

苔類ゼニゴケの油体から解き明かす新規オルガネラ獲得機構

Mechanism of organelle acquisition unraveled by studies of the oil body in the liverwort *Marchantia polymorpha*

(日本植物学会推薦)

代表研究者 基礎生物学研究所 上田 貴志 National Institute for Basic Biology Takashi UEDA

Eukaryotic cells comprise various membrane-bounded organelles with diverse and specific functions, which are connected one another by the membrane trafficking system. Diversification and evolution of the membrane trafficking system should be tightly related to acquisition and/or neofunctionalization of organelles, whose mechanisms, however, are remained elusive. A long-term goal of our research is to unravel how membrane trafficking pathways have been diversified and how new organelles have been acquired during evolution. During comparative analysis of membrane trafficking systems in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha*, we found that the oil body, which is a liverwort-specific organelle, is formed by the similar mechanism to the cell plate, which is formed by reorientation of the secretory pathway to accomplish cytokinesis in land plants. Furthermore, we discovered a master transcriptional regulator of oil body formation in *M. polymorpha*, which allowed us to modulate oil body formation in this plant. Using the knock-out mutant and overexpressor plants of this master transcriptional regulator, we performed RNA-seq analysis and succeeded in identification of many genes, which should be involved in oil body formation and synthesis of catabolites stored in the oil body.

研究目的

地球上には、それぞれに特有の体制や生活環を有する、実に多様な真核生物が存在する。それらの生物の細胞を構成するオルガネラレベルにおいても、それぞれの生物ごとに特殊化したオルガネラやオルガネラ機能の存在が知られており、真核生物の進化がオルガネラの進化と密接に関連していることが示唆されている。植物においても、タンパク質の貯蔵や空間充填などの機能を持つ液胞や、木質バイオマスの実体である植物細胞壁をはじめとし、人類の生活に密接に関わるオルガネラ機能や細胞構造が独自に進化してきた。しかし、進化の過程で新規のオルガネラがどのようにして獲得されたのか、また、相同なオルガネラ間における機能の多様性はどのようにうまれたのかなど、真核生物に共通する基本的な謎が多く残されている。我々は近年、苔類ゼニゴケを用いた研究により、苔類に特有の

オルガネラである油体(維管束植物に観られるオイルボディとは全く異なるオルガネラ)が、分泌経路の配向転換により形成されることを見いだした。さらに、順遺伝学的な解析を通して油体形成のマスター制御因子の同定にも成功した。この転写因子の制御機構および下流現象の解析により、油体形成の分子機構を明らかに出来ると期待される。さらに、その仕組みを他の植物の膜交通やオルガネラ機能発現の仕組みと比較することで、油体獲得に至る進化の道筋の再構築が可能であると期待される。また、油体中には *Marchantin* をはじめとする様々な生理活性物質が蓄積しており、油体形成マスター制御因子の下流因子の解析は、それらの生合成経路に関する知見の収集にも資するものと期待される。そこで本研究では、油体形成マスター制御因子の下流因子を網羅的に同定するとともに、その候補の機能解析を行うことで、油体形成の分子機

構の解明を試みた。

研究経過

油体形成のマスター転写因子（以後 **MpTF-2** と称する）は、油体の形態や分布パターンに異常を呈する変異体のスクリーニングにおいて、油体の数が顕著に増加する変異体の原因遺伝子として見いだされた。油体の数が増加するこの変異体では **MpTF-2** が過剰発現しており、一方ゲノム編集により得られた機能欠失変異体 **Mp μ f-2** では油体形成が全く起こらなかった。このことから、**MpTF-2** が油体形成のマスター転写因子であると結論づけた。この転写因子の下流遺伝子群を網羅的に同定するため、まずこれらの変異体と野生型を用いて **RNA-Seq** 解析をおこない、各遺伝子型の植物におけるトランスクリプトーム情報を得た。続いて、得られた結果の多群間比較解析をおこなった。その結果、野生型と比較し **MpTF-2** 過剰発現変異体で発現量が有意に増加し、かつ **Mp μ f-2** 機能欠失変異体で発現量が有意に減少する遺伝子が、**MpTF-2** を含めて 137 個存在することが明らかになった。これらの遺伝子が、**MpTF-2** による制御を受ける遺伝子であると考えられる。

これらの遺伝子群の変動が **MpTF-2** の発現に起因するかをより詳細に調べるため、**MpTF-2** の発現誘導系を構築し、誘導処理後の発現量の推移を調査した。**Estradiol** 誘導プロモーターに **MpTF-2** を連結したコンストラクトを作製し、先行研究で得られた油体マーカーである **YFP-MpSYP12B** により油体を可視化した植物体に導入した。この株に対して **Estradiol** 処理を行い経時的に観察をおこなったところ、約 14 時間後から **YFP** シグナルが観察され始め、24 時間後にはほぼ全ての細胞で油体形成が誘導される様子が観察された。また、**Estradiol** 処理したサンプルから経時的に **mRNA** を抽出し、上述の 137 遺伝子の中から選抜した遺伝子について定量的逆転写 **PCR** により発現量を定量した。その結果、発現誘導が起こるタイムコースに違いが見られるものの、いずれの遺伝子についても **MpTF-2** 誘導条件下でその発現が誘導された。このことから、これらの遺伝子群の発現が **MpTF-2** により誘導されることが確認された。

続いて、137 個の遺伝子についてオントロロジー解析を行った。その結果、**MpTF-2** により発現制御を受けている遺伝子群には、膜交通に関連する遺伝子、代謝経路に関連する遺伝子、膜輸送体遺伝子、機能

未知の分泌タンパク質遺伝子などが含まれることが明らかになった。これらの中から選抜した一部の遺伝子について、レポーター遺伝子や蛍光タンパク質との融合コンストラクトを用いた発現パターンの観察を行ったところ、調べたいずれの遺伝子についても油体細胞で特異的に発現していることが確認された。また、蛍光タンパク質との融合タンパク質の細胞内局在観察により、新規の油体局在タンパク質を複数見出すことに成功した。

現在、これらの遺伝子の機能解明をさらに進めるべく、それぞれの遺伝子の過剰発現変異体およびゲノム編集による機能欠失変異体の作出を進めている。現在までに、油体細胞への分化はおこるものの油体が形成されないなど、興味深い表現型を示す変異体が見られている。単一の機能欠失変異体で顕著な異常が見られなかったものについては、パラログとの多重機能欠失変異体の作出を進めている。これらの遺伝子の機能解析を進めることにより、油体形成における遺伝子発現制御とそれに伴う輸送経路の制御機構に関して、より詳細な知見が得られるものと期待される。

考察

本研究の長期的なゴールは、新規オルガネラ獲得やオルガネラ機能多様化の分子機構を明らかにすることにある。本研究課題では、新規獲得オルガネラのモデルとして苔類ゼニゴケの油体に注目し、その形成のマスター制御転写因子である **MpTF-2** を用いた研究を行った。

油体はコケ植物の中でも苔類に特異的に存在するオルガネラであり、今から 180 年以上前の文献に既にその記述がみられる。しかしその機能や由来となるオルガネラ、形成の分子機構はほとんど未解明であった。我々のこれまでの研究により、この油体膜に局在するタンパク質を世界で初めて同定するとともに、順遺伝学的スクリーニングを通して **MpTF-2** を発見したことで、油体形成の分子機構の解明が可能になった。

ゼニゴケの油体は全細胞に対し 0.5~1% しか存在しないため、その発生過程を追跡・解明することが非常に困難であった。しかし本研究で **MpTF-2** 誘導系を確立したことにより、人為的に油体発生を誘導することが可能となり、油体の発生過程を詳細に追跡することが可能となった。また、**MpTF-2** の過剰

発現体や機能欠失変異体を用いた RNA-seq 解析により、MpTF-2 の下流で機能する油体形成に関わる遺伝子群を網羅的に同定することに成功した。さらに本研究の結果は、油体というオルガネラの形成が単一の転写因子のオン・オフで制御されていることを示している。我々の誘導系は、オルガネラの発生を自在に操ることの出来る現存する唯一の系であり、今後オルガネラ新生のメカニズムを解明する上で、強力なモデル系となるものと期待される。

今後も引き続き、MpTF-2 による転写制御の仕組みをさらに明らかにするべく研究を進める。エピトープタグ融合の MpTF-2 が機能欠失変異体の表現型を相補しなかったため、これを用いた ChIP-Seq 解析などができなかった。今後 MpTF-2 の抗体を作製するなどして、直接の標的遺伝子の同定に取り組む予定である。また、MpTF-2 を含めた 137 遺伝子の機能解析を通して、油体形成の分子機構の解明を今後さらに進める予定である。

野生型植物の油体細胞では、油体以外のオルガネラや細胞骨格にもユニークな形態的あるいは動態的特徴が見られる。我々が確立した油体形成の誘導系を用いて油体形成時の様々なオルガネラや細胞骨格のダイナミクスを観察することで、油体と他のオルガネラや細胞骨格の関連が明らかにできるものと期待される。また、細胞骨格やオルガネラの機能阻害剤、膜交通の阻害剤などを用いた薬理的アプローチも、油体形成と他のオルガネラ機能や細胞骨格との関連を明らかにする上で有効であろう。

陸上植物の細胞質分裂時に一時的に出現する細胞板や、共生糸状菌が形成する樹枝状体など、植物には油体以外にも植物固有のオルガネラや細胞構造が存在する。興味深いことに、これらのオルガネラや細胞構造の形成の際には、油体形成時と同様に転写レベルでの発現制御を伴う分泌経路の一過的な方向転換が観察される。油体を含めこれらのオルガネラや細胞構造は、機能において全く異なっている。にも関わらず、そのすべての形成において分泌経路の配向転換が関わっているという事実は、植物におけるオルガネラ獲得戦略の一貫性を示しているのかもしれない。

油体形成マスター転写因子 MpTF-2 の下流で機能する遺伝子のホモログが、細胞板や樹枝状体形成においてどのような機能を担っているのかも、今後解析すべき興味深い研究対象である。そのような実験

を進めることで、植物が新規のオルガネラや細胞構造を獲得する上で採った共通の戦略を解明出来るものと期待される。さらにその延長線上には、その戦略を応用した植物細胞におけるオルガネラ創造の可能性が広がる。有用物質の産生や蓄積、有害物質の除去への貢献など、新しく造り出すオルガネラは、大きな可能性を秘めている。

研究の発表

口頭発表

国際学会

1. Takehiko Kanazawa and Takashi Ueda. Regulatory mechanisms of biogenesis of the oil body in *Marchantia polymorpha*. Japan-Taiwan Plant Biology 2019. 15th March, 2019, Nagoya, Japan
2. Takehiko Kanazawa and Takashi Ueda. A shared framework of organelle acquisition during land plant evolution. 21st ENPER meeting. 5th September 2018, Vienna, Austria
3. Takashi Ueda (invited speaker) Roles and regulation of membrane traffic in spermatogenesis of *Marchantia polymorpha*. EMBO workshop “New shores in land plant evolution” 23rd June 2018, Lisbon, Portugal
4. Takehiko Kanazawa and Takashi Ueda. A common strategy for organelle acquisition during plant evolution. EMBO workshop “New shores in land plant evolution” 22nd June 2018, Lisbon, Portugal
5. Takashi Ueda (co-organizer and invited speaker) Adaptor proteins involved in clathrin-mediated endocytosis in plant cells. CoB workshop “Cellular gateways: expanding the role of endocytosis in plant development” 22nd April 2018, West Sussex, UK
6. Takashi Ueda (invited speaker) Diversification of membrane trafficking pathways during land plant evolution unraveled with *Marchantia polymorpha*. The 65th NIBB conference Renaissance of *Marchantia polymorpha* –the genome and beyond–, 17th December 2017, Okazaki, Japan
7. Takehiko Kanazawa, Takashi L. Shimada and Takashi Ueda. Biogenesis and morphogenesis of the oil body. The 65th NIBB conference Renaissance of

Marchantia polymorpha -the genome and beyond-,
17th December 2017, Okazaki, Japan

8. Takashi Ueda (invited speaker) Evolution of plant membrane trafficking system driven by diversification of RAB and SNARE proteins. 4th AoE Symposium on Organelle Biogenesis and Function, 2nd December, 2017, Hong Kong
9. Takashi Ueda (invited speaker) Diversification of membrane trafficking pathways during land plant evolution. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 4th November, Taipei, Taiwan
10. Takehiko Kanazawa and Takashi Ueda. Cell-specific redirection of a membrane trafficking pathway led to acquisition of lineage-specific organelles during land plant evolution. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 4th November, Taipei, Taiwan

国内学会

1. 金澤建彦, 島田貴士, 上田貴志. ゼニゴケの油体形成および形態形成に関する因子の探索. 第59回日本植物生理学会年会. 2018年3月29日, 札幌・北海道
2. 金澤建彦, 上田貴志. 膜交通から探るゼニゴケ油体形成機構. 第60回日本植物生理学会年会. 2019年3月14日, 名古屋・愛知

誌上発表

1. Muro, K., Matsuura-Tokita, K., Tsukamoto, R., Kanaoka, MM., Ebine, K., Higashiyama, T., Nakano, A. and Ueda, T. (2018) ANTH domain-containing proteins are required for the pollen tube plasma membrane integrity via recycling ANXUR kinases. ***Commun. Biol.***, 1, 152, doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0158-8>
2. Ito, E., Ebine, K., Choi, S., Uemura, T., Nakano, A. and Ueda, T. (2018) Integration of two RAB5 groups during endosomal transport in plants. ***eLife***, 7: e34064, doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.34064>
3. Takemoto, K., Ebine, K., Askani, JC., Krüger, F., Ito, E., Goh, T., Schumacher, K., Nakano, A. and Ueda, T. (2018) Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in Arabidopsis. ***Proc Natl Acad Sci USA.***, 115: E2457-E2466, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1717839115>
4. Minamino, N., Kanazawa, T., Era, A., Ebine, K., Nakano, A. and Ueda, T. (2018) RAB GTPases in the basal land plant *Marchantia polymorpha*. ***Plant Cell Phys.***, 59, 850-861, doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy02>