

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570206

研究課題名（和文）植物受精卵の極性形成および不等分裂機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms in polarity formation and asymmetric division of angiospermic zygotes

研究代表者

岡本 龍史（OKAMOTO TAKASHI）

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：50285095

研究成果の概要（和文）：被子植物の受精卵第一分裂により生じる頂端および基部細胞は異なる分化能をもっており、この分裂過程は植物生活環における最初の発生・分化のステップである。本研究では、イネ *in vitro* 受精系や単細胞オーム解析などにより、それぞれの細胞で特異的に発現する遺伝子の同定に成功した。また、卵細胞アクチン繊維の可視化形質転換体の作出により、受精卵の極性形成時におけるアクチン繊維の動態観察が可能となった。

研究成果の概要（英文）：In angiosperms, a zygote generally divides into an asymmetric two-celled embryo consisting of an apical and a basal cell with different cell fates, and this unequal division is a putative first step for formation of the apical-basal axis of plants. In the project, apical and basal cell specific genes were identified using rice *in vitro* fertilization system and single cell transcriptome analyses. In addition, preparation of transformed rice plants for visualizing actin filament made it possible to observe dynamics of actin filament during zygote development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：植物発生学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：受精、卵細胞、精細胞、受精卵、胚発生、細胞極性、イネ

1. 研究開始当初の背景

被子植物の受精卵における極性形成は胚発生の出発点と考えられる重要な機構であるにもかかわらず、細胞内小器官・構造物が合点-珠孔軸に沿って不均一に局在しているという電子顕微鏡観察結果に基づいた多くの報告があるが、受精卵の頂端部領域や基部

領域にどのような分子が局在し、また、それらの局在がどのような機構により形成されるのかといった点については、ほとんど未知のままである。このような研究の遅れは、被子植物の受精および胚発生が子房の奥底で進行するため、卵細胞や受精卵を直接的に観察・解析することが困難であり、植物の胚発

生機構解析が主に変異体解析によってなされてきたことに起因する。変異体解析から胚形成機構に対する非常に多くの知見が蓄積しつつあるが、それらは胚発生の中期および後期に集中しており、胚発生第一分裂を含む初期胚発生機構への知見が少ないのが現状である。報告者の研究グループは、モデル植物であるイネからの卵細胞および精細胞の単離法を確立し、さらに、それら配偶子を用いたイネ *in vitro* 受精系を2006年に確立した。これにより、*in vitro* 受精系を用いた研究とモデル植物（イネ）解析用の各種研究手法・情報が有機的に結びつき、植物の受精から胚発生過程の分子機構を新たな視点・角度から解析することが可能になった。

2. 研究の目的

(1) 受精により受精卵中で発現が誘導され、かつ、2細胞胚の頂端細胞のみで発現している遺伝子の mRNA を受精卵頂端部に局在する mRNA、受精卵中で発現が誘導され2細胞胚の基部細胞のみで発現している mRNA を受精卵基部に局在する mRNA の候補として、イネ受精卵中の頂端部および基部に極性分布している mRNA をマクロアレイ解析で網羅的に同定する。

(2) 細胞内における極性形成および物質輸送に深く関与しているアクチン繊維を蛍光タンパク質で可視化した形質転換植物を作製し、それらの配偶子を *in vitro* 受精させることで、受精卵の極性形成過程における細胞骨格の動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) イネ *in vitro* 受精系により受精卵と2細胞胚を作製し、2細胞胚から頂端細胞と基部細胞をそれぞれ単離した。1細胞からのマイクロアレイ用 cRNA プローブの作成法 (Kurimoto et al. *Nuc. Acid Res.* 34: e42, 2006) に従い、イネ卵細胞、受精卵、2細胞胚、頂端細胞および基部細胞から cRNA プローブを作製し、イネ 4 X 44K オリゴ DNA スライド (アジレント社) を用いて解析した。1細胞からのサンプルを用いていることから、アレイ解析を 5-10 回行うことで結果の信頼性を検証した。受精卵、2細胞胚および頂端細胞においてのみ発現している遺伝子の mRNA を受精卵の頂端部領域に局在する mRNA (頂端部 mRNA) の候補とし、受精卵、2細胞胚および基部細胞においてのみ発現している遺伝子の mRNA を受精卵の基部領域に局在する mRNA (基部 mRNA) の候補とした。次に、候補 RNA のそれぞれの細胞における発現パターンを、RT-PCR により確認した。

(2) イネのユビキチンプロモータの下流に

FimbrinABD2-GFP をつないだ Ti プラスミド DNA コンストラクトを用いて、アグロバクテリウム法により形質転換イネを得た。また、シロイヌナズナ卵細胞プロモーター (DD45) の下流に Lifeact-tagRFP をつないだ DNA コンストラクトを作製し、上記と同様の方法で形質転換イネを得た。

4. 研究成果

(1) 2細胞胚からの頂端細胞および基部細胞の単離法を確立したのち、卵細胞、受精卵、頂端細胞、基部細胞、2細胞胚から単一細胞からのマイクロアレイ用 cRNA プローブの作成法 (Kurimoto et al. *Nuc. Acid Res.* 34: e42, 2006) に従い、逆転写および cDNA 増幅を行った。この際、cDNA 増幅時において相対的遺伝子発現比が変動しないように、6種の遺伝子間の発現比を定量 PCR で確認しつつ実験を進めた。最終的には、1st roundで18サイクル、2nd roundで12サイクルの PCR を行うことで、相対的遺伝子発現比が一定で、かつ、cRNA プローブ作製に十分な cDNA を得ることができた。

次に、上記の卵細胞、受精卵、頂端細胞、基部細胞、2細胞胚 cDNA をもとに cRNA プローブをそれぞれ作製し、トランスクリプトーム解析を進めた。遺伝子発現プロファイルのクラスタリング解析の結果、それぞれの細胞・胚は細胞・胚の種類ごとにグループ化された位置に存在した (図1)。このことは、本解析の結果の信頼性を示していると考えられた。次に、「卵細胞/受精卵で発現し、かつ、2細胞胚の頂端細胞でのみ発現する遺伝子」および「卵細胞/受精卵で発現し、かつ、2細胞胚の基部細胞でのみ発現する遺伝子」を絞り込んだところ、2細胞胚の頂端細胞でのみ発現する遺伝子が61個、基部細胞でのみ発現する遺伝子が57個それぞれ同定された。

図1 クラスタリング解析

卵細胞、受精卵、頂端細胞、基部細胞、2細胞胚のマイクロアレイデータのクラスタリング解析。赤は2細胞胚、青は頂端細胞、茶色は基部細胞、緑は受精卵、灰色は卵細胞を示す。以下は、クラスタリング解析のパラメータを示す。

・ Entity filtering

Expression: 100-20 % percentile, Error: SD < 0.1, Statistical analysis: Oneway ANOVA (P-value cutoff 0.05)

・ Clustering condition

Algorithm: Hierarchical, Sililarity measure: Peason absolute, Linkage rule: average

(2) イネのユビキチンプロモータの下流に FimbrinABD2-GFP をつないだ Ti プラスミド DNA コンストラクトを作製し、アグロバクテリウム法により 17 ラインの形質転換イネを得た。各ラインの花から卵細胞を単離し、蛍光顕微鏡により卵細胞のアクチン繊維が可視化されているライン (3 ライン) を選抜した (図 2 A)。さらに、シロイヌナズナ卵細胞プロモーター (DD45) の下流に

Lifeact-tagRFP をつないだ DNA コンストラクトを作製し、12 ラインの形質転換イネを得た。各ラインの花から卵細胞を単離し、蛍光顕微鏡により卵細胞のアクチン繊維が可視化されているライン (8 ライン) を選抜した (図 2 B)。Lifeact-tagRFP では太く長いアクチン繊維が標識された一方で、FimbrinABD2-GFP では細かいアクチン繊維が標識された。

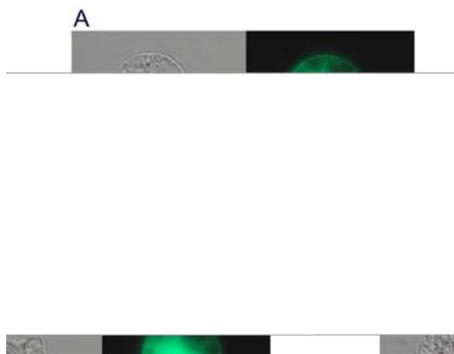


図2 イネ卵細胞内のアクチン繊維

A. FimbrinABD2-GFP で標識されたアクチン繊維。B. Lifeact-tagRFP で標識されたアクチン繊維。

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 9 件)

- ① Okamoto T. (2011) In vitro fertilization with isolated rice gametes: production of zygotes and zygote and embryo culture. *Methods Mol. Biol.* 710: 17-27.
- ② Ohnishi T., Takanashi H., Mogi M., Takahashi H., Kikuchi H., Yano K., Okamoto T., Fujita M., Kurata N. and Tsutsumi N. (2011) Distinct Gene Expression Profiles in Egg and Synergid Cells of Rice as Revealed by Cell Type-specific Microarrays. *Plant Physiol.* 155: 881-891.
- ③ Okamoto T. (2010) Gamete fusion site on the egg cell and autonomous establishment of cell polarity in the zygote. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 1464-1467
- ④ Nakajima K., Uchiumi T. and Okamoto T. (2010) Positional relationship between the gamete fusion site and the first division plane in the rice zygote. *J. Exp. Bot.* 61: 3101-3105.
- ⑤ Sato A., Toyooka K., and Okamoto T. (2010) Asymmetric cell division of rice zygotes located in embryo sac and produced by in vitro fertilization. *Sex Plant Reprod.* 23: 211-217.
- ⑥ Takanashi, H., Ohnishi, T., Mogi, M., Okamoto, T., Arimura, S and Tsutsumi N. (2010) Studies of mitochondrial morphology and DNA amount in the rice egg cell. *Curr. Genet.* 56:33-41.
- ⑦ Kranz E., Hoshino Y. and Okamoto T. (2008) In vitro fertilization with isolated higher plant gametes. *Methods Mol. Biol.* 427: 51-69.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 岡本龍史、佐藤明子、中島啓介 (2011) イネ卵細胞膜上における配偶子融合領域と受精卵の自律的細胞内極性形成。第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台)
- ② 安彦真文、岡本龍史 (2011) イネ雌雄配偶子および受精卵のトランスクリプトーム解析。第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台)
- ③ 岡本龍史、佐藤明子、豊岡公德、内海貴夫 (2010) イネ 2 細胞胚の頂端細胞-基部細胞間で差別的発現を示す遺伝子の同定。第 51 回日本植物生理学会年会 (熊本)
- ④ 高梨秀樹、大西孝幸、茂木美来、菊池俊介、矢野健太郎、岡本龍史、藤田雅丈、倉田のり、堤信浩 (2010) イネ雌性配偶体構成細胞における遺伝子発現プロ

ファイリング. 第 51 回日本植物生理学会年会 (熊本)

- ⑤ 岡本龍史 (2009) 被子植物における配偶子融合の分子認証機構、シンポジウム「動植物におけるアロ認証機構」第 82 回日本生化学会大会 (神戸)

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 岡本龍史 (2009) 受精の生理、「種子のバイオサイエンス (改訂版)」原田久也編、学会出版センター、pp25-27

〔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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/lab0.asp?ID=horcel>

アウトリーチ等

平成 20 年度 ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI
一日体験ラボ：生物の情報システム、行動、分類、エネルギー生産 (首都大学東京 HT20040)
実施日：平成 20 年 8 月 8 日 (金)
実施責任者

平成 21 年度 ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI
一日体験ラボ：タンパク質、細胞、環境適応、個体群の動態 (首都大学東京 HT21056)
実施日：平成 21 年 8 月 7 日 (金)
実施責任者

平成 22 年度 ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI
一日体験ラボ：線虫、植物の受精と発生、大腸菌ゲノム、環境微生物 (首都大学東京 HT22054)

実施日：平成 21 年 8 月 6 日 (金)

講演「植物の受精と発生」

実習「イネ卵細胞と精細胞の単離」

2008 年度 首都大学東京オープンユニバーシティー「植物の環境応答と適応」

2009 年度 首都大学東京オープンユニバーシティー「DNA で探る生命 受精のしくみを探る」

2010 年度 首都大学東京オープンユニバーシティー「DNA で探る生命 受精のしくみを探る」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 龍史 (OKAMOTO TAKASHI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・
准教授

研究者番号：50285095

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし