

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658095

研究課題名(和文) 基部陸上植物の低い遺伝的冗長性を活用したシス - トランス転写制御システムの解明

研究課題名(英文) Systematic analysis of transcription factors in *Marchantia polymorpha*

研究代表者

河内 孝之 (Kohchi, Takayuki)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：40202056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：陸上植物進化の基部に位置するゼニゴケは、陸上植物としての基本的遺伝子セットを有している。進化的な位置づけと体制の単純さを反映し、制御系遺伝子の冗長性が低い。本研究ではゼニゴケ転写因子を網羅的に単離同定した。構造の特徴からグループ分けを行った。その結果、ゼニゴケには、シロイヌナズナの1/6にあたる約300の転写因子が存在すること、総数の少なさにも関わらずファミリーは同一の38種類であることが分かった。ゼニゴケは陸上植物の基本的な転写因子のセットを保有しながらも、遺伝的冗長性が極めて低いため、優れた実験系となりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：Transcription factors are major regulators for various biological processes including development and environmental responses. *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens* have 2,000 and 1,200 transcription factors, respectively. The liverwort *Marchantia polymorpha* is an emerging model organism for developmental and evolutionary studies. *M. polymorpha* occupies a crucial position in the evolution of land plant and has the haploid-dominant life cycle, which provides advantages over diploid plants for molecular genetic analysis. In this study, we identified ca. 300 transcription factors in *M. polymorpha* by searching our EST and RNA-sequence databases that include more than 20,000 genes. Surprisingly, *M. polymorpha* had 38 transcription factor families that are common numbers with *A. thaliana*. These results indicate that redundancy of transcription factors in *M. polymorpha* should be very low and that *M. polymorpha* provides a suitable system for genetic analysis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：転写因子 ゼニゴケ 陸上植物進化

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの開発に代表されるゲノム解読技術革新によって、従来のモデル生物に限らず、多くの生物でゲノム情報に基づいた実験が可能となった。陸上には 25 万種以上の種子植物が繁栄している。器官が高度に分化している種子植物の進化は染色体レベルや遺伝子レベルでの重複が引き金となったと予想される。一方、遺伝的冗長性のため突然変異体による遺伝子機能解析の困難さも顕著になっている。

陸上植物は水中から陸上化した植物を祖先として、陸上環境に適応したものである。陸上植物進化の基部に位置するコケ植物の理解は、植物の進化的変遷を知る上で鍵となる。なかでもゼニゴケ *Marchantia polymorpha* は実験生物として優れた特徴をもつユニークな実験材料として注目されている。これまでの国内での遺伝子解析による情報解析に加えて、米国エネルギー省 Joint Genome Institute のコミュニティ配列決定プロジェクトに採択され、多数の EST とほぼゲノム全体をカバーするドラフトのゲノム配列が決定されている。その結果、ゼニゴケは陸上植物として基本的な遺伝子セットを持ちながらも遺伝子重複が極めて少なく単純なゲノム構成をもつことが明らかになった。その遺伝的冗長性の低さは、転写因子、受容体、リン酸化酵素、タンパク質分解系といった制御系因子で顕著である。そのリソースを活用したゼニゴケの比較ゲノム・分子遺伝学解析の展開が期待されている。

2. 研究の目的

ゼニゴケは基部陸上植物としての進化的位置づけのユニークさに加えて、半数体世代を対象とした実験系が可能であり、分子遺伝学解析に極めて優位である。高い形質転換系と低い遺伝的冗長性を生かした実験系は、基部陸上植物の理解にとどまらない。そこで、ゼニゴケの転写因子に注目し、明瞭かつ迅速な酵母および植物における転写因子機能解析系を開発し、分子遺伝学とシステムズバイオロジー分野を開拓する。酵母による迅速な実験系と植物体における転写因子複合体同

定の実験系を立ち上げる。

本研究は、植物の環境応答や発生の制御機能に重要な転写因子に注目し、系統的に解析する点に特徴がある。得られる知見は、多様性研究だけでなく生物で共通した現象の理解にも有効である。システム生物学的なアプローチを効率的に行うことで、普遍性の理解を作物や樹木の理解にもつなげることも期待される。

3. 研究の方法

ゼニゴケの EST には 300 万以上のリード、次世代シーケンサーによる RNA-Seq には桁違いの情報がありゲノム上の遺伝子に対する網羅性は高い。EST や抽出トランスクリプトのクラスタリングデータをもとに転写因子の ORF を抽出する。シロイヌナズナ、イヌカタヒバ、ヒメツリガネゴケ、クラミドモナスの相同遺伝子に対する系統樹を作成して、オルソログ、パラログなどの関係を解析する。そのデータをもとに、ゼニゴケの転写因子の総数とタイプ別分布を検証し、各 ORF に個別 ID を与えてデータベース化する。

推定した転写因子 ORF に対する cDNA を、ゼニゴケの様々な組織から抽出した mRNA に対して、RT-PCR によって増幅する。mRNA の由来は、各転写因子が組織・条件別 EST で出現した頻度情報を考慮する。ORF に対する cDNA は汎用性の高い Gateway エントリーベクターへクローン化する。Gateway ベクターを利用することと、カタログ化保存を行うことで、効率的に転写因子遺伝子へのアクセスが可能となる。

4. 研究成果

EST データや次世代 RNA-Seq のデータをもとに 20,000 以上遺伝子を含むデータセットを作成した。これに対して主に BLAST による相同性検索をもとに転写因子の候補を同定した。これらの遺伝子のアミノ酸配列をもとに被子植物、藻類、蘚類、小葉類などのゲノム解読が終了しているモデル植物の比較をおこなった。その結果、転写因子遺伝子の総数は約 300 とシロイヌナズナの 1/6 の数であることがわかった。転写因子は基本的なモチ

ーフや構造をもとにグループ化される。シロイヌナズナでは大きく 38 種類に分類されるが、それぞれのグループを構成する遺伝子数には大きな違いがあるもののグループ数はゼニゴケでも同一であった。ゼニゴケとシロイヌナズナを比較すると、一部のグループで大幅な遺伝子数の増加が見られた。例えば、MADS ボックス遺伝子は、MIKC 型と MIKC*型に分類される。ゼニゴケでは各タイプがひとつずつであるのに対して、シロイヌナズナでは合計 100 以上の遺伝子があり、50 倍以上に増加していた。このように各グループの構成数は大きく異なる場合があった。また、各遺伝子について、分子系統樹を作成した。なかにはゼニゴケに特異的な転写因子軍もあるが、多くの場合、被子植物の因子を複数含むクレードの基部にゼニゴケのタンパク質が位置した。これらの解析から、植物は陸上化した時点で基本的な転写因子を獲得していたこと、陸上環境に適応して複雑な発生プログラムを成立させる段階で転写因子の冗長性を増加させたことがわかった。今後、ゼニゴケの生活環において遺伝子発現の主要な制御系である転写因子を詳細に解析することで、植物に普遍的な転写因子の機能ロジックを解くことができる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Ishizaki, K., Nonomura, M., Kato, H., Yamato, K. T., and Kohchi, T. Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* 125, 643-651 (2012). DOI: 10.1007/s10265-012-0477-7
2. Okumura, M., Inoue, S. I., Takahashi, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Kinoshita, T. Characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol.* ;159, 826-834 (2012). DOI: 10.1104/pp.112.195537
3. Ueda, M., Kuniyoshi, T., Yamamoto, H., Sugimoto K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Nishimura, Y., and Shikanai, T. Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J.*, **72**, 683-693 (2012). DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05115.x
4. Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., and Kohchi, T. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 167-172 (2013) (査読有) DOI: 10.1271/bbb.120700
5. Ogasawara, Y., Ishizaki, K., Kohchi, T., and Kodama, Y. Cold-induced organelle relocation in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Environ.* **36**, 1520-1528 (2013). DOI: 10.1111/pce.12085.
6. Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S., and Kohchi, T. Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci. Rep.*, **13**, 1532 DOI: 10.1038/srep01532 (2013).
7. Kanazawa, T., Ishizaki, K., Kohchi, T., Hanaoka, M., and Tanaka, K. Characterization of Four Nuclear-Encoded Plastid RNA Polymerase Sigma Factor Genes in the Liverwort *Marchantia polymorpha*: Blue-Light and Multiple-Stress Responsive SIG5 was Acquired Early in the Emergence of Terrestrial Plants. *Plant Cell Physiol.*, **54**, 1736-1748 (2013). DOI: 10.1093/pcp/pct119
8. Althoff, F., Kopischke, S., Zobell, O., Ide, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., and Zachgo, S. Comparison of the MpEF1 α and CaMV35

promoters for application in *Marchantia polymorpha* overexpression studies.

Transgenic Res., 23, 235-244 (2014).

DOI: 10.1007/s11248-013-9746-z

9. Ishizaki, K., Mizutani, M., Shimamura, M., Masuda, A., Nishihama, R., and Kohchi, T. Essential role of the E3 ubiquitin ligase NOPPERABO1 in schizogenous intercellular space formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*, *Plant Cell* 25, 4075-4084 (2013).
DOI: 10.1105/tpc.113.117051
10. Ueda, M., Takami, T., Peng, L., Ishizaki, K., Kohchi, T., Shikanai, T., and Nishimura, Y. Subfunctionalization of sigma factors during the evolution of land plants based on mutant analysis of liverwort (*Marchantia polymorpha* L.) MpSIG1. *Genome Biol Evol.*, 5, 1836-1848 (2013).
doi: 10.1093/gbe/evt137
11. Shirakawa, M., Ueda, H., Koumoto, Y., Fuji, K., Nishiyama, C., Kohchi, T., Hara-Nishimura, I., and Shimada, T. CONTINUOUS VASCULAR RING (COV1) is a trans-Golgi network localized membrane protein required for golgi morphology and vacuolar protein sorting. *Plant Cell Physiol.*, 55, 764-772 (2014).
DOI: 10.1093/pcp/pct195
12. Sugano, S. S., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Shimada, T., Hara-Nishimura, I. and Kohchi, T. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L., *Plant Cell Physiol.*, 55, 475-481 (2014)
DOI: 10.1093/pcp/pcu014
13. Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T. and Kohchi, T. Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution, *Nature Comm.* 5, 3668 (2014).
DOI: 10.1038/ncomms4668

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 石崎公庸、加藤大貴、河内孝之 ゼニゴケから探るオーキシン応答の基本メカニズムとその進化(シンポジウム、招待) 第 54 回日本植物生理学会年会、岡山大学、3/21-23, 2013
2. 西浜竜一、石崎公庸、河内孝之、苔類ゼニゴケにおける光依存的な細胞分裂活性制御機構(シンポジウム、招待) 第 77 回日本植物学会大会、北海道大学、9/13-9/15, 2013 十
3. 白川一、井上佳祐、石崎公庸、西浜竜一、河内孝之、苔類ゼニゴケにおける転写因子レパートリー、55 回 日本植物生理学会年会、富山大学、3/18-3/20, 2014
4. 河内孝之、加藤大貴、西浜竜一、大和勝幸、石崎公庸、ゼニゴケ研究地平への投射:オーキシン信号伝達を例に(シンポジウム、招待) 55 回 日本植物生理学会年会、富山大学 S11-5、3/19

〔図書〕(計 1 件)

1. Chiyoda, S., Yamato, K. T., Kohchi, T. Plastid transformation of sporelings and suspension-cultured cells from the liverwort *Marchantia polymorpha* L., *Method Mol. Biol.*, 1132:439-447 (2014)
doi: 10.1007/978-1-62703-995-6_30.

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/plantmb>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河内 孝之 (KOHCHI, Takayuki)

京都大学・生命科学研究所・教授

研究者番号: 40202056

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)

京都大学・生命科学研究科・助教(24年度)

神戸大学・理学研究科・准教授(25年度)

研究者番号：00452293

西浜 竜一 (NISHIHAMA, Ryuichi)

京都大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：70283455