

令和 4 年 5 月 28 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：2019～2021

課題番号：19K23742

研究課題名(和文)被子植物において葉の獲得を可能にした分子機構の探索とその機能解析

研究課題名(英文) A study for molecular mechanisms that enable leaf acquisition in angiosperms and their functional analysis

研究代表者

中山 北斗(Nakayama, Hokuto)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：30610935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物において葉の獲得を可能にした分子機構を、現存する被子植物の系統樹の中で最基部に位置し、単葉を形成するアンボレラ(*Amborella trichopoda*)や、単葉のモデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)などを用いてRNA-seqを行なった。比較の結果、これら2種の葉原基の遺伝子発現プロファイルは、系統的に離れた2種であっても、その基本的な部分に関しては類似していることが明らかになった。これにより、被子植物における単葉の発生プログラムは、被子植物の基部において、その基本的な部分はすでに確立していたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、被子植物における単葉発生のメカニズムが、現存する被子植物の系統樹の中で最基部に位置し、単葉を形成するアンボレラ(*Amborella trichopoda*)とシロイヌナズナとの間で類似していることが初めて示唆された。これを端緒に、これからの解析により、これまで不明であった被子植物の葉の獲得とその進化についての理解が深まると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms that enable leaf acquisition in angiosperms were investigated. To investigate it, RNA-seq was performed using simple-leaved species, *Amborella* (*Amborella trichopoda*) and *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). DEG analysis, GO enrichment analysis, and comparative Gene Co-expression network revealed that the gene expression profiles of leaves of the two species were similar, even though they are phylogenetically distant from each other. This suggested that the developmental program of simple leaves in angiosperms was already established in early diverged angiosperms such as *Amborella*.

研究分野：進化発生学

キーワード：Amborella trichopoda Arabidopsis thaliana Evo-Devo RNA-seq Solanum lycopersicum インフォマティクス 進化発生学 葉

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

葉は植物にとって主たる光合成器官であり、花器官も葉の変形であることから、植物において最も重要な器官の一つである。これまでの化石を用いた古生物学や系統学における研究から、陸上に進出した初期の植物は葉を有していなかったことが知られ、1930年代に Walter Zimmermann が発表したテローム説では、二又分岐する軸上構造が「主軸形成」、「平面化」、「癒合」などの複数の過程を経て、葉を獲得したことが示唆されている。この陸上植物における葉の獲得は、植物の光合成の効率化をもたらし、放出される酸素は地球の大気組成の変化をももたらした。この一連のイベントは、その後続く動物の陸上進出の一助となったと考えられている。

近年のモデル生物の確立とゲノム情報を用いた解析の普及により、これまで葉の発生に関する研究はシロイヌナズナをはじめとするモデル植物を中心に解析がなされてきた。その中で葉の発生の分子機構は極めて精力的に研究がなされ、その詳細が明らかになりつつあるが、葉に関して最も根源的な問いである、『植物がその進化の過程でどのような分子機構により葉を獲得したのか』という命題は、それに関連する遺伝子や分子機構はおろか、その過程の理解さえも進んでいなかった。そのため前述のテローム説についても、被子植物ではその真偽は全く明らかになっていないの現状である。これは長年の生物学の命題でありながらも、その理解のためのアプローチが難しく、かつ形態学、発生学、進化学などの分野横断的の知見が必要であったためと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、被子植物で保存されている葉の発生の分子機構を複数の植物のトランスクリプトームデータをもとに推定することを目的とした。

これまで最も葉の発生について詳細がわかっているモデル植物のシロイヌナズナは、被子植物の系統樹上で派生的な位置に存在する真性双子葉類に含まれ、また被子植物の葉の形態は非常に多様であることから、被子植物において基本となる葉の発生の分子機構がどのようなものなのかについては、まだ十分に明らかになっていない。そこで、本申請では、被子植物で保存されている葉の発生の分子機構を、現生の被子植物の系統樹上において、他の全ての植物の姉妹群であるアンボレラ (*Amborella trichopoda*) を含む複数の植物のトランスクリプトームデータをもとに推定することを目的として研究を行なった。それを明らかにした上で、被子植物において葉の獲得を可能にした分子機構を、他の陸上植物の系統と比較を行ない、明らかにすることを最終的な目標とした。

## 3. 研究の方法

被子植物に共通な葉の発生に関わる遺伝子制御ネットワークを抽出するために、現存する被子植物の系統樹上において全ての被子植物の姉妹群であるアンボレラ (*Amborella trichopoda*) を含む、ゲノム情報が利用可能な複数のモデル生物を選定し、それらの茎頂、発生初期(P3)、発生中期(P4)、発生後期(P5)の葉原基を用いてトランスクリプトームを行なう。同時に、アンボレラの葉の発生の詳細は不明であったため、それについても明らかにする。得られたそれぞれの種のトランスクリプトームデータを用いて、葉の発生に関わる共発現遺伝子ネットワークを構築した後、比較し、種間で共通するもののみを抽出するために、ネットワーク間の差異を統計的に検出する。その後、複数種で保存されているネットワーク上のハブとなっている遺伝子を探索する。それらの遺伝子は葉の獲得において鍵となった可能性が考えられるため、シロイヌナズナなどを用いて形質転換体の作出を行なう。加えて既に利用可能なゼニゴケの各器官の RNA-seq データを用いて遺伝子ネットワークの構築を行ない、葉を持たない基部陸上植物においてそれらの遺伝子がどのような役割を有しているのかを推定する。以上により、葉の発生に関わる遺伝子制御ネットワークの変遷を植物の進化軸に沿って明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究では、コロナの感染拡大によるリモートでの作業の推奨などもあり、当初の予定通りに研究が行なうことが難しく、期限内に葉の獲得を可能にした分子機構の同定までは至らなかった。しかしながら、以下に示すようにその実現に欠かすことのできない解析法の確立や複数の基盤的知見を成果として得た。

1. アンボレラは雌雄異株であり、雌雄で葉の形態に差があるかどうかはこれまで不明であった。葉の形態は本研究の主要な研究対象であるため、雌雄で差がある場合は、トランスクリプトームを雌雄それぞれで行なう必要がある。そこで雌雄それぞれの葉の形態の実測と、深層学習を用いた画像解析、内部構造の観察などを行ない、アンボレラにおいて、葉の形態に雌雄差はないことを確認した。アンボレラの管理を行なっている東京大学附属植物園では、雌雄ともに複数の系統を維持しているが、これにより以降の解析では、植物園内で最も個体数が多く維持されていた Mont Dogny から採集された雌株の#3 を以降の解析に用いること

とした。

2. アンボレラはその系統的位置のため、被子植物の進化を理解する上で重要であり、花や花器官に関連した研究は多いものの、葉に着目した研究は非常に少なかった。そこでまず、アンボレラを用いて葉の基本的な発生メカニズムを明らかにするために各種観察を行なった。走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて葉の発生過程を観察したところ、アンボレラは顕著な二次形態形成は見られず、一般的な単葉型の発生であることが明らかになった。また被子植物においては、葉原基における分裂領域の分布と発生過程に沿ったその遷移がいくつかのパターンに分かれることが知られており、アンボレラにおけるパターンは不明であった。そこで S 期を経過した細胞を可視化することが可能なチミジンアナログである EdU を用いて、詳細に観察したところ、アンボレラの初期の葉原基内では一様に分裂活性が見られるものの、発生が進むにつれて原基の基部に限局することが明らかになった。この結果と SEM での観察も踏まえ、アンボレラの葉はシロイヌナズナなどで見られるような、求基的な分裂活性を持ち、顕著な二次形態形成を行なわない単葉型の葉であることを明らかにした。
3. アンボレラの葉の基本的な形態や発生過程が明らかになったため、次に茎頂および葉原基を用いた RNA-seq を行なった。具体的には、SAM+P1-P2, P3, P4, P5 といった発生段階ごとに mRNA を抽出し、RNA-seq を行なった。この RNA-seq データの詳細を確認したところ、Bharathan *et al.* (2002) において示されているような、葉原基における *KNOX1* 遺伝子群の発現抑制を確認した。さらに他の複数の解析からアンボレラを用いた RNA-seq が問題なく行なわれたことを確認した。そこでまず初めに、各発生段階における発現変動遺伝子 (DEG) を検出した。さらに共発現遺伝子ネットワークの構築とその中のモジュールの検出も行ない、アンボレラの葉における発生段階ごとのトランスクリプトームプロファイルを得ることができた。
4. これに加えて、アンボレラと同じ単葉を有し、植物において最も研究が進んでいるシロイヌナズナにおいても同様の解析を行ない、共発現遺伝子ネットワークを含むトランスクリプトームプロファイルの比較を行なった。その結果、アンボレラとシロイヌナズナでは類似した遺伝子セットが葉の発生の進行に伴って用いられていることが示唆される結果を得た。現在は、その中でどのモジュールが中心となっているのか、あるいはどの遺伝子がハブになっているのかなど、その詳細を明らかにするための解析を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakayama Hokuto, Rowland Steven D., Cheng Zizhang, Zumstein Kristina, Kang Julie, Kondo Yohei, Sinha Neelima R.	4. 巻 31
2. 論文標題 Leaf form diversification in an ornamental heirloom tomato results from alterations in two different HOMEBOX genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 4788 ~ 4799.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.08.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakayama Hokuto, Koga Hiroyuki, Long Yuchen, Hamant Olivier, Ferjani Ali	4. 巻 135
2. 論文標題 Looking beyond the gene network ? metabolic and mechanical cell drivers of leaf morphogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.259611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山北斗、塚谷裕一
2. 発表標題 現生被子植物の系統樹上で最基部に位置する <i>Amborella trichopoda</i> を用いた葉の獲得に関わる進化発生学的研究
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山北斗
2. 発表標題 京都産業大学 生命科学セミナー
3. 学会等名 Heirloom tomatoを用いた葉の形態多様性に関する研究（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hokuto Nakayama, Steven Rowland, Zizhang Cheng, Kristina Zumstein, Julie Kang, Neelima Sinha
2. 発表標題 特徴的な葉形態を示すHeirloom tomatoを用いた進化発生学的研究
3. 学会等名 日本植物学会 第83回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California, Davis		