

氏 名 越水 静

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2011 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Functional analysis of MIKC^C-type MADS-box genes in the
moss *Physcomitrella patens* to infer the functional evolution
of the gene family

論文審査委員 主 査 教授 上田 貴志
教授 長谷部 光泰
教授 川口 正代司
准教授 榊原 恵子 立教大学 理学部

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

MADS-domain proteins are transcription factors found in a wide range of eukaryotes including green plants, metazoans, and fungi. In green plants, MADS domain proteins with M, I, K, and C domains are called MIKC-type, which is further classified into classic (MIKC^C) and star (MIKC^{*}) types. MIKC^C-type MADS domain proteins function through interactions with different sets of other MADS-domain proteins, other transcription factors, and chromatin remodeling factors. These various protein interactions enable to regulate different genes involved in hormone biosynthesis, signalling, and growth regulation, and then MIKC^C-type MADS-box genes function in a range of developmental processes in gametophytes, seeds, embryos, roots, leaves, inflorescences, and fruits.

Although approximately 40 MIKC^C-type MADS-box genes are present in angiosperm species, single MIKC^C-type MADS-box genes have been found in species of the Zygnematophyceae, Charales, and Coleochaetales algae, in which the Zygnematophyceae is inferred to be most closely related to extant land plants. The moss *Physcomitrella patens* (*Physcomitrella*) is a member of a basal lineage of land plants and possesses six MIKC^C-type MADS-box genes, which diverged in the moss lineage. These results suggest that the common ancestor of land plants had a single MIKC^C-type MADS-box gene, and that the increase in the number of genes through gene and genome duplications and subsequent neo- and sub-functionalization resulted in the evolution of body organization in the land plants.

In this study, to elucidate the precise functions of the MIKC^C-type MADS-box genes in *Physcomitrella* and to infer their evolution in land plants, spatiotemporal protein localization patterns of all six *Physcomitrella* MIKC^C-type MADS-box genes were analysed and the morphology and development of deletion mutant and over-expression lines were characterized.

To examine the localisations of the MIKC^C-type MADS domain proteins, reporter fusion lines, in which a reporter gene is inserted to fuse with a targeted gene with homologous recombination, were produced and observed. The localization of the fusion proteins differed between MIKC^C-type MADS domain proteins and at least one MIKC^C-type MADS domain protein was detected in most cells of *Physcomitrella*. To analyze functions of MIKC^C-type MADS-box genes, sextuple deletion mutant lines were produced by deleting all six MIKC^C-type MADS-box genes, since their protein localizations were found to partially overlap each other. The gametophores of the sextuple deletion mutant lines were taller and had longer internodes than those of wild type, and the number and length of cells in each internode increased in the sextuple mutant lines compared to the wild type. These indicate that MIKC^C-type MADS-box genes negatively regulate cell divisions and growth in gametophore internodes. An appropriate length of the gametophore internodes led to external water conduction by capillarity, which supplies water to shoot apices of gametophores. Gametangia are formed at shoot apices, where sperms swim to eggs in water. Therefore, water supplied by external water conduction is necessary for fertilization. Therefore, the longer internodes of the sextuple deletion mutant lines

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

reduced the external water conduction, resulting in a defect in water supply to the shoot apex of gametophores and thus in sperm swimming. Accordingly, the number of archegonia into which the sperms entered and the percentage of gametophores forming sporophytes decreased in the sextuple deletion mutant lines compared to the wild type.

If the defect in water supply is the reason for the less number of sporophytes, artificial water supply should complement the phenotype of the sextuple deletion mutant lines. However, artificial water supply partially complemented the number of sporophytes, indicating that water supply is one of the reason but the mutant lines should have other defects in fertilization. Therefore, I examined the viability of the sperms and found that sperms of the sextuple deletion mutant did not swim with water as those of the wild type did under microscope. Comparisons of transcriptomes between wild-type and mutant antheridia containing developing sperms showed that the expression levels of 23 orthologs to flagellum-related genes decreased in the sextuple deletion mutant lines compared to the wild type. These data suggest the structural defects in the sperm flagella of the mutants.

Together, *Physcomitrella* MIKCC-type MADS-box genes are necessary for proper fertilization in two ways: the regulation of the length of the gametophore internodes affects external water uptake, which enables the sperms to swim to the egg, and the regulation of motile flagellum formation in the sperms. The former function appears to have been maintained in the angiosperms, since internode length is determined by the regulation of cell division and growth, and certain angiosperm MIKCC-type MADS-box genes also regulate cell division and growth. The latter function was lost during the evolution of angiosperms, consistent with the loss of sperm.

博士論文審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

MADS-box 遺伝子は転写因子をコードし、植物、動物、菌類に広く保存されている。MIKC classic (MIKC 標準) 型の MADS-domain タンパク質は、他の MADS-domain タンパク質、他の転写因子、そしてクロマチン制御因子と、いろいろな複合体を形成することによって、生体内における多様な機能を担っている。被子植物では花器官のホメオティック制御をはじめ、ホルモン合成、成長制御などさまざまな遺伝子を制御している。そして、種子、胚、根、葉、花序、花、果実など多くの発生過程を正常に進行させるために必須な遺伝子である。

被子植物では、ゲノム上に約 40 の MIKC 標準型 MADS-box 遺伝子が存在しているが、陸上植物に最も近縁な接合藻類、その外群となるコレオケータ類、シャジクモ藻類では、1 つの MIKC 標準型 MADS-box 遺伝子しか見つかっていない。ヒメツリガネゴケは陸上植物の基部で分枝したコケ植物セン類に属するが、これまでの研究からゲノム中に、セン類の系統で遺伝子重複によって 1 個から増えたと推定される 6 個の MIKC 標準型 MADS-box 遺伝子が存在することが知られていた。これらのことから、遺伝子重複やゲノム重複によって数が増え新機能を獲得することで、陸上植物の体制進化に寄与してきたと考えられてきた。しかし、被子植物以外の陸上植物における MADS-box 遺伝子の機能が未解明であったため、MADS-box 遺伝子がどのように機能進化してきたのかは、不明であった。

本博士論文では、まず、レポーター遺伝子を相同組換えによって 6 個の個々の遺伝子末端に挿入することで、融合タンパク質の発現場所を解析した。その結果、すべての遺伝子は異なって発現し、発生過程の全ての細胞で重複しつつ発現していた。そこで、6 個の遺伝子全てを欠失した 6 重欠失変異体を作成した。すると、受精によってできる孢子体がほとんど形成されないことがわかった。コケ植物は、茎葉体先端で精子が泳いで受精するので、必要な水を茎葉体下部から先端部へ輸送することが必要である。従来、毛細管現象で水が輸送されることは知られていたが、どのような経路で輸送されるかは不明だった。越水氏は、水上昇過程を高速度撮影をすることで、葉と茎の間の隙間を毛細管現象で上昇した水が葉腋に溜まり、溜まった水滴が大きくなると、一つ上の葉と茎の隙間に接することで再び毛細管現象で水が上昇することを発見した。そして、遺伝子欠失株では葉間の細胞数と細胞長が増加し、葉間長が伸びるため、水が葉間を伝わらず、受精できないことを明らかにした。さらに、過剰発現体では葉間の細胞数と細胞長が減少することを発見し、ヒメツリガネゴケの MIKC 標準型 MADS-box 遺伝子は、葉間長を適切な長さに保つことで受精を可能にしていると結論づけた。ところが、越水氏は、水を十分に与えた条件でも 6 重変異体の受精率が野生型ほどには回復しないことに気づいた。そこで、卵と精子が正常に機能しているかをいくつかの実験によって調べた結果、欠失変異体の鞭毛がうまく動かないことを発見した。そして、欠失変異体と野生型のトランスクリプトーム比較から、欠失変異体では鞭毛関連遺伝子が有意に発現減少していることを発見した。

以上より、越水氏によって、ヒメツリガネゴケの MIKC 標準型 MADS-box 遺伝子が、茎葉体の細胞分裂と伸長を制御することで受精に必要な植物体外水輸送に適した大きさになっていること、運動能力を持った精子を作っていること、という受精に必要な 2 つの機能を持

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

っていることを明らかにした。そして、前者の細胞分裂と伸長に関する制御機構は被子植物でも維持されている可能性があり、精子での機能は被子植物での精子の退化に伴い失われたと考察した。本博士論文により、陸上植物の形態変化が遺伝子のどのような変化によって引き起こされたかについて実証的に考察することが可能となった。

以上より、本博士論文は、学位授与に相応しいと審査委員全員が一致して判断した。