

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570083

研究課題名（和文）維管束植物の複葉と葉の起源の分子遺伝学的基盤の研究

研究課題名（英文）Basis of molecular genetics of origin of simple leaf and compound leaf in vascular plant.

研究代表者

上原 浩一（UEHARA KOICHI）

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：20221799

研究成果の概要（和文）：

本研究は大葉形成の制御機構の進化を明らかにするため、シダ植物の葉形態形成遺伝子の機能を特定することを目的とした。そのためリュウキュウトリノスシダの形質転換系の確立を目指した。アグロバクテリウムを用いた形質転換系は確立出来なかったため、エレクトロポレーション法による形質転換系の確立を試みた。その結果、カルス、プロトプラストの形成、再分化に成功したものの、形質転換系の確立には至っていない。今後も形質転換系の確立を進め、葉の形態制御を明らかにしたい。

研究成果の概要（英文）：

The aims of this study are to clarify the evolution of the controlling mechanism in the form of a simple leaf and the compound leaf of the vascular plant. We try to establish the transgenic strain using pteridophyte *Asplenium australasicum*. However, an effective transgenic strain was not made of establishment using *Agrobacterium*. We also tried to establishment of the transgenic strain by the electroporation method. As a result, it succeeded in the redifferentiation of the plant body from callus. However, the transgenic strain cannot be established yet. We want to be going to establish the transgenic strain of the pteridophyte in the future, and to clarify the control of a simple leaf and the compound leaf of vascular plant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：進化、形態形成遺伝子

1. 研究開始当初の背景

維管束植物、被子植物とシダ植物の起源、共通祖先をたどると古生代デボン紀の化石植物トリメロフィトンまでさかのぼることが出来る。だがトリメロフィトンは明瞭な葉の構造を持っておらず、それより進化したシダ植物と被子植物の葉が同じ起源なのか、別個に起源し独立に進化してきたのかはまだ明らかになっていない。本研究は葉の形態形成で重要な役割を持ち、植物において普遍的な機能を司る KNOX 遺伝子、LEAFY 相同遺伝子（以下 KNOX, LFY と略す）に着目し、維管束植物の大葉形成の制御機構の進化について特に単葉と複葉の形態制御の面から明らかにする事を目的とする。

KNOX は、トウモロコシ葉の葉脈の乱れを起こす遺伝子として単離され、特に複葉のトマトの葉の形態形成制御の分子遺伝学的研究（過剰発現させると複葉の切れ込みが増す）から複葉の形態形成に関わる事が明らかになった。またキンギョソウで側生器官の背腹性を決定する PHANTASTICA 遺伝子の相同遺伝子（以下 PHAN と略す）が KNOX とともにトマトの複葉形成に関わる事が明らかとなり KNOX・PHAN 系の複葉制御の研究が進んでいる（Kim et al. Nature 2003, Development 2003）。

一方、シロイヌナズナの花序分裂組織決定遺伝子として知られる LEAFY 遺伝子はエンドウの複葉形成に関わることから（Hofer et al. Curr. Biol. 1997, Pl. Mol. Biol. 2001）、被子植物のモデル植物では葉の形態制御に KNOX・PHAN 系と LFY 系という2つの異なった制御機構が存在する事が明らかになった。その後 Bharathan et al. (Science 2002) によりアブラナ科、セリ科、ブドウ科などで KNOX 制御が確認されマメ科植物を除く多くの被子植物で KNOX・PHAN 系が複葉形態制御に関与することが定説となった。

より原始的な維管束植物においてはシダ植物小葉類のイワヒバ属において葉の形態形成が KNOX・PHAN 系により制御されるという報告がある（Harrison et al. Nature 2005）。しかしこの報告は材料が単葉型の小葉のみであること、単離された KNOX および PHAN をシロイヌナズナを用いて機能解析し、被子植物と同じ機能を持つ事を示したのみである事から、シダ植物の複葉の形成制御を KNOX・PHAN 系に特定する結果とは言い難い。研究代表者は複葉の進化を明らかにすることを目的として被子植物でもっとも原始的な分類群の一つであるスイレン科ハゴロモモ（複葉的な切れ込みを持った水中葉と単葉の水上葉をつける）と、シダ植物のシケシダ・ヘラシダ（同属の近縁種で複葉と単葉をもつ）の KNOX・PHAN・LFY の単離とリアルタイム PCR による遺伝子発現解析を試みた結果、非常に

興味深い結果が得られた（基盤研究（C）H17~H18）。ハゴロモモでは複葉と単葉で KNOX・PHAN 系の発現量に有意差が見られたが LFY は差が見られなかった。シダ植物では複葉のシケシダと単葉のヘラシダで LFY 発現量に有意の差が認められたが KNOX は差がなかった。

このことからいままでに発表されたマメ科以外の被子植物と同様、原始的被子植物ハゴロモモにおいても単葉・複葉が KNOX・PHAN 系により制御されていること、そしてシダ植物では LFY により制御されていることが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

上記で引用した複葉の遺伝子制御に関する論文は Nature, Science などどれも有名学術雑誌に掲載されていることから学術上重要視されていることがわかる。研究代表者のこれまでの研究で明らかにされた事実はそのことからきわめて学術上重要であり有名学術雑誌に掲載される価値を持つものとする。しかし注目される分野だけに米国の Sinha をはじめ競争相手も多く、一刻も早く発表する必要がある。しかも現在のそれら学術雑誌の分子遺伝学研究に対する要求度からいって過剰発現トランスジェニック植物の作出、あるいは RNA 干渉による遺伝子機能抑制によるシダ植物における LFY の複葉形成機能の特定は必要と考えられる。そこでシダ植物の葉形態形成におけるこれらの遺伝子の過剰発現トランスジェニック植物の作出、および RNA 干渉をもちいた発現抑制を行い形成される葉の形態を確認、シダ植物の単葉・複葉の形態形成における葉形態形成機能を特定する。これらの実験はともに高度であるためどちらかが失敗する可能性を考慮し両方向う。また、シダ植物の葉形突然変異体（獅子葉）を探索し LFY・KNOX の機能との関わりを明らかにする。

本研究はマメ科植物を除き複葉の形態形成に KNOX・PHAN 系に関わるという近年の分子遺伝学上の定説を覆すものである。このことはさらに葉が未分化なトリメロフィトンからシダ植物と被子植物の葉が別の制御系を持って別個に造られ、進化していった可能性（大葉の多系統性）をも示唆する。これは本研究の分子データが化石データに先んじて維管束植物の大進化の流れを示す画期的なデータとなりうる。

古生代に出現した原始的陸上植物は葉を持たず、維管束を含む二又分枝する茎だけからなると考えられている。葉の起源は定説となったテローム説では枝が細かく分かれ平

面に並び枝の間を組織が埋める形で葉が形成されたと考えられている。そのプロセスで複雑化した枝から葉への移行において単葉より先に複葉がつくられたという仮説も考えられる。本研究により「複葉と単葉のどちらが先に生じたか」にも迫れる可能性がある。

また、シダ植物ではいまだ完全な形質転換系が確立されていない、そのことがシダ植物の分子遺伝学的研究に大きな障害となっている。本研究では形質転換系作出のエキスパートを研究分担者に迎えて研究・技術開発を進める。現時点ですでに再分化系の確立まで至っており、シダ植物の形質転換系作出へ向け研究が進行している。これによりで本研究のみならず今後のシダ植物の分子遺伝学研究にきわめて重要な技術の確立が期待できる。

3. 研究の方法

シダの各遺伝子の進化系統解析と発現解析：単離したヘラシダ（単葉）・シケシダ（複葉）の KNOX, LFY の系統解析、および茎頂と葉原基形成における KNOX, LFY の *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を行う。今まで発現解析が行われたシロイヌナズナ、トマト、エンドウ等と比較しシダ植物の両遺伝子発現様式が被子植物のそれと同じか否か確認し、遺伝子の進化について考察する。

KNOX, LFY のシダ植物複葉形成における機能解析：20 年度より行ってきた RNA 干渉および過剰発現の研究を継続、完成させ両遺伝子の機能を明らかにする。作出したトランスジェニック植物における両遺伝子の発現状態をリアルタイム PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションにより確認する。

シダ植物の形質転換系の開発：シダ植物の形質転換系は未だ有効な系が確立されていない、しかし本研究を遂行するにあたり KNOX, LFY のシダ植物における機能を明らかにする必要がある。そこで本研究ではシダ植物の形質転換系を確立する。シダ植物ヘラシダ・シケシダにおいて KNOX, LFY を過剰発現、または RNA 干渉により発現を抑制したときの葉の形態形成への影響を見ることで両遺伝子のシダ植物における機能を明らかにすることが出来る。

獅子葉突然変異体における KNOX, LFY の発現解析：シダ植物で種を問わず有望な獅子葉突然変異体が得られた場合、LFY および KNOX の単離とリアルタイム PCR, *in situ* ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析を行い突然変異体における両遺伝子の関与を特定する。

KNOX, LFY の過剰発現ベクターの作出と過

剰発現個体による機能解析：単離済みのヘラシダ・シケシダの LFY, KNOX を組み込んだ過剰発現ベクターを作成する。形質転換系が完成次第、作成した LFY および KNOX 過剰発現ベクターを導入したトランスジェニック植物を作出し、両遺伝子過剰発現の葉形成への影響を見ることで LFY および KNOX の機能を明らかにする。

シダ植物 KNOX, LFY のシロイヌナズナ突然変異体への導入による機能解析：単離済みのヘラシダ・シケシダの LFY, KNOX をシロイヌナズナの *knox* 突然変異体、*lfy* 突然変異体に導入し機能回復するか否か観察し、被子植物の LFY, KNOX の機能とシダ植物の LFY, KNOX の機能が同じかどうかを検証する。

KNOX, LFY の RNA 干渉による発現抑制と葉形成への影響：RNA 干渉 (RNAi) は、近年急速に頭角を現してきた強力な遺伝子機能解析法で、細胞や生体内の特異的な標的 mRNA を分解することにより、コードされているタンパク質の発現を抑制して遺伝子の機能を調べる方法である。このような特異的な mRNA の分解は、相補的な二本鎖 RNA によって行われる。研究代表者がすでに単離したヘラシダ・シケシダの KNOX, LFY の塩基配列をもとに short hairpin RNAs (shRNAs) を設計・合成し植物体の茎頂、葉原基に導入、標的遺伝子の発現抑制を行い形成される葉の形態から各遺伝子の機能を明らかにする。今までの研究結果からシダ植物においては LFY の制御が最も重要であるが同時に KNOX についても実験を行い複葉形成に関与するか否か、その機能を明らかにする。

単葉種シダ類の葉形突然変異体（獅子葉）の探索：シダ植物の葉形突然変異体、いわゆる獅子葉は以前からシダ愛好家の間で珍重されている。この中から単葉が複雑化する、あるいは複葉が単純化する変異株を探索し KNOX, LFY がどのように関わるかを明らかにすることも両遺伝子の機能決定の重要な証拠となる。そこでシダ愛好家の間で保存される獅子葉突然変異体を探索し有望な変異株の提供を受けて遺伝子のクローニングと発現解析を行う。

4. 研究成果

本研究を遂行するにあたり KNOX, LFY のシダ植物における機能を明らかにする必要がある。しかし、シダ植物の形質転換系は未だ有効な系が確立されていない。シダ植物の形質転換系の確立は本研究テーマのみならず、植物の進化や分子遺伝学の発展に大きな恩恵をもたらすと考えられる。

そこで、まず、アグロバクテリウを用いた形

質転換系の確立を試みたが現在までのところ有効な形質転換系は確立出来ていない。つぎに、エレクトロポレーション法による形質転換系の確立も試みた。その結果、展開前の若い葉を用いてカルスの作成に成功した。つぎにカルスと無菌植物体からのプロトプラスト形成、プロトプラストからのカルス形成、再分化に成功した。しかし、形質転換系の確立にはまだ至っていない。これからもアグロバクテリウムおよび、エレクトロポレーションの両方から形質転換系の確立を進め、単葉と複葉の形態制御を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 浩一 (UEHARA KOICHI)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号： 20221799

(2) 研究分担者

三位 正洋 (MII MASAHIRO)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号： 30093074

塚谷 裕一 (TSUKAYA HIROKAZU)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号： 90260512

伊藤 元己 (ITO MOTOMI)
東京大学・総合文化研究科・教授
研究者番号： 00193524