

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06065・19K21189

研究課題名(和文)植物シグナル伝達ハブモジュールGSK3-BES1/BZR1の起源的役割の解析

研究課題名(英文)Analysis of ancestral roles of a plant-specific GSK3-BES1 signaling module

研究代表者

古谷 朋之(Furuya, Tomoyuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：10827356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：GSK3-BES1シグナリングモジュールは顕花植物において維管束細胞分化やブラシノステロイド応答など様々な発生プロセスにおいて働く。GSK3やBES1/BZR1のホモログは少なくとも陸上植物において幅広く存在しているが、GSK3-BES1モジュールの祖先的な機能や役割はわかっていない。そこで私は基部陸上植物ゼニゴケを用いてこのモジュールの機能を解析した。MpGSK3の機能欠損体とMpBES1の過剰発現体は葉状体分化において類似の欠損が見られたことからこのモジュールがゼニゴケにおいて葉状体分化に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の発生、環境応答で様々なシグナル伝達経路において機能するGSK3-BES1シグナリングモジュールがどのように獲得されてきたのかを探るために、基部陸上植物であるゼニゴケにおけるこのモジュールの解析を行った。結果としてゼニゴケにおいても、このシグナリングモジュールが発生に寄与する重要な役割を持つことが示唆された。この結果はこのシグナリングモジュールの役割や機能をシンプルに理解することにつながるとともに、今後、さらに多岐にわたるシグナル伝達経路の解析に寄与することが予想される。

研究成果の概要(英文)：The GSK3-BES1 signaling module acts in various developmental processes such as vascular cell differentiation and brassinosteroid response in flowering plants. Although GSK3s and BES1/BZR1 homologs are widely conserved at least in the land plant lineage, the ancestral function and role of the GSK3-BES1 module are still unknown. Then, I analyzed the GSK3-BES1 module using a basal land plant, *Marchantia polymorpha*. Both MpGSK3 knock-out lines and MpBES1 over expressing lines showed similar defect in thallus differentiation, suggesting that the GSK3-BES1 module in *M. polymorpha* may contribute thallus differentiation.

研究分野：植物発生学

キーワード：シグナル伝達 ゼニゴケ 発生 形態形成 植物進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物細胞は、周囲の環境(外環境や隣接する細胞等)からのシグナルを受容し、それに応じた細胞内シグナル伝達経路を活性化することで環境変化への適応や正確かつ柔軟な形態形成を行なう。このシステムは、動物と異なり移動能を持たない植物が生存していくために極めて重要であるといえる。タンパク質リン酸化酵素GSK3ファミリーとBES1/BZR1転写因子ファミリーは様々な環境、発生シグナルのシグナル伝達に関わるハブモジュールとして働くことがわかっている。代表的なものとしては植物ホルモンであるブラシノステロイドや維管束幹細胞維持に関わるCLEペプチドホルモンTDIFのシグナル伝達において重要な役割を担っている(Yin et al. 2002, Kondo et al. 2014)。転写因子BES1/BZR1はGSK3によるリン酸化によって負に制御されており、非リン酸化状態の活性型BES1/BZR1は多数の遺伝子発現の制御に関与することが示唆されている(Sun et al. 2010)。GSK3は真核生物において幅広く存在し、またBES1/BZR1ファミリーは植物特有の転写因子群であることから、このGSK3-BES1/BZR1モジュールは植物の進化に伴い獲得されてきたと考えられる。一方、このモジュールがブラシノステロイドや維管束形成にいつ関連付けられたのか、またその起源的な役割がどのようなものかはわかっていない。そこで、GSK3-BES1/BZR1モジュールの起源的な役割を解明することで、陸上植物の進化にどのように寄与してきたのかに迫りたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シグナル伝達モジュールGSK3-BES1/BZR1の起源的役割を解明することである。このシグナル伝達モジュールの研究はこれまでシロイヌナズナやイネを含むいくつかの被子植物に限られており、基部陸上植物に位置するコケ植物での役割はわかっていない。そこで本研究では、近年モデル植物として研究の基盤が構築されてきたタイ類ゼニゴケ*Marchantia polymorpha L.*を用いて解析を進め(Bowman et al. 2017)、ゼニゴケにおけるGSK3-BES1モジュールの機能を明らかにし、さらにその下流遺伝子発現および上流シグナルを探索することで、その起源的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

ゼニゴケGSK3 (MpGSK3)、BES1 (MpBES1) 機能欠損ゼニゴケの作出と形態学的観察

ゼニゴケは他の植物と比べて、遺伝子の冗長性が低いという特徴を持っている。シロイヌナズナにおいてGSK3は10個、BES1/BZR1は6個のホモログが存在し、それらの間には機能的冗長性があることも示唆されていた。そのため機能欠損変異体を用いた解析を進める上での障壁となっていた。実際に、ゼニゴケではGSK3は一つであり、またBES1/BZR1は3つのホモログが存在しているが、BES1/BZR1に極めて近い類似性が見られるものは一つである。つまりゼニゴケを用いることで容易に機能欠損変異体の解析が可能である。そこで、ゼニゴケの簡便かつ高効率の形質転換法を利用しCRISPR法によるMpGSK3およびMpBES1遺伝子破壊株を作出する。形態学的観察などからMpGSK3、MpBES1がゼニゴケの形態形成等にどのように寄与しているのかを明らかにする。

各種形質転換ゼニゴケを用いた機能解析

遺伝子機能を解析する上でそれらの発現パターンやタンパク質の細胞内局在を調べることは重要である。特にシロイヌナズナにおいてはGSK3によるBES1のリン酸化は細胞内局在に影響し、機能制御に関与することが知られている。ゼニゴケでは発現パターンや細胞内局在を調べるためのツールがすでに構築されているのでそれらを用いて解析を行なう。加えて、過剰発現体や活性型変異体を作成し機能欠損体と比較することで機能解析を進める。

タンパク質機能の進化的保存性の評価

ゼニゴケにおけるGSK3やBES1のタンパク質機能が陸上植物において保存されているのかを評価する。シロイヌナズナ*bes1 bzr1*二重機能欠損変異体はファミリー遺伝子の冗長性からブラシノステロイド応答性への影響はわずかであるが、申請者が所属する研究室で確立された組織培養系における維管束分化誘導システムVISUALでその分化誘導が生じない変異体であることがわかっている(Saito et al. 2018)。そこでゼニゴケMpBES1がこの系において*bes1 bzr1*変異を相補できるのかにより評価可能である。逆に、MpGSK3およびMpBES1のゼニゴケ機能欠損体の表現型をシロイヌナズナGSK3、BES1が相補できるのかも評価できる。

MpGSK3-MpBES1 下流応答性遺伝子の同定

BES1BZR1ファミリーは転写因子であり多くの遺伝子発現を制御していることが知られているが、ゼニゴケにおける転写因子としての機能は未解明である。そこでMpBES1機能欠損株および活性型変異体を用いた下流遺伝子候補の特定を試みる。ゼニゴケのRNA-seq技術はすでに構築されており、トランスクリプトーム解析を進める。さらに、MpGSK3機能欠損株等を組み合わせることでこのハブモジュール特異的な下流因子を絞り込む。

MpGSK3-MpBES1 上流シグナルの解明

最終的に、ゼニゴケにおけるGSK3-BES1モジュールのインプットとなるシグナル因子を特定したいと考えている。MpGSK3、MpBES1の機能欠損株等の表現型や下流制御因子の発現などを指標にスクリーニングすることで上流シグナルの特定を進める。また被子植物における上流シグナルであるブラシノステロイドやTDIFペプチドは有力な候補であるのでこれらをゼニゴケに処理した際にどのようなようになるのか、またMpGSK3、MpBES1機能欠損株で応答が見られるのかを調べる。

4. 研究成果

ゼニゴケGSK3 (MpGSK3)、BES1 (MpBES1) 機能欠損ゼニゴケの作出と形態学的観察

ゼニゴケの簡便かつ高効率の形質転換法を利用し、CRISPR法によるMpGSK3機能欠損変異体やMpBES1機能欠損変異体の作出を試みた。MpGSK3機能欠損体は葉状体への分化が抑制され未分化細胞塊のような表現型を示した。一方で、MpBES1機能欠損変異体は得ることができていない。この要因としてMpBES1の機能欠損は致死性である可能性もあるので、条件特異的機能欠損株の作出などの準備を進めている。

各種形質転換ゼニゴケを用いた機能解析

遺伝子発現パターンを解析するためにMpBES1の上流5kbpのプロモーター領域を使用したレポーターラインを作出し、ゼニゴケ葉状体での発現を確認したところ、特に成長点であるノッチ付近で強く発現がみられた。またMpBES1過剰発現を作出したところ、葉状体への分化が抑制される表現型を示した。この表現型はMpGSK3機能欠損変異体と類似していた。一方でMpGSK3過剰発現体は得られなかったため、誘導型過剰発現体の作出を進めている。

タンパク質機能の進化的保存性の評価

MpBES1過剰発現体で顕著な葉状体分化が抑制された表現型が見られたので、シロイヌナズナのBES1およびBZR1のゼニゴケでの過剰発現体を作成したところ、類似した表現型が見られた。このことはタンパク質機能が保存されている可能性を支持する結果である。

MpGSK3-MpBES1 下流応答性遺伝子の同定

作出したMpGSK3機能欠損変異体およびMpBES1過剰発現体は共に葉状体の細胞分化を抑制する表現型を示し類似性が見られた。これら変異体のRNA-seqによるトランスクリプトーム解析

を行なったところ類似の遺伝子発現プロファイルを示したことから似た表現型であることが考えられる。また多くの発現が変動している遺伝子が見出されてきており、加えて作出を進めているMpBES1誘導型過剰発現体を用いてさらなる解析を進めることで下流遺伝子を特定していく。

MpGSK3-MpBES1 上流シグナルの解明

MpGSK3とMpBES1のタンパク質間相互作用がBiFC法により検出されたことからゼニゴケにおいてもGSK3とBES1/BZR1がシグナリングモジュールを形成していることが示唆された。これまでシロイヌナズナではGSK3はBES1を抑制することがわかっているが、MpGSK3の機能欠損変異体とMpBES1過剰発現体が類似した表現型を示していることを考えると、ゼニゴケでは抑制する関係ではないのかもしれない。さらに上流候補であるブラシノステロイド処理とこれらの変異体の表現型に共通性はほとんど見いだせなかった。ゼニゴケにおける上流経路の特定にはさらなる研究が必要である。

これらの成果に加えて、ゼニゴケにおいて存在している他のBES1/BZR1ホモログについても過剰発現体を作成したところ、MpBES1とは異なった表現型を示した。MpBES1が最も被子植物のホモログと近縁であることから考えても、基部陸上植物においてBES1/BZR1機能が多様であり、植物進化に伴ってダイナミックに変遷していったことが示唆する結果を得た。

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Furuya Tomoyuki, Kimori Yoshitaka, Tsukaya Hirokazu	4. 巻 10
2. 論文標題 A Method for Evaluating Three-Dimensional Morphological Features: A Case Study Using Marchantia polymorpha	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01214	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 Nurani Alif Meem, Ozawa Yasuko, Furuya Tomoyuki, Sakamoto Yuki, Ebine Kazuo, Matsunaga Sachihiro, Ueda Takashi, Fukuda Hiroo, Kondo Yuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Deep Imaging Analysis in VISUAL Reveals the Role of YABBY Genes in Vascular Stem Cell Fate Determination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 255 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa002	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 Matsuoka Daisuke, Furuya Tomoyuki, Iwasaki Tetsushi, Nanmori Takashi	4. 巻 592
2. 論文標題 Identification of tyrosine autophosphorylation sites of Arabidopsis MEKK1 and their involvement in the regulation of kinase activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3327 ~ 3334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/1873-3468.13242	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 Iwabuchi Kosei, Ohnishi Haruna, Tamura Kentaro, Fukao Yoichiro, Furuya Tomoyuki, Hattori Koro, Tsukaya Hirokazu, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 179
2. 論文標題 ANGUSTIFOLIA Regulates Actin Filament Alignment for Nuclear Positioning in Leaves	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 233 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1104/pp.18.01150	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 古谷朋之, 齊藤真人, 内村悠, 野崎翔平, 宮川拓也, 佐竹暁子, 島津舜治, 矢守航, 田之倉優, 福田裕穂, 近藤侑貴
2. 発表標題 BES/BZR 転写因子の競争的な関係が幹細胞維持の堅牢性を向上させる
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 Tomoyuki Furuya, Kimitsune Ishizaki, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Hiroo Fukuda, Yuki Kondo
2. 発表標題 The Roles of BZR/BES Transcription Factors in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 古谷 朋之, 石崎 公庸, 西浜 竜一, 河内 孝之, 福田 裕穂, 近藤 侑貴
2. 発表標題 ゼニゴケ組織分化へのBZR転写因子ファミリーの寄与
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Tomoyuki Furuya, Masato Saito, Haruka Uchimura, Shunji Shimadzu, Wataru Yamori, Shohei Nosaki, Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura, Hiroo Fukuda, Yuki Kondo
2. 発表標題 Competitive relationship among BES1/BZR1 transcription factor family
3. 学会等名 International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 古谷 朋之, 石崎 公庸, 西浜 竜一, 河内 孝之, 福田 裕穂, 近藤 侑貴
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるBZR転写因子ファミリーの役割
3. 学会等名 日本植物形態学会第31回大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 古谷 朋之, 石崎 公庸, 西浜 竜一, 河内 孝之, 福田 裕穂, 近藤 侑貴
2. 発表標題 GSK3-BES1シグナリングモジュールのゼニゴケにおける役割
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----