

氏 名 小野 聖二郎

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1764 号

学位授与の日付 平成27年3月 24 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 Genetic control of differentiation of inner anther wall cells  
surrounding male meiocytes in rice

論文審査委員 主 査 教授 荒木 弘之  
教授 相賀 裕美子  
教授 澤 齊  
助教 樽谷 芳明  
准教授 佐藤 豊 名古屋大学大学院

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

**ABSTRACT**

The anther, the male reproductive organ of angiosperm species, is composed of multiple and radial cell layers in a cross section; the innermost germline cells and their surrounding somatic cells, called inner-anther wall cells or companion cells, in addition to the outermost epidermal cells. All companion cells are produced from parietal cells, differentiated from primordial germ cells concurrently with the germ cell. Primary parietal cells with a stem cell-like ability divide periclinally and differentiate an undifferentiated cell layer inward, called secondary parietal cells, in addition to endothecium outward. Secondary parietal cells further divide periclinally and differentiate into middle layer and tapetal cells. Such a highly organized cellular patterning implies that in addition to the importance of germ cell development themselves, successful development of nursery companion cells adjacent to germ cells is indispensable to achieve sexual reproduction events in plants. Compared to the knowledge about earlier cell speciation events of these anther wall cells and characteristic functions of tapetum cells at later post-meiotic stages, little is known about the function of anther wall cells during meiotic stages. Therefore, in this study, I tried to find and figure out characteristic and novel functions of anther wall cells at early-meiotic stages. To solve this task, I identified that a paralogous pair of bHLH (basic Helix-Loop-Helix) transcription factor-encoding genes, *bHLH141* and *bHLH142*, play important functions in development of layered structure of inner-anther walls in rice.

From the results of this study, the bHLH142 function was supposed in tapetal and middle layer cell differentiation just after division of secondary parietal cells into two layers, resulting in tapetum and middle layer replaced by somewhat undifferentiated cells. The bHLH141 also acted in tapetum, and however, functions in development

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

after differentiation of tapetum, different from bHLH142. The realtime PCR and fluorescent cytological analyses revealed that both mRNA and protein expressions of bHLH141 were dependent on *bHLH142*, also supporting the result that bHLH142 is required for differentiation of tapetum and bHLH141 for subsequent development. Unfortunately, other groups already published the results for functions of bHLH141/EAT1 and bHLH142/TIP2 in rice, when I was conducting the experiments for this thesis. However, I got several new findings for both rice bHLH proteins in this study. One was to show subcellular localization of both bHLH proteins. Cytological observation of transgenic rice plants expressing GFP- or YFP- fused proteins cleared nuclear localization of both bHLHs in tapetal cells, while bHLH142 was expressed also in middle layer-cell nuclei. This result brought me another new finding in the expression pattern of bHLH141. Previous report demonstrates that bHLH141/EAT1 is expressed during post-meiotic microspore stage, and promotes programmed cell death of tapetal cells. However, I found that bHLH141 expression peaked twice; the first during the early meiotic stage, and the second in post-meiosis as previously reported. Furthermore, I newly confirmed by ChIP-PCR (Chromatin immunoprecipitation-PCR) that the first peak of bHLH141 directly bound to the upstream of the *DCL3b* (*Dicer-like ribonuclease 3b*) gene, encoding an endoribonuclease required for biogenesis of 24-nt phasiRNAs (phased small interfering RNAs) abundant in rice floral organs and anthers. In addition to direct activation of *DCL3b* expression by bHLH141, several precursor transcripts also predicted to under the direct or indirect control of bHLH142 and bHLH141 cascades. Ultimately, the amounts of resultant 24-nt phasiRNA molecules were hardly detected both in *bhlh142* and *bhlh141* mutant anthers. Taken together these findings, I concluded that early-meiotic expression of bHLH141 functions in biogenesis pathways to produce reproductive specific

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

24-nt phasiRNA molecules, and these bHLH141 dependent pathways were activated by the cue of bHLH142 signaling, a paralogous transcription factor of bHLH141.

An Argonaute protein, MEL1 (MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE 1), essential for pre-meiotic and meiotic development of rice meiocytes was previously identified in our laboratory and recent works revealed that 21-nt phasiRNAs are bound by MEL1 proteins and have somewhat important roles in meiosis progression. The findings and knowledge obtained in this study should not be restricted in events in anther-wall cells, but propagated for mechanisms to promote anther development, concomitant with small RNA-mediated gene regulatory systems and cell-to-cell communication.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

イネでは、花粉母細胞を包む葯壁の層構造が変化し、この層構造が花粉の形成に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、葯形成時の層構造の役割についてはほとんど分かっていない。小野聖二郎さんは、イネの葯壁の層構造の変化と葯形成に興味を持ち、そこで働く転写因子の解析を行った。

小野さんは、葯壁の変化を通して葯形成に働く因子を捜すため、*msp1* 変異により転写量の低下する遺伝子に注目した。*msp1* 変異では減数分裂期前の葯壁の層構造の最も内側にあるタペート細胞の形成が起こらない。減数分裂開始直前の葯の mRNA を *msp1* 変異と野生株で比較したデータベースから、小野さんは、*msp1* 変異で mRNA 量が減少し、転写因子と思われ、同一サブファミリーに属する bHLH141 と bHLH142 に注目し、これらの解析を行った。bHLH142 はタペート細胞が分化する時期にタペート細胞及び中間層の細胞内に mRNA 及び YFP-bHLH142 融合タンパク質が認められ、T-DNA 挿入変異ではタペート細胞の分化に異常を示す。また、bHLH142 の発現は bHLH141 には依存しないが、bHLH141 の発現は bHLH142 に依存する。一方、bHLH141 の mRNA は葯壁が 3 層時（減数分裂前）には見られず、タペート細胞が分化して葯壁が 4 層になる減数分裂直前から減数分裂初期、及び減数分裂後や花粉成熟過程の小孢子期初期のタペート細胞で確認された。同時期に、bHLH141-GFP 融合タンパク質もタペート細胞核に観察にされた。次に、トランスポゾンの bHLH141 への挿入変異を調べたところ、タペート細胞に異常は認められなかったが、葯は成熟せず、花粉は形成されなかった。

次に、bHLH141、bHLH142 の下流で働く遺伝子を同定するため、葯内壁で発現する遺伝子の中から、*msp1* 変異により転写量が減少する 15 遺伝子を選び、bHLH141、bHLH142 変異による効果を調べた。その結果、減数分裂前及び初期減数分裂期の葯で発現する遺伝子では bHLH141、bHLH142 変異の効果はなく、減数分裂を通じて発現するものでは、bHLH142 変異で発現が減少する。さらに、減数分裂後の葯で強く発現するものは bHLH142 変異で減少するが、bHLH141 変異では減少するものとそうでないものがあることが分かった。これら遺伝子に加えて、bHLH141 の変異において small RNA の一種である phasiRNA の前駆体、及びそのプロセッシングに関わる Dicer 様エンドリボヌクレアーゼ *DCL3b* の転写量が減少することが分かった。特に *DCL3b* 遺伝子の上流には bHLH141 が結合することを CHIP 法により示すことにより、bHLH141 が直接転写に関わっている事を示唆している。イネの生殖器官形成に small RNA による制御が示唆されているので、この結果は bHLH141 が small RNA を介して葯形成を制御している可能性を示唆するものである。

本研究は葯形成期における内壁の変化を制御する転写制御に新たな知見を加えるものであり、葯形成機構の研究へ貢献するものである。従って、小野聖二郎さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。