

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14753

研究課題名(和文)新規イメージング法とホームメイド薬剤による植物の不等分裂機構の解明

研究課題名(英文) Novel methods for live-imaging and chemical screening to reveal the molecular mechanism of plant asymmetric cell division

研究代表者

植田 美那子 (Ueda, Minako)

名古屋大学・理学研究科(WPI)・特任講師

研究者番号：20598726

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)：植物において、上下軸の形成は、受精卵の細胞内極性にまで還元されるが、受精卵を極性化させるしくみについては、これまでほとんど分かっていなかった。そんななか、本研究において、シロイヌナズナの受精卵の網羅的ライブイメージングを行った結果、植物細胞のほとんどを占めるオルガネラである液胞が、受精卵の非対称分裂の制御に必須であることを発見した(Kimata et. al., 2019; Ueda and Berger, 2018)。化合物スクリーニングの結果としても、受精卵の不等分裂を阻害する新規の薬剤を複数見出した(論文執筆中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らは、世界で初めて、植物の受精卵が極性化する動態をリアルタイムで観察することに成功した。さらに、これまで単なる水袋だと考えられてきた液胞のダイナミックな動きが、受精卵の非対称分裂だけでなく、その後の形作りにも必須であることも突き止めた。ほとんどの植物において、受精卵は大きな液胞を持つことから、本研究が明らかにした仕組みは、植物に共通した普遍的な機構であると期待される。液胞は植物だけでなく、真菌類にまで保存された基本的な細胞内小器官のため、植物の形が複雑に進化してきた経緯の理解や、農業技術への応用など、さまざまな分野への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In most flowering plants, the asymmetric cell division of the zygote is the initial step in establishing the apical-basal axis. In *Arabidopsis thaliana*, the zygote is polarized, possessing the nucleus at the apical tip in the elongated cell. In spite of its obvious asymmetry, the real-time dynamics of the zygote polarization steps was poorly understood. Therefore we established a live-cell imaging system to visualize intracellular dynamics of the zygote through the ovule (Ueda and Berger, 2018). By combining this system with various specific inhibitors and mutants, we assessed the dynamics and roles of vacuoles in the zygote polarization (Kimata et. al., 2019). We also have found novel compounds, which effectively inhibit the zygotic division (in manuscript preparation).

研究分野：植物発生学

キーワード：植物受精卵 ライブイメージング 化合物スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物がもつ多様な細胞種は、始原細胞の非対称分裂によって生じた娘細胞が異なる発生運命を得ることで形成される。つまり発生を理解するには、個々の細胞がどのように極性化して非対称分裂に至るかを知らなければならない。しかし植物では、シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析から、受精卵の非対称分裂に関与するキナーゼや転写因子はいくつか得られたものの、非対称分裂の動態を解析する系がなく、これら制御因子がどのように受精卵極性を制御するのかが未解明であった。

そんななか、研究代表者らはシロイヌナズナの初期胚をイメージングする系を開発し、それを発展させて受精卵の細胞内動態を高精細にライブイメージングする系を確立した。その結果、受精卵がアクチン繊維依存的に核を頂端側に移動させ、逆に液胞が基部側で集積するといった動態を発見した。この研究において、アクチン繊維や微小管などのさまざまな阻害剤を受精卵に投与すると、いずれも適切に作用したことから化合物の有効性を実感し、化合物スクリーニングを行うことで、極性制御因子を同定できるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが独自開発したシロイヌナズナ受精卵のライブイメージング系を駆使し、オルガネラの不等分布など、非対称分裂の時空間現象を網羅的に観察することで、受精卵分裂という発生現象を細胞生物学的に記載することを目指した。さらに、各現象を乱した際に非対称分裂がどう損なわれるかを解析するとともに、大規模な化合物スクリーニングによって時空間的動態を損なう新規薬剤を網羅的に探索することで、受精卵の非対称分裂を担う制御機構に迫ることも目的とした。

3. 研究の方法

研究方法の概要

受精卵のライブイメージング系を駆使して、非対称分裂時の様々な時空間動態を可視化した。次に、薬剤投与や変異体によって各現象を乱した際に非対称分裂がどう損なわれるかを解析し、各現象や制御因子が非対称分裂に果たす役割を精査した。さらに、さまざまな化合物をスクリーニングすることで、各現象を特異的に阻害する薬剤を単離し、その標的分子を同定することで、非対称分裂の新規制御機構を探索した。

シロイヌナズナ受精卵の網羅的なライブイメージング

研究代表者らの受精卵ライブイメージング系を用い、受精卵の時空間的制御を可視化する蛍光マーカーを網羅的に観察した。受精直後から非対称分裂に至るまで各マーカーを高精細に観察し、動態とタイミングを比較した。さらに、研究代表者らのこれまでの研究により、受精卵の細胞伸長時にはアクチン繊維が頂端-基部方向に配向することを突き止めたので、アクチン重合阻害剤の存在下での動態も判定した。加えて、アクチン繊維との共局在性についても詳細に検証するべく、蛍光色を変えて多色マーカーとして重ね合わせた。

受精卵の非対称分裂を阻害する化合物のスクリーニング

受精卵の核と細胞膜をそれぞれ緑と赤で蛍光標識した株では非対称分裂が可視化できるので、*in vitro* 培養したこの胚珠に、市販の化合物ライブラリーに加え、49,800種類のITbMホームメイド薬剤を投与することで、非対称分裂に影響する化合物の探索を進めた。その結果、受精卵分裂を阻害する薬剤を2つ単離した。得られた化合物を順次、上記の網羅的ライブイメージング解析で作出したマーカー株に投与することで、細胞極性と非対称分裂におけるどの事象を阻害する化合物かを検討した。

得られた化合物の標的分子の同定

ITbMのモレキュラーストラクチャーセンターは化合物とタンパク質の相互作用解析の専門家陣を擁し、植物細胞における化合物の標的分子同定法の最適化を既に進めているので、上記の解析で得られた2種類の化合物について、モレキュラーストラクチャーセンターに依頼して標的分子を同定した。このとき、得られた化合物と類似した構造をもつアナログ分子群の中から、受精卵の細胞分裂に影響しない化合物を探索し、それらを対照分子(negative control)として用いることで、標的分子同定の精度を高めた。同定した遺伝子について、受精卵ライブイメージング系を用いて発現場所や時期を詳細に検討するとともに、遺伝子破壊株を作成して表現型を解析することで、受精卵に果たす役割を検証した。

4. 研究成果

シロイヌナズナの受精卵の網羅的ライブイメージングを行った結果、オルガネラの一つである液胞が、受精卵の非対称分裂の制御に必須であることを発見した(Kimata et. al., 2019; Ueda and Berger, 2018)。細胞の大部分を占める水袋である液胞は、受精する前には細胞のほとんどを占めるものの、受精すると急速に脱水して小さくなる。次いで、液胞は細長い管状の構造を作り、核を避けるようにして徐々に下方向に移動した結果、上部の空いた空間に核が移動することで、受精卵が非対称に細胞分裂できることを見出した。上記の「研究の方法」で述べたよ

うに、液胞とアクチン繊維の同時観察によって共局在性を判定した結果、管状の液胞がアクチン繊維に沿っていることを見出した。同様に、アクチン重合阻害剤を投与したときに液胞の形や移動が損なわれるかを調べると、阻害剤の存在下では管状の液胞が消失して液胞の移動が損なわれること、さらにその結果として、受精卵の上部に残った巨大液胞の存在により、核の移動が妨害され、受精卵が非対称分裂に失敗することを見出した。これらの解析により、液胞はアクチン繊維を足場として管状の構造を作って受精卵内部を極性的に移動することで、受精卵の非対称分裂を支える役割があることが明らかとなった。

液胞が積極的に動くことで、細胞の極性化や形作りを制御するという発見は、これまで受動的な「ただの水袋」であると考えられてきた液胞のイメージを覆すものであった。この発見により、国内外の研究会議で講演者として招待されたほか、複数の新聞に取り上げられるなど、さまざまな反響を得た。さらに、受精卵のライブイメージングが植物発生研究にとって画期的なツールであることも認められ、方法論の図書執筆 (*Springer Protocols*, Chapter for Methods in Molecular Biology, 印刷中) も依頼されるに至った。化合物スクリーニングの成果としても、得られた2種類の新規化合物のいずれについても標的分子の候補を同定することに成功し、それらが細胞分裂時に特異的

な機能を果たす因子であることも特定できたので、現在はそれらの結果をまとめた論文を執筆中である。



Kimata et. al., 2019 を紹介した新聞記事

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Kimata, Y., Kato, T., Higaki, T., Kurihara, D., Yamada, T., Segami, S., Morita, M. T., Maeshima, M., Hasezawa, S., Higashiyama, T., Tasaka, M., Ueda, M. (2019) Polar vacuolar distribution is essential for accurate asymmetric division of *Arabidopsis* zygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(6), 2338-2343. 査読有
2. Ueda, M., Berger, F. (2018) New cues for body axis formation in plant embryos. *Curr Opin Plant Biol* 47, 16-21. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Ueda, M., Kimata, Y., Tanaka, S., Kato, T., Higaki, T., Kurihara, D., Yamada, T., Ando, N., Morita, M. T., Segami, S., Maeshima, M., Hasezawa, S., Kuwata, K., Sato, A., Suzuki, T., Higashiyama, T., Tasaka, M. シロイヌナズナ初期胚のライブイメージング, 第60回植物生理学会, 2019年3月13日, 名古屋
2. Kimata, Y., Suzuki, T., Mizutani, M., Yamada, T., Kanaoka, M., Higashiyama, T., Ueda, M. トランスクリプトーム解析による受精卵極性の制御因子の探索, 第60回植物生理学会, 2019年3月13日, 名古屋
3. Kimata, Y., Ando, N., Higaki, T., Kurihara, D., Kato, T., Yamada, T., Segami, S., Morita, M. T., Maeshima, M., Hasezawa, S., Higashiyama, T., Tasaka, M., Ueda, M. Live-cell imaging of the intracellular dynamics of *Arabidopsis* zygote, GARNet 2018, 2018年9月19日, York, U.K. (国際シンポジウム 基調講演)
4. 田中 小百合, 栗原 大輔, 柳沢 盛一郎, 東山 哲也, 植田 美那子 シロイヌナズナの胚のパターン形成におけるHD-ZIP IV転写因子群の役割, 第82回日本植物学会, 2018年9月15日, 広島
5. 木全 祐資, 加藤 壮英, 檜垣 匠, 栗原 大輔, 山田 朋美, 瀬上 紹嗣, 森田(寺尾)美代, 前島 正義, 馳澤 盛一郎, 東山 哲也, 田坂 昌生, 植田 美那子 ライブイメージングによる受精卵の極性化における液胞の動態と役割の解明, 第82回日本植物学会, 2018年9月14日, 広島
6. Kimata, Y., Ando, N., Kato, T., Higaki, T., Kurihara, D., Yamada, T., Segami, S., Morita, M. T., Maeshima, M., Hasezawa, S., Higashiyama, T., Tasaka, M., Ueda, M. Live-cell imaging of the axis formation in *Arabidopsis* zygote, The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (25th ICSPR), 2018年6月14日, 岐阜 (国際シンポジウム 招待講演)
7. Kimata, Y., Kato, T., Higaki, T., Kurihara, D., Yamada, T., Segami, S., Morita, M. T., Maeshima, M., Hasezawa, S., Higashiyama, T., Tasaka, M., Ueda, M. Intracellular dynamics controlling *Arabidopsis* zygote polarization, The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (25th ICSPR), 2018年6月14日, 岐阜 (国際

シンポジウム)

8. Ando, N., Kimata, Higashiyama, T., Ueda, M. Live-cell imaging of the mitochondrial behavior in *Arabidopsis* zygote, The 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (25th ICSPR), 2018年6月14日, 岐阜(国際シンポジウム)

〔図書〕(計 1 件)

1. Ueda, M., Kimata, Y., Kurihara, D. (印刷中) Live-cell Imaging of Zygotic Intracellular Structures and Early Embryo Pattern Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Springer Protocols*. Chapter for Methods in Molecular Biology

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/research/2019/01/20190115-ueda-PNAS.php>

毎日新聞 (2019年1月15日夕刊)

名古屋大、植物受精卵の分裂で液胞の働き確認

<https://mainichi.jp/articles/20190115/k00/00m/040/075000c>

中日新聞 (2019年5月9日朝刊)

植物の成長 液胞が起点

https://chuplus.jp/paper/article/detail.php?comment_id=644963&comment_sub_id=0&category_id=113&from=news&category_list=113

6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者 無し

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。