

氏 名 Harsha Somashekar

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2459 号

学位授与の日付 2023 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 GLUCAN SYNTHASE-LIKE5 promotes anther callose
deposition to maintain timely initiation and progression of
meiosis in rice (*Oryza sativa* L.)

論文審査委員 主 査 佐藤 豊
遺伝学コース 教授
宮城島 進也
遺伝学コース 教授
齋藤 都暁
遺伝学コース 教授
酒井 則良
遺伝学コース 准教授
安積 良隆
神奈川大学 大学院理学研究科 教授

Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : Harsha Somashekar

Title : GLUCAN SYNTHASE-LIKE5 promotes anther callose deposition to maintain timely initiation and progression of meiosis in rice (*Oryza sativa* L.)

Meiosis is a special type of eukaryotic cell division whereby one round of DNA replication is followed by two consecutive cell divisions to produce four haploid gametes in animals, or spores in land plants (embryophytes). In flowering plants, the successful pollen production involves a series of multiple complicated steps. An important earlier step is meiosis that takes place within microsporangium or pollen sac, two pairs of which compose an angiosperm anther. In rice, MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE2 (MEL2), an RNA recognition motif protein, functions in the timely transition of spore mother cells from mitosis to meiotic cycle in rice anthers. One of the candidate downregulated gene with known function in pollen development but unknown meiotic function was *GLUCAN SYNTHASE-LIKE5* (*OsGSL5*), which encodes callose synthase, an enzymes responsible for callose deposition in rice anther locules. The importance callose polysaccharide for pollen growth and development is well studied in plants. In contrast, its role in meiosis is largely unexplored.

In this study, I aim to uncover the importance of callose polysaccharide in initiation and progression of male meiosis. To this end, I knocked out *OsGSL5*, which is expressed specifically during microsporogenesis stages in anthers, by CRISPR/Cas9 tool. The *gs/5* knockout plants produce non-viable, shrunken pollen and exhibited complete male sterility at seed setting stage. Aniline blue staining revealed the hyper callose deposition in the premeiotic anther locules around PMCs in WT anthers, and during meiosis stages, the callose deposition is limited only to the PMC-PMC junction.

In contrast, in *gs15* anthers, callose is extremely reduced in premeiotic, meiotic and post meiotic anthers. Double immunostaining of callose and OsGSL5 using anti-callose and anti-GSL5 antibodies revealed that OsGSL5 is majorly responsible for the anther callose deposition observed by aniline blue staining. The knockout of *OsGSL5* severely disrupts several key meiotic events, whereby the meiotic mode of chromosome behavior and condensation was greatly affected in *gs15* mutant PMCs lacking callose. With respect to chromosome condensation and behavior, two types of PMCs, one with normal wild-type-like chromosomes (wl-PMC) and abnormal chromosomes (ab-PMC) were observed in *Osgs15* anthers, especially around the prophase I stages. In addition, the homologous synapsis, which is required for recombination/crossover events between homolog chromosomes is not formed, as detected by the failure in loading of ZEP1, a key synaptonemal complex protein in rice, onto the zygotene and pachytene chromosomes, raising the possibility of elevated crossing over events in *gs15* mutant PMCs. Furthermore, the *gs15* anthers also show early progression of several meiosis cell cycle stages, particularly meiosis-I division. Monitoring the timing of meiosis entry using PAIR2 (an S-phase marker) revealed that a considerably number of *gs15* PMCs precociously initiate meiosis relative to the wild type PMCs, suggesting that callose may play an important role in controlling male meiosis initiation time.

Callose is known to block the cytoplasmic channels called plasmodesmata (PD), the cytoplasmic bridges that mediate symplastic communication in plant system, in addition to controlling the apoplastic signalling. To answer how callose can impact the meiosis process, I focused on the cell-cell signaling aspects of callose using transmission electron microscopy (TEM). During the mitosis-meiosis transition stages, the PDs are gradually reduced between anther locular cells, especially at PMC-PMC and PMC-Tapetal cell (TC) in WT anthers. Surprisingly, in *gs15*, the PD numbers were greatly reduced at PMC-PMC, PMC-TC and TC-TC interfaces, suggesting that callose may maintain PD stability among anther locular cells during mitosis-meiosis transition.

In addition, the *gs15* mutant anthers show enhanced cell-cell distance between PMC-PMC interface during mitosis-meiosis transition and may contribute to maintaining the appropriate apoplast distance between meiocytes in addition to keeping the PDs number. Given the above observations, I propose that callose influence on male meiosis initiation and progression is likely due to perturbations in the symplastic and apoplastic pathways. Over all, my study will demonstrate that OsGSL5 is responsible for hyper callose accumulation in extracellular spaces of anther locules at premeiosis and early meiosis, and has an indispensable role in proper initiation of male meiosis in rice, likely by controlling symplast and apoplast pathways.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 Harsha Somashekar

論文題目 GLUCAN SYNTHASE-LIKE5 promotes anther callose deposition to maintain timely initiation and progression of meiosis in rice (*Oryza sativa* L.)

減数分裂は真核生物の特殊な細胞分裂であり、1回のDNA複製に続いて2回の連続した分裂が行われ、動物では4つの配偶子、陸上植物では孢子が作られる。被子植物の花粉形成の初期段階では、葯を構成する花粉囊の中で減数分裂が行われる。イネでは、RNA認識モチーフタンパク質である MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE2 (MEL2)が、花粉母細胞(PMC)の減数分裂サイクルへの正常な移行に必要である。イネ葯におけるカロース合成に機能する酵素 GLUCAN SYNTHASE-LIKE5 (*OsGSL5*)をコードする遺伝子は、*mel2* 突然変異体において顕著に発現低下する。*OsGSL5* 遺伝子は、花粉形成における機能は知られているが、減数分裂における機能は知られていない。

出願者は、花粉形成における減数分裂の開始と進行におけるカロースならびにその合成酵素である *OsGSL5* の機能を明らかにすることを目的として、CRISPR/Cas9 システムを用いて *OsGSL5* 遺伝子をノックアウトした植物を作出した。*osgsl5* ノックアウト植物の花粉は完全な不稔性を示した。野生型において、カロースは減数分裂前の PMC 周辺に高蓄積し、減数分裂期では PMC-PMC 接合部のみに限定して蓄積していた。一方、*osgsl5* では、減数分裂前と減数分裂期の葯でカロース蓄積が極端に減少していた。抗カロース抗体と抗 *OsGSL5* 抗体を用いた二重免疫染色により、*OsGSL5* が野生型の葯のカロース蓄積場所に局在することを明らかにした。

さらに、*osgsl5* ノックアウトでは、カロースの蓄積低下に加えて、減数分裂におけるいくつかの重要なイベントが阻害されていることを出願者は見出した。*osgsl5* ノックアウトの葯では、正常な野生型様の染色体挙動を示す PMC と異常な染色体挙動を示す PMC の2種類が、特に減数第一分裂前期付近で観察された。また、*osgsl5* ノックアウトでは、シナプトネマ複合体タンパク質である ZEP1 のパキテン染色体へのローディングが起こらず、シナプシスが形成されていないことが明らかになった。さらに、葯の長さを指標に減数分裂の進行状況を調べたところ、*osgsl5* では短い葯で減数分裂が早期に始まっていることを明らかにした。

カロースは、アポプラスティックな細胞間シグナリングだけでなく、プラスモデスマータ (PD) を介したシンプラスティックな細胞間コミュニケーションを制御することが知られている。そこで、出願者は透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて野生型と *osgsl5* ノックアウトの葯の細胞間隙の距離並びに PD の数を測定した。減数分裂への移行期において、野生型の葯の PMC-PMC と PMC-タペート細胞 (TC) で PD の数が徐々に減少した。一方、*osgsl5* ノックアウトでは、PMC-PMC、PMC-TC、TC-TC のいずれにおいても PD が野生

型と比べて大きく減少していた。このことは、減数分裂の移行期において、カロースが葯の細胞間で PD の安定性を維持している可能性を示唆している。さらに、*osgs15* ノックアウトの葯では、減数分裂移行期に PMC-PMC の細胞間隙が増大していた。このことから、カロースは、PD 数の維持に加えて、細胞間のアポプラスト距離を適切に維持することにも寄与している可能性が示唆された。

出願者の研究成果は、長年にわたり謎に包まれていた葯に蓄積するカロースの減数分裂における新たな役割を *osgs15* ノックアウトの解析から明らかにするとともに、減数分裂の開始と進行におけるカロースを介した細胞間信号伝達制御に関する新たな仮説を提示した。以上の理由により、審査委員会は全員一致で本論文が学位の授与に値すると判断した。