

論文の内容の要旨

論文題目 The Molecular Evolutional Analysis of AP2 subfamily
AP2 subfamily の分子進化的解析

執行美香保

第1章 General Introduction

本研究はシロイヌナズナの生殖器官の形態形成において重要な役割を持つと考えられている2遺伝子、APETALA2 (AP2)、AINTEGUMENTA (ANT) に注目した。AP2 遺伝子、ANT 遺伝子は推定核移行シグナルと2つのAP2ドメインを持ち、遺伝子構造が類似している。AP2ドメインは約70アミノ酸残基より成る植物特有のDNA結合性ドメインで、この構造を持つ遺伝子は転写制御因子であると考えられている。被子植物シロイヌナズナではAP2ドメインを持つ遺伝子は144存在し、これらはAP2ドメインを1つ持つEREBP subfamilyと2つ持つAP2 subfamilyに大きくわけることができ、まとめてAP2/EREBP multigene familyと呼ばれる。EREBP subfamilyはこれまで主に植物の低温、乾燥など環境ストレス応答シグナル伝達系に関わる遺伝子群であると考えられてきたが、近年、栄養器官の形態形成に関わる遺伝子も存在することが明らかにされてきている。これに対し、AP2 subfamilyは植物の生殖器官、栄養器官での形態形成に関わる重要な制御因子であることが明らかにされてきている。AP2 遺伝子、ANT 遺伝子もAP2 subfamilyに属する遺伝子で、この中では最も解析が進められている遺伝子である。これまでAP2 subfamilyに属する遺伝子はほぼすべてが被子植物より単離されてきており、3遺伝子の例外があるのみである。この内2遺伝子は裸子植物ノルウェートウヒ PaAP2L1 遺伝子、PaAP2L2 遺伝子で、もう1遺伝子はかずさ DNA 研究所 EST データベースに登録されている緑藻植物クラミドモナスの AV622151 である。他の陸上植物ではAP2 subfamilyに属する遺伝子がどのように利用されているの

かほぼ全くわかっていない。本研究は、被子植物の形態形成において重要な役割を持つ AP2 subfamily がどのような分子進化をしてきたのかを明らかにし、陸上植物の進化の中でどのように発現様式、機能を変化させてきたのかを探ることを目的とする。このためには被子植物以外からの AP2 subfamily に属する遺伝子情報が必要であると考えられる。裸子植物から被子植物への進化過程では、生殖器官において花弁、心皮、2 枚目の珠皮の獲得がおこっており、コケ植物からシダ植物への進化過程では、生活史の構成が大きく変化し、コケ植物は配偶体世代優占の生活史を持っている。このため裸子植物、コケ植物を用いて AP2 subfamily に属する遺伝子の解析を行った。

第 2 章 AP2 subfamily の分子進化的解析

裸子植物の材料は、構成する 4 群より 1 種ずつ、ソテツ (*Cycas revoluta*)、イチョウ (*Ginkgo biloba*)、グネツム (*Gnetum parvifolium*)、クロマツ (*Pinus thunbergii*)、とし、コケ植物の材料はヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) とした。裸子植物より ANT 遺伝子、AP2 遺伝子それぞれに類似性の高い遺伝子を単離することができ、種名より CrANTL1、CrAP2L1、GbANTL1、GbAP2L1、GpANTL1、GpAP2L1、PtANTL1、PtAP2L1、PtAP2L2 遺伝子と名付けた。ヒメツリガネゴケから ANT 遺伝子に類似性の高い遺伝子を 3 種類単離することができ、PpANT1、PpANT2、PpANT3 遺伝子と名付けた。推定アミノ酸配列の比較により、陸上植物の AP2 subfamily に属する遺伝子は、配列の特徴から AP2 様遺伝子のグループと ANT 様遺伝子のグループにわけられることがわかり、それぞれ AP2 グループと ANT グループと名づけた。また、ANT グループは AP2 ドメインリピート 1 内に特徴的な 10 アミノ酸残基を持つことがわかった。まず、シロイヌナズナの AP2 ドメインを持つすべての遺伝子を用いプログラム MOLPHY により最尤系統樹を作成した。この系統樹から AP2/EREBP multigene family が EREBP subfamily と AP2 subfamily に分けられることが示された。また、EREBP subfamily の中でも特に RAV subfamily と呼ばれる遺伝子群が最も AP2 subfamily と近い関係にあることが示唆された。次に、シロイヌナズナの RAV subfamily を外群とし、本研究により単離された遺伝子を含む AP2 subfamily に属する遺伝子を用いて最尤系統樹を作成した。AP2 subfamily が持つ 2 つの AP2 ドメインはドメインリピート 1 とリピート 2 と分けて独立に扱った。この系統樹では陸上植物の AP2 グループの AP2 ドメインリピート 1、リピート 2、ANT グループの AP2 ドメインリピート 1、リピート 2 がまとめられ単系統群を作成することが示された。クラミドモナス AV622151 はこれらの中含まれず外に位置し、AP2 subfamily がクラミドモナスと分岐して以降、陸上植物の共通祖先において新たに 2 つのグループにわかれたことが示唆された。次に、クラミドモナス AV622151 を外群とし、AP2 subfamily 内の系統関係を調べるため最尤系統樹を作成した。この系統樹から、AP2 グループと ANT グループがそれぞれ単系統群を形成することが示された。また、本研究により単離された遺伝子が各グループの中に位置することが示された。被子植物以外からの ANT グループに属する遺伝子の報告は本研究が初めてである。

第3章 裸子植物における AP2 subfamily に属する遺伝子の解析

種子植物は被子植物と裸子植物より成る。裸子植物から被子植物への進化では花弁、心皮、2枚目の珠皮の獲得が起こっている。シロイヌナズナ ant 突然変異体では、珠皮の欠損、花器官の減少、葉のサイズの減少がおこることから、ANT 遺伝子は珠皮、花器官、葉など側生器官の発生、サイズの決定に関わる機能を持つと考えられている。シロイヌナズナ ap2 突然変異体では、がく片が心皮におきかわるホメオティック変異がおこることから、AP2 遺伝子は花器官形成の ABC モデルの A クラス遺伝子であると考えられている。また、胚珠 identity 決定に関わることも明らかにされている。それではクロマツ PtANTL1、PtAP2L1、PtAP2L2 遺伝子は花弁、2枚目の珠皮を持たない裸子植物の生殖器官においてどのような発現様式を持つのだろうか。

PtANTL1、PtAP2L1、PtAP2L2 遺伝子について発現解析を行った。定量的 RT-PCR サザンハイブリダイゼーションでは、3 遺伝子がクロマツ雌性生殖器官の発生を通して発現していることが明らかにされた。また、解析した器官では、PtAP2L1、PtAP2L2 遺伝子の発現様式が異なること、PtANTL1、PtAP2L1 遺伝子の発現様式がほぼ一致することが示された。in situ ハイブリダイゼーションでは、雌性生殖器官におけるさらに詳細な発現解析を行い、この結果、組織レベルでも PtANTL1、PtAP2L1 遺伝子の発現様式がほぼ一致することが示された。また、PtANTL1 遺伝子は珠皮原基において発現していることが観察された。

第4章 ヒメツリガネゴケにおける AP2 subfamily に属する遺伝子の解析

ヒメツリガネゴケは遺伝子ターゲティングが可能なモデル植物で、孢子体は側生器官を持たない。コケ植物から種子植物への進化では、配偶体世代優占から孢子体世代優占の生活史へと大きな変化が起こっている。これまで AP2/EREBP multigene family に属する遺伝子は配偶体で発現、機能している報告はない。それではヒメツリガネゴケ PpANT1、PpANT2、PpANT3 遺伝子は側生器官を持たない孢子体、また葉様、茎様器官を持つ配偶体においてどのような発現様式、機能を持つのだろうか。

定量的 RT-PCR サザンハイブリダイゼーション、uidA 遺伝子 (GUS) 融合 (PpANT-GUS) コンストラクトを用いた発現解析を行なった結果、配偶体における PpANT2 遺伝子と PpANT3 遺伝子の発現様式が異なり、PpANT2 遺伝子は茎葉体の仮根基部で強く発現するのに対し、PpANT3 は茎葉体茎頂付近で強く発現していることが明らかにされた。PpANT2、PpANT3 遺伝子についてはそれぞれの遺伝子破壊株、二重遺伝子破壊株を作成しており、これらを用いた今後の機能解析が期待される。

第5章 総合考察

本研究により AP2/EREBP multigene family について以下のような進化が考えられる。植物の共通祖先は AP2 ドメインを1つ持つ EREBP subfamily に属する遺伝子を持っていた

が、AP2 ドメインの重複がおこり AP2 ドメインを 2 つ持つ AP2 subfamily が誕生した。さらに ANT グループの祖先遺伝子の AP2 ドメインリピート 1 において 10 アミノ酸残基の挿入がおこり、クラミドモナスと分岐して以降、陸上植物の共通祖先において AP2 subfamily は新たに ANT グループと AP2 グループにわかれたと考えられる。