

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650083

研究課題名(和文)核融合制御機構の解析

研究課題名(英文)Mechanisms in regulation of nuclear fusion

研究代表者

岡本 龍史 (Okamoto, Takahsi)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：50285095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：受精直後の植物の受精卵内には卵細胞核および精細胞核が存在し、それら核はすみやかに融合して受精卵核となり両親の遺伝情報が混ざり合う。一方、植物の胚のうや胚乳、動物の骨格筋繊維や胚盤などでは、細胞内に複数の核が存在するがそれら核が融合することはない。本研究では、これら「核融合を制御する機構」を見いだすことを目的に研究を行い、卵細胞と精細胞が核融合の進行因子および促進因子をそれぞれ有することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Transmission of genetic material from parents to next generation is a fertilization-dependent event. Upon fertilization, male and female gametes fuse each other, and the male and female nuclei in the zygote are fused to form a zygotic nucleus. In contrast, cell of embryo sac/endosperms of angiosperms and muscle cell of animals possess multiple nuclei in a cell, and these multiple nuclei do not fuse in the cell. In the study, mechanisms in the regulation of nuclear fusion in cells were investigated by the artificial fusion of rice egg cells, sperm cells and somatic cells. The results indicated that egg cell possess the molecular machineries for nuclear fusion, and that putative activating factor for the machinery of nuclear fusion, which exists in sperm cell, would be delivered into an egg cell by the fusion of a sperm cell, resulting in successful regulation for nuclear fusion in zygote.

研究分野：植物発生学

キーワード：核融合 細胞融合 受精卵 シンシチウム 核の合一 卵細胞 精細胞 体細胞

1. 研究開始当初の背景

多細胞真核生物を構成するほとんどの細胞では1細胞1核の状態が保たれているが、1個の細胞中に複数の核が存在する細胞として、合胞体(シンシチウム)と雌雄配偶子が融合した直後の受精卵がある。合胞体は、植物の胚のうや胚乳、昆虫の初期胚、動物の骨格筋繊維や胚盤などの形成期に生じるが、細胞内の核が融合することはない。一方、受精卵中では、受精直後には精核と卵核の2つの核が存在するが、それらは速やかに融合(合一)し、受精卵核(接合子核)を形成する。このように、1個の細胞内で複数の核が存在するという点では合胞体と受精卵は共通しているが、前者では核が融合しない状態で安定しているのに対して、後者では両核の融合が速やかに進行するという明確な違いがある。

申請者は、イネやトウモロコシなどの被子植物の花から卵細胞および精細胞を単離したのち、それらを電気的に融合させて受精卵を作出する系(in vitro 受精系)を確立し、受精卵の活性化や初期発生機構に関する研究を進めてきた(,)。さらには、染色系(細胞核)、核膜およびアクチン繊維が蛍光標識されている形質転換イネを作製し、これらイネから単離した配偶子を用いて in vitro 受精を行うことにより、受精卵中における核の動態をモニターできる系を確立しつつあった()。このような背景のもと、本研究は、卵細胞、精細胞、体細胞などを様々な組み合わせで融合させた細胞中の核の動態を詳細に観察・解析することで、核融合を制御する機構の一端を明らかにすることを目的として研究を遂行した。

2. 研究の目的

通常の細胞は1細胞1核であるが、合胞体(シンシチウム)と雌雄配偶子が融合した直後の受精卵には、1個の細胞中に複数の核が存在する。これら2種の細胞は、細胞内に複数の核を有するという点では共通しているが、合胞体では核が融合しない状態で安定しているのに対して、受精卵中では雌雄核の融合が速やかに進行するという明確な違いがある。本研究では、この違いは細胞が有している「核融合を制御する機構」に基づくものであることを、卵細胞、精細胞、体細胞などを様々な組み合わせで融合させた細胞中の核の動態を詳細に観察・解析することにより明確に提示するとともに、その機構を司る分子基盤の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イネ受精卵中における核の合一機構：受精卵中における雌雄核の融合過程およびその動態機構を調べるため、Histone H2B-GFP および H2B-RFP により核内クロマチンを、SUN2-GFP により核膜を、Lifeact-tagRFP によ

りアクチン繊維をそれぞれ蛍光標識したイネ形質転換体を作成した。それら形質転換体から配偶子を単離し、卵細胞の核、核膜、アクチン繊維、および精細胞の核、核膜が可視化されていることを確認したのち、それら配偶子を用いた in vitro 受精系により融合させ、受精卵中における雌雄核の移動、雌雄核クロマチンの動態、および核合一時におけるアクチン繊維骨格動態を観察・解析した。

(2) 核合一の制御機構：この項目で用いる細胞はすべてヒストン H2B-GFP で細胞核が蛍光標識されている形質転換イネから単離または調製した。イネ卵細胞、精細胞、および体細胞を任意の組み合わせで融合させ、それら融合細胞内において核融合が進行するのかが否か明らかにし、さらに、進行する際はその融合に要する時間を測定した。これにより、核タイプと核融合の関係性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 核の合一の動態観察および受精誘導性遺伝子の初期発現：配偶子融合後 10~30 分間で精細胞核はアクチン繊維依存的に卵細胞核と接するようになり、次に、卵核クロマチンの精核内への流入が見られた。その後、融合後 30~70 分から、融合核内で精核クロマチンの脱凝集が始まり、融合後 240 分程には精核のクロマチンが融合核内に均一に広がる様子が観察された(図 1)。これら観察結果から、被子植物の受精卵における核合一過程の経時的な動態が明らかとなり、核合一過程を 8 つのステージ(I-) に分類することが可能になった。

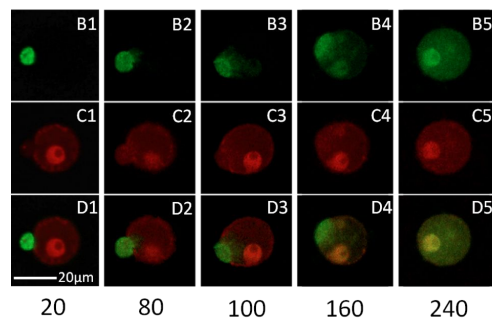


図 1. 核合一過程の経時的観察。緑は精核クロマチン (H2B-GFP)、赤は卵核クロマチン (H2B-RFP) 由来のシグナルをそれぞれ示す。

これら細胞生物学的解析に加えて、各々の核合一ステージにある受精卵中における受精誘導性遺伝子群の発現プロファイルを調べた。その結果、それら遺伝子群を、1) 精細胞 mRNA 由来の転写産物として検出されるもの、2) 精核クロマチンの脱凝集期に転写が開始されるもの、および、3) 核合一の完了後(ステージ以降)に転写が開始されるもの、の 3 グループに分けるこ

とができた。

(2) 核合一過程におけるアクチンメッシュワークの機能と動態：アクチンフィラメント依存的な核移動機構を明確にするために、卵細胞および受精卵内におけるアクチンフィラメントと精核の動態の定量的解析を行った。その結果、細胞内全域に広がったメッシュ状のアクチンフィラメントが卵核方向へと移動・集約し、受精卵内の精核は、精核膜とアクチンフィラメントとの接着を介して、卵核方向へと移動することが示唆された(図2)。また、卵細胞および受精卵内におけるこのアクチンメッシュワークの集約速度が、精細胞の融合後、および雌雄配偶子核の融合過程において、上昇することが観測された。このことから、アクチンメッシュワークの集約が精核の移動に加え、その後の受精卵発生に対しても何らかの機能を持つ可能性が示された。

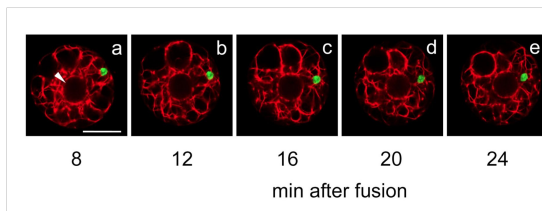


図2.核合一過程におけるアクチンメッシュワークと精核の動態。緑は精核クロマチン(H2B-GFP)赤はアクチン繊維・メッシュワーク(Lifeact-RFP)由来のシグナルをそれぞれ示す。

(3) 核融合制御機構の実験発生的手法による解析：精細胞と卵細胞を融合させた受精卵内では、融合後4時間以内に核の合一が完了した。興味深いことに、2個の卵細胞を融合させた融合細胞内においても核融合は進行するが、融合の完了には約20時間要することが明らかになった。これらに加え、卵細胞同士を融合させた融合細胞にさらに精細胞を融合させると、核合一の進行が速くなり、約12時間で融合細胞内の3つの核が1つに合一した。また、卵細胞と葉プロトプラストを融合させた融合細胞においては核の合一が進行したが、および、葉プロトプラスト同士の融合細胞では融合後24時間までの観察内では核合一が見られなかった。これら結果から、卵細胞が精核以外の核とも核合一を行う機構を保持すること、および、精細胞内には卵細胞内の核合一機構を促進的に機能させる因子が存在することが示唆された(図3)。

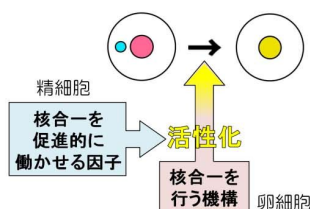


図3.核合一制御の推定モデル

<引用文献>

Uchiumi et al., *Planta* 226:581-589, 2007
Okamoto, *Methods Mol. Biol.*, 710: 17-27, 2011.
Abiko et al., *J Exp Bot* 64: 1927-1940, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

Toda E., Ohnishi Y. and Okamoto T. (2016) Development of polyspermic rice zygotes. *Plant Physiol.* 171: 206-214, 査読有, doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.15.01953>

Matsumura T. and Okamoto T. (2016) Isolation of gametes from *Brachypodium distachyon*. *Plant Biotech.* 33: 39-43, 査読有, <http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.16.0123a>

Ohnishi Y. and Okamoto T. (2015) Karyogamy in rice zygotes: Actin filament-dependent migration of sperm nucleus, chromatin dynamics, and de novo gene expression. *Plant Signaling & Behavior*, 10: e989021, 査読有, DOI:10.4161/15592324.2014.989021

Ohnishi Y. and Okamoto T. (2015) Microscopic observation, three-dimensional reconstruction, and volume measurements of sperm nuclei. *Bio Protocol*, 5: e1437, 査読有, <http://www.bio-protocol.org/e1437>

Ohnishi Y., Hoshino R. and Okamoto T. (2014) Dynamics of male and female chromatin during karyogamy in rice zygotes. *Plant Physiol.* 165: 1533-1543, 査読有, doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.236059>

Abiko M., Furuta K., Yamauchi Y., Fujita C., Taoka M., Isobe T., and Okamoto T. (2013) Identification of proteins enriched in rice egg or sperm cells by single-cell proteomics. *PLoS ONE* 8: e69578, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0069578.

Abiko M., Maeda H., Tamura K., Hara-Nishimura I. and Okamoto T. (2013) Gene expression profiles in rice gametes and zygotes: Identification of gamete-enriched genes and up- or down-regulated genes in zygotes after fertilization. *J. Exp. Bot.* 64: 1927-1940, 査読有, doi: 10.1093/jxb/ert054.

[学会発表](計 15件)

Ohnishi Y., Okamoto T. Continuous convergence of actin meshwork for nuclear migration in rice zygote during karyogamy. 24rd International Congress on Sexual Plant Reproduction, March 21, 2016

(Tucson, USA)

Toda E., Ohnishi Y., Okamoto T. Development of polyspermic rice zygote produced in vitro and possible contribution of polyspermy to polyploid formation. 24th International Congress on Sexual Plant Reproduction, March 21, 2016 (Arizona, USA)

Okamoto T., Toda E., Ohnishi Y. Fusion of gamete nuclei and division of zygote nucleus in plants and animals. Symposium“Fusion in Fertilization: Interdisciplinary Collaboration among Plant and Animal Scientists” 79th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan, September 12, 2015 (Niigata, Japan).

Ohnishi Y., Okamoto T. Actin networks in rice zygotes; continuous convergence to egg nucleus functions in karyogamy. International Symposium “Establishing Next-Generation Genetics” May 29, 2015 (Nara, Japan)

Toda E., Ohnishi Y., Okamoto T. Development of polyspermic rice zygotes produced in vitro. International Symposium “Establishing Next-Generation Genetics” May 29, 2015 (Nara, Japan)

Ohnishi, T., Abiko, M., Okamoto, T. Relationship between karyogamy progression and onset of de novo gene expression in rice zygotes produced by in vitro. 23rd International Congress on Sexual Plant Reproduction, July 15, 2014 (Port, Portugal)

Toda, E., Ohnishi, T., Okamoto, T. Dynamics of male and female chromatin during karyogamy in rice zygotes. 23rd International Congress on Sexual Plant Reproduction, July 15, 2014 (Port, Portugal)

大西由之佑、岡本龍史「イネ受精卵内における精核の移動はアクチンメッシュの卵核方向への集約に依存する」日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 12 日、新潟大学（新潟県・新潟市）

岡本龍史、戸田絵梨香、村松岳朗、大西由之佑、「配偶子融合法による同質および異質倍数体の作出」、日本園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015 年 9 月 28 日、徳島大学（徳島県・徳島市）

岡本龍史、戸田絵梨香、村松岳朗、大西由之佑、「in vitro 受精系を用いた同質および異質倍数体の作出」、2016 年 3 月 22 日、日本育種学会第 129 回講演会、横浜市立大学（神奈川県・横浜市）

岡本龍史、戸田絵梨香、大西由之佑、「イネ in vitro 受精系を用いた解析：受精卵中における核合一機構と同質倍数体の作出」、2015 年 11 月 6 日、第 36 回種子生理生化学研究会年会、ホテル翔峰（長野県・松本市）

大西由之佑、安彦真文、岡本龍史「イネ受精卵中の核合一過程の動態と受精誘導性遺伝子の新規発現」2014 年 9 月 13 日、日本植物学会第 78 回大会、明治大学（神

奈川県・川崎市）

大西由之佑、岡本龍史「イネの受精卵における核合一の動態：アクチン繊維依存的な核の移動」2014 年 11 月 26 日、第 37 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Toda, E., Ohnishi, Y., Okamoto, T. “Development of polyspermic rice zygotes produced in vitro” 2015 年 3 月 17 日第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学（東京都・世田谷区）

古田顕尚、岡本龍史「イネ卵細胞および受精卵への物質導入系の確立」植物化学調節学会第 49 回大会、2014 年 10 月 18 日、京都大学（京都府・京都市）

〔図書〕（計 2 件）

Okamoto, T. (2014) Gene and protein expression profiles in rice gametes and zygotes: a cue for understanding the mechanisms in gametic and/or early zygotic development of angiosperms. In “Sexual Reproduction in Animals and Plants”, Eds, Sawada H., Inoue H., Iwano M., Springer, 480(pp. 369-382)

井川智子、東山哲也、岡本龍史 (2014) 「第 7 章：被子植物の受精 2：花粉管の伸長とガイダンス、配偶子の融合、核の合一」、動植物の受精学：共通機構と多様性、澤田均編、化学同人、332(pp.103-118)

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：植物配偶子の電気融合による同質および異質倍数性植物の作出
発明者：岡本龍史、大西由之佑、戸田絵梨香

権利者：首都大学東京

種類：特願

番号：2014-195165

出願年月日：2014 年 9 月 25 日

国内外の別：国内

名称：植物に物質を導入する方法

発明者：加藤紀夫、岡本龍史

権利者：日本たばこ産業株式会社、首都大学東京

種類：特願

番号：2016-70288

出願年月日：2016 年 3 月 31 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

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

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・教授
研究者番号：50285095

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし