

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23870014

研究課題名（和文）

光顕微操作技術の開発を基盤とした植物初期胚発生における細胞分裂パターン機構の解析

研究課題名（英文）

Analysis of the cell division patterning during plant early embryogenesis by developing the optical manipulation techniques

研究代表者

栗原 大輔 (KURIHARA DAISUKE)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：90609439

研究成果の概要（和文）：

胚発生過程は、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、植物初期胚発生における細胞分裂パターン制御の解析の基盤となる、*in vitro* 胚珠培養系を用いたライブイメージングと各種マーカーライン、また光顕微操作を用いた植物胚における1細胞レベルでの遺伝子発現誘導系を構築できた。また、胚発生過程のライブイメージングによって、初期胚においても細胞分裂のタイミングは厳密に同調しているわけではないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Multicellular animals and plants develop from the single-celled zygote to form the mature embryo. During embryogenesis, the zygote follows a pattern of cell division to form the body plan of the embryo. In this study, I performed live-cell imaging using *in vitro* ovule culture and the fluorescent marker lines in *Arabidopsis thaliana*. The data of live-cell imaging indicated that the timings of cell division are not strictly synchronized even in 4-cell embryo stage. Moreover, I established the gene induction system in a single-cell level in *Arabidopsis* embryo using the optical manipulation technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：植物胚発生、光顕微操作、細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

高等生物がもつ複雑な器官はすべて、受精卵という単細胞に由来する。胚発生過程は、この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。線虫における研究などでは、胚発生過程

において受精卵から分裂した細胞は、それぞれの細胞系譜に沿って分裂を繰り返し、器官を形成することが明らかとなってきている。しかしながら、高等動植物において、胚発生は細胞系譜よりむしろ各細胞の位置情報を利用していることが示唆されている (De Smet et al., 2010)。個々の細胞がその位置に

応じて、それぞれの機能を発揮することによって、1つの完全な胚が構築される。植物において胚発生過程における時空間情報に基づいた細胞間コミュニケーションによる形態形成のメカニズムの詳細は、未だ多くが未知のままである。

これまで植物の胚発生の研究には突然変異体を用いた解析が行われてきた。初期胚発生に異常が見られる突然変異体においても、最終的には完全な胚がつくられることより、植物において胚発生は柔軟な過程であると予想される。しかしながら、突然変異体の固定組織切片などを用いたこれまでの手法では、特定の時期、細胞における発現制御ができないために時空間情報を解析することができなかった。空間特異的に細胞の機能を制御し、その影響を解析することが、胚発生のダイナミックな過程を解析するためには欠かせない。

2. 研究の目的

これまでの植物胚発生研究における突然変異体の固定した組織の表現型解析といった時間情報が不足した現状を打開するために、シロイヌナズナ *in vitro* 胚珠培養系を用いたライブイメージングと、ヒートショックプロモーター系を用いた顕微鏡操作による単一細胞の機能制御を組み合わせることによって、時期特異的に特定の細胞を機能阻害できるのではと考えた。これらの技術によって、ダイナミックな細胞分裂を伴う胚発生過程において、個々の細胞の機能、そして位置情報がまわりの細胞に与える影響、ひいては形態形成における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ *in vitro* 胚珠培養系を用いたライブイメージング系の確立

シロイヌナズナの初期胚発生を受精卵からライブイメージングするため、*in vitro* 胚珠培養系の構築を行った。顕微鏡観察には細胞へのダメージが少ないスピニングディスク共焦点顕微鏡と、組織の深くまで励起できる二光子顕微鏡を用いた。

マーカーラインは、WOX2、WOX9 プロモーター (Ueda et al., 2011) を用いて、胚で特異的に染色体を可視化できるヒストン H2B-GFP、LTI6b-RFP により細胞膜を可視化した二重形質転換植物体を構築し、観察した。この胚珠における受精卵から、後期胚までの細胞生長・細胞分裂動態を数日間に渡っ

てイメージングした。

(2) 赤外線レーザー誘起遺伝子発現操作法 (IR-LEGO: Infrared laser evoked gene operator) を用いた時空間特異的阻害系の確立

特定の細胞のみ機能阻害する系として、狙った細胞に近赤外レーザーを照射することによって、ヒートショックプロモーター下の遺伝子を発現させる IR-LEGO システムと Cre/loxP 組換え系を組み合わせた。

特定の細胞機能を阻害する手法としては、ヒートショックプロモーターを用いた誘導発現系 (Kurup et al., 2005) を改良した。胚で強い発現活性を示す RPS5A プロモーターと dsRNA の間に loxP 配列を持つリンカー配列を挿入することによって、熱を与えたとき細胞のみヒートショックプロモーター下の Cre リコンビナーゼがリンカー配列を切除し、RNAi を誘導する系を用いる。この系を用いる利点としては、ヒートショックを与えた後、恒常的に RNAi を誘導できるという点である。RNAi のターゲットとしては、オーロラキナーゼ・ハスピンキナーゼとした。オーロラキナーゼを発現阻害することによって染色体の不等分裂を (Kurihara et al., 2008)、ハスピンキナーゼを阻害することによって細胞分裂方向の異常を引き起こすことが期待される (雑誌論文①)。時空間特異的に、特定の細胞のみに細胞分裂異常を誘導するし、その後の胚発生過程をイメージング解析することによって、植物胚発生過程における時期特異的な個々の細胞の機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ *in vitro* 胚珠培養系を用いたライブイメージング系の確立

in vitro 胚珠培養観察系の構築について、*in vitro* 培養条件の検討、高輝度な核可視化形質転換体および細胞膜可視化形質転換体の選抜、また顕微鏡による撮像条件の検討によって、初期胚から後期胚までの数日間に渡る胚発生ライブイメージングに成功した。初期胚発生ライブイメージングによって、4細胞期胚といった初期胚においても、個々の分裂は数十分ずれている場合もあり、細胞分裂が厳密に同調しているわけではないことが分かった。しかしながら画像解析ソフト Imaris によって、胚および胚柄の細胞核をトラッキングした結果、初期胚 (8、16、32細胞期) では細胞分裂にかかる時間はある程度一定であることがわかった (図 1、図 2)。

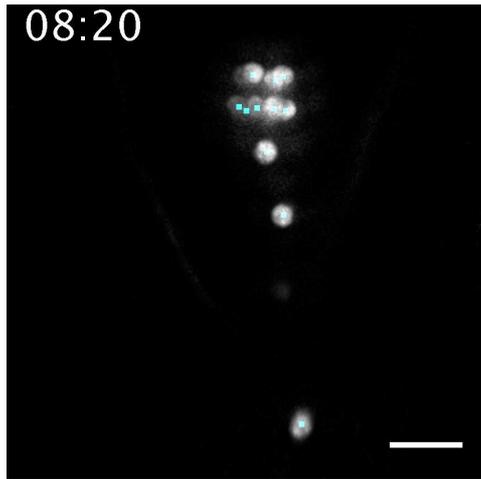


図1. シロイヌナズナ *in vitro* 胚珠培養系を用いた胚発生ライブイメージングと細胞核トラッキング。水色は Imaris で認識されている細胞核。数字は時：分。バーは 30 μm 。

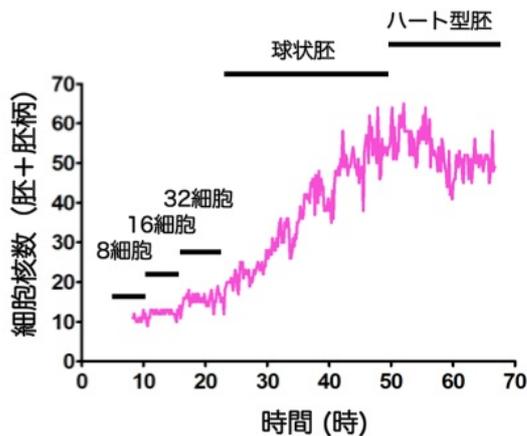


図2. Imaris でのトラッキングによる胚発生過程における細胞数増加。ハート型胚で細胞数が減少しているのは、細胞核数が多くなり、個々の細胞核をきちんと認識できていないことに起因する。

しかしながら、上記では胚のすべての細胞核を標識していたため、胚発生が進んで行くにつれて、細胞核数が多くなり、内側にある細胞核を認識することが難しく、すべての細胞核をトラッキングすること、また細胞分裂のタイミングを判断するのが困難であった(図2)。そのため、細胞分裂期マーカである *CycB1;2p::CycB1;2-YFP* と *WOX2, WOX9p::H2B-RFP* を掛けあわせることによって、どの細胞が分裂しているかをより詳細に解析できるようになった。

(2) IR-LEGO を用いた時空間特異的阻害系の確立

IR-LEGO によるヒートショック系の構築のため、ヒートショックプロモーター下に *H2B-GFP* をつないだ形質転換体の根を用いて、詳細に条件検討を行ったところ、11 mW のレーザーパワーで 1-2 秒照射することによって、1 細胞レベルで遺伝子発現が誘導できることが確認された(雑誌論文④⑥)。また、*in vitro* 胚珠培養下の胚において、レーザー照射条件の検討を行ったところ、8 細胞期胚について、11 mW のレーザーパワーで 4 秒照射することによって、1 細胞レベルでの遺伝子発現に成功した(雑誌論文④)。

時空間特異的阻害系としては、ヒートショックプロモーター下に *Cre* リコンヒビナーゼを発現、*loxP* 配列に囲まれた *GUS* 配列が除かれ、*AtAUR1/2, AtAUR3, AtHaspin, GFP, tdTomato* をターゲットとした RNAi を誘導する形質転換体を構築した。

このように、植物初期胚発生における細胞分裂パターン制御の解析の基盤となる、*in vitro* 胚珠培養系を用いたライブイメージングと各種マーカーライン、また光顕微操作を用いた 1 細胞レベルでの遺伝子発現誘導系を構築できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Kurihara D., Hamamura Y., Higashiyama T. Live-cell analysis of plant reproduction: Live-cell imaging, optical manipulation, and advanced microscopy technologies (2013) *Dev Growth Differ.* 55: 462-473, 査読あり, doi: 10.1111/dgd.12040.

② Luo L., Ando S., Sasabe M., Machida C., Kurihara D., Higashiyama T., Machida Y. Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2 protein required for leaf morphogenesis consistently forms speckles during mitosis of tobacco BY-2 cells via signals in its specific sequence. (2012) *J. Plant Res.* 125: 661-668, 査読あり, doi: 10.1007/s10265-012-0479-5.

③ Kurihara D., Hamamura Y., Higashiyama T. Live-Cell Imaging of Double Fertilization and Embryogenesis in Plants (2012) *Conference Proceedings APMC 10 / ICONN 2012 / ACMM 22*, 1055: 1-2, 査読あり

- ④Adachi S., Minamisawa K., Okushima Y., Inagaki S., Yoshiyama K., Kondou Y., Kaminuma E., Kawashima M., Toyoda T., Matsui M., Kurihara D., Matsunaga S., Umeda M. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in Arabidopsis. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A., 108: 10004-10009, 査読あり, doi: 10.1073/pnas.1103584108.
- ⑤栗原大輔, 細胞分裂期において分裂期キナーゼが制御する染色体動態 (2011) Plant Morphology, 23: 81-89, 査読なし, <http://dx.doi.org/10.5685/plmorphol.23.81>
- ⑥Kurihara D., Matsunaga S., Omura T., Higashiyama T., Fukui K. Identification and characterization of plant Haspin kinase as a histone H3 threonine kinase. (2011) BMC Plant Biology, 11: 73, 査読あり, doi: 10.1186/1471-2229-11-73.

[学会発表] (計 21 件)

- ①東山哲也, 栗原大輔, 組織深部のライブイメージングと光細胞操作で花の内部を探る, 日本女子大学バイオイメージングセンター第4回公開シンポジウム, 東京, 2012年10月27日, 招待講演
- ②栗原大輔, 牛王啓太, 東山哲也, 光顕微操作とライブイメージングで迫るパターン形成, 日本植物学会第76回大会, 兵庫, 2012年9月17日, 口頭発表
- ③栗原大輔, 東山哲也, ホロニックコミュニケーションを担うシグナリング分子の可視化に向けて, 日本植物形態学会第24回総会・大会, 兵庫, 2012年9月14日, ポスター発表
- ④栗原大輔, 光顕微操作とライブイメージングで迫る植物胚発生, 第53回日本植物生理学会年会, 京都, 2012年3月16日, 口頭発表
- ⑤Kurihara D., Hamamura Y., Higashiyama T. Live-Cell Imaging of Double Fertilization and Embryogenesis in Plants, APMC 10 / ICONN 2012 / ACMM 22, Perth (Australia), Feb 8th, 2012, 招待講演
- ⑥栗原大輔, 牛王啓太, 東山哲也, シロイヌナズナ胚発生過程のライブイメージング, 日本植物学会第75回大会, 東京, 2011年9月18日, 口頭発表
- ⑦栗原大輔, 牛王啓太, 東山哲也, 光操作技術によるシロイヌナズナ胚発生過程の解析, 日本植物形態学会第23回総会・大会, 東京, 2011年9月16日, ポスター発表
- ⑧栗原大輔, 東山哲也, Live-cell imaging of embryo development in Arabidopsis

thaliana, 第63回日本細胞生物学会大会, 北海道, 2011年6月27日, ポスター発表

[その他]

ホームページ等

<http://www.liveholonics.com>

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/paper/2011-17/07.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 大輔 (KURIHARA DAISUKE)

名古屋大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号: 90609439

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし