

平成 30 年 8 月 6 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 530

氏 名 田中 奈月

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: オックスフォード大学 (国名: 英国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

根毛形成における細胞自律的な形態形成の管理機構の解明

3. 派遣期間: 平成 29 年 6 月 4 日 ~ 平成 30 年 7 月 21 日

4. 受入機関名及び部局名

Department of Plant Sciences, University of Oxford, UK

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意

書式任意(A4判相当 3 ページ以上、英語で記入)

も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

細胞自律的な形態形成の制御機構の解明を大きな目的として研究を進めてきた。申請時は、シロイヌナズナの根毛をモデルとして細胞伸長制御機構を研究する予定であった。しかし、派遣先の Liam Dolan 教授の研究室では研究対象としてほとんどゼニゴケのみを用いている状況に変わっており、シロイヌナズナ研究を派遣先の研究室で行うメリットが無かったこと、さらに、半数体 n として生育する期間の長い新たなモデル植物であるゼニゴケの利用価値に魅了されたこと等から、ゼニゴケを用いて細胞伸長制御の研究を展開した。

それに加え、申請者のこれまでの研究背景と蓄積している知見、そして派遣先研究室で確立されていたゼニゴケでの遺伝子スクリーニング技術を合わせ、亜鉛過剰・欠乏耐性に関わる新規遺伝子の探索もサブテーマとして進めた。

<新規情報変換分子 A の細胞成長制御における機能の解明>

植物の形態形成や環境応答におけるシグナル伝達では、タンパク質や脂質、核酸、植物ホルモン、カルシウムイオン等が複雑に関わっている。本研究では、カルシウムイオンと脂質の両方と相互作用する新規タンパク質 A に焦点を当てた。情報伝達イオンであるカルシウムイオンの細胞質濃度が、環境刺激に応答して一過的に上昇することでカルシウム結合タンパク質が活性化され下流の標的タンパク質の活性が調節され、病原菌、接触、乾燥、光、温度などのストレス応答、また根毛や花粉管の細胞伸長にも寄与している。一方、脂質シグナルも、様々な固有の機能および局在をもち、細胞機能調節や細胞極性の形成に重要であることが解明されつつある。これまでに、カルモジュリンなどのカルシウム結合タンパク質や脂質合成酵素など、情報伝達分子に関する研究は進められているが、異なるシグナル分子間、たとえばカルシウムと脂質シグナルでの相互作用や情報変換に関する知見は乏しい。

本研究では、このような 2 つの重要なシグナル素子であるカルシウムと脂質の情報変換、さらに細胞骨格の構築にも関わると推定している新規タンパク質 A の生理機能および情報変換機構の詳細を明らかにすることで、植物の細胞成長におけるカルシウムシグナルを脂質シグナ

ルに変換することの役割を解明し、形態形成や環境応答における新たな適応機構の解明を目指す。タンパク質 A は、脂質修飾されることで細胞膜に結合し、カルシウムイオンを結合すると脂質分子を遊離することで、細胞膜極性の形成に関与していると推測している。

タンパク質 A は、植物界での保存性が高く、ゼニゴケ等のコケ植物からイネ・ダイズ等の被子植物を含む植物で保存されている。シロイヌナズナで同定したタンパク質であり、シロイヌナズナでは 2 つのホモログが存在するが、比較的シンプルなゲノムをもつゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) では 1 つのホモログしか存在しない。シロイヌナズナにおいて、タンパク質 A のホモログは、水ストレス応答や根毛伸長に関与していることを見出しているが、その作用機構は解明できていない。また、このタンパク質は根や気孔以外でも比較的高いレベルで発現しているタンパク質であるため、まだ解明できていない多様な機能が想定され、未知知られていない細胞普遍的な機能を担っていると推測している。その解明は、細胞自律的な形態形成の制御機構を解く鍵にもなると考えている。

本研究では、ゼニゴケにおいて遺伝子 a を CRISPR-Cas9 を用いて破壊することにより、シロイヌナズナの系では解明できていないタンパク質 A の新たな機能を探索・発見することを目的として進めた。また、シロイヌナズナでの過去の研究によって、脂質分子と結合する部位である N 末端部分を過剰発現すると、細胞膜上の遊離の脂質分子と結合しカバーすることでその機能を抑制してしまい、脂質分子によるシグナル伝達や細胞極性の形成を抑制してしまうため、根毛の先端伸長を抑制することが分かっている。そのドミナントネガティブに働く N 末端部分の過剰発現株をゼニゴケのタンパク質 A でも作製することにより、ゼニゴケにおいてタンパク質 A の情報伝達に関わる脂質シグナルの役割解明も進めた。

派遣期間を大幅に短縮したため、当初の目標は達成できていないが、現時点での進行状況を書きに述べる。

第一ステップとして、CRISPR-Cas9 でのゼニゴケ遺伝子 a 欠損株の作製を行った。まず、1 つのベクターで 2 箇所の gRNA を導入する方法で、2 種類の組み合わせのベクターを作製し、遺伝子コード領域の大幅な欠落を引き起こすことを試みた。しかし、得られた抗生物質耐性の候補株 100 株以上に対し目的遺伝子 a のジェノタイピングを行ったが、目的の欠損株は得られなかった。ベクターが予定どおりには機能しなかったためか、もしくは致死遺伝子であるためか、目的の遺伝子 a に変異が起きた株は全く得られなかった。この状況を乗り越えるため、1 つのベクターで 1 箇所のみ gRNA を導入し、塩基置換などの小さな変異を引き起こさせる方法に切り替えた。各エキソンに 1 箇所ずつの 4 種類のベクターを作製し、ゼニゴケの胞子に形質転換を行った。その結果、形質転換した 1 世代目において、形質転換株が小さいうちにジェノタイピングした株に関しては 10 分の 1 程度の割合で目的遺伝子 a に CRISPR による変異が入った株を同定できた。しかし、1 世代目で成長し大きくなった株でもジェノタイピングを行ったところ、野生株の割合が多く、変異が入っている株でもキメラの株しか同定できなかった。さらに、1 世代目において変異した配列が明瞭に解読できた株も無性生殖による無性芽から得た次世代（各ラインにつき 3～5 個体）をジェノタイピングし、純系の確立を試みたが、2 世代目では全ての株において野生型もしくはキメラの遺伝型を示した。さらに、1 世代目で変異した配列が読めた株の一部では、葉状体の一部が黒くなり死細胞となったような現象も観察された。これらの結果は、遺伝子 a の欠損は致死に近い表現型を示すため、キメラでしか生育できないことを暗示していると推測する。

上述のように、CRISPR-Cas9 での遺伝子欠損株の作製は当初の予定よりも大幅に遅れているが、ゼニゴケにおいて遺伝子 a が必須遺伝子に近い機能を持っていることが推定できたことは大きな成果であると考えている。今後、ノックダウン株や誘導性のノックアウト株を作製することにより、この遺伝子の機能解析を進めることで、興味深い機能が見えてくると期待している。

また、ゼニゴケにおける脂質シグナルの機能を解析するために作製したタンパク質 A の N 末端過剰発現株を観察したところ、非常に興味深い表現型が見えてきている。すなわち、N 末端過剰発現株では、葉状体の大きさが野生株よりも顕著に小さく、形も異常であり、細胞の配置も秩序だっていない。

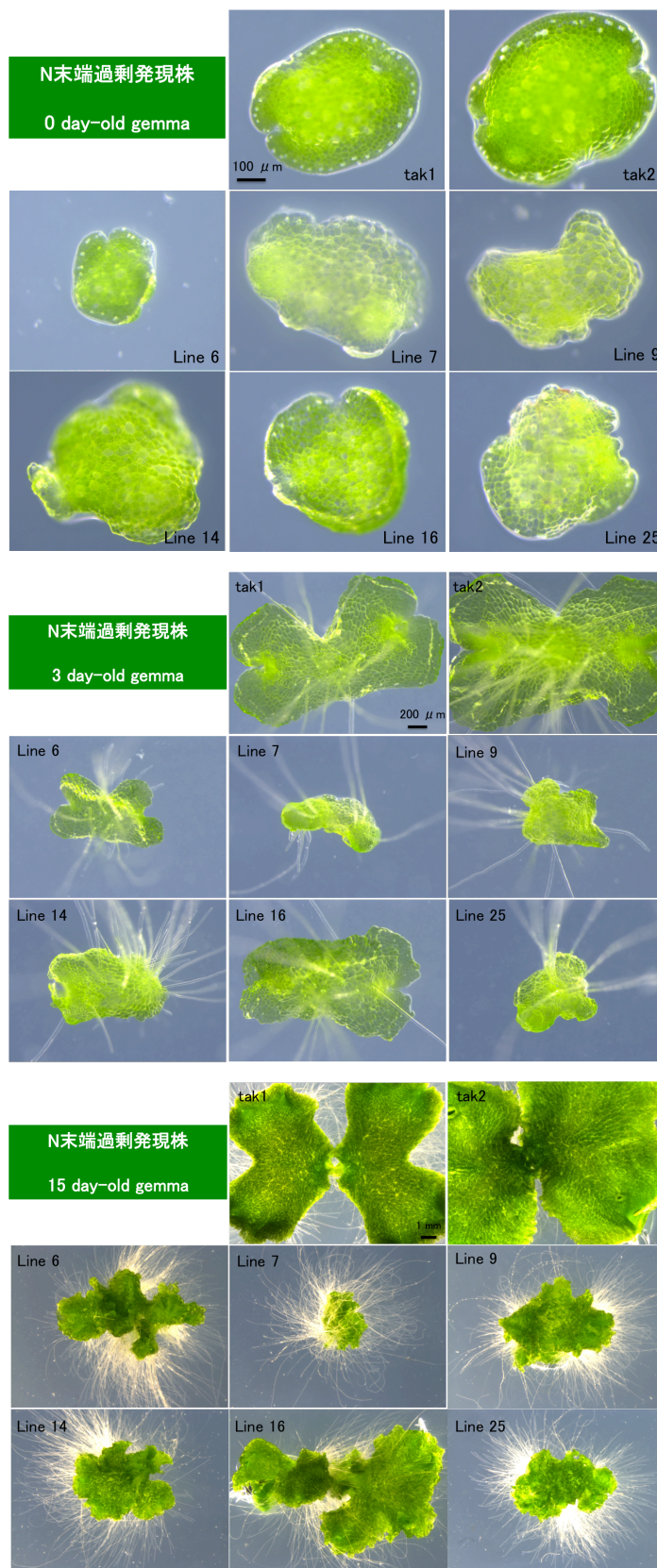
右図(上)に示した写真のように、杯状体から取り出したばかりの0日目の無性芽は、Line 6のように野生株(tak1、tak2、表面長径約0.6mm)と同じような形をしているが、半分以下のサイズである株、Line 7, 9, 14, 25のように本来の形状を失っている株、Line 16のように葉状体の縁の部分が反り返り、平板形状でなくなっている株が検出された。このようにN末端過剰発現株では、野生株で見られる部分ごとの細胞サイズの使い分け、もしくはその配置が統御されていないために、野生株のような平板的であり、かつ葉状体の両端の定まった部位にメリステム(細胞分裂の盛んな部位)が維持されている形態を形成できていないと推測している。

さらに、そこから3日経過した無性芽は、野生株(tak1、tak2)とのサイズ差がさらに開き、全体的に野生株より大きい細胞が少ない印象であった(右図(中))。Line 7, 9, 15, 25ではメリステムがどこにあるのか特定できない、Line 6, 16ではメリステムの位置が分かるがメリステム付近の小さい細胞の集合した部位の細胞数が野生株よりも少ない印象を受け、野生株よりも細胞分裂が遅いと推測される。また、N末端過剰発現株では、細胞の大きさや配置が無秩序になっており、細胞伸長方向や分裂方向が適切に制御できていない可能性も示唆される。

右図(下)のように、15日間生育させた後も、野生株(tak1、tak2)との差は顕著であり、ほとんどの株は少なくとも野生株の半分以下のサイズまで矮小化しており、野生株のように平板的な秩序立った形を形成できず、葉状体の端の凹凸が著しく、かつ立体的に盛り上がった形を形成した。

このように、脂質シグナル分子を結合する特性をもち、細胞膜上に局在するN末端ペプチドを過剰発現することにより、遊離状態の脂質シグナル分子が減少し、脂質シグナルに障害が生じると、細胞分裂または細胞伸長、もしくはその両方が阻害され、葉状体の成長が遅くなるとともに、正常な形態の葉状体を形成できないことを明らかにした。つまり、ゼニゴケにおいて、脂質シグナルは、細胞分裂や細胞伸長の速度や方向を制御することにより、形態形成に重要な機能を果たしていることが明らかになりつつある。

今後、その詳細を解析し、細胞分裂や細胞伸長にどのように関与しているのかを解明する。さらに、誘導性の遺伝子a破壊株を作製し、その解析を進めることにより、脂質シグナルのみでなく、カルシウムシグナルからの脂質シグナルへの変換がどのように機能しているのかを解明し、独創的なテーマとして新たな知見を得たい。また、タンパク質Aは細胞骨格と相互作用



する可能性もあるため、脂質シグナルやカルシウムシグナルによる細胞骨格の制御についても蛍光タンパク質などを用いて解析を進める予定である。

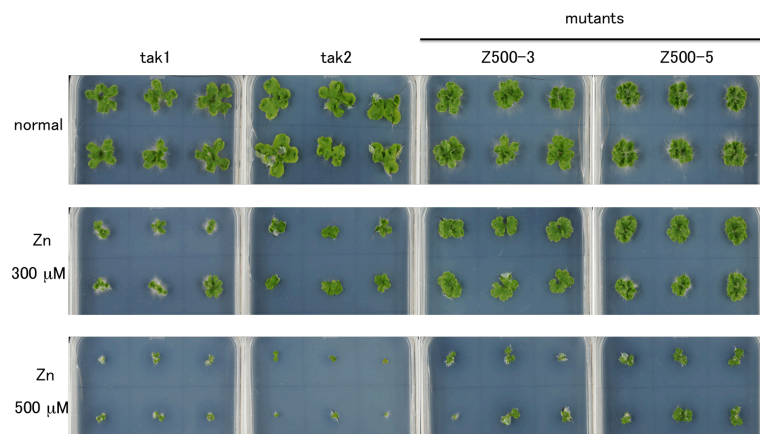
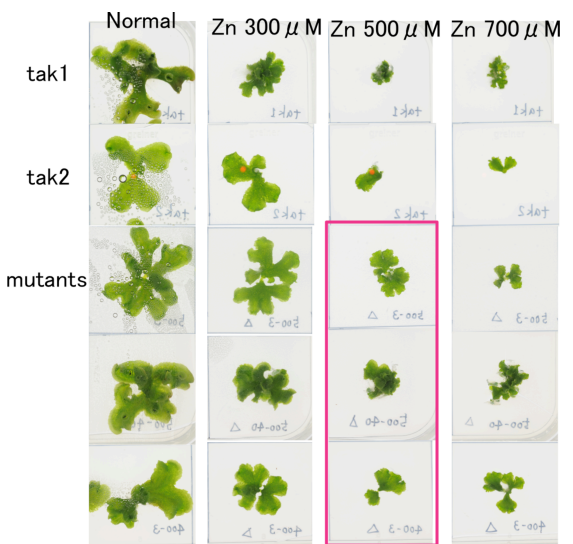
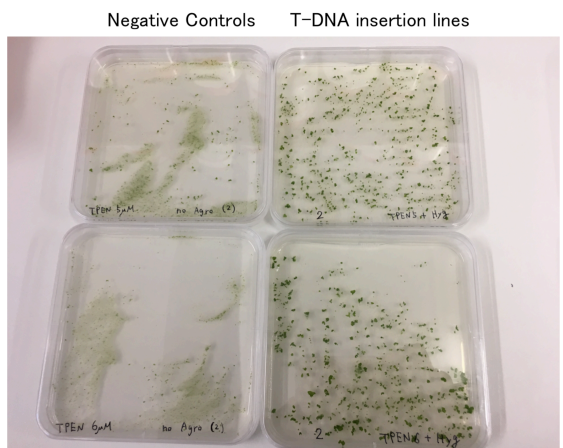
<亜鉛過剰・欠乏耐性に関わる新規遺伝子の探索>

亜鉛は、DNA ポリメラーゼなど酵素の活性に不可欠であり、生物にとっての微量必須元素である。世界の農作地の 50% が亜鉛不足であるが、一方で過剰な亜鉛は毒性を示し、高濃度の亜鉛が含まれる鉱山や工業跡地では植物は生育できない。この亜鉛欠乏・過剰の問題解決のためには、植物の亜鉛欠乏・過剰耐性の増強が有効である。金属高蓄積植物等を用いた研究により、亜鉛ホメオスタシスに関わる遺伝子・タンパク質が特定されてきている。しかし、亜鉛濃度の感知、多数の膜輸送体の量と機能の調節、亜鉛結合型タンパク質や有機酸の合成量調節、さらに個々の細胞・組織・器官の亜鉛蓄積での役割など、細胞内外の亜鉛ホメオスタシス機構の全体像の理解には解明すべき課題が多い。

そこで、その機構の包括的な理解を深めることを目的として、亜鉛ホメオスタシスに関わる新規遺伝子の大規模なスクリーニングを行った。実験材料にはゼニゴケを用いた。ゼニゴケは半数体 n での生育期間が長く、紫外線や T-DNA 挿入による突然変異体を容易に確立でき、変異体を孢子および無性芽の両方から増殖できる利点がある

UV 照射および T-DNA 挿入によってゼニゴケの孢子 400 万個にランダムな変異処理をし、右図（上）に示した写真のように亜鉛過剰・欠乏に耐性および感受性を示す株を 100 株ほど選抜した（今後、亜鉛過剰・欠乏に感受性を示す株についても選抜していきたい）。UV 照射あるいは T-DNA 挿入していないネガティブコントロールと比較して、亜鉛過剰培地あるいは亜鉛欠乏培地で生育が向上した株をピックアップし、無性生殖によって生じた次世代の無性芽も同様に耐性を示すか検討した。右図（下）の写真のように、亜鉛過剰および欠乏に若干の耐性を示すように見られる株（赤枠内）が 20 株ほど得られたが、ほとんどの株では耐性の再現性が安定せず、そのうちの 2 株のみ再現性良く亜鉛過剰耐性を示す株が得られ、亜鉛過剰条件下での葉状体の表面積が野生株と比較して有意に増加した（下図）。今後、スクリーニングを継続し、さらに顕著な耐性を示す株を探索するとともに、TAIL-PCR および次世代シーケンサーによって、原因遺伝子を特定し、新規亜鉛耐性遺伝子を見つけ出し、植物における亜鉛ホメオスタシス機構解明に新たな視点を加えたい。

Zn-deficient conditions



Thallus growth rate of Zn-excess resistant mutants

