戦略的創造研究推進事業
ERATO
追跡評価用資料

「長谷部分化全能性進化」プロジェクト
(2005.9～2012.3)

研究総括：長谷部　光泰

2018 年 3 月

目　次

要旨 1
プロジェクトの発足に至る経緯及び展開状況（まとめ図）..... 3
第 1 章 プロジェクトの概要..... 4
1.1 研究期間..... 4
1.2 プロジェクト発足に至る科学技術や社会の背景..... 4
1.2.1 科学技術の背景..... 4
1.2.2 社会の背景..... 6
1.3 プロジェクトのねらい..... 6
1.4 研究体制..... 7
1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義..... 9
1.5.1 ヒメツリガネゴケ実験系の洗練・開発..... 9
1.5.2 多能性幹細胞化に必要な外部刺激の解明..... 13
1.5.3 多能性幹細胞化時におこる細胞内環境変化の解明..... 14
1.5.4 多能性幹細胞化による細胞周期の再開機構の解明..... 19
第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況..... 21
2.1 各研究テーマの終了後の状況に関する基礎データ..... 21
2.1.1 調査方法 21
2.1.2 競争的研究資金の獲得状況..... 22
2.1.3 論文の発表状況..... 28
2.1.4 特許の出願・登録状況..... 33
2.1.5 招待講演 34
2.2 各研究テーマの進展状況..... 35
2.2.1 ヒメツリガネゴケ実験系の開発とゲノム情報整備に関する研究..... 35
2.2.2 切断葉細胞の多能性幹細胞化に関わる因子..... 36
2.2.3 通常発生過程における多能性幹細胞制御に関わる因子..... 42
2.2.4 細胞周期に関わる因子..... 46
2.2.5 ヒメツリガネゴケゲノム解読情報を活用した共同研究..... 47
2.2.6 その他の業績..... 50
2.3 プロジェクト参加研究者の活動状況..... 53
2.4 第 2 章まとめ..... 55
第 3 章 プロジェクトの成果の波及と展望..... 57
3.1　科学技術への波及と展望..... 57
3.1.1 学術的な新発見や発明による科学技術の波及..... 57
3.1.2 新規な理論や概念の提唱..... 58
3.1.3 新たな研究領域や研究の潮流の形成..... 59
3.1.4 科学技術への波及のまとめと展望..... 59
3.2　社会経済への波及と展望..... 59

3.2.1　農産物生産への応用..... 60
3.2.2　ヒメツリガネゴケを用いた物質生産..... 60
3.2.3　社会への貢献..... 60
3.2.4　メディアを介した研究成果の発信..... 61
3.2.5　社会経済への波及のまとめと展望..... 61
【引用文献】 62

要旨

多細胞生物の分化した細胞が、リプログラミングにより再び多分化能を獲得するメカニズムの解明は、生命科学の重要課題の一つであり、再生医療や農産物の育種などへの応用の面からも研究の進展が期待されている。特に、植物細胞が示す分化全能性については、様々な植物種で研究が進められてきたが、リプログラミングの分子機構はほとんど明らかになっていない。本プロジェクトは、ヒメツリガネゴケでみられる切断による茎葉体細胞からの多能性幹細胞化に着目し、植物が持つ高いリプログラミング能の根源を探求することを目指した。

ヒメツリガネゴケ切断葉が優れた再生能を持つことはよく知られていたが、再現性の高い実験系や観察系がなく、ヒメツリガネゴケをモデル植物としたリプログラミング研究は皆無であった。本プロジェクトにおいて、植物生理学・分子生理学・バイオインフォマティクス・オミクスなどの出身分野の異なる若手研究員らにより、多検体を長時間自動継続顕微観察できるイメージングシステムおよび次世代シーケンサーによる遺伝子の網羅的解析手法が構築され、葉細胞の幹細胞化を１細胞レベルで解析できるオリジナルな実験観察系が開発された。同時に、国際ゲノムコンソーシアムに参画し、ヒメツリガネゴケ全ゲノムが解読された。その結果、リプログラミングの分子機構に関する次のような重要知見が得られた。

すなわち、

・１葉細胞がそれ単独で幹細胞化へとリプログラミングされること、および幹細胞化した細胞の周辺の葉細胞の幹細胞化を抑制していること

・リプログラミングに関わる多くの因子の相互作用を明らかにし、そのネットワークを統括するマスターレギュレーターが発見されたこと

・細胞周期制御因子による細胞周期再開と幹細胞化過程との協調制御機構が発見されたことなどである。また、本プロジェクト期間中にシダ植物のイヌカタヒバの全ゲノム解読にも成功し、幹細胞関連遺伝子が陸上植物全体の中でどのように進化したかの仮説が提唱された。

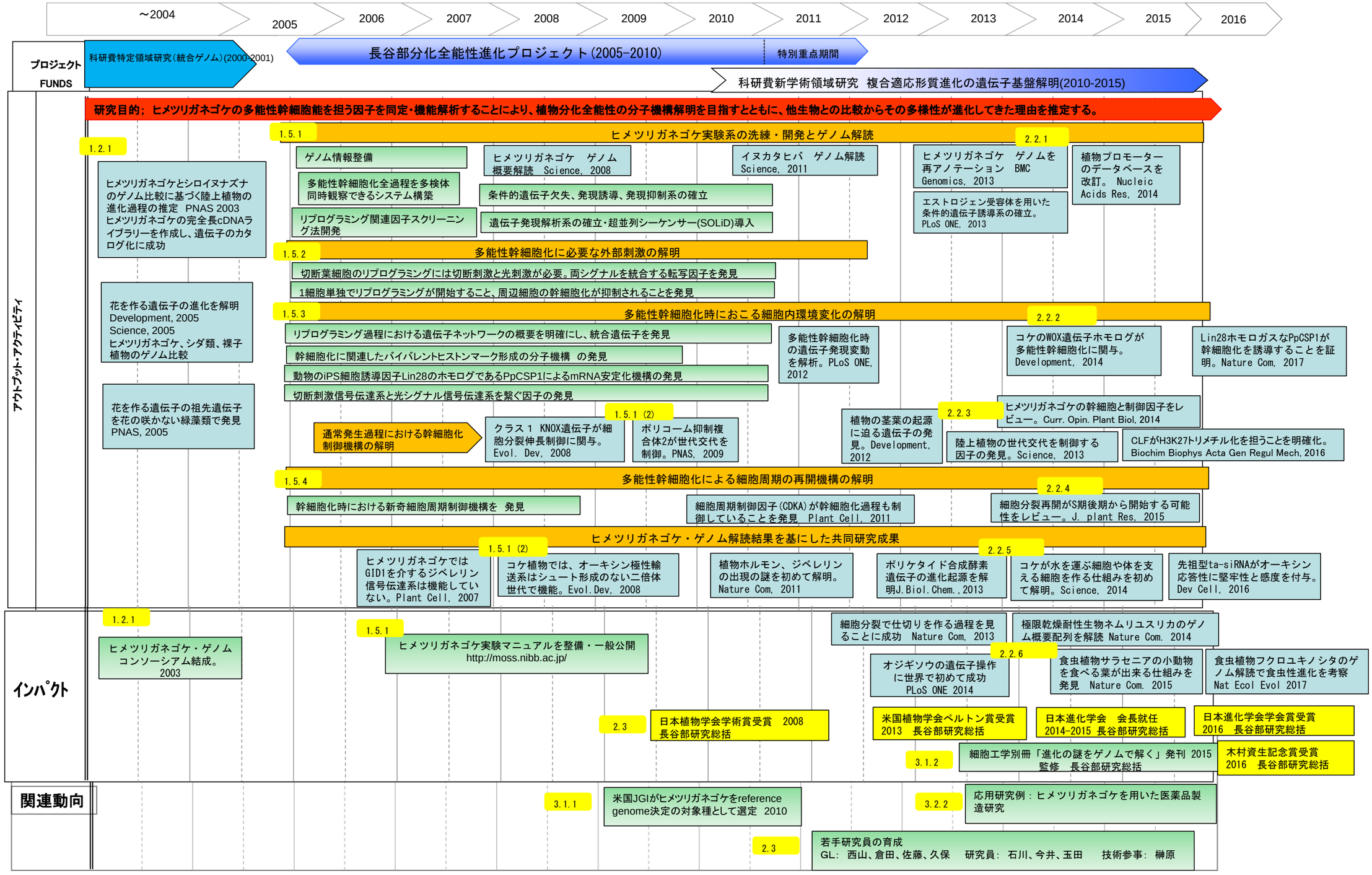
本プロジェクト終了後、切断葉細胞リプログラミング過程の全容解明を目指して、マスターレギュレーターである STEMIN(STEM cell INducting factor)や、植物ホルモンであるオーキシンの詳細な分子機構などが継続して研究されている。また、動物の多能性幹細胞を誘導する因子の１つである Lin28 のホモログである PpCSP1 が、ヒメツリガネゴケ切断葉細胞の幹細胞化を誘導することが明確に示された。動物と植物に共通の幹細胞誘導化因子が発見されたのはこれが始めてである。

一方で通常発生過程における幹細胞化を制御する因子についても研究が進展し、新たに APB(AINTEGUMENTA, PLETHORA and BABY BOOM)や KNOX2(クラス 2 KNOX)の役割が明確にされた。また、ゲノム情報をベースにした共同研究により、コケが水を運ぶ細胞や体を支える細胞を作る仕組みが初めて解明された。

ヒメツリガネゴケはシロイヌナズナにない様々な特徴を備えており、本プロジェクトで構築されたヒメツリガネゴケ実験方法は、分化全能性研究以外の分野の研究にも貢献するものと期待されている。実際、米国エネルギー省共同ゲノム研究所はヒメツリガネゴケを”flagship plant genome”に選定した。これは、被子植物以外の陸上植物では初めての選定であり、ヒメツリガネゴケが優れたモデル植物として国際的に認知されたことを意味している。また、本プロジェクトに参加した研究員の多くが公的研究機関で研究を継続しているこ

とから、本プロジェクトが若手研究員の育成にも大きく貢献したことが窺える。

プロジェクトの発足に至る経緯及び展開状況（まとめ図）



第 1 章　プロジェクトの概要

1.1　研究期間

ERATO 実施期間は 2005 年 9 月～2011 年 3 月であるが､2011 年 4 月～2012 年 3 月に ERATO 特別重点が実施されたため、研究期間は 2005 年 9 月～2012 年 3 月となる。

1.2　プロジェクト発足に至る科学技術や社会の背景

1.2.1　科学技術の背景

多細胞生物の分化した細胞が、リプログラミング[1]により再び多分化能を獲得するメカニズムの解明は、生命科学の重要課題の一つであり、再生医療や農産物の育種などへの応用の面からも研究の進展が期待されている。特に、植物細胞が示す分化全能性[2]については、様々な植物種で研究が進められてきたが、リプログラミングの分子機構はほとんど明らかになっていない[3]。これは、シロイヌナズナやイネのようなモデル被子植物の場合、分化細胞がカルスなどの多細胞状態を経た後、その一部の細胞のみが多能性幹細胞[4]化するため、リプログラミング時の遺伝子発現解析が困難なためである。また、リプログラミングに関わる遺伝子は、ハウスキーピングあるいは発生過程で機能している遺伝子と予想され、その突然変異が致死的であることも理由の一つである。

一方で、コケ植物やシダ植物は種子植物に比べ非常に高いリプログラミング能を持っていることが知られていた[5]。特にヒメツリガネゴケ[6]は通常発生過程において、分化した原糸体細胞からリプログラミングによって多能性幹細胞である原糸体頂端幹細胞や茎葉体頂端幹細胞が生じ(図 1-1)、茎葉体から葉が切り出されると、葉細胞がカルスを経ずにリプログラミングされ原糸体頂端幹細胞へ変わるという特徴を有している(図 1-2)。このように、ヒメツリガネゴケはリプログラミング分子機構解明に向けたモデル植物としての可能性を秘めていたが、本プロジェクトが開始されるまで、ヒメツリガネゴケを対象としたリプログラミング研究は皆無であった。

---

[1] リプログラミング：分化によって各細胞は役割に応じた性質を獲得するが、このことは多くの遺伝子からその細胞が必要な情報のみを読みだすようにプログラムすることで達成される。ひとたび分化した細胞は、このプログラムを転換する（リプログラミング）ことで、再び全能性や多能性を取り戻すことができる。本プロジェクト研究終了報告書

[2] 分化全能性：細胞や発生初期の個体あるいはその一部が、全個体の細胞・組織に分化する能力を持っていること。「生物学辞典：分化能」東京化学同人　2010 年

[3] Birnbaum KD and Sanchez AA, *Cell*, 132, 697-710, 2008

[4] 多能性幹細胞：自己増殖能を持ち、かつ種々の細胞に分化する多分化能力を併せ持った細胞の総称。「生物学辞典：幹細胞」東京化学同人　2010 年

[5] Steeves TA and Sussex IM,“Patterns in Plant Development”, Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989

[6] ヒメツリガネゴケ：コケ植物の一種。成長した個体の大きさは数 mm から 1cm 程度で、モデル生物として植物の進化や発生、生理学の研究に用いられている。ウィキペディア
https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%92%E3%83%A1%E3%83%84%E3%83%AA%E3%82%AC%E3%83%8D%E3%82%B4%E3%82%B1

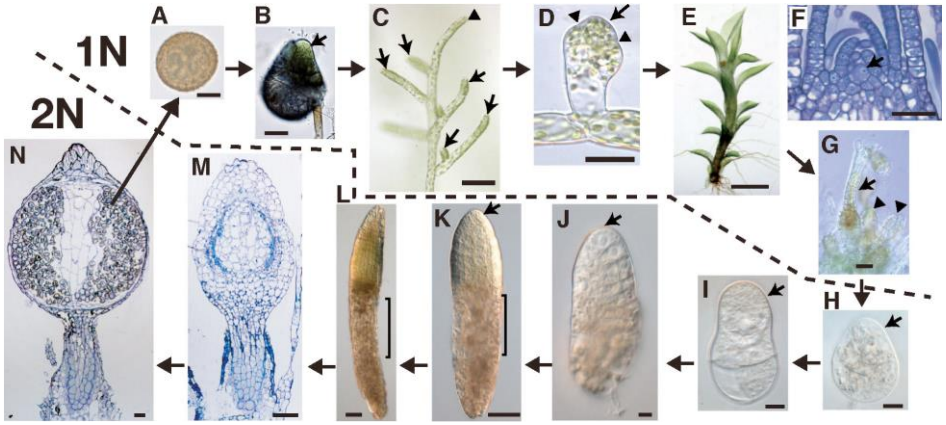


図 1-1　ヒメツリガネゴケの生活史[7]

胞子(A)発芽時の第一分裂で原糸体頂端幹細胞(B 矢印)が形成される。原糸体頂端幹細胞は不等分裂を続け、娘細胞として原糸体細胞を形成する(C)。分化した原糸体細胞は原糸体頂端幹細胞から数細胞離れるとリプログラムし、新たに原糸体頂端幹細胞(C　矢印)、あるいは茎葉体頂端幹細胞(D 矢印、D 矢尻は幹細胞と娘細胞の境界を示す)を形成する。茎葉体頂端幹細胞は茎葉体先端で維持される(E、F 矢印)。低温処理により、茎葉体先端に造卵器(G 矢印)と造精器(G 矢尻)が形成され、受精がおこる。受精卵の最初の分裂は不等分裂で、胞子体頂端幹細胞が形成される(H 矢印)。胞子体頂端幹細胞(I 矢印)は分裂を繰り返すが、約10回分裂すると分裂停止する(J 矢印、K 矢印は分裂停止した胞子体頂端幹細胞)。幹細胞の娘細胞は分裂、伸長を続け胞子体が形成される(J － L)。胞子体上部に胞原細胞が形成され(M 濃いトルイジンブルー染色部分)、約8000個の胞子が形成される(N)。

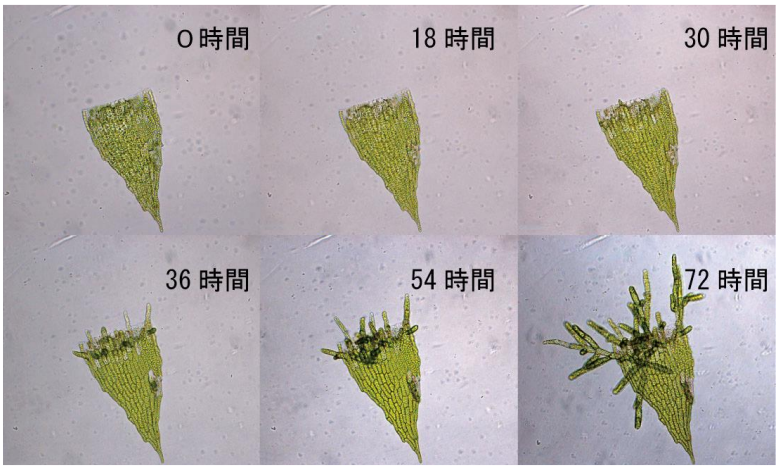


図 1-2　茎葉体から切除した葉の葉細胞の原糸体頂端幹細胞へのリプログラミング[8]
茎葉体の葉を切断すると、切り離した葉の切り口に面した葉細胞が約 30 時間で原糸体頂端幹細胞へとリプログラミングされる。

長谷部研究総括（以下、長谷部）は、植物で唯一遺伝子ターゲティングが容易なヒメツリガネゴケに注目し、科研費特定領域研究(A)「ヒメツリガネゴケを用いた茎頂分裂組織形成、維持、器官形成に関する分子機構の解明」(2000 年度)[9]や科研費特定領域研究(C)「ヒメツリガネゴケで植物ホルモンオーキシン、サイトカイニン機能解明への網羅的研究」

[7] 本プロジェクト研究終了報告書
[8] 本プロジェクト研究終了報告書
[9] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-12037218/

(2000-2001 年度)[10]などで、ヒメツリガネゴケの完全長 cDNA ライブラリーを作成し、遺伝子のカタログ化に成功していた[1]。2003 年には、ヒメツリガネゴケとシダ植物イヌカタヒバについて、それぞれの国際ゲノムコンソーシアムが結成され[11,12]、海外の研究者とともに米国エネルギー省共同ゲノム研究所(JGI)にそれぞれのゲノム解読が申請された。また、緑藻類や陸上植物であるヒメツリガネゴケ・シダ類・裸子植物のゲノム比較を通して、花を作る遺伝子の進化についても解明され[2],[3],[4]、ヒメツリガネゴケの発生進化研究で多くの成果が挙がっていた。

本プロジェクトは、ヒメツリガネゴケ研究を先導していた長谷部により、ヒメツリガネゴケの持つ高いリプログラミング能が世界で初めて着目され、その多能性幹細胞化能に関わる因子を同定・機能解析することにより、植物リプログラミングの分子機構およびその進化過程を解明することを目指して開始されたものである。

1.2.2 社会の背景

2007 年度の戦略目標で「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」を設定し、遺伝子発現情報も含めた細胞内の代謝変化を統合的あるいは網羅的に解析し、細胞の恒常性維持メカニズムを明らかにすることにより、細胞機能の向上や恒常性変調を改善する細胞制御のための基盤技術を創出することの重要性が文部科学省により示された[13]。本プロジェクトは、多能性幹細胞化に関する遺伝子発現機構を網羅的に解析することでその分子機構解明に寄与するものであり、応用面として、植物の再生能力を最大限生かすことで農産物生産などの技術革新に発展することが期待されることから、当該戦略目標に合致する研究である[14]。

1.3 プロジェクトのねらい

本プロジェクトでは、ヒメツリガネゴケのゲノム情報を最大限に利用し、その高いリプログラミング能、すなわち、多能性幹細胞形成能を担う因子を同定・機能解析することにより、植物分化全能性の分子機構解明を目指すとともに、他生物との比較からその多様性が進化してきたことを推定することを目的とした。

---

[10] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-12202051/

[11] http://www.soken.ac.jp/file/disclosure/pr/publicity/journal/no14/pdf/30-35.pdf
総研ジャーナル 14 号、2008 「どうしてヒメツリガネゴケのゲノムを解読することになったのか」

[12] http://www.nibb.ac.jp/evodevo/pdf_JP/2011_NIishiyama_Hasebe.pdf
遺伝 65: 8-14、2011「シダ植物イヌカタヒバのゲノム解読」

[13] http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/heisei23/pdf/pdf04/04.pdf

[14] ERATO「長谷部分化全能性進化プロジェクト」事後評価報告書
http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/hasebe.pdf

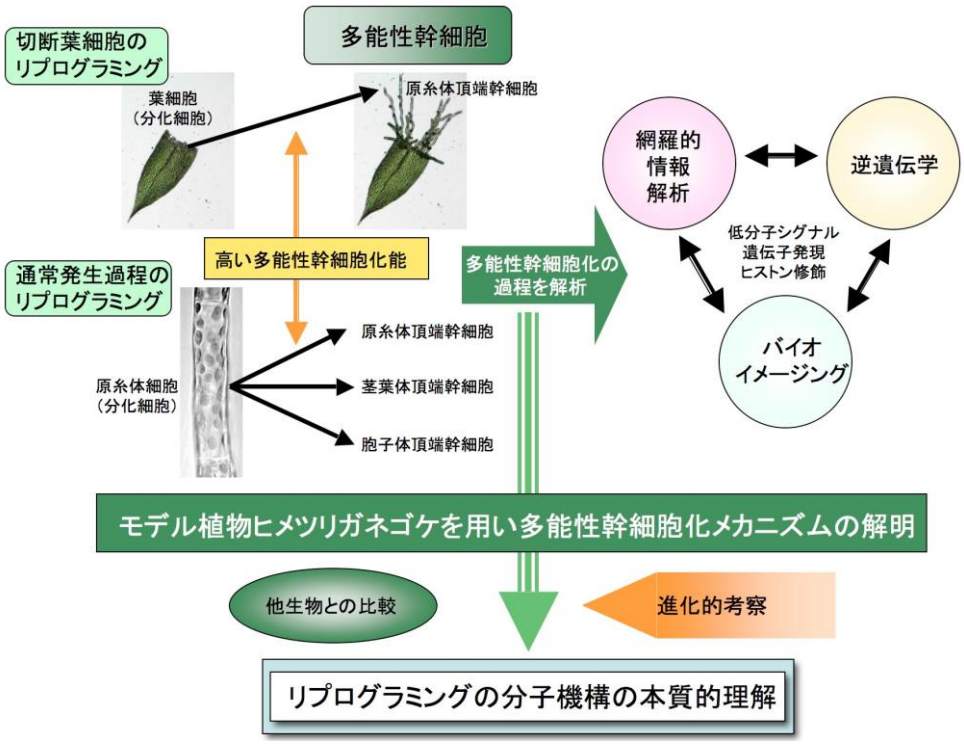


図 1-3　プロジェクト概念図[15]

具体的には、ヒメツリガネゴケ葉細胞多能性幹細胞化過程を 1 細胞レベルで観察できる実験系を確立し、幹細胞化過程における、植物ホルモンなどの低分子物質、small RNA、mRNA、タンパク質の変動、ヒストン修飾などを網羅的に解析し、多能性幹細胞化過程における各因子の細胞内動態が調べられた。同時に通常発生過程、特に原糸体細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングの分子機構についても研究され、両者の比較からリプログラミングの多様性と共通点が探索された。さらに、他の生物との間でゲノムを比較することで多能性幹細胞化機構の相違点を明らかにし、共通の祖先から多能性幹細胞化機構がどのように進化してきたかの解明を通して、リプログラミングを本質的に理解することを目指した(図 1-3)。

1.4　研究体制

本プロジェクトにおいては、バイオイメージング、逆遺伝学、インフォマティクス[16]・進化、オミクス[17]の 4 グループが切断葉の葉細胞の原糸体頂端幹細胞化の分子機構を研究し、通常発生過程における多能性幹細胞化の分子機構解明は基礎生物学研究所(以下、基生研)との共同研究で実施された。また、ヒメツリガネゴケゲノム情報をいち早く本プロジェ

[15] 本プロジェクト研究終了報告書
[16] インフォマティクス：本追跡調査報告書では、バイオインフォマティクス（生命情報科学あるいは情報生物学）を意味しており、大量の実験データのコンピューター解析を通して、情報という観点から生命現象を研究する学問分野。「生物学辞典：バイオインフォマティクス」東京化学同人　2010 年
[17] オミクス：生体中に存在する分子全体を網羅的に研究する学問。
https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/keyword/2393.html

クトに利用するために、金沢大学学際科学実験センターゲノム機能解析分野とインフォマティクスシステムの開発について共同研究を行った。各グループの人員・研究分担は表 1-1 の通りである。

グループの独自性を重視してグループ単位で独立した研究が行える体制がとられたが、緊密な情報共有を図るために研究員全員が同じ居室で研究を実施できる環境を整備するとともに、月 1 回研究員全員が発表するプログレスミーティングが開催された。

表 1-1　研究体制

<table>
<tr><td colspan="3">研究総括　長谷部 光泰(自然科学研究機構　基礎生物学研究所教授)
技術参事(1 名)、事務参事(1 名)、事務員(1 名)</td></tr>
<tr><td>グループ名</td><td>グループリーダー</td><td>主な研究分担</td></tr>
<tr><td>バイオイメージング
研究員　　2 名
技術員　　2 名
研究補助員　3 名
(計 7 名)</td><td>佐藤 良勝</td><td>葉細胞幹細胞化の経時観察法の確立
幹細胞化に必要な外部シグナルの検出
細胞周期変動のイメージング
ヒストン修飾関連因子の免疫抗体染色法の開発</td></tr>
<tr><td>逆遺伝学　グループ
研究員　　3 名
技術員　　1 名
研究補助員　7 名
(計 11 名)</td><td>久保 稔</td><td>逆遺伝学的実験方法の開発
ケミカルジェネティクス法の確立
多能性幹細胞化に関わる遺伝子の単離と機能解析
細胞周期再開を引き起す因子の解明</td></tr>
<tr><td>インフォマティクス・進化
研究員 1 名
(計 1 名)</td><td>西山 智明</td><td>ヒメツリガネゴケ・イヌカタヒバのゲノム情報整備
幹細胞化関連遺伝子のカタログ化
遺伝子ネットワークの解析</td></tr>
<tr><td>オミクス　グループ
研究員　　4 名
技術員　　4 名
研究補助員　7 名
(計 15 名)</td><td>倉田 哲也(～2010 年 3 月)
長谷部 光泰(兼任)
(2010 年 3 月～)</td><td>ゲノムワイドな遺伝子発現制御の解析
クロマチン修飾・DNA メチル化解析実験系の構築
mRNA、small RNA 発現解析実験系の構築</td></tr>
<tr><td rowspan="2">共同研究</td><td>自然科学研究機構基礎生物学研究所</td><td>通常発生過程におけるリプログラミング分子機構</td></tr>
<tr><td>金沢大学学際科学実験センターゲノム機能解析分野</td><td>インフォマティクスシステムの開発</td></tr>
</table>

研究員の人数にはグループリーダーを含む。

また、ERATO 特別重点期間(2011 年 4 月-2012 年 3 月)においては、植物の持つ高いリプログラミング能の原因の解明を目指して、総括グループ(長谷部リーダー)とインフォマティクスグループ(西山リーダー)の 2 グループ制で研究が遂行された。

1.5　プロジェクト終了時点での研究成果やその意義

本プロジェクトの最初の 3 年ほどで、現在の分子生物学的な研究に必須の主要な実験系と解析技術が新たにヒメツリガネゴケで確立された。特に、次世代シーケンサーの導入によるゲノムワイドな遺伝子の網羅的解析手法、および多検体を長時間自動継続顕微観察できるシステムの構築が成功し、幹細胞化を一細胞レベルで解析できる系が開発された。これら一連の斬新な実験手法と、ヒメツリガネゴケゲノム解読情報を組み合わせることにより、切断葉細胞の幹細胞化を統括する幹細胞誘導因子 STEMIN[18]が発見され、哺乳類の多能性幹細胞を引き起す因子がヒメツリガネゴケの幹細胞化を誘導することも見出された。また、これら以外にもリプログラミングに必要な多くの遺伝子が同定され、リプログラミング過程における遺伝子ネットワークの概要を明らかにすることに成功した。さらに、シダ植物イヌカタヒバのゲノム解読を通して、これらの因子が陸上植物全体の中でどのように進化したかが推定された[19]。

本プロジェクトの事後評価報告書で、本プロジェクトではリプログラミング研究に有利かつオリジナルな実験系が確立され、全ゲノム解読情報に加えて最新の解析法の導入と、新奇性の高い先導的な研究が行われ、リプログラミングの進化的側面までも明らかにする従来にない新しい展開が期待できる多くの重要な知見が得られたことが高く評価された[20]。

以下に本プロジェクト研究終了報告書に記載された個々の研究成果[21]について詳述する。

1.5.1　ヒメツリガネゴケ実験系の洗練・開発

本プロジェクトで開発された以下の実験系は、ヒメツリガネゴケ実験マニュアル(PHYSCO manual ver.2)として一般公開されている[22]。

(1)観察系の確立

①葉細胞幹細胞化の経時観察法、葉細胞幹細胞化実験系の確立

茎葉体から切断した細胞における葉細胞幹細胞化の全過程を観察するために、48 時間連続で 96 サンプルを同時に観察できる多検体同時蛍光タイムラプス顕微鏡システムが開発された。また、レーザーマイクロダイセクションシステムを用いて、切断葉内の任意の細胞を任意の数だけ破壊できる実験系が構築され、幹細胞化における細胞間相互作用を 1 細胞レベルで研究できる系が確立された [21]。

(2)ゲノム情報整備

---

[18] STEMIN：本追跡調査報告書では、タンパク質因子を示す場合は STEMIN と表記し、それをコードする遺伝子を示す場合はイタリック表記の *STEMIN* とした。野生型および優性遺伝子は大文字、変異遺伝子及び劣勢遺伝子は小文字で表記する。「生物学辞典：遺伝子記号」 東京化学同人　2010 年

[19] ERATO「長谷部分化全能性進化プロジェクト」
http://www.jst.go.jp/erato/research_area/completed/hbz_PJ.html

[20] ERATO「長谷部分化全能性進化プロジェクト」事後評価報告書
http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/hasebe.pdf

[21] 本プロジェクト研究終了報告書(以下　研究終了報告書を引用している部分は出典「21」と記載する)

[22] http://moss.nibb.ac.jp/

①核ゲノム解読と遺伝子モデルと統合的ゲノムブラウザ構築

ヒメツリガネゴケ解読プロジェクトに参画し[5]、ゲノムのアノテーション[23]、EST[24]、cDNAの貼り付けを行い、大量シークエンス解析による実際の転写領域データを取得し、幹細胞化の解析をゲノムワイドに行う基盤が整備された。また、国際コンソーシアムとして公開されたゲノムデータは､約4万遺伝子のうち3分の2についてcDNAの裏付け情報が無かったため、本プロジェクトでは高速パイロシーケンサー(454)システムを利用した完全長cDNAの全長配列決定法を確立し、約1万転写単位についての配列情報が取得された。さらに、454システムを利用した3’末端配列決定法を開発し特許出願された(表2-5)。これらの情報に基生研で集積したデータを統合してゲノムブラウザが構築された。このブラウザにはトランスクリプトーム解析、Chromatin immunoprecipitation sequence (ChIP-seq)の結果を表示でき、これによりゲノムワイドな統合解析が可能となった。

なお、ヒメツリガネゴケゲノム解読については、基生研からプレスリリースされ[25]、植物陸上進出の仕組み解明に繋がる成果として報道各紙に掲載された[26]。

②幹細胞化関連遺伝子のカタログ化

ヒメツリガネゴケ幹細胞化関連遺伝子の候補遺伝子を網羅するために、シロイヌナズナで既知の826の発生・再生関連遺伝子のヒメツリガネゴケオルソログが系統解析され、データベース化された[27]。特に細胞周期制御(49遺伝子)、エピジェネティク遺伝子発現関連遺伝子(83遺伝子)、光信号伝達系(165遺伝子)や植物ホルモン関連因子(153遺伝子)について重点的な解析が行われ、イヌカタヒバのゲノム解読を報告する論文にその結果が記載された[6]。なお、イヌカタヒバゲノム解読についても基生研からプレスリリースされ[28]、植物進化の解明に繋がる成果として報道された[29]。

また、解析情報を利用して基生研などと発生進化に関する共同研究が行なわれ、イヌカタヒバではジベレリン細胞内受容体(GID1：Gibberellin Insensitive Dwarf 1)を介するジベレリン信号伝達経路が働いているが､ヒメツリガネゴケではそれが働いていないこと[7]、ジベレリンはコケ植物に既に存在した生殖システムを促すスイッチとして後のシダ植物の誕生に伴って出現したこと[8]、コケ植物においては、シュート形成のない二倍体世代でオーキシン極性輸送系が機能していること[9]、フラグモプラスト形成に必須なキネシンが植物特異的であること[10]が見出された。

---

[23] アノテーション：DNA塩基配列データに対して配列情報の意味を注釈する作業のこと。「生物学辞典：アノテーション」東京化学同人　2010年

[24] EST：発現配列タグ(Expressed sequence tag)。DNAの配列情報の一種で、ゲノムから転写されたmRNAを用いて作成したcDNAライブラリーの塩基配列を網羅的に決定して得た配列情報。「生物学辞典：EST」東京化学同人　2010年

[25] 基生研プレスリリース2007年12月14日　http://www.nibb.ac.jp/press/2007/12/post-192.html

[26] 朝日新聞「コケゲノム解読」2007年12月14日、毎日新聞2007年12月16日、日本経済新聞2007年12月14日

[27] http://moss.nibb.ac.jp/treedb/

[28] 基生研プレスリリース2011年5月6日　http://www.nibb.ac.jp/press/2011/05/06.html

[29] 中日新聞「シダ植物のゲノム解読」2011年5月6日

さらに、ヒメツリガネゴケ通常発生過程における幹細胞化に関して以下の成果が得られた。まず、被子植物のシュート形成に関わるホメオボックス遺伝子の１つであるクラス 1 KNOX 遺伝子のオルソログが、ヒメツリガネゴケゲノム中に 3 個存在することが発見され、3 重遺伝子欠損体では胞子体の頂端幹細胞や分裂組織の分裂回数が減少することから、被子植物同様、クラス 1 KNOX 遺伝子が胞子体の頂端幹細胞や分裂組織の未分化状態の維持に関与していることが明らかにされた[11]。また、ヒメツリガネゴケの原糸体で、クロマチン修飾を制御するポリコーム抑制性複合体 2(PRC2)遺伝子を欠失させたところ、通常は、受精したあとに形成される胞子体が、受精なしに形成されることが発見され、PRC2 が 2 倍体発生プログラムの開始を制御していることが判明した[12]。この研究成果は基生研からプレスリリースされ[30]、陸上植物の起源についての新仮説提唱として報道された[31]。

(3)リプログラミング関連因子のスクリーニング法開発

①順遺伝学的遺伝子同定系の確立

ヒメツリガネゴケは交配が難しく順遺伝学的遺伝子同定法が確立されてないため、重イオンビームにより欠失突然変異体を作出し、ゲノムタイリングアレイによって欠失部位を特定する方法が開発された[21]。

②高効率スクリーニング系の開発

逆遺伝学的に幹細胞化関連遺伝子をスクリーニングするために、ヒメツリガネゴケで初めてアグロバクテリウムを用いた「同時に多種類の形質転換体を作出する実験系」が開発された[21]。

③ケミカルジェネティクススクリーニング法の開発

多検体同時蛍光タイムラプス顕微鏡システムを用いて、12,000 化合物を含むライブラリーからヒメツリガネゴケの幹細胞化過程を阻害する化合物が単離された。この阻害化合物が関与する幹細胞化ネットワーク作用因子を探索するために、ファージディスプレイと水晶振動子マイクロバランスによる標的因子同定法、ならびにシロイヌナズナ遺伝子過剰発現体ライブラリー(FOX ライン[32])を用いた下流因子同定法が開発された[21]。

(4)遺伝子発現解析系の確立

①mRNA、small RNA 発現解析系の確立

ヒメツリガネゴケのゲノム解読[5]を受け、超並列シーケンサーSOLiD(Applied Biosystems 社)を導入して、マイクロアレイの約 100 倍近くのダイナミックレンジで遺伝

[30] 基生研プレスリリース 2009 年 9 月 10 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2009/09/post-168.html
[31] 日本経済新聞「陸上植物の起源　コケじゃない!?」2009 年 9 月 11 日、朝日新聞 2009 年 10 月 27 日
[32] ライン：同一の遺伝子型を持つ一族。進化で時間の経過に対応するつながり。生物学用語辞典 http://www.weblio.jp/content/LINE#SBTGY

子の発現解析を可能とするデジタル遺伝子発現解析系が確立された(図 1-4)。このトランスクリプトーム解析法を用いて、葉切断後 6 時間以内に全遺伝子の 11%に及ぶ発現変動が起きること、初期にはストレス応答とタンパク質分解が誘導され、光合成他の代謝が低下し、再生過程後期では光合成系代謝系の回復が見られることが明らかになり、新規の遺伝子解析法としてどのような偏りを含みうるかが解析された[13]。

small RNA の網羅的発現解析は、small RNA を調整後、直接突出のある 2 本鎖アダプターをライゲーションし、アダプターと small RNA の境界を決定するプログラムを構築したうえで、超並列シーケンサーにより塩基配列が決定された。

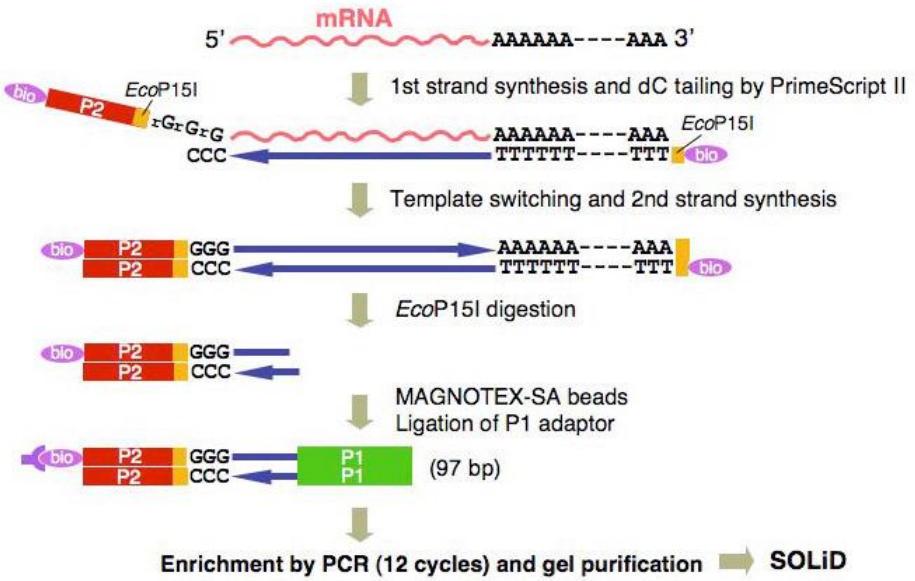


図 1-4　トランスクリプトーム解析実験法の概略[33]
超並列シーケンサーを導入し、Template Switching 法[34]を利用して、独自のトランスクリプトーム解析法を開発した。

②ヒストン修飾解析系の確立

体細胞から幹細胞形成過程において、クロマチン修飾変動が見られるかどうか、あるいは、幹細胞化に関わる遺伝子の発現変化にクロマチン修飾の変動が関わっているかどうかを調べるために、細胞レベルでの抗ヒストン修飾抗体を用いた免疫染色法、ゲノムワイドに超並列シーケンサーを用いてヒストン修飾を調べる ChIP-seq 法が開発された[21]。

(5) loss-of-function、gain-of-function 遺伝子機構解析系の確立

①条件的遺伝子発現誘導系の確立

発現誘導可能なベクター系として、ダイズ熱ショックプロモーターを用いた熱ショック誘導系ベクターと、エストロジェン誘導系ベクターが構築された[21]。

[33] 本プロジェクト研究終了報告書
[34] Zue Y et al., *Biotechniques* 30, 892-897, 2001

②条件的遺伝子欠失系、条件的遺伝子発現抑制系の確立

遺伝子発現抑制法である RNAi や人工 microRNA(amiRNA)を用いて、熱ショック誘導系やエストロジェン誘導系を組み合わせた条件的遺伝子発現抑制系が確立された[21]。

(6)遺伝子ネットワーク解析系の確立

幹細胞化の遺伝子ネットワークを解析するために、超並列型シーケンサーを用いて転写因子およびクロマチン修飾因子の直接ターゲットをゲノム全体にわたって同定できる ChIP-seq 法が確立された。また、野生型と比べて機能喪失型突然変異体や過剰発現型突然変異体で発現変動する遺伝子群と、ChIP-seq データから推定された遺伝子群の積集合を抽出し、それらを直接ターゲット候補遺伝子とするプログラムが開発された[21]。

1.5.2 多能性幹細胞化に必要な外部刺激の解明

(1)切断シグナル

茎葉体葉細胞の幹細胞化には切断刺激が必要であり、切り口に面した細胞が幹細胞化することがわかった。葉切断後の幹細胞化過程におけるトランスクリプトーム解析から、シロイヌナズナで傷害応答を担うジャスモン酸(JA)シグナル伝達系によって誘導される遺伝子群の発現が切断後 1 時間目から上昇していた。また、本プロジェクトにより、オーキシンシグナル伝達系が葉細胞の幹細胞化に必要であることが明らかになった(1.5.3 (2)参照)。葉切断刺激によってジャスモン酸シグナル伝達系が働いてオーキシンの内生量を増やし、その結果としてオーキシンシグナル伝達系が誘導される[21]。

(2)光シグナル

多検体同時蛍光タイムラプス顕微鏡システムによる観察の結果、葉細胞の幹細胞化には光刺激が必須であった。赤色光受容体フィトクロムあるいは青色光受容体クリプトクロムの恒常的活性型遺伝子改変体の切断葉は暗所で幹細胞化したが、葉切断しないと幹細胞化しないことが見出され、光とは別経路で切断シグナルが必要なことがわかった[21]。

(3)ニッチ細胞の必要性

後生動物の幹細胞は幹細胞としての性質を保つためにニッチ細胞を必要とする。また、被子植物においても幹細胞維持にはニッチ細胞が必要であると考えられている。レーザーマイクロダイセクションシステムを用いて、ヒメツリガネゴケ切断葉の 1 細胞だけを残し、それ以外の細胞を全て除去したところ、1 葉細胞が原糸体頂端幹細胞へと変化できることが観察された(図 1-5)。これは、葉細胞がニッチ細胞なしに単独で多能性幹細胞化できることが示された初めての実験例である。

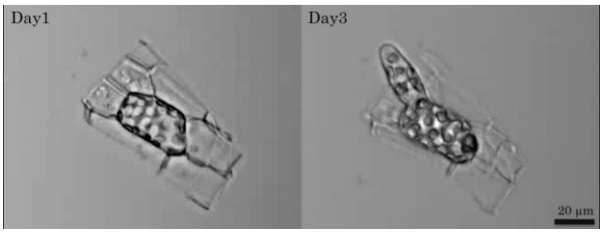


図 1-5　単独葉細胞の幹細胞化[35]
1 細胞を単離培養すると（左）、原糸体頂端幹細胞化する（右）。

(4) 抑制シグナル

隣接する 2 つの葉細胞を単離培養したところ、幹細胞化の初期過程である核の膨潤が両細胞でおこるが、片方の細胞のみが幹細胞化し、他方は再び核が縮小し幹細胞化しないことが発見された。このことから、幹細胞化した細胞は抑制物質を分泌し、周辺の細胞の幹細胞化を抑制していると考えられた[21]。

1.5.3　多能性幹細胞化時におこる細胞内環境変化の解明

本プロジェクトでは、葉細胞の原糸体頂端幹細胞への転換過程、原糸体細胞の茎葉体頂端幹細胞と原糸体頂端幹細胞への転換過程について、これまで不明であった幹細胞化時に機能する遺伝子ネットワークを明らかにすることを目指し、下記の実験結果をもとにネットワークの概要が解明された(図 1-6)。

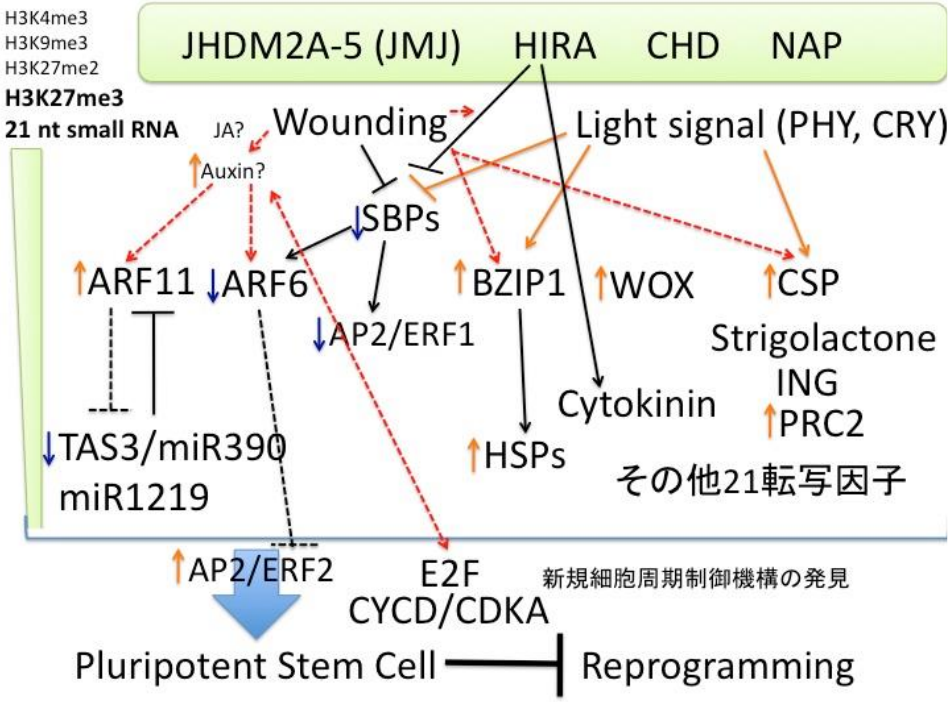


図 1-6　ヒメツリガネゴケ葉細胞幹細胞化過程の遺伝子制御ネットワーク概要[36]
ネットワークを統括する AP2/ERF2 は STEMIN と命名された(1.5.3 (7)参照)。図中のそれぞれの因子については、1.5.3 (1)～(11)に記述した。

[35] 本プロジェクト研究終了報告書

[36] 本プロジェクト研究終了報告書

(1)ヒメツリガネゴケの幹細胞形成と被子植物の幹細胞形成の類似点、相違点の解析

被子植物の分化細胞が幹細胞化するには、オーキシン、サイトカイニンの外生投与が必要であるが、ヒメツリガネゴケ葉細胞は植物ホルモンの外生投与無しに幹細胞化する。葉切断後のトランスクリプトーム解析から、切断刺激によってオーキシンシグナル伝達系に関わる因子の発現変動は起こるが、サイトカイニンについては顕著な変動は起こらなかった。このことは、幹細胞化にはオーキシン伝達系が陸上植物全体で機能しているが、サイトカイニンは多細胞幹細胞系の進化に伴って進化してきたことを意味している[21]。

(2)オーキシンシグナル伝達系の脱分化の分子実態解明

ヒメツリガネゴケ葉細胞からの幹細胞化には外生オーキシン投与は不必要であったが、オーキシンアンタゴニスト BH-IAA を外生投与すると幹細胞化が抑制された。また、ヒメツリガネゴケゲノムに存在する 3 つのリプレッサータンパク質 Aux/IAA 遺伝子の一つ *PpIAA1* に突然変異を導入した恒常的活性型 *PpIAA1CA* を作製し、これを誘導発現させると BH-IAA 投与と同様に幹細胞化が阻害された。このことから、葉細胞幹細胞化にオーキシンシグナル系が必要であることがわかった。

葉細胞幹細胞化過程におけるトランスクリプトーム解析の結果、オーキシン合成遺伝子を誘導することでオーキシン内生量の調節に働くことが知られている転写因子 PpSHI1、PpSHI2 や、オーキシン合成を担う YUCCA、活性型オーキシン量を減少させるオーキシンーアミノ酸複合体合成酵素 PpGH3-2 が関与することが示唆された。

被子植物においてオーキシンシグナル伝達系は転写因子 ARF を介して転写ネットワークへ連結している。そこでヒメツリガネゴケゲノムにコードされている 14 個の *ARF* 遺伝子の転写産物を全て同定し、葉切断後の発現解析と、エストロジェン誘導型 amiRNA を用いた *ARF* 遺伝子の発現抑制株を作製した。その結果、*PpARF6*、*PpARF11* の発現抑制によって葉切断後の幹細胞化が顕著に抑制された。また、*PpARF11* は *PpTAS3* 遺伝子由来の *trans*-acting siRNA(ta-siRNA)や、ヒメツリガネゴケ特有の miRNA である miR1219 の結合配列を有することから、これらの RNA により発現制御を受けている可能性が考えられた。そこで、ta-siRNA と miR1219 耐性型の *PpARF11* を高発現させたところ、葉細胞の幹細胞化が促進された。

以上のことから、上記の遺伝子群の間の相互作用によって PpARF6、PpARF11 の 2 つの転写因子の活性化を終結とするシグナル伝達系が機能し、一方で、葉の切断後 1 時間以内にジャスモン酸シグナル伝達系が活性化されることが見出されており、ジャスモン酸シグナル伝達系が内性オーキシン量の調節や small RNA の制御に関わると推定された[21]。

(3)幹細胞化におけるストリゴラクトン機能の解明

ストリゴラクトンは被子植物では待機分裂組織の分裂活性を抑制しているが、ヒメツリガネゴケにおいては分化細胞の幹細胞化を抑制する働きがあることが、人工合成ストリゴラクトンの外生投与実験で示唆された[21]。

(4)bZIP 転写因子

マイクロアレイと超並列シーケンサーを用いたデジタル遺伝子発現解析により、幹細胞

化に発現変動する転写因子を 256 個選抜した。これらについて、転写抑制ドメイン SRDX を融合した恒常的抑制型突然変異遺伝子を作出して調べたところ、*bZIP* 遺伝子(*PpBZIP1*)が冗長性を維持しながら葉細胞幹細胞化に関与していることが明らかとなった[21]。

(5)ヒストン修飾による制御

①葉細胞幹細胞化における H3K27me3 マーク減少の発見

葉細胞と原糸体幹細胞間でのヒストン修飾を比較したところ、葉細胞においては活性化マーク(H3K4me3)と不活性化マーク(H3K27me3)を共に持つバイバレントな状態であり、幹細胞化過程ではいくつかの遺伝子で不活性化マークが取り除かれることがわかった。このことから、幹細胞化には H3K27me3 の脱メチル化が重要であることが示唆され、ヒストン脱メチル化酵素 JMDM2A、およびヒストンシャペロン HIRA と NAP がリプログラミングの促進に機能することが見出された[21]。

②バイバレントヒストンマーク形成機構の新仮説の提唱

バイバレントヒストンマークは、多能性幹細胞から分化細胞に転換する際に発現変動する遺伝子上に多く見られ、細胞分化の過程でこれらの遺伝子が速やかに発現変動できるように、活性化マークと不活性化マークの両方を持っていると考えられている。そして、これらのH3K4me3とH3K27me3修飾は別々に形成されるとされているが、その形成機構は不明であった。H3K27me3修飾を司るポリコーム抑制性複合体2(PRC2)機能を完全に阻害した遺伝子破壊株を作製することに世界で初めて成功し[12]、各遺伝子座における遺伝子破壊株と野生株のH3K4me3修飾レベルの比較をChIP-seq法を用いてゲノムワイドに解析された。その結果、バイバレントマーカーを持つ遺伝子座のH3K4me3修飾レベルは遺伝子破壊株で全体的に減少しており、K27の喪失に伴ってK4も減る傾向にあることがわかった。このことは、ポリコーム抑制性複合体2は、H3K27をトリメチル化する活性を持つだけではなく、H3K4me3修飾の形成・維持にも関与することを示唆しており、同一遺伝子座にバイバレントマークを形成・維持する新しい分子機能が存在することを意味している[21]。

③幹細胞化に必須なクロマチン修飾因子の発見

クロマチン修飾に関連する因子(ヒストンメチル化・脱メチル化酵素、アセチル化・脱メチル化酵素、DNA メチル化酵素、ヒストン、ヒストンシャペロンなど)計 61 個について欠失突然変異体、誘導 amiRNA 形質転換体を作出し、ヒストンシャペロンである HIRA や NAP と、脱メチル化酵素である JHDM2A が幹細胞化に必須であることが明らかになった[21]。

(6)光シグナル系とオーキシンシグナル系のクロストークを担う転写因子 PpSBP4 の発見

光シグナル系が SQUAMOSA promoter binding protein-box 遺伝子 (SBP-box gene family)の発現を制御していることが知られているので、ヒメツリガネゴケ SBP-box genes の *PpSBP4* を切断葉で強制発現させたところ、幹細胞化が抑制された。逆に、*PpSBP4* に転写抑制ドメイン SRDX を結合させたタンパク質を強制発現させると、幹細胞化が切り口に面した

細胞、ならびに切り口に面しない細胞でも促進された。このことから、光シグナルの一部はPpSBP4を介して幹細胞化ネットワークに導入されることがわかった[21]。

ChIP-seq法などによってPpSBP4の直接ターゲットを探索したところ、*PpARF6*が直接ターゲットの１つであることがわかり、光シグナル系とオーキシンシグナル系のクロストークを*PpSBP4*遺伝子が担っていることがわかった。また、AP2/ERFドメインを持つ*PpAP2/ERF1*も直接のターゲットであった[21]。

(7) 幹細胞化遺伝子ネットワークにおけるインテグレーターの発見

PpSBP4、*PpARF6* のそれぞれの機能喪失変異体において発現変動する遺伝子の中にAP2/ERFドメインを持つ*PpAP2/ERF2*が見つかり、*PpSBP4*、*PpARF6*の下流で機能する転写因子であると考えられた。この*PpAP2/ERF2*をエストロジェン誘導プロモーター制御下で誘導すると、葉切断しなくても通常の葉細胞から幹細胞化が引き起された(図 1-7)。このことから、PpAP2/ERF2は幹細胞化過程で遺伝子ネットワークの途中に存在して、情報を統合する働きを持つインテグレーターであることがわかった(1.5.3 参照)。この因子をSTEMIN(STEM cell INducting factor)と名付けた。また、STEMINを過剰発現させたところ、次頂端細胞での分枝が引き起されたことから、STEMINは通常発生過程においても分化細胞の幹細胞化を制御していることがわかった(図 1-8)[21]。

図 1-7　*STEMIN*遺伝子による通常葉細胞からの幹細胞化[37]
*STEMIN*遺伝子の発現を誘導すると、無傷の葉において、葉細胞の幹細胞化が引き起される。図B、Cは図Aの拡大図。

図 1-8　原糸体細胞における*STEMIN*遺伝子の発現誘導[38]
左図：原糸体において*STEMIN*遺伝子を条件的発現誘導すると次頂端細胞での分枝が誘導される。右図：*STEMIN*遺伝子の発現誘導していない原糸体。

[37] 本プロジェクト研究終了報告書

[38] 本プロジェクト研究終了報告書

(8) *WUSHEL-related homeobox*（*WOX*）遺伝子の幹細胞形成における機能解析

シロイヌナズナの *WUSCHEL-related homeobox*（*WOX*）遺伝子は茎頂ならびに根端分裂組織のニッチ細胞で発現し、幹細胞の形成維持制御に関わっているが、その分子機構は不明であった。ヒメツリガネゴケで発現している *PpWOX1*、*PpWOX2* の二重欠失変異体が作出され、原糸体幹細胞や茎葉体幹細胞の形成維持は正常であったが、原糸体細胞からの原糸体頂端幹細胞化および切断葉細胞の幹細胞化が抑制されたことから、PpWOX は障害に応答して新規幹細胞を形成するのに必要な因子であることがわかった(2.2.2(4)参照) [21]。

(9)Lin28 オルソログによるフィードバック制御を介した同時遺伝子発現変動システムの発見

本プロジェクトにより、葉細胞の幹細胞化過程において、多くの mRNA の安定化に関与する RNA 結合タンパク質(PpCSP1)が発現することによって、多くの mRNA が安定化し、それが初発刺激となって、自己ポジティブフィードバック遺伝子の発現は急速に増加し、反対に自己ネガティブフィードバック遺伝子の発現は急速に減少するらしいことが明らかになった。PpCSP1 は、哺乳類では多能性幹細胞を誘導する際に導入される遺伝子の 1 つとして知られている Lin28 のオルソロガスなタンパク質である。Lin28 は cold shock domain を有する RNA 結合型タンパク質で、特定の micro RNA をターゲットとしている[39]。一方で、PpCSP1 は同時に複数の mRNA と結合し、mRNA の安定化などによる post-transcriptional な制御を介して、幹細胞過程を正に制御している(2.2.2(2)参照)[21]。

(10)ケミカルジェネティクスを用いた幹細胞化に必要な *PpING* 遺伝子の発見

約12,000種の化合物ライブラリーから葉細胞幹細胞化を阻害する化合物RIN16B(図1-9)が選抜された。シロイヌナズナ遺伝子過剰発現体ライブラリー(FOX ライン)を用いて、RIN16B 投与下でもシロイヌナズナ側根形成時の幹細胞化が阻害されないラインを選抜したところ、エピジェネティック制御因子をコードする遺伝子 *AtING2* を過剰発現するラインが RIN16B 非感受性であることがわかった。さらに、ヒメツリガネゴケの *AtING2* オルソログである *PpING2* およびその相同遺伝子である *PpING1* の二重欠失突然変異体を作製すると葉細胞幹細胞化の抑制が観察された [21]。

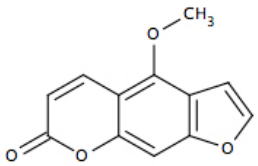


図 1-9　RIN16B の構造式[40]

[39] Yu J et al., *Science*, 318, 1917-1920, 2007

[40] 本プロジェクト研究終了報告書

(11)低分子 RNA による制御

生物の様々なプロセスに低分子 RNA による転写後制御が働いていることが報告されており、ヒメツリガネゴケにおいても 205 個の miRNA 遺伝子の存在が知られている。幹細胞化過程の網羅的な低分子 RNA 発現解析を行ったところ、茎葉体に比べ原糸体先端では 21 塩基の低分子 RNA が少ないこと、幹細胞化過程では 21 塩基 RNA が順次減少することが見出され、低分子 RNA のグローバルな変動がリプログラミングに寄与していることが示唆された[21]。

1.5.4　多能性幹細胞化による細胞周期の再開機構の解明

通常発生過程で見られる幹細胞化や葉細胞からの幹細胞化において、幹細胞化の指標は細胞周期の再開であるが、幹細胞形成時における細胞周期再開の分子機構はほとんど未解明であった。下記に示すように、本プロジェクトで、幹細胞化に伴う新規細胞周期制御機構および細胞周期制御因子 CDKA による細胞周期再開と幹細胞化のコーディネーションが明らかになった。

その他に、細胞周期制御転写因子 RBR/E2F による細胞周期再開とオーキシンとの連関についても検討された[21]。

(1)幹細胞化に伴う新規細胞周期制御機構の発見

これまで、コケ植物の原糸体細胞の DNA 量は 2C であるが、茎葉体は半数体の 1C であろうと考えられてきた。本プロジェクトにおいて、茎葉体葉細胞 DNA 量がフローサイトメーター、顕微測定により調べられたところ、茎葉体も 2C であることが明らかとなった。コケ大半の世代を占める配偶体が半数体ということを考慮すると、葉細胞は S 期後半か G2 期で細胞周期が停止していると考えられる。そこでその両者を区別するために、DNA 合成時に取り込まれる EdU(5-ethynil-2'-deoxyuridine)を用いたところ、幹細胞化の過程で EdU の取り込みが観察された。次に茎葉体から葉を切り離し、DNA ポリメラーゼの阻害剤であるアフィディコリン存在下で培養したところ、EdU の取り込みが見られず、また G2/M 期で発現する B タイプサイクリンの発現も観察されなかった。しかしながら幹細胞化の特徴である頂端成長は観察された[21]。

以上の結果から、2 つの仮説が提唱され、一つは、葉細胞は S 期後半で停止しており、幹細胞化の過程で複製されていない残りの DNA が複製されるという S 期停止仮説である。もう一つは、葉細胞は G2 期で停止しており、幹細胞化の過程でゲノム上の特定の領域の DNA が合成されるか、あるいは修復が起こり、それが幹細胞化に伴う細胞周期の再開に必要であるとする G2 期 de novo DNA 合成・修復仮説である。

(2)細胞周期制御因子 CDKA による細胞周期再開と幹細胞化のコーディネーション

細胞周期制御への関与が報告されている遺伝子のヒメツリガネゴケオルソログが同定され、それらの葉幹細胞化時における時空間的発現変動が解析された結果、CYCD;1 が発現し、それに伴い CDKA が活性化することが明らかになった。ロスコビチンによって CDKA の活性化が阻害されると、細胞周期の再開だけでなく頂端成長のような幹細胞化も阻害された。一方、アフィディコリンで細胞周期だけを阻害しても葉細胞は頂端成長を開始した。これ

らのことからCDKAの活性化が幹細胞化に必須であることが示唆された。そこで、エストロジェン誘導系でCDKAのキナーゼ不活性型を過剰発現させたところ、細胞周期進行の抑制と頂端成長の抑制が観察されたことから、CDKAは細胞周期再開と、頂端成長など幹細胞化のその他の過程をともに制御し協調させていることがわかった[14]。基生研は、「分化細胞が幹細胞化する過程で、CDKAが細胞周期の再開と他の過程を協調的に制御していることを発見した」と発表した[41]。

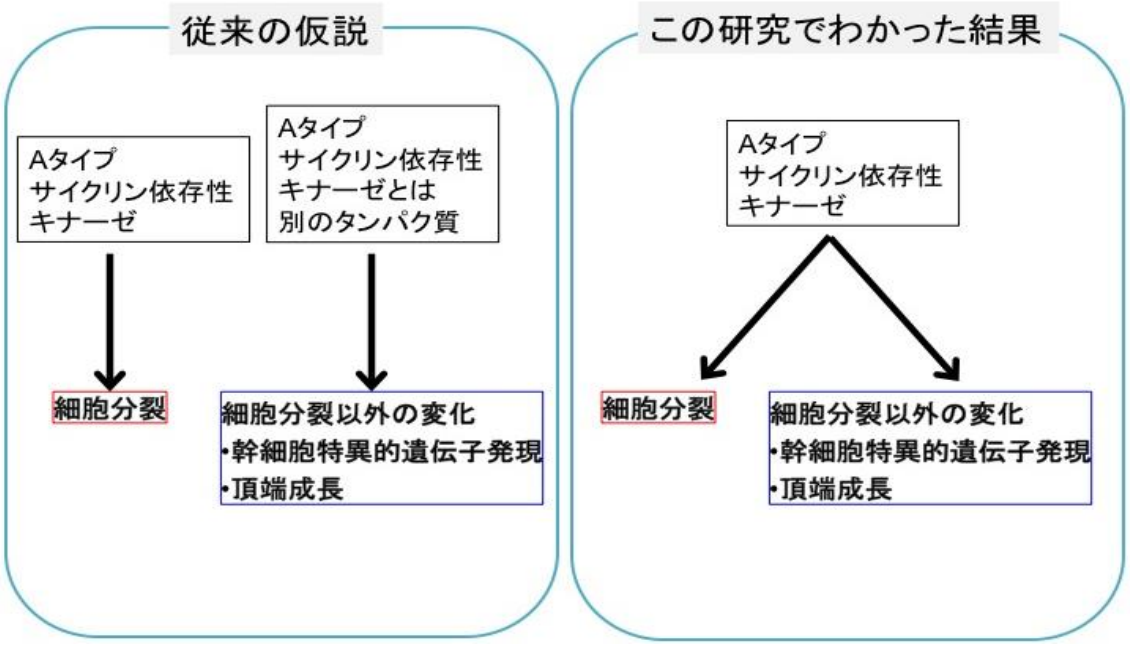


図 1-10　CDKAの新しい機能[42]
CDKAは細胞周期の再開を制御するだけでなく、頂端成長などの過程も制御している。

[41] 基生研最新ニュース 2011年9月10日
http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2011/09/post-40.html
[42] 基生研最新ニュース 2011年9月10日
http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2011/09/post-40.html

第 2 章　プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1　各研究テーマの終了後の状況に関する基礎データ

2.1.1　調査方法

本調査は、文献調査(プロジェクト報告書、解説、原著論文など)、インターネットによる調査、各種データベースによる業績(論文・特許・受賞他)の調査からなる基礎データ調査と、プロジェクト関係者や外部有識者へのインタビュー調査により行った。これに基づき、プロジェクト期間中の成果の現時点での発展状況及び波及効果等についてまとめた。

(1)基礎データ調査の方法

基礎データ調査については、基本的にプロジェクトメンバー全員を対象として、プロジェクトの研究に関連した成果の発展状況について、文献による成果の把握と、論文や研究助成金の獲得状況等のデータ調査を行った。各項目について利用したデータベースと調査範囲等を下記に記す。

①論文

プロジェクト期間中の論文は、本プロジェクト研究終了報告書に成果論文としてリストアップされている論文とした。成果論文リストの中で in press、submit 等と表記があり、その後発表されたものについても基本的に期間中の論文とした。

プロジェクト終了後の論文は、2012 年 4 月以降に発表され、かつプロジェクトメンバーが著者になっている論文を収集した(ただし、プロジェクト期間中の論文に含むものは除く)。収集した論文の中で、プロジェクトとの関連を Abstract 等で確認し、関連のあるものを関連論文としてリストアップした。

データベースは、Scopus 及び、Web of Science を利用した。

②競争的研究資金の獲得状況

プロジェクトメンバー全員を対象として、研究内容がプロジェクトの研究内容に関連している研究課題について調べた。

データベースとしては、調査対象者の所属する研究室や本人の WEB サイト及び KAKEN 科学研究費助成事業データベース等の競争的研究資金に関する検索サイトと、補助的に Google 等の検索サイトを利用した。

③特許の出願・登録状況

プロジェクト期間中の特許は、本プロジェクト研究終了報告書の成果リスト記載の特許とした。プロジェクト終了後の特許は 2012 年 4 月以降に出願された特許でかつ、プロジェクト関係者が発明者に入っているものから、プロジェクトの成果と関連のある特許を収集した。

データベースは、PatentSquare と、補助的に特許電子図書館、espacenet を利用した。

④招待講演

プロジェクト関係者の終了後の招待講演実績を調査対象者の所属する研究室や本人のWEBサイトの調査、Google等の検索サイト、①で記述した文献データベースの会議録情報等を併せて収集し、かつ、インタビューの際に主な招待講演について確認した。

(2)インタビュー調査の方法

インタビュー調査は本プロジェクト関係者(研究総括、グループリーダー、外部有識者等)からは、基礎調査で知り得た情報の本プロジェクトとの関連や、その後の展開等についての情報を収集した。また、外部有識者からは、本プロジェクトの成果及び、研究総括の研究をよく把握している研究者にプロジェクト外部から見た本プロジェクトの意義や、当該研究分野における波及効果等の情報を収集した。

2.1.2 競争的研究資金の獲得状況

本プロジェクト期間中から現在までのプロジェクトメンバーも含めた競争的資金の獲得状況を表2-1に示す。

本プロジェクト期間中に見出された葉細胞幹細胞化に関わる因子(図 1-6)については、頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム「植物リプログラミング研究におけるシステム生物学推進の国際研究ネットワーク形成」(2010-2012 年度)、科研費研究活動スタート支援「分化細胞から全能性幹細胞へのリプログラミング過程における低分子RNAの機能の解明」(2010-2011年度)、科研費若手研究(B)「リプログラミングを促進するRNA結合タンパク質PpCSPの分子機能の解明」(2012-2013年度)、科研費挑戦的萌芽研究「単細胞生物から多細胞生物への進化における鍵因子の探索」(2012-2013 年度)、および科研費基礎研究(B)「分化細胞を幹細胞に変えるマスターレギュレーターSTEMIN の機能解析」(2013-2015 年度)において研究が継続された。また、通常発生過程における幹細胞形成機構については、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「小数遺伝子変化による新奇複合適応形質進化の分子機構解明」(2010-2014年度)において継続して検討された。

本プロジェクト研究終了報告書において、「リプログラミング機構解明に向けて今後はシステム生物学的手法の導入が必要である」と言及されているが、この点については、上記の頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム[43]「植物リプログラミング研究におけるシステム生物学推進の国際研究ネットワーク形成」(2010-2012 年度)を通して実行された。日本学術振興会(JSPS)が主催する本プログラムは、国際共同研究ネットワークの核となる優れた研究者を育成することを目的としており、大学等研究機関が、研究組織の国際研究戦略に沿って、世界水準の国際共同研究に携わる若手研究者を海外へ派遣し、様々な課題に挑戦する機会を提供する取組を支援するものである。本プログラムにおいて、システム生物学を専門とするDuke大学・Benfey教授、およびFreiburg大学・Reski教授のもとにそれぞれ1名ずつの研究員が派遣され、システム生物学の立場でリプログラミン

[43] JSPS 頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム
https://www.jsps.go.jp/j-zunoujunkan2/jigohyoka.html

グを考察できる研究者を育成するとともに、多細胞生物の発生過程において細胞レベルで経時的に転写活性量を測定できる１細胞４次元ルシフェラーゼ定量解析システム、および１細胞トランスクリプトーム技術の開発に成功した[44]。

なお、長谷部は、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「適応形質進化の遺伝子基盤解明」(2010-2015 年度)において領域代表者を務め、その事業目的と意義を以下のように述べている[45]:「自然選択理論、中立理論を始めとする既存の進化理論がいまだ取り込むことに成功していない現象がある。食草転換、新奇適応形態、擬態、共生など、複数の形質進化が積み重なることによってはじめて適応的になり、未完成な段階では適応的でなく、かえって生存に不利になってしまうような形質(複合適応形質)の進化である。本領域では、複合適応形質を制御する遺伝子を同定し、その進化メカニズムとプロセスを推定することにより、進化の新しい共通理論を導きだすことを目指す」。一方で、長谷部は自身のホームページで、「幹細胞化を通した個体再生は適応的でかつ複雑なプロセスで中間段階は不適応ですから、まさしく、複合適応形質です。」としており[46]、リプログラミング機能解明を目指した本プロジェクトが、自然選択や中立説に匹敵するような進化の一般原則をゲノムから見つけ出そうとする長谷部の研究方針の一環であったことが窺える。

[44] JSPS 頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム事後評価資料
https://www.jsps.go.jp/j-zunoujunkan2/data/jigohyoka/h22/shiryo/shiryo_S2217.pd
[45] http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/hojyo/chukan-jigohyouka/1327530.htm
[46] 基生研・長谷部研究室ホームページ
http://www.nibb.ac.jp/evodevo/research_19_reprogramming.html

表 2-1　競争的資金の獲得状況(2016 年 12 月末時点)

	競争的研究資金	名称	予算額(億円)	研究代表者	研究年度														
					2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
	ERATO	**長谷部分化全能性進化**	**総額: 16.53**	長谷部 光泰															
1	科研費　基盤研究(A)	渓流沿い水生被子植物カワゴケソウ科の跳躍的進化機構の解明	総額: 0.42	今市 涼子(研究分担者　長谷部光泰)	■	■	■	■											
2	科研費　基盤研究(B)	食虫植物の消化酵素の起源と進化– 新規形質の獲得進化	総額: 0.15	長谷部 光泰	■	■	■												
3	科研費　基盤研究(B)	陸上植物の2倍体生活史進化多様性を生み出した分子機構の解明	総額: 0.18	長谷部 光泰			■	■	■										
4	科研費　基盤研究(B)	微小管分枝因子の解析による植物微小管構築分子機構の解明	総額: 0.17	村田 隆(研究分担者　長谷部光泰)			■	■	■										
5	科研費　基盤研究(B)	陸上植物の共通祖先が持っていた発生システムの推定	総額: 0.19	長谷部 光泰						■	■	■							
6	JSPS 頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム	植物リプログラミング研究におけるシステム生物学推進の国際研究ネットワーク形成	総額: 0.77	長谷部 光泰							■	■	■						
7	科研費　新学術領域研究(研究領域提案型)	少数遺伝子変化による新奇複合適応形質進化の分子機構解明	総額: 1.30	長谷部 光泰							■	■	■	■	■				
8	科研費　新学術領域研究(研究領域提案型)	複合適応形質進化の遺伝子基盤解明	総額: 4.44	長谷部 光泰(研究分担者 西山智明)							■	■	■	■	■				
9	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	非モデル生物におけるゲノム解析法の確立	総額: 1.10	西山智明							■	■	■	■	■				
10	科研費　基盤研究(B)	シャジクモ概要ゲノムの解読と遺伝学的地図の同時構築による陸上植物進化の解明	総額: 0.18	西山智明									■	■	■				
11	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	陸上植物の世代交代を制御するエピゲノム・遺伝子発現相関の解明	総額: 0.12	玉田 洋介									■	■					
12	科研費　基盤研究(B)	分化細胞を幹細胞に変えるマスターレギュレーターSTEMINの機能解析	総額: 0.18	長谷部 光泰(研究分担者 西山智明)										■	■	■			
13	科研費　基盤研究(B)	極限環境に適応したカワゴケソウ科の形態多様化に関する遺伝学的解析	総額: 0.18	加藤雅啓(分担研究者　西山智明)										■	■	■			
14	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	一細胞遺伝子発現解析を用いたステム・ニッチ形成機構の解明	総額: 0.11	久保 稔											■	■			
15	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	陸上植物の世代交代を制御するエピゲノム・遺伝子発現相関の解明	総額: 0.11	玉田 洋介											■	■			
16	科研費 若手研究(A)	幹細胞化過程の高分解能ライブイメージングを可能にする新規補償光学顕微鏡法の確立	総額: 0.25	玉田 洋介											■	■	■		
17	科研費　基盤研究(B)	シャジクモ藻綱全目ゲノム解読にもとづく陸上植物への進化解明	総額: 0.08	西山智明												■	■	■	■
18	科研費　基盤研究(S)	植物発生進化のグランドプランとしての細胞分裂軸制御機構とその時空間制御機構の解明	総額: 1.95	長谷部　光泰													■	■	■
19	科研費　基盤研究(A)	植物発生進化のグランドプランとしての細胞分裂軸制御機構の解明と進化	総額: 0.44	長谷部　光泰													■		
20	科研費　基盤研究(A)	全ゲノム比較解析で解き明かす多細胞化と雌雄性の進化	総額: 0.43	野崎久義(分担研究者　西山智明)														■	■
21	科研費　基盤研究(A)	コマチゴケとナンジャモンジャゴケのゲノム情報を基盤とした総合的研究	総額: 0.14	嶋村正樹(分担研究者　西山智明、榊原恵子)											■	■	■	■	

表 2-2　競争的資金の概要(2016 年 12 月末時点)

No	概　　要
1	カワゴケソウ科は、川岸や川床など雨期には水中に沈み、乾期の水位が下がった時には空中にでて花を着ける水生被子植物で、約280種が世界の熱帯の雨季・乾季の区別のある地域に分布している。カワゴケソウ科は、分子系統解析から真正被子植物オトギリソウ科に近縁であることがわかっており、体の単純化は、水中の岩に固着して生活するという特異な環境に適応したために生じた跳躍的進化の結果と考えられている。本研究では、アジア、アフリカ、アメリカ、マダガスカルでの野外調査において世界のカワゴケソウ科を収集し、葉緑体遺伝子matKを用いた分子系統解析と、比較形態形成研究、ならびに生理生態的研究からその跳躍的進化機構の解明をめざした。系統解析と生物地理学では、カワゴケソウ科は高い地域性をもっていること、トリスティカ亜科のうち1種は世界中に分布しているがこれの祖先はカメルーンなど西アフリカであり、後に世界に広がった事が示唆された。
2	食虫植物の消化酵素の起源と進化を探るために、多くの消化酵素タンパクを同定し、部分アミノ酸配列・BLASTPサーチ・系統解析によってこれらのタンパク質がどのような機能を持っているかを推定した。その結果、ほとんどの消化液中タンパク質は非食虫植物にオルソログ遺伝子を持つことがわかった。また、食虫植物の系統によって似たような機能のタンパク質を用いている場合でも、それらはオルソログ関係ではなくパラログ関係にあることがほとんどであった。これらのことから、食虫植物の消化酵素は非食虫植物が持っていたタンパク質から進化したものであり、系統によってそれぞれ独立に進化したものであることがわかった。非食虫植物の食虫植物消化液タンパク質オルソログのアノテーション解析から、いくつかの遺伝子は耐病性に関わる遺伝子であることがわかった。耐病性遺伝子はバクテリア、菌類の消化に関わる機能を持つものがあり、細胞間領域に分泌される場合が多い。このことから、元来耐病性遺伝子として用いられていた遺伝子の一部が食虫植物の消化酵素として機能するように進化したらしいことが推察された。このことは進化における新規形質の進化が既存のシステムをリクルートしていたという発見として意義があり、重要である。非食虫植物から食虫植物の進化においては、これら細胞外へ分泌されていたタンパク質を効率的に分泌するための腺構造の進化、消化物を吸収するための吸収線の進化、そして、捕虫葉の進化が必要だったと考えられる。
3	ヒメツリガネゴケのポリコーム抑制複合体2の構成因子であるPpCLFの全生活史を通した発現解析を行った。その結果、原糸体から原糸体、茎葉体形成時にはPpCLF遺伝子が発現し続けていることがわかった。さらに、茎葉体における造精器、造卵器形成時にも発現が継続していた。さらに、未受精卵ではPpCLFの発現が検出できるが、受精の前後で発現が消失することがわかった。さらに、胞子体幹細胞が分裂を停止する前後で発現が再び検出できるようになり、減数分裂、胞子形成時に発現しつづけていた。胞子においては発現検出できなかったが、胞子発芽直後より発現を検出できた。遺伝子破壊株の表現型観察(赤色光下における分化細胞から幹細胞分化における役割の解析)を行った結果、側芽形成にPpCLFが正の役割を果たすことがわかった。ヒートショックプロモーターにPpCLF cDNAを結合した遺伝子の導入によって、誘導的過剰発現実験を行った結果、胞子体様組織先端の頂端幹細胞が分裂を停止し、胞子嚢形成が開始した。しかし、減数分裂には至らなかった。
4	中心体を持たない植物細胞がどのようにして微小管を作るのかは長年の謎であった。我々は、すでに間期の細胞において微小管は既存の微小管から斜め40°の角度で伸び出すこと、この微小管枝分かれ形成においては、微小管重合核の構成因子γチューブリンが働くことを示したが、本研究課題においては、植物の細胞質分裂に枝分かれ微小管形成が働くか、もし働くとしたら枝分かれで形成された微小管はどのように再編成されるのかを解析した。タバコ培養細胞の細胞質分裂におけるγチューブリンの役割を調べるために、伸長中の微小管先端のマーカーであるGFP-AtEB1bを用いて、抗γチューブリン抗体の微小管伸長に対する効果を検討した。その結果、抗γチューブリン抗体は伸長中の微小管の数を大きく減らすことがわかった。隔膜形成体中には抗γチューブリン抗体で標識される微小管分枝構造があることから、微小管枝分かれ形成が隔膜形成体の発達を介して細胞板の発達に働くことが示された。
5	リニア植物が陸上植物の共通祖先であり、リニア植物型ボディープランが陸上植物共通の発生システムであるという仮説の妥当性を検証することを目的に、ヒメツリガネゴケのポリコーム遺伝子欠失変異体の無限成長分枝胞子体様構造の無限成長と分枝の制御機構を解析した。また、オーキシンによる胞子体様頂端幹細胞の形成制御機構を調べるために、ポリコーム複合体II遺伝子欠失変異体にオーキシンシグナル可視化マーカーコンストラクトと胞子体頂端幹細胞分子マーカー発現コンストラクトを導入し、ライブイメージング観察を行った。その結果、(1)オーキシンシグナルの高活性化部位は胞子体様頂端幹細胞の形成部位に一致し、オーキシンシグナルの活性化が幹細胞の位置決定に関連すること、(2)胞子体様頂端幹細胞におけるオーキシンシグナル活性化部位は幹細胞マーカーが発現すると消失するため、胞子体様幹細胞にはオーキシンシグナル活性を消失させる機構が存在すること、(3)オーキシンシグナル活性化は胞子体様構造において表層の細胞に強く検出されることから、表層の細胞特異的にオーキシンシグナルを活性化する機構があることがわかった。

No	概　　要
6	本プログラムは、国際共同研究ネットワークの核となる優れた研究者を育成することを目的としており、大学等研究機関が、研究組織の国際研究戦略に沿って、世界水準の国際共同研究に携わる若手研究者を海外へ派遣し、様々な課題に挑戦する機会を提供する取組を支援するものである。長谷部は本プログラムにおいて、「植物リプログラミング研究におけるシステム生物学推進の国際研究ネットワーク形成」を目的に、Duke大学・Benfey教授、およびFreiburg大学・Reskey教授のもとにそれぞれ1名づつの研究員を派遣し、システム生物学の立場でリプログラミングを考察できる研究者を育成するとともに、多細胞生物の発生過程において細胞レベルで経時的に転写活性量を測定できる１細胞4次元ルシフェラーゼ定量解析システム、および1細胞トランスクリプトーム技術の開発に成功した。
7	新奇複合適応形質はいくつかの遺伝子が変化して進化する場合と少数の遺伝子に変化が起こって生じる場合があると推定される。実際、我々は蛾類クルミホソガのAFLP 解析から親の産卵選好性と幼虫の寄主利用能力を制御する遺伝子座が同じか極めて近接した２つの遺伝子であること、食虫植物の消化酵素遺伝子や葉形態形成遺伝子がシロイヌナズナのような非食虫植物ゲノムにも存在していること、コケ植物ヒメツリガネゴケでクロマチン修飾を担うポリコーム抑制複合体２(PRC2)遺伝子を破壊すると現生コケ植物には無く、他の陸上植物が持つ共有派生形質である分枝系（永続性多能性幹細胞を持ち枝分かれする）を生じることを発見した。本研究では、これらの３つの系に着目して、複合適応形質が少数の遺伝子の変化で生じうるのか、生じるならばどのようなメカニズムとプロセスによって生じるのかを明らかにする。
8	自然選択理論、中立理論を始めとする既存の進化理論がいまだ取り込むことに成功していない現象が、食草転換、新奇適応形態、擬態、共生など、複数の形質進化が積み重なることによってはじめて適応的になり、未完成な段階では適応的ではなく、かえって生存に不利になってしまうような形質（複合適応形質）の進化である。本領域では、複合適応形質を制御する遺伝子を同定し、その進化メカニズムとプロセスを推定することにより、進化の新しい共通理論を導き出すことを目指す。また、本領域では、ゲノム生物学者、情報数理生物学者によって、新型シーケンサーなどを活用した非モデル生物にも適用可能な新実験研究手法の開発を行い、進化生物学者と共同研究を行うことによって、進化学研究領域の発展を目指す。
9	必ずしも遺伝学的分子生物学研究リソースが十分でない非モデル生物において、次世代シーケンサーを活用して、ゲノムを解析し、進化上重要な意味を持つ遺伝子を特定する方法を開発する。研究１：非モデル生物トランスクリプトーム解析のためのライブラリ調製法の開発。研究2：配列多型マッピングを組み合わせた全ゲノムアセンブリー法の開発。研究3：大量mRNAシーケンスのもとづくアノテーションと発現プロファイリング。研究4：発現プロファイルからの高精度候補遺伝子抽出法の開発。
10	本研究では、陸上植物に近縁なシャジクモ藻類のシャジクモの概要ゲノム配列を次世代シーケンサーを用いて安価に決定するとともに、遺伝学的地図を作成して、染色体レベルのスーパースキャッフォルドを作成する事を目指している。シャジクモ標準株の概要ゲノム配列を進め、インサート長が220 bpのペアエンドライブラリー１つと様々なインサート長のメイトペアライブラリー１２個のデータをアセンブルし、全長2.1 Gb, Scaffold N50 2.2 Mb, Contig N50 8.7 kbのアセンブリーを得た。RNA-seqのデータを利用して遺伝子構造を調べると、100 kbを越えるような大きな遺伝子が数多くあり、遺伝子中にGapある場合が多い事がわかった。さらに別株S277のペアエンドライブラリーのシーケンシングを行い、共通にはタグが検出されない、バクテリアなどのコンタミと疑われる配列250 Mbを識別した。また、このS277の配列を利用して標準株とS277を区別できるPCR-RFLPマーカーを開発した。S277株と標準株を同じ容器で培養して得られた子孫を育てており、このマーカーを利用する事で、交配による子孫であるかどうかを容易に判定できるようになった。
11	陸上植物は、受精によって配偶体（n）世代から胞子体（2n）世代へと世代交代を行う。本研究では、クロマチン状態と遺伝子発現の相互作用を「エピゲノム・遺伝子発現相関」と名付け、陸上植物の受精による世代交代を制御するエピゲノム・遺伝子発現相関を解明することを目的とする。コケ植物ヒメツリガネゴケでは、抑制型クロマチン修飾H3K27me3の唯一の触媒酵素PpCLFの発現が受精によって消失する。それに端を発するエピゲノム・遺伝子発現相関を、①次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム・エピゲノム解析、②胞子体の発生プログラムに機能する遺伝子（胞子体発生遺伝子）の同定と機能解析、③胞子体発生遺伝子とクロマチン修飾の卵細胞核4Dライブイメージング、によって解明することを試みた。

No	概　　要
12	ヒメツリガネゴケ分化細胞の幹細胞化を制御するマスターレギュレーターSTEMINの機能を解析した。STEMINL1およびSTEMINL2遺伝子のプロモーターにGFP-GUS融合遺伝子を連結させたコンストラクトをヒメツリガネゴケに導入し、それらのプロモーター活性を調べた。STEMIN遺伝子のプロモーターと同様、切断葉および原糸体での幹細胞化過程でそれらのプロモーターの活性が上昇した。またSTEMIN遺伝子破壊株では、幹細胞化に遅れはなかったが、STEMIN、STEMINL1、STEMINL2遺伝子の３重破壊株で幹細胞化が遅れた。一方、STEMINL1およびSTEMINL2遺伝子をエストロジェン発現誘導系を用いて茎葉体でそれぞれ発現させたが、幹細胞化を誘導しなかった。以上のことから、STEMINパラログ遺伝子も幹細胞化に関与しているが、その機能はSTEMINと異なることが示唆された。STEMIN遺伝子にYFP遺伝子をノックインしたラインを作製したが、幹細胞化過程でYFPの蛍光は観察されなかった。また、エストロジェン発現誘導系を用いてSTEMIN-YFPタンパク質を発現誘導したが、予想外にもSTEMIN-YFPタンパク質の蓄積レベルが低いことが分かった。STEMINの推定アミノ酸配列を調べると、ユビキチンープロテアソーム分解系の標的配列であるD-ボックスが存在していた。そのためSTEMINタンパク質は不安定であると考えられた。
13	カワゴケソウ科の中立的（非適応的）と思われる形態の多様化を検証するために、国内外で野外調査し、資料を採集した。これまでに集めた資料も用い、以下の解析を進めた。形態多様化に関わったと推定される遺伝子群を網羅的に探索するため、RNA-seq.解析により取得した遺伝子配列を用い、分子進化学的解析を行なった。その結果、Zeylanidium lichenoidesにおいて、相対進化速度が上昇していることがわかった。同義置換率が高い遺伝子が多く検出されたことから、突然変異率自体が上昇した可能性が考えられる。子葉枚数の中立進化を検証するため、胚・実生の観察を行なった。その結果、Hydrodiscus koyamaeとカワゴロモ属のHydrobryum austrolaoticum他３種で子葉が１枚しか作られないことを確認した。これから、カワゴロモ群において少なくとも5回、子葉の枚数が変化したと推定され、本科を含む真正双子葉植物で保存的な子葉枚数の中立的変化が起きた可能性を示唆された。
14	ヒメツリガネゴケ新型発光オーキシンセンサーラインの作成にむけて、ヒカリコメツキムシ由来の緑色型および赤色型ルシフェラーゼがヒメツリガネゴケの細胞内において発光活性をもつか調べた。各遺伝子を発現する形質転換体がそれぞれ緑色あるいは赤色の発光をもつことを、発光検出顕微鏡装置を用いることによって確認した。同時に、オーキシンセンサー上で両遺伝子配列を介在する手足口病ウイルス由来の自己切断配列2Aがヒメツリガネゴケにおいて機能することを、ウエスタンブロット解析によって確認した。オーキシンセンサーを誘導する恒常的プロモーターとして、EF1α遺伝子のプロモーターと、エストロジェン誘導性GX8プロモーターを比較した結果、その活性の強さからGX8を採用することに決めた。これらの予備実験を経て、新型発光オーキシンセンサー用プラスミドの構築を行い、ヒメツリガネゴケへの形質転換を完了した。当ラインのオーキシン応答性を評価するため、現在オーキシンおよびアンチオーキシンを添加した際の発光シグナルの変化を調べている。
15	陸上植物は、受精によって配偶体（n）世代から胞子体（2n）世代へと世代交代を行う。本研究では、クロマチン状態と遺伝子発現との相互作用を「エピゲノム・遺伝子発現相関」と名づけ、陸上植物の受精による世代交代を制御するエピゲノム・遺伝子発現相関を解明することを目的とした。コケ植物ヒメツリガネゴケでは、抑制型クロマチン修飾H3K27me3の唯一の修飾酵素PpCLFの発現が受精によって消失することが知られている。その消失に端を発するエピゲノム・遺伝子発現相関の変動を、次世代シーケンサーを用いたエピゲノム・トランスクリプトーム解析とライブイメージングによって解明することを試みた。
16	申請者は、コケ植物ヒメツリガネゴケの幹細胞化過程におけるクロマチン修飾の動態と機能を明らかにするため、クロマチン修飾検出プローブを開発し、幹細胞化過程の単一細胞核ライブイメージングを行ってきた。しかし、細胞内構造体を介した光の乱れにより像が劣化するため、既存の顕微鏡系では必要な分解能が得られないことが明らかとなった。そこで、光の乱れを補正して高分解能観察を行う天文技術である補償光学を応用した新規顕微鏡系を確立し、幹細胞化過程の精細なライブイメージングを行うことが本研究の目的である。
17	未公開
18	未公開
19	未公開

No	概　　要
20	未公開
21	ナンジャモンジャゴケの根茎の発生，発達過程を走査型電子顕微鏡，透過型電子顕微鏡，FIB-SEMを用いて観察し，粘液毛頂端部の粘液分泌孔が植物体内部への菌類の侵入経路となっていることを確認し，侵入した菌糸が粘液毛内部で維管束植物の菌根で知られるハルティヒネット様の構造を形成することを明らかにした．他の系統的に基部に位置するコケ植物とともに，ナンジャモンジャゴケの胞子の形態について観察し，基部コケ植物の胞子の特徴について議論した原著論文としてまとめた。

2.1.3　論文の発表状況

(1) プロジェクト期間中の成果論文

本プロジェクト期間中の成果論文のうち、Scopus で検索でき、かつドキュメントタイプが Article 及び Review の 16 報の被引用件数の累積と論文の発表数の推移を図 2-1 に示した。図 2-2 に成果論文の被引用件数の上位 5 件の年次推移を示し、表 2-3 にそれら 5 件の概要を記載した。

被引用件数上位 2 件(表 2-3)はコケ植物とシダ植物のゲノム解読に関する論文であり、本プロジェクト終了後も被引用件数が順調に増加している。特にヒメツリガネゴケゲノム解読に関する論文の累計被引用件数は 828 件に達している。図 2-3 に、この論文を引用した文献数の割合を科学分野毎に表示した。生化学・遺伝学・分子生物学、および農学・生物科学分野での引用文献数が多いが、医学、化学、薬学分野などの文献にも引用されており、本論文が広範な科学分野の発展に寄与したことが窺える。

他の 3 件のうち、2 件は植物ホルモンシグナル伝達について、ヒメツリガネゴケと被子植物との相違を進化学的に考察したもので、他の 1 件は被子植物の受精を引き起こす因子を研究したものである。

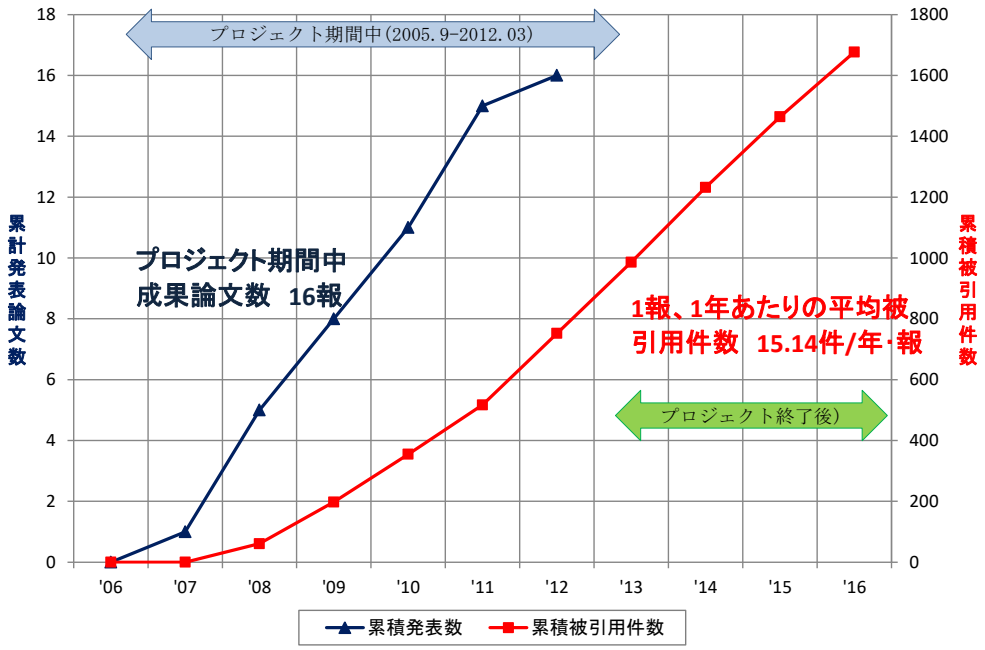


図 2-1 プロジェクト期間中の成果論文の発表数と被引用件数の推移
(検索 DB:Scopus 検索日 2017/1/5)

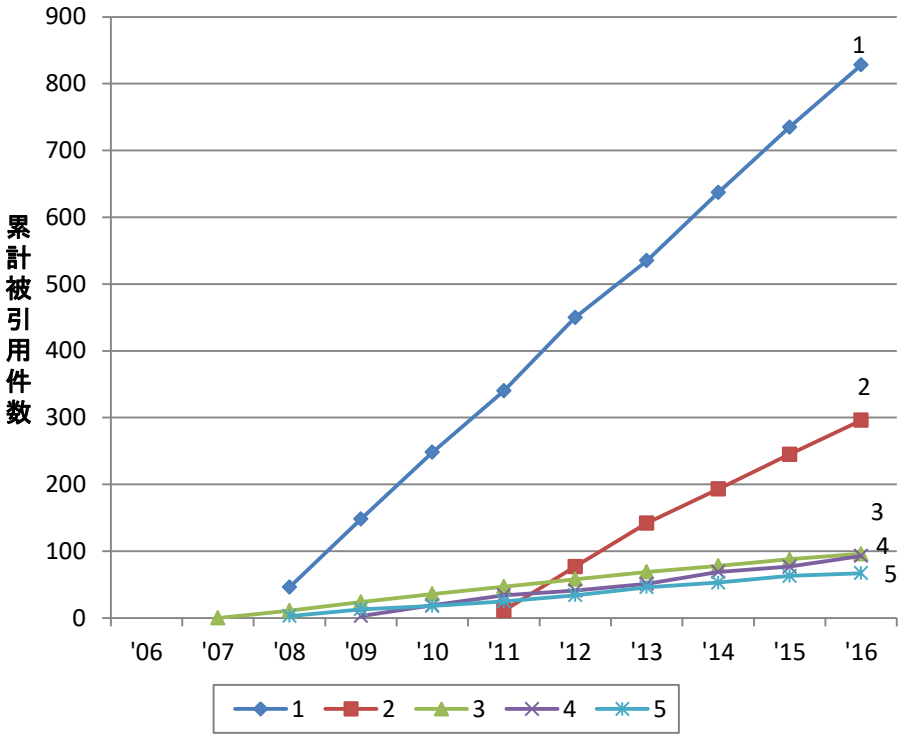


図 2-2　プロジェクト期間中の成果論文の内、被引用件数が上位 5 件の被引用件数の推移
（検索 DB:Scopus 検索日 2017/1/5）

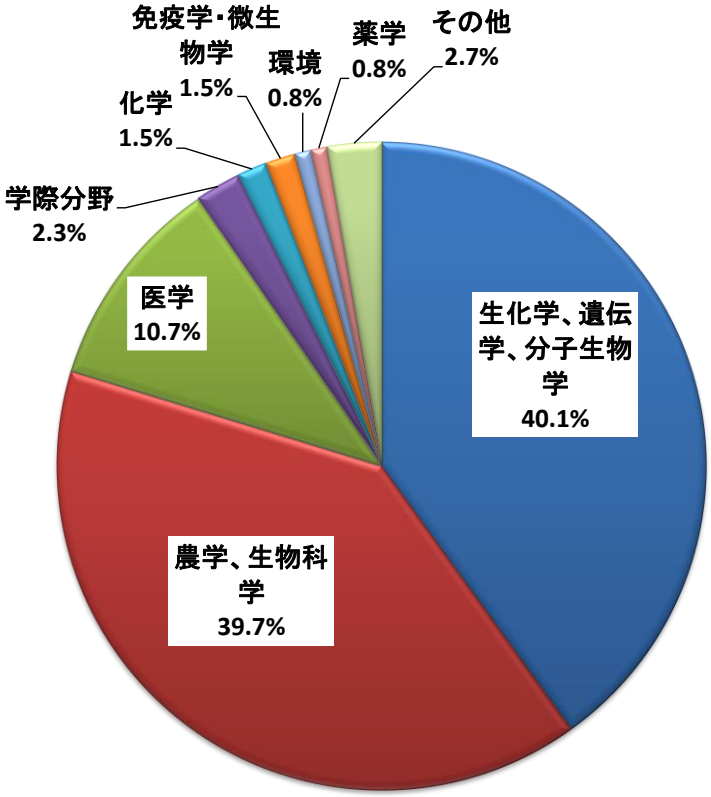


図 2-3　ヒメツリガネゴケゲノム解読論文を引用した文献の科学分野毎の割合
（検索 DB:Scopus 検索日 2017/1/18）

表 2-3 プロジェクト期間中の被引用上位 5 件の論文概要

No	タイトル	著者	掲載誌	巻	号	ページ	発行年	被引用件数	IF
1	The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants	Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S.-I., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Sung, H.C., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.-H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van De Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S., Boore, J.L.	Science	319	5859	64-69	2008	828	34.661
	概要：コケ植物ヒメツリガネゴケのゲノム解読に成功し、約3万6千遺伝子を発見した。その結果、陸上植物の進化過程で、植物の形作りや環境応答に必要な植物ホルモン関連遺伝子、乾燥耐性に必要な遺伝子、放射線などによってダメージを受けた遺伝子の効率的な修復機構に関わる遺伝子などが生じたことがわかった。								
2	The selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants	Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., DePamphilis, C., Albert, V.A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B.A., Ashton, N.W., Axtell, M.J., Barker, E., Barker, M.S., Bennetzen, J.L., Bonawitz, N.D., Chapple, C., Cheng, C., Correa, L.G.G., Dacre, M., DeBarry, J., Dreyer, I., Elias, M., Engstrom, E.M., Estelle, M., Feng, L., Finet, C., Floyd, S.K., Frommer, W.B., Fujita, T., Gramzow, L., Gutensohn, M., Harholt, J., Hattori, M., Heyl, A., Hirai, T., Hiwatashi, Y., Ishikawa, M., Iwata, M., Karol, K.G., Koehler, B., Kolukisaoglu, U., Kubo, M., Kurata, T., Lalonde, S., Li, K., Li, Y., Litt, A., Lyons, E., Manning, G., Maruyama, T., Michael, T.P., Mikami, K., Miyazaki, S., Morinaga, S.-I., TakashiMurata, Mueller-Roeber, B., Nelson, D.R., Obara, M., Oguri, Y., Olmstead, R.G., Onodera, N., Petersen, B.L., Pils, B., Prigge, M., Rensing, S.A., Riaño-Pachón, D.M., Roberts, A.W., Sato, Y., Scheller, H.V., Schulz, B., Schulz, C., Shakirov, E.V., Shibagaki, N., Shinohara, N., Shippen, D.E., Sørensen, I., Sotooka, R., Sugimoto, N., Sugita, M., Sumikawa, N., Tanurdzic, M., Theißen, G., Ulvskov, P., Wakazuki, S., Weng, J., Willats, W.W.G.T., Wipf, D., Wolf, P.G., Yang, L., Zimmer, A.D., Zhu, Q., Mitros, T., Hellsten, U., Loqué, D., Otillar, R., Salamov, A., Schmutz, J., Shapiro, H., Lindquist, E., Lucas, S., Rokhsar, D., Grigoriev, I.V.	Science	332	6032	960-963	2011	296	34.661
	概要：シダ植物イヌカタヒバのゲノム解読に成功した。シダ植物とコケ植物、被子植物のゲノムを比較した結果、陸上植物が共通に持つ遺伝子が明らかになり、花の咲く植物（被子植物）と花の咲かない植物（シダ植物）との間で、遺伝子の発現を制御する転写因子の数が増えており、これが単純な形を持った植物から複雑な形をを持った植物への進化を引き起した可能性が高いことも判明した。								
3	The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the lycophyte Selaginella moellendorffii but not in the bryophyte Physcomitrella patens	Hirano, K., Nakajima, M., Asano, K., Nishiyama, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Katoh, E., Xiang, H., Tanahashi, T., Hasebe, M., Banks, J.A., Ashikari, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M.	Plant Cell	19	10	3058-3079	2007	96	8.538
	概要：イネやシロイヌナズナのような被子植物では、ジベレリンのシグナル伝達系は、GID1とDELLAタンパク質によって制御されている。このシグナル伝達系がどのように進化してきたかを知るために、これらの遺伝子のシダ植物とコケ植物におけるホモログを調査した。その結果、シダ植物では被子植物と同様のジベレリンシグナル伝達系が機能しているが、コケ植物ではそれが機能していないことがわかった。								
4	ANXUR1 and 2, Sister Genes to FERONIA/SIRENE, Are Male Factors for Coordinated Fertilization	Miyazaki, S., Murata, T., Sakurai-Ozato, N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Hasebe, M.	Current Biology	19	15	1327-1331	2009	93	8.983
	概要：植物が交配して種を残すためには、花粉管からの精細胞の放出と雌しべの卵装置での卵細胞の開放が調度良いタイミングで起こる必要がある。シロイヌナズナで交配に必要な花粉管側で卵装置を認識する因子を発見した。発見された花粉管側（雄側）因子はこれまで報告されていた卵装置側（雌側）因子と、花の咲く植物の雄雌が進化した頃に、同じ祖先遺伝子から進化してきたことがわかった。雌雄で互いを認識する因子が同じ遺伝子に起源していたという発見は植物の雌雄の協調性がどのように進化するのかを解明する第一歩となる。								

No	タイトル	著者	掲載誌	巻	号	ページ	発行年	被引用件数	IF
5	Convergent evolution of shoots in land plants: Lack of auxin polar transport in moss shoots	Fujita, T., Sakaguchi, H., Hiwatashi, Y., Wagstaff, S.J., Ito, M., Deguchi, H., Sato, T., Hasebe, M.	Evolution and Development	10	2	176-186	2008	67	2.169
	概要：維管束植物はシュート(地上部主要器官）を二倍体世代で形成するが、コケのような非維管束植物は一倍体世代でシュートを形成する。被子植物のシュート形成にはオーキシンの極性輸送が必須であることが知られているが、コケ植物でも同様に必要であるかどうかを調べた。その結果、コケ植物の一倍体シュートにおいてはオーキシン極性輸送は検出されず、逆にシュート形成のない二倍体世代でそれが検出された。コケ植物においては二倍体世代の発生過程でオーキシン極性輸送が機能していると考えられた。								

(2) プロジェクト終了後の発表論文

本プロジェクト終了後の論文について、累積発表論文数と累積被引用件数の推移を図 2-4 に示した。図 2-5 に発表論文中で被引用件数の多い上位 5 件の年次推移を示し、表 2-4 にそれら 5 件の概要を記載した。終了後の発表論文数は期間中よりも多い 23 報であり、複数の論文が Science 誌や Nature Com.誌に掲載され、期間後も研究が進展したことが窺える。

被引用件数 1 位の論文(表 2-3)は、ヒメツリガネゴケゲノムの再アノテーションに関するものである。2 位はコケ植物が体内に水を供給する仕組みを明らかにしたものあり、3 位はヒメツリガネゴケ通常発生時の幹細胞化に関わる因子を明らかにしたものである。4 位の論文はタバコ細胞の分裂機構に関するものであり、5 位はシロイヌナズナの幹細胞に関するものである。

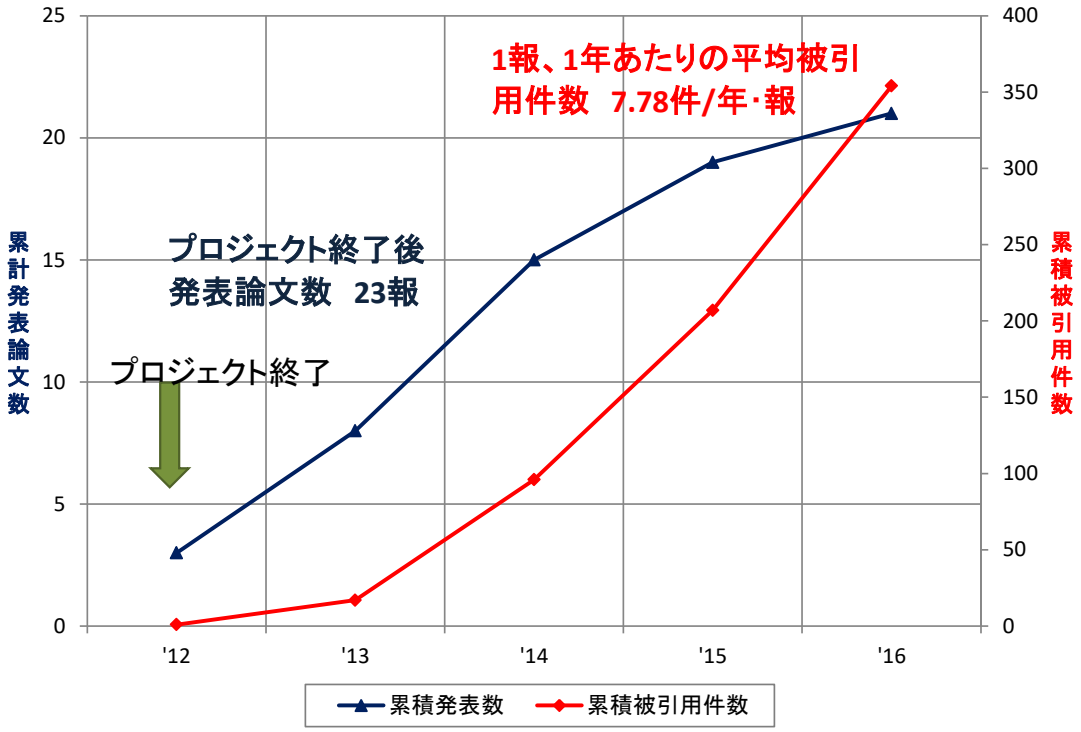


図 2-4 プロジェクト終了後の発表論文と被引用件数の推移
(検索 DB:Scopus 検索日 2017/2/9)

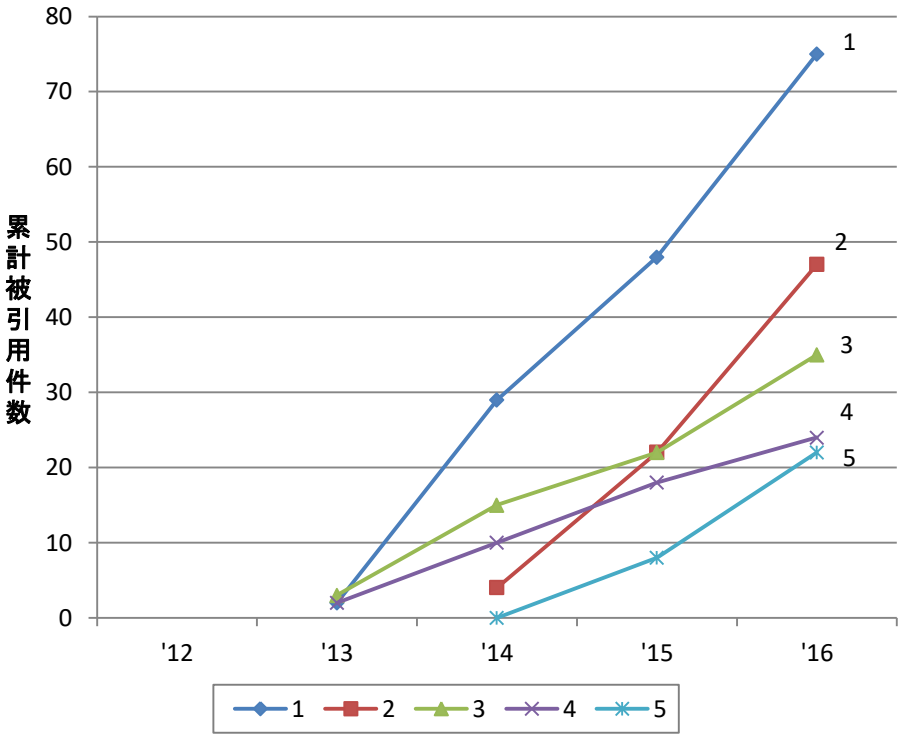


図 2-5　プロジェクト終了後の発表論文と被引用件数の推移
（検索 DB:Scopus 検索日 2017/2/9）

表 2-4 プロジェクト終了後の被引用上位 5 件の論文概要

No	タイトル	著者	掲載誌	巻	号	ページ	発行年	被引用件数	IF
1	Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant Physcomitrella patens provide insights into the evolution of plant gene structures and functions	Zimmer, A.D., Lang, D., Buchta, K., Rombauts, S., Nishiyama, T., Hasebe, M., Van de Peer, Y., Rensing, S.A., Reski, R.	BMC Genomics	14	1	498	2013	75	3.867
	概要：Science誌(2008年)に掲載されたヒメツリガネゴケゲノム解読は、アノテーションにおいて不十分な部分が残されていたが、本プロジェクトで得られた並列型シーケンサーによるトランスクリプトーム解析データ等からゲノムの再アノテーションを完成した。その結果、ヒメツリガネゴケは被子植物に比べ、その5’-UTR（5’-非翻訳領域）イントロンが多いことが判明した								
2	Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land	Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Kubo, M., Nakano, Y., Sano, R., Hiwatashi, Y., Murata, T., Kurata, T., Yoneda, A., Kato, K., Hasebe, M., Demura, T.	Science	343	6178	1505-1508	2014	47	34.661
	概要：コケ植物が、体内に水を運ぶ通り道の「通水細胞」と体を支えるための「支持細胞」を作る仕組みを明らかにした。この仕組み中では、自己の細胞を死なせて（自己細胞死）残った細胞の構造を利用することが重要であることを実験的に世界で初めて証明した。								

No	タイトル	著者	掲載誌	巻	号	ページ	発行年	被引用件数	IF
3	KNOX2 genes regulate the haploid-to-diploid morphological transition in land plants	Sakakibara, K., Ando, S., Yip, H.K., Tamada, Y., Hiwatashi, Y., Murata, T., Deguchi, H., Hasebe, M., Bowman, J.L.	Science	339	6123	1067-1070	2013	35	34.661
	概要：コケ植物ヒメツリガネゴケにて転写因子KNOX2をコードする遺伝子を欠損させたところ、複相における胚発生の途中で発生が停止し、減数分裂なしに配偶体様の組織を形成した。このことから、KNOX2遺伝子は複相において単相に特異的な発生プログラムを抑制するはたらきを担っていると推測された。								
4	Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast	Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasezawa, S., Machida, Y., Hasebe, M.	Nature Communications	4		2967	2013	24	11.329
	概要：本プロジェクトで開発された細胞観察技術を利用して、タバコ細胞の細胞分裂で仕切りができる過程を高解像度撮影することに世界で初めて成功し、生物の最も根源的な性質である細胞分裂の仕組みを明らかにした。								
5	Heterotrimeric G proteins control stem cell proliferation through CLAVATA signaling in Arabidopsis	Ishida, T; Tabata, R; Yamada, M; Aida, M; Mitsumasu, K; Fujiwara, M; Yamaguchi, K; Shigenobu, S; Higuchi, M; Tsuji, H; Shimamoto, K; Hasebe, M; Fukuda, H; Sawa, S	EMBO REPORTS	15	11	1202-1209	2014	22	7.739
	概要：シロイヌナズナのヘテロ3量体Gタンパク質βサブユニットの変異体が、clavata変異体と同様の伸長した幹細胞を形成することを見出した。遺伝的および細胞生物学的解析の結果、Gタンパク質のβサブユニット１(AGB1)とCLV3ペプチドホルモン受容体であるRPK2とが、物理的相互作用を通して幹細胞のホメオスタシスに相乗的に働くことが示された。								

2.1.4 特許の出願・登録状況

本プロジェクト期間中から現在に至るまでの特許出願状況を表 2-5 に示す。

本プロジェクト期間中の出願特許は、審査請求時に先行文献の存在が判明し、拒絶通知を受けている。本プロジェクト終了後に幹細胞化過程のエピジェネティックな変化を細胞レベルで検出することを目的に、補償光学顕微鏡を開発し、特許出願された。

表 2-5　プロジェクトの特許出願状況(2016/12/28 検索 DB:PatentSquare)
期間中

No.		発明の名称	優先権主張日（出願日）	出願番号	公開番号	登録番号	法的状況	出願人	備考
国内出願	1	オリゴｄＴプライマー、ｃＤＮＡライブラリー作製キット、およびｃＤＮＡライブラリー作製方法	2007.11.22	特願2007-303618	特開2009-125001		拒絶査定（１年経過）	国立研究開発法人科学技術振興機構	終了報告書記載の特願
国際出願									

終了後

特許ファミリー番号		発明の名称	優先権主張日（出願日）	出願番号	公開番号	登録番号	法的状況	出願人	備考
国内出願	1	補償光学系及び光学装置	2013.09.20	特願2013-195943	特開2015-060202		通常審査中	大学共同利用機関法人自然科学研究機構	
国際出願	1-1	補償光学系及び光学装置(ADAPTIVE OPTICAL SYSTEM AND OPTICAL DEVICE)	2013.09.20	WO2014JP74837	WO2015/041320			大学共同利用機関法人自然科学研究機構,服部雅之,玉田洋介,村田隆,亀井　保博,長谷部光泰,早野裕,大屋　真	
	1-2		2013.09.20	US201415023281	US2016209646 (A1)			大学共同利用機関法人自然科学研究機構,服部雅之,玉田洋介,村田隆,亀井　保博,長谷部光泰,早野裕,大屋　真	
	1-3		2013.09.20	EP20140845892	EP3048465 (A1)			大学共同利用機関法人自然科学研究機構,服部雅之,玉田洋介,村田隆,亀井　保博,長谷部光泰,早野裕,大屋　真	

2.1.5　招待講演

長谷部ならびにグループリーダー(GL)は、本プロジェクト期間中、31 件(国際会議)、42 件(国内)、終了後は 24 件(国際)、25 件(国内)の招待講演が行なわれた。

長谷部は、ヒメツリガネゴケのリプログラミングに関して、米国、英国、スイス、ドイツ、中国、シンガポール等で講演しており、本プロジェクトの研究内容が世界的に注目されていることが窺える。

2.2　各研究テーマの進展状況

2.2.1　ヒメツリガネゴケ実験系の開発とゲノム情報整備に関する研究

(1)条件的遺伝子誘導系の開発

本プロジェクト期間中に開発されたエストロジェン受容体を用いた条件的遺伝子発現系について(1.5.1 (5)参照)、エストロジェン存在下で、長期間にわたって高レベルの外来遺伝子誘導発現に成功した（図 2-6）[15]。

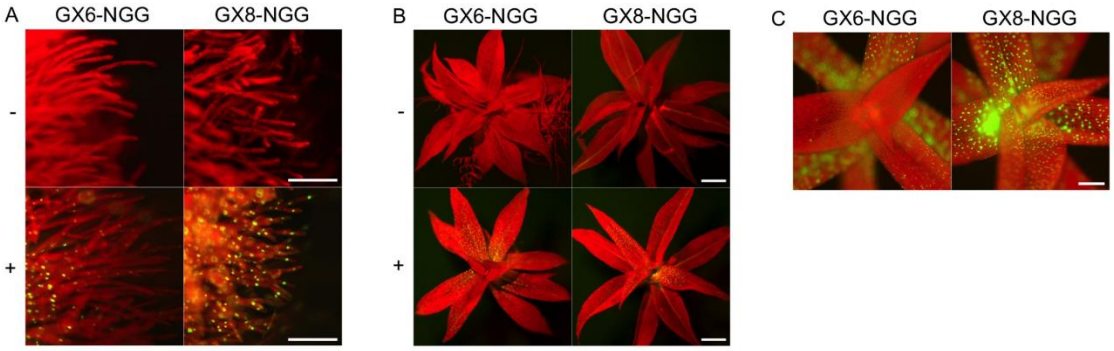


図 2-6　エストロジェン誘導による外来遺伝子の誘導発現[15], [47]

ヒメツリガネゴケの遺伝子発現プロファイルを参考に、恒常的発現を示す遺伝子を特定し、2 つのプロモーターを選抜してエストロジェン誘導系ベクターを開発した(pPGX6、pPGX8)。緑色蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子(NGG)を付与したベクターで形質転換された原糸体(A)、茎葉体(B)の蛍光を検出した。＋;エストロジェン誘導、－;エストロジェン非誘導。(C)は、(B)エストロジェン誘導の拡大図。

(2)ゲノム情報の整備

Science 誌に掲載されたヒメツリガネゴケゲノム解読[5]は、アノテーションにおいて不十分な部分が残されていたが、並列型シーケンサーによるトランスクリプトーム解析データ等からゲノムの再アノテーションが完成した[16]。その結果、ヒメツリガネゴケは被子植物に比べ、その 5'-UTR(5'-非翻訳領域)にイントロンが多いことが判明した(図 2-7)。

[47] *PLoS One*, 2013 Fig.2（メモ）

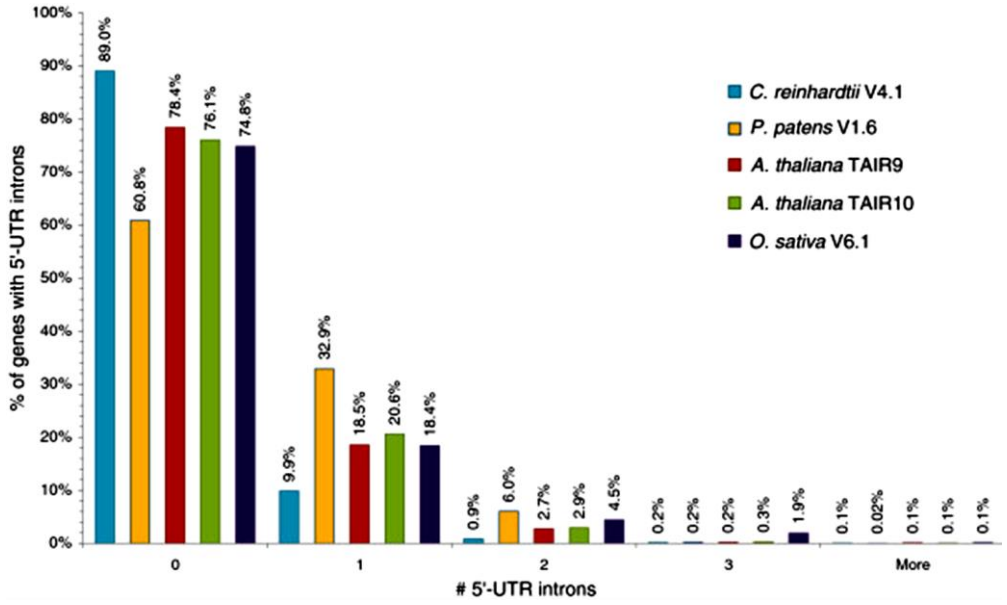


図 2-7　5’-非翻訳領域のイントロン数比較[16],[48]

また、植物のプロモーターに関するデータベース ppdb (http://ppdb.agr.gifu-u.ac.jp) にゲノム解析情報が提供され、シロイヌナズナ、ライス、ポプラおよびヒメツリガネゴケのプロモーター情報を完備するデータベースが構築された[17]。

2.2.2　切断葉細胞の多能性幹細胞化に関わる因子

本プロジェクト期間中に見出された葉細胞幹細胞化過程の遺伝子制御ネットワークを構成する因子(図 1-6)については、論文として報告されていないものが多いが、科研費の枠で研究が継続されている(表 2-1)。

(1)リプログラミング遺伝子ネットワークの統括制御因子 STEMIN

ヒメツリガネゴケゲノム上に、新たに 2 種のパラログ(STEMINL1、STEMINL2)が見出され、それらの機能が解析された。*STEMINL1* および *STEMINL2* 遺伝子のプロモーターに GFP-GUS 融合遺伝子を連結させたコンストラクトをヒメツリガネゴケに導入し、それらのプロモーター活性が調べられた。*STEMIN* 遺伝子のプロモーターと同様、切断葉および原糸体での幹細胞化過程でそれらのプロモーターの活性が上昇した。また *STEMIN* 遺伝子破壊株では、幹細胞化に遅れはなかったが、*STEMIN*、*STEMINL1*、*STEMINL2* 遺伝子の 3 重破壊株では幹細胞化が遅れた。一方、*STEMINL1* および *STEMINL2* 遺伝子を、エストロジェン発現誘導系を用いて茎葉体でそれぞれ発現させたが、幹細胞へ誘導されなかった。以上のことから、STEMIN パラログも幹細胞化に関与しているが、その機能は STEMIN と異なることが示唆された[49]。

また、STEMIN の推定アミノ酸配列を調べると、ユビキチンープロテアソーム分解系の標

[48] *BMC Genomics*, 2013 Fig.2(メモ)
[49] 科研費基盤研究(B)「分化細胞を幹細胞に変えるマスターレギュレーターSTEMIN の機能解析」、2013 年度研究実績報告書
https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-25291067/RECORD-252910672013jisseki/

的配列である D-ボックスが存在していた。そのため STEMIN タンパク質は不安定であると考えられたことから、D-ボックスに変異を入れ安定化させたが、幹細胞化は誘導できなかった。STEMIN による幹細胞誘導は STEMIN タンパク質の分解が必要であると考えられる[50]。

(2)RNA 結合タンパク質 PpCSP1

哺乳類で多能性幹細胞を誘導する遺伝子の１つとして知られている Lin28 のオルソロガスなタンパク質である PpCSP1 が、切断葉細胞の幹細胞化を誘導する因子の１つであることが証明された[18]。新たに *PpCSP1* とそれに近縁な 3 つの遺伝子を欠失させた 4 重変異体が複数作製され、それらの変異体では切断葉の幹細胞化が抑制されることが明確に示された（図 2-8)。また、*PpCSP1* の mRNA 量はその 3’末端非翻訳領域によって負に制御されており、3’領域を取り除くと PpCSP1 タンパク質量が増加するとともに幹細胞化が促進されることが見出された（図 2-9)。

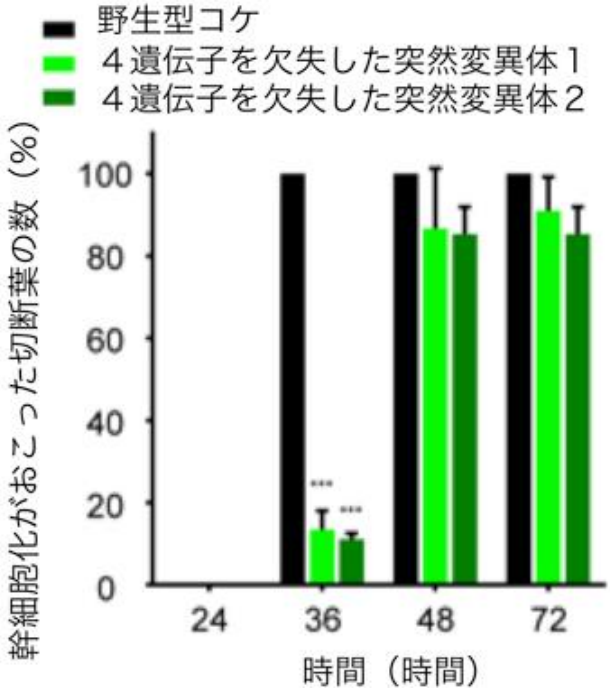


図 2-8　*PpCSP1* 多重欠失変異体の切断葉細胞幹細胞化頻度[51]

ヒメツリガネゴケ茎葉体の葉をいくつか切断し、そのうちのどのくらいの割合で幹細胞化がおこるかを調べた。*PpCSP1* ならびに近縁の３つの遺伝子の合計４遺伝子を欠失した突然変異体では 36 時間目で野生型と較べて統計的に有為に幹細胞化率が下がっている。しかし、48 時間後以降になると野生型と区別できなくなる。

[50] 科研費基盤研究(B)「分化細胞を幹細胞に変えるマスターレギュレーターSTEMIN の機能解析」、2014 年度研究実績報告書
https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-25291067/RECORD-252910672014jisseki/

[51] 基生研プレスリリース　2017 年 1 月 27 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2017/01/27.html

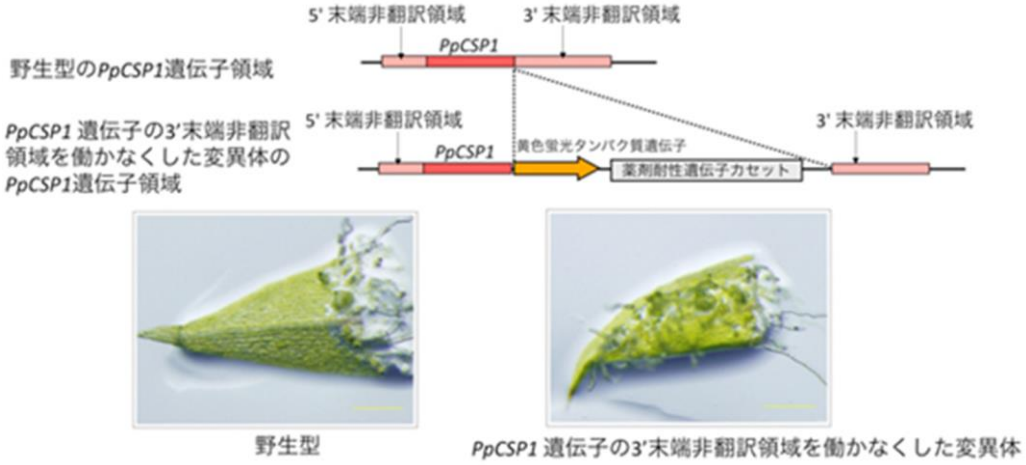


図 2-9　*PpCSP1* 遺伝子 3' 末端非翻訳領域を除去すると幹細胞化が促進される[52]。
別の実験から 3' 末端非翻訳領域に *PpCSP1* 遺伝子を分解する働きがあることがわかった。黄色蛍光タンパク質遺伝子と薬剤耐性遺伝子カセットを相同組換えによって *PpCSP1* 翻訳領域と 3' 非翻訳領域の間に挿入すると、3' 末端非翻訳領域が *PpCSP1* 翻訳領域から離れて、*PpCSP1* 遺伝子が分解されなくなる。

基生研のプレスリリースは、本研究成果を「幹細胞化を誘導する、動物と植物に共通の遺伝子の始めての発見である」と発表し[53],中部読売新聞が「幹細胞化を促進　動植物共通遺伝子　基礎生物研が発見」と報じた[54]。

PpCSP1 の幹細胞化誘導機構についても検討が進められた。PpCSP1 は複数の mRNA と同時に結合し、mRNA の安定化などによる post-transcriptional な制御を介して、幹細胞への過程を正に制御していると考えられる(1.5.3 (9)参照)。RNA 免疫沈降－シーケンシング法で PpCSP1 の標的 RNA が同定され、PpCSP1 がほぼ全ての mRNA と結合することを示す結果が得られた。また、免疫沈降法および液体クロマトグラフィー－質量分析法によって、PpCSP1 と相互作用するタンパク質が複数同定された。これらの相互作用候補タンパク質の１つとして同定された Polyadenylate-binding protein(PABP)に、cyan fluorescent protein(CFP)を融合させて PABP タンパク質の局在を調べたところ、細胞質基質全体において PpCSP1 タンパク質との共局在が観察された(図 2-10)。このことから、PpCSP1 は PABP と相互作用し、より強固に mRNA と結合することが示唆された[55]。

[52] 基生研プレスリリース　2017 年 1 月 27 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2017/01/27.html
[53] 基生研プレスリリース　2017 年 1 月 27 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2017/01/27.html
[54] 中部読売新聞「幹細胞化を促進　動植物共通遺伝子　基礎生物研が発見」2017 年 1 月 29 日
[55] 科研費若手研究(B)「リプログラミングを促進する RNA 結合タンパク質 PpCSP の分子機能の解明」、研究成果報告書　https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-24770051/24770051seika.pdf

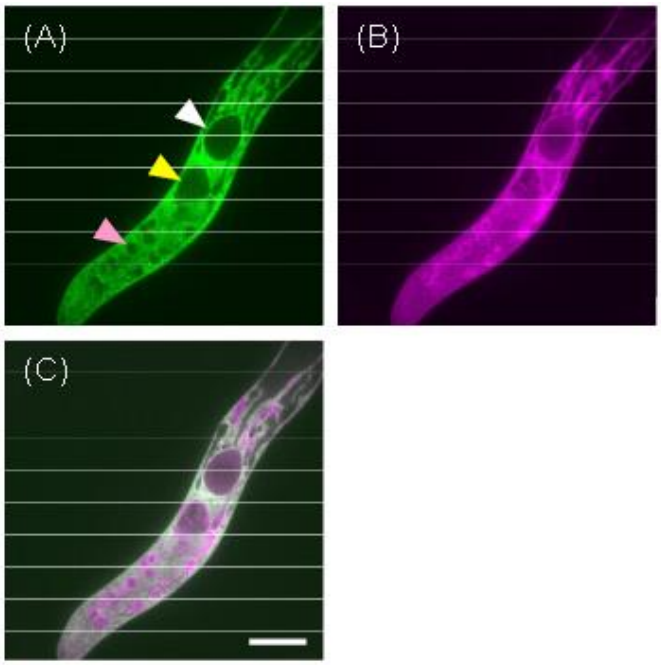


図 2-10　PpCSP1-YFP と PABP-CFP の細胞内局在[56]
ヒメツリガネゴケ原糸体頂端幹細胞における PpCSP1-YFP(A)と PABP-CFP(B)の細胞内局在をそれぞれ緑色と紫色の疑似色で示す。(C)はその重ねあわせ像で、局在が重なった部分は白の疑似色で示した。白矢尻は核、黄矢尻は液胞、桃矢尻は葉緑体をそれぞれ示す。

(3)オーキシン伝達系

本プロジェクト期間中に、隣接する 2 つの葉細胞を単離培養すると、片方の細胞のみが幹細胞化すること（1.5.2(4)参照)、およびヒメツリガネゴケの葉細胞幹細胞化には内生オーキシンの生成が必要であること(1.5.3 (2)参照)が見出されていた。

オーキシンは幹細胞化誘導因子であると同時に、幹細胞化抑制因子でもあることが新たに発見され、幹細胞化した細胞が抑制物質としてのオーキシンを分泌し、その結果、周辺の細胞の幹細胞化を抑制しているというモデルが提唱された[57]。すなわち、(ⅰ)幹細胞化の初期の過程では、両方の細胞で幹細胞化に必須なオーキシンが合成され、(ⅱ)ある時点で片方の細胞のみでオーキシン排出単体である ABC transporter-like phosphoglycoprotein(PGP)が発現し、隣接する細胞に接する細胞膜に局在し、(ⅲ)PGP が発現している細胞から、もう片方の細胞へとオーキシンが流入し、2 細胞間でオーキシン濃度勾配形成が引き起こされ、(ⅳ)オーキシンが低濃度で維持されている細胞は幹細胞へと細胞運命を変え、オーキシンレベルが上昇した細胞では幹細胞化が抑制される、という仮説である。その証明のためには、どのようにして PGP の発現が制御され、隣接する細胞に接する細胞膜に局在できるのかを解明することが必要である。

[56] 科研費若手研究(B)「リプログラミングを促進する RNA 結合タンパク質 PpCSP の分子機能の解明」、研究成果報告書　https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-24770051/24770051seika.pdf
[57] 科研費挑戦的萌芽研究「単細胞生物から多細胞生物への進化における鍵因子の探索」、研究成果報告書 https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-24657167/24657167seika.pdf

(4)細胞壁伸展に関わる因子

ヒメツリガネゴケで発現している *PpWOX1*、*PpWOX2* の二重欠失変異体は、切断葉細胞の幹細胞化が抑制された(1.5.3 (8)参照)。そこで本遺伝子により制御される下流の遺伝子が調べられ、切断葉細胞、配偶子、およびプロトプラストからの幹細胞化時の細胞増殖再開にあたり、細胞壁構造を緩めるのに必要な酵素群(expansins、xyloglucan-specific *endo*-β-1,4-glucanases(XEG)、xyloglucan endotransglucosylases/hydrolase(XET)、pectin metylesterases(PME))の発現が制御されていることが明らかになった[19]。葉切断後のこれらの酵素群をコードする遺伝子の発現量が測定され、野生株と比較し、*PpWOX1*、*PpWOX2* の二重欠失変異体では、明らかに発現量が低下していた (図 2-11 A-L)。一方で、3 種のβ-expansin(96876、146965、1500257)の発現量を増大させた野生株形質転換体がそれぞれ作製され、プロトプラストからの幹細胞形成頻度が測定されたところ、96876 と 146965 では頻度上昇が認められたが、1500257 では上昇が認められず、幹細胞形成そのものへのβ-expansin の関与は限定的であった(図 2-11 M、N)。なお、シロイヌナズナでは、WOX は茎頂ならびに根端分裂組織のニッチ細胞で発現し幹細胞の形成維持制御に関わっているとされているが、その分子機構は不明であり、これまで WOX が細胞壁伸展を制御するという知見はない。

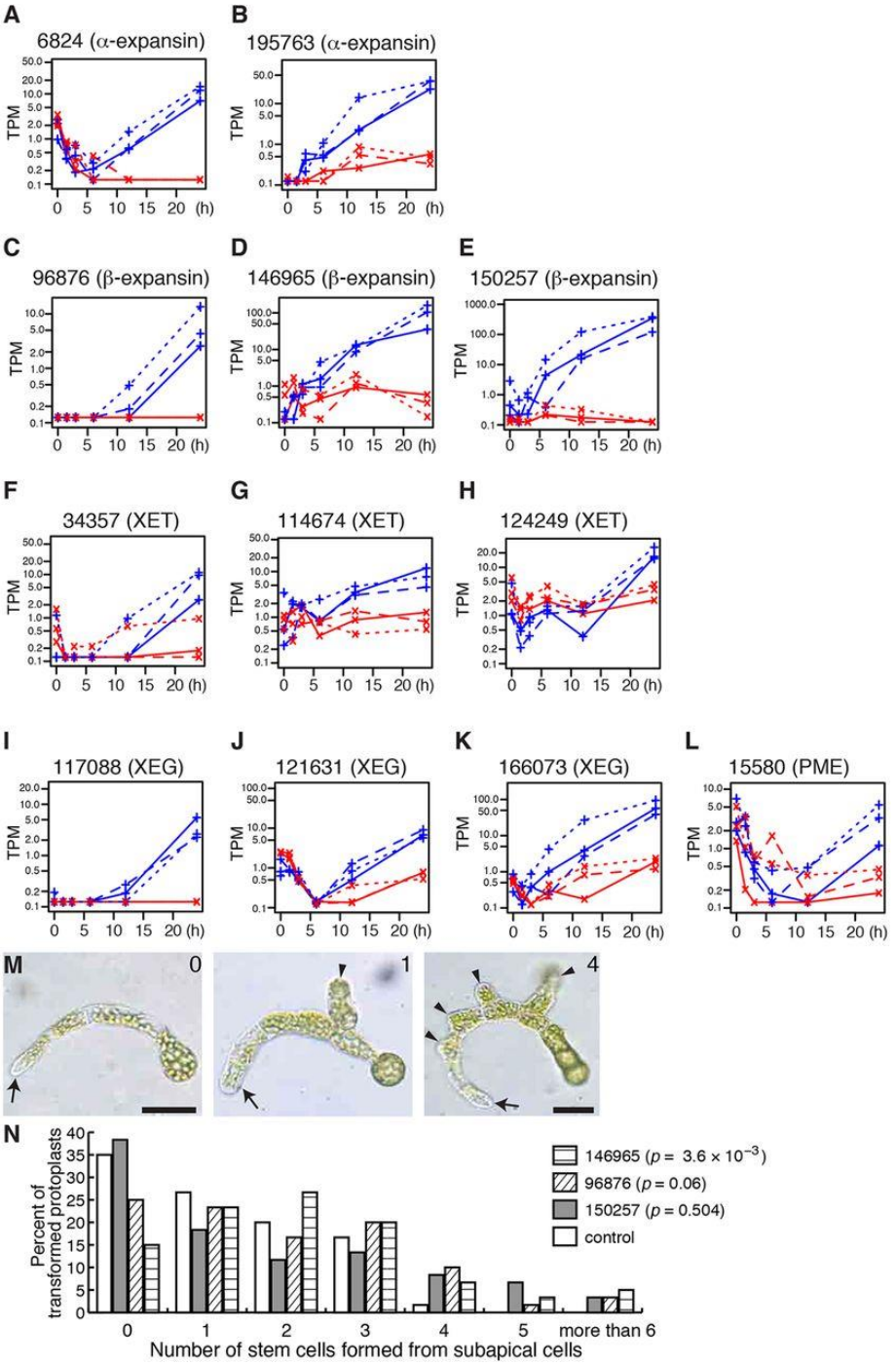


図 2-11　PpWOX は expansin の発現を制御している[19],58

A-L は、葉切断後の、それぞれの細胞壁進展性調節遺伝子の発現量の経時変化を示す。
青線は野生株、赤線は WOX2 重変異体の発現量（3 回の実験結果）。
M、N は、3 種の β-expansin 発現増強株での幹細胞形成頻度。

(5)その他

基生研・長谷部研究室のホームページによれば、本プロジェクトで見出された切断葉細

58 *Development*, 2014 Fig.4

胞幹細胞化に関わる次の因子について研究が継続されている[59]。

光と傷害シグナルをクロマチン修飾を介して統合する因子；SBP

HIRA ヒストンシャペロンの分子機能

ING 遺伝子の幹細胞化における機能解析

幹細胞化に伴うエピジェネティックな制御；small RNA、JHDM2A-5、NAP

2.2.3 通常発生過程における多能性幹細胞制御に関わる因子

通常発生過程における多能性幹細胞化については、ヒメツリガネゴケゲノム解読情報を活かした研究成果が報告されている。

(1)幹細胞の種類を選別する因子

ヒメツリガネゴケは原糸体細胞から原糸体頂端幹細胞と茎葉体頂端幹細胞を形成する(図 1-1)。これまで、2 種類の幹細胞のどちらを形成するかを決定する因子は知られていなかったが、AP2 型の転写因子がその機能を担うことが初めて見出された[20]。シロイヌナズナの AP2 型転写因子である AINTEGUMENTA, PLETHORA and BABY BOOM(APB)のオルソログはヒメツリガネゴケで 3 種知られていたが、ゲノム解読の結果、新たにもう一つの *PpAPB* 遺伝子が発見され、これら全ての *PpAPB* を欠損させた変異体が作製された。得られた変異体は茎葉体頂端幹細胞を形成できず、原糸体だけしか作れなくなった(図 2-12)。また、茎葉体頂端幹細胞の形成には、オーキシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンが関わっていることがわかった[20]。

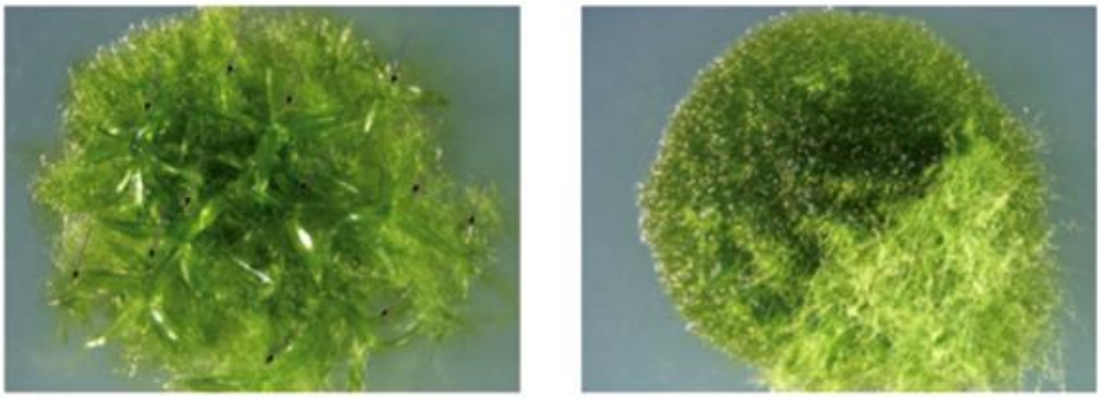


図 2-12　*APB* 遺伝子が壊れたヒメツリガネゴケは茎葉体ができない[60]。
APB 遺伝子が壊れていないヒメツリガネゴケ(左)と *APB* 遺伝子が壊れたヒメツリガネゴケ(右)。茎葉体を矢印で示した。

新聞で、APB 遺伝子の進化が、茎葉を作る最初の段階で重要だった可能性が高く、植物の茎葉進化の起源を探る糸口になると報じられた[61]。また、本研究成果は、太古、水中から陸に上がり、太陽の光を求めて茎や葉を伸ばすようになった植物の進化に迫る発見であ

[59] 基生研・長谷部研究室ホームページ
http://www.nibb.ac.jp/evodevo/research_19_reprogramming.html
[60] 基生研プレスリリース 2012 年 8 月 20 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2012/08/20.html(図 2)
[61] 日経速報ニュースアーカイブ「植物の茎葉の起源に迫る遺伝子を発見」2012 年 8 月 20 日

ると報じられた[62]。

(2)陸上植物の世代交代を制御する因子

陸上植物は単相と複相の両方において多細胞体制を構築し、それを核相の変化にともない交互にくり返し形成する世代交代を行う。それぞれの世代の発生プログラムは厳密に制御されており、減数分裂と受精により開始される。陸上植物のうち、コケ植物では単相の配偶体が優占しているが、裸子植物や被子植物を含む維管束植物では複相の胞子体が優占しており、陸上植物に近縁のシャジクモでは単相は多細胞体制をもつが複相は単細胞であることから、陸上植物の世代交代は、受精ののち減数分裂の開始が遅れて、新規に複相に特有の発生プログラムが獲得されたことにより誕生したと考えられている。この研究において、コケ植物ヒメツリガネゴケにて転写因子 KNOX2 をコードする遺伝子を欠損させたところ、複相における胚発生の途中で発生が停止し、減数分裂なしに配偶体様の組織が形成された（図 2-13)。このことから、*KNOX2* 遺伝子は複相において単相に特異的な発生プログラムを抑制するはたらきを担っていると推測され、*KNOX2* 遺伝子の獲得は陸上植物の世代交代の獲得に必須であると考えられた（図 2-14）[21]。

図 2-13　ヒメツリガネゴケにおける *KNOX2* 遺伝子の機能[63]

KNOX2 遺伝子を欠失させると、胞子体の成長が途中で停止し、配偶体に似た組織が作られる(矢じり)。左：ヒメツリガネゴケの通常の胞子体。中：*KNOX2* 遺伝子を欠失したヒメツリガネゴケの胞子体。右：ヒメツリガネゴケの通常の配偶体。

[62] 中日新聞「基生研など、茎葉形成決める遺伝子を特定」2012 年 8 月 31 日
[63] 基生研プレスリリース　http://www.nibb.ac.jp/press/2013/03/01.html

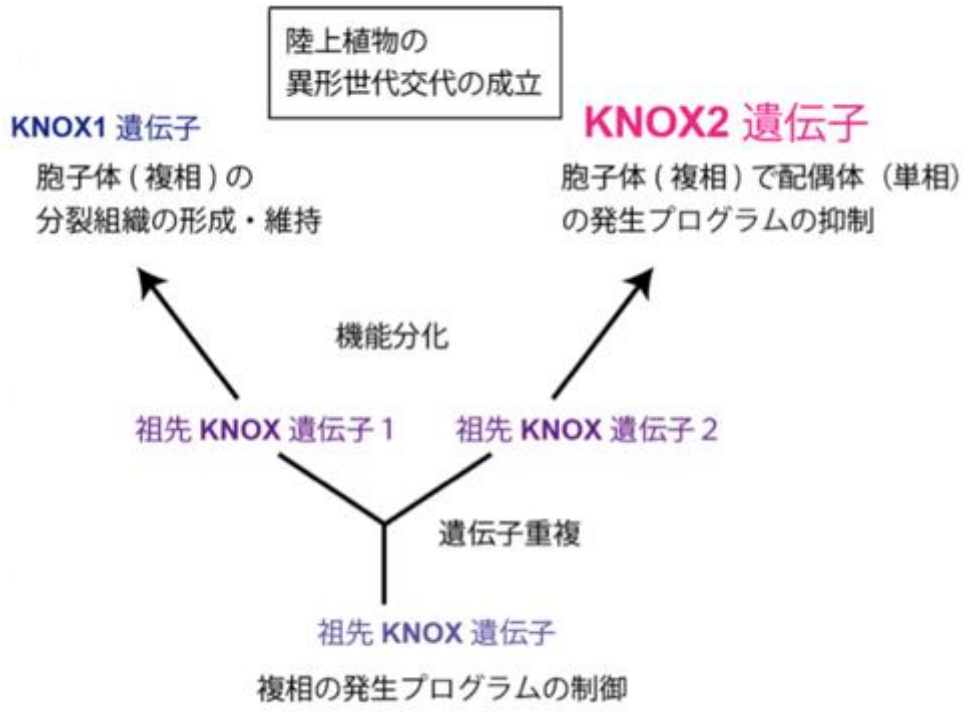


図 2-14　KNOX 遺伝子の重複による胞子体多細胞化の仮説[64]
陸上植物進化の初期において、祖先 KNOX 遺伝子が遺伝子重複により 2 個に増えた。その後、KNOX1 遺伝子が胞子体の分裂組織形成・維持に、KNOX2 遺伝子が複相で配偶体の発生プログラム抑制にそれぞれ機能分化したことで、胞子体の多細胞化が獲得された。

なお、本研究成果は陸上植物の世代交代の仕組みを解明したものであるとの記事が新聞に掲載された[65]。

(3) ヒメツリガネゴケの幹細胞と制御因子

ヒメツリガネゴケの 1 倍体世代は胞子細胞が分裂して原糸体幹細胞を形成し、この幹細胞が 1 倍体世代の源となる。一方、2 倍体世代は受精卵が分裂して胞子体幹細胞を形成し、この幹細胞が 2 倍体世代の源となり、世代交代とは異なった性質の幹細胞を作る。原糸体幹細胞からできた原糸体細胞からは、茎葉体幹細胞が形成され、茎葉体が生じる。茎葉体幹細胞は低温条件下で造精器幹細胞と造卵器幹細胞へと変化し、造精器と造卵器が形成される。このように、ヒメツリガネゴケは 1 倍体世代で 7 種の幹細胞、2 倍体世代で 1 種の幹細胞を持っていると考えられる(図 2-15)[22]。ポリコーム抑制性複合体 2 遺伝子(図 2-15 の PRC2)は 2 倍体発生プログラムの開始を制御しており[12]、クラス 2 KNOX ホメオボックス遺伝子(図 2-15 の Class 2 KNOX)は 1 倍体発生プログラムの開始を制御している[21]。また、APB 遺伝子(図 2-15 の APB s)は、原糸体細胞が原糸体幹細胞と茎葉体幹細胞のどちらを作るかを制御している[20]。

[64] 基生研プレスリリース　http://www.nibb.ac.jp/press/2013/03/01.html
[65] 朝日新聞「陸上植物の世代交代の仕組み解明」2013 年 3 月 25 日

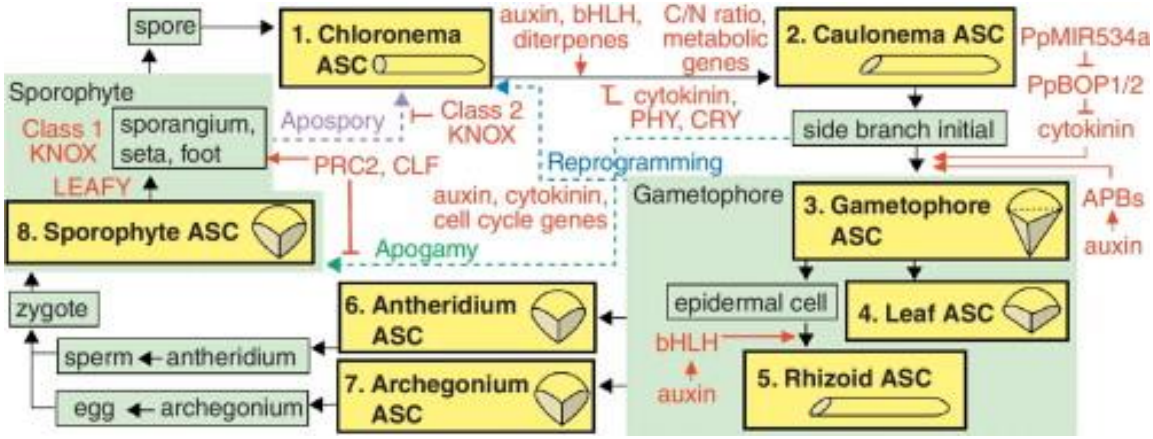


図 2-15　ヒメツリガネゴケの 8 個の幹細胞と制御因子[66]

黄色四角枠は、ヒメツリガネゴケ生活史の進行に必要な 8 種の頂端幹細胞(ASC; Apical Stem Cell)を示す。1-7 は 1 倍体世代、8 は 2 倍体世代の ASC である。それぞれの ASC を制御する因子を赤字で示した。

(4)ポリコーム抑制性複合体によるヒストン修飾の実態

本プロジェクト期間中にポリコーム抑制性複合体 2(PRC2)遺伝子の欠失により、胞子体が受精なしで形成されることが発見され[12](1.5.1(2)②参照)、PRC2 が H3K27 をトリメチル化する活性を持つことが示唆された(1.5.3(5)参照)。本プロジェクト終了後に、この胞子体形成と H3K27 トリメチル化は PRC2 の構成タンパク質の 1 つである CURLY LEAF(CLF)により引き起こされることが明らかになった[23]。H3K27me3、H3K27me2 および H3K27me1 に対するそれぞれの抗体を用いた実験で、ヒメツリガネゴケの CLF 欠失変異(⊿*PpCLF*)体では、H3K27me2 および H3K27me1 は検出されたが、H3K27me3 は検出されなかった。さらに CLF の SET ドメイン[67]に部位特異的変異を導入した複数の変異体でも H3K27me3 は検出されず、この SET ドメインがトリメチル化を担うことが示された。また、これらの変異体では受精無しでも胞子体が形成された（図 2-16）ことから、PpCLF が *in vivo* で H3K27 のトリメチル化を触媒することで、ヒメツリガネゴケの発生ログラムに関与する転写因子群の発現制御に関わっていると考えられた。

[66] 長谷部 HP http://www.nibb.ac.jp/evodevo/research_16_plant%20life%20cycle.html

[67] ショウジョウバエの転写抑制位置効果（position effect variegation：PEV）に影響する遺伝子として同定された SU（VAR）3-9, Enhance of zest（EZ）, TRITHORAX（TRX）の産物に共通して存在していたドメインからその名前がついた. 現在ではリジンのメチル化酵素ドメインとして知られる。実験医学増刊 Vol.27 No.17（1997）https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/keyword/1156.html

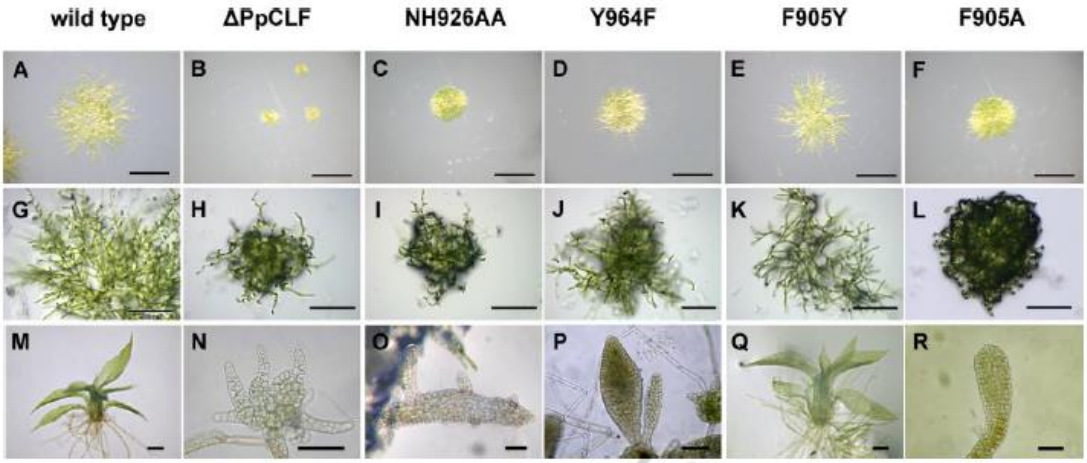


図 2-16　ヒメツリガネゴケ CLF 変異体の増殖形態[23]、[68]

NH926AA、Y964F、F905Y および F905A は、CLF の SET ドメインの変異体（F905Y はリーキー変異体）。
(A-F)生育 23 日目の形態。CLF 変異体は野生株よりも増殖が悪い。（バーサイズ：2000 μM）
(G-L)原糸体の形状。CLF 変異体は野生株よりも高密度の原糸体を形成する。（バーサイズ：500 μM）
(M-N)茎葉体の形状。CLF 変異体では胞子体の形成が見られる。（バーサイズ：100 μM）

2.2.4　細胞周期に関わる因子

本プロジェクト期間中に検討された幹細胞化に伴う新規細胞周期制御の機構(1.5.4（1）参照)について、論文として発表された[24]。ヒメツリガネゴケ茎葉体の分化細胞の DNA 量が 2C であること、ならびに細胞周期再開に DNA 合成が必要であるという事実は、細胞周期が S 期後半で停止していることを示しているとし、S 期後半から細胞周期が再開する可能性について論じられた（図 2-17)。

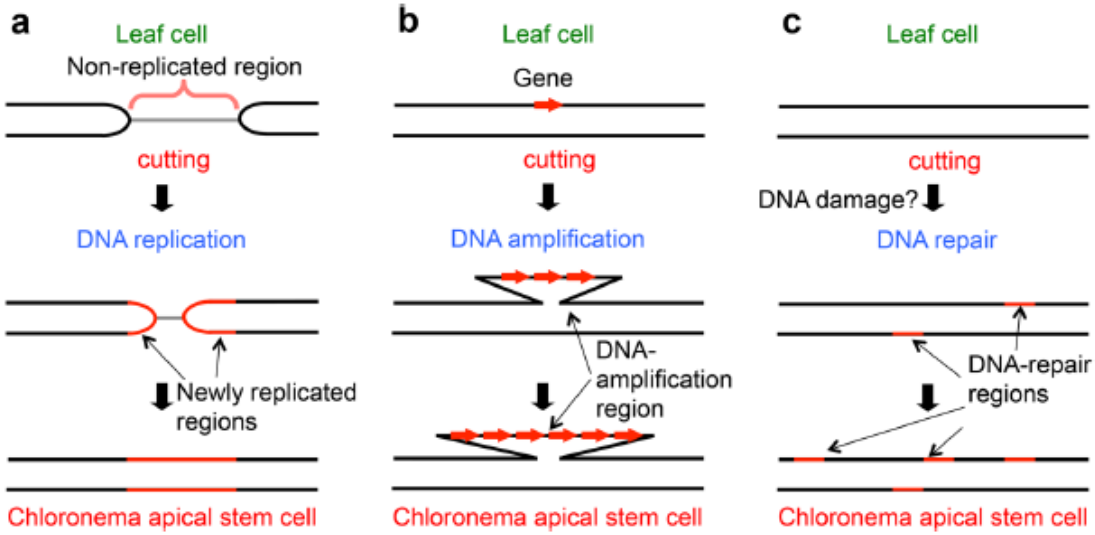


図 2-17　ヒメツリガネゴケの幹細胞化でおこる細胞周期再開のモデル[24],[69]

a は、S 期後半からの細胞周期再開モデル。細胞周期は S 期後半で停止しており、葉細胞切断後に複製されていない領域での DNA 複製が起こる。b は DNA 増幅を伴った細胞周期再開モデル。切断前の葉細胞は S 期後半で停止しているが、切断により DNA 複製だけでなく、DNA 複製とは異なる DNA 合成が特定のゲノム領域で起こる。c は DNA 修復を伴った細胞周期再開モデル。葉切断により DNA 損傷が起こり、DNA 修復系

[68] *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2016 Fig.7
[69] *J Plant Res*, 2015 Fig.3

の活性化が幹細胞化に必要である。

2.2.5　ヒメツリガネゴケゲノム解読情報を活用した共同研究

奈良先端科学技術大学院大学出村拓との共同研究で、コケ植物が、体内に水を運ぶ通り道の「通水細胞」(図 2-18)と体を支えるための「支持細胞」を作る仕組みが明らかになった[25]。この仕組みでは、自己の細胞を死なせて(自己細胞死)残った細胞の構造を利用することが重要であることが実験的に世界で初めて証明された。ヒメツリガネゴケは、8 つの *VNS* 遺伝子(シロイヌナズナ等で通水細胞(道管)や支持細胞の形成に必須であることが知られている遺伝子)を持っており、このうち、*PpVNS1*、*PpVNS6*、*PpVNS7* の 3 遺伝子を同時に破壊したところ、この変異体では葉の通水細胞の形状が異常になっており、水の輸送がうまく起こらないことがわかった。さらに、*PpVNS4* 遺伝子を破壊した変異体では、茎の通水細胞が消失し水輸送が起こらず、乾燥環境下で劇的なしおれが観察された(図 2-19)。また、細胞構造を詳細に観察したところ、これらの変異体では通水細胞における自己細胞死が起こっていないことも見出された。その結果、ヒメツリガネゴケの通水細胞と支持細胞の形成が *PpVNS* 遺伝子によって制御されていること、ならびにこの制御システムが植物進化の早い段階で既に確立されていたことが明らかになった(図 2-20)。

本研究成果は陸上植物全てに通じる高い汎用性をもったバイオマス制御技術開発に繋がるものである、とプレスリリースがあった[70]。また、本研究により、水を運ぶ通り道となる通水細胞や植物の体を支える支持細胞ができる仕組みが突き止められた、との報道があった[71]。

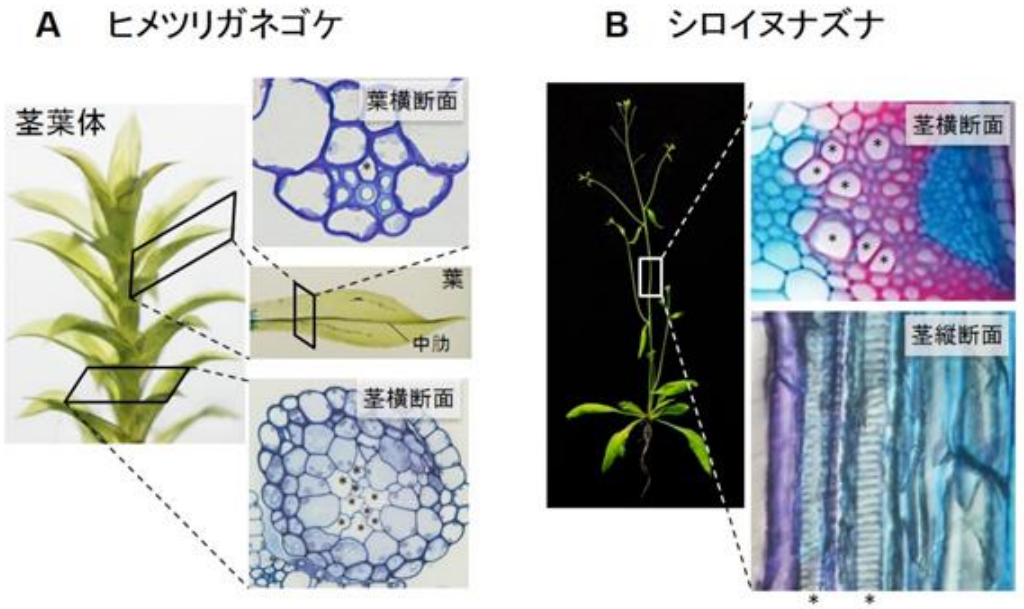


図 2-18　植物の通水細胞[72]

(A)ヒメツリガネゴケの通水細胞はハイドロイドと呼ばれ、茎葉体の茎や葉の中央部に存在する。ハイドロイドは細胞内容物を失った死細胞で、細胞壁は薄い。

(B)シロイヌナズナの通水細胞は道管細胞と呼ばれ、他の細胞とともに木部と呼ばれる組織を

[70] 基生研プレスリリース 2014 年 3 月 21 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2014/03/21.html
[71] 日本経済新聞「海から陸へ、植物どう進化－光防ぎ水運ぶ遺伝子獲得」2014 年 6 月 22 日
[72] 基生研プレスリリース 2014 年 3 月 21 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2014/03/21.html

形成する。道管細胞も死細胞であり、特徴的な厚い二次壁を持つ。

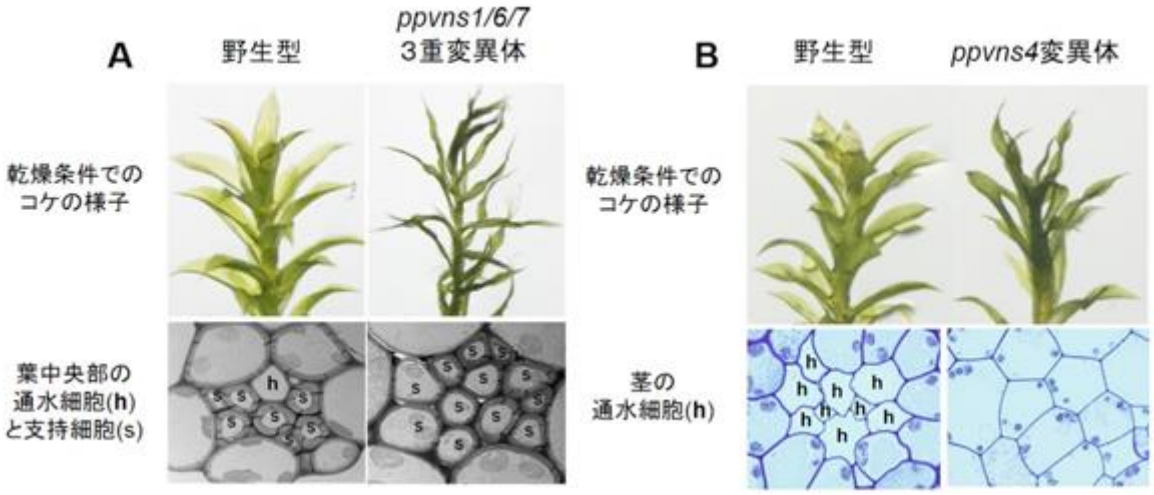


図 2-19 *Ppvns* 遺伝子変異体の性質[73]

(A) *ppvns1/6/7* の 3 重変異体の様子。葉の中心部にできる通水細胞(ハイドロイド：h)が欠落し、さらに支持細胞(ステライド：s)の細胞壁がうすくなってしまう。(B) *ppvns4* 変異体の様子。茎の中央にできる通水細胞が欠落する。

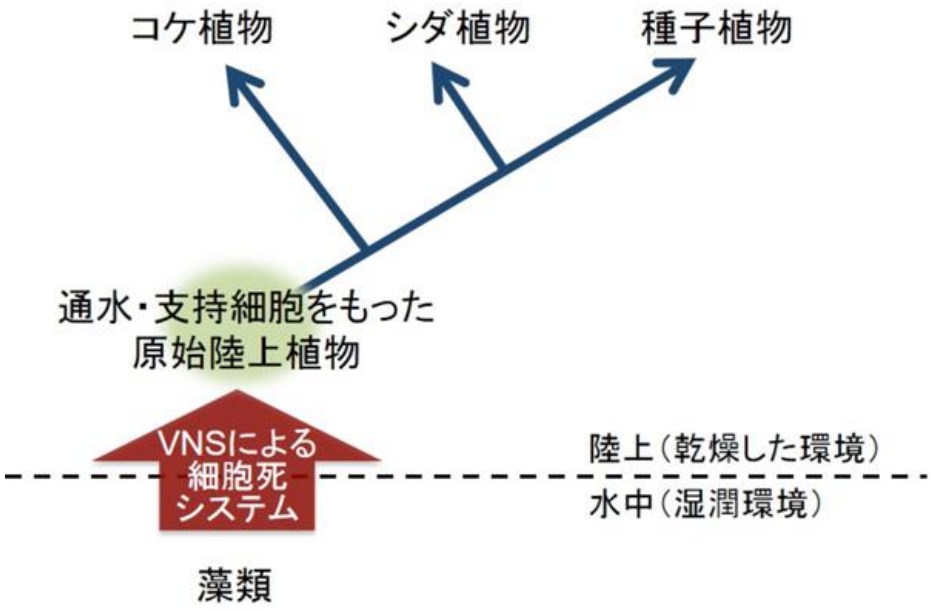


図 2-20　植物陸上化のイメージ図[74]

VNS による通水細胞と支持細胞の形成制御システムが、植物進化の早い段階（少なくともコケと維管束植物の共通祖先の段階）で既に確立されていた。植物の陸上化の過程で、自己細胞死のシステム獲得による通水・支持細胞の進化が重要なイベントであったと考えられる。

ヒメツリガネゴケゲノム情報が Regina 大学(カナダ)の Kim らに提供され、植物の二次代

[73] 基生研プレスリリース 2014 年 3 月 21 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2014/03/21.html
[74] 基生研プレスリリース 2014 年 3 月 21 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2014/03/21.html

謝産物生産に必須なポリケチド合成酵素(PKSs)がヒメツリガネゴケからクローニングされ、その反応特性が被子植物の PKSs と比較され、植物 PKSs の進化について論じられた(図 2-21)[26]。

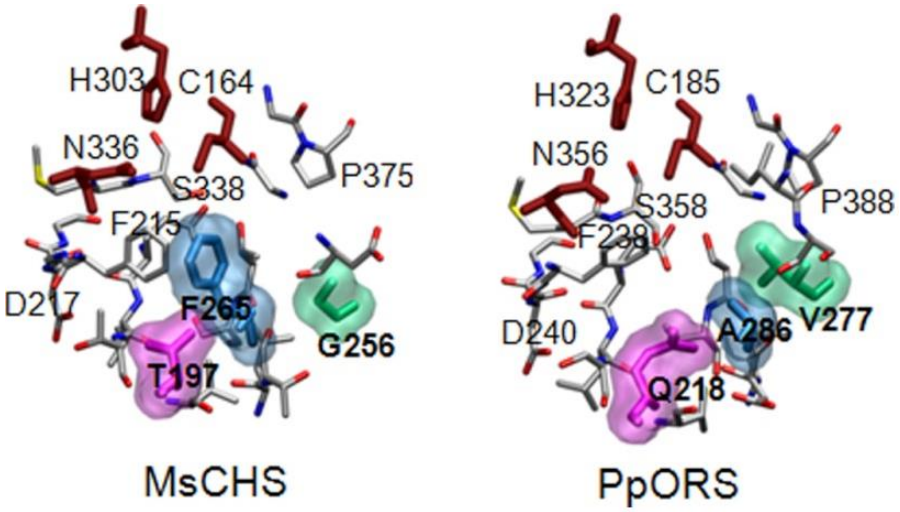


図 2-21　ヒメツリガネゴケ PpORS とアルファルファ(*Medicago sativa*)MsCHS の構造比較[26]
ORS(2′-oxoalkylresorcinol synthase)は、植物の PKSs 酵素の祖先型と考えられている。
CHS(chalcone synthase)は、PKSs の古い呼び方である。

また、Cold Spring Harbor 研究所(CSHL)の A. Timmermans との共同研究で、始原的な ta-siRNA が既存の遺伝子制御ネットワークをいかにして改変し、個体発生を制御するに足る堅牢性と感度を持つオーキシン応答性を進化させたかを論じ、*Tas3* ta-siRNA を生成できないヒツリガネゴケ変異体はオーキシン存在下でも原糸体の伸長が起こらないことが示され（図 2-22）[27]、先祖型の遺伝子制御ネットワークが植物の環境適応を助けた、とプレスリリースがあった[75]。

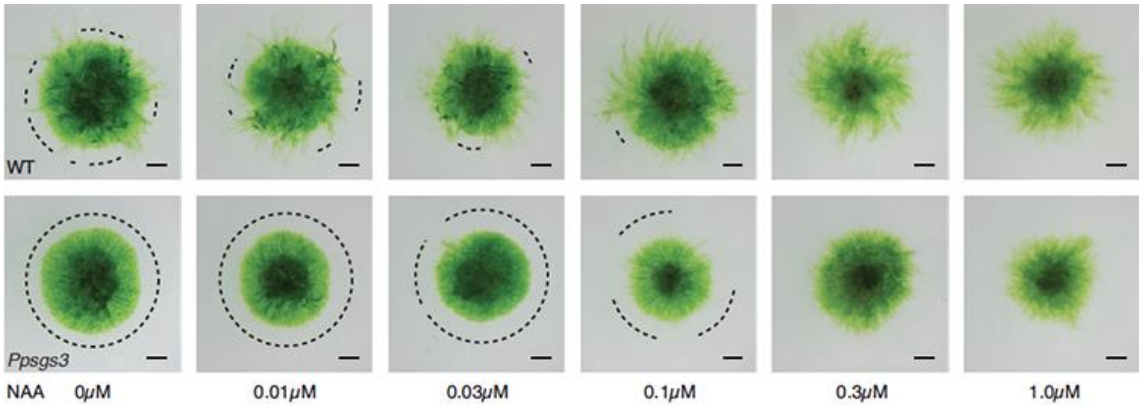


図 2-22 オーキシン応答性の原糸体伸長に及ぼす ta-siRNA の影響[76]
野生株(WT)は、オーキシン濃度に対応して原糸体を伸長させるが（上段)、ta-siRNA 生成に

[75] CSHL ニュースリリース(2016.10.18)
https://www.cshl.edu/news-and-features/ancient-gene-network-helps-plants-adapt-to-their-environments.html
[76] CSHL ニュースリリース(2016.10.18)
https://www.cshl.edu/news-and-features/ancient-gene-network-helps-plants-adapt-to-their-environments.html

必要な *sgs3* (suppressor of gene silencing 3)が欠損した変異体(*Ppsgs3*)は、オーキシン存在下でも原糸体を伸長できない（下段)。

2.2.6　その他の業績

本プロジェクトで開発された細胞観察技術を利用して、タバコ細胞の細胞分裂で仕切りができる過程を高解像度撮影することに世界で初めて成功し、生物の最も根源的な性質である細胞分裂の仕組みが明らかになった（図 2-23）[28]。この成果は植物の成長に関わる全ての基礎研究、たとえば葉や実ができる仕組みの理解などに貢献することが期待できる、とプレスリリースがあった[77]。本研究成果は、応用研究として果実や穀類の品質改良などにつながる可能性があると報じられた[78]。

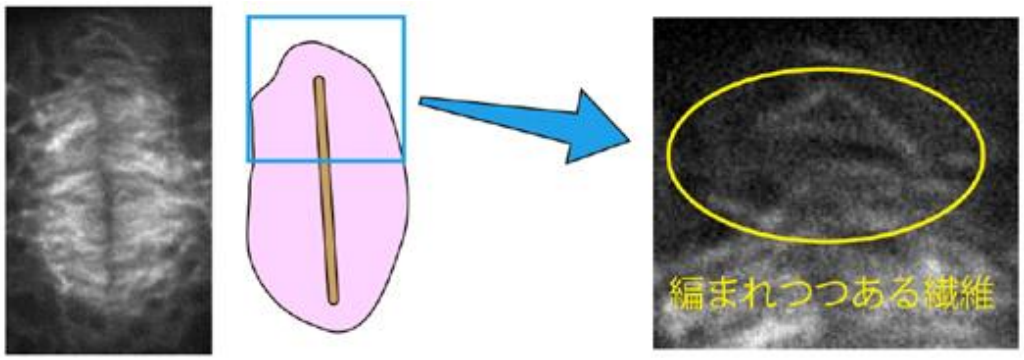


図 2-23　細胞分裂で仕切りを作る過程の高解像度撮影[79]

植物細胞は 1 つの細胞の中に、微小管で編まれた「ゆりかご」（隔膜形成体：ピンクの模式図）を作り、その中に仕切りを形成して分裂する。細胞分裂の過程でゆりかごは徐々に大きくなるが、その編み方の分子機構は知られていなかった。研究グループは、光の透過経路にシリコーンオイルを用いた顕微鏡システムを構築して分解能を上げることに成功し、編まれていく途中の微小管 1 本 1 本の動きを世界で初めて撮影することに成功した。

科研費新学術領域研究「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」（2010-2015 年度）において、極度の乾燥条件にも耐えうる能力を持つネムリユスリカのゲノム塩基配列を解読し、干からびても死なないネムリユスリカに極限的な乾燥耐性をもたらす遺伝子多重化領域と乾燥時特有の遺伝子発現調節機構が発見された（図 2-24）[29]。本研究成果は、ヒトの iPS 細胞や家畜の受精卵および血清などの常温乾燥保存法の開発促進につながると期待されている[80]。

[77] 基生研プレスリリース 2013 年 6 月 17 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2013/06/17.html
[78] 日経速報ニュースアーカイブ「細胞分裂で仕切りを作る過程の高解像度撮影に成功」2013 年 6 月 17 日
[79] 基生研プレスリリース 2013 年 6 月 17 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2013/06/17.html
[80] 基生研プレスリリース 2014 年 9 月 12 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2014/09/12.html

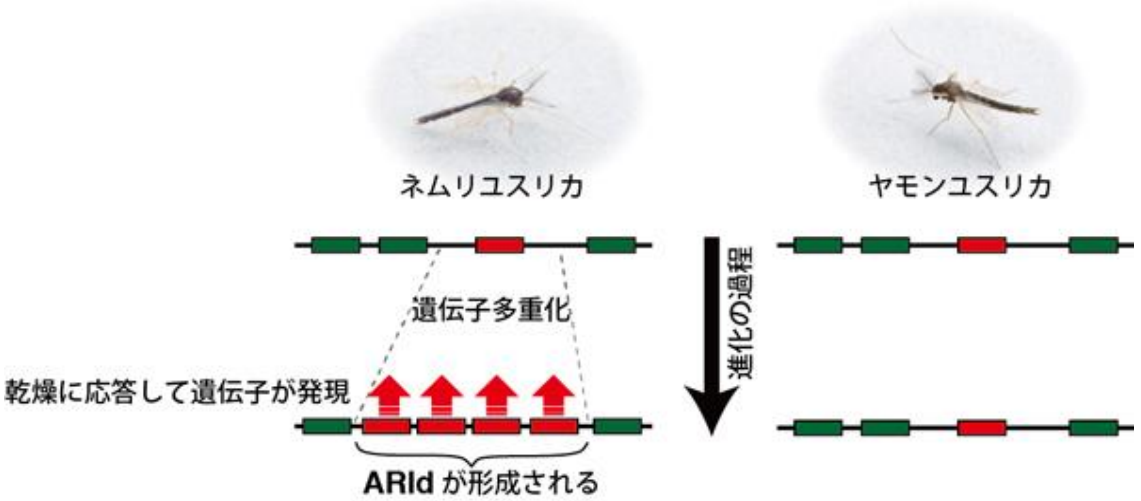


図 2-24　ネムリユスリカの乾燥無代謝休眠獲得に至る進化過程[81]
乾燥に対して感受性を示すヤモンユスリカと乾燥耐性のネムリユスリカとの比較ゲノム解析により、ネムリユスリカ特有の乾燥無代謝休眠に関する遺伝子を同定した。その結果、ARId(anhydrobiosis-related gene island)と命名した遺伝子領域が特定された。

マメ科植物であるオジギソウは、これまで遺伝子操作ができなかったが、オジギソウにオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質 GFP の遺伝子を導入した光るオジギソウを作り出すことに成功し、オジギソウにおける遺伝子操作技術が確立された（図 2-25）[30]。本研究で確立された遺伝子操作技術は、遺伝子操作が困難とされている作物への応用も可能であると期待されている[82]。

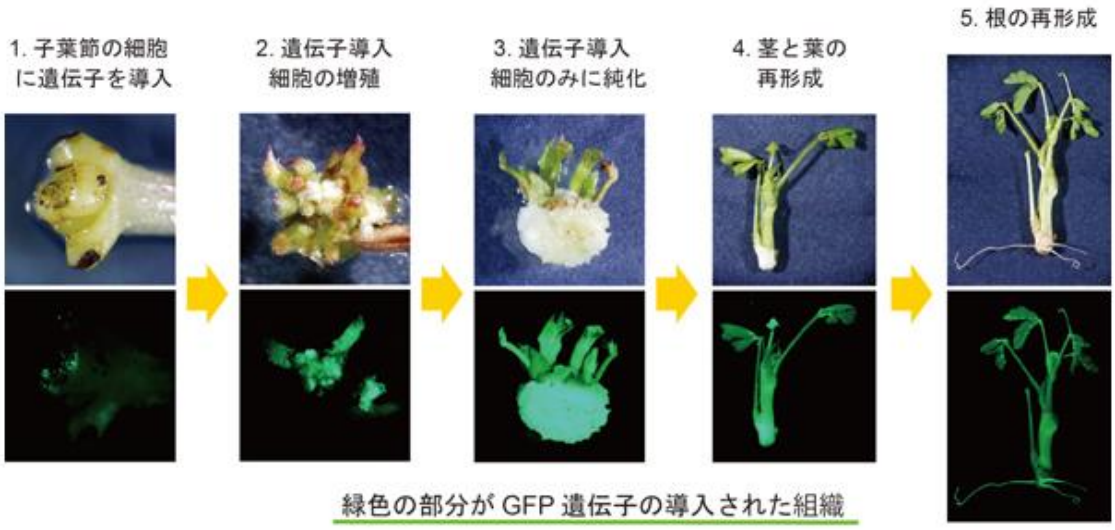


図 2-25　遺伝子導入オジギソウの作製の流れ[83]
子葉の付け根にあたる子葉節を出発材料として用いることにより、遺伝子が導入された細胞からの植物体の再形成が高い効率で起こることを発見した。また、アグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を上げるために、植物の組織とアグロバクテリウムを一緒に培養する際に培地の pH を安定化させることが重要であることを見出した。

[81] 基生研プレスリリース 2014 年 2 月 13 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2014/02/13.html
[82] 基生研プレスリリース 2014 年 2 月 13 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2014/02/13.html
[83] 基生研プレスリリース 2014 年 2 月 13 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2014/02/13.html

生物進化の残された大きな謎の一つに、著しい形の変化がどのように生じるのかという複合適応形質進化の問題がある。走査型電子顕微鏡による形態観察、葉を作る遺伝子の働きを調べる実験、コンピューターシミュレーションによる再構成実験により、袋のような葉の形作りの仕組みを調べた。その結果、サラセニアの葉は、葉の特定の場所で細胞の分裂方向を変えるという細胞レベルの変化で、平らな葉から袋への大きな形の変化が引き起されていることが明らかになった（図 2-26）[31]。本成果は、細胞レベルの詳細な研究を進めることで、著しい形態変化の進化を理解できるようになる可能性があるとしている[84]。また、「わな」のような独特の形を持つ食虫植物で、進化の過程が明らかになるのは初めてであり[85]、葉っぱの形を自在に操作することで農産物の品種改良への応用が期待できる、との記事が新聞に掲載された[86]。

長谷部は新たにオーストラリア固有の食虫植物であるフクロユキノシタのゲノムの概要解読に成功した。フクロユキノシタは 1 個体の中で捕虫葉と平面葉の両方を形成する。長谷部は、ゲノム情報を元に平面葉と捕虫葉を作る時で発現の異なる遺伝子を探索し、小動物の誘引に関わると推定される遺伝子や、消化吸収に役立つと推定される遺伝子などを明らかにした。また、異なる系統で食虫化した多種類の食虫植物の消化酵素を解析し、ある種の耐病性遺伝子が消化酵素遺伝子として進化したことを示唆した[32]。基生研のプレスリリースは「今後は、食虫性に関わったと推定される遺伝子の捕虫葉での機能解析を行うことで、食虫性がどのような遺伝子がどのように変わることで進化したのかを明らかにできるようになる」と報じた[87]。

[84] 基生研プレスリリース 2015 年 3 月 16 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2015/03/16.html
[85] 朝日新聞「食虫植物、葉の進化解明」2015 年 3 月 17 日
[86] 日本経済新聞「葉っぱの形、自在に操作―農産物の品種改良に期待」2016 年 10 月 30 日
[87] 基生研プレスリリース 2017 年 2 月 7 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2017/02/07.html

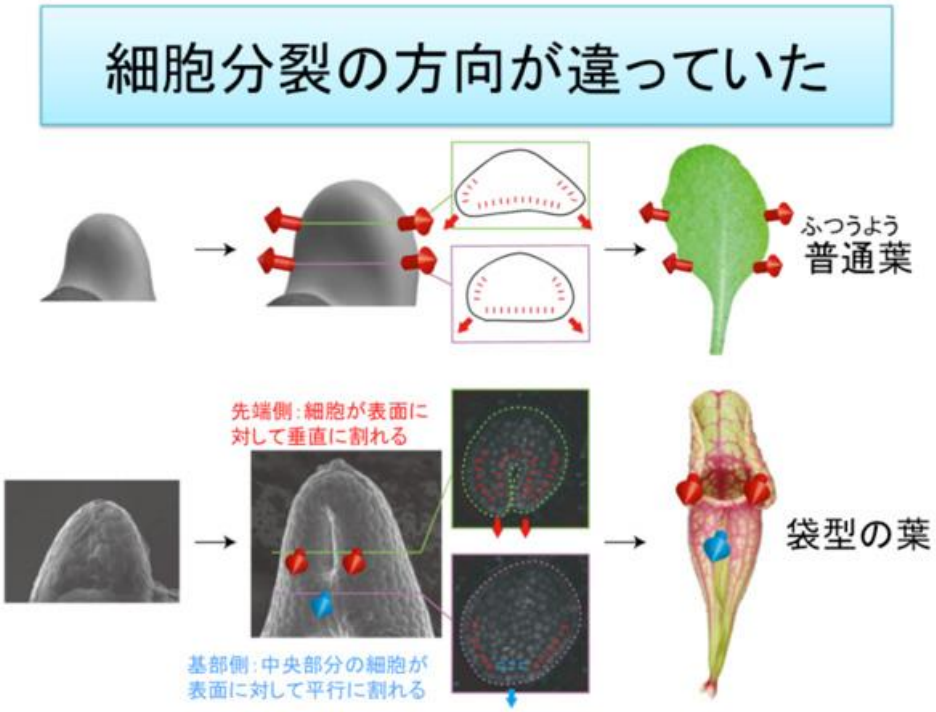


図 2-26　セラニアの袋のような葉の細胞分裂様式[88]
葉が作られる過程において、一般の平らな葉では、葉の表面に対して垂直に細胞分裂が起こり、葉は腕を伸ばすように広がる。サラセニアの葉においては、先端側では平らな葉と同じように表面に対して垂直に細胞分裂が起こるが、基部側では、表面の内部組織が異なる方向(葉の表面と平行)に細胞分裂を起こし、中央部分が出っぱってくる。先端側での腕を伸ばすような成長と、基部側での出っ張りの成長が相まって、袋の形が作られる。

2.3　プロジェクト参加研究者の活動状況

長谷部は、期間中の 2008 年に日本植物学会賞学術賞を受賞し（添付資料 D)、コケ植物における形態進化研究を大きく進展させた功績により 2013 年に米国植物学会のペルトン賞を日本人で初めて受賞した[89]。日本進化学会の会長を務め(2014-2015 年度)[90]、2016 年に、陸上植物を中心とした系統学や進化発生学において、独創的な研究を展開し、全ゲノム解読を始めとして、分類学、遺伝学、生理学など、多様な生物学分野に大きなインパクトを与える業績をあげたことにより同学会の学会賞を受賞した[91]。また、公益信託進化学振興木村資生基金より 2016 年度の木村資生記念学術賞（木村賞）も受賞した[92]。

本プロジェクト期間中に採用された研究員の現況は以下の通りである(2017 年 1 月調査時点)。グループリーダー(西山智明、佐藤良勝、久保稔、倉田哲也)を含め、多くの研究員が公的研究機関に職を得ている。特に、ヒメツリガネゴケおよびイヌカタヒバのゲノム解読に貢献した西山(金沢大学助教)は、科研費新学術領域研究(研究領域提案型)「非モデル

[88] 基生研プレスリリース 2015 年 3 月 16 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2015/03/16.html
[89] 米国植物学会ホームページ　http://www.botany.org/awards_grants/detail/pelton.php
[90] 日本進化学会ホームページ　http://sesj.kenkyuukai.jp/special/index.asp?id=12644
[91] 日本進化学会学会賞受賞者(2016 年)　http://sesj.kenkyuukai.jp/special/index.asp?id=22072
[92] 基生研お知らせ(2016 年 9 月 28 日)　http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2016/09/28.html

生物におけるゲノム解析法の確立」(2010-2014 年度)[93]、科研費挑戦的萌芽研究「次世代シーケンサーによる系統解析の革新」(2011-2013 年度)[94]、科研費基礎研究(B)「シャジクモ概要ゲノムの解読と遺伝学的地図の同時構築による陸上植物進化の解明」(2012-2014 年度)[95]、および科研費基礎研究(B)「シャジクモ藻綱全目ゲノム解読にもとづく陸上植物への進化解明」(2015-2019 年度)[96]の代表者を努め、ゲノム解読研究の第一線で活躍している。

久保(奈良先端科学技術大学院大学特任准教授)は、科研費新学術領域研究(研究提案型)「一細胞遺伝子発現解析を用いたステム・ニッチ形成機構の解明」(2014-2015 年度)[97]で代表者を務め、幹細胞化研究を継続している。

佐藤(名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所特任講師)は、科研費挑戦的萌芽研究「マイクロ流路を用いた花粉管間相互作用の定量解析」(2013 年度)[98]および科研費挑戦的萌芽研究「化合物ライブラリースクリーニングによるオルガネラ分布制御因子の同定と解析」(2015-2016 年度)[99]の代表者を務め、バイオイメージング研究を発展させている。名古屋大学プレスリリースは、佐藤が、生命現象などを可視化する超解像蛍光イメージングに最適な超耐光性蛍光色素の開発に貢献したことを報じている[100]。

倉田(東北大学特任助教)は、科研費基盤研究(C)「表皮細胞層による成長協調化機構の研究」(2012-2014 年度)[101]および科研費新学術領域研究 (研究提案型) 「オミクス解析による細胞外情報処理空間構築の統合的理解」(2012-2016 年度)[102]で、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析研究を続けている。

石川雅樹研究員(基生研助教)は、科研費基盤研究(C)「幹細胞化における細胞運命転換を制御する CDKA の標的因子の探索」(2015-2017 年度)[103]を獲得し、幹細胞化と細胞周期との連関について研究を進展させている。

今井章裕研究員(基生研リサーチフェロー)は、科研費若手研究(B)「幹細胞形成の場所と速度を決めるオーキシンネットワーク」(2014-2016 年度)[104]で、幹細胞化におけるオーキシンシグナル伝達系の研究を継続中である。

技術参事であった榊原恵子(立教大学准教授)は、科研費若手研究(B)「新規アポスポリー制御遺伝子を用いた陸上植物の異形世代交代を司る制御機構の解明」(2012-2013 年度)[105]、科研費挑戦的萌芽研究「陸上植物の胞子体進化解明に向けてのツノゴケ実験系の確立」

---

[93] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-22128008/
[94] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23657063/
[95] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24370095/
[96] https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-15H04413/
[97] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-26113514/
[98] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25650075/
[99] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15K14542/
[100] 名古屋大学プレスリリース 2015 年 10 月 26 日
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20151026_ITbM.pdf
[101] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24570051/
[102] https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PLANNED-24114002/
[103] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15K07119/
[104] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26840101/
[105] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24770077/

(2014-2016 年度)[106]および科研費新学術領域研究（研究領域提案型）「植物の新規幹細胞運命決定ロジックの解明」(2016-2017 年度)[107]において、植物の世代交代に関わる因子の研究を継続している。また、「植物の世代交代制御因子の発見」（シリーズ・遺伝子から探る生物進化③　慶應義塾大学出版会　2016 年）を著わした。本書の中で、榊原が技術参事として参画した本プロジェクトの活動について記載している。

本プロジェクトの特別重点期間中に参画した玉田洋介（基生研助教）は、科研費若手研究(B)「リプログラミングを促進する RNA 結合タンパク質 PpCSP の分子機能の解明」(2012-2013 年度)[108]、科研費新学術領域研究（研究領域提案型）「陸上植物の世代交代を制御するエピゲノム・遺伝子発現相関の解明」(2012-2013 年度)[109]、科研費新学術領域研究（研究領域提案型）「陸上植物の世代交代を制御するエピゲノム・遺伝子発現相関の解明」(2014-2015 年度)[110]、科研費若手研究(A)「幹細胞化過程の高分解能ライブイメージングを可能にする新規補償光学顕微鏡法の確立」(2014-2016 年度)[111]、科研費挑戦的萌芽研究「DNA 損傷による幹細胞化誘導機構の探索」(2016-2017 年度)[112]で研究代表者を務め、幹細胞研究を継続している。

2.4　第 2 章まとめ

本プロジェクト終了後も長谷部を始め、多くの研究員が公的研究資金を獲得して研究活動を継続している。

長谷部は、STEMIN などのリプログラミングに関わる因子の詳細な機構解明を続けるとともに、多数の海外招待講演を通して本プロジェクトの成果を発表している。また、米国植物学会ペルトン賞および日本進化学会学会賞を受賞するとともに、日本進化学会の会長にも就任し、国内外で進化学研究分野において高く評価されていることが窺える

期間中のものも含めて本プロジェクトの成果を表 2-6 に記載する。

表 2-6　プロジェクトの成果

項目		プロジェクト成果	従来の技術・知見	備考
1	リプログラミング研究	ヒメツリガネゴケの高いリプログラミング能に初めて注目	被子植物での研究：多細胞状態の一部細胞が幹細胞化するため、遺伝子発現解析が困難	1.2.1
2	観察技術	１細胞観察系を構築		1.5.1(1)①
		切断葉細胞単独で幹細胞化		1.5.2(3)
		周辺の細胞の幹細胞化を抑制		1.5.2(4)
3	遺伝子実験技術	条件的遺伝子発現誘導系、条件的遺伝子発現抑制系の開発	リプログラミング関連遺伝子の変異は致死的	1.5.1(5)
4	遺伝子発現解析技術	次世代シーケンサー導入による網羅的解析：マイクロアレイの100倍のダイナミックレンジ	マイクロアレイ法	1.5.1(4)①

[106] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26650143/
[107] https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PUBLICLY-16H01232/
[108] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24770051/
[109] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-24113521/
[110] https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-26113717/
[111] https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-26711010/
[112] https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-16K14760/

項目		プロジェクト成果	従来の技術・知見	備考
5	リプログラミングに関わる因子	マスターレギュレーター　STEMIN	植物の発生過程を制御する転写因子	1.5.3(7)
		iPS細胞誘導因子Lin28のホモログであるPpSCP1が切断葉細胞の幹細胞化を誘導することを発見	動物と植物に共通の幹細胞化誘導因子は知られていなかった。	2.2.2(2)
		切断刺激信号伝達系と光シグナル信号伝達系を繋ぐ因子　SBP	光シグナル系がSBPの発現を制御	1.5.3(6)
		PRC2によるバイバレントヒストンマーク形成機構	PRC2はH3K27をトリメチル化	1.5.3(5)②
		WOXが細胞壁進展性調節遺伝子を制御	WOXは幹細胞の形成維持制御に関与	2.2.2(4)
6	通常発生過程の幹細胞化因子	PRC2が2倍体発生プログラムの開始を制御	PRC2はH3K27をトリメチル化	1.5.1(2)②
		KNOX1が胞子体の未分化状態維持を制御	ホメオボックス遺伝子	1.5.1(2)②
		KNOX2が1倍体発生プログラムの開始を制御	ホメオボックス遺伝子	2.2.3(2)
		APBが幹細胞の種類選択を制御	APBは根の発生に関与	2.2.3(1)
7	細胞周期と幹細胞化	CDKAが細胞周期の再開と幹細胞化の過程を協調的に制御	CDKAは細胞周期再開のみに関与	1.5.4(2)
		葉細胞がS期途中で停止し、幹細胞化に新規DNA合成が必要	S期途中停止の知見はない	1.5.4(1)、2.2.4
8	陸上植物ゲノム解読情報	ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバ	被子植物のみ（シロイヌナズナ、イネなど）	1.5.1(2)
		米国JGIがヒメツリガネゴケをモデル植物に認定		3.1.1

第 3 章　プロジェクトの成果の波及と展望

3.1　科学技術への波及と展望

3.1.1　学術的な新発見や発明による科学技術の波及

本プロジェクトの成果であるヒメツリガネゴケのゲノム解読、1 細胞レベルの観察技術および分子生物学的研究に必須な解析技術の確立は、ヒメツリガネゴケが植物科学研究におけるモデル植物の１つとして確固たる地位を築くことに繋がった。実際、JGI は 2010 年にヒメツリガネゴケを” flagship plant genome”に選定した[113]。これは、被子植物以外の陸上植物では初めてのことである。名古屋大学の東山哲也らは、ERATO「東山ライブホロニクスプロジェクト」(2010-2015 年度)の研究の一環として、植物を丸ごと透明化し、中まで観察する新技術「ClearSee（クリアシー)」の開発に成功したが（図 3-1)、対象植物として被子植物シロイヌナズナのみならずヒメツリガネゴケも選定しており、このことからも、植物科学研究におけるヒメツリガネゴケの重要性が多くの研究者に認識されていることが窺える。なお、本プロジェクトのグループリーダーであった佐藤は、この新技術の開発にも貢献している[114]。

図 3-1　ClearSee 処理したシロイヌナズナのめしべ[115]
青色、緑色、黄色、赤色の各蛍光タンパク質で標識した花粉管がめしべの
中を伸長する様子を 2 光子励起顕微鏡を用いて撮影した。

[113] JGI ホームページ　http://www.hagsc.org/projects/flagship
[114] 名古屋大学プレスリリース 2015 年 10 月 28 日
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20151028_SCI_Itbm.pdf
[115]名古屋大学プレスリリース 2015 年 10 月 28 日
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20151028_SCI_Itbm.pdf

本プロジェクトで遺伝子発現解析法として次世代シーケンサーが導入されたが、これは植物科学の分野では初めてのことであり、リプログラミング研究以外の領域にも大きなインパクトを与えた(外部有識者 1,2 のコメント)。また、被子植物のリプログラミング研究においては、実験材料として様々な細胞が混在する多細胞系を扱わざる得ないために、実験結果の解析が困難であったが、1 細胞レベルでの幹細胞化過程を観察できるヒメツリガネゴケでの発見は、被子植物での幹細胞化の機構解明に貢献するものである(外部有識者 2 のコメント)。

ヒメツリガネゴケ実験マニュアル[116]は、動物細胞の研究にも貢献している。動物細胞研究者のなかには、動物細胞をより深く理解するために植物細胞の研究を同時に進める者が多く、ヒメツリガネゴケは格好の研究材料となっている[117]。その 1 例として、動物と植物では全く同じタンパク質が細胞分裂を進める役割を担っていることを、名古屋大学大学院理学研究科の五島剛太らのグループがコケを使った研究で突き止めたことが報じられた。本グループは動物の細胞分裂に必要なタンパク質「オーグミン」をヒメツリガネゴケでも発見し、植物でもオーグミンが働いていることを証明した。五島は「細胞のがん化は細胞分裂の異常で起きる。オーグミンの働きを探ることで将来のがん治療に繋がる」と考えている[118]。なお、長谷部のコメントによれば、ヒメツリガネゴケ実験マニュアルには累計で約 6 万アドレスからのアクセスがあったとのことである。

本プロジェクトからは、西山を始めとしてインフォマティクス、オミクス、バイオイメージングの研究者が輩出しており、事後評価報告書では、今後の植物科学研究を担う人材育成という面で本プロジェクトが大きく貢献したことが高く評価されている[119]。

3.1.2 新規な理論や概念の提唱

切断葉細胞からの多能性幹細胞化が 1 遺伝子(*STEMIN*)によって総括的に制御されているという発見は、被子植物を含めた植物分化全能性研究に新しい視点を提供したと同時に、iPS 細胞が何故 4 つの遺伝子の導入で構築しうるかの分子機構解明にも繋がる可能性を秘めている(外部有識者 2 のコメント)。一方で、動植物に共通の幹細胞化誘導因子 (Lin28 と PpCSP1) の発見は、動物と植物の幹細胞形成の共通性と多様性を明らかにすることに繋がると期待される[120]。

また、STEMIN 因子の発見は、進化学的に未解決な課題である複合適応形質進化が、少数の遺伝子の変化で生じうるという新しい概念を提唱するものである(長谷部コメント)。マスター因子的なものが進化に及ぼす影響については、細胞工学別冊「進化の謎をゲノムで解く」(長谷部光泰監修、2015 年)の第一章「進化学に残された謎：複数の形質が絡み合う

[116] http://moss.nibb.ac.jp/
[117] 名古屋大学・五島研究室ホームページ
http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~tenure2/project.html
[118] 中日新聞「動物と植物の細胞分裂　同じタンパク質推進役　名大解明「がん治療にも有用」」2012 年 4 月 19 日
[119] 事後評価報告書　http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/hasebe.pdf
[120] 基生研プレスリリース　2017 年 1 月 27 日　http://www.nibb.ac.jp/press/2017/01/27.html

進化プロセスはどのようにして可能か？」(古澤力)で、コアプロセスの連係の変化として議論されている[121]。

3.1.3　新たな研究領域や研究の潮流の形成

植物の分子生物学的な研究は、2000 年に全ゲノムが解読されたシロイヌナズナをモデル植物として進展してきた。一方で、シロイヌナズナで理解された事象が植物全般に共通するものなのかどうかが、近年、問われてきている。植物科学が特定のモデル植物を理解する時代から、植物全体の多様性を理解する時代に移行していると言える。本プロジェクトは、被子植物とは別の陸上植物であるコケをゲノム解読および実験手法の開発を通して、新奇なモデル植物として確立することに成功したものであり、植物科学の多様性理解という潮流を先取りした研究である(外部有識者 2 のコメント)。このような潮流の一例としては、理化学研究所の岩井優和らの研究が挙げられる。彼らは JST さきがけ「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」研究課題名「ライブセルイメージングによる光環境適応機構の実態解明」の一環として、緑藻型と陸上植物型の 2 種類の光化学系Ⅰ複合体を持つヒメツリガネゴケに注目し、光合成調節の分子機構解明に取り組んでいる[122,123]。

3.1.4　科学技術への波及のまとめと展望

本プロジェクトは、ヒメツリガネゴケでみられる切断による葉細胞からの幹細胞化に着目したユニークな研究であり、コケのリプログラミングに関する多くの基礎的なデータを収集することに成功した。これらのデータは、幹細胞組織の構造上の問題で正確なデータ収集が困難な被子植物にも適応できるものであり、植物の持つ分化全能性という植物科学の謎に迫る新しい展開を期待させるものである。長谷部は１細胞観察が可能なヒメツリガネゴケの特徴をさらに活かすために、１細胞トランスクリプトーム解析にも取り組んでおり[124]、その解析情報は植物が持つ分化全能性の理解に繋がると期待できる。

3.2　社会経済への波及と展望

本プロジェクトは、ヒメツリガネゴケの多能性幹細胞化に関する遺伝子発現機構を網羅的に解析することでその分子機構解明に寄与するものであり、将来的に被子植物の幹細胞化機構の解明に繋がれば、応用面として、植物の再生能力を最大限生かすことで農産物生産などの技術革新に発展することが期待される[125]。

また、幹細胞化機構の解明は、逆に特定の分化状態を維持させることも可能となり、植

---

[121] 秀潤社　細胞工学別冊「進化の謎をゲノムで解く」(2015 年)
[122] 理化学研究所・JST 共同発表　2014 年 1 月 20 日
http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140120/index.html
[123] 理化学研究所プレスリリース　2015 年 1 月 20 日　http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150120_1/
[124] 基生研・長谷部研究室ホームページ
http://www.nibb.ac.jp/evodevo/research_19_reprogramming.html
[125] ERATO「長谷部分化全能性進化プロジェクト」
http://www.jst.go.jp/erato/research_area/completed/hbz_PJ.html、および長谷部のコメント

物細胞培養による有用物質生産の効率化にも繋がる(外部有識者 2 のコメント)。

3.2.1　農産物生産への応用

植物細胞の組織培養やカルスから植物体再生が可能なものは、特定の品種だけに限られている。植物ホルモンのオーキシンとサイトカイニンの添加濃度比を経験的に操作する方法論で対応しているのが現状である。リプログラミングの分子機構が解明できれば、全ての有用作物に対して効率的な植物体再生を可能とする技術開発に繋がることが期待できる(外部有識者 2 のコメント)。

また、現時点では接ぎ木の分子機構についても全くわかっていないが、リプログラミング機構の解明は接ぎ木技術の向上にも繋がるものとなる(外部有識者 2 のコメント)。

コケやシダのゲノム解読の効果は、植物育種といった応用面にも波及する。例えば、被子植物の細胞壁はリグニンを含むリグノセルロースで構成されているが、コケ植物ではリグニンは含まれない。一方で、細胞壁構成に必要な遺伝子の多くは被子植物とコケでオルソログの関係にある。従って、リグニン成分の少ない有用植物を育種するために、従来の被子植物の遺伝子だけを操作するという方法論とは別に、コケ植物の遺伝子と置き換えるという方法論も可能になる(外部有識者 1 のコメント)。

3.2.2　ヒメツリガネゴケを用いた物質生産

長谷部自身は応用研究を実施していない。しかしながら、細胞培養が比較的容易なヒメツリガネゴケの特性を生かした応用研究が他者により進んでいる。

長谷部とともにヒメツリガネゴケゲノム解読国際コンソーシアムに参画した Ralf Reski は、ベンチャー企業を立ち上げてヒメツリガネゴケ細胞培養による医薬品製造に取り組んでいる[126]。植物細胞は、動物細胞と違って不必要な糖鎖修飾を起こさないことが利点とされている。

また、ヒメツリガネゴケ葉緑体ゲノムにワクチン遺伝子を導入して、ワクチンを生産する研究が進められている[127]。

3.2.3　社会への貢献

文部科学省は、2007 年度の戦略目標に「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」を設定し、遺伝子発現情報も含めた細胞内の代謝変化を統合的あるいは網羅的に解析し、細胞の恒常性維持メカニズムを明らかにすることにより、細胞機能の向上や恒常性変調を改善する細胞制御のための基盤技術を創出することの重要性を示した[128]。

本プロジェクトは、分化細胞が多能性幹細胞に変化する際に必要な細胞機能制御のための基盤技術を創出しており、ERATO「長谷部分化全能性進化プルジェクト」事後評価報告書

[126] https://en.wikipedia.org/wiki/Ralf_Reski
[127] 名古屋大学　杉田護研究室　http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~sugita-g/gaiyou.html
[128] http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/heisei23/pdf/pdf04/04.pdf

において、本プロジェクトは上記の戦略目標に資する成果が得られたと評価されている[129]。

3.2.4 メディアを介した研究成果の発信

報道各紙は、植物の持つ分化全能性あるいは植物の進化に興味を示し、本プロジェクトがそれらの謎の解明に繋がることを度々報道している。

植物は挿し木や葉差しから再生するように“万能細胞”が簡単にできるが、なぜなのかは意外にわかっていない、とし、本プロジェクトがその謎の解明に繋がると報じられた[130]。また、本プロジェクトはすでに分化した細胞を幹細胞に戻す遺伝子の存在を明らかにした、と報じられた[131]。

ヒメツリガネゴケゲノム解読は、植物が陸上に進出した仕組みが遺伝子レベルで明らかになると報道され[132]、イヌカタヒバゲノム解読は植物進化の過程解明が期待されると報じられた[133]。また、PRC2[134]、APB[135]、KNOX2[136]の機能解明についても各紙が報道しており、マスコミの本プロジェクトに対する注目度の高さが窺える。

なお、本プロジェクトの成果を映像化したサイエンスフロンティア 21 (69) ERATO 長谷部分化全能性進化プロジェクト「驚異の再生力の謎に挑む」[137]は、(公)映像文化製作者連盟アワード 2011 のソーシャル・コミュニケーション部門部門賞[138]、ならびに第 53 回科学技術映像祭(2012 年)研究開発部門・文部科学大臣賞を受賞した[139]。

3.2.5 社会経済への波及のまとめと展望

本プロジェクトの研究終了報告書では、「本研究領域から得られる知見と技術は、細胞機能を制御する分子機構解明に寄与し、植物の再生能力を最大限生かすことで農産物生産などの技術に革新をもたらすことが期待される」(研究総括) と記述されており、プロジェクト事後評価報告書も、本プロジェクトでは、戦略目標「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」に資する成果が得られたと評価しており、今後、本プロジェクトで見出された幹細胞化に関わる因子の全容が解明され、それらの知見が有用作物に応用展開されることになれば、農産物生産技術の向上に資するものと期待できる。

---

[129] ERATO「長谷部分化全能性進化プロジェクト」事後評価報告書
http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/hasebe.pdf
[130] 日本経済新聞　2009 年 2 月 1 日　「植物はなぜ万能細胞？」
[131] 朝日新聞「(先端人) 分子進化学　植物の謎、追い続ける長谷部部光泰さん名古屋】」2016 年 6 月 19 日
[132] 朝日新聞　2007 年 12 月 14 日　「コケゲノム解読」
[133] 中日新聞　2011 年 5 月 6 日　「シダ植物のゲノム解読」
[134] 日本経済新聞「陸上植物の起源　コケじゃない!?」2009 年 9 月 11 日、朝日新聞 2009 年 10 月 27 日
[135] 日経速報ニュースアーカイブ「植物の茎葉の起源に迫る遺伝子を発見」2012 年 8 月 20 日
[136] 朝日新聞「陸上植物の世代交代の仕組み解明」2013 年 3 月 25 日
[137] http://sciencechannel.jst.go.jp/D047001/detail/D107001069.html
[138] http://www.eibunren.or.jp/top/eibunren-award2011_4.html
[139] http://ppd.jsf.or.jp/filmfest/53/pdf/53pressrelease.pdf

【引用文献】

[1] Nishiyama T, Fujita T, Shin-I T, Seki M, Nishide H, Kamiya A, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K, Kohara Y, Hasebe M, “Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: Implication for land plant evolution”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 8007-8012, 2003

[2] Tanabe Y, Hasebe M, Sekimoto H, Nishiyama T, Kitani M, Henschel K, Münster T, Theissen G, Nozaki H, Ito M, “Characterization of MADS-box genes in charophycean green algae and its implication for the evolution of MADS-box genes”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 2436-2441, 2005

[3] Tanahashi T, Sumikawa N, Kato M, Hasebe M, “Diversification of gene function: homologs of the floral regulator *FLO/LFY* control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*”, *Development,* 132, 1727-1736, 2005

[4] Maizel A, Busch MA, Tanahashi T, Perkovic J, Kato M, Hasebe M, Weigel D, “The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain”, *Science* , 308, 260-263, 2005

[5] Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin IT, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL, “The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants”, *Science*, 319, 64-69, 2008

[6] Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribskov M, dePamphilis C, Albert VA, Aono N, Aoyama T, Ambrose BA, Ashton NW, Axtell MJ, Barker E, Barker MS, Bennetzen JL, Bonawitz ND, Chapple C, Cheng C, Correa LG, Dacre M, DeBarry J, Dreyer I, Elias M, Engstrom EM, Estelle M, Feng L, Finet C, Floyd SK, Frommer WB, Fujita T, Gramzow L, Gutensohn M, Harholt J, Hattori M, Heyl A, Hirai T, Hiwatashi Y, Ishikawa M, Iwata M, Karol KG, Koehler B, Kolukisaoglu U, Kubo M, Kurata T, Lalonde S, Li K, Li Y, Litt A, Lyons E, Manning G, Maruyama T, Michael TP, Mikami K, Miyazaki S, Morinaga S, Murata T, Mueller-Roeber B, Nelson DR, Obara M, Oguri Y, Olmstead RG, Onodera N, Petersen BL, Pils B, Prigge M, Rensing SA, Riano-Pachon DM, Roberts AW, Sato Y, Scheller HV, Schulz B, Schulz C, Shakirov EV, Shibagaki N, Shinohara N, Shippen DE, Sorensen I, Sotooka R, Sugimoto N, Sugita M, Sumikawa N, Tanurdzic M, Theissen G, Ulvskov P, Wakazuki S, Weng JK, Willats WW, Wipf D, Wolf PG, Yang L, Zimmer AD, Zhu Q, Mitros T, Hellsten U, Loque D, Otillar R, Salamov A, Schmutz J, Shapiro H, Lindquist E, Lucas S, Rokhsar D, Grigoriev IV, “The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants”, *Science*, 332, 960-963, 2011

[7] Hirano K, Nakajima M, Asano K, Nishiyama T, Sakakibara H, Kojima M, Katoh

E, Xiang H, Tanahashi T, Hasebe M, Banks JA, Ashikari M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M, “The GID1-mediated gibberellin perception mechanism Is conserved in the lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the bryophyte *Physcomitrella patens*”, *Plant Cell*. 19, 3058-3079, 2007

[8] Fujita T, Sakaguchi H, Hiwatashi Y, Wagstaff SJ, Ito M, Deguchi H, Sato T, Hasebe M, “Convergent evolution of shoots in land plants: lack of auxin polar transport in moss shoots”, *Evol Dev*, 10, 176-186, 2008

[9] Aya K, Hiwatashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Ueguchi-Tanaka M, Hasebe M, Matsuoka M, “The Gibberellin perception system evolved to regulate a pre-existing GAMYB-mediated system during land plant evolution”, *Nat Commun*, 2, 544, 2011

[10] Hiwatashi Y, Obara M, Sato Y, Fujita T, Murata T, Hasebe M, “Kinesins are indispensable for interdigitation of phragmoplast microtubules in the moss *Physcomitrella patens*”, *Plant Cell*, 20, 3094-3106, 2008

[11] Sakakibara K, Nishiyama T, Deguchi H, Hasebe M, “Class 1 KNOX genes are not involved in shoot development in the moss *Physcomitrella patens* but do function in sporophyte development”, *Evol Dev*, 10, 555-566, 2008

[12] Okano Y, Aono N, Hiwatashi Y, Murata T, Nishiyama T, Ishikawa T, Kubo M, Hasebe M, “A polycomb repressive complex 2 gene regulates apogamy and gives evolutionary insights into early land plant evolution”, *Proc Natl Acad Sci USA,* 106, 16321-16326, 2009

[13] Nishiyama T, Miyawaki K, Ohshima M, Thompson K, Nagashima A, Hasebe M, Kurata T, “Digital gene expression profiling by 5’-end sequencing of cDNAs during reprogramming in the moss *Physcomitrella patens*”, *PLoS ONE,* 7, e36471, 2012

[14] Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Imai A, Kimura M, Sugimoto N, Akita A, Oguri Y, Friedman WE, Hasebe M, Kubo M, “Physcomitrella cyclin dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells”, *Plant Cell*, 23, 2924-2938, 2011

[15] Kubo M, Imai A, Nishiyama T, Ishikawa M, Sato Y, Kurata T, Hiwatashi Y, Reski R, Hasebe M, “System for stable beta-estradiol-inducible gene expression in the moss *Physcomitrella patens*”, *PLoS ONE*, 8, e77356, 2013

[16] Zimmer AD, Lang D, Buchta K, Rombauts S, Nishiyama T, Hasebe M, Van de Peer Y, Rensing SA, Reski R, “Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions”, *BMC Genomics*, 14, 498 ,2013

[17] Hieno A, Naznin HA, Hyakumachi M, Sakurai T, Tokizawa M, Koyama H, Sato N, Nishiyama T, Hasebe M, Zimmer AD, Lang D, Reski R, Rensing SA, Obokata J, Yamamoto YY, “ppdb: plant promoter database version 3.0”, *Nucleic Acids Res*, 42, D1188-1192, 2014

[18] Li C, Sako Y, Imai A, Nishiyama T, Thompson K, Kubo M, Hiwatashi Y, Kabeya Y, Karlson D, Wu SH, Ishikawa M, Murata T, Benfey PN, Sato Y, Tamada Y, Hasebe M, “A Lin28 homologue reprograms differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*”, *Nat Commun*, 8, 14242, 2017

[19] Sakakibara K, Reisewitz P, Aoyama T, Friedrich T, Ando S, Sato Y, Tamada Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Kurata T, Ishikawa M, Deguchi H, Rensing SA, Werr W, Murata T, Hasebe M, Laux T, “WOX13-like genes are required for

reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens*", *Development*, 141, 1660-1670, 2014
[20] Aoyama T, Hiwatashi Y, Shigyo M, Kofuji R, Kubo M, Ito M, Hasebe M, "AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens*", *Development*, 139, 3120-3129, 2012
[21] Sakakibara K, Ando S, Yip HK, Tamada Y, Hiwatashi Y, Murata T, Deguchi H, Hasebe M, Bowman JL, "KNOX2 genes regulate the haploid-to-diploid morphological transition in land plants", *Science*, 339, 1067-1070, 2013
[22] Kofuji R and Hasebe M, "Eight types of stem cells in the life cycle of the moss *Physcomitrella patens*", *Curr Opin Plant Biol*, 17, 13-21, 2014
[23] Pereman I, Mosquna A, Katz A, Wiedemann G, Lang D, Decker EL, Tamada Y, Ishikawa T, Nishiyama T, Hasebe M, Reski R, Ohad N, "The Polycomb group protein CLF emerges as a specific tri-methylase of H3K27 regulating expression and development in *Physcomitrella patens*", *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 36, 276-289, 2016
[24] Ishikawa M and Hasebe M, "Cell cycle reentry from the late S phase: implications from stem cell formation in the moss *Physcomitrella patens*", *J Plant Res*, 128, 399-405, 2015
[25] Xu B, Ohtani M, Yamaguchi M, Toyooka K, Wakazaki M, Sato M, Kubo M, Nakano Y, Sano R, Hiwatashi Y, Murata T, Kurata T, Yoneda A, Kato K, Hasebe M, Demura T, "Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land", *Science*, 343, 1505-1508, 2014
[26] Kim SY, Colpitts CC, Wiedemann G, Jepson C, Rahimi M, Rothwell JR, McInnes AD, Hasebe M, Reski R, Sterenberg BT, Suh DY, "Physcomitrella PpORS, basal to plant type III polyketide synthases in phylogenetic trees, is a very long chain 2'-oxoalkylresorcinol synthase", *J Biol Chem*, 288, 2767-2777, 2013
[27] Plavskin Y, Nagashima A, Perroud PF, Hasebe M, Quatrano RS, Atwai GS, Timmermans MCP, "Ancient *trans*-acting siRNAs confer robustness and sensitivity onto the auxin response", *Dev Cell*, 36, 276-289, 2016
[28] Murata T, Sano T, Sasabe M, Nonaka S, Higashiyama T, Hasezawa S, Machida Y, Hasebe M, "Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast", *Nat Commun*, 4, 2967, 2013
[29] Gusev O, Suetsugu Y, Cornette R, Kawashima T, Logacheva MD, Kondrashov AS, Penin AA, Hatanaka R, Kikuta S, Shimura S, Kanamori H, Katayose Y, Matsumoto T, Shagimardanova E, Alexeev D, Govorun V, Wisecaver J, Mikheyev A, Koyanagi R, Fujie M, Nishiyama T, Shigenobu S, Shibata TF, Golygina V, Hasebe M, Okuda T, Satoh N, Kikawada T, "Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge", *Nat Commun*, 5, 4784, 2014
[30] Mano H, Fujii T, Sumikawa N, Hiwatashi Y, Hasebe M, "Development of an agrobacterium-mediated stable transformation method for the sensitive plant *Mimosa pudica*", *PLoS One*, 9, e8, 2014
[31] Fukushima K, Fujita H, Yamaguchi T, Kawaguchi M, Tsukaya H, Hasebe M, "Oriented cell division shapes carnivorous pitcher leaves of *Sarracenia purpurea*", *Nat Commun*, 6, 6450, 2015
[32] Fukushima K, Fang X, Alvarez-Ponce D, Cai H, Carretero-Paulet L, Chen C, Chang TH, Farr KM, Fujita T, Hiwatashi Y, Hoshi Y, Imai T, Kasahara M, Librado P, Mao L, Mori H, Nishiyama T, Nozawa M, Pálfalvi G, Pollard ST, Rozas J, Sánchez-Gracia A, Sankoff D, Shibata TF, Shigenobu S, Sumikawa N, Uzawa T,

Xie M, Zheng C, Pollock DD, Albert VA, Li S, Hasebe M, “Genome of the pitcher plant Cephalotus reveals
genetic changes associated with carnivory”, *Nat Ecol Evol*, 1:0059, doi:10.1038/s41559-016-0059