

FEATURE

# 植物内の「対話」を探る

01

植物細胞を生きたまま観察する  
ライブイメージング技術

02

植物ホルモン「ブラシノステロイド」を解明  
農作物の収量アップをめざして!

戦略的創造研究推進事業 ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト

## 01 植物細胞を生きたまま観察する ライブイメージング技術

名古屋大学の東山哲也教授が研究総括のERATO 東山ライブホロニクスプロジェクトが、植物の受精卵分裂の撮影に世界で初めて成功した。植物細胞を生きたまま顕微鏡で観察し、自由自在に操作できるライブイメージング技術を駆使した新しい「ライブセル生物学」をめざしている。

### 受精卵の分裂が見えた

植物の受精は小学校で教わるほどよく知られている。だが、卵細胞はめしべの奥深くにあるので、生きたまま外に取り出して見ることができない。めしべの一部を薄く切った別々の細胞で分裂の過程を推測するだけで、花を咲かせる被子植物が受精し、細胞が分裂していく様子をこれまで見た者はいなかった。東山プロジェクトのライブイメージング技術で初めて受精卵を生きたままリアルタイムで観察できるようになった。

プロジェクト名の「ホロニクス」とは、植物

体を構成する個々の細胞と全体を調和させる細胞間コミュニケーション（ホロニックコミュニケーション）を意味する。植物は動物のように脳や神経を持たないため、発芽や成長、受精などの基本機能は、ホルモンなどを使って細胞同士で「対話」する細胞間コミュニケーションで維持されている。東山さんは生きた細胞（ライブセル）にこだわり、生体の構成要素と全体の相互作用を生きた細胞で観察し、探求することをめざしている。

今回撮影に成功したのは、シロイヌナズ

### 東山 哲也

ひがしやま・てつや

名古屋大学

トランスフォーマティブ生命分子研究所

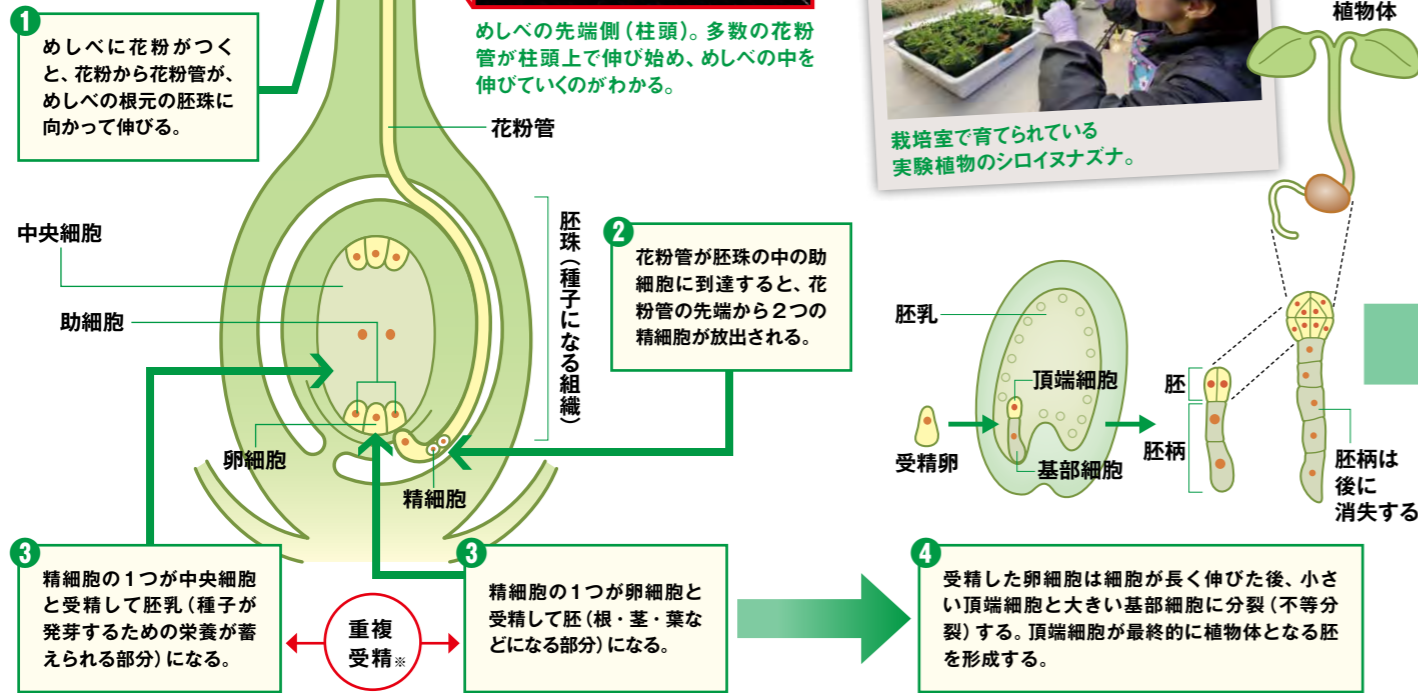
副拠点長・教授

1999年、東京大学大学院理学系研究科博士課程修了、博士（理学）。99年同大学院理学系研究科助手、2007年、名古屋大学大学院理学研究科教授、2013年より現職。08年よりさきがけ「花粉管ガイダンスの動的システムの解明」研究者。10年よりERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト研究総括。

ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト研究総括。



### 被子植物の受精



※重複受精における新たな細胞融合現象の発見については7ページを参照。

ナの受精卵が分裂していく様子である(5ページの連続写真)。精細胞と卵細胞が融合した受精卵(図の左端)は分裂し、胚と胚柄(はいへい)を形成する。胚柄は胚の成長に欠かせないがやがて消えてしまう。写真の緑色は細胞核を、ピンク色は細胞膜を示す。

時間の経過とともに、胚細胞は分裂する方向を変えながら丸い組織を形づくる。胚柄の細胞は縦にのみ分裂して棒状の組織を作っていくことが確認できる。まさに、受精卵の分裂の様子をリアルタイムで捉えた瞬間だ。しかし、ここまでの道のりは決して平坦ではなかった。

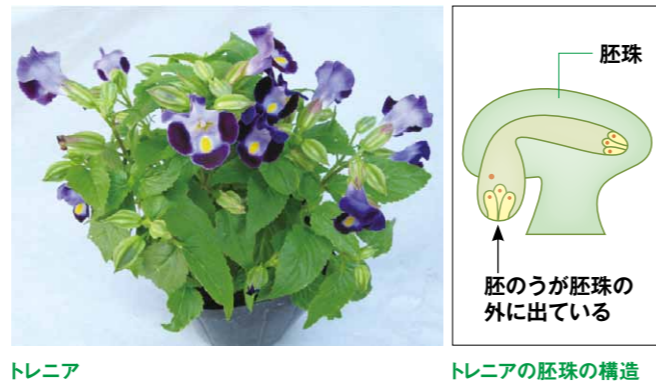
東山さんが「誰も植物の受精の瞬間を見ていないから、自分が最初に見てみたい」という思いで研究生生活をスタートさせたのは1994年、大学院生のときだった。指導教官が「一番適した植物を選んでやりなさい」とアドバイスしてくれたので、まず観察に適した植物を探すことから始めた。

「25万種ほどある被子植物の中から、ベストな植物を探そうとしました。数カ月が経った頃、ある文献から、熱帯地方原産の園芸品種アゼトウガシ科のトレニアが、卵細胞が組織の外に飛び出した特殊な形態を持つと知り、研究に使い始めたのです」と当時を振り返った。しかし、すぐに受精の瞬間が見られたわけではない。

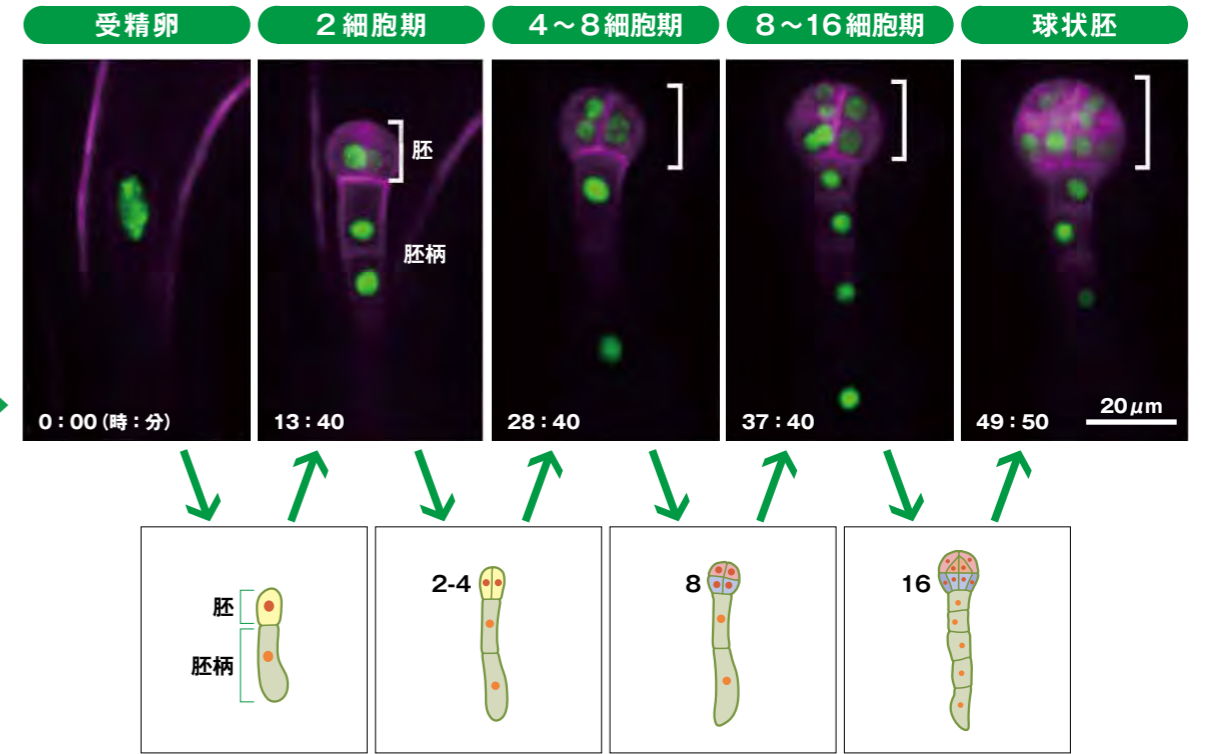
「卵細胞は外に飛び出ているし、花粉管も培養できるので、それぞれを見ることはできます。しかし、どうすれば受精させられるかわからない。花粉管を観察するのは中学生でもできますが、受精させるにはさまざまな条件をそろえなくてはなりません。でも、こうした条件を探すのは、骨が折れるもの

やっていて苦にはなりません。1年以上試行錯誤して、ついに受精の瞬間を観察できました。ライブで受精の瞬間を見たときは感動しました。動画で撮影できるようになるまでには、さらに5年ほどかかりました」。

次のステップで、材料をトレニアから、代表的な実験植物として研究データがそろっているシロイヌナズナに変えて、受精と発生メカニズムの探索が始まった(成果の一部については6~7ページ参照)。



### シロイヌナズナの受精卵分裂と胚発生の様子

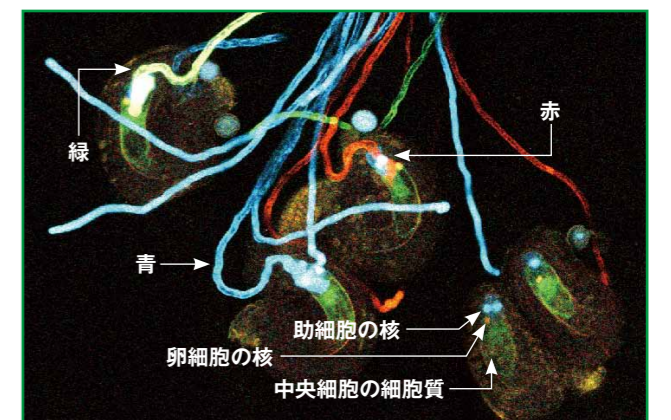


### 「レーザー顕微鏡」と「マイクロデバイス」の2本の柱が研究を推進

細胞を生きのまま観察するために、以前から研究に必要な機器や装置を自ら開発するのが東山流だ。レーザー顕微鏡など光学装置の専門家、植物細胞の効率的な培養・観察に適したマイクロデバイスを作る工学の専門家、データ解析など情報科学の専門家を一堂に集めてERATOの研究プロジェクトを編成した。現在、プロジェクトはおよそ20人の専門家で進めている。

「私たちは、多細胞生物の細胞や分子を顕微鏡下で自由自在に操作し、解析する生物学を『ライブセル生物学』と位置付けてプロジェクトのモットーとしています。主力のレーザー顕微鏡は、光学顕微鏡より波長が短く直進性の高いレーザー光を使います。散乱光の少ない反射光が得られるので、コントラストの高い鮮明な画像が得られます。さらにレーザーを使って細胞を操作することもできます。例えば、レーザーで狙った細胞や細胞の一部分を壊すことで、その機

能を調べることもできます(6ページ下)」と説明してくれた。レーザー顕微鏡を使った成果の一例が3ページの写真である。光を当てたときに蛍光たんぱく質を導入した5種類の個体を予め育て、得られた異なる色で光る花粉をそれぞれが塊にならないようにめしべに受粉させ、切り口から出てくる花粉管をレーザー顕微鏡で観察した。非常に根気と技術のいる作業だが、5色に分けて可視化することで、1本1本の花粉管がどのように伸びているかを見分けることができる。ほかにもめしべの先端の



培地上で胚珠へと誘引された花粉管の拡大画像。それぞれの胚珠に緑、赤、青の花粉管が誘引され、胚珠の内部へ侵入して受精が行われていることがわかる。花粉管だけでなく、胚珠内部と細胞質も観察するため、蛍光で光るようにしている。(助細胞の核:青、卵細胞の核:赤、中央細胞の細胞質:緑)

柱頭部(4ページ左上の写真)や、胚珠へと誘引された花粉管の拡大画像(上の写真)など、これまでわからなかった細胞の動きが、ライブイメージング技術のみで可視化できるようになった。

### 工学技術を応用した「マイクロケージアレイ」

プロジェクトのもう一つの特徴的な研究手法は、植物細胞を効率的な培養・観察に適した形に育てるマイクロデバイスの活用だ。工学系の技術を植物科学に応用することは世界でもほとんど行われていないが、両者の相性はとても良いという。研究の過程で、植物体を育てるのに適したマイクロデバイスがいくつも開発された。その一つがマイクロケージアレイである。

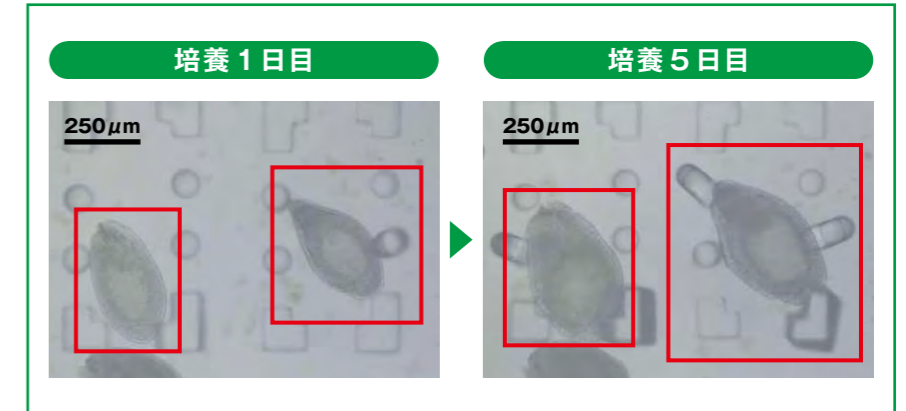
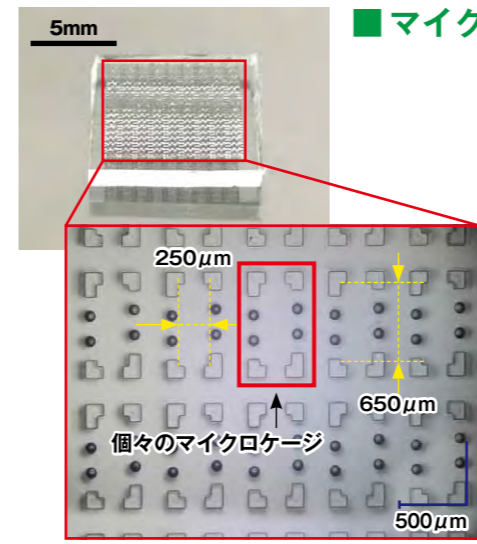
2013年に開発したマイクロケージアレイは、1辺が数百マイクロメートルの極めて小さな檻（ケージ）が格子状に並び、この

中に未熟な種子をセットする。檻は種子の成長を阻害しない特殊な設計と、柔軟性を持った素材（ジメチルポリシロキサン）で作られているため、成長する種子の内部を生きのまま長時間、観察できる。2015年には、発展型のマイクロピラーアレイ（ケージではなく、微小な円柱（ピラー）が並んでいる）も開発した。こちらはマイクロケージアレイよりもさらに柔軟な構造で、受精卵分裂と胚発生の様子や、胚柄細胞が頂端細胞に変化する様子などデリケートな細胞の変化を観察できる。

東山さんにこれからの研究の方向性について聞いた。

「植物の受精のメカニズムの全容を分子レベルで解明することをめざし、得られたデータの解析を進め、現象の鍵となる分子の同定を精力的に行っています。さらにライブイメージング技術を他の植物科学の分野にも応用し、マイクロデバイスを他の研究にも使いたい。将来は、ライブイメージング技術をさらに進化させ、植物の受精を制御できるような技術を開発して、有用な機能を持った植物を自由に作り出せたらと思っています」。

### ■ マイクロケージアレイ



1辺が約1センチメートルの正方形の中に96個のマイクロケージが配置されている。マイクロケージは柔軟性のある柔らかいポリマーなので、種子の成長を妨げない。

## 解明された植物の「細胞再生能力」と「新たな細胞融合」の発見

### 将来胚になる頂端細胞を破壊すると、一部の胚柄細胞が頂端細胞に変身

受精卵が分裂した直後の頂端細胞を顕微鏡下でフェムト秒パルスレーザーにより破壊し、その後の影響を連続観察した。フェムト秒(10<sup>-15</sup>秒)の非常に短いパルス幅のレーザー光は、瞬間的に高いエネルギーを持つので細胞を破壊することができる。

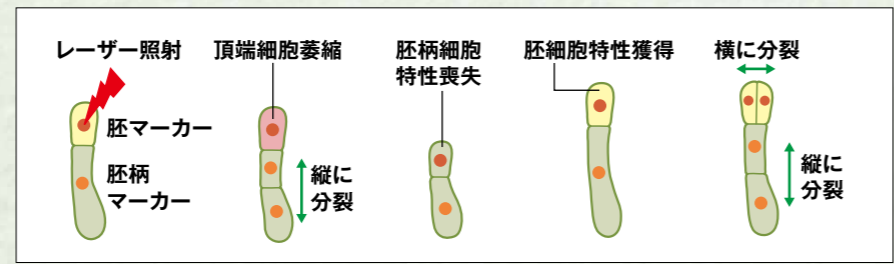
実験では、胚細胞と胚柄細胞を区別するために個別に発現する遺伝子にマーカーをつけており、下の写真では基部細胞の白い丸が細胞核を、緑の部分で頂端細胞を表している。写真の実線枠がレーザー照射した胚。22時間後には頂端細胞は完全に萎縮している。すると、70時間後には点線枠で示した上側の胚柄細胞が、

頂端細胞を補うように胚細胞特有の横に分裂するのが観察された。残った基部細胞は本来の胚柄細胞どおりに縦の分裂を続けた。

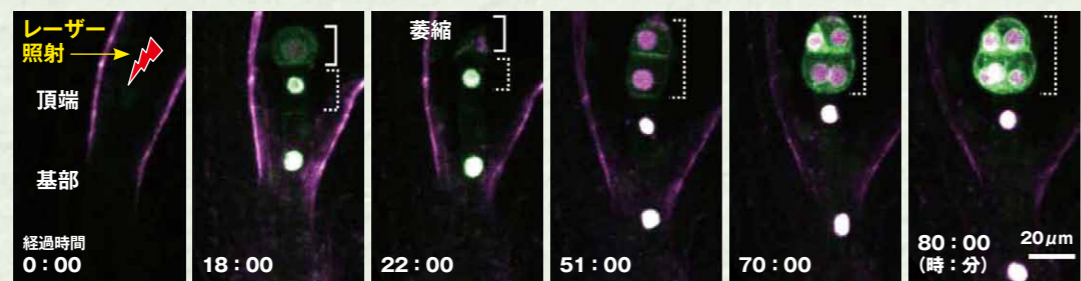
このことから、頂端細胞がダメージを受

けると、すでに胚柄細胞になろうとしていた細胞が、失った頂端細胞を補うために新たに頂端細胞へと役割を変える(細胞運命転換という)植物の驚くべき再生能力が示された。

### ■ 細胞運命転換の模式図



### ■ 頂端細胞破壊で細胞が変化する様子

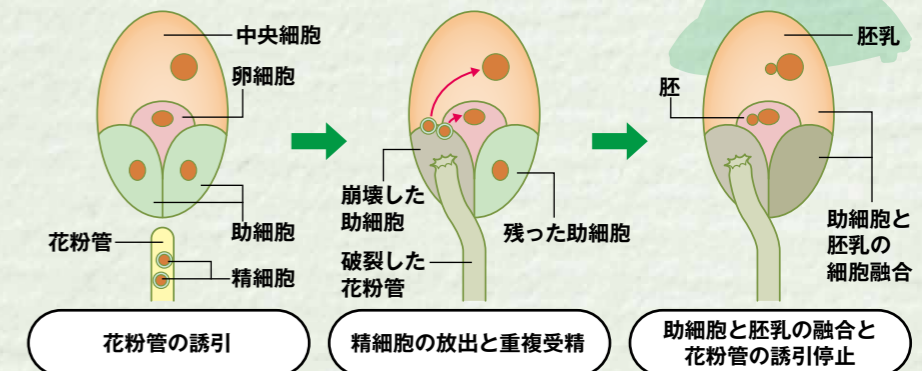


### 植物で受精に次ぐ新たな細胞融合現象を発見

植物が種子を作るときには、花粉から伸びた花粉管が、種子の元になる組織に導かれる。このとき花粉管を誘引する特殊な細胞が、卵細胞の隣に2つある助細胞である。

花粉管が助細胞に到達すると、先端から2つの精細胞が勢いよく放出される。精細胞の1つは卵細胞と受精して胚になり、もう1つの精細胞は中央細胞と受精して胚乳(発芽するための栄養が蓄えられる組織)になる。このとき余分な花粉管の誘引を防ぐため、残った助細胞の働きが抑えられることは知られていたが、シロイヌナズナの胚珠をレーザー顕微鏡で調べた結果、残った助細胞と胚乳が融合して互いの中身が混じり合う細胞融合現象が観察された。助細胞と胚乳が融合することで、助細胞の誘引物質が急速に薄まり花粉管の誘引を抑える。さらに胚乳の核が分裂増殖していく過程で助細胞の核が変性し、崩壊していく様子も明らかになった。これまで植物の細胞融合は受精以外の発生過程では知られておらず、新たな細胞融合現象の発見となった。

### ■ 被子植物の重複受精と助細胞の細胞融合



### ■ 胚乳と融合する助細胞



左写真: 助細胞のミトコンドリアを緑色蛍光たんぱく質(GFP)で光らせた受精後の胚珠。白の破線で囲った助細胞から、黄色の破線で囲った胚乳へと粒状構造を持つミトコンドリアが移動する様子を捉えている。  
右写真: 受精後の胚珠の電子顕微鏡画像。助細胞(白い実線)と胚乳(黄色の実線)の間を隔てる細胞壁の一部が壊れており、その付近のミトコンドリア(矢印)の移動を妨げる構造がないことがわかる。