

令和元年5月30日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14742

研究課題名(和文) 受精卵と体細胞に共通する発生機作

研究課題名(英文) Common developmental mechanisms between somatic cells and zygotes

研究代表者

岡本 龍史 (Takashi, Okamoto)

首都大学東京・理学研究科・教授

研究者番号：50285095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネ体細胞カルスから分化全能性(分裂能)を保持したままプロトプラストを調製し培養する系を確立し、さらに、それらプロトプラストの増殖プロファイルを経時観察することで単離・培養した細胞の約3.5%が増殖性プロトプラストであることを明らかにした。また、増殖性プロトプラストの比較対象となるイネ受精卵を対象とした単一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析法およびPEG-Ca<sup>2+</sup>法による物質導入系も確立した。さらには、当該物質系を用いて単離イネ細胞を用いたゲノム編集を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に被子植物の体細胞は分化全能性をもつとされているが、体細胞組織を構成する細胞群から分化全能性を保持している細胞を特定し、解析することは困難であった。本研究では、イネカルスから調製したプロトプラストから増殖性プロトプラストを特定する手法を確立した。さらに、それら増殖性プロトプラストや受精卵といった全能性をもつ細胞の超微量オーム解析やそれら細胞への物質導入系を可能にし、植物細胞の分化全能性機構の解明に向けた基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：In the study, the identification of the proliferative protoplasts among somatic protoplasts isolated from rice callus was conducted. Through the establishment of modified methods for protoplast isolation and culture, we successfully traced the initial developmental profiles of isolated somatic protoplasts, and it was shown that approximate 3.5% of isolated/cultured protoplasts possess proliferative ability. These suggest that the single cell level analysis for proliferative and non-proliferative protoplasts is possible to elucidate the molecular mechanisms of totipotency in plant somatic cells. Moreover, comparison of transcriptome between proliferating protoplasts and zygotes, the natural totipotent cell, is also available to estimate the common cellular mechanisms in somatic and zygotic cellular development. To broaden the scope of investigations using these cells, a procedure for delivery of macromolecules, such as DNA and proteins, into these cells was also established.

研究分野：植物発生学

キーワード：細胞分化 分化全能性 体細胞 受精卵 イネ 物質導入 微量オーム解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

被子植物を構成する体細胞は1つの受精卵から分裂・増殖・分化した細胞である。各組織を構成する体細胞は分化状態にあり、細胞周期はG1期あるいはG0期で停止している。体細胞を適当な条件下で培養すると、脱分化し、そして分裂・増殖を経て植物体へと再分化することが知られている。これは植物の体細胞が分化後も分化全能性を保持しているためとされている。一方、受精卵の発生過程においては、未分化状態の卵細胞に精細胞が融合することで、分化全能性を持った受精卵が生じ、発生が進行する。この2つの発生機構「脱分化した体細胞から植物体を再形成する体細胞発生と、受精卵から植物体が発生する受精卵発生」を解析・比較することで植物細胞の増殖、発生及び分化全能性を支える根本的な原理の一端を見出すことができると考えられるが、そのような解析は行われてこなかった。これは、増殖性体細胞と受精卵をきちんと比較できる実験系がなかったためである。そのような状況の中、申請者らは *in vitro* 受精系が確立されており、かつ体細胞発生の研究例があるイネを研究材料とすることで受精卵と体細胞の発生機構を細胞レベルで比較することが可能になると考え、本研究を計画した。

イネ受精卵を単離し培養した場合、その80-90%は増殖・発生をする。一方、葉などの植物体組織から単離した体細胞や、組織中の体細胞群が脱分化・増殖した細胞塊(カルス)を構成する体細胞の増殖・発生率は著しく低い。そこで本研究では、イネ体細胞発生の細胞レベルでの解析を可能にするため、分裂・増殖能を保持している「増殖性体細胞(プロトプラスト)」の効率的な単離、分画、培養方法を確立するとともに、それら増殖性プロトプラストや受精卵の一細胞解析を目的とした超微量試料オーム解析やそれら細胞への物質導入系の確立を進めた。

### 2. 研究の目的

脱分化した細胞由来の増殖細胞塊(カルス)のある領域からシュートおよび根が形成され、最終的には個体が再生することから、被子植物の体細胞は分化全能性を保持しているとされている。しかしながら、「カルスを構成するどの細胞が個体へと分裂・増殖するのか」といった細胞レベルの視点に立った解析例は非常に少ない。その理由として、カルスを構成する細胞群の中から増殖能をもつ細胞を特定すること、それら増殖性細胞を他の細胞から選り分けて単離・回収すること、および増殖性細胞のような極微量の試料を出発材料にして解析を行うことの難しさが挙げられる。本研究では、下の2つの目的を設定し研究を推進した。

(1) イネカルスから調製したプロトプラスト群の中から増殖性プロトプラストを特定する実験系を確立する。

(2) 増殖性プロトプラストおよび受精卵といった分化全能性を保持している細胞の性質を十全に解析するために、超微量細胞オーム解析法やそれら細胞への物質導入系を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) イネカルスの誘導・培養条件について、継代培養法、継代培養カルスの形態、それらカルスから単離されたプロトプラストの細胞活性などについて検討を行った。さらに、カルスからのプロトプラスト単離条件について検討を進め、プロトプラストの分裂・増殖過程の連続観察を行った。

(2) 増殖性プロトプラストの比較対象となるイネ受精卵を用いてトランスクリプトーム解析を試みた。受精卵および卵細胞8~10個からのcDNA増幅・ライブラリー作製および次世代シーケンズ解析を3反復行い、得られたデータの信頼性の検証等を進めた。さらに、解析の標的とする遺伝子やタンパク質の効率的な機能解析手法として、それら細胞へのDNAやタンパク質などの物質導入をPEG-Ca<sup>2+</sup>法を用いて行った。

### 4. 研究成果

(1-1) イネカルス由来のプロトプラストの調製: 継代培養1代目で移植後4日目のカルスを用いることが望ましく、さらに、直径2-6 mmでクリーム色を呈しているカルスを選抜することが生存率の高いプロトプラストの調製には重要であることが示された。また、当該カルスからのプロトプラスト単離条件としては、1% セルラーゼ、0.1% ペクトリアーゼの酵素液で6時間の処理が最適であり、その際のプロトプラストの回収量及び単離時の生存率は、それぞれ $3.9 \times 10^6$ 個/gカルス及び52.9%であった。

(1-2) イネカルス由来プロトプラストの培養および増殖性プロトプラストの特定: 単離したプロトプラストの培養方法(ゲル浮遊法および固定法)について検討を進めたところ、ゲル浮遊法では0.073%、ゲル固定法では0.126%のプロトプラスト分裂率を示した。また、同一プロトプラストの連続観察にはゲル固定法がより適していた。

(1-3) 上の項目1-1および1-2で確立したイネカルス由来プロトプラストの単離・培養法を用いてプロトプラストの分裂・増殖過程の連続観察を行った。その結果、プロトプラストの分裂・

増殖パターンを5通りに分類することができた、増殖性プロトプラストは培養開始時には1核であり、培養3日目に2核に分裂し、その後細胞分裂・増殖を進行させてカルスを形成するということが明らかになった(図1)。また、培養したプロトプラストの約3.5%(n=8/224)が増殖性プロトプラストであった。

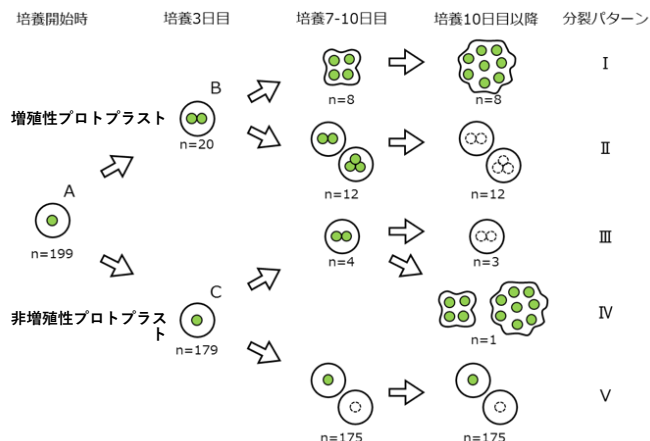


図1. イネカルス由来プロトプラストの分裂・増殖プロファイル

(2-1) イネ受精卵および卵細胞の mRNA シークエンシング解析(3反復)の結果、再現性の高いデータが得られた。さらに受精後に発現が誘導される、あるいは抑制される遺伝子群の同定にも成功した。

(2-2) PEG-Ca<sup>2+</sup>法による外来遺伝子の卵細胞における一過的発現に関しては、PEG濃度、DNA濃度、処理時間などの至適化を行い、約30%の効率で一過的発現が可能であることが示された。さらには、2種類のプラスミドDNA(pGFP, pRFP)を同時に導入したところ、両方の蛍光が同一細胞中で観察された(図2)。これは、今後の解析で同定されると期待される全能性に関する遺伝子を蛍光マーカータンパク質遺伝子の同時発現が可能であることを示している。

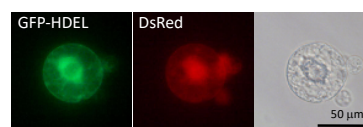


図2. イネ卵細胞における蛍光タンパク質遺伝子の一過的発現

(2-3) 受粉後の花から単離したイネ受精卵ではプラスミドの導入およびその発現が確認できなかったが、*in vitro* 受精系で作出した受精卵(融合・受精後約1時間以内)を用いることで、約70%の効率でプラスミドの導入が確認された。さらに、GFPおよびDsRedをコードする2種類のプラスミドDNAを共導入すると、導入が確認されたすべての細胞で両方の蛍光シグナルが同一細胞中に確認された。

(2-4) PEG-Ca<sup>2+</sup> transfection法とCRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を組み合わせることで、シングルセルレベルでのDNAフリー・ゲノム編集法の確立を試みた。その結果、CRISPR/Cas9ベクターおよびCas9タンパク質-gRNA複合体の直接導入により、処理した受精卵の約14-64%から標的変異導入された植物体を得られた(図3)。

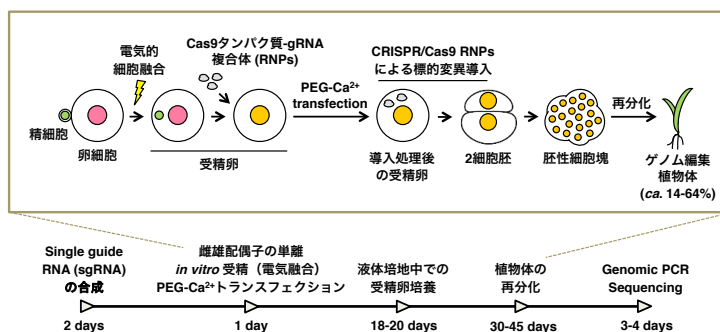


図3. イネ受精卵へのCas9タンパク質-gRNA複合体の導入によるゲノム編集

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計15件)

- Maryenti T., Kato N., Ichikawa M., Okamoto T. (2019) Establishment of an *in vitro* fertilization system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Physiol.* 60: 835-843. 査読有. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy250>
- Ohnishi Y., Kokubu I., Kinoshita T., Okamoto T. (2019) Sperm entry into the egg cell induces the progression of karyogamy in rice zygotes. *Plant Cell Physiol.*, in press. 査読有. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz077>
- Rahman MH, Toda E., Okamoto T. (2019) *In vitro* production of zygotes by electro-fusion of rice gametes. *Methods Mol. Biol.*, in press. 査読有.
- Rahman MH, Toda E., Kobayashi M., Kudo T., Takahara M., Iwami M., Watanabe Y., Sekimoto H., Yano K., Okamoto T. (2019) Expression of genes from paternal alleles in rice zygotes and involvement of OsASGR-BBML1 in initiation of zygotic development. *Plant Cell Physiol.* 60: 725-737. 査読有. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz030>
- Toda E., Koiso N., Takebayashi A., Ichikawa M., Kiba T., Osakabe T., Osakabe Y., Sakakibara H., Kato N., Okamoto T. (2019) An efficient DNA- and selectable marker-free genome editing system using

- zygotes in rice. *Nature Plants* 5: 363–368. 査読有. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0386-z>
- Sukawa Y., Okamoto T. (2018) Cell cycle in egg cell and its progression during zygotic development in rice. *Plant Reprod.* 31: 107-116. 査読有. DOI: 10.1007/s00497-017-0318-x
- Toda E., Ohnishi Y., Okamoto T. (2018) An imbalanced parental genome ratio affects the development of rice zygotes. *J. Exp. Bot.* 69: 2609-2619. 査読有. DOI: 10.1093/jxb/ery094.
- Koiso N., Toda E., Ichikawa M., Kato N., Okamoto T. (2017) Development of gene expression system in egg cells and zygotes isolated from rice and maize. *Plant Direct* 1: e00010. 査読有. DOI: 10.1002/pld3.10
- Okamoto T., Ohnishi Y., Toda E. (2017) Development of polyspermic zygote and possible contribution of polyspermy to polyploid formation in angiosperms. *J. Plant Res.*, 130: 485-490. 査読有. DOI: 10.1007/s10265-017-0913-9
- Ohnishi Y., Okamoto T. (2017) Nuclear migration during karyogamy in rice zygotes is mediated by continuous convergence of actin meshwork toward the egg nucleus. *J. Plant Res.* 130:339-348. 査読有. DOI: 10.1007/s10265-016-0892-2
- Okamoto T. (2017) Analysis of proteins enriched in rice gamete. *Methods Mol. Biol.* 1669: 251-263. 査読有. DOI: 10.1007/978-1-4939-7286-9\_20.
- Matsumura T., Okamoto T. (2016) Isolation of gametes from *Brachypodium distachyon*. *Plant Biotech.* 33: 39-43. 査読有. DOI: <http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.16.0123a>
- Toda E., Ohnishi Y., Okamoto T. (2016) Electro-fusion of gametes and subsequent culture of zygotes. *Bio Protocol*, 6: e2074 査読有. DOI:10.21769/BioProtoc.2074
- Toda E., Okamoto T. (2016) Formation of triploid plants via possible polyspermy. *Plant Signaling & Behavior* 11: e1218107. 査読有. DOI: 10.1080/15592324.2016.1218107.
- Toda E., Ohnishi Y., Okamoto T. (2016) Development of polyspermic rice zygotes. *Plant Physiol.* 171: 206-214. 査読有. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.15.01953>

〔学会発表〕（計 20 件）

- Okamoto T., Toda, E., Koiso N., Rahman MH., Takebayashi A., Ichikawa M., Kiba T., Osakabe Y., Osakabe T., Sakakibara H., Kato N. (2018) Development of gene expression and genome editing systems in rice egg cells and zygotes by direct delivery of macromolecules. 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction
- Okamoto T., Toda, E., Koiso N., Rahman MH., Takebayashi A., Ichikawa M., Kiba T., Osakabe Y., Osakabe T., Sakakibara H., Kato N. (2018) Genome editing in rice by direct delivery of preassembled CRISPR-Cas9 vectors or ribonucleoproteins into zygotes. International Association for Plant Biotechnology Congress 2018
- Rahman MH., Toda E., Ohnishi Y., Koiso N., Okamoto T. (2018) A paternally expressed transcription factor possibly initiates rice early zygotic development. 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction
- Toda E., Kobayashi M., Takahara M., Ohnishi Y., Kudo T., Rahman MH., Watanabe Y., Iwami M., Yano K., Okamoto T. (2018) Effects of an imbalanced parental genome ratio on development of rice zygotes and possible function of genes expressing in zygotes with paternal allele-specific manner. 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction
- Okamoto T., Toda E., Kakeda K., Ohnishi Y. (2017) In Vitro Fertilization System with Isolated Gametes: For Basic and Applied Plant Sciences. VISCEA Conference on Plant Cells In Vitro: Fundamentals and Applications
- Rahman MdH, Toda E, Kobayashi M, Kudo T, Ohnishi Y, Yano K, Okamoto T. (2017) Possible contribution of a paternally expressed AP2-type transcription factor to early zygotic development in rice. Taiwan-Japan Plant Biology.
- Toda E., Koiso N., Tunashima M., Kato N., Okamoto T. (2017) Development of gene expression system in egg cell and zygote isolated from rice and maize. Vienna International Science Conferences and Events Association, Plant Transformation & Biotechnology IV.
- 戸田絵梨香、古磯成美、Tety Maryenti、竹林有理佳、市川雅子、木羽隆敏、刑部敬史、刑部祐里子、榊原均、加藤紀夫、岡本龍史 (2019) イネ受精卵を用いた DNA および選抜マーカーフリーなゲノム編集技術の確立と他作物種への応用. 第 60 回日本植物生理学会年会
- Maryenti T., Kato N., Ichikawa M., Okamoto T. (2019) Establishment of an in vitro fertilization system in wheat (*Triticum aestivum* L.). 第 60 回日本植物生理学会年会
- 大西由之佑、國分巖、岡本龍史 (2018) 精細胞侵入に伴う細胞内 Ca<sup>2+</sup> レベルの上昇はイネ受精卵内の核合一を促進する. 日本植物学会第 82 回大会
- 岡本龍史 (2018) in vitro 受精系：育種への展開. 植物科学シンポジウム 2018
- 古磯成美、戸田絵梨香、加藤紀夫、岡本龍史 (2018) イネ初期受精卵発生における活性酸素種レベルの変動と発生に及ぼす影響. 第 59 回日本植物生理学会年会
- 戸田絵梨香、古磯成美、竹林有理佳、市川雅子、木羽隆敏、刑部敬史、刑部祐里子、榊原均、岡本龍史、加藤紀夫 (2018) 植物受精卵への Cas9 タンパク質-gRNA 複合体の直接導入によるゲノム編集技術の確立と応用. 日本植物学会第 82 回大会

戸田絵梨香、古磯成美、竹林有理佳、市川雅子、木羽隆敏、刑部祐里子、岡本龍史、加藤紀夫 (2018) イネ受精卵への CRISPR/Cas9 ベクターおよび Cas9 タンパク質-gRNA 複合体の直接導入によるゲノム編集技術の確立. 日本育種学会第 133 回講演会  
戸田絵梨香、古磯成美、竹林有理佳、市川雅子、木羽隆敏、刑部祐里子、岡本龍史、加藤紀夫 (2018) イネ受精卵への Cas9 タンパク質-gRNA 複合体の直接導入によるゲノム編集技術の確立. 第 59 回日本植物生理学会年会  
戸塚香里、須川友実子、岡本龍史 (2018) 単離イネ卵細胞の受精非依存的な分裂および発生. 第 59 回日本植物生理学会年会  
Rahman MdH, Toda E, Kobayashi M, Kudo T, Ohnishi Y, Yano K, Okamoto T (2018) A Paternally Expressed AP2-Type Transcription Factor, OsASGR-BBML1, Possibly Contribute to Early Zygotic Development in Rice. 第 59 回日本植物生理学会年会  
岩見百華、戸田絵梨香、小林正明、高原美嶺、大西由之佑、関本弘之、矢野健太郎、岡本龍史 (2017) イネ受精卵初期発生における父性鍵因子の探索および解析. 日本植物学会第 81 回大会  
加藤紀夫、戸田絵梨香、市川雅子、岡本龍史 (2018) トウモロコシ受精卵への物質導入と植物体再生. 第 35 回日本植物細胞分子生物学会大会  
古磯成美、戸田絵梨香、綱島雅子、加藤紀夫、岡本龍史 (2017) 植物卵細胞・受精卵を用いた一過的遺伝子発現系の確立および受精卵発生機構の解析へ向けた利用. 日本植物学会第 81 回大会

〔図書〕 (計 2 件)

戸田絵梨香、岡本 龍史 (2019) 「イネ受精卵発生過程における雌雄配偶子の機能差および父性アレル依存的遺伝子発現による受精卵の発生誘導」、アグリバイオ Vol. 4 (No. 3) pp73-78  
岡本龍史 (2017) in vitro 受精系と育種、「受精後雑種障壁研究の育種利用に向けて」、育種学研究、 Vol. 19 (No. 1) p. 35-36.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：植物に物質を導入する方法  
発明者：加藤紀夫、岡本龍史、木羽隆俊、戸田絵梨香  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：WO2017171092  
出願年：平成 29 年  
国内外の別：国外

名称：植物に物質を導入する方法  
発明者：加藤紀夫、市川雅子、岡本龍史、古磯成美、木羽隆俊、戸田絵梨香  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：WO2018143480  
出願年：平成 30 年  
国内外の別：国外

○取得状況 (計 1 件)

名称：植物配偶子の電気融合による同質および異質倍数性植物の作出  
発明者：岡本龍史、大西由之佑、戸田絵梨香  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許第 6436701 号  
取得年：平成 30 年  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=horcel>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者：該当なし

(2) 研究協力者：該当なし

※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、研究者個人に帰属されます。