

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570068

研究課題名（和文） 高等植物の受粉・受精過程におけるエピジェネティクス

研究課題名（英文） Epigenetics during pollination and fertilization in higher plants

研究代表者

田中 一郎（TANAKA ICHIRO）

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：60175445

研究成果の概要（和文）：本研究において、高等植物の受粉後の花粉管中に形成される2個の精細胞（雄性配偶子）内では、エピジェネティックな遺伝子発現制御において中心的な役割を果たす Argonaute(AGO)タンパク質が特異的に発現していることをテッポウユリにおいて初めて明らかにした。これにより、高等植物の雄性配偶子におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の存在を示唆することができたとともに、実際に、重複受精を行う2個の精細胞間にも明らかな二型性が存在することを初めて示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we first showed that Argonaute (AGO) was specifically expressed in the generative and sperm cells in *Lilium longiflorum*. This suggests that the gene expression in male gametic cells might be regulated epigenetically. Further, we found dimorphism between two sperm cells in the nuclear chromatin.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2012年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：精細胞・花粉・花粉管・ヒストン・雄原細胞・雄性配偶子

### 1. 研究開始当初の背景

クロマチンのエピジェネティックな制御機構が最近盛んに研究されている。DNAのメチル化を初めとして、ヒストンの修飾も主要な研究対象となっている。ヒストンの修飾には、リン酸化、アセチル化、メチル化などがあり、対象ヒストン種や対象アミノ酸、さらには修飾するアミノ酸の位置や修飾数もまちまちである。そして、個々の修飾を特異的に認識する抗体を用いて、特異的な修飾の実体が明らかにされつつある。しかしながら、植物細胞

における知見はまだ少ない。特に、有性生殖過程での解析は困難な状況にある。その理由は、植物の場合、雌雄配偶子形成過程にある細胞の量的制約、時期的制約、そして構造的制約が大きく、単離がほとんどできないからである。

テッポウユリは、そうした制約を何とか打破し、雌雄配偶子形成過程や受粉・受精過程におけるヒストン修飾の詳細を生化学的に解析できる唯一の植物材料といえる。

## 2. 研究の目的

そこで、本申請研究は、雄性配偶子形成過程におけるヒストン種の劇的な変化がすでに明らかになっているテッポウユリを用いて、その後の受粉・受精過程におけるヒストン修飾の詳細な解析を行い、高等植物の有性生殖過程におけるエピジェネティックな制御の実体を明らかにすることを目的とする。

まず、生化学的解析を基盤に、主として形態学的解析によって、これまでほとんど調べられていない高等植物の受粉・受精過程にある細胞核（花粉管内の栄養核、雄原核や精核、胚のう内の卵細胞核、受精卵核や胚乳核）のヒストン修飾、特にヒストン H3 のメチル化を解析し、エピジェネティックな制御機構の存在を明らかにする。同時に、我々が先に見出した雄性配偶子特異的ヒストン変種群との関連も明らかにする。

## 3. 研究の方法

自家（ひのもと×ひのもと）ならびに他家（ひのもと×へづん）受粉後の花粉管や受精前後の胚のうのクリオスタット切片を試料として、独自に作成した抗ヒストン変種抗体

（gH1, gH2A, gH2B, gH3, vH3. 3）や市販の抗修飾ヒストン抗体（リン酸化、メチル化、アセチル化）、特にヒストン H3 の各リジン残基におけるモノ、ジ、トリメチル化を認識できる抗体で染色し、花粉管内の栄養核、雄原核、精核、胚のう内の卵細胞核、受精卵核、胚乳核におけるシグナルの有無や変化を解析するとともに、生化学的調査が可能な試料についてはウエスタンブロットも併せて行う。また、異種（テッポウユリ）ヒストンを雄性配偶子で発現する形質転換タバコを作成し、受精への影響を調べる。

## 4. 研究成果

被子植物の雄性配偶体である花粉は、雌ずいの柱頭に受粉すると発芽し、花粉管を伸長する。この花粉管の伸長は、雄性配偶子を雌性配偶体である胚のうまで運搬することによって、重複受精に関与する。この花粉管中の雄原細胞ならびに精細胞に関して以下の知見を得た。

(1) 先に見出したテッポウユリの雄性配偶子特異的ヒストン変種の3種（gH2A, gH2B, gH3）について、受精過程における動態を形態学的に解析したところ、いずれも受精卵の融合核に取り込まれ、1回目の分裂後に消失することが観察された。一方、胚乳核では分裂後しばらく残存することも確かめられ、これらの結果はシロイヌナズナにおける雄性配偶子特異的ヒストン H3. 3 の消長とも一致し、雄性配偶子特異的ヒストン変種群のエピジェネティクスが想定された。

(2) テッポウユリの雌ずい内を伸長中の花粉管で発現している遺伝子群をサブトラクション法によって選抜したところ、Argonaute (AGO) タンパク質と相同性を示すクローンが得られた。AGO タンパク質は、small RNA による遺伝子発現制御において中心的な役割を担っているタンパク質の一つである。この AGO 様遺伝子のテッポウユリ花粉発生過程における機能を明らかにするために、遺伝子の単離ならびに発現解析を行った。

単離した遺伝子の塩基配列から推測されるアミノ酸配列には、動物や植物の AGO に共通する機能ドメインである PAZ ならびに PIWI ドメインがみられた。このドメイン部分の配列を基に分子系統樹を作成したところ、生殖細胞での発現が報告されているイネの *MEL1* やシロイヌナズナの *AGO5* を含むグループに分類された。このテッポウユリの *AGO* は、花粉で顕著に発現していたが、体細胞組織での発現はほとんどみられなかった。さらに、*in situ* hybridization 法により、成熟花粉内の雄原細胞で特異的に発現していることも明らかになった。さらに、リアルタイム PCR 法によって、精細胞を含む花粉管で発現量が顕著に増加しピークに達することが示された。従って、この新規のテッポウユリ *AGO* は雄性配偶子形成過程におけるエピジェネティックな遺伝子発現の制御に深く関与している可能性が期待される。

(3) テッポウユリの雄性配偶子特異的ヒストンとして見出された3種類のヒストン変種（gH2A, gH2B, gH3）遺伝子のプロモーターは、タバコでも雄性配偶子特異的に発現することがすでに明らかにされているが、その制御機構に関しては明らかになっていない。そこで、プロモーター活性を簡便に検定する実験系を開発するために、パーティクルガン法を用いたテッポウユリ花粉への遺伝子導入を試みた。

その結果、対象として用いたトウモロコシの栄養細胞特異的プロモーター（Zm13 プロモーター）をレポーター遺伝子の GFP とともに成熟花粉に導入した場合、伸長した花粉管全体から GFP 蛍光が検出された。それに対して、gH2A プロモーターを GFP とともに成熟花粉に導入した場合は、花粉管の一部に強い蛍光が見られた。DAPI との二重染色の結果から、蛍光を発する部分には核が含まれており、雄原細胞と判断された。さらに、2 個の精細胞からも特異的蛍光を得た。従って、この手法によって雄性配偶子（雄原細胞）特異的プロモーターの活性を初めて検定できたことになる。続いて、gH2A プロモーターのディレクションクローンを作製し、この実験系を用いて、雄性配偶子特異的プロモーターのシス配列解析を行い、特異的発現に関わる重要なシス因子

を同定した。

(4) テッポウユリの花粉管中の2個の精細胞はこれまで等価と考えられていたが、クロマチン形態に明らかな差異がみられ、二型性が存在することを初めて見出した。伸長中の花粉管では、先導する栄養核に続き、一つの精細胞(S1)ともう一つの精細胞(S2)が存在するが、約80%の花粉管でS1核よりS2核の方が約40%大きかった。この核の二型性は、自家受粉の場合でも他家受粉の場合でも同様にみられ、他家受粉の場合受精直前まで維持されていた。S1は栄養核と物理的に繋がっていることが想定されているが、その実体は明らかになっていない。

一方、(2)で開発した手法を用いて標識した二つの精細胞間には大きさの違いがほとんど認められなかったので、この二型性はクロマチン形態の違いと考えられる。二型性の意義は不明であるが、二つの精細胞間の選択的受精、あるいはそれに伴う雄性配偶子核のエピジェネティックな制御機構の存在が示唆される。

(5) 先にテッポウユリで見出した雄性配偶子豊富ヒストン遺伝子 *gHI* (ヒストンH1の変種) をアグロバクテリウム法を用いてタバコに導入した形質転換タバコを作成した。テッポウユリのリンカーヒストンはタバコのヘテロクロマチン領域に局在したものの、タバコの発生分化には大きな影響を与えず、稔性も正常であった。しかしながら、体細胞において機能面での改変が認められ、ヒストンを用いたエピジェネティック制御が応用面でも可能であることを示唆した。

#### 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6件)

- ① Yamada, K., Yanada, K., Matsuzawa, A., Tanaka, I., Shiota, H.: Expression of foreign aquaporin genes in lily pollen protoplasts. *Plant Biotechnol.*, 査読有, 28: 509-514, 2011  
DOI:10.5511/plantbiotechnology.11.0922a
- ② Tanaka, I.: Molecular morphological studies on pollen development using protoplasts. *Plant Morphol.*, 査読無, 23: 53-59, 2011  
<http://square.umin.ac.jp/pl-morph/>
- ③ Igawa, T., Fujiwara, M., Tanaka, I., Fukao, Y., Yanagawa, Y.: Characterization of bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase

expressed in male gametophyte of higher plants. *BMC Plant Biology*, 査読有, 10: 200-211, 2010

DOI:10.1186/1471-2229-10-200

- ④ Shiota, H., Matsuzawa, A., Kurokawa, K., Sugimoto, G., Yonezawa, M., Tanaka, I., Kamada, H.: Nucleotide polymorphism in the carrot embryogenesis abundant gene *DC8/ECP63*. *Scientia Horticulturae*, 査読有, 125: 767-770, 2010  
DOI:10.1016/j.scienta.2010.05.001
- ⑤ 田中一郎、最上則史、佐野弥生子: 花粉内栄養細胞の分化とクロマチン、横浜市立大学論叢自然科学系列、査読無、60: 41-49, 2010
- ⑥ Sano, Y., Tanaka, I.: Distinct localization of histone H3 methylation in the vegetative nucleus of lily pollen. *Cell Biol. Int.*, 査読有, 34: 253-259, 2010  
DOI:10.1042/CBI20090124  
[www.cellbiolint.org](http://www.cellbiolint.org)

[学会発表] (計13件)

- ① 朝倉さくら子、ニンジン液胞膜アクアポリン遺伝子 *DcTIP3* の発現解析、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学
- ② 新屋智尋、テッポウユリ花粉に特異的な *Argonaute* (AGO) の発現解析、第29回日本植物細胞分子生物学会、2011年9月7日、九州大学
- ③ 田中一郎、細胞からみる花粉の使命、日本花粉学会第51回大会、2010年10月9日、中央大学
- ④ 佐野弥生子、テッポウユリの花粉管伸長過程における栄養核クロマチンの変化、日本植物学会第74回大会、2010年9月11日、中部大学
- ⑤ 新屋智尋、テッポウユリ花粉における *Argonaute* 様遺伝子の単離と発現解析、日本植物学会第74回大会、2010年9月11日、中部大学
- ⑥ 田中一郎、プロトプラストを用いた花粉発生の分子形態学、日本植物形態学会第22回大会、2010年9月8日、中部大学

[図書] (計2件)

- ① 田中一郎、他、エヌ・ティー・エス、花粉の世界をのぞいてみたら、2012、335
- ② 田中一郎、他、生物学辞典、東京化学同人、2010、1620

[その他]

ホームページ等

<http://histone.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 一郎 (TANAKA ICHIRO)  
横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科  
学研究科・教授  
研究者番号：60175445

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：