

研究成果報告書

名古屋大学 大学院情報学研究科 青木撰之

研究テーマ題目「コケ植物のキナーゼ遺伝子を利用した低酸素環境下バイオマス制御」

1) 本研究の背景

近年、温暖化の影響によって広い地域で大雨が増加している。このため、冠水を原因とする土壌中の低酸素化が生じ、エネルギー資源作物や農作物の生育への悪影響が徐々に顕在化してきている。この現象は食料問題に拍車をかける可能性が大きく、人類の生存にとって大きな問題となりつつあると言ってもよい。そこで、低酸素条件下でも効果的に植物バイオマスを増やす技術が求められている。

申請者は、従来からコケ植物（蘚類）のモデル種、ヒメツリガネゴケ（*Physcomitrium patens*）を実験生物として用い、光合成機能の発現や生物時計の分子機構について研究を行ってきた。コケ植物は陸上植物の進化において初期に分岐し、緑色植物の進化・多様化を研究するうえで興味深い位置付けにあるうえ、ヒメツリガネゴケは相同組換えの効率が非常に高く、遺伝子の改変を柔軟に行えるので、遺伝子機能の解析のためにも有用である。コケ植物は藻類が陸上に進出した直後の植物の形態・特性を多く残すと考えられ、小型で冠水の影響を受けやすい（A）
 うえ、高等植物よりも乾燥に対する適応機構が未発達であると考えられる。また、被子植物とは異なり、精子が植物体表面上の水膜を泳ぎ、卵にたどり着くことによって有性生殖を営むために、ライフサイクルを完遂するうえで水への依存度が非常に高い（図1）。このような特徴を持つコケであるので、水中の低酸素条件に適応する固有の機構が発達している可能性があると考えられた。



図1. ヒメツリガネゴケの外観と生活環
 (A) ヒメツリガネゴケ。繊維状の原糸体組織から、立体的で茎・葉のある茎葉体が生じている。(B) 蘚類の生活環。茎葉体状に生じる造精器から造卵器まで、水膜の中を精子が泳いで到達し、有性生殖が行われる。

ヒメツリガネゴケのゲノム DNA の全塩基配列は 2008 年に報告され、高等植物の多様な遺伝子のホモログが存在することが確認されたが、その一方で、それらの多くがコケ特有の多様化を示すことも明らかとなった (Rensing et al., 2008)。さらに、被子植物にはみられないドメイン構造のタンパク質をコードする遺伝子群もあることもわかってきた。申請者は、多様な環境に由来する情報を受容・伝達する重要機構の一つ、多段階リン酸リレー (Multi-Step Phosphorelay; MSP) に興味を持ち、研究を行ってきた。MSP は多様な生物にみられるが、陸上植物においては、ヒスチジンキナーゼ、ヒスチジン含有リン酸転移因子 (HPt)、レスポンスレギュレーターから構成される。環境因子のセン

サーであるヒスチジンキナーゼが環境刺激を受け取ると、ヒスチジンキナーゼの自己リン酸化を経て、ヒスチジンキナーゼ、HPt、レスポンスレギュレーター の順でリン酸が転移され、最終的に生理的出力を担う遺伝子群が制御され、環境応答が行われる。ヒメツリガネゴケは、作物種を含む高等植物にみられない独特のドメイン構成のヒスチジンキナーゼを多く持つが、それらのうち、多様な環境受容に関わる PAS ドメインを持つヒスチジンキナーゼ (PAS Histidine Kinase 1 と PAS Histidine Kinase 2 ; PAS-HK1/2 と略す) が、低酸素条件で植物体の生育を促進的に制御することを見出した (Ryo et al., 2018)。

2) 本研究の目的

PAS-HK1/2 による低酸素条件での生育制御機能を確認し、そして PAS-HK1/2 に始まるシグナル伝達機構の詳細を解析することにより、植物の低酸素適応機構の解明とその強化植物の作出に向けた基礎データを得ること、さらには作物品種への適用を見据え、その知見をモデル被子植物シロイヌナズナへと移植し、低酸素条件での高等植物のバイオマス増産の基盤技術を確立することを本計画の目的とした。

3) 本研究の成果

3. 1) 低酸素条件での生育制御機能

既報では (Ryo et al., 2018)、酸素濃度 6%~12% の低酸素条件で、主に茎葉体の形成率を指標に用い、PAS-HK1/2 がヒメツリガネゴケの生育・発生を促進することを示した。本研究においては、より低い 0.1% 以下の酸素濃度条件 (嫌気条件) で、コケの生育・発生を観察した。すると、観察を行った期間の範囲では (数週間から 2 ヶ月ほど)、PAS-HK1/2 のコード領域を除去した遺伝子破壊株 (DKO 株) と野生型株 (WT 株) のどちらにおいても、ほとんど茎葉体の形成は見られなかった。そこで、原系体の生育速度をコロニーの直径を

測定することで比較した結果、驚いたことに、嫌気条件では、DKO 株が WT 株に比べて著しく速い生育速度を示すことが明らかになった (図 2 A と B ; 龍昌志ほか、未発表データ)。連続明条件 (LL) と 24 時間周期の明暗の繰返し条件で、2 つの株を培養し、その組織コロニーの直径を比較すると、DKO 株は WT 株の約 4 倍の直径のコロニーを形成した。一方で好気条件においては、WT 株と DKO 株の間に生育速度の差はみられなかった (図 2 A)。この結果は、嫌気条件においてコケ組織は生育可能であるが、PHK1/2 の働きによって積極的に生育が抑制されていることを示す。

3. 2) PAS-HK1/2 のシグナル伝達機構の解析

次に、PAS-HK1/2 に始まるシグナル伝達の仕組みを理解するために、PAS-HK1/2 は、パートナーのシグナルタンパク質と、どのような時間・空間的なダイナミクスで相互作用を行うかを調べた。この研究の開始時点で既に、PAS-HK1 と PAS-HK2 はそれぞれ、

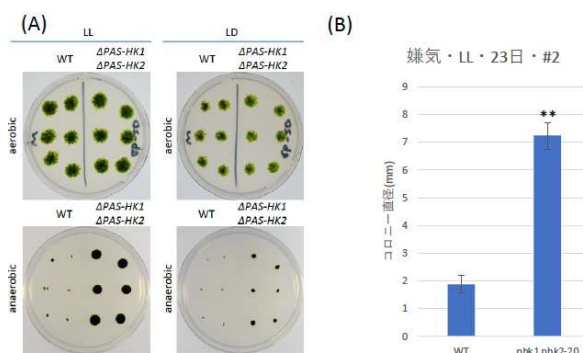


図 2. 嫌気条件でのコケの生育

(A) WT株とPAS-HK1/2破壊株の生育の比較。LLは連続明条件、LDは明暗の繰返し条件。プレートの左側はWT株、右側は破壊株の組織コロニーを培養した。上 (aerobic) は好気条件、下 (anaerobic) は嫌気条件の培養の結果を示す。(B) データの一部をグラフ化して示す。LL・嫌気条件におけるWT株 (左) と破壊株 (右) のコロニー直径を示す。

コケの HPt である HPt1 と HPt2 と相互作用すること、HPt1 と HPt2 はそれぞれ、被子植物で時計タンパク質として詳しく解析が進んでいる Pseudo-Response Regulator (PRR) タンパク質のコケ・ホモログの一つ、PRR2 と相互作用することを明らかにしていた。

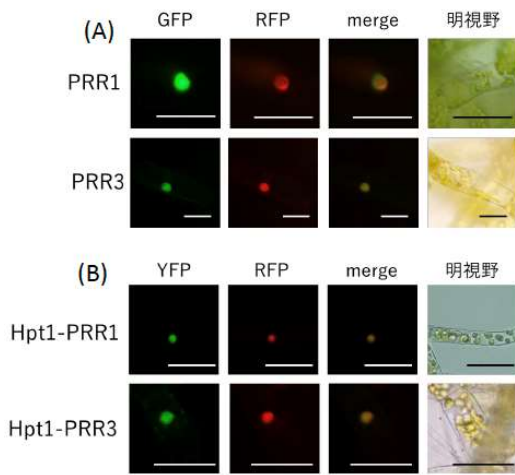


図3. PHK1/2の下流のパートナータンパク質の同定
(A) PRR1/3タンパク質の細胞内局在を示す。それぞれのタンパク質をGFPと融合し、コケの原糸体細胞にパーティクルガン砲で導入し、蛍光を観察した。GFP：GFP蛍光、RFP：核タンパク質のヒストンに連結したRFPに由来する蛍光、mergeはGFPとRFPの傾向を重ね合わせた画像を示す。(B) BiFC法でHpt1とPRR1/3との相互作用部位を観察した。YFPはHpt1とPRR1/3の結合により再構成されたYFP由来の蛍光を示す。

本研究では、PRR2のパラログタンパク質であるPRR1とPRR3がHPt1/2と相互作用するかどうかを調べた。まずPRR1/3の細胞内局在をGFPレポーターを用いて調べたところ、両タンパク質とも、PRR2

と同様に核に局在することが明らかになった(図3(A))。さらに、PRR1/3がPRR2と同様にHPt1/2と相互作用するかどうかをBimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法で調べたところ、両タンパク質ともそれぞれ、HPt1/2と相互作用することがわかった(図3(B))。一方で、PRR2と同様に、やはりPRR1/3はHPt3とは相互作用が認められなかった。

次に、PHK1/2 と HPt1/2 との相互作用が、自然条件の光環境の変動のもとでどのような変化を示すかを知るために、昼夜を模した 12 時間-12 時間の明暗繰り返し (LD) 条件で、BiFC 法による解析を行った。その結果、PHK1 と HPt1 または HPt2 は、昼に相当する明期には核内で相互作用する一方で、夜に相当する暗期には核に加えて細胞質でも相互作用するようになることがわかった (図 4)。なお、連続的な暗条件では、時刻に関わらず、PHK1 と HPt1/2 は核内で相互作用することがわかった。これらの結果から、i) PHK1 とパートナーの HPt1/2 は、昼間に核内で、夜間に核と細胞質で相互作用する日内変動を示す；ii) この日内変動の制御は、光に対する受動的な応答として起こり、自律的な概日時計の制御によるものではない、ということが示された (Kikuchi et al., 2022)。

コケ植物を取り巻く水環境の状況は、昼夜で変化を示す可能性があり、また日長/夜長の変化、つまり季節性の影響を強く受ける可能性も高い。したがってこの解析の結果明らかとなった PHK1 とパートナータンパク質の相互作用の日内変動は、コケ植物の水環境への適応の仕組みの一環として組み込まれているのかも知れない。

3. 3) PAS-HK1/2 の下流遺伝子の同定

次に、PAS-HK1/2 に始まる MSP の下流に位置付けられる出力遺伝子の解析を行なった。Shinde ら (2015) は、低酸素条件

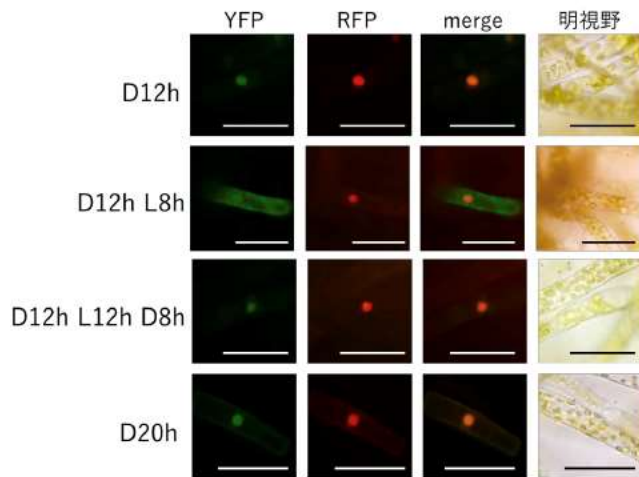


図 4. PHK1とHPt1の相互作用の細胞内分布のダイナミクス

BiFC法により、さまざまな時刻におけるPHK1-HPt1の相互作用の細胞内分布の変化を観察した。上のラベルは図 3 (B)を参照。観察する組織を連続明で培養した後、BiFC法用のプラスミドを導入し、暗条件で12時間置き (D12)、さらに明条件で8時間置き (D12h L8h)、さらに明条件を12時間延長したのちに、再び暗条件で8時間置いて (D12h L12h D8h)、それぞれの時刻に観察を行った。比較のために、12時間の暗条件の後、さらに8時間暗条件を延長した時刻 (D20h) でも観察を行った。

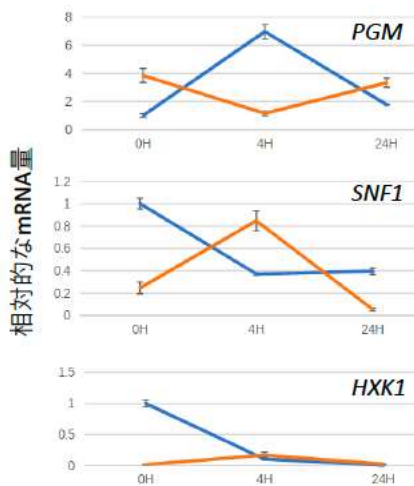


図 5. 出力遺伝子の発現の比較

WT株と破壊株のあいだで、PGM遺伝子 (上)、SNF1遺伝子 (中)、HXK1 (下) 遺伝子の嫌気条件での発現を定量PCRによって測定・比較した。各遺伝子のmRNA量を、アクチン遺伝子のmRNA量で補正して示す。横軸は嫌気条件移行後の時間を示す。

でヒメツリガネゴケを培養した時に発現量が変動する遺伝子を網羅的に同定した。そのうち、発現量が低下する3つの遺伝子、ヘキソキナーゼをコードするHXK1、SNF1 キナーゼをコードするSNF1、ホスホグルコムターゼをコードするPGM 遺伝子に焦点を当て、定量PCR 法による mRNA

レベルの発現解析を行なった。WT 株と DKO 株を嫌気条件下に移し、移行直前 (0 時間)、4 時間目、24 時間目の 3 点で、それぞれの遺伝子の発現を両株のあいだで比較した。その結果、3 つの遺伝子はどれも、WT 株と DKO 株のあいだで発現レベルとその推移のパターンが異なることがわかった (図 5)。移行直前では、*PGM* については WT 株 (青色) より DKO 株 (オレンジ色) の発現レベルの方が高く、一方で *SNF1* と *HXX1* については DKO 株より WT 株の発現レベルの方が高かった。そして嫌気条件に移行すると、このパターンは逆転する事がわかった。したがって好気条件では、PHK1/2 によって *PGM* は抑制され、また *SNF1* と *HXX1* は促進されており、一方で嫌気条件では、逆の制御が行われていることが示唆された (呉ほか, 未発表)。

ヘキソキナーゼは解糖系の初期段階を制御し、またグルコースセンサーとしても働く。ホスホグルコムターゼはやはり解糖系の初期段階を触媒する。*SNF1* キナーゼはグルコース欠乏条件で活性化され、適応的に代謝をリプログラムする。このように、3 つの遺伝子のコードタンパク質は、どれも糖代謝に関係する酵素タンパク質であり、代謝ダイナミクスの制御の観点でも興味深い特性を持っている。PHK1/2 は、これらのタンパク質の発現量を制御することで、低酸素条件での原糸体の生育を積極的に抑えており、DKO 株ではその抑制が解除されるために、生育速度が上昇したのかもしれない。この制御の仕組みを今後研究していくことで、低酸素条件でも効果的に生育する高機能植物の開発に結びつく可能性がある。

3. 4) PAS-HK1/2 のパートナータンパク質の探索

上記のように、PAS-HK1 と PAS-HK2 はそれぞれ、HPt1 と HPt2 と相互作用することを明らかにしていた。そこで、PAS-HK1/2 と相互作用する HPt1/2 以外のタンパク質の探索を試みた。PAS-HK2 をベイトとして、酵母 2 ハイブリッド系のスクリーニングを行った。現在、PAS-HK2 と相互作用するタンパク質の cDNA を含む候補クローンを 20 ほど得た段階である (地宗ほか, 未発表)。今後、偽陽性クローンを除いたのち、それぞれのタンパク質について、特異的に PAS-HK1/2 と相互作用するかどうかを検証する予定である。

4) 展望

研究のまとめ：本研究により、i) *PAS-HK1/2* 遺伝子を破壊すると嫌気条件下で原糸体の生育が顕著に促進されることを発見し、ii) *PAS-HK1/2* に始まるリン酸リレー系の下流タンパク質として PRR ファミリーのメンバータンパク質が位置付けられることを確認し、iii) *PAS-HK1* と HPt1/2 は日内制御を受け、夜間に核内のみで、日中に核と細胞質の中で相互作用することを明らかにし、iv) *PAS-HK1/2* の最下流に位置付けられる出力遺伝子として、3 つの糖代謝に関わる遺伝子を同定した。現在さらに、*PAS-HK1/2* と相互作用する制御タンパク質、あるいは環境因子受容タンパク質の分離を目指し、解析を鋭意続けている。

このように、低酸素条件でのコケ植物の生育にまつわる *PAS-HK1/2* の生理機能を明らかにし、さらに *PAS-HK1/2* を起点あるいは中心として、そのシグナル伝達機構とその動的な変化について解析を進め、新たな知見を多く得ることができた。今後、さらに *PAS-HK1/2* が関与するシグナル伝達機構の解明を詳細に進め、とくに酸素濃度の変化

がこのシグナル伝達系にどのように伝わり、また出力遺伝子の発現後、どのような仕組みにより低酸素環境への適応が行われるのかを明らかにすることが重要である。

5) 参考文献：

Rensing et al. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*. 319(5859):64-69.

Ishida et al. (2010) Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 74(12):2542-2545.

Ryo et al. (2018a) Light-regulated PAS-containing histidine kinases delay gametophore formation in the moss *Physcomitrella patens*. *J Exp Bot*. 69(20):4839-4851.

Ryo et al. (2018b) PAS-histidine kinases PHK1 and PHK2 exert oxygen-dependent dual and opposite effects on gametophore formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Biochem Biophys Res Commun*. 503(4):2861-2865.

Anami et al. (2021) Red light-regulated interaction of Per-Arnt-Sim histidine kinases with partner histidine-containing phosphotransfer proteins in *Physcomitrium patens*. *Genes Cells*. 26(9):698-713.

Kikuchi et al. (2022) Diurnal control of intracellular distributions of PAS-Histidine kinase 1 and its interactions with partner proteins in the moss *Physcomitrium patens*. *Biochem Biophys Res Commun*. 616:1-7.

Shinde et al. (2015) Genome-wide transcriptomic analysis of the effects of sub-ambient atmospheric oxygen and elevated atmospheric carbon dioxide levels on gametophytes of the moss, *Physcomitrella patens*. *J Exp Bot*. 66(13):4001-4012.