

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780034

研究課題名（和文） 高等植物における異型精細胞形成機構の解明

研究課題名（英文） Formation mechanism of sperm dimorphism in higher plant

研究代表者

平野 智也 (HIRANO TOMONARI)

独立行政法人理化学研究所・イオンビーム育種研究チーム・研究員

研究者番号：80455584

研究成果の概要（和文）：

キルタンサスでは、花粉管伸長過程で一組の精細胞が異型化し、雄原細胞分裂直後の表層微小管構成時に蓄積の差異が生じる事が明らかとなった。精細胞形成の分子基盤情報を得るために遺伝子解析を行い、異型化特異的ステージの前後で発現量に変化する遺伝子の候補リストが得られた。花粉に重イオンビーム照射することで、雄性配偶子の研究に有用な新たな材料を作出するとともに、雄性配偶子の DNA 損傷応答機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In *Cyrtanthus mackenzii*, the sperm cells showed structural dimorphism, and differences in microtubule accumulation between the pair of sperm cells arose during the process of cortical microtubule reorganization. As results from EST analysis for elucidation of molecular mechanisms on the sperm dimorphism, the candidate genes with changes in expression during sperm cell formation were listed up. Male gametes irradiated heavy ion beam had a potential to use for the study of sperm cell formation. It was also revealed that the generative cells recognized and managed genomic lesions during the pollen tube growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：花粉、雄原細胞、精細胞、遺伝子発現、EST解析、微細操作、重イオンビーム

1. 研究開始当初の背景

園芸作物の受精・発生のプロセスの理解は、結実のための生理機構や交雑による形質改良のために重要であるが未知の点も多い。中でも受精イベントの前段階として成熟花粉

から花粉発芽、花粉管伸長を経て胚珠に至る過程は、‘極めて短い時間に’、‘形態的・質的变化を生じ’、‘胚珠に向かって走行する能動的反応’を示す特殊性のため近年分子生物学的アプローチにより盛んに解析が進め

られている。

高等植物が持つ独自の生殖機構‘重複受精’では、花粉もしくは花粉管内で形成された2つの精細胞が、卵細胞と中央細胞それぞれと受精する。セイロンマツリ (*Plumbago zeylanica*) では、2つの精細胞が卵細胞および中央細胞と選択的に重複受精を行うことが報告されている (Russell 1985)。またセイロンマツリ、タバコ等の数種においては一組の精細胞間における形態的および生理的な差異(精細胞の異型化)が報告されており (Weterings and Russell 2004)、精細胞が機能的に分化し選択的な受精を行なう機構が存在することが予想されている。しかし、精細胞の分化過程および選択的受精機構のいずれもその詳細は明らかになっていない。

重複受精機構で解明されていない現象が数多く存在する最大の理由は、胚珠内及び花粉管内という特殊な環境下でプロセスが進行することが挙げられる。研究代表者は、高等植物における試験管内受精技術の研究を通じて、花粉における *in vitro* 培養系および微細操作技術を活用した花粉管伸長過程における雄性配偶子単離系を開発した (Hirano and Hoshino 2009)。本技術によりこれまでの技術的な困難さが緩和され、研究報告が特に少ない2細胞性花粉の雄性配偶子研究において新たな知見が得られると期待された。

2. 研究の目的

研究代表者は、2細胞性花粉を持つキルタンサス (*Cyrtanthus mackenii*) において、花粉管伸長過程で形成される精細胞が異型化する現象の予備的知見を得ていた。従って、本研究では、キルタンサスの花粉を用いて花粉管伸長過程における雄性配偶子の挙動を解析し、精細胞異型化機構を明らかにすることを目的とした。異型化機構の解明に向けて以下2つのテーマを設けた。

(1) 精細胞異型化の素過程を精査することで、異型化が生じる特異的ステージを明らかにする。本研究では、通常の成熟花粉を用いた解析に加え、変異原として重イオンビームを照射した花粉を用いることとした。これにより、DNA 損傷応答という異なる細胞分裂制御機構が活性化した条件下における雄性配偶子の挙動を解析することが可能となる。キルタンサスでは、突然変異体リソースおよび遺伝子発現情報、遺伝子組換え技術が皆無である。本研究により、精細胞異型化機構を多角的に解析することを可能にする。

(2) モデル植物であるシロイヌナズナやイネでは、精細胞の異型化は報告されていないことから、異型化過程の分子機構を明らかにするためには、キルタンサスにおいて花粉管伸長過程で発現する遺伝子情報を新たに取

得する必要がある。異型化の Key 遺伝子の発現は雄原細胞分裂時もしくは精細胞形成直後であると推定されることから、異型化特異的ステージの前後で遺伝子発現の変化を調査し、発現量が特異的に変化する遺伝子の同定を試みる。以上より、精細胞の異型化制御ネットワークの基盤的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 重イオンビーム照射および花粉培養

本研究に用いたキルタンサスの成熟花粉は、開葯後に回収し -20°C で実験に用いるまで保存した。1.5 ml チューブに入れた成熟花粉に、炭素イオンビーム (線エネルギー付与: $22.5\text{ keV}/\mu\text{m}$) を $10\text{--}80\text{ Gy}$ 照射し、 -20°C で保存した。花粉発芽および花粉管伸長は、液体発芽培地 (Hirano and Hoshino 2009) に花粉を飛散させ、暗黒下 25°C で培養を行った。

(2) 雄性配偶子単離および免疫染色

伸長した花粉管を 2% Tween 20 を添加した固定液中でチョッピングすることで、雄性配偶子の単離および固定を同時に行なった。30分間固定した後に細胞分取装置を用いて倒立顕微鏡下で雄性配偶子を回収し、免疫染色に用いた。ブロッキング処理を行った後に、DAPI, 抗 γH2AX 抗体および抗チューブリン抗体による3重染色を行い蛍光顕微鏡下で観察を行った。

(3) RNA シーケンシング

培養6時間および12時間後の花粉管を液体培地より回収し、それぞれのサンプルから Total RNA を抽出した。DNA 消化、精製後 Ovation RNA-Seq System (NuGEN) を用いて RNA 増幅および cDNA 合成を行った。シーケンスライブラリーは GS Titanium Rapid Library MID Adaptors Kit および GS Rapid Library Prep Kit を用いて作成した。6時間と12時間由来のライブラリーを等量混合し、GS Junior System および GS FLX System を用いて、それぞれ1ランシーケンスを行った。

(4) シーケンスデータ解析

RNA シーケンスで得られたリード配列データより、MIRA assembler を用いてアセンブリ解析を行いコンティグ配列を得た。さらに、CAP3 assembler によりコンティグ配列の統合を行い、最終的なコンティグ配列を得た。アノテーション解析を行うとともに、遺伝子の発現量を比較法として、RPKM (Read Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) 値を各コンティグ配列について算出した。

4. 研究成果

(1) キルタンサスにおける精細胞異型化

花粉管伸長時の相対的核 DNA 含量をフローサイトメトリー分析した結果、培養9時間

から 12 時間に雄原細胞が分裂し精細胞を形成し、また花粉管内の雄原細胞および精細胞はそれぞれ栄養核と結合し male germ unit (MGU) を形成することが明らかとなった。MGU を構成する精細胞において核の形態を比較したところ、精細胞形成直後の培養 12 時間から 栄養核と結合する精細胞 (Svn) に比べ、結合しない側の精細胞 (Sua) の精核が伸長し精細胞が異型化していることが明らかとなった(図 1)。

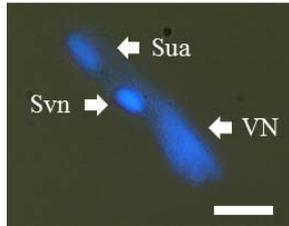


図 1. 培養 24 時間後の花粉管より単離した精細胞の DAPI 染色像。VN: 栄養核、Svn: 栄養核と結合する精細胞、Sua: 栄養核と結合しない側の精細胞。スケールバーは 20 μ m を示す。

雄原細胞や精細胞の形態維持には表層微小管が重要な働きをしていることから、共焦点レーザー顕微鏡で Z 軸セクションングを行った。蛍光強度から精細胞間の微小管蓄積量を比較した結果、Svn に比べ Sua において多くの微小管蓄積が見られた。チューブリン脱重合剤であるオリザリン処理により精核の形態的差異が見られなくなったことから、精細胞で見られる異型化は精細胞間の微小管蓄積の差異に起因すると考えられる。異型化過程を精査するため、精細胞形成過程における微小管分布を調査した。雄原細胞の分裂中期から終期においては微小管分布の偏りは見られなかったことから(図 2)、隔膜形成体消失後の表層微小管形成時に蓄積の

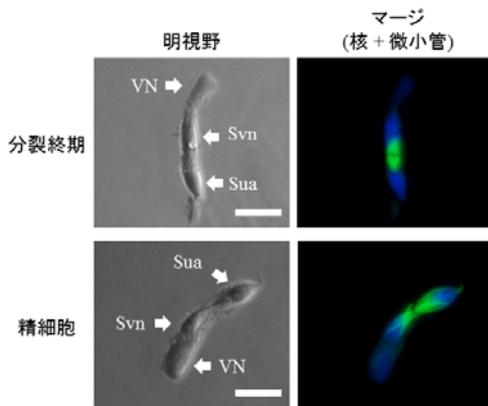


図 2. 培養 12 時間後の雄原細胞分裂像。蛍光画像は、青色が DNA 染色像、緑色が微小管染色像を示す。図中の略語、スケールは図 1 と同様。

差異が生じる事が示唆された。これまでに植物の精細胞が形態的に異型化する現象は数種において報告されている。しかし、表層微小管が関与していることはキルタンサスを用いることで初めて明らかとなった。また、本研究で確立した微細操作技術を用いた解析法が、雄性配偶子研究に非常に有用であることが実証された。

(2) 重イオンビーム照射花粉における雄性配偶子の挙動

重イオンビームを照射した細胞では、DNA 二本鎖切断が高頻度に生じるため、欠失変異、染色体再構成等が誘発される。重イオンビームの一種である炭素イオンビームをキルタンサス成熟花粉に照射し、花粉管伸長時における雄性配偶子の挙動を調査した。本研究に用いた線量範囲 (10–80 Gy) では、照射花粉において発芽遅延、発芽率の低下は見られなかったが、精細胞形成率は線量の増加に伴い低下することが明らかとなった。照射花粉における精細胞形成過程を明らかにするために、培養 12 時間後に雄性配偶子の細胞周期を調査した。10 Gy 照射花粉では、無照射花粉と同等の分裂期の進行度合いであったが、40 および 80 Gy 照射後は分裂中期および雄原細胞が増加していた。さらに、80 Gy 照射区では培養 12 時間の時点で精細胞形成が見られなかったことから、分裂の遅延もしくは停止が起きている可能性が示唆された。DNA 二本鎖切断が生じた際に誘導されるリン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) の免疫染色により、培養 12 時間の雄性配偶子における DNA 損傷を解析したところ、無照射および 10 Gy 照射花粉では細胞周期に関わらず γ H2AX のフォーカスは検出されなかった。40 および 80 Gy 照射花粉では、分裂中期で多くの細胞にフォーカスが検出されたが(図 3)、分裂後期および終期、精細胞では

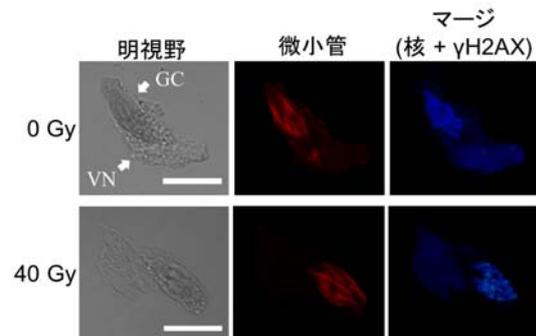


図 3. 炭素イオンビーム照射雄原細胞の分裂中期における γ H2AX フォーカス像。蛍光画像は、青色が DNA 染色像、緑色が γ H2AX 染色像、赤色が微小管染色像を示す。GC: 雄原細胞。その他の略語、スケールは図 1 と同様。

γ H2AX フォーカスが見られなかった。以上より、高線量照射区での精細胞形成率の低下は、修復されずに残存した DNA 二本鎖切断によって分裂の遅延が起きていることが明らかとなり、分裂中期において細胞周期を監視するスピンドル形成チェックポイント機構が関与することが示唆された。また、高線量照射した雄性配偶子において、培養 24 時間後では、 γ H2AX フォーカスを有する細胞の割合が低下することから、花粉管伸長中の雄性配偶子でも DNA 損傷が修復されることが明らかとなった。次世代に正確な遺伝情報を伝達するためには雄性配偶子における DNA 損傷修復機構が必要と考えられるがその詳細は不明であった。本研究結果により花粉管伸長過程の雄性配偶子における DNA 損傷応答機構の一端が初めて明らかとなった。

高線量照射した雄性配偶子では、分裂後期以降に遅滞染色体、染色体橋が多く観察され、最終的に表層微小管の配向は精細胞様であるが染色体の分配が起こらない非還元性の雄原細胞様精細胞を高頻度で形成することが明らかとなった (図 4)。精細胞異型化機構および分裂制御機構を精査する上で、正常な精細胞と雄原細胞様精細胞というように比較可能な材料が得られたことは、非モデル植物における研究の遂行上意義深い。

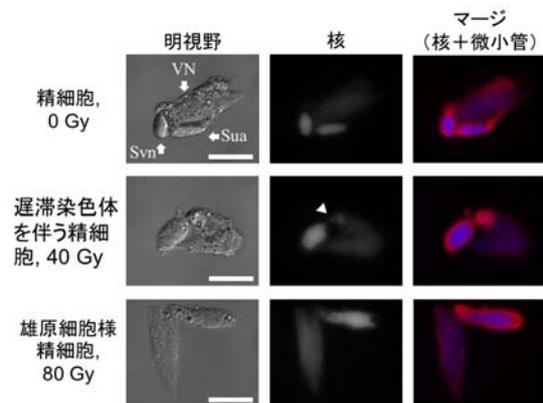


図 4. 炭素イオンビーム照射後に形成した精細胞。蛍光画像は、青色が DNA 染色像、赤色が微小管染色像を示す。図中の矢じりは遅滞染色体を示す。その他の略語、スケールは図 1 と同様。

(3) 花粉管伸長時の遺伝子発現解析

精細胞異型化は雄原細胞分裂直後の表層微小管の再構成時に生じることから、異型化の Key 遺伝子の発現は精細胞形成時もしくは形成直後であると推定される。これまでの研究で、キルタンサスの花粉管培養では、培養 9 時間から 12 時間にかけて雄原細胞の分裂、精細胞形成が起こる。従って、精細胞形成の基盤情報を得るために、精細胞形成以

前として花粉培養 6 時間の花粉管、形成直後の精細胞および分裂期の細胞を含む花粉管として、培養 12 時間の花粉管から Total RNA を抽出し EST 解析を行った。

GS Junior System および GS FLX System によりシーケンス解析を行い、6 時間のライブラリーより約 22 万、12 時間のライブラリーより約 49 万のリード配列を取得した。MIRA assembler を用いて 6 時間、12 時間全てのリードより 45555 個のコンティグ/シングレット配列を得た。これらの配列情報をもとに相同性解析したが、同一タンパク質に相同性を示すコンティグ/シングレット配列が非常に多くみられ、さらに配列の統合が必要であった。従って、MIRA に加え CAP3 assembler を用いることで最終的に 25786 個のコンティグ/シングレット配列情報を取得した。コンティグを構成するリード配列が、培養 6 時間由来のみ、もしくは 12 時間のみから構成されているものが、各培養時間で特異的に見られる遺伝子と考えられる。RPKM 値を用いることで、培養 6 時間で特異的に見られるコンティグ/シングレット配列が 1217 個、12 時間に特異的な配列が 5571 個抽出された。培養 12 時間由来のシーケンスライブラリーから得たリード配列が 6 時間由来の約 2 倍であった点は考慮する必要がある。しかしながら、特異的配列が培養 12 時間で 6 時間の約 4 倍得られている点、またリード配列数が少なかった培養 6 時間でも特異的配列が多数得られている点から、異型化特異的ステージの前後で発現量が変化する遺伝子の候補リストが得られたものと考えられる。

得られたコンティグ/シングレット配列についてアノテーション解析を行い、遺伝子オントロジーによるカテゴリー分けを行った (表 1)。single-organism process のカテゴリー中には、細胞分裂制御に関わる遺伝子が含まれており、培養 6 および 12 時間に特異的な配列が見られたことから、雄原細胞もしくは精細胞由来の遺伝子発現情報が反映されていると考えられる。また DNA 損傷応答に関わる遺伝子が見られたことは、前述した雄性配偶子で DNA 修復が行われることを支持する結果である。cellular process および single-organism process 内には微小管形成に関わる遺伝子が含まれていた。異型化ステージである隔膜形成体消失から表層微小管再構成に関わる遺伝子については、得られた配列情報が使用する抗体の選定および新たな抗体作成に利用可能である。また、キルタンサスで見られた精細胞異型化は、細胞学的観察の結果から不等分裂とは異なる制御機構が関わりと予想される。従って、本研究で構築した分子基盤情報に含まれる転写因子も解析対象として重要と考えられる。今後、注目するカテゴリーの詳細な遺伝子発現解析、

発現部位の特定を行い、異型化に関わる遺伝子の特定を進める必要がある。

表 1. 遺伝子オントロジー別のコンテイングおよびシングレット配列数

GO term	Total	6 h unique	12 h unique
reproduction	246	5	44
immune system	11	0	3
process			
metabolic process	4166	118	752
cellular process	4477	126	793
biological adhesion	2	0	0
signaling	427	10	68
multicellular	392	12	77
organismal process			
developmental	399	12	74
process			
growth	179	5	31
locomotion	3	0	2
single-organism	2556	69	401
process			
rhythmic process	8	0	2
response to stimulus	1127	36	202
localization	850	32	121
multi-organism	231	10	42
process			
biological	1163	20	190
regulation			
cellular component			
organization or	1034	29	156
biogenesis			

相同性検索において E-value < 1.0E-9 のものを集計した。

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 T. Hirano, K. Takagi, Y. Hoshino, T. Abe, DNA damage response in male gametes of *Cyrtanthus mackenii* during pollen tube growth. *AoB PLANTS*, 5, 2013, plt004, DOI: 10.1093/aobpla/plt004, 査読有.
- ② Y. Kazama, L. Ma, T. Hirano, S. Ohbu, Y. Shirakawa, S. Hatakeyama, S. Tanaka, T. Abe, Rapid evaluation of effective linear energy transfer in heavy-ion mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology*, 29, 2012, 440–444, DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.0921a, 査読有.
- ③ T. Hirano, Y. Kazama, S. Ohbu, Y. Shirakawa, L. Yang, T. Kambara, N. Fukunishi, T. Abe, Molecular nature of mutations induced by high-LET irradiation with argon and carbon ions in *Arabidopsis thaliana*. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 735, 2012, 19–31, DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2012.04.010, 査読有.
- ④ M. T. Fujiwara, Y. Yoshioka, T. Hirano, Y. Kazama, T. Abe, K. Hayashi, R. D. Itoh, Visualization of plastid movement in pollen tube of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 2012, 34–37, DOI: 10.4161/psb.7.1.18484, 査読有.
- ⑤ Y. Kazama, T. Hirano, H. Saito, Y. Liu, S. Ohbu, Y. Hayashi, T. Abe, Characterization of highly efficient heavy-ion mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 11, 2011, 161, DOI: 10.1186/1471-2229-11-161, 査読有.
- ⑥ T. Hirano, Y. Hoshino, Sperm dimorphism in terms of nuclear shape and microtubule accumulation in *Cyrtanthus mackenii*. *Sexual Plant Reproduction*, 23, 2010, 153–162, DOI: 10.1007/s00497-009-0123-2, 査読有.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 平野智也, 風間裕介, 大部澄江, 白川侑希, 阿部知子, 重イオンビーム誘発突然変異に対する LET 効果の解析, 第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会, 2011 年 9 月, 九州大学.
- ② T. Hirano, K. Takagi, Y. Hoshino, T. Abe: Analysis of DNA damage response in male gametes of *Cyrtanthus mackenii* during pollen tube growth, XVIII International Botanical Congress, 2011 年 7 月, Melbourne, Australia.
- ③ 平野智也, 高城啓一, 星野洋一郎, 阿部知子: 重イオンビームを用いたキルタンサ

ス雄性配偶子の DNA 損傷応答解析, 園芸学会平成 23 年度春季大会, 2011 年 3 月, 宇都宮大学.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① T. Hirano, Y. Hoshino, Nova Science Publishers, Pollen: Structure, Types and Effects, 2010, pp. 127-134.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

① 解説

山路達也の「エコ技術研究者に訊く」,
重イオンビームが生物進化を加速する.

URL,

<http://archive.wiredvision.co.jp/blog/yamaji/201003/201003121701.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 智也 (HIRANO TOMONARAI)

独立行政法人理化学研究所・イオンビーム育種研究チーム・研究員

研究者番号: 8 0 4 5 5 5 8 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし