

平成21年 6月 4日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770041

研究課題名（和文） 単子葉植物における葉の形態進化の遺伝的背景

研究課題名（英文） Genetic basis of evo-devo of leaf forms in monocots

研究代表者

山口 貴大（YAMAGUCHI TAKAHIRO）

基礎生物学研究所・植物発生遺伝学研究部門・助教

研究者番号：60450201

研究成果の概要：

単子葉植物の葉の形態形成とその進化の機構を明らかにするために、単子葉植物でよくみられる、「単面葉」という葉身が裏側（背軸面）だけで構成される葉に着目し、その発生進化機構に関する研究を行った。その結果、単面葉における葉身の裏側化と、その葉身の平面成長性に関して、それらを制御する基本的な遺伝的枠組みを明らかにするとともに、単面葉の発生進化機構をさらに詳細に遺伝子レベルで解明するための分子遺伝学的研究基盤を構築することに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：植物発生進化学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：発生・進化・単子葉植物・単面葉・葉の極性・葉の平面成長

1. 研究開始当初の背景

どういう仕組みで多様な生物の形態が進化してきたのかという問題は、古くから多くの生物学者の関心を集め、比較形態学や比較発生学といった学問の対象とされてきた。しかしながらそのような研究は、解釈学的議論にとどまり、明確な結論が得られずにいた。最近の、モデル生物を中心とした分子遺伝学の急速な進歩は、その発生を制御する主要な

遺伝子群を多数同定し、発生の基本的枠組みを遺伝子レベルで明らかにしてきた。それらの研究により得られた知見を基盤とし、様々な生物における形態の進化を、遺伝子レベルで実証する事が可能となりつつある。このような、いわゆる発生進化生物学（evo-devo）といわれる研究領域は、近年大きな関心を集めており、今後の発生遺伝学的研究の主軸の一つとなりうる分野である。

被子植物もまた、その形態に大きな多様性

を示す。中でも単子葉植物は、被子植物の進化の初期に、基部双子葉植物の系統から派生し、その後独自の形態を進化させている。とりわけ葉は、単子葉植物とその他の植物系統群の間で大きく異なる構造、発生様式を示す。それらの対応関係に関しては、古くから植物形態学者の興味を惹き付けてきた。その結果、例えば単子葉植物の葉は、双子葉植物の葉の leaf base といわれる最も基部の構造が発達したものであるといった様々な説が提唱されてきたが、未だ明確な結論は得られていない。

2. 研究の目的

以上のような学術的背景に基づき、本研究では、単子葉植物における葉の形態進化とその遺伝的背景の解明に向けた研究を開始した。研究材料としては、単面葉という葉を持つ植物に着目した。単面葉とは、アヤメ科、ネギ科、イグサ科など、単子葉植物で何度も繰り返し進化した、葉身が背軸面だけで構成される葉のことである。

この単面葉は、葉の極性が一般的な葉（両面葉）と比較して著しく異常であることから、単子葉植物の葉の極性制御機構を解明するための、独自の優れた発生学的材料となりうる。また、単面葉が単子葉植物だけで進化した原因を解明することにより、単子葉植物とその他の植物群の葉の発生機構の違いを明らかにすることが出来ると期待される。さらには、このような器官が、生物進化の過程でどのような機構により繰り返し進化（平行進化）し得たのか、という進化学的にも興味深い研究を遂行できると考えられる。また、一般に葉の平面成長は、向軸側と背軸側運命の境界部で細胞増殖が活性化されることにより形成されると考えられているが、単面葉をもつ多くの植物では、葉身は背軸面しか持たないにもかかわらず、平らな葉身が作られる。したがって、平らな葉身は、単面葉と両面葉で収斂進化したと考えられ、この収斂進化の遺伝的機構も興味深い。

以上のような、様々な発生進化学的に興味深い問題を明らかにするために、本研究では単面葉の発生・進化機構を解明することを目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 単面葉の研究システムを構築するために、研究に適したモデル種を選定し、分子遺伝学的研究の基盤整備を行う。

(2) 単面葉における葉身の背軸側化の機構を遺伝子レベルで理解するために、葉の極性制御や、その形態形成に重要な遺伝子群を網羅

的に単離する。そして *in situ* ハイブリダイゼーション法により、時空間的発現パターンの解析を行い、単面葉の発生を制御する遺伝的プログラムを解明する。

(3) 単面葉における葉身の平面成長機構を解明するために、解剖学的解析によりその発生機構を推測する。そしてその制御に関与すると考えられる因子を単離し、分子遺伝学的研究を行う。

(4) 単面葉の進化機構を明らかにするために、単面葉の種と両面葉の種の両者を含む植物群において、分子系統解析を行うとともに、葉の形態進化との相関関係を解析することにより、単面葉の進化機構に関する知見を得る。

(5) 単面葉の発生を制御する遺伝的機構を解明するために、単面葉を持つ種において突然変異体の単離システムを構築する。そして葉の発生に異常をしめす突然変異体を単離し、発生遺伝学的研究を行う。

(6) 単面葉を持つ植物種で逆遺伝学的研究を行うために、形質転換系の確立を試みる。

4. 研究成果

(1) 単面葉研究のモデル種を選定するために、単面葉をもつ様々な植物種を収集し、予備的解析を行った。その結果、イグサ科のイグサ属植物が、研究材料として非常に優れていることが明らかになった。

まず、イグサ属植物は、種によって葉の形態が非常に多様であり、両面葉、単面葉、それらの中間的な葉を持つ種が存在し、さらには単面葉に関しても、平たい葉身を持つ種と丸い葉身をもつ種が存在する。このような葉の形態の多様性を利用することにより、異なる形態の葉をもつ近縁種間での比較分子遺伝学的解析が可能であると考えられる。また、これらの種の系統解析と葉の構造の対応関係を解析することにより、上記のような多様な葉が、どのようなパターンで進化したかを明らかにすることができると期待される。

また、イグサ属植物には、植物体が小さい。ライフサイクルが短い。ゲノムサイズが小さい。自殖性で一個体から多数の種子が得られる。といった、分子遺伝学的研究に適した特性を持つ種が多く存在する。とりわけ、平たい単面葉を持つコウガイゼキショウ (*Juncus prismatocarpus*) は、研究材料として非常に扱いやすいことが明らかになった。また、その最近縁種であるハリコウガイゼキショウ (*Juncus wallichianus*) は丸い単面葉を持つことから、葉身の平面成長機構に関

する比較解析も可能である。そこでコウガイゼキショウを単面葉解析のモデル種として選定し、実験室内での栽培法を確立し、自殖を繰り返した純系を作成するとともに、分子遺伝学的研究を行うための基盤整備を行った。

(2) コウガイゼキショウから、葉の極性制御や形態形成に関与する遺伝子群を網羅的に単離し、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、それらの時空間的発現パターンの解析を行った。その結果、単面葉の葉身は、遺伝子発現レベルでも完全に背軸側化した構造を持つこと、そしてそのような葉は、発生のごく初期に、背軸側運命を持つ領域が異所的に増殖することによって発生することを明らかにした。

また、葉の向背軸の極性制御には、small RNA による遺伝子発現調節機構が深く関与する。そこで、コウガイゼキショウにおけるこの制御系の解析を行った結果、単面葉の発生進化には、small RNA による遺伝子発現調節機構の改変が深く関与することを明らかにした。

(3) 単面葉における平たい葉身の発生進化機構を明らかにするために、コウガイゼキショウとハリコウガイゼキショウの葉の発生過程の比較解剖学的解析を行った。その結果、コウガイゼキショウにおける平たい単面葉の葉身では、葉原基中央部での活発な細胞増殖により、葉の平面成長が促進されることを明らかにした。

次に、そのような細胞増殖制御に関与すると推測される因子を複数単離し、コウガイゼキショウとハリコウガイゼキショウで遺伝子発現パターンの比較解析を行った。その結果、2種の間で有意に発現レベルや発現パターンが異なる2つの因子を同定することに成功した。

また、このうち1つの因子に関してプロモーター解析を行った結果、ハリコウガイゼキショウにおいて、この因子のプロモーター領域にゲノム再編が起きたことを明らかにした。さらに、phylogenetic footprinting 法によりプロモーターの配列解析を行ったところ、この因子の発現制御に重要であると推測されるシス配列の1つが、ハリコウガイゼキショウではゲノム再編により失われたことを明らかにした。

(4) イグサ属植物の分子系統解析と、葉の構造の対応関係の解析を行った。まず、多数のイグサ属植物を収集し、葉の発生と独立な、複数の DNA 断片を増幅し、塩基配列を決定して分子系統樹を作成した。次に、葉の形態を組織学的に解析し、分子系統関係との関連

性を解析した。その結果、単面葉は、質的かつ不可逆的な、少数の遺伝的変異により進化したことが推測された。また、単面葉における葉身の平面成長性は、量的な遺伝的変異により、イグサ属植物の中でも何度か繰り返し進化したことが推測された。

(5) コウガイゼキショウにおける突然変異体の単離系の構築を試みた。変異源として EMS (Ethyl Methyl Sulfonate) を用い、処理濃度および処理時間の検討を行い、非常に効率良く突然変異体を単離可能な条件を設定することに成功した。さらに現在までに 3000 系統のスクリーニングを行い、葉の極性に異常をしめす変異体、そして葉身の平面成長性に異常をしめす変異体を複数単離することに成功した。また、後者の変異体に関して、(3)の解析により同定された2つの因子に変異が起きている可能性を検証した所、1つの因子に関しては、その遺伝子ファミリーの間で保存されたアミノ酸に、ミスセンス変異が起きている系統を同定することに成功した。

(6) コウガイゼキショウにおける形質転換系確立のために、カルス誘導系と再分化系の構築を行った。様々な条件検討を行った結果、合成オーキシン含有培地によりカルス誘導が可能であることを明らかにするとともに、最適合成オーキシン濃度を決定した。また、カルスをホルモンフリー培地に移植することにより、効率良く植物体再分化を誘導可能であることを明らかにした。また、形質転換植物の選抜のための抗生物質の選定およびその最適濃度の決定も行った。

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 山口貴大

被子植物における葉の向背軸の極性制御機構と単面葉の発生進化

Plant Morphology (2009) 21, 79-85.

査読有り

② Takahiro Yamaguchi and Hirokazu Tsukaya

Evo-Devo of leaf shape control with a special emphasis on unifacial leaves in monocots.

Korean J. Pl. Taxon. (2007) 37, 351-361

査読有り

[学会発表] (計8件)

① 山口貴大, 塚谷裕一
突然変異体を用いた単面葉発生機構の遺伝学的解析
第50回日本植物生理学会年会
2009年3月21日 (名古屋)

② 山口貴大, 塚谷裕一
単面葉における平らな葉身の発生進化機構
日本植物学会第72回大会
2008年9月25日 (高知)

③ 山口貴大, 塚谷裕一
イグサ属植物における単面葉の進化パターンとその遺伝的機構
日本植物形態学会第20回大会
2008年9月24日 (高知)

④ Takahiro Yamaguchi and Hirokazu Tukaya
Genetic basis for the development and evolution of unifacial leaves in Monocots
第10回日本進化学会 (東京)
2008年8月23日

⑤ Takahiro Yamaguchi and Hirokazu Tukaya
Evolution and Development of Unifacial Leaves in Monocots
2008 EURO EVO DEVO Conference
2008年7月31日 (Ghent)

⑥ 山口貴大, 塚谷裕一
イグサ属植物における単面葉の発生進化機構の解明
第49回日本植物生理学会年会
2008年3月20日 (札幌)

⑦ 山口貴大, 塚谷裕一
単面葉発生機構の分子遺伝学的解析
日本植物学会第71回大会
2007年9月7日 (野田)

⑧ 山口貴大, 塚谷裕一
単子葉植物における, 単面葉の発生機構と, 葉の極性制御因子の機能分化
日本植物形態学会第19回大会
2007年9月6日 (野田)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/bioenv2/index.j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 貴大 (YAMAGUCHI TAKAHIRO)
基礎生物学研究所・植物発生遺伝学研究部門・助教
研究者番号: 60450201

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し