

平成21年6月5日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370036
 研究課題名（和文） 陸上植物の2倍体生活史進化多様性を生み出した分子機構の解明
 研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms on the evolution of diploid plant body in land plants.
 研究代表者
 長谷部 光泰 (HASEBE MITSUYASU)
 基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授
 研究者番号：40237996

研究成果の概要：

ヒメツリガネゴケ *PpCLF* 遺伝子は配偶体世代で孢子体多能性幹細胞（孢子体頂端細胞）形成を抑制する働きを持っていることがわかった。そして、受精後にその発現が消失することによって、受精卵は孢子体幹細胞を形成し、孢子体幹細胞が活性を持つ間、孢子体は伸長を続ける。従って、ヒメツリガネゴケ *PpCLF* 遺伝子はシロイヌナズナ *CLF* 遺伝子と異なり栄養成長を抑制し、生殖成長を促進する働きがあることがわかった。このことから、*PpCLF* 遺伝子のターゲットの変化によって、陸上植物の2倍体世代延長が引き起こされた可能性が高いことがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：ポリコム遺伝子、CLF、FIE、世代交代、進化、孢子体、配偶体、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

全ての生物は独特の生活史を持っている。多様な生活史がどのように進化してきたかを解明することは進化多様性生物学の重要課題であり多くの研究がなされてきた。しかし、従来、生活史を制御する遺伝子が特定されていなかったことから、どのような分子機構の変化によって生活史の進化が引き起こされたのかはほとんどわかっていなかった。陸上植物の進化過程でおこった生活史の大きな変化の一つは、2倍体（孢子体）世代の

延長である。コケ植物では、1倍体世代が優占し、2倍体はほとんど栄養成長せずに生殖器官である孢子嚢を形成する。一方、被子植物では2倍体栄養成長期間が延長されており、栄養器官である茎葉を形成した後で、生殖成長へと転換し花を形成する。被子植物への系統における2倍体栄養成長期間の増大は2倍体植物体の巨大化をもたらし、その結果、よりたくさんの生殖器官を作り、散布効率も上昇し、これらは適応度増大に寄与し今日の被子植物の繁栄につながっていると考

えられている。このような生活史の違いを生じさせることに関与する遺伝子を単離し、コケ植物と被子植物で機能を比較すれば、陸上植物の2倍体世代延長の進化を引き起こした分子機構が明らかにできるのではないかと考え本研究を開始した。

ポリコムグループ遺伝子 (PcG 遺伝子) はショウジョウバエのホメオティック遺伝子の発現制御をする遺伝子として研究が開始し、動物、植物のいろいろな群における研究から、染色体構造を変化させることにより、ひとたび抑制された遺伝子を一定の時間抑制させ続ける「細胞記憶」を担う因子であることがわかってきた。被子植物シロイヌナズナの PcG 遺伝子の中で *MEDEA (MEA)*、*CURLY LEAF (CLF)*、*SWINGER (SWI)* は共通のドメイン構造を持ち遺伝子重複によって進化してきたことが知られている。*MEA* は1倍体世代で発現し2倍体発生遺伝子発現を抑制し、1倍体世代を維持する働きがある。受精後、2倍体世代が開始すると *MEA* の発現は抑制され、変わって *CLF* の発現が誘導される。*CLF* は生殖器官である花形成を抑制し2倍体栄養成長期間を維持するのに必要である。*CLF* と *MEA* の両方の遺伝子の発現が抑制された状態で生殖器官が形成され、減数分裂を介して、*MEA* の発現が誘導され再び1倍体世代が開始する。すなわち、*MEA* と *CLF* 遺伝子の発現制御によって被子植物の生活史が制御されていると考えられている。*SWI* は *CLF* と冗長的な機能を持っている。このような研究結果に基づき、申請者は陸上植物生活史進化過程における2倍体栄養成長期間の延長は、*CLF* の発現期間を長くすることによって引き起こされたのではないかとこの作業仮説をたてた。しかし、これまで被子植物以外の緑色植物から PcG 遺伝子のホモログが見つかっていなかったことからその進化を研究することは困難であった。申請者らはコケ植物セン類ヒメツリガネゴケ核ゲノム解析を行い、ほぼ全配列決定を終え、PcG 遺伝子の系統解析を行った。その結果、ヒメツリガネゴケゲノムに1つだけ *MEA*、*CLF*、*SWI* の全てに対するオルソログ、*PpCLF* 遺伝子が存在することを発見した。さらに、平成18年度終了萌芽的研究においてヒメツリガネゴケ *PpCLF* 破壊株を作製した。もしも、*PpCLF* 遺伝子が *MEA*、*CLF*、*SWI* の機能を併せ持っているとする、ヒメツリガネゴケ1倍体で *PpCLF* を破壊したとき、*MEA* 機能が失われていることにより2倍体が形成され、同時に *CLF* 機能が失われているのでできる2倍体は栄養成長を

せず2倍体生殖器官である胞子嚢を形成するはずである。ところが、ヒメツリガネゴケ1倍体である原系体において *PpCLF* 遺伝子を破壊すると、栄養成長段階の2倍体様構造が誘導されたものの生殖器官である胞子嚢を形成せず、被子植物のように栄養成長をし続ける(ただし葉は形成しない)という予想外の表現型を示した。このことから、PcG 遺伝子が2倍体栄養成長期間の延長という生活史進化に関係していることがわかったが、作業仮説に反し、単純に *PpCLF* 遺伝子が遺伝子重複し、重複した遺伝子の発現時期が変化することによって2倍体栄養成長期間が延長したのではないようである。

では、PcG 遺伝子にどのような変化が起こることによって2倍体栄養成長期間の延長という進化がおこったのだろうか。このような疑問のもと本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、ヒメツリガネゴケ PcG 遺伝子機能を解析し、シロイヌナズナ PcG 遺伝子と比較することによって、陸上植物の2倍体世代延長という生活史の進化がどのような分子機構の進化によって引き起こされたのかを推定することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケ遺伝子ターゲティング実験系を用い、PcG 複合体を形成する *PpCLF*、*PpFIE*、*PpEMF1*、*PpEMF2*、*PpEMF3*、*PpMSI* の遺伝子欠失体、*PpCLF* 遺伝子末端への *Citrine* 遺伝子ノックイン、*PpCLF* 遺伝子欠失株において熱ショックプロモーターによって *PpCLF* を誘導的に発現する形質転換体を作製した。

フローサイトメーターによる核 DNA 定量によって変異体の倍数性を調べた。

実体顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いて形態観察を行った。

4. 研究成果

PpCLF、*PpFIE*、*PpMSI* それぞれの一重遺伝子欠失体、*PpEMF1*、*PpEMF2*、*PpEMF3* の三重変異体を作成した。前2遺伝子については遺伝子欠失体が得られたが、*PpMSI* については数回の形質転換実験を試みたが全く欠失体は得られなかった。また *PpEMF* についてはそれぞれの一重欠失変異体、二重欠失変異体は野生型と変化が見られず、三重変異体は *PpCLF*、*PpFIE* の一重変異体に類似し、原系体の以上と茎葉体の胞子体様組織への転換が見られた。これらのことから、*PpEMF* の組織による使い分けの可能性は低くなった。このことから、コンプレックス形

成ならびに *PpMSI*、*PpEMFs* の解析は行わず、以後の研究を *PpCLF*、*PpFIE* に集中することとした。*PpCLF*、*PpFIE* 遺伝子欠失変異体は同様な表現型を示した。原糸体はクロロネマとカウロネマの中間的な形態を示し、側芽始源細胞のほとんどが孢子体様幹細胞へと転換し、孢子体様組織を形成した。孢子体と配偶体の違いを明確に検出するために、オーキシン極性輸送、クラス1 KNOX 遺伝子をマーカーとして用いることに成功した (Fujita et al. 2008; Sakakibara et al. 2008)。*PpCLF* と *PpFIE* 各遺伝子末端にシトリン遺伝子を導入し、*PpCLF* の全生活史を通じた発現解析を行った。その結果、原糸体から原糸体、茎葉体形成時には *PpCLF* 遺伝子が発現し続けていることがわかった。さらに、茎葉体における造精器、造卵器形成時にも発現が継続していた。さらに、未受精卵では *PpCLF* の発現が検出できるが、受精の前後で発現が消失することがわかった。さらに、孢子体幹細胞が分裂を停止する前後で発現が再び検出できるようになり、減数分裂、孢子形成時に発現しつづけていた。孢子においては発現検出できなかったが、孢子発芽直後より発現を検出できた。遺伝子破壊株の表現型観察 (赤色光下における分化細胞から幹細胞分化における役割の解析) を行った結果、側芽形成に *PpCLF* が正の役割を果たすことがわかった。ヒートショックプロモーターに *PpCLF* cDNA を結合した遺伝子の導入によって、誘導的過剰発現実験を行った結果、孢子体様組織先端の頂端幹細胞が分裂を停止し、孢子嚢形成が開始した。しかし、減数分裂には至らなかった。上記の受精卵における *PpCLF* の発現消失について、これまで植物においては発生過程におけるヒストン修飾のゲノムワイドな変動は報告されておらず、今回の実験結果はたいへん興味深い。そこで今後、*PpCLF* が関係すると考えられる H3K27me3 修飾について、免疫組織染色によりゲノム全体のヒストン修飾状態が変わっているかを調べるための実験系の確立を行う予定である。

以上の研究結果から、ヒメツリガネゴケ *PpCLF* 遺伝子は配偶体世代で孢子体多能性幹細胞 (孢子体頂端細胞) 形成を抑制する働きを持っていることがわかった。そして、受精後にその発現が消失することによって、受精卵は孢子体幹細胞を形成し、孢子体幹細胞が活性を持つ間、孢子体は伸長を続ける。従って、ヒメツリガネゴケ *PpCLF* 遺伝子はシロイヌナズナ *CLF* と異なり栄養成長を抑制し、生殖成長を促進する働きがあることがわかった。このことから、*PpCLF* 遺伝子のターゲットの変化によって、陸上植物の2倍体世代延長が引き起こされた可能性が高いことがわかった。

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2件)

- ① Sakakibara et al. 2008. Class 1 KNOX genes are not involved in shoot development in the moss *Physcomitrella patens* but do function in sporophyte development. *Evol. Dev.* 10: 555-556 査読有
- ② Fujita, T. et al. 2008. Convergent evolution of shoots in land plants: lack of auxin polar transport in moss shoots. *Evol. Dev.* 10: 176-186 査読有

[学会発表] (計11件)

- ① 岡野陽介他「ヒメツリガネゴケの世代交代を制御するポリコム遺伝子 *PpCLF*」第50回日本植物生理学会年会 2009.3.21 名古屋大学
- ② 長谷部光泰「基礎生物学のおもしろさ: その意外性」京都産業大学バイオフィラム 2008 秋 2009.3.10 京都産業大学
- ③ 長谷部光泰「植物の細胞履歴とクロマチン修飾」国際高等研究所研究会 2009.3.7 国際高等研究所
- ④ 長谷部光泰「植物の世代交代の分子機構とボディープランの進化」九大 COE シンポジウム 2009.2.7 九州大学
- ⑤ Mitsuyasu Hasebe “A polycomb repression complex 2 gene manages life cycle by regulating pluripotent stem cell character” 25th Symposium in Plant Biology 2009.1.31 カリフォルニア、米国
- ⑥ Mitsuyasu Hasebe “PcG gene manages life cycle by regulating pluripotent stem cell character” 8th NIBB-EMBL Join Meeting 2008.11.22 基礎生物学研究所
- ⑦ Mitsuyasu Hasebe “Genome analyses of the moss *Physcomitrella patens* and its implication on the evolution of development genes in land plants.” XIth France-Japan Workshop 2008.10.21 筑波大学
- ⑧ 長谷部光泰「多様性生物学における細胞生物学、発生学、ゲノム生物学との融合と新展開」日本植物学会第72回大会 2008.9.25 高知大学
- ⑨ Mitsuyasu Hasebe “The origin and evolution of shoot system in land plants” 日本進化学会第10回年会シンポジウム 2008.8.23 東京大学

- ⑩ Mitsuyasu Hasebe “Evolution of genome and body plan in land plants”
International Congress of Genetics
2008.7.15 ベルリン、ドイツ
- ⑪ 長谷部光泰 「比較ゲノムから明らかになった動物と植物の発生進化の違い」東大大学院新領域 21 世紀 COE シンポジウム
2008.4.12 東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷部 光泰 (HASEBE MITSUYASU)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

(2) 研究分担者

村田 隆 (MURATA TAKASHI)
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授

研究者番号：00242024

日渡 祐二 (HIWATASHI YUJI)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教

研究者番号：10373193

棚橋 貴子 (TANAHASHI TAKAKO)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・助教

研究者番号：40414015

(平成19年度まで)

(3) 連携研究者