

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成11年博士課程入学

氏名 間山智子

指導教官名 大坪栄一

論文題目 ペチュニアの花の形態形成に関与する遺伝子とその作用に関する研究

多くの被子植物の花は外側から内側に向かって whorl 1, 2, 3, 及び 4 と定義される四つの領域からなり、それぞれ萼片、花弁、雄蕊、及び雌蕊を形成する。このような花の器官決定を、三つのクラスの遺伝子 (A, B, と C) の組み合わせによって説明するモデルが提唱されている。この ABC モデルでは各クラスの花のホメオティック遺伝子は隣り合った二つの whorl で機能し、花の器官決定に関与している。すなわち、whorl 1 ではクラス A 遺伝子が機能し萼片が、whorl 2 ではクラス A と B 遺伝子が機能し花弁が、whorl 3 ではクラス B と C 遺伝子が機能し雄蕊が、そして whorl 4 ではクラス C 遺伝子が機能し雌蕊が形成される。クラス A 遺伝子の whorl 3 と 4 における機能はクラス C 遺伝子により抑制されており、クラス C 遺伝子の whorl 1 と 2 における機能はクラス A 遺伝子により抑制されている。シロイヌナズナでは各クラスの遺伝子が単離・同定されており、キンギョソウなどその他の被子植物でも、このモデルが大筋であてはまることが明らかとなっている。

ペチュニアの花の形態は、他の被子植物と同様に、萼片、花弁、雄蕊、雌蕊の四種類の器官からなっている (図 1)。ペチュニアにおいて、クラス A 遺伝子 *BLIND (BL)* の変異体は分離されているが、その遺伝子は単離・同定されていない。また、クラス B 遺伝子として *GREEN PETAL (GP)* と *FBP1* が、クラス C 遺伝子として *pMADS3* が単離・同定されている (表 1)。しかし一方で、後述するようにシロイヌナズナとは異なる点があることがわかっている。

本研究は、ペチュニアの雄蕊形成に関与する遺伝子を同定すると共に、クラス A 遺伝子を単離し、ペ

チュニアの花の形態形成機構を明らかにすることを目的としたものであり、その結果は以下のように要約される。

ペチュニアの花弁と雄薬の形成に関与する遺伝子の解析

ペチュニアのクラス B 遺伝子 *GREEN PETAL (GP)* は花弁の形成には必要であるが、雄薬の形成には必要ではない。これはシロイヌナズナの二つのクラス B 遺伝子が花弁と雄薬の両方の形成に必要なこととは異なっている。そこで、*GP* の作用を解析するために、その突然変異体 *gp* とクラス A 遺伝子 *BL* の突然変異体 *bl* を交配し、二重突然変異体 *bl gp* を作成した。その結果、*bl gp* の花は、*bl* 変異体の花と同様に whorl 2 において雄薬状組織を形成することが分かった。これは *GP* が雄薬状組織の形成に必要なことを示している。更に、ペチュニアの花弁と雄薬の両方の形成に必要な典型的なクラス B 遺伝子の作用を持つ *FBP1* の発現を *gp* および *bl gp* において解析したところ、*FBP1* は *gp* の whorl 2 の萼状組織では弱く whorl 3 の雄薬では強く発現するのに対し、*bl gp* では whorl 2 の葯状組織と whorl 3 の雄薬の両方で強く発現することが明らかとなった。この結果は、*FBP1* の強い発現に、花弁では *GP* を必要とするが、雄薬または雄薬状組織では *GP* を必要としないことを示している。そこで、我々は、雄薬または雄薬状組織の形成と、*FBP1* のそれらにおける強い発現に関与する新たなクラス B 遺伝子 *PhBX (Petunia hybrida* クラス *B gene X)* の存在を仮定し、その whorl 2 における作用が *BL* 遺伝子によって抑制されるというペチュニアの花の形成機構のモデルを提唱した (図 2)。

花の器官形成に関わるホメオティック遺伝子産物の多くはタンパク質複合体を形成し、器官形成に関与することがわかっている。そこで、雄薬形成に関与するペチュニアの遺伝子産物 (*FBP1*、*PMADS3* 及び *FBP2*; 図 2) 間のタンパク質間相互作用を酵母の two-hybrid system を用いて解析した。その結果、*PMADS3* と *FBP2* が相互作用を示したため、*PMADS3* と *FBP2* はヘテロダイマーを形成し、雄薬形成に関与することが示唆された。そこで、更に *PMADS3*-*FBP2* ヘテロダイマーと既知のペチュニアのホメオティック遺伝子及びそのパラログの遺伝子の産物間の相互作用を酵母の three-hybrid system を用いて解析した。その結果、*PMADS3*-*FBP2* ヘテロダイマーは、*FBP1* とは相互作用を示さなかったが、*GP* と *FBP1* のそれぞれのパラログであるが未だ機能が明らかにされていない *PhTM6* と *pMADS2* (表 1) の遺伝子産物と相互作用することが分かった。この結果は、*PHTM6* または *PMADS2* が、*FBP2* および *PMADS3* とともに三重複合体を形成して、雄薬形成に関与することを示唆し、更には *PhTM6* または *pMADS2* が *PhBX* である可能性を示唆する。

ペチュニアのクラス A 遺伝子の単離と発現解析

クラス A 遺伝子 *BLIND* (*BL*) の突然変異体 *blind* (*bl*) の花は、萼片の先端が柱頭状組織へ、花卉上部のリムが葯状組織へとホメオティックな変化を示し、葉も主脈方向にそって巻きあがる表現型を示す。シロイヌナズナには、典型的なクラス A 遺伝子 *APETALA1* (*AP1*) と *APETALA2* (*AP2*) が単離されているが、*BL* はペチュニアにおけるこれらの相同遺伝子ではないことが明らかになっている。シロイヌナズナには他のクラス A 遺伝子として *CURLY LEAF* (*CLF*) や *LUENIG* (*LUG*) など、複数の遺伝子が存在することが知られている。我々は、それらのうち *CLF* の突然変異体 *clf-2* の表現型が *bl* と類似していることに注目し、*BL* の単離を目的としてペチュニアにおける *CLF* 相同遺伝子の単離を行った。*CLF* 遺伝子産物がショウジョウバエの *E(z)* 遺伝子産物の C 末側のアミノ酸配列と相同性を持つことに着目し、この領域の塩基配列を元にディジェネレートプライマーを設計し、RT-PCR によってペチュニアの相同遺伝子を単離した。その結果、三つの遺伝子が得られ、それぞれ *PhCLF1*, *PhCLF2* 及び *PhCLF3* (*Petunia hybrida* *CURLY LEAF*) と命名した。これらのうち、*CLF* と最も高い相同性を持つ *PhCLF1* と *PhCLF2* の発現を解析したところ、*PhCLF1* は花卉で強く発現し、*PhCLF2* は生殖器官で強く発現することがわかった。この結果は、それぞれの遺伝子が異なった発現制御を受けていること、それぞれの作用する器官が異なっていることを示唆する。また、*PhCLF1* は、*PhCLF2* とは異なり選択的スプライシングを起こし、C 末側領域を欠失した種々のタンパク質をも産生することがわかった。この欠失したタンパク質はタンパク質間相互作用に重要と考えられる N 末側の領域を持っているため、全長を持つ *PhCLF1* タンパク質に対して阻害的に作用するものと考えられる。しかし、*PhCLF1* と *PhCLF2* は花のすべての器官と葉で発現している点、その発現が他のクラスの花のホメオティック遺伝子 (*MADS box* 遺伝子) と比べると弱い点において *CLF* に類似していることが明らかになった。

PhCLF1 または *PhCLF2* が、*BL* であるか否かを検証するため、*bl* 突然変異体で生じる *PhCLF1* と *PhCLF2* の転写産物の塩基配列を解析した。その結果、*PhCLF1* は野生型と比較してアミノ酸を変える三つの置換変異を持つことがわかったが、交配の結果、その変異を持つ遺伝子が *bl* の表現型とは分離することが明らかになった。一方 *PhCLF2* は、野生型と比較してアミノ酸を変える置換変異を一つ持つことがわかったが、この変異は保存性の低い領域に存在していた。これらの結果より、*PhCLF1* と *PhCLF2* は *BL* とは別の遺伝子であることが示唆された。しかし、*bl* の花の各器官における *PhCLF1* と *PhCLF2* の発現を解析したところ、whorl 2 の花卉が葯状組織へと変化した組織では *PhCLF1* の発現が弱くなり、whorl 1 の先端が柱頭状組織へと変化した萼片では、*PhCLF2* の発現が強くなることが分かった。この結果は、*BL* が *PhCLF1* と *PhCLF2* の発現制御に関与していることを示唆している。

以上の結果より、シロイヌナズナのクラス A 遺伝子 *CLF* のペチュニアにおける相同遺伝子は、*BL* と

は異なる遺伝子であるが、その発現は *BL* によって制御されることが明らかになった。

以上本論文において、ペチュニアには花弁と雄蕊の両方の形成に関与する *FBP1* と花弁形成に関与する *GP* の他に、雄蕊形成に特異的に関わるクラス B 遺伝子 *PhBX* が存在することを示すと共に、*PhBX* が *PhTM6* または *pMADS2* であることを示唆する結果を得た。また、シロイヌナズナのクラス A 遺伝子 *CLF* のペチュニアにおける二種類の相同遺伝子 *PhCLF1* と *PhCLF2* を単離同定すると共にそれらの発現を調べたが、両遺伝子はペチュニアのクラス A 遺伝子 *BL* とは異なること、しかしそれらの発現には *BL* が関わっていること、を明らかにした。これらの結果は被子植物の花の器官形成機構の多様性を示す重要な結果であると考えられる。

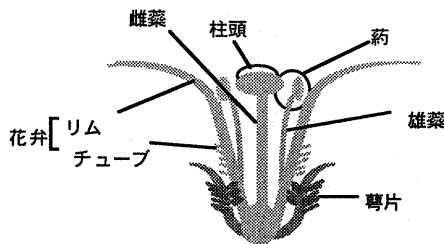


図1 ペチュニアの野生型の花

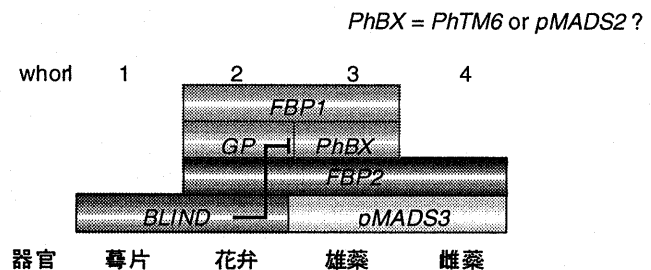


図2 ペチュニアの花の形態形成モデル

表1 花のホメオティック遺伝子

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Petunia hybrida</i>
class A	<i>APETALA1</i>	
	<i>APETALA2</i>	
	<i>CURLY LEAF</i>	
	etc.	<i>BLIND</i>
class B	<i>PISTILLATA</i>	<i>FBP1</i> (<i>pMADS2</i>)
	<i>APETALA3</i>	<i>GREEN PETAL</i> (<i>PhTM6</i>)
class C	<i>AGAMOUS</i>	<i>pMADS3</i>

○は機能が不明なパラログを示す