

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770077

研究課題名(和文) 新規アポスポリー制御遺伝子を用いた陸上植物の異形世代交代を司る制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism regulating the alternation of generations in land plants using the transcription factor

研究代表者

榭原 恵子 (Sakakibara, Keiko)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90590000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：陸上植物は1n世代と2n世代の両方に異なる多細胞体制を作る異型世代交代を行なうが、世代の発生プログラムの切り換えの仕組みはよくわかっていなかった。申請者は転写因子KNOX2が1nから2nへの発生プログラムの抑制に機能していることをつきとめた。野生株とKNOX2機能欠損株の初期胚を用いた比較トランスクリプトーム解析により、KNOX2遺伝子の標的遺伝子の探索を行なった。KNOX2機能欠損株では転写因子と代謝関連遺伝子の発現が大きく変動あり、遺伝子ネットワークおよびグローバルな代謝産物量の変化が世代交代制御の実働因子であると推測された。

研究成果の概要(英文)：Land plants undergo an alternation of generations, producing multicellular bodies in both 1n and 2n generations. We found the transcription factor KNOX2 function in the repression of haploid developmental program in the diploid body. To identify the molecular mechanism regulating the alternation of generations by KNOX2 genes, we performed the comparative transcriptome analysis using the early developing embryos of wild-type and KNOX2 mutant in a moss *Physcomitrella patens*. As the result of comparative transcriptome analysis, we found that the expression level of several transcription factors, secondary metabolic synthetic genes was altered in the KNOX2 mutant embryo. We hypothesize that the control of gene regulatory network and metabolism is important to regulate the alternations of generations in land plants.

研究分野：植物発生進化学

キーワード：陸上植物 世代交代 アポスポリー 転写因子 ホメオボックス遺伝子 ヒメツリガネゴケ

### 1. 研究開始当初の背景

陸上植物の特徴の一つとして、その生活環において異形世代交代を行うことがあげられる。陸上植物は配偶体 (n) 世代、孢子体 (2n) 世代においてそれぞれの役割に適した多細胞体制を構築し、通常受精後に孢子体の発生プログラムが、減数分裂後に配偶体の発生プログラムが進行するように制御されている。まれに受精を介さずに配偶体 (n) から孢子体が分化するアポガミー、減数分裂を介さずに孢子体 (2n) から配偶体が分化するアポスポリーという現象が報告されており、それぞれの発生プログラムを切替えるスイッチが存在し、このスイッチが異時的に作動した際に、アポガミー、アポスポリーが引き起こされると考えられてきた (Bell, 1992 Int. J. Plant Sci.) が、その実体は不明であった。

コケ植物ヒメツリガネゴケにおいて *PpCLF* 遺伝子の機能を欠損させると配偶体の一部から孢子体様組織が分化する表現型が観察された。このことは *PpCLF* が配偶体における孢子体の発生プログラムの抑制、つまりアポガミーの抑制に機能することを示すに機能することを示している (図 1)。 *PpCLF* は後生動物において器官分化をエピジェネティックに抑制しているポリコム遺伝子の相同遺伝子であり、配偶体組織で孢子体の発生プログラムを抑制するためにはエピジェネティックな制御が関与していることが示された (Okano et al. 2009 Proc. Natl. Acad.

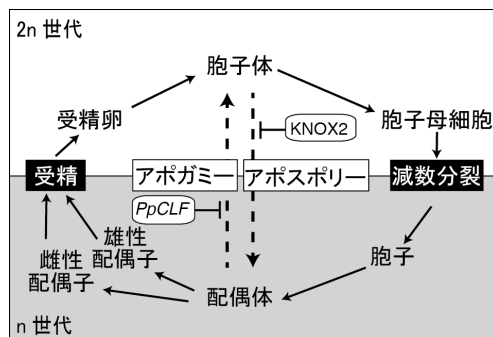


図 1 陸上植物の生活環  
Sci. USA).

一方、申請者はヒメツリガネゴケにおいて、その機能を欠損させることでアポスポリーを引き起こす新規の転写調節因子 *ASP1*、*ASP2* を発見した。コケ植物では、受精後、受精卵が適切な発生プログラムを経て孢子体を形成するが、この遺伝子の機能欠損株では、孢子体の胚発生が初期で停止し、配偶体組織である原糸体が形成される (図 2)。また、*KNOX2* 遺伝子は通常、孢子体全体で発現している。以上のことから、*KNOX2* 遺伝子は孢子体世代において配偶体発生プログラムが働かないように抑制し、この遺伝子の機能が欠損するとアポスポリーが引き起こされることがわかった (図 1)。これはアポスポリー制御遺伝子の初めての報告例である。*KNOX2* 遺伝子は転写因子であることから、この遺伝子の下流遺伝子を探索することで、孢子体で配偶体発生プログラムを抑制する分子機構を明らかにできると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) ヒメツリガネゴケ *KNOX2* 標的遺伝子を探索し、世代交代を制御する分子機構の実体を理解し、(2) これらの標的遺伝子をヒメツリガネゴケ (コケ植物) において機能解析するとともに、その相同遺伝子がシロイヌナズナ (種子植物) に存在する場合はその機能解析を行うことで、陸上植物に普遍的な孢子体から配偶体への転換に関わる分子機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析とクロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq) 法により世代交代を制御する転写因子 *KNOX2* の標的遺伝子を探索する。

### 4. 研究成果

申請者らは 2n 世代から n 世代への切替のスイッチとして働くホメオボックス型転写因

子KNOX2の発見を2013年3月にサイエンス誌に発表した (Sakakibara et al. 2013 Science)。

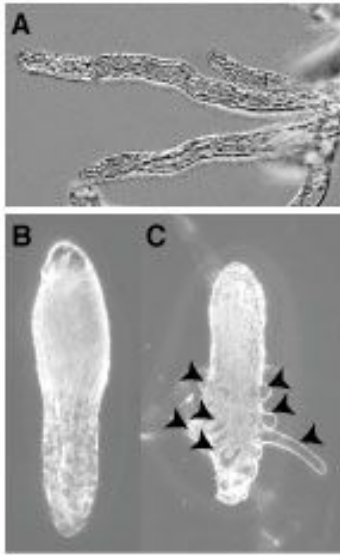


図2 ヒメツリガネゴケの配偶体と孢子体。

野生株の配偶体組織(A)と孢子体組織(B)。KNOX2 機能欠損株の孢子体(C)。矢尻は異所的に形成された配偶体組織。

さらに、陸上植物の世代間の発生プログラムの転換に関わる分子機構を明らかにすることを目的とし、転写因子であるKNOX2遺伝子の標的遺伝子を探索すべく1)トランスクリプトーム解析、及び2)ChIP-seq法を試みた。1)では野生株とKNOX2機能欠損株の若い孢子体(初期胚)を用いた比較トランスクリプトーム解析を行なった。ヒメツリガネゴケ初期胚は微小なので、通常のRNAシーケンスライブラリーの作成法を用いることが困難であったが、動物細胞で開発されたquartz-seq法(Sasagawa et al. 2013 Genome Biol.)とSMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing法(TaKaRa)を用いてRNAシーケンスライブラリーの作成を試み、いずれの手法でもライブラリーの作成が可能であることを確かめた。特にquartz-seq法ではヒメツリガネゴケ初期胚1個分からのライブラリー作成に成功した。quartz-seq法とSMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing法ではquartz-seq法の方がよ

り微量の組織から感度の高いライブラリーを作成できることがわかった。

一方、2)では微量サンプルからのライブラリー調整が困難であったので、1)の結果をもとに、KNOX2の標的遺伝子候補を選抜した。野生株とKNOX2機能欠損株の初期胚で発現している遺伝子を網羅的に調べた、RSEM法(Bo and Dewey 2011 BMC Bioinformatics)とTCC法(Sun et al., 2013 BMC Bioinformatics)により比較したところ、995遺伝子の発現が変動していた(q value < 0.001)。有意に発現変動している遺伝子を調べたところ、KNOX2機能欠損株では、特定の転写因子、脂肪酸合成酵素、糖輸送体、ペプチド輸送体の発現が変動し、フェニルアラニンアンモニアリアーゼやカルコン合成酵素などの二次代謝産物合成酵素、細胞壁合成酵素が上昇し、光合成関連遺伝子、細胞壁分解酵素の発現が低下していることがわかった。KNOX2遺伝子が制御する遺伝子ネットワークおよびグローバルな代謝産物量(メタボローム)の変化が世代交代制御の実働因子であると考えられた。今後、胚を用いたメタボローム解析により、実際にはどのような代謝産物が変化しているか特定し、その産物の世代交代における役割を特定する。また、特に転写因子に着目し、その遺伝子機能欠損株、遺伝子過剰発現株を作出し、機能解析を行っており、その成果により、KNOX2遺伝子が制御する遺伝子ネットワークが理解できると期待される。また、KNOX2の下流で働くと考えられる転写因子の一部にはシロイヌナズナにも相同遺伝子が存在する。この遺伝子のシロイヌナズナT-DNA挿入変異体株の解析を進める。

また、被子植物の報告例から、転写因子KNOX2自身は核移行シグナルを持たず、同じくホメオボックス型の転写因子であるBELLタンパク質と複合体を形成することにより、核移行し、転写因子として機能することが報告されている(Kumar et al., 2007 Plant Cell)。

ヒメツリガネゴケゲノムがコードする4個のBELL遺伝子のうち、3個が孢子体で発現することから、KNOX2タンパク質と複合体を形成し、世代交代制御因子として機能すると推測された。3個のBELL遺伝子に関して詳細な発現解析のためのノックイン株と機能解析のための機能欠損株を作出済みである。機能欠損株の1つではKNOX2機能欠損株と同じく胚発生初期に成長を停止した。また、この株を含む複数のBELL機能欠損株が部分的にKNOX2機能欠損株と類似の表現型を示したことから、これらのBELLタンパク質はKNOX2タンパク質とともに世代交代制御に機能する可能性が考えられた。このBELL遺伝子の解析をさらに進め、世代交代を制御する分子機構の全体像を明らかにすることが今後の方向性となる。

#### 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 4 件)

1. Furumizu, C., Alvarez, J. P., Sakakibara, K., Bowman J. L. “Antagonistic Roles for KNOX1 and KNOX2 Genes in Patterning the Land Plant Body Plan Following an Ancient Gene Duplication.” **PLOS Genetics** 査読有 11, 2015 ee1004980.
  2. Sakakibara, K., Reisewitz, P., Aoyama, T., Friedrich, T., Ando, S., Sato, Y., Nishiyama, T., Tamada, Y., Hiwatashi, Y., Kurata, T., Ishikawa, M., Deguchi, H., Rensing, S. A., Werr, W., Murata, T., Hasebe, M., Laux, T. “*WOX13-like* genes are required for the initiation of apical stem cells from differentiated leaf cells in the moss *Physcomitrella patens*” **Development** 査読有 141, 2014 1660-1670.
  3. Sakakibara, K.\*, Ando, S., Yip, H. K., Tamada, Y., Hiwatashi, Y., Murata, T., Deguchi, H., Hasebe, M., Bowman, J. L.\*
- (\*Authors for correspondence) “KNOX2 genes regulate the haploid to diploid morphological transition in land plants” **Science** 査読有 339, 2013 1067-1070.
4. Zalewski, C. S., Floyd, S. K., Furumizu, C., Sakakibara, K., Stevenson, D. W., Bowman, J. L. “Phylogeny of Class IV HD-Zip genes and the evolution of epidermal complexity in land plants” **Mol. Biol. Evol.** 査読有 30, 2013 2347-65.
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. 神原恵子、西山智明、塚谷裕一  
「Identification of downstream genes of KNOX2 transcription factor that regulates alternations of generations in land plants」第56回日本植物生理学会、東京農業大学(東京都世田谷区)、2015年3月16日.
  2. 神原恵子、古水千尋、Bowman, J. L.  
「KNOX 遺伝子族の進化による陸上植物複相の複雑化」シンポジウム「古い酒を新しい革袋に～preexisting gene regulatory network の転用による陸上植物のボディプラン革新」(オーガナイザー:石崎公庸、神原恵子)日本植物学会第78回大会、明治大学(神奈川県川崎市)、2014年9月12日.
  3. 神原恵子「コケ植物の再生能力とその制御因子」日本蘚苔類学会第43回大会、奥入瀬溪流ホテル(青森県十和田市)、2014年8月26日.
  4. 神原恵子「KNOX 遺伝子は陸上植物の世代交代を制御する」日本進化学会16回年会、高槻現代劇場(大阪府高槻市)、2014年8月21日.
  5. Sakakibara, K., Reisewitz, P., Aoyama, T., Friedrich, T., Ando, S., Sato, Y., Nishiyama, T., Tamada, Y., Hiwatashi, Y., Kurata, T., Ishikawa, M., Deguchi, H., Rensing, S. A., Werr, W., Murata, T., Hasebe, M., and Laux,

- T. “*WOX13-like* genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens*” 日本発生生物学会第 47 回年会、Winc Aichi (愛知県名古屋市)、2014 年 5 月 28 日.
6. **神原恵子**「ヒメツリガネゴケをモデルとした発生進化的解析による陸上植物の異形世代交代を司る分子機構の解明」植物学会奨励賞受賞講演、日本植物学会第 77 回大会、北海道大学 (北海道札幌市) 2013 年 9 月 14 日.
  7. **神原恵子**、安藤沙友里、Yip, H. K.、玉田洋介、日渡祐二、村田隆、出口博則、長谷部光泰、Bowman, J. L. 「KNOX 2 遺伝子は陸上植物の世代交代を制御する」日本蘚苔類学会第 42 回大会、岡山理科大学 (岡山県岡山市) 2013 年 8 月 6 日.
  8. **Sakakibara, K.**, Ando, S., Yip, H. K., Tamada, Y., Hiwatashi, Y., Murata, T., Deguchi, H., Hasebe, M., Bowman, J. L. “KNOX2 Genes Regulate the Haploid-to-Diploid Morphological Transition in Land Plants” Moss 2013, The Masaryk Congress Centre (Prague, Czech Republic), 2013 年 6 月 17 日.
  9. **Sakakibara, K.** “*Physcomitrella* WOX genes are necessary for the formation of stem cells from differentiated leaf cells” 第 3 回 Marchantia workshop、ホテルグリーンピア南阿蘇 (熊本県阿蘇郡南阿蘇村)、2012 年 11 月 17 日.
  10. **Sakakibara, K.**, Aoyama, T., Ando, S., Sato, Y., Kurata, T., Murata, T., Nishiyama, T., Hasebe, M. “*Physcomitrella* WOX genes are necessary for the formation of stem cells from differentiated leaf cells” Moss 2012, The New York Botanical Garden (Bronx, NY, U.S.A) 2012 年 6 月 17 日.

〔図書〕(計 4 件)

1. **神原恵子**「陸上植物の複相の巨大化と複雑化に貢献したホメオボックス遺伝子の重複と機能分化」**細胞工学** Vol. 33 No. 8 Special Review: 872-877. (2014).
2. **神原恵子**「蘚苔類の世代交代とその制御因子」**蘚苔類研究** 10 巻 12 号: 393-397. (2013).
3. **神原恵子**「陸上植物の世代交代の謎にせまる～遺伝子重複と機能分化による胞子体の劇的な形態進化～」**化学と生物** 51 巻: 595-596. (2013).
4. **神原恵子**「コケ植物のエボデボから見えてきた胞子体の複雑化」あんな形, こんなでしかた エボデボ研究最前線 [植物篇] 『生物の科学遺産』2013 年 1 月号: 39-44. (2013).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年月日 :  
 国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年月日 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等  
 日本植物学会研究トピック 10 回  
<http://bsj.or.jp/jpn/general/research/10.php>

ライフサイエンス新着レビュー  
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/6644>

受賞

平成 25 年 9 月 日本植物学会奨励賞受賞

平成 25 年 11 月 広島大学学長賞受賞

平成 26 年 8 月 日本進化学会奨励賞受賞

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榊原 恵子 (SAKAKIBARA Keiko)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号：90590000

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：