

## 受精卵の極性化動態とその制御機構

木全 祐資

名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所  
〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町

### The dynamics and molecular pathway regulating the zygote polarization

Yusuke Kimata

Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University  
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

Keywords: axis formation, cytoskeleton, live imaging, vacuole, zygote polarization

DOI: 10.24480/bsj-review.11b6.00188

#### 1. はじめに

初期胚発生は植物の形態形成の基盤となるプロセスである。植物は非常に複雑な形態をもつが、それらは全て一つの始原細胞である受精卵に由来する。受精卵から複数回の細胞分裂を経て胚が形成されていく過程で、将来の様々な器官の基礎となる構造のパターンが形作られる。この際に重要になるのが胚の内部での方向性、つまり体軸の確立である。受精卵が無秩序に分裂していくだけでは単なる細胞塊でしかなく、体軸に沿って胚の各細胞が秩序だつて細胞分裂・分化を行うことで、適切なパターン形成が可能となる。

植物の主要な体軸は、葉や花といった地上部と根からなる地下部を結ぶ上下の方向性を決める「頂端-基部軸」である。これまで、モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究から、頂端-基部軸が形成される過程が明らかになってきた (図 1)。卵細胞は頂端側に核、基部側に巨大な液胞を配するという頂端-基部方向の極性を持つが、受精後には核が細胞の中央に移動するとともに、液胞が細胞全体に散在する (脱極性化) (Faure *et al.*, 2002)。その後、受精卵は急激に細胞伸長し、核が頂端側に、液胞が基部側へと再び配置される (再極性化) (Ueda *et al.*, 2011)。細胞伸長が完了すると、移動した核の位置に細胞分裂面が形成されるので、受精卵は上下に不等分裂して 1 細胞期胚となる (Mansfield & Briarty, 1991)。不等分裂によって生み出された小さな頂端細胞は、特徴的なパターンで分裂を繰り返して胚体を形成し、将来的に植物体のほぼ全体を構成する一方で、大きな基部細胞から形成される胚柄は、最上部の細胞が根の一部となる以外はアポトーシスで死滅する (Jürgens & Mayer, 1994)。したがって、受精卵が不等分裂するための極性化の過程こそが、頂端-基部軸を形成するための原点であると言える。このように受精卵の不等分裂によって頂端-基部軸を形成する過程は、ヒバマタのような藻類でも観察されることから植物に広く共通した仕組みであると考えられるが (Goodner & Quatrano, 1993)、その詳細な制御機構は未だに十分に理解されていない。

これまで受精卵の極性化過程の解析が進展していなかったのには、大きく 2 つの原因があ

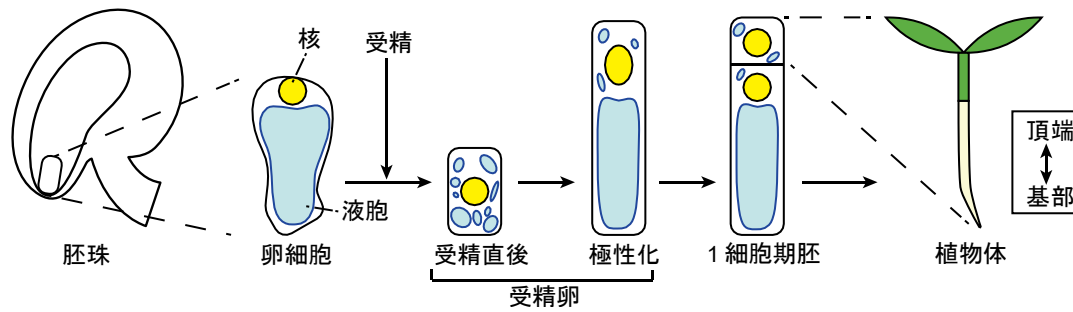


図1 シロイヌナズナの胚発生過程の模式図

固定サンプルの観察から推測されていた胚発生過程。受精卵が極性化して不等分裂することにより、将来の植物体の頂端-基部軸が形成される。

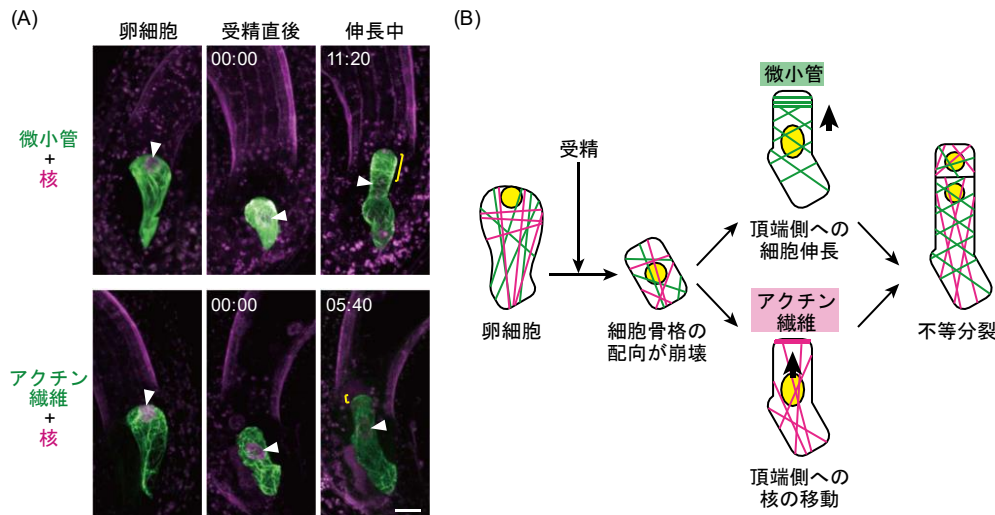
ると考えられている。まず第一に、植物の受精卵は動物とは異なり、母組織である胚珠に含まれているため、観察が困難であるという点である。前述のように、受精卵が極性化する際には、核や液胞といった細胞の内部構造の形態や配置がダイナミックに変化すると考えられている。しかしながら、この過程を生きたまま直接観察することができていなかったため、これまでの知見は固定サンプルの観察結果から断片的に推測されたにすぎない。そのため、受精卵内部のどのような動態が極性化に寄与するのかという、時空間な知見は全く得られていなかった。第二に、植物では遺伝子の冗長性が比較的高いため、変異体探索に基づく制御因子の同定が難しいことが挙げられる。そのため、単一遺伝子の欠損で極性化や不等分裂に表現型が現れず、逆に発生に重要な遺伝子群が欠損すると、その多くが胚性致死となってしまう。これらが原因で、受精卵で極性化に失敗する変異体はわずかしき得られておらず (Bayer *et al.*, 2009, Lukowitz *et al.*, 2004, Ueda *et al.*, 2011, Ueda *et al.*, 2017), 制御因子もほとんど同定されてこなかった。したがって、極性化がどのような分子機構によって制御されているのかも、ほとんど不明であった。

そのような中、近年これらの難点を克服できる新たな解析手法が開発されたことで、極性化の制御機構について、従来法では得られなかった新たな発見がなされつつある。本稿ではそれらについて概説し、頂端-基部軸をはじめとする、植物の体軸の形成機構に関する今後の展望を議論する。

## 2. 微小管とアクチン繊維は受精前後に大きく配向が変化する

極性化の過程での受精卵の内部動態を詳細に理解するために、受精卵をライブイメージングできる手法の確立が望まれていた。Gooh ら (2015) は胚珠を顕微鏡下で長期間培養できる液体培地の組成を見出し、受精卵が心臓型胚まで発生していく際の核の動態を、胚珠越しに詳細に観察することに成功した。Kimata ら (2016) はこの手法をさらに応用し、植物組織の深部観察に適した二光子励起顕微鏡 (Mizuta *et al.*, 2015) を用いることで、受精卵の内部構造までも鮮明に観察することを可能にした。

Kimata ら (2016) はまず、微小管やアクチン繊維といった細胞骨格の配向に注目して観察した (図 2A)。一般的に、これらの細胞骨格は力学的な細胞の形態制御や、小胞輸送の方向



**図2 受精卵での細胞骨格の動態と役割**

(A) 微小管マーカーライン (上) とアクチンマーカーライン (下) の卵細胞のスナップショットと受精卵のタイムラプス像。二光子励起顕微鏡で撮影した。左上の数字は撮影開始からの経過時間 (時間:分), 白矢尻は核, 黄色括弧は微小管のリング構造 (上) とアクチン繊維のキャップ状の蓄積 (下) をそれぞれ示す。スケールバー=10  $\mu\text{m}$ 。(B) 微小管とアクチン繊維の動態と役割のモデル図。(画像の一部は Kimata *et al.*, (2016), PNAS 113 (49), 14157-14162 から転用。)

制御などを担うことで, 細胞内の極性を生み出すのに重要な役割を果たすと考えられている。そこで, 受精卵での微小管の動態を可視化するべく, チューブリンとヒストンタンパク質の蛍光マーカーを卵細胞と受精卵で特異的に発現する EC1 プロモーター (Sprunck *et al.*, 2012) 下で発現させることで, 核の位置から極性化の進行度合いを把握しながら微小管の動態を観察できる二重マーカーライン (ECp::TUA6-mClover+ECp::H2B-tdTomato) が作出された。まず, このマーカーラインで卵細胞を観察した結果, 核は頂端側に位置しており, 微小管は頂端-基部方向に沿って配向することがわかった。一方で, 受精直後には細胞全体が縮小して, 核が細胞の中央に移動するとともに, 微小管の配向が崩れてバラバラになることが見出された。その後, 受精卵が伸長する際には, 微小管が頂端側でリング状の構造を形成し, 基部側では螺旋状に配向することが明らかになった。細胞伸長が完了すると, このリング構造は消失した。不等分裂の過程では, 微小管はスピンドル (紡錘糸) などの分裂装置に集中して局在した。次に, アクチン繊維についても, アクチン結合タンパク質とヒストンタンパク質の二重蛍光マーカー (ECp::Lifeact-VENUS+ ECp::H2B-tdTomato) を用いて同様に観察された。その結果, 卵細胞ではアクチン繊維がメッシュ状に配向するが, 受精後には微小管と同様に配向が崩れることが判明した。伸長中の受精卵においては, アクチン繊維は頂端側でキャップ状に蓄積するとともに次第に頂端-基部方向に沿って配向した。

Kimata ら (2016) はこれらの細胞骨格の配向を可視化するに留まらず, 細胞形態の抽出や, 細胞骨格の繊維抽出 (Higaki *et al.*, 2010, Ueda *et al.*, 2010) といった画像処理によって, 細胞のサイズや, 細胞骨格繊維の密度・平均角度・平行度・束化度 (太さ) を詳細に定量解析し

た。これによって、受精後に細胞のサイズが小さくなることに加え、卵細胞での微小管とアクチン繊維の配向が受精直後にともに崩壊することや、伸長中の受精卵で微小管が頂端側でリング状に、アクチン繊維が頂端-基部方向に沿って配向することが定量的に確認された。さらに、Kimata ら (2016) は細胞骨格の重合阻害剤の存在下で受精卵の極性化過程を観察したことで、微小管が頂端側への方向性をもった細胞伸長を、アクチン繊維が頂端側への核の移動を、それぞれ独立して制御することを突き止めた (図 2B)。

以上のように、受精卵での細胞骨格のライブイメージングが達成されたことで、微小管やアクチン繊維の配向が受精にともなって崩れ、その後、それぞれが独自のパターンで再配向することが見出された。つまり、核の位置だけでなく、細胞骨格の配向という観点からも、受精後に脱極性化が起きていると考えられる。さらに、微小管とアクチン繊維が、極性化においてそれぞれ別の現象を制御することもはじめて明らかになった。

### 3. 液胞は柔軟に変形しながら受精卵の基部側に不等分配される

前述のように、固定サンプルの観察では受精前後で液胞の配置がダイナミックに変化することから、液胞が受精卵内部の極性を制御するうえで重要な役割を担うことが示唆されていた (Ueda *et al.*, 2011)。そこで Kimata ら (2019) は、液胞膜に局在するピロホスファターゼ VHP1 の蛍光マーカー (Segami *et al.*, 2014) とヒストンタンパク質の蛍光マーカーを同時に導入した二重マーカーライン (EC1p::VHP1-mGFP + ECp::H2B-tdTomato) をライブイメージ

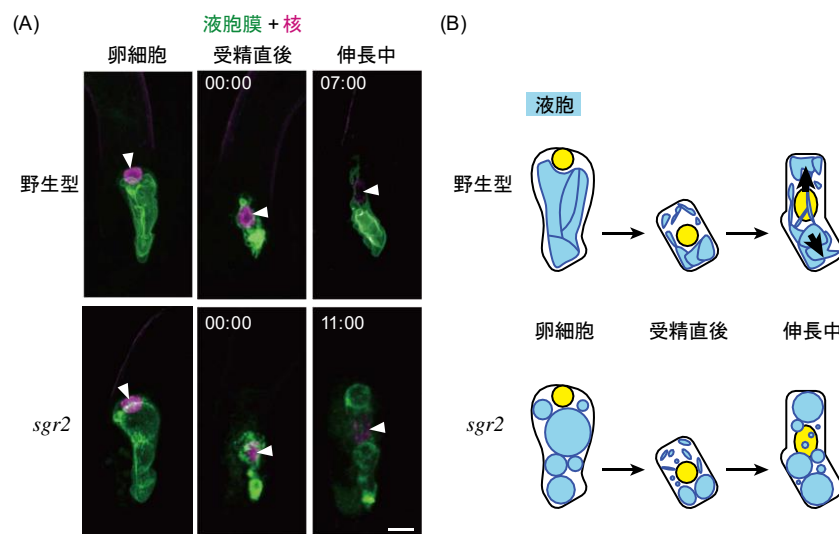


図3 受精卵での液胞の動態

(A) 野生型 (上) と *sgr2* 変異体 (下) における液胞マーカーラインの卵細胞のスナップショットと受精卵のタイムラプス像。二光子励起顕微鏡で撮影した。左上の数字は撮影開始からの経過時間 (時間:分), 白矢尻は核をそれぞれ示す。スケールバー=10  $\mu\text{m}$ 。(B) 野生型 (上) と *sgr2* 変異体 (下) の液胞の動態のモデル図。野生型では液胞が柔軟に変形しながら基部側に偏ることで核が頂端側へ移動できる。一方で、*sgr2* 変異体では巨大な液胞が頂端側に残留するために、核が頂端側へ移動できない。(画像の一部は Kimata *et al.*, (2019), PNAS 116 (6), 2338-2343 から転用。)

グすることで、受精卵での液胞の動態を可視化した (図 3A)。すると、卵細胞で基部側に観察された巨大な液胞が、受精後に急激に縮小して細胞全体に拡散することが判明した。つまり、液胞の配置についても、受精によってその極性が崩れると考えられる。その後、伸長中の受精卵では、液胞が核の周辺でチューブ状の構造を形成しながら、最終的に大部分の液胞が基部側に偏って分配された (図 3B)。

Kimata ら (2019) は、このダイナミックな液胞の動態の意義を探るべく、液胞膜の柔軟性が損なわれる *sgr2* 変異体 (Kato *et al.*, 2002, Toyota *et al.*, 2013) でも同様に受精卵を観察した (図 3A)。まず *sgr2* 変異体の卵細胞では液胞が球に近い形状をしていたものの、受精後の液胞の縮小と細胞全体への拡散には顕著な異常は認められなかった。しかしながら、受精卵が伸長し始めると、核周辺の液胞のチューブは観察されず、頂端側に巨大な丸い液胞が残留し、核も細胞の中央付近に留まった。結果として、受精卵は野生型に比べてより対称的な分裂を示した。このような野生型と *sgr2* 変異体の液胞形態の違いについても、画像解析によって液胞の真円度、周長、面積を比較することで確認された。さらに、アクチン重合阻害剤の存在下では、野生型の受精卵においても核周辺の液胞のチューブが消失するのに加えて、頂端側により多くの液胞が残留して等分裂に近い分裂が観察された。以上のことから、液胞のライブイメージングによって、液胞が核の周辺でチューブ状になるなど、柔軟にその形態を変化させながら基部側に偏ることが受精卵自体の極性化にも必要であることが明らかにされた (図 3B)。また、そのような液胞の動態はアクチン繊維によって制御されることも示唆された。

#### 4. 受精後の転写活性化が受精卵の極性化に重要である

前章までで述べたように、細胞骨格や液胞などの動態が受精卵の極性化に寄与することが明らかになってきた。したがって、受精後にこれらの動態を精密に制御する分子機構が存在すると考えられるが、そのような役割を担う因子は同定されていない。しかしながら、受精卵の極性化および不等分裂に異常を示す突然変異体がわずかではあるが得られており、極性化に関与するシグナル経路が徐々に解明されてきた (図 4)。

まず、極性化を制御するシグナルの活性化に重要な役割を担うのが、細胞膜に局在する偽キナーゼの SHORT SUSPENSOR (SSP) である (Bayer *et al.*, 2009)。SSP は精細胞では mRNA の状態で蓄積しており、受精卵で翻訳されると MAPKK キナーゼである YODA (YDA) を活性化する。YDA は MAPK キナーゼである MKK4/5, MAP キナーゼである MPK3/6 からなる MAP キナーゼ経路を介して、受精卵の極性化を制御している (Lukowitz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2017)。SSP やこれらの MAP キナーゼ経路の構成因子が欠損すると、受精卵の細胞伸長が異常になるとともに等分裂に近い分裂が観察され、その後の胚のパターン形成も損なわれる。また、SSP は BRASSINOSTEROID SIGNALING KINASE (BSK) ファミリーに属しており、同じファミリーに含まれる BSK1/2 も受精卵で YDA の活性化を担うことが示されている (Neu *et al.*, 2019)。BSK ファミリーは SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) 型受容体様キナーゼと複合体を形成して機能することが知られている (Majhi *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2019a)。しかしながら、シロイヌナズナを含むアブラナ



科に特異的な因子である SSP は、進化の過程で BSK ファミリーが持つ自己抑制機能を失ったことで、受容体を介さずに単独で YDA を活性化できるようになったと考えられている (Neu *et al.*, 2019)。一方で、BSK1/2 が受精卵においてどの受容体と協同して機能するのかは明らかになっていない。

MAP キナーゼ経路の下流では、WRKY2 転写因子がリン酸化によって活性化される (Ueda *et al.*, 2017)。活性化された WRKY2 は、雌側から持ち込まれる HOMEODOMAIN GLABROUS 11/12 (HDG11/12) 転写因子とともに、WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 8 (WOX8) 転写因子の転写を促進する (Ueda *et al.*, 2011, Ueda *et al.* 2017)。さらに Ueda ら (2017) は、WRKY2 や HDG11/12 の欠損株が MAP キナーゼ経路の欠損株と同様に受精卵の極性化に失敗するものの、受精卵で WOX8 を強制発現させればこれらの異常を相補できることも発見した。したがって、SSP・BSK1/2 によって活性化される MAP キナーゼ経路、およびその下流での WOX8 の転写活性化こそが、受精卵の極性化において中心的な役割を果たす経路であるといえる。つまり、雄側から持ち込まれる因子によって活性化される転写因子と、雌側から持ち込まれる転写因子が揃うことで、下流の実働因子群が一斉に転写され、はじめて正常な発生が可能になるのである。

WOX8 は冗長的に機能する WOX9 とともに、胚発生の過程で転写活性化因子として働くと考えられている (Breuninger *et al.*, 2008, Dolzblasz *et al.*, 2016)。しかしながら、WOX8/9 の下流でどんな遺伝子の転写が活性化されるのか、また WRKY2 や HDG11/12 が WOX8/9 の他にどんな遺伝子の転写を活性化するのかは依然として不明である。Zhou ら (2018) は、胚珠を細胞壁分解酵素で処理してから解剖することで、受精卵や初期胚を単離・回収する手法を確立した。そして、Zhao ら (2019b) はこの技術を用いて回収した卵細胞や受精卵から RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、各遺伝子の受精前後における発現量の変動についてのタイムコースを網羅的に明らかにした。これによって、受精後に 3000 近い遺伝子が発現上昇することが示されており、WRKY2 や HDG11/12、および WOX8/9 の下流遺伝子もこの中に含まれていることが期待される。実際に、Zhao ら (2019b) は阻害剤によって受精直後から新規転写を阻害した条件下では、極性化の進行が大幅に遅延することも示した。

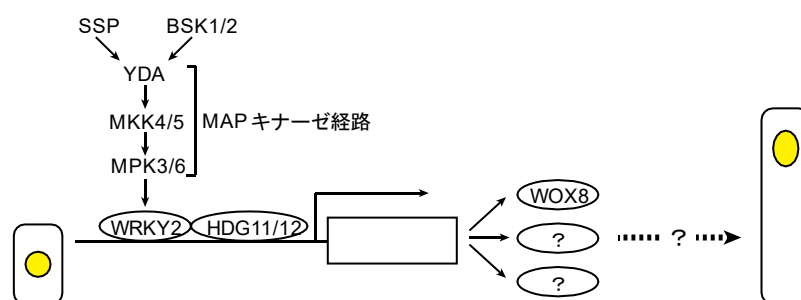


図4 受精卵の極性化を制御する分子機構

これまで明らかになっている極性化を制御する経路の模式図。受精後に活性化される MAP キナーゼ経路の下流で、極性化を制御する実働因子群の転写が活性化される。

## 5. おわりに

植物の頂端-基部軸の形成の端緒である、受精卵の極性化のメカニズムの解明に向けて、まず受精卵内部のライブイメージングが実現された。これによって、卵細胞での細胞骨格や液胞の極性が受精にともなって一旦崩壊し、その後それぞれが特異的なパターンで再構築されることで極性化に寄与することが明らかになった。特に液胞はこれまで受動的に細胞のサイズの変化に寄与することは知られていたものの (Krüger & Schumacher, 2018, Scheuring *et al.*, 2016)、受精卵で見出されたような、液胞が積極的に形態を変化させることで発生に寄与するという事実は予想外の発見であった。今後、ミトコンドリアなどの他のオルガネラの動態や、細胞周期、カルシウムなどのイオン濃度、ヒストン修飾などのエピジェネティック状態といった多様な動態を網羅的に可視化することで、受精卵が極性化して不等分裂に至るまでに細胞内で起こる様々な現象とその意義を理解できるであろう。

一方で、極性化を制御する分子機構については、これまで受精後にいくつかの転写活性化因子が働くことが見出されてきたものの、それらの下流で具体的にどんな遺伝子の転写が活性化されるのか、さらには受精卵という微小空間において、細胞骨格や液胞の動態がどのように精密に制御されるのかなど、未だに不明な点は多い。これらについても、まず既知因子の欠損株で受精卵内部のライブイメージングを行うことで、MAP キナーゼ経路や転写活性化因子群の下流でどのような動態が制御されているのかが明らかになるだろう。受精後に転写が活性化される未知因子については、順遺伝学的な手法での探索から同定できる期待は小さいと考えられる。RNA-seq 解析によって受精前後での網羅的な遺伝子発現プロファイルが明らかにされていることから、今後は何らかの手法で候補遺伝子を絞り込み、逆遺伝学的に制御因子を探索することが有効かもしれない。

また、今回紹介したようなライブイメージングやトランスクリプトーム解析といった手法は、植物のもう一つの体軸である放射軸（内外軸）の形成機構の解明にも有効であると考えられる。放射軸は1細胞期胚から発生が進んで、8細胞期胚が16細胞期胚となる過程で、胚体の各細胞が内外方向に分裂することで形成されると考えられている (Jürgens & Mayer, 1994)。しかしながら、この分裂方向を制御する因子は全く同定されておらず、放射軸の形成機構はほとんど解明されていない。そのような状況ながら、この時期の胚では細胞骨格や各種オルガネラなどの蛍光マーカーラインが既に整備されている (Liao & Weijers, 2018)。したがって、受精卵で用いられた手法を応用してこれらのマーカーラインを観察することで、放射軸の形成に寄与する細胞内動態を明らかにできると考えられる。さらに、細胞種特異的な核の単離により、これらの時期の胚における詳細なトランスクリプトームデータも取得されていることから (Palovaara *et al.*, 2017)、逆遺伝学的な制御因子の同定も期待できる。実際に初期胚のトランスクリプトーム解析から、胚発生における機能は未だ不明であるが、細胞膜上で偏って局在するタンパク質群である SOSEKIs が新規因子として同定された例もある (Möller *et al.*, 2017, Yoshida *et al.*, 2019)。

以上のように、受精卵においてライブイメージングやトランスクリプトーム解析が実現したことで、胚発生の過程での詳細な細胞内動態やそれらを制御する分子機構を理解するための道が拓けた。今後はこれらを足がかりとして、頂端-基部軸の形成機構、さらには植物の体

軸形成の根本原理の解明につながることを期待される。

## 6. 謝辞

本稿で紹介した研究成果の一部は、筆者が名古屋大学の東山哲也教授、植田美那子博士の指導のもと、名古屋大学の栗原大輔博士、佐藤良勝博士、山田朋美さん、瀬上紹嗣博士、前島正義教授、熊本大学の檜垣匠博士、東京大学の馳澤盛一郎教授、University of Kentucky (米国)の河島友和博士、Gregor Mendel Institute (オーストリア)のFrederic Berger教授、奈良先端科学技術大学院大学の加藤壮英博士、田坂昌生教授、基礎生物学研究所の森田美代教授らとの共同研究として行ったものである。これらの研究は、JSPS 科研費と科学技術振興機構 (JST), Austrian Science Fund (FWF) の支援を受けて実施した。

## 7. 引用文献

- Bayer, M., Nawy, T., Giglione, C., Galli, M., Meinel, T., & Lukowitz, W. 2009. Paternal Control of Embryonic Patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 323: 1485–1488.
- Breuninger, H., Rikirsch, E., Hermann, M., Ueda, M., & Laux, T. 2008. Differential Expression of WOX Genes Mediates Apical-Basal Axis Formation in the Arabidopsis Embryo. *Dev Cell* 14: 867–876.
- Dolzblasz, A., Nardmann, J., Clerici, E., Causier, B., van der Graaff, E., Chen, J., Davies, B., Werr, W., & Laux, T. 2016. Stem Cell Regulation by Arabidopsis WOX Genes. *Mol Plant* 9: 1028–1039.
- Faure, J., Rotman, N., Fortuné, P., & Dumas, C. 2002. Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: Developmental stages and time course. *Plant Journal* 30: 481–488.
- Goodner, B., & Quatrano, R.S. 1993. Fucus Embryogenesis: A Model to Study the Establishment of Polarity. *Plant Cell* 5: 1471–1481.
- Gooh, K., Ueda, M., Aruga, K., Park, J., Arata, H., Higashiyama, T., & Kurihara, D. 2015. Live-Cell Imaging and Optical Manipulation of Arabidopsis Early Embryogenesis. *Dev Cell* 34: 242–251.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Kondo, N., & Hasezawa, S. 2010. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in Arabidopsis guard cells. *Plant Journal* 61: 156–165.
- Jürgens, G., & Mayer, U. 1994. Arabidopsis. Bard, J (eds.) EMBRYOS, Color Atlas of Development. pp. 7–21. Mosby-Year Book Ltd., London.
- Kato, T., Morita, M., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama, M., & Tasaka, M. 2002. SGR2, a Phospholipase-Like Protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, Are Involved in the Shoot Gravitropism of Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 33–46.
- Kimata, Y., Higaki, T., Kawashima, T., Kurihara, D., Sato, Y., Yamada, T., Hasezawa, S., Berger, F., Higashiyama, T., & Ueda, M. 2016. Cytoskeleton dynamics control the first asymmetric cell division in Arabidopsis zygote. *Proc Natl Acad Sci* 113: 14157–14162.
- Kimata, Y., Kato, T., Higaki, T., Kurihara, D., Yamada, T., Segami, S., Morita, M.T., Maeshima, M., Hasezawa, S., Higashiyama, T., & Ueda, M. 2019. Polar vacuolar distribution is essential for accurate asymmetric division of Arabidopsis zygotes. *Proc Natl Acad Sci* 116: 2338–2343.



- Krüger, F., & Schumacher, K. 2018. Pumping up the volume—vacuole biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 80: 106–112.
- Liao, C.Y., & Weijers, D. 2018. A toolkit for studying cellular reorganization during early *Arabidopsis thaliana* embryogenesis. *Plant Journal* 93: 963–976.
- Lukowitz, W., Roeder, A., Parmenter, D., & Somerville, C. 2004. A MAPKK Kinase Gene Regulates Extra-Embryonic Cell Fate in Arabidopsis. *Cell* 116:109–119.
- Majhi, B.B., Sreeramulu, S., & Sessa, G. 2019. BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE5 associates with immune receptors and is required for immune responses. *Plant Physiology* 180: 1166–1184.
- Mansfield, S., & Briarty, L. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany* 69: 461–476.
- Mizuta, Y., Kurihara, D., & Higashiyama, T. 2015. Two-photon imaging with longer wavelength excitation in intact Arabidopsis tissues. *Protoplasma* 252: 1231–1240.
- Möller, B.K., ten Hove, C.A., Xiang, D., Williams, N., López, L., Yoshida, S., Smit, M., Datla, R., & Weijers, D. 2017. Auxin response cell-autonomously controls ground tissue initiation in the early Arabidopsis embryo. *Proc Natl Acad Sci* 114: E2533–E2539.
- Neu, A., Eilbert, E., Asseck, L.Y., Slane, D., Henschen, A., Wang, K., Bürgel, P., Hildebrandt, M., Musielak, T.J., Kolb, M., Lukowitz, W., Grefen, C., & Bayer, M. 2019. Constitutive signaling activity of a receptor-associated protein links fertilization with embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* 116: 5795–5804.
- Palovaara, J., Saiga, S., Wendrich, J.R., van Hofland, N., van Schayck, P.J., Hater, F., Mutte, S., Sjollem, J., Boekschoten, M., Hooiveld, G.J., & Weijers, D. 2017. Transcriptome dynamics revealed by a gene expression atlas of the early Arabidopsis embryo. *Nature Plants* 3: 894–904.
- Scheuring, D., Löffke, C., Krüger, F., Kittelmann, M., Eisa, A., Hughes, L., Smith, R.S., Hawes, C., Schumacher, K., & Kleine-Vehn, J. 2016. Actin-dependent vacuolar occupancy of the cell determines auxin-induced growth repression. *Proc Natl Acad Sci* 113: 452–457.
- Segami, S., Makino, S., Miyake, A., Asaoka, M., & Maeshima, M. 2014. Dynamics of Vacuoles and H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase Visualized by Monomeric Green Fluorescent Protein in Arabidopsis: Artfactual Bulbs and Native Intravacuolar Spherical Structures. *Plant Cell* 26: 3416–3434.
- Shi, H., Yan, H., Li, J., & Tang, D. 2013. BSK1, a receptor-like cytoplasmic kinase, involved in both BR signaling and innate immunity in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* 8: e24996.
- Sprunck, S., Rademacher, S., Vogler, F., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., & Dresselhaus, T. 2012. Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science* 338: 1093–1097.
- Toyota, M., Ikeda, N., Sawai-Toyota, S., Kato, T., Gilroy, S., Tasaka, M., & Morita, M. 2013. Amyloplast displacement is necessary for gravisensing in Arabidopsis shoots as revealed by a centrifuge microscope. *Plant Journal* 76: 648–660.
- Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., & Hara-Nishimura, I. 2010. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin

- organization in plant cells. *Proc Natl Acad Sci* 107: 6894–6899.
- 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.
- Ueda, M., Aichinger, E., Gong, W., Groot, E., Verstraeten, I., Vu, L., De Smet, I., Higashiyama, T., Umeda, M., & Laux, T. 2017. Transcriptional integration of paternal and maternal factors in the Arabidopsis zygote. *Genes Dev* 31: 617–627.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J., & Zhang, S. 2007. Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 63–73.
- Yoshida, S., van der Schuren, A., van Dop, M., van Galen, L., Saiga, S., Adibi, M., Möller, B., ten Hove, C.A., Marhavy, P., Smith, R., Friml, J., & Weijers, D. 2019. A SOSEKI-based coordinate system interprets global polarity cues in Arabidopsis. *Nature Plants* 5: 160–166.
- Zhang, M., Wu, H., Su, J., Wang, H., Zhu, Q., Liu, Y., Xu, J., Lukowitz, W., & Zhang, S. 2017. Maternal control of embryogenesis by MPK6 and its upstream MKK4/MKK5 in Arabidopsis. *Plant Journal* 92: 1005–1019.
- Zhao, P., Zhou, X., Shen, K., Liu, Z., Cheng, T., Liu, D., Cheng, Y., Peng, X., & Sun, M. 2019b. Two-Step Maternal-to-Zygotic Transition with Two-Phase Parental Genome Contributions. *Dev Cell* 49: 882–893.e5.
- Zhao, Y., Wu, G., Shi, H., & Tang, D. 2019a. RECEPTOR-LIKE KINASE 902 Associates with and Phosphorylates BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 to Regulate Plant Immunity. *Mol Plant* 12: 59–70.
- Zhou, X., Shi, C., Zhao, P., & Sun, M. 2018. Isolation of living apical and basal cell lineages of early proembryos for transcriptome analysis. *Plant Reproduction* 32: 105–111.