

苔類ゼニゴケの器官形成における細胞系譜の寄与と

核オーキシン信号伝達による制御機構の解析

鈴木 秀政

## 目次

要旨	2
略語一覧	3
緒言	5
第一章 苔類ゼニゴケの背側器官形成は位置情報により制御される	
序論	8
結果	12
考察	20
材料と方法	23
第二章 核オーキシン信号伝達はゼニゴケの器官形成に必須である	
序論	26
結果	29
考察	50
材料と方法	56
文献抄	66
謝辞	77



## 要旨

陸上植物は内外の区別のある三次元的なボディープランを共有派生形質とする。コケ植物は現生陸上植物で最も早期に分岐した単系統群であり、残る維管束植物との比較分析は植物に普遍的な発生原理解明への一助となる。

第一章では、苔類ゼニゴケの器官形成様式を解析した。維管束植物の地上部器官は、メリステム周辺で位置情報に応じて繰り返し形成される。一方コケ植物では、蘚類などでの解析から頂端幹細胞の娘細胞に由来するクローナルな細胞群“メロファイト”単位で器官形成されると考えられてきた。しかし、メロファイト単位の器官形成がコケ植物に普遍的であるのかは不明であった。そこで本研究では、ゼニゴケを用い、少数細胞の誘導的な遺伝的標識により細胞系譜を可視化する系を立ち上げた。ゼニゴケは葉状体先端のノッチに頂端幹細胞をもつ。無性繁殖体“無性芽”で誘導処理して培養すると、しばしば基部からノッチにかけて葉状体を縦断するセクタが生じた。当該セクタにより背側器官の気室や杯状体も二分されており、位置情報に応じてメロファイトを跨いで器官形成されることが示唆された。この結果から、陸上植物の位置情報依存的な器官形成機構は共通祖先で獲得された、あるいは進化上複数回獲得されたことが考えられる。

第二章では、移動性シグナル分子である植物ホルモンオーキシシンに着目した。被子植物では TIR1/ABF 受容体がオーキシシン依存的に転写抑制因子 AUX/IAA の DII 領域に結合して分解を促し、転写因子 ARF による転写制御を亢進する。TIR1/ABF ホモログ MpTIR1 の過剰発現はゼニゴケのオーキシシン感受性を上昇させた。逆に Mptir1 変異体は生理応答・転写応答両面でオーキシシン感受性が低下した。MpTIR1 は *in vitro* でオーキシシン依存的にゼニゴケ AUX/IAA (MpIAA) の DII と相互作用し、*in vivo* では DII 付加タンパク質の分解を促した。MpTIR1 とシロイヌナズナ TIR1 はともに Mptir1 変異体を相補した。これらの結果から MpTIR1 が被子植物 TIR1 と共通したオーキシシン受容体機能を有することが示唆された。孢子発芽体における MpTIR1 KO により、器官形成が損なわれ細胞塊状となった。誘導的な KO では、無性芽形成時の体軸形成かく乱や、無性芽が発芽後に細胞塊状となる表現型を呈した。RNA-seq データに基づく主成分分析では、ゼニゴケ各器官は第一・第二主成分軸に沿って発生順に分離され、Mptir1 変異体は孢子発芽体と葉状体の中間に位置した。Mptir1 変異体は孢子発芽体と葉状体いずれよりも、器官形成制御に関わる複数の転写因子が低発現であった。以上から、MpTIR1 を介した核オーキシシン信号伝達は体軸形成並びに器官形成を制御しており、三次元的な発生に必須であることが示唆された。

## 略語一覧

2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
AFB	AUXIN SIGNALING F-BOX
ANOVA	analysis of variance
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
At	(遺伝子名・タンパク質名の先頭で) <i>Arabidopsis thaliana</i>
AUX/IAA	AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
bp	base pair
C2HDZ	CLASS II HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER
Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
cDNA	complementary DNA
CDS	coding sequence
CKO	conditional knockout
DBD	DNA binding domain
DEG	differentially expressed gene
DEX	dexamethasone
DII	domain II
DNA	deoxyribonucleic acid
EF1 $\alpha$	ELONGATION FACTOR 1 ALPHA
FC	fold change
GR	glucocorticoid receptor
gRNA	guide RNA
GST	glutathione S-transferase
GUS	$\beta$ -glucuronidase
hpt	hygromycin-B-phosphotransferase
HS	heat shock
HSP	HEAT-SHOCK PROTEIN 17.8A
IAA	indole-3-acetic acid
IPyA	indole-3-pyruvic acid
kb	kilo base pair
KO	knockout
LRL	LOTUS JAPONICUS ROOTHAIRLESS1-LIKE
LRR	leucine-rich repeat
Mp	(遺伝子名・タンパク質名の先頭で) <i>Marchantia polymorpha</i>
MR	middle region

mutDII	mutated DII
NAA	naphthalene-1-acetic acid
NAS	nuclear auxin signaling
ncARF	non canonical ARF
ncIAA	non canonical IAA
NLS	nuclear localization signal
NOS	NOPALINE SYNTHASE
PAA	phenylacetic acid
PB1	Phox/Bem1
PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
Pp	(遺伝子名・タンパク質名の先頭で) <i>Physcomitrium</i> ( <i>Physcomitrella</i> ) <i>patens</i>
R2D2	radiometric version of 2 D2's
RNA	ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing
RSL1	ROOT-HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE 1
RT	reverse transcription
SCF	SKP1-CULLIN-F-box
SD	standard deviation
SEM	scanning electron microscopy
SKP1	S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 1
SYPI3	SYNTAXIN OF PLANT13
TAA	TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1
Tak-1	Takaragaike-1
Tak-2	Takaragaike-2
TAR	TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE-RELATED
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
TMK1	TRANSMEMBRANE KINASE 1
TPL	TOPLESS
TPM	transcripts per million
WT	wild-type
YUC	YUCCA

## 緒言

陸上植物は単一の共通祖先から派生した単系統群である。陸上植物の共通祖先は、約5億年前に車軸藻植物から分岐した後 (Morris et al. 2018)、植物ホルモンや転写因子などの新規生理調節機構を増加させ、三次元的なボディープラン (体制)や複相の孢子体世代といった形質を確立した (Bowman et al. 2017; Bowman et al. 2019)。これらの特徴は共有派生形質として今日まで受け継がれている。現生陸上植物ではコケ植物と維管束植物の共通祖先が最も早期に分岐しており、維管束植物の中ではまず小葉植物が、次いでシダ植物と種子植物が分岐した。進化的に離れた分類群同士の比較分析により、陸上植物に普遍的な発生原理の解明が期待される。

三次元的な体制は、内外層の分離による乾燥耐性や目的に応じた効率的な形状の器官形成など、植物の繁栄に大きく寄与した。細胞壁によって細胞移動が制限される植物では、三次元的に秩序だった発生を行うには、細胞間の協調的な分化に加え、適切な方向への細胞供給も必須となる。細胞供給の起点となる幹細胞は主として頂端部に位置しており、幹細胞数は進化と共に増加してきた。複数の幹細胞を有する被子植物では、その娘細胞は親細胞の系譜によらず位置情報を与えるシグナル分子に応じて分化し器官形成する。一方コケ植物では、幹細胞は単一の頂端幹細胞であり (Moody et al. 2020)、娘細胞の位置は分裂方向によって規定されるため、器官形成における局所的シグナルの寄与は不明な点が多い。

コケ植物はツノゴケ類、蘚類、苔類からなる単系統群である (Nishiyama et al. 2004; Cox et al. 2014; Wickett et al. 2014; Puttick et al. 2018)。コケ植物の共有派生形質は配偶体優勢の生活環である (Shimamura 2016; Rensing et al. 2020; Frangedakis et al. 2021)。発芽した孢子はまず原系体ないし孢子発芽体となり、その後三次元的な体制を築き、ツノゴケ類や葉状性苔類では扁平な葉状体、蘚類や茎葉性苔類では茎葉構造を備えた茎葉体となる。葉状体や茎葉体では生殖器官を形成して生殖細胞が分化し、有性生殖により配偶体上に孢子体を生じる。孢子体は脚部、蒴柄 (または介在メリステム)、孢子形成組織から成り (Ligrone et al. 2012)、減数分裂によって孢子を生じる。

本研究では、苔類ゼニゴケをモデルとして三次元的な器官形成における細胞系譜の寄与を解析した。また、被子植物で移動性シグナル分子として作用するオーキシシンに着目し、受容体ホモログの分子機能解析と三次元的な発生における生理機能を解析した。

第一章では、少数の細胞を遺伝的に標識するクローナル解析の実験系を立上げ、細胞系譜と器官形成の関係を解析した。発生初期に標識処理を行った後に十分な期間培養したところ、しばしば植物体が標識細胞と非標識細胞で縦断される様子が観られた。標識領域の境界部を詳細に観察したところ、同化器官である気室や無性繁殖体の生産を担う杯状体は標識細胞と非標識細胞の一方あるいは両方で構成されることを発見した。この結果から、これら背側器官は細胞系譜を跨いで形成されると結論付けた。また、気室や杯状体における標識細胞と非標識細胞の割合からこれらの発生的な起源についても検討を加えた。

第二章ではモルフォゲンとして作用する植物ホルモンオーキシンに着目し、特に信号伝達の起点となる受容体 TIR1/AFB の機能を詳細に解析した。まず、ゼニゴケ唯一の TIR1/AFB ホモログ MpTIR1 がオーキシン受容体としての機能を有することを実験的に示した。次いで MpTIR1 ノックアウト (KO)植物や条件的 KO (conditional KO; CKO)植物を作出し、MpTIR1 は体軸の確立や秩序だった発生に必須であることを示した。さらに KO 植物のトランスクリプトーム解析により MpTIR1 は細胞の分化において重要な機能を果たすことを示した。これらの結果から、MpTIR1 を介したオーキシン信号伝達は幹細胞の形成と維持を制御する一方で器官分化をも制御し、配偶体世代においても三次元的な発生に必須の機能を担うと結論した。

## 第一章

苔類ゼニゴケの背側器官形成は  
位置情報により制御される

## 序論

### 頂端成長

陸上植物は頂端部の幹細胞領域を起点に頂端成長する。陸上植物の三次元的な体制の起源と進化は、幹細胞や頂端部の機能変化と密接に関係している (Harrison 2017; Moody 2020)。種子植物は多細胞からなるメリステムを (Korn 2001, 2002; Poethig 1987; Poethig and Szymkowiak 1995)、シダ植物や小葉植物は一細胞ないし二細胞の頂端幹細胞を成長点とする (Harrison and Langdale 2010; Harrison et al. 2007; Sanders et al. 2011)。一方コケ植物は成長点に単一の頂端幹細胞を有し、その形状と分裂面制御によって器官配置ならびに体制が規定される (図 1-1A, 1-2A; Harrison et al. 2009; Parihar 1967)。頂端幹細胞から切出されたある娘細胞を起源とするクローン細胞集団をメロファイトと称する。頂端幹細胞からは規則的に娘細胞が切出されるため、コケ植物の植物体はメロファイトが積み重なった構造をとる (Douin 1925; Gifford 1983; Korn 1993)。蘚類や茎葉性苔類では、一メロファイト内に一葉および表皮や柔組織が形成される (図 1-1B, C; Crandall-Stotler 1980; Harrison et al. 2009; Parihar 1967; Ruhland 1924)。すなわち、器官形成はメロファイトという系譜を一にする細胞集団内において起こり、メロファイトがシュートを構成する繰返し構造の基本単位となっている。一方、葉状性苔類は茎と葉の構造を欠く扁平な体制をとり (Crandall-Stotler 1981; Shimamura 2016)、その器官形成におけるメロファイトの寄与は不明であった。

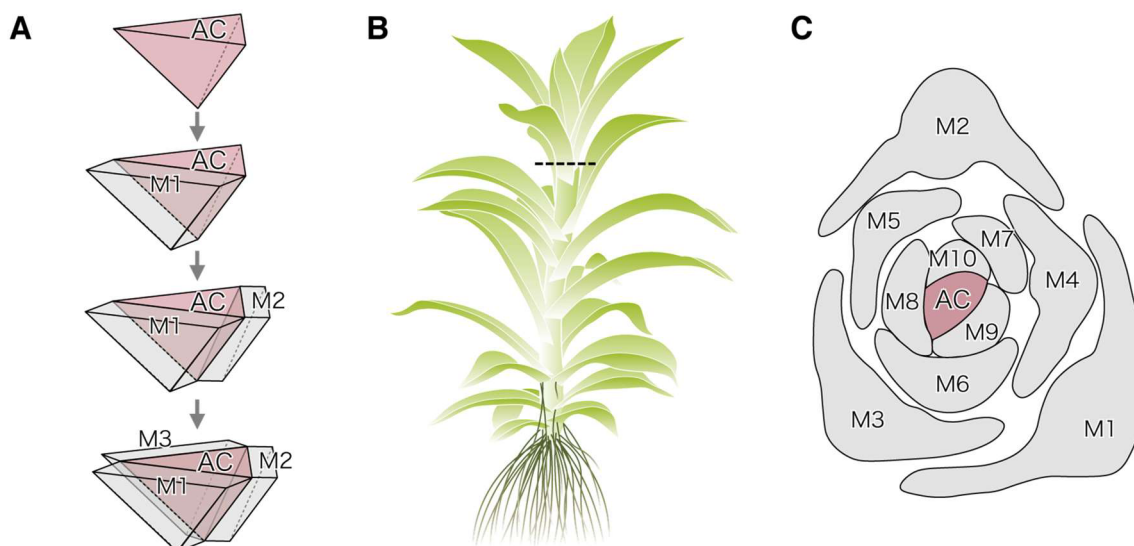


図 1-1. 蘚類における頂端成長

(A) 蘚類の茎葉体頂端幹細胞の模式図。四面体状の頂端幹細胞は三方向へ娘細胞を切出す。  
(B, C) 茎葉体 (B)と茎葉体の頂端幹細胞を含む横断面 (B 点線部)の模式図 (C)。メロファイトごとに一枚の葉が生じる。AC: 頂端幹細胞。M1-M10: 頂端幹細胞の娘細胞またはメロファイト (古い順に番号を割当てた)。Cは Crandall-Stotler 1980 を元に再描画。

## 苔類ゼニゴケの生活環

苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.)は配偶体優勢の生活環を有する。胞子は発芽してすぐに不等分裂して大小の二細胞を生じる。小細胞が仮根に分化する一方、大細胞は無秩序に分裂し、新たな仮根を生じつつ胞子発芽体 (sporelings)と呼ばれる細胞塊を成す。胞子発芽体ではやがて頂端幹細胞が確立され、葉状体へと成長する。葉状体は成長点である先端の湾入部 (ノッチ)から雄または雌の生殖器托を生じる。生殖器托は柄と傘から成り、雄器托の傘部 (雄器床)では造精器が発生して精子が、雌器托の傘部 (雌器托)では造卵器が発生して卵がつけられる。受精後、雌器床において脚、蒴柄、胞子形成組織からなる胞子体が発生し、減数分裂を経て胞子が生産される。有性繁殖のほか、ノッチを欠く組織からの葉状体再生 (Vöchting 1885; Nishihama et al. 2015)や、葉状体背側の杯状体で生産される無性芽による無性的な増殖も見られる。無性芽は扁平な楕円盤状の多細胞体であり、短軸端の一方には未成熟時に母体との連結を担った柄細胞の接続痕が、両長軸端には頂端幹細胞を備えた湾入部ノッチが見られる (図 1-2B; Shimamura 2016)。

## 葉状体背側器官

ゼニゴケの基本的な体制は扁平な匍匐性の葉状体であり、成長点である先端のノッチ基部に頂端幹細胞を有する。頂端幹細胞は楔型であり、背側・腹側・左右側方の四面にメロファイトを切出す (図 1-2A; Shimamura 2016)。葉状体はノッチを起点とする二叉分枝を繰返して成長する (図 1-3A, B; Shimamura 2016; Solly et al. 2017)。ここでは、ある分枝から次の分枝までをプラストクロンと称することとする。第 1 プラストクロンは発芽した無性芽が最初に分枝するまでの期間を指し、その後第 2、第 3 プラストクロンと二叉分枝を繰返す度にノッチ数は倍増する (図 1-3A; Solly et al. 2017)。葉状体背側には同化器官の気室と無性繁殖器官の杯状体が認められる (図 1-3B-D)。気室の形成時には、頂端幹細胞付近の表皮細胞間に初期間隙が生じ、屋根細胞と壁細胞からなる内腔が発達する。初期間隙を囲む細胞は外界と内腔を繋ぐ気室孔となる (図 1-3E; Apostolakos et al. 1982, Ishizaki et al. 2013b)。 *M. paleacea* ではほとんど全ての表皮細胞の交叉点に初期間隙が認められることから、Apostolakos らは気室は特定の母細胞を持たず初期間隙を囲む細胞が基となり生じると結論した (Apostolakos et al. 1982)。しかし、その直接的な証拠は得られていない。気室とは対照的に、杯状体は頂端幹細胞から背側へ数細胞離れた位置に原基が形成され (Barnes and Land 1908)、背面メロファイトの寄与が示唆される (図 1-3F)。しかし、杯状体が背面メロファイトのみから生じるのか側方メロファイトの背側細胞も含まれるのかは不明である。

背側器官の発生的起源が不明な要因として、連続的な発生過程の一時点を切取って観る形態学的・解剖学的観察上の制約と、発達した組織でのメロファイト境界識別の難しさが挙げられる。そこで本研究では、細胞系譜を標識するクローナル解析 (Poethig 1987)の手法を採った。本研究ではゼニゴケにおけるクローナル解析系を立上げ、気室と杯状体はともにメロファイトの境界を跨いで形成されることを示した。



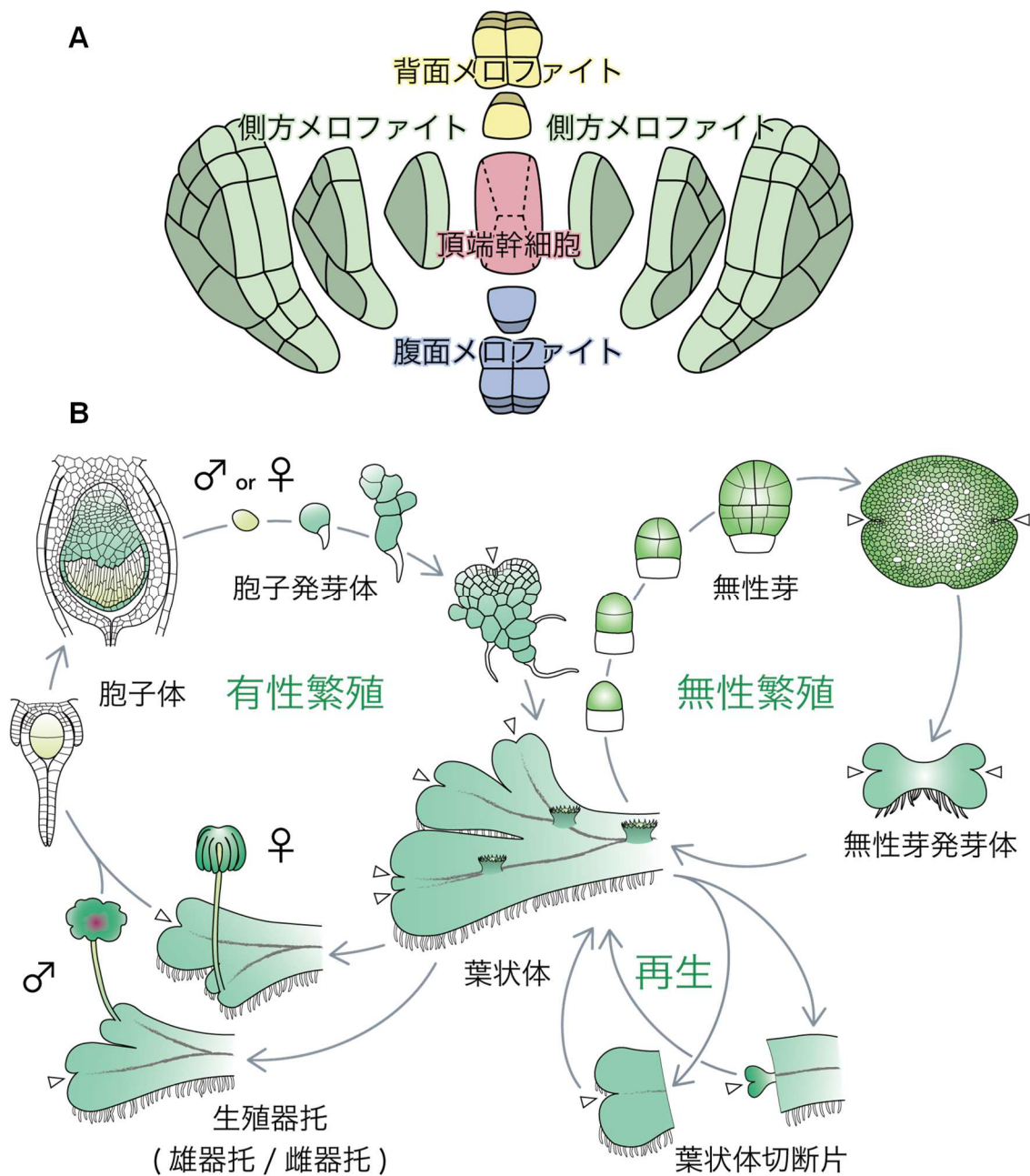


図 1-2. ゼニゴケの頂端成長

(A) ゼニゴケの葉状体頂端幹細胞模式図。楔型の頂端幹細胞は背腹側方の四方向へ娘細胞を切出す。広島大学 嶋村正樹准教授による模式図を一部修正。(B) ゼニゴケの生活環の模式図。詳細は本文を参照。Suzuki et al. 2021 より改図。矢尻は頂端ノッチを示す。

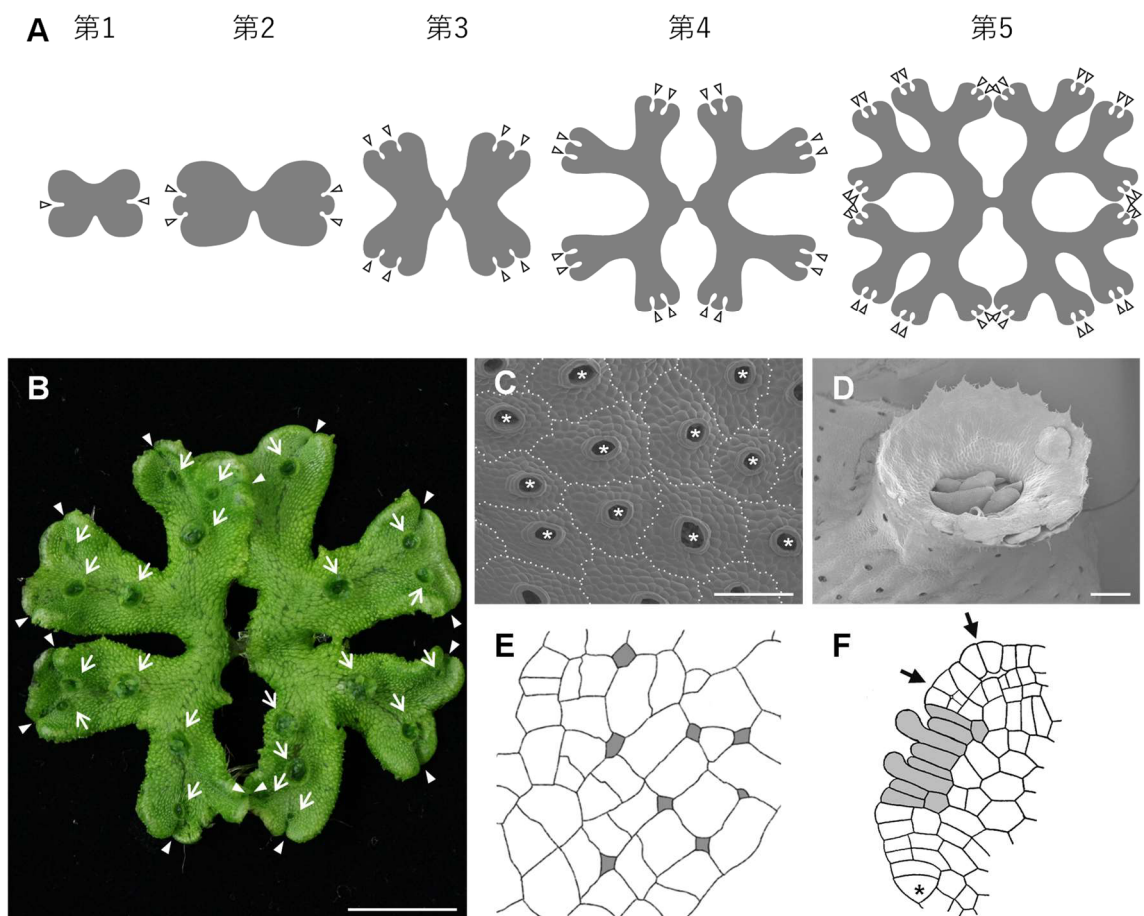


図 1-3. 葉状体の分枝と背側器官

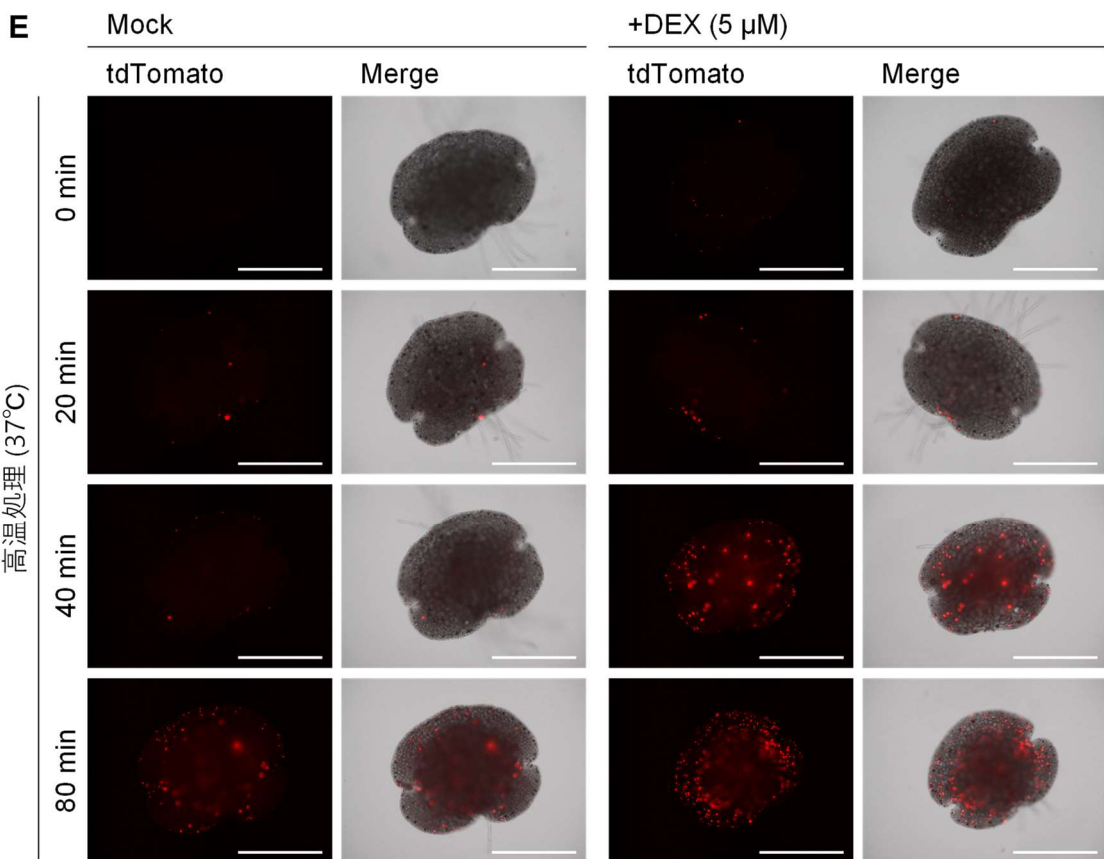
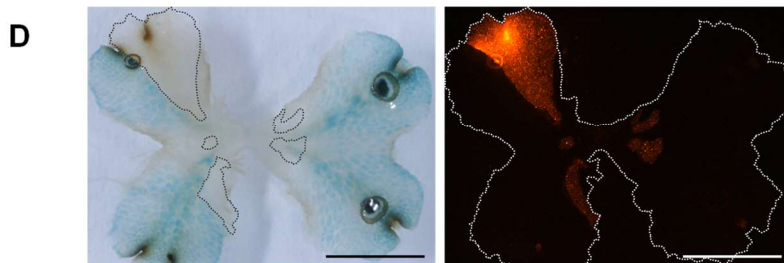
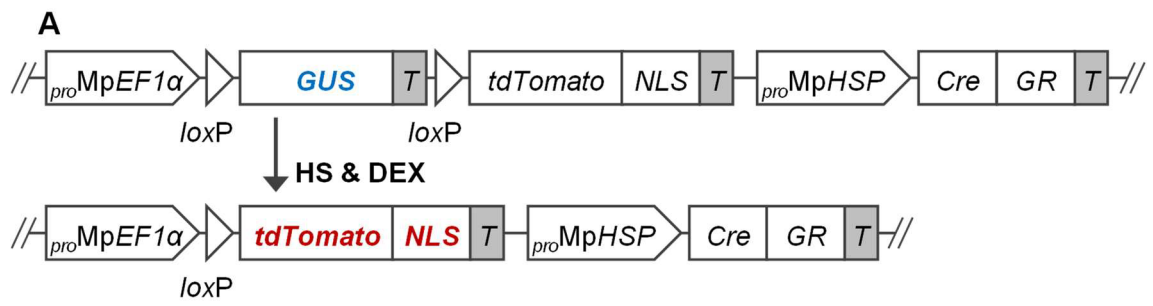
(A) 第  $n$  プラストクロンにおける葉状体の模式図。矢尻は頂端ノッチを示す。(B) 21日齢 (第4 プラストクロン)の葉状体。矢尻は頂端ノッチ、矢印は杯状体を示す。Bar: 5 mm。(C) 葉状体背側表面の走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscopy; SEM)画像。点線は気室の境界、アスタリスクは気室孔を示す。Bar: 200  $\mu$ m。(D) 杯状体の SEM 画像。Bar: 500  $\mu$ m。(E) 表皮細胞間における気室初期間隙の模式図 (灰色の塗潰し部分)。Apostolakos et al. 1982 を元に再描画。(F) 葉状体頂端ノッチにおける垂直縦断面の模式図。アスタリスクは頂端幹細胞、灰色の塗潰し部は杯状体原基、矢印は未成熟な気室を示す。Barnes and Land 1908 を元に再描画。ただし、Barnes と Land は各気室には母細胞が存在することを提唱しており (Barnes and Land 1907)、そのように描画されている点に留意のこと。

## 結果

### クローナル解析系の確立

葉状体背側器官の発生様式を解明するため、Cre-loxP 部位特異的組換えによる誘導欠損ベクタ (Nishihama et al. 2016)を用いたクローナル解析系を確立した。使用したベクタでは、非誘導時には *ELONGATION FACTOR 1a* (*MpEF1a*)プロモータ制御下で  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*)遺伝子を発現している。*GUS* 遺伝子は loxP 配列に挟まれており、Cre-loxP 部位特異的組換えによってゲノム中から切除され、代わって *MpEF1a* プロモータ制御下で nuclear localization signal (NLS)配列を融合した *tdTomato* 遺伝子 *tdTomato-NLS* が転写される。当該ベクタにはグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor; GR)を融合した *Cre* 遺伝子 *Cre-GR* も *HEAT-SHOCK PROTEIN 17.8A* (*MpHSP*)プロモータ制御下に組込まれており、高温処理で転写誘導される。また、*Cre-GR* 融合タンパク質は通常は細胞質に局在しており、デキサメタゾン (dexamethasone; DEX)を投与すると核内へ移行する。すなわち、当該ベクタでは高温処理・DEX 処理によって *Cre-loxP* 部位特異的組換えが誘導され、*tdTomato-NLS* が恒常的に発現する (図 1-4A; Sugano et al. 2018)。使用されたベクタの名称 pMpGWB337tdTN に因み、当該ベクタを導入した植物体をここでは「337tdTN-GUS 株」と表記する。337tdTN-GUS 株を用いることで、*tdTomato* 蛍光によって正に、*GUS* 染色の不在によって負に、組換えが誘導された細胞に由来する系譜からなるセクタが可視化された (図 1-4B, D)。

クローナル解析では、様々な発生段階において無作為に少数の細胞を標識し、十分な期間をおいた後に標識細胞とその娘細胞群からなるセクタを観察する。細胞を標識する頻度が過度に少ないと解析に十分なデータを得られず、逆に頻度が高すぎると複数のセクタが同時かつ連続的に生じて判別不能となる。そこでまず、至適な誘導条件の検討を行った。337tdTN-GUS 株の無性芽を寒天培地に摘播し、溶媒コントロール溶液または 5  $\mu$ M DEX 溶液 3  $\mu$ L を滴下して水滴が消失するまで数分間風乾し、37°C気相インキュベータにおいて異なる時間の高温処理を行った。以上の誘導処理後に通常の培養条件下で 24 時間培養した後蛍光を観察した (図 1-4C)。その結果、DEX 未処理かつ高温未処理の個体では蛍光を示す細胞は見られなかった。一方、DEX 処理後に 80 分間の高温処理を行った個体では非常に多くの細胞で蛍光が認められた。蛍光を示す細胞の頻度は高温処理時間が長くなるにつれて増加し、その傾向は DEX 処理群でより顕著であった (図 1-4C, E)。上で述べた必要条件を満たす程度の誘導頻度は、DEX 処理後 40 分の高温処理を行った個体で認められた。よって以降の解析では、特に記載のない限り、無性芽を摘播して 5  $\mu$ M DEX 溶液 3  $\mu$ L を滴下し、数分間風乾した後に 37°Cにて 30–40 分の高温処理を行った。



#### 図 1-4. ゼニゴケにおけるクローナル解析系

(A) クローナル解析に用いたコンストラクトの模式図。通常状態 (上段)では、*tdTomato-NLS* は上流のターミネータにより転写されない。高温処理 (Heat shock; HS)および DEX 処理により Cre-*loxP* 部位特異的組換えによる *loxP* 間配列の切除が誘導され (下段)、*tdTomato-NLS* が恒常的に発現する。T: NOS ターミネータ。(B, C) 誘導処理・観察日時々の模式図。D では 0 日齢の無性芽を高温処理・DEX 処理し、14 日間培養した (B)。E では 0 日齢の無性芽を高温処理・DEX 処理し、1 日間培養した (C)。(D) 14 日齢葉状体における GUS 活性の欠落 (左)と *tdTomato* 蛍光 (右)による相補的セクタ。左図の灰点線領域はおおよそその *tdTomato* 発現領域を、右図の白点線領域は葉状体輪郭を示す。Bars: 5 mm。(E) 異なる処理条件における誘導効率。無性芽を mock または DEX 処理して 37°Cにて 0、20、40、80 分間高温処理した。Bars: 500  $\mu$ m。

#### 側方メロファイトに起源する葉状体縦断セクタの形成が観られた

前項の手順により 337*tdTN-GUS* 株の無性芽に誘導処理を行ったところ (図 1-5A, B)、その後の成長に伴い多様なパターンのセクタ形成が認められた。しばしば基部から頂端ノッチにかけて葉状体を縦断するセクタが観察された (図 1-5C)。葉状体縦断セクタは背側から腹側細胞までにわたり、明瞭な境界を呈した (図 1-5D)。また葉状体縦断セクタは複数回の分枝を経てもノッチに隣接して維持されており (図 1-5E)、側方メロファイトに起源するものと考えられた。他の種におけるメロファイトを起源とするセクタは Harrison et al. 2007; Harrison et al. 2009; Sanders et al. 2011 を参照されたい。

なお、複数回の独立な試行において、第一分枝時点で葉状体縦断セクタが生じた割合は 37.1% (89/240)、25.8% (61/236)、21.3% (32/150)、14.2% (17/120)、10.4% (5/48)、7.70% (37/480) であった (括弧内の数値は“葉状体縦断セクタ/誘導処理した無性芽の総ノッチ数”を示す)。誘導条件を揃えても実験群によってばらつきが大きいことから、誘導条件だけでなく、使用された無性芽の状態や室温等の環境要因も誘導頻度に影響した可能性がある。

#### 気室はメロファイトの細胞系譜を跨いで形成され得る

葉状体縦断セクタの *tdTomato* 発現細胞と非発現細胞の境界部における気室を観察した (図 1-6A, B)。その結果、気室の境界がセクタ境界と一致するものが全体の半数を占めていた (図 1-6C, D)。その一方で、セクタ境界によって分断された気室も観察された (図 1-6C)。後者のうち、多くの場合セクタ境界は気室孔の中心を通過していたが、中心から外れた位置で気室孔を通過する事例も見られた。また、セクタ境界が気室孔から外れた位置で気室を通過した事例は稀であった (図 1-6D)。発生初期の気室でも、セクタと境界が一致したものとセクタによって分断されたものが認められた (図 1-6E, F)。これらの観察結果から、気室はメロファイト内とメロファイト間の両方で形成されることが示唆された (図 1-9 参照)。



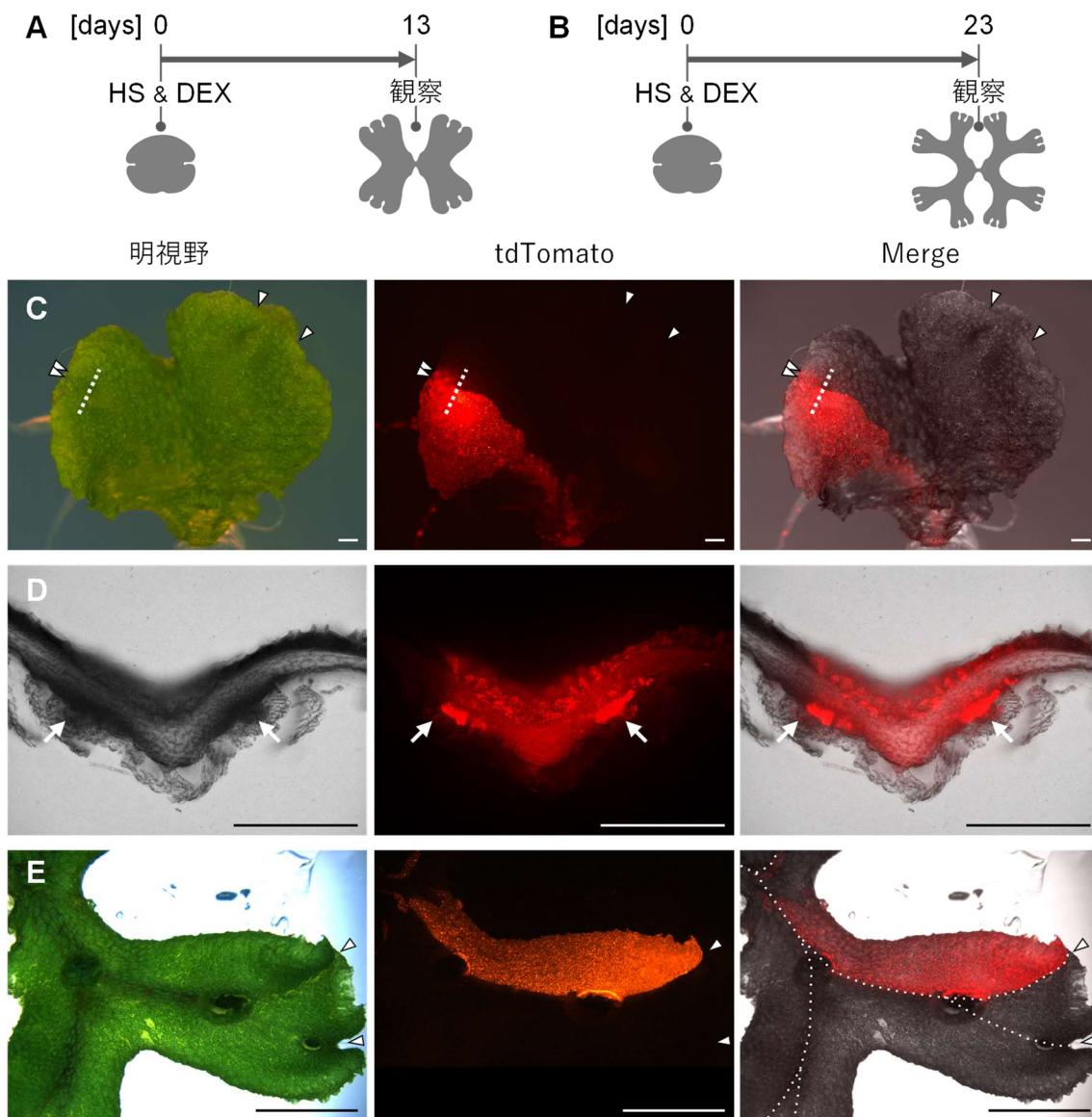


図 1-5. 葉状体縦断セクタの観察

(A, B) 誘導処理・観察日時の様式図。0 日齢の無性芽を高温処理・DEX 処理し、C では 13 日間 (A)、E では 23 日間 (B) 培養した。(C, D) 13 日齢葉状体 (第 3 プラストクロン) における葉状体縦断セクタ (C) とその垂直横断面画像 (D)。矢尻は頂端ノッチ、矢印は中肋の位置、白点線はおおよその横断面観察部位を示す。Bars: 500  $\mu$ m。(E) 23 日齢葉状体 (第 4 プラストクロン) における葉状体縦断セクタ。矢尻は頂端ノッチ、点線は中肋を示す。Bars: 5 mm。

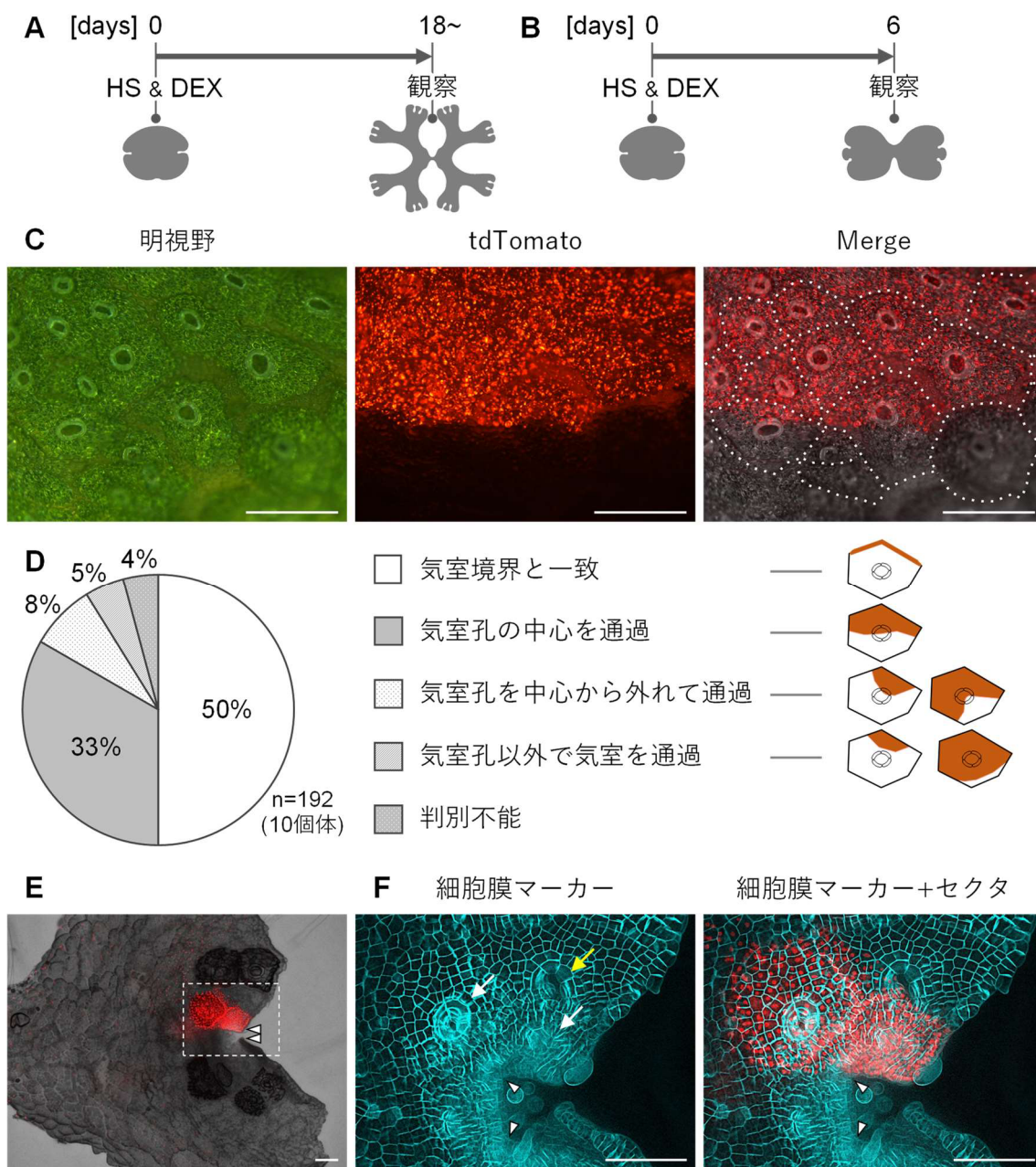


図 1-6. 葉状体縦断セクタ上に形成された気室の観察

(A, B) 誘導処理・観察日時の模式図。0日齢の無性芽を高温処理・DEX処理し、CとDでは18日以上(A)、EとFでは6日間(B)培養した。(C) 葉状体背側表皮におけるセクタ境界領域。点線は気室の境界を示す。Bar: 500  $\mu$ m。(D) セクタ境界と気室の位置関係の割合。10個体に由来する192個の気室を観察。(E, F) 6日齢葉状体(第2プラストクロン)におけるノッチ隣接セクタ。FはE点線内領域の高倍率観察。細胞膜マーカーとして、N末端側に蛍光タンパク質 mTurquoise2 を融合した SYNTAXIN OF PLANT13 (MpSYP13B; Kanazawa et al. 2016) を MpSYP13B プロモータ制御下で発現させた。矢尻は頂端ノッチ、白矢印はセクタ領域内に形成された気室孔、黄矢印はセクタ領域を跨いで形成された気室孔を示す。Bars: 100  $\mu$ m。

## 杯状体は複数細胞系譜を跨いで形成され得る

葉状体縦断セクタ上で第2-第4プラストクロンに形成された杯状体を観察した (図 1-7A, B; Solly et al. 2017)。その結果、杯状体もセクタ境界によって分断される様子が観られ、しばしば tdTomato 発現細胞からなる無性芽と非発現細胞からなる無性芽とが同一の杯状体内に混在していた (図 1-7C)。杯状体の横断切片を作成して観察したところ、杯状体の壁部だけでなく無性芽始原細胞を有する底部細胞も葉状体縦断セクタによって分断されている様子が観察された (図 1-7D)。これらの結果から、杯状体は単一のメロファイトに起源するのではなく、複数のメロファイトの細胞から協調的に形成されることが示唆された。杯状体における tdTomato 発現細胞と非発現細胞の割合を調べたところ、杯状体形成時期に応じて異なる結果となった。第2および第4プラストクロンに形成された杯状体では tdTomato 発現細胞の寄与は 0-100% でばらついていたのに対し、第3プラストクロンに形成された杯状体では tdTomato 発現細胞の寄与度は概ね 50% であった (図 1-7E)。これらの結果から、杯状体は側方メロファイト派生細胞を含む二細胞以上から形成されること、いずれの細胞が杯状体を構成するかという点において葉状体分枝のタイミングが何らかの影響を及ぼし得ること、杯状体形成には局所的なシグナルが重要であることが示唆された。

杯状体始原細胞は頂端幹細胞から数細胞背側に認められる (Barnes and Land 1908)。この観察結果から背面メロファイトが杯状体形成に寄与すると考えられるものの、実験的な裏付けはない。そこで、背面メロファイト由来のセクタに着目した観察を行った。第1プラストクロンでは杯状体が形成されないため (図 1-7A)、第2プラストクロンの8日齢葉状体に対して誘導処理を行った (図 1-8A)。その結果、数細胞幅で中肋に沿った線状セクタが第3プラストクロンの葉状体背側に認められた。こうした線状セクタは、tdTomato 発現細胞が背側細胞でのみ見られたことから (図 1-8B, C)、背面メロファイトに起因するものと考えられた。線状セクタと一部重複した位置に形成された杯状体も観察されたが、その横断切片を見ると tdTomato 発現細胞は杯状体底部細胞の一部に見られる程度であり (図 1-8B, D)、杯状体形成における背面メロファイトの寄与は比較的小さいことが示唆された。以上の観察結果から、杯状体は背面メロファイトと側方メロファイトの背側派生細胞から発生することが示唆された (図 1-9 参照)。



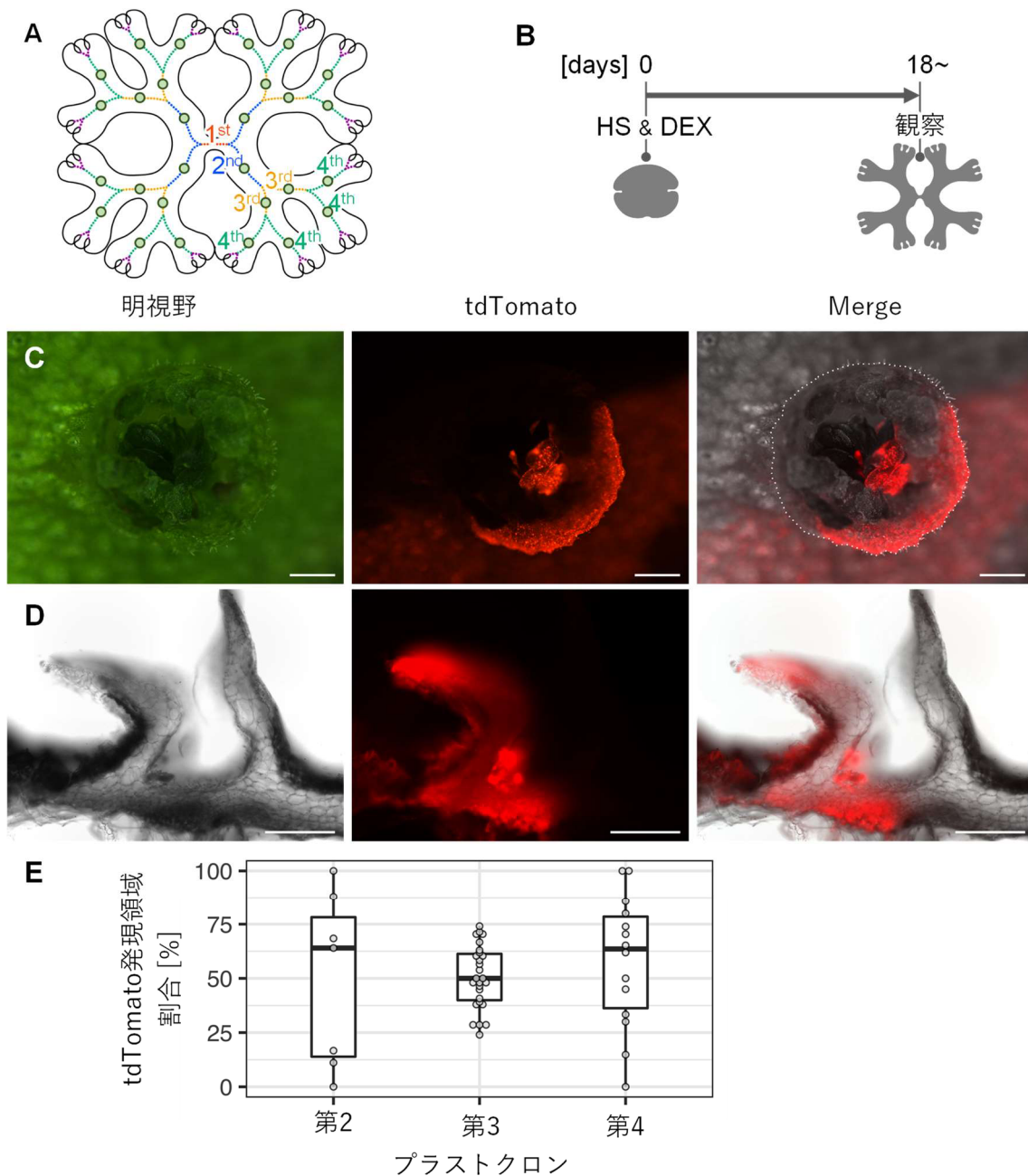


図 1-7. 葉状体縦断セクタ上に形成された杯状体の観察

(A) プラストクロンと杯状体の位置関係。円は杯状体を、色線はプラストクロンの段階を示す。第1プラストクロンでの杯状体形成は見られなかった。(B) C-E における誘導処理・観察日時の模式図。0日齢の無性芽を高温処理・DEX処理し、18日以上培養した。(C) 葉状体縦断セクタ上に形成された杯状体。点線は杯状体の輪郭を示す。Bars: 500  $\mu$ m。(D) 葉状体縦断セクタ上に形成された杯状体の垂直横断面。Bars: 500  $\mu$ m。(E) 葉状体縦断セクタ上の杯状体における tdTomato 発現領域の割合の箱ひげ図。プラストクロン毎に集計。箱は第一から第三四分位点の範囲を、箱内の線は中央値を示す。点は個別の観測値を示す。

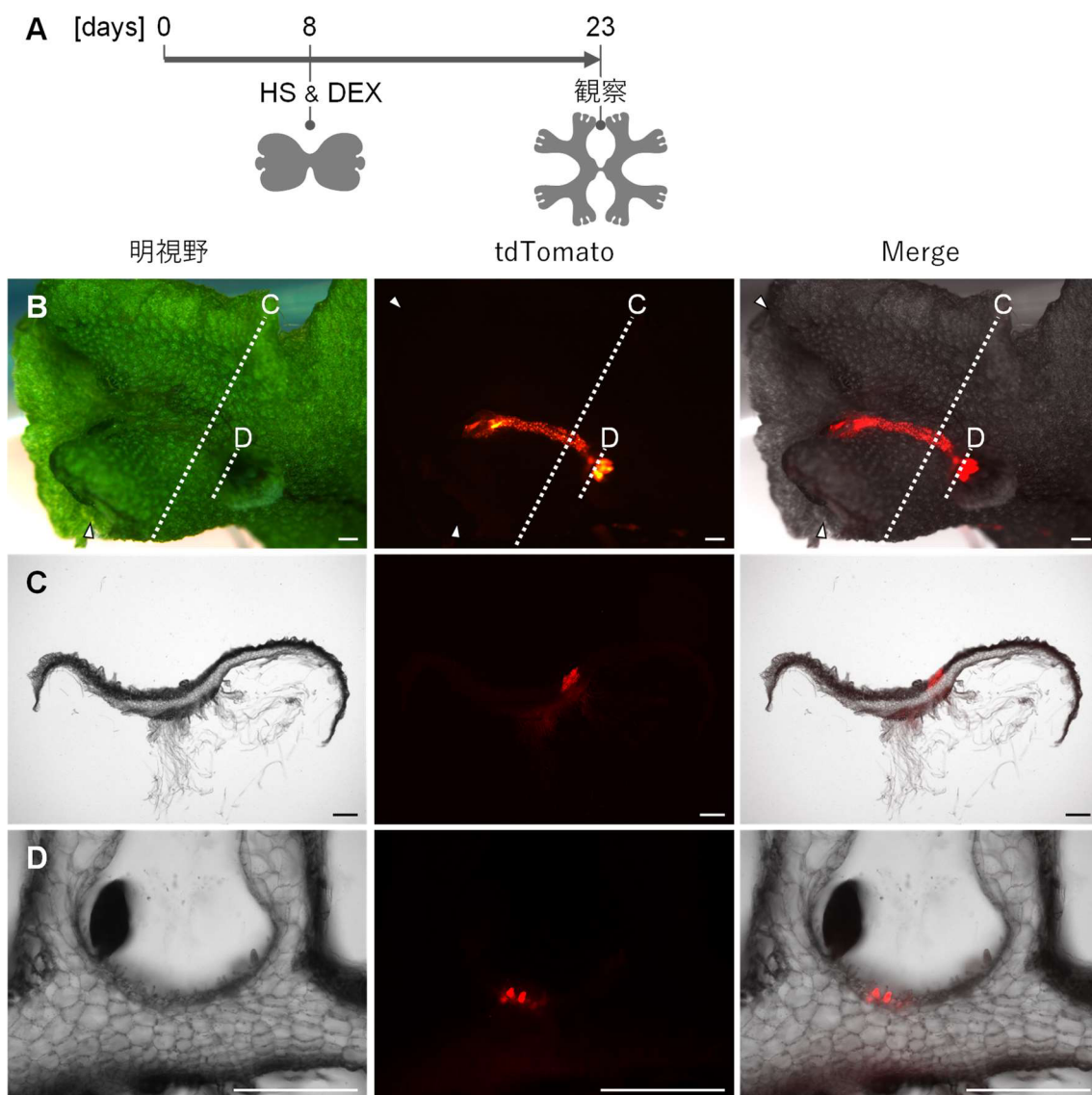


図 1-8. 背面メロファイトセクタ上に形成された杯状体の観察

(A) B-D における誘導処理・観察日時の模式図。8 日齢の葉状体を高温処理・DEX 処理し、その後 15 日間培養した。(B-D) 23 日齢葉状体 (第 3 プラストクロン) における杯状体を含む線状セクタ。Bars: 500  $\mu$ m。矢尻は頂端ノッチを示す。C と D は B に描画した点線部の垂直横断面の観察。

## 考察

### ゼニゴケ背側器官の発生は局所的なシグナルによって制御される

成熟無性芽における *Cre-loxP* 誘導とその後の成長によって、しばしば葉状体を縦断するセクタが生じ、複数回の分枝を経ても維持された。こうした葉状体縦断セクタは、側方メロファイトや頂端幹細胞で *Cre-loxP* 組換えが生じたものと考えられる。

気室は頂端幹細胞近傍で表皮細胞の交叉点に生じる細胞間隙を起点として発生し、初期間隙を囲む細胞は気室孔細胞へと発達する (Apostolakos et al. 1982)。本研究では、葉状体縦断セクタ上の気室が *tdTomato* 発現細胞と非発現細胞から構成される様子が観察された (図 1-6)。この結果は、気室が特定の母細胞から発生するのではなく、ノッチにおいて局所的なシグナルを受けて細胞系譜非依存的に発生することを示唆している (図 8)。さらに、葉状体縦断セクタが気室を分断する際、大多数は気室孔細胞を通過していたことから (図 1-6D)、気室を構成する細胞は初期間隙を囲む細胞に由来することが示唆される。

葉状体縦断セクタ上では、杯状体も *tdTomato* 発現細胞と非発現細胞から構成される様子が観られた (図 1-7)。この結果は、杯状体も単一の始原細胞から発生するのではなく、局所的なシグナルによって制御されることを示唆している。また、葉状体縦断セクタの境界が側方メロファイトの境界に一致すると考えられること、背面メロファイトも杯状体に寄与すること (図 1-8)を考慮すると、杯状体は側方メロファイトと背面メロファイトの細胞から構成されることが示唆される (図 1-9)。葉状体縦断セクタの境界部に形成された杯状体では、第 3 プラستクロンでは *tdTomato* 発現領域の割合は概ね 50%であったが、第 2・第 4 プラستクロンでは 0-100%でばらついていて (図 1-7E)。この結果は、杯状体を構成する側方メロファイト細胞と背面メロファイト細胞の割合が一定ではないことを示唆している。その要因として、杯状体形成シグナルの局在や細胞のシグナル応答性のため、杯状体分化を運命づけられる細胞の位置が変化しやすいことが考えられる。また杯状体分化が運命づけられた後にも、分裂の方向や頻度の違いから元の細胞の位置や系譜によって杯状体に寄与する割合が変わることも考えられる。しかし、プラストクロンによって差が生じた理由は不明であり、分枝が杯状体形成にどのように影響するか、さらなる理解が求められる。解釈を困難にしている要因の一つに、杯状体形成とその前後の分枝の間隔が一定か不明であることが挙げられる。本研究ではプラストクロン毎に一つの杯状体しか見られなかったが、培養条件や遺伝的操作によってはプラストクロン毎に複数の杯状体が生じ得る。同じ葉状体縦断セクタ上で同じにプラストクロンに生じた杯状体同士を比較できれば、分枝が杯状体形成に与える影響を理解する一助になると期待される。近年、R2R3-MYB 転写因子 GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1 (*GCAM1*)が杯状体形成に必須の機能を担うことが報告された (Yasui et al, 2019)。*GCAM1* 遺伝子はノッチや杯状体底部で発現しており、頂端幹細胞近傍の背側細胞を未分化な状態に維持することで杯状体形成を調節することが示唆されている (Yasui et al, 2019; Kato et al. 2020b)。側方・背面メロファイトの差異に留意して *GCAM1* の初

期発現パターンを解析することで、杯状体形成についてより詳細な理解が得られると期待される。

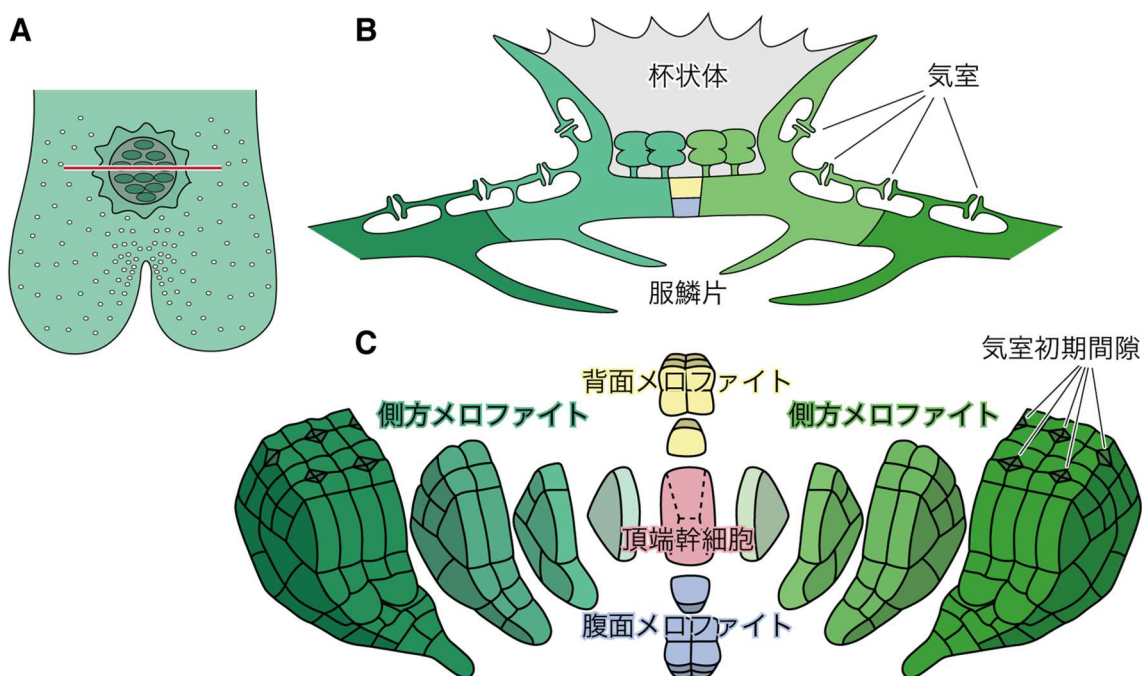


図 1-9. ゼニゴケの葉状体背側器官形成における細胞系譜モデル

(A) 葉状体背面の模式図。(B, C) 葉状体発生における細胞系譜の模式図。B は A 赤線部における垂直横断面を示す。赤、黄、青、各種緑で描画した組織・細胞は頂端幹細胞、背側メロファイト、腹側メロファイト、側方メロファイトを示す。本図は広島大学 嶋村正樹准教授に描画された模式図を元に、一部修正した。

位置情報に基づく細胞運命決定が複雑葉状性苔類の多様な器官形成に寄与した  
維管束植物では、組織や器官の分化は局所的なシグナルによる運命決定で規定される (Kidner et al. 2000; Reinhardt et al. 2005; Scheres 2001; Scheres et al. 1994; Sussex 1951, 1954; van den Berg et al. 1995)。細胞に位置情報を与える要因として、動物の発生ではモルフォゲンの濃度勾配が挙げられる。被子植物では植物ホルモンオーキシシンがモルフォゲン様に作用することが知られ、極性輸送等によるオーキシシンの局所的ピークによって葉や側根などの器官形成領域が規定される。茎頂分裂組織の外衣 (tunica) や内体 (corpus) といった層構造や根の放射組織に見られるように、細胞系譜も組織形成に寄与しているものの、多くは層間での細胞間コミュニケーションによってアイデンティティを維持している。ゼニゴケでも、核オーキシシン信号伝達は無性芽発生過程の分裂パターンや体軸形成を制御するなど、発生に重要な役割を担っている (次章; Kato et al. 2017)。本研究で明らかにされたメロファイトを跨いだ器官形成機構は、ゼニゴケでも被子植物と同様に局所的シグナルを介した細胞運命決

定が行われることを示唆している。そのため、位置情報依存的な器官形成の分子機構は、陸上植物の共通祖先で確立された、あるいは進化上複数回独立に獲得されたことが考えられる。ゼニゴケとは対照的に、茎葉性苔類や蘚類における側方器官形成はメロファイト単位で生じ、組織学的に明確な境界を示す (Crandall-Stotler 1980; Harrison et al. 2009; Parihar 1967; Ruhland 1924)。細胞運命決定様式の変化は、複雑葉状性苔類における形態学的多様性の一端を担ったものと考えられる。

### クローナル解析系の将来的な展望

クローナル解析は、植物発生様式の解明に大きく貢献してきた。セクタ形成の様式は多様であり、コルヒチン処理による倍数化を利用した細胞肥大 (Satina et al. 1940)、無作為ないし高温処理誘導的なトランスポゾン除去による *GUS* レポーター遺伝子の活性化 (Dlan et al. 1994; Kidner et al. 2000; Scheres et al. 1994)、高温処理誘導的な *Cre-loxP* 組換えによる *GUS* レポーター遺伝子の不活化 (Saulsberry et al. 2002)、X 線照射による淡緑色の色素沈着や葉緑体発育障害 (Harrison et al. 2007; Harrison et al. 2009)、斑入り変種の活用 (Sanders et al. 2011) などが挙げられる。本研究では、苔類では初となるゼニゴケのクローナル解析系を確立した。本解析系では任意の成長段階でセクタ形成の誘導が可能である。未発表ではあるが、本稿で報告した以外の器官におけるセクタ形成にも成功しており、苔類の発生様式解明に寄与すると期待される。また、細胞系譜の可視化のみを目的とするのならば、Brainbow (Livet et al. 2007) や Brother of Brainbow (Wachsmann et al. 2011) のように複数の蛍光タンパク質を用いて細胞を多色標識する手法を採ることで、さらなる改良が見込まれる。細胞系譜の解明だけでなく、クローナル解析の手法は特定の細胞種や部位における遺伝子の機能解析への活用も可能である (Heidstra et al. 2004; Sieburth et al. 1998)。本解析系の利点の一つはライブイメージングが可能なことであり、今後さまざまな分子生物学ツール (Ishizaki et al. 2015; Kopschke et al. 2017; Mano et al. 2018; Nishihama et al. 2016; Sugano et al. 2018) との併用で遺伝子機能解析に広く応用されると期待される。

## 材料と方法

### 使用した植物

本章では苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L. subsp. *ruderalis*)の野生型雄株として Takaragaike-1 (Tak-1)を用いた (Chiyoda et al. 2008)。特に記載のない限り、ゼニゴケは2倍希釈した Gamborg's B5 (Gamborg et al. 1968) 1%寒天培地上にて 50–60  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  恒常白色光下、22°Cの条件で培養した。

### プラスミドの作成と形質転換

337tdTN-GUS 株に形質転換したベクタは、LR Clonase II (Thermo Fisher Scientific)を用いた LR 反応によって pMpGWB337tdTN (Sugano et al. 2018)と pENTR-gus (Thermo Fisher Scientific)の組換えを行い作成された。発現ベクタは Kubota et al. 2013 の手順に従い Tak-1 葉状体に形質転換された。

*pro*MpSYPI3B:*mTurquoise2*-MpSYPI3B 発現ベクタは Kanazawa et al. 2016 に倣い、以下の手順で作成した。まず *mTurquoise2* コーディング配列を PCR で増幅した。鋳型には当該配列を有するベクタを、プライマーセットには *mTurquoise2*\_BamHI\_IF\_Fw (CCCCTTCACCGGATCATGGTGTCTAAGGGTGAGGAAC) / *mTurquoise2*\_BamHI\_IF\_Rv (GCTGCCCGCCGGATCCTTGTAAAGCTCATCCATTCCG)を用いた。次に増幅された DNA 断片と BamHI 処理 (タカラバイオ)処理で線形化した *pro*MpSYPI3B:MpSYPI3B エントリーベクタ (基礎生物学研究所 上田貴志教授、金澤建彦助教より分与)を In-Fusion HD Cloning System (タカラバイオ)を用いて連結した。完成した *pro*MpSYPI3B:*mTurquoise2*-MpSYPI3B エントリーベクタを LR 反応で pMpGWB101 (Ishizaki et al. 2015)に導入して発現ベクタとし、Kubota et al. 2013 の手順に従い 337tdTN-GUS 株葉状体に形質転換した。

### クローナル解析

無性芽に対する *Cre-loxP* 部位特異的組換え誘導処理は本章の結果に記載の手順に従って行った。葉状体に対する *Cre-loxP* 部位特異的組換え誘導処理は以下の手順で行った。8日齢葉状体を 5  $\mu\text{M}$  DEX 溶液に浸して吸引浸潤し、寒天培地上に引き揚げて 10–20 分間風乾した。その後 37°C気相インキュベータにて 35–50 分間高温処理した後、通常の培養条件下に戻して引き続き生育させた。

### GUS 活性の組織化学的解析

GUS 染色による *GUS* 遺伝子発現組織の可視化は Ishizaki et al. 2012 に記載された手順に従って行った。

#### 顕微鏡観察ならびに画像の調整

無性芽、1日齢無性芽発芽体、6日齢葉状体、および葉状体切片は、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (キーエンス)を用いて明視野、tdTomato 蛍光および mTurquoise2 蛍光の観察を行った。なお葉状体切断面は、葉状体を 6%寒天中に包埋して LinearSlicer Pro 7 (堂阪イーエム)を用いて ~200  $\mu\text{m}$  厚の切片として観察に供した。取得された画像は、必要に応じて輝度とコントラストを調節したうえで BZ-X Analyzer (キーエンス)を用いてマージした。

葉状体は蛍光実体顕微鏡 M205 C (Leica)を用いて明視野と tdTomato 蛍光の観察を行った。取得された画像は、必要に応じて輝度とコントラストを調節したうえで Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いてマージした。

杯状体における tdTomato 発現細胞と非発現細胞の寄与度は、各領域内にある杯状体縁部の棘の数により評価した。

#### 走査型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡観察には 21 日齢 Tak-1 葉状体を使用し、液体窒素で凍結したサンプルを TM3000 (日立ハイテク)により観察した。

## 第二章

核オーキシン信号伝達は  
ゼニゴケの器官形成に必須である



## 序論

### 植物ホルモンオーキシン

前章では、苔類ゼニゴケが局所的なシグナルにより器官形成を制御することを見た。多細胞生物が三次元的な体制を築くには細胞間コミュニケーションが必須であり、移動性の情報伝達物質による信号伝達が重要である。三次元的な体制は、陸上植物にとって陸上進出の鍵となった共有派生形質である。陸上植物の共通祖先では植物ホルモンによる細胞間連絡機構も複数獲得されており (Bowman et al, 2019)、三次元的な体制の確立に寄与したと考えられる。植物ホルモンオーキシンによる信号伝達は共通祖先で確立された生理調節機構の一つであり、極性輸送による濃度勾配を形成して生理調節を行うことから、植物におけるモルフォゲンであると目される。

オーキシンは苔類でも移動性の生理調節物質として機能する。ゼニゴケではオーキシン indole-3-acetic acid (IAA) や phenylacetic acid (PAA) が検出されており (Löbenberg 1959; Fries 1964; Schneider et al. 1967; Sugawara et al. 2015)、トリプトファンを初発物質に二段階の反応で IAA 生合成を担う indole-3-pyruvic acid (IPyA) 経路も保存されている (Eklund et al. 2015; Kasahara 2016)。ゼニゴケ IPyA 経路の各反応は、TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1/TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE-RELATED (TAA1/TAR) ホモログの MpTAA と YUCCA (YUC) ホモログの MpYUC1-5 (配偶体世代では MpYUC2 のみ発現) によって触媒される。MpTAA、MpYUC2 は葉状体ノッチや杯状体底部で共発現しており、これらの領域が IAA の供給源であると目されている (Eklund et al. 2015)。

ゼニゴケと近縁のミカツキゼニゴケ (*Lumuralia cruciata*) では、葉状体頂端部を切除すると残る基部側で切断面からの葉状体再生や杯状体内にある無性芽の発芽が誘導され、頂端部切除後に基部側切断面から IAA を投与すると再生や無性芽発芽が抑制される (LaRue and Narayannaswami 1957)。これらの結果から、葉状体頂端で生合成された情報伝達物質が基部側へ輸送され生理調節を行うこと、その実体がオーキシンであることが示唆されている (LaRue and Narayannaswami 1957)。実際にゼニゴケの葉状体では、放射性同位体を用いたトレーサー実験により頂端部から基部への IAA 極性輸送が示唆されている (Binns and Maravolo 1972; Maravolo 1976; Gaal et al. 1982)。

オーキシンは、発生的な背景に応じて多様な生理応答を引き起こす。苔類でもオーキシンや各種阻害剤の投与実験、オーキシン生合成遺伝子や後述する信号伝達因子の分子生物学的解析から、生活環を通じて多様な生理調節を担うことが報告されている (Fig. 2-1; Bowman et al. 2016; Kato et al. 2018)。オーキシシグナルを生理応答へ変換する系として、核オーキシン信号伝達 (nuclear auxin signaling; NAS) が知られる。

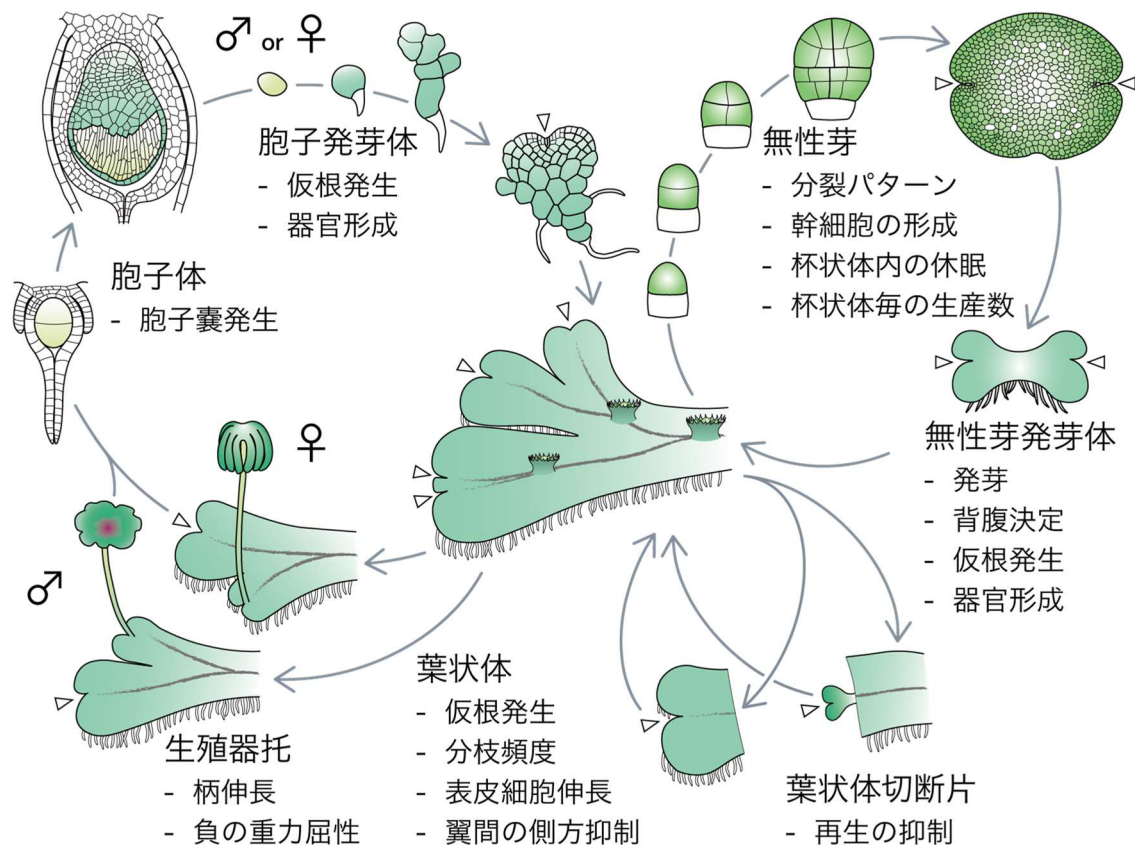


図 2-1. ゼニゴケ生活環を通じたオーキシンによる生理調節

Suzuki et al. 2021 より改図。

### 核オーキシン信号伝達 (nuclear auxin signaling; NAS)

被子植物では、オーキシンは主として NAS によって生理調節を行う。NAS の主要な構成因子は、S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 1 (SKP1)-CULLIN-F-box (SCF)-type E3 ユビキチンリガーゼ複合体の受容体サブユニットである TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/ AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB、転写抑制因子 AUXIN/ INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA)、転写因子 AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)である。オーキシンは、TIR1/AFB の leucine-rich repeat (LRR) ドメイン底部の疎水性の溝を埋め、TIR1/AFB と AUX/IAA の domain II (DII)との相互作用を仲介する (Dharmasiri et al. 2005; Kepinski and Leyser 2005; Tan et al. 2007)。TIR1/AFB と相互作用した AUX/IAA はユビキチン化され、26S プロテアソームにより分解される (Gray et al. 1999; Gray et al. 2001)。一方、低オーキシン条件下で AUX/IAA は、ARF と相互作用しつつ TOPLESS (TPL) コリプレッサーを招集し、ARF 標的遺伝子の転写制御を抑制している (Kim et al. 1997; Korasick et al. 2014; Nanano et al. 2014; Szemenyei et al. 2008, Ulmasov et al. 1999a; 1999b)。すなわち、TIR1/AFB はオーキシン依存的に AUX/IAA の分解を促進することで、ARF による転写調節を亢進する (図 2-2)。

緑色植物における網羅的な分子系統解析から、陸上植物の共通祖先で TIR1/AFB-AUX/IAA 共受容機構が獲得され、既存の ARF 転写制御系にオーキシンによる調節が加わって NAS が確立されたと考えられている (Bowman et al, 2017; Flores-Sandoval et al, 2018a; Flores-Sandoval et al. 2018b; Mutte et al, 2018)。被子植物シロイヌナズナでは、TIR1/AFB ホモログを全て機能欠損すると胚発生時に分裂の遅延と分裂面の異常が見られ、生育可能な種子は得られない (Prigge et al. 2020)。しかし、分裂パターンが TIR1/AFB に直接制御されているのか分裂遅延に伴う二次的な影響であるのかは不明である。また、*tir1/afb* 六重変異は配偶体の生存には必須ではないとされているものの、配偶体優勢の基部陸上植物で同様に生育可能な *tir1/afb* 変異体が得られるかは不明であった。コケ植物では蘚類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrium patens*) でオーキシン依存的な TIR1/AFB-AUX/IAA 相互作用が示されているものの (Prigge et al. 2010)、4 遺伝子のホモログを全て機能欠損した変異体は未だ報告されておらず、配偶体優勢種で TIR1/AFB が必須の機能を有するのかは依然不明である。

本章では、ゼニゴケを研究材料として、唯一の TIR1/AFB ホモログ MpTIR1 が天然オーキシン IAA や人工オーキシン 1-naphthaleneacetic acid (NAA)、2,4-dichlorophenxy acetic acid (2,4-D) の受容体として機能し、MpIAA の分解を促進することを生理的・生化学的に実証した。逆遺伝学的手法 (Ishizaki et al. 2013a; Sugano et al. 2018) により *Mptir1* KO 植物を作出したところ、細胞塊のまま増殖した。誘導的な KO では、ノッチ構造を欠いた異常な無性芽の形成や、正常な無性芽が発芽後に細胞塊となる様子が観られた。こうした表現型とトランスクリプトーム解析から、MpTIR1 を介した NAS は配偶体において細胞の生存には必須ではないものの、頂端幹細胞の形成と維持、体軸形成や器官分化を制御することで三次元形態形成に必須の生理調節を担うことが示唆された。

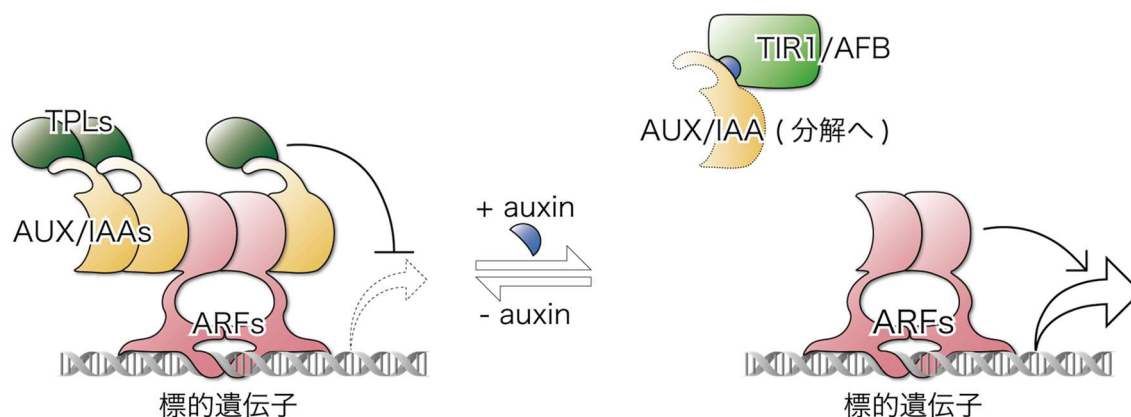


図 2-2. NAS 分子機構の模式図

低オーキシン状態 (左) では AUX/IAA が招集する TPL により ARF 標的遺伝子の転写が抑制されている。高オーキシン状態 (右) では TIR1/AFB と相互作用した AUX/IAA が分解促進され、解放された ARF による転写制御が行われる。

## 結果

### Mp *TIR1* はオーキシン応答を正に制御する

Mp *TIR1* がオーキシン応答に関与するか検証した。野生型株および4ラインの Mp *TIR1* 過剰発現株 (*proMpEF1α:MpTIR1-3xFLAG*; 図 2-3A)の無性芽を天然オーキシン IAA、人工オーキシン NAA、2,4-D 含有培地で培養した。野生型株はいずれのオーキシンでも濃度の上昇に伴い葉状体が矮化し、高濃度では無性芽の背面からも異所的に仮根が発生し葉状体の分化が損なわれる成長阻害が認められ、先行研究の結果が再現された (図 2-3B-D; Ishizaki et al, 2012)。Mp *TIR1* 過剰発現株では、より低濃度のオーキシン存在下で仮根が異所的に発生し葉状体発生が損なわれ枯死する成長阻害が観察され (図 2-3B-D)、オーキシン感受性の上昇が認められた。

Mp *TIR1* KO がオーキシン応答性に与える影響を検証するため、相同組換えによるジーンターゲットング法で *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株を作出した (図 2-4)。*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株は細胞塊として成長しており (詳細は後述)、野生型株が枯死する高濃度オーキシン含有条件でも仮根の異所的な発生は認められなかった (図 2-5A, B)。また、培養開始時点に対する培養 14 日時点の植物体の相対面積比を求めたところ、mock 条件に比べ NAA 処理条件と 2,4-D 処理条件では成長率に差が見られたものの、IAA 処理条件では成長率に差は見られず、オーキシン感受性の低下が確認された (図 2-5C)。*MpTIR1* ゲノム断片を *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株に導入したところオーキシン応答性が回復し、高濃度オーキシン存在下では無性芽からの発生時に野生型株同様の異所的な仮根発生や葉状体成長阻害が認められた (図 2-5A)。以上の結果から、Mp *TIR1* がオーキシン応答を正に制御することが示唆された。

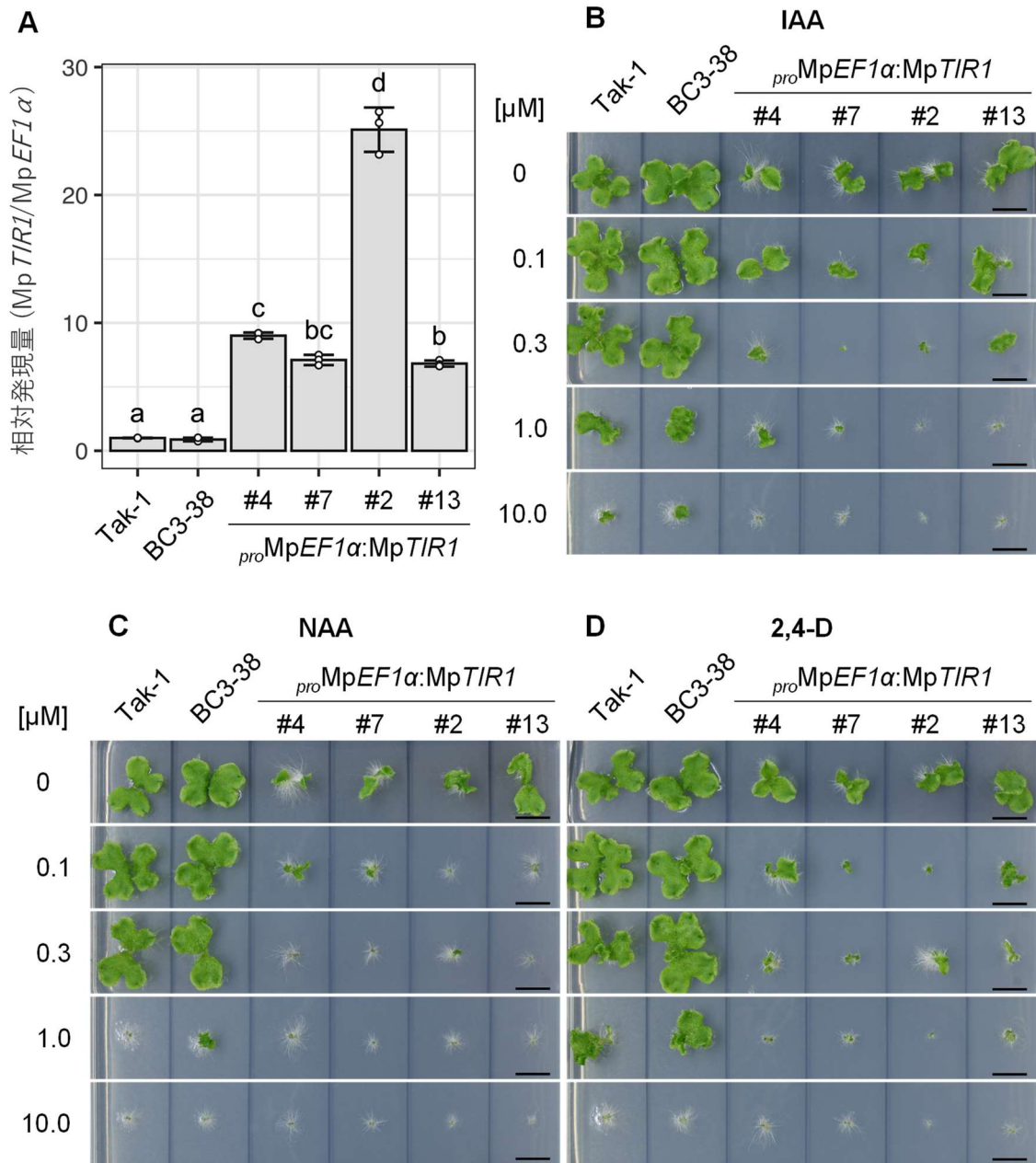


図 2-3. *MpTIR1* 過剰発現植物のオーキシン応答性解析

野生型株 (Tak-1、BC3-38) および *proMpEF1α:MpTIR1-3xFLAG* 株葉状体のオーキシン応答性解析。(A) 10 日齢葉状体における *MpTIR1* 平均相対転写産物量。MpEF1α を内部標準とするリアルタイム PCR で解析。一次元配置分散分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) と続く信頼度指数 99.9% の Tukey-Kramer 検定により統計的有意性を検定した。点は個別の測定値を示す。n = 3。Error bars: ±SD。(B-D) 14 日齢葉状体。無性芽を IAA (B)、NAA (C)、2,4-D (D) 含有培地にて培養した。Bars: 10 mm。

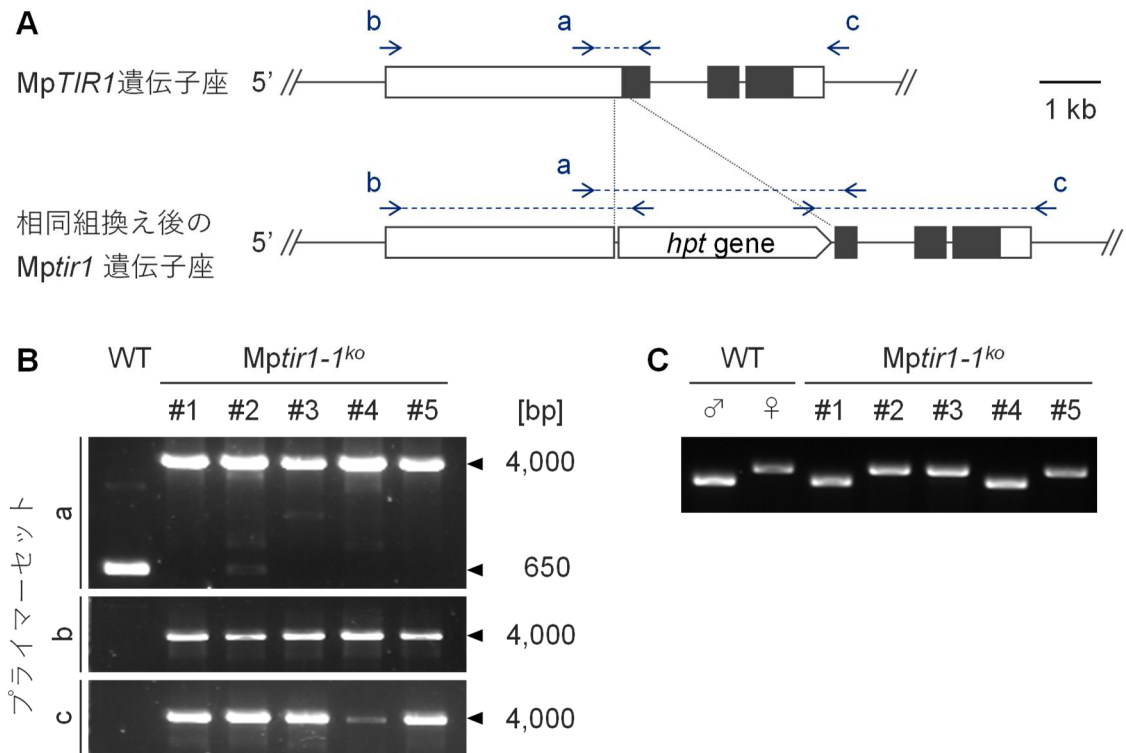
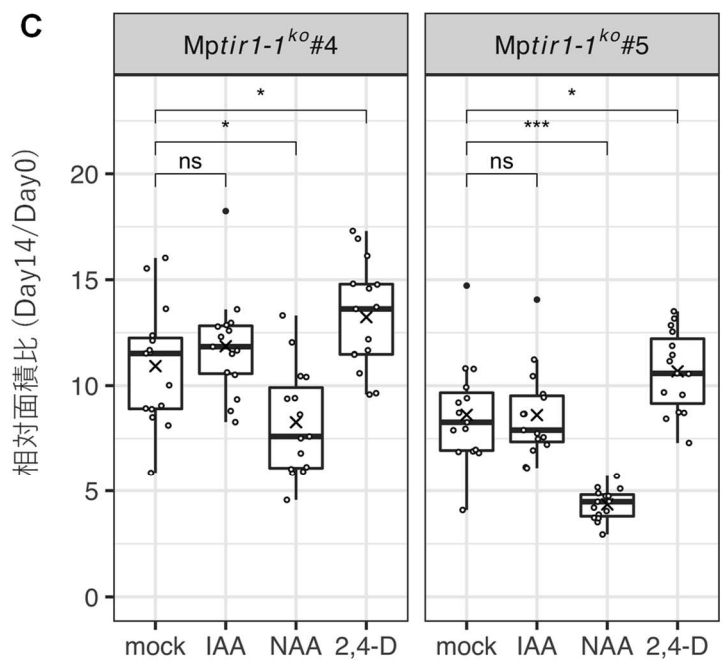
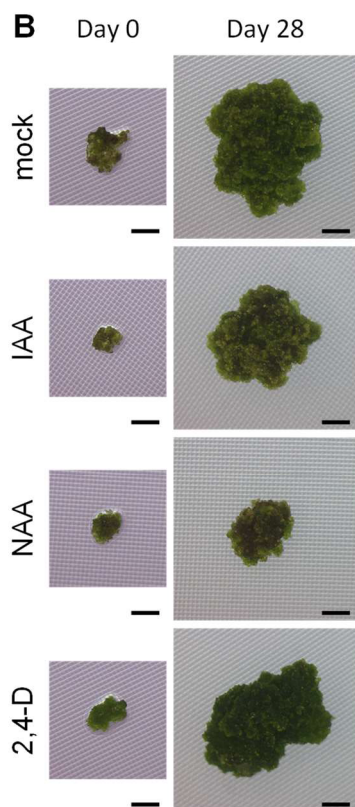
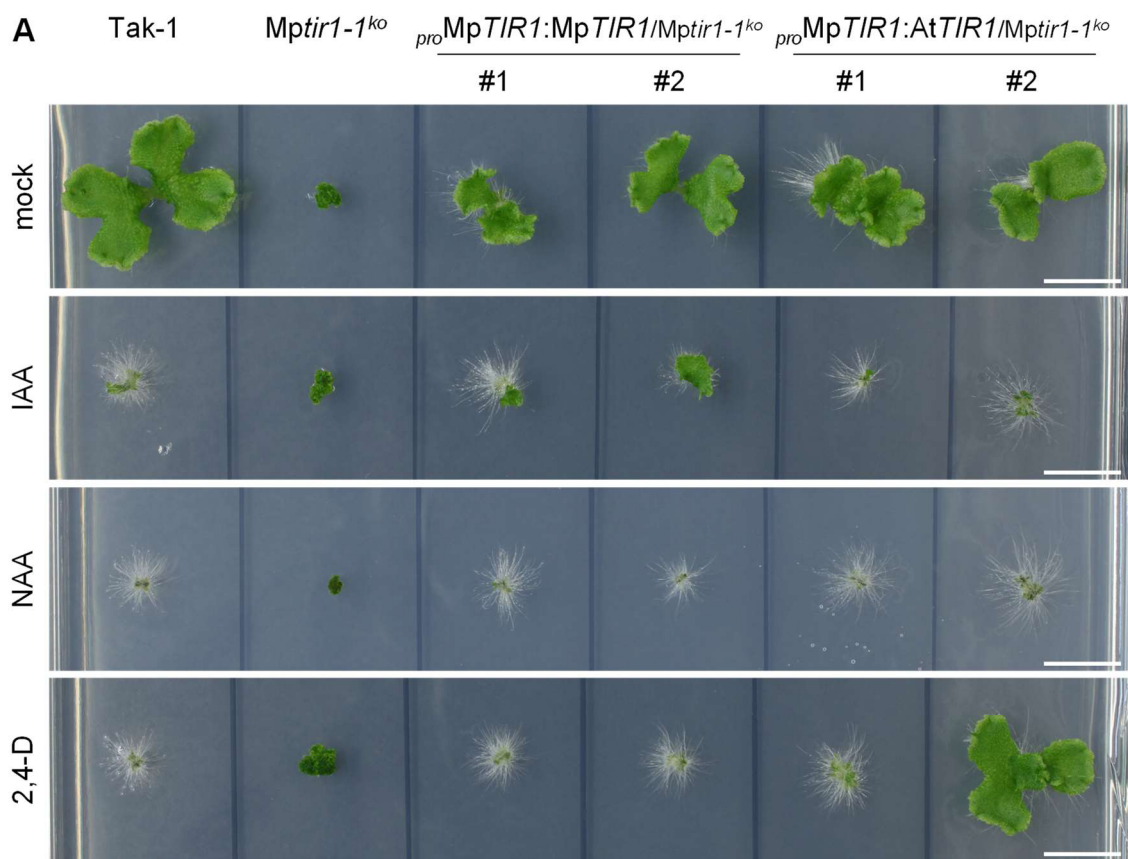


図 2-4. 相同組換えを利用したジーンターゲティング法による Mptir1-1<sup>ko</sup> 株の作出

(A) MpTIR1 遺伝子座と相同組換え後の遺伝子座の模式図。文字付きの矢印は (B) で用いたプライマー設計位置を示す。hpt gene: ハイグロマイシンリン酸転移酵素 (hygromycin-B-phosphotransferase) 遺伝子カセット。白長方形は非翻訳領域、黒長方形はコーディング配列を示す。(B) プライマーセット a-c を用いたジェノタイピング PCR。(C) 性染色体上に設計されたプライマーセットを用いた PCR による性判定。





## 図 2-5. *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株のオーキシン応答性解析

(A) 野生型株 (Tak-1)、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株、*proMpTIR1:MpTIR1/Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株、*proMpTIR1:3xFLAG-AtTIR1/Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株の 14 日齢植物体。無性芽 (*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株は小欠片) を mock またはオーキシン含有培地にて培養した。Bars: 10 mm。(B, C) mock またはオーキシン含有培地で培養した *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株の細胞塊。(B) 培養開始時点と培養 28 日時点における同一の細胞塊。Bars: 1 mm。(C) 植物体成長率のボックスプロット。培養開始時に対する 14 日後の相対面積比を成長率として算出した。箱内のバンドは中央値、十字は平均値を示す。箱は第一から第三四分位点の範囲を示す。ひげは四分位範囲×1.5 範囲内の最大値と最小値を示す。点は各データの値を示し、黒点は外れ値を示す。mock 処理個体とオーキシン処理個体で Dunnett 検定による両側検定を行った。ns: not significant、\*:  $p < 0.05$ 、\*\*\*:  $p < 0.001$ 。n = 15。

## MpTIR1 はオーキシンを受容し MpIAA を分解に導く

NAS では、オーキシン受容した TIR1/AFB による AUX/IAA との相互作用と続く分解促進が鍵となる。MpTIR1 がオーキシン受容体として機能するか検証するため、プルダウンアッセイを行った。ベイトとして、N 末端側に Glutathione S-Transferase (GST) を融合した第 627 アミノ酸から C 末端までの MpIAA タンパク質 GST-MpIAA (627C) を大腸菌で発現・精製して用いた。GST-MpIAA (627C) と MpTIR1-3xFLAG 発現植物 (*proMpEF1 $\alpha$ :MpTIR1-3xFLAG* 株 #2) のタンパク質抽出物を混和したところ、混合液にオーキシンを添加した場合にのみ相互作用が見られた (図 2-6A)。IAA 添加時には濃度依存的に相互作用が促進された (図 2-6A)。また NAA と 2,4-D では IAA と同程度からやや弱い相互作用が認められた (図 2-6A)。MpIAA DII は MpTIR1 相互作用ドメインと考えられ、当該配列に変異導入 (PP→SS) した MpIAA<sup>mutDII</sup> の発現植物はオーキシン耐性となる (Kato et al, 2015)。MpTIR1 が DII を認識するか検証するため GST-MpIAA (627C) に代えて GST-MpIAA<sup>mutDII</sup> (627C) を用いてプルダウンアッセイを行ったところ、オーキシンの有無によらず相互作用は認められなかった (図 2-6B)。以上の結果から、MpTIR1 はオーキシン依存的に MpIAA の DII に結合することが示唆された。

MpTIR1 が *in vivo* で MpIAA の分解に関与するかを検証した。まず、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株を誘導欠損ベクタで相補することで条件的 KO (conditional KO; CKO) 植物 (*Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株) を作出した (図 2-7)。使用したベクタは、通常条件下では MpEF1 $\alpha$  プロモータ制御下で MpTIR1 CDS を発現し、高温処理・DEX 処理によって Cre-loxP 部位特異的組換えを誘導すると、MpTIR1 CDS を切出すと同時に蛍光タンパク質 Citrine-NLS を発現させ KO 細胞を標識する構造となっている (図 2-7A)。次いで MpIAA の DII 配列または mutDII 配列を、NLS と融合した蛍光タンパク質 mTurquoise2 (mTurquoise2-NLS) で標識して *Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株背景で発現させた。MpTIR1 が DII を介してタンパク質の分解を促進するのであれば、MpTIR1 が KO されると DII-mTurquoise2-NLS が高蓄積すると考えられる。*proMpEF1 $\alpha$ :DII-mTurquoise2-NLS/Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株では、MpTIR1 KO 誘導時に mTurquoise2 蛍光の上昇が認められた (図 2-8A–C, F)。一方 *proMpEF1 $\alpha$ :mutDII-mTurquoise2-NLS/Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株では、mock 処理でも



強い mTurquoise2 蛍光が観察され、MpTIR1 KO を誘導しても mTurquoise2 蛍光は上昇しなかった (図 2-8A, D-F)。この結果から、MpTIR1 が相互作用タンパク質の分解を促進することが示唆された。

以上の結果から、MpTIR1 はオーキシン依存的に MpIAA と相互作用し分解促進することが示唆された。

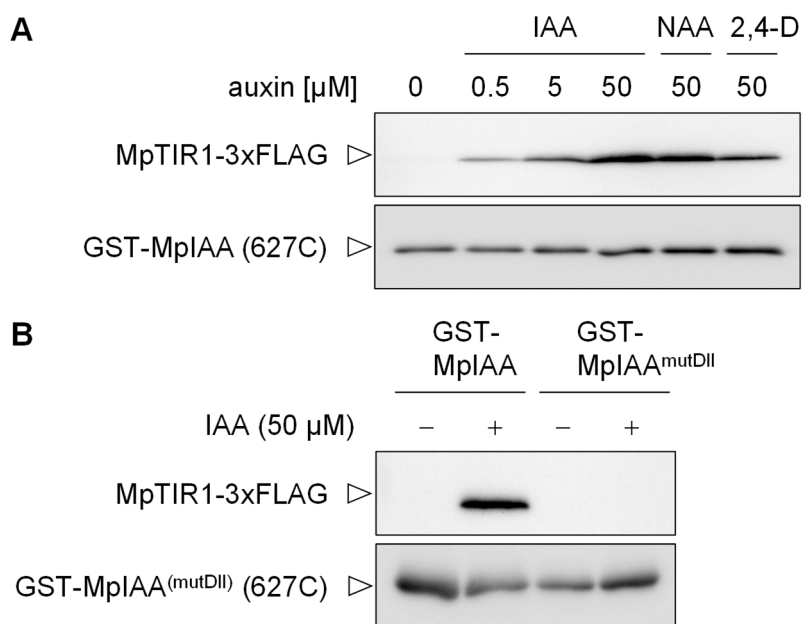
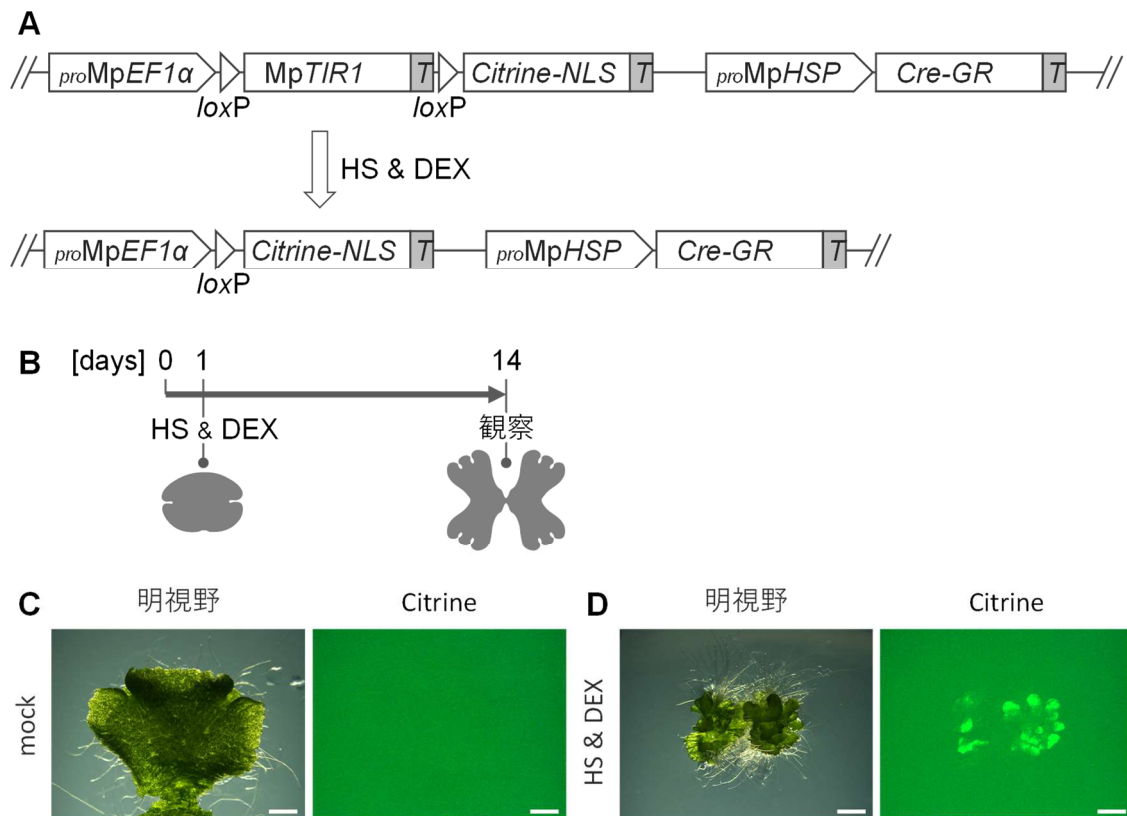


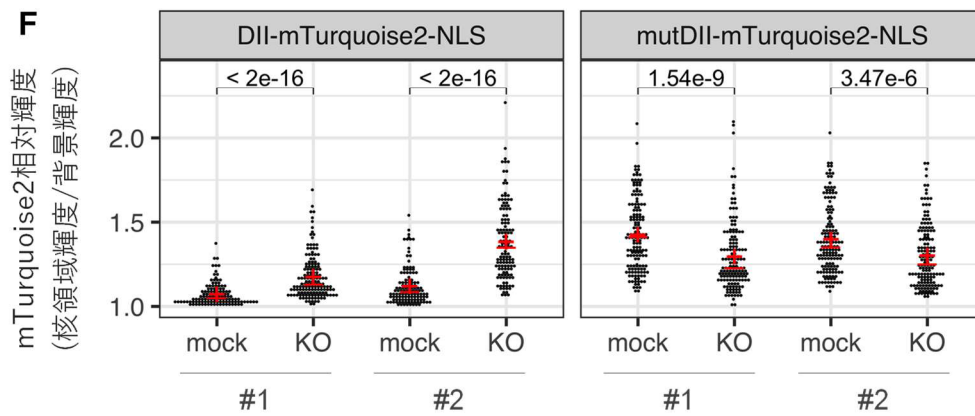
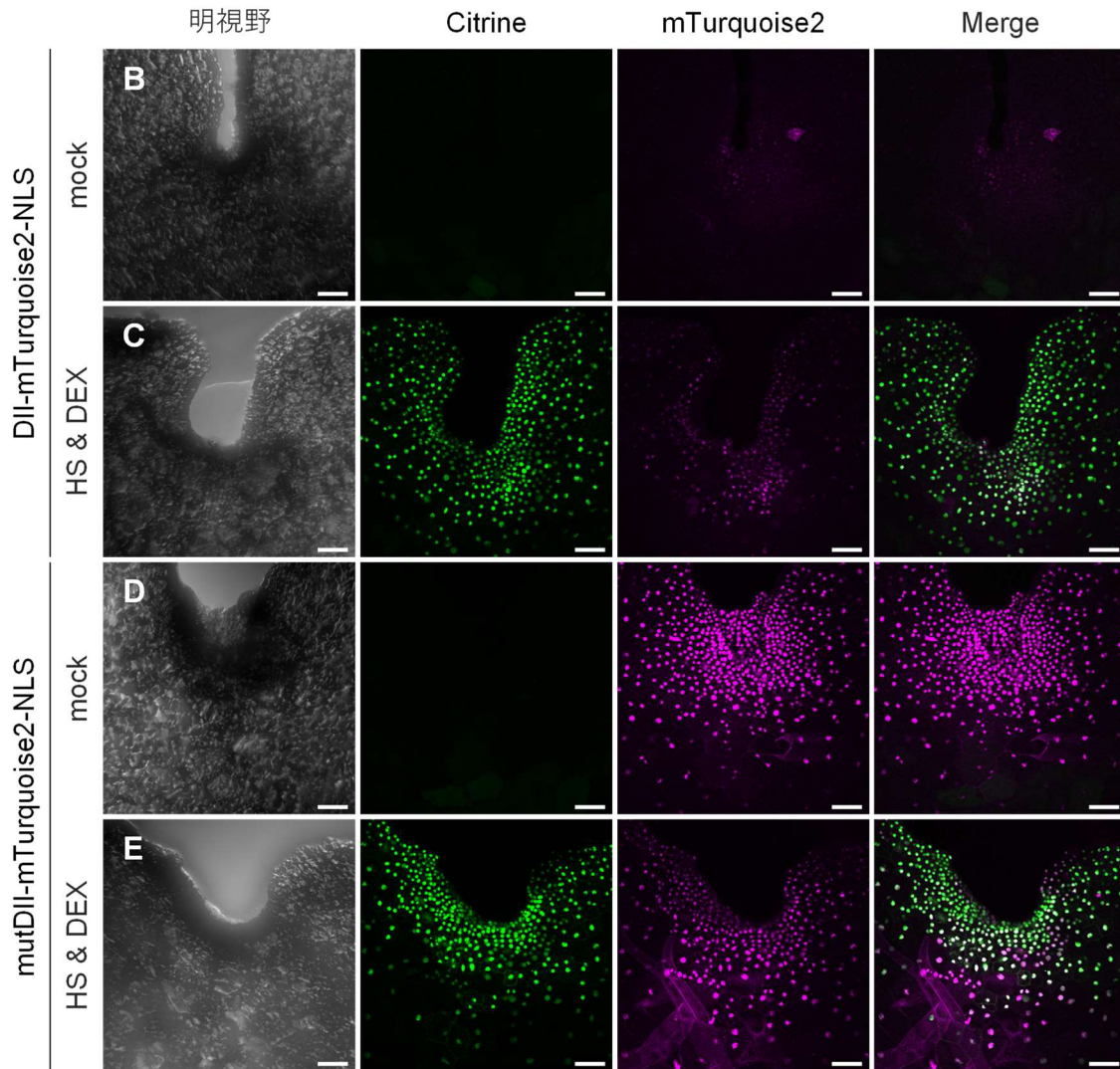
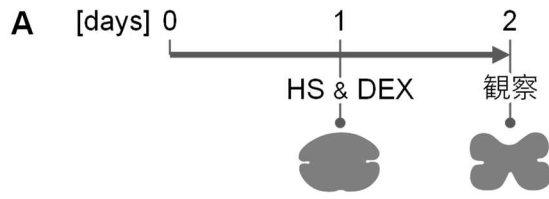
図 2-6. プルダウンアッセイによる MpTIR1-MpIAA 相互作用の検証

**(A, B)** GST-MpIAA (627C)と MpTIR1-3xFLAG のプルダウンアッセイ。GST 融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズで沈降させ、*proMpEF1  $\alpha$ :MpTIR1-3xFLAG* 株のタンパク質抽出液とオーキシン存在下および非存在下で混合した後、ビーズ結合タンパク質を抗 FLAG 抗体または抗 GST 抗体による免疫ブロットに供した。**(A)** GST-MpIAA (627C)精製タンパク質と *proMpEF1  $\alpha$ :MpTIR1-3xFLAG* 株タンパク質抽出物を異なる濃度の IAA、50  $\mu\text{M}$  NAA、または 50  $\mu\text{M}$  2,4-D と共に反応させた。**(B)** GST-MpIAA (627C)または GST-MpIAA<sup>mutDII</sup> (627C)と *proMpEF1  $\alpha$ :MpTIR1-3xFLAG* 株タンパク質抽出物を  $\pm 50$   $\mu\text{M}$  IAA 条件で反応させた。本実験は加藤大貴 博士により遂行された。



### 図 2-7. *Mptir1<sup>CKO>CitN</sup>* 株の作出

(A) *Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株作出に用いたコンストラクトの模式図。高温処理 (HS) と DEX 処理により Cre-loxP 部位特異的組換えによる相補用 *MpTIR1* 配列の切除が誘導され、*Citrine-NLS* が恒常的に発現する。T: NOS ターミネータ。(B) C, D における誘導処理・観察日時の様式図。1 日齢の植物を mock 処理 (C) または高温処理・DEX 処理 (D) し、13 日間培養した。(C, D) 14 日齢 *Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株。Bars: 2 mm。



## 図 2-8. MpTIR1 による相互作用タンパク質分解の検証

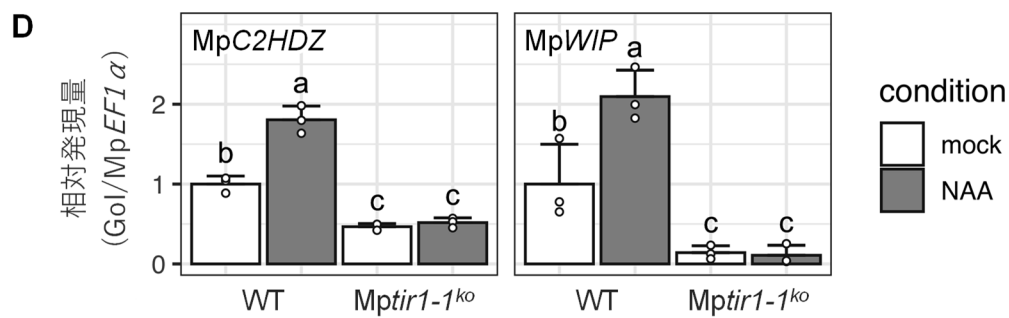
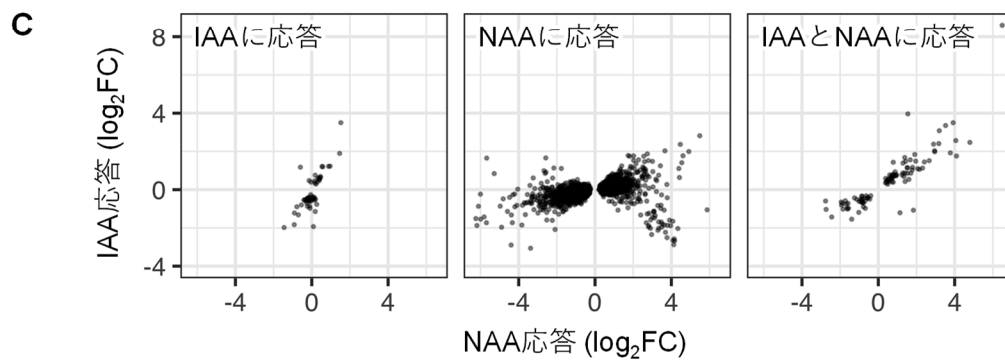
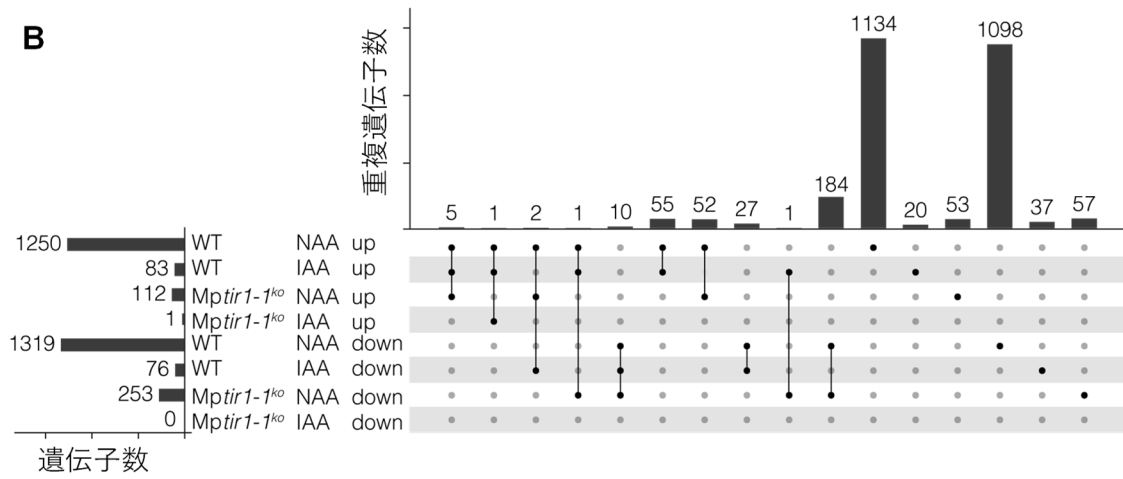
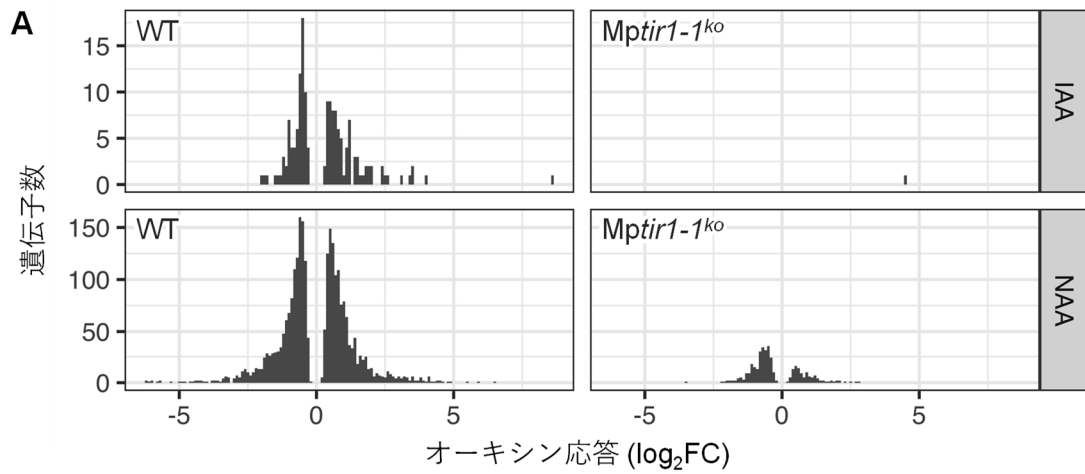
*proMpEF1*  $\alpha$ :*Dll-mTurquoise2-NLS/Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株および *proMpEF1*  $\alpha$ :*mutDll-mTurquoise2-NLS/Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株における mTurquoise2 蛍光の解析。(A) 誘導処理・観察日時の模式図。1 日齢の植物を mock 処理 (B, C, F) または高温処理・DEX 処理 (D-F) し、1 日間培養した。(B-E) *proMpEF1*  $\alpha$ :*Dll-mTurquoise2-NLS/Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株 #1 (B, C) または *proMpEF1*  $\alpha$ :*mutDll-mTurquoise2-NLS/Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株 #1 (D, E) のノッチ周辺の蛍光観察。Bars: 50  $\mu$ m。(F) 核領域における mTurquoise2 蛍光相対輝度のドットプロット。それぞれ独立な 2 ラインを解析した。mock 処理と誘導処理間で Brunner-Munzel 検定による二群間比較を行った。赤の十字は平均値、赤線は中央値を示す。各条件 5 個体または 6 個体を観察し、各個体あたり 25 個の核を無作為に選んで解析に供した。

## NAS はオーキシン信号伝達の主要経路である

NAS によるオーキシン応答制御の実態を明らかにするため、トランスクリプトーム解析を行った。野生型株 (5 日齢胞子発芽体) および *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株を 10  $\mu$ M IAA または溶媒コントロールで 4 時間処理し RNA-seq に供した。また、NAA 培養条件下で *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株が成長遅延を示した結果を踏まえ、10  $\mu$ M NAA で同様の RNA-seq を行った。各実験のオーキシン処理群と mock 処理群と比較して差次的発現変動遺伝子 (differentially expressed gene; DEG) を解析した。

野生型株では IAA 処理による発現変動遺伝子数 (上昇 83 遺伝子、低下 76 遺伝子) は、NAA 処理による発現変動遺伝子 (上昇 1,250 遺伝子、低下 1,319 遺伝子) に比べ少なかった (図 2-9A)。IAA 処理による発現変動遺伝子の過半数は NAA 処理でも変動していた (図 2-9B, C)。また両オーキシンで共に変動した遺伝子のほとんど (99/101 遺伝子) は同じ向きに応答しており、応答幅の違いは認められなかった (図 2-9B, C)。これらの結果から、NAA は IAA より強く作用するものの、同一の経路を介して遺伝子発現を誘導することが示唆された。

*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株では、MpTIR1 がオーキシン受容体であることと一致して、IAA 処理による差次的発現変動遺伝子はほとんど見られなかった (上昇 1 遺伝子、低下 0 遺伝子; 図 2-9A)。NAA 処理による発現変動遺伝子数 (上昇 112 遺伝子、低下 253 遺伝子) も野生型株に比べ顕著に少なかった (図 2-9A)。Mptir1-1<sup>ko</sup> 株の NAA 応答性の低下は、既知のオーキシン応答遺伝子 (MpCLASS II HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER; MpC2HDZ, MpWIP; Kato et al. 2017; Mutte et al. 2018) を対象としたリアルタイム PCR でも確認された (図 2-9D)。これらの結果からオーキシン応答において MpTIR1 を介した NAS が主要な働きを担うことが示唆された。



## 図 2-9. オーキシン応答に伴う転写変動の解析

(A-C) 野生型株 (wild-type; WT、胞子発芽体を使用)と *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株における IAA または NAA 処理に伴う DEG ( $p_{adj} < 0.001$ )解析。RNA-seq により全遺伝子について網羅的に解析した。(A) DEG 数のヒストグラム。X 軸は  $\log_2$  fold change (FC)を、Y 軸は遺伝子数を示す。上段と下段で Y 軸値が 10 倍異なる点に留意のこと。(B) DEG 重複関係のアップセットプロット。野生型株または *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株を IAA または NAA 処理した際に発現上昇または低下した遺伝子群について、各群中の遺伝子数を横棒グラフで、群間で重複するあるいはある群に特異的な遺伝子数を縦棒グラフで示した。縦棒グラフ下の黒点でいずれの遺伝子群に含まれた遺伝子かを示す。(C) 胞子発芽体において IAA 処理でのみ、NAA 処理でのみ、または両方で共通して見られた DEG の発現変動。横軸に NAA 処理に伴う  $\log_2$  FC を、縦軸に IAA 処理に伴う  $\log_2$  FC をプロットした。(D) 胞子発芽体と *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株における NAA 処理に伴う既知のオーキシン応答転写因子の発現変動。*MpEF1 $\alpha$*  を内部標準とするリアルタイム PCR で解析。各遺伝子の測定結果は、サンプル間で次元配置分散分析 (one-way ANOVA)と続く信頼度指数 99.9%の Tukey-Kramer 検定により統計的有意性を検定した。n = 3。Error bars: +SD。

## MpTIR1 は体軸の確立に必須である

MpTIR1 の生理機能を明らかにするため、*Mptir1* KO 植物の表現型を解析した。相同組換えでは雌雄両方を含む独立した 5 ラインの *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株が取得された (図 2-4B, C)。いずれも細胞塊状のまま生育し、多細胞からなる器官の形成や仮根の発生は認められなかった (図 2-10A-C)。さらに Cas9 nickase を用いたゲノム編集 (Hisanaga et al, 2019; Koide et al, 2020)により大規模欠損株を作出した (図 2-11A)。雌雄両方を含む独立した 4 ラインの変異体 (*Mptir1-2<sup>ld</sup>*-*Mptir1-5<sup>ld</sup>*株)を取得し、いずれも MpTIR1 遺伝子座をほぼ同じ長さで欠損していた (図 2-11B, C)。*Mptir1-2<sup>ld</sup>*-*Mptir1-5<sup>ld</sup>*株の表現型は *Mptir1-1<sup>ko</sup>*株と同様であり、器官形成や仮根の発生を欠く細胞塊のまま生育した (図 2-12)。*Mptir1-1<sup>ko</sup>*株の発生不全は MpTIR1 ゲノム断片を導入することで相補された (図 2-5A)。また、MpTIR1 プロモータ制御下で 3xFLAG と融合したシロイヌナズナ TIR1 (3xFLAG-AtTIR1)を発現するベクタの導入でも *Mptir1-1<sup>ko</sup>*株の発生不全が回復した。これら *proMpTIR1:3xFLAG-AtTIR1/Mptir1-1<sup>ko</sup>*株は、一部ラインの 2,4-D 応答性を除き、高濃度オーキシン存在下では葉状体形成が損なわれ異所的に仮根を生じるという野生型株と同様の応答を示し、オーキシン感受性も概ね回復していた (図 2-5A)。これらの結果から、MpTIR1 が器官形成に必須の機能を有すること、TIR1/AFB タンパク質機能が苔類と被子植物で保存されていることが示唆された。

増殖の盛んな野生型株の胞子発芽体と *Mptir1-1<sup>ko</sup>*株で切片を作成し、細胞構成を観察した。胞子発芽体では、比較的小さな細胞からなるメリステム様領域と液胞が発達し肥大した細胞が観られた(図 2-10D, E)。*Mptir1-1<sup>ko</sup>*株も外縁部に小さな細胞、内部に液胞に富む肥大した細胞を備えており、均一な細胞集団ではなかった (図 2-10F, G)。これらの結果から、MpTIR1 は生存には必須ではないものの、秩序だった発生に必須の機能を担うことが示唆された。

MpTIR1 の KO はいずれも孢子発芽体を背景として行われた。上の記述が発生初期の表現型として妥当であるか確認するため、孢子発芽体における MpTIR1 の発現を解析した。MpTIR1-tdTomato を MpTIR1 プロモータ制御下で発現するコンストラクトを Mptir1-1<sup>ko</sup> 株に導入して相補し、野生型株と交配して孢子を取得して観察した。tdTomato 蛍光は細胞内の核様領域で観られ、MpTIR1 が核局在することが示唆された (図 2-13A-C)。そのため tdTomato 蛍光は小さい細胞では密、肥大成長した細胞で疎であったものの、単細胞の孢子から扁平な構造が生じた幼葉状体に至るまで植物体全体で観られた (図 2-13A-C)。また、公開 RNA-seq データを解析したところ、培養 0 日目の孢子から 1-4 日齢孢子発芽体まで MpTIR1 の転写が確認された (図 2-13D)。これらの結果から、確かに MpTIR1 は孢子発芽段階から機能していることが示唆された。

孢子発芽以外の発生段階での MpTIR1 の機能を検証するため、先述の Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup> 株と新たに作出した Mptir1-1<sup>CKO>idTN</sup> 株で MpTIR1 の誘導 KO による表現型を観察した。Mptir1-1<sup>CKO>idTN</sup> 株で用いた誘導欠損ベクタでは、プロモータ領域を含む相補用の MpTIR1 ゲノム断片両側に loxP 配列を付加しており、高温処理・DEX 処理による Cre-loxP 部位特異的組換え誘導によって当該領域を切出すと同時に tdTomato-NLS が発現して KO 細胞を標識する (図 2-14A)。Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup> 株と Mptir1-1<sup>CKO>idTN</sup> 株の無性芽は、通常条件下では葉状体に発生した一方、発芽に前後して KO 誘導した際には葉状体発生が損なわれ細胞塊状となった (図 2-7B-D 図 2-14B-G)。Mptir1<sup>CKO>idTN</sup> 株において無性芽形成時期に重なるように誘導処理を行い、十分な期間培養を継続した後に無性芽を取得して観察した。楕円盤状で基部側に柄細胞の接続跡、両長軸端頂にはノッチを有する無性芽が形成されたのに加え (図 2-14H, I)、ノッチをもたない細胞塊状の構造体も観察された (図 2-14H, J)。前者は tdTomato が発現しておらず、KO 誘導のかからなかった無性芽始原細胞に由来し、後者では全体で tdTomato 蛍光が観られ Mptir1-1<sup>ko</sup> 細胞となった始原細胞に由来する構造体であると考えられた。これらの結果から、孢子発芽体以外でも MpTIR1 が体軸の確立や器官形成において必須の機能を担うことが示唆された。



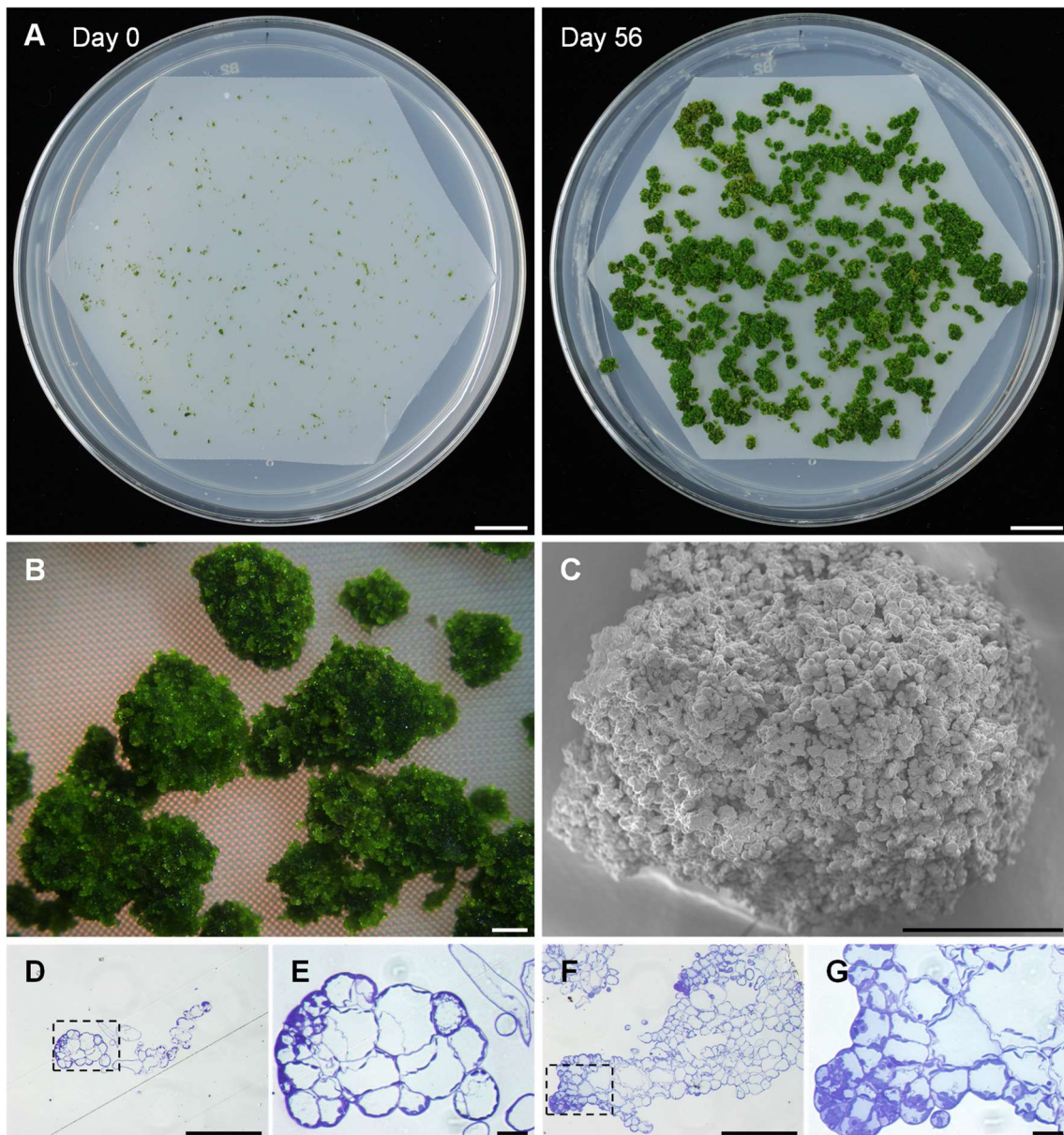


図 2-10. 発生における *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株の表現型解析

(A) 寒天培地 (六角形のシートは  $108 \mu\text{m}$  孔ナイロンメッシュ) で培養した *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞塊。培養 0 日目時点 (左) と 56 日時点 (右) における同一プレート の全体像を示す。Bars: 10 mm。(B) *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞塊。A の培養 56 日時点のプレートより。Bar: 1 mm。(C) 90 日以上培養した *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞塊の SEM 画像。Bar:  $200 \mu\text{m}$ 。(D-G) 10 日齢孢子発芽体 (D, E) および *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞塊 (F, G) の断面画像。E は D、G は F の点線領域内の高倍率観察。D-G の切片作成ならびに観察は岩野恵 博士により遂行された Bars:  $200 \mu\text{m}$  (D, F),  $20 \mu\text{m}$  (E, G)。





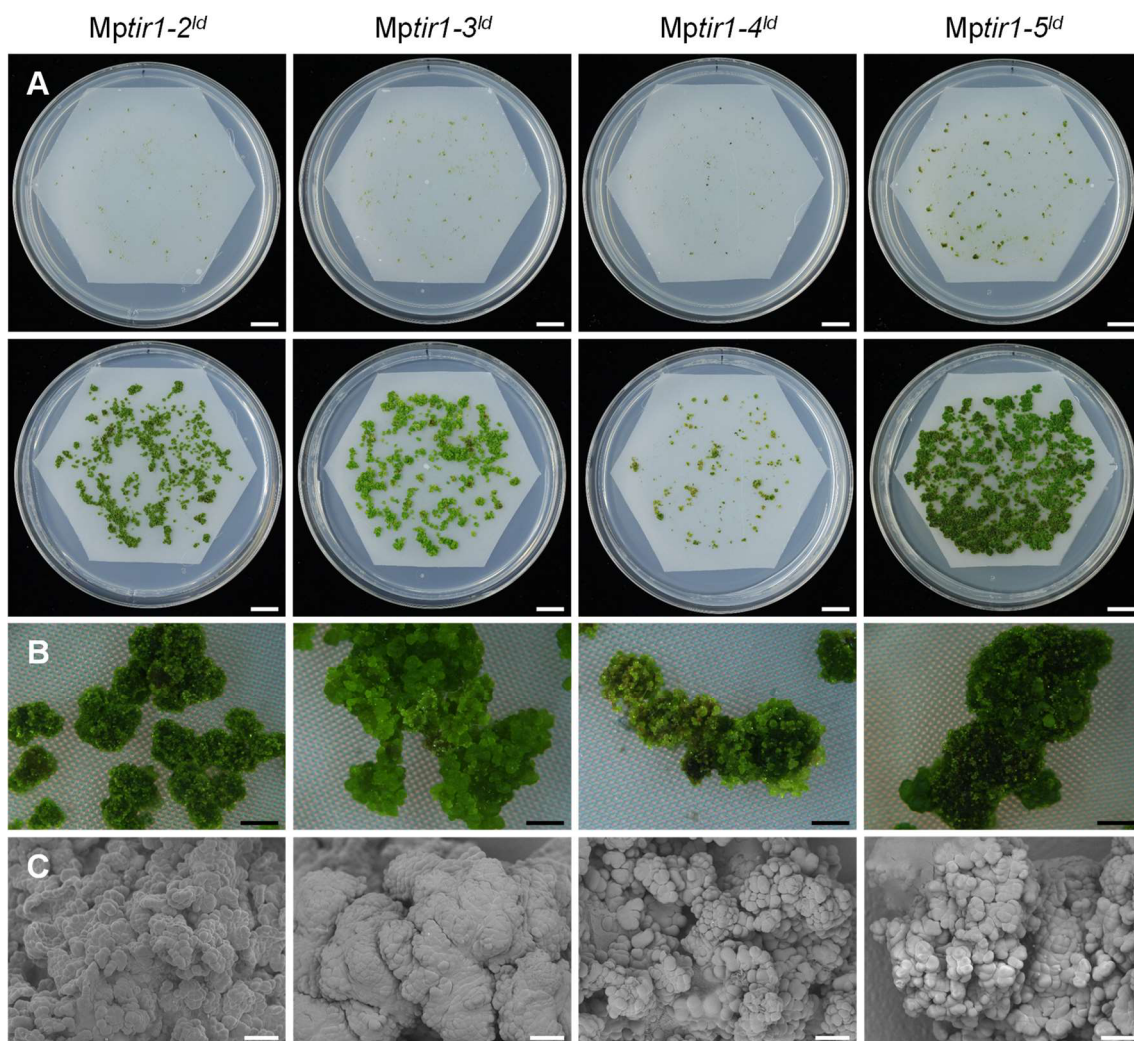


図 2-12. 発生における *Mptir1<sup>ld</sup>* 株の表現型解析

(A) 寒天培地 (六角形のシートは 108  $\mu$ m 孔ナイロンメッシュ) で培養した *Mptir1-2<sup>ld</sup>*–*Mptir1-5<sup>ld</sup>* 細胞塊。培養 0 日目時点 (上) と 56 日時点 (下) における同一プレート の全体像を示す。Bars: 10 mm。 (B) *Mptir1-2<sup>ld</sup>*–*Mptir1-5<sup>ld</sup>* 細胞塊。A の培養 56 日時点のプレートより。Bars: 1 mm。 (C) 35 日間培養した *Mptir1-2<sup>ld</sup>*–*Mptir1-5<sup>ld</sup>* 細胞塊の SEM 画像。Bars: 100  $\mu$ m。

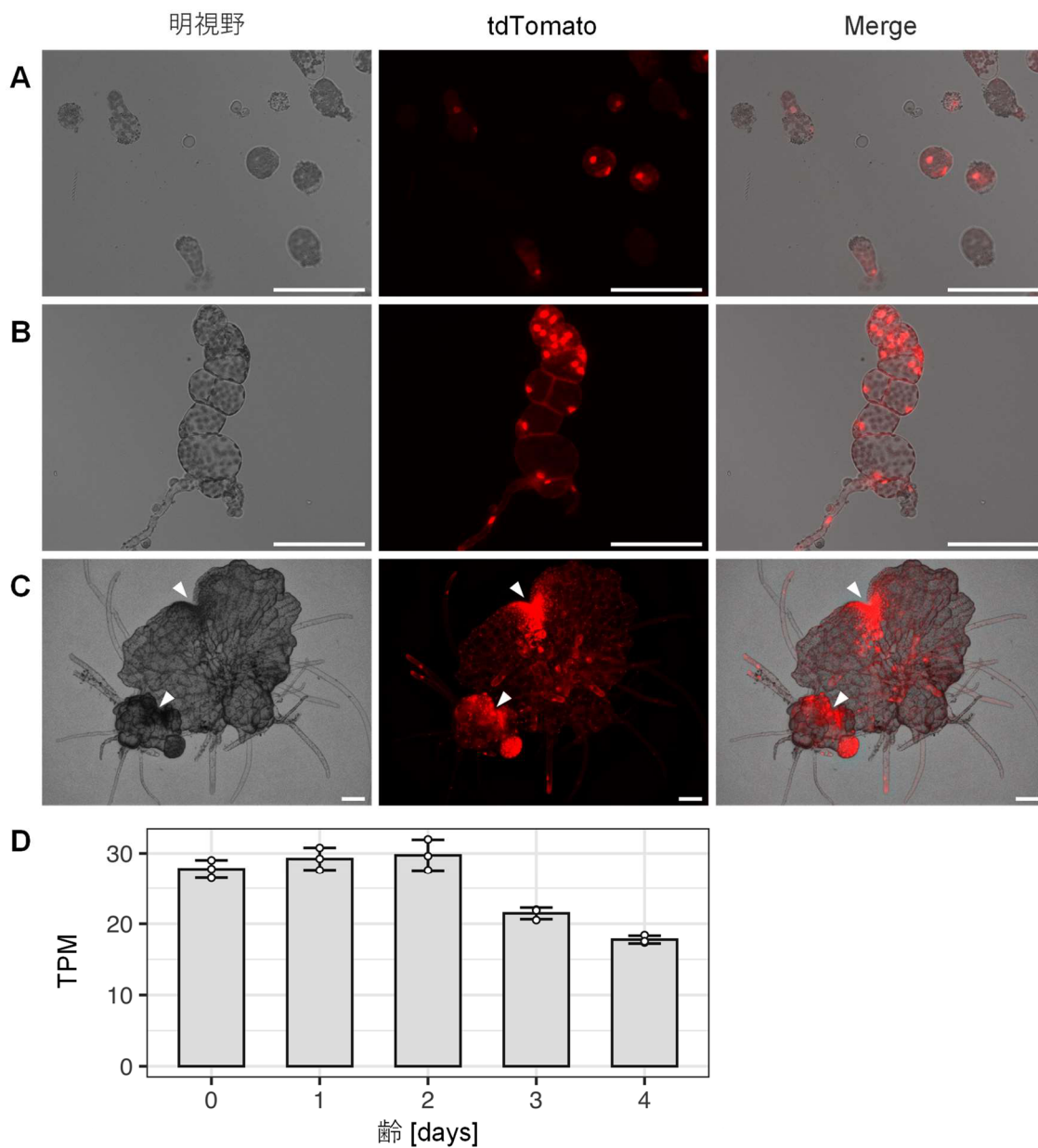
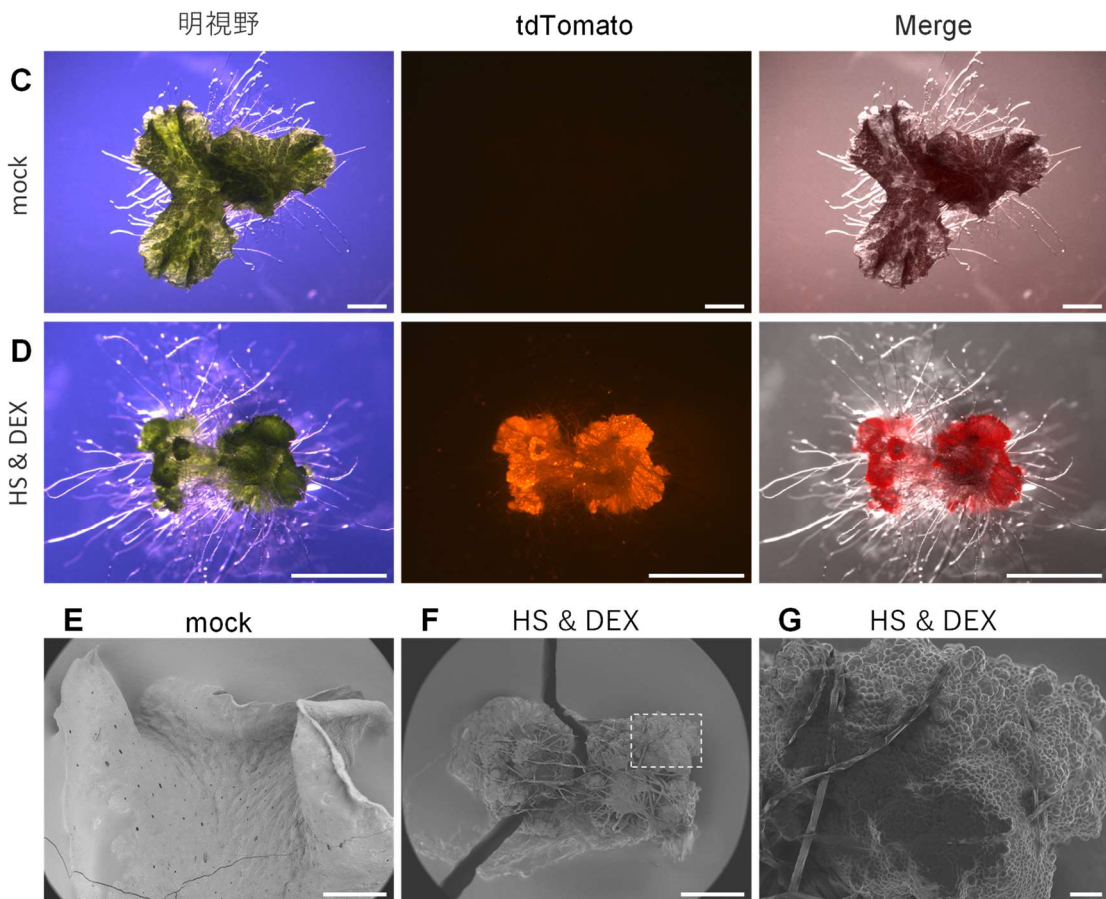
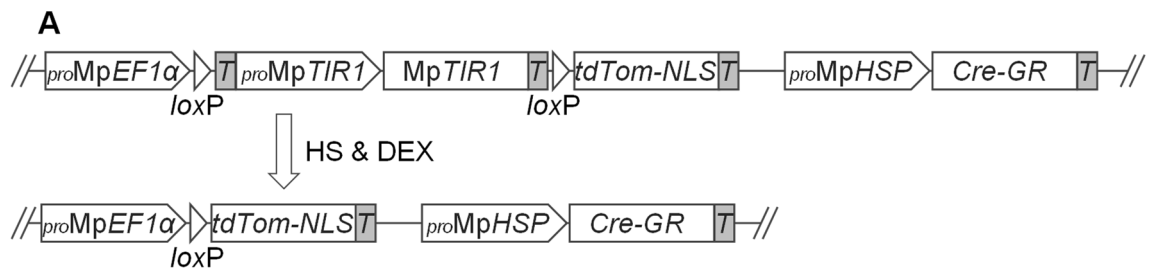


図 2-13. 胞子発芽体における *MpTIR1* の発現

(A–C) *proMpTIR1:MpTIR1-tdTomato/Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株と BC3-38 を交配して取得された胞子発芽体の観察。培養開始から 2 日後 (A)、5 日後 (B)、12 日後 (C) に観察。矢尻はノッチを示す。Bars: 100  $\mu$ m. (D) 胞子発芽体における *MpTIR1* 転写量。公開 RNA-seq (Bowman et al. 2017) を用いて transcripts per million (TPM) を計算した。点は個別の TPM を示す。n = 3。Error bars:  $\pm$ SD。



(次項に続く)



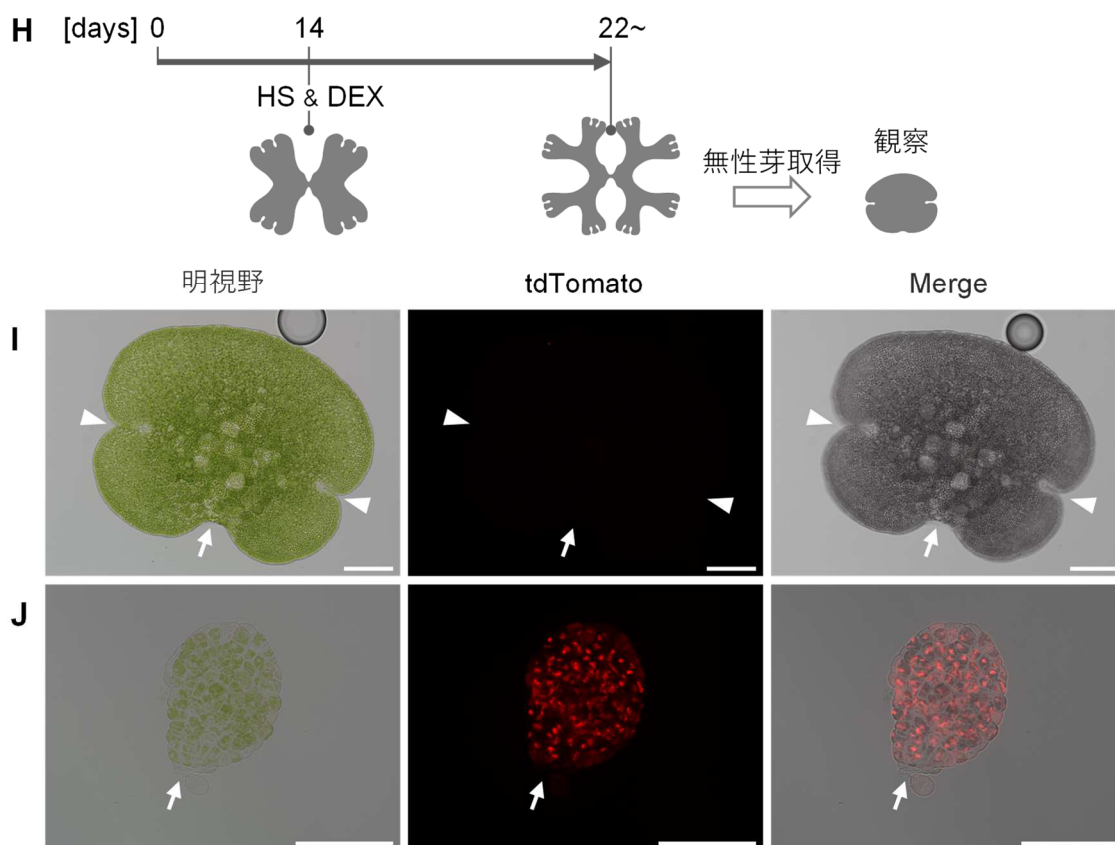
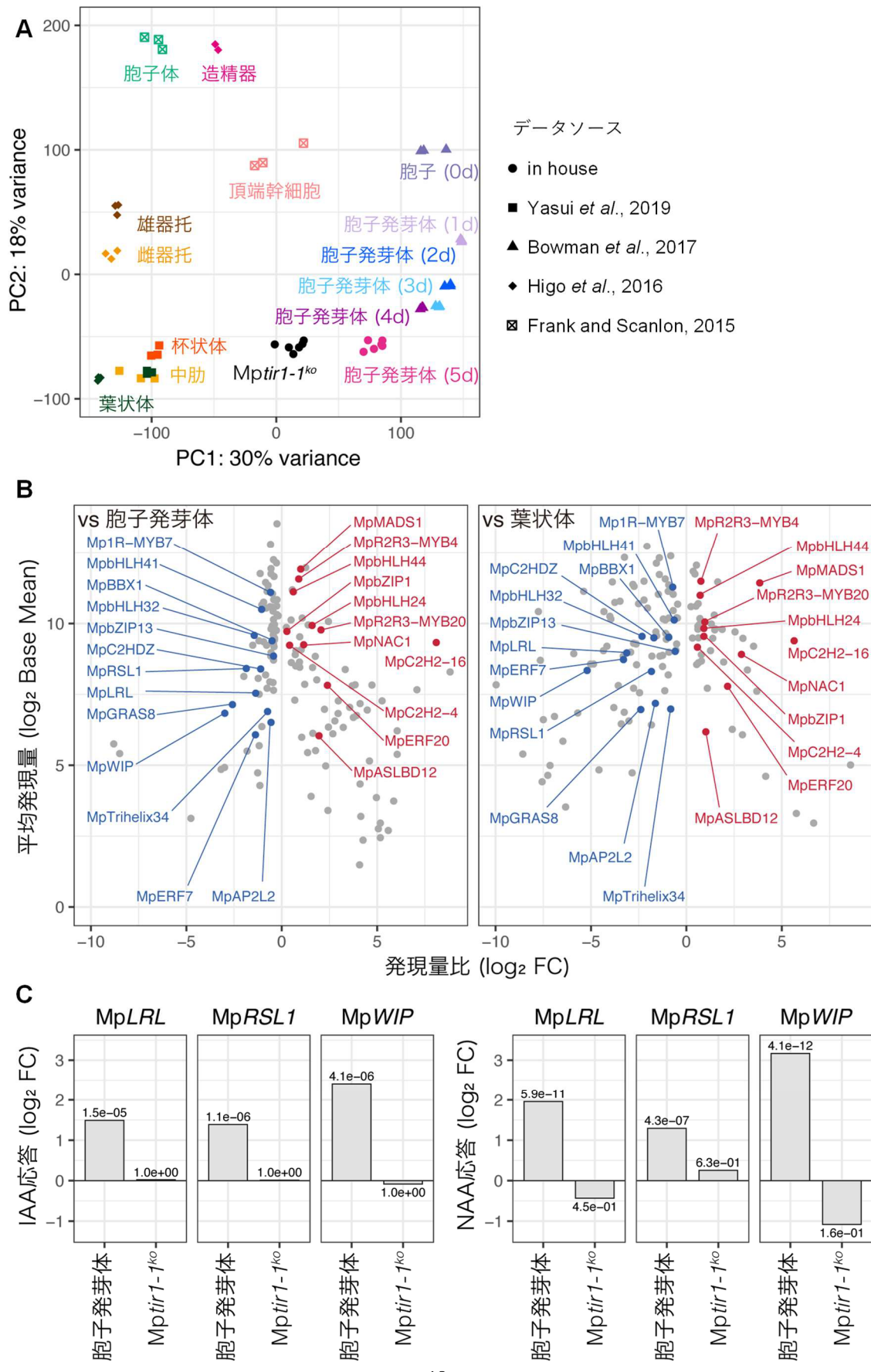


図 2-14. *MpTIR1* 誘導 KO による表現型の解析

(A) *Mptir1-1<sup>CKO>tdTN</sup>* 株作出に用いたコンストラクトの模式図。相補用 *proMpTIR1:MpTIR1* 配列が高温処理 (HS) と DEX 処理で誘導される Cre-*loxP* 部位特異的組換えにより切除される。T: NOS ターミネータ。(B) C-G における誘導処理・観察日時の模式図。0 日齢の無性芽を mock 処理 (C, E) または高温処理・DEX 処理 (D, F, G) し、14 日以上培養した。(C, D) *Mptir1-1<sup>CKO>tdTN</sup>* 株 14 日齢植物体。Bars: 2 mm。(E-G) *Mptir1-1<sup>CKO>tdTN</sup>* 株 22 日齢植物体の SEM 画像。G は F の点線領域の高倍率観察。Bars: 1 mm (E, F)、100  $\mu$ m (G)。(H) I-J における誘導処理・観察日時の模式図。14 日齢の葉状体を高温処理・DEX 処理し、その後 8 日間培養して杯状体から無性芽 (I) あるいは無性芽様の構造 (J) を取得して観察した。(I, J) *Mptir1-1<sup>CKO>tdTN</sup>* 株の無性芽。tdTomato 蛍光が観られず正常に発生した無性芽 (I) と全体で tdTomato 蛍光を示しノッチが形成されなかった無性芽様の構造体 (J)。矢尻はノッチ、矢印は柄細胞の接続痕を示す。Bars: 2 mm。

## MpTIR1 機能のトランスクリプトーム解析による検証

*Mptir1* KO 細胞の分化状態を明らかにするため、RNA-seq データを用いて野生型株と *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株の遺伝子発現プロファイルを比較した。主成分分析 (principal component analysis; PCA) により、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株とゼニゴケ各器官(Bowman et al, 2017; Frank and Scanlon, 2015; Higo et al, 2016; Yasui et al, 2019)を発現遺伝子に基づいて分類した。二次元のプロット上において各反復データはクラスターを成しており、野生型株の器官はおおよそその発生過程に沿って分離された。PC1 では孢子発芽体と葉状体・生殖器官・孢子体が分かれていた。PC2 では孢子と孢子発芽体が分かれていたほか、葉状体器官と生殖器官・孢子体も分かれていた。*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株は孢子・生殖器官・孢子体とは PC1 と PC2 両軸で分かれていた。また、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株は孢子発芽体・葉状体とも PC1 に沿って分かれており、両者の中間に位置していた (図 2-15A)。これらの結果から、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株は孢子発芽体から葉状体への分化が損なわれた状態にあることが想起された。この考えを検証するため、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞と孢子発芽体または葉状体の二群間比較を行った。制御系遺伝子に着目すると、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株では葉状体器官の分化制御への関与が示唆されている転写因子 Mp*LOTUS JAPONICUS ROOTHAIRLESS1-LIKE* (Mp*LRL*)、Mp*ROOT-HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE 1* (Mp*RSL1*)、Mp*WIP* (Breuninger et al. 2016; Jones and Dolan 2017; Proust et al. 2016)が有意に低発現であった (図 2-15B)。加えて、これら転写因子の発現は Mp*TIR1* 依存的にオーキシン処理に応じて発現上昇していた (図 2-15C)。以上の結果から、Mp*TIR1* を介した NAS は、これら転写因子の発現誘導を介して孢子発芽体から葉状体への分化を制御することが支持された。





## 図 2-15. 遺伝子発現に基づく *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞の分化状態解析

**(A)** *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞とゼニゴケ各器官の PCA。5 日齢孢子発芽体と *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株を mock 処理した際の RNA-seq データおよび公開 RNA-seq データを用い、全遺伝子の発現プロファイルに基づき解析した。各データ点の近くに同色でサンプル条件を記した。各点の形は RNA-seq データのソースを示す。 **(B)** *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞と孢子発芽体 (左) または葉状体 (右) の二群間比較で統計的有意に発現量に差が見られた転写因子の発現変動。横軸に  $\log_2FC$ 、縦軸に  $\log_2$  BaseMean (サンプル間平均発現) をプロットした。両比較で共通して見られた転写因子にラベルを付した。 **(C)** 孢子発芽体または *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株における IAA 処理 (左) または NAA 処理 (右) に伴う *MpLRL*、*MpRSL1*、*MpWIP* の発現変動。RNA-seq データの二群間比較結果による。各条件の  $p_{adj}$  を付記した。

## 考察

### MpTIR1 は進化的に保存されたオーキシン受容体である

ゼニゴケにおいて MpTIR1 過剰発現はオーキシンの感受性上昇を、KO はオーキシン耐性をもたらした (図 2-3B-D, 2-5)。in vitro で MpTIR1 はオーキシン依存的に MpIAA の DII と相互作用を示した (図 2-6)。in vivo で MpTIR1 KO 誘導により、DII を付加した mTurquoise2-NLS は蓄積上昇を示した一方、mutDII では蓄積上昇が認められなかった (図 2-8)。MpTIR1 および AtTIR1 は Mptir1-1<sup>ko</sup> 株を相補した (図 2-5A)。これらの結果は、MpTIR1 が AtTIR1 と共通した機能を有するオーキシン受容体であることを実証している。すなわち、MpTIR1 はオーキシン依存的に MpIAA の DII と相互作用して分解促進し、MpARF1 と MpARF2 による転写制御を亢進する (図 2-16)。次項で MpARF による転写制御を概観する。

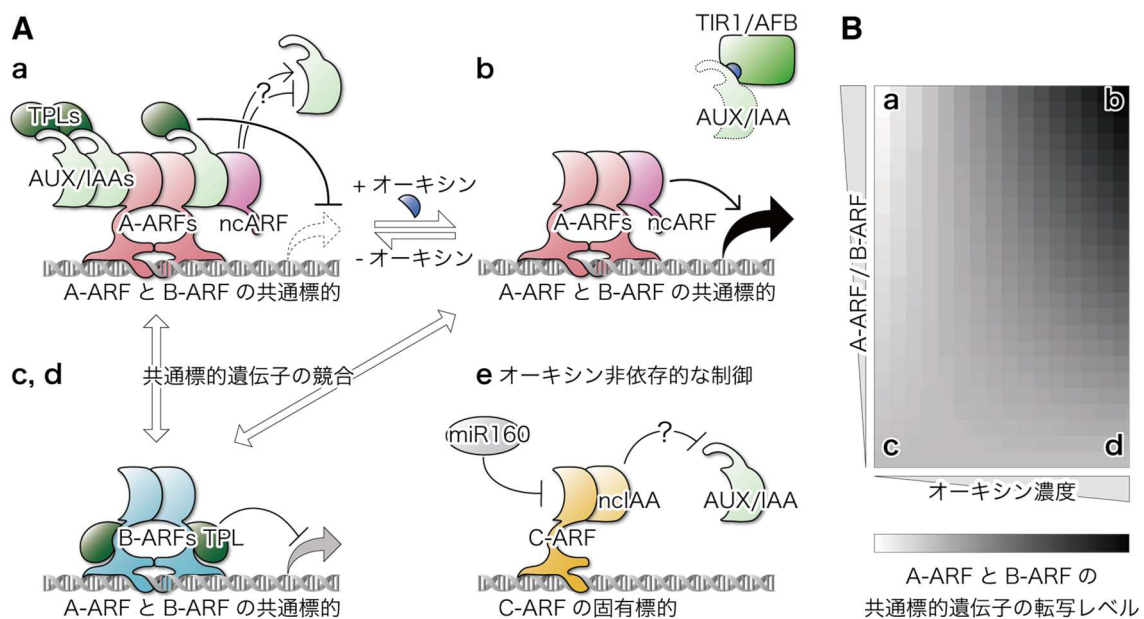


図 2-16. ゼニゴケでの解析から考察される NAS 基本原理

(A, B) 異なるオーキシン濃度・A-ARF/B-ARF 比率における NAS 因子による制御状態の模式図 (A) と各状態における A/B-ARF 共通標的遺伝子の転写レベル (B)。A-ARF は AUX/IAA を招集し、低オーキシン条件で標的遺伝子の転写を抑制する (a)。高オーキシン条件では AUX/IAA が TIR1/AFB に補足されて分解され、A-ARF が転写促進する (b)。B-ARF は A-ARF と標的遺伝子を取合い、AUX/IAA を介した強い転写抑制 (a) と A-ARF による転写促進 (b) を緩和し、オーキシン応答を微調整する (c, d)。C-ARF は A/B-ARF とは標的遺伝子が異なり、AUX/IAA との相互作用も弱いため、NAS とは独立な転写制御を行う (e)。詳細は本文および Suzuki et al. 2021 を参照。Suzuki et al. 2021 より改図。

## 最小セットのオーキシン信号伝達因子による遺伝子発現制御系

TIR1/AFB-AUX/IAA オーキシン受容機構は、陸上植物の共通祖先で確立された (Bowman et al. 2017; Mutte et al. 2018)。典型的 AUX/IAA は domain I (DI)、DII、Phox/Bem1 (PB1) ドメインからなり、それぞれ TPL、TIR1/AFB、PB1 との相互作用を担う (Szemenyei et al, 2008; Dharmasiri et al, 2005; Kepinski et al, 2005; Kim et al, 1997)。また、PB1 のみの非典型的 AUX/IAA (non-canonical AUX/IAA; ncIAA) も陸上植物で保存されている (Mutte et al. 2018)。ARF は class A/B/C に分類され (Finet et al, 2013)、いずれも DNA 結合ドメイン (DNA binding domain; DBD)、中間領域 (middle region; MR)、PB1 ドメインからなる (Kim et al. 1997; Ulmasov et al. 1997; Ulmasov et al. 1999a, b)。ARF は車軸藻植物と陸上植物の共通祖先で確立され、まず C-ARF が、その後陸上植物の共通祖先で A-ARF と B-ARF が分岐した。A-ARF はさらに DBD を欠く非典型的 ARF (non-canonical ARF; ncARF) を派生し、現生の蘚苔類と小葉植物に見られる (Bowman et al, 2017; Mutte et al, 2018)。一般に A-ARF は転写促進型、class B-ARF は転写抑制型とされる (Tiwari et al, 2003; Ulmasov et al, 1999a; Kato et al, 2015)。ゼニゴケは *TIR1/AFB*、*AUX/IAA*、*ncIAA*、*TPL*、*A/B/C-ARF*、*ncARF* を各 1 遺伝子の最小セットで有する (Mp*TIR1*、Mp*IAA*、Mp*NCIAA*、Mp*TPL*、Mp*ARF1/2/3*、Mp*NCARF*)。

Mp*ARF1* の KO 植物は、オーキシン感受性低下とともに葉状体の形態異常や無性芽形成過程の分裂面異常など多面的な成長阻害を示す (Kato et al. 2017)。しかし、Mp*TAA* の KO (Eklund et al. 2015) や Mp*IAA<sup>mutDII</sup>* の誘導活性化 (Kato et al. 2015)、Mp*TIR1* の KO 等による低オーキシン状態では葉状体形成も損なわれており、Mp*arf1<sup>ko</sup>* 植物の表現型は比較的穏やかである。その理由として、Mp*ARF1* 不在下では AUX/IAA が標的遺伝子座に招集されず、基底レベルで転写されることが考えられる (図 2-16; Kato et al. 2017; Kato et al. 2018)。

陸上植物の C-ARF は、miR160 に転写後調節される (Axtell et al. 2007; Lin et al. 2016; Tsuzuki et al, 2016; Flores-Sandoval et al. 2018a; Mallory et al, 2005; Wang et al, 2005)。Mp*ARF3* は、KO や過剰発現がオーキシン感受性にあまり影響せず (Flores-Sandoval et al, 2018a)、共発現グループもオーキシン関連遺伝子と異なる (Flores-Sandoval et al. 2018b)。系統関係も踏まえ、C-ARF は NAS とは独立に転写制御することが提唱されている (Flores-Sandoval et al. 2018a, b)。

Mp*ARF1/2/3* 間の DBD 交換可能性からも、Mp*ARF1/2* が共通の、Mp*ARF3* が異なる遺伝子を標的とすることが示唆される (Kato et al. 2020a)。一方 MR は、Mp*ARF2* では TPL と相互作用するなど、Mp*ARF1/2* で転写調節能が異なる (Kato et al. 2020a)。PB1 は、Mp*IAA*・Mp*ARF1/2/3* 間で Mp*ARF3*-Mp*ARF3* ホモを除く全組合せで相互作用する (Kato et al. 2015)。しかし、Mp*ARF1* の PB1 だけが Mp*IAA* と多量体形成すると考えられ、十分なオーキシン応答性を担保するには AUX/IAA 多量体が必要であると提唱されている (Kato et al. 2020)。そのため B-ARF は、TPL と相互作用するものの複数の TPL を擁する A-ARF-AUX/IAA 複合体に比べ転写抑制の程度は小さく、急激な転写変動の微調整を担うと考えられる (図 2-16)。

Mp*NCARF* はオーキシン応答を促す作用を有し、ncARF は A-ARF-AUX/IAA 相互作用の抑制や、ARF の補因子招集促進を担うと考察されている (Mutte et al. 2018)。しかし、充分

なオーキシン応答性の確立に AUX/IAA 多量体を要することを考慮すると (Kato et al. 2020a)、ncARF が ARF-AUX/IAA 相互作用を補助することも考え得る (図 2-16A)。一方 MpNCIAA は、KO によるオーキシン応答性の変化も見られず、オーキシン応答における機能は不明である (Mutte et al, 2018)。シロイヌナズナでは、ncIAA オルソログ AtIAA33 は AUX/IAA と競合的に C-ARF に結合して転写抑制を防ぐ (Lv et al, 2020)。ncIAA は AUX/IAA 結合阻害によって C-ARF を NAS から隔絶しているのかもしれない (図 2-16)。

### Mptir1 KO 細胞におけるオーキシン信号状態

前項で議論した通り、オーキシン依存的な転写抑制/促進の切替えと B-ARF による緩衝作用が NAS による転写制御の基本原則であると考えられる。蘚類ヒメツリガネゴケでは AUX/IAA ホモログを全て KO した *aux/iaa*  $\Delta$ 株が作出され、オーキシン感受性が完全に失われたことが報告されている (Lavy et al. 2016)。この場合、オーキシン応答が飽和して A-ARF による転写促進が最大の状態にあると考えられ (図 2-16B b~d)、実際に *aux/iaa*  $\Delta$ 株は高濃度オーキシン処理条件下で培養した野生型株と同様の表現型を示すと報じられている (Lavy et al. 2016)。ゼニゴケではオーキシン耐性変異体のスクリーニングの結果、MpARF1 の KO 株が取得された (Kato et al. 2017)。Mparf1 KO 細胞では、MpARF1 による転写促進が損なわれている一方で、MpARF1-MpIAA 複合体による強い転写抑制も行われず、A/B-ARF 標的遺伝子は低レベルで安定して転写されると考えられる (図 2-16B c~d; Kato et al. 2017; Kato et al. 2018)。本研究では、MpTIR1 がオーキシン受容体であることと一致して、Mptir1- $I^{ko}$  株が IAA に対する応答性を完全に喪失することを見出した (図 2-5; 図 2-9A, B)。このとき、Mptir1 KO 細胞では、オーキシンが認識されず最小レベルの状態、すなわち MpARF1-MpIAA 複合体による強力な転写抑制 (図 2-16B a~c) が継続した状態にあると考えられ、*aux/iaa*  $\Delta$ 株は反対の状態にある。実際に Mptir1- $I^{CKO>CitN}$  株を背景とした検証では、MpTIR1 の KO によって DII-mTurquoise2-NLS の蓄積上昇が認められ (図 2-8)、Mptir1 KO 細胞における MpIAA 高蓄積を支持している。以上のように AUX/IAA、A-ARF、TIR1/AFB の変異体が三者三様にオーキシン耐性となること、とりわけ *aux/iaa*  $\Delta$ 株や Mptir1- $I^{ko}$  株ではトランスクリプトームレベルで IAA 応答性が失われることは (図 2-9A; Lavy et al. 2016)、NAS がオーキシン応答における主要な経路であることを示唆している。

野生型株を 4 時間オーキシン処理した際の RNA-seq 解析では、NAA 処理に伴う発現変動遺伝子数は IAA 処理に比べ 10 倍以上多かった。しかし、両条件で共通して発現変動した遺伝子に着目すると、応答の強さに偏りは見られなかった (図 2-9C)。加えて、NAA と IAA はともに MpTIR1-MpIAA 相互作用を仲介するものの、その程度に顕著な差異は認められなかった (図 2-6A)。これらのことから、NAA と IAA はともに MpIAA 分解を促し MpARF による転写調節を亢進するものの、その強度に顕著な差はないと考えられる。NAA が IAA より多くの遺伝子の発現変化を誘導した別の理由として、転写応答を惹起するまでの時間的な差異が考えられる。NAA は受動拡散で細胞内に流入するのに対し、IAA は AUXIN 1/LIKE-

AUXIN 1 タンパク質による取込みを要する (Yamamoto and Yamamoto 1998, Yang et al. 2006)。細胞内でも、小器官への隔離や抱合等による不活化の程度は NAA と IAA で異なると推察される。こうした物性の違いから NAA は IAA より迅速に転写調節を惹起し、その結果、二次的な転写応答までも検出された可能性がある。この可能性を検証するには、オーキシン処理からサンプリングまでの時間を短くする、翻訳阻害剤を同時処理することで二次的な転写応答を抑制する、といった条件での RNA-seq 解析が有効と考えられる。

一方で、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株が NAA や 2,4-D を含有する培地では成長速度が低下したことや (図 2-5B)、4 時間の NAA 処理によって発現変動する遺伝子が見られたことから (図 2-9A, B)、MpTIR1 を介さない応答の可能性も残る。シロイヌナズナでは TRANSMEMBRANE KINASE 1 (TMK1) がオーキシン依存的に AtIAA32/34 を安定化させ、ARF による転写調節に干渉することが知られる (Cao et al, 2019)。しかし、IAA 処理では *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株の成長速度、転写応答ともにほぼ影響しなかったことを考慮すると (図 2-5B, 2-9A, B)、MpTIR1 非依存的なオーキシン受容機構の可能性は低く、仮に存在していてもその生理機能は NAS に比べ小さいと考えられる。生理調節物質としての作用以外にも、IAA や NAA は高濃度では脂質二重層のかく乱等によって動物細胞・植物細胞を問わず毒性を示す (Hąc-Wydro and Flasiński, 2015)。シロイヌナズナでは、NAA は膜交通阻害剤 Brefeldin A 処理に伴う細胞膜局在タンパク質 PINFORMED の細胞内局在促進を抑制するものの、同様の作用はオーキシン活性を持たない 2-naphthaleneacetic acid でも見られること、逆に IAA では見られないことから、NAA は非オーキシン特異的な応答をも誘導することが指摘されている (Paponov et al. 2019)。そのため、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株で観られた NAA 応答は、オーキシン非特異的な作用の可能性も考えられる。以上のような TIR1/AFB を介さないオーキシン応答やオーキシン様化合物への応答を解析する上でも、*Mptir1 KO* 細胞は有用な研究材料になると期待される。

### NAS は配偶体細胞の三次元的な形態形成に必須である

本研究では生育可能な *Mptir1 KO* 細胞が取得された (図 2-10A-C; 2-12)。この結果は、シロイヌナズナ *tir1/afb* 六重変異が配偶体の生存に影響しないことと一致して (Prigge et al, 2020)、TIR1/AFB を介した NAS が配偶体細胞の生命維持には必須ではないことを示唆する。

ゼニゴケの NAS では、オーキシン依存的に MpTIR1 が MpIAA 分解を促し、MpARF1 による転写調節を促す。このモデルと一致して、無性芽から葉状体への発生過程における MpIAA<sup>mutDII</sup> の誘導的活性化はしばしば細胞塊状の表現型を示し (Kato et al, 2015)、MpTIR1 の誘導 KO による表現型を想起させる (図 2-7B-D; 図 14B-G)。また、胞子発芽体におけるオーキシン合成遺伝子 *MpTAA1* の KO により、オーキシン感受性のある細胞塊となる (Eklund et al. 2015)。胞子発芽体が細胞塊状となる表現型は、IAA 不活化酵素 *iaaL* の恒常的過剰発現や MpARFs と直接相互作用する改変型 MpTPL による MpARFs 機能阻害でも生じる (Flores-Sandoval et al. 2015)。これらの結果からも、MpTIR1 のオーキシン受容に始まる NAS が適切な体制の確立や器官分化に必須であることが支持される。

ここで疑問となるのが、極端なオーキシン応答低下により生じた細胞塊の状態である。細胞壁によって細胞移動が制限される植物では、秩序だった発生のためには幹細胞からの適切な方向への細胞供給が必要となる。単一の頂端幹細胞を起点とするコケ植物の場合、細胞供給方向は頂端幹細胞の規則的な分裂に起因する (Harrison, 2017; Moody, 2020)。ゼニゴケでは、胞子発芽体や無性芽形成時に楔型の頂端幹細胞が確立される (Shimamura 2016)。MpTIR1 の KO による細胞塊では、適切な形状の頂端幹細胞の確立と細胞分裂面制御のどちらか、あるいは両方が損なわれているものと考えられる。すでに頂端幹細胞が形成された無性芽からの発生過程であっても MpTIR1 の誘導 KO によって細胞塊状となったことから (図 2-7D; 2-14D, E, G)、MpTIR1 は少なくとも適切な頂端幹細胞機能の維持に必須であると言える。また、無性芽形成時の MpTIR1 誘導 KO では適切な体軸形成が損なわれた (図 2-14H-J)。MpARF1 の KO でも無性芽形成過程の分裂面制御が損なわれることから (Kato et al. 2017)、NAS が体軸形成を制御することが支持される。Mptir1-1<sup>ko</sup> 細胞塊では、分化を想起させる肥大成長した細胞が認められたものの (図 2-10F, G)、RNA-seq からは器官分化の制御に関連する遺伝子の低発現が示され (図 15B, C)、適切な細胞分化が行われていないことが示唆された。MpTAA の軽微なノックダウン植物では、器官形成が損なわれた葉状体を呈することから (Eklund, 2015)、オーキシン応答が器官分化に必要であることが支持される。総合すると、MpTIR1 による NAS は頂端幹細胞の形成と維持を介して三次元的な体軸確立を制御すると同時に、MpLRL、MpRSL1、MpWIP といった器官形成の制御因子の発現を制御することで器官分化に関与すると考えられる。

### NAS 制御下にある発生制御因子

ヒメツリガネゴケの原系体では、オーキシンはクロロネマ細胞からカウロネマ細胞への分化を促し、TIR1/AFB ホモログ (*PpAFB1-4*) ノックダウン植物や *AUX/IAA* (*PpIAA1A/1B/2*) 優性変異体ではカウロネマ分化が抑制される (Ashton et al. 1979; Prigge et al. 2010)。カウロネマ分化はオーキシン信号伝達の下流で LRL ホモログと RSL ホモログにより制御されており、これらの遺伝子は茎葉体では仮根発生を制御している (Jang and Dolan 2011; Tam et al. 2015)。本研究では、胞子発芽体の IAA 処理または NAA 処理によって MpLRL と MpRSL1 の転写促進が確認された (図 2-16D)。胞子発芽体はオーキシン処理によって仮根発生が促進されることを踏まえると (Flores-Sandoval et al. 2015)、MpLRL・MpRSL1 はオーキシン信号伝達の下流で仮根発生を制御していると考えられる。

ヒメツリガネゴケでは、オーキシンは AP2 型転写因子の活性化を通じてカウロネマ側枝始原細胞からの茎葉体分化をも制御する (Aoyama et al, 2012)。茎葉体始原細胞は特徴的な分裂を経て四面体の頂端幹細胞が形成され、三次元的な体制の茎葉体が発生する (Harrison et al. 2009)。茎葉体頂端幹細胞では、*AUX/IAA* 分解を可視化する半定量的なオーキシン応答レポーター *PpR2D2* により、オーキシン受容が極小となることが示されている (Thelander et al, 2019)。ゼニゴケにおいて頂端幹細胞が形成される機構は明らかにされていないものの、

前項で議論した通り *MpTIR1* を介した NAS は分裂面制御や分化制御によって頂端幹細胞やその周辺細胞で重要な働きを担うと考えられる。RNA-seq 解析では、AP2 型転写因子を含め *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞で高発現または低発現となる転写因子が確認された (図 2-15B, C)。今後 NAS がどのように頂端幹細胞を確立し三次元的な体制を築くかを明らかにするうえで、これらの遺伝子は重要な研究対象であろう。



## 材料と方法

### 使用した植物

本章では苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L. subsp. *ruderalis*)の野生型雄株として Takaragaike-1 (Tak-1)野生型雌株として Takaragaike-2 (Tak-2; Chiyoda et al. 2008)または戻し交配第三世代 BC3-38 を用いた。表現型観察には Tak-1 と BC3-38 および Tak-1 と Tak-2 の交配により取得された孢子 (以下「F1 孢子」と記載)を使用した。*proMpEF1 $\alpha$ :MpTIR1-3xFLAG* 株は Tak-1、BC3-38、ならびに Tak-1 と B3-38 の交配により取得された孢子を背景に作出した。*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株ならびに *Mptir1-2-5<sup>ld</sup>* 株は F1 孢子を背景に作出した。*proMpTIR1:gMpTIR1-tdTomato/Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株は BC3-38 株と交配して次世代の孢子を取得した。

特に記載のない限り、ゼニゴケは 2 倍希釈した Gamborg's B5 (Gamborg et al. 1968) 1%寒天培地上にて 50–60  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  恒常白色光下、22°Cの条件で培養した。交配の際には 10–14 日齢の葉状体をバーミキュライト上に移植し、恒常白色光に加え遠赤色光を照射して生殖器形成を誘導した(Chiyoda et al. 2008).

### ゼニゴケへの形質転換

野生型株および *Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株へのバイナリベクタの形質転換は Ishizaki et al. 2008 または Kubota et al. 2013 に記載の手順に従って行った。*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株への形質転換は、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株と目的ベクタを保持するアグロバクテリウム GV2260 株を 0M51C 液体培地にて恒常白色光下で 2–3 日間振とう共培養して行った。共培養後の植物体は、滅菌水で十分に洗浄したうえで選抜培地に移植した。

### プラスミドの作成

プラスミド作成に用いたオリゴ DNA 配列は表 1 にまとめて記載した。

#### *proMpEF1 $\alpha$ :MpTIR1-3xFLAG* 株の作出

*MpTIR1* 開始コドンから最終コドンまでのコーディング配列 (CDS)を PCR により増幅した。鋳型にはゼニゴケ cDNA、プライマーセットは *MpTIR1\_entry/ MpTIR1\_nonstop* を使用した。増幅された DNA 断片を pENTR/D-TOPO (Thermo Fisher Scientific)にクローニングし、LR Clonase II (Thermo Fisher Scientific)を用いた LR 反応により pMpGWB110 (Ishizaki et al. 2015)に導入して発現ベクタを作成した。発現ベクタは F1 孢子、Tak-1、および BC3-38 に形質転換した。なお、ベクタ作出と F1 孢子への形質転換は当研究室卒業生の加藤大貴博士により遂行された。

#### プルダウンアッセイに使用する大腸菌株の作出

*MpIAA* または *MpIAA<sup>mutDII</sup>* CDS の第 627 アミノ酸から停止コドンまでを PCR により増幅した。鋳型には当該配列を含むベクタ (Kato et al. 2015)、プライマーセットは *EcoRI-MpIAA\_DII/MpIAA-NotI* を使用した。増幅された DNA 断片ならびに pGEX6P-1 ベクタを *EcoRI* (タカラバイオ)と *NotI* (タカラバイオ)で切断してライゲーションした。取得されたベ

クタは大腸菌 Rosetta2 (DE3)株に導入した。なお、ベクタ作出と大腸菌への形質転換は当研究室卒業生の加藤大貴博士により遂行された。

#### Mptir1-1<sup>ko</sup>株の作出

相同組換えは Ishizaki et al. 2013a の手順に従って行った。MpTIR1 5'側断片 3,462 bp および 3'側断片 3,367 bp を PCR により増幅した。鋳型には PAC クローン pMM23-241G5 (Okada et al. 2000)、プライマーセットは MpTIR1\_KO\_F1/MpTIR1\_KO\_R1 と MpTIR1\_KO\_F2/MpTIR1\_KO\_R2 を使用した。増幅された 5'側 DNA 断片、3'側 DNA 断片は、In-Fusion HD cloning kit (Clontech)を用いてそれぞれ pJHY-TMp1 ベクタの PacI サイトと AscI サイトに導入した。作成したベクタは F1 胞子に形質転換した。

#### proMpTIR1:MpTIR1/Mptir1-1<sup>ko</sup> 相補株の作出

MpTIR1 の開始コドン上流 5,618 bp から停止コドン下流 1,081 bp までのゲノム配列を PCR により増幅した。鋳型には pMM23-241G5、プライマーセットは MpTIR1\_usEntry/MpTIR1\_R15 を使用した。増幅された DNA 断片を pENTR/D-TOPO にクローニングして proMpTIR1:MpTIR1 エントリーベクタとし、LR 反応により pMpGWB301 (Ishizaki et al. 2015)に導入して発現ベクタを作成した。発現ベクタは Mptir1-1<sup>ko</sup> 株に形質転換した。

#### proMpTIR1:MpTIR1-tdTomato/Mptir1-1<sup>ko</sup> 株の作出

MpTIR1 の開始コドン上流 5,618 bp から最終コドンまでのゲノム配列を PCR により増幅した。鋳型には当該配列を含むベクタ、プライマーセットは MpTIR1\_usEntry/MpTIR1\_nonstop を使用した。増幅された DNA 断片を pENTR/D-TOPO にクローニングし、LR 反応により pMpGWB329 (Ishizaki et al. 2015)に導入して発現ベクタを作成した。発現ベクタは Mptir1-1<sup>ko</sup> 株に形質転換した。

#### proMpTIR1:3xFLAG-AtTIR1/Mptir1-1<sup>ko</sup> 相補株の作出

MpTIR1 プロモータ配列として MpTIR1 の開始コドン上流 5,618 bp から開始コドンまでを PCR により増幅した。鋳型には pMM23-241G5、プライマーセットは MpTIR1\_usEntry/MpTIR1\_R6 を使用した。増幅された DNA 断片は pENTR/D-TOPO にクローニングしてエントリーベクタとした。他方、N 末端側に 3xFLAG を付加した AtTIR1 CDS 配列を PCR により増幅した。鋳型には当該配列を含むベクタ (名古屋大学 鳥居啓子教授、打田直行教授より分与)、プライマーセットは AscI-Flag\_F/AtTIR1\_AscI\_R を使用した。増幅された 3xFLAG-AtTIR1 DNA 断片ならびに上記の proMpTIR1 エントリーベクタを AscI (New England BioLabs)で切断してライゲーションした。作成したベクタは LR 反応により pMpGWB301 (Ishizaki et al. 2015)に導入して発現ベクタとした。発現ベクタは Mptir1-1<sup>ko</sup> 株に形質転換した。なお、proMpTIR1 エントリーベクタ作出は研究室卒業生の加藤大貴博士により遂行された。

### Mptir1-1<sup>CKO>tdTN</sup>株の作出

NOS ターミネータ配列を PCR により増幅した。鋳型には当該配列を含むベクタ、プライマーセットは NotI-NosT\_F/ NotI-NosT\_R を使用した。増幅された DNA 断片ならびに *pro*MpTIR1:MpTIR1 エントリーベクタを NotI (タカラバイオ) で切断してライゲーションした。作成したベクタは LR 反応により pMpGWB337tdTN (Sugano et al, 2018) に導入して発現ベクタとした。発現ベクタは Mptir1-1<sup>ko</sup> 株に形質転換した。

### Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>株の作出

MpTIR1 開始コドンから停止コドンまでのコーディング配列 (CDS) を PCR により増幅した。鋳型には当該配列を含むベクタ、プライマーセットは MpTIR1\_entry/ MpTIR1\_stop を使用した。増幅された DNA 断片を pENTR/D-TOPO にクローニングし、LR 反応により pMpGWB337 (Nishihama et al. 2016) に導入して発現ベクタを作成した。発現ベクタは Mptir1-1<sup>ko</sup> 株に形質転換した。

### *pro*MpEF1α:(mut)DII-mTurquoise2-NLS/Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>株の作出

MpIAA の DII または mutDII 配列を PCR により増幅した。鋳型には当該配列を含むベクタ、プライマーセットは MpIAA\_dN3/MpIAA DII\_R1 を使用した。増幅された DNA 断片を pENTR/D-TOPO にクローニングして (mut)DII エントリーベクタとした。他方、mTurquoise2-NLS 配列を PCR により増幅した。鋳型には当該配列を含むベクタ、プライマーセットはリン酸化処理した Aor51HI-mT2\_F/NOS<sub>t</sub>\_head\_SacI-NLS\_mTurq\_R を使用した。増幅した mTurquoise2-NLS 配列は SacI (タカラバイオ) で切断し、SacI と Aor51HI (タカラバイオ) で切断した pMpGWB203 (Ishizaki et al. 2015) にライゲーションした。LR 反応により作成した改変型デスチネーションベクタに (mut)DII エントリーベクタを導入して発現ベクタとした。発現ベクタは Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup> 株に形質転換した。

### Mptir1-1<sup>ld</sup>株の作出

gRNA 配列をコードする一本鎖オリゴDNA とアンチセンス配列をコードするオリゴDNA とアニーリングし、BsaI (New England BioLabs) で切断したベクタにライゲーションした。但し、5'gRNA1 と 5'gRNA3 は pMpGE\_En\_04 へ、5'gRNA2 と 5'gRNA4 は pBC-GE12 へ、3'gRNA1 と 3'gRNA3 は pBC-GE23 へ、3'gRNA2 と 4'gRNA4 は pBC-GE34 へ導入した。以降、5'gRNA1 は 5'gRNA2 と、5'gRNA3 は 5'gRNA4 と、3'gRNA1 は 3'gRNA2 と、3'gRNA3 は 3'gRNA4 と組にして扱った。5'gRNA 一組と 3'gRNA 一組の 4 通りの組合せで各 4 ベクタを BglII (New England BioLabs) で切断して同時にライゲーションし、LR 反応により pMpGE017 に導入して発現ベクタとした。発現ベクタは Mptir1-1<sup>ko</sup> 株に形質転換した。

## ジェノタイピング

ジェノタイピングには、植物体の小片を緩衝液(100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 1 M KCl, 10 mM EDTA)中で破碎して滅菌蒸留水で 5 倍希釈した溶液の上清を PCR の鋳型とした。

性判定は、プライマーセット rbm-27F\_new/rbm-27R\_new および rhf-73F\_new/rhf-73R\_new を用いた PCR で V 染色体または U 染色体上の配列 (Fujisawa et al. 2001)を増幅して行った。

*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株のジェノタイピングにはプライマーセット A (MpTIR1\_L21/MpTIR1\_R12)、B (MpTIR1\_L14/MpEF\_GT\_R1)、または C (EnSpm\_L2/ MpTIR1\_R13)を用いた PCR を行い、増幅バンド長または増幅の可否で判定した。

*Mptir1-1<sup>ld</sup>* 株のジェノタイピングでは、まずプライマーセット MpTIR1\_L30/MpTIR1\_R21 を用いた PCR により *MpTIR1* ゲノム配列を増幅した。PCR 産物を Exonuclease I と Shrimp Alkaline Phosphatase (New England BioLabs)で処理した後に Fast Gene™ Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス)を用いて精製し、MpTIR1\_L45 または MpTIR1\_R20 をプライマーとするシーケンス反応を行い配列確認した。

## 誘導 KO

*Mptir1-1<sup>CKO>tdTN</sup>* 株は無性芽を培地に播いた直後に、*Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株と *proM pEF1a:(mut)DII-mTurquoise2-NLS/Mptir1-1<sup>CKO>CitN</sup>* 株は培養開始後 1 日目の段階で 5 μM DEX 溶液 3 μL を滴下し、数分間風乾した後に 37°Cにて 60 分の高温処理を行った。4 時間の間隔をおいて同様の DEX 処理・高温処理を再度行った。その後通常の条件で培養を継続し観察に供した。

無性芽形成時の誘導 KO では、*Mptir1<sup>CKO>tdTN</sup>* 株 14 日齢葉状体を 5 μM DEX 溶液に浸して吸引浸潤し、寒天培地上に引き揚げて約 20 分間風乾した。その後 37°C気相インキュベータにて 60 分間高温処理した。4-5 時間の間隔をおいて同様の DEX 処理・高温処理を再度行った。その後通常の条件で十分な期間培養を継続し観察に供した。

## 植物体切片作成

寒天培地にて培養した 10 日齢孢子発芽体ならびに *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 細胞塊を観察に用いた。採取した植物体は固定液 (2.5% (v/v) glutaraldehyde, 2% (w/v) paraformaldehyde, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2))に浸漬し、4°C にて一晩固定した。サンプルを 50 mM リン酸緩衝液で洗浄し、後固定のため 2% (w/v) OsO<sub>4</sub> 水溶液に浸漬して室温にて 2 時間処理し、8% w/v sucrose 水溶液で洗浄した。その後、サンプルを 25、50、80、99、100% (v/v) ethanol へ順に浸漬して脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。ウルトラマイクロトーム Ultracut-UCT (Leica)にてダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作成し、トルイジンブルーで組織を染色して観察に供した。なお、ウルトラマイクロトームによる切片作成、トルイジンブルー染色、顕微鏡観察は当研究室所属の岩野恵博士により遂行された。

## 植物体の観察

葉状体、孢子発芽体、細胞塊は SZX16 (オリンパス)、M205C (Leica)、Axiophot (Zeiss)また

は BZ-X710 (キーエンス)を用いて観察した。培地全体の写真は EOS Kiss X3 (キャノン)で撮影した。*proMpEF1α:(mut)DII-mTurquoise2-NLS/Mptir1-I<sup>CKO>CitN</sup>* 株のノッチ部の共焦点顕微鏡観察には FLUOVIEW FV1000 (オリンパス)を用いた。

走査型電子顕微鏡観察は、液体窒素で凍結した植物体を TM3000 (日立ハイテク)により観察した。

#### 蛍光画像の調整

M205C で取得された明視野画像と蛍光画像は、Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いてマージした。必要に応じて輝度とコントラストを調節した。FLUOVIEW FV1000 で取得された z 軸連続画像は Image J を用いて最大輝度による二次元投射を行い、その後マージした。BZ-710 で取得された画像は BZ-X Analyzer (キーエンス)を用いてマージした。

#### 植物体面積測定

植物体面積は Image J により測定した。明視野画像を RGB の 3 チャンネルに分割した。背景と植物体とのコントラストが最も明瞭な B チャンネル画像を基に Auto threshold (“Default” method)で二値化画像を作成した。二値化画像において Find Edges および Analyze Particles を用いて植物体面積を測定した。

#### 核内蛍光輝度定量

核内 mTurquoise2 蛍光輝度は Image J により測定した。*proMpEF1α:(mut)DII-mTurquoise2-NLS/Mptir1-I<sup>CKO>CitN</sup>* 株は培養 1 日時点で誘導処理を行った後、さらに 1 日培養して共焦点顕微鏡観察に供した。ノッチ周辺領域で z 軸方向に 5 μm 間隔で 45 枚の連続画像を取得し、積算値による二次元投射を行った。各二次元投射像について、無作為に選んだ 25 個の核領域 (それぞれ直径 8 μm の円形領域とした)内の蛍光輝度を測定し、その平均値を各核の代表値とした。同様にして 25 個所の背景領域の輝度を測定し、その平均値を背景輝度とした。核の輝度値から背景輝度値を引いて補正した値を統計検定に用いた。なお、*proMpEF1α:(mut)DII-mTurquoise2-NLS/Mptir1-I<sup>CKO>CitN</sup>* 株は各 2 ラインの独立な形質転換体植物を使用し、誘導処理群と未処理群それぞれについて 5 または 6 個体で蛍光を観察した。

#### プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイは当研究室卒業生の加藤大貴博士により遂行された。

GST-MpIAA (627C)発現大腸菌株および GST-MpIAA<sup>mutDII</sup> (627C)発現大腸菌株は、LB 液体培地 5 mL 中で 37°Cにて一晩振とう培養した。培養液を LB 液体培地 300 mL で希釈して 37°Cにて振とう培養し、OD<sub>600</sub> = 0.5 時点で 0.1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside 添加してさらに 5 時間培養した。培養後、菌体を回収して緩衝液 (PBS, 1 mM dithiothreitol)に再懸濁して超音波破碎した。4°Cにて 12,000 xg で 30 分間遠心分離した後、上清を Pierce™ Disposable Plastic Columns (Thermo Fisher Scientific)および Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare Life Science)を用いて精製した。

*proMpEF1 $\alpha$ :MpTIR1-3xFLAG* 株 14 日齢葉状体を採取して液体窒素中で凍結し、0.75 倍量の抽出緩衝液 (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% NP-40, 10  $\mu$ M dithiothreitol, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/mL Pepstatin A, 10  $\mu$ M MG132) とともに乳鉢と乳棒を用いて粉碎し、氷上で融解した。4°C にて 16,000  $\times$ g で 15 分間遠心分離し、上清を孔径 0.45  $\mu$ m のシリンジフィルタでろ過して破片を除去した。タンパク質濃度を Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した。2.5 mg 相当量のタンパク質抽出溶液に上記の GST-MpIAA または GST-MpIAA<sup>mutDII</sup> 結合グルタチオンセファロースビーズ 10  $\mu$ L と混和し、オーキシンを加えて 4°C にて 30 分間反応させた。ビーズを氷冷抽出緩衝液で 3 回洗浄した後、2x Laemmli 緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% [w/v] SDS, 10% [v/v] 2-mercaptoethanol, 20% [v/v] glycerol) と混合して 95°C にて 5 分間処理した。10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離し、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad Laboratories) に転写した。PVDF 膜は FLAG 抗体 (1:5,000; Sigma-Aldrich) または GST 抗体 (1:2,000; ナカライテスク) と 1 時間反応させ、Phosphate buffered saline-Tween (PBS-T; 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で洗浄した後、マウス IgG 抗体 (1:10,000; GE Healthcare) と 1 時間反応させた。ブロットは ECL Prime (GE Healthcare) で検出し、ImageQuant LAS 4010 (GE Healthcare) で撮影した。

#### リアルタイム PCR

*MpTIR1* のリアルタイム PCR には、Tak-1、BC3-38、*proMpEF1 $\alpha$ :MpTIR1-3xFLAG* 株の 10 日齢葉状体を用いた。オーキシン応答遺伝子 (*MpC2HDZ*, *MpWIP*) のリアルタイム PCR には、F1 胞子と *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株を 1/2 Gamborg's B5 液体培地で 5 日間振とう培養した後、10  $\mu$ M NAA で 4 時間処理して用いた。いずれも、植物体は採取後ただちに液体窒素で凍結し、Kubota et al. 2014 に記載の手順で RNA を抽出した。Kato et al. 2017 に記載の手順に従い、cDNA を逆転写してリアルタイム PCR を行った。使用したプライマーは表 1 にまとめて記載した。*MpEF1 $\alpha$*  を内部標準遺伝子として、目的遺伝子の相対発現量を Pfaffl 法 (Pfaffl. 2001) により計算した。

#### RNA-seq 解析

F1 胞子と *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株を 1/2 Gamborg's B5 液体培地で 5 日間振とう培養した後、4 時間の 10  $\mu$ M IAA 処理または mock 処理を行った。また、同様の条件で 4 時間の 10  $\mu$ M NAA 処理または mock 処理を行った。いずれも採取した植物体は直ちに液体窒素で凍結し、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) の“Purification of Total RNA from Plant Cells and Tissues and Filamentous Fungi”プロトコルに従い RNA を抽出した。IAA 処理実験における抽出 RNA は、京都大学生命科学研究科の近藤武史特定助教ならびに山銅ゆかり教務職員に依頼して品質確認、アダプタ付加、NextSeq500 (Illumina) によるシングルエンドシーケンシングを行った。NAA 処理実験における抽出 RNA は、株式会社マクロジェン・ジャパンに外注して品質確認、アダプタ付加、NovaSeq6000 (Illumina) によるペアエンドシーケンシングを行った。他の公開 RNA-

seq データは Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>)より取得した (表 2)。

RNA-seq の生データは、デフォルト設定の fastp (version 0.20.1; Chen et al. 2018)で処理してアダプタ配列と低クオリティリードを除去した。その後、STAR (version 2.6.1c; Dobin et al. 2013)によりゼニコゲゲノム (version 5.1 + U chromosome)にマッピングした。以降の解析は R (version 4.0.0; <https://www.R-project.org/>)を用いて行った。各遺伝子のエクソン上にマッピングされたリード数を Rsubread package (version 2.2.2; Liao et al. 2019)の“featureCounts”関数で計数した。二群間比較は DESeq2 パッケージ (version 1.28.1; Love et al. 2014)を用いて Wald test により行った。なお、*Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株と野生型株の比較では U 染色体遺伝子は予め除いた。二種の *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株 (mock 処理)と 9 日齢葉状体 (Higo et al. 2016)または 7 日齢葉状体 (Yasui et al. 2019)の比較では、バッチエフェクトを除けないため、4 通り全ての二群間比較で共通して差次的に発現変動していた遺伝子を抽出した。なお、図 2-15C の発現プロファイルは ± IAA 実験における mock 処理の *Mptir1-1<sup>ko</sup>* 株と 7 日齢葉状体 (Yasui et al. 2019)の二群間比較結果における数値で描画した。複数条件における共通変動遺伝子は UpSetR パッケージ (version 1.4.0; Nils. 2019)を用いて可視化した。PCA には全遺伝子の発現データを用い、底を 2 とする対数値に変換して DESeq2 の“plotPCA”関数により行った。グラフは特に記載のない限り ggplot2 パッケージ (version 3.3.1; <https://ggplot2.tidyverse.org>) と ggrepel パッケージ (version 0.8.2; <https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel>)を用いて描画した。



表 1. プライマーリスト (1/2)

Name	Sequence
Aor51HI-mT2_F	gctATGGTGTCTAAGGGTGAGGAAC
Ascl-Flag_F	TTTGCGCGCCATGGACTACAAAGACCATGACG
AtTIR1_AscI_R	TTTGCGCGCCTTATAATCCGTTAGTAGTAATGATTTG
EcoRI-MpIAA_DII	ttgaattcGAAACCAAGCAGCAATCGTC
EnSpm_L2	TGGATTTGAACTTCTTTCGTATGGA
MpC2HDZ-qPCR_F1	GGCAGCCAGCCATGTAAGTAG
MpC2HDZ-qPCR_R1	CCGGCAGAATTGAGACATTG
MpEF_GT_R1	GAAGGCTTCTGATTGAAGTTTCCTTTTCTG
MpEF-qPCR_F	AAGCCGTCGAAAAGAAGGAG
MpEF-qPCR_R	TTCAGGATCGTCCGTTATCC
MpIAA DII_R1	CTTCCGGAACGATCGAATG
MpIAA_dN3	caccatgGAAACCAAGCAGCAATCGTC
MpIAA-NotI	tttgcggccgcCTCACACGTTCCGGTTGAGTC
MpTIR1_3'gRNA_1F	ctcgCTCTCTACTCGATTGTGGGT
MpTIR1_3'gRNA_1R	aaacACCCACAATCGAGTAGAGAG
MpTIR1_3'gRNA_2F	ctcgCGTATCCACCAATGTTTAAG
MpTIR1_3'gRNA_2R	aaacCTTAAACATTGGTGGATACG
MpTIR1_3'gRNA_3F	ctcgGTACCTCTTCTCTTGCAAG
MpTIR1_3'gRNA_3R	aaacCTTGCAAGAGGAAGAGGTAC
MpTIR1_3'gRNA_4F	ctcgGACTACGTCTGCCCGCAACA
MpTIR1_3'gRNA_4R	aaacTGTTGCGGGCAGACGTAGTC
MpTIR1_5'gRNA_1F	ctcgCTGGCGCTCTGCGAAAGTAG
MpTIR1_5'gRNA_1R	aaacCTACTTTCGCGAGCGCCAG
MpTIR1_5'gRNA_2F	ctcgGATATCGAGCGATCGTTATT
MpTIR1_5'gRNA_2R	aaacAATAACGATCGCTCGATATC
MpTIR1_5'gRNA_3F	ctcgTGTCAGATCCTACATGGCGA
MpTIR1_5'gRNA_3R	aaacTCGCCATGTAGGATCTGACA
MpTIR1_5'gRNA_4F	ctcgCCACGCAGGGGCTATTGCC
MpTIR1_5'gRNA_4R	aaacGGGCAATAGCCCCTGCGTGG
MpTIR1_entry	CACCATGCCCTCTCCCTTTCCTG
MpTIR1_KO_F1	ctaaggtagcgattaACGATACAAAGGAGCGAGAC
MpTIR1_KO_F2	taaactagtgcgcgTGAGAAATGGAGCAGGCATC
MpTIR1_KO_R1	gccccggcaagcttaCGTTCATGCCCCAGCTTTAG
MpTIR1_KO_R2	ttatccctagggcgGCGCACGAGAGCTGATAATG
MpTIR1_L14	AGATTTGATGGGGTCTTCACA
MpTIR1_L21	GAGGCGTGCATTGATGTG
MpTIR1_L30	CGAGAACAGGTGCGAGAGTA
MpTIR1_L45	GGTGCCAAATCTTCATCCTGAGC
MpTIR1_nonstop	TTGTGCTATTTGACAAAGTCG
MpTIR1_R12	TGCCCTTGATGTGCAGAGAG
MpTIR1_R13	ACATGTGGAACCCATGGAAG
MpTIR1_R15	CGATGTTTCTGTAAGTTTCGTCC

表 1. プライマーリスト (2/2)

Name	Sequence
MpTIR1_R20	CGACGTATGTATGCTCCAAGG
MpTIR1_R21	GCTTCGAGCCAATCATCAGC
MpTIR1_R6	CATCTCTCCCCCTCCTCCTT
MpTIR1_stop	GTCATTGTGCTATTTGACAAAG
MpTIR1_usEntry	cACCTTACCCCAAGTCAAAGTGC
MpTIR1-qPCR_F2	TGCAAGTCGATGACCAATGC
MpTIR1-qPCR_R2	CGGCGTCAATATACACAATCG
MpWIP-qPCR_F1	GGTCGAGTGACCTTTGATCG
MpWIP-qPCR_R1	GTGGCTGGCTGGATAGTTGG
NOSt_head_SacI-NLS_mTurq_R	TTCGAGCTCTATCCTCCAACCTTTCTTCTTCTTAGGCTGC AATTTGTAAAGCTCATCCAT
NotI-NosT_F	TTTGC GGCCGCGAGCTCGAATTTCCCCGATC
NotI-NosT_R	TTTGC GGCCGCGAGTTAGCTCACTCATTAGGCAC
rbm27-F_new	ACTTTTGCAACAGCGACTTC
rbm27-R_new	GCCTGCAATATAGCCTTCAA
rhf73-F_new	GAACCCGAAACTCAGGTTTT
rhf73-R_new	ATAACAGCCAAACGGATCAA

表 2. トランスクリプトーム解析に用いた公開 RNA-seq データ

ID	Sample	Reference
DRR050343	11-day-old thalli	Higo et al., 2016
DRR050344	11-day-old thalli	Higo et al., 2016
DRR050345	Mature antheridiophores	Higo et al., 2016
DRR050346	Mature antheridiophores	Higo et al., 2016
DRR050347	Mature antheridiophores	Higo et al., 2016
DRR050348	Mature antheridiophores	Higo et al., 2016
DRR050349	Antheridia	Higo et al., 2016
DRR050350	Antheridia	Higo et al., 2016
DRR050351	Mature archegoniophores	Higo et al., 2016
DRR050352	Mature archegoniophores	Higo et al., 2016
DRR050353	Mature archegoniophores	Higo et al., 2016
DRX089774	Gemma cups of 21-day-old thalli	Yasui et al., 2019
DRX089775	Gemma cups of 21-day-old thalli	Yasui et al., 2019
DRX089776	Gemma cups of 21-day-old thalli	Yasui et al., 2019
DRX089777	Midribs of 21-day-old thalli	Yasui et al., 2019
DRX089778	Midribs of 21-day-old thalli	Yasui et al., 2019
DRX089779	Midribs of 21-day-old thalli	Yasui et al., 2019
DRX089780	7-day-old thalli	Yasui et al., 2019
DRX089781	7-day-old thalli	Yasui et al., 2019
DRX089782	7-day-old thalli	Yasui et al., 2019
SRR1553294	Gametophytic apical cells	Frank et al., 2015
SRR1553295	Gametophytic apical cells	Frank et al., 2015
SRR1553296	Gametophytic apical cells	Frank et al., 2015
SRR1553297	Immature sporophytes	Frank et al., 2015
SRR1553298	Immature sporophytes	Frank et al., 2015
SRR1553299	Immature sporophytes	Frank et al., 2015
SRR4450254	96-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450255	96-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450256	96-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450257	72-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450258	72-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450259	24-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450260	0-hour-old spores	Bowman et al., 2017
SRR4450261	0-hour-old spores	Bowman et al., 2017
SRR4450262	0-hour-old spores	Bowman et al., 2017
SRR4450263	48-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450264	48-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450265	24-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450266	24-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450267	72-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017
SRR4450268	48-hour-old sporelings	Bowman et al., 2017

## 文献抄

- Aoyama T, Hiwatashi Y, Shigyo M, Kofuji R, Kubo M, Ito M, Hasebe M. 2012. AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* **139**: 3120–3129.
- Apostolakos P, Galatis B, Mitrakos K. 1982. Studies on the development of the air pores and air chambers of *Marchantia paleacea* 1. Light microscopy. *Ann Bot* **49**: 377–396.
- Ashton NW, Grimsley NH, Cove DJ. 1979. Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* **144**: 427–435.
- Axtell MJ, Snyder JA, Bartel DP. 2007. Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell* **19**: 1750–1769.
- Barnes CR, Land WJG. 1907. Bryological papers. I. The origin of air chambers. *Bot Gaz* **44**: 197–213.
- Barnes CR, Land WJG. 1908. Bryological papers. II. The origin of the cupule of *Marchantia*. *Bot Gaz* **46**: 401–409.
- Binns AN, Maravolo NC. 1972. Apical dominance, polarity, and adventitious growth in *Marchantia polymorpha*. *Am J Bot* **59**: 691–696.
- Bowman JL, Briginshaw LN, Fisher TJ, Flores-Sandoval E. 2019. Something ancient and something neofunctionalized—evolution of land plant hormone signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **47**: 64–74.
- Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, 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.
- Bowman JL. 2016. A brief history of *Marchantia* from Greece to genomics. *Plant Cell Physiol* **57**: 210–229.
- Breuninger H, Thamm A, Streubel S, Sakayama H, Nishiyama T, Dolan L. 2016. Diversification of a transcription factor family led to the evolution of antagonistically acting genetic regulators of root hair growth. *Curr Biol* **26**: 1622–1628.
- Cao M, Chen R, Li P, Yu Y, Zheng R, Ge D, Zheng W, Wang X, Gu Y, Gelová Z, et al. 2019. TMK1-mediated auxin signalling regulates differential growth of the apical hook. *Nature* **568**: 240–243.

- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**: i884–i890.
- Chiyoda S, Ishizaki K, Kataoka H, Yamato KT, 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.
- Conway JR, Lex A, Gehlenborg N. 2017. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* **33**: 2938–2940.
- Cox CJ, Li B, Foster PG, Embley TM, Civián P. 2014. Conflicting phylogenies for early land plants are caused by composition biases among synonymous substitutions. *Syst Biol* **63**: 272–279.
- Crandall-Stotler B. 1980. Morphogenetic designs and a theory of bryophyte origins and divergence. *BioScience* **30**: 580–585.
- Crandall-Stotler B. 1981. Morphology/anatomy of hepatics and anthocerotes. J. Cramer, Vaduz, Lichtenstein.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441–445.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow, J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner Alexander. *Bioinformatics* **29**: 15–21.
- Dolan L, Duckett CM, Grierson C, Linstead P, Schneider K, Lawson E, Dean C, Poethig S, Roberts K. 1994. Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**: 2465–2474.
- Douin C. 1925. La théorie des initiales chez les Hépatiques à feuilles. *Bull Soc Bot Fr* **72**: 565–591.
- Eklund DM, Ishizaki K, Flores-Sandoval E, Kikuchi S, Takebayashi Y, Tsukamoto S, Hirakawa Y, Nonomura M, Kato H, Kouno M, et al. 2015. Auxin produced by the indole-3-pyruvic acid pathway regulates development and gemmae dormancy in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell* **27**: 1650–69.
- Finet C, Berne-Dedieu A, Scutt CP, Marlétaz F. 2013. Evolution of the ARF gene family in land plants: Old domains, new tricks. *Mol Biol Evol* **30**: 45–56.
- Flores-Sandoval E, Eklund DM, Bowman JL. 2015. A simple auxin transcriptional response system regulates multiple morphogenetic processes in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genet* **11**: e1005207. doi: 10.1371/journal.pgen.1005207.

- Flores-Sandoval E, Eklund DM, Hong SF, Alvarez JP, Fisher TJ, Lampugnani ER, Golz JF, Vázquez-Lobo A, Dierschke T, Lin SS, et al. 2018a. Class C ARFs evolved before the origin of land plants and antagonize differentiation and developmental transitions in *Marchantia polymorpha*. *New Phytol* **218**: 1612–1630.
- Flores-Sandoval E, Romani F, Bowman JL. 2018b. 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**: 1–21.
- Frangedakis E, Shimamura M, Villarreal JC, Li FW, Tomaselli M, Waller M, Sakakibara K, Renzaglia KS, Szövényi P. 2021. The Hornworts: morphology, evolution and development. *New Phytol* **229**: 735–754.
- Frank MH, Scanlon MJ. 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.
- Fries K. 1964. Über einen genuinen keimungs und streckungswachstumsaktiven hemmstoff bei *Marchantia polymorpha* L. *Beiträge Biol Pflanz* **40**: 177–235.
- Fujisawa M, Nakayama S, Nishio T, Fujishita M, Hayashi K, Ishizaki K, Kajikawa M, Yamato KT, Fukuzawa H, Ohyama K. 2003. Evolution of ribosomal DNA unit on the X chromosome independent of autosomal units in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Chromosome Res* **11**:695–703.
- Gaal DJ, Dufresne SJ, Maravolo NC. 1982. Transport of <sup>14</sup>C-indoleacetic acid in the hepatic *Marchantia polymorpha*. *Bryologist* **85**: 410–418.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151–158
- Gifford EMJ. 1983. Concept of apical cells in bryophytes and pteridophytes. *Ann Rev Plant Physiol* **34**: 419–440.
- Gray WM, del Pozo JC, Walker L, Hobbie L, Risseuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Ma H, Estelle M. 1999. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **13**: 1678–1691.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. 2001. Auxin regulates SCF<sup>TIR1</sup>-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271–276.

- Hąc-Wydro K, Flasiński M. 2015. The studies on the toxicity mechanism of environmentally hazardous natural (IAA) and synthetic (NAA) auxin – The experiments on model *Arabidopsis thaliana* and rat liver plasma membranes. *Colloids Surf B Biointerfaces* **130**: 53–60.
- Harrison CJ, Langdale JA. 2010. Comment: The developmental pattern of shoot apices in *Selaginella kraussiana* (Kunze) A. Braun. *Int J Plant Sci* **171**: 690–692.
- Harrison CJ, Rezvani M, Langdale JA. 2007. Growth from two transient apical initials in the meristem of *Selaginella kraussiana*. *Development* **134**:881–889.
- Harrison CJ, Roeder AHK, Meyerowitz EM, Langdale JA. 2009. Local cues and asymmetric cell divisions underpin body plan transitions in the moss *Physcomitrella patens*. *Curr Biol* **19**: 461–471.
- Harrison CJ. 2017. Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Phil Trans R Soc B* **372**: 20150490.
- Heidstra R, Welch D, Scheres B. 2004. Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes & Development* **18**:1964–1969.
- Higo A, Niwa M, Yamato KT, Yamada L, Sawada H, Sakamoto T, Kurata T, Shirakawa M, Endo M, Shigenobu S, Yamaguchi K, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T, Araki T. 2016. Transcriptional framework of male gametogenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* **57**: 325–338.
- Hisanaga T, Okahashi K, Yamaoka S, Kajiwara T, Nishihama R, Shimamura M, Yamato KT, Bowman JL, Kohchi T, Nakajima K. 2019. A *cis*-acting bidirectional transcription switch controls sexual dimorphism in the liverwort. *EMBO J* **38**: e100240.
- Ishizaki K, Chiyoda S, Yamato KT, 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, 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, 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, Nishihama R, Ueda M, Inoue K, Ishida S, Nishimura Y, Shikanai T, 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, Nonomura M, Kato H, Yamato KT, 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**: 643–51.
- Jang G, Dolan L. 2011. Auxin promotes the transition from chloronema to caulonema in moss protonema by positively regulating *PpRSL1* and *PpRSL2* in *Physcomitrella patens*. *New Phytol* **192**: 319–327.
- Jones VAS, Dolan L. 2017. MpWIP regulates air pore complex development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Development* **144**: 1472–1476.
- Kanazawa T, Era A, Minamino N, Shikano Y, Fujimoto M, Uemura T, Nishihama R, Yamato KT, Ishizaki K, Nishiyama T, Kohchi T, Nakano A, Ueda T. 2016. SNARE molecules in *Marchantia polymorpha*: unique and conserved features of the membrane fusion machinery. *Plant Cell Physiol* **57**: 307–324.
- Kasahara H. 2016. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **80**: 1–9.
- Kato H, Ishizaki K, Kouno M, Shirakawa M, Bowman JL, Nishihama R, Kohchi T. 2015. Auxin-mediated transcriptional system with a minimal set of components is critical for morphogenesis through the life cycle in *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genet* **11**: e1005084. doi: 10.1371/journal.pgen.1005084.
- Kato H, Kouno M, Takeda M, Suzuki H, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T. 2017. The roles of the sole activator-type auxin response factor in pattern formation of *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol* **58**: 1642–1651.
- Kato H, Mutte SK, Suzuki H, Crespo I, Das S, Radoeva T, Fontana M, Yoshitake Y, Hainiwa E, van den Berg W, et al. 2020a. Design principles of a minimal auxin response system. *Nat Plants* **6**: 473–482. doi: 10.1038/s41477-020-0662-y.
- Kato H, Nishihama R, Weijers D, Kohchi T. 2018. Evolution of nuclear auxin signaling: lessons from genetic studies with basal land plants. *J Exp Bot* **69**: 291–301.
- Kato H, Yasui Y, Ishizaki K. 2020b. Gemma cup and gemma development in *Marchantia polymorpha*. *New Phytol*. **228**: 459–465.

- Kepinski S, Leyser O. 2005. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446–451.
- Kidner C, Sundaresan V, Roberts K, Dolan L. 2000. Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta* **211**: 191–199.
- Kim J, Harter K, Theologis A. 1997. Protein–protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11786–11791.
- Koide E, Suetsugu N, Iwano M, Gotoh E, Nomura Y, Stolze SC, Nakagami H, Kohchi T, Nishihama R. 2020. Regulation of photosynthetic carbohydrate metabolism by a Raf-like kinase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol* **61**: 631–643.
- Kopischke S, Schussler E, Althoff F, Zachgo S. 2017. TALEN-mediated genome-editing approaches in the liverwort *Marchantia polymorpha* yield high efficiencies for targeted mutagenesis. *Plant Methods* **13**:20.
- Korasick DA, Westfall CS, Lee SG, Nanao MH, Dumas R, Hagen G, Guilfoyle TJ, Jez JM, Strader LC. 2014. Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 5427–5432.
- Korn RW. 1993. Apical cells as meristems. *Acta Biotheor* **41**: 175–189.
- Korn RW. 2001. Analysis of shoot apical organization in six species of the Cupressaceae based on chimeric behavior. *Am J Bot* **88**: 1945–1952.
- Korn RW. 2002. Chimeric patterns in *Juniperus chinensis* ‘Torulosa Variegata’ (Cupressaceae) expressed during leaf and stem formation. *Am J Bot* **89**: 758–765.
- Kubota A, Ishizaki K, Hosaka M, 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 KT, Kohchi T. 2020. Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution. *Nat Commun* **5**: 3668.
- LaRue CD, Narayanaswami S. 1957. Auxin inhibition in the liverwort *Lunularia*. *New Phytol* **56**: 61–70.
- Lavy M, Prigge MJ, Tao S, Shain S, Kuo A, Kirchsteiger K, Estelle M. 2016. Constitutive auxin response in *Physcomitrella* reveals complex interactions between Aux/IAA and ARF proteins. *eLife* **5**: e13325. doi: 10.7554/eLife.13325.

- Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2019. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research* **47**: e47.
- Ligrone R, Duckett JG, Renzaglia KS. 2012. The origin of the sporophyte shoot in land plants: A bryological perspective. *Ann Bot* **110**: 935–941.
- Lin PC, Lu CW, Shen BN, Lee GZ, Bowman JL, Arteaga-Vazquez MA, Liu LYD, Hong SF, Lo CF, Su GM, et al. 2016. Identification of miRNAs and their targets in the liverwort *Marchantia polymorpha* by integrating RNA-Seq and degradome analyses. *Plant Cell Physiol* **57**: 339–358.
- Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW. 2007. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* **450**: 56–62.
- Löbenberg E. 1959. Über genuine wuchsstoffe bei *Marchantia polymorpha* L. *PhD thesis, Frankfurt*.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550
- Lv B, Yu Q, Liu J, Wen X, Yan Z, Hu K, Li H, Kong X, Li C, Tian H, et al. 2020. Non-canonical AUX/IAA protein IAA33 competes with canonical AUX/IAA repressor IAA5 to negatively regulate auxin signaling. *EMBO J* **39**: e101515. doi: 10.15252/emj.2019101515.
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B. 2005. MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis *AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* **17**: 1360–1375.
- Mano S, Nishihama R, Ishida S, Hikino K, Kondo M, Nishimura M, Yamato KT, Kohchi T, Nakagawa T. 2018. Novel gateway binary vectors for rapid tripartite DNA assembly and promoter analysis with various reporters and tags in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLOS ONE* **13**: e0204964.
- Maravolo NC. 1976. Polarity and localization of auxin movement in the hepatic, *Marchantia polymorpha*. *Am J Bot* **63**: 526–531.
- Moody L. 2020. Three-dimensional growth: A developmental innovation that facilitated plant terrestrialization. *J Plant Res* **133**: 283–290.
- Morris JL, Puttick MN, Clark JW, Edwards D, Kenrick P, Pressel S, Wellman CH, Yang Z, Schneider H, Donoghue PCJ. 2018. The timescale of early land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E2274–E2283.

- Mutte SK, Kato H, Rothfels C, Melkonian M, Wong GKS, Weijers D. 2018. Origin and evolution of the nuclear auxin response system. *eLife* **7**: e33399. doi: 10.7554/eLife.33399.
- Nanao MH, Vinos-Poyo T, Brunoud G, Thévenon E, Mazzoleni M, Mast D, Lainé S, Wang S, Hagen G, Li H, et al. 2014. Structural basis for oligomerization of auxin transcriptional regulators. *Nat Commun* **5**: 3617.
- Nishihama R, Ishida S, Urawa H, Kamei Y, Kohchi T. 2016. Conditional gene expression/deletion systems for *Marchantia polymorpha* using its own heat-shock promoter and Cre/loxP-mediated site-specific recombination. *Plant Cell Physiol* **57**: 271–280.
- Nishihama R, Ishizaki K, Hosaka M, Matsuda Y, Kubota A, Kohchi T. 2015. Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporeling development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res* **128**: 407–421.
- Nishiyama T, Wolf PG, Kugita M, Sinclair RB, Sugita M, Sugiura C, Wakasugi T, Yamada K, Yoshinaga K, Yamaguchi K, et al. 2004. Chloroplast phylogeny indicates that bryophytes are monophyletic. *Mol Biol Evol* **21**: 1813–1819.
- 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.
- Paponov IA, Friz T, Budnyk V, Teale W, Wüst F, Paponov M, Al-Babili S, Palme K. 2019. Natural Auxin Does Not Inhibit Brefeldin A Induced PIN1 and PIN2 Internalization in Root Cells. *Front Plant Sci* **10**: 1–7.
- Parihar NS. 1967. An introduction to Embryophyta volume I: Bryophyta. Allahbad: Indian Universities Press.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Poethig RS, Szymkowiak EJ. 1995. Clonal analysis of leaf development in maize. *Maydica (Italy)* **40**: 67–76.
- Poethig RS. 1987. Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development. *Am J Bot* **74**: 581–594.
- Prigge MJ, Lavy M, Ashton NW, Estelle M. 2010. *Physcomitrella patens* auxin-resistant mutants affect conserved elements of an auxin-signaling pathway. *Curr Biol* **20**: 1907–1912.

- Prigge MJ, Platre M, Kadakia N, Zhang Y, Greenham K, Szutu W, Pandey BK, Bhosale RA, Bennett MJ, Busch W, et al. 2020. Genetic analysis of the Arabidopsis TIR1/AFB auxin receptors reveals both overlapping and specialized functions. *eLife* **9**: e54740. doi: 10.7554/eLife.54740.
- Proust H, Honkanen S, Jones VAS, Morieri G, Prescott H, Kelly S, Ishizaki K, Kohchi T, 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.
- Puttick MN, Morris JL, Williams TA, Cox CJ, Edwards D, Kenrick P, Pressel S, Wellman CH, Schneider H, Pisani D, Donoghue PCJ. 2018. The interrelationships of land plants and the nature of the ancestral embryophyte. *Curr Biol* **28**: 1–13.
- Reinhardt D, Frenz M, Mandel T, Kuhlemeier C. 2005. Microsurgical and laser ablation analysis of leaf positioning and dorsoventral patterning in tomato. *Development* **132**: 15–26.
- Rensing SA, Goffinet B, Meyberg R, Wu SZ, Bezanilla M. 2020. The moss *physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens*: A model organism for non-seed plants. *Plant Cell* **32**: 1361–1376.
- Ruhland W. 1924. Musci. Allgemeiner Teil. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Sanders HL, Darrah PR, Langdale JA. 2011. Sector analysis and predictive modelling reveal iterative shoot-like development in fern fronds. *Development* **138**: 2925–2934.
- Satina S, Blakeslee AF, Avery AG. 1940. Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of datura by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Am J Bot* **27**: 895–905.
- Saulsberry A, Martin PR, O'Brien T, Sieburth LE, Pickett FB. 2002. The induced sector *Arabidopsis* apical embryonic fate map. *Development* **129**: 3403–3410.
- Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P. 1994. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475–2487.
- Scheres B. 2001. Plant Cell Identity. The Role of Position and Lineage. *Plant Physiology* **125**: 112–114.
- Schneider MJ, Voth PD, Troxler RF. 1967. Methods of propagating bryophyte plants, tissues, and propagules. *Bot Gaz* **128**: 169–174.
- Shimamura M. 2016. *Marchantia polymorpha*: taxonomy, phylogeny and morphology of a model system. *Plant Cell Physiol* **57**: 230–256.

- Sieburth LE, Drews GN, Meyerowitz EM. 1998. Non-autonomy of *AGAMOUS* function in flower development: use of a Cre/*loxP* method for mosaic analysis in *Arabidopsis*. *Development* **125**: 4303.
- Solly JE, Cunniffe NJ, Harrison CJ. 2017. Regional growth rate differences specified by apical notch activities regulate liverwort thallus shape. *Curr Biol* **27**: 16–26.
- Sugano SS, Nishihama R, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Ishida S, Shimada T, Hara-Nishimura I, Osakabe K, Kohchi T. 2018. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLOS ONE* **13**: e0205117.
- Sugawara S, Mashiguchi K, Tanaka K, Hishiyama S, Sakai T, Hanada K, Kinoshita-Tsujimura K, Yu H, Dai X, Takebayashi Y, et al. 2015. Distinct characteristics of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants. *Plant Cell Physiol* **56**: 1641–1654.
- Sussex IM. 1951. Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. *Nature* **167**: 651–652.
- Sussex IM. 1954. Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. *Nature* **174**: 351–352.
- Suzuki H, Kohchi T, Nishihama R. 2021. Auxin biology in bryophyta: A simple platform with versatile functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a040055.
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA. 2008. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* **319**: 1384–1386.
- Tam THY, Catarino B, Dolan L. 2015. Conserved regulatory mechanism controls the development of cells with rooting functions in land plants. *Proc Natl Acad Sci* **112**: E3959–E3968.
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson C V, Estelle M, Zheng N. 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640–645.
- Thelander M, Landberg K, Sundberg E. 2019. Minimal auxin sensing levels in vegetative moss stem cells revealed by a ratiometric reporter. *New Phytol* **224**: 775–788.
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T. 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**: 533–543.
- Tsuzuki M, Nishihama R, Ishizaki K, Kurihara Y, Matsui M, Bowman JL, Kohchi T, Hamada T, Watanabe Y. 2016. Profiling and characterization of small RNAs in the liverwort, *Marchantia polymorpha*, belonging to the first diverged land plants. *Plant Cell Physiol* **57**: 359–372.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**: 1865–1868.

- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1999a. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 5844–5849.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1999b. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**: 309–319.
- van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B. 1995. Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* **378**: 62–65.
- Vöchting H. 1885. Ueber die regeneration der Marchantien. *Jahrbücher für wissenschaftliche Bot* **16**: 367–414; Taf. XII–XV.
- Wachsman G, Heidstra R, Scheres B. 2011. Distinct cell-autonomous functions of *RETINOBLASTOMA-RELATED* in *Arabidopsis* stem cells revealed by the Brother of Rainbow clonal analysis system. *Plant Cell* **23**: 2581–2591.
- Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY. 2005. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2204–2216.
- Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, Warnow T, Carpenter E, Matasci N, Ayyampalayam S, Barker MS, Burleigh JG, Gitzendanner MA, et al. 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: E4859–E4868.
- Yamamoto M, Yamamoto KT. 1998. Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. *Plant Cell Physiol.* **39**: 660–664.
- Yang Y, Hammes UZ, Taylor CG, Schachtman DP, Nielsen E. 2006. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr Biol.* **16**: 1123–1127.
- Yasui Y, Tsukamoto S, Sugaya T, Nishihama R, Wang Q, Kato H, Yamato KT, Fukaki H, Mimura T, Kubo H, Theres K, Kohchi T, Ishizaki K. 2019. GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1, an ortholog of axillary meristem regulators, is essential in vegetative reproduction in *Marchantia polymorpha*. *Curr Biol* **29**: 3987–3995.



## 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、西浜竜一准教授の下で遂行されました。河内教授、西浜准教授には長年にわたり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。研究遂行にあたり、嶋村正樹准教授 (広島大学大学院統合生命科学研究科)、C. Jill Harrison 上級講師 (School of Biological Sciences, University of Bristol, UK)、加藤大貴博士 (神戸大学大学院理学研究科)、岩野恵博士には論文執筆をはじめ、実験手法について多くのご指摘とご提言をいただきました。心より感謝いたします。安居佑季子助教、吉竹良洋特定助教にはミーティングの場を通じて多くのご助言いただきました。山岡尚平准教授 (京都大学大学院生命科学研究科)、末次憲之博士 (京都大学大学院理学研究科) には当研究室ご在籍中に多くのご助言をいただきました。荒木崇教授 (京都大学生命科学研究科)、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。

本研究を遂行するにあたり、MpSYP13B エントリーベクタを上田貴志教授 (基礎生物学研究所細胞動態研究部門) ならびに金澤建彦助教 (基礎生物学研究所細胞動態研究部門) から分与していただきました。3xFLAG-AtTIR1 配列を有するベクタを鳥居啓子教授 (College of Natural Sciences, The University of Texas at Austin) ならびに打田直行教授 (名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所) から分与していただきました。近藤武史特定助教 (京都大学生命科学研究科) ならびに山銅ゆかり教務職員 (京都大学生命科学研究科) に RNA-seq を遂行していただきました。京都大学学部生向け ILAS セミナにおいて、受講生の方々にクロール解析におけるセクタ像蒐集にご協力いただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、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。また、京都大学学内ファンドプログラム SPIRITS の支援により英国ブリストル大学へ短期留学の機会をいただきました。御礼申し上げます。

最後になりましたが、研究活動全般において遺伝子特性学分野の皆さまに多岐にわたるご支援・ご協力をいただき、本報を発表するに至りました。心より感謝いたします。

本学位論文第一章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。

Hidemasa Suzuki, C. Jill Harrison, Masaki Shimamura, Takayuki Kohchi, Ryuichi Nishihama  
Positional cues regulate dorsal organ formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*.  
*Journal of Plant Research* (2020) **133**:311–321. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01180-5>.