

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05779

研究課題名（和文）1細胞追跡による花粉の精細胞の運命と受精能を決定するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of cell fate and fertility determination of pollen sperm cells by single-cell tracking

研究代表者

水多 陽子（Mizuta, Yoko）

名古屋大学・高等研究院・ITbM・特任助教

研究者番号：70645142

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 36,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では蛍光タンパク質のマーカーラインを整備し、共焦点顕微鏡を用いて花粉や花粉管の発生過程を長時間生きたまま観察し、解析する手法を確立した。併せて花粉へ遺伝子を一過的に導入し、遺伝子機能や表現型に与える影響などを評価した。その結果、花粉の第一分裂時の核の位置が、栄養細胞と雄原細胞への分化に重要であることが明らかとなった。また、導入花粉を単離し、少数の花粉から次世代シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行なった。さらに、一過的導入花粉を選抜する方法を確立し、選抜した花粉を受粉することで、花粉管発芽などを評価した。本研究の成果の一部は、複数の論文、および学会にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉は被子植物に共通の器官である。よって、花粉の形成過程を知ることは、被子植物の生殖を知る上で重要である。また、作物の生産性の向上や不稔性の打破など、農業や育種にも重要である。本研究では、花粉に一過的な遺伝子導入を行うことで、生きたまま花粉の発生過程における遺伝子発現や形態変化を解析できるようになった。また、遺伝子導入された花粉を選抜し受粉することで、受精までを観察可能なことが示された。本研究の手法や知見を用いることで、今後は発生、分化に関わる遺伝子の調査や、種間の比較解析の研究などが促進されると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, some *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines were developed. We established a method to observe and analyze pollen and pollen tube development using confocal microscopy with fluorescent markers for a long period. We also transiently introduced genes into pollen and evaluated their effects on gene function and phenotype. Our results indicate that the position of the pollen nucleus at the first division is important for the differentiation of generative cell and vegetative cell. Gene-introduced pollen grains were isolated and gene expression analysis from a small number of gene-introduced pollen grains was performed by RNA-seq analysis. Furthermore, a method for automated isolation of transiently gene-introduced pollen was established. Pollination of the isolated pollen was used to evaluate pollen tube germination and following aspects. Some of the results of this research were reported in several articles and at conferences.

研究分野：植物生殖

キーワード：花粉 イメージング 一過的導入 植物 生殖

## 1. 研究開始当初の背景

花を咲かせる植物は被子植物と呼ばれる。花は被子植物の生殖器官であり、雄のゲノムを運ぶ細胞は花粉と呼ばれ、配偶子である精細胞を含んでいる(図1)。一方で雌のゲノムを持つ細胞は卵細胞と呼ばれ、めしべと呼ばれる母体組織の奥の胚珠の内部に埋め込まれている。種子をつくるには精細胞と卵細胞が出会い受精する必要があるが、精細胞は自力で卵細胞へと辿り着く能力を持たない。そこで、花粉は花粉管と呼ばれる管状の細胞を伸長させ、卵細胞に配偶子を届けることで受精が起きる。すなわち、花粉は雄のゲノムを雌の細胞へと運ぶのに特化した被子植物独自の生殖細胞といえる。花粉は減数分裂後に小孢子と呼ばれる前駆細胞から発生する(図1)。まず、小孢子が分裂(第一分裂)し、大きな栄養細胞と、小さな配偶子系列細胞(雄原細胞)を形成する。この時、雄原細胞は栄養細胞に取り込まれた形となる。次に、雄原細胞のみが分裂(第二分裂)し、2つの精細胞が形成される。栄養細胞は花粉管を伸ばし、その内部を精細胞が運ばれ、卵細胞と受精し種子となる。すなわち、花粉発生過程における第一分裂では、片方は次世代に伝わらない栄養細胞(花粉管)に、もう片方は次世代に伝わる雄のゲノムを持つ雄原細胞へと、全く異なる性質を持つ細胞へ運命決定される。

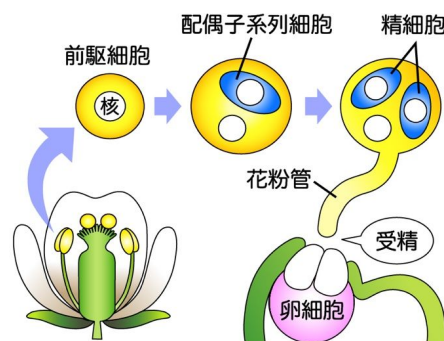


図1 被子植物の花粉の発生と受精

花粉は被子植物に共通の器官であり、種子の形成に必須な細胞であることから、花粉発生のメカニズムや受精能を獲得するしくみを知ることは、被子植物の生殖を知る上で重要である。そのため、精細胞と花粉管の細胞運命が決定されるしくみは、主にモデル植物を用いて解析されてきた。しかし、花粉の栄養細胞と精細胞への細胞運命はいつ、どのように決定されるのかの全貌は未だ明らかになっていない。その原因の一つとして、植物の体は不透明なため花粉の発達を生きのまま観察することが困難である点が挙げられる。また、被子植物のモデル植物であるイネやシロイヌナズナでは、開花時にすでに花粉の2回目の分裂が終了しており、発生途中の花粉を観察するには適していないことも研究が進まない要因の一つとなっている。よって、花粉の中で栄養細胞と精細胞の運命が決定され、それぞれ受精能力を獲得していくしくみについては、不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

花粉の発生過程において、栄養細胞と精細胞の細胞運命を決定し、それぞれ受精能力を獲得していくしくみを明らかにするため、花粉の採取や観察が容易なベンサミアナタバコを用い、その発生過程を1細胞レベルで生きのまま継続的に観察及び解析する手法を確立する。また、確立した手法を元に、花粉の細胞内をボンバードメント法によって一過的に可視化することで、ハイスループットに花粉の発生を観察する方法を構築する。さらに、分裂や発生に関わる遺伝子を直接花粉、または雄原細胞に一過的導入し、遺伝子発現解析と組み合わせることで、精細胞の運命決定と分裂制御のしくみを明らかにする。さらに、一過的導入した花粉を受粉することで、導入花粉における受精能力を評価する。これにより、精細胞の運命決定と受精能の獲得について、分子メカニズムの全貌を明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

初めに、花粉の発生を長時間ライブイメージングするのに適した条件の確立に着手した。次に、ベンサミアナタバコの形質転換を行い、蛍光タンパク質によるマーカーラインを作製した。共焦点顕微鏡を用いて作製したラインの花粉や花粉管の発芽をライブイメージングし、詳細なデータを得た。次に、花粉への一過的な遺伝子導入に用いるため、細胞内骨格や花粉の発生に関わる遺伝子を可視化するプラスミドを複数構築した。構築したプラスミドを花粉へ導入し、花粉発生の経時的な観察、及び得られた画像の解析を行った。並行して、一過的遺伝子の導入により遺伝子発現が変化するかを1花粉採取と大規模遺伝子発現解析によって調査した。次に、プラスミドが導入された花粉を選抜する方法を確立した。その後、選抜された導入花粉を受粉し、花粉発芽以降の生殖過程を調査した。

## 4. 研究成果

まず花粉の発生を生きのまま観察するため、ベンサミアナタバコの形質転換体 UBQ10p::H2B-

mClober、及び UBQ10p::H2B-tdTomato を作製した。次に、共焦点顕微鏡を用いてベンサミアナタバコの花粉の発生の観察を試みた。小胞子を葯から取り出し、最適化した培地にて観察を行ったところ、共焦点顕微鏡下で最大で 96 時間ライブイメージングを行うことが可能であり、第一分裂が観察可能であることが明らかとなった。また、開花期の葯から成熟した花粉を取り出し、花粉管発芽培地に散布し観察を行ったところ、散布から 10 時間前後で第二分裂が起こり、雄原細胞から 2 つの精細胞が形成される様子を捉えることに成功した (図 2)。

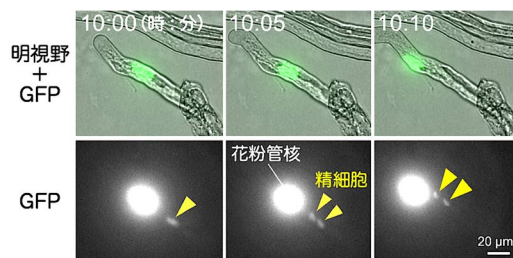


図 2 ベンサミアナタバコ花粉管での精細胞の分裂

次に、花粉への一過的な遺伝子導入に用いるため、細胞内骨格や花粉の発生に関わる遺伝子を可視化するプラスミドを複数構築した。構築したプラスミドを、ベンサミアナタバコ花粉へのボンバードメント法として確立した手法 (Nagahara et al. 2021 *Plant Reprod.*; 水多 2023 株式会社 情報機構) を用い、花粉へ導入して発生過程の経時的な観察を行った。その結果、第一分裂時の核動態や細胞板形成、液胞の局在と発達の様子などを生きたまま可視化することができた (図 3、水多 2023 *植物科学の最前線 (BSJ-Review)*)。さらに、一過的遺伝子の導入により遺伝子発現が変化するかを調査した。花粉の発生に関わる遺伝子を導入し、導入花粉を採取して次世代シーケンサーによる大規模遺伝子発現解析を行なった。その結果、一過的遺伝子導入によって花粉内の遺伝子発現が変化していることが明らかとなった。また、少量のベンサミアナタバコ花粉から効果的に核酸抽出法を確立することにより、花粉の発生や受精に関する遺伝子の発現解析や機能解析を行うための基盤が整った。

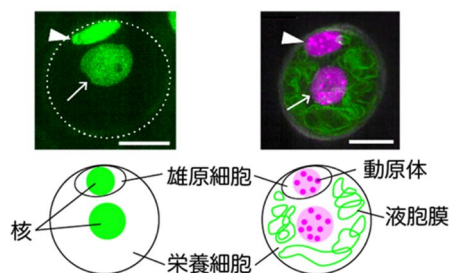


図 3. ベンサミアナタバコ花粉への一過的導入と可視化

左は核が緑色蛍光で標識されている。右は核質と動原体が赤色で、液胞膜が緑色で標識されている。矢じりは雄原細胞の核、矢印は栄養細胞の核を示す。(水多 (2023) *BSJ-Review* より転載。) ←

導入花粉の受粉後の様子を解析するため、プラスミドが導入された花粉を半自動的に選抜する方法を確立した。まず、顕微鏡制御ソフトウェアである Nikon NIS-Elements の JOBS を用いて、蛍光シグナルを指標に遺伝子導入された花粉と非導入花粉を判別するマクロを構築した。次に、近赤外レーザー光 (IR-LEGO) と電動ステージの制御機構を組み合わせ、非導入花粉のシグナルの重心に IR レーザーを自動的に照射する仕組みを構築した。これにより、花粉集団における導入花粉の割合を、選抜前に比べ 8 倍以上濃縮することが可能となった (Kaneshiro et al. 2022 *Quant. Plant Biol.*)。次にこの濃縮した花粉集団を受粉し、花粉発芽以降の生殖過程の調査を行った。その結果、導入花粉はめしべ上で発芽が可能であり、濃縮された花粉由来の花粉管が有意に伸長する様子が観察された (Kaneshiro et al. 2022 *Quant. Plant Biol.*)。これにより、一過的導入した花粉による受粉とその後の生殖過程を効果的に解析する基盤が整った。

本研究の成果の一部は、複数の論文および学会にて発表した。また、年 3 回の班会議にて発表と情報共有を行い、領域内の連携や協力も積極的におこなった。

#### <引用文献>

Ikuma Kaneshiro, Masako Igarashi, Tetsuya Higashiyama, Yoko Mizuta (2022) Target pollen isolation using automated infrared laser-mediated cell disruption. *Quant. Plant Biol.* 3: E30. doi: 10.1017/qpb.2022.24

Shiori Nagahara, Tetsuya Higashiyama, Yoko Mizuta (2021) Detection of a biolistic delivery of fluorescent markers and CRISPR/Cas9 to the pollen tube. *Plant Reprod.* 34:191-205. doi: 10.1007/s00497-021-00418-z

水多 陽子 (2023) 一過的導入による花粉の可視化とゲノム編集. *植物科学の最前線 (BSJ-Review)* 14: 21-29. doi: 10.24480/bsj-review.14a4.00239

水多陽子 (2023) ゲノム編集技術 ~実験上のポイント/産業利用に向けた研究開発動向と安全性周知 (担当:分担執筆, 範囲:第 3 節 第 1 項 ゲノム編集酵素のデリバリーと植物の特性改良) 株式会社 情報機構 ISBN: 9784865022421

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kurihara Daisuke, Mizuta Yoko, Nagahara Shiori, Sato Yoshikatsu, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Optical Clearing of Plant Tissues for Fluorescence Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/63428	査読の有無 有
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）	国際共著 -
1. 著者名 Nagahara Shiori, Higashiyama Tetsuya, Mizuta Yoko	4. 巻 34
2. 論文標題 Detection of a biolistic delivery of fluorescent markers and CRISPR/Cas9 to the pollen tube	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 191 ~ 205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00497-021-00418-z	査読の有無 有
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）	国際共著 -
1. 著者名 Mizuta Yoko	4. 巻 62
2. 論文標題 Advances in Two-Photon Imaging in Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1224 ~ 1230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab062	査読の有無 有
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）	国際共著 -
1. 著者名 Kurihara Daisuke, Mizuta Yoko, Nagahara Shiori, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 ClearSeeAlpha: Advanced Optical Clearing for Whole-Plant Imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab033	査読の有無 有
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）	国際共著 -

1. 著者名 Nagahara Shiori、Higashiyama Tetsuya、Mizuta Yoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of a biolistic delivery of fluorescent markers and CRISPR/Cas9 to the pollen tube	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.02.15.431139	査読の有無 有
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)	国際共著 -

1. 著者名 水多 陽子	4. 巻 14
2. 論文標題 一過的導入による花粉の可視化とゲノム編集	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 植物科学の最前線	6. 最初と最後の頁 21 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.14a4.00239	査読の有無 有
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)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneshiro Ikuma、Igarashi Masako、Higashiyama Tetsuya、Mizuta Yoko	4. 巻 3
2. 論文標題 Target pollen isolation using automated infrared laser-mediated cell disruption	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Quantitative Plant Biology	6. 最初と最後の頁 E30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/qpb.2022.24	査読の有無 有
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)	国際共著 -

1. 著者名 Niimi Yoko、Nagai Keisuke、Ashikari Motoyuki、Mizuta Yoko	4. 巻 184
2. 論文標題 Deep Fluorescence Observation in Rice Shoots via Clearing Technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e64116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/64116	査読の有無 有
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)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長江拓也, 武内秀憲, 水多陽子, 東山哲也
2. 発表標題 二光子顕微鏡を用いて生殖過程を定量的に捉え、異種と同種を見分ける認証機構に迫る
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新美陽子, 永井啓祐, 保浦徳昇, 水多陽子, 竹林裕美子, 小嶋美紀子, 榊原均, 島谷善平, 寺田理枝, 辻寛之, 芦苅基行
2. 発表標題 イネにおける成長相転換とジベレリン生合成の時空間的解析
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永原史織, 東山哲也, 水多陽子
2. 発表標題 花粉管を用いた生殖細胞のゲノム編集と導入細胞の可視化
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 花粉管を用いたゲノム編集酵素のデリバリーと生殖細胞の遺伝子改変
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 花粉管発生におけるライブイメージングと生殖細胞の改変
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会・関連集会「植物生殖改変ワークショップ」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 観る、知る、利用する。植物の花に秘められたいのちのしくみ
3. 学会等名 第7回名古屋大学の卓越・先端・次世代 研究シンポジウム「学問の意義と貢献：研究のインパクトと社会との対話」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 花の神秘 隠されたいのちのしくみ
3. 学会等名 第80回名大カフェ 'SCIENCE, AND ME'（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水多陽子, 皆川吉, 田中左恵子, 江面浩
2. 発表標題 花粉によるゲノム編集酵素のデリバリーと周辺技術の開発
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 花粉を用いた植物生殖細胞のゲノム編集と周辺技術の開発
3. 学会等名 2022年度植物科学シンポジウム「植物科学で挑む、社会実装への道」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 イメージングで解き明かす花粉の一生と受精メカニズム
3. 学会等名 京大植物縦横無尽の会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 一過的発現による花粉の分化運命の制御
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 皆川 吉, 田中 左恵子, 大島 崇彰, 水多 陽子, 東山 哲也, 江面 浩, 間 和彦
2. 発表標題 花粉のゲノム編集とRNP導入
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 花粉を用いた植物生殖細胞のゲノム編集
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第7回大会, シンポジウム「ゲノム編集植物の科学」(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Daniel L. Hartl、中村 千春、岡田 清孝	4. 発行年 2021年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 560
3. 書名 エッセンシャル遺伝学・ゲノム科学(原著第7版)	

1. 著者名 立川 雅司、畑田 出穂、藤井 渉	4. 発行年 2023年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 315
3. 書名 ゲノム編集技術～実験上のポイント/産業利用に向けた研究開発動向と安全性周知	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特願2022-023027 対象細胞の濃縮方法	発明者 金城行真, 栗原(水多)陽子, 東山哲也, 皆川吉, 和田悠作	権利者 東海国立大学機構、他3件
産業財産権の種類、番号 特許、2022-023027	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究紹介・成果紹介（令和2年度 科研費 学術変革B「植物生殖改変」公式webサイト）  
<https://www.remod-reprod.com>  
 研究紹介（名古屋大学研究成果発信サイト Researchers' Voice）  
[https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/researchers\\_voice/2020/11/no25.html](https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/researchers_voice/2020/11/no25.html)  
 「光らせよう！見てみよう！蛍光たんぱく質で科学者体験」 サカエ大学第13回キッズサイエンス  
<https://youtu.be/e3ajGXaZVis>  
 植物生殖改変領域ホームページ  
<https://www.remod-reprod.com>  
 研究紹介（名大トピックス No. 329）  
[http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/publication/topics/\\_no329.html](http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/publication/topics/_no329.html)  
 第80回名大カフェ  
<http://www.aip.nagoya-u.ac.jp/public/mcafe/event/detail/0005132.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 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

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------