

論文内容の要旨

論文題目 Evolutionary developmental studies on morphogenesis of phylloclade
in the genus *Asparagus*.

(アスパラガス属植物における擬葉に関する進化発生学的研究)

氏名 中山 北斗

【序論】

現在の地球上には、知られているだけでも 30 万種とも言われる程に多様な陸上植物が存在し、その形態の多様性はシュート構造の多様性と言い換えることができる。近年の発生学および分子遺伝学の進展により、シュートの形態形成機構は、特に精力的に研究が進められており、モデル植物で得られた知見をもとに、生物の多様性や進化の過程を遺伝子レベルで明らかにしようとする進化発生学 (Evolutionary Developmental Biology: Evo-Devo) が、現在注目を集めつつある。

アスパラガス属植物は葉が鱗片状に退化し、本来は側枝が発生する葉腋の位置に、擬葉と呼ばれる葉状器官を形成する。擬葉は光合成器官としての役割を担っており、形態上だけでなく、生理学的にも葉との類似点を有する。擬葉は、その分子遺伝学的背景はおろか、詳細な発生過程も未だ明らかとなっていない。属内において、その形態は多様化しており、アスパラガス属の擬葉は、植物におけるシュート構造の多様化の過程を、発生学および進化的観点から明らかにすることが可能な良いモデルであると考えられる。

そこで本研究では、特異なシュート構造である擬葉の発生、およびその多様化機構の理解を目的として研究を行った。まず、擬葉の基本的な発生を理解するために、属内の系統関係で基部に位置する *Asparagus asparagoides* を解析に選び、属内の擬葉形態の多様化を理解するために擬葉の形態が棒状の *A. officinalis* も用いた。これら 2 種を、解剖学的、発生学的、および分子遺伝学的手法を用いて比較解析することにより、上記の問題解決に挑んだ。

【結果および考察】

1. アスパラガス属の擬葉は葉の形態形成遺伝子の異所的発現により葉状化し、属内の擬葉形態の多様化は背腹性関連因子の変化を伴った進化を含む

アスパラガス属植物は葉が退化し、葉腋の位置に擬葉と呼ばれる葉状の器官を有する。*A. asparagoides* の擬葉の外部形態は、葉と同様の背腹性を有するように見える。背腹性は葉を特徴づける形質のひとつであり、それは内部構造や維管束の配置により定義されるものである。擬葉の背腹性を含めた内部構造を理解するために、

樹脂切片を用いて観察した。

その結果、*A. asparagoides* の擬葉では、向軸側に柵状組織様の細胞層がみられ、背軸側には海綿状組織様の細胞層が観察された。また維管束に着目すると、木部が背軸側、師部が向軸側に存在し、一般的な葉の維管束形態とは異なっていた。一方、擬葉の形態が棒状の *A. officinalis* では、背腹性は確認されなかった。

以上のことから、*A. asparagoides* の擬葉は解剖学的に背腹性を有していることが明らかとなった。また、擬葉は独自の内部構造を有し、茎、あるいは葉の構造とは異なることも示唆された。

次に、葉状の形態を呈する擬葉の発生を理解するために、擬葉の形態形成に関連する可能性がある遺伝子のオーソログを単離し、発現解析を行った。解析に用いた遺伝子は、茎頂分裂組織 (SAM) の形成・維持に関わる *KN1* および *STM*、これまでに知られている葉の形態形成ネットワーク中でも上位に位置する *AS1*、葉の向軸側の細胞運命を促進する *PHB* および *REV*、葉の背軸側の細胞運命を促進する *ARF3* および *miR166*、単子葉類のイネにおいて葉の厚さ方向への細胞増殖を制御することが知られている *DL* である。これらのオーソログの全長を単離し、擬葉原基での発現を確認した。

その結果、*AaKN1* および *AaSTM* の発現が擬葉原基で確認され、擬葉原基は茎頂分裂組織のアイデンティティを有していることが示唆された。また、本来、発生中の葉でのみ発現がみられる *AaAS1* の発現も、擬葉原基で確認されたことから、同時に葉のアイデンティティも有している可能性が示唆された。擬葉は、その発生位置から側枝の変形であるという解釈があり、近縁属のシュート構造との比較および今回の結果から、その起源は側枝であり、葉状の形態は、葉形態形成遺伝子の側枝における異所的発現が要因であることが示唆された。さらに、葉の向背軸の確立に関わると考えられる因子群の発現も確認されたことから、擬葉の背腹性は、これまでのモデル植物で報告されている背腹性関連因子の発現により、付与されたものであることが示唆された。興味深いことに、*AaDL* は葉において発現するものの、擬葉では発現が確認されなかった。このことから、葉において発現する遺伝子の全てが、擬葉において発現するわけではないことも示唆された。

以上のことから、擬葉はその進化の過程で、葉の形態形成における遺伝子ネットワークの一部が側枝において異所的に発現することで、葉状の形態を獲得した可能性が高いと考えられた。

一方、アスパラガス属内で擬葉の形態は多様である。その中でも棒状の擬葉を有する *A. officinalis* は、内部構造の観察から解剖学的に背腹性を有していないことが確認された。属内の系統樹上において、*A. officinalis* は *A. asparagoides* よりも派生的な位置に属する。このため、上記の結果より、*A. asparagoides* から *A. officinalis* への進化の過程で、背腹性関連因子に何らかの変化が起きた可能性が考えられる。そこで、*A. officinalis* を用いて背腹性関連因子を単離し、発現解析を行った。

その結果、向軸側因子の *AoPHB* および *AoREV* は、*A. asparagoides* で確認されたような特徴的局在が観察されなかったが、背軸側因子の *miR166* は擬葉の最外層全縁で発現していた。

以上のことから、*A. officinalis* の擬葉は全て裏側のアイデンティティを有しており、背軸側化していることが明らかとなった。これにより、属内における擬葉の形態の多様化は、背腹性関連因子の変化を伴った進化を含むことが示唆された。

2. *CRABS CLAW* 相同遺伝子である *AaDL* の発現は、単子葉植物において *CRC/DL* 型 *YABBY* 遺伝子が段階的に進化したことを示す

CRC/DL 型 *YABBY* 遺伝子は機能的に多様化した、植物特異的な転写因子である。真正双子葉類のシロイヌナズナでは心皮原基の背軸側で発現し、心皮形成の他に、蜜腺での機能も有する。一方、単子葉類のイネでは心皮原基全体で発現し、心皮の器官アイデンティティの確立の他に、葉の中肋形成の機能も有する。近年、その祖先的な機能は、心皮における細胞増殖の促進であることが示唆されている。この

ため、CRC/DL型 YABBY 遺伝子は心皮での機能がある程度保持しながら、各系統群で新規機能を獲得した興味深い遺伝子群である。しかしながら、イネで報告されている心皮原基全体での発現の獲得、あるいは葉の中肋形成に関わる新規機能の獲得の過程の詳細は未だ明らかとなっていない。また、蜜腺での機能の一般性についても不明な点が多い。アスパラガス属は単子葉類の系統関係において、イネ科に比べて基部に位置し、心皮合生雌蕊内に septal nectary と呼ばれる蜜腺を有する。そこで、単子葉類における CRC/DL 型 YABBY 遺伝子の進化の一端を明らかにすることを目的として、*A. asparagoides* を用いて解析を行った。

その結果、*A. asparagoides* の心皮では、原基の背軸側で発現が確認され、心皮での発現パターンはシロイヌナズナ CRC の特徴を有していた。また、葉の師部における発現も確認されたが、イネで報告されている発現パターンとは異なっていることが明らかとなった。さらに、Septal nectary での発現は見られないことも明らかにした。

以上のことから、イネで報告されている心皮原基全体における発現は、アスパラガス属の分岐以降に獲得したこと、一方、葉での発現は同属の分岐以前に獲得していたことが示唆された。また、蜜腺形成における CRC/DL 相同遺伝子のリクルートは、単子葉類の分岐以後、真正双子葉類のみに起きている可能性が示唆された。これらの結果は、シロイヌナズナとイネの間で見られる CRC/DL 型 YABBY 遺伝子の機能分化は、一度の変化で起きたわけではなく、それぞれの系統群の進化の過程において、段階的に変化した結果であることが、強く示唆された。

【結論】

本研究により私は、側枝の位置に発生し、葉状の形態を呈するアスパラガス属の擬葉は、葉の形態形成遺伝子群が異所的に発現していることを明らかとした。この結果、擬葉の葉状の形態は、これらの発現によるものであることが示唆された。これは、擬葉が側枝の変形であるという解釈を、遺伝学的に支持する結果である。また、属内の擬葉の形態の多様化に関して、*A. officinalis* では *A. asparagoides* と比べた場合、背腹性関連因子の変化により、擬葉が棒状化した、ということを示唆する結果を得た。

以上の結果から、擬葉という独自の器官は、新規の遺伝子を用いるのではなく、既存の遺伝子ネットワークを利用することで生じ、加えてそれに変化が起きることで多様化したことが強く示唆された。また、特徴的な転写因子群の進化における重要な知見が得られたことから、アスパラガス属は、単子葉類の進化や、遺伝子機能における考察を行う上で、非常に有用な植物群であると言える。