

氏 名	山岡 靖代
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記号番号	博理工甲第 842 号
学位授与年月日	平成 23 年 9 月 16 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	<i>PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1</i> is required for microspore development in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおけるホスファチジルセリン合成の分子機構と花粉成熟における役割の解明)
論文審査委員	委員長 教授 西田 生郎 委員 教授 円谷 陽一 委員 教授 松本 幸次 委員 准教授 森安 裕二

論文の内容の要旨

Phosphatidylserine (PS) has many important biological roles, but little is known about its role in plants, partly because of its low abundance. I show here that PS was enriched in *Arabidopsis* floral tissues and that genetic disruption of PS biosynthesis decreased heterozygote fertility due to inhibition of pollen maturation.

Atlg15110, designated *PSSI*, encodes a base-exchange-type PS synthase. *Escherichia coli* cells expressing *PSSI* accumulated PS in the presence of L-serine at 23°C. Promoter-GUS assays showed *PSSI* expression in developing anther pollen and tapetum. A few seeds with *pss1-1* and *pss1-2* knockout alleles escaped embryonic lethality but developed into sterile dwarf mutant plants. These plants contained no PS, verifying that *PSSI* is essential for PS biosynthesis. Reciprocal crossing revealed reduced *pss1* transmission via male gametophytes, predicting a rate of 61.6% *pss1-1* pollen defects in *PSSI/pss1-1* plants. Alexander's staining of inseparable *qrt1-1 PSSI/pss1-1* quartets revealed a rate of 42% three and four dead pollen grains, suggesting sporophytic *pss1-1* cell death effects. Analysis with the nuclear stain DAPI showed that all tetrads from *PSSI/pss1-1* anthers retain their nuclei, whereas unicellular microspores were sometimes anucleate. Transgenic *Arabidopsis* expressing a GFP-LactC2 construct that binds PS revealed vesicular staining in tetrads and bicellular microspores and nuclear membrane staining in unicellular microspores. Hence, distribution and/or transport of PS across membranes were dynamically regulated in pollen microspores. However, among unicellular microspores from *PSSI/pss1-2 GFP-LactC2* plants, all anucleate microspores showed little *GFP-LactC2* fluorescence, suggesting that *pss1-2* microspores are more sensitive to sporophytic defects or show partial gametophytic defects.

論文の審査結果の要旨

ホスファチジルセリン (PS) は多くの生物の生体膜に比較的少量しか含まれていないリン脂質である。PS は、脂質生合成の前駆体、中間体としてのほたらきや、アポトーシスや血液凝固、シグナル伝達と関連して多様な生物機能が明らかにされている。PS の生合成経路は、大腸菌や酵母の CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DG) とセリンを基質とする CDP-DG 経路 (CD-PSS) と、動物細胞の PC または PE の極性基を Ca^{2+} 依存的にセリンと置換する塩基交換経路 (BE 経路: BE-PSS) が知られている。しかしながら、植物において PS の生理学的な役割は明らかになっていない。そこで、本論文では、特に PS の含量が植物の花序で高いことから (Murata et al., 1982)、モデル植物であるシロイヌナズナの花組織における PS および PS 合成酵素の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

シロイヌナズナ各組織における脂質および脂肪酸解析を行った結果、花序に PS が豊富に含まれることや、PS が炭素鎖 20 以上の超長鎖脂肪酸を多く含んでいることを明らかにしている。また、シロイヌナズナには、BE-PSS 型の PS 合成酵素をコードする遺伝子 *PSSI* が一つ存在しており、大腸菌発現系を用いて活性測定を行った結果、*PSS1* は PE と L-serine を用いて PS を合成することを明らかにしている。

β グルクロニダーゼレポータ遺伝子発現系を用いた *PSSI* プロモーターの組織特異的発現解析を行った結果、葯 (タペート細胞や花粉小胞子) に高く発現していることが示唆される。花の成長段階では、花粉四分子が形成されるステージ 9 から、小胞子が形成されるステージ 11 までの葯で顕著な発現が観察されたことから、*PSSI* は花粉発達において何らかの役割を担っていると考えられる。また、*PSS1*-Enhanced Yellow Fluorescence Protein (EYFP) との融合タンパク質 *PSS1*-EYFP を *PSSI* プロモーター制御下で発現させた形質転換シロイヌナズナでは、共焦点レーザー蛍光顕微鏡下で、EYFP 蛍光は花粉四分子では核膜に、また、花粉小胞子では ER 染色蛍光試薬と共局在を示す。また、*PSS1*-EYFP の蛍光は根では細胞膜周囲の ER に観察される。

pss1-1 (T-DNA 挿入変異株) と *pss1-2* (点突然変異株) を用いて、逆遺伝学的解析を行った結果、*pss1* ホモ変異体は低い程度でしか分離されず、そのロゼットは萎縮して展開せず、抽苔する株もあったが配偶子形成能はない。ヘテロ植物体の種子には白色化した物や萎縮したものが多く含まれており、部分的な胚性致死を示している。*pss1-1* 変異の配偶子による伝搬性を調べるために野生型植物と *PSSI/pss1-1* 植物間で相反交雑実験を行った結果、*pss1* 型の雄性配偶子の約 6 割が伝搬されないことを示唆している。したがって、*pss1* 変異株では雄性配偶子形成に何らかの異常があると推定される。そこで、*PSSI/pss1-1* 植物体の開裂した葯を走査型蛍光顕微鏡によって観察した結果、正常な花粉と萎縮や変形のみられる異常な花粉が存在することを明らかにしている。萎縮した花粉や変形した花粉はアニリンブルーによるカロース染色でインティン (内壁) が染色されなかったため、花粉管発芽に対する準備が進行しない死細胞である可能性が高い。さらに、Alexander 試薬による生死判定によって、これらの異常な花粉は死細胞であることを示している。そこで、花粉四分子の不分離を示す劣勢変異 *qrt1-1* を導入した F2 植物 *qrt1-1 PSSI/pss1-1* の花粉観察からは、正常細胞と萎縮細胞を 2 : 2 の比で有する四分子だけでなく、死細胞を 1 つまたは 3 つもつ四分子や、4 つの細胞全てが生細胞である四分子、4 細胞すべてが細胞死した四分子なども観察される。このことは、*pss1* ヘテロ変異株における雄性配偶子の細胞死は、胞子体性致死が原因で起こっている可能性があることを示唆している。さらに、蛍光顕微鏡を用いた DAPI 染色では、*PSSI/pss1-1* 植物由来の花粉は四分子形成まではすべての四

分子で核に蛍光が見られるが、その後の小胞子形成期にかけて細胞核が消失していることを明らかにしている。また、PS と結合する蛍光バイオセンサー GFP-LactC2 を用いた花粉発達における PS の細胞内動態観察から、PS は小胞様構造と核膜でその表在性を動的に変化させ、特に変異株において核消失の見られる小胞子発達初期に核膜に表在することを明らかにしている。実際に、*PSSI/pss1-1* 植物に GFP-LactC2 を発現させると、小胞子発達初期において核膜に蛍光のない花粉細胞が観察される。以上の成果は、*pss1* 変異がもたらす細胞死は、胞子体性致死だけでなく配偶対性致死が原因で起こる可能性があることを示唆している。

以上、本論文では、シロイヌナズナにおける PS 合成酵素のクローニングを行い、その活性測定によって PS 合成能を解明している。さらに、逆遺伝学的解析から *PSSI* が花粉発達に重要な役割をもつことや、PS バイオセンサーを用いた観察から PS が小胞輸送や核膜における膜成分あるいは脂質標識分子として機能し花粉小胞子発達に重要であることを示している。従って、本審査会は、本学位申請論文を博士（理学）の学位を授与するにふさわしいと判断する。