

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06285

研究課題名(和文) 転写・翻訳後修飾による植物生殖細胞の分化調節メカニズムの検証

研究課題名(英文) Transcriptional and post-translational regulation of germ cell differentiation 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・准教授

研究者番号：00378770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：BONOBO(BNB)転写因子ファミリーは進化的に保存された植物生殖系列細胞分化の調節因子である。本研究ではBNBの機能発現について、転写・翻訳後レベルでの調節機構を解析した。苔類ゼニゴケのMpBNBは被子植物の日長・光質経路のオルソログによる転写調節を受けていた。シロイヌナズナBNB2は花粉形成の初期に転写活性化されていた。また、両者はいずれも別の転写因子とヘテロ二量体を形成して生殖細胞分化を制御していること、この二量体形成はゼニゴケでは配偶子器発生の最初期で安定化しているが、シロイヌナズナ花粉形成では雄原細胞の分化運命決定後直ちに消失す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

植物の配偶子形成機構は、未同定の基本的制御因子がいまだ多いため、不明な部分が多い。特にコケ植物などの基部植物の配偶子形成とその光環境依存的制御の分子機構はほとんど明らかでない。本研究は、最近研究代表者らが同定した鍵因子BNBの機能発現調節機構についての基礎的知見を得ることで、こうした問題の解明を目指すものである。こうした知見は、食糧生産の基礎である植物有性生殖のメカニズムの全容解明に不可欠であり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The BONOBO (BNB) family of transcription factor are evolutionarily conserved regulators of plant germline cell differentiation. In this study, transcriptional and post-translational regulation of BNB gene expression were analyzed. In the liverwort *Marchantia polymorpha*, I showed that MpBNB transcription is regulated by the orthologs of key regulators for flowering in response to day length and light quality. It was also shown that *Arabidopsis* BNB2 is transcriptionally activated in an early stage of flower bud development. Both of *Marchantia* and *Arabidopsis* BNB proteins form a heterodimer with the other transcription factors to regulate germline cell differentiation. Further analyses suggested that this heterodimer is relatively stable in an early stage of *M. polymorpha* gametangium development, while it is transiently formed during fate determination of generative cell in *Arabidopsis* pollen.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：生殖細胞分化 配偶子形成 転写因子 環境応答 陸上植物 ゼニゴケ 花粉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全ての陸上植物は、卵・精子(精細胞)を配偶体細胞(n)から分化させる。被子植物の雄性配偶体は花粉であり、減数分裂で生じた小孢子が非対称分裂したのち、雄原細胞が分化し、その等分裂により精細胞が生じる(Berger & Twell, Annu Rev Plant Biol 2011; Schmidt et al., Development 2015)。進化的基部にあるコケ植物では、配偶体は葉状体もしくは茎葉体であり、多細胞器官である造卵器・造精器の中に卵・精子を形成する(Niklas & Kutschera New Phytol 2009; Durand, Bull Torrey Bot Club 1908; Shimamura, PCP 2016)。このように発生様式は種によって大きく異なるが、全ての陸上植物は共通の祖先から進化したことから(Wickett et al., PNAS 2014; Finet et al., Curr Biol 2010; Qiu et al., PNAS 2006)、陸上植物の生殖細胞分化の中核メカニズムは進化的に保存されていると考えられる。

研究代表者は、1) 苔類ゼニゴケの配偶子器(造精器・造卵器)発生の始原細胞(配偶子器始原細胞)の分化、およびゼニゴケ目(Marchantiales)特異的な生殖組織である生殖器托の形成は、bHLH 転写因子 BONOBO (BNB)により統御されること、2) ゼニゴケの MpBNB は配偶子器始原細胞で発現し、配偶子器の発生が進むと消失すること、3) シロイヌナズナのオルソログ *BNB1* および *BNB2* は雄原細胞分化に冗長的に必要であること、4) シロイヌナズナ *BNB2* は雄原細胞の分化初期に一過的に発現すること、5) ゼニゴケ MpBNB はシロイヌナズナ *bnb1 bnb2* 二重変異を機能的に相補できることを示した。さらに分子系統解析から、BNB ファミリーはほぼ全ての陸上植物で保存されていることを明らかにした。これらのことから、BNB ファミリーは進化的に保存された植物生殖系列細胞の分化運命の決定因子と考えられる(Yamaoka et al., Curr Biol 2018; Hisanaga et al. Nat Plants 2019; 山岡ら、生化学 2019)。

ゼニゴケは、被子植物の花芽形成の日長経路を担う FKF1・GI のオルソログ MpFKF・MpGI をもち、生殖器托形成を制御する(Kubota et al., Nat Commun 2014; 山岡・河内 BSJ-Review 2016; 河内・山岡 化学と生物 2016)。また、FKF1-GI 下流の転写因子 CDF のオルソログ MpCDF ももち、生殖器托形成に抑制的に働く(論文未発表)。また生殖器托形成には遠赤色光(FR)が必要であり、その応答はフィトクロム Mpphy と転写因子 MpPIF を介した FR 高照射反応(FR-HIR)である(Inoue et al., PCP 2019; Inoue et al., Plant Cell 2016)。研究代表者は、ゼニゴケ MpBNB の転写は日長と FR に依存的である可能性を示した(論文未発表)。一方、シロイヌナズナ *BNB2* は分化初期の雄原細胞で発現することから、その転写は花粉形成過程の一環として活性化されるものと考えられる。こうした上流の違いは、陸上植物の進化において *BNB* の転写制御ネットワークの再構成(rewiring)により生じたと考えられる。この rewiring の要因は、ゼニゴケ・シロイヌナズナ両方での *BNB* 発現調節機構の保存性と差異により説明できると期待される。

また、ゼニゴケ MpBNB・シロイヌナズナ *BNB2* とともに、生殖系列細胞の分化初期において一過的なタンパク質の蓄積を示すことから、BNB には進化的に保存された翻訳後調節があり、重要な生理的意義があると考えられる。研究代表者は最近、*BNB2* が別の bHLH 転写因子 LRL/DROP と二量体を形成して機能することを示した(論文未発表)。本研究では、この二量体形成が *BNB2* タンパク質の安定性に寄与する可能性について検証する。

2. 研究の目的

本研究では、ゼニゴケ MpBNB とシロイヌナズナ *BNB2* の機能発現の転写レベルおよび翻訳後レベルの調節機構、および *BNB*-LRL/DROP 二量体の機能発現調節機構を解析することで、陸上植物の生殖細胞分化における中核的な調節メカニズムとその進化についての知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 光刺激によるゼニゴケ *BNB* の転写調節機構の解析

ゼニゴケ野生株と日長・光質経路の変異株を用いて、MpBNB の発現解析を行う。Mp**bnb**^{ko} ノックアウト変異株の機能相補検定を行い、光依存的な MpBNB 遺伝子の発現に十分なゲノム領域を明らかにする。その結果に基づき、遺伝子隣接領域を欠失させたレポーター・コンストラクトを作成し、様々な光条件下での MpBNB 遺伝子の発現を調べ、転写調節に必要な領域を同定する。

(2) シロイヌナズナ *BNB2* の転写調節機構の解析

シロイヌナズナ *BNB2* の機能発現に十分なゲノム領域(Yamaoka et al., Curr Biol 2018)に基づき、*BNB2* プロモーター活性の組織・時期特異性を調べ、その活性化に必要な領域を明らかにする。

(3) 翻訳後修飾による *BNB* の機能調節の検証と比較進化的解析

ゼニゴケ・シロイヌナズナにおいて、*BNB* と LRL/DROP をそれぞれ異なる蛍光タンパク質を用いて可視化して発現動態を調べることで、*BNB* 発現の翻訳後調節についての示唆を得る。

4. 研究成果

(1) 光刺激によるゼニゴケ *BNB* の転写調節機構の解析

変異株を用いた発現解析から、*MpBNB* の転写は *MpPIF*・*MpFKF*・*MpGI* により促進され、*MpCDF* により抑制された。ただし、*MpFKF*・*MpGI*・*MpCDF* による調節は、いずれも FR に依存していた。これらのことから、ゼニゴケではフィトクロムを介した光質経路と被子植物の日長経路と機能的に相関する経路が *MpBNB* の転写を制御すること、光質経路は日長経路と並行もしくは上流にあり、生殖器托形成に必要不可欠であることが示唆された。*Mpbnb^{ko}* ノックアウト変異株の機能相補検定により、長日かつ FR 依存的な *MpBNB* 遺伝子の発現に十分なゲノム領域を同定した。プロモーター領域の欠失シリーズを作成し光応答を調べたところ、*MpBNB* 発現に促進的・抑制的に働く領域がそれぞれあることが示唆された。こうした領域中には CDF 結合モチーフが多数あることから、抑制的領域の機能として *MpCDF* の結合領域の可能性が考えられる。

ゼニゴケは維管束組織がなく、フロリゲン FT のオルソログを持たない。また葉状体頂端メリステムの構造と機能は被子植物のものとは異なる。これらのことから、*MpFKF*-*MpGI*-*MpCDF* のモジュールは、被子植物のように全身性シグナル(フロリゲン)の活性を調節するのではなく、直接的に *MpBNB* の転写調節を行う可能性がある (Kohchi et al., Annu Rev Plant Biol 2021)。

(2) シロイヌナズナ *BNB2* の転写調節機構の解析

レポーター株とその欠失シリーズの解析から、*BNB2* プロモーターの活性は花芽特異的であり、花芽発生の初期から活性化されること、またその内部には *BNB2* 発現に促進的な領域があることが分かった。*BNB2* は花芽発生過程の一部として転写活性化することが示された。

(3) 翻訳後修飾による *BNB* の機能調節の検証と比較進化的解析

ライブイメージング解析により、ゼニゴケでは、*MpLRL* は配偶子器始原細胞を含む生殖器托のほぼ全体で発現し、配偶子器始原細胞の核で *MpBNB* と共局在することが分かった。またシロイヌナズナでは、*LRL/DROP* は発生中の花粉の栄養核で発現していたが、雄原細胞では、*BNB2* と共局在したのち、両者とも発現が消失することが分かった。すなわち *BNB* と *LRL/DROP* の二量体形成は一過的であると考えられる。ゼニゴケでは *MpBNB*-*MpLRL* 二量体は配偶子器発生の最初期で数回の細胞分裂の間安定化しているが、シロイヌナズナの *BNB2*-*LRL/DROP* 二量体は雄原細胞の運命決定後、直ちに積極的に分解される可能性がある。陸上植物進化の中で、*BNB*-*LRL* 二量体の安定性は短くなる方向に進化し、生殖細胞分化と配偶体発生の様式の変化に寄与したと考えられる。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山岡 尚平、河内 孝之、荒木 崇	4. 巻 91
2. 論文標題 陸上植物の配偶子形成の分子メカニズムとその進化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 534 ~ 539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910534	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 Hisanaga Tetsuya, Yamaoka Shohei, Kawashima Tomokazu, Higo Asuka, Nakajima Keiji, Araki Takashi, Kohchi Takayuki, Berger Frederic	4. 巻 5
2. 論文標題 Building new insights in plant gametogenesis from an evolutionary perspective	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 663 ~ 669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-019-0466-0	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Kohchi Takayuki, Yamato Katsuyuki T., Ishizaki Kimitsune, Yamaoka Shohei, Nishihama Ryuichi	4. 巻 72
2. 論文標題 Development and Molecular Genetics of Marchantia polymorpha	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annual Review of Plant Biology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-arplant-082520-094256	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井上 佳祐、金坂 侑紀、山岡 尚平、西浜 竜一、河内 孝之、荒木 崇
2. 発表標題 フィトクロムを介した遠赤色光シグナルはゼニゴケの生殖器官形成を制御する
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金坂 侑紀, 井上 佳祐, 山岡 尚平, 西浜 竜一, 河内 孝之, 荒木 崇
2. 発表標題 ゼニゴケの生殖器官形成における光質と日長の役割
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaoka S, Inoue K, Saito M, Yoshitake Y, Nishihama R, Kohchi T, Araki T.
2. 発表標題 Evolutionarily Conserved Transcription Factors Involved in Gametangium Development in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morisaki R, Yoshitake Y, Inoue K, Yamaoka S, Nishihama R, Kohchi T.
2. 発表標題 Tissue Specificity of Far-Red Light Signaling Pathway in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤美咲, 山岡尚平, 吉竹良洋, 光田展隆, 西浜竜一, 河内孝之
2. 発表標題 MpBONOB0 転写複合体による苔類ゼニゴケの生殖器官形成の制御
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岡尚平, 西浜竜一, 吉竹良洋, 石田咲子, 井上佳祐, 齋藤美咲, 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
2. 発表標題 陸上植物の生殖細胞分化に必要な転写因子BONOB0の同定と標的遺伝子の探索
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤美咲, 山岡尚平, 吉竹良洋, 光田展隆, 西浜竜一, 河内孝之
2. 発表標題 転写因子BONOB0の機能に必要な相互作用因子の同定
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金坂 侑紀, 井上 佳祐, 山岡 尚平, 荒木 崇
2. 発表標題 苔類ゼニゴケの遠赤色光・日長依存的な成長相転換の分子機構の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 佳祐, 金坂 侑紀, 山岡 尚平, 西浜 竜一, 河内 孝之, 荒木 崇
2. 発表標題 基部陸上植物ゼニゴケの日長認識メカニズムの解析
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 吉竹良洋, 山岡尚平, 西浜竜一, 河内孝之
2. 発表標題 陸上植物進化から探る環境依存的な有性生殖プログラムの起動メカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>「陸上植物における配偶子形成とその進化」に関する総説を发表 http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=research&p=12138</p>

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	荒木 崇 (Araki Takashi)		
研究協力者	河内 孝之 (Kohchi Takayuki)		
研究協力者	西浜 竜一 (Nishihama Ryuichi)		

6. 研究組織（つづき）

	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	井上 佳祐 (Inoue Keisuke)		
研究協力者	吉竹 良洋 (Yoshitake Yoshihiro)		
研究協力者	齊藤 美咲 (Saito Misaki)		
研究協力者	光田 展隆 (Mitsuda Nobutaka)		
研究協力者	金坂 侑紀 (Kanesaka Yuki)		
研究協力者	小谷 莞太 (Kotani Kanta)		

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