

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770086

研究課題名（和文）珠皮と葉の平行進化過程の解明

研究課題名（英文）Analyses on leaf-polarity genes co-opted into integument development

研究代表者

山田 敏弘（YAMADA TOSHIHIRO）

金沢大学・自然システム学系・講師

研究者番号：70392537

研究成果の概要（和文）：葉と珠皮（＝種皮）はともに扁平な器官で、それぞれ種子植物の代表的な適応形質である。また、両器官は今から約 3.8 億年前に同時に枝から進化した。珠皮と葉の起源には共通のメカニズムが用いられたようで、このことが両器官の同時出現につながったらしい。一方で、葉と珠皮は、器官を扁平にするメカニズムをそれぞれに洗練させており、この違いが、珠皮らしさ、葉らしさの創出に寄与しているのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Both leaf and integument (=seed coat) are planar organs which are evolved almost simultaneously from stem in 380 million years ago. At the same time, they are representative adaptive characters of seed plants. Their simultaneous evolution is partly explained by a fact that they adopt the same developmental mechanisms upon their origin. On the other hand, the mechanisms are modified independently in leaf and integument, enabling them to form their unique characters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：進化発生植物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：種子植物，種子，種皮，珠皮，葉，テローム

1. 研究開始当初の背景

約 4 億年前に出現した真葉類（シダ類と種子植物を含む分類群）の祖先は葉を持たず、その体はテロームと呼ばれる放射相称な軸だけで構成されていた。一方、現生の真葉類は扁平な葉を持ち、軸だけの祖先に比べて、格段に光を受け止める効率が高い。また、現生種子植物は、胚を扁平な種皮で包むことによって胚を休眠させ、広範囲に拡散したり、季節性に適応したりできる。

シダ類と種子植物は、約 3.8 億年前に独立に葉を進化させたが、それらの進化過程はどちらもテローム説で説明されてきた。この仮説では、まずテロームの中に主軸と側軸が分化し、次に数本の側テロームが同一平面上に配列し、最後にテロームどうしが癒合して水かき状の組織が形成され、葉が完成したと考える。また、種子植物の祖先は、葉を獲得したのとほぼ同時期に、孢子嚢の周囲にある立体的に配置したテロームを癒合させることで、珠皮を生み出した。つまり、葉と珠皮は

ともにテローム由来の扁平な器官であり、軸を扁平化させた機構は、真葉類の放散を飛躍的に促進した革新といえる。

被子植物のモデル植物シロイヌナズナの葉を用いた研究から、葉の扁平化メカニズムの大枠が明らかとなっている。すなわち、葉の扁平化には向軸側組織と背軸側組織の分化が必須であり、葉は両組織の境界面に垂直な方向 (=側方) に細胞増殖が促進されることで扁平になる。向軸側組織の分化は、Class III Homeodomain-Leucine Zipper (HDZIPIII) 遺伝子、背軸側組織の分化はKANADI (KAN) 遺伝子によって制御され、各遺伝子の発現は、それぞれ向軸側組織、背軸側組織に限られる。また、両遺伝子はお互いの発現を抑制し合う。一方、珠皮の扁平化メカニズムもシロイヌナズナで徐々に明らかとなりつつあり、最近、葉と同様にHDZIPIII 遺伝子が向軸側組織で、KAN 遺伝子が背軸側組織で発現することが示された。このことは、葉と珠皮という種子植物の代表的な新規器官が同じメカニズムで扁平化している可能性を示し、両器官が平行進化したことを示唆するものとして興味深い。しかし、珠皮の扁平化に関わる遺伝子についての情報はシロイヌナズナ以外では得られていない。このため、葉と珠皮で共通する遺伝子発現が、種子植物の祖先状態であるかは分かっていない。また、シロイヌナズナにおいてHDZIPIII, KAN 遺伝子の発現が調べられているものの、それら遺伝子の変異体の珠皮には顕著な表現型が見られない。このため、両遺伝子が、葉と同様な機能を珠皮で果たしているかは、さらに検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、以下の2点を明らかにし、得られた結果を総合して、珠皮と葉の平行進化過程を推定することを目的とする。

(1) 裸子植物や原始的被子植物において、葉形成遺伝子の珠皮での発現を観察する。その結果から、シロイヌナズナの珠皮で観察された事象が、種子植物の祖先状態であるかを検証する。

(2) シロイヌナズナにおいて、向背軸極性決定遺伝子の多重変異体の珠皮形態を観察し、珠皮におけるそれら遺伝子の機能を推定する。

3. 研究の方法

(1) 裸子植物、原始的被子植物における葉向背軸極性決定遺伝子の発現解析

裸子植物のグネツム (*Gnetum parvifolium*) および原始的被子植物のハゴロモモ

(*Cabomba caroliniana*) から、HDZIPIII 遺伝子(向軸側組織決定因子)、KAN, YABBY (YAB) 遺伝子(背軸側組織決定因子)を単離し、それらの発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法と半定量的 RT-PCR を用いて観察する。

(2) シロイヌナズナ胚珠における HDZIPIII, KAN 遺伝子の機能解析

これまでの研究から、シロイヌナズナの背軸側珠皮で異所的に HDZIPIII 遺伝子を発現させても、KAN 遺伝子の発現が抑制されないことが示されている。一方で、珠皮の表現型は変化しないことから、KAN 遺伝子は HDZIPIII 遺伝子の転写抑制を介さない方法で、HDZIPIII 遺伝子が背軸側で機能するのを阻害しているのかもしれない。そこで、HDZIPIII の背軸側での異所的発現が引き起こされる *phvoluta (phv)-1d* 変異体と KANADI 遺伝子の変異体である *aberrant testa shape (ats)-3* または *kan1* を交配し、二重変異体での表現型を観察する。

4. 研究成果

(1) 裸子植物、原始的被子植物における葉向背軸極性決定遺伝子の発現解析

①HDZIPIII 遺伝子の単離・発現解析

グネツム、ハゴロモモの胚珠軸で発現する HDZIPIII 遺伝子1つを単離し、3' UTR を含む部分配列約 2000bp を決定し、それぞれを *GpC3HDZ1*, *CcC3HDZ1* と名付けた。次に、他の維管束植物から単離されている HDZIPIII 遺伝子とそれらをアライメントし、系統樹を作成した。その結果、両者は、シロイヌナズナの *PHABULOSA*, *PHV* 遺伝子の co-ortholog であることが分かった。

単離した2遺伝子について、グネツム、ハゴロモモの胚珠と葉で発現解析を行った。両遺伝子とも、シロイヌナズナと同様に、葉(胚珠軸の葉に由来する器官も含む)、珠皮の向軸側での発現が観察された(学会発表①、③-⑤)。

②KAN 遺伝子の単離・発現解析

グネツムの胚珠軸で発現する KAN 遺伝子1つを単離し、3' UTR を含む部分配列約 600bp を決定し、*GpKAN1* と名付けた。系統解析の結果、この遺伝子はシロイヌナズナの *KAN1* の ortholog であった。

この遺伝子について、葉、胚珠軸での *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を行ったが、明瞭な発現シグナルを得る

ことは出来なかった。しかし、RT-PCRの結果は、本遺伝子の胚珠での発現を示唆するため、*in situ* ハイブリダイゼーション法における適当なプローブ会合条件などの検討を今後行う必要がある。

③YAB 遺伝子の単離・発現解析

グネツムの胚珠軸で発現する YAB 遺伝子を 2 つ単離し、それぞれを *GpFIL*, *Gp12* と名付けた。また、ハゴロモモで発現する YAB 遺伝子を 5 つ単離し、*CcCRC*, *CcFIL*, *CcINO*, *CcYAB2*, *CcYAB5* と名付けた。系統解析の結果、それぞれ、シロイヌナズナの *CRC*, *FIL/YAB3*, *INO*, *YAB2*, *YAB5* のオーソログであった。

これらについて RT-PCR を行い、大まかな発現場所を推定したところ、グネツムの 2 遺伝子は胚珠軸と葉での発現が認められた。一方、ハゴロモモの 5 遺伝子には、葉と胚珠の両方で発現する遺伝子は無かった (論文①)。次に *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、さらに詳細な発現場所を観察したところ、グネツムの 2 遺伝子は珠皮や葉の全体で発現し、シロイヌナズナの YAB 遺伝子のような背軸側組織特異的な発現は観察されなかった。また、ハゴロモモにおいて、珠皮で発現する YAB 遺伝子は無かった (論文①, 学会発表②)。さらには、ハゴロモモの葉における YAB 遺伝子の発現にも極性は認められず、YAB 遺伝子は元々背軸側組織の運命決定には関与していない可能性が示唆された (論文①, 学会発表②)。

(2) シロイヌナズナ胚珠における HDZIPIII, KAN 遺伝子の機能解析 (学会発表③-⑤)

① *ats-3 phv-1d/+* の解析

ats-3 変異体では、外珠皮・珠皮が癒合するが、それぞれの珠皮の形成様式は野生型と大きく変わらず、両珠皮は珠心を完全に覆うまで伸長する。一方、*phv-1d/+* 変異体 (*phv-1d/phv-1d* の多くは、雌蕊形成に至らない) では、珠皮形成に異常は見られないが、外珠皮は通常の 1/3 程度しか珠心を覆わない (Kelley et al., 2009. *Plant J* 57:1054-1064)。

本研究では、新たに *ats-3 phv-1d/+* 二重変異体の胚珠を観察した。この二重変異体の表現型は、珠皮が珠心の 1/3 程度を覆う段階までは、*ats-3* 変異体と同じだった。しかし、この後、外珠皮が伸長することはなく、珠皮は珠心の半分弱を覆ったところで伸長を止めた。結果として、成熟した胚珠でも、珠心の半分強が剥き出しとなった。

つまり、二重変異体の表現型は、外珠皮の伸長程度 (*phv-1d* 由来) と珠皮の癒合 (*ats-3* 由来) という点において、相加的であるものの、珠皮は、それぞれの単独変異体よりも明

らかに短くなっていた。従って、*ATS* 遺伝子は、*PHV* 遺伝子の転写抑制を介さない方法で、*PHV* 遺伝子が背軸側で機能するのを阻害していると考えられる。

② *kan1 phv-1d/+* の解析

kan1 単独変異体の胚珠は、野生型と全く同じ表現型を示す。しかし、*kan1 phv-1d/+* の胚珠では、*phv-1d/+* と同様に、外珠皮が、珠心を 1/3 程度覆うところまでしか伸長しなかった (相加的表現型)。一方、珠皮の伸長は阻害され、珠心の半分以上が剥き出しのまま胚珠が成熟した。

つまり、*ats-3 phv-1d/+* の場合と同様に、*kan1 phv-1d/+* でも珠皮の伸長が阻害された。従って、*KAN1* 遺伝子は、*PHV* 遺伝子の転写抑制を介さない方法で、*PHV* 遺伝子が背軸側で機能するのを阻害していると考えられる。

(3) 総括

本研究の結果、HDZIPIII 遺伝子の発現様式はシロイヌナズナとグネツムで共通することが明らかとなった。また、今回は詳細な発現様式を明らかにできなかったが、グネツムの胚珠においても *KAN* 遺伝子が少なくとも発現していることが示された。またシロイヌナズナの珠皮において、背軸側、向軸側の性質決定因子が拮抗的に働くことで、扁平な器官形成が促進されることが分かった。従って、種子植物の祖先は、共通する転写因子を用いて、テロームから葉と珠皮を扁平化させた可能性が高い。このことは、化石記録において、珠皮と葉がほぼ同時期に出現することを上手く説明する。一方、葉と珠皮で、向背軸決定因子の相互作用様式に違いが見られたことは、両器官が独自に扁平化メカニズムを“洗練”させてきたことを意味する。

今後、珠皮形成において HDZIPIII, *KAN* 遺伝子が含まれる遺伝子経路を明らかにし、それらを葉の扁平化に関わる遺伝子経路と比較することで、器官の扁平化に必須なメカニズムや、「葉らしさ、珠皮らしさ」を生み出したメカニズムが解明できるだろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① *Yamada T., *Yokota S., Hirayama Y., Imaichi R., Kato M., and Gasser C. S., in press. Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of YABBY genes in angiosperms. *Plant Journal*. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04570.x

〔学会発表〕(計5件)

- ① 山田敏弘. *Telomes come true? 枝からたねへの物語*. 第10回日本植物分類学会大会公開シンポジウム, 2011年3月21日, 筑波大学(茨城県).
- ② Yamada T., *Tracing ovule evolution-- Dialogue between palaeobotany and developmental biology*, Seminar Series of Plant Biology Graduate Group, University of California Davis, 2011年1月28日, カリフォルニア大学デービス校(USA).
- ③ 山田敏弘. *進化古植物学—化石の中に生きている植物の足跡を探し, 生きている植物の中に化石の面影を探す*, 第42回種生物学会種生物学シンポジウム, 2010年12月11日, 京都大学(京都府).
- ④ 横田真哉, 今市涼子, 加藤雅啓, 山田敏弘. *被子植物における YABBY 遺伝子の多様化過程の解明*. 第73回日本植物学会大会, 2009年9月18日, 山形大学(山形県).
- ⑤ 山田敏弘, 鈴木亮輔. *AINTEGUMENTA 遺伝子の発現から考える大葉と珠皮の平行進化*. 第73回日本植物学会大会, 2009年9月18日, 山形大学(山形県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 敏弘 (YAMADA TOSHIHIRO)
金沢大学・自然システム学系・講師
研究者番号: 70392537