

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06366

研究課題名(和文) 複雑な花卉形態が作られるメカニズムを探る：至近要因と究極要因の統合的解析

研究課題名(英文) Exploring the mechanism for complex petal morphogenesis: integration of the proximate and ultimate factors

研究代表者

武田 征士 (Takeda, Seiji)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90508053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な形態をもつサギソウ唇弁について、遺伝子・細胞レベルの形態形成メカニズム(至近要因)と、ポリネーターとの共進化という究極要因の観点から研究を進めた。では、花器官で発現する遺伝子の網羅的解析から、唇弁で発現する転写因子群(MADS, TCP)を同定した。また、唇弁の鋸歯形成時には、初期の細胞分裂と後期の極性をもった細胞伸長が重要であることが分かった。では、スズメガがホバリングしながら吸蜜を行うことや、鋸歯切除による結実や種子重量への影響が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サギソウは日本に自生する野生ランで、準絶滅危惧種に指定されている。3枚の花弁のうち「唇弁」と呼ばれる1枚は、鳥が飛んでいるような特徴的な形になる。本研究により、唇弁の形には地域差があり、DNAレベルでも少しずつ違いがあることが分かり、地域の自生種の保全が重要であることが示された。唇弁の複雑な形態は、訪花昆虫の「目印」になっており、その形態は唇弁で特異的に働く遺伝子(転写因子)によって行われることが分かった。本研究成果は、各地の自生地の特徴づけ、および特徴的な花卉形態を生み出す技術に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the morphology of the labellum in the white egret flower from viewpoints of (1) the genetic and cellular mechanisms of morphogenesis and (2) the co-evolution with pollinators. By comprehensive transcriptome analysis with RNA-sequencing, we identified transcription factors expressed in the labellum. We found that early cell division and later polar cell elongation were important during formation of labellum serration. The hawkmoth visited flowers and sucked honey with hovering but not landing on the flowers, and that elimination of the serration from labellum affected the fruit set and seed weight.

研究分野：植物分子生物学

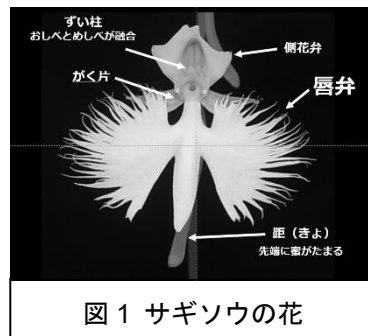
キーワード：サギソウ MADS転写因子 鋸歯 訪花昆虫 スズメガ

1. 研究開始当初の背景

生物は「デザイン力」の宝庫であり、時に驚くような形を作り上げる。植物で際立つ形態のひとつに、多種多様な花の形をもつラン科植物が挙げられる。世界中で約2万5千以上の種があると言われるランは、3枚のがく片、3枚の花弁と、1セットのずい柱（雄しべと雌しべが融合したもの）からなる花をつくる。3枚の花弁のうち、1枚は「唇弁（しんべん、lip または *labellum*）」と呼ばれ、種によって非常に特徴的な形態に発生する。

日本に自生する地生ラン「サギソウ (*Habenaria radiata*, syn. *Pecteilis radiata*)」は、鳥が羽ばたいているような唇弁を作る（図1）。その根元には蜜を貯める「距（きよ）」という筒状の構造が作られる。このような複雑な形態のかたちの花弁は、どのように進化し、作られてきたのだろうか。

他の多くのラン科植物で示されているように、ポリネーター（訪花昆虫）との共進化という要因が容易に推測される一方、どのようなポリネーターとの共進化なのか、唇弁の形態は訪花昆虫にとってどのような役割を果たすのか（例：目印なのか、吸蜜中の足場なのか）、さらにどのような遺伝子機能や細胞動態によって、このかたちが作り上げられるのかなど、多くの点が未解明であった。



2. 研究の目的

本研究では、サギソウ唇弁の複雑なかたちがどのように作り上げられるのかを解明するため、

- ① 遺伝子・細胞レベルでのメカニズム (How)
- ② ポリネーターとの共進化による進化的要因 (Why)

の2点を明らかにし、自然にある優れたデザイン力のメカニズムを、至近要因と究極要因の両面から理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 形態観察：サギソウの栽培品種である「青葉」を用いて、つぼみ段階からの鋸歯形成過程を顕微鏡観察 (Leica S8AP0) によって行った。鋸歯の細胞形態観察は、つぼみを固定液 (酢酸 1: エタノール 9) にて処理後、エタノールシリーズを経てカルコフロー染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP8) で得た画像を Image J で定量化した。

(2) 遺伝子発現解析とクローニング：「青葉」の葉とつぼみの発現遺伝子を RNA-sequencing (Illumina NextSeq500) で網羅的に解析し、得られた *de novo* シーケンスから花器官形成に関わる MADS および鋸歯形成に関わる TCP 遺伝子配列を抽出し、RT-PCR を行った。MADS 遺伝子のクローニングを行い、CaMV 35S プロモーター下で、シロイヌナズナで過剰発現させ、表現型を調べた。

(3) 訪花昆虫の観察：屋外で栽培しているサギソウ付近で、定点インターバル撮影 (RICOH GR11) およびビデオ撮影 (Everio R, JVC) を行い、訪花昆虫の調査を行った。

4. 研究成果

(1) サギソウ唇弁の発生プロセス解明

サギソウ品種「青葉」をモデルとし、つぼみから開花までの花弁発生プロセスを明らかにした (図2)。唇弁は、まず胴体 (ボディ) 部分が作られ、その後に両翼が左右に生じる。その後、両翼の先端が数点に分かれ始め、鋸歯を形成する。その後、各鋸歯が長く伸長することで深まり、鳥が羽ばたいているようなかたちになることが分かった。

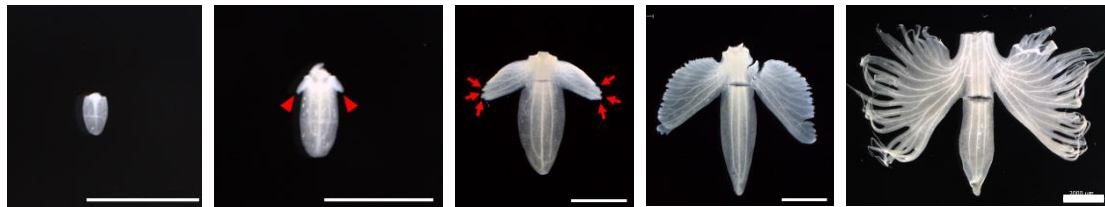


図2 つぼみ～開花までの唇弁の発達プロセス。Scale Bars= 2mm。

各発達段階の唇弁の鋸歯細胞を、カルコフロー染色と共焦点レーザー顕微鏡で可視化し、画像解析によって細胞形態を定量化した。鋸歯形成の初期は、細胞の縦横比に差がなく、1細胞の長軸方向もランダムだったが、鋸歯が伸長し始めると、細胞は鋸歯伸長方向に対して平行に長く伸び、細胞面積も増加していた（図3）。このことから、初期段階では鋸歯部分で細胞増殖が起こり、その後は各鋸歯の極性を持った細胞伸長によって、深い鋸歯が形成されることが示唆された。

・細胞面積

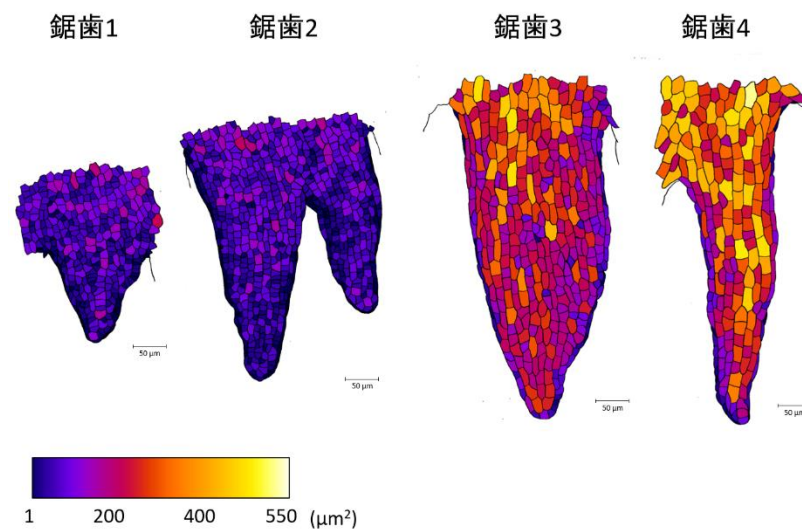


図3 発生段階の鋸歯部分について、細胞の可視化と定量を行った。鋸歯が伸長するにつれ、細胞面積が大きくなっている例を示している。

(2) サギソウ唇弁で発現する遺伝子の解析

葉とつぼみの RNA-sequencing を行い、得られた *de novo* シーケンス結果から、花器官のアイデンティティ確立に関わる MADS 遺伝子 (*HrAP2*, *HrDEF*, *HrAG*, *HrAGL6*) の配列を抽出して、器官別の RT-PCR とクローニングを行った。側花弁と唇弁で発現差がある遺伝子 (*HrDEF*, *HrAG*, *HrAGL6*) が得られ、これらの遺伝子が唇弁の特徴的な形を作る役割を持つことが示唆された。また、鋸歯形成への関与が予想される *TCP2* 遺伝子の RT-PCR を行ったところ、側花弁では発現せず、唇弁で発現が確認された。

クローニングした *HrAP2*, *HrDEF*, *HrAG* を、CaMV 35S プロモーター下で、シロイヌナズナで過剰発現させた。このうち、*HrAG* を過剰発現したものは、花弁の雄しべ化が起こり、機能が保存されていることが示唆された。

(3) ポリネーターの観察

屋外栽培サギソウのインターバル・ビデオ撮影により、スズメガ (*Theretra oldenlandiae*) が夕暮れ後に暗くなってから訪花し、花にとまることなく、ホバリングしながら吸蜜行動を行っていることが確認できた (図4)。このことから、少なくとも唇弁はスズメガにとっては足場ではなく、目印になっている可能性が示唆された。他に、アザミウマ、アリ、ハチなどの訪花が確認され、すでに知られているセセリチョウも併せて、様々な昆虫がサギソウを訪れていることが分かった。

野外自生地において、唇弁の鋸歯切除等によって結実率、果実重量、種子重量、種子有胚率に影響があるかどうかを確認したところ、年度によってばらつきはあったものの、唇弁切除でほとんどが低下することが確認できた。



図4 サギソウから吸蜜するスズメガ。

(4) 地域自生種の形態・DNA マーカーによる比較

近畿エリア (兵庫、京都、奈良、三重) の自生種の比較を行った。唇弁の形態を、6つの定量値 (dissection index_面積と周長の比、形態の複雑さの指標、ボディ部の幅と長さ、翼部の幅、ボディと翼の間の角度、鋸歯数) により比較したところ、地域によって大きな差があることが分かった。また、マイクロサテライトマーカーを作成して系統解析を行い、地域ごとの血縁関係を見出すことができた。これらの結果をまとめて論文発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tachibana Tsutomu, Nishikawa Yuki, Kubo Nakao, Takeda Seiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Morphological and Genetic Diversities of <i>Habenaria radiata</i> (Orchidaceae) in the Kinki Area, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 311~311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22010311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西川友貴、立花耕、坂本智昭、木村成介、武田征士
2. 発表標題 サギソウの花形態形成に関する遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本植物学会 第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Nishikawa, Tsutomu Tachibana, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Seiji Takeda
2. 発表標題 Morphological and genetic analysis for revealing petal development of <i>Habenaria radiata</i>
3. 学会等名 Basic and applied studies of plant natural products for agriculture and human health (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	末次 健司 (Suetsugu Kenji) (70748839)	神戸大学・理学研究科・准教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------