

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分  
令和2年3月31日現在

陸上植物の性分化：遺伝的頑健性と可塑性のメカニズム

Sex differentiation in land plants:  
mechanism of genetic robustness and plasticity

課題番号：17H07424

河内 孝之（KOHCHI, TAKAYUKI）

京都大学・大学院生命科学研究所・教授



研究の概要

陸上植物進化の基部に位置する苔類ゼニゴケをモデルとして、環境依存的な有性生殖の誘導と遺伝的な性分化の分子機構を解明する。メスの性染色体に座乗すると予想される配偶体世代の性決定因子を同定する。アンチセンス非コード長鎖RNAにより発現が抑制される雌性分化転写因子の発現解析を通して、性分化の遺伝的頑健性と可塑性の分子機構を明らかにする。

研究分野：基礎生物学、植物科学・生理学、

キーワード：陸上植物、性決定、性分化、有性生殖、環境応答

1. 研究開始当初の背景

有性生殖は種の遺伝的多様性に大きく貢献する。陸上植物は配偶体世代と孢子体世代を多細胞体制で交互に繰り返すという特徴をもつ（世代交代）。陸上植物が配偶体世代に生殖細胞系列を決定し、性決定・性分化を行う分子機構は未解明であった。

我々は配偶体世代が優占的な生活環をもち、近年急速に研究の分子基盤が整備された苔類ゼニゴケを用いることで、有性生殖の重要な問題が効率的に解明できると考えた。本研究の開始までに生殖細胞系列を決定するマスター制御因子としてBONOBO、雌性分化に重要な役割をもつ転写因子FGMYBを同定し、これらを起点として陸上植物の性分化の問題に迫ることを着想した。

2. 研究の目的

ゼニゴケは性染色体をもつ雌雄異株植物である。葉状体が日長や光質といった環境要因を感知し、遺伝的に決定される性に従って異なる形態の生殖枝を形成し、そこに造卵器または造精器を分化させる。本研究では、配偶体世代において、有性生殖プログラムを誘導するマスター転写制御因子BONOBOの誘導発現機構およびその標的遺伝子の制御機構を明らかにする（研究1）。雌性化因子FGMYBの発現は、同じ遺伝子座にあるアンチセンス非コード長鎖（lnc）RNA産生遺伝子SUFの発現と排他的関係にある。この性分化制御スイッチを作用させる分子機構を明らかにする（研究2）。古典的な研究によりメスの性染色体上には性決定因子Feminizer

が座乗することが予想される。このFeminizerを同定し、上記の発現スイッチとの関連を調べる（研究3）。また、FGMYBの解析を通して、生殖細胞系列が雌性配偶子を分化させる機構を明らかにする（研究4）。これらの研究項目を実施し、種子植物での知見と統合することで、陸上植物の配偶体世代の性分化の機構を明らかにする。

3. 研究の方法

（研究1）BONOBOのプロモーターレポーターを用いて、環境依存的な発現制御機構を明らかにする。また、bHLH転写因子であるBONOBOが生体内で相互作用する因子を同定する。また、人為的にBONOBOを誘導発現する系を用いて、BONOBOの標的遺伝子を同定する。（研究2）FGMYB-SUFローカスを大規模に欠損させた変異体を作成する。この変異体を宿主として、改変FGMYB-SUF遺伝子を導入し、FGMYBの雌性化とSUFによるその抑制能力を評価する。lncRNAであるSUFによってFGMYB遺伝子がエピジェネティックな遺伝子発現制御を受けているかを明らかにする。（研究3）性染色体上の遺伝子の比較や発現解析をもとにFeminizerの候補遺伝子を選び、ゲノム編集手法により作出した機能欠損変異体が雌性染色体の存在下で造精器を形成するかを検証することで、機能評価を行う。さらに、オス個体で候補遺伝子を強制的に発現させ、雌性化の誘導とSUFの発現抑制能を検証する。同定したFeminizerの機能予測に基づき、分子細胞生物学的な評価を進める。（研究4）FGMYBの

発現を人為的に制御する植物ラインを確立し、FGMYB が制御する遺伝子を同定する、また、標的遺伝子へのFGMYB の結合をクロマチン免疫沈降法などで明らかにする。

#### 4 . これまでの成果

(研究1) 日長および光質といった環境による有性生殖誘導をBONOBO が統合することを示した(Yamaoka et al., 2018; Inoue et al., 2019)。BONOBO プロモーター領域に発現を正及び負に制御する領域を見出した。BONOBO の相互作用タンパク質を同定し、複合体形成が生殖誘導機能に重要であることを示した。また、BONOBO を人為的に誘導発現する系を用いて、その制御下にある遺伝子を同定した。(研究2) 常染色体上にコードされるFGMYB が雌性分化の主要な制御因子であり、この遺伝子を欠くと雄性分化が起こることを示した。オス個体では、FGMYB の発現をアンチセンス lncRNA である *SUF* が抑制することで雄性分化が起こることを報告した。また、*SUF* RNA を別のローカスから発現させても作用しないことから、*SUF* が *FGMYB* に対してシスに作用することがわかった。以上の知見を基に転写因子と lncRNA から構成される新規性の高い性分化スイッチを報告した(Hisanaga and Okahashi et al., 2019)。また *SUF* の部分欠失系統の解析から *SUF* による発現抑制には RNA 構造ではなく転写衝突が重要であることが示された。(研究3) メスの性染色体上にコードされる Feminizer の同定のために10個の候補遺伝子の変異体を作成した。ある遺伝子の破壊株では、メスの性染色体をもつにも関わらずオスの生殖器官を分化する個体が出現した。また、この遺伝子をメス個体で発現させたところ、オスの性染色体をもつにも関わらず、メスの生殖器官を分化した。つまり、本研究の主要な目標である雌性染色体に座乗する配偶体世代の性決定因子 Feminizer の同定に成功した(発表準備中)。(研究4) *FGMYB* を人為的に誘導発現するコンストラクトをオス個体に導入した。薬剤添加により *FGMYB* 発現を誘導したところ、処理に依存して、遺伝的にはオスであるにも関わらず、メスの生殖器官が分化した。つまり、任意のタイミングで雌性化を誘導できる系が確立された。また、関連成果を統合し、モデルであるゼニゴケが陸上植物の配偶体世代の性分化と性決定を研究するうえで、重要なモデルとなることを提唱した(Hisanaga, Yamaoka, Kawashima, Higo et al., 2019)。

#### 5 . 今後の計画

上記の研究を通じて、有性生殖の誘導から性決定・性分化の鍵となる遺伝子の同定や解析に必要な変異体や人為的な転写因子発現系といった解析基盤の確立が完了した。今後は、

BONOBO や FGMYB の標的遺伝子の同定を通じて、有性生殖と性分化を制御する遺伝子制御ネットワークの解明を進める。また、性染色体上の配偶体世代の性決定因子の同定に基づいた性決定の分子機構の解明を進める。確立したクロマチン動態解析(Montgomery et al., 2020)を加えることによって各研究項目をつなぐ研究を推進する。

#### 6 . これまでの発表論文等(受賞等も含む) 原著論文

Montgomery, S. A.,† Tanizawa, Y.,† (10名省略), Kohchi, T., Lin, S. S., Liu, L. D., Nakamura, Y., Valeeva, L. R., Shakirov, E. V., Shippen, D. E., Wei, W. L., Yagura, M., Yamaoka, S., Yamato, K. T., Liu, C., Berger, F. Chromatin Organization in Early Land Plants Reveals an Ancestral Association between H3K27me3, Transposons, and Constitutive Heterochromatin. *Curr. Biol.* 30, 573-588 (2020). †Co-first authors

Hisanaga, T.,† Okahashi, K.,† Yamaoka, S., Kajiwara, T., Nishihama, R., Shimamura, M., Yamato, K. T., Bowman, J. L., Kohchi, T.,\* and Nakajima, K.\* A cis-acting bidirectional transcription switch controls sexual dimorphism in the liverwort. *EMBO J.* 38, e100240 (2019). †Co-first authors, \*Co-corresponding authors

Inoue, K., Nishihama, R., Araki, T. and Kohchi, T. Reproductive induction is a far-red high irradiance response that is mediated by phytochrome and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* 60, 1136-1145 (2019).

Yamaoka, S., Nishihama, R., Yoshitake, Y., Ishida, S., Okahashi, K., Bao, H., Nishida, H., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Ishizaki, K., Yamato, K. T., and Kohchi, T. Generative cell specification requires transcription factors evolutionarily conserved in land plants. *Curr. Biol.*, 28, 479-486 (2018).

#### 総説

Hisanaga, T.,† Yamaoka, S.,† Kawashima, T.,† Higo, A.,† Nakajima, K., Araki, T., Kohchi, T., Berger, F. Building new insights in plant gametogenesis from an evolutionary perspective. *Nature Plants* 5, 663-669 (2019). †Co-first authors

#### 7 . ホームページ等

<http://www.plantmb.lif.kyoto-u.ac.jp/>  
<https://bsw3.naist.jp/nakajima/>