

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	小林 遼亮
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>ペプチドは約100アミノ酸残基からなる短いタンパク質である。植物でも、一部のペプチドが細胞間のシグナル伝達因子 (ホルモン) として機能し、様々な生命現象が制御されている。そのようなペプチド遺伝子は陸上植物によく保存されている一方で、水生藻類には存在していないことから、植物の進化の観点からもホルモン様ペプチドを介した細胞間シグナル伝達は興味深い。現在でも新たなペプチド遺伝子が報告されており、機能未知・未発見のペプチド遺伝子が存在する可能性が示唆されている。本研究は、陸上植物種間で保存されている新規ペプチド遺伝子の同定を目指し、その探索と種間保存性・細胞内局在・遺伝子発現特性・遺伝子機能など様々な側面から機能解析を行ったものである。</p> <p>陸上植物種間で保存されている新規ペプチド遺伝子を選出するため、シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) のsORF (small ORF) データセットを新規ペプチド遺伝子候補のプールとし、ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>) のタンパク質配列に対してBLAST検索を行った。検索結果から、シロイヌナズナsORFとゼニゴケ遺伝子の組み合わせを18個のグループに分類し、これらをSMALL GENE FAMILIES (SGF) と名付けた。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と考えられる7遺伝子を選抜した。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種の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、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。</p> <p>続いて、ベンサミアナタバコ (<i>Nicotiana benthamiana</i>) の一過的発現系を用いた7個のMpSGFの細胞内局在観察を行った。これらのMpSGFはそれぞれ葉緑体やサイトゾルなど特定の区画に局在することが示された。GUS遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、ゼニゴケ植物体におけるMpSGFのプロモーター活性を可視化したところ、各MpSGFで様々な染色パターンが観察された。一部を除き、これらの染色パターンは公開されている遺伝子発現量のデータとも整合する。</p> <p>ここからMpSGF10Bについて、より詳細な解析を行った。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、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。続いて、CRISPR-Cas9を用いてMpSGF10B変異株を作出し、表現型観察を行った。これらのゲノム編集株は、雄性生殖器官である雄器托の形成数増加という表現型を示した。葉状体の成長や雄性配偶子の生殖能力自体には変異は現れなかった。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。</p> <p>MpSGF10Bは分子内に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。本研究で示した結果はMpSGF10Bが雄性生殖器官の形成への関与を示唆しており、植物の器官発生における機能は知られていないLRR-onlyタンパク質の可能性を広げるものである。今後、MpSGF10Bの詳細な活性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。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

小林遼亮氏は、新規植物ペプチド遺伝子の同定を目的として研究を行った。植物ペプチドは細胞間シグナル伝達に重要な因子であり、その機能は植物の進化的観点からも非常に注目されている。しかしながら、未だ多くのペプチド遺伝子が機能未知であり、データベースにも登録されていないような未発見のペプチド遺伝子の存在も強く示唆されている。小林氏は、遺伝子データベースが充実しているモデル植物シロイヌナズナと比較的新しいモデル植物であるコケ植物苔類ゼニゴケを用いて、陸上植物に保存されているような新たな植物ペプチド遺伝子の探索とその特徴を多面的に解析した。

小林氏は、シロイヌナズナで未知のペプチドをコードする配列として予測されたsORFデータセットを利用し、ゼニゴケにも保存される植物ペプチド遺伝子を探索した。その結果、多数のペプチド遺伝子候補を同定することに成功した。これらの遺伝子は配列類似性から18個の遺伝子ファミリーに分類することができた。

小林氏は、探索した植物ペプチド遺伝子から、機能未知の候補を選抜して植物種間保存度や細胞内局在、発現パターンなどの特徴について多面的調査を行った。この分類化と一連の解析は、本研究で記載した遺伝子やそのオーソログの、機能および進化的意義に関する研究の下地になると期待される。

小林氏は、逆遺伝学的手法による選抜した候補遺伝子の機能の特定を試みた。候補の中で、LRRドメインをもつMpSGF10Bが生殖器官の発生に関わることが示唆された。これまで同定されたホルモン様植物ペプチドのなかで、LRRモチーフを有するものは知られておらず、植物ペプチドのレパートリーの拡大に貢献することが期待される。研究を進めるにあたり、ゼニゴケの形質転換法の改善を図り、多くの形質転換体の作出を可能にした点や、根気強い観察の末、生殖器官形成への影響を見出した点は評価に値する。

本論文では新規ペプチド遺伝子同定の方法論に関する考察が行われた。ここでは、新規ペプチドの同定手法を網羅し、それら特徴や問題点、改善点について俯瞰的に議論を行っている。今後のペプチド遺伝子同定の動向を洞察するものとして評価できる。

ゼニゴケを用いた植物ペプチドの研究は乏しく、特に新規ペプチド遺伝子の探索はゼニゴケでは初めての業績である。また、陸上植物の進化的保存性にも着目しており、植物学の今後の研究の基礎を築くものとして高く評価できる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。また、令和5年2月1日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降