

博士論文

花粉形成過程における
花粉母細胞とタペート細胞の細胞壁の変化

松尾 優一

博士論文

花粉形成過程における
花粉母細胞とタペート細胞の細胞壁の変化

東京大学大学院農学生命科学研究科
生産・環境生物学専攻

平成 24 年度進学 松尾 優一
指導教員 堤 伸浩

目次

第一章. 緒言	3
第二章. 花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化	11
2.1 序論	12
2.2 材料及び方法	14
2.3 結果	18
2.3.1 セルロース性細胞壁の染色条件の検討	
2.3.2 野生型シロイヌナズナの小孢子期におけるセルロース性細胞壁の分布	
2.3.3 野生型シロイヌナズナの花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化	
2.3.4 固定していない花粉母細胞および四分子における細胞壁の分布	
2.3.5 Glycosyl hydrolase family 9 の系統樹および発現パターン	
2.4 考察	39
2.4.1 花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化	
2.4.2 花粉形成過程におけるセルラーゼホモログの発現	
第三章. 花粉形成に異常を示す変異体におけるセルロース性細胞壁の変化	41
3.1 序論	42
3.2 材料及び方法	44
3.3 結果	54
3.3.1 <i>spl/nzz</i> 変異体におけるセルロース性細胞壁の変化	
3.3.2 <i>tpd1</i> 変異体におけるセルロース性細胞壁の変化	
3.3.3 <i>dyl1</i> 変異体におけるセルロース性細胞壁の変化	
3.3.4 野生型および変異体におけるセルラーゼホモログの発現比較	
3.3.5 セルラーゼホモログの転写産物の組織局在	
3.4 考察	75
3.4.1 葯の発生を制御する遺伝子とセルロース性細胞壁減少の関係	
3.4.2 花粉母細胞の細胞壁分解とタペート細胞の関係	
3.4.3 セルラーゼホモログである <i>GH9B15</i> について得られた知見	

3.4.4 *GH9B15* の解析から明らかになった *spl/nzz* 変異体および *tpd1* 変異体の特徴

3.4.5 *GH9B1*、*GH9B2*、*GH9B13*、*GH9B18* の発現部位についての先行研究との比較

第四章. 総合考察	81
4.1 花粉母細胞とタペート細胞の分化過程	
4.2 花粉母細胞とタペート細胞においてセルロースが分解される意義	
4.3 セルロース分解に関わる遺伝子の候補	
第五章. 摘要	85
参考文献	90
謝辞	99

第一章. 緒言

植物の雄性配偶体である花粉は、多くの有性生殖を行う植物にとって生活環から欠くことのできない、必須の細胞である。花粉形成は急激な気温の変化により異常となりやすいことが知られており、花粉形成過程についての知見は基礎生物学的な観点からのみならず、農業生産上の観点からも必要とされている。近年、遺伝学・分子生物学的な研究によって花粉形成の詳細な分子機構が明らかになりつつあるが、未だ不明な点も多い。シロイヌナズナやイネなどの被子植物において、花粉は雄蕊の先端にある葯のなかで作られる。シロイヌナズナの葯の発生は、Sanders *et al.* (1999) によって14のステージに分けられている (Fig. 1-1, 1-2, Table 1, 足立および丸橋 1995)。葯ステージ1では雄蕊の原基が表皮によって囲まれた均一な組織から構成されているように見える。葯ステージ2において葯は4つの角を持つように見え、それぞれの角のL2層から胞原細胞が分化する。胞原細胞は葯ステージ3において分裂し、孢子形成細胞と側膜細胞が形成される。孢子形成細胞はのちに花粉母細胞へと分化し、減数分裂を経て、最終的に花粉粒となる細胞である。また側膜細胞は数回の体細胞分裂を経て、花粉粒を囲むように存在する数層の細胞層となる。葯ステージ5は、このような葯を構成する細胞層がすべて揃う時期である。葯は4つの葯室から構成されるが、それぞれの葯室の最も内側には花粉母細胞が存在する。この花粉母細胞の集団を囲むように、葯室の内側から順にタペート組織、中間層、内被、表皮が存在する。

花粉母細胞の減数分裂以降における、タペート細胞の花粉形成への関与が知られている。花粉母細胞は葯ステージ6の減数分裂を経て、葯ステージ7に減数分裂を終えた四つの細胞がカロース壁によって囲まれた四分子となり、その後四分子は分離して、葯ステージ8にばらばらの小孢子となる。減数分裂中の細胞と四分子は、カロースからなる細胞壁に包まれてひとかたまりとなっている。四分子が小孢子へと分離する過程で、この四分子の細胞壁のカロースは、タペート細胞から分泌される酵素によって分解されと考えられている (Fig. 1-3)。また、タペート細胞の花粉形成への関与は、環境ストレスに関する研究や発生学の観点からも示唆されている。低温ストレス下や様々な雄性不稔変異体において、タペート細胞は葯室側へ異常に肥大することが知られている (Nishiyama 1970, Satake and Hayase 1974, Nishiyama 1976, Majewska-Sawka *et al.* 1993, Matsuhira *et al.* 2007)。このようにタペート細胞の四分子期以降の花粉形成への関与はよく調べられている。一方で、タペート細胞が分化する機構については未だ十分に解明されていない。タペート細胞の分化に関する知見が、タペート細胞が発生せず、代わりに余分な花粉母細胞へと分化する変異体の解析から得られた (Yang *et al.* 2003)。変異体の解析から、花粉母細胞とタペート細胞はいずれももともとは花粉母細胞となる性質を持つことが示唆されている。

タペート細胞は細胞壁をほとんど持たないことがキンポウゲ科の *Helleborus foetidus* やイネ科

の *Avena sativa* において古くから知られている (Echlin and Godwin 1968, Steer 1977)。しかしながらシロイヌナズナでは、細胞壁の主要構成成分であるセルロースがタペート細胞においてどのように変化するのかについて解析が行われていなかった。植物の一次細胞壁は、ヘミセルロース、ペクチンおよび糖タンパク質からなる基質に埋め込まれたセルロース微繊維の基本骨格から構成されている (Talbot and Ray 1992, Carpita and Gibeault 1993)。シロイヌナズナの花粉形成過程では、花粉母細胞においてペクチンの分解が起こることが知られている (Rhee and Somerville 1998)。複数のペクチン分解酵素の変異体が知られており、これらの変異体では花粉母細胞の細胞壁のペクチンが分解されない結果、四分子が解離せず、接着したままの小胞子が得られる (Rhee and Somerville 1998, Rhee *et al.* 2003, Francis *et al.* 2006, Ogawa *et al.* 2009)。また、セルロース性細胞壁という観点からは、タペート細胞だけではなく花粉母細胞においてもこれまで十分な解析が行われていなかった。

このように植物の花粉形成過程には不明な点が残されている。本博士論文では、花粉形成過程のセルロース性細胞壁に着目した研究を行った。まず第二章でセルロース性細胞壁の染色法を確立し、シロイヌナズナの野生型の花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化を調べた。次に第三章で葯の発生に異常を示す変異体を用いて、花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化を調べ、セルラーゼホモログの発現解析を行った。第四章ではこれらをあわせて、花粉形成過程の細胞壁の変化について総合的に考察した。

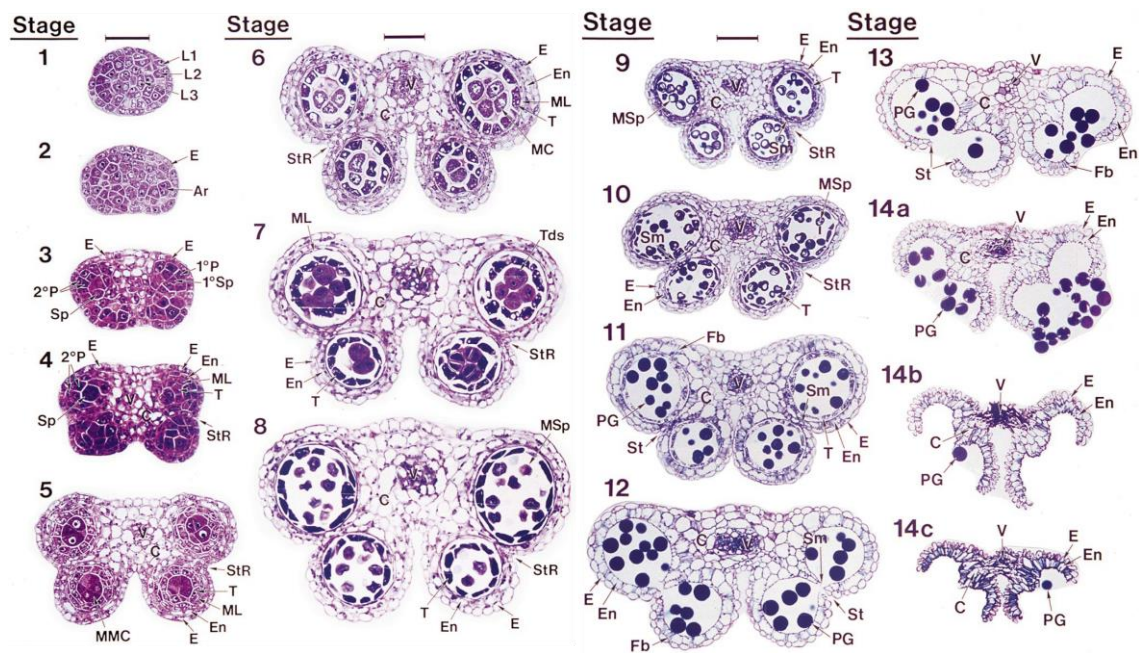


Fig. 1-1 シロイヌナズナにおける葯の発生過程とステージの定義

Sanders *et al.* (1999) より一部改変。花の樹脂包埋切片を Toluidine Blue O によって染色し、明視野顕微鏡で観察されたものである。Ar, 胞原細胞; C, 葯隔; E, 表皮; En, 内被; L1, L2, L3, 雄蕊原基の三つの細胞層; MC, 減数分裂中の細胞; ML, 中間層; MMC, 花粉母細胞; MSp, 小孢子, 1°P, 一次側膜細胞; 2°P, 二次側膜細胞; PG, 花粉粒; Sm, 隔壁; 1°Sp, 一次孢子形成細胞; Sp, 孢子形成細胞; St, 口辺細胞; StR, 口辺細胞領域; T, タペート組織; Tds, 四分子; V, 維管束領域。スケールバーは、ステージ 1 および 6 の上のが 25 μm でステージ 1 から 8 に適用され、ステージ 9 の上のが 50 μm でステージ 9 から 14c に適用される。

Table 1 シロイヌナズナの葯の発生中に起こる主要な現象^a

葯の ステージ	主要な現象と形態的指標 ^b	存在する 組織 ^c
1	丸みのある雄蕊原基が現れる。	L1, L2, L3
2	L2 層の四つの角に胞原細胞が発生する。	E, Ar
3	胞原細胞から一次側膜細胞と一次孢子形成細胞が発生する。それぞれがさらに分裂して二次側膜細胞と孢子形成細胞が発生する。	E, 2°P, Sp
4	二つの発生中の口辺細胞領域をもつ、四つの突出部からなる葯のパターンが現れる。維管束領域が発生する。	E, En, ML, T, Sp, C, V
5	四つのはっきりとした形の葯室が完成する。全ての葯の細胞のタイプが存在し、葯のパターンがはっきりとする。小孢子母細胞が現れる。	E, En, ML, T, MMC, C, V
6	小孢子母細胞が減数分裂に入る。中間層がつぶれて崩壊する。タペート細胞が空胞化し、葯全体が大きくなる。	E, En, ML, T, MC, C, V
7	減数分裂が完了する。小孢子からなる四分子はそれぞれの葯室内を自由に動ける。中間層の残さが存在する。	E, En, ML, T, Tds, C, V
8	四分子を包んでいるカロース壁が崩壊し、それぞれの小孢子が自由に動けるようになる。	E, En, T, MSp, C, V
9	葯の生長と拡大が続く。小孢子にエキシン壁ができ、空胞化が始まる。隔壁細胞が透過型電子顕微鏡のレベルで判別できる。	E, En, T, MSp, C, V, Sm
10	タペートの崩壊が始まる。	E, En, T, MSp, C, V, Sm
11	花粉の有糸分裂が起こる。タペート細胞が崩壊する。内被が拡大する。内被と葯隔において二次肥厚または“fibrous bands”が現れる。隔壁細胞の崩壊が始まる。口辺細胞の分化が始まる。	E, En, T, PG, C, V, Sm, St
12	花粉が三細胞になる。隔壁が崩壊した後、葯室同士がつながる。	E, En, PG, C, V, St
13	葯が裂開する。花粉が放出される。	E, En, PG, C, V
14	雄蕊が老化して、細胞が収縮する。	E, En, C, V
15	花が老化して、雄蕊が落下する。	

本表は Sanders *et al.* (1999) より和訳して引用した(一部改変)。

^a 各ステージの葯内の形態は Fig. 1-1 に示した。(次ページに続く)

^b それぞれの葯室内における細胞の分化は、ステージ 1 から 4 では同調していない。ステージ 5 以降では、葯室の細胞の発生段階は葯内で一致している。

^c Ar, 胞原細胞; C, 葯隔; E, 表皮; En, 内被; L1, L2, L3, 雄蕊原基の三つの細胞層; MC, 減数分裂細胞; ML, 中間層; MMC, 小孢子母細胞; MSp, 小孢子; 2°P, 二次側膜細胞; PG, 花粉粒; Sm, 隔壁; Sp, 孢子形成細胞; St, 口辺細胞; T, タペート組織; Tds, 四分子; V, 維管束領域。

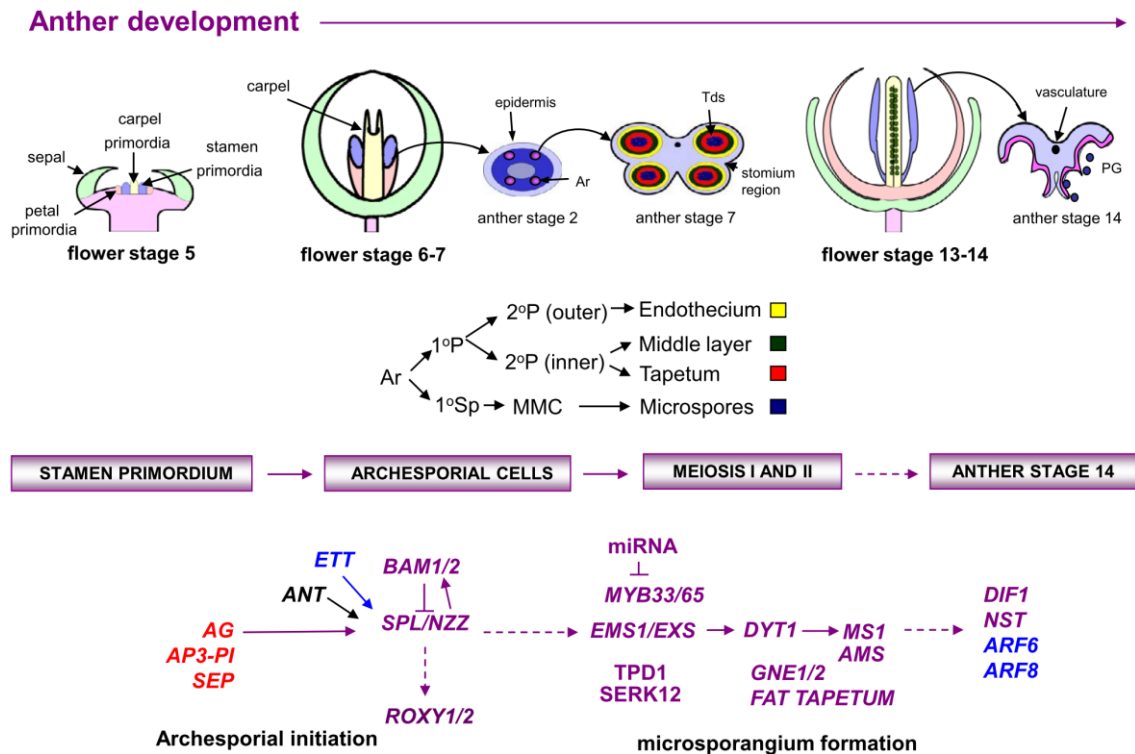


Fig. 1-2 葯形成に関わる遺伝子に着目した雄蕊の発生過程

本図は Alvarez-Buylla *et al.* (1990) より引用した。最も上には、葯の細胞分化の代表的なステージ (Sanders *et al.* 1999) および花の発生ステージが描かれている。葯発生のステージ 1 に、L1, L2 および L3 の三つの細胞層をもつ丸みを帯びた雄蕊の原基が現れる。ステージ 2 には、胞原細胞 (Ar) が L2 層の四か所の「角」に生じる。その後胞原細胞は分裂し、一次側膜細胞層 (1°P) および一次胞子形成細胞層 (1°Sp) が生じる。次に一次側膜細胞層は分裂し、外側と内側の二種類の二次側膜細胞層 (2°P) が現れる。外側の細胞層から内被が生じ、内側の細胞から中間層およびタペート組織が生じる。一次胞子形成細胞からは花粉母細胞 (MMC) が生じ、減数分裂を経て、小胞子が生じる (Alves-Ferreira *et al.* 2007)。ステージ 7 には減数分裂は完了し、小胞子の四分子 (Tds) を含む四か所の葯室が見られる。ステージ 14 には細胞が縮み、葯の裂開によって花粉粒 (PG, Sanders *et al.* 1999) が放出される。紫色の文字で、葯発生に役割を持つ既知の遺伝的相互作用が示されている。AG (赤の文字) は *SPL* (葯発生に関わることが知られている最初の遺伝子) の発現を誘導する。後の小胞子嚢形成において *EMS1*, *DYT1*, *MS1* および *AMS* 遺伝子のはたらきも必要不可欠である (Feng and Dickinson 2007)。矢印と T 字の線はそれぞれ正および負の制御関係を示しており、点線は間接的な相互作用の可能性を示している。

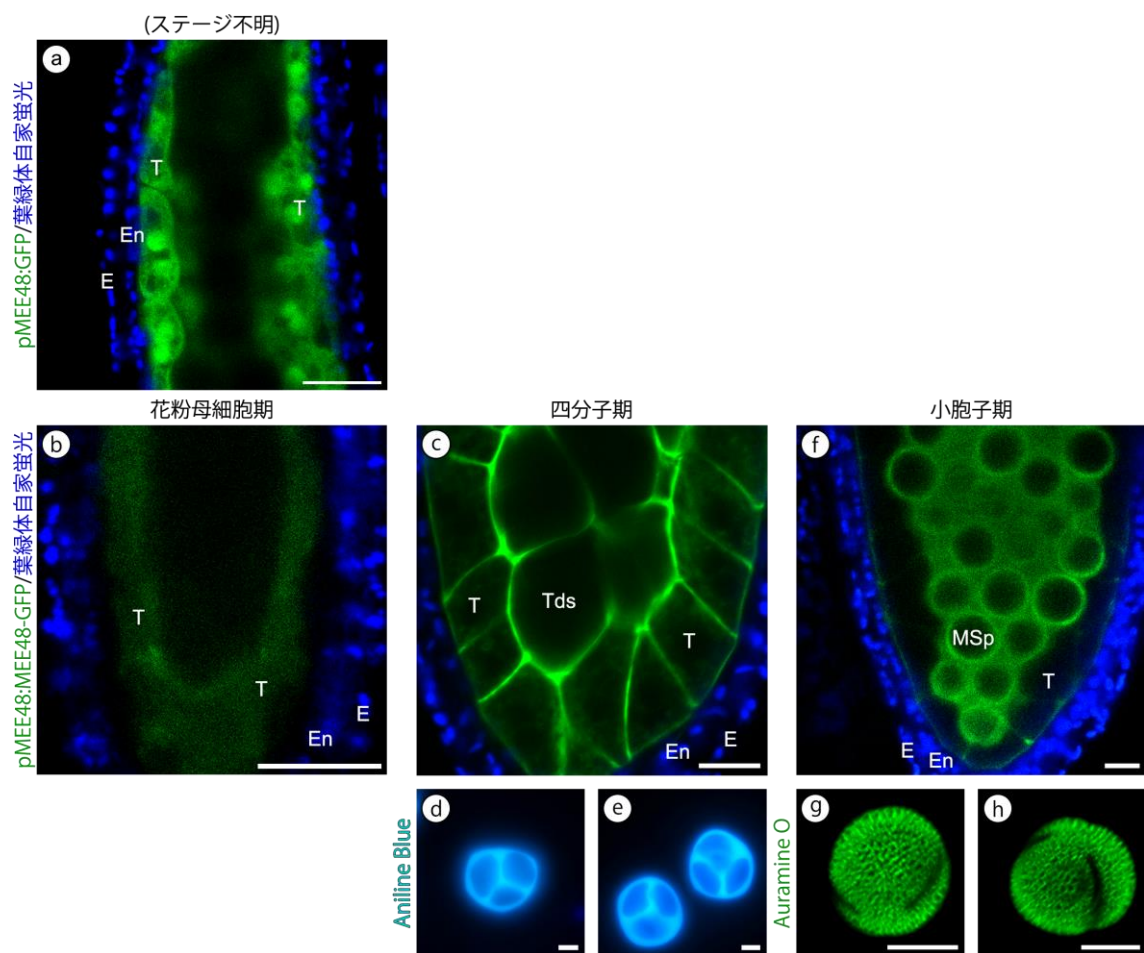


Fig. 1-3 タペート細胞から四分子への細胞壁分解酵素の分泌

シロイヌナズナの葯の縦断面が観察されている。MEE48/A6 はタペート細胞において発現するカラゼで、細胞外へ分泌され、四分子を接着しているカロースを分解する役割を持つと考えられている。GFP (a) および MEE48-GFP (b, c, f) の蛍光、葉緑体自家蛍光 (a-c, f)、四分子の細胞壁のカロースを染める Aniline Blue (d, e) および小胞子の外壁のエキシンを染める Auramine O (g, h) による蛍光。パネル c の葯から、発生ステージを確認するために四分子を取り出した (d, e)。パネル f の葯から、発生ステージを確認するために小胞子を取り出した (g, h)。四分子は蛍光顕微鏡によって観察した。小胞子は共焦点レーザー顕微鏡によって複数の断面を観察した後、立体構築して画像を作製した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、Msp microspores (小胞子)、T tapetum (タペート組織)、Tds tetrads (四分子)。スケールバーは 20 μm (a-c, f)、10 μm (d, e) および 5 μm (g, h)。

第二章. 花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化

2.1 序論

シロイヌナズナの葯の発生は14のステージに分けられる (Sanders *et al.* 1999)。ステージ5に、葯を構成する全ての細胞の種類 (中央に位置する花粉母細胞、内側から順にタペート細胞、中間層、外側の内被) が存在する。花粉母細胞の減数分裂後、ステージ7に、タペート細胞は酵素を分泌して四分子の細胞壁を分解する (Hird *et al.* 1993)。雄性不稔はしばしばタペート細胞の機能の異常を伴うことから、タペート細胞は花粉形成に対する機能を持つことが示されている。しかしながら、初期の葯発生の中のタペート細胞の発生と機能のしくみは未だによく分かっていない。

植物の細胞の大多数は細胞壁を持つが、タペート細胞、卵細胞、精細胞は例外であり、細胞壁をほとんど持たないと考えられている (Albersheim *et al.* 2010)。キンポウゲ科の *Helleborus foetidus* において、電子顕微鏡による解析から、タペート細胞の細胞壁はタペート細胞が分化する時には薄いですが、花粉母細胞形成中に厚くなり、四分子形成中には分解されたように見えることが明らかにされた (Echlin and Godwin 1968)。タペート細胞の細胞壁の厚みの増加はイネ科の *Avena sativa* においても電子顕微鏡によって減数分裂前に見られたが、一方で蛍光染色によって細胞壁はすでにセルロースを失っていたことが明らかにされた (Steer 1977)。電子顕微鏡の結果と蛍光染色の結果の違いは、セルロースに対する蛍光染色の特異性によって引き起こされている。そのため、蛍光染色によって電子顕微鏡が示していない細胞壁中のセルロース成分の分布を示すことが可能である。シロイヌナズナにおいて、タペート細胞の細胞壁の厚みは減数分裂の時期ごろに減少し、タペート細胞の細胞壁は四分子期までに完全に分解されることが電子顕微鏡による観察によって明らかにされた (Owen and Makaroff 1995)。しかしながら、タペート細胞の細胞壁においてセルロース成分がいつ減少するのかは明らかになっていない。

マメ科の *Lathyrus odoratus* において、葯は大量のセルラーゼを含むことが知られている (Sexton *et al.* 1990)。他の植物のセルラーゼ遺伝子に類似している4つの部分的なcDNAが *Lathyrus odoratus* から単離されてきた (Neelam and Sexton 1995)。しかしながら、これらの遺伝子がタペート細胞で発現しているのかどうかは明らかになっていない。

一次細胞壁はヘミセルロース、ペクチンおよび糖タンパク質の基質に埋め込まれたセルロース骨格から構成される (Talbot and Ray 1992, Carpita and Gibeaut 1993)。セルロース微繊維は β -1,4-グルカンの鎖から構成される。これらの多糖を染めるために、本研究では、Calcofluor と

Renaissance 2200 という二つの染色剤を用いた。Calcofluor はセルロースを染めるために一般的に用いられる染色剤であるが、カロースのような他の多糖も染める性質がある (Hughes and McCully 1975)。Renaissance 2200 はセルロース性の成分を認識するより改良された染色剤であるが (Harris *et al.* 2002)、この染色剤もカロースも染色する。また、Aniline Blue はカロースに対する特異的な染色剤である。本研究では、セルロース性細胞壁の染色法を確立し、花粉形成過程でいつ、どの組織でセルロース性細胞壁が変化するのかを解析した。

2.2 材料及び方法

植物材料

植物材料としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0) を人工気象器 (LH-220S、日本医化器械製作所) で、長日条件 (14h-light / 10h-dark) 、22℃で生育させた。

花序の採取および花粉母細胞の単離

シロイヌナズナの花序は、様々な発生ステージのつぼみが一揃いになっている。花序の採取においては、観察しないステージの花を含まないようにするために、Sanders *et al.* (1999) による葯の発生ステージ及び Smyth *et al.* (1990) による花の発生ステージを参考に、つぼみが開いて葯の裂開が起こる花ステージ 13 までを採取し、以降の花はピンセットにより切除した。

花粉母細胞の単離は、Leica ルーチン用実体顕微鏡 M125 または Leica 蛍光実体顕微鏡 MZ FLIII 上で、先の細いピンセットを用いて行った。花粉母細胞を含む葯は非常に小さいので、作業を容易にするために、できる限り大きな花序(主茎についた、主茎の短い時期の花序)を用いることが望ましい。葯の外見からは内部の発生ステージが分からないが、花序の大きさが同じであれば、葯の大きさ・形態と発生ステージの関係が似るので、花粉母細胞期の葯を経験的に推測することができる。葯の端をピンセットまたはカミソリで切断したあと葯を押し潰すことにより、減数分裂前期の花粉母細胞の集団を細胞同士が接着した状態で単離することができる(伊藤 1975)。

FAA および PFA・GA 固定

FAA 固定においては、MilliQ 水:99.5%エタノール:酢酸:ホルムアミド=7:10:1:2 の混合液を用いた。真空ポンプ (MINIVAC PD-52, Yamato) で 1 時間脱気を行った。PFA・GA 固定においては、Coimbra *et al.* (2007) に記述されているリン酸バッファー (0.025 M, pH 7, 0.001% Tween 80) に溶かした 2%パラホルムアルデヒド及び 2.5%グルタルアルデヒドの混合液を用いた。真空ポンプ (MINIVAC PD-52, Yamato) で 1 時間脱気を行い、4℃で一晩静置した。0.025 Mリン酸バッファーに 30 分、氷上で組織を浸すことを 2 回繰り返した。組織を脱水処理するために、上昇エタ

ノール系列を用いた。氷上で 30%、40%、50%、60%、70%、85%エタノールにそれぞれ 60 分、4℃で 95%エタノールに一晩、室温で無水エタノールに 30 分を 2 回、60 分を 2 回の順に組織を浸した。

樹脂への包埋と切片の作製

減圧器を適宜使い、99.5%エタノール:Technovit 7100 Base Liquid (Kulzer) が 1:1 の溶液に 2 時間組織を浸した。回転培養機 (RT-30mini, TAITEC) を使い、Hardener I (Kulzer) (0.1 mg/l) を含む Technovit 7100 溶液に 12 時間、室温で組織を浸した。組織を Hardener I (0.1 mg/l) を含む Technovit 7100 と Hardener II (Kulzer) を 15:1 で混合したものに浸し、Histoform S (Kulzer)、Histoblock (Kulzer) 及び 34℃に設定したホットプレート (HI1220, Leica) を用いて重合させた。十分に重合しない場合は Technovit 3040 (Kulzer) 及び Technovit Universal Liquid (Kulzer) を用いて、Technovit と Histoblock をしっかりと固定した。包埋したサンプルの切片 (5 µm) を、ミクロトーム (Jung RM 2035, Leica) を用いて作製した。

染色

セルロースの分布は Renaissance 2200 (Renaissance Chemicals Ltd) もしくは Calcofluor (Fluorescent Brightener 28, SIGMA) を用いて検出した。これらの染色剤はカロースも染めるため、一部の切片は Aniline blue (Wako) を用いてカロースを特異的に染色した。

テクノビット樹脂切片は、セルロースおよびカロースを 1% Renaissance 2200 もしくは Calcofluor を用いて染色し、対比染色として 2% Propidium Iodide (Invitrogen) を用いて染色した。一部の切片はカロースを染色するために、リン酸バッファー (0.07M, pH 8.5) に溶かした 0.05% Aniline Blue (Wako) を用いて染色した。カロースの観察後、葯のステージを調べるために、カバーガラスを一度取り外して Renaissance 2200 を用いて染色した。均一に染色するために、染色処理はシェーカー (LABO SHAKER MODEL BC-740, BIO CRAFT) 上で振盪しながら行った。

固定していない細胞の Renaissance 2200 および Aniline Blue 染色も、上記と同濃度の染色液を用いて行った。

顕微鏡観察

セルロースの蛍光観察のために条件検討を行い、最終的には以下の条件で観察した。Nikon C1Si 共焦点顕微鏡ユニット（対物レンズは Plan Apo VC 100×/1.40 Oil、Plan Apo 60×/1.40 Oil、Plan Fluor 40×/0.75 または Plan Fluor ELWD 20×/0.45、Renaissance 2200 及び Calcofluor の励起には $\lambda = 405$ nm の半導体レーザー、Propidium Iodide の励起には $\lambda = 561$ nm の固体レーザー、Renaissance 2200 及び Calcofluor の吸収フィルターには 460/50、Propidium Iodide および葉緑体の自家蛍光の吸収フィルターには 650LP）を用いた。カロースの観察においては、Nikon TE2000-U 蛍光顕微鏡（対物レンズは Plan Fluor 100×/1.30 Oil、励起フィルターには 365/10、吸収フィルターには 400LP）を用いた。セルロースの蛍光観察のための条件検討では、Nikon TE2000-U 蛍光顕微鏡（対物レンズは Plant Fluor 100×/1.30 Oil）を用いた。励起フィルターには 360/40、365/10 または 400/40、ダイクロイックミラーには 400 または 430、吸収フィルターには 400LP、460/50 または 450LP を用いた。画像の出力に際して、Adobe Photoshop CS4 Extended (Adobe Systems Inc.) を用いて調整を行った。Renaissance 2200、Calcofluor による染色結果および Renaissance 2200 と Aniline Blue による二重染色の結果は、擬似カラーとして緑色で示した。切片染色の対照実験として染色を行わなかった場合、自家蛍光はほとんど観察されなかった。

系統解析

アミノ酸配列の取得元のデータベースとして、*Amborella trichopoda* は Amborella Genome Database (<http://amborella.huck.psu.edu/>)、イヌカタヒバ、ヒメツリガネゴケは Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>) および SALAD Database (<http://salad.dna.affrc.go.jp/salad/>)、コットンウッド、タルウマゴヤシ、トウモロコシ、*Eucalyptus grandis* は Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>)、イネは RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) および UniProtKB (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb/>)、オウシュウトウヒは ConGenIE (<http://congenie.org/>)、カカオは CocoaGen DB (<http://cocoagendb.cirad.fr/>)、シロイヌナズナは TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)、トマトは Sol Genomics Network (http://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome/) および Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>)、バナナは The Banana Genome Hub (<http://banana-genome.cirad.fr/>) を用いた。アミノ酸配列のアラインメントには MAFFT v7.214 を用いた (Katoh *et al.* 2002, Katoh and Standley 2013)。Strategy のオプションは 1. --auto を用いた。系

統樹の作製には MEGA 6.06 を用いた (Tamura *et al.* 2013)。Statistical Method は Neighbor-joining (Saitou and Nei 1987)、Phylogeny Test は Bootstrap method を 1000 回、Model/Method は Poisson model、Rates among Sites は Uniform rates、Gaps/Missing Data Treatment は Complete deletion を用いた。Tree Explorer を用いて、ブートストラップ値は 50 以上のものを表示した。

2.3 結果

2.3.1 セルロース性細胞壁の染色条件の検討

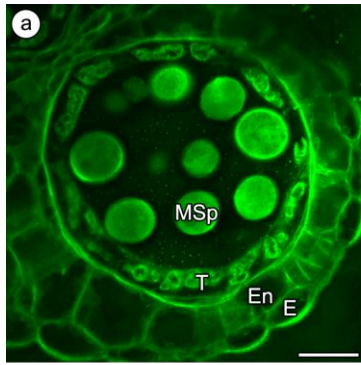
葯におけるセルロース性細胞壁の分布を調べるために、花序を FAA によって固定し、一般的に用いられるセルロースの染色剤である Calcofluor による染色を行った (Fig. 2-1a)。この結果、この手法には以下のいくつかの問題点があることが分かった。一点目は細胞質などの構造も染色されていたため細胞壁の明瞭な染色像が得られなかったこと、二点目はタペート細胞の細胞質の形態が異常であり固定による影響が考えられたこと、三点目は染色にムラがあったことである。そこでまず本項では染色条件の検討を行った。

Renaissance 2200 はより改良されたセルロースの染色剤である。葯の切片を Renaissance 2200 によって染色したところ、Calcofluor とほぼ同様の染色結果が得られた (Fig. 2-1b)。染色剤の変更だけでは不十分だと考え、観察条件の改良を目指した。Calcofluor および Renaissance 2200 の最大励起波長はおよそ 350 nm である。Fig. 2-1a および b は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察しており、励起に 405 nm のレーザーを用いていたため十分に蛍光を励起・検出できていなかった可能性を考えた。そこで蛍光顕微鏡を用いて、様々な励起フィルター・吸収フィルターの組合せによる観察を行った (Fig. 2-1c-f)。いずれもネガティブコントロール (Fig. 2-1g) と比較して強い蛍光が細胞壁部分において観察されたものの、350 nm 前後の励起フィルターを用いた結果においても、十分に明瞭な染色は得られなかった。これらの結果から、細胞壁部分の明瞭な染色を得るためには、蛍光顕微鏡よりも共焦点レーザー顕微鏡のほうが有効であると考えられた。

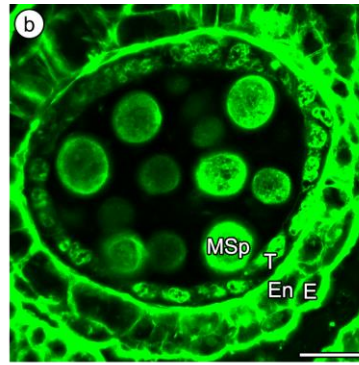
細胞質の非特異的な染色や形態異常を改善するために、固定液の検討を行った。小胞子の形態が FAA 固定によって変化しやすいことがイネを用いた実験から示されている (Satake 1974)。これまでの報告を精査した結果、PFA・GA 混合液を用いた手法 (Coimbra *et al.* 2007) では各細胞の形態が非常によく保存されていると考えられたので、固定液には PFA・GA 混合液を用いることとした。また染色ムラを改善するために振盪しながら染色処理した。以上の結果から細胞壁を明瞭に染色する手法が確立された (Fig. 2-1h, k)。

2.3.2 野生型シロイヌナズナの小孢子期におけるセルロース性細胞壁の分布

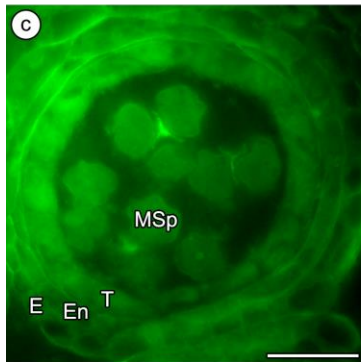
Calcofluor および Renaissance 2200 はいずれもセルロースおよびカロースを染色するが、非特異的な染色パターンについては野生型の葯切片を染色した際にわずかな違いが見られた (Fig. 2-1h, k)。タペート細胞を含むすべての細胞を可視化するために、Propidium Iodide による切片の対比染色を行った (Fig. 2i, l)。Fig. 2-1 h-m では小孢子期である葯ステージ 9 の切片の染色を行った。Calcofluor によって染色した場合に、表皮および内被の細胞は細胞壁部分が強い蛍光を発していたが、タペート組織および小孢子はほとんど蛍光を示していなかった (Fig. 2-1h)。Renaissance 2200 を用いた場合も、表皮および内被と比べてタペート組織および小孢子からはほとんど蛍光が検出されなかった (Fig. 2-1k)。



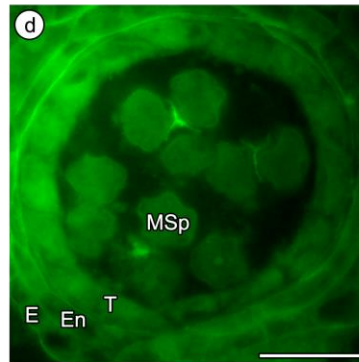
固定：FAA
 染色：Calcofluor
 検出：共焦点レーザー顕微鏡
 励起…405 nm
 検出…435～485 nm



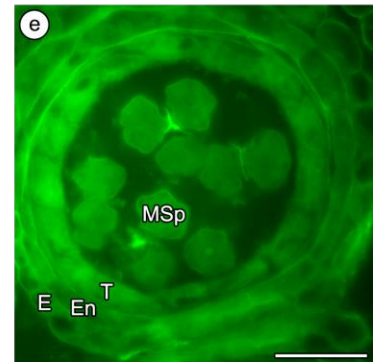
固定：FAA
 染色：Renaissance 2200
 検出：共焦点レーザー顕微鏡
 励起…405 nm
 検出…435～485 nm



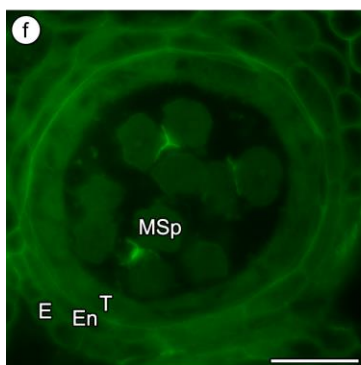
固定：FAA
 染色：Calcofluor
 検出：蛍光顕微鏡
 励起 …340～380 nm
 DM …430 nm
 検出 …435～485 nm
 (DMはダイクロイックミラーの意)



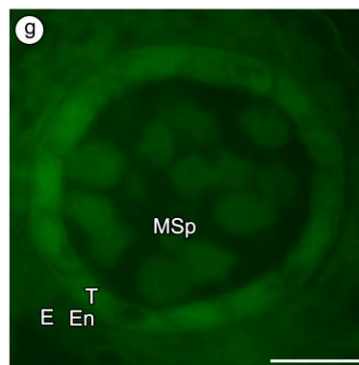
固定：FAA
 染色：Calcofluor
 検出：蛍光顕微鏡
 励起 …340～380 nm
 DM …400 nm
 検出 …400 nm～



固定：FAA
 染色：Calcofluor
 検出：蛍光顕微鏡
 励起 …360～370 nm
 DM …400 nm
 検出 …400 nm～



固定：FAA
 染色：Calcofluor
 検出：蛍光顕微鏡
 励起 …380～420 nm
 DM …430 nm
 検出 …450 nm～



固定：FAA
 染色：なし
 検出：蛍光顕微鏡
 励起 …340～380 nm
 DM …400 nm
 検出 …435～485 nm

Fig. 2-1 細胞壁を染色した野生型の小孢子期の葯の顕微鏡像(次ページに続く)

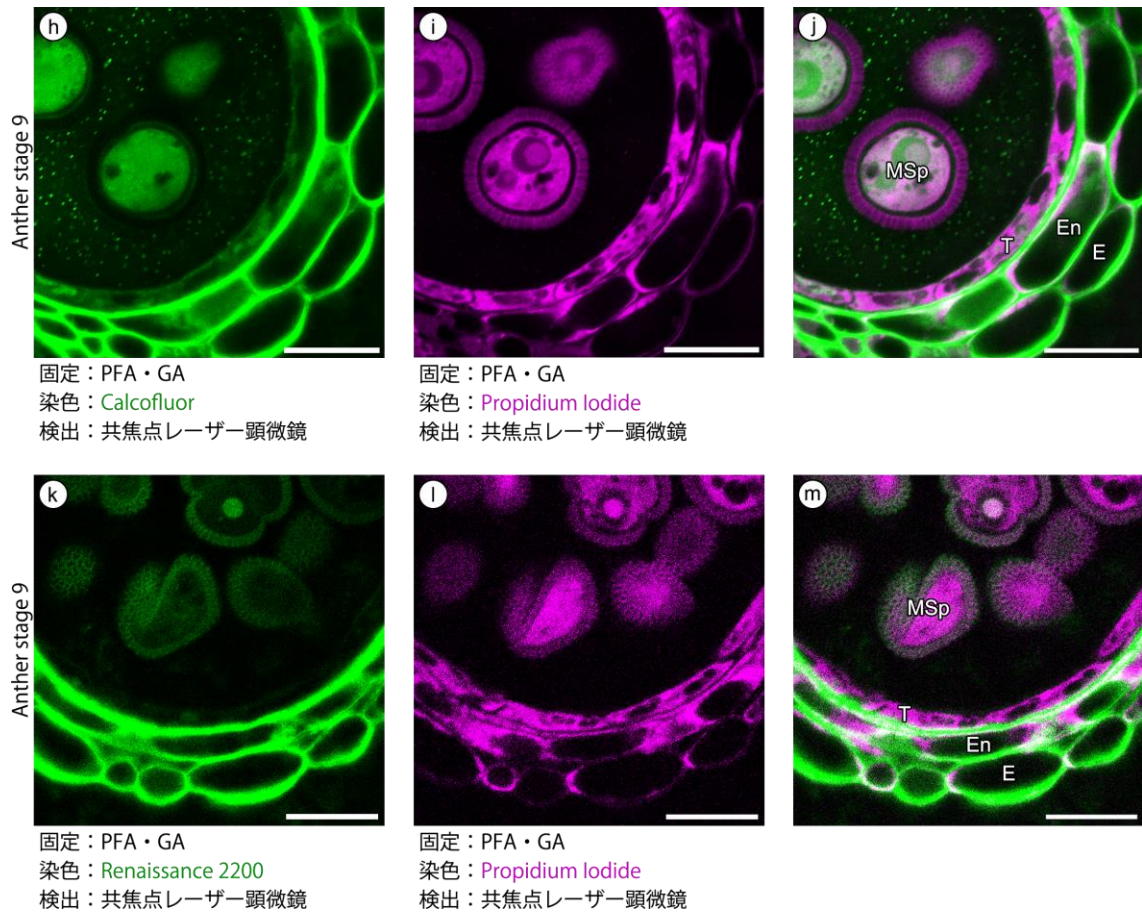


Fig. 2-1 細胞壁を染色した野生型の小孢子期の葯の顕微鏡像(続き)

Calcofluor による染色像 (a, c-f)、Renaissance 2200 による染色像 (b)、染色をしないネガティブコントロール (g) の顕微鏡像。Calcofluor による染色像 (h)、Renaissance 2200 による染色像 (k)、Propidium Iodide による染色像 (i, l)。j は h および i の重ね合わせ画像。m は k および l の重ね合わせ画像。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, h-m) または蛍光顕微鏡 (c-g) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、MSp microspores (小孢子)、T tapetum (タペート組織)。スケールバーは 20 μm。

2.3.3 野生型シロイヌナズナの花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化

タペート細胞のセルロース性細胞壁はもともと発生した時点で存在しなかったのであろうか。それとも、タペート細胞が発生した時点ではセルロース性細胞壁は存在しており、発生過程で減少したのであろうか。本項では、タペート細胞にはもともとセルロース性細胞壁が存在し、セルロース成分の変化がタペート細胞発生直後の葯ステージ 4 以降 (Sanders *et al.* 1999) に起こるのではないかと予想して実験を行った。染色剤としては、Calcofluor よりも非特異的染色が少ないと考えられた Renaissance 2200 を用いて切片を染色した。葯ステージ 4 に、四か所の袋状構造からなる葯のパターンが形成され、タペート細胞が現れる。このステージではタペート細胞と孢子形成細胞を含むすべての細胞層において、細胞壁部分に特異的な Renaissance 2200 の蛍光が検出された (Fig. 2-2c)。Renaissance 2200 は主にセルロースとカロースの両方を染色するため、Fig. 2-2c における細胞壁部分の蛍光は、セルロースとカロースの両方または一方の分布を示していると考えられる。タペート細胞および孢子形成細胞の細胞壁がカロースではなくセルロースからなることを確認するために、カロースを特異的に染める染色剤である Aniline Blue を用いて葯ステージ 4 の別の切片を染色した。カロースが存在する場合には、Fig. 2-4d のように水色で示すシグナルが検出される。葯ステージ 4 において、Aniline Blue による蛍光は葯の細胞層のどの部分においても検出されなかった (Fig. 2-2d)。なお葯切片のステージは Aniline Blue のみでは確認できなかったため、カロースの観察後に Renaissance 2200 によって二重染色し、ステージを確認した (Fig. 2-2d 左下)。以上をまとめると、Fig. 2-2 のパネル c および d のデータから葯ステージ 4 のタペート細胞および孢子形成細胞の細胞壁はカロースではなくセルロースから構成されていることが示された。

葯ステージ 5 は葯を構成するすべての種類の細胞が揃う時期である。このステージでは、表皮、内被および中間層の細胞壁は Renaissance 2200 による強い蛍光を示していたが、タペート細胞および花粉母細胞の細胞壁部分はわずかな蛍光しか示していなかった (Fig. 2-3c)。また Aniline Blue による染色の結果、カロースはどの細胞においても検出されなかった (Fig. 2-3d)。すなわち Fig. 2-3 のパネル c および d のデータから、葯ステージ 5 のタペート細胞と花粉母細胞においてセルロース性の細胞壁が減少したことが示された。カロースはほとんど存在しないままであり、葯ステージ 4 と 5 の間で変化はなかった。

葯ステージ 6 は花粉母細胞が減数分裂を行う時期である。このステージでは、表皮と内被の細胞は Renaissance 2200 による強い蛍光を示していたが、タペート組織はほとんど蛍光を示していなかった (Fig. 2-4c)。減数分裂中の細胞は Renaissance 2200 による強い蛍光を示しており (Fig.

2-4c)、これはカロース層によるものだと考えられる (Fig. 2-4d)。すなわち Fig. 2-4 のパネル c および d のデータから、薬ステージ 6 においてタペート細胞のセルロース性の細胞壁は完全に分解され、一方で減数分裂中の細胞はカロース壁によって囲まれることが示された。

薬ステージ 7 においても、表皮および内被と比べてタペート組織は Renaissance 2200 による蛍光をほとんど示さなかった (Fig. 2-5c)。四分子は Renaissance 2200 および Aniline Blue による強い蛍光を示すため (Fig. 2-5c, d)、カロース層に囲まれていることが分かる。

薬ステージ 8 および 9 において、表皮および内被と比べて小孢子およびタペート組織の細胞壁は Renaissance 2200 および Aniline Blue による蛍光をほとんど示さなかった (Fig. 2-6c, d および Fig. 2-7c, d)。

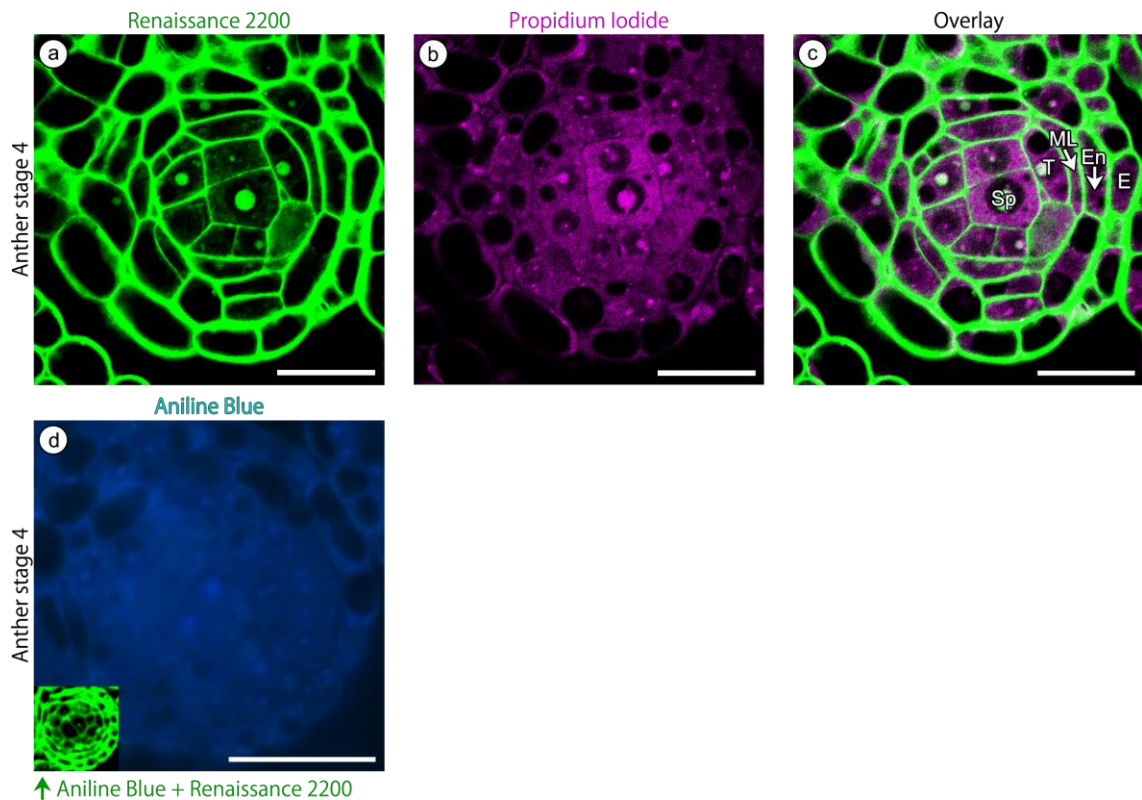


Fig. 2-2 細胞壁を染色した野生型のステージ 4 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 4 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、ML middle layer (中間層)、Sp sporogenous cells (孢子形成細胞)、T tapetum (タペート組織)。スケールバーは 20 μm 。

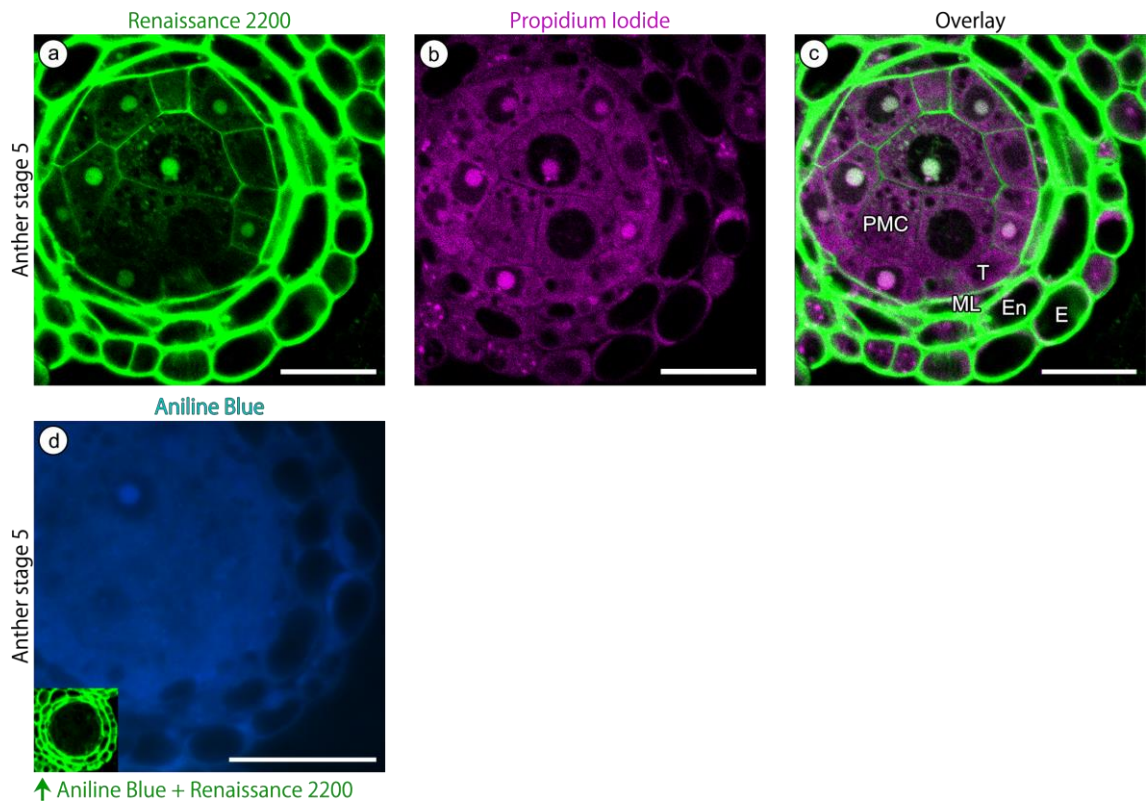


Fig. 2-3 細胞壁を染色した野生型のステージ 5 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 5 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、ML middle layer (中間層)、PMC pollen mother cells (花粉母細胞)、T tapetum (タペート組織)。スケールバーは 20 μm 。

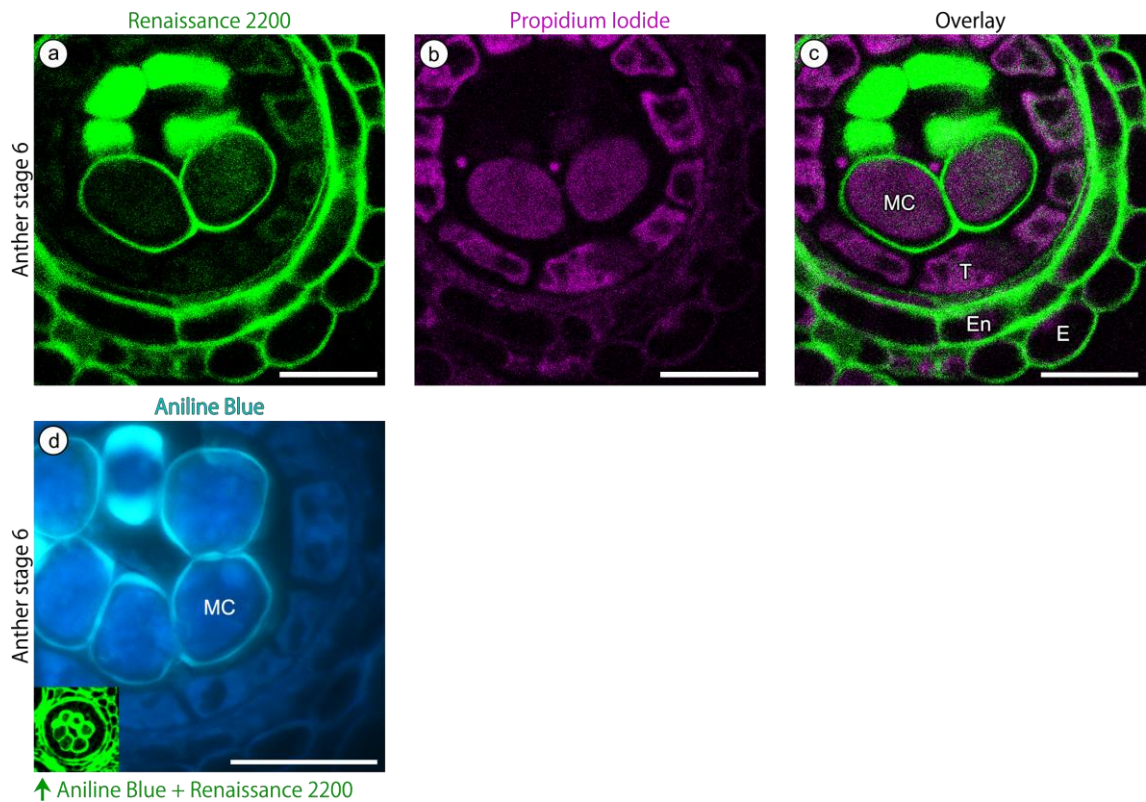


Fig. 2-4 細胞壁を染色した野生型のステージ 6 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 6 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、MC meiotic cell (減数分裂中の細胞)、T tapetum (タペート組織)。スケールバーは 20 μm 。

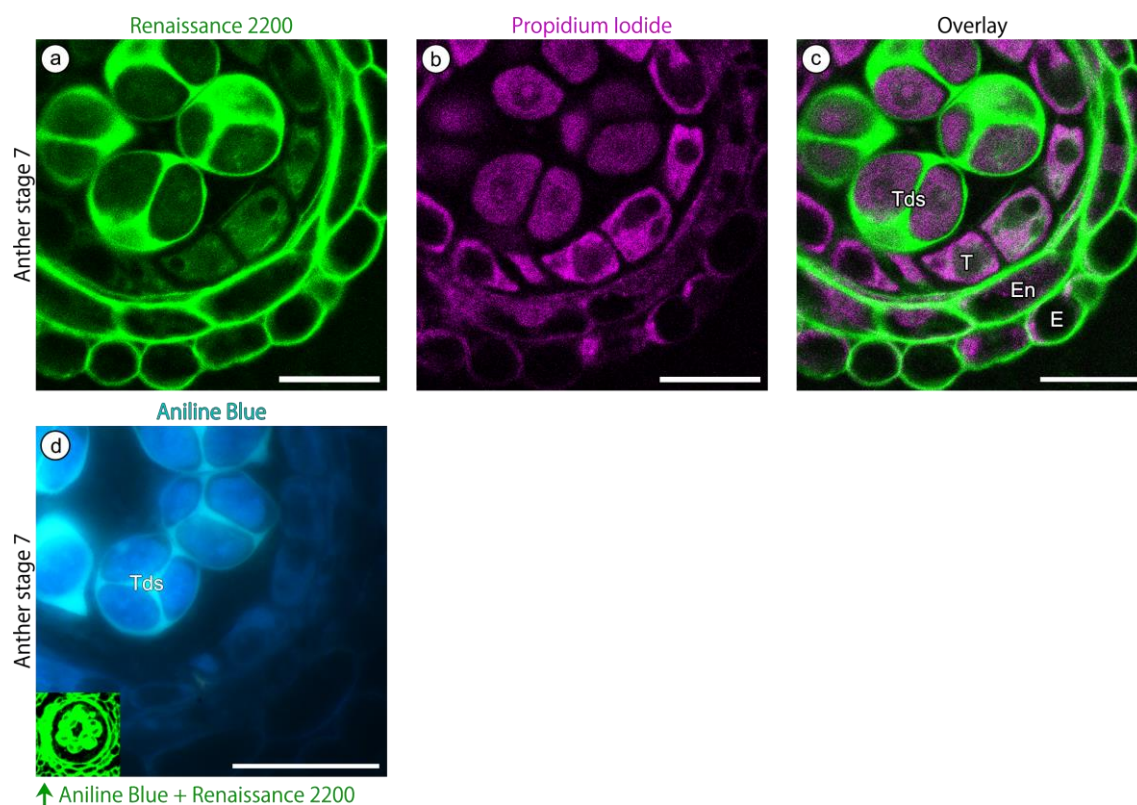


Fig. 2-5 細胞壁を染色した野生型のステージ 7 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 7 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、T tapetum (タペート組織)、Tds tetrads (四分子)。スケールバーは 20 μm 。

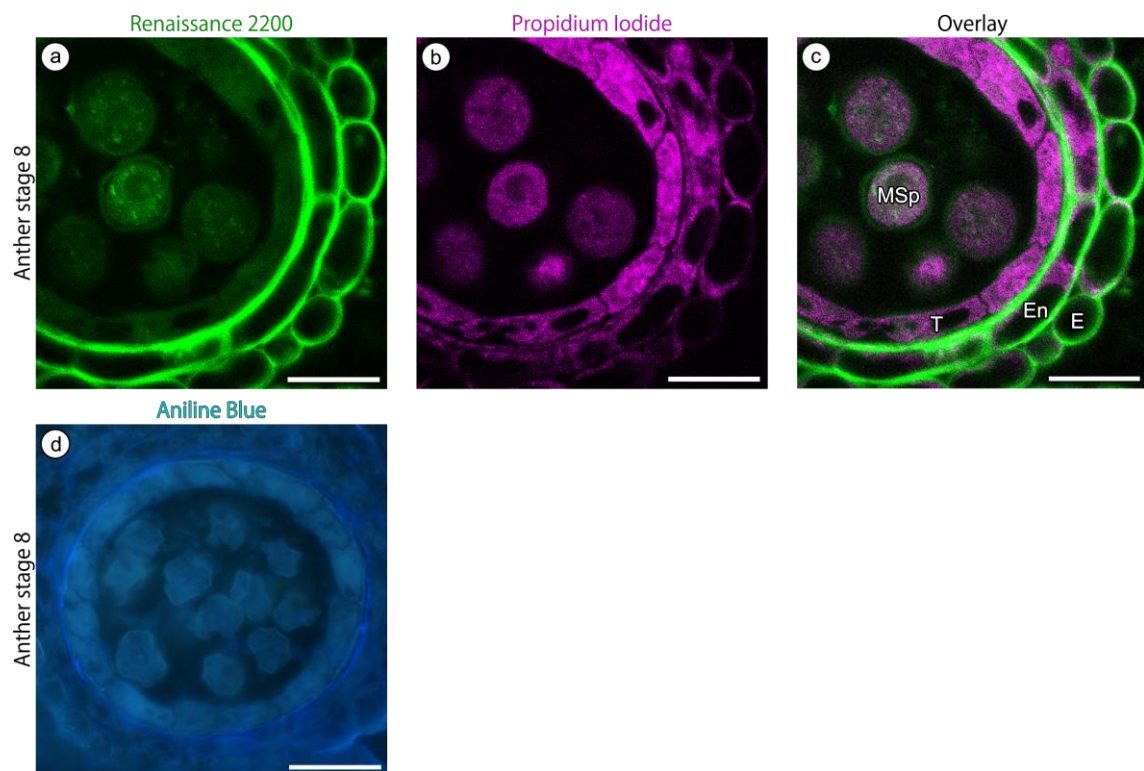


Fig. 2-6 細胞壁を染色した野生型のステージ 8 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 8 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、MSP microspores (小孢子)、T tapetum (タペート組織)。スケールバーは 20 μm 。

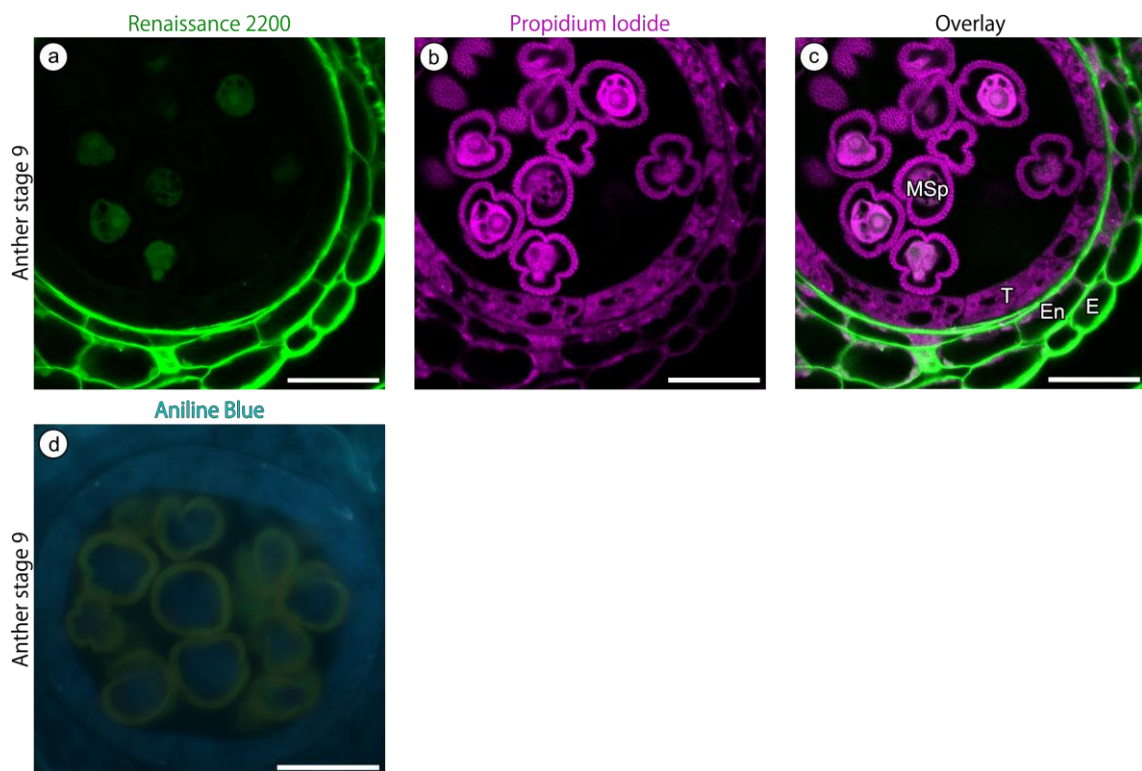


Fig. 2-7 細胞壁を染色した野生型のステージ 9 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 9 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis(表皮)、En endothecium(内被)、MSP microspores(小孢子)、T tapetum(タペート組織)。スケールバーは 20 μm 。

2.3.4 固定していない花粉母細胞および四分子における細胞壁の分布

前項までは固定した細胞を用いて実験を行った。本項では固定の操作による影響を排除するため、固定していない細胞でも同様の結果が得られるかどうかを調べるために実験を行った。葯ステージ5の葯から花粉母細胞を、葯ステージ7の葯から四分子を、先の細いピンセットを用いて取り出した。これらの細胞を **Renaissance 2200** および **Aniline Blue** によって染色した。この結果、前項までの固定した場合と同様の結果が得られることが確認された。すなわち、葯ステージ7の四分子の細胞壁からは **Renaissance 2200** による蛍光が検出されたが (Fig. 2-8e)、同じ観察条件にもかかわらず葯ステージ5の花粉母細胞の集団の細胞壁からは蛍光が検出されなかった (Fig. 2-8b)。次に、**Aniline Blue** によるカロースの染色を行った。カロースが存在する場合は、水色で示すシグナルが検出される。葯ステージ5の花粉母細胞の集団からは、細胞質部分に青色の弱いシグナルが検出されたものの、カロースに由来する水色のシグナルはほとんど検出されなかった (Fig. 2-8c)。一方で、葯ステージ7の四分子の細胞壁部分にはカロースに由来すると考えられる強い蛍光が検出された (Fig. 2-8f)。これらの結果は固定切片の場合と同様であり、葯ステージ5の花粉母細胞はたしかにセルロース性細胞壁を持たないことが示された。

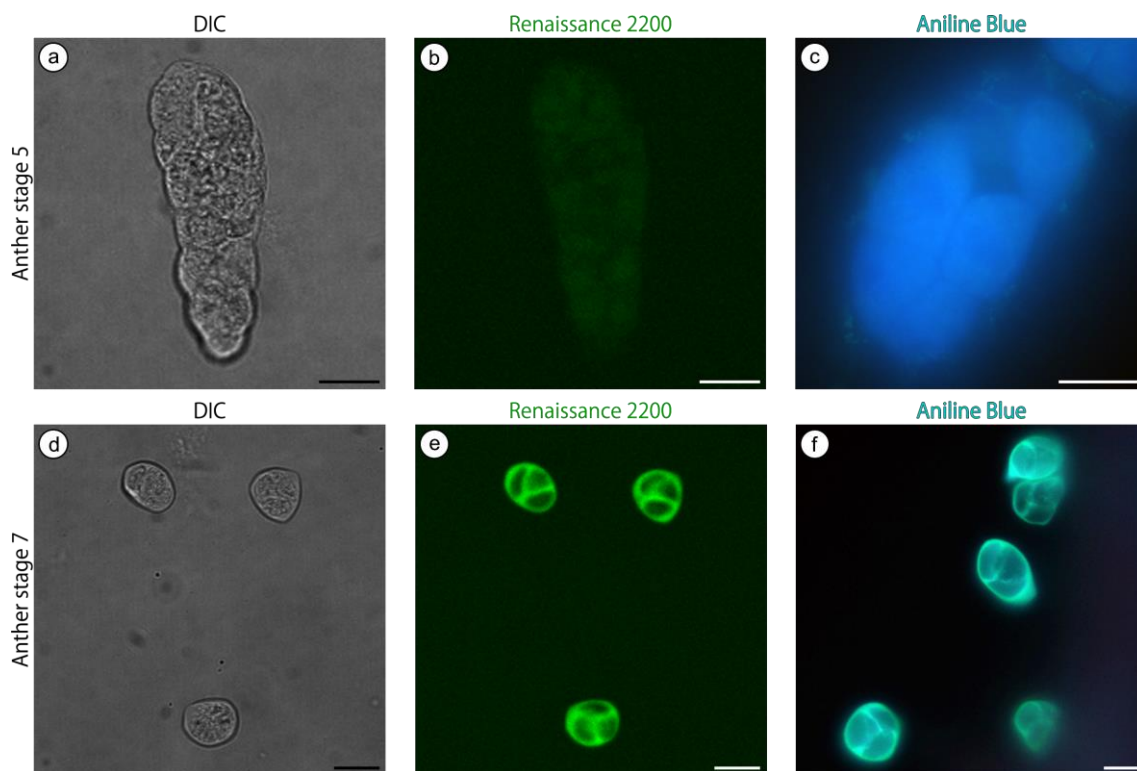


Fig. 2-8 花粉母細胞と四分子の細胞壁の染色像

葯ステージ 5 における花粉母細胞の集団 (a-c) と葯ステージ 7 における四分子 (d-f) の、微分干渉像(a, d)、Renaissance 2200 による染色像 (b, e) および Aniline Blue による染色像 (c, f)。a と b は同一の細胞。また d と e は同一の細胞。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d, e) または蛍光顕微鏡 (c, f) を用いて観察した。スケールバーは 20 μm 。

2.3.5 Glycosyl hydrolase family 9 の系統樹および発現パターン

タペート細胞と花粉母細胞のセルロース性細胞壁が減少したという観察結果から、これらの細胞の両方または一方でセルラーゼが発現している可能性が考えられた。シロイヌナズナの既知のセルラーゼは Glycosyl hydrolase family 9 (GH9) に含まれている (Urbanowicz *et al.* 2007)。シロイヌナズナに GH9 に含まれる遺伝子は 25 個あり (Fig. 2-9, 2-10, 2-11)、ドメイン構成から 4 遺伝子から構成される GH9A クラス、18 遺伝子から構成される GH9B クラス、3 遺伝子から構成される GH9C クラスに大別されている。クラス A は N 末端に細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを持つ。クラス B は N 末端にシグナルペプチドを持つ。クラス C は N 末端にシグナルペプチドを、C 末端にリンカー領域と糖結合モジュールを持つ。中でも GH9B には既知のセルラーゼが含まれている (Shani *et al.* 1997)。また GH9A にはセルロース合成に関わる遺伝子が含まれている (Lane *et al.* 2001, Sato *et al.* 2001)。

GH9 の系統解析が Libertini *et al.* (2004) によって行われており、GH9 は α 、 β 、 γ の大きく三つの集団に分けられることが知られていた。 γ サブファミリーには GH9A1, GH9A2 および GH9A3 が含まれる。 β サブファミリーには GH9B5 および GH9B7 が含まれる。 α サブファミリーにはこれらの 5 遺伝子以外の 20 遺伝子が含まれる。Libertini *et al.* (2004) による解析では主にシロイヌナズナ、イネおよびトマトの配列を用いて系統樹が作製され、 β サブファミリーはシロイヌナズナのみの配列から構成されていた。本研究では、より多くの配列を用いることで被子植物における GH9 の詳細な系統関係を明らかにすることを目的に、GH9 の系統樹を作製した。

GH9 に含まれるシロイヌナズナの 25 遺伝子および、*Amborella trichopoda*、イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*)、イネ (*Oryza sativa*)、オウシュウトウヒ (*Picea abies*)、カカオ (*Theobroma cacao*)、コットンウッド (*Populus trichocarpa*)、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、トマト (*Solanum lycopersicum*)、バナナ (*Musa acuminata*)、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) および *Eucalyptus grandis* におけるシロイヌナズナの GH9 のホモログの系統樹を作製した結果、GH9 は大きく三つの集団に分けられた(データ示さず)。一つ目の集団は α サブファミリーに相当し、シロイヌナズナの GH9 の中では GH9A1, GH9A2, GH9A3, GH9B5 および GH9B7 以外の 20 遺伝子が含まれていた (Fig. 2-9)。二つ目の集団は β サブファミリーに相当し、GH9B5 および GH9B7 が含まれていた (Fig. 2-10)。また、三つ目の集団は γ サブファミリーに相当し、GH9A1, GH9A2 および GH9A3 が含まれていた (Fig. 2-11)。GH9 の遺伝子群はシロイヌナズナだけでなく、イネなどの単子葉植物や、ヒメツリガネゴケにおいても存在すること

が明らかになった。

減数分裂直前の時期に発現している GH9 にはどのようなものがあるだろうか。Winter *et al.* (2007) によるマイクロアレイを用いた発現解析結果をもとに、GH9 のそれぞれの遺伝子について組織間で正規化を行った (Fig. 2-12)。細胞壁減少が起こる時期の葯を含む蕾において他の器官と比べて高発現している GH9 は GH9B1, B2, B13, B18 であった。その後、タペート細胞が崩壊し、葯が裂開する直前の時期の雄しべにおいて、GH9B1 および B2 の発現は減少し、GH9B13 および B18 は同程度に発現していた。

a



Fig. 2-9 Glycosyl hydrolase family 9 α サブファミリーの分子系統樹

GH9 α サブファミリー（シロイヌナズナの GH9A1, GH9A2, GH9A3, GH9B5, GH9B7 以外の 20 遺伝子が含まれる遺伝子群）の分子系統樹を、保存性の高い領域のアミノ酸配列を元に作製した。シロイヌナズナの GH9 の、本文中で用いられている遺伝子記号と図中の配列名の対応関係は以下の通り。(本文中, 図中) = (GH9A4, 3g43860_A4), (GH9B1, 1g70710_B1_CEL1), (GH9B2, 1g02800_B2_CEL2), (GH9B3, 1g71380_B3_CEL3), (GH9B4, 1g22880_B4_CEL5), (GH9B6, 1g23210_B6), (GH9B8, 2g32990_B8), (GH9B9, 2g44540_B9), (GH9B10, 2g44550_B10),

(次ページに続く)

(GH9B11, 2g44560_B11), (GH9B12, 2g44570_B12), (GH9B13, 4g02290_B13), (GH9B14, 4g09740_B14), (GH9B15, 4g23560_B15), (GH9B16, 4g38990_B16), (GH9B17, 4g39000_B17), (GH9B18, 4g39010_B18), (GH9C1, 1g48930_C1), (GH9C2, 1g64390_C2), (GH9C3, 4g11050_C3) (ただし、この脚注では図中の配列名の先頭にある “*Arabidopsis thaliana*” は省略した)。 *Physcomitrella patens* 003G028700.1 を外群として用いた。シロイヌナズナの遺伝子名は赤色で示した。ブートストラップ値は 50 以上のものを表示している。

b

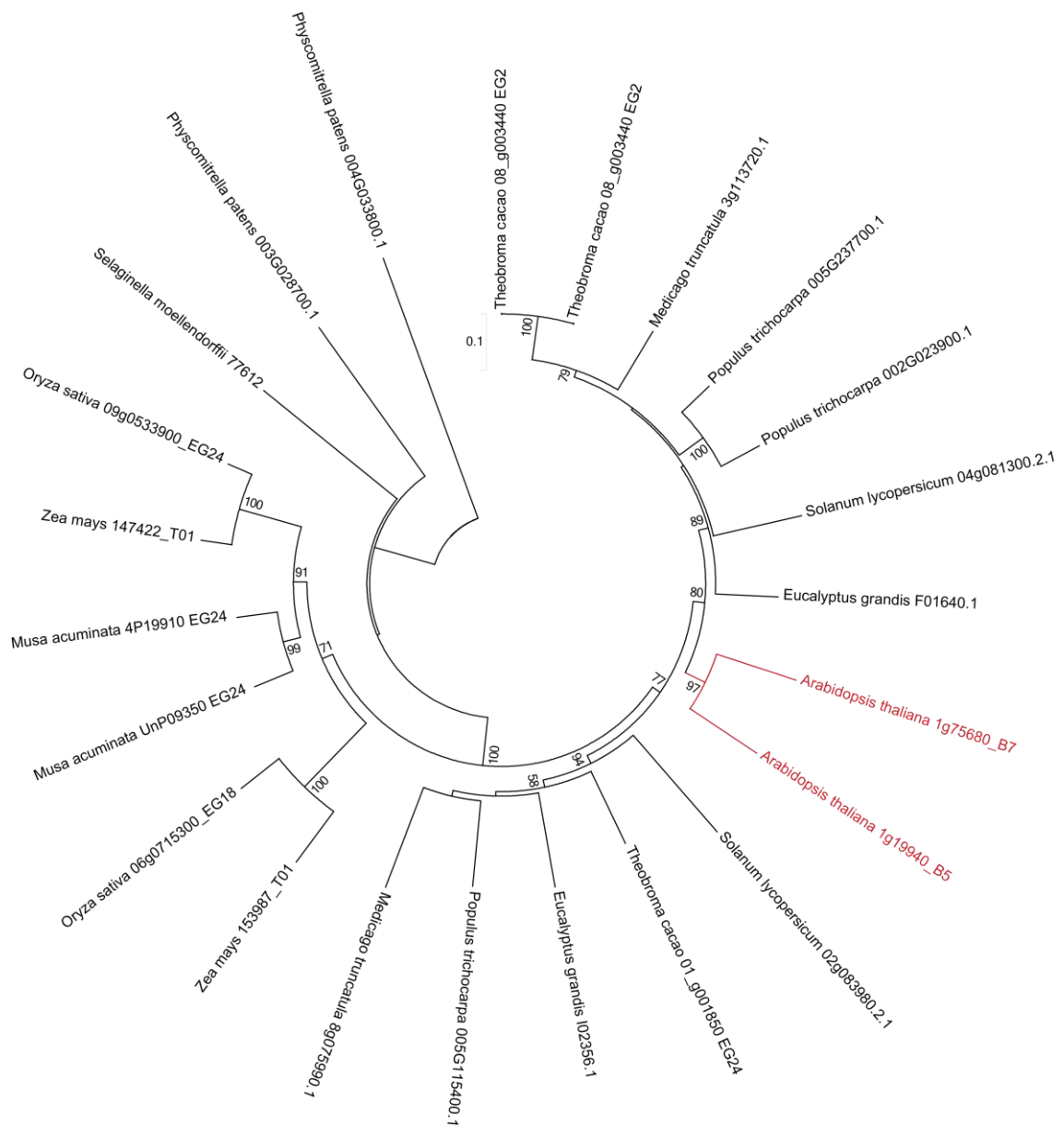


Fig. 2-10 Glycosyl hydrolase family 9 β サブファミリーの分子系統樹

GH9B5 (図中の *Arabidopsis thaliana* 1g19940_B5 に相当する)、GH9B7 (図中の *Arabidopsis thaliana* 1g75680_B7 に相当する) を含む遺伝子群の分子系統樹を、保存性の高い領域のアミノ酸配列を元に作製した。*Physcomitrella patens* 004G033800.1 を外群として用いた。シロイヌナズナの遺伝子名は赤色で示した。ブートストラップ値は 50 以上のものを表示している。

C

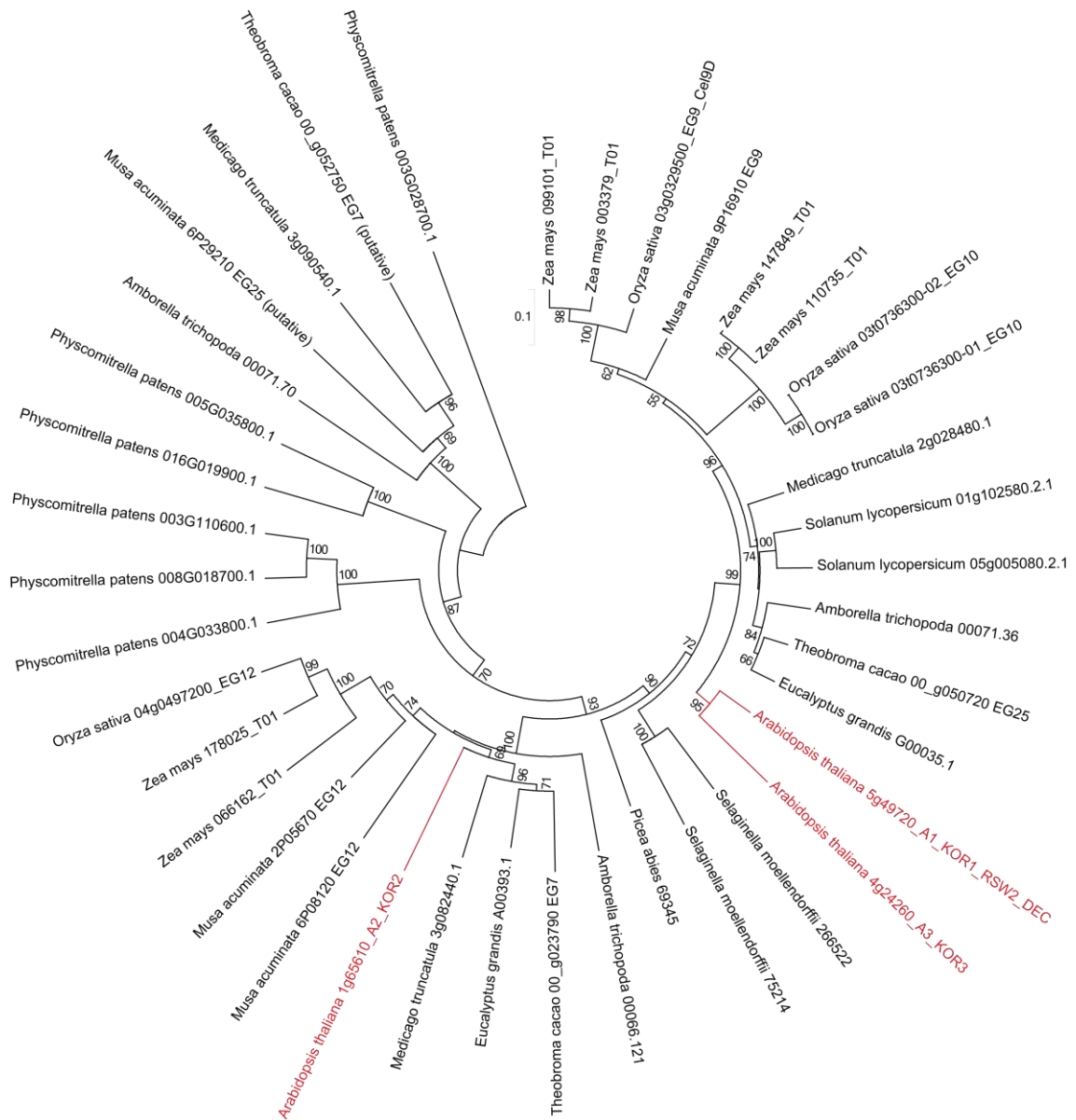


Fig. 2-11 Glycosyl hydrolase family 9 γ サブファミリーの分子系統樹

GH9A1 (図中の *Arabidopsis thaliana* 5g49720_A1_KOR1_RSW2_DEC に相当する)、GH9A2 (図中の *Arabidopsis thaliana* 1g65610_A2_KOR2 に相当する)、GH9A3 (図中の *Arabidopsis thaliana* 4g24260_A3_KOR3 に相当する) を含む遺伝子群の分子系統樹を、保存性の高い領域のアミノ酸配列を元に作製した。 *Physcomitrella patens* 003G028700.1 を外群として用いた。シロイヌナズナの遺伝子名は赤色で示した。ブートストラップ値は 50 以上のものを表示している。

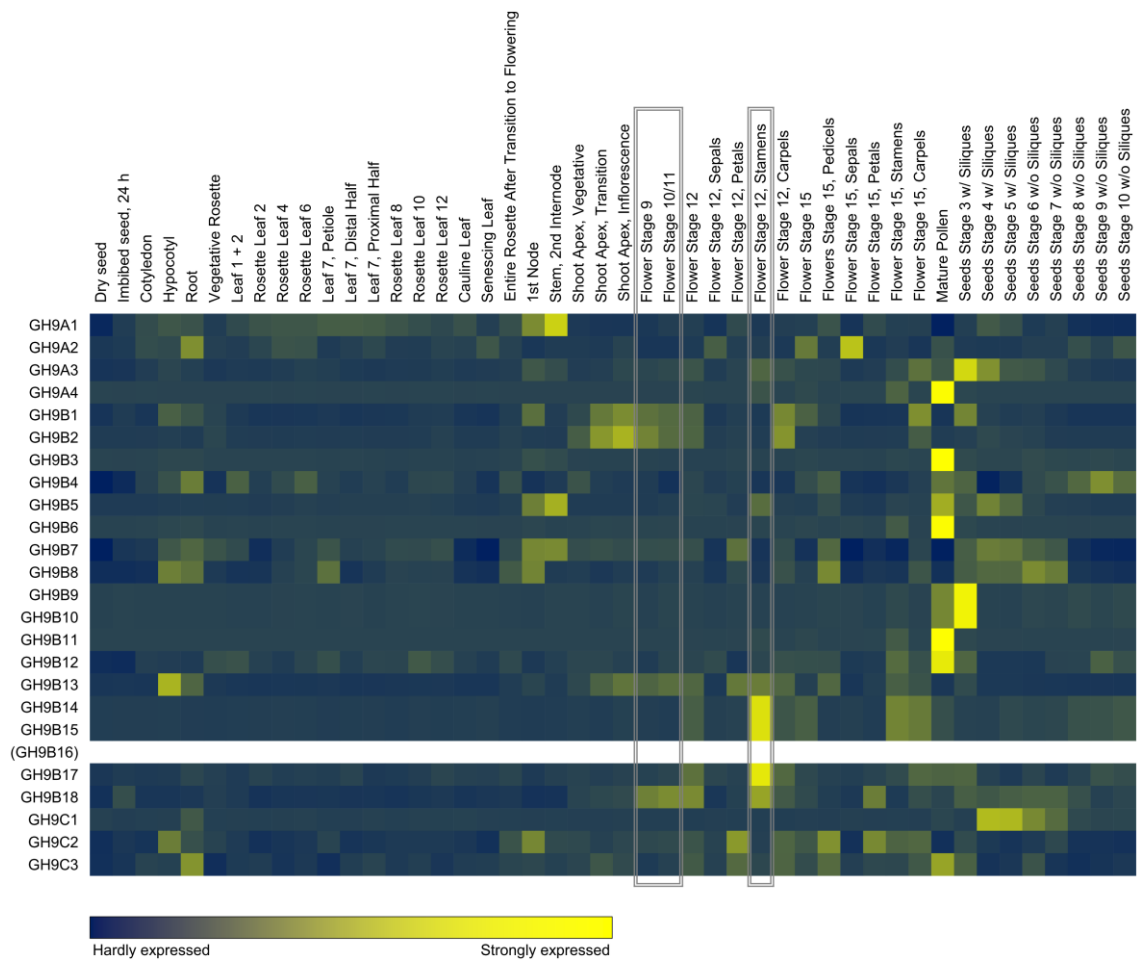


Fig. 2-12 マイクロアレイによる Glycosyl hydrolase family 9 の発現パターン

行はGlycosyl hydrolase family 9に含まれる各遺伝子 (GH9B16はデータなし)。列はシロイヌナズナの様々な発生ステージにおける器官。発現量が多い場合は黄色で表し、発現量が少ない場合は濃い青色で表している。葯ステージ 5-7 は花ステージ 9 に、葯ステージ 8-9 は花ステージ 10/11 に、葯ステージ 10-12 は花ステージ 11-12 に相当する (Sanders *et al.* 1999)。発現データは Arabidopsis eFP Browser から取得した (Winter *et al.* 2007)。

2.4 考察

2.4.1 花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化

本章の研究から、花粉形成過程でタペート細胞と花粉母細胞のセルロース性細胞壁は、減数分裂の開始前に減少することが示された。タペート細胞が発生した時には、すべての葯の細胞でセルロース性細胞壁が検出されたが、減数分裂直前にはタペート細胞と花粉母細胞においてセルロース性細胞壁が検出されなかった (Fig. 2-2, 2-3)。また固定していない状態の細胞においても花粉母細胞のセルロース性細胞壁は検出されなかったことから、固定の有無にかかわらず同様の細胞壁の染色結果が得られており、たしかに花粉母細胞はセルロース性細胞壁をほとんど持たないことが確認された (Fig. 2-8)。本研究小孢子期の観察結果は、シロイヌナズナの小孢子とタペート組織は Calcofluor によって染色されなかったという報告と一致している (Rhee and Somerville 1998)。また本研究の一連の観察結果は、イネ科の *Avena sativa* においてタペート細胞と花粉母細胞のセルロース性細胞壁が減数分裂前に減少したという報告と一致している (Steer 1977)。セルロース特異的な標識法を用いた更なる解析が必要とされるものの、タペート細胞発生直後の時期のタペート細胞および花粉母細胞の細胞壁が Renaissance 2200 によって染色され、Aniline Blue によって染色されなかったという結果から、これらの細胞壁はカロースではなくセルロースを含んでいることが示唆される。

Avena sativa の研究においては、電子顕微鏡による観察からはタペート細胞の細胞壁の厚みが減数分裂前に増加する一方で、蛍光染色による観察からはタペート細胞の細胞壁のセルロースがすでに減少していることが明らかになっていた (Steer 1977)。一方、本研究で用いたシロイヌナズナにおいては、電子顕微鏡による観察からはタペート細胞の細胞壁の厚みは減数分裂の時期頃に減少しており (Owen and Makaroff 1995)、蛍光染色による観察からはタペート細胞の細胞壁のセルロースも減数分裂直前に減少した (Fig. 2-2, 2-3)。これらの結果から、電子顕微鏡で観察される細胞壁の厚みからは蛍光顕微鏡で観察されるセルロースの量を推測できるとは限らないことが確認された。また、タペート細胞のセルロースが減少する時期は、シロイヌナズナにおいても *Avena sativa* と同様であることが確認された。

2.4.2 花粉形成過程におけるセルラーゼホモログの発現

タペート細胞と花粉母細胞のセルロース性細胞壁が減少したという観察結果から、これらの細胞の両方または一方でセルラーゼが発現している可能性が考えられた。既知のセルラーゼを含む Glycosyl hydrolase family 9 (GH9) の系統解析が Libertini *et al.* (2004) によって行われており、GH9 は α , β , γ の大きく三つの集団に分けられることが知られていた。本研究では Libertini *et al.* (2004) において使用されていた配列数より多くの配列をもとに系統解析を行った。本研究でも GH9 は大きく三つの集団に分けられており (Fig. 2-9, 2-10, 2-11)、Libertini *et al.* (2004) の結果と一致していた。Libertini *et al.* (2004) では β サブファミリーにはシロイヌナズナの配列のみが含まれていたが、本研究の結果から α , β , γ の全てのサブファミリーの遺伝子群が、シロイヌナズナだけでなくイネなどの単子葉植物や、ヒメツリガネゴケにおいても存在することが明らかになった。

マメ科の *Lathyrus odoratus* における先行研究から、葯に大量に含まれるセルラーゼの cDNA が四種類単離されてきた (Sexton *et al.* 1990, Neelam and Sexton 1995)。この中には花粉母細胞およびタペート細胞のセルロースの分解に関わる遺伝子が含まれている可能性がある。これらの四種類のセルラーゼに相同性の高いシロイヌナズナの GH9 は、それぞれ GH9A4, GH9B5・B7, GH9B2・B13, GH9B14・B15 の四グループであった(データ示さず)。本研究からセルロースの減少は減数分裂直前の時期に起こることが明らかになったため (Fig. 2-2, 2-3)、この時期に花粉母細胞およびタペート細胞においてこれらの遺伝子群が発現しているかどうかについて、更なる解析が必要である。

減数分裂直前の時期に発現している GH9 を探索するために、Winter *et al.* (2007) によるマイクロアレイを用いた発現データを解析した結果、細胞壁減少が起こる時期の葯を含む蕾において他の器官と比べて高発現している GH9 は GH9B1, B2, B13, B18 であることが分かった。これらの遺伝子についても、花粉母細胞もしくはタペート細胞で発現しているのかどうかを調べる必要があると考えられる。

第三章. 花粉形成に異常を示す変異体における セルロース性細胞壁の変化

3.1 序論

シロイヌナズナの葯内で花粉母細胞が生じる過程では、葯ステージ 2 に L2 層から胞原細胞が分化し、細胞分裂を経て葯ステージ 3 に孢子形成細胞が分化し、孢子形成細胞はのちに花粉母細胞へと分化する (Sanders *et al.* 1999)。またタペート細胞が生じる過程では、胞原細胞が細胞分裂した後、葯ステージ 3 に一次側膜細胞が分化し、二次側膜細胞を経て、葯ステージ 4 にタペート細胞が分化する。このような花粉母細胞とタペート細胞の特徴や、発生に関わる遺伝子がいくつか明らかになっている。

シロイヌナズナの減数分裂前の花粉母細胞の細胞壁には、メチルエステル化されたペクチンおよびラムノガラクトuronan II などの多糖が含まれることが分かっている (Rhee and Somerville 1998)。カロースに加えてこれらの多糖によっても、四分子を構成する小孢子同士が接着されていると考えられている。小孢子を分離させるために、いくつかの遺伝子が花粉母細胞の細胞壁の分解に関与している。*quartet1 (qrt1)* および *qrt2* 変異体において、四つの減数分裂後の細胞が接着されたままになっている (Preuss *et al.* 1994)。*QRT1* はペクチンの分解に必要とされ、ペクチンメチルエステラーゼをコードし、発生中の花粉とその周囲の組織で発現している (Rhee and Somerville 1998, Francis *et al.* 2006)。*QRT2* もペクチンの分解に必要とされ、ポリガラクトuronナーゼをコードし、小孢子分離の間にタペート組織において発現している (Rhee and Somerville 1998, Ogawa *et al.* 2009)。*qrt3* 変異体においても、減数分裂後の細胞が接着されたままになっている。*QRT3* はポリガラクトuronナーゼをコードしていて、小孢子分離の間にタペート組織において特異的に発現している (Rhee *et al.* 2003)。これらの知見から、タペート組織は花粉母細胞の細胞壁のペクチン性多糖の分解に関わっていることが示唆される。一方で、花粉母細胞の細胞壁ではペクチン性多糖の減少と近い時期にセルロース性成分の減少が起こるが、このセルロースの分解にタペート組織が関わっているかどうかは未だ明らかでない。

シロイヌナズナにおいて、初期の葯の発生に関与する遺伝子がいくつか明らかになっている (Chang *et al.* 2011)。このような遺伝子の一つとして *SPOROCYTELESS/NOZZLE (SPL/NZZ)* があり、推定上の転写因子をコードしていて、孢子形成細胞、花粉母細胞や胚嚢母細胞においても発現している。*spl/nzz* 変異体においては、花粉母細胞も葯壁(タペート細胞や中間層などからなる、花粉母細胞を囲む細胞層)も形成されない (Yang *et al.* 1999)。別の遺伝子である、*TAPETUM DETERMINANT1 (TPD1)* は推定上の分泌タンパク質をコードし、葉、若い実生および花芽、特

に花粉母細胞において発現している。*tpd1* 変異体において、葯はタペート組織を欠く一方で、より多くの花粉母細胞を持っている (Yang *et al.* 2003)。また、*DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1)* は推定上の bHLH 転写因子をコードする遺伝子である (Zhang *et al.* 2006)。葯ステージ 5 の後期から葯ステージ 6 において主にタペート細胞で発現するほか、花分裂組織、葯の原基、胞原細胞および減数分裂中の細胞においてもわずかながら発現することが分かっている。*EXCESS MICROSPOROCTES1/EXTRA SPOROGENOUS CELLS (EMS1/EXS)* はロイシンリッチリピート受容体様キナーゼをコードし、その変異体は *tpd1* と同様の表現型を示す (Canales *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2002)。また、*EMS1/EXS* は *TPD1* の受容体だと考えられている (Jia *et al.* 2008)。タペート細胞を欠き、より多くの花粉母細胞が形成される *ems1* 変異体の減数分裂中の細胞においても、*DYT1* の転写産物がわずかに存在することが分かっている (Zhang *et al.* 2006)。*dyt1* 変異体ではタペート細胞が早期に液胞化し、花粉母細胞の減数分裂が完了しないことが知られている (Zhang *et al.* 2006)。本章ではセルロース性細胞壁の減少と、葯の発生を制御する遺伝子の関係を調べるために、これらの遺伝子に異常のある変異体においてセルロース性細胞壁の消長を調べた。また、セルロース性細胞壁の減少とタペート細胞の関係について議論した。

3.2 材料及び方法

植物材料

植物材料としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を人工気象器 (LH-220S、日本医化器械製作所) で、長日条件 (14h-light / 10h-dark) 、22°Cで生育させた。*spl/nzz* として CS6586 (*spl-1*, ecotype *Ler*)、*tpd1* として SALK_075964 (*tpd1-3*, ecotype *Col-0*)、*dyl1* として CS315481 (*dyl1-3*, ecotype *Col*)、*gh9b2-2* として SALK_130668C (ecotype *Col-0*)、*gh9b13* として CS859973 (*gh9b13-1*, ecotype *Col-0*) および SALK_147526C (*gh9b13-2*, ecotype *Col-0*)、*gh9b18* として SALK_052907 (*gh9b18-1*, ecotype *Col-0*) および CS859555 (*gh9b18-2*, ecotype *Col-0*) を用いた。Ds または T-DNA 挿入変異体は Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から分譲していただいた。野生型アレルを持たない個体を、DNA 抽出およびそれぞれの遺伝子特異的な以下のプライマーを用いた PCR 増幅によって調べた (Table 2、*spl-1* の野生型アレルに対しては SPL/NZZ-LP および SPL/NZZ-RP、*tpd1-3* の野生型アレルに対しては TPD1-LP および TPD1-RP、*tpd1-3* の T-DNA 挿入アレルに対しては LBb1.3 および TPD1-RP、*dyl1-3* の野生型アレルに対しては DYT1-LP および DYT1-RP、*dyl1-3* の T-DNA 挿入アレルに対しては o8409 および DYT1-RP、*gh9b2-2* の野生型アレルに対しては GH9B2-LP および GH9B2-RP、*gh9b13-1* の野生型アレルに対しては GH9B13-1-LP および GH9B13-1-RP、*gh9b13-1* の T-DNA 挿入アレルに対しては LBb1.3 および GH9B13-1-RP、*gh9b13-2* の野生型アレルに対しては GH9B13-2-LP および GH9B13-2-RP、*gh9b13-2* の T-DNA 挿入アレルに対しては LBb1.3 および GH9B13-2-RP、*gh9b18-1* の野生型アレルに対しては GH9B18-1-LP および GH9B18-1-RP、*gh9b18-1* の T-DNA 挿入アレルに対しては LBb1.3 および GH9B18-1-RP、*gh9b18-2* の野生型アレルに対しては GH9B18-2-LP および GH9B18-2-RP、*gh9b18-2* の T-DNA 挿入アレルに対しては LBb1.3 および GH9B18-2-RP)。CS6586、SALK_075964 および CS315481 はいずれも、野生型アレルを持つ可稔個体と野生型アレルを持たない不稔個体におよそ 3:1 の比で分離し、不稔個体をそれぞれ *spl-1* (Yang *et al.* 1999)、*tpd1-3* (本研究) および *dyl1-3* (本研究) として用いた。

花序の採取、PFA・GA 固定、樹脂への包埋と切片の作製、染色

2 章と同様に行った。

顕微鏡観察

Renaissance 2200, Propidium Iodide および Aniline blue によって染色した切片の観察は、2 章と同様に行った。葯の裂開の観察には、マイクロスコープ (Keyence, VH-5500)、フリーアングル観察システム (Keyence, VH-S30) および顕微鏡用照明 (CCS, PML-1005SW) を用いた。

不稔変異体の解析

シーケンスのためのゲノム DNA を単離するために、*tpd1-3* 変異体の葉をすり潰し、200 μ l の抽出バッファー [200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS] に懸濁した。400 μ l の 100%エタノールをサンプルへと加え、5 分間 15000 rpm で遠心し、ペレットを 200 μ l の TE に溶解した。T-DNA 配列に隣接するゲノム DNA を増幅するために、Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO) および遺伝子特異的プライマー (LBb1.3, TPD1-RP) を用いて PCR を行った。増幅産物は FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) を用いて精製した。ABI 3130xl Genetic Analyzer および Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて、精製産物の配列を読むことによって、T-DNA 挿入箇所を調べた。

RT-PCR 解析に用いる total RNA はシロイヌナズナ野生型、*spl-1*、*tpd1-3* および *dyl1-3* 変異体の花序から、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) および Oligo (dT) 20 プライマーを用いて 1 μ g の total RNA から cDNA を合成した。各遺伝子の発現量を調べるため、Quick Taq HS Dye Mix (TOYOBO) およびそれぞれの遺伝子特異的な以下のプライマーを用いて PCR を行った (Table 2、*ACT2* に対して *ACT2-F* および *ACT2-R*、*SPL/NZZ* に対して *SPL/NZZ-F* および *SPL/NZZ-R*、*TPD1* に対して *TPD1-F* および *TPD1-R*、*DYT1* に対して *DYT1-F* および *DYT1-R*)。

系統解析

2 章と同様に行った。

Glycosyl Hydrolase の発現解析

GH9 の 25 遺伝子および GH5 の 5 遺伝子の発現量を調べるため、Quick Taq HS Dye Mix (TOYOBO) およびそれぞれの遺伝子特異的な以下のプライマーを用いて PCR を行った (Table 2、*GH9A1-A4*、*B1-B18*、*C1-C3* および *At5G16700*、*At3G26130*、*At5G17500*、*At3G26140*、*At1G13130* に対して、「各遺伝子名-F」および「各遺伝子名-R」のプライマー)。プライマーは相同性の高い遺伝子を判別できるように設計し、類似した遺伝子が非特異的に増幅されることによるアーティファクトを防ぐために、必要に応じて PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) を用いて精製し、ABI 3130xl Genetic Analyzer および Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行い、配列を確認した。

in situ ハイブリダイゼーション

プローブの作製は MAXIscript Kit (Ambion) を用いて行った。プローブを作製した遺伝子は、*GH9B1*、*GH9B2*、*GH9B13*、*GH9B15*、*GH9B18*、*histone H4* である。プローブの元となる配列を増幅するために、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) および遺伝子特異的なプライマーを用いて野生型の花序の cDNA をテンプレートとして PCR を行った。プローブを作製する過程では T7 配列を付加する必要があるが、まず T7 配列を付加していないプライマーを用いて各遺伝子の配列を増幅し、PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) を用いて精製し、ABI 3130xl Genetic Analyzer および Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行い、配列を確認した(プライマー配列は示さず)。その後、T7 配列を付加した以下のプライマーを用いて PCR を行った (Table2、*GH9B1*、*GH9B2*、*GH9B13*、*GH9B15*、*GH9B18*、*histone H4* に対して、アンチセンスプローブの場合は「各遺伝子名-as-F」および「各遺伝子名-as-R」のプライマー、センスプローブの場合は「各遺伝子名-s-F」および「各遺伝子名-s-R」のプライマー)。なお、*histone H4* のプローブは Dinneney *et al.* (2004) を参考にした。これらの PCR 産物および MAXIscript Kit (Ambion) を用いて、プロトコルに従ってプローブを作製した。

PFA 固定を行うために、MilliQ 水 40 ml にパラホルムアルデヒドを 2 g、10 N NaOH を 2 μ l 加え、60°C 程度に加熱して溶かした。氷上で冷まし、Triton X を 500 μ l、1 M のリン酸ナトリウムバッファーを 5 ml 加え、MilliQ 水を 50 ml になるまで加えた。花序を確実に固定液に沈めるために、メッ

シュで作製した袋に重りを付けたものに花序を入れ、固定を行った。真空ポンプ (MINIVAC PD-52, Yamato) で 10 分間の脱気を 2 回行い、4℃で二晩静置した。次に、0.1 M リン酸ナトリウムバッファーに 30 分、常温で組織を浸した。組織を脱水処理するために、上昇エタノール系列を用いた。常温で 30%、50%、70%、90%エタノールにそれぞれ 30 分、無水エタノールに 30 分を二回の順に組織を浸した。次に、室温でエタノール:ヒストクリア (HS-200, National Diagnostics) が 1:1 の溶液に 30 分、ヒストクリアに 30 分を二回、65℃でヒストクリア:パラプラスト (Paraplast Plus tissue embedding medium, McCormick Scientific) が 1:1 の溶液の順に組織を浸し、一晩静置した。100%パラプラストとの液交換を一日に二回、2~3 日行った。その後、プラスチック製のディッシュ (バランスディッシュ BD-1、アズワン) 内でパラプラストを常温に戻すことで包埋を行った。包埋したサンプルの切片 (10 μ m) を、ミクロトーム (HM 325 Microtome, Microm) を用いて作製した。

切片の乗ったスライドガラスを常温で 100%ヒストクリアに 10 分を 2 回、ヒストクリア:エタノールが 1:1 の溶液に 5 分、100%エタノールに 5 分を 2 回、90%エタノールに 5 分、70%エタノールに 5 分、50%エタノールに 5 分、30%エタノールに 5 分、滅菌した MilliQ 水に 3 分を 2 回の順に浸した。20 ml の 1 M Tris-HCl および 20 ml の 0.5 M EDTA に MilliQ 水を 200 ml になるまで加えたものを滅菌し、Proteinase K (recombinant, PCR Grade, Roche) を 56 μ l 加えたものに、37℃でスライドガラスを 20 分浸した。常温で滅菌した MilliQ 水に 3 分を 2 回の順に浸した。滅菌した MilliQ 水 200 ml にパラホルムアルデヒドを 8 g、1 N NaOH を 200 μ l 加え、加熱して溶かし、1 M のリン酸ナトリウムバッファーを 2 ml 加えたものに、常温でスライドガラスを 10 分浸した。常温で滅菌した MilliQ 水に 3 分を 2 回の順に浸した。滅菌した MilliQ 水 200 ml にトリエタノールアミンを 3.56 ml 混合し、使用直前に無水酢酸を 1.6 ml 混合したものに常温でスライドガラスを 10 分浸した。滅菌した 2 \times SSPE に 3 分を 2 回、30%エタノールに 2 分、50%エタノールに 2 分、70%エタノールに 2 分、90%エタノールに 2 分、100%エタノールに 2 分を 2 回、常温でスライドガラスを浸した。1 時間の脱気を行った。1 サンプルあたり 3 M DTT を 3 μ l、tRNA を 3 μ l、Poly(A) を 15 μ l、滅菌した MilliQ 水を 8 μ l、プローブを 1 μ l 混合した溶液を、80℃で 5 分間処理したのちに、氷冷し、50℃に温めた Solution A を 280 μ l 加えたものを混合した溶液を、スライドガラス上に加えた (Solution A は、30 ml の Deionized Formamide、3.6 ml の 5 M NaCl、6 ml の 100 mM Tris / 10 mM EDTA (pH7.5)、1.2 ml の 50 \times Denhardt's、12 ml の 50% Dextran Sulfate、0.6 ml の 3 M DTT、0.6 ml の水を混合したもの。また、50 \times Denhardt's は、5 g の Ficoll (Type 400, Pharmacia)、5 g の polyvinylpyrrolidone、5 g の bovine serum albumin (Fraction V, Sigma) に水を 500 ml まで加えた

もの)。次に、スライドガラスにカバーガラスをかぶせた。ホルムアミド 25 ml および滅菌した MilliQ 水 25 ml を混合したものを用いて作製した湿室にスライドガラスを入れ、遮光して 50°C で一晩静置した。

4×SSC 中でカバーガラスをはずし、スライドガラスを 4×SSC に 50°C で 5 分、4×SSC に 50°C で 10 分浸した。100 ml の 5 M NaCl、10 ml の 1 M Tris および 1000 ml の脱イオン水を混合して作成した RNase Buffer に 37°C で 5 分浸した。10 mg/ml の RNaseA:RNaseBuffer が 1:200 の混合液を作成し、37°C で 30 分浸した。RNase Buffer に 37°C で 5 分を 3 回、0.5×SSC に 52°C で 20 分を 2 回浸した。1×Buffer①に室温で 5 分を 2 回浸した (10×Buffer①は、121.4 g の Tris、87.8 g の NaCl、水を 1000 ml まで加え、HCl で pH 7.5 に合わせる。1×Buffer①は、10×Buffer① 100 ml に滅菌した MilliQ 水によって 1 L まで加える)。Blocking 液に室温で 30 分浸した (Blocking 液は、1×Buffer① 200 ml に Blocking reagent (Roche) 1 g を加え、レンジで人肌温にし溶かしたもの)。1×Buffer① 9 ml、10×BSA 1 ml および DIG 抗体 (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche) 10 µl を混合したものをスライドガラス上に加えた。1×Buffer①を用いて作製した湿室にスライドガラスを入れ、遮光して室温で 1 時間静置した。室温で 1×Buffer①中で 10 分振とうを 3 回、1×Buffer③中で 5 分振とうした (10×Buffer③(-Mg) は 60.7 g Tris、29.3 g NaCl を混合したものに水を 500 ml まで加え、HCl で pH 9.5 に調節した。1×Buffer③は、10×Buffer③を 30 ml、1 M MgCl₂を 150 ml に滅菌した MilliQ 水を 300 ml まで加えたもの)。1×Buffer③ 20 ml と NBT/BCIP Stock Solution (Roche) 160 µl を混合したものをスライドガラス上に加えた。1×Buffer③を用いて作製した湿室にスライドガラスを入れ、遮光して 37°C で 4 時間から一晩静置した。発色が適切な時点で 1×TE (pH 7.5) に 5 分間、滅菌した MilliQ 水に 5 分間浸した。観察には Nikon TE2000-U 蛍光顕微鏡を用いた。

RNAi 系統の作出

GH9B15 をノックダウンするプラスミドを作製するために、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) および遺伝子特異的な以下のプライマーを用いて、野生型の花序の cDNA をテンプレートとして PCR を行った (Table2、GH9B15-RNAi-F および GH9B15-RNAi-R)。PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) を用いて精製し、pENTR/D-TOPO Cloning Kit (Life Technologies) によりクローニングを行った。大腸菌から抽出したプラスミドに挿入された配列が正しいことを、ABI 3130xl Genetic Analyzer および Big Dye terminator cycle sequencing kit

(Applied Biosystems) を用いたシーケンスにより確認した。プラスミドへの挿入断片を、デスチネーションベクターである pH7GWIWG2(I)へと LR 反応によって導入した。LR 反応が成功し正しい配列のプラスミドが完成したことを確認するために、Quick Taq HS Dye Mix (TOYOBO) および以下のプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物を精製した後にシーケンスによる配列の確認を行った (2 か所を増幅した。プロモーター・イントロン間に対して p35S-F および Intron-R、イントロン・ターミネーター間に対して Intron-F および T35S-R)。コンストラクトは Clough and Bent (1998) による floral dip 法に従って、*Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 を用いて Col-0 に形質転換した。

RNA-seq データの解析

DDBJ Sequence Read Archive より、単離花粉母細胞の RNA-seq データである SRR210767 を取得した。Trimmomatic-0.32 を用いて、LEADING:20, TRAILING:20, SLIDINGWINDOW:4:25, MINLEN:29 の条件でクオリティの低い塩基を除去した。tophat-2.0.9.OSX_x86_64 を用いて、-i 40 -I 2000 の条件でマッピングを行った。bowtie2 のバージョンは 2.1.0、samtools のバージョンは 0.1.19 を用いた。シロイヌナズナゲノムとして、Source: NCBI, Version: TAIR10 のものを用いた。FPKM 値の算出は cufflinks v2.1.1 を用いて行った。

Table 2 実験に用いたプライマーの配列

プライマー名	配列 (5'-3')
SPL/NZZ-LP	ATGGCGACTTCTCTCTTCTTC
SPL/NZZ-RP	TTAAAGCTTCAAGGACAAATC
TPD1-LP	TACGCTCCAGCTTTCTCTTTG
TPD1-RP	ACAATTCACCATTTTCACGAGG
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
DYT1-LP	ATCTCATGTCCCCATTGTCAC
DYT1-RP	TCGTGGAGTAGGGAAAGTCAG
o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC
GH9B2-LP	TCCGACGTGGATATTTTCAGAC
GH9B2-RP	CTTCTTCACGACTCATCACCT
GH9B13-1-LP	AATTTTGGACCGTAACCAACC
GH9B13-1-RP	CCAAAGTCCTCCTCAAACGAG
GH9B13-2-LP	CTGCTCGTAATCAGACCGTTC
GH9B13-2-RP	TTTAAGGTTTTTGCATTTGCG
GH9B18-1-LP	CGAGGAGGAGGAAAGATATGG
GH9B18-1-RP	ATACACCACGGACTGCTTACG
GH9B18-2-LP	TCTTTCCGTGTACGTGAATCC
GH9B18-2-RP	TACCCGTTTTCTTTAGCAACC
ACT2-F	TCCATTCTTGCTTCCCTCAG
ACT2-R	TCTGTGAACGATTCCCTGGAC
SPL/NZZ-F	AACAACGCTACCCGTTTACC
SPL/NZZ-R	TTCTGATCACCATCCAAACG
TPD1-F	AACCGACGGCGACTTTTG
TPD1-R	AGGCATTGGTTCCGTTACTG
DYT1-F	GAAGCTCCTCCTGAGATTGATG
DYT1-R	TCACAGAGTTCCTGTGTCTGAAC
GH9A1-F	TTCGACAAGTGTGCTACGTG

GH9A1-R	CTGTGATGCACATGTCTTGG
GH9A2-F	TTCTACTGGAGTTCCTGGATGG
GH9A2-R	GGAAACTTCTTGCCGAATCC
GH9A3-F	GTTGCAAATGCGGCTTTC
GH9A3-R	ACTTGTTTCGGGTACCGTTG
GH9A4-F	CGATTCAACACACCTCATGG
GH9A4-R	CTGTGATGGGCTTGCTTTG
GH9B1-F	GTGCCTTGTGGCGAATTAAC
GH9B1-R	CCATGTAAGACAGTCCCATCG
GH9B2-F	GCTCTTGACCTACGCCAAATAC
GH9B2-R	AACGGGTTGCCTCCAAGTAG
GH9B3-F	AATCTTTAGGAGGTGGAGATCAG
GH9B3-R	AAATTCTCAGCTGCTTGCTTAT
GH9B4-F	TCTCCATCCTCGTCAACAAAG
GH9B4-R	CGTAGGTGGTGAGCAAGAATG
GH9B5-F	TGCTCACCTCTGGTGTTAAGG
GH9B5-R	CACCATATCCCACCAAATAGC
GH9B6-F	GTGCCATGTGGCGAATTTAC
GH9B6-R	TTCTGTGGAAACCTCGAACC
GH9B7-F	TCTTGCGACGGGAAAATC
GH9B7-R	TTGTCTCCATAACCCACCAC
GH9B8-F	CGGTGTTCAACTCCTAGCTTC
GH9B8-R	AGTTCGCTGGACGTTTGTG
GH9B9-F	TCAGCATATTCTAAGTATCTCACAAAG
GH9B9-R	CAACAAACGGAGCAACAGTAAC
GH9B10-F	TAAATATCTTGAAGCCGCAA
GH9B10-R	CAACAAGCGGAGCAGTAGTGAC
GH9B11-F	TCTAAATATCTTACAGACGCAAAAGC
GH9B11-R	AACAAATGGAGCAGCAGTGG
GH9B12-F	CACCGCTTCTTTCGCATTAG

GH9B12-R	TGGGGTTTGACCCAAGTATG
GH9B13-F	AAAACCGTCGTCCATTGC
GH9B13-R	GGGAATTTTGGACCGTAACC
GH9B14-F	CTGTCTGACGGTGCATCA
GH9B14-R	TGAGCACGGAGGATAAAATTA
GH9B15-F	TCGACCAAGTTCACCGTATC
GH9B15-R	CCCAAATCCGACCATGTAAG
GH9B16-F	TCGTCAATCTTTTGGGTCAG
GH9B16-R	GCAATCGCAGCAACATTC
GH9B17-F	ATTCTCTTCGCCGCATAGTC
GH9B17-R	CCGGATGAACGGTAACAGAC
GH9B18-F	TGATTATCTCCGCCGTCTTG
GH9B18-R	ACGGTGATGGATCCTCTTTG
GH9C1-F	TCCACTTGTTGGCCTATTCG
GH9C1-R	CACCTGATTGCTTTGGACTG
GH9C2-F	CCGAAGACCAATGCCTATTC
GH9C2-R	TCCCTTTGAGACCCATGAAC
GH9C3-F	CGACTCCAAGTCCGGTTATC
GH9C3-R	TTCCCTCGTTCTTCCATGAG
At5G16700-F	TGAATTGTTTGGTGGCTTGG
At5G16700-R	GTTCTTGTTGGGTCGCAATC
At3G26130-F	GGTCTAGCATAAGGAACTCAACC
At3G26130-R	GCAAAGTCCAGTTGAAGGATG
At5G17500-F	GCTCTCCGTCATTCAACCAC
At5G17500-R	TTGTGCATGGACCTAACGTG
At3G26140-F	TCTGATTCTATCCCCGCTTC
At3G26140-R	CGGTTAACGGGTGGAAAAC
At1G13130-F	GACGTTGATTGGTCGCTATG
At1G13130-R	TTCGGAGCTATTGCATGGAC
GH9B1-as-F	AGCTTAGAAACGCCGTGAAA

GH9B1-as-R	TAATACGACTCACTATAGGGACAAGGCACAACCTTTTGG
GH9B2-as-F	TCTCTCCAATGGCTTCTCGT
GH9B2-as-R	TAATACGACTCACTATAGGGTCAGCTCCAAGGATTTGTCC
GH9B13-as-F	CTTTGAAGGCCAAAGGTCAG
GH9B13-as-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGCGTGCTTGTTATCCCAAC
GH9B15-as-F	AGTTGGGATGTTCTTGGCTTTT
GH9B15-as-R	TAATACGACTCACTATAGGGTCCGATACGAGTAAAGCTTGA
GH9B15-s-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGTTGGGATGTTCTTGGCTTT
GH9B15-s-R	TCCGATACGAGTAAAGCTTGAGC
GH9B18-as-F	GGATACACCACGGACTGCTT
GH9B18-as-R	TAATACGACTCACTATAGGGCAATCGATGGCAATGATGAG
histone H4-as-F	ACACGGATCGATATCTCAGCC
histone H4-as-R	TAATACGACTCACTATAGGGCACCGAATCCGTAAAGAGTCC
GH9B15-RNAi-F	CACCAGTTGGGATGTTCTTGGCTTTT
GH9B15-RNAi-R	AATGACATTGGCCACACAAA
p35S-F	TGCTGACCCACAGATGGTTA
Intron-R	TCAAGCTGACCTGCAAACAC
Intron-F	TTGATGGCCATAGGGGTTTA
T35S-R	TCACTGGATTTTGGTTTTAGGAA

3.3 結果

3.3.1 *spl/nzz* 変異体におけるセルロース性細胞壁の変化

葯発生を制御する遺伝子がセルロース性細胞壁の変化に関わっているかどうかを調べるために、葯ステージ 5 より前に雄蕊の発生が異常になり、花粉母細胞も葯壁も形成されない *spl-1* 変異体 (Yang *et al.* 1999) におけるセルロース性成分の変化を調べた。

葯ステージ 3 に、胞原細胞から一次側膜細胞および一次孢子形成細胞が生じる。この時期には、一次側膜細胞および一次孢子形成細胞を含むすべての葯の細胞層の細胞壁部分が特異的に Renaissance 2200 による蛍光を発していた (Fig. 3-1c)。カロースの分布を調べるために、別の切片を Aniline Blue によって染色した。葯ステージ 3 において、どの葯の細胞層においても Aniline Blue による蛍光は検出されなかった (Fig. 3-1d)。すなわち葯ステージ 3 において、*spl-1* 変異体の葯の全ての細胞はセルロース性細胞壁を持っていた。

spl-1 変異体においてはタペート組織および花粉母細胞の形成が起こらず、代わりに変異体の葯は液胞化された細胞から構成される。成熟した葯においても葯ステージ 3 の葯と同様に、全ての細胞の細胞壁部分から Renaissance 2200 による蛍光が検出された (Fig. 3-2c)。またこのステージにおいて、Aniline Blue による蛍光もどの細胞においても検出されなかった (Fig. 3-2d)。

これらの結果からセルロース性細胞壁の減少は *SPL/NZZ* による葯の組織の分化制御の下流で起こることが示された。

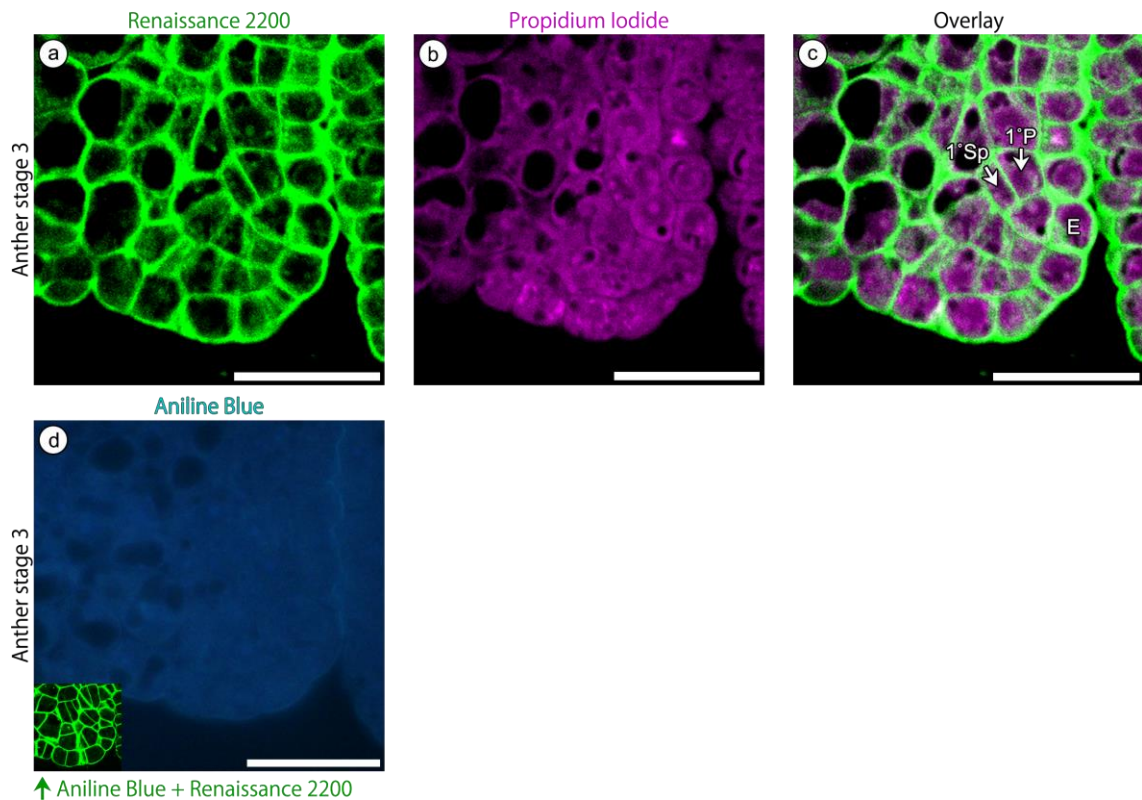


Fig. 3-1 細胞壁を染色した *spl/nzz* 変異体のステージ 3 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 3 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、1°P primary parietal layer (一次側膜細胞層)、1°Sp primary sporogenous layer (一次孢子形成細胞層)。スケールバーは 20 μm 。

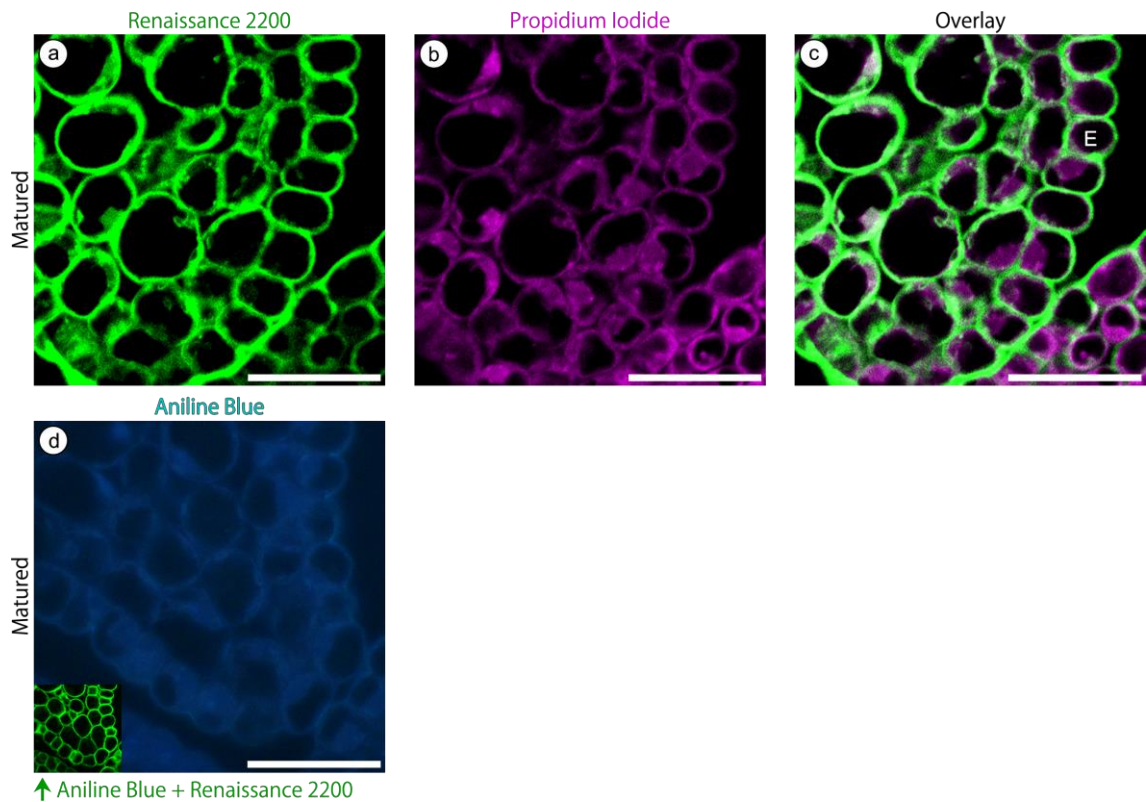


Fig. 3-2 細胞壁を染色した *spl/nzz* 変異体の成熟した葯の顕微鏡像

成熟した葯における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)。スケールバーは 20 μm 。

3.3.2 *tpd1* 変異体におけるセルロース性細胞壁の変化

tpd1 変異体における葯の発生異常は、*spl/nzz* 変異体よりも後の時期に起こる。葯がタペート組織を欠き、代わりにより多くの花粉母細胞を形成する *tpd1* 変異体 (Yang *et al.* 2003) におけるセルロース成分の変化を調べた。

タペート組織から分泌される酵素が四分子のカロース壁を分解する役割を果たすと考えられているが、もしタペート組織が花粉母細胞のセルロース性細胞壁の分解も担っているならば、*tpd1* 変異体においては野生型と異なり、花粉母細胞におけるセルロース性細胞壁分解が起こらないことが予想された。逆に、もし花粉母細胞が自身のセルロース性細胞壁を分解する能力を持つならば、*tpd1* 変異体においては野生型と同様に、花粉母細胞におけるセルロース性細胞壁分解が起こることが予想された。

SALK_075964 (*tpd1-3* と名付けた) は *TPD1* 遺伝子の第一エクソンに T-DNA 挿入を持っている (Fig. 3-3a)。*tpd1-3* 変異体は自家受粉では種子が得られなかったが、*tpd1-3* 変異体の雌蕊に野生型の花粉を交配させた結果、種子が実ることが分かった(データ示さず)。これらのデータから、*tpd1-3* 変異体は *tpd1-1* および *tpd1-2* 変異体と同様に (Yang *et al.* 2003) 雄性不稔であることが示された。予想された通り、*tpd1-3* 変異体において *TPD1* の mRNA 量は大きく減少していた (Fig. 3-3b)。

葯ステージ 3、5 および 6 の切片を染色した結果、*tpd1-3* 変異体におけるセルロース性細胞壁の分布変化は野生型と同様であることが明らかになった。葯ステージ 3 において、表皮細胞の細胞壁、二次側膜細胞層の細胞および孢子形成細胞から、セルロースとカロースの両方または一方に由来する Renaissance 2200 の蛍光が検出された (Fig. 3-4c)。カロースの分布を調べるために、別の切片を Aniline Blue によって染色した。葯ステージ 3 において、葯の細胞層のどの細胞からも Aniline Blue による蛍光は検出されなかった (Fig. 3-4d)。すなわち葯ステージ 3 において、*tpd1-3* 変異体の葯の全ての細胞がセルロース性細胞壁を持っていることが分かった。

葯ステージ 5 において、表皮、内被および中間層の細胞壁は Renaissance 2200 による強い蛍光を発していたが、花粉母細胞の細胞壁はほとんど蛍光を示さなかった (Fig. 3-5c)。このステージでは、Aniline Blue の蛍光はどの細胞においても検出されなかった (Fig. 3-5d)。すなわち、Fig. 3-5 のパネル c および d のデータから *tpd1-3* 変異体においては、花粉母細胞のセルロース性細胞壁は野生型と同様にステージ 5 に減少することが分かった。

葯ステージ 6 において、減数分裂中の細胞からセルロースとカロースの両方または一方に由

来する Renaissance 2200 の蛍光が検出された (Fig. 3-6c)。減数分裂中の細胞からは Aniline Blue による強い蛍光が検出された (Fig. 3-6d)。Aniline Blue による蛍光は、野生型においては減数分裂中の細胞を完全に囲んでいるが、*tpd1-3* 変異体においては減数分裂中の細胞を完全に囲んではおらず、減数分裂中の細胞同士の間、細胞外領域に異常に蓄積している場合があった (Fig. 3-6d)。これらのデータから、野生型と同様に、*tpd1* 変異体の葯内で花粉母細胞のセルロース性細胞壁がほとんど失われる時期があることが示された。

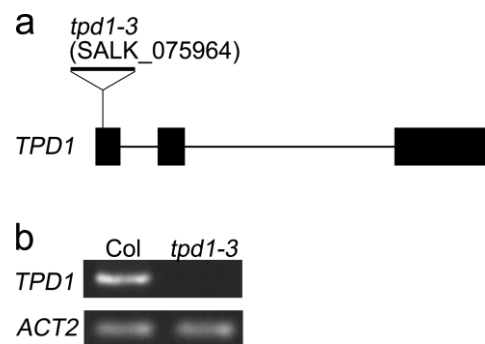


Fig. 3-3 *tpd1* 変異体における T-DNA 挿入部位と転写産物量

a *TPD1* の遺伝子構造および T-DNA の挿入箇所。黒い四角は mRNA のコード領域を示している。

b 花序における *TPD1* 遺伝子の発現解析。Total RNA を野生型および T-DNA 挿入変異体から抽出し、RT-PCR に用いた。

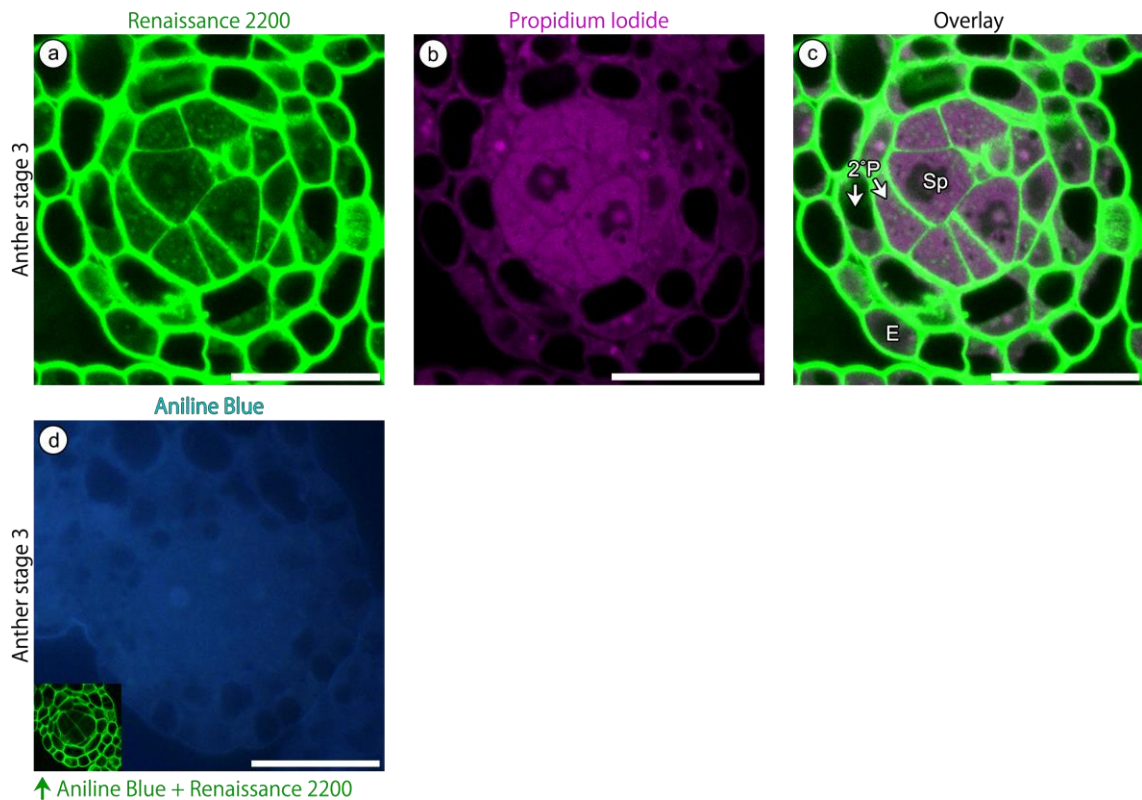


Fig. 3-4 細胞壁を染色した *tpd1* 変異体のステージ 3 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 3 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、2°P secondary parietal cell layers (二次側膜細胞層)、Sp sporogenous cells (孢子形成細胞)。スケールバーは 20 μm 。

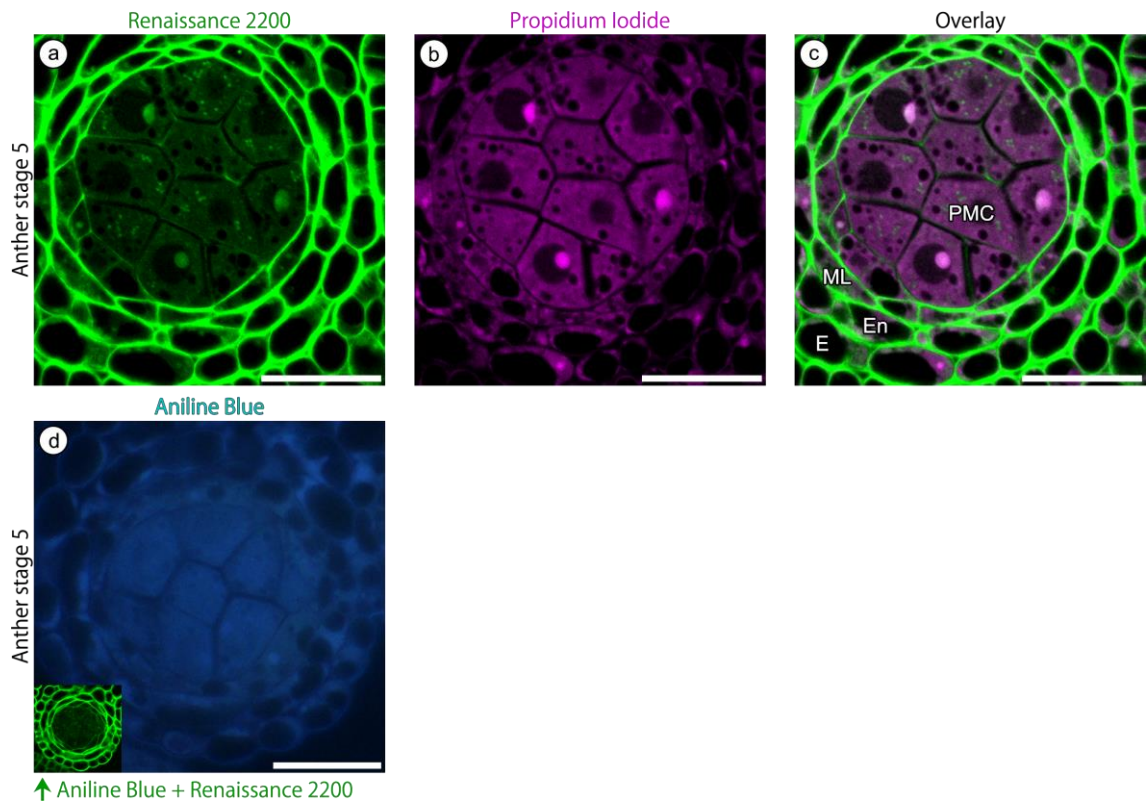


Fig. 3-5 細胞壁を染色した *tpd1* 変異体のステージ 5 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 5 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、ML middle layer (中間層)、PMC pollen mother cells (花粉母細胞)。スケールバーは 20 μm 。

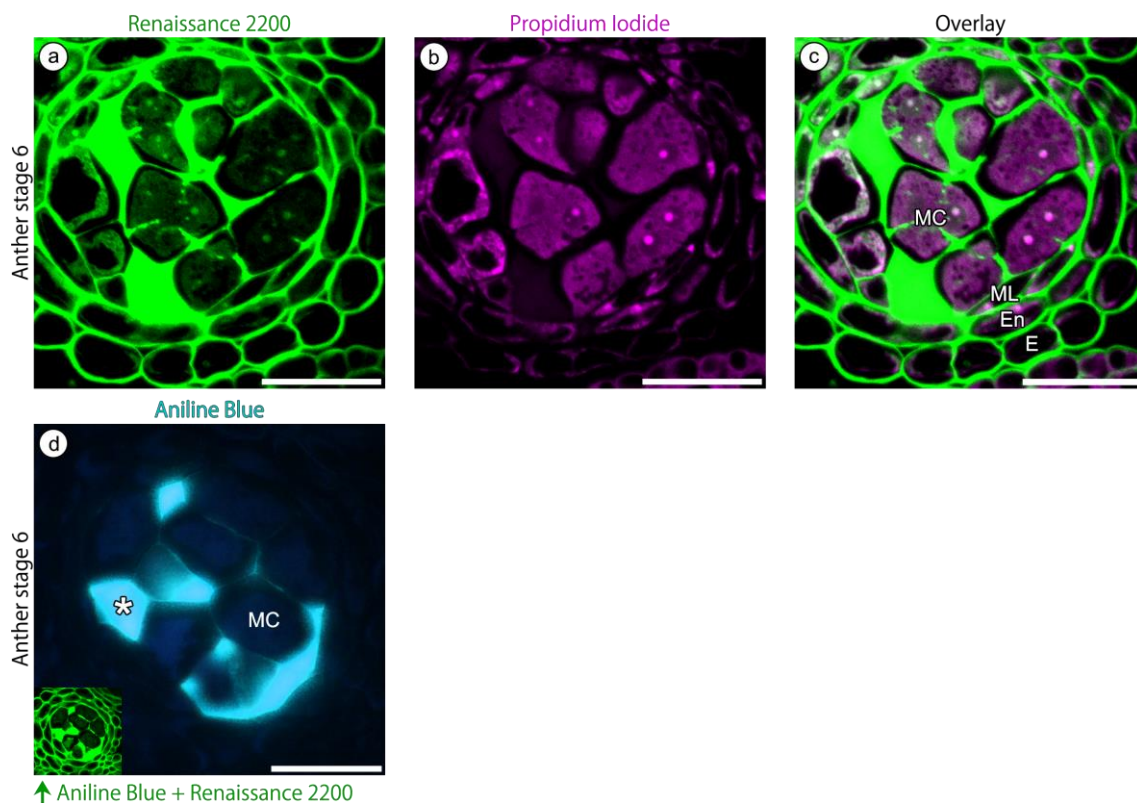


Fig. 3-6 細胞壁を染色した *tpd1* 変異体のステージ 6 の葯の顕微鏡像

葯ステージ 6 における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a)、Propidium Iodide による染色像 (b) および Aniline Blue による染色像 (d)。アスタリスクは減数分裂中の細胞同士のための細胞外領域に異常に蓄積した Aniline Blue 蛍光を示している。d 左下 カロースを観察した後、切片をさらに Renaissance 2200 で染色した。葯は共焦点レーザー顕微鏡 (a, b, d 左下) または蛍光顕微鏡 (d) を用いて観察した。E epidermis (表皮)、En endothecium (内被)、MC meiotic cell (減数分裂中の細胞)、ML middle layer (中間層)。スケールバーは 20 μm 。

3.3.3 *dyl1* 変異体におけるセルロース性細胞壁の変化

dyl1 変異体ではタペート細胞が早期に液胞化し、花粉母細胞が減数分裂を完了しないことが知られている (Zhang *et al.* 2006)。DYT1 は主に葯ステージ 5 の後期から葯ステージ 6 のタペート組織で発現することからも、タペート組織の機能に関与すると考えられている。一方で、葯ステージ 5 以前のタペート細胞および花粉母細胞において DYT1 が機能を持つのかどうかは、変異体の表現型解析からは明らかになっていない。しかしながら、DYT1 の転写産物は花分裂組織、葯の原基、胞原細胞および減数分裂中の細胞においても存在することが分かっている。また DYT1 の転写産物は、タペート細胞を欠き、より多くの花粉母細胞が形成される *ems1* 変異体の減数分裂中の細胞においても存在することが分かっている (Zhang *et al.* 2006)。以上のように、これまでタペート細胞の機能に関与することが示されている DYT1 は、葯ステージ 5 以前の段階でも機能を持つ可能性があるため、本項では *dyl1* 変異体の表現型をセルロース性細胞壁の観点から調べた。

DYT1 が葯ステージ 5 以前のタペート細胞もしくは花粉母細胞において、セルロース性細胞壁の分解を冗長性なく制御しているならば、*dyl1* 変異体においては野生型と異なり、花粉母細胞におけるセルロース性細胞壁分解が起こらない可能性が考えられた。

CS315481 (*dyl1-3* と名付けた) は DYT1 遺伝子の T-DNA 挿入変異体である。*dyl1-3* 変異体は自家受粉による種子が実らなかったが、*dyl1-3* 変異体の雌蕊に野生型の花粉を交配させた結果、種子が実ることが分かった(データ示さず)。これらのデータから、*dyl1-3* 変異体は *dyl1* (Zhang *et al.* 2006) および *dyl1-2* 変異体 (Gu *et al.* 2014) と同様に雄性不稔であることが示された。予想された通り、*dyl1-3* 変異体において DYT1 の mRNA 量は大きく減少していた (Fig. 3-9)。

葯ステージ 3、5 および 6 の切片を染色した結果、*dyl1-3* 変異体におけるセルロース性細胞壁の分布変化は野生型と同様であることが明らかになった。葯ステージ 3 において、表皮細胞の細胞壁、二次側膜細胞層の細胞および孢子形成細胞から Renaissance 2200 の蛍光が検出されたことから (Fig. 3-7c)、*dyl1-3* 変異体の葯の全ての細胞がセルロース性細胞壁を持っていることが示唆された。

葯ステージ 5 において、表皮および内被の細胞壁は Renaissance 2200 による強い蛍光を発していたが、花粉母細胞およびタペート細胞の細胞壁はほとんど蛍光を示さなかったことから (Fig. 3-7f)、*dyl1-3* 変異体においては、花粉母細胞およびタペート細胞のセルロース性細胞壁は野生

型と同様にステージ 5 に減少することが分かった。

葯ステージ 6 には、減数分裂中の細胞およびタペート細胞を含むすべての細胞の細胞壁部分に Renaissance 2200 の蛍光が検出された (Fig. 3-7i)。

これらのデータから、野生型と同様に、*dyl1* 変異体の葯内で花粉母細胞およびタペート細胞のセルロース性細胞壁がほとんど失われる時期があることが示された。

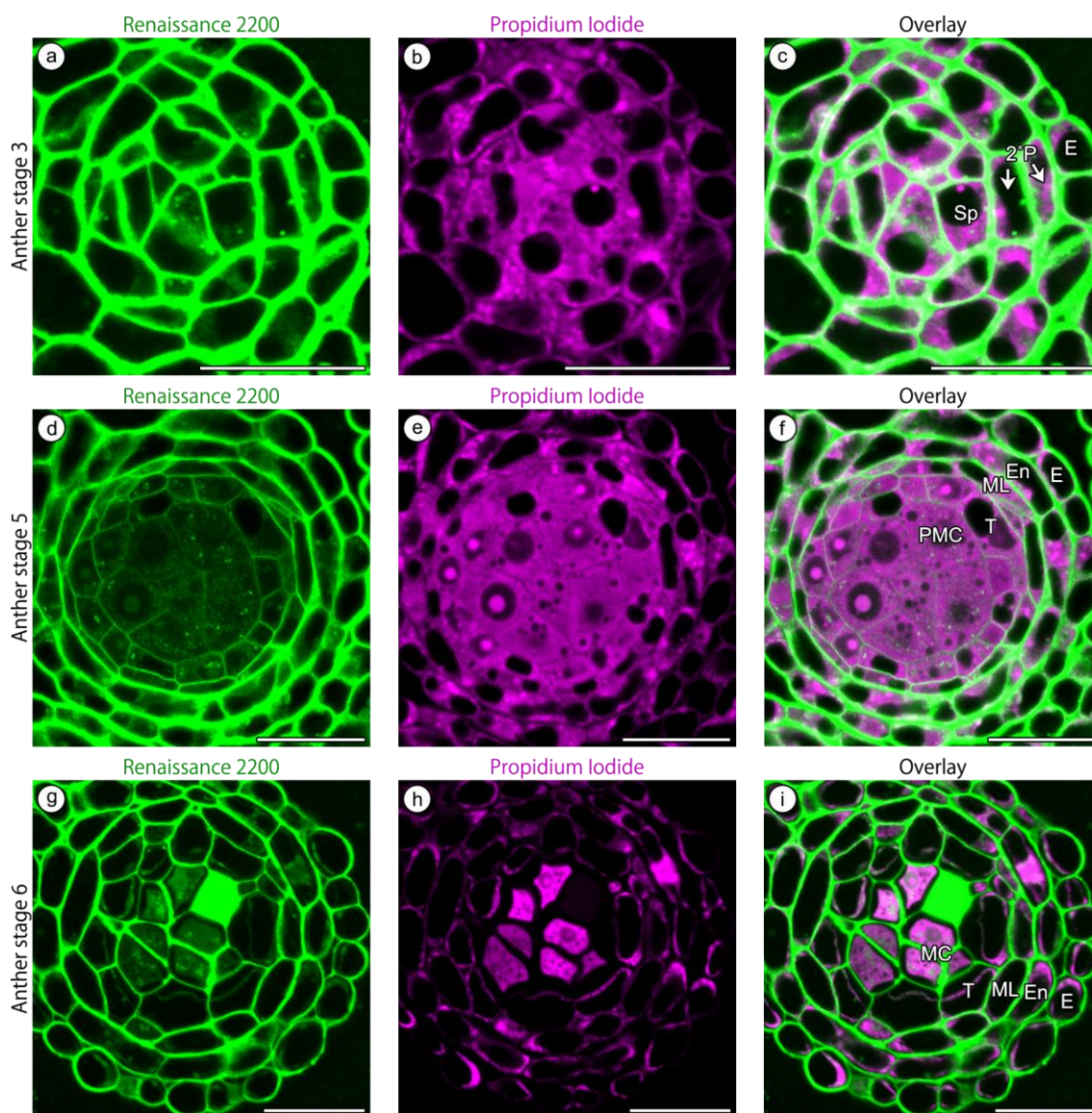


Fig. 3-7 細胞壁を染色した *dyt1* 変異体の葯の顕微鏡像

葯ステージ3 (a-c)、5 (d-f) および6 (g-i) における葯室の、Renaissance 2200 による染色像 (a, d, g)、Propidium Iodide による染色像 (b, e, h)。葯は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。*E* epidermis (表皮)、*En* endothecium (内被)、*MC* meiotic cell (減数分裂中の細胞)、*ML* middle layer (中間層)、*2P* secondary parietal cell layers (二次側膜細胞層)、*PMC* pollen mother cells (花粉母細胞)、*Sp* sporogenous cells (孢子形成細胞)、*T* tapetum (タペート組織)。スケールバーは 20 μm 。

3.3.4 野生型および変異体におけるセルラーゼホモログの発現比較

花粉母細胞およびタペート細胞で発現しているセルラーゼホモログの候補を絞り込むために、野生型および前項までに用いた三種類の変異体の花序から RNA を抽出し、セルラーゼホモログの発現量を RT-PCR によって調べた (Fig. 3-9)。GH9 には既知のセルラーゼが含まれる。また、Glycosyl hydrolase family 5 (GH5) の遺伝子群はセルラーゼ、マンナーゼ、キシラナーゼ、ガラクトナーゼ、キシログルカナーゼなどを含む可能性があると考えられている (Aspeborg *et al.* 2012)。GH5 に含まれるシロイヌナズナの 13 遺伝子およびそのホモログの系統解析を行った結果、GH5 は大きく二つの集団に分けられた (Fig. 3-8)。一方は、シロイヌナズナのマンナーゼなどの 8 遺伝子を含む集団であった。もう一方は、シロイヌナズナの At5G16700, At3G26130, At5G17500, At3G26140, At1G13130 を含む集団であった。これらの 5 遺伝子は機能についての報告がほとんどないものの、At3G26130, At3G26140 および At1G13130 は TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) でセルラーゼとアノテーションされている。このことから、GH5 の 5 遺伝子も花粉母細胞およびタペート細胞で発現するセルラーゼの候補と考えた。本項では GH9 の 25 遺伝子 (GH9A1~GH9C3) および GH5 の 5 遺伝子 (At5G16700, At3G26130, At5G17500, At3G26140, At1G13130) を対象に発現解析を行った。

最初に、プライマーを用いて正常に PCR 産物が得られることを確認するために、野生型のゲノムを鋳型に PCR を行った。この結果、本研究において設計したプライマーを使用することで全ての遺伝子について特異的な PCR 産物が得られることが確認された。

次に、ACT2, SPL/NZZ, TPD1 および DYT1 の発現解析を行った (Fig. 3-9)。ACT2 は四種類の植物の花序において同程度発現していた。SPL/NZZ は *spl/nzz* 変異体においてほとんど発現していないことが確認された。また、*tpd1* および *dyl1* 変異体においてわずかに発現していた。TPD1 は *tpd1* 変異体においてほとんど発現していないことが確認された。DYT1 は *dyl1* 変異体だけでなく、*spl/nzz* 変異体および *tpd1* 変異体においてもほとんど発現していないことが分かった。

さらに、GH9 および GH5 に含まれる遺伝子の発現解析を行った (Fig. 3-9)。野生型、*tpd1* 変異体および *dyl1* 変異体では花粉母細胞のセルロース性細胞壁が分解されたことから、もし花粉母細胞においてセルラーゼホモログが発現していれば、少なくともこれらの 3 種類の植物において発現が検出されることが期待された。

野生型、*tpd1* 変異体および *dyl1* 変異体の花序において発現が検出された遺伝子は、GH9A1, GH9A3, GH9B1, GH9B2, GH9B4, GH9B5, GH9B7, GH9B8, GH9B12, GH9B13, GH9B15,

GH9B18, GH9C2, GH9C3, At3G26130, At3G26140, At1G13130 の 17 種類であった。この中で、細胞壁減少が起こらなかった *spl/nzz* 変異体の花序において相対的に発現が減少している遺伝子は、GH9B15, At3G26130, At1G13130 であった。

次に、組織間の比較だけでなく遺伝子間の発現量の比較を行うことを目的に、公共データベースから RNA-seq データをダウンロードし、各遺伝子の発現量を調べた (Fig. 3-10)。 *tpd1* 変異体のセルロース性細胞壁の観察結果から (Fig. 3-4 および 3-5)、少なくとも花粉母細胞においてはセルラーゼホモログが発現していることが推測された。そこで、シロイヌナズナの単離花粉母細胞の RNA-seq データ (SRP003699) をもとに、シロイヌナズナゲノム (TAIR10) へのマッピングを行い、各遺伝子の FPKM 値を算出した。この結果、花粉母細胞には GH9B1, GH9B13, GH9B2 などの転写産物が多く存在することが明らかになった (Fig. 3-10)。これらの 3 遺伝子はいずれも、野生型、 *tpd1* 変異体および *dyl1* 変異体の花序において発現が検出された遺伝子であった (Fig. 3-9)。

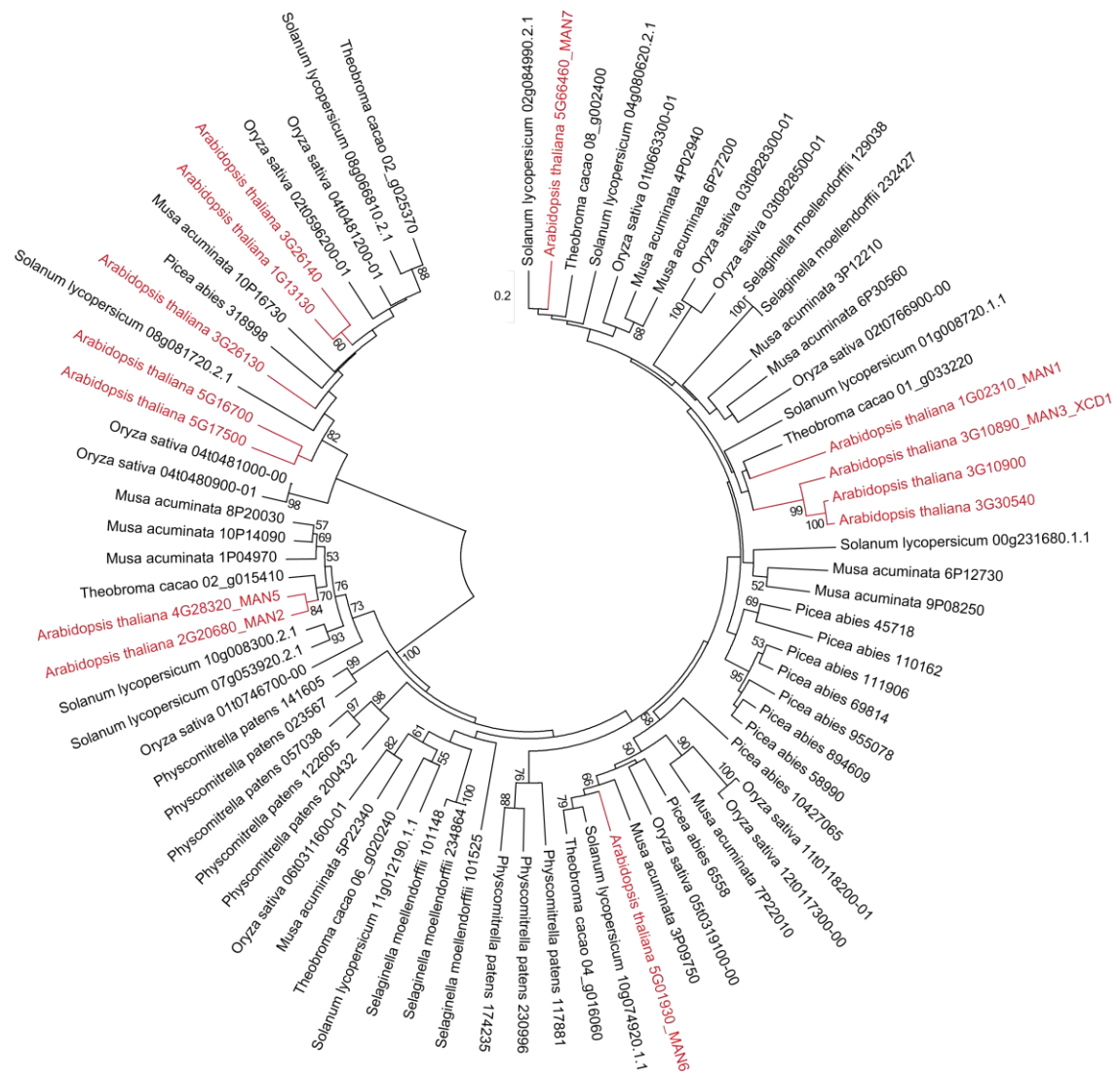


Fig. 3-8 Glycosyl hydrolase family 5 の分子系統樹

GH5 の遺伝子群の分子系統樹を、保存性の高い領域のアミノ酸配列を元に作製した。シロイヌナズナの遺伝子名は赤色で示した。ブートストラップ値は 50 以上のものを表示している。

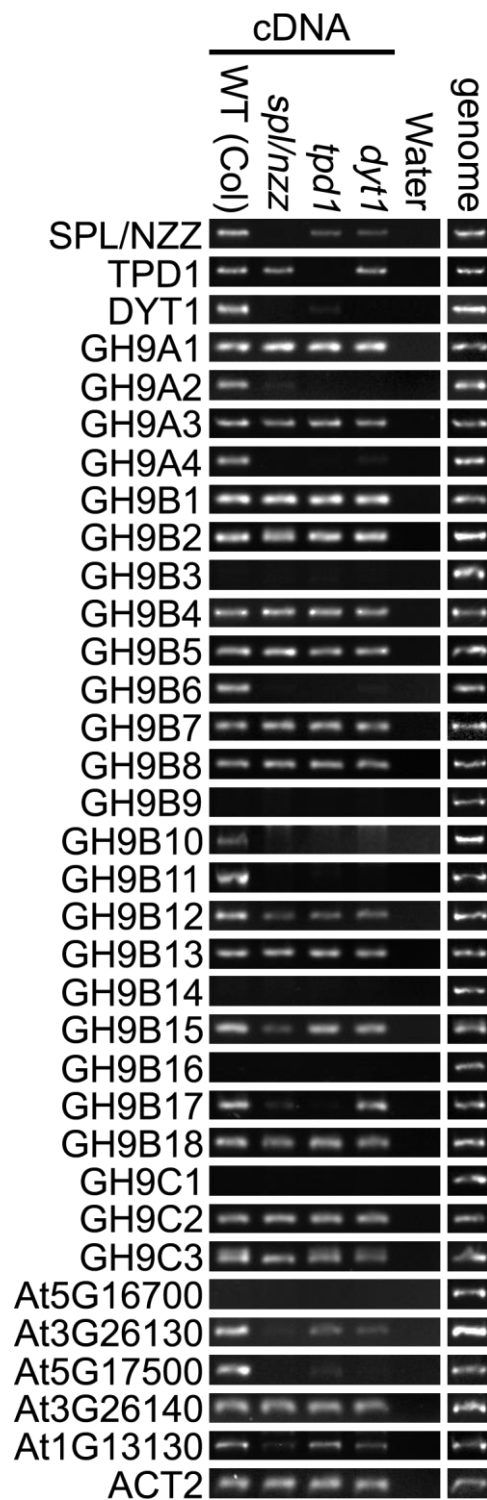


Fig. 3-9 野生型および変異体の花序における GH9 および GH5 の発現比較

花序における GH9 および GH5 に含まれる遺伝子群の発現解析。Total RNA を野生型および T-DNA 挿入変異体から抽出し、RT-PCR に用いた。

Gene Name	FPKM
GH9A1/KOR1/RSW2/DEC	21
GH9A2/KOR2	2
GH9A3/KOR3	0
GH9A4	1
GH9B1/CEL1	45
GH9B2/CEL2	21
GH9B3/CEL3	1
GH9B4/CEL5	3
GH9B5	0
GH9B6	0
GH9B7	14
GH9B8	1
GH9B9	1
GH9B10	1
GH9B11	1
GH9B12	1
GH9B13	37
GH9B14	1
GH9B15	0
GH9B16	2
GH9B17	2
GH9B18	10
GH9C1	1
GH9C2	7
GH9C3	2
AT5G16700	0
AT3G26130	1
AT5G17500	1
AT3G26140	2
AT1G13130	1

Fig. 3-10 シロイヌナズナ野生型の花粉母細胞における GH9 および GH5 の発現量
 RNA-seq による単離花粉母細胞の発現解析結果 (SRP003699) をもとに、シロイヌナズナゲノム (TAIR10) へのマッピングを行い、FPKM 値を算出した。

3.3.5 セルラーゼホモログの転写産物の組織局在

野生型の植物の花序のパラフィン切片を作成し、GH9 の転写産物の組織局在を *in situ* ハイブリダイゼーションによって調べた。まず前項の RT-PCR の結果から、野生型、*tpd1* 変異体および *dyl1* 変異体の花序において発現が検出され、*spl/nzz* 変異体の花序において発現が減少していた *GH9B15* 遺伝子に着目した。葯ステージ 4 において、*GH9B15* のアンチセンスプローブを用いた場合も (Fig. 3-11a)、センスプローブを用いた場合も (Fig. 3-11b) 葯のどの細胞においてもシグナルはほとんど検出されなかった。また、葯ステージ 5 (Fig. 3-11c, d) および 9 (Fig. 3-11e, f) においても、同様に *GH9B15* のシグナルはほとんど検出されなかった。一方で、葯の裂開部である隔壁細胞の崩壊が始まる葯ステージ 11 において、*GH9B15* の強いシグナルが隔壁において検出された (Fig. 3-11g, h)。葯が裂開し花粉が放出される葯ステージ 13 において、*GH9B15* の強いシグナルが花糸の頂部において検出された (Fig. 3-11i, j)。また、雌蕊中でも *GH9B15* のシグナルが transmitting tract において検出された (Fig. 3-11k, l)。これらの結果から、*GH9B15* は花粉母細胞およびタペート細胞ではほとんど発現していないが、葯の裂開部などで発現していることが明らかになった。*GH9B15* は Open Reading Frame に T-DNA が挿入された系統が得られなかったため、35S プロモーター下での RNAi 系統を作出した。その結果、ネガティブコントロールである *ccdB* のノックダウン系統では野生型と同様に、葯が裂開したが (Fig. 3-11n)、*GH9B15* のノックダウン系統の一部では葯が裂開しないことが明らかになった (Fig. 3-11m)。RNAi が正常に起こっていることを確認するために、RT-PCR を行った結果、*GH9B15* のノックダウン系統では確かに *GH9B15* 遺伝子の転写産物量が減少していた (Fig. 3-11o)。

次に、単離花粉母細胞の RNA-seq データの解析結果を受けて、*GH9B1*, *GH9B2*, *GH9B13* および *GH9B18* の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。葯ステージ 4 の葯において、ポジティブコントロールである *histone H4* のシグナルが様々な細胞において検出された (Fig. 3-11p)。次に、*GH9B1* についての実験を行った。葯ステージ 5 の葯において、*GH9B1* のシグナルはほとんど検出されなかった (Fig. 3-11q)。一方で、葯ステージ 5 の葯を含む蕾において、*GH9B1* は雌蕊および花弁において強いシグナルが検出された (Fig. 3-11r)。次に、*GH9B2* についての実験を行った。葯ステージ 4 の葯において、*GH9B2* のシグナルはほとんど検出されなかった (Fig. 3-11s)。一方で、葯ステージ 5 の葯を含む蕾において、*GH9B2* は雌蕊の内部および花弁の側部において弱いシグナルが検出された (Fig. 3-11t)。次に、*GH9B13* についての実験を行った。葯ステージ 4 の葯において、*GH9B13* のシグナルはほとんど検出されなかった (Fig. 3-11u)。一方で、葯ステージ 5

の葯を含む蕾において、*GH9B13* は雌蕊および花卉の側部において弱いシグナルが検出された (Fig. 3-11v)。最後に、*GH9B18* についての実験を行った。葯ステージ 5 の葯において、*GH9B18* のシグナルはほとんど検出されなかった (Fig. 3-11w)。一方で、*GH9B18* は雌蕊の内部において弱いシグナルが検出された (Fig. 3-11x)。これらの実験から、RNA-seq によって花粉母細胞で発現していることが明らかになったセルラーゼホモログも、他の組織と比較して非常に発現量が多いわけではないことが分かった。次に、*GH9B2*, *GH9B13*, *GH9B18* に T-DNA が挿入された系統を、それぞれ 1, 2, 2 系統ずつ取り寄せ、表現型を解析した。T-DNA がホモに挿入された系統において、5 種類のどの系統も野生型と比べて花粉稔性などの表現型に大きな違いは見られなかった (データ示さず)。さらに、*gh9b2-2 gh9b13-1* 二重変異体を作製したが、T-DNA が両方の遺伝子にホモに挿入された系統において、野生型と比べて花粉稔性などの表現型に大きな違いは見られなかった (データ示さず)。

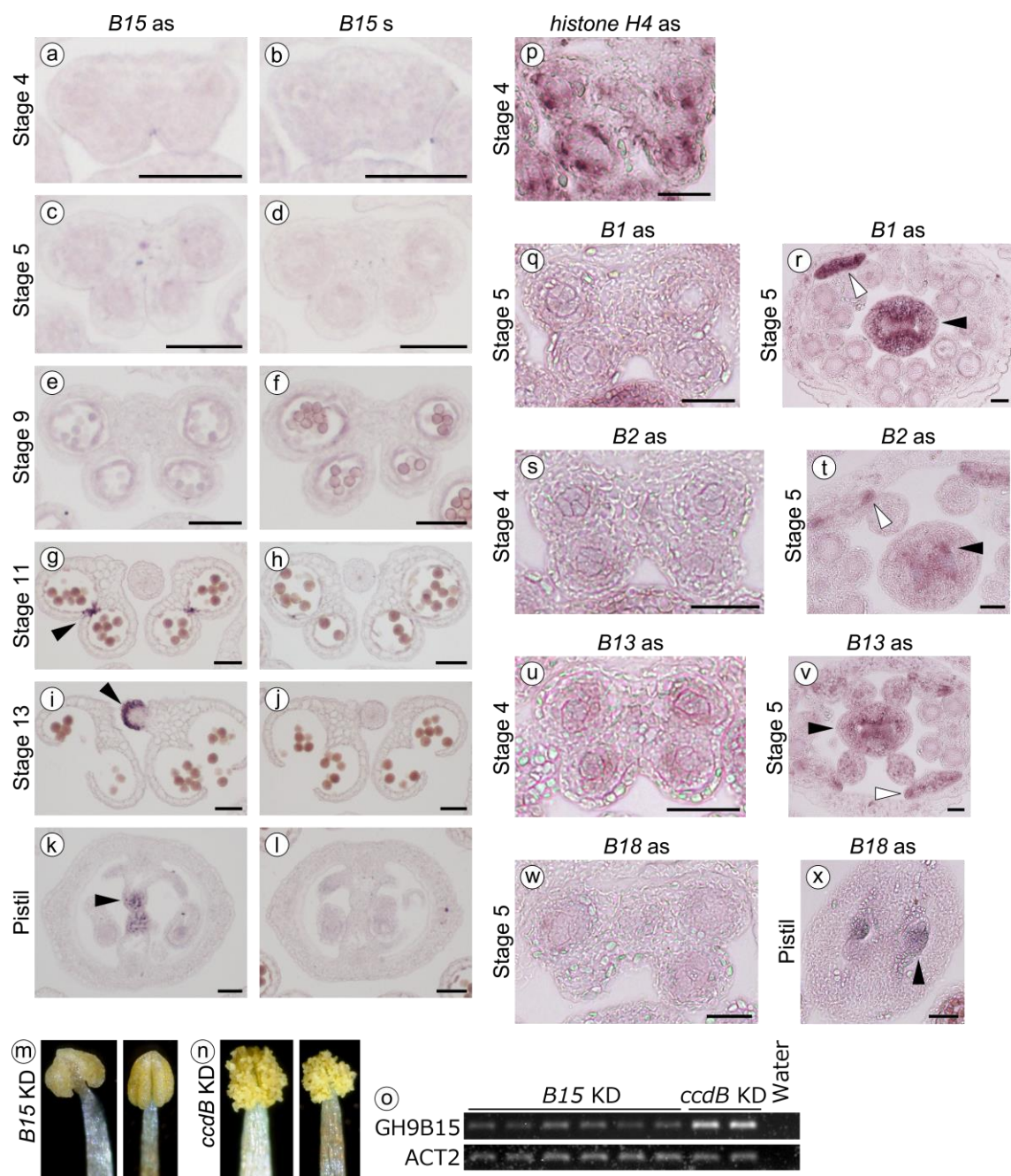


Fig. 3-11 GH9 の転写産物の組織局在

葯ステージ 4 (a, b), 5 (c, d), 9 (e, f), 11 (g, h), 13 (i, j) および雌蕊 (k, l) における、*GH9B15* アンチセンスプローブ (a, c, e, g, i, k) および *GH9B15* センスプローブ (b, d, f, h, j, l) を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析。g 矢尻は葯の裂開部を示す。i 矢尻は花糸の頂部を示す。k 矢尻は transmitting tract を示す。スケールバーは 50 μm。(次ページに続く)

35S プロモーター下での、*GH9B15* (**m**) およびネガティブコントロールとして *ccdB* (**n**) のノックダウン植物の葯の形態。**o** *GH9B15* のノックダウン植物の花序における、RT-PCR による *GH9B15* の発現解析。葯ステージ 4 (**p, s, u**), 5 (**q, w**), 葯ステージ 5 の葯を含む蕾 (**r, t, v**) および雌蕊 (**x**) における、*histone H4* (**p**), *GH9B1* (**q, r**), *GH9B2* (**s, t**), *GH9B13* (**u, v**) および *GH9B18* (**w, x**) アンチセンスプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析。**r** 黒い矢尻は雌蕊を、白抜きの矢尻は花卉を示す。**t** 黒い矢尻は雌蕊の内部を、白抜きの矢尻は花卉の側部を示す。**v** 黒い矢尻は雌蕊を、白抜きの矢尻は花卉の側部を示す。**x** 矢尻は雌蕊の内部を示す。スケールバーは 50 μm 。

3.4 考察

3.4.1 葯の発生を制御する遺伝子とセルロース性細胞壁減少の関係

本章の結果から、セルロース性細胞壁の減少は *SPL/NZZ* の下流で起こることが明らかになった (Fig. 3-1 および 3-2)。すなわち、花粉母細胞および葯壁を欠く *spl/nzz* 変異体において (Yang *et al.* 1999)、セルロース性細胞壁は葯の全ての種類の細胞から検出されたことから、葯の細胞壁の分解は花粉母細胞およびタペート細胞が分化した後に起こることが示唆された。

SPL/NZZ は葯発生の初期段階を制御している転写因子様タンパク質であるが、*SPL/NZZ* タンパク質が花粉母細胞およびタペート細胞で機能し続け、セルロース性細胞壁を分解する遺伝子の発現を直接的に増加させる可能性も否定されてはいない。

花粉母細胞のセルロース性細胞壁は *TPD1* および *DYT1* 非依存的に減少することが明らかになった (Fig. 3-4, 3-5 および 3-7)。すなわち、*tpd1* 変異体 (Yang *et al.* 2003) および *dyt1* 変異体 (Zhang *et al.* 2006) において、セルロース性細胞壁は花粉母細胞およびタペート細胞において、野生型と同様に減少した。*tpd1* 変異体における観察結果をより確かなものとするためには、*tpd1* と同様の葯の発生異常を示す *ems1/exs* 変異体 (Canales *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2002) においてもセルロース性細胞壁の変化を調べる必要がある。*dyt1* 変異体は電子顕微鏡による観察から、減数分裂前の時期のタペート細胞に液胞が多いこと、減数分裂中の細胞のカロース壁が薄いことが報告されている (Feng *et al.* 2012)。しかし、減数分裂前の時期の花粉母細胞およびタペート細胞の細胞壁の厚みは、野生型と *dyt1* の間に大きな差は見受けられない。第 2 章のように、もしシロイヌナズナでは電子顕微鏡によって観察される細胞壁の厚みと、蛍光染色によって観察されるセルロースの量に相関があるとするならば、本章の *dyt1* 変異体についての観察結果は Feng *et al.* (2012) の結果と一致していると言える。

3.4.2 花粉母細胞の細胞壁分解とタペート細胞の関係

タペート組織を欠き、野生型より多くの花粉母細胞を持つ *tpd1* 変異体において (Yang *et al.* 2003)、花粉母細胞のセルロース性細胞壁はほとんど検出されなかった (Fig. 3-5)。このことから、タペート細胞の非存在下でも、花粉母細胞の細胞壁分解は起こることが分かった。*tpd1* 変異体、*ems1/exs* 変異体および *somatic embryogenesis receptor kinase1 (serk1) serk2* 二重変異体はいずれも、タペート組織を欠損する変異体であるが、減数分裂中の細胞の各分裂は正常であることが知られており、花粉母細胞の発生は減数分裂の途中までタペート細胞とは独立に進行すると考えられている (Zhao *et al.* 2002, Yang *et al.* 2003, Albrecht *et al.* 2005, Colcombet *et al.* 2005)。花粉母細胞のセルロース性細胞壁の分解にタペート細胞も関わっているかどうかは明らかではないが、少なくとも花粉母細胞のセルロース性細胞壁の分解は、減数分裂中の核分裂の事例と同様にタペート細胞の関与なしに進行することが明らかになった。

一方で、花粉母細胞の細胞壁のペクチン性多糖の分解酵素は、タペート細胞において発現していることが知られている。ペクチンメチルエステラーゼをコードする *QRT1* は発生中の花粉とその周囲で (Rhee and Somerville 1998, Francis *et al.* 2006)、ポリガラクトツロナーゼをコードする *QRT2* および *QRT3* (Rhee *et al.* 2003) はタペート組織において発現している。また、四分子の細胞壁のカロースの分解酵素も、*qrt* 変異体の場合と異なり遺伝学的な証明がまだ行われていないものの、*MEE48/A6* カラーゼがタペート細胞で主に発現していることが知られている (Fig. 1-3, Stieglitz 1977, Hird *et al.* 1993)。以上のような花粉母細胞のペクチン性多糖およびカロースの分解に対するタペート細胞の積極的な関与と、セルロース性細胞壁の分解におけるタペート細胞の役割には違いがあるように思われる。

3.4.3 セルラーゼホモログである *GH9B15* について得られた知見

花粉母細胞やタペート細胞で特異的にセルロース分解に関与する遺伝子は特定できなかったが、本章の結果から花序における *GH9* に含まれる複数の遺伝子の発現パターンが明らかになった。本章ではまず、野生型および変異体における RT-PCR の結果をうけて *GH9B15* に着目した (Fig. 3-9, 3-11)。*GH9B15* と配列の相同性の高い遺伝子として *GH9B14* がある (Fig. 2-9)。これまでマイクロアレイでは両者の発現の差は分けられていなかったが (Fig. 2-12)、プライマーを適切に設計することにより、花序において *GH9B14* はほとんど検出されず、*GH9B15* は検出されるという違いがあることが明らかになった。一般的に、異なるプライマーを用いた PCR は増幅効率が違うため単純に比較することはできないが、本研究の条件検討の過程で *GH9B14* の異なる場所に設計したプライマーを用いた場合に、*GH9B15* の cDNA に非特異的に結合したキメラな増幅産物が得られたことを RT-PCR およびシーケンスによって確認しており(データ示さず)、花序では *GH9B14* の量は *GH9B15* よりも非常に少ないと考えられる。しかしながら、単離花粉母細胞の RNA-seq データを解析した場合に、量は少ないものの *GH9B14* 遺伝子に貼りつくリードが存在することをゲノムブラウザで確認できており、花序において *GH9B14* は全く発現していないということを意味してはいない(データ示さず)。

ダイコンの細胞質雄性不稔系統の解析から、可稔系統では *GH9B15* のホモログが発現しており、不稔系統ではほとんど発現していないことが報告されていた (Sun *et al.* 2013)。本研究の RT-PCR の結果において、*GH9B15* が *spl/nzz* 変異体では発現量が少なく、*tpd1* 変異体では発現量が野生型と同程度であった (Fig. 3-9)。このことから、*GH9B15* は花粉母細胞およびタペート細胞で発現している可能性が考えられたが、*in situ* ハイブリダイゼーションによる解析から、葯の裂開部で高発現していることが明らかになった (Fig. 3-11a-j)。また、*GH9B15* のノックダウン系統を作出した結果、一部の系統で葯の裂開が抑制された (Fig. 3-11m-o)。細胞間の接着にはペクチンが関わると考えられており、実際に葯の裂開にはポリガラクトナーゼが関与していることが明らかになっているが (Ogawa *et al.* 2009)、葯の裂開部における細胞接着にはセルロースも関わっている可能性が考えられる。

3.4.4 *GH9B15* の解析から明らかになった *spl/nzz* 変異体および *tpd1* 変異体の特徴

spl/nzz 変異体および *tpd1* 変異体はいずれも L2 層由来の細胞に異常を持つことが知られている。しかしながら、*GH9B15* が葯の裂開部で発現していたことおよび RT-PCR の結果を併せると、*spl/nzz* 変異体は L3 層由来の細胞の分化にも異常がある一方で、*tpd1* 変異体は L3 層由来の細胞に分化に異常がないことが予想される。*GH9B15* が発現していた葯の隔壁 (Sanders *et al.* 1999) は、Goldberg *et al.* (1993) の定義する Circular Cell Cluster と同じ位置に存在する組織であり、Circular Cell Cluster は L3 層由来の細胞系譜を持つ細胞である。*spl/nzz* 変異体ではこの L3 層由来の細胞分化にも異常があるため *GH9B15* を発現する細胞が分化せず、*tpd1* 変異体では L3 層由来の細胞分化には異常がないため葯の裂開部が分化したと考えられる。

イネの *MICROSPORE AND TAPETUM REGULATOR1 (MTR1)* 遺伝子は、減数分裂中の細胞から初期の小孢子において発現する遺伝子であり、小孢子 (核相:n) の発生だけでなく孢子体 (核相:2n) 側の組織であるタペート細胞も制御していることが知られている (Tan *et al.* 2012)。タペート細胞から小孢子への発生制御だけでなく、小孢子 (n) から孢子体 (2n) 側の細胞に対しても発生制御が行われていると考えられる。しかしながら、本研究では *tpd1* 変異体においては、減数分裂期に小孢子的発生が異常になるにも関わらず、葯の裂開期に機能する *GH9B15* が発現していることが分かった。組織間の発生段階の協調について更なる解析が必要である。特に、*tpd1* 変異体における *GH9B15* および、葯の裂開部におけるペクチンの分解酵素をコードする *QRT2*, *ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1)*, *ADPG2* (Ogawa *et al.* 2009) の発現時期および部位を詳細に調べる必要がある。

3.4.5 *GH9B1*、*GH9B2*、*GH9B13*、*GH9B18* の発現部位についての先行研究との比較

花粉母細胞とタペート細胞のどちらでセルラーゼが発現しているのか、または両方で発現しているのかについて、野生型の解析からは絞り込むことができていなかった。本研究の *tpd1* 変異体を用いた解析から、花粉母細胞においてセルラーゼが発現していることが示唆された (Fig. 3-4 および 3-5)。単離花粉母細胞の RNA-seq データをもとに遺伝子間での発現量比較を行うことが可能となり、この比較結果を参考に *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析を行った。*GH9B1* 遺伝子は、アボカドおよびトマトのセルラーゼのアミノ酸配列を基に単離された遺伝子である (Shani *et al.* 1997)。*GH9B1* の発現は、成長中のシュートおよび線虫に感染した根 (Mitchum *et al.* 2004)、木部細胞および若い表皮細胞において観察されるほか (Shani *et al.* 2006)、(データは示されていないが) 成長中の果実、花、葯、柱頭およびトライコームにおいても発現することが報告されている (Shani *et al.* 2006)。本研究で *GH9B1* の転写産物が花弁および雌蕊で確認されたという結果は、先行研究と矛盾しない、新規の知見である。一方で、本研究で *GH9B1* の転写産物は減数分裂前の時期の葯においてほとんど検出されず、Shani *et al.* (2006) の報告と一見矛盾しているように思われる。しかしながら、本研究では *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、減数分裂前の時期の葯を観察している一方で、Shani *et al.* (2006) では *GH9B1* のプロモーターの効果を GUS によって検出しており、葯のステージも不明という点に違いがあるため、実験条件を揃えた解析が必要である。

GH9B2 遺伝子は、心皮および萼片からなる花を持つ *pistillata* 変異体 (Bowman *et al.* 1989, Hill and Lord 1989) および、萼片からなる花を持つ *pistillata agamous* 二重変異体 (Bowman *et al.* 1991) の発現比較から同定された遺伝子である (Yung *et al.* 1999)。*GH9B2* は雌蕊の隔壁、胚珠原基 (Yung *et al.* 1999) および線虫に感染した根 (Wieczorek *et al.* 2008) で発現することが確認されており、本研究で *GH9B2* の転写産物が雌蕊の内部で確認されたという結果は整合性がある。

GH9B13 遺伝子は、マイクロアレイなどの網羅的な解析を除くとこれまでに発現パターンや機能に関する報告がない。本研究では *GH9B13* は *GH9B2* と類似した発現パターンを示していた。また、*GH9B13* と *GH9B2* は配列の相同性も高いため (Fig. 2-9)、重複した機能を持つ可能性がある。

GH9B18 遺伝子も *GH9B13* 遺伝子と同様に、網羅的な解析を除くとこれまでに発現パターンや機能に関する報告はなかった。

本研究における *GH9B1*、*GH9B2*、*GH9B13* および *GH9B18* の *in situ* ハイブリダイゼーションの

結果、花粉母細胞におけるシグナルはほとんど検出されなかった (Fig. 3-11)。一方で、単離花粉母細胞の RNA-seq データの解析からは、花粉母細胞にこれらの遺伝子の転写産物が存在することが示唆されている (Fig. 3-10)。実際に花粉母細胞にこれらの遺伝子の転写産物が存在するが、*in situ* ハイブリダイゼーションの検出限界以下の量であった可能性がある。また、花粉母細胞のセルロース性細胞壁を分解する酵素が、GH9 および GH5 以外のファミリーに含まれている可能性を考慮する必要があるかもしれない。CAZY (Carbohydrate-Active enZYmes, <http://www.cazy.org/>) によると、現時点で GH ファミリーは (削除されたものも含めて) 133 番までが登録されている。セルロース分解に関わる可能性がある EC 3.2.1.4 の活性を持つとされるファミリーに含まれる遺伝子の中で、マイクロアレイによる発現データなどを考慮して候補遺伝子を探索する必要があるかもしれない。

GH9 の T-DNA 挿入変異体の解析の結果、転写産物が完全に失われていることの確認およびセルロースの染色を行う必要があるものの、*gh9b2-2*, *gh9b13-1*, *gh9b13-2*, *gh9b18-1*, *gh9b18-2* 変異体および *gh9b2-2 gh9b13-1* 二重変異体の花粉稔性などの表現型は、野生型と大きな違いがないことが確認された。今後 *gh9b1* 変異体も含めた掛け合わせを行い、三重または四重変異体の花粉母細胞の細胞壁の変化を調べる必要がある。

第四章. 総合考察

4.1 花粉母細胞とタペート細胞の分化過程

本研究から、花粉母細胞とタペート細胞の細胞壁のセルロースは花粉母細胞の減数分裂前に大きく減少することが示された。この時期の表皮および内被の細胞の中央には大きな液胞が存在し、細胞質は細胞の周縁部に存在する傾向がある。しかしながら、花粉母細胞とタペート細胞はその中心部に比較的広い体積の細胞質を持っている。細胞の内部形態の観点からも、花粉母細胞とタペート細胞はお互いに似た性質を持つ細胞なのではないかと考えられる。また、タペート細胞が分化せず、代わりにより多くの花粉母細胞を形成する変異体の解析から、タペート細胞はもともと花粉母細胞となる性質を持っていると考えられており、このことから両者の間に何らかの類似性があると考えられる。

一方で、両者の細胞系譜は異なる順番を辿っている。胞原細胞から、一次孢子形成細胞を経て花粉母細胞が生じる。しかしながら、タペート細胞のもととなる細胞である一次側膜細胞は、胞原細胞から発生する段階で花粉母細胞の系列から分かれることが知られている。その後、一次側膜細胞からはタペート細胞、中間層および内被が生じる。

このような細胞系譜と細胞の特徴の関係から、細胞の分化は完全に細胞自律的ではなく、葯を構成する細胞間で何らかの情報交換が行われていることが推測される。推定上の分泌タンパク質である TPD1 および受容体様キナーゼである EMS1/EXS の解析から、花粉母細胞とタペート細胞の分化に関わる細胞間相互作用の存在が証明された (Jia *et al.* 2008)。

しかしながら、花粉母細胞性の付与がどのような機構で行われているのかについては、今後の解明が待たれている。 *tpd1* 変異体および *ems1/exs* 変異体では花粉母細胞の分化は正常に起こり、 *spl/nzz* 変異体では花粉母細胞を含む複数の組織が分化しないため、これらの中間的な表現型である花粉母細胞のみ (あるいは花粉母細胞およびタペート細胞のみ) の分化に異常を示す変異体が必要であろう。もし花粉母細胞の細胞壁を分解するセルラーゼを同定することができれば、それらの変異体の解析は、花粉母細胞の分化機構の解明の一助となると考えられる。

4.2 花粉母細胞とタペート細胞においてセルロースが分解される意義

セルロース性細胞壁の減少が四分子形成の前に起こることから、セルロース性細胞壁の減少は花粉母細胞同士および花粉母細胞・タペート細胞間の分離を促進している可能性が考えられる。一般的に植物の細胞の接着にはペクチン性多糖が関わりと考えられており、葯の裂開においても組織の解離にポリガラクトナーゼが関与することが明らかになっている (Ogawa *et al.* 2009)。これに加えて、葯の裂開部における細胞接着にはセルロースも関わる可能性が本研究から示唆された。花粉母細胞の細胞壁にはペクチン性多糖が含まれており、発生過程で正常に分解されない場合、四分子を構成する小孢子同士が接着された表現型を示すことが知られている。花粉母細胞同士および花粉母細胞・タペート細胞間において、セルロースも細胞接着を担っている可能性が考えられる。

また、タペート細胞は四分子期以降にカラーゼなどの酵素を活発に分泌すると考えられている (Hird *et al.* 1993)。タペート細胞のセルロース性細胞壁の減少がこの時期より前に起こることから、セルロース性細胞壁の減少はタペート組織から四分子または小孢子への酵素の分泌を促進している可能性も考えられる。

花粉母細胞の周囲では、セルロースの分解に引き続いて、カロースの合成および分解が起こる。花粉母細胞にカロース壁が形成される時期と、RNA、タンパク質および可溶性 2-¹⁴C-チミジン誘導体の花粉母細胞への透過率が減少する時期が一致しており、カロース壁の形成は減数分裂を終えたそれぞれの胞子が独立に発生するために重要なのではないかと考えられている (Heslop-Harrison and Mackenzie 1967, Rodkiewicz 1970)。

4.3 セルロース分解に関わる遺伝子の候補

セルロース分解には Glycosyl Hydrolase family 9 (GH9) に含まれる遺伝子群が関わると考えられており、GH5 にもセルラーゼ活性を持つタンパク質が含まれている可能性が考えられた。マイクロアレイによる組織別の発現データ、RNA-seq による単離花粉母細胞の発現データ、野生型・変異体における RT-PCR の結果および *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を併せた場合に、特異的に花粉母細胞およびタペート細胞のセルロース分解に関与する遺伝子の特定には至らなかったが、いくつかの新規の知見を得た。まず、RT-PCR の結果から *GH9B15* が候補と考えられたが、マイクロアレイ、RNA-seq および *in situ* ハイブリダイゼーションのいずれのデータからも、*GH9B15* は花粉母細胞における機能を持たないことが示唆された。

マイクロアレイ、RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションの結果は、*GH9B2* および *GH9B13* は雌蕊および花卉で発現しているとすれば矛盾しないデータであった。しかしながら、単離花粉母細胞の RNA-seq データおよびマメ科の *Lathyrus odoratus* を用いた先行研究 (Sexton *et al.* 1990, Neelam and Sexton 1995) とは一致しない点があるため、これらの遺伝子の雄蕊における発現についてはさらに検討する必要があると考えられる。*gh9b2-2 gh9b13-1* 変異体は不稔ではなかったが、今後は RNA-seq のデータを参考にした *gh9b1 gh9b2 gh9b13* の三重変異体などの作製や、セルロース性細胞壁の観察を行う必要がある。

近年、シロイヌナズナの花粉母細胞の RNA-seq 解析だけでなく (Chen *et al.* 2010, Yang *et al.* 2011)、トウモロコシの花粉母細胞の RNA-seq データが得られている (Dukowic-Schulze *et al.* 2014a, Dukowic-Schulze *et al.* 2014b, Dukowic-Schulze *et al.* 2014c)。特にトウモロコシの発現データは、比較対象の組織および反復を含めてすべての元データが公開されているため、各遺伝子の発現量を得ることができ、有用である。今後、トウモロコシにおいても花粉母細胞のセルロース性細胞壁の減少が起こるのかどうか、検証が望まれる。

また、多種類の変異体および種の表現型観察には時間と労力がかかるため、本研究の結果 2.3.4 で確立した、固定を伴わない花粉母細胞の観察法も有用だと考えられる。

第五章. 摘要

植物の雄性配偶体である花粉は、多くの有性生殖を行う植物にとって生活環から欠くことのできない、必須の細胞である。花粉形成は気温の変化により異常となりやすいことが知られており、花粉形成過程についての知見は基礎生物学的な観点からのみならず、農業生産上の観点からも必要とされている。シロイヌナズナやイネなどの被子植物において、花粉は雄蕊の先端にある葯のなかで作られる。葯は4つの葯室から構成され、それぞれの葯室の最も内側で、花粉母細胞が減数分裂を経て四分子となり、順に小孢子、花粉粒へと分化する。花粉母細胞の集団を囲むように、葯室の内側から順にタペート組織、中間層、内被、表皮が存在する。四分子が小孢子へと分離する過程で、四分子の細胞壁のカロースは、タペート細胞から分泌される酵素によって分解されると考えられている。このように減数分裂以降における、タペート細胞の花粉形成への関与はよく調べられている一方で、タペート細胞が分化する機構は十分に解明されていない。

タペート細胞は細胞壁をほとんど持たないことがキンポウゲ科の *Helleborus foetidus* やイネ科の *Avena sativa* において古くから知られている。しかしながらシロイヌナズナでは、細胞壁の主要構成成分であるセルロースがタペート細胞においてどのように変化するかについて解析が行われていなかった。植物の一次細胞壁は、ヘミセルロース、ペクチンおよび糖タンパク質からなる基質に埋め込まれたセルロース微繊維の基本骨格から構成されている。シロイヌナズナの花粉形成過程では、花粉母細胞においてペクチンの分解が起こることが知られている。また、セルロース性細胞壁の観点からは、タペート細胞だけでなく花粉母細胞においてもこれまで十分な解析が行われていなかった。本研究では、花粉形成過程のセルロース性細胞壁に着目した研究をおこなった。

1. 花粉形成過程におけるセルロース性細胞壁の変化

セルロースを染めるために、Calcofluor と Renaissance 2200 という二つの染色剤を用いた。Calcofluor はセルロースを染めるために一般的に用いられる染色剤、Renaissance 2200 はセルロース性の成分を認識するより改良された染色剤である。葯におけるセルロース性細胞壁の分布を調べるために、花序を FAA によって固定し、Calcofluor による染色を行った。この結果、この手法では細胞質などの構造も染色されており、細胞壁の明瞭な染色像が得られないなどの問題点があることが分かったため、条件検討を行った。その結果、固定液として PFA・GA 混合液を、染色剤として Renaissance 2200 を用い、振盪しながら染色処理し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することで細胞壁を明瞭に染色する手法を確立した。

小孢子期の葯の切片を Renaissance 2200 によって染色した結果、タペート組織および小孢子はほとんどセルロース性細胞壁を持たないことが分かった。タペート細胞が発生した時点ではセルロース性細胞壁は存在しており、発生過程で減少したのではないかと考え、タペート細胞発生直後の時期の葯の切片を染色した。その結果、この時期のタペート細胞および孢子形成細胞はセルロースから構成される細胞壁を持っていることが示された。次に、減数分裂直前の時期の葯の切片の染色結果から、この時期にタペート細胞と花粉母細胞のセルロース性細胞壁が減少したことが示された。また、固定していない細胞を染色することによっても花粉母細胞はセルロース性細胞壁をほとんど持たないことが確認された。

2. 花粉形成に異常を示す変異体におけるセルロース性細胞壁の変化

シロイヌナズナにおいて、初期の葯の発生に重要な役割を果たす遺伝子がいくつか明らかになっている。セルロース性細胞壁の減少と、葯の発生を制御する遺伝子の関係を調べるために、これらの遺伝子に異常のある変異体においてセルロース性細胞壁の消長を調べた。

初期の葯の発生に重要な役割を果たす遺伝子の一つとして *SPOROCYTELESS/NOZZLE* (*SPL/NZZ*) があり、推定上の転写因子をコードしていて、孢子形成細胞、花粉母細胞や胚嚢母細胞において発現している。*spl/nzz* 変異体においては、花粉母細胞も葯壁(タペート細胞や中間層などからなる、花粉母細胞を囲む細胞層)も形成されない。*spl/nzz* 変異体の葯切片の染色結果から、セルロース性細胞壁の減少は *SPL/NZZ* による葯の組織の分化制御の下流で起こることが示された。*TAPETUM DETERMINANT1 (TPD1)* は推定上の分泌タンパク質をコードし、葉、若い実生および花芽、特に花粉母細胞において発現している。*tpd1* 変異体において、葯はタペート組織を欠く一方で、より多くの花粉母細胞を持っている。タペート組織から分泌される酵素が四分子のカロース壁を分解する役割を果たすと考えられているが、もしタペート組織が花粉母細胞のセルロース性細胞壁の分解も担っているならば、*tpd1* 変異体においては野生型と異なり、花粉母細胞におけるセルロース性細胞壁分解が起こらないことが予想された。逆に、もし花粉母細胞が自身のセルロース性細胞壁を分解する能力を持つならば、*tpd1* 変異体においては野生型と同様に、花粉母細胞におけるセルロース性細胞壁分解が起こることが予想された。切片を染色した結果から、*tpd1* 変異体においては野生型と同様に、花粉母細胞のセルロース性細胞壁がほとんど失われる時期があることが明らかになった。*DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1)* は推定上の bHLH 転写因子をコードし、*dyt1* 変異体ではタペート細胞が早期に液胞化し、花粉母細胞が減数分裂を

完了しないことが知られている。*DYT1* の転写産物は主にタペート組織に存在するが、花分裂組織、葯の原基、胞原細胞および減数分裂中の細胞においても存在することが分かっており、*DYT1* は葯発生のさらに初期の段階でも機能を持つ可能性があるため、*dyl1* 変異体の表現型をセルロース性細胞壁の観点から調べた。その結果、*dyl1* 変異体においては野生型と同様に、花粉母細胞およびタペート細胞のセルロース性細胞壁がほとんど失われる時期があることが示された。

次に、花粉母細胞およびタペート細胞で発現しているセルラーゼホモログの候補を絞り込むために、野生型および上記の三種類の変異体の花序におけるセルラーゼホモログの発現量を RT-PCR により調べた。Glycosyl hydrolase family 9 (GH9) には既知のセルラーゼが含まれる。また、GH5 の遺伝子群もセルラーゼ活性を持つ可能性がある。GH9 の 25 遺伝子および GH5 の 5 遺伝子を対象に発現解析を行った。花粉母細胞のセルロース性細胞壁が分解された、野生型、*tpd1* 変異体および *dyl1* 変異体の花序において発現が検出された遺伝子は 17 種類であった。この中で、細胞壁減少が起らなかった *spl/nzz* 変異体の花序において相対的に発現が減少していた遺伝子は *GH9B15*、*At3G26130*、*At1G13130* の 3 種類であった。さらに、組織間の比較だけでなく遺伝子間の発現量の比較を行うことを目的に、公共データベースから RNA-seq データをダウンロードし、各遺伝子の発現量を調べた。*tpd1* 変異体のセルロース性細胞壁の観察結果から、少なくとも花粉母細胞においてはセルラーゼホモログが発現していることが推測された。そこで、シロイヌナズナの単離花粉母細胞の RNA-seq データをもとに、各遺伝子の FPKM 値を算出した。この結果、花粉母細胞には *GH9B1*、*GH9B13*、*GH9B2* などの転写産物が多く存在することが明らかになった。GH9 の転写産物の組織局在を調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。RT-PCR において野生型、*tpd1* 変異体および *dyl1* 変異体の花序において発現が検出され、*spl/nzz* 変異体の花序において発現が減少していた *GH9B15* は、花粉母細胞およびタペート細胞におけるシグナルはほとんど検出されなかったが、葯の裂開部などで発現が検出された。また、*GH9B15* の RNAi 系統の一部が葯の裂開異常を示した。次に、単離花粉母細胞の RNA-seq データの解析結果を受けて、*GH9B1*、*GH9B2*、*GH9B13* および *GH9B18* の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。この結果、*GH9B1* は雌蕊および花弁で強いシグナルが、*GH9B2* および *GH9B13* は雌蕊および花弁で弱いシグナルが、*GH9B18* は雌蕊で弱いシグナルが検出されたが、花粉母細胞およびタペート細胞におけるシグナルはほとんど検出されなかった。また、*gh9b2*、*gh9b13*、*gh9b2 gh9b13*、*gh9b18* 変異体の花粉稔性に異常がないことが確認された。

本研究から、発生直後のタペート細胞はセルロース性細胞壁を持っており、花粉母細胞の減

数分裂直前にそれが大きく失われることが明らかになった。また、セルロース性細胞壁の減少はタペート細胞だけではなく花粉母細胞においても起こることが分かった。タペート細胞を欠いていると考えられている変異体においても花粉母細胞のセルロース性細胞壁が減少したことから、花粉母細胞は自身のセルロース性細胞壁を分解する能力を持つことが示唆された。特異的にタペート細胞、花粉母細胞のセルロース分解に関与する遺伝子は特定できなかったが、本研究結果は花粉母細胞およびタペート細胞の発生についての今後の研究に重要な情報を与えるものと考えられる。

参考文献

- 足立泰二, 丸橋亘 (1995) 第 3 章 小孢子囊. 植物の発生学—植物バイオの基礎. Bhojwani and Bhatnagar 著 講談社 10-23
- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A (2010) Plant cell walls. Garland Science, New York
- Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, de Vries S (2005) The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* 17:3337-3349
- Alvarez-Buylla ER, Benitez M, Corvera-Poire A, Chaos Cador A, de Folter S, Gamboa de Buen A, Garay-Arroyo A, Garcia-Ponce B, Jaimes-Miranda F, Perez-Ruiz RV, Pineyro-Nelson A, Sanchez-Corrales YE (2010) Flower development. *Arabidopsis Book* 8:e0127
- Alves-Ferreira M, Wellmer F, Banhara A, Kumar V, Riechmann JL, Meyerowitz EM (2007) Global expression profiling applied to the analysis of *Arabidopsis* stamen development. *Plant Physiol* 145:747-762
- Aspeborg H, Coutinho PM, Wang Y, Brumer H 3rd, Henrissat B (2012) Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evol Biol* 12:186
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1:37-52
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112:1-20

- Canales C, Bhatt AM, Scott R, Dickinson H (2002) EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 12:1718-27
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth. *Plant J* 3:1-30
- Chang F, Wang YX, Wang SS, Ma H (2011) Molecular control of microsporogenesis in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 14:66-73
- Chen C, Farmer AD, Langley RJ, Mudge J, Crow JA, May GD, Huntley J, Smith AG, Retzel EF (2010) Meiosis-specific gene discovery in plants: RNA-Seq applied to isolated *Arabidopsis* male meiocytes. *BMC Plant Biol* 10:280
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-743
- Coimbra S, Almeida J, Junqueira V, Costa ML, Pereira LG (2007) Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction. *J Exp Bot* 58:4027-4035
- Colcombet J, Boisson-Dernier A, Ros-Palau R, Vera CE, Schroeder JI (2005) *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* 17:3350-3361
- Dinneny JR, Yadegari R, Fischer RL, Yanofsky MF, Weigel D (2004) The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* 131:1101-1110
- Dukowic-Schulze S, Harris A, Li J, Sundararajan A, Mudge J, Retzel EF, Pawlowski WP, Chen C

- (2014a) Comparative transcriptomics of early meiosis in *Arabidopsis* and Maize. *J Genet Genomics* 41:561-565
- Dukowic-Schulze S, Sundararajan A, Mudge J, Ramaraj T, Farmer AD, Wang M, Sun Q, Pillardy J, Kianian S, Retzel EF, Pawlowski WP, Chen C (2014b) The transcriptome landscape of early maize meiosis. *BMC Plant Biol* 14:118
- Dukowic-Schulze S, Sundararajan A, Ramaraj T, Mudge J, Chen C (2014c) Sequencing-based large-scale genomics approaches with small numbers of isolated maize meiocytes. *Front Plant Sci* 5:57
- Echlin P, Godwin H (1968) The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. I. The development of the tapetum and ubisch bodies. *J Cell Sci* 3:161-174
- Feng B, Lu D, Ma X, Peng Y, Sun Y, Ning G, Ma H (2012) Regulation of the Arabidopsis anther transcriptome by DYT1 for pollen development. *Plant J* 72:612-624
- Feng X, Dickinson HG (2007) Packaging the male germline in plants. *Trends Genet* 23:503-510
- Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP (2006) Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiol* 142:1004-1013
- Goldberg RB, Beals TP, Sanders PM (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5:1217-1229
- Gu JN, Zhu J, Yu Y, Teng XD, Lou Y, Xu XF, Liu JL, Yang ZN (2014) DYT1 directly regulates the expression of TDF1 for tapetum development and pollen wall formation in Arabidopsis. *Plant J* 80:1005-1013
- Harris K, Crabb D, Young IM, Weaver H, Gilligan CA, Otten W, Ritz K (2002) In situ visualisation

- of fungi in soil thin sections: problems with crystallisation of the fluorochrome FB 28 (Calcofluor M2R) and improved staining by SCRI Renaissance 2200. Mycol Res 106:293-297
- Heslop-Harrison J, Mackenzie A (1967) Autoradiography of soluble [2-¹⁴C]thymidine derivatives during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. J Cell Sci 2:387-400
- Hill JP, Lord E (1989) Floral development in *Arabidopsis thaliana*, a comparison of the wild type and the homeotic *pistillata* mutant. Can J Bot 67:2922-2936
- Hird DL, Worrall D, Hodge R, Smartt S, Paul W, Scott R (1993) The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to beta-1,3-glucanases. Plant J 4:1023-1033
- Hughes J, McCully ME (1975) The use of an optical brightener in study of plant structure. Stain Technol 50:319-329
- 伊藤道夫 (1975) 減数分裂 (UP バイオロジー (6)) 東京大学出版会
- Jia G, Liu X, Owen HA, Zhao D (2008) Signaling of cell fate determination by the TPD1 small protein and EMS1 receptor kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 105:2220-2225
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res 30:3059-3066
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol 30:772-780
- Lane DR, Wiedemeier A, Peng L, Höfte H, Vernhettes S, Desprez T, Hocart CH, Birch RJ, Baskin TI, Burn JE, Arioli T, Betzner AS, Williamson RE (2001) Temperature-sensitive alleles of

- RSW2 link the KORRIGAN endo-1,4-beta-glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126:278-288
- Libertini E, Li Y, McQueen-Mason SJ (2004) Phylogenetic analysis of the plant endo-beta-1,4-glucanase gene family. *J Mol Evol* 58:506-515
- Majewska-Sawka A, Rodriguez-Garcia MI, Nakashima H, Jassen B (1993) Ultrastructural expression of cytoplasmic male-sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Sex Plant Reprod* 6:22-32
- Matsuhira H, Shinada H, Yui-Kurino R, Hamato N, Umeda M, Mikami T, Kubo T (2007) An anther-specific lipid transfer protein gene in sugar beet: its expression is strongly reduced in male-sterile plants with Owen cytoplasm. *Physiol Plant* 129:407-414
- Mitchum MG, Sukno S, Wang X, Shani Z, Tsabary G, Shoseyov O, Davis EL (2004) The promoter of the Arabidopsis thaliana Cell endo-1,4-beta glucanase gene is differentially expressed in plant feeding cells induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol Plant Pathol* 5:175-181
- Neelam A, Sexton R (1995) Cellulase (endo beta-1,4 glucanase) and cell wall breakdown during anther development in the sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.): isolation and characterization of partial cDNA clones. *J Plant Physiol* 146:622-628
- Nishiyama I (1970) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. VI. Electron microscopical observations on normal tapetal cells at the critical stage. *Proc Crop Sci Soc Jpn* 39:474-479
- Nishiyama I (1976) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XII. Classification of tapetal hypertrophy on the basis of ultrastructure. *Proc Crop Sci Soc Jpn* 45:254-262

- Ogawa M, Kay P, Wilson S, Swain SM (2009) ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:216-233
- Owen HA, Makaroff CA (1995) Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* 185:7-21
- Preuss D, Rhee SY, Davis RW (1994) Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science* 264:1458-1460
- Rhee SY, Osborne E, Poindexter PD, Somerville CR (2003) Microspore separation in the quartet 3 mutants of Arabidopsis is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation. *Plant Physiol* 133:1170-1180
- Rhee SY, Somerville CR (1998) Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J* 15:79-88
- Rodkiewicz B (1970) Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. *Planta* 93:39-47
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu YC, Lee PY, Truong MT, Beals TP, Goldberg RG (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod* 11:297-322

- Satake T (1974) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. IX. Revision of the classification and terminology of pollen developmental stages. Proc Crop Sci Soc Jpn 43:31-35
- Satake T, Hayase H (1974) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. X. A secondary sensitive stage at the beginning of meiosis. Proc Crop Sci Soc Jpn 43:36-39
- Sato S, Kato T, Kakegawa K, Ishii T, Liu YG, Awano T, Takabe K, Nishiyama Y, Kuga S, Sato S Nakamura Y, Tabata S, Shibata D (2001) Role of the putative membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 42:251-263
- Sexton R, Del Campillo E, Duncan D, Lewis LN (1990) The purification of an anther cellulose (beta(1:4)4-glucan hydrolase) from *Lathyrus odoratus* L. and its relationship to the similar enzyme found in abscission zones. Plant Sci 67:169-176
- Shani Z, Dekel M, Tsabary G, Shoseyov O (1997) Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4-beta-glucanase (cel1) from *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 34:837-842
- Shani Z, Dekel M, Roiz L, Horowitz M, Kolosovski N, Lapidot S, Alkan S, Koltai H, Tsabary G, Goren R, Shoseyov O (2006) Expression of endo-1,4-beta-glucanase (cel1) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth, xylem development and cell wall thickening. Plant Cell Rep 25:1067-1074
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. Plant Cell 2:755-767

- Steer MW (1977) Differentiation of tapetum in *Avena*. I. The cell surface. *J Cell Sci* 25:125-138
- Stieglitz H (1977) Role of beta-1,3-glucanase in postmeiotic microspore release. *Dev Biol* 57:87-97
- Sun X, Wang Y, Chen Y, Xu L, Jiang L, Gong Y, Wang L, Liu L (2013) Differential gene expression profiling of Ogura CMS line and its maintainer in radish (*Raphanus sativus* L.). *Acta Physiol Plant* 35:3413-3425
- Talbott LD, Ray PM (1992) Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides. Implications for models of primary wall structure. *Plant Physiol* 98:357-368
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729
- Tan H, Liang W, Hu J, Zhang D (2012) MTR1 encodes a secretory fasciclin glycoprotein required for male reproductive development in rice. *Dev Cell* 22:1127-1137
- Urbanowicz BR, Bennett AB, del Campillo E, Catala C, Hayashi T, Henrissat B, Hofte H, McQueen-Mason SJ, Patterson SE, Shoseyov O, Teeri TT, Rose JKC (2007) Structural organization and a standard nomenclature for plant endo-1,4-beta-glucanases (cellulases) of glycosyl hydrolase family 9. *Plant Physiol* 144:1693-1696
- Wieczorek K, Hofmann J, Blochl A, Szakasits D, Bohlmann H, Grundler FM (2008) Arabidopsis endo-1,4-beta-glucanases are involved in the formation of root syncytia induced by *Heterodera schachtii*. *Plant J* 53:336-351
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data

sets. PLoS One 2:e718

Yang H, Lu P, Wang Y, Ma H (2011) The transcriptome landscape of Arabidopsis male meiocytes from high-throughput sequencing: the complexity and evolution of the meiotic process. Plant J 65:503-516

Yang SL, Xie LF, Mao HZ, Puah CS, Yang WC, Jiang LX, Sundaresan V, Ye D (2003) TAPETUM DETERMINANT1 is required for cell specialization in the Arabidopsis anther. Plant Cell 15:2792-2804

Yang WC, Ye D, Xu J, Sundaresan V (1999) The SPOROCTELESS gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. Genes Dev 13:2108-2117

Yung MH, Schaffer R, Putterill J (1999) Identification of genes expressed during early *Arabidopsis* carpel development by mRNA differential display: characterisation of *ATCEL2*, a novel endo-1,4- β -D-glucanase gene. Plant J 17:203-208

Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, Chen C, Grossniklaus U, Ma H (2006) Regulation of Arabidopsis tapetum development and function by DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1) encoding a putative bHLH transcription factor. Development 133:3085-95

Zhao DZ, Wang GF, Speal B, Ma H (2002) The excess microsporocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the Arabidopsis anther. Genes Dev 16:2021-2031

謝辞

本研究を行うにあたり、指導教官である堤伸浩教授には温かいご指導、ご鞭撻を賜りましたこと、また素晴らしい実験環境を与えていただいたことに深く感謝いたします。有村慎一准教授からは、適切なご指導、ご助言をいただいたことに深く感謝いたします。

本研究において各種固定法、テクノビット樹脂およびパラフィンへの包埋、切片の作製および *in situ* ハイブリダイゼーション法をご指導いただいた石綱史子さん、顕微鏡観察および細胞の単離についてご助言を賜りました高梨秀樹助教に重ねて感謝いたします。T-DNA 挿入ラインの解析を簡便にする手法を開発してくださり、コンストラクトの作製においてもご助言を賜りました片山健太博士にお礼申し上げます。*in situ* ハイブリダイゼーション法についてご指導、ご助言を賜りました本研究室の卒業生である住吉光莉氏および、東京大学 大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 桧原健一郎助教をはじめとする育種学研究室の皆様を重ねて感謝いたします。また、研究において相談に乗ってくださり、ご助言を賜りました本研究室の藤本優特任准教授および、名古屋大学 大学院生命農学研究科 生物機構・機能科学専攻 中園幹生教授をはじめとする植物遺伝育種学研究分野の皆様にお礼申し上げます。本研究の遂行に必要な様々な実験手法をご指導いただいた、本研究室の卒業生である栗栖里奈氏、林辰星氏および柳田晃伸氏に感謝いたします。

植物分子遺伝学研究室の先輩、同僚、後輩およびスタッフの皆様には、素晴らしい雰囲気の中で研究させていただいたことに心よりお礼申し上げます。東京大学 大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 岸野洋久教授、岩田洋佳准教授、大森宏助教をはじめとする生物測定学研究室の皆様には、私が修士課程の段階から温かいご指導を賜り、様々な点で支えていただいたことに心よりお礼申し上げます。この研究の過程で、様々な実験手法をご指導いただき、研究における相談に乗ってくださった林嘉禾氏、亀岡啓氏をはじめとする東京大学 大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻の博士課程の皆様にも深く感謝いたします。

また、研究の過程で様々なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 植物グローバル教育プロジェクトの皆様および、博士課程に所属する三年間、特別研究員奨励費および科学研究費を提供していただいた日本学術振興会に感謝いたします。