

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06727

研究課題名(和文)ゼニゴケの分枝を促進するペプチドシグナルの研究

研究課題名(英文) Study of a peptide signal that promotes branching in *Marchantia polymorpha*

研究代表者

平川 有宇樹 (Hirakawa, Yuki)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：60736669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は体の頂端部に分裂組織を維持し、長期にわたる成長を実現している。コケ植物ゼニゴケでは、MpCLE2ペプチドホルモンが分裂組織を増やし、植物体の分枝を促進する活性を持つ。本研究ではその作用機序の解明を目指した。透明化処理後の分裂組織を観察したところ、MpCLE2が幹細胞領域の細胞数を増やす働きを持つことを明らかにした。またMpCLE2を細胞が受容する分子機構として、既知のMpCLV1受容体に加えてMpCIK共受容体が必要であることを示した。さらにMpCLE2シグナルの標的遺伝子の候補として転写因子の一種を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CLE-CLV1-CIKが陸上植物に保存された情報伝達分子として、分裂組織の幹細胞活性を調節することが示唆された。ただし、ゼニゴケCLEは幹細胞領域のサイズ調節で促進的に働くことから、シロイヌナズナ等の被子植物で知られたCLE/CLV3の幹細胞活性抑制性活性とは異なっている。本研究で明らかとなった幹細胞維持促進活性は、これまで報告されていない新たなCLEの機能と考えられる。今後、ゼニゴケCLEの作用機序をより詳細に解析することで、陸上植物に共通の幹細胞維持機構を解明する手掛かりになるとともに、農作物種での収量調節にも貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Plants maintain the apical meristems at the tips of their bodies, which are essential for continued growth. In the liverwort *Marchantia polymorpha*, MpCLE2 peptide hormone was found to promote “branching” from the meristem. The aim of this research is to elucidate the mechanisms of action of MpCLE2. Tissue clearing method revealed that MpCLE2 promotes expansion of the stem cell zone. In addition to the receptor MpCLV1, MpCIK coreceptor gene was necessary for the activity of MpCLE2. A transcription factor gene was identified as a candidate of target genes in MpCLE2 signaling.

研究分野：植物科学、発生生物学

キーワード：分裂組織 ゼニゴケ CLEペプチド 受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物体の地上部(シュート)は、頂端部に存在する分裂組織で細胞増殖をおこない、持続的な成長を実現している。さらに、適切な時期に頂端分裂組織を増やす分枝が起こる。このような分裂組織の活性調節は、植物の成長と発生を理解する上で重要な問題である。

分枝の様式は「単軸分枝」および「二叉分枝」の大きく2種類に分けられる。単軸分枝では、主軸の先端に存在する頂端分裂組織から離れた位置の葉腋に新たな分裂組織が形成され、側枝となる。種子植物はほとんどがこの様式である。一方、シダ植物の一部やコケ植物においては二叉分枝が見られる。1つの頂端分裂組織から同等の分裂組織が2つ生じ、それぞれの分裂組織が同時期に成長することで、シュートはY字型の繰り返し構造となる。

単軸分枝と二叉分枝では頂端分裂組織を新しく生み出す発生過程は異なるが、いずれの場合も、どのようにして頂端分裂組織を空間的に離れた位置に新生するかという点は重要な問題と考えられる。分枝の調節に関する分子機構は、これまで主にシロイヌナズナ等の被子植物を対象として研究されており、単軸分枝においては、たとえば葉原基の形成位置が植物ホルモンのオーキシンの分布によって調節されることが明らかとなっている。しかしながら、二叉分枝においては分子レベルでの調節機構は不明であった。

コケ植物タイ類のゼニゴケは、配偶体世代において茎と葉の区別を持たない葉状体をつくる。葉状体の周縁に位置する湾入部に分裂組織を維持して成長し、定期的に二叉分枝をおこなう。申請者らは、植物ペプチドホルモンの一種である MpCLE2 ペプチドをゼニゴケゲノムにおいて見出し、MpCLE2 ペプチドの投与実験においてゼニゴケの頂端分裂組織から多数(3本以上)の分枝を誘導できることを見出した。この実験では、ゼニゴケの無性芽を MpCLE2 ペプチド含有培地で育成して分裂組織内の未分化な細胞を増やしたのち、ペプチド非含有培地に移植することで複数の分裂組織の形成が起こった。

### 2. 研究の目的

本研究では、MpCLE2 ペプチドがゼニゴケの多叉状の分枝を誘導する分子機構の解明を目的とし、分裂組織内での細胞種を見分けるための細胞マーカーの開発、MpCLE2 シグナルの作用におけるオーキシンの役割の解析、および MpCLE2 シグナルによって発現変動する遺伝子の探索をおこなった。

### 3. 研究の方法

分裂組織における細胞マーカーの開発として、MpYUC2 プロモーター下で蛍光タンパク質を発現する形質転換体を作成し、蛍光タンパク質の組織内分布を観察する。また植物体の透明化手法である ClearSee 法を用いて、分裂組織構造を観察し、CLE2 ペプチドの過剰発現による効果を細胞レベルで解析する。MpCLE2 の作用へのオーキシンの関与を調べる為、オーキシン合成阻害剤の効果を観察する。オーキシン以外の因子の関与を調べるため、CLE2 ペプチドおよび CLE2 受容体の変異体を用いたトランスクリプトーム解析をおこない、発現変動する遺伝子を探査する。候補遺伝子についての変異体を作成し、分裂組織構造についての表現型を調べる。

### 4. 研究成果

育成4日目の無性芽において、MpYUC2prom:3xCitrine の傾向は分裂組織中の広い領域で観察され、MpYUC2p:GUS の染色領域と比べて特異性が低かった。これはタンパク質翻訳後の原形質連絡を介した細胞間移行による可能性もあるが、タンパク質サイズを考慮すれば分解や安定性に問題がある可能性が考えられる。そこで MpYUC2p:Citrine-NLS に MpCYCB;1 の destruction-box を付加したマーカーを検討した。その結果、蛍光を示す細胞は減少したものの蛍光は分裂組織内部の広い領域に点在していた。したがって、MpYUC2 プロモーターは分裂内部の細胞種識別には十分でないと考えられる。

次に ClearSee 法による透明化処理をおこない、分裂組織の構造を観察した。その結果、育成2日目の無性芽において幹細胞領域の細胞を形態的におおむね判別することができた。MpCLE2 の機能獲得型変異体で幹細胞領域を観察すると、細胞数数の増加がみられた。一方で、機能欠損型変異体では幹細胞領域の細胞数が減少しており、MpCLE2 シグナルは幹細胞領域を拡大させる役割を担うことが示唆された。

この現象への植物ホルモンのオーキシンの関与を調べるため、オーキシン合成阻害剤である Yucasin と L-Kynurenine の効果を観察した。まず、阻害剤を含有する培地上で野生型の無性芽を育成すると、分裂組織が含まれる頂端湾入部が拡大した。この効果は、MpCLE2 による分裂組織の拡大と類似していた。しかしながら MpYUC2p:GUS マーカーはオーキシン阻害剤処理では拡大がみられず、このマーカー領域を拡大させる MpCLE2 ペプチドとは異なっていた。また、MpCLE2 ペプチドとオーキシン合成阻害剤の両方を与えた実験では相加的な効果が見られ、両者は独立の作用であることが支持された。

MpCLE2 ペプチドを細胞が受容するには MpCLV1 受容体が必須であることが分かっていた。シロイヌナズナでの研究により、CLV1 の共受容体として Clks (CLAVATA3 INSENSITIVE RECEPTOR

KINASES)が報告されており、ゼニゴケにおいても同様の仕組みが働いているかを調べた。ゼニゴケの CIK ホモログは単一コピーの遺伝子であり、これを MpCIK と名付けて遺伝学的な解析をおこなった。MpCIK のゲノム編集により機能欠損型変異体を作成したところ、MpCLE2 ペプチドに対する感受性が失われた。また MpCLV1 と MpCIK の弱いタンパク質間相互作用が生化学実験により検出され、ゼニゴケにおいても CLV1 受容体と CIK 共受容体の両者が CLE の受容に働くことが示唆された。また、これらの変異体では分裂組織以外にも栄養繁殖器官である杯状体の形成時期に表現型がみられ、MpCLE2 シグナルは MpCLV1 と MpCIK を介して杯状体形成を遅らせることが示唆された。

MpCLE2 シグナルの標的遺伝子を探索するため、MpCLE2 の機能獲得型変異体ならびに MpCLV1、MpCIK の機能欠損型変異体を用いてトランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、野生型と比べてそれぞれ数百の発現変動遺伝子が検出された。発現変動遺伝子群から、特に MpCLE2 によって発現が著しく低下した転写因子を JIN 遺伝子と名付けた。JIN のゲノム編集により機能欠損型変異体を作成したところ、MpCLE2 ペプチドの効果とは反対に分裂組織拡大を抑える活性を持つことが分かった。したがって、JIN が MpCLE2 経路の制御因子の 1 つであることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Go, Betsuyaku Shigeyuki, Okuzumi Natsuki, Kiyosue Tomohiro, Hirakawa Yuki	4. 巻 12
2. 論文標題 An Evolutionarily Conserved Coreceptor Gene Is Essential for CLAVATA Signaling in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 657548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.657548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirakawa Yuki	4. 巻 142
2. 論文標題 CLAVATA3, a plant peptide controlling stem cell fate in the meristem	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170579 ~ 170579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2021.170579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirakawa Yuki, Fujimoto Toko, Ishida Sakiko, Uchida Naoyuki, Sawa Shinichiro, Kiyosue Tomohiro, Ishizaki Kimitsune, Nishihama Ryuichi, Kohchi Takayuki, Bowman John L.	4. 巻 30
2. 論文標題 Induction of Multichotomous Branching by CLAVATA Peptide in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3833 ~ 3840.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.07.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirakawa Yuki, Sawa Shinichiro	4. 巻 51
2. 論文標題 Diverse function of plant peptide hormones in local signaling and development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbi.2019.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 平川 有宇樹
2. 発表標題 植物幹細胞活性の促進因子としてのCLEペプチドの役割
3. 学会等名 第7回幹細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 剛、清末 知宏、平川 有宇樹
2. 発表標題 ゼニゴケ幹細胞領域におけるMpCLE2シグナル下流因子の探索と解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirakawa Yuki
2. 発表標題 A hypothesis on the evolution of meristem zonation by CLE gene duplication
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirakawa Yuki
2. 発表標題 CLE peptide as a positive regulator of plant stem cell identity
3. 学会等名 3rd webinar of the IRN France-Japan Frontiers in Plant Biology on “Development and Adaptation”（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 剛、清末 知宏、平川 有宇樹
2. 発表標題 ゼニゴケの頂端分裂組織活性を調節するMpCLE2シグナル下流因子の探索と解析
3. 学会等名 第85回日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 陽夏、奥墨 夏生、清末 知宏、平川 有宇樹
2. 発表標題 ゼニゴケの杯状体形成におけるCLAVATAとRPK2の遺伝学的相互作用の解析
3. 学会等名 第85回日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Hirakawa
2. 発表標題 Effects of CLAVATA peptide signaling on liverwort meristem activity
3. 学会等名 第84回日本植物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ゼニゴケ分裂組織の細胞形態観察によるMpCLE2とオーキシンの役割の解析
2. 発表標題 高橋 剛、清末 知宏、平川 有宇樹
3. 学会等名 第84回日本植物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Hirakawa, Go Takahashi, Natsuki Okuzumi, Shigeyuki Betsuyaku, Tomohiro Kiyosue
2. 発表標題 Analysis of co-receptor gene for CLAVATA peptide signaling in Marchantia polymorpha apical meristem
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥墨 夏生, 清末 知宏, 平川 有宇樹
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるLRR 型受容体様キナーゼ遺伝子RPK2 の機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 剛, 清末 知宏, 平川 有宇樹
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるMpCLE2 ペプチドシグナル下流因子の探索
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川 有宇樹, 高橋 剛, 藤本 童子, 清末 知宏
2. 発表標題 ゼニゴケの分裂組織におけるCLEペプチドとオーキシンによる細胞分化の制御
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Hirakawa
2. 発表標題 Role for CLE singling in the apical meristem of Marchantia polymorpha.
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Go Takahashi, Toko Fujimoto, Tomohiro Kiyosue, Yuki Hirakawa
2. 発表標題 Exploring the role for auxin in MpCLE2 peptide signaling in Marchantia polymorpha.
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 剛、平川 有宇樹、清末 知宏
2. 発表標題 ゼニゴケの分裂組織を調節するMpCLE2 シグナルへのオーキシンの関与
3. 学会等名 第83回日本植物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Hirakawa
2. 発表標題 Control of meristem organization by local peptide signaling in the liverwort Marchantia polymorpha.
3. 学会等名 FASEB Conference - Mechanism of Plant Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	Monash University			