

アサガオ (*Ipomoea nil*) のモデル 植物化に関する研究

「形とはたらき」領域 仁田坂 英二

1. 研究のねらい

アサガオ (*Ipomoea nil* または *Pharbitis nil*) は、英名 Japanese Morning Glory が示すように、日本独自の園芸植物であるが、日本に自生する植物ではなく、今から約1200年前に遣唐使によって薬草（下剤）として中国より輸入されたとされている。その後、江戸時代後期に当時の園芸ブームに乗じて、数多くの突然変異体（変化朝顔）が見いだされ現在まで保存されてきている。戦前には今井義孝、荻原時雄をはじめとする日本人遺伝学者による精力的な遺伝解析が行われ、連鎖地図が作製された。このようにアサガオは、当時トウモロコシに次いで詳細に解析されていた植物であった。しかし、江戸時代から連綿と保存されたきたアサガオの突然変異系統は第二次世界大戦の混乱で激減しその後、国立遺伝学研究所が保存収集を始めたが、私がさきがけ研究で系統更新を再開するまで系統維持を休止している状態であった。

本研究のねらいは、日本独自の遺伝学的研究材料としてのアサガオを、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のような分子生物学におけるモデル植物とすることを見据えて、そのための基礎的な研究環境の整備を行うことである。アサガオは他のモデル植物と比べて、以下に述べるような色々と優れた点があり、古典遺伝学的知見も集積している。モデル植物として欠かせない、自殖性であること、世代時間も比較的短いことなども備えている。現在、遺伝学的解析が比較的詳細に行われている植物は単子葉植物ではトウモロコシとイネ、双子葉植物ではシロイヌナズナとキンギョソウである。例えば、これらの植物では開花調節においてはどれも鋭敏で明確な反応を示さないため非常に研究がやりづらい面がある。しかしアサガオは短日性植物であり、たった1度の暗処理で花芽を分化する。またシロイヌナズナはいちばん詳細に解析されている植物であるが、その名のとおりの白い花を咲かせるため花色に関する色素合成等の研究には向いていない。アサガオにはトランスポゾンによると考えられる易変性の変異が多く、現在でも頻繁に転移を行っており、他の植物には見られないような特殊な突然変異体もいくつも存在する。また交配可能な近縁種が存在するため、種分化過程

で固定した形質を遺伝学的に解析することができ、分子進化と形態進化をつなぐことのできるモデル植物としても有用である。

本研究では、アサガオをモデル植物として使っていくために欠かせない、以下のような点に関して研究を行った。1) 突然変異系統の更新・解析。2) 詳細な連鎖地図の作製。3) トランスポゾンによるクローニング系の開発 4) 形態形成遺伝子のクローニング 5) アサガオ近縁種の分子進化的解析。次の項目でこれらの研究成果について順を追って述べていく。

2. 研究方法と成果

(1) 突然変異系統の維持・解析

アサガオの突然変異体の多くは江戸時代後期、文化文政期に起源を持つものが多い。現在までの研究でこれらの突然変異体の多くは*Tpn*（後述）と呼ばれる、トウモロコシの*En/Spm*タイプに類似のトランスポゾンによって誘発されていると考えられる。そのため、これらの突然変異系統は、遺伝学的解析を行う上でも、*Tpn*を指標に遺伝子クローニングを行う上でも非常に貴重な遺伝子資源である。

さきがけ研究の開始に伴い、国立遺伝学研究所から約550系統からなるアサガオの突然変異系統を移管した。これらは同研究所の竹中要氏が収集したものに由来する。移管した種子は1991年を最後に種子の更新が行われていなかった。それまでも、私は小川信太郎・渡辺好孝氏・遺伝研等由来の種子を保存しており、系統維持を行ってきたが、1998年より本格的に栽培・系統の更新を行った。種子の保存に関しても、4度の低湿度下では少なくとも30年以上は種子の発芽力は衰えないことが明らかになった。2000年までにほとんど全ての系統更新を終え、この際に各系統の突然変異形質の写真記録を行った。これらの情報についてはカタログ化を進めており、図1に複数の突然変異が複合した系統の写真を示した。これらは私のホームページ (<http://mg.biology.kyushu-u.ac.jp>)でも公開している。戦前にアサガオの突然変異系統を特に精力的に解析した、今井義孝・萩原時雄は200以上の遺伝子座を同定・記述しているが、彼らが用いた系統はほとんど現存しておらず、花色・模様、葉形に関するような、異なる遺伝子座が同様の表現型を示す変異については、交配実験による相補性の検定や連鎖地図による座位の確認、遺伝子クローニングなど今後の解析を待たねばならない。

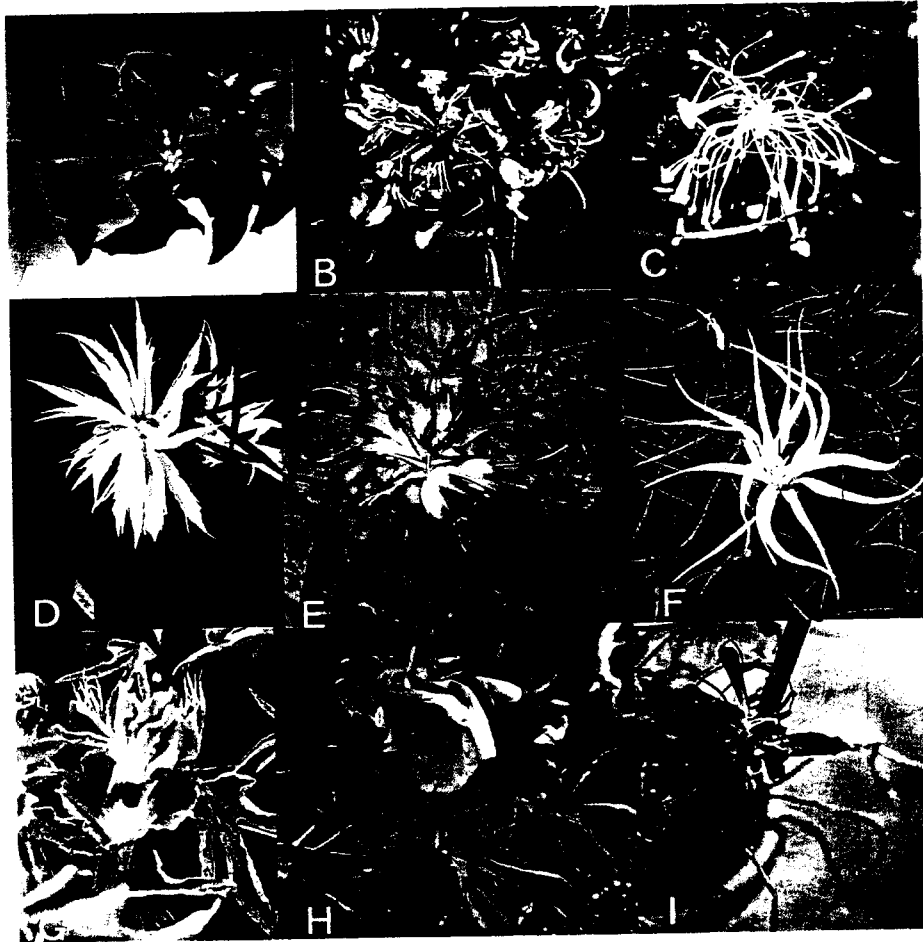


図1 アサガオの突然変異体の例。代表的な突然変異体を示した。A 以外は牡丹 (*duplicated*) と呼ばれる八重咲きになる変異をあわせ持つため花弁数が増加している。A~C、獅子咲系統 (*fe*)。D~F、采咲系統 ($m^* + \alpha$)、G~I、台咲系統 ($cp + \alpha$)。

(2) 連鎖地図の作製

戦前の交配実験に基づいて、1956年に萩原時雄によってそれまで研究された219の遺伝子についてまとめられているが、この連鎖地図 (古典地図) は染色体数から予測される15群のうち10群からなり、5群についてはある程度の遺伝子座が乗っているが、残りの5群については2, 3の遺伝子座の位置しか決まっておらず、これは今後、アサガオのゲノム解析を行なっていく上であまりに不完全である。そのため、近年のゲノム生物学の発達に伴って考案されてきた、分子マーカーを用いたマッピング法によって古典地図上の表現型マーカーも含むような、アサガオの連鎖地図を作成した。分子マーカーとしては、一度の反応で多くの多型マーカーが得られる AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法および、クローン化された遺伝子の SSLP および CAPS マーカーをもちいた。AFLP 法は、従来、同様の目的で用いられてきた RAPD (Randomly Amplified Fragment Length

Polymorphism) 法と比較して、再現性が高いため、他のアサガオ系統を用いてマッピングする場合にも応用できる。また、一度の反応で多数の多型マーカーが得られるため密なマップが比較的容易に作成できる。サンプルとしてはアサガオ系統 (#931) とアメリカアサガオ (#65) の F₂ 展開系統をもちいた。LOD スコアを上げていくと複数の連鎖群に別れるが、マーカーの多い順に連鎖群の番号をつけていくと、1 から15群に多数のマーカーが乗っており、15群と16群の間に閾値が見られた。これは染色体数から予測される連鎖群の数と一致していた。

(3) トランスポゾンによるクローニング系の開発

アサガオの突然変異体は前にも述べたように文化文政期かその少し前に起源を持つものが多い。そのため、現存しているアサガオの突然変異体の多くも少ない種類のトランスポゾンによって誘発されていると予想していたが、実際、八重咲きになる牡丹突然変異体の原因遺伝子をクローニングしたところ、*Tpn* ファミリーと呼ばれ、末端のウィングと呼ばれる500~1000bp の塩基配列が相同なトランスポゾンの一つ、*Tpn-botan* が挿入していた (後述)。また基礎生物学研究所の飯田らのグループはアントシアニン合成経路に関わるいくつかの遺伝子の突然変異体を解析しているがほとんどが *Tpn* の挿入によるものであった。そのため、この *Tpn* ファミリーの共通配列を用いることで、そのトランスポゾンの挿入している原因遺伝子をクローニングすることができる。

まず *Tpn* ファミリーの全容が明らかではなかったため、*Tpn-botan* をプローブとしてアサガオのゲノムライブラリから多数の *Tpn* ファミリーに属するトランスポゾンを単離した。*Tpn* はハプロイドゲノムあたり、1000コピー程度と非常に多数存在している。およそ200の独立な *Tpn* を含むフェージクローンを制限酵素地図により31種類に分類した (図2)。それぞれをプラスミドにサブクローンして、現在までに主な15グループについて全塩基配列を決定した。*Tpn* の内部配列を BLAST 検索にかけると、どれも高等植物の遺伝子と高い相同性があり、たとえば、HMG、 β ガラクトシダーゼ、ミオシン、花の形態形成に関わるような AP2、分裂組織の維持・形成に関わるような CAF など多種多様な遺伝子と相同性があった。このような構造を持つトランスポゾンが増えている生物はアサガオしか知られていない。おそらく、アサガオの進化過程において、*Tpn* が内部にアサガオの遺伝子を取り込んできたのだと考えている。また、現在までに AP2 遺伝子のアサガオ側の遺伝子をクローニングしており、これらを比較することで内部への取り込み機構も明らかにできると考えている。

Tpn はコピー数が非常に多いため、ウィングの配列をプローブとした、突然変異体と野

アサガオの遺伝子

28bp TIRs
subterminal regions
28bp TIRs
subterminal regions

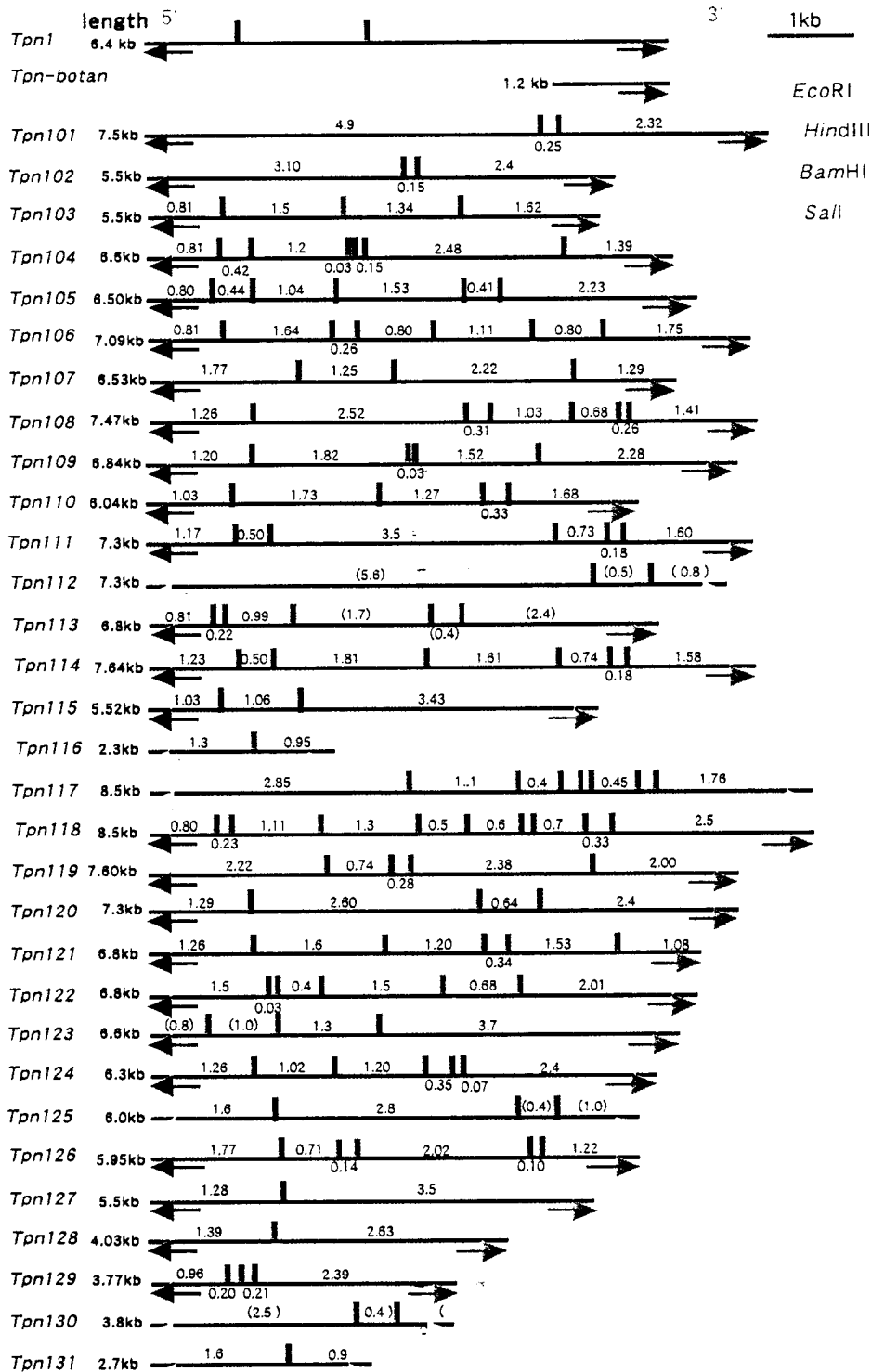


図2 *Tpn*ファミリーの構造。アサガオで突然変異を誘発している主なトランスポゾンである *Tpn*は両端に相同な反復配列の部分（ウィング）と内部にアサガオ由来の配列を持つ。内部構造から少なくとも31種類に分類されている。

生型のサザン法による比較などによる単純な方法では突然変異の原因遺伝子のクローニングはできない。そのため、*Tpn* の各グループの内部配列を用いたサザン法や、ウィングの部分のプライマーを利用した AFLP 法の変法（トランスポゾンディスプレイ法）、RDA 法を利用して遺伝子クローニングを行っていく（後述）。

(4) 形態形成遺伝子のクローニング

A 牡丹遺伝子の解析

現存している突然変異体がどのようなトランスポゾンによって誘発されているか、また花の形態形成に関与している MADS-box 遺伝子と既存の突然変異を関連づける目的で、花の形態形成遺伝子である“牡丹 (*duplicated; dp*)” のクローニングをおこなった。牡丹は花弁数が増えて花が豪華に見えるため多くのアサガオ系統に導入されている（図1）。牡丹はその形態から、シロイヌナズナにおける *ag* やキンギョソウの *ple* と相同な、C機能 MADS-box 遺伝子に相当する、花の形態形成遺伝子の突然変異によるものだと考えた。共通配列をもちいて転写産物をクローニングし、このプローブをもちいてゲノム領域も単離した（図3）。クローニングに用いた突然変異体は安定な系統であるが、やはり牡丹遺伝子に *Tpn* ファミリーに属するトランスポゾンが挿入していた。安定化している原因は、このトランスポゾン (*Tpn-botan*) が挿入して、再転移する際に牡丹ゲノムの一部と *Tpn* の大部分を欠失してしまったことによる。この *Tpn-botan* の挿入部位の近傍を解析した結果、野生型のゲノム領域にも *Tpn* 様の配列が存在し、ここに再度 *Tpn* が挿入して牡丹突然変異を引き起こしていた。また解析した *Ipomoea* 属全ての種にこの *Tpn* 様の配列が存在した。このことは、他のトランスポゾンで知られているように同種のトランスポゾンが存在すること

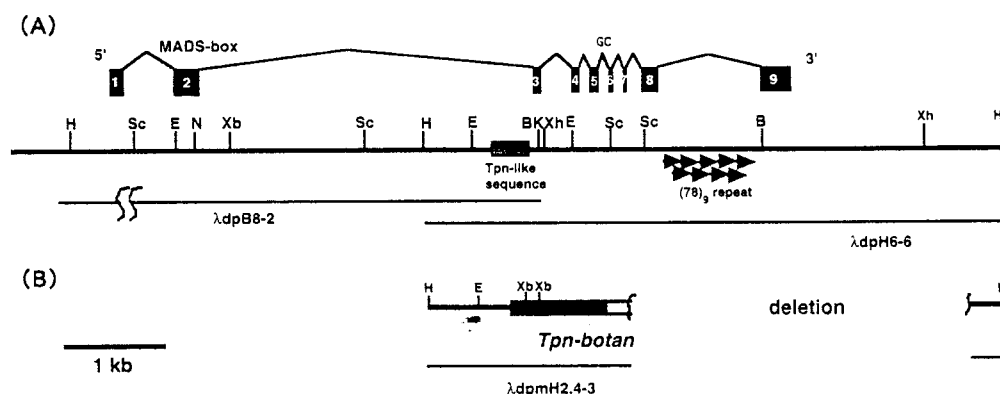


図3 牡丹遺伝子の構造。C機能 MADS-box 遺伝子である牡丹 (*duplicated*) のゲノム構造、転写産物を示した。(A) 野生型遺伝子。(B) 牡丹突然変異体。Tpn-botan が野生型遺伝子の *Tpn* 様配列に挿入した後、再転移し、その際、*Tpn* とゲノムを含む領域に欠失を起こしている。

でそのトランスポゾンの挿入に対してホットになったのかもしれない。実際、アサガオの牡丹変異は単一起源ではなく、近縁種にも同様の変異が知られている。

他にもC機能 MADS-box 遺伝子が単離され、この遺伝子は芍薬 (*PEONY*; *PN*) と名付けた。最近キンギョソウで、*PLE* 遺伝子の他にC機能遺伝子 (*FAR* 遺伝子) が単離されたが、分子系統学的解析の結果、興味深いことに、牡丹 (*DP*) 遺伝子に近縁なのは *FAR* 遺伝子で、芍薬 (*PN*) に近縁なのは *PLE* であった。つまり、雄ずい、心皮形成に重要な役割を果たしているのは、アサガオでは牡丹遺伝子、キンギョソウでは *PLE* 遺伝子であり、進化過程で役割分担が逆になっている (図4)。

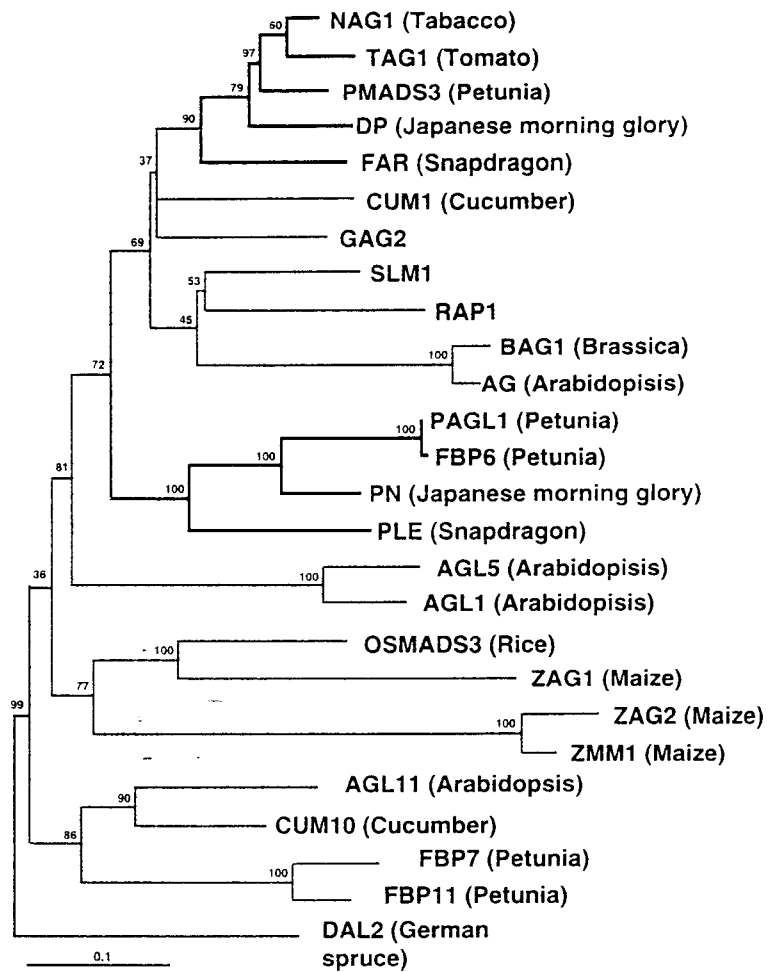


図4 C機能 MADS-box 遺伝子の分子系統樹。アサガオおよびキンギョソウの遺伝子は色つき文字で示した。DP=牡丹、PN=芍薬。この系統樹は MADS-box を含む120 アミノ酸を用いて作成し、100回あたりのブートストラップ値も示した。

B IANのクローニング

シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) で葉の形態形成に関与する *AN* が基礎生物学研究所の塚谷らによってクローニングされている。*AN* 機能が失われた突然変異体では葉が細くなることが知られており、アサガオの葉が細くなる変異体に相当するか解析する目的で、まず *AN* のアサガオホモログを単離した。これは *IAN* (*Ipomoea nil's AN*) と名付け、ノーザン法により、葉の細くなる突然変異体、柳 (*maple-willow*)、笹 (*delicate*)、南天 (*acuminate*) について *IAN* の転写量を調べた。これらの転写量は正常だったが、他に *IAN* の欠損による変

異体が存在する可能性があり、
現在解析中である。

C 吹詰 (ふきつめ) のクロー ニング

系統維持の過程で、花卉・が
く・雄ずいが増加し、心皮
も増加し融合しているため太く
なる突然変異体が見つかり“吹
詰”と名付けた (図5)。この
系統は茎も太くなったり、帯化
をおこし、分裂組織が巨大化す
るためこのような表現型になっ
ていると考えられた。シロイヌ
ナズナにも同様な突然変異体が
知られており、*clv(clavata)1*,

clv2, *clv3* の遺伝子座が知られている。吹詰突然変異体も相同な遺伝子の突然変異だと考え、*CLV* と相同な遺伝子をアサガオから単離し、*ICLV1*, *ICLV2* と名付けた。現在、それぞれの転写産物の量を野生型と吹詰変異の間で比較しており、近いうちに吹詰変異と *icl**v* が対応づけられることを期待している。

D 柳のクローニング

植物体全体 (子葉、本葉、花卉等) を細くするように働く立田 (*maple*) 遺伝子が知られており、対立遺伝子として立田より、葉や花卉がより細くなる、柳 (*maple-willow*) や松葉 (*maple-pine*, 現在は失われている) がある。また最近、細柳 (*maple-narrow*) と名付けた新規の対立遺伝子も見いだした。この柳も枝変わり現象を起こすことからトランスポゾンの挿入による変異だと考えられ、おそらくは *Tpn* ファミリーの挿入による変異であろう。糸柳系統 (*m^w dl*) が一部から笹 (*dl*) に復帰変異を起こした株が見つかり、これは柳が体細胞において野生型に復帰したために起こったと考えた。この糸柳と笹の部分 *subtraction* によって比較することで、立田遺伝子をクローニングすることを試みた。具体的には3種類の制限酵素をもちいた RDA 法によって、それぞれ単一のバンドを得た。これらを

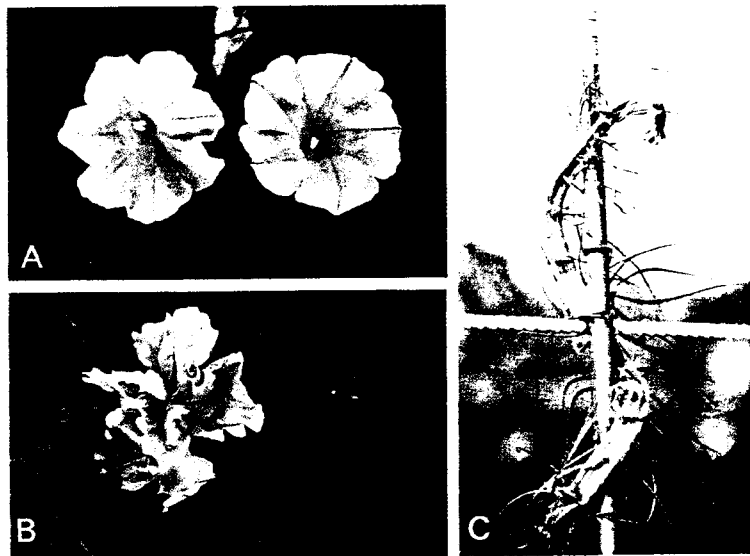


図5 アサガオの吹詰 (ふきつめ) 突然変異体。(A) 右 ; 野生型、左 ; 吹詰。吹詰変異体では花卉、萼、雄ずい、心皮数が増加している。(B) 右 ; 牡丹、左 ; 牡丹+吹詰。牡丹変異は生殖器官を花卉化するため、左の花では花卉が著しく増加し、吹き詰めている。(C) 吹詰変異体は分裂組織が巨大化しているため、しばしばこのように帯化を起こす。これは柳 (*mw*) と笹 (*dl*) のバックグラウンドのため、葉が細くなっている。

もちいて現在までに3つのゲノム領域が得られており、このなかの一つが立田遺伝子に相同すると考えて現在、確認を急いでいる。もしこの方法がうまく機能するのであれば、このクローニング法が他の易変性を示す突然変異体にも応用できると考えている。

(5) アサガオとその近縁種の進化学的解析

アサガオの属する *Ipomoea* 属は全世界で約500種から構成され、この属には一年生草本から多年生草本、木本まで存在し、非常に多岐にわたっている。これらの属内の系統関係を分子系統学手法で明らかにできれば、一般的な植物における進化についても重要な知見が得られると考えられ、アサガオ種内と近縁種およびサツマイモを含む *Ipomoea* 属の14種について葉緑体遺伝子の *matK* を指標にして系統関係を解析した。

また、アサガオの近縁種にはアメリカアサガオ (*I. hederacea*)、マルバアサガオ (*I. purpurea*) 等があり、それらは種間で交雑可能であり、種分化機構をアサガオの遺伝学をもちいて解析することができるという点で有用なモデルである。その前段階として、アサガオ近縁種の系統関係を牡丹遺伝子および前述の AFLP 法によってアサガオ種内の系統関係を解析した。その結果、日本産アサガオと一番近縁なものは中国・北京産のアサガオ（北京天壇）でこのことは歴史的事実とも一致しており興味深い（図6）。

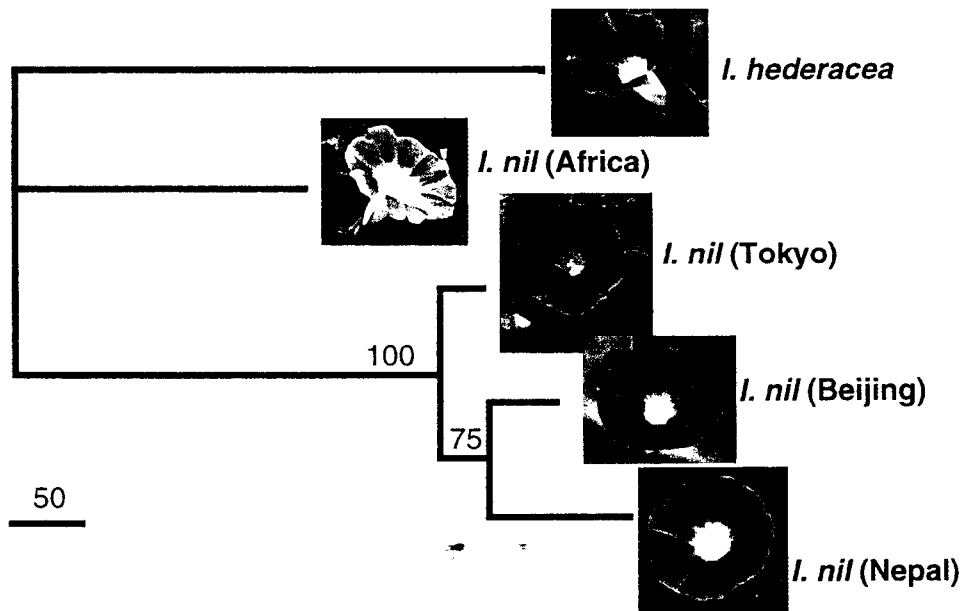


図6 アサガオ地域品種の系統関係。AFLP 法によって多型を測定し、アメリカアサガオをアウトグループに設定して、MP 法で系統樹を作成した。

3. 今後の展望

このように、このさきがけ研究の3年間を通して、突然変異系統の更新・観察によって、現存している突然変異体の全容がわかり、今後の遺伝学的解析の礎になるような連鎖地図が作製できた。また、トランスポゾンタギングによるクローニング法についてはまだ試行錯誤をしている段階であるが、その元となる *Tpn* ファミリーの全容も明らかになってきたし、ボーナスとして *Tpn* は他の生物では見られないような特殊な構造を持つことがわかってきた。

今後の目標としては、突然変異系統を完全にカタログ化し、マーカー遺伝子の同定を進める。連鎖地図はとりあえず、AFLP法によってフレームワークとなるようなものを作製したが、今後、より正確な共優性マーカーを用いた連鎖地図に切り替えていく予定である。*Tpn* は現在でもアサガオで頻繁に転移しているが、今後、自律性因子を同定し、転移機構も明らかにしていきたい。またこの *Tpn* を指標にしたクローニング法を確立し、アサガオの興味深い突然変異遺伝子を解析していきたい。私がさきがけ研究を始めるころはまだあまりアサガオという研究材料に注目が集まっていなかったと思うが、最近ではシロイヌナズナの研究者もアサガオに注目しており、8月下旬には私の研究室で植物分子生物学者を含めたアサガオワークショップが開かれた。他にもアサガオの突然変異体である、変化朝顔が一般に注目を集めるようになってきており、私が協力している部分も多いが、博物館や海外でも展示が行われるようになってきた。アサガオ研究はこのさきがけ研究によるサポートで弾みがついたが、今後も私のライフワークとして続けていく。将来的には日本独自のアサガオという材料をもちいて、一般的な植物の形づくりや遺伝子のはたらきの一端を明らかにできるのではないだろうか。

4. 発表リスト

論文・総説

- 仁田坂英二 “アサガオの系統保存” 蛋白質核酸酵素増刊：ライフサイエンスのための系統保存とデータベース(中辻憲夫編) 印刷中(2000)
- 米田芳秋、仁田坂英二 “アサガオ画像データベース” (財) 遺伝学普及会編 (2000)
- 仁田坂英二 “伝統の朝顔Ⅲ-作り手の世界” 国立歴史民俗博物館編 (2000)
- 仁田坂英二 “伝統の朝顔Ⅱ-芽生えから開花まで” 国立歴史民俗博物館編 (2000)
- 仁田坂英二 “朝顔の形態形成突然変異体(変化朝顔)の歴史と展望” 細胞工学別冊 植

物の形を決める分子機構 12, 16-23 (1999)

E. Nitasaka. Linkage maps of the Japanese morning glory I. *Gene. Genet. Sys.* **74**, 334 (1999)

S. Kawasaki and E. Nitasaka. The structures of *Tpns*, transposable elements of the Japanese morning glory. *Gene. Genet. Sys.* **74**, 333 (1999)

仁田坂英二 “江戸園芸文化の粋、変化朝顔、種子のできない一年草” *biohistory* **7(2)**, 12-13 (1999)

仁田坂英二 “伝統の朝顔” 歴史民俗博物館編 (1999)

E. Nitasaka. Molecular and morphological evolution of morning glories. *Gene. Genet. Sys.* **73**, 451 (1998)

仁田坂英二 “アサガオの系統保存” 蛋白質核酸酵素 **44**, 71-74 (1999)

E. Nitasaka. Molecular cloning of a floral homeotic gene *duplicated* in *Ipomoea nil*. *Gene. Genet. Sys.* **72**, 421 (1997)

口頭発表

22件 (そのうち国外3件)

その他

雑誌3件、新聞2件、TV3件