

ゼニゴケ *MpCLE* 遺伝子の解析

澤進一郎 本田紘章 田畑亮
 熊本大学大学院自然科学研究科理学専攻
 〒860-8555 熊本市黒髪 2-39-1

An analysis of *MpCLE* genes in *Marchantia polymorpha*

Key words: CLE, Hormone, Peptide, Development, *Marchantia polymorpha*

Shinichiro Sawa, Hiroaki Honda, Ryo Tabata
 Kumamoto University
 Kurokami 2-39-1, Kumamoto, 860-8555, Japan

1. はじめに

植物の発生を制御し、様々な局面における植物生理を調節すると考えられている CLE (CLAVATA3/Embryo-Surrounding-Region)ペプチドホルモンは、シロイヌナズナを中心に、盛んに研究がなされている。なかでも、その CLE ファミリーである CLAVATA3 (CLV3)や tracheary element differentiation inhibitory factor (TDIF; CLE41/CLE44)は、茎頂分裂組織の活性や維管束細胞の分化を制御することが明らかとなってきた(Betsuyaku et al. 2011a; Miwa et al. 2009a)。

典型的な *CLE* 遺伝子がコードするタンパク質は 100 アミノ酸程度であり、その N 末には細胞外に放出されるためのシグナルペプチドがコードされている。また、C 末にコードされる *CLE* ドメインのうち、12-13 アミノ酸が切り出され、糖鎖修飾を受けた後、成熟したペプチドホルモンとして細胞外で、細胞非自律的に機能すると考えられている(Ohyama et al. 2010)。

これまでに調べられた様々な植物で、多くの *CLE* 遺伝子が見つかったが (Oelkers et al. 2008)、ヒメツリガネゴケに典型的な *CLE* 遺伝子が存在するため、少なくとも進化的にコケ植物以降の植物は *CLE* ペプチドホルモンを利用していると考えられている。この *CLE* 遺伝子はクラミドモナスにも存在するとされているが (Oelkers et al. 2008)、その *CLE* ドメインはさほど保存されていないため、*CLE* ペプチドホルモンとして機能するか否かはさらなる研究が必要と思われる。現在のところ、そのクラミドモナスを除き、ヒメツリガネゴケよりも下等な植物における *CLE* 遺伝子の知見はない。

シロイヌナズナゲノム上には、*CLE* 遺伝子が 32 個存在し、イネには 47 個(Sawa et al. 2008)、シダ植物小葉類であるイヌカタヒバにも 15 個の *CLE* 遺伝子が存在する(Miwa et al. 2009b)。このように、植物ゲノム上には多くの *CLE* 遺伝子が存在することから、植物における *CLE* 遺伝子の機能の重要性が伺われるだけでなく、多様な機能を持つことも推測される。そこで、我々は、この *CLE* 遺伝子の分子進化、機能進化、シグナル伝達系の解明を目指して研究を行っている。

2. 何故, “ゼニCLE” か?

CLEの機能やシグナル伝達系の研究において, 現在, 分子遺伝学的解析の実験材料として確立されたシロイヌナズナが主に使われており, 筆者らもやはりシロイヌナズナを用いてきた。しかし, 多くの研究者がCLEシグナル伝達系の解析を行っているにもかかわらず, そのシグナル伝達因子の多くは未解明であり, 受容体は単離されたものの(Kinoshita et al. 2010), その下流因子はほとんど明らかになっていない。さらに, シロイヌナズナには32ものCLE遺伝子があるにもかかわらず, 研究が進んでいるのはCLV3とTDIFのみである。CLE遺伝子を過剰発現した場合, 多くのCLE遺伝子の形質転換体が類似した表現型を示し, また, 多くのCLE遺伝子は機能的冗長性が高いと考えられ, 機能欠失型でも表現型を示さないことから, どのような機能を持っているか予想することは困難である。

シロイヌナズナにおけるCLEに関する研究がこのような状況であるため, CLE遺伝子の機能解明や, シグナル伝達系の解明には, ブレークスルーが必要であった。ゼニゴケは, 最も下等な陸上植物として注目を浴びている実験材料である(河内さんの稿参照)。我々は, そのゼニゴケの遺伝子重複性の低さと, 遺伝子破壊が可能である点に注目した。シロイヌナズナでは, T-DNA挿入ラインが整備され, 多くの遺伝子破壊株がストックセンターから容易に分与して貰うことが可能である。しかし, CLE遺伝子の多くはイントロンももたず, 100アミノ酸程度のタンパク質しかコードしないため, 遺伝子領域が大変短く, 多くのCLE遺伝子にはT-DNA挿入ラインが存在しない。このことから, 機能欠損変異体を利用した遺伝学的解析が困難であった。ゼニゴケでは遺伝子破壊が可能であるため, この点もクリアできることから, CLE遺伝子解析には大変有効であると考えられる。そこで, 我々は, ゼニゴケのCLE遺伝子, “ゼニCLE”の単離, 解析を行った。

3. *MpCLE1*と*MpCLE2*の同定

ゼニゴケゲノム上には, 2個のCLE遺伝子が見つかり, それぞれ*MpCLE1*, *MpCLE2*と名付けた(図1)。これらは, 典型的なCLE遺伝子で, それらの翻訳産物は, 適切なプロセッシングを受け, シグナルペプチドにより細胞外に放出され, C末のCLEドメインが細胞外でペプチドとして機能することが予想された。

*MpCLE1*はTDIFグループに属し, *MpCLE2*は, CLV3が属する大きなグループの祖先的なタイプであることが示唆された。TDIFは, 道管分化を抑制し, 前形成層細胞の分裂を活性化させる機能を持つことが知られている(Ito et al. 2006)。また, CLV3は茎頂分

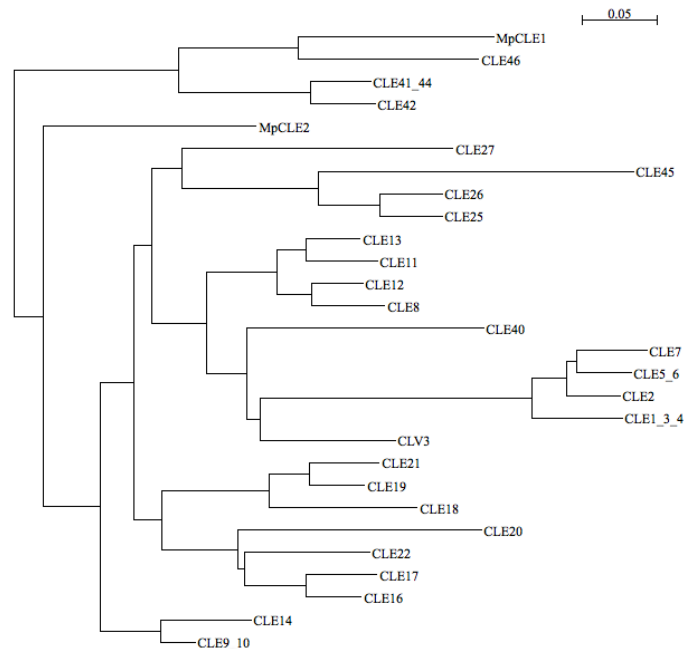


図1 シロイヌナズナとゼニゴケのCLE系統樹

裂組織の幹細胞の細胞分裂活性を抑制し、側方器官の分化を促進する機能を持つと考えられている。どちらも、細胞分裂の活性を制御することで、植物の分化に携わっているため、ゼニゴケでも同様の機能を持つ可能性が考えられた。

そこで我々は、*MpCLE1*遺伝子の過剰発現株を作成し、その表現型観察を行う事で、*MpCLE1*がどのような機能を持つか解析することにした。*MpCLE1*の過剰発現により、*MpCLE2*の経路を活性化させ、*MpCLE2*の効果を観察してしまうことも危惧されるが、ゼニゴケには2つの*MpCLE*遺伝子しか存在しないので、今後の遺伝学的解析でそれら2つの*CLE*遺伝子の機能を分離して検討することも可能であると考えている。そこで、まずは、過剰発現株を作成し、どのような形態的特徴に注目すればよいかを検討した上で、遺伝子重複性の低いゼニゴケを用いて、今後詳細な解析を行いたいと考えている。

4. *MpWOX1* の同定

シロイヌナズナでは、*CLV3*は、ホメオボックス転写因子の*WUSCHEL* (*WUS*)遺伝子の発現を抑制することが知られている。シグナル伝達経路がゼニゴケから高等植物まで保存されているか否か検証するために、ゼニゴケゲノム、及び、EST配列を用いて、*WUS*のホモログを探索し、一つの候補を得た(図2)。*MpWOX1*遺伝子は、321アミノ酸からなるタンパク質をコードすると考えられ、シロイヌナズナの*wuschel-related homeobox13*(*WOX13*)と最も高い相同性を示した。*WOX13*と相同性を示す遺伝子は、緑藻からも見つかり、*WOX13*ファミリーは最も原始的な*WOX*と考えられている(Nardmann et al. 2009)。このことから、ゼニゴケに一つしかない*WOX*が、*WOX13*と相同性を示すのはリーズナブルである。

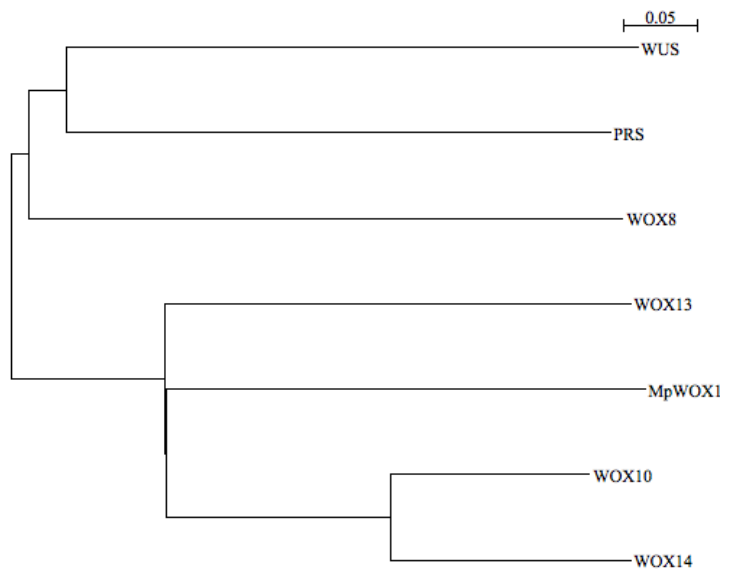


図2 シロイヌナズナとゼニゴケの*WOX*系統樹

5. ゼニゴケとシロイヌナズナの *CLE* と *WOX* の機能とシグナル伝達経路の保存性

これまでに、*MpCLE1*の過剰発現株と発現抑制株、及び*MpWOX1*の過剰発現株を作成し、その表現型を観察した。その結果、*MpCLE1*の過剰発現株は表皮細胞の細胞分裂抑制と、それに伴う表皮細胞の欠損が観察され、発現抑制株は表皮細胞の細胞分裂過剰とそれに伴う気室、及び気室孔の形態異常が観察されている(田畑ら未発表)。また、表皮細胞周辺と、その分化過程において、*MpCLE1*の遺伝子発現が*in situ hybridization test*により確認された(Zachgoら未発表)。一方、現在のところ、*MpWOX1*は表皮細胞での発現が観察されておらず(Zachgoら未発表)、*MpWOX1*が気室分化に関わるという結果は未だ得られていない。

これまでの結果より、我々は、*MpCLE1*は、表皮細胞や気室分化の分化抑制を担うことで、適切なゼニゴケの発生を制御すると考えているが、その局面において、*MpWOX1*は*MpCLE1*の下流で機能しないと考えている。このことは、高等植物でみられるようなCLEとWOXを介したシグナル伝達経路が植物の進化に伴って再構築されたことを示唆している。

現在、高等植物には多くのCLE遺伝子が存在し、受容体複合体も複雑化し、多様な生理機能を持つことが示唆されているが(Betsuyaku et al. 2011b)、ペプチドホルモンとしての構造はあまり変化させないながらも、受容体より下流のシグナル伝達経路を複雑化することで、多数のペプチドホルモンによる情報を適切に伝達することが可能となるように進化したとも考えられる。この複雑なシグナル伝達経路のために、これまで、シロイヌナズナを材料としただけでは受容体より下流の因子が同定できなかつたのではないかと思われる。

今後、*MpCLE1*だけでなく、*MpCLE2*も用いた、より詳細な分子遺伝学的解析を行う事で、CLEシグナル伝達系の、特に、今まで手つかずであった受容体下流の一端を明らかにすることができ、未だ明らかになっていない高等植物におけるシグナル伝達経路研究の道標となると考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたり、お世話になった、京都大学の河内孝之先生、石崎公庸先生、近畿大学の大和勝幸先生、Monash大学のJohn, Bowman先生、平川有宇樹先生、Osnaburueck大学のSabine Zachgo先生にこの場を借りて感謝申し上げます。

引用文献

- Betsuyaku, S., Sawa, S., & Yamada, M. 2011a. The function of the CLE peptide in plant development and symbiosis. *The Arabidopsis Book*. 9: e0149
- Betsuyaku, S., Takahashi, F., Kinoshita, A., Miwa, H., Shinozaki, K., Fukuda, H., & Sawa, S. 2011b. Mitogen-Activated Protein Kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to the shoot apical meristem homeostasis. *Plant Cell Physiol*. 52: 14-29.
- Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., & Fukuda, H. 2006. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell. *Science* 313: 842-845.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., & Sawa, S. 2010. RPK2/TOAD2 is an essential receptor-like kinase transmitting the CLV3 signalling in Arabidopsis. *Development* 137: 3911-3920.
- Miwa, H., Kinoshita, A., Fukuda, H., & Sawa S. 2009a. Plant meristems: CLV3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *J. Plant Res.* 122: 31-39.
- Miwa, H., Tamaki, T., Fukuda, H., & Sawa, S. 2009b. Evolution of CLE signaling. *Plant Signaling & Behavior* 4: 477-481.

- Nardmann, J., Reisewitz, P., & Werr, W. 2009. Discrete Shoot and Root Stem Cell-Promoting *WUS/WOX5* Functions Are an Evolutionary Innovation of Angiosperms. *Mol Biol Evol.* 26: 1745-1755.
- Oelkers, K., Goffard, N., Weiller, G., F., Gresshoff, P., M., Mathesius, U., & Frickey, Y. 2008. Bioinformatic analysis of the CLE signaling peptide family. *BMC Plant Biology* 8:1. doi:10.1186/1471-2229-8-1
- Ohyama, K., Shinohara, H., Ohnishi, M. O., & Matsubayashi, Y. 2009. A Glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chem. Biol.* 5: 578-580.
- Sawa, S., Kinoshita, A., Betsuyaku, S., & Fukuda, H. 2008. A large family of genes that share homology with CLE domain in *Arabidopsis* and rice. *Plant Signaling & Behavior* 3: 1-3.