

別紙4

報告番 一	※ 甲 第 号
----------	---------

主　論　文　の　要　旨

論文題目 アブラナ科植物の花粉管誘導過程における異種と同種を見分ける認証機構の解析

氏　名　長江　拓也

論　文　内　容　の　要　旨

生物が安定して子孫を残すためには、同種の雄と雌で生殖を行うことが重要である。植物の生殖過程においても、子孫を残すために選択的に異種を排除し、同種を受容する「同種認証」機構が存在する。被子植物では、精細胞を運ぶ花粉管が雌しべの中を伸長する過程で、雌組織由来のシグナルによって正確に胚珠（受精前の種子）に誘導され、受精が完了する。しかし、厚い子房組織に覆われた雌しべ内で起こる花粉管誘導をそのまま観察し、定量的に測定することは容易ではなかった。そのため、多段階で構成される花粉管誘導のどの段階に同種認証が存在するのかはほとんど不明であり、どのような組織・因子によって同種認証機構が生み出されているのかについても解析が進んでいなかった。

本研究では、第一に遺伝学的解析が容易で雌しべが適度に小さく顕微鏡観察に最適なアブラナ科植物について、二光子励起顕微鏡法を駆使することによって花粉管誘導過程を雌しべの空間情報を保持したまま測定できるイメージング系を構築した。アブラナ科植物の花粉管誘導を①伝達組織から胚珠方向への隔壁の通過、②珠柄への誘導、③珠孔への誘導の3つに分類し、この系を用いて、雌しべ内を伸長する同種および近縁種の花粉管を観察した。その結果、同種花粉管は雌しべ上部の伝達組織から隔壁を通過し、胚珠へと向かうことが分かった。一方で、近縁種花粉管の多くは伝達組織内を雌しべ基部まで伸長した後に隔壁を通過することを見出した。また、全ての花粉管誘導段階において同種花粉管の方が近縁種よりも高い誘導率を示すことを見出した。

第二に、どのような雌しべ組織が各花粉管誘導段階を制御するのかを明らかにするため、胚珠の特定組織または機能を欠損する変異体の雌しべ内において花粉管誘導率の測定を行った。その結果、助細胞で高発現する転写因子 MYB98 の欠損変異体では、珠孔への誘導だけでなく珠柄への誘導にも異常が生じることを見出した。また、*myb98*変異体の雌しべ内では、花粉管

が伝達組織内を雌しべ中央付近まで伸長した後に隔壁を通過することから、花粉管の隔壁通過段階にも胚珠の助細胞が関与することを明らかにした。さらに、柱頭切除実験によって、柱頭組織は花粉管に誘引物質への応答能獲得を付与することで珠孔への誘導と珠柄への誘導に大きく寄与する一方、隔壁通過段階を制御に関わる可能性が低いことを見出した。

第三に、MYB98 下流に存在する既知の花粉管誘引ペプチドやその受容体が花粉管誘導のどの段階に作用するのかを検証した。誘引ペプチド LURE1s、XIUQIUs、TICKETs の遺伝子を発現抑制した雌しべと LURE1 受容体である POLLEN-SPECIFIC RECEPTOR-LIKE KINASE6 (PRK6) を欠損した花粉管を用いた解析から、これらの因子が珠孔への誘導の一端を担うことを確認した。また、花粉管が隔壁を通過する段階には既知の花粉管誘導因子ではない MYB98 下流の別の因子が作用することを示唆した。

最後に、培地上で胚珠への花粉管誘引を再現できる semi-in vivo アッセイによって胚珠から分泌される花粉管誘引シグナルの種選択性について解析を行った。従来の semi-in vivo アッセイでは蛍光タンパク質を発現させた花粉管を用いるため、形質転換体の作出に時間がかかる植物種では、花粉管誘引率の定量が困難であった。そこで、花粉管を効率よく染色できる化学色素を検討した結果、フルオレセインジアセテート (FDA) によって胚珠内に誘引した花粉管の先端まで可視化できること、膜透過性ペプチドを付加した PREX710 を用いて花粉管が胚珠に誘引される様子をライブイメージングできることを見出した。この FDA 染色を併用した semi-in vivo アッセイを利用して、アブラナ科植物 *Arabidopsis thaliana* (シロイスナズナ) とその近縁種 *Arabidopsis lyrata* (セイヨウミヤマハタザオ) の花粉管と胚珠に対する花粉管誘引率を測定した。その結果、この近縁 2 種間においても花粉管誘引シグナルには種選択性が存在し、花粉管は異種よりも同種胚珠に誘引されやすいことを明らかにした。また、誘引ペプチド LURE1s、XIUQIUs、TICKETs の遺伝子を発現抑制した胚珠と LURE1 受容体である PRK6 を欠損した花粉管を用いて semi-in vivo アッセイを行った結果、培地上での花粉管誘引現象が胚珠助細胞から分泌される既知の誘引ペプチド群と LURE1 受容体である PRK6 によって主に制御されることを見出した。さらに、近縁種 *A. lyrata* の PRK6 を導入した *prk6* 変異体花粉管を用いた semi-in vivo アッセイの結果より、PRK6 によって花粉管は同種の誘引シグナルを識別できることを明らかにした。

本研究では、二光子励起顕微鏡法を用いた雌しべ内花粉管の定量的な観察法と、花粉管誘導過程にある花粉管と胚珠の細胞間相互作用を詳細に解析できる semi-in vivo アッセイを駆使することによって、花粉管誘導段階における異種と同種を見分ける認証機構が複数の雌しべ組織によって協調的に生み出されることを明らかにした。本研究の知見を基に、遺伝学的・生理学的な解析をさらに進めることによって花粉管誘導過程で働く同種認証メカニズムの解明が期待される。