

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770036  
 研究課題名（和文） 花粉のオルガネラ可視化系を用いた新しいオルガネラ研究法の開発  
 研究課題名（英文） **Organelar dynamics in plant male gametophyte visualized by fluorescent live imaging**  
 研究代表者  
 松島 良 (MATSUSHIMA RYO)  
 岡山大学・資源生物科学研究所・助教  
 研究者番号：80403476

## 研究成果の概要（和文）：

半数体細胞である花粉におけるオルガネラ可視化形質転換体を作成した。この植物体を用いて、従来の方法では遺伝学的に単離不可能であったホモ接合体だと致死になる突然変異体の単離方法を構築した。また、花粉の精細胞のミトコンドリアを可視化できる植物体を作成し、受精時におけるライブイメージング解析を行った。その結果、精細胞と卵細胞ならびに中央細胞とが融合する瞬間におけるミトコンドリアのダイナミックな挙動を世界で初めて捕らえることに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

Combination of mitochondria-targeted fluorescent proteins with vegetative or sperm cell-specific expression allowed us to observe precise number and dynamic behavior of mitochondria in the respective cell types. Furthermore, live imaging analysis showed that sperm mitochondria enter into egg and central cells. We showed that the transgenic materials constructed in this project are useful for not only live imaging but also studying mitochondrial functions by mutant analysis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：オルガネラ、生殖、蛍光タンパク質、ライブイメージング解析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来のオルガネラ可視化植物では、主に

葉や茎などの体細胞においてのみオルガネラが可視化されていた。これまでにvisual screeningで単離されたオルガネラの形態や機能に異常を示す変異体は、植物個体自体にはそれほど大きな異常を示さないことが多かった。これは、「オルガネラの重要な機能に関与する遺伝子に欠損が生じた変異体は致死になり単離できない」という順遺伝学的手法の限界を示唆している。この事は、オルガネラ機能に深く関与することが分かっている遺伝子のノックアウト変異体の多くが、ホモ接合体では胚致死になるという逆遺伝学的な解析結果からも支持される。変異の多くは劣性であり、変異の影響(つまり表現型)を観察するためにはホモ接合体を得る必要があり、従来の体細胞における可視化植物ではこの問題は解決できなかった。

(2) 被子植物の受精は子房内部で行われるために観察するのが難しく、受精時の精細胞の挙動をライブイメージング解析した研究例は少ない。特に精細胞のオルガネラの挙動を追跡した研究例は過去に無い。ミトコンドリアはほぼすべての被子植物で母性遺伝することが知られており、精細胞のミトコンドリアがどの段階で排除されるかという問いは、ミトコンドリアの遺伝様式決定機構という観点からも興味深い研究領域である。

## 2. 研究の目的

(1) 従来単離することが困難であったオルガネラ関連の新奇変異体の単離法を構築し、オルガネラ研究のための新しい方法論を提唱する。

(2) 従来観察が不可能であった受精時における花粉ミトコンドリアのライブイメージング解析を行い、新知見を得る。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究で用いる可視化植物は、花粉という半数体細胞でオルガネラを可視化できる。この利点により、劣性変異のヘテロ接合体(体細胞で表現型が観察できない個体)においても、花粉で表現型が観察できる。ヘテロ接合体において表現型が観察できるということは、ホモ接合になると胚致死になる変異体でも、順遺伝学的なスクリーニングによってヘテロ接合体として回収できることを意味する。これは、「従来単離する事が不可能であった”オルガネラの重要な機能に関与する遺伝子に欠損が生じた変異体”の単離を可能にする新しい変異体単離方法である。本研究では上記のアイデアをもとに、可視化植物の種子を突然変異誘発処理し、当代植物(ヘテロ接合)の花粉をvisual screeningすることにより新奇変異体の単離を行った。

(2) 研究代表者は、花粉の精細胞で特異的に発現するプロモーターを用いて精細胞特異的にミトコンドリアを可視化することに成功した。この可視化植物を用いることで精細胞のミトコンドリアの受精時ならびに受精後の挙動を追跡し、新しい知見を得ることを目指した。

## 4. 研究成果

(1) 半数体細胞である花粉におけるオルガネラ可視化形質転換体を作成した(図1)。

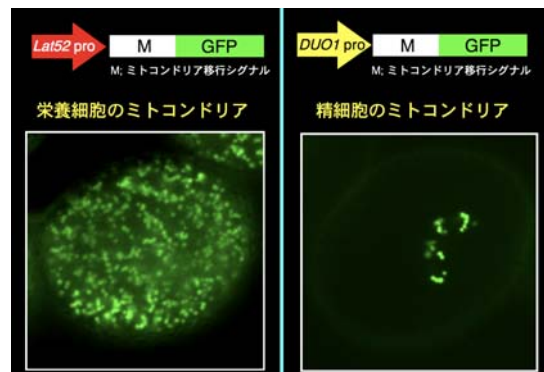


図1

これらの植物を用いることで、ヘテロ接合体

においても変異の表現型が観察できる系を構築した。その結果、ホモ接合体だと致死になるミトコンドリア蛋白質輸送に関わる新奇の変異体を順遺伝学的に単離することに成功した(図2)。

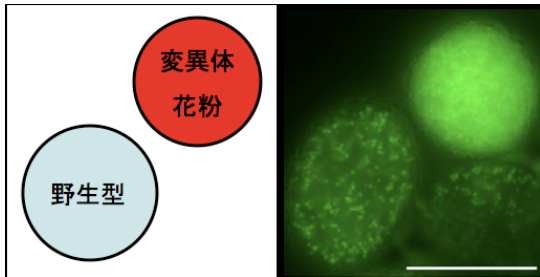


図2

(2) シロイヌナズナの精細胞のミトコンドリアを可視化できること植物体を作成し、受精時のライブイメージング解析を行った。その結果、シロイヌナズナの精細胞には約8個のミトコンドリアが含まれており、これらは受精時に卵細胞ならびに中央細胞に伝達されることを証明した。また、接合体に侵入した精細胞由来のミトコンドリアは最終的に分解される可能性を示した(図3)。植物の接合体における雄由来のミトコンドリアの積極的分解は、ミトコンドリアの母性遺伝現象(母親のみから遺伝すること)を保証する機構として機能している可能性があり、新知見であった。

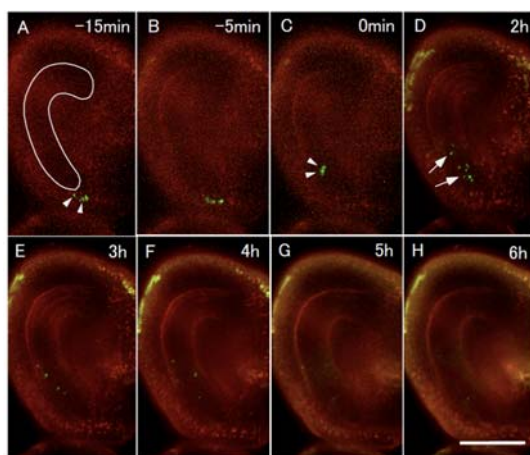


図3

(3) 花粉の栄養細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用し、シロイヌナズナの

栄養細胞の色素体を可視化できる植物体(*VC-ptGFP*)を作成した。*VC-ptGFP*植物体と花粉ミトコンドリアをRFPで可視化できる植物体とを交配し、花粉においてミトコンドリアと色素体を別々の蛍光タンパク質により、同時に可視化できる系を開発した。また、シロイヌナズナの葉緑体分裂異常変異体(*ftsZ*変異体)と*VC-ptGFP*植物体とを交配し、*ftsZ*変異体の花粉での色素体の分裂異常の有無について調べた。その結果、葉緑体ほどではないが花粉の色素体においても分裂異常が引き起こされていることが分かった。花粉の色素体は、チラコイド膜はほとんど発達しておらず、デンプンを蓄積しているアミロプラスト様構造であった。本結果より、葉の葉緑体と花粉の色素体(アミロプラスト)の分裂機構が一部重複している可能性が示唆された。

## 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4件)

① Nakano, R. T., Matsushima, R., Ueda, H., Tamura, K., Shimada, T., Li, L., Hayashi, Y., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. GNOM-LIKE1/ERM01 and SEC24a/ERM02 are required for maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 査読有, Vol. 21, 2009, 3672-3685

② Tang, L. Y., Nagata, N., Matsushima, R., Chen, Y., Yoshioka, Y., Sakamoto, W. Visualization of plastids in pollen grains: Involvement of FtsZ1 in pollen plastid division. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, Vol. 50, 2009, 904-908

③ Matsushima, R., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Arimura, S.-i., Sodmergen, Tsutsumi, N., Sakamoto, W. Mitochondrial dynamics in plant male gametophyte visualized by fluorescent live imaging. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, Vol. 49, 2008, 1074-1083

④ Matsushima, R., Hu, Y., Toyoda, K., Sodmergen, Sakamoto, W. The model plant *Medicago truncatula* exhibits biparental plastid inheritance. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, Vol. 49, 2008, 81-91

[学会発表] (計 8 件)

① 松島 良・前川雅彦・藤田直子・山下 純・坂本 亘 : デンプン粒の形状多様性を支配する分子機構の解明にむけて. 植物細胞生物学若手の会, 12月21日-22日, 2009, 奈良

② 坂本 亘・松島 良 : 植物の雄性配偶体形成におけるオルガネラDNAのダイナミクス. 第81回日本遺伝学会, 9月16日-18日, 2009, 松本

③ 中野亮平・松島 良・上田晴子・林八寿子・田村謙太郎・嶋田知生・西村いくこ : 小胞体の形態と細胞内分布に異常を示す

*endoplasmic reticulum morphology (ermo)* 変異体の解析, 第50回日本植物生理学会年会, 3月21日-24日, 2009, 名古屋

④ 松島 良・Lay Yin Tang・蘇都莫日根・David Twell・坂本 亘 : 花粉においてオルガネラDNAの分解を担う遺伝子の単離と解析. 第50回日本植物生理学会年会, 3月21日-24日, 2009, 名古屋

⑤ Nakano, T. R., Matsushima, R., Ueda, H., Hayashi, Y., Tamura, K., Shimada, T. and Hara-Nishimura, I. *endoplasmic reticulum morphology (ermo)* mutants of *Arabidopsis thaliana* develop a number of novel

ER-derived structures in the cells. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同学会. 12月9日-12日, 2008, 神戸

⑥ 松島 良・坂本 亘 : 花粉における細胞質ゲノムの分解機構に関する研究. 国立遺伝学研究所研究集会「高等植物の生殖過程を制御する因子と生殖隔離」, 11月5日-6日, 2008, 三島

⑦ Matsushima, R., Hamamura, Y., Higashiyama, T. and Sakamoto, W. Mitochondrial dynamics in plant male gametophyte studied by fluorescent live imaging. *Frontiers of Sexual Plant Reproduction III.*, USA, October 17-19, 2008, Arizona

⑧ Tang, L. Y., Matsushima, R. and Sakamoto, W. : Pollen organellar DNA retention in ribonucleotide reductase mutants of *Arabidopsis*. 第49回日本植物生理学会年会, 3月19日-22日, 2008, 札幌

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/saka/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松島 良 (MATSUSHIMA RYO)  
岡山大学・資源生物科学研究所・助教  
研究者番号 : 80403476