

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20649

研究課題名(和文) ツノゴケを用いた植物ホルモンKLの栄養繁殖制御因子としての祖先的機能の検証

研究課題名(英文) Analysis of the ancestral function of the plant hormone KL as a regulator of vegetative reproduction using hornworts

研究代表者

鈴木 秀政 (Hidemasa, Suzuki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：30908059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物はクローン個体による栄養繁殖でさかんに増殖する。栄養繁殖の制御因子に、新規植物ホルモンと目されるKAI2-Ligand (KL)がある。本研究では、ツノゴケ類を用いてKL信号伝達と栄養繁殖制御のしくみを解析した。本研究では、ナガサキツノゴケでKL信号伝達の標的遺伝子を網羅的に探索し、陸上植物で広く保存された標的遺伝子を特定した。さらに、KL応答レポーター株とKL応答を遮断した株を作出し、生理機能解析の実験基盤を整えた。また、独自の栄養繁殖を発達させたホウライツノゴケにおいて、クローン個体の発生様式を明らかにするとともに、形質転換法を確立し栄養繁殖の新規研究モデルとしての実験基盤を整備した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栄養繁殖は植物の重要な繁殖戦略であるとともに、植物栽培における重要な性質でもある。本研究では、陸上植物で共通してKL信号伝達に制御される遺伝子を明らかにした。これらの遺伝子とKLによる栄養繁殖制御の関係を明らかにすることで、栄養繁殖を精緻に制御する技術につながると期待される。また、本研究ではホウライツノゴケという新たな栄養繁殖の研究モデルを立ち上げた。ツノゴケ類はコケ植物のなかでも最初期に分岐した系統であり、被子植物などの維管束植物や従来のモデルコケ植物とは進化的に大きな隔りがある。今後、栄養繁殖の普遍性や多様性を解明する研究への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Plants propagate vigorously by generating clones through a process called vegetative reproduction. KAI2-Ligand (KL), an as-yet-unknown novel plant hormone, is one of the regulators of vegetative propagation. In this study, we investigated the mechanism of KL signaling and vegetative reproduction in hornworts.

In the hornwort *Anthoceros agrestis*, we comprehensively searched for target genes of KL signaling, and identified genes that are widely conserved in land plants. Additionally, we generated KL-response reporter plants and plants that blocked the KL signaling to further analyze the physiological function of KL. Furthermore, we explored the developmental basis of vegetative reproduction in the hornwort *A. angustus*, which evolved a unique vegetative reproduction system. To facilitate future experiments as a new research model for vegetative reproduction, we established a transformation method in *A. angustus*.

研究分野：植物発生

キーワード：陸上植物 進化 栄養繁殖 植物ホルモン KL信号伝達 コケ植物 ツノゴケ類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

効率的な繁殖は生物にとって普遍的な課題である。植物は根や茎などからクローンをつくる栄養繁殖のしくみを発達させ繁栄を収めた。

陸上植物は共通の祖先から進化した。進化の最初期にコケ植物と維管束植物が分岐し、その後、コケ植物ではツノゴケ類と蘚苔類が分岐した(図1)。苔類ゼニゴケでは、栄養繁殖制御のマスター遺伝子として *GCAMI* が知られる[1]。*GCAMI* は種子植物で腋芽形成を制御する遺伝子のオーソログであり、栄養繁殖の制御機構は陸上植物の共通祖先ですでに獲得されていたと考えられる(図2)。

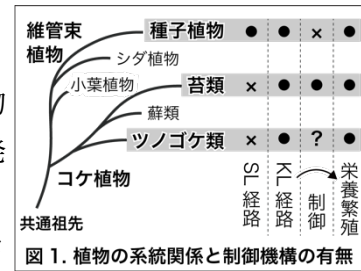


図1. 植物の系統関係と制御機構の有無

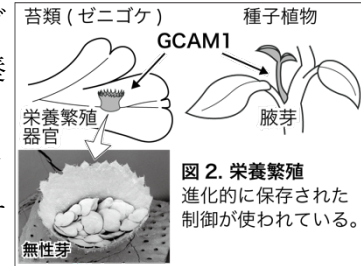


図2. 栄養繁殖 進化的に保存された制御が使われている。

KAI2-Ligand (KL) は、未同定ながらその存在が確実視される新規植物ホルモンである。KL が *KAI2* 受容体に受容されると、抑制因子 *SMXL* が分解され、標的遺伝子が発現する(図3)。KL 信号伝達経路は陸上植物の共通祖先で獲得され、維管束植物では *KAI2* の遺伝子重複でストリゴラクトン (SL) をリガンドとして受容する姉妹経路が生じた。SL は腋芽の伸長を制御する[2]。

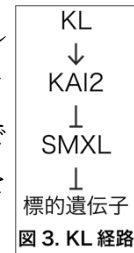


図3. KL 経路

2. 研究の目的

申請者らの研究室では、KL 経路がゼニゴケにおいて無性芽(クローン個体)形成を制御することを見出した。KL 経路を活性化すると無性芽形成が促進され、不活性化すると無性芽形成が阻害される。さらに、*GCAMI* は KL の下流で働く[3]。一方、種子植物では KL 経路は栄養繁殖を制御しない。これらの結果から、KL 経路の祖先的機能は栄養繁殖の制御であり、維管束植物では SL との機能分担で KL 経路はその機能を失ったのではないかと考えた。その結果、*GCAMI* は KL 経路に制御されなくなったと考える。以上を踏まえ、本研究では、KL 経路は栄養繁殖を制御するためのホルモン信号伝達系として誕生したという仮説の検証を目的とした。

3. 研究の方法

まず、(1)ツノゴケにおける KL 経路の機能を解明する。次に、(2)ツノゴケ *GCAMI* の機能を解明するとともに、KL 経路との遺伝学的関係を明らかにする。さらに、(3)ゼニゴケで KL 経路の下流で栄養繁殖を制御する標的遺伝子群を特定し、ツノゴケでも保存されているかを明らかにする(図4)。

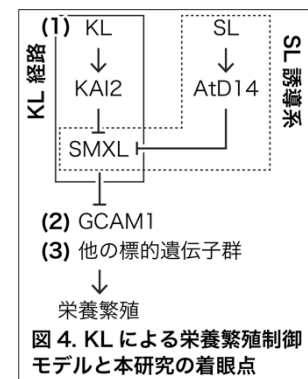


図4. KL による栄養繁殖制御モデルと本研究の着眼点

(1) 研究にはハウライツノゴケを用いる。ハウライツノゴケは無性芽を生産することが知られ、また全ゲノムが解読されている[4]。ハウライツノゴケには、1 コピーの *KAI2*、*SMXL* が存在する。CRISPR/Cas9 によりこれらの機能欠損変異体を作成し、無性芽の数や無性芽をつける領域の変化を解析する。ハウライツノゴケへの形質転換が必要となるため、近縁種であるナガサキツノゴケの手法[5]を応用する。

(2) GCAM1 機能欠損変異体を作成し、無性芽の生産における表現型を解析する。GCAM1 と KAI2 や SMXL との二重変異体を作成し、遺伝学的な上下関係を解析する。蛍光タンパク質を用いたレポーター株を作出して GCAM1 の発現領域を解析する。KAI2 および SMXL 変異体で GCAM1 の発現領域が変化するかを解析する。

(3) 申請者らは、ゼニゴケにシロイヌナズナの SL 受容体 AtD14 を導入し、SL 投与で誘導的に KL 経路を活性化する系を確立した (図 4) [6]。この SL 誘導系を用い、KL 経路の活性化で発現量が変化する遺伝子を RNA-seq で網羅的に探索する。このとき、タンパク質翻訳阻害剤を用いて KL 経路の直接の標的と二次的な応答遺伝子を区別する。ハウライツノゴケでも部位ごとの RNA-seq を行い、栄養繁殖に関わる遺伝子を特定し、ゼニゴケと共通する遺伝子を特定する。(2)と同様にして、KL 経路の下流にあるか、実際に栄養繁殖を制御しているかを解析する。

4. 研究成果

(1) ホウライツノゴケで無性芽の発生様式を解明し、制御因子候補を特定した

ハウライツノゴケでは分子遺伝学研究の先例がなく、無性芽の発生様式や関連する遺伝子も不明であった。そこでまず、ハウライツノゴケの無菌化系統を作出し、均一かつ効率的に成長する培養条件を検討した。次に走査型電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察し、無性芽がどのように生産され、どのように発生するのかを明らかにした。

ハウライツノゴケの各発生段階で RNA-seq を行い、無性芽形成時に特異的に機能する遺伝子を特定した。発生制御に重要と考えられる転写因子に着目すると、ゼニゴケなどで既知の栄養繁殖制御因子はなかった。ハウライツノゴケでは、無性芽の発生様式も他の植物とは異なるユニークなものであり、独自に無性芽形成のしくみを発達させたことが考えられる。したがって、今回発見した遺伝子の機能を解析することで、陸上植物の栄養繁殖機構の多様性の一端を解明できると期待される。

(2) ホウライツノゴケの形質転換手法を確立した

当初、ハウライツノゴケでの遺伝子機能解析を予定していた。しかし、ハウライツノゴケへの遺伝子導入は予想以上に困難であることが判明し、本研究では形質転換手法を確立するにとどまった。

(3) ナガサキツノゴケで KL 経路の機能解析を行った

ハウライツノゴケの代わりに、形質転換手法の確立されていたナガサキツノゴケを用いて、ツノゴケ類における KL 経路の機能を調べた。

KL アナログを処理して 30 分後の遺伝子発現を RNA-seq 解析したところ、遺伝子の発現促進が見られる一方、発現低下はほとんど見られなかった。この結果は、KL 経路は転写抑制因子 SMXL の分解により標的遺伝子の発現を促すという、他の植物でのモデルとよく一致する。処理後 30 分という応答の速さも加味すると、KL 経路により直接制御される遺伝子を数多く特定できていると期待される。

KL 経路の生理機能を明らかにするため、RNA-seq で特定した KL 応答遺伝子のプロモータ活性を可視化するレポーター株を作出した。また、KL の有無によらず分解され

ない非分解型 SMXL を過剰発現する株を作出した。現在これらの株を用いて、KL 経路がいつどこで機能するか、KL 経路を抑制することでどのような表現型が生じるかを解析している。

(4) 進化的に保存された KL 経路の標的遺伝子を解明した

ゼニゴケの SL 誘導系で RNA-seq 解析し、KL 経路の標的遺伝子を明らかにした。ナガサキツノゴケの RNA-seq で特定した遺伝子と重複するオーソログも多数見つかり、進化的に保存された KL 経路の標的遺伝子を特定できている。

発見した遺伝子の一つについて、ゼニゴケで機能欠損株を作出し表現型解析した。栄養繁殖への直接的な影響は見られなかったものの、KL 経路の抑制に関わる機能を持つことを見出しており、KL 経路における重要な制御因子として機能解析を進めている。

文献 [1] Yasui et al. *Curr Biol.* 29(23):3987–3995 (2019). [2] Waters. *Annu Rev Plant Biol.* 68:291–322 (2017). [3] Komatsu et al. *Curr Biol.* 33(7):1196–1210 (2023). [4] Li et al. *Nat Plants.* 6(3):259–272 (2020). [5] Frangedakis et al. *New Phytol.* 232:1488–1505 (2021). [6] Kodama et al. *Nat Commun.* 13(1):3974 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishida S., Suzuki H., Iwaki A., Kawamura S., Yamaoka S., Kojima M., Takebayashi Y., Yamaguchi K., Shigenobu S., Sakakibara H., Kohchi T., Nishihama R.	4. 巻 63
2. 論文標題 Diminished Auxin Signaling Triggers Cellular Reprogramming by Inducing a Regeneration Factor in the Liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 384 ~ 400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac004	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 Suzuki Hidemasa, Kato Hirota, Iwano Megumi, Nishihama Ryuichi, Kohchi Takayuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Auxin signaling is essential for organogenesis but not for cell survival in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac367	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 鈴木秀政	4. 巻 7
2. 論文標題 コケ植物の栄養繁殖の分子基盤解明に向けて	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 64 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kodama K., Rich M.K., Yoda A., Shimazaki S., Xie X., Akiyama K., Mizuno Y., Komatsu A., Luo Y., Suzuki H., Kameoka H., Libourel C., Keller J., Sakakibara K., Nishiyama T., Nakagawa T., Mashiguchi K., Uchida K., Yoneyama K., Tanaka Y., Yamaguchi S., Shimamura M., Delaux P.M., Nomura T., Kyojuka J.	4. 巻 13
2. 論文標題 An ancestral function of strigolactones as symbiotic rhizosphere signals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-31708-3	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hidemasa Suzuki, Junko Kyozyuka
2. 発表標題 Analysis of the vegetative reproduction in the hornwort <i>Anthoceros angustus</i>
3. 学会等名 The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junko Kyozyuka, Aino Komatsu, Kyoichi Kodama, Kazato Kumagai, Hidemasa Suzuki
2. 発表標題 Control of vegetative reproduction by KL signaling in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木秀政、経塚淳子
2. 発表標題 ホウライツノゴケの栄養成長
3. 学会等名 第4 回コケ幹細胞研究
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidemasa Suzuki, Kazato Kumagai, Aino Komatsu, Kyoichi Kodama, Junko Kyozyuka
2. 発表標題 Transcriptome approach to reveal target genes of SMXL in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 3rd International Congress on Strigolactones. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木秀政, 経塚淳子
2. 発表標題 ツノゴケ類ホウライツノゴケにおける栄養繁殖の遺伝的制御
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松 愛乃, 藤林 瑞季, 細矢 福多郎, 熊谷 風杜, 鈴木 秀政, 児玉 恭一, 竹林 裕美子, 小嶋 美紀子, 榊原 均, 経塚 淳子
2. 発表標題 サイトカイニンによるタイ類ゼニゴケの栄養繁殖制御
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷風杜、鈴木秀政、小松愛乃、児玉恭一、経塚淳子
2. 発表標題 苔類ゼニゴケにおけるK L 信号伝達の下流因子探索
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 優音, 萩原 雄樹, 橋本 研志, 鈴木 秀政, 西浜 竜一, 朽津 和幸
2. 発表標題 ゼニゴケのMpRbohSによる活性酸素種 (ROS) 生成の細胞分裂・分化における役割と標的因子の探索
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidemasa Suzuki, Junko Kyojuka
2. 発表標題 Analysis of the vegetative reproduction in the hornwort <i>Anthoceros angustus</i>
3. 学会等名 EMBO Worksop: An integrated view of early land plant evolution (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryuichi Nishihama, Sakiko Ishida, Hidemasa Suzuki, Takayuki Kohchi
2. 発表標題 Low auxin responsiveness, key to cellular reprogramming and stem cell regulation in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 EMBO Worksop: An integrated view of early land plant evolution (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidemasa Suzuki, Junko Kyojuka
2. 発表標題 Analysis of vegetative reproduction in the hornwort <i>Anthoceros angustus</i>
3. 学会等名 日本植物生理学会第64回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazato Kumagai, Hidemasa Suzuki, Aino Komatsu, Kyoichi Kodama, Xie X, Junko Kyojuka
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるKL信号伝達系の下流因子探索
3. 学会等名 日本植物生理学会第64回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	Aino Komatsu, Mizuki Fujibayashi, Fukutaro Hosoya, Kazato Kumagai, Hidemasa Suzuki, Kyoichi Kodama, Yohei Mizuno, Yumiko Takebayashi, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Xiaonan Xie, Satoshi Naramoto, Junko Kyozyuka
2. 発表標題	Cytokinin works downstream of the KL signaling pathway to control vegetative reproduction in <i>Marchantia polymorpha</i> .
3. 学会等名	日本植物生理学会第64回大会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Yuto Yamashita, Yuki Hagiwara, Kenji Hashimoto, Hidemasa Suzuki, Ryuichi Nishihama, Kazuyuki Kuchitsu
2. 発表標題	Roles and downstream gene networks of Rboh-mediated ROS production in cell division pattern and cell cycle progression in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名	日本植物生理学会第64回大会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	鈴木秀政、経塚淳子
2. 発表標題	ホウライツノゴケの栄養成長
3. 学会等名	第4回コケ幹細胞研究会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	鈴木秀政、経塚淳子
2. 発表標題	ツノゴケ類ホウライツノゴケの栄養繁殖の解析
3. 学会等名	第5回コケ幹細胞研究会
4. 発表年	2023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
---------	---------