

氏名 岡本裕行

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大乙第15号

学位授与の日付 平成8年3月21日

学位授与の要件 生命科学研究科

学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 シロイヌナズナにおける花芽形態形成過程を支配する
ホメオティック遺伝子APETALA3の単離とその
解析

論文審査委員 主査教授 村田紀夫

教授 西村幹夫

助教授 渡辺正勝

教授 中村研三

（名古屋大学）

教授 岡田清孝

（京都大学）

論文内容の要旨

花の形態は八重咲きの存在などのように、さまざまな変異の種類が知られている。しかし、どのような遺伝子によってそれが支配されているのかについてはあまり解析が行われてこなかった。その理由として、それまで解析が行われていた植物は観賞用の草木や穀物であり、詳しい遺伝的解析がされていても植物の栽培に広大な温室あるいは農場を必要としていたり、栽培に時間がかかり実験のサイクルが長くなってしまおうという問題を持っていた。

これらの問題を解消できる分子遺伝学的解析に適したモデル植物として、シロイヌナズナが近年注目されている。シロイヌナズナは小型の植物であり、世代時間が短く、ゲノムサイズも小さい。この利点を生かして、現在まで様々な遺伝子が単離されている。花の形態についても多くの、形態が異常になる突然変異体が単離されてきた。このうち、*apetala3(ap3)*突然変異体は花卉ががく片に、雄しべが心皮（雌しべ）に転換するホメオティック突然変異体である。遺伝学的解析より、野生型の植物体では*AP3*遺伝子は花卉と雄しべのみで発現し、*PISTILLATA(PI)*遺伝子産物(*pi*突然変異体は*ap3*突然変異体と同じ表現型を示す)と相互作用して機能するというモデルが示されていた。しかし*ap3*突然変異体はEMS処理によって得られた点突然変異体であるため、それ以上の遺伝子の単離などの分子生物学的解析が困難であった。

1990年に、園芸植物であるキンギョソウで表現型の変化が全く同じである突然変異体*deficiens(defA)*の遺伝子が単離された(Sommer et al.1990)。*DEFA*遺伝子はヒトの転写因子であるSRFと酵母のMCM1のDNA結合領域(MADS Box)とホモロジーを持っており、転写制御遺伝子であることが示唆された。そこで、シロイヌナズナにおける*DEFA*遺伝子の相同遺伝子を単離すれば、*AP3*あるいは*PI*遺伝子が単離できるのではないかと考えてそれらの遺伝子を単離し、機能を解析することを目標として研究を開始した。

まず*DEFA*のcDNAをPCRにより単離し、それをプローブとして穏やかな条件でノーザンブロットティングを行ったところ、シロイヌナズナの花のpoly-(A)⁺RNAでバンドがみられたので、花のpoly-(A)⁺RNAよりcDNAライブラリーを作成し、スクリーニングを行った。150000個のファージをスクリーニングした結果、3個のクローンを単離したが制限酵素マッピングの結果、これらのクローンは同じ遺伝子によるものであることが判明した。そこでこのcDNAの塩基配列を決定したところ、全長は960bpで232アミノ酸からなるタンパクをコードしうることやそのアミノ酸配列を*DEFA*タンパクと比較したところ、全体で60%のホモロジーを持っていた。しかも*DEFA*タンパクと同様にMADS Boxを持っており、MADSドメイン部分のアミノ酸配列の相同性は90%であった。このことから、単離した遺伝子は*DEFA*遺伝子の相同遺伝子であると考えられ、*ADAI*と命名した。

次に*ADAI*遺伝子のゲノム構造を明らかにするために、cDNAをプローブとしてシロイヌナズナのλDASH IIゲノムライブラリーをスクリーニングした。得られたクローンの構造を決定したところ、*ADAI*ゲノム遺伝子は6個のイントロンに挟まれた7個のエクソンから構成されていた。これらのイントロンとエクソンの境界部分の位置は*DEFA*遺伝子とすべて一致しており、*ADAI*遺伝子と*DEFA*遺伝子とは進化的にも非常に近いものと考えられた。

*ADAI*遺伝子はMADS Boxを持っているが、*DEFA*以外のMADS Boxを持つ遺伝子についてMADS

ドメイン間の相同性を比較した。ADA1タンパクとはGLO、TM6タンパクが70%以上のホモロジーを持っていた。これら3つの遺伝子は花弁と雄しべで発現するところが共通しているので、花弁と雄しべの形成にはMADSドメインのアミノ酸配列で重要な部分があることが示唆される。また、Maら(1991)はシロイヌナズナにおけるAG遺伝子の相同遺伝子をいくつか単離してアミノ酸配列を比較したところ、タンパクの中間部に相同性のある領域を発見してK-Boxと命名した。ADA1遺伝子もタンパクの中間部にK-Boxを持っており、他のタンパクとK-Box部分のアミノ酸配列を比較した。その結果、K-Box部分のアミノ酸配列は α -ヘリックスを形成することが予測され、ロイシン残基が規則的に現れることから、別のタンパクと相互作用する可能性が示唆された。

MADS Boxを持つ遺伝子はファミリーを形成していると考えられたので、ADA1遺伝子をプローブとしてサザンブロッティングを行った。MADS Box部分をプローブに用いたところいくつかのバンドが検出され、MADS Boxをもつ遺伝子がファミリーを形成している可能性が示唆された。また、C末端部分をプローブに用いてサザンブロッティングを行ったところ、ADA1はゲノム中に1コピー存在していることがわかり、ADA1遺伝子以外にDEFAの相同遺伝子は存在しないことが示された。

ADA1遺伝子の発現の組織特異性を調べるためにノーザンブロット解析を行ったところ、ADA1遺伝子は花芽および花で特異的に発現しており、茎や葉では発現していなかった。また、*ap3-1*突然変異体の花からもRNAを抽出してノーザンブロット解析を行ったところ、*ap3-1*突然変異体でも発現がみられ、*ap3-1*突然変異体はナンセンス変異ではないことが示された。さらに、*in situ*ハイブリダイゼーションを行ってADA1遺伝子の発現を詳しく調べたところ、分化の初期段階では花弁と雄しべの原基で発現がみられた。また、花弁と雄しべが形成された後の発現については雄しべの花糸、特に葯との接続部(connective)で強い発現が維持されていた。

ADA1遺伝子は上述したように、AP3遺伝子あるいはPISTILLATA遺伝子である可能性が高い。そこで、ADA1遺伝子がRFLP(Restriction fragment length polymorphism)を持つかどうかを調べ、AP3あるいはPI遺伝子のどちらかとリンクしている可能性について調べた。その結果ADA1遺伝子近傍にRFLPが見出されたが、AP3、PIのどちらかとリンクしているかについてははっきりした結論が得られなかった。一方、本研究を行っていた過程でJackら(1992)はシロイヌナズナにおけるDEFA遺伝子のホモログを単離してAP3遺伝子であることを示したが、そこでは野生型遺伝子による突然変異体の表現型の相補試験は行われていなかった。そこで彼は*ap3*、*pi*両突然変異体にADA1遺伝子を導入して表現型が相補されるかどうか調べた。その結果、ADA1遺伝子によって*pi*変異体は相補されないが*ap3-1*変異体は相補され、ADA1遺伝子はAP3遺伝子であることが明らかになった。

ADA1遺伝子は花弁と雄しべの原基で特異的に発現しており、その発現が花弁と雄しべの形成にとって重要な働きをしているものと考えられるが、どのような遺伝子がADA1遺伝子の発現を制御しているかについてはわかっていない。また、MADS Boxを持つ遺伝子がファミリーを形成していることから、他のMADS Boxを持つ遺伝子によって発現が制御されている可能性が考えられる。そこで、AGAMOUS(AG)タンパクが*in vitro*でADA1遺伝子のプロモーターに結合できるかどうか調べたところ、ゲルシフトアッセイでAGタンパクがADA1遺伝子のプロモーターに結合できることがわかった。従って、AG遺伝子がADA1遺伝子の転写を

制御している可能性が示唆された。

*ADAI*遺伝子などのMADS Boxではアミノ酸配列が保存されているが、このような領域ではタンパク質の二次構造も保存されていることが期待できる。そこで、Chou and Fasmanの方法によりMADSドメイン部分の二次構造を予測したところ、 α -ヘリックスと β -シートが2回ずつ繰り返した構造をとりうることが示され、新しい種類のDNA結合領域である可能性が示唆された。

本研究によりキンギョソウとシロイヌナズナという、2つの双子葉植物において遺伝子が進化的に保存されていることが明らかになった。シロイヌナズナは分子遺伝学的研究に適した植物であり今後シロイヌナズナの花の形態形成に関わる遺伝子が急速に単離されることが予想され、分子的な理解が深まることが期待される。また本研究を行う過程においてJackら(1992)が*AP3*遺伝子の単離を報告したが、本研究は彼らの研究とは独立して行われたものであり、新たに相補性試験を行ったことで*AP3*遺伝子を単離したことが別の角度からも証明できたものと考えられる。

審査結果の要旨

申請者岡本裕行君の申請論文「シロイヌナズナにおける花芽形態形成過程を支配するホメオティック遺伝子APETALA3の単離とその解析」は、現代の植物分子生物学のモデル植物であるシロイヌナズナを用いて、花芽の形態形成過程の中でもっとも重要なステップの一つである花弁と雄しべの形成を決定する遺伝子APETALA3を単離し、遺伝子構造とこの遺伝子にコードされたタンパク質分子の構造と機能について解析したものである。

この論文は、3つの部分に分かれるが、第一は、APETALA3遺伝子の単離と構造解析、第二は遺伝子導入によるAPETALA3遺伝子の機能確認、第三は、APETALA3遺伝子産物の構造解析である。申請者はキングョソウのDEFICIENS突然変異体がシロイヌナズナのAPETALA3突然変異体ときわめてよく類似した形質を持つことに注目し、シロイヌナズナよりDEFICIENS遺伝子の相同遺伝子を単離し、遺伝子クローンとcDNAクローンの構造を明らかにした。ついで単離したクローンがAPETALA3遺伝子であることを確認するために、遺伝子クローンをAPETALA3突然変異体に導入してトランスジェニック・シロイヌナズナを作製した。得られたトランスジェニック植物の花は正常な形態に回復したことから、単離したクローンが目的の遺伝子であることが確認された。得られたAPETALA3遺伝子は、MADSボックスと呼ばれるDNA結合領域をコードしており、転写因子であることが予想された。申請者は、他の植物や動物から得られたMADSボックスタンパク質のアミノ酸配列を比較して系統樹を作成し、植物においてこの領域を持つ転写因子の遺伝子ファミリーが多様に分化したことを示した。

以上のように、申請者岡本君の研究は植物の分子生物学研究として高い水準を持っており、博士論文としてふさわしいものであると判断した。なお、これらの成果の一部はPlant Mol. Biol.誌に発表されている。

また、審査委員全員の立ち会いの下で、申請者岡本裕行君に口頭諮問をおこなった。申請論文の内容、背景、基礎的な知識について質問し、回答について検討した結果、十分な学力を有すると判断した。外国語の語学力については、申請者が筆頭著者として英文で投稿論文を書き、既に国際誌に掲載されていることから、研究者として十分な語学力を持っていると判断した。