

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16167

研究課題名(和文)細胞の分化状態を操作できる系を用いた植物の再生メカニズムの解明

研究課題名(英文)The mechanism of production of new meristems in land plants, revealed from the liverwort *Marchantia polymorpha*.

研究代表者

安居 佑季子(Yasui, Yukiko)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90724758

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):植物の再生能は非常に高く、多くの植物は切断部に新たな器官を形成したり、場合によっては新たな個体を再生することができる。陸上植物進化の基部で分岐したコケ植物苔類ゼニゴケの、転写因子GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1(GCAM1)は、栄養繁殖を行なうための器官である杯状体の形成に必須である。GCAM1とそのホモログであるGCAM1 LIKE(GC1L)を両方欠損させた*gcam1 gc1l*二重変異体では再生が著しく抑制される。またそれぞれを過剰発現させた株では未分化細胞が増殖することからGCAM1とGC1Lは再生過程において未分化細胞の増殖に機能すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の再生やクローン繁殖は、植物の生存にとって重要であると同時に農業においても非常に重要な現象である。GCAM1の被子植物のオーソログは腋芽形成に機能することがわかっており、被子植物の腋芽形成にゼニゴケのGCAM1が機能していることをこれまでに報告している。本研究ではGCAM1とGC1Lはゼニゴケの再生過程において未分化細胞の増殖に機能することを示した。本研究の成果は植物に保存された未分化性の細胞を増殖させるメカニズムの解明につながると期待できる。

研究成果の概要(英文):Plants can regenerate from differentiated tissue, based on the ability to produce new stem cells. Recently we reported that an R2R3-MYB transcription factor gene, GCAM1, is an essential factor for the formation of gemma cup, in which over a hundred of clonal propagules, gemmae, are formed. In the *gcam1 gc1l* double mutants, regeneration was severely suppressed, whereas the ectopic inductions of GCAM1 or GC1L caused the formation of cell masses. These results indicated that GCAM1 and GC1L function in the proliferation of undifferentiated cells in the regeneration process.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：再生 幹細胞 苔類ゼニゴケ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

固着生活をする植物は、生涯を通して幹細胞をメリステムに維持し、新たな器官を作り続けることで柔軟に発生する。また自らの生存のため幹細胞を新たに生み出す。多くの植物は傷害を受けると、その部分に新たな器官を再生し、場合によっては新たな個体を再生する能力を持つ。

植物の再生は、一度分化した細胞が、未分化な状態に戻り(脱分化)、その後幹細胞が新たに作られる現象である。これまでに被子植物における研究から、外植片の培養系や傷害ストレスによるカルス誘導の系を中心に、再生に関係する因子が複数報告されている。しかし、扱う組織における細胞の分化状態が均一でなく、脱分化から幹細胞新生に至る細胞の分化状態の特定が難しく、それら因子の作用点が明確になっていない現状がある。

陸上植物の基部で分岐した苔類ゼニゴケは、植物の中でも再生能力が高い。生活環の大半を過ごす葉状体は、幹細胞の性質を持つメリステムを除去するだけで、数日後には新たなメリステムを作り、葉状体の分化を再開する。またゼニゴケは、栄養繁殖を旺盛にすることも知られており、栄養成長期には、杯状体と呼ばれる器官にクローン個体である無性芽を大量に形成させる。研究代表者らの研究により、ゼニゴケにおいて *GCAMI* 遺伝子が無性芽発生の際である杯状体の形成に必須な遺伝子であることが明らかになっていた。*GCAMI* を欠損すると、無性芽形成の際である杯状体が全く形成されなくなる。また、*GCAMI* は無性芽が発生する杯状体の底部細胞で発現すること、*GCAMI* を異所的に過剰発現させると正常な組織分化が起こらなくなり、植物体全体が細胞塊となる。これらのことから、*GCAMI* は杯状体の底部細胞において未分化性を維持することで、杯状体と無性芽の発生を促進することが考えられた。

ゼニゴケは *GCAMI* のホモログとして *GCAMI LIKE (GCIL)* 遺伝子を有している。*GCIL* を異所的に過剰発現させると植物体全体が細胞塊様となる。また幹細胞の性質を持つメリステムを除去した基部側断片において *GCIL* の発現が上昇する。これらのことから、*GCIL* がゼニゴケの再生に機能することが考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゼニゴケの再生過程で機能すると考えられる *GCIL* の機能解析を通して、再生における分子メカニズムを包括的に理解することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) *GCIL* の再生における機能解析

*GCIL* の機能を知るため欠損変異体の作出を行ない表現型の解析をおこなった。また、*GCAMI* と *GCIL* が両方欠損した二重変異体の作出も行なった。さらに、強力な転写抑制ドメインである *SRDX* を付与した *GCIL* を誘導的に機能的にさせることができる系も、野生型と *gcaml* 変異体背景において作出した。これらの作出した株を用い、再生における表現型を解析した。

#### (2) *GCIL* と *GCAMI* の再生過程における発現解析

ゼニゴケはメリステムを含む先端を切除した後、基部側断片において再生が起こる。メリステムを切除した基部側断片において、*GCIL* と *GCAMI* の発現を経時的に qRT-PCR により解析した。

#### (3) *GCIL* と *GCAMI* の再生における下流因子の解析

*GCIL* と *GCAMI* の再生における下流因子を明らかにするため、*gcaml gcil* 二重変異体を用いた、

再生過程における経時的な RNA seq 解析をおこなった。

#### 4. 研究成果

##### (1) *GCIL* の再生における機能解析

Crispr-Cas9 システムを用いて、野生型と *gcam1* 変異体を背景に *GCIL* の機能を欠失させる変異を導入した。作出した変異体を用いて再生の表現型を解析した結果、*gcam1 gcll* 二重変異体において、著しく再生が抑制される表現型がみられた。また、再生部分の面積を定量的に解析した結果、*gcll* 単一変異体においても、野生型と比べ再生スピードが有意に遅いことが明らかになった。栄養成長期の野生型では、幹細胞の性質を持つメリステムが二叉分枝しながら成長していく。*gcam1 gcll* 二重変異体は、再生の表現型に加え、メリステムの幹細胞としての性質が途中で停止することがある表現型が見られた。そこで、強力な転写抑制ドメインである SRDX を付与した *GCIL* を誘導的に機能させることができる系を野生型と *gcam1* 変異体背景に導入した。*GCIL-SRDX* を野生型背景において機能誘導すると、切断面に無数の無性芽様の組織が異所的に形成されたが、正常な再生は見られなかった。また、*GCIL-SRDX* を *gcam1* 変異体背景で機能誘導すると、切断面において、無性芽様組織の異所的な形成も正常な再生もどちらも見られなかった。これらのことから、*GCIL* は *GCAM1* と共に再生に機能するが、無性芽発生には *GCAM1* のみが機能することが考えられた。

##### (2) *GCIL* と *GCAM1* の再生過程における発現解析

ゼニゴケはメリステムを含む先端を切除した後、基部側断片において再生が起こる。そこでメリステム切除後、基部側断片における *GCAM1* と *GCIL* の発現変動を経時的に解析した。その結果、再生の初期段階において *GCIL* の発現が著しく上昇すること、*GCIL* に少し遅れて *GCAM1* の発現も上昇することを明らかにした。

##### (3) *GCIL* と *GCAM1* の再生における下流因子の解析

野生型と *gcam1 gcll* 二重変異体を用いて、メリステム切除後、経時的に基部側断片のサンプリングを行ない、再生過程における RNA seq 解析をおこなった。野生型と比較して、*gcam1 gcll* 二重変異体で発現が低い遺伝子群に着目して RNA seq のデータ解析を行ない、細胞周期関連などの、再生に関係する遺伝子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kato Hiroataka, Yasui Yukiko, Ishizaki Kimitsune	4. 巻 228
2. 論文標題 Gemma cup and gemma development in Marchantia polymorpha	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 459 ~ 465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16655	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 Yasui Y, Tsukamoto S, Sugaya T, Nishihama R, Wang Q, Kato H, Yamato KT, Fukaki H, Mimura T, Kubo H, Theres K, Kohchi T, Ishizaki K.	4. 巻 29
2. 論文標題 GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1, an ortholog of axillary meristem regulators, is essential in vegetative reproduction in Marchantia polymorpha.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Biol.	6. 最初と最後の頁 3987-3995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.10.004.	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 該当する

1. 著者名 Hiwatashi T, Goh H, Yasui Y, Koh LQ, Takami H, Kajikawa M, Kirita H, Kanazawa T, Minamino N, Togawa T, Sato M, Wakazaki M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Fukaki H, Mimura T, Toyooka K, Sawa S, Yamato KT, Ueda T, Urano D, Kohchi T, Ishizaki K.	4. 巻 29
2. 論文標題 The RopGEF KARAPPO is essential for the initiation of vegetative reproduction in Marchantia polymorpha.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Biol.	6. 最初と最後の頁 3525-3531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.08.071.	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤大貴, 安居佑季子, 石崎公庸
2. 発表標題 ゼニゴケの無性生殖から探る幹細胞新生の制御機構
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukiko Yasui, Shigeyuki Tsukamoto, Hiroataka Kato, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Kimitsune Ishizaki
2. 発表標題 The conserved mechanism of production of new meristems in land plants, revealed from the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i> .
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤大貴, 安居佑季子, 深城英弘, 三村徹郎, 石崎公庸
2. 発表標題 苔類ゼニゴケの杯状体形成に重要なsingle-MYBタンパク質の同定
3. 学会等名 日本植物学会 第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安居 佑季子, 加藤 大貴, 石田 咲子, 西浜 竜一, 深城 英弘, 三村 徹郎, 河内 孝之, 石崎 公庸
2. 発表標題 ゼニゴケの再生を制御する2つのR2R3-MYB型転写因子の機能解析
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 大貴, 安居 佑季子, 深城 英弘, 三村 徹郎, 石崎 公庸
2. 発表標題 苔類ゼニゴケの杯状体形成に関わる新奇因子の同定と機能解析
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会
4. 発表年 2020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
研究協力者	石崎 公庸  (Ishizaki Kimitsune)		
研究協力者	河内 孝之  (Kohchi Takayuki)		
研究協力者	西浜 竜一  (Nishihama Ryuichi)		

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
---------	---------