

論文内容の要旨

論文題目

Studies on stamen-carpel development and deletions in the sex chromosome by using bisexual and asexual mutants of the dioecious plant *Silene latifolia*

(両性花と無性花突然変異体を用いた雌雄異株植物ヒロハノマンテマの雌蕊・雄蕊発達と性染色体欠失部位に関する研究)

氏名

小泉 綾子

序論

種子植物のほとんどは雄蕊と雌蕊を一つの花の中にもつ両性花植物であり、雌花と雄花が別々の個体につく雌雄異株植物は被子植物全体の6%に過ぎない。しかし、両性花植物から雌雄異株植物への進化は、科や属のレベルで独立に何回も起きている現象であり、被子植物全49目中、7割にあたる35目に雌雄異株植物が存在する(Charlesworth 2002)。ヒロハノマンテマは、植物の雌雄異株性を研究するうえで、生殖器官である花が大きく観察しやすく、形態的に明瞭に識別可能な性染色体をもつなどの点から優れた材料である。その雌雄性は、Y染色体の有無で決まっており、Y染色体上には雌蕊抑制機能(GSF:Gynoecium Suppression Function)領域、雄蕊促進機能(SPF:Stamen-Promoting Function)領域と葯成熟機能(MFF: Male-Fertility Function)領域が存在する。それぞれの領域を欠失した個体は両性花あるいは無性花変異体となることが知られている(Farbos et al. 1999, Lardon et al. 1999)。

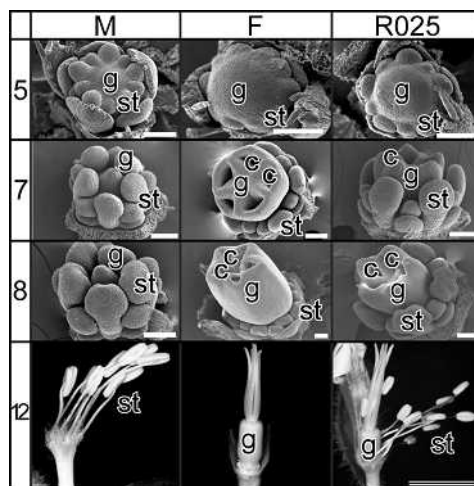
本研究では、ヒロハノマンテマの無性花突然変異体と両性花変異体を用いて、Y染色体上に存在する性決定因子の欠失によって、花の各器官、特に雌蕊と雄蕊の形態変化がどのように起こるのかを明らかにした。さらに、無性花や両性花の雌蕊、雄蕊において、形態異常が起こる時期に発現する花器官形成遺伝子の発現解析を行い、雌蕊と雄蕊の形態異常に関わる遺伝子を明らかにしたいと考えた。この研究はヒロハノマンテマの性染色体欠失と、雌蕊や雄蕊の形態変化を遺伝子レベルで結びつけるための糸口となると考えられる。

結果と考察

1. 両性花突然変異体 R025 の性染色体と花発達

1) R025 の両性花

ヒロハノマンテマ乾燥種子に炭素イオンビームを照射し、染色体部分欠失変異体を作成した。芽生え以降の生存率が 80%となる、100 Gy-120 Gy 照射区から照射当代の両性花突然変異体 R025 が単離された。R025 の成熟花は、10 本の成熟した雄蕊(st)に加えて、5 本の花柱と 1 つの子房からなる成熟した雌蕊(g)をもっていた(図 1)。野生型雌雄の花では発達初期には雄蕊原基と雌蕊原基の両方が分化し、その後 2 つの発達段階で雌雄の差異が生じる。第 1 段階は領域決定期のステージ 5 で、雌の雌蕊領域(g)は、雄の雌蕊領域(g)より大きくなり、テーブル状になる。第 2 段階は器官伸長期のステージ 7 である。このとき、雌の雌蕊(g)には 5 つの筒状の心皮(c)が現れるが、雄の雌蕊(g)は棒状に抑制され、心皮構造は見られない。同じくステージ 7 で、雌の雄蕊(st)はステージ 6 のまま変化しないが、雄の雄蕊(st)は葯と花糸に分離し、その後ステージ 8 で伸長を開始する(図 1)。R025 の花は、発達初期においてすべての花原基をもっていた。ステージ 5 で R025 の花の雌蕊領域(g)は、雌に似て、大きなテーブル状となり、その後ステージ 7 において、5 つの心皮(c)を形成した。また R025 の雄蕊原基(st)は、ステージ 7 で雄と同様に葯と花糸に分離し、その後伸長して、正常な形態の花粉をつけた(図 1)。R025 の花では、葯における半葯の分化や、心皮における花柱の分化なども野生型と同時期に観察されており、本来抑制されるはずの性器官の発達により、他方の性器官の成熟が遅れることはなかった。



2) R025 の Y 染色体

R025 個体には当初、一部野生型雄花への枝変わりが見られたことから、R025 は Y 染色体を有すると考えられた。R025 の核型を AA+XY(A:常染色体)と仮定し、かけ合わせにより両性花化の原因となる変異の座乗染色体を解析した。R025(AA+XY)と野生型雌(AA+XX)の交配では、雌花個体と両性花個体が約 1:1 の割合で得られた。R025 どうしの自家交配では、得られた子孫の分離比は雌花:両性花が約 1:2 となった。これらの子孫分離比と、雄花の子孫が得られなかったことから、両性花の原因となる変異は Y 染色体上にあることが示唆された。さらにマーカー解析により、R025 は確かに Y 染色体特異的配列をもつことが確認された。

3) R025 の雌蕊発達

R025 はもともと雄であるが、領域決定期のステージ 5 において雌に似て大きな雌蕊領域を生じる。これには花器官領域の形成に関わる遺伝子 *SISTM1*、*SISTM2*(*SHOOT MERISTEMLESS*(*STM*)のホモログ)と *SICUC*(*CUP-SHAPED COTYLEDON*(*CUC*)1, *CUC2* のホモログ)が関与する可能性が考えられる。そこでステージ 5 以前の花芽において、*SISTM1*、*SISTM2*(*SISTM*)と *SICUC* の発現パターンを調べた。ステージ 2 のドーム状の花芽では、*SISTM* は花芽中央部(予定雌蕊領域)で発現し、*SICUC* は予定がく片領域とそれ以外の領域の境界で発現していた。ステージ 3 になると、雄の予定雌蕊領域で *SICUC* が検出され、同時に *SISTM* 発現が消失した。一方、ステージ 3 の R025 の予定雌蕊領域では *SICUC* は検出されず *SISTM* の発現が保たれた。雄と R025 において、雌蕊発達の有無は予定雌蕊領域での *SICUC* 発現の有無と一致していた。R025 のもつ雌蕊発達に関わる変異は、花形成カスケードで *SICUC* あるいはその上流に働いて *SISTM-SICUC* 遺伝子発現パターンを変化させることが示唆された。

2. 無性花突然変異体 K034 の性染色体と花発達

1) K034 の無性花と雌様花

純系 K 系統(柏市系統)から自然発生した突然変異体 K034 は、無性花と不完全な雌花(雌様花)をつけた。無性花は成熟した雄蕊と成熟した雌蕊のどちらももっておらず、雌様花は、通常 5 本あるはずの心

皮が1から3本に減少した不完全な雌蕊(g)をもっていた(図2)。K034の2種類の花の混在がキメラによるものである可能性を考え、K034の花つき分布を調べた。K034につくほとんどの花(90%)は無性花であり、残り(10%)は雌様花であった。この傾向は、挿し木個体やK034の子孫個体においても変

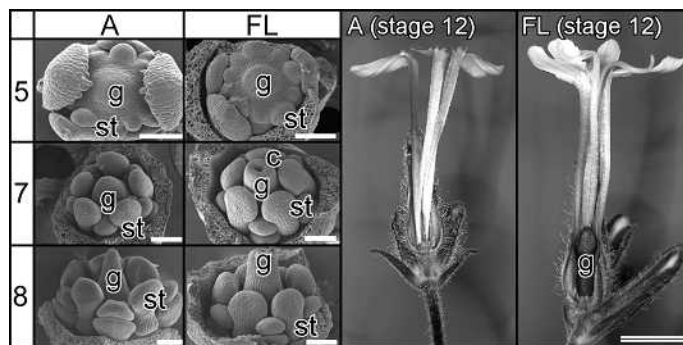


図2.K034の無性花と雌様花.数字はステージ. A:K034無性花. 雌蕊原基(g)と雄蕊原基(st)の両方が発達しない. FL:K034 雌様花. 1-3の心皮(c)をもつ雌蕊原基(g)が発達する.

わらなかったことからK034のキメラの可能性は除外された。

K034の2種類の花における形態異常

を走査型電子顕微鏡により観察した。K034の無性花と雌様花の雌蕊領域(g)は、領域決定期のステージ5において、どちらも雄に似て小ぶりだった。ステージ7には、無性花の雌蕊(g)は棒状に抑制され、雌様花の雌蕊(g)には1から3本の心皮(c)が出現した。K034の無性花と雌様花の雄蕊(st)は、雄の雄蕊と同様にステージ7で葯と花糸に分離したが、ステージ8において発育不全を起こした(図2)。ステージ10で、雌の雄蕊は退化するが、K034の花の雄蕊は退化することなくそのままの形を保った。

2) K034のY染色体

K034の花の形態異常が性染色体に因るものかどうか調べるため、Y染色体上のSTSマーカーを用いてK034におけるY染色体の有無を調べた。STSマーカー12個のうち7つの存在は確認されたため、K034はY染色体特異的な領域をもつことがわかった。しかしK034はY染色体p腕上の5つのSTSマーカーを欠失していた。ヒロハノマンテマのY染色体p腕上には、雌蕊抑制(GSF)領域と雄蕊促進(SPF)領域がある。欠失マーカー5つのうち4つはGSF領域にあり、1つ(ScQ14マーカー)はSPF領域にあるため、K034のY染色体はGSFとSPFという2つの領域の一部を欠失することがわかった。K034ではScQ14マーカーを含むSPF領域を欠失するため雄蕊伸長遺伝子が活性化せず無性花をつけると考えられる。また、GSF領域の一部を失ったために雌蕊伸長遺伝子が時折活性化する可能性がある。

3) K034の核型と子孫解析

K034のY染色体に注目しK034の核型と子孫解析を行った。K034には通常と同じ22対の常染色体に加えて、2本のX染色体と1本の、形態異常をもつY染色体(Y^d)が観察された。K034のY染色体(Y^d)はマーカー解析から予想されたp腕の大規模欠失に加えて、減数分裂時にX染色体と対合するPAR領域を失っている可能性が高いこともわかった。ヒロハノマンテマでは、XXY、XXX Y^d 個体がいずれも正常雄個体となるため(Westergaard 1940)、K034の花の形態異常の原因は、余分なX染色体ではなく、形態異常をもつ Y^d 染色体にあると考えられる。K034雌様花と野生型雄を掛け合わせると雄、雌、K034タイプ(無性花と雌様花)の子孫がそれぞれ12、14、6個体得られた。K034タイプの子孫6個体の核型はすべてK034と同様にXXY d であった。K034では、減数分裂時に大規模欠失をもつ Y^d ではなく、2本のX染色体が対合する可能性が高く、このためにK034の Y^d 染色体が後代に安定して伝わるのではないかと考えられる。

4) K034の雄蕊発達と雌蕊発達

K034の雌蕊と雄蕊はステージ7以降の器官伸長期に形態異常を起こす。器官伸長期に雄蕊と雌蕊が発達するメカニズムはABCクラス遺伝子が担っていると考えられる。そこで、雌蕊(g)と雄蕊(st)の器官形成に関わるSLM1(Cクラス遺伝子AGAMOUSホモログ)と、雄蕊(st)と花弁(p)の器官形成に関わるSLM2(Bクラス遺伝子PISTILLATAホモログ)の発現解析を行った。

K034の無性花と雌様花の雄蕊原基(st)では、ステージ7まで、SLM1とSLM2はともに発現していた。しかし、ステージ8になると、雄蕊原基(st)でのSLM1とSLM2の発現はともに消失した。野生型雄花の発

達する雄蕊(st)ではステージ 8 以降も *SLM1* と *SLM2* の発現が継続することから、ステージ 8 に K034 の無性花と雌様花の雄蕊が發育不全を起こすのは、雄蕊形成に必要な *SLM1* と *SLM2* の発現が消失するからであると考えられる。K034 の雄蕊發育に関わる変異は、花形成カスケードの ABC クラス遺伝子の上流に働き、雄蕊での *SLM1* と *SLM2* 発現を消失させ、その結果、K034 の雄蕊が發育不全を起こすものと考えられる。

一方、K034 の花の雌蕊原基(g)は、ステージ 7 において、心皮をもつもの(雌様花)と心皮をもたないもの(無性花)にわかれる。このとき *SLM2* はどちらの雌蕊原基(g)でも発現せず、*SLM1* はどちらの雌蕊原基(g)でも発現していた。そこで、ステージ 7 より前の K034 の花において、雌蕊領域形成に関わる *SISTM* と *SICUC* の発現解析を行った。K034 の花には、ステージ 3 の雌蕊領域で *SISTM* 発現が保たれるもの(14.3%)と *SICUC* が検出されるもの(85.7%)があり、中間型の発現パターンは観察されなかった。この割合は、K034 における雌様花の頻度(約 10%)とほぼ一致したことから、K034 で、*SISTM-SICUC* の発現パターンがその後の雌蕊抑制パターンと対応すると考えられた。K034 の雌蕊抑制に関する変異は *SICUC* と *SISTM* の上流で働いており、その変異によりステージ 3 の花芽における *SISTM-SICUC* の発現パターンが一定の割合で切り替わる。その結果、K034 の雌蕊抑制が約 10%の割合で解除されて雌様花となると考えられる。

結論

雌雄異株植物ヒロハノマンテマの両性花変異体(R025)と無性花変異体(K034)を用いて、形態的解析により性染色体上の性決定因子と花の形態異常との関係を明らかにし、それに関わる分子メカニズムの一端を遺伝子発現解析により明らかにした。K034 の雄蕊促進(SPF)に関する変異は、Y 染色体上の ScQ14 マーカー近傍にあり、*SLM1* と *SLM2* あるいはその上流の遺伝子に働きかけ、ステージ 8 の花芽において、雄蕊形成に必要な *SLM1* と *SLM2* の雄蕊原基での発現を消失させる。その結果、K034 の雄蕊は發育不全を起こすと考えられる。

R025 はもともと雄だが両性花をつけるため、雌蕊抑制(GSF)に関する変異をもつと考えられる。R025 の雌蕊領域は、領域決定期のステージ 5 の花芽において、雌と同様に大きくなり、その後、雌がもつような 5 つの心皮を形成する。そのため、R025 の雌蕊抑制に関する変異は、雌蕊抑制を完全に解除するものだと考えられる。一方、K034 もまた、もともと雄だが時折不完全な雌花をつけるため、雌蕊抑制(GSF)に関する変異をもつと考えられる。K034 の雌蕊領域は雄に似て小さいが、その後、約 10%の割合で小さな雌蕊領域に心皮が形成され、雌様花となる。K034 の雌蕊抑制に関する変異は、一部の花において限定的に雌蕊抑制を解除するため、R025 の雌蕊抑制に関する変異とは異なる性質のものである可能性がある。しかしながら、R025 と K034 の雌蕊抑制に関する変異は、どちらも Y 染色体上にある可能性が高く、*SICUC* あるいはその上流の遺伝子に働きかけて、ステージ 3 の花芽において、*SISTM* と *SICUC* の遺伝子発現パターンを変化させる。その結果、R025 や K034 における雌蕊の形態変化が起こると考えられる。

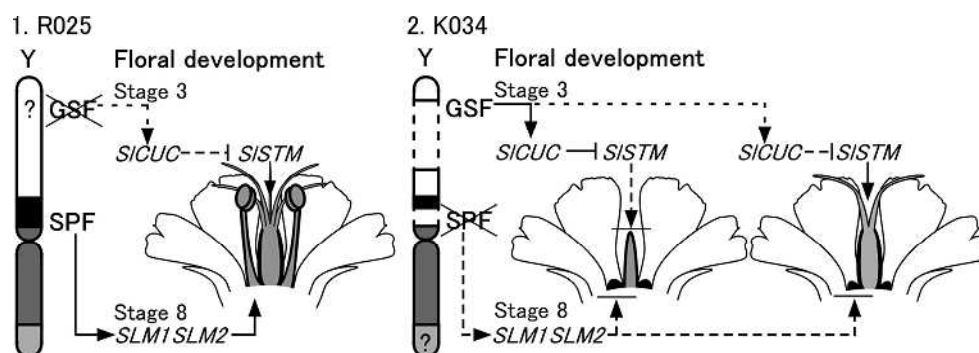


図 3. R025 と K034 の性染色体と花發育. R025 は Y 染色体上の雌蕊抑制因子 GSF に変異をもつため、ステージ 3 の雌蕊での *SISTM* 発現が保たれて、成熟雌蕊をもつ両性花となる。K034 は Y 染色体上の雄蕊促進因子 SPF を欠くため、雄蕊形成に必要な *SLM1* と *SLM2* の雄蕊原基での発現が消失し、雄蕊が伸長しない無性花となる。K034 は GSF 領域の一部も欠失するため、雌蕊の發育抑制が一部解除され、不完全な雌蕊ができる。