

論文の内容の要旨

論文題目

Cloning and characterization of MADS-box genes from
the basal eudicot *Ranunculus sceleratus* (Ranunculaceae)
(基部真正双子葉類に属するキンポウゲ科タガラシにおける
MADS-box 遺伝子群の単離及び発現解析)

氏名： 牛久(佐藤) 由夏

第 1 章 General Introduction

被子植物の生殖器官である花は、一般的にがく片・花弁・雄ずい・心皮という器官で構成されているが、これら花器官の数や配置は多様である。祖先的な分類群であるモクレン科やキンポウゲ科は離生心皮であり、単一雌ずいが数個〜多数存在する（図 1、2）。一方、中核真正双子葉類は合生心皮であり、2つ以上の心皮が融合して1つの複合雌ずいを形成している。このように、祖先的な分類群と中核真正双子葉類とは、花器官の形態形成メカニズムが異なることが予想される。本研究では、祖先的な形質である離生心皮を持つ植物において、花形態形成のメカニズムを調べることで、花器官の数が変動できる原因を明らかにすることを目的とする。

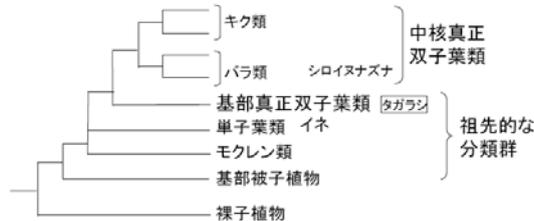


図1) 被子植物の簡易系統樹

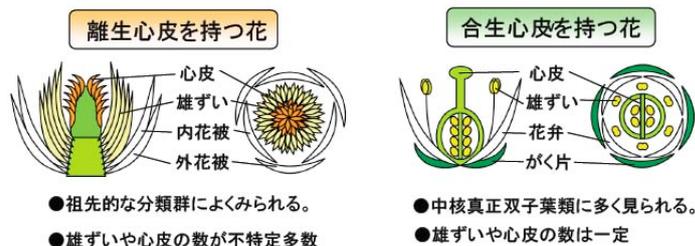


図2) 離生心皮と合生心皮の説明

中核真正双子葉類に属するシロイヌナズナを用いた研究によって、花の形態形成の制御機構を説明するABCモデルが提唱されている(図3)。ABCモデルとは、将来花になる花芽分裂組織上において、A機能、B機能、C機能という3種類の遺伝子が、それぞれ隣り合う2つの領域にまたがって機能するという仮説である。領域1ではA機能遺伝子が単独でがく片を規定し、領域2ではAとB機能遺伝子が花弁を、領域3ではBとC機能遺伝子が雄ずいを、領域4ではC機能遺伝子が単独で心皮(雌ずい)を規定する。また、AとC機能遺伝子の発現は拮抗している。シロイヌナズナでは、A機能遺伝子として*AP1*、*AP2*が、B機能遺伝子として*AP3*、*PI*が、C機能遺伝子として*AG*がそれぞれ同定されており、*AP2*以外は全てMADS-box遺伝子ファミリーに属する。

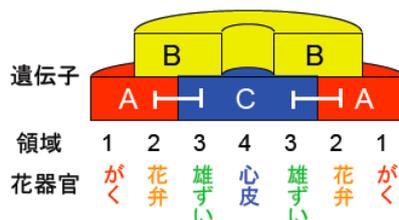


図3) ABCモデル

花の形態形成に関与するMADS-box遺伝子ファミリーの系統解析の結果から、中核真正双子葉類の基部で重要な遺伝子重複が起きたことが示唆されている(図4)。この時に、*AP1/FUL-like* 遺伝子群は *FUL-like* グループからABCモデルのA機能遺伝子を含む *euAP1* と *euFUL* という新しいグループを生み出し、B及びC機能を持つ遺伝子群でもそれぞれ新しいグループが生み出された事が示唆されている。このことから、中核真正双子葉類とその外側の分類群では花形態形成のメカニズムが異なることが予想される。よって、ABCモデルでは全ての被子植物の花形態形成を説明することが難しいと考えられる。この可能性を立証するためには、祖先的な分類群の植物を用いて花形態形成に関わる遺伝子の機能解析を行う必要がある。

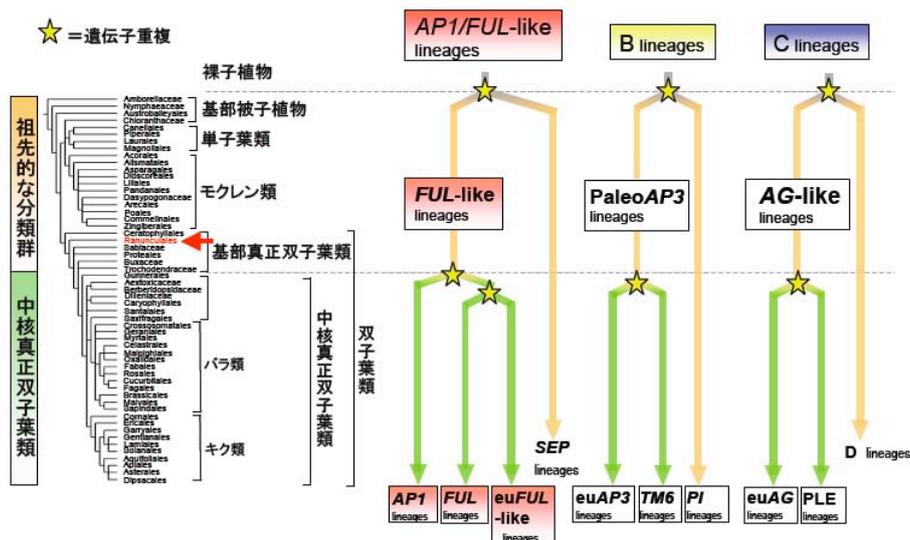


図4) ABCモデルのMADS-box遺伝子群の遺伝子重複

そこで私は、祖先的な分類群の基部真正双子葉類に属し、離生心皮を不特定多数持つキンポウゲ科のタガラシに着目した。タガラシの花は多数の雄ずい・雌ずいが突出した花床にらせん状に配置する祖先的な花形態を持つ。このように多数の花器官を生み出すためには、花器官が全て形成されるまで花床の先端に花芽分裂組織が維持され続けている可能性が考えられる。

第2章 タガラシにおける *FUL*-like 相同遺伝子の単離および発現解析

本研究では、花芽分裂組織を特定化する機能を祖先的な役割として持つとされる *AP1/FUL*-like 遺伝子群に着目した。この遺伝子群の *euAP1* グループにはシロイヌナズナの *AP1* が、*euFUL* グループには *FUL* が属している。この2つの遺伝子はさらに花器官形成にも関与し、*AP1* はABCモデルのA機能を持ち、がく片と花弁を規定し、C機能遺伝子と発現が拮抗していると報告されている。また、*FUL* は果実のさやと苞葉の正常な発達に関与していると報告されている。

第2章では、祖先的な花形態を持つタガラシから *AP1/FUL*-like 相同遺伝子を単離し発現パターンを調べることで、*AP1/FUL* 遺伝子群が離生心皮を不特定多数作ることにおいてどのような役割を果たしているのか考察することを目的とした。

本研究では、まずタガラシから *RascFUL1*, 2, 3 を単離した。次にこれらの遺伝子と *AP1/FUL*-like 相同遺伝子群を用いて、ML法により系統樹を作製した。その結果、*RascFUL1*, 2, 3 は他の基部真正双子葉類と同じ *FUL*-like グループに属していた。

生殖成長期の植物体において、どの組織で *RascFUL1*, 2, 3 の発現が見られるのか調べるために半定量的 RT-PCR を行った。その結果、*RascFUL1* と 2 は同じ発現パターンを示し、花序、

開花前のつぼみ、ロゼット葉、苞葉、がく片、心皮、果実において強い発現が見られた。このことから、*RascFUL1* と *2* は同じ機能を持つ可能性が考えられる。一方、*RascFUL3* は花序や花芽分裂組織があると思われる部位や全ての花器官において発現が検出されず、花の形態形成には関与していないと考えられたため、以降の解析には用いなかった。次に開花前の花芽における *RascFUL1* の発現パターンを調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、発生初期の花芽において *RascFUL1* は苞葉、花序および花芽分裂組織、がく片・雄ずい原基で発現が見られた。発生後期には花弁と雄ずいの発現は見られなくなったが、心皮では引き続き発現が維持されていた。以上の結果より、*RascFUL1* は他の *API/FUL*-like 遺伝子と同様に花序及び花芽分裂組織で発現が見られることから、分裂組織のアイデンティティの決定という役割を持っていることが示唆された。また、全ての花器官原基で発現している可能性があることから、*RascFUL1* は花器官原基が発生する時に必要な遺伝子であると考えられる。

第3章 祖先的な分類群における花形態形成のメカニズムの仮説

近年、ABCモデルのA機能への疑問を投げかけた論文がいくつか報告されている。シロイヌナズナの *API* は、C機能遺伝子の発現を抑制する機能はなく、A機能の概念には完全に一致していないとの意見が挙げられている。実はABCモデルが発表されたのと同時期に、A機能が無いBCモデルが提唱されている。このモデルは、「分裂組織の一般的な特徴は、側生の器官を生み出すことである」という考えを基本としている。他に遺伝子がなくても花芽分裂組織の側生器官としてがく片が生み出され、そこにB、C機能遺伝子を加えられて側生器官として花弁、雄ずい、心皮が完成する。このように、A機能という概念がなくてもがく片や花弁といった花被が生じることを説明することが出来る (図5)。



図5) BCモデル

第3章では、タガラシからB機能 (*PI*) 相同遺伝子として *RascPI* を、C機能 (*AG*-like) 相同遺伝子として *RascAG* を単離し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、発生初期の花芽において *RascPI* は花弁と雄ずい原基で発現が見られ、*RascAG* は雄ずい原基と将来心皮が生じる領域で発現が見られた。このことから、タガラシの *RascPI* と *RascAG* は従来のABCモデルのB、C機能を保持していることが示された。*RascAG* が発現している心皮で

RascFUL1 も発現していることから、*RascFUL1* には ABC モデルの A 機能はないことが示唆された。

本研究で得られたタガラシの *FUL*-like 相同遺伝子及び B、C 機能相同遺伝子の発現パターンの結果と、BC モデルの考えを基にして、離生心皮に見られるような不特定多数の花器官を生み出すしくみについて仮説を立てた (図6)。花序及び花芽分裂組織アイデンティティ遺伝子である *API/FUL*-like 遺伝子は、C 機能遺伝子に発現が抑制されることがないため、花床の先端の分裂組織は無限性を維持され、側生器官として花器官原基を作り続けるのだろう。また、B 及び C 機能相同遺伝子が発現する領域が増減することによって、雄ずいや心皮原基の数が増減することも考えられる。このように本研究で提案した仮説によって、多数の離生心皮を作り出すタガラシの花形態形成のメカニズムを説明することができた。

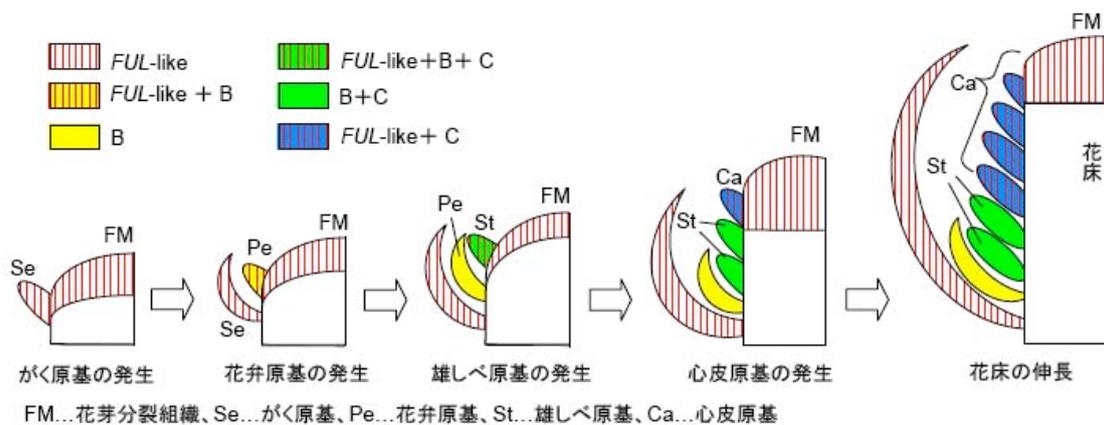


図6) タガラシにおける多数の離生心皮を作り出すしくみを説明した仮説

第4章 総合考察

現在までに、中核真正双子葉類における花の形態形成のしくみについてはよく研究されてきたが、*API/FUL*-like 遺伝子群の遺伝子重複前の祖先的な分類群における花の形態形成についての報告は非常に少ない。本研究において、遺伝子重複の直前に分岐した分類群であるキンポウゲ科のタガラシでは *API/FUL*-like 相同遺伝子には A 機能がないことが示唆された。また、祖先的とされる離生心皮という花形態をもつタガラシを用いたことによって、ABC モデルでは説明しきれない祖先的な分類群における花形態形成のしくみを説明する仮説を立てることができた。

現在までに、祖先的な分類群の多様な花形態を説明するモデルがいくつか提唱されている。The 'sliding Boundary'モデルは、B 機能遺伝子の発現する領域が移動することによって、ユリやチューリップの様にながく片と花弁が同じ形態になることを説明している。また、The fading borders モデルは、A、B、C 機能遺伝子の発現領域の境目が曖昧なため、基部被子植物でよく

見られるような中間形の花器官ができることを説明している。しかしこれらのモデルはあくまでも A 機能の存在を前提としており、ABC モデルの単純な変形に留まっている。

それに対して本研究のモデルは、従来の A 機能はない。そして、FUL-like 遺伝子の花芽分裂組織を維持することと C 機能遺伝子と発現領域が拮抗しないという機能を F 機能と新たに命名した (図 7)。このモデルは、領域の幅が増減することによって、花器官の数が増減することを説明できる (図 8)。このように、本研究で提案したモデルは、花器官の数が変わりやすい祖先的な花形態を説明できる初めてのモデルである。

さらに、タガラシは一年生草本でモデル植物化が期待されるため、これら遺伝子の機能解析を将来行えるであろう。

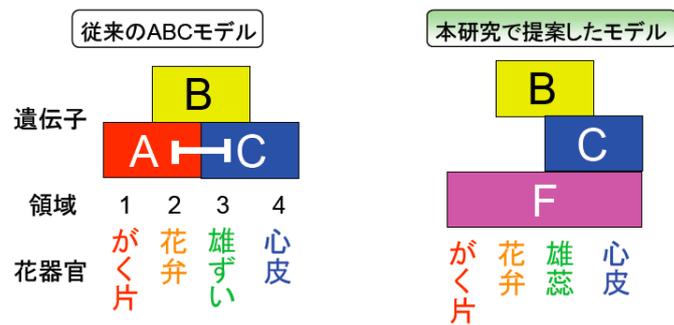


図 7) 従来の ABC モデルと本研究で提案したモデルの比較

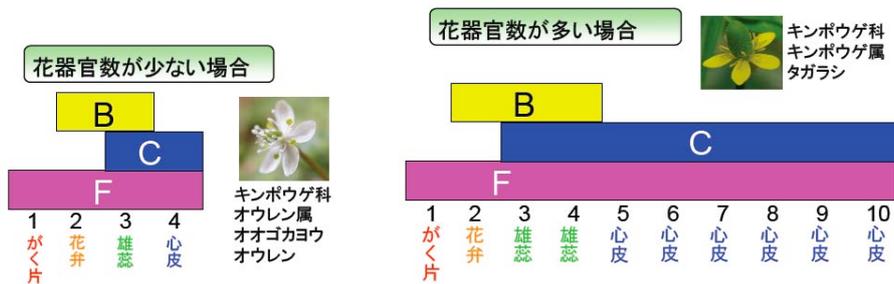


図 8) 本研究で提案したモデルによる花器官数が少ない又は多い場合の説明