

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32686

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15821

研究課題名（和文）有限成長するコケ植物2倍体メリステムの維持機構の解明

研究課題名（英文）Genetic study of the determinate diploid meristem in Physcomitrium patens

研究代表者

小田原 瑛美子（養老瑛美子）（Yoro, Emiko）

立教大学・理学部・助教

研究者番号：40802054

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：陸上植物のうち、初期に分岐したコケ植物は核ゲノムが1セットの1倍体が優占的である一方、被子植物は核ゲノムが2セットの2倍体が優占的である。両者の生活環に占める核相の割合の相違の一因として、2倍体世代の発生を司る分裂組織の性質の相違が挙げられる。コケ植物では、2倍体の分裂組織は有限型である一方、被子植物の2倍体分裂組織は、無限型である。本研究では、既に見出したコケ植物ヒメツリガネゴケの2倍体の分裂組織の有限性を規定する分子、RWP-RK転写因子の機能解析と下流候補遺伝子の同定を実施した。ヒメツリガネゴケの2倍体分裂組織が、細胞分裂を限定的に留めている候補となるいくつかの遺伝学的経路を同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進化学的観点から、コケ植物と被子植物の発生様式や細胞分裂を司る因子の比較解析は多数実施されてきた。しかし、コケ植物では1倍体が生活環の主を占めることから、1倍体を用いた研究が多数である。コケ植物の2倍体の分裂組織の有限性に関わる因子の同定は、本研究が初めてであり、その遺伝学的経路の同定は、コケ植物と被子植物のそれぞれ2倍体同士を比較するという点において重要な学術的意義をもつ。コケ植物の2倍体の発生様式が限定的である分子機構の解明は、被子植物を含む維管束植物が巨大化した一方、コケ植物は比較的小さいままであることなど、陸上植物の発生進化を理解するための鍵となる重要事項の発見につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：Bryophytes have a life cycle dominated by the haploid generation with a single set of nuclear genomes; whereas, angiosperms have a life cycle dominated by the diploid with two sets of nuclear genomes. The difference in the dominance of nuclear phases in their life cycles can be due to the determinacy of the meristems governing the development of the diploid generation. In bryophytes, the diploid meristems are determinate, while in angiosperms, the diploid meristems are indeterminate. In this study, we analyzed the function of the RWP-RK transcription factor, a candidate molecule that we previously identified as regulating the determinacy of the diploid meristem in the bryophyte *Physcomitrium patens*. We were able to identify several genetic components involved in the determinacy of the diploid meristem regulated by the RWP-RK.

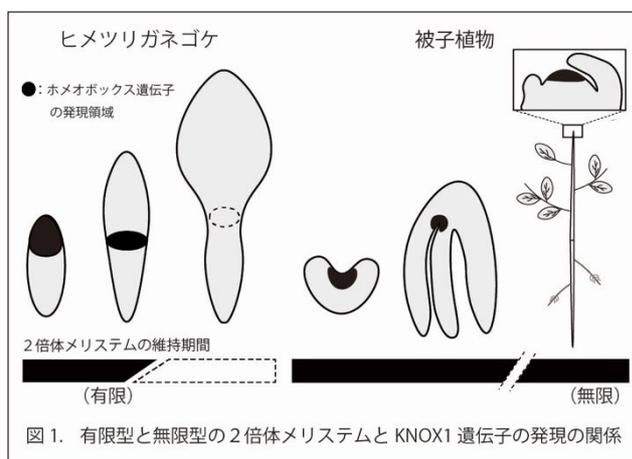
研究分野：植物発生進化学

キーワード：コケ植物 ヒメツリガネゴケ 分裂組織 転写因子

1. 研究開始当初の背景

植物に特異な形質に、1倍体と2倍体の発生プログラムを有し、それを交互に繰り返す生活環をもつことがある。興味深いことに、この1倍体と2倍体が生活環に占める割合は、陸上植物の進化の過程で、変化してきたことが推測される。陸上植物の基部に位置するコケ植物は1倍体が優占的な生活環である一方、被子植物は2倍体が優占的な生活環をもつ。1倍体優占的なコケ植物は、1倍体世代である配偶体において被子植物に似た茎葉構造を形成するが、2倍体世代である孢子体の成長は有限で、茎葉構造のような枝分かれもしない(図1左)。一方、2倍体優占的な被子植物は、2倍体世代である孢子体の頂端に茎葉構造を生み出し続ける、無限成長を支える茎頂メリステムを形成する(図1右)。陸上植物の進化過程における、生活環に占める核相の相違の要因の一つとして、2倍体世代のメリステムの性質の相違、すなわち有限型か無限型かの違い、が挙げられる。そこで、本研究では、「どのようなメカニズムでコケ植物の2倍体発生は限定的に留まっているのか?」を解明するため、ヒメツリガネゴケの2倍体メリステムの有限性を規定する新規の候補因子であるRWP-RK転写因子に着目し、機能解析を実施することとした。

また、先行研究により、コケ植物2倍体メリステムの有限型と無限型の差は、ホメオボックス型転写因子の遺伝子の発現期間の違いによってもたらされていることが示唆されている(図1)。本研究で着目したRWP-RK転写因子と、既知のホメオボックス遺伝子との遺伝学的関係の解析にも取り組むこととした。



2. 研究の目的

本研究の目的は、「ヒメツリガネゴケ2倍体メリステムの有限性を規定する分子機構を明らかにする」ことである。本研究の独自性は、コケ植物の2倍体に着目することである。これまでに、ヒメツリガネゴケは1倍体に茎葉構造を形成することから、ヒメツリガネゴケ1倍体世代と被子植物2倍体世代を比較した、進化発生学的研究が実施されてきた。一方、ヒメツリガネゴケ2倍体の有限型メリステム形成の分子基盤は大部分が不明であり、陸上植物の進化過程における1倍体優占から2倍体優占的な生活環への移行という観点において、その解明は重要である。本研究では、ヒメツリガネゴケ2倍体メリステムの有限性を規定するRWP-RK転写因子と、既知の被子植物のRWP-RK転写因子の細胞分裂制御における機能とを比較することで、進化学的側面からの理解を目指した。

3. 研究の方法

(1)

はじめに、ヒメツリガネゴケの2倍体を研究対象とするにあたり、2倍体を効率的に得るための培養条件を検討した。培地の成分のうち、窒素源に着目し、硝酸とアンモニウムを割合を変更し、受精率と2倍体の発生速度等を比較した。

(2)

2倍体メリステムの有限性を規定する鍵因子であるヒメツリガネゴケRWP-RK転写因子は、2倍体発生段階のどのステージにおいて発現しているかを、レポーター遺伝子導入株を作製し、蛍光およびGUS染色により観察した。当初、レポーター遺伝子をRWP-RK転写因子の終止コドンの直前に挿入するノックイン株を作製し、発現解析を実施する予定であったが、蛍光が観察されなかったことから、プロモーターレポーター株の作製に切り替え、発現解析を実施した。RWP-RK転写因子のうち、2倍体発生における機能が示唆されている2遺伝子について、上流約2.5kbをクローニングし、核局在化GFPに連結し、プロモーターレポーター株として解析に用いた。

(3)

2倍体発生に関わる RWP-RK 転写因子について、複数の遺伝子が冗長的に機能している可能性を鑑み、エストロゲン添加依存的にドミナントネガティブに働く SRDX ドメインを付加した RWP-RK を発現する機能抑制株、およびゲノム編集による機能欠失株をそれぞれ作製し、2倍体発生に関する表現型解析を実施した。さらに、エストロゲン誘導的に機能抑制した株を用い、RWP-RK 転写因子が標的とする下流遺伝子を同定するため、RNA-seq 解析を実施し、エストロゲン添加依存的に発現変動する遺伝子を同定した。

(4)

既に2倍体発生を正に制御することがわかっていたホメオボックス転写因子との関連を調べるため、上記の RWP-RK 転写因子の機能抑制株やゲノム編集による機能欠失株と、ホメオボックス転写因子の機能欠失株との交配実験を進め、多重破壊株を作製した。それらを用い、ホメオボックス転写因子と RWP-RK 転写因子が2倍体発生において、どのような遺伝学的関係にあるかを解析した。また、ホメオボックス遺伝子の過剰発現株の RNA-seq 解析も実施し、(2)の RWP-RK 転写因子の機能抑制における発現変動遺伝子と比較解析を行った。

4. 研究成果

(1)

2倍体の発生に影響する窒素源について検討した結果、アンモニアはヒメツリガネゴケの受精を著しく阻害し、高濃度の硝酸は孢子体の発生を抑制することが明らかになった(図2; Yoro et al., 2023, Plant Methods 100)。



図2. 高濃度の硝酸は孢子体形成を阻害し、窒素欠乏培地において孢子体発生が促進する

(a): 同じ窒素含有標準培地で生育させた茎葉体を、硝酸濃度の異なる培地に移動させ、低温短日条件下で培養してから8週目の茎葉体塊
(b): 同様に低温短日条件下で培養してから6週目の茎葉体塊から、葉を取り除いた茎葉体先端を孢子体の発生段階に従って並べた
黒見えるのが成熟孢子体(<), 孢子体発生の中期と後期の境界(----)

(2)

ヒメツリガネゴケ RWP-RK 転写因子のうち、プロモーターレポーター株を作製した2遺伝子は、共通して2倍体発生において、比較的后期の発生段階である、メリステムとしての役割を終結させる、すなわち活発な細胞分裂が減少する時期に、メリステムとその周辺の孢子体基部で発現していることを見出した。したがって、少なくとも解析した2遺伝子の RWP-RK 転写因子については、2倍体の細胞分裂制御に関わることが推測される。

(3)

RWP-RK 転写因子のうちの一つは、エストロゲン誘導による機能抑制株と、ゲノム編集による機能欠失株は、ともにメリステムが長期間維持されるような無限型へ転換したような孢子体の表現型が観察された。したがって、ヒメツリガネゴケ RWP-RK 転写因子の一つは、2倍体発生において、メリステムの細胞分裂を負に制御する因子であると推測される。野生株と RWP-RK 転写因子の機能抑制株の比較 RNA-seq 解析では、発現上昇または発現減少した下流候補遺伝子のリストを取得した。そのうち、発現減少した候補遺伝子の中に、RWP-RK 転写因子の直接の標的遺伝子が含まれている可能性がある。

(4)

RWP-RK 転写因子の一つの機能抑制または機能欠失により、2倍体発生の期間が延長することが、(3)からわかっていたが、ホメオボックス転写因子の変異が加わると、2倍体発生の期間延長はキャンセルされることがわかった。これは、2倍体のメリステムの制御において、RWP-RK 転写因子はホメオボックス転写因子よりも遺伝学的に上流で機能している可能性を示唆する。また、RNA-seq 解析では、RWP-RK 転写因子の機能抑制により発現変動した遺伝子と、ホメオボックス転写因子の過剰発現により発現変動した遺伝子の重ね合わせを行い、RWP-RK 転写因子の機能抑制で特異的に変動した遺伝子を抽出した。この RWP-RK 転写因子の機能抑制で特異的に変動した遺伝子リストの中に、RWP-RK 転写因子の下流、尚且つホメオボックス転写因子の上流で、2倍体メリステムにおける細胞分裂制御に関与する遺伝子の候補があることになる。(2)および(3)の RNA-seq 解析によって抽出された発現変動遺伝子は、既報の被子植物の RWP-RK オルソログで同定されている下流候補遺伝子とどの程度一致しているかを解析することで、RWP-RK 転写因子の機能の進化的な保存性について考察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Yoro Emiko, Koshimizu Shizuka, Murata Takashi, Sakakibara Keiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Protocol: an improved method for inducing sporophyte generation in the model moss <i>Physcomitrium patens</i> under nitrogen starvation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Methods	6. 最初と最後の頁 100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13007-023-01077-z	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 Yoro Emiko, Sakakibara Keiko	4. 巻 34
2. 論文標題 Sexual reproduction: Is the genetic pathway for female germ cell specification conserved in land plants?	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 R241 ~ R244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2024.01.062	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 養老 瑛美子, 佐藤 遼平, 秋吉 信宏, 鈴木 誠也, 小藤 累美子, 榎原 恵子
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケの雌の生殖器官の運命決定機構の解明
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 養老 瑛美子, 鈴木 誠也, 小藤 累美子, 榎原 恵子
2. 発表標題 雌雄同株のヒメツリガネゴケの生殖器官の雌雄決定機構の解明に向けて
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 養老 瑛美子, 榊原 恵子
2. 発表標題 セン類ヒメツリガネゴケの有限成長する胞子体分裂組織の維持機構
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 養老 瑛美子
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケ胞子体発生の分子機構
3. 学会等名 第5回コケ幹細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 誠也, 養老 瑛美子, 榊原 恵子, 小藤 累美子
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケの生殖器官形成に関わるPpRKDの機能解析
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 養老 瑛美子, 榊原 恵子
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケNIN-like protein相同遺伝子は配偶体に依存した胞子体発生を制御する
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 養老 瑛美子、川崎 理子、榎原 恵子
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケの配偶体に依存した胚発生にSWEET 糖輸送体が関与する
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020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
---------	---------