

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840104

研究課題名(和文) In vivoライブイメージングと遺伝学の融合による植物受精機構の動的理解

研究課題名(英文) The study of sexual plant reproduction by in vivo live-imaging with genetics

研究代表者

水多 陽子 (Mizuta, Yoko)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70645142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の花の内部では、めしべに受粉した花粉から花粉管が伸びて胚珠に到達し、受精することで種子ができる。しかし、植物の体は不透明なため、めしべの中をどのように花粉管が伸びていくのかは不明である。本研究では、めしべ内部を詳細に観察するため、めしべを透明化し可視化した花粉管を二光子顕微鏡により観察する方法を確立した。また、めしべ内部を生きたまま観察する方法を確立した。これにより、めしべ内で花粉管の挙動を詳細かつ生きたまま観察する基盤が整った。

研究成果の概要(英文)：In the flowering plants, sexual reproduction begins with pollination, the transfer of pollen to stigma of the pistil. After pollen germination, pollen tube elongates in the pistil, are attracted to the ovules (ovule develops into a seed), and finally, fertilization occurs. This phenomenon is called as 'pollen tube guidance'. This process is an important in the reproductive process, however, the molecular mechanisms of how pollen tube grows toward the ovule is largely unknown. Here we attempted to visualize pollen tube growth and guidance inside the clearing pistil of the *Arabidopsis thaliana* by the two-photon microscopy. Addition to that, the method for live imaging inside the living pistil was developed. As a result, I succeeded to deep and live imaging of pollen tube growth and guidance in the pistil.

研究分野：植物生殖

キーワード：花粉管 植物生殖 花粉管ガイダンス 二光子顕微鏡 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

被子植物の生殖過程では、雄の配偶体である花粉はめしべ先端の柱頭に受粉し、花粉管を発芽する。その後、花粉管はめしべの伝達組織と呼ばれる組織の内部を伸長し、雌の配偶体である胚のうを含む胚珠へ到達し、受精する。これら一連の過程は植物が受精し種子を形成するのに重要である。しかし、花粉管が発芽した後のステップは、めしべの奥深くで起きる現象である。そのため、花粉管と胚珠の相互作用について、観察や解析をおこなうのは困難であった。

これまで、めしべ内部の花粉管の挙動を観察するには、固定して花粉管を染色する方法や、解剖して内部を観察する方法が主に用いられてきた。双子葉類のモデル植物であるシロイヌナズナでは、めしべ内に約五十個の胚珠が内包されている。開花時には、柱頭に数百の花粉が受粉し、多数の花粉管が伝達組織を伸長し、それぞれの胚珠へと到達し、受精する。これまで、めしべ内の花粉管の挙動を観察するには、固定および解剖をおこない、アニリンブルー染色により花粉管を選択的に染色する方法が主に用いられてきた。しかし、アニリンブルーは全ての花粉管を染色してしまう。そのため、数十本の花粉管が内部を伸長するシロイヌナズナのような植物では、どの花粉管がどの胚珠へ向かったのかなどを調査することは不可能であった。また、固定をおこなう必要があるため、生きた花粉管の挙動をリアルタイムに解析することは不可能であった。

そのため、花粉管と胚珠の相互作用を生きたまま解析する方法として、Semi-in vitro 受精法と呼ばれる方法が開発された (Qin et al., 2009)。Semi-in vitro 受精法は、受粉した花柱と胚珠を解剖し、培地上で共培養することで受精させる方法である。この方法により、花粉管を胚珠へ導く分子が同定され、花粉管が胚珠へと向かう仕組みの一端が解明されてきた (Takeuchi et al. 2016)。しかし、この方法では伝達組織や隔壁、珠柄といっためしべ内部の組織が取り除かれており、胚珠の位置や数も自然条件とは大きく異なっている。そのため、花粉管とめしべの相互作用の分子メカニズムは未だ不明な点が多く残されている。例えば、めしべ内の多数の花粉管は競争しながら進んでいるのか、花粉管はどのように伝達組織から隔壁上に這い出すのか、個々の花粉管はなぜ正確に胚珠へたどり着き一対一で受精できるのか、など受精過程の多くは未知のままである。

これらの問題にアプローチするためには、めしべ内部の花粉管の挙動を、組織を解剖すること無く観察する必要がある。また、生きたままめしべの中で受精過程を解析することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、花粉管が発芽し受精するまで

の生殖過程を、シロイヌナズナのめしべ内で
① 解剖すること無く一本一本の花粉管の挙動を詳細に観察すること ② 花粉管が胚珠へ向かう様子を生きたままイメージングすること、の2つを目的とし実験をおこなった。観察の基盤を整えることで、シロイヌナズナにおける受精、ひいては被子植物における受精機構の全貌を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 花粉管マーカーラインの作製

めしべ内の花粉管の挙動を観察するには、花粉管を可視化する必要がある。花粉管を生きたまま観察するため、蛍光タンパク質を用いて花粉管のマーカーラインを作製した。植物材料は形質転換が容易なシロイヌナズナを用いた。それぞれの蛍光タンパク質を花粉管特異的なプロモーターである LAT52 下で発現させ、それぞれの色に光る花粉管マーカーラインを作製した。

(2) ClearSee によるめしべ内部の詳細な観察

めしべ内部の花粉管を解剖すること無く詳細に観察するには、めしべの自家蛍光が問題になる。シロイヌナズナの場合、めしべの子房壁に含まれる葉緑体や、細胞壁、めしべ内部の複雑な構造が観察を妨げる要因となる。これらの問題を解決するため、共同研究により植物の透明化試薬、ClearSee の開発をおこなった (Kurihara et al. 2015)。従来の透明化試薬と異なり、ClearSee は発現させた蛍光タンパク質を維持したまま組織の自家蛍光を軽減し、内部を観察することが可能である。ClearSee を用い、どの蛍光タンパク質が最も観察に適しているかなど、観察に最適な条件を検討した。

(3) 二光子顕微鏡を用いた最適条件の検討

多光子 (二光子) 励起顕微鏡は、生体深部を低侵襲、かつ低光毒性な条件で長時間観察可能なことから、生体内で解析をおこなう重要なツールとして注目されている (Helmchen and Denk 2005, Benninger and Piston 2013)。植物においてもその有用性が複数報告されているが、シロイヌナズナのめしべ内部を観察するのに最適な条件は検討されていなかった。そこで、深部を観察するのに最も適した蛍光タンパク質と励起波長の組み合わせを、①固定後 ClearSee により透明化しためしべ ② 固定していないそのままのめしべ、の2通りについて検討した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナを用いた生殖マーカーラインの作製

花粉管特異的なプロモーターを用いて様々な蛍光タンパク質を発現させることで、花粉管を生きたまま可視化した。図1は花粉発芽培地上で、シロイヌナズナの胚珠へ向かって伸長する三色の花粉管の様子である。花

花粉管がどのように伸び、どこから来ているかをはっきり見分けることができる。これにより、花粉管の様子をリアルタイムで観察できるだけでなく、花粉管が多数伸びていても、それぞれを見分けることが可能となった。

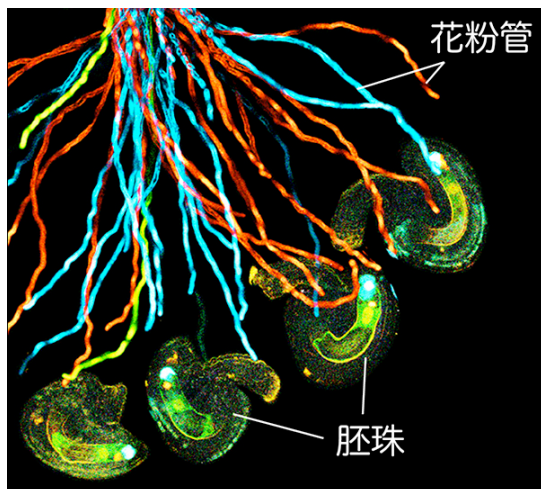


図 1 培地上でシロイヌナズナの胚珠へ向かって伸長する色とりどりの花粉管。mTFP1 (青), Venus (緑), TagRFP (橙) の異なる三色の蛍光タンパク質を発現させた花粉管を花柱に受粉後切断し、解剖した胚珠と培地上で共培養した。胚珠の各細胞の核も蛍光タンパク質により可視化している。励起波長は 980 nm。

(2) ClearSee によるめしべ内部の詳細な観察

これまでめしべ内の花粉管は、主に解剖や切片作製、または染色により観察がおこなわれてきた。しかし、解剖や切片作製は操作が煩雑で時間がかかり、組織が潰れたり失われたりするなどの問題点がある。また、染色には主にアニリンブルーが用いられているが、どの花粉管も染まってしまったため、花粉管どうしを見分けられないといった問題点があった。そこで、本研究ではめしべを解剖も切片作製もせずに、花粉管を一本一本区別し観察する方法の確立に着手した。

めしべを解剖せずに深部を観察するためには、めしべ自身が持つ自家蛍光が妨げとなる。そのため、まず、栗原らとの共同研究により、植物組織からクロロフィルを取り除く最適な化合物の組み合わせを探索した。その結果、植物を透明化する試薬 ClearSee の開発に成功した (Kurihara et al., 2015)。次に、ClearSee 溶液で透明化しためしべ内で花粉管を色分けし、一本ずつ見分けるため、異なる波長の蛍光タンパク質を発現させた花粉を受粉する方法を確立した。図 2 は mTFP1 (青色), sGFP (緑色), Venus (黄色), mApple (赤色) の各蛍光タンパク質を発現させたシロイヌナズナの花粉管を混合して野生型のめしべの柱頭に受粉させた後、めしべを固定し、ClearSee により透明化し、二光子励起顕微鏡により観察したものである。それぞれの蛍光タンパク質で標識された花粉管がどの

ように伸びているか、はっきり識別することができる。このように、ClearSee 溶液を用いることで、解剖や切片作製などをおこなわず、めしべ内の花粉管を一本一本はっきり識別できることが明らかとなった。一方、ClearSee 溶液内で五ヶ月間保管しためしべでも、安定して花粉管の蛍光タンパク質を観察できたこと (Kurihara et al., 2015) から、めしべを長期間保存し、内部の花粉管を詳細に観察することも可能であることが示された。

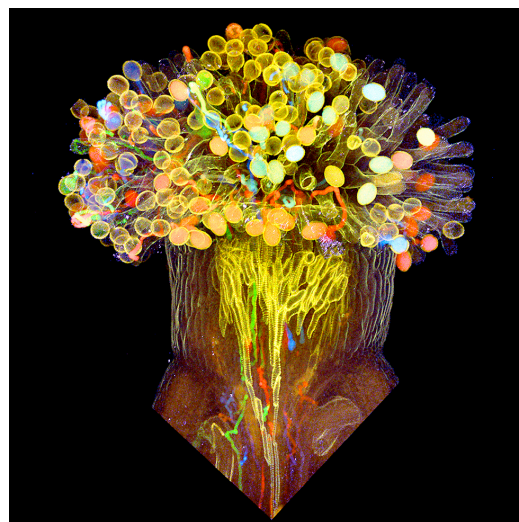


図 2 柱頭上で発芽し、めしべ内を伸長する色とりどりの花粉管。mTFP1 (青), sGFP (緑), Venus (緑), mApple (橙) の異なる 4 色の蛍光タンパク質を発現させた花粉管を花柱に受粉し、受粉後 5 時間に 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。その後、ClearSee 溶液によって透明化し、二光子顕微鏡により観察した。励起波長は 980 nm。

(3) 二光子顕微鏡によるめしべ深部の花粉管の観察

組織深部を観察する優れたツールとして、二光子励起顕微鏡が知られている。固定後 ClearSee により透明化しためしべ深部を観察するため、Nikon 社の AIRMP を用いて条件検討を行った。まず、mTFP1 (青色), sGFP (緑色), Venus (黄色), mApple (橙色) の各蛍光タンパク質を発現させた花粉を受粉しためしべを ClearSee により透明化し、二光子励起顕微鏡により観察した。その結果、mTFP1 (青色), sGFP (緑色), Venus (黄色) はいずれもはっきり蛍光を観察することができた。一方、mApple (橙色) の蛍光タンパク質は ClearSee 溶液の中であっても、めしべの細胞壁や細胞質由来の自家蛍光と重なってしまい、観察には不向きであることが明らかとなった。この結果から、めしべ内で発現させた蛍光タンパク質を観察する際には、蛍光タンパク質の種類が重要であることが示唆された。

次に、自家蛍光を最も軽減でき、めしべ内部の蛍光タンパク質を最も明るく観察でき

る励起波長を調査した. mTFP1 (青色), sGFP (緑色), Venus (黄色), mApple (赤色) の各蛍光タンパク質を発現させた花粉を受粉下めしべを ClearSee により透明化し, 二光子励起顕微鏡により観察した. その結果, 800~900 nm といった波長よりも, より長波長である 980~1000 nm といった励起波長の方が, 細胞壁や細胞内の内容物の自家蛍光を抑え, 蛍光タンパク質をよりはっきり検出できることがわかった (Kurihara et al., 2015; Mizuta et al., 2016).

また, 同様の実験を生きた組織を用いておこなった. まず, 葉緑体の自家蛍光を軽減する励起波長を調査するため, シロイヌナズナの葉柄を二光子顕微鏡により観察した (図 3A). その結果, 800 nm では葉緑体が励起されてしまい, 蛍光タンパク質を観察する妨げとなることが分かった. 一方, 900 nm や 1000 nm といったより長波長で励起することで, 葉緑体の自家蛍光を軽減し, 蛍光タンパク質をはっきり観察できることがわかった (Mizuta et al., 2015).

次に, 生きためしべ内での観察に適した蛍光タンパク質の検証をおこなった. 葉緑体による自家蛍光の影響を避けるため, 葉緑体を持たない花粉で mTFP1 (青色), sGFP (緑色), Venus (黄色), TagRFP (橙色) を発現させ, 二光子顕微鏡で観察した. その結果, 800 nm 付近の励起波長では細胞質や細胞壁由来の自家蛍光が観察を妨げる一方, 1000 nm では自家蛍光が抑えられ, 各蛍光タンパク質をはっきり励起できることが明らかとなった (図 4B). また, ClearSee 溶液を用いた場合と異なり, 橙色の蛍光タンパク質 (TagRFP) を用いた場合に, 細胞壁や細胞質の自家蛍光を抑え, 最も明るく観察できることが明らかとなった (Mizuta et al., 2015).

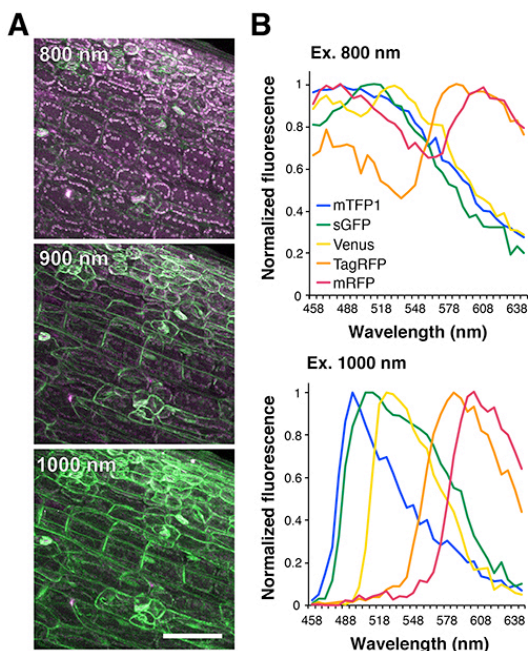


図 3 (A) GFP-mTalin (アクチン繊維) を発現させたシロイヌナズナの葉柄. 800, 900,

1000 nm で励起し, レーザーパワーをそろえて二光子顕微鏡により観察したもの. 画像は FF01-534/30 (500-550 nm, 緑) と FF01-578/105 (570-620 nm, 赤) のフィルタで検出したものを合成している. スケールバーは 100 μ m. (B) 5 色それぞれの蛍光タンパク質を発現させた花粉を 800 nm および 1000 nm により励起し, スペクトルディテクタにより検出したもの.

これらの結果は, 自家蛍光を持つ組織を二光子顕微鏡で観察する場合, 蛍光タンパク質と励起波長の選択が重要になってくることを示唆している (水多ら, 2014a; 水多ら, 2014b).

以上本研究により, 固定し ClearSee により透明化しためしべを用いて, めしべ深部の花粉管の挙動を個別かつ詳細に観察が可能となった. また, 検討した条件下で長波長を用いてめしべを生きたまま観察し, めしべ内, 更に胚珠内の各細胞も観察することが可能となった (図 4; Mizuta et al., 2015). これにより, めしべ内で花粉管の挙動を詳細かつ生きたまま観察する基盤が整った.

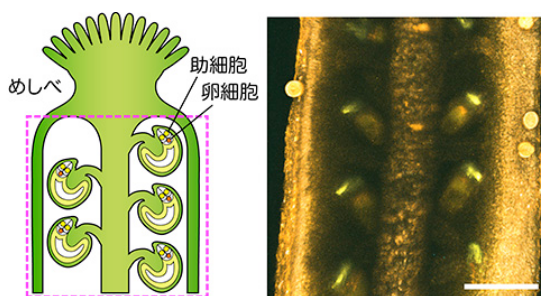


図 4 子房壁の外側から観察した開花直前のめしべの内部. 図は子房壁表面から 80 μ m 深部を示す. 胚のう内の二つの助細胞の核は GFP (黄) で, 中央細胞の細胞質は YFP (黄) で, 卵細胞の核は DsRed (橙) で可視化されている. めしべ中心部の隔壁や, 胚のう内を観察できる. 励起波長は 1000 nm. スケールバーは 100 μ m.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) Mizuta Y, Kurihara D, Higashiyama T. (2016) Visualization of plant sexual reproduction in the whole-mount pistil by ClearSee. *Cytologia* 81: 1-2. *Cover of the issue, 査読なし
doi: 10.1508/cytologia.81.1

(2) Kurihara D, Mizuta Y, Sato Y, Higashiyama T. (2015) ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* 142:

4168-4179. *Cover of the issue, 査読あり
doi: 10.1242/dev.127613.

(3) Mizuta Y, Kurihara D, Higashiyama T. (2015) Two-photon imaging with longer wavelength excitation in intact Arabidopsis tissues, *Protoplasma* 252: 1231-1240. 査読あり
doi: 10.1007/s00709-014-0754-5.

(4) Mizuta Y, Higashiyama T. (2014) Antisense gene inhibition by phosphorothioate antisense oligonucleotide in Arabidopsis pollen tubes, *Plant J.* 78: 516-526. 査読あり
doi: 10.1111/tpj.12461

(5) Horade M, Yanagisawa N, Mizuta Y, Higashiyama T, Arata H. (2014) Growth assay of individual pollen tubes arrayed by microchannel device, *Microelectronic Engineering.* 118: 25-28. 査読あり
doi:10.1016/j.mee.2014.01.017

(6) 水多陽子, 栗原大輔. (2014a) 2光子励起顕微鏡を用いた生体深部イメージングと光顕微操作. 植物の生長調節. 49: 96-103. 査読なし
ホームページ:
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009913068>

(7) 水多陽子, 栗原大輔, 東山哲也. (2014b) 2光子顕微鏡による植物深部の in vivo イメージング. *Plant Morphology.* 26: 25-30. 査読なし
doi: 10.5685/plmorphol.26.25

[学会発表] (計 6件)

(1) 水多陽子, 栗原大輔, 東山哲也. 一本の花粉管が一つの胚珠にたどりつくには? ~ 深部イメージングで探る花粉管ガイダンスの謎~. 日本植物学会第79回大会, 2015年9月, 新潟

(2) Mizuta Y, Kurihara D, Higashiyama T. Two-photon imaging of pollen tube guidance in the Arabidopsis pistil. NIG Biological Symposium, 2015年2月, 三島

(3) 水多陽子, 栗原大輔, 東山哲也. 2光子顕微鏡を用いた花粉管ガイダンスの in vivo ライブイメージング. 日本植物学会第78回大会, 2014年9月, 神奈川

(4) 水多陽子, 栗原大輔, 東山哲也. 生体深部イメージングによる花粉管ガイダンスの「形」と「通り道」の解析. 日本植物形態学会第26回大会, 2014年9月, 神奈川

(5) Mizuta Y. Deep imaging of pollen tube

guidance by two-photon microscopy. International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2014 "Plant Live-Cell Imaging and Microdevices", 2014年7月, 名古屋

(6) Mizuta Y, Kurihara D, Higashiyama T. Two-photon imaging of pollen tube growth and guidance in the pistil. 23rd ICSPR: International Conference on Sexual Plant Reproduction, 2014年7月, Porto, Portugal

[その他]

JST・ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクトホームページ

<http://www.liveholonics.com/top.html>

トランスフォーマティブ生命分子研究所ホームページ

<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/index-ja.php>

6. 研究組織

(1) 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・さきがけ専任研究者・招へい教員

研究者番号: 70645142

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし