

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 ( 共通 )

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 2 9 年 5 月 2 2 日現在

機関番号： 1 4 6 0 3

研究種目： 基盤研究(B) ( 一般 )

研究期間： 2012 ~ 2016

課題番号： 2 4 3 7 0 0 2 2

研究課題名 ( 和文 ) シロイヌナズナ初期胚発生におけるパターン形成の制御機構

研究課題名 ( 英文 ) Mechanisms regulating early embryogenesis in Arabidopsis thaliana

研究代表者

中島 敬二 ( Nakajima, Keiji )

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号： 8 0 2 7 3 8 5 3

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 14,100,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : 高等植物の初期胚発生を制御するメカニズムには不明な点が多い。我々は陸上植物に保存されたRKD転写因子ファミリーに属するRKD4が、シロイヌナズナの初期胚発生を制御していることを明らかにしている。本研究課題では、RKD4が既知の胚発生制御因子を含む多数の遺伝子のゲノム領域に結合し、それらの発現を直接制御していることを明らかにした。また、ゼニコケとシロイヌナズナを用いた遺伝学的解析から、RKD転写因子が、陸上植物に保存された生殖細胞形成の制御因子であることを明らかにした。

研究成果の概要 ( 英文 ) : Mechanisms regulating early phases of plant embryogenesis are poorly understood. We have previously identified a member of the plant-specific RKD transcription factors, RKD4, as a regulator of early embryogenesis in Arabidopsis thaliana. The present study revealed that RKD4 directly binds to the genomic DNAs of many genes including known regulators of embryogenesis, and thereby regulates their expression. In addition, genetic studies using liverworts and Arabidopsis indicated that RKD factors are evolutionarily conserved regulators of germ cell differentiation in land plants.

研究分野： 植物発生生物学

キーワード： 胚発生 パターン形成 植物 シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

有性生殖により繁殖する多細胞生物の個体は、受精卵という単一細胞から発生する。なんらパターンをもたない受精卵がどのようにして複雑な個体を形成できるのか、この制御機構を解明することは、発生生物学における重要課題の1つである。

高等植物の胚発生は、おもにモデル植物のシロイヌナズナを用いて研究されている。シロイヌナズナの胚発生は、大まかに初期、中期、後期の3段階に分けることができる。初期は受精卵が不等分裂を繰り返しながら球状胚を作る過程であり、最も未解明の段階である。中期には、根やふた葉や茎頂分裂組織が形づくられ、ハート形の胚を生じる。後期は、貯蔵タンパク質や脂質の合成が活性化され、休眠に向けた乾燥が誘導される。

初期胚発生の最終段階で、球状胚の特定の区画にパターン形成遺伝子群が発現し始める。例えば茎頂メリステム(SAM)の予定領域ではWUSが発現し、根端メリステムの(RM)予定領域ではWOX5が発現する。また維管束や子葉の予定領域においては、それぞれSHRやAS1が発現する。これらの遺伝子は発芽後の植物体においても、各器官の維持に機能することから、球状胚の各区画において、既に各器官への運命づけが行われていることがわかる。

胚発生における器官原基の形成には、植物ホルモンであるオーキシンの極性分布が必要であることが知られている。しかし胚の中に様々な器官原基が配置されることや、WUSやWOX5の発現がオーキシンに応答しないことから考えても、オーキシンが器官原基形成の初発段階を決めているとは考えにくい。これまでの知見を総合すると、初期胚においてはオーキシンとは独立した、未知の遺伝子発現制御系が機能している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は、独自のアクティベーションタギング法により、RKD4転写因子が初期胚で特異的に発現し、そのパターン形成や遺伝子発現に重要な機能を担っていることを明らかにした。シロイヌナズナの胚発生において、RKD4の発現は受精卵から始まり、球状胚初期まで胚全体で維持される。*rkd4*変異体の胚はWOX5を正常に発現できず、異常なRMを形成するが、RKD4が初期胚のパターン形成やRMの形成を制御する機構は明確でない(図1)。

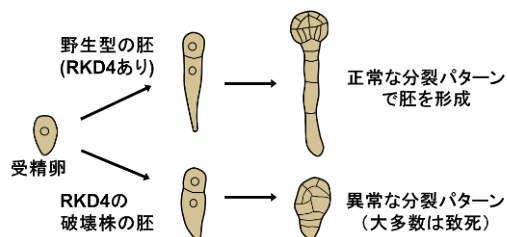


図1 RKD4は正常な初期胚発生に必要な

RKD4を本来発現しない発芽後の植物体で過剰発現させると、葉や根の細胞から未分化な細胞塊が生じ、その後、過剰発現を停止させると、この細胞塊から多数の胚が形成される(図2)。このことから、RKD4は分化した体細胞を、初期胚様の状態へとリプログラミングする機能を持つことが分かる。

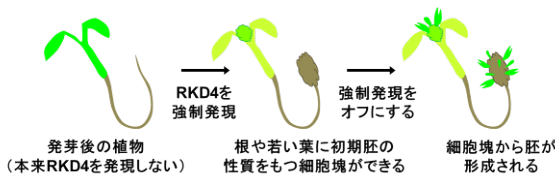


図2 RKD4の過剰発現は体細胞を初期化する

以上の観察結果は、RKD4が初期胚発生におけるパターン形成や、それに必要な細胞の未分化状態の調節に重要な機能を果たしていることを示唆しているが、その分子機構は不明である。そこで本研究では、RKD4により制御を受ける下流遺伝子を同定することで、この問題に取り組むことを第1の目的とした。RKD遺伝子ファミリーは比較的最近になって発見されたもので、植物ゲノムに普遍的に存在するにも関わらず、その機能に関してはほとんどわかっていない。シロイヌナズナのゲノムには、RKD1-RKD5の5つの遺伝子があるが、RKD4以外の4つの遺伝子については、生物学的機能は不明である。これら4つの遺伝子もRKD4と同様に初期胚において、特異的なパターンで発現していることが分かっている。またRKD1とRKD2は受精以前の卵細胞においても発現していることが報告されており、これらの遺伝子もRKD4と同様に初期胚のパターン形成、あるいはそれ以前の卵細胞の形成や機能発現に関与していることが示唆される。

また、RKD遺伝子に由来するcDNAは基部陸上植物のゼニゴケの造精器においても検出されている。このことは、RKD遺伝子が植物の進化過程を通じて生殖細胞の形成や機能発現において、保存された機能を担っていることを示唆している。そこでゼニゴケとシロイヌナズナを用いて、RKD遺伝子ファミリーの機能、特に陸上植物の進化において保存された機能を明らかにすることを、本研究の第2の目的とした。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達するために、大きく分けて以下の2つの研究を行った。それぞれについて、実験方法の概略を記す。

### (1) RKD4遺伝子の下流遺伝子の探索

トランスクリプトーム解析においては、RKD4をステロイドホルモンDEXで誘導的に過剰発現する形質転換植物を用い、DEX添加前、添加1,3,5日後の実生を回収し、それぞれ2回の反復サンプルからRNAを抽出した。これらのサンプルに対して、Agilent社製の

Arabidopsis oligo DNA マイクロアレイ 44k を用いて全遺伝子の発現解析を行った。

さらに RKD4 が直接結合するゲノム領域を同定するために、GFP, Myc, または HA でタグされた RKD4 を DEX 誘導的に過剰発現する植物を作成した。理化学研究所の金鐘明博士との共同研究により、Myc および HA でタグされた RKD4 を過剰発現する植物について、それらの実生を DEX 存在下で栽培し、処理 3 日目の植物から抗 Myc または抗 HA 交代により免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物を次世代シーケンサーにより解析した。

(2) *RKD* 遺伝子ファミリーの進化的に保存された機能の解明

ゼニゴケの *RKD* 遺伝子 (*MpRKD* 遺伝子) の解析は、京都大学の河内らとの共同研究によりおこなった。破壊株は、*MpRKD* のコード領域とイントロン約 0.9kb を相同組換えにより欠失させることで作成した。発現解析には野生型株を用いた RT-PCR 解析と *in situ* ハイブリダイゼーション、及び GUS や YFP を用いたレポーターラインの作成と観察により行った。変異体の表現型解析は、光学顕微鏡を用いた造卵器と造精子細胞の観察と、透過型電子顕微鏡を用いた卵細胞の内部構造の観察により行った。

シロイヌナズナの *RKD* 遺伝子の発現解析は、GFP を用いたレポーターラインを作成し、それらの胚や胚珠を共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより行った。*RKD2* の機能欠損変異体の解析では、5' 非翻訳領域に T-DNA が挿入されたラインを Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から取り寄せ、これを野生型株に 2 度戻し交雑したホモラインを用いて行った。雌性配偶体の分化状態の解析には、*MYB64* マーカー遺伝子のレポーター遺伝子を導入したものをを用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) *RKD4* 遺伝子の下流遺伝子の探索

*RKD4* の過剰発現を誘導した実生のトランスクリプトーム変化を、マイクロアレイを用いて解析した。誘導 5 日後には、全ゲノムの 4 分の 1 にあたる遺伝子の発現が大きく変化していた (図 3)。

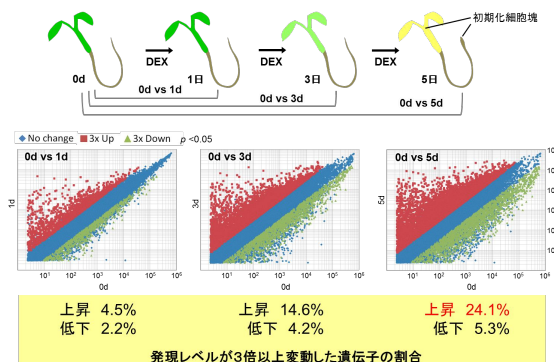


図 3 *RKD4* の過剰発現体のマイクロアレイ解析

*RKD4* は転写因子として機能すると推定されている。*RKD4* と GFP の融合タンパク質を誘導的に過剰発現させると、分化した体細胞が胚性の未分化細胞へと初期化され、GFP 蛍光は細胞核に局在していた。この植物に対して抗 GFP 抗体によるクロマチン免疫沈降をおこない、共沈降した DNA を次世代シーケンサー解析することで、*RKD4* が結合するゲノム領域の特定を試みたが、ウェスタン解析で *RKD4*-GFP の回収が確認できなかった。

そこで GFP の代わりに *RKD4* と HA または Myc エピトープとの融合タンパク質を過剰発現させ、抗 HA または抗 Myc 抗体による免疫沈降を行った結果、十分量の結合 DNA が回収された。免疫沈降したクロマチンに対して、次世代シーケンス解析を行い、*RKD4* が直接結合する遺伝子を 300 個同定した。結合部位別の内訳は、5' 上流域に結合する遺伝子が 103、内部に結合する遺伝子が 142、3' 下流域に結合する遺伝子が 55 であった。先に述べたトランスクリプトームデータと比較した結果、5' 上流域に結合する遺伝子の 33%、および遺伝子内部に結合する遺伝子の約 49% は、*RKD4* の過剰発現に応答して速やかに発現誘導されることが分かった (図 4)。これらの標的遺伝子には、DNA のメチル化に關与するものや、既知の胚発生制御因子が含まれており、*RKD4* がこれらの遺伝子を直接発現統御するマスター因子であることが明らかとなった。

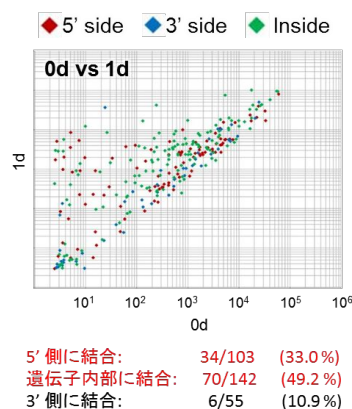


図 4 *RKD4* が直接結合する遺伝子のうち、転写レベルで初期応答する遺伝子の割合

##### (2) *RKD* 遺伝子ファミリーの進化的に保存された機能の解明

基部陸上植物のゼニゴケは、形質転換系と遺伝子破壊系が確立された新しいモデル植物である。また全ゲノムがほぼ解読され、非常に単純なゲノム構成をもつこと、つまり機能重複した遺伝子をほとんど持たないことが分かっている。データベース検索の結果、ゼニゴケの造精子において、*RKD* 相同遺伝子が発現していることが示唆された。またゼニゴケのゲノムには *RKD* 遺伝子が 1 つだけ存在することが明らかとなった。そこでこの *RKD* 遺伝子を、ゼニゴケの学名 (*Marchantia polymorpha*) の頭文字をとって *MpRKD* と名付けた。



ゼニゴケは雌雄異株の半数体植物であり、メスの造卵器に卵細胞が、オスの造精器に精子が作られる。MpRKD の発現パターンを詳細に調べたところ、オスでは精子のもとになる精原細胞で発現し、メスでは成熟過程の卵細胞で発現していることが明らかとなった。一方で受精後の接合子では発現していなかった。このことから MpRKD はシロイヌナズナの RKD1 や RKD2 と同様に、受精前に働いており、受精後に働く RKD4 とは異なっていることが示唆された。

次に相同組換えを用いて、MpRKD の破壊株を作成した。メスの破壊株では、卵細胞の前駆細胞までは問題なく作られるものの、その後の卵に特有な分化がおこらず、異常な細胞分裂と液胞化を経て崩壊していた（図 5）。また破壊株の卵は精子を誘引できなかった。

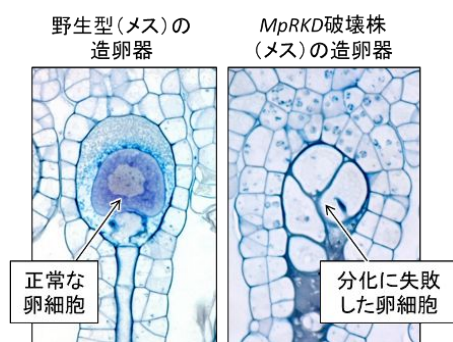


図 5 MpRKD を破壊した雌株では卵細胞が正常に成熟しない

またオスの破壊株では、造精器までは正常に作られるものの、その内部にある精原細胞が同調的に分裂せず、正常な精子形成が起らなかった（図 6）。一方で、雌雄ともに生殖細胞以外には顕著な異常は見られなかった。

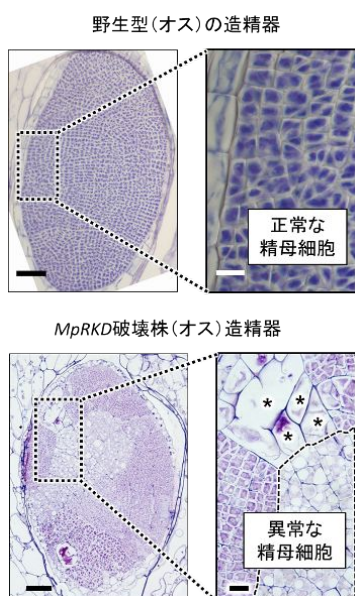


図 6 MpRKD を破壊した雄株では精子形成が正常に進行しない

シロイヌナズナにおいて、RKD4 以外の 4 つの RKD 遺伝子の発現解析を行ったところ、RKD1-RKD3 の 3 つの遺伝子は卵細胞で強く発現していることが明らかとなった（図 7）。また RKD2 の機能欠損変異体では、弱いながらも雌性配偶体の形成に異常が見られることが明らかとなった。

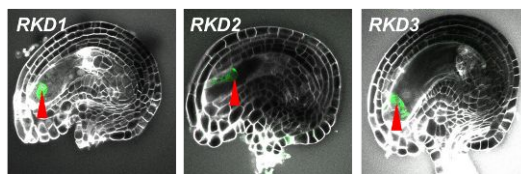


図 7 RKD1-RKD3 は卵で発現する

以上の結果から、RKD 遺伝子機能の進化的な起源は、生殖細胞の分化や初期化の制御であると結論づけた。種子植物に至るまでの進化の過程で遺伝子の数が増え、シロイヌナズナではそのうちの 1 つである RKD4 が、受精後の胚発生を制御するように機能分化したと考えられる（図 8）。

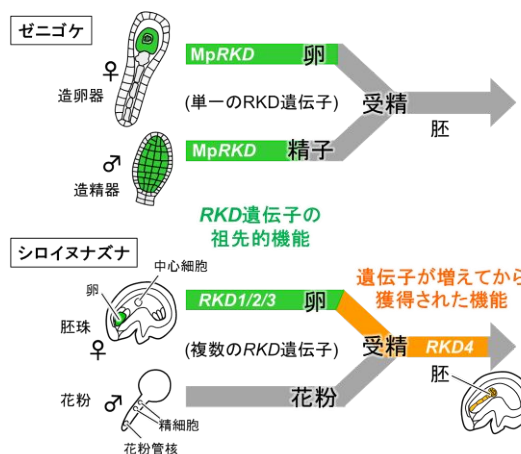


図 8 陸上植物の進化における RKD 遺伝子機能の保存性と多様化

## 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）

Koi, S., Hisanaga, T., Sato, K., Shimamura, M., Yamato, K. T., Ishizaki, K., Kohchi, T., and Nakajima, K. "An evolutionarily conserved plant RKD factor controls germ cell differentiation" *Curr. Biol.* 26, 1775-1781 (2016) 査読あり  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.013>

Bowman, J.L., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M.A., Berger, F., Dolan, L., Haseloff, J., Ishizaki, K., Kyojima, J., Lin, S.S., Nagasaki, H., Nakagami, H., Nakajima, K., Nakamura, Y., Ohashi-Ito, K., Sawa, S., Shimamura, M., Solano, R.,

Tsukaya, H., Ueda, T., Watanabe, Y., Yamato, K.T., Zachgo, S., and Kohchi, T. "The Naming of Names: Guidelines for Gene Nomenclature in Marchantia" *Plant Cell Physiol.* (2015) 査読あり  
doi: 10.1093/pcp/pcv193

Waki T., Miyashima, S., Nakanishi, M., Ikeda, Y., Hashimoto, T. and Nakajima, K. "GAL4-based targeted activation tagging system in *Arabidopsis thaliana*" *Plant J.* 73, 357-367 (2013) 査読あり  
DOI: 10.1111/tpj.12049

中島敬二「植物細胞を初期化する RKD 遺伝子の発見 - 発生研究による鍵遺伝子の同定と応用展開の可能性」 *化学と生物* 51, 789-791 (2013) 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

Tetsuya Hisanaga, Satoshi Koi, Katsutoshi Sato, Keiji Nakajima "Marchantia polymorpha as a model to study plant reproductive development" Seminar at the Marchantia training course 京都大学 (京都府・京都市) 2016 年 12 月 12 日

Keiji Nakajima "Marchantia polymorpha as a genetic tool to study plant egg cell differentiation" Marchantia Seminars: Welcome to Marchantia world! 京都大学 (京都府・京都市) 2016 年 3 月 3 日

Satoshi Koi, Tetsuya Hisanaga, Gaku Fukui, Kaori Furuta, Masaki Shimamura, Takafumi Watabe, Katsuyuki Yamato, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, Keiji Nakajima "Conservation and diversification of reprogramming factors in land plant evolution" International Symposium on Plant Sciences & Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists, Daejeon (Korea) 2015 年 11 月 6 日

Satoshi Koi, Tetsuya Hisanaga, Gaku Fukui, Kaori Furuta, Masaki Shimamura, Takafumi Watabe, Katsuyuki Yamato, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, Keiji Nakajima "Control of germ cell differentiation and pluripotency by evolutionarily conserved factors in land plants" International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium and Technical Workshop 2015 "Organogenesis from Eggs to Mature Plants" 名古屋大学 (愛知県・名古屋市) 2015 年 8 月 27 日

Tetsuya Hisanaga, Satoshi Koi, Gaku Fukui, Keiji Nakajima "RKD genes are conserved regulator for egg cell differentiation among land plants" International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium and Technical Workshop 2015 "Organogenesis from Eggs to

Mature Plants" 名古屋大学 (愛知県・名古屋市) 2015 年 8 月 27 日

Tetsuya Hisanaga, Keiji Nakajima "An enhancer trap screening to identify genes regulating egg cell specification and differentiation in *Marchantia polymorpha*" 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学 (東京都・世田谷市) 2015 年 3 月 16 日

厚井聡, 久永哲也, 嶋村正樹, 石崎公庸, 河内孝之, 中島敬二 「ゼニゴケの生殖における RWP-RK ファミリー遺伝子 MrKD の機能」 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学 (東京都・世田谷市) 2015 年 3 月 16 日

Keiji Nakajima "Comparative studies of female gametogenesis in land plant" Marchantia Workshop 2014 神戸大学 (兵庫県・神戸市) 2014 年 12 月 9 日

Satoshi Koi, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, Keiji Nakajima "Evolutionarily conserved role of RKD gene family in land plant reproduction" Marchantia IV, Melbourne (Australia) 2013 年 12 月 8 日

厚井聡, 中島敬二 「モデル苔類ゼニゴケを用いた初期胚発生に関わる遺伝子の機能解析」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

厚井聡, 石崎公庸, 橋本隆, 河内孝之, 中島敬二 「初期胚発生に関わる RKD4 遺伝子の祖先的機能の解析」日本植物分類学会第 12 回大会 千葉大学 (千葉県・千葉市) 2013 年 3 月 15 日

Satoshi Koi, Kimitsune Ishizaki, Takashi Hashimoto, Takayuki Kohchi, Keiji Nakajima "Evolutionary insights into the RKD gene function in the development of land plants" 第 54 回日本植物生理学会年会 岡山大学 (岡山県・岡山市) 2013 年 3 月 23 日

厚井聡, 中島敬二 「初期胚発生に関わる AtRKD4 のゼニゴケ相同遺伝子の機能解析」日本蘚苔類学会第 41 回北海道大会 斜里町公民館ゆめホール知床 (北海道・斜里郡斜里町) 2012 年 9 月 8 日

〔その他〕

新聞報道

朝日新聞 H28.6.24 朝刊 「植物の生殖細胞作る遺伝子」

奈良新聞 H28.7.15 朝刊 「生殖細胞作る遺伝子 ゼニゴケで突き止め」

朝日新聞 H28.10.30 朝刊 「ゼニゴケ世界が注目」

ホームページ

<http://www.naist.jp/pressrelease/2016/06/003257.html>

<http://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=1340>

[http://bsw3.naist.jp/nakajima/Research\\_](http://bsw3.naist.jp/nakajima/Research_)

JP/embryogenesis.html  
[http://bsw3.naist.jp/nakajima/Research\\_JP/Germ\\_cell.html](http://bsw3.naist.jp/nakajima/Research_JP/Germ_cell.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中島 敬二 (NAKAJIMA, Keiji)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・教授  
研究者番号：80273853

### (2)研究協力者

金 鐘明 (KIM, Jong-Myong)  
遠藤 高帆 (ENDO, Takaho)  
厚井 聡 (KOI, Satoshi)  
久永 哲也 (HISANAGA, Tetsuya)  
古田 かおり (FURUTA, Kaori)  
河内 孝之 (KOHCHI, Takayuki)  
嶋村 正樹 (SHIMAMURA, Masaki)  
大和 勝幸 (YAMATO, Katsuyuki)  
石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)  
LUKOWITZ, Wolfgang