

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19331

研究課題名（和文）顕微操作を用いた核動態制御により位置情報と細胞個性決定の関係性に迫る

研究課題名（英文）Investigation of the relationship between positional information and cell identity by controlling the nuclear dynamics using optical manipulation

研究代表者

栗原 大輔 (Kurihara, Daisuke)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任講師

研究者番号：90609439

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞数が少なく単純な雌性配偶体形成過程をモデルとして、植物の細胞個性制御機構を明らかにするために、核の位置情報と細胞個性決定との関係性を明らかにし、分子機構解明に迫ることを目的とした。シロイヌナズナ *in vitro* 雌性配偶体発生系を確立し、雌性配偶体発生の動態をリアルタイムに捉えることに成功した。雌性配偶体発生における核動態と細胞個性決定の時空間情報を解析した結果、これまで考えられていたよりも早い時期に細胞個性が決定している可能性を示した。また、植物細胞における細胞内オルガネラ操作技術の克服すべき課題を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

被子植物の雌性配偶体形成過程における細胞個性決定機構は、細胞間コミュニケーションを介した機構と予想され、非常に魅力的なモデル現象としても注目され、以前より世界中で解析が行われているが、これまで花の奥深くで起こる現象であるため、突然変異体を用いた解析しか行うことができなかった。本研究で確立した *in vitro* 胚珠培養系を用いたライブセル解析により、リアルタイムに雌性配偶体形成への影響を解析することがはじめて可能となったことで、細胞個性決定機構の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the relationship between nuclear positional information and cell fate specification to elucidate the molecular mechanisms of cell fate specification in plants using a simple female gametophyte formation process with a small number of cells. We established the *in vitro* female gametophyte development system of Arabidopsis and monitored the dynamics of female gametophyte development in real-time. Analysis of the spatiotemporal information of nuclear dynamics and the expression of cell fate marker during the female gametophyte development suggested that the cell fate specification initiated earlier than previously thought. We also clarified the problem to be overcome in the intracellular organelle manipulation technology in the plant cells.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：植物 雌性配偶体 細胞個性 位置情報 顕微操作 イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物では、複雑な構造・機能を構築するために、細胞をさまざまに分化させることにより特徴を持った形質を発揮する。たったひとつの受精卵から多種多様な機能を持つ器官を作り出すためには、適切な時期、適切な場所で細胞個性を決定することが重要である。しかし、植物において、細胞がどのように位置情報を

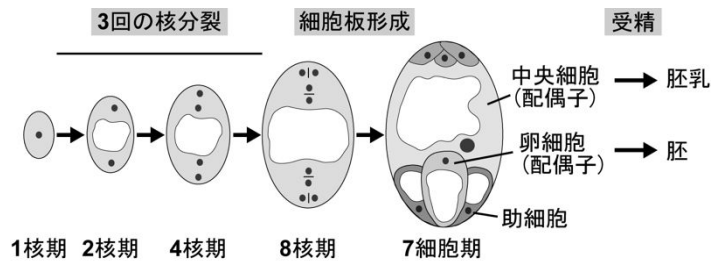


図1 被子植物における雌性配偶体形成

認識して細胞個性を決定しているのか、その制御機構の分子実体は不明な部分が多い。このような、植物の細胞分化に重要な細胞個性の制御機構について研究する上で、非常に興味深い発生過程が被子植物の雌性配偶体形成過程である(図1)。シロイヌナズナの雌性配偶体は、細胞質分裂を伴わない核分裂により多核体として発生が進行する。3回の核分裂の後、細胞板を形成することで細胞化を起こし、その後、各細胞特異的な遺伝子が発現することで分化する。特に、細胞化後の細胞分化(細胞個性決定)は核の位置情報により決定されていると考えられているが、これらは花のめしべ組織深部で起こっている現象であるため、これまで生きたままリアルタイムでその過程を観察することは叶わず、断片的な情報から解析・推察することしかできなかった。そのような中、*in vivo*で起こっている現象を再現できる*in vitro*培養系を開発し、また高度な顕微鏡技術を用い低侵襲・高解像度で観察することによって、顕微鏡下において生きたまま観察しながら、細胞を自在に操り解析する、ライブセル解析技術を確立すれば、リアルタイムに雌性配偶体形成過程への影響を解析できるため、細胞個性制御メカニズムの解明に迫れるのではないかと着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞数が少なく単純な雌性配偶体形成過程をモデルとして、植物の細胞個性制御機構を明らかにするために、核の位置情報と細胞個性決定との関係性を明らかにし、分子機構解明に迫ることである。

3. 研究の方法

(1) 光顕微操作による核動態制御と細胞個性解析

シロイヌナズナの雌性配偶体発生における核動態と細胞個性決定の時空間情報を解析するために、*in vitro*培養系を開発し、ライブイメージングを行う。さらに、核の移動を直接制御することで、核の位置情報と細胞個性決定の関係性を明らかにする。光顕微操作として、光ピンセットにより核を自在に移動させ、その後の細胞個性決定への影響をライブイメージングで解析する。別の光顕微操作として、フェムト秒パルスレーザーを用いて、核動態を制御しているアクチン繊維を局所的に破壊することで、核の移動を阻害し、細胞個性への影響の解析も並行して行う。また、単一の核を破壊し、核の相対位置を変化させることで、細胞個性に影響が出るか解析する。これらの実験を通して、雌性配偶体内のどの位置に核が局在するときどの細胞個性を発揮するのか、あるいはそれぞれの核との位置関係が重要であるのか明らかにすることを目指した。

(2) 多核体細胞における個々の核特異的発現解析

細胞化後迅速に異なる細胞個性を発揮するために、多核体の時期からすでに異なる遺伝子発現パターンを有しているかを明らかにするために、多核体である4核期において、光変換蛍光タンパク質を利用して単一核を標識・単離し、核一つのRNAから遺伝子発現解析(RT-PCR・トランスクリプトーム解析)を試みる。また、レーザー光により位置を操作した核を単離して、遺伝子発現解析をすることで、核の位置情報の認識、あるいは制御をする分子の同定を目指した。

4. 研究成果

(1) 光顕微操作による核動態制御と細胞個性解析

シロイヌナズナ *in vitro* 雌性配偶体発生系の確立

我々は独自に開発した胚珠培養培地を用いることで、シロイヌナズナ *in vitro* 胚発生系の確立に成功している(Gooh et al., 2015)。この培地は受精後の胚珠の培養に適していたため、受精前の胚珠も同様に培養したところ、雌性配偶体発生が大きな問題なく進行することが分かった。そこで、雌性配偶体の核や細胞膜を標識した胚珠を用いてライブイメージングしたところ、1核期から3回の核分裂、細胞質分裂、細胞化など雌性配偶体発生の動態をリアルタイムに捉えることに成功した。次に、細胞個性がいつ獲得されているかを解析するために、助細胞機能に必

須な転写因子である MYB98 のプロモーター下で NLS-mRuby2 を発現させた胚珠を観察したところ、驚くべきことに、細胞化を起こす前の多核体の状態である 4 核期においてすでに発現が始まっていることが明らかとなった。以上の結果は、2020 年 bioRxiv に報告した (Susaki et al., 2020)。

顕微鏡操作による核動態制御

in vitro 雌性配偶体発生系の確立に成功したため、続いて、顕微鏡操作による核動態制御として、光ピンセットにより直接雌性配偶体内の核を移動できないか試みた。光ピンセットにより細胞内オルガネラを操作できるかを確認するために、タバコ培養細胞 BY-2 を用いた

ところ、細胞内の粒子状オルガネラや細胞質系の動かすことに成功した。そこで、シロイヌナズナの胚珠を用いて 8 核期の核を補足しようと試みたが、光ピンセットで補足することはできなかった。シロイヌナズナでは雌性配偶体が胚珠の中に埋め込まれているため、光ピンセットを用いた核の移動制御が困難であったことも考えられたので、雌性配偶体が胚珠から裸出しているため顕微鏡操作が容易なトレニアを用いて、同様に核の補足を試みたが、こちらもシロイヌナズナ同様、補足することはできなかった。この要因として、タバコ培養細胞で動かしていた粒子状オルガネラや細胞質系に比べ核が大きく、光ピンセットでは植物細胞内で核を動かすための力が足りないことが考えられた。

そのため、別の顕微鏡操作として、光ピンセットではなく、磁気ピンセットにより核を移動させることはできないかと考え、ウニの受精卵細胞の中で磁気ピンセットを用いて微小管星状体が生み出す力の測定に成功している谷本博一博士 (横浜市立大) に助言を頂き、実験系のセットアップを行った。磁気ビーズを核に局在させるため、核膜のピオチン化を利用する INTACT 法 (Deal and Henikoff, 2010) を参考に、植物細胞に BirA/NTF を発現させ、核膜をピオチン化を行った。パーティクルボンバードメントによりストレプトアビジン磁気ビーズを導入することで核膜に磁気ビーズをトラップし、磁気ピンセットによる補足を試みようとした。しかし、パーティクルボンバードメントにより導入したストレプトアビジン磁気ビーズを効率よく見つけることができず、補足に至らなかった。改善点としては、ストレプトアビジン磁気ビーズを蛍光標識する、またマイクロインジェクションにより導入する、などが挙げられる。このように本研究により、植物細胞における細胞内オルガネラ操作技術の克服すべき課題を明らかにすることができた。

(2) 多核体細胞における個々の核特異的発現解析

多核体である 4 核期において、各位置と遺伝子発現に特徴があるのか、遺伝子発現解析を行うために、光変換蛍光タンパク質 mEos4 をヒストン H2B に融合させ、顕微鏡下で解析したい核だけ UV を照射し、緑色から赤色に蛍光を変換させた後、核を回収できるよう、実験材料の準備を進めた。雌性配偶体特異的に十分量発現できるプロモーターの選定に時間がかかってしまい、最終的には GPR1pro::H2B-mEos4 形質転換植物体を確立できたが、最適な色変換の条件を見いだすまでには至らなかった。

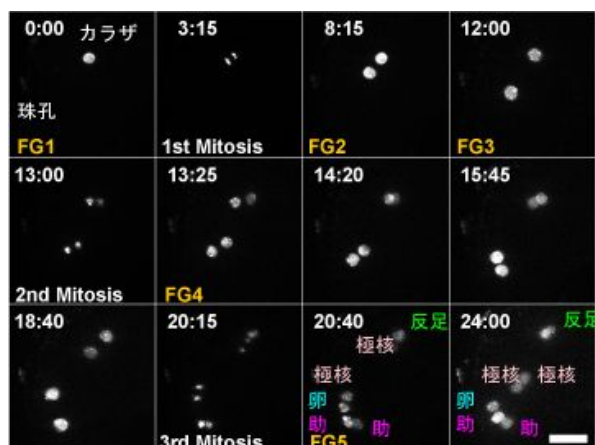


図2 雌性配偶体形成過程のライブイメージング (20 μ m)
Susaki et al. (2020)より改変転載

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda Minako, Kimata Yusuke, Kurihara Daisuke	4. 巻 2122
2. 論文標題 Live-Cell Imaging of Zygotic Intracellular Structures and Early Embryo Pattern Formation in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 37～47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0342-0_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Susaki Daichi, Suzuki Takamasa, Maruyama Daisuke, Ueda Minako, Higashiyama Tetsuya, Kurihara Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in Arabidopsis	5. 発行年 2020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） 10.1101/2020.04.07.023028	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Daisuke Kurihara
2. 発表標題 Live cell analysis and deep imaging for plant development
3. 学会等名 JSOL2019（第16回日本ナス科コンソーシアム年会）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Kurihara, Daichi Susaki, Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Live-cell analysis of female gametophyte development in Arabidopsis
3. 学会等名 the 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kurihara, Daichi Susaki, Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Live-cell analysis of female gametophyte development in Arabidopsis
3. 学会等名 Synthetic Morphogenesis: From Gene Circuits to Tissue Architecture (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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