ミズワラビMADS box遺伝子の単離と解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16109

氏　　名	小　藤　累美子
生　年　月　日	
本　　籍	石川県
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	博甲第220号
学位授与の日付	平成9年3月31日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	ミズワラビMADS box遺伝子の単離と解析
論 文 審 査 委 員	（主査）山口　和男 （副査）和田敬四郎，清水　建美，植田　邦彦，矢倉　公隆

学位論文要旨

Abstract

Plant MADS box genes were first recognized as floral homeotic genes. The MADS box genes are found in many flowering and a non-flowering seed plant and form a large gene family with several subfamilies. Most of these genes are expressed at flowering or in similar organs. Considering the existence of the MADS box motif in taxonomically distant organisms, plants, animals and fungi, and its function as a transcriptional factor, it is possible that every plant lineage originally has this motif, participating in functions other than that of the formation of flowering organs. In this study, we show the existence of MADS box genes (CMADS) in a fern, *Ceratopteris richardii*. This is the first report of MADS box genes in a non-seed plant. These genes conserve the MADS box, the L region and the K box from flowering and non-flowering seed plants. They are expressed in sporophytes but not detected in gametophytes. Phylogenetic analyses indicated that these genes do not belong to any subfamilies found in seed plants; some of them form a new subfamily. This suggests that a separation of A, B and C subfamilies of floral homeotic genes occurred after the ancestors of ferns and seed plants diverged. The functions of CMADS genes might be distinct from the known functions in seed plants because of the structural differences between seed plants and ferns. Sequence analyses showed that the cDNA from each CMADS gene has sequence variations. The comparison of these variants suggested that these variations are generated by frequent alternative splicing.

MADS boxを持つ転写因子（MADS box 遺伝子）は生物界全体に広く存在すると考えられている。植物では、双子葉植物であるシロイヌナズナとキンギョソウで、花器官形態形成遺伝子として単離された。その後の研究から典型的な双子葉植物が持つ4種類の花器官（がく片、花弁、雄蕊、雌蕊）は、MADS box 遺伝子を中心とする花器官形態形成遺伝子群の発現の組合せによって形成が決定されることが確かめられた。この花器官形態形成遺伝子群は、機能、アミノ酸配列の類似性の両方からABCのサブファミリーにわけられる。シロイヌナズナとキンギョソウでこれらの遺伝子に関する詳細かつ広範囲な解析が進められて行く一方、上記4種類の花器官を持たない植物で形態形成制御機構の比較やしいては花型の進化の解明をめざして、相同遺伝子の単離、解析が始められている。しかしこれら遺伝子群がどのような進化を経て、花器官形成を制御するようになったかについては明かにされていない。

陸上植物はシダ段階、裸子段階、被子段階と生殖器官を進化させ、被子段階の「花」を獲得する。ABCのサブファミリーに属する遺伝子が発現する4つの領域を持つのは「花」を形成する被子植物のみである。シダ植物に至っては「花」に相当する器官が、胞子体上の胞子嚢と前葉体という独立して生活をする2つの世代に分離している。生殖器官の進化を、花器官形態形成遺伝子群の進化という面から検証するため、著者は以下のような仮説を立てた。

生殖器官の本体は核相nの配偶子を形成する珠心である。シダ植物ではこれは胞子嚢に相当し、胞子葉に剥き出しで付いている。裸子植物の珠心は一枚の珠皮に保護されている。被子植物では、珠心は二枚の珠皮に保護された上心皮に包まれており、その外側を（雄蕊、）花弁、がく片とさらに付加的な器官が取り巻いている。単純化のため珠心以外の器官を全て珠心の保護器官とみなすと、生殖器官の進化は保護器官の進化と考えることができる。もっと単純化すると保護器官の増加である（Fig. 1）。保護器官の増加は保護器官形成を制御する遺伝子の増加（重複）によって起こったのではないかと考えることができる。したがって花器官形態形成遺伝子群であるMADS box 遺伝子群の数、機能、アミノ酸配列の類似性を研究することで、生殖器官の進化を考察することができると考えた。

現在、被子植物以外、すなわち花器官を形成しない植物群での研究は針葉樹での一例しか発表されていない。それによると「花」を持たない裸子植物には、ABCのサブファミリーのそれぞれに類似したアミノ酸配列を持つMADS box 遺伝子が存在する。このことは、これらのサブファミリーが被子植物と裸子植物の祖先が分化する以前に出現していたことを示唆する。これをふまえて、さらに原始的な段階の体制を持つシダ植物でMADS box 遺伝子の数、機能、アミノ酸配列の類似性を調べることによって、MADS box 遺伝子群の進化を推定することができると考えた。

以上の理由により著者は、シダ植物を材料としてMADS box 遺伝子の単離と解析を行った。シダ植物のなかでミズワラビ（*Ceratopteris richardii*）を用いたのは、1）実験室内で栽培することが可能である、2）植物体が30cm程度と小さい、3）世代時間（胞子を蒔いてから次世代の胞子が得られるまで）が約3ヶ月と短い、4）系統が管理されている、5）2倍体で染色体数がn=32と少ない（シダ植物は一般に倍数性が高く染色体数も非常に多い）、などの利点があるためである。

MADS box 遺伝子の単離は3'RACE法で行った。用いたprimerは、MADS box内部のSRF（ヒト）やMCM1（酵母）と植物のMADS box 遺伝子で共通しているアミノ酸配列を基にして設計したdegenerate primerと、針葉樹である*Picea abies*のMADS box 遺伝子の配列を基に設計したdegenerate primerである。ミズワラビ由来のtotal RNAを鋳型として、これらのうち1種類とpolyA側primerでPCRを行った後、より3'側に位置するprimerとpolyA側primerで2回目のPCRを行うというnested PCR法を用いることによって、効率よくMADS box 配列を持つcDNAを単離することができた。さらに、得られた配列をもとに設計した特異的なprimerを用いて5'RACE法を行い、cDNAの5'側を決定した。

上記の方法により3種類のミズワラビMADS box 遺伝子（CMADS）cDNAの全長を決定することができた。推定されるアミノ酸配列は、MADS box 、L region、K boxという植物型MADS box 遺伝子の特徴を持っており、その中の二量体形成やDNA結合に関与すると考えられているアミノ酸残基も保存されていることが明らかになった（Fig. 2）。推定されるアミノ酸配列を用いて行った分子系統学的解析では、CMADSは既存のいずれのサブファミリーにも属さないとの結果が得られた。このことはCMADSがかなり早い時期に分化したことを示唆する。

さらに今回の実験で、いずれのCMADS cDNAにも複数の多型が存在することが確かめられた（Fig. 3A）。これらの多型は、1）特定の範囲の配列が"挿入"または"欠失"することによって起こっており、数塩基といった短い範囲での違いはみられない、2）"挿入"または"欠失"は決まった位置で起こっている、3）"挿入"または"欠失"の起こる位置には必ず、イントロンの末端に保存されている配列であるGT-AGが見られる（Fig. 3B）、4）"挿入"されている配列にはイントロンの特徴とされるT clusterが多く見られる（Fig. 3C）、といった理由からsplicing variationであると考えられる。ここで二つの問題が考えられる。すなわち、

1）これらの variationはどのくらいの頻度で起こっているのだろうか。

2）これらの variationは何故生じるのであろうか。

である。

1）について確かめるため半定量的PCR法を行った。この方法はサイクル数を変化させ

てPCRを行い、産物を比較することによって鋳型中のvariationの頻度を推定するものである。さらにこのvariationが時期または組織特異的発現をしている可能性を検討するため、生殖器官である胞子嚢形成に関して異なった状態を示す3種類（展開後の栄養葉、未展開の胞子葉、展開後の胞子葉）の生葉全体からtotal RNAを抽出して半定量的PCR法を行い、パターンを比較した（Fig. 4A, B）。その結果、variationはかなりの頻度で存在していること、しかし材料の種類による違いは見られないことが明かとなった。このことは、これらの材料での発現に違いがないことを示唆すると考えられるが、葉全体を用いていることによる検出限界が影響している可能性もある。

2）については、alternative splicingの可能性は現段階では否定も肯定もできない。しかし、CMADS6に見られるような多くの多型はむしろmiss splicingの可能性を示しているように思われる。miss splicingはイントロン内部の配列（末端配列であるGT-AGやbranching point）の変異によって引き起こされることが知られているが、CMADSの多型分子を比較する限り末端配列は保存されており、またどの"挿入"配列にもbranching pointらしい配列は見られない。植物におけるイントロンの認識に関しては、AT含量が寄与しているというトウモロコシでの研究がある。そのことをふまえて、全イントロン配列がデータベースに登録されているキンギョソウのMADS box遺伝子についてイントロンとエクソンのAT含量を調べてみたところ、それぞれ70％と60％で明らかに違いが見られた。しかしCMADSでは、推定されるエクソン配列で56％、イントロン配列で58％とほとんど差が見られない。このことから、splicingにおいてAT含量が重要な役割を果たしているとすれば、CMADSではmiss splicingが起こりやすいと考えられる。

本研究により、シダ植物であるミズワラビにも複数のMADS box遺伝子（CMADS）が存在することが確認された。ただしこれらCMADS cDNAは全て核相2nの胞子体から得られたもので、nである前葉体からは得ることができなかった。これは、用いた方法による検出限界を反映しているのかもしれないが、前葉体ではMADS box遺伝子が発現していない可能性を示唆している。

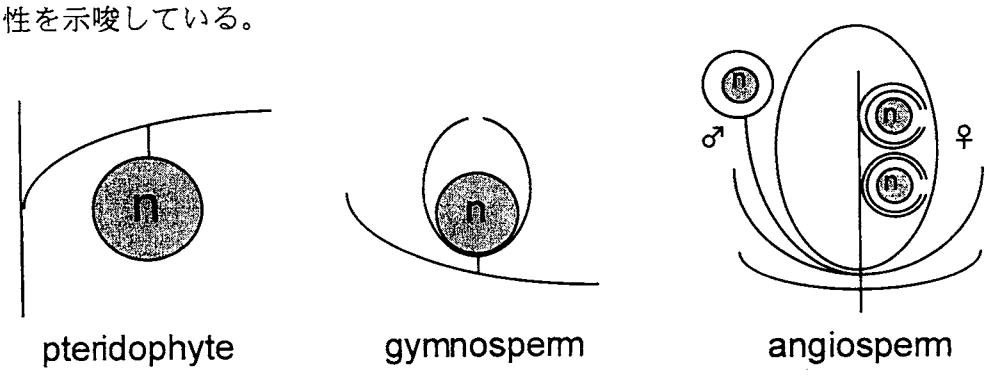

Fig. 1 Comparison of reproductive organs between vascular plants. Hatched n regions mean nucelli and curved lines and open circles are protective organs. In the right scheme, the left half shows a male organ and the right half shows a female organ.

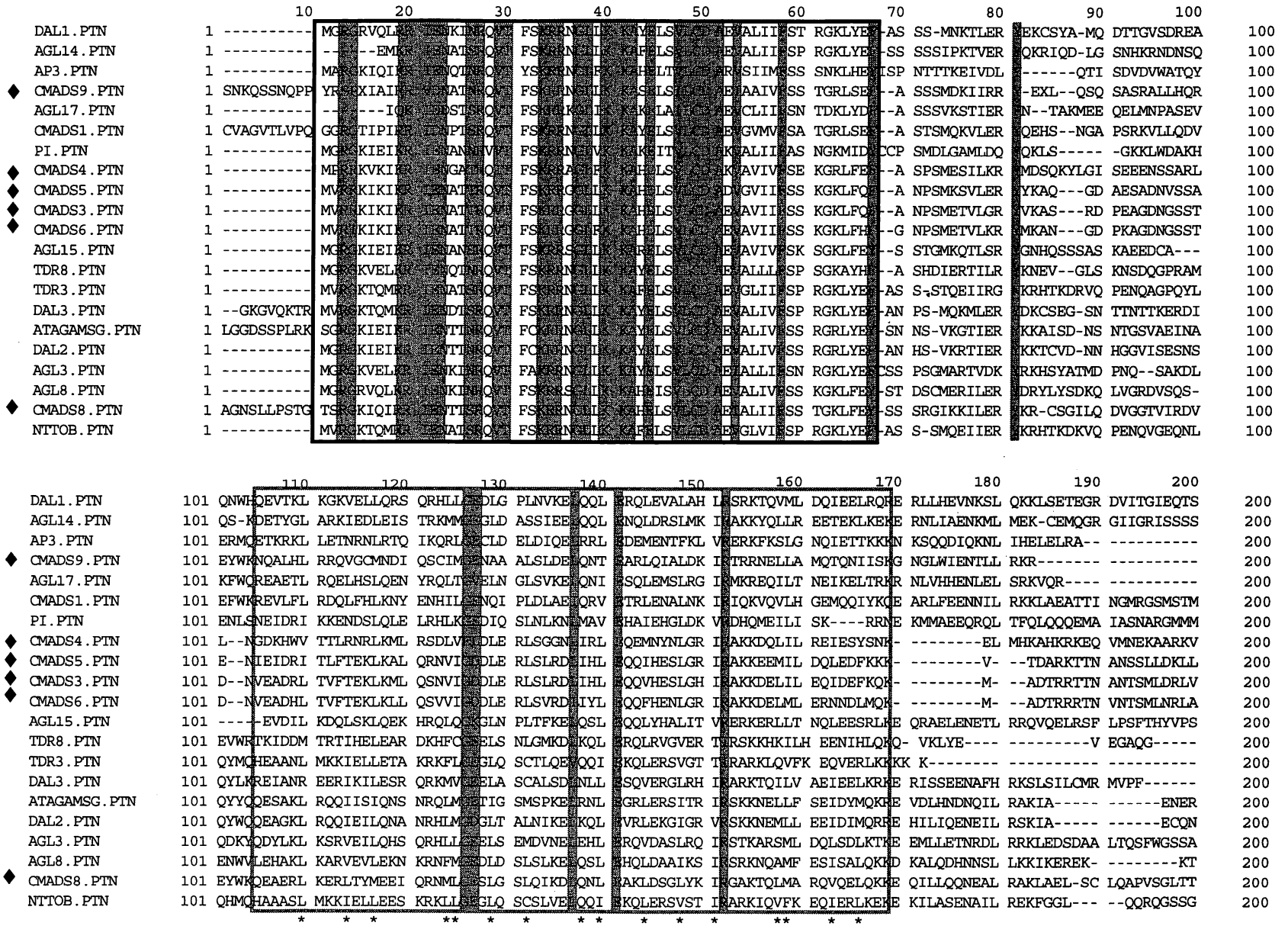

Fig. 2 Multiplealignment of variable plant MADS box genes. Brack and gray boxed regions are MADS box and K box, respectively. Shadow residues are conserved in ABC subfamilies. Asterisks in K box are amphipathic residues.

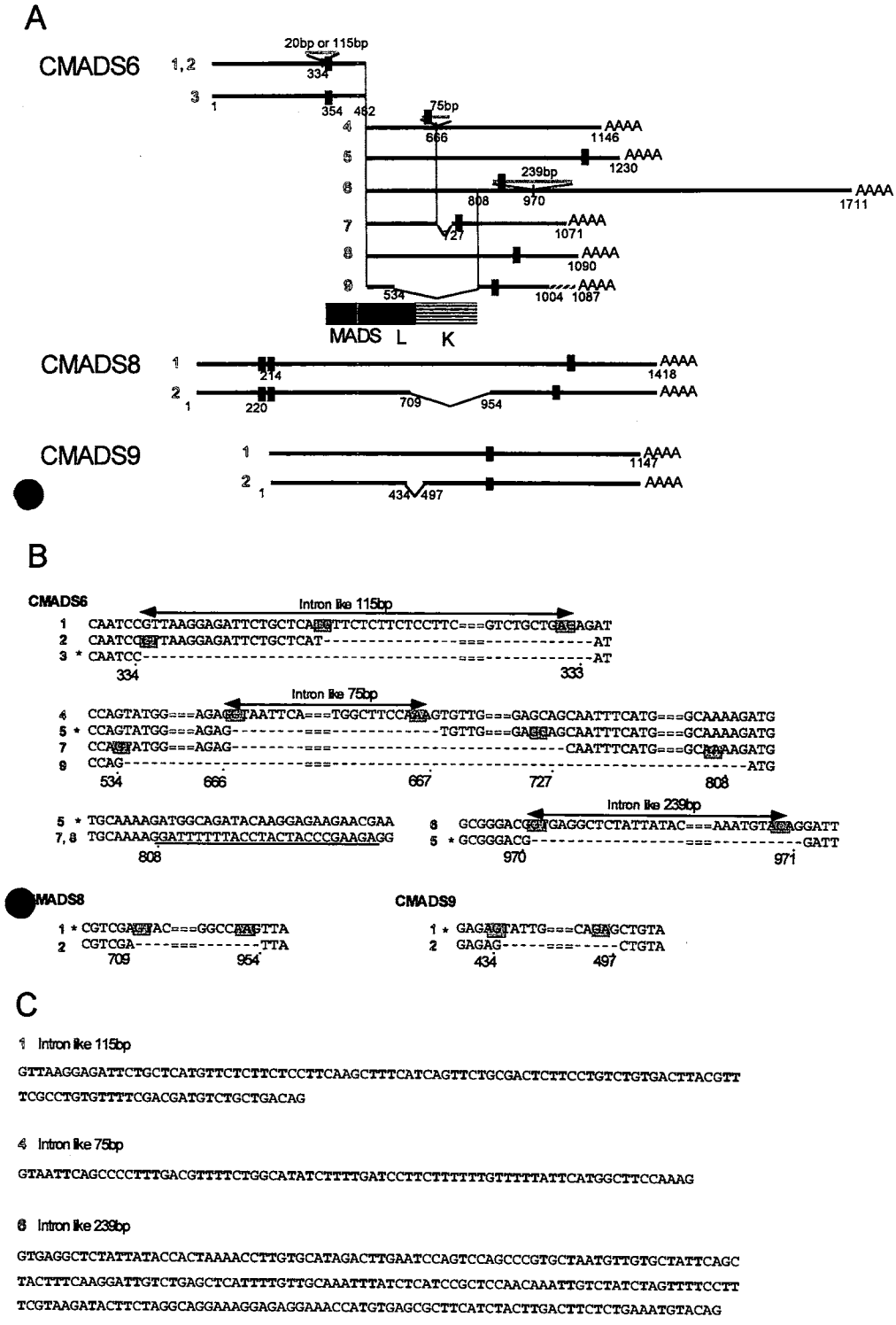

Fig. 3 Summaries of the various cDNA from CMADS genes. A. Schematic diagrams of cDNA variants. Common sequences between variants are shown by thick lines. Inserts and deleted regions are indicated by hatched lines above thick lines and bent lines, respectively. Hatched lines in CMADS6-7 and -8 mean alternative cDNA sequence. Hatched boxes and closed boxes indicate a putative start codon and a stop codon, respectively. Three conserved motifs (MADS, L and K) are indicated at the center. B. Sequences of putative alternative splicing sites. The numbers under sequences indicate the nucleotide positions. Asterisks are attached to putative exon sequences. Broken lines: sequences spliced out; double broken lines: shortening. Shaded letters show consensus sequences of intron ends. Thick underline shows an alternative cDNA sequence. C. Complete intron-like sequences of CMADS6. T nucleotides are emphasized by boldface.

学位論文審査結果の要旨

本研究は，酵母から，ヒト，高等植物にわたる転写調節因子の中に，MADSboxと呼ばれる共通のアミノ酸配列を持つものがあり，高等植物ではそれが，4種類の花器官（がく片，花弁，雄蕊，雌蕊）形成に主要な役割を果たしていることに注目して，花器官の形成に至らないシダ植物におけるMADSbox遺伝子を解析することにより，器官形成の進化を遺伝子レベルで追跡するための第一歩を踏み出したものである。

実験室内での容易な栽培，短い世代時間などの理由から，ミズワラビ（Ceratopteris richardii）を選び，そのMADSbox遺伝子の単離と解析を行い，以下のような成果を得た。

1）RNAからの効率良いMADSbox遺伝子の単離法を確立した。

2）ミズワラビRNAから4種類のMADSbox遺伝子のcDNAをクローニングし，全塩基配列の決定をおこなった。その結果，これらの遺伝子は全て，植物型MADSbox遺伝子に特徴的な配列を保持していた。このことは，シダ植物の祖先と種子植物の祖先が分岐する以前に，植物型MADSbox遺伝子は進化をとげていたことを示唆する。

3）分子系統学的解析から，ミズワラビMADSbox遺伝子は，被子植物の花器官形成に関与するMADSbox遺伝子群のいずれとも近縁でないことが明らかとなった。このことは，被子植物の祖先とシダ植物の祖先が分岐した後に，花器官形成に関与するMADSbox遺伝子は被子植物で進化を遂げたことを示唆している。

4）核相nの前葉体では，どのMADSbox遺伝子の発現も検出できなかったのに対して，核相2nの胞子体では，栄養葉，生殖葉いずれからも検出された。

5）いずれのミズワラビMADSbox遺伝子のcDNAにも，スプライシングパターンの異なる分子種が数多く検出された。これは植物型MADSbox遺伝子では初めてのことであり，スプライシングが起きた近傍や，スプライシングで除かれたと考えられるDNA領域の塩基配列の解析から，ミススプライシングが高頻度で起きている可能性が示唆された。

以上，本研究はシダ植物からのMADSbox遺伝子を解析することにより，多くの新事実を明らかにし，植物の器官形成に関与する遺伝子の進化に対して示唆に富む結果を得ており，博士論文に値すると判定した。