

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06689

研究課題名(和文) 単子葉植物受精卵の非対称分裂を制御する分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for asymmetric cell division in monocot plants

研究代表者

木下 温子 (Kinoshita, Atsuko)

東京都立大学・理学研究科・助教

研究者番号：00612079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胚発生の進行にともない、受精卵のもつ分化全能性は失われ個々の細胞は異なる細胞運命をもつ機能的な細胞へと分化する。単子葉植物においては分裂の非対称性やその後の細胞系譜は不明瞭であり、受精卵の第一分裂の重要性については未だ限定的な知見しか得られていない。本研究では、*in vitro*で作出したイネ受精卵発生過程を解析することにより、4細胞胚までの分裂パターンは*in vivo*と類似していることを示した。また、*in vitro*で作出した初期胚の細胞増殖能や、遺伝子発現プロファイルを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の細胞は、外部刺激に応答して脱分化し、個体へと再生する分化全能性を有することが知られている。しかしながら、全ての細胞が一様に脱分化を引き起こすとは限らない。植物細胞の分化全能性はどのように獲得され、どのように限定化されていくのか。この問いに答えるため、本研究ではイネの受精卵発生過程に着目した発生学的解析を行った。本研究の成果は、細胞の分化状態を規定する分子メカニズムの解明という基礎的な知見をもたらすのみならず、作物の育種や品種改良などの応用的な利用にもつながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The fusion of male and female gametes produces a zygote, a totipotent stem cell, which gives rise to an embryo. The totipotency of the zygote is lost during embryogenesis, and the cells are gradually differentiated into specific cells. This process varies among species and has been examined by various experimental techniques. In angiosperm, the asymmetric cell division of the zygote is thought to be a critical step for the establishment of the apical-basal axis. Although the embryonic cell lineage is well-defined in dicots, such as Arabidopsis, it is still unclear how the zygotic cell division contributes to the following embryogenesis in monocots. To address this question, we adopted a unique technique, the rice *in vitro* fertilization (IVF) system. Here, we present the development of two daughter cells isolated from a 2-cell embryo and discuss the possible role of zygotic asymmetric division in rice.

研究分野：植物生理学

キーワード：受精卵 分化全能性 細胞分化 非対称分裂

1. 研究開始当初の背景

受精卵の第一分裂は、被子植物の生活環で最も初期にみられる非対称分裂であり、形態的、機能的に分化した頂端細胞および基部細胞を生じる重要な過程である。これまでに、双子葉モデル植物であるシロイヌナズナにおける分子遺伝学的解析から、胚発生初期過程における制御因子が同定されているが、これらがどのようにして受精卵における極性を決定および維持しているのかについてはほとんど知見が得られていない。研究代表者の所属研究室では、これまで単子葉植物のイネやトウモロコシを用い、単離された卵細胞と精細胞を電氣的に融合する *in vitro* 受精 (IVF) 系を確立している (Uchiumi et al., *Planta* 2007)。この手法で得られた受精卵は等張液中で非対称に分裂することから、非対称第一分裂は母体組織や膨圧変化に依存せず、細胞自律的に進行することが示唆される。また、培養を続けることにより球状胚様構造が得られることから、この系で得られた 2 細胞胚においても細胞の極性が維持されていると考えられる。研究代表者は IVF 系により得られた受精卵が、細胞の極性化をもたらす内在性因子の存在を検証する上で有用なツールであると考え、本研究課題に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞自律的な非対称分裂とその極性決定および維持機構を明らかにするため、*in vitro* で非対称分裂が高い再現性で観察され、かつ外来遺伝子の一過的導入系が確立されているイネ受精卵を用いて発生学的な解析を行った。特に、初期発生過程で生じる数細胞の間で機能分化が見られる可能性を、発生学的・遺伝学的に検証することにより、母体組織との細胞間相互作用や力学的作用の影響を排除し、受精を発端とする自律的な極性形成機構を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) 3次元画像構築を用いた初期胚の観察

in vitro 受精系で作出された受精卵の初期発生過程は概ね *in vivo* の発生過程を反映していると考えられるが、これを定性的に示した例はない。近年他のグループから発表された論文で、*in vivo* では 2 細胞胚における頂端および基部 2 細胞の分裂が独立して起こり、この 2 細胞における分裂面間の角度はランダムであることが示されている (Ishimoto et al., 2019)。*in vitro* および *in vivo* における受精卵の分裂様式について知見を得るため、受精後約 24 時間の 4 細胞胚の細胞壁を染色して共焦点レーザー顕微鏡で Z-stack 画像を取得し、3次元的な細胞配置を比較解析した。

(2) 初期胚の単離培養技術の確立

in vitro で作出した 2 細胞胚の特性を明らかにすることを目的として、分離培養技術を確立した。*in vitro* で作出したイネ 2 細胞胚を細胞壁分解酵素で処理し、ガラスニードルで細胞を単離し、さらに単離した細胞をそれぞれ独立に培養することを試みた。さらに、4 細胞胚についても同様の処理を行うことにより分離培養を行った。また、分離した個々の細胞の特性を明らかにするため、分離した 2 細胞、あるいは 4 細胞をそれぞれ独立のシャーレで培養し経時観察を行った。

(3) 初期胚の 1 細胞トランスクリプトーム解析による遺伝子発現プロファイル

双子葉植物において受精卵の第一分裂によって生じる 2 細胞の発生運命は明確に異なっており、この 2 細胞の間には遺伝子発現プロファイルも異なることが知られている。一方で、単子葉植物の初期胚発生における運命決定については、ほとんど知見が得られていない。そこで、*in vitro* で作出した 2 細胞胚を細胞壁分解酵素で処理し、得られた細胞から回収した転写産物を用いて、シングルセルトランスクリプトーム解析を行った。

(4) Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) 法を用いたマーカー遺伝子の発現パターン解析

in vitro で作出した胚で、遺伝子の発現パターンを可視化するため、イネ初期胚を用いた Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) 法を確立した。また、この手法を用いて、*in vitro* および *in vivo* で発現する遺伝子の発現パターンを検証した。

4. 研究成果

(1) 3次元画像構築を用いた初期胚の観察

イネ *in vivo* 胚について細胞壁染色と透明化により、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得する方法を確立した。また、*in vitro* に

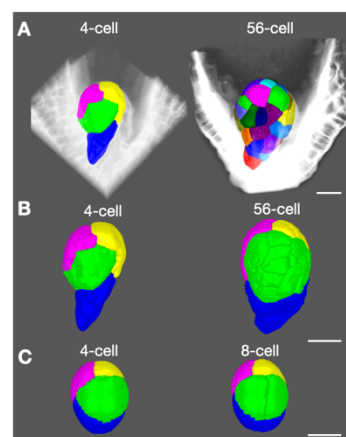


図1 3次元イメージング解析

(A) 3次元イメージングデータを元に *in vivo* 胚のセグメンテーションを行った例。4細胞胚、56細胞胚について、個々の細胞を色分けして示している。(B) (A) のセグメンテーションデータから細胞分裂面の連続性を指標に細胞系譜を推測した例。(C) *in vitro* 胚のセグメンテーション例。ライブイメージングで4-8細胞期の胚を観察し、細胞系譜を追跡した。スケールバー: 20 μ m。

についても共焦点レーザー顕微鏡で Z-stack 画像を取得し、両者を比較解析した結果、力学的な制約による形状の違いはあるものの、両者の細胞配置は類似していることが明らかとなった（図 1）。さらに、*in vitro* および *in vivo* 胚について、2 細胞胚の細胞体積や核の体積を比較し、両者の類似性についても確認している。上記の結果より、*in vivo* と *in vitro* の発生過程において、受精卵から 4 細胞胚までの分裂パターンは高度に保存されていることが示唆された。

（2）初期胚の単離培養技術の確立

（1）の結果を受け、*in vitro* で作出した 2 細胞胚および 4 細胞胚の特性を明らかにすることを目的として、細胞壁分解酵素処理により分離した細胞を培養し、その発生能を検証した。その結果、細胞サイズの大きい基部細胞は培養期間を通じて盛んに分裂し、カルスを経て植物体再生に至ったのに対して、細胞サイズの小さい頂端細胞は培養後 2 日目以降に分裂活性が顕著に低下するものが多く観察された。一方で、4 細胞胚を分離し単離培養した場合には、その分裂活性は顕著に低下し、大部分の細胞で分裂することなく発生を停止した。以上の結果より、受精卵の持つ高い分裂活性は 2 細胞期までは維持されているものの、2 細胞から 4 細胞へと至る過程で大きく低下すること、また 2 細胞期においても、細胞サイズ依存的に分裂活性に違いが見られることが示唆された。

（3）初期胚の 1 細胞トランスクリプトーム解析による遺伝子発現プロファイル

（2）で単離した 2 細胞胚における遺伝子発現を解析することにより、単子葉植物であるイネ 2 細胞胚において、発現が変動する遺伝子の探索を試みた。トランスクリプトーム解析の結果、個体ごとのばらつきが大きく、同一受精卵由来の 2 細胞間で顕著に発現が異なる遺伝子の特定には至らなかった。この結果から、イネ 2 細胞胚においては、シロイヌナズナで見られるような明確な遺伝子発現変化は起こっていない可能性が考えられる。一方で、（2）で見られるような細胞の発生学的特性については違いが見られたことから、今後 4 細胞胚のトランスクリプトーム解析やエピジェネティックな解析を行うことにより、初期胚の機能分化を検証していく予定である。

（4）Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) 法を用いたマーカー遺伝子の発現パターン解析

イネ *in vitro* および *in vivo* 胚を用いた WISH 法の確立に成功した。この手法を用い、イネ初期胚で発現する OsZFN1 および OsERL1 の発現パターンを検証した。その結果、*in vivo* 胚において OsZFN1 は胚の基部側に、OsERL1 は胚の頂端側に特異的な発現が見られた。この発現パターンは、パラフィン切片を用いて *in situ* hybridization を行った先行研究の結果と一致している。*in vitro* 胚においては、OsZFN1 が発現する領域と発現しない領域があり、その領域の部位は胚ごとに異なっていた。この結果より、*in vitro* 胚においても何らかの機能分化が生じていること、一方で、そのパターンは *in vivo* 胚とは異なることが示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Rattanawong K., Koiso N., Toda E., Kinoshita A., Tanaka M., Tsuji H., Okamoto T.	4. 巻 108 (4)
2. 論文標題 Regulatory functions of ROS dynamics via glutathione metabolism and glutathione peroxidase activity in developing rice zygote.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1097-1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15497	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 Zhang Yilin, Maruyama Daisuke, Toda Erika, Kinoshita Atsuko, Okamoto Takashi, Mitsuda Nobutaka, Takasaki Hironori, Ohme Takagi Masaru	4. 巻 597
2. 論文標題 Transcriptome analyses uncover reliance of endosperm gene expression on <i>Arabidopsis</i> embryonic development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 407 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14570	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木下 温子, Maryenti Tety, Aini Hanifah, 戸田 絵梨香, 岡本 龍史
2. 発表標題 単子葉植物イネ受精卵および初期胚における極性決定機構
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rattanawong K., Koiso N., Toda E., Kinoshita A., Tanaka M., Tsuji H., Okamoto T
2. 発表標題 Redox interplay of ROS-level dynamics and glutathione metabolism upon gamete fusion and subsequent zygotic development in rice
3. 学会等名 26th International Conference on Sexual Plant Reproduction
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野 里佳、戸田 絵梨香、手塚 拓海、縣 歩美、木下 温子、佐藤 豊、岡本 龍史
2. 発表標題 顕微授精法を用いたイネ栽培種 - 遠縁・近縁野生種間の交雑体および複二倍交雑体の作出
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------