

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23759

研究課題名（和文）細胞単離とライブセルイメージングを基盤とした精細胞移行RNAの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of mobile RNAs that are transferred to the sperm cells based on cell isolation and live cell imaging

研究代表者

元村 一基 (Motomura, Kazuki)

立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・助教

研究者番号：50844049

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では植物の花粉中に存在する精細胞が、花粉管を伸ばす栄養細胞から受け取る細胞間シグナルの性質に注目し、特に栄養細胞から精細胞に移行するRNAに着目して、精細胞へのRNA移行を阻害した変異体花粉を作出して解析した。まず野生型花粉と変異体花粉それぞれの精細胞を花粉から単離して、それぞれに含まれるRNA種をトランスクリプトーム解析で比較した。その結果、多数の精細胞移行RNA候補を見出した。また、この変異体花粉が精細胞の輸送異常の表現型を示したことから、精細胞輸送と細胞間コミュニケーションの関連性が示唆されたとともに、この精細胞輸送が欠失した表現型を利用して花粉管の新機能も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者はホモ接合体が取得できないミュータント花粉を利用して、野生型花粉や野生型精細胞を含むヘテロな集団から、野生型精細胞またはミュータント精細胞だけをそれぞれ精製する技術を確立した。本研究で示唆された精細胞移行RNAの共通性が明らかになれば、個々の精細胞移行RNAの機能解析などの基礎研究は勿論のこと、社会的に重要な研究開発にも発展する可能性がある。更に花粉の機能解析を進めることで、これまで分かっていなかった精細胞の輸送と細胞間コミュニケーションとの関連性も明らかになることが期待できる。以上の2点から、本研究成果は当該学術分野にとどまらず、社会的価値の面でも波及効果を持つと考えている。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the intercellular signals that sperm cells in pollen receive from the vegetative cells that elongated pollen tubes. In particular, I focused on RNAs that are transferred from the vegetative cell to the sperm cells. I isolated sperm cells from wild-type pollen and mutant pollen and compared the RNA variations in each sample. The result revealed a large number of candidates of mobile RNAs in pollen. The mutant pollen showed a phenotype of abnormal sperm cell trafficking, suggesting a link between sperm cell trafficking and intercellular communication. Using the mutant pollen tube, I uncovered a novel function of pollen tubes.

研究分野：RNA植物生殖工学

キーワード：細胞生物学 花粉 RNA

1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う生物は、受精により配偶子から子孫へ遺伝情報を伝える。動物と同様に、植物の配偶子も隣接する細胞の補助を受けて受精を達成する。例えば植物の雄性配偶子である精細胞は、栄養細胞という花粉管を伸ばす運搬役の中に存在する。エンドサイトーシスにより取り込まれた精細胞は栄養細胞の補助を受けて子孫を残す。このように花粉は2種類の細胞からなる特殊な構造を持つ。

近年の研究から、栄養細胞と精細胞の間で様々なやり取りがあることが明らかになってきている。精細胞は伸長する花粉管中を長時間に渡って移動したのち、めしべ中に放出されて短時間で受精を達成するが、その生殖段階を通じて精細胞の状態がどう変化するかはほとんど分かっていない。そこで研究代表者は、外の世界と隔離された精細胞が受精というダイナミックな現象を実現するために、唯一接触のある栄養細胞から、外界状況を理解するためのシグナルを受け取ると仮説を立てた。

近年、花粉中で栄養細胞から精細胞に RNA が移行する可能性が示唆されてきた。例えば花粉における機能未知遺伝子 AHG3 は栄養細胞で mRNA の転写が行われ、その後 mRNA が精細胞に移行して翻訳されると報告されていた。しかし AHG3 の発見以降、精細胞移行 RNA はほとんど報告されてきていない。その原因は花粉が他の組織に比べ小さく扱いづらいことや、また生殖細胞は単相体で致死性表現型が出やすく順遺伝学で原因遺伝子が取れないことなどの原因が想定される。そこで研究代表者は「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」の作出を行った。

植物では情報伝達物質は動物のギャップ結合と似た構造である「プラズモデスマータ」という隣接した細胞を繋ぐトンネルを通して移動すると考えられている。そこで研究代表者は精細胞周辺に存在するであろうプラズモデスマータを人為的に塞いだ花粉の作出に成功した。この「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」で既知の精細胞移行 RNA である AHG3 がコードするタンパク質を可視化すると、AHG3 が栄養核にも観察された。同時に精細胞の AHG3 タンパク質の蛍光強度が減少したことから、AHG3 の mRNA の精細胞移行が阻害されたことが想定された。つまりこの「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」では、精細胞と栄養細胞の間で起こる RNA を含む情報伝達物質の移動が阻害されていることが予想された。この材料を基盤として本研究を遂行した。

2. 研究の目的

本研究では、被子植物の果実形成に必須の生殖細胞である精細胞が、唯一接触のある栄養細胞から受け取るシグナルの性質と、その生理学的意義を明らかにすることを目的とした。中でも栄養細胞から精細胞に移行する RNA に着目して、精細胞へ細胞間移行する RNA を「精細胞移行 RNA」と定義して、移行する RNA の機能を明らかにすることを発展的な目標とした。この目的の為に、本研究では「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」を用いて「細胞単離」と「ライブセルイメージング」という2つの技術を駆使して解析を進めた。

3. 研究の方法

本研究の特色の一つは研究代表者が独自に作出した「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」である。本研究ではまず「細胞単離」技術として、Fluorescence activated cell sorter (FACS)を用いて、シロイヌナズナの成熟花粉の中から、精細胞だけを単離する技術を確立した。次に精細胞移行 RNA 同定のため植物を育成して回収した花粉を用いて、野生型花粉と「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」それぞれの精細胞を単離した。そしてそれぞれに含まれる RNA 種をトランスクリプトーム解析で比較した。

上記の細胞単離実験とは独立して、「ライブセルイメージング」を駆使して「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」の表現型から精細胞移行 RNA を含む、栄養細胞 - 精細胞間の細胞間情報伝達の生理学的意義を明らかにすることを試みた。「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」では細胞間の物質移動が阻害されることから、細胞間コミュニケーションや情報伝達が loss-of-function された表現型が観測できることが予想された。そこで、この花粉の詳細な表現型解析を通して、これまで未知であった、栄養細胞から精細胞へ送られる外界状況を理解するためのシグナルの存在や機能を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」では、精細胞と栄養細胞の間で起こる RNA を含む情報伝達物質の移動が阻害されていることが想定されることから、野生型精

細胞に比べ、「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」中の精細胞では精細胞移行 RNA の存在量が減少しているはずである。これを調べるため、まず細胞移行 RNA 同定のため植物を育成して回収した花粉を用いて、野生型花粉と変異体花粉それぞれの精細胞の単離を試み、これに成功した。その後それぞれに含まれる RNA 種をトランスクリプトーム解析で比較した。その結果、野生型精細胞に比べ、変異体花粉中の精細胞では 300 種余りの RNA が有意に減少していることが明らかとなった。しかしながら、RNA 移行が阻害された結果として、二次的に精細胞内在性の RNA も減少する可能性がある。次にこれを区別するため、花粉全体のトランスクリプトームも取得することで、比較解析を行った。減少した精細胞内在性 RNA と異なり、精細胞移行 RNA の花粉全体の総量は「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」でも変化しないはずである。野生型に比べて、「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」の精細胞で減少しているものの、ミュータント花粉全体では減少は見られない RNA は 280 種程度に及ぶことが分かった。この中の多くは、精細胞での機能は未知の遺伝子であった。これらが本研究で明らかとなった、精細胞移行 RNA 候補である。これらの実験から、これまで日本では報告例のない、単離した精細胞を用いたトランスクリプトーム解析を行うことに成功し、未知であった精細胞移行 RNA の候補を見出すことができた。

「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」は致死表現型を示したことから、半数が「人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉」となるヘテロ接合植物の花粉を野生型のめしべに交配した。すると半数の種子が典型的な受精異常表現型である不稔となることが分かり、この実験結果から細胞間情報伝達が生殖に必須の機能を担っている可能性が高いことが分かった。更に精細胞への RNA 移行を阻害したミュータント花粉を用いた形態学的解析を進めたところ、この精細胞 RNA 移行が阻害されたミュータント花粉は、精細胞自身の遺伝子発現には大きな異常は見られない一方で、精細胞と接する栄養細胞の生体膜構造が変化することで、精細胞自身の輸送に異常をきたすことが明らかとなった。この表現型は精細胞移行 RNA など、細胞間相互作用が異常となった結果であることが予想され、本研究により"精細胞移行 RNA"の生理学的機能の一端が示唆された。

研究代表者はこの例を見ない表現型が、花粉管伸長における核の機能を調べるために利用できるのではないかと考えた。そこで花粉管自身の核である栄養核の輸送異常を示す変異体において、人為的に精細胞への RNA 移行を阻害したところ、花粉管中の全ての核が花粉管基部に取り残される表現型を示す花粉管の作出に成功した。この二重ミュータントの花粉管は花粉管が伸長する先端側に遺伝物質を供給する核を持たない。しかしこの状態でもこの二重ミュータントの花粉管は伸長を続け、卵細胞のある胚珠の位置を認識してその中に進入する能力を保持していることが明らかとなった。これらの研究から明らかになった、花粉管の未知なる機能に関する成果を査読付き論文としてまとめ、国際誌に報告見込である。

また、この花粉研究に関連して、花粉で遺伝子発現制御に関与するタンパク質 NOT1 の機能解析も併せて行い、植物の花粉形成において、ネガティブな遺伝子発現制御が重要な役割を果たすことをはじめて明らかにした。これらの研究成果についても論文としてまとめ、査読付き論文として国際誌に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Motomura Kazuki, Arae Toshihiro, Araki-Uramoto Haruka, Suzuki Yuya, Takeuchi Hidenori, Suzuki Takamasa, Ichihashi Yasunori, Shibata Arisa, Shirasu Ken, Takeda Atsushi, Higashiyama Tetsuya, Chiba Yukako	4. 巻 61
2. 論文標題 AtNOT1 Is a Novel Regulator of Gene Expression during Pollen Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 712 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz235	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 Motomura Kazuki, Takeuchi Hidenori, Notaguchi Michitaka, Tsuchi Haruna, Takeda Atsushi, Kinoshita Tetsu, Higashiyama Tetsuya, Maruyama Daisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Persistent directional growth capability in Arabidopsis thaliana pollen tubes after nuclear elimination from the apex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-021-22661-8	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 元村 一基
2. 発表標題 カロースを利用した花粉における細胞間コミュニケーションの解析
3. 学会等名 立命館大学総合科学技術研究機構生物資源研究センターシンポジウムバイオ研究が拓く糖質の未来
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 元村 一基, 荒江 星拓, 鈴木 悠也, 武内 秀憲, 荒木 春花, 鈴木 孝征, 市橋 泰範, 柴田ありさ, 白須 賢, 竹田 篤史, 東山 哲也, 千葉 由佳子
2. 発表標題 ポリA分解複合体AtCCR4-NOTは花粉の発生に必須の新奇RNA代謝制御因子である
3. 学会等名 第8回植物RNA研究ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下川心平, 元村一基, 津田賢一, 竹田篤史, 峯彰
2. 発表標題 免疫受容体を介した花粉発生に必要なlong noncoding RNAの発現制御
3. 学会等名 第8回植物RNA研究ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 元村 一基
2. 発表標題 花粉を利用したRNAを介した遺伝子発現制御と細胞間コミュニケーションの研究
3. 学会等名 立命館大学第8回生物資源セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 元村 一基, 荒江 星拓, 鈴木 悠也, 武内 秀憲, 鈴木 孝征, 市橋 泰範, 柴田ありさ, 白須 賢, 竹田 篤史, 東山 哲也, 千葉 由佳子
2. 発表標題 ポリA分解複合体の足場タンパク質であるAtNOT1は花粉発生中に起こる遺伝子発現変動に重要な役割を果たす
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山 大輔, 泉 理恵, 武内 秀憲, 東山 哲也, 木下 哲, 元村 一基
2. 発表標題 精細胞を包むユニークな生体膜の動態と機能
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 元村 一基, 武内 秀憲, 野田口 理孝, 土 春菜, 竹田 篤史, 木下 哲, 東山 哲也, 丸山 大輔
2. 発表標題 シロイヌナズナ花粉管は無核の状態でも正常に伸長して胚珠へ到達する能力を保持している
3. 学会等名 日本植物学会 第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 元村 一基, Michael Borg, 武内 秀憲, 野田口 理孝, 竹田 篤史, 木下 哲, Frederic Berger, 東山 哲也, 丸山 大輔
2. 発表標題 カロースによりRNAの細胞間移行が阻害された花粉の解析
3. 学会等名 第9回植物RNA研究ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

立命館大学プロフィール http://research-db.ritsumei.ac.jp/Profiles/147/0014687/profile.html
--

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
---------	---------