

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07104

研究課題名(和文) 植物の有性生殖器官形成の新奇マスター転写因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of a novel master transcription factor for sexual organ development in land plants

研究代表者

山岡 尚平 (Yamaoka, Shohei)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00378770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：苔類ゼニゴケの有性生殖器官形成を統御するマスター転写因子MpBONOBO (MpBNB)を同定した。MpBNBは生殖始原細胞で発現し、造卵器・造精器の発生を主に制御することが示唆された。分子系統解析によれば、MpBNBは陸上植物全体で保存された転写因子ファミリーの一員であった。シロイヌナズナの相同遺伝子BNB1とBNB2は花粉の雄原細胞分化に冗長的に必要であり、その機能はMpBNBで置き換えることができた。これらのことから、BNBファミリーは進化的に保存された陸上植物の生殖細胞の分化制御因子と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Here we identified a master transcription factor MpBONOBO (MpBNB) that controls sexual organ development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. MpBNB is expressed in the initial cells that are destined to develop into archegonia and antheridia, suggesting its major role in archegonial/antheridial development. Phylogenetic analysis suggested that MpBNB is a member of an evolutionarily conserved transcription factor family. Arabidopsis BNB1 and BNB2 are redundantly required for specification of generative cell in developing pollen, and are functionally replaceable with MpBNB. These findings suggest evolutionarily conserved role of BNB family proteins in the regulation of germ cell differentiation from gametophytes in land plants.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：生殖細胞 発生・分化 転写因子 陸上植物 ゼニゴケ

1. 研究開始当初の背景

被子植物の有性生殖器官形成は、花芽の形成であり、その制御メカニズムの理解は大きく進んでいる。一方、被子植物以外の植物では、有性生殖器官の形成を制御する分子メカニズムはほぼ未解明である。

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* subsp. *ruderalis*) は雌雄異株の苔類であり、成熟植物体は葉状体として栄養成長を行う。有性生殖は、雌雄それぞれの株が造卵器・造精子を形成することにより行われる。これらは生殖器托とよばれる、傘状(メス)もしくはテーブル状(オス)の先端部と柄をもつ組織の中につくられる。この生殖器形成には、遠赤外光(FR)に富む光質と長日条件が必要である (Chiyoda et al., 2008; Kubota et al., 2014)。FRの感知とシグナル伝達は、ゼニゴケにそれぞれ1遺伝子のみ存在する赤色光受容体フィトクロムと、その下流の転写因子 MpPIF (Inoue et al., 2016) が担う可能性が考えられる。また日長の感知は、被子植物と類似のメカニズムによると考えられる。ゼニゴケにはシロイヌナズナの日長感知に関わる *GI* および *FKF1* のオルソログが1遺伝子ずつ (Mp*GI*, Mp*FKF*) あり、それらが複合体を形成して長日を感じ、生殖器形成を促進する (Kubota et al., 2014)。一方で、こうした光シグナル伝達の下流にあって、生殖器形成を実行する因子は不明であった。

研究代表者はこれまで、パーティクルガンによるゼニゴケ形質転換法を開発し (Takenaka et al., 2000)、FRを含まない光条件下でも恒常的に生殖器を形成する変異体 hpt2040 を単離した (Yamaoka et al., 2004)。次世代シーケンサー解析および分子遺伝学解析により、hpt2040 のゲノムには約 422 kb の領域の逆位と隣接する 51 kb の領域の欠失があり、これらは変異表現型と遺伝的に連鎖していることを明らかにした。さらに RNA-seq 解析により、この領域に 45 個の遺伝子が存在し、このうちの1つの遺伝子のみ、栄養組織ではほとんど発現せず、生殖器托で高い発現を示すことを明らかにした。この遺伝子は新奇的な basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子をコードしており、Mp*BONOBO* (Mp*BNB*) と名付けた。Mp*BNB* を過剰発現させたところ、雌雄それぞれの個体で光質・日長に依存せず生殖器托が形成された (図1)。このことから、hpt2040 は Mp*BNB* の過剰発現

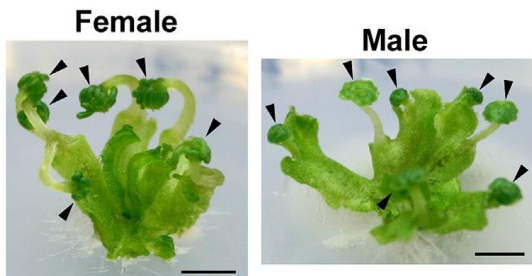


図1 Mp*BNB* 過剰発現株。矢じりは雌雄生殖器官、バーは 5 mm を示す。

をもたらず変異であり、Mp*BNB* は光質・日長シグナルの下流に位置し、生殖器形成を統御する遺伝子であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、1) 転写因子 Mp*BNB* がゼニゴケにおける生殖器形成のマスター制御因子であることを示す。2) Mp*BNB* の分子機能を解明する。3) *BNB* 機能が進化的に保存されているかを検証する。4) 光シグナルによる Mp*BNB* 発現制御機構について解析する。5) Mp*BNB* の標的因子の網羅的な同定・解析を試みる。

3. 研究の方法

ゼニゴケにおける遺伝子ノックアウト、および Mp*BNB* コーディング領域への蛍光タンパク質 (Citrine) 配列挿入 (ノックイン) には、相同組換えによるジーン・ターゲティング法を用いた (Ishizaki et al., 2013)。Mp*BNB*-Citrine の可視化には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体 (ABRC) の交配により多重変異体を作成した。花粉表現型の解析は DAPI 染色および H3.10-RFP (生殖系列マーカー; Ingouff et al., 2007) の導入により行った。

4. 研究成果

1) Mp*BNB* はゼニゴケ生殖器形成のマスター転写因子である

Mp*BNB* がゼニゴケ生殖器形成に必要なことを示すため、ノックアウト植物 (Mp*bnb^{ko}*) を作成した。その結果、誘導光条件下において生殖器托形成が完全に抑制された (図2)。



図2 野生株 (WT) および Mp*bnb^{ko}* 株の表現型。点線四角内を各写真右下に拡大。バーは 1 cm、拡大写真では 5 mm を示す。

また、Mp*BNB* の活性化が生殖器托形成に十分であることを示すため、グルココルチコイド受容体配列 (GR) を Mp*BNB* に付加して発現させたところ、この Mp*BNB*-GR 株はデキサメサゾン (DEX) 依存的に生殖器托を形成した (図3)。このことから、Mp*BNB* は生殖器托形成に必要なかつ十分なマスター転写因子であることが示された。



図3 MpBNB-GR 株の DEX による誘導時(+)および非誘導時(-)の表現型。点線四角内を各写真右下に拡大。バーは 1 cm、拡大写真では 5 mm を示す。

2) MpBNB は生殖始原細胞の分化を制御する
MpBNB の局在を明らかにするため、蛍光タンパク質 Citrine の配列を MpBNB 遺伝子の末端にノックインした。その結果、MpBNB-Citrine は造卵器・造精器へと分化する最初の細胞(生殖始原細胞)で蓄積し、発生が進んで未成熟の造卵器・造精器が形成されることに消失した(図4)。

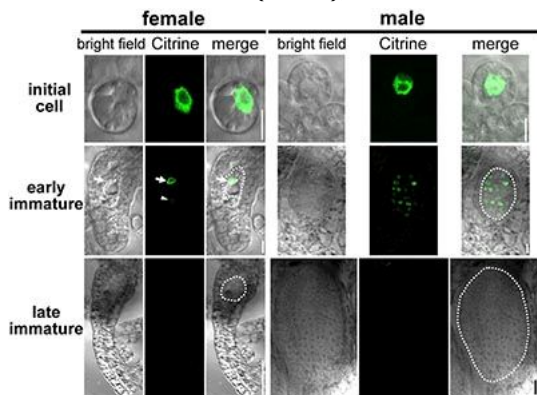


図4 造卵器・造精器発生における MpBNB-Citrine 蛍光。生殖始原細胞核と未成熟の生殖器でみられ、矢印は卵細胞核、矢じりは腹溝細胞核、点線で囲む部分は精原細胞。バーは 10 μm (始原細胞、未成熟期早期)もしくは 50 μm (未成熟期後期)を示す。

また MpBNB-Citrine 蛍光を示す生殖始原細胞は、光誘導開始後すぐに葉状体の頂端部で観察され、その後その数が増えるとともに、それらを含む組織がドーム状の生殖器原基へと変形していく様子が観察された。加えて、MpBNB-Citrine 蛍光は、光誘導がなければ観察されなかった。これらのことから、MpBNB は主に生殖始原細胞の分化を制御しており、その分化に伴って、周囲の組織が生殖器托へと変化していくことが示唆された。

3) BNB ファミリーは進化的に保存された生殖細胞分化の制御因子である

ゼニゴケ・ゲノムの解析の一環として、陸上植物と藻類がもつ bHLH 転写因子の分子系

統解析を行った結果、MpBNB は陸上植物全体でのみ保存されている、機能未知のサブファミリー-VIIIa に属することが明らかとなった。シロイヌナズナは3つの VIIIa メンバーを持っており、これらを *BNB1*、*BNB2*、*BNB-LIKE (BNL)*と名付けた。このうち、*BNB1* と *BNB2* の二重変異体から得られる変異型(*bnb1 bnb2*)の花粉では、精細胞が失われていた(図5)。

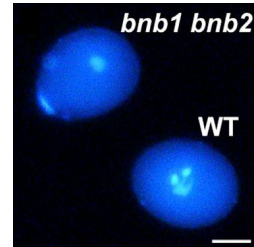


図5 野生型と *bnb1 bnb2* 変異型の成熟花粉。バーは 10 μm。

花粉は、減数分裂後に生じる小胞子が非対称分裂し、小さい方の娘細胞が雄原細胞に分化し、それが大きい方の娘細胞(栄養細胞)に取り込まれ(エンドサイトーシス)細胞質内で等分裂して精細胞がつくられてできる3核の雄性配偶体である(Bérgér & Twell, 2011)。*bnb1 bnb2* 変異型の花粉では、非対称分裂後のエンドサイトーシスが見られず、また雄原細胞のマーカである H3.10-RFP の発現もみられなかった。この変異表現型は、*BNB1* か *BNB2* のいずれかで相補することができた。これらのことから、*BNB1* と *BNB2* は冗長的に雄原細胞の分化に必要であることがわかった。

bnb1 bnb2 変異表現型は、*GFP-BNB2* の発現によっても相補された。この植物を用いて *BNB2* の局在を調べたところ、*GFP-BNB2* は小胞子非対称分裂後の小さい娘細胞(2核早期)でのみ明確な発現がみられ、精細胞を含む、その後の発生段階では蛍光が観察されなかった。このことから、*BNB2* は非対称分裂後の2核早期にのみ一過的に発現することが示唆された(図6)。

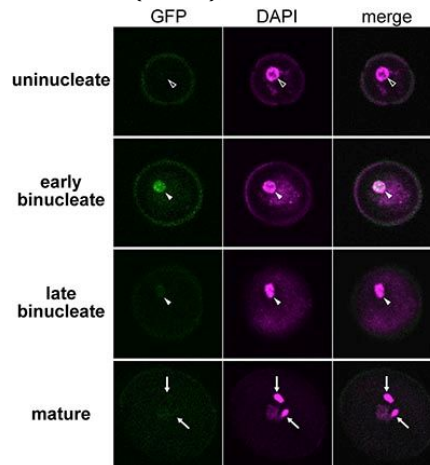


図6 花粉発生における GFP-BNB2 蛍光。黒矢じりは小胞子核(1核期)、白矢じりは2核期の細胞核、矢印は精細胞。バーは 10 μm。

bnb1 bnb2 変異表現型は、MpBNB を BNB2 プロモーターにより発現させることによっても部分的に相補できた。相補された花粉は、精細胞 2 つ、もしくは 1 つ (雄原細胞の等分裂がみられない) という表現型を示した。これらのことから、BNB の機能は、ゼニゴケとシロイヌナズナの間で進化的に保存されていることが示唆された。

全ての陸上植物は、共通の祖先 (車軸藻類) から進化してきた。またその生殖細胞を、半数体 (*n*) である配偶体の中に分化させる。ゼニゴケは、卵・精子を、造卵器・造精器形成を介して、配偶体である葉状体の中に分化させる。またシロイヌナズナを含む被子植物は、精細胞を雄性配偶体である花粉の中に分化させる。進化的にみれば、被子植物の配偶体は、祖先の陸上植物 (現生コケ植物に似ていると考えられる) がもっていた配偶体が縮退し数細胞になったものである (Bérgér & Twell, 2011)。本研究により、BNB を含む VIIIa サブファミリーの bHLH 転写因子は、配偶体からの生殖細胞分化に中核的な役割を果たしている進化的に保存された制御因子であることが示唆された。

4) 光シグナルによる MpBNB の発現制御の解析

長日 (16 時間明期・8 時間暗期)・短日 (8 時間明期・16 時間暗期) 下での MpBNB の発現を調べた。その結果、長日では約 2~3 週間で雌雄ともに MpBNB の発現が顕著に上昇し、ほぼ同時に生殖細胞托原基の形成がみられた。一方、短日では MpBNB の顕著な発現上昇はみられなかった。また、長日条件下において、MpBNB の発現、および MpBNB-Citrine の蓄積は FR 依存的であった。誘導光条件下で *Mpgl^{ko}*, *Mpfk^{ko}* 変異株での MpBNB の発現を調べたところ、顕著な発現上昇は見られなかった。以上のことから、ゼニゴケの生殖器官形成は、MpGI および MpFKF による日長経路、およびフィトクロム・シグナル経路により MpBNB の発現が促進されて引き起こされることが示唆された。

5) MpBNB の標的因子の網羅的同定・解析

MpBNB の標的因子を同定するために、MpBNB-GR 株を DEX により誘導し、RNA シークエンス (RNAseq) 解析により数時間後に発現変動する遺伝子を網羅的に明らかにすることを試みた。標的候補の遺伝子として、転写因子、代謝酵素、分泌性ペプチドなどが見出された。これらは雌雄両方で発現するもの、性特異的に発現するものに区別できた。これらのことから、MpBNB は遺伝子発現・代謝・シグナル伝達など、多様な過程を一元的に制御していることが示唆された。

引用文献 Chiyoda et al., *Plant Cell Rep.* 27:1467-1473, 2008; Kubota et al., *Nat. Commun.* 5:3668, 2014; Inoue et al., *Plant Cell* 28: 1406-1421, 2016; Takenaka et al., *Transgenic*

Res. 9:179-185, 2000; Yamaoka et al., *Sex. Plant Reprod.* 16: 253-257, 2004; Ishizaki et al., *Sci. Rep.* 3:1532, 2013; Ingouff et al., *Curr. Biol.* 17:1032-103, 2007; Bérgér & Twell, *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 461-484, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Yamaoka S, Nishihama R, Yoshitake Y, Ishida S, Inoue K, Saito M, Okahashi K, Bao H, Nishida H, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T. (2018) Generative Cell Specification Requires Transcription Factors Evolutionarily Conserved in Land Plants. *Curr. Biol.* 28:479-486.
2. Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, Jenkins J, Shu S, Ishizaki K, Yamaoka S, Nishihama R, Nakamura Y, Berger F, et al. (2017) Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* 171:287-304.
3. Hatsugai, N., Hillmer, R., Yamaoka S, Hara-Nishimura, I., Katagiri, F. (2016) The μ Subunit of *Arabidopsis* Adaptor Protein-2 Is Involved in Effector-Triggered Immunity Mediated by Membrane-Localized Resistance Proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29:345-351.
4. Yamashita, A., Fujimoto, M., Katayama, K., Yamaoka S, Tsutsumi, N., Arimura, S. (2016) Formation of Mitochondrial Outer Membrane Derived Protrusions and Vesicles in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 11:e0146717. doi: 10.1371/journal.pone.0146717.
5. Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka S, Kohchi, T., Hori, K., Ohta, H., Shikanai, T., Nishimura, Y. (2015) Eukaryotic Components Remodeled Chloroplast Nucleoid Organization during the Green Plant Evolution. *Genome Biol. Evol.* 8:1-16.
6. 山岡尚平・河内孝之 (2016) 植物における日長による成長相転換制御のメカニズムとその進化 **植物科学の最前線 (BSJ-Review)** 7:78-86.
7. 河内孝之・山岡尚平 (2016) 植物の陸上進出と成長相転換 **化学と生物** 54:591-597.

〔学会発表〕(計 41 件)

1. 山岡尚平, 西浜竜一, 吉竹良洋, 石田咲子, 井上佳祐, 齊藤美咲, 岡橋啓太郎, 包昊南, 西田浩之, 山口勝司, 重信秀治, 石崎公庸, 大和勝幸, 河内孝之 (2018) 転写因子 BONOBO は陸上植物の生殖系列細胞の分化に必要である 第 59 回日本植物生理学会年会
2. 山岡尚平, 西浜竜一, 石崎公庸, 大和勝

幸, 河内孝之 (2018) ゼニゴケ・ゲノムにおける植物ホルモン合成・シグナル伝達系遺伝子 日本農芸化学会 2017 年度大会

3. Yamaoka S, Nishihama R, Yoshitake Y, Ishida S, Inoue K, Saito M, Okahashi K, Bao H, Nishida H, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T. (2017) BONOBOs Are Evolutionarily Conserved Transcription Factors for Germ Cell Fate Determination in Land Plants. *The 65th NIBB Conference Renaissance of Marchantia polymorpha - the genome and beyond* - (国際学会)
4. Yamaoka S, Inoue K, Nishihama R, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T. (2017) The transcription factor BONOBO controls sexual organ development in the basal land plant *Marchantia polymorpha*. *50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists*
5. Yamaoka S, Inoue K, Nishihama R, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T. (2016) The transcription factor BONOBO plays a central role in transition from vegetative to reproductive growth in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *EMBO Workshop - New model systems for early land plant evolution* (国際学会)
6. 山岡尚平, 井上佳祐, 友金寛和, 西浜竜一, 山口勝司, 重信秀治, 石崎公庸, 大和勝幸, 河内孝之 (2016) 苔類ゼニゴケの成長相制御因子 BONOBO の日長・光質による発現制御 第 57 回日本植物生理学会年会

他、共著発表 3 5 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 山岡尚平 (2018)「12 章 形づくりの不思議 動物・植物の発生 12.2 節 植物の発生」 **京大発！フロンティア生命科学** 京都大学大学院生命科学研究科編 講談社サイエンティフィック 182-188.
2. 山岡尚平 (2018)「13 章 体を守るしくみ 動物と植物の生体防御機構 13.2 節 植物の病害抵抗性の分子機構」 **京大発！フロンティア生命科学** 京都大学大学院生命科学研究科編 講談社サイエンティフィック 204-207.

〔その他〕

ホームページ等

植物の生殖細胞をつくる鍵因子を発見-花粉の精細胞をつくる仕組みは花の咲かないコケ植物に起源があった-

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/180126_1.html

植物の生殖細胞をつくる鍵因子を発見
<http://www.nibb.ac.jp/analyins/jp/?p=4723>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 尚平 (YAMAOKA, Shohei)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：00378770

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

河内孝之 (KOHCHI, Takayuki)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：40202056

西浜竜一 (NISHIHAMA, Ryuichi)
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：70283455

大和勝幸 (YAMATO, Katsuyuki T.)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：50293915

石崎公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)
神戸大学・理学研究科・准教授
研究者番号：00452293

重信秀治 (SHIGENOBU, Shuji)
基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授
研究者番号：30399555

山口勝司 (YAMAGUCHI, Katsushi)
基礎生物学研究所・生物機能解析センター・技術職員

吉竹良洋 (YOSHITAKE, Yoshihiro)
京都大学・大学院生命科学研究科・特定助教

井上佳祐 (INOUE, Keisuke)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：20805931

石田咲子 (ISHIDA, Sakiko)
齊藤美咲 (SAITO, Misaki)
岡橋啓太郎 (OKAHASHI, Keitaro)
包昊南 (BAO, Haonan)
西田浩之 (NISHIDA, Hiroyuki)
京都大学・大学院生命科学研究科