

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成26年度）

1. 機関番号

1

4

6

0

3

2. 研究機関名

奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名

挑戦的萌芽研究

4. 補助事業期間

平成25年度～平成27年度

5. 課題番号

2

5

6

5

0

1

0

0

6. 研究課題名

高等植物の胚発生における配偶子効果の解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
10432593	フルタニ マサヒコ 古谷 将彦	バイオサイエンス研究科	准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

平成26年度は受精卵の不等分裂に重要な働きをするRAN結合タンパク質AtMAGOが結合するRNA候補SSPの解析とターゲットRNAの網羅的同定に向けた予備実験を行った。AtMAGOが受精卵において雄性配偶体由来のSSP mRNAと結合する可能性を検証するため、まずAtMAGOタンパク質とSSP mRNAの共局在性を調べようと試みた。AtMAGOタンパク質に関しては免疫染色およびMAGO-GFP融合タンパク質の局在解析を行うことで明らかとなったが、問題はSSP mRNAの局在解析である。受精卵に対するin situ hybridization法の確立を目指したが、固定組織において受精卵と卵細胞との違いを判断することは難しく、SSPの明確なシグナルを得ることはできなかった。そこで、RNA結合タンパク質PUMを人為的に改変しSSP mRNA特異的に結合するよう設計した遺伝子を植物体に導入することにした。現在、改変版PUMの作成中で今年度には植物体に導入できそうである。つぎに、卵細胞および受精卵におけるAtMAGOタンパク質のターゲットRNAの網羅的同定に向けて、それぞれの細胞特異的に発現誘導できるプロモーターの検討を行った。卵細胞特異的プロモーターに関しては前年度構築済みで、そのプロモーター制御下でMAGO-GFP融合タンパク質を発現する系統を確立することができた。しかし、受精卵特異的プロモーターに関しては特異性の乏しいプロモーターばかりで構築には至らなかった。一方で、卵細胞特異的プロモーター制御下でMAGO-GFPを発現させると受精卵にMAGO-GFPが持ち込まれることが明らかとなり、この現象を実験に利用することとした。卵細胞におけるAtMAGOのターゲットRNAの同定実験には卵細胞特異的プロモーター制御下でMAGO-GFPを発現する植物体の未受精胚珠をサンプルとし、受精卵におけるAtMAGOの結合RNAの同定実験には受精胚珠をサンプルとすることとした。ついに、AtMAGOのターゲットRNAの網羅的同定に向けた実験系を確立することができた。

10. キーワード

(1) RNAの可視化	(2) 細胞特異的プロモーター	(3)	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分) (2) おおむね順調に進展している。
(理由) 平成26年度にはSSP mRNAとAtMAGOの関係を明らかにするためSSP mRNAの局在解析を計画していたが、受精卵に対するin situ hybridization法がうまく働かず、代替案としてSSP mRNAに特異的に結合する改変型RNA結合タンパク質の局在解析を行う実験系に変更し、現在進行中である。また、本年度は卵細胞及び受精卵におけるAtMAGOのターゲットRNAの網羅的同定に向けた実験系の構築も計画していた。受精卵特異的にエピトープタグされたAtMAGOを発現させるための受精卵特異的プロモーターを作成することができなかったが、卵細胞特異的に発現させたタンパク質が受精卵に持ち込まれるという現象を発見し、卵細胞からの持ち込みを受精卵特異的プロモーターの代替えとした。 以上のように、当初計画していたいくつかの実験系がうまく働かないことが明らかとなったが、代わりの実験系をすぐさま立ち上げることでおおむね順調に進展している。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策) 最終年度である平成27年度は(1) 受精卵におけるmRNA可視化技術の確立とSSP mRNAの局在解析、(2) 卵細胞および受精卵におけるAtMAGOのターゲットRNAの網羅的同定を行い、卵細胞および受精卵における極性形成機構を分子レベルで明らかにする。計画(1)においてはSSP mRNAに特異的に結合する改変型RNA結合タンパク質とGFPの融合タンパク質を植物体において発現させ、受精卵において局在解析を行う。また、atmago変異体背景でも同様にGFP融合タンパク質を発現させその局在解析から、SSP mRNAの局在とAtMAGOの関係を明らかにする。計画(2)においては、卵細胞特異的にMAGO-GFPを発現させた植物体を用いて未受精卵を回収し、GFP抗体を用いてRNA免疫沈降を行う。回収したRNAをcDNA化した後にDNAマイクロアレイを行い、卵細胞におけるAtMAGOのターゲットRNAを同定する。また、卵細胞特異的にMAGO-GFPを発現させた植物体の受精卵をサンプルに、GFP抗体を用いてRNA免疫沈降を行い、受精卵におけるAtMAGOのターゲットRNAを同定する予定である。
(次年度使用額が生じた理由と使用計画) (理由) (使用計画)

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計(2)件 うち査読付論文 計(2)件

著 者 名		論 文 標 題			
Hayashi K, Nakamura S, Fukunaga S, Nishimura T, Jenness MK, Murphy AS, Motose H, Nozaki H, Furutani M, Aoyama T.		Auxin transport sites are visualized in planta using fluorescent auxin analogs.			
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.		有	111	2 0 1 4	11557-11562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)					
10.1073/pnas.1408960111					

著 者 名		論 文 標 題			
Kamiuchi Y, Yamamoto K, Furutani M, Tasaka M, Aida M		The CUC1 and CUC2 genes promote carpel margin meristem formation during Arabidopsis gynoecium development.			
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Front Plant Sci.		有	165	2 0 1 4	1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)					
10.3389/fpls.2014.00165.					

〔学会発表〕 計(5)件 うち招待講演 計(0)件

発 表 者 名		発 表 標 題			
Furutani M, Tasaka M		The MAB4-PID signaling complex controls PIN dynamics on the plasma membrane			
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所		
内藤コンファレンス「Molecule-based biological systems」		2014年10月08日～2014年10月09日	シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道札幌市)		

発 表 者 名	発 表 標 題	
Furutani M, Tasaka M	The MAB4-PID signaling complex controls PIN dynamics on the plasma membrane	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
The 5th NIBB-MPIPZ-TLL合同シンポジウム	2014年11月25日～2014年11月26日	マックスプランク研究所 (ドイツ・ケルン)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Furutani M, Tasaka M	The MAB4-PID signaling complex controls PIN dynamics on the plasma membrane	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
Plant Organ Growth Symposium	2015年03月11日～2015年03月12日	ゲント大 (ベルギー・ゲント)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Furutani M, Tasaka M	The MAB4-PID signaling complex controls PIN dynamics on the plasma membrane	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第56回日本植物生理学会年会	2015年03月18日～2015年03月18日	東京農業大学 (東京都世田谷区)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Furutani M, Tasaka M	Mitochondria-derived reactive oxygen species are required for polar auxin transport in Arabidopsis organ formation	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
International Conference for Plant Mitochondrial Biology	2015年05月18日～2015年05月19日	マーキュリーホテル ザロツワフ (ポーランド・ザロツワフ)

〔図書〕 計(0)件

著 者 名	出 版 社		
書 名	発行年	総ページ数	

14.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考