

## 別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 ライブセルイメージングと顕微細胞操作による  
被子植物の雌性配偶体発生の解析

氏 名 須崎 大地

## 論 文 内 容 の 要 旨

有性生殖をおこなう生物において、受精は種を維持するために不可欠な現象である。被子植物では、その達成のために雌雄の配偶体（単相世代）が正しく発生して、それぞれ機能する必要がある。典型的な雌性配偶体は、1つの卵細胞、1つの中央細胞、2つの助細胞、3つの反足細胞という4種の7細胞により構成される。このうち卵細胞と中央細胞は配偶子であり、2つの精細胞とそれぞれ受精する。これは重複受精と呼ばれる生殖様式で、被子植物に特有かつよく保存された機構である。重複受精において、雌性配偶体を構成する卵細胞と中央細胞、そして2つの助細胞は独自の重要な機能をもつことが分かっている。しかしながら、一般的に雌性配偶体は母組織である胚珠の中央に埋め込まれて存在するため、各細胞の詳細な発生過程は明らかでない。また同時に、個々の細胞の分子レベルでの解析が困難であるため、各機能を司る遺伝子や細胞間コミュニケーションについても不明な点が多い。

本研究では、雌性配偶体が胚珠から裸出したトレニアを用いたライブセルイメージングと顕微操作により、その詳細な発生過程と細胞間コミュニケーションを解明すること、およびゲノム情報やバイオリソースが豊富なシロイヌナズナの各雌性配偶体細胞を用いて、次世代シーケンサーによるRNA-seqをおこなう技術の開発を目的とした。

まず、雌性配偶体の発生過程を詳細に解析するために、トレニアを用いてその発生を顕微鏡下で経時的に観察することのできる *in vitro* 胚珠培養系を確立した。培地上で発生した雌性配偶体の助細胞は、花粉管を正常に誘引することを確認した。雌性配偶体は、多核の1細胞の状態が発生し、全ての核が生じたのちに細胞化が起こり、成熟が進む。雌性配偶体が胚珠組織から裸出する4核期以降のステージでのライブイメージングの結果、個々の核が発生運命に従って雌性配偶体内で位置取りを変える動態や、最終的な細胞分裂（核の分裂）から  $54 \pm 20$  分で細胞化が起こること、中央細胞の2つの核（極核）が細胞化から  $13.1 \pm 1.1$  時間で融合し二次核を形成すること、助細胞において、GFPレポーターで可視化される誘引物質遺伝子 *LURE2* の発現が細胞化から  $10.7 \pm 2.3$  時間

で起こることなどが明らかとなった。

さらに確立した *in vitro* の実験系を利用して、細胞化直後の未熟な雌性配偶体の各細胞を UV レーザーで破壊し、その後の発生と花粉管誘引能の有無を調べた。花粉管は助細胞により誘引されることが知られる。解析の結果、卵細胞と中央細胞核を破壊した場合に花粉管誘引能の低下がみられたことから、助細胞が花粉管誘引能を獲得するには発生過程における卵細胞、中央細胞との細胞間コミュニケーションが重要であることが示唆された。また、未成熟な卵細胞を破壊した後の雌性配偶体の観察において、残った2つの助細胞のうち一方の核がカラザ側へと移動して卵細胞に似た極性を示した。このような助細胞では、助細胞を標識する *TfLURE2p::GFP* の GFP 蛍光が減少することから、未成熟な卵細胞の破壊が助細胞の細胞運命決定を阻害したことが示唆された。

次に、シロイヌナズナを用いて、発生途中で多核の段階の雌性配偶体において、1つの核をフェムト秒パルスレーザーで破壊してその後の発生を解析した。珠孔側（卵細胞および助細胞が生じ、花粉管が進入する側）から2番目の核を破壊したところ、最も珠孔側に位置して助細胞核になる核がカラザ側（珠孔の反対側）へ移動して卵細胞マーカーの発現を示した。また、カラザ側から2番目の核を破壊した場合にも、反足細胞核になる核が中央細胞の極核のような挙動を示した。この結果からも雌性配偶体の発生には細胞間コミュニケーションが重要であることが示唆された。

これに関わる実働因子や各細胞の機能を担う遺伝子を調べるために、シロイヌナズナの助細胞、卵細胞、中央細胞を顕微鏡下で回収する方法を開発した。回収した野生型の各細胞と花粉管誘引に異常を示す *myb98* 変異体の助細胞から mRNA または total RNA を抽出し、IVT (*in vitro* transcription) 法もしくは Ribo-SPIA (Single Primer Isothermal Amplification) 法の増幅産物を用いて、次世代シーケンサーによる RNA-seq をおこなった。各条件から得られたデータを検討した結果、mRNA 抽出と Ribo-SPIA 法が適していることがわかった。この解析手法によって細胞種ごとに再現性のある結果が得られた。データ解析から、これまでに報告されたマイクロアレイ解析よりも多くの発現遺伝子が検出されること、各細胞特異的な遺伝子が発現していることが確認できた。また、野生型と変異体の助細胞の比較から、発現変動遺伝子の一部が卵細胞と *myb98* 変異体の助細胞で似た発現パターンを示した。

本研究により、雌性配偶体形成の動態が明らかになるとともに、各細胞の正常な運命決定に対して細胞間コミュニケーションが重要であることが示され、さらに個々の雌性配偶体細胞の RNA-seq により各細胞の機能を裏打ちする遺伝子発現プロファイルが明らかとなった。これらは、雌性配偶体の発生機構の解明に大きく貢献するものと期待される。