

論文の内容の要旨

論文題目 Study on evolutionary genetics of early morphological evolution in land plants

(陸上植物形態の初期形態進化に関する進化遺伝学的解析)

氏名 川井 絢子

第1章 General Introduction

陸上植物の初期に分岐したと考えられているコケ植物と、維管束植物の初期に分岐したと考えられている小葉類は、それぞれ特異的な形態を示す系統群であり、その形態形成の分子機構は興味深い。どのような遺伝的变化でそれらの分類群に特異的な形態が出現したのだろうか。遺伝子重複は新規機能の獲得に寄与することから、形態形成に関与する遺伝子の重複は形態の多様化に深く関わると考えられる。しかし、ある形態変化に関して、ゲノム内の多数の遺伝子の中で、どの遺伝子に注目すべきかを決定することは難しい。この問題点の解決には、研究の進んでいる被子植物において機能既知の遺伝子の相同遺伝子について、陸上植物全体で遺伝子系統樹を構築することが有効であると考えられる。

被子植物において形態形成に関与する遺伝子は数多く存在するが、本研究では植物の基本体制を作るのに重要な働きをしている遺伝子群—茎頂分裂組織の維持に重要である *Class 1 KNOX* 遺伝子と、植物ホルモンであるオーキシンの極性輸送を担うことから様々な形態形成に関与する *PIN* 遺伝子に注目し、遺伝子系統樹をベースにして初期陸上植物の形態進化におけるそれらの遺伝子の機能についての解析を行った。

第2章 コンテリクラマゴケにおける *Class 1 KNOX* 遺伝子の発現解析

コンテリクラマゴケが属する小葉類イワヒバ科には、根、茎、葉とは別に担根体よばれる第四の基本器官が存在する。この器官は、茎の分枝点に生じる軸状器官で、葉をつけず、屈地生があり、先端から根を生じる。担根体は、根の一部であるとする地上根説と、特別な器官であるとする担根体説で議論が長く続けられた。しかし、Imaichi と Kato (1989, 1991)による細胞レベルでの詳細な発生過程の観察によって担根体の発生と根の発生は明らかに不連続であることを明らかにし、担根体と根を連続した一つの器官とする地上根説を否定した。また、それによって担根体は、根、茎、葉に次ぐ第四の基本器官であると結論した。

こうした背景を受けて本研究では、担根体説の分子レベルでの検証を試みるために、コンテリクラマゴケにおける *Class 1 KNOX* 遺伝子の発現解析を行った。シロイヌナズナ *Class 1 KNOX* 遺伝子 *STM* は、茎頂分裂

組織で特異的に発現し（根端分裂細胞では発現しない）、茎頂分裂組織の維持に重要であることが知られている。

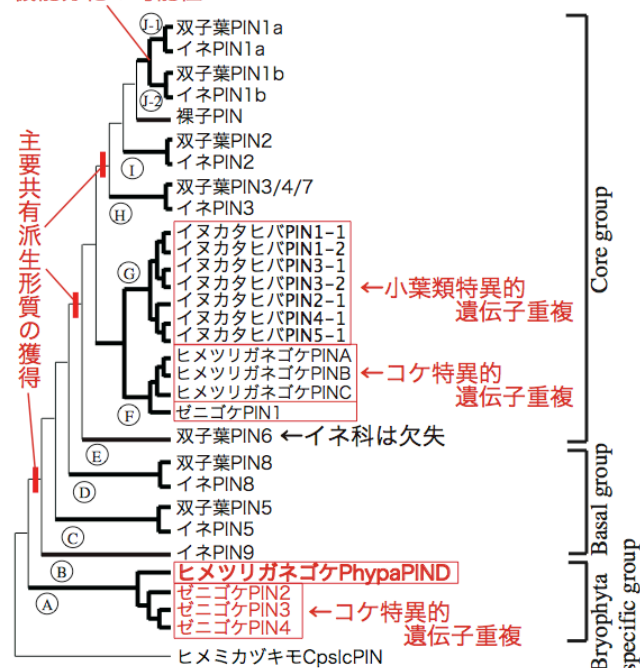
まず、コンテリクラマゴケにおいて *KNOX* 遺伝子に類似性が高い2つの配列を単離することができた (*SuKNOX1*, *SuKNOX2* 遺伝子と名付けた)。これらの遺伝子を含め *KNOX* 遺伝子の最尤系統樹を作成した結果、Class 1 *KNOX* に属するのは *SuKNOX1* 遺伝子であることが示された。*SuKNOX1* 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションと定量的 RT-PCR ハイブリダイゼーションの結果、*SuKNOX1* 遺伝子の発現は根では検出されず、茎頂と担根体先端でのみ特異的に検出された。この結果から、担根体は根とは異なる発生機構であることが示唆され、担根体は特異器官とする担根体説を分子レベルで支持した。

第3章 PIN 遺伝子の単離と陸上植物 PIN の分子系統解析

陸上植物の形態の多様化は、植物ホルモンであるオーキシンと深く関わっている。植物は、オーキシン極性輸送によりオーキシン濃度勾配を制御することで遺伝子発現調節や器官発生位置の決定を行っている。オーキシン極性輸送に重要な遺伝子として *PIN-FORMED (PIN)* 遺伝子が知られており、*PIN* の起源と多様化の解明はオーキシンの関わる陸上植物の形態の多様化の解明に大きく貢献すると考えられる。*PIN* は、全ゲノム解読が完了している双子葉植物シロイヌナズナで8個、単子葉植物イネで12個、小葉類イヌカタヒバで5個、コケ植物ヒメツリガネゴケで4個存在し、緑藻植物クラミドモナスとボルボックスなどには存在しないといわれている。これまで、*PIN* の起源は不明であり、また、十分な系統解析は行われていない。

本研究において、陸上植物に近縁である単細胞車軸藻類ヒメミカツキモの完全長 EST データベースにおいて *PIN* 類似配列を見だし、得られた配列を元にヒメミカツキモ *PIN (Cps1cPIN)* の完全長 cDNA とゲノムの単離に成功した。また、ヒメツリガネゴケ *PIN(PhypaPIN)* においても、新規な *PhypaPIN* 配列をヒメツリガネゴケ完全長 EST データベースで見だし、cDNA とゲノムを単離した。これら *PhypaPIN* と *Cps1cPIN* の exon-intron 構造をシロイヌナズナ *PIN(ArathPIN)* と比較した結果、どちらも *PIN* family に属する遺伝子であることが示された。さらに、遺伝子単離の報告例のなかった裸子植物においても、イチョウとクロマツから *PIN* の cDNA を単離した。*Cps1cPIN* を外群に用いて陸上植物 *PIN* の最尤系統樹を構築した結果、高い bootstrap 値により支持された11個のグループからなることが示唆された（下図）。しかし、グループ間の bootstrap 値は低く、*PIN* グループ間の系統関係は結論が出なかった。そこで、アミノ酸モチーフの比較を行い、モチーフ比較の結果と *PIN* 系統樹の結果とを比較し、

機能分化の可能性



モチーフ比較の結果と *PIN* 系統樹の結果とを比較し、*PIN* の系統関係を検討した。その結果、幾つもの共有派生形質の存在が明らかとなり、アミノ酸配列を基にした *PIN* 系統樹 (図) において支持の低かった枝が、主要なモチーフの有無により強化された。遺伝子の機能推定など、さらなる研究に用いることができるより強固な *PIN* 系統樹の構築に成功したと考えられた。*PIN* 系統樹の結果、主要な共有派生形質の存在が見つかり、3つのグループ (コケ植物、小葉類、裸子植物、被子植物を含んでいる "Core"、基部に位置する "Basal"、コケ植物特異的な "Bryophyta specific" グループ) に大別できることが分かった。*PhypaPIN* は他の3個の *PhypaPIN* と分かれて3個のゼニゴケ *PIN* とグループとなった。また、系統樹の基部に位置した (図中 A、Bryophyta

specific group)。このことから、*PhypaPIND* はコケ特異的な機能に関わる可能性が考えられた。

第4章 ヒメツリガネゴケにおける *PIN* 遺伝子の解析

コケ植物は配偶体世代が優占し、孢子体世代は配偶体世代に従属している。孢子体は分枝せず、側生器官も持たないコケ植物特異的な形態である。ヒメツリガネゴケは遺伝子ターゲティングが容易なモデル植物である。第3章における *PIN* 最尤系統樹の結果 (図) から、初期に分岐した *PhypaPIND* に注目した。*PIN* の最尤系統樹 (図) において、維管束植物には *PhypaPIND* グループに属する遺伝子は存在しない。このことから、*PhypaPIND* の機能を解明することは、コケ植物特異的な形態形成との関わりが明らかになるのではないかと考えた。

半定量的 RT-PCR と real time PCR を用いた発現解析の結果、*PhypaPIND* は孢子体成熟期において、孢子体と茎葉体茎頂で強く発現していることが分かった。機能解析を行うために *PhypaPIND* 遺伝子欠損株を作出した。表現型観察の結果、形態異常は検出できなかったが、孢子体成熟期において、孢子体と茎葉体の合着が弱くなる個体の出現頻度が2倍増えることが明らかとなった。さらに、孢子体成熟期における SEM 観察において、*PhypaPIND* 遺伝子欠損株は、茎葉体と合着している孢子体フットの細胞表面がやや滑らかであった。以上の結果から、完全な機能欠損は示されなかったものの、*PhypaPIND* は孢子体の茎葉体への従属に関わる可能性が示された。*PhypaPIND* の獲得は、コケ植物において孢子体の陸上適応に関わると考えられる。さらに、*PhypaPIND* とオーキシン輸送との関係を調べるために、オーキシンに応答して GUS 活性を示す GH3:GUS 株において *PhypaPIND* 遺伝子欠損株を作出した。GUS 染色による表現型観察の結果、孢子体が合着する茎葉体の *vaginula* 組織の一部において、GUS 染色に変化が生じた。このことから、*PhypaPIND* はオーキシン輸送に関わる可能性が示され、オーキシンと *PIN* を介したメカニズムがコケ植物と維管束植物の祖先の段階で既にあったことが示唆された。また、完全な機能欠損が示されなかったことから、*PhypaPINA*、*PhypaPINB*、*PhypaPINC*、またはオーキシン輸送に関わる MDR/ABCB/PGPs や AUX1/LAX 遺伝子による機能相補の可能性が考えられた。

第5章 General Discussion

第2章では、*KNOX* 遺伝子系統樹の結果に基づいて、*SuKNOX1* 遺伝子は *Class 1 KNOX* 遺伝子であることが推定できた。このことは、*SuKNOX1* 遺伝子が茎頂で発現し、根では発現しない可能性を示す。実際の *SuKNOX1* 遺伝子発現解析の結果は、推定と一致した。さらに、担根体頂端においても発現が検出されたことから、担根体は根とは異なる器官とする担根体説を遺伝子レベルで支持することができた。第3章と第4章では、*PIN* 遺伝子系統樹の結果に基づいて、*PhypaPIND* 遺伝子はコケ植物特異的な機能を持つ可能性が推定されたことから、*PhypaPIND* 遺伝子の機能解析を行った。その結果、系統樹で推定された通り、*PhypaPIND* 遺伝子はコケ植物特有な組織で機能する遺伝子であることが示唆された。第2章、第3章、第4章から、遺伝子系統樹ベースで遺伝子の機能を解明して行くといったアプローチは、機能既知遺伝子に基づいた機能遺伝子の選択の為のみならず、系統群固有の機能遺伝子の選択においても有効であることが示唆され、先行研究の少ない系統群における遺伝子の機能解析において特に有効な手法であることが示された。今後、このようなアプローチによって、陸上植物初期に派生した系統群の形態形成機構を解明していきたいと考えている。さらに、陸上植物に近縁である車軸藻類ヒメミカヅキモとシャジクモの EST データベースにおいて、複数の *PIN* 類似配列を見いだすことに成功している。車軸藻類においても、遺伝子系統樹ベースで解明して行くといったアプローチの有効性について検討していき、陸上植物の形態形成機構の解明に役立てたいと考えている。