

花と葉の表面構造の違いについて part VI

静岡県立磐田南高等学校
生物部 2 年 大村智暉 他 4 名

1 研究の目的とこれまでの経緯

本論文は、過去 5 年間行ってきた、花卉の表面構造の研究の最終的な結論を述べたものである。

研究のきっかけとなったのは、平成 23 年度に行われた『磐南スーパーサイエンス I』の走査型電子顕微鏡実習だった（中村 他 2011）。8 種類の植物の、葉と花卉の表面構造を比較した結果、7 種類の植物の花弁の表面には、葉には見られない突起が観察されたが、キキョウの花弁にはそのような突起は見られなかった。図 1 には 7 種の中で特に顕著な突起を花卉もっていたバラと、キキョウのデータを示した。「何故、キキョウの花弁表面は葉のように平坦な表面構造なのか」と疑問に思ったことが、この研究の出発点となった。

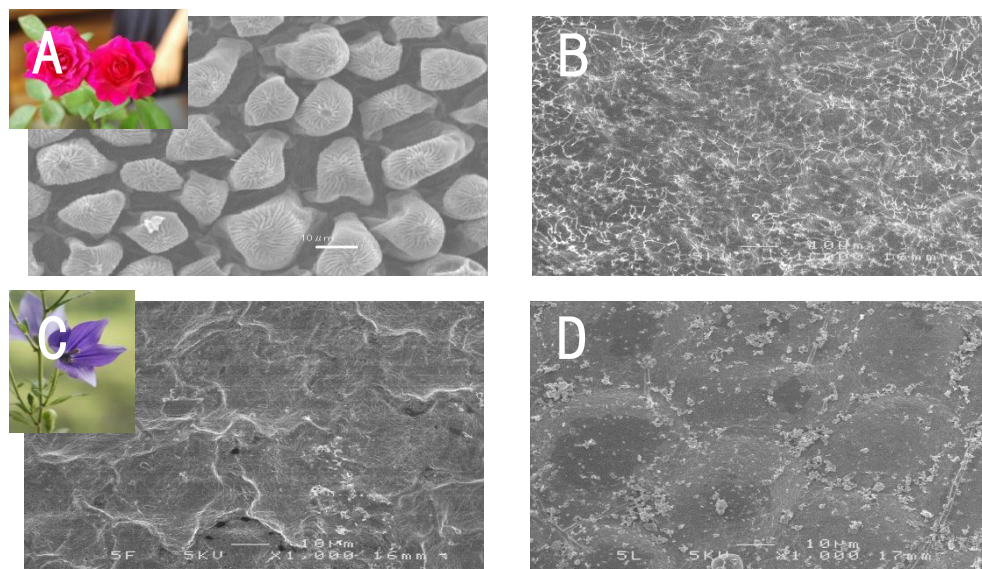


図 1 観察した植物の外観、葉、及び花卉の表面構造

(A)花弁と(B)葉：バラ(*Rosa* sp.)

(C)花弁と(D)葉：キキョウ(*Platycodon grandiflorus*)

Kay *et al.* (1981)によれば、被子植物の多くの花の花弁表面には、円錐状または乳頭状の突起があり、逆に花弁表面が平坦だったのは調べた 201 種中 11 種だったという。さらに文献調査を進めたところ、その特異的な花弁表面の突起生成には、MIXTA 遺伝子ファミリーが関係していることがわかった (Glover *et al.* 1998)。

そこで、「キキョウの蕾では、MIXTA 遺伝子が発現していないか、または変異したものが発現しているため、突起が形成されない」という仮説を立て、MIXTA 遺伝子を探索した。

まず、代表的な突起形成遺伝子である *AmMIXTA* 遺伝子のシークエンスをもとに縮重プライマーを設計し、キキョウの蕾中の mRNA から合成した cDNA を PCR で増幅したところ、1 つの MIXTA 遺伝子 (*PgMIXTA* と命名) を単離し、その全塩基配列の決定に成功した。そして、そのはたらきを探るため、無根系統樹を作成して他の MIXTA 遺伝子と比較したところ、最も近縁だったのが葉のトリコーム形成を抑制するはたらきをもつ遺伝子だった (平野 他 2014、澤 他 2015)。トリコームは特に発達した突起であるため、このことは私たちの仮説を支持した。

しかし、MIXTA 遺伝子は植物の中で広く発現している MYB 遺伝子の仲間であり(浦尾 他 1995)、一組の縮重プライマーで発見した *PgMIXTA* 以外にも関連遺伝子がある可能性があった。そこで、最先端の技術の一つである RNA シークエンスを用いることにより、この問題の解決を試みた。すなわち、キキョウの蕾の中の全 mRNA のすべての塩基配列を把握した上で、コンピューターを用いた情報処理により、*PgMIXTA* 以外の MIXTA 遺伝子が発現していないかを調べた(上川 他 2016)。今年度は昨年度見つけ出した MIXTA 遺伝子について、正常な突起形成作用がある MIXTA 遺伝子と比較することにより、その機能を分析した。その後、発現量解析を行い、その遺伝子の発現の度合いも調べた。

2 材料と方法

(1) 材料

キキョウ科 キキョウ (*Platcodon grandiflorus*)、品種名は『五月雨』

1 株から蕾を 3 個、及び葉を 1 枚採取した。

(2) 方法

ア シークエンスの比較

ORF finder プログラム (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) を用いて、先行研究(上川 他 2016)で行った RNA シークエンスで得た翻訳領域を検索した。得られた各翻訳領域に通し番号を付け、BLAST プログラム (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて、近縁性がある既知のタンパク質を探し出した。

イ 突起形成を行う遺伝子との比較

RNA シークエンスで得たデータと、正常な突起形成の機能を持つ 3 つの遺伝子、すなわち、キンギョソウ(*Antirrhinum majus*)の *AmMIXTA*、シロイナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の *AtMYB16*、タバコ(*Nicotiana tabacum*)の *Transcription factor MYB35-like* とを比較した。

ウ *PgMIXTA* 発現量の解析

RNA シークエンスで得たデータを、Excel で集計し、蕾と葉で MIXTA 遺伝子がどのくらい発現しているかを調べた。

3 結果

(1) キキョウの蕾で発現している MIXTA 遺伝子

3 種の MIXTA 遺伝子(*AtMYB16*, *AmMIXTA*, *Transcription factor MYB35-like*)と、RNA シークエンスで得られた全ての mRNA とを BLAST プログラムを利用して比較した。3 種類の遺伝子に共通して最も近似性が高かった *c27294_g3_i1* は、特に *Transcription factor MYB-like* において最も近似性を示した為、*c27294_g3_i1* だけを MIXTA 遺伝子と判断した。そして、*c27294_g3_i1* の塩基配列を、既に発見している *PgMIXTA* と比較したところ、両者は同じ遺伝子であることがわかった。

(2) 3 種類の遺伝子と *PgMIXTA* との相同性について

キキョウにおいて唯一発見された *PgMIXTA* であるが、突起形成作用を持つか否かの検討の一つ目として、正常な突起形成機能を持つ前述の 3 遺伝子との間で、アミノ酸配列を Clustalw により比較した。その結果、0 から 168~186 番目のアミノ酸間で相同性が確認できた。しかし、3 つの MIXTA 遺伝子の配列中央部に共通している配列は、*PgMIXTA* には見られなかった。*c27294_g3_i1* は、特に *Transcription factor MYB-like* において最も近似性を示した為、*Transcription factor MYB-like* との比較結果の表のみを示す。(図 2)

図2 *Transcription factor MYB-like* と *PgMIXTA* とのアミノ酸配列の比較

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Nicotiana tabacum      MGRSPCCDKVGLKKGWPTPEEDQKLLAY IEEHGHGSWRALP AKAGLQRCG  50
PgMIXTA                MGRSPCCDKVGLKKGWPTPEEDQKLLAY I DEHGHGSWRALPSKAGLQRCG  50
                        *****;*****;*****

Nicotiana tabacum      KSCRLRWTNYLRPD I KRGKFTLQEEQT I IQLHALLGNRWSA IATHLPKRT  100
PgMIXTA                KSCRLRWTNYLRPD I KRGKFSQHEEQT I IQLHALLGNRWSA IATHLPKRT  100
                        *****;*****;*****

Nicotiana tabacum      DNE I KNYWNTHLKKRLVKMG I DPVTHKPKNDTLLSNDGQSKY AANLSHMA  150
PgMIXTA                DNE I KNYWNTHLKKRLAKMG I DPVSHKPKNDTLLSSDGQSKSTANLSHMA  150
                        *****;*****;*****;*****;*****

Nicotiana tabacum      QWESARLEAEARLV RQSKLRNSFQNS I FASQEFFTTTSPSSPLNKP VVGP  200
PgMIXTA                QWESARLEAEARLVKQSKQRSSSLQTLLGSAELSQLVKPVVPL----VVPP  197
                        *****;*** **;*;*: : : : . . * ** ** *

Nicotiana tabacum      PRCLDV LKAWNG I WTKPMNE I TASGSAT I SVTGLDLEESPTSTLGYFDQN  250
PgMIXTA                PRCLD I LKAWTGGWGG-----SGFGQESPSSTL-----  226
                        *****;***; ** *: . : ***;***

Nicotiana tabacum      APH I STPG I NGGNSTV LFEFVGNSSGSSEGR I MNNEESEEDWKGF GNSST  300
PgMIXTA                ----STTG I -GESSTNF I EFGVNSSGSCEDGMVGDEVG--EEWKSFG--STT  269
                        **, ** * . ** : ;*****;*. : : ;* . **; ** *;*

Nicotiana tabacum      GQLPEYKDG I NENSVSFTSGLQDLTMPMDNTWT--AESLRN--ADQ I SPR  347
PgMIXTA                TRLPEYKDGRRGNS I PFNSSGMGMSS--MENGWTTAES I TSDNSNEHVASE  318
                        ;***** . **;. *. * . : : *;* ** **;*; *; : : : .

Nicotiana tabacum      NFVETFTDLLS-----SNSGD--GGLSENGTESDNGGEG--GNASENCED  389
PgMIXTA                NFLESFTDLLNNNI TSTGGDRSGGLAEGGGDS I GGGRGCGNSCYDDN  368
                        **;*;*****. *..** **;*;*. : ** ** **;. : :

Nicotiana tabacum      SKNYWNS I FNLVNSSPSDSAMF  412
PgMIXTA                YKNYWNS I LNLVNSPPDPSPH I F  391
                        *****;*****..*.. : *

```

(3) *PgMIXTA* の発現量解析

次に、*PgMIXTA* が突起形成作用を持つかどうかの検討の二つ目として、「もし花の突起形成のために *PgMIXTA* が発現しているならば、その発現量は葉よりも蕾の方が多いはずである」という仮説の下、蕾と葉で発現量を比較した。その結果を表1に示した。

表1 遺伝子の発現量

ID	logFC	logCPM	Pvalue	False Discovery Rate
c27294_g3_i1	-3.58182508	6.35739439	3.95E-32	5.87E-30

logFC は、葉に対して蕾で何倍発現量が高いかを対数（底は2）で示している。値が負の場合は葉に比べて蕾の発現量が少ないことを示し、正の場合は発現量が多いことを示すので、*c27294_g3_i1 1*すなわち *PgMIXTA* は、蕾は葉よりも発現量が少ないことがわかる。

logCPM は全リード数を 100 万としたときに、該当する遺伝子が占めるリード数を対数で表しており、値が大きいほど発現量が高いことを示している。P value は logFC の値が統計的にどれだけ有意であるかを示し、一般的には P value が 0.05 よりも低い場合、その値は有意であるといえる。False Discovery Rate は多重検査を行うときの有意水準指数であり、0.05 よりも値が低ければ、有意性が持てる。*c27294_g3_i1 1*、すなわち *PgMIXTA* は 3.95×10^{-32} であるので、有意である。

4 考察

今回、Blast プログラムにより、キキョウの蕾の中の全 mRNA の解析を終了したが、新たな MIXTA 遺伝子は発見されず、唯一 RNA シークエンスにより確認できたものは、これまでの別の実験法により発見していた *PgMIXTA* だった。

これを受けて、仮説の検証のためになすべきことは、再びこの *PgMIXTA* が、花卉表面の突起形成の機能を持つか否かを調べることであった。そこで、正常に花卉表皮に突起を作らせる機能を持つ MIXTA 遺伝子と *PgMIXTA* とで、その転写産物であるタンパク質のアミノ酸配列を比較してその機能の有無を探ったほか、発現量解析も行い、キキョウの蕾の中でどのくらい *PgMIXTA* が働いているのかも把握した。

その分析の結果は、仮説を支持するものであった。MIXTA 遺伝子は転写調節遺伝子であるため、その翻訳の産物は DNA に結合するドメインの他に、転写活性化ドメインをもち、後者のドメインがその遺伝子の機能の発現に関与する（浦尾 1995）。*PgMIXTA* は、DNA 結合ドメインは正常な MIXTA 遺伝子によく似ていたが、転写活性化ドメインは大きく異なっていた。これは花卉表皮の突起形成の機能を持たないことを示唆する。その上、この遺伝子の発現量は、蕾よりも葉の方が多かった。つまり、この遺伝子は蕾でも葉でも発現していたわけであり、葉には無い花卉表面特有の突起を作らせる遺伝子として働いているとは考えにくい。

ようやく、私たちは結論を出すことができた。キキョウの花卉表面に突起が無いのは、そのためにはたらく正常な MIXTA 遺伝子が発現していないからと考えられる。

謝辞

お忙しい中、遺伝子解析実験の原理の御教示、実験の御指導と実験器具や薬品を提供してくださった、静岡大学大学院農学領域総合科学技術研究科助教、一家崇志先生、静岡大学大学院農学研究科、博士課程2年の田中靖乃さん、同修士2年の山下寛人さんに心より感謝申し上げます。

参考文献・参考 Web サイト

- ・ B.J.Glover and C.Martin, 1998. The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. *Heredity* 80:778-784.
- ・ B.J.Glover, M.Prez-Rodriguez and C.Martin. 1998. Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor. *Development* 125, 3497-3508.
- ・ S.F.Brockington, R.A-Fernandez, J.B.Landis, K.Alcorn, R.H.Walker, M.M.Thomas, L.C.Hileman and B.J.Glover. 2012. Evolutionary Analysis of the MIXTA Gene Family Highlights Potential Targets for the Study of Cellular Differentiation. Published by Oxford University.
- ・ Q.O.N.Kay, H.S.Daoud and C.H.Stirton.1981.Pigment distribution,light reflection and cell structure in petals. *Botanical Journal of Linnean Society*.vol.83.P.57-84

- K.Noda,B.J.Glover,P.Linstead,C.Martin,Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related tran-scription factor,Nature 369(1996)661-664
- ScovilleAG,Barnett LL,Bodby-Roels S,Kelly JK,Hileman LC.2011.Differential regulation of a MYB transcription factor is correlated with trnsgenerational epijenetic inheritance of trichome density in *Mimulus guttatus*. New Phytol.191:251-263
- H.Du,B-R.Feng,S-S.Yang,Y-B.Huang&Y-X.Tang 2012.
The R2R3-MYB Transcription Factor Gene Family in Maize. PLoS one Vol.7(6) e37463
- 磐南 SS I 活動報告作成委員会（代表 中村一貴）2011. 花と葉の表面構造の違いについて，第 28 回（平成 23 年度）山崎賞受賞作品
- 平野靖也 他 4 名，2014. 花と葉の表面構造の違いについて partⅢ，第 31 回（平成 26 年度）山崎賞受賞作品
- 澤 康一,鈴木 萌絵,山本 珠永,2015. 花と葉の表面構造の違いについて partⅣ，第 59 回（平成 27 年度）静岡県学生科学賞科学教育振興委員会賞受賞作品
- 上川純平,杉山大悟,高田佳樹,鈴木裕陽,2016. 花と葉の表面構造の違いについて partⅤ，第 60 回（平成 28 年度）静岡県学生科学賞科学教育振興委員会賞受賞作品
- 浦尾 剛,岩崎 俊介,柴崎 一雄,1995. 植物の MYB 転写因子の多様な機能.
化学と生物 Vol. 33, No. 1.
- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)
- TREEVIEW
- Grasslus(Grass Regulatory Information Server)
(<http://grassius.org/family.html?KEYWORDS=MYB&SPECIES=4>)