

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21870042

研究課題名（和文） 低分子 RNA による遺伝子発現制御に着目した、
単面葉の発生進化機構の解析研究課題名（英文） Evo-devo study on unifacial leaves through the analysis of
small RNA-controlled gene expression.

研究代表者

糠塚 明 (NUKAZUKA, AKIRA)

基礎生物学研究所・植物発生遺伝学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：20546907

研究成果の概要（和文）：

被子植物の葉は、表側と裏側の両方の極性をもつ「両面葉」であることが一般的だが、単子葉植物の中には、葉が裏側だけで構成される「単面葉」をもつ種が多く存在する。本研究では、単面葉が示す特徴的な形質の発生メカニズムの解明を目的として、イグサ属植物を材料に用いた分子遺伝学的研究を行った。結果、両面葉において表側極性の獲得に必要な低分子 RNA (tasiR-ARF) の作用が、単面葉では低下していることを見出し、これが葉の単面化の主要因である可能性が示唆された。また、単面葉をもつ種から葉が表側化する新規変異体を多数単離し、将来的な順遺伝学的解析のための材料として確保した。

研究成果の概要（英文）：

In general, angiosperm leaves are bifacial, consisting of distinct adaxial and abaxial identities. By contrast, some monocot species develop unifacial leaves, whose leaf blades have only the abaxial side. How do unifacial leaves acquire this morphological trait? In this project, I have taken a molecular genetic approach in *Juncus* to unravel the mechanisms underlying this issue. Here, I demonstrate that an action of small RNA (tasiR-ARF) is misregulated in unifacial leaves, which is suggested to be causally related to their loss of adaxial identity. In addition, I have isolated multiple lines of mutants from unifacial-leaved species whose leaves are adaxialized, which can be powerful tools for forward genetic analysis in future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：植物・単面葉・発生・進化・遺伝学

1. 研究開始当初の背景

被子植物の葉は一般的に、向軸面（表面）と背軸面（裏面）とが明確に区別可能であり、このような葉は「両面葉」と呼ばれる。近年の研究から、低分子 RNA による標的遺伝子の発現制御システムが、両面葉における向背軸極性の決定要因であることが示唆されている。このような制御システムのひとつに、ARF3 と trans-acting siRNA (tasiR-ARF) との相互排他的干渉がある。tasiR-ARF は、ARF3 mRNA との高い相補的塩基配列を有する低分子 RNA で、ARF3 mRNA を分解し発現抑制する作用を示す。一方、ARF3 には葉を背軸面化させる機能があるが、予定向軸面領域では tasiR-ARF による発現抑制を受けるため、この領域の背軸面化が抑制される。実際、この排他的相互作用システムが崩壊した変異体では、葉の向背軸極性が乱れることが報告されている。

一方、単子葉植物のなかには、葉身が背軸面に相当する組織だけで構成される「単面葉」と呼ばれる葉をもつ種が多く存在する。この単面葉は、両面葉とは明らかに異なる形態を持つために、葉の向背軸極性の制御機構を解明するうえでの恰好の研究材料となりうる。さらには、単面葉がイグサ科やアヤメ科、ショウブ科、ネギ科など、単子葉植物の多くの科にまたがって見られることから、繰返し進化の機構を調べる研究に応用可能な、独自の材料ともなりうる。実際、この単面葉は 100 年以上も前から研究対象とされてきた。しかしながら、それらの研究は組織学の枠を超えておらず、単面葉の形質獲得に対しての分子遺伝学的な解析は全くなされていなかった。

近年、単面葉の研究材料としてイグサ属植物の有用性が評価されている (Yamaguchi and Tsukaya, 2007)。イグサ属植物の葉の形態は多様で、単面葉と両面葉に大別されるほか、これらの中間的な形質を示す葉をもつ種も存在する。さらには、単面葉をもつイグサ属植物である「コウガイゼキショウ」には遺伝学的解析に有利な点が備わっており、実際の解析のための基盤がほぼ整っていた。従って、単面葉がいかにして発生するのか、またいかにして進化を遂げてきたのか、という議題に対して、比較生物学的・分子遺伝学的アプローチから追跡するための研究材料として、イグサ属植物は非常に有効である。

2. 研究の目的

単面葉が示す形態的特徴、すなわち葉身が背軸面に相当する組織のみで構成されるといって極めて特殊な形質は、葉の向軸面と背軸

面とが明確に区別可能な両面葉の形質と比べて著しく異常であることから、向背軸極性の形成機構を解明するうえでの恰好の発生のモデルとなりうる。さらには、この形質がいかなる機構で繰返し進化を果たしたのかという議題は、進化論的な観点からも興味深い。

そこで本研究では、単面葉の発生および進化機構の遺伝学的背景の解明を目的とする研究を行った。なお、研究の遂行にあたっては、相互補完的な複数のプロジェクトを同時進行することによって、単面葉の発生および進化機構の全体像の解明を究極的な目標に据えた研究を展開した。

3. 研究の方法

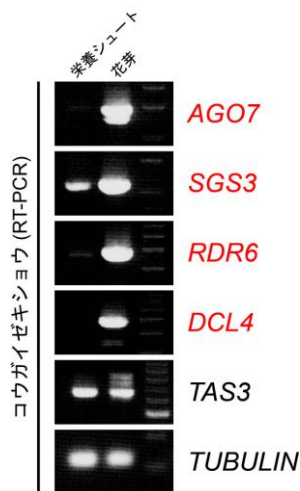
単面葉において葉身が背軸面化する遺伝学的背景を明らかにするために、逆遺伝学的解析ならびに順遺伝学的解析の、2つのアプローチを採った。

(1) 既知の情報に基づいた逆遺伝学的な研究を行った。ここでは、tasiR-ARF の生合成に必要な上流因子 (AG07、SGS3、RDR6、DCL4)、および tasiR-ARF の前駆体遺伝子である TAS3 遺伝子の各オルソログを、コウガイゼキショウ (単面葉) やマツカサコウガイゼキショウ (両面葉) を含む複数のイグサ属植物種から単離した。続いて、単面葉と両面葉の原基組織における各遺伝子の発現様式を、定量 RT-PCR ならびに *in situ* hybridization により比較検証した。さらには、これらの違いと単面葉・両面葉の形質差異との因果関係を、機能的側面から解析するための準備を整えた。

(2) コウガイゼキショウに EMS 処理を施し、葉の形態に異常を示す突然変異体を単離することによって、順遺伝学的アプローチから単面葉の発生機構の解明を目指した。

4. 研究成果

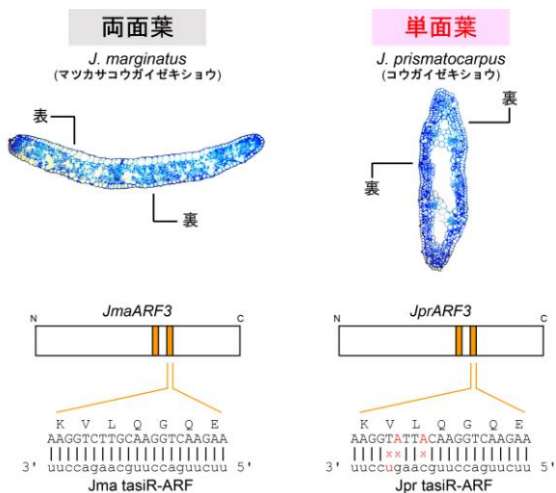
(1) コウガイゼキショウにおいて、tasiR-ARF の生合成に必要な上流因子 (AG07、SGS3、RDR6、DCL4) の発現量を定量 RT-PCR により調べた結果、花芽 (向軸・背軸の極性をもつ) ではいずれも多量に発現していたのに対し、栄養シュート (単面葉の原基組織を含む) では軒並み微量でしか発現していなかった (次項図)。従って、単面葉では tasiR-ARF の生合成の効率が悪く、tasiR-ARF の量的な作用低下が起きている可能性が示唆された。



(2) 単面葉あるいは両面葉をもつ様々なイグサ属植物の栄養シュートにおける AGO7、SGS3、RDR6、DCL4 の発現量を比較調査した結果、単面葉をもつ種では揃って各遺伝子が微量な発現にとどまっており、単面葉の進化メカニズムの一端が示唆された。

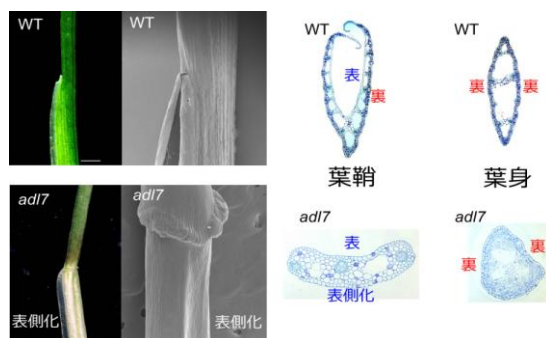
(3) in situ hybridization 法により、コウガイゼキショウの葉身では、tasiR-ARF の前駆体である TAS3 遺伝子の発現が内部組織のみに限局されている事が分かった。従って単面葉では、tasiR-ARF の作用が空間的にも制限されている事が示唆された。

(4) tasiR-ARF と ARF3 との間の相補性を、両面葉をもつ種と単面葉をもつ種とで比較した。その結果、両面葉をもつ種では両遺伝子間の相補性が高く、tasiR-ARF による ARF3 の負の発現制御が示唆された。一方で単面葉をもつ種では、両遺伝子間には相補性を低くするようなミスマッチが見られた (下図)。従って、単面葉では tasiR-ARF による ARF3 の発現抑制作用が質的にも損なわれている可能性が示唆された。



(5) 遺伝子組み換えが容易なクサイ (イグサ属: 両面葉) やイネ (両面葉) を用いて、tasiR-ARF 生合成経路遺伝子や、TAS3、および ARF3 の発現を任意に操作する株の作製に着手し、tasiR-ARF の作用の生理学的意義を逆遺伝学的アプローチから検証する準備を整えた。

(6) EMS 誘発性のコウガイゼキショウ突然変異体を、10 万ゲノム超の M2 世代株のスクリーニングを経て、多数単離した。この中には、葉が表側化するものも多く含まれており (下図の ad17 変異体など)、単面葉の発生を順遺伝学的アプローチから解析するための重要な材料として今後活用する。



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 糠塚 明, 山口 貴大, 塚谷 裕一
単面葉の平面成長における、オーキシン分布の寄与についての研究
第 52 回 日本植物生理学会年会
2011 年 3 月 21 日
東北大学 川内北キャンパス
- ② 山口 貴大, 糠塚 明, 塚谷 裕一
葉鞘が向軸側化する変異体を用いた単面葉の発生遺伝学的研究
第 52 回 日本植物生理学会年会
2011 年 3 月 21 日
東北大学 川内北キャンパス
- ③ 糠塚 明, 山口 貴大, 塚谷 裕一
単面葉の平面成長における、オーキシン濃度勾配の寄与についての研究
第 51 回 日本植物生理学会年会
2010 年 3 月 19 日
熊本大学 黒髪北キャンパス

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糠塚 明 (Nukazuka Akira)

基礎生物学研究所・植物発生遺伝学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：20546907