

## 別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 新規解析系の創出を基盤としたシロイヌナズナ受精卵の極性化機構の解析

氏 名 木全 祐資

## 論 文 内 容 の 要 旨

受精卵の不等分裂は植物の形態形成の根幹をなす過程である。植物の受精卵は高度に極性化して不等分裂し、これによって将来の頂端-基部軸（上下軸）が形成される。したがって、受精卵の極性化こそが植物の発生の原点であると考えられるが、その制御機構はほとんど明らかでなかった。

植物の受精卵は母組織の深部にある胚珠の中に位置しているため、極性化の過程をリアルタイムに直接観察することは、これまでできていなかった。それゆえに、これまで極性化に至る過程は固定組織の観察から推測するしかなく、細胞内のどのような動態が受精卵を極性化させるのかという時空間的な知見は一切得られていなかった。また、遺伝子の冗長性の高さや、変異体の致死性が原因となって、受精卵の極性化に失敗する変異体はこれまでほとんど単離できていなかった。そのため、極性化を担う分子機構の詳細についても、ほとんど解明されていない。

本研究では、まず極性化の詳細な細胞内動態を理解するべく、二光子励起顕微鏡を駆使して様々な条件検討をおこない、受精卵のライブセルイメージング系を構築した。これを用いて、微小管やアクチン繊維といった細胞骨格の動態を可視化したところ、どちらの細胞骨格についても、受精前に卵細胞で形成されていた配向が、受精直後に一過的に崩壊することを見出した。その後、微小管は受精卵の頂端側でリング状に配向する一方で、アクチン繊維は細胞質内で頂端-基部方向に沿って配向することを明らかにした。さらに、細胞骨格の阻害剤を用いた解析によって、微小管が頂端方向への細胞伸長を、アクチン繊維が頂端方向への核の移動を、それぞれ独立して担うことを発見した。

次に、植物細胞の容積の大部分を占めるオルガネラである液胞についても、その動態を詳細に観察した。その結果、卵細胞の基部側に存在した巨大な液胞が、受精にともな

って急激に収縮することを突き止めた。その後、液胞はアクチン繊維に沿うようにしてチューブ状に変形しながら、頂端側へ向かう核と行き違うように、基部側に非対称に分配されることを明らかにした。さらに、液胞の機能や形態に関連した様々な変異体群を解析したことで、液胞膜の柔軟性が損なわれた *sgr2-1* 変異体では、液胞が頂端側に残留することで核の移動が阻害され、受精卵が極性化できなくなることを発見した。加えて、*sgr2-1* 変異体では受精卵以降の胚の形態も損なわれることも見出した。これらのことから、液胞の柔軟な変形が受精卵の極性化に必須であり、さらには適切な胚のパターン形成にも寄与することをはじめて明らかにした。

さらに、変異体の探索に立脚しない方法で制御因子を同定するべく、受精卵の化合物スクリーニング系を確立した。その結果、受精卵の細胞分裂の強力な阻害剤として、PD-180970 と PP2 という二つの化合物を見出した。様々な細胞種や植物種を用いて解析したところ、どちらの化合物も植物の細胞分裂を一般的に阻害することを明らかにした。さらに、ライブセルイメージング解析も組み合わせた結果、PD-180970 は微小管の動態を損なわせることで核分裂を阻害し、PP2 はフラグモプラストの形成を妨げることで細胞板形成を阻害することを発見した。また、これらの化合物の作用機序を明らかにするべく、下流因子のリン酸化に注目したプロテオミクス解析を行い、PD-180970 が微小管関連タンパク質 MAP70 のリン酸化を、PP2 が微小管モータータンパク質 KINESIN-12 のリン酸化を阻害することを見出した。

これに加えて、逆遺伝学的な方法でも制御因子を同定するために、不等分裂直後の受精卵である 1 細胞期胚に着目したトランスクリプトーム解析も行った。まず、細胞単離に用いる酵素液の組成と処理条件を検討することで、1 細胞期胚を安定的に回収できる方法を確立した。さらに、回収した 1 細胞期胚からの mRNA の抽出方法や、シーケンシング用サンプルの調整条件などについて、様々な検討と改善を行った結果、特異的な遺伝子発現を高感度で検出可能な RNA-seq データを得ることに成功した。加えて、極性化の実働因子は受精後に転写が活性化されると考えられたことから、既存の卵細胞の RNA-seq データとの比較も行い、卵細胞と比べて、1 細胞期胚では 6,000 個以上の遺伝子が発現上昇することを見出した。

本研究によって、極性化を制御する細胞骨格や液胞の詳細な動態と役割がはじめて明らかになっただけでなく、従来法の問題点を乗り越えて分子機構を解明するための技術基盤も整備された。これらの成果は、極性化の仕組みを明らかにし、植物の体軸形成の根本原理を理解するための重要な足がかりになると期待される。