

論文の内容の要旨

Studies on morphogenesis of floral organ of the dioecious *Silene latifolia* and the smut fungus *Microbotryum lychnidis-dioicae* disturbing it

(雌雄異株植物ヒロハノマンテマの花器官の形態形成とそれを攪乱する黒穂菌に関する研究)

川元 寛章

序論

Silene 属には、1 つの花の中に雄蕊と雌蕊をもつ両性花を咲かせる雌雄同株、雌花と両性花を異なる株に咲かせる雌性両全性異株、ヒロハノマンテマのように雄花と雌花を異なる株に咲かせる雌雄異株が存在する。雌雄異株のような単一の性をもつ単性花の発生については、Diggle らによって 2 つのパターンに分けられている(図 1; Diggle et al., 2011)。ひとつは、初めから片方の原基のみが形成される。もうひとつは、最初は雄蕊と雌蕊になる器官の両方をもつため両性的な形態を示すが、発達の過程で、雌花では雄蕊の発達が抑制され、雄花では雌蕊の発達が抑制されることで単性花となる。この 2 つのパターンが生じるのは、器官の発達が抑制されるタイミングに原因があると思われる。また、雄蕊と雌蕊が抑制されるタイミングは種によって異なる。これらの雄花と雌花の形成に関わる抑制には、器官で特異的な細胞周期の停止、あるいは器官で特異的な細胞死のどちらか片方が関与していると考えられている。

雌雄異株植物ヒロハノマンテマの Y 染色体上には、雄蕊の発達を促進する遺伝子の存在が予想されている。この雄蕊の発達を促進する遺伝子は Y 染色体のみに存在しているので、X 染色体しかもたない雌花には雄蕊を伸長させる能力はないが、黒穂菌が雌花に感染すると、雌花でも雄蕊が発達して雄花ようになる(Uchida et al., 2003)。黒穂菌が感染することで、雌花で雄蕊が作られることから、黒穂菌が Y 染色体の代わりにしていると考えられる。本研究では、ヒロハノマンテマの雄花と雌花がどのようにして形成されるか、黒穂菌がヒロハノマンテマをどのように性転換しているのかを研究した。

結果と考察

1. 雄蕊と雌蕊における細胞周期の停止と細胞死

雌雄異株植物ヒロハノマンテマの単性花の形成には、細胞周期の停止や細胞死の関与が考えられる。また、黒穂菌が引き起こす雌花から雄花への性転換がどのように起きているかを調べた。細胞周期の進行はサイクリンとヒストンをプローブとした二重染色 *in situ* hybridization で検出した。また、細胞死の検出には TUNEL アッセイを用いた。ヒロハノマンテマの雌花の雄蕊と雄花の雌蕊では、その原基で細胞周期の停止と細胞死の両方が起きていることが明らかになった。ヒロハノマンテマの雌花は、黒穂菌が感染することで、雄蕊が発達する。黒穂菌が感染した雌花では、雄蕊の細胞周期は進行し細胞死も起こらなくなることを明らかにした。

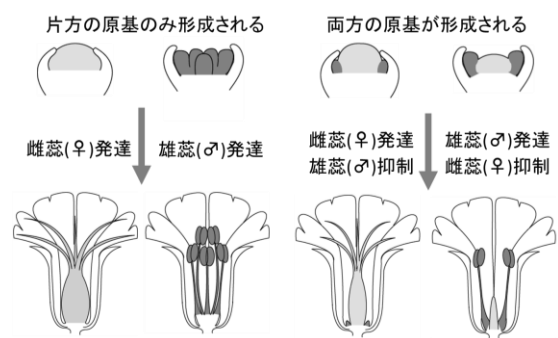


図 1. 単性花の形成過程による分類 片方の原基しかないものと、両方の原基をもつものに分類されている。

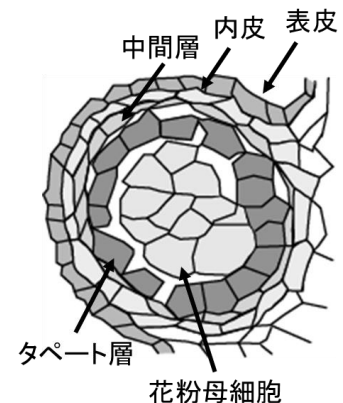


図 2. ヒロハノマンテマのステージ V における葯室内の模式図

黒穂菌が感染したヒロハノマンテマの葯内の動態を理解するために、シロイヌナズナで定義された発達段階 (Sandes et al., 1999) をもとに葯の発達段階を定義した。ステージ I では、花芽原基から生じた雄蕊原基の内部で細胞層が L1、L2、L3 の 3 層に分かれる。ステージ II からステージ IV で葯室内が発達していき、ステージ V で 4 つの葯室が完成する。完成した葯室の中には、表皮、内皮、中間層、タペート細胞の 4 層が、花粉を形成する花粉母細胞を包み込むようにして形作られている (図 2)。

ステージ VI からステージ VII では花粉母細胞が減数分裂後、花粉四分子を形成する。また、タペート細胞では液胞の肥大化が観察される。ステージ VIII からステージ XI では、花粉四分子を覆うカロース膜が消失し、花粉四分子は小孢子となって放出される。タペート細胞がスプロポレニンを分泌することで、小孢子に花粉壁が形成される。ステージ XII で、花粉壁が完成し、花粉内部の有糸分裂が終わると、ステージ XIII で葯の口辺細胞が裂開する。口辺細胞が裂開することにより、ステージ XIV で花粉が放出される。花粉が正常に発達するには、タペート細胞から栄養分や花粉壁を構成する成分を供給する必要がある。タペート細胞はプログラム細胞死を起こし崩壊するが、ここでは、細胞質の縮小、DNA の断片化、液胞の破裂、小胞体の膨張などが見られる (図 3; Papin et al., 1999)。

黒穂菌が感染したヒロハノマンテマの雄花では、通常より早いステージ VI でタペート細胞が崩壊していた。ステージ VII では、減数分裂する前に花粉母細胞も崩壊していた。ステージ VIII になると、タペート細胞のあった外側にある中間層、内皮も崩壊し、葯には花粉の代わりに黒穂孢子が形成された。TUNEL アッセイにより細胞死を検出した結果、花粉母細胞、中間層、内皮ではネクロシス様の TUNEL ネガティブな細胞死が起きていた。花粉母細胞は細胞壁が薄いため、細胞質の溶出をとまう崩壊を起こしていた。中間層や内皮では、細胞壁が厚いため細胞質は溶出せず細胞が縮退していた。タペート細胞でのみ正常な雄花と同様に TUNEL ポジティブな細胞死が検出されたが、細胞壁が薄いため細胞壁の崩壊や核質の溶出をとまう細胞死が起きていた (図 4)。

2. 無性花変異体の黒穂菌感染実験

ヒロハノマンテマの雄花においては雌蕊の発達が抑制され、雌花では雄蕊の発達が抑制される。黒穂菌は、ヒロハノマンテマの雌花に感染したとき、雄蕊の発達を促進する。雌雄の単性花で、雄蕊と雌蕊の発達の抑制がそれぞれ同じ機構で働いているのならば、雄蕊の発達抑制が黒穂菌の感染により解除される時、同時に雌蕊の発達抑制も解除されると考えられる。両性花を咲かせる雌雄同株からの雌雄異株への成立には、劣性の雄性不稔変異、優性の雌性不稔変異の少なくとも 2 回の変異が起きており、Y 染色体上には、雄蕊を促進する機能 (SPF) と雌蕊を抑制する機能 (GSF) が存在する (Charlesworth 2013)。γ 線や重イオンビームを照射し、Y 染色体上にある SPF を欠損させることで、雄蕊も雌蕊ももたない萼と花弁だけの無性花変異体を単離することができる。黒穂菌を感染させるには双葉の段階で菌を接種するの

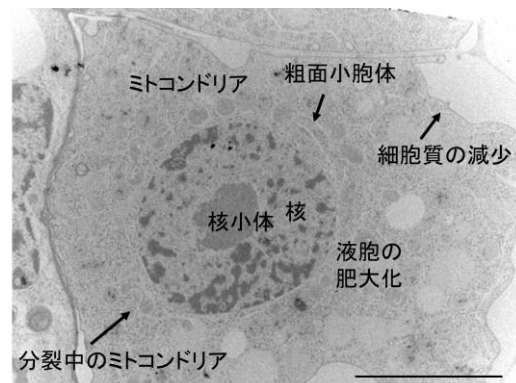


図 3. 正常な雄花のステージ VI のタペート細胞
花粉の発達にはタペート細胞が栄養分や花粉壁を構成する成分を供給する必要がある。Bar = 5 nm

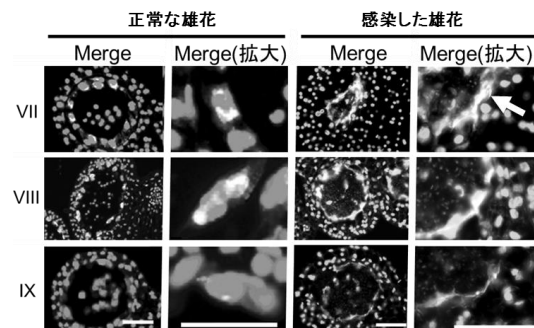


図 4. TUNEL アッセイによる細胞死の検出 正常な雄花とは異なり、感染した雄花ではシグナルが液状に広がっている 矢印: 液状に広がった TUNEL シグナル
Bars = 50 μm

が最も効率的である。そこで、無性花変異体(XY^d)に稀に咲く花柱を2本しかもたない雌様花とWTの雄花(XY)を掛け合わせ後代を作出し、得られた後代に黒穂菌を接種しPCRにより黒穂菌に感染したヒロハノマンテマの中から無性花変異体を選抜した。選抜の結果、189個体中、黒穂菌が感染した個体は雄花が54個体、雌花が48個体、無性花変異体が5個体得られた。黒穂菌が感染した無性花変異体の雄蕊は、雄花と同様に発達していることがわかった(図5)。黒穂菌が感染した無性花変異体の雌蕊は、雄花と同様に抑制されたままであった。雄蕊の発達の抑制は黒穂菌によって解除されるが、雌蕊の発達抑制は解除されないことが明らかになった。黒穂菌が感染することで形成された葯の内部がどのように分化するか調べた。黒穂菌が感染した雌花の葯では、胞源細胞から細胞が分化していなかった(図6 e, f)。黒穂菌が感染した無性花変異体の葯ではタペート細胞に異常が生じていた(図6 g, h)。雌花の葯は分化していなかったことから、葯の組織が分化するのに必須な遺伝子はY染色体上に存在し、無性花変異体の葯でタペート細胞が正常に発達しなかったことから、SPF領域の近傍にはタペート細胞の分化に関与する遺

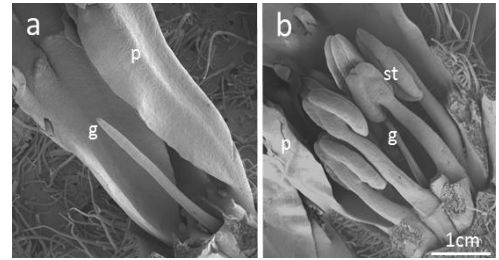


図5. SPFを欠失した無性花変異体に黒穂菌を感染させた際の変化 黒穂菌の感染により無性花変異体で雄蕊の発達が見られた。(a) 無性花変異体、(b) 黒穂菌が感染した無性花変異体 g: 抑制された雌蕊, st: 雄蕊, p: 花弁

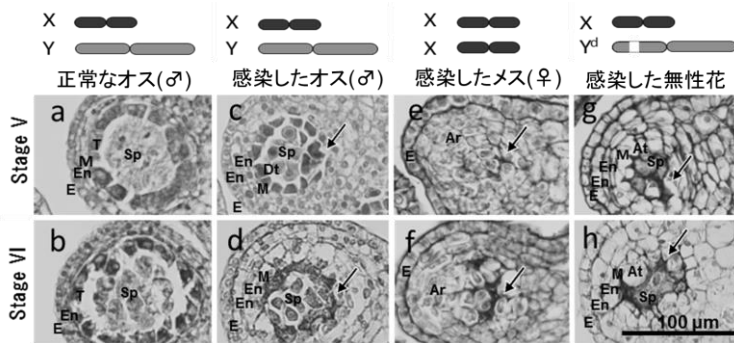


図6. 黒穂菌が作り出した葯の内部の発達段階 雌花はY染色体をもたないため、雌花の葯では分化が起こらないと考えられる。また、無性花変異体でタペート組織に異常が観察されたことから、SPF領域の近傍にタペート組織の分化に関与する遺伝子が存在する。(a, b) 野生型雄花, (c, d) 黒穂菌が感染した雄花, (e, f) 感染した雌花, (g, h) 黒穂菌が感染した無性花 Ar: 胞源細胞, Sp: 胞子形成細胞, E: 表皮, En: 内皮, M: 中間層, T: タペート組織, Dt: 発達が遅れているタペート組織, At: 異常なタペート組織, 矢印: 黒穂菌

伝子が存在することが示唆される。

3. 黒穂菌の感染実態と葯内電顕 3D

黒穂菌がヒロハノマンテマに感染すると、雄蕊の葯に花粉ではなく、黒穂菌の胞子が形成される。黒穂菌の胞子は、訪花昆虫により媒介される。しかし、黒穂菌がどのようにいつ葯へ侵入するかは明らかになっていない。黒穂菌が初めから葯に分化する領域に存在しているのか、それとも雄蕊が分化してから葯へと侵入しているのか明らかにするために、黒穂菌が感染した雄花の花糸において、レクチン染色を実施した。花糸が形成されている花の発達段階のステージ8から12までのすべてにおいて、花糸に菌糸が観察された。このことから、黒穂菌は花糸が形成される前に、すでに葯へ侵入していると考えられる。そこで、パラフィンを用いた組織切片と菌を特異的に染色するグロコット染色を用いて、葯が形成されて間もない花の発達ステージ7(葯の発達ステージ III)の葯で黒穂菌の菌糸が観察されるか調べた。その結果、下部の組織と接着している領域(将来、花糸と接着する領域)で、黒穂菌の菌糸が観察された(図7)。このことから、花の発達段階のス

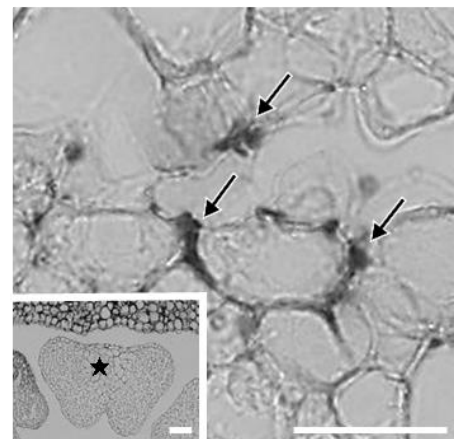


図7. 黒穂菌が葯に侵入する時期の特定 黒穂菌は花の発達ステージ7(葯の発達ステージ III)には葯に侵入している。星印: 観察した領域, Bars = 50 μm

その結果、下部の組織と接着している領域(将来、花糸と接着する領域)で、黒穂菌の菌糸が観察された(図7)。このことから、花の発達段階のス

ステージ7(葯の発達ステージ III)には、葯に黒穂菌が侵入しており、後期のステージでも菌糸が花糸を通して葯へと侵入していると考えられる。

葯の内部を継時的に観察した結果、花粉母細胞は減数分裂が起こる時期になると、黒穂菌は急激に増殖するとともにタペート細胞が急激に崩壊し、その後に花粉母細胞も崩壊していることが明らかになっている。

そこで、電顕 3D により葯の組織と黒穂菌の存在する位置の関係をより明確にすることにした。黒穂菌は、細胞と細胞の間に存在することがわかった(図 8)。黒穂菌はタペート細胞と中間層の間に存在するものと(図 8 a)、表皮と内皮の間に存在するものでは形態が異なっていた(図 8 b)。黒穂菌の感染により、内皮でもネクロシス様の細胞死を起こしていたが、細胞壁が厚いため細胞質の溶出は見られなかった。

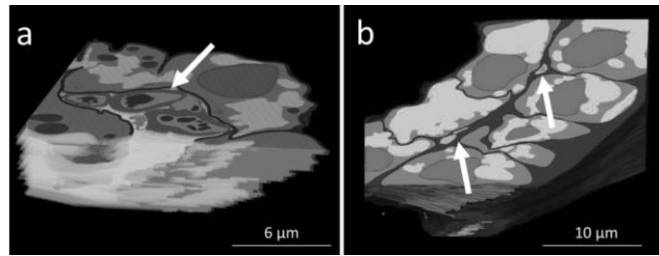


図 8. 電顕 3D を用いて観察した葯に侵入した黒穂菌の菌糸 a、中間層とタペート層の間に存在する黒穂菌の菌糸 b、表皮と内皮に存在する黒穂菌の菌糸 矢印: 黒穂菌の菌糸

結論

1. ヒロハノマンテマの雄蕊と雌蕊の抑制には細胞周期の停止と細胞死の両方が関与しており、黒穂菌が感染すると雌花でのみ、雄蕊の細胞周期は進行し細胞死も起こらなくなることを明らかにした。
2. 黒穂菌の感染により、内皮や中間層、花粉母細胞ではネクロシス様の TUNEL ネガティブな細胞死が起きていた。内皮と中間層は細胞質の溶出は見られないが、花粉母細胞は細胞壁が薄いため、細胞質の溶出をともなう崩壊を起こしていた。タペート細胞でのみ、正常な雄花と同様に TUNEL ポジティブな細胞死が検出されたが、細胞壁の崩壊や核質の溶出をともなう細胞死が起きていた。
3. 雄蕊と雌蕊をもたない無性花変異体に黒穂菌が感染すると、雄蕊のみ発達することが明らかになった。黒穂菌の感染によって無性花変異体でできた葯はタペート細胞の形成に異常が起こり、黒穂菌が感染した雌花でできた葯では黒穂胞子が形成されるときも未分化な細胞である胞源細胞の状態であった。
4. 花の発達段階のステージ 7(葯の発達ステージ III)には、葯に黒穂菌が侵入しており、後からも菌糸が花糸を通して葯へと侵入していると考えられる。葯に侵入した黒穂菌は、細胞と細胞の間に存在していることがわかった。黒穂菌はタペート細胞と中間層の間に存在するものと、表皮と内皮の間に存在するものでは形態が異なっていた。

発表論文

Kawamoto, H., Yamanaka, K., Ishii, K., Kazama, Y., Abe, T., Kawano, S.: An asexual flower of *Silene latifolia* and *Microbotryum lychnidis-dioicae* promoting its sexual-organ development. (in revision).

Kawamoto, H., Yamanaka, K., Koizumi, A., Hirata, A., Kawano, S.: Cell death and cell cycle arrest of *Silene latifolia* stamens and pistils after *Microbotryum lychnidis-dioicae* infection. *Plant Cell Physiol* DOI: 10.1093/pcp/pcw193(2016)

Kawamoto, H., Suzuki, R., Ugaki, M., Kawano, S.: Location of gold particles and puncture of tobacco leaf epidermis by particle bombardment. *Cytologia* 481(4):455-458 (2016)

Kazama, Y., Ishii, K., Aonuma, W., Ikeda, T., Kawamoto, H., Koizumi, A., Filatov, D. A., Chibalina, M., Bergero, R., Charlesworth, D., Abe, T., and Kawano, S.: A new physical mapping approach refines the sex-determining gene positions on the *Silene latifolia* Y-chromosome. *Sci. Rep.* 6, 18917 (2016)