

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06733

研究課題名(和文)水草ミズハコベをモデルとした異形葉形成機構の進化発生学研究

研究課題名(英文) Evolutionary and developmental study on heterophylly of an aquatic plant
Callitriche palustris

研究代表者

古賀 皓之 (Koga, Hiroyuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：30783865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オオバコ科の水草ミズハコベ *Callitriche palustris* をモデルとして、水草が沈水時に示す顕著な異形葉性がどのような発生メカニズムで制御され、どのように進化してきたのかを明らかにすることを目的とした。研究の結果、ミズハコベの異形葉性には種々の植物ホルモンが関与すること、また、本種、および異形葉性を示さない近縁種も用いた網羅的発現解析の結果、異形葉形成に重要な遺伝子群が明らかになった。本研究をとおして、異形葉性の進化を理解する上で基礎的な知見となる、異形葉の発生機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：This study aims to reveal how the remarkable heterophylly exhibited when the aquatic plants submerged is controlled and how it evolved, using *Callitriche palustris* (Plantaginaceae) as a model. As a result of the study, it was confirmed that various phytohormones are involved in the heterophylly of this plant. Also, comprehensive and comparative expression analyses using the closely related plant which does not show heterophylly revealed the gene set important for heterophyllic leaf formation in *C. palustris*. Through this study, we were able to reveal a part of the mechanism of differential leaf development, which is a fundamental finding in understanding the evolution of heterophylly in aquatic plants.

研究分野：進化発生学

キーワード：異形葉性 葉の発生 ミズハコベ 水草

1. 研究開始当初の背景

地球上に繁栄する被子植物は、実に多様な葉の形態を示す。その多様性は多くの場合、系統間もしくは個体間で見られるものであるが、しばしば異形葉性と呼ばれる現象として、同一個体内で様々な葉のかたちを観察することができる。その顕著な例は、水辺に育成する水草に見られる。多くの水草は、水没と乾燥を繰り返す環境に生息しているため、同じ個体が気中(陸上)用と水中用の二つの姿を作り分けることができる(図1)。特に葉の変化は顕著であり、一般に気中葉は幅広く厚い葉であるのに対し、水中葉は細長く、薄く、時に分岐する。水草の異形葉性は非常に劇的であるため、古くから研究者の興味を引いてきた。しかし、異形葉性の発生・進化メカニズムの分子的な理解はほとんど進んでいなかった。これまでの研究で、オオバコ科の水草ミズハコベ *Callitriche palustris* を用いた実験室育成系を確立し、その結果、本種が分子発生的研究に用いる際の多くの利点を備えることを見出した。また、次世代シーケンス技術を用いて本種の転写産物の網羅的情報を明らかにするなど、分子的解析の下地も整いつつあった。

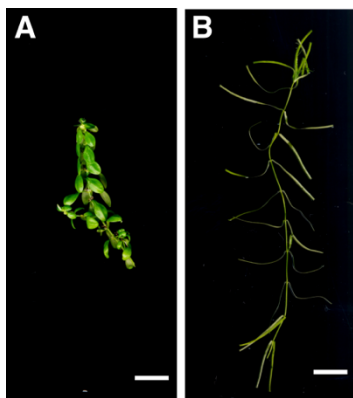


図1: ミズハコベの気中型(A)と水中型(B)。スケールバー: 1 cm

2. 研究の目的

本研究では、顕著な異形葉を示す水草ミズハコベを用いて、その異形葉性の発生・進化メカニズムを、分子発生的な視点、特に遺伝子発現制御の観点から、深く理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミズハコベにおける異形葉性と植物ホルモンの関連の検証

過去の研究で、様々な水草の異形葉性の制御に、幾つかの植物ホルモンが関わることが示されている。そこで本種においてもこれらのホルモンが異形葉性に関与するのかどうかを、ホルモンやその阻害剤の添加実験によって確かめた。

(2) ミズハコベにおいて異形葉性の制御に関わる遺伝子群の絞り込み

ミズハコベが環境によって異なる葉の発生を行なう際に、発現が変動している遺伝子群を明らかにするため、発生中の葉の mRNA-seq を行なった。また、重要な因子を更に絞り込むため、(1) で用いたホルモンシグナル阻害の系における mRNA-seq も行ない、因子の絞り込みを進めた。

(3) 近縁の陸生種アメリカアワゴケにおける発現解析とミズハコベとの発現比較

アメリカアワゴケ *C. terrestris* は水中で育ててもミズハコベのような顕著な異形葉性を示さない。そこで、本種の発生葉でも気中と水中で RNA-seq を行ない、発現変動遺伝子を調べた。ここで見られる発現変動遺伝子のオーソログは、ミズハコベにおいて異形葉性に重要ではないと考えられる。そこで、相互 blast でミズハコベとのオーソロジーを決定し、発現変動情報をミズハコベにおける異形葉制御因子の絞り込みに活用した。

(4) ミズハコベにおける形質転換系の確立

ある遺伝子が実際に異形葉性に関わっているのかを実証的に示すためには、その遺伝子の機能阻害や発現誘導実験が必要となる。そのためには植物への外来配列の形質転換系の確立が必須である。そこで、植物ホルモンによる非幹細胞組織からのシュート再生誘導系と、アグロバクテリウムによる外来遺伝子導入を適切に組み合わせ、高効率な形質転換系の確立を目指した。外来遺伝子には全身発現性の CaMV 35S プロモーターに GFP を繋いだコンストラクトを用いた。

4. 研究成果

(1) ミズハコベにおける異形葉性と植物ホルモンの関連の検証

① 通常は細長い葉を形成する水中環境に、エチレンシグナルの阻害剤として知られる銀イオンや、ジベレリン (GA) の合成阻害剤の Uniconazole P (Uni) を加えて、植物を育成した。その結果、これらの阻害剤の存在下では、細長い水中葉は形成されず、気中葉のような形態の葉が生じた(図2)。また、アブシシン酸 (ABA) を添加しても同様に気中葉型の葉が観察された。このことから、水中葉形成にはエチレンシグナルと GA シグナルの活性化が必要であり、ABA シグナルは逆に水中葉形成に阻害的に働くことが示唆された。

② エチレンシグナルと GA シグナルが水中葉形成に十分な因子であるかどうかを確かめるため、気中環境にエチレン前駆体の ACC や、GA を添加する実験を行なった。その結果、どちらの添加も、さらには組み合わせの添加でも、完全な水中葉の形成は観察されなかった。そのため、水中葉形成誘導には実験したホルモンシグナルの他に、水中環境に関連した何らかの因子が必要であることが示唆された。

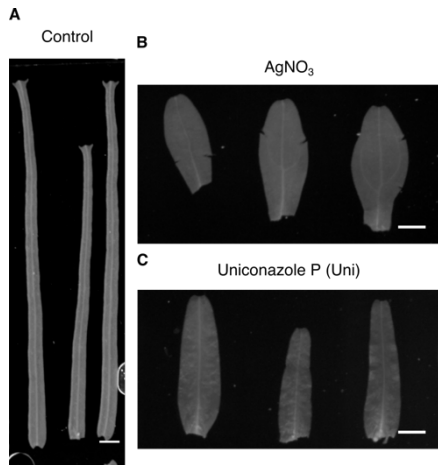


図 2: 水中環境において作られる葉 (A) と銀イオン (B) および Uniconazole P (C) 添加時に作られる葉の形態。スケールバー: 1 mm

(2) ミズハコベにおいて異形葉性の制御に関わる遺伝子群の絞り込み

上記ホルモン攪乱実験で、水中環境に銀イオンや Uni を添加することで、水中葉形成が抑制されることがわかった。そのため、発生中の葉の網羅的発現パターンを以下の 3 つの組み合わせで比較し、水中葉の形成に重要な因子の絞り込みを行なった: A) 通常の水中和気中、B) 水中と銀イオン添加下の水中、C) 水中と Uni 添加下の水中。

ホルモン阻害下の葉の形態観察の結果とくに A と B の比較で共通して変動している遺伝子群は重要であると考えられた。その結果をもとに絞り込むことで、約 450 の遺伝子が異形葉制御の候補因子として絞り込まれた。

(3) 近縁の陸生種アメリカワゴケにおける発現解析とミズハコベとの発現比較

アメリカワゴケの水中と気中それぞれでの発生葉の発現比較の結果、ミズハコベとは大きく異なる種類の遺伝子に変動が見られた。これはアメリカワゴケに異形葉性が見られないことと関連すると考えられる。先述のミズハコベの異形葉形成制御の候補遺伝子から、アメリカワゴケで変動が見られる遺伝子オーソログ等を除くことで、さらに 388 遺伝子まで候補を減らす事ができた。

この遺伝子セットの特徴を Gene Ontology (GO) term enrichment 解析によって調べると、転写因子と nucleosome assembly に関する遺伝子が有意に多く含まれていた。より詳細なアノテーションの結果少なくとも 36 の転写因子が含まれていることがわかった。これらの遺伝子には、様々な植物で気孔の発生に関わることが知られる転写因子や、本種で葉脈での発現が観察された遺伝子も含まれており、水中葉における気孔数や葉脈数の減少と一致した発現パターンが見られた。

(4) ミズハコベにおける形質転換系の確立

これまでの研究で、ミズハコベの子葉節にアグロバクテリウムを感染させることで、形質転換体の作出に成功していたが、本研究を通して同様の手法で複数回再現に成功し(図 3)、安定的な手法であることが示された。さらに効率をあげるべく、条件を変えて試行を繰り返したところ、アグロバクテリウムの株を変えることで効率が上昇する可能性が示唆された。また形質転換系改良の手がかりを得るため、本種の茎組織におけるシュート再生の過程の観察を行なった。その結果、表皮細胞一層からシュートが再生することが示唆され、今後、表皮組織を標的に効率的に感染を行なうことで効率改善が期待できることが示唆された。

現在 CRISPR-Cas9 による遺伝子ノックアウトや、誘導発現系による、条件的な遺伝子発現誘導の系を導入等にむけて、コンストラクトの作成や形質転換植物の作成を進めている。

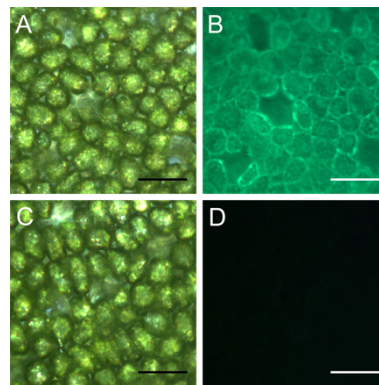


図 3: 35S:GFP 形質転換植物の葉肉細胞 (A: 明視野、B: GFP) と野生型の葉肉細胞 (C: 明視野、D: GFP)。スケールバー: 100 μ m

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)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Hiroyuki Koga, Hirokazu Tsukaya

An aquatic plant *Callitriche palustris*: its dimorphic nature of leaf development, and potentials as a modern experimental plant, シンポジウム S03 「植物が見せるユニークな発生および成長様式を読み解く」、第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター (北海道)

(2) Hiroyuki Koga, Kei Hashimoto, Kiminori Toyooka, Hirokazu Tsukaya

Understanding the molecular mechanisms of dimorphic leaf development in response to submergence using non-model plants *Callitriche*, Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)、2017 年 11 月 4 日、中央研究院 (台湾)

(3)古賀皓之、塚谷裕一

水草ミズハコベにおけるシュート再生系と
形質転換法の確立、日本植物学会第81回大会、
2017年9月8-10日、東京理科大学（千葉県）、
ポスター発表

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 皓之 (Koga, Hiroyuki)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：30783865