

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03697

研究課題名(和文)植物胚発生における細胞間コミュニケーションによる細胞運命制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the cell fate regulation by cell-cell communication in plant embryogenesis

研究代表者

栗原 大輔(Kurihara, Daisuke)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任講師

研究者番号：90609439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：胚発生過程は、受精卵という単細胞から高等生物の複雑な構造、機能を構築するうえで基本的で重要な過程である。本研究では、胚発生過程において細胞運命制御機構に関わる細胞間コミュニケーションの分子実体を明らかにすることを目的とした。細胞外を伝わるシグナル経路としてリガンド-受容体ペアに着目して網羅的に解析した結果、候補となる変異体を発見し、原因遺伝子を同定・解析するためのデータを収集した。また、細胞内を伝わるシグナル経路を解析するための光操作技術の確立を進め、問題点・改善点を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞運命転換は、植物の多能性、分化可塑性を担う重要なメカニズムである。しかしながら、植物は生きたままの観察・解析の困難さから、多数の細胞が混在する組織レベルの研究に終始しており、個々の細胞で、どのように細胞運命が変化しているのかさえ、多くは未知のままである。本研究では、頂端細胞と基部細胞というわずか2細胞の発生時期において、細胞間コミュニケーションの解析を行うことができ、細胞運命転換をする様子を追跡できるため、1細胞レベルでシグナル分子のやりとり、また細胞運命転換のメカニズムに迫った。本研究成果は胚発生だけに留まらず、植物の分化可塑性を担う普遍的なメカニズム解明に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Embryogenesis is a fundamental process in the construction of the complex structures and functions of higher organisms from a single cell, the zygote. The purpose of this study was to clarify the molecular entities of cell-cell communication involved in the regulation of cell fate during embryogenesis. We discovered a candidate mutant as a result of comprehensive analysis focusing on ligand-receptor pairs as signaling pathways that transport outside the cell. We collected data to identify and analyze the causative genes. We also tried to establish the optical manipulation technique for analyzing the signal pathway transported in the cell and clarified the problems and improvement points.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：植物 胚発生 細胞運命 細胞間コミュニケーション イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物には複雑な構造や機能を持つさまざまな器官があるが、それらはすべて受精卵というたった1つの細胞に由来する。被子植物において、受精卵の不等分裂により生じる2つの細胞、頂端細胞と基部細胞は形態的特徴も異なるが、その後の発生運命も大きく異なる。頂端細胞は、分裂面を高頻度に変化させながら特有の細胞パターンを示す胚体を形成し、植物体を生み出す。すなわち、頂端細胞は胚始原細胞と言える。一方、基部細胞は一方向にのみ数回分裂をし、母体組織とつながる胚柄を形成し胚への栄養供給を担い、最終的には細胞死に至る胚体外細胞である(図1)。ごく初期であるわずか2細胞の時期において、異なる細胞運命を持つようになるが、その細胞運命を決定する仕組みについては、不明な点が多く残されている。近年、個々の細胞は他の細胞とコミュニケーションを取りながら、それぞれの細胞運命を決定し、からだ作りをすることが示唆されているが、その詳細はまだ明らかになっていない。

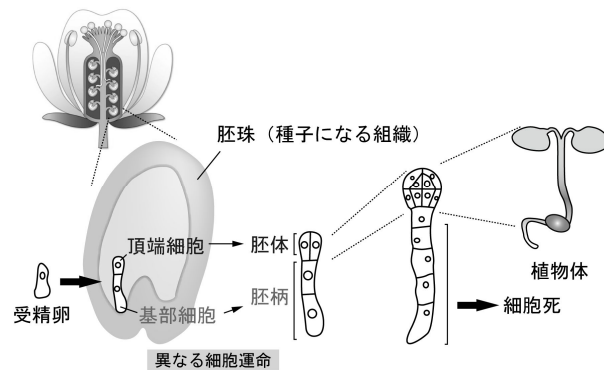


図1 シロイヌナズナの花と胚発生。被子植物において、将来種子になる胚珠の中で胚発生は進行する。

ごく初期であるわずか2細胞の時期において、異なる細胞運命を持つようになるが、その細胞運命を決定する仕組みについては、不明な点が多く残されている。近年、個々の細胞は他の細胞とコミュニケーションを取りながら、それぞれの細胞運命を決定し、からだ作りをすることが示唆されているが、その詳細はまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、頂端細胞・基部細胞間の細胞間コミュニケーションを担っている分子の実体を明らかにするために、シグナル分子が伝わると考えられる、アポプラステック(細胞外を介する)あるいはシンプラスティック(細胞質をつなぐ原形質連絡を介する)の2つの経路に着目して、シグナル分子を同定する(図2)。同定したシグナル分子・受容する分子通常状態、あるいは頂端細胞破壊時の胚柄細胞運命転換において、どのように機能しているのかを明らかにすることで、細胞運命制御機構の分子実体解明を目指した。

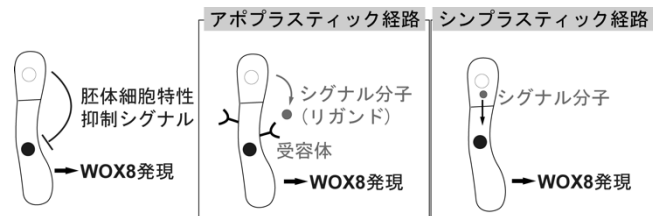


図2 シグナル分子が伝わる2つの経路

同定したシグナル分子・受容する分子通常状態、あるいは頂端細胞破壊時の胚柄細胞運命転換において、どのように機能しているのかを明らかにすることで、細胞運命制御機構の分子実体解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、アポプラステック経路に関わるリガンド-受容体ペアの同定、およびシンプラスティック経路に関わる因子の同定の2研究項目を実施した。

(1) アポプラステック経路に関わるリガンド-受容体ペアの同定

アポプラステック経路に関わるリガンド-受容体ペアの同定するために、CLE8に着目して研究を行ったが、CLE8のノックアウト植物体を解析するために、CRISPR/Cas9システムにより変異を導入して、胚柄から胚体様組織が形成されるか、遺伝子発現に異常は見られないか解析を行った。また、表現型頻度が低い原因としては冗長性の可能性も考えられるため、系統樹解析によりCLE8ペプチドに相同性の高いCLEについて、CRISPR/Cas9システムによるノックアウト変異体を用いて、表現型解析を行った。一方、受容体候補の同定においては、連携研究者である篠原(名古屋大学)が*in vitro*でCLE8と相互作用する受容体を見つけており、その受容体が属するLRRグループの受容体全種をCLE8受容体候補とし、各T-DNA挿入ノックアウト変異体を観察し、胚柄に異常が見られないか表現型解析を行った。さらに、受容体欠損変異体解析で絞った候補について、CLE8、あるいはCLE8ペプチドに相同性の高いペプチドとの相互作用解析を目指した。

(2) シンプラスティック経路に関わる因子の同定

シンプラスティック経路に関わる因子の同定において、有力候補であるWOX2に着目して研究を行った。WOX2がタンパク質として頂端細胞から基部細胞へ移動している可能性を明らかにするために、IR-LEGO法により頂端細胞にだけWOX2-sGFPを発現させ、局在変化をライブイメージングすることを目指した。また、胚柄細胞においてWOX2が、WOX8の発現あるいはWOX8自体を安定化させている可能性を明らかにするために、レーザーで頂端細胞を破壊した後に、残った基部細胞にIR-LEGOでWOX2を発現させ、胚柄細胞において細胞運命転換が抑制されるかの解析を目指した。

4. 研究成果

(1) アポプラステック経路に関わるリガンド-受容体ペアの同定

リガンドについて

リガンド候補として、CLE8ペプチドに着目して研究を行った。CLE8ペプチドは、一アミノ酸

変異が導入された変異体の胚柄から胚体様の組織が形成されているため、細胞運命転換に関わるシグナル分子の候補と考えられる (Fiume and Fletcher, 2012)。しかしながら、表現型頻度が約 14%と低く、実際に働いているのか、どのようなメカニズムで働いているのは未だ不明である。そこで、CRISPR/Cas9 システムにより変異を導入して CLE8 のノックアウト植物体を作製し、胚柄から胚体様組織が形成されるなど、遺伝子発現を含めて異常は見られないか解析を行ったが、顕著な表現型は観察されなかった。また、蛍光マーカーラインを作製して発現場所を解析したが、胚体や胚柄ではなく、胚乳のみで発現が検出された。このことから、CLE8 は胚体-胚柄間における細胞間コミュニケーションに直接は関わっていないことが明らかとなった。

Fiume and Fletcher (2012) が示していた表現型を考慮すると、一アミノ酸変異 CLE8 ペプチドがドミナントネガティブに他の CLE ペプチドと受容体の相互作用を阻害することによって考えられた。そこで、続いて CLE ファミリー全 32 遺伝子についてノックアウト変異体の表現型解析を行った。CLE ファミリーノックアウト変異体ライブラリーは石田喬志博士 (熊本大学) から分与して頂いた。しかしながら、CLE ファミリーの単独変異体では顕著な表現型が見られなかった。一方、既存の発現データベースで CLE ファミリーが胚で発現しているか解析したが、受精卵分裂直後の発現データは不足していたため、CLE32 種について、プロモーター発現マーカーラインを作成し、発現解析を行った。これまでに解析が終了した 12 種類のうち、胚で発現が確認できた CLE は一種類であった。しかし、胚での発現は球状胚期の胚体から発現が始まっており、一細胞期胚といった初期の発現は観察されなかった。胚で特異的に発現する CLE の存在が分かったため、今後 CLE 全種類解析することにより、新たな特異的 CLE 遺伝子の同定が期待される。また、胚では発現していなかったが、別の細胞特異的に発現する CLE 遺伝子も見つかってきており、植物発生分野における CLE 遺伝子の新たな機能解明に繋がると期待される。

受容体について

受容体候補の同定としては、CLE ペプチドに結合しうるロイシンリッチリピート (LRR) 型受容体キナーゼに着目して研究を行った。網羅的に、LRR ファミリーにおける各 T-DNA 挿入ノックアウト変異体を観察した結果、胚柄に異常が見られる候補が 1 種類見つかった。受容体候補 #16 は球状型胚期において、胚柄から胚体様の細胞分裂を示した。しかし、#16 変異体に #16 遺伝子を外来遺伝子として導入しても表現型は回復されず、また #16 の別アレルの変異体の胚に異常は見られなかった。このことは、原因遺伝子が T-DNA 挿入ヶ所とは別に存在していることが考えられた。そこで #16 変異体の原因遺伝子の同定を行うために、全ゲノムリシーケンスにより変異ヶ所の同定を試みたが、顕著な遺伝子への一塩基挿入・欠失は見つけることはできなかった。このことより、変異は数塩基~数十塩基の欠失ではないかと予想される。さらに #16 変異体の胚珠を用いて RNA-seq 解析を行い、原因遺伝子同定に向けたデータ整備が整った。本研究において当初想定していた目的遺伝子の破壊によるものではなかったが、非常に有望な変異体を得ることができた意義は大きい。また、#16 変異体はこれまで別の分野で用いられてきた変異体であるが、T-DNA 挿入ヶ所ではない変異の存在が明らかとなったため、原因遺伝子によってはこれまでの研究を見直す必要があることを示唆できた。一方、受容体候補についても掛け合わせによって二重変異体・三重変異体を作成して解析を進めた結果、表現型の割合は低いながらも胚柄から胚体様分裂を示すものも見つかってきているため、さらなる多重変異体を作成し解析することで、重要な受容体群を明らかにできると期待される。

(2) シンプラスティック経路に関わる因子の同定

シンプラスティック経路に関わる因子の同定においては、有力候補である WOX2 に着目して研究を行った。WOX2 がタンパク質として頂端細胞から基部細胞へ移動している可能性を明らかにするために、IR-LEGO 法により頂端細胞にだけ WOX2 の発現を誘導させライブイメージングを試みた。

IR-LEGO 法は水によく吸収され効率よくヒートショックを誘導できる 1,480 nm のレーザーを照射する手法である (Kamei et al., 2009)。HSp::H2B-sGFP 発現シロイヌナズナを用いて、根では一細胞特異的に誘導できることは確認していた (Kurihara et al., 2013)。胚でも IR-LEGO 法を用いることができるか条件検討した結果、単離胚珠を用いて、11 mW・4 秒間照射という条件で、8 細胞期胚の一細胞のみで H2B-sGFP の発現を誘導できることが明らかとなった (図 3)。

そこで、連携研究者である植田 (名古屋大学) が確立した HSp::WOX2-mCerulean の単離胚珠を用いて、胚体あるいは胚柄に 11 mW・4 秒間 1,480 nm のレーザーを照射した後、タイムラプス観察を行ったが、顕著な WOX2 の発現上昇は確認できなかった。このことは、転写因子である WOX2 は分解が速いためか、一過的な発現誘導では分量の発現が行われなかったことが考えられる。

直接の WOX2 の発現を誘導させることが難しいため、次に、原形質連絡を制御することで、シンプラスティック経路を実際にシグナル分子が伝わっているかを解析することを目指した。光

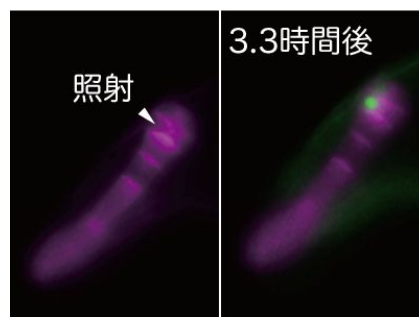


図 3 シロイヌナズナ単離胚珠を用いた IR-LEGO

顕微操作によって原形質連絡を制御する系の確立目指し、細胞壁へのカロースの蓄積により原形質連絡を阻害できると期待される HSp::iCals3m 植物体において、IR-LEGO による条件確立を行った。しかし、HSp::iCals3m 植物体の初期胚を用いて原形質連絡の阻害を試みたが、照射条件を定めることができず、頂端細胞、基部細胞あるいは胚柄細胞などへの特異的な阻害には至らなかった。

本研究では IR-LEGO による胚細胞への顕微操作技術を確立するに至らなかった。これは想定以上に胚細胞を取り巻く組織、胚乳や種皮が特異的に光を照射させることを阻害していたからかもしれない。しかし、本研究により、タンパク質の種類によって、短時間のヒートショックによる一過的な発現誘導で十分かどうかの知見を得ることができた。今回の転写因子のような場合、目的遺伝子を直接 HSp により誘導するのではなく、Cre/loxP のような部位特異的組換え反応を HSp を用いて誘導することで、目的遺伝子を恒常的に発現させる方法が有用と考えられる。我々は、シロイヌナズナの胚においても、Cre/loxP を用いることで、H2B-sGFP を IR-LEGO により恒常的に発現させることに成功している。今後は、これらの技術が植物の胚発生に留まらない発生研究に重要なツールになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueda Minako, Kimata Yusuke, Kurihara Daisuke	4. 巻 2122
2. 論文標題 Live-Cell Imaging of Zygotic Intracellular Structures and Early Embryo Pattern Formation in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 37 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0342-0_4	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 Susaki Daichi, Suzuki Takamasa, Maruyama Daisuke, Ueda Minako, Higashiyama Tetsuya, Kurihara Daisuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Dynamics of the cell fate specifications during female gametophyte development in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.04.07.023028	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kimata Yusuke, Kato Takehide, Higaki Takumi, Kurihara Daisuke, Yamada Tomomi, Segami Shoji, Morita Miyo Terao, Maeshima Masayoshi, Hasezawa Seiichiro, Higashiyama Tetsuya, Tasaka Masao, Ueda Minako	4. 巻 116
2. 論文標題 Polar vacuolar distribution is essential for accurate asymmetric division of Arabidopsis zygotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 2338 ~ 2343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1814160116	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10件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Daisuke Kurihara, Daichi Susaki, Tetsuya Higashiyama
2. 発表標題 Live-cell analysis of female gametophyte development in Arabidopsis
3. 学会等名 Synthetic Morphogenesis: From Gene Circuits to Tissue Architecture (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原大輔, 大谷悠登, 石田喬志, 澤進一郎, 東山哲也
2. 発表標題 シロイヌナズナ初期胚の細胞運命制御機構に関わる因子の探索
3. 学会等名 日本植物形態学会第31回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木全祐資, 佐藤綾人, 桑田啓子, 鈴木孝征, 山田萌恵, 栗原大輔, 山田朋美, 東山哲也, 植田美那子
2. 発表標題 化合物スクリーニングにより見出された新規細胞分裂阻害剤
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田美那子, 木全祐資, 田中小百合, 檜垣匠, 栗原大輔, 東山哲也
2. 発表標題 ライブイメージングで迫るシロイヌナズナ受精卵の極性化機構
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原大輔, 大谷悠登, 石田喬志, 澤進一郎, 東山哲也
2. 発表標題 植物胚発生における細胞間コミュニケーションによる細胞運命制御機構の解明
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Kurihara
2. 発表標題 Live cell analysis and deep imaging for plant development
3. 学会等名 JSOL2019 (第16回日本ナス科コンソーシアム年会) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minako Ueda, Yusuke Kimata, Takehide Kato, Takumi Higaki, Daisuke Kurihara, Tomomi Yamada, Shoji Segami, Miyo Terao Morita, Masayoshi Maeshima, Seiichiro Hasezawa, Tetsuya Higashiyama, Masao Tasaka, Naoe Ando
2. 発表標題 Live-cell imaging of the axis formation in Arabidopsis zygote
3. 学会等名 the 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田美那子, 木全祐資, 田中小百合, 加藤壮英, 桧垣匠, 栗原大輔, 山田朋美, 安藤奈央恵, 森田(寺尾)美代, 瀬上紹嗣, 前島正義, 馳澤盛一郎, 桑田啓子, 佐藤綾人, 鈴木孝征, 東山哲也, 田坂昌生
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける初期胚のライブイメージング
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原大輔, 須崎大地, 東山哲也
2. 発表標題 雌性配偶体形成過程における細胞運命制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗原大輔
2. 発表標題 植物組織における透明化イメージング
3. 学会等名 第43回レーザー顕微鏡研究会（招待講演）
4. 発表年 2017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
連携研究者	植田 美那子 (Ueda Minako) (20598726)	名古屋大学・理学研究科(WPI)・特任講師 (13901)	
連携研究者	篠原 秀文 (Shinohara Hidefumi) (40547022)	名古屋大学・理学研究科・講師 (13901)	