

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870031

研究課題名（和文） 環境に応じて葉の形を変化させる植物ニューベキアを用いた植物の表現型可塑性の研究

研究課題名（英文） Analysis of phenotypic plasticity of leaf shape of lake cress, *Neobeckia aquatica*

研究代表者

木村 成介 (KIMURA SEISUKE)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：40339122

研究成果の概要（和文）：

ニューベキアは、水中と気中では発生する葉の形を変化させる表現型可塑性を示す。私達は、この植物が温度や光強度によっても葉の形を変化させることを見いだした。この葉形変化は葉原基の基部で行われ、*KNOX*遺伝子やジベレリンが重要な働きをしていることを明らかにした。さらに、次世代シーケンシングにより網羅的遺伝子発現解析を行い、葉形変化に伴い発現が変動している遺伝子を同定した。これらの遺伝子を解析することで、葉の形態の表現型可塑性のメカニズムが明らかになると期待される。

研究成果の概要（英文）：

The North American lake cress, *Neobeckia aquatica* alters its leaf morphology dramatically depending on the growth conditions. We found that leaf shape changes in response to varying temperature and light intensity, as well as to underwater submergence. The final morphology of mature leaf is determined in early phases of primordium development, via the plant hormone gibberellin and *KNOX1* gene activity. In order to identify genes important for the environmental plasticity, we have conducted transcriptome analysis employing next-generation sequencing technology. Groups of genes implicated in hormonal regulation or response, as well as genes involved in leaf development, were found differentially expressed. In future we plan to analyze the spatiotemporal expression and function of these genes and uncover the mechanism underlying the environmental plasticity of *Neobeckia* leaf morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：表現型可塑性，発生，葉，植物，環境応答，ニューベキア

## 1. 研究開始当初の背景

生物をとりまく環境は一定でなく、生物が

生存するためには刻々と変化する環境にตอบสนองする必要がある。移動する事の出来ない植物に

においては、環境に応答する能力を獲得することが進化の過程で特に重要であったと考えられている。同じ遺伝子型を持つ個体が、周囲の環境に応じてその表現型を変化させることを表現型可塑性という。

北米の湖畔の湿地帯に生育する水生植物ニューベキアは、生育環境に応答して葉の形態を変化させる表現型可塑性を示す。空気中では基本的に楕円形の単葉を発生する一方、水中では一枚の葉が複数の小葉に分かれた羽状複葉を発生し、さらにそれぞれの小葉が針状に変化する。また、空気中であっても温度や光強度の変化によって、単葉から複葉までさまざまに葉の形態を変化させる。このような葉の形態の変化は水の流れに抵抗したり、様々な環境条件においても光合成を効率良く行なうために役に立っていると考えられ、植物の環境応答と適応、および葉の形態の決定機構という2つの観点から興味深い。

ニューベキアの示す表現型可塑性の発現は、葉の発生に関与する遺伝子などの発現部位や量が環境に応じて変化することでおこると考えられ、これらの遺伝子を同定してその機能を解析することが表現型可塑性のメカニズムの解明に必要である。これまで DNA 配列情報の乏しい生物でマイクロアレイなどの網羅的な遺伝子発現解析を行なう事は難しかったが、最近 Illumina 社の Solexa などの次世代シーケンサーが転写産物の解析にも応用されるようになり、ニューベキアのような非モデル生物でも網羅的遺伝子発現解析が可能になりつつある。またニューベキアはシロイヌナズナと近縁で、そのゲノム情報を利用できるという利点もある。そこで本研究では、次世代シーケンスを用いたニューベキアの網羅的遺伝子発現解析により表現型可塑性に関与していると考えられる遺伝子を同定し、植物がどのように環境に応答してその形態を変化させているかを分子レベルで明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

ニューベキアの示す葉の形態の表現型可塑性のメカニズムを明らかにするため、本研究では、以下の2点を目的として研究を実施した。

- (1) 発生学的解析を行い、ニューベキアの示す葉形変化の発生学的基盤を明らかにする。
- (2) ニューベキアを用いて次世代シーケンス(Solexa)による網羅的遺伝子発現解析を行なうことで、環境や葉の形態の変化に伴って発現が変化する遺伝子群を同定し、表現型可塑性の発現に重要な遺伝子を発見する。

## 3. 研究の方法

本研究では、具体的に以下の方法で研究を進めた。

(1) ニューベキアを様々な環境条件下(光、温度、湿度、水没、植物ホルモンの添加など)で生育し、葉の形態を決定する環境条件を明らかにした。

(2) ニューベキアの茎頂や葉原基の詳細な形態観察および発生学的な解析を行ない、葉の発生のどの時期に環境を検知し、葉の形態を変化させているかを明らかにした。

(3) 異なる形態の葉を発生する条件で生育したニューベキアを用いてSolexaシーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行ない、環境や葉の形態の変化に伴い発現が変化する遺伝子群を同定した。

## 4. 研究成果

これまでニューベキアが水没により葉の形態を大きく変化させることが知られていたが

(図1)、気中で生育させると生育条件により単葉から複葉まで様々な形態の葉を発生することがわかってきた。そこで、葉の形態と環境との関係を明らかにするため、様々な環境条件がニューベキアの葉形態に与える影響を系統的に解析した。様々な温度や光強度でニューベキアを生育し、発生した葉の形態を Dissection Index (葉の周囲の長さを面積の平方根で割った値で、葉の複雑度の指標となる)を測定することで定量的に評価した。その結果、温度が低下および光強度の上昇に伴って葉の複雑度が上昇する(よりギザギザの葉になる)ことが明らかとなった(図2)。温度や光強度により葉の形態が変化することの適応的な意義については不明であるが、変動する環境においても、効率よく光を受けて光合成を行うのに役に立っていると考えられる。また、湿度や光の波長などによっても葉の形態が変化する可能性があるため、適応的な意義を考察しながら、詳しく解析している。

次に、ニューベキアの葉形変化の発生学的基盤を明らかにするため、形態学的解析を行った。樹脂包埋法により葉の切片を観察したところ、葉の複雑度が上昇すると細胞の大きさは小さくなり、細胞数は減少していること



図1 ニューベキア (*Neobeckia aquatica*)  
左: 陸上の形態 右: 水中の形態

がわかった。さらに、茎頂培養したニューベキア葉が大きくなって行く過程をタイムラプス撮影して観察した。単葉が形成される過程では、葉原基の基部の部分に新しい鋸歯が足されながら葉が大きくなっており、先端部に新しい鋸歯が足されることはなかった。また、複葉が形成される過程では、葉原基の基部から小葉原基が発生し、さらに、小葉原基の基部から二次小葉が形成されていた。Eduというヌクレオチドのアナログの取り込みにより細胞分裂している細胞を可視化したところ、基部でのみ細胞分裂が行われていることがわかった。これらの結果から、葉原基の基部の部分が形態形成の場であることが示唆された。ニューベキアの生育中に環境を変化させると、移行した時に形態形成をしていた葉は、移行的な形態を示した。複葉を形成する条件から単葉を形成する条件に移行させた時は、葉の上半分が複葉的で下半分が単葉的な形態となり、逆に移行させたときは葉の上半分が単葉的で下半分が複葉的な形態となった。この結果からも、移行したときの葉の先端部の形態はすでに決定しており、基部が形態を変化させていることが分かった。以上の結果から、ニューベキアの葉原基の基部が環境にตอบสนองし形態形成を行う重要な部位であることが明らかとなった。

複葉を持つ多くの植物では、ホメオボックス遺伝子である*KNOX*遺伝子が葉原基で強発現していることが知られている。組織免疫染色によりニューベキアの*KNOX*遺伝子の発現パターンを調べた所、複葉を発生する条件においては、小葉原基などで強い発現が観察された。*KNOX*遺伝子は*GA20ox*遺伝子などの発現を抑制する事で、ジベレリン合成量を低下させることが知られている。そこでジベレリンがニューベキアの葉の形態に与える影響について調べた所、ジベレリンの添加により低温条件であっても単葉が発生し、逆にジベレリンの生合成阻害剤であるウニコダゾールの添加により高温条件においても複葉が発生した。このことから、ニューベキアの葉の形態形成においても*KNOX*遺伝子経路が重要な働きをしていると考えられた。

ニューベキアの表現型可塑性の発現は、葉の発生やメリステムの維持に関与する遺伝子の発現部位や量が環境に応じて変化することでおこると考えられる。そこで、次世代シーケンズを用いたトランスクリプトーム解析により、表現型可塑性の発現に重要な遺伝子

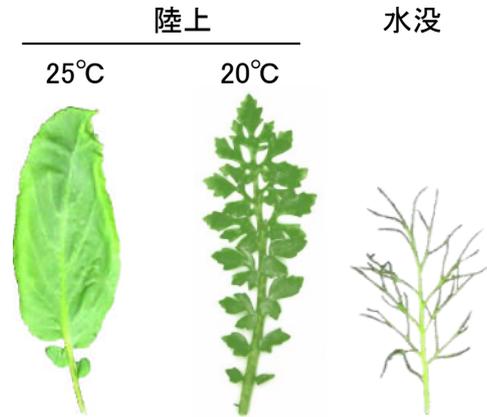


図2 ニューベキアの葉の形態の表現型可塑性

左: 25°C 中: 20°C 左: 水中  
で生育したニューベキアの葉の形態

を同定することを試みた。まず、複葉および単葉を発生する条件で生育させたニューベキアの茎頂からmRNAを単離し、次世代シーケンズによりmRNA-seq解析を行った。得られたリードをシロイヌナズナのゲノム配列情報をリファレンスとしてマッピングし、それぞれの遺伝子にマップされたリードの数を、複葉と単葉を作る条件間で統計的に比較することで網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、植物ホルモン関連遺伝子群や、葉の発生に関わる遺伝子群の発現が葉形変化に伴って変動していることが明らかとなった。今後は、これらの遺伝子の時空間遺伝子発現解析や機能解析を行い、ニューベキアの示す葉の形態の表現型可塑性のメカニズムを明らかにしていきたい。

#### 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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① H. Nakayama, N. Nakayama, A. Nakamasu, N. Sinha and S. Kimura: Toward elucidating the mechanisms that regulate heterophylly.(Review) *Plant Morph* (2012). 査読無し, 印刷中

[学会発表] (計13件)

- ① Modeling and analysis for iterative protrusion on Neobeckia leaf, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J Suematsu, Seisuke Kimura, CBS symposium 2012, Quantitative Developmental Biology, Mar. 26-28, 2012, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan

- ②環境に応じて単葉と複葉をつくり分ける植物ニューベキア(*Neobeckia aquatic*)を用いた葉の表現型可塑性の研究、中山北斗、木村成介、第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学、2012 年 3 月 16 日～18 日
- ③Developmental and molecular mechanisms of the heterophylly of *Neobeckia aquatica*, Hokuto Nakayama and Seisuke Kimura, 第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日
- ④木村成介: 生育環境に応じて葉の形を変化させるニューベキアを用いた植物の表現型可塑性の研究. 第 21 回植物バイテクシンポジウム「植物における遺伝子制御と形態形成・生理応答の新展開」、京都市、2011.12.18
- ⑤N. Nakayama, R. Smith, T. Mandel, S. Kimura, A. Boudaud, C. Kuhlemeier: Mechanical regulation of auxin-mediated growth. 5<sup>th</sup> Mechanobiology Conference: Mechanobiology of Multicellular Systems, University of Singapore, Singapore, 2011.11.9-11
- ⑥中益朗子、末松 J 信彦、木村成介: ニューベキアの複葉突起の等間隔性の解析とモデリング、先端数理科学研究科開設記念シンポジウム、川崎市、2011.10.2-5
- ⑦中山北斗、中山尚美、木村成介: 環境に応じて葉の形を変化させる植物ニューベキアを用いた植物の表現型可塑性の研究. 日本植物学会・日本植物形態学会共催シンポジウム「おかしな形はかしこい形? -環境に合わせた植物形態の進化-」、東京都文京区、2011.9.17
- ⑧中山北斗、木村成介: 表現型可塑性を示すニューベキア(*Neobeckia aquatica*)を用いた葉の発生的解析、日本植物学会第 75 回大会、東京都文京区、2011.9.17-19
- ⑨中益明子、中山北斗、木村成介: ニューベキア(*Neobeckia aquatica*)の複葉形成時における、等間隔性の解析とモデリング、日本植物学会第 75 回大会、東京都文京区、2011.9.17-19
- ⑩中益朗子、末松 J 信彦、木村成介: ニューベキアの葉の発生過程における表現型可塑性のモデリング、第 71 回形の科学シンポジウム「形、模様、画像の時間変化の科学と応用」、千葉市、2011.6.17-19
- ⑪木村成介: 植物の葉の形態の多様性に関する研究. 京都大学化学研究所セミナー、宇治市、2011.3.4

- ⑫木村成介: 環境に応じて葉の形を変化させる植物ニューベキアを用いた植物の表現型可塑性の研究. 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸市、2010.12.7-10
- ⑬木村成介: ガラパゴス諸島に固有の野生トマトに観察される葉形態の自然変異の発生機構. 京都産業大学総合生命科学部バイオフィォーラム、京都市、2010.11.10

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~seisuke/index-j.html/HOME.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 成介 (KIMURA SEISUKE)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：40339122