

(研究題目) 花芽形成遺伝子 *agamous* の分子進化学的研究

Molecular evolutionary study of floral homeotic gene; *agamous*

(研究者)

長谷部 光泰
Mitsuyasu Hasebe

東京大学理学部附属植物園 助手
Research Associate, Botanical Gardens, Faculty of Science,
The University of Tokyo

Agamous is a gene related to floral morphogenesis and is thought to have had a important role in the evolutionary process from spore-bearing ferns to flowering plants.

Cloning of the homologues from fern species *Ceratopteris richardii* was done. The genomic library was screened using specific oligo nucleotides to the conservative region and *agamous* as probes. 5 candidates were cloned and the characterization is now in progress.

(研究目的)

花形成は植物に特異的な現象であり、これまで多くの研究が行われてきた。近年、その分子生物学的解析も開始され、いくつかのホメオティック遺伝子が同定された。Tanofsky ら (1990: *Nature* 346:35) は、シロイヌナズナのホメオティック遺伝子の一つである *agamous* (AG) 遺伝子を解析し、その遺伝子産物がヒトの転写調節因子や酵母の転写因子と共通のアミノ酸配列 (MADS box) を持つことを明らかにした。このことから AG 遺伝子は花形成時に特異的に発現する遺伝子群の転写を調節しているのではないだろうかと考えられている。Ma ら (1991: *GenDev*.5:484) は MADS box の配列をプローブとして用い、AG 遺伝子と相同性の高い 6 つの遺伝子を新たにクローニングし、解析した。その結果、各遺伝子は発現時期や場所が異なり、それぞれ別々の機能を持つであろうことが予想された。また、別のホメオティック遺伝子である *defA* の塩基配列を外群として 6 つの遺伝子の系統樹を作ってみると解析された AG 族遺伝子は 2 つのサブファミリーにわけられることがわかった。

被子植物は孢子段階の植物から進化してきたと考えられる。では、花を形成しない孢子植物において被子植物の花形成遺伝子はどのような機能をになっており、孢子植物から被子植物への進化の過程でどのような変化がおこることによって花を形成するようになったのであろうか。維管束植物における花形成遺伝子の進化に関するこのような問題を解決するためには孢子植物での花形成遺伝子の役割を解明することが必要である。孢子植物の中で、同型孢子シダ類のミズウラボは栽培の簡易さ、世代時間の短さ、などから孢子植物の中で最も分子生物学的解析の材料として適したものであろうと考えられている。

本研究ではミズワラビにおけるAG関連遺伝子の解析と被子植物AG遺伝子族との関係を明らかにすることを目的とする。

(研究経過および成果)

シダ植物の中から世代時間が短く、新しいモデルプラントとして注目されているミズワラビを材料として選択した。全DNAを抽出し、シロイヌナズナの*agamous*をプローブとしてゲノミックサザンを行った。低ストリンジェントな条件で薄いバンドが検出できたが、バックグラウンドが高くはっきりと特定できる断片は検出できなかった。これは、シダ植物と被子植物が3億年前に分化したため、相同な遺伝子間の同義的塩基置換が蓄積しているためではないかと考えた。そこで、花形成遺伝子の中で保存性の高いMADS領域のアミノ酸配列からdegenerateな23塩基からなるオリゴマーを合成し、再びゲノミックサザンを試みた。80%以上の相同性を持つ断片のみを検出できるような条件で実験を行ったところ約20本の断片が明確に検出された。次に胞子葉、裸葉のそれぞれから抽出したmRNAとノーザンハイブリダイゼーションを行ったが、有為な断片は検出できなかった。さらに、オリゴマーとpolyTを用いてRT-PCRを行ったが有為な結果は得られなかった。これはMADS関連遺伝子群が胞子嚢形成初期のみで発現しており、実験に用いた段階の胞子葉では既にこれらの遺伝子群が発現を終了していることによるのかもしれない。ミズワラビの胞子葉の断片を観察したところ、葉長1cm程度のワラビ巻き段階で既に胞子嚢形成が終了し、減数分裂を開始していることがわかった。現在、約1000個体のミズワラビを培養し、発生初期の胞子葉を採集する準備をしている。

次に、ミズワラビの全DNAからゲノミックライブラリーを作成した。ミズワラビの精子核を染色し、半数体当たりのゲノムサイズを 4×10^8 bpと推定した。ミズワラビの全DNAをSau3A1で部分分解し、LambdaGEM-11ベクターにクローニングした。この段階でミズワラビのDNAがうまくクローニングできないという問題にぶつかったが、ホストのストレインを選択することにより克服できた。ゲノムDNAのメチル化等かかわっているのかも知れない。 4×10^7 のプラークをオリゴマーを用いてスクリーニングし、23個のポジティブなクローンを得た。これらのクローンからラムダDNAを抽出し、制限酵素で切断後、オリゴマーとハイブリダイズする断片をpBluescriptIIベクターへサブクローニングした。これらのクローンから、最も厳しい条件下でオリゴマーおよび*agamous*とハイブリダイズするものを5つ選択し、現在塩基配列を決定中である。本年中にはこれらのクローンの塩基配列決定が終了、本年採集するミズワラビの新芽から対応するcDNAをクローニングし、それらの発現様式をin situハイブリダイゼーションで検出する予定である。

*agamous*と並行して、花形成の極初期に発現される*leafy*、シロイヌナズナの成長実付近で発現され、動物や菌類の形態形成に重要な役割をはたすホメオボックスを持つ*Knotted*も同時にクローニングすることができた。現在、*agamous*と共に解析を進行中である。

本助成により、ミズワラビをモデルシステムとして、シダ植物から被子植物への形態進化を分子生物学的手法で解析する基礎を確立することができた。