

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03244

研究課題名（和文）基部陸上植物を用いた生殖細胞形成過程の転写制御ネットワークとその進化の研究

研究課題名（英文）Transcriptional network regulating gametogenesis in basal land plants and its evolution

研究代表者

荒木 崇 (Araki, Takashi)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：00273433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000 円

研究成果の概要（和文）：ゼニゴケの精細胞形成過程の転写制御ネットワークにおいては、研究開始当初の予想とは異なり、被子植物との間で保存された (DU01-DAZ1) モジュールの寄与は相対的に小さく、被子植物に至る進化の過程で失われた (DU01-RWP1) モジュールが大きな寄与を持つことを明らかにした。(DU01-RWP1) モジュールは核凝縮を含む、父性ゲノムの安定性・完全性維持と安定な伝達の機構などに関わることを明らかにした。生殖系列の決定機構に関しては、BNB上流の制御経路を明らかにするとともに、MS1遺伝子が配偶子器において配偶子を生じる細胞とそれを保護する細胞が分かれる過程を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

仮入力

陸上植物の生殖細胞形成は、生殖系列の体細胞系列からの分離が生活環の後期におこる点で動物のそれとは大きく異なる。そのため、生殖細胞形成の理解には、陸上植物の過程を研究し、動物との共通点と相違点を理解することが不可欠である。これまで陸上植物の生殖細胞形成過程の研究は、シロイヌナズナ、イネなどの被子植物のモデル植物を用いて進められ、多くの細胞生物学・分子生物学上の知見が蓄積している。しかし、被子植物における生殖細胞形成は、基部陸上植物のコケ植物（苔類、蘚類、ツノゴケ類）のそれとは2つの点で大きく異なる。

研究成果の概要（英文）：In male germ cell development in *Marchantia polymorpha*, we found that the relative contribution of DU01-DAZ1 regulatory module, which is conserved among land plants, is relatively small. By contrast DU01-RWP1 regulatory module, which has been lost during evolution leading to angiosperm, has a greater contribution. It plays an important role in stability, integrity, and stable transmission of the paternal genome through sperm nuclear condensation and other processes. We also investigated germline specification in *Marchantia polymorpha* and found upstream pathways of BNB, a master regulator of germline specification. After germline specification, a cell lineage which eventually generates gametes and a cell lineage for surrounding protective cells are separated. We found that another factor MS1 plays an important role in this process.

研究分野：植物生理学

キーワード：生殖系列 生殖細胞 配偶子形成 精細胞 転写制御ネットワーク 転写制御因子 有性生殖 ゼニゴケ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

陸上植物の生殖細胞形成は、生殖系列の体細胞系列からの分離が生活環の後期におこる点で動物のそれとは大きく異なる。そのため、生殖細胞形成の理解には、陸上植物の過程を研究し、動物との共通点と相違点を理解することが不可欠である。これまで陸上植物の生殖細胞形成過程の研究は、シロイヌナズナ、イネなどの被子植物のモデル植物を用いて進められ、多くの細胞生物学・分子生物学上の知見が蓄積している。しかし、被子植物における生殖細胞形成は、基部陸上植物のコケ植物(苔類、蘚類、ツノゴケ類)のそれとは2つの点で大きく異なる。一つ目は、生殖細胞形成過程の大幅な簡略化である。これは、進化の過程で生活環の中の配偶体世代(単数体世代)が大幅に短縮・単純化したことによる。雄性生殖細胞形成を例に取ると、被子植物においては、雄性配偶体の2回の体細胞分裂により、生殖系列の決定と生殖細胞(配偶子)である2個の精細胞の形成がおこる。これに対して、配偶体世代が自由生活を営むコケ植物では、生殖器官分化を経て、造精器の中に形成された生殖系列が、活発な細胞増殖をおこない、その後多数の精細胞の細胞分化がおこる。二つ目は、精細胞の構造と機能の大幅な単純化である。被子植物の精細胞は、いわば「細胞内細胞」として花粉管の先端近くに存在し、花粉管の伸長によって卵を含む胚嚢まで受動的に運ばれる。このため運動能と運動装置が失われている。これに対して、コケ植物では動物と同じく、精細胞は鞭毛をはじめとする運動装置を備え、運動能と化学走性を有する複雑な構造の細胞である。このことは一つ目にあげた形成過程の複雑さの違いにも反映されている。この2つの違いは、被子植物と動物を比較した場合の違いであるとも言える。したがって、動物との比較も視野に入れて陸上植物の生殖細胞形成過程を理解するためには、基部陸上植物の研究が不可欠である。しかし、蘚類のモデル植物であるヒメツリガネゴケ *Physcomitrium patens* を含めて、被子植物以外の陸上植物の生殖細胞形成過程の研究はこれまでほとんどなされてこなかった。その背景には、これまで、被子植物の少数のモデル植物を除いて、生殖細胞形成のモデル系となる植物が存在しなかったことがある。

申請者の研究グループは、苔類のモデル植物ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* の利点に着目し、陸上植物の生殖細胞形成過程のモデル系としての基盤整備と研究を進めてきた。特に、理解が進んでいる被子植物との差異が特に大きい雄性生殖系列の発生と精細胞形成の過程に主眼をおき、まず、これらがおこる造精器の発生過程で特異的に発現する遺伝子の網羅的解析を、進行中であったゲノムプロジェクトの成果を利用することにより進めた。これにより、被子植物との共通性と相違点、被子植物には見られない動物との共通性が明らかになった (Higo *et al.* 2016)。また、これに先行して、造精器や造卵器で顕著な発現を示すいくつかの転写因子遺伝子に着目した研究も進めてきた。これらの研究から、DUO POLLEN1 (DUO1) を中心とする精細胞形成過程で発現する転写因子群や、雌雄の生殖器官の発生開始や生殖系列決定に関わる可能性が高い候補因子として、SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) ファミリーの転写因子や MALE STERILITY1 (MS1) のようなクロマチン関連因子を見出していた。DUO1 に関しては4ヶ国12研究室による国際共同研究を主導して進めることにより、シヤジクモ植物に起源を持ち、陸上植物において保存された転写因子 DUO1 を要とする転写制御ネットワークが精細胞形成を司るという仮説を得ていた (Higo *et al.* 2018)。

精細胞形成過程については、研究開始の時点までに、造精器特異的な発現を示す DUO1 とその制御標的である DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER1 (DAZI) を含む13個の転写因子遺伝子を同定し (Higo *et al.* 2016)、DUO1 を含む数個の転写因子の機能解析に着手していた (Higo *et al.* 2018)。また、発生前期(精原細胞増殖期)と発生後期(精細胞分化期)の造精器の RNA seq 解析(未発表)から、造精器の発生過程で発現する273個の転写因子遺伝子のうち、前期に優先的に発現するもの(84個)と後期に優先的に発現するもの(107個)を特定し *duo1-KO* 株では前者の約54%で発現が上昇し、後者の約57%で発現が低下することを見出していた。さらに、176個の鞭毛関連蛋白質遺伝子のうち鞭毛特異的な α および β チューブリン4種 (*TUA4*, *TUA5*, *TUA6*, *TUB4*) を含む約半数と、核凝縮に関わる3個の塩基性精子核蛋白質遺伝子 (*PRM*, *Hls1*, *Hls2*) が DUO1 の制御下にあることがわかった。これらに基づいて、DUO1 は後期転写因子群の発現促進により精子形成プログラムを進めるとともに、転写抑制因子 DAZ1 を介した前期転写因子群の発現抑制により精原細胞増殖プログラムを確実に停止するという作業仮説モデルを立てていた。

一方、精細胞形成過程に先行する、雌雄の生殖器官の発生開始や生殖系列決定の過程に関しては、山岡尚平博士(現在は、当研究室の准教授)により転写因子 BONOBO (BNB) が重要な鍵因子として報告されたところであった (Yamaoka *et al.* 2018)。これに加えて、それまでの研究から、SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) ファミリーの2つの転写因子 SPL1 と SPL2 や MALE STERILITY1 (MS1) のようなクロマチン関連因子をこの過程に関わる制御因子の有力な候補として見出していた。MS1 は被子植物でも保存されているが、胞子体組織のみで発現し、生殖細胞(配偶子)形成への関与は知られていなかった (Yang *et al.* 2007, Ito *et al.* 2007)。生殖系列決定における MS1 の役割が基部陸上植物内でどの程度保存されているか、ゼニゴケの MS1 は胞子体においても役割を持つかの二点に強い興味を持たれるという状況であった。

2. 研究の目的

以上の研究開始当初の背景を踏まえて、本研究では、陸上植物における (1) 精細胞形成過程の転写制御ネットワークの全体像の理解、(2) 雌雄生殖系列決定過程の理解、の2つを主たる目的とした。この目的のために、主にゼニゴケを用いて、研究課題1. DUO1 を要とする転写制御ネットワークの解明、研究課題2. 生殖系列決定因子の探索、の2つの研究課題を進めることにした。

3. 研究の方法

2つの研究課題について、研究の進捗に伴う変更を踏まえて実際におこなった研究方法を記載する。

研究課題1. DUO1 を要とする転写制御ネットワークの解明

(1) *daz1-KO* 株を用いた (DUO1→DAZ1) モジュールの役割の検証

daz1-KO 株における遺伝子発現プロファイルの解析、*daz1-KO* 相補株の取得、*daz1-KO* 株がドミナントネガティブ型変異であることの判明に伴う *daz1* 遺伝子座欠失変異 (*daz1-ld*) 株の作出などを進めた。

(2) 3つの塩基性精子核蛋白質 (精細胞特異的なヒストン H1 バリエントである PRM、H1s1、H1s2) の精子核凝縮への関わりを解析と発現制御の解析

(3) DUO1 下流の転写因子 RWP1 の機能解析

(2)を進める中で着目することになった RWP1 について、3つの塩基性精子核蛋白質遺伝子の直接的な発現制御の検証、これ以外の制御標的遺伝子の探索、DUO1 による直接的な発現制御の検証などをおこなった。

(4) DUO1 と RWP1 の制御標的遺伝子の探索

取得済みの RNAseq データ (未発表) の再解析をおこない、制御標的遺伝子候補を抽出し、個別に検証をおこなうとともに、野生型株、*rwp1* 株、*rwp1* 相補株の RNAseq 解析のための材料の整備、*DUO1:Citrine knock-in (DUO1:Citrine-KI)* 株と *RWP1:Citrine knock-in (RWP1:Citrine-KI)* 株を用いた ChIP-seq 解析のための材料の整備と条件検討、試料調整をおこなった。

研究課題2. 生殖系列決定因子の探索

(1) 雄株および雌株の *msl-KO* 株の表現型解析により、造精器および造卵器分化のどの段階に MS1 が関与するかを明らかにする

(2) 雄株および雌株において *MS1:Citrine knock-in (MS1:Citrine-KI)* 株を作出し、造精器および造卵器分化過程における MS1 蛋白質の発現の動態を明らかにする

(3) *SPL2* 遺伝子とそれを制御する miR529c (Tsuzuki *et al.* 2016)、配偶子器始原細胞分化のマスター制御因子 BNB (Yamaoka *et al.* 2018) に関して、環境要因による (miR529c→SPL2→BNB) モジュールの制御を明らかにする (東京大学・濱田隆宏博士らとの共同研究)

(4) 配偶子器以外の器官・組織における MS1 の発現の動態を明らかにする

(5) (miR529c→SPL2→BNB) モジュールの上流にあることが予想された日長認識機構における概日時計と赤色光・遠赤色光受容体フィトクロムの役割を明らかにする

4. 研究成果

研究課題1. DUO1 を要とする転写制御ネットワークの解明

(1) *daz1-KO* 株を用いた (DUO1→DAZ1) モジュールの役割

研究の初期の段階で、研究開始当初に得ていた相同組換えによる *daz1-KO* 株が野生型 *DAZ1* 遺伝子の再導入によって相補できないことからドミナントネガティブ型変異であることが判明した。そのため、本研究の遂行の過程で実用されるようになった nickase を利用した大きな欠失誘導による *daz1* 遺伝子座欠失変異 (*daz1-ld*) 株の作出を試みることにした。残念ながら、現時点では作出に成功していない。研究開始当初に計画していた *DAZ1* の制御標的の網羅的な解析は見送ることにした。後述するように、(DUO1→DAZ1) モジュールの寄与は、シロイヌナズナとの間の保存性から研究開始当初に期待したよりもかなり小さいと推察される。

daz1-KO 株および *duo1*; *proDUO1:DAZ1* 株 (*duo1-KO* 変異体背景で DUO1 プロモータ制御下で *DAZ1* の発現を回復させた株) の表現型と *duo1-KO* 株の表現型の比較から、シロイヌナズナの DUO1 と *DAZ1*、*DAZ2* の場合とは異なり、*daz1* 変異体の表現型は *duo1* 変異体の表現型に比べて顕著に弱いこと、*duo1* 変異体背景で *DAZ1* の発現を回復させても精細胞の致死性は回復できないことが明らかになった。*duo1-KO* 株では核凝縮や運動装置と鞭毛の形成が全く起こらず細胞死に至るのに対して、*daz1-KO* 株では精子核の凝縮と伸長が不十分であり、鞭毛軸糸の 9+2 構造に異常が見られるが、造精器からの精細胞塊の放出は起こる。

(2) 塩基性精子核蛋白質の核凝縮への関わりを解析と発現制御

3つの精細胞特異的 H1 バリエント PRM、H1s1、H1s2 の単独変異体と多重変異体 (*h1s1*, *h1s2*, *prm*, *h1s1 h1s2*, *h1s1 prm*, *h1s2 prm*, *h1s1 h1s2 prm*) を作出した。*prm* の単独および多重変異体 (*h1s1 prm*, *h1s2 prm*, *h1s1 h1s2 prm*) は精細胞致死表現型を示し、核凝縮はほとんど見られなかった。*h1s1* と *h1s2* はそれぞれ固有の核凝縮不全表現型を示し、二重変異体はいずれの単独変異体よりも重篤な核凝縮不全となった。いずれも造精器からの成熟精子の排出が見られたが、*h1s1* 精子は受精能を持たず、*h1s2* 精子では遊泳速度と受精能の顕著な低下が見られた。これらの知見か

ら、3つの精細胞特異的 H1 バリエントは精子核凝縮に必要であることが示された。*h1s1* と *h1s2* の単独変異体の成熟精子の精子核塩基性蛋白質 (SNBP) (研究開始後に D'Ippolito *et al.* 2019 のゼニゴケの SNBP の論文が出版された)の解析から、H1S1 と H1S2 は、それ自身に由来する SNBP の産生と蓄積に必須であることに加えて、他の2つの H1 バリエントに由来する SNBP の蓄積にも必要であることが推察された。

3つの精細胞特異的 H1 バリエント遺伝子は精細胞において、鞭毛の構造蛋白質遺伝子群の後に発現すること、これに対してカノニカルな H1 遺伝子の発現は、精子形成過程では精原細胞に限られることがわかった。上述のように、*daz1* 変異体では3つ H1 バリエント遺伝子の発現量の低下が見られないが、*duo1* および *rwpl* 変異体ではほぼ消失した。このことから、DUO1 → RWP1 → H1S1, H1S2, PRM という制御関係が考えられた。(3)および(4)で述べる RWP1 結合モチーフ候補の発見により、このモチーフに着目した ChIP 解析により、H1 バリエント遺伝子を発現する時期の造精器 (*RWP1:Citrine-KI* 株から採取した Citrine 蛍光陽性の造精器)において RWP1 が H1 バリエント遺伝子のプロモータに結合していることが示された。また Higo *et al.* (2018) に報告した DUO1 結合モチーフに着目した同様の解析により、*RWP1* 遺伝子を発現する時期の造精器 (*DUO1:Citrine-KI* 株から採取した Citrine 蛍光陽性の造精器)において DUO1 が *RWP1* 遺伝子のプロモータに結合していることも確認された。タバコ *Nicotiana benthamiana* の葉の表皮細胞における一過的発現系を用いた解析も進めている。これらにより、(DUO1→RWP1) モジュールが3つの精細胞特異的 H1 バリエント遺伝子の発現制御を介して、精子核凝縮を司ることが明らかになった。

精細胞特異的 H1 バリエントと精子核塩基性蛋白質 (SNBP) が受精卵において果たす役割について *h1s2* 精子と野生型卵の交配および *h1s2* 卵と野生型精子の交配による受精卵を用いた解析をおこなった。後者の受精卵 (+*h1s2*) では、正常に胚発生が進行するのに対して、前者の受精卵 (*h1s2*+) では、第一分裂に達する胚の割合が大幅に低下し、胚発生が進行した胚においても体軸に沿ったパターン形成が始まる前に発生を停止した。このことは、H1S2 とそれに由来するものを含む SNBP が初期胚発生に何らかの役割を果たす可能性を示唆する。

3つの精細胞特異的 H1 バリエントによる核凝縮に関しては、(DUO1→RWP1) との関わりを含めて論文作成中である。

(3) DUO1 下流の転写因子 RWP1 の機能

2021年に公表されたプレプリント (Walker *et al.* 2021) において、ゼニゴケの精細胞で新しく発見された特異な DNA メチル化 (シトシンの4位の N^[N⁴] のメチル化、4mC。原核生物ではよく知られている)を担う酵素 DN4MT1 の隣接する2つの遺伝子 (*DN4MT1a, b*) の遺伝子座欠失変異では、成熟精子の遊泳速度が低下することが報告された。(2)に述べた *h1s2* 精子で遊泳速度の低下が見られたことを踏まえ、*dn4mt1a, b* 変異体においても精子核凝縮に異常が生じている可能性が考えられた。(DUO1→RWP1) モジュールが精子核凝縮を司るモジュールであることを踏まえ、まず、*DN4MT1a, b* 遺伝子の発現の *DUO1, RWP1* 依存性を調べた。その結果、*duo1* および *rwpl* 変異体では *DN4MT1a, b* 遺伝子の発現がほぼ消失することがわかった。

また、3つの H1 バリエント遺伝子がいずれも造精器で発現する遺伝子の中で最も発現量が高い遺伝子である (*PRM, H1S1, H1S2* はそれぞれ1、3、8位) ことを踏まえ、上位10個の遺伝子について *DUO1, RWP1* 依存性を調べたところ、high mobility group (HMG) 蛋白質の遺伝子の1つ (*NHP6/HMGB1* と名付けた) と *LAA10* と仮に名付けた遺伝子の発現がやはり *DUO1* と *RWP1* に依存することを見出した (それぞれ、5位と10位)。前者は、シロイヌナズナには存在しないが、イネおよびトウモロコシにおいて精細胞で最も高発現する遺伝子として報告されているもの (Chen *et al.* 2017) に相当する遺伝子である点が興味深い。これら2つの遺伝子も核凝縮や核の伸長といった過程に関わることが予想される。

これらの結果を踏まえて、(DUO1→RWP1) モジュールにより発現が制御される遺伝子の探索を研究協力者の井上佳祐博士がおこなった。研究開始時点で取得済みであった造精器分化の初期、中期、後期の RNAseq データ (未公表) および *duo1, duo1* 相補株、野生型の後期造精器の RNAseq データ (未公表) の再解析から、造精器分化後期特異的に発現し、*DUO1* 依存性が顕著な遺伝子を抽出すると、そのプロモータ領域に特定の配列モチーフが有意に濃縮されることがわかった。そのモチーフを持つ約190遺伝子が *RWP1* の制御標的遺伝子候補と考えられる。(2)に述べたように、後期造精器の ChIP 解析により、3つの H1 バリエント遺伝子のプロモータ上のこのモチーフを持つ領域に *RWP1* が結合することが示された。約190遺伝子の中には、ゲノムの安定性や完全性の維持、受精後の胚発生といった雄性配偶子機能の根幹に関わるものが含まれていた。このことから、研究期間前半に想定していた、(DUO1→RWP1) モジュールは精子核凝縮に特化した小規模な制御モジュールである、というモデルを大幅に改定することになった。(DUO1→RWP1) モジュールに含まれる様々なユニットの解析は、今後の重要な課題と考えている。これが、本研究の研究課題1における最も大きな成果である。

(4) DUO1 と RWP1 の制御標的遺伝子の探索

DUO1 については、研究開始時点で *duo1, duo1* 相補株、野生型の後期造精器の RNAseq データが取得済みであった (未公表)。RWP1 についても同様の RNAseq データを得るために、*rwpl* 相補株を確立した。各株から後期造精器を単離して、RNAseq をおこなう予定である。

DUO1:Citrine-KI 株と *RWP1:Citrine-KI* 株からそれぞれ得た、Citrine 蛍光陽性の後期造精器を用いた ChIP 解析から良好な結果が得られたこと ((2)参照) から、同じ試料を用いた ChIPseq 解

析を進めつつある。(3)に述べた約 190 個の RWP1 制御標的遺伝子候補に、RNAseq と CHIPseq の結果を合わせて、2つの転写因子の制御標的遺伝子が網羅的に同定できると期待している。

研究課題 2. 生殖系列決定因子の探索

(1) 造精器および造卵器分化における MS1 の役割

研究開始の時点で、*ms1-KO* 株では造精器および造卵器分化の初期から異常が見られることがわかってきた。造精器に関しては、造精器細胞の不等分裂により外側の外被始祖細胞と内側の精原始祖細胞を生じる過程、あるいは、生じた外被始祖細胞と精原始祖細胞がそれぞれの運命を維持する過程に異常があると推察していた。本研究では、発生初期の造精器の透過型電子顕微鏡観察により、これを再確認するとともに、その過程で、精原細胞では色素体数の大幅に減少していることに気づき、発生中の造精器における色素体の可視化系 (*proEF:MpRECAtp-Citrine*) を作出した。これを用いることで、野生型の造精器の精原細胞と外被細胞における色素体の動態の解析をおこなった。その結果、精原細胞で見られる色素体数の減少は不等分裂の際の不等分配によるものではないこと、精原始祖細胞に分配された色素体の数が減る過程には新規の機構に関わる可能性があることがわかった。また、その解析の過程で、外被細胞では細胞壁の Calcofluor 染色性が速やかに低下することもわかった。同様の解析を *ms1* 変異体背景でも進めており、野生型の造精器で見られるそれらの現象が *ms1* 変異による失われることが判明しつつある。現時点では、*MS1* 遺伝子が造精器細胞の不等分裂に必要であるのか、その結果生じた外被始祖細胞と精原始祖細胞の運命維持に必要なものであるのかを区別することはできていないが、早い段階から異常が認められることから、一見すると正常におこなわれているように見える不等分裂が正しく行なわれていない可能性は否定できない。造卵器に関しては、一次卵母細胞を生じる過程の不等分裂が正しくおこなわれていないことを示唆する結果が得られていたが、これを再確認した。

(2) 造精器および造卵器分化過程における MS1 の発現動態

研究開始の時点で、RNA *in situ* hybridization (RISH) 法による mRNA レベルの発現解析は完了していた。そこで、*MS1:Citrine-KI* 株を作出し、造精器および造卵器分化過程における MS1 蛋白質の発現動態を解析することで、RISH 法では解析が難しい分化初期段階における発現の解析と分化の後半のどの段階まで MS1 蛋白質が存続するかの検討をおこなった。得られた結果は、RISH 法による mRNA レベルの発現解析の知見や(1)で述べた変異体の表現型とよく合致するものであり、また、RISH 法では解析が難しい分化初期段階の造精器、造卵器の各細胞タイプにおける発現の有無を確認することができた。加えて、造精器においては、RISH 法で mRNA が検出されなくなる時期よりもかなり遅くまで MS1:Citrine 融合蛋白質の蛍光シグナルが観察されることがわかった。*MS1:Citrine-KI* 株の作出により、*BNB:Citrine-KI* 株 (Yamaoka *et al.* 2018) や *DUO1:Citrine-KI* 株 (Higo *et al.* 2018) との比較により、BNB や DUO1 との発現時期の重なるの有無を考察することが可能となった。*MS1* は *BNB* よりも遅れて発現し、BNB の発現が認められなくなった後も発現が存続する。そのため、*MS1* の発現が *BNB* の制御下にあるかに興味を持たれるが、*bnb* 変異体では配偶子器原基が形成されないため、その検証は困難である。なお、*BNB* の活性誘導系 (*BNB-GR*, Yamaoka *et al.* 2018) を用いた解析では *MS1* の発現誘導は観察されない。

(3) 環境要因による (miR529c→SPL2→BNB) モジュールの制御

研究開始の時点で進行中であった濱田隆宏博士ら (東京大学) との共同研究により、ゼニゴケにおいて、(miR529c→SPL2) モジュールが日長による栄養成長から生殖成長への移行の制御に関わることを報告した論文を公表した (Tsuzuki *et al.* 2019)。この論文では配偶子器の始原細胞の運命決定に関わる *BNB* 遺伝子との関わりについては推測にとどめたが、本研究により、(miR529c→SPL2) モジュールが *BNB* 遺伝子の上流にあることを確認した。さらに、(miR529c→SPL2) モジュールの役割は、*BNB* 遺伝子の発現誘導ではなく、日長認識機構による正のシグナルが乗り越えるべき発現抑制のレベルの調節にあることを示唆する知見が得られた。これらをまとめた論文を作成中である。

(4) 配偶子器以外の器官・組織における MS1 の発現動態

被子植物の *MS1* 遺伝子は孢子体のタペート組織で特異的に発現することが知られており、RISH 法による発現解析で、ゼニゴケにおいても孢子体の孢子嚢における発現が確認されていた。*MS1:Citrine-KI* 株を用いることで、*MS1* 遺伝子の孢子体での発現はタペート組織に対応するという解釈がある弾糸細胞ではなく孢子母細胞で見られることなどを確認することができた。また、造精器、造卵器、無性芽器に存在する粘液細胞における *MS1* 遺伝子の発現を確認した。

MS1 遺伝子に関しては、(1)および(2)の成果と合わせて論文を作成中である。

(5) (miR529c→SPL2→BNB) モジュール上流の日長認識機構

光受容体と概日時計による栄養成長から生殖成長への移行の制御機構についての研究も進めた。光受容体に関しては、ゼニゴケの日長応答がフィトクロムの遠赤色光高照射反応 (FR-HIR) であることを示した (Inoue *et al.* 2019)。概日時計の関わりについては、無周期あるいは短周期の *toc* および *pr* 変異体を用いた遺伝学的解析、NH-cycle や T-cycle という人工的な日長条件を用いた生理学的解析 (Roden *et al.* 2002)、概日リズムの長周期化を引き起こす化合物を用いた薬理的解析 (Nakamichi *et al.* 2019) によって、日長認識は概日時計による符合機構 (coincidence model) によるものではない、という結論を得た。これは、日長応答がフィトクロムの FR-HIR であることと矛盾しない。これらについて、論文を作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaoka Shohei, Inoue Keisuke, Araki Takashi	4. 巻 34
2. 論文標題 Regulation of gametangia and gametangiophore initiation in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 297 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00497-021-00419-y	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 Torii Kotaro, Kubota Akane, Araki Takashi, Endo Motomu	4. 巻 61
2. 論文標題 Time-Series Single-Cell RNA-Seq Data Reveal Auxin Fluctuation during Endocycle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz228	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 Tuzuki, M., Futagami, K., Shimamura, M., Inoue, C., Kunimoto, K., Oogami, T., Tomita, Y., Inoue, K., Kohchi, T., Yamaoka, S., Araki, T., Hamada, T., and Watanabe, Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 An early arising role of microRNA156/529c-SPL module in reproductive development revealed by the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3307-3314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.07.084	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 Hisanaga, T., Yamaoka, S., Kawashima, T., Higo, A., Nakajima, K., Araki, T., Kohchi, T., and Berger, F.	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 Inoue, K., Nishihama, R., Araki, T., and Kohchi, T.	4. 巻 60
2. 論文標題 Reproductive induction is far-red high irradiance response mediated by phytochrome and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant & Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1136-1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz029	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 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14件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 荒木 崇
2. 発表標題 Understanding plant sperm cell differentiation using basal land plants and Charophyte algae
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (オンライン開催) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田陽子, 十川大輔, 西浜竜一, 荒木 崇, 河内孝之, 平山隆志, 大和勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケの新規DNAメチルカ制御機構: 植物と動物の狭間で
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣畑敦洋, 山蔦祐太, 荒木 崇, 遠藤 求
2. 発表標題 花成時期を制御する新規化合物の同定とその作用機序の解明に向けて
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上本恭平, 荒木 崇, 遠藤 求
2. 発表標題 栄養素の輸送を介した時間情報伝達が概日時計の安定性を生み出す仕組み
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上本恭平, 国本有美, 荒木 崇, 遠藤 求]
2. 発表標題 栄養素を介した器官間カップリングによる概日周期の安定化の仕組み
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小谷堯太, 西田瑠理, 肥後あすか, 山岡尚平, 井上佳祐, 荒木 崇
2. 発表標題 ゼニゴケの精子形成における精細胞特異的ヒストンH1 バリエーションの役割
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古谷朋之, 山岡尚平, 石崎公庸, 西浜竜一, 荒木 崇, 河内孝之, 福田裕穂, 近藤侑貴
2. 発表標題 ゼニゴケにおける植物特異的BZR転写因子の役割
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021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 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上本恭平, 国本有美, 森 史, 伊藤浩史, 久保田茜, 江頭春樹, 木下俊則, 荒木 崇, 遠藤 求
2. 発表標題 栄養素の輸送を介した器官間でのカップリングが概日時計の安定性を高める
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷堯太, 西田瑠理, 肥後あすか, 井上佳祐, 山岡尚平, 荒木 崇
2. 発表標題 ゼニゴケの精子形成に関わる精細胞特異的ヒストンH1バリエーションの解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会 (開催中止. 要旨公表のみ)
4. 発表年 2020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調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 (開催中止. 要旨公表のみ)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shohei Yamaoka, Keisuke Inoue, Saito Misaki, Yoshihiro Yoshitake, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Takashi Araki
2. 発表標題 Evolutionarily conserved transcription factors involved in gametangium development in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 International Marchantia Workshop 2019 (招待講演) (国際学会)
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 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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 塚谷 裕一, 荒木 崇 (編著)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 放送大学教育振興会	5. 総ページ数 297
3. 書名 三訂版 『植物の科学』	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学生命科学研究科分子代謝制御学分野HP http://www.plantdevbio.lif.kyoto-u.ac.jp/index.html 京都大学生命科学研究科分子代謝制御学分野HP http://www.plantdevbio.lif.kyoto-u.ac.jp/index.html 京都大学HP 研究成果 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190920_2.html 京都大学生命科学研究科HP 研究成果 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	山岡 尚平 (Yamaoka Shohei) (00378770)	京都大学・生命科学研究科・准教授 (14301)	
研究協力者	井上 佳祐 (Inoue Keisuke) (20805931)	京都大学・生命科学研究科・助教 (14301)	

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