

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16172

研究課題名（和文）雌性配偶体の細胞運命決定機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism for cell fate determination in the female gametophyte

研究代表者

須崎 大地（Susaki, Daichi）

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

研究者番号：20757869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：被子植物の雌性配偶体の発生は独特で、1つの細胞が3回の核分裂を経て多核体となった後に細胞化し、4種7細胞がそれぞれ固有の機能を獲得する。本研究は、各細胞の運命と機能を担う分子基盤を明らかにすることを旨とした。1細胞の逆遺伝学的な解析によって助細胞から卵細胞への運命転換を反映した遺伝子発現の変遷を検出した。また、助細胞の花粉管誘引を支える極性分泌の制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

雌性配偶体は、被子植物の繁栄を支える重複受精に不可欠な組織である。この特有な発生過程や細胞機能の制御は、不明な点が多い。運命転換時の遺伝子発現変動をとらえたことで、細胞運命の決定機構を明らかにするための基盤整備が出来た。また、花粉管誘引の制御機構の解明は植物生殖の制御技術の開発に繋がる重要な成果といえる。

研究成果の概要（英文）：The development of the female gametophyte in angiosperms is unique. After undergoing three rounds of mitosis without cytokinesis, a single cell becomes a multicellular tissue. Cellularization occurs almost simultaneously and results in four cell types with seven cells, each acquiring specific functions. Here we studied how the female gametophyte develops by acquiring its appropriate cell fate and function of each cell. By reverse genetic analysis of a single cell, we detected the dynamic changes in gene expression that reflect the fate conversion from the synergid to the egg cell. Furthermore, we revealed the mechanism for polarized secretion of pollen tube attractants in the synergid cells.

研究分野：植物発生学

キーワード：雌性配偶体 細胞運命 scRNA-seq ライブイメージング アクチン繊維 助細胞 極性分泌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

雌性配偶体は被子植物の繁栄を支える重複受精に不可欠な組織である。形成過程は独特で、1つの細胞が3回の核分裂を経て多核体となった後に細胞化し、2つの助細胞、雌性配偶子である1つずつの卵細胞と中央細胞、3つの反足細胞という4種の7細胞となる。これらの細胞は、生殖過程においてそれぞれ固有の機能を獲得する。遺伝的に同一の核から生じる多細胞が多様に機能分化する点において、発生分化の研究に最適な組織といえる。各細胞の運命決定には多核体での核の配置や植物ホルモンの分布の違いが重要であると示唆されているが、その時期や分子実体は明らかでない。これまでの申請者の研究から4核期後半には細胞の運命が決定されることが示唆された。また、各細胞の機能を裏打ちする制御システムも未だ不明な点が多い。2つある助細胞は、分泌活動が活発な細胞であり、花粉管誘引ペプチドを分泌して雄性配偶子を運搬する花粉管を胚珠へと導く。しかしながら、その分泌制御の詳細は明らかでない。

### 2. 研究の目的

(1) 顕微細胞操作とライブイメージング、逆遺伝学的解析によって、雌性配偶体の運命決定や細胞機能に関わる遺伝子を探索して解析する。

(2) 助細胞における花粉管誘引物質の分泌制御システムを解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 雌性配偶体の運命決定や細胞機能に関わる遺伝子の探索

多核体期(1, 2, 4, 8核期)の雌性配偶体の遺伝子発現を調べるために、該当の発生ステージを通して核を標識する蛍光レポーターシステムを作出した。さらに、珠孔側とカラザ側を確実に採り分けるために、CK11プロモーターでカラザ側の核を別の色の蛍光タンパク質で重ねて標識した形質転換体を作成した。

これまでに雌性配偶体の細胞運命が異常になる変異体はいくつか報告されている。amp1変異体では低頻度であるが、助細胞が卵細胞様になる胚珠が観察される。この変異体を背景に各細胞種の分化マーカーを作出した。卵細胞マーカーもしくは助細胞マーカーのみが発現する細胞と卵細胞、助細胞マーカーがともに発現する細胞を回収して、scRNA-seqを実施した。

本研究代表者は、これまでに助細胞特異的に発現する転写因子MYB98の変異体の助細胞のRNA-seqデータを取得していた。データ解析の結果、myb98の助細胞は部分的に卵細胞様に転換していることが明らかになった(Susaki et al., PLoS Biol., 2021)。この助細胞で卵細胞や初期胚で特異的に発現するRKDを発現させ、さらに助細胞を運命転換出来ないかを検討した。

(2) 助細胞における花粉管誘引物質の分泌制御システムの解明

助細胞の珠孔端には織形装置とよばれる細胞膜と細胞壁が複雑に陥入した特殊な構造があり、花粉管誘引物質(ペプチド)等の分泌活動に重要だと考えられている。この独特な構造の詳細な3次元解析のために、FIB-SEMで撮像した。これまで免疫染色による形態学的な解析から織形装置から放射状に広がる微小管と、助細胞の長軸方向に沿って分布するアクチン繊維が観察されていた。こういった助細胞の特徴的な形態と細胞骨格の配向は、細胞機能に重要であると考えられてきたが詳細は不明だった。そこで、ライブイメージングを駆使して微小管またはアクチンの経時的な動態変化を観察した。また、微小管またはアクチンを遺伝学的、薬理的な方法で重合阻害した際の細胞の形態と花粉管の誘引を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 雌性配偶体の運命決定や細胞機能に関わる遺伝子の探索

まず多核体期の核の標識のためにES2プロモーターを使ったpES2::NLS-Clover、pES2::H2B-Cloverを作製したが、4核の後期からしか発現がみられなかった上、蛍光シグナルも弱く顕微鏡下での細胞回収に耐える形質転換体は作出できなかった。また成熟胚珠では卵細胞と反足細胞では蛍光レポーターの発現が弱く、本研究の使用目的には沿わなかった。有望な他のプロモーター候補が見つからないなか2~3年目にかけて、pGPR1::H2B-mNeonGreenを作出した。この系統は1核~成熟胚珠まで雌性配偶体内の核だけを標識できた。カラザ側の核だけを標識するためにpCK11::NLS-tdTomato、pCK11::HTB1-mRuby2を観察したがどちらも暗く顕微鏡下での細胞回収での使用は難しかった。の結果からscRNA-seqで十分な検出遺伝子数のデータ取得が可能だとわかったので、今後はpGPR1::H2B-mNeonGreenの1つの胚珠から珠孔側、カラザ側を取り分けたscRNA-seqを実施する

検出遺伝子数はバルクサンプルでは2万以上であったのに対して、シングルセルでは半分程度であった。野生型と変異体の比較から、興味深いことに既知の卵細胞特異的遺伝子群が変異

体の助細胞で発現上昇することが確認できた。変異体の卵細胞においても複数の助細胞特異的な遺伝子の発現上昇が見られた。以上の結果からこれらの遺伝子が細胞運命の転換を担っている可能性が示唆された。また、ATAC-seq も実施したが、サンプル量が不十分だったためか有用な解析結果は得られなかった。

*RKD 1 ~ 4* を野生型と *myb98* の助細胞特異的に発現させた。野生型背景で *RKD2, 4* を発現させた系統の一部では、助細胞の核がカラザ側に移動して細胞の中ごろに見られた。*myb98* 背景で *RKD2, 4* を発現させた一部の系統では、卵細胞様の核配置が観察できた胚珠を確認できた。また、導入遺伝子をホモ接合にもつ系統を選抜できなかった。

## (2) 助細胞における花粉管誘引物質の分泌制御システムの解明

微小管またはアクチンを遺伝学的、薬理的な方法で重合阻害した際の細胞の形態と花粉管の誘引を調べた。微小管の破壊では、織形装置の細胞膜の陥入が少なくなったが、花粉管の誘引に異常は見られなかった。一方、アクチンを破壊すると織形装置の形態異常だけでなく、花粉管誘引ペプチドの分泌が阻害されて発生異常を示す種子が見られた(図 1)。受精異常を示す精細胞膜タンパク質の変異体の花粉管を受容して残った一方の助細胞では、一時的なアクチン繊維の消失が観察された。さらに、経時的な観察によって再びアクチン繊維が観察された(図 2)。野生型においても受精後に残った助細胞でアクチン繊維が観察された。このアクチン繊維の再形成は、受精失敗時に再び花粉管を誘引するために機能すると考えられる。この成果は国際誌に出版した(Susaki et al., Plant Cell, 2022)。

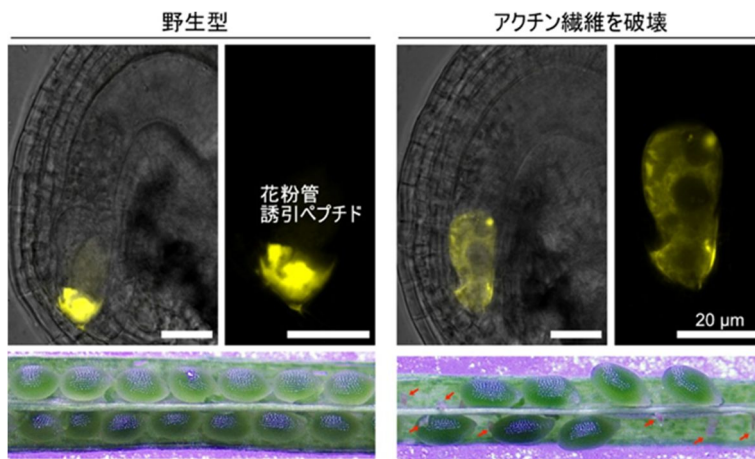


図 1 助細胞のアクチン繊維を破壊すると花粉管誘引ペプチドの局在が変化し種子の発生異常が見られた

左：野生型の助細胞では花粉管誘引ペプチドが織形装置に局在する

右：アクチン繊維を破壊すると花粉管誘引ペプチドが織形装置に局在できなくなり、受精できず種子が正常に形成されなくなる(赤矢印)

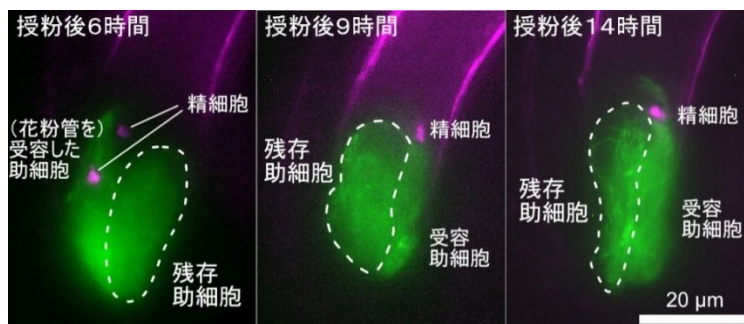


図 2 受精失敗後に残った助細胞では消失したアクチン繊維が回復する

緑色：アクチン、マゼンタ：精細胞

左：授粉後 6 時間では残存助細胞ではアクチン繊維が消失する

中：授粉後 9 時間ではほとんどアクチン繊維は見られない

右：授粉後 14 時間ではアクチン繊維の回復が見られた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Susaki Daichi, Izumi Rie, Oi Takao, Takeuchi Hidenori, Shin Ji Min, Sugi Naoya, Kinoshita Tetsu, Higashiyama Tetsuya, Kawashima Tomokazu, Maruyama Daisuke	4. 巻 35
2. 論文標題 F-actin regulates the polarized secretion of pollen tube attractants in Arabidopsis synergid cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1222 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac371	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 該当する
1. 著者名 Sugi Naoya, Izumi Rie, Tomomi Shun, Susaki Daichi, Kinoshita Tetsu, Maruyama Daisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Removal of the endoplasmic membrane upon sperm cell activation after pollen tube discharge	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1116289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1116289	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 Nishikawa Shuh-ichi, Yamaguchi Yuki, Suzuki Chiharu, Yabe Ayaka, Sato Yuzuru, Kurihara Daisuke, Sato Yoshikatsu, Susaki Daichi, Higashiyama Tetsuya, Maruyama Daisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Arabidopsis GEX1 Is a Nuclear Membrane Protein of Gametes Required for Nuclear Fusion During Reproduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 548032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.548032	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 Susaki Daichi, Suzuki Takamasa, Maruyama Daisuke, Ueda Minako, Higashiyama Tetsuya, Kurihara Daisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001123	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 Tsutsui Hiroki, Sato Yoshikatsu, Susaki Daichi, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 86
2. 論文標題 Microtubule depletion domain 1 localizes at the boundary between female gametes in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 925 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23175	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 Michael Borg, Yannick Jacob, Daichi Susaki, Chantal LeBlanc, Daniel Buendia, Elin Axelsson, Tomokazu Kawashima, Philipp Voigt, Leonor Boavida, Jorg Becker, Tetsuya Higashiyama, Robert Martienssen, Frederic Berger	4. 巻 in press
2. 論文標題 Targeted reprogramming of H3K27me3 resets epigenetic memory in plant paternal chromatin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	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) 10.1038/s41556-020-0515-y	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 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 須崎大地, 大井崇生, 友実駿, 榎本早希子, 荒井重勇, 木下哲, 丸山大輔
2. 発表標題 卵細胞による精細胞ポジショニング制御機構
3. 学会等名 超分野植物科学研究会第一回研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須崎大地
2. 発表標題 Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in Arabidopsis
3. 学会等名 新学術領域 全能性プログラム 論文徹底解説シリーズ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須崎大地, 大井崇生, 友実駿, 榎本早希子, 荒井重勇, 木下哲, 丸山大輔
2. 発表標題 重複受精における卵細胞の精細胞ポジショニング制御の解析
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 須崎大地
2. 発表標題 卵細胞特異的な新規細胞外構造が制御する重複受精機構の解析
3. 学会等名 卵細胞特異的な新規細胞外構造が制御する重複受精機構の解析 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須崎 大地, 栗原 大輔, 鈴木 孝征, 丸山 大輔, 植田 美那子, 東山 哲也
2. 発表標題 シロイヌナズナ雌性配偶体細胞の RNA-seq 解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原大輔, 須崎大地, 海老根一生, 鈴木孝征, 丸山大輔, 植田美那子, 東山哲也
2. 発表標題 シロイヌナズナ雌性配偶体細胞における運命決定のダイナミクス
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山大輔, 太田かおる, 須崎大地, 木下哲
2. 発表標題 助細胞の細胞融合現象に異常を示すシロイヌナズナ変異体の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須崎 大地, 大井 崇生, 友実 駿, 榎本 早希子, 荒井 重勇, 木下 哲, 丸山 大輔
2. 発表標題 卵装置の形態から迫る精細胞ポジショニング制御機構
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田 千裕, 長谷川 綾子, 殿崎 薫, 須崎 大地, 丸山 大輔, 木下 哲
2. 発表標題 シロイヌナズナの雌性配偶体細胞におけるエピゲノム制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長江拓也, 武内 秀憲, 須崎 大地, 東山 哲也
2. 発表標題 助細胞特異的転写因子MYB98 に制御される新規誘引物質の探索
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物の卵細胞がつくられる様子を生きのまま観察することに成功  
[https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2020/202103maruyama\\_PLOSBIol.html](https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2020/202103maruyama_PLOSBIol.html)  
植物の卵細胞がつくられる様子を生きのまま観察することに成功  
<http://square.umin.ac.jp/pl-morph/pages/glossary.html>  
アクチン繊維が花粉管の誘引を制御する - 助細胞による誘引ペプチド分泌のメカニズムを解明 -  
<https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2022/202301susaki.html>  
横浜市大、助細胞による誘引ペプチド分泌のメカニズムを解明  
[https://www.nikkei.com/article/DGXZRSP647385\\_S3A110C2000000/](https://www.nikkei.com/article/DGXZRSP647385_S3A110C2000000/)  
アクチン繊維が花粉管の誘引を制御 助細胞による誘引ペプチド分泌のメカニズムを解明 横浜市立大  
<https://www.jacom.or.jp/saibai/news/2023/01/230113-64000.php>

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		
オーストリア	Gregor Mendel Institute (GMI)		
米国	University of Kentucky		