

## 論文内容の要旨

### 論文題目

**Studies on the sex chromosomes and the sexual differentiation in the dioecious plant *Silene latifolia* using satellite DNA at individual chromosome ends and the smut fungus *Microbotryum violaceum***

**(性染色体末端サテライト DNA と黒穂菌を用いた雌雄異株植物ヒロハノマンテマの性染色体構造と性分化に関する研究)**

風間 裕介

### 序論

ナデシコ科の雌雄異株植物ヒロハノマンテマは、XY 型の性染色体をもつ。Y 染色体は中部動原体型で、その部分欠損変異体の解析から、①雌蕊(♀)の発達抑制領域、②雄蕊(♂)の初期発達促進領域、③葯の成熟促進領域、④偽常染色体領域(Pseudo Autosomal Region : PAR)に分けられている(Westergaard 1940, Farbos et al 1999)。X 染色体は、次中部動原体型で、短腕(p)と長腕(q)との長さの差が明瞭である。PAR は、異型化した XY 染色体が減数分裂時に対合する部位で、X 染色体にも存在する。PAR では対合した XY 染色体間で交差がおこる。

ヒロハノマンテマの Y 染色体の片末端と X 染色体の両端にはサテライト DNA (satDNA) があることが知られている(Bůžek et al 1997)。satDNA は、数十から数百塩基対の DNA 配列が、数 kb から数 Mb にわたって連続して反復する構造である。真核生物のゲノム DNA を塩化セシウム密度勾配遠心法で分画するとメインバンドの他にサテライトバンドが観察されるが、satDNA はその構成成分の 1 つとして同定された。通常性染色体は末端で対合するので、PAR は性染色体の末端にあることになる。X 染色体の両端にある 2 つの satDNA のうちのいずれか一方が、Y 染色体の末端にある satDNA と相同で、そこが PAR だということになる。

雄蕊(♂)の初期発達促進因子(Stamen promoting factor : SPF)は Y 染色体にコードされているので、X 染色体しかもたない雌(♀)には雄蕊(♂)を伸長させる能力はない。ところが、ヒロハノマンテマに黒穂菌(*Microbotryum violaceum*)が感染すると、雌花(♀)でも雄蕊(♂)が発達して両性花ようになる。これはリンネ(1707~1778)の頃から知られていることで、黒穂菌は葯に胞子を形成するから、雌花(♀)で雄蕊(♂)を誘導するのは、黒穂菌の巧みな生存戦略の一つと考えられている(Uchida et al 2003, 2005)。黒穂菌は Y 染色体の代わりをしていることになる。黒穂菌

感染雌花(♀)で雄蕊(♂)が発達する機構を明らかにするため、ヒロハノマンテマの雄蕊(♂)発達に関わる遺伝子を単離しようと考えた。雄蕊(♂)の発達は本来 Y 染色体の雄蕊(♂)の初期発達促進領域で制御される。黒穂菌感染雌(♀)をカウンターパートとすることで、Y 染色体の雄蕊(♂)発達制御機構の一端を明らかにできると期待される。

## 結果と考察

### 1. X 染色体 PAR 領域と染色体末端 satDNA の分布

1) **染色体末端 satDNA の単離・同定:** X 染色体 PAR 領域をマッピングするため、satDNA を構成する繰返し単位の配列の組成を調べた。BAC ライブラリーをスクリーニングし、計 10 個の BAC クローンを単離した。satDNA の断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なったところ、7 クローンが *SacI* 処理で satDNA に特有のラダーパターンを示したのに対し、*KpnI* 処理でラダーパターンを示したのは #15B12 のみであった。#15B12 のインサート 150 kb には、約 420 回の繰返しに相当する 130 kb の satDNA が存在した。そのうちサブクローニングした 8.4 kb の断片の塩基配列を決定した。全長 8,371 bp には *HaeIII*, *HinfI*, *KpnI* などの制限酵素サイトを基準とした繰返し単位が 26 回含まれていた。一方、*SacI* サイトは 2 カ所しかなかった。satDNA には、繰返し構造ごとに制限酵素サイトに偏りがあると考えられる。

2) **染色体末端 satDNA の分子系統解析:** 繰返し構造間の塩基配列を比較するため、各クローンから繰返し単位の配列を決定した。それぞれの繰返し単位は互いに 83 - 94% 相同であった。塩基配列の違いを検出するため、近隣結合法(NJ法)により系統樹を作製した。satDNA は、*SacI* サブファミリー、*KpnI* サブファミリー、#11F02 サブファミリー、#16E07 サブファミリーに分類された。

3) **satDNA を用いたマルチカラー競合 FISH 法による X 染色体 PAR のマッピング:** 4 種のサブファミリーの配列相同性と、各染色体末端での配列の分布を調べるため、マルチカラー競合 FISH を行った。*SacI*、#11F02、*KpnI*、#16E07 サブファミリーの繰返し単位をそれぞれ別々の蛍光色素でラベルし、同時にハイブリダイズさせた。*SacI* サブファミリーと #11F02 サブファミリーとのシグナルは一致し、*KpnI* サブファミリーと #16E07 サブファミリーとのシグナルは一致した。*KpnI* サブファミリーと *SacI* サブファミリーのシグナルは各染色体末端でそれぞれ固有の色調と強度を示した。X 染色体の q 腕では赤い *SacI* サブファミリーのシグナルが強く、p 腕では緑色の *KpnI* サブファミリーのシグナルが強かった。Y 染色体の PAR 上では緑色の *KpnI* サブファミリーのシグナルが強く、X 染色体の p 腕のシグナルと色調と強度ともに同じだった。1940 年 Westergaard によって、X 染色体の q 腕に位置づけられた PAR は、p 腕に存在することが示された(図 1)。

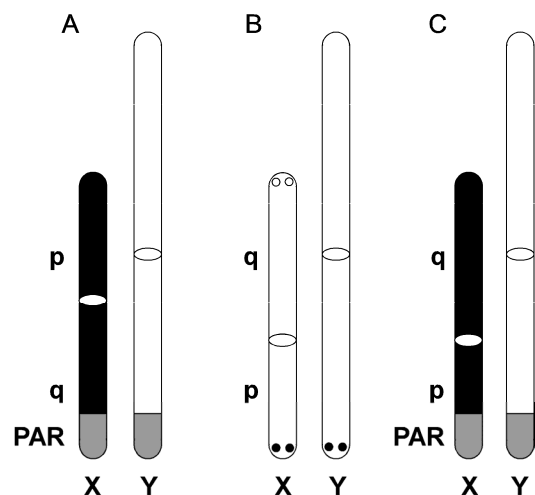


図 1 ヒロハノマンテマ X 染色体 PAR 領域 Westergaard(1940) によると偽染色体領域(PAR)は X 染色体の q 腕に存在する(A)。本研究の FISH では Y と同様のシグナルは p 腕にみられた(B)。X 染色体の PAR はこれまでの見解とは逆向きの p 腕に存在することがわかった(C)。

## 2. Y染色体による雄蕊(♂)発達制御と黒穂菌感染雌(♀)における雄蕊(♂)の発達

1) ヒロハノマンテマの雄蕊(♂)の初期発達促進にかかわる制御遺伝子の探索: Y染色体の雄蕊(♂)の初期発達促進領域にコードされているのは雄蕊(♂)の発達制御に関わる MADS ボックス遺伝子あるいはさらにそれを制御する遺伝子だろうと考えられる。黒穂菌はそれらの遺伝子の発現を攪乱している可能性がある。がく片、花弁、雄蕊(♂)、心皮の4つの花器官の決定はABCモデルで説明される(Coen and Meyerowitz 1991)。シロイヌナズナでは、雄蕊(♂)と花弁を決定するB遺伝子 *APETALA3(AP3)* と *PISTILLATA(PI)* は雄蕊(♂)の成熟にも必要であることがわかっている。*LEAFY(LFY)*、*UNUSUAL FLORAL ORGAN(UFO)*、*WUSCHEL(WUS)* はB遺伝子を正に制御する。*SUPERMAN(SUP)* はB遺伝子の発現を負に制御する。これらの遺伝子のホモログ(*SILFY*、*SIUFO*、*SIWUS*、*SISUP*)を、縮重プライマーを用いたPCRでヒロハノマンテマから単離した。*WUS*ホモログの *SIWUS* だけが2コピー(*SIWUS1*、*SIWUS2*)で後の遺伝子はシングルコピーだった。*SILFY*、*SIUFO* と *SIWUS2* は蕾特異的に発現していたが、*SIWUS1* は根や葉でも発現していた。*SISUP* は雌(♀)の蕾特異的に発現し、雄(♂)では発現していなかった。

2) *SISUP*の雄株(♂)、雌株(♀)、黒穂菌感染雌株(♀)における発現パターン: RACE法を用いて *SISUP* の全長 cDNA を同定した。予想されるアミノ酸配列のN末には Cys2/His2 タイプの Zinc フィンガーモチーフがあった。植物で同定されている Cys2/His2 タイプの Zinc フィンガーモチーフ 59 個を用いて NJ 法で系統解析を行った。*SISUP* は、シロイヌナズナの *SUP* とペチュニアの *SUP* ホモログ *PhSUP* と共通の独立したクレードを形成した。*SISUP* の時間的・空間的な発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べた。ヒロハノマンテマの花の発達段階は 12 の Stage に分けられる(Grant et al 1994)。*SISUP* のシグナルは、雄(♂)では観察されなかった。雌(♀)では、Stage 4 の予定雄蕊(♂)領域でシグナルが検出された。Stage 8 では、*SISUP* は抑制雄蕊(♂)の基部で発現しており、stage 12 では、抑制雄蕊(♂)全体で発現していた。*SISUP* は雄蕊(♂)の発達を抑制しているので、雌雄異株植物のヒロハノマンテマでは、雌(♀)の抑制雄蕊(♂)で発現が顕著となることがわかった。黒穂菌感染雌(♀)の *SISUP* の発現を RT-PCR で調べると、*SISUP* は、雌(♀)と感染雌(♀)の蕾のいずれの場合でも発現していた。雄蕊(♂)が伸長する感染雌(♀)で *SISUP* が発現することから、黒穂菌感染によって攪乱されるのは、*SISUP* による雄蕊(♂)発達抑制よりも下流であることがわかる(図2)。

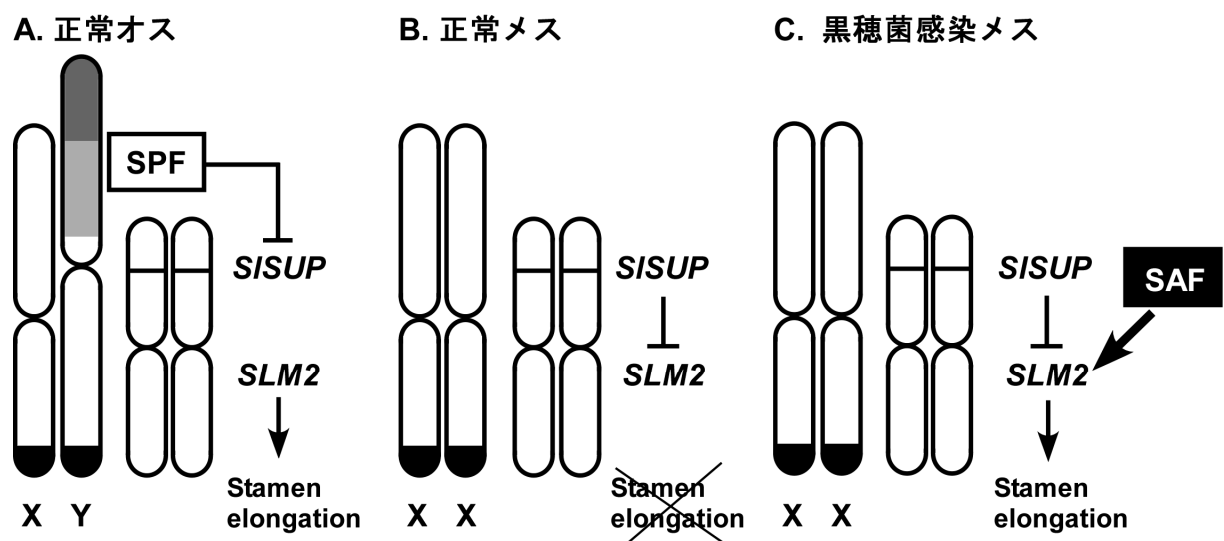


図2 Y染色体にコードされた仮想的な雄蕊初期発達促進因子(SPF)と *SISUP*、*SLM2*、黒穂菌による性分化制御 正常雄(♂)では、SPFが雄蕊伸長抑制遺伝子 *SISUP* の発現を抑制する。雄蕊原基で *SLM2* が発現し、雄蕊(♂)が伸長する(A)。正常雌(♀)では *SISUP* が発現し、*SLM2* の発現が抑制され、雄蕊伸長が抑制される(B)。黒穂菌感染雌(♀)では、*SISUP* の発現は抑制されないが、黒穂菌による何らかの *SLM2* 発現誘導因子(SAF)により *SLM2* が発現し、雄蕊伸長が起こる(C)。

## 結論

シロイヌナズナを含め植物の約 90%が雌雄同株(両性花)であるため、植物の雌雄の性分化や性染色体についてはあまり多くのことはわかっていない。今回、XY型の性染色体をもつ雌雄異株植物ヒロハノマンテマを用いて以下のことを明らかにした。

1. 染色体末端 satDNA には4つのサブファミリーが存在する。
2. X染色体の偽常染色体領域 PAR はp腕に存在する。
3. シロイヌナズナの雄蕊(♂)伸長抑制遺伝子 *SUPERMAN* のホモログ *SISUP* は、雌(♀)の雄蕊原基で発現するが雄(♂)では発現しない。
4. 黒穂菌感染雌(♀)のつぼみでも *SISUP* は発現することから、黒穂菌は *SISUP* による雄蕊(♂)発達抑制よりも下流を制御していることになる。
5. B機能遺伝子 *SLM2* は、Stage 3の雄(♂)、雌(♀)、感染雌(♀)では、予定花卉、雄蕊(♂)領域で発現するが、Stage 8では雌(♀)の雄蕊原基で発現しなくなっていた。感染雌(♀)ではStage 8になっても *SLM2* が発現し続け雌花(♀)にもかかわらず雄蕊(♂)が発達する。

## 発表論文

- 1) Kazama Y, Sugiyama R, Suto U, Uchida W, Kawano S. The clustering of four subfamilies of satellite DNA at individual chromosome ends in *Silene latifolia*. *Genome, in press*.
- 2) Ageez A, Kazama Y, Sugiyama R, Kawano S. Male-fertility genes expressed in male flower buds of *Silene latifolia* include homologs of anther-specific genes. *Genes Genet. Syst. reviced*.
- 3) Kazama Y, Koizumi A, Uchida W, Ageez A, Kawano S. Expression of the floral B-function gene *SLM2* in female flowers of *Silene latifolia* infected with the smut fungus *Microbotryum violaceum*. *Plant and Cell Physiol.* 46 (5), 806-811 (2005).
- 4) Kazama Y, Sugiyama R, Matsunaga S, Shibata F, Uchida W, Hizume M, Kawano S. Organization of the *KpnI* family of chromosomal distal-end satellite DNAs in *Silene latifolia*. *J Plant Res.* 116, 317-326 (2003).
- 5) Sugiyama R, Kazama Y, Miyazawa Y, Matsunaga S, Kawano S. CCLS96.1, a member of a multicopy gene family, may encode a non-coding RNA preferentially transcribed in reproductive organs of *Silene latifolia*. *DNA Res.* 10, 213-220 (2003).
- 6) Uchida W, Matsunaga S, Sugiyama R, Kazama Y, Kawano S. Morphological development of anthers induced by the dimorphic smut fungus *Microbotryum violaceum* in female flowers of the dioecious plant *Silene latifolia*. *Planta* 218, 240-248 (2003).
- 7) Ageez A, Matsunaga S, Uchida W, Sugiyama R, Kazama Y, Kawano S. Isolation and characterization of two homeodomain leucine zipper genes from the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genes Genet Syst.* 78, 353-361 (2003).
- 8) Uchida W, Matsunaga S, Sugiyama R, Shibata F, Kazama Y, Miyazawa Y, Hizume M, Kawano S. Distribution of interstitial telomere-like repeats and their adjacent sequences in a dioecious plant, *Silene latifolia*. *Chromosoma* 111,313-320 (2002).