

論文内容の要旨

論文題目 Isolation and characterization of genes
differentially expressed in the male flower bud
of the dioecious plant *Silene latifolia*
(雌雄異株植物 *Silene latifolia* の雄花で特異的に
発現する遺伝子の単離と同定)

氏 名 アムル・モハメド・アジーズ

Amr · Mohamed · Ageez

序 論

ヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) は形態学的に識別可能な性染色体 X と Y をもっている。雄株 (22A+X+Y) は 10 本の雄蕊と退化した雌蕊をもつ雄花を発達させ、雌株 (22A+2X) は花柱と上位子房と 10 本の退化した雄蕊をもつ雌花を発達させる。ヒロハノマンテマの雌花に黒穂菌 *Microbotryum violaceum* が感染すると、退化していた雄蕊は葯を発達させるようになる。発達した葯には花粉の代わりに黒穂胞子 (teliospores) が含まれる。

ホメオボックスは、動植物の発生や発達過程にかかわる多くの遺伝子に存在する 180bp のコンセンサス配列である。生殖器官特異的なホメオボックス遺伝子は数多く同定されているが、雌雄異株植物の雄花と雌花の性的な分化にかかわるホメオボックス遺伝子についてはほとんどわかっていない。本研究では、ヒロハノマンテマで 2 つのホメオボックス遺伝子を単離し、その発現パターンを花器官分化過程で解析した。

健康な雄花蕾と黒穂菌が感染した雌花蕾を用いた cDNA サブトラクション法を用いて、葯の発達過程後期で雄花の遺伝子制御にかかわる cDNA を単離した。それらの cDNA は葯の発達や花粉の成熟に直接関連しているように見えた。それらは、雄性不稔を遺伝子操作する方法を考案し、雄性不稔回復遺伝子と稔性遺伝子との相互作用を深く理解するうえでも極めて有益である。

結果と議論

1. 2 つのホメオドメイン・ロイシンジッパー遺伝子の単離と解析

単離された 2 つの遺伝子、*SIHDL1* と *SIHDL2* は、特徴的な転写因子である HD-Zip をコードして

いた。HD-Zip領域の前に酸性アミノ酸領域があり、ロイシンジッパーに直接つながったホメオドメイン、6残基のロイシンの位置には疎水残基と親水残基があった(図1)。SIHDL1とSIHDL2のHD-Zip部位と他の植物のホメオドメインとの比較から、それらのアミノ酸配列がHD-ZipのクラスIとクラスIIにそれぞれ最もよく似ていることがわかった。

*In situ*ハイブリダイゼーション(ISH)は、SIHDL1が特異的に葯の最外層と雌蕊の内層で途切れ途切れに発現しており、これはSIHDL1の転写産物がヒロハノマンテマの花器官の表皮組織形成の初期発達段階で働いていることを示唆している(図2A-C)。葯と雌蕊の発現パターンは、この遺伝子が生殖器官の分化にかかわっていることを示唆している。SIHDL2の転写産物の著しい蓄積が雄花の葯と花粉にあることがリアルタイムPCRとISHで見いだされた。ヒロハノマンテマの花器官での特異的な遺伝子発現がSIHDL1とSIHDL2によって制御されている可能性がある(図2)。

2. 雄花蕾で発現する雄の稔性にかかわる遺伝子の単離と同定

ヒロハノマンテマの稔性花粉で発現する遺伝子を単離するため、健康な雄花蕾と黒穂菌感染雌花(両性花の雄性不稔)のcDNAサブトラクションを行った。タペート細胞の活性と花粉の発達が起こるので、サブトラクションには蕾長1.0-3.5 mm(ステージ8-11)を選んだ。サブトラクションライブラリーの作成にはPCR選別cDNAサブトラクションキット(Clontech, Palo Alto, CA)を用いた。2回の連続したサブトラクションによって1356のcDNAクローンライブラリーが構築できた。ライブラリーの成否を確かめるために、288のクローンをランダムにピックアップしてシーケンスした。36のクローンについては、先に同定された雄花特異的な遺伝子*men2*, *men3*, *men8*, *men9*, *men369*, *MROS3A*, *MROS3B*, *ST1*, *CCLS4*, *SIX1*と*SLP2*に一致していた。

健康な雄花と雌花、根、葉のmRNAからcDNAを合成し、それをPCRで増幅してパーチャルノーザンプロット解析を行った。増幅cDNAはスーパーSMART PCR cDNA合成キット

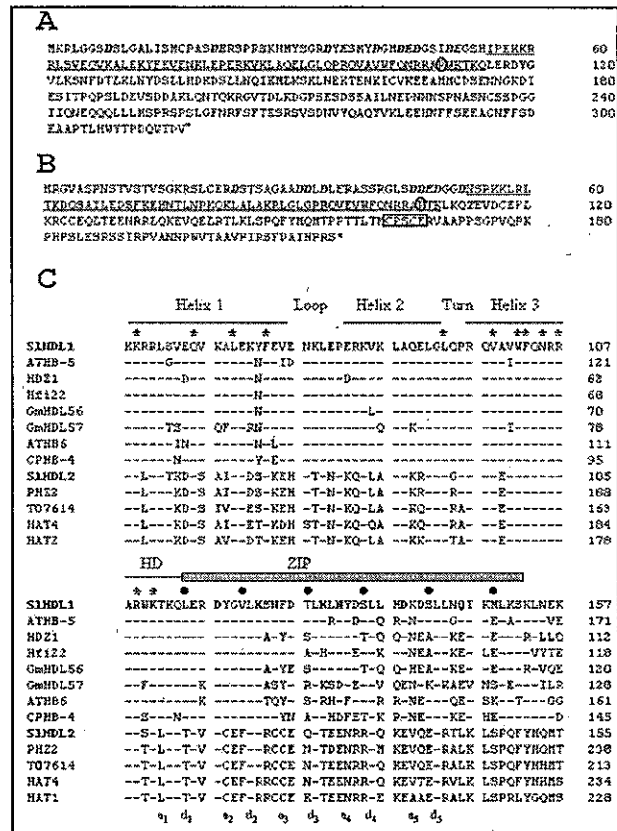


図1. SIHDL1とSIHDL2の塩基配列 AとB SIHDL1とSIHDL2のアミノ酸配列。HDモチーフには下線を引き、Zipの周期的なLeu残基はイタリックで、HDに先行するアミノ酸を太字とイタリックで示す。C, 異なる生物のHDとZipの塩基配列の比較。ダッシュはSIHDL1と同じものを示す。

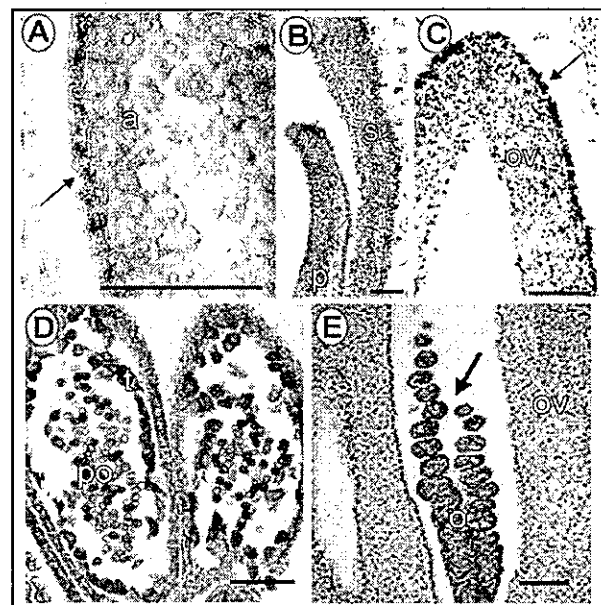


図2. 雌雄の蕾におけるSIHDL1とSIHDL2の空間的発現 A, 葯の外層におけるSIHDL1の発現 B, 雌花後期のがくと花弁におけるSIHDL1の発現 C, 雌蕊の外層におけるSIHDL2の発現 DとE, 葯と胚珠におけるSIHDL2の発現

(Clontech)を用いて精製した。雄特異的あるいは雄で多く発現している5つの特異的なcDNAクローンが同定できた。これら5つのクローンの転写産物は雄の蕾でのみ検出され、*SIGH17*、*SIAPG*、*SISs*、*SIMDL1*と*SIChs*と名付けられた。それらのアミノ酸配列は、グリコシル脱水素酵素17の蛋白質ファミリー(*Gh17*)、葯特異的プロリンリッチ(APG)蛋白質前駆体、ストリクトシリンジン合成酵素ファミリー(*Ss*)、マンデロニトリル分解酵素ファミリー(*MDL1*)、とチャルコン合成酵素ファミリー(*Chs*)にホモロジーがあった。

SIGH17、*SIAPG*、*SISs*、*SIMDL1*と*SIChs*の雄花の蕾の発達段階における発現パターンをバーチャルノーザンプロット解析で調べた。1.0~3.5 mmの若い雄花の蕾(ステージ8~11)と7.0-15.0 mmの成熟した雄花(ステージ12とそれ以上)から得られたcDNAをPCRで増幅した。*SIGH17*、*SIAPG*、*SISs*、*SIMDL1*と*SIChs*のcDNAクローンはバーチャルノーザンで若い蕾の時期に強くハイブリダイズした。これら5つの転写産物は、強いタペート細胞活性、カロース沈着、減数分裂に入って花粉四分子を作る花粉母細胞によって特徴付けられる時期に、特異的に蓄積されていた。ISHの結果は、*SIGH17*の転写産物は成熟した花粉に蓄積することを明らかにした。*SIAPG*と*SIChs*はタペート細胞で発現していたが、その発現はタペート細胞の崩壊とともに止んでいた。*SIMDL1*と*SISs*の転写産物はタペート細胞と小孢子で花粉が成熟するまで発現していた。

*SIGH17*と*SIChs*の全長をRACEシステム(Clontech)を用いて単離した。*SIGH17*タンパク質グループは系統樹では葯特異的な小さなサブグループがあった(図3)。タペート細胞と花粉における*SIGH17*の強い発現はISHで確かめられている。系統樹では、*SIChs*は、すでに単離された6つのカロース合成酵素のサブグループに分類できる(図4)。Chs酵素は花粉の発達に必須であることが示されている。ペチュニア、トウモロコシ、タバコの花の葯でChs活性を破壊すると不稔花粉になる。

3. 雄花の葯で強く発現するヒロハノマンテマのソマチン様タンパク質

雄花と黒穂菌感染雌花のサブトラクションで作成されたcDNAライブラリーのスクリーニングで、ヒロハノマンテマのソマチン様タンパク質遺伝子(*SITh*)のcDNAが単離された。異なる植物から単離されたソマチン様タンパク質は、生体内で菌類病原菌の成長を阻害することが示され

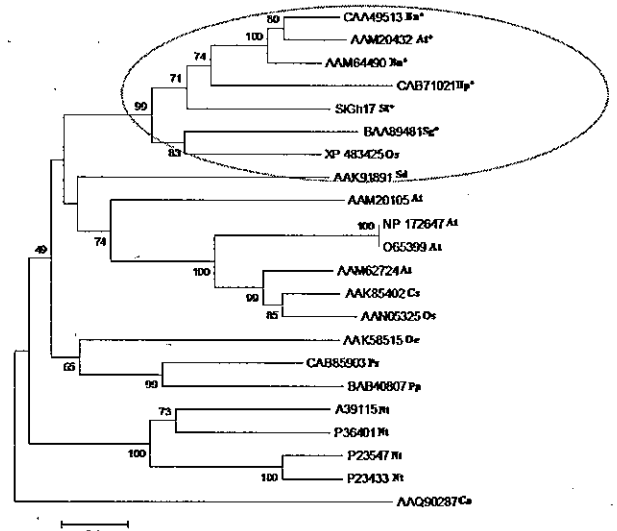


図3 *SIGH17*の系統解析 植物Gh17のアミノ酸配列のアライメントを系統解析した。*SIGH17*クレード(星印)は雄生殖器官特異的であった。

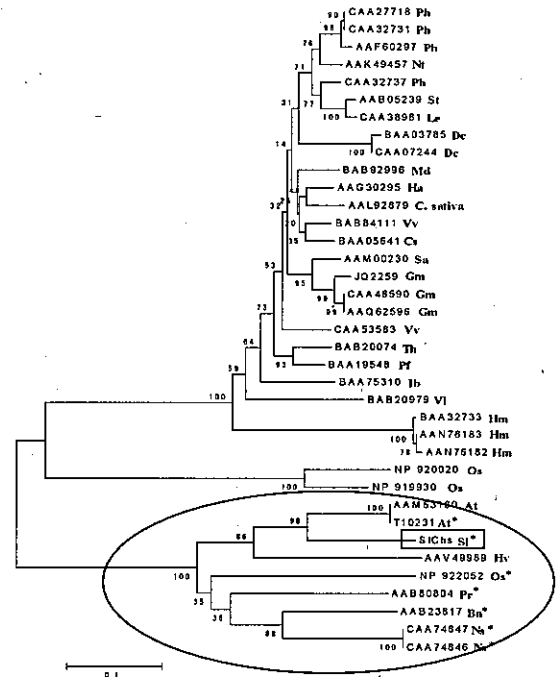


図4 *SIChs*の系統解析 植物Chsファミリーのアライメントを系統解析した。*SIChs*クレード(星印)は雄生殖器官特異的であった。

ている。雄花と雌花から単離した*SITH* のcDNAを調べると、*SITH* の転写産物は健康な雄花の蕾で非常に多くまた雌花の蕾でも発現していることがわかった。*SITH* 遺伝子の全長cDNAはRACEシステムを使って単離した。ゲノミックサザンハイブリダイゼーションのパターンから*SITH* が単一コピー遺伝子であることがわかった。

植物ソマチンのアライメントから、*SITH* は疎水性のN末端シグナル配列をもったタンパク質をコードしていることがわかった。この分泌タンパク質は、多くの単子葉植物で見つかっている保存的なCys残基の欠損型17-kDではなく、保存的なCys残基を保持した24~25-kDのソマチンタンパク質だと予測される。*SITH* の発現パターンをISHを用いて調べた。雄花と雌花両方の蕾の発達段階の後期に*SITH* の転写産物は蓄積していた。*SITH* 転写産物は雌花の蕾の雌蕊と花弁に蓄積されていることがモニターされている。これに対して、雄花の蕾では、*SITH* 転写産物は明確に雄花の蕾の葯と特に四分子と花粉で蓄積していた。また、タペート細胞やがく片、花弁では発現は認められなかった。

SITH cDNAの発現パターンは*SIGH17* cDNAと同様であった。Trudelら(1998)は、いくつかのソマチン様タンパク質が特異的に結合する β (1,3)グルコネースが、成熟花粉の発達を導く*SIGH17* のような遺伝子と*SITH* が相互作用する可能性があることを明らかにしている。

結 論

1. 二つのホメオドメイン・ロイシンジッパー遺伝子をヒロハノマンテマ雄花の蕾から単離した。
 - a. *SIHDL1* は葯と雌蕊の表皮の発達段階の初期に機能する。それは花器官の形成と機能を制御する遺伝子と相互作用すると考えられる。
 - b. *SIHDL2* は雄の生殖器官で高い発現レベルであった。それは同様の部位で特異的な標的に働きかけているものと考えられる。
2. ヒロハノマンテマの雄花の蕾の葯で特異的に発現する7つのcDNAクローンを単離した。
 - a. 5つの遺伝子(*SIGH17*, *SIAPG*, *SISs*, *SIMDL1* と *SICHs*) は、雄の生殖器官発達にともなって起こるタペート細胞活性の増大期間に特異的に発現する。
 - b. *SIGH17* は触媒部位と*Gh17* ファミリーに保存的なアミノ酸残基をもっている。それは系統樹で葯特異的な*Gh17*タンパク質の小さなサブグループに分類できる。
 - c. *SICHs* は触媒部位と*Chs* ファミリーに保存的なアミノ酸残基をもっている。それは系統樹で葯特異的な*Chs*タンパク質の小さなサブグループに分類できる。
- 3- *SITH* 遺伝子は葯の発達の後期の四分子と花粉で高度に発現している。

参考文献

1. Ageez A, Matsunaga S, Uchida W, Sugiyama R, Kazama Y, Kawano S. (2003) Isolation and characterization of two homeodomain leucine zipper genes from the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genes Genet Syst.* 78, 353-361.
2. Ageez A, Kazama Y, Sugiyama R, and Kawano S. (2005) Male-fertility genes expressed in male flower buds of *Silene latifolia* include homologs of anther-specific genes. *Genes Genet Syst.* submitted.