

高等植物の花粉形成機構に関する共同研究の実施

理学研究科 修士課程 2年

大坪 卓

スペイン

2018年10月21日～2018年11月13日

計画の概要

私は、現在行っている研究で高等植物の細胞核運動の分子メカニズムを解き明かそうとしています。その中で、核運動が正常な花粉形成を通じて植物の生殖戦略に関与していることが示唆される結果が得られていました。そこで今回、減数分裂の細胞学的解析や FISH での染色体の可視化等の解析を通じて、核運動が担う花粉形成機構の細胞生物学的解析の共同研究を目的として渡航しました。渡航先の Dr. Monica Pradillo Orellana (Universidad Complutense de Madrid) の研究室は、花粉形成を支える減数分裂の分子解析のための高度な手法を保持しており、現在も精力的に解析を行っています。渡航中は事前に播種していただいた Col-0 を用いて花粉母細胞の発見から各減数分裂ステージの時系列的観察、メタフェーズ 1 に対する FISH を行い、渡航後には協力を維持しながら更に習得した技術を用い核運動の異常になった変異体を用いた同様の解析を行うこととしました。

成果

花の開花前の蕾を固定したものを適切な薬剤でリンスし、細胞壁を消化した後に実体顕微鏡下で押しつぶすことで一細胞ごとに分離させて、DAPI 染色しました。作製したスライドを蛍光顕微鏡を用いて観察し、花粉母細胞を含んでいるスライドを選別していきました。実験を開始した当初は特に細胞分裂中の体細胞と減数分裂細胞との区別が困難であり、高倍率レンズを用いてスキミングしていたため選別作業に多くの時間を要しました。しかし、次第に細胞のサイズや特徴的な構造等を見分けられる技量が身につく様々なステージの減数分裂細胞を見つけることができました。また、減数分裂は各ステージが時系列に伴い明確に区切ることが困難なのですが、数多くのスライドをチェックすることで、レプトテン期からテトラドまでのほぼ全ての減数分裂ステージ中の花粉母細胞を同定することができました。本報告書にはその一例としてパキテン期の花粉母細胞の写真を添付しています。今後、細胞学的解析をより高効率に進めるために、観察対象とする花の開花前の蕾の選抜をよりの確にすることが必要だと感じているので、蕾のサイズや色や外観

等と減数分裂ステージとの相関も注意していきたいと考えています。特に花粉形成が終了しているスライドにおいては減数分裂中の花粉母細胞は見つからないので、花粉を含んでいるものを蕾の選抜段階で出来るだけ排除することが必要だと感じています。

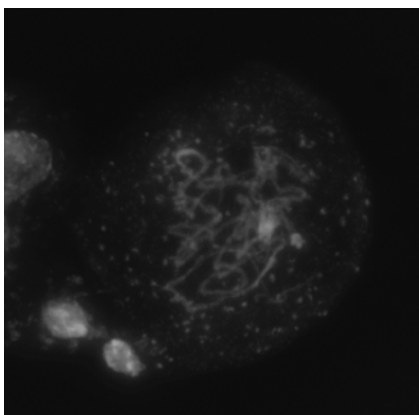
減数分裂の各ステージのスライドを同定してきた中で、特に今回はメタフェーズ1を含むスライドをピックアップし、全てのメタフェーズ1の座標を確認した後に、FISHを行いました。一例として得られた結果の写真を添付しています。取得された蛍光パターンにより全染色体を同定することができました。今後、核運動の異常な変異体に対してもFISHを行い、染色体の数的異常や構造異常の解析に役立てていきます。

今後は、引き続き Dr. Pradillo らのグループと協力体制を保ちつつ、習得した技術を元に核運動の異常が見られる変異体を用いてまず細胞学的解析を優先的に行い、具体的な異常のあるステージを同定していく予定です。その後にFISHを行います。更に、今回の渡航中のディスカッションを通じて、減数分裂後の細胞分裂についても解析の提案を頂いたので、今後の課題として検討したいと考えています。

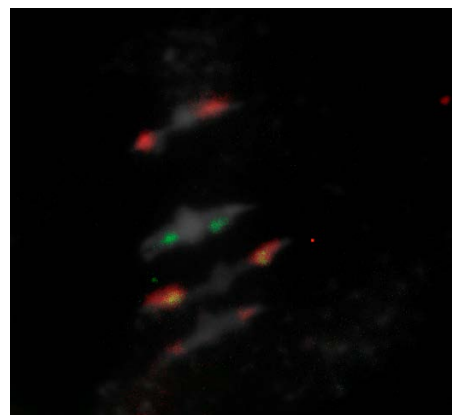
最後になりましたが、本研究は Dr. Monica Pradillo Orellana(Universidad Complutense de Madrid)の研究室内で行わせて頂きました。温かく私に研究環境を提供してくださった研究室メンバーの皆様に深く感謝申し上げます。



研究室の入っている建物のエントランス



Pachytene 期の花粉母細胞



Metaphase I の花粉母細胞に対して FISH を行った。上から第 5、1、2、4、3 染色体。