

審査の結果の要旨

氏名 松尾優一

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。そこで本研究は、シロイヌナズナを材料として、花粉形成過程における花粉母細胞およびタペート細胞のセルロース性細胞壁の変化を検証するために行われた。

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。セルロース性細胞壁の染色条件を検討した結果、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。シロイヌナズナの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明らかとなった。

発生ステージを追って染色を行った結果、タペート細胞発生直後の時期にはタペート細胞および胞子形成細胞はセルロースから構成される細胞壁を持つことが示された。このセルロース性細胞壁は、タペート細胞と花粉母細胞において、減数分裂直前の時期に減少することが示された。

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、これらの遺伝子の変異体においてセルロース性細胞壁の消長を調べた。*sporocyteless (spl)* 変異体では、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* 変異体の葯切片を染色した結果、セルロースの分解が起こっていなかったことから、セ

ルロース性細胞壁の減少は *SPL* 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) 変異体では、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。*tpd1* 変異体の葯切片を染色した結果、花粉母細胞におけるセルロースの分解が起こっていたことから、セルロース性細胞壁の減少は *TPD1* (またはタペート細胞) 非依存的に起こることが示された。*dysfunctional tapetum1 (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。*dyl1* 変異体の葯切片を染色した結果、花粉母細胞とタペート細胞におけるセルロースの分解が起こっていたことから、セルロース性細胞壁の減少は *DYT1* 非依存的に起こることが示された。

また、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の発現量を *RT-PCR* により調べた。既知のセルラーゼが含まれる、Glycosyl hydrolase family 9 (GH9) の 25 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の中で、細胞壁減少が起らなかった *spl* 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* であった。*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、花粉母細胞およびタペート細胞ではほとんど *GH9B15* のシグナルは検出されなかったが、葯の裂開部などでシグナルが検出された。また、*GH9B15* の *RNAi* 系統の一部が葯の裂開異常を示した。

以上本論文は、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を明らかにした。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を示した。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を示唆した。これらの知見は、いずれも被子植物の花粉形成過程の詳細な理解に資するものであり、学術的および応用的な価値が高い。したがって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として十分に値するものと認めた。