

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23751

研究課題名(和文)陸上植物におけるオーキシンを介した細胞分裂面制御機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism for auxin-mediated regulation of cell division plane in land plants

研究代表者

加藤 大貴 (Kato, Hirotaka)

神戸大学・理学研究科・特命助教

研究者番号：30846994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモン・オーキシンは全ての陸上植物の発生において多面的かつ重要な役割を果たすホルモンである。本研究では研究代表者が見出した、陸上植物に共通するオーキシン応答遺伝子であるWIP転写因子に着目し、コケ植物ゼニゴケを研究モデルに機能解明を目指した。その結果、ゼニゴケにおいてWIPが頂端分裂組織の腹側や杯状体内部で強く発現していること、機能欠損変異体では仮根の伸長異常と杯状体の形成密度の向上することを明らかにした。また変異体及び過剰発現株を用いたRNA-seq解析を行い、ゼニゴケにおけるWIPの下流遺伝子候補を同定するとともに、被子植物シロイヌナズナのデータと比較し進化的な考察を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オーキシンは陸上植物の成長・発生制御の主要因子であるが、オーキシンが多様な現象を制御する仕組みは未だ明らかになっていない。過去の研究により、WIPが陸上植物に保存されたオーキシン応答遺伝子であること、被子植物において胚根の幹細胞形成など多面的機能を担うことが示されていた。本研究はコケ植物ゼニゴケにおいてもWIPが複数の器官の発生に重要な役割を果たすこと、陸上植物に共通してWIPに制御される遺伝子が存在していることを明らかにした。このことはWIP経路が陸上植物の発生制御の基盤であることを示唆している。本研究の成果を活用することで植物の形を精緻に制御する技術につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The plant hormone auxin plays critical and versatile roles in the growth and development of all land plants. My recent study identified WIP family as a common auxin-responsive gene in land plants. To investigate the role of auxin-WIP pathway in land plants, this study focused on the liverwort *Marchantia polymorpha* of which genome encodes only a single WIP gene (MpWIP). Expression analysis revealed that MpWIP was highly expressed in the ventral side of apical meristem and gemma cup. Loss-of-function mutants generated by CRISPR/Cas9 method showed reduction of rhizoid elongation and dense formation of gemma cups. RNA-seq analyses using the mutants and overexpression lines identified downstream candidates of MpWIP. Comparison with published transcriptome data from *Arabidopsis thaliana* provided insights into the conserved role of WIP family in land plants.

研究分野：植物進化発生学

キーワード：ゼニゴケ オーキシン WIP 発生 進化

1. 研究開始当初の背景

植物は約 5 億年前に比較的安定した水中環境から、激しい気温変動や乾燥に晒される陸上へと進出し、周囲の環境に応じて形態を緻密に制御する術を獲得してきた。植物の細胞は固い細胞壁に囲まれ移動できないため、細胞分裂面の向き・位置の制御はその後の細胞運命や成長方向を決める重要な要素である。オーキシンは全ての陸上植物の発生において多面的かつ重要な役割を果たすホルモンであり、細胞分裂面制御にも関与している[1]。しかしオーキシンによって引き起こされる遺伝子発現の変化がどのようにして細胞分裂面を制御しているかは明らかにされていなかった。

過去の研究でコケ・シダ・被子植物に共通するオーキシン応答遺伝子として C2H2 転写因子をコードする *WIP* ファミリーが同定されていた[2]。*WIP* は被子植物において様々な器官の発生や種皮の色素合成など多面的な役割をもち[3]、特にシロイヌナズナの胚発生において、*WIP2/4/5* が冗長的にオーキシンの下流で根端分裂組織形成に必須な非対称分裂を制御することが示されているが、その分子メカニズムは明らかになっていなかった [4]。

2. 研究の目的

多くの植物種がゲノム中に複数の *WIP* をもつものに対しゼニゴケは *WIP* を 1 コピーのみもつ。予備的な解析においてゼニゴケ *WIP* の機能欠損変異体を作成したところ、*wip* 変異体は野生型よりも無性生殖器官 (杯状体) を密に形成した。杯状体は頂端細胞から背側に分裂した細胞からガス交換器官 (気室) と並行して作られる。杯状体と気室は発生における最初の細胞分裂の向きで区別することができる[5]。また過去の研究からオーキシンの生合成が頂端細胞や杯状体で盛んなことが分かっていた[6,7]。これらことから本研究では杯状体形成において *WIP* がオーキシンの下流で平層分裂と垂層分裂の転換を制御しているのではないかと考え (図 1)、ゼニゴケにおける *WIP* の機能解明を目的とした。

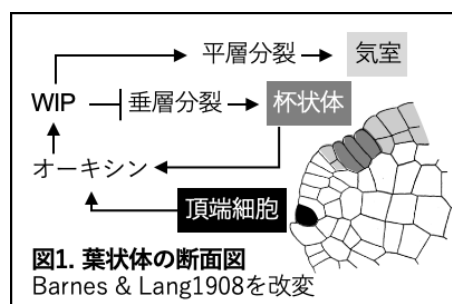


図1. 葉状体の断面図
Barnes & Lang1908を改変

3. 研究の方法

目的を達成するため、本研究ではゼニゴケ *WIP* の (1) 発現パターンの解析、(2) 機能改変株の表現型解析、(3) 下流遺伝子の同定と機能解析を計画した。以下に方法の詳細を記述する。

(1) *WIP* 発現パターンの解析

WIP タンパク質がいつ、どこで機能しているかを調べるため、*WIP* とレポータータンパク質の融合タンパク質を *WIP* 自身のプロモーターで発現するベクターを *wip* 変異体に導入する。変異体の相補を確認した上で、機能的な *WIP* タンパク質の時空間的発現パターンやオーキシンによる変化を共焦点顕微鏡による観察で明らかにする。

(2) *WIP* 機能改変株の表現型解析

作出済みの *wip* 機能欠損株に加え、*WIP* を誘導的に過剰発現する株を作成し、葉状体背側表面に着目して細胞分裂面に関する異常があるかを明らかにする。具体的には細胞壁を蛍光標識し、共焦点顕微鏡による Z-stack 画像から三次元画像を構築して分裂面を詳細に解析する。

(3) *WIP* 下流遺伝子の同定と機能解析

WIP は転写因子であると予測されており、標的遺伝子の発現制御を介して細胞分裂面制御に関わると考えられる。そこで (2) で作成した *WIP* 機能改変株を用いた RNA-seq 解析により *WIP* の下流遺伝子を同定する。同定された下流遺伝子のうち、特に細胞骨格に関連する因子など細胞分裂面の制御に関わりそうな因子について、CRISPR/Cas9 法を用いて機能欠損株を作成し、細胞分裂面制御や杯状体形成における役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *WIP* 発現パターンの解析

まず *WIP* プロモーター制御下で *WIP* と *GUS* の融合タンパク質を発現するベクターを作成し、*wip* 変異体に導入した。その結果 *wip* 変異体の形態異常が回復した株が得られ、機能的な *WIP* タンパク質を発現していることが示唆された。この株を用いて *GUS* 染色を行ったところ、葉状体の頂端分裂組織の腹側や、杯状体の内部、発生中の無性芽において強い染色が見られ、これらの

組織で *WIP* が機能していることが示唆された。次に細胞レベルでの *WIP* の挙動を調べるため、*GUS* の代わりに蛍光タンパク質をレポーターに用いた株の作成を試みた。複数種類の蛍光タンパク質 (*Citrine*, *tagRFP*, *GFP*, *mNeonGreen*)、タンパク質融合の方法 (N 末、C 末)、遺伝子組み換え法 (T-DNA 挿入、騒動組み換え) を試したが、いずれの場合においても、変異体の異常を完全に相補する株は得られず、異所的または過剰発現していることが疑われる表現型を示す株しか得られなかった。

(2) *WIP* 機能改変株の表現型解析

まず *wip* 機能欠損株について詳細な表現型解析を行った。その結果 *wip* 変異体は葉状体の下偏成長に加えて、仮根の発達が低下する表現型を示した。定量的な解析から *wip* 変異体は仮根原基の形成ではなく仮根の伸長に異常があることが示唆された。このことは過剰なオーキシン投与実験からも支持された。また杯状体の密度上昇についても定量的に解析を行ったところ、最初の杯状体が形成されるまでの期間は野生型と変わらないが、培養期間が長くなるのに従って杯状体数・密度が高くなるよることが明らかになった。

次に薬剤 (エストロゲン) 依存的に目的遺伝子を過剰発現する系を用いて *WIP* の過剰発現株を作成した。qRT-PCR の結果、誘導後 8 時間で *WIP* の発現が 80 倍程度高まる株が得られた。この株の無性芽および葉状体をエストロゲン含有培地で培養すると、頂端ノッチを中心に褐変して枯死する強い表現型を示した。薬剤の濃度を下げると葉状体の上偏成長や杯状体が形成されなくなるといった機能欠損変異体とは逆の表現型が観察された。

(3) *WIP* 下流遺伝子の同定と機能解析

(2) で観察に用いた *WIP* の機能欠損変異体と誘導的過剰発現株を用いて RNA-seq 解析を行い *WIP* 下流因子の探索を行った。野生型と変異体の比較には 1 週間目または 2 週間目の葉状体を用い、それぞれ 2,137 または 3,036 の発現変動遺伝子 (DEG) が検出された。過剰発現株の解析では薬剤誘導 4 時間の有無を比較し、合計で 5,421 の DEG を検出した。これらの遺伝子について予測される機能を調べたところ、発現が変異体で上昇し、過剰発現株で低下する遺伝子群に興味深い遺伝子群が多く、例えば主要なオーキシン生合成遺伝子である *TAA* や *YUCCA2*、*ROP* シグナリング因子などの先端成長に関わる遺伝子、*GCAMI* を含む杯状体形成に参与する複数の転写因子が見られた。また今回得られたデータをシロイヌナズナの *WIP* 過剰発現株の RNA-seq データ [8] と比較したところ、上に挙げた遺伝子のホモログがシロイヌナズナでも *WIP* により発現低下していることが明らかになった。

(4) まとめ

本研究の成果によりゼニゴケにおいても *WIP* が葉状体の形態、仮根の伸長、杯状体形成など多面的な役割を果たすことが明らかになった。このことはオーキシン-*WIP* 経路が陸上植物の発生制御の基盤の一つであることを示唆している。また機能改変株を用いた RNA-seq から *WIP* 下流因子候補を多数同定し、シロイヌナズナとの比較から陸上植物に保存された *WIP* 下流因子の存在が示唆された。当初の計画全てを実行することはできなかったものの、陸上植物の発生制御機構とその進化を理解するための重要な知見を得ることができたと言える。今後の研究により *WIP* タンパク質の機能について分子レベルでの理解が進めば、将来的に陸上植物の形態を精緻に制御する応用技術につながるかと期待される

<引用文献>

- ① Kato H, Nishihama R, Weijers D, Kohchi T. Evolution of nuclear auxin signaling: lessons from genetic studies with basal land plants. *J Exp Bot.* 2018;69(2):291-301.
- ② Mutte SK, Kato H, Rothfels C, Melkonian M, Wong GK, Weijers D. Origin and evolution of the nuclear auxin response system. *Elife.* 2018;7.
- ③ Appelhagen I, Huep G, Lu GH, Strompen G, Weisshaar B, Sagasser M. Weird fingers: functional analysis of *WIP* domain proteins. *FEBS Lett.* 2010;584(14):3116-22.
- ④ Crawford BC, Sewell J, Golembeski G, Roshan C, Long JA, Yanofsky MF. Plant development. Genetic control of distal stem cell fate within root and embryonic meristems. *Science.* 2015;347(6222):655-9.
- ⑤ Barnes CR, Land WJG. Bryological papers, II The origin of the cupule of *Marchantia*. *Bot Gaz.* 1908;46(6):401-9.
- ⑥ Eklund DM, Ishizaki K, Flores-Sandoval E, Kikuchi S, Takebayashi Y, Tsukamoto S, et al. Auxin Produced by the Indole-3-Pyruvic Acid Pathway Regulates Development and Gemmae Dormancy in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell.* 2015;27(6):1650-69.
- ⑦ Ishizaki K, Nonomura M, Kato H, Yamato KT, Kohchi T. Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res.* 2012;125(5):643-51.
- ⑧ Roldan MVG, Izhaq F, Verdenaud M, Eleblu J, Haraghi A, Sommard V, et al. Integrative genome-wide analysis reveals the role of *WIP* proteins in inhibition of growth and development. *Commun Biol.* 2020;3(1):239.

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------------|
| 1. 著者名 Bowman John L., Flores Sandoval Eduardo, Kato Hiroataka | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 On the Evolutionary Origins of Land Plant Auxin Biology | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology | 6. 最初と最後の頁 a040048 ~ a040048 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a040048 | 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 Kato Hiroataka, 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kato Hiroataka, Yasui Yukiko, Ishizaki Kimitsune | 4. 巻 228 |
| 2. 論文標題 Gemma cup and gemma development in Marchantia polymorpha | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 New Phytologist | 6. 最初と最後の頁 459 ~ 465 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16655 | 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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤大貴, 近藤侑貴, 深城英弘, Dolf Weijers, 石崎公庸 |
| 2. 発表標題 陸上植物に保存されたオーキシン応答遺伝子WIP のゼニゴケにおける機能解析 |
| 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 加藤大貴, Dolf Weijers, 石崎公庸 |
| 2. 発表標題 陸上植物におけるオーキシン-WIP 経路の研究 |
| 3. 学会等名 近畿植物学会第9回講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hirotaka Kato, Sumanth Mutte, Tatyana Radoeva, Emi Hainiwa, Hidemasa Suzuki, Yoshihiro Yoshitake, Minami Katayama, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Dolf Weijers |
| 2. 発表標題 Design principle of auxin response system in Marchantia polymorpha |
| 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 Hirotaka Kato, Sumanth K. Mutte, Emi Hainiwa, Hidemasa Suzuki, Yoshihiro Yoshitake, Minami Katayama, Isidro Crespo, Shubajit Das, Tatyana Radoeva, Mattia Fontana, Mark Roosjen, Simon Lindhoud, Johannes Hohlbein, Jan Willem Borst, Roeland Boer, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Dolf Weijers |
| 2. 発表標題 Design principles of a minimal auxin response system |
| 3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>植物ホルモン・オーキシン応答機構の原理を解明 https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2020_05_16_01.html</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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|