

## 論文内容の要旨

論文題目 Molecular cytological studies of genes isolated from angiosperm male-gametic cells  
(被子植物雄性配偶子細胞から単離された遺伝子の分子細胞学的解析)

氏名 森稔幸

被子植物の花粉成熟は、減数分裂によって生じた花粉小胞子の不等細胞分裂（花粉第一分裂）を起点としている。これによって形成される大小二つの細胞（栄養細胞、雄原細胞）は、同一の細胞に由来するにもかかわらず、形態的・機能的に全く異なる運命を辿る。栄養細胞は大型の細胞であり、受粉後に伸長させた花粉管によって精細胞を雌性配偶体に輸送することをその機能としている。一方、雄性配偶子の前駆的細胞に相当する雄原細胞は小型で、栄養細胞質内で成熟する。雄原細胞はその後、花粉または花粉管内で二つに分裂し、これによって生じた精細胞は重複受精を行うことが知られている。

雄原細胞核のクロマチンは高度に凝縮していることから、その遺伝子発現についてはこれまで否定的な見解がなされており、さらに細胞単離の困難さから、その生化学的な解析はほとんどなされていない。しかしながら、ユリ (*Lilium longiflorum*) 花粉においては花粉プロトプラストを用いた雄原細胞の大量調製が唯一可能であり (Tanaka, 1988)、近年、同法を用いた解析から雄原細胞の形態や機能への関与を推察できる遺伝子の発現がごくわずかに報告されている (Xu et al., 1999; Ueda et al., 2000)。そこで本研究では、雄原細胞におけるさらに多くの遺伝子の発現を予想し、クロマチン凝縮下におけるそれらの調節や機能を分子細胞学的に解析することを目的とした。

近年、私はディファレンシャルディスプレイ (DD) 法によって雄原細胞で大量に蓄積する *ftsZ* 遺伝子 (*LftsZ*) の転写産物を見いだすことに成功した。緑色植物における FtsZ は色素体分裂への関与が示唆されているが (Strepp et al., 1998; Osteryoung et al., 1998)、細胞形態学的に実証した報告はまだなされていない。また、テッポウユリの色素体は母性遺伝型であり、成熟した雄原細胞での色素体の存在は確認されていない (Miyamura et al., 1987)。この二点から、色素体のない雄原細胞における色素体分裂タンパク質の機能が注目された。リコンビナント LIFtsZ を基にして作製した抗体を用いて間接蛍光抗体染色法を行ったところ、LIFtsZ のシグナルは花粉小胞子や葉の色素体を取り巻くリング状の構造 (Z リング) であることが明らかとなった。二分裂中の色素体を観察すると、Z リングは色素

体の収縮に伴って分裂面で収縮する様子が確認された。また、免疫電顕法による観察結果から、LIFtsZ の局在は収縮部のストロマ側であることが分かった。これらの結果から、雄原細胞で見いだされた FtsZ は色素体の分裂にはたらく分子であることが示された。一方、雄原細胞においてその発現を解析したところ、同細胞における発現は確認されなかった。この結果から、雄原細胞においては LIFtsZ の翻訳抑制が行われ、色素体分裂の阻害を基にした色素体ゲノムの母性遺伝機構に関与することが推察された。

上記の結果から、*LftsZ* は雄原細胞形成前からその発現が見られ、転写活性が優位な雄原細胞ではその翻訳が抑制されるタイプの遺伝子であることが実証された。一方、これまでに単離されている雄原細胞発現遺伝子の報告によると、雄原細胞の構造変化や機能は特異的遺伝子によるものと考えられている。そこで、雄原細胞が形成されて初めて転写活性がみられ、その活性が雄原細胞特異的な遺伝子に的を絞り、DD 法による新たな遺伝子の単離を次に試みた。花粉第一分裂の直前、直後、成熟直前の花粉、単離雄原細胞の四者で、PCR 産物を比較したところ、単離雄原細胞で強い増幅を示すクローンの一つを見いだすことに成功した。さらに、半定量的 RT-PCR の結果から雄原細胞特異性が示されたため、このクローンを *GCS1* (Generative Cell Specific 1) と名付け、詳細な解析を試みた。全長 cDNA の配列から、*GCS1* のアミノ酸配列 696 残基が推定されたが、これまでに詳細な報告のあるホモログはないことが相同性検索から明らかとなった。また、一次構造の特徴から、*GCS1* は小胞輸送を經由する膜貫通型タンパク質と予想された。そこで、このタンパク質の発現局在を調べるために、特異的な抗体を作製した。成熟花粉の抽出タンパク質について、超遠心とウェスタン法を用いた細胞内局在を解析したところ、*GCS1* の強いシグナルは膜構造を多く含むミクロソーム画分で検出された。発生過程各ステージの花粉についてミクロソーム画分の *GCS1* 量を調べると、その蓄積は花粉第一分裂後間もないステージから見いだされた。次に、*GCS1* の局在を視覚的に検証した。発生の各ステージで、花粉の間接蛍光抗体染色を試みたところ、その発現は花粉第一分裂直後から雄原核の周辺で特異的に検出された。この局在を免疫電顕法によって調べると、多量の金粒子シグナルが雄原細胞の表層部で検出され、抗体染色の結果を支持した。また、原形質分裂を誘導した雄原細胞を観察すると、シグナルは細胞壁ではなく、分離した原形質膜で検出された。さらに、花粉管中の精細胞が容易に観察できるナス (*Tropaeolum majus*) について、精細胞における *GCS1* の発現を観察した。その結果、抗ユリ *GCS1* 抗体は双子葉植物においても雄原細胞特異的に反応し、その発現は精細胞でも保持されることが判明した。次に、*GCS1* の雄性配偶子細胞における機能を決定するために、シードストックセンターから *GCS1* 遺伝子を破壊したと思われる表現型未知の T-DNA 導入株の分与を受けた。花粉四分子の不分離を示す *qrt* ミュータントをバックグラウンドとした *gcs1* のヘテロ接合体 (+/*gcs1*;*qrt*/*qrt*) の花粉を観察したところ、互いに接着した四つの花粉のうち、メンデル遺伝的に二つが萎縮する表現型を示す個体が多数同定された。さらにテクノビット樹脂胞埋切片の DAPI 染色により、花粉の萎縮を観察した。その結果、花粉の萎縮は *GCS1* の発現開始の時期に、栄養細胞の萎縮を伴って生じることが明らかとなった。以上の結果から、*GCS1* は雄原細胞の表層に特異的な新規の膜タンパク質であり、その機能は栄養細胞との相互作用を伴う正常な花粉発生の進行に関与することが予想された。

上記の結果から、*GCS1* は雄原細胞の成熟に伴って働く機能的タンパク質の可能性が示唆されたが、被子植物の配偶子形成に働くタンパク質は未だわかっていない。そこで、私は雄原細胞形成因子の探索を次に試みた。BLAST を用いた相同性検索の結果、ボルボックスの生殖細胞形成にはたらくシャペロン様タンパク質 *GlsA* をコードする遺伝子のホモログがシロイヌナズナのゲノムで 2 コピー見いだされた。これら二つの *GlsA* (*AtGlsA1*, *AtGlsA2*) とボルボックス *GlsA* (*VcGlsA*) の 3 者における保存配列を基にプライマーを作製し、

テッポウユリ花粉と単離雄原細胞からのユリ *glsA* (*LlglsA*)のクローニングを試みた。その結果、目的サイズの PCR 産物の増幅が確認された。得られたクローンを基に、cDNA の完全長配列を決定したところ、推定アミノ酸配列とその構造から、GlsA のホモログ (LIGlsA) であることが判明した。発生過程の花粉と単離雄原細胞について半定量的 RT-PCR を試みると、*LlglsA* の花粉成熟に伴う弱い転写量増加がみられ、単離雄原細胞においては強い転写活性が検出された。また、体細胞組織と同様の方法で比較したところ、これらの組織においても発現がみられた。さらに、発現量変化のパターンと、ボルボックス GlsA について得られている知見から (Miller and Kirk, 1999)、LIGlsA は雄原細胞で発達する微小管の修飾に関与することが推察された。次に、LIGlsA タンパク質の雄原細胞発現を検証するために特異的抗体を作製した。ウェスタン解析によって成熟直前の花粉と単離雄原細胞で発現量を比較すると、雄原細胞で比較的強いシグナルが得られ、半定量的 RT-PCR の結果を支持した。さらに発生過程の花粉について発現量を調べたところ、LIGlsA の強い発現は雄原細胞の細胞伸長が起こり始める時期にみられ、その発現量変化は $\alpha$ チューブリンのそれと同調していた。そこで、微小管構造と LIGlsA との関連を視覚的に検証した。LIGlsA と $\alpha$ チューブリンに対する抗体で単離雄原細胞を二重染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察したところ、大量の GlsA シグナルが細胞質全体にドット状に検出された。しかしながら、微小管と局在が一致するシグナルはわずかであったことから、LIGlsA は雄原細胞の形態変化に伴う微小管を含めたあらゆる構造変化に働く分子シャペロンであることが予想された。

以上、本研究の成果から、雄原細胞で発現を見せる三つの遺伝子の特徴が新たに明らかとなり、雄原細胞ではクロマチンの凝縮にもかかわらず、様々な遺伝子が複雑な制御下で発現していることが示された。また、免疫細胞学的手法によってそれらの遺伝子産物は細胞機能や細胞形態変化に働くことが示唆された。