

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18600

研究課題名(和文)植物の適応的な葉形変異を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular genetics of leaf shape variation in wild plants

研究代表者

三井 裕樹(MITSUI, Yuki)

東京農業大学・農学部・准教授

研究者番号：40613138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の成長・生存の基盤である葉形態を制御する分子メカニズム解明を目的として、顕著な細葉形態をもつ溪流植物を用いて組織学的解析を行った結果、溪流植物の葉身拡大は高い細胞増殖活性に起因し、発達初期の葉の先端と基部にオーキシンが蓄積することで、細胞増殖の活性化と主脈となる維管束の発達が促進される可能性が考えられた。遺伝学的解析の結果、溪流植物の発達中の葉ではオーキシン機能に関する遺伝子の活性化が明示された。また、溪流植物と近縁種との比較解析により、オーキシンの輸送、シグナル伝達の調整に関わる遺伝子の発現調節の変化によって、葉形変異が制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand molecular mechanism regulating plant leaf shape variation, this study conducted leaf anatomy of narrow leaves in rheophytic plants which grow in riverbanks. The development of narrow leaf shape was found to be mainly caused by active cell division and proliferation. Immunohistochemical analysis suggested that auxin accumulation in the top and base of the leaf blade could promote activation of cell proliferation and development the main vein, leading to the longitudinal elongation of leaf blade. Transcriptome analysis showed that the auxin-related genes were significantly activated in developing leaves. Comparative analysis between rheophytic plants and their closely related species with broad leaves showed that the expression patterns of several genes regulating auxin transport and signaling were significantly different in the young leaves between the narrow and broad leaves. These genes are the candidates that could play important roles in leaf shape variation.

研究分野：進化・多様性

キーワード：葉形態形成 オーキシン 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

葉は光などの環境シグナルを受容・伝達する基本器官であるため、葉の形は光合成効率を左右する。したがって、葉の形は植物の生存に関わる重要な形質であることから、葉形態を制御する仕組みを理解することは、植物の環境応答戦略の解明に重要である。また、植物種に見られる多様な葉形態は、周囲の環境に適応して獲得された進化的形質である。したがって、葉形態の進化メカニズムを解明することは、植物の進化・多様性形成の解明において重要である。葉形態形成の発生学的・遺伝学的研究は、シロイヌナズナやイネなどのモデル植物を中心に進展してきた。しかし、野生植物にみられる多様な葉形態変異を制御する分子メカニズムはほとんど分かっていない。

本研究では、植物の葉形態の進化のメカニズムを明らかにするために、渓流植物に注目した。渓流植物は、葉を細く、または小さくすることで、洪水によってしばしば水没する河川沿いの環境（渓流帯）に適応して進化した分類群である。渓流植物は熱帯・亜熱帯地域を中心に分布し、細葉形質の収斂的な進化が多様な分類群で見られる。また、対照的な広い葉形態をもつ近縁な姉妹種が隣接して生育することが多いため、細葉・広葉の比較解析が可能となり、葉形態の進化研究のモデル系になり得る。

2. 研究の目的

(1) 植物の葉身伸長の過程では、伸長初期には葉肉組織の細胞数の増加が著しく、増加した個々の細胞サイズが次第に拡大することで葉身拡大が進行していくことが多い。しかし、縦方向へ著しく偏って伸長する渓流植物の細葉形成が同様のメカニズムで生じているかはわからない。渓流植物の細葉形態に関する先行研究は多くなされているが、ほとんどが成熟葉を用いた解剖学的解析である。そこで本研究ではまず、渓流植物では葉の発達に沿って組織・細胞構造がどのように変化するかを明らかにするため、異なるサイズの葉を用いて細胞数、細胞サイズを解析した。

(2) 葉形の発生・遺伝学的研究はモデル植物のシロイヌナズナやイネを中心に進展し、なかでも植物ホルモンのオーキシンが維管束の形成とパターン化に関わることで葉形が制御されていることが知られている。そこで、渓流植物の葉の発達段階でオーキシンの局在を解析することで、細葉形成におけるオーキシンの関与を検証した。

(3) 細葉と広葉の形成過程で特徴的に発現する遺伝子を探索することを目的として、渓流植物および近縁種の葉の発達段階ごとに発現する遺伝子を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。同時に、モデル植物を中心に報告されているオーキシン関連遺伝

子の発現パターンを詳細に解析し、細葉形成に關与する遺伝子の検出を試みた。

3. 研究の方法

(1) キク科モミジハグマ属の渓流植物であるホソバハグマ（細葉型）とその姉妹種であるキッコウハグマ（広葉型）を用いて、葉身の発達段階毎にパラフィン包埋した組織の切片を作成し、葉身中央部分の表皮細胞および柵状細胞の数を計測した。

(2) キク科モミジハグマ属の渓流植物ホソバハグマとユキノシタ科ダイモンジソウ属の渓流植物ウチワダイモンジソウを用いて、葉の発生、維管束形成、葉身発達に関わると考えられるオーキシンの葉内分布を解析した。葉身全体におけるオーキシンの局在分布を可視化するため、ホールマウント蛍光抗体法を用いて葉身形成初期段階の葉におけるオーキシン（IAA）の局在を解析した。

(3) ホソバハグマ（細葉型）とキッコウハグマ（広葉型）を用いて、葉の発達初期および成熟葉から RNA を抽出し、HiSeq200 シーケンサーで発現遺伝子を網羅的に定量解析した。その際、ホソバハグマの葉、蕾、根より抽出した RNA を HiSeq2000 および MiSeq シーケンサーで解析し、約 15 万個のリファレンス遺伝子配列を構築し、解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 渓流植物および近縁種を用いた葉形変異の比較解剖学的解析：渓流植物のホソバハグマ（細葉型）では、葉身の伸長に伴い縦（長さ）と横（幅）両方向で表皮細胞や柵状細胞のサイズが低下する傾向がみられた（図 1 a,c）。対照的に近縁種キッコウハグマ（広葉型）では、葉の伸長に伴って細胞サイズが大きくなった（図 1 b,d）。

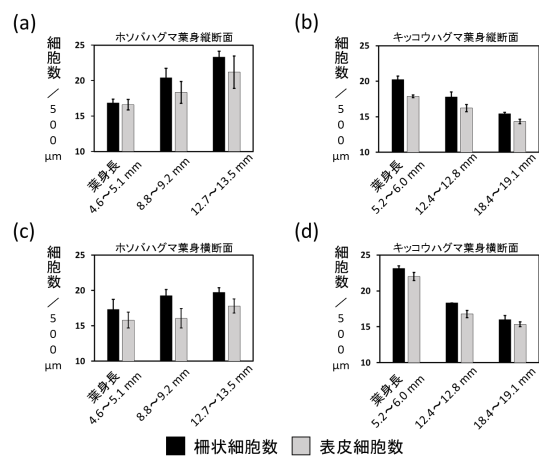


図1: 発達段階毎の葉身(中央部)の柵状・表皮細胞数。(a)ホソバハグマ(細葉型)縦断面、(b)キッコウハグマ(広葉型)縦断面、(c)ホソバハグマ横断面、(d)キッコウハグマ横断面。

一般的に植物の葉身拡大では、細胞サイズの増加がみられるが、ホソバハグマでは、葉身の拡大に伴って細胞サイズが減少する結

果となった。広葉型のキッコウハグマでは、対照的に葉の伸長に伴って細胞サイズが増加しており、このような姉妹種との比較によって、渓流植物の葉身発達の特異性が明示された。渓流植物では、活発な細胞分裂により生まれた新しい細胞が多いため細胞サイズが減少しているか、細胞を小さくすることで分裂活性を高めているのかもしれない。これまでの先行研究では、シダ植物と被子植物の渓流植物で細葉の組織構造に大きな違いがあることや、分類群間でのちがいも報告されており、今後は複数の渓流植物を用いた比較検討が必要である。

(2) 蛍光抗体法を用いたオーキシン (IAA) の局在解析：渓流植物ウチワダイモンジソウの初期葉におけるオーキシン (IAA) 分布を解析した結果、葉身では全体的に蛍光発色は弱かったが、先端部分と葉基部 (葉身と葉柄の付け根の部分) で比較的強い蛍光発色が観察された (図 a-c)。1000 倍および 500 倍の異なる希釈倍率の一次抗体による比較では、蛍光染色の強度に大きな差は見られなかった。一方、一次抗体を用いなかったコントロールでは、一次抗体を用いて染色したものより蛍光発色が非常に弱かったことから、二次抗体が一次抗体に適切に結合していることが確認できた (図 d)。また、より成長した葉身では、オーキシンシグナルがほとんど観察されなかった。

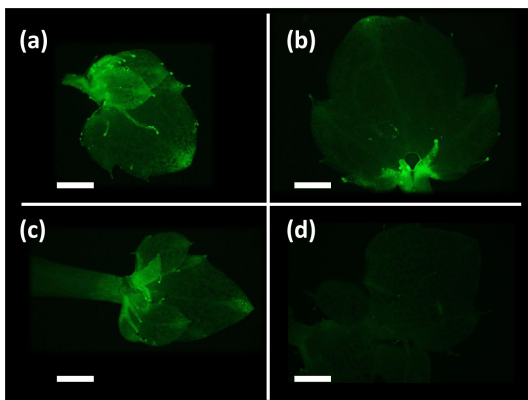


図 2: ホールマウント蛍光抗体法によるオーキシン (IAA) の局在。(a) 一次抗体および二次抗体の濃度: 500 倍・300 倍、(b, c) 1000 倍・300 倍、(d) 二次抗体のみ 300 倍 (コントロール)。バーは全て 0.5mm。

また、ウチワダイモンジソウの葉の基部 (葉身と葉柄の境界付近) には小型の細胞が密集しており、基部で増殖した細胞が葉の上部に広がって細胞サイズの拡大が生じ、基部から上部にかけて放射状に細胞が配列している様子が観察された。したがって、本種は葉基部からの細胞増殖によって葉身が拡大していくと考えられる。

一方、ホソバハグマでも同様の蛍光抗体観察を行ったが、オーキシンシグナルを確認することができなかった。ホソバハグマの表皮組織は比較的厚いワックス層で覆われており、蛍光抗体法における細胞の固定、膜透過

が十分でなかった可能性が考えられる。

オーキシンは組織分化の促進や細胞の増殖、伸長生長に作用していることが知られている。モデル植物であるシロイヌナズナの葉を用いた実験では、発生初期では葉の先端にオーキシンが局在し、オーキシン濃度の高い方向に向かって維管束が形成されること、オーキシン輸送阻害剤を用いて葉の発生を観察した場合、主脈が形成されなくなったことから、オーキシンが維管束の形成にも作用していることが分かっている。

本研究でも、ウチワダイモンジソウの葉の先端と基部でオーキシンの局在が観察されたことから、葉の主脈の形成・発達にオーキシンが関与している可能性を示唆している。一方、葉の先端と基部と比べて側脈の鋸歯の先端では蛍光発色は僅かなものだった。また、葉身発達がある程度進んだ段階では、オーキシンシグナルが検出されなかった。以上のことから、オーキシンは主に葉の発生および発達初期段階で機能し、渓流植物の細葉ではオーキシンが先端部分に集中して蓄積することで主脈となる維管束が特に発達し、縦方向への伸長が促進される可能性が考えられた。さらに、オーキシンが葉基部での活発な細胞分裂に関与している可能性が考えられた。

(3) 葉形態形成に関与する遺伝子の探索：渓流植物ホソバハグマと近縁種キッコウハグマを用いて、細葉の発達段階と成熟段階、広葉の発達段階と成熟段階、細葉の発達段階と広葉の発達段階で RNA-seq 解析を行い、統計的に有意に (FDR P-value < 0.01) 発現量が異なる遺伝子群 (Differentially Expressed Genes: DEGs) を検出した。その結果、DEGs の数は、3,921 個、1,746 個、5,895 個となった。続いて、それぞれの DEGs の遺伝子機能 (Gene Ontology: GO) を予測し、全発現遺伝子 (142,648 個: 細葉型をリファレンスとした) の GO と比較して、有意に変化している GO を Fisher's Exact Test によって検定した結果、細葉および広葉の発達中に活性化している遺伝子群が検出された。とりわけ、細胞壁や細胞膜の機能、Carbohydrate 代謝の機能が増加していた。さらに、発達中の細葉と広葉で比較した結果、細胞壁や細胞膜の機能などに関して差が確認できた。したがって、全体的な遺伝子発現パターンにおいて、これらの遺伝子群の機能的変化により、葉の発達や形態形成の差異がもたらされている可能性が示唆された。

続いて、オーキシン関連遺伝子の発現パターンを詳細に解析し、細葉形成に関与する遺伝子の検出を試みた。これまでに、オーキシンの生合成や極性輸送に関わるオーソログ遺伝子が被子植物全般で見つかっており、これらの活性変化が維管束や葉身細胞の分化を制御することで著しい細葉形質が生じることが示されている。今回、オーキシン生合成に関わる YUC 遺伝子群、オーキシンの輸

送に関わる *PIN/PILS* および *AUX1/LAX* 遺伝子群、オーキシンの受容に関わる *AFB* 遺伝子、オーキシンスIGNAL伝達に関わる *AUX/IAA* および *ARF* 遺伝子群について、合計 266 個の関連遺伝子が検出された。これらの遺伝子群について、ホソバハグマの発達中の葉（幼葉）と成熟葉で発現量が有意に変化したものは 32 個で、全て幼葉で発現上昇していた。また、キッコウハグマにおいても、幼葉で 12 個の遺伝子が発現上昇し、1 個の遺伝子が発現低下していた。これらの結果は、細葉、広葉ともに発達中の葉ではオーキシン関連遺伝子の働きが活性化することを強く示しており、細葉ではよりその傾向が強いことを示唆している。さらに、細葉と広葉の幼葉間では 19 個のオーキシン関連遺伝子の発現量が有意に変化しており、うち 12 個が細葉で発現上昇し、9 個が広葉で発現上昇した（図 3）。これらの遺伝子は組織・細胞内でのオーキシンの輸送、シグナル伝達の調整に関わるものであった。したがって、これらの遺伝子の発現調節の変化によって、細葉、広葉の葉形変異が制御されている可能性がある。

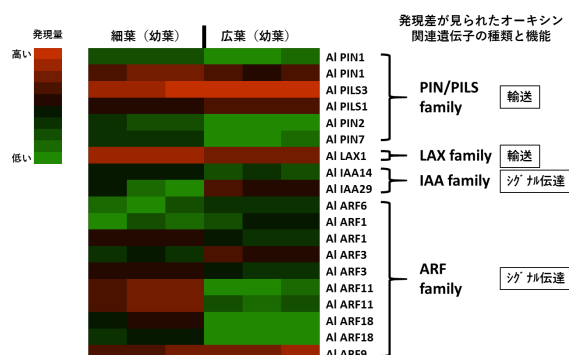


図 3: ホソバハグマ(細葉型)、キッコウハグマ(広葉型)の幼葉で発現量が有意に変化したオーキシン関連遺伝子の発現パターン。細葉型、広葉型それぞれ 3 サンプルを解析した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

三井裕樹、琉球列島の溪流環境で進化した植物。その起源と適応様式について、日本植物学会第 80 回大会、2016 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 裕樹 (MITSUI, Yuki)
東京農業大学・農学部・准教授
研究者番号: 40613138

(4) 研究協力者

小松 憲治 (KOMATSU, Kenji)
坂口 達哉 (SAKAGUCHI, Tatsuya)