

ゼニゴケを用いた新規植物ペプチド遺伝子の探索および
多面的手法による機能解析

小林 遼亮

目次

目次	1
略語一覧	2
要旨	3
序論	5
結果	10
1. 新規植物ペプチド遺伝子の候補の選抜	10
2. 多面的な MpSGF ^{GOI} の性質解析	11
3. MpSGF10B の機能解析	14
4. MpSGF ^{GOI} のゲノム編集変異株の表現型観察	19
考察	21
材料と手法	27
謝辞	36
引用文献	37
図表	45

略語一覽

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNB	BONOBO
CDS	coding sequence
CLE	CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
Cas9	CRISPR-associated protein 9
DNA	deoxyribonucleic acid
EXP	EXPANSIN
GOI	gene of interest
GUS	β -glucuronidase
HMM	hidden Markov model
lncRNA	long non-coding RNA
LRR	leucine-rich repeat
LRR-RLK/RLP	LRR-receptor-like kinase/ receptor-like protein
MSA	Multiple sequence alignment
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
NBS-LRR	nucleotide binding site-LRR
NLR	nucleotide-binding domain LRR-containing protein
NTCD4	MONLP1-TRIGGERED CELL DEATH ON CHROMOSOME 4
PAM	protospacer adjacent motif
PCR	polymerase chain reaction
PGIP	POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN
PHI-BLAST	Pattern Hit Initiated BLAST
PSI-BLAST	Position-Specific Iterated BLAST
RNA	ribonucleic acid
RT-qPCR	quantitative real-time PCR
SGF	SMALL GENE FAMILIES
sORF	small open reading frame
TPM	transcripts per million
WIP	WPP DOMAIN-INTERACTING PROTEIN
YFP	yellow fluorescent protein

要旨

植物では、多種多様なペプチドによって発生やストレス応答など多岐にわたる生命現象が制御されることが明らかになってきた。ペプチドの多くが細胞外に分泌されて細胞間のシグナル伝達因子として機能する。現在に至るまで多くの種類のペプチド遺伝子が同定されており、今なお機能を有する新たな植物ペプチド遺伝子の報告が増えている。一部のペプチド遺伝子では、コケ植物から種子植物の、いわゆる陸上植物によく保存されていることが報告されている。本研究では、コケ植物ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) を用いて植物種間で保存される新規ペプチド遺伝子の探索を行った。

ゼニゴケとシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に共通するペプチド遺伝子を選出するため、シロイヌナズナの small Open Reading Frame (sORF) データセットをクエリとしてゼニゴケのタンパク質配列に対して配列類似性検索 (BLAST 検索) を行った。検索結果から、シロイヌナズナ sORF とアミノ酸配列が類似するゼニゴケ遺伝子を 28 個見出し、それらを sORF とゼニゴケ遺伝子の組み合わせから 18 個のグループに分類した。これらを *SMALL GENE FAMILIES* (*SGF1-SGF18*) と名付けた。これらの *SGF* は、一部の系統にのみ保存されるものもあるものの、大半が植物種間で広く保存されている傾向を示した。さらに、これらの *SGF* の中から機能解析の対象として、ゼニゴケで機能未知である遺伝子を 7 個選抜した (MpSGF6, MpSGF10B, MpSGF13A, MpSGF13B, MpSGF13C, MpSGF17, MpSGF18)。

機能解析に先立ち、これらの 7 遺伝子が属する 5 つの *SGF* ファミリーについて分子系統解析を行った。ゼニゴケを含む植物 10 種に保存されるオーソログのアミノ酸配列を用いて作成した多重配列アライメントより、保存される残基パターンが散在するものや一箇所に集中するものが見られた。特定の種で高度に保存されているものもあるが、総じて陸上植物種間で保存されていた。

続いて、7 個のゼニゴケ *SGF* 遺伝子産物の細胞内局在を観察するために、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた一過的発現系による蛍光タンパク質融合型 MpSGF (MpSGF-YFP) の蛍光観察を行った。選抜した MpSGF は葉緑体やサイトゾルなどの区画に局在することが観察され、その中でも、MpSGF10B-YFP は細胞外領域で検出された。

これらの MpSGF がゼニゴケ植物体内のどの器官で発現しているかを確認するために、*GUS* 遺伝子を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、全身的にシグナルが見られるもの (MpSGF13A, MpSGF13B)、細胞分裂が盛んな組織にシグナルが集中するもの

(*MpSGF10B*), 配偶子形成器官が特異的に呈色するもの (*MpSGF6*, *MpSGF18A*) など様々な染色パターンが観察された。これらの染色パターンは、公開されているトランスクリプトームによる発現量解析データとも整合する。

ここから、細胞外に分泌される *MpSGF10B* をホルモン様新規植物ペプチドの最有力候補として、より詳細な機能解析を行った。まず、レポーター遺伝子アッセイによる GUS 染色を詳細に観察し、*MpSGF10B* のプロモーター活性が杯状体内部やメリステム周辺のように細胞分裂が盛んな組織や、無性芽の仮根細胞、造精器周辺で観察された。*MpSGF10B* と共発現する遺伝子の GO エンリッチメント解析から、*MpSGF10B* が「細胞周期」や「細胞分裂」に関わる遺伝子と共発現することを示す結果が得られた。また、*MpSGF10B* がゼニゴケでも細胞外に分泌されることを確認した。

続いて、CRISPR-Cas9 を用いて作出した *MpSGF* 遺伝子変異株を用いてさらに詳細な機能解析を行った。これらのゲノム編集株は葉状体において明確な表現型を示さなかった。レポーターアッセイによる GUS 染色パターンがオーキシン応答遺伝子のもものと類似していることから、*Mpsgf10b* 変異株のオーキシン応答性の検証を試みたところ、変異株と野生株の間で変化は確認されなかった。生殖器官 (雄器托) は変異株でも正常に形成されるが、個体あたりの雄器托の数が変異株系統で野生株よりも増加する傾向が観察された。一方で、生殖誘導環境下での成長点の分岐を経時的に観察したところ、野生株と変異株の間で明確な差異は確認されなかった。また、雄器托の発生タイミングも野生株と変異株で概ね同様の傾向を示した。雄株背景の *Mpsgf10b-1^{se}* 変異株と野生型雌株を掛け合わせたところ、正常に胞子が形成され、*Mpsgf10b-1^{se}* 変異株と同じ遺伝子型が遺伝することが確認された。また本研究では、残り 6 種類の *MpSGF* についてもゲノム編集による変異体を作成し、表現型の観察を行った。

MpSGF10B は分子内に 2 つのロイシンリッチリピート (LRR) ドメインをもつ微小な LRR タンパク質 (LRR-only タンパク質) である。植物において、LRR-only タンパク質の機能や作用機序についてはよく知られていない。LRR-only タンパク質が器官の発生に関わることは殆ど知られていない。*MpSGF10B* の機能の実態については明らかにすることはできなかったものの、本研究を通して、*MpSGF10B* の機能が雄性生殖器官の形成に影響する可能性が示唆された。今後、*MpSGF10B* の作用機序や他の植物種における機能に加えて、他の *MpSGF* の特性についても注目されることが期待される。

序論

1. 陸上植物における植物ペプチドの生理的役割

植物ペプチドは、一般にアミノ酸 100 残基以下からなる小分子タンパク質の総称である。植物ペプチドの重要な生理活性として、細胞間シグナル伝達のリガンドとしての機能がある。植物における細胞間シグナル伝達のリガンドとして、オーキシンのような非ペプチド性植物ホルモンが古くから注目されてきた (Verma et al., 2016)。その歴史は、19 世紀後半にダーウィン親子によって行われた植物の光屈性実験まで遡り (Darwin and Darwin, 1880)、現在では植物ホルモンに関する研究は植物の中でも一大学術領域として扱われている。このような古典的な植物ホルモンに比べると植物ペプチドは比較的新しい因子だが、植物ペプチドの最初の発見例である systemin の報告 (Pearce et al., 1991) から 30 年以上経過し、多種多様な植物ペプチドが様々な生命現象に重要な因子として同定されてきた。有名な植物ペプチドとして、CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED (CLE) (Fletcher et al., 1999) や、INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA) (Butenko et al., 2003)、EPIDERMAL PATTERNING FACTOR (EPF) (Hara et al., 2007)、RAPID ALKALINIZATION FACTOR (RALF) (Pearce et al., 2001) などが挙げられる。植物ペプチドの生理的機能は、分裂組織の維持や器官の成長といった発生の制御から、病原体に対する免疫応答にまで及ぶ (Murphy et al., 2012; Tavormina et al., 2015)。局所的な細胞間シグナル伝達に加え、植物ペプチドを介した長距離の組織間コミュニケーションが明らかになっている (Tabata et al., 2014; Notaguchi and Okamoto, 2015; Takahashi and Shinozaki, 2018)。このように植物ペプチドは組織レベルから個体レベルでの情報の統合に重要な因子として、植物がもつ多能性幹細胞の維持と分化のバランス制御や不均一環境への迅速な応答に大きく寄与している。

2. 植物ペプチドの構造と翻訳後修飾

植物ペプチドは、ゲノム中の短い遺伝子や small Open Reading Frame (sORF) にコードされるペプチド前駆体 (prepropeptide や propeptide) が様々な翻訳後修飾を経ることで生産される (図 1)。植物ペプチドの多くは N 末端に分泌シグナル配列 (シグナルペプチド配列) を有し、細胞外に分泌される。分泌された成熟ペプチドは、細胞膜上にあるロイシンリッチリピート受容体様キナーゼ/タンパク質 (Leucine-rich repeat-receptor like kinase/receptor like protein; LRR-RLK/RLP) と結合し、局所的あるいは長距離の細胞間シグナル伝達を行う (Olsson et al., 2018)。その構造や成熟プロセスから、植物ペプチドは

大きく二つのグループに分類される (Matsubayashi, 2014)。一つは、翻訳後の化学修飾と最終的な成熟ペプチドのサイズが小さい (約 5–20 アミノ酸) ことを特徴とする翻訳後修飾ペプチド (post-translationally modified peptide) である。植物ペプチドの翻訳後修飾には、チロシン硫酸化、プロリン水酸化、および水酸化プロリンの糖修飾の 3 種類が知られており、これらの修飾は小胞体やゴルジ体で行われる (Matsubayashi, 2018; Stührwohldt and Schaller, 2018)。これらの化学修飾によって電荷の分布や親水性、立体構造などの物理化学的特性が変化し、受容体に対するペプチドリガンドの結合能や特異性が調節される。もう一つのグループは、システイン残基によって分子内ジスルフィド結合を形成する、比較的サイズが大きい (約 40–120 アミノ酸) システインリッチペプチド (cysteine-rich peptide) である。植物ペプチドの多くは、細胞外に輸送される過程で subtilisin 様プロテアーゼによる加水分解を受ける (Chen et al., 2020)。これらの翻訳後修飾を経て成熟型となり、リガンドとして細胞間シグナル伝達を担う (図 1)。

3. 新規植物ペプチド遺伝子の同定方法

古典的な遺伝子予測アルゴリズムでは、植物ペプチド遺伝子のような短い配列を遺伝子ではなくノイズと判断するように設定されており、古いバージョンの遺伝子データベースでは実際にタンパク質をコードする遺伝子でも配列の短さの為に non-coding RNA として登録される可能性があった (Hellens et al., 2016)。植物ペプチド遺伝子の重要性が認知されつつあった 2000 年初頭、新たな植物ペプチド遺伝子を探索するために様々な手法が開発されてきた (Cheng et al., 2011)。植物では花田らにより、ペプチドをコードする可能性が高い sORF (coding sORF) の検出に特化した遺伝子予測アルゴリズムが開発された (Hanada et al., 2007; 2010)。この遺伝子予測とトランスクリプトームを組み合わせることで、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) で遺伝子間領域や long non-coding RNA (lncRNA) から形態形成に関与する coding sORF を発見することに成功している (Hanada et al., 2013)。さらに近年、機能未知の coding sORF や分泌ペプチドのデータベースが構築されている (Ghorbani et al., 2015; Hazarika et al., 2017; Chen et al., 2020)。シロイヌナズナの遺伝子データベース (The Arabidopsis Information Resource; TAIR) では、長さ 120 アミノ酸以下の短い遺伝子の登録数がバージョン更新に従い増加している (Takahashi et al., 2019)。この中に形態制御のみならず様々な生理現象に関わるような未知の coding sORF や植物ペプチドが存在することは十分に考えられる。先行研究により提供される coding sORF や機能未知の分泌ペプチドの情報は新たな植物ペプチドを探索する手掛かりとして大変有用であると考えられる。

4. 植物ペプチドと陸上植物の進化の関係性

これまでに同定されてきた植物ペプチドおよびその受容体の多くは、陸上植物種間に保存されている一方で、それらの遺伝子ファミリーが緑藻類では保存度が低いことから、植物ペプチド-受容体によるシグナル伝達は陸上植物の共通祖先で獲得され、植物の地上進出に多大な貢献をしたといわれている (Bowman et al., 2017; Olsson et al., 2018; Furumizu et al., 2021)。例えば、シロイヌナズナの CLE は茎頂および根端の幹細胞の維持に関与する植物ペプチドである (Fletcher et al., 1999; Hobe et al., 2003)。CLE ペプチドとその受容体は、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrium patens*) にも保存されており、細胞運命の制御や細胞分裂面の決定を通じて二次元的な成長から三次元的な成長への転換に関与することが報告されている (Moody et al., 2018; Whitewoods et al., 2018)。この三次元方向の成長は植物の陸上化に大きく寄与した形質と言われている (Furumizu et al., 2018; Moody, 2020)。

5. コケ植物のモデル生物ゼニゴケ

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L. subsp. *ruderalis*) は、コケ植物苔類に属する植物の一種である (Qiu et al., 2006; Bowman et al., 2017; 2022)。ゼニゴケは生活環の大部分が一倍体である葉状体 (thallus; 複数形 thalli) で占められており、胞子によって有性生殖を行うほか、葉状体上に形成される無性芽 (gemma; 複数形 gemmae) や葉状体切片からクローン個体を殖やすことができる (Shimamura, 2016)。成長の速さや、一倍体世代が優占しておりノックアウト変異株の作出が容易であることなど、分子遺伝学実験の材料としての利点が多い (Ishizaki et al., 2015)。現在まで、ゼニゴケを用いて逆遺伝学、細胞生物学的に目的遺伝子の機能を研究するためのプラットフォームが整えられた。例えば、コンストラクト作成に用いる gateway binary vector (Ishizaki et al., 2015)、アグロバクテリウムによる形質転換法 (Ishizaki et al., 2008; Kubota et al., 2013; Tsuboyama and Kodama, 2014)、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集 (Sugano et al., 2014; 2018) 等の様々なシステムが構築されている。

さらに、染色体レベルでゲノム配列が公開されたことや、様々な網羅的解析が可能な遺伝子発現データベースが利用できることも、分子生物学実験のモデル生物としての利便性を向上させている (Montgomery et al., 2020; Kawamura et al., 2022)。とりわけゼニゴケを分子遺伝学的実験に用いる利点として、転写因子やシグナル伝達を制御する遺伝子の冗長性の低さが挙げられる。このことは *CLE* や *EPF* のような植物ペプチド遺伝子でも同様であり、シロイヌナズナではパラログを多く有している一方でゼニゴケはその数が少ない (Bowman et al., 2017; Olsson et al., 2018)。

上述の通り、ゼニゴケは無性芽によってクローン個体を維持することができる（図2）。培地に接地した無性芽は、吸水と光によって休眠状態から脱却し栄養成長を開始する。ゼニゴケの成長点（apical meristem）は無性芽の中心から点対称の先端部分のくぼみ（apical notch）に位置する。はじめ無性芽の両極端の2箇所に位置する幹細胞は周期的に、成長軸に直交する向きに分裂し、二分岐を繰り返す。組織の成熟が進むと背面に杯状体（gemma cup）が形成され、内部で無性芽が生み出される。この無性芽は杯状体底部の一細胞に由来し、無性芽から植え継ぐ植物体は常に同一のクローン体になる。無性芽の成長が開始してからおよそ3週間程度で再び無性芽を得ることができる。

6. ゼニゴケの生殖誘導とその関連遺伝子

ゼニゴケの生殖誘導は長日条件および遠赤色光照射によって促進される（Chiyoda et al., 2008）。生殖誘導を受けたゼニゴケの頂端分裂組織から生殖器托が発生する（図2, 図3）。ゼニゴケは雌雄異株であり、雄株からは雄器托、雌株からは雌器托が鉛直方向に発生する（図2）。雄器托の上部にある円盤構造（雄器床）に水が溜まると内部にある造精器から精子が放出され、雌器托の上部にある破れ傘状の構造（雌器床）内側の造卵器に精子を含む水が到達することで受精が行われる。受精してできた接合子は孢子体となり、先端の孢子嚢にある孢子が散布され、再び葉状体へと成長する。

環境刺激による生殖誘導シグナルの伝達に関わる遺伝子がいくつか特定されている（Kohchi et al., 2021; Yamaoka et al., 2021）。例えば、長日条件には *MpFKF-MpGI* モジュール、遠赤色光には *Mpphy-MpPIF* モジュールが関与する（Kubota et al., 2014; Inoue et al., 2019）。オーキシシンシグナルの下流に位置する *MpmiR529-MpSPL* や *MpmiR160-MpARF3* も生殖誘導に関与している（Flores - Sandoval et al., 2018; Tsuzuki et al., 2019）。これらのシグナルの下流で、*MpBNB* は生殖発生に関するマスターレギュレーターとして働く（Yamaoka et al., 2004; 2018）。これらのモジュールが制御するシグナル伝達は雌雄で共通している。また、これらの遺伝子はシロイヌナズナでも光応答や配偶子形成に関与していることから、相同の遺伝子ネットワークが陸上植物種間で保存されているものと推測されている（Kohchi et al., 2021）。

7. 本研究の狙い

植物ペプチドは、発生や環境応答に対して重要な役割を果たしており、進化的にも大きな意義のある因子が多く報告されてきた。しかし、様々な技術的障壁により、長らく未知の植物ペプチド遺伝子を探索することが困難とされてきた。ところが、オミクス解析の改良やバイオインフォマティクス技術を駆使したアプローチの開発、さらには、分子遺伝学の対象に

適したモデル植物の登場と、現在に至り新たな植物ペプチド遺伝子の解析が難しくなくなりつつある。未だ発見されていない植物ペプチドの存在を示唆する情報も多く存在する。

本研究では、シロイヌナズナでペプチドをコードする可能性が高い 7,901 個の sORF (Hanada et al., 2013) を機能未知の植物ペプチド遺伝子のプールとし、それらと配列類似度が高いゼニゴケ遺伝子の機能解析を通じて、陸上植物に共通する機能未知の植物ペプチド遺伝子の同定とその機能を明らかにすることを目的とした。

結果

1. 新規植物ペプチド遺伝子の候補の選抜

1.1. シロイヌナズナ sORF とゼニゴケデータベースを用いた配列類似性検索

本研究は、植物種間で保存される新規植物ペプチド遺伝子を同定することを目的としている。シロイヌナズナとゼニゴケのように、系統的に遠く離れた種間で保存される遺伝子は、それらの間に位置する種においても同様に保存されていると想定した。そこで、BLAST 検索によって陸上植物種間で保存される新規植物ペプチド遺伝子の候補の選抜を試みた。

選抜の流れを図 4 A に示している。新規植物ペプチド遺伝子のプールとして、花田らによって coding sORF として報告された sORF のデータセット (Hanada et al., 2013) を利用した。この sORF は、シロイヌナズナの遺伝子間領域や lncRNA からペプチドをコードするような配列を検出するアルゴリズムによって抽出され、マイクロアレイによって様々な器官および条件で発現することが確認されている。BLAST 検索に先立ち、長い遺伝子がヒットするのを防ぐためにゼニゴケのタンパク質データベースから 200 アミノ酸残基未満の短いタンパク質を抽出した。これらゼニゴケの短いタンパク質データベースに対し、アミノ酸配列に翻訳したシロイヌナズナの sORF をクエリとして BLASTp 検索を行った。E-value の閾値を 0.0001 とし、それ未満のクエリとヒットの組み合わせ 18 群を、陸上植物に保存される植物ペプチド遺伝子の候補として選抜した。これらの組み合わせを、*SMALL GENE FAMILIES* (SGF) と名付けた。この 18 群の SGF には 28 個のゼニゴケ遺伝子 (MpSGF) が含まれる (図 4 A, 表 1)。

1.2. 植物種間における SGF 遺伝子ファミリーの進化的保存性

18 群の SGF が植物種間でどの程度進化的に保存されているかを確認するために、Dicots PLAZA 5.0 を利用してオーソログの調査を行った。ここでは、シロイヌナズナ、イネ (*Oryza sativa*), アンボレラ (*Amborella trichopoda*), セコイアデンドロン (裸子植物, *Sequoiadendron giganteum*), イヌカタヒバ (シダ植物, *Selaginella moellendorffii*), ツノゴケ (*Anthoceros agrestis*), ゼニゴケ, ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrium patens*), シャジクモ (*Chara braunii*), クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の 10 種に注目した。これらの植物種において MpSGF と同じ Orthologous gene family ID が付与されている遺伝子の個数を図 4B に示した。このチャートから、SGF 遺伝子ファミリーの大半がシロイヌナズナとゼニゴケ以外の陸上植物種でも保存されていることが分かる。一方で、

SGF5 のようにごく一部の種にのみオーソログが登録されている *SGF* も見受けられた。

1.3. 機能未知 Mp*SGF* 遺伝子の選抜

28 個の Mp*SGF* 遺伝子には、ドメイン構造のアノテーションが付与されているものがある (図 5, 表 2)。この中で、細胞外に分泌するためのシグナルペプチド配列を、Mp*SGF10B* と Mp*SGF16* ファミリーのみが有していることが予測された。Mp*SGF16* は「Dirigent」ドメインを有するファミリーである。Dirigent タンパク質は形成性操作タンパク質と呼ばれ、二次代謝産物を合成する酵素に作用して代謝産物の立体構造を一意的に決定づけるタンパク質である (Pickel and Schaller, 2013)。したがって、*SGF16* ファミリーはシグナル伝達のリガンドとしての役割をもつとは考えにくい。他方、Mp*SGF10B* は「LRR」ドメインをもつタンパク質であり、植物において LRR モチーフは受容体 (LRR-RLK/RLP および NLR) に数リピート存在する (Wang et al., 2011)。しかしながら、Mp*SGF10B* は受容体としては LRR モチーフが少なく、転写因子では細胞外分泌に重要なシグナルペプチド配列をもつことは考えにくい。これらの観点から、Mp*SGF10B* は細胞外においてシグナル伝達に関わりうるタンパク質として候補に含めた。その他、例えば「Ribosomal L21e」ドメインをもつ Mp*SGF2* や「Ubiquitin related modifier」ドメインをもつ Mp*SGF12* のように、ドメインから分子機能がある程度推測できるものが含まれていた。このような候補は、ペプチドの分子活性の新規性の観点から解析対象から除外した。最終的に、7 個の Mp*SGF* 遺伝子を新たな植物ペプチド遺伝子の候補として選出した (図 4A)。便宜上、本論文ではこれらの遺伝子を総称して Mp*SGF^{GOI}* と表記する。なお、Mp*SGF6* および Mp*SGF17* は、研究開始当初の遺伝子アノテーション (MpTak1v5.1) ではドメインのアノテーションが付与されていなかったため、この 2 遺伝子も Mp*SGF^{GOI}* に含めて解析を行った。

2. 多面的な Mp*SGF^{GOI}* の性質解析

2.1. *SGF^{GOI}* ファミリーの分子系統解析

Mp*SGF^{GOI}* が属するファミリー (*SGF6*, *SGF10*, *SGF13*, *SGF17*, *SGF18*) は、複数の陸上植物種間に保存されていることが分かった (図 4B)。そこで、前述の植物 10 種から取得した遺伝子のアミノ酸配列を用い、多重配列アラインメント (MSA) と分子系統解析を行った。(図 6, 7)。*SGF6* はセコイアデンドロンを除き、シャジクモからシロイヌナズナでオーソログが確認された。それらの配列は保存する残基が全長にわたって存在することが分かった (図 6A)。*SGF10* は陸上植物種に広く保存されており、藻類にはオーソログが確認されなかった。配列についても全長にわたって保存度が高く、特にロイシン残基がよく

保存されていることが確認できる (図 6B)。SGF13 はアンボレラとツノゴケを除く植物種に保存されている。しかし、クラミドモナスでもこのファミリーのオーソログが確認されたことから、アンボレラとツノゴケにおいても未発見の SGF13 オーソログが存在する可能性がある。SGF13 のオーソログの大半は配列長が 100 アミノ酸残基未満と短く、その全体がよく保存されていることが分かった (図 6C)。SGF17 はセコイアデンドロンとイヌカタヒバを除いてシャジクモからシロイヌナズナまでオーソログが存在するが、コピー数はいずれも単一である。それらの配列の C 末端領域が高度に保存されていることが分かった (図 6D)。SGF18 は他の SGF^{GOI}とは異なり、シロイヌナズナの sORF に加え、ゼニゴケとヒメツリガネゴケにのみオーソログが確認された (図 6E)。特にヒメツリガネゴケでは重複が進んでおり、この遺伝子がこれら 2 種を含むクレードにおいて適応的であることが推測される。

これらの MSA を用いて分子系統樹を作成した。SGF6 では、コケ植物やイヌカタヒバのオーソログを主に含むクレードと、被子植物のみを含むクレードの 2 つに分割された (図 7A)。SGF6 はそれぞれの種内で独自に重複が進んでいる傾向が見受けられる。MpSGF6 はゼニゴケ一種のみで構成されるクレードに属しており、その中で配列長が特に短いことから、他の遺伝子の一部が重複して現れた遺伝子であることが示唆される。SGF10 では信頼性のある系統樹を得ることができなかった (図 7B)。SGF13 はクラミドモナスのクレードと陸上植物のクレードに分かれた (図 7C)。信頼度は低いものの、陸上植物の共通祖先で数回の重複が起こり、その後の種分化後に種子植物を中心に遺伝子喪失が起こった可能性が推測できる。SGF17 は種子植物のクレードと、コケ植物とシャジクモを含むクレードに分かれた (図 7D)。SGF18 では乱れた樹形が得られた (図 7E)。このことは、ヒメツリガネゴケで重複する配列間の変異が少ないことが原因と考えられる。シロイヌナズナでも sORF6133 がオーソログとして保存されている一方で藻類では確認されないことから、SGF18 が陸上植物の共通祖先で獲得されたと推測することができる。この場合、SGF18 遺伝子がヒメツリガネゴケとゼニゴケを含む系統でより適応的であり、シロイヌナズナの sORF6133 は痕跡的あるいは偽遺伝子的な配列である可能性も考えられる。

2.2. 一過的発現系を用いた MpSGF^{GOI}の細胞内局在観察

MpSGF^{GOI} の細胞内局在を調べるために、蛍光タンパク質 YFP 融合型 MpSGF (MpSGF-YFP) を一過的に発現するベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) 表皮の共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。それらの MpSGF-YFP は大きく分けて、葉緑体や細胞外領域、サイトゾルの 3 通りの局在パターンを示した (図 8)。MpSGF6-YFP は葉緑

体と共局在した。MpSGF10B-YFP は、低張液条件ではシグナルが細胞膜と重なるが、0.8 M マンニトール溶液で原形質分離を引き起こすと細胞外領域にシグナルが広がる様子が観察された。この結果は、MpSGF10B が分泌経路を通して細胞外に分泌されることを示している。MpSGF13A, MpSGF13B および MpSGF13C はサイトゾル領域でシグナルが観察された。MpSGF17-YFP は葉緑体とシグナルが重なった。MpSGF18A-YFP はサイトゾル領域でシグナルが観察された。MpSGF6-YFP および MpSGF17-YFP が葉緑体に局在することについて、それらのシグナルが実際に葉緑体の自家蛍光と重なることも確認した (図 9)。

2.3. GUS を用いたレポーター遺伝子アッセイによるプロモーター活性の観察

続いて、レポーター遺伝子アッセイにより *MpSGFGOI* プロモーターが活性化する器官の可視化を行った。*MpSGFGOI* の CDS の上流 4-5 kbp 制御下で *GUS* 遺伝子を発現するゼニゴケ形質転換株を、雌雄両方の背景で作出し、栄養成長相の植物体と生殖器官を染色した (図 10)。なお、栄養成長相のサンプルとして、雄株では 2 週齢の葉状体、雌株では 3 週齢の葉状体を用いた。*proMpSGF6:GUS* の *GUS* シグナルは造精器でのみ検出され、葉状体および雌器床は染色されなかった。*MpSGF10B* のプロモーター活性は杯状体内部や頂端分裂組織、造精器および造卵器周辺に見られた。*proMpSGF13A:GUS* と *proMpSGF13B:GUS* は、雄株では全身的に強いシグナルが観察された。雌株での全体的なシグナルは雄株に比べると弱い、杯状体内部が強く染まった。*proMpSGF13C:GUS* のシグナルは雌雄ともに検出できなかった。*MpSGF17* のプロモーター活性は造精器および造卵器で強く現れた。*proMpSGF18A:GUS* のシグナルは造精器でのみ観察された。

2.4. 様々な器官および条件における発現量の確認

ゼニゴケの遺伝子発現データベース MarpolBase Expression を利用し、各 *MpSGFGOI* の器官・条件での発現変動を調べた。図 11 は MarpolBase Expression より取得した発現量 (TPM 値) を図示したものである。*MpSGF6* は、葉状体の中肋 (“21day midrib”) や胞子体 (“13day sporophyte”) で比較的高く発現する傾向が示された。ただし、発現量は全体的に低く、*GUS* を用いたレポーター遺伝子アッセイでは検出限界を下回っていたものと考えられる。また、*GUS* の染色が観察された雄器床および造精器では発現量が低く示されたが、精子 (“sperm cell”) において一つだけ高く外れるサンプルがある。*GUS* 遺伝子産物の安定性を考慮すると、*MpSGF6* は限られた時期の造精器や精子でのみ発現する可能性が考えられる。*MpSGF10B* は無性芽 (“1day gemma”) や杯状体 (“21day gemma cup”), 雄性生殖器官 (“antheridiophore” および “antheridium”) で発現量が増加する。この傾向は、G

US の染色パターンと整合する。MpSGF13A と MpSGF13B は類似する発現パターンを示す。この 2 遺伝子は杯状体 (“21day gemma cup”) で特に高く発現し、ABA 処理によって発現が誘導される。このデータは、雌雄両方において杯状体内が強く染まるという GUS の染色パターンと合致する。また、それ以外の器官でも比較的高い発現量を示しており、定常状態でもある程度発現していることが示唆される。MpSGF13C は GUS による呈色を示さなかったものの、葉状体や生殖器官で発現しているデータが得られた。上流のプロモーター配列の他に、発現に必要なエレメントが存在する可能性がある。MpSGF17 の mRNA は造精子 (“antheridium”) でより蓄積する。このことは GUS の染色パターンと合致する。その一方で葉状体のような他の器官である程度 TPM 値が高いことが示された。MpSGF18A の発現量は精子において突出している。これは GUS のシグナルが造精子に強く現れることと合致する。

ここまで、MpSGF^{GOI}の性質について様々なアプローチから包括的に解析を行った。これらの候補の中で、MpSGF10B は細胞外に分泌されることがベンサミアナタバコを用いた一過的発現系によって明らかになった。また、レポーター遺伝子アッセイと遺伝子発現データベースを利用した調査から、MpSGF10B が特定の器官特異的に発現していることが確認された。さらに、SGF10 のオーソログが陸上植物種間で保存され、藻類にはそのオーソログの存在が未確認であることから、SGF10 は陸上植物の共通祖先で獲得されたファミリーと考えられる。以上の観点から、MpSGF10B を細胞外でシグナル伝達に関わる植物ペプチド遺伝子の有力候補と捉え、更なる機能解析を行った。

3. MpSGF10B の機能解析

3.1. ゼニゴケにおける MpSGF10B の細胞内局在解析

ベンサミアナタバコを用いた一過的発現解析より、MpSGF10B が分泌経路を通過して細胞外に輸送されることが示された。ゼニゴケにおいても同様に MpSGF10B が細胞外に分泌されることを確認するために、MpSGF10B-YFP を恒常的に発現する形質転換体を作成した。この植物体を用いた共焦点レーザー顕微鏡観察の結果、原形質分離処理によって MpSGF10B-YFP の蛍光シグナルが細胞外領域に検出された (図 12)。すなわち、ゼニゴケにおいても MpSGF10B が細胞外に分泌することが確かめられた。

3.2. より詳細な MpSGF10B の発現解析

GUS を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、MpSGF10B のプロモーター活性は

杯状体内や造精器に見られた。この染色パターンをより詳細に観察した。葉状体では、GUS のシグナルは杯状体の底部と無性芽に加え、頂端分裂組織の周辺でも確認された (図 13A, B, C)。無性芽では一部の細胞が呈色した (図 13D, E)。雄器床の染色サンプルの横断面観察より、造精器周辺に加えて柄と雄器床の連結部分にも GUS のシグナルが検出された (図 13F)。

MpSGF10B の生物学的な機能を推測するために、遺伝子共発現解析を行った。8 つの器官と 2 条件のトランスクリプトームデータを用い、MpSGF10B 遺伝子の発現量の変動に対しピアソン相関係数が全体の上位 1%に相当する 182 遺伝子を共発現遺伝子として抽出した。それら共発現遺伝子群の GO アノテーションの濃縮を調査したところ、「細胞周期」や「細胞分裂」に関連するカテゴリーが有意に濃縮した (図 14, 表 4)。この結果は、GUS のシグナルが、細胞分裂が盛んな杯状体や頂端分裂組織で観察されたことと整合する。また、微小管 (“microtubule”) のカテゴリーも有意に濃縮した。微小管の合成が仮根の伸長に関わることが報告されており (Otani et al., 2018), 無性芽の GUS で染まった細胞が仮根細胞であると推測できる。以上より、MpSGF10B 遺伝子は細胞周期や細胞分裂に関連する遺伝子と共発現することが確認された。MpSGF10B はこれらの現象に何かしら寄与していることが推測される。

3.3. ゲノム編集による Mpsgf10b^{se} 変異株の作出

次に、逆遺伝学的に MpSGF10B の機能を解析することを試みた。ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 を利用し、CDS 内のゲノム編集サイトに変異を導入した二種類の変異株アレルを作出した (図 15A)。なお、雄株野生型 Tak-1 背景を形質転換に用いた。これら変異株の遺伝子型はサンガー法により特定した (図 15B)。また、逆転写 PCR およびサンガー法により転写産物にも同様の変異が生じていることも確認した。これらの変異株では、フレームシフトにより MpSGF10B の CDS の途中で終止コドンが現れ、完全長の翻訳産物が合成されないと予想される (図 15C)。

3.4. 葉状体における Mpsgf10b^{se} 変異株の表現型観察

3.4.1. Mpsgf10b^{se} 変異株の葉状体は正常に成長する

ここまでの解析より、MpSGF10B は葉状体の頂端分裂組織で発現し、細胞分裂関連遺伝子と共発現することが明らかになった (図 13A, C, 14)。そこでまず、葉状体の栄養成長の様子を観察したところ、Mpsgf10b^{se} 変異株の葉状体は野生株と同様の形態を示した (図 16A)。上方向から撮影した 2 週齢植物体の面積は、野生株と変異株との間で明確な差は確

認められなかった (図 16B)。同様に、2 週齢植物体の頂端分裂組織の個数も野生株と変異株で同程度だった (図 16C)。これらの結果から、*MpSGF10B* は葉状体の成長に不可欠な因子ではないことが示された。

3.4.2. *Mpsgf10b^{se}* 変異株はオーキシン応答性を示す

MpSGF10B のプロモーター活性が杯状体内部および頂端分裂組織の周辺で検出された (図 13A, B, C)。これらの染色パターンは、オーキシン応答遺伝子のものとよく類似している (Ishizaki et al., 2012)。このことを踏まえ、*MpSGF10B* がオーキシニングナルと何かしら関連する可能性を考えた。そこで、*Mpsgf10b^{se}* 変異株のオーキシン応答性を確かめた。オーキシンのアナログである 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) を含む培地で無性芽を培養したところ、野生株と *Mpsgf10b^{se}* 変異株は同様の形態を示した (図 17A)。さらに、それらの遺伝的背景におけるオーキシン応答性遺伝子 *MpWIP* (Jones and Dolan, 2017) および *MpEXP* (Kato et al., 2017) の発現量を RT-qPCR によって定量した結果、*Mpsgf10b^{se}* 変異株のアリル間で共通の傾向を示さず野生株と同等の結果を示した (図 17B)。さらに、遺伝子発現データベースより *MpSGF10B* 自体の発現がオーキシン処理では変化しないというデータも得られている (図 11, “auxin: mock” vs “auxin: 2,4-D”)。以上の結果から、*MpSGF10B* 自体はオーキシニングナルの伝達に必要ではないことが示唆される。

3.5. 雄器托における *Mpsgf10b^{se}* 変異株の表現型観察

3.5.1. *Mpsgf10b^{se}* 変異株では生殖器托の形成数が増加する

MpSGF10B の生殖器官における機能を探索した。ゼニゴケを長日条件下で遠赤色光を照射すると相転換が起こり、頂端分裂組織に生殖系列細胞が形成される。基本的に先端組織 (apical notch) 一か所に一つの生殖器托が発生する (図 3)。白色光下での前培養ののち生殖誘導をおこなうと、*Mpsgf10b^{se}* 変異株でも正常に雄器托が形成され、雄器托が途中で分岐するような明らかな形態異常は観察されなかった (図 18A)。しかし、*Mpsgf10b^{se}* 変異株系統で野生株よりも雄器托の数が若干増加する傾向が観察された (図 18B)。雄器托の形成数は個体ごとの成長度に大きく左右されるものの、試行毎の平均値で比較すると再現性が得られた。その差分はかなり小さいが、図 16 で示されたように生殖誘導以前の葉状体に明確な差がないことを踏まえると、*MpSGF10B* は生殖誘導後の生理応答に関与している可能性が考えられる。

3.5.2. Mpsgf10b^{se}変異株の雄器托発生にかかる日数は変化しない

雄器托の数に関わる要因のひとつとして、雄器托が観測されはじめる日数も考えられる。これは、雄器托が周期的に形成されるため最初の雄器托形成が早ければその後の雄器托の形成も早くなり、単位時間当たりの雄器托の数が多くなるという予想に基づく。生殖誘導条件下で無性芽を生育し、それぞれの個体で少なくとも一つの雄器托が観察される日数を数えると、Mpsgf10b^{se}変異株と野生株で雄器托が観察され始めるタイミングは同程度だった(図 19A)。配偶子形成のマスター因子である MpBNB の発現量を RT-qPCR により定量すると、Mpsgf10b^{se}変異株は野生株よりも若干減少する傾向が見られた(図 19B)。また、MpSGF10B-YFP 過剰発現株では MpBNB の発現量が増加した。これらの結果から、MpSGF10B は MpBNB の発現に必要なではないものの、発現量の制御に何かしら関与する可能性がある。

3.5.3. 生殖誘導条件下における葉状体の分岐頻度は Mpsgf10b^{se}変異株で変化しない

雄器托の形成に関わるほかの要因として、頂端分裂組織の数、すなわち葉状体分岐の頻度に変化が生じた可能性を考えた。そこで、生殖誘導条件下での無性芽の成長を経時的にモニターし、頂端分裂組織と雄器托の個数の変化を調べたところ、野生株と Mpsgf10b^{se}変異株とで葉状体の分岐の頻度の差は見られなかった(図 20A, B)。

以上を踏まえると、MpSGF10B の遺伝子変異は雄器托の発生タイミングや生殖誘導条件下での成長自体には大きな影響を及ぼさないことが確認された。

3.6. Mpsgf10b^{se}変異株の雄性生殖能力

MpSGF10B のプロモーター活性は造精器周辺で観察された(図 10, 13F)。造精器からは精子が生産される。そこで、Mpsgf10b^{se}変異株の生殖能力を検証した。雄株背景の Mpsgf10b-1^{se}変異株と野生型雌株 Tak-2 を掛け合せの結果、正常に胞子が形成された(図 21)。この胞子から Mpsgf10b-1^{se}と同じ遺伝子型の個体を得られたことから、MpSGF10B は雄株の生殖能力に必要なではないことが明らかになった。

3.7. MpSGF10B の発現量と表現型の相関

生殖誘導による MpSGF10B の発現量を RT-qPCR より定量したところ、通常培養条件に比べて生殖誘導環境下で MpSGF10B の発現量が増加した(図 22A)。同様に遺伝子発現データベースからも、遠赤色光照射によって MpSGF10B の mRNA 蓄積量が増加することが確認された(図 22B)。以上のことから、MpSGF10B が生殖誘導環境において発現誘導を受けることが示された。

続いて、雄器托の数と *MpSGF10B* 発現量の相関関係を確認した。そこで、*MpSGF10B* の CDS を恒常的に発現する形質転換株 (*proMpEF1a:MpSGF10B*) を複数系統作出した。それらの *MpSGF10B* 発現量を RT-qPCR により確認した (図 23A)。恒常発現株において雄器托の数が野生株よりも増加した (図 23B)。*MpSGF10B* の発現量と雄器托の数の間に、明確な相関関係は確認されなかった (図 23C)。

3.8. *Mpsgf10b* 変異の相補株の作出

Mpsgf10b^{se} 変異株の雄器托数の増加が、相補によって回復するかを確認した。*MpSGF10B* のプロモーター領域を含むゲノム断片をクローニングし、*Mpsgf10b-1^{se}* に導入した (図 24A)。*Mpsgf10b-1^{se}* はゲノム編集カセットを保持しており、導入する *MpSGF10B* の配列でゲノム編集が起こることを防ぐために、導入する *MpSGF10B* のゲノム編集領域にアミノ酸の同義置換を施した (図 24A, *MpSGF10B^{resi}*)。独立した形質転換体を 2 系統単離した (*MpComp1*, *MpComp2*)。DNA シーケンシングにより得られる配列のスペクトルから、これらの形質転換体にはゲノム編集を受けた内在性 *MpSGF10B* 配列と導入した *MpSGF10B^{resi}* 配列が重複して検出されていることが確認できた (図 24B)。これらの相補株の雄器托の数は野生株よりも増加し、*Mpsgf10b-1^{se}* の表現型を相補しなかった (図 24C)。導入した相補コンストラクトから翻訳産物が実際に合成されているかを検証する必要がある。

3.9. 無性芽の仮根細胞数の計測

MpSGF10B のプロモーター活性が無性芽表面の仮根細胞と思われる細胞で検出されたことから (図 13D, E)、野生株および *Mpsgf10b-1^{se}* 変異株、*MpSGF10B* 恒常発現株で無性芽の仮根細胞の数を計測した (図 25A)。*Mpsgf10b^{se}* 変異株および *MpSGF10B* 恒常発現株において、無性芽の仮根細胞数は野生型と同程度だった (図 25B)。このことは、*MpSGF10B* は仮根細胞への分化に関与しないことを示唆する。

3.10. ウェスタンブロッティングによる *MpSGF10B* タンパク質検出の試み

MpSGF10B タンパク質の発現を確認するために、ウェスタンブロッティングによる検出を試みた。*MpSGF10B* のアミノ酸配列の一部をエピトープとして抗体を作製した (図 26A)。*MpSGF10B*-YFP または YFP のみを発現する形質転換ゼニゴケから抽出したタンパク質を SDS-PAGE によって分離し、これらの抗体を用いてウェスタンブロッティング解析を行ったところ、抗体#1 において非特異を含む複数のバンドが検出された (図 26B)。また、抗体#2 ではシグナルは検出されなかった (図 26C)。抗 GFP 抗体を用いると、

MpSGF10B-YFP を発現する植物体で約 55 kDa 付近と約 35 kDa 付近にバンドが検出された (図 26D, アスタリスク)。このバンドは YFP のみ発現するサンプルには現れず, 抗体 #1 でも MpSGF10B-YFP を発現する植物体で同様の位置にバンドが見られた。今回のコンストラクトにおける MpSGF10B-YFP の予想分子量は約 46.7 kDa (シグナルペプチド配列を含む) であり, これらのバンドとサイズが異なる。それらの実態は不明だが, 分子内でプロセッシングを受ける可能性や, 糖修飾など翻訳後修飾を受ける可能性, 他のタンパク質と強く結合している可能性が考えられる。

4. MpSGF^{GOI} のゲノム編集変異株の表現型観察

4.1. ゲノム編集による各 *Mpsgf* 変異株の作出

本研究では MpSGF10B 以外の候補についても逆遺伝学的機能解析を行った。ゲノム編集による各 *Mpsgf^{goi}* 変異株は *Mpsgf10b^{se}* 変異株と同じ要領で作出した。すなわち, 各 MpSGF^{GOI} の CDS にゲノム編集サイトを設計した (図 27A)。MpSGF13A と MpSGF13B は配列や発現パターンがよく類似していることから, 両者が冗長的に機能することが懸念された。この二つの遺伝子はゲノム上に隣接して位置しており, 二箇所を同時にゲノム編集することで大規模欠損による二重変異株を作出した (図 27B)。各 MpSGF^{GOI} 遺伝子について, 独立なゲノム編集株を複数系統単離し, サンガー法により遺伝子型を確認した (図 27C)。これらの変異株では, 葉状体に明らかな形態変化を示さなかった (図 28)。

以降は, GUS を用いたレポーター遺伝子アッセイ (図 10) や遺伝子発現解析 (図 11) の結果を踏まえたゲノム編集株の表現型観察の結果である。

4.2. *Mpsgf6^{se}* 変異株の雄性生殖能力

MpSGF6 のプロモーター活性が造精器で高く検出されたことから, MpSGF6 が生殖に関わる可能性を検証するために *Mpsgf6-1^{se}* と野生型雌株 Tak-2 を掛け合わせた。この組み合わせでの掛け合わせにより, 孢子体は正常に形成された (図 29A)。MpSGF6 は 13 日目の孢子体 (“13day sporophyte”) において発現量が上昇していることをうけて, 受精後も機能をもつ可能性を考えた。孢子から生育した 32 個体の MpSGF6 の遺伝子型および雌雄を判別した結果, 雌雄ともに変異型の個体が生育した (図 29B)。したがって, MpSGF6 は雄株背景における生殖能力およびその後の発生に必要ではないことが明らかになった。

4.3. *Mpsgf13ab^{se}* 変異株に見られた表現型

MpSGF13A および MpSGF13B のプロモーターが杯状体内部で活性化し, トランスクリ

プトームから杯状体サンプルでの発現量が突出して高くなることが示されている。*Mpsgf13ab^{se}* 二重変異株では杯状体内部に仮根が発生した (図 30)。この表現型は野生株ではめったに確認されない。なお, *Mpsgf13ab-1^{se}* に比べ, *Mpsgf13ab-2^{se}* ではこの表現型が弱く表れた。以上より, *MpSGF13A* および *MpSGF13B* は杯状体内部で仮根の伸長を抑制している可能性が考えられる。

4.4. *Mpsgf17^{se}* 変異株の生殖器における表現型

proMpSGF17:GUS のシグナルが造精器および造卵器で特に強く観察された。これを受け, *Mpsgf17-1^{se}* と野生型雌株 Tak-2 を掛け合わせた結果, 胞子体が観察された (図 31A)。したがって *MpSGF17* は雄株背景における生殖能力に関与しないことが明らかになった。その一方で, *Mpsgf17^{se}* 変異体系統では翼部 (周縁部) が鋸歯状になる雄器床が観察された (図 31B)。 *MpSGF17* の発現量が雄器托で特に高くなることから *MpSGF17* がこの表現型に関与する可能性が考えられる。ただし, この表現型は野生株でも観察されることがあるため, 決定的な主張のためには慎重な検証が必要である。

4.5. *Mpsgf18a^{se}* 変異株の雄性生殖能力

MpSGF18A のプロモーター活性が造精器で高く観察され, 精子で特異的に発現されることから, *Mpsgf18a-1^{se}* と野生型雌株 Tak-2 を掛け合わせることで *MpSGF18A* が生殖に関わる可能性を検証した。その結果, 胞子体は正常に形成された (図 32)。 *MpSGF18A* は造精器や精細胞内で何らかの機能を有すると考えられるが, 雄株の生殖能力自体には関与しないことが明らかになった。

考察

1. *SGF^{GOI}* の進化的保存性

本研究で新規植物ペプチド遺伝子の候補として選抜した *SGF^{GOI}* の分子系統解析の結果、*SGF18* を除いた *SGF^{GOI}* は様々な陸上植物種で保存されていることが明らかになった (図 4B, 6, 7)。これまでよく解析されてきた植物ペプチド遺伝子は、ゼニゴケとヒメツリガネゴケを含む蘚苔類では遺伝的冗長性が低く、維管束植物ではコピー数が多くなると言われてきた (Bowman et al., 2017; Olsson et al., 2018; Furumizu et al., 2021)。しかしながら、*SGF13* と *SGF17* のオーソログは主に蘚苔類に多く保存されていた (図 4B)。1つの可能性として、*SGF13* および *SGF17* が、蘚苔類の生活環でより適応的な機能をもつ可能性が考えられる。

シロイヌナズナの最新データベース (TAIR10) においても、未特定のペプチド遺伝子が依然として存在する可能性が指摘されている (Takahashi et al., 2019; Fan et al., 2022)。近年、新規植物ペプチドを同定する試みが様々な植物種で行われており、ペプチドをコードする遺伝子のアノテーションが今後も充実していくことが予想される。すなわち、分子系統解析では、ペプチド遺伝子が十分に登録されていないデータベースを参照していた可能性は否定できない。したがって、本研究で分類した *SGF* 遺伝子は、実際には維管束植物においても保存されている可能性がある。

今回、*MpSGF10B* がゼニゴケの生殖器官誘導に関与する可能性を示した。ゼニゴケの生殖誘導は遠赤色光や光周期など様々な刺激によって行われる (Yamaoka et al., 2021)。ゼニゴケで生殖誘導を制御する遺伝子のオーソログが陸上植物種間で保存されており、光応答や配偶子形成に関与している (Kohchi et al., 2021)。今回、*SGF10* のオーソログが陸上植物種で保存され、藻類では保存されていないことが分かった (図 4B)。他の植物でもこれらの *SGF10* オーソログが *MpSGF10B* と同様の機能をもつのか、進化的保存性を検証するためのさらなる解析が必要である。

2. *MpSGF^{GOI}* の細胞内局在とリガンドとしての機能

MpSGF^{GOI} の中で、*MpSGF10B* のみが N 末端シグナルペプチド配列を持ち、細胞外領域に輸送されることが観察された (図 8, 12)。植物ペプチドは細胞外に放出されることでリガンドとして機能する。このため、シグナルペプチド配列をもつもののみが植物ペプチドとして定義されることがある。ただし、サイトゾルに局在するペプチド前駆体 *AtPROPEP1* は、細胞の損傷によってプロセッシングを受けて成熟型 *AtPep1* となり、細胞外領域に放出さ

れることでリガンドとして機能することが報告されている (Hander et al., 2019)。すなわち、N 末端のシグナルペプチド配列は細胞外におけるシグナル伝達の機能には必要ではない。したがって、サイトゾルでの局在が観察された MpSGF13A および MpSGF13B, MpSGF13C, MpSGF18A についても、細胞外でシグナル伝達リガンドとして機能する可能性が残されている。

3. MpSGF10B は細胞外に分泌される LRR-only タンパク質である

本研究で新たな植物ペプチド遺伝子として同定した MpSGF10B は LRR ドメインをもち、細胞外領域に分泌されることを明らかにした (図 8, 12)。LRR タンパク質は、細胞内局在と構造により 3 つのグループに分類される。すなわち、細胞膜/細胞壁局在型 LRR-RLK/RLP, 細胞内局在型 Nucleotide-binding site-LRR (NBS-LRR), 細胞外局在型 LRR-only タンパク質である (Wang et al., 2011)。MpSGF10B は LRR-only タンパク質に属すると考えられる。

LRR タンパク質は植物の様々な生命現象に関与している。LRR-RLK/RLP や NBS-LRR は結合するパートナーや立体構造、生理的機能など数多くの知見が得られている (Dievart et al., 2020; Sett et al., 2022)。一方、植物の LRR-only タンパク質の機能に関する研究は少ない。その中でも比較的よく知られている LRR-only タンパク質として、POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN (PGIP) が挙げられる。PGIP は菌類のペクチン分解酵素を阻害する活性をもち、病害抵抗性に関与する因子として報告され、現在まで様々な植物種のオーソログを含めた活性や構造が研究されている (Albersheim and Anderson, 1971; Cheng et al., 2021)。シロイヌナズナの PGIP は N 末端にシグナルペプチド配列をもち細胞外に輸送される点で、MpSGF10B は PGIP と類似した特徴をもつ。しかし、シロイヌナズナやイネの PGIP は細胞膜や細胞壁に固定される (Caroli et al., 2011; Wang et al., 2015)。これらの細胞内局在パターンと MpSGF10B-YFP のパターンが異なることから、MpSGF10B は細胞間領域で遊離して存在することが示唆される。また、LRR-only タンパク質の多くは 7 から 13 回の繰り返しを含むという報告がある (Wang et al., 2011)。MpSGF10B はこれらに比べて LRR ドメインの数が少なく、non-canonical な LRR-only タンパク質と捉えることができる。

このような non-canonical な LRR-only タンパク質として、シロイヌナズナで近年 NTCD4 (UniProt ID : F4JNB0) と LRrop-1 (UniProt ID : Q56X33) が報告された。NTCD4 は、MAMP の一種である MoNLP1 と相互作用して細胞死を誘導する細胞外分泌型 LRR-only タンパク質である (Chen et al., 2021)。LRrop-1 は 218 アミノ酸からなる

LRR-only タンパク質であり、ER への局在が報告されている (Ravindran et al., 2020)。

LRR ドメインの繰り返し構造は螺旋構造や円弧状の構造を形成し、特異的なタンパク質間相互作用に寄与する (Kobe and Kajava, 2001; Chakraborty et al., 2019)。したがって、受容体として機能するためには LRR ドメインがある程度存在することが重要であると考えられる。ゆえに、MpSGF10B はそれ自身が受容体として機能するかどうかは不明である。LRR 構造をもつ植物ペプチドホルモンはこれまで知られていない。図 33A に示すように、MpSGF10B を含む SGF10 ファミリーがシグナル伝達のリガンドとして機能するのか、または他の受容体を補助する機能を果たすのか、その分子機能を明確にするための更なる研究が必要である。

4. MpSGF10B のゼニゴケの生殖誘導における機能

今回の解析から構想した MpSGF10B の生理的機能モデルを図 33B に示した。本研究では MpSGF10 の明確な機能や作用機序に迫ることができなかったが、これまでの知見に照らし合わせて MpSGF10B の関わる生理応答や分子メカニズムを推測する。

4.1. オーキシシグナルとの関係性

まず、MpSGF10B のプロモーター活性が杯状体の底や頂端分裂組織の周辺、造精器周辺で検出された (図 13)。これらの発現パターンは、オーキシンの蓄積パターンと大部分が重なっているように見える (Ishizaki et al., 2012)。しかしながら、MpSGF10B の発現はオーキシンの制御を受けず、さらに *Mpsgf10b* 変異株でも正常なオーキシン応答性を示した (図 11, 17)。オーキシン応答遺伝子の変異株では、葉状体の生育の遅滞や分岐の増加など、顕著な表現型を示すが (Flores-Sandoval et al., 2015; Kato et al., 2017; Flores - Sandoval et al., 2018), *Mpsgf10b* 変異株には葉状体の生育不全が確認できなかった (図 16)。このように、葉状体においては MpSGF10B とオーキシシグナルとの関連を示す結果は得られなかった。

今回、MpSGF10B とオーキシシグナルの関係は葉状体のみでの検証に留まっている。しかし、オーキシシグナル伝達因子が生殖器托の発生に関わることが知られている。例えば、*MpmiR160-MpARF3* モジュールが生殖器托の発生を調整することが報告されている (Flores - Sandoval et al., 2018)。また、オーキシシグナル抑制遺伝子の発現が生殖器托で有意に濃縮していることから、オーキシシグナル伝達の抑制因子が生殖相への転換に寄与するという提言がある (Flores-Sandoval et al., 2018)。生殖誘導時や生殖器官での、MpSGF10B とオーキシシグナルの関係を検証する価値はあると考えられる。

4.2. 生殖誘導マスター因子 *MpBNB* との関係性

また、本研究では *MpSGF10B* と *MpBNB* の関連性についても検証した。*MpBNB* の過剰発現株では、遠赤色光の照射がない条件でも生殖誘導が行われる (Yamaoka et al., 2018)。このように、*MpBNB* はゼニゴケにおける生殖誘導のマスターレギュレーターとして知られている (Yamaoka et al., 2021)。*Mpsgf10b* 変異株では *MpBNB* の発現量が安定せず、また *MpSGF10B-YFP* 過剰発現株で *MpBNB* 発現量が上昇する結果 (図 19B) は、*MpSGF10B* の存在が *MpBNB* の発現量の制御に影響を及ぼす可能性を示唆している。以上を踏まえると、*MpSGF10B* の遺伝子変異と過剰発現による表現型は、異なるメカニズムで現れた可能性がある。すなわち、*MpSGF10B* の過剰発現株で雄器托が増加したのは、*MpBNB* の発現が増加したことによる表現型であり、ゲノム編集株では異なる要因で雄器托数増加という表現型が現れたことが考えられる。例えば、生殖誘導の表現型が副次的なものであり、本研究で明らかにできなかった真の表現型が優位に影響した可能性も十分に考えられる。網羅的かつより詳細な解析により、*MpSGF10B* と生殖誘導との関連の実態が明らかになることが期待される。

4.3. 相互作用因子

MpSGF10B は葉状体においても発現が確認されたが、表現型観察からはその機能が観察されなかった (図 16)。その理由として、相互作用因子が葉状体で発現していない可能性が考えられる。植物ペプチドリガンドの受容を、受容体の発現によって特異的にしている。例えば、シロイヌナズナの気孔制御ペプチド Stomagen は、葉肉細胞で発現し細胞外マトリックスを通して表皮細胞の受容体 TOO MANY MOUTHS (TMM) や ERECTA family (ERf) と相互作用する (Sugano et al., 2010)。この発現場所の位置的隔離によって、葉肉細胞は Stomagen の自己受容を行わない。さらに、シロイヌナズナの C-terminally encoded peptide (CEP) は、根で発現したものが維管束を通り、地上部で CEP receptor (CEPR) に受容される (Tabata et al., 2014)。このように、*MpSGF10B* の機能は相互作用因子の存在に依存する可能性が考えられる。この場合、*MpSGF10B* の相互作用因子は生殖誘導によって発現する遺伝子と推測される。

5. 昨今における新規ペプチド遺伝子同定の方法論

本研究では、新たな植物ペプチド遺伝子を探索する手法として、BLASTp による配列類似性検索を実施した (図 4A)。BLAST プログラムを用いた例として、CLE ペプチドファミリーに属するパラログの探索がある (Cock and McCormick, 2001; Oelkers et al., 2008)。このように、ペプチド遺伝子の探索において BLAST 検索は有効なアプローチのひとつとい

える。その一方で、標準的な BLASTp プログラムの運用では遠縁の種からのペプチドホモログを同定することが困難であるという意見がある (Furumizu et al., 2021)。この節では、新たな植物ペプチド遺伝子の同定のために用いられた技術や手法に触れつつ、新規ペプチド遺伝子の探索という目的における BLAST 検索の有用性について議論する。

未知の遺伝子やその産物を同定するアプローチのひとつとして、近年ではリボソームプロファイリングやトランスクリプトーム解析、質量分析によるプロテオーム/ペプチドーム解析などの網羅的解析が注目されている。特に、プロテオーム/ペプチドーム解析はペプチドの存在を直接証明する手法として大変強力である。ところが、事前に構築するタンパク質データベースに大きく左右されることや発現が少ないような植物ペプチドは検出されにくいことなど、ペプチドの同定に質量分析は不向きと考えられてきた (Makarewich and Olson, 2017; Lyapina et al., 2021)。近年、機械学習などの統計学的手法を取り入れたペプチド予測パイプラインの性能や検出感度が向上したことにより、微量のペプチドでも同定することが可能になりつつある。実際、様々な植物種において、これらの網羅的解析を用いて未知のペプチドの同定に成功した研究はこれまでに多く報告されている (Ohyama et al., 2008; Coninck et al., 2013; Ghorbani et al., 2015; Fesenko et al., 2019; 2019; 2021; Kurihara et al., 2019; Wang et al., 2020; 2020; Lyapina et al., 2021; Fan et al., 2022)。このように、新たなペプチド遺伝子を同定するアプローチとしてオミクス解析は大変強力な手法である。その反面、網羅的解析はサンプル調製から結果の分析までに莫大な費用と時間を要するため、取り組みやすいアプローチとはいえない。

もうひとつのアプローチは進化的な保存性や特徴的なモチーフに基づく探索である。このアプローチでは、BLAST 検索による配列類似性解析に加えて、 K_o/K_s 比 (アミノ酸の非同義置換と同義置換の比) や隠れマルコフモデル (HMM) によるモチーフ検索、コドン使用率の偏りなどが用いられる (Andrews and Rothnagel, 2014)。こちらのアプローチは、リファレンスゲノムや公開されているトランスクリプトームデータを利用できれば、複数種のゲノム情報を比較することで新規ペプチド遺伝子の候補を絞ることができる。

以上の二つのアプローチは同時に適用されることで最大限の有用性を示すことが、数多くの報告例から示されている。例えば、CEP1 ペプチドはアミノ酸配列長および N 末端のシグナルペプチド配列の有無、C 末端の保存領域の存在による *in silico* スクリーニングと LC-MS/MS の組み合わせにより同定された (Ohyama et al., 2008)。このように、BLAST 検索や HMM によるモチーフ検索のような *in silico* スクリーニングで対象を絞り、オミクス解析でその発現を検出するというワークフローが現行のゴールドスタンダードといえる。

本研究では新たなオミクス解析は行わず、既存のペプチド候補データセットを用いた

BLASTp 検索と逆遺伝学解析のみに基づくシンプルな実験デザインで、形態形成に関与すると思われる新規植物ペプチド遺伝子を同定することができた。オミクス解析と *in silico* 解析を組み合わせて収集された、利用可能なペプチドデータセットは他にも存在する (Ghorbani et al., 2015; Hazarika et al., 2017; Chen et al., 2020)。本研究で行った解析手法は新規植物ペプチドの同定に有効なアプローチのひとつとして捉えることができる。

本研究では標準的な BLASTp プログラムを利用したが、前述の通り、遠く離れた系統間でのペプチド保存性の評価には適さないという意見がある。また、本研究ではゼニゴケの遺伝子データベースに登録されている遺伝子を対象にしたが、遺伝子間領域に植物ペプチドをコードする配列が存在する可能性は十分に考えられる。したがって、本研究の選抜では偽陰性を抑えることができていなかった可能性が高い。BLAST プログラムには、遺伝子間領域のペプチド遺伝子の検出が可能な tBLASTn や、特定のパターン検出に長けた PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) および PHI-BLAST (Pattern-Hit Iterated BLAST) などの選択肢がある。また、ゼニゴケでも遺伝子間領域の coding sORF を探索することも有意義である。これらのアルゴリズムを利用することで、より検出感度の高い選抜を行うことができると考えられる。今後、モデル植物のみならず非モデル種においても、多面的なアプローチから植物ペプチドの探索が行われ、未だ空白の多い植物ペプチドのレパートリーが充実していくことが期待される。

材料と手法

1. 試薬

試薬は特に記述のない場合、ナカライテスクもしくは和光純薬工業から購入したものをを用いた。

2. 植物材料と育成条件

ゼニゴケの雄株として Takaragaike-1 (Tak-1) アクセション, 雌株として Takaragaike-2 (Tak-2) アクセションを野生株として用いた。ゼニゴケを培養するための培地として, sucrose (終濃度 1% [w/v]) と MES-KOH (pH 5.7) (終濃度 0.05% [v/v]) を含む 1/2 Gamborg's B5 固形培地 (寒天 1% [w/v]) を用いた。植物体の培養は, 人工気象器 (サンヨーグロースチャンバー MLR-350 または TOMY CLE-303) および白色蛍光灯を用いて 22°C, 50–60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の連続明条件で行った。生殖器の誘導は, 人工気象器 (サンヨーグロースチャンバー MLR-350 または日本医化器械製作所 LPH-240/430SP) および白色蛍光灯, 遠赤色光 LED (ナモト IR LED STICK 18W) を用いて, 白色光 40–50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 遠赤色光 70–80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ となるように調節し, 18°C, 16 時間明期 8 時間暗期の長日条件で行った。光量の測定にはライトアナライザー (NK system LA-105) を用いた。

ベンサミアナタバコは園芸用育苗培土 (日本肥糧) に播種し, 18°C, 16 時間明期 8 時間暗期の長日条件で 4 週間から 1 ヶ月間生育した。

3. BLAST 検索による解析対象遺伝子の選抜

クエリとして用いたシロイヌナズナ sORF のアミノ酸配列は ARA-PEPs リポジトリ (<https://www.biw.kuleuven.be/CSB/ARA-PEPs/>; データベースの複製サイト <https://rdr.kuleuven.be/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.48804/SP9WIK>) より取得した。検索対象とするゼニゴケのタンパク質データベースはゼニゴケデータベース (MarpolBase; <https://marchantia.info/>, MpTak1 v5.1) より取得した。検索前の配列処理と短いタンパク質の抽出は独自のスクリプトを用いて行った。配列類似性検索には NCBI よりダウンロードした BLAST 2.10.0+ の blastp プログラムを用い, E-value < 0.0001 を閾値として行った。

4. 多重配列アライメントおよび分子系統解析

オーソログ遺伝子の探索は Dicots PLAZA 5.0 (<https://bioinformatics.psb.>

ugent.be/plaza/versions/plaza_v5_dicots/) に登録されている情報を参照した。BLAST 検索でヒットしたゼニゴケ遺伝子 (MpSGF) と同じ ortholog ID が付与された遺伝子をオーソログとして扱った。そのアミノ酸配列は同データベースより入手した。なお、SGF ファミリーと ortholog ID の組み合わせは、SGF6 は ORTHO05D000774, SGF10 は ORTHO05D001118, SGF13 は ORTHO05D007973, SGF17 は ORTHO05D009227, SGF18 は ORTHO05D009796 である。

多重配列アラインメントは、MAFFT (v7.490) を用いてスタンドアローンにて L-INS-i 法で実行した。アラインメントギャップは TrimAl (v1.4) の“-automated1”メソッドで除去した。置換モデルは ModelTest-NG (v0.1.6) を用いて評価した。系統樹は RAxML-NG (v0.9.0) を用いて作成し、SGF6 は JTT+G4m, SGF10 は LG+I+G4m, SGF13 は LG+G4m, SGF17 は LG+I+G4m, そして SGF18 は JTT+I の置換モデルを用いた。ブートストラップ値は 1,000 回の反復により算出した。

5. ゲノム DNA の抽出

ゼニゴケの葉状体切片をゲノム DNA 抽出バッファー (200 mM Tris-HCl [pH 7.5~8.0], 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% [v/v] SDS) 内で破碎した後、細胞破碎液をスピンドウンし、上清からエタノール沈殿法によって DNA を精製した。DNA の溶出には TE バッファー (pH 7.5) を用いた。

6. RNA 抽出および逆転写反応

液体窒素で凍結した組織を乳鉢またはビーズで破碎し、その破碎粉末から RNA を精製した。RNA の抽出には RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) または核酸自動精製システム Maxwell RSC Instrument と Maxwell RSC Plant RNA Kit (Promega) を用い、それぞれ添付のプロトコルに従った。実験毎にサンプル間で等量の RNA を用い、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いてゲノム DNA 除去および cDNA 合成を行った。

7. 遺伝子クローニングとプラスミドコンストラクション

本研究で作製したコンストラクトは表 5 および表 6 に、遺伝子クローニングに使用したプライマーを表 7 および表 8 に、ゲノム編集株および相補株のコンストラクションに用いたオリゴヌクレオチドは表 10 に示した。以降で用途別のコンストラクションについて記述するが、特に記載のない場合、目的の DNA 断片は PrimeSTAR GXL polymerase (Takara Bio) を用いて増幅し、目的のサイズの DNA 断片をアガロースゲル電気泳動とゲル切り出

しに続く MagExtractor –PCR & Gel Clean up– (TOYOBO) で精製し、制限酵素 (SalI および EcoRV) で直鎖化したエントリーベクター pENTR1A (Invitrogen) に In-fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いて導入した後、大腸菌 DH5 α コンピテントセル (NIPPON GENE) に形質転換して増幅した。Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Invitrogen) を用いた LR 反応により目的の DNA 断片をディステイナーベクターに移した。以上のキットの反応はメーカーから提供されているプロトコルに従って行った。大腸菌からのプラスミド回収には、FastGene (NIPPON Genetics co., Ltd) の標準プロトコルを用いた。

7.1. タバコ一過的発現系に用いたコンストラクト

MpSGF GOI の CDS 配列は、前述の手法で Tak-1 葉状体から RNA を抽出し合成した cDNA をテンプレートに増幅した。YFP 断片として、STOMAGEN-YFP-GGGG コンストラクト (Sugano et al., 2010) をテンプレートとして用い、C 末端に 4 個の Gly 残基を付加した Venus (YFP-GGGG) を増幅した。C 末端の Gly 残基は、小胞輸送される蛍光タンパク質が誤って液胞に輸送されることを防ぐ (Dombrowski et al., 1993; Nishizawa et al., 2006)。MpSGF GOI の CDS, YFP-GGGG および直鎖化 pENTR1A の 3 フラグメント (YFP のみの場合は YFP-GGGG と直鎖化 pENTR1A の 2 フラグメント) を In-fusion HD Cloning Kit を用いて融合させた。このエントリーベクターを LR 反応によってディステイナーベクター pGWB602 (島根大学 中川強教授より分与) に移し替えて完成させた。細胞膜マーカー mRFP-LTI6b を発現するコンストラクトは村上知暉氏より提供を受けた。

7.2. GUS レポーターアッセイに用いたコンストラクト

MpSGF GOI の開始コドンの上流約 5,000 bp の配列をプロモーター領域として Tak-1 ゲノム DNA テンプレートから増幅した。増幅断片を、直鎖化 pENTR1A で導入した。このエントリーベクターからプロモーター配列をディステイナーベクター pMpGWB104 (京都大学大学院生命科学研究科 河内孝之教授より分与) に導入した。

7.3. MpSGF10B-YFP および YFP, 並びに MpSGF10B 過剰発現株の作出に用いたコンストラクト

MpSGF10B-YFP と YFP のコンストラクションは、タバコ一過的発現系で作製したエントリーベクターからディステイナーベクター pMpGWB103 (京都大学大学院生命科学研究科 河内孝之教授より分与) に移し替えて行った。コントロールとして用いた YFP のみ発現するコンストラクトは、MpSGF10B 過剰発現株の作出にあたっては、MpSGF10B

の CDS と直鎖化 pENTR1A を In-fusion HD Cloning Kit を用いて融合させた。このエントリーベクターを LR 反応によってディステーションベクター pMpGWB103 に目的の DNA 断片を移し替えた。

7.4. ゲノム編集用のコンストラクション

ゲノム編集サイトのガイド RNA 設計には CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>) (Concordet and Haeussler, 2018) を利用し、各標的 MpSGF^{GOI} の CDS にガイド RNA を設計した。ガイド RNA の forward/reverse ペアをアニールさせ、制限酵素 AarI 処理を行った。同様の制限酵素処理を pMpGE013 (Sugano et al., 2018) にも行い、両者を DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio) を用いてライゲーションした。ライゲーション反応産物を大腸菌 DH5 α コンピテントセルに導入し増幅した、

7.5. Mpsgf10b-1^{se} 変異の相補株の作出に用いたコンストラクト

Tak-1 ゲノム DNA の MpSGF10B CDS とその上流 5.4 kbp を含む領域に対して、オーバーラップ PCR 法によりガイド RNA の標的配列に同義置換を導入した DNA 断片を合成し、pENTR1A に導入した。大腸菌から回収したエントリーベクターからディステーションベクター pMpGWB301 (京都大学大学院生命科学研究科 河内孝之教授より分与) に移し替えて行った。なお、同義置換にはゼニゴケにおけるコドン使用率を考慮した。コドン使用率は Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3197> ; かずさ DNA 研究所) の数値を参照し、置換前と置換後におけるガイド RNA 標的配列のコドン使用率の平均値に差が生じないような塩基に置換した。

8. アグロバクテリウムの形質転換

作製したコンストラクトは、すべて電気穿孔法によってアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株または GV2260 株) へ形質転換した。通電装置は MicroPulser (BIO-RAD) を用いた。

9. タバコ葉を用いた一過的発現系

タバコインフィルトレーション法に基づく (Sparkes et al., 2006)。アグロバクテリウムは抗生物質入り LB 培地 5 mL に懸濁し 28°C, 220 rpm で浸透しながら一晩培養した。菌液は 2,800 \times g で 15 分間の遠心分離後、沈殿したペレットを滅菌水に再懸濁させる操作を 2 回繰り返す、LB 培地を水と置換した。MpSGF^{GOI}-YFP を発現するコンストラクトと mRFP-LTI6b を発現するコンストラクトとを等量混合し、ベンサミアナタバコ本葉に打ち

込み、暗所にて 50 時間程度放置した。

10. 共焦点レーザー顕微鏡観察

蛍光画像は共焦点レーザー走査顕微鏡 (Zeiss LSM780) を用いて撮影した。励起レーザーラインは 514 nm または 561 nm の波長を用いた。YFP 蛍光には 519/549 nm のバンドパスフィルタ, mRFP には 583/633 nm のフィルター, FM4-64 には 571/645 nm のフィルターセットで検出した。タバコ過発現系の蛍光イメージングにあたり, 1 mL シリンジを用いて水 (コントロール) または 0.8 M D-マンニトール溶液 (原形質分離) を葉に打ち込み, 直ちに観察した。

ゼニコケ植物体の観察にあたり, 10 µg/ml FM4-64 (Invitrogen) を添加した水または 0.8 M D-mannitol 溶液により細胞膜を染色した。これらの蛍光画像は, ImageJ (Fiji) (Schindelin et al., 2012) を用いて処理した。

11. 共発現遺伝子解析

公開されている RNA-Seq ライブラリーのリードデータを NCBI の sequence read archive から取得した。Fastq データのクオリティチェックおよびアダプター配列の除去に fastp v.0.20.0 (Chen et al., 2018) を用いた。フィルター後のリードは STAR v.2.7.8 (Dobin et al., 2013) によりゼニコケのリファレンスゲノム (MpTak1 v6.1) にマッピングした。遺伝子発現量 (TPM) の算出には RSEM v1.3.0 (Li and Dewey, 2011) を用いた。利用したリードデータのアクセッション番号は以下の通りである。11 日齢葉状体 (DRR050343, DRR050344, DRR050345), 雌器托 (DRR050351, DRR050352, DRR050353), 雄器托 (DRR050346, DRR050347, DRR050348), 造精器 (DRR050349, RR050350), 頂端細胞 (SRR1553294, SRR1553295, SRR1553296), 13 日齢胞子体 (SRR1553297, SRR1553298, SRR1553299), 0 時間胞子発芽体 (SRR4450262, SRR4450261, SRR4450260)。24 時間胞子発芽体 (SRR4450266, SRR4450265, SRR4450259), 48 時間胞子発芽体 (SRR4450268, SRR4450264, SRR4450263), 72 時間胞子発芽体 (SRR4450267, SRR4450258, SRR4450257)。96 時間胞子発芽体 (SRR4450256, SRR4450255, SRR4450254), 葉状体 (オーキシン mock 処理) (SRR5905100, SRR5905099, SRR5905098), 2,4-D 処理 1 時間 (SRR5905097, SRR5905092, SRR5905091), *Phytophthora palmivora* 接種後 2 日 (SRR7977547, SRR7977549, SRR7977550), 葉状体 (感染 mock 処理) (SRR8068335, SRR8068336, SRR8068340) (Carella et al., 2018; Flores-Sandoval et al., 2018)。MpSGF10B と全遺伝子の TPM について, R 4.0.3 によりピアソン相関係数 (PCC) を算出し, その上位 1%

(182 遺伝子) を *MpSGF10B* との共発現遺伝子として選択した。これらの遺伝子 ID を MarpolBase (<https://marchantia.info/>) の“convert ID”ツールを用いて、アセンブリバージョン 3 (Mapoly ID) に変換した。これらの遺伝子群について、Plant Transcriptional Regulatory Map (PlantRegMap, <http://plantregmap.gao-lab.org/>) を用いて GO エンリッチメント解析を行った。

12. ゼニゴケの形質転換

ゼニゴケの形質転換体は、切断面法または AgarTrap 法 (Kubota et al., 2013; Tsuboyama et al., 2018) を用いて作出した。

切断面法では、形質転換に用いるアグロバクテリウムを 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のスペクチノマイシンを含む LB 液体培地 (5 mL) で 28°C, 2 日間前培養し、ゼニゴケはショ糖を含まない 1/2 Gamborg's B5 固形培地 (寒天 1% [w/v]) 上にて無性芽を 22°C, 連続明条件で 2 週間培養した植物体を供した。頂端分裂組織を切り取った葉状体を約 1 cm^2 未満大に切断し、1% [w/v] ショ糖を含む 1/2 Gamborg's B5 固形培地 (寒天 1% [w/v]) 上に移して同様の条件で 3 日間培養した。アグロバクテリウム前培養液 5 mL のうち 1 mL を 4 mL の LB 液体培地と混合し、スペクチノマイシンとアセトシリノンをそれぞれ最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 0.1 mM となるよう添加して 28°C で 6 時間培養し、そのうちの 0.1 mL とゼニゴケ切片を、アセトシリノン (終濃度 0.1 mM) を添加した 50 mL の 0M51C 液体培地で 22°C, 長日条件 (明条件 16 時間, 暗条件 8 時間) で 3 日間共培養した。洗浄した共培養後のゼニゴケ切片をショ糖 (終濃度 1% [w/v]), セフォタキシム (終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ハイグロマイシン (終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む 1/2 Gamborg's B5 固形培地 (寒天 1% [w/v]) で選抜した。

AgarTrap 法では、無性芽を 0.1% [w/v] 寒天液に懸濁して 1% [w/v] ショ糖を含む 1/2 Gamborg's B5 固形培地 10 mL (寒天 1% [w/v]) 上に散布し、22°C, 連続明条件で 3 日程度培養した。アグロバクテリウムは切断面法と同様に培養した。培養後のシャーレに形質転換バッファー (10 mM MES-NaOH [pH 5.7], 10 mM MgCl_2 , 0.15 mM アセトシリノン) を 1 mL 注ぎ、シャーレ内でアグロバクテリウム培養液を 1,000 倍希釈となるように懸濁した。余分な液を除去し、遮光して 22°C で 3 日間共培養した。共培養後、培地表面を滅菌水でよく洗浄し、アグロバクテリウムの膜を除去した後に選抜バッファー (セフォタキシム 1 mg/mL , ハイグロマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 1 mL 注ぎ、サージカルテープを巻いて植物体が再生するまで 22°C, 連続明条件で培養した。なお、*Mpsgf10b-1^{se}* の相補株 (MpComp) の選抜にあたり、pMpGWB301 の薬剤選抜のために選抜バッファーには 1 μM クロルスルフロンを添加した。

13. ジェノタイピング

再生した葉状体を T1 個体とした。T1 個体に形成される無性芽を選抜培地に移植し、成長した植物体 (G1 個体) を形質転換体として T-DNA 挿入やゲノム編集の確認を行った (Sugano and Nishihama, 2018)。使用したプライマーは表 11 に示した。

ゲノム編集の確認には、MultiNA (SHIMADZU DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202) を用いたヘテロ二重鎖検出法により塩基の挿入/欠失を検出し、Go Taq (Promega) による増幅産物をテンプレートとして BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて Big Dye 反応を行った。Big Dye 反応産物の精製に CleanSEQ (BECKMAN COULTER Life Science) を用いた。精製した反応産物は ABI 3130x1 (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンシングを行い、遺伝子型を特定した。

14. GUS 染色および切片作成

サンプルを冷却した 90%アセトンで固定し、GUS 染色液 (100 mM NaH_2PO_4 [pH 7.0], 0.5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0.5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 10 mM EDTA [pH 8.0], 0.1% Triton X-100, 0.5 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronic acid) に浸漬させて脱気し、37°C, 暗所で一晩反応させた。GUS 染色したサンプルを 70%エタノールと抱水クロラル溶液で透明化した。切片作成には 5%寒天に包埋した雄器托サンプルを供し、ビブラトーム (Leica VT1200S) を用いて切片を作製した。

サンプルの観察には SteREO Lumar V12 (Carl ZEISS) または Stemi 305 (Carl ZEISS) を用いた。切片観察には Axioskop 2 plus (Carl ZEISS) をもちい、顕微鏡画像のパノラマ画像作成には ImageJ の“MosaicJ”プラグインを用いた

15. 植物体の表現型観察

植物体の撮影には、SteREO Lumar V12 (Carl ZEISS) や Stemi 305 (Carl ZEISS), ゲル撮影装置 (AMS System Science STAGE-1000) に設置したデジタルカメラ Power shot G12 (Canon) や Stylus tough TG-4 (Olympus) を用いた。

葉状体の面積は、上から撮影した画像に対し、ImageJ の“Color threshold”を用いて背景と植物体を区別し、植物体の領域の面積を“Analyze Particles”で測定した。

雄器托数のカウント実験では、22°C, 連続白色光下で 2 週間の前培養し、その後生殖誘導条件で 3 週間の生殖誘導の結果、植物体に形成された雄器托の数を計測した。雄器托の発達ステージの分類 (Higo et al., 2016) における stage 1 (apical notch 内の突起構造) 以

降の雄器托をカウントした。

雄器托数の発生タイミングおよび生殖誘導条件下での葉状体の分岐観測では、無性芽の時点から生殖誘導条件で育成した。

無性芽の仮根細胞は、Axioskop 2 plus (Carl ZEISS) を用いて観察した。UV 照射による葉緑体の自家蛍光が見られず、中央付近に位置する細胞を仮根細胞として計測した。

16. オーキシシン含有培地の調製

NAA を 1N NaOH に溶解し、3 mM となるように滅菌水で希釈したものをストック溶液とし、終濃度 3 μ M となるように NAA 溶液を培地に混合しオートクレーブした。

17. RT-qPCR

合成した cDNA をテンプレートとして、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) および StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) または LightCycler 96 (Roche) を用いて定量を行った。相対発現量の算出には比較 Ct 法を用い、内部コントロールとして Mp*EF1 α* を用いた。用いたプライマーは表 9 に示した。

18. SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

過剰発現コンストラクトのプロモーターである *pro*Mp*EF1 α* が分裂組織でより高い活性を示すこと(Althoff et al., 2014) や細胞の密度を考慮し、頂端分裂組織から小動物用イヤーパンチ (夏目製作所 KN-291-2) で直径 2 mm のディスクを各個体あたり 2 枚、各系統で 5 個体分 (2 \times 5 = 10) サンプルングした。サンプルは 2 \times Laemmli サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% [w/v] SDS, 10% [v/v] glycerol, 100 mM DTT) 100 μ L とともに 1.5 mL チューブ内で破碎した。その後、サンプルの湿重量 (mg) : バッファー量 (μ L) = 1 : 10 となるようにサンプルバッファーで希釈した。破碎液を 95°C, 10 分間加熱し、軽くスピンドウンして上清を SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は 15% ポリアクリルアミド分離ゲルを用いて 20 mA で 120 分間泳動した。

電気泳動後、ゲルを転写バッファー (100 mM Tris-glycine [pH 6.8], 20% methanol) に数分浸した。ゲル中のタンパク質をセミドライ法で PVDF 膜 (東京ミリポア Immobilon-P) に転写した。2 mA/cm² の条件で 1 時間通電した。

転写後の PVDF 膜は TBST バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05 % [w/v] Tween 20) で数分間振とうした後、5% (w/v) スキムミルクを含む TBST バッファーに浸し、室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。一次抗体には、抗 MpSGF10B 抗体#1 および抗 MpSGF10B 抗体#2 (コスモバイオ株式会社へ合成委託)、抗 GFP 抗体

(Clontech JL-8) (いずれも 1,000 倍希釈) を使用し, 4°Cで一晩中反応させた。二次抗体には, 抗 MpSGF10B 抗体にはイムノピュア, 抗 GFP 抗体には ECL 抗マウス IgG HRP (いずれも 4,000 倍希釈) 30 分間反応させた。その後, PDVF 膜を TBST バッファーで数回洗浄し, イムノスター ゼータ (富士フイルム) の化学発光によって可視化し, シグナルは CCD カメラ (エムエス機器株式会社 FUSION SL4) を用いて検出した。

19. 統計処理

統計解析は R version 4.0.3 で行った。Dunnett' test (パッケージ“multicomp”) は, technical replicate 毎の平均値の多重比較に使用した。

謝辞

本研究は2016年4月より京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 植物分子細胞生物学分科（現・植物分子生理学分科）にて嶋田知生講師のご指導のもとで開始しました。嶋田先生には、基礎的な実験手法や研究成果の発表など、研究者として活動するうえで必要な要素をご教授いただきました。特に、申請書や論文の執筆の際にご教示頂いたアカデミックライティングのノウハウは、今後の私のキャリアで強力なスキルとなると確信しています。また、本研究で行ったゼニゴケ形質転換法 AgarTrap 法において、無性芽を0.1%寒天で散布するというアイデアは嶋田先生のアドバイスによるものでした。このおかげで、無性芽が水の上で凝集してしまい培地上にうまく散布できない問題や、洗浄時のアグロバクテリウムの洗い残し問題が解消され、形質転換体を効率的に作出することができるようになりました。論文作成の際も大変手厚くお力添え頂きました。心より深く御礼申し上げます。

守屋健太氏、河本恭子博士、寺西岳生氏、福手淳平氏には当研究室でゼニゴケを扱ううえで種々有益なアドバイスをいただきました。とりわけ、守屋氏には生殖誘導を含めて様々な情報を教えていただきました。心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、多くの方々にお力添えいただきました。河内孝之博士（京都大学大学院生命科学研究科教授）、松田頼子氏（京都大学大学院生命科学研究科）には実験材料の提供およびゼニゴケを用いた実験手法を伝授していただきました。深く感謝申し上げます。田村謙太郎博士（現・静岡県立大学准教授）および菅野茂夫博士（現・産業技術総合研究所主任研究員）石川一也博士（現・岡山大学助教）、八木宏樹博士（現・甲南大学）には、同じ研究室に所属している時から実験手法や発表のアドバイスなど様々な事でサポートいただきました。深く御礼申し上げます。花田耕介博士（九州工業大学教授）や石崎公庸博士（神戸大学教授）、澤進一郎博士（熊本大学教授）には、個人的に訪問した際に快く応じて頂き、有益な情報をご教示いただきました。心よりお礼申し上げます。本研究では中川強博士（島根大学教授）より分与いただいたベクターを利用させていただきました。また、組織切片作製機器は鹿内研所有のものを使用させていただきました。厚く御礼申し上げます。また、西村いくこ博士（甲南大学名誉教授）は私が理学の世界に足を踏み入れるきっかけを与えてくださいました。すべての出会いに感謝いたします。

植物分子細胞生物学分科に在籍されていた皆様、松下智直教授および岡義人助教をはじめとする植物分子生理学分科の皆様、植物学教室の皆様には、研究以外にも日常的に大変お世話になりました。特に、松下先生と岡先生からは、生理学の観点から私にとって非常に新鮮なアドバイスをいただきました。本当にありがとうございました。

最後に、遠い所より支えてくれた家族に感謝します。

引用文献

- Albersheim, P., and Anderson, A. J. (1971). Proteins from Plant Cell Walls Inhibit Polygalacturonases Secreted by Plant Pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1815–1819. doi: 10.1073/pnas.68.8.1815.
- Althoff, F., Kopischke, S., Zobell, O., Ide, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., et al. (2014). Comparison of the *MpEF1α* and *CaMV35* promoters for application in *Marchantia polymorpha* overexpression studies. *Transgenic Res.* 23, 235–244. doi: 10.1007/s11248-013-9746-z.
- Andrews, S. J., and Rothnagel, J. A. (2014). Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nat. Rev. Genet.* 15, 193–204. doi: 10.1038/nrg3520.
- Bowman, J. L., Arteaga-Vazquez, M., Berger, F., Briginshaw, L. N., Carella, P., Aguilar-Cruz, A., et al. (2022). The renaissance and enlightenment of *Marchantia* as a model system. *Plant Cell* 34, 3512–3542. doi: 10.1093/plcell/koac219.
- 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. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030.
- Butenko, M. A., Patterson, S. E., Grini, P. E., Stenvik, G.-E., Amundsen, S. S., Mandal, A., et al. (2003). *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* Controls Floral Organ Abscission in Arabidopsis and Identifies a Novel Family of Putative Ligands in Plants. *Plant Cell* 15, 2296–2307. doi: 10.1105/tpc.014365.
- Carella, P., Gogleva, A., Tomaselli, M., Alfs, C., and Schornack, S. (2018). *Phytophthora palmivora* establishes tissue-specific intracellular infection structures in the earliest divergent land plant lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E3846–E3855. doi: 10.1073/pnas.1717900115.
- Caroli, M. D., Lenucci, M. S., Sansebastiano, G. D., Dalessandro, G., Lorenzo, G. D., and Piro, G. (2011). Protein trafficking to the cell wall occurs through mechanisms distinguishable from default sorting in tobacco. *Plant J.* 65, 295–308. doi: 10.1111/j.1365-313x.2010.04421.x.
- Chakraborty, S., Nguyen, B., Wasti, S. D., and Xu, G. (2019). Plant Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase (LRR-RK): Structure, Ligand Perception, and Activation Mechanism. *Molecules* 24, 3081. doi: 10.3390/molecules24173081.
- Chen, J., Bao, S., Fang, Y., Wei, L., Zhu, W., Peng, Y., et al. (2021). An LRR-only protein promotes NLP-triggered cell death and disease susceptibility by facilitating oligomerization of NLP in Arabidopsis. *New Phytol.* 232, 1808–1822. doi: 10.1111/nph.17680.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34, i884–i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.
- Chen, Y., Fan, K., Hung, S., and Chen, Y. (2020). The role of peptides cleaved from protein precursors in eliciting plant stress reactions. *New Phytol.* 225, 2267–2282. doi: 10.1111/nph.16241.
- Chen, Y., Li, D., Fan, W., Zheng, X., Zhou, Y., Ye, H., et al. (2020). PsORF: a database of small ORFs in plants. *Plant Biotechnol. J.* 18, 2158–2160. doi: 10.1111/pbi.13389.

- Cheng, H., Chan, W., Li, Z., Wang, D., Liu, S., and Zhou, Y. (2011). Small Open Reading Frames: Current Prediction Techniques and Future Prospect. *Curr. Protein Pept. Sci.* 12, 503–507. doi: 10.2174/138920311796957667.
- Cheng, S., Li, R., Lin, L., Shi, H., Liu, X., and Yu, C. (2021). Recent Advances in Understanding the Function of the PGIIP Gene and the Research of Its Proteins for the Disease Resistance of Plants. *Appl. Sci.* 11, 11123. doi: 10.3390/app112311123.
- Chiyoda, S., Ishizaki, K., Kataoka, H., Yamato, K. T., and Kohchi, T. (2008). Direct transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. by particle bombardment using immature thalli developing from spores. *Plant Cell Rep.* 27, 1467–1473. doi: 10.1007/s00299-008-0570-5.
- Cock, J. M., and McCormick, S. (2001). A Large Family of Genes That Share Homology with *CLAVATA3*. *Plant Physiol.* 126, 939–942. doi: 10.1104/pp.126.3.939.
- Concordet, J.-P., and Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 46, W242–W245. doi: 10.1093/nar/gky354.
- Coninck, B. D., Carron, D., Tavormina, P., Willem, L., Craik, D. J., Vos, C., et al. (2013). Mining the genome of *Arabidopsis thaliana* as a basis for the identification of novel bioactive peptides involved in oxidative stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 64, 5297–5307. doi: 10.1093/jxb/ert295.
- Darwin, C. R., and Darwin, F. (1880). The Power of Movement in Plants. *John Murray, London*.
- Dievart, A., Gottin, C., Périn, C., Ranwez, V., and Chantret, N. (2020). Origin and Diversity of Plant Receptor-Like Kinases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 1–26. doi: 10.1146/annurev-arplant-073019-025927.
- 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. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Dombrowski, J. E., Schroeder, M. R., Bednarek, S. Y., and Raikhel, N. V. (1993). Determination of the functional elements within the vacuolar targeting signal of barley lectin. *Plant Cell* 5, 587–596. doi: 10.1105/tpc.5.5.587.
- Fan, K., Hsu, C., and Chen, Y. (2022). Mass spectrometry in the discovery of peptides involved in intercellular communication: From targeted to untargeted peptidomics approaches. *Mass Spectrom. Rev.*, e21789. doi: 10.1002/mas.21789.
- Fesenko, I., Azarkina, R., Kirov, I., Kniazev, A., Filippova, A., Grafaskaia, E., et al. (2019). Phytohormone treatment induces generation of cryptic peptides with antimicrobial activity in the Moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* 19, 9. doi: 10.1186/s12870-018-1611-z.
- Fesenko, I., Kirov, I., Kniazev, A., Khazigaleeva, R., Lazarev, V., Kharlampieva, D., et al. (2019). Distinct types of short open reading frames are translated in plant cells. *Genome Res.* 29, 1464–1477. doi: 10.1101/gr.253302.119.
- Fesenko, I., Shabalina, S. A., Mamaeva, A., Knyazev, A., Glushkevich, A., Lyapina, I., et al. (2021). A vast pool of lineage-specific microproteins encoded by long non-coding RNAs in plants. *Nucleic Acids Res.* 49, 10328–10346. doi: 10.1093/nar/gkab816.

- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R., and Meyerowitz, E. M. (1999). Signaling of Cell Fate Decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* Shoot Meristems. *Science* 283, 1911–1914. doi: 10.1126/science.283.5409.1911.
- 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, e1005207. doi: 10.1371/journal.pgen.1005207.
- Flores-Sandoval, E., Eklund, D. M., Hong, S., 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. doi: 10.1111/nph.15090.
- Flores-Sandoval, E., Romani, F., and Bowman, J. L. (2018). Co-expression and Transcriptome Analysis of *Marchantia polymorpha* Transcription Factors Supports Class C ARFs as Independent Actors of an Ancient Auxin Regulatory Module. *Front. Plant Sci.* 9, 1345. doi: 10.3389/fpls.2018.01345.
- Fujisawa, M., Hayashi, K., Nishio, T., Bando, T., Okada, S., Yamato, K. T., et al. (2001). Isolation of X and Y Chromosome-Specific DNA Markers From a Liverwort, *Marchantia polymorpha*, by Representational Difference Analysis. *Genetics* 159, 981–985. doi: 10.1093/genetics/159.3.981.
- Furumizu, C., Hirakawa, Y., Bowman, J. L., and Sawa, S. (2018). 3D Body Evolution: Adding a New Dimension to Colonize the Land. *Curr. Biol.* 28, R838–R840. doi: 10.1016/j.cub.2018.06.040.
- Furumizu, C., Krabberød, A. K., Hammerstad, M., Alling, R. M., Wildhagen, M., Sawa, S., et al. (2021). The sequenced genomes of non-flowering land plants reveal the innovative evolutionary history of peptide signaling. *Plant Cell* 33, 2915–2934. doi: 10.1093/plcell/koab173.
- Ghorbani, S., Lin, Y.-C., Parizot, B., Fernandez, A., Njo, M. F., Peer, Y. V. de, et al. (2015). Expanding the repertoire of secretory peptides controlling root development with comparative genome analysis and functional assays. *J. Exp. Bot.* 66, 5257–5269. doi: 10.1093/jxb/erv346.
- Hanada, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Toyoda, T., Shinozaki, K., and Shiu, S.-H. (2010). sORF finder: a program package to identify small open reading frames with high coding potential. *Bioinformatics* 26, 399–400. doi: 10.1093/bioinformatics/btp688.
- Hanada, K., Higuchi-Takeuchi, M., Okamoto, M., Yoshizumi, T., Shimizu, M., Nakaminami, K., et al. (2013). Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2395–2400. doi: 10.1073/pnas.1213958110.
- Hanada, K., Zhang, X., Borevitz, J. O., Li, W.-H., and Shiu, S.-H. (2007). A large number of novel coding small open reading frames in the intergenic regions of the *Arabidopsis thaliana* genome are transcribed and/or under purifying selection. *Genome Res.* 17, 632–640. doi: 10.1101/gr.5836207.
- Hander, T., Fernández-Fernández, Á. D., Kumpf, R. P., Willems, P., Schatowitz, H., Rombaut, D., et al. (2019). Damage on plants activates Ca²⁺-dependent metacaspases for release of immunomodulatory peptides. *Science* 363, eaar7486. doi: 10.1126/science.aar7486.
- Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C., and Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene *EPFL* enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Gene Dev.* 21, 1720–1725. doi: 10.1101/gad.1550707.

- Hazarika, R. R., Coninck, B. D., Yamamoto, L. R., Martin, L. R., Cammue, B. P. A., and Noort, V. van (2017). ARA-PEPs: a repository of putative sORF-encoded peptides in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Bioinform.* 18, 37. doi: 10.1186/s12859-016-1458-y.
- Hellens, R. P., Brown, C. M., Chisnall, M. A. W., Waterhouse, P. M., and Macknight, R. C. (2016). The Emerging World of Small ORFs. *Trends Plant Sci.* 21, 317–328. doi: 10.1016/j.tplants.2015.11.005.
- Higo, A., Niwa, M., Yamato, K. T., Yamada, L., Sawada, H., Sakamoto, T., et al. (2016). Transcriptional Framework of Male Gametogenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* 57, 325–338. doi: 10.1093/pcp/pcw005.
- Hobe, M., Müller, R., Grünewald, M., Brand, U., and Simon, R. (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in *Arabidopsis*. *Dev. Genes Evol.* 213, 371–381. doi: 10.1007/s00427-003-0329-5.
- Inoue, K., Nishihama, R., Araki, T., and Kohchi, T. (2019). 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. doi: 10.1093/pcp/pcz029.
- 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. doi: 10.1093/pcp/pcn085.
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0138876.
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., and Kohchi, T. (2015). Molecular Genetic Tools and Techniques for *Marchantia polymorpha* Research. *Plant Cell Physiol.* 57, 262–270. doi: 10.1093/pcp/pcv097.
- Ishizaki, K., Nonomura, M., Kato, H., Yamato, K. T., and Kohchi, T. (2012). Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* 125, 643–651. doi: 10.1007/s10265-012-0477-7.
- Jones, V. A. S., and Dolan, L. (2017). MpWIP regulates air pore complex development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Development* 144, 1472–1476. doi: 10.1242/dev.144287.
- 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. doi: 10.1093/pcp/pcx095.
- Kawamura, S., Romani, F., Yagura, M., Mochizuki, T., Sakamoto, M., Yamaoka, S., et al. (2022). MarpolBase Expression: A Web-Based, Comprehensive Platform for Visualization and Analysis of Transcriptomes in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* 63, 1745–1755. doi: 10.1093/pcp/pcac129.
- Kobe, B., and Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 725–732. doi: 10.1016/s0959-440x(01)00266-4.

- 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, 1–26. doi: 10.1146/annurev-arplant-082520-094256.
- 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. doi: 10.1271/bbb.120700.
- Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., and Kohchi, T. (2014). Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution. *Nat. Commun.* 5, 3668. doi: 10.1038/ncomms4668.
- Kurihara, Y., Makita, Y., Shimohira, H., Fujita, T., Iwasaki, S., and Matsui, M. (2019). Translational Landscape of Protein-Coding and Non-Protein-Coding RNAs upon Light Exposure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 61, 536–545. doi: 10.1093/pcp/pcz219.
- Li, B., and Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform.* 12, 323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323.
- Lyapina, I., Filippova, A., Kovalchuk, S., Ziganshin, R., Mamaeva, A., Lazarev, V., et al. (2021). Possible role of small secreted peptides (SSPs) in immune signaling in bryophytes. *Plant Mol. Biol.* 106, 123–143. doi: 10.1007/s11103-021-01133-z.
- Lyapina, I., Ivanov, V., and Fesenko, I. (2021). Peptidome: Chaos or Inevitability. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13128. doi: 10.3390/ijms222313128.
- Makarewich, C. A., and Olson, E. N. (2017). Mining for Micropeptides. *Trends Cell Biol.* 27, 685–696. doi: 10.1016/j.tcb.2017.04.006.
- Matsubayashi, Y. (2014). Posttranslationally Modified Small-Peptide Signals in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 385–413. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120122.
- Matsubayashi, Y. (2018). Exploring peptide hormones in plants: identification of four peptide hormone-receptor pairs and two post-translational modification enzymes. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 94, 59–74. doi: 10.2183/pjab.94.006.
- 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. doi: 10.1016/j.cub.2019.12.015.
- Moody, L. A. (2020). Three-dimensional growth: a developmental innovation that facilitated plant terrestrialization. *J. Plant Res.* 133, 283–290. doi: 10.1007/s10265-020-01173-4.
- Moody, L. A., Kelly, S., Rabbinowitsch, E., and Langdale, J. A. (2018). Genetic Regulation of the 2D to 3D Growth Transition in the Moss *Physcomitrella patens*. *Curr. Biol.* 28, 473–478.e5. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.052.
- Murphy, E., Smith, S., and Smet, I. (2012). Small Signaling Peptides in *Arabidopsis* Development: How Cells Communicate Over a Short Distance. *Plant Cell* 24, 3198–3217. doi: 10.1105/tpc.112.099010.

- Nishizawa, K., Maruyama, N., and Utsumi, S. (2006). The C-terminal region of α' subunit of soybean β -conglycinin contains two types of vacuolar sorting determinants. *Plant Mol. Biol.* 62, 111–125. doi: 10.1007/s11103-006-9007-0.
- Notaguchi, M., and Okamoto, S. (2015). Dynamics of long-distance signaling via plant vascular tissues. *Front. Plant Sci.* 6, 161. doi: 10.3389/fpls.2015.00161.
- Oelkers, K., Goffard, N., Weiller, G. F., Gresshoff, P. M., Mathesius, U., and Frickey, T. (2008). Bioinformatic analysis of the CLE signaling peptide family. *BMC Plant Biol.* 8, 1. doi: 10.1186/1471-2229-8-1.
- Ohyama, K., Ogawa, M., and Matsubayashi, Y. (2008). Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *Plant J.* 55, 152–160. doi: 10.1111/j.1365-313x.2008.03464.x.
- Olsson, V., Joos, L., Zhu, S., Gevaert, K., Butenko, M. A., and Smet, I. D. (2018). Look Closely, the Beautiful May Be Small: Precursor-Derived Peptides in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 70, 1–34. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040413.
- Otani, K., Ishizaki, K., Nishihama, R., Takatani, S., Kohchi, T., Takahashi, T., et al. (2018). An evolutionarily conserved NIMA-related kinase directs rhizoid tip growth in the basal land plant *Marchantia polymorpha*. *Development* 145, dev.154617. doi: 10.1242/dev.154617.
- Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J., and Ryan, C. A. (2001). RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12843–12847. doi: 10.1073/pnas.201416998.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., and Ryan, C. A. (1991). A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science* 253, 895–897. doi: 10.1126/science.253.5022.895.
- Pickel, B., and Schaller, A. (2013). Dirigent proteins: molecular characteristics and potential biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8427–8438. doi: 10.1007/s00253-013-5167-4.
- Qiu, Y.-L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., et al. (2006). The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 15511–15516. doi: 10.1073/pnas.0603335103.
- Ravindran, P., Yong, S. Y., Mohanty, B., and Kumar, P. P. (2020). An LRR-only protein regulates abscisic acid-mediated abiotic stress responses during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell Rep.* 39, 909–920. doi: 10.1007/s00299-020-02538-8.
- Saint-Marcoux, D., Proust, H., Dolan, L., and Langdale, J. A. (2015). Identification of Reference Genes for Real-Time Quantitative PCR Experiments in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS One* 10, e0118678. doi: 10.1371/journal.pone.0118678.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.

- Sett, S., Prasad, A., and Prasad, M. (2022). Resistance genes on the verge of plant–virus interaction. *Trends Plant Sci.* 27, 1242–1252. doi: 10.1016/j.tplants.2022.07.003.
- Shimamura, M. (2016). *Marchantia polymorpha* : Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant Cell Physiol.* 57, 230–256. doi: 10.1093/pcp/pcv192.
- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., and Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat. Protoc.* 1, 2019–2025. doi: 10.1038/nprot.2006.286.
- Stührwoldt, N., and Schaller, A. (2018). Regulation of plant peptide hormones and growth factors by post-translational modification. *Plant Biol.* 21, 49–63. doi: 10.1111/plb.12881.
- Sugano, S. S., and Nishihama, R. (2018). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing of Transcription Factor Genes in *Marchantia polymorpha*. *Methods Mol. Biol.* 1830, 109–126. doi: 10.1007/978-1-4939-8657-6_7.
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0205117.
- Sugano, S. S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M., et al. (2010). Stomagen positively regulates stomatal density in *Arabidopsis*. *Nature* 463, 241–244. doi: 10.1038/nature08682.
- Sugano, S. S., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., et al. (2014). CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* 55, 475–481. doi: 10.1093/pcp/pcu014.
- Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., and Matsubayashi, Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346, 343–346. doi: 10.1126/science.1257800.
- Takahashi, F., Hanada, K., Kondo, T., and Shinozaki, K. (2019). Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 51, 88–95. doi: 10.1016/j.pbi.2019.05.011.
- Takahashi, F., and Shinozaki, K. (2018). Long-distance signaling in plant stress response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 47, 106–111. doi: 10.1016/j.pbi.2018.10.006.
- Tavormina, P., Coninck, B. D., Nikonorova, N., Smet, I. D., and Cammue, B. P. A. (2015). The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions. *Plant Cell* 27, 2095–2118. doi: 10.1105/tpc.15.00440.
- Tsuboyama, S., and Kodama, Y. (2014). AgarTrap: A Simplified *Agrobacterium*-Mediated Transformation Method for Sporelings of the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* 55, 229–236. doi: 10.1093/pcp/pct168.
- Tsuboyama, S., Nonaka, S., Ezura, H., and Kodama, Y. (2018). Improved G-AgarTrap: A highly efficient transformation method for intact gemmalings of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Sci. Rep.* 8, 10800. doi: 10.1038/s41598-018-28947-0.

- Tsuzuki, M., Futagami, K., Shimamura, M., Inoue, C., Kunimoto, K., Oogami, T., et al. (2019). An Early Arising Role of the MicroRNA156/529-*SPL* Module in Reproductive Development Revealed by the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Curr. Biol.* 29, 3307-3314.e5. doi: 10.1016/j.cub.2019.07.084.
- Verma, V., Ravindran, P., and Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 16, 86. doi: 10.1186/s12870-016-0771-y.
- Wang, J., Tan, S., Zhang, L., Li, P., and Tian, D. (2011). Co-Variation Among Major Classes of LRR-Encoding Genes in Two Pairs of Plant Species. *J. Mol. Evol.* 72, 498–509. doi: 10.1007/s00239-011-9448-1.
- Wang, P., Yao, S., Kosami, K., Guo, T., Li, J., Zhang, Y., et al. (2020). Identification of endogenous small peptides involved in rice immunity through transcriptomics- and proteomics-based screening. *Plant Biotechnol. J.* 18, 415–428. doi: 10.1111/pbi.13208.
- Wang, R., Lu, L., Pan, X., Hu, Z., Ling, F., Yan, Y., et al. (2015). Functional analysis of *OsPGIP1* in rice sheath blight resistance. *Plant Mol. Biol.* 87, 181–191. doi: 10.1007/s11103-014-0269-7.
- Wang, S., Tian, L., Liu, H., Li, X., Zhang, J., Chen, X., et al. (2020). Large-Scale Discovery of Non-conventional Peptides in Maize and *Arabidopsis* through an Integrated Peptidogenomic Pipeline. *Mol. Plant* 13, 1078–1093. doi: 10.1016/j.molp.2020.05.012.
- Whitewoods, C. D., Cammarata, J., VENZA, Z., Sang, S., Crook, A. D., Aoyama, T., et al. (2018). *CLAVATA* Was a Genetic Novelty for the Morphological Innovation of 3D Growth in Land Plants. *Curr. Biol.* 28, 2365-2376.e5. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.068.
- Yamaoka, S., Inoue, K., and Araki, T. (2021). Regulation of gametangia and gametangiophore initiation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Reprod.* 34, 297–306. doi: 10.1007/s00497-021-00419-y.
- Yamaoka, S., Nishihama, R., Yoshitake, Y., Ishida, S., Inoue, K., Saito, M., et al. (2018). Generative Cell Specification Requires Transcription Factors Evolutionarily Conserved in Land Plants. *Curr. Biol.* 28, 479-486.e5. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.053.
- Yamaoka, S., Takenaka, M., Hanajiri, T., Shimizu-Ueda, Y., Nishida, H., Yamato, K. T., et al. (2004). A mutant with constitutive sexual organ development in *Marchantia polymorpha* L. *Sex. Plant Reprod.* 16, 253–257. doi: 10.1007/s00497-003-0195-3.

图表

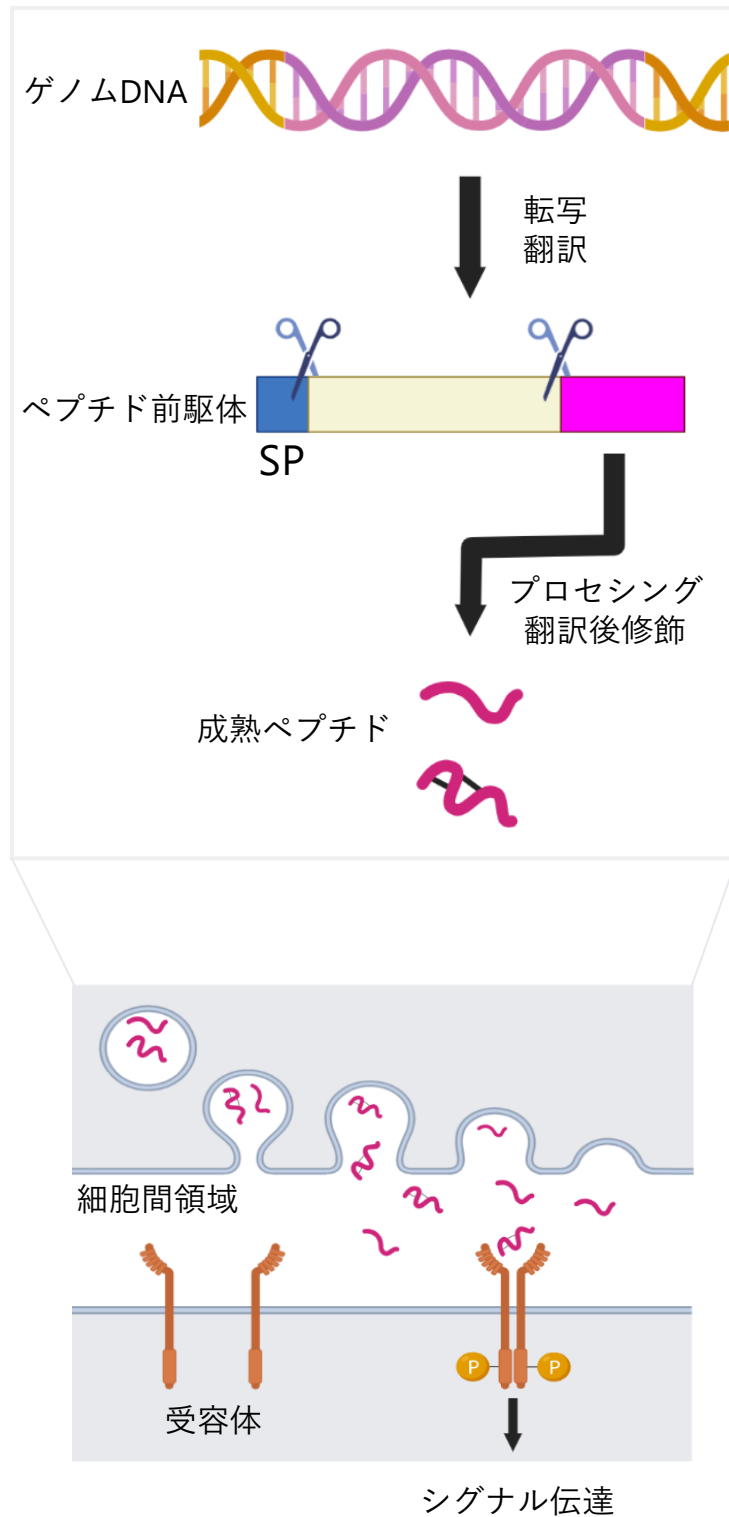


図 1. ペプチドの発現様式

ペプチドの発現の流れと作用機序の模式図。BioRender (<https://biorender.com>) を用いて作図した。SP = Signal peptide。

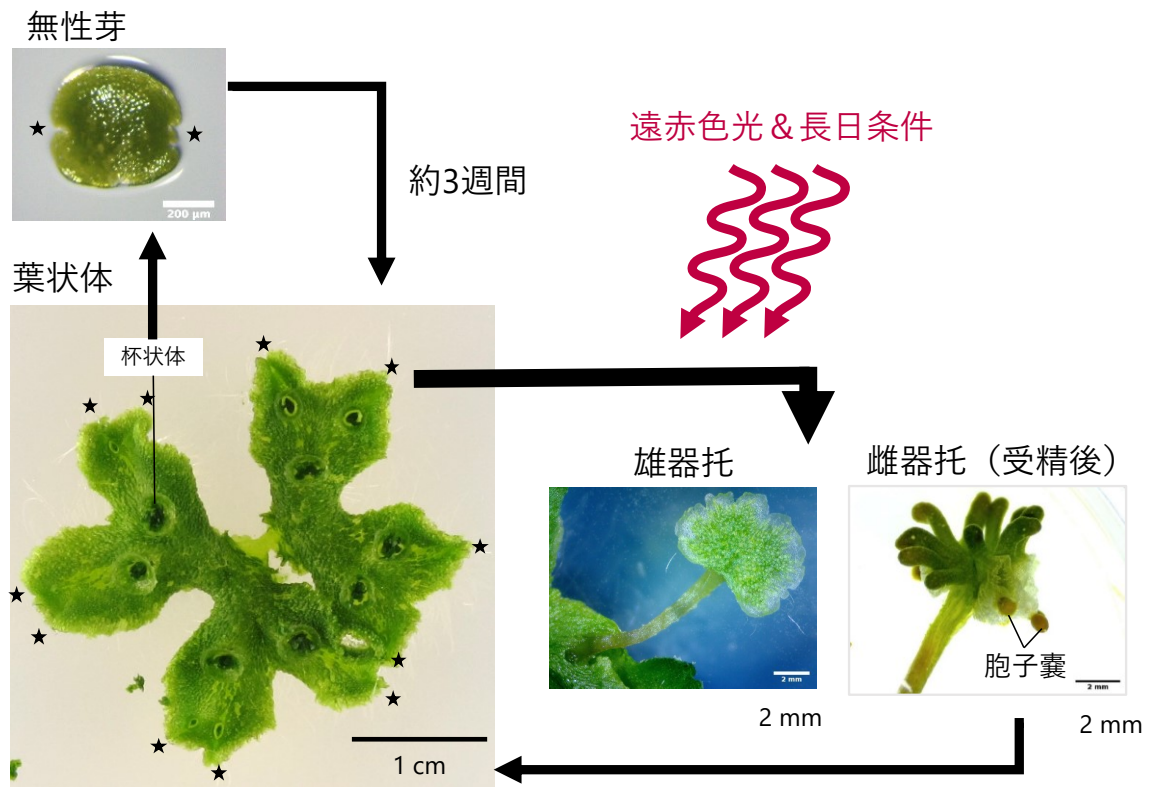


図 2. コケ植物ゼニゴケの形態と生活史

ゼニゴケの各ステージにおける器官の写真と生活史。星印は植物体先端のメリステム (apical notch) の位置を示している。

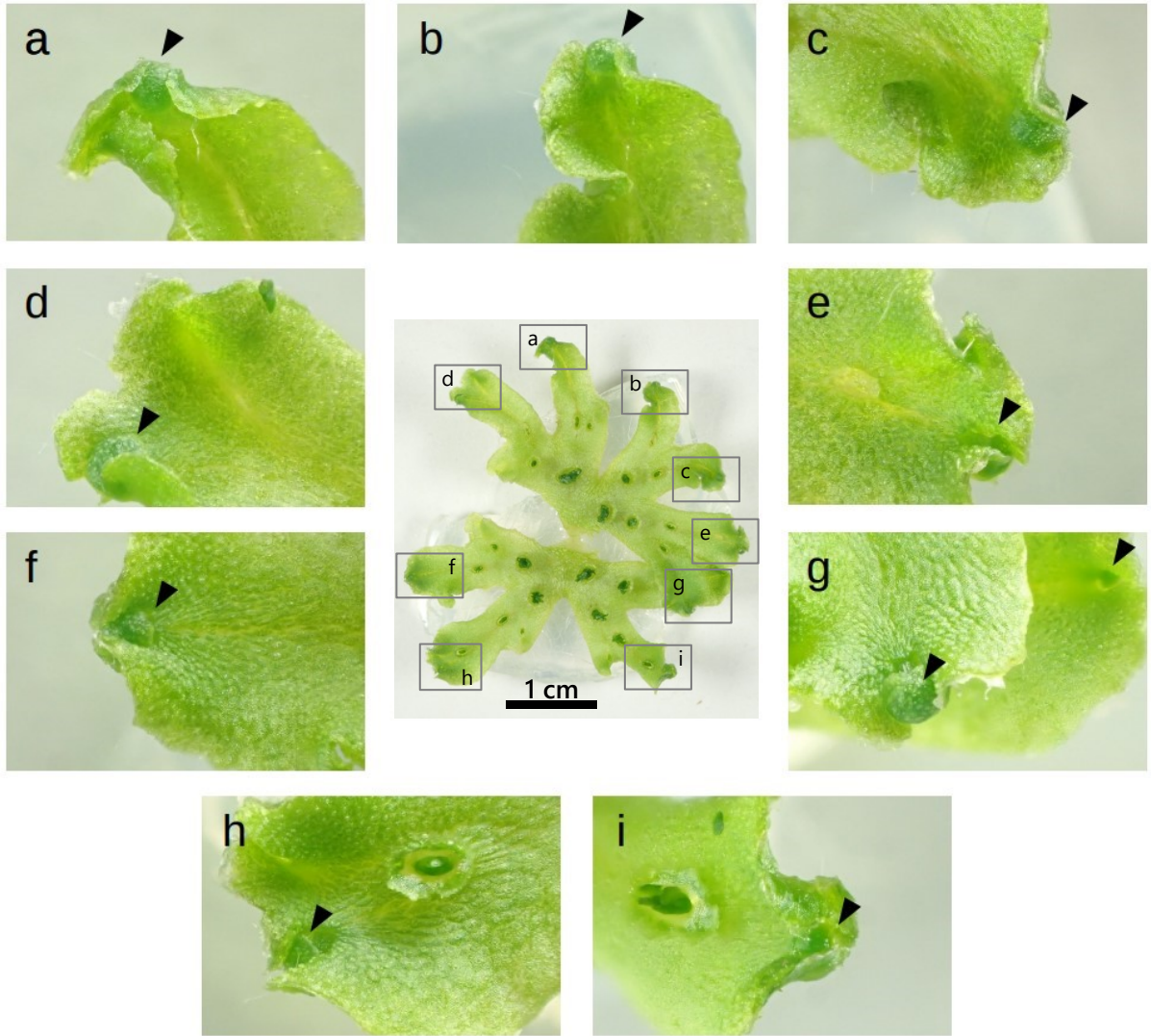
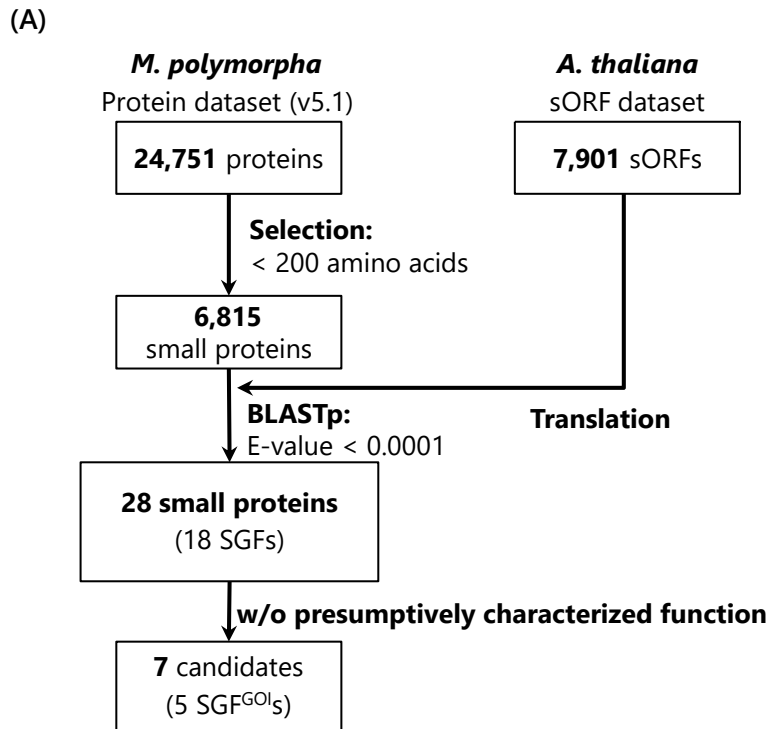


図 3. ゼニゴケの雄器托は先端成長組織に形成される

無性芽から生殖誘導条件で約 1 ヶ月間生育した葉状体の写真。中央の写真の四角で囲った領域を周囲に拡大して示した。小文字のアルファベットはそれぞれの対応を示している。雄器托を矢じりで示した。



(B)

	SGF 1	SGF 2	SGF 3	SGF 4	SGF 5	SGF 6	SGF 7	SGF 8	SGF 9	SGF 10	SGF 11	SGF 12	SGF 13	SGF 14	SGF 15	SGF 16	SGF 17	SGF 18
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	5 (1)	1	1	2 (2)	6 (1)	13 (1)	2 (1)	4 (1)	2	0	2	1	1	1 (1)	14	1	1 (1)
<i>Oryza sativa</i>	1	2	2	2	0	6	14	0	4	9	0	0	1	1	0	25	1	0
<i>Amborella trichopoda</i>	1	2	1	0	0	3	6	0	1	4	0	1	0	1	0	54	1	0
<i>Sequoiadendron giganteum</i>	2	1	1	0	0	0	479	1	3	9	0	1	3	0	0	30	0	0
<i>Selaginella moellendorffii</i>	1	1	0	0	0	2	0	0	4	7	0	1	5	0	0	18	0	0
<i>Anthoceros agrestis</i>	2	1	1	1	0	4	90	0	2	1	0	1	0	0	0	30	1	0
<i>Physcomitrium patens</i>	1	4	1	1	0	2	128	0	6	2	0	1	9	1	0	10	1	20
<i>Marchantia polymorpha</i>	1	1	0	1	0	10	4	1	4	3	2	1	3	1	0	26	1	1
<i>Chara braunii</i>	1	1	0	0	6	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	1	0	1	0	0	4	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0

図 4. 新規植物ペプチド遺伝子の種間保存度に基づく解析対象の選抜

(A) シロイヌナズナとゼニゴケに保存される新規植物ペプチド遺伝子の選抜フローチャート。BLASTp の結果を表 1 に示した。(B) 陸上植物種間における *SGF* のオーソログ数。数値は Dicots PLAZA 5.0 データベースより入手した。シロイヌナズナのセル内の括弧で囲まれた数値は AGI コードが付与されていない sORF の個数を表している。ゼニゴケにおける *SGF* のオーソログ数を赤字で、機能未知として選抜した *SGF* のセルを黄色で強調した。

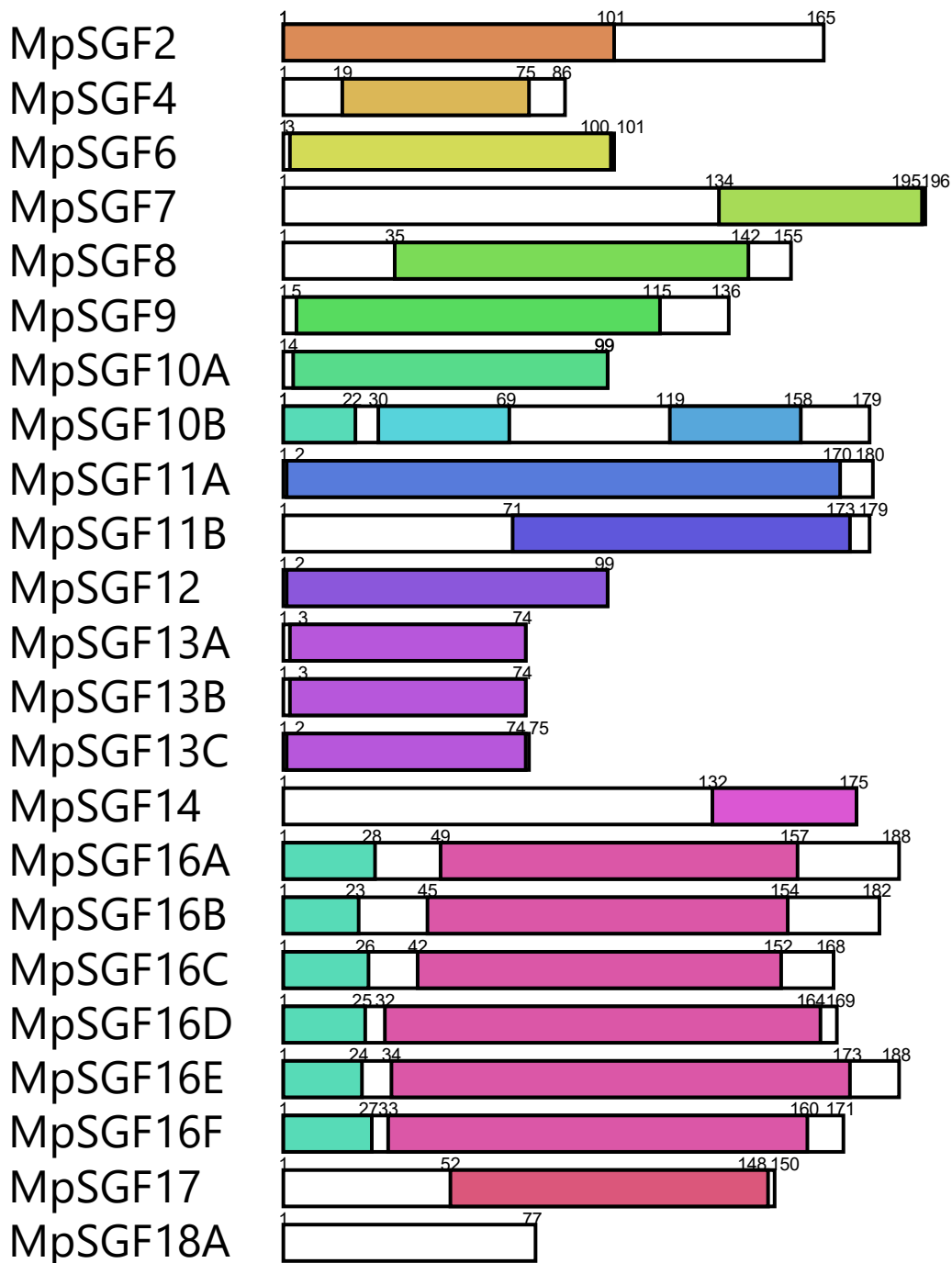
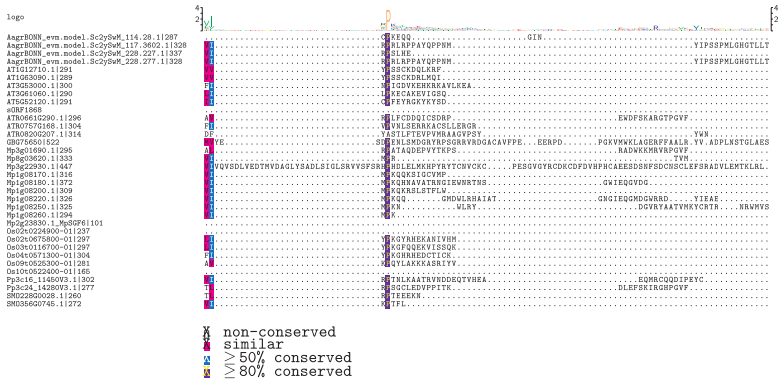


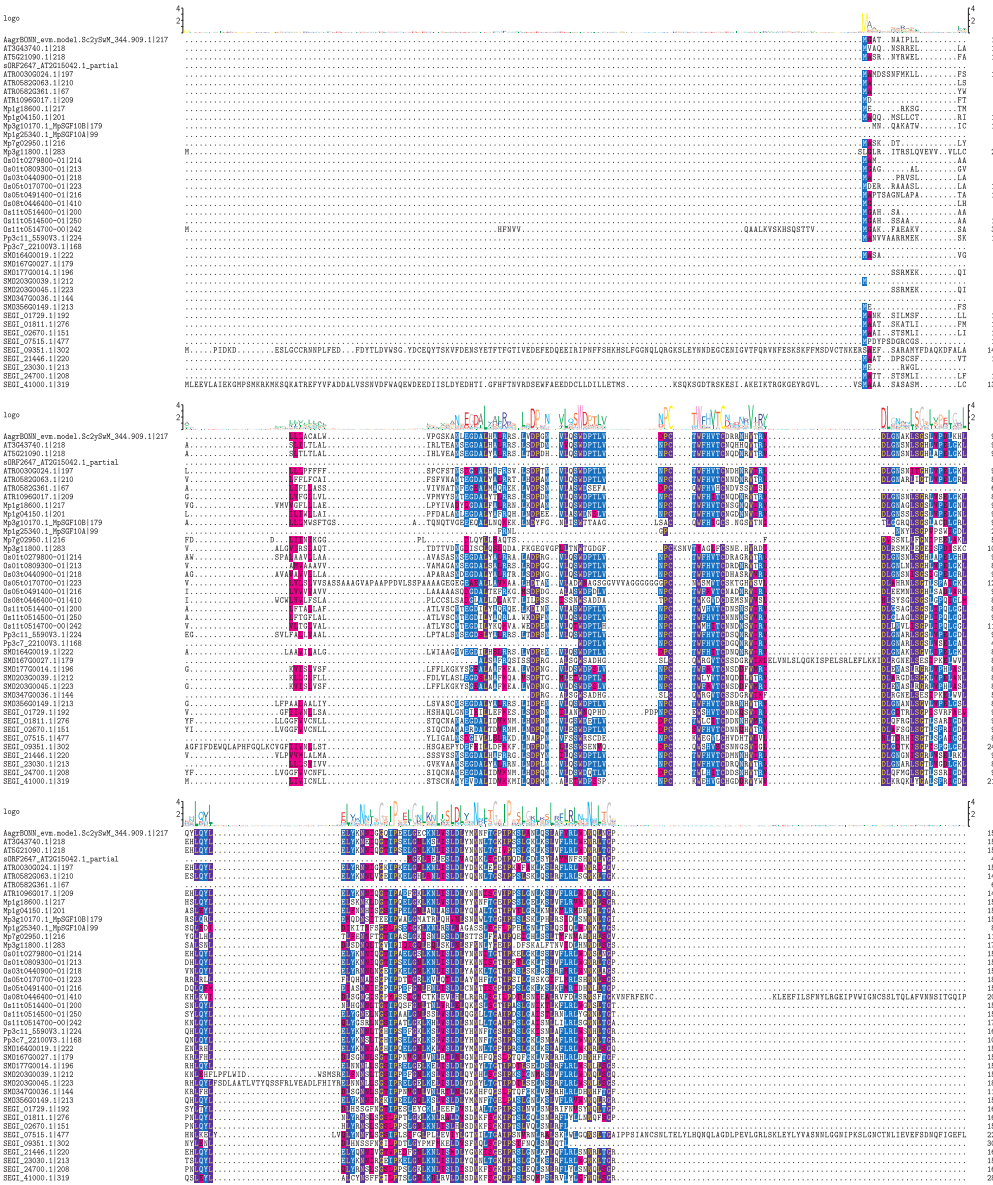
図 5. MpSGF タンパク質のドメイン構造

MpSGF のタンパク質ドメインを色つきのボックスで示している。ドメインのアノテーションおよび位置情報はゼニゴケデータベース MarpolBase に登録されているものを利用した。MpSGF の機能アノテーションおよびドメインの位置情報を表 2 に示した。なお、MpSGF1, MpSGF5, MpSGF15 および MpSGF18B は最新バージョンのデータベース (MpTak1 v6.1) から削除されているため除外した。

(次項より続き)

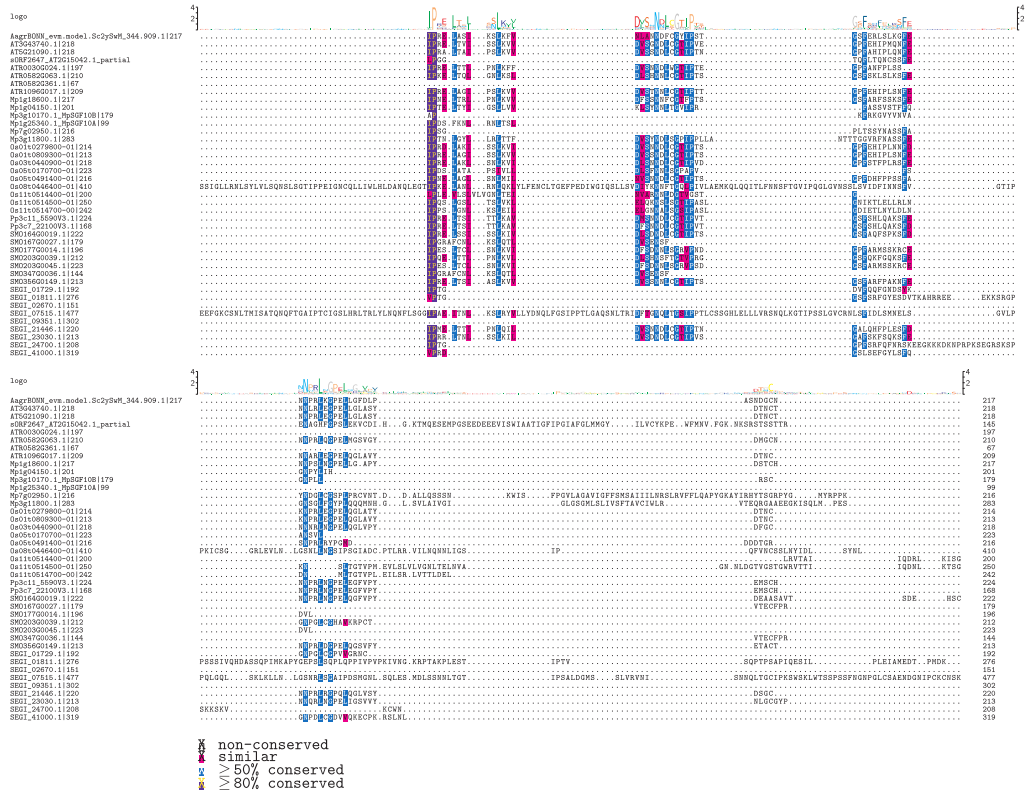


(B) SGF10: ORTHO05D001118



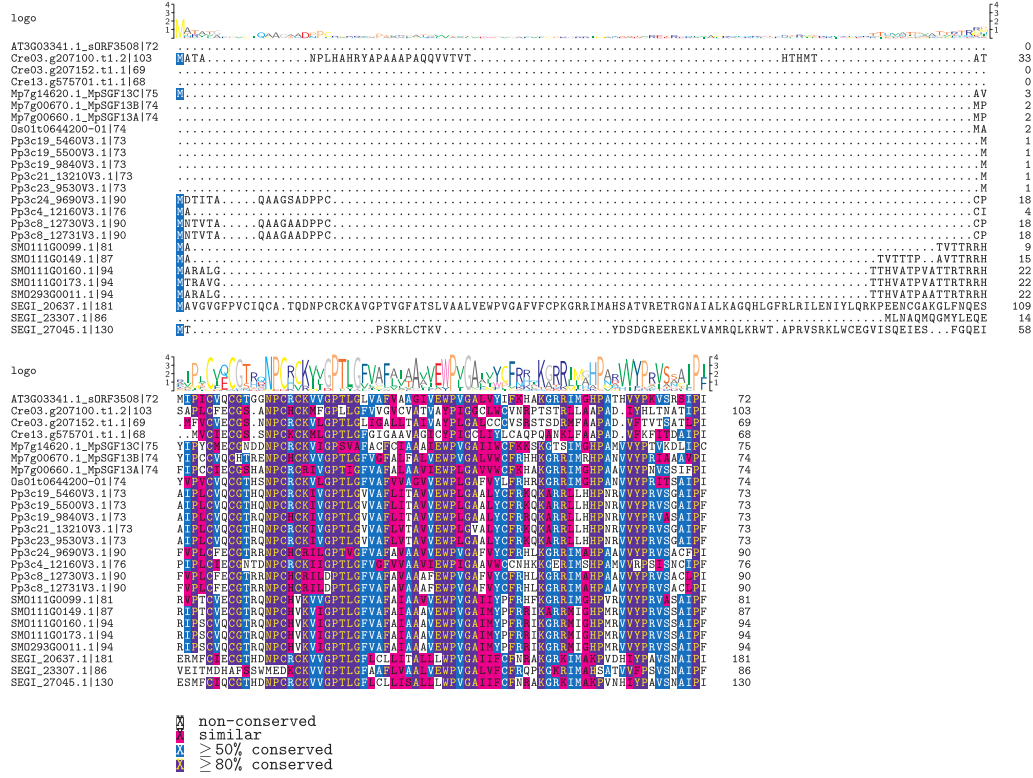
(次項へ続く)

(次項より続き)



(C)

SGF13: ORTHO05D007973

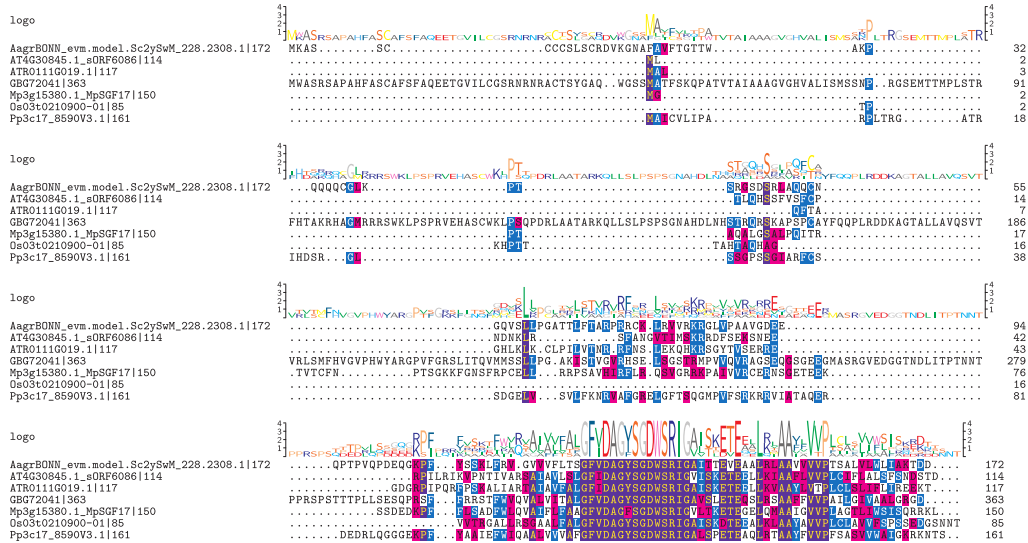


(次項へ続く)

(次項より続き)

(D)

SGF17: ORTHO05D009227



(E)

SGF18: ORTHO05D009796

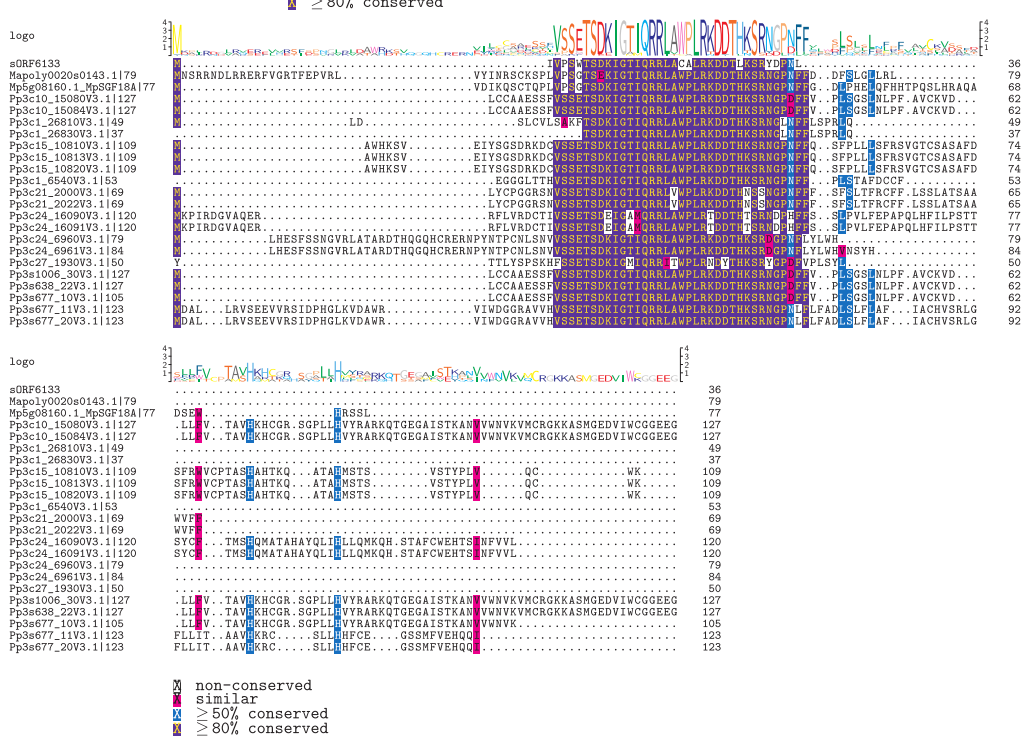


図 6. *SGF^{GOI}* のオースログの多重配列アライメント

(A) *SGF6*, (B) *SGF10*, (C) *SGF13*, (D) *SGF17*, (E) *SGF18* のオースログ遺伝子のアミノ酸配列を用いて作成した多重配列アライメント。結果の視覚化には LaTeX パッケージの TEXshade を用いた。コンセンサス配列をアライメントの上部に表示した。

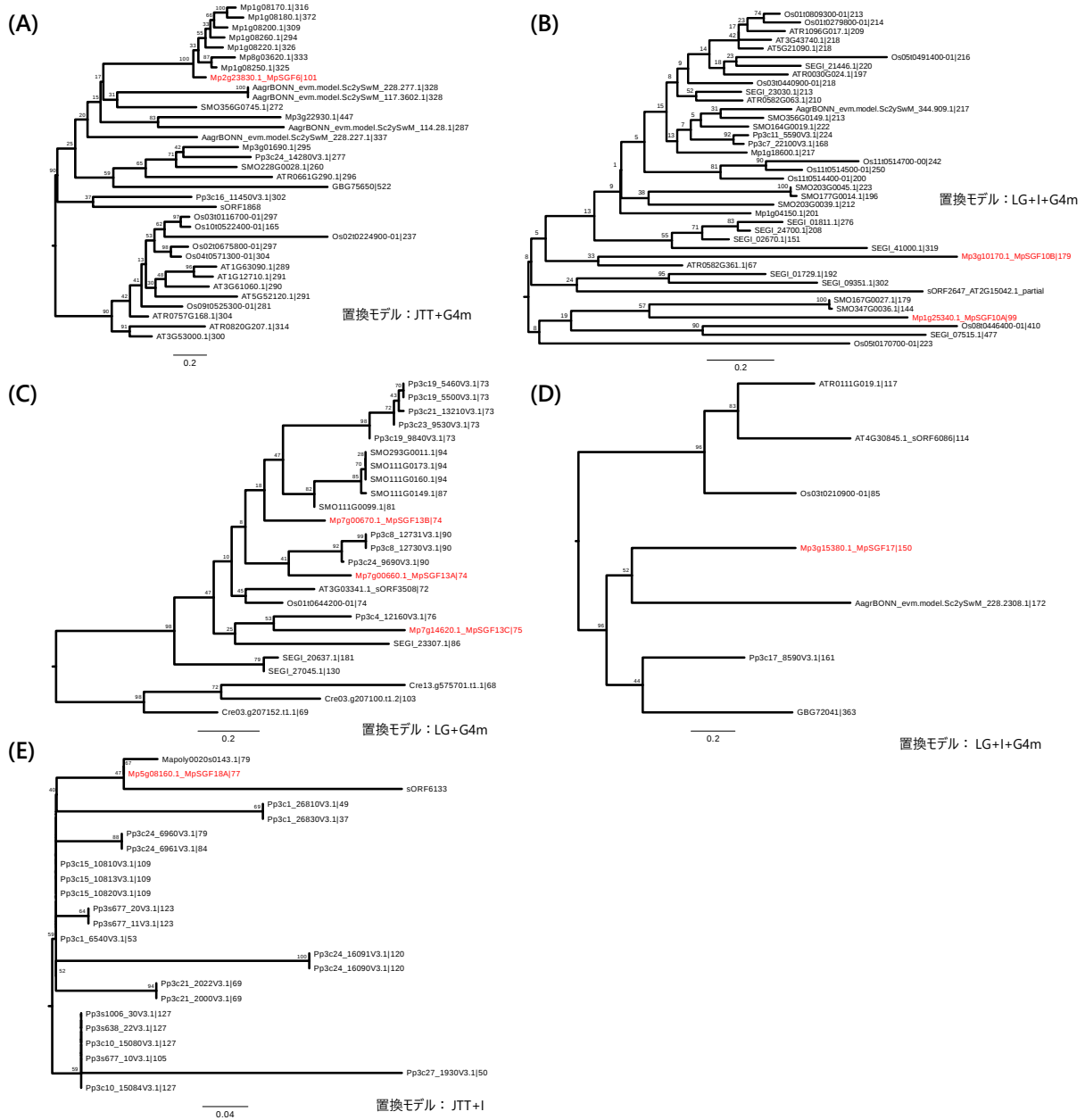


図 7. *SGF^{GOI}* の分子系統樹

(A) *SGF6*, (B) *SGF10*, (C) *SGF13*, (D) *SGF17*, (E) *SGF18* のオースログ遺伝子の分子系統樹。Mp*SGF* を赤字で示している。分子系統樹は最尤法を用いて作成した。各ノードのブートストラップ値は 1,000 回の反復により得られたものを表している。FigTree を用いて樹形を描写した。

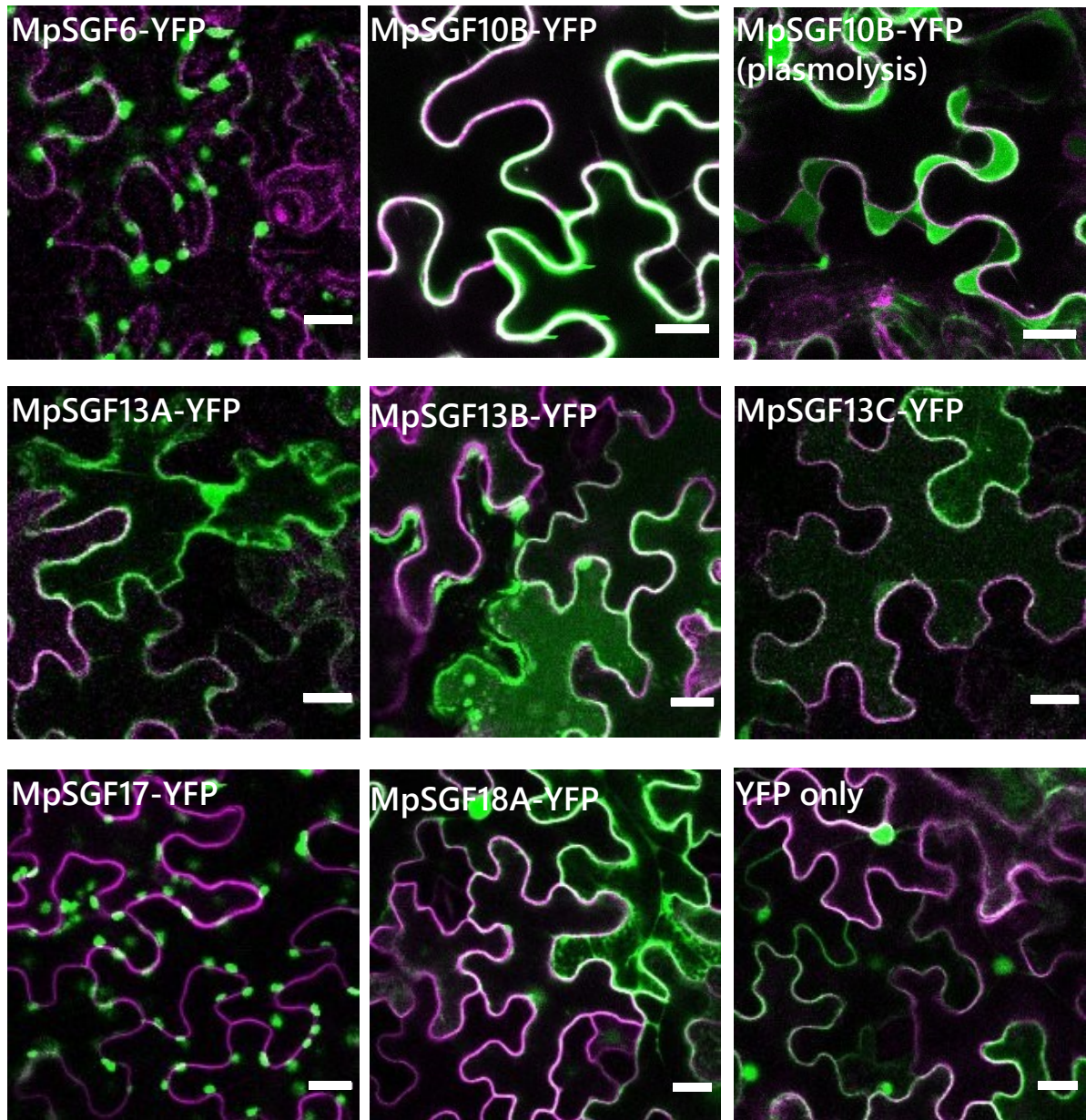


図 8. MpSGF^{GOI}の一過的発現系をもちいた細胞内局在観察

YFP 融合型 MpSGF を一過的に発現するベンサミアタバコ裏側表皮の共焦点レーザー顕微鏡画像。MpSGF10B-YFP の原形質分離 (plasmolysis) 処理は 0.8 M マンニトール溶液を葉に注入して行った。緑で YFP 蛍光を、マゼンタで細胞膜マーカー mRFP-LTI6b のシグナルを可視化している。スケールバー = 20 μm。

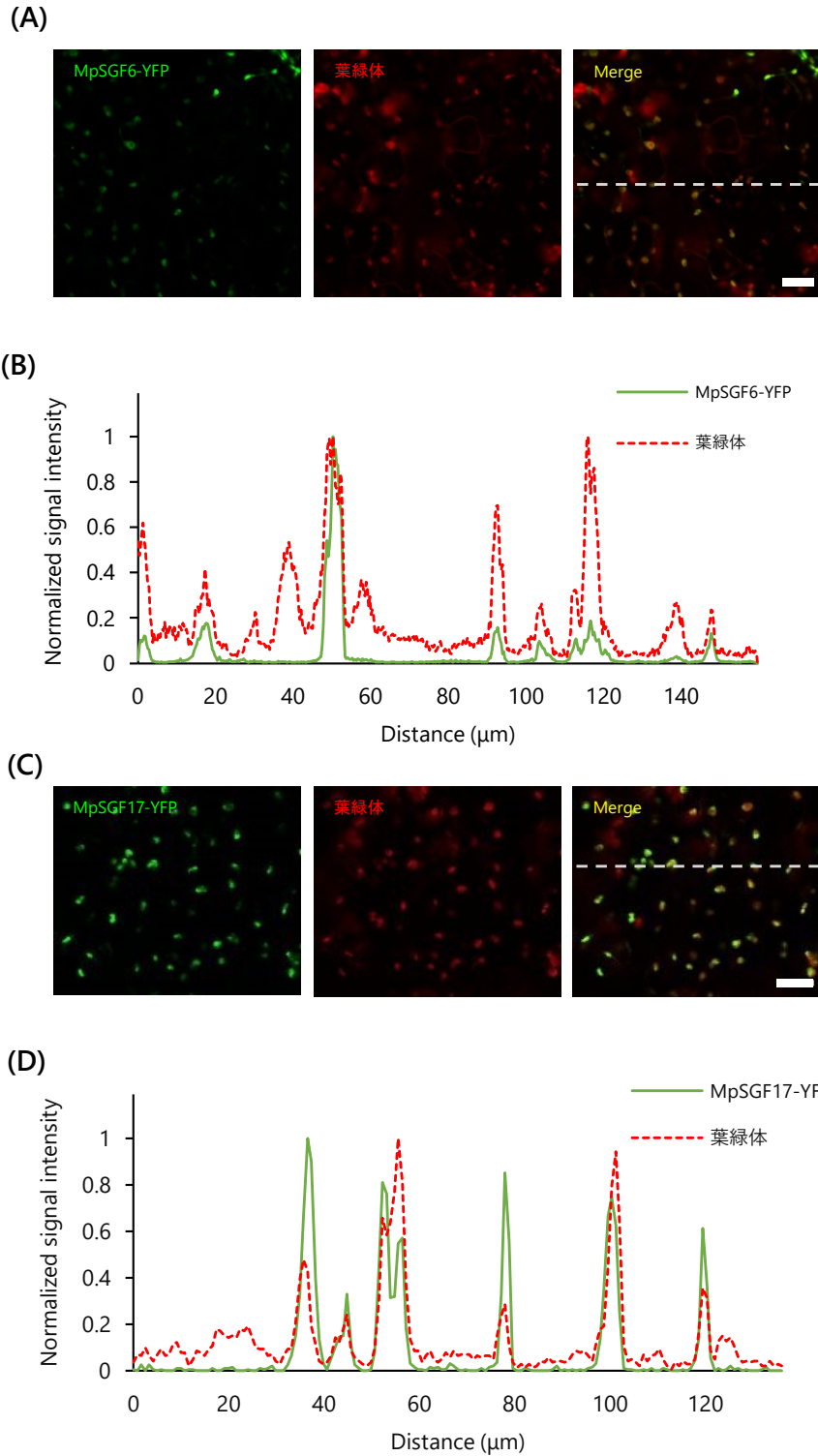


図 9. MpSGF6 および MpSGF17 と葉緑体の細胞内共局在観察

(A) MpSGF6-YFP または (C) MpSGF17-YFP を一過的に発現するベンサムアタバコ裏側表皮の共焦点レーザー顕微鏡画像。(B, D) マージ画像の点線上の蛍光シグナル強度をプロットした。数値は min-max 正規化を行った。スケールバー = 20 μm 。

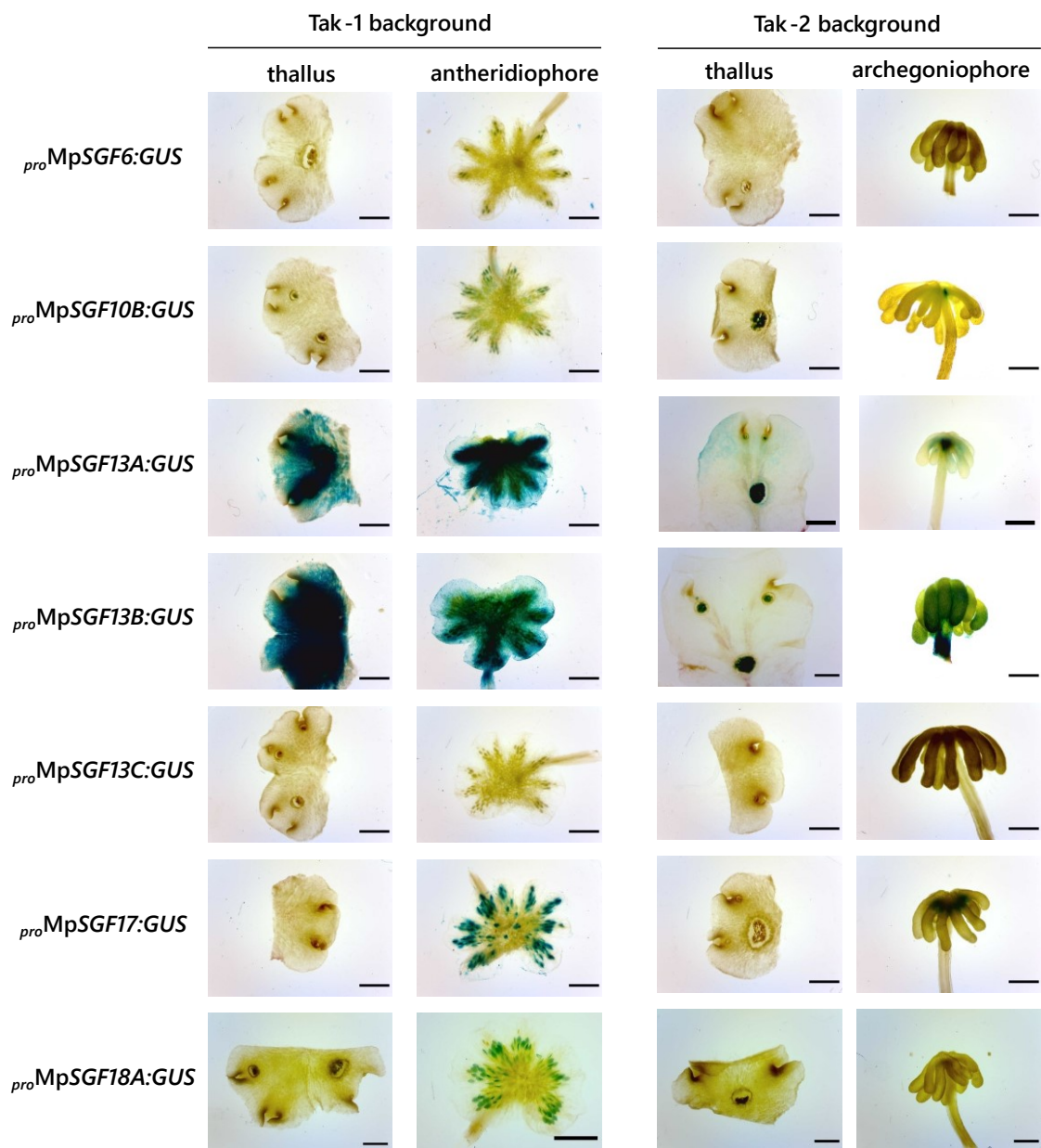


図 10. MpSGF^{GOI} プロモーターの GUS レポーターアッセイ

MpSGF^{GOI} プロモーターの制御下で *GUS* を発現する形質転換ゼニゴケの *GUS* 染色画像。雄株 (Tak-1) 背景では 2 週齢葉状体と雄器托, 雌株 (Tak-2) 背景では 3 週齢葉状体と雌器托を染色処理した。スケールバー = 2 mm。

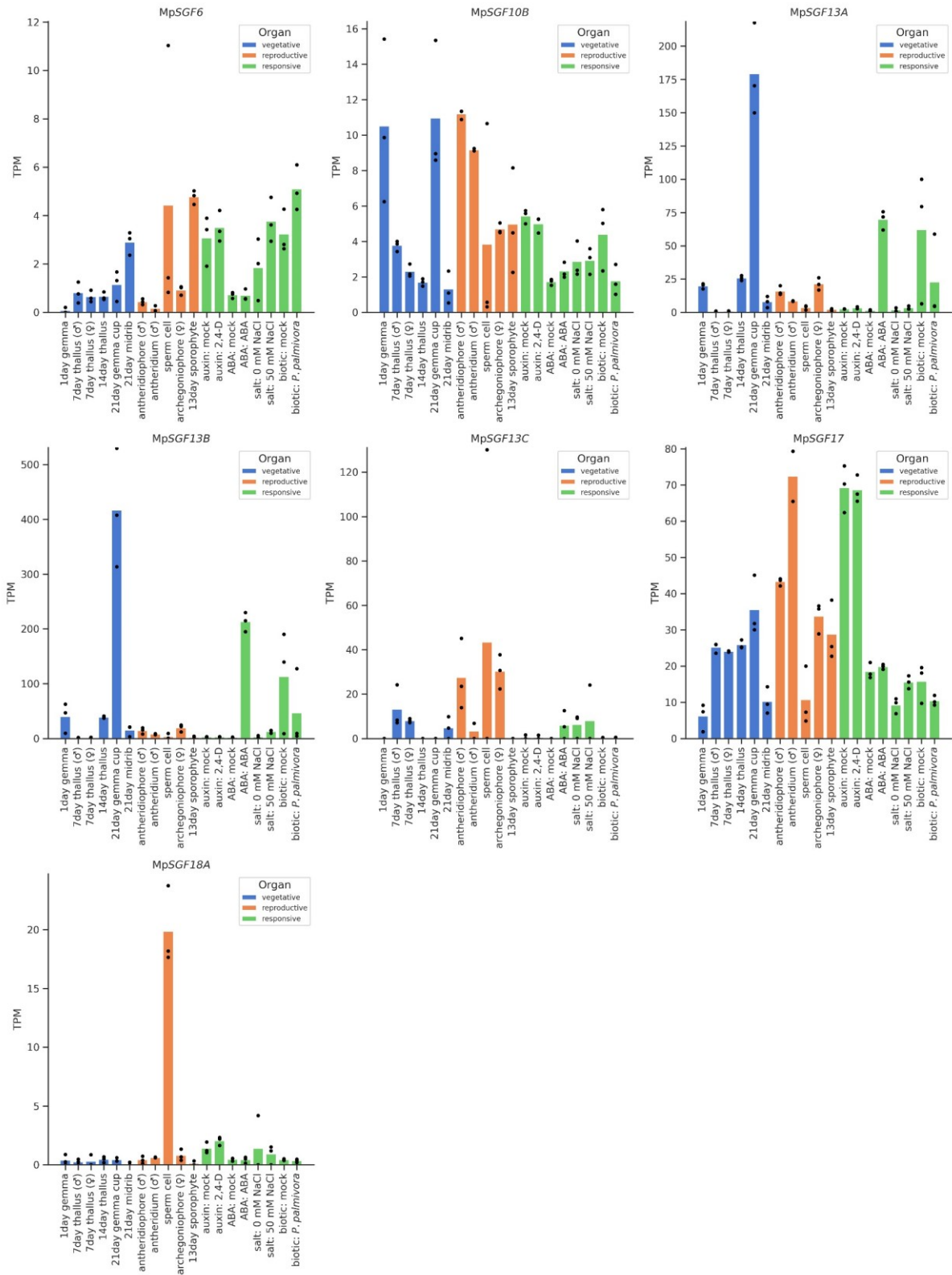


図 11. MpSGF^{GOI} の器官・条件別発現量

MarpolBase Expression (<https://marchantia.info/mbex/>) より取得した各 MpSGF の相対発現量 (TPM 値) のグラフ。青, 橙, 緑のバーはそれぞれ栄養成長器官, 生殖器官, 外部要因での発現量を示している。データのアクセッション ID を表 3 に示した。

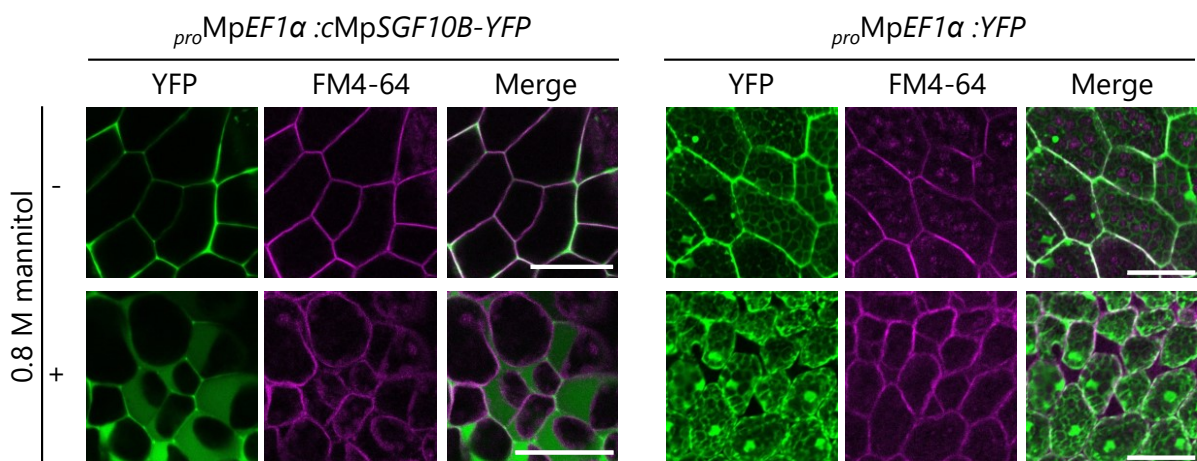


図 12. ゼニゴケにおける MpSGF10B の細胞内局在観察

MpSGF10B-YFP および YFP を恒常的に発現する形質転換ゼニゴケの共焦点レーザー顕微鏡画像。3 日間培養した幼葉状体のメリステム周辺を観察した。緑で YFP シグナルを、マゼンタで細胞膜 (FM4-64) を可視化した。原形質分離は 0.8 M マンニトール溶液でマウントすることで行った。スケールバー = 50 μm 。

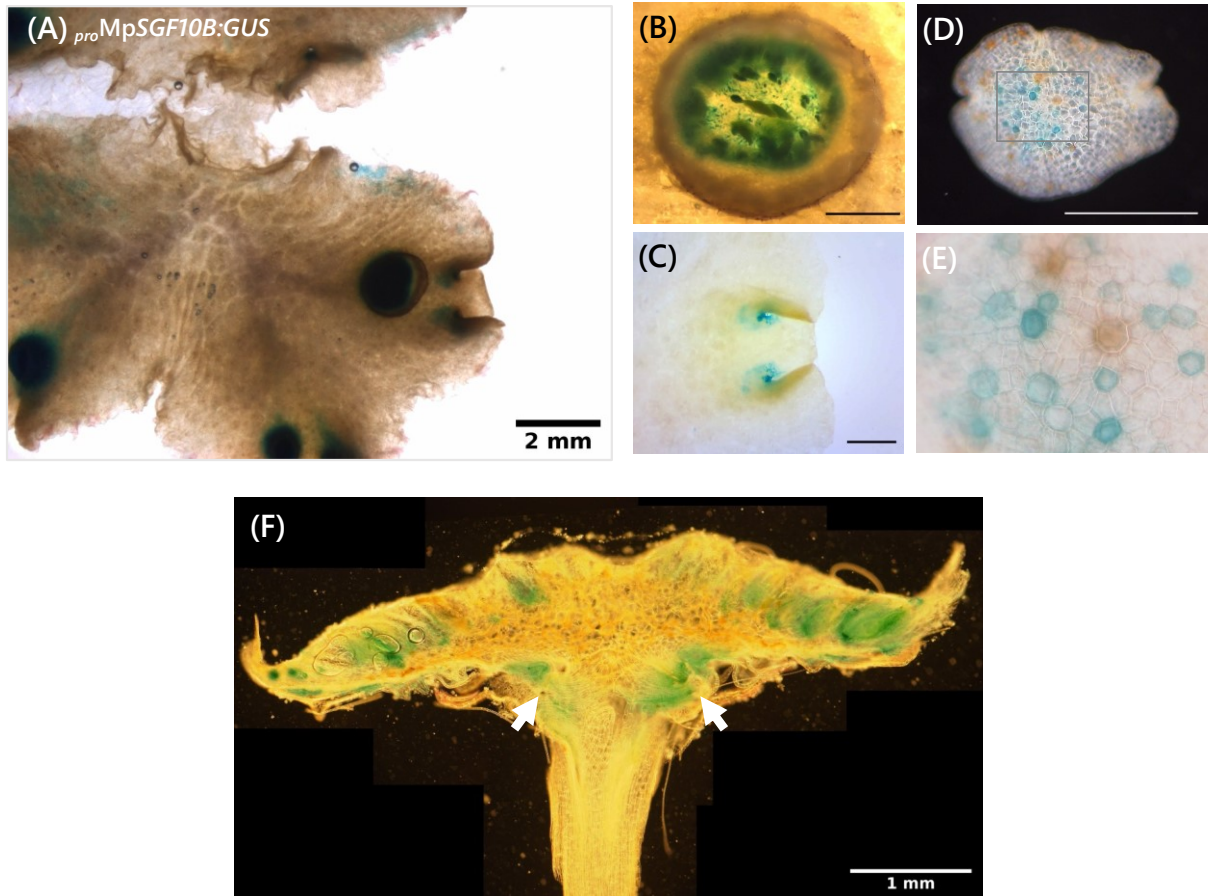


図 13. *proMpSGF10B:GUS* の詳細な染色パターン観察

(A-E) 栄養成長器官での GUS 染色画像。(A) 2 週齢の葉状体の全体画像。(B) 杯状体。(C) メリステム領域の拡大画像。(D, E) 無性芽とその中央部（グレーの四角）の拡大画像。(B-D) スケールバー = 0.5 mm。(F) 雄器托の横断切片画像。矢印は柄と雄器床の連結部分に見られる GUS シグナルを示している。

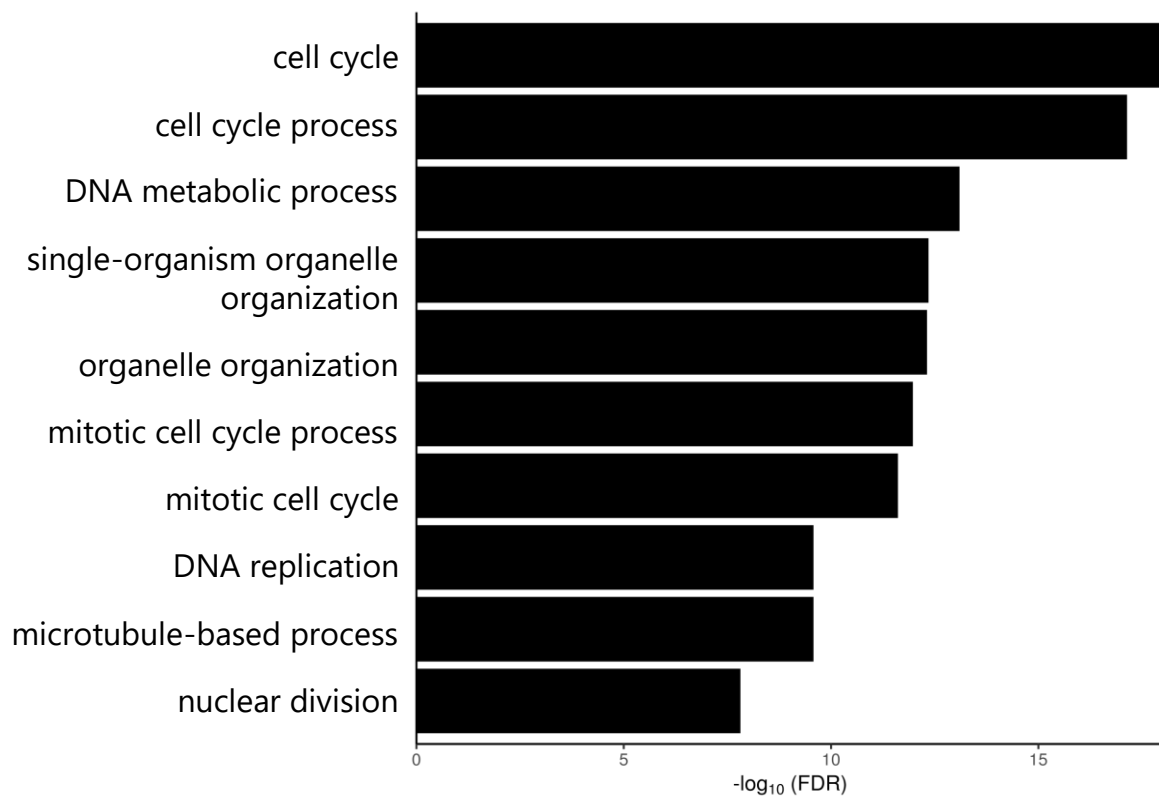


図 14. MpSGF10B の遺伝子共発現解析

MpSGF10B と共発現する遺伝子群の GO エンリッチメント解析結果。上位 10 個の “biological process” のカテゴリーを示した。“cellular component” および “molecular function” のカテゴリーを含めた解析結果は表 4 に示した。

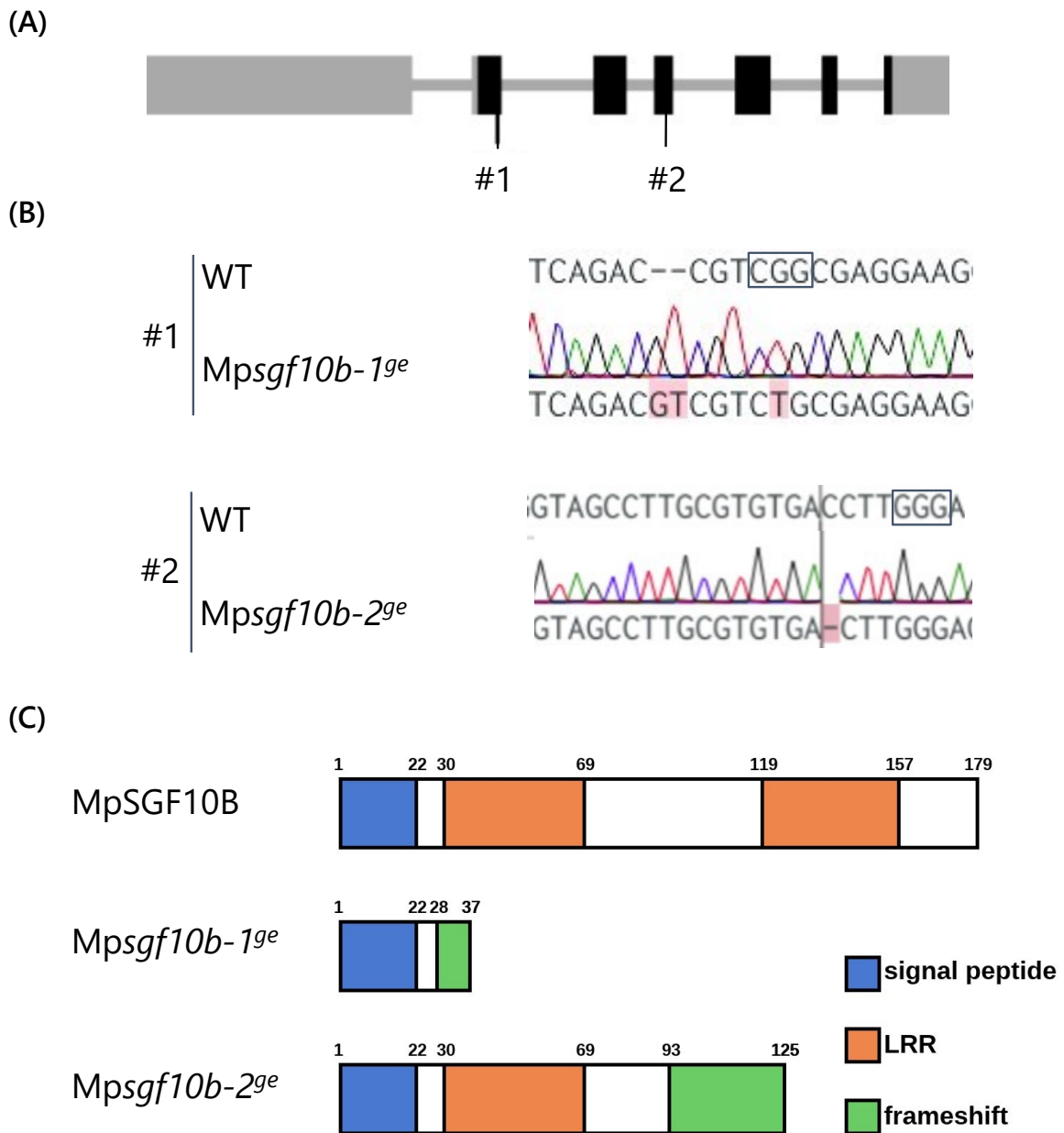
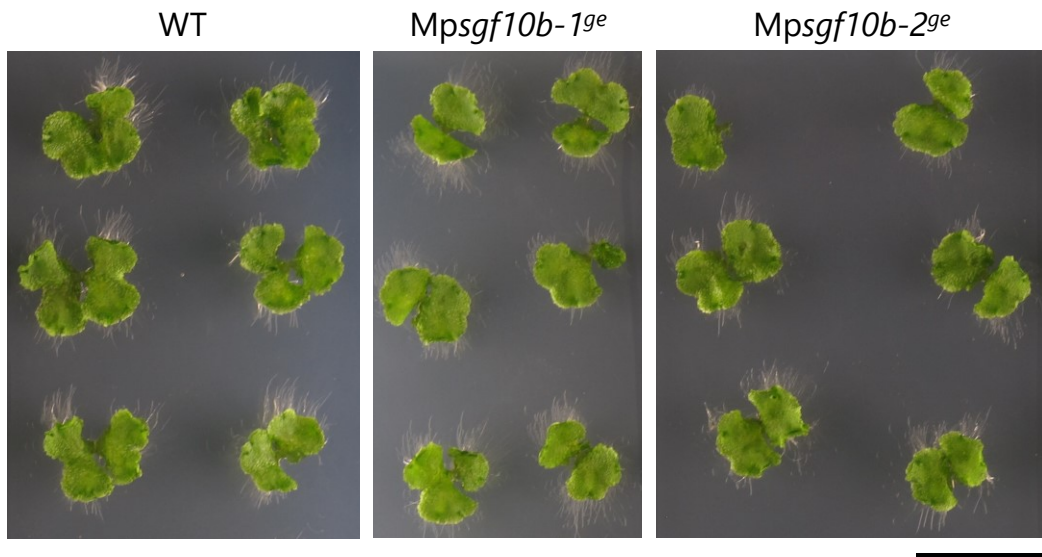


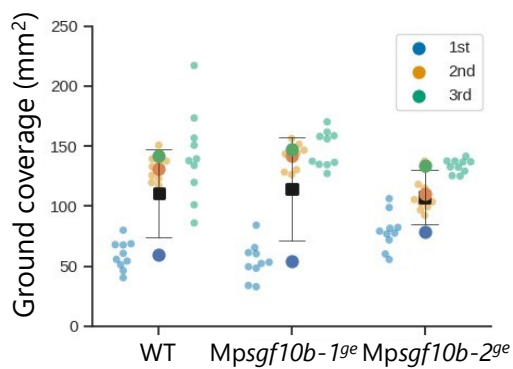
図 15. MpSGF10B の遺伝子モデルと変異株の作出

(A) MpSGF10B の遺伝子モデル図。灰色の線とボックスはそれぞれイントロンと非翻訳領域、黒のボックスは CDS 領域を表している。CDS 領域の 2 か所 (#1, #2) にゲノム編集領域を設計した。(B) ゲノム編集株の DNA シーケンシング結果。リファレンス配列とのミスマッチ塩基を赤のハイライトで示している。黒の四角でゲノム編集の PAM 配列 (NGG) を示している。(C) ゲノム編集による遺伝子産物の構造予想図。ボックスの上部にある数字は、アミノ酸配列におけるポジションを示している。

(A)



(B)



(C)

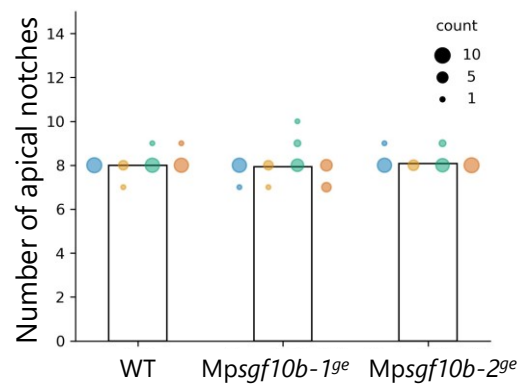


図 16. *Mpsgf10b*^{ge} 変異株の栄養成長

(A) 野生株 (WT) と *Mpsgf10b*^{ge} の変異株の 2 週齢葉状体の写真。スケールバー = 2 mm。

(B) 2 週間培養した葉状体面積。半透明ドットは実測値を、無透過のドットは試行ごとの平均値を、黒の四角は全体の平均値を表している。エラーバーは全体の平均値 ± 試行ごとの平均値の標準偏差を表している。各試行、各ラインについて $n = 10$ 。(C) 2 週齢葉状体の成長点 (apical notch) の個数。ドットのサイズは、その計測値の個体数を示している。各ラインについて、 $n = 8$ (青), 5 (黄), 8 (緑), 8 (橙)。

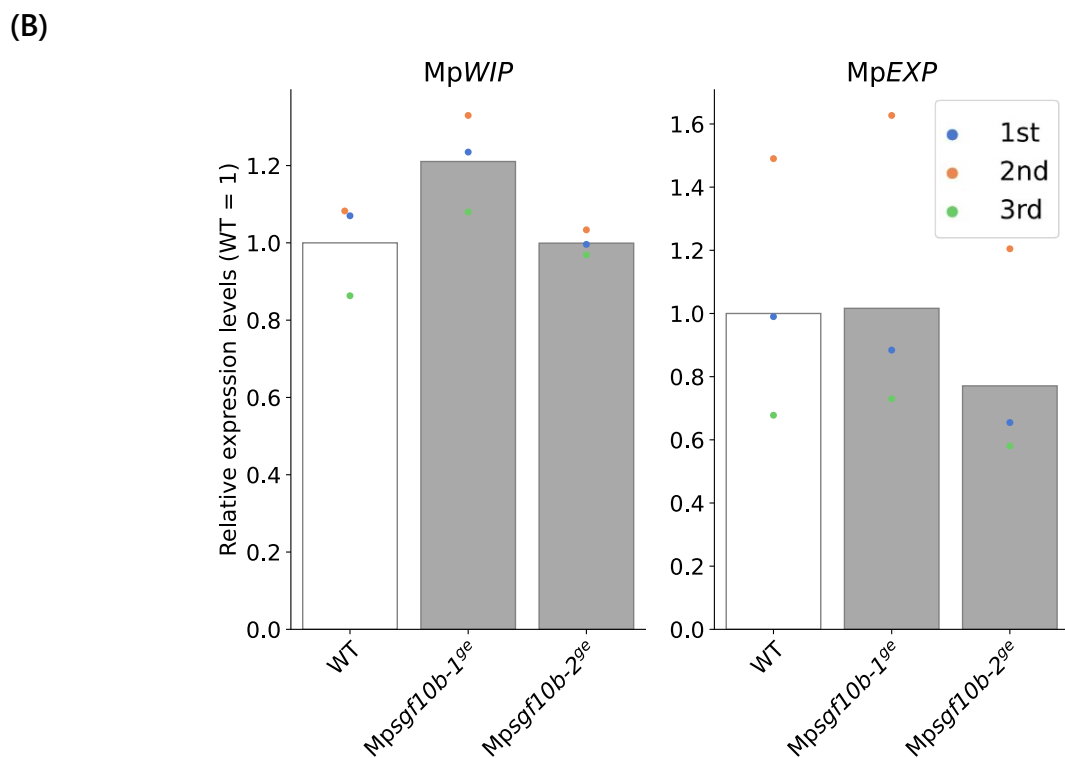
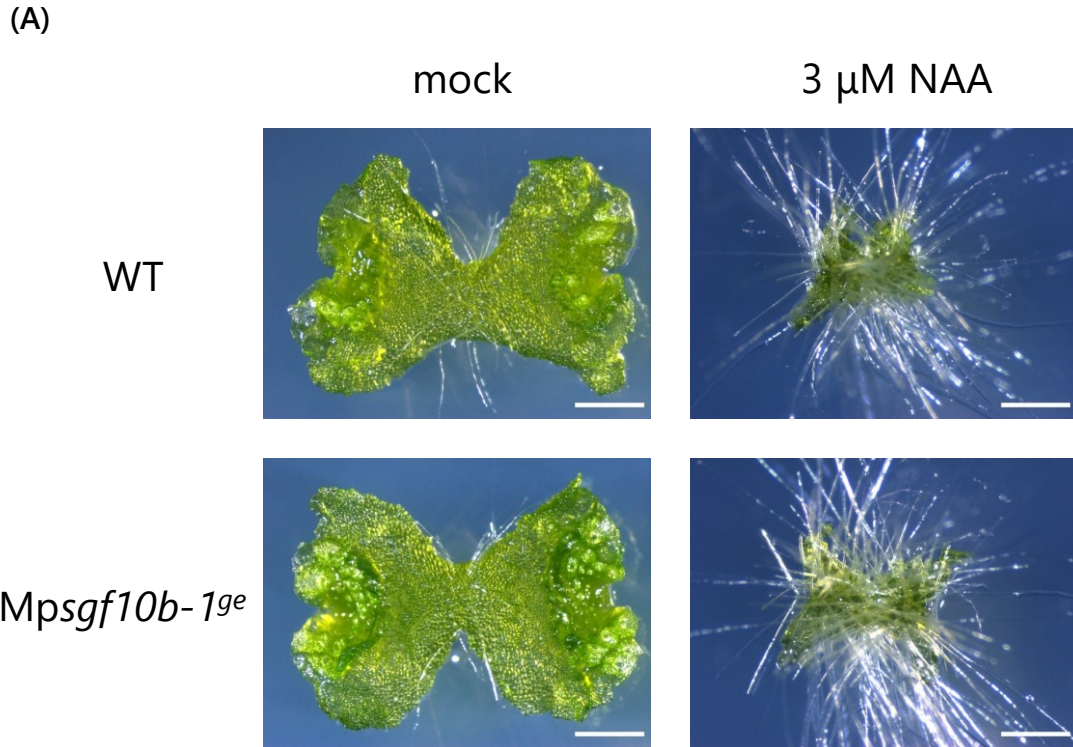


図 17. *Mpsgf10b^{ge}* 変異株のオーキシン応答性

(A) NAA を含む培地で 7 日間培養した葉状体の写真。スケールバー = 1 mm。(B) 連続明条件 (22°C) で 10 日間生育した葉状体におけるオーキシン応答遺伝子の RT-qPCR 結果。各試行について、それぞれ 5 個体から抽出した RNA の逆転写産物をテンプレートとした。

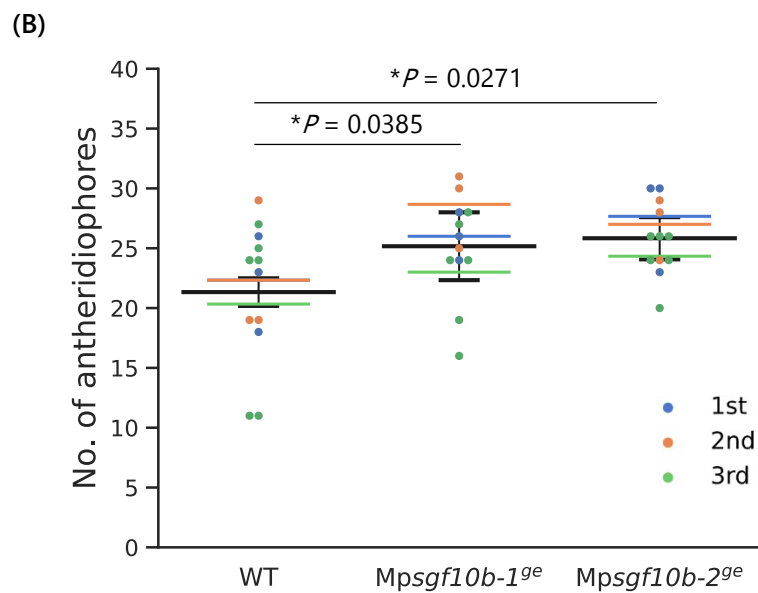
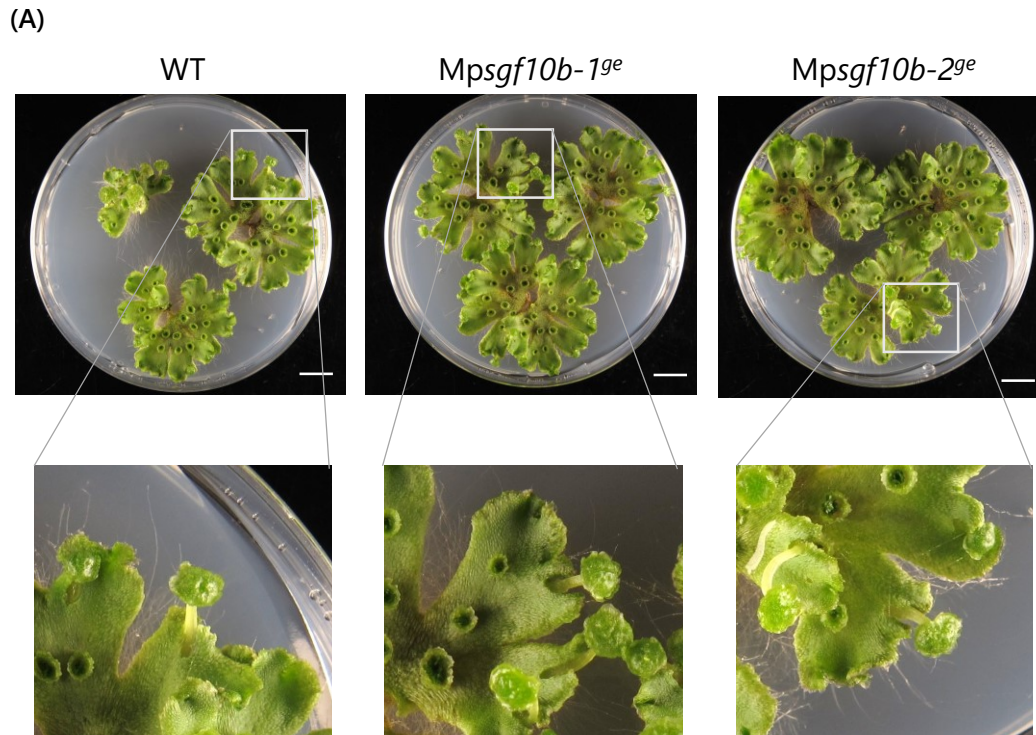
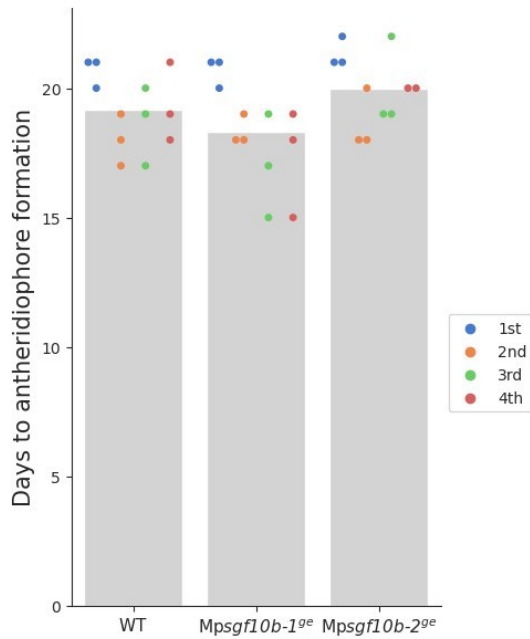


図 18. *Mpsgf10b^{ge}* 変異株の生殖誘導

(A) 5日間前培養の後、30日間生殖誘導を行った葉状体の写真。雄器托を形成した葉状体先端部を拡大している。スケールバー = 1 cm。(B) 2週間の前培養の後、3週間生殖誘導を行った葉状体に形成された雄器托の個数。独立した3回の試行ごとに色分けし、各試行での平均値を色付きの横棒で表した。黒の横棒は全体の平均値±試行ごとの平均値の標準偏差を表している。 P 値は野生株を対照群とするDunnett's testにより算出した。各試行、各ラインにおいて $n = 3$ (青), 3 (橙), 5 (緑)。

(A)



(B)

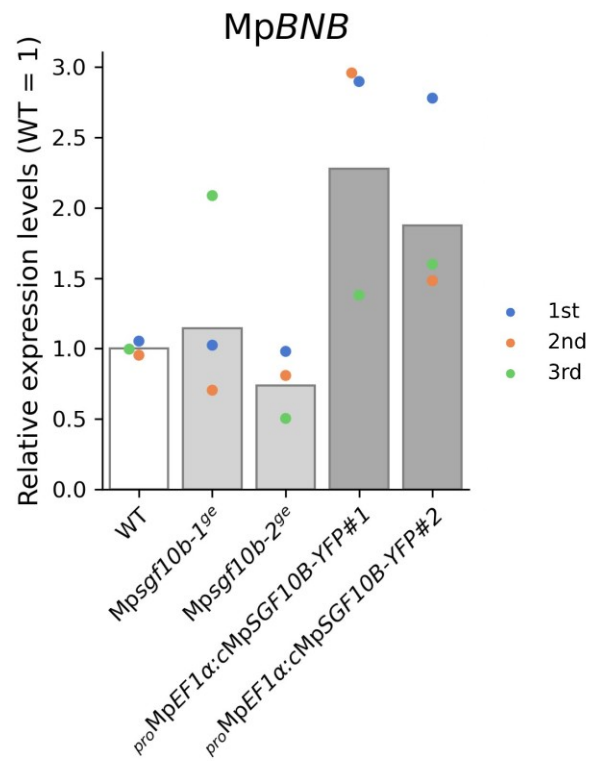
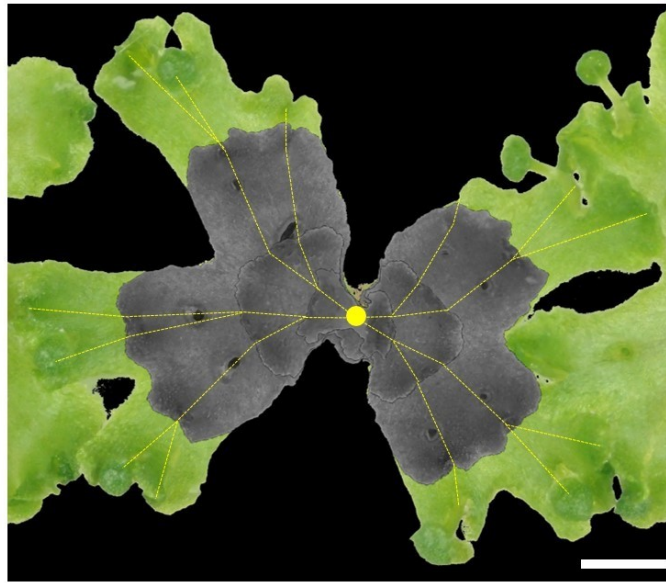


図 19. Mpsgf10b^{ge} 変異株における雄器托形成のタイミング

(A) 培養開始から雄器托が観察されるまでに経過した日数。(B) 生殖誘導条件下で 10 日間培養した葉状体における、生殖誘導マスター制御因子 MpBNB の RT-qPCR 結果。各試行について、それぞれ 5 個体を混合して抽出した RNA の逆転写産物をテンプレートとした。

(A)



(B)

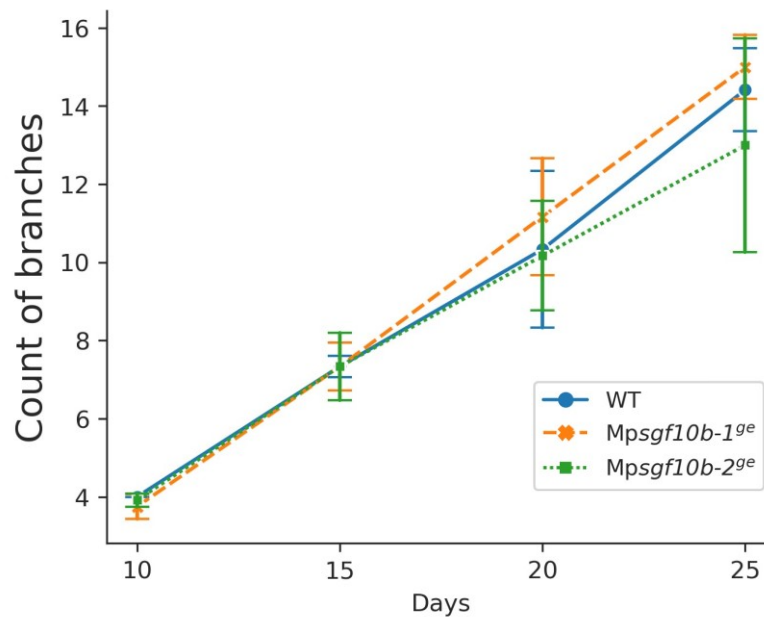


図 20. *Mpsgf10b^{ge}* 変異株の生殖誘導条件における成長

(A) 無性芽を生殖誘導条件下で培養した場合のゼニゴケ葉状体の成長点の軌跡。10 日齢, 15 日齢, 20 日齢, 25 日齢の植物体を重ね合わせ, それぞれの成長点を点線で繋いだ。中央の黄色のドットは無性芽を置いた場所を表している。スケールバー = 5 mm。(B) 10 日齢, 15 日齢, 20 日齢, 25 日齢の葉状体の分岐の枝数の推移。測定は 4 試行繰り返し, すべての試行で各ラインについて 3 個体ずつ観測した。エラーバーは全体の平均値 ± 試行ごとの平均値の標準偏差を表している。

Mpsgf10b-1^{ge} (♂) × Tak-2 (♀)

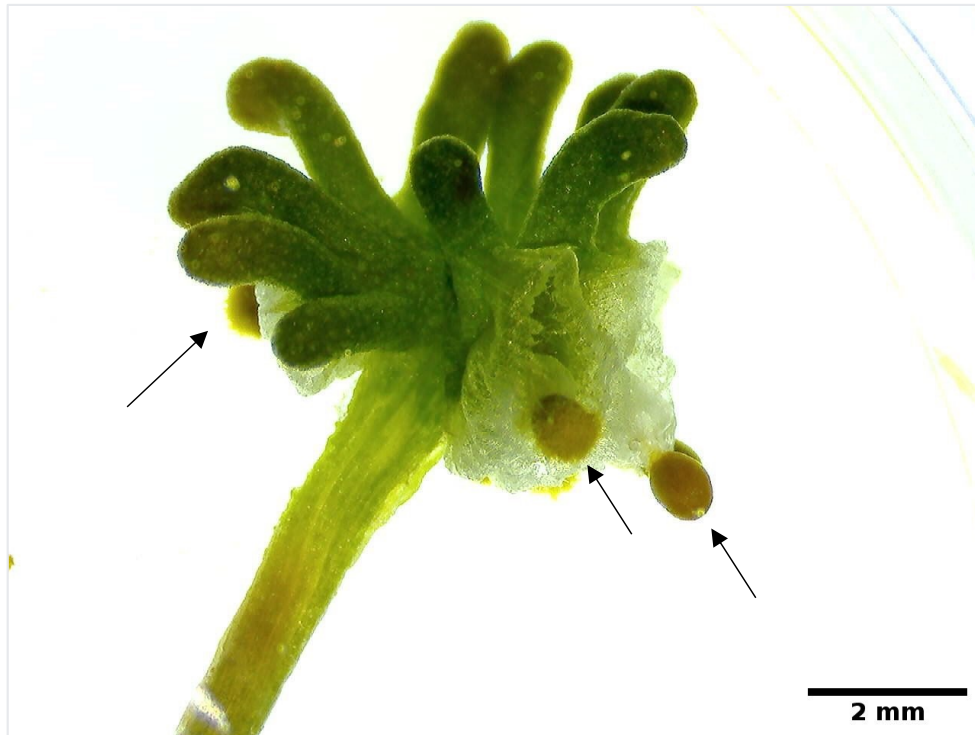


図 21. *Mpsgf10b^{ge}* 変異株の雄性生殖能力

雄株背景の *Mpsgf10b^{ge}* 変異株と雌株背景の野生株の掛け合わせにより形成した孢子体の写真。矢印は孢子嚢を示している。

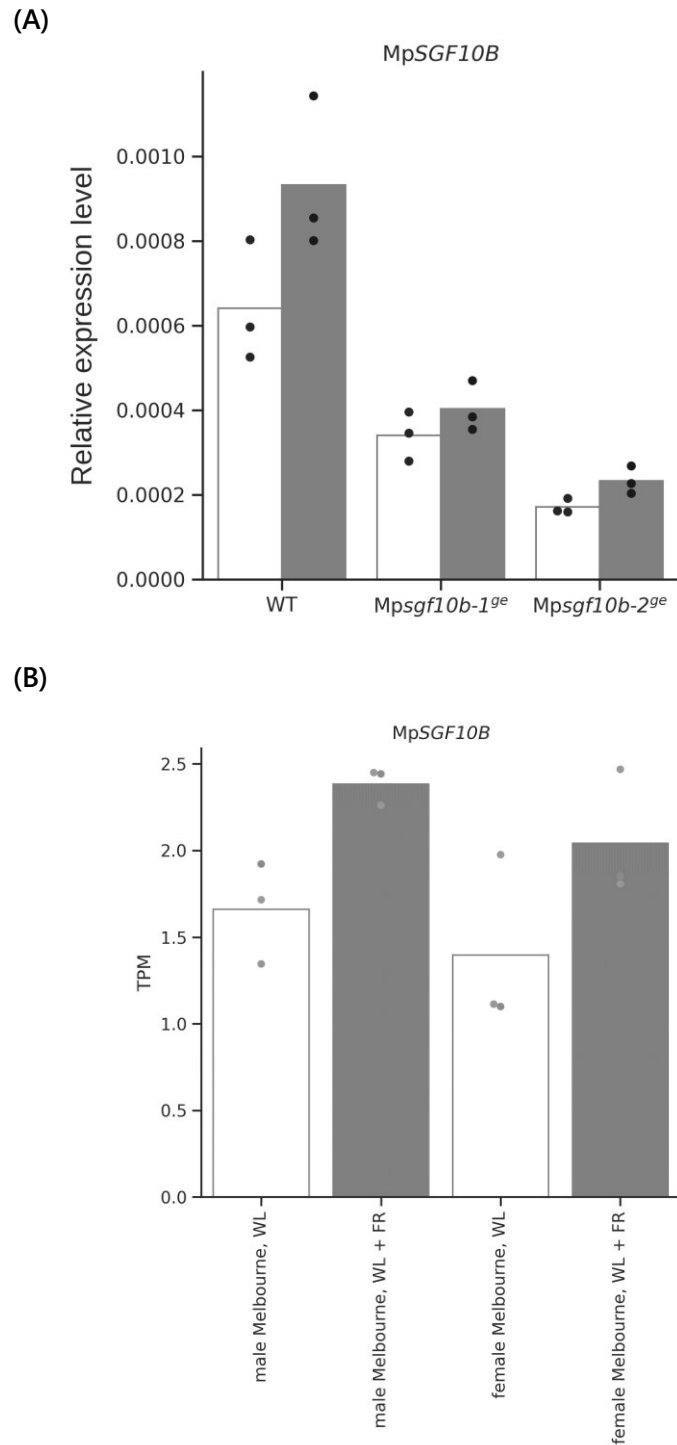
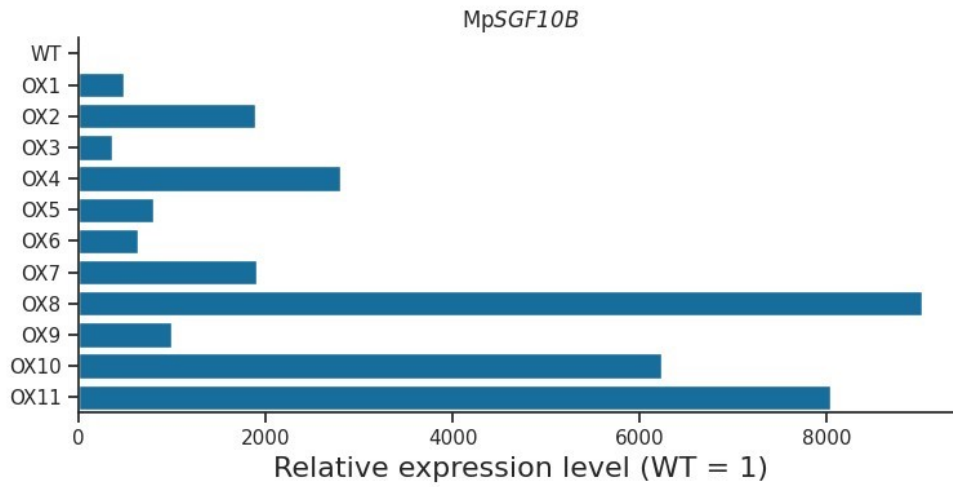


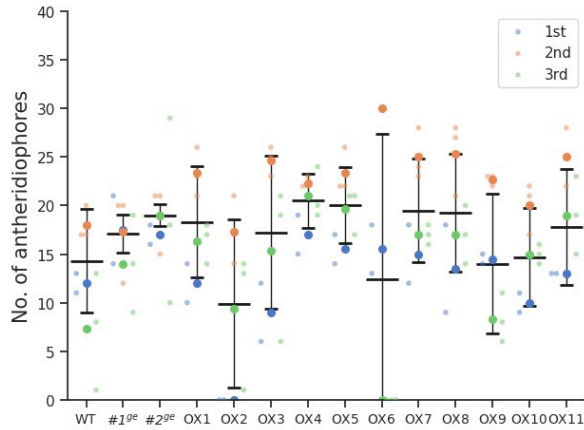
図 22. 生殖誘導条件による *MpSGF10B* の発現変動

(A) 通常生育条件（連続明，22°C）または生殖誘導条件（連続遠赤色光と明期：暗期 = 16h：8h，18°C）下で培養した 10 日齢葉状体における *MpSGF10B* の RT-qPCR 結果。(B) 公開トランスクリプトームにおける，遠赤色光照射による *MpSGF10B* の発現変動。相対発現量は MarpolBase Expression より取得した。

(A)



(B)



(C)

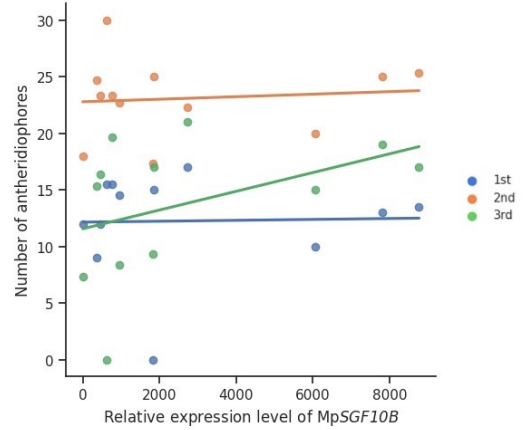
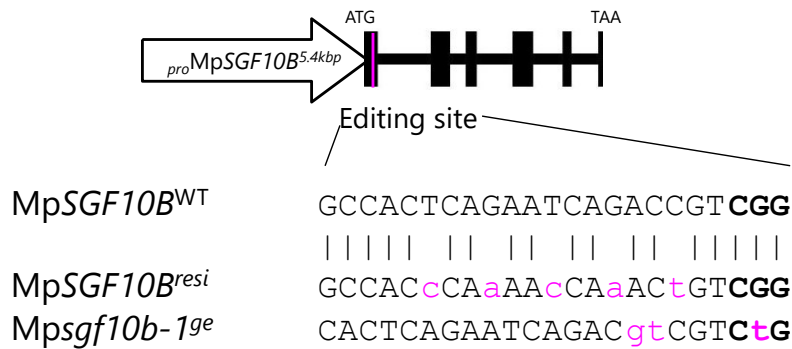


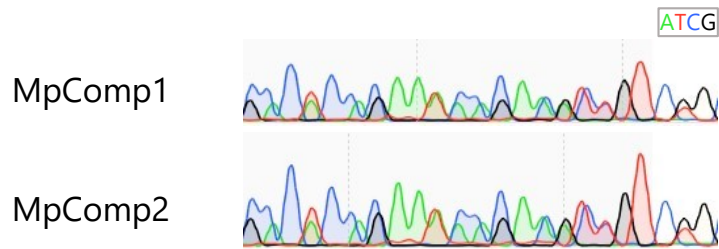
図 23. MpSGF10B 過剰発現株における表現型観察

(A) MpSGF10B 過剰発現株の 2 週齢葉状体における MpSGF10B の RT-qPCR 結果。各系統 3 個体ずつ定量し、その平均値を示している。(B) 個体毎に形成された雄器托の個数。独立した 3 回の試行ごとに色分けし、それぞれの試行での平均値を色付きの横棒で表した。黒の横棒は全体の平均値±試行ごとの平均値の標準偏差を表している。(C) MpSGF10B 発現量 (横軸) と雄器托の個数 (縦軸) の関係を示す散布図。

(A)



(B)



(C)

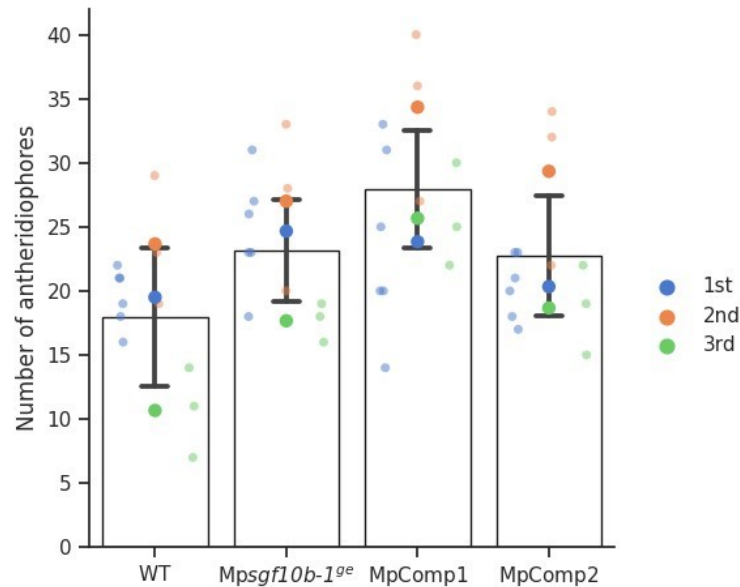
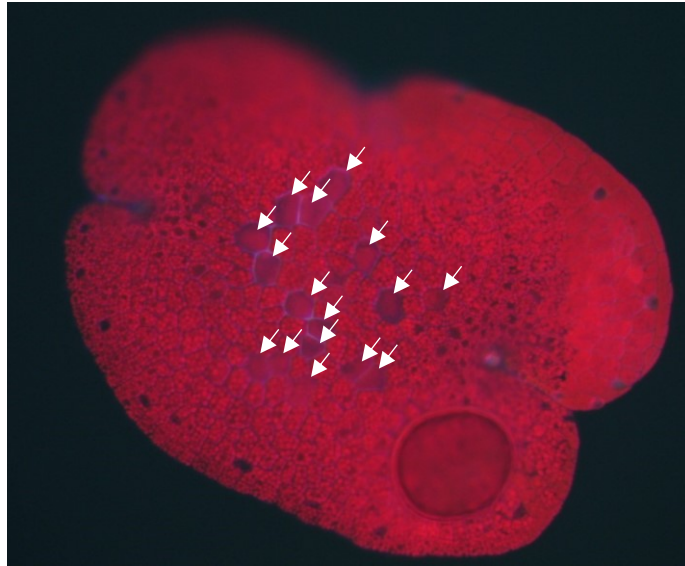


図 24. *Mpsgf10b-1^{ge}* 変異の相補株の作出

(A) *MpSGF10B* のゲノム編集耐性コンストラクトの設計。モデル図は作製したコンストラクトの相補カセットを表している。リファレンス配列とのミスマッチ塩基をマゼンタのハイライトで示している。太字の塩基はゲノム編集の PAM 配列 (NGG) を示している。(B) 相補株の DNA シーケンシング結果。緑 (アデニン), 赤 (チミン), 青 (シトシン), 黒 (グアニン)。(C) 個体毎に形成された雄器托の個数。独立した 3 回の試行ごとに色分けし, それぞれの試行での平均値を色付きのドットで表した。エラーバーは平均値±試行ごとの平均値の標準偏差を表している。

(A)



(B)

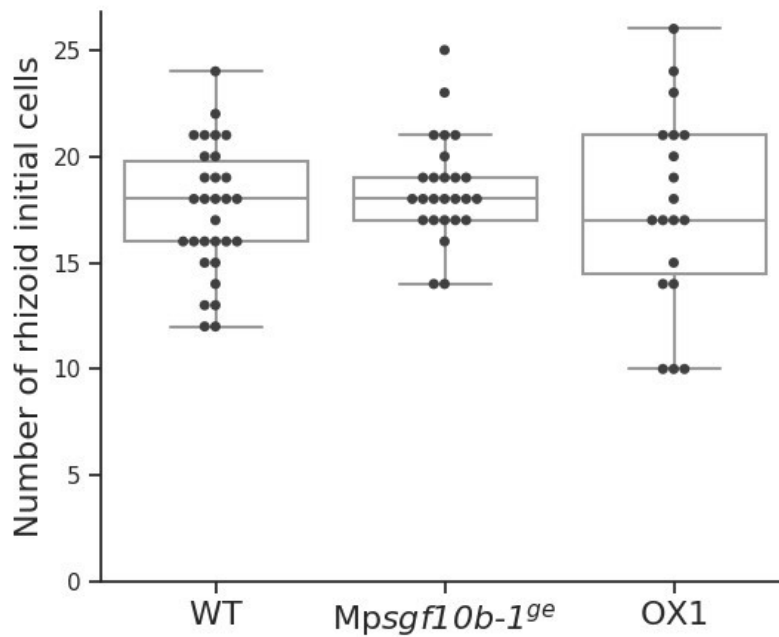


図 25. *Mpsgf10b^{ge}* 変異株と *MpSGF10B* 過剰発現株における無性芽の仮根細胞の数

(A) 野生型無性芽の顕微鏡画像。UV による葉緑体の自家蛍光 (赤) が撮影されている。矢印は葉緑体の自家蛍光が抜けている仮根細胞を示している。(B) 無性芽あたりの仮根細胞の個数。葉緑体が蓄積していない細胞を計測した。n = 30 (WT, 野生株), 26 (*1^{ge}*, 変異株), 19 (OX1, 過剰発現株)。

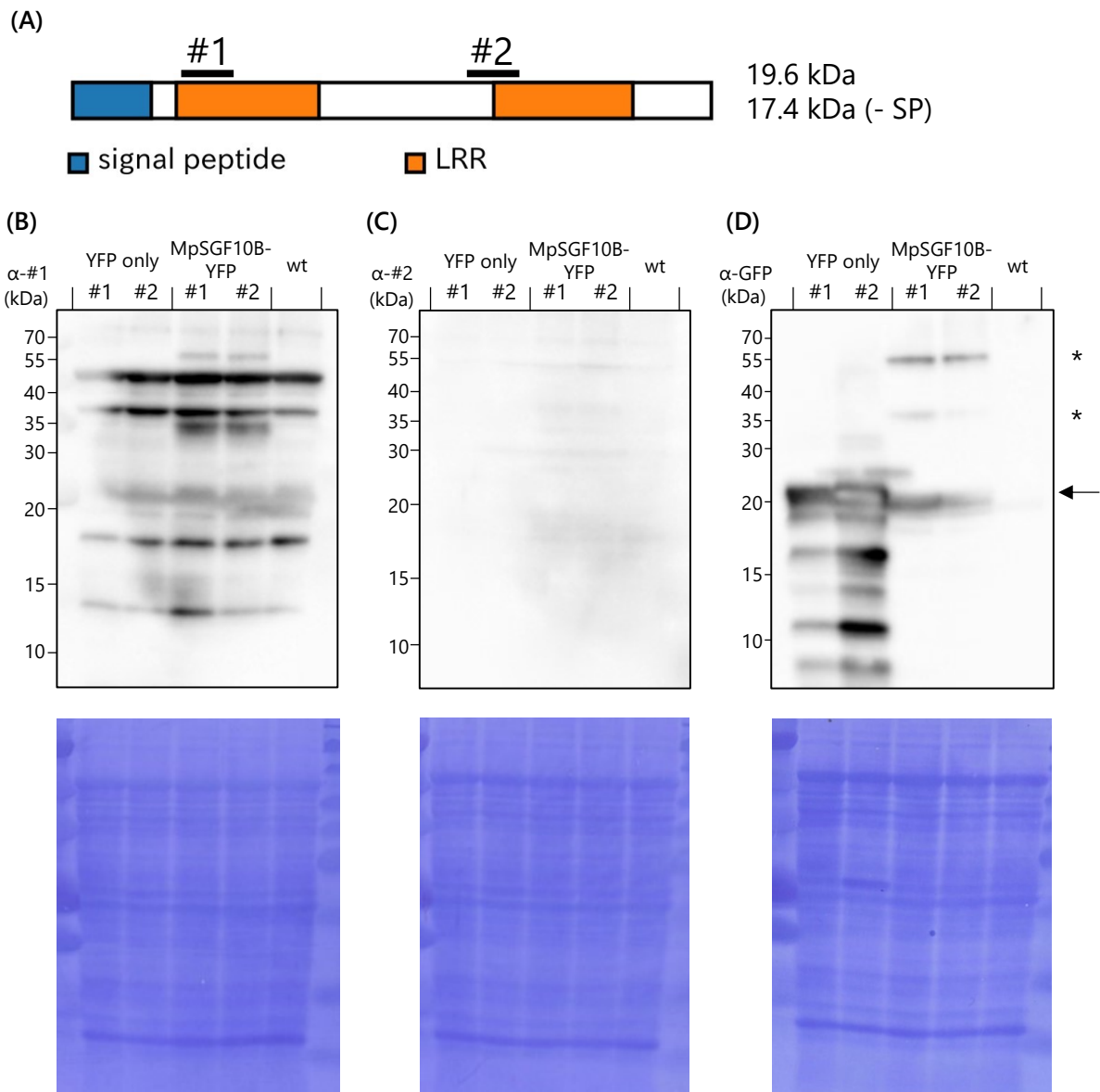


図 26. ウェスタンブロットングによる MpSGF10B の検出の試み

(A) MpSGF10B の構造と抗体作成に用いたエピトープ (#1 および#2)。MpSGF10B 産物の予想分子量を右に示した。(B-D) 転写メンブレンの露光画像。(B) 抗体#1, (C) 抗体#2, (D) GFP 抗体を一次抗体として検出した。アスタリスクは MpSGF10B-YFP のレーンにおいて GFP 抗体で確認できるシグナルの位置を, 矢印は遊離 YFP の位置を表している。該当領域のメンブレン CBB 染色結果を下に示している。

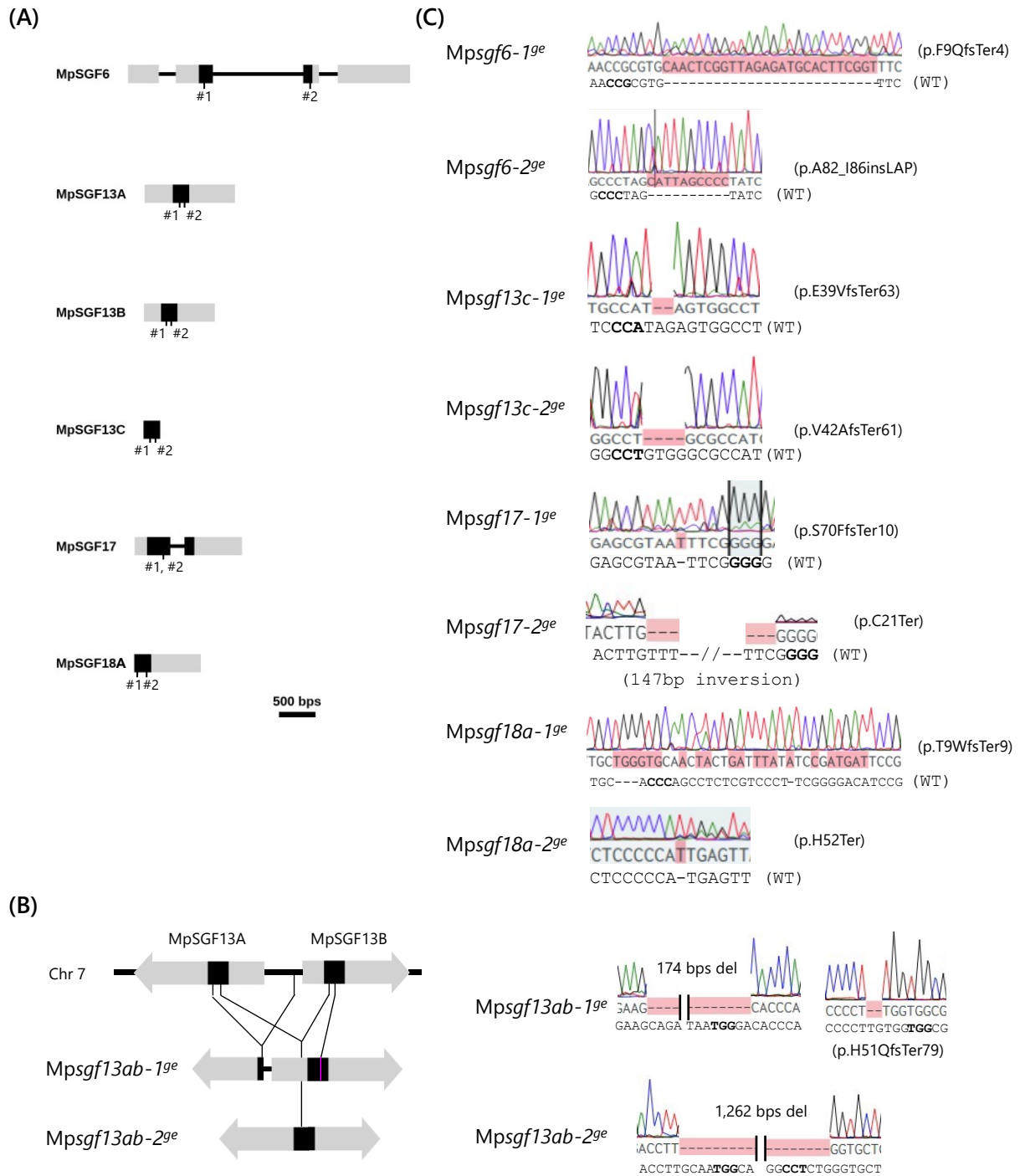


図 27. 他の $MpSGF^{GOI}$ の遺伝子モデルとゲノム編集株の作出

(A) $MpSGF^{GOI}$ の遺伝子モデル図。灰色の線とボックスはそれぞれイントロンと非翻訳領域、黒のボックスは CDS 領域を表している。CDS 領域にゲノム編集領域を設計した (#1, #2)。(B) ゲノム編集による大規模欠失による $MpSGF13A$ と $MpSGF13B$ の両方を欠失する二重変異株の作出。(C) ゲノム編集株の DNA シーケンシング結果。リファレンス配列との mismatches 塩基を赤のハイライトで示している。太字の塩基はゲノム編集の PAM 配列 (NGG) を示している。

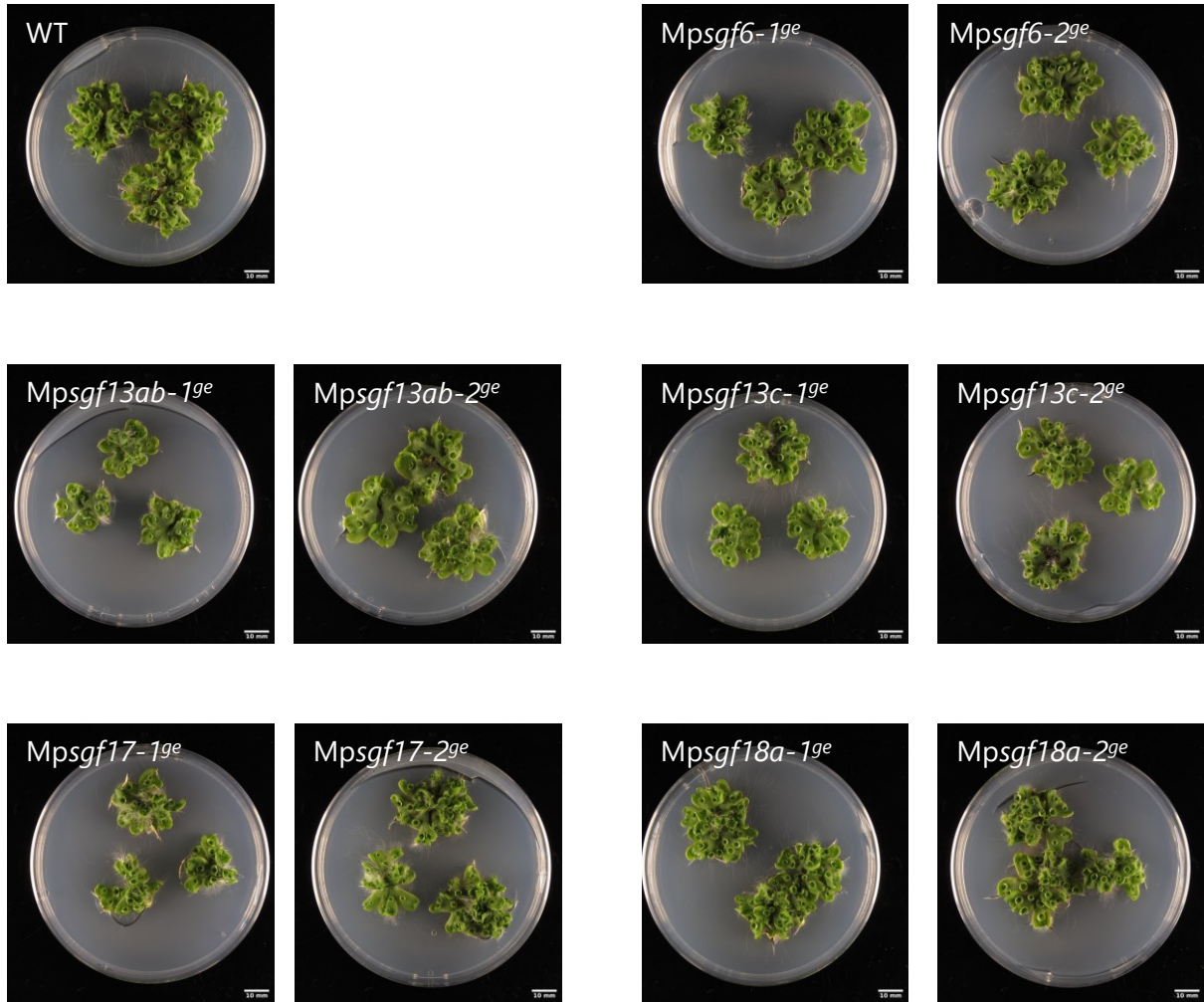


図 28. $Mpsgf^{oi}$ 変異株の形態

連続明条件（22℃）で無性芽から生育した 3 週齢の葉状体の写真。スケールバー = 1 cm。

(A)

Mpsgf6-1^{ge} (♂) × Tak-2 (♀)



(B)

	male	female	
Wildtype	10	4	14
mutant	6	12	18
	16	16	32

図 29. *Mpsgf6^{ge}* 変異株の雄性生殖能力の確認

(A) 雄株背景の *Mpsgf6-1^{ge}* 変異株と雌株背景の野生株の掛け合わせによ形成した孢子体の写真。矢印は孢子嚢を示している。(B) 孢子から生育した葉状体の *MpSGF6* 遺伝子型と性別のクロス表。n = 32。ゼニゴケは一倍体世代が優占するため、F1 世代の葉状体では分離比の期待値が野生型：変異型 = 1：1 となることに注意。

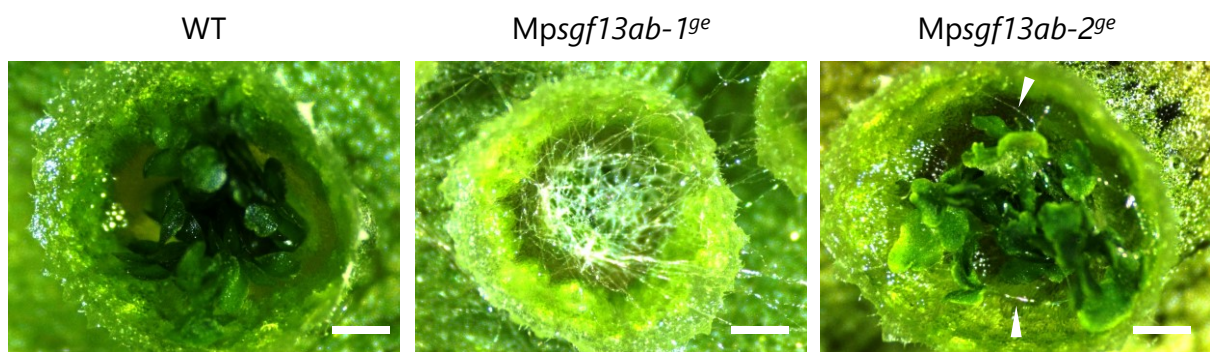


図 30. *Mpsgf13ab*^{ge} 二重変異株に見られた表現型

杯状体内部の拡大図。WT は 31 日齢，*Mpsgf13ab-1*^{ge} および *Mpsgf13ab-2*^{ge} は 27 日齢の葉状体の杯状体を撮影した。*Mpsgf13ab-2*^{ge} で視認できる仮根を矢じりで示している。スケールバー = 1 mm。

(A)

Mpsgf17-1^{ge} (♂) × Tak-2 (♀)



(B)

WT



Mpsgf17-1^{ge}



Mpsgf17-2^{ge}



図 31. *Mpsgf17^{ge}* 変異株の雄性生殖能力および雄器托の形態の観察

(A) 雄株背景の *Mpsgf17-1^{ge}* と雌株背景の野生株との掛け合わせによる孢子体を撮影した写真。矢印は孢子嚢を示している。(B) 雄器托を上から撮影した写真。スケールバー = 2 mm。

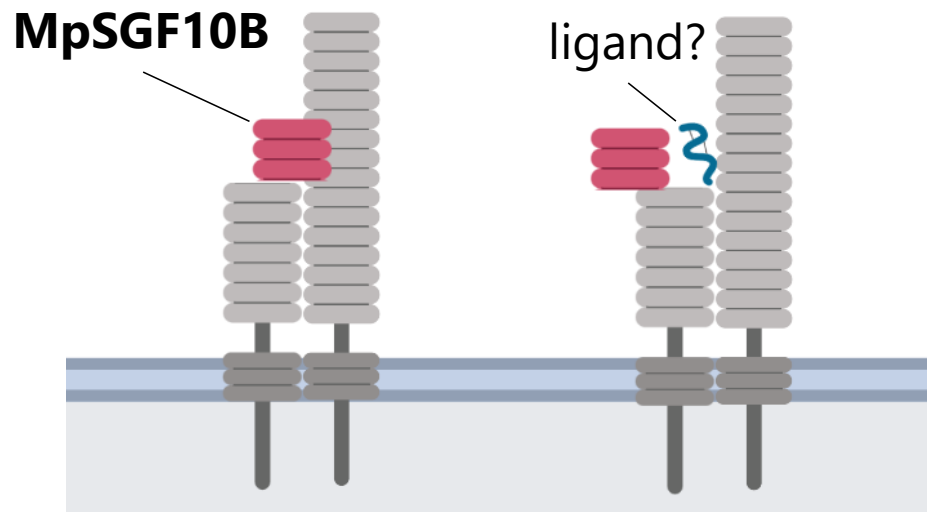
Mpsgf18a-1^{ge} (♂) × Tak-2 (♀)



図 32. *Mpsgf18a^{ge}* 変異株の雄性生殖能力の確認

雄株背景の *Mpsgf18a-1^{ge}* と雌株背景の野生株との掛け合わせによる胞子体を撮影した写真。
矢印は胞子嚢を示している。

(A)



(B)

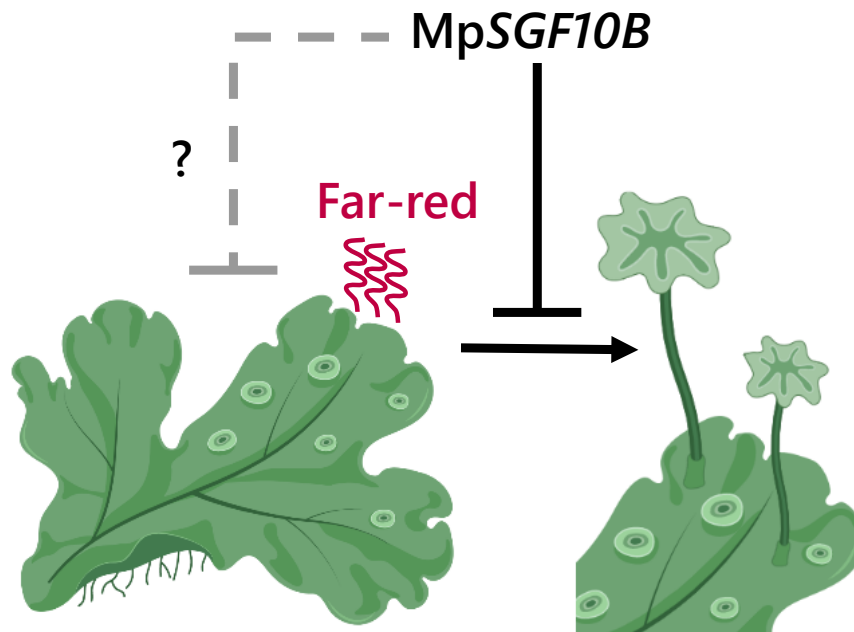


図 33. MpSGF10B の機能と分子メカニズムの模式図

(A) MpSGF10B の分子メカニズムの予想図。左は MpSGF10B 自身がリガンドとして機能するシナリオ、右は他のリガンド分子や受容体と協調して機能するシナリオを表している。

(B) ゼニゴケにおける MpSGF10B の生理的機能のモデル図。 BioRender (<https://biorender.com>) により作図した。

表 1. BLAST 検索結果

アスタリスク (*) は最新のリファレンスゲノム (MpTak v6.1) で削除されているものを、
 ダガー (†) は CDS が ATG で始まらないものを示している。

SGF ID	sORF ID (query)	MpGene ID (target; v5.1)	Identity (%)	E-value	Bit score
SGF1	sORF0377	Mp1g07140*	45.6	9.76E-13	54.7
SGF2	sORF0615	Mp6g01390	50.5	2.17E-23	84.3
SGF3	sORF1673	Mp5g15190†	64.3	8.87E-06	36.6
SGF4	sORF1694	Mp7g02600	51.9	1.02E-25	87.4
SGF5	sORF1820	Mp2g20530†	87.5	2.17E-20	73.6
	sORF4433				
SGF6	sORF1868	Mp2g23830	30.9	5.56E-08	44.3
SGF7	sORF2128	Mp8g00200	37.3	2.80E-10	49.7
SGF8	sORF2161	Mp4g08500	82.1	8.39E-26	89
SGF9	sORF2341	MpVg01020	36.4	1.57E-05	36.6
SGF10	sORF2647	Mp1g25340†	39.1	5.43E-06	39.3
		Mp3g10170	37.0	7.36E-06	40
SGF11	sORF2716	Mp4g19140	38.5	6.37E-11	51.2
		Mp4g19080	43.2	1.91E-05	36.2
SGF12	sORF3431	Mp3g15410	67.3	2.43E-44	135
SGF13	sORF3508	Mp7g00660	63.9	5.71E-33	105
		Mp7g00670	64.8	1.94E-30	98.6
		Mp7g14620	54.3	1.44E-23	81.3
SGF14	sORF3693	Mp6g09670	43.5	1.36E-11	55.8
SGF15	sORF4434	Mp1g23010†	47.6	1.07E-09	47
SGF16	sORF4935	Mp4g14630	33.0	4.53E-11	53.5
		Mp7g13800	33.9	7.62E-10	50.1
		Mp8g16530	29.4	4.51E-07	42.4
		Mp5g00590	28.0	8.55E-07	41.6
		Mp3g23830	34.8	8.49E-06	38.9
		Mp3g07430	29.3	9.90E-05	35.8
SGF17	sORF6086	Mp3g15380	57.692	2.59E-14	61.6
SGF18	sORF6133	Mp5g08160	77.143	2.30E-13	53.9
		Mp4g23800†	74.286	1.39E-12	52

表 2. MpSGF タンパク質のドメイン構造

アノテーションおよび位置情報は最新のリファレンスゲノム (MpTak v6.1) に登録されているものを示した。

MpSGF ID	Start	End	Discription	Annotation ID
MpSGF2	1	101	Ribosomal_L21e	PF01157
MpSGF4	19	75	Complex 1 LYR protein	PF05347
MpSGF6	3	100	F-BOX PROTEIN PP2-A15	PTHR31960
MpSGF7	134	195	RNase_HI_RT_Ty1	cd09272
MpSGF8	35	142	NADH:quinone oxidoreductase/Mrp antiporter, membrane subunit	PF00361
MpSGF9	5	115	Protein kinase	PF00069
MpSGF10A	4	99	Ribonuclease Inhibitor	GENE3D
MpSGF10B	1	22	signal peptide	SignalP 5.0
MpSGF10B	30	69	LRRNT_2	PF08263
MpSGF10B	119	158	LRR_4	PF12799
MpSGF11A	2	170	Glycosyl transferase	PTHR48047
MpSGF11B	71	173	UDPGT	PF00201
MpSGF12	2	99	Ubiquitin related modifier	PF09138
MpSGF13A	3	74	FAMILY NOT NAMED	PTHR34673
MpSGF13B	3	74	FAMILY NOT NAMED	PTHR34673
MpSGF13C	2	74	FAMILY NOT NAMED	PTHR34673
MpSGF14	132	175	Ribosomal_L34	PF00468
MpSGF16A	1	28	signal peptide	SignalP 5.0
MpSGF16A	49	157	Dirigent	PF03018
MpSGF16B	1	23	signal peptide	SignalP 5.0
MpSGF16B	45	154	Dirigent	PF03018
MpSGF16C	1	26	signal peptide	SignalP 5.0
MpSGF16C	42	152	Dirigent	PF03018
MpSGF16D	1	25	signal peptide	SignalP 5.0
MpSGF16D	32	164	Dirigent	PF03018
MpSGF16E	1	24	signal peptide	SignalP 5.0
MpSGF16E	34	173	Dirigent	PF03018
MpSGF16F	1	27	signal peptide	SignalP 5.0
MpSGF16F	33	160	Dirigent	PF03018
MpSGF17	52	148	DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE SUBUNIT BETA	PTHR38389

表 3. MarpolBase Expression で参照した公開トランスクリプトームのアクセッション ID

SRA accession	Strain	Stage	Tissue	Condition	Remark
SRR9678057, SRR9678058, SRR9678061	Tak-1	1 day	developing gemma	-	無性芽
DRR118949, DRR118950, DRR118951	Tak-1	7 day	thallus	-	葉状体
DRR118943, DRR118944, DRR118945	BC3-38	7 day	thallus	-	葉状体 (雌株)
SRR10879457, SRR10879458, SRR10879459	Tak-1	14 day	thallus	-	葉状体 (雄株)
DRR096278, DRR096279, DRR096280	Tak-1	21 day	gemma cup	-	杯状体
DRR096281, DRR096282, DRR096283	Tak-1	21 day	midrib	-	中肋 (非杯状体組織)
DRR050346, DRR050347, DRR050348	Tak-1	-	mature antheridiophore	-	雄器托
DRR050349, DRR050350	Tak-1	-	antheridium	-	造精子
ERR4471743, ERR4471744, ERR4471745	Tak-1	-	sperm cell	-	精子
DRR050351, DRR050352, DRR050353	Tak-2	-	mature archegoniophore	-	雌器托
SRR1553297, SRR1553298, SRR1553299	BC3 x Tak-1	13 day	young sporophyte	-	孢子体
SRR5905098, SRR5905099, SRR5905100	Tak-1	10 day	thallus	mock	オーキシン応答
SRR5905091, SRR5905092, SRR5905097	Tak-1	10 day	thallus	2-4-D	オーキシン応答
DRR093991, DRR093992, DRR093993	Tak-1	-	thallus	mock	アブシジン酸応答
DRR093994, DRR093995, DRR093996	Tak-1	-	thallus	ABA	アブシジン酸応答
DRR127460, DRR127461, DRR127462	Tak-1	-	thallus	0 mM NaCl	塩ストレス
DRR127463, DRR127464, DRR127465	Tak-1	-	thallus	50 mM NaCl	塩ストレス
SRR7977547, SRR7977549, SRR7977550	Tak-1	-	thallus	mock 2 dpi	感染応答
SRR8068335, SRR8068336, SRR8068340	Tak-1	-	thallus	<i>P. palmivora</i> 2 dpi	感染応答

表 4. GO 解析結果の生物学的プロセスの上位 10 カテゴリー

Category	GO.ID	Term	Annotated	Count	Expected	p-value	q-value
Biological process	GO:0007049	cell cycle	186	29	2.79	2.20E-22	9.39E-19
	GO:0022402	cell cycle process	151	26	2.26	3.40E-21	7.26E-18
	GO:0006259	DNA metabolic process	288	29	4.31	5.60E-17	7.97E-14
	GO:1902589	single-organism organelle organization	261	27	3.91	4.20E-16	4.48E-13
	GO:0006996	organelle organization	515	36	7.71	5.70E-16	4.87E-13
	GO:1903047	mitotic cell cycle process	68	16	1.02	1.50E-15	1.07E-12
	GO:0000278	mitotic cell cycle	72	16	1.08	4.00E-15	2.44E-12
	GO:0006260	DNA replication	81	15	1.21	5.40E-13	2.66E-10
	GO:0007017	microtubule-based process	114	17	1.71	5.60E-13	2.66E-10
	GO:0000280	nuclear division	73	13	1.09	3.60E-11	1.54E-08
Molecular function	GO:0008017	microtubule binding	52	13	0.73	1.60E-13	3.43E-10
	GO:0044877	macromolecular complex binding	110	16	1.53	1.70E-12	1.29E-09
	GO:0015631	tubulin binding	62	13	0.86	1.80E-12	1.29E-09
	GO:0032403	protein complex binding	65	13	0.91	3.50E-12	1.88E-09
	GO:0008092	cytoskeletal protein binding	84	13	1.17	1.10E-10	4.72E-08
	GO:0003777	microtubule motor activity	41	7	0.57	1.30E-06	4.65E-04
	GO:0003774	motor activity	45	7	0.63	2.50E-06	7.66E-04
	GO:0005524	ATP binding	1007	32	14.04	4.70E-06	1.26E-03
	GO:0003677	DNA binding	563	22	7.85	8.60E-06	1.95E-03
	GO:0032559	adenyl ribonucleotide binding	1043	32	14.55	9.90E-06	1.95E-03
Cellular compartment	GO:0009524	phragmoplast	29	11	0.49	4.20E-13	2.79E-10
	GO:0005819	spindle	34	11	0.57	3.20E-12	1.06E-09
	GO:0005634	nucleus	1071	47	17.92	6.10E-12	1.35E-09
	GO:0015630	microtubule cytoskeleton	93	15	1.56	1.90E-11	3.15E-09
	GO:0044430	cytoskeletal part	106	15	1.77	1.30E-10	1.72E-08
	GO:0005856	cytoskeleton	109	15	1.82	2.00E-10	2.21E-08
	GO:0043234	protein complex	709	34	11.87	2.70E-09	2.56E-07
	GO:0005874	microtubule	47	10	0.79	3.20E-09	2.65E-07
	GO:0005694	chromosome	135	15	2.26	4.20E-09	3.01E-07

表 5. 本研究で作出した形質転換植物

Purpose	Construct	Background	Distination vector	Reference
GUS レポーターアッセイ				
	<i>pro</i> MpSGF6: <i>GUS</i>	Tak-1, Tak-2	pMpGWB104	in this study
	<i>pro</i> MpSGF10B: <i>GUS</i>	Tak-1, Tak-2	pMpGWB104	in this study
	<i>pro</i> MpSGF13A: <i>GUS</i>	Tak-1, Tak-2	pMpGWB104	in this study
	<i>pro</i> MpSGF13B: <i>GUS</i>	Tak-1, Tak-2	pMpGWB104	in this study
	<i>pro</i> MpSGF13C: <i>GUS</i>	Tak-1, Tak-2	pMpGWB104	in this study
	<i>pro</i> MpSGF17: <i>GUS</i>	Tak-1, Tak-2	pMpGWB104	in this study
	<i>pro</i> MpSGF18A: <i>GUS</i>	Tak-1, Tak-2	pMpGWB104	in this study
遺伝子ノックアウト				
	<i>Mpsgf6^{ge}</i>	Tak-1	pMpGE013	in this study
	<i>Mpsgf10b^{ge}</i>	Tak-1	pMpGE013	in this study
	<i>Mpsgf13ab^{ge}</i>	Tak-1	pMpGE013	in this study
	<i>Mpsgf13c^{ge}</i>	Tak-1	pMpGE013	in this study
	<i>Mpsgf17^{ge}</i>	Tak-1	pMpGE013	in this study
	<i>Mpsgf18a^{ge}</i>	Tak-1	pMpGE013	in this study
細胞内局在				
	<i>pro</i> MpEF1α: <i>MpSGF10B-YFP</i>	Tak-1	pMpGWB103	in this study
	<i>pro</i> MpEF1α: <i>YFP</i>	Tak-1	pMpGWB103	in this study
過剰発現				
	<i>pro</i> MpEF1α: <i>MpSGF10B</i>	Tak-1	pMpGWB103	in this study
遺伝子相補				
	MpComp	<i>Mpsgf10b-1^{ge}</i>	pMpGWB301	in this study

表 6. 一過的発現系で用いたコンストラクション

Construct	Destination vector	Reference
<i>pro</i> 35S: <i>MpSGF6-YFP</i>	pGWB602	in this study
<i>pro</i> 35S: <i>MpSGF10B-YFP</i>	pGWB602	in this study
<i>pro</i> 35S: <i>MpSGF13A-YFP</i>	pGWB602	in this study
<i>pro</i> 35S: <i>MpSGF13B-YFP</i>	pGWB602	in this study
<i>pro</i> 35S: <i>MpSGF13C-YFP</i>	pGWB602	in this study
<i>pro</i> 35S: <i>MpSGF17-YFP</i>	pGWB602	in this study
<i>pro</i> 35S: <i>MpSGF18A-YFP</i>	pGWB602	in this study
<i>pro</i> 35S: <i>YFP</i>	pGWB602	in this study

表 7. 細胞内局在解析のコンストラクションに用いたプライマー

Target	Name	Sequence (5' to 3')※小文字はエンターベクターの配列	Reference
Mp2g23830	MpSGF6_FWD	aaccaattcagtcgacATGTCGGCTTGCACTAACCG	in this study
	MpSGF6-YFP_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATCGTGGAAACACCTCGCTGAT	in this study
Mp3g10170	MpSGF10B_FWD	aaccaattcagtcgacATGAATCAAGCGAAGGCAACT	in this study
	MpSGF10B-YFP_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGACGAGCGCAGAAGCGGAT	in this study
Mp7g00660	MpSGF13A_FWD	aaccaattcagtcgacATGCCCTTCATTCCGTGCTG	in this study
	MpSGF13A-YFP_rev	CCTCGCCCTTGCTCACCATGATGGGGAAGATGCTTGAGAC	in this study
Mp7g00670	MpSGF13B_FWD	aaccaattcagtcgacATGCCTTACATTCCGTGCTG	in this study
	MpSGF13B-YFP_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGATGGGGACGGCTGCAGCAA	in this study
Mp7g14620	MpSGF13C_FWD	aaccaattcagtcgacATGGCCGTGTACATCCCGTA	in this study
	MpSGF13C-YFP_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATACAGGGAATGAGTCCCTGA	in this study
Mp3g15380	MpSGF17_FWD	aaccaattcagtcgacATGGGGCCGACTGCG	in this study
	MpSGF17-YFP_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGAGCTTCTCCGCTGAC	in this study
Mp5g08160	MpSGF18A_FWD	aaccaattcagtcgacATGGTGGATATAAAGCAGAGTTGC	in this study
	MpSGF18A-YFP_rev	CCTCGCCCTTGCTCACCATCAGACTGGATCTGTGCCATTC	in this study
YFP	YFP_FWD	aaccaattcagtcgacATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	in this study
	MpSGF6-YFP_FWD	ATCAGCGAGGTGGTTCACGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	in this study
	MpSGF10B-YFP_FWD	ATCCGCTTCTGCGCTCGTGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	in this study
	MpSGF13A-YFP_FWD	GTCTCAAGCATCTTCCCATCATGGTGAGCAAGGGCGAGG	in this study
	MpSGF13B-YFP_FWD	TTGCTGCAGCCGTCCCCATCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	in this study
	MpSGF13C-YFP_FWD	TCAAGGACCTCATTCCCTGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	in this study
	MpSGF17-YFP_FWD	GTCAGCGGAGAAAGCTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	in this study
	MpSGF18A-YFP_FWD	GAATGGCACAGATCCAGTCTGATGGTGAGCAAGGGCGAGG	in this study
	YFP-4xGly_rev	ctgggtctagatatctTACCCCCCCCCCTTGTACAGCTCGTCCA	in this study
AT3G05890	pE1A_LTI6b_F	aaccaattcagtcgacATGAGTACAGCCACTTT	村上氏より
	LTI6bsc_pE1A_R	agctgggtctagatatccTCACTTGGTGATGATATAAAG	村上氏より

表 8. GUS レポーターアッセイのコンストラクションに用いたプライマー

Target	Name	Sequence (5' to 3')※小文字はエントリーベクターの配列	Reference
Mp2g23830	proMpSGF6_FWD	aaccaattcagtcgacTGTTCCCACTCTCCGTTTCC	in this study
	proMpSGF6_rev	ctgggtctagatatctGGCAATGCTTTGGGATCAAG	in this study
Mp3g10170	proMpSGF10B_FWD	aaccaattcagtcgacAACAGCCTTCCCTGAACTCG	in this study
	proMpSGF10B_rev	ctgggtctagatatctTGTTGAGCTCAGAAGTAAGCA	in this study
Mp7g00660	proMpSGF13A_FWD	aaccaattcagtcgacGGTTTGCACTTGTTAGCGCA	in this study
	proMpSGF13A_rev	ctgggtctagatatctTGCGATCGATGCTGTTGAGT	in this study
Mp7g00670	proMpSGF13B_FWD	aaccaattcagtcgacACGCTCCAGCTTTGCTTTTG	in this study
	proMpSGF13B_rev	ctgggtctagatatctTTTGCCCTGAACACTCTTC	in this study
Mp7g14620	proMpSGF13C_FWD	aaccaattcagtcgacTTTGCGCTCAAGAGACCACT	in this study
	proMpSGF13C_rev	ctgggtctagatatctAGTTCAGATCCTCCTTTGAACA	in this study
Mp3g15380	proMpSGF17_FWD	aaccaattcagtcgacTGACATGACATTCAGAGTTTCACT	in this study
	proMpSGF17_rev	ctgggtctagatatctTTGGCAGCTCAAATGCTCAC	in this study
Mp5g08160	proMpSGF18A_FWD	aaccaattcagtcgacCTGGTATCGGCAGACGTACC	in this study
	proMpSGF18A_rev	ctgggtctagatatctTATTCAGTCTTCACTAAACGTATGG	in this study

表 9. 定量 RT-PCR に用いたプライマー

Target	Name	Sequence (5' to 3')	Reference
Mp1g09500	MpWIP_qPCR_FWD	CGTGGGGCTAATGAGAAATG	Jones and Dolan, 2017
	MpWIP_qPCR_rev	ATGCCCATCTGAAGTCGAAG	Jones and Dolan, 2017
Mp4g06560	MpEXP_qPCR_FWD	TGTGGATGAGGGGAAGCAAC	Kato et al., 2017
	MpEXP_qPCR_rev	TTGAAAGAGAGCGCCTGACC	Kato et al., 2017
Mp3g23400	MpEF1 α _qPCR_FWD	CCGAGATCCTGACCAAGG	Saint-Marcoux et al., 2015
	MpEF1 α _qPCR_rev	GAGGTGGGTACTIONCAGCGAAG	Saint-Marcoux et al., 2015
Mp3g23300	MpBNB_qPCR_FWD	ACCACGGGGGAAACAGAAGT	in this study
	MpBNB_qPCR_rev	CTCCTGCTCCTCCTCCACTG	in this study
Mp3g10170	MpSGF10B_qPCR_FWD	CCGTGTTGCCATCCGAGAG	in this study
	MpSGF10B_qPCR_rev	GTCACACGCAAGGCTACCAG	in this study

表 10. ゲノム編集株および遺伝子変異相補株の作出に用いたオリゴヌクレオチド

小文字の塩基はライゲーション反応のための配列またはリファレンスゲノムと異なる配列を表している。

Target	Name	Strand	Sequence (5' to 3')	Reference
Mp2g23830	MpSGF6_sgRNA1_FWD	forward	attgGAGATGCACTTCGGAACACG	in this study
	MpSGF6_sgRNA1_rev	reverse	aaacCGTGTTCCGAAGTGCATCTC	in this study
	MpSGF6_sgRNA2_FWD	forward	attgATCACCCCATGCGATACCTA	in this study
	MpSGF6_sgRNA2_rev	reverse	aaacTAGGTATCGCATGGGGTGAT	in this study
Mp3g10170	MpSGF10B_sgRNA1_FWD	forward	attgGCCACTCAGAATCAGACCGT	in this study
	MpSGF10B_sgRNA1_rev	reverse	aaacACGGTCTGATTCTGAGTGGC	in this study
	MpSGF10B_sgRNA2_FWD	forward	attgTAGCCTTGCGTGTGACCTT	in this study
	MpSGF10B_sgRNA2_rev	reverse	aaacAAGGTACACGCAAGGCTAC	in this study
Mp7g00660	MpSGF13A_sgRNA1_FWD	forward	attgCACGACGACAGCACCCAG	in this study
	MpSGF13A_sgRNA1_rev	reverse	aaacCTGGGTGCTGCTGCTGGTG	in this study
	MpSGF13A_sgRNA2_FWD	forward	attgTGCGAAGGGCCGTAGGATAA	in this study
	MpSGF13A_sgRNA2_rev	reverse	aaacTTATCCTACGGCCCTTCGCA	in this study
Mp7g00670	MpSGF13B_sgRNA1_FWD	forward	attgTAGGACCGACGACCTTGCAA	in this study
	MpSGF13B_sgRNA1_rev	reverse	aaacTTGCAAGGTGCTGGTCTCTA	in this study
	MpSGF13B_sgRNA2_FWD	forward	attgTAATTCTGCGCCCTTGTTGG	in this study
	MpSGF13B_sgRNA2_rev	reverse	aaacCCACAAGGGGCGCAGAATTA	in this study
Mp7g14620	MpSGF13C_sgRNA1_FWD	forward	attgGGCGCCACAGCCACTCTA	in this study
	MpSGF13C_sgRNA1_rev	reverse	aaacTAGAGTGGCTGTGGGCGCC	in this study
	MpSGF13C_sgRNA2_FWD	forward	attgCACGAGATGATGGCGCCAC	in this study
	MpSGF13C_sgRNA2_rev	reverse	aaacGTGGGCGCCATCATCTGGTG	in this study
Mp3g15380	MpSGF17_sgRNA1_FWD	forward	ctcgAAGTAACCGTGCGGTAATC	in this study
	MpSGF17_sgRNA1_rev	reverse	aaacGATTACGCGCACGGTACTT	in this study
	MpSGF17_sgRNA2_FWD	forward	ctcgTCAGGTGTGAGCGTAATTCG	in this study
	MpSGF17_sgRNA2_rev	reverse	aaacCGAATTACGCTCACACCTGA	in this study
Mp5g08160	MpSGF18A_sgRNA1_FWD	forward	attgGGTGGAACTGTAACCTCATGG	in this study
	MpSGF18A_sgRNA1_rev	reverse	aaacCCATGAGTTACAGTTCCACC	in this study
	MpSGF18A_sgRNA2_FWD	forward	ctcgCCCCGAAAGGACGAGAGGCT	in this study
	MpSGF18A_sgRNA2_rev	reverse	aaacAGCCTCTCGTCCCTTCGGGG	in this study
Mp3g10170 (complementation)	Mp85s10comp_mut_FWD	forward	CGCCACcCaAAcCaActGTCGGCGAGGAAGGTTAG	in this study
	Mp85s10comp_mut_rev	reverse	GCCGACaGTtTgTtTgGtGGCGCTGCCAGTAAAT	in this study

表 11. genotyping に用いたプライマー

Target	Name	Strand	Sequence (5' to 3')	Reference
Mp2g23830	MpSGF6_geno1_FWD	forward	GCCGATGATCACCTGTGCTC	in this study
	MpSGF6_geno1_rev	reverse	TGAAGAGGGACCTTGCTGCA	in this study
	MpSGF6_geno2_FWD	forward	TGGCTAGTGAGGTCGCCTTT	in this study
	MpSGF6_geno2_rev	reverse	ATGCAGAGCGTACAAGCAGC	in this study
Mp3g10170	MpSGF10B_geno1_FWD	forward	TCAACGTTGTGACTGCAGGC	in this study
	MpSGF10B_geno1_rev	reverse	AAACATGACATCACGGGCCG	in this study
	MpSGF10B_geno2_FWD	forward	GTCTGTCAGCATGCCAGTGG	in this study
	MpSGF10B_geno2_rev	reverse	TTTCGACTCGTAGGTGCTGC	in this study
Mp7g00660, Mp7g00670 (large-deletion)	MpSGF13AB-LD_geno_1	forward	TGACATTCCATTGAGAAGGAAGGA	in this study
	MpSGF13AB-LD_geno_2	reverse	TGATCACTAGCGGACAGGCC	in this study
Mp7g14620	MpSGF13C_geno_FWD	forward	ACCGAGCAGCAAACACACAG	in this study
	MpSGF13C_geno_rev	reverse	GGTTGGCAAGGCTTGATCC	in this study
Mp3g15380	MpSGF17_geno_FWD	forward	AGTGAGCATTGACGTGCCA	in this study
	MpSGF17_geno_rev	reverse	GGGGAAGATGGGCTACTGCT	in this study
Mp5g08160	MpSGF18A_geno_FWD	forward	CCACAGTTGAGACACGTGGC	in this study
	MpSGF18A_geno_rev	reverse	CTGTGAAAGTGCCGCTGGAA	in this study
MpVg00610	rbm27-F	forward	ACTTTTGCAACAGCGACTTC	Fujiwara et al., 2015, modified
	rbm27-R	reverse	GCCTGCAATATAGCCTTCAA	Fujiwara et al., 2015, Modified
MpUg00050	rhf73-F	forward	GAACCCGAAACTCAGGTTTT	Fujiwara et al., 2015, Modified
	rhf73-R	reverse	ATAACAGCCAAACGGATCAA	Fujiwara et al., 2015, modified