

平成22年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19780112
 研究課題名（和文） 微細構造学的解析によるスギの雄性不稔発現機構の解明
 研究課題名（英文） Ultrastructural studies on the expression mechanism of male sterility in *Cryptomeria japonica*
 研究代表者
 細尾 佳宏（HOSOO YOSHIHIRO）
 信州大学・ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・助教
 研究者番号：80377184

研究成果の概要（和文）：スギにおける花粉形成過程と雄性不稔性の機構を、細胞生物学的、分子生物学的に研究した。そして、無花粉スギ（雄性不稔スギ）4 個体について、減数分裂の欠陥、四分子からの小胞子の不分離、小胞子の発達異常など不稔性を引き起こす花粉退化の仕組みを明らかにした。また、スギからカリウムイオン（ K^+ ）膜輸送体をコードする遺伝子を2 個単離した。これらの遺伝子は、雄花で細胞内外への K^+ の輸送に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The process of pollen development and the mechanism of male sterility in *Cryptomeria japonica* were studied using cytobiological and molecular approaches. The patterns of pollen degeneration causing male sterility such as defects in meiosis, failure in separation of individual microspores from tetrads, and abnormal microspore development were clarified in four male-sterile *C. japonica* trees found in Niigata, Japan. In addition, two genes encoding potassium membrane transport proteins were isolated from *C. japonica*. Analyses of these genes indicated that they were involved in the uptake or release of cellular potassium in male cones.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	300,000	2,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：スギ，花粉，小胞子，雄性不稔

1. 研究開始当初の背景

(1) スギは有用な樹種である一方で、スギ花粉症問題が深刻化している

スギは日本の最も重要な造林樹種の一つとして育種が進められ、多くの地域に植林さ

れてきた。一方、スギの花は風媒花であり、毎年早春の開花期には、スギ造林地から大量の花粉が飛散する。このスギ花粉が花粉症を引き起こし、現在では日本の全人口の15%以上がスギ花粉症に苦しんでいると考えられている。

(2) スギの花粉形成過程には、未だ不明な点が多く残されている

スギの花粉形成について理解を深めることは、この樹種の育種や遺伝学的研究だけでなく、花粉症対策にとっても必要となる。しかし、スギの花粉形成過程を詳細に研究した例は少なく、特に分化中花粉に関する情報は少ない。

(3) 雄性不稔スギは、花粉症問題の緩和する重要な鍵になる

花粉形成過程に異常があり、花粉が生産されない無花粉スギ（雄性不稔スギ）が、花粉飛散量を低減する方法の一つとして最近注目されている。これまでに、新潟県で複数の雄性不稔スギが発見され、これらのうち一個体では雄性不稔性の発現機構が細胞・組織レベルで明らかになっている。一方、その他の雄性不稔スギでは、花粉の発達異常が起きる過程の大部分が不明のままである。

2. 研究の目的

スギの花粉形成過程や、雄性不稔スギにおいて不稔性につながる花粉の発達異常が起きる過程を研究し理解することは、花粉症対策の観点から重要な課題である。本研究課題では、スギの花粉形成過程に関する明確なモデルを確立するとともに、それに基づいて雄性不稔スギにおける不稔性の発現機構の様々な局面を解明することを目的とした。そのために、正常スギの雄花の分化過程や花粉形成過程を細胞生物学的、分子生物学的に研究し、各分化段階における情報を蓄積することを目標とした。そして、得られた情報をもとに、新潟県で発見された雄性不稔スギ数個体について、花粉の発達異常が発生する分化段階の同定、発達異常を引き起こす機構、異常発生後の花粉の崩壊過程などを解析することにより、雄性不稔の発現機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) スギの花粉形成過程と雄性不稔の発現過程の観察

7月上旬に、正常スギの実生苗と雄性不稔スギ（新大3号、5号、7号、8号）の挿し木苗にジベレリンを散布し、雄花の着花を促進させた。9月から翌年の花粉飛散期（3月）まで、3日から7日ごとにそれぞれの個体から雄花を採取し、固定した。その後、固定した雄花の一部をアセトン上昇系列で脱水・置換し、樹脂に包埋した。また別の雄花をエタノールおよびブタノール・エタノール混合液で脱水・置換し、パラフィンに包埋した。包埋した試料からは、ロータリーマイクロトームで薄切片を作製し、トルイジンブルーで染色

した。パラフィンに包埋した試料からは、スライディングマイクロトームを用いて薄切片を作製し、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。染色した切片をキシレンで置換し、オイキットで封入した。そして、光学顕微鏡で正常スギにおける花粉母細胞から成熟花粉への分化過程（図1）と、雄性不稔スギにおける花粉の発達異常と花粉崩壊の過程を観察した。

減数分裂期に花粉母細胞や四分子を覆うカロスを検出するために、包埋していない雄花を押しつぶし、露出した花粉嚢内の細胞をアニリンブルーで染色した。また、核の有無や形態を観察するために、小孢子形成後から花粉飛散期までの雄花を押しつぶし、DAPIで染色した。染色した試料を、蛍光顕微鏡で観察した。

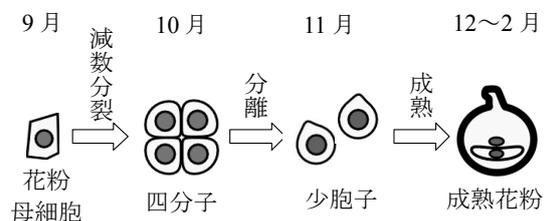


図1. スギ花粉の分化とおおよその時期

(2) スギの花粉および花粉嚢の微細構造観察

正常スギで花粉が成熟した頃（12月下旬）から翌年の花粉飛散期にかけて、正常雄花と不稔雄花を採取し、グルタルアルデヒドで固定した。固定した雄花をエタノール上昇系列で脱水し、 t -ブタノール凍結乾燥を行った。乾燥させた雄花をカミソリで分割し、オスミウムと白金-パラジウムをコーティングした。そして、電解放出形走査電子顕微鏡（FE-SEM）で花粉や花粉嚢の微細構造を観察した。

(3) スギからのカリウムイオン膜輸送体遺伝子の単離と解析

カリウムイオン (K^+) は植物体内で最も豊富な陽イオンであり、細胞の増殖・成長、細胞内浸透圧の調整、酵素の活性など、植物生理の様々な局面で中心的な役割を担い、花芽の分化にも関係している。細胞膜、液胞膜などの生体膜を横切っての K^+ の輸送、すなわち K^+ の膜輸送は、 K^+ 透過性のチャネルやトランスポーターと呼ばれる膜タンパク質が担っている。そこで、スギの雄花で発現する K^+ 膜輸送体遺伝子を単離し、その機能を明らかにするための研究を行った。

遺伝子データベースを検索し、 K^+ チャネルまたは K^+ トランスポーターをコードする既知の遺伝子の塩基配列やそれに対応するアミノ酸配列をもとにプライマーを設計した。スギから total RNA を抽出し、設計したプラ

イマーと抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行い、目的とする遺伝子のコード領域に相当する cDNA を取得した。取得した cDNA を大腸菌にサブクローニングし、塩基配列の決定と解析を行った。

単離した遺伝子の K^+ 輸送活性を、相補性検定により解析した。 K^+ の内向き整流性（取り込み）輸送能が欠損した大腸菌 LB2003 変異株で発現させ、 K^+ 取り込み能の回復の有無を調べた（回復すれば、単離した遺伝子に K^+ の取り込み輸送活性がある）。また、雄花、分化中木部、内樹皮などの各部位での発現特性を RT-PCR により調べた。

4. 研究成果

(1) 主な成果

① スギの花粉や花粉囊の微細構造を大きな変形や収縮を引き起こすことなく FE-SEM を用いて高倍率・高分解能で観察する手法を確立した。また、雄花の最適な樹脂包埋条件を検討し結果、包埋材に Quetol651、Spurr 樹脂といった低粘性で浸透性が高い樹脂、脱水・置換用の溶媒にアセトンを用いることにより、良好な結果が得られることが分かった。これらの手法は、今後の樹木を含む植物の花粉に関する研究に有用な研究ツールとなることが期待される。

② 雄性不稔スギ新大 7 号の花粉分化過程では、10 月上旬にはタペート組織に囲まれた正常な花粉母細胞が形成されていた。そして、10 月下旬の減数分裂で正常スギとの違いが見られた。正常スギの雄花では均一な大きさの小孢子からなる四分体が形成されたのに対し、新大 7 号では不均一な大きさの小孢子からなる四分体が観察され、一分子、二分子、そして三分子も観察された。11 月上旬になると個々の小孢子に分離し、その後一部の小孢子は分化を続け、残りは分化が停止した。分化を続けた小孢子も、正常花粉のように花粉有糸分裂を行い、二核の成熟花粉まで分化したものはほとんどなかった。花粉飛散期には、正常スギでは均一な大きさの花粉が観察されたのに対し、新大 7 号では大小様々な大きさの花粉が観察された（図 2）。小さい花粉、大きい花粉ともに表面の様相は正常花粉と

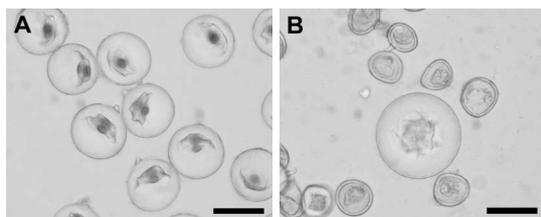


図 2. 花粉飛散期の正常スギの花粉(A)と新大 7 号の花粉(B)
スケールバー = 30 μ m

ほとんど変わらなかった（図 3）。これらの花粉粒は花粉囊中に花粉粒が残留し続け、飛散しなかった。これらの結果から、新大 7 号の雄性不稔性には、減数分裂の欠陥とそれに伴う小孢子の発達異常が関連していることが明らかになった。

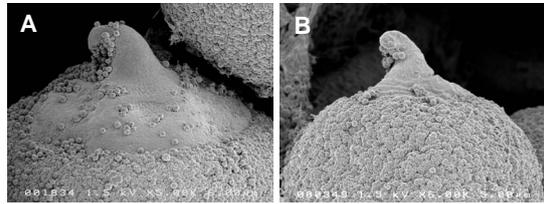


図 3. 花粉飛散期の花粉表面構造
A: 正常スギの花粉、B: 新大 7 号の花粉

③ 雄性不稔スギ新大 3 号の花粉分化過程では、正常な花粉母細胞が形成され、10 月下旬の減数分裂による四分体形成段階まで正常に進行した。しかし、11 月上旬になると正常スギでは四分体を覆うカロースが分解され、個々の小孢子が四分体から分離したのに対し、新大 3 号ではカロースの消失後も小孢子は四分体から分離しなかった（図 4）。無定形物質が新大 3 号の四分体の周りに観察され、その量は 11 月中旬から 12 月中旬にかけて増加した。四分体の形態は正常スギの花粉飛散期まで維持され、最終的に四分体は退化した。以上の結果から、無定形物質が小孢子同士を接着するまたは四分体を覆うことにより小孢子が分離できないことが、新大 3 号の雄性不稔性を引き起こす機構に関連していることが明らかになった。

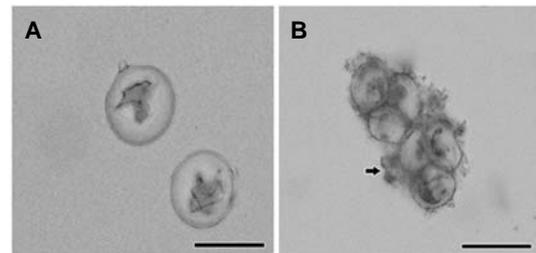


図 4. 11 月上旬の正常スギの小孢子(A)と新大 3 号(B)の小孢子
矢印: 無定形物質、スケールバー = 30 μ m

④ 雄性不稔スギ新大 5 号では、減数分裂は正常に進行し、11 月上旬には均一な大きさの小孢子が形成された。しかし、その後の分化過程において異常が見られた。11 月下旬になると、小孢子中の核が断片化し始め、正常スギで見られる花粉有糸分裂は起こらなかった。その後、核の断片化が進み、12 月下旬（正常花粉の成熟時期）には、小孢子が収縮してつぶれ始め、小孢子同士が癒着していた（図 5A）。花粉飛散期になると、断片化した核のほとんどが消失した。正常雄花中のタペート組織は花粉の成熟後の消失したのに対し、不稔雄花

中のタペート組織の一部は花粉飛散期まで残り、収縮した小孢子は無定形物質で覆われていた (図 5B)。これらのことから、この個体ではタペート組織の分解不良や小孢子中に生じる異常が雄性不稔性に関係していると考えられた。

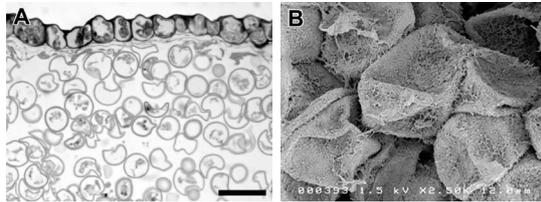


図 5. 12 月下旬の新大 5 号の花粉囊 (A) と小孢子表面構造 (B)
スケールバー=30 μ m

⑤雄性不稔スギ新大 8 号の雄花では、10 月上旬に花粉母細胞が形成されており、正常スギの花粉母細胞と明確な違いは見られなかった。四分子の形状にも、正常スギと大きな違いは見られず、11 月上旬には正常な 1 核の小孢子が形成された。しかし、12 月上旬の花粉有糸分裂で異常が生じた。正常スギでは不均等分裂により 2 つの核が互いに接近し、片方の極に偏った花粉が観察されたのに対し、新大 8 号では 2 つの核を持つ花粉が観察されたが、それらは互いに離れた位置に存在し、形態にも異常が認められた。核が存在しない花粉もいくつか観察され、花粉飛散期に近づくにつれこのような花粉がより顕著に観察されるようになった。また、花粉同士が互いに癒着している様子が観察された。花粉飛散期における花粉表面には無定形物質が付着しており、body zone、発芽帯そしてオービクルが明確に観察されなかった。以上の結果から、新大 8 号では花粉有糸分裂の欠陥や、タペート組織の異常による不完全な花粉壁形成が雄性不稔性に関わっていることが明らかになった。

⑥RT-PCR により、スギの K^+ 膜輸送体遺伝子と予想される 2 種類の cDNA 増幅断片が得られた。これらのうち 1 つは、354 アミノ酸残基をコードする 1062bp の ORF を含むと推定され、塩基配列に対応したアミノ酸配列は既知の two-pore K^+ チャネル (TPK) と相同性を有することが分かった (*CjTPK1* 遺伝子、図 6)。*CjTPK1* 遺伝子は分化中雄花を含む様々な部位で発現しており、大腸菌 LB2003 株で発現させると K^+ 取り込み能が回復した。このことから、*CjTPK1* は内向き整流性 (取り込み) の K^+ 輸送機能を持つことが明らかになった。もう 1 方の cDNA は、748 アミノ酸残基をコードする 2244bp の ORF を含むと推定され、対応するアミノ酸配列は既知の KUP 系 K^+ トランスポーターと相同性を有していた (図 7)。

また、このスギ KUP トランスポーター (*CjKUP1*) 遺伝子は、雄花でのみ発現していた。これらのことから、*CjTPK1* 遺伝子と *CjKUP1* 遺伝子は、雄花において細胞膜または液胞膜を横切る K^+ の輸送を担い、花粉形成過程に関係している可能性が示唆された。

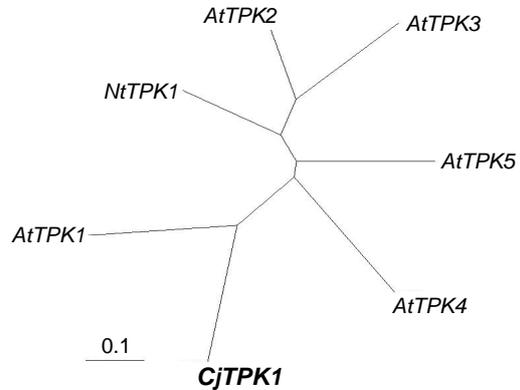


図 6. TPK 系 K^+ チャネル遺伝子の系統樹
AtTPK1; 2; 3; 4; 5: シロイヌナズナ由来、*NtTPK1*: タバコ由来

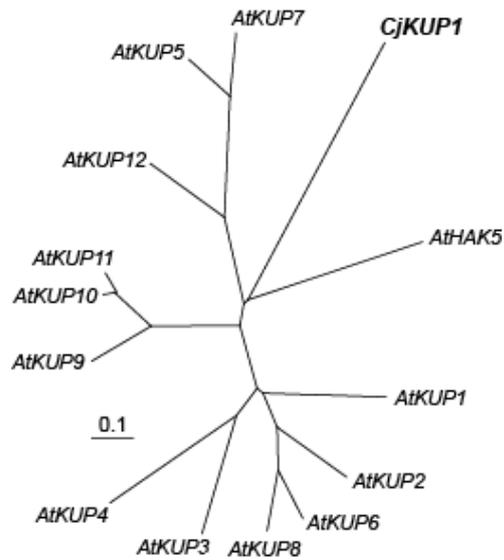


図 7. KUP/HAK 系 K^+ トランスポーター遺伝子の系統樹
AtTPK1-12, *AtHAK5*: シロイヌナズナ由来

(2) まとめと今後の展望

①雄性不稔スギ 4 個体について、不稔性を引き起こす花粉の発達異常の機構と花粉崩壊過程が明らかになった。このことにより、これらの個体における雄性不稔の発現とその信頼性が科学的に実証された。

②針葉樹における花粉形成や不稔性を含む生殖・発生に関する研究は、世界的に見ても草本のモデル植物に比べて大きく遅れている。

るのが現状である。スギにおける雄性不稔の発現機構に関する結果は、針葉樹の生殖・発生の分野における知見の蓄積に貢献するものである。

③スギの雄花で発現している K^+ 膜輸送体遺伝子を 2 個単離した。これまで針葉樹から K^+ 膜輸送体遺伝子を単離し、その機能や発現特性まで調べた研究は国内外を含めほとんどなく、スギの雄花に関しては初めての成果となる。

④本研究課題で対象とした雄性不稔スギのほとんどは雌性が正常で、交配に利用できる。花粉の発達異常や花粉崩壊の過程に関する成果は、雄性不稔スギの表現型に関する正確な情報を提供し、雄性不稔スギの効果的な育種に役立つものと期待される。

⑤今後の研究としては、雄性不稔の遺伝様式の解明、雄性不稔の発現に関わる遺伝子の同定など、分子遺伝学的、分子生物学的研究による花粉形成や雄性不稔の分子機構の解明が必要になると思われる。本研究課題の成果は、このような研究を進める上で有用な情報を提供するもので、将来的にスギの育種や遺伝学的研究、そして花粉症対策につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Ueuma H, Yoshii E, Hosoo Y, Taira H, Cytological study of a male-sterile *Cryptomeria japonica* that does not release microspores from tetrads, *Journal of Forest Research*, 14, 123–126, 2009, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 細尾佳宏, 木村恭文, 今井悟, 武田孝志, スギ分化中木部からのカリウムイオン膜輸送体遺伝子の単離, 第 60 回 日本木材学会大会, 2010.3.18, 宮崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細尾 佳宏 (HOSOO YOSHIHIRO)

信州大学・ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・助教

研究者番号：80377184