

令和元年6月18日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07394

研究課題名(和文)シロイヌナズナ有性生殖過程の核膜融合機構の解析

研究課題名(英文)Mechanisms of nuclear membrane fusion during Arabidopsis reproduction

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：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、ここでは核膜の融合が必須となっている。本研究では、ライブイメージング解析と雌性配偶体特異的遺伝子発現誘導系を用いて、シロイヌナズナ有性生殖過程の核膜融合機構の解析を行った。その結果、小胞体分子シャペロンHsp70システムが、極核融合と精核融合の両方に必要であることを明らかにするとともに、受精とカップルした精核融合が正常な胚乳形成に必要なことを示した。また、極核の核膜融合過程で発現し機能する核膜タンパク質を同定するとともに、それらの機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体Hsp70システムが極核融合だけでなく受精時の精核融合でも核膜融合に必要なことが示され、シロイヌナズナ有性生殖過程で観察される核膜融合の分子機構には共通性があることが示唆された。核膜融合装置の実体はこれまで不明であったが、本研究によって核膜融合に必要な核膜タンパク質が複数同定された。これらを足がかりとした解析によって、核膜融合装置の解明が進むと期待される。また、体細胞ではほとんどおこらない核融合が、有性生殖過程では効率よく進行するメカニズムが明らかになることで、細胞融合による体細胞雑種作出の効率化などの応用面での展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：During the life cycle of angiosperms, nuclear fusion occurs three times. Two of these nuclear fusion events are sperm nuclear fusion events that occur during double fertilization. The third nuclear fusion is the polar nuclear fusion during female gametogenesis. These nuclear fusion events require the nuclear membrane fusion processes to complete. In this study, we analyzed mechanisms of nuclear membrane fusions during Arabidopsis reproduction using live-cell imaging and the newly-developed female gametophyte-specific gene induction system. We showed that the Hsp70 molecular chaperone system in the endoplasmic reticulum is required for nuclear membrane fusion in the sperm nuclear fusion process in addition to the polar nuclear fusion. We also showed that fertilization-coupled sperm nuclear fusion is essential for proper endosperm proliferation after fertilization. We identified two nuclear membrane proteins that are required for nuclear membrane fusion events during polar nuclear fusion.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：有性生殖 核融合 雌性配偶体 重複受精 膜融合 シロイヌナズナ ライブイメージング 遺伝子発現誘導系

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 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、シロイヌナズナでは小胞体内腔の分子シャペロン Hsp70 である BiP と、その制御因子である小胞体内腔の J タンパク質

(ERdj3A、ERdj3B、P58<sup>PK</sup>) からなる Hsp70 システムが、雌性配偶体形成時の極核の核膜融合過程に必要であることを明らかにした。そして、極核の核膜融合は核外膜融合と核内膜融合という2回の膜融合過程に分けられること、核外膜融合では ERdj3A と P58<sup>PK</sup>、核内膜融合では ERdj3B と P58<sup>PK</sup> が BiP の制御因子として機能していることを明らかにした。また、*erdj3a p58<sup>pk</sup>* 二重欠損の雌性配偶体の中央細胞では、受精時の精核と中央細胞核の融合も欠損することも見いだした。この結果は、受精時の精核融合にも小胞体 Hsp70 システムが関与することを示唆している。一方で、ERdj3B は精核融合にも必要であるのか、卵細胞における精核融合でも Hsp70 システムが必要なのかなど、不明な点が残されている。

核膜は小胞体膜の特殊化した領域であり、小胞体の Hsp70 システムは核膜局在の膜融合タンパク質をクライアントとし、その機能を調節することで核膜融合を制御していると考えられる。このような核膜融合タンパク質は現在未同定であるが、われわれは極核融合に関与する核膜融合タンパク質の候補として、Gex1 と SUN タンパク質を見いだした。これら因子が欠損した雌性配偶体では、極核融合が欠損する。これら膜タンパク質と小胞体 Hsp70 システムは、植物の有性生殖過程での核膜融合機構解明の足がかりとなるものである。

植物の有性生殖過程での核融合の解析は、これまで変異株の表現型解析が中心であり、特定の時期や細胞における核融合因子の機能解析を行うことは困難であった。われわれは最近、雌性配偶体を用いた遺伝子発現誘導系を開発した。この手法では、花序全体の熱ショック処理によって雌性配偶体全体で効率よく遺伝子発現が誘導できることを示している。

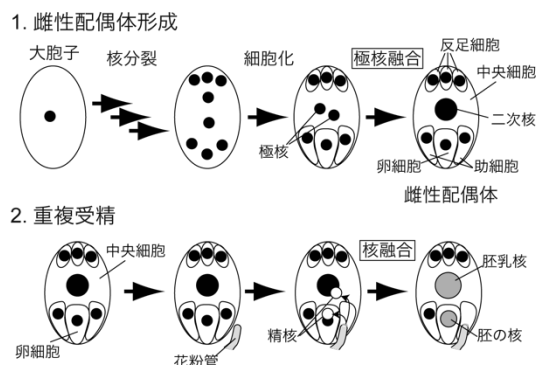


図1 シロイヌナズナの有性生殖過程で観察される核融合

### 2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナの有性生殖における核膜融合の解明を目指し、われわれがこれまでに同定した核膜融合因子の機能を、変異株や優性欠損変異体の発現誘導系を用いて解析する。具体的には、以下の因子について解析を行う。

- 1) 小胞体 Hsp70 システム
- 2) Gex1 タンパク質
- 3) SUN タンパク質

### 3. 研究の方法

#### (1) ライブイメージングによる雌性配偶体形成過程の核動態の解析

形成過程(4核期~8核期)の雌性配偶体をもつ胚珠を雌しべから摘出し、胚珠培養培地(Gooh et al., 2015)に入れた。これをスピニングディスク型共焦点装置(Yokogawa CSU-W1 または CSU-X1)を設置した倒立型顕微鏡を用いて、5分間隔で16~20時間のタイムラプス撮影(GFP 蛍光または tdTomato 蛍光)を行った。

#### (2) 雌性配偶体特異的遺伝子発現誘導系を用いた解析

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)。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い、極核融合に対する標的遺伝子の発現の影響を検討した。

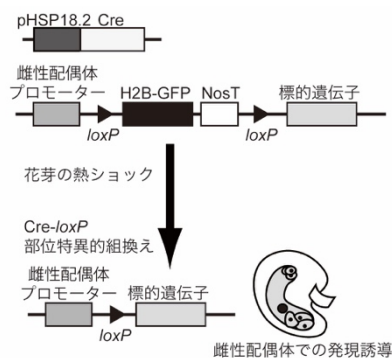


図2 雌性配偶体特異的遺伝子発現誘導系  
熱ショック前は Histone H2B-GFP (H2B-GFP) で雌性配偶体の核が可視化される。熱ショックにより Cre が発現し、Cre-loxP 部位特異的組換えがおり、雌性配偶体で標的遺伝子の発現が誘導される。

#### 4. 研究成果

##### (1) 極核融合過程のライブイメージング解析

シロイヌナズナ雌性配偶体形成過程の極核融合のライブイメージング解析を行い、この過程に欠損を持つ変異株が示す異常の詳細を明らかにすることを目的とした。雌性配偶体の核は RPS5A プロモーターによって Histone H2B-tdTomato を発現することで可視化した。極核融合過程の観察では、形成過程の 4~8 核期の雌性配偶体をもつ胚珠を胚珠培養培地で培養しながら、共焦点顕微鏡を用いて 5 分間隔のタイムラプス観察を 16~20 時間行った。解析の結果、以下のことが明らかとなった。

- ① 極核融合過程は 2 つの極核の接近と核膜融合の 2 つの過程に分けられる。
- ② 極核の接近過程は雌性配偶体における 3 回目の核分裂終了から 1.5 時間程度後に開始し、接近開始後 1.5~2 時間で 2 つの極核が接触する。
- ③ 核膜融合の完了には極核の接触後 5~9 時間かかる。また、2 つの極核は接触後にサイズの拡大が観察された。極核の接触をきっかけとする何らかの核内構造の変化が示唆される。

極核接触後の核内構造の変化に関する情報を得るため、極核融合過程での細胞周期と中央細胞特異的遺伝子発現のライブイメージング解析を行った。細胞周期マーカー株として pPCNA1::PCNA1-sGFP 株 (東京理科大学 松永幸大博士から分与) を使用した。この株の体細胞では S 期の核内でドット・スペckル様の蛍光が観察されることが報告されている。雌性配偶体のタイムラプス観察の結果、3 回目の核分裂直後から極核接触前の雌性配偶体の核でドット様の蛍光が観察された。この結果は、雌性配偶体形成過程では 3 回目の核分裂の後すぐに細胞周期が S 期に進行していることを示唆している。中央細胞特異的遺伝子発現の解析は、中央細胞特異的プロモーターである DD65 プロモーターによって Histone H2B-GFP を発現する株を使用した。タイムラプス観察の結果、Histone H2B-GFP のシグナルは細胞化後の完了から 3 時間程度で検出されはじめた。この時期は極核の接近から接触の過程に対応していた。これらの結果は、中央細胞特異的な遺伝子発現は、細胞化完了後比較的早期に開始することを示している。極核接触後に観察された極核のサイズの拡大は、中央細胞が S 期~G2 期に入り、中央細胞特異的な遺伝子発現が開始した後におこっていると考えられる。

われわれは、極核の核膜融合過程に、小胞体の Hsp70 である BiP が制御因子である小胞体 J タンパク質 (ERdj3A, ERdj3B, P58<sup>IPK</sup>) とともに機能することを報告している。また、ERdj3A と P58<sup>IPK</sup> の両方を欠損すると極核の核外膜融合が、ERdj3B と P58<sup>IPK</sup> の両方が欠損すると極核の核内膜融合が欠損する。極核融合過程のライブイメージング解析の結果、これらの変異株を用いた極核の接近過程には異常を示さないことが示された。また、融合しなかった極核は接触したままで核のサイズの拡大が観察された。この結果は、極核のサイズ拡大は極核融合の完了とは独立した現象であることを示唆している。

##### (2) 受精時の精核融合における小胞体 Hsp70 システムの役割の解析

小胞体 Hsp70 システムに関する変異株のうち、BiP 欠損変異、および、ERdj3A と P58<sup>IPK</sup> の二重欠損変異を持つ雌性配偶体は、野生株の花粉管で受精した場合でも、受精後の胚乳形成が異常となり種子は致死となる。ライブイメージング解析の結果、これが中央細胞における精核融合の欠損によるためであることを見いだした。中央細胞では精核融合が欠損しても胚乳核分裂は開始するが、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、この結果胚乳核分裂が異常となることが示された。また、電子顕微鏡解析の結果、精核融合の欠損は精核と中央細胞核の核外膜の融合過程の欠損のためであることが示された。

BiP 欠損変異をもつ雌性配偶体を野生株の花粉管で受精した場合、中央細胞に加えて卵細胞でも受精時の精核融合欠損が観察された。卵細胞における精核融合欠損は中央細胞特異的な BiP1 の発現によっては回復しなかった。中央細胞の場合とは異なり、BiP 欠損変異の卵細胞では受精後数時間で精核と卵細胞核との融合が観察されたことから、卵細胞核の精核融合能は完全には失われず、初期胚発生も進行することが示された。

##### (3) 新規核膜融合因子 Gex1 の解析

シロイヌナズナ Gex1 は出芽酵母の核膜融合因子 Kar5 のホモログと考えられる。これまでの解析の結果、gex1 変異を持つ雌性配偶体は極核融合欠損を示すことが明らかとなっていた。本研究ではまず、電子顕微鏡解析によって、これが核外膜の融合以降のステップの欠損であることを明らかにした。また、gex1 変異の雌性配偶体は極核の移動過程には欠損を示さないことも、ライブイメージング解析によって明らかとなった。gex1 変異をもつ雌性配偶体と花粉管同士の受精後の胚珠の解析から、Gex1 が極核融合に加えて、中央細胞と卵細胞の両方で受精時の精核融合に関与していることを明らかにした。上記の結果から、Gex1 の機能は有性生殖過程の 3 回の核融合すべてに必要なことが示された。

本研究ではまた、Gex1 の局在および動態解析を行った。このため、GEX1 プロモーターによって GFP-Gex1 を発現する株を作製し、胚珠の共焦点顕微鏡観察を行った。その結果、雌性配偶体では Gex1 は卵細胞と中央細胞特異的に発現し、核膜に局在することが示された。また、Gex1 は核膜に一樣に広がっているのではなく、ドットが散在するように存在していることが示されたことから、何らかの複合体を形成していることが示唆される。また、ライブイメージング解析によって雌性配偶体形成過程の Gex1 の動態の観察を行った。Gex1 は 3 回目の核分裂後、

極核が接近する過程の中央細胞で観察されはじめた。卵細胞では中央細胞から少し遅れて *Gex1* の発現が観察された。*Gex1* は、発現直後は核膜全体に広がっていたが、極核融合が進むにつれて *Gex1* のドットが観察されるようになった。これらの結果は、*Gex1* が核膜融合過程に直接関与することを強く示唆する。

#### (4) 極核融合過程への SUN タンパク質の関与

SUN タンパク質は、真核細胞に広く存在する核内膜の内成膜タンパク質である。SUN タンパク質は、核外膜の KASH タンパク質と 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。われわれは、出芽酵母の SUN タンパク質である *Nep98/Mps3* が酵母接合時の核膜融合に関与することを、変異株の解析から明らかにした (Nishikawa et al., 2003)。シロイヌナズナ有性生殖過程の核融合への SUN タンパク質の関与が示唆されたが、シロイヌナズナの SUN タンパク質は多重遺伝子 (*SUN1*~*SUN5*) によってコードされるため、変異株を用いた解析は困難であった。

*SUN2* は、膜貫通領域を一つ持つ内在性膜タンパク質であり、内腔側の C 末端領域には KASH タンパク質との相互作用ドメインである SUN ドメインが存在する。最近、tagRFP と *SUN2* の C 末端領域の融合タンパク質 (*SUN2DN*) は、小胞体内腔側で過剰発現すると核膜における SUN-KASH 相互作用が阻害し、優性欠損変異体となることが報告された (Zhou et al., 2015)。そこで本研究では、われわれが構築した遺伝子発現誘導系を用いて形成過程の雌性配偶体で *SUN2DN* を発現することで、極核融合過程への SUN タンパク質の関与を検討した。

*SUN2DN* 発現誘導株の発達中 (4 核期~8 核期) の雌性配偶体を含む雌しべを熱処理し、成熟後の雌性配偶体の共焦点顕微鏡観察を行った。*SUN2DN* の発現が誘導された雌性配偶体では、接触した状態の 2 つの極核が観察された。一方で、*SUN2DN* が発現しなかった雌性配偶体や、未処理の雌しべの雌性配偶体では極核の融合によって二次核が形成した。この結果は、*SUN2DN* の発現誘導によって極核の移動過程は阻害されないが、核融合が阻害されることを示している。本研究では、SUN ドメインに変異を持ち KASH タンパク質と相互作用しない *SUN2DN* 変異体を用いた解析も行った。*SUN2DN* の場合とは異なり、*SUN2DN* 変異体の発現が誘導された雌性配偶体では極核融合の欠損は観察されなかった。以上の結果は、極核融合過程への SUN タンパク質の関与を示すものであり、これには KASH タンパク質との相互作用が重要な役割をはたしていることを示唆している。すなわち、極核融合過程への LINC 複合体の関与が示唆される。

シロイヌナズナ有性生殖過程の核膜融合の分子機構には未解明の点が多く、膜融合装置の実体は不明である。本研究の結果は、*Gex1* および LINC 複合体という核膜タンパク質が核膜融合因子であることを強く示唆するものである。これら因子を足がかりとした解析を進めることで、核膜融合装置の実体が明らかになっていくと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Imai, H., Abe, T., Miyoshi, T., Nishikawa, S., Ito, K., and Uchiumi, T. (2018) The ribosomal stalk protein is crucial for the action of the conserved ATPase ABCE1. *Nucleic Acids Res.* 46:7820-7830. doi: 10.1093/nar/gky619
- ② Arakawa, S., Yunoki, K., Izawa, T., Tamura, Y., Nishikawa, S., and Endo, T. (2016) Quality control of nonstop membrane proteins at the ER membrane and in the cytosol. *Sci Rep.* 6:30795. doi: 10.1038/srep30795

[学会発表] (計 10 件)

- ① 西川周一、鈴木千晴、河野慎、渡邊信久、遠藤斗志也「極核融合因子シロイヌナズナ *Gex1* タンパク質のシステインリッチドメインの構造と機能の解析」第 60 回日本植物生理学会年会 2019 年 3 月 13 日~15 日 名古屋大学東山キャンパス、愛知県
- ② 西川周一、宇治周平、坂本智昭、山本雅也、杉山智之、木村成介、遠藤斗志也「シロイヌナズナ小胞体品質管理変異株が高温ストレス下で示す花粉成熟異常の解析」日本植物学会第 82 回大会 2018 年 9 月 14 日 広島国際会議場、広島県
- ③ Shuh-ichi Nishikawa, Azusa Takahashi, Satomi Wada, Dukhyun Hwang, Hiroko Urawa, Yasuhiro Kamei “Development of a female gametophyte-specific gene induction system in *Arabidopsis thaliana*” 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction 2018 年 6 月 12 日 長良川コンベンションセンター、岐阜県
- ④ 鈴木千晴、山口友輝、西川周一 「シロイヌナズナの極核融合に関与する核膜タンパク質」第 59 回日本植物生理学会年会 2018 年 3 月 29 日 札幌コンベンションセンター、北海道
- ⑤ 高橋梓、和田敏実、亀井保博、浦和博子、西川周一 「シロイヌナズナ雌性配偶体の細胞特異的な遺伝子発現誘導システムの構築」第 59 回日本植物生理学会年会 2018 年 3 月 29 日 札幌コンベンションセンター、北海道
- ⑥ 西川周一、栗原大輔、丸山大輔、佐藤良勝、東山哲也「シロイヌナズナ極核融合欠損株のライブイメージング解析」第 58 回日本植物生理学会年会 2017 年 3 月 17 日 鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県

- ⑦ Shuh-ichi Nishikawa, Daisuke Kurihara Daisuke Maruyama, Yoshikatsu Sato, Tetsuya Higashiyama “Live Imaging Analyses of Polar Nuclear Fusion in Wild-type and Mutant Arabidopsis Ovules” The 1st ABiS Symposium Towards the Future of Advanced Bioimaging for Life Sciences 2017年2月19日 岡崎コンファレンスセンター、愛知県 ポスター発表
- ⑧ 和田敏実、亀井保博、浦和博子、西川周一「シロイヌナズナの雌性配偶体における遺伝子発現誘導システムの構築」第1回 Biothermology Workshop —生命システムの熱科学— 2016年12月11日 岡崎コンファレンスセンター、愛知県
- ⑨ 和田敏実、亀井保博、浦和博子、西川周一「シロイヌナズナの雌性配偶体における遺伝子発現誘導システムの構築」第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日 パシフィコ横浜、神奈川県
- ⑩ 宇治周平、杉山智之、山本雅也、梶山智晴、神原秀記、遠藤斗志也、西川周一「小胞体品質管理欠損が花粉成熟に与える影響の解析」第5回エンドメンブレンミーティング 2016年9月28日 東京大学理学部、東京都

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：東山 哲也

ローマ字氏名：HIGASHIYAMA, Tetsuya

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・教授

研究協力者氏名：佐藤 良勝

ローマ字氏名：SATO, Yoshikatsu

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究協力者氏名：栗原 大輔

ローマ字氏名：KURIHARA, Daisuke

名古屋大学・大学院理学研究科・特任講師

研究協力者氏名：丸山 大輔

ローマ字氏名：MARUYAMA, Daisuke

横浜市立大学・木原生物学研究所・助教

研究協力者氏名：亀井 保博

ローマ字氏名：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

研究協力者氏名：浦和 博子

ローマ字氏名：URAWA, Hiroko

岐阜聖徳学園大学・教育学部・准教授

研究協力者氏名：和田 敏実

ローマ字氏名：WADA, Satomi

新潟大学・大学院自然科学研究科・大学院生

研究協力者氏名：HWANG, Dukhyum

ローマ字氏名：HWANG, Dukhyum

新潟大学・大学院自然科学研究科・大学院生

研究協力者氏名：鈴木 千晴

ローマ字氏名：SUZUKI, Chiharu

新潟大学・大学院自然科学研究科・大学院生

研究協力者氏名：高橋 梓

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Azusa

新潟大学・理学部・学部学生

研究協力者氏名：長尾 榛花

ローマ字氏名：NAGAO, Haruka

新潟大学・理学部・学部学生

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。