

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06298

研究課題名（和文）精子を作る植物が持つcAMP合成酵素を中心とするcAMP信号系の生理機能の解明

研究課題名（英文）Physiological function of cAMP signaling in streptophytes reproducing via motile sperms

研究代表者

笠原 賢洋（Kasahara, Masahiro）

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70361748

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）：ゼニゴケcape遺伝子編集株の解析によってCAPEが精子鞭毛運動に関わり、cAMPがその調節因子としてはたらくことを強く示唆する結果を得た。また、CAPEが精子を使って有性生殖をする緑色植物で保存されていることをイチョウ、ソテツ、ツノゴケからCAPEを単離して明確に示すことができた。さらに、本研究課題によって、cAMPが鞭毛運動の調節因子として生物界を通して共通のはたらきをもつ可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおける血糖調節などさまざまな生物で、cAMP（サイクリックAMP）が細胞内シグナル分子として重要なはたらきをもつことがわかっている。本研究において、ゼニゴケのcAMP合成・分解酵素CAPEのはたらきを調べることで、精子による有性生殖をおこなう植物の精子遊泳や精子鞭毛運動でcAMPが細胞内シグナル分子としてはたらく可能性を示唆する成果が得られた。植物研究における学術的意義のある発見である。

研究成果の概要（英文）：The analysis of the *Marchantia polymorpha* cape-edited lines strongly suggests that CAPE is involved in sperm flagellar motility and that cAMP may act as a regulator of sperm motility. We have also isolated CAPE from ginkgo, cycad, and hornwort and clearly demonstrated that CAPE is conserved in streptophytes that reproduce via motile sperms. Furthermore, this research project has demonstrated that cAMP may have a common function as a regulator of flagellar motility throughout the living organisms.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物cAMPシグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

光や植物ホルモンなどの細胞内外部からの物理的・化学的因子は、各々特有の受容体を刺激し、細胞内シグナル分子であるセカンドメッセンジャーやリン酸化などを介して細胞内に伝達され、最終的に細胞運動や代謝変化など様々な生理反応を引き起こす。植物では、 Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして、花粉管伸長、重力屈性、共生の成立、光環境応答などのシグナル伝達で中心的な役割を担っている。動物など他の生物では、cNMP (サイクリックヌクレオチド; cAMP、cGMP) が様々な生理現象ではたらき、 Ca^{2+} とともにセカンドメッセンジャーとして普遍的に使われている。植物でも cAMP が花粉管伸長 (Moutinho et al 2001 PNAS) や細胞周期制御 (Ehsan et al 1999 FEBS Lett) 等の生理現象の調節因子として働くことが報告され、植物特有の cAMP 合成酵素 (adenylyl cyclase; AC) 遺伝子の単離に関する報告 (Gehring and Turek 2017 Front Plant Sci) がある。一方、細胞内の cAMP 量が低いことなどの理由により、植物における cAMP シグナル系のはたらきははっきりしなかった。

そのような状況の中、苔類コケ植物のゼニゴケから新奇の興味深い構造を持つ AC が発見された (Kasahara et al 2016 Sci Rep)。このタンパク質は、AC に加え、cAMP 分解酵素 (cAMP phosphodiesterase; PDE) の触媒部位を持つことから CAPE (combined AC with PDE) と名付けられた (図1)。CAPE の AC は、動物から原核生物まで普遍的に存在する AC であり、生化学的な解析により cAMP 合成酵素活性を保持することが示された。また CAPE は、ゼニゴケだけでなく、雄性配偶子として精子を用いて有性生殖を行う植物分類群に存在していた。



図1 CAPEのドメイン構造 C末端側にアデニル酸シクラーゼ(AC)、N末端側にホスホジエステラーゼ(PDE)の触媒部位が存在する。

2. 研究の目的

さまざまな生物のシグナル伝達機構において、サイクリック AMP (cAMP) がセカンドメッセンジャーとして機能しているが、植物では cAMP の生理機能は明確に示されていないが、私たちの研究グループは、新奇の cAMP 合成酵素 (CAPE) をゼニゴケから発見した。CAPE はゼニゴケのみならず、精子を用いて有性生殖を行う緑色植物に存在し、CAPE 遺伝子がゼニゴケ造精器で特異的に発現していることから、CAPE を中心とする cAMP シグナル伝達機構が精子機能の調節にはたらいていることが予想された。本研究の主な目的は、cAMP の細胞内での機能を明確に示すことであり、ゼニゴケの cape 遺伝子編集株を用いて精子形成と精子運動能を中心に解析した。この目的に加え、CAPE 遺伝子の網羅的な単離、CAPE-PDE の酵素学的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ゼニゴケ cape 遺伝子編集株等、遺伝子組換え体の構築

ゼニゴケで確立されている CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集技術を利用した。CAPE 遺伝子の AC コード領域をターゲットにする 2 種のガイド RNA を設計し、ゲノム編集を行った。また、CAPE の細胞内局在と遺伝子編集株の表現型回復を観察するために、CAPE の C 末端にシトリン (蛍光タンパク質) を付加したタンパク質をコードする遺伝子を cape 遺伝子編集株へ導入した。

(2) ゼニゴケ cape 遺伝子編集株の表現型の解析

CAPE の遺伝子発現が造精器で強く見られ、さらにその成熟につれて発現が強くなることから、精子の形態を中心に表現型を観察した。さらに、精子の運動能について、遊泳の軌跡や、鞭毛の詳細な動きをハイスピードカメラで解析した。

(3) CAPE 遺伝子の単離と系統解析

ツノゴケと裸子植物イチョウ、ソテツから CAPE の cDNA について、RT-PCR 法により部分配列を取得後、5'-RACE 法、3'-RACE 法により、cDNA 全長を獲得した。公開されている遺伝子データベースの情報より、裸子植物針葉樹類のスギが CAPE を保持している可能性がわかったため、スギからも cDNA を同様に単離した。さらに、植物 CAPE と他生物の AC、PDE のアミノ酸配列を用いて系統解析を行った。

(4) ゼニゴケ CAPE-PDE の生化学的解析

ゼニゴケ CAPE の PDE 部位 (MpCAPE-PDE) をタンパク質発現するために、低温誘導性タンパク質発現ベクター pColdI に MpCAPE-PDE 遺伝子をクローニングした。His-tag を利用して精製後、精製 MpCAPE-PDE を用いて酵素活性を解析した。

4. 研究成果

(1) ゼニゴケ *cape* 遺伝子編集株の構築と表現型

ゼニゴケ雄株 (Tak-1 株) を親株に 2 ラインずつ、雌株 (Tak-2 株) を親株に 2 ラインずつ、*cape* 遺伝子編集株が得られた。いずれのゲノム編集株も AC の保存領域に変異があり、CAPE の AC 活性を欠損していると考えられた。これらの *cape* 遺伝子編集株の表現型を観察したところ、無性芽や葉状体の成長と形態、雄器托、雌器托の発生タイミングや形態には異常が見つからなかった。*cape* 遺伝子編集株の雄器床に水滴を与え、精子を放出させたところ、精子が凝集して塊になることや、細胞壁の殻の中に留まる精子が多く観察された。光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察では、核を含む頭部と二本の鞭毛を確認でき、精子形態に大きな異常は見つからなかった。しかし、野生株の精子が直線的に水中を泳ぐのに対し、*cape* 遺伝子編集株では直線的な移動がなかった。cAMP が遊泳に必要な鞭毛運動調節に関わることが示唆された。*cape* 遺伝子編集株に CAPE-citrine を発現させたところ、直線的な遊泳が回復した。しかし、citrine 蛍光を検出できず、細胞内局在を観察することはできなかった。

(2) CAPE 遺伝子の単離と系統解析

ツノゴケと裸子植物イチヨウ、ソテツから CAPE の cDNA 全長を獲得した。ツノゴケ CAPE は 1240 アミノ酸 (Genbank accession: BCL77501.1) 、イチヨウ CAPE は 1259 アミノ酸 (Genbank accession: BCL77500.1) 、ソテツ CAPE は 1252 アミノ酸 (Genbank accession: BCL77499.1) から成っていた。さらに本研究期間中にゲノム解析が終了した 2 種の接合藻類のゲノムデータを調査したところ、精子を形成しないこれら接合藻類ゲノムにおいて CAPE は検出されなかった。一方、同じく本研究期間中に公開された植物網羅的トランスクリプトームデータベース (OneKP) を検索したところ、複数の針葉樹類から CAPE の部分配列が検出された。そこで、スギから RNA を抽出して RT-PCR を行い、スギ CAPE の cDNA を単離した。スギ CAPE は、3319 塩基対と 3371 塩基対の 2 種の cDNA (Genbank accession: LC588318.1, LC588319.1) が得られた。5'-RACE 法を繰り返し行ったが、5'側を完全に取得することはできなかった。また、PDE と AC ドメインが異なるフレームにコードされていたが、cDNA に PDE と AC をコードする配列があることから、ゲノムに CAPE 遺伝子が存在することが明らかとなった。針葉樹類の中でもヒノキ目は CAPE を保持することが示唆された。これまでの研究と合わせ、精子を形成する植物分類群 [車軸藻類 (車軸藻、コレオケータ)、コケ植物 (ツノゴケ類、タイ類、蘚類)、小葉植物、シダ植物、裸子植物 (イチヨウ、ソテツ)] で CAPE が保存されていることがわかった。精子を形成しない接合藻と被子植物からは CAPE は検出されず、これらの植物群では、精子形成能の喪失に合わせて CAPE を失ったようである。精子を形成しない裸子植物針葉樹類では、マツ目からは CAPE は検出されないが、例外的にヒノキ目からは CAPE が検出された。緑色植物における分布は CAPE が精子機能に深く関係することを示唆するものである。ヒノキ目では精子機能とは異なるところではたらくと考えられ、異なる CAPE のはたらきとして興味深く、今後の課題である。

(3) ゼニゴケ CAPE-PDE の生化学的解析

ゼニゴケ CAPE の PDE 部位 (MpCAPE-PDE) のタンパク質発現・精製系を構築して得た酵素標品を用いて MpCAPE-PDE の性質を詳細に解析した。MpCAPE-PDE の cAMP に対する K_m は 30 μM 、 V_{\max} は 5.8 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ であった。PDE 活性は Mg^{2+} など二価金属イオンを要求したが、 Ca^{2+} の存在下で Mg^{2+} の約 3.5 倍の高い活性を示し、 Ca^{2+} で活性が促進されることがわかった。各種 PDE 阻害剤の効果を調べたところ、IBMX (3-isobutyl 1-methylxanthine) は効果がなく、高濃度のジピリダモールで部分的に活性が阻害されることが明らかとなった。MpCAPE-PDE は哺乳動物 PDE と同じクラス PDE に属し、植物クラス PDE の酵素学的諸性質がはじめて明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashida Yuta, Yamamoto Chiaki, Takahashi Fumio, Shibata Aika, Kasahara Masahiro	4. 巻 135
2. 論文標題 Characterization of the cAMP phosphodiesterase domain in plant adenylyl cyclase/cAMP phosphodiesterase CAPE from the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 137 ~ 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-021-01359-4	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 -

1. 著者名 Yamamoto Chiaki, Takahashi Fumio, Ooe Yosuke, Shirahata Haruto, Shibata Aika, Kasahara Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Distribution of adenylyl cyclase/cAMP phosphodiesterase gene, CAPE, in streptophytes reproducing via motile sperm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89539-z	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本千愛、高橋文雄、山田和正、吉川伸哉、末次憲之、河内孝之、笠原賢洋
2. 発表標題 ゼニゴケcAMP合成・分解酵素CAPEは精子の前進遊泳に関与する
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本千愛、高橋文雄、大江遥介、白畑陽都、柴田あいか、笠原賢洋
2. 発表標題 精子による生殖を行う植物はcAMP合成・分解酵素CAPEをもつ
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 山本千愛、高橋文雄、末次憲之、河内孝之、笠原賢洋
2. 発表標題 ゼニゴケ精子の運動性におけるcAMP合成・分解酵素CAPEの機能
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本千愛、大江遥介、白畑陽都、柴田あいか、高橋文雄、笠原賢洋
2. 発表標題 植物cAMP合成・分解酵素遺伝子CAPEの単離と系統分布
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 堤帆乃香、高橋文雄、笠原賢洋
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケcAMP合成・分解酵素CAPEの機能解析
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 Chiaki Yamamoto, Fumio Takahashi, Yousuke Ooe, Haruto Shirahata, Aika Shibata, Noriyuki Suetsugu, Takayuki Kohchi and Masahiro Kasahara
2. 発表標題 Characterization of plant cyclic AMP function 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 笠原賢洋
2. 発表標題 精子を作る植物に保存されたcAMP合成・分解酵素とその生理的役割
3. 学会等名 2019年度(第8回)近畿植物学会講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本千愛、高橋文雄、末次憲之、河内孝之、笠原賢洋
2. 発表標題 ゼニゴケの生殖時期におけるサイクリックAMPの機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 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

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