

審査の結果の要旨

氏名 タンプラノコン スラチャット

植物の有性生殖過程は作物生産に直結する重要な過程であり、基礎生物学の観点からのみならず、応用面からもその分子機構解明が求められている。本博士論文は、有性生殖過程における花粉と雌蕊の相互作用に関わる因子を探索し、その機能解析を通じて花粉発芽における新しい生理メカニズムを見出したものである。

第一章では、モデル植物のシロイヌナズナを用いて、受粉直後の生殖過程に関わる新規の花粉側因子の探索を行なっている。受粉直後に乳頭細胞内で発現誘導される遺伝子として報告がある *At4g24570* に着目し、そのプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を連結した受粉レポーター系統を作出した。本レポーター系統の雌蕊が、機能的な花粉を受粉した際にのみ発光することを確認した後、本系統をプレートリーダーを用いた変異体花粉のスクリーニングに利用している。変異原処理して得た 2,400 以上の M_2 植物の花粉をスクリーニングした結果、花粉機能に異常を示す 11 の独立した変異体を見出している。そのうち、受粉後にレポーター遺伝子の誘導をまったく引き起こせない 4 系統 (non-induction class) と、誘導効率が著しく低下した 3 系統 (low-induction class) をそれぞれ野生型株と交雑し、変異遺伝子同定のための分離集団を作出し、続く bulked-segregant analysis により、6 系統について原因遺伝子の同定に成功している。得られた low-induction class のうち 2 系統は、*At2g47240* (*CER8*, long-chain acyl-CoA synthase gene) と *At5g35700* (*FIMBRIN5*, actin bundling factor gene) がそれぞれ原因遺伝子であることが示唆された。これらの遺伝子は過去においても花粉発芽に関わることが報告されていたことから、本スクリーニング系が変異体花粉の探索に有効であると考察している。一方、non-induction class の 4 系統は、全て同一の遺伝子 *At1g48090* (*AtVPS13a*, vacuolar protein sorting 13) に変異が認められた。この遺伝子の解析例はなかったが、T-DNA 挿入による欠損変異体の花粉がレポーター遺伝子を誘導できなかったことより、この遺伝子が責任遺伝子であると結論づけている。

第二章では、見出されたシロイヌナズナの *AtVPS13a* 変異体について生理学

的な解析を行なっている。*AtVPS13a* の変異体花粉には顕著な形態異常は認められず、受粉後も吸水反応までは野生型の花粉と同様に進行した。しかし、観察を行なった 45 分以内では、花粉の発芽はまったく認められなかった。*AtVPS13a* 変異アリルの花粉側からの次世代への伝達率は著しく低下していたが、雌蕊側からの伝達率は正常であった。また、*AtVPS13a* のパラログである *AtVPS13b* の欠損変異体では花粉発芽の異常はまったく観察されなかった。従ってシロイヌナズナのゲノム上で見出された 3 つの *VPS13* ファミリー遺伝子のうち、*AtVPS13a* が花粉発芽において主たる機能を持つと考察している。

第三章では、*AtVPS13a* の細胞内における役割についてさらなる研究を展開している。*AtVPS13a* と *AtVPS13b* のタンパク質のドメイン構成は高度に保存されていたが、*AtVPS13a* の中間部分にのみカルシウムイオン依存的な脂質結合性で知られる C2 ドメインの存在が予測されてきた。ゲノム編集法を用いてタンパク質全体のフレームを維持しつつこの C2 ドメインを削除したところ、*AtVPS13a* 欠損変異体と同様に花粉が発芽できなくなることが示された。また、カルシウムレポーターである Yellowameleon 3.6 を用いて受粉後の *AtVPS13a* 欠損変異体の花粉における細胞質カルシウムイオン濃度の計測を行なったところ、野生型花粉と差異は見出されなかった。このことから、*AtVPS13a* は受粉後の花粉におけるカルシウム変動を受けて機能すると考察している。*VPS13* は真核生物において高度に保存されたタンパク質であり、ヒトの細胞においては粗面小胞体と脂質体の間の脂質輸送を担うことや、両オルガネラ間のテザリング(連結)活性があることが報告されている。そこで透過型電子顕微鏡を用いて *AtVPS13a* 変異体花粉のオルガネラの形態を野生型花粉のものと詳細に比較解析した。受粉前の成熟花粉内には小胞体と脂質体が癒着した構造が多数観察されたが、野生型花粉では吸水後にその構造がすみやかに解離する様子が観察された。一方、変異体の花粉では、吸水後に小胞体と脂質体の解離がほとんど起こらないことを発見し、この解離反応が急速な花粉管伸長に必須であることを考察している。

以上、本論文では、独自に開発した受粉レポーター系を用いた探索により、花粉発芽に必須の因子 *AtVPS13a* を見出した。さらに、詳細な機能解析を通じて、本因子が花粉吸水後の小胞体と脂質体との一斉解離現象に関与することを発見した。これまでに観察例のない興味深い現象であり、本現象における *AtVPS13a* の作動原理を更に追求することで、未解明の部分が多い *VPS13* の機能が明らかにされることが期待される。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。