

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19328

研究課題名（和文）花粉の自律的なde novo極性決定機構の解明

研究課題名（英文）Autonomous de novo polarity determination mechanism in pollen

研究代表者

水多 陽子（Mizuta, Yoko）

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・助教

研究者番号：70645142

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では双子葉植物の一種であるベンサムアナタバコを用いて一過的な遺伝子導入と花粉発生系を組み合わせ、花粉の発生過程を共焦点ライブイメージングする手法を確立した。これにより、生きたまま花粉の非対称分裂や細胞内極性を解析することが可能となった。核分裂や細胞質分裂をリアルタイムに画像解析する方法を確立し、細胞内構造や極性を定量化した。また、シロイヌナズナの知見をもとに非対称分裂や分化に関わる遺伝子を導入したところ、非対称分裂や分化を阻害または促進し、非対称分裂前後で特異的な局在を示すなど、様々な局在や表現型が解析可能であることが明らかとなった。

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細胞であり、被子植物の花粉に普遍的な非対称分裂や雄原細胞の分化メカニズムを明らかにすることは、生物学上重要なだけでなく、農業育種などの分野においても重要である。本研究は花粉の発生を1細胞レベルで追跡可能であり、本研究により確立された観察・解析手法は、例えば樹木など開花までに時間がかかる種や形質転換体の作出が困難な種においても、遺伝子の働きや細胞機能を調べるのに有効な方法である。本研究によって得られた成果は、今後、植物生殖分野を含む様々な植物研究へと発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, *Nicotiana benthamiana*, a type of dicotyledonous plant, was used to establish a method for confocal live imaging of the pollen development process with transient gene delivery. This made it possible to analyze asymmetric division and intracellular polarity of pollen. We established a method for real-time imaging of nuclear and cytoplasmic divisions and quantified intracellular structure and polarity. Based on the findings in *Arabidopsis*, we introduced genes involved in asymmetric division and differentiation and found that some specific localizations and phenotypes can be analyzed, such as inhibition or promotion of asymmetric division and differentiation.

研究分野：植物生殖

キーワード：花粉 発生 極性 非対称分裂 遺伝子導入 ライブイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は、1つの細胞が2つ以上の細胞に分かれる生命の根源的な現象である。多細胞生物は細胞分裂によって細胞の数を増やすが、1つの細胞から大きさや性質が異なる2つの細胞をつくることを非対称分裂と呼ぶ。非対称分裂は、生物が多様な細胞を生み出し、様々な機能を持つ器官や組織をつくりだすのに非常に重要な現象である。花粉は被子植物のオスの生殖細胞であり、直径わずか数十マイクロメートルの単相 (n) の多細胞体であり、花の中の葯と呼ばれる器官内で発生する。減数分裂後に小胞子と呼ばれる1細胞が非対称分裂し、大きな娘細胞と小さな娘細胞をつくる。その後、大きな娘細胞は栄養細胞に、小さな娘細胞はオスゲノムを持つ雄原細胞へと分化することで花粉へと発生する (図1上)。花粉がめしべに受粉すると、栄養細胞は先端成長して花粉管を伸ばし、内部に取り込んだ雄原細胞を胚珠に送り届け、受精する。この時、栄養細胞のゲノムは後代には伝わらず、雄原細胞のオスゲノムのみが次世代へと受け継がれる。一方で、発生過程で異常な不等分裂を起こすと2つとも栄養細胞へと分化し、受精できない花粉となる (図1下)。すなわち花粉はもともと栄養細胞の性質を持ち、非対称分裂することで初めて雄原細胞へと分化すると考えられている。このように、花粉の非対称分裂は被子植物が有性生殖を成功させ、子孫を残すのに必須の現象であると言える。しかし、花粉の非対称分裂を制御するしくみや小さい娘細胞のみが雄原細胞へと分化するしくみはあまりよくわかっていない。その原因として、花粉の発生は花の組織の奥深くで起きる現象のため、観察や解析が困難であった点が挙げられる。また、これまでは花粉の発生や非対称分裂に関わる遺伝子を時空間的にピンポイントに制御し、発生ダイナミクスを迅速に調べる方法も確立されていなかった。

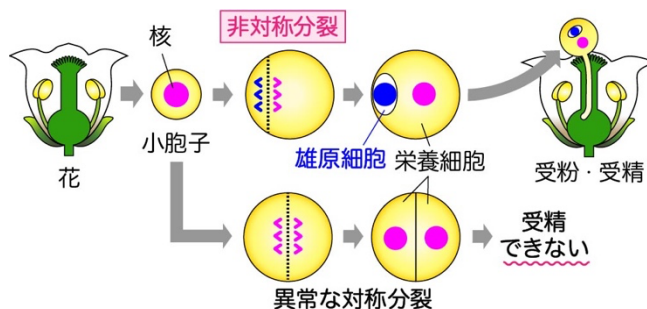


図1 花粉の発生過程と生殖過程

図1上) 花粉がめしべに受粉すると、栄養細胞は先端成長して花粉管を伸ばし、内部に取り込んだ雄原細胞を胚珠に送り届け、受精する。この時、栄養細胞のゲノムは後代には伝わらず、雄原細胞のオスゲノムのみが次世代へと受け継がれる。一方で、発生過程で異常な不等分裂を起こすと2つとも栄養細胞へと分化し、受精できない花粉となる (図1下)。すなわち花粉はもともと栄養細胞の性質を持ち、非対称分裂することで初めて雄原細胞へと分化すると考えられている。このように、花粉の非対称分裂は被子植物が有性生殖を成功させ、子孫を残すのに必須の現象であると言える。しかし、花粉の非対称分裂を制御するしくみや小さい娘細胞のみが雄原細胞へと分化するしくみはあまりよくわかっていない。その原因として、花粉の発生は花の組織の奥深くで起きる現象のため、観察や解析が困難であった点が挙げられる。また、これまでは花粉の発生や非対称分裂に関わる遺伝子を時空間的にピンポイントに制御し、発生ダイナミクスを迅速に調べる方法も確立されていなかった。

### 2. 研究の目的

花粉の発生過程を培地上で生きたまま解析する実験系を確立する。確立した方法を用いて共焦点ライブイメージングをおこない、細胞内構造を可視化し極性が生まれる瞬間や、雄原細胞への分化をリアルタイムに捉える。得られた画像を解析することで、花粉発生過程における非対称分裂と雄原細胞の分化を制御する分子メカニズムを明らかにすることを旨とする。

### 3. 研究の方法

一般に、陸上植物は硬い細胞壁を持つため、外部から細胞内に物質を導入することは困難である。植物細胞へ物質を導入する方法としては大きく物理的導入、化学的導入、生物学的導入の3つが存在し、そのうち物理的な導入方法の一つであるボンバードメント法では、簡便かつ形質転換体を作らずに一過的に導入が可能のため、古くから様々な植物細胞において用いられてきた (水多 2023 情報機構)。ボンバードメント法では色素や核酸、タンパク質など導入したい分子を金粒子に付着させ、ガス圧を利用して高速で射出し細胞へ導入する。簡便な操作で固い細胞壁を貫通して分子を導入することができることから、花粉のみならず様々な細胞種で用いられてきた (Sanford et al. 1993 *Methods Enzymol*)。これまでに我々は、パーティクルボンバードメント法を用いてベンサミアナタバコの花粉に遺伝子を一過的導入し、花粉をゲノム編集する手法を報告している (Nagahara et al. 2021 *Plant Reprod*)。また、遺伝子導入後の花粉を培地上で選抜し、受粉可能な花粉へと発生させる方法も報告している (Kaneshiro et al. 2022 *Quant Plant Biol*)。これらの手法を基に最適化を行い、花粉内に細胞内構造可視化用プラスミドを導入し、発生過程を培地上で生きたまま長時間観察する方法を確立した。まず、上記手法と同様にベンサミアナタバコの花粉を培地上に置床し、ボンバードメント法で細胞骨格を可視化するプラスミドや、雄原細胞のマーカージェノムの可視化プラスミド、細胞極性関連遺伝子の可視化プラスミドを導入した。その後、共焦点顕微鏡でタイムラプス撮影を行った。得られた画像は顕微鏡付属の画像解析ソフト、または Image J を用いて非対称分裂のタイミングや割合、雄原細胞へと分化する条件について解析を行った。

### 4. 研究成果

蛍光タンパク質の配列を含む細胞骨格可視化用プラスミドをベンサミアナタバコの花粉に導入した結果、成熟花粉に導入した場合 (Nagahara et al. 2021 *Plant Reprod*) と同様に、導入から2~5時間後から蛍光タンパク質のシグナルを検出できることが明らかとなった。導入後の蛍光タンパク質の蛍光強度はプロモーター活性など遺伝子の量に比例し、かつ蛍光タンパク質自身の蛍光強度に依存することがわかった。また、シグナルを検出し始めることができる時間

は、蛍光タンパク質自身が持つ成熟時間に依存する傾向が見られた。例えば、tdTomato や mClover3 を用いた場合は、最短で導入 2~3 時間後から蛍光タンパク質のシグナルが検出可能であった (水多 2023 *植物科学の最前線:BSJ-Review*)。小孢子が非対称分裂するまでの時間は数十分~数時間程度の場合もあることから、導入直後から観察を始める場合は成熟時間が短く、蛍光強度が高い蛍光タンパク質を選択する必要があると考えられた。また、発生過程の観察には長時間かつ時間解像度の高い連続撮影が必要になるため、例えば酸性オルガネラなど特定の細胞や器官を観察する場合は、蛍光タンパク質の光安定性や pH 安定性なども重要と考えられた。

上記のような検討をもとに、適切な蛍光タンパク質を融合したプラスミドを作製し、小孢子に導入 (図 2A) して共焦点タイムラプス撮影を行った。図 2 はベンサミアナタバコの花粉に、シロイヌナズナの液胞膜に局在する VAM3 を緑色で標識するプラスミド (*35Sp::sGFP-AtVAM3*; Uemura et al. 2004 *Cell Struct Funct*) とセントロメア特異的なヒストン H3 である HTR12 を赤色蛍光タンパク質で標識するプラスミド (*35Sp::tdTomato-HTR12*; Kurihara et al. 2008 *Plant Cell Physiol*) を混合し導入した花粉である。導入 10 時間後の小孢子では、動原体と核質に赤色のシグナルが観察され、花粉の細胞質内に存在する液胞の複雑な構造が可視化された。続けてタイムラプス撮影を行ったところ、小孢子内で核が片側に極性移動した後に核膜が崩壊し、分裂面に動原体が整列して非対称分裂する様子を鮮明に捉えることができた (図 2B)。また、画像解析の結果、この間に花粉は直線的に肥大成長していることがわかった。さらに雄原細胞特異的なマーカー遺伝子の発現も同様に調査した結果、非対称分裂後の小さい娘細胞でのみ発現することが明らかとなった。以上の結果、培地上でも花粉発生は可能であり、細胞内を蛍光タンパク質によって一過的に可視化すれば、花粉や受精過程を生きのまま迅速に観察することが可能であることがわかった。さらに非対称分裂に関わる様々な遺伝子を含むプラスミドを導入した結果、非対称分裂を阻害または促進し、非対称分裂前後で特異的な局在を示すなど、様々な局在や表現型が解析可能であることが明らかとなった。今後はこれらの遺伝子について非対称分裂をどのように制御しているのか、また、雄原細胞への分化に関わるのかを引き続き調査する予定である。

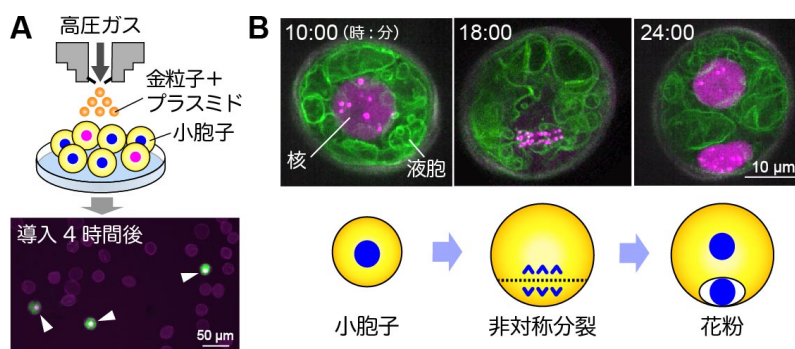


図 2 一過的導入による花粉発生のライブイメージング。矢じりは導入花粉

花粉は被子植物に共通の細胞であり、被子植物の花粉に普遍的な非対称分裂や雄原細胞の分化メカニズムを明らかにすることは、生物学上重要なだけでなく、農業育種などの分野においても重要である。本研究は花粉の発生を 1 細胞レベルで追跡可能であり、本研究により確立された観察・解析手法は、例えば樹木など開花までに時間がかかる種や形質転換体の作出が困難な種においても、遺伝子の働きや細胞機能を調べるのに有効な方法である。本研究によって得られた成果は、今後、植物生殖分野を含む様々な植物研究へと発展することが期待される。

参考文献

Kaneshiro I, Igarashi M, Higashiyama T, Mizuta Y (2022) Target pollen isolation using automated infrared laser-mediated cell disruption. *Quant Plant Biol* 3:e30.  
 Kurihara D, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K (2008) Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol* 49: 1256-1261.  
 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.  
 水多陽子 (2023) ゲノム編集酵素のデリバリーと植物の特性改良. *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. 情報機構* pp169-173.  
 Nagahara S, Higashiyama T, Mizuta Y (2021) Detection of a biolistic delivery of fluorescent markers and CRISPR/Cas9 to the pollen tube. *Plant Reprod* 34:191-205.  
 Sanford JC, Smith FD, Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* 483-509.  
 Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH (2004) Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* 29:49-65.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

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 永原史織, 丸山大輔, 山岡尚平, 水多陽子
2. 発表標題 花粉発生過程のライブイメージングと分裂誘導による雄原細胞の分化機構の解明
3. 学会等名 日本植物生理学会第65回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 水多陽子
2. 発表標題 新規モデル植物のゲノムを"編集する・解析する"！「一過的な遺伝子導入による植物生殖細胞のゲノム編集と遺伝子発現制御」
3. 学会等名 基礎生物学研究所 新規モデル生物開発トレーニングコース（招待講演）
4. 発表年 2024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
---------	---------