

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	梶原 智明
論文題目	苔類ゼニゴケにおける性分化制御遺伝子ネットワークの研究		
(論文内容の要旨)			
<p>性分化を時空間的に適切に制御することは有性生殖の成功に重要である。配偶体世代が優占的なコケ植物は、世代交代を特徴とする陸上植物の配偶子の発生制御を解析するのに適した生物である。モデルコケ植物の一つであるゼニゴケは苔類に属する雌雄異株植物で、生殖系列細胞分化には転写因子 <i>BONOBO</i> (<i>BNB</i>) がマスター制御因子として働く。また、性分化は雌性化促進に働く転写因子 <i>FEMALE GAMETOPHYTE MYB</i> (<i>FGMYB</i>) と、その逆鎖にコードされる長鎖非翻訳 RNA (lncRNA) である <i>SUPPRESSOR OF FEMINIZATION</i> (<i>SUF</i>) から成る常染色体の性分化モジュールによって制御される。しかし、これらの制御機構の詳細な分子メカニズムや、制御遺伝子の下流にある遺伝子制御ネットワークはまだ明らかにされていない。</p> <p>本研究の第一章では <i>SUF</i> による <i>FGMYB</i> の発現抑制機構を解析した。<i>SUF</i> は雄株で特異的に転写され、<i>FGMYB</i> の発現を抑制することで、結果として雄性分化を引き起こす。まず CRISPR/Cas9^{D10A} ニッカーゼ技術を用いて <i>FGMYB-SUF</i> 領域の大規模欠失変異株を作出し、トランスジーン相補実験により、性分化スイッチ機能に十分な <i>FGMYB-SUF</i> 遺伝子座のゲノム領域を同定した。遺伝的雄株背景において <i>SUF</i> の転写領域に polyA 付加シグナルを挿入し、<i>FGMYB</i> との重複領域より上流で転写を終結させた結果、<i>SUF</i> の機能が失われ、<i>FGMYB</i> が発現し、性表現型が雄から雌へ転換した。また、<i>SUF</i> の部分的欠失はその機能に影響を与えなかった。さらに、<i>FGMYB</i> の配列を別の遺伝子に置き換えても、<i>SUF</i> 転写によるセンス鎖遺伝子の発現抑制は依然として認められた。これらの結果から、<i>SUF</i> の転写産物ではなく、転写過程自体が標的遺伝子を抑制する上で必要であることが示唆された。</p> <p>第二章では有性生殖プログラムの誘導と性分化を制御する遺伝子ネットワークの解明を目指した。まず生殖系列細胞の希少性に起因する解析の困難さを克服するために、ゼニゴケの生殖系列細胞様細胞 (GLCLCs) の分化誘導系を確立した。ゼニゴケ用の誘導型 CRISPR 転写活性化 (CRISPRa) システムを応用し、生殖系列細胞分化の鍵遺伝子 <i>BONOBO</i> (<i>BNB</i>) を異所的に過剰発現させることで、多数の GLCLCs を栄養組織から直接分化させる実験系を確立した。顕微鏡観察と時系列 RNA-seq 解析の結果、これらの GLCLCs は野生型の生殖系列細胞と類似した初期発生パターンおよび遺伝子発現プロファイルを示した。この系を利用して CUT&RUN 解析を行い、<i>BNB</i> の DNA 結合部位と標的遺伝子を同定した。さらに、シングル核 RNA シーケンシング (snRNA-seq) 解析により、生殖系列細胞由来の核のクラスターとその分化経路を推定し、これらの細胞で特異的に発現する転写因子を同定した。また、この推定を利用して、<i>FGMYB</i> の転写制御ネットワークを構築し、下流で機能する遺伝子候補群を見出した。さらに、公開されているモデル被子植物シロイヌナズナの花粉の snRNA-seq データとの比較から、シロイヌナズナの雄性生殖系列とゼニゴケの雌雄の生殖系列との間で共通して発現する保存された遺伝子群の存在が示唆された。これらの結果から同定された遺伝子群の機能を解析することで、陸上植物において性分化を制御する遺伝子ネットワークの全体像が明らかになることが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

雌雄の性分化と生殖細胞の発生は有性生殖に重要な過程である。陸上植物は配偶体世代と孢子体世代を繰り返す世代交代を特徴とする。広く研究に用いられる被子植物は配偶体世代が数細胞の花粉や胚のうにまで縮退しているのに対して、コケ植物は配偶体世代が優占的であり、配偶子発生の研究に適している。本論文ではモデル植物である苔類ゼニゴケを用いて、生殖細胞系列の決定と性分化の遺伝子制御ネットワークの解明を目指したものである。

第一章では、雌性化促進に働く転写因子 *FEMALE GAMETOPHYTE MYB (FGMYB)* が、その逆鎖にコードされる長鎖非翻訳RNA (lncRNA) である *SUPPRESSOR OF FEMINIZATION (SUF)* によって雄では発現抑制されるメカニズムを解析した。遺伝子座全体を欠失させた変異体を作成し、これを背景にさまざまな変異を導入したトランスジーンを用いて相補実験を実施し、*SUF* の転写産物ではなく、転写過程自体が標的遺伝子を抑制する上で必要であることを示すことに成功した。polyA付加シグナルの挿入により転写を終結させる実験や *FGMYB* を致死遺伝子に置き換えるモデル実験系といった独創性の高い実験は高く評価できる。

第二章では、生殖系列細胞分化の鍵遺伝子 *BONOBO (BNB)* を誘導的に過剰発現させることで、多数の生殖系列細胞様細胞 (GLCLCs) を栄養組織から分化させる実験系を確立し、性分化を制御する遺伝子ネットワークを解析した。生殖系列細胞の希少性に起因する解析の困難さを誘導型CRISPR転写活性化 (CRISPRa) システムを巧みに用いて克服した点は高く評価できる。野生型生殖系列細胞との発生パターンおよび遺伝子発現プロファイルの比較によるGLCLCs誘導の評価も適切に行われている。また、CUT&RUN解析によりBNBのDNA結合配列と標的遺伝子を推定することにも成功している。ゼニゴケのシングル核RNAシーケンシング (snRNA-seq) 解析を確立し、生殖系列細胞の分化経路を推定し、ネットワーク推定も行った。さらに、公開されているシロイヌナズナの花粉のsnRNA-seqデータとの比較から、花粉の雄性生殖系列とコケ植物の雌雄の生殖系列との間で共通して発現する保存された遺伝子群の存在が示唆された。これらの成果は陸上植物において性分化を制御する遺伝子ネットワークの存在は植物進化の観点でも興味深い知見である。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、分子細胞生物学・分子遺伝学分野および植物生殖研究分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和6年2月5日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日