

「新興モデル植物ゼニゴケを用いた植物における栄養繁殖メカニズムの解析」

神戸大学理学研究科

石崎 公庸

1 研究の背景と目的

植物には交配／受精による有性生殖の他に、種子や胚を経由せず、栄養器官から次世代の個体を繁殖する栄養繁殖という増殖様式を有するものが多い。栄養繁殖の際には、根・茎・葉などの栄養器官から繁殖に特殊化した器官が分化する。例えば、茎に栄養分を溜め肥大化した組織であるジャガイモや、葉の付け根にできる芽が栄養分を貯めて球状となったヤマイモのムカゴなどが挙げられる。栄養繁殖は交配を経由しないので、遺伝的に同一（クローン）である個体が迅速に増殖できることから、移動する能力を持たない植物にとって、安定した環境下において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増殖様式である。近年、葉の周縁部に不定芽と呼ばれる栄養生殖器官を形成し栄養生殖により繁殖することで知られるカラシコエの仲間において、被子植物の胚発生や器官形成に関与する *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* 遺伝子と *LEAFY COTYLEDON (LEC1)* 遺伝子が、葉からの不定芽形成にも関わることが報告された (Graces HM et al. 2007, PNAS 104: 15578-83)。しかしこの報告以外に、植物における栄養繁殖の分子メカニズムについては、ほとんど知見がない。

苔類ゼニゴケは、陸上植物進化の基部に位置し、雄雌異株で半数体優勢の生活環を持つユニークなモデル植物である。ゼニゴケは、交配による有性生殖の他に、栄養成長の本体である葉状体上に杯状体という器官を形成し、その中に数十個もの無性芽という栄養繁殖器官を形成することで、栄養繁殖する (図1)。ゼニゴケの杯状体と無性芽の形態形成については、今から100年以上も前に組織学的記述がなされている (Barnes CR and Land WJG, 1908, Bot. Gaz. 46: 401-9) が、分子メカニズムに関しては全く解明されていない。近年、申請者を中心に苔類ゼニゴケの高効率の形質転換系や、相同組換えによるジーンターゲットングなど種々の分子遺伝学の研究基盤技術を開発した (Ishizaki et al., 2008, Plant Cell Physiol. 49: 1084-91; Ishizaki et al., 2013, Scientific Rep. 3: 1532)。さらに、ゼニゴケは陸上植物進化の重要な位置を占めること

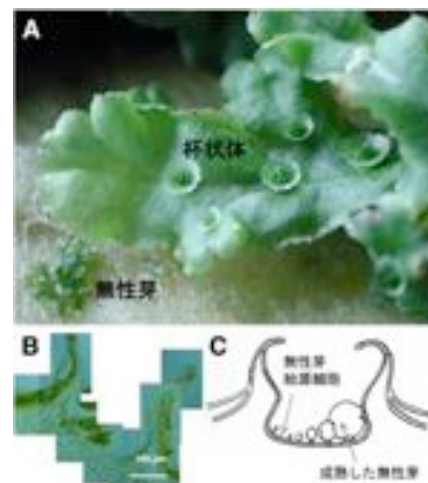


図1：ゼニゴケの栄養繁殖
(A) ゼニゴケ葉状体の中肋上に杯状体を形成し、中に無性芽が形成される。形成された無性芽が雨水などによりこぼれ落ちることで、群落を広げる。(B) 杯状体の切片、(C) 無性芽は杯状体基部に位置する1個の表皮細胞から形成される

ことから、米国エネルギー省 Joint Genome Institute により、全ゲノム解析プロジェクトが進行しており、申請者も主要メンバーとしてこの計画に参加している。

これまでに解析してきたゼニゴケの全ゲノム情報をベースに、杯状体組織と葉状体のトランスクリプトーム比較解析を行った結果、杯状体で特異的に発現が上昇する制御因子候補 *MpMYB9* (解析を進める中で *GEMMA-CUP ASSOCIATED MYB1: GCAM1* と改名。以後 *GCAM1* とした) を見出した。さらに *GCAM1* の異所過剰発現を行ったところ、杯状体以外の部位から無性芽様の細胞塊が多数形成されることを見出した。このことは、*GCAM1* が、無性芽形成のマスターレギュレーターである可能性を示唆している。興味深いことに R2R3-MYB 型転写因子 *GCAM1* は、系統解析から被子植物において茎

や葉の付け根に形成される芽(腋芽)の発生を制御する *REGULATORS OF AXILLARY MERISTEMS (RAX)* 遺伝子のオーソログであることが示唆された。

これらの事実は、植物の栄養繁殖のプロセスが、本質的には腋芽の形成プロセスと共通のメカニズムで制御されていることを示唆している。分化した栄養器官から新たな芽を作り出すこれらの制御機構は、植物細胞の分化状態を制御するような強力な仕組みであると考えられ、多くの子孫(芽)を作り出すというメリットの反面、栄養器官の正常な形づくりと機能にとってはマイナスになりうる。そのため厳密な制御機構が存在し、進化的にもその中心的な仕組みが保存されていると考えられる。進化的に保存された *R2R3-MYB* を軸に、その上流の発現制御機構と下流の遺伝子ネットワークを解明することにより、植物の形づくりの基本的な制御メカニズムの理解が深まる。さらに、人為的操作により、よりフレキシブルな農業生産性向上のための基盤技術の確立が可能となる可能性がある。

本研究では、ゼニゴケの分子遺伝学研究基盤をフルに活用し、栄養繁殖プロセスの鍵制御因子候補 *GCAM1* に着目した機能解析を行う。栄養繁殖プロセスで特異的に発現が制御される *GCAM1* 自身の発現制御メカニズムや、*GCAM1* の下流で制御される遺伝子ネットワークについても解析を行った。既に見出している栄養繁殖プロセスの制御因子候補 *GCAM1* に着目し、制御遺伝子の冗長性が低いゼニゴケを利用して解析することにより、植物に共通する栄養繁殖制御の分子機構のみならず、腋芽の発生制御の成立と進化を考える上で重要な知見を得られると期待される。

2 研究方法・研究内容

・栄養繁殖の制御因子候補、*GCAM1* の発現解析

まず、*GCAM1* の発現組織および細胞を詳細に解析するため、*GCAM1* のプロモーターに GUS レポーター遺伝子をゼニゴケに導入した形質転換体を作成し、杯状体・無性芽発生プロセスにおける *GCAM1* のプロモーター活性を解析する。

また同時にゲノム断片に蛍光タンパク質を融合したコンストラクトを作出し、ゼニゴケに導入することで、杯状体・無性芽発生プロセスにおける *GCAM1* の細胞レベルでの発現と細胞内局在についても解析する。

・栄養繁殖 *GCAM1* の機能解析

近年開発した相同組換えに基づくジーンターゲティング法 (Ishizaki et al. 2013) を用いて *GCAM1* のノックアウト変異体を作成する。

・*GCAM1* の栄養繁殖プロセス特異的な発現を制御する分子機構の解析

杯状体特異的な発現パターンを示す *GCAM1* 遺伝子のプロモーター解析を行う。プロモーターデリションシリーズを作製し、杯状体特異的な発現パターンに必要な *cis* エlementを同定すると共に、プロモーター領域に結合しうる転写因子を酵母 one-hybrid 法等により探索する。

・*MpMYB9* の下流で制御される遺伝子発現ネットワークの解析

MpMYB9 下流で制御される無性芽形成関連遺伝子を探索するため、野生株と変異体でのトランスクリプトーム比較解析を行う。蛍光蛋白質融合型遺伝子による相補実験が成功していれば、蛍光蛋白質の抗体を用いた ChIP 解析を行い、直下で制御される遺伝子を絞り込む。

以上の結果を統合的に解析し、被子植物におけるホモログの機能と併せて、植物における *GCAM1* を介した栄養繁殖の制御機構について、機能モデルを考察する。

3 研究成果

・栄養繁殖の制御因子候補、GCAM1の発現解析

GCAM1のプロモーターにGUSレポーター遺伝子をゼニゴケに導入した形質転換体を作成し、ゼニゴケ葉状体の様々な発生段階におけるGCAM1プロモーターの活性を解析した。その結果、杯状体の形成が始まる葉状体の頂端部、発生初期の杯状体底部、および発生中の無性芽において、顕著なGCAM1プロモーター活性が確認された。また、杯状体を形成していない葉状体、発生中の無性芽を含む杯状体、杯状体を含まない葉状体の中肋組織について、定量的RT-PCRによるGCAM1の発現解析を行ったところ、発生中の無性芽を含む杯状体では、杯状体を形成していない葉状体、杯状体を含まない葉状体の中肋組織と比べ、GCAM1転写産物の蓄積が顕著に増加していることが明らかとなった。これらの結果より、GCAM1が、杯状体形成および無性芽発生の初期で発現し、機能することが示唆された。

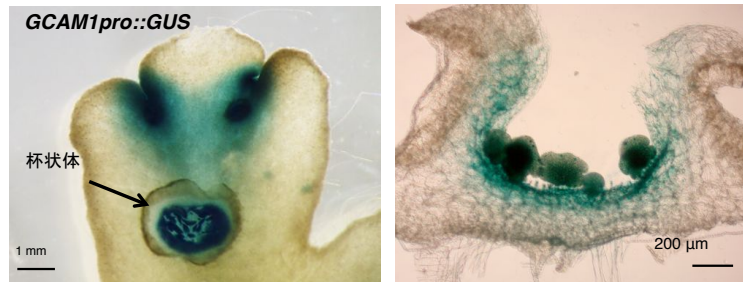


図2：GCAM1プロモーター活性の解析 GCAM1プロモーター活性が高まっている部位が青色に染色された

・栄養繁殖 GCAM1 の機能解析

GCAM1の機能を解析するため、相同組換えによるジーンターゲット法(Ishizaki *et al.*, 2013)を用いて、GCAM1の遺伝子構造が破壊されたノックアウト変異体の作出を試みた(図3a)。522株の候補株をジェノタイプングしたところ、2株の独立したGCAM1ノックアウト変異体を得ることができた(図3b)。得られた2株の*gcam1*^{KO}株の表現型を観察したところ、杯状体が完全に欠損していることが明らかとなった(図3c)。さらにこの表現型がGCAM1の機能喪失によるものかを確認するためにノックアウト変異体の1つ*gcam1*^{KO}#229株にGCAM1のゲノム断片を導入したところ、杯状体の形成が回復した(図3c)。これらの結果からGCAM1は杯状体形成に必須であることが明らかとなった。

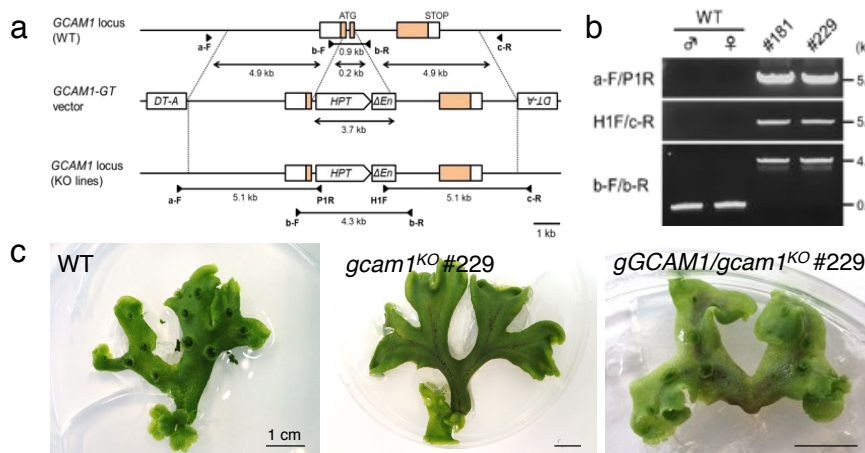


図3：GCAM1 遺伝子ノックアウト株の作出および表現型
 (a) GCAM1 遺伝子ノックアウト用コンストラクトの模式図
 (b) ゲノミック PCR による *gcam1*^{KO} 株の遺伝子型の確認
 (c) *gcam1*^{KO} 株および相補株の表現型

GCAM1 の機能をさらに明らかにするため、GCAM1 のコード領域を、ゼニゴケの植物体全体で恒常的に活性がある MpEF1a プロモーター制御下で発現させるコンストラクトを作製し、ゼニゴケの野生株に導入した。その結果、*MpEFpro::GCAM1* 株は未分化な組織が植物体全体に形成される表現型を示した (図4)。さらに培養開始後 2 ヶ月後の植物体では、分裂組織をもつ小型の葉状体が多数形成されている様子が観察された。これらの結果は、GCAM1 には、新たな分裂組織を形成する機能をもつことを示唆している。

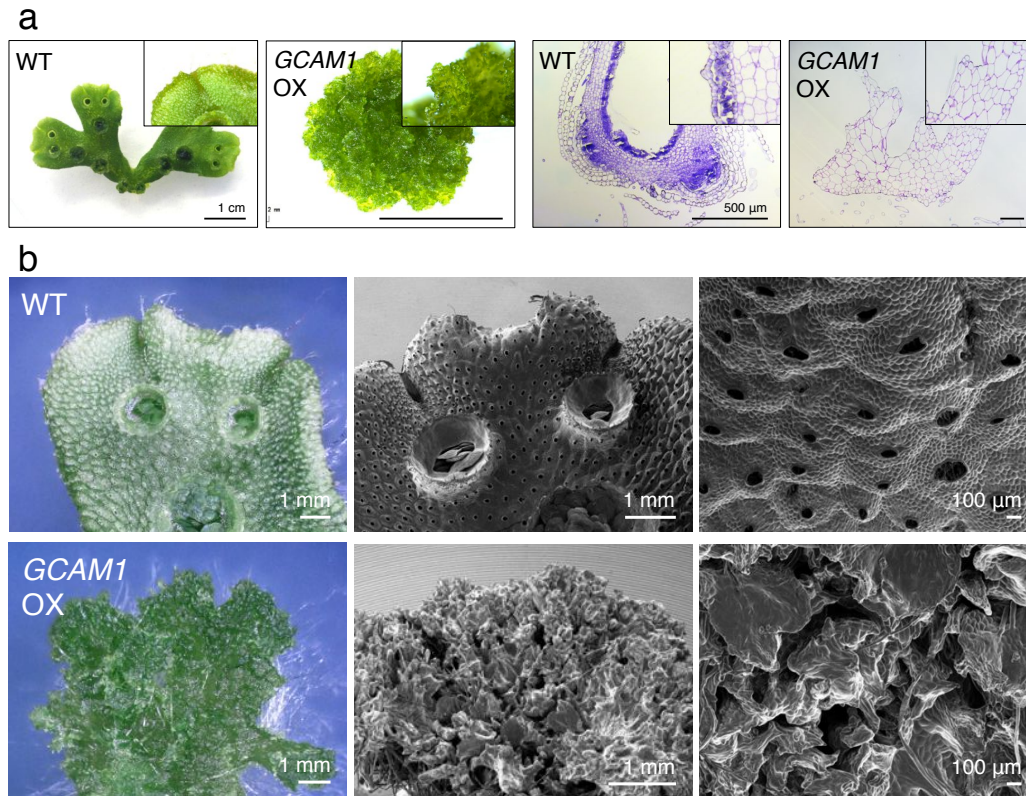


図4: GCAM1 恒常発現株の表現型

(d) 培養開始後3週間目の野生株および *MpEFpro::GCAM1* 株 (左) とその切片像 (右)

(e) 培養開始後3週間目の野生株および *MpEFpro::GCAM1* 株の葉状体頂端部分の走査型電子顕微鏡像

現在、GCAM1 下流で制御される遺伝子ネットワークおよび GCAM1 そのものの発現制御について、RNA-seq 解析やプロモーターに結合する cis 領域の解析を進めている。

4 生活や産業への貢献および波及効果

栄養繁殖は、交配が困難な環境下でも、遺伝的に同一のクローン個体を効率的に増やすメカニズムであり、有用作物の維持および生産技術の開発につながる可能性を秘めている。本研究で同定した栄養生殖制御の鍵因子GCAM1は、被子植物の腋芽形成を制御する転写因子とオーソログの関係にあり、植物におけるクローン繁殖の制御メカニズムの普遍性と進化の道筋を考察する上で、重要な知見を提供する可能性をもつ。また本研究は、関西発の新興モデル植物ゼニゴケを用いた分子遺伝学の可能性を、世界に先駆けて具体的に明示するものであり、兵庫県発のユニークな基礎研究の成果として世界に発信していきたい。