

平成 20 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006 年度～2008 年度

課題番号：18370034

研究課題名（和文） 植物における多細胞生物への進化の分子遺伝学的基盤の解明

研究課題名（英文） Study of the molecular genetic basis on evolution of multicellular body plan in plants

研究代表者

伊藤 元己（Ito Motomi）

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00193524

研究成果の概要：

本研究は、被子植物へと繋がる植物の系統での多様性創生に関わるもっとも重要なステップである多細胞化について着目し、その分子遺伝学的基盤を明らかにすることが目的である。そのため、単細胞生物であるミカヅキモと多細胞化したシャジクモにおいて、遺伝子の網羅的かつ系統的解析を行い、どのような制御機構や遺伝子ネットワークが多細胞化や初期の器官分化において重要な働きをしたかを明らかにする。

シャジクモの栄養成長時の細胞と有性生殖器官からそれぞれ RNA を単離し cDNA を合成した。両者の cDNA について均一化したライブラリーを作製して EST を取得した。約 6000 個について配列決定を行い、プロファイリングを行なった。転写制御遺伝子である LEAFY 遺伝子と KNOX 遺伝子について行ない、シャジクモ藻類で初めて単離に成功した。これらの遺伝子について DNA 配列決定を行ない、陸上植物の相同遺伝子とともに系統解析を行なうとともに発現解析を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：遺伝子、植物、進化、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

地球上には多様な生物が存在している。現在見られる生物多様性は、多細胞生物への進化とその後のさまざまな体制の進化が重要と考えられる。単細胞生物から多細胞生物への進化は、ただ一度起きたのではなく、さまざまな系統群で独立に複数回起こっている。多細胞生物となり陸上に進出し、現在、繁栄を遂げているのが動物・植物（陸上植物）・菌の3群である。

光合成生物での多細胞生物化は、いくつかの藻類グループでおこっている。現在、陸上で繁栄している被子植物などの陸上植物へと連なる系統では、単細胞生物の接合藻類と多細胞生物のシャジクモ類の両者を含むシャジクモ藻類綱から進化してきたことが、分子系統解析や微小形態の解析から明らかになってきている。すなわち、陸上植物の祖先での多細胞生物化は、接合藻類の祖先から、シャジクモ類の祖先への進化段階で起こったことを意味する。

生物の多細胞化とそれに伴う体制の複雑化には、単に細胞分裂後に細胞が分離しないことだけでなく、細胞間に形態や機能分化がおき、さらに全体として1つの生物として成立するような細胞間のコミュニケーションの確立が必要と考えられる。特に組織や器官を新たに作るには、マスター遺伝子となる転写因子とその下流で働く遺伝子群のネットワークが新たに確立される必要がある。このような新たに獲得した器官の制御遺伝子ネットワークの例として、動物では体節の分化にかかわるHomeobox遺伝子、被子植物では花をはじめとしたさまざまな器官分化に関わるMADS-box遺伝子が詳しく解析・研究されている。

2. 研究の目的

本研究は、被子植物へと繋がる植物の系統での多様性進化において、どのような分子遺伝学的機構が関与してきたかを明らかにする研究構想の中で、多様性創生に関わるもっとも重要なステップの1つである多細胞化について着目し、その分子遺伝学的基盤を明らかにすることが目的である。そのため、系統進化において多細胞化が達成される前段階の単細胞生物であるミカヅキモと多細胞化したシャジクモにおいて、遺伝子の網羅的かつ系統的解析を行い、どのような制御機構や遺伝子ネットワークが多細胞化や初期の器官分化において重要な働きをしたかを明らかにする。

3. 研究の方法

シャジクモおよびミカヅキモのEST解析

シャジクモおよびシャジクモにおいて、均一化cDNAライブラリを作成した。このライブラリからシャジクモ・ミカヅキモのESTを決定した。決定されたESTはこれまで取得したESTとともに解析し、重複のないユニーク・クローン配列を作成した。この遺伝子配列を、既知の遺伝子配列に対し相同検索を行い、アノテーションを付けた。

転写制御遺伝子の単離

転写制御遺伝子は、細胞内において比較的発現量が少ないので、ESTにより取得できない可能性が考えられる。ESTの補完の目的で、植物でこれまで重要と考えられてきている転写制御遺伝子ファミリーのKNOX, LEAFYについて、各転写制御遺伝子ファミリー特異的なプライマーを作成し、3' RACE法により、cDNA

ライブラリからの該当遺伝子の単離を試みた。

分子進化解析

EST解析およびRACE法で取得された遺伝子の中で、転写制御遺伝子や細胞間シグナル伝達に關与する遺伝子と判断された遺伝子ファミリーに関して、該当の遺伝子ファミリーに属する既知の遺伝子配列をDNA塩基配列データベースより取得し、今回、兩種で得られた遺伝子とともに分子系統樹を作成した。

発現解析

分子系統解析で注目に値する系統樹が得られた遺伝子ファミリーに属する遺伝子について、シャジクモでは各器官について、ミカヅキモでは有性生殖誘導を行い、各有性生殖ステージ別に、各遺伝子特異的プライマーおよびプローブを用いて、リアルタイム PCR法にて発現解析を行った。

4. 研究成果

EST 解析

シャジクモの栄養成長時の細胞と有性生殖器官からそれぞれ RNA を単離し、cDNA を合成した。両者の cDNA について均一化したライブラリーを作製して EST を取得した。約 6000 個について配列決定を行い、プロファイリングを行なった。現在、この 2 種とヒメツリガネゴケ、シロイヌナズナのゲノムレベルでの相違を比較検討中である。

転写制御遺伝子の単離と分子進化、機能解析

LEAFY 遺伝子相同遺伝子

LEAFY 遺伝子は被子植物のシロイヌナズナでは花の形態形成にかかわる MADS box 遺伝子の発現を誘導する転写因子である。最近の多くの生物における大規模ゲノム解析の結果では、本遺伝子は陸上植物のみからしか報告されていない。一方、本遺伝子は陸

上植物の中でもっとも基部に位置するコケ植物のヒメツリガネゴケにおいて、受精卵の第一分裂に端を発する 2 倍体の細胞分裂全般を制御する因子であることが明らかになっている。したがってこの因子がどのように進化してきたのかを明らかにすることは、2 倍体における多細胞体制進化を解明するうえで重要となると予想される。そのため LEAFY 遺伝子の起源と進化を明らかにするために、陸上植物の姉妹群であり 2 倍体が多細胞にならないシャジクモ類から本遺伝子の単離を試み、シャジクモ類から本遺伝子ホモログを 1 つ (CbLFY1) 単離することに成功した。また本遺伝子の活性に重要な DNA 結合ドメインのアミノ酸配列をシャジクモ類と陸上植物との間で比較した結果、活性に重要なアミノ酸置換がシャジクモ (CbLFY1) とヒメツリガネゴケ (PpLFY1、PpLFY2) の配列のみに共通してみられた。既知の陸上植物の LEAFY 相同遺伝子を含め系統樹を作成したところ、その中に入らずもっとも基部に位置した (図 1)。

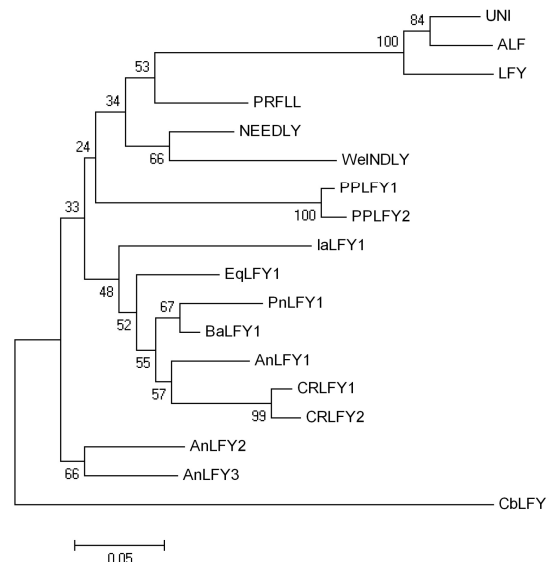


図 1. LEAFY 相同遺伝子の分子系統樹

KNOX 遺伝子相同遺伝子

陸上植物における KNOX 型ホメオボックス遺

伝子群には、I型とII型の系統的に異なる二つのグループが存在する。これらの遺伝子群は、アオサ藻類/緑藻類の共通祖先から陸上植物が分岐した後に遺伝子重複したものと考えられるが、その起源の特定には至っていない。本研究では、単細胞シャジクモ藻類ヒメミカツキモより、KNOX 遺伝子 (CpKN1) をコードする全長 cDNA、ゲノム DNA を単離し、構造、分子系統、発現条件について解析した。

CpKN1 には、陸上植物の KNOX 遺伝子ファミリーに保存されている4つの box (KNOX, GSE, ELK, TALE 型 homeobox) が存在しており、また保存性の高い4カ所の intron のうち、GSE box 内以外の3カ所の保存性が確認された。また、class 2 ファミリーのみ保存される ELK box 中の intron は、CpKN1 には存在しなかった。系統解析の結果、ヒメミカツキモの CpKN1 遺伝子は陸上植物の全ての KNOX 遺伝子群の基部に位置したことから、陸上植物が単細胞シャジクモ藻類から分岐した後に、I型とII型 KNOX 遺伝子の遺伝子重複が起こったことが示唆された(図2)。さらに CpKN1 は、+型細胞と-型細胞を混合してから24時間後に発現することが見出された。この時期には、接合子が形成され始めることから、CpKN1 は接合子において、機能する可能性が強く示唆された。

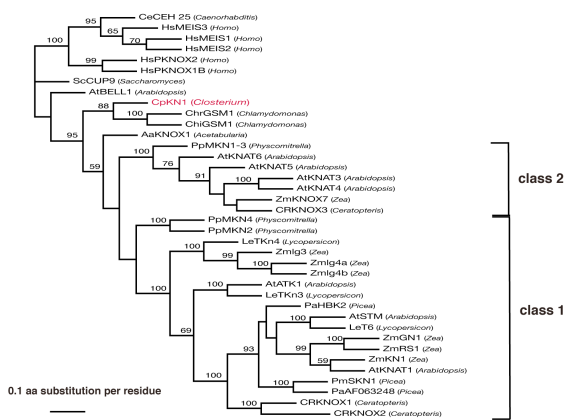


図2. KNOX 相同遺伝子の分子系統樹

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 9件)

1. Sakayama, H., Kasai, F., Kawachi, M., Watanabe, M. M., Nozaki, H., Nishihiro, J., Washitani, I., Shigyo, M., Krienitz, L. & Ito, M. 2009. Taxonomic reexamination of *Chara globularis* (Charales, Charophyceae) from Japan based on oospore morphology and *rbcL* gene sequences, and the description of *C. leptospora* sp. nov. Journal of Phycology (In press).
2. Abe, J., Hiwatashi, Y., Ito, M., Hasebe, M., Sekimoto, H. 2008. Expression of the exogenous genes under the control of the endogenous *HSP70* and *CAB* promoters in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Plant Cell Physiol. 49: 625 - 632
3. Fujita, T., Sakaguchi, H., Hiwatashi, Y., Wagstaff, S.J., Ito, M., Deguchi, H., Sato, T., and Hasebe, M. 2008. Convergent evolution of shoots in land plants: lack of auxin polar transport in moss shoots. Evol. Develop. 10:2, 176-186.
4. Sakayama, H. 2008. Taxonomy of *Nitella* (Charales, Charophyceae) based on comparative morphology of oospores and multiple DNA marker phylogeny using cultured material. Phycological Research 56: 202-215.
5. Kato, S., Sakayama, H., Sano, S., Kasai, F., Watanabe, M. M., Tanaka, J. & Nozaki, H. 2008. Morphological variation and intraspecific phylogeny of the ubiquitous species *Chara braunii* (Charales, Charophyceae) in Japan. Phycologia 47: 191-202.

6. Higa, A., Kasai, F., Kawachi, M., Kumano, S., Sakayama, H., Miyashita, M. & Watanabe, M. M. 2007. Seasonality of gametophyte occurrence, maturation and fertilization of the freshwater red alga *Thorea okadae* (Thoreaales, Rhodophyta) in the Kikuchi River, Japan. *Phycologia* 46: 160-167.
7. Sekimoto, H., Tanabe, Y., Tsuchikane, Y., Shirotsuki, H., Fukuda, H., Demura, T., and Ito, M. 2006. Gene expression profiling using cDNA microarray analysis of the sexual reproduction stage of the unicellular Charophycean alga *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* Complex. *Plant Physiol.* 141: 271-279
8. Tsuchimatsu, T., Sakai, S., and Ito, M. 2006. Sex allocation bias in hermaphroditic plants: effects of local competition and seed dormancy. *Evol. Ecol. Res.* 8: 829-842
9. Hamada, S., Sekimoto, H., Tanabe, Y., Tsuchikane, Y., Ito, M. 2006. Isolation of myosin XI genes from the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex and analysis of their expression during sexual reproduction. *J. Plant Res.* 119: 105-113.

〔学会発表〕(計5件)

1. 坂山英俊・伊藤元己 . シャジクモ類における LEAFY 遺伝子ホモログの単離 日本藻類学会 2009.3.28, 那覇
2. 佐藤真知子・坂山英俊・関本弘之・伊藤元己 シャジクモ (*Chara braunii*) の生殖器官形成の解析 日本藻類学会 2009.3.28, 那覇
3. 土金勇樹・山崎華奈子・伊藤元己・関本弘之 . 接藻ヒメミカヅキモの非対称な生殖隔離に関わる性フェロモン日本藻類学会 2008.3.22, 東京
4. 堀 早知恵・阿部 淳・伊藤元己・関本弘之 .ヒメミカヅキモへの外来遺伝子導入による形質転換体の作出日本藻類学会 2008.3.22, 東京
5. 関本弘之・坂本 季美枝・田邊 陽一・阿部 淳・伊藤元己 . ヒメミカヅキモの KNOX 遺伝子クローニングと分子的解析 日本植物学会 2007.9.5, 野田

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 元己 (Ito Motomi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号 : 00193524

(2)研究分担者

坂山 俊英 (Sakayama Toshihide)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号 : 60391108

関本 弘之 (Sekimoto Hiroyuki)

日本女子大・理学部・准教授

研究者番号 : 20281657