

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Analyses of double fertilization mechanism by heat-inducible genetic modification and micromanipulation of gametes in *Arabidopsis thaliana*

(熱誘導的遺伝子改変および配偶子に対する顕微細胞操作によるシロイヌナズナ重複受精機構の解析)

氏 名 永原 史織

論 文 内 容 の 要 旨

被子植物の重複受精では、雄性配偶子である2つの精細胞が、1本の花粉管により将来種子となる胚珠組織へと正確に運ばれ、それぞれ異なる雌性配偶子、すなわち卵細胞および中央細胞と受精する。精細胞と卵細胞の受精により次世代を担う胚が、精細胞と中央細胞の受精により胚に栄養を供給する胚乳がそれぞれ形成される。正常な種子の発達には両方の受精が達成されることが必須であるが、2つの精細胞を異なる受精相手へと正確に分配する機構など、重複受精の詳細な仕組みは未だ明らかになっていない。本研究では、重複受精の仕組みを理解するために、これまでの受精研究の障壁を打破するために、熱誘導的遺伝子改変および顕微細胞操作によるアプローチを着想し、モデル植物シロイヌナズナを用いて解析を行った。

まず、重複受精機構の解明には、受精に異常を示す突然変異体を用いた生理学的・遺伝学的解析が重要である。しかし受精異常変異体の中には、重複受精時の膜融合ができない精細胞をもつ *gcs1/hap2* 変異体のように、雌雄配偶子の受精機能欠損により、ヘテロ接合変異体の状態でしか維持できないものが存在する。これまで、ヘテロ接合変異体を用いた場合、野生型配偶子が半数含まれることが解析の障壁となっていた。そこで本研究では、*gcs1* 変異体をモデルに、シロイヌナズナ受精異常変異体のホモ接合変異体を熱誘導的に作出する系を確立した。植物体の熱処理により、ほぼ完全な雄性不稔を示す *gcs1* ホモ接合変異体を得ることに成功した。その結果、熱処理により得られたこのホモ接合変異体からわずかながら種子が得られることが分かり、この変異体がホモ接合の状態でも維持できることが明らかとなった。これまでヘテロ接合でしか維持できないと思われていた他の受精異常変異体についても、ホモ接合変異体として維持できる可能性が示唆される。さらに、*gcs1* ホモ接合変異体を用い、1本目の花粉管から供給された配偶子

が受精に失敗した際に雌性配偶体が2本目の花粉管を誘引する「受精回復機構」が7割以上の胚珠において観察されることが明らかとなった。この結果により、限られた数の花粉管で極めて効率よく重複受精を回復するシステムが働いていることが示された。

また、重複受精は雌しべの奥深くで行われているため、受精を自在に操作することは困難であった。近年、シロイヌナズナの花粉管と胚珠組織を用いた *semi-in vivo* 重複受精系による重複受精のライブイメージング解析が可能となり、2つの精細胞は花粉管から胚珠内へと放出され、卵細胞と中央細胞の両者と密接する位置まで運ばれていることが報告された。そこで本研究では、ライブイメージングと顕微細胞操作により、2つの精細胞の受精相手が決定されるための雌雄配偶子間コミュニケーションの実態を解明することを目指した。まず、二光子レーザー顕微鏡のフェムト秒パルスレーザーを用いることで、胚珠内の1細胞を特異的に破壊することに成功した。卵細胞を破壊した胚珠内における2つの精細胞の挙動を *semi-in vivo* 重複受精系により観察したところ、残された中央細胞が2つのうち1つの精細胞のみと受精する「多精拒否機構」を有する可能性が示唆された。さらに、1本の花粉管内に複数ペアの精細胞をもつ *tetraspore* 変異体を用い、胚珠内に放出された4つの精細胞のうち2つだけがそれぞれ卵細胞および中央細胞と受精する様子を捉えた。これらの結果により、2つの雌性配偶子が1つの精細胞とだけ受精する多精拒否機構を有することで、重複受精が成立していることが示唆された。

本研究では、熱誘導的遺伝子改変および顕微細胞操作の2つのアプローチにより、重複受精の成立に重要な機構を明示した。今後、様々な受精異常ホモ接合変異体を用いた遺伝子発現解析などにより、新規受精関連因子の同定、および多精拒否機構などを含む重複受精の分子機構の解明が期待される。