

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 須崎 大地

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

論文審査担当者

主 査 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所

教 授 博士(理学) 東山 哲也

委 員 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所

教 授 博士(理学) 木下 俊則

委 員 名古屋大学大学院理学研究科 准教授 農学博士 吉岡 泰

論文審査の結果の要旨

有性生殖をおこなう生物において、受精は種の維持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が正常に発生して機能する必要がある。典型的な雌性配偶体は、1つの卵細胞と中央細胞、2つの助細胞、3つの反足細胞という4種7細胞により構成される。反足細胞以外は生殖過程で重要な機能をもつことが知られている。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奥深くにあり個々の細胞の解析が困難であるため、各細胞の詳細な発生過程や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明らかでない。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、およびモデル植物であるシロイヌナズナの各雌性配偶体細胞を用いたRNA-seqのための技術開発を目的とした。

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経時的に観察できる *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が、正常に花粉管を誘引することを確認した。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位置取りを変える動態や、最終的な核の分裂から細胞化、中央細胞の2つの核が融合する二次核の形成、花粉管誘引物質遺伝子 *LURE2* の発現開始までの時間が明らかとなった。この実験系を使って、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。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率が低下したことから、助細胞が花粉管誘引能を獲得するには発生過程において隣接する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、未成熟な卵細胞の破壊により、2つの助細胞の一方の核が卵細胞に似た極性を示した。これら助細胞では、助細胞マーカーであるGFP蛍光の減少がみられ、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、発生途中で多核の雌性配偶体において、4核期の1つの核をフェムト秒パルスレーザーで破壊した後の発生を解析した。卵細胞と中央細胞の核が消失すると隣接した核がそれらになり代わる様子が観察された。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。細胞から抽出するRNAの精製法や増幅法、RNA-seqにより得られた配列のマッピング法を検討して、適した手法を決定した。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得たデータの解析から既報のマイクロレイ解析に比べて多くの各細胞特異的な遺伝子や発現変動遺伝子が検出できた。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とその過程で重要な細胞間コミュニケーションが示された。また、RNA-seqにより各細胞の遺伝子発現プロファイルが明らかとなった。本研究は、雌性配偶体の発生機構の解明に大きく貢献するものである。以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。