

植物におけるクローン繁殖の制御機構とその進化

Molecular mechanism and its evolution of vegetative propagation in plants

代表研究者 神戸大学

石崎 公庸

Kobe University

Kimitsune ISHIZAKI

Many plants have an ability to reproduce asexually via vegetative propagation, in which clonal progenies are generated directly from vegetative organs. However, little is known about the molecular mechanisms. The liverwort *Marchantia polymorpha* propagates asexually via gemmae generated in gemma cup formed on the dorsal side of gametophyte thallus. To investigate genes involved in the process of gemma and gemma cup development, we performed RNA-seq analysis comparing gemma-cups containing gemmae and thallus without any gemma cup. Through the comprehensive transcriptome analysis, we identified the gene encoding an R2R3-MYB transcription factor, designated as GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB 1 (GCAM1), which was significantly up-regulated in the developing gemma cup. Targeted disruption of GCAM1 conferred a complete loss of gemma and gemma cup formation. Overexpression of GCAM1 resulted in suppression of tissue differentiation in thallus, suggesting the function of GCAM1 in the maintenance of stem cell like property in the basal epidermis of gemma-cup. Phylogenetic analysis showed the orthologous relationship of GCAM1 to factors involved in axillary meristem formation of angiosperms. Our results demonstrated the crucial role of GCAM1 in the vegetative reproduction in the liverwort, and suggested a common regulatory mechanism of secondary meristem formation shared between gametophyte of liverworts and sporophyte in angiosperms.

研究目的

動物では初期発生の過程で分化能力が強固に限定され分化全能性は失われるのに対し、植物では発生が進んでも体細胞の分化全能性が維持される。多くの植物では、体細胞の分化全能性に基づき、受精を介さず根・茎・葉といった栄養器官の体細胞から独立したクローン個体を形成して繁殖することができる。例えば、塊茎から芽が形成されるジャガイモや、葉の付け根に芽（ムカゴ）が形成されるヤマイモの例が挙げられる。また竹林すべて根で繋がった1クローンである竹もその一例である。この繁殖様式は栄養繁殖と呼ばれ、固着性の生活様式をもつ植物にとって、安定した環境下で迅速に繁殖する際に有利であり、また農業や園芸の分野でも重要な繁殖様式である。しかしながら、これまで分子遺伝学が利用可能な栄養繁殖のモデル植物がなく、その分子メカニズムについてはほとんど知見がない。

ゼニゴケは、陸上植物進化の基部に位置し半数体

優占の生活史をもつユニークなモデル植物であり、有性生殖に加えて、栄養繁殖の仕組みをもつ。ゼニゴケの栄養繁殖では、その本体である葉状体上に杯状体という器官が形成され、その中に100個以上ものクローン個体が形成される。ゼニゴケにおける杯状体と無性芽の形成メカニズムについては、100年以上前に詳細な形態学的観察がある（Barns and Land 1908, *Botanical Gazette* 6: 401-6）。杯状体はゼニゴケ葉状体の頂端細胞近くからその発生が開始される。まず、①葉状体の背（上）側の表皮細胞の一部が、杯状体底部細胞となり、垂層分裂を繰り返しながら杯状体底部領域が拡大する。次に、②杯状体底部細胞から、無性芽始原細胞が分化し、不等分裂の後、頂端側の細胞が分裂を繰り返して、円盤状の無性芽が形成される。③また、杯状体の外壁となる部分は杯状体底部表皮細胞の外側の組織が、上部方向へ成長することで盛り上がりカップ上の形態となると考えられる。①と②、そして③のプロセスは同時に進

行する。形成された無性芽は、杯状体の中に存在する限り休眠しているが、雨粒などの物理的刺激により杯状体の外に散布され、吸水すると成長を開始する。無性芽による栄養繁殖は、有性生殖に水を必要とし多大なコストを払うゼニゴケにとって、生育範囲を迅速かつ効率的に拡大するために重要な繁殖様式である。

近年、進化的に重要な位置を占めるゼニゴケに注目が集まっている。2008年には、米国エネルギー省 Joint Genome Institute によって、全ゲノム解読プロジェクトがスタートした。さらに、申請者らが中心となって簡便かつ効率的なアグロバクテリウムを介した形質転換系が開発され、相同組換えに基づくジーンターゲット法、CRISPR/Cas9 系による効率的なゲノム編集が可能となり、分子遺伝学の基盤が整った (Ishizaki et al. 2016, Plant Cell Physiol. 57: 262-70)。本研究では、ゼニゴケをモデルとして、植物に共通するクローン繁殖器官の発生制御の分子メカニズムを解明することを目的としている。

研究経過

ゼニゴケにおいて、クローン繁殖器官の発生に重要な遺伝子を探索するため、次世代 DNA シーケンサーを用いて無性芽を含む杯状体組織の網羅的トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行った。その結果、杯状体組織で特異的に発現が上昇する遺伝子を 500 個以上見出した。その中で、R2R3-MYB 型転写因子をコードする遺伝子の 1 つについて、qRT-PCR により、その発現が杯状体組織で特異的に上昇していることが支持された。そこでその R2R3-MYB 遺伝子を *GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB 1* (*GCAMI*) と名付け、さらなる機能解析を行うことにした。

GCAMI の発現パターンを詳細に解析するため、*GCAMI* の ATG 上流約 5kb の DNA 断片を GUS レポーター遺伝子に連結したコンストラクトを作成し、野生株ゼニゴケに導入した。得られた *GCAMI*pro::GUS 株では、発生中の杯状体底部と無性芽で顕著な GUS 活性が確認されたことから、*GCAMI* は、発生中の杯状体底部および無性芽で重要な機能をもつことが示唆された。現在、*GCAMI* の組織レベルの RNA の蓄積状況を直接検出するためゼニゴケ葉状体で *in situ* RNA ハイブリダイゼーション法を立ち上げており、系が確立し次第、プロモ

ーターレポーターアッセイで得られた結果の検証を行う予定である。

次に、*GCAMI* の機能を解析するため、相同組み替えによるジーンターゲット法により、*GCAMI* の遺伝子構造が破壊された *GCAMI* ノックアウト株の作出を行った。ゲノミック PCR によるスクリーニングの結果、2 株の独立した *GCAMI* ノックアウト株が単離された。*GCAMI* ノックアウト株の表現型を解析したところ、2 株とも、杯状体 (そしてもちろん無性芽も) を全く形成しない、杯状体形成を完全に欠損した表現型を示した。さらに我々は、CRISPR/Cas9 系によるゲノム編集により、*GCAMI* のタンパク質コード領域に 1~数塩基の欠失が生じ、正常な *GCAMI* タンパク質が形成されないと考えられる *GCAMI* ゲノム編集株を複数株単離した。単離した *GCAMI* ゲノム編集株はいずれも *GCAMI* ノックアウト株と同様に杯状体形成不全の表現型を示した。得られた *GCAMI* 機能欠失変異体は、いずれも気室や仮根、生殖器などの形成は野生株と比較して顕著な異常は確認されず、葉状体の分枝にも異常は見られなかった。以上より、*GCAMI* がコードするタンパク質は、ゼニゴケ杯状体の形成に必須の役割を持つことが明らかとなった。

GCAMI の機能を更に解析するため、*GCAMI* の過剰発現株を作出した。当初、*GCAMI* を過剰発現すると、杯状体の形成数が増加するような表現型を期待した。実際に *GCAMI* を過剰発現した形質転換体は、成長が大幅に抑制され、未分化な細胞塊様の組織を形成した。さらに、*GCAMI* の過剰発現の効果を検証するため、動物のステロイドホルモン受容体ドメイン (GR) を *GCAMI* の C 末端に融合し、デキサメタゾン (DEX) 処理依存的に *GCAMI* の機能を誘導できる株を作出した。作出した *GCAMI*-GR 株は、DEX 処理依存的に未分化な細胞塊様の組織が葉状体の先端に形成された。次に 2 週間の DEX 処理を行って、未分化な細胞塊を大きく成長させた後、DEX を洗い流したところ、細胞塊の様々なところから小さな葉状体組織が形成された。以上より *GCAMI* は、組織分化を抑制し未分化な細胞の増殖を促進する機能をもつことが示唆された。そのような未分化な細胞集団は、葉状体先端の頂端細胞のような、あらゆる組織・器官の形成中心となる領域を形成するポテンシャルを有するという意味で、杯状体底部表皮細胞と似た細胞集団だと考えられる。

現在、GCAM1 下流で制御される遺伝子を解析するため、GCAM1-GR 株を用いて DEX 処理時と、DEX を洗い流した後のサンプルから RNA を抽出し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行っている。

杯状体形成に必須の機能をもつことが明らかとなった GCAM1 はどのようなタンパク質をコードする遺伝子なのか？GCAM1 のアミノ酸配列をクエリーに陸上植物と、また陸上植物に近縁の車軸藻類のデータベースから、相同性を示すタンパク質を抽出し、分枝系統解析を行った。その結果、GCAM1 がコードするタンパク質は、陸上植物で多様に機能分化した R2R3-MYB 型転写因子のサブファミリー14 の基部に位置することが明らかとなった。興味深いことに R2R3-MYB 型転写因子サブファミリー14 に属する被子植物の遺伝子は、トマト Blind やシロイヌナズナ REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS (RAXs) など、被子植物の腋芽（茎頂分裂組織と葉の境界領域に形成される芽、側枝をつくる芽となる）形成に重要な機能をもつことが報告されている (Schmitz et al. 2003, PNAS 99: 1064-69; Müller et al. 2006, Plant Cell 18: 586-597)。

GCAM1 とシロイヌナズナ RAX 遺伝子のオーソログ関係を検証するため、GCAM1 をシロイヌナズナの *rax1 rax2 rax3* 変異体に導入し機能を相補するか検証した。しかしながら、GCAM1 は *rax* 変異体の腋芽形成の表現型を相補することは無かった。GCAM1 と RAXs は、もともと共通の祖先遺伝子から派生した可能性が高いが、それらの N 末端領域の DNA 結合ドメインに高い相同性は見られるものの、C 末端領域の相同性は低く、長い進化の過程で変わってしまった可能性が考えられる。現在は、RAX 遺伝子や RAX3 と GCAM1 のキメラ遺伝子をゼニゴケに導入し、同様の機能をもつか検証する実験を準備している。シロイヌナズナ RAX の DNA 結合ドメインがゼニゴケで GCAM1 と同様に機能すれば、GCAM1 と被子植物の腋芽形成制御因子 Blind や RAX との機能の保存性を補強するデータとなる。

また GCAM1 の他に、杯状体形成に必須の機能をもつ、R2R3-MYB 型転写因子の単離に成功した。アグロバクテリウムを介した形質転換では、T-DNA 断片がゲノム中にランダムに挿入され、挿入場所に遺伝子が存在した場合は、その構造が破壊される。この T-DNA タギング法による変異体作出法からスク

リーニングされた *am9* 変異体は、杯状体形成頻度が野生株に著しく低く、さらに低い頻度で杯状体の形成される葉状体背側中肋部に不完全な杯状体を形成する表現型を示した。サザンブロット解析の結果 T-DNA の挿入数は 1 コピーであり、また TAIL-PCR の増幅断片の解析結果から T-DNA の挿入部位近傍に R2R3-MYB 型転写因子のタンパク質コード領域が存在することが示唆された。さらに杯状体の RNA-seq 解析から、この R2R3-MYB 遺伝子の発現が杯状体で顕著に上昇することが示唆されたので、qRT-PCR 解析によって確認した。そこでこの R2R3-MYB 遺伝子が、*am9* 変異体の原因遺伝子と考え、GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB 2 (GCAM2) と名付け、更なる実験を進めた。まず、プロモーターレポーター解析の結果により、GCAM2 の発現が、葉状体頂端部に加えて発生中の杯状体と無性芽で顕著であることが示唆された。次に、相同組替えによるジーンターゲット法により GCAM2 の遺伝子構造を破壊した GCAM2 ノックアウト変異体を作出した。独立した 4 系統の変異体が単離され、いずれも *am9* と同様、杯状体形成不全の表現型を示した。GCAM2 ノックアウト変異体の葉状体は、杯状体形成が不全という以外には、その仮根や気室などの器官形成に明確な表現型は見つからなかった。しかしながら生殖器を誘導したところ、野生株では生殖器が形成される条件でも GCAM2 ノックアウト変異体では生殖器の形成が確認できなかった。以上のことから、GCAM2 は、GCAM1 と同様に、杯状体と無性芽形成に必須の機能をもつ制御因子であることが明らかとなった。さらに GCAM2 は GCAM1 とは違い、生殖器の形成にも何らかの役割をもつことが示唆された。

GCAM2 の分枝系統解析を行ったところ、GCAM2 は GCAM1 とは別の R2R3-MYB サブファミリー21 に属することが示唆された。R2R3-MYB サブファミリー21 には、腋芽や複雑形成に関わるトマト *Trifoliolate* やシロイヌナズナ *LATERAL ORGAN FUSION1/2 (LOF1/2)* が属する (Lee et al. 2009, Development 136: 2423-32; Ahmad Naz et al. 2013, PNAS 110: 2401-6)。GCAM2 とオーソログの関係にある *Trifoliolate* や *LOF* と、GCAM1 のオーソログである RAXs や *Blind* とは、遺伝学的な関係は示唆されているものの、どのような相互作用が存在するのかについては、明らかになっていない。今後、GCAM1

と *GCAM2* の遺伝学的関係や相互作用について、詳細に解析する予定である。

また順遺伝学解析から *GCAM1*, *GCAM2* とは別のメカニズムで栄養繁殖プロセスに関わる制御因子の同定に成功した。これまでに杯状体は正常に形成されるが、その中に無性芽を形成しない変異体が 2 株単離されており、それぞれ *karappo-1(kar-1)* と *karappo-2(kar-2)* と名付けていた。*kar-1* および *kar-2* の表現型をプラスチック包埋ブロックの切片像解析などにより詳細に解析したところ、*kar-1*, *kar-2* 変異体はいずれも、発生初期の無性芽が全く確認できず、無性芽発生の初期プロセスである不等分裂などに異常があることが示唆された。*kar-1*, *kar-2* とともに外来遺伝子がランダム挿入された集団から選抜された変異体であるが、遺伝学的解析を進めたものの、表現型と連鎖する外来 DNA は同定できなかつた。変異原因遺伝子の同定は困難と考えられたが、ゼニゴケのゲノム解析がほぼ完了してきたので、変異体ゲノムのリシーケンス解析を行うことにした。その結果、独立して単離された *kar-1*, *kar-2* であるが 1 つの共通した遺伝子に変異が確認された。その遺伝子の野生型 DNA 断片を、*kar-1* と *kar-2* に導入したところ、杯状体の中の無性芽形成が回復したことから、この遺伝子を *KARAPPO (KAR)* と名付けた。相同性検索の結果、*KAR* 遺伝子は、植物の低分子量 G タンパク質の一種である *Rop* の活性化を担うグアニルヌクレオチド交換因子(GEF)をコードすることが示唆された。*KAR* により活性化されると考えられる *Rop* 遺伝子をゼニゴケで探索したところ、1 つの遺伝子 (*MpRop*) を見出した。そこで、*KAR* と *MpRop* タンパク質を大腸菌で発現・精製し、*KAR* による *MpRop* の GDP 結合型から GTP 結合型への変換活性を生化学的に解析し、*KAR* が *MpRop* の GEF として機能しうることを確認した。さらに酵母 2 ハイブリッド実験によって、*KAR* と *MpRop* の相互作用を検証した。その結果、*KAR* がホモ二量体を形成すること、*KAR* と *MpRop* が相互作用することが明らかとなった。

以上の結果より、低分子量 G タンパク質の活性化を担う *KAR* が、杯状体内における無性芽発生の初期プロセスに必須の役割をもつことが明らかとなった。すなわち低分子量 G タンパク質の活性化が、無性芽始原細胞の極性形成や不等分裂に重要な役割をもっていることが考えられる。現在、杯状体底部で、

恒常活性型やドミナントネガティブ型など様々な *RopGTPase* を発現させ、細胞骨格や細胞分裂の進行をライブイメージングすることで、低分子量 G タンパク質による無性芽発生の初期プロセス制御機構を解明しようと実験を準備している。

考察

本研究では、ゼニゴケの栄養繁殖について、分子遺伝学的に解析をすすめ、杯状体形成に必須の転写因子 *GCAM1*, *GCAM2* を同定することに成功した。さらに杯状体底部からの無性芽発生開始に重要な機能をもつ *KAR* を同定し、低分子量 G タンパク質シグナリングが、無性芽発生開始の鍵となっていることが示唆された。本研究は、植物の自然発生的な栄養繁殖プロセスの制御因子を同定に成功した世界初の成果である。

さらに杯状体形成の制御因子 *GCAM1*, *GCAM2* がいずれも被子植物の腋芽形成の制御因子のオーソログであったことは極めて興味深い。無性芽発生の場合となる杯状体底部細胞は、葉状体の頂端細胞近傍で形成が開始される未分化な幹細胞群である。一方で、腋芽の元となる腋芽メリステムは、茎頂分裂組織と葉の境界領域で形成される幹細胞群である。両者とも新たな芽を生み出す幹細胞群が増えるメカニズムと言う点で機能的に共通と考えられる。本研究の結果は、コケ植物と被子植物という 4 億年以上も前に分岐した系統間で、幹細胞の増殖に関する共通の遺伝子制御ネットワークが保存されていることを示唆するものである。今後、*GCAM1*, *GCAM2* のお互いの制御関係、および上流、下流の制御メカニズムを詳細に解析することにより、植物における幹細胞の増殖制御の基本メカニズムを明らかにできると考えられる。

一方、無性芽発生開始の制御因子 *KAR* は、細胞骨格の制御を介して植物細胞の形や極性を制御すると考えられている低分子量 G タンパク質 *Rop* の活性化因子であった。被子植物における *Rop* シグナリングは、根毛の伸長制御や、表皮細胞やトライコームなどの細胞形態形成に関与することが知られているが、栄養繁殖プロセスへの関与は報告されていない。今後、*KAR* による *Rop* の活性化メカニズムや、*Rop* による無性芽始原細胞の不等分裂などについて、詳細に解析することにより、被子植物では、冗長性のために解析が進んでいない *Rop* による発生制御の基

本メカニズムが明らかになる可能性がある。

今後、本研究により同定された栄養繁殖の制御因子について更なる解析をすすめ、論文にまとめるとともに、植物におけるクローン繁殖制御の基本メカニズムから、陸上植物における発生制御の原型と進化について新たな知見や概念を発見し、発信していきたい。

研究の発表

口頭発表

1. Ishizaki, K. Molecular genetics of gemma and gemma-cup development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. EMBO workshop “New model systems for early land plant evolution” Vienna Austria, 2016年6月
2. 石崎公庸、ゼニゴケ配偶体の幹細胞増殖を制御するメカニズム、日本植物学会第80回大会、沖縄、2016年9月
3. 宇野真里奈、塚本成幸、深城英弘、三村徹郎、石崎公庸、ゼニゴケ無性芽形成における LATERAL SUPPRESSOR 相同遺伝子の機能、日本植物学会第80回大会、沖縄、2016年9月
4. 塚本成幸、大和勝幸、山口勝司、重信秀治、深城英弘、三村徹郎、河内孝之、石崎公庸、ゼニゴケの栄養繁殖器官におけるトランスクリプトーム解析、日本植物学会第80回大会、沖縄、2016年9月
5. 高見英幸、塚本成幸、増田晃秀、深城英弘、三村徹郎、河内孝之、石崎公庸、ゼニゴケ杯状体

形成に重要な GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB 2 の機能、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月

6. 樋渡琢真、山口勝司、重信秀治、澤進一郎、桐田啓如、深城英弘、三村徹郎、河内孝之、石崎公庸、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月
7. 吉川未樺子、塚本成幸、深城英弘、三村徹郎、竹澤大輔、坂田洋一、石崎公庸、ゼニゴケ無性芽の休眠に関連する bHLH 遺伝子の機能解析、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017年3月-

誌上発表

1. Ishizaki, K. (2017) Evolution of land plants: insights from molecular studies on basal lineages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81: 73-80.
2. Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T. and Kohchi, T. (2016) Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research. *Plant Cell Physiol.* 57: 262-270.
3. Proust, H., Honkanen, S., Jones, V.A., Morieri, G., Prescott, H., Kelly, S., Ishizaki, K., Kohchi, T. and Dolan L. (2016) RSL class I genes controlled the development of epidermal structures in the common ancestor of land plants. *Curr. Biol.* 26: 93-99.
4. 石崎公庸、榊原恵子 (2016) 巻頭言：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～、*BSJ-review* 7: 37-44.