

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06367

研究課題名(和文)植物の世代交代制御因子の進化機構の解明

研究課題名(英文)Evolution of regulating factor of alternation of generations

研究代表者

榊原 恵子 (Sakakibara, Keiko)

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：90590000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：陸上植物はその生活環の中で単相と複相の両方に多細胞体制を構築する世代交代を行う。陸上植物ヒメツリガネゴケにおいて同定されたホメオボックス型転写因子KNOX2遺伝子は陸上植物とストレプト藻類の共通祖先において既に存在していた。ストレプト藻類ヒメミカツキモを用いて変異体を単離した。別の陸上植物であるツノゴケゲノムを解読したところ、ツノゴケはKNOX2遺伝子を持つが、姉妹遺伝子であるKNOX1遺伝子は持たないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は陸上植物の世代交代制御因子であるKNOX2遺伝子を報告しているが、KNOX2遺伝子は陸上植物出現以前から陸上植物と緑藻類の共通祖先において存在していたことがわかった。陸上植物以前の機能解明のため、緑藻類のKNOX2遺伝子の機能解析を実施し、変異体を獲得できた。ツノゴケAnthoceros agrestisのゲノム解読を行い、ツノゴケゲノムにはKNOX2遺伝子は存在するがその姉妹遺伝子であるKNOX1遺伝子は欠失していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Land plants exhibit multicellular body both in haploid and diploid generations, which called the alternation of generations. We previously reported the transcription factor regulating alternation of generations, KNOX2 gene. KNOX2 genes were found in Streptophyte algal genomes. Functional analysis of KNOX2 gene in Streptophyte alga *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* is ongoing. We reported three hornwort genome informations and transformation method of a hornwort *Anthoceros agrestis*. KNOX1 gene, which is sister gene to KNOX2 gene, was lost in hornwort genomes.

研究分野：植物発生進化学

キーワード：世代交代 転写因子 KNOX遺伝子 ストレプト藻類 陸上植物

## 1. 研究開始当初の背景

陸上植物は単相と複相の両方にそれぞれの役割に適した多細胞体制を構築する世代交代を行うが、これは陸上植物の進化の初期に獲得された新規形質である。研究代表者らは陸上植物であるコケ植物ヒメツリガネゴケを用いて世代交代を制御するホメオボックス型転写因子 KNOX2 遺伝子を報告している (Sakakibara et al. Science 2013)。KNOX2 遺伝子は KNOX1 遺伝子と姉妹遺伝子であるが、遺伝子重複によってできたものであり、緑藻類クラミドモナスではこれらが重複する前の単一の遺伝子として KNOX 遺伝子を持つことが知られている。研究代表者らは陸上植物の系統での遺伝子重複により、KNOX1 遺伝子と KNOX2 遺伝子が成立し、KNOX2 遺伝子が世代交代制御因子として機能するようになったという仮説をたてていた。しかし、近年、陸上植物に近縁なストレプト藻類のゲノムが報告されたが、世代交代を行わないストレプト藻類と陸上植物の共通祖先においてすでに KNOX1 遺伝子と KNOX2 遺伝子の重複がおきていたことがわかった。しかし、これらの遺伝子のストレプト藻類における機能は不明である。一方で、ヒメツリガネゴケ以外の陸上植物の KNOX2 遺伝子が世代交代を制御しているかは不明であった。同じくホメオボックス型転写因子で KNOX 遺伝子と相互作用することが知られている BELL 遺伝子も世代交代制御因子であることが報告されている (Horst et al. Nature Plants 2016)。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) ストレプト藻類の KNOX2 遺伝子の機能解析により、KNOX2 遺伝子の陸上植物成立以前の機能を解明する。2) 別の陸上植物であるツノゴケ *Anthoceros agrestis* の KNOX2 遺伝子の機能解析により、KNOX2 遺伝子が陸上植物で普遍的な世代交代制御因子であるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) 遺伝子改変が容易なストレプト藻類である接合藻類ヒメミカツキモの KNOX2 遺伝子、及びその姉妹遺伝子である KNOX1 遺伝子、BELL 遺伝子の変異体を作製し、その機能解析を行う。  
2) 別のコケ植物であるツノゴケ *Anthoceros agrestis* のゲノム解読と形質転換系の確立を進め、これらを活用してツノゴケ KNOX2 遺伝子の機能解析を行い、KNOX2 遺伝子が世代交代制御因子であるかを明らかにする。

## 4. 研究成果

1) ヒメミカツキモ KNOX1 遺伝子、及び KNOX2 遺伝子、BELL 遺伝子のリアルタイム PCR による発現解析を実施したところ、これらの遺伝子はいずれも有性生殖過程において発現が上昇することが確認された。次に、ヒメミカツキモでは CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集が可能であるので (Kanda et al. Sci. Rep. 2017; Kawai et al. New Phytol. 2022)、これを用いてこれらの遺伝子の変異導入を試みたところ、KNOX1 遺伝子及び BELL 遺伝子の変異体単離に成功した。これらの変異体の有性生殖過程における表現型を観察したところ、いずれの変異体においても、有性生殖過程において、接合が亢進しており、これらの遺伝子は接合を制御していることが推測された。KNOX1 変異株と BELL 変異株とで接合実験をおこなったところ、単独の変異体において確認されたほどの接合の亢進はみられなかったことから、これらの遺伝子産物は相互作用して機能している可能性が見出された。その検証のため、BiFC 法によりヒメミカツキモ KNOX1 遺伝子及び BELL 遺伝子の相互作用を調べたところ、これらの遺伝子産物は相互作用して核に局在することが確認された。また、BELL 遺伝子変異株では 2 つの接合型でのペアプロトプラスト形成時に、野生株同士の組み合わせではみられない、片方の細胞でのみプロトプラスト放出がみられたり、プロトプラスト放出するものの 2 つの接合型細胞間の凝集がみられない表現型が観察され、BELL 遺伝子が接合に機能している可能性が示唆された。KNOX2 遺伝子変異株の候補株が得られており、引き続き単離と解析を進めていく予定である。

また、別のストレプト藻類であるシャジクモ *Chara braunii* の遺伝子導入系を確立し、将来的にこれを用いても KNOX 遺伝子の解析が可能のように実験系の開発に取り組んだ。パーティクルガン法によるシャジクモへの遺伝子導入に成功し、シャジクモで有効なプロモーター、ターミネーターの組み合わせを見出した。このプロモーターとターミネーターの組み合わせでレポーター遺伝子の発現誘導がおきることを確認した。また、シャジクモに有効な抗生物質とその濃度を特定した。シャジクモに有効なプロモーターとターミネーターを抗生物質耐性遺伝子につないでパーティクルガン法によりシャジクモに導入したところ、抗生物質耐性の獲得に成功した。今後、これを足掛かりとして、シャジクモの形質転換系の確立を目指す。

2) 他のコケ植物で KNOX2 遺伝子の機能解析を実施するため、ナガサキツノゴケ *Anthoceros agrestis* を含むツノゴケ 2 種 3 系統のゲノムを解読し報告した (Li et al. Nature Plants 2020)。ナガサキツノゴケゲノムには KNOX2 遺伝子と BELL 遺伝子が 1 個ずつ存在するが、KNOX1

遺伝子が欠失していることがわかった。これらの遺伝子の RNA シークエンス解析では KNOX2 遺伝子と BELL 遺伝子は胞子体で発現していることが推測された。ナガサキツノゴケ KNOX2 遺伝子をヒメツリガネゴケ KNOX2 遺伝子のプロモーター下で発現するような導入 DNA をヒメツリガネゴケ KNOX2 遺伝子変異株に導入したところ、ヒメツリガネゴケ KNOX2 遺伝子の表現型は回復しなかった。

ナガサキツノゴケ KNOX2 遺伝子の機能解析のため、ナガサキツノゴケの形質転換系の確立を試み、アグロバクテリウムによる形質転換法を確立して報告した(Frangedakis et al. *New Phytol.* 2022)。まず、KNOX2 遺伝子及び BELL 遺伝子の発現解析のため、これらの遺伝子の推定プロモーター配列をクローニングし、GFP あるいは GUS レポーター遺伝子の 5'末端側に挿入した T-DNA プラスミドを作製した。これらをナガサキツノゴケに形質転換し、KNOX2 遺伝子の発現解析用の形質転換体候補株を複数得た。GFP レポーター株及び GUS レポーター株のいずれにおいても KNOX2 遺伝子の単相の配偶体と複相の胞子体での発現は確認できなかった。ツノゴケ KNOX2 遺伝子の発現を再現するには、遺伝子の 5'末端配列のみを用いるのでは不十分である可能性が示唆され、今後、コード領域を含めた発現解析を実施していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Eftychios Frangedakis, Masaki Shimamura, Juan Carlos Villarreal, Fay Wei Li, Marta Tomaselli, Manuel Waller, Keiko Sakakibara, Karen S. Renzaglia, Peter Szovenyi	4. 巻 229
2. 論文標題 The hornworts: morphology, evolution and development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 735-754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16874	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 該当する
1. 著者名 Li, F.-W., Nishiyama, T., Waller, M., Frangedakis, E., . . . ., Sakakibara, K., Szovenyi, P.	4. 巻 6
2. 論文標題 Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 259-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-020-0618-2.	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 該当する
1. 著者名 Higo A, Kawashima T, Borg M, Zhao M, Lopez-Vidriero I, Sakayama H, Montgomery SA, Sekimoto H, Hackenberg D, Shimamura M, Nishiyama T, Sakakibara K, Togawa T, Kunimoto K, Suzuki Y, Osakabe A, Yamato KT, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T, Franco-Zorrilla JM, Twell D, Berger F, Araki T	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcription factor DU01 generated by neo-functionalization is associated with evolution of sperm differentiation in plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07728-3	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 該当する
1. 著者名 Eftychios Frangedakis, Manuel Waller, Tomoaki Nishiyama, Hirokazu Tsukaya, Xia Xu, Yuling Yue, Michelle Tjahjadi, Andika Gunadi, Joyce Van Eck, Fay-Wei Li, Peter Szovenyi, Keiko Sakakibara	4. 巻 232
2. 論文標題 An Agrobacterium-mediated stable transformation technique for the hornwort model Anthoceros agrestis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1488-1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17524	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 該当する

1. 著者名 西山 智明, 榊原 恵子, 嶋村 正樹	4. 巻 59
2. 論文標題 ゲノム解析から見たツノゴケの二酸化炭素濃縮機構とシアノバクテリア, 菌類との共生 植物の陸上進出を可能にした生存戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 484-487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 嶋村正樹、西山智明、榊原恵子	4. 巻 12
2. 論文標題 陸上植物起源研究の最後のフロンティア、ツノゴケの生物学	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BSJ-Review	6. 最初と最後の頁 183-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 西山智明、嶋村正樹、榊原恵子	4. 巻 12
2. 論文標題 ツノゴケゲノムと陸上植物の発進進化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BSJ-Review	6. 最初と最後の頁 186-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Eftychios Frangedakis, Alan O. Marron, Manuel Waller, Anna Neubauer, Sze Wai Tse, Yuling Yue, Stephanie Ruaud, Lucas Waser, Keiko Sakakibara, Peter Szovenyi	4. 巻 14
2. 論文標題 What can hornworts teach us?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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) 10.3389/fpls.2023.1108027	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 榊原 恵子、嶋村 正樹、西山 智明
2. 発表標題 ツノゴケの特異性をもたらした遺伝子基盤
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 榊原 恵子
2. 発表標題 コケ植物モデル、ヒメツリガネゴケと <i>Anthoceros agrestis</i> を使って陸上植物らしさの謎に挑む
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakakibara, K.
2. 発表標題 Function of homeodomain leucine zipper IV genes in <i>Physcomitrella patens</i>
3. 学会等名 Marchantia workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井絵実加、堀直樹、Chris Zalewski、John Bowman、榊原恵子
2. 発表標題 Evolution of homeodomain leucine zipper IV genes
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎原 恵子、川井 絢子、小竹 敬久、西山 智明
2. 発表標題 PpWOX13LAB遺伝子は細胞壁成分の調節を介して幹細胞形成を制御する
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 養老 瑛美子、榎原 恵子
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケNIN-like protein相同遺伝子は2倍体の分裂組織の維持に関わる
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Sakakibara, Emiko Yoro, Tomomi Nakagawa, Eftychos Frangedakis, Masaki Shimamura, Tomoaki Nishiyama
2. 発表標題 Making new bryophyte model systems using genome sequencing and transformation technique.
3. 学会等名 EMBO Workshop "New shores in land plant evolution" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 無津呂 一輝 川井 絢子 榎原 恵子
2. 発表標題 フタバネゼニゴケの凍結保存法の確立
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eftychios Frangedakis、Manuel Waller、西山智明、塚谷裕一、Peter Szovenyi、榊原恵子
2. 発表標題 ツノゴケAnthoceros agrestisのアグロバクテリウムを介した形質転換系の確立
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

陸上植物の起源を探る研究モデル「ツノゴケ」への遺伝子導入技術開発に成功（立教大学ホームページ） <a href="https://www.rikkyo.ac.jp/news/2021/07/mknpps000001p9jk.html">https://www.rikkyo.ac.jp/news/2021/07/mknpps000001p9jk.html</a> 陸上植物の起源を探る比較ゲノム解析の謎、「ツノゴケ」の高精度ゲノム解読に成功（立教大学ホームページ） <a href="https://www.rikkyo.ac.jp/news/2020/03/mknpps0000015huk.html">https://www.rikkyo.ac.jp/news/2020/03/mknpps0000015huk.html</a> 植物の多様な精子の形成の進化的起源を解明 - 7億年前のDU01遺伝子獲得が植物の精子形成に関わる - <a href="http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/181211_1.html">http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/181211_1.html</a>
---

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
研究分担者	関本 弘之  (Sekimoto Hiroyuki)  (20281652)	日本女子大学・理学部・教授    (32670)	

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