

アサガオゲノムの解析

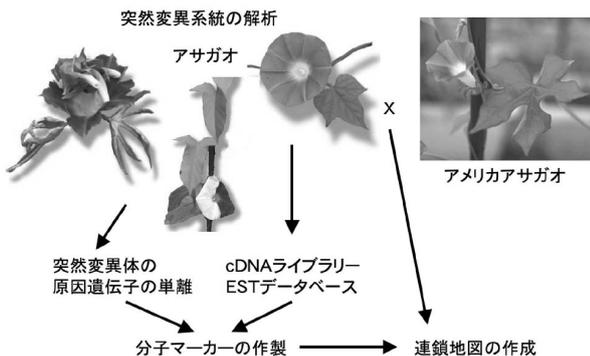
●仁田坂 英二¹⁾ ◆飯田 滋²⁾

1) 九州大学大学院理学研究院 2) 基礎生物学研究所

〈研究の目的と進め方〉

アサガオ (*Ipomoea nil* または *Pharbitis nil*) は、日本独自の園芸植物であり、江戸時代後期に花の色や模様だけでなく、花や葉の形態に関しても数多くの自然突然変異体が単離され現在まで保存されている。さらに大正から昭和初期にかけて、アサガオを用いた古典遺伝学的研究が我が国で盛んに行われ、多くの知見が集積している。また戦後、日長条件に鋭敏に反応する短日植物であることから植物生理学において、花成（花芽形成）機構についての研究も行われてきた。現在盛んに研究に用いられている、シロイヌナズナやキンギョソウなどの双子葉植物と比べて、アサガオは蔓性草本である点や、短日植物である点など大きく異なる特徴がある。また、高い自殖性を示すことや、世代時間も比較的短い、遺伝子解析に用いることができる転移活性の高い内在のトランスポゾンの存在など、次世代のモデル植物として様々な可能性を秘めている。そのため、本研究の目的は今後の分子生物学的研究の基礎となるようなアサガオのゲノム解析を行うことにある。

我々のグループは既に、アサガオの自然突然変異体の大部分は、En/Spm (CACTA) 類縁の Tpn1 (Transposable elements of *Pharbitis nil* one) ファミリーに属するトランスポゾンの挿入によるという事を見出している。したがって、この挿入を利用した、突然変異体の原因遺伝子の単離・解析が可能である。また、戦後、国立遺伝学研究所によって収集された突然変異系統は長い間種子の更新は休止しており、詳細な系統ごとの記録等は行われていなかったが、現在では、九州大学に移管し保存しているため、これらの詳細な解析を行う。連鎖地図に関しては、戦前の遺伝学的解析に基づいた連鎖地図が作成されているが、15連鎖群のうち、10群の不完全なものしか作成されておらず、今後のゲノム解析の使用に耐えうるものではないため、分子マーカーを含めた詳細な連鎖地図の作成を行う。また、転写されている遺伝子を網羅的に解析するために、各種組織からcDNAライブラリーを作製し、EST配列の決定、およびそのデータベースの構築を行い、この配列を遺伝子クローニングや分子マーカーの設計等に利用する。



〈研究開始時の研究計画〉

1) 突然変異系統の解析

江戸時代から保存されてきたアサガオの突然変異体の多くはTpn1ファミリーの挿入によって誘発されていると考えられるため、トランスポゾンの挿入を指標にした遺伝子クローニングや、遺伝学的解析の材料として非常に貴重である。これまで保存されてきた系統の個々の特性等は明らかではないため、そのため、種子の更新や突然変異系統の系統情報の記録、交配実験による遺伝学的解析や分子マーカーによる系統解析を行う。また新規変異体の単離やその解析も行う。

2) 突然変異体の原因遺伝子の単離・解析

アサガオには江戸時代から保存されている花色や模様、花型や葉型に関する興味深い変異体が多数存在する。これらの原因遺伝子を明らかにすることで、花色の発現機構や形態形成機構についての新たな知見が得られることが期待される。突然変異体の原因遺伝子を単離するための方法として、変異体の多くがTpn1ファミリーに属するトランスポゾンによって誘発されていると考えられることから、Tpn1ファミリーの共通末端配列を利用した簡易トランスポゾンディスプレイ (STD) 法を用いる。

他の方法として、シロイヌナズナ等のモデル植物で既に明らかになった変異体と類似のアサガオの変異体の原因遺伝子を、シロイヌナズナの同祖遺伝子を4) のESTデータベース等も利用して単離し、突然変異体における転写量や3) の連鎖地図上の位置に基づいて同定する。

またツールとして用いているトランスポゾン自体もゲノムの構成に種々に影響を与えていると考えられるため、トランスポゾンの構造や転移機構についても研究する。

3) 連鎖地図の作成

アサガオの近縁種であるアメリカアサガオ (*Ipomoea hederacea*) と交配したF₂展開系統を用いて、AFLPマーカー新規に単離した遺伝子やEST配列からPCRベースの分子マーカーを作製し、これらを元にして15連鎖群からなる詳細な連鎖地図を作成する。この地図は2) の突然変異体の原因遺伝子の同定にも利用する。

4) ESTデータベースの構築

各器官で発現している遺伝子を網羅的に解析する目的で、均一化・完全長cDNAライブラリーを幼植物で作製し、これらの塩基配列決定を行い、ESTデータベースの構築を行う。特に、形態だけでなく、花色に関与するアントシアニン生合成系の遺伝子が発現している未熟蕾と幼植物から抽出したmRNAを材料に用いることを考えている。

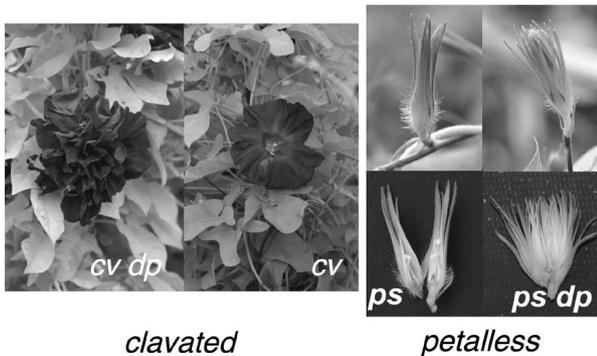
〈研究期間の成果〉

1) 突然変異系統の解析

国立遺伝学研究所が保存していた種子は1991年以降更新されておらず、詳細が不明な系統も多かったため、毎年度栽培し、記録、交配実験や遺伝子構造解析による遺伝子型の同定などを進めた。その結果、少なくとも遺伝研から移管した系統についてはほとんど記録を終えるこ

とができた。これらの成果は文献9)にも記載している。また2002年度よりナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)に採択されたため、この項目について、系統の開発等以外は、以後はNBRPで行うことにした。

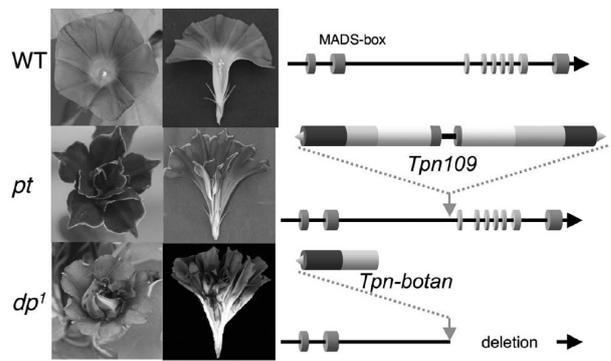
新規突然変異体誘発実験として、野生型系統である、東京古型標準型(TKS)系統をEMS処理し、約50,000本の植物体について、突然変異体のスクリーニングを行ったが、分裂組織の壊死が多く観察され、変異原は有効に作用していると考えられたが、可視変異体の出現頻度は比較的効率が低かった。また既存のアサガオ系統は内在のTpn1ファミリーの転移活性の高い系統があり、系統維持の過程で、自然突然変異体が分離してくる。例えば、分裂組織の制御に関わるシロイヌナズナのCLAVATA経路と同様の変異体である、吹詰(ふきつめ:clavated; cv)、B機能MADS-box遺伝子の変異体だと考えられる無弁花(petalless; ps)、重力感受性に異常を示す枝垂2(weeping2; we2)が得られた。他にも新規花色変異体やマルバアサガオの八重咲変異体(flora pleno; fp)など様々な新規自然突然変異体を得られ、これらについて既存の変異体との対立性等の解析を行った。



2) 突然変異体の原因遺伝子の単離・解析

花弁数を増やすために多くの系統に導入されている牡丹(duplicated; dp)の原因遺伝子は、その表現型から、アラビドプシスのagやキンギョソウのpleの同祖遺伝子の変異体だと考え、突然変異体の同祖遺伝子の構造を解析した。その結果、原因遺伝子であるDP遺伝子に、部分的に欠失したトランスポゾンの挿入が見られ、このトランスポゾンが転移する際に近傍のゲノム領域も欠失させた構造をしていた(文献7)。また、これ以外にも2つのdp突然変異遺伝子(対立遺伝子)の構造を明らかにしたが、いずれもゲノムの欠失を伴うものであった。牡丹よりも弱い八重咲きの表現型を示す、八重咲(petaloid; pt)変異体のゲノムの構造を解析した結果、ptはこれまで別遺伝子座だと思われていたが、同じDP遺伝子に完全な形のTpn109トランスポゾンが挿入しており、この挿入によって転写量は減少しているが、野生型の転写産物も有る程度作られているために弱い突然変異表現型を示すと考えられた。またptとdp変異体に挿入しているトランスポゾンの構造から、江戸時代にまずpt変異が出現し、挿入しているトランスポゾンが不完全に離脱する際にゲノムの欠失を起こしたために強い表現型のdp変異が出現したことを明らかにすることが出来た(投稿準備中)。

アサガオにはブラシノステロイド生合成に関与すると考えられる変異体が複数存在し、その一つ渦小人と呼ばれる系統がある。東京大学の鈴木らとの共同研究で、この原因遺伝子はやはりブラシノステロイド生合成経路に関わるPnDET2遺伝子に突然変異を持っていた(文献6)。その後の解析で、この渦小人とよばれる変異体は、渦



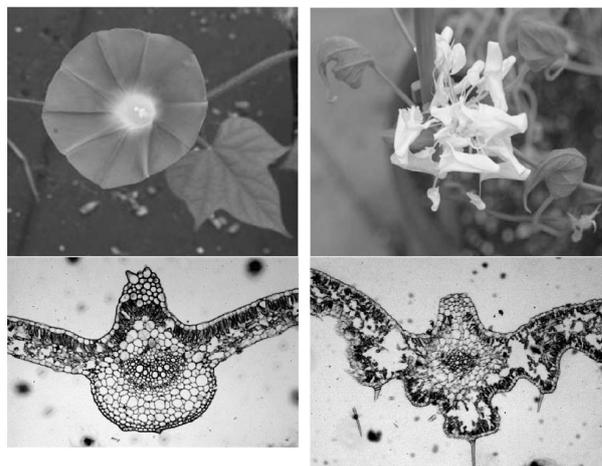
花のホメオティック変異体におけるDP遺伝子の構造

(contracted; ct)と桔梗渦(star; s)の2重変異体で、後者の変異体にPnDET2が相当することを明らかにした。

アサガオには葉の幅が減少する変異体が複数存在し、その原因遺伝子は、同様の表現型を示すシロイヌナズナのanに対応している可能性が考えられる。基生研の塚谷との共同研究でアサガオの同祖遺伝子(IAN)を単離した結果、対応するものはなかったが、このアサガオのIANは部分的にシロイヌナズナのan変異体を相補したため、機能的に分化していることを明らかにした(文献3)。

アサガオには他の花卉園芸植物と比較しても非常に多様な色彩変異が知られており、これらはアントシアニン合成系で発現している酵素遺伝子や転写因子である。これらのうち、突然変異体では花が暗色になるdusky変異体の原因遺伝子、3GGTおよび、白花になるc-1およびcaの原因遺伝子である転写因子を明らかにした(文献1, 2)。

前述のように、他の植物で既に解析された遺伝子との相同性を利用する方法の他に、アサガオで固有に転移しているTpn1ファミリーの末端配列を利用した、トランスポゾンディスプレイ法の一つである、STD法による遺伝子クローニングも試みた。獅子(feathered, fe)突然変異体は葉は裏側を表にしたように抱え、花冠は裂けて強い変異体では先端が折り返したチューブ状の花弁となる。形態学的にその原因を探るため、葉の表皮組織を観察したところ、野生型では気孔は主に葉の裏側(背軸側)に分布しているのに対して、獅子変異体では裏側の気孔数が減少していた。また、獅子変異体の葉の切片を作製して観察したところ、葉の裏側において、本来発達する海綿状組織がなくなり、表側に発達する柵状組織が発達していた。そのため、獅子突然変異体では、裏(背軸)側が表(向軸)側化していることが明らかになった。花弁についても細胞の形態から同様の傾向が見られる。



野生型

獅子(fe)

獅子変異体は比較的安定であるが、体細胞突然変異を起し、途中から野生型に復帰した株を見いだした。アサガオの変異体のほとんどに挿入していると予想されるトランスポゾンTpn1ファミリーの末端配列を利用し、AFLP法を改変したSTD法によって獅子突然変異体と復帰した野生型のTpnコピーの差がある部分を検出し、獅子遺伝子のクローニングに成功した。獅子遺伝子は、シロイヌナズナにおいて、側生器官の裏側で発現し、背軸側の特徴を決定しているのKAN1遺伝子ともっとも高い相同性を持っており、これは表現型の観察結果と一致した。また、獅子変異体では、挿入していたTpn102トランスポゾンと融合した転写産物が作られており、これが野生型の産物に対して、Dominant-Negativeに働くことで獅子変異体は優性を示すのかもしれない(投稿中)。ゲノム構造の解析や交配実験から強い表現型を示す系統は獅子変異に加えて別の突然変異による多重変異体である証拠が得られた。現在維持されている強いfe系統を野生型と交配して分離実験を行ったところ、弱いものから元の系統同様に強い変異体、またその中間型が分離した。この分離比から、葉と花に関わる主要な修飾変異がそれぞれ1つ存在すると推定した。また、他の実験植物で明らかになっている向背軸の形成に関与する遺伝子のfe変異体における転写量を解析したところ、CRC (CRABS CROW)転写量が顕著に減少していたため、修飾変異の1つがこのCRCに対応する可能性があると考えて、引き続き解析を行っている。

アサガオで主に突然変異を起しているTpn1ファミリーは両末端に共通な配列を持つ、トウモロコシのEn/Spmなどに類似のトランスポゾンであり、コピー数はゲノムあたり500-1000と非常に多数存在する。この構造を網羅的に解析するため、130クローンの構造を分類したところ、少なくとも22タイプに分類することができ、ほとんどのコピーが内部にアサガオの遺伝子を取り込んだ特殊な構造をしていた(文献5)。またこれらのTpn1ファミリーの転移活性は非常に高いが、その転移を制御している転移酵素をコードしている自律型因子はこれまで見つかっていなかった。しかし多くのTpnの3'側に共通のエクソンが存在するため、このエクソンと他のEn/Spmスーパーファミリーで保存されている配列を用いて、自律型の転写産物と、ほぼ自律型だと考えられるTpnのコピーの単離に成功した。

アサガオの近縁種である、マルバアサガオ(*Ipomoea purpurea*)のノースカロライナの野外集団から得られた八重咲き変異体(*flora pleno*; fp)の原因遺伝子を解析した結果、やはりアサガオのDP遺伝子の同祖遺伝子にトランスポゾン(Helip1)の挿入があった。このトランスポゾンは近年のゲノム解析において、その存在が明らかになってきたHelitronとよばれるローリングサークル型複製をされると考えられる特殊なトランスポゾンで、稀に復帰変異体が出現することからこのマルバアサガオのHelip1は全ての生物を通じて唯一転移可能なHelitronであることが明らかになった。

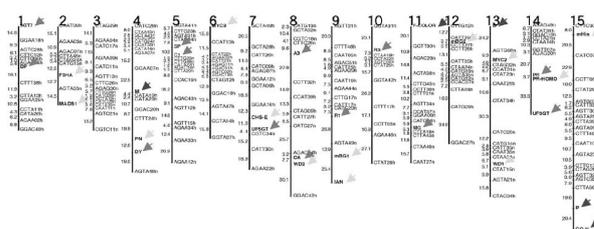
3) 連鎖地図の作成

今後、アサガオを用いてゲノム解析を行っていく上でも、連鎖地図は非常に重要な情報である。これまで利用されているアサガオの連鎖地図(古典地図)は、戦前の遺伝学的解析に基づいたものであり、15連鎖群のうち、10群のしか作成されておらず、そのうちの5群には2, 3の表現型マーカーしか座乗しておらず、甚だ不完全なものである。そのため、近年発達している、各種分子マーカー



fp変異体

ーを利用した連鎖地図作成を行った。材料としては、アサガオの近縁種であるアメリカアサガオ(*Ipomoea hederacea*)とアサガオ系統を交配したF₂展開系統のゲノムDNAについて、まずフレームワークとなるような400ほどのAFLPマーカーを作製し、これらによるマップを作成した。その結果、染色体数から予測されるように15の連鎖群に分けることが出来た。この地図に、新規に単離した遺伝子やEST配列からPCRベースの分子マーカーを作製し、付け加えていくことを行った。また地図の作成に関して、古典地図との整合性もできるだけ維持するようにした。この地図と古典地図を比較すると、古典地図には本来違う連鎖群を結合している部分が存在することが明らかになった。また、他の植物で同定されている遺伝子の同祖遺伝子の位置と古典地図の一致を利用して、2)の突然変異体の原因遺伝子の同定にも利用することができる。2002年度よりナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)に採択され、提供系統の質的向上に用いる分子マーカーの利用に伴い、この地図の作成も認められたため、研究機関後半ではこの項目についての研究は行っていない。



4) ESTデータベースの構築

将来的なアサガオのモデル植物としての利用を考えた際に、ゲノムはもとより、その転写ユニットの網羅的解析は欠かすことができない。我々は形態形成変異体のみならず、アントシアニン合成など花色素に関する変異体の解析も行っているため、これらの遺伝子が発現していると予想される、アサガオの蕾および、幼植物の完全長・均一化cDNAライブラリーを、一部理化学研究所との共同研究で作製した。完成したこれらのcDNAについて、国立遺伝学研究所の小原のグループと共同で配列決定を行い、蕾については13,000クローン、幼植物については20,000クローンの両末端配列を決定し、公的データベースに公開した。これに加えて独自に配列決定を行い合計

48,300クローンの配列を得て、これらについて相同な植物遺伝子配列の検索等を行い、ESTデータベースを構築した。アントシアニン合成に関する既知の遺伝子を検索した結果、ほとんどの遺伝子が含まれており、形態形成に関しても多くの遺伝子が含まれていた。これらの配列を元に分子マーカーの設計等も行った。

〈国内外での成果の位置づけ〉

国外にもアサガオをもちいた研究を行っている研究者はいるが、多くが近縁種のマルバアサガオを用いており、また多くが進化、生態学的興味に基づいて研究を行っている。そのため、国内外を通じて、我々のグループのように潤沢なアサガオのリソースを保有、遺伝学・分子生物学ないしはゲノム学的な興味から研究を行っているグループは皆無であり、ESTデータベースや単離された遺伝子についても初めてのものである。

本研究を通じて得られた成果は、まだ公表準備中のものも多く含まれているが、これらの成果は今後アサガオを用いて研究を行う研究者のみならず、植物科学者に大いに影響を与えることが予想される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

突然変異体の原因遺伝子を同定する過程において、他の植物で機能が知られている遺伝子と相同なアサガオ遺伝子の転写量解析を行ったが、系統や形態による転写量の幅が大きいことと、原因遺伝子とその経路の他の遺伝子の転写量に影響を与える場合があることから、原因遺伝子の同定を困難にしている。そのため、多少手間はかかるが、候補遺伝子と突然変異形質をそれぞれ連鎖地図上に位置づける方法や、候補遺伝子と野生型の塩基の違いと表現型の連鎖を調べる方法が結局は確実だと考えている。

またSTD法を様々な変異体について適用しているが、今回のfe遺伝子の同定の成功の鍵となったのはやはり明確な復帰変異体とその分離系統であり、このことをふまえて、立田(m)遺伝子など、非常に興味深い変異体であるが遺伝子の候補領域が絞りきれなかったものも、再度復帰変異体由来の系統を作製している。STD法によるクローニングでは得られるDNA断片が短いものが多く、特定のゲノムクローンを得るためのプローブとしては不十分な場合が多かった。そのため、Vectorette-PCR法によって近傍のゲノム領域まで延長したプローブを作製し利用することで解決した。

〈今後の課題〉

本研究では、既存の変異体の原因遺伝子の同定を主にを行った。しかしアサガオという植物の特性についての変異体の解析を行うことで、より材料の特徴も引き出せると考えている。例えば、蔓性植物ということを生かした巡回性、日長感受性(短日性植物)、花卉の老化(一日花)などである。このような形質についての新規変異体を単離するために、一般的な化学突然変異原をもちいることも考えられるが、トランスポゾン指標にしたクローニングの容易さを考えると、内在のTpn1ファミリーを用いた方法をもちいることを考えている。またコピー数が多いため、誘発効率も格段に高いことが予備的実験から明らかになった。

アサガオや、その近縁種には内在の活性のトランスポゾンが存在することも特徴の一つであり、特に我々がマルバアサガオの八重咲き変異体fpに挿入していたHelip1は、ヒトをはじめとする多くの生物に存在するヘリトロン

の中で唯一転移する系であり、今後このHelip1の解析を通して、普遍的に存在するヘリトロン転移機構や存在意義等を明らかにしていきたいと考えている。またこれまでその実体が明らかでなかったTpn1ファミリーの自律型因子の候補も単離できたため、このトランスポゾンの転移機構の解明も進めていきたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング

1.

Morita, Y., Saitoh, M., Hoshino, A., Nitasaka, E. and Iida, S., Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH, and WDR transcriptional regulators and identification of c and ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol.*, in press(2006)

2. 0505071849

Morita, Y., Hoshino, A., Kikuchi, Y., Okuhara, H., Ono, E., Tanaka, Y., Fukui, Y., Saito, N., Nitasaka, E., Noguchi, H. and Iida, S., Japanese morning glory dusky mutants displaying reddish-brown or purplish-gray flowers are deficient in a novel glycosylation enzyme for anthocyanin biosynthesis, UDP-glucose:anthocyanidin 3-O-glucoside-2nd-O-glucosyltransferase, due to 4-bp insertions in the gene. *Plant J*, 42, 353-363 (2005).

3. 0505071859

Cho, K. H., Shindo, T., Kim, G. T., Nitasaka, E. and Tsukaya, H., Characterization of a member of the AN subfamily, IAN, from *Ipomoea nil*. *Plant Cell Physiol.*, 46, 250-255 (2005).

4. 0505071905

Harada, K., Okaura, T., Giang, L. H., Van, H. N., Iwasaki, M. and Nitasaka, E. (2005) A novel microsatellite locus isolated from an AFLP fragment in the mangrove species *Kandelia obovata* (Rhizophoraceae). *J Plant Res*. 118: 49-51 (2005).

5. 0408112103

Kawasaki, S. and Nitasaka, E., Characterization of Tpn1 family in the Japanese morning glory: En/Spm-related transposable elements capturing host genes. *Plant Cell Physiol.*, 45, 933-44 (2004).

6. 0404050814

Suzuki, Y., Saso, K., Fujioka, S., Yoshida, S., Nitasaka, E., Nagata, S., Nagasawa, H., Takatsuto, S. and Yamaguchi, I. (2003) A dwarf mutant strain of *Pharbitis nil*, *Uzukobito* (kobito), has defective brassinosteroid biosynthesis. *Plant J*. 36: 401-10 (2003).

7. 0404050758

Nitasaka, E., Insertion of an En/Spm-related transposable element into a floral homeotic gene *DUPLICATED* causes a double flower phenotype in the Japanese morning glory. *Plant J*, 36, 522-31 (2003).

2) データベース/ソフトウェア

8. 0305131301

アサガオホームページ (<http://mg.biology.kyushu-u.ac.jp/>)