

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 24 年度博士課程進学
氏 名 松尾 優一
指導教員名 堤 伸浩

論文題目 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

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。しかしながら、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ボウゲ科クリスマスローズ属やイネ科カラスムギ属の植物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。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セル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、*dyt1* 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、*dyt1* 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 *dyt1* 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 *dyt1* 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。