

苔類ゼニゴケにおけるオーキシンを介した
転写制御機構の解析

加藤 大貴

目次

要旨	2
略語一覧	3
序論	5
結果	12
考察	31
材料と方法	37
引用文献	44
謝辞	55

要旨

オーキシンは植物の発生と生長の多くの面を制御する主要なホルモンである。オーキシン信号伝達には転写を介した経路が重要であり、その分子機構として F-box タンパク質 TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB) がオーキシン依存的に転写抑制因子 AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA) を分解に導くことで転写因子 AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) の機能を制御するモデルが明らかにされている。この機構は植物が陸上化する進化の過程で獲得されたと考えられるが、基部陸上植物におけるオーキシンを介した転写制御機構の役割については未解明な点が多い。そこで本研究では、陸上植物進化の最基部に位置する苔類に属するゼニゴケにおいて、オーキシンを介した転写制御の機構とその生理的役割について解析を行った。

まず、ゼニゴケにおけるオーキシン信号伝達因子の相同遺伝子をトランスクリプトーム、ゲノムデータベースを用いて探索し、ゼニゴケが 1 種の *TIR1/AFB* (*MpTIR1*)、1 種の *AUX/IAA* (*MpIAA*)、3 種の *ARF* (*MpARFs*) オーソログを持つことを明らかにした。予測された分解調節領域を改変した *MpIAA* (*MpIAA^{mDII}*) をゼニゴケで発現させたところ、植物体はオーキシン耐性を示し、ダイズ由来のオーキシン応答レポーターである *proGH3:GUS* の発現が完全に抑制された。このことから *MpIAA* は被子植物における *AUX/IAA* と同様の機構でオーキシン信号伝達に関与することが示唆された。次に *MpIAA^{mDII}* とグルココルチコイド受容体の融合タンパク質を発現させることで、DEX 依存的にオーキシン応答を抑制できるシステムを構築した。この形質転換体を用いて誘導的にオーキシン応答を抑制したところ、無性芽からの分化、様々な器官の発生、生殖器の屈性応答、孢子体の発生など、生活環全体で多くの発生プロセスに異常を示した。次にゼニゴケがどのようにして少ない転写制御因子で多様なオーキシン応答を制御するかを明らかにするため、3 種の *MpARFs* の機能分化に着目した。Y2H 法、BiFC 法による解析から、*MpIAA* と *MpARFs* タンパク質は C 末端領域を介して様々な組み合わせで相互作用し、それぞれ異なる親和性を持つことを明らかにした。さらにタバコ培養細胞を用いた一過的トランス活性化実験から、3 種の *MpARFs* はそれぞれ異なる転写制御能をもつことを明らかにし、この結果は系統解析による機能予測と一致するものであった。つまり、ゼニゴケは被子植物で見られるオーキシンを介した転写制御機構を完全かつ最小の形でもち、多様なオーキシン応答を制御していると考えられる。このように、ゼニゴケは陸上植物におけるオーキシンを介した転写制御機構の進化とその役割を解析するモデルとして非常に優れている。本研究の結果、*TIR1/AFB*、*AUX/IAA*、3 種の *ARF* を介したオーキシン信号伝達機構は陸上植物の共通祖先で既に獲得されており、オーキシンを介した転写制御が陸上植物の体制を獲得する上で重要であったことが示唆された。

略語一覽

2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
4-Cl-IAA	4-chloroindole-3-acetic acid
aa	amino acid residues
ABP1	AUXIN BINDING PROTEIN 1
AD	activation domain
AFB	AUXIN SIGNALING F-BOX
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
AUX/IAA	AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
BD	binding domain
BiFC	bimolecular fluorescence complementation
BLAST	basic local alignment search tool
cDNA	complementary DNA
COI1	CORONATINE INSENSITIVE 1
DBD	DNA binding domain
DEX	dexamethasone
DNA	deoxyribonucleic acid
F-Luc	firefly luciferase
GUS	β -glucuronidase
H ⁺ -ATPase	proton-adenosine triphosphatase
IAA	indole-3-acetic acid
IBA	indole-2-butyric acid
kb	kilo base pair
MU	4-methylumbelliferone
MUG	4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide
NAA	naphthalene-1-acetic acid
ONPG	ortho-nitrophenyl- β -galactoside
PAA	phenylacetic acid
PCR	polymerase chain reaction
PIN	PIN FORMED
R-Luc	Renilla luciferase
ROP	Rho-like guanosine triphosphatase from plants
RT	reverse transcription
SD	standard deviation
SE	standard error

SEM	scanning electron microscope
SKP2A	S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
TMK1	TRANSMEMBRANE KINASE 1
WT	wild type
Y2H	yeast two-hybrid

序論

植物ホルモン オーキシシン

動物とは異なり、固着生活を営む植物は絶えず変化する周囲の環境に対して、自身の形態を変化させ、遺伝子発現を最適化させることで対応している。植物ホルモンは低濃度で生理作用を引き起こす天然化合物と定義され、植物が内的・外的な刺激を最適な生理応答へと変換するための情報伝達物質として働いている(Davies, 2010)。これまでに、様々な低分子化合物やペプチドが植物ホルモンとして認識されており、中でもオーキシシンは最も早く単離・同定され、その研究の端緒は 19 世紀にまで遡る。Charles Darwin は移動性の物質がオートムギの幼葉鞘が太陽光に向かって屈曲する現象を制御していることを提唱した(Darwin, 1880)。その後、この現象を制御する信号伝達物質がオーキシシンと呼ばれる一群の化合物であり、主には indole-3-acetic acid (IAA) であることが明らかにされた(reviewed in Mockaitis and Estelle, 2008)。オーキシシンとしての生理作用を持つ化合物は多数知られているが、IAA の他に植物体内で見られるのは indole-3-butyric acid (IBA)、4-chloroindole-3-acetic acid (4-Cl-IAA)、phenylacetic acid (PAA) だけである(図 1)。しかし、IBA は容易に IAA へと転換されることから IAA の貯蔵形態であると考えられている。4-Cl-IAA は限られた種にしか存在せず、IAA とは異なる応答も引き起こすこと、PAA は比較的弱いオーキシシン活性を示し、IAA の細胞間輸送を阻害することから 4-Cl-IAA と PAA はオーキシシンとは別の情報伝達物質ではないかと考えられている。そのため現在のところ IAA が一般的な天然オーキシシンであると言える(reviewed in Bennett and Leyser, 2014; Simon and Petrusek, 2011; Strader and Nemhauser, 2013)。また、人工オーキシシンとしては naphthalene-1-acetic acid (NAA)、2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) が多く用いられている(図 1)。オーキシシンの生理作用は被子植物を中心によく研究されており、胚発生におけるパターン形成(Friml et al., 2003)、茎頂分裂組織における葉原基の発生(Reinhardt et al., 2000)、根の発生(Benkova et al., 2003)、光や重力への屈性応答など(Harper et al., 2000; Tatematsu et al., 2004)、植物の生活環を通じて細胞の分裂・伸長・分化を介して形態形成を制御する(Perrot-Rechenmann, 2010; Vanneste and Friml, 2009)。

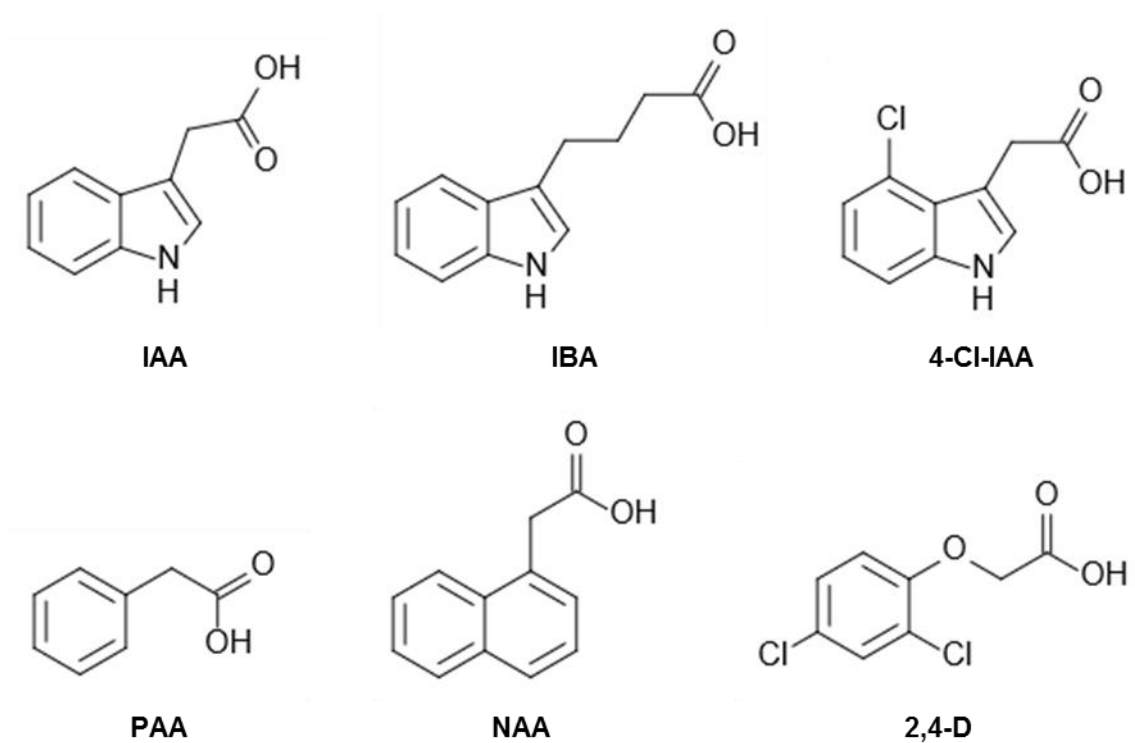


図1 代表的なオーキシン化合物の構造式

オーキシン信号伝達機構

近年のシロイヌナズナを中心とした分子遺伝学の発展から、オーキシン信号伝達の分子機構が明らかにされてきた。オーキシン信号伝達の主要な経路として、TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB) と AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA) が共受容体として機能する転写を介したモデルが明らかにされている。またシロイヌナズナでは F-box タンパク質 S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A (SKP2A) がオーキシンと結合することで細胞周期制御転写因子の分解を制御する経路も見つかっている(Jurado et al., 2010)。さらに、近年 AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1) が細胞外で機能するオーキシン受容体として働き、転写を介さない速い応答を担っていることが示唆されている(Grones and Friml, 2015)。TIR1/AFB-AUX/IAA を介した転写制御経路と、ABP1 を介した経路の詳細については以下に記述する。

TIR1/AFB-AUX/IAA を介した経路

TIR1/AFB-AUX/IAA 共受容体は転写因子 AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) による転写制御を調節する(Salehin et al., 2015)。ARF は N 末端側に DNA 結合領域 (DBD) を持ち、オーキシン応答遺伝子のシス領域 (Auxin Responsive Element: AuxRE) に直接結

合する(Ulmasov et al., 1999b)。ARFのDBDは二量体を形成することで回文状に配置されたAuxREへの結合能を調節していることが示唆されている(Boer et al., 2014)。またARFの転写制御能には中間領域(MR)のアミノ酸組成が重要であることが示されている(Ulmasov et al., 1999a)。細胞内のオーキシン濃度が低いときは、AUX/IAAとARFはそれぞれのC末端領域にあるドメインIII/IVを介して多量体を形成し、AUX/IAAはドメインIを介して転写共抑制因子TOPLESS(TPL)と相互作用することでオーキシン応答遺伝子の転写を抑制する(Kim et al., 1997; Korasick et al., 2014; Nanao et al., 2014; Szemenyei et al., 2008; Ulmasov et al., 1999b)。細胞内のオーキシン濃度が高くなると、オーキシンが“分子接着剤”のように働いてAUX/IAAのドメインIIとTIR1/AFBの相互作用を安定化し(Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005)、AUX/IAAのユビキチン化と26Sプロテアソームによる分解を促進する(Gray et al., 2001)。結果として、AUX/IAAから解放されたARFが転写制御を行えるようになる(図2)。AUX/IAAのドメインIIのコア配列(GWPP)に変異が入るとプロテアソーム依存的な分解が阻害され(Ramos et al., 2001)、シロイヌナズナにおける多くのAUX/IAAの優性的機能獲得変異体ではここに変異が見られる。このような変異体はオーキシン感受性の低下と様々な形態異常を示すことが明らかにされている(Mockaitis and Estelle, 2008; Reed, 2001)。

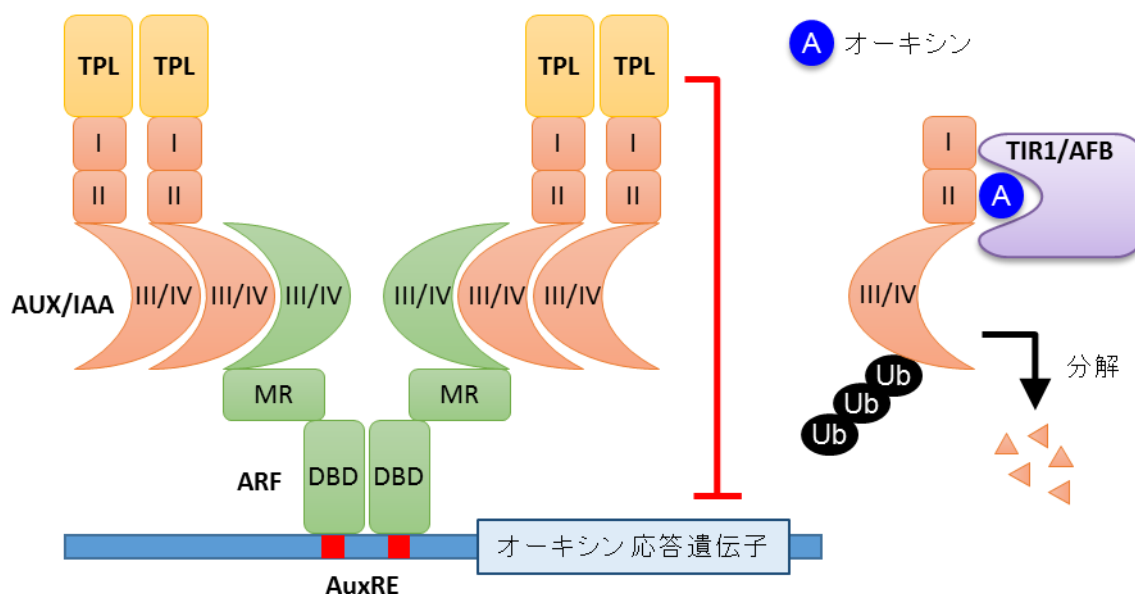


図2 オーキシンを介した転写制御モデル (Salehin et al., 2015をもとに作成)
 ARF(緑)、AUX/IAA(橙)、TPL(黄)、TIR1/AFB(紫)を介したオーキシン依存的な転写制御機構。
 Tバーは転写抑制を表している。ローマ数字:ドメインI~IV。DBD: DNA結合領域。MR: 中間領域。Ub: ユビキチン。

ABP1を介した経路

ABP1は転写を介さない早期のオーキシン応答を担う受容体であると考えられている(Grones and Friml, 2015)。ABP1は最初、トウモロコシにおいてオーキシン結合タンパク

質であることが示され(Hertel et al., 1972)、その後の解析から ABP1 は細胞膜でのオーキシシン結合に関わり、オーキシシンとの結合によって H⁺-ATPase の活性化、細胞外の酸性化、内向きの K⁺チャンネルの活性化を誘導することが示された(Napier et al., 2002)。シロイヌナズナにおいて *ABP1* の T-DNA 挿入変異体は胚性致死であることが報告されており(Chen et al., 2001b)、また *abp1/ABP1* ヘテロ接合体の解析から ABP1 は根や胚軸の伸長、頂芽優勢、求基本的なオーキシシン輸送に関わることが示唆されている(Effendi et al., 2011)。

ABP1 が細胞表面からどのようにしてオーキシシン信号を伝えているかは長年の疑問であったが、最近になって ABP1 がオーキシシン依存的に細胞膜貫通型受容体キナーゼ TRANSMEMBRANE KINASE 1 (TMK1) と相互作用し、細胞膜付近にある Rho-like GTPase from Plants (ROP) を活性化することが示された(図3)(Xu et al., 2014)。シロイヌナズナではオーキシシンによって ROP2 と ROP6 は速やかに活性化され、細胞骨格を介して葉の表皮細胞の凹凸の形成に関与し、またオーキシシン排出輸送体 PIN FORMED 1 (PIN1) の小胞輸送を介したリサイクリングを制御する(図3)(Nagawa et al., 2012; Xu et al., 2010)。また、ABP1 は転写を介したオーキシシン応答にも関与することが示唆されており、様々な細胞壁関連遺伝子の発現に影響し、その制御は主に TIR1 依存的であることが示されている(Paque et al., 2014)。

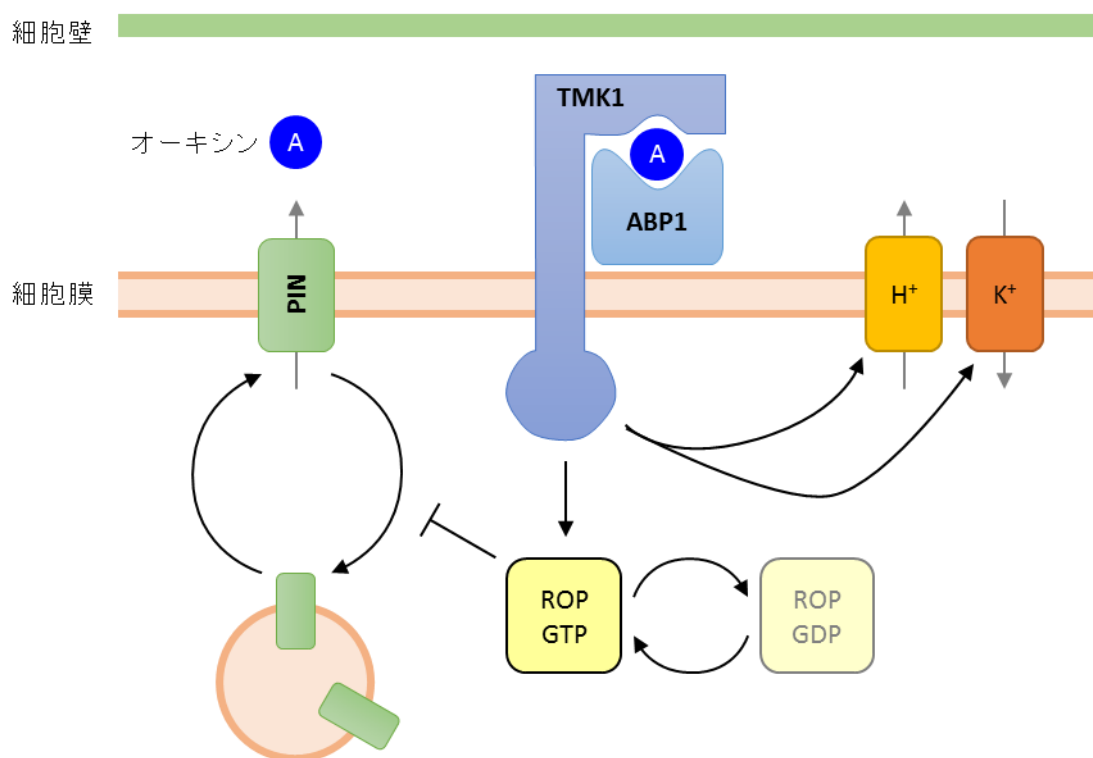


図3 ABP1の機能モデル(Grones and Friml, 2015を元に作成)

植物の進化とオーキシン応答

シロイヌナズナのゲノムには 29 種の AUX/IAA と 23 種の ARF がコードされており (図 4)、これらの協調的な働きによって多様なオーキシン応答を制御していると考えられている (Piya et al., 2014; Vernoux et al., 2011)。また、AUX/IAA の中にはドメイン II を持たないものがあり、ARF の中でも DBD またはドメイン III/IV を欠失したものがみついている (Finet et al., 2013; Paponov et al., 2009)。このような非典型的なドメイン構造をしたタンパク質は前述したモデルとは異なる形で転写制御に関わり、オーキシン応答の多様性に貢献している可能性がある。さらに 6 種の TIR1/AFB と典型的な 24 種の AUX/IAA による様々な組み合わせがオーキシン親和性の異なる共受容体を形成し、AUX/IAA 分解のオーキシン感受性に多様さを与えることが示唆されている (Calderón Villalobos et al., 2012; Shimizu-Mitao and Kakimoto, 2014)。このように被子植物ではオーキシン転写制御因子の遺伝的冗長性と多様性が高く、また様々な器官から構成される複雑な体制も相まって、信号伝達因子の相互作用やフィードバック制御を含めたオーキシン転写制御機構の全体像を把握することが困難である。

植物の進化に着目すると、オーキシン応答は基部陸上植物であるコケ植物、シダ植物、また陸上植物の姉妹群である車軸藻類においても観察されている (Cooke et al., 2002)。これまでにコケ植物蘚類に属するヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、小葉類に属するイヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) においてゲノム情報が解読され、これらの種が基本的なオーキシン信号伝達因子の相同遺伝子を持つことが明らかにされている (図 4) (Banks et al., 2011; Rensing et al., 2008)。また、ヒメツリガネゴケにおいては TIR1/AFB と AUX/IAA によって受容されるオーキシンシグナルが原糸体のクロロネマからカウロネマへの分化や仮根の発生に寄与していることが示されている (Prigge et al., 2010)。車軸藻類では最近、クレブソルミディウム (*Klebsormidium flaccidum*) のドラフトゲノムが公開され、TIR1/AFB、AUX/IAA、ARF をコードする遺伝子を持たないことが報告された (図 4) (Hori et al., 2014)。これらのことから、オーキシンを介した転写制御機構はクレブソルミディウムと陸上植物につながる祖先種が分岐した後に獲得されたと考えられる。

		オーキシン				
		応答	TIR1/AFB	AUX/IAA	ARF	ABP1
陸上化→	緑藻類	—	—	—	—	—
	車軸藻類(クレブソルミディウム)	+	—	—	—	1
	コケ植物(ヒメツリガネゴケ)	+	4	2	13+4*	2
	小葉植物(イヌカタヒバ)	+	2	2+2*	7+7*	1
	被子植物(シロイヌナズナ)	+	6	24+5*	19+4*	1

図4 植物の進化とオーキシン 応答

植物の進化系統の概略図とそれぞれの種におけるオーキシン 応答の有無(+;あり、-;なし)、オーキシン 信号伝達因子の分子種の数を示している。*: 非典型的なドメイン 構造分子種の数。

苔類ゼニゴケ

コケ植物は苔類、蘚類、ツノゴケ類の3種に大きく分類される。ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) は現存する陸上植物の進化上、最も基部に位置するグループである苔類に属し(Bowman, 2013)、実験生物として長い歴史を持っている。ゼニゴケは複雑葉状性の苔類で、生活環の大半を半数体の扁平な葉状体で過ごす(図5)。葉状体は先端生長し、明確な背腹性を持つ。葉状体の背側にはガス交換に重要だと考えられる気室が並び(Barnes and Land, 1907)、無性生殖器官である杯状体と無性芽が形成される(Barnes and Land, 1908)。葉状体の腹側には腹鱗片や仮根が形成される(McConaha, 1941; Schiffner, 1909)。ゼニゴケは雌雄異株であり、長日条件、遠赤色光の照射によって有性生殖のために造卵器を作る雌器床と造精器を作る雄器床を形成する(Chiyoda et al., 2008; Kubota et al., 2014)。受精は水を媒介して行われ、2倍体の接合子は多細胞の孢子体(胚)へと分化し、減数分裂を経て多数の半数体の孢子を作る孢子嚢へと発達する(Durand, 1908)。

植物においてもっとも普遍的なオーキシンである IAA はゼニゴケにおいても検出されている(Schneider et al., 1967)。外生オーキシンの添加実験から、オーキシンはゼニゴケにおいて仮根の発生と伸長(Ishizaki et al., 2012; Kaul et al., 1962; Maravolo and Voth, 1966)、葉状体の生長(Ishizaki et al., 2012; Maravolo, 1980)、葉状体切断面からの再生(Binns and Maravolo, 1972)、頂芽優勢に関与していることが示されている(Davidonis and Munroe, 1972)。さらに、当研究室ではダイズ由来のオーキシン応答レポーター $proGH3:GUS$ が、ゼニゴケにおいてもオーキシン特異的かつ濃度依存的に発現することを明らかにした(Ishizaki et al., 2012)。このことは被子植物と共通のオーキシンを介した転写制御機構がゼニゴケにおいても保存されていることを示唆している。

近年ゼニゴケは進化的に重要な位置を占めることから注目を集めている(Bowman et al., 2007)。またゼニゴケは半数体優勢な生活環を持ち、無性生殖が可能という遺伝学的な長所も持つ。これまでにアグロバクテリウムを介した遺伝子導入(Ishizaki et al., 2008; Kubota et al., 2013)や相同組み換えによる遺伝子ターゲティング(Ishizaki et al., 2013a)、CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集(Sugano et al., 2014)などの分子遺伝学ツールが開発されてきた。また、Joint Genome Institute (JGI)によるゲノム解読プロジェクトが進行中であり、網羅的なゲノム・トランスクリプトームの情報が得られ、一般的に遺伝的冗長性が低いことが明らかになりつつある(未発表データ)。

本研究ではゼニゴケにおけるオーキシン信号伝達因子をゲノム・トランスクリプトームデータベースから探索し、ゼニゴケが最小かつ完全なオーキシンを介した転写制御機構を持つことを明らかにした。また AUX/IAA を介したオーキシン信号伝達がゼニゴケの生活環全体に渡って発生に重要な役割を果たすこと、ARF のタンパク質相互作用や機能分化についても明らかにした。これらの結果から、ゼニゴケが最小限の信号伝達因子セットにより多様なオーキシン応答を引き起こす仕組みについて議論する。

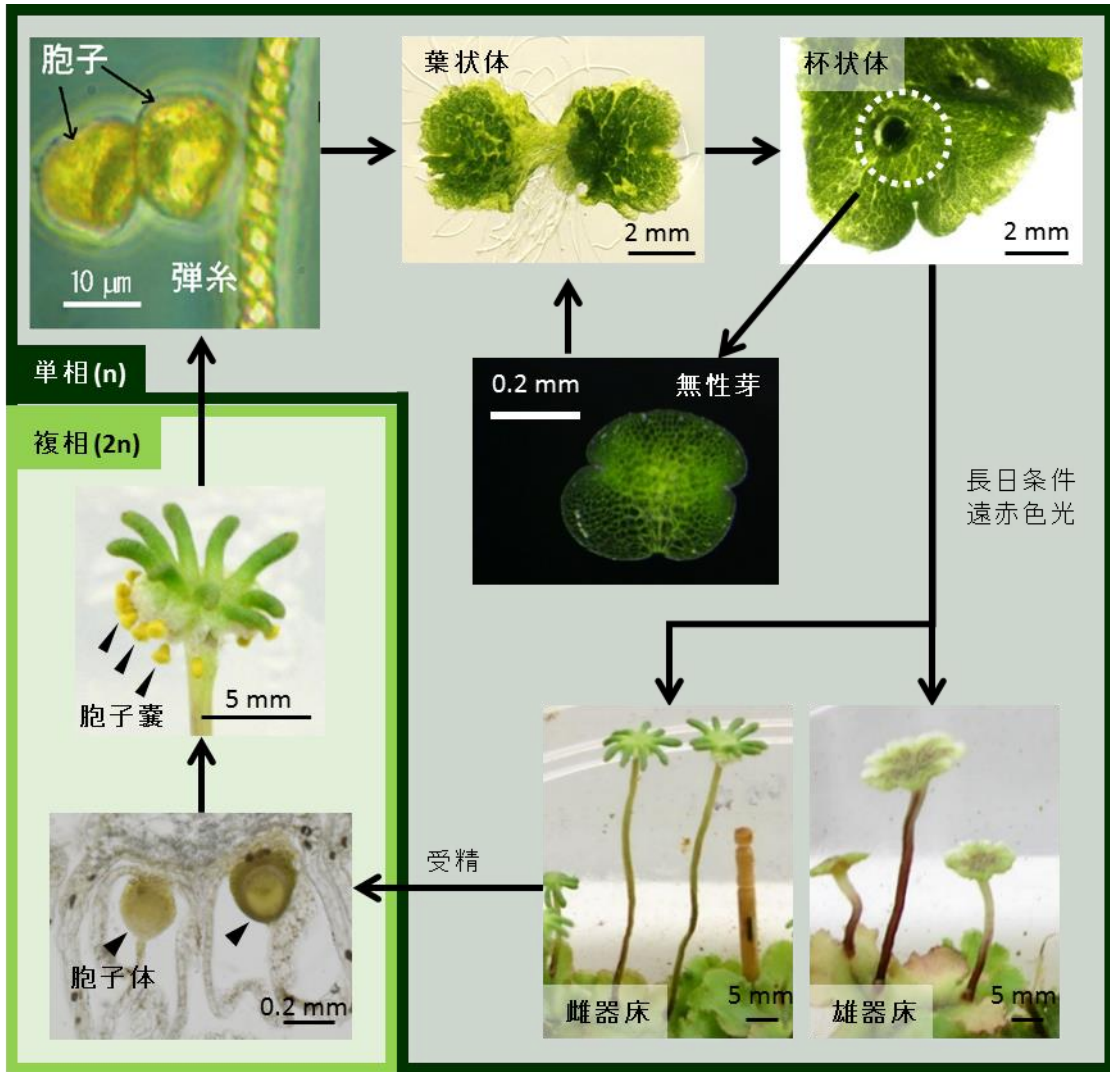


図5 ゼニゴケの生活環

結果

ゼニゴケにおけるオーキシン信号伝達因子の探索

ゼニゴケが基本的なオーキシン信号伝達因子を持つかどうかを調べるため、ゼニゴケのゲノム・トランスクリプトームのデータベースに対して BLAST 検索を行った。

AUX/IAA に特徴的な 4 つのドメイン (ドメイン I-IV) をすべてもつタンパク質をコードする遺伝子はゼニゴケのゲノムに 1 種しかコードされておらず、これを *MpIAA* と命名した。*MpIAA* の予測アミノ酸配列の N 末端側に存在するドメイン I には TPL との相互作用に重要な LxLxL 配列が保存されていた (図 6A, 7)。*MpIAA* の C 末端側には *AUX/IAA* の分解調節領域であるドメイン II、タンパク質相互作用ドメインであるドメイン III/IV が保存されていた (図 6A, 7)。*MpIAA* のドメイン III/IV には、*AUX/IAA* と ARF のオリゴマー化に重要なリシン残基や酸性残基が保存されていた (図 7) (Korasick et al., 2014; Nanao et al., 2014)。*MpIAA* のアミノ酸配列は他の植物種の *AUX/IAA* に比べて非常に長く (825 aa)、ドメイン I とドメイン II の間にグルタミンに富んだ長い領域を持っていた。この構造が進化的に保存されたものであるかを調べるため、同じゼニゴケ目に属するジャゴケ (*Conocephalum conicum*)、ヒメジャゴケ (*Conocephalum japonicum*) から degenerate RT-PCR によって *AUX/IAA* 遺伝子の部分配列を取得した。その結果ジャゴケ、ヒメジャゴケの *AUX/IAA* にもグルタミンに富んだ領域が N 末端側に存在しており、この領域が少なくともゼニゴケ目の *AUX/IAA* に保存された領域であることが示された (図 7)。またゼニゴケ、ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバ、シロイヌナズナの配列を用いて *AUX/IAA* ファミリーの系統解析を行ったところ、*MpIAA* はヒメツリガネゴケやイヌカタヒバと共に、シロイヌナズナの *AUX/IAA* とは異なる系統群を形成した (図 6B)。

ゼニゴケのゲノムには N 末端側に B3 タイプの DNA 結合領域、C 末端側にタンパク質相互作用ドメインであるドメイン III/IV をもつ典型的な ARF の構造を持つタンパク質が 3 種コードされており、それぞれ *MpARF1*、*MpARF2*、*MpARF3* と命名した (図 6A, 8)。*MpARF1* は DNA 結合領域とドメイン III の間にグルタミンに富んだ領域を持っており、これは転写活性化型 ARF の特徴として知られている (Ulmasov et al., 1999a)。Finet らは様々な陸上植物から 224 の ARF タンパク質配列を集めて系統解析を行い、ARF ファミリーが 3 つの大きなクレード (A、B、C) に分類されることを報告している (Finet et al., 2013)。ゼニゴケの ARF についても系統解析を行ったところ、*MpARF1* は転写活性化型 ARF であるクレード A に分類された (図 6C)。*MpARF2* はクレード B に分類され、シロイヌナズナではこのクレードに属する ARF のいくつかは転写抑制因子として機能することが示されている (Tiwari et al., 2003; Ulmasov et al., 1999a)。*MpARF3* は比較的長い DNA 結合領域を持っており、ドメイン III/IV の配列もクレード A、B に属する ARF とはやや低い相同性を示した (図 8A, B)。また *MpARF3* の mRNA 配列は miR160 の標的配列と予測される領域があった (図 8C)。これらの特徴はシロイヌナズナの ARF10、ARF16 にも共通しており、また

ARF10、ARF16 は転写抑制因子であると予測されている(Liu et al., 2010)。系統解析の結果からも MpARF3 がシロイヌナズナの ARF10、ARF16、ARF17 と同じくクレード C に属することが示された (図 6C)。以上の結果をまとめると、MpARF1、MpARF2、MpARF3 は系統的に異なるクレードにそれぞれ分類されており、このことから ARF ファミリーは陸上植物の共通祖先においてすでに 3 種類に機能分化していたことが示唆された。

BLAST 探索の結果、ゼニゴケには TIR1/AFB とジャスモン酸受容体 CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) に高い相同性を示す遺伝子が 2 つ見つかった。一方はシロイヌナズナの TIR1 とアミノ酸配列が 54%一致し、系統解析からも TIR1/AFB のグループに分類されたことから MpTIR1 と命名した (図 6D)。もう一方の遺伝子がコードするタンパク質はシロイヌナズナ COI1 とアミノ酸配列が 44%一致しており、系統解析の結果 COI1 と同じクレードに分類された (図 6D)。このことから、ゼニゴケは *TIR1/AFB* 遺伝子を 1 種のみ持つことが示唆された。

以上の結果から、ゼニゴケはオーキシンを介した転写制御に必要な基本的因子のすべてを、最小の遺伝的冗長性で備えていることが明らかになった。また、もう一つのオーキシン受容体として知られる ABP1 の相同遺伝子をゼニゴケが持つかを調べるため、BLAST 検索に加えてタンパク質相同性検索プログラム HMMER(Finn et al., 2011)を用いた検索も行ったが、ゼニゴケのゲノムに ABP1 の相同遺伝子は見つからなかった。

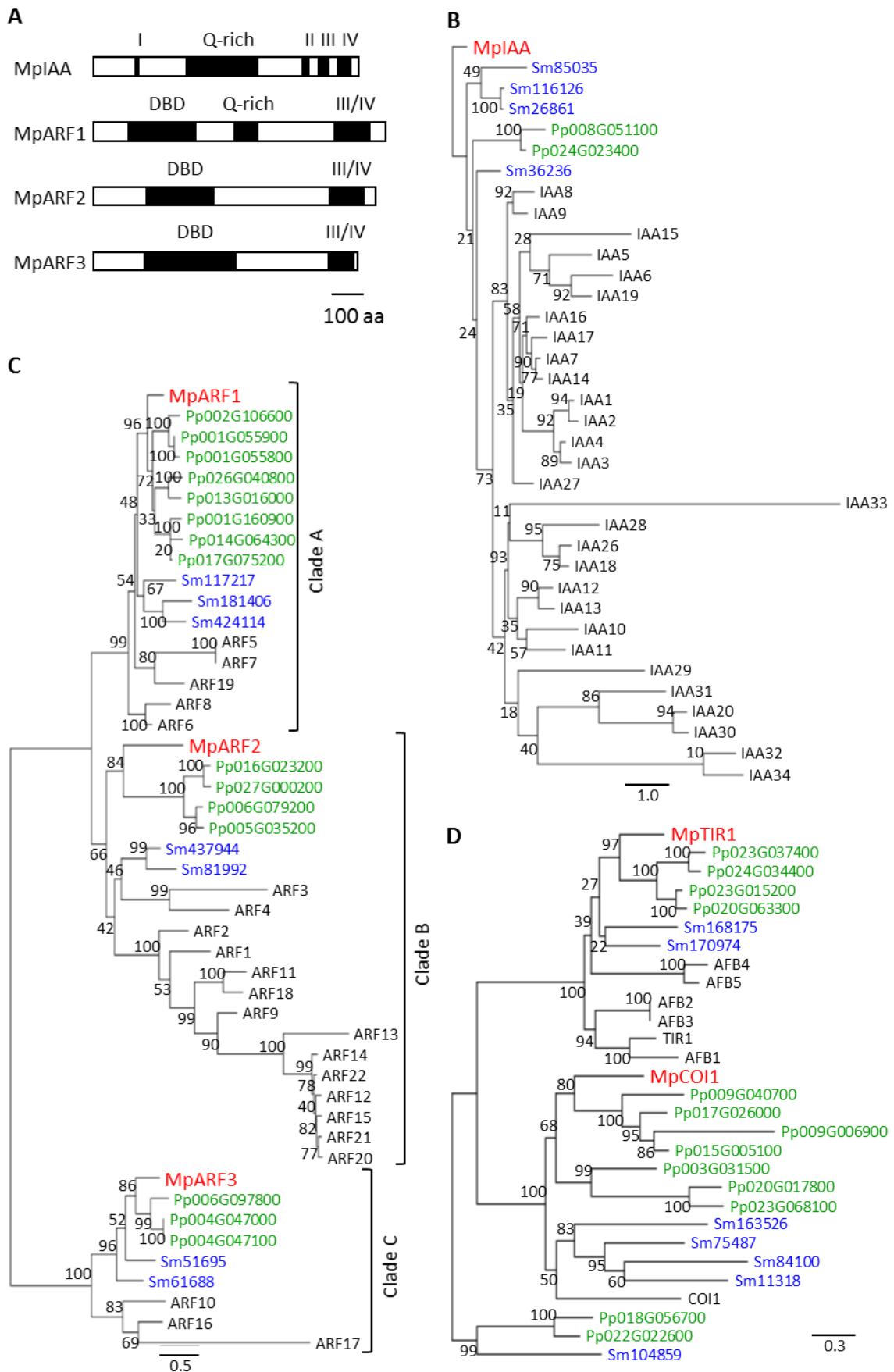


図6 ゼニゴケにおけるオーキシン信号伝達因子

(A) MpIAA, MpARFsのドメイン構造。ローマ数字: ドメインI-IV。(B-D) MpIAA (B)、MpARFs (C)、MpTIR1 (D) の系統的位置。解析にはゼニゴケ(赤)、ヒメツリガネゴケ(青)、イヌカタヒバ(緑)、シロイヌナズナ(黒)の配列(表2)を用いた。Bar: アミノ酸の置換率。

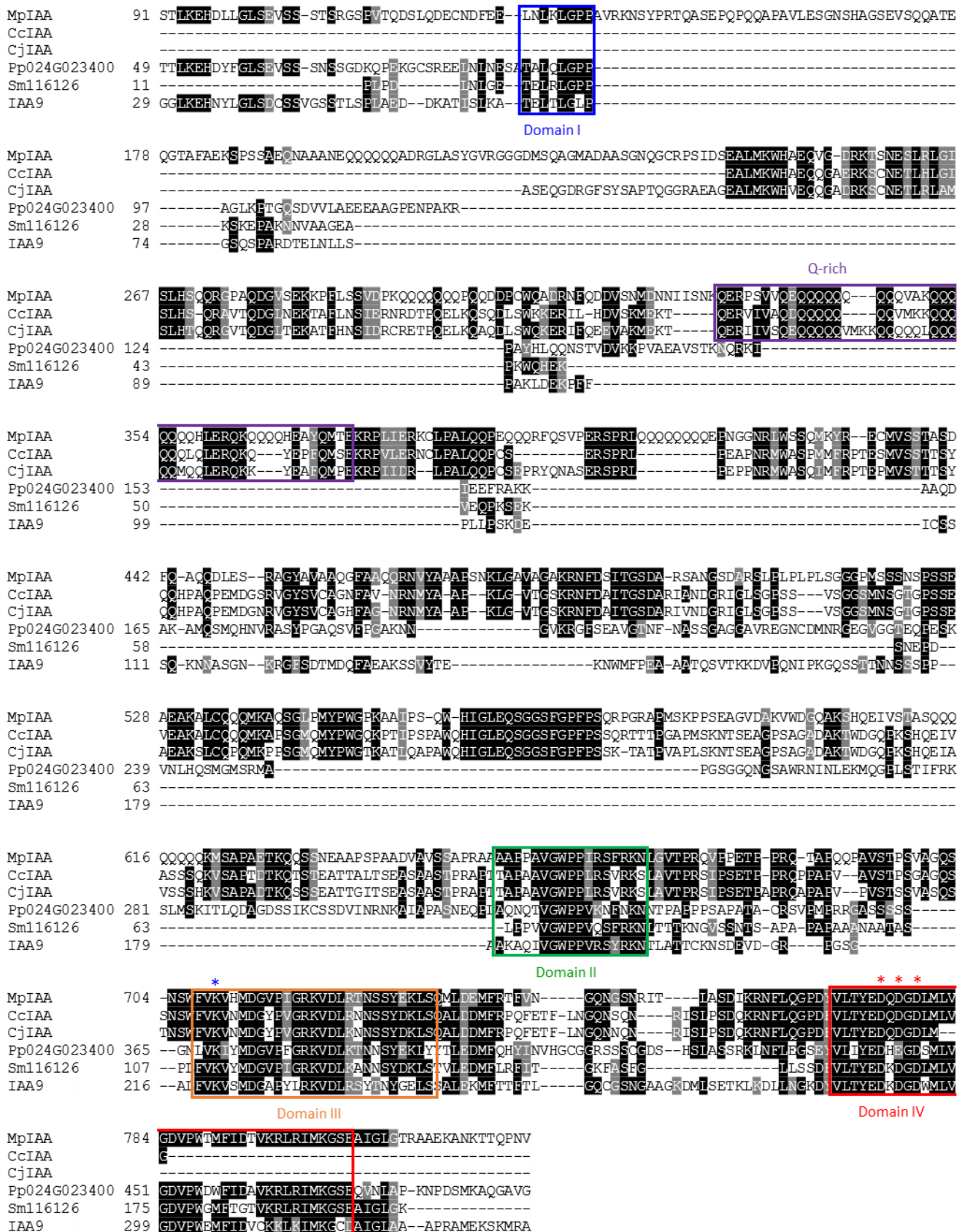


図7 AUX/IAAファミリーのマルチプルアライメント

ゼニゴケ、ジャゴケ (Cc)、ヒメジャゴケ (Cj)、ヒメツリガネゴケ (Pp)、イヌカタヒバ (Sm)、シロイヌナズナの AUX/IAAアミノ酸配列をMUSCLEプログラムを用いて整列した。青と赤のアスタリスクはそれぞれ相互作用に重要な塩基性、酸性残基を示す。

A

MpARF1	1	-----MCAEQRSINSELWHACAGPLVSVPPVGSRVVYFPQGH
ARF5	1	-----MMISLSCVEDRMKTSCLVNGGGTITTTTSQSTLLEEMKLLKQSGTRKPVINSSELWHACAGPLVCLPEQVGSIVVYFSSQGH
MpARF2	1	MSEASSITRHPYKANTGPLLKFOQSSASSLPPMARPMASRQLATSHAAASNVSVAIGDITAEELWHACAGPQKALPPVGSVVAYLPQGH
ARF2	1	---MASSEVSMKCNRGCDNFSSSGFSLPKETRNVSVAEGEQKSNSTRSAAARALDPEAATLYRELWHACAGPLVTVRQDDVEVYFPQGH
MpARF3	1	---MPGSPGCGTMSCTNIKMEKSEISMGGGG---KGWGGGRDRDSSSDGGGGSSENTGLDLPQLWHACAGMVQLPPVGARVVIYFPQGH
ARF10	1	-----MEQEKSLDLPQLWHACAGSMVQLPESINSIVVYFAPQGH
MpARF1	39	SEQVAASTCKEADVHIFSPYSLPSRLTGLDINVTLHADMETDEVYTRMTLLPMSGSP---EKEL---VIVPD---ITRDTKQPTDFECKTI
ARF5	81	SEQVAVSTRRSATTQVENYPLPSQLMCQVNVTLHADKDSDEIYAQMSIQPVHS---ERDV---FVVPDFGMLRGSKHPTIEFFCKTI
MpARF2	91	IEQVASFNQELDAQIPRY-NLBAVIFGMINDIQLSADPDSDEVYATITICPMSECH---EDSSDCAEFPF-----PPKRRKRSSTFKTI
ARF2	88	IEQVEASTNQAEQQMELY-DLPSKLCRVINVDLKAETDEVYACTITLLEAAND---ENATEKEAEPF-----PPRFQVHSFCKTI
MpARF3	84	GEQAAT---PPEF---PRMMGPQGTICRVVSVSFLADTETDEVYARIRIQPIEREA---AMSIADSTLDAIGGPPSPPEKFPASEAKTI
ARF10	37	TEHAHA---PPEFHAPRV---PLITICRVVSVKFLDAETDEVFAKITLLPLPGNDLLENIAVLGLTPESSDGNNGKPKFPASEAKTI
MpARF1	121	TASDTSHTGGGFSVPRRAAEKVPPLDYSQEPAPHAQELVARDLHDQEWHRFHIYRGQPRRHLLTTGWSVVFSAKRIQAGDSVLFTRIDK
ARF5	163	TASDTSHTGGGFSVPRRAAEKVPPLDYSQEP---PTQELVVRDLHENITWIFRHIYRGQPKRHLLTTGWSIFVGSKRIRAGDSVLFTRIDEK
MpARF2	171	TVSDTSHGGGFSVPRRAADCLFELKLDMSLNE---PNQELVAKDLHGNEWRFRHIFRGQPKRHLLTTGWSVVFSAKRIQAGDSVLFTRIDK
ARF2	169	TASDTSHTGGGFSVPRRAADCLFELKLDMSLNE---PTQELVAKDLHGNEWRFRHIFRGQPKRHLLTTGWSVVFSAKRIQAGDSVLFTRIDK
MpARF3	165	TCSDANNGGGGFSVPRYCAETIFPPLDYSIDE---FVQTVIAKDVHGERWFRHIFRGTERRHLLTTGWSTFVNQKILVAGDAIVFLRTAS
ARF10	120	TCSDANNGGGGFSVPRYCAETIFERLDYSAEF---FVQTVIAKDVHGERWFRHIFRGTERRHLLTTGWSTFVNQKILVAGDSIVFLRSSES
MpARF1	211	GQLLLGTRRANRQQTAMPS-----SVLTSI-----
ARF5	250	SQLMVGVRRANRQQTAMPS-----SVLSAD-----
MpARF2	258	GQLRVGVRRARQQQLQPK-----VLTSP-----
ARF2	256	GETRVGVRRARQQGNVPS-----SVLSSH-----
MpARF3	252	GETCVGVRRSMRGTGADSSSTWSGGSSSTSHHRPNRWEVKGTESFSDFTGNDSAAGGGSVSSAGSAAGPGGPRAGPGGSNSGPGIGIPGFS
ARF10	207	GETCVGTRRKRGGLESNA-----GSDNPY-----PGFSGFIRDESTTTTSKLMMMKRNGNNDGNAATG-----
MpARF1	236	-----SMHIGVLAAANHAAATNSRFTIFYNPRASPSEFVIEPLAKYNKATYHTQVSVGMFRFMVFETEEISGV---RRYMGTTITGIGDV
ARF5	275	-----SMHIGVLAAAHAATANRPFILIFYNPRACPAEFVIEPLAKYRKATCGSISVGMFRFGMMFETEDSGK---RRYMGTTIVGISDL
MpARF2	282	-----TMHIGVLAAAHAATEKSRFSLIFYNPRSCPSEFVIEPYSKYLKAV---KSNFNVGQRFKMKFESELPD---RRHTGITITGIGDF
ARF2	281	-----SMHIGVLATAWHAISTGIMFTVYKPRTPSPSEFVIEPFDQYMSV---KNNYSIGMRFKMRFEGEFAPE---QRFTGITIVGIEES
MpARF3	342	TTSSFARNRARTAQSVLEAASLAVQGFVEVYYPRASTAEFCVKAQAVKAAAL---DHTWFGMRFKMAFETEDSSRISWFMTISAVQPA
ARF10	268	-----RVRVEAVAEAVARAACQAFVEVYYPRASTAEFCVKAADVRSAM---RIRVCSGMRFKMAFETEDSSRISWFMTVSAVQPA
MpARF1	315	DPLRWFSHWRSLKVGWDESIAGERQRRVSLIWEIEPLTTPFLICEPLILRAKRPASSRSGHSGEDEEGDGSVKKSSMMWIRDDERDGLSNI
ARF5	354	DPLRWFGSKWRNLQVEWDEFGCNDKPTRVSPWDIETPESIF---IFPSLTSLGKRLQLH---PSYFAGETEWGS-----LIKRPILIR---V
MpARF2	360	DEARWFGSEWRSLQVNWDESSSERQERQVSEVVEVEFSPSTTITPSVSTR---KRLRPVTOHSESAVNRNA-----VETSKAQT---Q
ARF2	359	DETRWPKSKWRSIKVRWDETSSTPRPRVSPWKEPALAFAPALSPVEMPRKRPNSNIAPSSPSSMLT-----REGTTKANMDPI
MpARF3	431	DSLWPKSPWRVLOVWDEPDLIQGVSRSVSPQVELVSTIE---MQLPEFSLPKKLRAPQPSDMNQGG-----IMG-----M
ARF10	347	DETRWPNSEWRLLQVAWDEPDLIQNVKRVSPWLVELVSNMPTIHLSEFS---PRKIRIRIQPFE-----F

B

MpARF1	733	FCYSSAGQDLPISPGIIISHGSIINDSQFMQRGFMAPVSSP-----QRSYTKVKIKG-SVGRSLDVAQFTNYTDLRVHILARMFCLEG
ARF5	747	Q--AFSRQDFPDNSG--GTGSSSNVDFDCSLRQNSKSSQKIATPVRVITYTKVQKIG-SVGRSLDVTSEKDYEELKSAIECMFGLG
MpARF2	713	F--SSSRGLEKVVSPS--PTSSAVGGQEQDKQPQRSNKTSONEQQ--GPVRSYTKVHKQG-SFGRSLDVQSDGYTDLRKRVENMFEING
ARF2	690	F---KVQDLSQSK--GSKSTNDHREQGRPFQTNPHPKDACTKTNS--SRSTKVKHKGGIALGRSVDISKQNYEELVAEIDRIEENFG
MpARF3	694	SLSNGKQSDLVIG---EFQKWPVGLDKERGAGEKLAASP-----GESFSHCKVFKENDEVGRITVDLSQSSYEELYDRIGAMFLEQ
ARF10	543	QQVMNRKRFLLEEEAE-----AEEKGL---VARGLTNYSLQGLIETGHCKVMESELDVGRITDLSVIGSYQELYRKLAEMLHEE

Domain III

MpARF1	812	QIEDEQRSGVQLVFDNEQDVLVGGDDPWDEFVNCVRSIRILSPSEVMHMSQEGLEFLNIVPPTAPRPTSSSEDGATMPAGFEKSCGND
ARF5	832	LITHPQSSGVKLVYVDYESDVLVGGDDPWEEFVGCVRCTIRILSPTEVQQMSSEGMKILN-----SAGINDLKTSVS-----
MpARF2	796	ELEFDK-SGVLVYTDHEDDVLVGGDDPWMEFVSCVTRTIRILSPGEASSSGSGQ-----SHDEDAGKDKAKRCDSSSPSAGAR
ARF2	773	EIMAPK-KDVLVYTDHENDMLVGGDDPWQEECCMVRIETVYKEEVRKMNPGTILSCRS-----EEEAVVGCSDAKDAKASNPSSLSSA
MpARF3	773	KVPLNA---MFYRDGENYTRNVGCEPFYRNFAKSARRLVI-----RVDP-----SSNGKTRSQ-----
ARF10	620	RSDLLT---HVYRDANGVTKRIGDFEFSDFWKATKRITL-----KMDTGGDNVRK-----TWITGIRTEGENDASDKTIGELSIFA

C

miR160a 3'-ACCGUAUGUCCUCGGUCCGU-5'
 ::::::::::::::::::::

MpARF3 5'-GGGCATGCAGGGAGCCAGGCA-3'
ARF10 5'-AGGAATACAGGGAGCCAGGCA-3'
ARF16 5'-GGGTTTACAGGGAGCCAGGCA-3'
ARF17 5'-TGGCATGCAGGGAGCCAGGCA-3'

図8 MpARFsの配列解析

(A-B) ゼニゴケとシロイヌナズナのARFタンパク質のDNA結合領域(A)またはドメインIII-IV (B)におけるマルチプルアライメント。青と赤のアスタリスクはそれぞれ保存された塩基性・酸性残基を示している。(C) MpARF3のcDNA配列におけるmiR160の予測標的配列をシロイヌナズナのARF10、ARF16、ARF17と共に示している。

ドメイン II 改変型 MplAA によるオーキシン応答の抑制

AUX/IAA のドメイン II 変異は AUX/IAA のオーキシン依存的な分解を抑制し、優性的にオーキシン感受性の低下を引き起こす。シロイヌナズナでは複数の AUX/IAA についてドメイン II のプロリン残基がセリンに置換された変異体が報告されている (Mockaitis and Estelle, 2008; Reed, 2001)。ゼニゴケはゲノム中に *AUX/IAA* オースログを 1 種しかコードしていなかったことから、ゼニゴケにおけるオーキシン信号伝達のメカニズムと役割を調べるにあたり *MpIAA* に着目した。*MpIAA* がオーキシン応答に関与しているかどうかを調べるため、ドメイン II のプロリン残基をセリンに置換した機能獲得変異体になると期待される *MpIAA* (*MpIAA^{mDII}*)、あるいは野生型の *MpIAA* を、ゼニゴケ *ELONGATION FACTOR 1α* プロモーター (*proMpEF1α*) (Althoff et al., 2013) 制御下で恒常的に発現する形質転換体を作成し (*proMpEF1α:MpIAA*, *proMpEF1α:MpIAA^{mDII}*; 図 9A)、外生オーキシンへの応答を観察した。それぞれの形質転換体をオーキシン非存在下で生育したところ、*proMpEF1α:MpIAA* 株は野生型と同様に生育したのに対し、*proMpEF1α:MpIAA^{mDII}* 株では葉状体の矮化や湾曲という表現型が見られた (図 9B)。次にそれぞれの株を高濃度 (3 μM) の合成オーキシン NAA 存在下で生育したところ、*proMpEF1α:MpIAA* 株はこれまでに野生型で報告されていたのと同様に、葉状体の面積が著しく減少する生長抑制を示し、仮根の増加が見られた (Ishizaki et al., 2012; Otto and Halbsguth, 1975; Rousseau, 1950, 1951; Tarén, 1958)。それに対して *proMpEF1α:MpIAA^{mDII}* 株では NAA 処理による葉状体面積の減少はほとんど見られなかった (図 9B)。以上の結果から、*MpIAA* は被子植物の AUX/IAA で示されたのと同様に、ドメイン II の機能を介してオーキシン信号伝達に関与していることが示唆された。

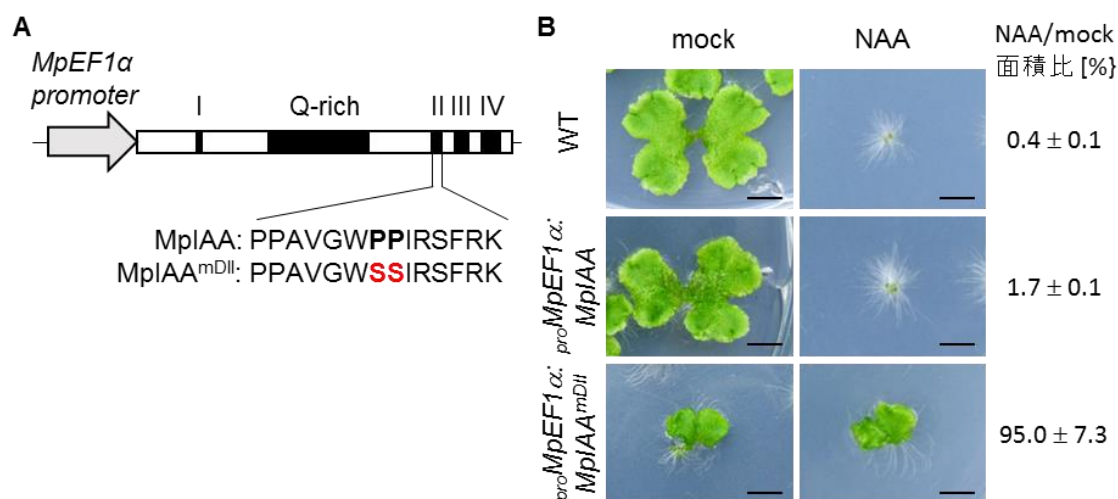


図9 オーキシン感受性におけるドメインII改変型MplAAが与える影響

(A) *proMpEF1α:MpIAA* と *proMpEF1α:MpIAA^{mDII}* の模式図。ドメインIIに保存されたプロリン残基をセリンに置換した。(B) 野生型、*proMpEF1α:MpIAA* 株、*proMpEF1α:MpIAA^{mDII}* 株の無性芽を mock 培地または 3 μM の NAA を含む培地で 2 週間生育した。Bars: 5 mm. 数字は mock 条件で生育した個体に対する NAA 含有条件で生育した個体の面積の割合 ± SD (n = 12)。

proMpEF1α:MpIAA 株、*proMpEF1α:MpIAA^{mDII}* 株における導入遺伝子の発現量を半定量的 RT-PCR によって調べたところ、*proMpEF1α:MpIAA^{mDII}* 株における導入遺伝子の発現量が *proMpEF1α:MpIAA* 株に比べて著しく低いことが明らかになった (図 10)。このことから *MpEF1α* プロモーターによる過剰な *MpIAA^{mDII}* タンパク質の蓄積はゼニゴケの生育にとって有害であることが予想された。そこで、グルココルチコイド受容体 (GR) を用いたタンパク質の核移行を dexamethasone (DEX) により誘導できるシステムを利用し (Lloyd et al., 1994; Schena et al., 1991)、ゼニゴケ生活環全体における *MpIAA* やオーキシンの生理機能を調べることにした。*MpIAA* プロモーターの制御下で、*MpIAA^{mDII}* タンパク質と GR の融合タンパク質を発現するコンストラクトを作成した (*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR*)。このコンストラクトが DEX 依存的に *MpIAA* を介したオーキシン応答を抑制できるか調べるため、*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* をダイズ由来のオーキシン応答レポーター *proGH3:GUS* を発現するゼニゴケに導入した (Ishizaki et al., 2012)。10 μM の NAA を含み、DEX を含まない液体培地で 12 時間処理したところ、*proGH3:GUS* 株と *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR/proGH3:GUS* 株のどちらにおいても GUS 活性が上昇した (図 11)。10 μM の NAA と DEX を同時に処理したところ、*proGH3:GUS* 株ではオーキシン依存的な GUS 活性の上昇に DEX は影響を与えなかったのに対し、*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR/proGH3:GUS* 株ではオーキシン依存的な GUS 活性の上昇が完全に抑制された (図 11)。これらの結果から、*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* は DEX 依存的にオーキシン応答を抑制できることが示された。さらに、*MpIAA^{mDII}* タンパク質の核における蓄積が、オーキシン依存的な転写応答を抑制することが示唆された。

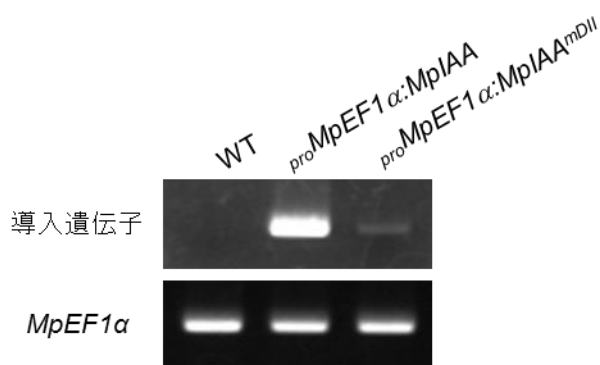


図10 半定量的RT-PCRによる導入遺伝子の発現量解析

proMpEF1α:MpIAA 株と *proMpEF1α:MpIAA^{mDII}* 株における導入遺伝子の発現量を半定量的 RT-PCR によって調べた。PCR には導入した *MpIAA* 特異的なプライマーを用いた。また、*MpEF1α* をコードする cDNA も PCR で増幅し、コントロールとして用いた。形質転換体の解析については遺伝的に異なる複数ラインについて行い同様の結果を得た。

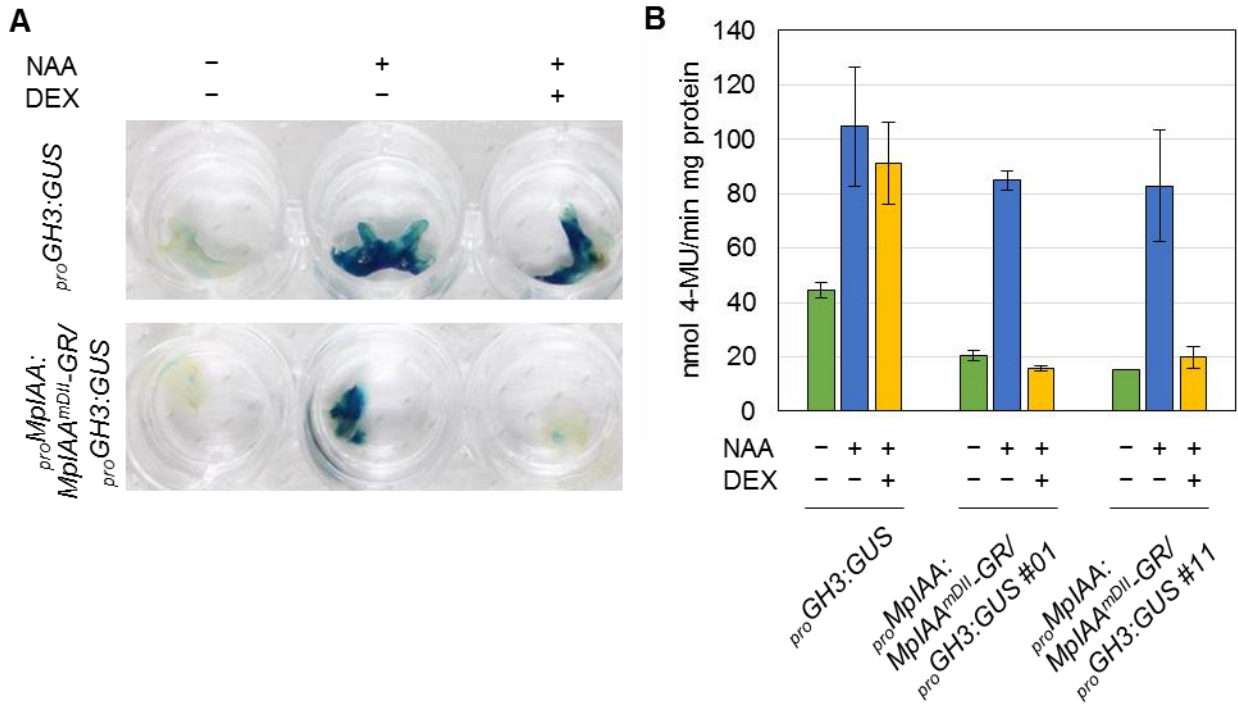


図11 *proMplAA:MplAA^{mDII-GR}*によるDEX依存的なオーキシン応答の抑制

(A, B) *proGH3:GUS*株と*proMplAA:MplAA^{mDII-GR}/proGH3:GUS*株のGUS染色(A)または蛍光定量的なGUS活性測定(B)。それぞれの植物体は10 μ MのNAAまたは10 μ MのDEXを含む液体培地で12時間処理された。Error bars: SE (n = 3)。

MplAA を介したオーキシン信号伝達による細胞伸長制御

次に、*MplAA* を介したオーキシン信号伝達の細胞の形態に与える影響について調べるため、野生型または *proMplAA:MplAA^{mDII-GR}* 株の葉状体における外生オーキシンへの応答を観察した。野生型では10 μ MのNAA処理により葉状体の上偏生長(図12A, B)、気室孔の突出(図12D, E)、杯状体の伸長(図12G, H)が観察された。杯状体の走査型電子顕微鏡(SEM)画像から表皮細胞の大きさと縦横比を測定したところ、NAA処理により細胞が特定の方向に偏って伸長していることが示され(図13)、前述の表現型の原因である可能性が考えられた。DEXを与えない条件においては *proMplAA:MplAA^{mDII-GR}* 株は野生型と同様にNAAに応答した表現型が見られたが(図12J, K, M, N, P, Q, 図13)、NAAとDEXを同時に処理したところ、NAAによって誘導される表現型が打ち消され、mock条件よりも背側表皮細胞が小さくなり、下偏生長を示した(図12L, O, R, 図13)。それに対し、野生型ではDEX処理はNAA応答に影響を与えなかった(図12C, F, I, 図13)。これらの結果から、葉状体の背側表皮における細胞伸長が *MplAA* を介したオーキシン信号伝達によって促進されることが示唆された。

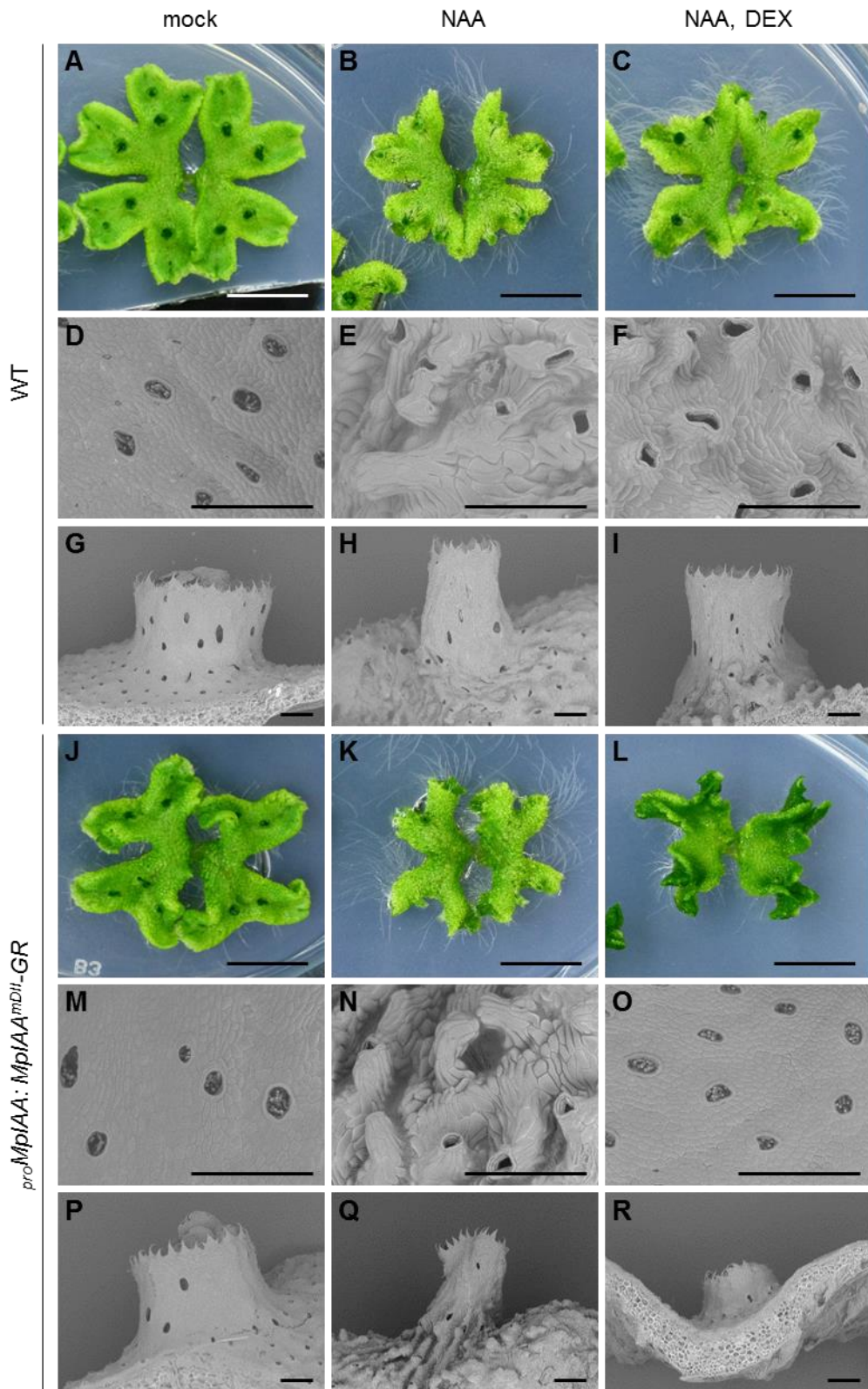


図12 葉状体に対する外部オーキシンの影響

WT (A-I) または *proMplAA:MplAA^{mbDII-GR}* 株 (J-R) の無性芽をNAA、DEXを含まない培地で12日間生育し、その後 mock条件 (A, D, G, J, M, P)、10 μ M NAA条件 (B, E, H, K, N, Q)、もしくは10 μ M NAA +10 μ M DEX条件 (C, F, I, L, O, R) に移して7日間生育し、写真 (A-C, J-L; bars: 10 mm) とSEM (D-I, M-R; bars: 500 μ m) による観察を行った。

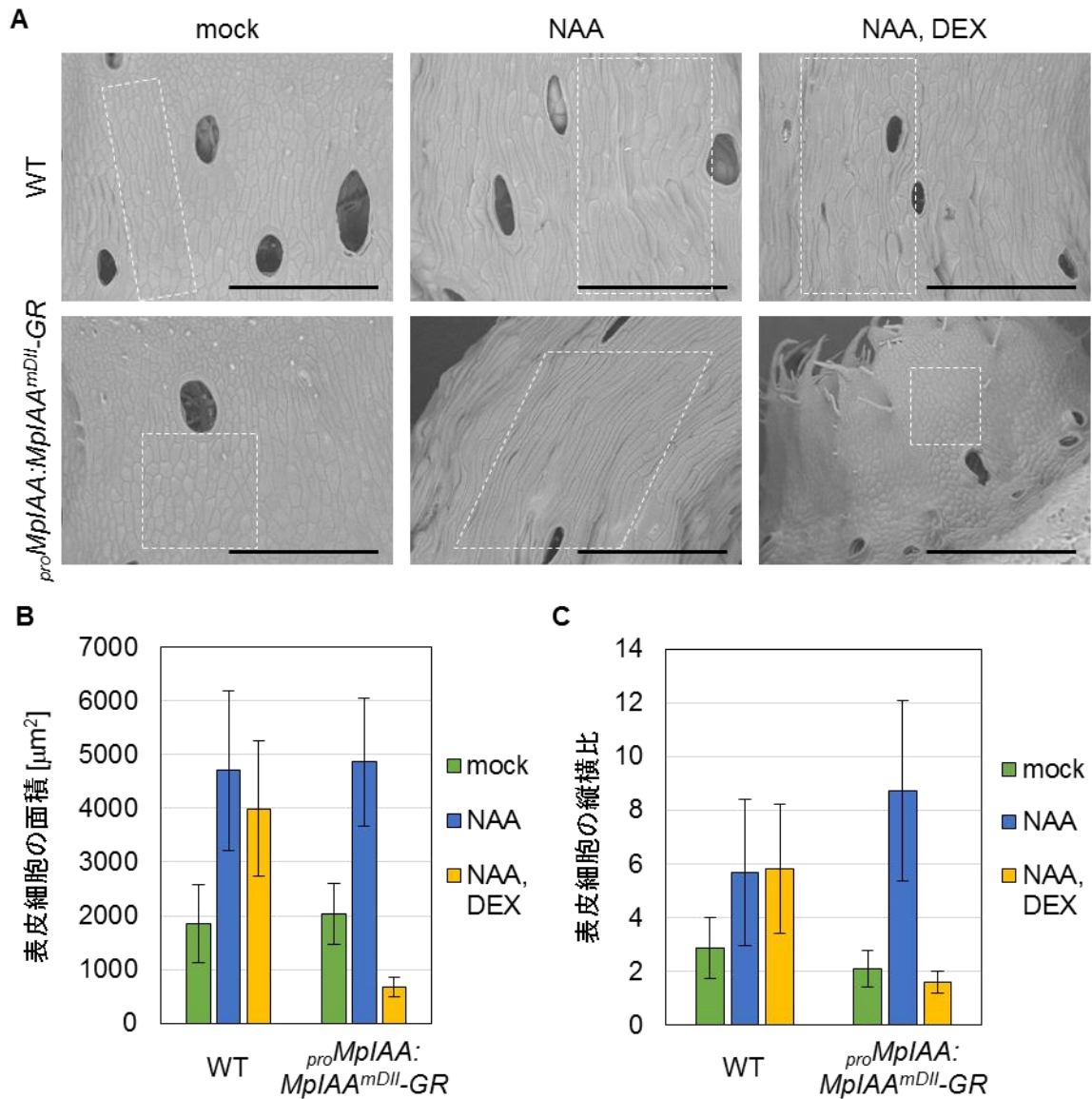


図13 外生オーキシンの細胞形態への影響

WTまたは *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株の無性芽をNAA、DEXを含まない培地で12日間生育し、その後mock条件、NAA条件、NAA+DEX条件で7日間培養した。NAA、DEXは終濃度10 μMになるよう加えた。(A) 杯状体のSEM画像。Bars: 0.5 mm。(B-C) 表皮細胞の面積(B)と縦横比(C)をSEM画像(A)からImageJを用いて測定した。白い破線で測定領域を示す。Error bars: SD (n = 50)。

MpIAA の発現組織解析

次に *MpIAA* の時空間的な発現パターンを調べるため、*MpIAA* プロモーター制御下で *GUS* レポーター遺伝子を発現する形質転換体を作成した (*proMpIAA:GUS*)。 *proMpIAA:GUS* 株を用いて栄養生長相における発現を調べたところ、杯状体を含む葉状体全体で強い *GUS* 活性が観察された (図 14A)。寒天包埋による葉状体切片の観察から、背

側の気室層、杯状体や無性芽、内部の柔組織、腹鱗片や仮根など葉状体のすべての層において強い GUS 活性があることが示された (図 14B, C)。次に生殖生長相における発現組織を調べた。雄器床は全体で強い GUS 染色を示し、造精器や周辺の細胞でも GUS 染色が見られた (図 14D, E)。雄器床と比べて雌器床では GUS 染色が比較的弱く、指状突起の先端で GUS 染色が見られた (図 14F)。寒天包埋切片を作成して観察したところ、卵細胞を含む造卵器において強い GUS 染色が見られた (図 14G)。さらに、雄の *proMplAA::GUS* 株と雌の野生型を掛け合わせ、胞子体における発現組織も調べた。その結果、強い GUS 染色が若い胞子体で見られ、胞子体の発生に伴い GUS 染色の勾配が先端基部軸に沿って形成された。先端にある胞原組織における GUS 染色は比較的弱く、胞子の発生が進むにつれて消失していった。一方、胞子体の足や柄を作る基部側の領域では発生後期においても GUS 染色が見られた (図 14H-K)。これらの染色パターンは *proMplAA::GUS* 株と野生型の性別を反転させて掛け合わせた胞子体においても同様であった。以上の結果から、*MplAA* が配偶体と胞子体の両世代においてある程度の組織特異性を持ちながらも広範囲で発現しており、*MplAA* を介したオーキシン応答が生活環全体で様々な組織において役割を持つことが示唆された。

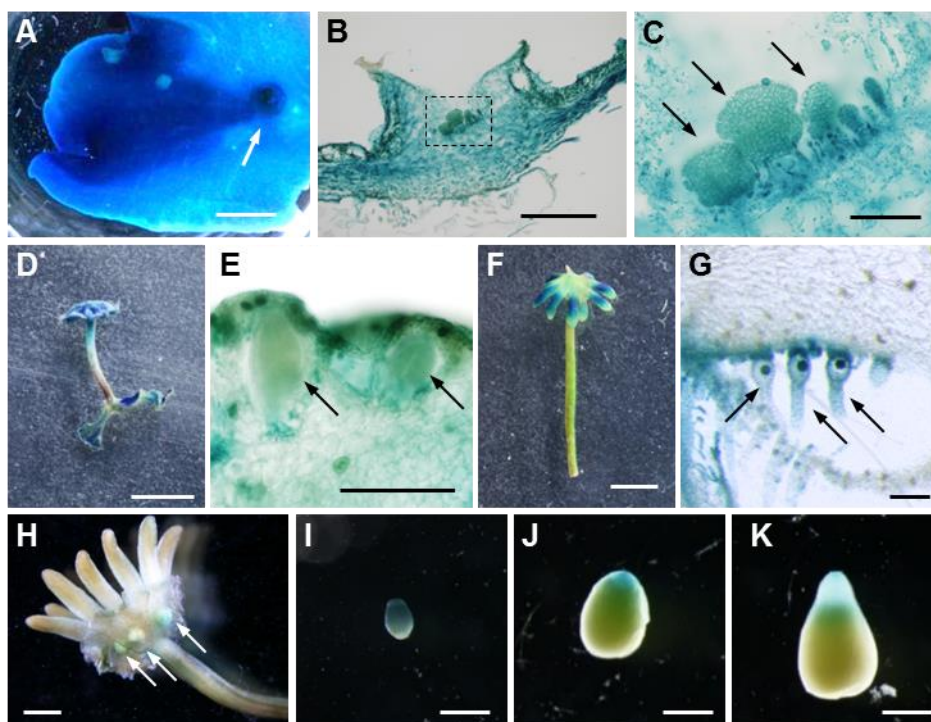


図14 *MplAA*の発現組織解析

*proMplAA::GUS*株のGUS染色。(A) 3週間生育した葉状体。矢印: 杯状体。(B) 杯状体の切片画像。(C) (B)において破線で囲まれた領域の拡大画像。矢印: 発生中の無性芽。(D, E) 雄器床の全体像(D)と切片画像(E)。矢印: 造精器。(F, G) 雌器床の全体像(F)と切片画像(G)。矢印: 造卵器。(H-K) 雌の野生株に雄の *proMplAA::GUS* を掛け合わせ、胞子体を観察した。(H) 発生中の胞子体(矢印)を含む受精後の雌器床の全体像。(I-K) 単離した発生中の胞子体。先端側が写真の下側を向いている。Bars: 2 mm (A, H), 0.5 mm (B, I-K), 0.1 mm (C, E, G), 5 mm (D, F)。

MpIAA を介したオーキシン信号伝達の形態形成における多面的な役割

先に示したように *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株では DEX 依存的にオーキシン応答を抑制することが可能である。そこで、*MpIAA* 依存的なオーキシン応答の役割を発生段階や組織ごとに調べるため、*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株の様々な生長段階において DEX 処理を行い、表現型を観察した。まず *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株を DEX 非含有培地で生育したところ、野生型と同様の扁平な葉状体を形成し、葉状体の背側には杯状体や規則的に並んだ気室孔が見られた (図 15A)。杯状体はその縁に鋸歯状の構造を作り、内部には多くの無性芽が形成された (図 15B, C)。また、葉状体の腹側には腹鱗片や仮根が観察された (図 15D)。

proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR 株の無性芽を 10 μ M の DEX 含有培地で 14 日間培養したところ、著しい生長阻害が見られた (図 15E)。8 個体の観察を行ったところ、以下に示すような形態異常の一部またはすべてが観察された。5 個体では背腹性のない細胞塊が形成された (図 15F)、4 個体では異所的な気室孔が、5 個体では杯状体を想起させる鋸歯状構造が見られた (図 15G)。また、6 個体では表面に無性芽のような多細胞の不定芽がクラスター状に形成された (図 15H)。さらに、DEX 含有培地で生育した *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株の先端には仮根や腹鱗片などの腹側器官は見られなかった。これらの結果は *MpIAA* を介したオーキシン信号伝達が、無性芽からの生長と発生に関与しており、特に腹側で重要な役割を果たすことを示唆している。

次に 7 日間 DEX 非存在下で生育した葉状体に対して DEX 処理を行った。DEX 処理前の段階では *proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株は正常な背腹性に従って器官を発生し、成熟した葉状体を形成した。その後 7 日間にわたって 10 μ M の DEX 存在下で生育したところ、葉状体は V 字型に湾曲し、下偏生長した (図 15I)。DEX 処理した葉状体の背側には杯状体が形成されていたものの、その形状は浅く、先端基部軸に沿って細長くなり、多数の鋸歯構造を持っていた (図 15J)。杯状体の底には無性芽原基が作られていたが、成熟した無性芽は見られなかった (図 15K)。また葉状体の腹側では仮根の数が減少し、この表現型は特に平滑仮根において顕著であった (図 15L)。これらの結果から、内生のオーキシンと *MpIAA* を介した転写制御が、葉状体の背側と腹側の協調した生長に重要であることが示唆された。また、*MpIAA* を介したオーキシン応答が、杯状体、無性芽、仮根といった器官の発生にも関与することが示唆された。

MpIAA を介したオーキシン信号伝達の生殖器官における役割を調べるため、*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株を生殖成長相へ誘導し、生殖器が視認できる大きさ (5 mm 以下) になった後に継続的に DEX 処理を行った。DEX 非存在下において生殖器は垂直に伸長するのに対して (図 15M, O)、DEX 処理した生殖器では柄が短くなり、伸長方向が攪乱する表現型が観察された (図 15N, P)。この結果から *MpIAA* を介した転写制御が生殖器の屈性応答に関与する可能性が考えられたため、生殖器を DEX 処理後に 90 度転換する実験を行った。その結果、DEX 処理なしでは 1 日後にほぼ垂直に生殖器の向きが転換するのに対し、DEX 処理条件では垂直方向への屈曲角度が減少した (図 16)。これらの結果から、

MpIAA を介したオーキシン応答が、生殖器の伸長と屈性応答にも関与することが示唆された。生殖器の偏差生長についてはこれまでに外生オーキシンに対する応答としても報告されている(Rousseau, 1953)。

最後に、孢子体発生における *MpIAA* を介したオーキシン信号伝達の役割について調べるため、雌の *proMpIAA1α:MpIAA^{mDII}-GR* 株と雄の野生型とを掛け合わせた。DEX 非存在下では孢子体は雌器床の上で正常に発達し、受精後約 4 週間で黄色の孢子嚢を形成した (図 13Q, S)。受精操作の翌日から継続的に DEX 処理を行ったところ孢子体発生が途中で停止し、4 週間後でも孢子嚢が観察されなかった (図 15R, T)。これらの結果から、*MpIAA* を介したオーキシン信号伝達が孢子体発生にも重要な役割を果たすことが示唆された。

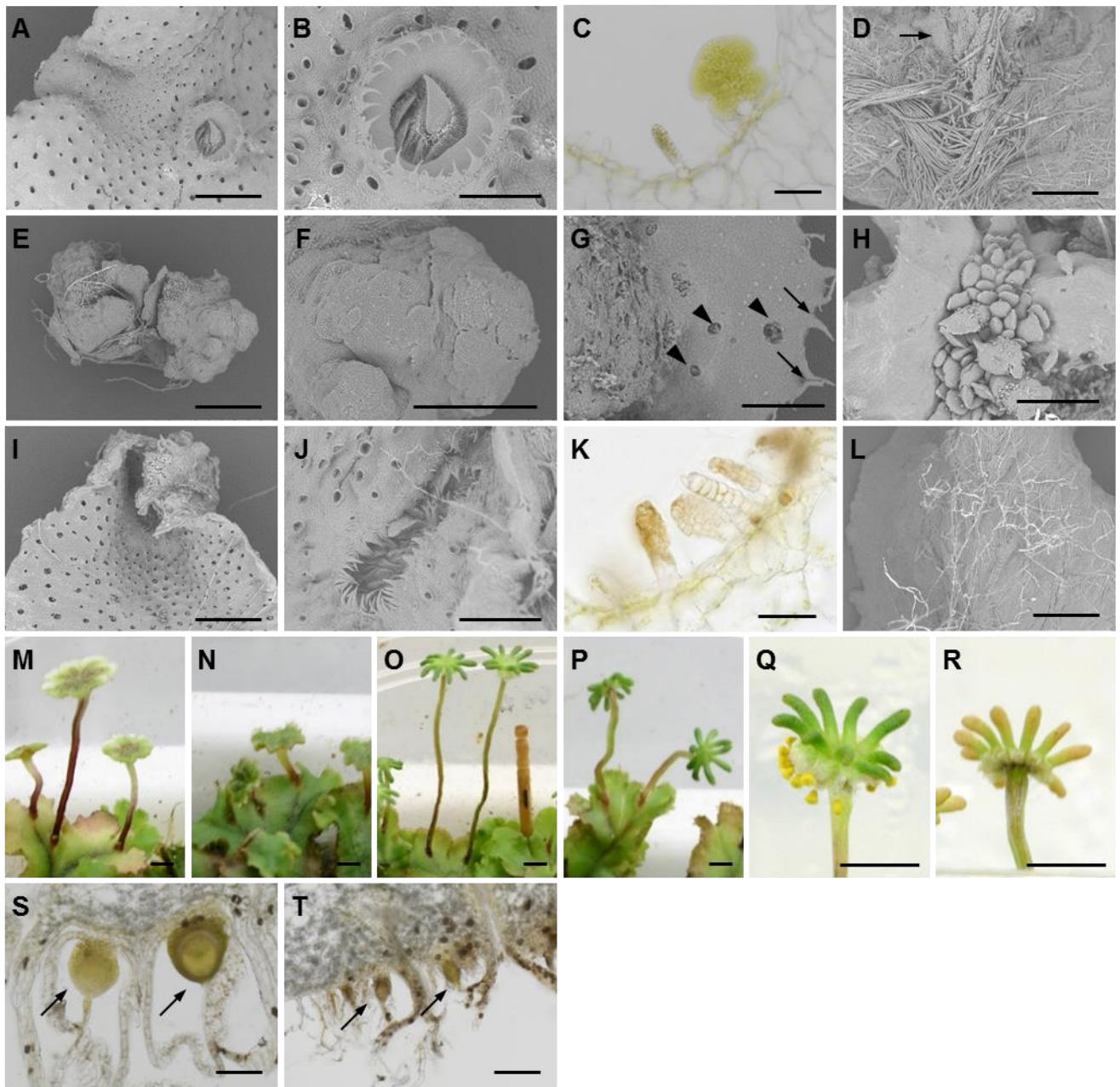


図15 *proMplAA:MplAA^{MDII-GR}* 株における形態異常

(A-D) DEX非含有培地で14日間生育した*proMplAA:MplAA^{MDII-GR}*株。(A) 葉状体背側のSEM画像。気室孔が黒点として観察される。(B, C) 杯状体のSEM画像(B)と切片画像(C)。(D) 葉状体腹側のSEM画像。矢印: 腹鱗片。(E-H) 10 μ M DEX 含有培地で14日間生育した*MplAA^{MDII-GR}* 株のSEM画像。矢印: 杯状体様の鋸歯構造。矢尻: 気室孔。(I-L) 7日間DEX無しで生育し、その後10 μ M DEX存在下で7日間培養した*MplAA^{MDII-GR}* 株。(I, J) 葉状体背側(I)と杯状体(J)のSEM画像。(K) 杯状体の切片画像。(L) 葉状体腹側のSEM画像。(M-P) 雄器床(M, N)と雌器床(O, P)を含む葉状体を2週間mock条件(M, O)またはDEX条件(N, P)で生育した。(Q-T) 受精後4週間(Q, R)または2週間(S, T)のmock条件(Q, S)またはDEX条件(R, T)の雌性生殖器。DEX処理は受精操作の翌日から継続的に行った。矢印: 発生中の孢子体。Scale bars: 1 mm (A, D, E, I, L), 0.5 mm (B, F-H, J), 0.1 mm (C, K), 5 mm (M-R), 0.2 mm (S, T)。

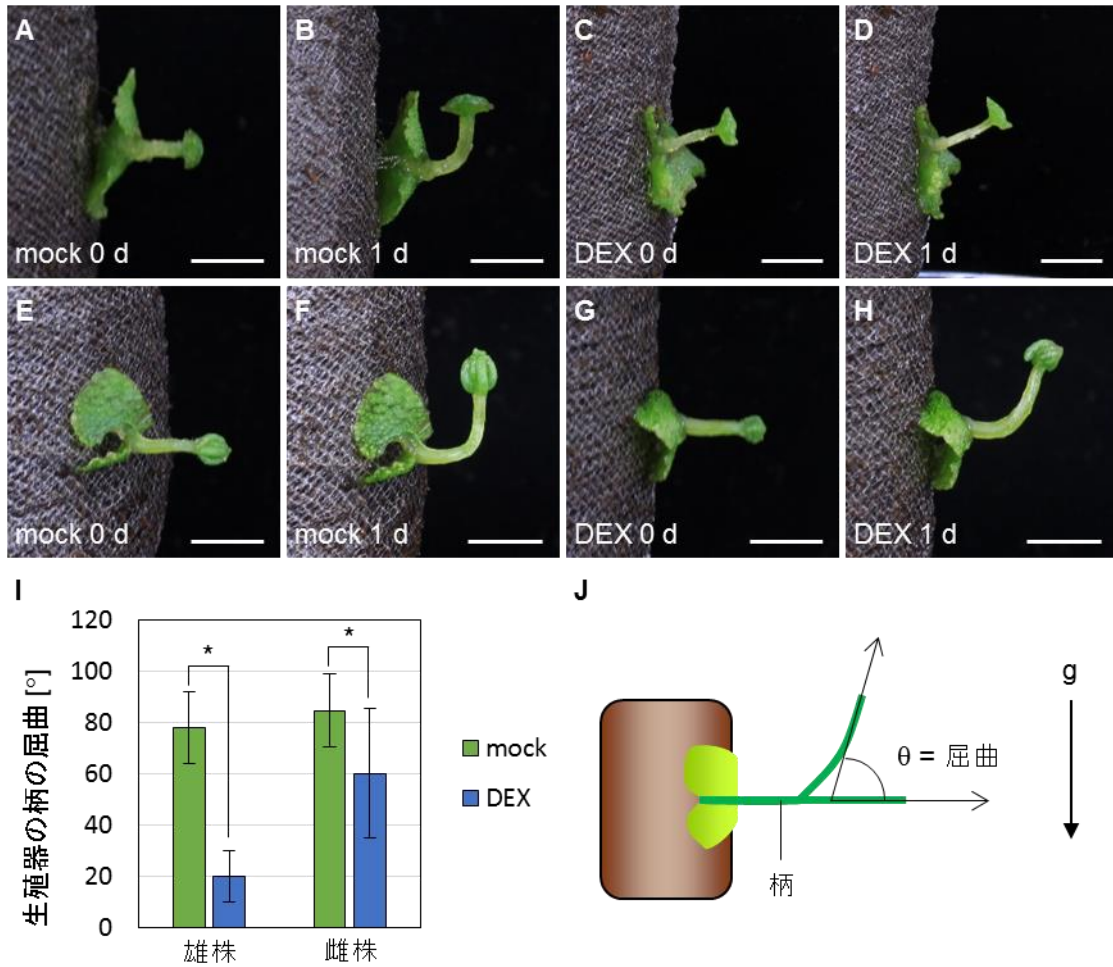


図16 *proMpIAA;MpIAA^{mDII}-GR* 株における生殖器の屈性応答

(A-H) *proMpIAA;MpIAA^{mDII}-GR*株の雄(A-D)と雌(E-H)の生殖器を含む葉状体を横向きにしたジフィーポットの側面に移植して3日間培養した後、10 μMのDEXを含まない(A, B, E, F)または含む(C, D, G, H)水溶液を噴霧し、3時間誘導した後ポットを垂直に回転した。回転後0日(A, C, E, G)と、1日(B, D, F, H)に写真を撮影した。Bars: 5 mm。(I, J) 0日目と1日目の生殖器の柄の角度の差を(J)に示すように測定し、屈曲とした。Error bars: SD (n ≥ 8)。*: P < 0.01。g: 重力の向き。

MpIAA、MpARFs 間のタンパク質相互作用

proMpIAA;MpIAA^{mDII}-GR 株の観察から、*MpIAA* を介したオーキシン信号伝達がゼニゴケの生活環全体で発生と生長を制御することが示された。ゼニゴケはこのように多様なオーキシン応答を、どのようにして少ない因子で構成された転写制御機構によって調節しているのだろうか。ゼニゴケには TIR1/AFB と AUX/IAA が1種ずつしかないため、3種ある ARF のタンパク質相互作用や転写制御能の違いによって多様性を生み出しているのではないかと考えた。シロイヌナズナでは AUX/IAA と ARF のタンパク質相互作用が Y2H 法や BiFC 法によって明らかにされている(Piya et al., 2014; Tatematsu et al., 2004; Vernoux et al., 2011)。MpIAA と 3種の MpARFs がホモまたはヘテロに相互作用することができる

かを調べるため、まず MpIAA と MpARFs の C 末端領域の相互作用を Y2H 法により解析した。その結果、MpIAA はすべての MpARFs と相互作用し、MpARFs 同士の相互作用は MpARF3 同士以外のすべての組み合わせで観察された (図 17)。これらの相互作用の親和性の違いについて調べるため、 β -ガラクトシダーゼレポーターの活性測定を行った。その結果、MpIAA は MpARF1 > MpARF2 > MpARF3 の順に高い β -ガラクトシダーゼ活性を示した。MpARFs 同士の相互作用において、MpARF1 は MpARF2、MpARF3 よりも MpARF1 自身との組み合わせで高い活性を示し、MpARF2 は MpARF3 との組み合わせで高い活性を示した (表 1)。これらの結果から、3 種の MpARFs 間の相互作用にもそれぞれ親和性に違いがあることが示唆された。

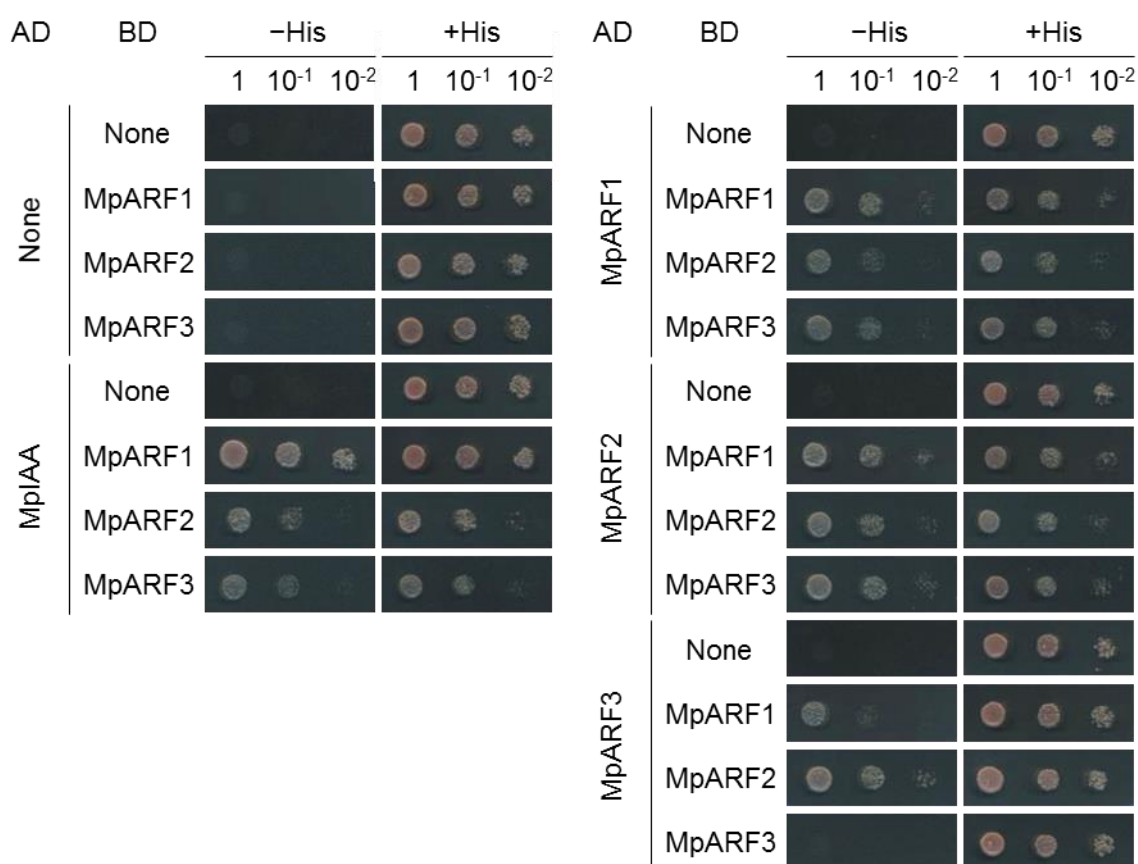


図17 酵母内におけるMpIAA、MpARFs間のタンパク質相互作用

*HIS3*をレポーター遺伝子とした。10倍ごとの希釈系列培養液を+His非選択培地(-Trp/-Leu)または-His選択培地(-His/-Trp/-Leu)にスポットし、22℃で2日間培養した。AD: VP16アクチベーションドメインと融合したタンパク質。BD: *lexA* DNA結合領域と融合したタンパク質。

表1 β -ガラクトシダーゼ活性測定による酵母内でのMplAA、MpARFs間の相互作用の検証

AD	BD	-His*	β -galactosidase activity (Miller unit)**
None	None	-	Not detected
	MpARF1	-	0.07 \pm 0.00
	MpARF2	-	0.05 \pm 0.00
	MpARF3	-	0.08 \pm 0.00
MplAA	None	-	0.06 \pm 0.01
	MpARF1	+	483 \pm 4.43
	MpARF2	+	1381 \pm 13.91
	MpARF3	+	11.5 \pm 0.10
MpARF1	None	-	0.06 \pm 0.02
	MpARF1	+	158 \pm 1.98
	MpARF2	+	0.12 \pm 0.02
	MpARF3	+	0.15 \pm 0.02
MpARF2	None	-	0.07 \pm 0.00
	MpARF1	+	1.28 \pm 0.11
	MpARF2	+	0.80 \pm 0.01
	MpARF3	+	1608 \pm 12.71
MpARF3	None	-	0.05 \pm 0.00
	MpARF1	+	0.14 \pm 0.00
	MpARF2	+	0.60 \pm 0.00
	MpARF3	-	0.07 \pm 0.00

* -His選択培地上での生育。+ : 生育した、- : 生育しなかった (図15)

** β -ガラクトシダーゼ活性の平均 \pm SE (n = 3).

MpIAA と MpARFs が植物体内でも相互作用するかを調べるため、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉を用いた BiFC 法による検証を行った。MpIAA もしくは MpARFs の C 末端領域を、YFP の N 末端側 (nYFP) または C 末端側 (cYFP) に融合したコンストラクトを用いて実験を行い、nYFP または cYFP 断片のみを発現するベクターをネガティブコントロールとして用いた。その結果、MpIAA は MpIAA 自身と、すべての MpARFs と相互作用した。MpARFs 同士の相互作用は MpARF3 同士以外のすべての組み合わせにおいて観察された (図 18)。これらの結果から MpIAA と MpARFs の相互作用、MpARFs 同士の相互作用は植物体内でも起きることが確認された。

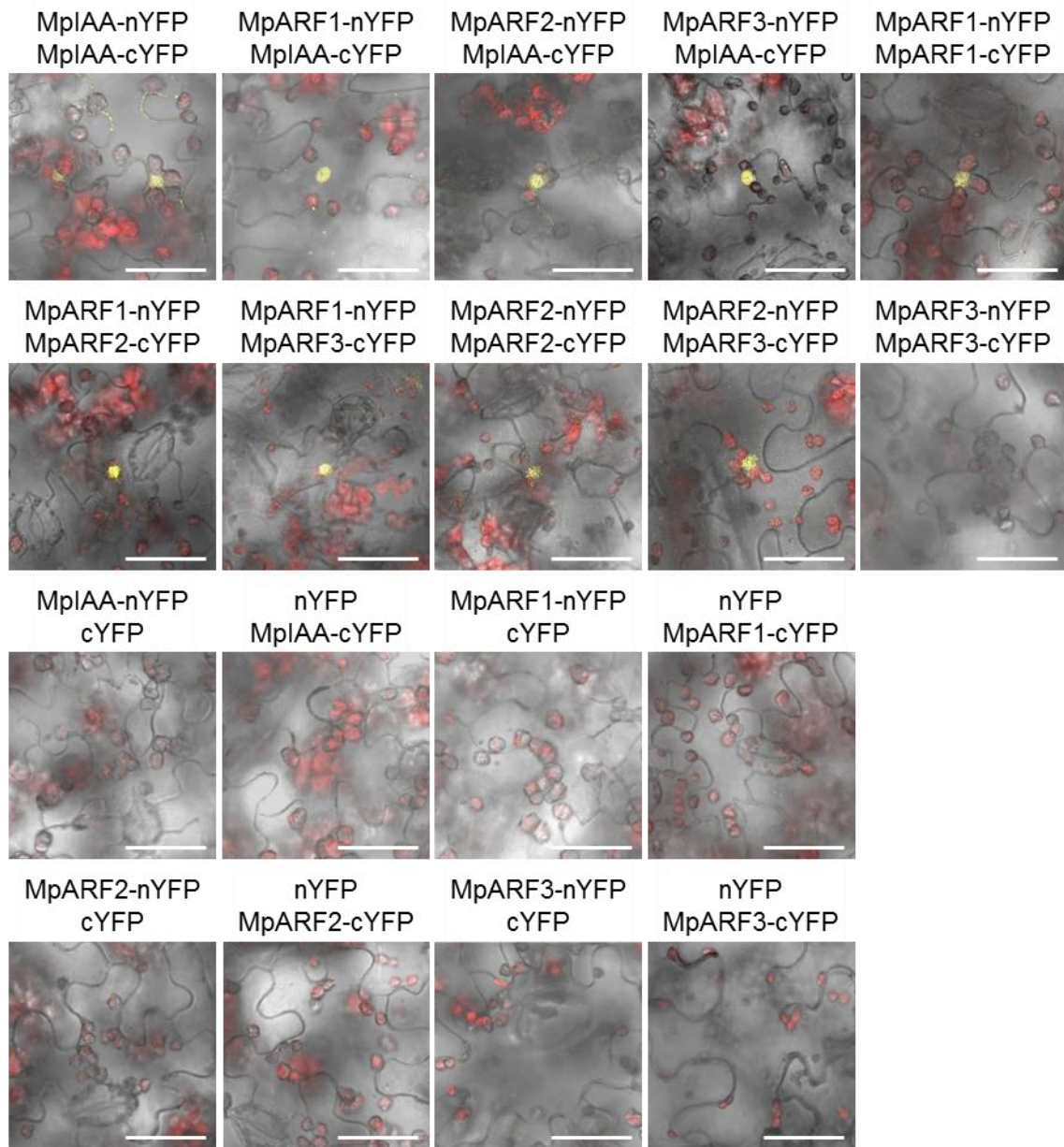


図18 植物体内におけるMpIAA、MpARFs間の相互作用

*N. benthamiana*の葉を用いたBiFC法によるMpIAA、MpARFs間相互作用の検証。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、YFP蛍光(黄色)、葉緑体自家蛍光(赤)画像を取得し、明視野画像と重ね合わせた。nYFPまたはcYFPのみを発現するベクターをネガティブコントロールとして用いた。Bars: 50 μ m。

MpARFs の転写制御能

次にそれぞれの MpARFs の転写制御能に違いがあるかを調べるため、BY-2 タバコ培養細胞を用いた一過的トランスアクチベーション実験を行った。エフェクターとして MpARFs の全長もしくは MR を出芽酵母の Gal4 DNA 結合領域に融合したタンパク質を発現させた。レポーターベクターは 6 回反復された Gal4 結合配列下流でホタルルシフェラーゼ (F-Luc) を発現する。また形質転換効率のコントロールとして、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター制御下でウミシイタケルシフェラーゼ (R-Luc) を発現するベクターを作成した (図 19A)。これらのコンストラクトはパーティクルボンバードメントにより BY-2 細胞に同時に形質転換され、2 日間の培養後にタンパク質を抽出しルシフェラーゼ活性を測定した。転写活性化能は R-Luc に対する F-Luc の相対的な活性によって評価した。MpARF1 は中間領域、全長のどちらを導入した場合においても Gal4 DNA 結合領域のみを発現させたコントロールに比べて約 2 倍の活性を示し、MpARF2 を導入した場合はコントロールより低い活性を示した (図 19B)。これらの結果から MpARF1 は転写活性化因子、MpARF2 は転写抑制因子としてそれぞれ機能することが示唆された。MpARF3 については中間領域を導入するとコントロールよりわずかに低い活性を示し、全長を導入するとコントロールよりわずかに高い活性を示したため、本実験からは MpARF3 が転写活性化因子か抑制因子かを結論することはできなかった (図 19B)。以上の結果から、ゼニゴケにおける 3 種の ARF タンパク質は転写制御能においてもそれぞれ異なる性質を持つことが示唆された。

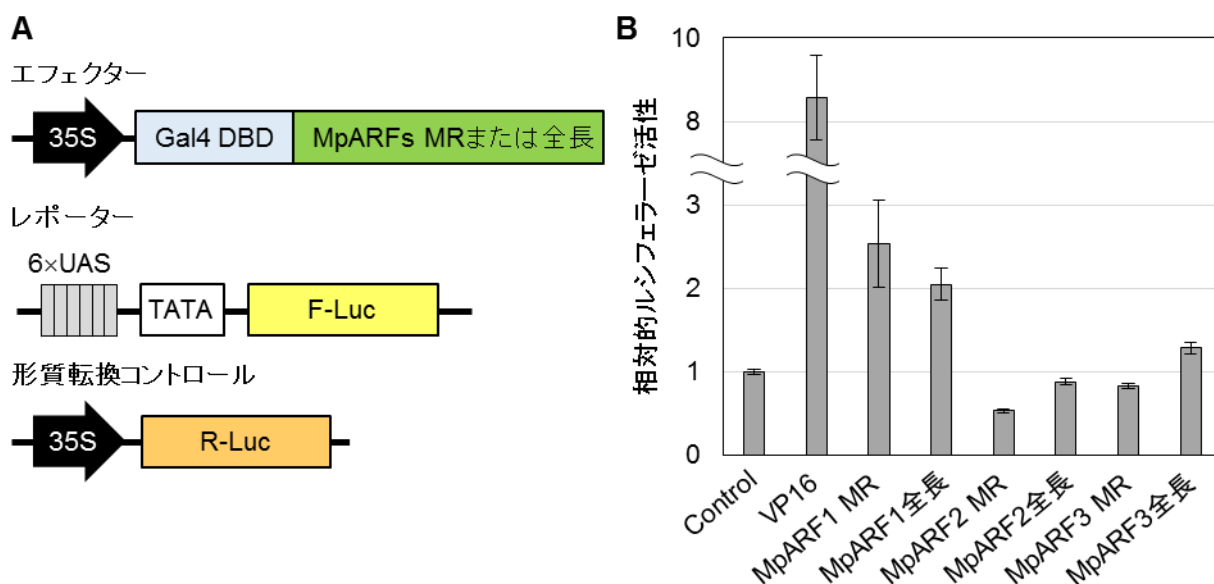


図19 トランスアクチベーション実験によるMpARFs転写制御能の測定

(A) トランスアクチベーション実験に用いたコンストラクトの模式図。(B) エフェクターにより誘導された相対的ルシフェラーゼ活性。GAL4 DBDのみを発現するベクターを基準とした。ウイルス由来のVP16転写活性化ドメインをポジティブコントロールとして用いた。すべてのサンプルがControlに対して $P < 0.05$ で有意差を示した。Error bars: SE (n = 3)。神埜勝氏提供。

考察

オーキシンを介した転写制御の起源と進化

本研究の結果から、苔類ゼニゴケが 1 種の TIR1/AFB、1 種の AUX/IAA、また系統的・機能的に分化した 3 種の ARF を持つことが明らかにされた (図 6, 図 19)。シロイヌナズナでは AUX/IAA はドメイン I を介して転写共抑制因子 TPL と相互作用することでオーキシン応答遺伝子の発現を抑制する (Szemenyei et al., 2008)。本研究で MpIAA もドメイン I 内に TPL との相互作用に重要な LxLxL モチーフを保存していることが示された (図 7)。またゼニゴケのゲノムには TPL のホモログが 1 種コードされており (*MpTPL*)、オーキシンを介した転写制御への関与が示唆されている (Flores-Sandoval et al., 2015)。本研究でドメイン II を改変した MpIAA をゼニゴケで発現させるとオーキシン耐性となり、*proGH3:GUS* でモニターされるオーキシン依存的な転写応答が抑制されることが示された (図 9, 図 11)。このことと一致して、*MpIAA* のノックダウン変異体がオーキシン過敏になることが明らかにされている (Flores-Sandoval et al., 2015)。これらの結果から、*MpIAA* のおそらく *MpTIR1* を介したオーキシン依存的な分解が転写制御に重要であることが示唆された。Y2H 法と BiFC 法による解析から、*MpIAA* とすべての *MpARFs* はドメイン III/IV を介して相互作用することが示された (図 17, 図 18, 表 1)。以上の結果から、ゼニゴケは被子植物で示されたオーキシンを介した転写制御機構を、最小かつ完全な形で保持していることが示唆された。過去のゲノム解析から、蘚類ヒメツリガネゴケと小葉類イヌカタヒバもオーキシンを介した転写制御の基本的な構成因子を持っているのに対し、陸上植物の姉妹群である車軸藻類に属するクレブソルミディウムは持たないことが示されている (Banks et al., 2011; Hori et al., 2014; Rensing et al., 2008)。最近、他の車軸藻類、メソスティグマ (*Mesostigma viride*)、フラスコモ (*Nitella mirabilis*)、コレオケーテ (*Coleochaete orbicularis*)、アオミドロ (*Spirogyra pratensis*) のトランスクリプトームデータが公開され、フラスコモ、コレオケーテ、アオミドロからは ARF の DBD やドメイン III/IV と高い相同性を示す配列が見つかったが、AUX/IAA と TIR1/AFB の明確なオースログは見つからない (De Smet et al., 2011; Ju et al., 2015; Timme and Delwiche, 2010)。水生だった陸上植物の共通祖先がオーキシンを介した転写制御系を獲得していたかについては未だ議論の余地があるが、本研究の結果は 3 種の ARF を介したオーキシン応答が少なくとも現存する陸上植物の共通祖先にまで遡れることを示唆している。

維管束植物の AUX/IAA と比較して、*MpIAA* の予測アミノ酸配列は 825 アミノ酸と非常に長く、ドメイン I と II の間にグルタミンに富んだ長い領域を持っていた (図 6A, 図 7)。この領域は既知のモチーフと相同性を示さなかったが、少なくとも苔類ゼニゴケ目には保存されていることが明らかになった (図 7)。ヒメツリガネゴケの AUX/IAA も維管束植物に比べて長いことが報告されている (Paponov et al., 2009)。これらの結果から AUX/IAA のアミノ酸配列は進化に伴い短くなっていった可能性が考えられる。また、グルタミンに富ん

だ領域は真核生物において転写活性化能を持つことが知られている(Escher et al., 2000)。転写活性化型の ARF もまたグルタミンに富んだ領域を持っており(Ulmasov et al., 1999a)、MpARF1 も同様である(図 6A, 図 8)。ARF と AUX/IAA は C 末端領域のタンパク質相互作用ドメインにおいて高い相同性を示すことから、これらの遺伝子は共通の祖先遺伝子から進化したと考えられる。そのため、ゼニゴケ目の AUX/IAA が持つグルタミンに富んだ領域は祖先遺伝子の名残である可能性や、未知の機能を備えている可能性が考えられる。

proGH3:GUS でモニターされるオーキシン応答組織と MpIAA の関係

これまでの研究から *proGH3:GUS* の活性がゼニゴケにおいて内生のオーキシン応答を反映することが示唆されている(Ishizaki et al., 2012)。ダイズ由来のプロモーターがゼニゴケでも機能することから、両者には共通のオーキシン応答メカニズムが保存されていると考えられる。本研究からオーキシン依存的な *proGH3:GUS* の発現が MpIAA によって制御されることが示された(図 11)。また、MpIAA の発現は *proGH3:GUS* が強く発現する杯状体の底部、雌器床の柄や指状突起、造精器、孢子体を含む広い組織で見られた(図 14)。これらの組織における MpIAA の重要性は、DEX 処理された *proMpIAA:MpIAA^{mDII-GR}* 株において杯状体の形態異常、生殖器の柄の伸長・屈性の異常、無性芽や孢子体の発生が抑制されたことから支持される(図 15, 図 16)。これらの結果は *proGH3:GUS* でモニターできるオーキシン応答が MpIAA の機能によって説明できることを示唆している。

興味深いことに、*proMpIAA:MpIAA^{mDII-GR}* 株を DEX 処理した際に見られた形態異常は *proGH3:GUS* の発現が見られない無性芽芽生えや葉状体、仮根においても見られた(図 15)。このことからダイズ由来の *GH3* プロモーターが MpIAA を介した転写応答のすべてを反映していないことが示唆された。この原因として *proGH3:GUS* のオーキシン応答の閾値が高い、または *proGH3:GUS* では活性化型 ARF (MpARF1) の機能しかモニターできず、活性化型でない ARF の機能は見えない可能性が考えられる。後者の場合、ゼニゴケの発生において活性化型でない ARF の機能が重要であることが考えられる。

オーキシンを介した転写制御による細胞分化の制御

オーキシンは植物の発生と生長の様々な面を制御しており、オーキシンの主要な生理機能の一つは細胞の分化状態の制御である。被子植物においてオーキシンは胚発生、根、葉において維管束の分化に主要な役割を果たしている(Furuta et al., 2014; Ohashi-Ito and Fukuda, 2010; Scarpella et al., 2010; Schuetz et al., 2013; Yoshida et al., 2013)。またシロイヌナズナの ARF10 は培養細胞において細胞の全能性を制御していることが報告されている(Qiao et al., 2012)。ヒメツリガネゴケでは AUX/IAA のドメイン II に変異が入った機能獲得変異体においてクロロネマからカウロネマへの分化が遅延することが報告されている(Prigge et al., 2010)。本研究において、MpIAA を介したオーキシン応答を抑制した無性芽は未分化な細胞塊を形成したことから(図 15E, F)、オーキシンを介した転写制御がゼ

ゼニゴケにおいて細胞分化の制御に関わることが示唆された。このことと一致して、ゼニゴケにおいてバクテリア由来のオーキシン不活性化酵素 *iaaL* を発現する形質転換体も未分化な細胞塊を形成することが明らかにされている (Flores-Sandoval et al., 2015)。これらの結果から、細胞分化の制御が陸上植物におけるオーキシンを介した転写制御の共通の役割であることが示唆された。

オーキシンを介した転写制御による細胞伸長の制御

オーキシンは陸上植物における細胞伸長を制御する主要な因子でもあり、生長と屈性応答を制御している (Perrot-Rechenmann, 2010)。シロイヌナズナでは *AUX/IAA*、*ARF*、*TIR1/AFB* 遺伝子における様々な変異体が、細胞伸長や屈性応答に異常を示すことが示されており、特に *IAA17/AUXIN RESISTANT3* の機能獲得型変異体では葉の向軸側表皮の細胞が小さくなり、下偏生長することが示されている (Harper et al., 2000; Leyser et al., 1996; Liscum and Reed, 2002; Möller et al., 2010; Perez-Perez et al., 2010; Tatematsu et al., 2004)。本研究で、外生オーキシンによってゼニゴケ葉状体の表皮細胞が方向性をもって伸長し、上偏生長することが示された (図 12)。これらの現象は MpIAA 依存的なオーキシン応答を抑制することで打ち消された (図 12, 図 13)。また MpIAA 依存的なオーキシン応答の抑制は、生殖器の柄の伸長と屈性応答を阻害することも示された (図 15M-P, 図 16)。これらの結果から、*AUX/IAA* 依存的なオーキシン応答がゼニゴケにおいても細胞伸長と屈性応答の制御に重要であり、オーキシンを介した転写制御による細胞伸長と屈性の制御機構が進化的に保存されている可能性が示唆された。

シロイヌナズナにおいて、オーキシンに誘導される胚軸伸長の初期応答は *TIR1/AFB* 依存的な転写を介さないことが報告されている (Schenck et al., 2010; Takahashi et al., 2012)。これまでの研究から、*ABP1* は転写非依存的かつ迅速に細胞伸長を引き起こすオーキシン受容体であることが示唆されている (Chen et al., 2001a; Chen et al., 2001b; Perrot-Rechenmann, 2010; Rück et al., 1993; Steffens et al., 2001)。オーキシン応答への関与など機能は明らかではないが、*ABP1* は車軸藻類から被子植物まで広く保存されている (Hori et al., 2014; Ju et al., 2015; Timme and Delwiche, 2010; Tromas et al., 2010)。驚いたことに、本研究におけるゼニゴケのゲノム・トランスクリプトームのデータを用いた探索からは *ABP1* のホモログは見つからず、このことからゼニゴケが進化の過程で *ABP1* を喪失したと考えられる。シロイヌナズナでは *ABP1* の欠損変異体は胚性致死であると考えられていたが (Chen et al., 2001b)、最近になって新たな *ABP1* の欠損変異体が複数取得され、それらの変異体が過去に報告されていたようなオーキシン応答や発生の異常を示さず、*ABP1* がオーキシン応答にも発生にも関与しないという報告がされ議論を呼んでいる (Gao et al., 2015)。ゼニゴケが *ABP1* を持たないという本研究の結果は、*ABP1* のオーキシン応答への関与を否定するこの報告を支持しているのかもしれない。今後、オーキシンを介した細胞伸長への *ABP1* の関与の再検証や *ABP1* 遺伝子の祖先的な役割の解析が期待される。

オーキシンを介した転写制御による発生軸の決定

発生軸の形成は多細胞生物の発生にとって非常に重要であり、植物におけるオーキシンの重要な役割の一つである。本研究において、MpIAA の発現パターンが孢子体において先端基部軸に沿って勾配を形成することが示された (図 14I-K)。このパターンはオーキシン応答をモニターする *proGH3:GUS* の発現パターンとよく一致していた (Ishizaki et al., 2012)。これらの結果は MpIAA を介したオーキシン信号伝達がゼニゴケ胚発生における先端基部軸の形成に関与している可能性を示唆している。実際、*proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR* 株において DEX 処理により受精後のオーキシン応答を抑制すると、孢子体の発生が阻害され、成熟した孢子体が得られなかった (図 15Q-T)。ヒメツリガネゴケでは *proGH3:GUS* レポーターの発現パターンが孢子体の発生中において先端基部軸に沿って大きく変化すること、オーキシン極性輸送阻害剤によって孢子体の発生異常が生じることが報告されている (Fujita et al., 2008)。シロイヌナズナにおいては、*IAA12/BODENLOS* と *ARF5/MONOPTEROS* が胚発生における先端基部軸の形成に関与することが示されている (Hamann et al., 2002; Hamann et al., 1999)。これらのことから、陸上植物は受精後の発生における先端基部軸の形成においてオーキシン依存的な転写制御を介した共通の機構を持っていることが考えられる。

これまでの研究から、ゼニゴケへの過剰な外生オーキシン投与が背腹両面で仮根の発生を促進することが示されており、そのためオーキシンが葉状体の背腹性決定に関与することが提唱されている (Ishizaki et al., 2012; Kaul et al., 1962; Maravolo, 1980; Otto and Halbsguth, 1975)。本研究では MpIAA を介したオーキシン応答を抑制することで、無性芽からの分化、仮根・腹鱗片の発生が阻害されることが示された (図 15)。これらの結果は少なくとも MpIAA を介したオーキシン信号伝達が腹側組織の発生を促進していることを示唆している。オーキシンが腹側組織の発生を直接制御しているのか、あるいは背腹軸の決定を介しているのかは興味深い点である。シロイヌナズナにおいては孢子体世代において ARF3/ETTIN と ARF4 が葉の向背軸の決定に重要な働きをしていることが知られている (Iwasaki et al., 2013)、配偶体における発生軸決定へのオーキシンの関与は未だ議論の余地がある (Lituiev et al., 2013; Pagnussat et al., 2009)。植物の配偶体世代においてオーキシンが発生軸の決定に関与しているかを明らかにするためには今後さらなる研究が必要である。

最小の信号伝達機構による多様なオーキシン応答の制御

シロイヌナズナでは 29 の AUX/IAA と 23 の ARF による複雑な転写制御により多様なオーキシン応答が行われていると考えられている (Piya et al., 2014; Vernoux et al., 2011)。また、様々な TIR1/AFB と AUX/IAA の組み合わせが複雑なオーキシン応答に寄与していることも示唆されている (Calderón Villalobos et al., 2012; Shimizu-Mitao and Kakimoto,

2014)。本研究によって、苔類ゼニゴケが最小限のオーキシン転写制御システムによって多様な発生プロセスを制御していることが明らかになった。ゼニゴケは AUX/IAA と TIR1/AFB のオーソログを 1 種ずつしか持たないことから (図 6)、ゼニゴケの多様なオーキシン応答は 3 種の MpARFs の機能の違いに起因する可能性が考えられた。本研究において 3 種の MpARFs は系統的に分化しており、異なる転写制御能を持つことが示された (図 6C, 図 19)。Y2H 法における β -ガラクトシダーゼアッセイではそれぞれの MpARF が異なる親和性で MpIAA と相互作用することが示されたことから (表 1)、MpARFs はそれぞれ異なるオーキシン応答性を持つことが示唆された。このことは MpIAA または MpARFs のドメイン III/IV と MpTPL のキメラタンパク質発現株の表現型に多様性があったという知見からも支持される (Flores-Sandoval et al., 2015)。また、本研究で Y2H 法と BiFC 法による解析から MpARFs 同士もドメイン III/IV を介して様々な組み合わせで相互作用しうることが示された (図 17, 図 18)。最近の結晶構造解析から、シロイヌナズナの AUX/IAA と ARF がドメイン III/IV を介して多量体を形成することや、ARF の DNA 結合領域が二量体を形成して回文的に配置された AuxRE に結合する際の“分子ノグス”として機能することが報告された (Boer et al., 2014; Korasick et al., 2014; Nanao et al., 2014)。ドメイン III/IV を介した ARF 同士の相互作用の生理的意義や、MpARF の DBD が二量体を形成するかについては今後の解析が必要であるが、ゼニゴケの多様なオーキシン応答は機能の異なる 3 種の ARF の発現パターンや様々な複合体形成によって制御されている可能性が考えられる。また、ゼニゴケにはドメイン III/IV をもつがそれ以外の ARF、AUX/IAA に見られるドメインをもたない遺伝子を 2 種コードしていることが報告されている (MpAXILTIA5; Flores-Sandoval et al., 2015)。これらのタンパク質はドメイン III/IV を介した相互作用により、MpIAA と拮抗的に働いて転写を促進する、あるいはオーキシン非依存的に転写を抑制する、というような形でオーキシン応答遺伝子の発現を微調整している可能性が考えられる。

一方で、多様なオーキシン応答を生み出すメカニズムがタンパク質相互作用の多様性のみで説明できるかは疑問である。最近の報告で、シロイヌナズナの系統的・機能的に異なる 2 種類の ARF タンパク質が、標的 DNA 配列の特異性においてほとんど差がないことが示された (Boer et al., 2014)。このことから、ARF タンパク質の多様性は標的遺伝子の特異性にさほど貢献していないとも考えられる。ゼニゴケに活性化型 ARF は 1 種しか存在しないことを考えると、オーキシン応答の種類は細胞種ごとにあらかじめ決められており、オーキシンは単に MpARF1 を介したスイッチを制御しているという仮説が考えられる。この仮説は最近提唱された多様なオーキシン応答を説明する新たなモデルと一致しており、このモデルにおいてオーキシンは様々な発生プロセスに“impetus (起動力)”を提供するシグナルとして解釈される (Bennett and Leyser, 2014)。今後、3 種の MpARFs がどのようにして多様な応答を制御しているかを解析することで、陸上植物における多様なオーキシン応答を引き起こすメカニズムへの理解が得られると期待される。

今後の展望

本研究によりゼニゴケが被子植物で示されたオーキシンを介した転写制御機構を完全かつ最小な形で持ち、細胞の伸長や分化を介して多様な発生イベントを制御していることが示された。このことから、ゼニゴケはオーキシンによって制御される多様な形態形成のメカニズムとその進化を調べる上で優れたモデル植物であると提案する。遺伝子発現制御に加えて、多様なオーキシン応答はオーキシンの生合成、代謝、輸送によっても生み出されると考えられ、今後はゼニゴケにおけるこれらの現象についても解析が必要である。

材料・方法

使用した植物

本論文では苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) の野生型雄株として Takaragaike-1 (Tak-1) を、野生型雌株として Tak-2 を用いた (Chiyoda et al., 2008)。形質転換には Tak-1 と Tak-2、もしくは Tak-1 と *proGH3:GUS#21* (Ishizaki et al., 2012) を掛け合わせて得られた胞子を用いた。

ゼニゴケの培養は特に記載のない限り 2 倍希釈した Gamborg B5 培地 (Gamborg et al., 1968) に寒天を 1% となるよう加えた培地で、 $50\text{-}60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色 Cold Cathode Fluorescent Lamp 下で培養した。生殖器の誘導は過去に報告されているように遠赤色光を照射することで行った (Chiyoda et al., 2008)。

遺伝子の単離と系統解析

ゼニゴケ遺伝子に対する相同性検索は、アメリカエネルギー省 Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) において進行中のトランスクリプトーム・ゲノムデータベースに対して BLAST を用いて行った。トランスクリプトームデータには 18 以上の異なる組織・条件から抽出された RNA をもとに読まれた、Roche 454 GS FLX による 3.0×10^6 リード、Illumina Hi-Seq による 10^{10} 以上のリードが含まれており、ほとんどの転写物を網羅できていると思われる。ゲノムデータは Roche 454 GS FLX、Illumina Hi-Seq によりそれぞれ 26.7 倍、54.0 倍のカバレッジで読まれている。*ABP1* 相同遺伝子の検索は上記の BLAST 検索に加え、ゼニゴケのトランスクリプトームデータから得られる全フレームの翻訳配列に対して、Pfam データベースにある *ABP1* の HMM ファイルを利用して (<http://pfam.xfam.org>; ID: PF02041)、HMMER3.1 (<http://hmmer.org>) (Finn et al., 2011) 中のプログラム hmmscan によっても行った。

MpIAA、MpARFs、MpTIR1 のアミノ酸配列は表 2 (末尾) に記載した配列と共に整列された。ジャゴケ、ヒメジャゴケから抽出した AUX/IAA の部分配列は degenerate-IAA_L2, degenerate-IAA_R1 のプライマーセットを用いた degenerate RT-PCR により取得した。本研究で使用したプライマーの配列は表 3 (末尾) に記載する。PCR 断片は pBC-SK+ベクターにクローニングし、シーケンス解析を行った。これらの配列は配列解析ソフト Geneious version 6.1.6 (Biomatters; <http://www.geneious.com/>) に埋め込まれたプログラム MUSCLE によって整列した (Edgar, 2004)。系統解析のため、AUX/IAA の C 末端領域 (ドメイン II から末端まで)、ARF の DNA 結合領域、TIR1/AFB の全長を用いた。系統樹は Geneious に埋め込まれたプログラム PhyML version 2.1.0 (Guindon et al., 2010) を使い、LG モデルに基づき以下の設定で作成した。Branch Support: Bootstrap, Number of bootstraps: 1000, Proportion of invariable sites: 0, Number of substitution rate

categories: 4, Optimize: Topology/length/rate, Topology Search: NNI (Nearest Neighbor Interchange)。

ゼニゴケ形質転換用プラスミドの作成

proMpEF1α:MpIAA, *proMpEF1α:MpIAA^{mDII}*

MpIAA のコード領域を RT-PCR により増幅し (プライマーセット: *MpIAA_entry*、*MpIAA_stop*、表 3)、pENTR/D-TOPO ベクター (Life Technologies) に Gateway TOPO cloning kit (Life Technologies) を用いてサブクローニングした。RNA の抽出は約 100 mg の Tak-1 葉状体から TRIzol Reagent (Life Technologies) を用いて行い、cDNA の合成には ReverTra Ace (Toyobo) を用いてそれぞれ手順書に従って行った。ドメイン II への変異はプライマーセット *mDII_L3*、*mDII_R3* (表 3) を用いてプラスミド全長を PCR することで導入した。得られた *MpIAA* と *MpIAA^{mDII}* のカセットを持つエントリークローンをバイナリーベクター pKIGWB2 と LR Clonase II (Life Technologies) を用いて反応させ、目的のプラスミドを得た。

proMpIAA:GUS

ゼニゴケ PAC クローン pMM23-245C5(Okada et al., 2000)を鋳型に、*MpIAA* の予測開始コドンから 5.2 kb 上流から 52 番目のコドンまでのゲノム配列を PCR により増幅し (プライマーセット: *MpIAA_usEntry*、*MpIAA_R9*、表 3)、pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした。得られたゲノム配列を LR Clonase II を用いて pGWB3(Nakagawa et al., 2007)に挿入し GUS レポーター遺伝子と連結した。

proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR

PAC クローン pMM23-245C5(Okada et al., 2000)を鋳型に *MpIAA* コード領域とその上流 5.2 kb を含むゲノム配列を PCR により増幅し (プライマーセット *MpIAA_usEntry*、*MpIAA_nonstop*、表 3)、pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした。ドメイン II への変異導入は前述した方法で行った。グルココルチコイド受容体ドメイン (GR) は pOpOn2.1(Moore et al., 2006)を鋳型に増幅し (プライマーセット *GR_L_AscI*、*GR_R_AscI*、表 3)、エントリークローンの *AscI* サイトに Ligation high ver.2 (Toyobo) を用いて挿入した。得られた *MpIAA* ゲノム配列と GR の融合カセットは LR Clonase II を用いて pGWB1(Nakagawa et al., 2007)または pKIGWB201 に導入した。

ゼニゴケへの形質転換

ゼニゴケへの形質転換はアグロバクテリウムを用いた方法で行った (Ishizaki et al., 2008)。独立の T1 世代を複数単離し、それぞれから得られた単一の無性芽を培養することで G1 世代を取得した。解析には G1 ラインから得られた無性芽 (G2 世代) を用いた。

半定量的 RT-PCR

2 週間目の葉状体から TRIzol Reagent を用いてトータル RNA を手順書に従い抽出した。First-strand cDNA の合成は 0.5 μg のトータル RNA を用いて ReverTra Ase 逆転写酵素と oligo(dT) プライマーを用いて行った。導入した遺伝子特異的な PCR は MpIAA_dN2、attB2_R のプライマーを用いて行った (表 3)。MpEF1 α をコードする cDNA の増幅は過去の報告通りに行い、コントロールとして用いた (Ishizaki et al., 2013b)。これらの PCR 反応は C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) を用いて行った。

GUS 活性の組織化学的解析

GUS 活性の組織化学的解析は過去に報告された手順に従った (Ishizaki et al., 2012)。GUS 染色された杯状体と生殖器は 6% 寒天ブロックに包埋し、Linear Slicer Pro 7 (堂阪イーエム) を用いて 100 μm 以下の厚さの切片を作成し観察した。

GUS 活性の定量的測定

2 週間目の葉状体を NAA または DEX 処理はそれぞれ終濃度が 10 μM になるよう加えた 1/2 ガンボーク B5 液体培地 (Gamborg et al., 1968) に浸け、5 分間の脱気を 2 回行い、白色光下で 12 時間処理した。GUS 活性測定は過去に報告された手順 (Ishizaki et al., 2012) にいくつかの変更を加えて、 β -グルクロニダーゼの基質 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide (MUG) の切断を蛍光により定量した。抽出液のタンパク質濃度を 10 $\mu\text{g}/70 \mu\text{l}$ extraction buffer に揃えた後、20 μl のエタノールを加え、10 μl MUG を加えた。37°C で 30 分間反応させた後、900 μl の 200 mM 炭酸ナトリウム溶液を加えて反応を終了させた。反応により生じた 4-methylumbelliferone (MU) の蛍光 (450 nm 蛍光/360 nm 励起光) を Powerscan4 (DS ファーマバイオメディカル) により測定した。

proMpIAA:MpIAA^{mDII}-GR 株の表現型観察

栄養生長相での観察の際、NAA または DEX 処理は 10 μM の NAA または DEX を含む 1/2 ガンボーク B5 培地上で生育することで行った。生殖成長相での DEX 処理は 10 μM の DEX 水溶液を 1~2 日おきに噴霧することで行った。走査型電子顕微鏡画像の取得は、液体窒素で凍結した植物体を直接 Miniscope TM3000 (日立) で観察した。

タンパク質相互作用の解析

Y2H 法による解析

ゼニコゲ cDNA を鋳型に、MpIAA (aa 627-825)、MpARF1 (aa 783-928)、MpARF2 (aa 751-879)、MpARF3 (aa 730-821) の C 末端領域を pBTM116、pVP16 (Vojtek et al., 1993) を改変した Y2H 用ベクター pBTM116SBEN、pVP16PS に、それぞれ *EcoRI/BamHI* または

*Bam*HI/*Not*I サイトを利用してクローニングした。作成したコンストラクトは出芽酵母 L40 株に形質転換し、形質転換体はトリプトファンとロイシンを欠く SD 培地で選抜した。タンパク質相互作用はヒスチジン要求性の回復または ONPG アッセイによって確認した (Vojtek et al., 1993)。

BiFC 法による解析

Y2H 法による解析に用いたのと同じ MpIAA と MpARFs の C 末端領域を PCR で増幅し pENTR/D-TOPO にクローニングした。それぞれの挿入断片は LR 反応によって pB4CY2 または pB4NY2 に導入した。アグロバクテリウムの準備と *N. benthamiana* への浸潤は過去に報告された手順に従った (Yasui et al., 2012)。アグロバクテリウムの浸潤後 20-21 時間で YFP シグナル (観察: 520-560 nm、励起光: 515 nm) を観察した。YFP 蛍光、葉緑体自家蛍光、明視野の画像は共焦点レーザー顕微鏡 FluoView 1000 (オリンパス) を用いて撮影した。

一過的トランスアクチベーションアッセイ

Tak-1 の cDNA を鋳型に MpARFs の全長もしくは中間領域 (MpARF1: aa 347-822, MpARF2: aa 388-764, MpARF3: aa 448-628) を PCR により増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターで Gal4-DBD との融合タンパク質を発現するベクターにクローニングした (Shikata et al., 2003)。Gal4 結合配列の 6 回反復と F-Luc をコードするベクターをレポーターとして、また形質転換効率のコントロールとして 35S プロモーター制御下で R-Luc を発現するベクターを用いた (Shikata et al., 2003)。これらのコンストラクトを Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (BIO-RAD) を用いたパーティクルボンバードメントによりタバコ BY-2 培養細胞へ同時に形質転換した。48 時間の培養後、F-Luc と R-Luc の活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用い付属の手順に従い、Centro XS³ LB 960 Microplate Luminometer (Berthold) により測定した。ルシフェラーゼ活性はタンパク質濃度で標準化した。

アクセッション番号

本研究で明らかにしたゲノム配列は DDBJ のデータベースより下記のアクセッション番号で登録した。AB981316 (*MpIAA*)、AB981317 (*MpARF1*)、AB981318 (*MpARF2*)、AB981319 (*MpARF3*)、AB981320 (*MpTIR1*)、AB981321 (*MpCOI1*)。

表2 系統解析に用いた配列

Name	Accession	Database*	Organism
MpIAA		GenBank/EMBL/DDBJ	<i>M. polymorpha</i>
Pp008G051100	Phpat.008G051100	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp024G023400	Phpat.024G023400	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Sm116126	116126	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm26861	26861	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm36236	36236	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm85935	85935	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
IAA1	AT4G14560	TAIR	Arabidopsis
IAA2	AT3G23030	TAIR	Arabidopsis
IAA3	AT1G04240	TAIR	Arabidopsis
IAA4	AT5G43700	TAIR	Arabidopsis
IAA5	AT1G15580	TAIR	Arabidopsis
IAA6	AT1G52830	TAIR	Arabidopsis
IAA7	AT3G23050	TAIR	Arabidopsis
IAA8	AT2G22670	TAIR	Arabidopsis
IAA9	AT5G65670	TAIR	Arabidopsis
IAA10	AT1G04100	TAIR	Arabidopsis
IAA11	AT4G28640	TAIR	Arabidopsis
IAA12	AT1G04550	TAIR	Arabidopsis
IAA13	AT2G33310	TAIR	Arabidopsis
IAA14	AT4G14550	TAIR	Arabidopsis
IAA15	AT1G80390	TAIR	Arabidopsis
IAA16	AT3G04730	TAIR	Arabidopsis
IAA17	AT1G04250	TAIR	Arabidopsis
IAA18	AT1G51950	TAIR	Arabidopsis
IAA19	AT3G15540	TAIR	Arabidopsis
IAA20	AT2G46990	TAIR	Arabidopsis
IAA26	AT3G16500	TAIR	Arabidopsis
IAA27	AT4G29080	TAIR	Arabidopsis
IAA28	AT5G25890	TAIR	Arabidopsis
IAA29	AT4G32280	TAIR	Arabidopsis
IAA30	AT3G62100	TAIR	Arabidopsis
IAA31	AT3G17600	TAIR	Arabidopsis
IAA32	AT2G01200	TAIR	Arabidopsis
IAA33	AT5G57420	TAIR	Arabidopsis
IAA34	AT1G15050	TAIR	Arabidopsis
MpARF1		GenBank/EMBL/DDBJ	<i>M. polymorpha</i>
MpARF2		GenBank/EMBL/DDBJ	<i>M. polymorpha</i>
MpARF3		GenBank/EMBL/DDBJ	<i>M. polymorpha</i>
Pp001G055800	Phpat.001G055800	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp001G055900	Phpat.001G055900	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp001G160900	Phpat.001G160900	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp002G106600	Phpat.002G106600	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp004G047000	Phpat.004G047000	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp004G047100	Phpat.004G047100	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp005G035200	Phpat.005G035200	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp006G079200	Phpat.006G079200	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp006G097800	Phpat.006G097800	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp013G016000	Phpat.013G016000	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp014G064300	Phpat.014G064300	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp016G023200	Phpat.016G023200	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp017G075200	Phpat.017G075200	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp026G040800	Phpat.026G040800	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp027G000200	Phpat.027G000200	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Sm117217	117217	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm181406	181406	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm424114	424114	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm437944	437944	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>

Sm51695	51695	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm61688	61688	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm81992	81992	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
ARF1	AT1G59750	TAIR	Arabidopsis
ARF2	AT5G62000	TAIR	Arabidopsis
ARF3	AT2G33860	TAIR	Arabidopsis
ARF4	AT5G60450	TAIR	Arabidopsis
ARF5	AT1G19850	TAIR	Arabidopsis
ARF6	AT1G30330	TAIR	Arabidopsis
ARF7	AT5G20730	TAIR	Arabidopsis
ARF8	AT5G37020	TAIR	Arabidopsis
ARF9	AT4G23980	TAIR	Arabidopsis
ARF10	AT2G28350	TAIR	Arabidopsis
ARF11	AT2G46530	TAIR	Arabidopsis
ARF12	AT1G34310	TAIR	Arabidopsis
ARF13	AT1G34170	TAIR	Arabidopsis
ARF14	AT1G35540	TAIR	Arabidopsis
ARF15	AT1G35520	TAIR	Arabidopsis
ARF16	AT4G30080	TAIR	Arabidopsis
ARF17	AT1G77850	TAIR	Arabidopsis
ARF18	AT3G61830	TAIR	Arabidopsis
ARF19	AT1G19220	TAIR	Arabidopsis
ARF20	AT1G35240	TAIR	Arabidopsis
ARF21	AT1G34410	TAIR	Arabidopsis
ARF22	AT1G34390	TAIR	Arabidopsis
MpCOI1		GenBank/EMBL/DDBJ	<i>M. polymorpha</i>
MpTIR1		GenBank/EMBL/DDBJ	<i>M. polymorpha</i>
Pp003G031500	Phpat.003G031500	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp009G006900	Phpat.009G006900	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp009G040700	Phpat.009G040700	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp015G005100	Phpat.015G005100	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp017G026000	Phpat.017G026000	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp018G056700	Phpat.018G056700	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp020G017800	Phpat.020G017800	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp020G063300	Phpat.020G063300	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp022G022600	Phpat.022G022600	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp023G015200	Phpat.023G015200	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp023G037400	Phpat.023G037400	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp023G068100	Phpat.023G068100	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Pp024G034400	Phpat.024G034400	JGI, phytozome 10, Physcomitrella patens v3.0	<i>P. patens</i>
Sm104859	104859	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm11318	11318	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm163526	163526	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm168175	168175	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm170974	170974	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm75487	75487	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
Sm84100	84100	JGI, phytozome 10, Selaginella moellendorffii v1.0	<i>S. moellendorffii</i>
AFB1	AT4G03190	TAIR	Arabidopsis
AFB2	AT3G26810	TAIR	Arabidopsis
AFB3	AT1G12820	TAIR	Arabidopsis
AFB4	AT4G24390	TAIR	Arabidopsis
AFB5	AT5G49980	TAIR	Arabidopsis
COI1	AT2G39940	TAIR	Arabidopsis
TIR1	AT3G62980	TAIR	Arabidopsis

* JGI: <http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, TAIR: <http://www.arabidopsis.org>

表3 プライマーリスト

Name	Sequence	Purpose
degenerate-IAA_L2	GAGGCCCTTATGAAATGGCACGCNGARCAR	degenerate PCR
degenerate-IAA_R1	TCCGACGAGCATGAGATCTCCATCYTGRTCYTCRTA	degenerate PCR
MplAA_entry	CACCTTGGGCACAATGAGTCAAAA	cloning
MplAA_stop	CTCACACGTTCCGGTTGAGTC	cloning
mDII-L3	GCCGTAGGTTGGTCTTCCATTTCGATCG	mutagenesis
mDII-R3	CGATCGAATGGAAGACCAACCTACGGC	mutagenesis
MplAA_usEntry	CACCACGGTTTCTTCGGATCACAC	cloning
MplAA_R9	GCCATTGTTCAACAAGACTCC	cloning
MplAA_nonstop	CACGTTCCGGTTGAGTCGTC	cloning, BiFC
GR_L_AscI	TTGGCGCGCCATGGCTAGTGAAGCTCGAAA	cloning
GR_R_AscI	AAGGCGCGCCTCATTTTTGATGAAACAGAAGCTTC	cloning
attB2_R	GAGCTCTAAGCGCTGTTATCAA	semi-quantitative RT-PCR
MplAA_dN2	CACCAAGATGTCCGCCCTG	semi-quantitative RT-PCR
EcoRI-MplAA_DII	TTTGAATTGAAACCAAGCAGCAATCGTC	Y2H
MplAA-BamHI	TTTGGATCCCTCACACGTTCCGGTTGAGTC	Y2H
BamHI-MplAA_DII_2	TTTGGATCCCGAAACCAAGCAGCAATC	Y2H
MplAA-NotI	TTTGGCGCCCGCTCACACGTTCCGGTTGAGTC	Y2H
EcoRI-MpARF1_CTD	TTTGAATTCTTCATGGCACCCGATCTTC	Y2H
MpARF1-BamHI	TTTGGATCCCGCCTCGGGGAGTAATCA	Y2H
BamHI-MpARF1_CTD_2	TTTGGATCCCATGGCACCCGATCTTCTC	Y2H
MpARF1-NotI	TTTGGCGCCCGCCTCGGGGAGTAATCA	Y2H
EcoRI-MpARF2_CTD	TTTGAATTCCAACAAGGTCCAGTTCGTAGC	Y2H
MpARF2-BamHI	TTTGGATCCCGCCTCCTACATGTCGTC	Y2H
BamHI-MpARF2_CTD	TTTGGATCCTCAACAAGGTCCAGTTCGTAGC	Y2H
MpARF2-NotI	TTTGGCGCCCGCCTCCTACATGTCGTC	Y2H
EcoRI-MpARF3_CTD	TTTGAATTCGGTGAGTCCTTCTCGCACTG	Y2H
MpARF3-BamHI	TTTGGATCCTGGTGCTAGCCTGCTACTG	Y2H
BamHI-MpARF3_CTD	TTTGGATCCTGGTGAGTCCTTCTCGCACTG	Y2H
MpARF3-NotI	TTTGGCGCCCGCTGGTGCTAGCCTGCTACTG	Y2H
MplAA_dN3	CACCATGGAACCAAGCAGCAATCGTC	BiFC
MpARF1_CTDentry	CACCATGTTTCATGGCACCCGATCTTC	BiFC
MpARF1_nonstop	GGGGCACCCCGCTGGGCATCATT	BiFC
MpARF2_CTDentry	CACCATGCAACAAGGTCCAGTTCGTAGC	BiFC
MpARF2_nonstop	CATGTCGTCGCCCGCGC	BiFC
MpARF3_CTDentry	CACCATGGGTGAGTCCTTCTCGCACTG	BiFC
MpARF3_nonstop	CTGCGACCCGCTTTTG	BiFC
MpARF1_F_inf3	CAGTTGACTGTATCGATGTATTCTTGTTCGCCGATG	Transactivation
MpARF1_R_inf3	TCGAGCTCTAAATCGTCAGGGGCACCCCC	Transactivation
MpARF1_MR_F_inf	CAGTTGACTGTATCGGTTGGCTGGGATGAATCTAC	Transactivation
MpARF1_MR_R_inf	TCGAGCTCTAAATCGCAAGGTGAACACGCAAATCT	Transactivation
MpARF2_F_inf	CAGTTGACTGTATCGATGTCAGAAGCATCTTCCATCAC	Transactivation
MpARF2_R_inf2	TCGAGCTCTAAATCGCGCCTCCTACATGTCGTC	Transactivation
MpARF2_MR_F_inf	CAGTTGAGTGTATCGTCACCATGGGAAGTGGAG	Transactivation
MpARF2_MR_R_inf	TCGAGCTCTAAATCGCCTGCTTGTGAATCTTCGTG	Transactivation
MpARF3_F_inf	CAGTTGACTGTATCGTCCTTTCTGTTTGGGATGC	Transactivation
MpARF3_Rlong_inf	TCGAGCTCTAAATCGCTGTCAAGCATACTGTCAATGG	Transactivation
MpARF3_MR_F_inf	CAGTTGACTGTATCGCCGGATTTGTTACAGGGAGT	Transactivation
MpARF3_MR_R_inf2	TCGAGCTCTAAATCGATGCGGCGAGCTTCTCTC	Transactivation

引用文献

Althoff, F., Kopischke, S., Zobell, O., Ide, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., and Zachgo, S. (2013). Comparison of the *MpEF1α* and *CaMV35* promoters for application in *Marchantia polymorpha* overexpression studies. *Transgenic Res* 23, 235-244.

Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V.A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B.A., *et al.* (2011). The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332, 960-963.

Barnes, C.R., and Land, W.J.G. (1907). Bryological papers. I. The origin of air chambers. *Bot Gaz* 44, 197-213.

Barnes, C.R., and Land, W.J.G. (1908). Bryological papers. II. The origin of the cupule of *Marchantia*. *Bot Gaz* 46, 401-409.

Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., and Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.

Bennett, T., and Leyser, O. (2014). The auxin question: a philosophical overview. in *Auxin and its role in plant development*, E. Zazimalova, J. Petrasek, and E. Benkova, eds. (Wien: Springer), pp. 3-19.

Binns, A.N., and Maravolo, N.C. (1972). Apical dominance, polarity, and adventitious growth in *Marchantia polymorpha*. *Am J Bot* 59, 691-696.

Boer, D.R., Freire-Rios, A., van den Berg, W.A., Saaki, T., Manfield, I.W., Kepinski, S., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., de Vries, S.C., Solano, R., *et al.* (2014). Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell* 156, 577-589.

Bowman, J.L. (2013). Walkabout on the long branches of plant evolution. *Curr Opin Plant Biol* 16, 70-77.

Bowman, J.L., Floyd, S.K., and Sakakibara, K. (2007). Green genes-comparative genomics of the green branch of life. *Cell* 129, 229-234.

Calderón Villalobos, L.I., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L.B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., *et al.* (2012). A combinatorial TIR1/AFB-

- Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol* *8*, 477-485.
- Chen, J.G., Shimomura, S., Sitbon, F., Sandberg, G., and Jones, A.M. (2001a). The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *Plant J* *28*, 607-617.
- Chen, J.G., Ullah, H., Young, J.C., Sussman, M.R., and Jones, A.M. (2001b). ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* *15*, 902-911.
- Chiyoda, S., Ishizaki, K., Kataoka, H., Yamato, K.T., and Kohchi, T. (2008). Direct transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. by particle bombardment using immature thalli developing from spores. *Plant Cell Rep* *27*, 1467-1473.
- Cooke, T.J., Poli, D., Sztein, A.E., and Cohen, J.D. (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol Biol* *49*, 319-338.
- Darwin, C. (1880). *The power of movement in plants* (London: John Murray).
- Davidonis, G.H., and Munroe, M.H. (1972). Apical dominance in *Marchantia*: correlative inhibition of neighbor lobe growth. *Bot Gaz* *133*, 177-184.
- Davies, P.J. (2010). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*, 3 edn (Netherland: Springer).
- De Smet, I., Voss, U., Lau, S., Wilson, M., Shao, N., Timme, R.E., Swarup, R., Kerr, I., Hodgman, C., Bock, R., *et al.* (2011). Unraveling the evolution of auxin signaling. *Plant Physiol* *155*, 209-221.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jurgens, G., and Estelle, M. (2005). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* *9*, 109-119.
- Durand, E.J. (1908). The development of the sexual organs and sporogonium of *Marchantia polymorpha*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* *35*, 321-335.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* *32*, 1792-1797.
- Effendi, Y., Rietz, S., Fischer, U., and Scherer, G.F. (2011). The heterozygous *abp1/ABP1* insertional mutant has defects in functions requiring polar auxin transport and in regulation of early auxin-regulated genes. *Plant J* *65*, 282-294.
- Escher, D., Bodmer-Glavas, M., Barberis, A., and Schaffner, W. (2000). Conservation of

glutamine-rich transactivation function between yeast and humans. *Mol Cell Biol* *20*, 2774-2782.

Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C.P., and Marlétaz, F. (2013). Evolution of the ARF gene family in land plants: old domains, new tricks. *Mol Biol Evol* *30*, 45-56.

Finn, R.D., Clements, J., and Eddy, S.R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* *39*, W29-37.

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jurgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* *426*, 147-153.

Flores-Sandoval, E., Eklund, D.M., Bowman, J.L. (2015). A simple auxin transcriptional response system regulates multiple morphogenetic processes in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genet* in press.

Fujita, T., Sakaguchi, H., Hiwatashi, Y., Wagstaff, S.J., Ito, M., Deguchi, H., Sato, T., and Hasebe, M. (2008). Convergent evolution of shoots in land plants: lack of auxin polar transport in moss shoots. *Evol Dev* *10*, 176-186.

Furuta, K.M., Hellmann, E., and Helariutta, Y. (2014). Molecular control of cell specification and cell differentiation during procambial development. *Ann Rev Plant Biol* *65*, 607-638.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* *50*, 151-158.

Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, D., Dai, X., Estelle, M., and Zhao, Y. (2015). Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 2275-2280.

Gray, W.G., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* *414*, 271-276.

Grones, P., and Friml, J. (2015). Auxin transporters and binding proteins at a glance. *J Cell Sci* *128*, 1-7.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* *59*, 307-321.

- Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M., and Jürgens, G. (2002). The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev* *16*, 1610-1615.
- Hamann, T., Mayer, U., and Jürgens, G. (1999). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* *126*, 1387-1395.
- Harper, R.M., Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M.K., Yamamoto, K., and Liscum, E. (2000). The *NPH4* locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant cell* *12*, 757-770.
- Hertel, R., Thomson, K.S., and Russo, V.E. (1972). *In-vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta* *107*, 325-340.
- Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S., Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., *et al.* (2014). *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Commun* *5*, 3978.
- 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. (2013a). Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci Rep* *3*, 1532.
- Ishizaki, K., Mizutani, M., Shimamura, M., Masuda, A., Nishihama, R., and Kohchi, T. (2013b). Essential Role of the E3 ubiquitin ligase NOPPERABO1 in schizogenous intercellular space formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell* *25*, 4075-4084.
- Ishizaki, K., Nonomura, M., Kato, H., Yamato, K.T., and Kohchi, T. (2012). Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res* *125*, 643-651.
- Iwasaki, M., Takahashi, H., Iwakawa, H., Nakagawa, A., Ishikawa, T., Tanaka, H., Matsumura, Y., Pekker, I., Eshed, Y., Vial-Pradel, S., *et al.* (2013). Dual regulation of *ETTIN(ARF3)* gene expression by AS1-AS2, which maintains the DNA methylation level, is involved in stabilization of leaf adaxial-abaxial partitioning in *Arabidopsis*.

Development *140*, 1958-1969.

Ju, C., B., V.d.P., Cooper, E.D., Thierer, J.H., Gibbons, T.R., Delwiche, C.F., and Chang, C. (2015). Conservation of ethylene as a plant hormone over 450 million years of evolution. *Nature Plants* *1*, 1-7.

Jurado, S., Abraham, Z., Manzano, C., Lopez-Torrejon, G., Pacios, L.F., and Del Pozo, J.C. (2010). The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell* *22*, 3891-3904.

Kaul, K.N., Mitra, G.C., and Tripathi, B.K. (1962). Responses of *Marchantia* in aseptic culture to well-known auxins and antiauxins. *Ann Bot* *26*, 447-466.

Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* *435*, 446-451.

Kim, J., Harter, K., and Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11786-11791.

Korasick, D.A., Westfall, C.S., Lee, S.G., Nanao, M.H., Dumas, R., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Jez, J.M., and Strader, L.C. (2014). Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 5427-5432.

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.

Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T., and Kohchi, T. (2014). Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution. *Nature Commun* *5*, 3668.

Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (1996). Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the *SAUR-AC1* promoter. *Plant J* *10*, 403-413.

Liscum, E., and Reed, J.W. (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* *49*, 387-400

Lituiev, D.S., Krohn, N.G., Müller, B., Jackson, D., Hellriegel, B., Dresselhaus, T., and Grossniklaus, U. (2013). Theoretical and experimental evidence indicates that there is no detectable auxin gradient in the angiosperm female gametophyte. *Development* *140*,

4544-4553.

Liu, X., Huang, J., Wang, Y., Khanna, K., Xie, Z., Owen, H.A., and Zhao, D. (2010). The role of floral organs in carpels, an *Arabidopsis* loss-of-function mutation in *MicroRNA160a*, in organogenesis and the mechanism regulating its expression. *Plant J* *62*, 416-428.

Lloyd, A.M., Schena, M., Walbot, V., and Davis, R.W. (1994). Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* *266*, 436-439.

Möller, B., Schenck, D., and Lüthen, H. (2010). Exploring the link between auxin receptors, rapid cell elongation and organ tropisms. *Plant Signal Behav* *5*, 601-603.

Maravolo, N.C. (1980). Control of development in hepatics. *Bull Torrey Bot Club* *107*, 308-324.

Maravolo, N.C., and Voth, P.D. (1966). Morphogenic effects of three growth substances on *Marchantia gemmalings*. *Bot Gaz* *127*, 79-86.

McConaha, M. (1941). Ventral structures effecting capillarity in the Marchantiales. *Am Bot* *28*, 301-306.

Mockaitis, K., and Estelle, M. (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* *24*, 55-80.

Moore, I., Samalova, M., and Kurup, S. (2006). Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J* *45*, 651-683.

Nagawa, S., Xu, T., Lin, D., Dhonukshe, P., Zhang, X., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., and Yang, Z. (2012). ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Biol* *10*, e1001299.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* *104*, 34-41.

Nanao, M.H., Vinos-Poyo, T., Brunoud, G., Thevenon, E., Mazzoleni, M., Mast, D., Laine, S., Wang, S., Hagen, G., Li, H., *et al.* (2014). Structural basis for oligomerization of auxin transcriptional regulators. *Nature Commun* *5*, 3617.

- Napier, R.M., David, K.M., and Perrot-Rechenmann, C. (2002). A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol Biol* *49*, 339-348.
- Ohashi-Ito, K., and Fukuda, H. (2010). Transcriptional regulation of vascular cell fates. *Curr Opin Plant Biol* *13*, 670-676.
- Okada, S., Fujisawa, M., Sone, T., Nakayama, S., Nishiyama, R., Takenaka, M., Yamaoka, S., Sakaida, M., Kono, K., Takahama, M., *et al.* (2000). Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant J* *24*, 421-428.
- Otto, K.R., and Halbsguth, W. (1975). Die Förderung der Bildung von Primärrhizoiden an Brutkörpern von *Marchantia polymorpha* L. durch Licht und IES (Stimulation of primary rhizoid formation on gemmae of *Marchantia polymorpha* L. as caused by light and IAA). *Z Pflanzenphysiol* *80*, 197-205.
- Pagnussat, G.C., Alandete-Saez, M., Bowman, J.L., and Sundaresan, V. (2009). Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science* *324*, 1684-1689.
- Paponov, I.A., Teale, W., Lang, D., Paponov, M., Reski, R., Rensing, S.A., and Palme, K. (2009). The evolution of nuclear auxin signalling. *BMC Evol Biol* *9*, 126.
- Paque, S., Mouille, G., Grandont, L., Alabadi, D., Gaertner, C., Goyallon, A., Muller, P., Primard-Brisset, C., Sormani, R., Blazquez, M.A., *et al.* (2014). AUXIN BINDING PROTEIN1 links cell wall remodeling, auxin signaling, and cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *26*, 280-295.
- Perez-Perez, J.M., Candela, H., Robles, P., Lopez-Torrejón, G., del Pozo, J.C., and Micol, J.L. (2010). A role for *AUXIN RESISTANT3* in the coordination of leaf growth. *Plant Cell Physiol* *51*, 1661-1673.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001446.
- Piya, S., Shrestha, S.K., Binder, B., Stewart, C.N., Jr., and Hewezi, T. (2014). Protein-protein interaction and gene co-expression maps of ARFs and Aux/IAAs in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* *5*, 744.
- Prigge, M.J., Lavy, M., Ashton, N.W., and Estelle, M. (2010). *Physcomitrella patens* auxin-resistant mutants affect conserved elements of an auxin-signaling pathway. *Curr*

Biol 20, 1907-1912.

Qiao, M., Zhao, Z., Song, Y., Liu, Z., Cao, L., Yu, Y., Li, S., and Xiang, F. (2012). Proper regeneration from *in vitro* cultured *Arabidopsis thaliana* requires the microRNA-directed action of an auxin response factor. *Plant J* 71, 14-22.

Rück, A., Palme, K., Venis, M.A., Napier, R.M., and Felle, H.H. (1993). Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant J* 4, 41-46.

Ramos, J.A., Zenser, N., Leyser, O., and Callis, J. (2001). Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell* 13, 2349-2360.

Reed, J.W. (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 6, 420-425.

Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12, 507-518.

Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., *et al.* (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319, 64-69.

Rousseau, J. (1950). Action de l'acide indol β -acétique sur les propagules de *Marchantia polymorpha* et *Lunularia cruciata*. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 230, 675-676.

Rousseau, J. (1951). Action de l'acide α naphthaléne acétique sur les corbeilles à propagules de *Marchantia polymorpha* L. et de *Lunularia cruciata* Adans. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 232, 107-108.

Rousseau, J. (1953). Action des hetero-auxines sur les chapeaux du *Marchantia polymorpha* L. *Bulletin de la Société Botanique de France* 100, 179-180.

Salehin, M., Bagchi, R., and Estelle, M. (2015). SCF^{TIR1/AFB}-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* 27, 9-19.

Scarpella, E., Barkoulas, M., and Tsiantis, M. (2010). Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001511.

Schena, M., Lloyd, A.M., and Davis, R.W. (1991). A steroid-inducible gene expression

system for plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 10421-10425.

Schenck, D., Christian, M., Jones, A., and Lüthen, H. (2010). Rapid auxin-induced cell expansion and gene expression: a four-decade-old question revisited. *Plant Physiol* *152*, 1183-1185.

Schiffner, V. (1909). Studien über die Rhizoïden der Marchantiales. *Ann jard bot Buitenz* *3*, 473-492.

Schneider, M.J., Troxler, R.F., and Voth, P.D. (1967). Occurrence of indoleacetic acid in bryophytes. *Bot Gaz* *128*, 174-179.

Schuetz, M., Smith, R., and Ellis, B. (2013). Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *J Exp bot* *64*, 11-31.

Shikata, M., Takemura, M., Yokota, A., and Kohchi, T. (2003). *Arabidopsis* ZIM, a plant-specific GATA factor, can function as a transcriptional activator. *Biosci Biotechnol Biochem* *67*, 2495-2497.

Shimizu-Mitao, Y., and Kakimoto, T. (2014). Auxin sensitivities of all *Arabidopsis* Aux/IAAs for degradation in the presence of every TIR1/AFB. *Plant Cell Physiol* *55*, 1450-1459.

Simon, S., and Petrasek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci* *180*, 454-460.

Steffens, B., Feckler, C., Palme, K., Christian, M., Böttger, M., and Lüthen, H. (2001). The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J* *27*, 591-599.

Strader, L.C., and Nemhauser, J.L. (2013). Auxin 2012: a rich mea ho'oulu. *Development* *140*, 1153-1157.

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.

Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J.A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* *319*, 1384-1386.

Takahashi, K., Hayashi, K., and Kinoshita, T. (2012). Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis*.

Plant Physiol *159*, 632-641.

Tarén, N. (1958). Factors regulating the initial development of gemmae in *Marchantia polymorpha*. The Bryologist *61*, 191-204.

Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E., and Yamamoto, K.T. (2004). *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell *16*, 379-393.

Timme, R.E., and Delwiche, C.F. (2010). Uncovering the evolutionary origin of plant molecular processes: comparison of *Coleochaete* (Coleochaetales) and *Spirogyra* (Zygnematales) transcriptomes. BMC Plant Biol *10*, 96.

Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. Plant Cell *15*, 533-543.

Tromas, A., Paponov, I., and Perrot-Rechenmann, C. (2010). AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. Trends Plant Sci *15*, 436-446.

Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1999a). Activation and repression of transcription by auxin response factors. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 5844-5849.

Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1999b). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. Plant J *19*, 309-319.

Vanneste, S., and Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. Cell *136*, 1005-1016.

Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., *et al.* (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. Mol Syst Biol *7*, 508.

Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., and Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. Cell *74*, 205-214.

Xu, T., Dai, N., Chen, J., Nagawa, S., Cao, M., Li, H., Zhou, Z., Chen, X., De Rycke, R., Rakusova, H., *et al.* (2014). Cell surface ABP1-TMK auxin-sensing complex activates ROP GTPase signaling. Science *343*, 1025-1028.

Xu, T., Wen, M., Nagawa, S., Fu, Y., Chen, J.G., Wu, M.J., Perrot-Rechenmann, C., Friml,

J., Jones, A.M., and Yang, Z. (2010). Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* *143*, 99-110.

Yasui, Y., Mukougawa, K., Uemoto, M., Yokofuji, A., Suzuri, R., Nishitani, A., and Kohchi, T. (2012). The phytochrome-interacting vascular plant one-zinc finger1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *24*, 3248-3263.

Yoshida, S., Saiga, S., and Weijers, D. (2013). Auxin regulation of embryonic root formation. *Plant Cell Physiol* *54*, 325-332.

謝辞

本研究は京都大学大学院生命科学研究科 遺伝子特性学分野の河内孝之教授の下で行われました。河内教授には長年にわたり研究と生活の両面で多くのご指導・ご支援を賜りました。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、石崎公庸准教授（神戸大学大学院理学研究科）、西浜竜一講師、白川一博士には論文執筆をはじめ、実験手法についてなど多くのご指導とご提言をいただきました。心より感謝いたします。

山岡尚平助教、末次憲之助教にはセミナーやミーティングの場を通じて多くのご助言をいただきました。また福澤秀哉教授（京都大学生命科学研究科）、大和勝幸准教授（近畿大学生物理工学部）には当研究室にご在籍中に様々なご助言をいただきました。深く御礼申し上げます。

荒木崇教授（京都大学生命科学研究科）、青木一洋准教授（京都大学医学研究科）、白石英秋准教授（京都大学生命科学研究科）には副指導教員としてご指導いただきました。深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、植物用バイナリーベクターを中川強教授（島根大学）、pOpOn2.1ベクターを Ian Moore 博士 (Oxford 大学)、Y2H 用ベクターを町田泰則教授 (名古屋大学)、BiFC 用ベクターを真野昌二助教（基礎生物学研究所）、ジャゴケ・ヒメジャゴケのサンプルを荒木崇教授から分与していただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

また本研究は日本学術振興会より特別研究員としての支援をいただきました。お礼申し上げます。

本研究が行われました遺伝子特性学分野の皆様には、研究生生活を通じて多くのご助言、ご協力をいただきました。特に共同研究者である神埜勝さんにはトランスアクチベーション実験でのご協力、日々の議論などお世話になりました。ありがとうございます。この場にはとても書ききれませんが、数えて 7 年もの長い間、楽しく研究生生活を送ってこられたのは先輩・同期・後輩・スタッフの皆様のご協力あつてのことです。深く感謝いたします。

最後になりましたが、これまで自分を支えてくれた家族・友人の皆様には心より感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Hiroataka Kato, Kimitsune Ishizaki, Masaru Kouno, Makoto Shirakawa, John L. Bowman, Ryuichi Nishihama and Takayuki Kohchi

Auxin-Mediated Transcriptional System with a Minimal Set of Components Is Critical for Morphogenesis through the Life Cycle in *Marchantia polymorpha*

PLOS Genetics, in press 2015