

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20650

研究課題名（和文）植物受精卵が上下軸を作る仕組み～細胞の極性化と分裂タイミングの時空間連携～

研究課題名（英文）Understanding the mechanism of establishment of apical-basal axis-
Spatio-temporal coordination of cell polarization and division timing-

研究代表者

松本 光梨 (Matsumoto, Hikari)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10914153

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：植物の発生は単細胞である受精卵から始まる。ほとんどの植物では、受精卵は極性化した後、上下に非対称分裂する。非対称分裂に至るには、極性化と分裂のタイミングを連携させる必要があるが、その詳細な機構は不明である。本研究において代表者は、多数のマーカー株を用いたシロイヌナズナ受精卵のライブイメージングにより、極性化の推移、Ca波の減衰、細胞周期の進行を解析し、その順序と関係性を明らかにした。その結果、受精卵では伸長速度が一定ではなく、分裂直前に急速に早くなること、またその前後で起こる各事象の変化を見出した。今後、この急速な伸長期の制御機構を探ることで、時空間連携の仕組みの解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで植物の受精卵では、細胞伸長や核の移動という極性化が非対称分裂に必須だと判明している一方で、分裂タイミングを決める時間的制御の理解は進んでいなかった。本研究では、細胞周期の解析から、発生最初期の時間的制御の一端を解明することに世界で初めて成功した。細胞の極性化や非対称分裂は、植物の発生全般で見られる重要な現象であるため、本研究の知見は植物の発生の原理への理解につながる。また、受精卵は個体発生の原点であり、正常に極性化や非対称分裂することは、正常な種子・個体形成にも必要である。ゆえに本研究は、農業や育種といった応用研究への基盤として重要である。

研究成果の概要（英文）：Body axis formation is the first developmental event required for a unicellular zygote to develop into a multicellular organism. In most flowering plants, apical-basal axis is established by the asymmetrical zygote division. To achieve asymmetric division, the finishing of polarization and the timing of division must be coordinated, but the detailed mechanism is unknown. In this study, we performed live-cell imaging of Arabidopsis zygote with some markers to analyze the transition of polarization, Ca wave dynamics, and cell cycle progression. Also, we clarified the sequence and relationships among them. As a result, we found that the growth rate of zygote is not constant, but transfer rapid growth stage just before division, as well as the change of Ca wave dynamics and cell cycle progression that occur before and after this phase. In the future, we expect to elucidate the mechanism of spatio-temporal coordination by exploring the control mechanism of this rapid growth stage.

研究分野：植物発生

キーワード：胚発生 カルシウム ライブイメージング 細胞内動態 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

発生には、細胞分裂の方向と時期といった空間と時間の制御の連携が重要である。植物の受精卵では、細胞伸長や核の移動という極性が非対称分裂に必須だと判明している一方で、分裂タイミングを決める時間的制御の理解は進んでいない。近年、代表者らは、シロイヌナズナ受精卵のライブイメージング系を確立させ、世界で初めて受精卵の内部動態を追跡することに成功した。例えば、受精卵内部で上下に配向したアクチン繊維に沿ってミトコンドリアが連結して上方方向に移動するという極性化動態や、極性化の完了後に非対称分裂する間だけ、ミトコンドリアが球状に分離し、娘細胞への不等分配を助けるという役割を明らかにした (Kimata et al., 2020)。このことから、受精卵では、極性化の完了と非対称分裂のタイミングを適切に連動させる時空間連携の仕組みが存在し、それによって細胞内事象が制御される可能性を見出した。また、受精後に細胞上部からカルシウム振動 (Ca 波) が生じ、極性化が完了する時期に減衰して非対称分裂に至ることを見出し、① 極性化の完了が Ca 波の減衰を誘導し、② Ca 波の減衰によって細胞周期が進行することで、適切な非対称分裂に至るのではと考えた (図 1)。

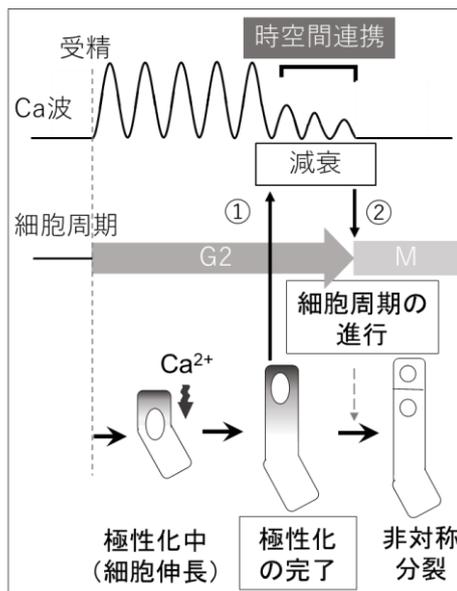


図 1 当初想定した時空間連携の仕組み

2. 研究の目的

本研究では、多数のマーカーや阻害剤を駆使したシロイヌナズナ受精卵のライブイメージングにより、極性化の推移、Ca 波の減衰、細胞周期の進行といった時空間連携に関与する事象の時系列を解析することで、発生の根幹をなす、時空間連携とはどのような仕組みなのか、その実態と機構に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、①極性化の完了が、Ca 波の減衰を誘導するか②Ca 波の減衰により、細胞周期が進行するかについて検証した。検証にあたり、まず極性化の指標として、細胞形状 (細胞輪郭) と細胞内部の変化に着目した。それぞれ細胞膜や細胞骨格を蛍光標識したマーカー株を作成し、ライブイメージング観察を行った。細胞周期の進行は、S/G2/M 期を判別することのできるマーカーに細胞膜を加えた多色株を作成し、判定した。また、Ca 波の動態に関しては、Ca イオンセンサーを導入した株をライブイメージングし、調べた。そして最終的にこれら各事象の順序を推察した。さらに、各事象に関連する阻害剤を与えることで、その上下関係も検討した。

4. 研究成果

(1) 極性化の完了が Ca 波の減衰を誘導するかの検証

極性化の完了のタイミングを明瞭にするため、極性化と共に起こる細胞伸長に着目した。細胞膜のマーカー株をライブイメージングしたところ、受精卵の伸長速度は一定ではなく、分裂前に急速に速度が上昇することを見出し、このステージを Rapid growth stage (RGS) と名付けた (Kang and Matsumoto et al., 2023; 図 2)。この RGS 以前は受精卵の先端は細くなるが、RGS 開始前後には先端が太くなることも明らかになり、受精卵の成長 (極性化) ステージを細分化することができた (図 2, 3)。RGS の終了後は、細胞伸長は停止し、その後分裂に至ったことから、RGS において極性化が完了すると考えられた。

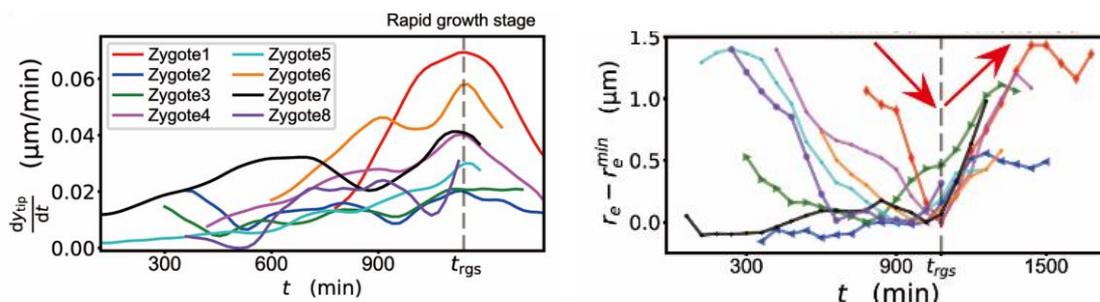


図 2 受精卵の伸長速度 (左) と先端半径の推移 (右)

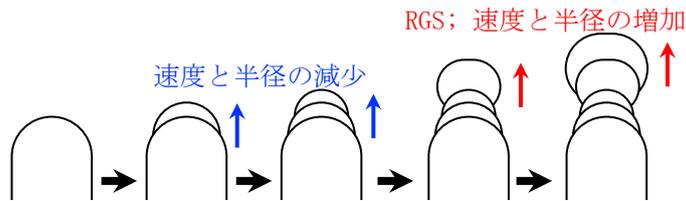


図3 受精卵の成長ステージ

次に Ca 波の減衰と極性化の完了のどちらが先に起こるかを調べるために、Ca マーカー株をライブイメージングした。Ca 波は RGS の間、高頻度で発振され、RGS の終了後に減衰することが明らかになった。このことから、Ca 波が高頻度で発振されることが、極性化を完了させるために必要であると考えた。実際に

Ca 阻害剤を与えると、受精卵の伸長は損なわれた。そこで、次に Ca 波が細胞内部の変化を制御するかを検証した。Ca 阻害剤の存在下で細胞骨格のマーカー株のライブイメージングを行った結果、Ca 波が特定の細胞骨格の制御に関わることを突きとめた。このことから、RGS 開始後、高頻度で発振される Ca 波が細胞骨格に働きかけ、極性化を完了させると考えられた(論文執筆中)。また、極性化の完了が Ca 波の減衰を引き起こすかを調べるため、受精卵において、微小管とアクチン繊維の重合阻害剤を Ca マーカー株に投与した。予備的な結果ではあるものの、どちらの阻害剤を与えた場合も、Ca 波は正常に発振され、減衰も損なわれなかったことから、極性化の完了は Ca 波の減衰の合図ではないと推察された。

(2) Ca 波の減衰により、細胞周期が進行するかの検証

まず細胞周期 (S/G2/M) と細胞膜の多色株の作出を試みたが、S/G2 期に関しては、観察可能な蛍光強度を保持したマーカー株を確立することができなかった。そこで、M 期と細胞膜の多色株を用いてライブイメージングした結果、細胞周期は RGS の後に M 期へと進行することが明らかになった。よって、細胞周期の進行は、極性化の完了後、Ca 波の減衰と同時期に起きていることが判明した。一方で、Ca 阻害剤下でも細胞の分裂タイミングは変化しなかったことから、Ca 波の減衰により M 期への移行が起きているわけではないと考えられた。

(1)と(2)の結果から、受精卵は分裂前の RGS において、高頻度の Ca 波で極性化を完了させた後、極性化の完了により細胞周期が進行することで、非対称分裂が達成されることが見出された(図4)。

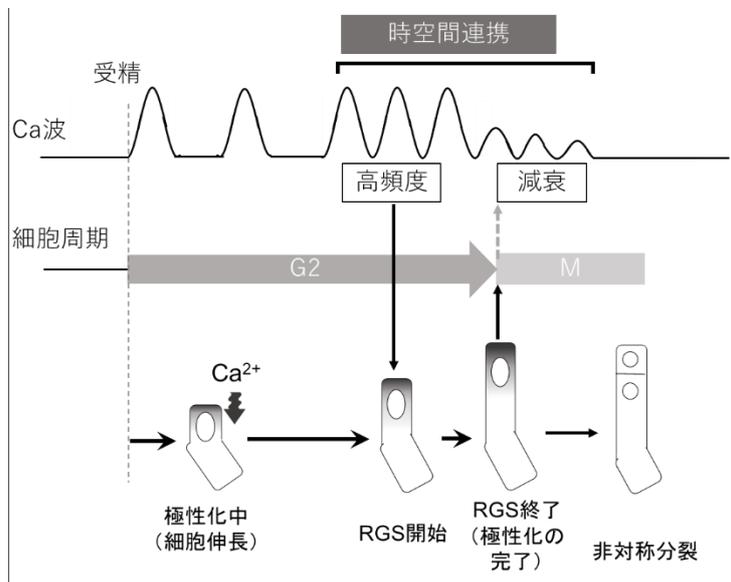


図4 実験結果から推定される時空間連携の仕組み

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kang Zichen, Matsumoto Hikari, Nonoyama Tomonobu, Nakagawa Sakumi, Ishimoto Yukitaka, Tsugawa Satoru, Ueda Minako	4. 巻 -
2. 論文標題 Coordinate Normalization of Live-Cell Imaging Data Reveals Growth Dynamics of the Arabidopsis Zygote	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	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） 10.1093/pcp/pcad020	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本 光梨, 中川 朔未, 檜垣 匠, 津川 暁, 石本 志高, 野々山 朋信, 康 子辰, 田中 美虹, 植田 美那子
2. 発表標題 ライブイメージング技術と顕微操作の統合により迫る細胞内ダイナミクス
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 光梨, 中川 朔未, 檜垣 匠, 津川 暁, 石本 志高, 野々山 朋信, 康 子辰, 植田 美那子
2. 発表標題 ライブイメージング解析から迫る、シロイヌナズナ受精卵の極性的な伸長機構
3. 学会等名 第64回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hikari Matsumoto, Zichen Kang, Tomonobu Nonoyama, Sakumi Nakagawa, Yukitaka Ishimoto, Satoru Tsugawa, Minako Ueda
2. 発表標題 Elucidation of elongation mechanism of Arabidopsis zygote using image analysis methods based on live-cell imaging
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023) (国際学会)
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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