

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650121

研究課題名(和文)シュート頂形成の普遍性

研究課題名(英文)Common mechanism of shoot development

研究代表者

米田 好文(Komeda, Yoshibumi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10124215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：種子植物の発分化は、種子の段階の胚発生と頂端分裂組織での後期発生とも呼ぶべき過程に分かれる。材料として一見双葉のまま一生を終えるLithops属植物を採用した。この植物は、微粉の種子を蒔くと通常の双子葉植物のように双葉が出現する。その後、胚軸に相当する部分が伸長・肥大するのと子葉に相当する部分が肥大するのみである。その後、この双葉部分が老化すると中から新たな双葉が出現し、昆虫の脱皮のような形で双葉を新生する。このとき、栄養状態によると思われるが、シュート頂が複数出現することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Development of seed plant consists of two distinct developmental processes; embryogenesis and post-embryogenesis. To further understand the early steps of the post-embryogenesis of seed plant, I focused on the Lithops genus plants. The appearance of Lithops looks like an inverted cone with a single pair of cotyledons fattened for the water-storage function. Sometimes, a new pair of leaves can be found deep inside the old cotyledons and it starts to develop. In this project, we found that in Lithops several shoots are developed at the bottom of the old cotyledons in a nutrient states dependent manner.

研究分野：遺伝学

キーワード：リトプス属植物 シュート頂 DNA単離 PCR ライブラリー作成 走査型電子顕微鏡 切片観察

1. 研究開始当初の背景

種子植物の発生分化は、種子の段階での胚発生と頂端分裂組織での後期発生とも呼ぶべき過程に分かれる。そこで双葉しか存在しないように見えるリトプス属植物では、その後期発生がどうなっているか。そもそもシュート頂はどうなっているかを検討する必要がある。

2. 研究の目的

一見すると双葉だけしか作らないように見える植物、リトプス属植物を材料に用いて、見えそうで見えないシュート頂が、実際にはどこにあり、どのように機能しているのかを分子レベル、遺伝子機能のレベルで明らかにしたい。特に、高等植物のモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) でシュート頂の機能維持に重要と考えられている遺伝子群のリトプス属植物における遺伝子構成の確認とリトプス属植物に存在する遺伝子群の遺伝子発現制御機構に焦点を当てて研究をしたいと考えている。そのため、シロイヌナズナで研究が進んできた花芽形成、花茎伸長、花序形成、花序発生分化に關与する主要な遺伝子群に關して、リトプス属植物における遺伝子存在の有無をまずは確かめることを目指していく。

リトプス属植物において、シロイヌナズナにおける発生上の重要な遺伝子群が単離できたあかつきには、それら遺伝子群の遺伝子発現制御機構と実際のリトプス属植物の解剖形態的觀察の結果とをつなぎ合わせて、全体としてリトプス属のシュート頂形成の仕組みを理解したい。

現時点では、シロイヌナズナで知られている遺伝子セットが、そのまま全てリトプス属植物においても存在するとは思わないが、少なくとも、一部断片のようなかたちで、痕跡はある程度は存在しているのではないかと推定している。その場合、なぜリトプス属植物では茎がシロイヌナズナをはじめとする他の植物のように見えてこないのかを、遺伝子のはたらきかた、すなわち、発現制御機構と関連づけて分子生物学的解析を行っていききたい。

当研究室で解析しているシロイヌナズナの *ACAULIS1* 遺伝子を単離することを目指していく。*ACAULIS1* 遺伝子は、シロイヌナズナの花茎伸長において、重要なはたらきかたをしていることが期待される遺伝子の一つである。この *ACAULIS1* 遺伝子と相同な遺伝子がリトプス属植物にも存在するのかを特に検討したい。リトプス属植物に加えて、スミレも対照として解析の対象とすることを考えている。

3. 研究の方法

この研究計画は、<目的>項目に示したシロイヌナズナを用いた発生遺伝学研究を実施している際に、発展項目として企図してきたものである。そこで、シロイヌナズナでの発生遺伝学研究、ゲノム情報を基盤としてリトプス属植物を用いた研究を進めていく。

まずは、リトプス属植物を材料にし、遺伝子単離法の確立、大腸菌内でのライブラリーの作成に取り組む。そのリトプス属植物遺伝子ライブラリーを利用して PCR 法を用いて、目的とする遺伝子群の単離を行う。対象として計画しているのは、*CORYMBOSA1* (*CRM1*)、*CORYMBOSA2* (*CRM2*)、*LEAFY* (*LFY*)、*BREVIPEDICELLUS* (*BP*)、*ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*)、*ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*) の各遺伝子である。

リトプス属植物の遺伝子ライブラリーを探索し、*CRM1*、*LFY*、*BP*、*AS1*、*AS2* 各遺伝子のホモログ、オーソログ候補を単離する。シロイヌナズナのような明確な花茎組織をもたないリトプス属植物であることから、a-対象とする *CRM1* をはじめとする遺伝子群が存在しない、あるいは、b-たとえ単離されたとしてもそうした遺伝子群が発現していない可能性が考えられる。その場合の対策を考えておく。

順に、遺伝子が存在しない場合は、無いということを確認することは実験としてはかなり難しい。ある程度現在の技術では得られないと方針を変更する。

その時は興味を發展させ、シロイヌナズナでシュート頂形成に関わっていると考えられている遺伝子群、*CLAVATA* (*CLV*)、*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* (*WOX*) のホモログ遺伝子、オーソログ遺伝子がリトプス属植物に存在するかを調べる。もしかしたら、これらも得られないかもしれない。その場合、探索遺伝子群の幅をもっと広げる予定である。しかしながら、現在までの予備実験では似た遺伝子が得られる可能性が十分にあると考えられる。

平成 26 年度は、遺伝子メンバーの検索、塩基配列解析を行い、遺伝子構成を明らかにした上で、構成員の相同性の検討、発現様式の解析を行う。In situ ハイブリダイゼーション法を用いて、組織と遺伝子存在の相互関係を明らかにしていく。そのためには、リトプス属植物の解剖形態的觀察が重要になってくる。徒手切片を用いた組織構造の觀察、走査型電子顕微鏡を用いた構造の解析を通して、リトプス属植物の形態的特色を事前に明らかにしておく必要がある。

さらに、我々は今までシロイヌナズナの花茎伸長に關わる遺伝子の変異体を得て、*acaulis* (*acl*) と名前をつけて研究してきた。これまでに Locus を 5 つ同定し *acaulis1* から *acaulis5* と命名した。そのうち、現在まで遺伝子を単離で来たのは、*ACAULIS5* がポ

リアミン合成酵素をコードするというものだけである。この研究の進展がどうしても心残りである。

現在、*acaulis1*の研究につき、以下のことが明らかになっている(どこにも発表していない)、*acl3*、*acl4*も示している表現型からそうだと予想するが、この遺伝子作用は植物病原性応答に関連した遺伝子の可能性が高いと考えている。

4. 研究成果

被子植物・双子葉植物でのシュート頂形成の普遍性を解析した。材料として、一見、双葉のまま一生を終えるリトプス属植物を採用した。

本研究では、以下の3つの課題に集中して取り組んだ。

(1) -光学顕微鏡を用いた切片の解剖形態的観察；組織切片を光学顕微鏡観察してみた。その結果は、かなり興味深い事実を示唆していた。双葉の下には次の1セットが90度の角度で用意され次々世代もその90度に存在しているようであった。

(2) -走査型顕微鏡を用いた切片の解剖形態的観察；シュート頂を探索するために、まずはリトプス属植物の縦断切片を作成した。思っていたより、接合面にはまるでそれらしい組織を見いだせなかった。下までたどって、ずっと根に近い部分、おそらく根から茎相当に移動する部分にシュート頂の原基と思われる組織集団を見いだした。横断切片では、場所の特定がかなり難しく、シュート頂そのものを同定するには残念ながらいらなかった。

(3) -定性的PCR解析；リトプス属植物から、効率の良い遺伝子単離方法を試行錯誤してDNAを得ることができるようになった。それを用いてまず遺伝子ライブラリーの作成を試みた。が、DNAの純度不足により不十分な規模しか得られなかった。そこで、PCR法によりいきなりシロイヌナズシュート頂形成関連遺伝子の増幅を試みたシロイヌナズナで、シュート頂形成に関連している遺伝子群、*ACAULIS1*、*ACAULIS5*、*CORYMBOSA1*、*CORYMBOSA2*、*WUSCHELL*各遺伝子のプライマーを用いてPCRを行った。その結果、現在までのところ、明瞭に増幅したバンドは得ることができていない。

ACL1 遺伝子単離に向けての遺伝子補講は近傍に重複遺伝子が存在することもあり、遅々として振興していない。しかし、以下の事実は明らかにした。*acl1* 変異体では病原体応答に関連した遺伝子 *PAD4* 遺伝子の発現量が上昇していた。そこで、*acl1&pad4* 二重変異体を作成した。そうすると、*acl1* 欠損、花茎伸長阻害が抑制された。すなわち、二重変異体では野生型と同程度の花茎伸長を示すことを見いだした。この実験事実は、*ACL1* 遺

伝子は *PAD4* 遺伝子発現量を低下させる。花茎伸長に対する遺伝子作用の大部分は *PAD4* 遺伝子存在量の低下をもって行われていることを示すと考えた。これらの実験により、*ACL1* 遺伝子は単離できていないが、*PAD4* 遺伝子をさらに解析すれば、その遺伝子作用の大部分を理解できることと同義であると考えられる。

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1件)

Hiroaki Kato, Tamao Saito, Hidetaka Ito, Yoshibumi Komeda, Atsushi Kato

「Overexpression of the TIR-X gene results in a dwarf phenotype and activation of defense-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*」

Journal of Plant Physiology (2014) 171, (6), 382-388.

DOI: 10.1016/j.jplph.2013.12.002

[学会発表](計3件)

澁田未央、米田好文、阿部光知

「花成ホルモン「フロリゲン」と新奇転写制御因子 FE」

第14回東京大学生命科学シンポジウム、東京(2014年4月26日)

澁田未央、米田好文、阿部光知

「花成ホルモン「フロリゲン」の制御における新奇花成制御因子 FE の役割」

日本植物学会第78回大会、明治大学・生田キャンパス(2014年9月12~14日)

澁田未央、渡辺綾子、米田好文、阿部光知

「FT 遺伝子の転写活性化における新奇花成因子 FE の機能解析」

第56回日本植物生理学会年会、東京農業大学・世田谷キャンパス(2015年3月16~18日)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/iden/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

米田 好文 (KOMEDA YOSHIBUMI)
東京大学大学院理学系研究科・教授
研究者番号：10124215

(2)研究分担者

なし
研究者番号：

(3)連携研究者

なし
研究者番号：