

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	守屋 健太
論文題目	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学的研究		
(論文内容の要旨)			
<p>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る。被子植物では, 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) が相互作用し, 気孔の形成を制御している。また, コケ植物セン類において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示された。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の分子基盤は進化的に保存されていると考えられている。しかし, 気孔をもたない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, Ia bHLH転写因子が保存されていることがわかった。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気孔との関係を明らかにすることを目的とした。</p> <p>気孔をもたないゼニゴケのMpSETAが気孔形成を制御できるかどうか検証するために, Ia bHLH遺伝子を欠損するシロイヌナズナ変異体背景で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<i>mute</i>変異体および<i>fama</i>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。</p> <p>公開されている組織別RNA-seq解析の結果から, MpSETAは発生過程にある孢子体 (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は孢子体の蒴柄で特異的にプロモーター活性が検出されたため, 孢子体に着目し解析を行った。相同組換えを利用した遺伝子ターゲティング法によりMpseta^{ko}株を作成し, 孢子体における表現型観察を行った結果, Mpseta^{ko}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^{ko}株では孢子が成熟しているにも関わらず, 孢子嚢が配偶体由来の保護器官を破って外側に露出せず, 孢子嚢が裂開しないため孢子が散布されなかった。以上の結果より, MpSETAが蒴柄形成およびそれに伴う孢子の散布に重要な役割を果たすことが示された。</p> <p>次に, ゼニゴケでIIIb bHLH転写因子が蒴柄形成に関与するかどうかを検証した。組織別RNA-seq解析から, MpICE2がMpSETAと同様, 発生過程にある孢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と相互作用することが示された。ゲノム編集により作出したMpice2^{oe}変異体において蒴柄が欠損することを明らかにし, Mpice2^{oe}変異体の孢子嚢が配偶体由来の保護器官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孢子の散布に機能することを支持している。</p> <p>以上の結果から, 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, 陸上植物の進化の過程におけるIa-IIIb bHLH転写因子モジュールの進化と転用が明らかとなった。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

陸上植物の表皮にはガス交換に重要な役割を果たす気孔が存在する。気孔の形成には、subfamily IaおよびIIIbに属する塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス型転写因子モジュール (Ia-IIIb bHLH型転写因子モジュール) による遺伝子発現制御が必要であることが先行研究により報告されている。水中に進出した植物など、二次的に気孔を喪失した植物はあるものの、門レベルで気孔を失っているのはコケ植物タイ類のみである。本論文は、タイ類のモデル植物であるゼニゴケに着目し、気孔を失った植物におけるIa-IIIb bHLH転写因子モジュールの役割を、分子遺伝学的手法や進化発生学的手法を用いて明らかにすることを試みたものである。

第一章では、ゼニゴケで唯一保存されたIa bHLH転写因子 (MpSETA) を発見し、これに注目した。組織別トランスクリプトームデータから、MpSETAが発生過程の二倍体 (孢子体) で高発現することを確かめた。野生型のゼニゴケ孢子体について、解剖学的解析から10のステージに分類し、発生過程を定義した。ゼニゴケはモデル植物ではあるものの孢子体に関する研究はほとんど行われていなかったため、本論文による孢子体発生過程の定義は今後のコケ植物研究の基盤になるものであり、高く評価できる。次いで、相同組み換えを利用してMpsetaノックアウト株を作出し、ノックアウト株の表現型を解剖学的に詳細に観察し、MpSETAが蒴柄形成に必要な転写因子であることを明らかにした。タイ類においてIa bHLHが気孔とは全く異なる蒴柄の形成を制御することはこれまでに想定されていない結果であり、これらの知見を得たことは植物の進化学・発生学への大きな貢献であると評価できる。

第二章ではゼニゴケのIIIb bHLH転写因子に注目した。ゼニゴケにおけるIIIb bHLH遺伝子を2つ同定し (MpICE1およびMpICE2) , このうちMpICE2がMpSETAと同様、若い孢子体で蒴柄を含む領域に発現することを明らかにした。次いで、*in vivo*でMpSETAとMpICE2が核内で相互作用することを確認し、ゲノム編集によって作出したMpice2変異体においてMpsetaノックアウト株同様、正常な蒴柄を欠損するという表現型を示すことを明らかにした。以上の結果は、陸上植物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タイ類にも保存されており、蒴柄の形成を制御することを示している。これは、Ia-IIIb bHLH転写因子モジュールが進化の過程で転用されていることを示した成果として高く評価できる。また、Mpsetaノックアウト株とMpice2変異体では蒴柄の異常により孢子嚢が配偶体由来の保護器官を破って外に出ず、孢子散布に異常を示すことを明らかにした。コケ植物の気孔、被子植物の葯孔も孢子または花粉の散布に重要であり、Ia-IIIb bHLH転写因子モジュールが形成を制御する組織の生理生態学的な役割を説明した重要な成果である。

以上のように、本論文は植物学に対する高度かつ幅広い学識、植物進化発生学分野における優れた研究能力、および生物学の理解・発展に貢献する新しい発見・概念が示されており、論理的かつ一貫性をもって記述されている。以上より、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値のあるものと認める。また、令和5年2月1日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降