

様式 Z - 7

平成27年度科学研究費助成事業 実績報告書(研究実績報告書)

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	基礎研究(B)(一般)																										
4. 研究期間	平成24年度～平成28年度																										
5. 課題番号	2 4 3 7 0 0 2 2																										
6. 研究課題名	シロイヌナズナ初期胚発生におけるパターン形成の制御機構																										
7. 研究代表者	<table border="1"> <thead> <tr> <th>研究者番号</th> <th>研究代表者名</th> <th>所属部局名</th> <th>職名</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>8 0 2 7 3 8 5 3</td> <td>ナカジマ ケイジ 中島 敏二</td> <td>バイオサイエンス研究科</td> <td>教授</td> </tr> </tbody> </table>			研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名	8 0 2 7 3 8 5 3	ナカジマ ケイジ 中島 敏二	バイオサイエンス研究科	教授																
研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名																								
8 0 2 7 3 8 5 3	ナカジマ ケイジ 中島 敏二	バイオサイエンス研究科	教授																								
8. 研究分担者	<table border="1"> <thead> <tr> <th>研究者番号</th> <th>研究分担者名</th> <th>所属研究機関名・部局名</th> <th>職名</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>			研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名																				
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	<p>我々は植物に特有のRKD4が、初期胚の発生を制御する重要な鍵因子であることを明らかにした。さらに、シロイヌナズナに存在する他の4つのRKD遺伝子についても、初期胚内の微小な領域で特異的な発現パターンを示すことを見出している。本研究では、RKD転写因子群や下流遺伝子群の機能解析を通じて、これまで知見の少ない植物初期発生の制御機構を分子レベルで明らかにする。</p> <p>1. RKD遺伝子の生物学的機能：レポーター解析により、RKD1-RKD4の4遺伝子が卵細胞で発現し、それ以前の雌性配偶体細胞では発現しないことが明らかとなった。次にRKD遺伝子の機能を遺伝学的に解析するため、多重変異体の作製を試みた。RKD2については、新たな変異アレルの単離に成功していたので、まずRT-PCRにより転写産物が蓄積していないことを確認した。この変異体の胚珠を観察した結果、ごく低頻度ではあるが、雌性配偶体の形成に異常を示す胚珠が野生型よりも多く存在することが示唆された。さらにこのrkd2変異体とrkd1変異体の一重変異体では、異常な雌性配偶体の比率が上昇することが示唆された。</p> <p>2. RKD4タンパク質が直接発現制御する遺伝子群の同定：RKD4は転写因子として機能すると推定されている。RKD4とGFPの融合タンパク質を誘導的に過剰発現させると、分化した体細胞が胚性の未分化細胞へと初期化され、GFP蛍光は細胞核に局在していた。この植物に対して抗GFP抗体によるクロマチン免疫沈降をおこない、共沈降したDNAを次世代シーケンサー解析することで、RKD4が結合するゲノム領域の特定を試みたが、ウェスタン解析でRKD4-GFP自体の回収を確認できなかつた。そこでGFPの替わりにHAまたはMycエピトープとの融合タンパク質として過剰発現させ、抗HAまたは抗Myc抗体による免疫沈降を行った結果、十分量の結合DNAが回収された。</p>																										

10. キーワード

(1) 植物	(2) 発生・分化	(3) 胚発生	(4) 生殖細胞
(5) リプログラミング	(6)	(7)	(8)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(1/5)

11. 現在までの進捗状況

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

RKD4の機能解析については、この遺伝子の発現量が予想以上に低く、GFP融合タンパク質を過剰発現させても、蛍光が弱く、わずかなタンパク質の蓄積しか検出されないなど、研究を進める上で多くの困難があった。融合タンパク質については、HAやMycタグに交換し、過剰発現ベクターのデザイン変更や、大量の形質転換ラインの作製を経て、ようやく解析に用いる植物を確立することができた。これらのラインを用い、マススペクトル解析による相互作用因子の探索と、クロマチン免疫沈降実験による結合ゲノム領域の同定をおこなっている。本研究課題の研究期間を1年間延長し、平成28年度にこれらの解析結果が出ることが期待される。これとは別に、rkd4変異体と野生型の初期胚の比較トランスクリプトーム解析の結果を得ており、2つのデータを合わせて、RKD4が初期胚の発生を制御する際に標的とする遺伝子が同定されることが期待される。

RKD4以外のRKD遺伝子群については、胚発生よりも卵細胞の形成に機能することが考えられた。複数のRKD遺伝子が冗長的に機能していると考えられるため、多重変異体の作製と表現型解析を急ぐ予定である。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

1. RKD4が結合するゲノム領域の同定

RKD4-HAまたはRKD4-Mycの融合タンパク質を誘導的に過剰発現する植物を用いて、クロマチン免疫沈降と次世代シークエンス解析により、RKD4が結合するゲノム領域を同定する。これまでに誘導過剰発現後のマイクロアレイ解析と、rkd4変異体と野生型植物の初期胚の、次世代RNAシークエンスによる比較トランスクリプトーム解析の結果をいるので、これらのデータを合わせて、初期胚発生性制御における標的遺伝子を絞り込む。また、これらの遺伝子の初期胚における発現パターンを、rkd4と野生型で比較することで、RKD4が初期胚発生のパターン形成を制御するメカニズムを考察する。

2. 卵細胞形成におけるRKD遺伝子群の機能

RKD1-RKD4遺伝子の多重変異体の解析を進める。卵細胞の形成に異常があった場合には、ホモ個体がとれず、次世代の分離比に異常が生じると予想されるため、遺伝子型の解析により、卵細胞形成の必須因子であるかを解析する。また卵細胞以外の助細胞や中央細胞などでRKD2を異所的に発現させ、細胞運命が転換するかを検証する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

研究材料の準備に予想外の時間がかかり、研究期間を1年間延長した。

(使用計画)

クロマチン免疫沈降や多重変異体を用いた実験のデータが出次第、これらを基に解析をさらに1年続けることとし、繰越金は、そのための消耗品購入や成果発表のための旅費や論文投稿料に充てる予定である。

(課題番号： 24370022)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(2 / 5)

13.研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件 / うち査読付論文 計(1)件 / うち国際共著論文 計(1)件 / うちオープンアクセス 計(1)件

著者名	論文標題				
John L. Bowman, Takashi Araki, Mario A. Arteaga-Vazquez, Frederic Berger, Liam Dolan, Jim Haseloff, Kimitsune Ishizaki, Junko Kyozuka, Shih-Shun Lin, Hideki Nagasaki, Hirofumi Nakagami, Keiji Nakajima, et al.	The Naming of Names: Guidelines for Gene Nomenclature in Marchantia				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Plant Cell Physiol.	有	57	2 0 1 5	257-261	該当する
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1093/pcp/pcv193					
オープンアクセス					
オープンアクセスとしている(また、その予定である)					

(学会発表) 計(4)件 / うち招待講演 計(3)件 / うち国際学会 計(4)件

発表者名	発表標題	
Tetsuya Hisanaga, Satoshi Koi, Gaku Fukui, Keiji Nakajima	RKD genes are conserved regulator for egg cell differentiation among land plants	
学会等名	発表年月日	発表場所
International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium and Technical Workshop 2015(国際学会)	2015年08月27日	名古屋大学(愛知県名古屋市)

発表者名	発表標題	
Satoshi Koi, Tetsuya Hisanaga, Gaku Fukui, Kaori Furuta, Masaki Shimamura, Takafumi Watabe, Katsuyuki Yamato, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, Keiji Nakajima	Control of germ cell differentiation and pluripotency by evolutionarily conserved factors in land plants	
学会等名	発表年月日	発表場所
International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium and Technical Workshop 2015(招待講演)(国際学会)	2015年08月27日	名古屋大学(愛知県名古屋市)

発表者名	発表標題	
Satoshi Koi, Tetsuya Hisanaga, Gaku Fukui, Kaori Furuta, Masaki Shimamura, Takafumi Watabe, Katsuyuki Yamato, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, Keiji Nakajima	Conservation and diversification of reprogramming factors in land plant evolution	
学会等名	発表年月日	発表場所
International Symposium on Plant Sciences & Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists (招待講演) (国際学会)	2015年11月06日	Chungnam National University (Daejeon Korea)

発表者名	発表標題	
Keiji Nakajima	Marchantia polymorpha as a genetic tool to study plant egg cell differentiation	
学会等名	発表年月日	発表場所
Marchantia Seminars: Welcome to Marchantia world! (招待講演) (国際学会)	2016年03月03日	京都大学 (京都府京都市)

(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

(課題番号： 24370022)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(4/5)

(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.科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1)国際共同研究: -

17.備考

--