

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15824

研究課題名(和文) RAB23が関わる植物精子の運動装置形成機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of RAB23 in formation of locomotory apparatus of plant spermatozooids

研究代表者

南野 尚紀 (Minamino, Naoki)

基礎生物学研究所・細胞動態研究部門・特任助教

研究者番号：20823256

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)：コケ植物を含む植物のいくつかの系統では、動物と同様に精子を形成し、鞭毛および多層構造体は植物精子の運動能を担う重要な構造である。本研究では、膜交通制御因子であるRAB GTPaseのサブファミリーのひとつであるRAB23について、コケ植物タイ類ゼニゴケを主に用い、そのはたらきを検証した。精子変態期における発生段階のステージ分けやオルガネラ動態の観察などの解析基盤を確立するとともに、ゼニゴケRAB23の分子的な性質や、ゼニゴケRAB23が鞭毛形成において軸糸構造の正常な形成に関わることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の精子の運動装置形成の仕組みはこれまであまり明らかになっておらず、本研究はその一端を明らかにしました。また鞭毛は植物だけでなく動物にも保存された構造であり、本研究により明らかになったRAB23の鞭毛形成における役割は、他の生物における鞭毛形成の仕組みを考察するうえでも重要な知見になることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Some plant lineages including bryophytes generate motile sperm cells called spermatozooids which harbor a locomotory apparatus such as a flagellum and multilayered structure. RAB23 is one of subfamilies of RAB GTPase which is a machinery component of the membrane trafficking system. In this study, we attempted to elucidate the function of RAB23 in plant spermatozooids using the liverwort, *Marchantia polymorpha*. To establish an analytical foundation, we delineated the developmental stages and observed the dynamics of various organelles during spermiogenesis in *M. polymorpha*. We found that MpRAB23 acts on forming flagella and should be involved in proper flagellar formation during spermiogenesis.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：膜交通 RAB GTPase 精子 鞭毛 ゼニゴケ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有性生殖は、遺伝情報を次世代に伝え、進化の原動力にもなるシステムであり、それを担う配偶子の形成は重要なプロセスの一つである。植物のいくつかの系統では、雄性配偶子として運動能をもつ精子を形成する。鞭毛と多層構造体は植物精子の運動能を担う構造であるが、その形成の仕組みについては未解明な点が多かった。

真核生物に広く保存された物質輸送の仕組みである膜交通は、様々な生命現象の基盤としてはたらく。膜交通制御因子である RAB GTPase のサブファミリーのひとつである RAB23 は、運動性の鞭毛またそれに類似した構造である繊毛をもつ生物によく保存されており、植物においても精子をつくる系統で保存されている。さらにタイ類ゼニゴケの *rab23* 変異体において、精子の運動性や鞭毛や多層構造体の構造に著しい異常がみられ、RAB23 が植物精子の運動装置形成に関わることが考えられたが、その分子機能については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、ゼニゴケをモデルとして RAB23 の分子機能を解析し、植物精子の運動装置の構築システムの一部を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

ゼニゴケ *rab23* 変異体における微小管および軸系成分のマーカーの局在を観察し、変異体でおこる異常の評価を行った。タグ融合ゼニゴケ RAB23 の細胞内局在を観察し、RAB23 が機能する場所を調べた。また RAB23 の活性化状態に応じた局在変化や RAB23 の機能ドメインのはたらきについても検証した。

RAB23 と協調的にはたらく分子を明らかにするため、タグ融合ゼニゴケ RAB23 の共免疫沈降と質量分析を行った。発現パターンの情報と合わせて相互作用因子の候補を探索した。得られた候補因子について、他の手法による相互作用の検証や遺伝子破壊株の作出と表現型解析を行い、ゼニゴケ RAB23 との機能的な関連について調べた。

ゼニゴケを用いて明らかにした RAB23 の機能の普遍性について、単細胞緑藻クラミドモナスを用いて検証した。変異体ライブラリーからクラミドモナス *RAB23* 領域に T-DNA が挿入された株を取り寄せ、その表現型を調べた。

4. 研究成果

ゼニゴケ *rab23* 変異体における微小管および軸系構成成分のマーカーラインの観察を行った結果、鞭毛への局在に目立った影響は観られなかったが、一部の精細胞において、鞭毛が異常な繊維状の構造として細胞体内に蓄積する様子がみられた。微小管の翻訳後修飾についても調べたが、ゼニゴケ *rab23* において目立った差は観られなかった。一方で、通常の精子変態の過程で、発生段階により翻訳後修飾の度合いが異なることを見出した。この結果に加えて、ゼニゴケ精子形成過程を解析するうえで基盤となる発生段階のステージ分けや各発生段階におけるオルガネラ動態の観察結果をまとめ、論文として発表した。

タグ融合ゼニゴケ RAB23 の細胞内局在を観察した結果、精子変態期のうち鞭毛が伸長する時期で最も強くシグナルが観られた。また 1 アミノ酸変異を加えた恒常活性型ゼニゴケ RAB23 は伸長中の鞭毛に蓄積する様子がみられた。これらの結果から、ゼニゴケ RAB23 は活性化状態の時に伸長中の鞭毛ではたらくことが考えられた。ゼニゴケ RAB23 の C 末端には脂質修飾を受けると予想されるサイトが存在する。C 末端を削ることによる動態の影響を調べた結果、膜との結

合性の低下や恒常活性型ゼニゴケ RAB23 の鞭毛局在への影響がみられた。これらの結果から、ゼニゴケ RAB23 の C 末端領域はその機能に重要な役割を果たすことが示唆された。

共免疫沈降産物の質量分析の結果と発現パターンの比較から、ゼニゴケ RAB23 の相互作用因子の候補を選定した。選定した候補因子について、ゲノム編集により作出した遺伝子破壊株の精子を観察した結果、2 種類において運動性の異常がみられた。さらにそのうち 1 種類においてゼニゴケ RAB23 と同様の軸系構造の異常がみられ、RAB23 との機能的な関連が示唆される因子を見出すことができた。

クラミドモナス *rab23* 変異体については、変異体ライブラリーから取り寄せた T-DNA 挿入ラインでは運動性の異常が観察されたものの、戻し交配により得られた F2 世代では運動性の異常がみられなくなるという結果が得られた。一方で、得られたラインでは掛け合わせ効率が著しく低下することを見出した。この表現型とクラミドモナス RAB23 の機能との関連について検証することを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Norizuki Takuya, Minamino Naoki, Sato Miyuki, Ueda Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Autophagy regulates plastid reorganization during spermatogenesis in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2023.1101983	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 -
1. 著者名 Minamino Naoki, Norizuki Takuya, Mano Shoji, Ebine Kazuo, Ueda Takashi	4. 巻 149
2. 論文標題 Remodeling of organelles and microtubules during spermiogenesis in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200951	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 -
1. 著者名 Koshimizu Shizuka, Minamino Naoki, Nishiyama Tomoaki, Yoro Emiko, Sato Mayuko, Wakazaki Mayumi, Toyooka Kiminori, Ebine Kazuo, Sakakibara Keiko, Ueda Takashi, Yano Kentaro	4. 巻 236
2. 論文標題 Phylogenetic distribution and expression pattern analyses identified a divergent basal body assembly protein involved in land plant spermatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1182~1196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.18385	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 Norizuki Takuya, Minamino Naoki, Sato Miyuki, Tsukaya Hirokazu, Ueda Takashi	4. 巻 39
2. 論文標題 Dynamic rearrangement and autophagic degradation of mitochondria during spermiogenesis in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110975~110975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110975	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 Feng Yihong, Hiwatashi Takuma, Minamino Naoki, Ebine Kazuo, Ueda Takashi	4. 巻 596
2. 論文標題 Membrane trafficking functions of the ANTH/ENTH/VHS domain containing proteins in plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2256 ~ 2268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14368	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 南野尚紀、法月拓也、真野昌二、海老根一生、上田貴志
2. 発表標題 基部陸上植物タイ類ゼニゴケにおけるESCRT-III複合体の機能解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南野尚紀、法月拓也、藤井春樹、八野田奨、海老根一生、真野昌二、堀田一弘、上田貴志
2. 発表標題 イメージング・AI技術を駆使して植物精子の形成と運動の仕組みを理解する
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南野尚紀、海老根一生、上田貴志
2. 発表標題 ゼニゴケ精子変態過程におけるオルガネラ動態の解析
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
---------	---------