

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on new Y chromosome-specific STS markers in the dioecious plant *Silene latifolia* and a novel *Microbotryum violaceum* mutant causing a petal-less flower (雌雄異株植物ヒロハノマンテマの STS マーカー開発と新規黒穂菌変異体の作出)

氏 名 藤田 尚子

序論

ナデシコ科ヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) は、雌雄異株植物で、雄花 (♂) と雌花 (♀) に分かっている。雄花には 10 本の雄蕊がつき、雌蕊は抑制される。雌花には 5 本の雌蕊と子房がつき、雄蕊は抑制される。ヒロハノマンテマの雌雄性は、植物ホルモンや他の環境要因に影響されず、XY 型の性染色体によって遺伝的に決定される。Y 染色体には少なくとも 3 つの雄性決定機能因子 (雌蕊抑制、雄蕊促進、雄性稔性) が存在するとされ、雄株 (XY) では、Y 染色体上のこれらの雄性機能によって雄蕊が促進され、雌蕊が抑制されると考えられている。Y 染色体有無による雄蕊と雌蕊の促進・抑制メカニズムは花の性的二形性を考える上で重要な鍵となっている。

Y 染色体がなくともヒロハノマンテマの雌花に雄蕊がつく現象がある。黒穂菌 (*Microbotryum violaceum*) の感染である。雌花 (XX) には雄蕊がないが、黒穂菌が感染すると雄花のように雄蕊を伸長させる。黒穂菌が感染すると花粉の代わりに大量の黒色の黒穂胞子をつけるが、雌 (♀) に感染したときも雄蕊 (♂) を促進させ、雄花に感染したときと同じように葯に黒穂胞子をつくる。

本研究では、宿主植物の Y 染色体による雄蕊形成と、Y 染色体によらない黒穂菌感染による雄蕊形成の 2 つに注目し、花の二形性研究における雄蕊促進メカニズムの解明に新たな進展を目指した。

結果と考察

1. Y 染色体特異的 STS マーカーの開発

1) PAR 近傍 Y 染色体特異的マーカー : Y202

ヒロハノマンテマの XY 性染色体は進化的に若く、その痕跡は組換え領域と非組換え領域 (= 偽常染色体領域 (PAR: Pseudo Autosomal Region)) の相同性にみることができる。PAR 近傍に位置する *SIX1/Y1* 遺伝子は 97% の相同性をもつ (Delichere et al. 1999, Filatov et al. 2000)。性染色体は常染色体 → 原始 XY → XY 染色体へと進化したと考えられており (Charlesworth et al. 2005)、組換え領域である PAR と XY 染色体の非組換え領域の境界は、XY 性染色体の進化を考える上で重要である。

ヒロハノマンテマの PAR 全域には染色体末端サテライト DNA, X43.1 (Buzek et al. 1997) が散在し、*S1Y1* 付近にも孤島状に X43.1 の繰返し配列断片が存在することをみつけた。X43.1 の配列断片は X 染色体側 (*S1X1* 近傍) にはなく、*S1Y1* (Y 染色体

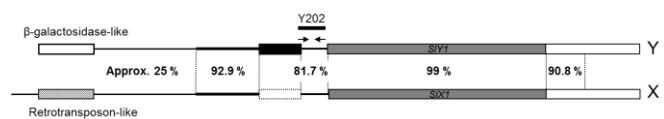


図 1 *S1X1*(X 染色体) と *S1Y1* (Y 染色体) 周辺配列模式図
S1Y1 近くには染色体末端サテライト DNA 断片 (黒四角) が存在するが、*S1X1* 側にはない (点線四角)。

側) 近傍のみに存在する (図 1)。この違いから新規 PAR 近傍 Y 染色体特異的 STS マーカー (Y202) を設計した。Y202 付近の配列には XY 間 25%の相同性しかない領域もあり、PAR と非組換え領域の境界はモザイク状の相同性で構成されることが示唆された。

2) SSR を利用した新規 Y 染色体特異的マーカー : SmicSy1-6

ヒロハノマンテマの XY 性染色体には多数のマイクロサテライトが含まれることが、FISH 解析により推測されている (Kubat et al. 2008; Kejnovsky et al. 2009)。しかし、ショットガンゲノミックライブラリーから算出されたマイクロサテライトはわずか 1.4%にすぎない。マイクロサテライト配列をプローブした FISH 解析では Y 染色体に強いシグナルが検出される。このことからヒロハノマンテマの Y 染色体には短い単純反復配列 (SSR, Simple Sequence Repeat) が多数含まれることが考えられた。そこで複合 SSR マーカー (Lian et al. 2001; 2006) を応用し、ヒロハノマンテマの SSR マーカー開発に取り組んだ。20 種の複合 SSR プライマーを使い、578 個の SSR マーカーを設計し、シングルまたはダブルバンドを増幅するマーカーを SmicS (STS marker in combination with SSR primer) とし、そのうち雄特異的に増幅される新規 Y 染色体 STS マーカーを 6 つ、SmicSy1-6 (STS marker in combination with SSR primer y chromosome-specific) を獲得した。これら新規マーカーと既知 Y 染色体マーカーを用いて、Y 染色体欠失変異体の欠失マップを作成した。得られた SmicSy1-6 のうち、SmicSy6 は雄蕊促進機能 (SPF: Stamen promoting Factor) に位置する。さらに、SmicSy6 はこれまで SPF 最近傍マーカーとされてきた ScQ14 (Zhang et al. 1998) と SPF を挟んで反対側に位置し、これにより SPF を挟み込むことに成功した。

重イオンビーム照射により作出した雄蕊不全個体は ESS (Early stage Stamen Suppressed mutant) と ISS (Intermediate stage Stamen Suppressed mutant) に分けることができる。今まで報告された雄蕊不全個体は全て ScQ14 が欠けていたが、本研究では ESS と ISS の ScQ14 および SmicSy6 の欠失パターンは明らかに異なる。雄蕊促進機能は少なくとも 2 つ以上存在することがわかった。両性花変異体では完全両性花 (図 2 e) と不完全両性花 (図 2 b-d) に分けられる。不完全両性花における雄蕊・雌蕊の発達レベルは Y 欠失サイズに比例し、Y 欠失サイズが大きいほど雌様の花をつけた。このことから Y 染色体上には花形成に関わる遺伝子が多数存在し、さらに雄蕊と雌蕊の発達には “トレードオフ” があると考えられた。

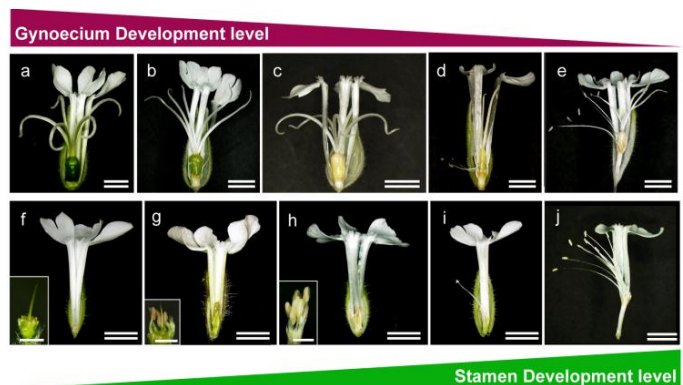


図 2 Y 染色体欠失変異体の雄蕊・雌蕊発達レベル

野生型雌花 (a)、両性花変異体 (b-e)、雄蕊発達不全変異体 (f-i)、野生型雄花 (j)。両性花変異体 (GP: Gynoecium Promoted mutant) は不完全両性花 (GP1-3, b-d) と完全両性花 (GP4, e) にわけられる。不完全両性花では雄蕊と雌蕊発達レベルが反比例する。雄蕊発達不全変異体は、雄蕊の発達レベルにより、無性花 (ESS1, f) ESS: Early stage Stamen Suppressed mutant)、雄蕊不全変異体 (ISS1-3, g-h) (ISS: Intermediate stage Stamen Suppressed mutant)、雄性不稔変異体 (LSS: Late stage Stamen Suppressed mutant) に分けられる。ESS と ISS は Y 染色体の雄蕊促進領域の欠失パターンも違い、雄蕊促進機能は少なくとも初期雄蕊促進と中期雄蕊促進機能の 2 つ以上あることがわかる。Bar = 3mm、Double bar = 1cm

2. 新規黒穂菌変異体の作出

1) 黒穂菌の宿主特異性

黒穂菌 (*M. violaceum*) はナデシコ科を宿主とする植物共生菌である。宿主特異性が高く、同じナデシコ科マンテマ属 (例えば *S. latifolia*, *S. vulgaris*, *S. paradoxa*) のなかでも、宿主の種が異なると感染率は著しく低下する (Sloan et al. 2008)。本研究ではさらに、同じ *S. latifolia* 種内でもエコタイ

プによって感染率が異なることを明らかにした。ヒロハノマンテマ U-line (Uchida et al. 2003) では感染率 100%の黒穂菌を、4つの異なるエコタイプに感染させ、それぞれの感染率を調べた。過酷な環境下におかれるほど菌に変異が起こりやすい。感染率 0%の K-line と H2005-1-9 に繰返し黒穂菌を接種したところ、H2005-1-9 の一株 (H2005-1-9(11)) に花の奇形症状がみられた。

2) 花弁完全抑制花 (PETAL-LESS FLOWER)

H2005-1-9(11)の奇形花、花弁完全抑制花は、花弁が無く、黒い胞子をつけた葯だけの花弁完全抑制花である (図 3 C)。正常な雄花には葯に黄色の花粉がつき、黒穂菌に感染した雄花は花粉に代えて黒色の黒穂胞子がつく。花弁完全抑制花を走査型電子顕微鏡で観察すると、肉眼では見えないが、抑制された花弁が観察できた (図 3 D)。また、花弁内側に位置する後熟雄蕊は雌蕊側に位置する先熟雄蕊より小さく、花弁とあわせて後熟雄蕊も抑制されていることがわかった。

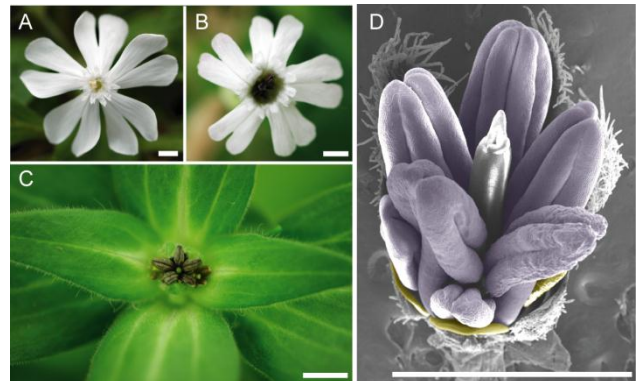


図 3 黒穂菌変異体 Mv537 感染による花弁完全抑制花

正常雄花 (A)、WT 黒穂菌感染雄花 (B)、花弁完全抑制花 (C) 葯だけがつき花弁が抑制されている、花弁完全抑制花の走査型電子顕微鏡像 (D) 抑制された花弁が観察できる。Bar= 5 mm

3) 新規黒穂菌突然変異体 Mv537

花弁完全抑制花をつけた H2005-1-9(11)には半年後に、異なる花弁抑制レベルの花と、正常な雄花もつけた。正常雄花には花粉も形成され、この花粉を正常雌花に受粉させたところ、F1 全てが正常な花をつけた。また、花の奇形症状を引き起こすことで知られるファイトプラズマ有無を PCR で調べたが、ファイトプラズマは検出されなかった。このことから花弁完全抑制花は宿主植物ヒロハノマンテマの変異によるものではなく、黒穂菌の変異によることである可能性が高いことが示唆された。花弁完全抑制花から黒穂菌を単離し (Mv537)、4つのエコタイプのヒロハノマンテマに感染させた。その結果、全てのエコタイプで花の奇形がみられたことから Mv537 は新規黒穂菌変異体であることが確認できた (表 1)。

表 1 野生型と変異体 Mv537 感染における症状の頻度

エコタイプ	WT			Mv537					
	非感染 (%)	正常感染 (%)	奇形症状 (%)	非感染 (%)	正常感染 (%)	奇形症状 (%)			
						Bud	Not-S	M-S	S-S
K-line	6 (100)	0 (0)	0 (0)	9 (81.8)	0 (0)	1 (9.1)	0 (0)	1 (9.1)	0 (0)
H2005-1-9	6 (85.7)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Japan	5 (71.4)	2 (28.6)	0 (0)	5 (23.8)	3 (14.3)	7 (33.3)	4 (19.0)	1 (4.8)	1 (4.8)
Germany	3 (42.9)	4 (57.1)	0 (0)	3 (20.0)	1 (6.7)	6 (40.0)	3 (20.0)	1 (6.7)	1 (6.7)

4) 黒穂菌の病原性ステージ

M. violaceum は最も宿主植物と密接に共進化した植物病原菌の 1つである。複雑な花芽器官のなかから雄蕊原基を探り当て、さらには花粉形成タイミングに合わせて黒穂胞子をつくる。ヒロハノマンテマのメスには雄蕊促進機能はないにも関わらず雄蕊を促進させることから、黒穂菌は雄蕊促進機

能にも作用していることがわかる。ヒロハノマンテマの花芽形成過程は 12 ステージに分けることができる (Grant et al. 1994)。黒穂菌感染によるヒロハノマンテマへの作用は、正確なタイミングで起こる。1) ステージ 5 で雄蕊促進、2) ステージ 11 で雌蕊抑制、3) ステージ 11-12 で黒穂胞子の形成 (Uchida et al. 2003)。Mv537 はこれらの病原性に変異が生じたため花弁抑制症状を引き起こしたと考えられる。Mv537 感染花は花芽発達ステージ 10 で生長抑制される。ステージ 10 の正常雌花と WT 黒穂菌感染花は子房中央あたりまで花弁が伸長するが、この時点で Mv537 感染花では花弁は抑制され、後熟雄蕊も花弁とともに抑制される。Mv537 感染による花芽メリステムの攪乱は、ステージ 10 で孢子形成することから孢子形成のミスタイミングに因る。または、その後の花芽生長が抑制されることから、過剰抑制によるものだと考えられる。

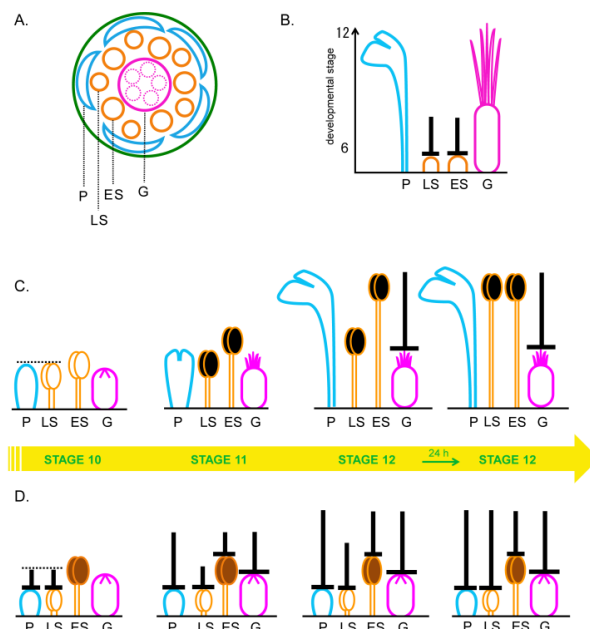


図4 黒穂菌感染による花芽の促進・抑制モデル図

雌花の断面図 (A)、正常な雌花の雄蕊と雌蕊の促進・抑制 (B)、WT 黒穂菌感染雌花の各花芽器官 ステージ 10~12 (C)、Mv537 感染雌花の各花芽器官 ステージ 10~12 (D)。P = Petal (花弁)、LS = Late developing Stamen (後熟雄蕊)、ES = Early developing Stamen (先熟雄蕊)、G = Gynoecium (雌蕊)

結論

本研究ではヒロハノマンテマの Y 染色体解析と黒穂菌感染による Y 染色体以外の雄蕊促進現象について、以下のことを明らかにした。

- 1) PAR 近傍遺伝子 *SIY1* 付近に染色体末端サテライト DNA 断片が存在することを見出し、この領域の XY 間の違いから新規 PAR 近傍 Y 染色体特異的 STS マーカー Y202 を開発した。
- 2) Y 染色体には単純反復配列が散在することを利用し、新規 Y マーカーを 6 つ (SmicSy1-6) を開発した。SmicSy6 は雄蕊促進機能近傍マーカーであり、雄性決定機能領域の特定に寄与した。
- 3) 新規黒穂菌突然変異体 Mv537 を単離し、ヒロハノマンテマにおける Mv537 感染症状を観察した。Mv537 は、病原性に変異が生じたと考えられ、花芽ステージ 10 で顕著な花芽メリステムの攪乱がみられる。
- 4) 新規 Y マーカーと黒穂菌変異体 Mv537 は花の性的二形性研究の有用なツールである。

発表論文

Fujita, N., Ishii, K., and Kawano, S. An STS marker, Y202, located on the *Silene latifolia* Y chromosome between the chromosome distal-end satellite DNA and *SIY1*. *Cytologia* 73 (2): 159-165, 2008

Fujita, N., Aonuma, W., Shimizu, Y., and Kawano S. Plant sex change with biotrophic fungus revealed by the advanced light and SEM combining microscopy. *Acad. J. Sci. in press*

Fujita, N., Torii, C., Ishii, K., Aonuma, W., Shimizu, Y., Kazama, Y., Abe, T., and Kawano, S. Narrowing down the mapping of plant sex-determination regions using new Y chromosome specific-markers and heavy-ion beam irradiation-induced Y deletion mutants in *Silene latifolia*. G3. *in revision*

Fujita, N., Aonuma, W., Shimizu, Y., Yamanaka, K., Hirata, A., Hood, M.E., and Kawano, S. A petal-less flower caused by a *Microbotryum violaceum* mutant. *Int. J. Plant Sci. in submission*