

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19570060
 研究課題名（和文） 被子植物の葉の形態形成にかかわる *ANGUSTIFOLIA* 遺伝子の機能進化
 研究課題名（英文） Evolution of *ANGUSTIFOLIA* genes, which is related with leaf morphology in angiosperm
 研究代表者
 高野 博嘉（TAKANO HIROYOSHI）
 熊本大学・バイオエレクトリクス研究センター・教授
 研究者番号：70242104

研究成果の概要：

ANGUSTIFOLIA (*AN*) 遺伝子は、シロイヌナズナにおいて葉の細胞の横幅方向への極性伸長やトライコームの分岐数の制御に関わっている。ヒメツリガネゴケの持つ 4 つの *AN* 遺伝子 (*PpAN*) についてそれぞれ遺伝子破壊実験を行ったが、単一遺伝子の機能欠損では、野生型と異なる形態変化は生じなかった。また、*PpAN1-1* が茎葉体の茎の部分で強く発現することを見いだした。更に、カラマツ及びゼニゴケの *AN* 遺伝子はシロイヌナズナ中で *AN* と同等の機能を持つことを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 基礎生物学・形態・構造

キーワード： シロイヌナズナ、ヒメツリガネゴケ、カラマツ、*ANGUSTIFOLIA*、EvoDevo

1. 研究開始当初の背景

種子植物における葉の形態は、光合成の生産能力と密接にかかわりあう重要な形質であり、各植物種は、各々の適応戦略に合う葉の形を選択していると考えられている。植物分子生物学の著しい進展により、葉の形態形成に関与する様々な遺伝子が次々と見いだされてきた。研究分担者である東京大学の塚谷らによってシロイヌナズナから単離され

た *ANGUSTIFOLIA* (*AtAN*) 遺伝子は植物で初めて単離された C-terminal Binding Protein (CtBP) をコードする遺伝子であり、その変異体 (*an* 変異体) では葉の長さが変わらないまま細くなるという形質を示す (図 1、Kim et al. 2002 年)。動物の CtBP ファミリーは他のタンパク質の C 末端部分と相互作用することにより、特定の遺伝子の発現を抑制するコリプレッサーである。*an* 変異体では植物細胞の極性伸長に重要なかわりを持つ

細胞表層微小管の配向異常が起きていることを明らかにしており、このことは、*AN* 遺伝子が何らかのターゲット遺伝子の発現調節を介して極性伸長を制御していることを示唆している。

動物細胞における CtBP は、最初にアデノウイルス E1A タンパク質の C 末端に結合するタンパク質として発見された。その後の研究により、CtBP が遺伝子発現抑制機能を介して、アフリカツメガエルの幼生の頭部や眼の発生・ショウジョウバエの分節やパターン形成等に関与していることが明らかとなった。このことは、CtBP はターゲットとなるタンパク質を変えることにより、生物種で異なる機能を持つことができることを示している。では、植物の進化に伴って、*AN* 遺伝子はどのような機能変化を経てきたのであろうか？ そのことを明らかにするために、本研究では裸子植物カラマツとコケ植物ヒメツリガネゴケおよびゼニゴケを用いた。シロイヌナズナの葉は、背腹性にに基づく表裏面を持つ両面葉と呼ばれる普通の葉の構造を持つが、カラマツの葉は針状であり外観からでは背腹面が区別できない等面葉である。また、コケ植物は茎葉体と呼ばれる形態を取るが、種子植物の葉と相同な器官を持たないことが知られている。このような植物種における *AN* 遺伝子の機能を解析することにより、*AN* 遺伝子を通して植物の形態進化を解析することができると考えた。

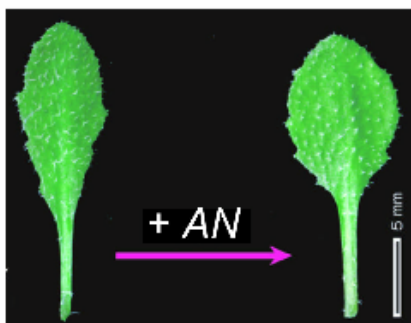


図 1 葉の幅が短い *an* 変異体(左)に正常な *AN* 遺伝子を導入する(右)と、葉の横幅が野生型と同程度にまで回復する。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、裸子植物およびコケ植物の *AN* 遺伝子の機能を明らかにすることによって、*AN* 遺伝子の機能進化を明らかにしていくことにある。そのために、各実験植物での *AN* 遺伝子の単離、ヒメツリガネゴケで使用できる遺伝子破壊技術を用いた *AN* 遺伝子破壊形質転換ヒメツリガネゴケの作出と、それぞれの遺伝子を用いたシロイヌナズナ *an* 変異体

の相補性解析を行った。特に葉を持たないコケ植物において *AN* 遺伝子がどのような機能を持っているのかを明らかにすることは重要である。

近年、動物・植物を問わず、遺伝子の機能変化と生物種特有の形態進化とのかかわりが一つの大きな研究テーマとして認識されつつある。葉は主要な光合成器官であり、その形質が光合成能にもかかわることから、遺伝子の機能進化による葉の形態進化というテーマは植物の形態進化に関する非常に重要なテーマである。また、葉の形態は、光合成能という物質的な側面だけでなく、将来的には新たな葉の形態を持つ観葉植物の作出に繋がる可能性もある。葉の形態形成については、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて急速に理解が進んできているが、被子植物以外の植物についてはほとんど研究が行われていない。また、コケ植物にはもともと葉が存在していない。被子植物以外の植物から *AN* 遺伝子を単離したという報告もなく、この点は本研究の特色となっている。

3 . 研究の方法

コケ植物における *AN* 遺伝子の解析は、主にヒメツリガネゴケを用いて研究を進めた。ヒメツリガネゴケは 2008 年にゲノム配列の決定がなされている。ヒメツリガネゴケのデータベースを用い、ゲノム中から 4 つの *AN* 遺伝子を既に見いだしている。4 種類の内の 2 種はシロイヌナズナの *AN* と同等の大きさのタンパク質をコードする遺伝子 (*PpAN1-1* および *1-2*) である一方、他の 2 種は植物の *AN* に特有で動物の CtBP には見られない C 末端領域を欠くタンパク質をコードしている (*PpAN2-1* および *2-2*) と予測された。まず、遺伝子破壊が可能なヒメツリガネゴケの特性を活かし、これらの遺伝子のタグ挿入型遺伝子破壊ラインの作出を行った。遺伝子破壊用に導入した遺伝子がターゲットされるべき遺伝子領域以外のゲノム領域に挿入されることがあるため、目的の遺伝子にだけ外来遺伝子の挿入が認められるラインを確立した。更に、*PpAN1-1, 1-2* の二重挿入破壊ラインの確立も行った。確立できたラインについて、細胞の形や原糸体・茎葉体の形などの形態を観察した。しかし、野生型との違いが見いだせなかったため、遺伝子領域を完全に欠失された欠失型遺伝子破壊ラインの確立も行った。また、*PpAN* 遺伝子の発現領域を確定するために、ノーザン解析およびプロモーター-GUS 解析も行った。

次にシロイヌナズナ *an* 変異体を用いた相補性解析を行った。シロイヌナズナ *an* 変異体は細葉の形質とともに、葉の表面に生えて

いるトライコームと呼ばれる毛状の組織の分枝が3本から2本になるという形質を持つ。*an* 変異体にヒメツリガネゴケの *AN* 遺伝子 (*PpAN1-1* および *PpAN2-1*) を導入し、形質が相補されるかどうかを検証を行った。相補性解析については、既に単離していたゼニゴケ *MAN* による *an* 変異体の相補解析も行った。更に、カラマツより単離した *LgAN* を用いた相補性解析も行った。

4. 研究成果

コケ植物の *AN* 遺伝子については、まずヒメツリガネゴケの持つ4つの *AN* 遺伝子について解析を行った。*AN* 特有のC末端配列をもつ *AN* 相同遺伝子 (*PpAN1-1*, *1-2*)、および *AN* 特有のC末端領域が欠失した *AN* 相同遺伝子 (*PpAN2-1*, *2-2*) について、それぞれの遺伝子領域に薬剤耐性遺伝子が挿入した、挿入型単一遺伝子破壊ラインを作成した。更に、*PpAN1-1/2-1* 二重遺伝子挿入破壊ラインの作成も行った。しかし、二重遺伝子破壊ラインにおいても野生型との形態的な変化は観察されなかった。また、野生型と同様、胞子体及び胞子が形成され、次世代の植物体も生育出来た。全ての挿入破壊ラインにおいてWTとの間に有意差が見出されなかった可能性の一つとして、*PpAN* の機能を完全に欠損させていないことが考えられたため、*PpAN* を完全に欠失させた遺伝子欠失破壊ラインの作成を行った。現在までにサザン解析によって単一遺伝子欠失ラインと確定できた *PpAN1-1* 及び *PpAN2-1* 単一遺伝子欠失ラインにおいて顕微鏡観察を行ったが、野生型に対する形態変化は観察できていない。今後は、それぞれの組み合わせで欠失ラインを作成し、その形態を観察して行く必要があるだろう。

WTの原系体及び茎葉体における *AN* 相同遺伝子の発現量を調べるために、ノーザン解析を行った。すると、全ての *PpAN* で原系体よりも茎葉体で発現が多かった。そこで、植物体における遺伝子発現部位を特定するために、*PpAN1-1* および *2-1* 遺伝子のプロモーターで発現制御される *GUS* 遺伝子を持つプラスミドを作成し、破壊されても特に形質が観察されない *PpDRP5B-2* 遺伝子領域に挿入することで、*PpAN* プロモーターによる *GUS* 発現ラインを作成した。顕微鏡観察を行ったところ、*PpAN1-1* では、茎葉体の茎の中心部分に強く *GUS* 発現が見られた。また、*PpAN2-1* では、茎葉体の葉の若い部分および茎頂を含む茎の上部に *GUS* 発現が見られた。これらの結果は、ノーザン解析の結果とも合っており、今後遺伝子欠失ラインの茎の形成を重点的に観察することで、ヒメツリガネゴケにおける変異形質を見いだすことができるかもしれ

ない。

次にシロイヌナズナ *an* 変異体を用いた相補性解析を行った。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S RNA のプロモーターでヒメツリガネゴケの *AN* 遺伝子 (*PpAN1-1* および *PpAN2-1*) を発現させるコンストラクトを作成し、*an* 変異体に導入して形質転換体を作成した。その結果、驚くことに植物特有のC末端領域を持たない *PpAN2-1* が *an* 変異体の変異形質を相補できることがわかった。一方、*PpAN1-1* は遺伝子導入時に予期せぬ DNA 組換えが生じており、相補性については今後の課題である。*PpAN1-1* を発現させる異なるコンストラクトを作成するとともに、*PpAN1-2*, *2-2* についても *an* 変異体を相補するか解析を進める予定である。

相補性解析については、既に単離していたゼニゴケ *MAN* による *an* 変異体の相補解析も行った。同様に CaMV 35S プロモーターで *MAN* を発現させたところ、形質転換体では葉もトライコームの形質も野生型と同程度まで復帰することが明らかとなった。

また、裸子植物として、カラマツから *AN* 遺伝子 (*LgAN*) の単離を行った。*LgAN* は調べたカラマツの葉・茎・根のいずれでも発現していた。このカラマツ *LgAN* 遺伝子によって、シロイヌナズナ *an* 変異体の形質が回復するののかについて、解析を進めた結果、カラマツ *LgAN* はゼニゴケ *MAN* と同様にシロイヌナズナの *an* 変異体の形質をほぼ完全に相補することがわかった (図2~4)。これらの相補性検定の結果は、*AN* の機能が広く植物で保存されていることを示している。

今後は、単離したコケ植物およびカラマツの *AN* 遺伝子の、それぞれの植物における機能を解明していきたい。

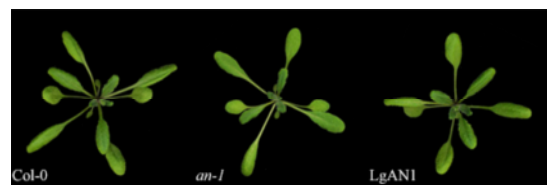


図2 野生型 (Col-0)、*an* 変異体 (*an-1*) および *LgAN* を *an* 変異体に導入した形質転換体 (*LgAN1*) の植物体 (論文番号1)



図3 図2の植物体の葉の形態(論文番号1)



図4 図2の植物体のトライコーム(論文番号1)

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 3 件)

Lin, X., Minamisawa, N., Takechi, K., Zhang, W., Sato, H., Takio, S., Tsukaya, H., Takano, H. Isolation and characterization of the *Larix gmelinii* *ANGUSTIFOLIA* (*LgAN*) gene. *Planta* 228, 601-608, (2008), 査読有

Cho, K.-H., Tsukaya, H. and Kim, G.-T. Characterization of a dehydrogenase motif and an uORF in Arabidopsis *ANGUSTIFOLIA* gene. *Plant Biotech.* 25, 365-368, (2008), 査読有

Stern, M.D., Aihara, H., Cho, K.-H., Kim, G.-T., Horiguchi, G., Roccaro, G.A., Guevara, E., Sun, J., Negeri, D., Tsukaya, H. and Nibu, Y. Structurally related Arabidopsis *ANGUSTIFOLIA* is functionally distinct from the transcriptional corepressor CtBP, *Dev, Genes & Evol.* 217, 759-769, (2007), 査読有

[学会発表](計 8 件)

塚谷裕一、葉の発生における細胞と器官の関係：統合システムの正体は何か？、第50回日本植物生理学会年会、(2009年3月21-24日)、名古屋

沖田友美、ヒメツリガネゴケにおける *ANGUSTIFOLIA* 相同遺伝子の機能解析、第50回日本植物生理学会年会、(2009年3月21-24日)、名古屋

Tsukaya, H. "Genetic Basis of Leaf Shape/Size Evolution" 8th NIBB-EMBL Joint Meeting, (21-23, Nov. 2008), Okazaki, Japan

塚谷裕一、シロイヌナズナにおいて、倍数性の増加が葉サイズに及ぼす効果は、遺伝背景によって異なる、日本植物学会第72回大会、(2008年9月25-27日)、

高知

南澤直子、「葉の横方向への極性伸長制御因子・*ANGUSTIFOLIA* は CtBP とも BARS とも異なる機能を持つ」第49回日本植物生理学会年会、(2008年3月20日~22日)、札幌市

沖田友美、「高等植物において葉の形態形成に關与する *ANGUSTIFOLIA* 遺伝子のヒメツリガネゴケにおける機能解析」基礎生物学研究所研究会 テクニカルワークショップ「コケ植物の実験生物学」、(2007年12月22日~23日)、岡崎

南澤直子、「葉の横方向への極性 細胞伸長を司る *ANGUSTIFOLIA* の細胞内局在性」日本植物学会第71回大会、(2007年9月6日~9日)、野田市

Tsukaya, Hirokazu 「How leaf size and shape are controlled? . . . Genetic analyses of Arabidopsis mutants as an attempt to answer the question」Plant Biology & Botany 2007 JOINT CONGRESS (7-11, July 2007) Hilton Chicago, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 博嘉 (TAKANO HIROYOSHI)
熊本大学・バイオエレクトロクス研究センター・教授
研究者番号：70242104

(2) 研究分担者

塚谷 裕一 (TSUKAYA HIROKAZU)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：90260512