

陸上植物における Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールの  
進化発生的研究

守屋 健太

## 目次

目次	2
略語一覧	3
要旨	5
序論	7
結果	
1. ゼニゴケにおける Ia bHLH 転写因子の機能	15
2. ゼニゴケにおける Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールの機能	23
3. セン類における気孔形成遺伝子の発現プロファイル	28
考察	31
材料と方法	41
謝辞	53
引用文献	55
図表	72

## 略語一覽

1/2 B5	half strength Gamborg's B5
1/2 MS	half strength Murashige and Skoog
aa	amino acid residues
ACT-like	aspartate kinase, chorismate mutase, TyrA-like
ACT2	ACTIN 2
AD	activation domain
BD	binding domain
bHLH	basic helix-loop-helix
BiFC	bimolecular fluorescence complementation assay
BLAST	basic local alignment search tool
bp	base pairs
Cas9	CRISPR-associated protein 9
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CDS	coding sequence
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Dbox	destruction box
DNA	deoxyribonucleic acid
DT-A	diphtheria toxin fragment A
E-box	enhancer box
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EF1 $\alpha$	ELONGATION FACTOR 1 ALPHA
EPF	EPIDERMAL PATTERNING FACTOR
ge	gene editing
GMC	guard mother cell
GUS	$\beta$ -glucuronidase
Hgr	hygromycin
ICE	INDUCER OF CBF EXPRESSION
IDR	intrinsic disordered region

kbp	kilo base pairs
ko	knock out
MES	2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid
MMC	meristemoid mother cell
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NLS	nuclear localization signal
PCR	polymerase chain reaction
RBR	RETINOBLASTOMA RELATED
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SCRM	SCREAM
SD	synthetic dextrose
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLGC	stomatal lineage ground cell
SMF	SPCH, MUTE, and FAMA-like
SPCH	SPEECHLESS
sqRT-PCR	semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
Tak	Takaragaike
TE	Tris-EDTA
TMM	TOO MANY MOUTHS
TPM	transcript per million
UTR	untranslated region
WT	wild type
X- $\alpha$ -gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-glucuronide cyclohexylammonium
Y2H	yeast two-hybrid assay
YFP	yellow fluorescent protein



## 要旨

塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子は真核生物に広く保存された転写因子であり、発生や代謝などの生命現象において中心的な役割を果たす。植物の bHLH 型転写因子は bHLH ドメインのアミノ酸配列によって複数の subfamily に分類される。被子植物シロイヌナズナでは、subfamily Ia に属する bHLH 型転写因子 (Ia bHLH) および subfamily IIIb に属する bHLH 型転写因子 (IIIb bHLH) が相互作用することで、表皮でガス交換を行う気孔の形成を制御している。また、セン類ヒメツリガネゴケにおいて Ia bHLH 転写因子と IIIb bHLH 転写因子が気孔形成を制御することが明らかにされた。したがって、Ia bHLH および IIIb bHLH からなる転写因子モジュール (Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュール) を中心とした気孔形成を制御するメカニズムは進化的に保存されていると考えられている。しかしながら、陸上植物で唯一気孔をもたない系統であるコケ植物タイ類における Ia bHLH 転写因子の存在や機能に関する知見はほとんど得られていなかった。近年、タイ類ゼニゴケのゲノムが解読され、ゼニゴケには気孔がないものの Ia bHLH 転写因子をコードする遺伝子が保存されていることが明らかとなった。本研究ではゼニゴケにおける Ia bHLH 転写因子である MpSETA の解析を行うことで、Ia bHLH 転写因子の起源的な機能を明らかにし、気孔との関係を明らかにすることを目的とした。

気孔をもたないゼニゴケの MpSETA がシロイヌナズナの気孔形成を制御できるかどうか検証するために、Ia bHLH 遺伝子を欠損する *spch* 変異体、*mute* 変異体および *fama* 変異体背景で MpSETA を発現する植物体を作成し、気孔の表現型を調べた。この結果、MpSETA は *mute* 変異体および *fama* 変異体の気孔における表現型を一部相補することが明らかとなった。以上の結果から、気孔をもたないゼニゴケに由来する MpSETA が「真の」Ia bHLH 転写因子であることが示された。

公開されている組織別トランスクリプトーム解析の結果から、MpSETA は発生過程にある胞子体 (二倍体の器官) で高発現することが示唆された。プロモーター解析による組織レベルの発現解析を行ったところ、MpSETA は胞子体の蒴柄 (さくへい) で特異的にプロモーター活性が検出されたため、胞子体に着目し解析を行った。相同組換えを利用したジーンターゲット法により *Mpseta<sup>ko</sup>* 株を作成し、胞子体における表現型観察を行った結果、*Mpseta<sup>ko</sup>* 株では正常な蒴柄細胞が形成されていないことが明らかとなった。また、*Mpseta<sup>ko</sup>* 株では胞子が成熟しているにも関わらず、胞子嚢が配偶体由来の保護器官 (カリプトラ、偽花被) を破って外側に露出せず、胞子嚢が裂

開しないため胞子が散布されなかった。蒴柄は胞子の成熟後に細胞伸長することで胞子嚢をカリプトラや偽花被の外に押し出す組織であるため、正常な蒴柄が欠損しているために胞子嚢が外に露出しないと考えられる。以上の結果より、MpSETA が蒴柄形成およびそれに伴う胞子の散布に重要な役割を果たすことが示された。

前述の通り、被子植物やセン類において Ia bHLH 転写因子は IIIb bHLH 転写因子とヘテロ二量体を形成し、気孔の形成を制御する遺伝子の転写を促進することが知られている。ゼニゴケのゲノムに IIIb bHLH 転写因子をコードする遺伝子が保存されているか調べたところ、MpICE1 および MpICE2 が IIIb bHLH 遺伝子であることが明らかとなった。組織別の遺伝子発現プロファイル解析から、MpICE2 が MpSETA と同様、発生過程にある胞子体で高発現することがわかった。Y2H 法および BiFC 法により、MpSETA は MpICE2 と相互作用し、核に局在することが示された。さらに、ゲノム編集により作出した Mpice2<sup>se</sup> 変異体において蒴柄が欠損することを明らかにし、Mpice2<sup>se</sup> 変異体の胞子嚢がカリプトラ、偽花被の外へ露出しないことを確認した。これらの結果は、MpICE2 が MpSETA と同様、蒴柄の形成とそれに伴う胞子の散布に機能することを支持している。以上の結果から、気孔形成を制御する Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールがタイ類では蒴柄形成を制御することが示された。

コケ植物セン類における遺伝子発現プロファイル解析から、気孔前駆細胞が形成される以前と思われるステージで Ia bHLH 遺伝子の発現が活性化している可能性が示唆された。

本研究はコケ植物の蒴柄と陸上植物の気孔の発生メカニズムの関係に着目した初めての研究例である。コケ植物の配偶体組織形成についてはよく調べられてきたが、胞子体組織形成については未だ不明な点が多い。本研究により、コケ植物胞子体の組織発生の研究基盤が構築されたとともに、植物における転写因子モジュールの転用や再利用に関する研究が進展することが期待される。

## 序論

### 1. 塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子

塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子は真核生物に広く保存されており、最も典型的な二量体化転写調節因子の一種である。bHLH 型転写因子は構造的に2つの領域、すなわち2本の $\alpha$ -ヘリックスとそれらを繋ぐループ構造からなるHLHモチーフと、DNAに結合する塩基性領域 (basic region) で構成されている。

bHLH 型転写因子はHLHモチーフで他のbHLH型転写因子と二量体を形成した後、塩基性領域でE-box (CANNTG) と呼ばれるDNAの特定の塩基配列 (コンセンサス配列) と結合し、RNA Polymerase IIを含む基本転写因子群をリクルートすることで下流の遺伝子の発現調節をすることが知られている (Bertrand et al., 2002; Ramsay and Glover, 2005; Dennis et al., 2019)。酵母や緑藻類クラミドモナスなどの単細胞生物において、bHLH型転写因子は代謝経路や環境応答など、ホメオスタシスに関わる遺伝子発現制御を担うことが知られている一方、多細胞生物では動植物を問わず、組織発生における細胞運命の決定、細胞分裂や細胞分化においても非常に重要な役割を果たしている (Chen and Lopes, 2007; Jia et al., 2022)。動物では特に筋細胞分化および神経細胞分化におけるbHLH型転写因子の機能解析が進められている (Jin et al., 2016; Dennis et al., 2019)。筋芽細胞形成に重要なマスター制御因子としてMyoDが発見され、その後筋細胞形成に関与するbHLH型転写因子群が次々と同定された (Davis et al., 1987; Murre et al., 1989; Perry and Rudnicki, 2000)。筋細胞形成はこれらのbHLHタンパク質がヘテロ二量体を形成し、連続的に機能することで起こる。神経細胞形成においてはactivator型bHLHタンパク質であるAscl1やMath3と、repressor型bHLHタンパク質であるHesが、それぞれ神経細胞分化と、未分化な神経前駆細胞の維持に重要な役割を果たすことが知られている (Gyoja, 2017)。また、分化した体細胞を多能性幹細胞 (iPS細胞) にリプログラムすることで知られる転写因子群、いわゆる山中4因子のひとつであるc-MycもbHLH型転写因子である (Takahashi and Yamanaka, 2006)。

### 2. 植物の形態形成におけるbHLH型転写因子の役割

モデル双子葉植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) を用いた研究が中心となり、様々なbHLH型転写因子が植物の発生過程を制御していることが明らかとなっている。植物のbHLH型転写因子は、bHLHドメインのアミノ酸配列とその他のドメイン構造により28以上のsubfamilyに分類されている (Heim et al., 2003;

Pires and Dolan, 2010a; Feller et al., 2011). 分類されていない, すなわち緑藻特異的なものや種子植物には存在しないものを含めるとさらに多くの subfamily に分けられると推定されている. 植物の発生を制御することが明らかになっている bHLH 型転写因子には主に次のようなものが知られている: 生殖系列細胞の細胞運命決定を制御する subfamily VIIIa (BONOBO など) (Yamaoka et al., 2018), 光形態形成を制御する subfamily VII(a+b) (PIF など) (Pham et al., 2018), 根毛や仮根の形成を制御する subfamily VIIIc(1) (RHD6 や RSL1 など) と subfamily IXa (LRL1 など) (Menand et al., 2007; Tam et al., 2015; Proust et al., 2016; Bonnot et al., 2019), トライコームや根毛の形成を制御する subfamily IIIf (TT8 や GL3 など) (Payne et al., 2000), 胚発生と胚乳細胞のプログラム細胞死を制御する subfamily Ib(1) (RGE1/ZHOUP1) (Yang et al., 2008; Xing et al., 2013), 維管束の発生を制御する subfamily Vb (TMO5 など) と subfamily XIII (LHW など) (Vera-Sirera et al., 2015; Lu et al., 2020), タペート細胞の細胞死や花粉や胞子の発生を制御する subfamily II (Zhu et al., 2015; Lopez-Obando et al., 2022).

代表的なシャジクモ藻綱 (Charophyceae) やクレブソルミディウム藻綱 (Klebsormidiophyceae), 緑藻類 (Chlorophyta) のゲノム中には高々10個の bHLH 遺伝子 (4-5 の subfamily に分類される) のみが発見されていたため, 陸上進出前後に bHLH 遺伝子の遺伝子重複および機能分化, 新規機能獲得が起こったと考えられていた (Feller et al., 2011). しかし, 最近の研究で, 陸上植物に最も近縁な接合藻綱 (Zygnematophyceae) の一種である *Penium margaritaceum* (Ehrenberg) Brébisson ex Ralfs や *Spirogloea muscicola* (de Bary) Melkonian のゲノムに bHLH 遺伝子が陸上植物と同程度の数コードされていることが明らかとなった (Cheng et al., 2019; Jiao et al., 2020). これらがいくつの subfamily に分類されるのかは未解明であるが, 陸上進出前に bHLH 型転写因子の多様化が起こった可能性も考えられる.

表皮に存在するガス交換のための装置である「気孔」の発生には, 陸上植物特有の subfamily Ia に属するに属する bHLH 型転写因子 (以下, Ia bHLH 転写因子) が重要な役割を果たすことがわかっている (図 1). シロイヌナズナの気孔は, 厳密な細胞系譜を経て形成される. 未分化な原表皮細胞 (protoderm) はメリステモイド母細胞 (MMC, meristemoid mother cell) へと分化し, MMC は三角形のメリステモイド細胞 (meristemoid) とより大きな SLGC (stomatal lineage ground cell) に非対称分裂する. SLGC がジグソーパズル形の敷石細胞 (pavement cell) または MMC になるのに対し, メリステモイド細胞は楕円形の孔辺母細胞 (GMC, guard mother cell) へ分化し, さらに一度の対称分裂を経て一对の孔辺細胞 (guard cell) となる. この気孔系列細胞の細胞分裂と分化は複数の Ia bHLH 転写因子によって制御される (Pillitteri and Dong,

2013) . SPEECHLESS (SPCH), MUTE, FAMA という 3 つの bHLH 型転写因子はそれぞれ非対称分裂によるメリステモイド細胞の形成と SLGC のメリステモイド母細胞へのリプログラム, メリステモイド細胞の非対称分裂の停止と孔辺母細胞への分化, 孔辺母細胞から孔辺細胞への分化と対称分裂の制御に重要であることが報告されている (Ohashi-Ito and Bergmann, 2006; MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007) . これらの転写因子は ICE1 (INDUCER OF CBF EXPRESSION 1) /SCREAM (SCRM) および ICE2/SCRM2 という subfamily IIIb に属する bHLH 型転写因子 (以下, IIIb bHLH 転写因子) とヘテロ二量体を形成し, 気孔形成を正に制御する (Kanaoka et al., 2008) .

モデル単子葉植物であるイネ (*Oryza sativa* L.), トウモロコシ (*Zea mays* L.), ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon* (L.) P.Beauv.) における分子遺伝学的な研究で, Ia bHLH 転写因子および IIIb bHLH 転写因子からなるモジュール (以下, Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュール) が, 多少の形成メカニズムの違いはあるものの, シロイヌナズナの場合と同様に気孔形成に重要な役割を果たすことが示されている (Liu et al., 2009; Serna, 2011; Raissig et al., 2016; Raissig et al., 2017; Wang et al., 2019; Wu et al., 2019) . 一方で, 水中という環境に適応したことで二次的に気孔を喪失した単子葉植物であるアマモ (*Zostera marina* L.) のゲノムが解読され, SPCH, MUTE, FAMA を含む多くの気孔形成関連遺伝子が失われていることが明らかとなった (Olsen et al., 2016) . 以上のことから, 維管束植物の気孔形成にはこうした Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールを介した遺伝子発現調整メカニズムが必要であると考えられている.

### 3. 植物の進化と気孔形成

陸上植物は約 4 億 8000 万年前 (カンブリア紀) に陸上へと進出したと考えられている (図 2) (Delwiche and Cooper, 2015; Harris et al., 2022) . 陸上植物は形態学的には維管束をもたない非維管束植物 (non-vascular plants, 前維管束植物を含む) と維管束を獲得した維管束植物 (vascular plants, Tracheophyta) に大別される. 前維管束植物は絶滅しているため, 現生の非維管束植物はコケ植物 (Bryophyta) のみである. 最近の分子系統解析の結果は, 非維管束植物 (=コケ植物) と維管束植物が姉妹群であることを支持している. コケ植物はさらにタイ類 (苔類), セン類 (蘚類), ツノゴケ類に大別される. 当初, 胞子の化石記録等からコケ植物 3 系統の中でタイ類が最も早く分岐した基部系統であり, コケ植物は側系統群であると考えられてきたが, 最近の分子系統解析の多くがコケ植物の単系統性を支持している. さらに, セン類とタイ類が姉妹群であり, セン類とタイ類の共通祖先がツノゴケ類と分岐したことを支持しており, これが現時点で最も有力な説だと考えられている (Edwards et al., 1995; Wellman et al.,

2003; Wickett et al., 2014; Puttick et al., 2018; One Thousand Plant Transcriptomes Initiative, 2019; Li et al., 2020; Harris et al., 2022) . 種子植物が二倍体である孢子体 (sporophyte) 世代優占の生活環を有する一方で, コケ植物は緑藻類などと同様に一倍体である配偶体 (gametophyte) 世代優占の生活環をもつ.

過酷な陸上環境への適応のために陸上植物はさまざまな種類の組織・細胞種を獲得したが, 中でも特に重要な要素のひとつが, ガス交換のための組織である気孔の獲得である (図 2). 4 億 3200 万年前の地層から発見された前維管束植物 *Cooksonia barrandei* は孢子体の表皮に気孔を有していたことが示されている (Vatén and Bergmann, 2012; Libertín et al., 2018) . コケ植物タイ類を除き, 現生の陸上植物のほとんどが気孔を有しているため, 陸上植物の共通祖先で気孔が獲得され, タイ類が二次的に気孔を喪失したとする説が最も有力である. 現生の陸上植物はすべて孢子体に気孔を有するが, 4 億 1000 万年前の地層から発見される前維管束植物 (リニア植物) の一種である *Aglaophyton* や *Horneophyton* では配偶体において気孔様の構造が観察される (Kerp et al., 2004; Taylor et al., 2005; Kerp, 2018). 気孔が陸上植物において孢子体特有の組織であったかどうかについては議論の余地がある.

近年, セン類のモデル植物として利用されているヒメツリガネゴケ (*Physcomitrium patens* (Hedw.) Mitt.) を用いた研究により, セン類の気孔形成メカニズムの一端が明らかとなった (図 1) (Caine et al., 2016; Chater et al., 2016; Rensing et al., 2020) . セン類には Ia bHLH 転写因子をコードする *SMF* (*SPCH*, *MUTE*, and *FAMA-like*) 遺伝子が 2 つ保存されており (*PpSMF1* および *PpSMF2*), このうち *ppsmf1* 変異体で気孔が形成されなくなることが報告された. また, 4 つある IIIb bHLH 遺伝子 (*PpSCRM1*, *PpICE2-4*) のうち, *ppscrm1* 単独変異体では気孔が形成されなくなる. Ia bHLH 転写因子 (*PpSMF1*) と IIIb bHLH 転写因子 (*PpSCRM1*) の相互作用はヒメツリガネゴケにおいても保存されているため, 被子植物の気孔形成と同様, セン類においても Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールによって気孔形成が制御することが示唆された (Chater et al., 2016). また, 被子植物において気孔密度を制御するペプチドをコードする *EPIDERMAL PATTERNING FACTOR* (*EPF*) やその受容体をコードする *TOO MANY MOUTH* (*TMM*), *ERECTA* のオルソログもヒメツリガネゴケにおいて気孔形成を制御することが報告された (Caine et al., 2016). セン類と被子植物の気孔形成メカニズムが共通しているため, 陸上植物の気孔が単一起源であることが支持される (Vatén and Bergmann, 2012; Ligrone et al., 2012) .

前述の通り、現生のすべてのタイ類には気孔が存在しない。二次的に気孔を喪失した植物のゲノム解析などの研究例を元に、タイ類では気孔の喪失とともに Ia bHLH 遺伝子などの気孔形成特異的な遺伝子は失われたと考えられていた。

#### 4. タイ類のモデル植物ゼニゴケ

ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L. subsp. *ruderalis* Bischl. & Boissel.-Dub.) はタイ類に属するコケ植物であり、19 世紀から今日に至るまで詳細な形態観察が行われてきた (Mirbel, 1835; Durand, 1908; Bowman, 2013; Bowman, 2016; Shimamura, 2016; Bowman et al., 2022) . 体細胞由来の無性芽 (gemma) による無性生殖が植物体の継代に有用である点、アグロバクテリウムによる形質転換法が確立されている点などから、近年タイ類のモデル植物として広く利用されている (Bowman et al., 2016; Ishizaki et al., 2016) . さらに、相同組換えや CRISPR/Cas9 を利用した遺伝子破壊株の作出やレポーター遺伝子を使った解析など、現代的な分子遺伝学的手法が開発・導入され、様々な遺伝学的な解析が行われるようになった (Ishizaki et al., 2013; Sugano et al., 2014; Ishizaki et al., 2015; Sugano et al., 2018) . 種子植物が二倍体である孢子体世代優占の生活環をもつ一方で、コケ植物は一倍体である配偶体世代優占の生活環をもつため、遺伝子破壊を行った当代で表現型を観察することができるという利点がある。

#### 5. ゼニゴケの組織と生活環

以下、ゼニゴケの組織と生活環について解説する (図 3) (Durand, 1908; Shimamura, 2012; Shimamura, 2016) . 一倍体の孢子 (spore) が発芽すると孢子発芽体 (sporeling) が形成される。孢子発芽体の頂端細胞 (apical cell) と呼ばれる幹細胞周辺では盛んに細胞分裂が起こり、分化した細胞が切り出され、組織・器官の形成が進むことで葉状体 (thallus) ができる。葉状体には明確に背腹性がある。背面には光合成とガス交換を行う気室 (air chamber) や無性芽を生み出すための杯状体 (はいじょうたい; gemma cup) が形成される。腹面には腹鱗片 (ふくりんぺん; ventral scale) や、通水を担う有紋仮根 (ゆうもんかこん; pegged rhizoid), 葉状体を支えるための平滑仮根 (へいかつかこん; smooth rhizoid) などの組織が形成される。無性芽は杯状体底部の表皮 1 細胞に由来するクローン体であり、杯状体内部に無数に作り出される。杯状体内部の無性芽は休眠状態にあるが、杯状体外部に出て吸水および光を受容することにより発芽し、一つ一つの無性芽が新たな葉状体 (gemma) となる。葉状体は、長日条件、遠赤色光の照射によって生殖成長相へ移行する。ゼニゴケは雌雄異株であり、X 染色体 (一倍体世代優占の生物では U 染色体と呼ぶことが提唱されている [Hisanaga et al.,

2019]) をもつ雌株と、Y 染色体 (同 V 染色体) をもつ雄株が、それぞれ雌器托 (しきたく; archegoniophore) と雄器托 (ゆうきたく; antheridiophore) と呼ばれる傘状の構造をつくる。雌器托の先には指状の雌器床 (しきしょう; archegonial receptacle) が、雄器托の先には円盤状の雄器床 (ゆうきしょう; antheridial receptacle) が形成される。雌器床の指状突起の下には卵細胞 (egg cell) を内包する造卵器 (archegonium) がつくられ、雄器床の内部には精子 (sperm) を産生するための造精器 (antheridium) がつくられる。雄器床の周縁部から新しい造精器が作られるため、周縁部から中心部に向かって発生段階の異なる造精器が観察される。雄器床の上に水を垂らすと精子が採取でき、精子を含む水を雌器床にかけることで造卵器内部に精子が泳いで侵入し、受精する。受精してできた二倍体の接合子 (zygote) は細胞分裂と細胞分化を繰り返し、多細胞の孢子体を形成する。タイ類の孢子体は、その他の陸上植物と異なり、頂端細胞をもたないことで特徴付けられる (Ligrone et al., 2012)。

成熟したゼニゴケの孢子体は足 (あし; foot), 蒴柄 (さくへい; seta), 孢子囊 (ほうしのう; sporangium or capsule) という3つの器官・組織からなる単純な構造をとる (図4)。雄性前核と雌性前核の融合により生じた二倍体の接合子は、はじめに上下に非対称分裂する。この時点で細胞運命は決定されており、基部側の細胞 (hypobasal cell) は足と蒴柄、末端側の細胞 (epibasal cell) は孢子囊になるとされている。その後 epibasal cell 由来の細胞が並層分裂することで内側の細胞群と外側群が形成される。内側の細胞群 (エンドセシウム; endothecium) は胞原組織 (ほうげんそしき; sporogenous tissue) となり、外側の細胞群 (アンフィセシウム; amphithecium) は蒴壁 (さくへき; capsule wall) となる。胞原組織の細胞からは、一對の弾糸母細胞 (elater mother cell) と胞原細胞 (sporogenous cell) が分裂・分化する。弾糸母細胞は細胞伸長して、死細胞で特徴的な細胞壁の肥厚を伴った弾糸 (elater) となる。一方で胞原細胞は4回から5回細胞分裂し、孢子母細胞 (spore mother cell) を形成する。孢子母細胞は減数分裂をして孢子四分子 (spore tetrads) となり、孢子四分子が分裂して孢子ができる。孢子が形成される頃には蒴壁細胞の細胞壁が螺旋状に肥厚する。一方で、hypobasal cell から足と蒴柄が分化することはわかっているが、いつどのように分化するかはよくわかっていない。足は孢子体と配偶体の接続および栄養輸送を担い、配偶体側に細胞壁が肥厚する。蒴柄は孢子的成熟後に細胞伸長をする組織であり、孢子囊を配偶体由来の保護器官の外に押し出すことで孢子囊の裂開を促し、孢子散布を助ける役割がある

(図5)。蒴柄は細胞伸長後すぐに乾燥し、枯死する。配偶体由来の保護器官は孢子体側からカリプトラ (calyptra), 偽花被 (ぎかひ; pseudoperianth), 苞膜 (ほうまく; involucre) と呼ばれるが、カリプトラと偽花被は受精後のみにつくられる器官であ



る。胞子嚢の裂開後、胞子は弾糸の乾湿運動により散布される。生殖成長相への転換から胞子採取までは最短で2ヶ月ほどである。

## 6. ゼニゴケの遺伝的冗長性と進化発生学的研究

2017年にBowmanらによってゼニゴケの全ゲノム構造が解明された (Bowman et al., 2017)。これによりゼニゴケには、陸上植物の発生に関わる転写因子や植物ホルモン関連因子、シグナル伝達系を制御するタンパク質をコードする遺伝子がほぼ全て保存されており、それらの遺伝的冗長性が非常に低いことが明らかとなった。シロイヌナズナやイネなどのモデル植物では遺伝的冗長性が高いが故に遺伝学的解析が困難だった遺伝子群について、ゼニゴケを利用すれば発生学的な解析が容易になる例が多い (Bowman et al., 2017; Romani and Moreno, 2021)。

ゼニゴケは陸上植物の進化発生学的な研究のモデルとして利用されている。維管束植物の組織は複雑な制御ネットワークを経て形成されるが、*de novo* の転写因子の獲得により遺伝子調節ネットワークが新たに構築されたというよりも、既存の転写制御ネットワークの転用 (co-option) もしくは遺伝子の重複による転写因子の機能分化もしくは新規機能獲得 (neofunctionalization) によるところが大きいと考えられている (Pires and Dolan, 2010b)。実際に、ゼニゴケを用いた研究でその一端が明らかとなっている。シロイヌナズナで根毛の形成に関与する bHLH 型転写因子である RSL class I がゼニゴケの仮根形成に関与する例、VIIIa bHLH 転写因子がシロイヌナズナとゼニゴケにおいて生殖成長の鍵転写因子となっている例、シロイヌナズナの精細胞分化に必要な R2R3-MYB 型転写因子 DUO1 がゼニゴケにおいて精子形成に重要な役割を果たしている例、miRNA156/529-SPL 転写因子モジュールがシロイヌナズナ胞子体およびゼニゴケ配偶体で成長相転換を制御する例、シロイヌナズナで腋芽形成を制御する R2R3-MYB 型転写因子 RAX のゼニゴケにおけるオルソログ (*GCAMI*) がゼニゴケでは無性芽形成を制御する例などが報告されており、遺伝子調節ネットワークの転用が示唆されている (Proust et al., 2016; Higo et al., 2018; Yamaoka et al., 2018; Tsuzuki et al., 2019; Yasui et al., 2019)。陸上植物の進化における遺伝子発現調節ネットワークの進化を理解する上で、ゼニゴケは有用なモデルになる。

## 7. 本研究の目的

これまで、気孔をもたないタイ類は気孔形成を制御する因子を喪失していると考えられていた。本研究では、気孔形成を制御する Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールに着目し、モデルタイ類ゼニゴケを対象として進化発生学的な解析を行った。陸上植物の

bHLH 型転写因子の分子系統解析の結果から、ゼニゴケは気孔をもたないものの、Ia bHLH 転写因子および IIIb bHLH 転写因子をコードする遺伝子がゲノム中に存在することが示された。また、公開されている組織別のトランスクリプトームデータの再解析によって、ゼニゴケの Ia bHLH および IIIb bHLH 遺伝子は若い胞子体で高発現することが明らかとなった。これらのことから、ゼニゴケには気孔形成を制御するためのメカニズムと同等のものが存在し、胞子体組織の形成を制御している可能性が考えられた。本研究では Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールのゼニゴケにおける機能を解明し、気孔をもたない植物における気孔形成制御因子の役割と進化を明らかにすることを目的とした。

## 結果

### 1. ゼニゴケにおける Ia bHLH 転写因子の機能

#### 1.1 MpSETA は bHLH subfamily Ia に属する唯一の転写因子である

先行研究により、ゼニゴケには *SMF* 遺伝子のオルソログは存在しないものの、subfamily Ia に属する bHLH 型転写因子は存在する可能性が示唆されていた (Chater et al., 2017; Bowman et al., 2017; Flores-Sandoval et al., 2018; Harris et al., 2020). ゼニゴケに Ia bHLH 転写因子が存在するかどうかを再確認するために、シロイヌナズナの AtFAMA のアミノ酸配列を用いて、ゼニゴケのプロテオームデータに対して BLAST 検索を行ったところ、MpBHLH35 (Mp2g04160) がヒットした。MpBHLH35 遺伝子を、蒴柄への特異的な遺伝子発現 (後述) に基づいて MpSETA と命名した。

InterPro や NCBI BLAST を用いたドメイン解析から、MpSETA は bHLH ドメインと、C 末端側には ACT-like ドメイン (特に Ia bHLH 転写因子の ACT-like ドメインは SMF ドメインとよばれる [MacAlister and Bergmann, 2011]) を保持すると予測された (図 6A)。ACT-like ドメインは、植物の bHLH 型転写因子のうち 3 分の 1 がもつとされるドメインで、タンパク質間相互作用に重要であることが示唆されている (Feller et al., 2006; Peterson et al., 2010; MacAlister and Bergmann, 2011; Lu et al., 2020; Seo et al., 2022)。N 末端領域のアミノ酸配列は Ia bHLH 転写因子間では保存されていないが、IUPred3 で天然変性領域 (IDR, intrinsic disordered region) を予測した結果、MpSETA の N 末端側に IDR が予測された (図 6B)。また、AtSPCH に見られる PEST ドメイン (リン酸化されることでタンパク質の分解を指示するドメイン [MacAlister and Bergmann, 2011]) は MpSETA には存在しなかった。AlphaFold2 を用いて MpSETA の立体構造を解析したところ、bHLH ドメインは典型的な helix-loop-helix を形成し、SMF ドメインは典型的な ACT-like ドメイン構造をとっていることから、MpSETA は機能的な bHLH 型転写因子であることが示唆された (図 6C)。

MpSETA と他の植物種の Ia bHLH 転写因子を比較するため、様々な植物のタンパク質データベースからアミノ酸配列を取得し、MAFFT により bHLH ドメインと SMF ドメインのアミノ酸配列アラインメントを行った (図 7)。bHLH ドメイン中の E-box の結合に重要なアミノ酸と二量体化に重要なアミノ酸は MpSETA でも高度に保存されていたが、その他のアミノ酸配列の類似性は他と比べると低かった (図 7A)。AtFAMA は AtRBR1 と相互作用して気孔の形成を制御することが知られている (Lee et al., 2014; Matos et al., 2014)。RBR との相互作用に重要である LxCxE モチーフは AtFAMA、

PpSMF1, PpSMF2 で保存されているが, MpSETA には存在しなかった. SMF ドメインの全体的なアミノ酸配列の類似性は低かったが, アミノ酸の性質は保存されている場合が多かった (図 7B). ACT-like ドメインのアミノ酸配列はオルソログ間でも保存されていない場合が多く, 機能には立体構造が重要であると考えられる (Feller et al., 2006).

MpSETA/MpBHLH35 がゼニゴケにおける唯一の Ia bHLH 転写因子であるとの報告がある一方で (Chater et al., 2017; Bowman et al., 2017), MpBHLH36 (Mp2g04180), MpBHLH37 (Mp2g04200), MpBHLH50 (Mp2g04190) も FAMA-like であるとする報告も存在する (Flores-Sandoval et al., 2018). また, ゼニゴケにはそもそも Ia bHLH 転写因子は存在しないとした報告もあり (Ran et al., 2013; Qu et al., 2017), ゼニゴケにおける Ia bHLH 転写因子の有無はこれまで不明確であった. これまでの系統解析には主に bHLH ドメインの配列のみが用いられていたため, 解析に用いた配列が短く, 精度が低かった可能性が考えられた. そこで, bHLH ドメインおよび SMF ドメインの配列を使用して改めて分子系統解析を行ったところ, Ia bHLH 転写因子に分類されるのは MpSETA/MpBHLH35 のみであることがわかった (図 8). MpBHLH36, 37, 50 はすべて II のクレードに属した. 以下, ゼニゴケに存在する唯一の Ia bHLH 転写因子として, MpSETA の解析を行った.

興味深いことに, タイ類ゼニゴケ亜綱ミカヅキゼニゴケ (*Lunularia cruciate* (L.) Dumort. ex Lindb.) のドラフトゲノム (Linde et al., 2021) から, MpSETA 様の部分配列が取得された (*LcSETA1* および *LcSETA2*) (図 7,8). bHLH ドメインと SMF ドメインのアミノ酸配列は, *LcSETA1*, MpSETA 間で高度に保存されていた. ミカヅキゼニゴケの全ての組織を含んだトランスクリプトームデータは現状存在しないので, *LcSETA1* および *LcSETA2* が実際に発現し, タンパク質として機能するかどうかはさらなる検証が必要ではあるが, Ia bHLH 遺伝子は少なくともゼニゴケ亜綱のタイ類のゲノムに保存されていると結論づけた.

## 1.2 MpSETA はシロイヌナズナ *mute* 変異体および *fama* 変異体の表現型を部分的にレスキューする

MpSETA のアミノ酸配列は多様化しているため, 他の Ia bHLH と同様の機能を担っているかどうかは不明だった. したがって, ゼニゴケの Ia bHLH 転写因子である MpSETA が, 被子植物シロイヌナズナにおいて AtSPCH, AtMUTE および AtFAMA の機能を代替できるかどうかを調べた. MpSETA を AtSPCH, AtMUTE, AtFAMA のプロモーター制御下で発現するコンストラクトを, それぞれ *spch-3* 変異体, *mute-2* 変異

体, *fama-1* 変異体に導入した. T<sub>3</sub>まで世代を回して分離比を確認して導入した遺伝子を1遺伝子ホモにもつ系統を選抜し, T<sub>4</sub>の植物体を観察に用いた. 低温処理解除後9日目の子葉背軸側の表皮細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した.

AtMUTEを欠損したT-DNA挿入変異体 *mute-2* 変異体ではGMCに分化できず発生が停止したメリステモイドが観察されるが (Pillitteri et al., 2007; Pillitteri et al., 2008), MpSETAを発現する *mute-2* (*proAtMUTE:MpSETA mute-2*) ではいくつかの気孔が観察された (図 9A). *proAtMUTE:MpSETA mute-2* #8-4 では子葉1枚(背軸側)あたり  $2.67 \pm 1.56$  個の気孔, *proAtMUTE:MpSETA mute-2* #10-11 では子葉1枚(背軸側)あたり  $2.33 \pm 1.72$  個の気孔が観察された (mean  $\pm$  s.d.;  $n = 12$ ). これらのラインでは, 特に水孔(排水組織付近にある気孔の一種)がよく観察された. これはAtMUTEプロモーター活性が子葉の排水組織で高いことに影響されている可能性が考えられる (Pillitteri et al., 2008). *proAtMUTE:MpSETA mute-2* 株は, *mute-2* 変異体と比較すると植物体のサイズが大きくなり, 伸長した花茎が観察された (図 9B-D). さらにMpSETAは*fama-1*の表現型を一部相補することが明らかとなった. AtFAMAを欠損したT-DNA挿入変異体 *fama-1* は, GMCの対称分裂が一度で停止せずに複数の孔辺細胞様の構造からなる「*fama tumor*」とよばれるキャタピラー様の構造体が観察される (Ohashi-Ito and Bergmann, 2006). MpSETAを発現する *fama-1* (*proAtFAMA:MpSETA fama-1*) では, 成熟した気孔は観察されなかったものの, 孔辺細胞系列の過剰な分裂が抑制された (図 10A,B). *proAtFAMA:MpSETA fama-1* 株の植物体は*fama-1*と同程度の大きさであった (図 10C). 一方で, MpSETAを発現する *spch-3* (*proAtSPCH:MpSETA spch-3*) では, *spch-3* 変異体同様に気孔系列細胞は観察されなかったため, MpSETAはAtSPCHの機能を代替することができないと考えられる (図 11) (MacAlister et al., 2007).

MpSETAがシロイヌナズナの気孔系列細胞の細胞分裂および細胞分化において部分的に機能するというこれら一連のデータから, MpSETAがAtICE1およびAtSCRM2と相互作用する可能性が示唆された. 酵母ツーハイブリッド法 (Y2H, yeast two-hybrid assay) およびBiFC法 (bimolecular fluorescence complementation assay) により, MpSETAはAtICE1およびAtSCRM2と核内で相互作用することが明らかとなった (図 12). 以上の結果から, 気孔のないタイ類由来のMpSETAは, アミノ酸配列は多様化しているものの「真の」Ia bHLH転写因子であることが示された.

### 1.3 MpSETAは発生過程にある鞘柄で高発現する

MpSETA がゼニゴケのどの器官で発現するか調べるために、ゼニゴケの9つの組織・器官（孢子発芽体、雌雄の葉状体、雄器床、雌器床、造精器、造卵器、受精後13日目の若い孢子体、成熟した孢子体）のトランスクリプトーム解析のデータを再解析したところ、MpSETA は一倍体世代である配偶体ではほとんど発現しないが、二倍体世代である孢子体優先的に発現し、特に若い孢子体で高発現することがわかった（**図 13**）。MpSETA が孢子体で機能することが考えられたため、孢子体に着目し解析を行った。

MpSETA の詳細な発現パターン解析のために、先行研究で記載された特徴的な発生イベントに基づいてゼニゴケ野生型の孢子体の発生過程を以下の10ステージに分類した（**図 14A**）（Durand, 1908; Shimamura, 2016; Hisanaga et al., 2021）：(I) epibasal cell（将来足と蒴柄を形成する細胞、上側）と hypobasal cell（将来孢子嚢を形成する細胞、下側）に非対称分裂した2細胞期、(II) 4細胞もしくは8細胞期、(III) hypobasal cell由来の細胞群が内側（エンドセシウム、将来胞原組織に分化）と外側（アンフィセシウム、将来蒴壁に分化）に分化した初期球状胚期、(IV) 組織分化が不明瞭な後期球状胚期、(V) 胞原組織、蒴柄、足が分化した胞原組織期、(VI) 弾糸母細胞（弾糸の前駆体）および胞原細胞（孢子母細胞の前駆体）が分化した胞原細胞期、(VII) 孢子母細胞期、(VIII) 減数分裂後の孢子四分子期、(IX) 成熟した孢子体（蒴柄伸長前）、(X) 成熟した孢子体（蒴柄伸長後）。足および蒴柄は stage V から stage IX の間で形成される

（**図 14B**）。stage VIII の孢子体の蒴柄領域を観察したところ、形態学的に対称分裂が盛んに行われている様子が確認できた（**図 14C**）。

タイ類の孢子体の細胞分裂は不規則に起こるため、どの細胞がいつどのようにして分裂するかは解剖学的な解析のみでは不明瞭であった（Durand, 1908; Kato and Akiyama, 2005; Ligrone et al., 2012）。足および蒴柄領域における細胞分裂活性を調べるため、G2-M 期のレポーターである *proMpCYCB;1:Dbox-GUS*（内生の *MpCYCB;1* プロモーター制御下で *MpCYCB;1* の N 末端側のタンパク質分解に重要な Dbox に、核局在シグナル [NLS, nuclear localization signal] および GUS [ $\beta$ -glucuronidase] を付与したタンパク質を発現するコンストラクト [Hernández-García et al., 2021]) を雌の野生型背景で作出し、オス野生型と交配した F<sub>1</sub> 孢子体を GUS 染色して観察した（**図 15**）。Stage VI から stage VIII の孢子体において、足の領域では GUS のシグナルは検出されなかったものの、減数分裂前後の蒴柄領域では継続的に細胞分裂活性が検出された。*MpCYCB;1* は減数分裂期の孢子で強く発現するため、全体が染色されて見えた。成熟した孢子体（stage IX）では GUS のシグナルは検出されなかったため、蒴柄細胞の伸長前に細胞分裂は停止していると考えられる。形態観察および細胞周期レポーターの解析から、

縦に並んだ蒴柄細胞の列は、発生後期の胞子体において推定の「蒴柄母細胞 (seta mother cell)」の数回の対称分裂により形成されることが示唆される。

MpSETAの組織レベルでの発現パターン解析のため、MpSETAのプロモーター（翻訳開始点より上流4,194 bp）の制御下でGUSレポーターを発現する形質転換体 *proMpSETA:GUS* を作出した。作出した株を野生型と掛け合わせ、得られたF<sub>1</sub>個体から雌雄を選抜し、同じ系統の雌雄株を揃えた上で発現解析を行った。作出された形質転換株のGUS染色を行ったところ、stage IVのhypobasal cell由来の細胞群およびstage Vからstage VIIの胞子体の蒴柄領域に特異的に発現が確認され、stage VIII以降の胞子体、足や胞子嚢ではプロモーター活性は確認されなかった（**図16A**）。トランスクリプトーム解析の結果は配偶体の組織ではMpSETAはほとんど発現しないことを示唆していたが、発生過程にある造精器で特異的にプロモーター活性が検出された（**図16B**）。以上の結果は、MpSETAが発生初期の蒴柄に発現し、蒴柄伸長というよりは蒴柄細胞形成に寄与している可能性を示唆する。

#### 1.4 Mpseta<sup>ko</sup>株は蒴柄を欠損する

MpSETAの機能を明らかにするために、ジーンターゲットイング法 (Ishizaki et al., 2013) を用いてノックアウト株を作出し、解析を行った。共同研究者の白川一助教（奈良先端科学技術大学院大学）および松田頼子氏（京都大学大学院生命科学研究科）により、MpSETAのbHLHドメインをコードする領域485 bpを相同組換えによりハイグロマイシン耐性遺伝子カセット（*proMpEF1a:hpt:ΔEn*）に置換したMpseta<sup>ko</sup>株が、独立に2系統作出された（Mpseta-1<sup>ko</sup>, Mpseta-2<sup>ko</sup>）（**図17A**）。得られた個体は全て雌株であったため、野生型（Tak-1）と掛け合わせ、得られたF<sub>1</sub>個体から雌雄を選抜し、各系統で雌雄を揃えた（**図17B,C**）。semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR)により、受精後21日目の胞子体（stage VI-VII）におけるMpSETAの発現を確認したところ、野生型ではMpSETAの全長のmRNAが発現するが、Mpseta<sup>ko</sup>株ではいずれもMpSETAの発現は検出されなかった（**図17D**）。*proMpSETA:GUS*株において、発生過程の造精器でGUSのシグナルが検出されたが、Mpseta<sup>ko</sup>株は配偶体世代（精子形成含む）において顕著な表現型を示さなかった（**図18**）。Mpseta<sup>ko</sup>株の雄株と野生型の雌株は交配可能なので、精子形成にも異常はないと思われる。

二倍体世代での表現型を確認するため、雌雄のMpseta<sup>ko</sup>株を交配し得られた胞子体を、野生型の胞子体と比較した。野生型とMpseta<sup>ko</sup>株の成熟した胞子体の組織切片を作製して観察したところ、Mpseta<sup>ko</sup>株では伸長した蒴柄細胞が欠損していることが判明した（**図19A,B**）。胞子嚢全体の長さをSP、足から胞子嚢基部までの長さをSFとし

て SF/SP 比を定量したところ、野生型と比較して *Mpseta*<sup>ko</sup> 株では有意に減少していた (図 19C)。蒴柄領域にある細胞数の定量を行ったが、野生型と比較して *Mpseta*<sup>ko</sup> 株では有意に減少していた (図 19D)。より早いステージの胞子体の表現型の詳細な観察から、*Mpseta*<sup>ko</sup> における蒴柄の欠損は、「蒴柄母細胞」と思われる細胞が観察される最も早いステージである stage VI ですで見られるということがわかった (図 20A)。*Mpseta*<sup>ko</sup> では正常な蒴柄細胞が喪失しているにもかかわらず、胞子や他の胞子体組織は正常に形成された (図 19,20B)。蒴柄は足から胞子嚢への栄養輸送も担っていると考えられているが、蒴柄を喪失しても胞子は形成されることから、*Mpseta*<sup>ko</sup> において足から胞子嚢への有機および無機栄養の輸送は行われていると考えられる。以上の結果から、*Mpseta*<sup>ko</sup> 株では推定される「蒴柄前駆細胞 (seta precursor cell)」から蒴柄母細胞への細胞分裂もしくは細胞分化に異常があり、蒴柄母細胞が生じない影響でそれに続いて起こる対称分裂による蒴柄細胞の生産が起こらなくなることが示唆される。

野生型と *Mpseta*<sup>ko</sup> 株の受精後 1 ヶ月の雌器床を観察した。野生型では胞子の成熟後に蒴柄細胞が細胞伸長することで胞子嚢がカリプトラ、偽花被を破り苞膜の外に露出するが、*Mpseta*<sup>ko</sup> 株では胞子が成熟しているにも関わらず胞子嚢がカリプトラの中に埋まったままであった (図 21)。胞子体はカリプトラおよび偽花被に完全に包まれて生育するため、蒴柄細胞の伸長により胞子嚢がカリプトラや偽花被を破らない限り胞子の飛散は起こらない (Shaw and Renzaglia, 2004)。遺伝学的相補性実験のために、*MpSETA* の翻訳開始点より上流 4,194 bp から *MpSETA* の終止コドンまでのゲノム断片 (6,472 bp) を *Mpseta*<sup>ko</sup> 株の雌株に導入した形質転換体 (*gMpSETA Mpseta*<sup>ko</sup>) を作出した。これを *Mpseta*<sup>ko</sup> 株の雄株と交配し、F<sub>1</sub> から *gMpSETA Mpseta*<sup>ko</sup> の雄株を確立した。*gMpSETA Mpseta*<sup>ko</sup> の雌雄を交配して得られた胞子体では正常な蒴柄が形成され、SF/SP 比ならびに蒴柄領域の細胞数も野生型と同程度まで回復した (図 19)。さらに、*gMpSETA Mpseta*<sup>ko</sup> では野生型同様に胞子嚢の苞膜の外への露出を確認できた (図 21)。このことから、*Mpseta*<sup>ko</sup> 株の各系統で見られた、成熟した胞子嚢が外に現れないという表現型は、*MpSETA* を欠損し、正常に蒴柄細胞が形成されなくなったことに起因するものであるということが確認された。

次に、*AtMUTE* および *AtFAMA* がゼニゴケにおいて *MpSETA* の機能を代替できるかどうか検証した。内生の *MpSETA* プロモーター制御下で *AtMUTE* もしくは *AtFAMA* を発現するコンストラクトを *Mpseta*<sup>ko</sup> 株の雌株に導入した形質転換体 (*proMpSETA:AtMUTE Mpseta*<sup>ko</sup> ♀ もしくは *proMpSETA:AtFAMA Mpseta*<sup>ko</sup> ♀) を作出し、それぞれ *Mpseta*<sup>ko</sup> 株の雄株と交配して得られた胞子体を観察した。成熟した F<sub>1</sub> 胞子体の蒴柄は、いずれも *Mpseta*<sup>ko</sup> と同様欠損していた (図 22A,B)。また、



AtMUTE もしくは AtFAMA を発現する Mpseta-1<sup>ko</sup> では、いずれも Mpseta-1<sup>ko</sup> と同様、胞子が成熟しているにも関わらず胞子嚢がカリプトラの中に埋まったままであった (図 22C)。これらの結果は、AtMUTE および AtFAMA がゼニゴケにおいて MpSETA の機能を担うことができないことを示している。

### 1.5 葉状体における MpSETA の発現抑制

胞子体で特異的に発現する遺伝子は配偶体世代で発現しないようさまざまなエピジェネティック修飾によって発現抑制されている。エピジェネティック修飾を担うタンパク質をコードする遺伝子の変異体において、配偶体組織で胞子体様の組織が発達する、あるいは胞子体特異的遺伝子が発現するようになる例や、胞子体特異的な転写因子の配偶体における発現誘導により胞子体様組織が形成される例などが報告されている (Okano et al., 2009; Flores-Sandoval et al., 2016; Horst et al., 2016; Dierschke et al., 2021)。逆に、胞子体で抑制型エピジェネティック修飾が起こらなくなった場合、胞子体自体は発達するが (組織形成に異常があるかどうかは不明)、胞子が発芽できなくなるという表現型が見られることが最近報告された (Montgomery et al., 2022)。胞子体特異的に発現する TALE 型ホメオドメイン転写因子をコードする MpKNOX2 や MpBELL1 は、抑制ヒストンマークである H3K27me3 によって配偶体では発現抑制されているが、H3K27me3 修飾酵素である MpE(z) の発現抑制株 (*proEF1:XVE*>>*amiR-MpE(z)<sup>SkMIR166</sup>*) では葉状体で発現するようになり、形態異常を引き起こす (Flores-Sandoval et al., 2016; Dierschke et al., 2021; Hisanaga et al., 2022)。MpSETA は野生型の葉状体では発現が抑制されており、MpSETA 遺伝子座周辺には H3K27me3 が濃縮している ([https://marchantia.info/MpTak\\_v6.1/Mp2g04160/](https://marchantia.info/MpTak_v6.1/Mp2g04160/))。10 日目の無性芽発芽体の MpE(z) の発現抑制株の  $\beta$ -estradiol 添加処理後 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h のトランスクリプトームデータ (GEO Series accession number GSE147756) を再解析したが、いずれの条件でも MpSETA は葉状体では発現していなかった。ただし、この実験では生物学的反復がそれぞれ 1 回ずつであることに注意が必要である。また、DNA メチル化 (CpG メチル化) を DNA 複製時に維持するシトシンメチルトランスフェラーゼである MpMET をコードする遺伝子の変異体 (Mpmet) についても同様に葉状体トランスクリプトームの再解析を行った (Ikeda et al., 2018)。解析により、Mpmet-3 では 4,503、Mpmet-4 では 196 の発現変動遺伝子が検出された (FDR < 0.01)。しかし、Mpmet 変異体において MpSETA の発現は変動していなかった。これらの結果は、MpKNOX2 や MpBELL1 とは異なり、MpSETA は葉状体組織では複数のエピジェネティック修飾によって抑制され

ており、いずれか一つを解除されても発現するようにはならないという可能性を示唆している。

## 2. ゼニゴケにおける Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールの機能

### 2.1 ゼニゴケにおける IIIb bHLH 転写因子の同定

陸上植物において、Ia bHLH 転写因子と IIIb bHLH 転写因子が相互作用することが知られている (Kanaoka et al., 2008; Chater et al., 2016; Wu et al., 2019). 第 1 章において、MpSETA がシロイヌナズナの IIIb bHLH 転写因子である AtICE1 および AtSCRM2 と相互作用しうることが示された (図 12). そこで、本章ではゼニゴケにおける IIIb bHLH 転写因子の機能を解析した。まず、ゼニゴケにおける IIIb bHLH 転写因子を同定した。IIIb bHLH 転写因子がゼニゴケに存在するかどうか調べるために、AtICE1 のアミノ酸配列をクエリとして BLAST 検索を行ったところ、MpBHLH16 (Mp4g04910) および MpBHLH17 (Mp4g04920) という、コードする遺伝子がゲノム上で隣接する 2 つの bHLH 転写因子がヒットした。得られた配列を MAFFT によりアラインメントし、保存されたドメインのアミノ酸配列を用いて分子系統解析を行った結果、MpBHLH16 と MpBHLH17 がともに IIIb bHLH 転写因子であることがわかった (図 23). 以下、MpBHLH16 遺伝子を MpICE1, MpBHLH17 を MpICE2 と命名し、解析を行った。InterPro や NCBI BLAST を用いたドメイン解析および Alphafold2 による立体構造予測から、MpICE1 および MpICE2 は bHLH ドメインおよび ACT-like ドメインをもつことが明らかとなった (図 24). IIIb bHLH 転写因子の bHLH ドメインと ACT-like ドメインはともに、Ia bHLH 転写因子と比較するとアミノ酸配列が高度に保存されており、進化速度が遅いことがわかった (図 23,25D,E). IIIb bHLH 転写因子は気孔発生以外にもさまざまな生命現象の制御に関与しているため、より高い選択圧がかかっているものと推測される (Chinnusamy et al., 2003; Xing et al., 2013; Denay et al., 2014; Ohta et al., 2018; MacGregor et al., 2019). シロイヌナズナにおいて、AtICE1/AtSCRM は bHLH ドメインの N 末端側に MAP キナーゼ (AtMPK3 および AtMPK6) と直接相互作用するモチーフ (KiDoK モチーフ, MAPK docking and KRAAM motif) をもつことが報告されている (Li et al., 2017; Putarjunan et al., 2019). アミノ酸配列のアラインメントの結果、ゼニゴケでは MpICE2 のみが KiDoK モチーフをもっていることがわかった (図 24,25). MpICE1 と異なり、MpICE2 は MAPK と直接結合し、リン酸化等の制御を受けることが示唆される。すなわち、MpICE1 と MpICE2 が MAPK によって異なる制御を受ける可能性を示唆しており、両者のタンパク質レベルでの機能分化も考えられる。コケ植物の IIIb bHLH 転写因子とシロイヌナズナの IIIb bHLH 転写因子を比較すると、コケ植物の IIIb bHLH 転写因子に高度に保存された機能未知のモチーフが 2 つ発

見された (図 25A,B). さらなる解析が必要ではあるが, コケ植物と維管束植物の IIIb bHLH 転写因子が機能分化していることが示唆される. タイ類ミカヅキゼニゴケのドラフトゲノムデータから, IIIb bHLH 転写因子をコードする遺伝子が2つ見つかった (LcICE1 および LcICE2) (図 23,25). 興味深いことに, LcICE1 と LcICE2 は MpICE1 と MpICE2 同様, ゲノム上で隣接していた. また, KiDoK モチーフは LcICE1 のみに保存されていることから, LcICE1 および LcICE2 も機能分化している可能性が示唆される.

## 2.2 MpICE2 は発生過程の胞子体で高発現する

公開されている組織別 RNA-seq データの再解析から, MpICE1 および MpICE2 の発現プロファイルを調べた (図 26). MpICE1 の発現量がどの組織でもほぼ一定であるのに対して, MpICE2 は MpSETA 同様, 受精後 13 日目の若い胞子体 (stage III から stage IV と推定される) で高発現することがわかった. Stage III から IV の胞子体では, 「蒴柄前駆細胞」の細胞分裂および細胞分化が行われているステージであると考えられる. したがって, MpICE1 というよりも MpICE2 が優先的に MpSETA と協調的に蒴柄分化に関わるという作業仮説を立てた.

MpICE2 の発現組織の解析を行うために, MpICE2 のプロモーター (翻訳開始点の上流 3,060 bp) 制御下で, Citrine (YFP, yellow fluorescent protein, の一種), GUS および NLS の融合タンパク質を発現する形質転換体 *proMpICE2:Citrine-GUS-NLS* を作出した. 栄養成長相の配偶体組織では, 葉状体のメリステム, メリステム付近の表皮細胞, 中肋 (midrib, 通水組織である有紋仮根が通っている) で GUS のシグナルおよび Citrine の蛍光が観察された (図 27A,B). 生殖成長相の配偶体では, 造精器および雌器床全体で発現が確認された (図 27C,D). 胞子体について, stage IV と V では胚全体, stage VI から VIII では特に足と蒴柄, stage IX では足のみで GUS のシグナルが検出された (図 27E). MpICE2 は発生過程の蒴柄で発現しており, これは作業仮説と矛盾しない.

## 2.3 MpICE2 は MpSETA と相互作用して蒴柄形成を制御する

ゼニゴケでも他の植物種と同様に, Ia bHLH 転写因子と IIIb bHLH 転写因子が相互作用するかどうかを検証するため, MpSETA と MpICE2 とのタンパク質相互作用を Y2H 法で確認した. その結果, MpSETA は MpICE2 と相互作用することが明らかとなった (図 28A). さらに, BiFC 法により相互作用を検証したところ, ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana* Domin) の表皮細胞で YFP 蛍光が確認され, DAPI により染色

された細胞核とマージしたことから、MpSETA および MpICE2 が核内で相互作用するということがわかった (図 28B)。

MpICE2 のゼニゴケにおける機能を調べるために、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを利用して変異体を作成した (Sugano et al., 2014; Sugano et al., 2018)。共同研究者である Jeanne Loue-Manifel 博士 (リヨン高等師範学校) および Yen-Ting Lu 博士 (エディンバラ大学, 現・奈良先端科学技術大学院大学) によって2つの独立した Mpice2 ゲノム編集変異体を作成された (Mpice2-2<sup>se</sup> および Mpice2-6<sup>se</sup>) (図 29A)。それぞれ雄株で作出され、野生型の雌と交配して得られた F<sub>1</sub> 孢子発芽体から Cas9 を含む T-DNA を保持しない雌雄の Mpice2<sup>se</sup> 変異体が選抜され、これらを解析に用いた。Mpice2-2<sup>se</sup> 変異体は bHLH ドメインの DNA 結合に重要と予測されるアミノ酸に置換があり、Mpice2-6<sup>se</sup> 変異体は bHLH ドメインの C 末端以降と ACT-like ドメインの全てを含む領域の欠損を生じるフレームシフト変異をもつ (図 29B)。これら Mpice2<sup>se</sup> 変異体における孢子体の表現型を観察するために組織切片を作製したところ、蒴柄が正常に形成されていないことが明らかとなった (図 30A,B)。Mpice2<sup>se</sup> 変異体では SF/SP 比、蒴柄領域の細胞数がともに野生型よりも有意に減少していた (図 30C,D)。蒴柄領域の細胞数については、Mpice2-2<sup>se</sup> 変異体の方が Mpice2-6<sup>se</sup> 変異体よりも多かった (図 30D)。これは、Mpice2-2<sup>se</sup> 変異体の予測される翻訳産物が bHLH ドメインの 2 アミノ酸置換であり、Mpice2-6<sup>se</sup> 変異体と比較すると部分的に機能する可能性があるためであると考えられる。いずれの Mpice2<sup>se</sup> 変異体でも配偶体由来の保護器官の外に孢子嚢が押し出されないという、Mpseta<sup>ko</sup> 株と同様の表現型が観察された (図 31)。Mpice2<sup>se</sup> 単独変異体が Mpseta<sup>ko</sup> 株とほぼ同じ表現型を示すことから、MpICE1 と MpICE2 は少なくとも蒴柄形成においては冗長的に機能していないと考えられる。また、遺伝学的相補性実験のために、MpICE2 の翻訳開始点より上流 3,060 bp から MpICE2 の終止コードンまでのゲノム断片 (6,134 bp) を Mpice2-6<sup>se</sup> 変異体の雌株に導入した形質転換体 (gMpICE2 Mpice2-6<sup>se</sup>) を作成した。これを Mpice2-6<sup>se</sup> 変異体の雄株と交配し、F<sub>1</sub> から gMpICE2 Mpice2-6<sup>se</sup> の雄株を確立した。gMpICE2 Mpice2-6<sup>se</sup> の雌雄を交配して得られた孢子体では正常な蒴柄が形成され、SF/SP 比ならびに蒴柄領域の細胞数も野生型と同程度まで回復した (図 30)。さらに、gMpICE2 Mpice2-6<sup>se</sup> では野生型同様に孢子嚢の苞膜の外への露出を確認できた (図 31)。以上の結果から、MpSETA-MpICE2 ヘテロ二量体 (Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュール) がゼニゴケの蒴柄形成に重要な役割を担うことがわかった。

#### 2.4 MpICE1 および MpICE2 はシロイヌナズナでは機能しない

次に, MpICE2 が, *proAtMUTE:MpSETA* の導入による *mute-2* 変異体の気孔における表現型のレスキューをさらに促進できるかどうか検証した. *proAtMUTE:MpSETA mute-2* において MpICE2 を過剰発現させたが, 気孔形成は促進されなかった (図 32).

*pro35S:MpICE2 proAtMUTE:MpSETA mute-2* #8-4 (T<sub>1</sub>)では子葉1枚(背軸側)あたり 3.63±3.16 個の気孔, *pro35S:MpICE2 proAtMUTE:MpSETA mute-2* #10-11 (T<sub>1</sub>)では子葉1枚(背軸側)あたり 2.64±1.41 個の気孔が観察された (mean±s.d.; n = 11). また, 野生型および *mute-2* 変異体背景で MpICE2 を過剰発現させたときにも気孔細胞系列の形成に影響はなかった (図 32). さらに, MpICE1 または MpICE2 を AtICE1 プロモーター制御下で発現するコンストラクトを *ice1-2 scrm2-1* 二重変異体に導入した. T<sub>3</sub>まで世代を回して分離比を確認して導入した遺伝子を1遺伝子ホモにもつ系統を選抜し, T<sub>4</sub>の植物体を観察に用いた. MpICE1 を発現する *ice1-2 scrm2-1* 二重変異体

(*proAtICE1:MpICE1 ice1-2 scrm2-1*) および MpICE2 を発現する *ice1-2 scrm2-1* 二重変異体 (*proAtICE1:MpICE2 ice1-2 scrm2-1*) の本葉の表皮細胞を観察したが, 気孔系列細胞はできていなかった (図 33). これは, MpICE1 および MpICE2 が AtSPCH と協調してはたらくことができないためであると考えられる. 孔辺細胞で *erGFP* (小胞体に局在する GFP) を発現するエンハンサートラップライン E1728 株背景で, MpSETA と MpICE2 を同時に過剰発現させた. MpSETA, MpICE2 単独の過剰発現株も, MpSETA と MpICE2 を共発現させた株でも, 気孔形成および気孔パターン形成に異常は見られなかった (図 34). シロイヌナズナにおいて, AtFAMA-AtICE1 ヘテロ二量体はミロシン細胞という, アブラナ目特有の維管束沿いにある異形細胞の形成も制御することが先行研究により明らかとなっている (Shirakawa et al., 2014). E1728 株は気孔およびミロシン細胞で *erGFP* を発現する株である (Li and Sack, 2014). しかしながら, E1728 株背景で MpSETA, MpICE2 単独の過剰発現株も, MpSETA と MpICE2 を共発現させた株でもミロシン細胞のパターン形成に影響はなかった (図 35). 以上の結果から, IIIb bHLH 転写因子のアミノ酸配列は植物種間で高度に保存されているものの (図 25), ゼニゴケの IIIb bHLH 転写因子はシロイヌナズナでは機能しないことが明らかとなった.

## 2.5 ゼニゴケにおいて Ia bHLH および IIIb bHLH の ACT-like ドメインがタンパク質間相互作用に関与しない可能性

Ia bHLH 転写因子の C 末端側に存在する特有のドメインである SMF ドメインは, 構造的には ACT-like ドメインの一種である (Feller et al., 2006; Peterson et al., 2010; MacAlister and Bergmann, 2011). ACT ドメインは細菌の *aspartate kinase*, *chorismate mutase*, *TyrA*

で発見されたドメインで、アミノ酸生合成酵素に広く存在し、アロステリック制御を担う (Chipman and Shaanan, 2001) . 植物では、さまざまな bHLH 型転写因子において ACT-like ドメインがタンパク質相互作用に重要な役割を果たすことが示されている (Feller et al., 2006; Cui et al., 2016; Lu et al., 2020; Seo et al., 2022) . MpSETA および MpICE1, MpICE2 の SMF/ACT-like ドメインがタンパク質間相互作用に関与するかどうかを、Y2H 法により検証した. MpSETA, MpICE1 および MpICE2 の bHLH ドメイン, および MpSETA, MpICE1 および MpICE2 の SMF/ACT-like ドメインのみを保持するコンストラクトを作製し、アッセイに用いた. 実験の結果, MpSETA の bHLH ドメインと, MpSETA 自身, MpICE1 および MpICE2 の bHLH ドメインとの相互作用は検出されたのに対し, SMF/ACT-like ドメイン同士での相互作用は検出されなかった (図 36). 同様の実験をベンサミアナタバコ本葉を用いて BiFC 法で検証したが, いずれの組み合わせにおいても YFP 蛍光は観察されなかった. Co-IP, SMF/ACT-like ドメインのスワップ実験など, 他の手法を用いてさらに検証する必要があるが, MpSETA および MpICE2 の SMF/ACT-like ドメイン同士が直接相互作用しない可能性が示唆された.

### 3. セン類における気孔形成遺伝子の発現プロファイル

#### 3.1 ヒメツリガネゴケにおける気孔形成遺伝子の発現パターン解析

本研究により、タイ類において Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールが蒴柄の形成を制御することが明らかとなった。蒴柄はコケ植物特有の組織であり、セン類にも蒴柄という名前の孢子嚢を支持し細胞伸長する組織が存在するため、セン類およびタイ類からなる単系統のクレードは「Setaphyta」とよぶことが提唱されている (Ligrone et al., 2012; Haig, 2013; Puttick et al., 2018; Sousa et al., 2020)。したがって、セン類は気孔と蒴柄をとともにもつ唯一の植物群となる。Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールがセン類において気孔と蒴柄の形成を制御する可能性を考え、公開されているトランスクリプトームデータから、孢子体の発生ステージに応じた気孔形成関連遺伝子群の発現プロファイルを解析した。

モデルセン類であるヒメツリガネゴケにおいて、気孔および蒴柄はともに孢子体世代の組織である。ヒメツリガネゴケの孢子体は、大きく分けると足、蒴柄、孢子嚢からなる (図 37A)。孢子嚢内部には孢子嚢を物理的に支持するコルメラ (軸柱) とよばれる構造があり、孢子嚢の基部側はアポフィシス (apophysis) とよばれ、表皮に気孔を備えている。多くのセン類はアポフィシスのみに気孔をもつ。蒴柄はアポフィシスと接続している。セン類の孢子体の発生過程は、タイ類の孢子体の発生過程とは大きく異なっている (Ligrone et al., 2012)。セン類では孢子嚢が形成される前に蒴柄細胞が分裂および伸長し、孢子嚢原基を上を押し上げる。孢子嚢およびアポフィシスにある気孔はその後に成熟する。また、セン類の蒴柄は蒴柄分裂組織とよばれる一過的な介在分裂組織 (intercalary meristem, 分化した組織の間に存在する分裂組織) から生み出されるとされている。2016 年に Ortiz-Ramírez らによって、ヒメツリガネゴケ孢子体の発生ステージごとのトランスクリプトームデータ (microarray) が取得された (Ortiz-Ramírez et al., 2016)。孢子体ステージは 4 つに分けられている: (S1) 受精後 5–6 日目の孢子体 (孢子体の頂端細胞およびメロファイトが活性化し、蒴柄分裂組織が部分的に活性化している状態だと思われる), (S2) 受精後 9–11 日目の孢子体 (孢子体の頂端細胞が不活性化し、孢子嚢原基と気孔前駆細胞が形成され、蒴柄分裂組織が活性化している状態だと思われる), (S3) 受精後 18–20 日目の孢子体 (孢子体組織が分化し、蒴柄の分裂および伸長が停止し、孢子母細胞の減数分裂前後であると思われる), (S4) 受精後 28–30 日目の孢子体 (完全に成熟した孢子体)。発生ステージに関する明確な表記はなかったため、その他の先行研究から推定した (Coudert et al., 2019; Caine et al.,



2020). これら胞子体の4つのステージと6つの配偶体組織を含めた遺伝子発現プロファイルを解析対象とした。Ia bHLH 遺伝子, IIIb bHLH 遺伝子, 先行研究によりヒメツリガネゴケの気孔形成を制御することが知られている遺伝子を計5つ選抜した (*PpSMF1*, *PpSMF2*, *PpSCRM1*, *PpTMM*, *PpEPF1*) (Caine et al., 2016; Chater et al., 2016; Kirbis et al., 2020). 気孔形成特異的にはたらく *PpTMM* は S2 で一過的に発現上昇していた (図 37B). シロイヌナズナにおいて *AtTMM* は初期の気孔系列細胞 (メリステモイド, SLGC, MMC) で発現し, 機能する (Yang and Sack, 1995; Bhave et al., 2009). したがってヒメツリガネゴケにおいて気孔前駆細胞の形成が S2 で行われることを裏付けている. S1 ではまだ気孔系列細胞の分裂および分化は起こっていないと推測される. しかし, 気孔形成マスター制御因子をコードする *PpSMF1* はたしかに S2 で発現上昇するものの, *PpTMM* とは対照的に S1 ですでに発現が始まっていることが示唆された (図 37B). ここで2つの可能性を考えた: (1) 原表皮細胞で *PpSMF1* が先行して発現し, 気孔前駆細胞の形成を誘導している, (2) *PpSMF1* が気孔系列以外の組織 (蒴柄分裂組織など) で発現している. 仮説1については, *AtTMM* が発現する前の原表皮細胞において *AtSPCH* が発現し, メリステモイドにおいて *AtSPCH* が *AtTMM* の遺伝子発現を直接制御することが知られているため, 十分に考えられる可能性である (Lau et al., 2014; Horst et al., 2015). しかし, ヒメツリガネゴケの胞子体では蒴柄分裂組織の活性が持続しないため, 成熟した胞子体の蒴柄も非常に短い (図 37A). したがって, ヒメツリガネゴケでは気孔形成と蒴柄形成が同時期 (S1) に起こるため, 気孔形成と蒴柄形成における遺伝子発現パターンの切り分けができない. したがって, ヒメツリガネゴケ胞子体の遺伝子発現プロファイルの解析だけでは *PpSMF1* の役割は明らかにできなかった.

### 3.2 ヒョウタンゴケにおける気孔形成遺伝子の発現パターン解析

蒴柄が伸長するセン類のモデルとしてはヒメツリガネゴケの近縁種であるセン類ヒョウタンゴケ (*Funaria hygrometrica* Hedwig) がヨーロッパを中心に用いられ, 形態学的な観察が行われてきた (French and Paolillo, 1975; Reski and Abel, 1985; Budke et al., 2012; Liu et al., 2013; Medina et al., 2019). ヒョウタンゴケの胞子体は数 cm と長い蒴柄をもつ (図 38A). 2020 年, Kirbis らによってヒョウタンゴケのドラフトゲノムが解読され, 同時に胞子体の発生ステージごとのトランスクリプトームデータ (RNA-seq) が公開された (Kirbis et al., 2020). まず, ドラフトゲノムのデータから, ヒョウタンゴケにおける Ia bHLH 遺伝子および *TMM* 遺伝子のオルソログを同定した. ヒメツリガネゴケの *PpSMF1* に対応する遺伝子として *FhSMF1* (Fh\_20449), *PpSMF2* に対応する

遺伝子として *FhSMF2* (Fh\_20350), *PpTMM* に対応する遺伝子として *FhTMM* (Fh\_9808) が同定された。解析の結果, *FhSMF1* にはスプライシングバリエントが2つ存在することがわかった (図 38B)。 *FhSMF1.1* (Fh\_20449.1) と *FhSMF1.2* (Fh\_20449.2) では転写開始点が異なり, 5'UTR のスプライシングパターンが異なる。しかし, タンパク質をコードする領域は同じあることから, いずれのバリエントからも同じタンパク質が作られると考えられる。Kirbis らは胞子体のステージを以下の4つに分けて RNA-seq 解析を行っている: (1) 胞子体が配偶体組織から現れたステージ (蒴柄分裂組織の活性化), (2) 蒴柄の伸長が起こるステージ (蒴柄分裂組織の活性化, 胞子嚢は未分化), (3) 蒴柄の伸長が停止し, 胞子嚢の分化が開始するステージ, (4) 減数分裂前であるが全ての胞子体組織が分化したステージ。 *FhTMM* は stage 3 で高発現し, 胞子嚢が形成され始める時期と一致する (図 38C)。 *FhSMF1.2* が *FhTMM* と同様の発現パターンを示す一方で, *FhSMF1.1* は stage 1-2 ですでに *FhSMF1.2* と同程度発現していることが明らかとなった (図 38C)。 *FhSMF1* は発生ステージにより転写開始点が切り替わると考えられる (alternative promoter selection)。形態学的な気孔系列細胞は stage 3 で出現するので, 気孔が形成されるよりかなり以前から *SMF1* が発現していることになる。Stage 1 では気孔の前駆細胞であるアポフィシス領域の原表皮細胞もまだ形成されていないと考えられるため, *SMF1* 遺伝子が気孔系列以外の胞子体組織で発現し, 機能するという仮説2が支持される。ゆえに, セン類において Ia bHLH 転写因子が蒴柄形成にも関与する可能性が示唆された。今後の分子遺伝学的な解析等によりセン類における Ia bHLH 転写因子の機能が明らかになると期待される。

## 考察

本研究では、気孔のないタイ類ゼニゴケにおいて、気孔形成を制御する Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールが孢子体組織である蒴柄の形成を制御することを明らかにした。また、先行研究が皆無であった気孔と蒴柄の関係について明らかにした。これまでほとんど着目されていなかったコケ植物孢子体組織の形成機構の解析を中心として、植物の組織形成の進化および遺伝子発現制御メカニズムの進化にあらゆる角度から迫ることができると考えられる。

以下、本研究により得られた Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールによる陸上植物の組織形成と進化に関する知見を記す。

### 1. ゼニゴケにおける Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールの機能と蒴柄形成メカニズム

本研究により、ゼニゴケにおいて MpSETA (Ia bHLH 転写因子) および MpICE2 (IIIb bHLH 転写因子) が孢子体の蒴柄の形成に重要な役割を果たすことが示された (図 39)。タイ類以外の陸上植物において、subfamily Ia および IIIb に属する bHLH 型転写因子で構成される転写モジュールは、気孔発生の遺伝子発現制御ネットワークを駆動する (図 1) (Chater et al., 2016; Romani and Moreno, 2021; Han et al., 2021)。シロイヌナズナでは機能分化した 3 つの Ia bHLH 転写因子 (SPCH, MUTE, FAMA) がそれぞれ IIIb bHLH 転写因子 (ICE1/SCRM, SCRM2) とヘテロ二量体を形成して DNA に結合し、下流の遺伝子発現を調節する。一方で、ゼニゴケでは蒴柄前駆細胞から蒴柄母細胞への細胞分裂および細胞分化を Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールが直接もしくは間接的に制御することが示唆される。蒴柄系列細胞の細胞運命を決定する詳細な分子機構は未解明であるが、陸上植物において Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールが細胞分裂および細胞分化に機能する可能性が考えられる。

Mpseta<sup>ko</sup> 株および Mpice2<sup>se</sup> 変異体を用いた解析から、タイ類における蒴柄の形成メカニズムが明らかとなった。Mpseta<sup>ko</sup> 株および Mpice2<sup>se</sup> 変異体では正常な蒴柄は欠損するものの、孢子嚢と足との間には小さな細胞群が観察される (図 19,20,30)。蒴柄細胞は液胞化が進んだ伸長した細胞であるのに対し、これらの細胞はサイトゾルリッチな細胞群である。変異体で見られる小さな細胞群と同一の性質をもつものかどうかは不明だが、こうした小さい細胞群は野生型の足と蒴柄の間にも見られる (図 14)。この細胞群は、蒴柄細胞の伸長後 (stage IX-X) においても細胞伸長しないことから、蒴柄細胞とは異なる細胞種であると考えられる。このことから、足と蒴柄の間

にある小さな細胞群は一過的に蒴柄前駆細胞または蒴柄母細胞を生み出す介在分裂組織であるという仮説を提唱する (図 40)。セン類の孢子体では蒴柄分裂組織 (seta meristem) とよばれる一過的な介在分裂組織が存在し、この分裂組織から蒴柄細胞が生み出される (French and Paolillo, 1975; Sakakibara et al., 2008)。また、ツノゴケ類の孢子体の基部には介在分裂組織が存在し、この分裂組織から孢子嚢が作られる (Ligrone et al., 2012; Li et al., 2020; Frangedakis et al., 2021)。一方で、タイ類の孢子体にはこうした分裂組織の存在はこれまでに知られていない (Ligrone et al., 2012)。他の陸上植物の介在分裂組織では規則的かつ整然とした細胞列が形成されるため形態学的に容易に同定できるのに対し、タイ類の孢子体の細胞分裂は方向が不規則であるため、解剖学的な解析からでは分裂組織を同定できなかった可能性がある。タイ類で介在分裂組織が確認されれば、介在分裂組織がコケ植物の共有派生形質となり、これまでの仮説を覆す結果となる。シロイヌナズナの気孔形成時には、AtSPCH-AtICE1 が気孔幹細胞であるメリステモイドの細胞分裂および細胞分化を担っている。また、ヒメツリガネゴケの気孔形成において PpSMF1-PpSCRM1 が直接非対称分裂に関与するかどうかは依然として不明だが、形態観察からヒメツリガネゴケでは GMC が幹細胞様の特徴をもち、自己複製および非対称分裂することが示唆されている (Caine et al., 2020)。Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールが陸上植物において幹細胞の非対称分裂制御に関わる可能性が示唆される。したがって、ゼニゴケでも同様に MpSETA-MpICE2 が幹細胞様の細胞から異なる細胞の分裂と分化を担う可能性が考えられる。以上を踏まえて、MpSETA が発現することで蒴柄前駆細胞が孢子嚢方向に非対称分裂し、蒴柄母細胞が形成された後に蒴柄細胞へと成熟するというモデルを提示する (図 39)。Mpseta<sup>ko</sup> 株および Mpice2<sup>se</sup> 変異体では蒴柄前駆細胞から蒴柄母細胞への非対称分裂が起らないために蒴柄が形成されず、孢子嚢と足との間に蒴柄分裂組織もしくは細胞分化が異常になり活性を失った分裂組織様の組織が観察されると考えられる。ただし、蒴柄前駆細胞が幹細胞様の特徴をもつかどうかは不明である。GUS 染色を用いた発現パターン解析では MpSETA や MpICE2 を発現する細胞を詳細に観察することが困難である。Citrine ノックイン株 (MpSETA-Citrine<sup>ki</sup> 株や MpICE2-Citrine<sup>ki</sup> 株) や、MpSETA または MpICE2 と蛍光タンパク質との融合タンパク質をそれぞれの内生プロモーターで発現するコンストラクトを変異体に導入した形質転換体を作成し観察したが、蛍光が検出できなかった。したがって、現時点で孢子体で MpSETA および MpICE2 を発現する細胞の性質は不明であるが、ChIP-seq や DAP-seq (DNA affinity purification and sequencing) による MpSETA-MpICE2 の標的遺伝子探索、Mpseta 変異体における発現

変動遺伝子の同定などにより、詳細な蒴柄形成メカニズムの解明と本仮説の検証を行うことができると考えている。

MpSETA は受精後のみに発現する遺伝子である。接合子ゲノムからの遺伝子発現がオンになった後 (zygotic genome activation) に発現し始めるため、直接か間接かは不明だが MpKNOX および MpBELL の下流にある遺伝子である可能性もある (Hisanaga et al., 2021; Dierschke et al., 2021)。MpSETA の遺伝子発現を制御する上流因子を同定することで、蒴柄形成における遺伝子発現制御ネットワークを包括的に理解できると考えられる。また、MpSETA は配偶体組織ではエピジェネティック修飾により強い発現抑制を受けていると思われるが、孢子体組織でいつどのようにこうしたエピジェネティック修飾が解除される遺伝子発現が始まるか (もしくは遺伝子発現が始まりエピジェネティック修飾が解除されるか) についても興味を惹かれるところである。ゼニゴケを用いた研究で、抑制型ヒストン修飾の挙動が一部シロイヌナズナと異なることも報告されている (Montgomery et al., 2020)。今後の解析により、孢子体を含む組織特異的に発現する遺伝子のエピジェネティックな遺伝子発現制御メカニズムが明らかになると期待される。

タイ類には気孔は存在しないが、配偶体にはガス交換を行う相似器官である気室孔 (air pore) が存在し、Ia bHLH 転写因子が気室孔形成を担う可能性が指摘されていた (Chater et al., 2017)。しかしながら、Mpseta<sup>ko</sup> 株および Mpice2<sup>se</sup> 変異体の配偶体組織では顕著な発生異常は見られなかったため、気孔と気室孔の形成機構が異なっており、気室孔がタイ類において独立に獲得された組織であることが示唆された。ゼニゴケ綱 (Marchantiopsida) では気室や気室孔を備えた複雑葉状性 (complex thalloid) とよばれる体制をとる植物が多いのに対し、ウロコゴケ綱 (Jungermanniopsida) やコマチゴケ綱 (Haplomitriopsida) のタイ類は茎葉性もしくは組織分化が不明瞭な単純葉状性 (simple thalloid) をとるため、気室孔は特にゼニゴケ綱で気孔や蒴柄とは異なるメカニズムで獲得された組織かもしれない (Shaw et al., 2011)。

ゼニゴケは雌雄異株植物であるため、孢子体で変異体の表現型を観察するためには雌雄それぞれの変異体を作成し、それらを交配しなければならない。ゼニゴケのモデル生物としてのメリットの一つが一倍体優占の生活環をもつことであり、ノックアウトの表現型を当代で観察できることである。孢子体研究の場合、このメリットを生かすことができないため、研究の効率化のためには、CRISPR/Cas9 技術を応用した二倍体ノックアウト株作出を効率的に行う技術の確立 (e.g. 遺伝子ドライブ)、あるいは雌雄同株のタイ類のモデル化が必要になると考えている。雌雄同種のタイ類をモデル化するには、茎葉体タイ類かつ孢子体をよくつける種を選択することが望ましい。

## 2. 蒴柄の生理学的機能

気孔と蒴柄は、形態学的には全く異なる組織であるが、いずれも孢子嚢の裂開および孢子の散布を促進するという共通の生理学的機能をもっている。ゼニゴケの孢子嚢は蒴柄の伸長前はカリプトラ、偽花被、苞膜に囲われており、完全に密閉された状態になっている。蒴柄の伸長により孢子嚢が保護器官の外に押し出された後、乾燥によって蒴壁が裂開し、孢子嚢の中にある孢子が弾糸の乾湿運動によって散布される (Shimamura, 2016)。MpSETA または MpICE2 の欠損により蒴柄が形成されなくなると孢子嚢がカリプトラや偽花被の外に出られないため裂開せず、孢子の散布を行うことができなくなる (図 21,31)。セン類やツノゴケ類では孢子嚢の表皮にある気孔がガス交換を行い、能動的に孢子嚢の乾燥と裂開、それに伴う孢子の散布を促進している (Ligrone et al., 2012; Chater et al., 2017; Renzaglia et al., 2017; Duckett and Pressel, 2018; Renzaglia et al., 2020)。セン類ヒメツリガネゴケの Ia bHLH 転写因子をコードする PpSMF1 を欠損した変異体では気孔が形成されなくなり、それにより孢子嚢の裂開が遅延することが報告されている (Chater et al., 2016; Caine et al., 2020)。シロイヌナズナでは、AtICE1 が葯の表皮にある気孔 (葯孔) の形成を制御しており、葯孔が葯の乾燥と裂開、それに伴う花粉の散布を促すことが示されている (Wei et al., 2018)。Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールが、陸上植物において孢子嚢または葯の裂開を促す組織の形成に関わるという共通の生理現象を担うというのは非常に興味深い。

## 3. Ia bHLH 転写因子の機能と DNA 結合能

MpSETA はシロイヌナズナの *mute* 変異体および *fama* 変異体の表現型を部分的に相補できるので Ia bHLH 転写因子はゼニゴケとシロイヌナズナで似た性質をもつことが示唆される (図 9,10)。しかしながら、MpSETA は *spch* 変異体の表現型は相補しなかった (図 11)。ヒメツリガネゴケの PpSMF1 は、*mute* 変異体および *fama* 変異体の表現型を一部相補し、*spch* 変異体の表現型は相補できないため、祖先型の Ia bHLH 型転写因子が MUTE 様の機能と FAMA 様の機能をもっている可能性が示唆されている (MacAlister and Bergmann, 2011)。シロイヌナズナにおいて、*spch* 変異体背景に AtMUTE もしくは AtFAMA を発現させた場合、気孔系列細胞は一部形成されるようになるが成熟した気孔は形成されない (MacAlister et al., 2007)。PEST ドメインに置換を導入しタンパク質安定性が向上した AtSPCH を発現する *mute* 変異体は成熟した気孔を作り出す (Davies and Bergmann, 2014)。したがって、AtSPCH, AtMUTE, AtFAMA は

完全に機能分化しているわけではないと考えられる。シロイヌナズナにおいて Ia bHLH 転写因子の機能と DNA 結合能について興味深い研究例がある (Ohashi-Ito and Bergmann, 2006; Davies and Bergmann, 2014)。E-box への結合に重要とされるアミノ酸を置換した DNA に結合できない AtFAMA (AtFAMA<sup>PGG</sup>, ヒスチジン残基, グルタミン酸残基, アルギニン残基をそれぞれプロリン残基, グリシン残基, グリシン残基に置換した) を野生株背景で過剰発現させると, AtMUTE の過剰発現株と同様の表現型を示した。また AtFAMA<sup>PGG</sup> は *fama* 変異体の表現型を相補できない一方で, *mute* 変異体の表現型を相補でき, 気孔が形成される。同様に AtMUTE<sup>PGG</sup> を発現する *mute* 変異体では正常に気孔が形成される。AtSPCH<sup>PGG</sup> は *spch* 変異体で正常な気孔の形成を促進し, *mute* 変異体の表現型を相補し一部正常な気孔を形成させる。これらの変異導入によって転写因子が DNA への結合能を完全に失っているかどうかは検証が必要であるが, 以上の結果からは気孔系列細胞の運命決定の際に, AtSPCH および AtMUTE の DNA 結合は必要ないことが示唆される。逆に, AtFAMA は DNA 結合能が自身の機能に重要であることを示す。AtMUTE は ACT-like ドメインを介して AtICE1 または AtSCRM2 と強く相互作用するため (Seo et al., 2022), 孔辺母細胞形成時の遺伝子発現制御には AtICE1 または AtSCRM2 の DNA 結合が重要になると思われる。同様の理由でメリステモイド形成時にも AtICE1 または AtSCRM2 の DNA 結合活性が必要になると考えられる。MpSETA は *mute* 変異体だけでなく *fama* 変異体の表現型を相補するため, *in vivo* で DNA に結合して遺伝子発現を制御できると推察される。一方で, MpICE1 や MpICE2 は *ice1-2 scrm2-1* 二重変異体の表現型を相補しなかった (図 33)。立体構造やドメイン構造の違いにより AtSPCH と相互作用しないという可能性の他に, MpICE1 および MpICE2 が AtICE1 または AtSCRM2 とは異なる *cis* 配列に結合しているため気孔形成を誘導できなかった可能性も考えられる。AtSPCH や AtMUTE, AtFAMA が気孔形成時にゲノム上のどの領域に結合しているかを調べるための ChIP アッセイが行われているが, 検出された領域に直接結合しているかどうかは他の実験系を用いて注意深く判断する必要がある (Hachez et al., 2011; Lau et al., 2014; Han et al., 2018)。また, AtMUTE もしくは AtFAMA を Mpseta-1<sup>ko</sup> に導入しても萌柄細胞は形成されなかったことから, 被子植物の Ia bHLH 転写因子は気孔形成特異的に機能するようになっていると思われる (図 22)。祖先的な Ia bHLH 型転写因子が MUTE 様の機能をもっていた可能性は, 主にシロイヌナズナの *mute* 変異体を用いた遺伝学的相補実験により示唆されている。MUTE は DNA 結合能を失っても機能しうる特殊な bHLH 型転写因子である可能性もあるため, 祖先 Ia bHLH 分子種の機能についてはさらなる検証が必要であると考えられる。今後, MpSETA<sup>PGG</sup> の導入によって Mpseta<sup>ko</sup> 株の表現型が

レスキューされるかどうか調べることで、Ia bHLH 転写因子の DNA 結合能と機能の進化について、より詳細に議論できるようになると思われる。

#### 4. 陸上植物における Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールの進化

陸上植物における Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールの進化と転用について考察する

(図 41). まず、陸上植物の共通祖先において、気孔と subfamily Ia および IIIb に属する bHLH 型転写因子が獲得された。この時点で、Ia bHLH 転写因子と IIIb bHLH 転写因子からなる転写モジュールが獲得されたと考えている。次に、セン類とタイ類からなる単系統クレード「Setaphyta」の共通祖先で Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールの転用および蒴柄の獲得が起こった可能性が示唆される。その後、セン類とタイ類が分岐した後にタイ類の共通祖先で気孔が失われたと考えられる。Ia bHLH 転写因子の bHLH ドメインのアミノ酸配列多様化と、形態学的な気孔の喪失のどちらが先かは現時点では不明である。実際に、先行研究で、既存の遺伝子発現制御ネットワークの再利用および転用によって陸上植物が進化したことが示唆されている (Menand et al., 2007; Xu et al., 2014; Yamaoka et al., 2018; Tsuzuki et al., 2019; Yasui et al., 2019; Romani and Moreno, 2021)。根と仮根、腋芽と無性芽、木部と通水組織 (ハイドロイド, hydroid) など、似た役割を担う相似器官で転写因子モジュールの転用が起こったとする研究例が多いが、全く異なる組織形成または生理応答に転用された例も最近報告が増えつつある。被子植物の花器官のアイデンティティ決定に重要な役割を果たす LEAFY 転写因子は、ヒメツリガネゴケでは接合子の分裂に関与している (Tanahashi et al., 2005)。被子植物の LEAFY は細胞分裂には関与しないため、コケ植物の LEAFY とは異なった制御を行っている。同じく被子植物において花形成に重要な MIKC<sup>C</sup> 型 MADS-box 転写因子は、ヒメツリガネゴケでは茎葉体節間の細胞分裂と精子の運動能の発生を制御する (Koshimizu et al., 2018)。シロイヌナズナ (花器官) とヒメツリガネゴケ (茎葉体) の MIKC<sup>C</sup> 型 MADS-box 転写因子の下流遺伝子の共通性が調べられているが、発現変動する遺伝子のうち約 1-5% と割合は高くないものの一部が両者で MIKC<sup>C</sup> 型 MADS-box 転写因子による遺伝子発現制御を受ける可能性が示唆されている。被子植物の腋芽メリステムの形成を制御する植物特異的な GRAS family 転写因子 (シロイヌナズナの LAS, イネの MONOCULM1) 遺伝子のオルソログがヒメツリガネゴケでは中肋の組織であるステライド (steroid) およびハイドロイドの形成を制御する (Ge et al., 2022)。中肋は通水組織であるため、維管束との関連が疑われるが、AtLAS は維管束の発生を制御しない。しかし、同じく GRAS family に属する転写因子



である SCARECROW (SCR) や SHORTROOT (SHR) は維管束組織の発生を制御しており共通性は見られる。生理応答では、シロイヌナズナの光周性制御に関与する CONSTANS (CO) および NF-Ys (Nuclear Factor-Ys) が単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii* R.W.Hoshaw & H.Ettl) において光周性関連の応答だけでなく、光防御を制御することが報告されている (Serrano et al., 2009; Tokutsu et al., 2019)。CO や NF-Ys の、他の緑藻類や被子植物系統以外の陸上植物での機能が不明であるため深い議論はできないが、光防御と光周性において遺伝子発現制御ネットワークの共有が示唆される (Zobell et al., 2005; Romero-Campero et al., 2013)。Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールについても同様に、発現パターンの変化や遺伝子発現制御ネットワークの繋ぎ換え等により、全く異なる組織・細胞への転用と特殊化が起こったことが示唆される。

Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールは、アブラナ目の植物において、異形細胞であるミロシン細胞の形成に転用されている (Li and Sack, 2014; Shirakawa et al., 2014)。ミロシン細胞は植食者からの防御に関わるアブラナ目特有の維管束沿いにある異形細胞であり、気孔とは形態・機能ともに全く異なる組織であるため、気孔形成に使われていた AtFAMA-AtICE1 モジュールが転用されてミロシン細胞形成を制御するようになったと思われる。AtFAMA および AtICE1 が維管束の ground meristem で発現することがミロシン細胞の形成には重要であると考えられており、遺伝子発現パターンの変化も転用には重要であると思われる。気孔形成とミロシン細胞形成において AtFAMA-AtICE1 は異なる遺伝子の発現を制御する可能性が示唆されている (Shirakawa et al., 2022)。ゼニゴケの場合、ロイシンリッチ-リピート型受容体様遺伝子 *TMM* や分泌ペプチド遺伝子 *EPF1/2* など気孔形成関連因子をいくつか失っていることが明らかとなっている (Yang and Sack, 1995; Hara et al., 2007; Hara et al., 2009; Hunt and Gray, 2009; Abrash and Bergmann, 2010; Bowman et al., 2017; Li et al., 2020)。蒴柄形成と気孔形成のメカニズムは大きく異なっているかもしれないが、AtMUTE や AtSPCH, AtFAMA が直接遺伝子発現制御することが示唆される遺伝子群 (サイクリンなどの細胞周期関連遺伝子、ロイシンリッチ-リピート型受容体様キナーゼ遺伝子 *ERECTA*, グラスノステロイド関連遺伝子) はゼニゴケにも保存されている。MpSETA-MpICE2 の標的遺伝子とシロイヌナズナの Ia-IIIb bHLH の標的遺伝子の比較により、Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールによる遺伝子発現制御メカニズムの比較が可能になる。これに加え、ゼニゴケに保存されている気孔形成関連因子が蒴柄形成に関与するかどうかは蒴柄と気孔の形成メカニズムを知る上で今後重要になる。

タイ類ゼニゴケ亜綱（ゼニゴケ，ミカツキゼニゴケ）において *MpSETA* オルソログは保存されている（図 7,8）。それでは，長い蒴柄をもつゼニゴケ綱ウスバゼニゴケ目（Blasiales），ウロコゴケ綱やコマチゴケ綱の植物のゲノム上に，*SMF* 遺伝子もしくは *MpSETA* オルソログは保存されているのだろうか。1,000 plant transcriptomes（OneKP）（One Thousand Plant Transcriptomes Initiative, 2019）のデータベースに対し，*AtFAMA* をクエリとして BLAST 検索したがタイ類では *MpSETA* 以外はヒットしなかった（*LcSETA-like* も検出されなかった）。OneKP におけるタイ類のトランスクリプトームサンプルにはほとんど胞子体は含まれていないため，Ia bHLH のような胞子体特異的，もしくは一過的に発現する遺伝子は検出できないと思われる。トランスクリプトームデータから遺伝子の有無について議論するのは危険であるという点は他の研究でも指摘されている（Wickell et al., 2021）。今後の解析が待たれる。また，*MpICE1* と *MpICE2* 同様，*LcICE1* および *LcICE2* もゲノム上で隣接していたことから，少なくともゼニゴケ亜綱が分岐した三畳紀（約 2 億 5200 万年前から 2 億 100 万年前まで）にはすでに IIIb bHLH 遺伝子の重複は起こっていた可能性がある（Bowman et al., 2022）。いずれかが KiDoK モチーフを欠損しており，独立に機能分化が起こったことも考えられる。

タイ類ゼニゴケ目ウキゴケ科（Ricciaceae）に属する植物は胞子体に足および蒴柄をもっていない（図 42）。ウキゴケ（*Riccia fluitans* L.）について，造精器誘導はまだ成功していないものの，形質転換法は確立されており，イチョウウキゴケ（*Ricciocarpos natans* (L.) Corda）に関する解析も行われている（Althoff and Zachgo, 2020; Singh, 2022）。これらの植物に *SETA/SMF* が保存されているかどうか，保存されていた場合の機能については今後重要な鍵となるだろう。

## 5. セン類における Ia-IIIb bHLH 転写因子モジュールと蒴柄形成との関係

蒴柄はコケ植物であるタイ類とセン類のみがもつ組織である。気孔と蒴柄を両方もつのはセン類だけであるため，セン類の Ia bHLH 転写因子が気孔形成と蒴柄形成を同時に制御する可能性が考えられる。セン類ヒメツリガネゴケの *ppsmf1* 変異体では気孔が形成されなくなるが，胞子体特異的に発現する *ppsmf2* 変異体では表現型は報告されていない（Chater et al., 2016）。ヒメツリガネゴケの *ppsmf1 ppsmf2* 二重変異体における胞子体の表現型観察により，セン類において Ia bHLH 転写因子が蒴柄形成に関与するかどうかを調べられると期待される。

セン類にも気孔または蒴柄を欠損した系統が存在する (図 42) (Shimamura, 2016; Liu et al., 2019; Renzaglia et al., 2020) . セン類の基部系統の多くは気孔をもっていないことがわかっている. セン類ではミズゴケ綱 (Sphagnopsida) およびクロゴケ綱 (Andreaeopsida) に属する植物は気孔と蒴柄を両方もたないが, 配偶体由来の組織 (偽足, pseudopodium) が蒴柄のように伸長して孢子嚢が押し上げられる. ミズゴケ綱の植物 *Sphagnum fallax* のドラフトゲノムからは Ia bHLH 様の bHLH 型転写因子として Sphfalx0023s0041 が同定されている (SMF 遺伝子は喪失している) が, MpSETA よりも配列が多様化しており, 機能しているかどうかは不明である (Chater et al., 2017). ミズゴケ綱の孢子嚢には偽孔 (pseudostomata) とよばれる構造が見られるが, 気孔との相同性については議論の余地がある (Merced and Renzaglia, 2017). また, イシヅチゴケ綱唯一の種であるイシヅチゴケ (*Oedipodium griffithianum* (Dicks.) Schwägr) の蒴柄様組織では例外的に多数の気孔が観察される (Shimamura and Deguchi, 2009; Merced and Renzaglia, 2013). 解剖学的な研究から, この組織が蒴柄ではなくアポフィシス由来の組織である可能性が考えられており, 偽蒴柄 (pseudoseta) という名前がつけられている. また, ゼニゴケ亜綱の蒴柄はコマチゴケ綱やウロコゴケ綱の蒴柄と比較すると短く, ジンガサゴケ (*Reboulia hemisphaerica* subsp. *orientalis* R.M.Schust.) のようにほぼ伸長しない種もあるが, 代わりに雌器托を発達させて造卵器ごと上に持ち上げている (図 43). このように, 蒴柄以外で孢子嚢を上を押し上げるための器官はセン類およびタイ類で複数回独立に獲得されていると考えられ, 孢子散布のために孢子嚢を持ち上げることの生理・生態学的な重要性を裏付けている. こうした様々な特徴をもつコケ植物のゲノムが明らかになることで, Ia bHLH 転写因子の配列の多様化と喪失, 蒴柄・気孔の関係を考察することが可能であると考えられる.

ヒメツリガネゴケを用いた研究から, 蒴柄形成を制御する遺伝子が報告されている. TALE 型ホメオドメイン転写因子をコードする *Class I KNOX* (*KNOX1*) 遺伝子は蒴柄分裂組織で発現し, *KNOX1* を欠損した変異体では蒴柄の形成が異常になる (Sakakibara et al., 2008). *KNOX1* の過剰発現では蒴柄が少し長くなることから (Coudert et al., 2019), *KNOX1* は蒴柄分裂組織ではたらく重要な因子だと考えられる. ゼニゴケにおいて *Mpknox1* 変異体は胚発生の異常を示す (Hisanaga et al., 2021; Dierschke et al., 2021). しかし, *Mpknox1* 変異体においても一部孢子体形成されるようであるため, *Mpknox1* 変異体を用いて *MpKNOX1* が蒴柄形成に関与するか調べるのが可能かもしれない (Hisanaga et al., 2021). しかし, ツノゴケ類 *Anthoceros agrestis* Paton では *KNOX1* は失われているため, *KNOX1* はコケ植物で共通して孢子体の介在分裂組織の制御を行なっているわけではない可能性もある (Li et al., 2020). ヒメツリガネゴケに

においてサイトカイニンが蒴柄伸長を制御することも報告されているが、統計解析に問題があるためデータの解釈については注意が必要である (Coudert et al., 2019).

*ANGUSTIFOLIA* (*AN*) のオルソログが蒴柄の伸長もしくは細胞分裂を制御することが報告されているが、若い孢子体での発現パターン、*ppan* 変異体における蒴柄付近の組織構造が論文からは読み取れないため、詳細な解析が待たれる (Hashida et al., 2019).

また、ごく最近、オーキシン輸送担体をコードする *PpPINC* が蒴柄分裂組織に発現し、*pinC* 変異体で蒴柄が野生型より伸長する可能性が示唆された (Lüth et al., 2023). *PpPINC* の孢子体における詳細な機能は不明ではあるものの、コケ植物の蒴柄伸長がオーキシンによって制御されるという生理学的な実験とは対照的な結果であり、興味深い (Thomas, 1980; Cecchetti et al., 2008).

蒴柄はセン類とタイ類がもつとされているが、細胞の特徴や成り立ちは大きく異なる。セン類の蒴柄は蒴柄分裂組織（一過的な介在分裂組織）から作られる。セン類の蒴柄は丈夫で乾燥にも強く、孢子囊の裂開後も数ヶ月程度は残っている。一方、タイ類の蒴柄は胚発生初期の formative cell division により形成されるとされている。蒴柄細胞は葉緑体を分化しない柔組織様の細胞で、細胞伸長後すぐに乾燥して枯死する (図 5)。細胞の特徴と形成機構の相違にも関わらず、蒴柄という共通した名前がついているのは、孢子囊を支持する役割をもつ組織という大まかな共通認識だけがあり、これまであまり注目されてこなかったことの一つの表れであると考えられる。セン類のモデルとして一般的に利用されているヒメツリガネゴケの蒴柄は非常に短く、蒴柄細胞の定義、組織の境界、発生メカニズムは曖昧である。蒴柄の研究のためにはヒメツリガネゴケ近縁種で長い蒴柄をもつヒョウタンゴケ、アゼゴケ (*Physcomitrium sphaericum* (Ludw.) Furnr.), コツリガネゴケ (*Physcomitrium japonicum* (Hedw.) Mitt.) を用いるのが良いと思われる。セン類の蒴柄とタイ類の蒴柄が異なる起源の組織であるという可能性も視野に入れつつ、進化発生学的な研究を進めるべきである。

## 材料と方法

### 1. アラインメントおよび分子系統解析

bHLH 転写因子は先行研究に基づいて分類された (Pires and Dolan, 2010a). subfamily Ia および subfamily IIIb に属する bHLH 型転写因子のアミノ酸配列を得るために BLAST を用いて類似性検索をした [MarpolBase (<http://marchantia.info>), Phytozome v.13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), OneKP (<https://db.cngb.org/onekp/>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=PRJNA701193>) ]. Query には AtFAMA (Ia bHLH) および AtICE1 (IIIb bHLH) を用いた. 得られたアミノ酸配列データを, GenomeNet (<https://www.genome.jp/>) で公開されている多重整列プログラム MAFFT ver.6.864 (Kato and Toh, 2008) を用いてデフォルトのパラメーターでアラインメントを行った. 系統解析には, bHLH ドメインと SMF/ACT-like ドメインを使用した. 保存されていない領域のアラインメントギャップはマニュアルで除去した. 次に, アミノ酸配列のアラインメント結果を Jalview v.2.11.2.1 (Waterhouse et al., 2009) を用いて可視化した. bHLH ドメインの DNA 結合に重要なアミノ酸残基および二量体化に重要なアミノ酸残基の予測には NCBI の BLAST 検索を利用した (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ia bHLH は JTT+G+I モデル, IIIb bHLH は LG+G+I モデルに基づき, MEGA 7.0.26 (Kumar et al., 2016) を用いて最尤法 (Felsenstein, 1981) で系統樹を作成した. 設定は以下の通りである. Branch Support: Bootstrap (Felsenstein, 1985), Number of Bootstraps: 1000 replicates, Gaps/Missing Data Treatment: Use All Sites, ML Heuristic Method: Nearest-Neighbor-Interchange. Ia bHLH の外群として subfamily Ib(1), subfamily II および subfamily III(a+c)を用い, IIIb bHLH の外群として subfamily III(a+c)および subfamily III(d+e)を用いた. 単純化のために, 外群にはシロイヌナズナおよびゼニゴケの bHLH 型転写因子のアミノ酸配列を用いた.

### 2. 植物供試材料と育成条件

ゼニゴケの雄の野生型として Takaragaike-1 (Tak-1) アクセションを, 雌の野生型として Tak-2 アクセションまたは Tak-1 と 3 回戻し交配をして得られた BC3-38 株を用いた. ゼニゴケの培養は特に記載のない場合, sucrose (終濃度 1% [w/v]), MES-KOH [pH 5.7] (終濃度 0.05% [v/v]) を含む 1/2 B5 培地 (寒天 1% [w/v]) で育成した. 葉状体, 孢子発芽体, 無性芽発芽体の培養は, 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、 $22^{\circ}\text{C} \cdot 50\text{--}60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の連続明条件下で行った。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), 白色蛍光灯および遠赤色 LED (ナモト IR LED STICK 18W) を用いて、白色光  $50\text{--}60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 遠赤色光  $50\text{--}70 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  となるよう調整し、 $18^{\circ}\text{C} \cdot 16$  時間明期 8 時間暗期の長日条件下で培養した。

シロイヌナズナの野生型として Columbia-0 (Col-0) アクセッションを用いた。ただし、*mute-2* の解析の際には Wassilewskija-4 (Ws-4) アクセッションを用いた。シロイヌナズナは特に記載のない限り、以下の条件で生育した。固形培地は 1/2 MS 培地用混合塩類, sucrose (終濃度 1% [w/v]) と MES-KOH [pH 5.7] (終濃度 0.05% [v/v]), Gellan Gum (終濃度 0.5% [w/v]) を混合して調整した。種子は 70% EtOH で滅菌した後、99%エタノールで脱水・乾燥させ、クリーンベンチ内で無菌的に固形培地上に播種した。固形培地に播種した植物体は  $22^{\circ}\text{C} \cdot 50\text{--}60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の連続明条件下で育成した。育成にはゼニゴケ葉状体培養時と同じ人工気象器および白色蛍光灯を使用した。成長した植物体はバーミキュライト (ニッタイ株式会社 GS) を入れたプラントポットに移植した後、 $22^{\circ}\text{C} \cdot 16$  時間明期 8 時間暗期の長日条件下で育成した。

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、4 週間、 $22^{\circ}\text{C} \cdot 50\text{--}60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} \cdot 16$  時間明期 8 時間暗期の長日条件下で育成した。

ヒメツリガネゴケの野生型として Gransden アクセッションを用いた。オートクレーブ滅菌した Jiffy-7 Peat Pallet (Jiffy) に茎葉体を植え継ぎ、 $15^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{--}40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} \cdot 8$  時間明期 16 時間暗期の短日条件下で栽培して胞子体を誘導した。

ヒョウタンゴケおよびジンガサゴケの胞子体は、2021 年 3 月 31 日に京都大学理学研究科植物園内 (北緯 35.030835 東経 135.786286) で採取された。

### 3. タンパク質の構造予測

InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), NCBI BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用してタンパク質のドメイン構造を予測した。天然変性領域の予測には IUPred3 (<https://iupred3.elte.hu>) を用いた (Erdos et al., 2021)。立体構造は Uniprot (<https://www.uniprot.org>) にアップロードされた、AlphaFold2 (Jumper et al., 2021; Tunyasuvunakool et al., 2021) によって予測されたものである (MpSETA: A0A2R6X7M8・A0A2R6X7M8\_MARPO, MpICE1: A0A2R6W5A1・A0A2R6W5A1\_MARPO, MpICE2: A0A2R6W565・A0A2R6W565\_MARPO)。

#### 4. プラスミドコンストラクト

本研究で作製したプラスミドコンストラクトと使用したプライマーを表1に示す。詳細なコンストラクションは各項で記す。融合遺伝子を発現するプラスミドの構築には、Gateway System (Invitrogen) を用いた。クローニングのための PCR には PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara Bio) もしくは PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio) を用いて添付のプロトコール通りに行った。目的の領域を増幅した PCR 産物を MagExtractor (TOYOBO) により精製し、制限酵素で切断したエントリークローン pENTR1A (Invitrogen) へ In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を利用して 50°C・15 min インキュベートで導入した後、大腸菌 (DH5α コンピテントセル) 内で増幅した。Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Invitrogen) を用いた LR 反応 (室温・overnight) により目的の DNA 領域をエントリークローンからデスティネーションベクターに移すことで、目的の融合遺伝子を発現するプラスミド (融合コンストラクト) を完成させた。ゼニゴケ用デスティネーションベクター pMpGWB シリーズは河内孝之教授 (京都大学大学院生命科学研究科) および西浜竜一教授 (東京理科大学) から、シロイヌナズナ用デスティネーションベクターは中川強教授 (島根大学) および真野昌二准教授 (基礎生物学研究所) から供与いただいたものである (Nakagawa et al., 2007; Hino et al., 2011; Ishizaki et al., 2015; Yamaoka et al., 2018) .

#### 5. 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全てエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株, GV2260 株, EHA101 株) に導入した。エレクトロポレーションには MicroPulser (BIO-RAD) を用いた。

#### 6. シロイヌナズナ形質転換体の作出

シロイヌナズナの形質転換は floral-dip 法 (Clough and Bent, 1998) に基づいて行われた。T-DNA 挿入変異体 *spch-3* (SAIL\_36\_B06) および *fama-1* (SALK\_100073) は Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), *mute-2* (FLAG\_225D03) は French National Institute for Agricultural Research (INRA) より分与された。*ice1-2 scrm2-1* 二重変異体は鳥居啓子教授 (テキサス大学オースティン校) から分与された。

##### 6.1 *proAtSPCH:MpSETA spch-3*

*AtSPCH* のプロモーター領域 (翻訳開始点の上流 2,572 bp) を Col-0 の gDNA から、*MpSETA* の CDS を Tak-1 雄器床由来の cDNA から PCR により増幅した。これ

ら DNA 断片を overlap extension PCR により繋ぎ、得られた PCR フラグメントを pENTR1A の SalI/EcoRV サイトにサブクローニングし、LR 反応により pGWB501 (Nakagawa et al., 2007) ヘクローニングした。pGWB501<sub>proAtSPCH:MpSETA</sub> を *spch-3+/-* に導入し、分離比を確認後、T-DNA を 1 コピーもつラインを選抜した。*spch-3* 変異をヘテロで維持し、T<sub>4</sub> 世代を観察するときにホモ変異体を選抜した。

## 6.2 ***proAtMUTE:MpSETA mute-2* または *proAtFAMA:MpSETA fama-1***

白川一助教（奈良先端科学技術大学院大学）により、*AtMUTE* のプロモーター領域（翻訳開始点の上流 1,930 bp）および *AtFAMA* のプロモーター領域（翻訳開始点の上流 3,105 bp）が Col-0 の gDNA から増幅され、pENTR5'/TOPO にサブクローニングされた。これらはそれぞれ pENTR1A<sub>MpSETA\_CDS</sub> とともに LR 反応によって R4pGWB501 もしくは R4pGWB601 (Nakamura et al., 2010) にクローニングされた。R4pGWB501<sub>proAtMUTE\_MpSETA</sub> と R4pGWB601<sub>proAtFAMA\_MpSETA</sub> をそれぞれ *mute-2+/-* および *fama-1+/-* に導入し、分離比を確認後、T-DNA を 1 コピーもつラインを選抜した。*mute-2* 変異および *fama-1* 変異をヘテロで維持し、T<sub>4</sub> 世代を観察するときにホモ変異体を選抜した。

## 6.3 ***proAtICE1:MpICE1 ice1-2 scrm2-1* または *proAtICE1:MpICE2 ice1-2 scrm2-1***

*AtICE1* のプロモーター領域（翻訳開始点の上流 2,578 bp）を Col-0 の gDNA から、*MpICE1* または *MpICE2* の CDS を Tak-1 葉状体由来の cDNA から PCR により増幅した。これら DNA 断片を overlap extension PCR により繋ぎ、得られた PCR フラグメントを pENTR1A の SalI/EcoRI サイトにサブクローニングし、LR 反応により pGWB501 ヘクローニングした。pGWB501<sub>proAtICE1:MpICE1</sub> または pGWB501<sub>proAtICE1:MpICE2</sub> を *ice1-2+/- scrm2-1-/-* に導入し、分離比を確認後、T-DNA を 1 コピーもつラインを選抜した。*ice1-2* 変異をヘテロで維持し、T<sub>4</sub> 世代を観察するときにホモ変異体を選抜した。

## 6.4 ***pro35S:MpICE2 proAtMUTE:MpSETA mute-2***

*MpICE2* の CDS を LR 反応により pFAST-R02 (Shimada et al., 2010) にクローニングした。これを Ws-4, *mute-2+/-*, *proAtMUTE:MpSETA mute-2+/-* (#8-4 および #10-11)。TagRFP 蛍光を確認できる T<sub>1</sub> 種子を選抜し、選抜マーカーを入れていない培地で生育させ、*mute-2* ホモ変異体を観察に用いた。



## 6.5 E1728 株における MpSETA または MpICE2 の過剰発現

MpSETA もしくは MpICE2 の CDS を LR 反応によりそれぞれ pGWB502 $\Omega$  もしくは pGWB602 $\Omega$  (Nakagawa et al., 2007) にクローニングした。エンハンサートラップライン E1728 株 (Gardner et al., 2009) に導入し、分離比を確認後、T-DNA を 1 コピーもつラインを選抜した。MpSETA と MpICE2 を共発現させるために、MpSETA 過剰発現株の#3-2 と#6-11 を、それぞれ MpICE2 過剰発現株の#6-11 と#7-1 を交配し、得られた F<sub>1</sub> を観察に用いた。F<sub>1</sub> で遺伝子発現がサイレンシングされていないことを RT-PCR により確認している (図 34B)。

## 7. ゲノム DNA の抽出

ゼニゴケ葉状体片もしくはシロイヌナズナ本葉片を DNA Extraction Buffer (200 mM Tris-HCl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% [w/v] SDS) とジルコニアビーズが入ったチューブに入れ破碎した。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り DNA を精製した。DNA の溶出液として TE (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA) を用いた。

## 8. 公開 RNA-seq データの解析

公開されている RNA-seq のリードデータを Sequence Read Archive (SRA) もしくは DDBJ Sequence Read Archive (DRA) レポジトリからダウンロードした。ゼニゴケの各組織の遺伝子発現プロファイリングに用いたアクセッションナンバーは以下の通りである：胞子発芽体 (SRR4450254, SRR4450255, SRR4450256) (Bowman et al., 2017), 雄葉状体 (DRR118949, DRR118950, DRR118951) (Yamaoka et al., 2018), 雌葉状体 (DRR118943, DRR118944, DRR118945) (Yamaoka et al., 2018), 雄器床 (DRR050346, DRR050347, DRR050348) (Higo et al., 2016), 雌器床 (DRR050351, DRR050352, DRR050353) (Higo et al., 2016), 造精器 (DRR050349, DRR050350) (Higo et al., 2016), 造卵器 (DRR209029, DRR209030, DRR209031, DRR209031) (Hisanaga et al., 2021), 受精後 13 日目の胞子体 (SRR1553297, SRR1553298, SRR1553299) (Frank and Scanlon, 2015), 成熟した胞子体 (SRR896223) (Bowman et al., 2017). MpE(z) の発現抑制株 (*proEF1:XVE>>amiR-MpE(z)<sup>SkMIR166</sup>*) の 10 日目の無性芽発芽体の  $\beta$ -estradiol 添加処理後 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h または  $\beta$ -estradiol 添加前のトランスクリプトームデータ (Dierschke et al., 2020) についてのアクセッションナンバーは次の通りである：mock 処理 (SRR11452627), 3 h (SRR11452623), 6 h (SRR11452625), 9 h (SRR11452626),

24 h (SRR11452622), 48 h (SRR11452624). また, *Mpmet* 変異体のトランスクリプトームデータ (Ikeda et al., 2018) についてのアクセッションナンバーは次の通りである: 野生型 (*Mpmet-3* のコントロール) (DRR172356, DRR172357, DRR172358), *Mpmet-3* (DRR172359, DRR172360, DRR172361), 野生型 (*Mpmet-4* のコントロール) (DRR172362, DRR172364), *Mpmet-4* (DRR172363, DRR172365). RNA-seq データから low-quality リードおよびアダプター配列の除去等を fastp v.0.20.0 (Chen et al., 2018) を使ってプロセッシングした. フィルターされたリードをゼニゴケゲノム (*M. polymorpha* genome v.6.1) に STAR v.2.7.8a (Dobin et al., 2013) を用いてデフォルトパラメーターでマッピングした. 得られた SAM/BAM ファイルを SAMtools v.1.11 (Li et al., 2009) を用いてプロセッシングした. 遺伝子発現量 (TPM) を算出するために, RSEM v.1.3.0 (Li and Dewey, 2011) を用いた.

ヒョウタンゴケにおける各組織の遺伝子発現プロファイリング (Kirbis et al., 2020) に用いたアクセッションナンバーは以下の通りである: 胞子発芽体 (ERR3958978, ERR3958996), 原糸体 (ERR3958997, ERR3958998), 若い茎葉体 (ERR3958999, ERR3959000), stage 1 の胞子体 (ERR3958969, ERR3958970, ERR3958971), stage 2 の胞子体 (ERR3958972, ERR3958973, ERR3958974), stage 3 の胞子体 (ERR3958975, ERR3958976, ERR3958977) stage 4 の胞子体 (ERR3958993, ERR3958994, ERR3958995). リードデータを fastp v.0.20.0 を用いてプロセッシングした後, フィルターされたリードを HISAT2 v.2.2.1 (Kim et al., 2019) を用いてヒョウタンゴケドラフトゲノムにマッピングした. SAMtools v.1.11 を用いて bam ファイルをプロセッシングした後, StringTie v.2.2.1 (Pertea et al., 2015) を用いて遺伝子発現量 (TPM) を推定した. プロットは Microsoft Office Excel for Mac (Microsoft) および Rstudio v.1.4.1106 (<https://www.rstudio.com/>) を利用して作成した. ヒョウタンゴケにおけるオルソログの同定は, ヒメツリガネゴケのアミノ酸配列をクエリとし, ローカル BLAST で同定した.

## 9. 組織切片作製

植物体を前固定液 (2% [w/v] paraformaldehyde, 2% [v/v] glutaraldehyde, 0.05 M cacodylic acid [pH 7.4]) に入れて脱気した後, 室温で 2 h 静置した. 固定した植物体を 0.05 M cacodylic acid で 3 回すすぎ, 固定液を除いた. さらに後固定液 (2% [v/v] osmium tetroxide, 0.1 M cacodylic acid) に入れ, 室温で 2 h 静置し固定した. サンプルを sucrose 入り 0.05 M cacodylic acid ですすぎ, 回転しながら一晩インキュベートした. EtOH シリーズ (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%), acetone と EtOH の

混合物, 100% acetone で各 30 min 以上, 回転しながらインキュベートし, 脱水した. Spurr 樹脂 (ERL 4.1 g, DER 1.43 g, NSA 5.9 g, DMAE 0.11 mL) の濃度を 4 日間かけて徐々に上げ (1% [overnight], 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12.5% [overnight], 25%, 50% [overnight], 75% [overnight]), 最後に 100% Spurr 樹脂に置換し回転しながら一晩インキュベートした. 置換したサンプルを包埋板に入れ, 60°C で 3 日間重合させた. ウルトラミクロトーム (Leica Ultra Cut UCT) を用いてガラスナイフ (Leica) で 0.75–1  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作製した. 切片はホウ砂を含む toluidine blue O 液で染色した.

## 10. ゼニゴケの形質転換

### 10.1 葉状体を用いた切断面法による形質転換

基本的なプロトコールは Kubota et al. (2013) に基づく.

形質転換に供するゼニゴケは, 1/2 B5 培地 (寒天 1% [w/v]) 上にて Tak-1 または Tak-2 の無性芽を 22°C・連続明条件下で 2 週間培養し, メリステムを含む先端部を切除した基部側断片を, sucrose (終濃度 1% [w/v]), MES-KOH [pH 5.7] (終濃度 0.05% [v/v]) を含む 1/2 B5 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. 2 日間 28°C・180 rpm で前培養したアグロバクテリウム懸濁液 5 mL のうち 1 mL を新たな 4 mL の acetosyringone (終濃度 0.1 mM), 抗生物質適量を含む LB 液体培地と混合して 28°C・6 h 培養した. この液のうちの 0.1 mL とゼニゴケ断片と acetosyringone (終濃度 0.1 mM) を 50 mL の 0M51C 液体培地に混合して 22°C・16 時間明期 8 時間暗期の長日条件下で 3 日間共培養した. 共培養後のゼニゴケ断片は約 30 mL の滅菌水で 30 s ボルテックスを 3 回以上行って洗浄し, cefotaxime (終濃度 1 mg/mL) を含む滅菌水で 15 min 静置したものを選抜培地上で培養した. 選抜培地で再生した個体を T<sub>1</sub> 個体とした.

### 10.2 AgarTrap 法による形質転換

基本的なプロトコールは G-AgarTrap 法 (Tsuboyama et al., 2018) に基づく.

プラスミドを保持する形質転換アグロバクテリウム株を, 抗生物質適量を含む固形 LB 培地 (寒天 1.5% [w/v]) に塗布し, 2 日間 28°C の暗所で培養した.

ゼニゴケの前培養には, 60 mm シャーレ上に作製した sucrose (終濃度 1% [w/v]), MES-KOH [pH 5.7] (終濃度 0.05% [v/v]) を含む 1/2 B5 培地 (寒天 1% [w/v]) を用いた. 100–200  $\mu\text{L}$  の滅菌水を培地に垂らした後, 無性芽を 30–50 個滅菌水の上に播き, シャーレを揺らすことで培地全体に均一に広げた. シャーレをサージカルテープで巻き, 22°C 連続明条件下 2 日間培養した. LB 培地で培養し

たアグロバクテリウムをコンラージ棒でかきとり、形質転換バッファー（10 mM MES-KOH [pH 5.7], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 μM acetosyringone）に濃度が OD<sub>600</sub> = 0.1 となるように懸濁し、アグロバクテリウム懸濁バッファーを作製した。シャーレ 1 枚に対してアグロバクテリウム懸濁バッファーを 1 mL かけ、全ての無性芽が浸るようにした。1 min 静置の後、余分なアグロバクテリウム懸濁バッファーを除去し、パラフィルムでシャーレを巻き、22°C・暗所（アルミホイルで遮光した）で 3 日間共培養した。共培養後、シャーレに滅菌水を加えてアグロバクテリウムをすすぎ、完全に除去した。選抜バッファー（100 μg/mL cefotaxime、終濃度の 10 倍の濃度の抗生物質）1 mL を加えシャーレをサージカルテープで巻き、22°C・連続明条件下で 2–3 週間培養した。再生した個体をピンセットで 90 mm シャーレ上に作製した選抜培地に移し替え、生き残った個体を T<sub>1</sub> 個体とした。

### 10.3 孢子発芽体を用いた形質転換

基本的なプロトコールは Ishizaki et al. (2008) に基づく。

Tak-1 と Tak-2 を掛け合わせて得られた孢子囊 5 つあたり、500 μL の滅菌水を加え懸濁した後、苞膜を除いた。2×滅菌液（0.4% NaClO [原液を 100% とした]、0.1% Triton X-100）を等量加えて懸濁した後、90 s 静置した。13,000 rpm で 1 min 遠心してすぐに上清を除き、1 mL の滅菌水で懸濁した。孢子懸濁液 200 μL を 0M51C 液体培地 50 mL に加え、22°C・130 rpm・連続明条件下で 5 日間浸透培養した。これに終濃度 0.1 mM となるように acetosyringone を加えた後、28°C・180 rpm で 2 日間前培養したアグロバクテリウム懸濁液を 500–700 μL 加え、22°C・130 rpm・連続明条件下で 2 日間、連続明条件下で共培養した。共培養後、ゼニゴケを 100 μm セルストレーナー（Falcon）で回収し、滅菌水で数回すすぎ、できるだけアグロバクテリウムを除いた。選抜培地の上に cefotaxime 入りの滅菌水を垂らし、その上にゼニゴケを広げた後、培地を乾燥させてサージカルテープを巻き、22°C・連続明条件下で 2 週間程度インキュベートした。再生した個体をピンセットで 90 mm シャーレ上に作製した選抜培地に移し替え、生き残った個体を T<sub>1</sub> 個体とした。

## 11. GUS 染色

*proMpSETA::GUS* のコンストラクトは、*MpSETA* プロモーター（翻訳開始点の上流 4,194 bp）を Tak-1 の gDNA から増幅し、pENTR1A の EcoRI/EcoRI サイトにサブクローニングした後、LR 反応による pMpGWB104 (Ishizaki et al., 2015) へのクローニングによっ

て作製した。 *pro*MpICE2:Citrine-GUS-NLS のコンストラクトは、 MpICE2 プロモーター（翻訳開始点の上流 3,060 bp）を Tak-1 の gDNA から、 Citrine を pMpGWB107 (Ishizaki et al., 2015) から、 GUS-NLS を pPZP211\_35S-NG-GUS-NLS-nosT (Matsushita et al., 2003) から増幅し、 overlap extension PCR によって繋げて得られた PCR 産物を pENTR1A の Sall/EcoRV サイトにサブクローニングし、 LR 反応による pMpGWB104 へのクローニングによって作製した。 これらを切断面法もしくは AgarTrap 法により Tak-1 に導入し、 Tak-2 または BC3-38 と交配して得られた F<sub>1</sub> から雌株を確立した。 胞子体の GUS 染色には、 形質転換体同士を交配して得られた F<sub>1</sub> 胞子体を使用した。

*pro*MpCYCB;1:Dbox-GUS のコンストラクトは、 西浜竜一教授（東京理科大学）から分与された pENTR1A-MpCYCB;1*pro*-MpCYCB;1(Dbox-NLS) (Hernández-García et al., 2021) を用い、 LR 反応によって pMpGWB104 にクローニングした。 AgarTrap 法により BC3-38 に導入した。 植物体を GUS 染色液（10 mM EDTA [pH 8.0], 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.0], 0.1% Triton X-100, 0.5 mg/mL X-Gluc, 1 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 1 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) に浸した状態で減圧し、 染色液をよく浸漬させた。 GUS 染色反応を行うために、 染色液および植物体が入った容器を 37°C の恒温器に入れ、 暗所で一晩インキュベートした。 染色液を除き、 70% [v/v] エタノールで 30 分間浸透した後、 抱水クロラル溶液（chloral hydrate-glycerol-water, 6:2:1）を入れ、 組織が透明になるまで浸透した。 発現量が高く染色されやすい場合あるいは異所的なシグナルが観察されたには、 GUS 染色液中の K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]および K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]の濃度を 5 mM に調整して再実験した。

## 12. ジーンターゲティング法による Mpseta<sup>ko</sup> 株の作出

MpSETA の bHLH ドメインをコードする領域より上流 3,125 bp と下流 3,101 bp を Tak-1 gDNA から増幅し、 それぞれ pJHY-TMp1 (Ishizaki et al., 2013) の PacI サイトおよび AscI サイトに導入した。 胞子発芽体の形質転換によりベクターを導入し、 相同組換えが起こった T<sub>1</sub> を GoTaq DNA polymerase (Promega) を使った genotyping PCR により選抜した。 得られた Mpseta-1<sup>ko</sup> および Mpseta-2<sup>ko</sup> はいずれも雌株であったため、 Tak-1 と交配して得られた F<sub>1</sub> からそれぞれノックアウト株の雄株を確立した。 ノックアウト株の作出は白川一助教および松田頼子氏（京都大学大学院生命科学研究科）によって行われた。

## 13. RNA 抽出と cDNA 作製

RNA の抽出は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) あるいは核酸自動精製システム Maxwell RSC Instrument および Maxwell RSC Plant RNA Kit (Promega) を用いて添付のプロトコ

ールに従って行った。RNA の定量は NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を使って行った。等量の total RNA を元に ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。

#### 14. RT-PCR

RT-PCR は、cDNA を鋳型として Go Taq DNA Polymerase または KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて添付のプロトコール通りに行った。

#### 15. 酵母ツーハイブリッド法 (Y2H)

MpSETA と MpICE2 の CDS 全長、および MpSETA, MpICE1, MpICE2 の bHLH ドメインもしくは SMF/ACT-like ドメインをコードする領域を Tak-1 の cDNA から増幅し、PCR 産物を pENTR1A の EcoRI/EcoRI または SalI/EcoRI または SalI/EcoRV サイトにサブクローニングした。AtICE1 および AtSCRM2 の CDS 全長を Col-0 本葉由来の cDNA から増幅し、pENTR1A の SalI/EcoRV サイトに導入した。LR 反応によりエントリークローンから Y2H assay 用のベクターに移し、クローニングした。デスティネーションベクターとして、GAL4 Activation Domain (GAL4 AD) を保持する pDEST-GADT7 と、GAL4 DNA-Binding Domain (GAL4 BD) を保持する pDEST-GBKT7 のカナマイシン耐性遺伝子を、SfoI サイトで切断して破壊し代わりにアンピシリン耐性遺伝子カセットに置換し改変した pDEST-GBKT7-Amp<sup>r</sup> を作製し用いた。GAL4 と GAL4 BD の組み合わせになるようにしてベクターを 2 種類ずつ酵母 (Y2H Gold 株) に導入した。導入には、Frozen-EZ Yeast Transformation II (ZYMO RESEARCH) を用いて添付のプロトコールに従って行った。なお、ネガティブコントロールとして、pDEST-GADT7 および pDEST-GBKT7-Amp<sup>r</sup> の空ベクターを用いた。形質転換体はロイシンとトリプトファンを欠く SD 培地 (SD-LW) で選抜した。タンパク質相互作用はロイシン、トリプトファン、ヒスチジン、アデニンを欠き、抗真菌抗生物質 Aureobasidin A (終濃度 200 µg/mL) および呈色基質 X-α-gal (終濃度 40 µg/mL) を加えた SD 培地 (SD-LWHA+X-α-gal+AbA) で確認した。

#### 16. タバコ植物体への一過的遺伝子導入

タバコインフィルトレーション法 (Sparkes et al., 2006) により、ベンサミアナタバコ本葉で目的の融合遺伝子を一過的に発現させた。アグロバクテリウムは、抗生物質適量を加えた LB 培地 (10 g/L bacto triptone, 5 g/L bacto yeast extract, 10 g/L NaCl, 0.2

mL/L 5 N NaOH) 5 mL に懸濁し、28°C・180 rpm で一晩培養した。アグロバクテリウム懸濁液は OD<sub>600</sub> = 0.5 となるように水で希釈して用いた。

## 17. BiFC 法

Y2H法による解析で用いたのと同じMpSETA, MpICE2, AtICE1, AtSCRM2のCDSを pENTR1Aへサブクローニングし、それぞれをLR反応によって、目的タンパク質にYFP断片 (nYFP; Met<sup>1</sup>-Asp<sup>174</sup>) を結合するpB4GWnYまたは目的タンパク質にC末端YFP断片 (cYFP; Gly<sup>175</sup>-Lys<sup>239</sup>) を結合するpB4GWcY/pB4cYGWバイナリーベクター (Hino et al., 2011) へクローニングした。CaMV35Sプロモーター制御下でMpSETA-nYFP, MpICE2-cYFP, cYFP-AtICE1, cYFP-AtSCRM2を発現するコンストラクトである。作製したコンストラクトをアグロバクテリウム (GV3101株) へ導入し、nYFPとcYFPの組み合わせとなるよう上述の方法でタバコ本葉へ浸潤した。なお、ネガティブコントロールとして、pB4GWnYおよびpB4GWcY/pB4cYGWを用いた。その後アグロバクテリウムの浸潤を行った葉 (接種後1.5日) に1 µg/mL DAPIをインジェクションし、30分後に共焦点レーザー顕微鏡でYFPおよびDAPIの蛍光を観察した。

## 18. 共焦点レーザー顕微鏡観察

植物体をスライドガラスとカバーガラスの間に水でマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM780) で観察した。画像の処理・解析には Fiji v.1.0 (NIH) および Adobe Photoshop Element 9 (Adobe) を用いた。

## 19. ゲノム編集による Mpice2<sup>ge</sup> 変異体の作出

Mpice2<sup>ge</sup> 変異体を作成するために、MpICE2 の bHLH ドメインをコードするエクソン上に gRNA を 2 つ設計し、CRISPR/Cas9 システムを利用して独立に変異体を作成した。sgRNA をコードするオリゴヌクレオチドを、それぞれ pMpGE\_En03 (Sugano et al., 2018) の BsaI サイトに、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio) を用いて 16°C・1 h でインキュベートした後、形質転換した大腸菌 (DH5α) 内で増幅した。LR 反応により pMpGE010 (Sugano et al., 2018) に gRNA 発現カセットを導入した。T<sub>1</sub> の genotyping PCR により変異が導入されている株を同定し、これを野生型と交配して得られた F1 胞子発芽体の中から Cas9 を含む T-DNA をもたず、Mpice2 変異をもつ雌雄を確立した。ゲノム編集株の作出は Jeanne Loue-Manifel 博士 (リヨン高等師範学校) および Yen-Ting Lu 博士 (エディンバラ大学, 現・奈良先端科学技術大学院大学) によって行われた。

## 20. *Mpseta*<sup>ko</sup>株および *Mpice2*<sup>ge</sup>変異体の相補株作出

*gMpSETA Mpseta-1<sup>ko</sup>*株の作出のために、*MpSETA*の翻訳開始点より上流4,194 bpから*MpSETA*の終止コドンまでのゲノム断片(6,472 bp)をTak-1 gDNAから増幅し、pENTR1AのEcoRIサイトにサブクローニングし、LR反応によりpMpGWB301 (Ishizaki et al., 2015)へクローニングした。*proMpSETA:AtMUTE Mpseta-1<sup>ko</sup>*または*proMpSETA:AtFAMA Mpseta-1<sup>ko</sup>*の作出のために、Tak-1 gDNAから増幅した*MpSETA*プロモーターとCol-0本葉由来のcDNAから増幅した*AtMUTE* CDSもしくは*AtFAMA* CDSをoverlap extension PCRにより繋げ、それぞれpENTR1AのSalI/EcoRVサイトにサブクローニングし、LR反応によりpMpGWB301へクローニングした。これらを*Mpseta-1<sup>ko</sup>*株の雌株に導入した。*gMpSETA Mpseta-1<sup>ko</sup>*株について、得られた形質転換体を*Mpseta-1<sup>ko</sup>*株の雄株と交配し、得られたF<sub>1</sub>から雌雄の形質転換体を確立した。

*gMpICE2 Mpice2-6<sup>ge</sup>*株の作出のために、*MpICE2*の翻訳開始点より上流3,060 bpから*MpICE2*の終止コドンまでのゲノム断片(6,134 bp)をTak-1 gDNAから増幅し、pENTR1AのSalI/EcoRVサイトにサブクローニングし、LR反応によりpMpGWB101 (Ishizaki et al., 2015)へクローニングし、これを*Mpice2-6<sup>ge</sup>*株の雌株に導入した。得られた形質転換体を*Mpice2-6<sup>ge</sup>*株の雄株と交配し、得られたF<sub>1</sub>から雌雄の形質転換体を確立した。



## 謝辞

本研究は、2017年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行われました。

嶋田講師には、基礎的な実験手法や研究成果の発表、研究をする上での心構えなど研究に必要な様々なご助言をいただきました。嶋田先生のご指導があったからこそ、自分の研究に自信をもって取り組みました。また、研究の機会と高度な研究環境を与えてくださいました。心より御礼申し上げます。

小林遼亮氏、河本恭子博士、福手淳平氏、寺西岳生氏には、当研究室でゼニゴケを用いた実験を行うにあたって様々なアドバイスをいただきました。また、小林氏にはデータ解析についても多くのご助言をいただきました。深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、多くの方々にご助言およびご指導いただきました。白川一助教（奈良先端科学技術大学院大学）には、実験材料の提供や得られた実験結果に関するディスカッションなど、あらゆる面でお世話になりました。また、本研究で用いた *Mpseta<sup>ko</sup>* 株は白川助教および松田頼子氏（京都大学大学院生命科学研究科）により作出されました。心より御礼申し上げます。河内孝之教授（京都大学大学院生命科学研究科）、西浜竜一教授（東京理科大学）をはじめとするゼニゴケ研究者の皆様および生命科学研究科遺伝子特性学分野の皆様には、研究の立ち上げ当初から、本研究を行うための実験材料の提供およびゼニゴケを用いた実験手法のご指導をいただきました。ゼニゴケに関する実験がうまくいかないときにご助言いただき、いつも熱心にディスカッションしていただきました。心より感謝申し上げます。田村謙太郎准教授（静岡県立大学）および石川一也助教（岡山大学）、八木宏樹博士（甲南大学）には、実験手法の紹介、発表方法、実験結果の解釈など様々な面でご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。また、西村いくこ名誉教授（甲南大学）には、実験データ、論文作成等についてご助言およびご指導いただきました。誠にありがとうございました。

*MpICE2* の解析に関しては、Justin Goodrich 教授（エディンバラ大学）、Jeanne Loue-Manifel 博士（リヨン高等師範学校）、Gwyneth Ingram グループリーダー（CNRS/リヨン高等師範学校）、Yen-Ting Lu 博士（エディンバラ大学、現・奈良先端科学技術大学院大学）と共同で研究を進めてきました。実験材料の分与、実験データのディスカッションから論文作成にいたるまで大変お世話になりました。本研究で使用した *Mpice2<sup>ge</sup>* 変異体は Loue-Manifel 博士と Lu 博士により作出されました。心より御礼申し上げます。

中川強教授（島根大学）、真野昌二准教授（基礎生物学研究所）、菅野茂夫主任研究員（産業総合研究所）にはベクターを分与していただきました。ice1-2 scrm2-1 二重変異体は鳥居啓子教授（テキサス大学オースティン校）に分与していただきました。これらの方々のご協力無くしては本研究を迅速に行うことはできませんでした。厚く御礼申し上げます。また、図 41 および 42 で使用した植物図は中島敬二教授（奈良先端科学技術大学院大学）によって描かれたものです。使用許可をいただきありがとうございました。本論文に記載していない未発表データについて共同研究を進めていただいている皆様にも感謝申し上げます。本研究は日本学術振興会特別研究員（研究課題番号 21J14990）として、日本学術振興会のご支援のもと行われました。また、公益財団法人林レオロジー記念財団、公益財団法人帝人奨学会のご支援のもと研究活動を遂行できました。この場をお借りして御礼申し上げます。

植物分子細胞生物学分科に在籍されていた皆様、松下智直教授ならびに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、常日頃から研究面と生活面において大変お世話になりました。実験結果について様々な議論をしていただき、充実した研究環境を提供していただいた他、研究以外の面で楽しく過ごさせていただきました。ありがとうございました。

最後に、これまで支えてくれた家族・友人に感謝します。

## 引用文献

- Abrash, E. B., and Bergmann, D. C.** (2010). Regional specification of stomatal production by the putative ligand CHALLAH. *Development* **137**:447–455.
- Althoff, F., and Zachgo, S.** (2020). Transformation of *Riccia fluitans*, an amphibious liverwort dynamically responding to environmental changes. *Int. J. Mol. Sci.* **21**:5410.
- Bertrand, N., Castro, D. S., and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**:517–530.
- Bhave, N. S., Velej, K. M., Nadeau, J. A., Lucas, J. R., Bhave, S. L., and Sack, F. D.** (2009). TOO MANY MOUTHS promotes cell fate progression in stomatal development of *Arabidopsis* stems. *Planta* **229**:357–367.
- Bonnot, C., Hetherington, A. J., Champion, C., Breuninger, H., Kelly, S., and Dolan, L.** (2019). Neofunctionalisation of basic helix–loop–helix proteins occurred when embryophytes colonised the land. *New Phytol.* **223**:993–1008.
- Bowman, J. L.** (2013). Walkabout on the long branches of plant evolution. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**:70–77.
- Bowman, J. L.** (2016). A brief history of *Marchantia* from Greece to genomics. *Plant Cell Physiol.* **57**:210–229.
- Bowman, J. L., Araki, T., and Kohchi, T.** (2016). *Marchantia*: Past, present and future. *Plant Cell Physiol.* **57**:205–209.
- Bowman, J. L., Kohchi, T., Yamato, K. T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., et al.** (2017). Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell* **171**:287–304.e15.
- Bowman, J. L., Arteaga-Vazquez, M., Berger, F., Briginshaw, L. N., Carella, P., Aguilar-Cruz, A., Davies, K. M., Dierschke, T., Dolan, L., Dorantes-Acosta, A. E., et al.** (2022). The renaissance and enlightenment of *Marchantia* as a model system. *Plant Cell* **34**:3512–3542.
- Budke, J. M., Goffinet, B., and Jones, C. S.** (2012). The cuticle on the gametophyte calyptra matures before the sporophyte cuticle in the moss *Funaria hygrometrica* (Funariaceae). *Am. J. Bot.* **99**:14–22.
- Caine, R. S., Chater, C. C., Kamisugi, Y., Cuming, A. C., Beerling, D. J., Gray, J. E., and Fleming, A. J.** (2016). An ancestral stomatal patterning module revealed in the non-vascular land plant *Physcomitrella patens*. *Development* **143**:3306–3314.

- Caine, R. S., Chater, C. C. C., Fleming, A. J., Gray, J. E., Fleming, A. J., and Gray, J. E.** (2020). Stomata and sporophytes of the model moss *Physcomitrium patens*. *Front. Plant Sci.* **11**:643.
- Cecchetti, V., Altamura, M. M., Falasca, G., Costantino, P., and Cardarelli, M.** (2008). Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* **20**:1760–1774.
- Chater, C. C., Caine, R. S., Tomek, M., Wallace, S., Kamisugi, Y., Cuming, A. C., Lang, D., MacAlister, C. A., Casson, S., Bergmann, D. C., et al.** (2016). Origin and function of stomata in the moss *Physcomitrella patens*. *Nat. Plants* **2**:16179.
- Chater, C. C. C., Caine, R. S., Fleming, A. J., and Gray, J. E.** (2017). Origins and evolution of stomatal development. *Plant Physiol.* **174**:624–638.
- Chen, M., and Lopes, J. M.** (2007). Multiple basic helix-loop-helix proteins regulate expression of the ENO1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **6**:786–796.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J.** (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**:i884–i890.
- Cheng, S., Xian, W., Fu, Y., Marin, B., Keller, J., Wu, T., Sun, W., Li, X., Xu, Y., Zhang, Y., et al.** (2019). Genomes of subaerial Zygnematophyceae provide insights into land plant evolution. *Cell* **179**:1057–1067.e14.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B. ha, Hong, X., Agarwal, M., and Zhu, J. K.** (2003). ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **17**:1043–1054.
- Chipman, D. M., and Shaanan, B.** (2001). The ACT domain family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**:694–700.
- Clough, S. J., and Bent, A. F.** (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**:735–743.
- Coudert, Y., Novák, O., and Harrison, C. J.** (2019). A KNOX-cytokinin regulatory module predates the origin of indeterminate vascular plants. *Curr. Biol.* **29**:2743–2750.e5.
- Cui, J., You, C., Zhu, E., Huang, Q., Ma, H., and Chang, F.** (2016). Feedback regulation of DYT1 by interactions with downstream bHLH factors promotes DYT1 nuclear localization and anther development. *Plant Cell* **28**:1078–1093.
- Davies, K. A., and Bergmann, D. C.** (2014). Functional specialization of stomatal bHLHs through modification of DNA-binding and phosphoregulation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**:15585–15590.

- Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**:987–1000.
- Delwiche, C. F., and Cooper, E. D.** (2015). The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Curr. Biol.* **25**:R899–R910.
- Denay, G., Creff, A., Moussu, S., Wagnon, P., Thévenin, J., Gérentes, M.-F., Chambrier, P., Dubreucq, B., and Ingram, G.** (2014). Endosperm breakdown in Arabidopsis requires heterodimers of the basic helix-loop-helix proteins ZHOUP1 and INDUCER OF CBP EXPRESSION 1. *Development* **141**:1222–1227.
- Dennis, D. J., Han, S., and Schuurmans, C.** (2019). bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming. *Brain Res.* **1705**:48–65.
- Dierschke, T., Flores-Sandoval, E., Rast-Somssich, M. I., Althoff, F., Zachgo, S., and Bowman, J. L.** (2020). Gamete-specific expression of TALE class HD genes activates the diploid sporophyte program in *Marchantia polymorpha*. *bioRxiv* Advance Access published 2020.
- Dierschke, T., Flores-Sandoval, E., Rast-Somssich, M. I., Althoff, F., Zachgo, S., and Bowman, J. L.** (2021). Gamete expression of TALE class HD genes activates the diploid sporophyte program in *Marchantia polymorpha*. *Elife* **10**:e57088.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R.** (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**:15–21.
- Duckett, J. G., and Pressel, S.** (2018). The evolution of the stomatal apparatus: intercellular spaces and sporophyte water relations in bryophytes—two ignored dimensions. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **373**:20160498.
- Durand, E. J.** (1908). The development of the sexual organs and sporogonium of *Marchantia polymorpha*. *Bull. Torrey Bot. Club* **35**:321–335.
- Edwards, D., Richardsont, D. B. J. B., and Boron, W. F.** (1995). Hepatic characters in the earliest land plants. *Nature* **374**:635–636.
- Erdos, G., Pajkos, M., and Dosztányi, Z.** (2021). IUPred3: Prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. *Nucleic Acids Res.* **49**:W297–W303.
- Feller, A., Hernandez, J. M., and Grotewold, E.** (2006). An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helix-loop-helix transcription factors. *J. Biol. Chem.* **281**:28964–28974.

- Feller, A., MacHemer, K., Braun, E. L., and Grotewold, E.** (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* **66**:94–116.
- Felsenstein, J.** (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368–376.
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution (N. Y.)*. **39**:783–791.
- Flores-Sandoval, E., Dierschke, T., Fisher, T. J., and Bowman, J. L.** (2016). Efficient and inducible use of artificial MicroRNAs in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* **57**:281–290.
- 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.
- Frangedakis, E., Shimamura, M., Villarreal, J. C., Li, F., Tomaselli, M., Waller, M., Sakakibara, K., Renzaglia, K. S., and Szövényi, P.** (2021). The hornworts: morphology, evolution and development. *New Phytol.* **229**:735–754.
- Frank, M. H., and Scanlon, M. J.** (2015). Transcriptomic evidence for the evolution of shoot meristem function in sporophyte-dominant land plants through concerted selection of ancestral gametophytic and sporophytic genetic programs. *Mol. Biol. Evol.* **32**:355–367.
- French, J. C., and Paolillo, D. J. J.** (1975). Intercalary meristematic activity in the sporophyte of *Funaria* (Musci). *Am. J. Bot.* **62**:86–96.
- Gardner, M. J., Baker, A. J., Assie, J. M., Poethig, R. S., Haseloff, J. P., and Webb, A. A. R.** (2009). GAL4 GFP enhancer trap lines for analysis of stomatal guard cell development and gene expression. *J. Exp. Bot.* **60**:213–226.
- Ge, Y., Gao, Y., Jiao, Y., and Wang, Y.** (2022). A conserved module in the formation of moss midribs and seed plant axillary meristems. *Sci. Adv.* **8**:eadd7275.
- Gyoja, F.** (2017). Basic helix-loop-helix transcription factors in evolution: Roles in development of mesoderm and neural tissues. *genesis* **55**:e23051.
- Hachez, C., Ohashi-Ito, K., Dong, J., and Bergmann, D. C.** (2011). Differentiation of Arabidopsis guard cells: Analysis of the networks incorporating the basic helix-loop-helix transcription factor, FAMA. *Plant Physiol.* **155**:1458–1472.
- Haig, D.** (2013). Filial mistletoes: the functional morphology of moss sporophytes. *Ann. Bot.* **111**:337–345.

- Han, S., Qi, X., Sugihara, K., Dang, J. H., Endo, T. A., Miller, K. L., Kim, E., Miura, T., and Torii, K. U.** (2018). MUTE directly orchestrates cell-state switch and the single symmetric division to create stomata. *Dev. Cell* **45**:303–315.e5.
- Han, S.-K., Kwak, J. M., and Qi, X.** (2021). Stomatal lineage control by developmental program and environmental cues. *Front. Plant Sci.* **12**:751852.
- Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C., and Kakimoto, T.** (2007). The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev.* **21**:1720–1725.
- Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K. M., Torii, K. U., and Kakimoto, T.** (2009). Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol.* **50**:1019–1031.
- Harris, B. J., Harrison, C. J., Hetherington, A. M., and Williams, T. A.** (2020). Phylogenomic evidence for the monophyly of bryophytes and the reductive evolution of stomata. *Curr. Biol.* **30**:2001–2012.e2.
- Harris, B. J., Clark, J. W., Schrempf, D., Szöllősi, G. J., Donoghue, P. C. J., Hetherington, A. M., and Williams, T. A.** (2022). Divergent evolutionary trajectories of bryophytes and tracheophytes from a complex common ancestor of land plants. *Nat. Ecol. Evol.* **6**:1634–1643.
- Hashida, Y., Takechi, K., Abiru, T., Yabe, N., Nagase, H., Hattori, K., Takio, S., Sato, Y., Hasebe, M., Tsukaya, H., et al.** (2019). Two *ANGUSTIFOLIA* genes regulate gametophore and sporophyte development in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **3**:tpj.14592.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., and Bailey, P. C.** (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**:735–747.
- Hernández-García, J., Sun, R., Serrano-Mislata, A., Inoue, K., Vargas-Chávez, C., Esteve-Bruna, D., Arbona, V., Yamaoka, S., Nishihama, R., Kohchi, T., et al.** (2021). Coordination between growth and stress responses by DELLA in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Curr. Biol.* **31**:3678–3686.e11.
- Higo, A., Niwa, M., Yamato, K. T., Yamada, L., Sawada, H., Sakamoto, T., Kurata, T., Shirakawa, M., Endo, M., Shigenobu, S., et al.** (2016). Transcriptional framework of male gametogenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* **57**:325–338.
- Higo, A., Kawashima, T., Borg, M., Zhao, M., López-Vidriero, I., Sakayama, H.,**

- Montgomery, S. A., Sekimoto, H., Hackenberg, D., Shimamura, M., et al.** (2018). Transcription factor DUO1 generated by neo-functionalization is associated with evolution of sperm differentiation in plants. *Nat. Commun.* **9**:5283.
- Hino, T., Tanaka, Y., Kawamukai, M., Nishimura, K., Mano, S., and Nakagawa, T.** (2011). Two Sec13p homologs, AtSec13A and AtSec13B, redundantly contribute to the formation of COPII transport vesicles in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**:1848–1852.
- Hisanaga, T., Yamaoka, S., Kawashima, T., Higo, A., Nakajima, K., Araki, T., Kohchi, T., and Berger, F.** (2019). Building new insights in plant gametogenesis from an evolutionary perspective. *Nat. Plants* **5**:663–669.
- Hisanaga, T., Fujimoto, S., Cui, Y., Sato, K., Sano, R., Yamaoka, S., Kohchi, T., Berger, F., and Nakajima, K.** (2021). Deep evolutionary origin of gamete-directed zygote activation by KNOX/BELL transcription factors in green plants. *Elife* **10**:e57090.
- Hisanaga, T., Romani, F., Wu, S., Kowar, T., Lintermann, R., Jamge, B., Montgomery, S. A., Axelsson, E., Dierschke, T., Bowman, J. L., et al.** (2022). Transposons repressed by H3K27me3 were co-opted as cis-regulatory elements of H3K27me3 controlled protein coding genes during evolution of plants. *bioRxiv* Advance Access published 2022.
- Horst, R. J., Fujita, H., Lee, J. S., Rychel, A. L., Garrick, J. M., Kawaguchi, M., Peterson, K. M., and Torii, K. U.** (2015). Molecular framework of a regulatory circuit initiating two-dimensional spatial patterning of stomatal lineage. *PLOS Genet.* **11**:e1005374.
- Horst, N. A., Katz, A., Pereman, I., Decker, E. L., Ohad, N., and Reski, R.** (2016). A single homeobox gene triggers phase transition, embryogenesis and asexual reproduction. *Nat. Plants* **2**:15209.
- Hunt, L., and Gray, J. E.** (2009). The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. *Curr. Biol.* **19**:864–869.
- Ikeda, Y., Nishihama, R., Yamaoka, S., Arteaga-Vazquez, M. A., Aguilar-Cruz, A., Grimanelli, D., Pogorelnik, R., Martienssen, R. A., Yamato, K. T., Kohchi, T., et al.** (2018). Loss of CG methylation in *Marchantia polymorpha* causes disorganization of cell division and reveals unique DNA methylation regulatory mechanisms of non-CG methylation. *Plant Cell Physiol.* **59**:2421–2431.
- Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K. T., and Kohchi, T.** (2008). Agrobacterium-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol.* **49**:1084–1091.



- Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S., and Kohchi, T.** (2013). Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci. Rep.* **3**:1532.
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., Nishimura, Y., Shikanai, T., and Kohchi, T.** (2015). Development of gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS One* **10**:e0138876.
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., and Kohchi, T.** (2016). Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research. *Plant Cell Physiol.* **57**:262–270.
- Jia, M., Munz, J., Lee, J., Shelley, N., Xiong, Y., Joo, S., Jin, E., and Lee, J.** (2022). The bHLH family NITROGEN-REPLETION INSENSITIVE1 represses nitrogen starvation-induced responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **110**:337–357.
- Jiao, C., Sørensen, I., Sun, X., Sun, H., Behar, H., Alseikh, S., Philippe, G., Palacio Lopez, K., Sun, L., Reed, R., et al.** (2020). The *Penium margaritaceum* genome: Hallmarks of the origins of land plants. *Cell* **181**:1097–1111.e12.
- Jin, W., Peng, J., and Jiang, S.** (2016). The epigenetic regulation of embryonic myogenesis and adult muscle regeneration by histone methylation modification. *Biochem. Biophys. Reports* **6**:209–219.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., et al.** (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**:583–589.
- Kanaoka, M. M., Pillitteri, L. J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N. L., Takabayashi, J., Zhu, J. K., and Torii, K. U.** (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *Plant Cell* **20**:1775–1785.
- Kato, M., and Akiyama, H.** (2005). Interpolation hypothesis for origin of the vegetative sporophyte of land plants. *Taxon* **54**:443–450.
- Katoh, K., and Toh, H.** (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinform.* **9**:286–298.
- Kerp, H.** (2018). Organs and tissues of Rhynie chert plants. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **373**:20160495.
- Kerp, H., Trewin, N. H., and Hass, H.** (2004). New gametophytes from the Early Devonian Rhynie chert. *Trans. R. Soc. Edinburgh, Earth Sci.* **94**:411–428.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S. L.** (2019). Graph-based

- genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **37**:907–915.
- Kirbis, A., Waller, M., Ricca, M., Bont, Z., Neubauer, A., Goffinet, B., and Szövényi, P.** (2020). Transcriptional landscapes of divergent sporophyte development in two mosses, *Physcomitrium (Physcomitrella) patens* and *Funaria hygrometrica*. *Front. Plant Sci.* **11**:747.
- Koshimizu, S., Kofuji, R., Sasaki-Sekimoto, Y., Kikkawa, M., Shimojima, M., Ohta, H., Shigenobu, S., Kabeya, Y., Hiwatashi, Y., Tamada, Y., et al.** (2018). *Physcomitrella* MADS-box genes regulate water supply and sperm movement for fertilization. *Nat. Plants* **4**:36–45.
- 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.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K.** (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**:1870–1874.
- Lau, O. S., Davies, K. A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M. H., Ballenger, C. E., and Bergmann, D. C.** (2014). Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science* **345**:1605–1609.
- Lee, E., Lucas, J. R., and Sack, F. D.** (2014). Deep functional redundancy between FAMA and FOUR LIPS in stomatal development. *Plant J.* **78**:555–565.
- Li, B., and Dewey, C. N.** (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**:323.
- Li, M., and Sack, F. D.** (2014). Myosin idioblast cell fate and development are regulated by the *Arabidopsis* transcription factor FAMA, the auxin pathway, and vesicular trafficking. *Plant Cell* **26**:4053–4066.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R.** (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**:2078–2079.
- Li, H., Ding, Y., Shi, Y., Zhang, X., Zhang, S., Gong, Z., and Yang, S.** (2017). MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **43**:630–642.e4.
- Li, F.-W., Nishiyama, T., Waller, M., Frangedakis, E., Keller, J., Li, Z., Fernandez-Pozo, N., Barker, M. S., Bennett, T., Blázquez, M. A., et al.** (2020). *Anthoceros* genomes

- illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nat. Plants* **6**:259–272.
- Libertín, M., Kvaček, J., Bek, J., Žárský, V., and Štorch, P.** (2018). Sporophytes of polysporangiate land plants from the early Silurian period may have been photosynthetically autonomous. *Nat. Plants* **4**:269–271.
- Ligrone, R., Duckett, J. G., and Renzaglia, K. S.** (2012). The origin of the sporophyte shoot in land plants: a bryological perspective. *Ann. Bot.* **110**:935–941.
- Linde, A. M., Eklund, D. M., Cronberg, N., Bowman, J. L., and Lagercrantz, U.** (2021). Rates and patterns of molecular evolution in bryophyte genomes, with focus on complex thalloid liverworts, *Marchantiopsida*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **165**:107295.
- Liu, T., Ohashi-Ito, K., and Bergmann, D. C.** (2009). Orthologs of *Arabidopsis thaliana* stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. *Development* **136**:2265–2276.
- Liu, J., Qian, W., Song, D., and He, Z.** (2013). Genetic transformation of moss plant. *African J. Biotechnol.* **12**:227–232.
- Liu, Y., Johnson, M. G., Cox, C. J., Medina, R., Devos, N., Vanderpoorten, A., Hedenäs, L., Bell, N. E., Shevock, J. R., Agüero, B., et al.** (2019). Resolution of the ordinal phylogeny of mosses using targeted exons from organellar and nuclear genomes. *Nat. Commun.* **10**:1485.
- Lopez-Obando, M., Landberg, K., Sundberg, E., and Thelander, M.** (2022). Dependence on clade II bHLH transcription factors for nursing of haploid products by tapetal-like cells is conserved between moss sporangia and angiosperm anthers. *New Phytol.* **235**:718–731.
- Lu, K. J., van't Wout Hofland, N., Mor, E., Mutte, S., Abrahams, P., Kato, H., Vandepoele, K., Weijers, D., and de Rybel, B.** (2020). Evolution of vascular plants through redeployment of ancient developmental regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**:733–740.
- Lüth, V. M., Rempfer, C., van Gessel, N., Herzog, O., Hanser, M., Braun, M., Decker, E. L., and Reski, R.** (2023). A *Physcomitrella* PIN protein acts in spermatogenesis and sporophyte retention. *New Phytol.* Advance Access published January 25, 2023, doi:10.1111/nph.18691.
- MacAlister, C. A., and Bergmann, D. C.** (2011). Sequence and function of basic helix-loop-helix proteins required for stomatal development in *Arabidopsis* are deeply conserved in land plants. *Evol. Dev.* **13**:182–192.

- MacAlister, C. A., Ohashi-Ito, K., and Bergmann, D. C.** (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* **445**:537–540.
- MacGregor, D. R., Zhang, N., Iwasaki, M., Chen, M., Dave, A., Lopez-Molina, L., and Penfield, S.** (2019). ICE1 and ZOU determine the depth of primary seed dormancy in *Arabidopsis* independently of their role in endosperm development. *Plant J.* **98**:277–290.
- Matos, J. L., Lau, O. S., Hachez, C., Cruz-Ramírez, A., Scheres, B., and Bergmann, D. C.** (2014). Irreversible fate commitment in the *Arabidopsis* stomatal lineage requires a FAMA and RETINOBLASTOMA-RELATED module. *Elife* **3**:e03271.
- Matsushita, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A.** (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* **424**:571–574.
- Medina, R., Johnson, M. G., Liu, Y., Wickett, N. J., Shaw, A. J., and Goffinet, B.** (2019). Phylogenomic delineation of *Physcomitrium* (Bryophyta: Funariaceae) based on targeted sequencing of nuclear exons and their flanking regions rejects the retention of *Physcomitrella*, *Physcomitridium* and *Aphanorrhagma*. *J. Syst. Evol.* **57**:404–417.
- Menand, B., Yi, K., Jouannic, S., Hoffmann, L., Ryan, E., Linstead, P., Schaefer, D. G., and Dolan, L.** (2007). An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* **316**:1477–1480.
- Merced, A., and Renzaglia, K. S.** (2013). Moss stomata in highly elaborated *Oedipodium* (Oedipodiaceae) and highly reduced *Ephemerum* (Pottiaceae) sporophytes are remarkably similar. *Am. J. Bot.* **100**:2318–2327.
- Merced, A., and Renzaglia, K. S.** (2017). Structure, function and evolution of stomata from a bryological perspective. *Bryophyt. Divers. Evol.* **39**:7–20.
- Mirbel, M.** (1835). Recherches anatomiques et physiologiques sur le *Marchantia polymorpha*, pour servir à l'histoire du tissu cellulaire, de l'épiderme et des stomates. *Mém. l'Acad. R. des Sci. l'Inst. Fr.* **13**:337–373.
- Montgomery, S. A., Tanizawa, Y., Galik, B., Wang, N., Ito, T., Mochizuki, T., Akimcheva, S., Bowman, J. L., Cognat, V., Maréchal-Drouard, L., 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.
- Montgomery, S. A., Hisanaga, T., Wang, N., Axelsson, E., Akimcheva, S., Sramek, M., Liu, C., and Berger, F.** (2022). Polycomb-mediated repression of paternal chromosomes maintains haploid dosage in diploid embryos of *Marchantia*. *Elife* **11**:e79258.
- Murre, C., McCaw, P. S., and Baltimore, D.** (1989). A new DNA binding and dimerization

- motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**:777–783.
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., Tabata, R., Kawai, T., Tanaka, K., Niwa, Y., et al.** (2007). Improved gateway binary vectors: High-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**:2095–2100.
- Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., et al.** (2010). Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**:1315–1319.
- Ohashi-Ito, K., and Bergmann, D. C.** (2006). *Arabidopsis* FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *Plant Cell* **18**:2493–2505.
- Ohta, M., Sato, A., Renhu, N., Yamamoto, T., Oka, N., Zhu, J.-K., Tada, Y., Suzaki, T., and Miura, K.** (2018). MYC-type transcription factors, MYC67 and MYC70, interact with ICE1 and negatively regulate cold tolerance in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* **8**:11622.
- Okano, Y., Aono, N., Hiwatashi, Y., Murata, T., Nishiyama, T., Ishikawa, T., Kubo, M., and Hasebe, M.** (2009). A polycomb repressive complex 2 gene regulates apogamy and gives evolutionary insights into early land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:16321–16326.
- Olsen, J. L., Rouzé, P., Verhelst, B., Lin, Y., Bayer, T., Collen, J., Dattolo, E., De Paoli, E., Dittami, S., Maumus, F., et al.** (2016). The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature* **530**:331–335.
- One Thousand Plant Transcriptomes Initiative** (2019). One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature* **574**:679–685.
- Ortiz-Ramírez, C., Hernandez-Coronado, M., Thamm, A., Catarino, B., Wang, M., Dolan, L., Feijó, J. A., and Becker, J. D.** (2016). A transcriptome atlas of *Physcomitrella patens* provides Insights into the evolution and development of land plants. *Mol. Plant* **9**:205–220.
- Payne, C. T., Zhang, F., and Lloyd, A. M.** (2000). GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* **156**:1349–1362.
- Perry, R. L. S., and Rudnicki, M. A.** (2000). Molecular mechanisms regulating myogenic

- determination and differentiation. *Front. Biosci.* **5**:750–767.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., and Salzberg, S. L.** (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* **33**:290–295.
- Peterson, K. M., Rychel, A. L., and Torii, K. U.** (2010). Out of the mouths of plants: The molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *Plant Cell* **22**:296–306.
- Pham, V. N., Kathare, P. K., and Huq, E.** (2018). Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiol.* **176**:1025–1038.
- Pillitteri, L. J., and Dong, J.** (2013). Stomatal Development in *Arabidopsis*. *Arab. B.* **11**:e0162.
- Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L., and Torii, K. U.** (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* **445**:501–505.
- Pillitteri, L. J., Bogenschutz, N. L., and Torii, K. U.** (2008). The bHLH protein, MUTE, controls differentiation of stomata and the hydathode pore in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **49**:934–943.
- Pires, N., and Dolan, L.** (2010a). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Mol. Biol. Evol.* **27**:862–874.
- Pires, N., and Dolan, L.** (2010b). Early evolution of bHLH proteins in plants. *Plant Signal. Behav.* **5**:911–912.
- Proust, H., Honkanen, S., Jones, V. A. S., Morieri, G., Prescott, H., Kelly, S., Ishizaki, K., Kohchi, T., and Dolan, L.** (2016). RSL class I genes controlled the development of epidermal structures in the common ancestor of land plants. *Curr. Biol.* **26**:93–99.
- Putarjunan, A., Ruble, J., Srivastava, A., Zhao, C., Rychel, A. L., Hofstetter, A. K., Tang, X., Zhu, J. K., Tama, F., Zheng, N., et al.** (2019). Bipartite anchoring of SCREAM enforces stomatal initiation by coupling MAP kinases to SPEECHLESS. *Nat. Plants* **5**:742–754.
- Puttick, M. N., Morris, J. L., Williams, T. A., Cox, C. J., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Schneider, H., Pisani, D., et al.** (2018). The interrelationships of land plants and the nature of the ancestral embryophyte. *Curr. Biol.* **28**:733–745.e2.
- Qu, X., Peterson, K. M., and Torii, K. U.** (2017). Stomatal development in time: the past and the future. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **45**:1–9.
- Raissig, M. T., Abrash, E., Bettadapur, A., Vogel, J. P., and Bergmann, D. C.** (2016).

- Grasses use an alternatively wired bHLH transcription factor network to establish stomatal identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**:8326–8331.
- Raissig, M. T., Matos, J. L., Anleu Gil, M. X., Kornfeld, A., Bettadapur, A., Abrash, E., Allison, H. R., Badgley, G., Vogel, J. P., Berry, J. A., et al.** (2017). Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science* **355**:1215–1218.
- Ramsay, N. A., and Glover, B. J.** (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci.* **10**:63–70.
- Ran, J.-H., Shen, T.-T., Liu, W.-J., and Wang, X.-Q.** (2013). Evolution of the bHLH genes involved in stomatal development: implications for the expansion of developmental complexity of stomata in land plants. *PLoS One* **8**:e78997.
- Rensing, S. A., Goffinet, B., Meyberg, R., Wu, S. Z., and Bezanilla, M.** (2020). The moss *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*: A model organism for non-seed plants. *Plant Cell* **32**:1361–1376.
- Renzaglia, K. S., Villarreal, J. C., Piatkowski, B. T., Lucas, J. R., and Merced, A.** (2017). Hornwort stomata: Architecture and fate shared with 400-million-year-old fossil plants without leaves. *Plant Physiol.* **174**:788–797.
- Renzaglia, K. S., Browning, W. B., and Merced, A.** (2020). With over 60 independent losses, stomata are expendable in mosses. *Front. Plant Sci.* **11**:567.
- Reski, R., and Abel, W. O.** (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* **165**:354–358.
- Romani, F., and Moreno, J. E.** (2021). Molecular mechanisms involved in functional macroevolution of plant transcription factors. *New Phytol.* **230**:1345–1353.
- Romero-Campero, F. J., Lucas-Reina, E., Said, F. E., Romero, J. M., and Valverde, F.** (2013). A contribution to the study of plant development evolution based on gene co-expression networks. *Front. Plant Sci.* **4**:291.
- Sakakibara, K., Nishiyama, T., Deguchi, H., and Hasebe, M.** (2008). Class 1 KNOX genes are not involved in shoot development in the moss *Physcomitrella patens* but do function in sporophyte development. *Evol. Dev.* **10**:555–566.
- Seo, H., Sepuru, K. M., Putarjunan, A., Aguirre, L., Burrows, B. A., and Torii, K. U.** (2022). Intragenic suppressors unravel the role of the SCREAM ACT-like domain for bHLH partner selectivity in stomatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**:e2117774119.

- Serna, L.** (2011). Stomatal development in *Arabidopsis* and grasses: Differences and commonalities. *Int. J. Dev. Biol.* **55**:5–10.
- Serrano, G., Herrera-Palau, R., Romero, J. M., Serrano, A., Coupland, G., and Valverde, F.** (2009). Chlamydomonas *CONSTANS* and the evolution of plant photoperiodic signaling. *Curr. Biol.* **19**:359–368.
- Shaw, A. J., and Renzaglia, K.** (2004). Phylogeny and diversification of bryophytes. *Am. J. Bot.* **91**:1557–1581.
- Shaw, A. J., Szövényi, P., and Shaw, B.** (2011). Bryophyte diversity and evolution: Windows into the early evolution of land plants. *Am. J. Bot.* **98**:352–369.
- Shimada, T. L., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I.** (2010). A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **61**:519–528.
- Shimamura, M.** (2012). An introduction to the taxonomy and morphology of *Marchantia polymorpha*. *BSJ Rev.* **3**:84–113.
- Shimamura, M.** (2016). *Marchantia polymorpha*: Taxonomy, phylogeny and morphology of a model system. *Plant Cell Physiol.* **57**:230–256.
- Shimamura, M., and Deguchi, H.** (2009). Sporophyte Anatomy of *Oedipodium griffithianum* (Oedipodiaceae). *Bryol. New Millenium* (InMohamed, H., al. Advance Access published 2009).
- Shirakawa, M., Ueda, H., Nagano, A. J., Shimada, T., Kohchi, T., and Hara-nishimura, I.** (2014). FAMA is an essential component for the differentiation of two distinct cell types, myrosin cells and guard cells, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**:4039–4052.
- Shirakawa, M., Tanida, M., and Ito, T.** (2022). The cell differentiation of idioblast myrosin cells: Similarities with vascular and guard cells. *Front. Plant Sci.* **12**:829541.
- Singh, S.** (2022). Genomic evolution of *Ricciocarpos natans* : A monoecious liverwort derived from dioecious ancestor Advance Access published 2022, doi:<https://doi.org/10.26180/20327328.v1>.
- Sousa, F., Civián, P., Brazão, J., Foster, P. G., and Cox, C. J.** (2020). The mitochondrial phylogeny of land plants shows support for Setaphyta under composition-heterogeneous substitution models. *PeerJ* **8**:e8995.
- 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.



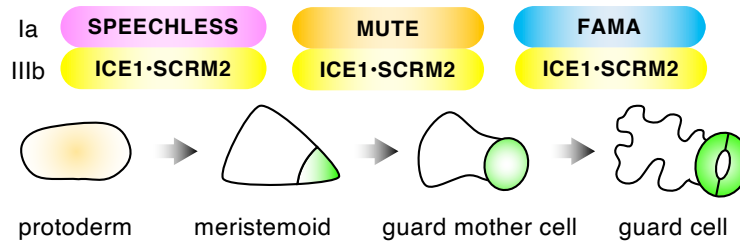
- Sugano, S. S., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., and Kohchi, T.** (2014). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* **55**:475–481.
- Sugano, S. S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K., and Kohchi, T.** (2018). Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS One* **13**:e0205117.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**:663–676.
- Tam, T. H. Y., Catarino, B., and Dolan, L.** (2015). Conserved regulatory mechanism controls the development of cells with rooting functions in land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**:E3959–E3968.
- Tanahashi, T., Sumikawa, N., Kato, M., and Hasebe, M.** (2005). Diversification of gene function: homologs of the floral regulator FLO/LFY control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* **132**:1727–1736.
- Taylor, T. N., Kerp, H., and Hass, H.** (2005). Life history biology of early land plants: Deciphering the gametophyte phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:5892–5897.
- Thomas, R. J.** (1980). Cell elongation in Hepatics: The seta system. *Bull. Torrey Bot. Club* **107**:339–345.
- Tokutsu, R., Fujimura-Kamada, K., Matsuo, T., Yamasaki, T., and Minagawa, J.** (2019). The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas*. *Nat. Commun.* **10**:4099.
- 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.
- Tsuzuki, M., Futagami, K., Shimamura, M., Inoue, C., Kunimoto, K., Oogami, T., Tomita, Y., Inoue, K., Kohchi, T., Yamaoka, S., 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.
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Žídek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., et al.** (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* **596**:590–596.
- Vatén, A., and Bergmann, D. C.** (2012). Mechanisms of stomatal development: an

- evolutionary view. *Evodevo* 4:11.
- Vera-Sirera, F., De Rybel, B., Úrbez, C., Kouklas, E., Pesquera, M., Álvarez-Mahecha, J. C., Minguet, E. G., Tuominen, H., Carbonell, J., Borst, J. W., et al.** (2015). A bHLH-Based Feedback Loop Restricts Vascular Cell Proliferation in Plants. *Dev. Cell* 35:432–443.
- Wang, H., Guo, S., Qiao, X., Guo, J., Li, Z., Zhou, Y., Bai, S., Gao, Z., Wang, D., Id, P. W., et al.** (2019). BZU2/ZmMUTE controls symmetrical division of guard mother cell and specifies neighbor cell fate in maize. *PLoS Genet.* 15:e1008377.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., and Barton, G. J.** (2009). Jalview version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191.
- Wei, D., Liu, M., Chen, H., Zheng, Y., Liu, Y., Wang, X., Yang, S., Zhou, M., and Lin, J.** (2018). INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 is a male fertility regulator impacting anther dehydration in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 14:e1007695.
- Wellman, C. H., Osterloff, P. L., and Mohiuddin, U.** (2003). Fragments of the earliest land plants. *Nature* 425:282–285.
- Wickell, D., Kuo, L.-Y., Yang, H.-P., Dhabalia Ashok, A., Irisarri, I., Dadras, A., de Vries, S., de Vries, J., Huang, Y.-M., Li, Z., et al.** (2021). Underwater CAM photosynthesis elucidated by *Isoetes* genome. *Nat. Commun.* 12:6348.
- Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M. S., Burleigh, J. G., Gitzendanner, M. A., et al.** (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:E4859–E4868.
- Wu, Z., Chen, L., Yu, Q., Zhou, W., Gou, X., Li, J., and Hou, S.** (2019). Multiple transcriptional factors control stomata development in rice. *New Phytol.* 223:220–232.
- Xing, Q., Creff, A., Waters, A., Tanaka, H., Goodrich, J., and Ingram, G. C.** (2013). ZHOUP1 controls embryonic cuticle formation via a signalling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAF-SHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development* 140:770–779.
- Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Kubo, M., Nakano, Y., Sano, R., Hiwatashi, Y., et al.** (2014). Contribution of NAC Transcription Factors to Plant Adaptation to Land. *Science* 343:1505–1509.
- Yamaoka, S., Nishihama, R., Yoshitake, Y., Ishida, S., Inoue, K., Saito, M., Okahashi, K.,**

- Bao, H., Nishida, H., Yamaguchi, K., et al.** (2018). Generative cell specification requires transcription factors evolutionarily conserved in land plants. *Curr. Biol.* **28**:479–486.e5.
- Yang, M., and Sack, F. D.** (1995). The *too many mouths* and *four lips* mutations affect stomatal production in Arabidopsis. *Plant Cell* **7**:2227–2239.
- Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J., and Ingram, G.** (2008). The endosperm-specific ZHOUP1 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development* **135**:3501–3509.
- Yasui, Y., Tsukamoto, S., Sugaya, T., Nishihama, R., Wang, Q., Kato, H., Yamato, K. T., Fukaki, H., Mimura, T., Kubo, H., et al.** (2019). GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1, an ortholog of axillary meristem regulators, is essential in vegetative reproduction in *Marchantia polymorpha*. *Curr. Biol.* **29**:3987–3995.e5.
- Zhu, E., You, C., Wang, S., Cui, J., Niu, B., Wang, Y., Qi, J., Ma, H., and Chang, F.** (2015). The DYT1-interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for Arabidopsis anther development and transcriptome. *Plant J.* **83**:976–990.
- Zobell, O., Coupland, G., and Reiss, B.** (2005). The family of CONSTANS-like genes in *Physcomitrella patens*. *Plant Biol.* **7**:266–275.

## 图表

*Arabidopsis thaliana* (angiosperm)



*Physcomitrium patens* (moss)

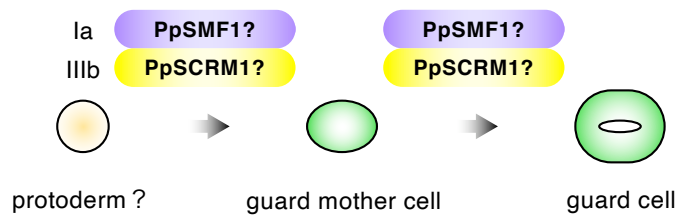


図1. 陸上植物における気孔の発生様式

被子植物シロイヌナズナ (*A. thaliana*) では、原表皮細胞 (protoderm) からメリステモイド (meristemoid)、孔辺母細胞 (guard mother cell, GMC) を経て一対の孔辺細胞 (guard cell) が生じる。セン類ヒメツリガネゴケ (*P. patens*) では原表皮細胞と思われる細胞から孔辺母細胞を経て、細胞分裂を伴わず1細胞からなる気孔が生じる。シロイヌナズナではメリステモイドが気孔幹細胞として振る舞う一方で、ヒメツリガネゴケでは初期気孔系列細胞では初期GMCが幹細胞様の形質をもつ可能性が示唆されている。気孔系列細胞の細胞分裂・細胞分化は、サブファミリーIaに属するbHLH型転写因子 (Ia bHLH) とサブファミリーIIIbに属するbHLH型転写因子 (IIIb bHLH) からなる転写因子ヘテロ二量体によって正に制御されている。

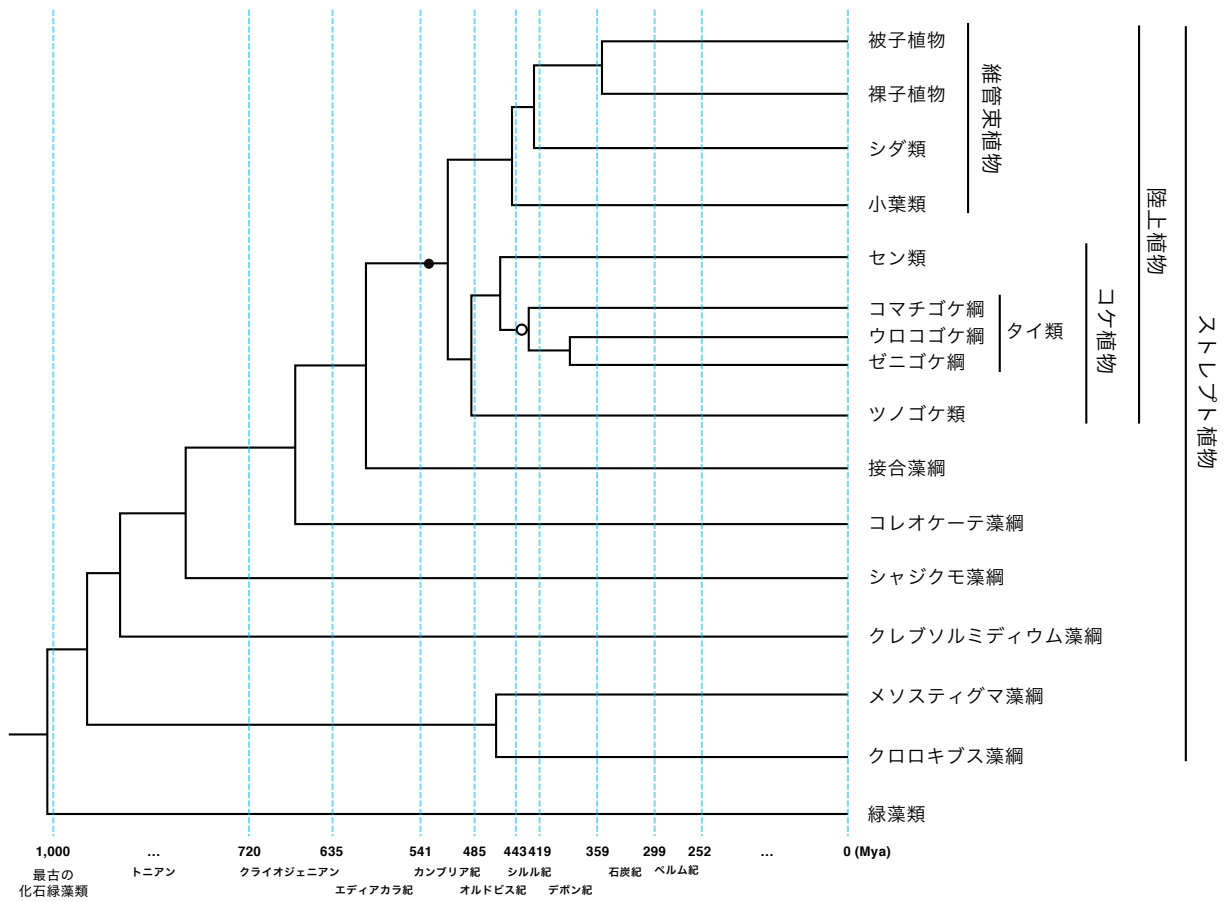


図2. 植物の系統樹

Harris et al. 2022によって推定された分岐年代に基づいて作成した陸上植物の系統樹。気孔は陸上植物の共通祖先（515–493 Mya, カンブリア紀）で獲得され（黒丸）、現生タイ類の共通祖先（440–412 Mya, シルル紀）で失われたと考えられる（白丸）。最古の化石陸上植物（*Cooksonia barrandei*, 前維管束植物）は4億3200万年前の地層から発見されている。気孔は陸上植物の孢子体（ $2n$ ）世代で確認されるが、化石植物 *Aglaophyton* や *Holneophyton*（4億1000万年前ごろ）の配偶体（ $n$ ）では気孔様の構造が見られる。IaおよびIIIb bHLHは藻類では発見されていないため、陸上植物の共通祖先で獲得されたと考えられる。藻類の分岐年代ははっきりしていないことを注記しておく。Mya, million years ago.

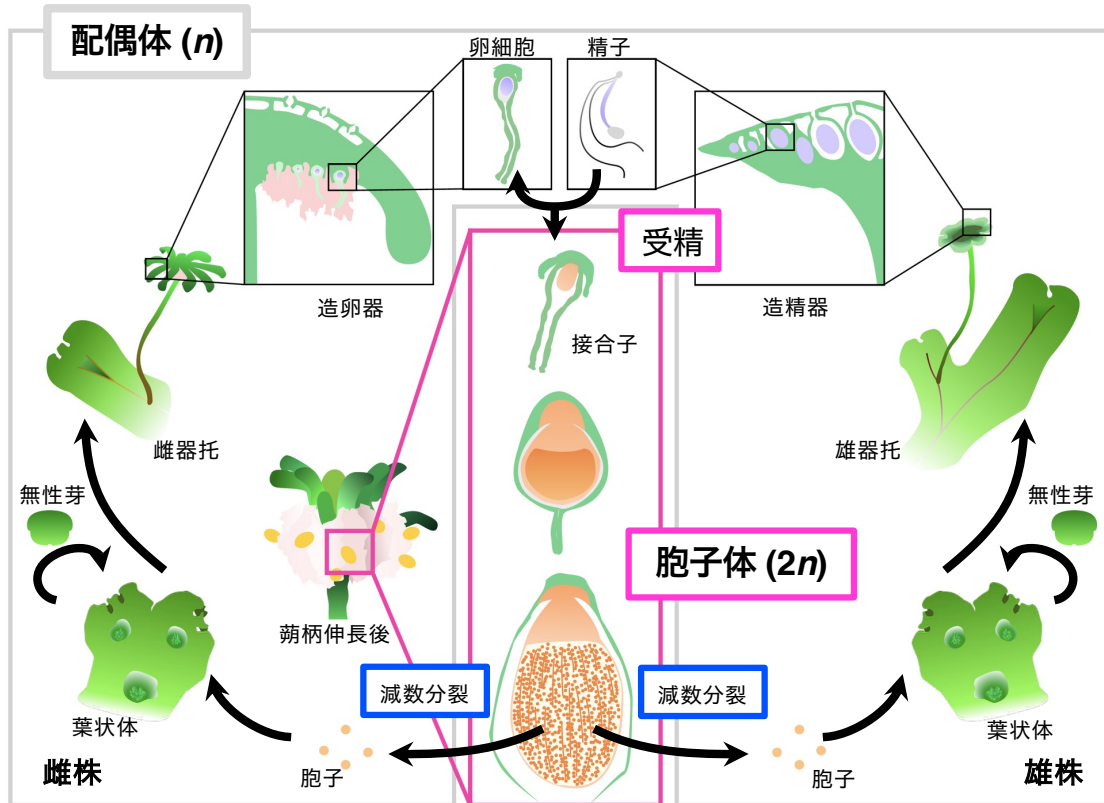
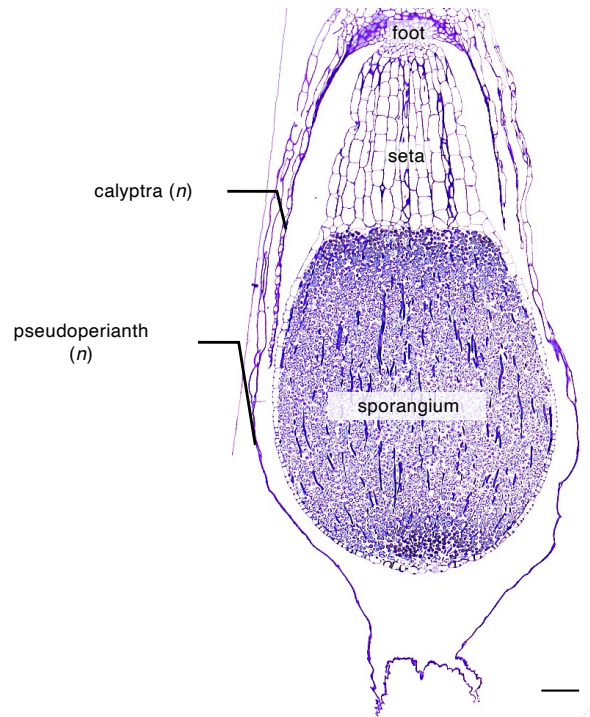


図3. タイ類ゼニゴケの生活環

モデルタイ類であるゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* subsp. *ruderalis* Bischl. & Boissel.-Dub.) は配偶体 (n) 世代優占の生活環をもつ雌雄異株植物である。栄養成長相では葉状体という形態を取り、平面的に二叉分岐を繰り返して成長し、雌雄で大きな違いは見られない。葉状体の背側表皮に杯状体とよばれるカップ状の組織が形成され、その中で表皮1細胞由来のクローン器官である無性芽が形成される。無性芽は光の受容および吸水により休眠が解除され、成長すると葉状体を形成する。遠赤色光照射により栄養成長相から生殖成長相に移行し、雄株からは雄器托、雌株からは雌器托とよばれる傘状の器官が形成されるようになる（柄を除いた部分をそれぞれ雄器床、雌器床という）。雄器床背側では造精器、雌器床腹側では造卵器がそれぞれ形成される。雄器床に水が落ちるとそこに精子が放出され、精子を含んだ水が造卵器にたどり着く。造卵器の頸部とよばれる溝を通過した精子と卵細胞が受精をすると接合子となり、細胞分裂・細胞分化を繰り返すことで多細胞の孢子体 (2n) が形成される。孢子体は造卵器や雌器床由来の保護器官（カリプトラ・偽花被・苞膜）の中で成長する。受精後1ヶ月ほどで成熟した孢子 (n) が作られる。孢子の成熟後、柄の細胞伸長により孢子嚢は保護器官を破って外に押し出され、乾燥により柄壁が裂開することで内包されている孢子が散布される。孢子は発芽すると葉状体を形成する。

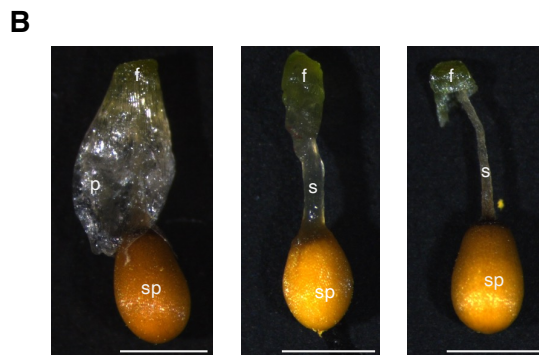


**図4. ゼニゴケ孢子体の組織**

ゼニゴケ孢子体の縦断切片。基部側から足 (foot) , 蒴柄 (seta) , 孢子嚢 (sporangium) という3つの組織・器官からなる。孢子嚢は造卵器および雌器床由来の保護器官であるカリプトラ (calyptra) , 偽花被 (pseudoperianth) , 苞膜 (involucre, 偽花被のさらに外側) に包まれて成長する。

Bar, 100  $\mu$ m.



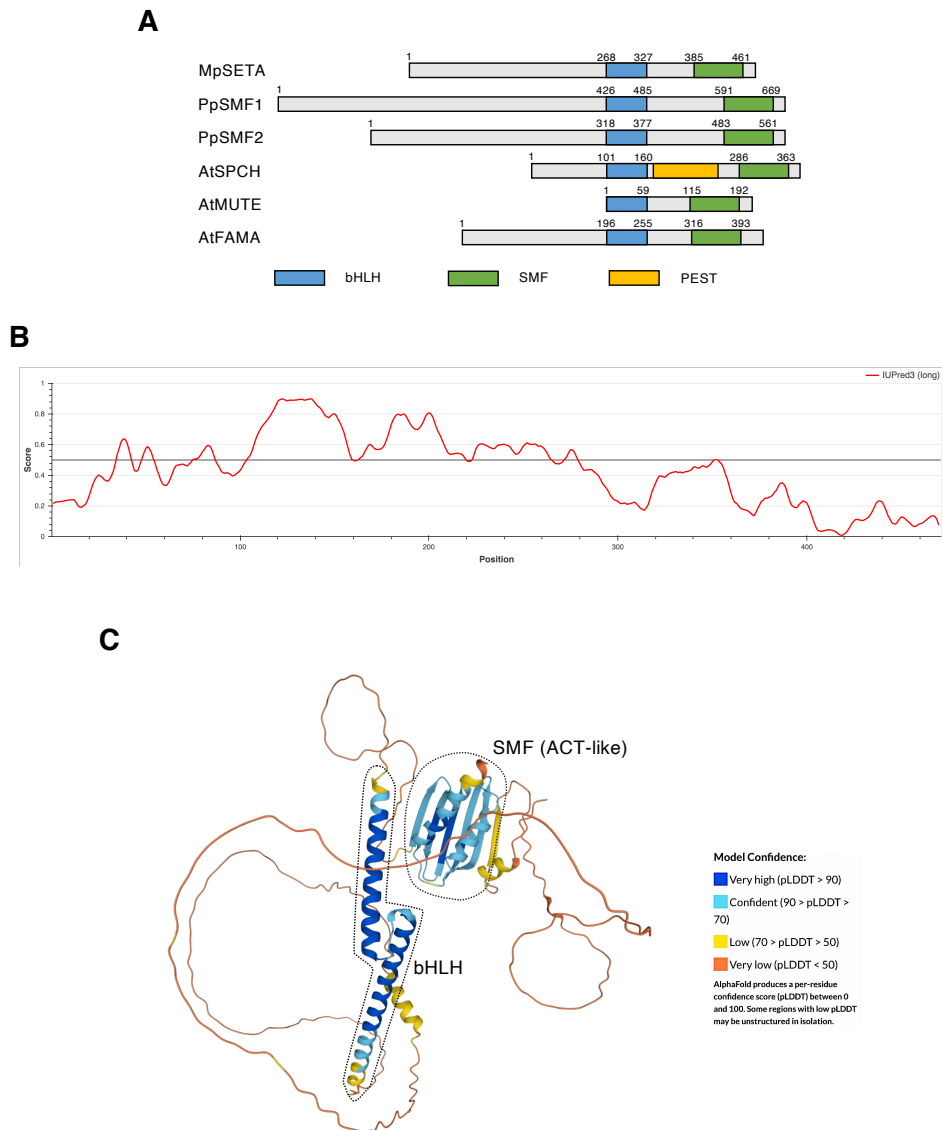


**図5. 蒴柄の伸長により孢子嚢は配偶体由来の保護器官の外に押し出される**

(A) 受精前後の雌器床の写真。上段が横から見た雌器床，下段が腹側から見た雌器床。受精後に苞膜，偽花被，カリプトラが発達し，孢子体を保護する。受精後およそ1ヶ月で孢子が成熟し，蒴柄の伸長により孢子嚢が保護器官の外に出る。孢子嚢は乾燥により不規則に裂開し，孢子が散布される。

(B) 蒴柄伸長後の孢子体。左から雌器床から摘出した孢子体，カリプトラを切除した蒴柄伸長直後の孢子体，蒴柄伸長後2-3日経過した孢子体を示す。蒴柄は伸長後すぐに乾燥し枯死する。f, 足; s, 蒴柄; p, 偽花被; sp, 孢子嚢。

Bars, 5 mm. (A) , 1 mm (B) .



## 図6. MpSETAのドメイン構造

- (A) サブファミリーIaに属するbHLH型転写因子のドメイン構造。これらはすべて、DNA結合領域であるbHLHドメインと、Ia bHLHに特有のC末端ドメインであるSMF (ACT-like) ドメインを有する。AtSPCHのみリン酸化修飾をうけることでタンパク質の分解を指示するPESTドメインをもつ。Mp, *M. polymorpha*; Pp, *P. patens*; At, *A. thaliana*.
- (B) IUPred3によるMpSETAの天然変性領域 (IDR, intrinsic disordered region) の予測。スコアが閾値より高い領域がIDRであることが予測される領域である。
- (C) Alphafold2によるMpSETAの三次構造予測 [Uniprot: A0A2R6X7M8 · A0A2R6X7M8\_MARPO].



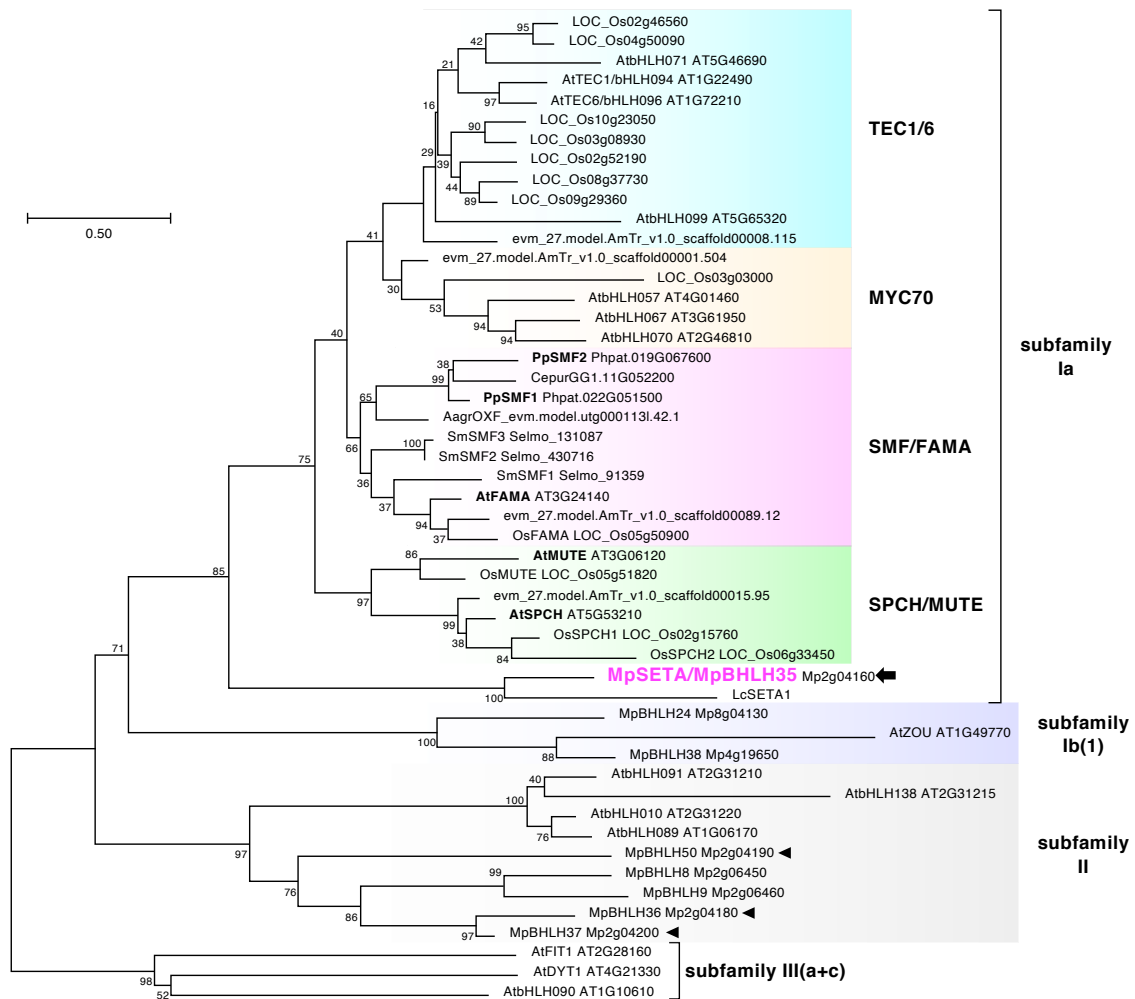
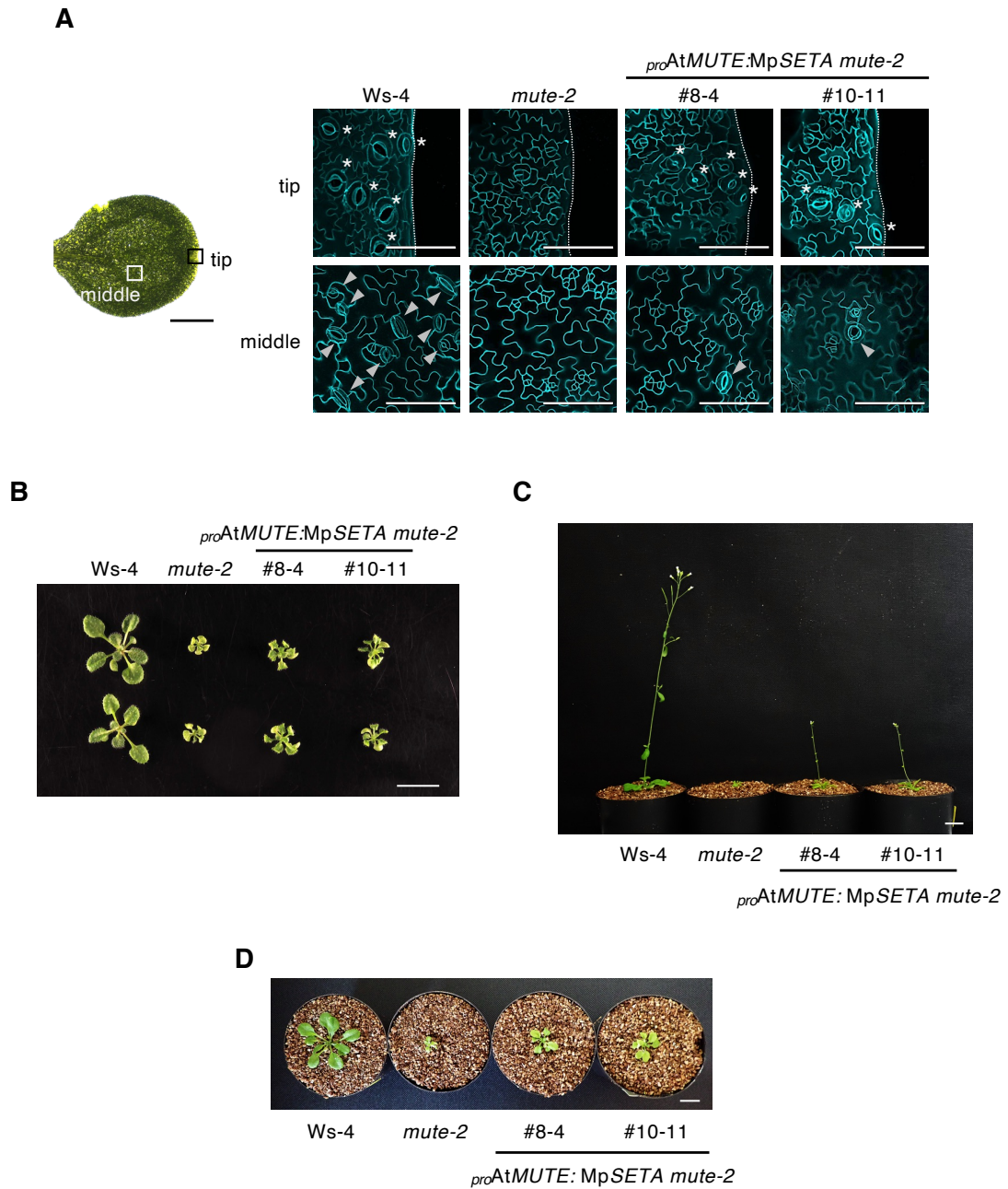


図8. サブファミリーIaに属するbHLH型転写因子の分子系統樹

最尤法により作成されたサブファミリーIa, Ib(1), II, III(a+c)に属するbHLH型転写因子の分子系統樹。ノード上の数字はブートストラップ値、バーはアミノ酸置換率を示す。典型的なIa bHLHは以下の4つのクレードに分かれた：TEC1/6クレード、MYC70クレード、SMF/FAMAクレード、SPCH/MUTEクレード。種名の略称は次の通りである：Mp, *M. polymorpha* (タイ類・ゼニゴケ)；Lc, *L. cruciata* (タイ類・ミカツキゼニゴケ)；Pp, *P. patens* (セン類・ヒメツリガネゴケ)；Cepur, *Ceratodon purpureus* (セン類・ヤノウエノアカゴケ)；Aagr, *Anthoceros agrestis* (ツノゴケ類・ナガサキツノゴケ)；Sm, *Selaginella moellendorffii* (小葉類・イヌカタヒバ)；AmTr, *Amborella trichopoda* (基部被子植物・アンボレラ)；Os, *Oryza sativa* (単子葉類・イネ)；At, *A. thaliana* (双子葉類・シロイヌナズナ)。矢印はMpSETA/MpBHLH35 (Mp2g04160)、矢尻は先行研究でFAMA-likeであると指摘されていたbHLH型転写因子を示す。サブファミリーIb(1), II, III(a+c)にはゼニゴケおよびシロイヌナズナのアミノ酸配列のみを用いた。いずれもbHLHドメインおよびACT-likeドメインをもち、これらを解析に用いた。



**図9. MpSETAはシロイヌナズナの *mute* 変異体の表現型を一部相補する**

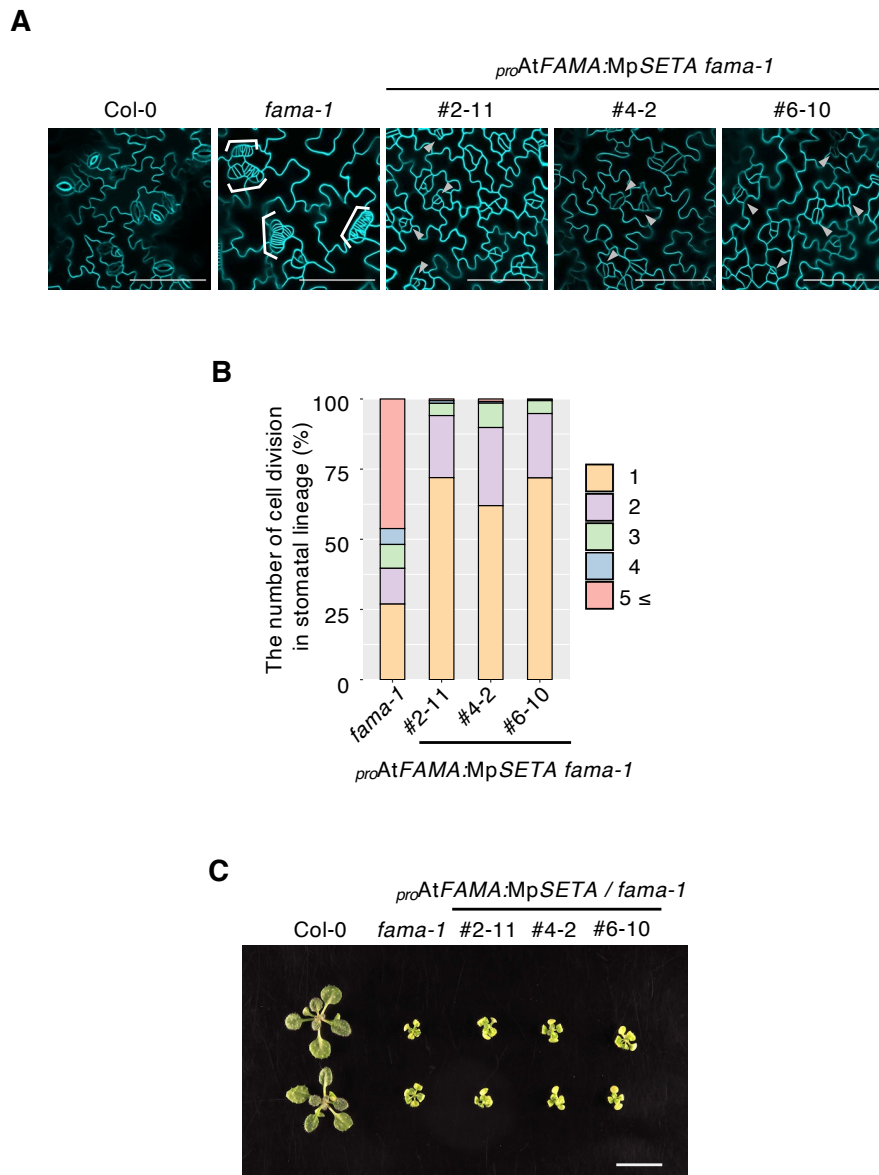
(A) 野生型 (Ws-4), *mute-2* 変異体および *mute-2* 変異体背景で *proAtMUTE:MpSETA* を発現する相補株 (#8-4および#10-11) の低温処理後9日目 (9 days after stratification, DAS) の子葉背軸側の共焦点レーザー顕微鏡像。写真左に示すように、上段が排水組織付近の表皮、下段が子葉中肋付近の表皮を示す。細胞膜をFM4-64により染色した (シアン)。アスタリスクは水孔、矢尻は気孔を示す。

(B) 17 DASの植物体の地上部の比較画像。

(C,D) 30 DASの植物体の画像。(D)は摘芯後のロゼット葉の写真を示す。

Bars, 1 mm (A, 左), 100  $\mu$ m (A, 右), 1 cm (B-D).





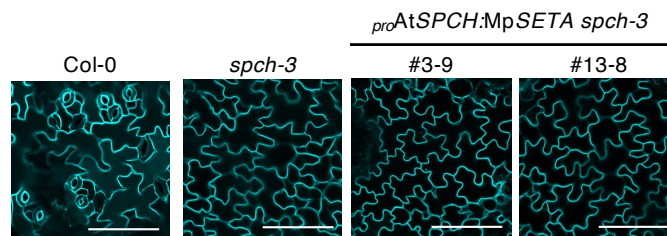
**図10. MpSETAはシロイヌナズナの fama 変異体の気孔における表現型を一部相補する**

**(A)** 野生型 (Col-0) , *fama-1*変異体および*fama-1*変異体背景で*proAtFAMA:MpSETA*を発現する相補株 (#2-11, #4-2および#6-10) の9 DASの子葉背軸側の共焦点レーザー顕微鏡像。括弧は孔辺母細胞が過剰に分裂することにより生じる*fama* tumor, 矢尻は相補株における気孔系列細胞を示す。細胞膜をFM4-64で染色した (シアン)。

**(B)** 9 DASの子葉の気孔系列細胞における対称分裂の回数の割合を定量した結果.  $n \geq 320$

**(C)** 17 DASの植物体の地上部の比較画像。

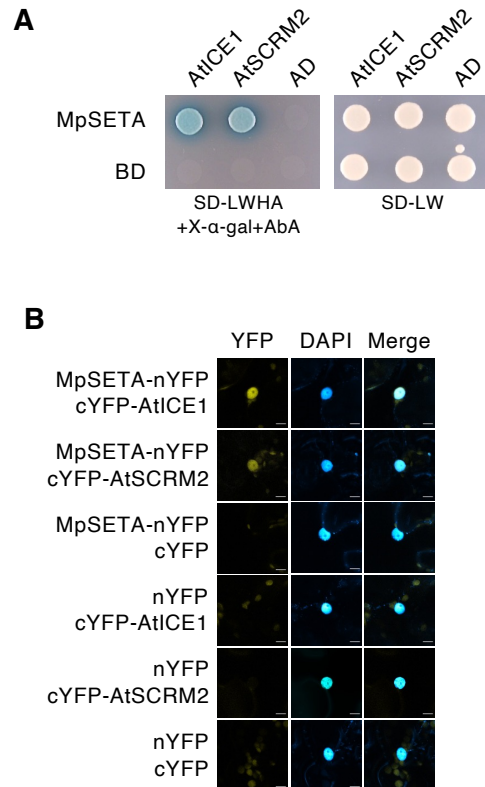
Bars, 100  $\mu$ m (A), 1 cm (C).



**図11. MpSETAはシロイヌナズナの *spch*変異体の気孔における表現型を相補しない**

野生型 (Col-0) , *spch-3*変異体および*spch-3*変異体背景で $proAtSPCH:MpSETA$ を発現する相補株 (#3-9および#13-8) の9 DASの子葉背軸側の共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞膜をFM4-64で染色した (シアン)。

Bars, 100  $\mu$ m.

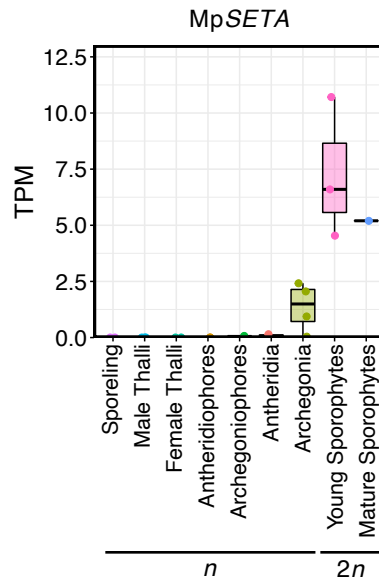


**図12. MpSETAはAtICE1およびAtSCRM2と相互作用しうる**

- (A)** 酵母ツーハイブリッド法によるタンパク質相互作用の検証. GAL4 Activation Domain (AD) のC末端にクローニングしたCDSを縦に, GAL4 DNA Binding Domain (BD) のC末端にクローニングしたCDSを横に示す. 呈色基質X-α-galおよび抗真菌抗生物質 Aureobasidin Aを含む選択培地 (SD-LWHA+X-α-gal+Aureobasidin A) および非選択培地 (SD-LW) で酵母の生存を確認した. ネガティブコントロールとしてADまたはBDのみを発現する空ベクターを用いた.
- (B)** BiFC法によるタンパク質相互作用の検証. 播種後4週間のベンサミアナタバコ本葉にアグロバクテリウムを感染させて一過的に発現させ, 接種後1.5日目に表皮細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した. コンストラクトの組み合わせを左に示す. それぞれ, YFP蛍光画像 (左), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) により染色した核の蛍光画像 (中央), それらをマージした画像 (右) を示している. ネガティブコントロールとしてnYFPまたはcYFPのみを発現する空ベクターを用いた.

Bars, 10 μm.





**図13. MpSETAは孢子体優先的に発現する**

公開されているゼニゴケの9つの組織別トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) のデータを再解析して得られたMpSETAの発現プロファイル。Y軸はtranscripts per million (TPM) を示す。孢子発芽体 (sporeling) および葉状体 (thallus) は配偶体の栄養器官、雄器床 (antheridiophore) および雌器床 (archegoniophore) は配偶体の生殖器托、造精子器 (antheridium) および造卵器 (archegonium) は配偶体の生殖器官である。MpSETAは若い孢子体 (young sporophyte, 受精後13日目) および成熟した孢子体 (mature sporophyte) で発現上昇する。

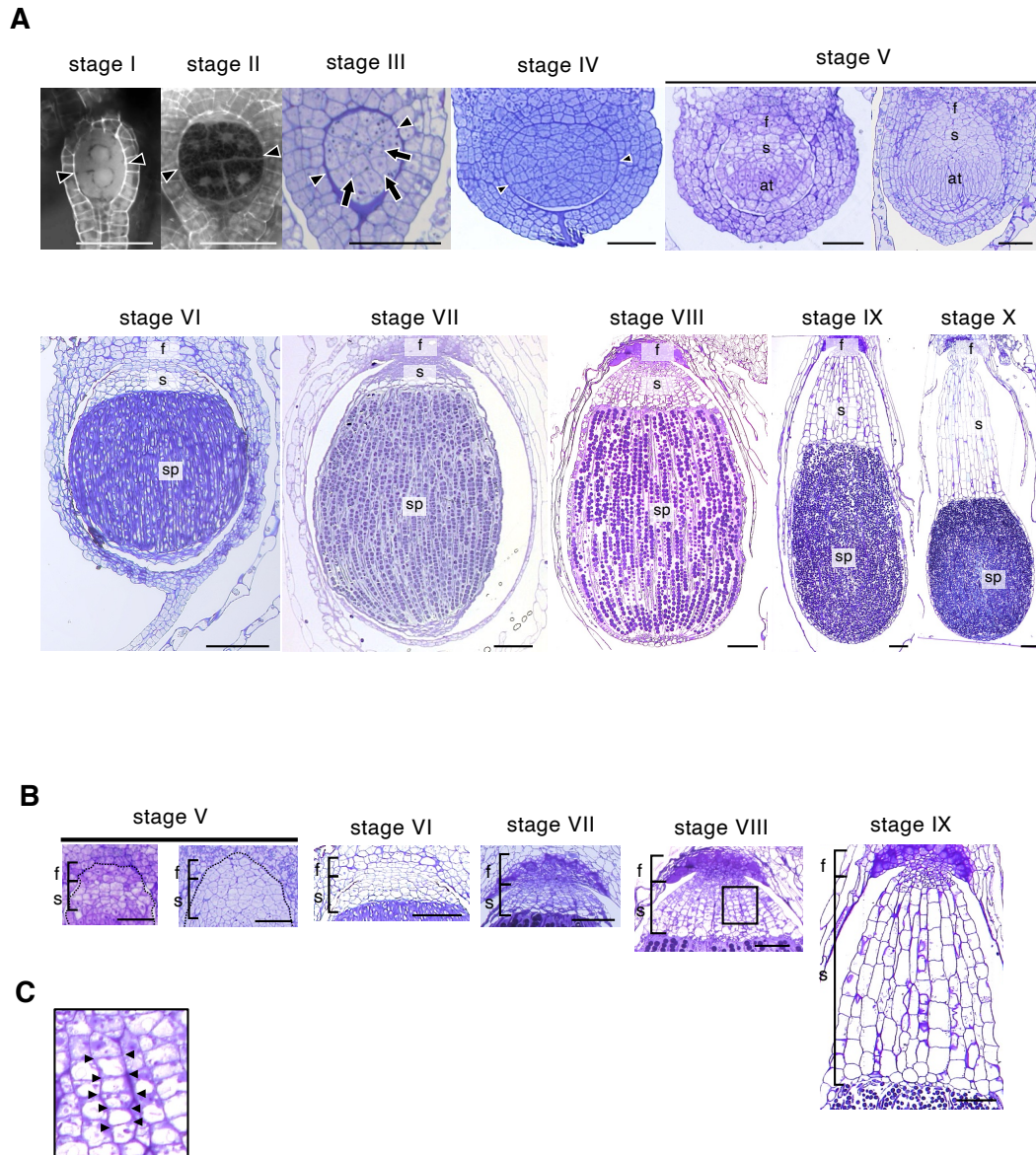


図14. ゼニゴケ胞子体の発生過程

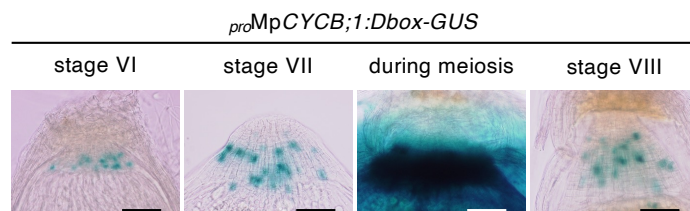
(A) 受精後4-40日目のゼニゴケ胞子体の発生ステージの分類。組織分化に応じて以下の10ステージに分類した。(I) 2細胞期, (II) 4細胞または8細胞期, (III) エンドセシウム (胞原組織になる細胞) とアンフィセシウム (蒴壁になる細胞) を分化した球状胚期, (IV) 後期球状胚期, (V) 胞原組織期, (VI) 胞原細胞期, (VII) 胞子母細胞期, (VIII) 胞子四分子期, (IX) 成熟期, (X) 蒴柄伸長後の成熟胞子体。矢尻は接合子の第一分裂面, 矢印は分化したエンドセシウムを示す。

(B) (A)で示した図の足・蒴柄領域の拡大図。

(C) stage VIIIにおける蒴柄細胞の拡大図。(B)の黒枠で囲った領域を拡大している。矢尻は対称分裂によって生じた分裂面を示す。

f, 足; s, 蒴柄; at, 胞原組織; sp, 胞子嚢。

Bars, 50  $\mu$ m (A, 上段), 100  $\mu$ m (A, 下段, B).



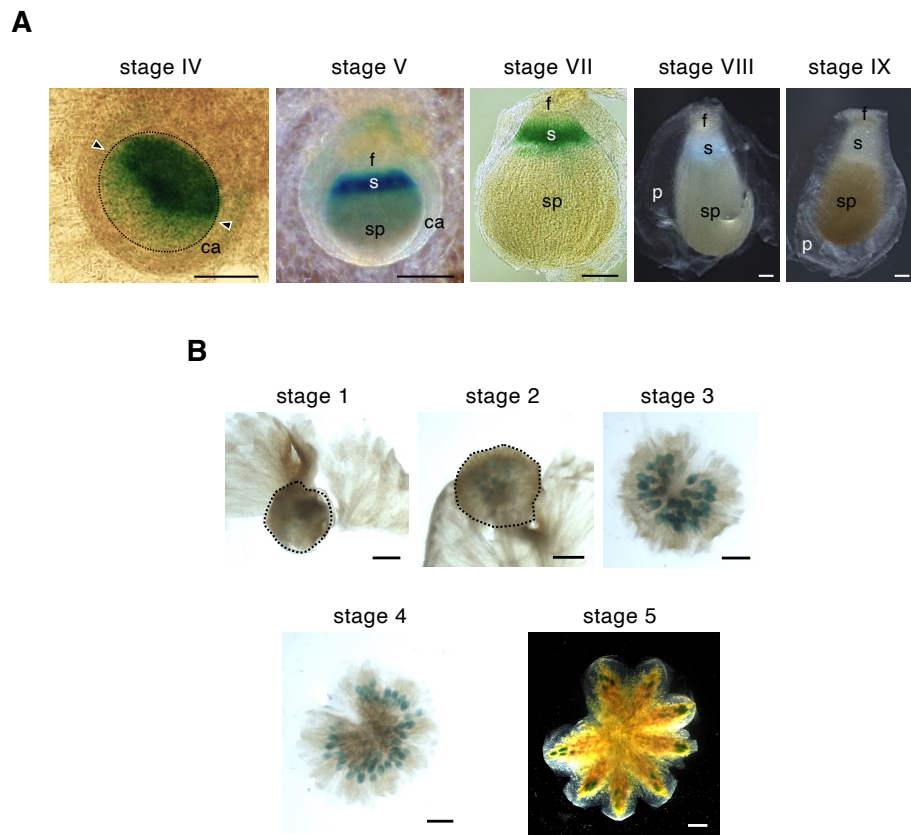
**図15. 蒴柄細胞における細胞分裂活性**

細胞周期マーカーであるサイクリン (*MpCYCB;1*) を発現する形質転換体

(*proMpCYCB;1:Dbox-GUS*) の、発生後期の孢子体の蒴柄領域におけるGUS染色像。

*MpCYCB;1*は減数分裂期の孢子母細胞で高発現するため、蒴柄領域にGUSの呈色基質が滲み出ている。

Bars, 100  $\mu$ m.



**図16. MpSETAの組織別発現パターン解析**

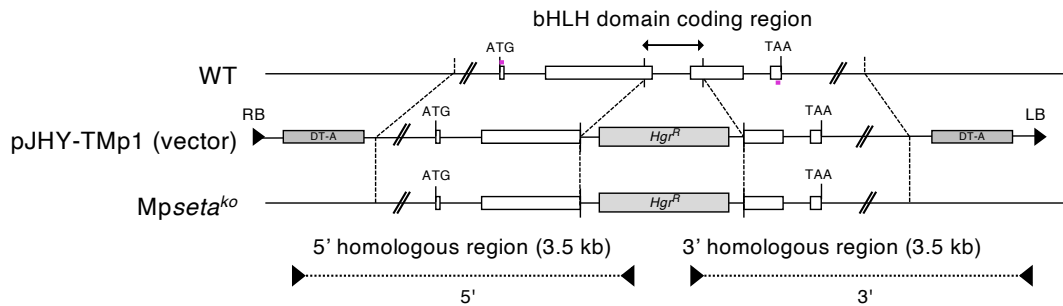
MpSETAプロモーター制御下でGUSを発現させた株 ( $_{pro}MpSETA:GUS$ ) のGUS染色像.

**(A)** 胞子体の各ステージにおけるMpSETAの発現パターン. ca, カリプトラ; p, 偽花被; s, 莖柄; f, 足; sp, 胞子嚢.

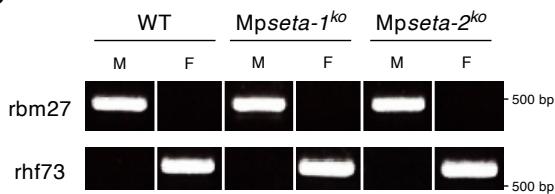
**(B)** 雄器床の各ステージにおけるMpSETAの発現パターン.

Bars, 100  $\mu$ m (A), 1 mm (B).

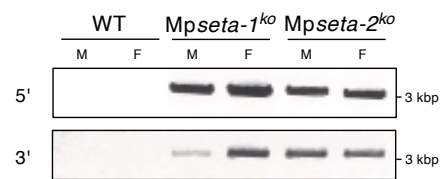
**A**



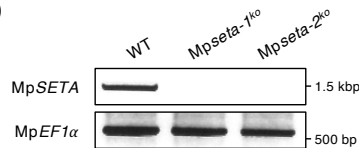
**B**



**C**



**D**



### 図17. *Mpseta*ノックアウト株の作出

- (A) 相同組換えにより破壊された*MpSETA*遺伝子座の構造。独立に作出した*Mpseta*ノックアウト株 (*Mpseta-1<sup>ko</sup>*および*Mpseta-2<sup>ko</sup>*) では、bHLHドメインをコードする領域がハイグロマイシン耐性遺伝子の発現カセットに置換されている。白い箱はタンパク質をコードするエキソンを示している。WT, wild type; DT-A, diphtheria-toxin A-chain gene; *Hgr<sup>R</sup>*, hygromycin-resistance gene cassette.
- (B) *Mpseta<sup>ko</sup>*株の雌雄判定の結果を示す。rbm27はV染色体 (雄) 特異的マーカー、rhf73はU染色体 (雌) 特異的マーカー。M, male; F, female.
- (C) *Mpseta<sup>ko</sup>*株のジェノタイプングの結果。使用したプライマーの位置を (A) に示す。
- (D) 受精後21日目 (21 days post fertilization, 21 DPF) の胞子体から抽出したRNAを元にcDNAを作製し、*MpSETA*の全長でかかるプライマー (Aのマゼンタ部分) を用いて行ったRT-PCRの結果。内部標準として*MpEF1α*を用いた。

Bars, 10  $\mu$ m.

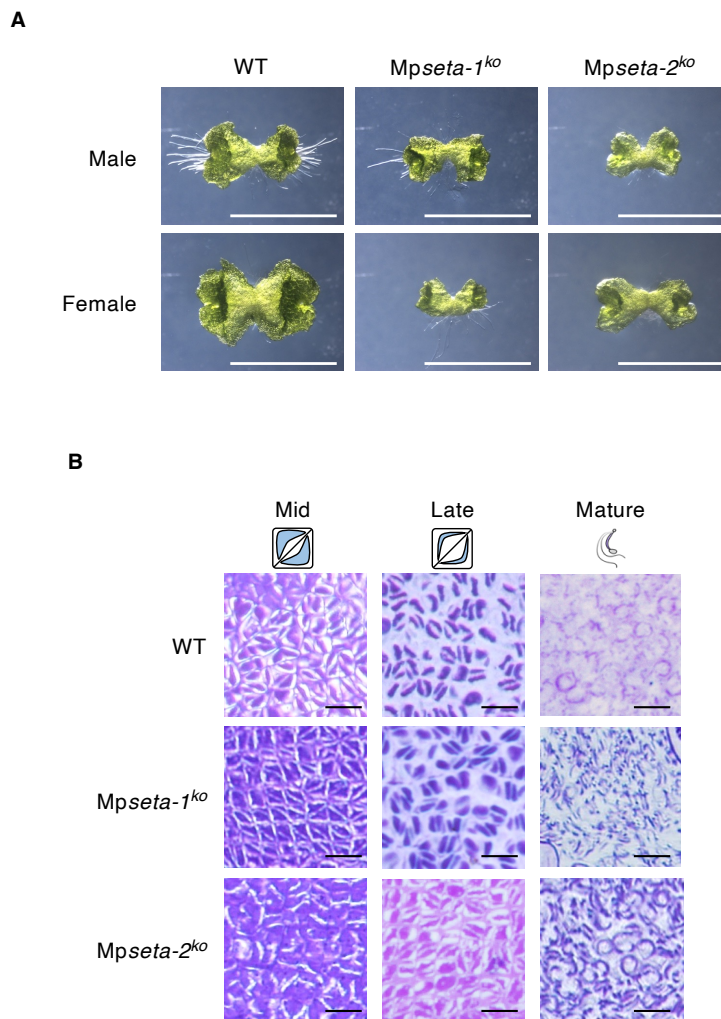


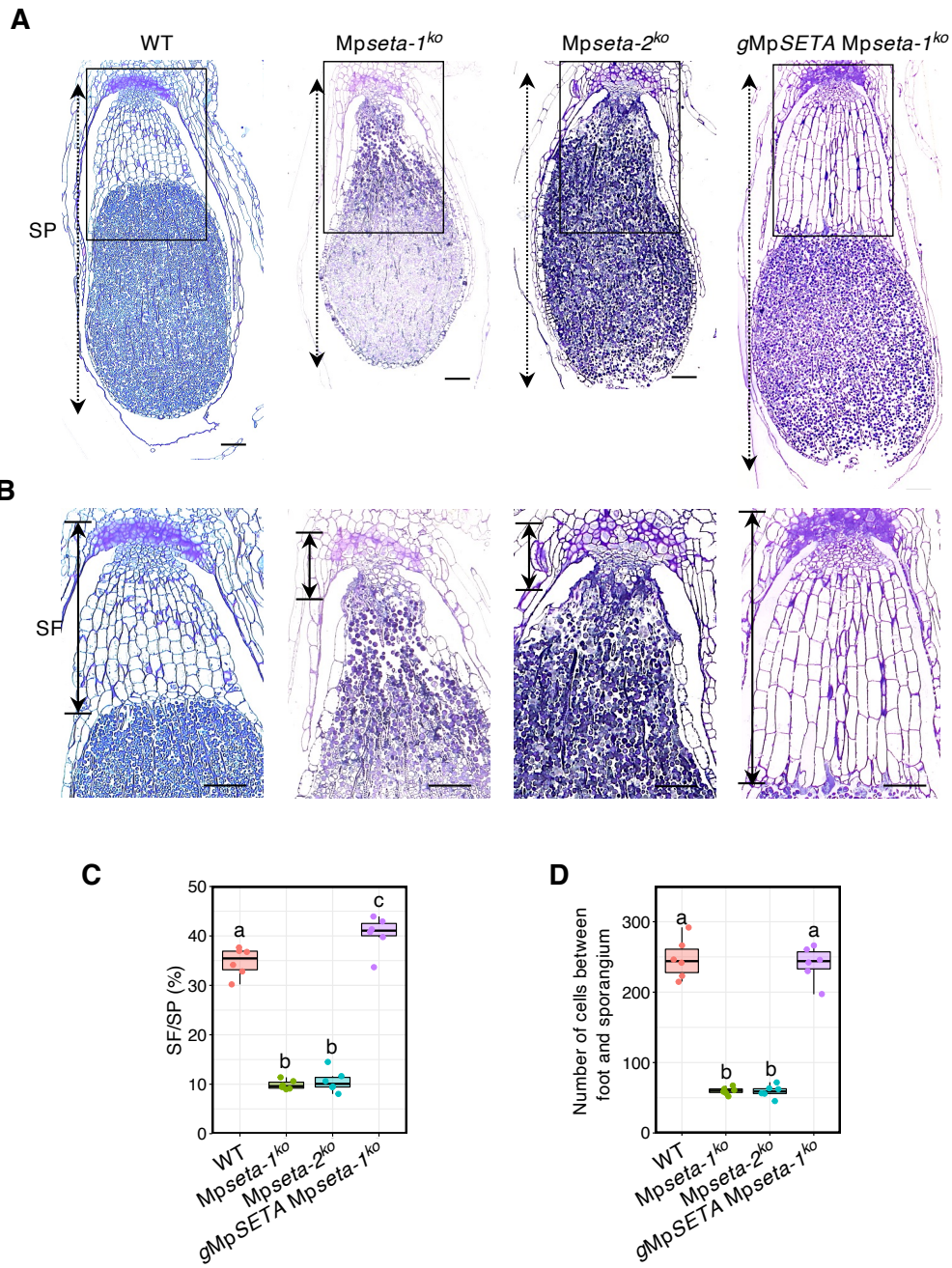
図18. *Mpseta<sup>ko</sup>*株の葉状体や精子形成に異常は見られない

(A) 8日目の葉状体の写真。

(B) 造精器の組織切片を作製し、精子の成熟過程を観察した結果。

Bars, 5 mm (A), 10  $\mu$ m (B).



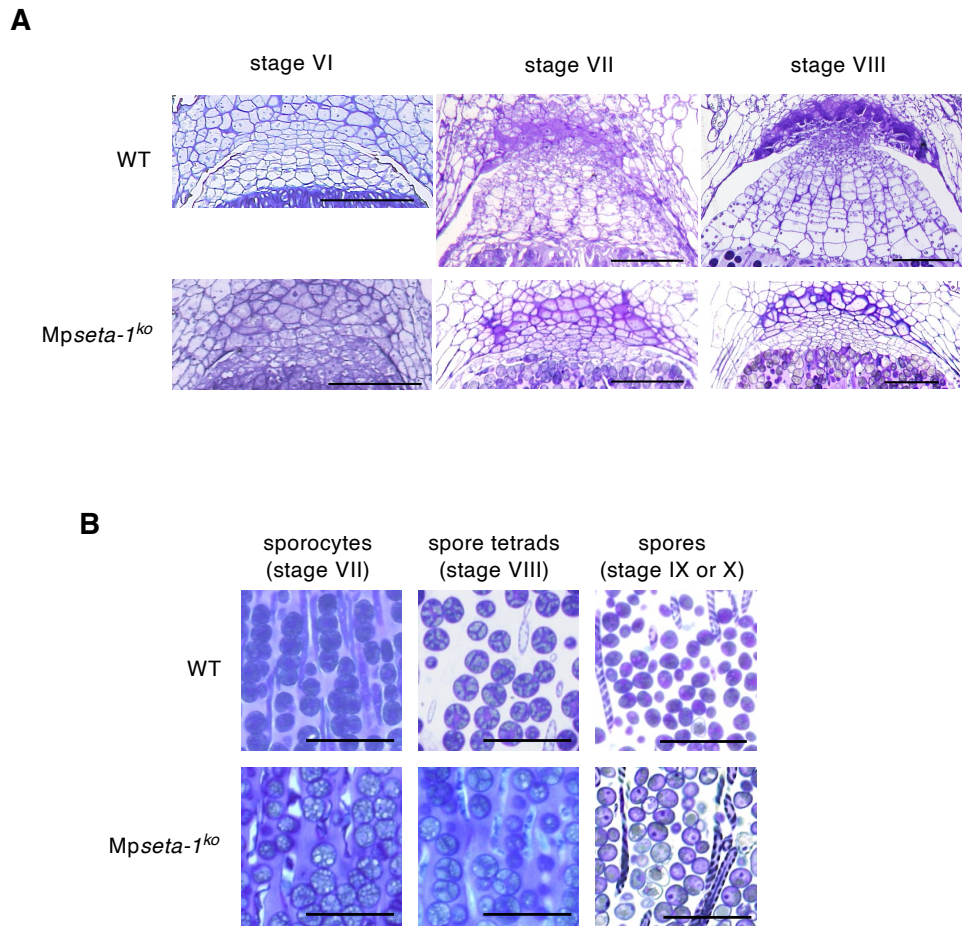


**図19. Mpseta<sup>ko</sup>株は柄を欠損する**

(A,B) 野生型 (WT), Mpseta-1<sup>ko</sup>株, Mpseta-2<sup>ko</sup>株およびMpseta-1<sup>ko</sup>株に上流のプロモーター領域を含むMpSETA遺伝子座のゲノム断片を導入した相補株 (gMpSETA Mpseta-1<sup>ko</sup>) の成熟した孢子体の縦断切片. 四角で囲った領域の拡大図を(B)に示す. 破線が孢子体全体の長さ (SP), 実線が足から孢子囊基部までの長さ (SF) を示す.

(C,D) SF/SP比および足から孢子囊基部の領域に存在する細胞数を定量した結果. 柄と足との境界は不明瞭であるため, 細胞数の定量には伝達細胞 (transfer cell, 足と配偶体との境界にある大きい細胞. 細胞壁の肥厚が見られる) を除いた細胞を用いた. 異なる文字は統計的に有意に異なる平均値を示す ( $p < 0.01$ , Tukey's HSD test).  $n = 6$ .

Bars, 100  $\mu$ m.



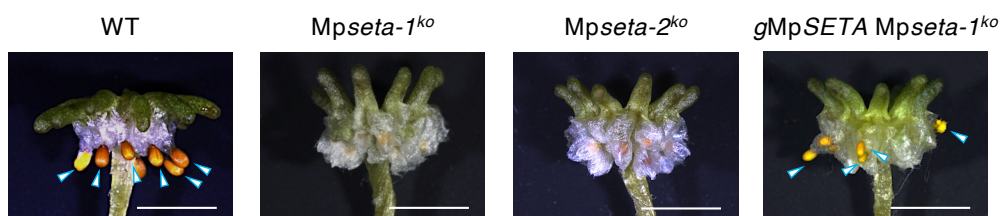
**図20. Mpseta<sup>ko</sup>株における蒴柄および胞子の発生過程**

**(A)** 野生型 (WT) およびMpseta-1<sup>ko</sup>株のstage VIからstage VIIの胞子体の蒴柄領域の比較画像。

**(B)** WTおよびMpseta-1<sup>ko</sup>株の胞子の発生過程。左から胞子母細胞，胞子四分分子，胞子を示す。長い細胞は弾糸細胞である。

Bars, 100 μm (A), 50 μm (B).

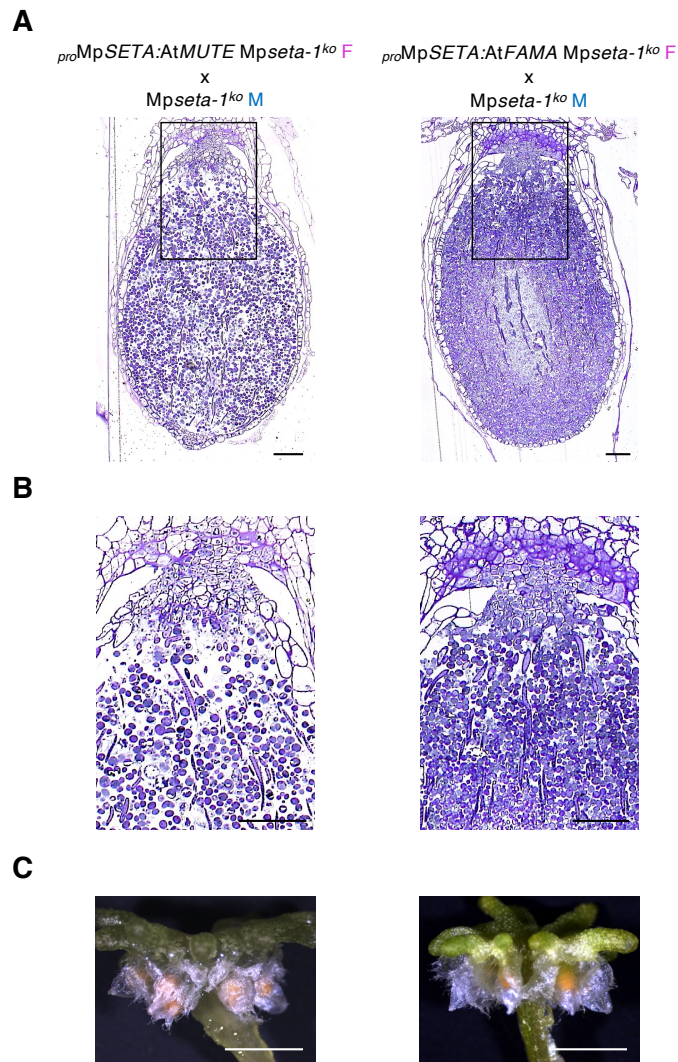




**図21.  $Mpseta^{ko}$ 株は蒴柄を欠損するために孢子嚢が保護器官の外に出ない**

受精後1ヶ月の成熟した孢子体を含む雌器床の写真。野生型の孢子嚢は、孢子の成熟後に蒴柄細胞の伸長により苞膜の外に露出するが、 $Mpseta^{ko}$ 株の孢子嚢は孢子が成熟しているにもかかわらず苞膜の外に現れない。

Bars, 5 mm.



**図22. *AtMUTE*および*AtFAMA*は*Mpseta<sup>ko</sup>*株の莖柄における表現型を相補しない**

メスの*Mpseta-1<sup>ko</sup>*株に*proMpSETA:AtMUTE*または*proMpSETA:AtFAMA*を発現するコンストラクトを導入した株 (*proMpSETA:AtMUTE Mpseta-1<sup>ko</sup>*または*proMpSETA:AtFAMA Mpseta-1<sup>ko</sup>*) と、オスの*Mpseta-1<sup>ko</sup>*株を交配して形成されたF<sub>1</sub>胞子体の表現型。成熟した胞子体の縦断切片を(A)および(B)、雌器床の写真を(C)に示す。(A)で四角で囲った領域の拡大図を(B)に示す。

Bars, 100 μm (A,B), 5 mm (C).

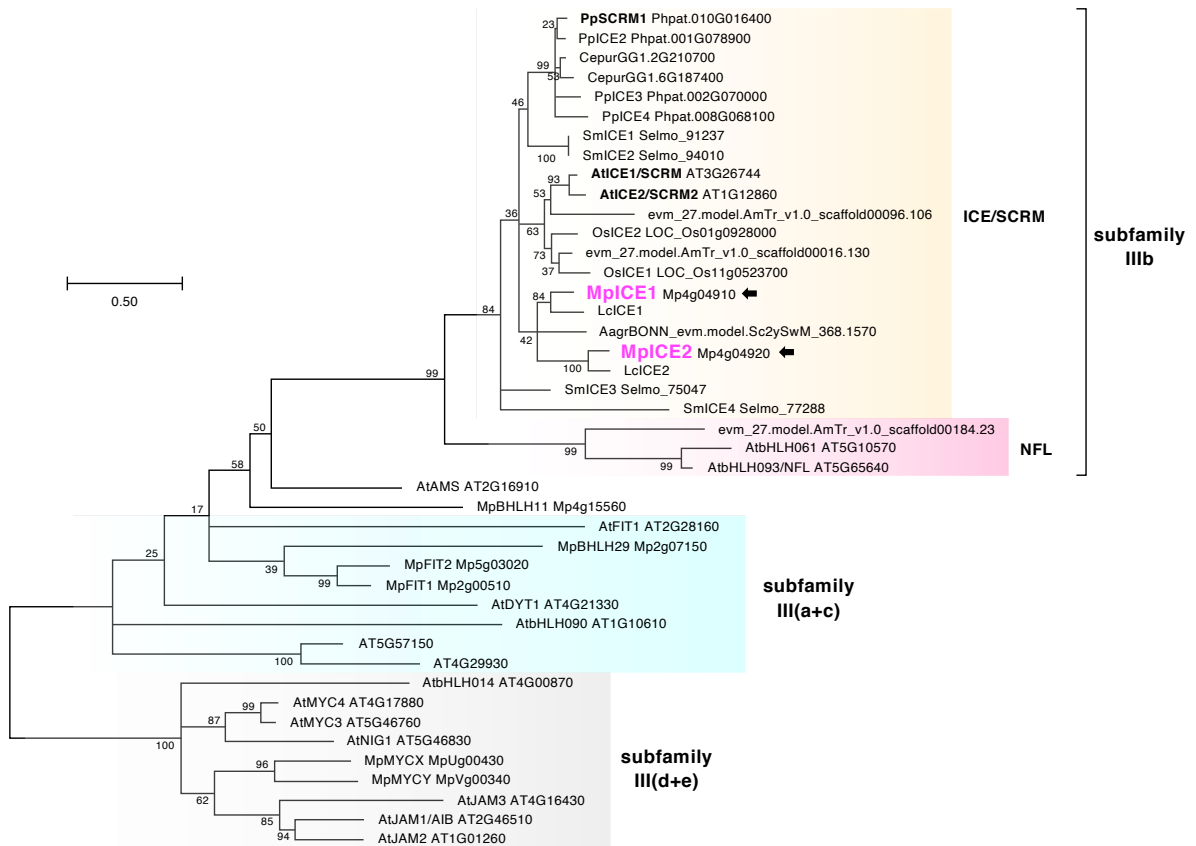
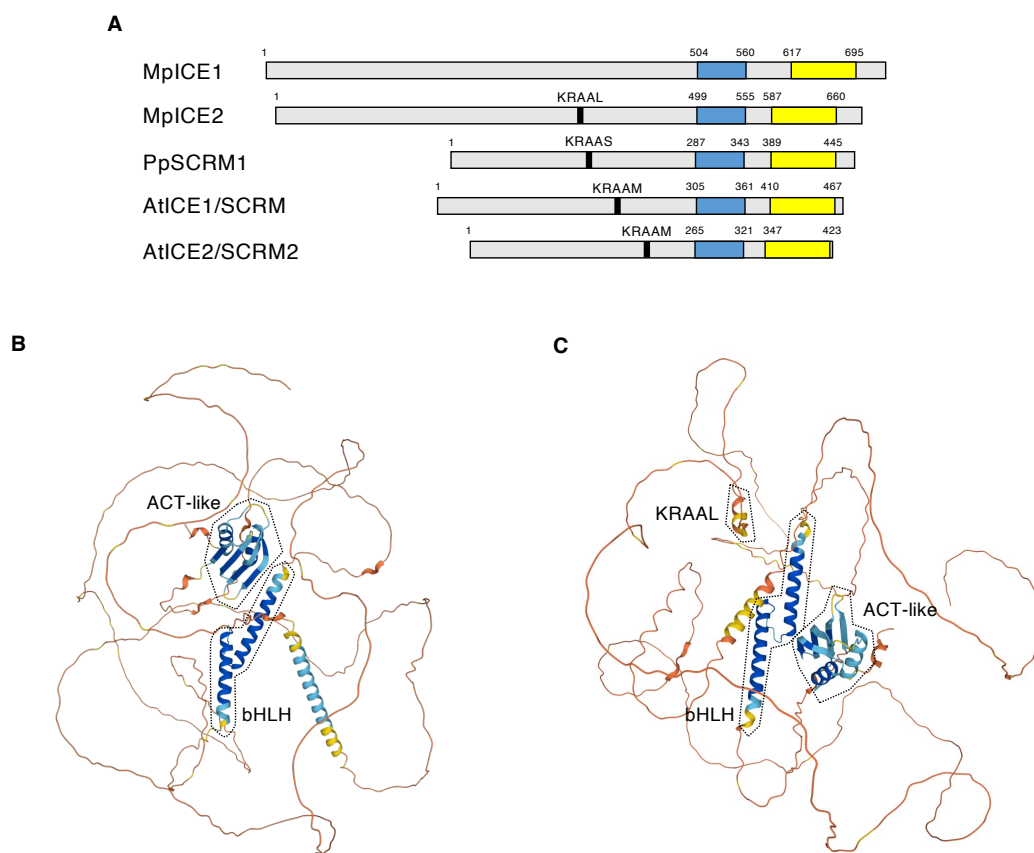


図23. サブファミリーIIIbに属するbHLH型転写因子の分子系統樹

最尤法により作成されたサブファミリーIIIb, III(a+c), III(d+e)に属するbHLH型転写因子の分子系統樹。ノード上の数字はブートストラップ値、バーはアミノ酸置換率を示す。IIIb bHLHは以下の4つのクレードに分かれた：ICE/SCRMクレード、NFLクレード。種名の略称は次の通りである：Mp, *M. polymorpha* (タイ類・ゼニゴケ)；Lc, *L. cruciata* (タイ類・ミカヅキゼニゴケ)；Pp, *P. patens* (セン類・ヒメツリガネゴケ)；Cepur, *C. purpureus* (セン類・ヤノウエノアカゴケ)；Aagr, *A. agrestis* (ツノゴケ類・ナガサキツノゴケ)；Sm, *S. moellendorffii* (小葉類・イヌカタヒバ)；AmTr, *A. trichopoda* (基部被子植物・アンボレラ)；Os, *O. sativa* (単子葉類・イネ)；At, *A. thaliana* (双子葉類・シロイヌナズナ)。矢印はMpICE1 (Mp4g04910) およびMpICE2 (Mp4g04920) を示す。サブファミリーIII(a+c)およびIII(d+e)にはゼニゴケおよびシロイヌナズナのアミノ酸配列のみを用いた。いずれもbHLHドメインおよびACT-likeドメインをもち、これらを解析に用いた。

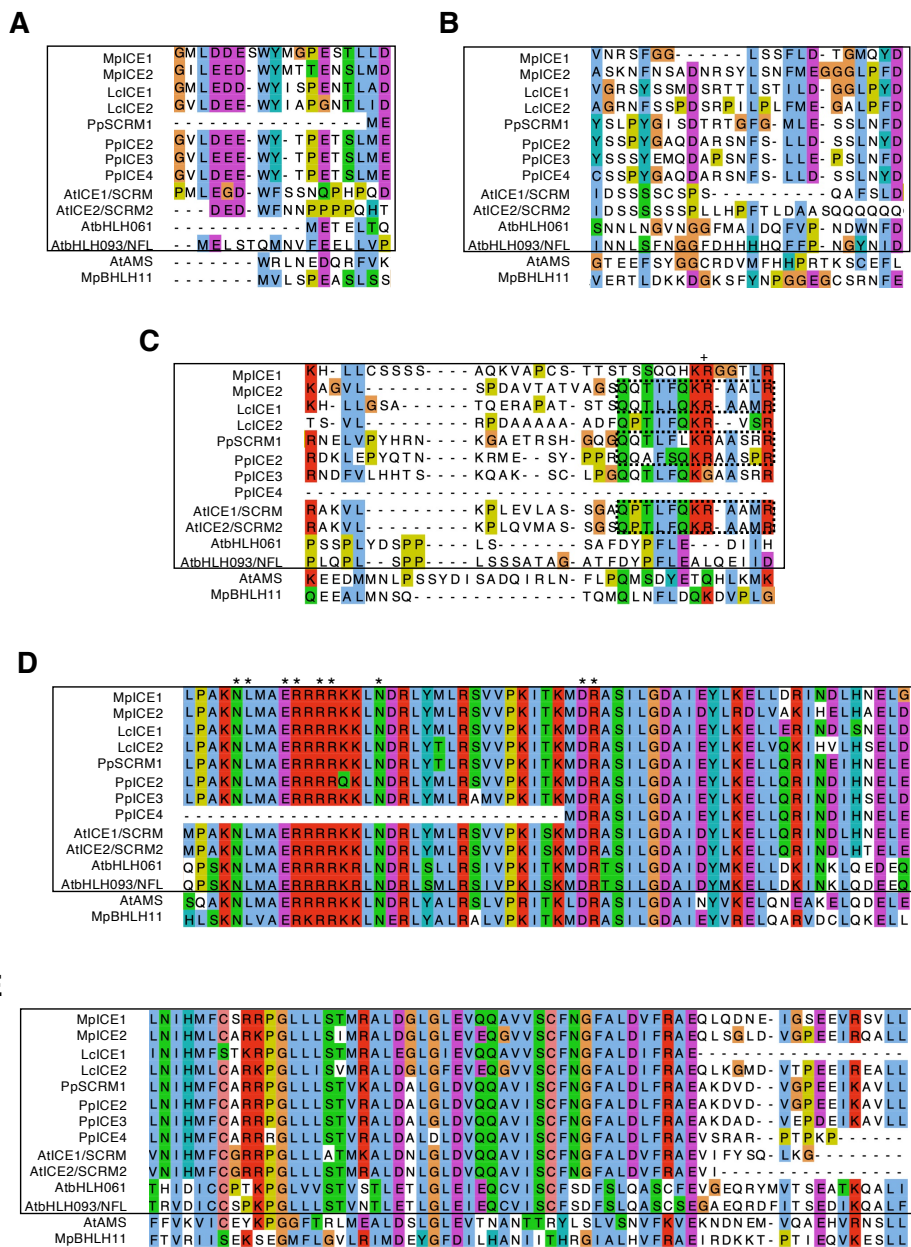


**図24. MpICE1およびMpICE2のドメイン構造**

**(A)** サブファミリーIIIbに属するbHLH型転写因子のドメイン構造。これらはすべて、DNA結合領域であるbHLHドメインと、IIIb bHLHのC末端にあるACT-likeドメインを有する。MAPキナーゼとの結合に重要なモチーフ（KiDoKモチーフの中で特に重要なKRAA(M/L/S)モチーフ）を黒い箱で示す。Mp, *M. polymorpha*; Pp, *P. patens*; At, *A. thaliana*。

**(B)** AlphaFold2によるMpICE1の三次構造予測 [Uniprot: A0A2R6W5A1 · A0A2R6W5A1\_MARPO]。

**(C)** AlphaFold2によるMpICE2の三次構造予測 [Uniprot: A0A2R6W565 · A0A2R6W565\_MARPO]。



**図25. IIIb bHLH転写因子の amino 酸配列アラインメント**

MAFFTによりアラインメントしたIIIb bHLH転写因子の各ドメインの amino 酸配列。黒枠で囲ったタンパク質がIIIb bHLH転写因子である。IIIb bHLH転写因子と最も類似したbHLH転写因子（AtAMS, MpBHLH11）の配列を下に示した。

(A,B) タイ類およびセン類のICE/SCRMクレードに含まれるIIIb bHLH転写因子に特有の機能未知モチーフの amino 酸配列。

(C) KiDoKモチーフの amino 酸配列。保存されたモチーフを破線の四角、MAPキナーゼとの結合に重要なアルギニンを十字で示した。

(D) bHLHドメインの amino 酸配列。E-boxへの結合時に重要と予測される amino 酸残基をアスタリスクで示した。

(E) SMFドメインの amino 酸配列。

Mp, *M. polymorpha*; Lc, *L. cruciata*; Pp, *P. patens*; At, *A. thaliana*.

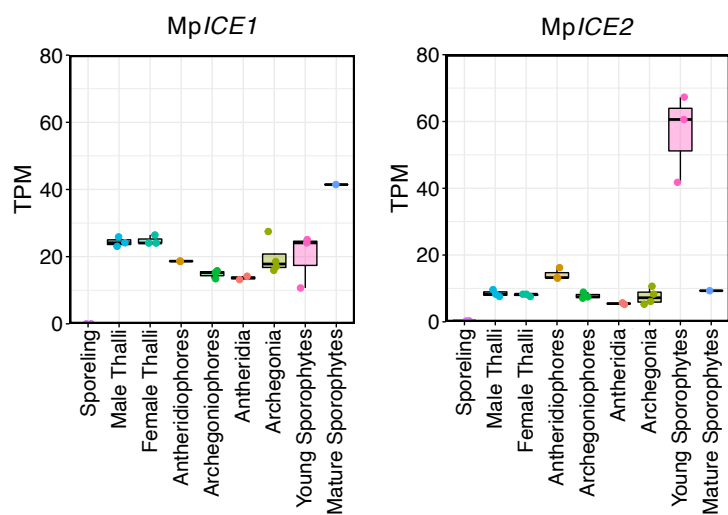
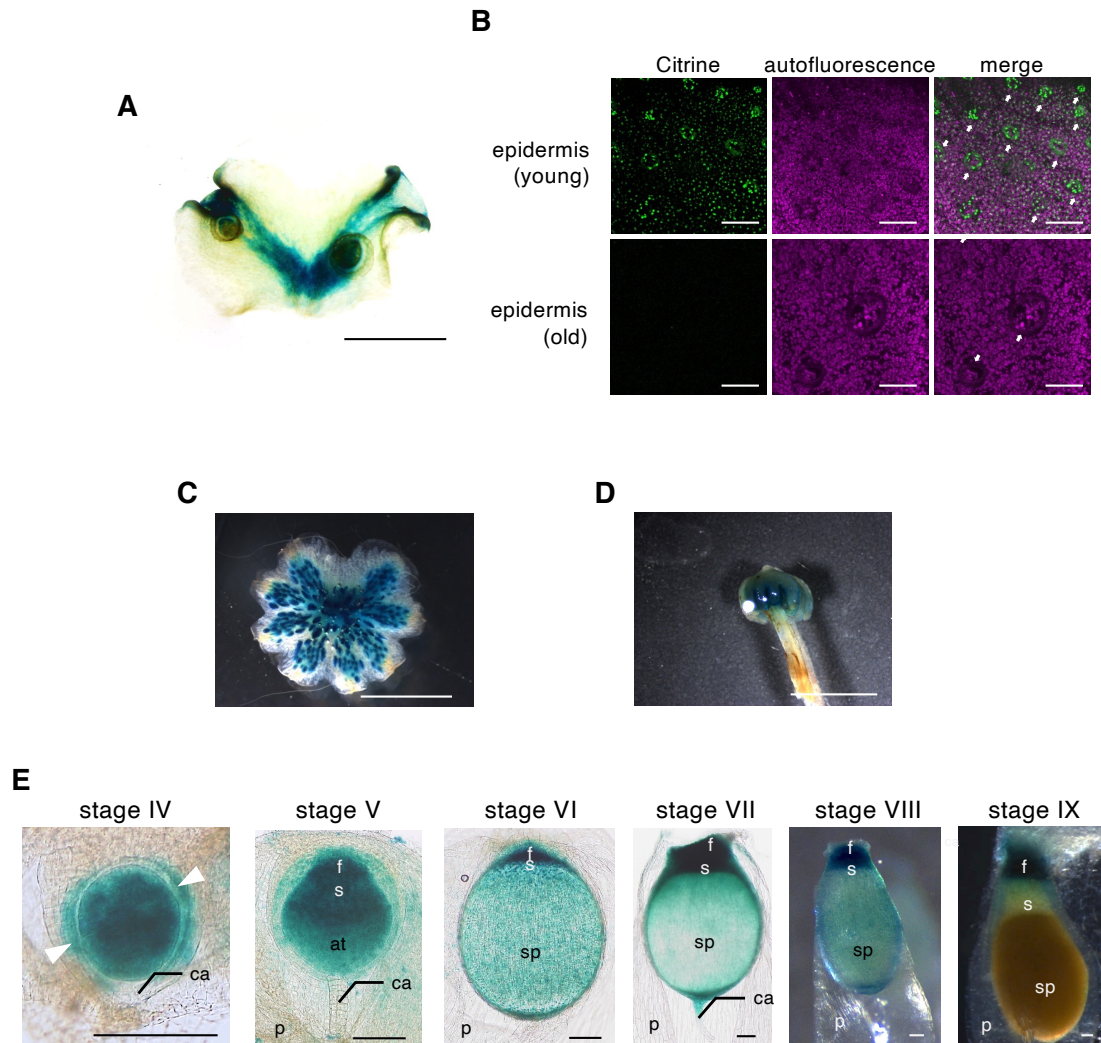


図26. *MpICE1*および*MpICE2*の発現プロファイル

公開されているゼニゴケの9つの組織別トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) のデータを再解析して得られた*MpICE1*および*MpICE2*の発現プロファイル。Y軸はtranscripts per million (TPM) を示す。





### 図27. *MpICE2*の組織別の発現パターン

*MpICE2*プロモーター制御下で、蛍光タンパク質Citrineと $\beta$ -glucuronidase (GUS) とを融合させたタンパク質に核局在シグナル (NLS) を付与したタンパク質を発現させた株 (*proMpICE2:Citrine-GUS-NLS*) のGUS染色および共焦点レーザー顕微鏡像。

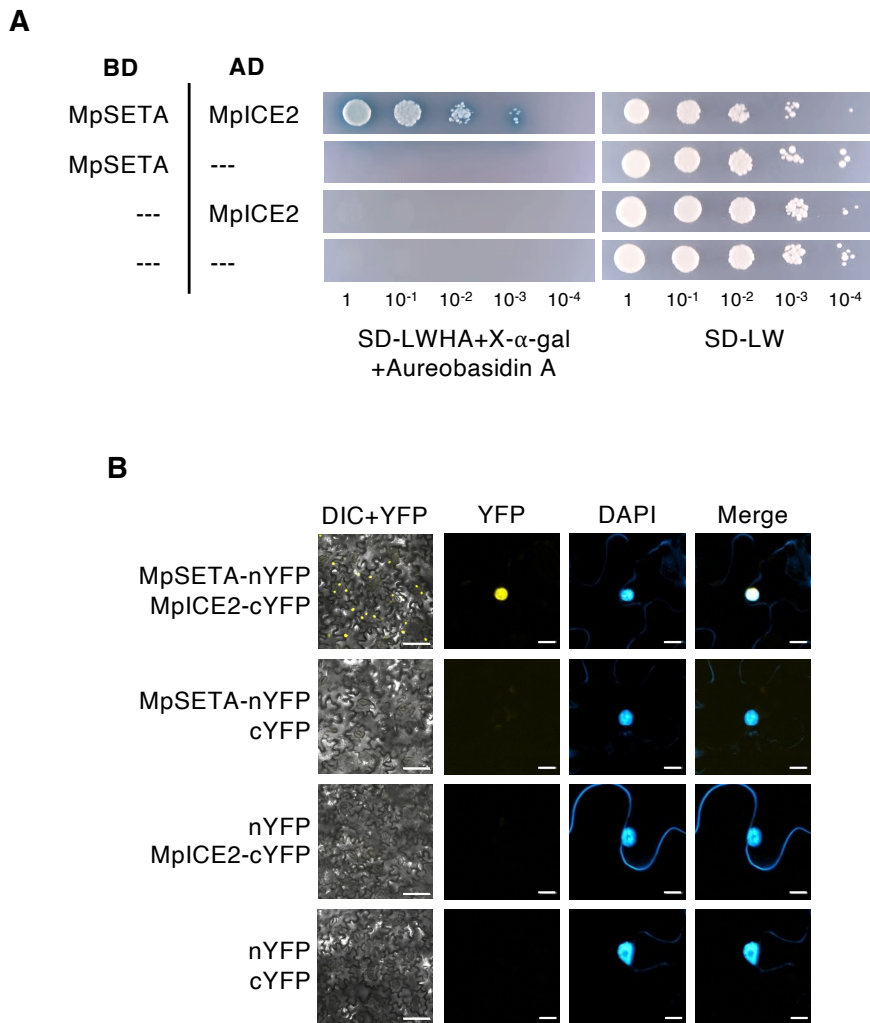
(A) 葉状体における*MpICE2*の発現パターン。メリステム、メリステム周辺の表皮組織および中肋で発現が見られる。

(B) 表皮の共焦点レーザー顕微鏡像。左からCitrine、葉緑体の自家蛍光、それらをマージさせた像を示す。上段がメリステム周辺の表皮、下段が成熟しメリステムから離れた位置にある表皮の写真を示す。

(C,D) 雄器床 (C) および雌器床 (D) における*MpICE2*の発現パターン。

(E) 胞子体の各ステージにおける*MpICE2*の発現パターン。ca, カリプトラ; p, 偽花被; at, 胞原組織; s, 蒴柄; f, 足; sp, 胞子嚢。

Bars, 5 mm (A,C,D), 100  $\mu$ m (B,E).

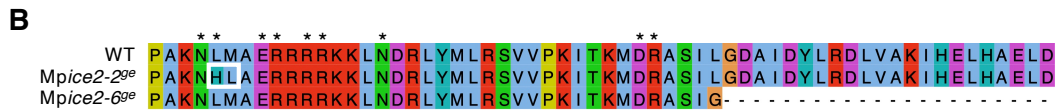
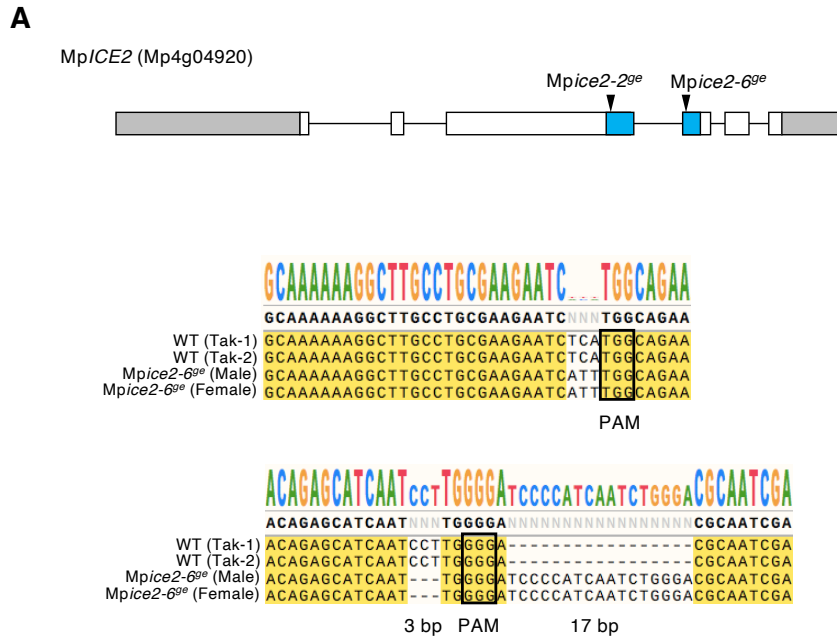


**図28. MpICE2はMpSETAと相互作用する**

- (A)** 酵母ツーハイブリッド法によるタンパク質間相互作用の検証。 GAL4 Activation Domain (AD) のC末端にクローニングしたCDSを縦に、 GAL4 DNA Binding Domain (BD) のC末端にクローニングしたCDSを横に示す。 呈色基質X-α-galおよび抗真菌抗生物質 Aureobasidin Aを含む選択培地 (SD-LWHA+X-α-gal+Aureobasidin A) および非選択培地 (SD-LW) で酵母の生存を確認した。 ネガティブコントロールとしてADまたはBDのみを発現する空ベクターを用いた。
- (B)** BiFC法によるタンパク質間相互作用の検証。 播種後4週間のベンサミアタバコ本葉にアグロバクテリウムを感染させて一過的に発現させ、 接種後1.5 日目に表皮細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。 コンストラクトの組み合わせを左に示す。 一番左は微分干渉顕微鏡像とYFP蛍光をマージさせた画像を示す (DIC+YFP)。 ネガティブコントロールとして nYFPまたはcYFPのみを発現する空ベクターを用いた。

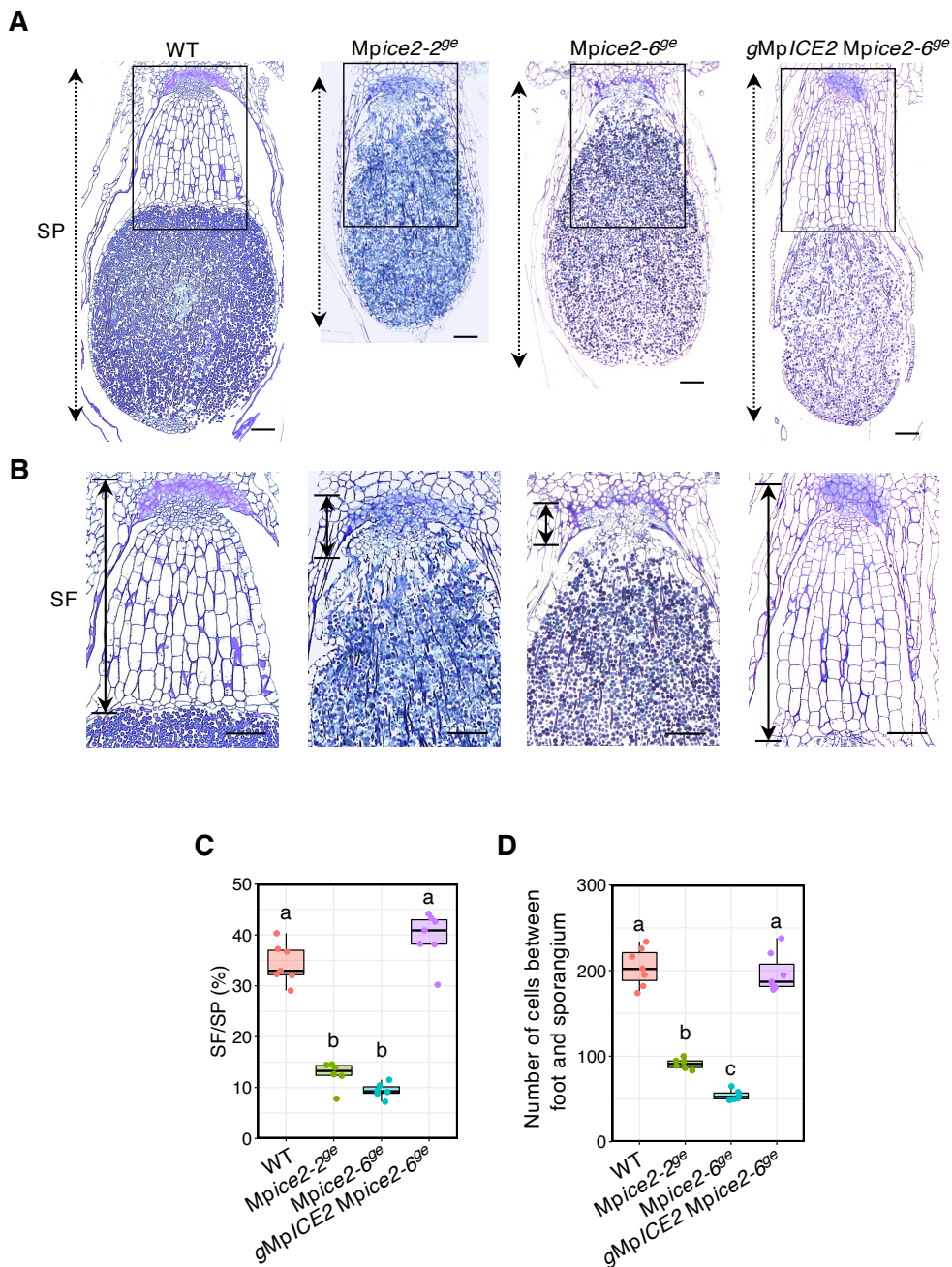
Bars, 10 μm.





**図29. CRISPR/Cas9によるMpice2<sup>9e</sup>変異体の作出**

- (A) MpICE2遺伝子の模式図とCRISPR/Cas9によって生じた塩基配列の変異。UTRを灰色、タンパク質をコードするエクソンを白色、bHLHドメインをコードする領域を青色で示す。矢尻で示す位置にgRNAを設計した。PAM, Proto-spacer adjacent motif.
- (B) 野生型 (WT) とMpice2<sup>9e</sup>変異体の予測される翻訳産物のアミノ酸配列のアラインメント。E-boxへの結合に重要とされるアミノ酸をアスタリスクで示す。

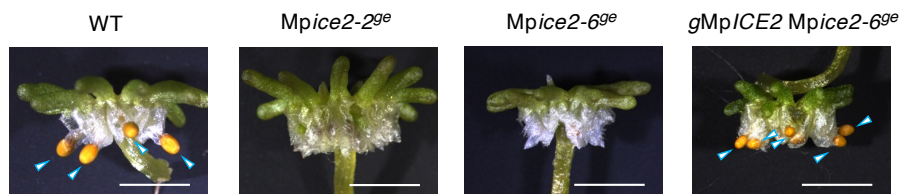


**図30. *Mpice2<sup>ge</sup>*株は柄を欠損する**

(A,B) 野生型 (WT), *Mpice2-2<sup>ge</sup>*株, *Mpice2-6<sup>ge</sup>*株および*Mpice2-6<sup>ge</sup>*株に上流のプロモーター領域を含むMpSETA遺伝子座のゲノム断片を導入した相補株 (*gMpSETA Mpseta-1<sup>ko</sup>*) の成熟した孢子体の縦断切片. 四角で囲った領域の拡大図を(B)に示す. 破線が孢子体全体の長さ (SP), 実線が足から孢子囊基部までの長さ (SF) を示す.

(C,D) SF/SP比および足から孢子囊基部の領域に存在する細胞数を定量した結果. 柄と足との境界は不明瞭であるため, 細胞数の定量には伝達細胞 (transfer cell, 足と配偶体との境界にある大きい細胞. 細胞壁の肥厚が見られる) を除いた細胞を用いた. 異なる文字は統計的に有意に異なる平均値を示す ( $p < 0.01$ , Tukey's HSD test).  $n = 6$ .

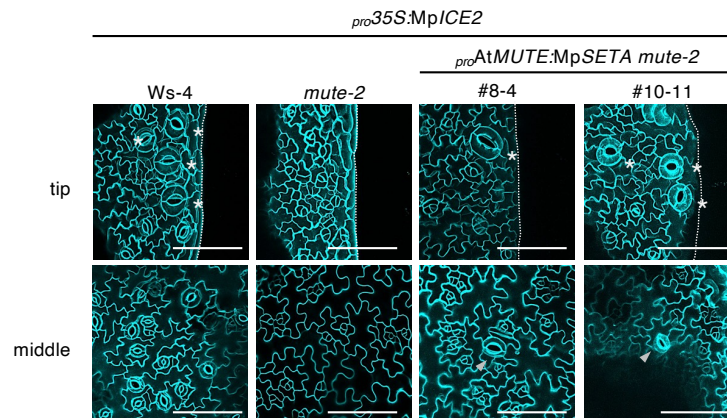
Bars, 100  $\mu$ m.



**図31. *Mpice2<sup>ge</sup>*株は蒴柄を欠損するために孢子嚢が保護器官の外に出ない**

受精後1ヶ月の成熟した孢子体を含む雌器床の写真。野生型の孢子嚢は、孢子の成熟後に蒴柄細胞の伸長により苞膜の外に露出するが、*Mpice2<sup>ge</sup>*株の孢子嚢は孢子が成熟しているにもかかわらず苞膜の外に現れない。

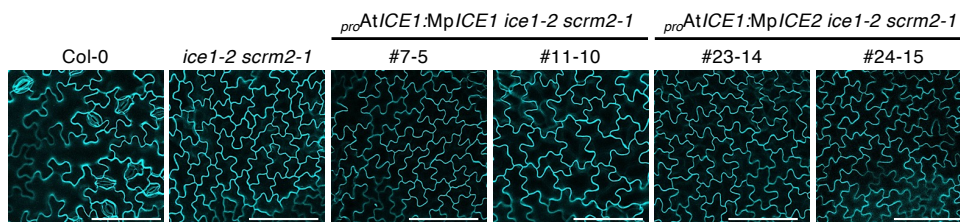
Bars, 5 mm.



**図32. MpSETAとMpICE2の共発現はシロイヌナズナのla bHLH変異体の気孔における表現型のレスキューを亢進しない**

野生型 (Ws-4) , *mute-2*変異体および *proAtFAMA:MpSETA mute-2*株 (#8-4および#10-11) 背景でMpICE2を発現する植物体 (T<sub>1</sub>) の9 DASの子葉背軸側の共焦点レーザー顕微鏡像。上段が排水組織付近の表皮, 下段が子葉中肋付近の表皮を示す。アスタリスクは水孔, 矢尻は気孔を示す。

Bars, 100 μm.

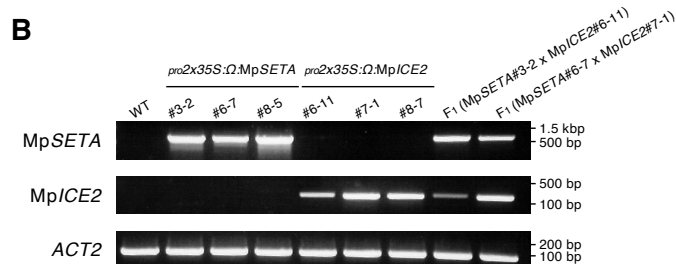
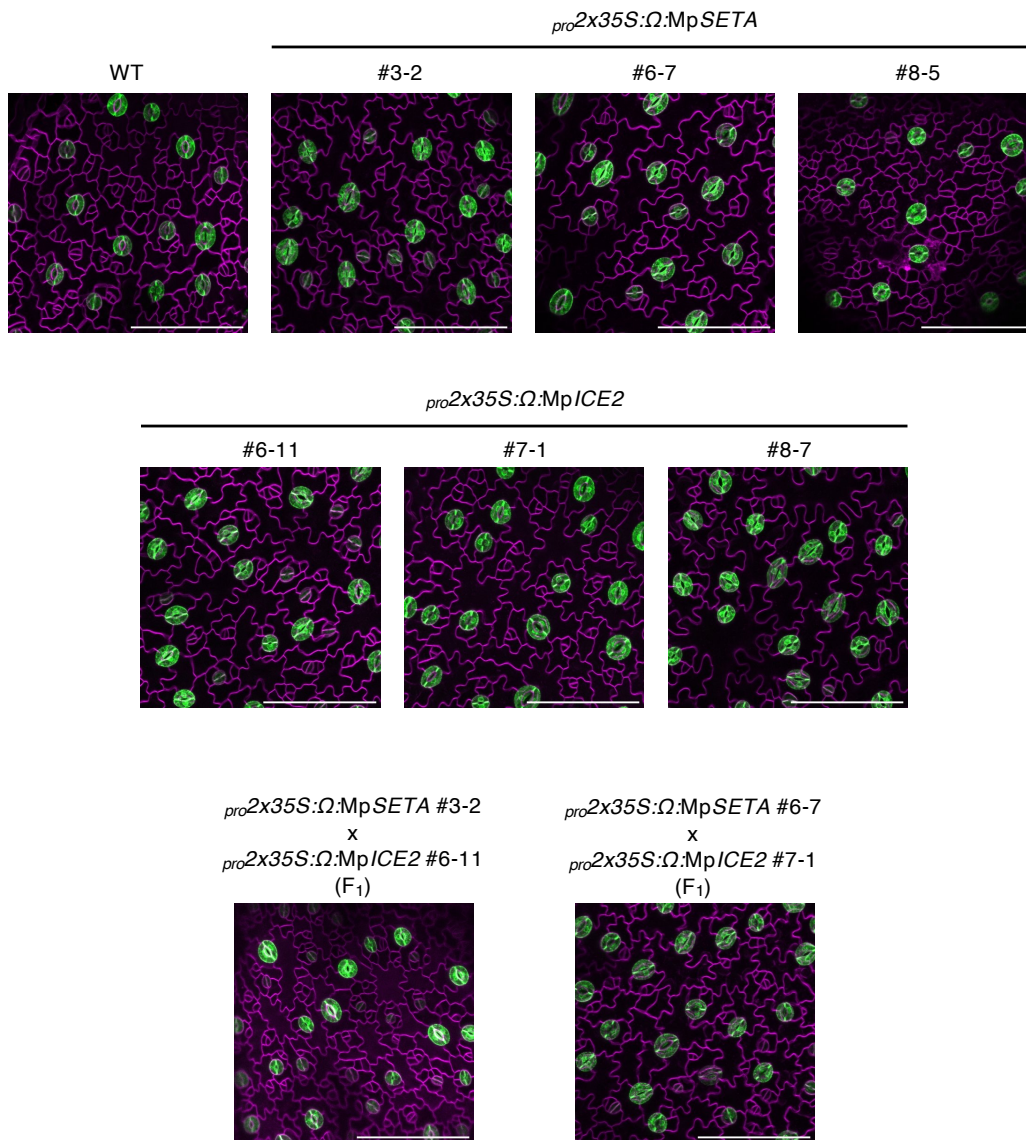


**図33. MpICE1およびMpICE2はシロイヌナズナの *ice1 scrm2*二重変異体の気孔における表現型を相補しない**

野生型 (Col-0) , *ice1-2 scrm2-1*二重変異体, *ice1-2 scrm2-1*二重変異体背景で *proAtICE1:MpICE1*を発現する相補株 (#7-5および#11-10) およびの *ice1-2 scrm2-1*二重変異体背景で *proAtICE1:MpICE2*を発現する相補株 (#23-14および#24-15) の13 DASの第一本葉背軸側の共焦点レーザー顕微鏡像、細胞膜をFM4-64で染色した (シアン) .

Bars, 100  $\mu$ m.



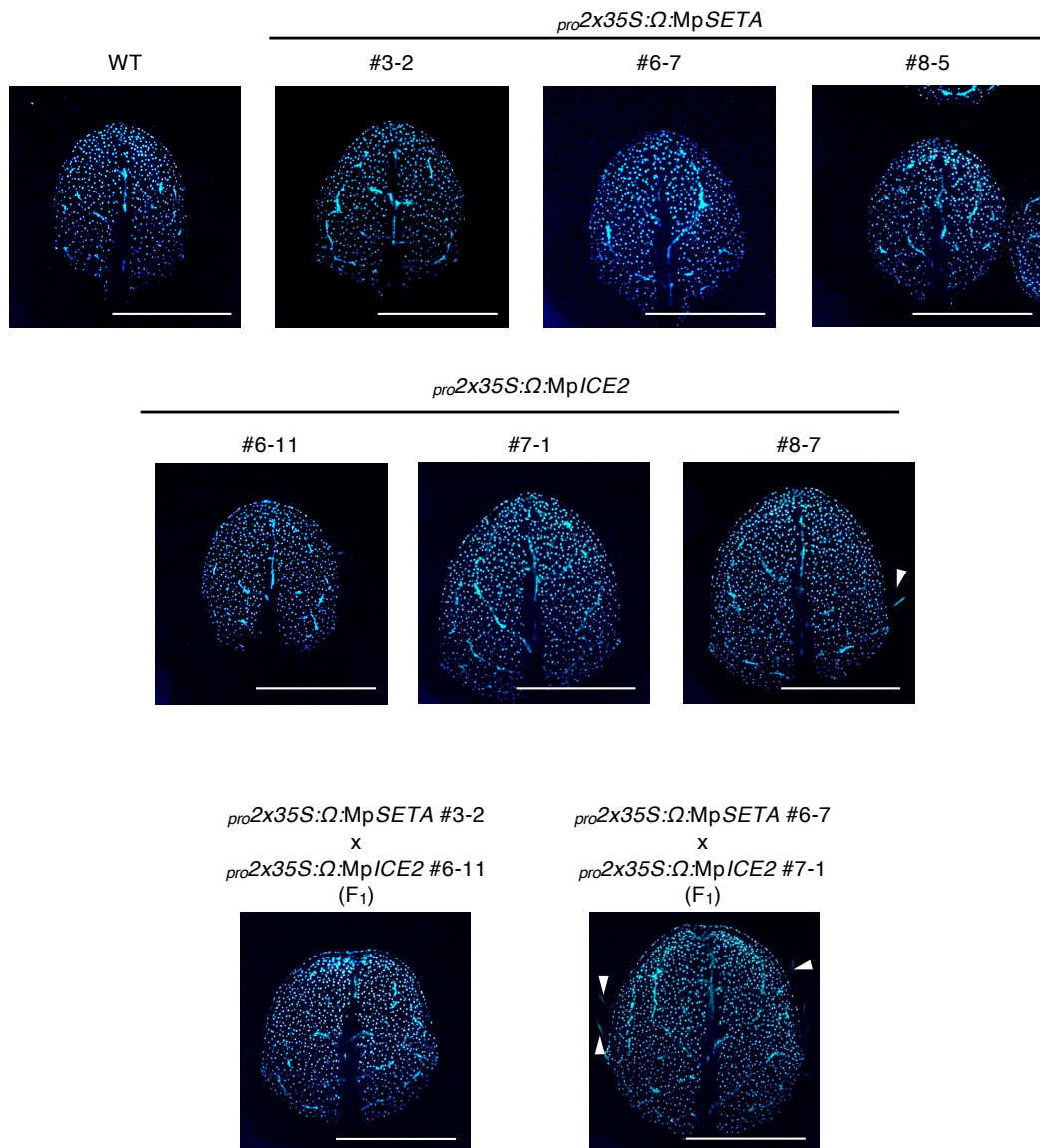


**図34. MpSETAおよびMpICE2は気孔形成およびパターン形成に影響を与えない**

(A) 孔辺細胞およびミロシン細胞でGFPを発現するエンハンサートラップライン (E1728株) 背景でMpSETA, MpICE2を発現させた株の表皮細胞の共焦点レーザー顕微鏡像. 細胞膜をFM4-64で染色している (マゼンタ). 9 DASの植物体の第一本葉を観察した. Ω, 翻訳エンハンサーであるタバコモザイクウイルスゲノムの5'-UTR Ω配列.

(B) (A)で使用した植物体におけるMpSETAおよびMpICE2の発現レベルの確認のためのsemi-quantitative RT-PCRの結果. 内部標準としてシロイヌナズナのACTIN2 (ACT2) を用いた.

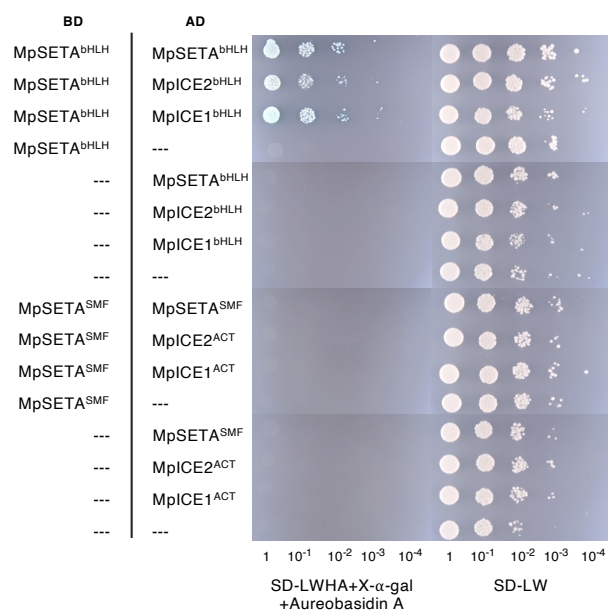
Bars, 100 μm.



**図35. MpSETAおよびMpICE2はミロシン細胞のパターン形成に影響を与えない**

孔辺細胞およびミロシン細胞でGFPを発現するエンハンサートラップライン（E1728株）背景でMpSETA, MpICE2を発現させた株の蛍光実体顕微鏡像。9 DASの植物体の第一本葉の背軸面を観察に用いた。ドット状に見られるのが気孔，維管束添いに見られるのがミロシン細胞である。トライコームの自家蛍光を矢尻で示した。

Bars, 1 mm.



**図36. Ia bHLHとIIIb bHLHのACT-likeドメイン同士は直接相互作用しない**

酵母ツーハイブリッド法によるタンパク質間相互作用の検証。 GAL4 Activation Domain (AD) のC末端にクローニングしたCDSを縦に、 GAL4 DNA Binding Domain (BD) のC末端にクローニングしたCDSを横に示す。 呈色基質X-α-galおよび抗真菌抗生物質Aureobasidin Aを含む選択培地 (SD-LWHA+X-α-gal+Aureobasidin A) および非選択培地 (SD-LW) で酵母の生存を確認した。 ネガティブコントロールとしてADまたはBDのみを発現する空ベクターを用いた。



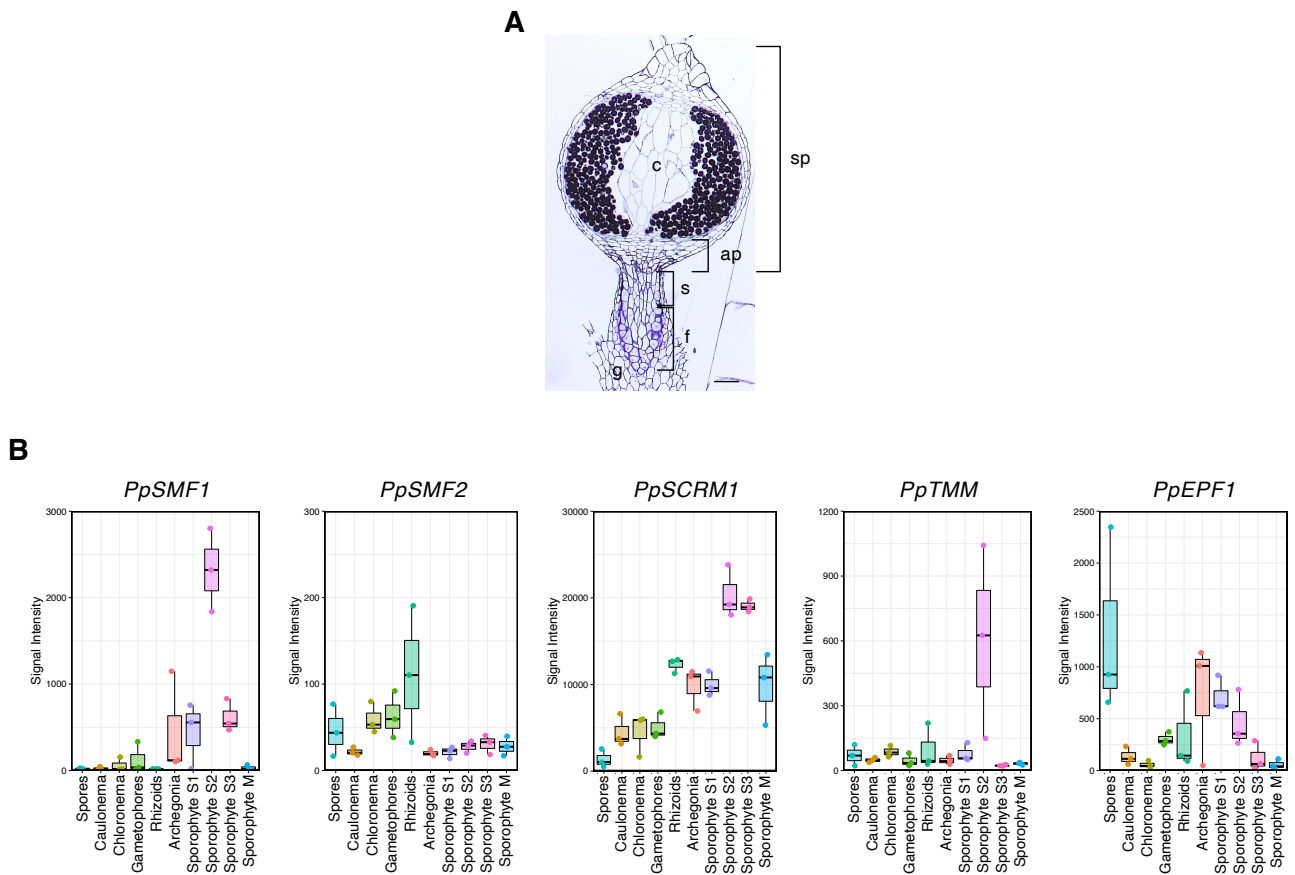


図37. セン類ヒメツリガネゴケにおける気孔形成遺伝子の発現パターン

(A) 成熟したヒメツリガネゴケ胞子体の縦断切片。ヒメツリガネゴケにおいて気孔はアポフィシスにのみ存在する。g, 配偶体（茎葉体）；f, 足；s, 蒴柄；ap, アポフィシス（apophysis, 胞子嚢の基部で気孔が見られる領域）；c, コルメラ（軸柱）；sp, 胞子嚢。

(B) 公開されているヒメツリガネゴケの組織別トランスクリプトーム解析（Microarray）のデータから得られた気孔形成遺伝子（*PpSMF1*, *PpSMF2*, *PpSCRM1*, *PpTMM*, *PpEPF1*）の発現プロファイル。Y軸はsignal intensityを示す。胞子（spores），カウロネマ（caulonema），クロロネマ（chloronema），茎葉体（gametophores），仮根（rhizoids）は配偶体の栄養器官，造卵器（archegonia）は配偶体の生殖器官である。胞子体の発生ステージは4つにわけられており，若い方から順にS1, S2, S3, M（mature）となっている。

Bar, 100  $\mu$ m.

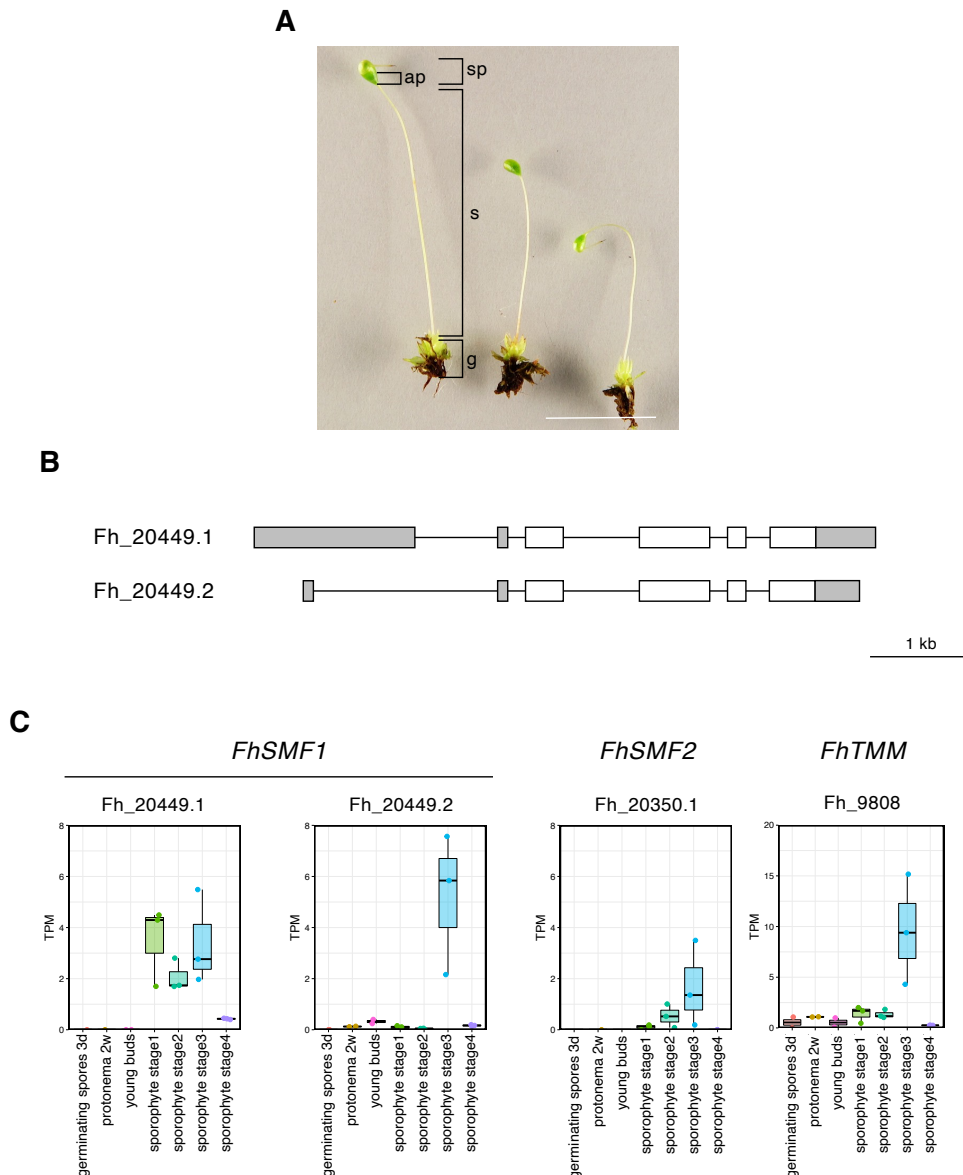


図38. セン類ヒョウタンゴケにおける気孔形成遺伝子の発現パターン

- (A) ヒョウタンゴケ (*Funaria hygrometrica* Hedwig) の胞子体。g, 配偶体 (茎葉体) ; s, 蒴柄; ap, アポフィシス; sp, 胞子嚢。
- (B) ヒメツリガネゴケ *PpSMF1* のヒョウタンゴケにおけるパラログ遺伝子 (*FhSMF1*) の遺伝子アノテーションの図 (灰色, UTR; 白色, CDS)。ヒョウタンゴケのドラフトゲノムの scaffold 6497 35.8 を元に作成。転写開始点および5' UTR のスプライシングパターンの異なる2つのバリエーションが予測される。
- (C) 公開されているヒョウタンゴケの7個の組織別トランスクリプトーム解析 (*de novo* RNA-seq) のデータを再解析して得られた気孔形成遺伝子 (*FhSMF1*, *FhSMF2*, *FhTMM*) の発現プロファイル。Y軸は transcripts per million (TPM) を示す。胞子発芽体 (germinating spores), 原糸体 (protonema), 若い茎葉体 (young buds) は配偶体の栄養器官である。胞子体の発生ステージは4つにわけられており, 若い方から順に stage 1, stage 2, stage 3, stage 4 (mature) となっている。気孔はヒメツリガネゴケ同様, アポフィシスにのみ存在する。

Bar, 1 cm.

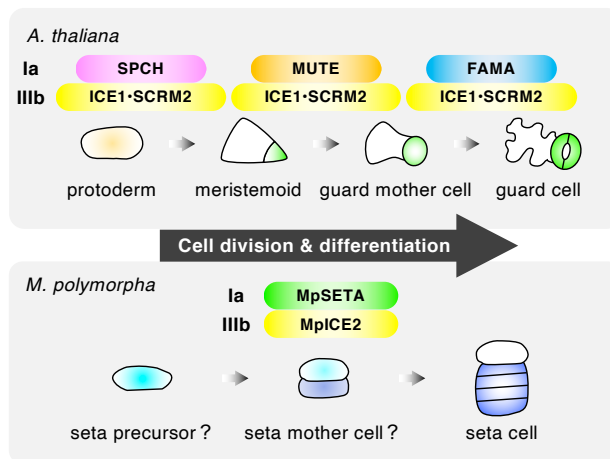
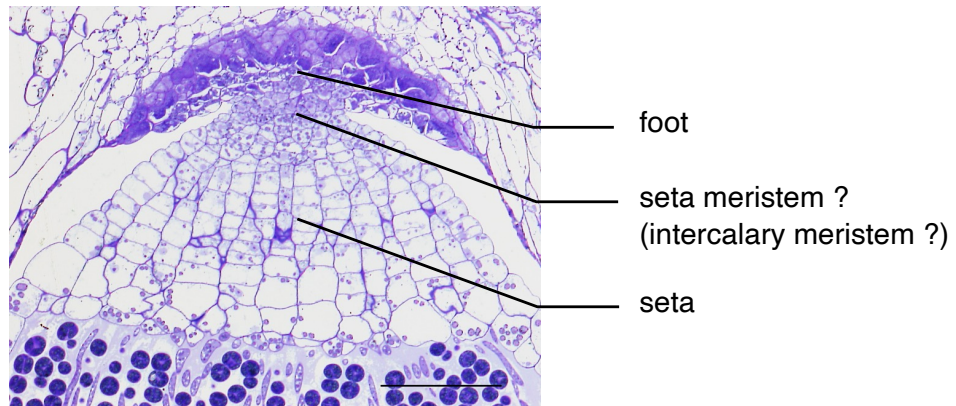


図39. Ia-IIIb bHLH転写因子モジュールによる細胞運命決定

シロイヌナズナとゼニゴケの細胞運命決定におけるIa-IIIb bHLH転写因子モジュールの機能のモデル図。シロイヌナズナでは、Ia bHLH転写因子（SPCH, MUTE, FAMA）がそれぞれIIIb bHLH転写因子（ICE1, SCRM2）とヘテロ二量体を形成して、原表皮細胞から孔辺細胞までの細胞分裂および細胞分化を制御する（上段）。一方、ゼニゴケではIa bHLH転写因子（MpSETA）とIIIb bHLH転写因子（MpICE2）のヘテロ二量体が蒴柄前駆細胞（推定）の細胞分裂および細胞分化、そして直接的か間接的かは不明だが蒴柄母細胞（推定）の対称分裂を制御することが示唆された。



**図40. 蒴柄の組織分化に関する仮説**

野生型のゼニゴケ胞子体の組織切片図（胞子四分子期，図20Aと同じ図）。足と蒴柄の境界は不明瞭であるが，境界領域にはサイトゾルリッチな小さな細胞群が見られる。これまでの実験結果から，この細胞群が未分化な蒴柄細胞が集まった領域，すなわち蒴柄分裂組織（seta meristem）であると推定した。発生後期では細胞分裂活性が失われるため，タイ類の蒴柄分裂組織は一過的に生じるものであると考えられる。分化した組織に挟まれた分裂組織である介在分裂組織は，ツノゴケ類およびセン類の胞子体でも見られる。

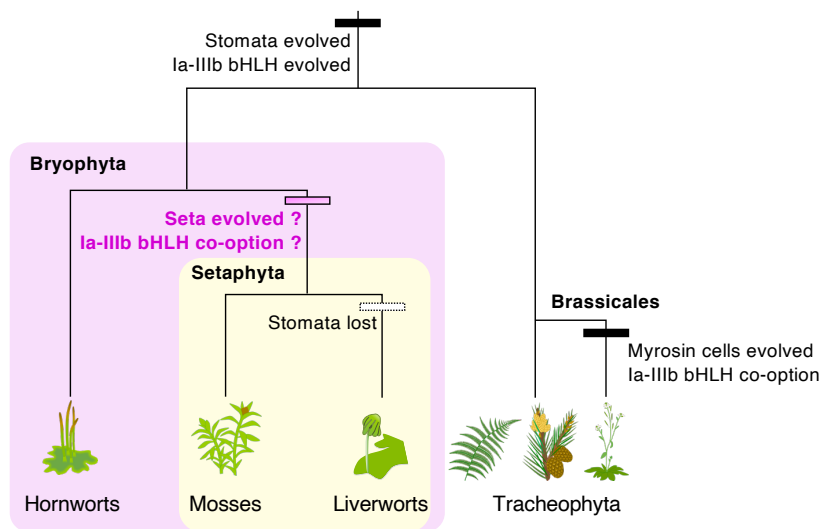


図41. 陸上植物におけるla-IIIb bHLH転写因子モジュールの進化と転用

la-IIIb bHLH転写因子モジュールの転用は、陸上植物の進化過程で独立に複数回起こったと推定される。まず、陸上植物の共通祖先において、気孔とla-IIIb bHLHで構成される転写モジュールが獲得されたと考えられる。祖先的な植物では、la bHLH転写因子はMUTE様あるいはFAMA様の機能をもっていたと思われる。次に、la-IIIb bHLH転写因子モジュールはSetaphyta（セン類およびタイ類からなるクレード）の共通祖先において、蒴柄形成を制御するよう転用された可能性が示唆される。セン類とタイ類が分岐した後に、タイ類の共通祖先で気孔が失われた。被子植物アブラナ目では、la-IIIb bHLH転写因子モジュールが異形細胞であるミロシン細胞の発生を制御するようになった。

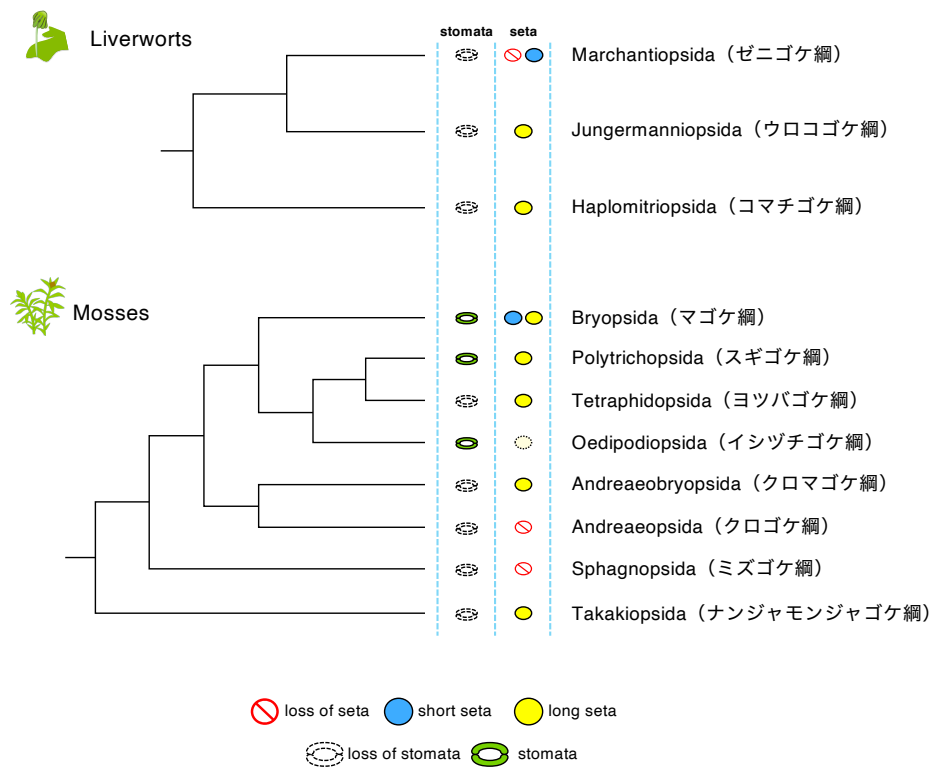


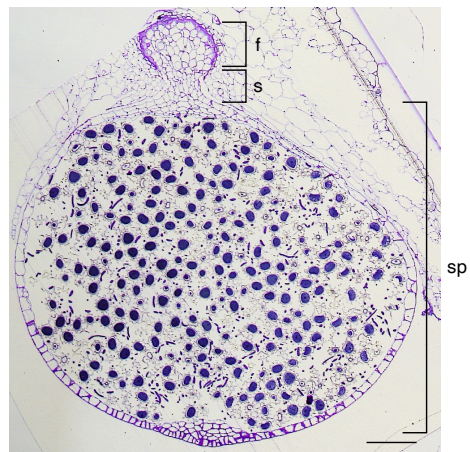
図42. Setaphytaにおける蒴柄と気孔の関係

タイ類とセン類の系統と、蒴柄および気孔の有無を示した図。タイ類ゼニゴケ綱ウキゴケ科の植物は蒴柄および足を喪失している。セン類の基部系統の多くが気孔を二次的に喪失しており、クロゴケ綱とミズゴケ綱の植物は蒴柄を欠損していると考えられている。イシヅチゴケ綱の植物の蒴柄と思われる領域には、通常アポフィシスのみで観察される気孔が分布しており、組織学的には孢子嚢の一部であると考えられる。蒴柄と孢子嚢の境界は不明瞭で、今後検証を要するためここでは破線で表示している。

**A**



**B**



**図43. タイ類ジンガサゴケの胞子体**

**(A)** タイ類ゼニゴケ亜綱ジンガサゴケ (*Rebolulia hemisphaerica* subsp. *orientalis*) の成熟した胞子体をつけた雌器托。黒い部分が露出した胞子嚢である。2020年4月20日撮影（京都市左京区、京都大学北部キャンパス付近）。

**(B)** ジンガサゴケの成熟した胞子体の組織切片像。s, 蒴柄; f, 足; sp, 胞子嚢。

Bar, 200  $\mu$ m.

Plasmid	Primer Name	Sequence (5'→3')	Source
pENTR1A-MpSETA CDS	MpSETA_CDS_ENTR_F	atccggtaccgaattcgcATGGACGGTGTGTTCTGGACGATG	this study
	MpSETA_CDS_ENTR_R	gtgcggccgcgaattctaACCCATGTTCTCAAATTGAAGATTG	
pENTR1A-MpICE2 CDS	MpICE2_CDS_ENTR_F	atccggtaccgaattcgcATGGCTTCGACCAGAGT	this study
	MpICE2_CDS_ENTR_R	gtgcggccgcgaattctaCTGAAGAATCACATTTTGCTCT	
pENTR1A-MpSETA <sup>bHLH</sup>	MpSETA_ENTR_bHLH_F	aaccaattcagtcgacCATCGGAACGCCACATTGTC	this study
	MpSETA_ENTR_bHLH_R	aagctgggtctagatattccATCTTGACGTCGTTTACCAAGT	
pENTR1A-MpICE1 <sup>bHLH</sup>	MpICE1b_bHLH_ENTR_F_Sall	aaccaattcagtcgacCCAGCTAAAACTCATGGCC	this study
	MpICE1b_bHLH_ENTR_R_EcoRV	aagctgggtctagatattccTAGATAGGTGGTCCGTCACAGG	
pENTR1A-MpICE2 <sup>bHLH</sup>	MpICE1a_bHLH_ENTR_F_Sall	aaccaattcagtcgacCTCGGAAGAATCTCATGGC	this study
	MpICE1a_bHLH_ENTR_R_EcoRV	aagctgggtctagatattccTATTTGTCAGCAGCTGTGTC	
pENTR1A-MpSETA <sup>SMF</sup>	MpFAMA_ENTR_C-ter_F	aaccaattcagtcgacGGAGAAGTTGAGGTGCAGATTACG	this study
	MpSETA_CDS_ENTR_R	see above	
pENTR1A-MpICE1 <sup>ACT-like</sup>	MpICE1b_ACT-like_ENTR_F_EcoRV	aaccaattcagtcgacAGAGCCCTCAACATTCACAT	this study
	MpBHLH16_ENTR_R_EcoRI	gtgcggccgcgaattctaCTGAAGGCCACTGACGTTA	
pENTR1A-MpICE2 <sup>ACT-like</sup>	MpICE1a_ACT-like_ENTR_F_Sall	aaccaattcagtcgacAACATTCACATGCTGTGTGC	this study
	MpICE2_CDS_ENTR_R	see above	
pENTR1A-proMpSETA	MpSETApro_ENTR_F	aaccaattcagtcgacCAAGCCAGGTGAAAAAATC	this study
	MpSETApro_ENTR_R	gtgcggccgcgaattcCGAAGCGATTGGACCAGTAT	
pENTR1A-proMpICE2:Citrine-GUS-NLS	MpICE2pro_ENTR_F	atccggtaccgaattcgcACTTCTACTTGCAGCAGCTGA	this study
	MpICE2pro_Cit_R	gcccttgctcaccatGAGAGAGTGAAGCCCTTCG	
	Citrine_proMpICE2_F	GCGCTCACTCTCTCtggtgagcaagggcgag	
	Citrine_GUS_R	acgtaacatctgcaagctgtacagctgctgctcgc	
	GUS_Citrine_F	gacgagctgtacaagctgcagatgtaactgctct	
GUS-NLS_ENTR_R	gtgcggccgcgaattctaactccaactctctctct		
pENTR1A-gMpSETA	MpSETApro_ENTR_F & MpSETA_CDS_ENTR_R	see above	this study
pENTR1A-gMpICE2	MpICE2pro_ENTR_F & MpICE2_CDS_ENTR_R	see above	this study
pDEST-GBKT-Amp <sup>r</sup>	Amp <sup>r</sup> Pro_Stol	TGTCAGCGCAGGGGGCCCGGGAACCCCTATTGTTT	this study
	Amp <sup>r</sup> CDS_Stol	CAAAAAGAACCGGGCCCTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC	
pENTR1A-AtICE1	AtICE1_CDS_ENTR_F	aaccaattcagtcgacATGGGTCTTGACGGAAACAA	this study
	AtICE1_CDS_ENTR_R	aagctgggtctagatattccTCAGATCATACCAGCATACCCTG	
pENTR1A-AtSCRM2	AtSCRM2_CDS_ENTR_F	aaccaattcagtcgacATGAACAGCGACGGTGTGTTG	this study
	AtSCRM2_CDS_ENTR_R	aagctgggtctagatattccTCAACCAACACGCGTAACC	
pENTR 5'/TOPO-proAtMUTE	AtMUTEpro_F	CAGCAATTTGAAAAATCCA	this study
	AtMUTEpro_R	gataacttaattgatcaagata	
pENTR 5'/TOPO-proAtFAMA	AtFAMApro_F	cttccaaactctatgatgaa	this study
	AtFAMApro_R	tgctattctggttagtgata	
pENTR1A-proAtSPCH:MpSETA	SPCHpro_ENTR_F	aaccaattcagtcgacAGATCATCACTGCGATAAGG	this study
	SPCHpro_Mp_R	AACAACACCGTCCATCGTGATTAGAGATATATCCT	
	MpSETA_SPCHpro_F	ATCTCTAATCACATGACGGGTGTTGTTCTGGACGATG	
pENTR1A-proAtICE1:MpICE1	proICE1_ENTR_F_Sall	aaccaattcagtcgacGGACCACCGTCAATAACATCG	this study
	proICE1_MpBHLH16_R	TCTGTTGTGAGAAGTCATCATGCCAAAGTTGACACCTTTACC	
	MpBHLH16_proICE1_F	gtaaagggtgcaactttggcATGATGACTTCTACAACAGAG	
	MpBHLH16_CDS_ENTR_R	gtgcggccgcgaattctaCTGAAGGCCACTGACGTTA	
pENTR1A-proAtICE1:MpICE2	proICE1_MpBHLH17_R	CTGACTCTGGTCCGAAGCCATGCCAAAGTTGACACCTTTACC	this study
	MpBHLH17_proICE1_F	gtaaagggtgcaactttggcATGGCTTCGACCAGAGT	
pJHY-TMp1-MpSETA	MpSETA-KO-Pac-F	ctaaggtagcgattaatACTCCGAATTTAAACGAT	this study
	MpSETA-KO-Pac-R	gccccggcaagtttaactCCGGTAGCTTTTATTTCGC	
	MpSETA-KO-Asc-F	taaaactagtgccgctGCAAGATCAAAAAGAAAT	
	MpSETA-KO-Asc-R	ttatccctaggccgctGACAATGCTTCGATCAC	

表1. 本研究で作製したエンタリークローンとプライマーの塩基配列



Name	Sequence (5' > 3')	Note
<b><i>M. polymorpha</i></b>		
new rbm27-F	ACTTTTGCAACAGCGACTTC	male specific
new rbm27-R	GCCTGCAATATAGCCTTCAA	
new rhf73-F	GAACCCGAAACTCAGGTTTT	female specific
new rhf73-R	ATAACAGCCAAACGGATCAA	
MpBHLH35_KO1_F	AACAAAAAAGAAGCAATAAAAGCTACCGG	Mpseta <sup>ko</sup> genotyping
MpBHLH35_KO1_R	AGCGATGCTTGATTCTTTTGATCTTGACG	
MpBHLH35_5'genomic_F	TGTTTTCACTCTCTATGACTTTTCAAGT	gene targeting (5')
P1R	GAAGGCTTCTGATTGAAGTTTCCTTTCTG	
H1F	GTATAATGATGCTATACGAAGTTATGTTT	gene targeting (3')
MpBHLH35_3'genomic_R	TATCTGGGTTTTCTAGAGCTCATATAAACT	
MpSETA_RT_F	ATGGACGGTGTGTTCTGGACGATG	
MpSETA_RT_R	ACCCATGTTCTCAAATTGAAGATTG	
MpEF1 $\alpha$ _F	AGGTTGTCCACATGGAAAGGAGA	RT-PCR
MpEF1 $\alpha$ _R	TCACACGCTTGTCATACCTCCCA	
MpICE1a RT F	ATGCTACAAAGTGGTGTCA	
MpICE1a RT R	AAACCGTTGAAGCAGCTAAC	
MpICE2_sgRNA1_F	CTCG CTTGCCTGCGAAGAATCTCA	genome editing (Mpice2 <sup>96</sup> )
MpICE2_sgRNA1_R	AAAC TGAGATTCTTCGACGGCAAG	
MpICE2_sgRNA2_F	CTCG GGACAGAGCATCAATCCTTG	
MpICE2_sgRNA2_R	AAAC CAAGGATTGATGCTCTGTCC	
<b><i>A. thaliana</i></b>		
SAIL_36_B6_LP	GAAAAACCTAGATCCTCCCCC	spch-3 genotyping
SAIL_36_B6_RP	TCCTATGATCGATGCTTGGTC	
LB2	GCTTCCTATTATATCTCCCAAATTACCAATACA	
mute-2(FLAG)_LP	CCTTCATCGATCCATGAAAAAC	mute-2 genotyping
mute-2(FLAG)_RP	CAGATTGGTGCATCCGAGTAG	
LB4	CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT	
fama-1 LP	TCATTCATTGCTTCTACGG	fama-1 genotyping
fama-1 RP	CAATACAAAAAGCTCCCCTCAC	
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	
scrm_LP	GTTTTTCTTCACTTACATCATCAAAG	ice1-2 genotyping
scrm_RP	AGCTTGTTTACTTGTGCTGTTATAGAG	
scrm2_LP	GATTTTATCTTAAAGGGACCATTCG	scrm2-1 genotyping
scrm2_RP	ACGGAGAAGAAGAAGAAGAATC	
Actin2 F	agagattcagatgccagaagtctgttcc	RT-PCR
Actin2 R	aacgattcctggacctgcctcatcactc	

表2. ジェノタイピング, RT-PCR, ゲノム編集に用いたプライマー