

研究終了報告書

「花粉を用いた「細胞間移行 RNA 分子」の解析とそれを利用した遺伝子改変」

研究期間:2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者:元村 一基

1. 研究のねらい

細胞間の分子のやり取りを理解するためには、隣り合う細胞に着目することが重要である。しかし細胞壁を溶かして植物細胞を個体から単離すると、隣り合う細胞の位置情報が失われてしまう。そこで私は“栄養細胞”と“精細胞”の2種類の細胞で構成される「花粉」を材料にすることでこの問題を回避して、位置関係を保ったまま細胞間のやり取りを理解することを目指した。本研究では最近報告が相次ぐ栄養細胞から精細胞へ移行する RNA, “精細胞移行性 RNA”について理解を深めることで, RNA の細胞間移行をつかさどるタンパク質を発見するとともに, 栄養細胞－精細胞間のコミュニケーションの生理学的意義を解き明かすことを目的に実験を進めた。

もう一つのねらいは、高速スクリーニング技術の開発であった。様々な技術を基盤としたスクリーニング技術は動物細胞研究においてトレンドとなっている一方で、個体を使用した研究が一般的な植物科学において利用例は少なかった。そこで私は「花粉」の様々な利点を利用して高速スクリーニングが可能になると考え、その技術の開発を目指した。

以上2点に加え、応用・発展的な目標として、RNA の細胞間移行を利用した植物遺伝子改変技術の可能性を検討した。精細胞は雌細胞と受精する生殖細胞であることから、この精細胞に RNA を直接送り込むことで、組換え無しに直接遺伝子を改変できることが期待できる。これまで得られた知見から、この技術の将来展望について考察した。

2. 研究成果

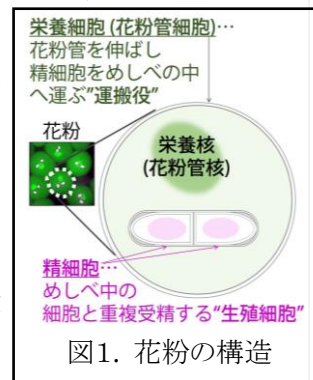
(1) 概要

本研究はシロイヌナズナの花粉(図1)を用いて、大きく分けて、

- ① 新奇スクリーニング系の確立と RNA の精細胞移行に関与するタンパク質候補同定
- ② RNA の精細胞移行が欠損した植物の作出とそれを利用した花粉管の解析

という2本柱で遂行した。項目①では実験開始後に浮かび上がってきた様々な課題を解決し、花粉を用いたスクリーニング実験系を確立した。そして RNA の精細胞移行に関与する遺伝子の候補を複数同定することに成功した(成果2)。またこのスクリーニング系が別の生命現象にも適用可能であるかを調べ、本スクリーニング系の威力を示すことができた(成果1)。加えて、スクリーニング系確立の過程では革新的なシーズを複数確立することができた。例えば、高効率な遺伝子ノックアウトツールの創出(成果3)、花粉収穫法の考案(成果4)などの本研究で生まれたシーズをもとに、多くの領域内外共同研究が開始している。

項目②では RNA の精細胞移行を阻害した花粉を材料に、細胞単離とトランスクリプトーム解



析によって、精細胞移行性 RNA の候補を同定、特徴を見出すことができた(成果5)。現在、簡便なRNAの細胞間移行の検出系の確立に取り組んでおり、この系を併用してどんな配列がRNA にモビリティを付与するのかを調査する予定である。項目①のスクリーニングの成果と合わせて、近い将来 RNA 精細胞移行の分子メカニズムが解明できると期待している。この理解が進めば、精細胞ゲノムを直接改変する技術も実現する可能性がある。

また興味深い発見として、RNA 精細胞移行の阻害は、花粉管中の精細胞の輸送欠損を引き起こした。精細胞の輸送は植物の種子形成に不可欠であることから、RNA の精細胞移行などの細胞間コミュニケーションが、生殖現象に必須の役割を持つ可能性が明らかとなった。この特徴的な表現型を利用して、細胞質に核を持たない花粉管を作出することに成功し、核非依存的な花粉管伸長能力や受精能力を世界に先駆けて明らかにした(成果7)。また細胞間コミュニケーションが関与する精細胞の輸送メカニズムにも研究範囲を広げ、微小管依存的な精細胞位置維持機構を発見、成果発表した(成果8)。

(2) 詳細

成果1「高速スクリーニング系の確立」

動物細胞ではウイルスで簡便に RNA などが導入できるのに対して、植物では類似の系が存在しない。そこで私は通常の植物育成で使用しない道具を用いて、従来に比べ高速な形質転換手法を確立した。また大腸菌やアグロへの形質転換方法を改良して数十万クローンを得ることもできた。更に RNA の精細胞移行が阻害されたときだけ蛍光を発する花粉を作出し、これをつくる植物を材料としてスクリーニング用のライブラリーを導入した。この植物から花粉を回収して観察したところ、ごく一部の花粉でのみ RFP 蛍光の回復が確認できた。そこで RFP 蛍光の強い花粉と弱い花粉に分離し、蛍光強の花粉でどんな遺伝子が壊れているかを同定した。更に本スクリーニング系の汎用性を示すため、別実験として花粉に重要な遺伝子のスクリーニングを行い、本実験系の汎用性を示すことができた。

成果2「RNA の精細胞移行に関与する遺伝子候補の同定」

上記スクリーニングを3回試行し、そのうち2回以上の実験において同定されたものを、RNA の精細胞移行に関与するタンパク質候補”とした。期待通りネガコンはこの中に含まれなかった。同定された遺伝子がコードするのは、酵素が3つ、機能未知タンパク質が1つであった。そのうち一つは核酸修飾酵素であることから、転写後修飾などで細胞間移行させる RNA に目印を付ける可能性が考えられる。一方で RNA 精細胞移行に関与する可能性が高いと考えられる RNA 結合タンパク質群はまだスクリーニングで得られておらず、多くの試行が必要と思われる。現在追加でスクリーニングを行っており、より多くの候補遺伝子が得られることが期待される。また、ゲノムワイドなスクリーニングと並行して、同じ材料植物で標的遺伝子を絞ったスクリーニングも行い、既知の RNA サイレンシングに関与する遺伝子が RNA の精細胞移行に関与することも示唆された。

以上のように、長らく未知であった RNA の精細胞移行に関与する遺伝子の候補を一挙に同定することができた。今後はスクリーニングと平行して同定した原因遺伝子の機能解析を進め、発表する予定である。

成果3「超高効率な遺伝子ノックアウトツールの創出」

loss-of-function スクリーニングにおいて、遺伝子ノックアウトの効率はスループットに直結する。そこで高効率な遺伝子ノックアウトを実現するプラスミドの開発を目指した。動物細胞研究などを参考に、複数のプロモーターなどを比較した。八重咲きの表現型となる AGAMOUS 遺伝子のノックアウト効率で評価したところ、多くの T1 植物が全て八重咲き、つまりホモ接合変異体になることが分かった。この割合は既報を超えるものであった。現在これを用いて、“花粉の致死表現型が原因でホモ変異植物が得られなかった”遺伝子の解析を行い、論文投稿を計画している。

成果4「花粉収穫法の応用」

スクリーニングでは花粉を集める必要があり、既存の手法を参考に独自の花粉収穫法を考案した。この技術が他の植物種に応用可能かを検討するため、複数の植物の研究者の助けを借りて、様々な植物において既存の手法に早く花粉が回収できることが確認できた。一方で改良すべき点も炙り出されたことから、現在は更なる改良を目指している。この技術の汎用性や需要は高く、これまでに複数の共同研究展開が進んでいる。

成果5「精細胞移行性 RNA の共通性の発見」

体細胞での研究から、細胞内でカロースが過剰に合成されると、障壁を作ることで RNA の細胞間移行が阻害されることが知られていた。そこで精細胞特異的にカロースを過剰に合成させることで、“RNA の精細胞移行が阻害された花粉”の作出に成功した。単離精細胞のトランスクリプトーム解析により、この精細胞では野生型精細胞に比べ多くの RNA が減少していることが分かった。そしてこれら精細胞移行性 RNA 候補に幾つかの特徴的な配列を見出した。引き続き他の配列を調べるとともに、gRNA にこの配列を付与することで、精細胞に移行するようになるかを調査する予定である。

成果6「簡便な RNA 細胞間移行検出ツールの開発」

成果1で花粉において RNA の細胞間移行を検出する実験系は確立したものの、観察には形質転換が必要で簡便さに欠けた。そこで RUBY という色素を利用して、タバコインフィルトで RNA の移動などを調べる実験系を確立した。この成果を論文として発表見込である。

成果7「核非依存的な花粉管能力の発見」

被子植物の生殖では、栄養細胞が花粉管を伸ばし、内包する精細胞と数珠繋ぎになった栄養細胞核を花粉管先端へと輸送する。成果5で作出した花粉管は過去に例のない“精細胞が輸送されない”という表現型を示すことが明らかとなった。そこで発展的な研究として、栄養細胞核が輸送されない変異体に *cals3m* を発現させることで、全ての細胞核が輸送されない花粉管を作出した。驚くべきことにこの花粉管は先端細胞質成分に核が存在しないにも関わらず花粉管は伸長を続ける能力を保持していた(図6)。本研究 *Nat Commun* 誌のエディターズハイライトに選ばれ、2つの学会より表彰される評価を受けた(代表論文1)。更に継続して本研究を

進め、花粉管が核非依存的に卵細胞まで辿り着くことを明らかにした(代表論文2, 3)。

成果8「微小管がつかさどる精細胞位置保持機構の発見」

前述した花粉管の精細胞輸送欠損の原因を調べるため、様々な変異体で花粉管の表現型解析を行った。その結果、細胞骨格微小管が精細胞の正しい位置の維持に不可欠であることを発見した(図7)。更に精細胞の外周には特殊な脂質組成を持つ生体膜が存在することを発見し、前述した花粉ではこの膜組成が失われることが分かった。これらの結果より、精細胞は細胞間コミュニケーションにより特殊な膜組成を外周に作り、微小管がそこに結合して精細胞を正しい位置に運ぶメカニズムが示唆された。この成果を論文として発表した。

3. 今後の展開

① RNA 精細胞移行の分子メカニズムとその意義の解明

スクリーニングにより、RNA 精細胞移行の関連遺伝子の候補が複数同定された(成果2)。これらの遺伝子は繰り返しのスクリーニングで複数回候補遺伝子として検出されており信頼度が高い。今後は更に試行回数を重ねるとともに、並行して個別遺伝子のバリデーションを進める。そして成果5で得られた精細胞移行性 RNA の共通性や、成果7や8で明らかになった花粉管機能における重要性を踏まえ、個別遺伝子の研究にとどまらない RNA 精細胞移行メカニズムの全容解明を目指す。

② RNA の細胞間移行を利用した植物遺伝子改変技術の実現に向けて

近年パーティクルガンや磁気反応などを用いて、花粉に核酸を導入する様々な手法が開発されているものの、組換え植物や遺伝子改変植物を安定的に作出できた例はない。もし上記①で得られた情報をもとに、様々な物質に精細胞に移行させることができれば、精細胞の遺伝子改変効率は一躍的に上昇する。上記①で得られた知見をもとに実験系を確立する。

③ スクリーニングの成果発表とさらなる改良

近年複数のスクリーニング技術が報告され、今後は熾烈な競争が予想される。私が確立した幾つかのツールや技術、そしてそれを基盤にした高速スクリーニングは検出力や時間の短さなど大きなアドバンテージを持つ。様々な現象に着目しながら、本スクリーニング系を更に発展させていく。

④ 開発した技術の実用化

これらの新技術シーズは多くの研究グループと共同研究を進めている。例えば花粉回収法は幾つかの植物種で有用であることが分かっており、幾つかの課題さえクリアできればすぐに実用化が可能である。現在他分野の研究者と共同開発を計画しており、開発を目指す。一方スクリーニング用に構築したツールも高い汎用性を持つ。培ったツール構築のノウハウをもとに、範囲を絞ったスクリーニング、あるいは他植物の遺伝子に対してのスクリーニングなどを共同研究として推し進めたい。

4. 自己評価

① 研究目的の達成状況

さががけ研究期間の3年半は順風満帆とはいえなかった。コンセプトとして完成されていたスクリーニング技術を実際に動かしてみると様々な問題が噴出した。そのため材料から生成物、細かな実験手法までほとんどを見直す必要があり、それに多くの時間を費やす必要があった。それでも最終的に「高速スクリーニング技術の開発」という目標を達成できた意義は大きく、2つの生命現象でスクリーニングが順調に進んでいることは評価できる。

スクリーニングが後ろにズレ込んだ影響で、「RNAの細胞間移行をつかさどるタンパク質の発見」はまだ候補が複数見つかった段階であり、達成状況は道半ばである。その先の応用的な目標であった“RNAを利用した遺伝子改変”に手をつけられなかったこともあり、この点で達成状況には満足していない。現在は遅れを取り戻すため数ヶ月で数万個体のスクリーニングを実行しており、多くの原因遺伝子発見が期待できる。精細胞移行性RNAの共通性などのデータと合わせて、成果発表を目指したい。

他方、RNA精細胞移行を阻害した花粉管から派生した発展的な研究では、特筆すべき成果を上げることができた。核非依存的な花粉管の機能に関しては論文発表に加え、日本細胞生物学会、日本植物形態学会から荣誉ある賞を受賞した。続報論文も投稿中であり、「栄養細胞－精細胞間のコミュニケーションの生理学的意義を解き明かす」という目的に関しては期待以上の成果を上げることができた。

② 研究の進め方

本プロジェクトはたくさんの植物の育成や形質転換、ツール構築など、非常に規模感の大きい研究内容で、専用の植物育成スペースや研究補助者が必要不可欠であった。そのため研究当初、自前の植物育成スペース設立には半年以上を費やした。またほとんどの期間について雇用して人材育成しながら、人海戦術で遂行した。これらには多くの費用と時間を費やしたが、3年にわたる研究、そして来年度以降の継続的な研究を支える何よりの基盤となった。物品としては花粉管観察用の蛍光顕微鏡、あるいは形質転換用の遠心機や遺伝子導入装置を購入、これらを毎日のように活用した。また、スクリーニングのNGS解析にも多くの費用を費やした。このように体制・予算について大きな変更は無く、順調に遂行することができた。

③ 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

今後の展開の③で記載したように、花粉収穫やツール開発など、社会や経済へ波及するシーズを生み出すことができた。これらのシーズ様々な将来的に植物へ適用することで、植物科学研究のみならず、農業分野にも大きな利益をもたらすことができると期待している。現在、領域内外で様々な植物種の研究者らと共同研究を展開しており、ここから得られた知見をもとに実用的・実践的な実験技術を確立・洗練させていきたい。

④ 総評

本さががけ研究では、植物科学を飛躍させる(未発表のものを多く含む)複数の革新的技術を

生み出すことができた。それに加えて複数の研究成果を発表することができた。また最終年度には日本植物形態学会より奨励賞を受けるなど、有り難くも研究者として高い評価を頂いている。さきがけ研究がなければ間違いなく得られなかった数多くのシーズをバネに、今後さらに飛躍できるよう研究を続けたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 件

1. Motomura et al, Persistent directional growth capability in <i>Arabidopsis thaliana</i> pollen tubes after nuclear elimination from the apex. <i>Nature commun.</i> 2021. 12(1) 2331-2331.	1.
RNA の生細胞移行を阻害した花粉管では、精細胞が輸送されなくなることを発見した。そしてこの表現型を利用することで、世界ではじめて細胞質中に核を持たない花粉管の作出に成功した。そして、この核を持たない花粉管が、通常の花粉管同様に伸長して雌組織まで辿り着くことを示すことで、花粉がこれまで考えられていたよりずっと早い発生段階で、受精に至る能力を獲得していることを明らかにした。	
2. Motomura et al, Possible Molecular Mechanisms of Persistent Pollen Tube Growth without De Novo Transcription. <i>Front. Plant Sci.</i> 2022a. Nov 24;13:1020306.	2.
精細胞が無くなる変異体を利用することで、上記とは異なるアプローチで遺伝的に核を持たない花粉管の作出に成功した。この花粉管を雌しべを通して観察し、正常な花粉管同様に胚珠に到達することを明らかにした。更にこの挙動をもとに、どうして先端部に核がない花粉管が伸長し続けられるのか、そのメカニズムを考察した。	
3. Motomura et al, A way to discover a hidden pollen-tube potential controlling directional tip-growth in <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Plant Morphol.</i> 2022b. (34),69-76.	3.
上記1で発見した花粉管能力を踏まえ、それ以前の花粉管研究との対比から様々な可能性を考察した。以前の研究で議論が分かれていた精細胞の花粉管伸長への貢献の否定、そして栄養核こそが花粉管伸長に大事という定説が生まれてから、上記論文1でそれを否定するまでをいくつかの研究成果から論じた。花粉管中の転写や翻訳という現象にもフォーカスして、いつどのタイミングで花粉管が能力を獲得するのかについても考察した。	

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

1	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	
2	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	

	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞歴

2021 年 若手最優秀発表賞, 日本細胞生物学会

2021 年 平瀬賞, 日本植物形態学会

2023 年 奨励賞, 日本植物形態学会

国際学会発表

2023 年 6 月 7 日 Motomura et al, Proposed molecular mechanism for persistent growth capability in physiologically anuclear pollen tubes. *The 33rd International Conference on Arabidopsis Research*.