

機関番号：13901

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19370017

研究課題名（和文）レーザーインジェクションによる標的眞核細胞およびオルガネラの
遺伝子発現制御

研究課題名（英文）Gene regulation of targeted cells and organelle by laser microinjection

研究代表者 東山 哲也 (HIGASHIYAMA TETSUYA)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00313205

研究成果の概要（和文）：

独自に開発したレーザーインジェクション法（Laser-assisted Thermal-expansion Microinjection 法, LTM 法）を用いて、標的細胞やオルガネラの遺伝子発現制御を行うことを目指した。特に、胚嚢（雌性配偶体）が裸出するユニークな植物トレンニアにおいて、遺伝子発現抑制を行い、標的遺伝子の特異的な発現の低下を確認することも目指した。その結果、トレンニアの胚嚢にモルフォリノアンチセンスオリゴを導入することで、標的遺伝子の特異的にノックダウンすることに成功した。標的遺伝子として、助細胞特異的に発現する花粉管誘引ペプチド候補である *LURE1* および *LURE2* を用いたところ、ノックダウンにより花粉管の誘引が阻害されることが明らかとなった。この実験により、花粉管誘引物質の同定に成功するという画期的な成果につながった。モルフォリノアンチセンスオリゴが植物にも有効であることが示され、また、原生生物である粘菌においてもその有効性が示されたことから、マイクロインジェクション技術の組み合わせにより、広く眞核細胞の遺伝子発現抑制に用いることの技術であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Here I aimed to control gene expression in targeted cells and organelle by using our laser injection method (Laser-assisted Thermal-expansion Microinjection; LTM). I especially focused on down-regulation of targeted genes by using a unique plant *Torenia fournieri*, of which embryo sac is protruding from the ovule tissue. We succeeded in down-regulation of targeted genes by injecting morpholino antisense oligomers (MOs) into the protruding embryo sac. When we down-regulated *LURE1* or *LURE2* genes, which were candidates of pollen tube attractant genes specifically expressed in the synergid cell, pollen tube attraction was impaired. These results lead to identification of true attractant molecules LUREs. MOs were shown to be effective in plant cells as well as a protist *Physarum polycephalum*. Combination of laser injection with MOs was shown to be a powerful technique for down-regulation of eukaryotic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：植物生理・分子

キーワード：レーザーインジェクション、マイクロインジェクション、植物細胞、モルフォリノアンチセンスオリゴ、遺伝子発現制御、

1. 研究開始当初の背景

マイクロインジェクションは、狙った細胞に核酸、タンパク質、薬剤など様々な物質を導入するための、重要な細胞工学技術である。しかし、マイクロピペットの先端径が 1 μm 以下になるとインジェクションに対して十分な圧力を得ることができず、インジェクションが困難になるという技術的制約が存在した。そのため、対象となる細胞が、大型の動物卵細胞やディッシュに接着した培養細胞などに限定され、微小な細胞やオルガネラ、植物や菌類の細胞などへのインジェクションは困難とされた。そこで申請者は、レーザー光を熱源とし、レーザー吸収剤の熱膨張圧によりマイクロインジェクションを行う方法を発明した。これにより、先端径わずか 0.1 μm のキャピラリーを用いて、従来法では難しかった微小な細胞、多糖質の堅い細胞壁をもち内部には高い膨圧を保持する植物細胞、そしてそのオルガネラに至るまで、インジェクションに成功した。このような精密なインジェクションを簡便に行える方法・装置は、世界的にも実用化に至った例がない。

2. 研究の目的

本研究では、任意の細胞系で、狙った個々の細胞で確実に遺伝子の発現制御を行う技術の開発を目指す。これにより、細胞工学的に遺伝子発現制御を行うための基本原理を解明する。

特に、遺伝子発現制御を (I) 標的遺伝子のノックダウンと、(II) 外来遺伝子の発現の 2 つに大きく分け、研究を進める。I については、(1) 種々の核酸等の導入による標的遺伝子の発現阻害と、(2) 抗体の導入による標的遺伝子産物の機能阻害について解析する。また II については、(1) DNA の核内への導入またはゲノムへの挿入による遺伝子発現と、(2) mRNA の細胞質への導入による遺伝子発現について解析する。

3. 研究の方法

はじめにレーザーインジェクターの実用化（販売開始）を行い、それにともない、レーザー吸収剤や紫外線硬化性樹脂などの検討、および実験手法の最適化（マニュアル化）を行った。

植物の雌性配偶体細胞（トレニアの裸出胚嚢）へのモルフォリノアンチセンスオリゴのインジェクションによる遺伝子発現阻害実験、ならびに植物の培養細胞（タバコ BY-2）への抗体のインジェクションによる標的タ

ンパク質の機能阻害実験を中心に、レーザーマイクロインジェクション法の評価・最適化を進めた。

モルフォリノアンチセンスオリゴについては、真正粘菌を用いて、核コードのミトコンドリアタンパク質の発現阻害効果を検討した。

外来遺伝子の発現については、タマネギの表皮細胞を中心に、トレニアの裸出胚嚢なども用いて、条件検討を行った。

4. 研究成果

レーザーインジェクターの実用化により、レーザーインジェクターを購入した研究者と、異なる細胞系での結果について情報を得ることもできるようになった（図 1～図 3）。ヒメツリガネゴケなども含めた様々な細胞系、特に被子植物細胞で多く実験を行うことにより、LTM 法でインジェクションを高効率で行うための重要なポイントが多く明らかとなった。例えば、植物細胞においてガラス針を抜いた後も細胞が維持されるためには、ガラス針先端の直径（外径）が 0.3 μm 以下である必要があること、インジェクションの際の細胞の保持が各実験系において重要であること、サンプルが常にガラス針先端から穏やかに出続けている状態でインジェクションを繰り返すことで連続的なインジェクションが可能になること、その他良好な針の充填・保管法などが明らかとなった。

はじめに、抗体のインジェクションによる標的タンパク質の機能阻害効果について検討した。タバコ培養細胞 BY-2 は、他の植物細胞に比べマイクロインジェクションが容易であり、条件検討に大いに役立った。微小タンパク質に対する抗体を導入することで、細胞分裂に対する影響を、細胞周期におけるピンポイントで解析することができ、特異的な阻害効果が確認された（基礎生物学研究所の村田隆氏との共同実験）。

次に実用化したレーザーインジェクターを用いて、植物の雌性配偶体細胞（トレニアの裸出胚嚢）へのモルフォリノアンチセンスオリゴのインジェクションによる遺伝子発現阻害実験を中心に進めた。レーザーマイクロインジェクション法の評価・最適化を進めた結果、標的とした花粉管誘引物質の候補遺伝子の遺伝子発現阻害に成功し、候補遺伝子が真の花粉管誘引物質であることを証明できた（図 4）。同定した遺伝子は 2 種あり、それぞれ *LURE 1* および *LURE 2* という、ディフェンシンに類似した低分子量タン

パク質である。そのそれぞれの遺伝子に対する特異的なアンチセンスオリゴを導入した場合、アンチセンス特異的に花粉管誘引が阻害された。また、それぞれのアンチセンスオリゴ単独で、誘引が阻害されたことから、それぞれの遺伝子が異なる機能を持つ可能性も考えられる。その成果は、*Nature* 誌に掲載され、表紙を飾った。植物細胞においてモルフォリノアンチセンスオリゴの初めての使用例としても、メーカーから紹介された。

さらに、*LURE* 遺伝子の発現がどの程度抑制されているのか、定量的な解析を試みた。トレニアの組織を培養開始後すぐに、胚嚢へのインジェクションを行い、さらに1日間培養したのち、微小な胚珠組織を顕微操作により1つずつ回収した。個々の胚珠は、*LURE* を発現する助細胞を2つもつが、その胚珠組織から mRNA を精製し、安定してリアルタイム PCR を行う方法を開発した。その結果、アンチセンスオリゴを導入した胚珠特異的に、mRNA がほとんど検出されないほど減少していることが明らかとなった。アンチセンスオリゴは翻訳開始点と、スプライスドナー、スプライスアクセプターの3箇所に対するものを混合して導入している。したがって、スプライス阻害により mRNA がナンセンスメディエテッド mRNA 崩壊 (NMD) を受けている可能性が考えられる。また例えば *LURE1* を標的とした場合は、*LURE2* をはじめ、他の助細胞特異的遺伝子の発現は減少しないなど、標的遺伝子特異的に発現が減少していることも示唆された。モルフォリノアンチセンスオリゴによる遺伝子発現抑制が、トレニアの胚嚢で非常に良好にはたっていることが示唆されたので、今後、トレニアの胚嚢をモデル系とした、ユニークな解析が展開されることが期待される。

さらに *LURE* 以外の重複遺伝子群の機能解析に対するレーザーインジェクションの有効性と、より安価で短時間で入手できる S 化 DNA オリゴの有効性について検証した。トレニア助細胞の EST 解析から、システインに富むペプチドの他に、ペクチンメチルエステラーゼインヒビター (*PMEI*) に類似の遺伝子群などが主に発現していることを見出した。そこで、*PMEI* に対する複数のモルフォリノアンチセンスオリゴを作製し、インジェクションを行った。その結果、これらの遺伝子群においても、mRNA 量の減少が確認され、ナンセンスメディエテッド mRNA 崩壊が起きている可能性などが考えられた。*LURE* とは異なり、花粉管誘引には影響が見られず、助細胞の他の機能に対する関与が考えられた。花粉管の侵入や放出に関わることも考えられるので、現在、その解析のための培養系の改変を含め、解析を進めている。また、*PMEI* に対する S 化 DNA オリゴをイン

ジェクションした場合には、モルフォリノアンチセンスオリゴほどの標的的特異的で強いノックダウンは見られず、モルフォリノアンチセンスオリゴの有効性が示された。こうした知見は、レーザーインジェクションにより真核生物の遺伝子発現制御を行うための、重要な知見であると評価できる。

モルフォリノアンチセンスオリゴについては、原生生物である真正粘菌のミトコンドリア核様体タンパク質 (核コード) においてのノックダウンにも有効に機能することが示され、インジェクションさえ行えば、広く真核細胞で利用できることが示唆された。

このように標的遺伝子の発現阻害については、良好な結果が得られた。一方、外来遺伝子の発現については、低頻度にしかなら発現が見られなかった。タマネギ表皮細胞を用いて核内にプラスミドをインジェクションすると、稀に GFP などのリポーター遺伝子を発現した。トレニアの胚嚢の細胞質にプラスミドを導入した場合も、同様に低い効率でしか発現が見られなかった。動物の培養細胞では、核内へのプラスミドのインジェクションにより、高頻度にリポーター遺伝子の発現が見られることが知られる。プラスミドではなく、mRNA を *in vitro* 精製し様々な植物細胞の細胞質にインジェクションすることも試みているが、やはり高頻度な発現は見られておらず、さらなる条件検討の必要性を要することが示された。



図1. 実用化したレーザーインジェクター

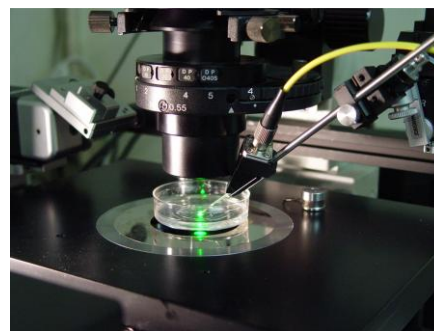


図2. 倒立顕微鏡を用いたレーザーインジェクションの様子

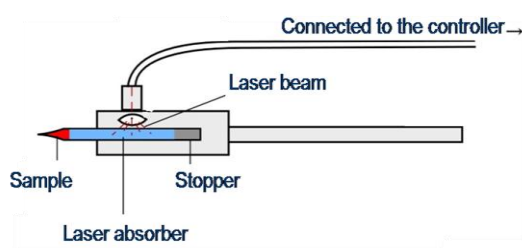


図3. レーザーインジェクターの針フォルダ一部分の模式図

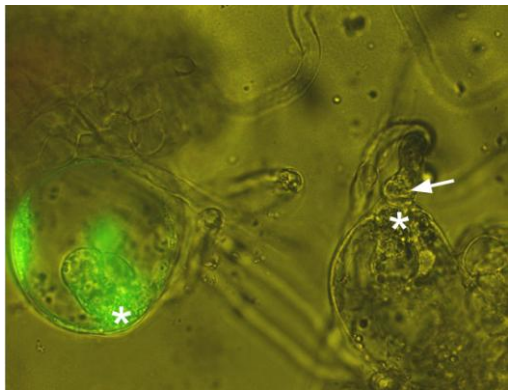


図4. モルフォリノアンチセンスオリゴ（緑色の蛍光）を導入した胚嚢における花粉管誘引の阻害

アスタリスクは花粉管の入口にあたる胚嚢の珠孔側端を示す。矢印は誘引された花粉管。

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 31 件）

- ① Yuki Hamamura, Chieko Saito, Chie Awai, 以下省略 8 名 11 番目. Live-Cell Imaging Reveals Dynamics of Two Sperm Cells during Double Fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 査読有. 21 巻. 2011. 497-502
- ② Kei Itoh, Akio Izumi, Toshiyuki Mori, 以下省略 1 3 名中 1 0 番目. DNA packaging proteins Glom2 coordinately organize the mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum*. *Mitochondrion*. 査読有. 2011. 印刷中
- ③ Hiroaki Goto, Satohiro Okuda, Akane Mizukami, 以下省略 4 名 7 番目. Chemical Visualization of an Attractant Peptide, LURE. *Plant Cell Physiol*. 査読有. 52 巻. 2011. 49-58
- ④ 東山哲也. 花粉管ガイダンス分子 LURE の発見. *Plant Morphology*. 査読無. 22 巻. 2010. 23-31
- ⑤ Tetsuya Higashiyama. Peptide Signaling in Pollen-Pistil Interactions. *Plant Cell Physiol*. 査読有. 51 巻. 2010. 177-189
- ⑥ 東山哲也, 奥田哲弘, 筒井大貴, 以下省略 4 名 1 番目. 花粉管誘引物質ルアーの発見. 査読無. *化学と生物*. 47 巻. 2009. 617-623
- ⑦ 筒井大貴, 東山哲也. 植物生殖 140 年の謎—花粉管誘引物質の同定とレーザーマイクロインジェクション法による解析. *バイオインダストリー*. 査読無. 26 巻. 2009. 37-43
- ⑧ 金岡雅浩, 東山哲也. 花粉管ガイダンス分子の同定と種間と多様性. 査読無. *BLAIN テクニクス*. No 135. 2009. 16-20
- ⑨ 東山哲也. ユニークな植物トレンシアを用いて花粉管誘引物質ルアーを発見. *細胞工学*. 査読無. 28 巻. 2009. 700-701
- ⑩ Okuda S, Tsutsui H, 以下省略 23 名中 23 番目. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature*. 査読有. 458 巻. 2009. 357-361
- ⑪ 東山哲也. 花のなかでの受精と細胞間シグナリング. *蛋白質核酸酵素*. 査読有. 53 巻. 2008. 1267-1274
- ⑫ Berger F, Hamamura Y, Imgouff, M, Higashiyama Tetsuya. Double fertilization -caught in the act. *Trends Plant Sci*. 査読有. 13 巻. 2008. 437-443
- ⑬ Matsushima R, Hamamura Y, 以下省略 7 名中 3 番目. Mitochondrial dynamics in plant male gametophyte visualized by fluorescent live imaging. *Plant Cell Physiol*. 査読有. 49 巻. 2008. 1074-1083
- ⑭ Higashiyama T, and Hamamura Y. Gametophytic pollen tube guidance. *Sex Plant Reprod*. 査読有. 21 巻. 2008. 17-26
- ⑮ Ingouff, M. Hamamura Y, 以下省略 5 名中 4 番目. Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. *Curr. Biol*. 査読有. 17 巻. 2007. 1032-1037
- ⑯ Higashiyama T, Inatsugi R, 以下省略 10 名中 1 番目. Species specificity of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of *Torenia fournieri*. *Plant Physiol*. 査読有. 142 巻. 2006. 481-491
- ⑰ Nishimura Y, Yoshinari T, Naruse K,

- 以下省略8名中7番目. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 査読有. 103巻. 2006. 481-491
- ⑱ Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, and Kuroiwa T. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. Nat. Cell Biol. 査読有. 8巻. 2006. 64-71
- ⑲ 東山哲也. マイクロインジェクション, ビデオ顕微鏡. 新版 植物の細胞を観る実験プロトコール. 査読無. 2006. 88-94

[学会発表] (計 83 件)

- ① 東山哲也. Live Cell Analysis of Pollen Tube Guidance. GOLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES. 2010/10/26. Suzhou Dushu Lake Conference Center (中国).
- ② 東山哲也. Pollen tube guidance and peptide attractants in flowering. 2010SDB-JSDB Joint Meeting. 2010/8/8. アルバカーコンベンションセンター(アメリカ).
- ③ 東山哲也. Live Cell Analysis of Pollen Tube Guidance and Double Fertilization. XX1 International Congress on Sexual Plant Reproduction. 2010/8/5. ブリストル大学(イギリス).
- ④ 東山哲也. Defensin-like polypeptide LUREs are diffusible pollen tube attractants. IPGSA Conference 2010. 2010/6/29. Universitat. Poviral Virgiti Campus (スペイン).
- ⑤ 笠原竜四郎、浜村有希、東山哲也. Plant fertilization captured by live cell imaging - How do plants two sperm cells two recipient cells? 11th International Symposium on Spermatology. 2010/6/29. 沖縄コンベンションセンター.
- ⑥ 東山哲也. Pollen tube guidance by defensin-like polypeptide LUREs. 第9回 IPBM 学会. 2009/10/27. St. Louis America's Center(アメリカ).
- ⑦ 東山哲也. Identification of pollen tube attractants derived from the synergid cell. Plant Biology 2009(American Society of Plant Biologists). 2009/7/20. ハワイコンベンションセンター(アメリカ).
- ⑧ 村田 隆、野中茂樹、東山哲也、以下省略6名中3番目. 2光子顕微鏡を用いた3次元トラッキングによる微小管形成の解析. 生体運動研究合同班会議 2009 in TOKYO. 2009/1/9. 東京
- ⑨ Satohiro Okuda, Hiroki Tsutsui, narie

- Sasaki, Keiko Shiina, Hidenori Takeuchi, Masahiro Kanaoka, Tetsuya Higasiyama. Pollen tube attractants for gametophytic interaction. 第31回日本分子生物学会年会. 2008/12/11. 神戸ポートアイランド.
- ⑩ 東山哲也. Pollen Tube Attractants Derived from the Synergid Cell. Frontiers of Sexual Plant Reproduction III. 2008/10/17. アリゾナ大学(アメリカ)
- ⑪ Yuki Hamamura, Chieko Saitou, Masahiro M Kanaoka, 以下省略6名中6番目. Real Time Imaging of Double Fertilization in Arabidopsis thaliana. Frontier of Plant Sexual Reproduction III. 2008/10/17. アリゾナ大学(アメリカ)
- ⑫ 東山哲也. Behavior and signaling in gametophytic interactions. FASEB Summer Research Conferences. 2008/8/12. サクストンズリバー(アメリカ).
- ⑬ 東山哲也. Behavior and signaling in gametophytic interactions. XX International Congress on Sexual Plant Reproduction. 2008/8/5. ブラジリア(ブラジル).
- ⑭ 東山哲也. 受精のメカニズムをとらえた、公開講演会「かたちと情報から植物の生存戦略を探るー若い世代に向けた植物学への招待ー. 2008/3/22. 札幌.
- ⑮ 東山哲也. 植物の重複受精の謎に挑む～花の中での雌雄の出会い～. 名古屋市立向陽高等学校 先端科学分野講演会. 2007/10/17. 名古屋市立向陽高等学校.

[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 1 件)

名称：レーザ加熱による液体膨張圧を用いたマイクロインジェクション法
発明者：東山哲也
権利者：国立大学法人東京大学
種類：特許
番号：P4621942
取得年月日：2011年2月2日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

東山哲也. 花の中でオスをおびき寄せるための遺伝子. バイオポータル

(http://www.biportal.jp/ja/Column/2009/07/post_51.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東山哲也 (HIGASHIYAMA TETSUYA)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00313205

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：