

## 植物の高温障害にみられる雄性不稔の発生メカニズムとオーキシン

東北大学 大学院生命科学研究科 教授 東谷篤志

### はじめに

植物は固着性を示すので動物と比べて様々な環境変化に対する高い適応能力や可塑性を有している。それらの高い能力は栄養成長において顕著であるが、一方、生殖成長においてはより脆弱であることも知られている。従って、様々な環境ストレスの影響は、最終的には種子の稔実歩合の低下や不稔といったかたちであらわれる。東北地方におけるイネの冷害（低温障害）などは、身近な生殖障害のひとつとして有名である。また、世界においては、地球規模での温暖化による気温上昇が既に作物の収量低下をまねいており、特に、コムギ、オオムギ、トウモロコシの主要3穀物の総生産量は、ここ数年来、毎年約4,000万トン、金額にして50億ドルの損失が報告されている<sup>1)</sup>。これら高温や低温ストレスは、生殖成長のなかでも花粉形成に最も強い影響を及ぼし、花粉の形成不全による成熟花粉数の低下や消失にともなう雄性不稔が生じることが報告されている<sup>2)</sup>。本稿では、主に、筆者らの研究室で得られたオオムギならびにシロイヌナズナにおける高温による花粉形成不全の発生メカニズムとオーキシンとの関わりについて論じる。

### 高温に最も脆弱な雄蕊の初期形成過程

オオムギやコムギにおいては、平均気温が25℃を越えると高温障害（不稔）が生じやすいことが一般的に知られている。私たちはオオムギはるな二条を用いて高温に感受性の高い時期を特定した。昼20℃/夜15℃の16時間日長の人工気象器のなかで成育させると、播種後約30日で出穂し、開花・結実をむかえる。また、出穂までに第1葉から7葉（止め葉）までが展開するので、それぞれの葉の先端が外にあらわれた段階から各5日間昼30℃/夜25℃と10℃上昇させた高温処理を行い、処理後は常温に戻して成育を続け、最終的な種子の結実率を調べた。その結果、第1～3葉展開期の高温処理では結実率に影響はみられず、続く第4～6葉展開期における高温処理では出穂はみられるもののその後の種子がほとんど結実することなく不稔となることが確認された（図-1）。なかでも第5葉展開から5日間の高温処理においては、葯内に成熟花粉が全くみられなくなり、一方、雌蕊は他の正常な花粉と受粉することで種子が結実したことから、花粉形成が不全となる雄性不稔が生じたことが確認された（図-1）。また、播種後、昼30℃/夜25℃の高温条件下で継続的に生育させても、同様の雄性不稔が生じることから

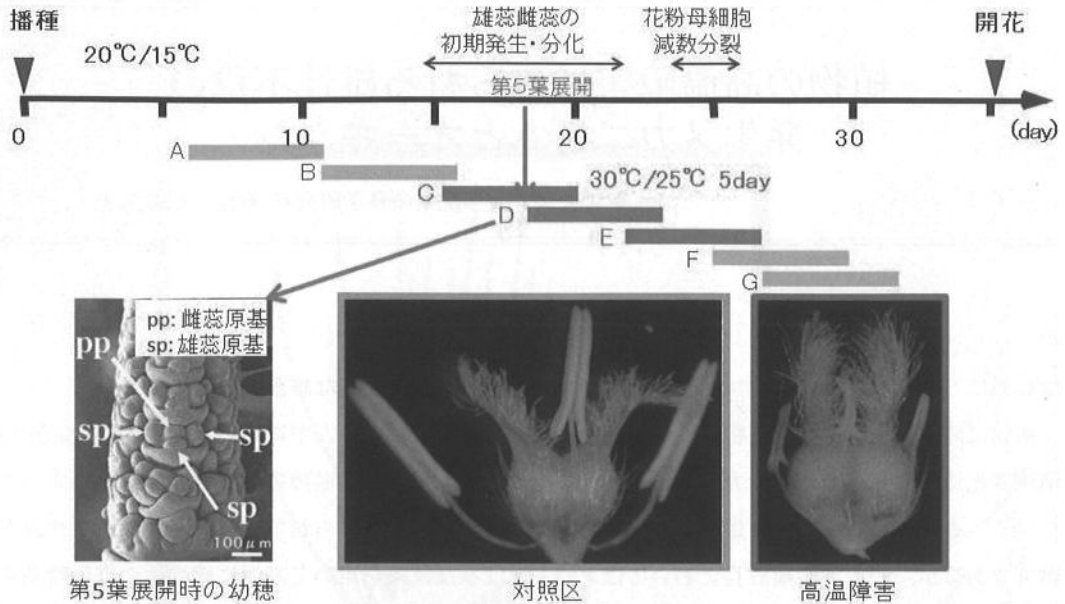


図-1 オオムギはるな二条における高温障害。昼30°C/夜25°Cで各5日間高温にさらすことで、特に第5葉展開する時期からの処理では、その後、常温で生育させても完全に花粉が形成されない雄性不稔が生じる。C、D、Eの高温処理期間ではほぼ完全不稔になる。

花粉形成の過程が最も高温に脆弱であることが確認された。第4葉が上部に出現する頃から、稈内部の茎頂分裂組織が幼穂へと分化しはじめ生殖成長に移行する。第5葉が出現し展開する時期は幼穂長が2 mm程度になり穎花数が決定するとともに、3日後には5 mm程度、5日後には10 mm前後にまで成長する。花粉母細胞の減数分裂は幼穂長が15~17mm (第6葉展開時) に生じるため、第5葉展開期は雄蕊形成の初期過程から前減数分裂期の段階といえる(図-1)<sup>3), 4)</sup>。

#### 高温による雄性始原細胞の早期細胞分裂の停止と葯壁細胞の早期崩壊

組織学的な解析から、今回の高温条件下においても、幼穂長5 mmの時点で、葯壁細胞の4層からなる組織構造、表皮細胞、内被、中間層、タペート層(花粉母細胞に接する一番内側の葯壁細胞

層)の分化発生は観察され、またその中央にある花粉始原細胞も分化していることが、一方で葯壁細胞では特に液胞化が進行することが確認された(図-2)<sup>4), 5)</sup>。また、幼穂長が5~10 mmにおけるこれらの細胞群では、常温コントロール区で20%程度の高頻度に細胞分裂M期の核相が観察されるが、高温処理区ではM期の核相が著しくみられなくなる(図-3)、また、幼穂あたりのDNA量を定量したところ、核、ミトコンドリア、葉緑体のいずれのDNAコピー数も、高温下で増加が顕著に阻害されることが示された<sup>5), 6)</sup>。特に、ミトコンドリアや葉緑体のオルガネラDNAの複製がより早期に停止していた。また、葯壁細胞群における液胞化が早期から生じること、5日間の高温処理(幼穂長10 mm時)から常温に戻して2日後、15 mm長にまで発育した幼穂の葯壁タペート細胞層の細胞壁ならびにミトコンドリ

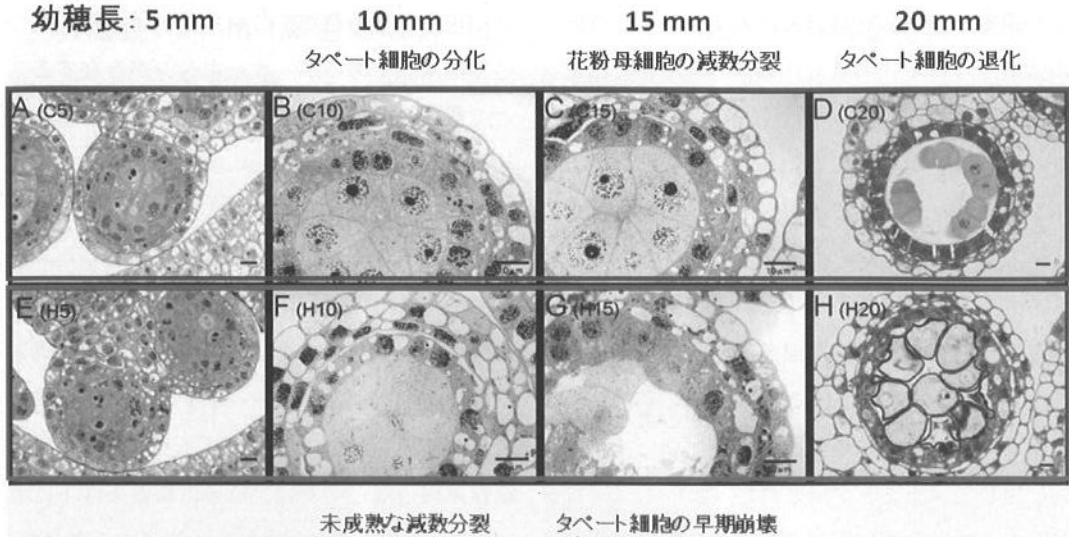


図-2 葯の初期発生分化の過程と高温による影響。論文5より改変。

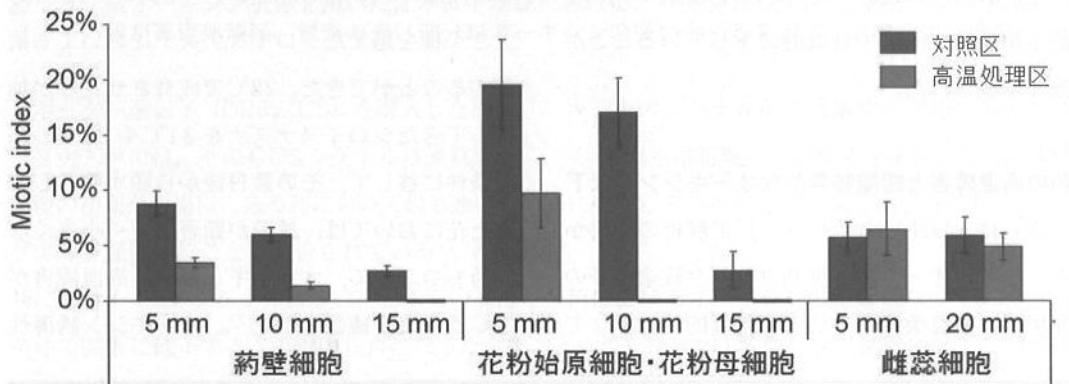


図-3 高温における発生初期の葯特異的な細胞分裂の低下。論文5より改変。

アが崩壊する<sup>5), 6)</sup>。本来タペート細胞は、花粉母細胞の減数分裂が完了した後に、花粉成熟に必要な様々な物質を供給し、最終的には自らはプログラム細胞死する重要な細胞群である。従って、高温による花粉始原細胞ならびに葯壁細胞群の早期の細胞分裂の停止とタペート細胞の早期崩壊により、正常な花粉形成が完全に阻害されたものといえる。一方で、雌蕊の始原細胞などにみられる細胞分裂は、高温条件下でも正常に行われており、花粉形成の初期過程が最も高温に脆弱であることが示された (図-3)<sup>6)</sup>。

#### 網羅的な遺伝子発現の解析からの知見

オオムギのゲノムプロジェクトならびに cDNA プロジェクトは日本をはじめとする各国の協力下で進められ、約2万遺伝子のDNAマイクロアレイチップ (Affymetrix BarleyChip1) を数年前から利用できる状況にある。これを利用した網羅的な遺伝子発現の解析から、昼30℃/夜25℃の高温条件では、芽生えの栄養成長期においても幼穂のサンプルと同様かそれ以上に、熱ショック遺伝子の発現誘導がみられた<sup>5)</sup>。従って、生殖組織が栄養組織と比較して高温を

より過敏に感受したためとは考えにくく、今回の常温から10℃上昇させた高温処理条件では全ての組織器官において、分子レベルでの熱ショック応答が生じているものといえる。一方で、細胞の分裂増殖に不可欠なヒストンやリボソームタンパク質などの遺伝子群、DNAポリメラーゼやDNA複製のライセンス因子などの遺伝子群の発現は、高温条件下の幼穂で特異的に抑制がみられ、さらにin situでの解析の結果、幼穂のなかでも雄蕊始原細胞において特異的に生じていることが示された(図-4)<sup>5)</sup>。すなわち、これら複製関連遺伝子群の発現抑制が前述の葯内での細胞分裂の早期停止につながり、葯の初期発生段階で特異的に生じていることが強く示唆された。

#### 葯の高温障害と組織特異的なオーキシンの低下

さらに、DNAマイクロアレイ解析の結果から、複数のオーキシン抑制タンパク質遺伝子の発現が、高温条件下の幼穂で特異的に上昇して

いる現象がみられた。これら遺伝子の機能については未知であるが、オーキシンが存在することで普段その発現が抑制される遺伝子群として知られている。従って、この結果は高温により幼穂で特異的にオーキシンまたはその活性シグナルが低下している可能性を強く示唆した。そこで、抗オーキシン抗体を用いた組織免疫学的な解析を行った結果、初期発生過程の葯組織において、高温条件下でオーキシン量が低下することが確認された(図-5)<sup>7)</sup>。一方で、穂軸の維管束周辺などにおいては逆に高温条件下においてオーキシンが増加している様子も示された。この高温による葯特異的なオーキシンの低下は、大きく種を越えたシロイヌナズナにおいても観察することができた。23℃で成育させ花序が抽台してきたシロイヌナズナを31℃や33℃の高温条件に移して、その数日後から順次開花してきた花においては、雄蕊が顕著に短く小さくなり葯もつぶれて、オオムギと類似の高温障害が生じることが確認された<sup>7)</sup>。オーキシン誘導性

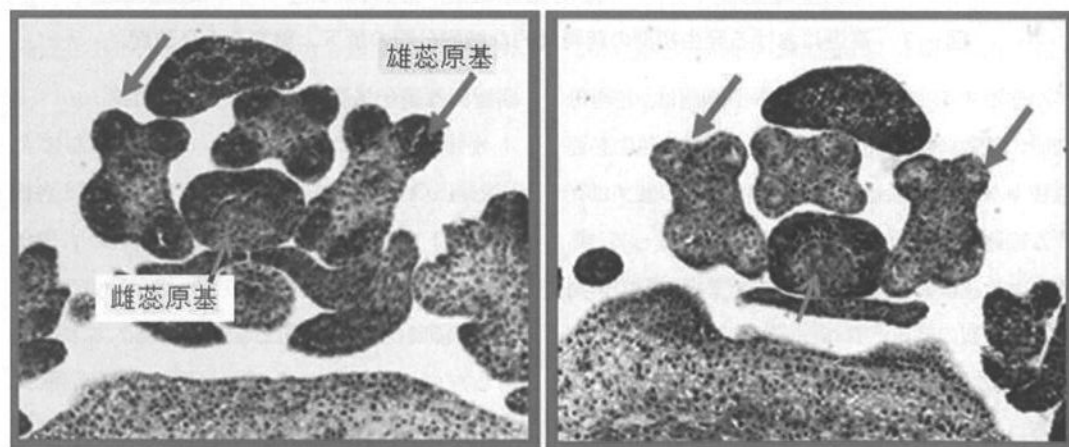


図-4 細胞複製の関連遺伝子をプローブに用いたin situ hybridizationの結果。高温により、雄蕊原基のなかでも雄性始原細胞のシグナルが著しく低下する。



幼穂長: 5 mm (高温処理3日目)

10 mm (高温処理5日目)

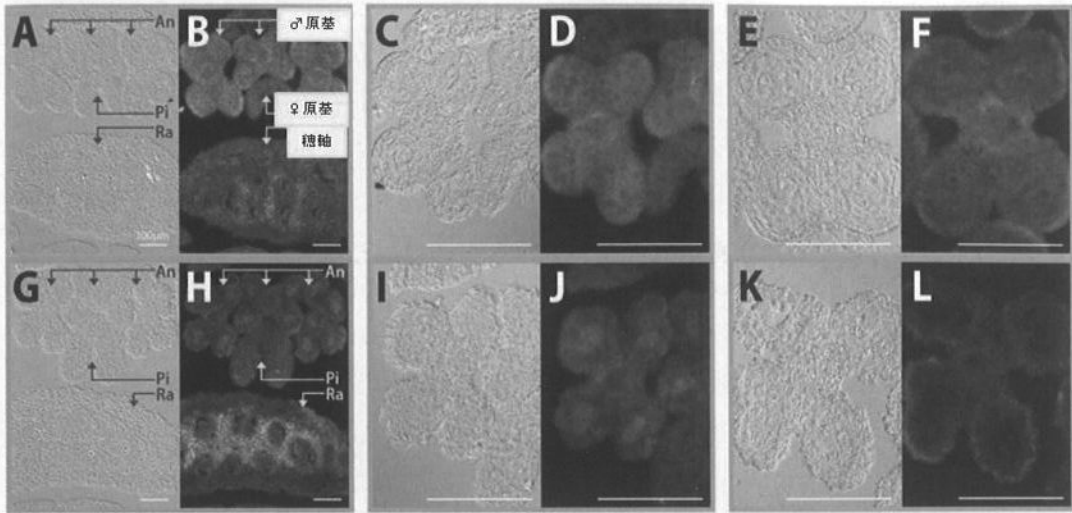


図-5 抗オーキシン抗体を用いたオオムギ幼穂におけるオーキシンの局在。上段が常温対照区、下段が高温処理区。蛍光の強い部分がオーキシンの多いところを示す。論文7より改変。

レポーター遺伝子 (DR5::GUS) を導入したシロイヌナズナでは、その GUS シグナルは減数分裂前後の初期発生過程にある葯において最も強いシグナルを発現することが報告されている<sup>8)</sup>。その葯における GUS シグナルは 31°C や 33°C の高温条件で顕著に低下することが明らかになった (図-6)<sup>7)</sup>。一方、雌蕊の維管束や芽生えの茎頂ならびに根端における GUS シグナルは逆に高温条件下で強くなっていた (図6)<sup>7)</sup>。すなわち、オー

キシンのシグナル活性は植物の組織特異性が高く、それらは組織特異的なオーキシン生成機構に依存している可能性が強く示唆された。

#### 葯におけるオーキシンの生成

オーキシンは茎長分裂組織において生合成され極性輸送によって植物体の隅々に運ばれることが広く知られている。近年、それ以外にも、様々な組織・細胞において特異的にオーキシン

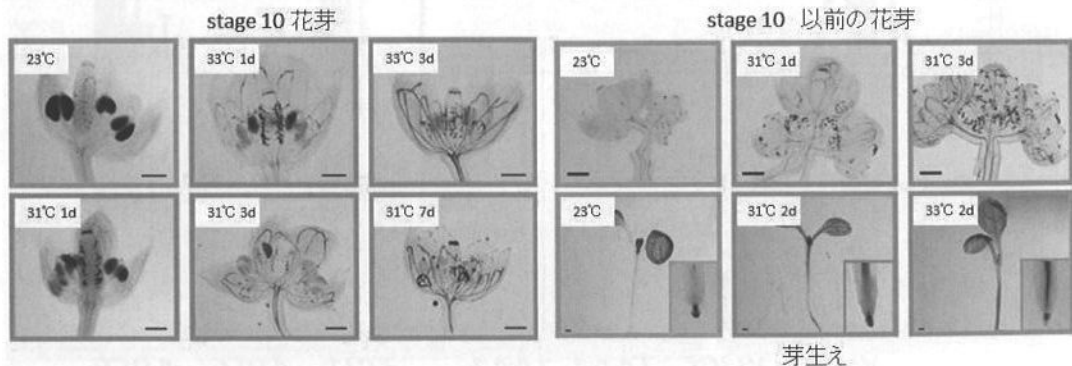


図-6 シロイヌナズナ DR5-GUS 活性と高温処理による影響 stage 10 の花芽 (左) と stage 10 以前の花芽 (右上段)、芽生え (右下段)。論文7より改変。

が合成されていることが報告されてきた<sup>9)</sup>。薬の初期発生の過程においてYUCCA遺伝子を介したオーキシン合成が行われており、先述のDR5::GUSの発生過程における薬での強い発現はこの合成に依存していることが示された<sup>8)</sup>。今回みられた高温による薬特異的なオーキシンならびにそのシグナル活性の低下について、YUCCA遺伝子の発現との関連性を調べたところ、シロイヌナズナの薬で発現がみられるYUCCA遺伝子YUC-2, YUC-6の発現が高温処理24時間後において顕著に抑制されており(図-7)、同様の結果がオオムギにおいても観察された<sup>7)</sup>。以上の結果から、初期発生過程の薬においては、自身がYUCCA遺伝子によりオーキシンを合成しているが、高温によりこの転写活性が低下し、オーキシン欠乏の状況に陥り雄性始原細胞の細胞分裂が停止し、最終的には花粉が形成されなくなったものと考察された。

### オーキシンの散布による高温障害の回避

また、オオムギBarleyChip1を用いて行われたDNAマイクロアレイ解析の公開されているデータ約600実験分を集めて、チップ上にスポットされている2万の遺伝子間の共発現の相関解析を行ったところ、DNA複製に関わる遺伝子群はミトコンドリアに関わる遺伝子群ならびにオーキシン誘導性・応答遺伝子群と、発現に正の相関がみられること、一方、これらのグループと光合成・葉緑体関連遺伝子群ならびにオーキシン抑制タンパク質遺伝子群とは、発現に負の相関がみられることが明らかになった(図-8)<sup>6)</sup>。そして、前者のグループはオオムギの薬における高温障害時に発現が抑制され、後者のグループは発現が増加していた。そこで、高温下においてオーキシンを散布することで、薬におけるオーキシン欠乏を補うとともに、DNA複製に関わる遺伝子群やミトコンドリアに関わる

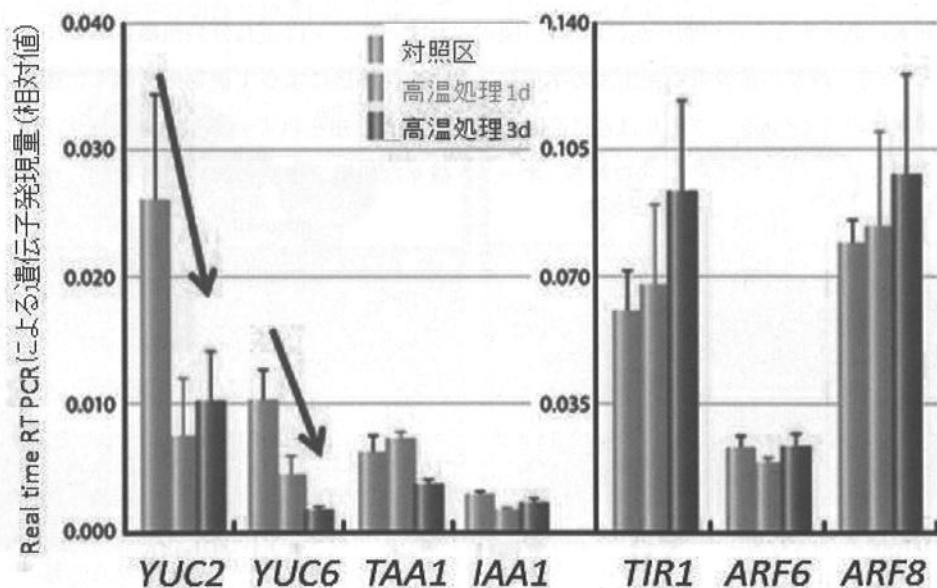


図-7 シロイヌナズナstage 9の花芽薬内における各遺伝子発現の高温による変動。論文7より改変。

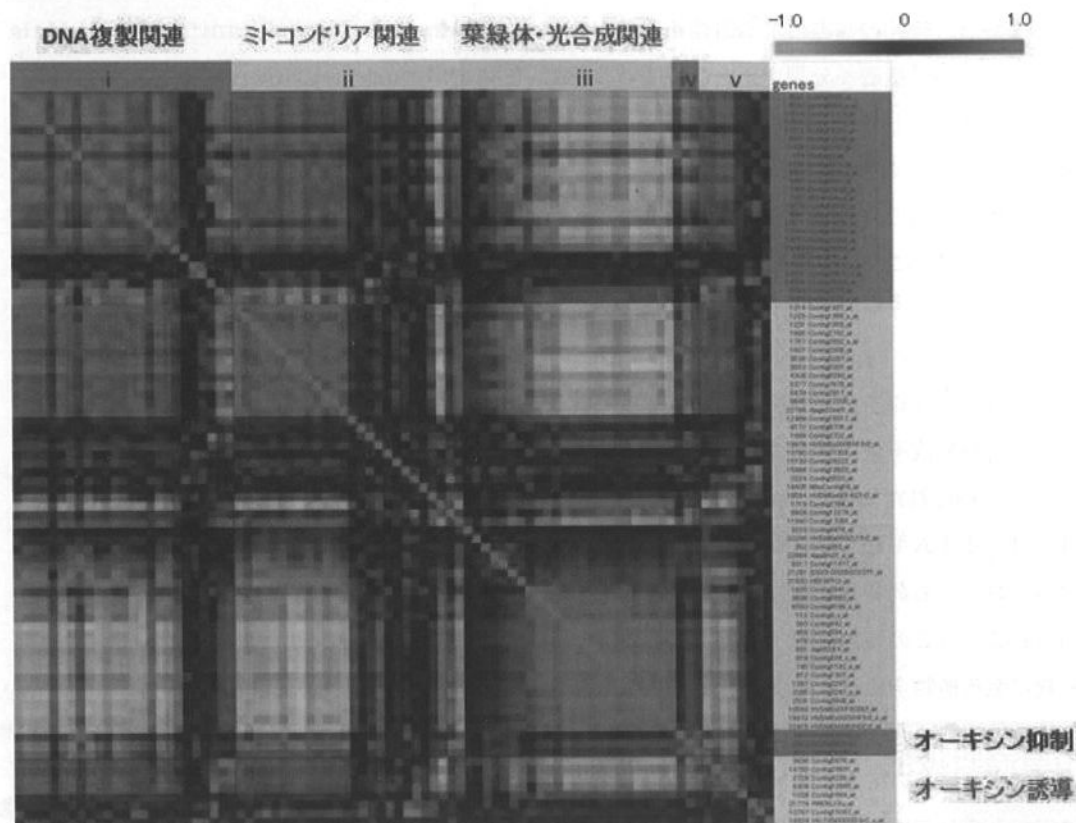


図-8 オオムギDNAマイクロアレイデータを用いた各遺伝子の共発現相関。論文6より改変。

遺伝子群も共に誘導され、雄性始原細胞の細胞分裂の停止が回復する可能性が強く示唆された。実際、オーキシシン (IAA, NAA, 2,4-D) の散布によりオオムギの雄性始原細胞の分裂は回復

し、成熟花粉が形成され、高温下でも種子が結実するまでに至った (図-9)<sup>7)</sup>。シロイヌナズナ的高温障害も同じくオーキシシンを散布することにより抑えられることが確認された<sup>7)</sup>。以上

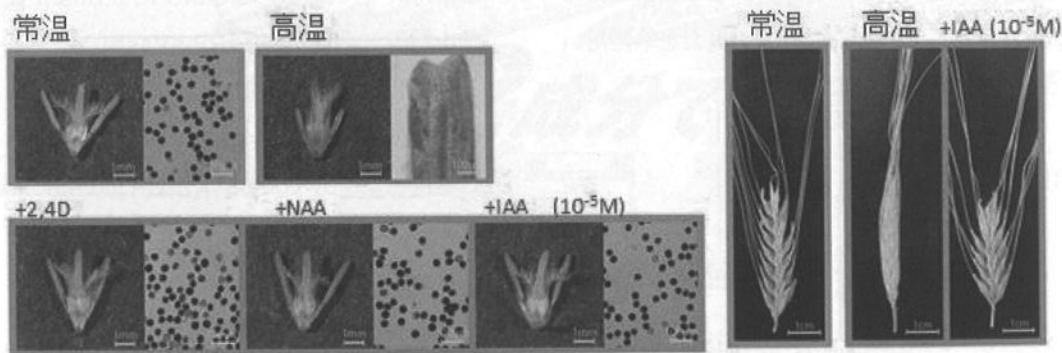


図-9 オオムギの高温処理5日間にオーキシシンを散布することで花粉形成が回復し、種子稔性も回復する。論文7より改変。

の結果から、植物の高温による雄性不稔においては、その始原細胞が分裂増殖を行っている時期にピンポイントでオーキシンを与えることで高温障害を回避できるという、地球規模での温暖化に伴う作物の高温障害に対する新たなオーキシンの利用法につながるものと期待している。

### まとめ

オオムギやシロイヌナズナを用いた高温障害による花粉形成不全のメカニズムについて、これまでに得られた知見を中心に紹介してきた。高温は、オオムギならびにシロイヌナズナのいずれにおいても薬特異的なオーキシンの低下を引き起こし、この現象は単子葉植物から双子葉植物に至る植物全般に広く保存されたものである可能性が強く示唆された。従って、ササゲなど他の作物においても花粉数の低下による高温障害がみられているが、それらも同じ原因に起因するのかもしれない。今後は、高温により薬特異的に YUCCA 遺伝子をはじめ細胞の分裂増殖に不可欠な遺伝子群の発現が低下する機構についての解明が待たれる。最後に、ここで紹介させていただいた主な研究は当研究室の多くの大学院学生と共同研究者の方々との成果であること、また、このような執筆の機会をいただいたことと深く感謝します。

### 引用文献

- 1) Lobell DB, Field CB (2007) Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environ Res Lett* 2:014002.
- 2) Sakata T, Higashitani A (2008) Male sterility accompanied with abnormal anther development in plants-genes and environmental stresses with special reference to high temperature injury. *Intl J Plant Dev Biol* 2:42-51.
- 3) Sakata T, Takahashi H, Nishiyama I, Higashitani A (2000) Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. *J Plant Res* 113: 395-402.
- 4) Abiko M, Akibayashi K, Sakata T, Kimura M, Kihara M, Itoh K, Asamizu E, Sato S, Takahashi H, Higashitani A (2005) High-temperature induction of male sterility during barley (*Hordeum vulgare* L.) anther development is mediated by transcriptional inhibition. *Sex Plant Reprod* 18:91-100.
- 5) Oshino T, Abiko M, Saito R, Ichiishi E, Endo M, Kawagishi-Kobayashi M, Higashitani A (2007) Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high-temperature injury in barley plants. *Mol Genet Genomics* 278:31-42.



6) Oshino T, Miura S, Kikuchi S, Hamada K, Yano K, Watanabe M, Higashitani A (2011) Auxin depletion in barley plants under high-temperature conditions represses DNA proliferation in organelles and nuclei via transcriptional alterations. *Plant Cell Environ* 34:284-290.

7) Sakata T, Oshino T, Miura S, Tomabechi M, Tsunaga Y, Higashitani N, Miyazawa Y, Takahashi H, Watanabe M, Higashitani A (2010) Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:8569-8574.

8) Cecchetti V, Altamura MM, Falasca G, Costantino P, Cardarelli M (2008) Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20:1760-1774.

9) Cheng Y, Dai X, Zhao Y (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* 20:1790-1799.

水稻用一発処理除草剤

**新登場!!**  
ホクコー

# エーワン

1キロ粒剤・フロアブル・ジャンボ

**強力な2つの成分**

|  |  |
|--|--|
| 新規成分<br>雑草を白く枯らす<br>テフリルトリオン<br><b>(AVH-301)</b> | ノビエを長く抑える<br>オキサジクロメホン<br><b>(4-110)</b> |
|--|--|

雑草を白く枯らす!  
ノビエを長く抑える!

**2成分で雑草撃退!**

SU抵抗性雑草・  
特殊雑草に高い効果!






取扱 全農 製造

北興化学工業株式会社

エーワンは北興化学工業(株)の登録商標