

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570098

研究課題名(和文) シダ類の頂端細胞型シュートを形成する遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analyses on developmental genes expressed in fern shoot with a single apical cell

研究代表者

山田 敏弘 (Yamada, Toshihiro)

金沢大学・自然システム学系・准教授

研究者番号：70392537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：シダ類と種子植物の葉は平行進化したと考えられている。すると、シダ類と種子植物の葉形成のメカニズムは異なる可能性がある。本研究では、これまで不明だったシダ類の葉形成メカニズムを解明するため、種子植物で葉形成に関わる遺伝子について、リチャードミズワラビの葉で発現解析を行った。また、リチャードミズワラビの葉で発現する遺伝子のRNA-seq解析を行い、それらを種子植物の葉で発現する遺伝子群と比較した。その結果、種子植物とシダ類の葉形成メカニズムの違いの一端を発見することができた。

研究成果の概要(英文)：Leaves are acquired independently in pteridophytes and seed plants. This implies that different mechanisms are used for leaf development between these two groups. In this study, we observed expression patterns of some transcription factors in leaf of *Ceratopteris richardii*, which are inevitable for leaf development of seed plants. We also conducted RNA-seq analysis to grasp gene expression in leaf of *Ceratopteris* comprehensively and compared the obtained data with those of seed plants. These data partly suggests that different mechanisms are prevailed in leaves of pteridophytes and seed plants.

研究分野：進化古植物学

キーワード：葉 シダ類 種子植物 平行進化 シュート

1. 研究開始当初の背景

シダ類は種子植物の姉妹群であり、維管束植物の原始的体制を保持する。一方、種子植物には数々の体制革新が起きた。従って、種子植物とシダ類の形態制御機構を比較して初めて、維管束植物の体制進化過程が理解できる。

シダ類と種子植物のシュート（葉と茎からなる構造）の形成様式は大きく異なる。すなわち、シダ類はただ1つの頂端細胞からシュートのすべての細胞が作られるのに対し、種子植物では茎頂分裂組織と呼ばれる複数の細胞群から作られる。単一細胞型のシュート形成は小葉類などの基部維管束植物にも見られることから、単一細胞型から分裂組織型が進化したと考えられている。しかし、単一細胞型シュート形成を担う遺伝子についての情報はほとんどなかった。そのため、多細胞によるシュート形成を可能にした責任遺伝子経路も分かっていかなかった。

現在生きているシダ類と種子植物は、茎の側方につく扁平な葉を持つ。しかし、今から約4億年前に現れたシダ類と種子植物の共通祖先は、葉を持たず、その体は茎と胞子嚢からできていた。その後、シダ類と種子植物が分岐し、それぞれの系統で茎から葉が進化した。つまり、シダ類と種子植物の葉は平行進化したのであり、シダ類と種子植物で、葉形成を制御する機構が異なる可能性がある。しかし、シダ類の葉形成遺伝子についての情報は驚くほど得られておらず、両者の形態制御機構を比較できていなかった。

シダ類のリチャードミズワラビ (*Ceratopteris richardii*) では、パーティクルガンを用いた DNAi と呼ばれる方法で、ターゲット遺伝子の機能を、全身でノックダウンできる。また、アグロバクテリウムを介した方法およびパーティクルガンを用いた方法により、外来遺伝子を導入する方法が報告されている。そのため、リチャードミズワラビを用いて研究を行うことで、シダ類のシュート形成機構についての理解が進むと期待される。しかし、アグロバクテリウムを介した方法は形質転換効率が低いという問題があった。一方、パーティクルガンを用いる方法では、リチャードミズワラビ自身の遺伝子配列を含む遺伝子断片を導入した場合に、ノックダウンが起きてしまう可能性がある。そのため、遺伝子導入の方法についてさらに検討を進める必要があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シュート形成遺伝子を題材に、シダ類におけるモデル実験系を実際に立ち上げること、遺伝子の機能的側面から葉の平行進化とシュート進化の実態に迫ることである。そのために、リチャードミズワラビを用いて、以下の3点についての研究を行った。

(1) いくつかの転写因子について *in situ* ハイ

ブリダイゼーションを行い、さらに詳細な時間・空間的発現様式を観察する。

(2) RNA-seq を行い、シュートで発現する遺伝子群を明らかにする。

(3) 形質転換体を作製し、それら転写因子の機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子の単離と *in situ* ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析

リチャードミズワラビのシュート頂から全 RNA を抽出し、ターゲットとなる遺伝子を単離した。

in situ ハイブリダイゼーション解析には、リチャードミズワラビのシュート頂（胞子葉形成前の段階）を用いた。シュート頂は FAA で固定し、脱水後、パラフィンに封埋した。

(2) ノックダウン実験

上記(1)で得た遺伝子断片を金粒子にまぶし、パーティクルガンで、リチャードミズワラビの胞子体（胞子葉展開前のもの）および配偶体に打ち込んだ。

(3) RNA-seq 解析

リチャードミズワラビのシュート頂、根、普通葉、胞子葉から全 RNA を抽出し（根と胞子葉については各2サンプルを用意）、polyA カラムによる精製を行った後、RNA-seq 用のライブラリを作成した。また、ライブラリにおける non-coding RNA の検出状況を評価するため、胞子葉から抽出した全 RNA の1サンプルについて、リボソーム RNA の除去による精製 (Ribo-zero 精製) を行い、併せてライブラリを作成した。

(4) アグロバクテリウムを介した形質転換条件の検討

アグロバクテリウムの感染に適した配偶体の発生段階と感染継続時間を検討するため、前培養日数を 0-7 日間、アグロバクテリウムとの共培養日数を 2-10 日間の範囲で変動させ、配偶体に 35S プロモータで *uidA* 遺伝子 (GUS タンパク質をコード) とハイグロマイシン耐性遺伝子を発現させるコンストラクトを導入した。

4. 研究成果

(1) リチャードミズワラビにおける Class III Homeodomain-Leucine Zipper (HD-ZIP III) 遺伝子の発現解析

種子植物において、HD-ZIP III 遺伝子は葉の向軸側で発現し、葉の向軸側組織のアイデンティティを決定する。また、背軸側のアイデンティティを決定する因子が向軸側組織で発現するのを抑制する。このような HD-ZIP III 遺伝子の働きを介して葉の向背軸が決定し、葉原基が向背軸に垂直な方向（側方）に伸長することで葉が扁平になる。

本研究では、リチャードミズワラビのシュ

ートにおける HD-ZIPIII 遺伝子 (*CrHDZ31* および *CrC3HDZ1*) の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で観察した。その結果、*CrC3HDZ1* については発現シグナルが弱く発現の詳細は分からなかったが、*CrHDZ31* は頂端細胞、葉原基先端およびシュートの維管束で強く発現した。維管束および頂端での発現は種子植物および小葉類と共通し、維管束植物の共有派生形質であると考えられる。一方、*CrHDZ31* の葉での発現は種子植物とは異なり、向軸側に偏った発現を示さなかった。

これらの結果は、HD-ZIPIII 遺伝子がシダ類と種子植物の葉で異なる働きを果たすことを示唆する。すなわち、シダ類の葉において、HD-ZIPIII 遺伝子は向背軸の決定に関与していない可能性がある。

(2) DNAi による *CrC3HDZ3* の一過的ノックダウン実験

リチャードミズワラビにおける *CrC3HDZ3* の機能を推定するため、*CrC3HDZ3* の mRNA 配列をパーティクルガンにより配偶体および孢子体に打ち込んだ。その結果、数個体の配偶体において、造卵器基部付近の細胞増殖が促進され、造卵器が球状になった。一方、雄性配偶体や造精器の形状は、コントロールと区別できなかった。また、孢子体では明瞭な表現型の変化は認められなかった。

CrC3HDZ3 の発現は孢子体では極めて弱く、そのことが明瞭な表現型が得られなかった原因かもしれない。孢子体世代ではこれまで、DNAi によるノックダウン実験の研究例が無い。この結果はあるいは、DNAi の効果が配偶体に限定的であることを示唆するのかもしれない。

(3) miR165/166 非感受型 HD-ZIPIII 遺伝子の過剰発現実験

被子植物の葉における HD-ZIPIII 遺伝子の向軸側組織限定的な発現は、microRNA (miR) 165/166 により背軸側で発現する HD-ZIPIII 遺伝子が分解されることで実現する。そのため、miR165/166 の認識サイトに変異を持つ (=非感受型) HD-ZIPIII 遺伝子は背軸側組織でも発現し、葉の扁平な成長を妨げる。

HD-ZIPIII 遺伝子における miR165/166 の認識サイトは、被子植物からシヤジクモ藻類に至るまで保存されていることが知られている。そこで本研究では、miR165/166 による HD-ZIPIII 遺伝子の発現制御をシダ類と被子植物で比較するため、miR165/166 の認識サイトを変異させた *CrC3HDZ3* を作成し、リチャードミズワラビの全身でそれを発現させることにした。

現在までに miR165/166 非感受型 *CrC3HDZ3* を発現させるためのコンストラクトの作成を終え、それをアグロバクテリウムに導入した。今後、孢子体カルスにアグロバクテリウムを感染させることで、このコンストラクト

をリチャードミズワラビに導入する予定である。

(4) リチャードミズワラビにおける *AINTEGUMENTA* (*ANT*) 遺伝子の発現解析
ANT 遺伝子は、種子植物において、珠皮や葉の原基の未分化な細胞群で発現し、それらの細胞増殖を制御する。例えば、被子植物の *ant* 変異体では細胞増殖の停止により珠皮などの伸長が阻害される。一方、*ANT* 遺伝子を過剰に発現させると細胞増殖が増加し、器官サイズが増大する。

本研究では、リチャードミズワラビにおける *ANT* 遺伝子の機能を推定するため、*ANT* 遺伝子を単離し、その発現解析を行った。その結果、リチャードミズワラビの *ANT* 遺伝子は、葉原基、前形成層、根原基の未分化な細胞群で発現し、茎頂での強い発現は観察されなかった。

従って、シダ植物の葉、種子植物の葉、珠皮のすべてにおいて、*ANT* 遺伝子は共通して未分化な細胞群で発現する。すると、*ANT* 遺伝子は、真葉類の共通祖先の軸的器官の細胞増殖に関わっていたと推定され、同様の機能がその子孫器官に引き継がれたと考えられる。つまり、*ANT* 遺伝子の機能は、葉が平行進化する以前の段階で獲得されていたと思われる。

(5) リチャードミズワラビにおける RNA-seq 解析

シュート頂、根 1、普通葉、孢子葉 1、根 2、孢子葉 2 (polyA 精製)、孢子葉 2 (Ribo-zero 精製) 由来のライブラリをそれぞれ、25%、12.5%、10%、12.5%、10%、5%の割合で混合し、次世代シーケンサーによる解析を行った。その結果、全体で 217.9M リードを得た。その内訳は、シュート頂 33.3%、根 1 11.1%、普通葉 19.5%、孢子葉 1 10.3%、根 2 9.2%、孢子葉 2 (polyA 精製) 10.9%、孢子葉 2 (Ribo-zero 精製) 5.6%であった。これらをアセンブルしたところ、トータルで 130,851,336 塩基対、140,829 本のコンティグを得た。コンティグの最大長は 26,855 塩基対、最小長は 224 塩基対であった。また、N50 のコンティグサイズは、1,736 塩基対 (23,777 本)、N90 のコンティグサイズは 332 塩基対 (91,901 本) であり、平均コンティグサイズは 929 塩基対であった。一方、孢子葉 2 の polyA 精製と Ribo-zero 精製のライブラリを比較すると、polyA を含まない RNA (おそらく non-coding RNA と思われる) が、Ribo-zero 精製のライブラリに有意に多く含まれることが確認できた。

各ライブラリに含まれる遺伝子の詳細については現在も解析を続けているが、種子植物の葉形成に関わる遺伝子のうち、HD-ZIPIII 遺伝子、Class I Knotted-like homeobox 遺伝子、KANADI 遺伝子などは、普通葉、孢子葉、シュート頂で発現が確認され

た。しかし、YABBY 遺伝子はどのライブラリからも検出されず、YABBY 遺伝子が種子植物型の大葉の獲得と深く関わったとする仮説が裏付けられた。

(6) リチャードミズワラビにおける形質転換条件の検討

各前培養・共培養条件の組み合わせで培養した後、選抜をかけずに GUS 染色をしたが、各条件で得られた陽性個体の割合は大きく変わらなかった。そこで、前培養 0 日間、共培養 7 日間の後、ハイグロマイシン選抜を行うことにした。また、培養開始後 7 日目にある配偶体の選抜に適したハイグロマイシン濃度を検討し、10~12 $\mu\text{g/ml}$ が最適であると推定した。

実際に以上の条件を用いて形質転換を行ったところ、ハイグロマイシン選抜で 2.9% の個体が生存し、そのうち 29.2% が GUS 染色陽性であった。すなわち、計 0.85% の個体で形質転換が成功したことになる。

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 2 件)

- ①山田敏弘. 2013. 陸上植物の体作りに起きた革新を解き明かす—エボデボ研究の挑戦. 遺伝 67(1): 20-24. (査読無し)
- ②山田敏弘. 2013. 種子植物の葉と珠皮—扁平な兄弟器官の進化. 遺伝 67(1): 45-49. (査読無し)

[学会発表] (計 5 件)

- ①山田敏弘・佐々木悠介・Charles S Gasser. 前裸子植物における Class III Homeodomain-Leucine Zipper 遺伝子の“機能解析”. 日本植物分類学会第 14 回大会. 2015 年 3 月 8 日. 福島大学 (福島).
- ②山田敏弘・佐々木悠介・Charles S Gasser. シロイヌナズナの胚珠において Class III Homeodomain-Leucine Zipper 遺伝子は WUSCHEL の発現を抑制する. 日本植物学会第 78 回大会. 2014 年 9 月 14 日. 明治大学 (東京).
- ③山田敏弘. リチャードミズワラビにおける HD-ZIP III 遺伝子の発現解析. 日本植物分類学会第 13 回大会. 2014 年 3 月 21 日. 熊本大学黒髪キャンパス (熊本).
- ④山田敏弘. 維管束植物に関する進化古植物学的研究. 日本植物学会第 76 回大会 (招待講演). 2012 年 9 月 15 日. 兵庫県立大学 (姫路).
- ⑤山田敏弘. たねには双子の兄弟がいた—遺伝子が語るたねの誕生秘話. IPC XIII/IOPC IX 2012 一般普及講演会 (招待講演). 2012 年 8 月 26 日. 中央大学 (東京).

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・准教授
研究者番号: 70392537

(2) 研究分担者

西山 智明 (NISHIYAMA, Tomoaki)
金沢大学・学際科学実験センター・助教
研究者番号: 50390688

今市 涼子 (IMAICHI, Ryoko)
日本女子大学・理学部・教授
研究者番号: 60112752