

## 植物の配偶体を用いた 新たな遺伝子機能解析系を開発

本学自然科学系（理学部）の西川周一教授、大学院生の Dukhyun Hwang、基礎生物学研究所の亀井保博特任准教授らの研究グループは、植物の雌性配偶体（卵細胞をつくる半数体の個体）中で遺伝子の発現を誘導する新たな手法を開発しました。この手法を用いて、植物の生殖過程で観察される細胞核の融合で、SUN タンパク質という進化的に保存された核膜タンパク質が機能していることを初めて明らかにしました。

### 【本研究成果のポイント】

- 植物の雌性配偶体中で遺伝子発現を誘導する手法を開発した
- 植物の生殖過程で観察される核融合では、進化的に保存された核膜タンパク質である SUN タンパク質が関与することを明らかにした
- 開発した実験系は植物の生殖機構の解明の促進に寄与すると期待される

### I. 研究の背景

植物の生殖<sup>(注1)</sup>は配偶体形成、受精過程、そして胚発生（種子形成）などいくつかの過程があり、それぞれモデル植物シロイヌナズナなどで研究されています。雌性配偶体は7細胞と少ない細胞から作られますが、ひとつの個体と考えることができます（図1）。雌性配偶体の形成や機能に必要な遺伝子の働きについては、突然変異株の解析などによって明らかにされてきました。しかし、植物では同じ機能を持つ遺伝子の重複が頻繁に見られます。このため、遺伝子機能の解析のために重複した遺伝子の機能をすべて失わせるための変異体を作製することには限界がありました。また、遺伝子によっては、欠失すると配偶体形成以前の過程に影響が出るため、配偶体の形成や機能だけに着目した解析が困難なものもあります。そこで本研究では、雌性配偶体における遺伝子機能解析のための新たな実験手法の開発を目指し、顕微鏡とレーザー技術（IR-LEGO 法<sup>(注2)</sup>）と、遺伝子組換えを起こす分子生物学技術（Cre/loxP 部位特異的組換えシステム<sup>(注3)</sup>）を組み合わせ、雌性配偶体という小さな組織で遺伝子機能解析を行える新たな実験系を開発しました。さらに、この実験系を用いて、植物生殖過程の核融合で機能するタンパク質を同定することができました。



真の強さを学ぶ。

新潟大学  
NIIGATA UNIVERSITY

---

## II. 研究の概要

本研究では、図2に示す組換えDNAを利用した遺伝子発現誘導系を作製しました。このシロイヌナズナ株の雌性配偶体では、通常は雌性配偶体特異的な遺伝子発現調節配列（ES2プロモーター）によってHistone H2B-GFPが発現しています。この植物は熱ショックプロモーターによってCre組換え酵素が発現する組換え遺伝子を持っています。この植物の花芽を35°Cで短時間（5分間程度）処理したり、IR-LEGO法を用いて雌性配偶体を加温すると、Cre-loxP部位特異的組換えが誘導され、雌性配偶体で標的遺伝子が発現しました（遺伝子の発現誘導）。この発現誘導は、できあがった雌性配偶体だけでなく、形成過程の雌性配偶体でも行うことができました。

シロイヌナズナ雌性配偶体の形成過程では、中央細胞の中で2つの極核の融合が観察されず。本研究では、開発した遺伝子発現誘導実験系を用いて、SUNタンパク質<sup>(注4)</sup>という真核生物に共通に存在する核内膜タンパク質の機能欠損を誘導しました。この結果、SUNタンパク質が極核融合に関与することを明らかにしました。

## III. 研究の成果

被子植物の配偶体は、2倍体の体細胞の減数分裂の結果できる半数体です。本研究の成果のひとつは、多重遺伝子が多い植物において、雌性配偶体形成をはじめとする植物生殖過程の遺伝子機能を解析する新たな実験手法を構築したことにあります。

私たちは以前、酵母の生殖過程の核融合にSUNタンパク質が関与することを示しました（Nishikawa et al., 2003）。本研究のもうひとつの成果は、生殖過程の核融合のメカニズムが、植物と酵母という進化的に離れた生物の間でも保存されていることを明らかにしたことにあります。

## IV. 今後の展開

本研究で作製した遺伝子発現誘導系を用いて、雌性配偶体形成に限らず、植物生殖のさまざまな過程での遺伝子の機能解析を行うことができると期待されます。また、本研究の手法は、生殖過程以外にも、植物を用いた様々な細胞特異的な遺伝子機能の解析へと展開できると期待されます。

植物の生殖過程の核融合は、次世代の植物の形成に必須な重要な過程です。本研究の成果を足がかりに、これまで不明であった生殖過程の核融合のメカニズムが明らかになると期待されます。その成果は、植物の育種などへと展開できると期待されます。

## V. 研究成果の公表

これらの研究成果は、2019年8月22日（日本時間）、Plant Cell and Physiology 誌（IMPACT FACTOR 3.929）に掲載されました。

論文タイトル：Development of a Heat-inducible Gene Expression System using Female Gametophytes of *Arabidopsis thaliana*

著者：Dukhyun Hwang, Satomi Wada, Azusa Takahashi, Hiroko Urawa, Yasuhiro Kamei, and Shuh-ichi Nishikawa

doi: 10.1093/pcp/pcz148

---

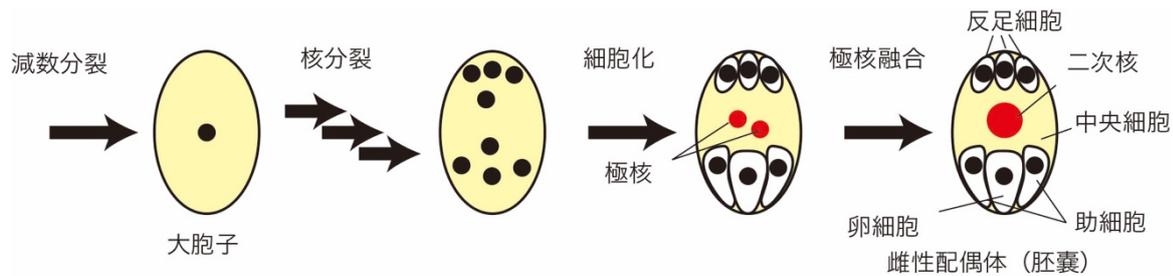


図1 シロイヌナズナの雌性配偶体形成過程

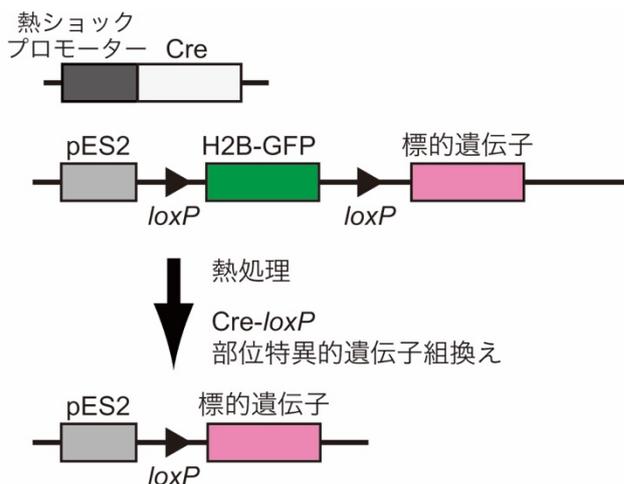


図2 本研究で作製した遺伝子発現誘導実験系  
 pES2 と H2B-GFP はそれぞれ、ES2 プロモーター（雌性配偶体特異的遺伝子発現調節領域）と Histone H2B-GFP 遺伝子を示す。作製したシロイヌナズナの雌性配偶体では ES2 プロモーターによって Histone H2B-GFP が発現する。この植物の花芽を短時間熱処理すると、Cre-loxP 部位特異的組換えによって Histone H2B-GFP 遺伝子が除去され、標的遺伝子が発現するようになる。

### 研究サポート

本研究は科学研究費補助事業・基盤研究 C（課題番号 16K07394、19K06704）、挑戦的萌芽研究（課題番号 26650094）新学術領域研究「植物環境感覚」（課題番号 25120711）、新学術領域研究「植物新種誕生原理」（課題番号 17H05837、19H04857）、挑戦的研究（開拓）（課題番号 17H06258）によって実施されました。

また、科学研究費助成事業・新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「先端バイオイメージング支援プラットフォーム」（課題番号 JP16H06280）による研究支援を受けました。さらに、自然科学研究機構基礎生物学研究所共同利用研究（研究課題 16-152、18-517）の一環として実施されました。

注 1：ヒトをはじめとする哺乳動物の生殖の過程では、雌雄の個体それぞれが配偶子（精子と卵）をつくり、雌個体内で 1：1 の受精によって次世代の個体（胚）ができます。被子植物の場合は、雌しべと雄しべで配偶体が作られ、雄性配偶体（花粉）は精細胞を 2 個もち、雌性配偶体は雌しべの中の胚珠と呼ばれる組織の中で作られます。多くの被子植物の雌性配偶体は、卵細胞と中央細胞がそれぞれ 1 個、2 個の助細胞と 3 個の反足細胞という 7 細胞で構成されま



す（図1）。受精の過程は重複受精とよばれ、花粉由来の2つの精細胞がそれぞれ卵細胞と中央細胞と融合し、次世代の個体である胚と、これに栄養を供給する胚乳ができます。その後しばらく発生が進んだ後に一時成長が休止した状態となり種子ができます。

注2：顕微鏡下で微小領域に赤外レーザー照射を行うことで、単一細胞を加温する技術。本研究で作製した遺伝子発現誘導実験系と組み合わせることで、狙った細胞のみで遺伝子発現を誘導することが可能です（Kamei et al. 2009）。様々なモデル動物やモデル植物の研究で利用され始めています（Deguchi et al. 2009）。

注3：Cre-loxP 部位特異的組換えシステムは、バクテリオファージ P1 由来の DNA 組換え酵素 Cre が、loxP 配列とよばれる DNA 配列に対して働くことで生じる部位特異的遺伝子組換えシステムです。この手法は、これまでに様々な生物で遺伝子欠損実験や遺伝子発現誘導実験に用いられてきました。本研究では、熱ショックによる Cre-loxP 部位特異的組換えの誘導と、雌性配偶体特異的なプロモーターを組み合わせ、植物の配偶体中で人為的に遺伝子発現を誘導する実験系を作製しました。

注4：SUN タンパク質は、真核生物に広く存在する核内膜のタンパク質であり、核外膜の KASH タンパク質とともに LINC 複合体というタンパク質複合体を作り、細胞核の動きや形の制御を行っています。私たちは以前、酵母の生殖過程の核融合に SUN タンパク質が関与することを示しました（Nishikawa et al., 2003）。シロイヌナズナには、SUN1~SUN5 の5つの SUN タンパク質遺伝子が存在します。変異株を用いたこれまでの解析では、これら5つの SUN タンパク質遺伝子の機能をひとつずつ失わせた変異株を元に、複数の遺伝子欠損株を作製する必要がありました。本研究では、SUN 優性欠損変異体という SUN タンパク質の機能を阻害するタンパク質の発現を誘導することで、このような煩雑な手法を回避して、多重遺伝子の機能解析を簡便に行うことができました。

#### 参考文献

- Deguchi, T., Itoh, M., Urawa, H., Matsumoto, T., Nakayama, S., Kawasaki, T., et al. (2009) Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and Arabidopsis thaliana. *Dev Growth Differ* 51:769–775.
- Kamei, Y., Suzuki, M., Watanabe, K., Fujimori, K., Kawasaki, T., Deguchi, T., et al. (2009) Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells in vivo. *Nat. Meth.* 6: 79–81.
- Nishikawa, S. and Endo, T. (1997) The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion. *J. Biol. Chem.* 272: 12889–12892.

#### 本件に関するお問い合わせ先

新潟大学理学部

西川周一・教授

E-mail : shuh@bio.sc.niigata-u.ac.jp