

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650094

研究課題名(和文) 雌性配偶体の細胞特異的遺伝子発現誘導系を用いた有性生殖過程の核融合機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of nuclear fusion during plant reproduction using gametophyte cell-specific gene induction systems

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、熱ショックによるCre-loxP部位特異的組換えの誘導と、雌性配偶体特異的プロモーターを組み合わせた遺伝子発現誘導系を構築し、雌性配偶体形成過程の極核融合を解析するための新たな実験系として、シロイヌナズナ雌しべ内の雌性配偶体を対象とした時期特異的・細胞特異的な遺伝子発現誘導法を開発した。得られた形質転換植物の花芽全体の熱処理で、雌性配偶体特異的な遺伝子発現が誘導されること、単離した胚珠への赤外線照射による遺伝子発現誘導が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a new gene induction method, which allows cell-specific gene induction in Arabidopsis female gametophytes using heat shock-induced Cre-loxP recombination and female gametophyte-specific promoters. Female gametophyte-specific gene expressions were induced by heat treatment of flower buds of constructed transgenic lines. We also showed induction of cell-specific gene expression by irradiating isolated female gametophytes with the infrared laser. The developed method will be a good tool to analyze functions of proteins involved in the fusion of polar nuclei during female gametophyte development.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：核膜融合 有性生殖 遺伝子発現誘導系 シロイヌナズナ 配偶体

1. 研究開始当初の背景

細胞核の融合は、さまざまな生物の有性生殖で必須の役割をはたす過程である。シロイヌナズナなどの有性生殖過程では、雌性配偶体中央細胞に存在する2個の極核の融合と重複受精における2回の核融合の、合計3回の核融合が観察される。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。

研究代表者らは、小胞体の分子シャペロン Hsp70 である BiP に関するシロイヌナズナ変異体の解析から、極核の核膜融合には中央細胞における BiP の機能が必要であることを明らかにした。しかし、BiP の機能が必要なのは極核融合のどのタイミングか、BiP は重複受精の核融合でも必要かなどは不明である。その理由のひとつに、これまでの解析は変異株の表現型解析に留まっており、雌性配偶体形成のさまざまな時期特異的に、特定の細胞で BiP の機能欠損を誘導する実験系がないことが挙げられた。

単一細胞において任意のタイミングで遺伝子発現誘導を制御する IR-LEGO (infrared laser-evoked gene operator) 法は、赤外線レーザー照射により細胞を暖め、熱ショックプロモーター下流の遺伝子の発現誘導を行う手法であり、シロイヌナズナを含む多くの生物に適用可能である。

2. 研究の目的

本研究では、IR-LEGO 法を進展させ、シロイヌナズナの雌性配偶体を対象に、細胞特異的、時期特異的な遺伝子発現誘導系を開発することを目的とする。そして、構築した遺伝子発現誘導系を用いて、極核融合で BiP を必要とする時期を明らかにするとともに、受精時の核融合における BiP の関与の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 雌性配偶体の細胞特異的な遺伝子発現誘導実験系の構築

本研究では次の2種類を構築した。

熱ショックによる遺伝子発現誘導系 (図 1a)

IR-LEGO 法を用いて雌性配偶体の中央細胞特異的に遺伝子発現を誘導するための実験系である。標的遺伝子は、IR-LEGO に実績のある Hsp18.2 プロモーターの下流に Gateway 法を用いて導入する。組換え遺伝子には、ターゲットとなる中央細胞の可視化 (レーザー照射時の目印となる) と極核融合過程の解析のため、中央細胞特異的な DD65 プ

ロモーターによって Histone H2B-GFP を発現するコンストラクトが導入してある。

熱ショックによる細胞特異的な遺伝子発現誘導系 (図 1b)

Cre-loxP 部位特異的な組換えを利用して、花芽全体の熱処理によって雌性配偶体の細胞特異的に遺伝子発現を誘導する実験系である。この組換え遺伝子中には雌性配偶体特異的なプロモーター (図では中央細胞特異的な DD65 プロモーターを例に示している) の下流に loxP-Histone H2B-GFP-loxP 遺伝子と標的遺伝子 (Gateway 法で導入する) がタンデムに存在する。この組換え遺伝子は、熱処理によって Cre が誘導される pHsp18.2-Cre 遺伝子をもつシロイヌナズナ株 (HS-Cre 株) に導入する。得られた形質転換植物では配偶体特異的なプロモーターによって Histone H2B-GFP が発現し、雌性配偶体の核が GFP

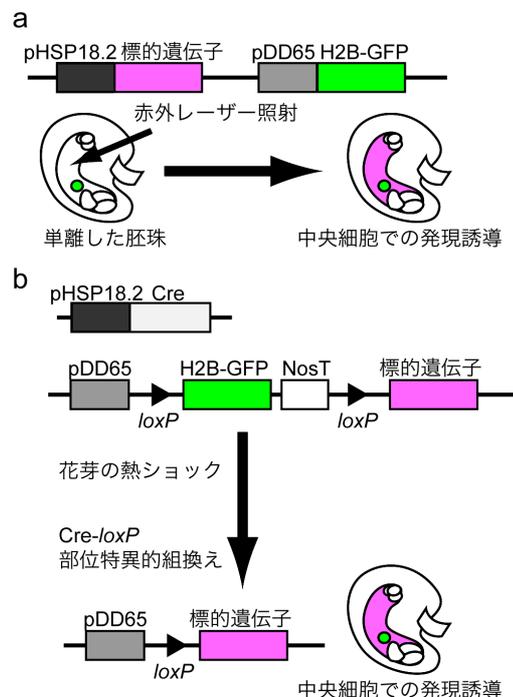


図 1 本研究で構築する遺伝子発現誘導系

(a) 熱ショックによる遺伝子発現誘導系

(b) 熱ショックによる細胞特異的な遺伝子発現誘導系

どちらの発現系でも、Histone H2B-GFP

(H2B-GFP) で中央細胞の核が可視化される。

で可視化される。この植物の花芽を熱処理すると、Cre-loxP 部位特異的な組換えが誘導されて標的遺伝子が発現する。

(2) 遺伝子発現誘導法

IR-LEGO を利用する手法では、作製した形質転換植物より雌性配偶体を摘出し、これを培地中に入れ、IR-LEGO 用顕微鏡システム (基礎生物学研究所光学解析室の機器を、研究協力者である基礎生物学研究所亀井保博特任准教授、岐阜聖徳学園大学浦和博士准

教授との共同研究で利用した)を用いて赤外レーザー照射することで行った。Cre-loxP 部位特異的組換えを利用した実験系では、直接花芽を熱処理する手法での発現誘導も行った。本研究では、蛍光タンパク質遺伝子を標的遺伝子として利用し、発現誘導後の雌性配偶体の共焦点顕微鏡解析によって、標的遺伝子の発現を検出した。

4. 研究成果

(1) 雌性配偶体の細胞特異的な遺伝子発現誘導実験系の構築

本研究ではまず、標的遺伝子に tagRFP を用いて、熱ショックによる遺伝子発現誘導系(図 1a)の構築を行った。作製したシロイヌナズナ形質転換体の芽生えの根を用いて IR-LEGO による遺伝子発現誘導を試みたところ、赤外レーザー照射後 8~14 時間で tagRFP の発現が観察された。この株より単離した胚珠を用いた、IR-LEGO による遺伝子発現誘導も試みた。しかし、雌性配偶体の中央細胞付近で観察される自家蛍光のため、発現の誘導を検出することは困難であった。

この遺伝子発現誘導系は熱ショックによって植物体全体で遺伝子発現が誘導されるため、配偶体特異的な遺伝子発現誘導の検討が可能な手法は IR-LEGO のみであり、この手法は常に利用可能な状況にはなかった。そこで本研究では、雌性配偶体における遺伝子発現誘導条件の検討を効率よく進めるため、熱ショックによる細胞特異的遺伝子発現誘導系(図 1b)を用いることとした。

熱ショックによる細胞特異的遺伝子発現誘導系では、配偶体特異的プロモーターとして、中央細胞特異的プロモーター(DD65、AGL80、AGL61) 助細胞特異的プロモーター(DD31、MYB98) および、配偶体細胞特異的プロモーター(ES2)を使用した。発現誘導条件の検討には、中央細胞付近の自家蛍光の波長とは異なる GFP の誘導体を標的遺伝子に利用することとした。誘導前の細胞で Histone H2B-GFP が発現している。そこで、これとは細胞内局在が異なるミトコンドリア局在型 GFP (mtGFP) を標的遺伝子とする組換え遺伝子を作製し、これを導入した HS-Cre 株を構築した。

作製した株より胚珠を単離し、共焦点顕微鏡解析を行った結果、各プロモーターの細胞特異性と一致した細胞で、Histone H2B-GFP により細胞核が可視化されることが示された。また、非誘導時の胚珠では mtGFP の発現は観察されなかった。ES2 プロモーターを用いた場合、雌性配偶体形成初期からの遺伝子発現誘導が可能であることが示唆された。このため、以降は、ES2 プロモーターを使用して配偶体特異的な遺伝子発現誘導条件の

検討を行った。

(2) 遺伝子発現誘導条件の検討

花芽全体の熱処理による誘導

遺伝子発現誘導は、35 °C の水中に花芽全体を 30 分間浸すことで行った。熱処理 16 時間後に胚珠を摘出し、共焦点顕微鏡解析を行った結果、雌性配偶体の細胞全体で mtGFP の発現が観察された(図 2)。この結果は雌性配偶体においても熱ショックによる Cre-loxP 部位特異的組換えが誘導されること、花芽の熱処理自体は雌性配偶体形成や遺伝子発現に影響を与えないことを示している。

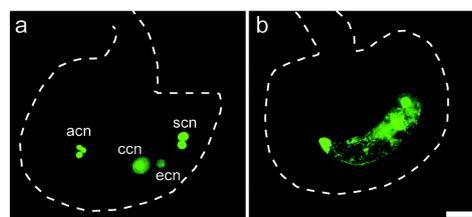


図 2 雌性配偶体特異的な遺伝子発現誘導

(a) 熱処理前 (b) 熱処理後の胚珠の共焦点顕微鏡像を示す。破線は胚珠の輪郭を示す。熱処理前の胚珠では Histone H2B-GFP (H2B-GFP) によって雌性配偶体の核 (ecn: 卵細胞核、ccn: 中央細胞核、scn: 助細胞核、acn: 反足細胞核) が可視化される。熱処理後には、ミトコンドリア局在型 GFP の発現による顆粒状の蛍光が雌性配偶体全体で観察される。スケールバー: 20 μm

IR-LEGO を用いた遺伝子発現誘導

IR-LEGO を用いた遺伝子発現誘導では、生存率を保ったまま胚珠を長時間培養することが必須であった。当初は、植物用の培地として一般的な Murashige-Skoog 培地を使用していたが、この培地では生存率の顕著な低下なしに培養可能な時間は 7 時間程度であった。このため種々の培地を検討した結果、Gooh et al. (2015) の培地を使用することで 1 日以上培養可能であることが示された。

IR-LEGO 用顕微鏡システムを用いて、細胞化前の雌性配偶体に赤外レーザー照射を行ったところ、成熟した雌性配偶体全体での mtGFP の発現が観察された。この結果は、赤外レーザー照射自体は雌性配偶体形成を阻害しないことを示している。また、成熟後の雌性配偶体の中央細胞に赤外レーザー照射を行ったところ、中央細胞特異的な mtGFP の発現が観察され、細胞特異的な遺伝子発現誘導が可能であることが示された。

(3) 極核融合における BiP の機能解析への応用

Cre-loxP 部位特異的組換えを利用した遺伝子発現誘導を行うために、BiP 変異株に HS-Cre 遺伝子を掛け合わせによって導入した。現在、この株に ES2 プロモーターによ

て *BIP* 遺伝子の誘導が可能なコンストラクトを導入している。また、*BiP* に関する優性欠損変異体を発現するコンストラクトも作製し、これを *HS-Cre* 株へと導入している。形質転換植物が確立したところで、花芽の熱処理および *IR-LEGO* による遺伝子発現誘導を行い、極核融合および受精時の核融合における *BiP* の機能解析を行う計画である。

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 5 件)

Maruyama, D., Endo, T., and Nishikawa, S. (2015) *BiP3* supports the early stages of female gametogenesis in the absence of *BiP1* and *BiP2* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 10: e1035853 doi:10.1080/15592324.2015.1035853、査読有

Maruyama, D., Völz, R., Takeuchi, H., Mori, T., Igawa, T., Kurihara, D., Kawashima, T., Ueda, M., Itoh, M., Umeda, M., Nishikawa, S., Groß-Hardt, R., and Higashiyama, T. (2015) Rapid elimination of the persistent synergid through a cell-fusion for polytubey block. *Cell* 161: 907-918 doi:10.1016/j.cell.2015.03.018、査読有

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 doi:10.1093/pcp/pcu120、査読有
Maruyama, D., Sugiyama, T., Endo, T., and Nishikawa, S. (2014) Multiple *BiP* genes of *Arabidopsis thaliana* are required for male gametogenesis and pollen competitiveness. *Plant Cell Physiol.* 55: 801-810 doi:10.1093/pcp/pcu018、査読有

[学会発表](計 9 件)

Shuh-ichi Nishikawa, Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama and Toshiya Endo. "Premitotic sperm nuclear fusion is required for proper endosperm proliferation in *Arabidopsis thaliana*." The 24th International Congress on Sexual Plant Reproduction. 2016 年 3 月 21 日 Tucson Marriott University Park Tucson (米国)

西川周一、丸山大輔、山口友輝、東山哲也、遠藤斗志也「小胞体分子シャペロン

による植物有性生殖過程の核膜融合の制御」BMB2015 2015 年 12 月 4 日 神戸ポートアイランド、兵庫県

宇治周平、梶山智晴、神原秀記、西川周二「シロイヌナズナの花粉成熟過程の薬における小胞体分子シャペロンの発現解析」日本植物学会第 79 回大会 2015 年 9 月 8 日 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター、新潟県

西川周一、加藤詩織、杉山智之、野元美佳、多田安臣、山本雅也、遠藤斗志也「シロイヌナズナ小胞体品質管理欠損株は特異的な細胞膜受容体様キナーゼの機能欠損のため花粉成熟が異常となる」第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 30 日 タワーホール船堀、東京都

加藤詩織、杉山智之、野元美佳、多田安臣、山本雅也、遠藤斗志也、西川周一「花粉形成過程に必要な受容体キナーゼの機能発現における *AtERdj3B* の役割の特異性」第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 16 日 東京農業大学世田谷キャンパス。東京都

Shuh-ichi Nishikawa, Daisuke Maruyama, Masaya Yamamoto, Tetsuya Higashiyama, and Toshiya Endo "Chaperone-dependent nuclear membrane fusion in *Arabidopsis* fertilization" KAAB International Symposium 2014 2014 年 9 月 29 日 新潟大学、新潟県

杉山智之、山本雅也、遠藤斗志也、西川周一「小胞体品質管理による花粉成熟過程の高温ストレス耐性機構の解析」日本植物学会第 78 回大会 2014 年 9 月 13 日 明治大学生田キャンパス、神奈川県

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究協力者

亀井 保博 (KAMEI, Yasuhiro)
基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授
浦和 博子 (URAWA, Hiroko)
岐阜聖徳学園大学・教育学部・准教授
山口 友輝 (YAMAGUCHI, Yuki)
新潟大学・大学院自然科学研究科・大学院生
和田 敏実 (WADA, Satomi)
新潟大学・大学院自然科学研究科・大学院生