶子に進入する精細胞膜 GFP シグナル (矢尻)。点線は卵細胞膜 RFP マーカーによって示された卵細胞の位置

これらの観察結果から、シロイヌナズナの重複受精においては、雌雄の配偶子原形質膜の融合が起きていること、続いて精細胞の細胞質に存在する内膜が雌性配偶子内へ進入して、細胞質融合が起きていることが示された。本研究は、ライブセルイメージングでは初めて被子植物の重複受精における配偶子融合を観察した最初の例となった。

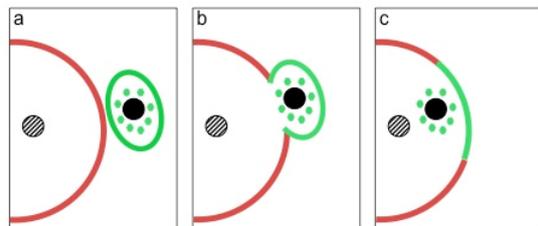


図6 本研究で示されたシロイヌナズナ重複受精における配偶子融合。a: 雌雄配偶子の接着、b: 雌雄配偶子の原形質膜融合、c: 細胞質合体 赤: 雌性配偶子、緑: 雄性配偶子

(3) 卵細胞膜 GFP マーカラインを用いた、卵細胞膜プロテオーム解析

本研究では、卵細胞膜 GFP マーカライン (pDD45::GFP-PIP) を研究材料として、また野生型シロイヌナズナをネガティブコントロールとして、卵細胞膜タンパク質の精製を行った。雌ずい組織約 0.1 g から、非変性条件下で粗タンパク抽出液を調整し、GFP 抗体を用いた pull-down による精製を行った。精製タンパク質を SDS-PAGE で展開後、シヨッ

トガン解析によるタンパク質質量分析を行った。

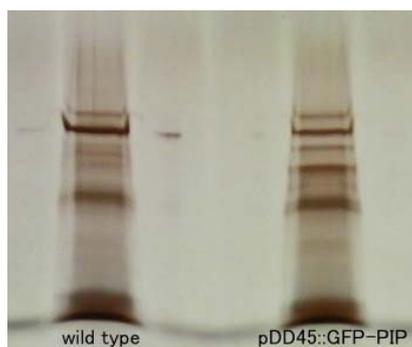


図7 GFP pull-downにより精製した卵細胞膜タンパク質のSDS-PAGE (左;野生型、右;卵細胞膜マーカーライン)

同定タンパク質のうち、マーカーラインのみで検出されたもの、もしくは同定ペプチド数が野生型に比べて顕著に多いタンパク質を9種、機能解析の候補として選抜した。このうち、7種のタンパク質には1つ以上の推定膜貫通領域が存在した (SOSUI データーベース検索による)。これら同定されたタンパク質について、それぞれのコード遺伝子のT-DNA 挿入変異体の種子を取り寄せ、表現型を調査した。T-DNA 挿入変異体がないものについては、随時 RNAi によって発現を低下させた形質転換体を作成して、生殖細胞の発生や受精における表現型を調査する予定である。

調査した T-DNA 挿入変異体のうち、種子稔性が著しく低下した植物体が1種見出された。この変異体は、TIR-NBS-LRR (Toll-interleukin-1 receptor-like domain - Nucleotide binding site - Leucine rich repeat)クラスに属するタンパク質 (をコードする遺伝子が破壊された変異体、と登録されているものである)。

今後はこの TIR-NBS-LRR について、分子生物学的および形態学的な解析をすすめ、受精における機能を評価していく。

## 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2件)

- ① Tomoko Igawa, Yuki Yanagawa, Shin-ya Miyagishima and Toshiyuki Mori、Analysis of gamete membrane dynamics during double fertilization of Arabidopsis、Journal of Plant Research、査読有、126 巻、2013、387-394

DOI:10.1007/s10265-012-0528-0

- ② Tomoko Igawa, Toshiyuki Mori、Gamete membrane dynamics during double fertilization in Arabidopsis、Plant Signaling Behavior、査読なし、8 巻、2013、in press  
<http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/24512/>

[学会発表] (計1件)

- ① Tomoko Igawa, Toshiyuki Mori、Live cell imaging analysis of gamete membrane behavior during double fertilization of Arabidopsis、International Symposium on the Mechanisms of sexual Reproduction in Animals and Plants、Nov.12-16th, 2012, Hotel Nagoya Garden Palace

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井川 智子 (IGAWA TOMOKO)  
千葉大学・大学院園芸学研究所・助教  
研究者番号：00360488

### (2) 研究協力者

山田 力志 (YAMADA LIXY)  
名古屋大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号：10551020  
森 稔幸 (MORI TOSHIYUKI)  
早稲田大学・高等研究所・助教  
研究者番号：00462739