

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 高 藤 良 典

論 文 題 目 コメの細胞分化

～ 胚乳発生における細胞運命特定機構～

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	武 田	真
委 員	名古屋大学教授	榊 原	均
委 員	名古屋大学教授	犬 飼	義 明
委 員	国立遺伝学研究所教授	佐 藤	豊
委 員	名古屋大学准教授	上 口	智 治

論文審査の結果の要旨

植物種子に形成される胚乳は重要な栄養貯蔵組織である。イネを含む主要穀類の胚乳は、2つの主要な組織、デンプン性胚乳（starchy endosperm; SE）とアリューロン層（aleurone layer; AL）をもつが、SEは多量のデンプンや貯蔵タンパク質を、ALは油脂をそれぞれ蓄積する。野生型イネでは、SEは胚乳内部の大部分を占めるのに対し、ALは胚乳組織の最外層に位置する。ALは、胚側（腹側）と側部においては1~2細胞層よりなるが、背側では3~5細胞層の細胞を形成する。SEとALの分化については、主にトウモロコシの変異体の解析などから、細胞運命特定に関わる因子の幾つかが同定されているほか、細胞の位置情報が関わることが報告されている。しかしながら、SEやALの分化がどのように進行するのか、その時空間的制御についての知見は殆ど得られていなかった。高藤良典は、SEおよびALの細胞の運命特定機構に関して、以下のような解析による研究を展開し、優れた研究成果を挙げた。

（1）イネ胚乳の細胞化初期過程における詳細な組織学的解析

穀物の胚乳発達は、受精核（胚乳原核）が細胞質分裂を伴わずに分裂して中央細胞の外側に並び、多核組織であるシンシチウムを形成することで始まる。その後、内側中央液胞側を除いて細胞壁が合成されることでアルベオラスが形成され、次いでこれが並層分裂することで、内側と外側に2つの細胞層ができる。さらに並層分裂が繰り返されることで中央液胞に細胞が充填されていく。高藤良典は、この胚乳発生の過程について、イネを用いて詳細に解析するために、開花後66~84時間の穎花より子房を採取し、新たに導入した手法による多検体観察を行った。その結果、同じ子房の胚乳では、細胞化の初期において、細胞層の形成が高い同調性をもって進行することを見出した。さらに、開花後時間が同じでも子房によって必ずしも発達段階が揃わないことから、開花時間ではなく細胞層形成を指標に胚乳発達段階を分類した。また、開花後時間毎の発達段階の進行度のデータをもとに、シンシチウム期から細胞化期の間には発達が停止する期間が存在することを見出し、この期間はおそらく母体からの糖転流等を確実にする種子形成のチェックポイントとして働くと推定した。

高藤良典はまた、胚乳の細胞化過程において、内側細胞層が増えていくことに加えて、最外層に位置する細胞が繰り返し並層分裂を起こすことを明確にした。このことから、最外層細胞では、並層分裂のたびに、内側にはSE始原細胞が、外側にはSE/AL始原細胞が生じるというイベントを繰り返すことを示した。これはSEとALの分化様式を理解する上で重要な知見である。

（2）イネ胚乳の細胞化初期過程における細胞層特異的トランスクリプトームの解析

高藤良典は、イネ胚乳の細胞化過程において、最初に起こる並層分裂により生じる

非対称性をトランスクリプトームレベルで特徴づけするために、2細胞層後期の胚乳組織より、最外層細胞を含む切片と、内側細胞層のみからなる切片を、レーザーマイクロダイセクション法を用いてそれぞれ切り出し、これらを用いた mRNA-seq 解析を行った。得られたデータセットから、最外層特異的に発現する遺伝子群（515 遺伝子）と内側層特異的に発現する遺伝子群（334 遺伝子）を選出した。さらに、同様な解析をシンシチウム期から 1 細胞層期、2 細胞層前期、および 3 細胞層期について行い、それぞれについて最外層と内側層のトランスクリプトームを得た。また、開花後 10 日の穎花より子房を採取して SE 組織と AL 組織をそれぞれ分取し、mRNA-seq 解析を行うことで、SE と AL にそれぞれ特異的な遺伝子マーカーセットを取得した。これらのマーカーを利用することにより、シンシチウム期から 1 細胞層期、2 細胞層前期、2 細胞層後期、および 3 細胞層期の胚乳の最外層および内側層のトランスクリプトームを解析した。

その結果、SE の属性は、1 細胞層期より現れ始めることを見出した。また、最初の並層分裂によって生じる 2 つの娘細胞では、分裂直後は両方ともに SE の属性がみられるが、その後内側細胞に特異的に SE の属性が発現することを見出した。さらに、SE 特異的マーカー遺伝子の発現量（および発現する遺伝子の種類）は内側細胞において胚乳発生の進行に伴い増加していくこと、すなわち、SE の分化が段階的に進むことを示した。また、AL の属性が、2 細胞層後期から、最外層の細胞に偏って発現することを明らかにした。さらに高藤良典は、2 細胞層後期において、最外層細胞に特異的に発現する 515 遺伝子の発現パターンについて階層クラスタリング解析を行い、これらが 2 つの発現パターンに大別されることを見出した。そのうち、Cluster 1 に分類されるパターンでは、2 細胞層後期と 3 細胞層期において最外層細胞で顕著に高い発現を示すが、シンシチウム期や 1L 期では殆ど発現しない傾向を示した。一方、Cluster 2 は、シンシチウム期から発現し続け、2 細胞層後期や 3 細胞層期になると最外層細胞に発現が限定されてゆく発現パターンとなった。これらの結果より、胚乳初期発生における AL アイデンティティの獲得が 2 細胞層後期以前に行われることを発見した。また、7 つの AL 特異的マーカー遺伝子の発現がシンシチウム期からみられることから、この段階から AL アイデンティティの一部が確立され始めることを示した。これらより、最初の並層分裂の非対称性がトランスクリプトームレベルで明確に示された。

さらに高藤良典は、上述の Cluster 2 の発現パターンを示す遺伝子群に、表皮特異的遺伝子やそれらを制御する *typeIV HD-ZIP* 遺伝子が含まれること、また、その多くがシンシチウム期から発現すること、2 細胞層後期以降に最外層細胞に特異的に発現することを示した。高藤良典は、このように表皮のアイデンティティが細胞化の始まる前のシンシチウム期に既に獲得されていることを明らかにし、最外層細胞が表皮性をも

つことが胚乳細胞の分化のための位置情報としての役割を担い得ると主張した。

高藤良典は、以上の解析結果とこれまでの知見とを統合して、最終的に次のような2つの仮説を提唱した。1つめは、表皮のアイデンティティがAL細胞運命づけに先立って獲得されること、2つめは、SEとALの分化のメカニズムが、ある発達段階までは可塑性を保持しつつ、位置情報と”developmental cue”の両方を通じて、分化を段階的に進めるようにはたらくこと、である。

こうした研究成果に加えて、高藤良典の学識審査の結果を踏まえ、当審査委員会は本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。