

アポスポリー性胚嚢始原生殖細胞 (AIC)

出現メカニズムの分子的解析

—ギニアグラスを用いた異なる処理方法による AIC 単離と回収の試み—

陳 蘭庄^{1*}, 西村佳子¹, 徐 成体²

¹南九州大学 環境造園学部 環境園芸学科 生物工学研究室; ²中国青海省畜牧獣医科学院

2013年10月11日受付; 2014年1月27日受理

Molecular analysis of mechanism of aposporous embryo sac initial cell (AIC) appearance: Attempt to isolate and collect AIC using different methods in guineagrass (*Panicum maximum*)

Lanzhuang Chen^{1*}, Yoshiko Nishimura¹ and Chenti Xu²

¹Laboratory of Plant Biotechnology, Faculty of Environmental and Horticultural Science, Minami Kyushu University, 3764-1, Tatenochi, Miyakonojo city, Miyazaki 885-0035, Japan; ²Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Xining, Qinghai 810016 China

Received October 11, 2013; Accepted January 27, 2014

Apomixis is a reproductive mode that bypasses the meiosis and syngamy to produce seed genetically identical to their maternal parent. When this characteristic is applied practically, it is expected in obtaining economic effects higher than the “Green Revolution” by using apomixis gene to fix F₁ generation to down the cost of F₁ production fee, to fix the middle lines occurred with hopeful characteristic in breeding process to shorter the years of breeding, and more, to make seed formation possible in the vegetative plants. Up to now, we have been successful in obtaining apomixis-specific gene (*ASG-1*) by using apomictic guinea grass as the materials based on the strategy that the length of ovary was used as an index to collect different developing stages for mRNA extraction, cDNA synthesis, and then the differential screening method was used to isolate aposporous embryo sac initial cell (AIC) appearance-stage specific gene. In the last paper, we have reported that *ASG-1* was introduced into *Arabidopsis*, a model plant. In this study, in order to do molecular analysis of the mechanism of AIC appearance, we focused on that, the key points were to isolate AIC single cell from apomictic guinea grass using different methods, and then to establish the method of controlling a single cell using picopipet machine. As the results, 1) the sizes of young buds and ovaries, and the colors of ovaries have direct proportion with the mature period of the ovary, indicating that the developmental stages of ovary can be estimated according to the colors of ovary; 2) with the pre-treatments of ovaries dipped in enzyme solution, single protoplast can be isolated efficiently from different stages of ovaries and from different kinds of enzyme solutions prepared; 3) the isolated single protoplast can be controlled to absorb and to spit freely by using super particle electron syringe picopipet controller. These results obtained in this study will be a useful tool for molecular analysis of AIC, and provide important information for clarification of apomixis reproductive mode.

Key words: apomixis, aposporous embryo sac initial cell(AIC), enzyme solution, guineagrass, (*Panicum maximum*), isolation and collection of AIC, pre-treatments of ovary.

緒 言

アポミクシスは母親の遺伝子型だけが子供に伝わ

る生殖様式である。この形質を実用的に利用できれば、一代雑種の固定による種子生産の大幅なコストダウンや、育種途中の有望な中間母本固定による育種年限の大幅な短縮、栄養繁殖性植物の種子繁殖への転換などが可能になるなど、「緑の革命」以上の経済効果

*連絡著者: E-mail, lzchen@nankyudai.ac.jp

が期待されている (Hanna and Bashaw, 1987; Koltunow, 1993; Chen et al, 1999, 2006). 著者らは、アポミクシス遺伝子を探るため、イネ科暖地型牧草であるギニアグラスの有性生殖性系統と条件的アポミクシス性系統を材料として、ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察による胚嚢分析法 (DIC) (Chen and Kozono, 1994a, b) と透過型電子顕微鏡観察による微細構造的解析法 (TEM) (Guan et al, 2006, 2007) を併用し、アポミクシスの生殖様式を子房を中心に体系的に観察した結果、これまでに次のようなことが分かった。つまり、有性生殖性およびアポミクシス性ギニアグラスは、大孢子形成までは殆ど同じ発育過程を辿るが、その後、アポミクシス性系統では大孢子が分裂を行うことなく、または退化して、その周りにある珠心組織の体細胞が何らかのシグナルを受けて細胞が肥大し、いわゆるアポスポリー性胚嚢始原生殖細胞 (Aposporous Embryo Sac Initial Cell, AIC) となる。さらに AIC は退化した大孢子的位置に移行し、大孢子的の代わりに AIC 由来の胚嚢を形成する。これらのことから、この AIC の出現は有性生殖の発育過程とは根本的に違うものであり、アポミクシス遺伝子の発現に関わることが明らかとなった (Chen and Kozono, 1994a, b).

著者らは、上記の観察結果に基づき、子房長を指標とした differential screening 法により、AIC 出現時期に特異的に発現する遺伝子 (Apomixis-specific gene-1, ASG-1) のクローニングに成功している (Chen et al, 1999, 2005). さらに、遺伝子組換え体を用いた手法により、その遺伝子の機能解析を行なっている (Nishimura et al, 2013).

一方、AIC の出現メカニズムの解明はアポミクシス現象を理解する上で非常に重要であると考えられる。

そこで、ASG-1 遺伝子と AIC の出現との関連を探るため、AIC の出現メカニズムを分子的に解析することが必要となる。本研究では、その第一歩として、まず AIC を得るため、条件的アポミクシス性ギニアグラスを用いて異なる発育ステージの子房の前処理を行い、酵素処理による効率的なプロトプラスト (AIC) の単離法を確立した。次に、AIC 細胞を自由に制御するため、超微量電子スポイトピコピペットによるシングルセルの回収方法を確立した。

材料及び方法

1) 植物材料

実験材料としてイネ科暖地型牧草の中で条件的アポミクシス性ギニアグラス系統 (*Panicum maximum* Jacq.) N68/96-8-o-11 (アポミクシス率 94%) と品種“ナツカゼ” (アポミクシス率 90%) (Chen and Kozono, 1994a) を用いた。植物は南九州大学環境園芸学部附属フィールドセンターの温室内で育成し、蕾及び小花をサンプリングした。

2) 異なる発育ステージの蕾及び小花からの子房のサンプリング

解剖顕微鏡下で蕾及び小花を目視で選抜した後、倒立顕微鏡でそれぞれの長さや幅を測定した。その後、解剖顕微鏡下で子房を切り出した (図1)。切り出された子房の成熟時期を糸状の柱頭と花柱の色で4期 (白, 黄, 桃, 紫) (図2) に分け、倒立顕微鏡で子房の長さや幅を測定して、平均値をそれぞれ求め、Chen and Kozono (1994a) が発表した胚珠の生育ステージを参考にそれ

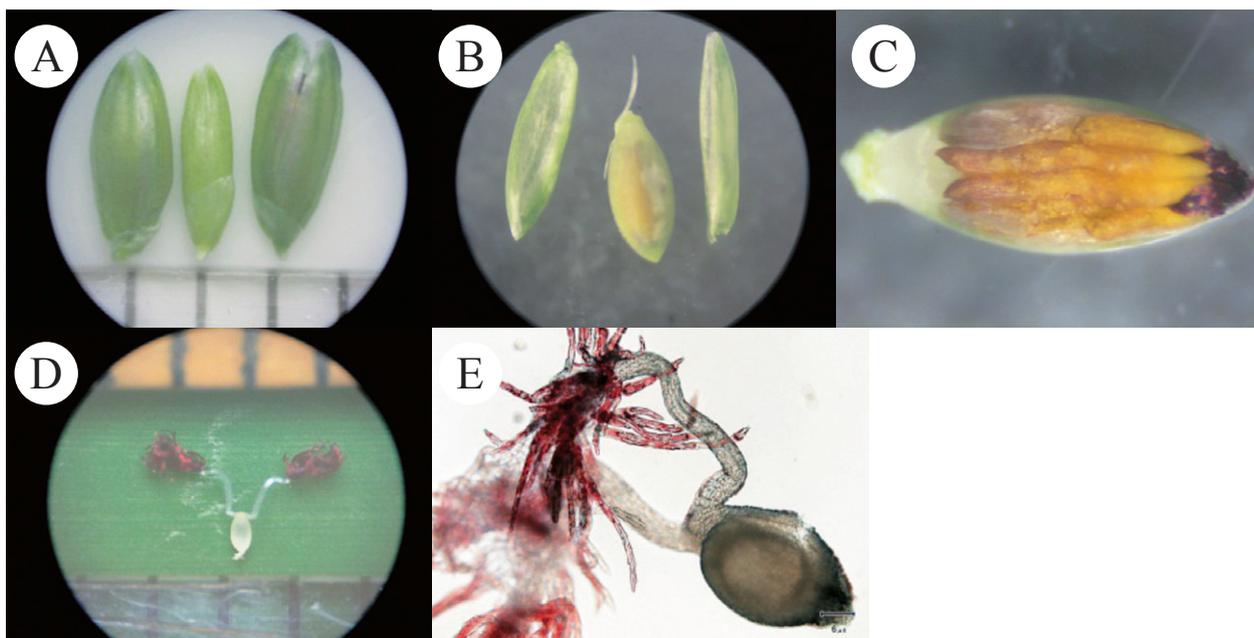


図1. 酵素処理におけるアポミクシス性ギニアグラスの蕾からの子房の抽出過程

A: 異なる発育ステージの幼蕾, B: 蕾の解剖, C: 子房 (左の白い部分) と葯 (中間の黄色部分) と柱頭 (右の赤い部分), D: 抽出した完全な雌蕊 (子房 (下), 花柱 (中間), 柱頭 (上)), E: 酵素液に入れた子房 (酵素液で褐色に染まった子房)

ぞれの子房の発育ステージの位置づけを行った (表1)。開花当日の子房は、同様の測定を行って対照とした。

3) 子房の前処理と酵素処理によるプロトプラストの単離

酵素処理による AIC の単離実験は下記のとおり行っ

た。酵素液は以下の3種類を用いた。酵素液 I (0.5% Cellulase Onozuka RS, 0.25% Pectolyase Y-23, 0.75% Pectinase), 酵素液 II (0.5% Cellulase Onozuka RS, 0.1% Pectolyase Y-23), 酵素液 III (1% Cellulase Onozuka RS, 0.5% Pectinase, 0.5% Dricellase) にそれぞれ9%の Mannitol を加えたものを使用した (Chen and

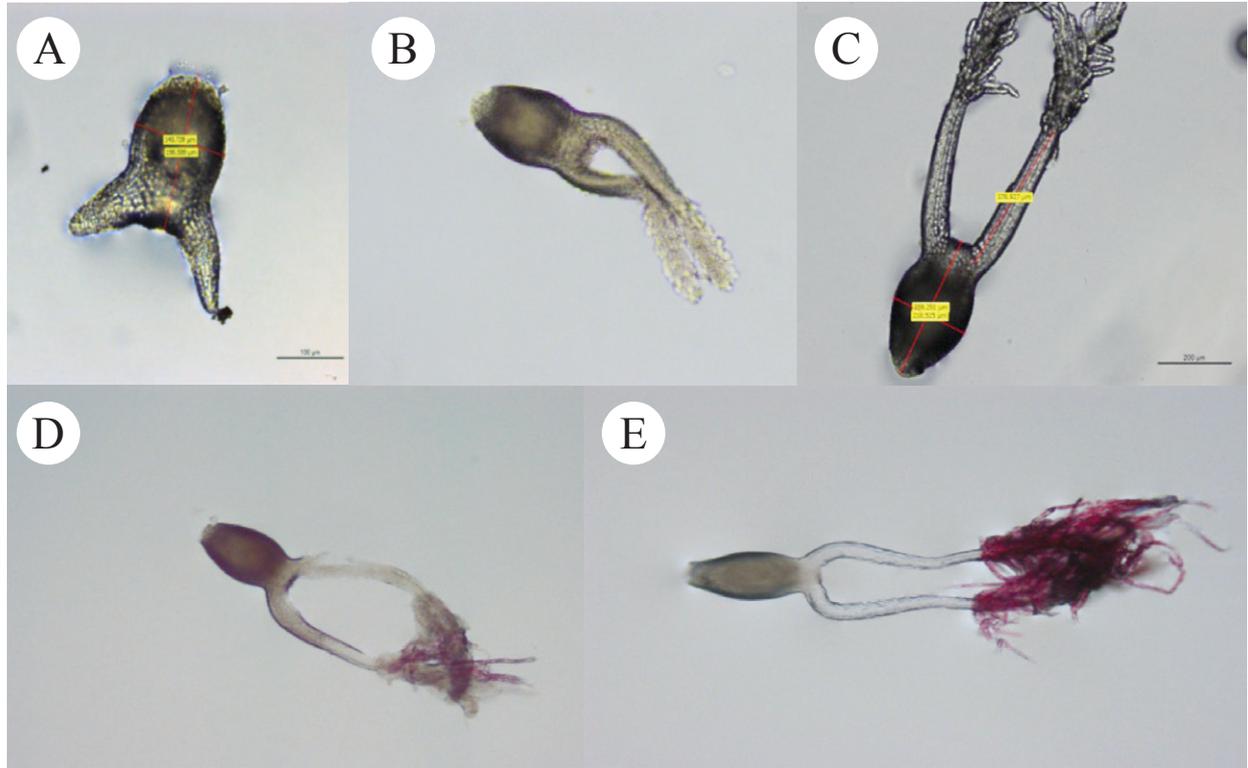


図2. アポミクス性ギニアグラス N68/96-8-o-11 の雌蕊の成熟時期を推定するための子房の外観形態

A～B: 白色は雌蕊の発生とアポスポリー性始原生殖細胞 (AIC) の出現時期に相当する, C: 黄色は1核期の AIC 細胞, D: 桃色は AIC 細胞に由来する2～4核胚嚢の形成時期, E: 紫色は AIC 細胞に由来する胚嚢の成熟期。摘出した子房のそれぞれの色は表1に示した調査データと対応している

表1. 条件的アポミクス性ギニアグラスにおける子房の色、子房のサイズ及び蕾のサイズと胚珠の発育ステージとの関係

系統名	子房 (柱頭) の色	蕾長 (μm)		子房長 (μm)		胚珠の発育ステージ (Chen and Kozono, 1994a) ¹⁾
		長さ	幅	長さ	幅	
N68/96-8-o-11 (Apomict)	白色	2,558 \pm 56	696 \pm 43	360 \pm 33	203 \pm 29	Functional megaspore ~ 1st AIC
	黄色	2,778 \pm 78	899 \pm 55	415 \pm 31	229 \pm 40	1st AIC ~ 2nd AIC
	桃色	2,718 \pm 43	995 \pm 33	471 \pm 28	244 \pm 39	3rd AIC ~ 4th AIC
	紫色	2,764 \pm 97	965 \pm 27	534 \pm 35	280 \pm 43	4th AIC and/or over 5th AIC ~
	開花当日	2,845 \pm 101	1,264 \pm 51	737 \pm 41	318 \pm 48	Mature 4-nucleate embryo sac
"Natsukaze" (Apomict)	白色	2,782 \pm 87	823 \pm 28	322 \pm 30	190 \pm 34	Megaspore ~ Functional megaspore
	黄色	2,848 \pm 98	932 \pm 44	405 \pm 34	226 \pm 41	1st AIC ~ 2nd AIC
	桃色	2,980 \pm 86	1,112 \pm 59	438 \pm 65	233 \pm 45	2nd AIC ~ 3rd AIC
	紫色	3,015 \pm 120	1,091 \pm 67	532 \pm 41	274 \pm 61	3rd AIC ~ 4th AIC
	開花当日	—	—	649 \pm 59	333 \pm 57	Mature 4-nucleate embryo sac

1) AIC: Aposporous embryo sac initial cell. —: 未調査
平均値の土標準偏差 (n=13 ~ 21)

Adachi, 1994, 1998). 酵素処理は、3種類の酵素液に子房を入れ、真空ポンプで脱気して、処理開始1時間～4時間は100rpm、4時間以降は60rpmで、温度は25℃～35℃の範囲で行った。

子房の大きさに合わせて、酵素液内に入れた子房にメスと針で切断したり、傷をつけたりする前処理 (図5) を行うことで、酵素液の子房への浸透を促進させたり、また局部的に分断させたりして組織からの細胞の単離を行った。酵素処理による子房の単離過程を光学顕微鏡で時間ごとに観察した。

4) 単離したプロトプラストの回収実験

超微量電子スポイトピコピペット (ネッパジーン社) を LeicaDMI6000B 倒立型顕微鏡の上に設置して、酵素処理の時間ごとに顕微鏡による観察をしながら、単離されたプロトプラストの析出を確認した後、シングル

細胞の回収を行った。

結果および考察

1) ギニアグラスの異なる発育ステージの蕾及び小花からの子房のサンプリング

Chen and Kozono (1994a) は、アポミクシス性ギニアグラスの生殖様式を明らかにするため、初めてノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いてさまざまな発育ステージの子房を透明化して観察した。その際、各発育ステージの子房の長さも一緒に調査して、子房長をもって胚嚢の発育ステージを推定することが可能となった。本研究で用いたアポミクシス性系統 N68/96-8-o-11 と “ナツカゼ” における子房長と胚嚢の発育ステージとの関係はすでに調査している (Chen and Kozono, 1994a)、本研究では、AIC 細胞を確実に単離

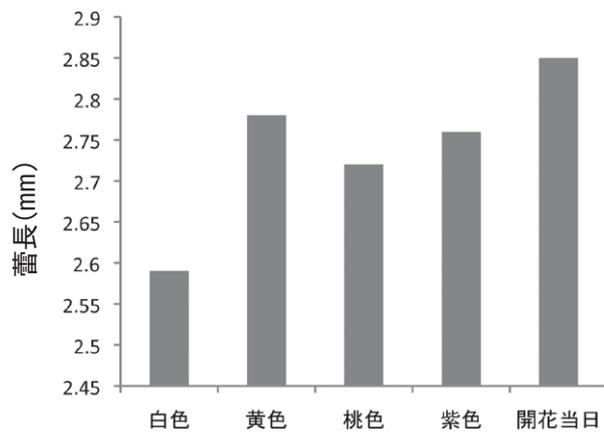


図3. 蕾長と雌蕊成熟時期 (子房外観) との関係 (蕾数 n=15, 4反復)

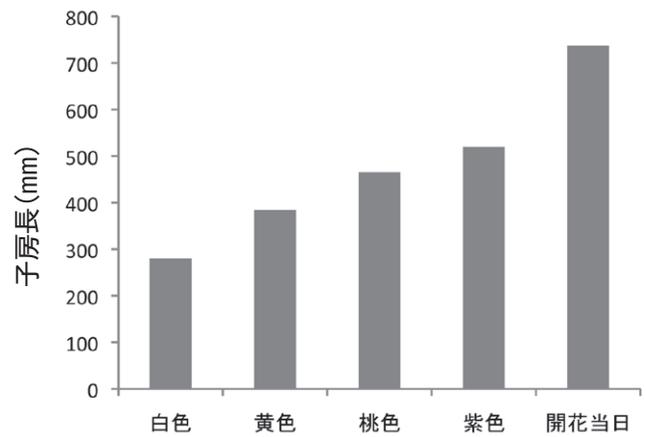


図4. 子房長と雌蕊成熟時期 (子房外観) との関係 (子房数 n=15, 4反復)

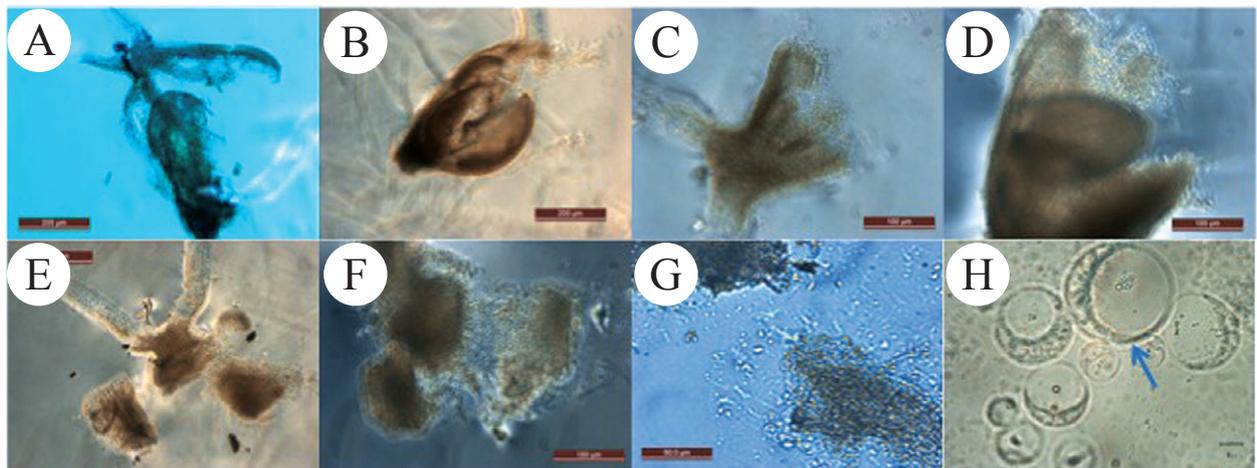


図5. 酵素液中でさまざまな前処理によりアポミクシス性ギニアグラスの異なる発育ステージの子房からプロトプラストが単離される過程

A: 子房の珠孔側を針でカットした, B: 子房の合点側を針でカットした, CとD: 子房の中間部位を針でカットした上部 (C) と下部 (D), E: 子房の中間部位をカットして酵素処理1時間後に、さらにその珠孔側を縦にカットした, FとGとH: 酵素処理2時間後に細胞の塊が、4時間後に単細胞が、6時間後にシングルプロトプラストがそれぞれ観察された。→: 細胞の大きさが一番大きなプロトプラストは肥大したAICであると思われる

するため、子房を蕾及び小花から摘出する方法を確立した。すなわち、肉眼で判別できる異なる色の子房を有する蕾の大きさと子房長を調査し (図3, 4), それぞれの胚嚢の発育ステージ (Chen and Kozono, 1994a) を参考 (表1) に、蕾及び小花からアポミクシス性ギニアグラス系統である N68/96-8-o-11 のさまざまな発育ステージの子房を摘出した (図2)。アポミクシス系統の子房/蕾の大きさは、AIC 形成前のステージ (ステージ1) では $350\mu\text{m}$ 以下/ $2,000\mu\text{m}$ 以下で、AIC 形成後~胚嚢成熟のステージ (ステージ2) では $380\mu\text{m}$ 以上~ $600\mu\text{m}$ 以下/ $2,100\mu\text{m}$ 以上~ $3,500\mu\text{m}$ 以下であった (Chen and Kozono, 1994a, b; Chen et al, 1999, 2005)。そこで、上記の調査及び参考データに基づき、摘出した子房の色を指標として、蕾長と子房長との関係を検証した。その結果、蕾長や子房長が子房の成熟期間と正比例していることが分かった (図3, 4)。また、子房の成熟期間は子房の色から推定し得ることも分かった。以上のことから、本研究で定めた基準 (表1) で子房の色を指標としてさまざまな発育ステージの子房をサンプリングすることができると考えられた。今後、この方法を利用してさまざまな発育ステージの胚嚢や、胚珠、子房をサンプリングできることが示唆された。本研究の目的は AIC 細胞の単離であるので、表1に示した子房色と胚嚢発育ステージのデータから、AIC 細胞を有すると考えられる子房の色は白色~黄色 (図3, 4; 表1) と判断し、これらの色の子房を中心に摘出して次の酵素処理に供試した。

2) 子房の前処理と酵素処理によるプロトプラストの単離

子房から1~数細胞を単離することは困難である。そこで、AIC 細胞の単離をより確実にするため子房の前処理を計画した。前処理として、摘出した子房を酵素液の中に入れて次のような処置を行った。(1) 子房の珠孔側を針でカットした (図5A); (2) 子房の合点側を針でカットした (図5B); (3) 子房の中間部位を針でカットした (図5C, D); (4) 子房の中間部位をカットして酵素処理を1時間行った後、さらにその珠孔側を縦にカットし (図5E), その後、時間ごとに観察した。酵素処理4~6時間後にシングルプロトプラストがそれぞれの酵素液で観察された (図5G, H)。上記の4種類の処理区を設けて、酵素処理した結果、いずれの処理区でもプロトプラストが単離できた。単離の所用時間は (3) と (4) 区は (1) と (2) 区より1~2時間短縮できた。また、単離されたプロトプラストの種類においても珠孔組織に由来する AIC 細胞が含まれていることが分かった (図5H, 矢印)。これらの結果から、局所的な組織から細胞を単離できる可能性が示唆された。ここで用いた3種類の酵素液は、トマトなどのプロトプラスト単離 (Chen and Adachi, 1994, 1998) や、アポミクシス性ギニアグラスの生殖細胞の単離に使用したもの (Chen et al, 2006) と同じである。それらを使って、主に開花当日前後の子房からシングル細胞の単離ができた。しかし、もっと若いステージの子房については、単離はできたものの、すぐ破裂することが分かった。これは、単離されたプロトプラストの浸透圧と酵

素液の浸透圧の不一致によって破裂が起ったものと考えられた。

そこで、さまざまな発育ステージの子房より単離したプロトプラストの適正な浸透圧を求めるため、酵素液の浸透圧の調整を行った。筆者らは、柱頭の色が白色、黄色、桃色及び紫色の子房に分け、さらに異なるマニトール濃度 (12%, 11%, 10%, 9%) で再調整した酵素液で処理を行った。その結果、図6に示したように、柱頭の色が白色、黄色、桃色及び紫色の子房からのシングルプロトプラストの単離可能な適正濃度は、それぞれ12%, 11%, 10%, 9%であった。これらの結果から、子房から AIC 細胞を含むシングルプロトプラストを単離するためには、酵素液の濃度を適正に調整する必要があると認められた。以上で得られた結果は、ほかの植物の異なる発育ステージの子房からのプロトプラストの単離や、細胞融合などの実験にも有用かつ重要な情報であると考えられる。

3) シングルプロトプラストの回収方法の確立

以上の方法により、異なる大きさと色の各発育ステージの子房からプロトプラストを単離することができた。しかも、ほぼ予想したとおりに白と黄色の子房から目的とする AIC を得ることができた。今後 AIC 出現メカニズムを分子的に解析するため、ASG-1 遺伝子導入によって作成した組換え体の子房を用いて、各発育時期のシングルセル、特に AIC を単離し、ASG-1 の発現を観察する必要がある。そこで、まずシングル細胞を自由自在に操ることが必要と考えられる。今回は、顕微鏡の上に超微量電子スポイトピコピペットを設置して、シングルセルを回収できるかどうかを検証した (図7A)。今回の操作で単離した子房由来のシングルプロトプラスト (図7B) を吸引し (図7C, 矢印) またそれを吐き出すことができた (図7D, 矢印)。このように本研究では、単離したシングルセルを回収することが可能となった。今後は、本研究で確立した異なる大きさと色の子房の前処理及びその酵素処理法を用いて、ギニアグラスから目的とする AIC 及び AIC になりうる

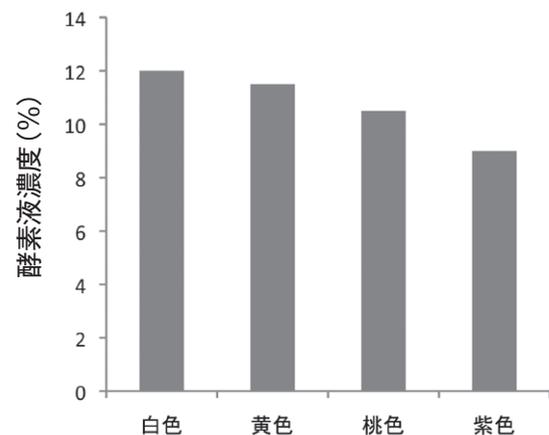


図6. プロトプラスト単離における酵素液の異なる濃度と雌蕊成熟時期 (子房外観) との関係 (子房数 n=10, 4 反復)

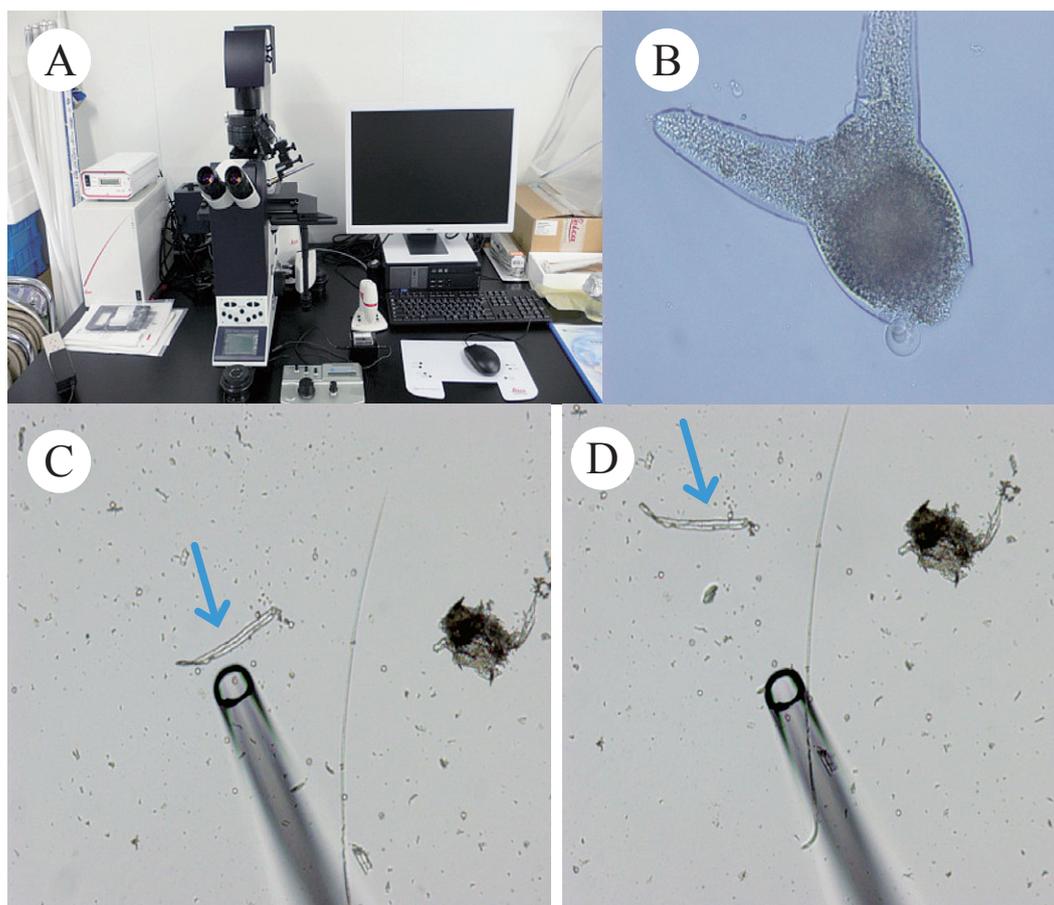


図7. 超微量電子スポイトピコピペットを用いたシングルセルの回収過程

A: 本体コントローラーとピコピペットを顕微鏡の上に設置, B: 白色の子房からシングルセルが単離された, C: ピコピペットによるシングルセルの吸引過程. →: 吸引した時の残骸でここでは目印とした, D: ピコピペットによるシングルセルの吐き出す過程. →: 吐き出した時の残骸でここでは目印とした

プロトプラストを単離・回収し、マイクロインジェクション法による *ASG-1* 遺伝子導入実験を行う予定である。それによって *ASG-1* 遺伝子による一過性発現などを利用してより確実に AIC 細胞を検出する手法の確立を図りとともに、アポミクシス性特異的遺伝子 *ASG-1* の機能解析を目指したい。

謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金 (23380009) の支援を受けて行ったものである。

要 約

アポミクシスは母親の遺伝子型だけが子供の世代に伝わる生殖様式である。この性質が実用されれば、一代雑種の固定による種子生産のコストダウンや、中間母本の固定による育種年限の短縮、ひいては栄養生殖

性植物の種子繁殖性への転換が可能になるなど、「緑の革命」以上の経済効果が期待されている。これまで我々はイネ科暖地型牧草であるアポミクシス性ギニアグラスを材料とし、*differential screening* 法を用いて、アポスポリー性胚嚢始原生殖細胞 (AIC) の出現時期に特異的に発現する遺伝子、すなわちアポミクシス性特異的遺伝子 (*ASG-1*) のクローニングに成功している。前報では、モデル植物のシロイヌナズナを用い、*ASG-1* 遺伝子を導入してその機能解析に関する研究結果を報告した。本研究では、AIC の出現メカニズムの分子的解析の一環として、アポミクシス性ギニアグラスを用いて、まず、異なる発育ステージの子房から AIC 細胞の単離方法を確立し、シングルプロトプラストの回収方法の確立を試みた。その結果は以下のとおりである。1) 蕾及び子房の大きさと子房の色は子房の成熟期間と正比例関係にあることが分かった。よって子房の色で子房の発育時期を推定できる; 2) 酵素液に浸した子房をさまざまな前処理を施すことによって、シングルプロトプラストの効率的な単離が可能となった; 3) さらに単離されたシングルプロトプラストは、超微量電子スポイトピ

コピーレットを使って回収することができた。本研究で得られたこれらの技術は、今後の AIC 細胞の出現メカニズムの分子的解析に重要な手段となるとともに、アポミクシス現象の全容解明にも重要な情報を提供する。

参考文献

- 1) Chen, L.Z. and Adachi, T. (1994) Plant regeneration via somatic embryogenesis from cotyledon protoplasts of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Breeding Science* **44**: 257-262.
- 2) Chen, L.Z. and Adachi, T. (1998) Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* (Mill.) and *Lycopersicon peruvianum*-complex: Somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology. *Plant Cell Reports* **17**(6/7): 508-514.
- 3) Chen, L.Z., Amano, S., Guan, L.M. and Adachi, T. (2006) Preliminary isolation of viable embryo sacs and protoplasts from viable egg cells in facultative apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). *Cytologia* **70**: 171-179.
- 4) Chen, L.Z. and Guan, L.M. (2006) Advances in cloning and expression of apomixis-specific genes in flowering plants. 572-577. [Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Advances and Topical Issues Volume I] Edited by Jaime A. Teixeira da Silva, Global Science Books, London, UK
- 5) Chen, L.Z., Guan, L.M., Seo, M., Hoffmann, F. and Adachi, T. (2005) Developmental expression of ASG-1 during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology* **162**: 1141-1148.
- 6) Chen, L.Z. and Kozono, T. (1994a) Cytology and quantitative analysis of aposporous embryo sac development in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Cytologia* **59**: 253-260.
- 7) Chen, L.Z. and Kozono, T. (1994b) Cytological evidence of seed-forming embryo development in polyembryonic ovules of facultatively apomictic guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Cytologia* **59**: 351-359.
- 8) Chen, L.Z., Miyazaki, C., Kojima, A., Saito, A. and Adachi, T. (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during the period of aposporous embryo sac initial cell appearance in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Journal of Plant Physiology* **154**: 55-62.
- 9) Guan, L.M., Chen, L.Z. and Terao, H. (2006) Ultrastructural studies of gametophytic apomicts in guinea grass (*Panicum maximum*) . I. Differentiation of aposporous initial cell. *Cytologia* **71**: 379-389.
- 10) Guan, L.M., Chen, L.Z. and Terao, H. (2007) Ultrastructural studies of Gametophytic Apomicts in Guinea grass (*Panicum maximum*) II. Characteristics of aposporous initial cell-derived embryo sac. *Cytologia* **72**: 145-153.
- 11) Hanna, W.W. and Bashaw, E.C. (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science* **27**: 1136-1139.
- 12) Koltunow, A.M. (1993) Apomixis: embryo sac and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* **5**: 1425-1437.
- 13) 西村佳子, 鉄村琢哉, 濱口卓郎, 杉田亘, 市川裕章, 吉田薫, 徐成体, 陳蘭庄 (2013) アポミクシス性特異的遺伝子の機能解析 - Floral dip 法による ASG-1 遺伝子導入と組換えシロイヌナズナの作出 - 南九州大学研報 **43A**: 33-39.