

論文内容の要旨

申請者氏名 五十嵐 元子

植物の受粉-受精過程においては、様々な段階で交配相手の選別が行われる。アブラナ科では、雌ずいの表層の乳頭細胞が最初の選別の場合として重要である。異種の花粉（種間不和合性）や同種であっても自己の花粉（自家不和合性）は、この乳頭細胞上で吸水や発芽が阻害される。この内自己の花粉に関しては、花粉表層の SP11 リガンドと乳頭細胞膜上の SRK 受容体との特異的な相互作用を介して不和合反応が誘起されることが示されているが、その詳細は未解明である。一方、同種かつ非自己の花粉のみを選択的に受け入れる和合反応の仕組みもほとんど未解明である。本研究では、SP11 と SRK を発現させることで自家不和合性を付与したモデル植物のシロイヌナズナを用いて、和合・不和合反応に関与する新たな鍵分子を同定することを目的とした。

まず、laser microdissection-microarray 法により、和合・不和合受粉時の乳頭細胞内遺伝子の発現変動を解析した。和合花粉の吸水・発芽が認められる受粉15分後において、不和合受粉特異的に誘導される遺伝子を9個同定した。その内4個が Ca^{2+} 応答性遺伝子であり、不和合受粉後の乳頭細胞質で Ca^{2+} 濃度の上昇が起きていることが示唆された。実際、当研究室において不和合受粉時に特異的な乳頭細胞内 Ca^{2+} 上昇が確認されると共に、逆に和合受粉時に特異的な乳頭細胞外への Ca^{2+} 流出が示された。

そこで次に、この和合・不和合受粉時の異なる Ca^{2+} 動態に関与する Ca^{2+} 輸送体を探索することにした。上記 microarray 法の解析結果をもとに、乳頭細胞内で特に強く発現する機能未知の autoinhibited Ca^{2+} -ATPase 13 (ACA13) に着目した。 Ca^{2+} 輸送体を欠失した酵母を用いた相補試験から、N 末の自己阻害調節部位を欠く ACA13 が Ca^{2+} 輸送活性を持つことが確認された。様々な発現解析実験により、ACA13 は開花時の柱頭で強く発現すること、受粉後に花粉表層物質によりさらに発現誘導されることが示された。TILLING 法により ACA13 の変異株をスクリーニングした結果、3種類の nonsense 変異株を取得した。いずれの変異株もさや当たりの種子数が減少する表現型を示すと共に、変異株の乳頭細胞上での花粉の吸水・発芽が遅れ、発芽率も減少することが示された。また、不和合受粉時の乳頭細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、野生株と変異株で差がみとめられなかったが、和合受粉時の Ca^{2+} の乳頭細胞外への流出が変異株では抑制され、それに合わせて花粉の発芽が遅れることが示された。さらに、GFP 標識 ACA13 の発現・局在解析から、ACA13 が乳頭細胞膜と細胞内小胞に多く局在し、和合受粉時に特異的に花粉および花粉管直下の細胞膜上へ移行することが示された。以上の結果から、花粉表層物質により発現誘導される ACA13 が和合受粉時の乳頭細胞外への Ca^{2+} 流出に関与し、花粉の発芽・伸長を促進していることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 五十嵐 元子

高等植物の有性生殖過程においては、昆虫などによって無作為に運ばれてくる花粉の中から交配相手として適切な花粉が選別されるが、実際の関与が示されている分子は限られており、選別の仕組みの多くは未解明である。本研究は、進化の過程で欠失した自家不和合性関連遺伝子を導入することで自家不和合性を復活させたモデル植物のシロイヌナズナを用いて、種間不和合性および自家不和合性に関わる未知の機能分子を同定することを目指した独自性の高い研究である。

申請者は、まず第1章において、laser microdissection-microarray法を用いて雌ずい表層の乳頭細胞の transcriptome 解析を行い、本細胞に特徴的な遺伝子を多数同定した。さらに和合および不和合受粉後の遺伝子発現の比較解析から、 Ca^{2+} 応答性の遺伝子が不和合受粉時に特異的に発現誘導されていることを見出し、 Ca^{2+} の動態の違いが和合・不和合反応の鍵を握っていることを初めて明らかにした。

さらに、第2章において、この受粉時の Ca^{2+} 動態に関わる可能性のある分子として乳頭細胞で強く発現する autoinhibited Ca^{2+} -ATPase 13 (ACA13)に着目した研究を展開した。ACA13が花粉表層物質により発現誘導されること、またN末端の自己阻害調節領域を欠失した ACA13が高親和性の Ca^{2+} 輸送活性を示すことを共同研究により証明した。さらに、TILLING法により ACA13のナンセンス変異株を3種類同定し、それらが共通して稔性の低下を示すこと、変異株の乳頭細胞上では花粉の発芽が阻害されていることを見出した。また、 Ca^{2+} の動態解析から、乳頭細胞質内の Ca^{2+} 濃度が変異株で上昇していること、和合受粉時の乳頭細胞外への Ca^{2+} 輸送が変異株で有意に低下していることを見出した。さらに、乳頭細胞内で発現させた GFP 標識 ACA13の局在解析から、ACA13は乳頭細胞膜と細胞内小胞に局在するが、和合受粉後には細胞内小胞から花粉および花粉管直下の細胞膜上へと移動・集積していることを明らかにした。以上の結果は、ACA13が乳頭細胞内から小胞への Ca^{2+} の汲み出しに関わっていること、和合受粉後にはこの細胞内小胞が細胞膜と融合することにより Ca^{2+} が乳頭細胞外へ放出され、花粉の発芽を誘導していることを強く示唆した。

以上のように、本論文はアブラナ科植物の和合・不和合受粉時の乳頭細胞における遺伝子発現変化を網羅的に明らかにすると共に、和合受粉時の花粉発芽に必要な Ca^{2+} 供給に関わる分子として ACA13の存在を初めて明確にしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。