

植物の初期胚イメージング系の発展

植田 美那子

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
(名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻生殖分子情報学研究室 兼任)
〒464-8602 名古屋市千種区不老町

Minako Ueda

Recent innovations of embryo imaging methods

Key words: *Arabidopsis*, cell fate, embryogenesis, geometric analysis, live-cell analysis

Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM) & Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8402, Japan

1. はじめに

被子植物は複雑な形態を有するが、それらはすべて受精卵に由来する。形づくりの基盤となる体軸は初期胚で確立され、特に、頂端-基部軸（上下軸）は最初に形成される。この軸に沿って受精卵は不等分裂し、生じた頂端細胞と基部細胞が個々の運命にしたがって発生することで、植物体の茎頂-根端パターンが構築される（図1）。つまり初期胚発生には、体軸形成・運命獲得・パターン形成といった、発生の基盤をなす仕組みが詰まっていると言えるが、被子植物の胚発生は母組織の奥深くで進行するという特性から、発生過程を詳細に解析する手法は乏しく、個々の細胞の分裂動態や、それを制御する仕組みについてはほとんど研究されてこなかった。しかし近年、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において、コンピューター解析による胚の三次元構造の再構築や、胚珠の *in vitro* 培養によるライブセル解析など、さまざまな研究が進んできた。そこで本稿では、これらの最新手法を紹介することで、今後の胚発生研究の展望について考えたい。

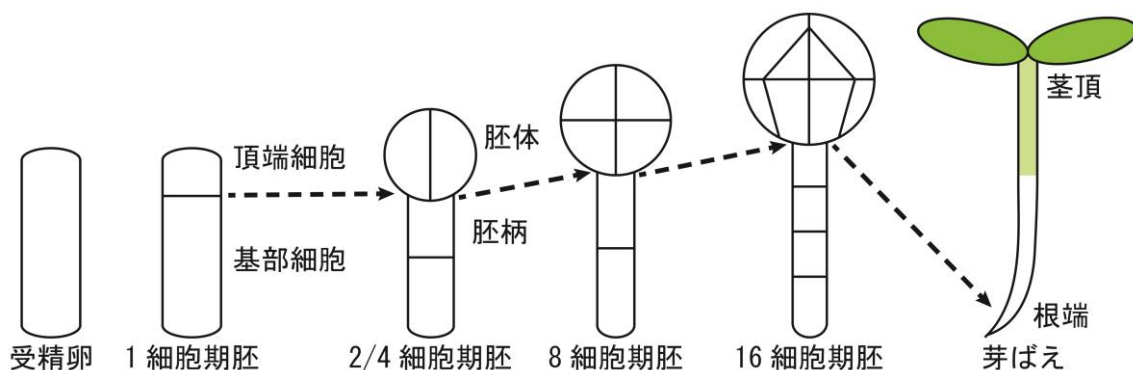


図1. シロイヌナズナの胚発生

シロイヌナズナの受精卵から初期胚が発生する様子を示した。点線は頂端細胞と基部細胞の系譜の境界面を示す。

2. シロイヌナズナ胚の細胞形態を三次元的に解析する手法の確立

近年、胚の観察画像をコンピューター解析するというジオメトリック（幾何学）解析法が開発され、さまざまな発生ステージの胚において、個々の細胞がどのような容積をもち、どの方向に分裂するかといった特徴を三次元的に理解できるようになった（Yoshida et al. 2014）。この手法では、蛍光色素（FM4-64 あるいは propidium iodide）によって細胞輪郭を可視化した胚を透明化し、それを 0.1 μm 間隔という高密度で観察する。得られた光学切片を三次元画像解析ソフトウェア（MorphoGraphX）で処理することで、胚内部の個々の細胞の形態やサイズ、細胞分裂面の位置やその面積など、多様な情報を統計的に解析することができる（Kierzkowski et al. 2012）。古くから、細胞は分裂面の面積が最小になるように分裂すると考えられてきたが、この様式での分裂パターン予測と実際の胚の三次元再構成画像を比較したところ、細胞分裂面は常に最小面積になるわけではないことが判明した（Yoshida et al. 2014）。例えば、4 細胞期胚や 8 細胞期胚が形成される際の分裂面は最小面積になる位置に形成されるものの、8 細胞期胚の各細胞が非対称分裂して胚の内層と外層が生じる際の分裂面は、平面的ではあるものの、最小面積にはならない位置に形成される（図 2 の上段）。一方、ドミナントネガティブ型の BODENLOS（オーキシン応答の制御因子）を強制発現させることでオーキシン非感受性にした株では、8 細胞期胚の各細胞は分裂面が最小面積になる位置で分裂するため、胚に内層と外層が形成されない（図 2 の下段、Hamann et al. 1999）。オーキシンが蓄積することが知られている他の胚細胞でも同様の結果が得られたことから、胚の細胞は本質的には細胞分裂面を最小面積にする性質をもつものの、オーキシン応答を用いた制御機構によって分裂面の位置が調整されることで、内外層の分離といった胚のパターン形成が実現すると考えられる。

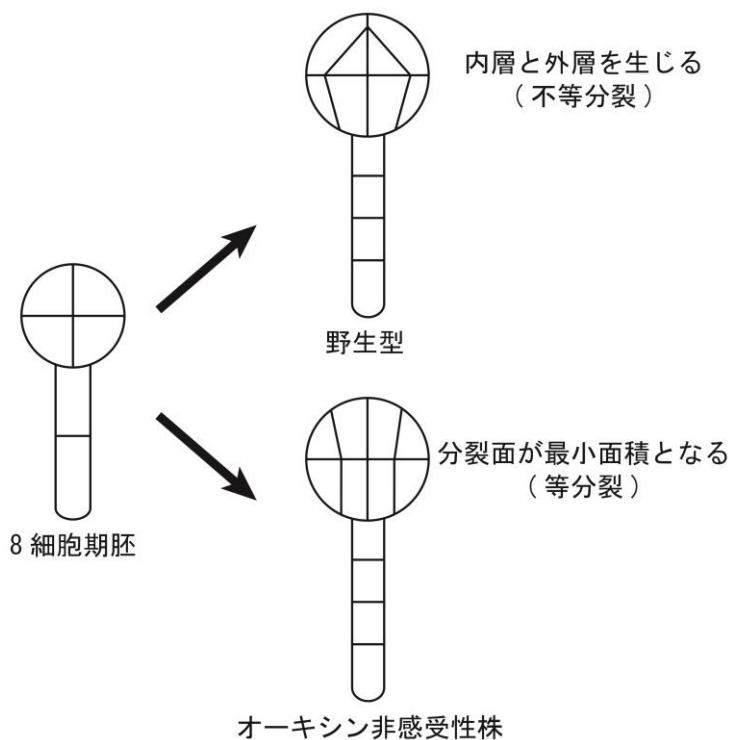


図 2. 細胞分裂面の制御様式

シロイヌナズナ胚の三次元立体構築によって判明した、8 細胞期胚から 16 細胞期胚になる際の細胞分裂の様式（上段）。オーキシンに応答できない株では等分裂になる（下段）。

3. シロイヌナズナ胚珠の *in vitro* 培養による胚のライブイメージング

前述した胚の三次元解析によって、個々の細胞の形態や分裂面を詳細に比較することが可能となった。しかし、これは多数の固定胚による解析であるため、細胞分裂の所要時間や分裂順序といった時間情報や、どのような位置や形の細胞が実際にどのように分裂してどの組織になるかという系譜を知ることはできない。これらを知るには、一つの胚の発生を追跡できるラ

ライブイメージング系が必要になる。これまで、タバコの単離受精卵を *in vitro* 培養して植物体まで成長させる方法は報告されているが、多様な変異体や分子マーカーが整備されたシロイヌナズナでは、受精卵を培養できる方法はいまだ確立されていない (He et al. 2007)。しかしながら、シロイヌナズナでは、胚を含む母組織 (胚珠) を単離して *in vitro* 培養する方法は報告されている (Sauer & Friml 2004)。この方法では、受精卵や若い胚を用いた際の植物体の発生率は低く、初期胚の形成過程のライブイメージングには適さなかったが、近年、培地の組成を変えることで、成功率を大幅に改善できることが明らかになった (Gooh et al. 2015)。さまざまな成分検討の結果、Nitsch 培地とトレハロースを組み合わせることで、胚珠の生存率と胚の発生率がともに向上したのである。この系を用いて、胚の核と細胞膜のそれぞれを蛍光標識した株の胚珠を顕微鏡下で培養することで、受精卵が後期胚まで発生する様子を一連の過程としてライブイメージングすることが可能となった (Gooh et al. 2015)。この際、胚珠は成長にともなって肥大するので、数日にわたるライブイメージングでは、胚珠が視野から逃げるといった問題が生じるが、ポリジメチルシロキサン類 (PDMS) を素材とするマイクロピラーアレイを培地容器に被せ、そのなかに胚珠を置くことで、胚珠を定位置に保持することができる (Gooh et al. 2015, Park et al. 2014)。この *in vitro* 胚珠培養系を用いることで、受精卵を起点とする細胞系譜を追跡できるだけでなく、それぞれの細胞分裂の所要時間や、発生運命が次第に確立される様子も観察することが可能となった。例えば、基部細胞系列 (胚柄) の発生に重要であることが知られている *WOX8* 遺伝子の発現を蛍光標識したマーカーをライブイメージングすると、受精卵ですでに蛍光シグナルが検出され、その不等分裂後 (1 細胞期胚) に頂端細胞と基部細胞の両方で蛍光が観察されたあと、次の細胞分裂後 (2 細胞期胚) によりやく基部細胞の系列に限局した (Ueda et al. 2011)。一方、*WOX8* とは逆に胚の頂端領域で働く *DRN* 遺伝子のマーカーでは、受精卵では蛍光が観察されず、不等分裂後に頂端細胞で発現が始まり、その系譜で発現が受け継がれた (Cole et al. 2009)。これらの観察結果から、頂端と基部の運命は一律に決定されるのではなく、受精卵から発現している遺伝子や、不等分裂後に発現し始める因子の働きによって、次第に細胞性質が確立されていくと考えられる。

4. 胚の特定細胞を狙った破壊による細胞運命の転換

上記のライブイメージング中の胚に対し、長波長の近赤外光を用いたフェムト秒パルスレーザーを照射することで、発生中の胚内部にある単一細胞だけを狙って破壊することも可能となった (Gooh et al. 2015)。この系を用いて 1 細胞期胚の頂端細胞のみを破壊した場合、残された基部細胞の系譜から頂端細胞の様式で細胞分裂を始めるものが現れた (図 3)。この際、基部細胞は一旦分裂して細胞数を増やしたのち、上部の細胞のみを頂端細胞に転換させるという動態が観察されたことから、基部細胞を保持しつつ、頂端細胞を補填するという発生戦略が読み取れる。このとき、基部細胞系譜の上部にある細胞では、前述の *WOX8* の発現は失われ、かわりに *DRN* の発現が始まったことから、細胞運命が分子レベルで切り替わったと考えられる (図 3)。頂端細胞は、植物体のほとんどを生み出す胚体のもととなる始原細胞であることから、胚の補助組織である胚柄の中から新たな頂端細胞が生まれて胚体が補償されるという制御は、植物の発生戦略として理にかなっていると言える。発生の進んだ胚に対しても同様のレーザー照射をおこない、胚体と胚柄の境界を分断したところ、球状胚期では残された胚柄から二次胚が生じるが、より後期の初期

心臓型胚期では、胚柄はもはや分裂しないことも明らかとなった (Liu et al. 2015)。このことから、胚柄がもつ胚体の補償能力は発生ステージに依存することが明らかになった。胚柄は発生後期には縮退して死滅するので、胚体が十分に成長したあとで補償能力を失うことで、胚柄としての役割を終えると考えられる。

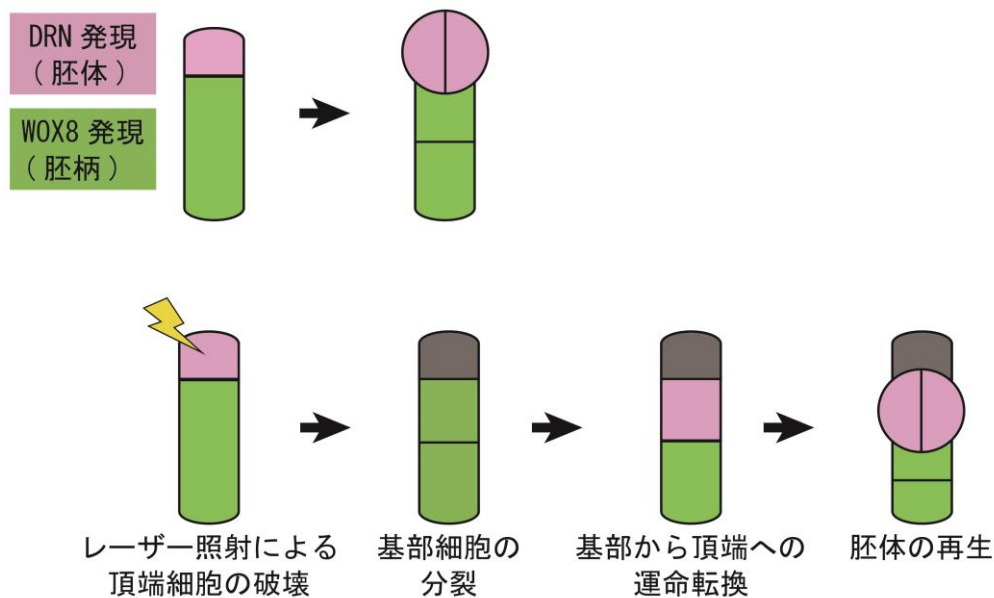


図3. 細胞破壊による運命転換の誘導

シロイヌナズナ初期胚へのレーザー照射実験の結果を模式的に示した。上段は通常状態（レーザー照射なし）の発生様式を、下段はレーザー照射後の発生様式を示す。桃色は *DRN* 遺伝子を発現する細胞、緑色は *WOX8* 遺伝子を発現する細胞、灰色は死滅した細胞を表す。

5. 今後の展望

本稿では、コンピューター解析を用いた胚の細胞形態の詳細な比較、ライブ観察による時空間的な動態変化、単一細胞を狙った破壊による運命転換という、3つの最新手法について紹介した。今後は、これらを組み合わせることで、より精緻な解析が可能になると考えられる。例えば、細胞の運命が転換する際、遺伝子発現や分裂パターンだけでなく、細胞の形態や容積も変わると考えられるので、それらを時系列に沿って詳細に比較することで、細胞のどのような変化が端緒となって細胞運命の転換に至るかを明らかにできるかもしれない。さらに、細胞形態や遺伝子発現の変化の解析に加え、細胞内構造（細胞骨格やオルガネラなど）や生理状態（代謝活性やエピジェネティック制御など）についても、時空間的かつ定量的に解析する手法が確立されれば、胚内部のそれぞれの細胞がどのように変化することで、胚全体としての発達に貢献しているかについても、包括的に理解できると期待される。

引用文献

Cole, M., Chandler, J., Weijers, D., Jacobs, B., Comelli, P., & Werr, W. 2009. DORNROSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the Arabidopsis embryo. *Development* 136: 1643-1651.

- Gooh, K., Ueda, M., Aruga, K., Park, J., Arata, H., Higashiyama, T., et al. 2015. Live-Cell Imaging and Optical Manipulation of Arabidopsis Early Embryogenesis. *Dev. Cell* 34:242-251.
- Hamann, T., Mayer, U., & Jurgens, G. 1999. The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development* 126: 1387-1395.
- He, Y.C., He, Y.Q., Qu, L.H., Sun, M.X., & Yang, H.Y. 2007. Tobacco zygotic embryogenesis in vitro: the original cell wall of the zygote is essential for maintenance of cell polarity, the apical-basal axis and typical suspensor formation. *Plant J.* 49: 515-527.
- Kierzkowski, D., Nakayama, N., Routier-Kierzkowska, A.L., Weber, A., Bayer, E., Schorderet, M., et al. 2012. Elastic domains regulate growth and organogenesis in the plant shoot apical meristem. *Science* 335: 1096-1099.
- Liu, Y., Li, X., Zhao, J., Tang, X., Tian, S., Chen, J., et al. 2015. Direct evidence that suspensor cells have embryogenic potential that is suppressed by the embryo proper during normal embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112: 12432-12437.
- Park, J., Kurihara, D., Higashiyama, T., & Arata, H. 2014. Fabrication of microcage arrays to fix plant ovules for long-term live imaging and observation. *Sensor Actuat B-Chem* 191: 178-185.
- Sauer, M. & Friml, J. 2004. *In vitro* culture of Arabidopsis embryos within their ovules. *Plant J.* 40: 835-843.
- Ueda, M., Zhang, Z., & Laux, T. 2011. Transcriptional activation of Arabidopsis axis patterning genes WOX8/9 links zygote polarity to embryo development. *Dev. Cell* 20: 264-270.
- Yoshida, S., Barbier de Reuille, P., Lane, B., Bassel, G.W., Prusinkiewicz, P., Smith, R.S., et al. 2014. Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Dev. Cell* 29: 75-87.