

植物ホルモンオーキシンの減少が引き起こす
ゼニゴケ葉状体再生の分子機構

石田咲子

目次

| | |
|-------|----|
| 要旨 | 2 |
| 略語表 | 4 |
| 序論 | 6 |
| 結果 | 11 |
| 考察 | 48 |
| 材料と方法 | 53 |
| 文献 | 60 |
| 謝辞 | 69 |

要旨

陸上植物は非常に高い再生能を備え、被食や物理的な損傷によって組織を欠損した後に新たに組織や器官を再形成することができる。維管束植物のシュートや根の再生には主要な植物ホルモンの一つオーキシンが重要な機能をもつことが古くから知られている。

コケ植物もまた非常に高い再生能をもつ。コケ植物の再生は、頂端メリステムを含む頂端部を切除することによって誘導される。頂端側断片の切断面に再生芽は形成されない。また、基部側断片にオーキシンを添加すると再生芽の形成が抑制される。これらのことから、コケ植物の再生はオーキシンによる頂芽優勢機構の一形態であると考えられてきた。しかしながら、その詳細な分子機構は未だ不明である。そこで本研究では、苔類ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* を用いて葉状体再生過程の詳細な分子機構の解明を目指した。

まず、オーキシンの添加によって再生過程の細胞周期再開が阻害されることを明らかにした。また、ゼニゴケに1分子種存在する転写活性化型の AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) 転写因子 *MpARF1* の機能欠損株の再生はオーキシン存在下においても抑制されないことから、オーキシン添加による再生抑制はオーキシン信号伝達経路を介することがわかった。

ゼニゴケ葉状体切断後の内生ホルモンの定量を経時的に行ったところ、頂端部を切除した基部側断片の切断面領域では内生オーキシン量が一過的に大きく減少することを明らかにした。一方で、頂端側断片の切断面領域では内生オーキシン量は緩やかに減少するものの、その程度は基部側と比較して小さかった。これらの結果から、ゼニゴケの葉状体再生において、内生オーキシン量の一過的な減少が再生を引き起こすことが示唆された。

次に、葉状体切断後の経時的なトランスクリプトーム解析により再生関連遺伝子の探索を行ったところ、基部側断片特異的に発現が上昇し、またオーキシン添加によって発現誘導が抑制される 29 遺伝子を同定した。その中には転写因子が1遺伝子のみ含まれており、それは APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR ファミリーに属する *MpERF20* であった。*MpERF20* は基部側断片特異的に発現が誘導され、オーキシンの添加によって誘導が抑制された。反対に、無傷の葉状体にオーキシン生合成阻害剤を処理し内生オーキシン量を低下させると *MpERF20* の発現が上昇することがわかった。このことから、*MpERF20* を *LOW-AUXIN RESPONSIVE (MpLAXR)* と再命名した。

MpLAXR の機能欠損株を作出し再生実験を行ったところ、オーキシン添加によって生じる再生阻害と同様の細胞周期進行の遅延が生じることがわかった。また、 β -エストラジオール依存的に *MpLAXR* を誘導過剰発現する *proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 株を作出し、一過的に発現誘導したのちに、オーキシン含有培地で再生実験を行った。その結果、オーキシン存在下においても再生芽が形成され、*MpLAXR* の一過的な過剰発現はオーキシン添加による再生芽形成抑制効果を無効化できることが明らかになった。

さらに、*proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 株の無性芽を切断することなく β -エストラジオールとともに培養し *MpLAXR* を誘導的に過剰発現させると、メリステム領域だけでなく通常は細

胞分裂をしない領域においても細胞分裂を引き起こし、未分化な細胞塊が生じた。MpLAXR 過剰発現誘導を止めると新たな葉状体が発生したことから、この細胞塊は幹細胞形成能をもつ細胞からなることが明らかとなった。これらの結果から、MpLAXR は再生過程において細胞リプログラミング因子として機能することが示唆された。

本研究において、ゼニゴケ葉状体切断後にオーキシン濃度が一時的に減少し細胞リプログラミング因子 MpLAXR の発現を誘導することを明らかにした。MpLAXR と同じ AP2/ERF ファミリーのクラス VIIIb に属するシロイヌナズナ *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1/DORNRÖSCHEN* はシュートの再生因子として機能するとともに、オーキシン濃度極小領域における腋芽メリステムの確立に関与する。これらのことから、陸上植物における幹細胞新生制御と頂芽優勢機構の関わりが示唆された。

略語表

| | |
|-----------|-----------------------------------------------------------|
| 2,4-D | 2,4-dichlorophenoxyacetic acid |
| AFB | AUXIN SIGNALING F-BOX |
| AP2/ERF | APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR |
| ARF | AUXIN RESPONSE FACTOR |
| AUX/IAA | AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID |
| Cas9 | CRISPR-associated endonuclease |
| CRISPR | clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| CKX | cytokinin-inactivating cytokinin oxidase |
| cZ | <i>cis</i> -zeatin |
| cZR | <i>cis</i> -zeatin riboside |
| cZRP | <i>cis</i> -zeatin riboside phosphate |
| Dex | dexamethasone |
| EdU | 5-ethynyl-2'-deoxyuridine |
| EF1 | ELONGATION FACTOR1 |
| ESR1/DRN | ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1/DORNRÖSCHEN |
| ESR2/DRNL | ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2/DORNRÖSCHEN-LIKE |
| Est | β -estradiol |
| GO | gene ontology |
| GR | glucocorticoid receptor |
| gRNA | guide RNA |
| IAA | indole-3-acetic acid |
| iPR | isopentenyladenine riboside |
| iPRP | isopentenyladenine riboside phosphate |
| LAXR | LOX AUXIN RESPONSIVE |
| LBD | LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN |
| LOG | LONELY GUY |
| NAA | 1-naphthaleneacetic acid |
| OPDA | 12-oxo-phytodienoic acid |
| PAM | protospacer adjacent motif |
| PLT | PLETHORA |
| qRT-PCR | quantitative reverse transcription-PCR |
| RAP2.6L | RELATED TO AP2 L |
| SEM | Scanning electron microscope |
| STEMIN1 | STEM CELL-INDUCING FACTOR 1 |

| | |
|-------|--------------------------------------------|
| TAA | TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS |
| TIR1 | TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 |
| tZR | <i>trans</i> -zeatin riboside |
| tZRP | <i>trans</i> -zeatin riboside phosphate |
| WIND1 | WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 |
| WOX | WUSCHEL RELATED HOMEBOX |
| YUC | YUCCA |
| XVE | LexA-VP16-ER fusion protein |

序論

陸上植物の再生

陸上植物は高い組織再生能をもつ。被食等により植物体の一部を損傷すると、その損傷箇所の癒着や、新たな組織や器官の形成が起こる。多くの場合、損傷を受けるとその傷口付近の細胞が新たに細胞分裂を繰り返し、カルスとも呼ばれる細胞塊が形成される。カルスは被子植物の組織片から植物ホルモンオーキシシンとサイトカイニンを添加することでも誘導される。カルスからは新たな組織のみならず植物体全体を再生させることができ、カルスは分化全能性をもつ細胞を含んでいる(Steward et al., 1958)。また、タバコ葉肉細胞のプロトプラストからの個体再生の研究(Nagata and Takebe, 1971)からも、植物細胞が分化全能性をもつことが明らかにされている。傷害を受けると、その傷シグナルが一つの引き金となり傷口周辺の細胞のリプログラミングが起こり、細胞周期が再開する(Umeda et al., 2021)。

再生過程におけるオーキシシンの役割

被子植物の花茎や葉、根など様々な組織で見られる再生現象は組織によって異なる応答やメカニズムによって制御されているが、多くの場合、細胞運命の転換が起こる細胞リプログラミング過程においてオーキシシンが極めて重要な役割をもつことが明らかになってきた(Christiaens et al., 2021; Ikeuchi et al., 2019; 図 1)。被子植物シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の根端を切除すると、オーキシシンがジャスモン酸とともに、APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF)ファミリーに属する *ERF115* の発現を誘導し、根端の幹細胞領域の形成や組織再生を制御する(Efroni et al., 2016; Zhang et al., 2019; Zhou et al., 2019; 図 1)。また、主根からの根の新生過程においても、オーキシシンが *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 11 (WOX11)*、*WOX12* の転写を制御し、その後 *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16 (LBD16)* の発現が誘導される(Liu et al., 2018)。このように、根における再生には損傷領域におけるオーキシシンの生合成が重要な役割を担う(Matosevich et al., 2020)。また、シロイヌナズナの葉身からの根の再生においても、生合成されたオーキシシンの傷口における蓄積が細胞運命転換の引き金となり、根原基の形成に関与する遺伝子の発現が制御される(Chen et al., 2016; Hu and Xu, 2016; Liu et al., 2014)。

カルスからの組織再生においてもオーキシシンによる遺伝子発現が引き金となることが知られている。シロイヌナズナのカルス誘導条件において、オーキシシン信号伝達の下流で *WOX11* や *PLETHORA3 (PLT3)*、*PLT5*、*PLT7*、*LBD16* 等の根端メリステム制御に関与する遺伝子の発現が誘導され、カルスの多能性が獲得される(Kareem et al., 2015; Liu et al., 2018)。また、カルスからのシュート再生の誘導にはサイトカイニン信号伝達が重要な機能をもつことも知られている(Higuchi et al., 2004; Sakai et al., 2001)。このシュート再生の初期過程において、サイトカイニン合成および信号伝達をオーキシシンが制御することも報告されている(Cheng et al., 2013)。一方で、この過程においてオーキシシン生合成遺伝子の発現がサイトカ

イニン信号伝達によって制御されるという報告もあり(Meng et al., 2017)、オーキシンとサイトカイニンによる複雑な制御メカニズムが存在していると考えられる。

また、シロイヌナズナの花茎の組織癒合の初期過程において、茎頂から極性輸送された内生オーキシンが傷口の上部では蓄積するが、傷口の下部では枯渇し、それぞれ特異的に遺伝子発現制御が起こることで細胞分裂が誘導されることが報告されている(Asahina et al., 2011)。これらの報告から、オーキシンは様々な組織、あるいはカルスからの再生過程において機能する再生因子を制御している。

再生過程における AP2/ERF 転写因子の機能

シロイヌナズナの再生の分子機構の解析から、AP2/ERF ファミリーに属する複数の転写因子が重要な機能をもつことがわかってきている。クラスIに属する *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1)* は傷シグナルに応答して発現し、カルス形成を促進する(Iwase et al., 2011)。また、クラス VIIIb に属する *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1/DORN RÖSCHEN (ESR1/DRN)* は、その過剰発現により、通常では必要なサイトカイニンの添加に依存することなくシュートの再生を誘導することができる(Banno et al., 2001)。この *ESR1/DRN* の発現は *WIND1* によって直接制御されていることも報告されている(Iwase et al., 2017)。また、上述の根の再生において、クラスXに属する *ERF109* と *ERF115* はジャスモン酸信号伝達によって傷害に応じて発現し、オーキシンシグナル伝達とともに幹細胞領域の形成や組織再生を制御する(Zhang et al., 2019; Zhou et al., 2019)。上述した花茎の組織癒合過程ではクラスXの *ERF113/RELATED TO AP2 L (RAP2.6L)* が花茎の切断箇所の下部において発現する(Asahina et al., 2011)。コケ植物蘚類ヒメツリガネゴケ *Physcomitrium patens* では、茎葉体の葉を切断すると切断面の細胞がリプログラミングされ、直接新たな幹細胞に変換する(Ishikawa et al., 2011)。この過程において、AP2/ERF 転写因子である *STEM CELL-INDUCING FACTOR 1 (STEMIN1)* がリプログラミング因子として機能することが報告されている(Ishikawa et al., 2019)。これらの知見から、様々なタイプの AP2/ERF 転写因子が陸上植物の再生において重要な機能をもつことが示されている。

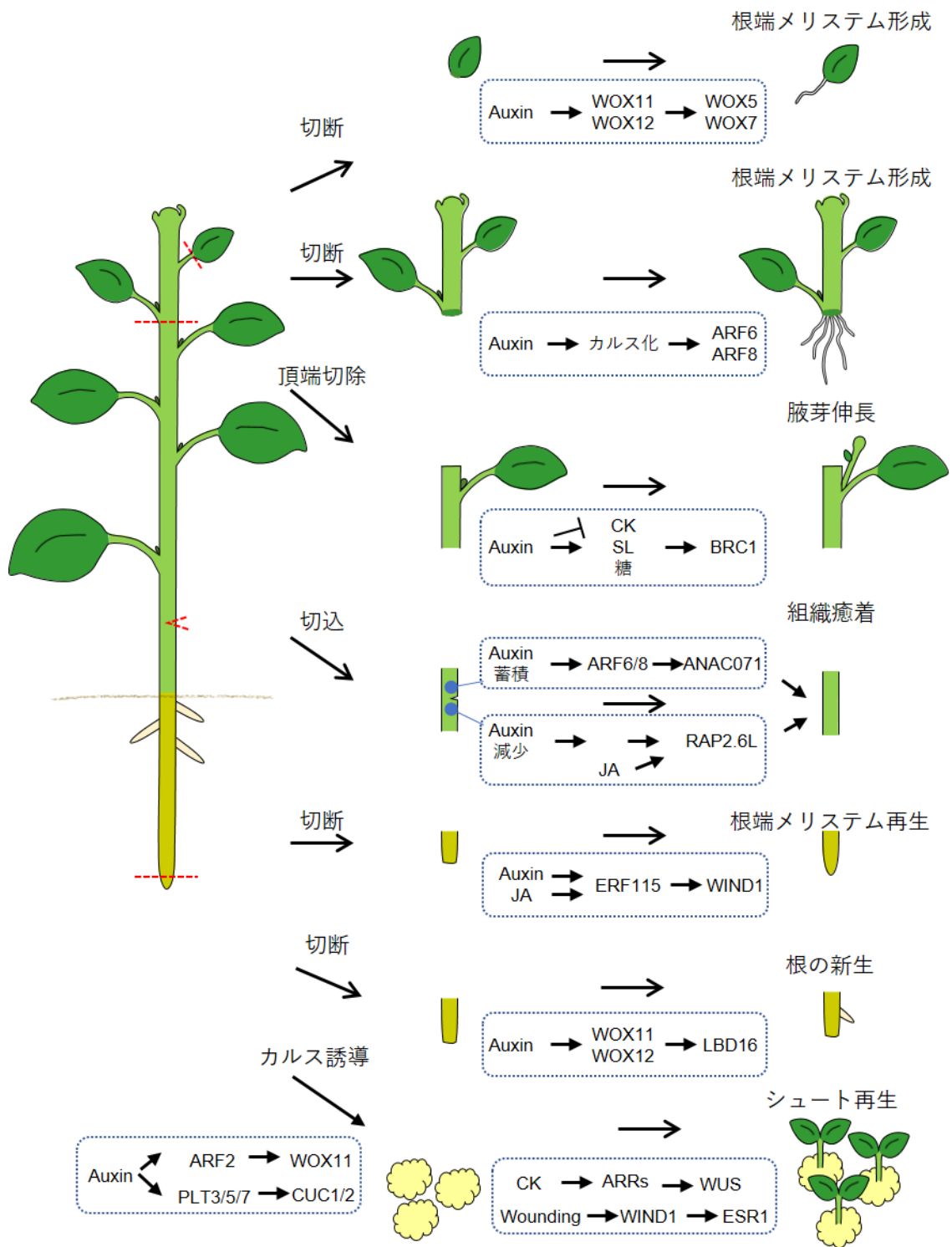


図1 植物の様々な再生現象における植物ホルモンと再生関連遺伝子の役割

オーキシン信号伝達経路とその進化

オーキシンは形態形成や再生、環境応答など、非常に多くの生理応答を制御する植物ホルモンである。オーキシンの主要な信号伝達経路に関わる因子として、オーキシン受容体 TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB)、転写抑制因子 AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA)、転写因子 AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)が知られている。オーキシン低濃度条件下において、AUX/IAA は ARF と相互作用し、コリプレッサー TOPLESS を招集することで ARF による転写制御を抑制する。オーキシン高濃度条件下において、オーキシンは TIR1/AFB に受容され、TIR1 と AUX/IAA のドメイン II を介した相互作用を高める。さらに、TIR1 の E3 ユビキチンリガーゼ活性により AUX/IAA はユビキチン化され、26S プロテアソーム系によって分解される。その結果、AUX/IAA による抑制が解除された ARF 転写因子によって標的遺伝子の転写制御が行われる (Powers and Strader, 2020; Weijers and Wagner, 2016)。

この信号伝達経路は被子植物のみならず陸上植物に広く保存されており、陸上植物進化の初期に維管束植物と分岐したモデル植物である苔類ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* (Kohchi et al., 2021)において、生活環全体を通して形態形成あるいは細胞運命決定に関与している (Bowman et al., 2017; Flores-Sandoval et al., 2015; Kato et al., 2015; Mutte et al., 2018; Suzuki et al., 2021)。先行研究において、ゼニゴケに 1 分子種存在する転写抑制因子 AUX/IAA をコードする *MpIAA* が同定され、機能解析が行われている (Kato et al., 2015)。AUX/IAA のドメイン II にオーキシンによる分解を抑制する変異を導入しグルココルチコイド受容体 (GR) と融合したタンパク質を発現し、デキサメタゾン (dexamethasone; Dex) 依存的にオーキシン信号伝達を抑制することができる *proMpIAA:MpIAA^{MDL}-GR* 株が作出された。この株において Dex 処理によってオーキシン信号伝達を抑制すると、オーキシン低感受性を示す (Kato et al., 2015)。また、葉状体の発生が阻害され、正常な分化状態を維持できなくなり、細胞塊が生じることが報告されている (Kato et al., 2015)。

転写因子 ARF は転写活性化型のクラス A、転写抑制型のクラス B、およびクラス C に分類される (Powers and Strader, 2020; Weijers and Wagner, 2016)。ゼニゴケには各クラスに属する ARF が 1 分子種ずつ存在し、そのうち転写活性化型の *MpARF1* の解析が進められている (Kato et al., 2017)。*MpARF1* の機能欠損株はオーキシン非感受性を示し、また、無性芽のメリステム形成や葉状体の発生に異常が生じることが報告されている (Kato et al., 2017)。クラス B に属する *MpARF2* は転写抑制型としての機能をもつことが示唆されている (Kato et al., 2020, 2017)。また、クラス C の *MpARF3* はオーキシン依存的な遺伝子発現制御には関わらないことも示唆された (Flores-Sandoval et al., 2018; Kato et al., 2020)。これらのゼニゴケが保持する陸上植物に共通する最小のオーキシン応答機構は、ゼニゴケの祖先種と車軸藻類の祖先種との分岐後に獲得されたと考えられている (Mutte et al., 2018)。

苔類ゼニゴケの再生

苔類がもつ非常に高い再生能は古くから研究されてきた。苔類の葉状体再生には植物ホルモンの添加は必要でなく、葉状体を切断すると切断片の腹側から新たな葉状体が容易に再生する(Kubota et al., 2013; Nishihama et al., 2015; Vöchting, 1885)。ミカヅキゼニゴケ *Lunularia cruciata* において葉状体の再生には頂端メリステムの切除が必要であり、切込を入れるだけでは再生芽の形成が起こらないことが報告されている(LaRue and Narayanaswami, 1957; Vöchting, 1885)。また、頂端を切除した切断片(以降基部側断片と呼ぶ)にのみ再生芽が生じ、頂端を含む切断片(以降頂端側断片と呼ぶ)の切断面には再生芽が形成されることはない(LaRue and Narayanaswami, 1957; Vöchting, 1885)。また、ゼニゴケやミカヅキゼニゴケにおいて、オーキシンを添加すると再生芽形成が阻害されることが報告されている(LaRue and Narayanaswami, 1957; Rota and Maravolo, 1975)。ゼニゴケにおいてオーキシンは求基的に輸送され(Binns and Maravolo, 1972; Gaal et al., 1982)、また主要なオーキシン生合成遺伝子 *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS* (MpTAA) や *YUCCA* (MpYUC2) が頂端で発現していることがわかっている(Eklund et al., 2015)。これらのことから、葉状体再生は頂端由来のオーキシンを介した頂芽優勢によって抑制されると考えられてきた。しかしながら、どのようにオーキシンが再生を制御するのか分子機構についてはまだ明らかになっていない。

先行研究においてゼニゴケの再生過程における細胞・組織学的な観察結果が報告されている。頂端を切除すると基部側断片の腹側表皮細胞の細胞運命の変化が始まり、切断後 24 時間以内に細胞周期が再開し、細胞増殖が始まる(Nishihama et al., 2015)。本研究では、ゼニゴケの葉状体再生過程における細胞周期再開へ至る細胞リプログラミングに対するオーキシンの機能を明らかにすることを目的とした。基部側断片において内生オーキシン量が一時的に低下し、それが引き金となって細胞リプログラミングの鍵となる AP2/ERF 転写因子の発現が誘導され、再生が引き起こされることを明らかにした。

結果

オーキシンはオーキシンスIGNAL伝達を介してゼニゴケ葉状体の再生を抑制する

はじめに、ミカヅキゼニゴケの葉状体の再生が頂芽優勢の原理により制御されるという過去の観察結果(LaRue and Narayanaswami, 1957; Vöchting, 1885) について、当研究室の培養条件下においてゼニゴケにおいても同様の結果がみられるかを調べた。野生型株の 10 日目葉状体において頂端メリステムを含む頂端側を完全に切除すると、全ての基部側の切断片の切り口に再生芽が形成された (図 2A; Nishihama et al., 2015)。一方、頂端部を切り離さずに葉状体に切込だけを入れた場合、60%の葉状体では切込を入れた箇所の腹側に小さな細胞塊様の再生芽が形成され、残りの 40%は全く再生芽が形成されなかった (図 2B)。このことから、ゼニゴケの葉状体再生には頂端部の完全な切除が必要であり、切込だけでは再生芽形成の誘導には不十分であることが示唆され、過去の苔類の再生実験(LaRue and Narayanaswami, 1957; Vöchting, 1885)と同様の結果が得られた。

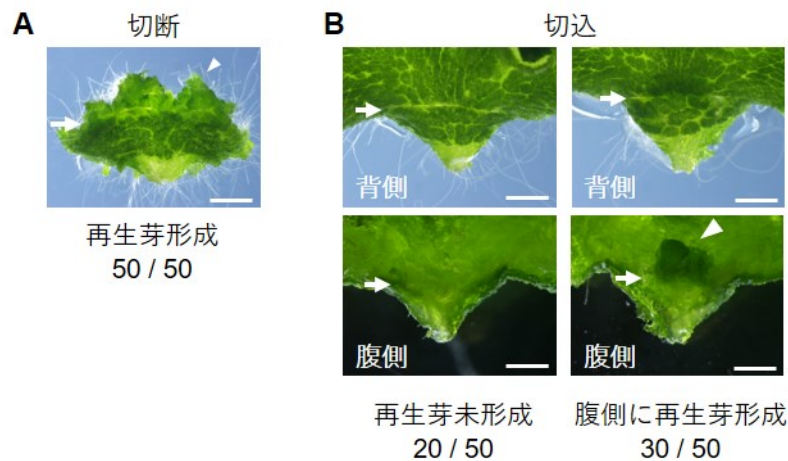


図2 頂端部の切除が誘導するゼニゴケの再生芽形成

野生型株の 10 日目葉状体の頂端メリステムを切除した基部側切断片 (A) および頂端メリステムを切除せずに切込のみ入れた葉状体 (B) を 7 日間培養した。切込を入れた葉状体は背側および腹側の写真を示す。矢尻は再生芽を示す。矢印は切込を入れた箇所を示す。再生芽が形成された割合を下に示す。スケールバーは 2 mm を示す。

次に、苔類の葉状体の再生に対するオーキシンの抑制的な効果(LaRue and Narayanaswami, 1957; Rota and Maravolo, 1975) がゼニゴケにおいてみられるのかを検証するため、3種のオーキシン indole-3-acetic acid (IAA)、1-naphthaleneacetic acid (NAA)、および 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)をゼニゴケの切断片に添加し、再生への影響とその濃度依存性を調べた。野生型株の10日目葉状体を図3で示すように頂端メリステムを含む頂端側断片と含まない基部側断片の2つに切り出した。基部側はさらに両横および基部側の端を切り取り長方形の断片にし、再生の極性を検証することにした。切り出した頂端側および基部側断片を0~10 μM のIAA、NAA、および2,4-D含有培地で7日間培養した(図4)。頂端側断片はオーキシン非存在下では頂端成長を続け、IAA、NAA、および2,4-Dを添加した場合においても、高濃度オーキシン存在下ではやや生育遅延が見られるものの、どの濃度でも頂端成長が続いた(図4)。一方で、オーキシン非含有培地で培養した基部側断片の頂端側の切断面には7日以内に再生芽が形成された(図4)。また、頂端側以外の切断面に再生芽が形成されることはなかった(図4; Nishihama et al., 2015)。対照的に、IAA、NAA、および2,4-Dを添加した場合、基部側断片の再生芽の形成は濃度依存的に抑制されることがわかった(図4)。中でもNAAは最も低濃度で再生芽形成の抑制効果が見られた(図4; 図5A)。1 μM NAA添加によって約80%の基部側断片で再生芽形成が抑制され、残り約20%の断片では非常に小さな再生芽が形成された(図5B)。これらの結果から、過去の苔類の知見(LaRue and Narayanaswami, 1957; Rota and Maravolo, 1975)と同様に、添加したオーキシンはゼニゴケの再生芽形成を抑制することが確認された。また、頂端側断片は頂端成長を続けたことから、今回検証した濃度でのオーキシン処理は葉状体の成長自体を阻害するものではないと考えられた。以降、オーキシン処理は1 μM NAAを用いることにした。

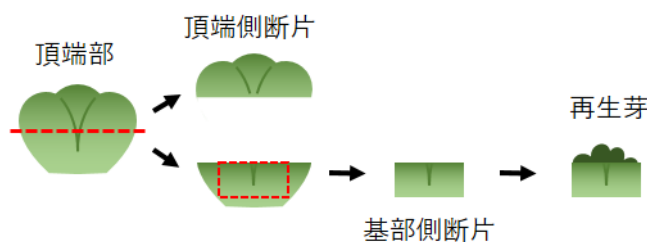


図3 葉状体からの切断片切り出し方法の模式図

葉状体を2つの断片に切り分けた。頂端部を含む半分を頂端側断片として使用した。基部側の半分は図示するようにさらに切り出し、基部側断片として使用した。

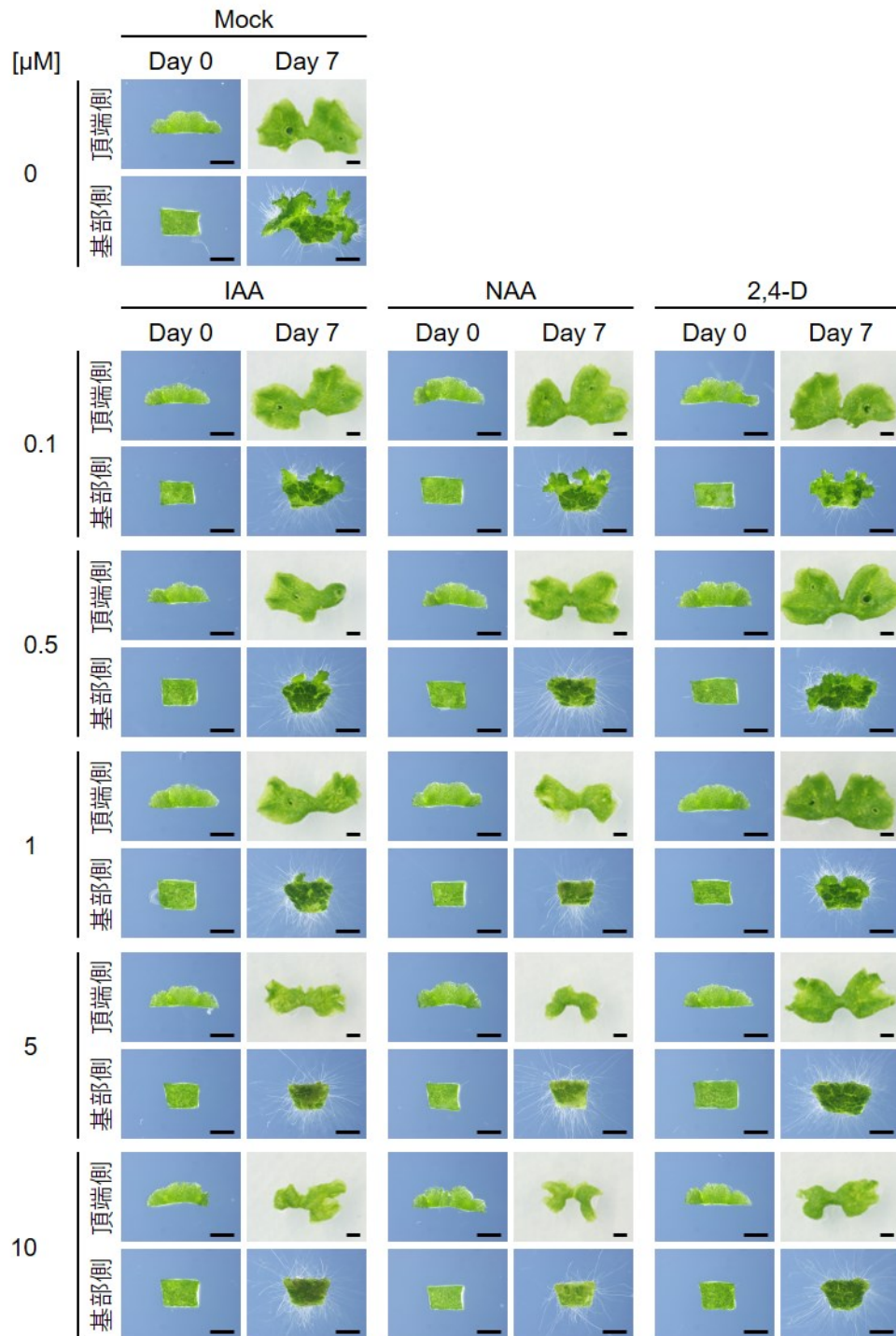


図4 濃度依存的なオーキシンによる再生芽形成抑制効果

野生型株の10日目葉状体より切り出した頂端側および基部側断片を0、0.1、0.5、1、5、および10 μM の IAA、NAA、および 2,4-D 含有培地上で7日間培養した。各区3個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例1個を図に示した。スケールバーは2 mmを示す。

オーキシン添加による再生芽形成の抑制がオーキシン信号伝達経路の転写制御を介するのかを検証するため、ゼニゴケに1分子種存在する転写活性化型 ARF である *MpARF1* の機能欠損株 (Kato et al., 2017) を用いて再生実験を行った。*Mparf1* 機能欠損株より切り出した基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有培地上で培養したところ、NAA 存在下においても再生芽が形成されることがわかった (図 5C)。さらなる検証のため、*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株 (Kato et al., 2015; 詳細は序論を参照) を用いて Dex 依存的にオーキシン信号伝達を抑制した条件で、NAA を添加した再生実験を行った。対照として NAA 存在下で Dex 処理を行わなかった場合は *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株の基部側断片には再生芽が形成されなかったが、Dex 処理をした場合は再生芽が形成された (図 5D)。このとき形成された再生芽は葉状体へと成長することはなかったが、これは *MpIAA^{mDII}* 過剰発現による形態形成阻害効果 (Kato et al., 2015) によると考えられる。これらの結果から、ゼニゴケの切断片に添加したオーキシンはオーキシン信号伝達経路を介して再生芽の抑制効果を発揮することが示唆された。

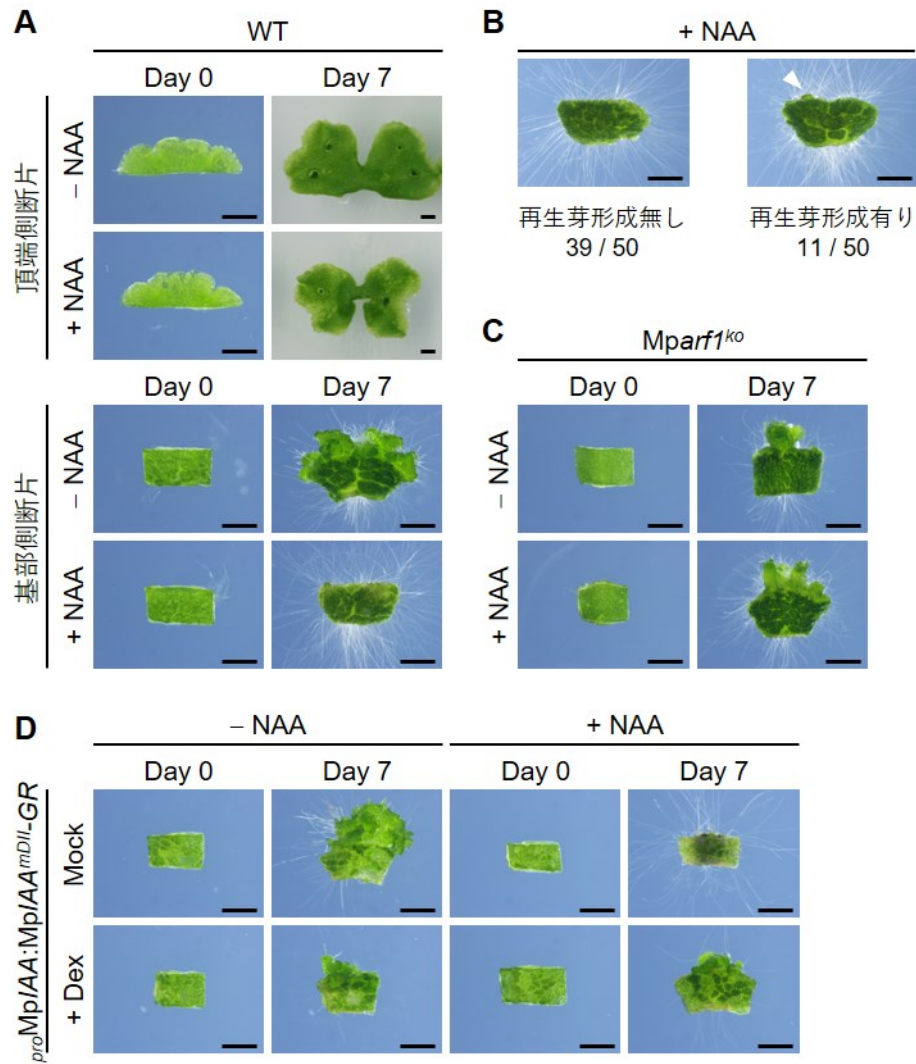


図5 オーキシン信号伝達を介した再生芽形成の抑制

(A) 野生型株 (WT) の 10 日目葉状体から切り出した頂端側および基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有培地上で 7 日間培養した。各区 6 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。(B) 1 μ M NAA 含有培地で 7 日間培養した基部側断片に形成された再生芽の割合を示す。矢尻は再生芽を示す。(C) *Mparf1-4^{ko}* 株の 20 日目葉状体から切り出した基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有培地上で 7 日間培養した。各区 6 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。(D) 誘導的にオーキシン信号伝達を阻害した条件における再生実験。*proMp/IAA:Mp/IAA^{MDII}-GR* 株の 10 日目葉状体より切り出した基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有、かつ 10 μ M デキサメタゾン (Dex) 含有あるいは非含有培地で 7 日間培養した。各区 3 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 2 mm を示す。

オーキシンは再生過程における細胞周期再開を阻害する

ゼニゴケの葉状体再生の初期過程では、G₁ 期で停止していた基部側断片の腹側表皮細胞の細胞周期が速やかに再開し S 期へと移行する(Nishihama et al., 2015)。オーキシンの添加がこの細胞周期再開へ与える影響を調べるため、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)を用いて細胞周期 S 期進入細胞の可視化を試みた。基部側断片を切断して 32 時間後には EdU のシグナルが検出された細胞が顕著に増大した (図 6A; Nishihama et al., 2015)。また、DAPI 染色との二重染色により、EdU のシグナルは核由来であり、細胞周期 S 期に進入した細胞であることを確認した (図 6B)。一方、NAA 含有培地で培養した基部側断片では、切断 80 時間後以降においても S 期に進入した細胞はほとんど検出されなかった (図 6A)。また、切断片当たりの EdU 検出領域の面積を定量した結果、NAA 処理によって S 期に進入した細胞が有意に減少することがわかった (図 6C)。

さらに、被子植物や蘚類で細胞分裂活性化因子として機能することが知られている D タイプサイクリン(Ishikawa et al., 2011; Masubelele et al., 2005)のゼニゴケホモログ *MpCYCD;1* の再生過程における発現量を調べた。定量には頂端側および基部側断片を NAA 含有あるいは非含有培地で培養し、その切断面から幅 1 mm ほどの領域をそれぞれ切り出して採取したサンプルを用いた (図 7)。定量 RT-PCR (qRT-PCR) によって測定した結果、*MpCYCD;1* の発現量は基部側断片でのみ切断 24 時間後以降に大きく上昇し、頂端側断片で発現上昇することはなかった (図 8)。一方で、NAA を添加した場合には、基部側断片の *MpCYCD;1* の発現誘導は有意に抑制されていた (図 8)。この抑制は完全ではなかったものの、細胞周期再活性化に十分な発現量には達していなかった可能性が考えられた。これらの結果から、オーキシンは再生過程における細胞周期再進入の前段階において抑制効果を発揮することが示唆された。

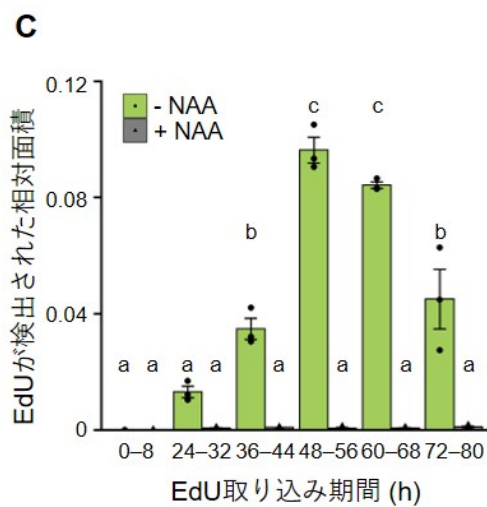
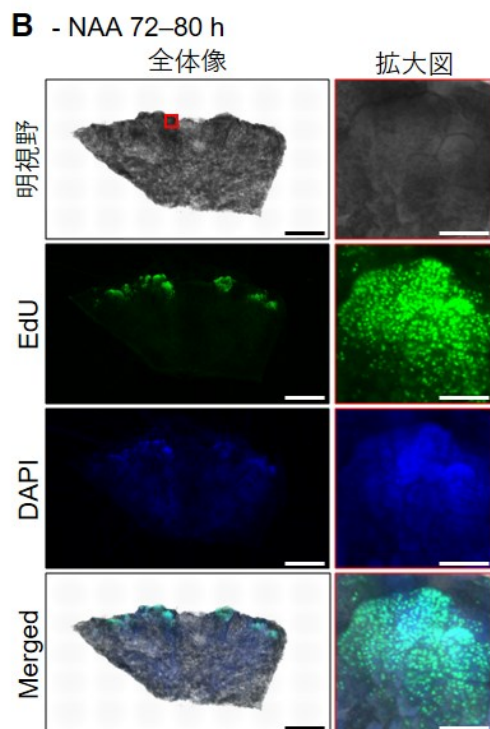
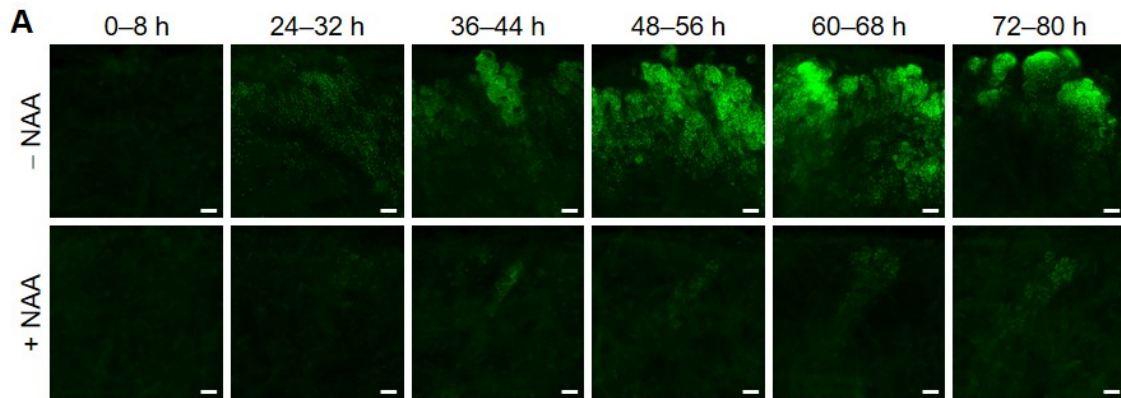


図6 オーキシンによる再生過程の細胞周期再開の阻害

(A, B) EdU アッセイにより細胞周期 S 期に進出した細胞を可視化した。野生型株の基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有培地で培養し、表記した期間において EdU を取り込ませた。頂端を切除した切断面付近の中肋周辺の腹側表皮 (A)、および切断 80 時間後の切断片全体の腹側表皮 (B) の EdU を取り込んだ細胞を Alexa Fluor 488 で検出した (緑色)。DAPI による DNA 染色 (青色)、EdU シグナル、明視野およびすべて重ね合わせた画像を B で示す。また赤色の四角で示す領域の拡大図もともに示す。各区 3 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 100 μ m (A および B の右図)、1 mm (B の左図) を示す。(C) EdU のシグナルが検出された面積の定量結果。1 断片あたりの相対値を示す。バーは \pm SE を示す。バーの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。n = 3。

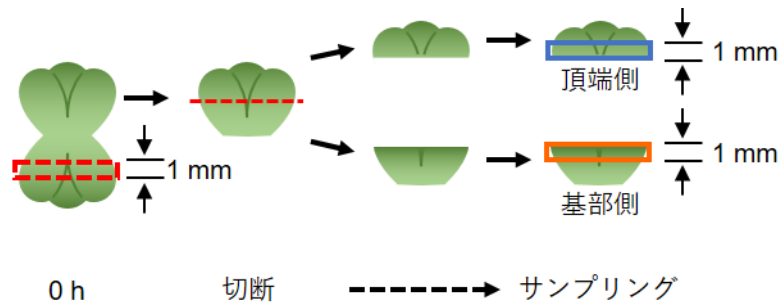


図7 遺伝子発現およびホルモン定量に供したサンプルの採取方法の模式図

10日目葉状体を頂端部を含む断片と含まない断片の2つに切断して培養し、各タイムポイントにおいてそれぞれの断片の切断面から幅1mmほどの領域（青色および橙色で囲った領域）をさらに切り出してサンプリングした。切断0時間のサンプルは葉状体の中央部の幅1mmほどの領域（赤色で囲った領域）を切り出した断片を使用した。

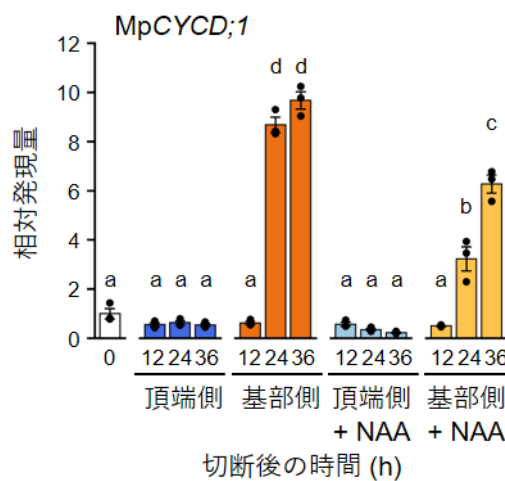


図8 再生過程における **MpCYCD;1** の発現上昇のオーキシシンによる抑制

野生型株の頂端側および基部側断片を $1 \mu\text{M}$ NAA 含有あるいは非含有培地で培養後、図7で示すようにサンプリングし、**MpCYCD;1** の相対発現量を qRT-PCR によって定量した。**MpEF1** を内部標準として使用した。バーは \pm SE を示す。バーの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。 $n = 3$ 。

ゼニゴケの再生過程において内生オーキシニン量が一過的に減少する

オーキシニン添加が再生抑制効果をもたらすことから、再生過程において頂端側および基部側断片内における内生オーキシニン量の変動が起こる可能性が考えられた。そこで、葉状体切断後の切断面領域（図7と同様に採取）における内生オーキシニン IAA の定量を行った。その結果、基部側断片では IAA 濃度が切断3時間後までに 43.4 pmol/g fresh weight (gFW) から 14.5 pmol/gFW にまで急激に減少し、その後24時間後までに元の内生量にまで回復していった（図9A）。対照的に、頂端側断片では IAA 濃度は切断12時間後までに 21.2 pmol/gFW まで減少したものの、基部側断片と比較すると減少は緩やかであり大きくはなかった（図9A）。この結果から、基部側断片における一過的な内生 IAA 量の減少が再生過程の開始に関わることが示唆された。

内生 IAA 量の減少がオーキシニン応答性遺伝子の発現と相関するのかを調べるため、MpARF1 依存的にオーキシニンによって発現誘導される遺伝子 MpWIP (Kato et al., 2017) の再生過程における発現変動を qRT-PCR によって定量した。MpWIP の発現量は基部側断片において切断3時間後に有意に減少し、その後ある程度発現量が上昇した（図9B）。さらに、NAA 処理によって頂端側、基部側断片ともに MpWIP の発現量が上昇した（図9B）。これらの結果から、基部側断片においては、内生 IAA 量の急激な減少と一致して、オーキシニン誘導性遺伝子の発現低下も起こることが明らかになった。

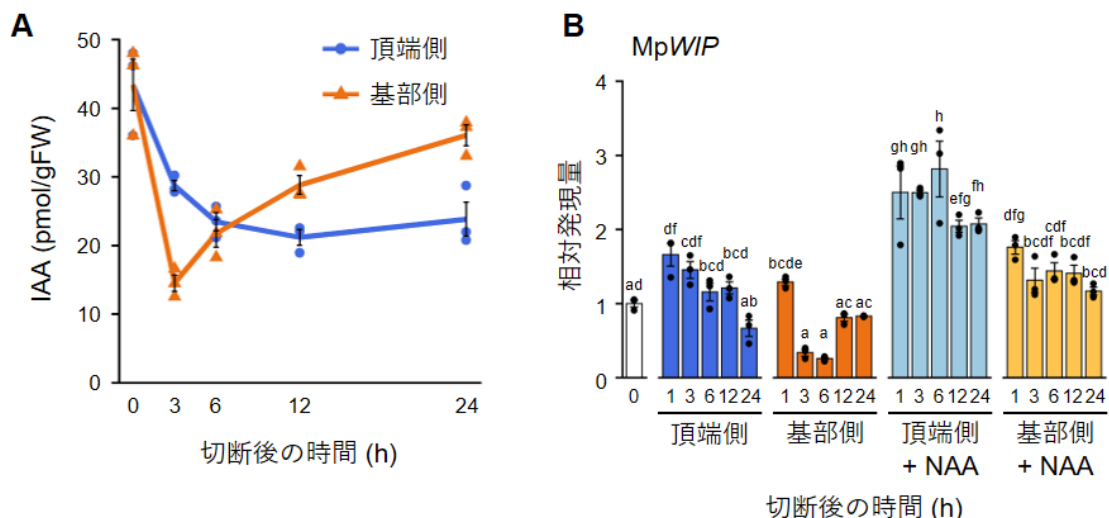


図9 基部側断片における一過的な内生オーキシニン量の低下

(A) 内生 IAA 量の定量結果。野生型株の頂端側および基部側断片の切断面領域を図7で示すようにサンプリングし、IAA 濃度を定量した。バーは±SE を示す。n=3。(B) 野生型株の頂端側および基部側断片を 1 μM NAA 含有あるいは非含有培地で培養後、図7で示すようにサンプリングし、MpWIP の相対発現量を qRT-PCR により定量した。MpEF1 を内部標準として使用した。バーは±SE を示す。バーの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において P<0.05 で有意差のあるグループを示す。n=3。

基部側断片における切断後の内生オーキシン量の減少がオーキシン生合成遺伝子の発現変動によるものなのかを調べるため、ゼニゴケのオーキシン生合成遺伝子 *MpTAA* および *MpYUC2* の発現量を定量した。qRT-PCR の結果、*MpTAA* の発現量は基部側断片において切断3時間後に一過的に減少し、その後上昇していた (図 10A)。一方で *MpYUC2* の発現は基部側断片で減少することなく、経時的に上昇していた (図 10B)。このことから、*MpTAA* の発現変動は基部側断片における内生 IAA 量の変動に部分的に寄与している可能性が考えられたが、*MpTAA* および *MpYUC2* の発現量はともに頂端側断片においても一過的に減少していたことから (図 10A,B)、生合成遺伝子の発現変動だけでは内生 IAA 量の変動を説明することはできない結果となった。

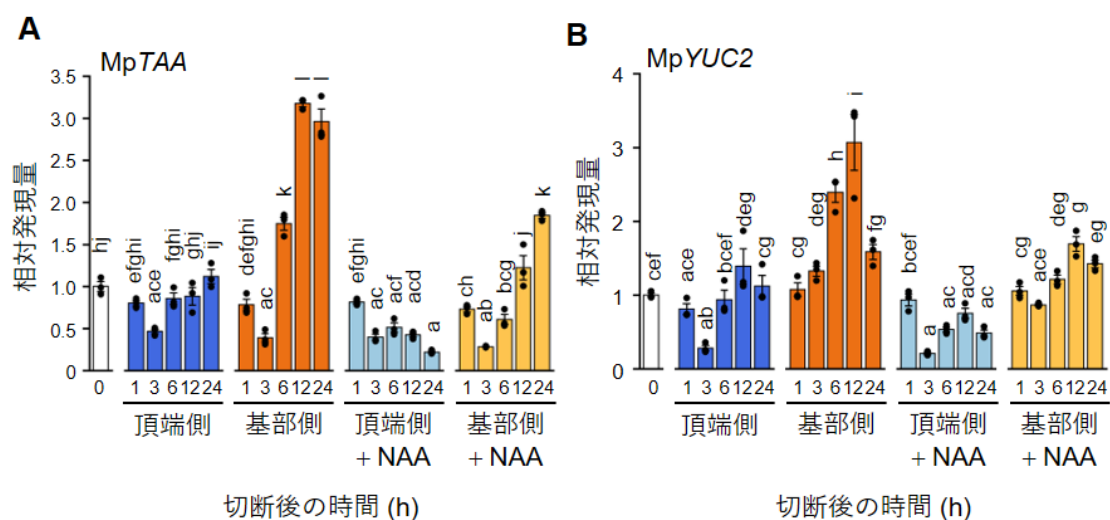


図 10 再生過程におけるオーキシン生合成遺伝子の発現変動

野生型株の頂端側および基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有培地で培養後、図 7 で示すようにサンプリングし、*MpTAA* (A) および *MpYUC2* (B) の相対発現量を qRT-PCR により定量した。*MpEF1* を内部標準として使用した。バーは \pm SE を示す。バーの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。 $n = 3$ 。

再生過程における経時的トランスクリプトーム解析

再生過程における遺伝子発現動態を調べるため、野生型株の頂端側および基部側断片の切断面領域を図 7 と同様に採取したサンプルを用いて切断 24 時間後までの経時的な RNA-seq 解析を行った。主成分分析の結果から、切断 1 時間後には既に頂端側および基部側断片との間で転写応答が異なることがわかった (図 11A)。クラスタリング解析から 4 つのクラスター (C1–C4) に分かれることがわかった (図 11B)。Gene ontology (GO) 解析 (図 12) により、C1 には切断 24 時間までの間で基部側でのみ発現が上昇する 1,801 遺伝子が含まれており、翻訳や細胞分裂などに関わる遺伝子が濃縮されていた。C2 には頂端側、基部側断片ともに切断後直ちに発現上昇するストレス応答に関与するような 877 遺伝子が含まれていた。C3 には頂端、基部側断片ともに減少し、その減少幅が基部側でより大きい 1,281 遺伝子が含まれており、光合成に関与する遺伝子が多く含まれていた。C4 には頂端側断片でやや上昇し基部側断片でやや減少する 224 遺伝子が含まれていたが、どの GO タームも濃縮されなかった。

また、NAA 処理をした基部側断片についても同様に RNA-seq 解析を行った。主成分分析の結果から、NAA 処理によって切断 6 時間までに転写応答に差が生じていることがわかった (図 11A)。またフィッシャーの正確確率検定では、基部側においてオーキシン制御遺伝子の発現が減少傾向にあることがわかり、上記 MpWIP の基部側断片における発現低下 (図 9B) と一致する結果であった (図 11C)。これらの結果から、オーキシン制御遺伝子の発現パターンの差が頂端側と基部側断片との再生芽形成能の差を生む可能性が示唆された。

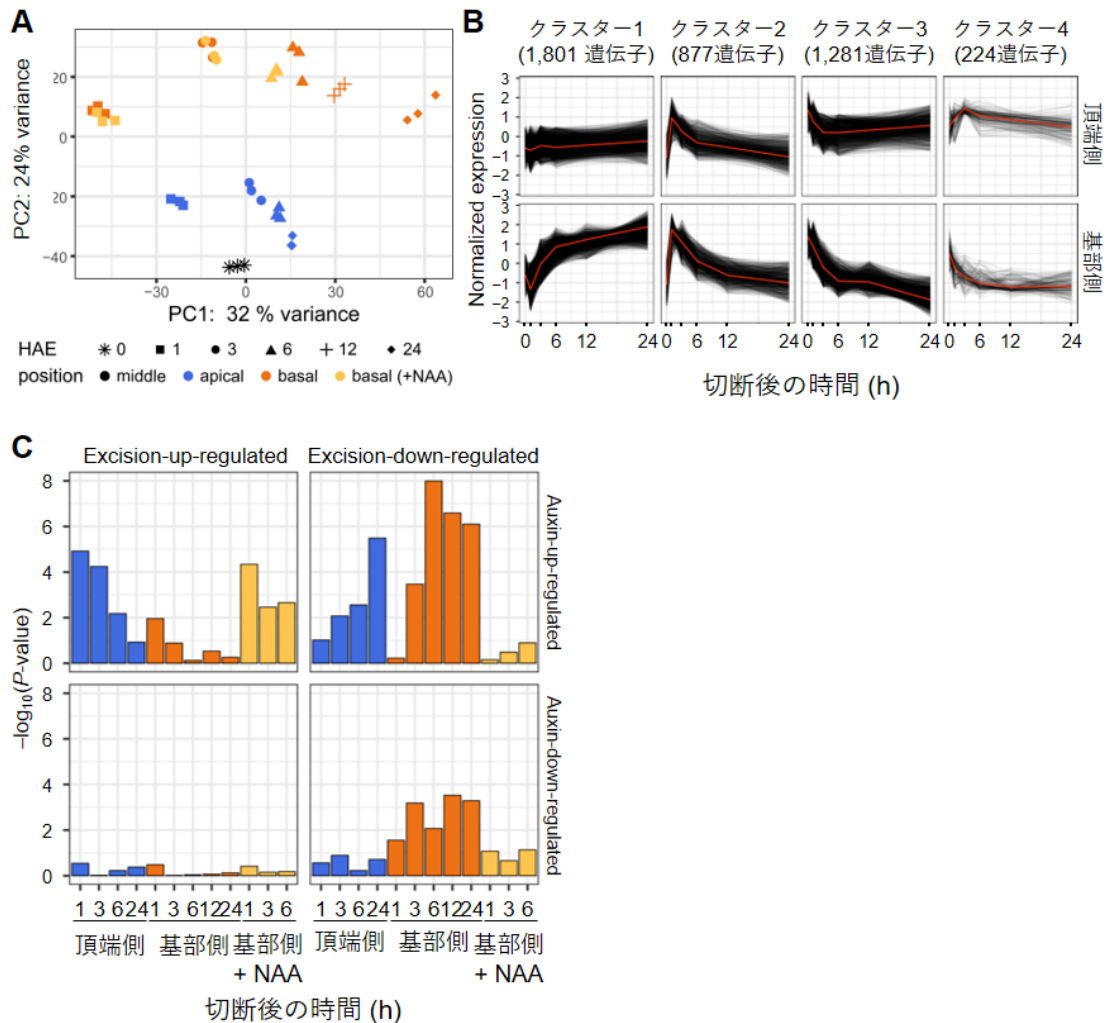


図 11 再生過程における経時的なトランスクリプトーム解析

(A) 主成分分析の結果。主成分分析により切断からの時間 (hours after excision; HAE)、切断片の種類、および NAA 処理による遺伝子発現プロファイルへの影響を可視化した。各サンプルにおける第一主成分および第二主成分 (PC1 および PC2) を示す。(B) 頂端側および基部側断片のタイムコース RNA-seq データのクラスタリング解析。(C) フィッシャーの正確確率検定。基部側断片においてオーキシンの制御を受ける遺伝子が切断 0 時間と比較して発現が抑制される傾向にあることを $P\text{-values}$ で示す。Mutte et al. (2018) によって報告された葉状体への 1 時間の 2,4-D 処理によって発現変動した遺伝子をオーキシン応答遺伝子として使用した。(鈴木秀政博士による解析結果)

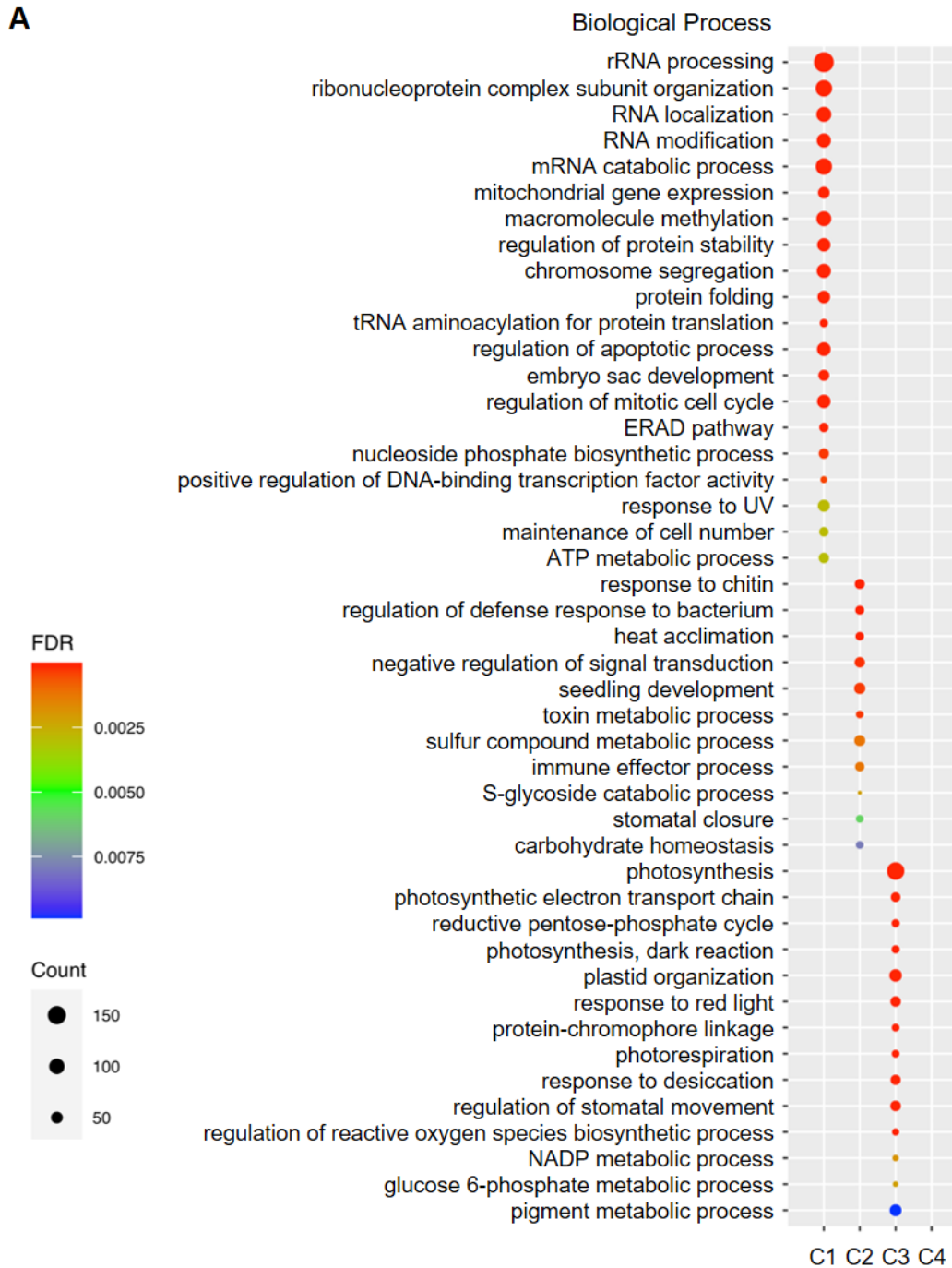


図 12 各クラスターの **Gene ontology** 解析

(A) 図 11B で示した C1–C4 各クラスターの **Biological Process** の濃縮された **GO** タームを示す。False discovery rate (FDR; カラーコード)の順に **GO** タームを示す。円のサイズは各クラスター内の遺伝子数を示す。(鈴木秀政博士による解析結果)

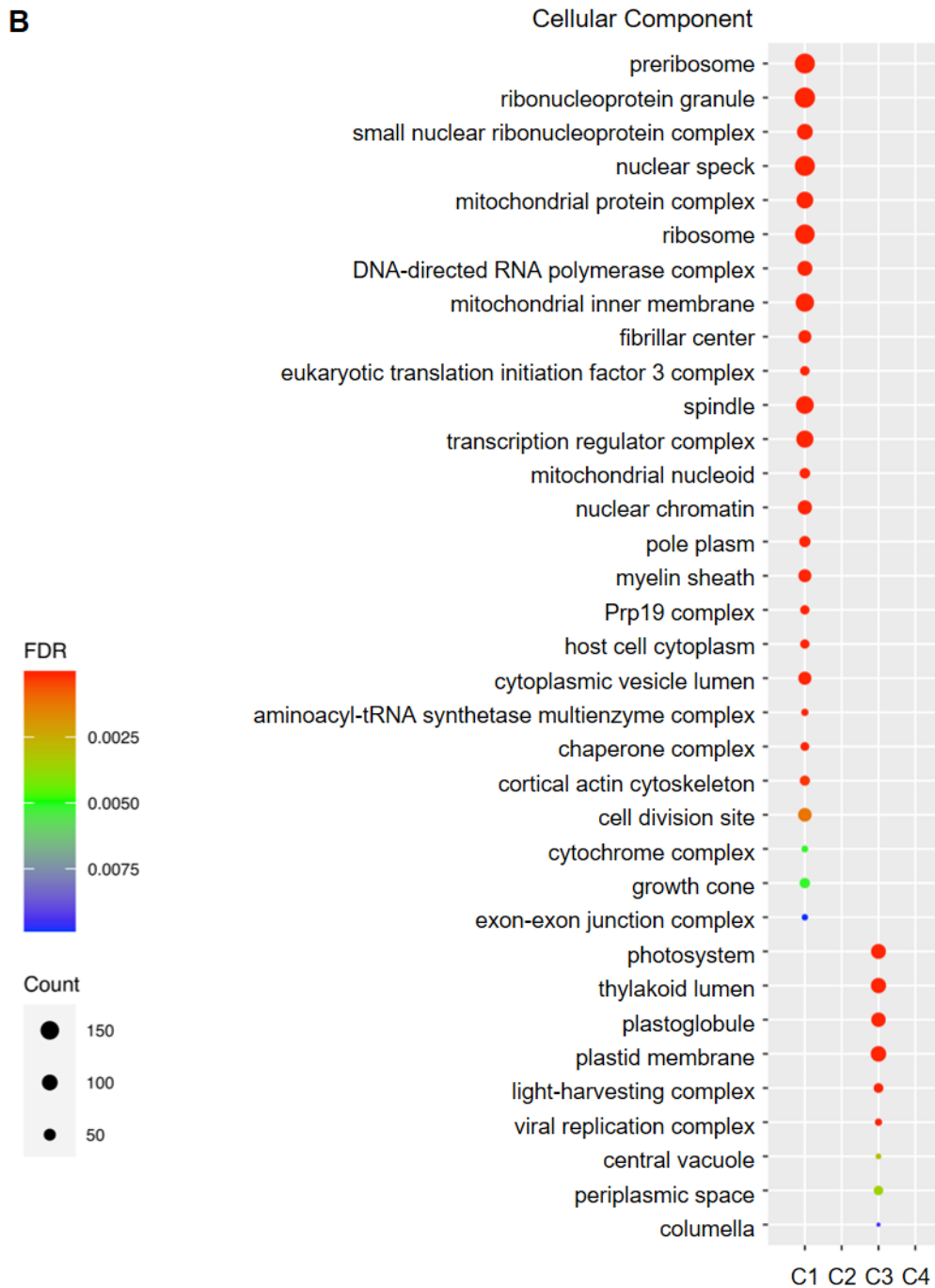


図 12 各クラスターの **Gene ontology** 解析 (続き)

(B) 図 11B で示した C1–C4 各クラスターの Cellular Component の濃縮された GO タームを示す。FDR の順に GO タームを示す。円のサイズは各クラスター内の遺伝子数を示す。(鈴木秀政博士による解析結果)



図 12 各クラスターの **Gene ontology** 解析 (続き)

(C) 図 11B で示した C1–C4 各クラスターの **Molecular Function** の濃縮された GO タームを示す。FDR の順に GO タームを示す。円のサイズは各クラスター内の遺伝子数を示す。(鈴木秀政博士による解析結果)

基部側断片において低オーキシシンレベルに応じて発現誘導される転写因子 *MpLAXR* の同定

細胞のリプログラミングを引き起こす鍵となる遺伝子を同定するため、上記トランスクリプトーム解析を用いて絞り込みを行った。まず、基部側断片の内生オーキシシン量の減少がみられた (図 9A) 切断 3 時間後において、基部側断片における発現量が NAA を添加条件よりも非添加条件の方が高い遺伝子を探索した。そのうち 29 遺伝子が、基部側断片でのみ発現が上昇する C1 にも含まれることを見出した (図 13; 表 1)。これら 29 遺伝子の中で唯一転写因子をコードすると予測された *MpERF20* に着目した。

MpERF20 は AP2/ERF 転写因子をコードしており、シロイヌナズナの *ESR1/DRN* や *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2/DORN RÖSCHEN-LIKE (ESR2/DRNL)*、*PUCHI* 等が含まれるクラス VIII b に属していた (図 14; Bowman et al., 2017; Chandler, 2018)。シロイヌナズナの *ESR1* はシュート再生の鍵となる因子であることが報告されており (Banno et al., 2001)、系統的に近い *MpERF20* が再生に関与する可能性が考えられ、解析を行うことにした。

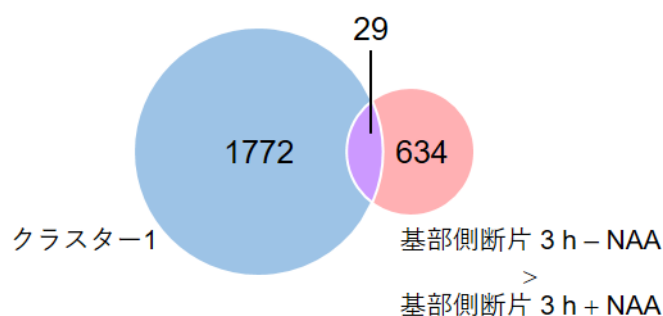


図 13 再生特異的に発現しオーキシシンが発現上昇を抑制する遺伝子の同定

クラスター1 に含まれ、かつ切断 3 時間後において NAA 処理によって発現上昇が抑制された遺伝子を示したベン図。(鈴木秀政博士による解析)

表1 再生特異的に発現しオーキシンが発現上昇を抑制する 29 遺伝子のリスト

| Gene ID | Annotation |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Mp1g08290 | Stay green protein, chloroplastic-related |
| Mp1g12380 | pre-mRNA-processing factor 8-related |
| Mp1g12930 | Golgi to ER traffic protein 4 homolog |
| Mp1g20620 | DNA topoisomerase type II; C-term missing |
| Mp1g21710 | ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD8-related |
| Mp2g00570 | Large subunit ribosomal protein L23Ae |
| Mp2g09050 | Exportin-5 |
| Mp2g15930 | Mannose-6-phosphate isomerase / Phosphomannose isomerase |
| Mp3g13670 | Glycosyltransferase stello1-related |
| Mp3g17870 | Cytochrome P450 family protein |
| Mp3g21390 | Ubiquitin-conjugating enzyme; N-term missing; C-term missing |
| Mp4g00240 | Histidine triad (HIT) family protein |
| Mp4g02260 | ATP-dependent RNA helicase; CCCH zinc finger-containing protein |
| Mp4g11270 | V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit A |
| Mp4g14100 | Polyketide/Chalconesynthase |
| Mp4g18440 | Organic acid biosynthesis and exudation |
| Mp4g20810 | UBX domain containing protein |
| Mp5g01230 | Guanylate-binding protein, N-terminal domain |
| Mp5g06970/MpERF20 | AP2/ERF transcription factor |
| Mp6g05510 | Glycosyl hydrolase family 10 |
| Mp6g15950 | Phosphoinositide phosphatase SAC9-related |
| Mp6g18410 | ABC transporter |
| Mp6g18980 | Transmembrane amino acid transporter protein |
| Mp7g04100 | Glutathione S-transferase |
| Mp7g07050 | PDDEXK-like family of unknown function |
| Mp7g08080 | Ubiquitin-activating enzyme E1 |
| Mp7g09640 | Protein phosphatase |
| Mp7g18470 | Unknown |
| Mp8g00700 | Phosphatidylinositol phospholipase C, delta (PLCD) |

VIII

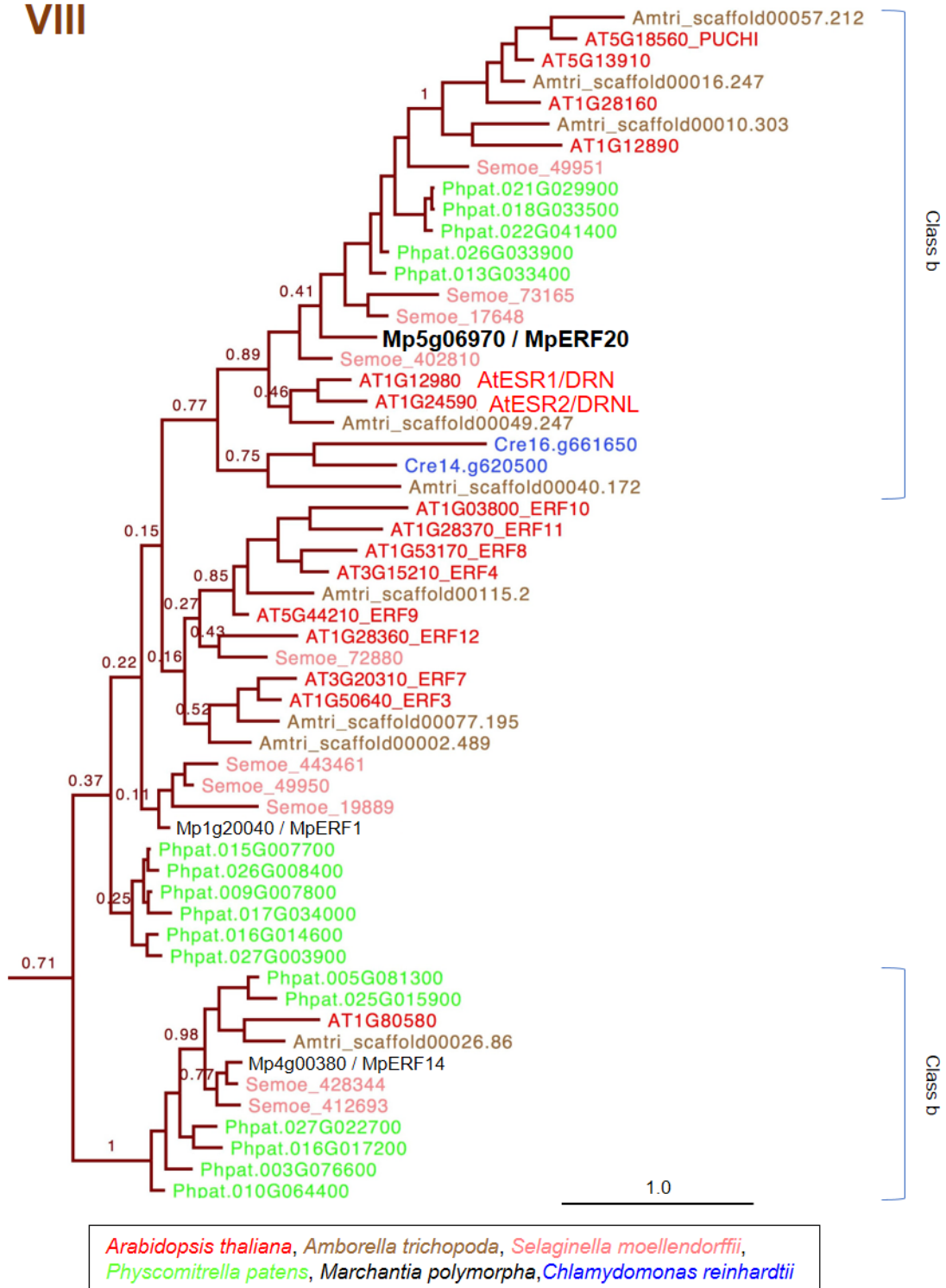


図 14 AP2 ドメイン部分のアミノ酸配列に基づいた AP2/ERF 転写因子ファミリークラス VIII の系統樹

Bowman et al., 2017 を改変。系統樹内の数字は事後確率を、バーはアミノ酸の置換率を示す。

MpERF20の再生過程における発現変動をqRT-PCRによって確認したところ、切断後基部側断片でのみ大きく発現上昇し、頂端側断片では発現上昇は見られなかった(図15)。また、NAAの添加によって部分的ながら有意に発現上昇が抑制された(図15)。このことから、MpERF20は基部側断片特異的に発現上昇し、オーキシン添加により発現上昇が抑制される遺伝子であることが示唆された。

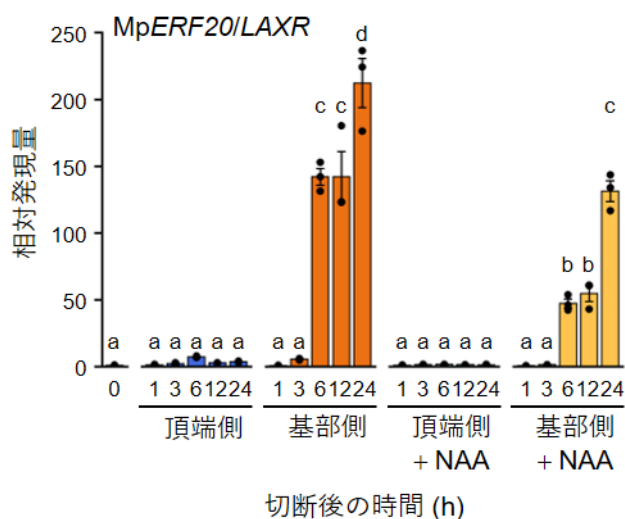


図15 頂端切除により誘導される転写因子 **MpERF20/LAXR** の同定

野生型株の頂端側および基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有培地で培養後、図7で示すようにサンプリングし、MpERF20/LAXR (再命名について後述) の相対発現量を qRT-PCR により定量した。MpEF1 を内部標準として使用した。バーは \pm SE を示す。バーの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。n = 3。

植物の再生過程では、AP2/ERF ファミリーに属する複数の転写因子が関与することが報告されていることから、ゼニゴケの再生過程における *MpERF20* を含む AP2/ERF 転写因子遺伝子の発現変動について、上述の RNA-seq データを用いて解析した。ゼニゴケがもつ 30 の AP2/ERF 転写因子のうち 24 遺伝子の転写産物が検出された (図 16)。その中で、*MpERF9* (Mp4g17430)、*MpERF15* (Mp7g09350)、および *MpERF21* (Mp5g22160) は切断 1 時間後に頂端側、基部側断片ともに大きく発現が上昇していた (図 16)。これらは *MpERF20* とは異なり、NAA による発現誘導の抑制は受けていなかった (図 16)。また、シロイヌナズナにおいて傷害誘導的に発現上昇する *WIND1* に最も近縁なゼニゴケの *MpERF2* (Mp7g13760) の大きな発現変動は検出されなかった (図 16)。これらの結果から、いくつかの AP2/ERF 転写因子は傷シグナルに応答して発現誘導され、ゼニゴケの *MpERF2* はシロイヌナズナの *WIND1* とは異なる機能をもつことが示唆された。また、これら 24 の AP2/ERF 転写因子のうち *MpERF20* のみが基部側特異的な発現上昇を示しており、再生過程特異的に機能する可能性が示唆された。

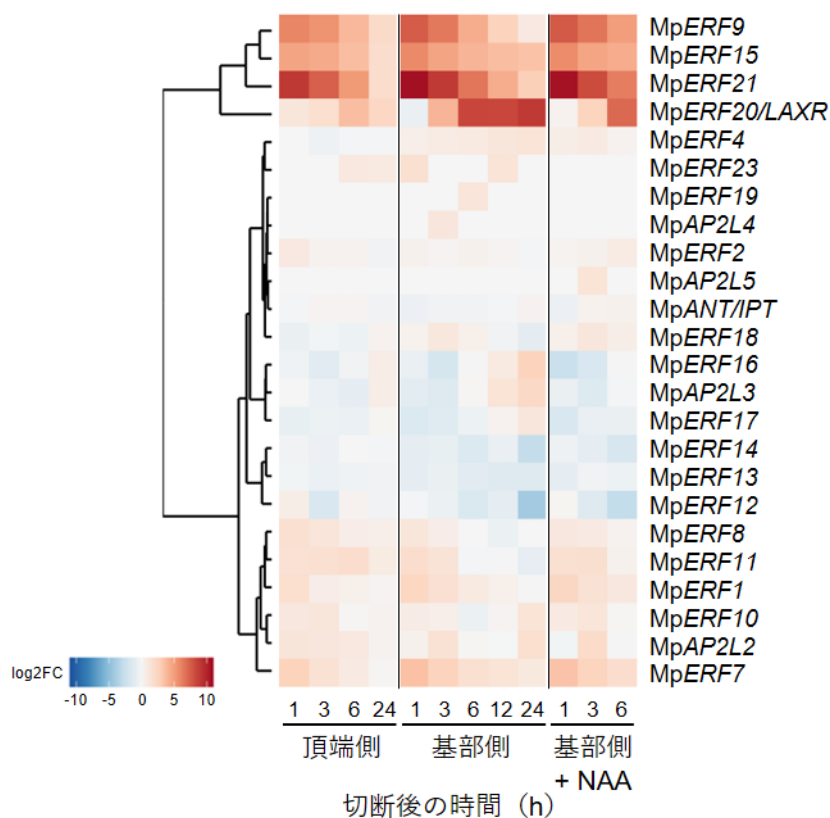


図 16 AP2/ERF 転写因子ファミリーの切断後の発現変動

ゼニゴケの AP2/ERF ファミリーに属する 30 遺伝子のうち、24 遺伝子の発現パターンをヒートマップで示す。残りの 6 遺伝子の転写産物は検出されなかった。(鈴木秀政博士による解析)

MpERF20 の低オーキシン応答性の検証

仮に MpERF20 が再生において重要な機能をもつのであれば、内生オーキシン量の減少に応答して発現が誘導される可能性があるのではないかと考えた。そこで、傷シグナルによる影響を排除するために切断はせず、無傷の無性芽にオーキシン生合成阻害剤 4-phenoxyphenylboronic acid (PPBo) (Kakei et al., 2015)、yucasin (Nishimura et al., 2014)、および L-kynurenine (He et al., 2011) を与えて MpERF20 の発現を定量した。その結果、オーキシン生合成阻害剤処理によって MpERF20 の発現は有意に上昇することがわかった (図 17A; 岩木 2019 学士論文)。また、*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株を用いて Dex 誘導的なオーキシン信号伝達の抑制が MpERF20 の発現に及ぼす影響を調べた。10 日目の *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株葉状体を Dex 処理し、qRT-PCR によって発現量を定量したところ、Dex 処理によって MpERF20 の発現が有意に上昇した (図 17B)。これらの結果から、MpERF20 はオーキシン生合成ならびに信号伝達の低下に応答して発現が上昇する遺伝子であることが示唆された。そこで、MpERF20 を *LOW-AUXIN RESPONSIVE (MpLAXR)* と再命名した。

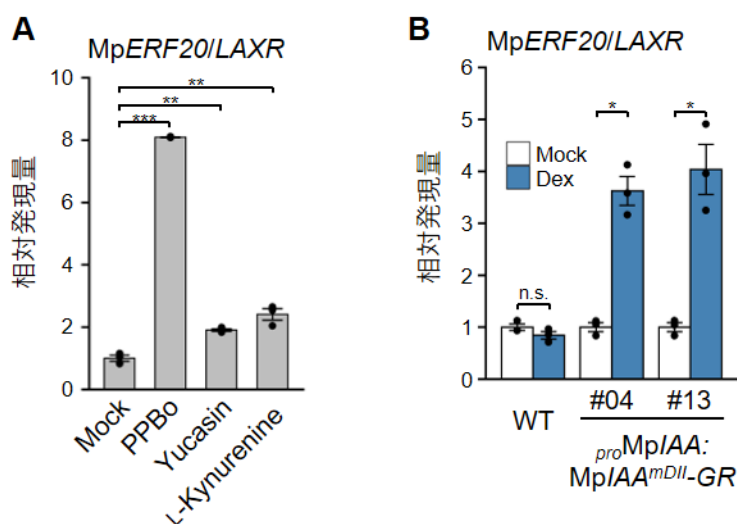


図 17 オーキシンレベルの低下に応じて **MpERF20/LAXR** は誘導される

(A) 野生型株の無性芽をオーキシン生合成阻害剤 (10 μ M PPBo, 10 μ M yucasin, および 100 μ M L-kynurenine) とともに 3 日間培養し、MpERF20 の相対発現量を qRT-PCR により定量した。MpEF1 を内部標準として使用した。バーは \pm SE を示す。アスタリスク (**および***) は Welch's two-tailed paired t-tests による有意水準 $P < 0.01$ および $P < 0.001$ を示す。 $n = 3$ 。(B) 野生型株 (WT) および *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株 (#04 および #13) の 10 日目葉状体を 10 μ M Dex 処理を 12 時間行い、MpERF20/LAXR の相対発現量を qRT-PCR により定量した。MpEF1 を内部標準として使用した。バーは \pm SE を示す。アスタリスク (*) は Welch's two-tailed paired t-tests による有意水準 $P < 0.05$ を示す。 $n = 3$ 。

再生過程における *MpLAXR* の時空間的な発現解析

再生過程における *MpLAXR* の時空間的な発現パターンを調べるため、核移行シグナル (NLS) を融合した *tdTomato* 蛍光タンパク質を *MpLAXR* プロモーター制御下で発現するレポーター株を作成した (*proMpLAXR:tdTomato-NLS*)。切断直後にはレポーター株の切断片腹側の切断面付近で蛍光シグナルは検出されなかった (図 18, 0 h)。観察を続けた結果、切断 12 時間に切断片の頂端側切断面寄りの中肋付近で蛍光が観察され始めた (図 18, 12 h)。さらに切断 24 時間後にはシグナルが中肋の周辺でも検出された (図 18, 24 h)。一方で、NAA 存在下では蛍光シグナルはほとんど検出されなかった (図 18)。これらの結果から、基部側断片の中肋付近において、*MpLAXR* は切断誘導的に、またオーキシンによって抑制的に発現制御されることが示唆された。また、再生芽形成は中肋付近で生じることから (Nishihama et al., 2015; Vöchting, 1885)、*MpLAXR* がその過程に寄与する可能性が示唆された。

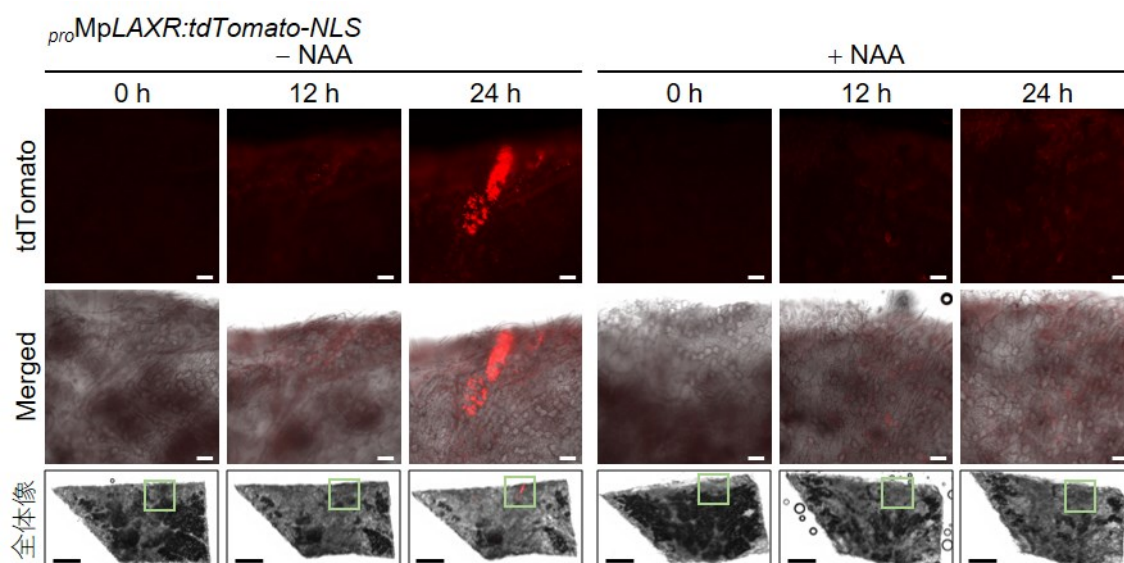


図 18 基部側断片における *MpLAXR* の経時的発現解析

proMpLAXR:tdTomato-NLS 株の 10 日目葉状体より切り出した基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有培地で培養し、経時的に観察した。切断片全体の *tdTomato* 蛍光写真と明視野を merge した画像 (下段) と、緑色で囲った領域を拡大した *tdTomato* 蛍光写真 (上段) および明視野と Merge した画像 (中央) を示す。各区 3 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 100 μ m (上段および中央)、1 mm (下段) を示す。

MpLAXR 機能欠損は再生過程における細胞周期を遅延させる

MpLAXR の機能が再生に必要であるかを調べるため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集によって MpLAXR ゲノム編集株を作出した (図 19A, B)。Mp*laxr* 変異体の葉状体発生を観察したところ、野生型株と比較してわずかな生育阻害を示した (図 20A)。また、葉状体面積定量結果から、変異体の葉状体サイズは野生型株と比較して有意に低下していたことがわかった。この Mp*laxr* 変異体の葉状体サイズ減少の表現型は、CRISPR 耐性の同義置換変異を導入した MpLAXR ゲノム断片 (gMpLAXR*resist*) を導入すると部分的に相補されたことから、MpLAXR の変異は葉状体の成長遅延を引き起こすことが明らかになった (図 20A, B)。

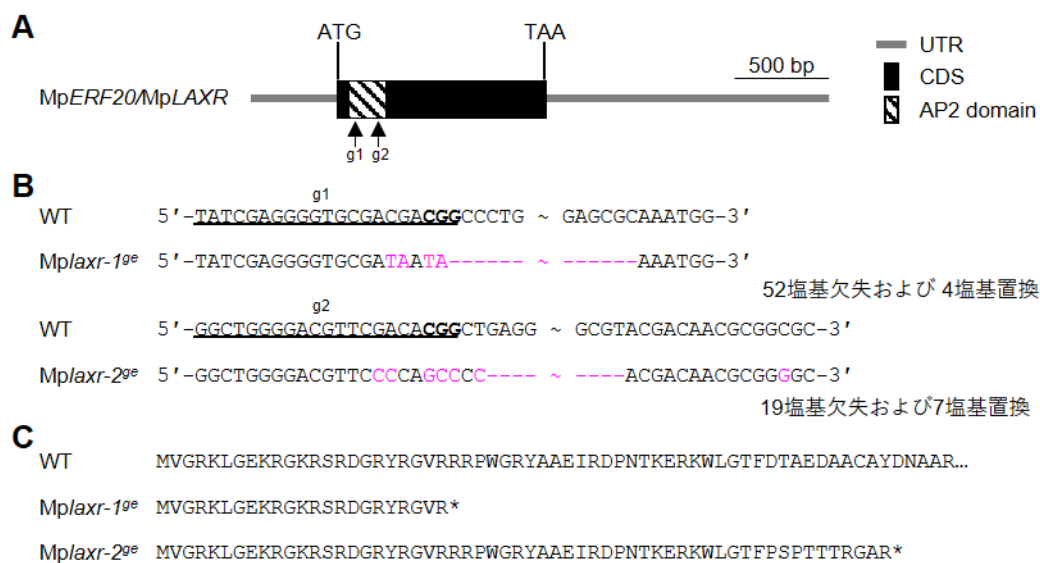


図 19 Mp*laxr* 変異体の作出

(A) MpLAXR 遺伝子座を模式的に示す。矢印 (g1、g2) は CRISPR/Cas9 ゲノム編集による Mp*laxr*-1^{oe} 変異体および Mp*laxr*-2^{oe} 変異体作出に使用した gRNA ターゲットサイトをそれぞれ示す。(B) MpLAXR 遺伝子座の塩基配列を示す。gRNA 標的配列を下線で、PAM 配列を太字で示す。変異の詳細は右側に示す。(C) 予測されたアミノ酸配列を示す。

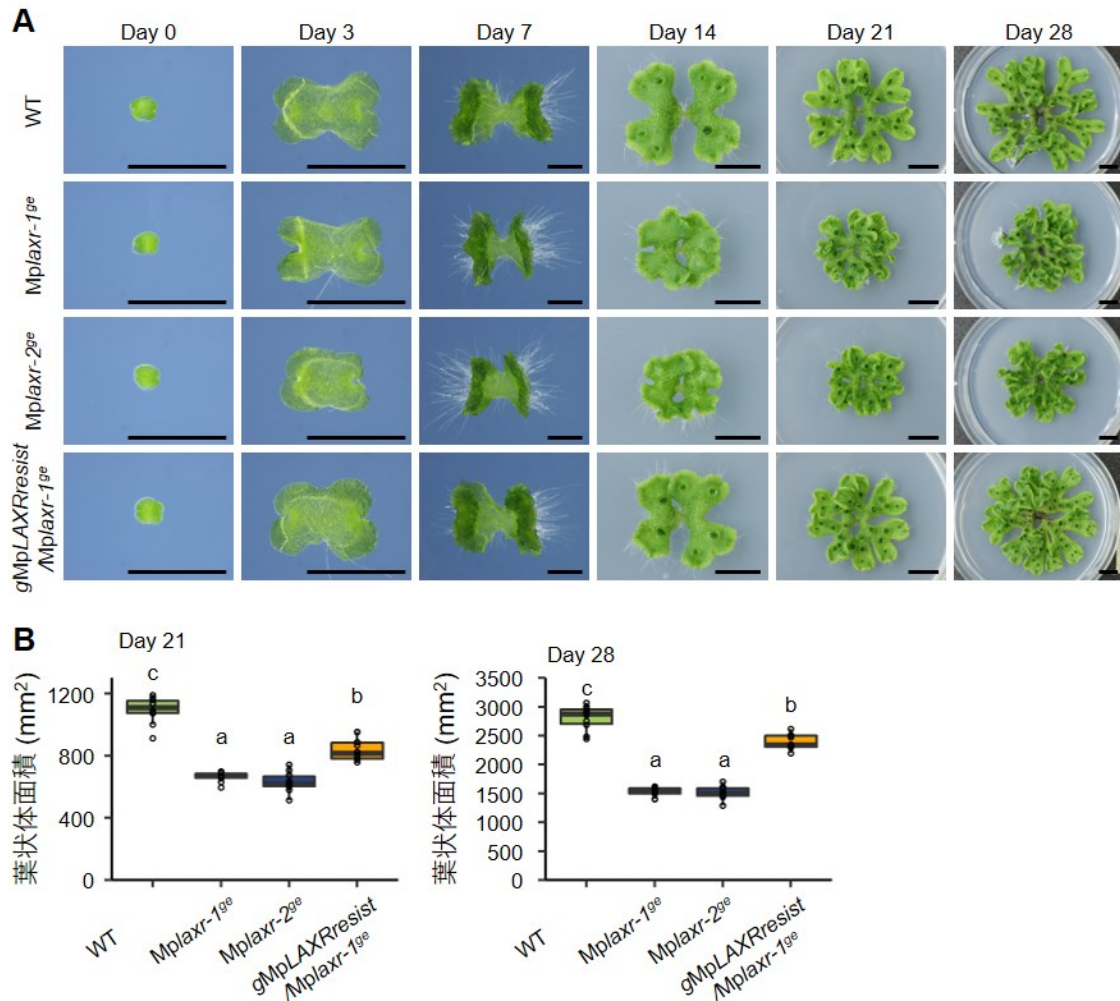


図 20 **Mplaxr** 変異による成長遅延

(A) 野生型株 (WT)、*Mplaxr-1^{ge}* 株、*Mplaxr-2^{ge}* 株、および *gMpLAXRresist/Mplaxr-1^{ge}* 株の無性芽を 28 日間生育させた。各株 10 個体について観察を行い、そのうちの代表例 1 個体を図に示した。スケールバーは 2 mm (Day 0-7)、10 mm (Day 14-28) を示す。(B) 生育 21 および 28 日目の WT、*Mplaxr-1^{ge}*、*Mplaxr-2^{ge}*、および *gMpLAXRresist/Mplaxr-1^{ge}* 株の葉状体の面積定量結果。ボックスの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。 $n = 10$ 。

次に、*Mplaxr* 変異体の葉状体を用いて再生実験を行った。*Mplaxr* 変異体は野生型株と比較して著しい再生芽の成長遅延を示した (図 21A)。再生芽の面積定量結果からも、*Mplaxr* 変異体の再生芽の面積が野生型株と比較して有意に減少することがわかった (図 21B)。また、*gMpLAXRresist* 導入により再生芽の成長遅延の表現型は完全に相補された (図 21A,B)。これらの結果から、*MpLAXR* の変異は再生芽の形成および成長を大きく阻害することが明らかになった (図 21A, B)。また、*gMpLAXRresist* 導入による相補の程度が葉状体成長と再生芽形成との間で差があったことから、二つの過程で要求される *MpLAXR* の厳密な発現量制御に差があるものと考えられた。

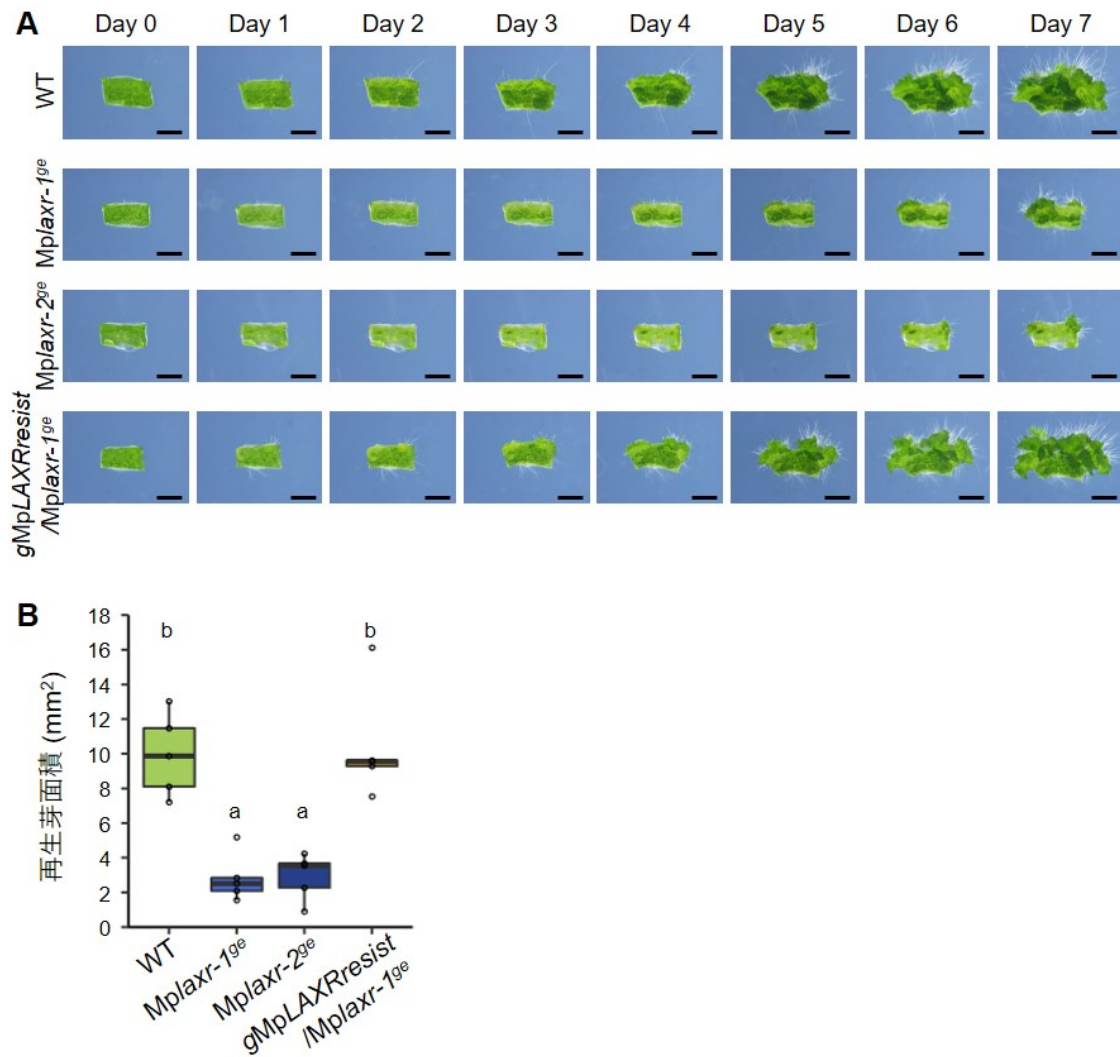


図 21 *Mplaxr* 変異による再生芽の成長遅延

(A) 野生型株 (WT)、*Mplaxr-1^{ge}* 株、*Mplaxr-2^{ge}* 株、および *gMpLAXRresist*/*Mplaxr-1^{ge}* 株の基部側切断片を 7 日間経時的に観察した。各株 5 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 2 mm を示す。(B) 培養 7 日目の WT、*Mplaxr-1^{ge}*、*Mplaxr-2^{ge}*、および *gMpLAXRresist*/*Mplaxr-1^{ge}* 株の再生芽の面積定量結果。ボックスの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。 $n = 5$ 。

Mplaxr 変異体における再生初期過程での細胞周期再開頻度を調べるため、EdU アッセイを行った。どのタイムポイントにおいても、*Mplaxr* 変異体の基部側断片において EdU シグナルが検出された細胞は、野生型株と比較して大きく減少していた (図 22A)。EdU シグナルが検出された面積定量の結果からも、*Mplaxr* 変異体では切断後に細胞周期 S 期に進入する細胞が有意に減少することがわかった (図 22B)。

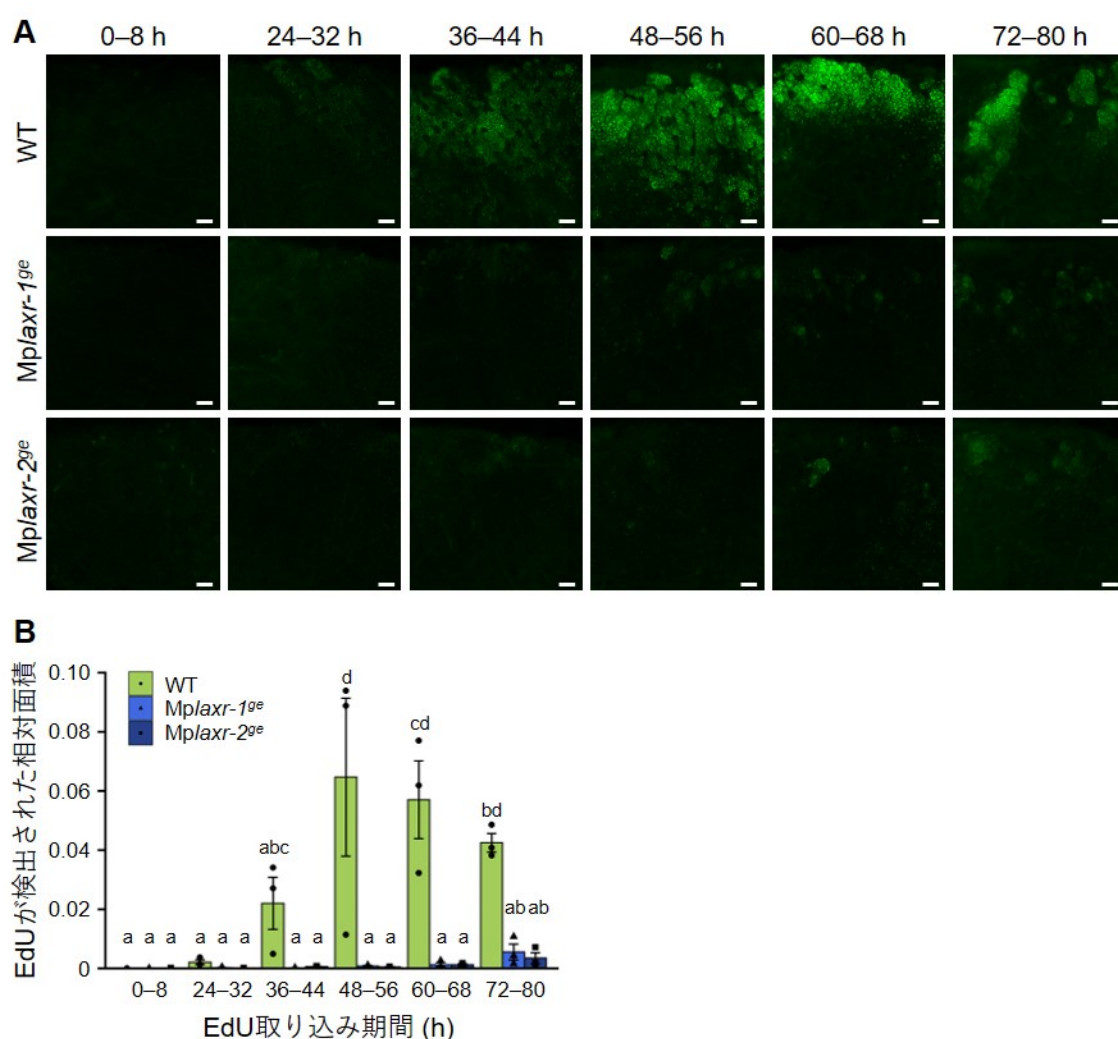


図 22 *Mplaxr* 変異による再生過程の細胞周期再開の遅延

(A) 野生型株 (WT)、*Mplaxr-1^{ge}* 株、および *Mplaxr-2^{ge}* 株の基部側切断片の EdU アッセイ。表記した期間 において EdU を取り込ませ、Alexa Fluor 488 で検出した (緑色)。各株 3 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 100 μ m を示す。(B) EdU のシグナルが検出された面積の定量結果。1 断片あたりの相対値を示す。バーは \pm SE を示す。バーの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。 $n = 3$ 。

さらに、*Mplaxr* 変異体の再生過程における *MpCYCD;1* の発現量を qRT-PCR によって定量したところ、野生型株より有意に低くなっていた (図 23)。これらの結果から、*Mplaxr* の変異は、オーキシン処理によって生じる再生抑制効果と同様に、再生過程の初期における細胞周期の再進入に影響を及ぼすと考えられた。このことから、*MpLAXR* は再生過程の開始において重要な機能をもつことが示唆された。

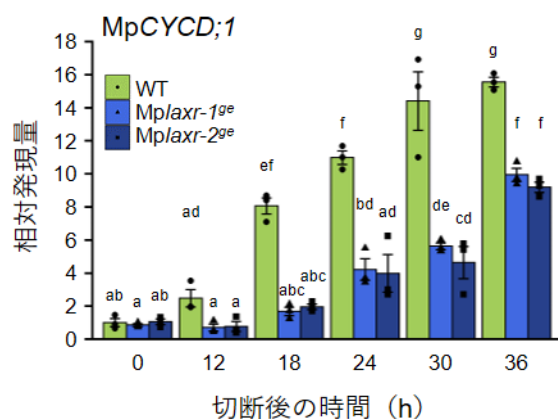


図 23 *Mplaxr* 変異による再生過程における *MpCYCD;1* の発現誘導の阻害

野生型株 (WT)、*Mplaxr-1^{ge}* 株、および *Mplaxr-2^{ge}* 株の基部側断片から図 7 で示すようにサンプリングし、*MpCYCD;1* の相対発現量を qRT-PCR によって定量した。*MpEF1* を内部標準として使用した。バーは \pm SE を示す。バーの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。 $n = 3$ 。

MpLAXR は細胞リプログラミング因子として機能する

次に、MpLAXR を切断時に一過的に発現させることで、オーキシン添加による再生形成抑制効果を無効化できないか調べた。まず、MpE2F プロモーター制御下でエストロゲン依存的に転写を誘導する XVE システムを用いて、MpLAXR を誘導的に過剰発現させる株を作出した (*proMpE2F:XVE>>MpLAXR*) (黄瀬 2017 修士論文)。*proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 無性芽をエストロゲン存在下で培養すると、MpLAXR の発現量が大きく上昇することを確認した (図 24A)。*proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 株 10 日目の葉状体を切断する直前の 8 時間だけ一過的にエストロゲン処理を行い、その後切断片を切り出し、NAA 非含有あるいは NAA 含有培地で培養する実験を行った。野生型株においては、エストロゲン前処理の有無に関わらず、NAA 存在下では再生芽の形成は抑制された (図 24B)。また、エストロゲン未処理の *proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 切断片においても NAA 存在下では再生芽の形成は見られなかった (図 24C)。一方で、エストロゲン前処理を行った *proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 株切断片では NAA 存在下でも再生芽を形成し、葉状体を発生した (図 24C)。これらの結果から、MpLAXR の一過的な発現は NAA による再生芽形成抑制効果を無効化できることが示唆された。また、葉状体切断と同時にエストロゲンを継続的に添加した場合、NAA 存在下においても同様に再生芽形成を引き起こせたが、MpLAXR の恒常的な過剰発現効果 (後述; 図 26 参照) のために葉状体が発生することはなかった (図 25)。

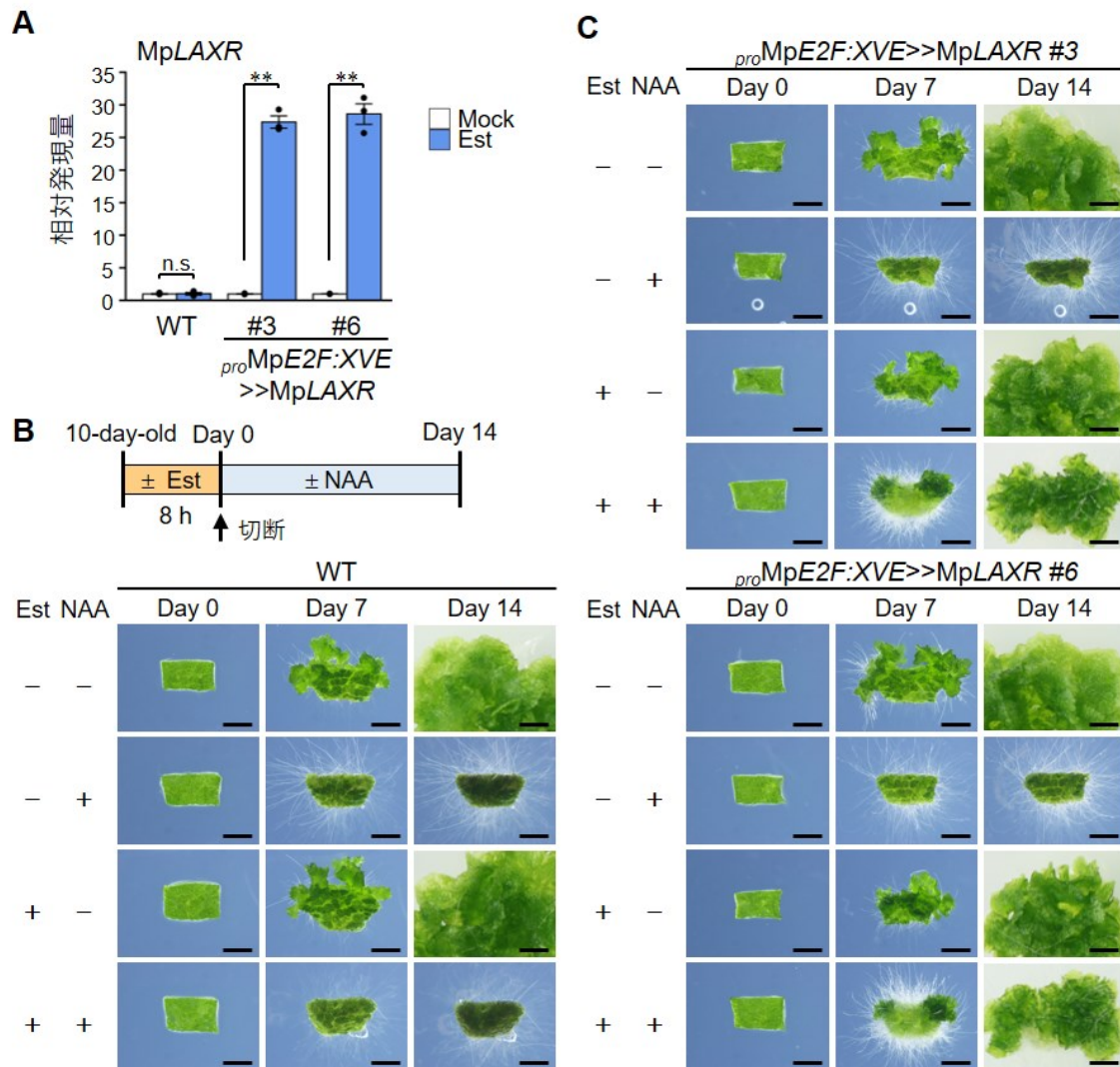


図 24 **MpLAXR** の一過的過剰発現によるオーキシンの再生芽形成抑制効果の無効化
 (A) 野生型株 (WT) および *proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 株 (#3 および#6) の無性芽を $5 \mu\text{M}$ β -エストラジオール (Est) 含有あるいは非含有培地で 14 日間培養し、**MpLAXR** の相対発現量を qRT-PCR によって定量した。**MpEF1** を内部標準として使用した。バーは \pm SE を示す。アスタリスク (**) は Welch's two-tailed paired *t*-tests による有意水準 $P < 0.01$ を示す。n. s., not significant. $n = 3$ 。(B,C) **MpLAXR** 一過的過剰発現後の再生実験法を模式的に示す。WT (B) および *proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 株 (#3 および#6) (C) の 10 日目葉状体を $5 \mu\text{M}$ Est の 8 時間前処理 (+) あるいは無処理 (-) ののち、切り出した基部側断片を $1 \mu\text{M}$ NAA 含有 (+) あるいは非含有 (-) 培地上で 14 日間培養した。各区 5 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 2 mm を示す。

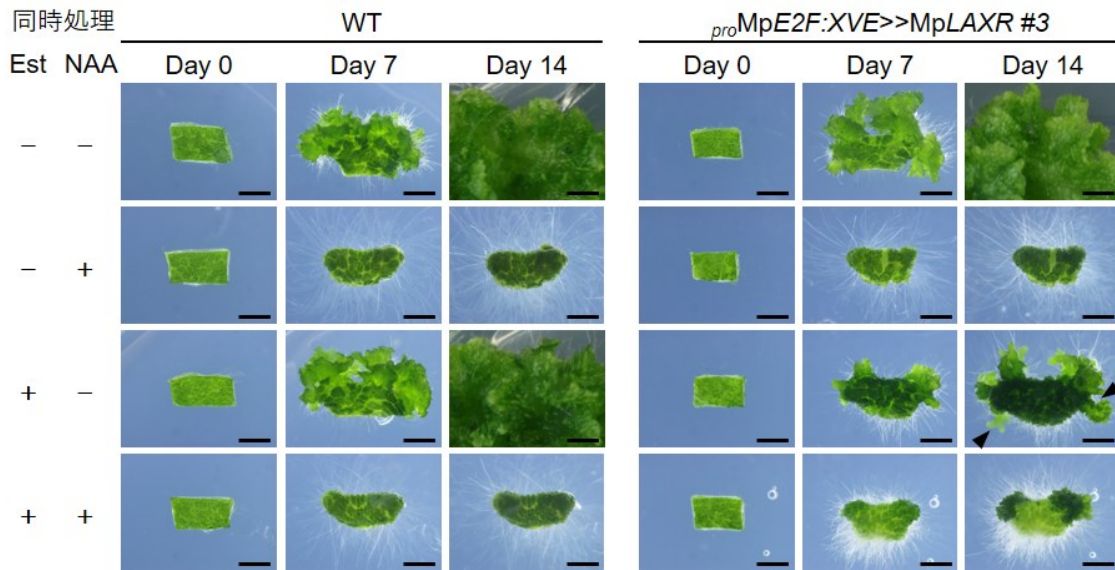
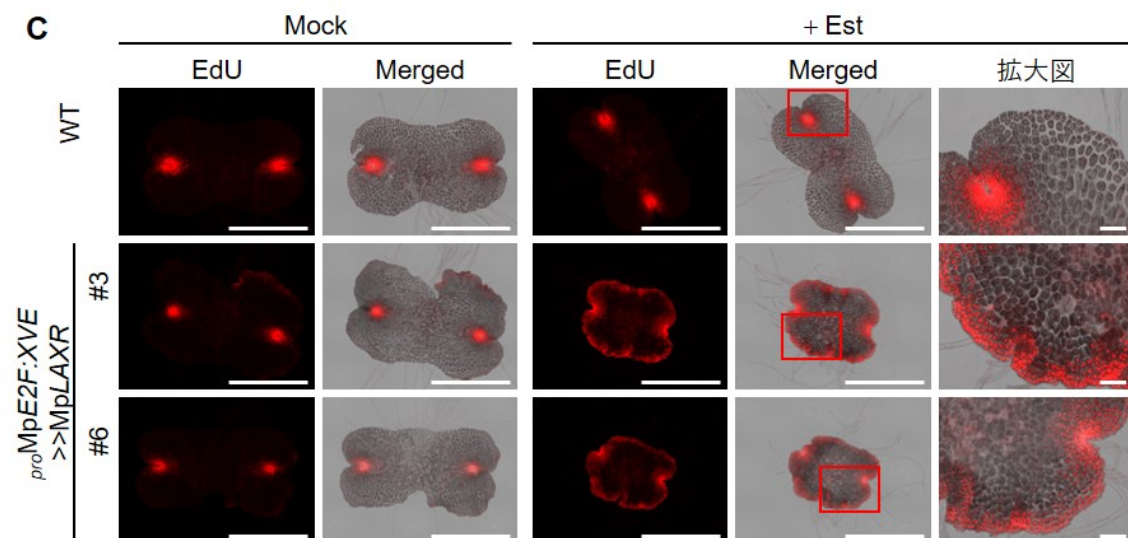
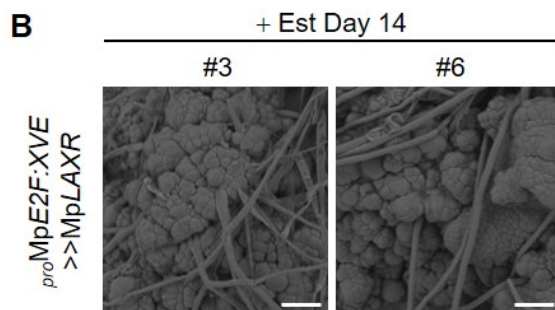
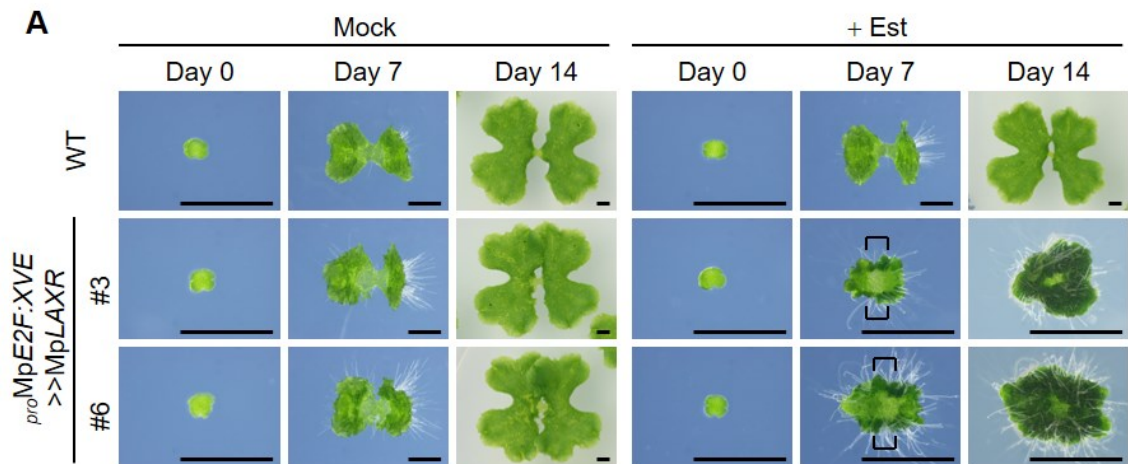


図 25 **MpLAXR** の恒常的過剰発現によるオーキシンの再生芽形成抑制効果の無効化
 野生型株 (WT) および *pro*MpE2F:XVE>>MpLAXR 株 (#3) の 10 日目葉状体の基部側断片を 5 μ M Est 含有 (+) あるいは非含有 (-)、かつ 1 μ M NAA 含有 (+) あるいは非含有 (-) 培地上で 14 日間培養した。矢尻は頂端側以外の切断面に形成された再生芽を示す。各区 5 個の切断片について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 2 mm を示す。

MpLAXR が細胞リプログラミング因子としての機能をもつ可能性を検証するため、MpLAXR の誘導過剰発現によって通常は細胞分裂を行わない細胞で細胞分裂を引き起こすことができるのかを調べた。野生型株および *pro*MpE2F:XVE>>MpLAXR 株の無性芽をエストロゲン含有、あるいは非含有培地で培養した。野生型株はエストロゲンの有無に関わらず、またエストロゲン非含培地で培養した *pro*MpE2F:XVE>>MpLAXR 株は、葉状体の発生に異常を示すことはなかった (図 26A)。一方で、エストロゲン含有培地で培養した *pro*MpE2F:XVE>>MpLAXR 株は細胞塊様の組織を形成し、葉状体が発生することはなかった (図 26A, B)。この細胞塊はメリステム領域からだけではなく、通常の発生過程においては細胞分裂をしない無性芽の周縁部からも形成された (図 26A)。走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、MpLAXR の誘導によって生じた細胞塊は未分化な小さい細胞と仮根からなるように見受けられた (図 26B)。この小さい細胞は切断後 2-3 日後に基部側断片で盛んに細胞分裂している細胞 (Nishihama et al., 2015) に似ていた。

また、野生型株および *pro*MpE2F:XVE>>MpLAXR 株を同様にエストロゲン誘導した葉状体を用いて EdU アッセイを行った。野生型株ではエストロゲンの有無に関わらずメリステム領域でのみ高い細胞分裂活性が検出された (図 26C)。また、エストロゲン処理をしてない *pro*MpE2F:XVE>>MpLAXR 株でも細胞分裂活性はメリステム領域に限定されていた (図 26C)。一方で、エストロゲン処理をした *pro*MpE2F:XVE>>MpLAXR 株ではメリステム領域のみならず、無性芽の周縁部全体で強い細胞分裂活性が検出された (図 26C)。これらの結果から、高い細胞分裂活性をもたない細胞において MpLAXR の誘導過剰発現によって異所的に細胞分裂を引き起こすことができることが示唆された。

また、エストロゲン誘導によって生じた細胞塊が多能性をもつのかを調べるため、エストロゲンによる 14 日間の誘導後、エストロゲンを除去し、さらにエストロゲン存在下、あるいは非存在下で培養した。エストロゲンを与え続けた場合、誘導によって生じた細胞塊は細胞塊のまま分裂を続けた。一方で、エストロゲンを除去した場合、誘導によって生じた細胞塊からはメリステムを含む新たな葉状体が発生した (図 26D)。これらの結果から、MpLAXR の過剰発現は細胞リプログラミングを誘導し、新たな幹細胞形成能をもつ未分化な細胞を生み出すことが示唆された。



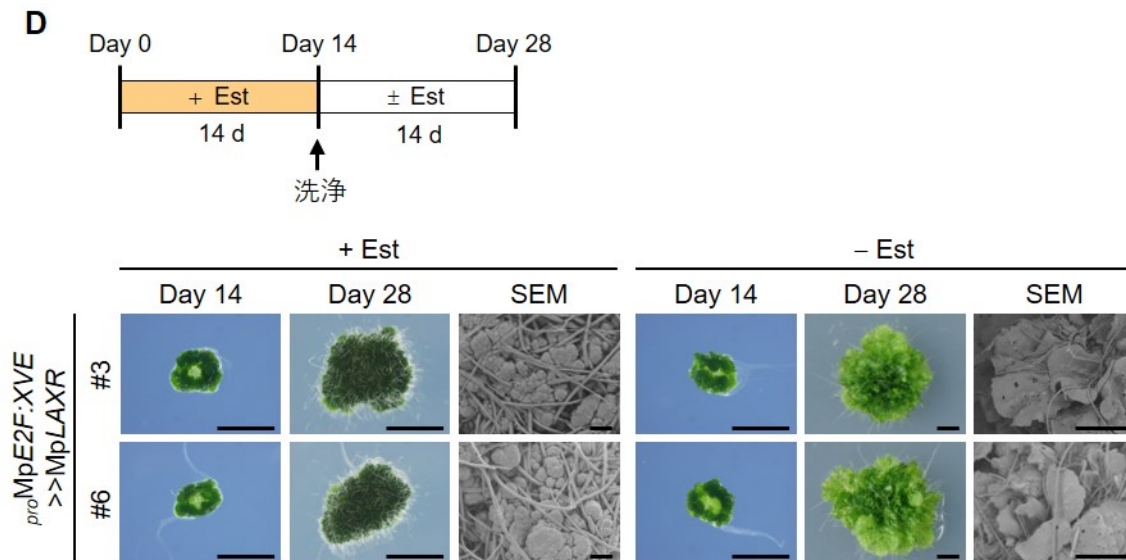


図 26 *MpLAXR* の誘導により幹細胞形成能をもつ細胞が形成される

(A) 野生型株 (WT) および *proMpE2F:XVE*>>*MpLAXR* 株 (#3 および #6) の無性芽を 5 μ M Est 含有あるいは非含有培地で 14 日間培養した。通常は細胞分裂をしない領域に生じた細胞塊を角括弧で示す。各区 10 個体について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 2 mm を示す。(B) 走査型電子顕微鏡 (SEM) による、5 μ M Est で 14 日間培養した *proMpE2F:XVE*>>*MpLAXR* 株 (#3 および #6) の観察。スケールバーは 100 μ m を示す。各株 3 個体について観察を行い、そのうちの代表例 1 株を図に示した。(C) WT および *proMpE2F:XVE*>>*MpLAXR* 株 (#3、#6) の無性芽を 5 μ M Est 含有あるいは非含有培地で 3 日間培養し EdU アッセイを行った。EdU を Alexa Fluor 555 で検出した画像 (赤色)、明視野と重ね合わせた画像、および赤色の四角で示す領域の拡大図を示す。各区 3 個体について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 1 mm、または 100 μ m (拡大図) を示す。(D) *proMpE2F:XVE*>>*MpLAXR* 株 (#3、#6) の無性芽を 5 μ M Est 含有培地で 14 日間培養後洗淨し、さらに 5 μ M Est 含有 (+ Est) あるいは非含有 (- Est) 培地で 14 日間培養した。実験法を模式的に示すとともに、14 日目、28 日目の写真、および SEM 画像を示す。各区 10 個体について実験を行い、そのうちの代表例 1 個を図に示した。スケールバーは 2 mm (写真)、100 μ m (SEM) を示す。

切断後に生じるサイトカイニン量の変動

植物ホルモンサイトカイニンは植物の発生や組織再生においてオーキシンと相乗的、あるいは拮抗的に働くことはよく知られている。また、シロイヌナズナにおいて傷シグナルが誘導する *WIND1* の下流で発現する *ESR1/DRN* はサイトカイニンによって制御される (Banno et al., 2001; Iwase et al., 2017)。そこで、再生過程におけるサイトカイニン濃度の定量を上記 IAA の定量と同様に行った。活性型サイトカイニンのうち、ゼニゴケにおいて主要なサイトカイニンである *cis*-zeatin (cZ) (Aki et al., 2019a) のみ非常に低いレベルで検出された (図 27)。切断後頂端側および基部側断片ともに cZ 濃度は減少していたが、基部側断片の方がより急激に減少していた (図 27)。興味深いことに、サイトカイニン前駆体である *cis*-zeatin riboside phosphates (cZRPs) の濃度は基部側において大きく減少していた (図 27)。

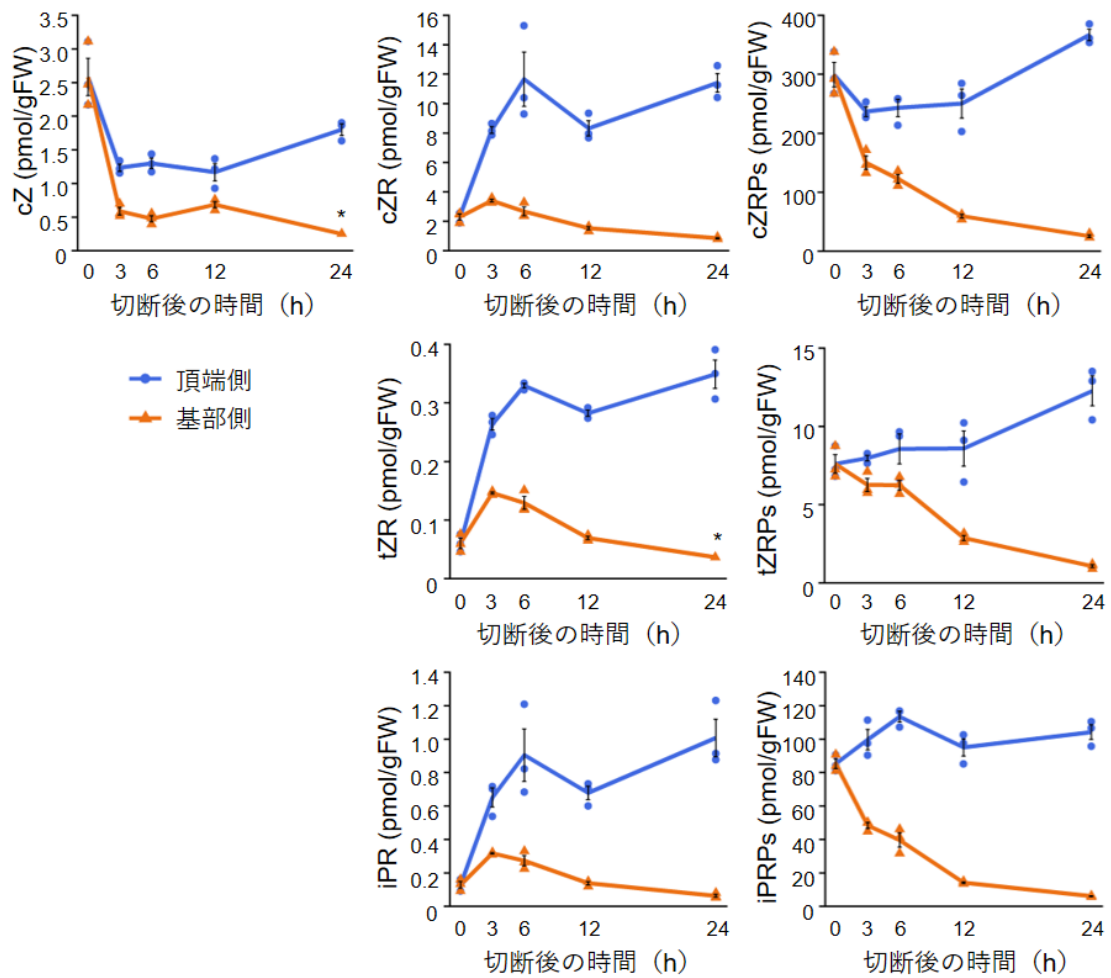


図 27 再生過程における内生サイトカインの定量

図 9A と同様に *cis*-zeatin (cZ)、*cis*-zeatin riboside (cZR)、*cis*-zeatin riboside phosphates (cZRPs)、*trans*-zeatin riboside (tZR)、*trans*-zeatin riboside phosphates (tZRPs)、isopentenyladenine riboside (iPR)、および isopentenyladenine riboside phosphates (iPRPs) の定量結果を示す。活性型サイトカインの *trans*-zeatin および isopentenyladenine は検出限界を下回っており検出できなかった。バーは± SE を示す。 $n = 3$ 。アスタリスク (*) で示す区は $n = 1$ 。

サイトカイニン濃度の変動がサイトカイニン生合成遺伝子および代謝遺伝子の発現変動によるものかを、上述再生過程における RNA-seq 解析および qRT-PCR によって検証した。サイトカイニン生合成遺伝子 *LONELY GUY (LOG)* (Kurakawa et al., 2007) のゼニゴケオーソログ遺伝子 *MpLOG* の発現は、基部側断片において切断 6 時間後以降に上昇し、切断 12 時間後に最も高くなっていったが、頂端側断片では大きな変動は見られなかった (図 28A, B)。この *MpLOG* の発現上昇はサイトカイニン前駆体量の減少に関与している可能性が示唆された。また、NAA 添加によって *MpLOG* の基部側での発現上昇が部分的に抑制されたことから、再生過程において *MpLOG* はオーキシンによる制御を受ける可能性が示唆された。一方で、cytokinin-inactivating cytokinin oxidase (CKX) (Schmülling et al. 2003) のゼニゴケオーソログ遺伝子 *MpCKX1* が基部側断片でより強く発現上昇し、また NAA の添加による抑制を受けることがわかった (図 28A)。この発現誘導も活性型サイトカイニン量の減少と相関がある可能性が考えられた。これらの結果から、切断 6 時間目以降の再生過程において基部側断片ではオーキシンの制御下でサイトカイニン前駆体から活性型サイトカイニンへの生合成、また活性型サイトカイニンの不活性化がどちらも起こっており、サイトカイニンの代謝が活性化している可能性が考えられた。

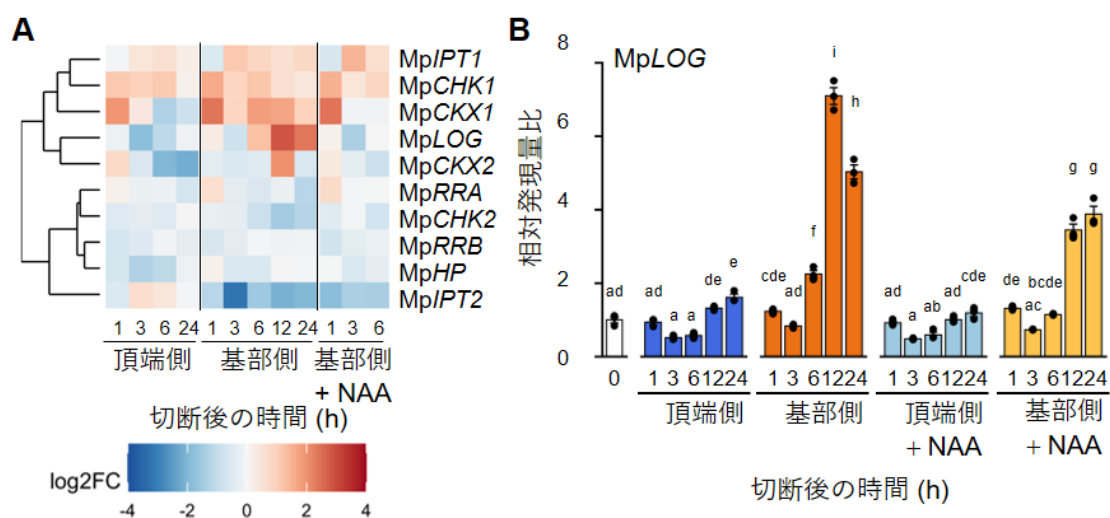


図 28 再生過程におけるサイトカイニン関連遺伝子の発現パターン

(A) 再生過程におけるサイトカイニン関連遺伝子の発現プロファイルをヒートマップで示す。(鈴木秀政博士による解析)。(B) 野生型株の頂端側および基部側断片を 1 μ M NAA 含有あるいは非含有培地で培養後、図 7 で示すようにサンプリングし、*MpLOG* の相対発現量を qRT-PCR により定量した。*MpEF1* を内部標準として使用した。バーは \pm SE を示す。バーの上のアルファベットは Tukey-Kramer 検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。 $n = 3$ 。

考察

ゼニゴケの再生におけるオーキシンの役割

本研究においてゼニゴケの葉状体再生過程は内生オーキシンの低下によって誘導されることを示した (図 29)。これにより頂端メリステムを切除した切断面において細胞リプログラミング因子 *MpLAXR* の発現が誘導され、幹細胞形成能をもつ未分化な細胞を生み出すことを明らかにした。NAA 処理による *MpLAXR* の発現抑制やオーキシン生合成阻害剤処理による *MpLAXR* の発現上昇から、オーキシンが *MpLAXR* 発現を負に制御していることが強く示唆された。シロイヌナズナの SAM において ARF5/MONOPTEROS を介したオーキシン信号伝達が *ESR1/DRN* を抑制するということが知られており、進化を通して保存された制御機構であることが考えられた (Luo et al., 2018)。数分という AUX/IAA タンパク質の半減期の短さからすると、切断後数時間での内生オーキシンの減少は *MpLAXR* の転写応答を引き起こすために十分であろう。通常の葉状体においては *MpLAXR* の発現はオーキシン応答性の転写抑制因子によって抑制されており、頂端部の切除によって生じるオーキシン信号伝達レベルの低下により抑制因子が減少することで *MpLAXR* の発現が上昇すると推測される。

オーキシン生合成遺伝子 *MpTAA* の発現は切断後に一時的に減少していたが、*MpYUC2* の発現は減少しなかった (図 10)。切断後のこの 2 遺伝子の発現変動が内生オーキシンの減少に部分的に寄与している可能性は考えられる。しかしながら、頂端側においてもどちらの遺伝子も発現が減少したことから、遺伝子発現変動のみによって説明することはできない。基部側断片の切断面付近においてオーキシンの化学修飾による不活化、あるいはオーキシンの排出による輸送が生じ、オーキシン濃度が一過的に減少している可能性が考えられる。

ゼニゴケにおいて、オーキシン生合成遺伝子 *MpTAA* の機能欠損株 (Eklund et al., 2015) やオーキシン不活化酵素の過剰発現体 (Flores-Sandoval et al., 2015)、また *MpIAA^{MDII}* によるオーキシン信号伝達抑制によって正常な葉状体が発生せず、細胞塊様の表現型を示すようになる (Kato et al., 2015)。このことから、ゼニゴケにおいてオーキシンは細胞の分化状態の確立、あるいは維持に関与すると考えられる。本研究で明らかにしたオーキシンの減少によって細胞リプログラミングが引き起こされるという現象は、オーキシンによって維持されていた分化状態を *MpLAXR* の発現誘導を介して変化させているものと考えられる。

基部側断片において切断 3 時間後に一過的に急減した内生オーキシン量は切断 24 時間にかけて元の内生量にまで回復していった (図 9A)。基部側断片においてオーキシン生合成遺伝子 *MpTAA* および *MpYUC2* の発現量は切断 6 時間後以降上昇しており (図 10)、内生オーキシンの増加に寄与する可能性が考えられた。細胞リプログラミング過程を経て切断 24 時間後以降に細胞周期が進行し増殖した細胞が再び分化し新たな組織を形成すると考えられる。この細胞分化へ向かう過程において切断前と同レベルの内生オーキシン量が必要となる可能性が考えられた。

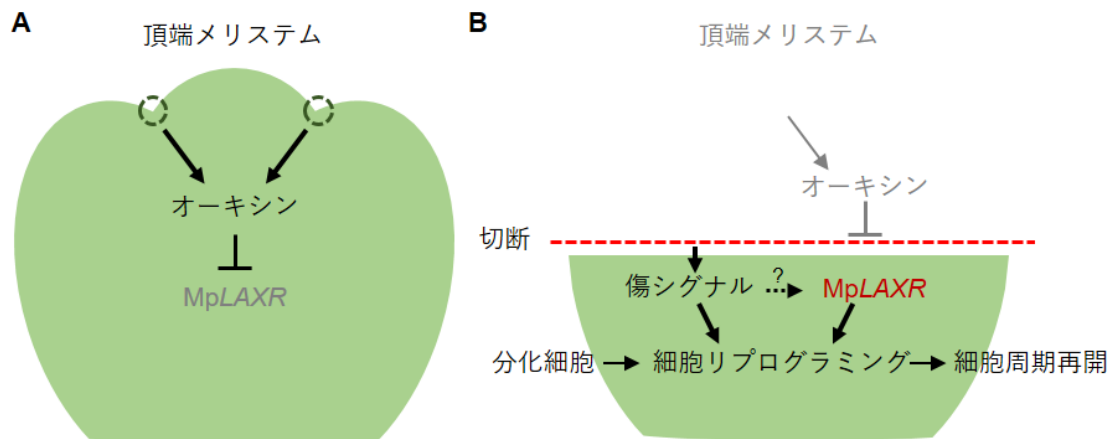


図 29 ゼニゴケにおける葉状体再生の制御経路モデル

(A) 通常の発生中の葉状体において頂端メリステムで生合成されたオーキシシンは基部側へ求基的に輸送され、そこで **MpLAXR** の発現をオーキシシン信号伝達を介して負に制御していると考えられる。(B) 頂端部を切除すると傷シグナルや内生オーキシシン量の一過的な減少が生じる。内生オーキシシン量が低下することにより **MpLAXR** の発現が誘導され、傷シグナルとともに細胞リプログラミングを引き起こすと考えられる。

再生におけるオーキシシン以外の植物ホルモンの役割

シロイヌナズナにおいて *WIND1* は傷シグナルに応じて発現し、*ESRI/DRN* の発現を直接制御する。この発現制御にはサイトカイニン信号伝達も関与することが報告されている (Banno et al., 2001; Iwase et al., 2017)。切断後の基部側断片において、サイトカイニン前駆体 *cZRP*s および活性型サイトカイニン *cZ* 量はともに減少し (図 27)、サイトカイニン生合成遺伝子 *MpLOG* およびサイトカイニン代謝酵素遺伝子 *MpCKX1* の発現が上昇したことから (図 28)、サイトカイニンの代謝が基部側断片において活性化されることが予想された。*MpLOG* および *MpCKX1* の発現上昇はオーキシシン外部添加により抑制されたことから、サイトカイニンの代謝活性変動はオーキシシンの制御下にある可能性が考えられる。これらの結果から、**MpLAXR** の発現誘導はサイトカイニンではなく、オーキシシンの減少によるものと考えられるが、**MpLAXR** の発現制御とサイトカイニンとの直接的な関連についての検証は今後の課題である。

また、オーキシシン濃度の変動が切断直後の 3 時間後に最も大きくなっていたのに対し、活性型サイトカイニンやサイトカイニン前駆体の変動は切断 24 時間に最も大きくなっていた (図 9A; 図 27)。被子植物のカルスからのシュート再生において、多能性を獲得したカルスから組織が再分化する過程においてサイトカイニンが重要な役割を持つことが報告されて

いる(Higuchi et al., 2004; Sakai et al., 2001)。ゼニゴケのサイトカニン信号伝達は発生過程において様々な器官形成に関わることが報告されている(Aki et al., 2019a, 2019b)。これらのことから、ゼニゴケの葉状体再生の細胞のリプログラミング過程が進行し、その後活性化したサイトカニン信号伝達経路が器官形成過程に関与する可能性も考えられる。

根端メリステムの再生過程において傷害応答性の *ERF109* および *ERF115* はジャスモン酸信号伝達による制御を受ける(Zhang et al., 2019; Zhou et al., 2019)。また、組織癒合過程において花茎の切断面の下部で *RAP2.6L* はジャスモン酸によっても発現が調節される(Asahina et al., 2011)。これらのことから、再生過程においてオーキシンのみならず、複数の植物ホルモンによる複雑な制御機構が存在すると考えられる。ゼニゴケは被子植物がもつジャスモン酸信号伝達経路の原型を保持しており、jasmonoyl-isoleucine の前駆体である dinor-12-oxo-phytodienoic acid (dinor-*cis*-OPDA) をリガンドとしている (Monte et al., 2018)。今後、切断後の dinor-*cis*-OPDA の定量をすることで、ジャスモン酸経路を介した傷害応答および再生過程における機能が明らかになることが期待される。

MpLAXR と傷応答性遺伝子

頂端側断片の切断面領域において MpLAXR は誘導されないこと、基部側断片を四角く切断した際の頂端側以外の切断面で MpLAXR プロモーターの発現は検出されていないことから (図 15; 図 18)、MpLAXR の発現誘導は傷応答性ではないと考えられる。しかしながら、NAA 処理をした基部側断片においても MpLAXR は弱いながらも発現しており、傷シグナルが部分的に発現を誘導している可能性も考えられる。傷シグナルが直接的に MpLAXR の発現を誘導するかどうかの検証は今後の課題である。Mp*laxr* 変異体において再生芽は遅れるものの形成されることから (図 21)、細胞リプログラミングに関わる別経路が存在すると考えられる。ゼニゴケには AP2/ERF 転写因子が 30 遺伝子存在し、クラス I に属する *WIND1* (Mp*ERF2*/Mp7g13760) とクラス X に属する *ERF109*、*ERF115*、および *ERF113/RAP2.6L* (Mp*ERF9*/Mp4g17430、Mp*ERF21*/Mp5g22160、および Mp*ERF22*/Mp6g11770) をもつが、STEMIN はもたない(Bowman et al., 2017; Ishikawa et al., 2019)。シロイヌナズナにおいて傷害応答性を示す *WIND1* と近縁のゼニゴケ Mp*ERF2* は切断後に大きな発現変動を示さなかったことから (図 16)、シロイヌナズナとは異なる機能を持つものと考えられる。Mp*ERF9*、Mp*ERF15*、Mp*ERF21* は頂端側および基部側断片ともに切断後大きく発現上昇しており、傷応答性であることが示唆される (図 16)。これらの AP2/ERF 転写因子や、RNA-seq のクラスタリング解析で C2 に含まれていた遺伝子が傷シグナルを伝達している可能性が示唆される。また、これらの遺伝子は MpLAXR の発現が大きく上昇する切断 6 時間よりも早く切断後直ちに発現上昇していた (図 16)。これらことから、これらの傷害応答性遺伝子による MpLAXR の発現制御機構が存在する可能性も考えられる。

再生芽形成の極性

ゼニゴケの再生芽は基部側断片の中肋付近の頂端側切断面でのみ形成されるという極性があるが(図4; Nishihama et al., 2015)、この分子機構についてはまだ明らかになっていない。先行研究から、中肋周辺の細胞は葉状体周縁部の細胞と比較して小さいように見受けられるという観察結果が報告されている(Nishihama et al., 2015)。この中肋周辺の細胞の形態や性質の差により細胞リプログラミングが生じやすくなっている可能性が考えられる。

興味深いことに、基部側断片において異所的に *MpLAXR* を過剰発現すると、頂端側以外の切断面からも再生芽が生じた(図25)。また、*MpLAXR* プロモーター活性は頂端側断片の切断面付近で限定的に検出された(図18)。これらのことから、*MpLAXR* の発現領域が頂端側断片の切断面付近に限定されることが、再生芽形成の極性を生む一つの要因である可能性が考えられる。

また、先行研究においてスクロースが基部側断片の細胞周期を促進することが報告されている(Nishihama et al., 2015)。ゼニゴケ葉状体ではスクロースが求頂的に輸送されることが知られており(Rota and Maravolo, 1975)、このスクロースの極性輸送も再生芽形成の極性を生み出す原因の一つである可能性が考えられる。

オーキシンは植物体内で濃度勾配を形成し、成長軸方向を決定づける(Friml, 2003; Leyser, 2005)。ゼニゴケの葉状体再生において、頂端側断片と基部側断片の二つの切断面領域でのオーキシンを介した異なる応答制御は、シロイヌナズナの花茎切断後の内生オーキシン量変動による組織癒合制御と類似している(Asahina et al., 2011)。本研究により、植物が自身の損傷を頂端メリステムから供給される内生オーキシン量の変動により感知し、細胞リプログラミングを引き起こす仕組みを進化的に保持していることが示唆された。

頂芽優勢機構の進化

陸上植物の進化の過程で初期に分岐した維管束植物は二叉分枝する形質を獲得し、さらに腋生の分枝機構が進化していったと考えられる(Harrison, 2017; Sussex and Kerk, 2001; Tomescu et al., 2014)。その後、頂芽の成長を優先させ、腋芽の休眠状態を維持しその成長を制御する頂芽優勢機構が確立したと考えられる(Aarssen, 1995; Domagalska and Leyser, 2011; Harrison, 2017)。維管束植物の頂芽優勢機構において茎頂からのオーキシンの供給が途絶えることで、既に形成されていて休眠状態にある腋芽が活性化することが古くから知られている(Thimann and Skoog, 1934)。頂端から輸送されるオーキシンがサイトカイニン等の植物ホルモンとともに腋芽の成長を制御することが報告されている(Crawford et al., 2010; Prusinkiewicz et al., 2009; Shinohara et al., 2013)。

コケ植物の胞子体は通常は分枝をしないが、蘚類ヒメツリガネゴケの胞子体においてはオーキシン極性輸送機構を攪乱すると分枝が起こることが報告されている(Bennett et al., 2014; Fujita et al., 2008)。また、ヒメツリガネゴケの配偶体はオーキシンを介した頂端メリス

テムによる側生器官の形成抑制機構を持つ(Coudert et al., 2015; Von Maltzahn, 1959)。

苔類ゼニゴケの配偶体世代である葉状体において、オーキシンは頂端メリステムから基本的に輸送されており、頂芽優勢機構を持つと考えられてきた(Binns and Maravolo, 1972; Gaal et al., 1982)。ゼニゴケの再生は分化した細胞のリプログラミングを引き起こし新たに幹細胞を形成する、という点では維管束植物の頂芽優勢機構とは異なる。しかし、ゼニゴケの葉状体再生も頂端切除が引き金となり内生オーキシン量の低下が再生を誘導することから、頂端の成長を優先させる頂芽優勢機構に類似した制御機構であると考えられる。これらのことから、オーキシンを介した頂芽優勢制御機構はコケ植物を含む陸上植物に広く保存されていることが示唆される。

ゼニゴケの再生機構と維管束植物の腋芽形成機構の類似性

近年になって、シロイヌナズナの腋芽メリステム形成に ESR1/DRN が関与することが報告されている(Shi et al., 2016; Zhang et al., 2018)。茎頂メリステムにおいて、腋芽メリステム形成の鍵となる因子 *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* の発現量は、オーキシンの制御を受け低レベルで維持されている(Shi et al., 2016; Zhang et al., 2018)。葉原基が成長を開始すると、茎頂メリステム内に内生オーキシン量が減少したオーキシン濃度極小領域が形成され、内生サイトカイニン量の上昇とともに腋芽メリステム形成の引き金となる(Wang et al., 2014a; Wang et al., 2014b)。オーキシン濃度極小領域内において、ESR1/DRN は *STM* の発現を上昇させ、腋芽メリステムの確立に寄与する(Cao and Jiao, 2020; Shi et al., 2016; Zhang et al., 2018)。本研究では、ゼニゴケの再生過程において、シロイヌナズナ ESR1/DRN と同じクラス VIIIb に属する AP2/ERF 転写因子 MpLAXR の発現が内生オーキシン量の減少に応じて上昇し、新たな幹細胞新生過程が進行することを示した。シロイヌナズナ ESR1/DRN はシュート再生およびオーキシン濃度極小領域における腋芽メリステムの形成に関与することから、これら2つの遺伝子が類似した機能や発現制御機構を持つ可能性が示唆された。今後、低オーキシンレベルに応じて発現する AP2/ERF ファミリークラス VIIIb に属する転写因子の詳細な機能を解析することで、陸上植物における幹細胞新生制御と頂芽優勢機構の関わりや分子機構について新たな知見が得られると期待される。

材料と方法

使用した植物と培養条件

苔類ゼニゴケの野生型株として Takaragaike-1 (Tak-1) (Ishizaki et al., 2008)を用いた。胞子形質転換には Takaragaike-2 (Ishizaki et al., 2008)と Tak-1 の交配により取得した F1 胞子を用いた。特に断りのない限り、ゼニゴケは 1%寒天含有の 1/2 Gamborg's B5 培地 (Gamborg et al., 1968)上にて恒常白色光条件 (50-60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; OPT-40C-N-L, Optrom)、22°Cの条件下で培養した。

形質転換体の作出

・ *proMpLAXR:tdTomato-NLS* 株

MpLAXR プロモーターレポーター株の作出のために、野生型株のゲノム DNA を鋳型に *MpLAXR* プロモーター領域を *MpLAXR_F1/MpLAXR_R1* のプライマーセットを用いて PCR で増幅した。得られた DNA 断片を pENTR/D-TOPO ベクター (Thermo Fisher Scientific)にクローニングし、pENTR/D-TOPO_ *proMpLAXR* を作出した。得られたエンタリクローンを pMpGWB116 ベクター (Ishizaki et al., 2015)に LR Clonase II (Thermo Fisher Scientific)を用いて導入し、pMpGWB116_ *proMpLAXR* を作出した。作出した発現ベクターを F1 胞子に形質転換した(Ishizaki et al., 2008)。

・ *Mplaxr^{se}* 株

MpLAXR 機能欠損株は、ゼニゴケ用に確立された CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術(Sugano et al., 2018; Sugano and Nishihama, 2018)により作出した。AP2 ドメイン内に設計した gRNA 標的配列およびそのアンチセンス配列をコードする一本鎖オリゴ DNA をアニールして得られた二本鎖オリゴ DNA (*MpLAXR_gRNA1_A/MpLAXR_gRNA1_B* および *MpLAXR_gRNA2_A/MpLAXR_gRNA2_B*)を pMpGE_En03 (Sugano et al., 2018)の Bsa I サイトにクローニングした。使用したオリゴ DNA は表 2 に記載した。得られた gRNA 発現カセットをそれぞれ pMpGE010 ベクター(Sugano et al., 2018)に LR Clonase IIを用いて導入し、pMpGE010_ *MpLAXR_gRNA1* および pMpGE010_ *MpLAXR_gRNA2* を作出した。得られた CRISPR ベクターを野生型株の葉状体切断片に導入した(Kubota et al., 2013)。形質転換体の *MpLAXR* 遺伝子配列にゲノム編集が起こったことを確認するため、形質転換体ゲノム DNA を鋳型に、gRNA1 および gRNA2 の標的配列を含む領域を *MpLAXR_pro_F3/MpLAXR_cds_R2* のプライマーセットを用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物の配列を BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific)を用いてダイレクトシーケンスした。gRNA1 および gRNA2 それぞれの導入によって取得した *Mplaxr-1^{se}* および *Mplaxr-2^{se}* 株にフレームシフト変異が生じていることを確認した。

・ *gMpLAXRresist/Mplaxr^{ge}* 株

Mplaxr-1^{ge} 変異株の相補株を取得するために、MpLAXR_gRNA1 抵抗性になるようにコードするアミノ酸配列を変えずに塩基置換した MpLAXR プロモーターから 3'UTR までを含む領域をクローニングした。まず、ゲノム DNA を鋳型に MpLAXR_pro_F2/MpLAXR_gRNA1_resist_R および MpLAXR_gRNA1_resist_F/MpLAXR_3utr_R のプライマーセットを用いて PCR によって塩基置換を導入した 2 つの断片を増幅した。得られた 2 つの PCR 断片を合わせて鋳型とし、MpLAXR_pro_F2/MpLAXR_3utr_R のプライマーセットを用いて overlap extension PCR を行った。増幅された DNA 断片を pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした。さらに、得られたエンターベクターの NotI-PmaCI サイトに、上記 pENTR/D-TOPO_proMpLAXR より切り出した 4.3-kb のプロモーター領域を含む NotI-PmaCI断片を連結し、pENTD/D-TOPO_proMpLAXR:gMpLAXRresist を作出した。得られたエンタークロンを pMpGWB301 (Ishizaki et al., 2015) に LR Clonase II を用いて導入した。得られた pMpGWB301_proMpLAXR:gMpLAXRresist ベクターを *Mplaxr-1^{ge}* 変異株の葉状体切断片に形質転換した(Kubota et al., 2013)。

・ *proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 株

MpLAXR の誘導過剰発現株を作出するため、野生型ゲノム DNA を鋳型に MpLAXR の CDS 領域を MpLAXR_cds_F1/MpLAXR_cds_R のプライマーセットを用いて増幅し、pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした。得られた pENTR/D-TOPO_MpLAXR_cds ベクターを pMpGWB168 (黄瀬修士論文 2017; 吉竹未発表)に LR Clonase II を用いて導入した。作出した pMpGWB168_MpLAXR 導入ベクターを野生型株の葉状体切断面に形質転換した (Kubota et al., 2013)。

再生実験

野生型株、*proMpIAA:MpIAA^{MDII}-GR* 株 (Kato et al., 2015)、*proMpLAXR:tdTomato-NLS* 株、*Mplaxr-1^{ge}* 変異体株、*Mplaxr-2^{ge}* 変異体株、および *proMpLAXR:gMpLAXRresist/Mplaxr-1^{ge}* 株を用いた再生実験は 10 日目の葉状体を用いて行った。*Mparf1-4* 株 (Kato et al., 2017)を用いた再生実験は、植物体の成長速度が遅いため、20 日目の葉状体を用いて行った。図 3 で示すように、葉状体をプラスチックシャーレ上でメスを用いて切断し、切り出した頂端側および基部側断片を上記通常生育条件下で培養した。オーキシン添加実験では、切断片を 1 μM の NAA 含有あるいは非含有培地上で培養した。*proMpIAA:MpIAA^{MDII}-GR* 株を用いたオーキシンシグナル抑制条件下での再生実験は、切断片を 10 μM Dex 添加あるいは無添加の 1 μM の NAA 含有あるいは非含有培地上で培養した。*proMpE2F:XVE>>MpLAXR* 株を用いた一過的誘導発現の再生実験は 10 日目葉状体を用い、前処理として 5 μM Est 溶液あるいは Moch 溶液に浸漬したのち 5 μM Est 含有あるいは非含 Moch 培地へ移し 8 時間培養した。顕微鏡写真は実

体顕微鏡 SZX16 (オリンパス) を用い DP20 CCD カメラで撮影した。広角の写真は EOS Kiss X3 (キャノン) で撮影した。

EdU 染色

細胞周期 S 期進入細胞の可視化のために、Click-iT EdU Imaging Kits (Thermo Fisher Scientific) を使用し、付属のプロトコルおよび先行研究に従って行った (Nishihama et al., 2015)。野生型株の 10 日目葉状体より切り出した基部側断片は 1 μM の NAA 含有あるいは非含有培地上、通常生育条件下で培養した。各タイムポイントにおいて切断片をマイクロタイタプレートに移し、20 μM の EdU を添加した 1 μM の NAA 含有あるいは非含有 1/2 Gamborg's B5 液体培地中で 8 時間培養した。Mplaxr-1^{se} 変異株の切断片は各タイムポイントから 20 μM の EdU を添加した 1/2 Gamborg's B5 液体培地中で 8 h 培養した。組織を 3.7%ホルムアルデヒド含有 phosphate buffer saline (PBS) 中で 1 時間処理し固定した。0.5% Trion X-100 含有 PBS 中で 20 分間膜透過処理を行った後、Alexa Fluor 488-azide 含有 Click-iT 反応液中で 1 時間染色した。3% bovine serum albumin 添加 PBS および PBS で洗浄した後、1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DAPI 含有 PBS 中で 1 晩遮光して DNA を染色し、PBS で 2 回洗浄した後観察に供した。

野生型株および *proMpE2F:XVE*>>*MpLAXR* 株ジェンマリングは 5 μM の Est 含有あるいは非含有培地で 2 日間生育させたのち、マイクロタイタプレートに移し、20 μM の EdU を添加した 5 μM の Est 含有あるいは非含有 1/2 Gamborg's B5 液体培地中で 24 h 培養した。上記と同様に固定、膜透過処理を行った後、Alexa Fluor 555-azide 含有 Click-iT 反応液中で 1 時間染色し、同様に洗浄した。

BZ-X710 (キーエンス) を用いて観察し、DAPI、Alexa Fluor 488 および 555 の蛍光をそれぞれ DAPI (OP-87762)、GFP (OP-87763)、および TRITC (OP-87764) フィルタキューブを用いて検出した。相対的な EdU が検出された相対面積は、取得した蛍光画像を ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012) を用いて二値化して測定した面積を、計測した切断片 1 つの面積値で割って算出した。

植物ホルモン定量

野生型株の 10 日目葉状体を頂端側および基部側の 2 つに切断し、1/2 Gamborg's B5 培地上で培養した。切断後 0、3、6、12 および 24 時間後に図 7 で示すように切断面から 1 mm ほどの領域をさらに切り取り 30 切片 (新鮮重 30–60 mg) を収集した。各条件について 3 反復のサンプルを定量に供した。

以降の操作は理化学研究所の榊原均博士、小嶋美紀子氏並びに竹林裕美子氏に依頼して行っていただいた。IAA およびサイトカイニン関連物質は ultra-high-performance Plant & Cell Physiology liquid chromatography-quadrupole orbitrap mass spectrometer (UHPLC/Q/Exactive; Thermo Scientific) および ultra-performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass

spectrometer (ACQUITY UPLC System/XEVO-TQS; Waters)を用いて Kojima and Sakakibara (2012)および Shinozaki et al. (2015)で報告されている手法に従って定量した。

RNA-seq 解析

野生型株の 10 日目葉状体を図 7 で示すように頂端側および基部側断片の 2 つに切断し、1 μ M NAA 含有あるいは非含有 1/2 Gamborg's B5 培地上で培養した。NAA 非含有培地で切断後 0、1、3、6、12 および 24 時間培養した頂端側および基部側切断片、および NAA 含有培地で切断後 1、3、6 時間培養した基部側断片から、図 7 で示すように切断面から幅 1 mm ほどの領域をさらに切り取り 30 切片（新鮮重 30–60 mg）を収集した。RNeasy Plant Mini kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出した。各条件について 3 反復のサンプルを RNA-seq 解析に供した。

NAA 無添加の 0、3、12、24 時間サンプルは山岡尚平准教授の指導のもと TruSeq RNA Sample Prep Kit v.2 (Illumina)を用いてシーケンスライブラリーを調整した。以降、基礎生物研究所生物機能情報分析室の重信秀治教授、山口勝司博士に依頼し、Illumina HiSeq1500 を用いて 126-nt のシングルエンドシーケンシングを行っていただいた。

NAA 無添加の 1、6 時間サンプルおよび NAA 添加の 1、3、6 時間基部側断片のサンプルは株式会社マクロジェン・ジャパンに外注してライブラリー調整、NovaSeq6000 を用いてペアエンドシーケンシングを行った。

RNA-seq データ（BioProject number PRJDB12610 (DRX319152–DRX319190)）は DDBJ (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/dra/>)にて取得可能である。

以下の解析は鈴木秀政氏に行っていただいた。RNA-seq の生データはデフォルトの設定の fastp version 0.20.1 (Chen et al., 2018)で処理し、ゼニゴケゲノム v.5.1_r1 (MarpolBase, <https://marchantia.info>; Montgomery et al., 2020)に STAR v2.6.1c (Dobin et al., 2013)を用いてマッピングした。Rsubread package v2.2.6 (Liao et al., 2019) 内の *featureCounts* 関数を用いてリードカウントを行った。

主成分分析解析は全遺伝子の発現データを \log_2 変換し、DESeq2 package v1.28.1 (Love et al., 2014)内の *plotPCA* 関数を用いて行った。切断 0 時間との二群間比較は DESeq2 package 内の *DESeq* 関数を用いて Wald test により行った。

オーキシン応答遺伝子は公開されている 2,4-D 処理した葉状体の RNA-seq データ (SRR5905091, SRR5905092, SRR5905097 SRR5905098, SRR5905099, SRR5905100; Mutte et al., 2018)を SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>)より取得した。フィッシャーの正確確率検定は R v4.0.0 (<https://www.R-project.org/>) の *fisher.test* 関数を用いて切断 0 時間と比較し (adjusted P-value < 0.001)、オーキシン応答性かつ切断による上昇あるいは減少遺伝子であるかを評価した。

クラスター解析はclust v1.12.0 (Abu-Jamous and Kelly, 2018)を使用した。GO termsはNetGO v2.0 (You et al., 2019)、Argot2 (Falda et al., 2012)、PANNZER2 (Törönen et al., 2018)、および

DeepGOPlus v1.0.1 (Kulmanov and Hoehndorf, 2020)を使用し、ゼニゴケゲノムversion 5.1_r1にアノテーションされた。アノテーションデータベースは、MarpolBaseのアノテーション情報、Hernández-García et al. (2021)にて報告されたアノテーション情報、および川村省吾氏作成のアノテーション情報を合わせ、重複を除いた後 AnnotationForge package v1.30.1 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/AnnotationForge.html>)を用いて構築した。GO terms enrich解析はclusterProfiler package v3.16.1 (Yu et al., 2012)内のenrichGO関数を使用して各クラスターに対して行った。濃縮したGO termはrrvgo package v1.0.2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/rrvgo.html>)内のcalculateSimMatrix関数、reduceSimMatrix関数を使用してまとめた。

qRT-PCR

各実験において、下記のようにサンプリングした組織を用いて qRT-PCR を行った。各条件について3反復のサンプルを定量に供した。

・切断片における発現解析

野生型株および *Mplaxr^{ge}* 株切断片から各タイムポイントにおいて図7で示すように切断面領域から切り出した20切片からRNAを抽出した。

・*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株を用いた発現定量

野生型株および *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株の10日目葉状体を10 μM Dex 溶液あるいはmock 溶液に浸して減圧条件下で10分おいた。10 μM Dex 含有あるいは非含有寒天培地上へ移して12時間培養し、1個体からRNAを抽出した。

・*proMpE2F:XVE*>>*MpLAXR* 株の発現誘導後の定量

5 μM Est 含有あるいは非含有 1/2 Gamborg's B5 培地上で2週間生育させた *proMpE2F:XVE*>>*MpLAXR* 株ジェンマリング3個体からRNA抽出を行った。

・オーキシン生合成阻害剤処理サンプルの発現解析

野生型株の無性芽を10 μM PPBo (Kakei et al., 2015)、10 μM yucasin (Nishimura et al., 2014) および 100 μM L-Kynurenin (He et al., 2011)含有 1/2 Gamborg's B5 培地上で3日培養したおよそ200個体からRNAを抽出した。

採取したサンプルを液体窒素で凍結・破碎し、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて付属のプロトコルに従ってRNA抽出を行った。得られたRNAをRNase-Free DNase (Qiagen)で処理を行った。逆転写反応には0.5-1.0 μgのRNAを使用し、ReverTraAce (Toyobo)を用いてオリゴ(dT)で逆転写を行った。CFX96 Touch リアルタイムPCR解析システム(Bio-

Rad)を用いて SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Lonza)によって二本鎖 DNA 合成を測定した。Mp*EF1* を内部標準として用いた。反応は 95°C・30 秒の後、95°C・5 秒、60°C・30 秒を 40 サイクル行った。使用したプライマーは表 2 に記載した。

Est 誘導後の *pro*Mp*E2F:XVE*>>Mp*LAXR*株の Est 除去実験

図26 D模式図で示すように、*pro*Mp*E2F:XVE*>>Mp*LAXR*株の無性芽を 5 μM Est含有培地で14日間培養後した。植物体を培地から取り出してコニカルチューブに移し、滅菌水で3回洗浄した。5 μM Est含有 (+ Est) あるいは非含有 (-Est) 培地に移し14日間培養した。

葉状体面積の定量

葉状体は背側から撮影した画像を ImageJ/Fiji を用いて青色のチャンネル画像を二値化し、Measure ツールを使用して定量した。再生芽の面積は 0 日目および 7 日目に撮影した画像から同様に面積を定量し、7 日目の面積から 0 日目の切断片の面積を引き再生した葉状体の面積とした。

SEM による観察

SEM による観察は、Nishihama et al. (2015)で記述されているように植物体を液体窒素で凍結し TM3000 (日立ハイテク) を用いて観察した。

表2 実験に用いたオリゴ DNA 配列

| Name | Sequences (5'-3') |
|-----------------------|-------------------------------------------|
| MpLAXR_pro_F1 | caccAGATCTCGAGGCCTCCCTCG |
| MpLAXR_pro_F2 | caccCCAGCATTCGTACACGGTAGG |
| MpLAXR_cds_F1 | caccATGGTGGGGAGGAAGCTGG |
| MpLAXR_R1 | CCTTTTTTCGCCCAGCTTCCTC |
| MpLAXR_cds_R | TTACATGAGTGGGGGAACATAAAAG |
| MpLAXR_3utr_R | GACGCTGCGAGGAAGACTTTTG |
| MpLAXR_pro_F3 | TTATATAGCGAGACCCGGCC |
| MpLAXR_cds_R2 | ATTGCTGTTGCTGCTGGTGC |
| MpLAXR_gRNA1_resist_F | TACCGCGGAGTCAGACGCAGACCCTGGGGCCGATATGCTGC |
| MpLAXR_gRNA1_resist_R | TCTGCGTCTGACTCCGCGGTACCTCCCATCTCGACTCCGC |
| MpLAXR_gRNA1_A | ctcgTATCGAGGGGTGCGACGA |
| MpLAXR_gRNA1_B | aaacTCGTCGCACCCCTCGATA |
| MpLAXR_gRNA2_A | ctcgGGCTGGGGACGTTTCGACA |
| MpLAXR_gRNA2_B | aaacTGTCGAACGTCCCCAGCC |
| MpEF1-qPCR-F1 | AAGCCGTCGAAAAGAAGGAG |
| MpEF1-qPCR-R1 | TTCAGGATCGTCCGTTATCC |
| MpCYCD-qrt-F1 | ATAGAATCGCCCCTTTGAGC |
| MpCYCD-qrt-R1 | GCCTCCAGCTTTGTTTATCGTC |
| MpWIP-qPCR_F1 | GGTCGAGTGACCTTTGATCG |
| MpWIP-qPCR_R1 | GTGGCTGGCTGGATAGTTGG |
| MpLAXR_qPCR_F | CACAGCCTCCAGATGCACTTC |
| MpLAXR_qPCR_R | GAAGAAAGCCTCGTCGTGACC |
| MpLOG_qPCR_F1 | CCGTGTACCCATTCAATCTGC |
| MpLOG_qPCR_R1 | CAAACCCTTGTCACAACACC |
| MpTAA_qPCR_F1 | TCGTAGCAATCTAGCTTCAGCAC |
| MpTAA_qPCR_R1 | TCGTGCGCCCTTGCTATAACC |
| MpYUC2-qPCR-F1 | AGATTGCCGCCCGAAAG |
| MpYUC2-qPCR-R1 | TGGTTGGCAGACCACATGC |

文献

- Aarssen, L.W. (1995) Hypotheses for the Evolution of Apical Dominance in Plants : Implications for the Interpretation of Overcompensation. *OIKOS*. 74: 149–156.
- Abu-Jamous, B., and Kelly, S. (2018) Clust: automatic extraction of optimal co-expressed gene clusters from gene expression data. *Genome Biol.* 19: 172.
- Aki, S.S., Mikami, T., Naramoto, S., Nishihama, R., Ishizaki, K., Kojima, M., et al. (2019a) Cytokinin signaling is essential for organ formation in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* 60: 1842–1854.
- Aki, S.S., Nishihama, R., Kohchi, T., and Umeda, M. (2019b) Cytokinin signaling coordinates development of diverse organs in *Marchantia polymorpha*. *Plant Signal Behav.* 14.
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., et al. (2011) Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 16128–32.
- Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2001) Overexpression of *Arabidopsis* *ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell*. 13: 2609–18.
- Bennett, T.A., Liu, M.M., Aoyama, T., Bierfreund, N.M., Braun, M., Coudert, Y., et al. (2014) Plasma membrane-targeted PIN proteins drive shoot development in a moss. *Curr Biol*. 24: 2776–2785.
- Binns, A.N., and Maravolo, N.C. (1972) Apical dominance, polarity, and adventitious growth in *Marchantia polymorpha*. *Am J Bot.* 59: 691–696.
- Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., et al. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*. 171: 287-304.e15.
- Cao, X., and Jiao, Y. (2020) Control of cell fate during axillary meristem initiation. *Cell Mol Life Sci.* 77: 2343–2354.
- Chen, L., Tong, J., Xiao, L., Ruan, Y., Liu, J., Zeng, M., et al. (2016) YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 67: 4273–4284.

- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 34: i884–i890.
- Cheng, Z.J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y.H., et al. (2013) Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiol*. 161: 240–251.
- Christiaens, F., Canher, B., Lanssens, F., Bisht, A., Stael, S., and Zimmermann, S.D. (2021) Pars Pro Toto : Every Single Cell Matters. 12: 1–14.
- Coudert, Y., Palubicki, W., Ljung, K., Novak, O., Leyser, O., and Harrison, C.J. (2015) Three ancient hormonal cues co-ordinate shoot branching in a moss. *eLife*. 4: 1–26.
- Crawford, S., Shinohara, N., Sieberer, T., Williamson, L., George, G., Hepworth, J., et al. (2010) Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development*. 137: 2905–2913.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 29: 15–21.
- Domagalska, M.A., and Leyser, O. (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12: 211–221.
- Efroni, I., Mello, A., Nawy, T., Ip, P.L., Rahni, R., Delrose, N., et al. (2016) Root Regeneration Triggers an Embryo-like Sequence Guided by Hormonal Interactions. *Cell*. 165: 1721–1733.
- Eklund, D.M., Ishizaki, K., Flores-Sandoval, E., Kikuchi, S., Takebayashi, Y., Tsukamoto, S., et al. (2015) Auxin produced by the indole-3-pyruvic acid pathway regulates development and gemmae dormancy in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell*. 27: 1650–1669.
- Falda, M., Toppo, S., Pescarolo, A., Lavezzo, E., Di Camillo, B., Facchinetti, A., et al. (2012) Argot2: a large scale function prediction tool relying on semantic similarity of weighted gene ontology terms. *BMC Bioinformatics*. 13 Suppl 4: S14.
- Flores-Sandoval, E., Eklund, D.M., and Bowman, J.L. (2015) A Simple Auxin Transcriptional Response System Regulates Multiple Morphogenetic Processes in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genet*. 11: 1–26.
- Flores-Sandoval, E., Eklund, D.M., Hong, S.F., Alvarez, J.P., Fisher, T.J., Lampugnani, E.R., et al. (2018) Class C ARFs evolved before the origin of land plants and antagonize differentiation

- and developmental transitions in *Marchantia polymorpha*. *New Phytol.* 218: 1612–1630.
- Friml, J. (2003) Auxin transport - Shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 7–12.
- Fujita, T., Sakaguchi, H., Hiwatashi, Y., Wagstaff, S.J., Ito, M., Deguchi, H., et al. (2008) Convergent evolution of shoots in land plants: Lack of auxin polar transport in moss shoots. *Evol Dev.* 10: 176–186.
- Gaal, D.J., Dufresne, S.J., and Maravolo, N.C. (1982) Transport of ¹⁴C-indoleacetic acid in the hepatic *Marchantia polymorpha*. *Bryologist.* 85: 410–418.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50: 151–158.
- Harrison, C.J. (2017) Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 372: 20–25.
- He, W., Brumos, J., Li, H., Ji, Y., Ke, M., Gong, X., et al. (2011) A small-molecule screen identifies L-Kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in ethylene-directed auxin biosynthesis and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23: 3944–3960.
- Hernández-García, J., Sun, R., Serrano-Mislata, A., Inoue, K., Vargas-Chávez, C., Esteve-Bruna, D., et al. (2021) Coordination between growth and stress responses by DELLA in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Curr Biol.* 31: 3678-3686.e11.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., et al. (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 8821–8826.
- Hu, X., and Xu, L. (2016) Transcription factors WOX11/12 directly activate WOX5/7 to promote root primordia initiation and organogenesis. *Plant Physiol.* 172: 2363–2373.
- Ikeuchi, M., Favero, D.S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., et al. (2019) Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annu Rev Plant Biol.* 70: annurev-arplant-050718-100434.
- Ishikawa, M., Morishita, M., Higuchi, Y., Ichikawa, S., Ishikawa, T., Nishiyama, T., et al. (2019) Physcomitrella STEMIN transcription factor induces stem cell formation with epigenetic reprogramming. *Nat Plants.* 5: 681–690.

- Ishikawa, M., Murata, T., Sato, Y., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Imai, A., et al. (2011) Physcomitrella cyclin-dependent kinase a links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell*. 23: 2924–2938.
- Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K.T., and Kohchi, T. (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol*. 49: 1084–1091.
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., Nishimura, Y., et al. (2015) Development of gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS One*. 10: e0138876.
- Iwase, A., Harashima, H., Ikeuchi, M., Rymen, B., Ohnuma, M., Komaki, S., et al. (2017) WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 29: 54–69.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., et al. (2011) The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Curr Biol*. 21: 508–514.
- Takei, Y., Yamazaki, C., Suzuki, M., Nakamura, A., Sato, A., Ishida, Y., et al. (2015) Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *Plant J*. 84: 827–837.
- Kareem, A., Durgaprasad, K., Sugimoto, K., Du, Y., Pulianmackal, A.J., Trivedi, Z.B., et al. (2015) PLETHORA genes control regeneration by a two-step mechanism. *Curr Biol*. 25: 1017–1030.
- Kato, H., Ishizaki, K., Kouno, M., Shirakawa, M., Bowman, J.L., Nishihama, R., et al. (2015) Auxin-mediated transcriptional system with a minimal set of components is critical for morphogenesis through the life cycle in *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genet*. 11: e1005365.
- Kato, H., Kouno, M., Takeda, M., Suzuki, H., Ishizaki, K., Nishihama, R., et al. (2017) The roles of the sole activator-type auxin response factor in pattern formation of *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol*. 58: 1642–1651.
- Kato, H., Mutte, S.K., Suzuki, H., Crespo, I., Das, S., Radoeva, T., et al. (2020) Design principles of a minimal auxin response system. *Nat Plants*. 6: 473–482.
- Kohchi, T., Yamato, K.T., Ishizaki, K., Yamaoka, S., and Nishihama, R. (2021) Development and molecular genetics of *Marchantia polymorpha*. *Annu Rev Plant Biol*. 72: 677–702.

- Kojima, M., and Sakakibara, H. (2012) Highly sensitive high-throughput profiling of six phytohormones using MS-probe modification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. In *Methods in Molecular Biology*. pp. 151–64 Humana Press.
- Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., and Kohchi, T. (2013) Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77: 167–172.
- Kulmanov, M., and Hoehndorf, R. (2020) DeepGOPlus: improved protein function prediction from sequence. *Bioinformatics.* 36: 422–429.
- LaRue, C., and Narayanaswami, S. (1957) Auxin inhibition in the liverwort *Lunularia*. *New Phytol.* 56: 61–70.
- Leyser, O. (2005) Auxin distribution and plant pattern formation: How many angels can dance on the point of PIN? *Cell.* 121: 819–822.
- Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2019) The R package *Rsubread* easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 47: e47.
- Liu, J., Hu, X., Qin, P., Prasad, K., Hu, Y., and Xu, L. (2018) The WOX11 - LBD16 Pathway Promotes Pluripotency Acquisition in Callus Cells during de Novo Shoot Regeneration in Tissue Culture. *Plant Cell Physiol.* 59: 734–743.
- Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., and Yang, Z. (2014) WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 7: 1–14.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15: 550.
- Luo, L., Zeng, J., Wu, H., Tian, Z., and Zhao, Z. (2018) A molecular framework for auxin-controlled homeostasis of shoot stem cells in *Arabidopsis*. *Mol Plant.* 11: 899–913.
- Von Maltzahn, K.E. (1959) Interaction between kinetin and indoleacetic acid in the control of bud reactivation in *Selaginella selaginoides* (L.) Hedw. *Nature.* 183: 60–61.
- Masubelele, N.H., Dewitte, W., Menges, M., Maughan, S., Collins, C., Huntley, R., et al. (2005) D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 15694–15699.

- Matosevich, R., Cohen, I., Gil-Yarom, N., Modrego, A., Friedlander-Shani, L., Verna, C., et al. (2020) Local auxin biosynthesis is required for root regeneration after wounding. *Nat Plants*. 6: 1020–1030.
- Meng, W.J., Cheng, Z.J., Sang, Y.L., Zhang, M.M., Rong, X.F., Wang, Z.W., et al. (2017) Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS specify the shoot stem cell niche by dual regulation of WUSCHEL. *Plant Cell*. 29: 1357–1372.
- Monte, I., Ishida, S., Zamarreño, A.M., Hamberg, M., Franco-Zorrilla, J.M., García-Casado, G., et al. (2018) Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nat Chem Biol*. 14: 480–488.
- Montgomery, S.A., Tanizawa, Y., Galik, B., Wang, N., Ito, T., Mochizuki, T., et al. (2020) Chromatin organization in early land plants reveals an ancestral association between H3K27me3, transposons, and constitutive heterochromatin. *Curr Biol*. 30: 573-588.e7.
- Mutte, S.K., Kato, H., Rothfels, C., Melkonian, M., Wong, G.K.S., and Weijers, D. (2018) Origin and evolution of the nuclear auxin response system. *eLife*. 7: e33399.
- Nagata, T., and Takebe, I. (1971) Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*. 99: 12–20.
- Nishihama, R., Ishizaki, K., Hosaka, M., Matsuda, Y., Kubota, A., and Kohchi, T. (2015) Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporeling development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res*. 128: 407–421.
- Nishimura, T., Hayashi, K.I., Suzuki, H., Gyohda, A., Takaoka, C., Sakaguchi, Y., et al. (2014) Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis. *Plant J*. 77: 352–366.
- Powers, S.K., and Strader, L.C. (2020) Regulation of auxin transcriptional responses. *Dev Dyn*. 249: 483–495.
- Prusinkiewicz, P., Crawford, S., Smith, R.S., Ljung, K., Bennett, T., Ongaro, V., et al. (2009) Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 17431–17436.
- Rota, J., and Maravolo, N.C. (1975) Transport and mobilization of ¹⁴C-sucrose during regeneration in the hepatic, *Marchantia polymorpha*. *Bot Gaz*. 136: 184–188.

- Sakai, H., Honma, T., Takashi, A., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., et al. (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science (80-)*. 294: 1519–1521.
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., et al. (2012) Fiji - an open source platform for biological image analysis. *Nat Methods*. 9: 676–82.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 9: 671–5.
- Shi, B., Zhang, C., Tian, C., Wang, J., Wang, Q., Xu, T., et al. (2016) Two-step regulation of a meristematic cell population acting in shoot branching in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*. 12: e1006168.
- Shinohara, N., Taylor, C., and Leyser, O. (2013) Strigolactone Can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane. *PLoS Biol*. 11.
- Shinozaki, Y., Hao, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Ozeki-Iida, Y., Zheng, Y., et al. (2015) Ethylene suppresses tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit set through modification of gibberellin metabolism. *Plant J*. 83: 237–251.
- Steward, F.C., Mapes, M.O., and Mears, K. (1958) Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *Am J Bot*. 45: 705.
- Sugano, S.S., and Nishihama, R. (2018) CRISPR/Cas9-based genome editing of transcription factor genes in *Marchantia polymorpha*. In *Methods in Molecular Biology*. pp. 109–126 Humana Press.
- Sugano, S.S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., et al. (2018) Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS One*. 13: e0205117.
- Sussex, I.M., and Kerk, N.M. (2001) The evolution of plant architecture. *Curr Opin Plant Biol*. 4: 33–37.
- Suzuki, H., Kohchi, T., and Nishihama, R. (2021) Auxin biology in bryophyta: a simple platform with versatile functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 13: a040055.
- Thimann, K.V., and Skoog, F. (1934) On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in *Vicia faba*. *Proc R Soc Lond B*. 114: 317–339.

- Tomescu, A.M.F., Wyatt, S.E., Hasebe, M., and Rothwell, G.W. (2014) Early evolution of the vascular plant body plan - the missing mechanisms. *Curr Opin Plant Biol.* 17: 126–136.
- Törönen, P., Medlar, A., and Holm, L. (2018) PANNZER2: a rapid functional annotation web server. *Nucleic Acids Res.* 46: W84–W88.
- Umeda, M., Ikeuchi, M., Ishikawa, M., Ito, T., Nishihama, R., Kyojuka, J., et al. (2021) Plant stem cell research is uncovering the secrets of longevity and persistent growth. *Plant J.* 106: 326–335.
- Vöchting, H. (1885) Ueber die regeneration der Marchantieen. *Jahrbücher für wissenschaftliche Bot.* 16: 367–414.
- Wang, Q., Kohlen, W., Rossmann, S., Vernoux, T., and Theres, K. (2014a) Auxin depletion from the leaf axil conditions competence for axillary meristem formation in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Cell.* 26: 2068–2079.
- Wang, Y., Wang, J., Shi, B., Yu, T., Qi, J., Meyerowitz, E.M., et al. (2014b) The stem cell niche in leaf axils is established by auxin and cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 26: 2055–2067.
- Weijers, D., and Wagner, D. (2016) Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. *Annu Rev Plant Biol.* 67: 539–574.
- You, R., Yao, S., Xiong, Y., Huang, X., Sun, F., Mamitsuka, H., et al. (2019) NetGO: improving large-scale protein function prediction with massive network information. *Nucleic Acids Res.* 47: W379–W387.
- Yu, G., Wang, L.G., Han, Y., and He, Q.Y. (2012) ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi A J Integr Biol.* 16: 284–287.
- Zhang, C., Wang, J., Wenkel, S., Chandler, J.W., Werr, W., and Jiao, Y. (2018) Spatiotemporal control of axillary meristem formation by interacting transcriptional regulators. *Development.* 145: dev158352.
- Zhang, G., Zhao, F., Chen, L., Pan, Y., Sun, L., Bao, N., et al. (2019) Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. *Nat Plants.* 5: 491–497.
- Zhou, W., Lozano-Torres, J.L., Blilou, I., Zhang, X., Zhai, Q., Smant, G., et al. (2019) A Jasmonate Signaling Network Activates Root Stem Cells and Promotes Regeneration. *Cell.* 177: 942-956.e14.

岩木彩 (2019) ゼニゴケ幹細胞領域におけるオーキシン応答因子の関わる遺伝子制御ネットワーク解明に向けた解析

黄瀬 啓太 (2018) サイクリン D を介したフィトクロムと糖のシグナルによるゼニゴケ細胞周期制御機構 修士論文

謝辞

本研究は京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野にて西浜竜一准教授（現東京理科大学理工学部教授）、河内孝之教授のもとで行われました。指導教員である西浜竜一教授には多くのご指導とご鞭撻を賜りましたこと、心より御礼申し上げます。河内孝之教授には学生として研究を行う機会を与えていただき、多くのご支援を賜りましたことを心より感謝いたします。また山岡尚平准教授（京都大学大学院生命科学研究科）には実験指導や多くのご助言をいただきましたこと、御礼申し上げます。荒木崇教授（京都大学大学院生命科学研究科）、福澤秀哉教授（京都大学大学院生命科学研究科）には副指導教員としてご指導いただきました。深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くの方々のご協力を頂きました。植物ホルモンの定量は理科学研究所環境資源科学研究センターの榎原均教授（現名古屋大学大学院生命農学研究科）、小嶋美紀子氏、竹林裕美子氏に行っていただきました。RNA-seq 解析は基礎生物研究所生物機能情報分析室の重信秀治教授、山口勝司博士にご協力いただきました。深く御礼申し上げます。RNA-seq データの解析は京大生命科学研究科の鈴木秀政博士（現東北大学）、川村昇吾さんのお力をお借りいたしました。また *MpLAXR* の低オーキシン応答性を示すデータ取得を岩木彩氏にご協力いただきました。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、吉竹良洋助教（京都大学大学院生命科学研究科）、黄瀬啓太氏（京都大学大学院生命科学研究科卒業生）に XVE 誘導過剰発現株作出用のベクターを分与頂きました。岡山理科大学理学部の林謙一郎教授にオーキシン生合成阻害剤をご分与頂きました。井上佳祐助教（京都大学大学院生命科学研究科）には多くの実験指導やご助言を賜りました。深く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究が行われました遺伝子特性学分野の皆様にご支援とご協力をいただきました。心より御礼申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Sakiko Ishida, Hidemasa Suzuki, Aya Iwaki, Shogo Kawamura, Shohei Yamaoka, Mikiko Kojima, Yumiko Takebayashi, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Hitoshi Sakakibara, Takayuki Kohchi and Ryuichi Nishihama

Diminished Auxin Signaling Triggers Cellular Reprogramming by Inducing a Regeneration Factor in the Liverwort *Marchantia polymorpha*
Plant & Cell Physiology, in press, 2022