

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16166

研究課題名(和文)陸上植物における環境依存的な生殖細胞系列決定の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of environment-dependent germ cell determination in land plants

研究代表者

吉竹 良洋(YOSHITAKE, YOSHIHIRO)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10839179

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):次世代に子孫を残すための生殖細胞の分化は、生物が生物たりうる重要な要素である。世代交代を最大化させるため、生殖細胞分化をいつ・どこで活性化させるかが重要であるが、植物において日長は重要な決定要因の1つである。コケ植物においては日長認識の分子機構は長らく不明であったが、本研究では、苔類ゼニゴケをモデルに、シロイヌナズナと相同な分子モジュールが日長認識を制御することを明らかにし、その分子モジュールが制御する遺伝子群を網羅的に示した。さらにシロイヌナズナとゼニゴケの制御遺伝子群を比較することにより、進化を超えて保存される経路を発見し、生殖細胞分化の本質を考察することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、苔類ゼニゴケにおいて日長(光周性)を感知する分子機構を詳細に解析しこの感知モジュールが制御する遺伝子の進化的な共通性を見出した。単系統群で進化する陸上植物において、コケ植物と被子植物の遺伝的経路(パスウェイ)の比較解析は、進化的変遷を超えて保存される経路の抽出を可能とし、経路に重み付けを与えることで、光周性経路の基本骨格すなわち本質を見出すことに成功した。生物学的意義については今後の解析が待たれるが、栄養状態を適切に保つことが重要であると推察される。また本研究は、コケ植物では困難であった実験技術の障壁を数多く乗り越えており、今後の植物間のパスウェイ解析を円滑に実行可能にした。

研究成果の概要(英文):Germ cell differentiation is a critical for maintaining organisms. Day length is one of the key determinants in plants. In bryophytes, the molecular mechanism of day-length recognition has long been unknown. In this study, we demonstrated that a molecular module homologous to that of Arabidopsis thaliana regulates day-length recognition and comprehensively showed the gene cluster regulated by this molecular module. Furthermore, by comparing the regulatory genes of Arabidopsis and Marchantia, we were able to discover pathways that are conserved across evolution.

研究分野：生殖細胞分化におけるエピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 転写因子 生殖細胞 ゼニゴケ 進化

## 1. 研究開始当初の背景

環境情報の統合を経て適切な時期に栄養成長から生殖成長へと転換し、配偶子を形成することは植物進化の原動力である。シロイヌナズナ(被子植物)を用いた研究から、FLOWERING LOCUS T (FT) がこの転換を担う花成ホルモン(フロリゲン)の分子実体であることが明らかにされた(Kobayashi et al., 1999 Science)。さらにこの遺伝子の制御系に関する研究から、日長に応じて植物が花を咲かせる仕組みが明らかにされた。時計タンパク質 GIGANTEA (GI) と F-box タンパク質 FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX (FKF)、DOF 型の転写抑制因子が日長依存的に複合体を形成することが日長認識の鍵と結論される(Sawa et al., 2007 Science)。陸上植物進化の基部に位置する苔類ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha L.*)の生殖器の形成も日長(長日条件; LD)と光質(富遠赤色光条件; FR)の周囲環境に応じて誘導されることが見出されて以来、この形成メカニズムは被子植物の花成に類する現象として解析が進められる(Wann 1925; Kubota et al., 2014, Nat Commun)。ゼニゴケの相同的な構成因子(MpGI, MpFKF, MpCDF)の変異体を作成するといずれも日長応答性を喪失し、また互いにタンパク質間相互作用をすることから、日長認識の分子機構の基本形は、コケ植物にはすでに存在したと推定されるが、その詳細な分子機構は未だ明らかではない。また、MpCDFの相互作用因子の探索から、新たにMpTPLの存在を明らかにした。MpTPLはショウジョウバエのGroucho/Tup1ファミリーに属する“Co-repressor”で分子機能の詳細については未だ不明な点も多いが、ヒストンの脱アセチル化酵素(HDAC)と複合体を形成することでクロマチンのリモデリングに関与することが報告される。以上のことから、ゼニゴケの生殖細胞分化機構(成長相転換)は、MpGI-MpFKF-MpCDF複合体を糸口にして環境情報(日長情報)を入力し、MpCDF-MpTPL-HDAC複合体を介してエピジェネティックにゲノム構造を変化させることにより、細胞運命を直接的に生殖細胞系列へと転換させていると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、MpCDFによる遺伝子発現制御機構の詳細を明らかにするため、1. 標的遺伝子の探索とこの発現制御の背景に存在する 2. エピゲノムに着目した解析を実施する。さらに、被子植物シロイヌナズナとコケ植物ゼニゴケ間でのCDFの標的遺伝子の相違点を見出し、単系統群である陸上植物進化においてCDF(日長応答)が標的とする制御ネットワークの基本骨格を抽出し、植物が適応した日長応答の本質を問う

## 3. 研究の方法

2-1.を実施するため、MpCDFタンパク質を検出する。エピトープタグを融合したMpCDFを自身のプロモーター制御下で発現する株を作成したことから免疫沈降法(ChIP-seq)によりMpCDFの結合標的DNAを探索する。また、2-2については、最近、動植物種を問わず、従来のChIP-seq法より高感度にクロマチン動態を解析する手法にskene et al., 2017らが開発したCUT&RUN(Cleavage Under Target & Release Using Nuclease)法がある。これまでゼニゴケのクロマチン動態解析には、ChIP-seq解析を適用していたが、煩雑かつ大量の植物体が必要となり一度に多種のクロマチン動態を解析することが困難であったが、この手法を適用することで、これらの問題が解決され、より高精度にMpCDFが標的とする遺伝子のクロマチン動態を明らかにできる。

## 4. 研究成果

HA・FLAG・MYC といった代表的なエピトープタグを融合した MpCDF について、自身のプロモーター制御下で発現する相補株やエストロゲン誘導系により高発現する株の作成を試みたがこれらの株におけるタグ抗体を用いたウェスタンブロット解析では検出できなかった。この検討に1年以上の時間を要したが、タンパク質が非常に不安定である。あるいは、低発現タンパク質である可能性があると考えられたことから、迅速かつ高感度に目的タンパク質を検出できる実験系が必要と判断し、新規発光タンパク質タグを用いて CDF タンパク質の検出を試みた。その結果、発光検出系により MpCDF タンパク質動態を捉えることに成功した。これは CDF タンパク質の挙動を時間分解能が高く検出できた全植物種を通じて初めての事例となる。明らかになったことは、短日条件では、MpCDF タンパク質は、蓄積しかつ光周期に応じて振動するのは、反対に長日条件では完全に分解されていることが明らかになった。同じサンプルで MpCDF mRNA は長日短日両条件で大きな差異は認められなかったことから日長認識の分子機構はシロイヌナズナで提案されるモデルを再現し、被子植物とコケ植物が同じメカニズムを共有していたことが示された。次に、MpCDF の標的遺伝子の探索を実施した。しかし、上記ウェスタンブロット解析では、MpCDF の検出は困難であったことから ChIP-seq 解析ではなく、CUT&RUN 法を転写制御因子の解析に応用することにより、MpCDF の標的遺伝子を解析することにした。MpCDF 遺伝子座の CDS 領域の C 末端にこの新規発光タンパク質タグをノックインした株を作出し、解析材料とした。こちらも CUT&RUN 法の条件検討に2年以上の歳月を要したが、高精度に約 6000 遺伝子の結合箇所を同定した。種々の RNA 解析とこの結合箇所の統合を行い、MpCDF が直接的に発現制御する遺伝子を約 50 遺伝子に絞った。この中には、ゼニゴケの生殖枝と生殖細胞系譜を決定するマスター制御遺伝子 MpBNB が含まれており、コケ植物では日長認識のシグナルを、直接的に生殖細胞系譜を規定する遺伝子に情報伝達していることが示された。シロイヌナズナにおいては日長認識のシグナルをフロリゲンである FT 遺伝子に情報伝達していることから、進化の過程で遺伝的なかけかけ (rewiring) が生じており、フロリゲンの発明がその原動力になった可能性があると考えられる。また、公開されるシロイヌナズナの転写制御因子の結合標的遺伝子のライブラリー (DAP-seq データ) と比較し、保存される遺伝子リストを抽出した。その結果、特定の無機イオンの取り込みや生成に関与するトランスポーターや分解酵素、またこの無機イオンを活性中心に配位する酵素などが多く濃縮された。この生物学的意義は不明であり今後の課題であるが、植物が日長を認識する意義にこの無機イオンが積極的に関与している可能性が考えられた。この無機イオンの積極的な取り込みがなぜ必要なのかまた、どのように利用されているかが明らかとなれば、植物に共通する日長認識の意義に新たな知見が加えられるとともに本質が見えてくると考えている。

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 1件）

1. 著者名 Kato Hirotsuka, Mutte Sumanth K., Suzuki Hidemasa, Crespo Isidro, Das Shubhajit, Radoeva Tatyana, Fontana Mattia, Yoshitake Yoshihiro, Hainiwa Emi, van den Berg Willy, Lindhoud Simon, Ishizaki Kimitsune, Hohlbein Johannes, Borst Jan Willem, Boer D. Roeland, Nishihama Ryuichi, Kohchi Takayuki, Weijers Dolf	4. 巻 6
2. 論文標題 Design principles of a minimal auxin response system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 473 ~ 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-020-0662-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 Iwasaki Miyuki, Kajiwara Tomoaki, Yasui Yukiko, Yoshitake Yoshihiro, Berger Fredric, Yamato Katsuyuki T., Bowman John L., Kohchi Takayuki et al	4. 巻 31
2. 論文標題 Identification of the sex-determining factor in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i> reveals unique evolution of sex chromosomes in a haploid system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 5522 ~ 5532.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.10.023	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

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原理
3. 学会等名 日本分子生物学会__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 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Yoshitake, Shohei Yamaoka, Ryuichi Nishihama and Takayuki Kohchi,
2. 発表標題 MpCDF and MpTPL complex mediates repression of the photoperiodic growth-phase transition in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 日本エビジェネティクス研究会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉竹良洋, 山岡尚平, 川村昇吾, 西浜 竜一, 河内孝之
2. 発表標題 コケ植物の解析から明らかになった陸上植物の環境依存的な有性生殖起動メカニズムの進化
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021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		
オーストリア	Gregor Mendel Institute		