

論文内容の要旨

論文題目 Functional analysis of homologs of floral regulator *FLO/LFY* genes
in the moss *Physcomitrella patens*

(花形成制御因子*FLO/LFY*遺伝子のヒメツリガネゴケ相同遺伝子の機能解析)

氏名 棚 橋 貴 子

近年のシロイヌナズナを中心とした数多くの研究により、花の形成を制御する複雑な遺伝子ネットワークの全貌が明らかになりつつある。このネットワークの中で、中心的な役割を担う因子の一つが、陸上植物特有の転写因子をコードしている*FLO/LFY*遺伝子である。被子植物シロイヌナズナの相同遺伝子*LFY*は、花成を促進する複数のシグナルを統合し、栄養成長から生殖成長への転換を誘導する。そして花器官のアイデンティティを決定する花のホメオティック遺伝子群(主にMADS-Box遺伝子群に含まれる)の転写を活性化することで花の形成の制御に深く関わる。花の形成を制御する*FLO/LFY*相同遺伝子の機能は被子植物の間で概ね保存されている。*FLO/LFY*相同遺伝子がMADS-Box遺伝子を発現誘導する機能は、裸子植物でも保存されていると推定されているが、シダ植物では保存されていないことが、それぞれの相同遺伝子の発現解析から示唆されている。しかしながら、被子植物以外の群では*FLO/LFY*相同遺伝子の機能欠損型変異体は得られていないため、それらの植物での*FLO/LFY*相同遺伝子の機能は分かっていない。

「*FLO/LFY*相同遺伝子→MADS-Box遺伝子」という制御系は花自身の出現よりも先に確立されていたらしいが、では*FLO/LFY*相同遺伝子はもともとどのような機能を担っていたのか。*FLO/LFY*相同遺伝子の祖先的機能とその進化を考察するために、本研究ではコケ植物における*FLO/LFY*相同遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。

まずFLO/LFY相同遺伝子に保存的な配列から縮重プライマーを設計し、RT-PCR法によりヒメツリガネゴケから2つのFLO/LFY相同遺伝子*PpLFY1*、*PpLFY2*を単離し、TAIL-PCR法によりそのゲノムDNA配列も決定した(図1 A, B)。両者は互いによく似た配列をしており(塩基配列で89.5%同一)、推定アミノ酸配列*PpLFY1*、*PpLFY2*はそれぞれ、シロイヌナズナLFYとの同一度が49.5%、48.5%、類似度が77.8%、78.1%であった。また両遺伝子はエクソン-イントロン構造も共通しており、被子植物の相同遺伝子よりもイントロンを1つ余分に含む構造をしていた。またゲノムサザン解析により(図1 C)、ヒメツリガネゴケのFLO/LFY相同遺伝子は今回得られた*PpLFY1*、*PpLFY2*のみであることが推定された。

RT-PCR法により*PpLFY1*、*PpLFY2*は茎葉体や胞子体で原糸体よりも強く発現していることが分かった(図2)。2つの遺伝子のより詳しい発現パターンを調べるために、*PpLFY1*-GUSまたは*PpLFY2*-GUSタンパクを発現するラインを作成した。融合タンパクの発現パターンを調べたところ、両者は共通した発現パターンを示した(図3)。胞子が発芽してできる原糸体では発現は見られず、芽でまず発現が観察された。芽は成長して茎葉をもつ茎葉体をつくるが、茎葉体の茎頂および側芽の茎頂で発現が見られた。生殖器官である造精器では発現は検出されなかったが、造卵器およびその内部の卵細胞ではその発生過程を通じて発現が検出された。また若い胚全体と発生中の胞子体の中の胞子嚢、足でも発現が見られた。

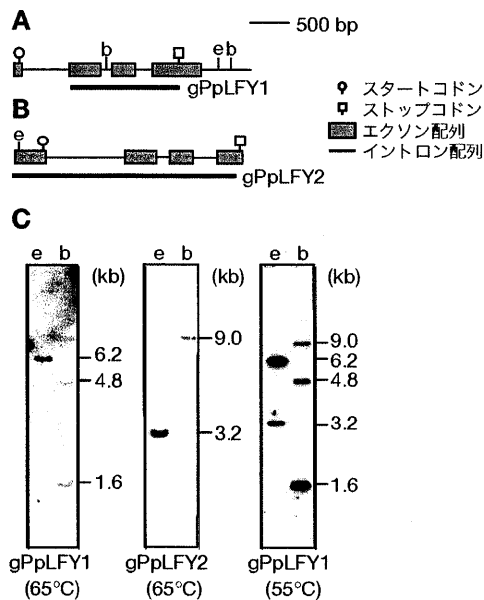


図1 *PpLFY1*、*PpLFY2*の遺伝子構造とゲノムサザン解析 (A) *PpLFY1* (B) *PpLFY2* (C) *PpLFY1*、*PpLFY2*のゲノムサザン解析ハイブリダイゼーションと洗浄は厳しい条件(65°C)と緩やかな条件(55°C)のそれぞれで、*gPpLFY1*、*gPpLFY2*をプローブに用いて行った。b: *Bgl*II, e: *Eco*RI

次に*PpLFY1*、*PpLFY2*の機能を推定するためにそれぞれの一重破壊株、および二重破壊株を作成した。これらの株は原糸体、茎葉体の形態には野生株との差異は見られず、造精器や造卵器の形成も正常だった。ところが胞子体の形成を誘導すると、野生株が90%以上の茎葉体で胞子体を形成する条件で、*PpLFY2*一重破壊株はそれより若干低い胞子体形成率を示した。*PpLFY1*一重破壊株はラインによる違いがあったが、

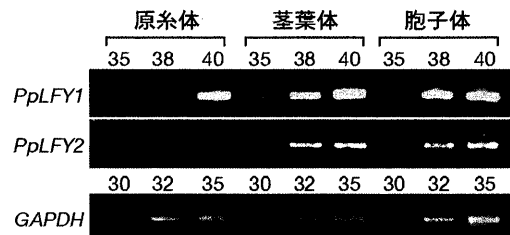


図2 *PpLFY1*、*PpLFY2*のRT-PCRによる発現解析

いずれも野生株よりもずっと低い孢子体形成率を示し、二重破壊株はどのラインでもほとんど孢子体を形成しなかった(表1)。

遺伝子破壊株で孢子体を形成しないのはどの発生段階で欠損があるためなのか。PpLFY1-GUSおよびPpLFY2-GUSの発現は造精器や精子で検出されなかったこと、また遺伝子破壊株でも造卵器の中に侵入する精子が観察されたことから、遺伝子破壊株で精子に欠損はないと考えられた。そこで造卵器に注目して、遺伝子破壊株の卵細胞および胚の共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察を試みた(図4)。野生株では、受精後の接合子は造卵器腹部の空間を満たすように膨張して、造卵器の長軸に垂直な方向で分裂して、2細胞の胚を形成する。一方でPpLFY二重破壊株では、膨れた接合子および2細胞以上の胚は全く観察されなかった。観察されたのは一細胞の未受精卵または膨張していない接合子のみで、二重破壊株の卵細胞は受精後の接合子の段階で発生が止まっていると推測された。

さらに遺伝子破壊株の卵細胞と野生株の精子の交雑を試みて、遺伝子破壊株の卵細胞の受精能が正常かどうかを検証した。その結果、遺伝子破壊株と野生株の交雑受精によって生じたと考えられる孢子体が5個得られた。これらの孢子体は形態に異常はなく、含まれる孢子の発芽率もほぼ正常だった。これにより遺伝子破壊株は受精能に欠損はないことがわかり、PpLFY1、PpLFY2は受精後の過程で機能する因子であることが確かめられて、CLSMによる観察結果とも合致した。

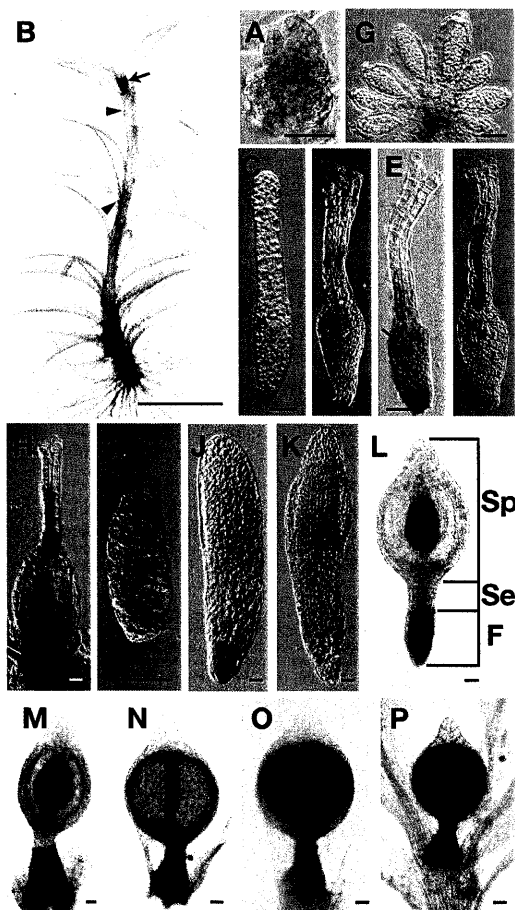


図3 PpLFY2-GUSタンパク発現ラインのGUS染色パターン (A) 芽 (B) 茎葉体 (矢印:茎頂 矢尻:側芽) (C-F) 造卵器 矢印:卵細胞 (G) 造精器 (H) 造卵器とその内部の若い胚 (I-K) 単離した胚 (L-P) 孢子体の発生 Sp:孢子囊 Sp:さく柄 F:足
スケールバー 50 μm in (A,C-P); 1 mm in (B).

表1. 各株の孢子体形成率

調べた株	孢子体をつけた茎頂	
	%	N
Wild type	93.9	441
PpLFY1一重破壊株		
PpLFY1-dis-1	1.3	318
-2	26.7	648
-3	0	307
-6	23.0	417
-7	24.4	328
-8	0.9	438
PpLFY2一重破壊株		
PpLFY2-dis-1	84.0	194
PpLFY2-GUS-3	88.5	340
-5	89.6	365
PpLFY1 PpLFY2二重破壊株		
PpLFY1 PpLFY2-dis-1	0.4	936
-2	0.8	1777
-3	0.3	1429
-5	0.6	724
-6	0.5	1768

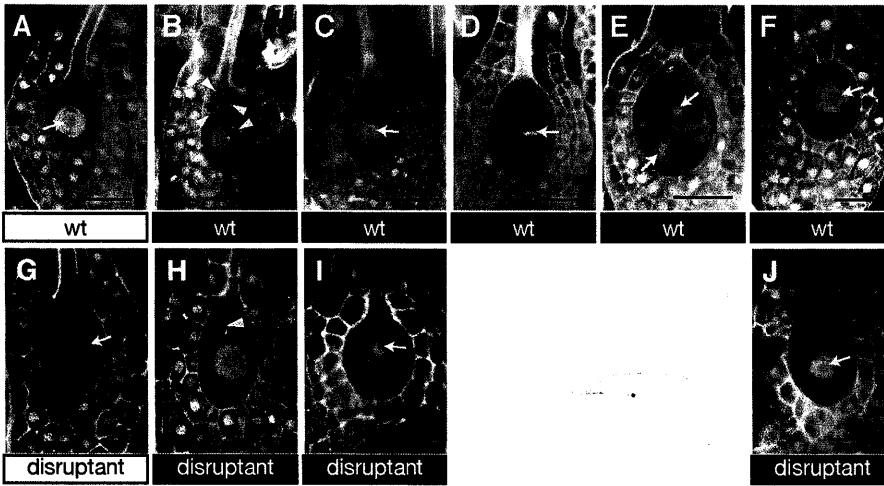


図4 卵細胞、接合子、胚の発生 (A-F) 野生株 (G-J) *PpLFY*二重破壊株 (A,G) 若い卵細胞 (B,H) 造卵器に精子(矢尻)が侵入 (C,I) 受精卵/接合子 (D) 接合子の第一分裂 (矢印は分裂面) (E) 2細胞期の胚 (F,J) 未受精卵 (D) 以外の矢印は細胞核を示す。スケールバー 25 μ m

*PpLFY*二重破壊株がまれにつくる胞子体は異常な形態を示した(図5)。これらの形態異常の胞子体は、ヒメツリガネゴケと近縁の*Physcomitrium cyathicarpum*で報告されている単為生殖で形成された胞子体と共通した形態をしており、*PpLFY*二重破壊株で形成された胞子体も単為生殖によるものである可能性が高かった。一方で*PpLFY*二重破壊株で形成された胞子体は、その他の異常形態も観察され、胞子の稔性も非常に低かった。これらは単為生殖により形成された胞子体には見られない特徴で、*PpLFY*の機能欠損により生じた表現型だと考えられた。異常形態の胞子体は器官形成は概ね正常だったが、細胞分裂に異常があることが組織切片の観察から明らかとなった。このことは、*PpLFY1*と*PpLFY2*が接合子の第一分裂に至る過程のみならず、胞子体のその後の形成過程でも細胞分裂を制御していることを示唆している。

この研究により、ヒメツリガネゴケの*FLO/LFY*遺伝子 *PpLFY1*、*PpLFY2*は受精後の接合子の第一分裂を制御する因子であることが明らかとなった。また2つの遺伝子は、その後の胞子体形成においても適切な細胞分裂を制御することが示唆された。これらの結果は、*PpLFY*遺伝子が胞子体形成を細胞分裂の制御を介して普遍的に制御していることを示している。被子植物の*FLO/LFY*遺伝子は花形成の制御因子であり、報告のある機能欠損型変異体の中に細胞分裂に異常のある変異体は一切報告されていない。*FLO/LFY*遺伝子は被子植物でもコケ植物でもその発生過程に重要な機能を果たす因子であるが、陸上植物の系統によって全く異なった機能をもつ因子に進化したことが本研究により明らかとなった。

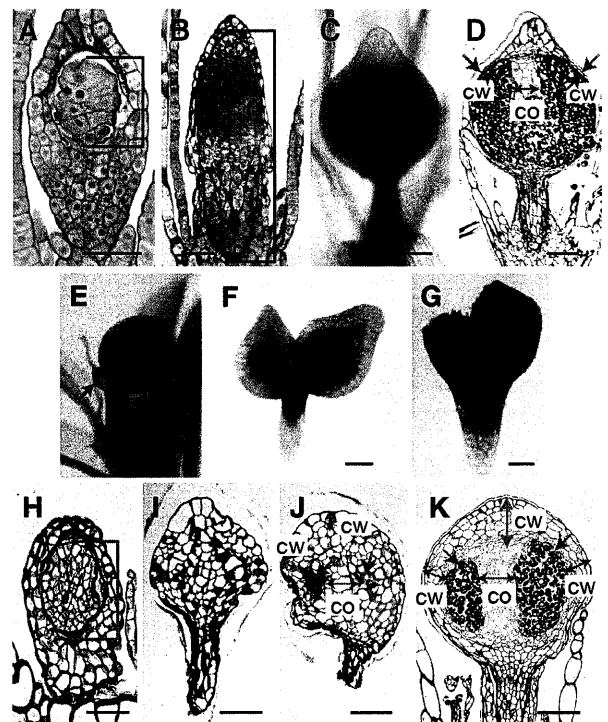


図5 胞子体の発生 (A-D) 野生株 (E-K) *PpLFY*二重破壊株 (A,B) 造卵器内で成長する胚 (C,D) 成熟した胞子体 (E,F) 単為生殖で形成された胞子体にも共通して見られる異常形態の胞子体 (G-K) 異常形態の胞子体 スケールバー 100 μ m