

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

Studies on dioecism of hermaphrodite mutants and B-class genes *SIAP3X/Y* deletion mutants in the dioecious plant *Silene latifolia*

(雌雄異株植物ヒロハノマンテマにおける両性花変異体と B クラス遺伝子 *SIAP3X/Y* 欠失変異体の雌雄異株性に関する研究)

氏 名 青 沼 航

## 序論

雌雄異株植物は、雄花のみを咲かせる雄株と雌花のみを咲かせる雌株に分かれている植物で、身近なところではハウレンソウ、アスパラガス、ホップなどの農作物がある。ナデシコ科マンテマ属の雌雄異株植物ヒロハノマンテマ(*Silene latifolia*)は、両性花から雌性両全性異株を経て雌雄異株へ進化したと考えられている。マンテマ属の中では複数回独立した雌雄異株への進化が見られることから、植物にとって雌雄異株性の獲得は比較的ありふれた事象なのだろう。

植物のほとんどは両性花を咲かせる雌雄同株植物で、両性花は自家受粉を忌避するために雌蕊と雄蕊を離れた位置に配置したり (雌雄離熟)、異なる時期に成熟したり (雌雄異熟)、さらには花粉の自家不和合性を発達させたりしている。全てが他家受粉となる雌雄異株植物には自家受粉の忌避装置は必要ないが、今度は誰とも受粉できない危険があるので雌雄の開花を同調させることなどが必要となる (開花同調性)。雌雄異株植物の多くは雌雄性を維持するために異形化した性染色体をもっているが、これらは 1 組の常染色体に組換え抑制が起こり、その領域の異形化が進んでお互いに組換えることのない性染色体に進化したと考えられている。XY 型の性染色体の場合、雄(XY)と雌(XX)で染色体構成が変わってしまうため、X 染色体は遺伝子の発現量を雌雄間で一定に調節する必要がある (遺伝子量補償)。

本研究では、ヒロハノマンテマの両性花変異体と *SIAP3X/Y* 欠失変異体を用いて、植物の開花同調性の意味や雌雄異株性の維持に必要な性染色体の遺伝子量補償を独自の系で解析した。

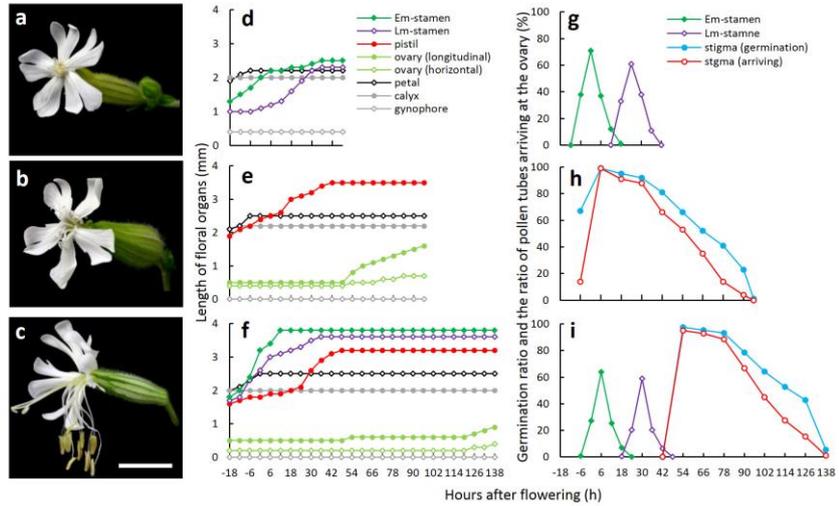
## 結果と考察

### 1. 雌雄異株植物における雄蕊と雌蕊成熟タイミングの同調化

雌雄同株植物は自家受粉を防ぐため、1 つの花の中で雄蕊と雌蕊の位置を空間的に離す雌雄離熟や、雄蕊と雌蕊の成熟期間を時間的に離す雌雄異熟などの機構をもっている種が多い(Barrett 2003, Medrano et al. 2012)。雌雄異株植物は、他家受粉を前提とするため、雄個体から雌個体へ花粉が伝達されなければ子孫を残すことができない。このため開花イベントを同調させて、異なる雌雄の個体間で受粉タイミングを一致させていると考えられる。

ヒロハノマンテマの雄花の雄蕊は長い 5 本と短い 5 本に分かれているため、それぞれ先熟雄蕊 (Em-stamen)、後熟雄蕊 (Lm-stamen) と定義した。先熟雄蕊と雌蕊の長さは 6 h after flowering (HAF)

**図1 ヒロハノマンテマとシロバナムシトリナデシコの比較** 雌雄異株植物ヒロハノマンテマは異なる株の雄花と雌花が雄蕊と雌蕊が同じ時期に成熟している。これに対して両性花植物シロバナムシトリナデシコは雄蕊が先に成熟し、雌蕊が後に成熟していた。また、シロバナムシトリナデシコは雄蕊と雌蕊の物理的距離が保たれていた。a ヒロハノマンテマの雄花、b ヒロハノマンテマの雌花、c シロバナムシトリナデシコの両性花、d-f 花器官伸長のパターン、g-i 雄蕊と雌蕊の成熟期間。スケールバー=1cm



に花弁長に到達しており、

雄蕊と雌蕊の発生が開花直後において同時に始まっていた。次に、花粉培地上の花粉発芽率(*in vitro*)を雄蕊の成熟度合、柱頭上の花粉発芽率(*in vivo*)を雌蕊の成熟度合とみなして、雄蕊と雌蕊の成熟期間を調べた。その結果先熟雄蕊の成熟期間は-6 - 24 HAF、後熟雄蕊の成熟期間は 18- 48 HAF、雌蕊の成熟期間は-6 - 96 HAF であり、雄蕊と雌蕊は開花を起点として同時期に成熟していることがわかった(図 1g,h)。

シロバナムシトリナデシコ(*Silene viscosa*)の雄蕊はヒロハノマンテマと同様に 5 本の先熟雄蕊と 5 本の後熟雄蕊にわかれ、花弁の下に垂れ下がっていた。雌蕊は 3 本の花柱がまっすぐ伸びる構造をしていた(図 1c)。雄蕊は常に雌蕊よりも長く、雌雄離熟が見られた(図 1f)。先熟雄蕊と後熟雄蕊の成熟期間はそれぞれ-6 - 24 HAF、18 - 48 HAF でヒロハノマンテマと同じだったが、雌蕊の成熟期間は 42 - 138 HAF であり、雄蕊と雌蕊の成熟期間が異なる雌雄異熟も見られた(図 1i)。

## 2. ヒロハノマンテマの両性花変異体と雌雄異株性

ヒロハノマンテマの Y 染色体上には雌蕊を抑制する領域(GSF: gynoecium suppression factor)雄蕊を促進する領域(SPF: stamen-promoting factor)雄蕊の成熟に関わる領域(MFF: male fertility factor)がある。このうち GSF 領域を欠失させることで両性花変異体を作出することができる。両性花変異体には 1 つの花に雄蕊と雌蕊が両方存在するため、雌雄異株状態では調べられなかった様々な仮説を検証することが可能になる。第 1 にヒロハノマンテマにおいて雌雄同株植物に普遍的に存在する他家受粉を担保する機構があるかどうかを検証できる。第 2 に雌雄異株の進化に必要な条件として考えられている雌雄トレードオフがあるかどうかを検証できる (Charlesworth et al. 1978, Charnov et al. 1982)。両性花変異体を単離することでこの 2 つの仮説について調べようと考えた。

### 1) Y 染色体部分欠失変異体と両性花変異体

野生型雄花の花粉に重イオンビームや  $\gamma$  線などの変異原を照射し、雌花に受粉させて  $M_1$  世代 2,722 個体を作出した。 $M_1$  世代を圃場で栽培し、花表現型に異常のある変異体をスクリーニングし、合計で両性花変異体 9 個体を含む 38 個体の変異体を得た。

### 2) 両性花変異体で見られるトレードオフ

単離した 9 個体の両性花変異体と 1 個体の XY 型雌花において花粉-胚珠の数を測定した(図 2)。散布図の中で 9 個の両性花変異体はすべて WT♂と WT♀を結ぶ線より右上に位置していた。両性花変異体が野生型より多くの資源を雄蕊と雌蕊に投資しているようだった(図 2e)。それぞれの両性花変異体の発芽花粉を測定し、野生型雄花の花粉を受粉させて形成した種子数を数えた。発芽

花粉-種子の散布図を描いたところ、すべての変異体は WT♂と WT♀を結ぶ線より左下に位置していた(図 3f)。2つの散布図はどちらも雌雄トレードオフがあることを示した。両性花変異体の発芽花粉-種子は散布図において WT♂と WT♀を結ぶ線より左下に位置していたことから、ヒロハノマンテマの自然状態において両性花は優占種になりえないことが示唆された。

### 3) ヒロハノマンテマの両性花変異体における雌雄離熟の出現と雌雄同調性

両性花変異体の雄蕊と雌蕊の長さ、および成熟期間を図 1 と同様の方法で測定し、ヒロハノマンテマの野生型、シロバナムシトリナデシコの野生型、両性花変異体の結果をまとめた(図 3)。ヒロハノマンテマの 9 個体中 5 個体の両性花変異体は雌蕊が雄蕊よりも長い approach 型雌雄離熟が出ていた。これは雄蕊が雌蕊よりも長い reverse 型雌雄離熟が出るシロバナムシトリナデシコとは逆だった。

一方、両性花変異体の雄蕊と雌蕊の成熟期間は野生型雄花、雌花とほぼ同じ時期だった。さらに、ヒロハノマンテマの両性花変異体は雌蕊の成熟時期を早める傾向があることがわかった。

### 3. ヒロハノマンテマ XY 性染色体にある B クラス遺伝子 *SIAP3X/Y* の欠失変異

XY 型の性決定をする生物は Y 染色体の退化によって遺伝子が失われると、雄(XY)と雌(XX)で遺伝子発現量が変わってしまう。これを是正する機構として遺伝子量補償が多くの生物において知られている(Mank 2009)。ヒロハノマンテマにおいて性染色体遺伝子の消失によって対立遺伝子の発現量が増加することを調べるため、

B クラス遺伝子 *SIAP3X/Y* に着目し、欠失変異体を単離して遺伝子発現量を雌雄間で比較した。

#### 1) *SIAP3Y* と *SIAP3X* 欠失変異を起こした変異体のスクリーニング

重イオンビーム、 $\gamma$  線を照射した M<sub>1</sub> 世代において 4 つ STS マーカーのスクリーニングをしたところ(上述)、4 個体 *SIAP3Y* 欠失変異体が得られた。そのうちの 1 個体 *slap3y-3* は野生型と全く同じ表現型だった。*SIAP3Y* と *SIAP3X* は同じ機能を担っていることが考えられた。対立遺伝子 *SIAP3X* を欠失させるため、*slap3y-3* を花粉親として雌花に受粉させ、得られた種子に重イオンビームや  $\gamma$  線を照射して M<sub>2</sub> 世代 1,240 個体を作成した。*SIAP3X/Y* 両方欠失した変異体は得られなかった。一方、XX 型 991 個体の中から *SIAP3X* をヘテロで欠失した変異体が 6 個体得られた。

#### 2) *SIAP3Y* 欠失変異体と *SIAP3X* ヘテロ欠失変異体における遺伝子量補償

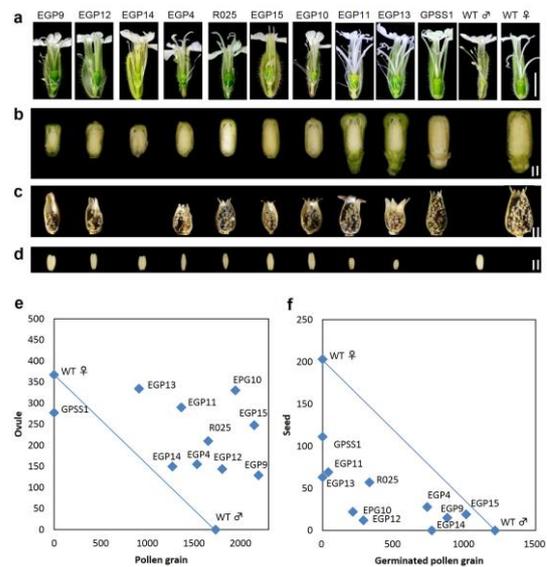


図2 両性花変異体における雄蕊と雌蕊のトレードオフ 両性花変異体は胚珠が少ない順に左から右へ並べている。両性花変異体の投資量は WT♂、♀より大きい、適応度は WT♂、♀より小さいと考えられる。a 両性花変異体の横断面図、b 子房の横断面と胚珠、c 蒴果と種子、d 葯の側面図、e 花粉数-胚珠数の散布図、f 発芽花粉数-種子数の散布図 スケールバー = 1 cm。ダブルスケールバー = 1 mm。

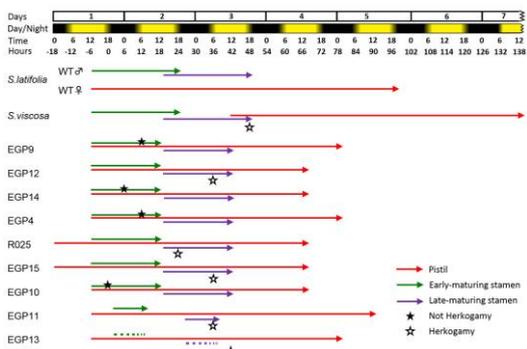
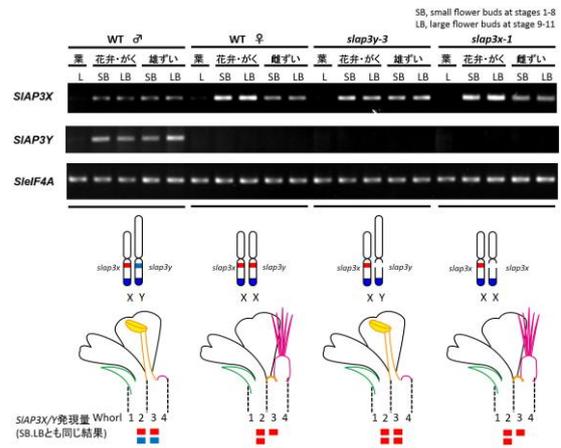


図3 両性花変異体の雄蕊と雌蕊の成熟期間 水平の矢印は雌蕊と先熟雄蕊と後熟雄蕊の寿命を示している。黒星印は雄蕊の長さが雌蕊の長さと同じになるタイミングを示している。黒星印で示した 4 個体は雄蕊と雌蕊の長さが同じになっていたが、他の 5 個体は雌蕊が雄蕊より長く、雌雄離熟が出現していた(輪郭星印)。また、両性花変異体の雄蕊と雌蕊の成熟時期は一致しているため、雌雄同調性が保たれていた。

*SIAP3Y* 欠失変異体と *SIAP3X* ヘテロ欠失変異体における遺伝子発現量を RT-PCR によって比較した (図 4)。野生型雄花(XY)は *SIAP3X* と *SIAP3Y* が花弁・がくおよび雄蕊で発現していた。これに対して野生型雌花(XX)は *SIAP3X* が花弁・がくおよび雌蕊区画で発現していた。*SIAP3Y* は雌花において発現していなかったが、その分 *SIAP3X* の発現量が野生型雄花より多かった。*SIAP3Y* 欠失変異体における *SIAP3X* の発現量は野生型の雄花と比較して増大しており、*SIAP3Y* が欠失したことによって *SIAP3X* の発現量が補償されていた。*SIAP3X* ヘテロ欠失変異体では、*SIAP3X* が 1 遺伝子になっているにもかかわらず、*SIAP3X* の発現量は野生型雌花の発現量と変わらなかった。今回の実験は Y 染色体遺伝子の欠失のみならず、X 染色体の欠失も補償されることを示した。



**図4 *SIAP3X/Y* 変異体に見られる遺伝子量補償**  
WT♂、WT♀、*SIAP3Y* 欠失変異体、*SIAP3X* ヘテロ欠失変異体の遺伝子発現量を RT-PCR で示している。*SIAP3Y* 欠失変異体は WT♂と比較して *SIAP3X* の発現量が増加していた。*SIAP3X* ヘテロ欠失変異体は片方の遺伝子が消失しているにもかかわらず、発現量は WT♀と同じになっていた。*SIAP3X/Y* には遺伝子量補償がはたらいっていることが示された。

## 結論

1. 培地上 (*in vitro*) と柱頭上 (*in vivo*) の花粉発芽率をから雄蕊と雌蕊の成熟タイミングを推定した結果、ヒロハノマンテマは開花を起点として同調的に雄蕊と雌蕊を成熟させているのに対し、シロバナムシトリナデシコには雌雄異熟があることがわかった。
2. 花粉に重イオンビーム、 $\gamma$  線を照射して M<sub>1</sub> 世代 2,722 個体を作成し、両性花 9 個体を含む 38 個体の変異体を単離した。新規マーカーを含む 78 個の STS マーカーで欠失マップを作成した。
3. 両性花変異体の花粉-胚珠および発芽花粉-種子の散布図においてトレードオフの関係が見られた。9 個体中 5 個体の両性花変異体において、雌蕊が雄蕊より長い approach 型の雌雄離熟が出現しており、さらに両性花には雄蕊と雌蕊を同時に成熟させる雌雄同調性があることがわかった。
4. M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 世代スクリーニングによって *SIAP3Y* 欠失変異体を 4 個体と *SIAP3X* ヘテロ欠失変異体を 6 個体単離した。それぞれの遺伝子発現量を調べたところ、両者の発現量は雄花(XY)と雌花(XX)の発現量と一致しており、遺伝子量補償がはたらいっていることがわかった。

## 発表論文

Aonuma W., Kawamoto H., Kawano S. Appearance of male/female tradeoff and monoecism in hermaphrodite mutants of the dioecious plant *Silene latifolia*. (投稿準備中).

Aonuma W., Shimizu Y., Ishii K., Fujita, N., Kawano, S. (2013) Maturation timing of stamens and pistils in the dioecious plant *Silene latifolia*. J. Plant Res. 126, 105-112.

Fujita, N., Torii, C., Ishii, K., Aonuma, W., Shimizu, Y., Kazama, Y., Abe, T., Kawano, S. (2012) 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, 2, 271-278

Fujita, N., Aonuma, W., Shimizu, Y., Yamanaka, Kahori., Hirata, A., Hood, ME., Kawano, S. (2012) A petalless flower caused by a *Microbotryum violaceum* mutant, Int. J. Plant Sci, 173(5), 464-473

Aonuma W., Ishii K., Fujita, N., Shimizu Y., Kazama, Y., Abe, T., and Kawano S. (2012) Imbalanced functional-disorders between pollen germination and seed formation by heavy-ion beams and  $\gamma$ -rays irradiation, RIKEN Accel. Prog. Rep. 45, 217.

Aonuma W., Ishii K., Torii C., Fujita, N., Shimizu Y., Nishihara, K., Kazama, Y., Abe, T., and Kawano S. (2011) Production of bisexual flower mutants of the dioecious plant, *Silene latifolia*, by the  $\gamma$ -ray and the heavy ion beam irradiation, RIKEN Accel. Prog. Rep. 44, 271.