

平成 29 年 5 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06271

研究課題名(和文)ゼニゴケの重力応答シグナリング因子の単離・解析

研究課題名(英文)Analysis of gravity responses in *Marchantia polymorpha* L.

研究代表者

杉本 美海(橋本美海)(Mimi, Hashimoto-Sugimoto)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：70437755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの重力応答に関わる遺伝子のゼニゴケオルソログの解析を行った。その結果、発現時期やパターンを同定でき、過剰発現体ではオーキシン生合成遺伝子の過剰発現体と類似した表現型が見られた。重力応答はオーキシンの偏差分布に起因する成長反応なので、この遺伝子が種を超えてオーキシンのシグナリングに関与している可能性が示唆された。また、ゼニゴケの重力応答に関わる遺伝子の変異体スクリーニングについて、仮根や生殖器の重力応答性を検討したが、同一個体でも一様な応答が見られないこと、定量化が難しいことがわかった。そこで条件検討を行い、重力に依存した明確に定量化が可能な表現型を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed MpRLD gene which is just one orthologue of *Arabidopsis* AtRLD1-4 involved in gravity responses. We identified MpRLD gene expression patterns, and its overexpression induced morphologically similar phenotype to overexpression lines of phytohormone auxin synthesis gene in *M. polymorpha*. This suggests that the RLD genes in *Arabidopsis* and liverwort have a common role in auxin signaling which requires gravity responses. We are challenging to isolate novel mutants which have defect in gravity responses in the liverwort. We examined which phenotypes and growth conditions should be payed attention for the mutant screen, and we found one of the best conditions for it.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：植物 環境応答 分子メカニズム ゼニゴケ 変異体

## 1. 研究開始当初の背景

重力応答は根を水分や栄養分が豊かな地中へ、地上部を光合成や生殖に有利な上方へと成長させるという陸上植物にとって重要な環境応答の一つである。我々の研究室ではシロイヌナズナを用いた重力応答メカニズムの研究がおこなわれてきた。重力屈性反応は、重力感受細胞におけるアミロプラストの沈降がきっかけとなり、最終的にはオーキシンの偏差分布による偏差成長によって引き起こされると考えられている。しかしこの2つをつなぐ分子機構に関しては不明な点が多い。重力感受細胞に着目した独自のトランスクリプトーム解析の結果重力シグナリングに重要なタンパク質ファミリーDLLs とその相互作用因子 RLD を単離した。これまで高等植物のモデル植物であるシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的な研究が進められており、重力応答にかかわる因子もいくつか明らかとなってきた。しかし、従来のスクリーニング法では既存のものが単離されることも多く、新奇遺伝子の単離が難しくなっている。この原因の一つに高等植物における遺伝子機能の冗長性があげられる。ゼニゴケを含む苔類は進化上最初に陸上に進出したと考えられており、重力応答性の基本単位を持つと考えられる。またゼニゴケは遺伝子の冗長性が低いため、これを実験材料として用いることで高等植物では発見できなかった重力関連遺伝子を発見する突破口となる可能性がある。近年、ゼニゴケへの遺伝子導入、CRISPR を用いた遺伝子破壊株作製などが容易となり、分子遺伝学的研究を進めやすい環境が整ってきている。

## 2. 研究の目的

ゼニゴケの重力応答変異体の単離、またシロイヌナズナにおいて既存の重力応答関連遺伝子のゼニゴケオルソログの役割について機能解析をおこなう。これによって陸上植物として共通に必要な重力応答因子の機能解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの重力応答関連遺伝子のゼニゴケホモログにおける欠損株の作製: 我々の研究室で扱っているシロイヌナズナの重力関連遺伝子 RLD の機能解析を行うため、ゼニゴケの RLD オルソログ MpRLD 遺伝子のノックアウト変異体を作成した。CRISPR-CAS9 のシステムを利用し、MpRLD 遺伝子の 2 か所をターゲットにして遺伝子破壊を試みた。

(2) ゼニゴケの重力応答関連遺伝子オルソログの発現場所の同定:  
MpRLD Promoter::GUS 解析、および MpRLDpro::MpRLD-Citrine コンストラクトの

作製と発現解析によって発現場所、時期の特定を試みた。

(3) シロイヌナズナの重力応答関連遺伝子のゼニゴケにおける過剰発現体の作製:  
MpRLD 全長、および重力応答において特に重要なドメインである BRX 部位の過剰発現体を作製し、表現型を調べた。

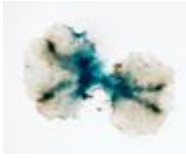
(4) ゼニゴケスクリーニングのための表現型の検討:

コケ類における重力応答に関する研究は古く、仮根の正の重力屈性や生殖器の負の重力屈性の存在が示唆されていた。これらを指標に変異体のスクリーニングが可能であるか検討した結果、同一個体であっても発生時期が異なることもあり、応答性にかなりばらつきが生じるということが明らかとなった。そこで、その個体を持つ重力応答性能を明確に評価できる環境条件、注目すべき表現型について検討した。

## 4. 研究成果

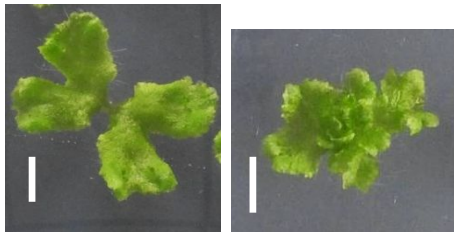
(1) 各ターゲットに対しそれぞれ 20 系統の選抜個体を調べた。その結果、一方のターゲットでは全く塩基配列の異常は検出されなかった。これは重力応答性に重要な機能を持つことが示唆されている BRX ドメイン部をターゲットにしたものであった。BRX ドメイン部の変異は致死になる可能性が考えられた。もう1つのターゲットの方では塩基に欠損または挿入変異が生じているものを 4 系統得ることができた。各系統の cDNA を調べた結果、ゲノム配列が同じ変異でも複数のスプライシングバリエーションを生じることが明らかとなった。そのうち2つの系統ではフレームシフトを生じ、その結果終始コドンを生じることが明らかとなった。しかしそのような個体においても明確な重力応答異常または形態の変化を見つけることはできなかった。

(2) MpRLD Promoter::GUS 形質転換植物を作製し、無性芽を生育させ1週間おきに GUS 染色を行った。生育1週間以降の無性芽の中肋付近、成長点、連結部など分裂が比較的盛んな部分で発現が高いことが明らかとなった。また生育2週間目が比較的発現量が高く、生育がさらに進むにつれて発現量は低下することが明らかとなった。一方、MpRLDpro::MpRLD-Citrine 形質転換植物における蛍光観察を行ったが、蛍光をほとんど観察することができなかった。シロイヌナズナの RLD においても蛍光タンパクとの融合遺伝子を用いた発現解析では蛍光がほとんど見られていないことから、RLD は分解されやすいタンパクである可能性が示唆された。

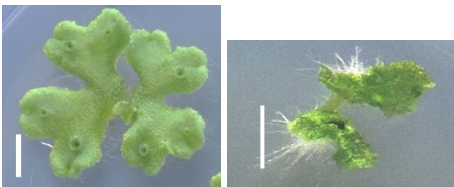


MpRLD pro::GUS 形質転換植物

(3)ゼニゴケで恒常的な発現を誘導する EF1 $\alpha$  promoter を用い、MpRLD\_BRX をゼニゴケで過剰発現させた。その結果いくつかの葉状体が重なりあった特徴的な表現型を示した。この表現型はオーキシシンシグナルを正に制御する因子である MpARF1 の過剰発現体の形質と類似していた。さらに MpRLD 全長の過剰発現体は葉状体が立ち上がり仮根が長く伸びて見えるような表現型を示した。これはオーキシシン生合成遺伝子 YUC2 の過剰発現体と類似した表現型であった。また、MpYUC2 は成長点や葉状体の連結部での発現量が高いが、promoter::GUS 解析の結果、MpRLD も同様の場所で発現量が高いことがわかった。これらの結果から MpRLD 遺伝子がオーキシシンの合成またはシグナル伝達に関わる可能性が示唆された。シロイヌナズナの Atr1d1~4 の4重変異体はオーキシシンの輸送に関わる変異体と表現型が類似していることが我々の研究で明らかにされていることから、RLD 遺伝子のオーキシシンシグナリングへの関わりは種を超えて保存されていると考えられた。



野性株(左)と EF1a::MpRLD\_BRX-Citrine(右)



野性株(左)と EF1a::MpRLD-Citrine(右)

(4)条件検討の結果、特定の条件で定量化可能で明確な表現型を見出すことができた。この表現型はクリノスタットで生育させると方向性がランダムになることから重力に依存した反応であることが裏付けられた。現在この表現型を指標にスクリーニングを開始

し始めたところである。今後さらにスクリーニングの時間短縮、処理数の拡大を目指し条件をさらに絞り込む予定である。また、スクリーニングに用いるゼニゴケ胞子について、どのような変異原で処理したものがスクリーニングやマッピングに適しているのかを含めて検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

杉本(橋本)美海  
(HASHIMOTO-SUGIMOTO, Mimi)  
名古屋大学生命農学研究科 助教

研究者番号：70437755

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )