

ヒメツリガネゴケにおける
PAS ヒスチジンキナーゼの生理機能の解析

龍 昌志

要旨

二成分制御系 (Two-Component Systems; TCSs) は、動物以外の生物において広く保存されたシグナル受容・伝達機構である。一般的な TCS は、ヒスチジンキナーゼ (HK) とレスポンスレギュレーターから構成される。HK が様々なセンサードメインと組み合わせられることで、TCS は多様な生物学的・非生物学的な環境シグナルに応答するための分子回路として機能する。植物の TCS については、高等植物の植物ホルモン応答の分子基盤としての研究が進んでいる。しかし、裸子植物、シダ植物、コケ植物などの初期に分岐した植物群の TCS の研究は遅れており、植物の TCS の多様性や起源については未解明である。本研究では、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用いて Per-Arnt-Sim (PAS) ドメインを持つ 2 つの HK、PAS-Histidine kinase 1 (PHK1) とそのパラログである PHK2 をそれぞれコードする遺伝子、*PHK1* と *PHK2* の機能解析を行った。ヒメツリガネゴケは原始的な性質をいまでも多く残す蘚類の一種で、モデル植物に適した性質を持つため、進化的な観点から生理学や発生学のモデル植物として研究されている。PAS ドメインは多様な環境シグナルの受容機能が報告されているので、PHK1/PHK2 は環境応答のうえで重要であると考えられた。まず、PHK1/PHK2 のホモログ遺伝子の系統的な分布を調べるため、植物関連のゲノムデータベースを網羅的に検索した。その結果、*PHK1/PHK2* のホモログ遺伝子は、緑色植物では車軸藻、コケ植物、小葉類のみにみられ、裸子植物または被子植物の公開されたゲノム配列には一切見つからないことが分かった。さらに、様々な PAS タンパク質の PAS ドメインの配列を用い、最尤法により系統樹を作成した結果、ヒメツリガネゴケの PHK の PAS は、高等植物が持つどの PAS 含有タンパク質の PAS ともクラスター化せず、むしろ細菌の一群の PAS 含有 HK と系統的に近い可能性が高いことが分かった。次に、相同組換えを利用した遺伝子

ターゲティング法により、*PHK1* と *PHK2* それぞれの一重破壊株と、両方の遺伝子が壊れた二重破壊株を作出した。これらの *PHK* 破壊株においては、野生型株 (WT) に比べて茎葉体の形成が早くなり、さらに赤色光によるカウロネマ側枝始原細胞の形成誘導が促進されることがわかった。茎葉体は一部のカウロネマ側枝始原細胞から発生するため、*PHK1/PHK2* は、カウロネマ側枝始原細胞の誘導を抑制することで、茎葉体の形成を遅らせる働きがあると考えられた。また、茎葉体の発生の初期段階を促進する *APB* (*AINTEGUMENTA*, *PLETHORA* and *BABY BOOM*) 遺伝子群の転写産物量を定量 PCR 法により測定した結果、*PHK1/PHK2* 二重破壊株においては、WT と比べ、一部の *APB* 遺伝子の転写産物量が上昇していることが分かった。この結果から、*PHK1/PHK2* は、*APB* の転写を抑制することにより茎葉体の形成を制御している可能性が示唆された。さらに、*PHK* 破壊株の茎葉体の形成を冠水条件と低酸素条件で観察した結果、どちらの条件においても、好氣的な条件で行なった上記の結果とは対照的に、*PHK* 破壊株において茎葉体の形成が抑制されることがわかった。この結果から、1) *PHK1/PHK2* は冠水条件下では好氣的な条件とは逆に茎葉体の形成を促進する；2) 冠水条件下であるかどうかは、環境の酸素濃度を感知することにより判断されており、*PHK1/PHK2* はそのシグナル伝達に関与している、という2つのことが明らかになった。つまり、*PHK1/PHK2* は、酸素濃度に依存して調節を変化させ、逆方向の応答を引き起こす発生制御因子であると考えられた。

以上の結果から、*PHK1/PHK2* は光と酸素のシグナルを伝達し、発生を精妙に制御する重要因子であることが示された。*PHK* ホモログを持つ上記の植物はどれも、有性生殖のために体外の水を必要とする植物である。*PHK1/PHK2* による制御の方向性が冠水条件と好気条件で逆転することから、*PHK* ホモログは植物の陸上化とその後の進化・多様化に貢献した可能性が考えられる。

目次

略語.....	iii
背景.....	1
陸上植物の進化.....	1
二成分制御系について.....	1
被子植物のTCSについて.....	3
ヒメツリガネゴケについて.....	4
ヒメツリガネゴケのTCSについて.....	6
本研究の目的.....	6
材料と方法.....	9
植物試料と培養条件.....	9
PHK1 と PHK2 のクローニング.....	10
系統解析.....	11
遺伝子破壊用プラスミドの構築.....	12
ヒメツリガネゴケの形質転換.....	12
サザンブロッティング.....	14
ヒメツリガネゴケの観察.....	15
定量PCR.....	16
試薬等.....	17
結果.....	18
PHK1 と PHK2 のクローニング.....	18
PHK と PHK が持つPAS ドメインの系統解析.....	19

PHK の発現解析.....	21
PHK 破壊株の作出	22
PHK 破壊株では茎葉体形成が早くなる	23
PHK 破壊株ではカウロネマ細胞の分岐が早くなる.....	24
APB 遺伝子群の発現.....	25
冠水条件と低酸素条件では PHK 破壊株の茎葉体形成は抑制される.....	26
考察.....	29
PHK1 と PHK2 の機能についての解析.....	29
PHK1/PHK2 とそのホモログの進化について	34
植物の進化における PAS-HK の役割について	36
引用文献	38
参考文献	39
謝辞.....	52
付図.....	54

略語

本論文に用いた略語は以下の通りである。

AHK: Arabidopsis-Histidine Kinase

AHP: Arabidopsis- Histidine-Containing Phosphotransmitter

APB: AINTEGUMENTA, PLETHORA and BABY BOOM

ARR: Arabidopsis-Response Regulator

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTP: Protein-protein Basic Local Alignment Search Tool

cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid

CHASE: Cyclase/Histidine Kinase-Associated Sensing Extracellular

CHK: CHASE domain-containing Histidine Kinase

DNA: Deoxyribonucleic acid

HATPase: Histidine Kinase-like ATPase domain

HisKA: Histidine Kinase A domain

HK: Histidine Kinase

HPt: Histidine-containing Phosphotransmitter

LD: Long day

LL: Contentious light

LOV: Light-Oxygen-Voltage

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ND: Neutral day

PAS: Per-ARNT-Sim

PCR: Polymerase chain reaction

PHK: PAS containing-Histidine Kinase

PHY: Phytochrome

PRR: Pseudo-Response Regulator

REC: Receiver domain

RNA: Ribonucleic acid

RR: Response Regulator

RT-PCR: Reverse transcription Polymerase chain reaction

SD: Short day

TCS: Two-Component System

WT: Wild type

ZTL: ZEITLUPE

背景

陸上植物の進化

生物の歴史において、植物の陸上化は最も大きなイベントの一つである。全ての生物はかつて海中で暮らしていた。今からおよそ 4.8 億年前、植物の祖先は接合藻類の祖先から分岐し、陸上に進出した (Kenrick and Crane, 1997; Wickett et al., 2014)。陸上に進出した植物は、形態形成や代謝の仕組みを変化させながら生育域を拡大していき、水源から離れた環境でも生育できるようになった (Raven, 2000; Renzaglia et al., 2000; Shaw et al., 2011)。現在では、植物は地球上の様々な地域で繁栄しており、その環境に合わせて多様な体制や環境耐性の仕組みを備えている。陸上化した植物の祖先から、コケ植物 (蘚類、苔類、ツノゴケ類) が分岐し、その後小葉類、シダ植物、裸子植物、被子植物が順に分岐した (図 1)。植物は陸上の環境に適応するために強光、乾燥、重力、温度変化、紫外線など様々な新しい環境ストレスに対する耐性を獲得したと考えられる (Rensing et al., 2008; Shaw et al., 2011)。したがって、環境シグナルの受容とそれに応じた適応の過程の変遷を解明していくことで、植物の上陸およびその後の多様化における戦略を明らかにできると期待される。絶滅種について調べることはできないため、系統的に隔たった現生種の間で比較を行うことが重要である。

二成分制御系について

環境シグナルは受容体タンパク質によって認識され、受容体タンパク質はシグナルのかたちを変換して下流のタンパク質などに伝達することで、シグナル

への応答を引き起こす（テイツら、2017）。特に細胞内で行われるこのような仕組みを、細胞内シグナル伝達と呼ぶ。二成分制御系（Two-Component Systems; TCSs）は、原核生物と真核生物（動物を除く）に広く保存された環境シグナル受容・細胞内シグナル伝達機構である（Stock et al., 2000）。一般的な TCS は、ヒスチジンキナーゼ（Histidine Kinase: HK）とレスポンスレギュレーター（Response Regulator: RR）から構成される。HK は N 末端側にセンサードメイン、C 末端側にキナーゼドメインをもつ。RR は N 末端側にレシーバードメイン、C 末端側に DNA 結合ドメインなどの出力ドメインをもつ。HK と RR は、次の仕組みによりシグナル伝達を行なう: 1) HK がセンサードメインの働きにより環境変化を感知し、キナーゼドメイン内のヒスチジン残基が自己リン酸化される; 2) HK から RR のレシーバードメイン内のアスパラギン酸残基へとリン酸が転移する; 3) RR の多様な出力ドメインが活性化し、下流の遺伝子発現を制御する; 4) 最終的に環境変化の種類に応じた生理的な応答に至る（Stock et al., 2000）。一部の HK は C 末端側にレシーバードメインをもち、ハイブリッド型 HK と呼ばれる。ハイブリッド型 HK の場合は、ヒスチジン含有トランスミッター（Histidine-containing Phosphotransmitter: HPt）を介した多段階のリン酸リレー系を構成する。HPt は保存されたヒスチジン残基をもち、HK のレシーバードメインからリン酸を受け取り、RR のレシーバードメインに渡す（山篠と水野、2009; Pekárová et al., 2016）。HK と RR の組み合わせは特異性が高く、情報の混線が起こることはほとんどない（山篠と水野、2009）。HK が各種のセンサードメインやタンパク質間相互作用ドメインなど、様々なドメインと組み合わせられることにより、TCS は様々な環境シグナルに応答するための分子回路として機能する（Mizuno et al., 1996;

Rensing et al., 2008; Pils and Heyl, 2009; Ishida et al., 2010) 。 TCS は、原核生物では浸透圧、pH、酸化ストレスへの応答の仕組みとして詳しく調べられている (Mizuno et al, 1996) 。

TCS は、植物ではサイトカイニンやエチレンに対する応答の分子機構であることが明らかになっている (図 2) (Chang et al., 1993; Hwang and Sheen, 2001; To and Kieber, 2008; 山篠と水野, 2009; Merchante et al., 2013) 。また、植物の光受容体ファイトクロム (Phytochrome: PHY) や時計タンパク質擬似 RR (Pseudo-RR: PRR) は、TCS 因子のホモログとして同定された (ただし、これらの因子はリン酸の転移に必須のヒスチジン残基やアスパラギン酸残基が置換しており、TCS 因子としては機能しない (Matsushika et al., 2000; Nakamichi et al., 2005, 2007, 2009; Yamashino, 2013)) 。植物は、多様な環境に適応するために TCS のドメイン構造を変化させてきたと考えられている (山篠と水野, 2009) 。この過程には、新規の TCS 因子の獲得や不要となった TCS 因子の欠失が伴ったと考えられる。したがって、植物界の TCS の多様化の過程を理解することで、植物の進化と多様性を支えた分子メカニズムの解明につながると期待できる。植物の TCS の多様性を理解するために、被子植物と、被子植物とは系統的に隔たった種との間で TCS 因子を比較することが重要である。

被子植物の TCS について

シロイヌナズナの TCS 因子として、11 個の HK (Arabidopsis-HK: AHK) 、6 個の HPt (Arabidopsis-HPt: AHP) 、23 個の RR (Arabidopsis-RR: ARR) が同定されている (To and Kieber, 2008; 山篠と水野, 2009; Pekárová et al., 2016) 。AHK

は機能により5つのサブファミリーに分類されている：(1) サイトカイニン受容体 (AHK2-4 の3つ)；(2) エチレン受容体 (ETR1, ERS, ETR2, EIN4, ERS2 の5つ)；(3) 浸透圧センサー (AtHK1)；(4) 塩感受性制御因子 (AHK5)；(5) 雌性配偶体制御因子 (CK11) (Kakimoto, 2003; Grefen and Harter, 2004; Desikan et al., 2008; Deng et al., 2010; Pham et al., 2012)。AHP1-5 はリン酸化されるヒスチジン残基が保存されており、また実際にリン酸の受容活性が確認され、さらにその相互作用パートナーも同定されている (Kakimoto, 2003; 山篠と水野, 2009)。一方で、AHP6 はヒスチジン残基が置換されているためにリン酸を受容することはできないが、AHK から AHP へのリン酸転移を阻害することで、リン酸リレー系に負のフィードバック制御をかける役割を担っている (図 2) (Kakimoto, 2003; Mähönen et al., 2006; 山篠と水野, 2009)。ARR はサイトカイニンへの応答性からタイプ A からタイプ C に分類されている (Kakimoto, 2003; 山篠と水野, 2009)。AHK4 がサイトカイニンを受容すると、最初にタイプ B の ARR にリン酸が転移される (図 2) (山篠と水野, 2009)。タイプ B の ARR はタイプ A の ARR をコードする遺伝子の転写を制御し、タイプ A の ARR が AHP からリン酸を奪うことで、サイトカイニン応答の情報伝達が沈静化する (図 2) (山篠と水野, 2009)。なお、タイプ C の ARR は、サイトカイニンの情報伝達系に関与しない。このように、植物の TCS は被子植物シロイヌナズナで最も詳しく調べられてきている。

ヒメツリガネゴケについて

ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) は蘚類に属する植物種であり、蘚類

はさらに苔類、ツノゴケ類とともにコケ植物を構成する。コケ植物は、様々な研究が進んでいる被子植物とは系統的に大きく隔たっており、いまでも原始的な性質を多く残している (Kenrick and Crane, 1997; Lang et al., 2008; Wickett et al., 2014)。さらにヒメツリガネゴケは、生活環が短く、遺伝子ターゲティングを効率的に適用できるなど、分子遺伝学的な実験植物に適した性質を持つため、全ゲノム配列が決定されており、転写産物に関する情報も豊富である (Schaefer, 1994; Cove, 2005; Rensing et al., 2008)。このためヒメツリガネゴケは、進化的な観点から、生理学や発生学のモデル植物として研究されてきた (Cove and Knight, 1993; Cove, 2005; Cove et al., 2006)。ヒメツリガネゴケの組織は、糸状の原糸体と、葉と茎からなる立体的な茎葉体の2つに大別される (図3)。原糸体は、さらにクロロネマ細胞とカウロネマ細胞に分類される。クロロネマ細胞は丸く大きな葉緑体を密に持ち、細胞壁が細胞の長軸に対して垂直に形成される。カウロネマ細胞は楕円の葉緑体をまばらに持ち、細胞壁が細胞の長軸に対して斜めに形成される。胞子が発芽すると一次クロロネマ細胞へと分化し、頂端細胞が分裂することで伸長する。一次クロロネマ細胞の頂端細胞は一次カウロネマ細胞に分化する。カウロネマ細胞は始原側枝細胞を形成し、その約 87%が二次クロロネマ頂端細胞に、約 5%が二次カウロネマ頂端細胞に、約 5%が茎葉体頂端細胞に分化し、約 3%は未分化のまま維持される。茎葉体頂端細胞は茎葉体に分枝し、茎葉体の茎頂に造卵器と造精器が形成される。精子は造精器から放出されると、茎葉体表面の水の膜を通して造卵器に移動して受精が起こる (図3) (Cove and Knight, 1993; 日渡ら, 2000; Cove et al., 2006)。以上の過程は植物ホルモン、光、温度などの影響を受けるため (Cove and Knight, 1993)、環境応答のシグナ

ル伝達系がどのように発生を制御するかを理解するために重要である。

ヒメツリガネゴケの TCS について

ヒメツリガネゴケは、シロイヌナズナのサイトカイニン受容体やエチレン受容体のホモログを持つ (Pils and Heyl, 2009; Ishida et al., 2010; Gruhn et al., 2014; von Schwartzberg et al., 2016)。Gruhn らは、ヒメツリガネゴケから被子植物の AHK2-4 と同一のドメイン構造を持つ HK を 4 つ (CHASE (Cyclase/Histidine kinase-Associated Sensing Extracellular) domain-containing HK: CHK1-4) 同定した (Gruhn et al., 2014)。さらに、von Schwartzberg らは、CHK1-3 の生理機能の解析を行い、CHK1-3 がサイトカイニンを感知し、茎葉体の発生を制御することを示した (von Schwartzberg et al., 2016)。CHK4 は *in vitro* ではサイトカイニン受容活性を示すが、CHASE ドメインの相同性が低く、植物体内ではサイトカイニン受容に関与しない (Gruhn et al., 2014; von Schwartzberg et al., 2016)。一方で、ヒメツリガネゴケは種子植物や緑藻にみられないマルチドメイン構造の HK を持つが、これらの機能はわかっていない (Ishida et al., 2010)。コケ植物の多様な TCS 因子の一部は、植物が陸上に進出し、厳しい環境に適応するために獲得されたと考えられており、実際にコケ植物は高等植物を凌ぐ環境耐性を持つ (Ishida et al., 2010)。そのため、ヒメツリガネゴケの TCS は、植物の進化や多様性を理解する上で魅力的な研究課題である。

本研究の目的

本研究では、ヒメツリガネゴケを用いて、2 つの PAS (Per-ARNT-Sim) ドメ

インを持つ HK、PAS containing-Histidine Kinase 1 (PHK1) とそのパラログである PHK2 をそれぞれコードする遺伝子、*PHK1* と *PHK2* の機能解析を行った。PAS ドメインは全ての生物界にみられるドメインであり、低分子や他のタンパク質と結合することで、環境センサーとして機能している (Möglich et al., 2009; Henry and Crosson, 2011; Vogt and Schippers, 2015)。また、PAS ドメインは多様なドメインと組み合わせられることで様々な機能を発揮する (Henry and Crosson, 2011; Vogt and Schippers, 2015)。原核生物では多数の PAS タンパク質が同定されており、そのほとんどがシグナル伝達経路のセンサーの役割を担っている (Henry and Crosson, 2011)。さらに、PAS タンパク質のおよそ半数は HK であり、様々な補因子と結合し、リン酸転移を介して、最終的に多様な下流遺伝子の発現を制御する (Henry and Crosson, 2011)。例として、枯草菌の FixL は、HK ドメインを持つ PAS タンパク質であり、PAS ドメインを介してヘム b と結合する酸素センサーとして知られる (Henry and Crosson, 2011)。FixL が酸素を検出すると、RR の FixJ にリン酸を転移し、FixJ が窒素固定遺伝子の発現を制御する (Philip et al., 1990; Henry and Crosson, 2011)。被子植物の PAS タンパク質は、そのドメイン構成と生理機能によって 6 つのグループに分類されている (Vogt and Schippers, 2015)。例として ZEITLUPE (ZTL) は、PAS ドメインが青色光を受容すると標的の時計タンパク質を分解することで概日リズムを制御する E3 ユビキチンリガーゼであることが知られている (Más et al., 2003; Fujiwara, 2008; Vogt and Schippers, 2015)。概日リズムは花成など様々な生理現象と関係しており、*ZTL* の過剰発現体では花成が顕著に遅くなる (Fujiwara, 2008)。この例にみられるように、PAS ドメインは被子植物の環境応答において重要な役割を担っていると考えら

れる。しかし、原核生物と異なり、被子植物においては PAS ドメインと組み合わさった HK は報告されていなかった (Vogt and Schippers, 2015)。したがって、PHK1/PHK2 はコケ植物の環境応答の分子機構を解明するためだけでなく、陸上植物の進化や多様性を理解するためにも重要な手がかりになると考えられた。

本論文では、逆遺伝学的な解析により、ヒメツリガネゴケの PHK1/PHK2 が環境シグナルに応答して発生を制御する重要な因子であることを明らかにした。

材料と方法

植物試料と培養条件

本研究では実験植物としてヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens* ssp. *patens*) (Ashton and Cove, 1977) を用いた。ヒメツリガネゴケの培養は、基礎生物学研究所・長谷部研究室の方法 (PHYSCObase: <http://moss.nibb.ac.jp>) に従い、次のように行った。原糸体は BCD 培地 (1 mM MgSO_4 , 10 mM KNO_3 , 45 μM FeSO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 0.8% (w/v) アガー, trace element solution (alternative TES; 0.22 μM , Na_2MoO_4 , 2 μM MnCl_2 , 0.23 μM CoCl_2 and 0.17 μM KI)) に 1 mM CaCl_2 と 5 mM 酒石酸アンモニウムを添加した培地 (BCDAT 培地) 上にセロハンを敷いて培養した (Nishiyama et al., 2000)。原糸体は 3 日から 7 日ごとにホモジナイザー (Phystron、マイクロテック、船橋市) で破碎し、細胞破碎液を新しい BCDAT 培地にまき直した (Nishiyama et al., 2000)。茎葉体は 1 mM CaCl_2 を含む BCD 培地上で培養した (Nishiyama et al., 2000)。培養は 25 °C、連続明条件 (LL、光強度約 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) で行った。光源には白色蛍光灯 (FL20SS W/18、東芝ライテック、横須賀市) を用いた。培地の詳細な組成は表 1 に示す。

胞子嚢誘導は青木と杉田 (2009) の方法に従い、次のように行った。プラントボックスにジフィーセブン (サカタのタネ、横浜市) とそれが浸かるほどの水を入れ、オートクレーブして膨らませた。まき直しと同様に原糸体を破碎し、膨らんだジフィーセブン上にまいて、25 °C の長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期 (LD)) で茎葉体を発生させた。十分な茎葉体が発生したら、16 °C の短日条件 (8 時間明期/16 時間暗期 (SD)) に移した。その後、週に 1 回程度水を与え、

受精を誘導した。胞子嚢は乾燥させ、4 °C で保存した。培地の詳細な組成を表 1 に示す。

PHK1 と PHK2 のクローニング

ヒメツリガネゴケの PAS 含有 HK (PAS-HK とする) は、石田らによって、KEGG データベースに登録されていた (PHYPADRAFT_159715 と PHYPADRAFT_125421) (Ishida et al., 2011)。PHYPADRAFT_159715 のアミノ酸配列をクエリーに用いて、COSMOSS version 3.1 (<http://www.cosmoss.org/>; Lang et al., 2018) を対象に BLASTP 検索 (Altschul et al., 1997) を行い、Pp3c16_14810V3.1 のアミノ酸配列を取得した。同様に、PHYPADRAFT_125421 のアミノ酸配列から、Pp3c27_2730V3.1 のアミノ酸配列を取得した。Pp3c16_14810V3.1 を PHK1、Pp3c27_2730V3.1 を PHK2 とそれぞれ名付けた。Pp3c16_14810V3.1 と Pp3c27_2730V3.1 のアノテーションされた発現配列タグに基づいて非翻訳領域にプライマー (PHK1 用: PHK1-5'UTR-F2 と PHK1-3'UTR-R2、PHK2 用: PHK2_5'UTR-Fw と PHK2_3'UTR-Rv) を設計し、それぞれのコード領域を含む cDNA 断片を PCR (Polymerase Chain Reaction) 増幅した。増幅断片の塩基配列を決定し、予測されたそれぞれのコード領域の配列と一致することを確認した。cDNA 増幅に用いた鋳型は、次のように合成した。BCDAT 培地上で 4 日間生育させた原糸体 100 mg を回収し、液体窒素中で破碎した。NucleoSpin RNA Plant (MACHEREY- NAGEL、デュレン市、ドイツ) を用いて全 RNA を抽出し、ReverTra Ace (東洋紡、大阪市) によって逆転写した。使用したプライマーを表 2 に示す。

系統解析

PHK1 のアミノ酸配列をクエリーとして用いて、各生物種のデータベースに対して BLASTP 検索 (Altschul et al., 1997) を行った。使用したデータベースは、ヒメツリガネゴケ: COSMOSS (<http://www.cosmoss.org/>)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*): TAIE10 (<https://www.arabidopsis.org/>); イネ (*Oryza sativa*): IRGSP-1.0 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>); イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*)、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*)、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)、プラシノ藻 (*Ostreococcus tauri*) : Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) ; シャジクモ (*Klebsormidium nitens*) : NIES-2285 genome project (http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/)。検索により得られたアミノ酸配列を Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) を用いてドメイン検索し、PAS, HisKA, HATPase, REC のアミノ酸配列を抽出して、それらを連結させたアミノ酸配列を作成した。編集したアミノ酸配列を ClustalW (Higgins and Sharp, 1988) で多重整列し、最尤法により系統樹を作成した。系統樹は MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets) (Kumar, 2015) により描画した。

PHK1/PHK2 の PAS ドメインのアミノ酸配列をクエリーに用いて、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のタンパク質データベースに対して BLASTP 検索 (Altschul et al., 1997) を行なった。検索により得られたアミノ酸配列を Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) を用いてドメイン検索し、PAS ドメインのみを ClustalW

(Higgins and Sharp, 1988) で多重整列し、最尤法により系統樹を作成した。系統樹は MEGA7 (Kumar, 2015) により描画した。

遺伝子破壊用プラスミドの構築

遺伝子破壊用プラスミドは、野本友司博士（名古屋大学）から分与していただいた。以下に簡潔な構造を示す。

PHK1 上流 1 kb のゲノム配列と下流 1.5 kb のゲノム配列を PCR 増幅し、pTN182（基礎生物学研究所・長谷部研究室から分与）の 5'末端側と 3'末端側のマルチクローニングサイトにそれぞれクローニングした。これを pTN182_phk1 とした。
PHK2 上流 1 kb のゲノム配列と下流 1.5 kb のゲノム配列を PCR 増幅し、pTN188（基礎生物学研究所・長谷部研究室から分与）の 5'末端側と 3'末端側のマルチクローニングサイトにそれぞれクローニングした。これを pTN186_phk2 とした。
pTN182_phk1 と pTN186_phk2 をそれぞれ *KpnI-BamHI* と *ApaI-BamHI* で切断し、形質転換に用いた。詳細な構築方法は、龍らに示した (Ryo et al., 2018a)。プライマーの配列を表 2 に示す。

ヒメツリガネゴケの形質転換

PHK1 遺伝子破壊株 (*phk1-13* と *phk1-22*) は、野本友司博士（名古屋大学）から分与していただいた。ヒメツリガネゴケの形質転換は、岡田らの方法に従い、次のように行った (Okada et al., 2009)。

BCDAT 培地で 4 日間生育した原系体を 2% ドリセラーゼ溶液（協和発酵キリン、東京都）中で懸濁させ、プロトプラスト化した。プロトプラストを孔径 50 μm

のナイロンメッシュで濾過し、8%マンニトール溶液で3回洗浄した。洗浄したプロトプラストを 1.6×10^6 cells ml⁻¹ となるように MMM 溶液 (8.3% (w/v) マンニトール, 0.1% (w/v) MES-KOH (pH 5.6) , 15 mM MgCl₂) 中で懸濁させた。プロトプラスト溶液 300 μ l に 30 μ l の DNA 溶液 (1 μ g/ μ l) を加え、PEG/T 溶液 (28.5% PEG4000, 7.2% (w/v) マンニトール, 0.1 M CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) 中で懸濁させ、45 °C で 5 分間、20 °C で 10 分間保温した。プロトプラスト溶液を 8 ml のプロトプラスト液体培地 (5 mM Ca (NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 45 μ M FeSO₄, 0.18 mM KH₂PO₄ (pH 6.5), the alternative TES, 5 mM 酒石酸アンモニウム, 6.6% (w/v) マンニトール, 0.5% (w/v) グルコース)) で段階的に希釈し、25 °C・暗条件で 1 日培養した。プロトプラストを 8 ml のプロトプラスト再生培地 PRM/T (BCD 培地に 5 mM 酒石酸アンモニウム, 10 mM CaCl₂, 0.8% (w/v) アガー, 8% (w/v) マンニトールを添加した) 中で懸濁させ、セロハンを敷いた PRM/B 培地 (BCD 培地に 5 mM 酒石酸アンモニウム, 10 mM CaCl₂, 0.8% (w/v) アガー, 6% (w/v) マンニトールを添加したもの) にまいた。LL で 3 日間培養し、再生したプロトプラストを選択培地 (BCDAT 培地に 30 mg liter⁻¹ の hygromycin B (富士フィルム和光純薬、大坂市) と 20 mg liter⁻¹ の G-418 (富士フィルム和光純薬) のどちらかあるいは両方を添加したものに植え替えた。2 週間培養し、生き残ったコロニーを新しい BCDATG 培地に植え替えた。1 週間培養した後、コロニーを新しい選択培地に植え替え、さらに 2 週間培養し、生き残ったコロニーを形質転換候補株として取得した。培地の詳細な組成は表 1 に示す。

ゲノム DNA の組換えの確認は、ゲノム PCR によって行った (PHK1 用: (PHK1 genomic Fw1 と Pmcv-R) , (nptII genomic Fw2 と PHK1 genomic Rv1.2) , (PHK1

RT-PCR Fw と PHK1 genomic Rv1.2), *PHK2* 用: (PHK2 genomic Fw1 と Pmcv-R), (aph4 genomic Fw2 と PHK2 genomic Rv1), (PHK2 RT-PCR Fw と PHK2 genomic Rv1))。遺伝子破壊の確認は RT-PCR によって行い (*PHK1* 用: (PHK1 RT-PCR Fw と PHK1 RT-PCR Rv), *PHK2* 用: (PHK2 RT-PCR Fw と PHK2 RT-PCR Rv))、その際アクチン (PpAct3U1 と PpAct3D1) をポジティブコントロールとして用いた (Ichikawa et al., 2004)。プライマーの配列を表 2 に示す。

サザンブロッティング

全ゲノム DNA を CTAB 法 (岡田, 2010) によって抽出した。1 μ g の全ゲノム DNA を *Afl*III 処理 (37 °C、16- 18 時間) で断片化し、1% アガロースゲル (アガロース LE (低電気浸透度品)、富士フィルム和光純薬) を用いて電気泳動 (50 V、60 分) によって分離した。ゲルをアルカリ変性液中で 45 分間振とうし、続いて中和液中に移して 45 分間振とうした。20 \times SSC (表 1) を入れたバットにガラス板を乗せ、濾紙 (Chromatography Paper 3MM CHR、GE ヘルスケア・ジャパン、日野市) が 20 \times SSC に浸かるようにガラス板の上に敷いた。ゲルを濾紙の上に裏表を反転しておき、ゲルと同じ大きさのナイロンメンブレン (Hybond N+, GE ヘルスケア・ジャパン) を純水と 10 \times SSC に順次湿らせた後にゲルの上に敷いた。同じ大きさの濾紙を 2 \times SSC で湿らせて、2 枚重ねてナイロンメンブレンの上に乘せた。その上にペーパータオルひと束、ガラス板、重りを順番に乗せ、12 時間以上転写した。ゲルからメンブレンを剥がし、2 \times SSC で洗浄し、濾紙の上で乾燥させた。メンブレンを 2 枚の濾紙で挟み、80 °C で 90 分間熱し、DNA をメンブレンに架橋固定した。メンブレンはハイブリダイゼーションを行

うまで、暗所に保存した。試薬の詳細な組成は表 1 に示す。

プローブの標識とハイブリダイゼーションは AlkPhos Direct Labelling Module (GE ヘルスケア・ジャパン) を用い、付属のマニュアルに基づいて行った。標識プローブは pTN182 を鋳型に用いて PCR 増幅 (プライマー: 35S-PA-F と 35S-PA-R (表 2); (Katsumata et al., 2011)) して得られた 561 bp の DNA 断片を標識して作製した。メンブレンをハイブリダイゼーションバッファーに浸し、標識プローブを加えて 55 °C で 12 時間以上ハイブリダイゼーションを行なった。55 °C の一次洗浄バッファー中で 2 回洗浄し、続いて二次洗浄バッファー中で 2 回洗浄した。メンブレンに CDP-Star Detection Reagent (GE ヘルスケア・ジャパン) を添加し、X 線フィルム (Hyperfilm ECL、GE ヘルスケア・ジャパン) に感光させ、シグナルを検出した。試薬の詳細な組成は表 1 に示す。

ヒメツリガネゴケの観察

茎葉体を観察するため、原糸体を BCDAT 培地上で 3 日間生育させ、直径 1 mm ほどの組織片を取り、これを新しい BCDAT 培地に植えた。これを LD または SD で 2 週間から 4 週間培養した。カウロネマ細胞を観察するため、直径 1 mm ほどの組織片を取り、これを BCD 培地に植えた。これに側面から弱い赤色光 ($\sim 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) を 10 日間照射し、その後、白色光 ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)、赤色光 ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)、青色光 ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) のいずれかの光の下で 2 日間培養した。光源には赤色発光ダイオード (LT20R、ビームテック、川口市) と青色発光ダイオード (LT20B、ビームテック) を用いた。細胞の観察には実体顕微鏡 (SZX16、オリンパス、東京都) で行い、デジタルカメラ (DP21、オリンパス) で写真を

撮影した。コロニーの直径や茎の長さは、ImageJ (<https://imagej.nih.gov>) を用いて測定した。

冠水条件での組織観察のためには、上述のように組織片を BCDAT 培地に植えつけ、1 週間培養した。その後、プレートに滅菌水を 30 ml 程度加え、組織片を完全に水没させた状態で 3 週間培養した。

低酸素条件では、上述のように組織片を植えつけた BCDAT 培地プレートをアネロパック用角形ジャー標準型（三菱ガス化学、東京都）に入れ、酸素吸着剤のアネロパック・微好気（三菱ガス化学）を用いて酸素濃度を 6~12%、二酸化炭素濃度を 5~8% に調整し、3 週間培養した。

定量 PCR

LD または SD で 2 週間以上培養した原系体を新しい BCDAT 培地上にまきなおし、同じ条件でさらに 4 日間培養して、全 RNA を抽出した。1 μ g の全 RNA を逆転写し、10 倍に希釈した cDNA（100 ng 当量）を鋳型として用いた。定量 PCR は Fast SYBR Green Master Mix（Thermo Fisher Scientific、ウォルサム市、マサチューセッツ州）を用いて行なった。使用したプライマーを次に示す。*PHK1* 用： *PHK1_qPCR_Fw* と *PHK1_qPCR_Rv*; *PHK2* 用： *PHK2_qPCR_Fw* と *PHK2_qPCR_Rv*; *APB1* 用： *PpAPB1GSP-F1* と *PpAPB1GSP-R1*; *APB2* 用： *PpAPB2GSP-F1* と *PpAPB2GSP-R1*; *APB3* 用： *PpAPB3GSP-F1* と *PpAPB3GSP-R1*; *APB4* 用： *PpAPB4GSP-F3* と *PpAPB4GSP-R3*; *PpTUA1* 用： *PpTUA1F* と *PpTUA1R*（Aoyama et al., 2012）。プライマーの配列を表 2 に示す。

試薬など

酵素類はタカラバイオ（草津市）、東洋紡、New England Biolabs Japan（東京都）、Promega（Madison）から購入した。その他の一般試薬類は富士フィルム和光純薬から購入した。デオキシオリゴヌクレオチドは FASMAC（厚木市）から購入した。寒天培地は、ヒメツリガネゴケの培養にはシグマアルドリッチジャパン（東京都）の寒天（A9799）を、大腸菌の培養には日本ベクトン・ディッキンソン（東京都）の Bacto Agar（214010）を用いて作製した。

結果

PHK1 と PHK2 のクローニング

石田らは、COSMOSS version 1.1 (Rensing et al., 2008) から 2 つの PAS-HK のアミノ酸配列を見出した (Ishida et al., 2011) 。そのうちの 1 つ (National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence : XP_001754744.1) は 2 つの PAS ドメインを持ち、もう一方 (XP_001762415.1) は PAS ドメインを 1 つしか持っていなかった (Ishida et al., 2010) 。これらのアミノ酸配列をクエリーにして最新版のデータベース (COSMOSS version 3.1; Lang et al., 2018) に対して BLASTP 検索 (Altschul et al., 1997) を行った結果、2 つの予測コード領域配列、Pp3c16_14810V3.1 (XP_001754744.1 に相当) と Pp3c27_2730BV3.1 (XP_001762415.1 に相当) を見出した。RT-PCR によりこれらの実際のコード領域の配列を増幅し、塩基配列を決定した。その結果、どちらも PAS ドメインを 2 つ持つタンパク質をコードすることがわかった (図 4) 。Pp3c16_14810V3.1 の cDNA を *PHK1* (*PAS-containing Histidine Kinase 1*; DDBJ アクセッション番号: LC325738) 、 Pp3c27_2730V3.1 の cDNA を *PHK2* (DDBJ アクセッション番号: LC325739) と名付けた。これらがコードするタンパク質である PHK1 と PHK2 のアミノ酸配列は 84% 一致し、ドメイン構造も同一だった (図 4) 。すなわち、N 末端側から順に 2 つの PAS ドメイン (N 末側から PAS A, PAS B とする (Möglich et al., 2009)) 、ヒスチジンキナーゼドメイン (HisKA) 、ヒスチジンキナーゼ様 ATPase ドメイン (HATPase_C) 、レシーバードメイン (REC) を持つ (図 4) 。どちらのタンパク質においても、HisKA と REC は TCS 因子として機能するため

に不可欠なアミノ酸残基、すなわち自己リン酸化の基質となる HisKA のヒスチジン残基と、リン酸転移に関わる REC のアスパラギン酸-アスパラギン酸-ロイシン残基 (DDK モチーフ; Ueguchi et al., 2001) が保存されていた (図 4)。

PHK と PHK が持つ PAS ドメインの系統解析

PHK1 と PHK2 のホモログを探すため、それぞれの全長アミノ酸配列をクエリーとして用い、各生物種のデータベースに対して BLASTP 検索 (Altschul et al., 1997) を行った (使用したデータベースは「材料と方法」の系統解析の項を参照) 。その結果、イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) からホモログ (405045) を 1 つ見出した (E 値: 1.3E-158 (PHK1) ; 5.7E-159 (PHK2)) 。逆に 405045 のアミノ酸配列をクエリーとして用いて BLASTP 検索 (Altschul et al., 1997) を行なった結果、PHK2 と PHK1 が最も相同性の高い因子としてヒットした。したがって、405045 と PHK1/PHK2 は極めて近縁な因子であると考えられた。さらに、PHK1/PHK2 をクエリーとした場合、405045 ほど相同性は高くないが、シアノバクテリアを含むいくつかの原核生物のグループに多数のヒットが認められた。これらの原核生物の配列は、ドメイン構造が PHK に似ており、HK 領域の上流に 1 つ以上の PAS ドメインを持っていた。さらに、Phytozome version 12 を対象に BLASTP 検索を行い、2 種のコケ植物 (蘚類のミズゴケ (*Sphagnum fallax*) と苔類のゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*)) からホモログをそれぞれ 1 つずつ見出した。さらに、車軸藻類の一種 *Klebsormidium nitens* のデータベース (*K. nitens* NIES-2285 genome project (version 1.0)) から 5 つのホモログを見出した。これらの配列は、ミズゴケの配列 (Sphfalx0047s0109.1) を除いて、PHK1/PHK2 とド

メイン構造 (PAS-PAS-HisKA-HATPase_C-REC) が一致した。ミズゴケの配列 (Sphfalx0047s0109.1) は HisKA が欠けており、不完全なものと考えられたが、同じ遺伝子座に HisKA のみの別の配列 (Sphfalx0047s0109.2) も登録されていた。したがって、両者はスプライスバリエントであり、ミズゴケには PHK1/PHK2 と同様のドメイン構造を持つ配列が存在すると推測された。他にも、緑藻 (*Ostreococcus tauri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Coccomyxa subellipsoidea*) にも同様のドメイン構造を持つ配列が見つかった。これらの配列の PAS ドメインは LOV (Light-Oxygen-Voltage) ドメインに分類されていた (Douani-Tahri et al., 2011; Vogt and Schippers, 2015)。PAS ドメインはその機能や配列の違いに応じてさらに細かく分類され、LOV ドメインは青色光受容ドメインとして知られている (Vogt and Schippers, 2015)。さらに、oneKP (Johnson et al., 2012; Matasci et al., 2014; Wickett et al., 2014; Xie et al., 2014) において、2つのツノゴケ (*Megaceros tosanus* と *Paraphymatoceros hallii*) からそれぞれ1つずつ PHK のホモログを見出した。一方で、被子植物と裸子植物からは、oneKP を含む様々なデータベースを使って検索したが、PAS-HK のホモログを見出すことができなかった。

上述した PHK のホモログの配列を用いて系統樹を作成した (図 5)。この系統樹では、PHK1/PHK2 とミズゴケ (SfPHK) がクラスターを形成した (図 5)。イヌカタヒバ (SmPHK)、ゼニゴケ (Mp0082)、車軸藻 (kf00624) の配列がクラスター化し、蘚類の配列から成るクラスターの姉妹群となった (図 5)。一方で、車軸藻の一部の配列は、Kf00624 と異なるクラスターを形成した (図 5)。このホモログ群は、kf00024 と PHK1/PHK2 が分岐するよりも以前に車軸藻の系

統で分岐したグループであると推測される。

続いて、様々な PAS タンパク質の配列を用いて系統樹を作成した (図 6) 。 PAS タンパク質の配列として、(1) 緑色植物の PAS (LOV) -HK タンパク質、 (2) シロイヌナズナの PAS タンパク質、 (3) バクテリオフィトクロム、 (4) PHK1/PHK2 のアミノ酸配列をクエリーとして用いて NCBI のタンパク質データベースに BLASTP 検索を行い、ヒットしたバクテリアの PAS タンパク質、 (5) リガンドが既知のバクテリア PAS タンパク質を用いた。PHK1/PHK2、イヌカタヒバ、ミズゴケの PHK ホモログは図 5 と同様にクラスターを形成した (図 6) 。シロイヌナズナの PAS タンパク質は、それらの生理機能の違いを反映した複数のクラスターに別れた (Vogt and Schippers, 2015) 。PHK1/PHK2 とそのホモログは、シロイヌナズナのどのクラスターにも属さなかった (図 6) 。また、緑藻の LOV-HK は陸上植物の LOV ドメインに分類される PAS ドメインを持つタンパク質と同じクラスターに属し、PHK とはクラスター化しなかった (図 6) 。したがって、PHK1/PHK2 は、これらの既知の PAS ドメインを持つタンパク質グループとは異なる機能を持つ可能性が高いと考えられる。

PHK の発現解析

PHK1 と *PHK2* の発現を調べるため、逆転写 PCR (RT-PCR) と定量 PCR を行った。まず、原糸体と茎葉体から全 RNA を抽出し、RT-PCR により *PHK1* と *PHK2* の増幅を試みたところ、どちらの組織でも *PHK1* と *PHK2* の発現が認められた (図 7) 。さらに、原糸体組織から全 RNA を抽出し、*PHK1* と *PHK2* の発現レベルの変化を定量 PCR により調べた。原糸体を長日条件 (LD: 16 時間明期/8 時

間暗期) または短日条件 (SD: 8 時間明/16 時間暗期) で培養し、それぞれ明期開始後 0 時間目と 8 時間目に細胞を回収して全 RNA を抽出して、定量 PCR を行なった。その結果、どちらの遺伝子も日長条件に関わらず、8 時間目で発現が低下することがわかった (図 7) 。したがって、*PHK1* と *PHK2* の発現は光で抑制されることが示唆された。

PHK 破壊株の作出

逆遺伝学的な解析を行うため、*PHK1* と *PHK2* それぞれの遺伝子座を薬剤耐性遺伝子カセットと入れ替え、*PHK1* と *PHK2* のそれぞれの単独破壊株と *PHK1 PHK2* 二重破壊株を作出した (図 8) 。*PHK1 PHK2* 二重破壊株は *PHK1* の単独破壊株 (*phk1-13*) の *PHK2* 遺伝子を破壊して作出した。それぞれの株で 2 つの独立なラインを単離し (*PHK1* 単独破壊株: *phk1-13* と *phk1-22*; *PHK2* 単独破壊株: *phk2-26* と *phk2-44*; *PHK1 PHK2* 二重破壊株: *phk1 phk2-7* と *phk1 phk2-20*) 、ゲノム PCR で標的部位に相同組換えが起こったことを確認した (図 8C-5J) 。さらに RT-PCR を行い、破壊した遺伝子の転写産物が発現していないことを確認した (図 8K-5M) 。サザンブロットィング解析により、*phk1-22*、*phk2-26*、*phk2-44* のゲノムに薬剤耐性カセットがそれぞれ一つずつ挿入されたことを確認した (図 8 N) 。*phk1-13* の *PHK2* を破壊して作出した *phk1 phk2-7* と *phk1 phk2-20* はバンドが 3 本確認され、*PHK2* の遺伝子座に薬剤耐性遺伝子カセットが一つずつ挿入されたことが確認された (図 8O) 。

PHK 破壊株では茎葉体形成が早くなる

PHK1 と *PHK2* の遺伝子破壊の影響を調べるため、野生株 (WT) と *PHK* 破壊株の茎葉体形成を比較した (図 9)。直径 1 mm ほどの原糸体コロニーを BCDAT 培地上で 4 週間生育させ、形成された茎葉体の数を数えた。まず、LD と SD における茎葉体の形成数を比較した (図 9A-D)。SD においては、最初の 2 週間では全ての株でわずかな茎葉体しか発生しなかったが、4 週間後には、全ての *PHK* 破壊株は WT より多くの茎葉体を形成した (図 9A, B)。一方 LD では、最初の 2 週間の時点で全ての *PHK* 破壊株は WT より多くの茎葉体を形成したが、4 週間後では差がなくなっていた (図 9C, D)。中日条件 (12 時間明/12 時間暗 (ND)) で生育させた結果、全ての *PHK* 破壊株は WT より多くの茎葉体を発生させた (図 10G, H)。また、各破壊株の 2 つの独立なラインは、それぞれ同様の表現型を示した (図 10A- H; Ryo et al., 2018a)。この培養期間内における原糸体コロニーの拡大率は、SD と LD のどちらの条件でも WT と *PHK* 破壊株の間で差がみられなかった (図 9E-M)。これらの結果から、*PHK1* と *PHK2* は茎葉体の発生を抑制し、茎葉体発生のタイミングを遅らせることが示唆された。なお、LD では 4 週間後に形成される茎葉体の数は、各株の間で変わらなかった (図 9D)。これと同様に、LL で 4 週間生育させた場合においても、WT と全ての *PHK* 破壊株の間に差はみられなかった (図 10E, F)。WT を十分生育させることで、*PHK* 破壊株とほぼ同数の茎葉体が形成されることが考えられる。したがって、*PHK1* と *PHK2* は茎葉体の発生を遅らせるが、最終的に形成される茎葉体の総数には影響しないことが示された。さらに、日長によらず *PHK* 破壊株が多く茎葉体を形成したため、*PHK1* と *PHK2* は光周性の制御には関与しないことが

示唆された（図 9, 10）。

茎葉体の形態を比較するため、4 週間後の茎葉体の葉の枚数と茎の長さを調べた（図 11）。SD において、全ての *PHK* 破壊株の茎葉体は、WT より葉の数が多く、茎が長かった（図 11A, C）。すなわち、*PHK* 破壊株の茎葉体は WT より大きかった。LD において、全ての *PHK* 破壊株の茎葉体は WT より葉の数が多く、特に *PHK2* 破壊株で顕著に増加した（図 11B）。茎の長さは *PHK2* 破壊株のみ WT より長く、*PHK1* 単独破壊株と *PHK1 PHK2* の二重破壊株では WT と差がなかった（図 11D）。SD と LD のどちらにおいても、茎 1 mm に対する葉の枚数には差がみられなかった（図 11E, F）。なお、各 *PHK* 破壊株の 2 つの独立なラインは互いに同様の表現型を示すことを確認した（Ryo et al., 2018a）。以上の結果から、*PHK1* と *PHK2* の破壊は茎葉体の形態形成に関与しないと考えられる。

PHK 破壊株ではカウロネマ細胞の分岐が早くなる

茎葉体は次のように発生する：（1）クロロネマ頂端細胞がカウロネマ細胞に分化する；（2）カウロネマ細胞からカウロネマ側枝始原細胞が発生する；（3）カウロネマ側枝始原細胞の一部が芽に分化する；（4）芽が茎葉体へと発生する（図 3）（Cove and Knight, 1993, 日渡ら、2000, Cove, 2005）。*PHK1/PHK2* が茎葉体発生の際の過程を制御しているか調べるため、まず、*PHK1 PHK2* 二重破壊株におけるカウロネマ側枝始原細胞の発生（過程 2）を調べた（図 12）。カウロネマ側枝始原細胞の発生は弱赤色光で抑制される（Uenaka et al., 2000）。そこで、原糸体組織に弱赤色光（ $\sim 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ）を 10 日間横から与えた後、白色光（ $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ）、青色光（ $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ）、赤色光（ $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ）の

いずれかの下で2日間培養し、カウロネマ側枝始原細胞を誘導した(Kadota et al., 2000; Okano et al., 2009; Aoyama et al., 2012)。10日間の弱赤色光によって、カウロネマ側枝始原細胞の発生が抑制されることを確認した(WT: n = 13, *phk1*-13: n = 8, *phk2*-44: n = 10, *phk1 phk2*-20: n = 19)。2日間光を照射してカウロネマ側枝始原細胞を誘導し、カウロネマ頂端細胞から6細胞(頂端細胞は分岐しないので除く)についたカウロネマ側枝始原細胞を数えた。白色光下と赤色光下において、*PHK*二重破壊株はWTより多くのカウロネマ側枝始原細胞を発生させたが、青色光下では株間で差はみられなかった(図12)。また、*PHK1*と*PHK2*の単独破壊株においても白色光下で同様の結果が観察された(表4)。これらの結果から、*PHK1*と*PHK2*は、赤色光によるカウロネマ側枝始原細胞の誘導を抑制することがわかった。

次に、*PHK1/PHK2*が芽の発生(過程3)を制御するかどうか検討した。カウロネマ側枝始原細胞の誘導後、3日間または4日間白色光を照射し、コロニーにできる芽の数を比較したが、結果に再現性がみられなかった(図13)。この理由の一つとして、芽の発生のタイミングの細胞間の同調が弱くなっている可能性が考えられる。

APB 遺伝子群の発現

青山らは、AP2型転写因子をコードする*APB*遺伝子群(*APB1-4*)が茎葉体形成を促進することを示した(Aoyama et al., 2012)。*APB*遺伝子群はシロイヌナズナの*AINTEGUMENTA*, *PLETHORA* and *BABY BOOM* (*APB*)遺伝子のオーソログ(Shigyo et al., 2006)であり、オーキシンに誘導され、茎葉体頂端細胞の発生

を誘導する (Aoyama et al., 2012)。 *PHK1* と *PHK2* は *APB* 遺伝子群を介して茎葉体の発生を制御する可能性があると考えられたため、 *PHK* 二重破壊株における *APB* 遺伝子の発現を調べた。定量 PCR の結果、 *PHK* 二重破壊株の *APB2* と *APB3* の mRNA 蓄積レベルが WT よりわずかに高くなった (図 14)。この結果から、 *PHK1* と *PHK2* の両方あるいはどちらかが、 *APB2* と *APB3* の発現を弱く抑制することがわかった。したがって、 *APB2* と *APB3* は *PHK1/PHK2* がリン酸を転移する RR の標的遺伝子であり、これらの転写調節活性を通じて、茎葉体の発生が制御されている可能性が示唆された。

冠水条件と低酸素条件では *PHK* 破壊株の茎葉体形成は抑制される

系統解析から、 *PHK* ホモログは車軸藻、コケ植物、小葉類に保存されていることがわかった (図 5)。コケ植物や小葉類は陸上で生活しているが、体のサイズが小さいため、大雨などによる冠水の影響を受けやすい。車軸藻は反対に、水から出て大気中に晒されてしまうことがある。また、これらの植物は、有性生殖に体外の水を必要とすることが知られている。すなわち、 *PHK* を持つ植物は、その生活環の一定期間において、生育する場所における水の環境が大きく変動する可能性がある。したがって、 *PHK* は冠水条件と非冠水の好気条件が転換するような環境においても何らかの役割を持つと考えられた。そこで、各 *PHK* 破壊株を水没させ (冠水条件)、WT と生育・発生を比較することで、 *PHK* が冠水条件で機能を持つかどうか調べた。日長条件は、好気条件における WT と *PHK* 破壊株の表現型の差が大きかった SD と、差が少なかった LL を検討した。各株を好気条件で 1 週間生育した後、冠水条件でさらに 3 週間生育した。LL の

冠水条件において、各 *PHK* 単独破壊株と WT の茎葉体数の間に統計的に差はなかったが、*PHK* 二重破壊株のみ茎葉体の数が WT の半数ほどまで減少した（図 15I, K）。SD の冠水条件では WT は好気条件と変わらない数の茎葉体を発生させたが、その一方で、各 *PHK* 破壊株は茎葉体をわずかにしか作れなかった（図 15J, L）。4 週間好気条件で培養した場合は、LL と SD のどちらも図 9 と図 10 の結果と一致していた。すなわち、LL では株間で茎葉体数に統計的な差はないが、SD では *PHK* 破壊株の茎葉体形成が促進されていた（図 9, 10）。これらの結果から、冠水条件においては、好気条件と対照的に、*PHK1/PHK2* は茎葉体形成を促進することがわかった。

一般的に、好気条件では酸素濃度は約 20% (200,000 ppm) であるのに対し、水中の溶存酸素濃度は 10 ppm 未満であると言われている（テイツら、2017）。したがって、冠水条件では、植物は低酸素ストレスに晒される。*PHK1/PHK2* が酸素のシグナリングに関与するかどうか調べるため、WT と *PHK* 破壊株を低酸素条件（酸素濃度 6~12%、二酸化炭素濃度 5~8%）で 3 週間培養し、生育を比較した。日長条件は、冠水条件と同様に LL と SD で比較した。LL の低酸素条件において、各 *PHK* 単独破壊株と WT の茎葉体数の間に統計的に差はなかったが、*PHK* 二重破壊株のみにおいて茎葉体の数が WT の半数ほどまで減少した（図 16I, K）。SD の低酸素条件では全ての株で茎葉体ができなかった（図 16J, L）。3 週間好気条件で培養した場合は、LL と SD のどちらにおいても、*PHK* 破壊株は WT より多くの茎葉体を形成した（図 16I-L）。この結果は図 9 の結果と整合する。これらの結果から、*PHK1/PHK2* は好気条件とは対照的に、低酸素条件においては茎葉体形成を促進することがわかった。したがって、*PHK1/PHK2* は茎葉

体形成の促進または抑制という、逆方向の制御機能のどちらかを酸素濃度に応じて示すことがわかった。

考察

PHK1 と PHK2 の機能についての解析

PHK1 と PHK2 は、茎葉体の発生の遅延と、赤色光によるカウロネマ側枝始原細胞誘導の抑制に関わることを示した (図 9, 10, 12, 表 4)。さらに、PHK1/PHK2 は、冠水条件と人工的な低酸素条件では好気条件と対照的に、茎葉体の発生を促進することを示した (図 15, 16)。これらの結果から、PHK1/PHK2 は酸素濃度を指標に冠水条件かどうかを判断し、茎葉体の発生を制御すると考えられる。

図 9 と図 10 の結果から、PHK1/PHK2 は好気条件下において茎葉体が発生するタイミングを遅らせるが、最終的に発生させる茎葉体の数に影響しないと考えられた。*PHK* 破壊株で茎葉体が発生するタイミングが早くなる原因として、次の 4 つの現象のうちの一つ、あるいはいくつかが起きている可能性が考えられる: (1) クロロネマ細胞からカウロネマ細胞への分化が促進される; (2) カウロネマ細胞からカウロネマ側枝始原細胞が分化するタイミングが早くなる; (3) カウロネマ側枝始原細胞が芽に分化する確率が高くなる; (4) 茎葉体頂端細胞の分裂が速くなる。

カウロネマ細胞はクロロネマ細胞よりも成長が速いが (Kofuji and Hasebe, 2014)、図 9E-M から PHK1/PHK2 は原糸体組織の発生速度に関与しないと考えられた。したがって、(1) の可能性は低いと考えられる。(2) の「カウロネマ側枝始原細胞の分化」は、青色光に強く、赤色光に弱く誘導され、白色光は両者の中間の効果を示す (Imaizumi et al., 2002; Uenaka et al., 2005)。図 12 から PHK1/PHK2 は、カウロネマ側枝始原細胞の分岐を誘導する赤色光のシグナル伝達経路に関

与し、その効果を抑制することがわかる。したがって、*PHK* 破壊株では赤色光によるカウロネマ細胞の分岐誘導が早くなることで、茎葉体が発生するタイミングが早くなると考えられる。続いて (3) の「芽に分化する確率」について検証を試みたが、結果に再現性が見られなかった (図 13)。本試験では、弱赤色光でカウロネマ細胞の分岐を抑制したのち、白色光を 3~4 日照射してカウロネマ側枝始原細胞および芽の分化を誘導した。カウロネマ細胞の分化・発生は光がついた時点で一齐に始まり、各細胞間で同調していると考えられる。しかし、数日間明条件で生育されたことで細胞間の同調が崩れ、このせいで再現性が取れなくなったと推測される。(4) の茎葉体頂端細胞の分裂速度については未検証であるため、今後の解析が必要である。

PHK 破壊株では、茎葉体の発生を制御する遺伝子の発現量が WT とは異なっていると考えられる。青山らは、*APB* 遺伝子群が茎葉体頂端細胞の分化を促進し、茎葉体形成を正に制御することを示した (Aoyama et al., 2012)。そこで、*PHK1/PHK2* が *APB* を通じて茎葉体の発生を抑制する可能性を念頭に置き、*PHK1/PHK2* が *APB* を制御するかどうか検証した。その結果、*PHK1* と *PHK2* のどちらか、あるいは両方が *APB2* と *APB3* の発現を弱く抑制すると考えられた (図 14)。したがって、*PHK1/PHK2* は *APB2/APB3* の制御を通じて茎葉体の発生を抑制する可能性がある。*PHK* 破壊株における茎葉体数やカウロネマ側枝始原細胞の増加は非常に大きい、その一方で、*APB2/APB3* の発現量の上昇はわずかだった (図 9, 12, 14)。したがって、*PHK1/PHK2* による茎葉体形成の制御において、*APB* の貢献はあったとしても部分的であると考えられる。また、*APB* は、カウロネマ側枝始原細胞の発生には関与せず、カウロネマ側枝始原細胞から茎

葉体頂端細胞への分化を促進し、茎葉体形成を誘導すると考えられている (Aoyama et al., 2012)。PHK1/PHK2 は、図 12 からカウロネマ細胞からカウロネマ側枝始原細胞への分化を抑制すると考えられるため、*APB* とは異なる茎葉体形成の制御経路を構成することが示唆された。

図 15 から、PHK1/PHK2 は冠水条件において茎葉体形成を促進すると考えられた。SD では明期が短いため、光合成によって十分な糖の合成と酸素の生成ができず、そのために茎葉体の数が少なくなったと推測される。図 16 から、PHK1/PHK2 は人工的な低酸素条件においても茎葉体形成を促進すると考えられた。そのため、PHK1/PHK2 は冠水条件において、酸素濃度をシグナルとして利用し、茎葉体の発生を制御していると考えられる。

HK はダイマーとして機能することが知られている (山篠と水野, 2009)。好気条件において、それぞれの *PHK* 破壊株は WT より有意に多い茎葉体を形成し、各 *PHK* 単独破壊株と二重破壊株の間に統計的な差はなかった (図 9, 10)。したがって、PHK1/PHK2 は発現レベルや活性が互いに依存しているか、それぞれ異なる機能を持つか、のどちらかであると推測される。一方で、図 15I, K と図 16I, K の結果から、冠水条件と低酸素条件下においては、PHK1 と PHK2 はそれぞれの機能を相補しながら茎葉体形成を促進していると考えられた。しかし、冠水条件の SD では、好気条件と同様に、それぞれの *PHK* 破壊株は WT より有意に多い茎葉体を形成し、各 *PHK* 単独破壊株と二重破壊株の間に統計的な差はなく、やはり PHK1 と PHK2 は互いに相互作用するか、それぞれ異なる機能を持つことが示唆された (図 15J, L)。冠水条件と低酸素条件において矛盾した結果が得られた理由はわからないが、明暗条件に依存して PHK1/PHK2 のダイマー形成な

どの相互作用が制御されている可能性がある。この可能性を検証するため、現在酵母2ハイブリッド法を用いて PHK1/PHK2 の相互作用について解析が進められている（中井と佐藤、未発表）。

以上の結果から、PHK1/PHK2 は茎葉体形成を好気条件では遅延させ、その一方で冠水条件ではおそらく低酸素濃度を検知することによって促進させることが明らかになった（図 17）。コケ植物は、有性生殖の様式のうえで、冠水した環境と冠水していない環境のどちらにも適応する必要がある。そのため、冠水条件かどうか認識し、発生や生育を制御できる因子が必要だと考えられる。PHK1/PHK2 は酸素濃度を指標にして冠水条件かどうかを認識しているのだろう。

しかしながら、PHK1/PHK2 がどのように酸素濃度を認識し、下流の遺伝子発現を制御しているかはまだわからない。そのため、PHK1/PHK2 の生化学的な特徴を解明することは重要な課題である。原核生物の PAS-HK には、様々な補因子が結合することが知られている。例として、FixL はヘム b を、MmoS や NifL は FAD をそれぞれ結合する（Henry and Crosson, 2011）。PAS ドメインに結合する補因子を同定することで、PHK1/PHK2 の生化学的な機能を解明できると期待される。PHK1/PHK2 は FixL と同様に、酸素を認識する HK である可能性がある。

したがって、PHK1/PHK2 の PAS ドメインはヘムと結合する可能性が考えられる。ヘムはペルオキシダーゼと結合するため、ペルオキシダーゼ活性をテトラメチルベンジジンなどの色素前駆体の分解物の着色から検出することで、ヘムを定量することができる（Karlsen et al., 2008）。さらに、ピロニン Y などで標識したタンパク質をポリアクリルアミド電気泳動で分離し、色素を検出することで、ヘムと結合するタンパク質を検出することができる（Karlsen et al., 2008）。

図 12 から、PHK1/PHK2 は赤色光シグナリングに関与すると考えられた。赤色光によるカウロネマ側枝始原細胞の分化には PHY が関与すると考えられている (Uenaka et al., 2005)。PHY はフィトクロモビルンと結合する赤色光受容体で、PAS ドメインを 3 つ持ち、核に局在する (Vogt and Schippers, 2015)。後藤 (2018) は蛍光タンパク質と融合させた PHK2 を細胞に導入することで、PHK2 が核に局在する可能性を示した。したがって、PHK1/PHK2 と PHY は核内で PAS ドメインを介して相互作用する可能性がある。PHK1/PHK2 が PHY の赤色光シグナル伝達経路にどのように作用するかを解明することで、PHK1/PHK2 に関わる制御機構の一端を明らかにできると期待される。

PHK1/PHK2 が発生を制御する仕組みを明らかにするために、PHK1/PHK2 がリン酸を転移する HPt と RR を同定することが必要である。シロイヌナズナの AHP をクエリーに用いた BLAST 検索の結果、ヒメツリガネゴケは 3 つの HPt (HPt1-3) を持つことがわかった。さらに、酵母 2 ハイブリッド法により、PHK1 と PHK2 はそれぞれが HPt2 と結合することが示された (佐藤、未発表)。PHK1/PHK2 と HPt2 の結合を *in planta* で示す必要はあるが、PHK1/PHK2 は HPt2 にリン酸を転移すると考えてよいだろう。HPt2 と結合する RR を同定することで、PHK1/PHK2 の TCS 経路の全容を明らかにできる。これにより、酵母 1 ハイブリッド法などを用いて、RR が制御する遺伝子を直接探索することができる。他のアプローチとして、*PHK* 破壊株を用いて網羅的に遺伝子発現を解析することが考えられる。*PHK* 破壊株において発現レベルが変化した遺伝子は PHK1/PHK2 の制御を受けると言える。酵母 1 ハイブリッド法の結果と合わせることで、PHK1/PHK2 の TCS が制御する標的遺伝子を絞り込むことができる。標的遺伝子

を詳細に解析することで、PHK1/PHK2 から始まる TCS が発生を制御する仕組みを解明できると期待される。

PHK1/PHK2 とそのホモログの進化について

SfPHK はミズゴケで唯一の PHK ホモログであり、PHK1/PHK2 の姉妹群になった (図 5)。したがって、ミズゴケとヒメツリガネゴケが分岐した後にヒメツリガネゴケの系統で遺伝子重複が起こり、*PHK1/PHK2* が形成されたと考えられる。また、PHK1/PHK2 とそのホモログの PAS_A と PAS_B は、それぞれ異なるクラスターを形成した (図 6)。したがって、PHK の祖先遺伝子において PAS_A と PAS_B が分かれ、両者が揃って子孫に継承されたと考えられる。図 6 から、PHK1/PHK2 の PAS ドメインのクラスターには、シロイヌナズナや緑藻の PAS ドメインは属さないことがわかった。また、このクラスターの比較的近傍に原核生物の PAS タンパク質のクラスターがあることから、PHK1/PHK2 は原核生物の PAS-HK に近いと考えられた (図 6)。PAS-HK は原核生物では普遍的に見られ、多様化して様々な機能を担っている (Henry and Crosson, 2011)。PHK の起源を明らかにするためには、原核生物の PAS-HK の系統解析も重要な手がかりになると推測される。PHK1/PHK2 のホモログが緑藻にみつからないことを考慮すると、PHK1/PHK2 の起源は、車軸藻の祖先が水平伝播によって原核生物から獲得した PAS-HK である可能性が考えられる。あるいは、PAS-HK の PAS ドメインのみが緑藻で失われた可能性や、車軸藻の祖先が PAS ドメインのみを原核生物から獲得し、HK と組み合わせた可能性も考えられる。しかし、PHK1/PHK2 のアミノ酸配列を用いて BLAST 検索を行った結果、イヌカタヒバやミズゴケを

除き、原核生物の PAS-HK が上位にヒットし、この時に高い類似性が PAS ドメインのみならず HK 関連ドメインにも認められた。このことから、車軸藻の祖先が PAS-HK を丸ごと獲得し、その PAS-HK が PHK の祖先となった可能性が高いと考えられる。図 5 から、コケ植物と車軸藻の共通祖先が PAS-HK を獲得し、さらにこれを重複させており、そのうちの 하나가 PHK1/PHK2 の祖先遺伝子であるという可能性が考えられる。また、車軸藻の祖先が複数の PAS-HK を独立に獲得しており、そのうち 하나가 PHK1/PHK2 の祖先遺伝子であったという可能性も除外できない。これら 2 つの可能性のどちらが正しいか検証するためには、水平伝播のタイミングを明らかにする必要があると考えられる。

緑藻の PAS-HK の PAS ドメインは、さらに LOV ドメインに分類される。LOV ドメインはフラビンを結合する青色光受容ドメインである (Herrou and Crosson, 2011; Ito et al., 2012)。LOV タイプの PAS-HK は、PHK1/PHK2 のクラスターには属さず、シロイヌナズナの LOV タンパク質 (PHOT や ZTL など) と同じクラスターに属した (図 6)。したがって、PHK1/PHK2 は、コケ植物と緑藻の共通祖先が持っていた LOV-HK を起源とするのではないと考えられる。LOV-HK は原核生物や緑藻に保存されており、プラシノ藻の LOV-HK は青色光下で概日リズムの維持に関与する (Djouani-Tahri et al., 2011)。概日リズムは光合成や発生など様々な生理現象に関与しており、LOV-HK は緑藻や原核生物の環境適応で重要な役割を担うと考えられる。その一方で、コケ植物や被子植物は LOV-HK を持たないことから、植物は陸上化の際に LOV-HK を失ったと推測される。

植物の進化における PAS-HK の役割について

PHK1/PHK2 のホモログは、コケ植物の系統よりも後の時代に分岐した陸上植物の中では小葉類までにしか保存されていなかった（図 5）。このことから、PHK1/PHK2 が持つ生理機能は高等植物では重要でなくなったと考えられる。本研究により、PHK1/PHK2 は配偶体世代の制御因子であることがわかった。植物は進化の過程で、配偶体と孢子体の世代交代の様式を変化させてきた。車軸藻の生活環は、多細胞の配偶体のみからなる (Hori et al., 2014; Nishiyama et al., 2018)。コケ植物の生活環は配偶体優占であり、茎葉体や原糸体は配偶体である。茎葉体上で受精が起こり、孢子体が形成される。孢子体は孢子嚢の形成を含むわずかな期間しか存在しない。小葉類の生活環は孢子体優占だが、孢子から前葉体という配偶体が発芽し、孢子体に依存せずに生育する。そして前葉体で受精が起こり、孢子体を形成する (Banks, 2009; Banks et al., 2011)。高等植物の生活環は孢子体優占であり、配偶体は胚嚢と花粉として生活環の特定の期間にのみ発生する。さらに、配偶体は孢子体の組織（胚珠と葯）に包まれ、環境の変化から保護されている。このように植物は、陸上に適応するにつれて孢子体世代が優占になり、孢子体として過ごす期間が長くなるように進化してきた。またそれに伴い、配偶体は環境から保護されるようになった。そのため、高等植物では配偶体世代の発生の制御因子である PHK の必要性がなくなったのではないだろうか。

以上の結果から、PHK1/PHK2 は光と酸素のシグナルを伝達し、発生を精妙に制御する重要因子であることが示された。PHK1/PHK2 による制御の方向性が冠水によって引き起こされた低酸素条件と非冠水の好気条件で逆転すること、

および系統解析の結果から、PHK1/PHK2（とそのホモログ）は植物の陸上化とその後の進化・多様化において何らかの貢献をなしたと考えられる。本研究の結果は、植物とそのシグナル伝達の進化と多様性の解明に資する基礎生物学的に重要な知見である。この知見を分子育種に利用することで、将来的に湛水耐性の向上などの農業上の応用への貢献も期待される。

引用文献

本論文は、以下の 2 報の文献をもとに作成した。

Ryo M, Yamashino T, Nomoto Y, Goto Y, Ichinose M, Sato K, Sugita M, Aoki S.

2018a. Light-regulated PAS-containing histidine kinases delay gametophore formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany*. **69**, 4839-4851.

Ryo M, Yamashino T, Yamakawa H, Fujita Y, Aoki S. 2018b. PAS-histidine kinases

PHK1 and PHK2 exert oxygen-dependent dual and opposite effects on gametophore formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **503**, 2861-2865.

参考文献

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.

1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. **25**, 3389–3402.

Aoyama T, Hiwatashi Y, Shigyo M, Kofuji R, Kubo M, Ito M, Hasebe M. 2012.

AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*. **139**, 3120-3129.

Ashton NW, Cove DJ. 1977. The isolation and preliminary characterization of

auxotrophic and analogue resistant mutants in the moss *Physcomitrella patens*.

Molecular Genetics and Genomics. **154**, 87–95.

Banks JA. 2009. *Selaginella* and 400 million years of separation. *Annual Review of*

Plant Biology. **60**, 223-238.

Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, et al. 2011. The *Selaginella* genome identifies

genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science*. **332**, 960-963.

Chang C, Kwok SF, Bleeker AB, Meyerowitz EM. 1993. *Arabidopsis*

ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*. **262**, 539-544.

Cove DJ, Knight CD. 1993. The Moss *Physcomitrella patens*, a model system with potential for the study of plant reproduction. *Plant Cell*. **5**, 1483-1488.

Cove D, Bezanilla M, Harries P, Quatrano R. 2006. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annual Review of Plant Biology*. **57**, 497-520.

Cove D. 2005. The moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics*. **39**, 339-358.

D'Agostino IB, Kieber JJ. 1999. Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulators. *Trends in Biochemical Sciences*. **24**, 452-456.

Deng Y, Dong H, Mu J, Ren B, Zheng B, Ji Z, Yang WC, Liang Y, Zuo J. 2010. *Arabidopsis* histidine kinase CKI1 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *Plant Cell*. **22**, 1232-1248.

Desikan R, Horák J, Chaban C, et al. 2008. The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells. *PLoS One*. doi:

Djouani-Tahri el-B, Christie JM, Sanchez-Ferandin S, Sanchez F, Bouget FY, Corellou F. 2011. A eukaryotic LOV-histidine kinase with circadian clock function in the picoalga *Ostreococcus*. *Plant Journal*. **65**, 578-588.

Fujiwara S. 2008. Novel blue light receptors with an F-box: their direct control of the circadian clock and the flowering timing in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*. **25**, 123–129

Grefen C, Harter K. 2004. Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta*. **219**, 733-742.

Gruhn N, Halawa M, Snel B, Seidl MF, Heyl A. 2014. A subfamily of putative cytokinin receptors is revealed by an analysis of the evolution of the two-component signaling system of plants. *Plant Physiology*. **165**, 227-37.

Gruhn N, Seidl MF, Halawa M, Heyl A. 2015. Members of a recently discovered subfamily of cytokinin receptors display differences and similarities to their classical counterparts. *Plant Signaling & Behavior*. doi: 10.4161/21659087.2014.984512

Henry JT, Crosson S. 2011. Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and

structural context. *Annual Review of Microbiology*. **65**, 261-286.

Herrou J, Crosson S. 2011. Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nature Reviews Microbiology*. **9**, 713-723.

Hori K, Maruyama F, Fujisawa T, et al. 2014. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications* **5**, doi: 10.1038/ncomms4978

Higgins D.G, Sharp P.M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237-244.

Hwang I, Sheen J. 2001. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.

Ichikawa K, Sugita M, Imaizumi T, Wada M, Aoki S. 2004. Differential expression on a daily basis of plastid sigma factor genes from the moss *Physcomitrella patens*. Regulatory interactions among *PpSig5*, the circadian clock, and blue light signaling mediated by cryptochromes. *Plant Physiology* **136**, 4285-4298.

Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M, Wada M. 2002. Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*.

Plant Cell **14**, 373-386.

Ishida K, Yamashino T, Nakanishi H, Mizuno T. 2010. Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 2542-2545.

Ito S, Song YH, Imaizumi T. 2012. LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis. *Molecular Plant* **5**, 573-582.

Johnson MT, Carpenter EJ, Tian Z, et al. 2012. Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. *PLoS One* doi: 10.1371/journal.pone.0050226

Kadota A, Sato Y, Wada M. 2000. Intracellular chloroplast photorelocation in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor. *Planta* **210**, 932-937.

Kakimoto T. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 605-627.

Karlsen OA, Lillehaug JR, Jensen HB. 2008. The presence of multiple c-type

cytochromes at the surface of the methanotrophic bacterium *Methylococcus capsulatus* (Bath) is regulated by copper. *Molecular Microbiology* **70**, 15–26

Katsumata T, Fukazawa J, Magome H, Jikumaru Y, Kamiya Y, Natsume M, Kawaide H, Yamaguchi S. (2011) Involvement of the CYP78A subfamily of cytochrome P450 monooxygenases in protonema growth and gametophore formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **75**, 331-336.

Kenrick P, Crane PR. (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**, 33-39.

Kofuji R, Hasebe M. (2014) Eight types of stem cells in the life cycle of the moss *Physcomitrella patens*. *Current Opinion in Plant Biology* **17**:13–21

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870-1874.

Lang D, Ullrich KK, Murat F, et al. 2018. The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *Plant*

Journal **93**, 515-533.

Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Törmäkangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y. 2006. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **6**;311 (5757) :94-98.

Más, P., Kim, W.Y., Somers, D.E., & Kay, S.A. 2003. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **426**, 567-570.

Matasci N, Hung LH, Yan Z, et al. 2014. Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. *Gigascience* doi: 10.1186/2047-217X-3-17

Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T. 2000. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiology* **41** (9) :1002-1012

Mizuno T, Kaneko T, Tabata S. 1996. Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 *DNA Research* **3**, 407–414.

Mizuno T. 2005. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants:

from hormone responses to circadian rhythms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**, 2263-2276.

Möglich A, Ayers RA, Moffat K. 2009. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* **17**, 1282-1294.

Nakamichi N, Kita M, Ito S, Yamashino T, Mizuno T. 2005. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **46** (5) :686-698

Nakamichi N, Kita M, Niinuma K, Ito S, Yamashino T, Mizoguchi T, Mizuno T. 2007. *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. *Plant Cell Physiology* **48** (6) :822-832.

Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, Saito K, Sakakibara H, Mizuno T. 2009. Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant and Cell Physiology* **50** (3) :447-462.

Nishiyama T, Hiwatashi Y, Sakakibara I, Kato M, Hasebe M. 2000. Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis.

DNA Research **7**, 9–17.

Nishiyama T, Sakayama H, de Vries J, et al. 2018. The *Chara* genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization. *Cell* **174** (2) : 448-464.

Okada R, Kondo S, Satbhai SB, Yamaguchi N, Tsukuda M, Aoki S. 2009. Functional characterization of *CCA1/LHY* homolog genes, *PpCCA1a* and *PpCCA1b*, in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Journal* **60**, 551-563.

Okano Y, Aono N, Hiwatashi Y, Murata T, Nishiyama T, Ishikawa T, Kubo M, Hasebe M. 2009. A polycomb repressive complex 2 gene regulates apogamy and gives evolutionary insights into early land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 16321-16326.

Pekárová B, Szmitkowska A, Dopitová R, Degtjarik O, Žídek L, Hejátko J. 2016. Structural aspects of multistep phosphorelay-mediated signaling in plants. *Molecular Plant* **9**, 71–85.

Pham J, Liu J, Bennett MH, Mansfield JW, Desikan R. 2012. *Arabidopsis* histidine kinase 5 regulates salt sensitivity and resistance against bacterial and fungal infection. *New Phytologist* **194**, 168-180.

Pils B, Heyl A. 2009. Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiology* **151**, 782-791.

P de Philip, J Batut, P Boistard. 1990. *Rhizobium meliloti* Fix L is an oxygen sensor and regulates R. meliloti nifA and fixK genes differently in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **172** (8) :4255-4262

Raven JA. 2000. Land plant biochemistry. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **355**, 833-846.

Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, et al. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64-69.

Renzaglia KS, Duff RJT, Nickrent DL, Garbary DJ. 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **355**, 769-793.

Shaw AJ, Szövényi P, Shaw B. 2011. Bryophyte diversity and evolution: windows into the early evolution of land plants. *American Journal of Botany* **98**, 352-369.

Shigyo M, Hasebe M, Ito M. 2006. Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene*

366, 256-265.

Stevenson SR, Kamisugi Y, Trinh CH, et al. 2016. Genetic analysis of *Physcomitrella patens* identifies ABSCISIC ACID NON-RESPONSIVE, a regulator of ABA responses unique to basal land plants and required for desiccation tolerance. *Plant Cell* **28**, 1310-1327.

Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. 2000. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* **69**, 183-215.

To JP, Kieber JJ. 2008. Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science* **13**, 85-92.

Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T. 2001. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **42**, 231-235.

Uenaka H, Wada M, Kadota A. 2005. Four distinct photoreceptors contribute to light-induced side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **222**, 623-631.

Vogt JH, Schippers JH. 2015. Setting the PAS, the role of circadian PAS domain proteins during environmental adaptation in plants. *Frontiers in Plant Science* doi:

von Schwartzberg K, Lindner AC, Gruhn N, Šimura J, Novák O, Strnad M, Gonneau M, Nogué F, Heyl A. 2016. CHASE domain-containing receptors play an essential role in the cytokinin response of the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **67**, 667-679.

Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, et al. 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E4859-E4868.

Xie Y, Wu G, Tang J, et al. 2014. SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. *Bioinformatics* **30**, 1660-1666.

Yamashino T. 2013. From a repressilator-based circadian clock mechanism to an external coincidence model responsible for photoperiod and temperature control of plant architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77** (1) :10-16.

Zuckerkandl E, Pauling L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel HJ, eds. *Evolving Genes and Proteins*. New York: Academic Press, 97-166.

青木摂之、杉田護. 2009. 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 5.ヒメツリガネゴケ。光合成研究法編集委員会編「光合成研究法」（北海道大学低温科学研究所）、31-37

岡田龍. 2010. ヒメツリガネゴケにおける CCA1/LHY 相同遺伝子 PpCCA1a と PpCCA1b の機能解析。博士学位論文、名古屋大学大学院情報科学研究科

テイツ L、ザイガーE、モラーIM、マーフィーA. 2017. 植物生理学・発生学 原著第6版、736、講談社

後藤友規. 2018. ヒメツリガネゴケの PAS 含有ヒスチジンキナーゼ PHK1、PHK2 の機能解析。修士学位論文、名古屋大学大学院情報科学研究科

鈴木友美、水野猛. 2004. 高等植物における His-Asp リン酸リレー情報伝達系。化学と生物、40 巻 3 号、159-167

日渡祐二、西山智明、長谷部光泰. 2000. ヒメツリガネゴケ-植物ホルモン、分化、そして進化-。蘚苔類研究、7 巻 9 号、276-284

山篠貴史、水野猛. 2009. 植物の成長を制御するサイトカイニン情報伝達機構。化学と生物、47 巻 5 号、312-322

謝辞

本研究の遂行から本論文の作成に至るまで、様々なご指導とご協力を頂きました青木撰之先生に感謝いたします。実体顕微鏡などの設備を使わせて頂き、副指導教官としてご指導頂いた吉田久美先生（名古屋大学情報学研究科）に深く御礼申し上げます。遺伝子破壊株と破壊用プラスミドを譲渡して頂いた野本友司博士と山篠貴史先生（名古屋大学生命農学研究科）に深く感謝いたします。様々な実験機器をお借りし、多くのご指導やご助言、情報を頂いた一瀬瑞穂先生、杉田護先生、杉田研究室の皆さん（名古屋大学遺伝子実験施設）に深く感謝いたします。ヒメツリガネゴケのプロトコルと薬剤耐性配列を譲渡して下さいました長谷部光泰先生（基礎生物学研究所）に深く感謝いたします。嫌気培養の器具をお借りし、様々なご助言を頂きたい藤田祐一先生、山川壽伯博士、ゲノム情報機能学研究分野の皆さん（名古屋大学生命農学研究科）に深く感謝いたします。ヒメツリガネゴケの観察方法のご助言を頂いた佐藤良勝先生（名古屋大学 ITbM）に感謝いたします。定量 PCR などの設備を使わせて頂いた鈴木泰博先生と谷口利英さん（名古屋大学情報学研究科）に感謝いたします。実験や進路について様々なアドバイスを頂いた、手塚修文先生、石渡龍輔博士、伊藤 誉明さん（名古屋大学情報科学研究科）に深く感謝いたします。大腸菌の共同研究に取り組み、研究や進路のアドバイスを頂いた別所学博士、小西花織さん（名古屋大学生命農学研究科・修了生）、大場裕一先生（中部大学応用生物学部）に深く感謝いたします。実験を手伝って頂いた後藤雄規くんと、研究室メ

ンバーとして頑張ってきた大塚徹寛くん、小林佑斗くん、ダオ・ミン・フォンさん（名古屋大学情報科学研究科・修了生）に感謝いたします。最後に、私の学位取得を後押ししていただいた会社の人事部と研究所の皆さんに感謝申し上げます。

付図

表1. 本研究に用いた試薬・培地（次ページに続く）

培地とその組成	最終濃度
×1000 Alternative TES	
CuSO ₄ ・H ₂ O	0.22 mM
H ₃ BO ₃	9.9 mM
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.23 mM
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.1 mM
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.19 mM
MnCl ₂ ・4H ₂ O	2 mM
KI	0.17 mM
胞子発芽用寒天培地	
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1 mM
KH ₂ PO ₄	1.84 mM
KNO ₃	10 mM
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.45 mM
CaCl ₂ ・2H ₂ O	10 mM
酒石酸アンモニウムナトリウム	5 mM
Alternative TES	1000×
アガー	0.8%
汎用培地（BCDG、BCDAT）	
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1 mM
KH ₂ PO ₄	1.84 mM
KNO ₃	10 mM
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.45 mM
CaCl ₂ ・2H ₂ O	1 mM
酒石酸アンモニウムナトリウム（BCDAT）	5 mM
Alternative TES	1000×
アガー	0.8%
D-グルコース（BCDG）	0.5%

表1. 続き（次ページに続く）

形質転換用の試薬とその組成	最終濃度
<u>ドリセラゼ溶液</u>	
ドリセラゼ	2%
マンニトール	8%
<u>MMM溶液</u>	
マンニトール	0.5 M
MgCl ₂	15 mM
MES	0.1%
<u>プロトプラスト液体培地</u>	
Ca(NO ₃) ₂	5 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5 nM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM
酒石酸アンモニウムナトリウム	5 mM
マンニトール	6%
D-グルコース	0.5%
<u>PEG/T溶液</u>	
Ca(NO ₃) ₂	100 mM
Tris-HCl(pH 8.0)	10 mM
PEG4000	40%
マンニトール	7.2%
<u>ゲノム抽出の試薬とその組成</u>	
<u>2×CTAB溶液</u>	
CTAB(cetyl trimethyl ammonium bromide)	2%
NaCl	1.4 M
Tris-HCl(pH 8.0)	100 mM
EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)	20 mM
<u>CTAB沈殿バッファー溶液</u>	
CTAB	1%
Tris-HCl(pH 8.0)	50 mM
EDTA	10 mM
<u>1 M NaCl TE</u>	
NaCl	1 M
Tris-HCl(pH 8.0)	10 mM
EDTA	1 mM

表1. 続き

サザンブロットに用いた試薬とその組成	最終濃度
<u>変性溶液</u>	
NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M
<u>中和液</u>	
Tris	1 M
NaCl	1.5 M
HCl	pH = 7.4に調整
<u>20×SSC</u>	
NaCl	3 M
Sodium citrate · 2H ₂ O	0.3 M
1N HCl	pH = 7.0に調整

本研究に用いた試薬とヒメツリガネゴケの培養・形質転換に用いた培地について、それぞれの名称と組成を示し、種類別にまとめた。

表2. 本研究に用いたプライマー

名前	図8中の表記	配列(5'から3')	参考文献
PHK1とPHK2のクローニング			
PHK1-5'UTR-F2		GAATTGTAGAGAGTTAGGTATCTCAAG	
PHK1-3'UTR-R2		GCTATAGAGTGAACAAAACCTCGG	
PHK2-5'UTR-Fw		TCGCCACAGGCTGATTCTGAACCTAC	
PHK2-3'UTR-Rv		GAGTGATTGCGGAGACAGGAGGAG	
PHK1 PHK2の破壊株の作成			
PHK1-5'F2		AATCGGTACCGATTGAGTGGAACCGAGCG	
PHK1-5'R2		GATGGGGCCCCATCTTGAGATACCTAACTCTCTAC	
PHK1-3'F		GAACCCCGGGGTTTCATCAAGGACGGAGGAG	
PHK1-3'R-BamHI		GCGGATCCGCTTTCAAAAAGATCACATCACTGC	
PHK2-5'F-Sall		TGTGGTCGACGTGTTCTGTGCAACCACG	
PHK2-5'R(EcoRV)		CCGTGATATCCGTAATAGACCC	
PHK2-3'F(EcoRV)		GAATATGATATCATTTTCATGGACTGTC	
PHK2-3'R-BamHI		GCGGATCCCGAAGCTGAATTCGTATTAGGC	
PHK1 PHK2破壊株のゲノムPCR			
PHK1_genomic_Fw1	P1	CTATATGATGACCCGCGAGTCAA	
PHK1_genomic_Rv1.2	P2	AAATTCCAACCTATGAAATTACAACC	
PHK2_genomic_Fw1	P11	TAAGCCTTCAGGTCGCCACA	
PHK2_genomic_Rv1	P12	GATGCATCTGTCAAGCCGGT	
nptII_genomic_Fw2	P3	ATCGCCGCTCCCGATTGCA	
aph4_genomic_Fw2	P13	GCAGGGTCGATGCGACGCAA	
Pmcv-R	P4	GAGGAAGGGTCTTGCGAAGGATAGTG	Aoyama et al., 2012
PHK1_RT-PCR_Fw	P7	CTCAGCGACTGCTCAACAATTTGG	
PHK1_RT-PCR_Rv	P8	CAGCTATGCACTTCTCCACCTCTC	
PHK2_RT-PCR_Fw	P17	CAGCGACTGCTCAACAATTTGAGG	
PHK2_RT-PCR_Rv	P18	CGAGATGCAATCCTTCTGCCGCAC	
RT-PCR			
PHK1_RT-PCR_Fw	P7	CTCAGCGACTGCTCAACAATTTGG	
PHK1_RT-PCR_Rv	P8	CAGCTATGCACTTCTCCACCTCTC	
PHK2 -5' RT-PCR_Fw	P19	AAGAGGAGCAAGCTCGAC	
PHK2-5' RT-PCR_Rv	P20	GTATTGGAGGTCGTAGGAGG	
PpAct3U1		CGGAGAGGAAGTACAGTGTGTGGA	Ichikawa et al., 2004
PpAct3D1		ACCAGCCGTTAGAATTGAGCCCAG	Ichikawa et al., 2004
定量PCR			
PHK1_qRCR_f1		CTTTGCGTTTCGCCTTTCC	
PHK1_qPCR_r1		CACAACCGACCGCTCTACAA	
PHK2_qRCR_f1		CATTCAAGTTTCCATTCGACAGC	
PHK2_qPCR_r1		AAAGCTCCCACTACTGATCGCTCTAC	
PpAPB1GSP-F1		CCATCCACGCGGTTGATAGT	Aoyama et al., 2012
PpAPB1GSP-R1		TCACAGGATCACGAAGGACAAA	Aoyama et al., 2012
PpAPB2GSP-F1		CGGTCCGCGGGAAAG	Aoyama et al., 2012
PpAPB2GSP-R1		TGGGACTGGGAACCTCGTCAT	Aoyama et al., 2012
PpAPB3GSP-F1		GGCGAATTGTGCGCATCT	Aoyama et al., 2012
PpAPB3GSP-R1		TCTGCGCCTGACCTGAGTACT	Aoyama et al., 2012
PpAPB4GSP-F3		CGTGCGCTAGTCTGTGCTAGTG	Aoyama et al., 2012
PpAPB4GSP-R3		CCACCTGGATTGGATGCAA	Aoyama et al., 2012
PpTUA1F		CGTAGGAGGGACCAAGTTTGG	Aoyama et al., 2012
PpTUA1R		TGCATTTCATCCCCGAGTCA	Aoyama et al., 2012
サザンブロット			
35S-PA-F		GTGTGAGTAGTTTCCCCGATAAGGG	Katsumata et al., 2011
35S-PA-R		GACCTATTCATGGCCCTGATACC	Katsumata et al., 2011

本研究に用いたプライマーについて、それぞれの名称と塩基配列を示し、種類別にまとめた。

表3. 本研究に用いたアミノ酸配列（次ページに続く）

図6中の表記	アクセッション番号	タンパク質名
<i>Arabidopsis thaliana</i>		
AtPhyA	P14712	Phytochrome A
AtPhyB	P14713	Phytochrome B
AtPhyC	P14714	Phytochrome C
AtPhyD	P42497	Phytochrome D
AtPhyE	P42498	Phytochrome E
ATHB8	Q39123	ATHB-8
AtICU4	Q9ZU11	ATHB-15
AtPHV	O04292	ATHB-9
AtREV	Q9SE43	REVOLUTA
AtMAP3K	AEE84700	MAP3K64
AtMAPKKK1	AEE74423	Putative MAPKKK1
AtMAPKKK2	AEE74424	Putative MAPKKK2
AtMAPKKK3	AEE74425	Putative MAPKKK3
AtRAF10	AED95818	RAF10
AtRAF11	AEE34716	RAF11
AtZTL	Q94BT6	Zeitlupe
AtFKF1	Q9C9W9	FKF1
AtLKP2	Q8W420	LKP2
AtPHOT1	O48963	Phototropin-1
AtPHOT2	P93025	Phototropin-2
AtTLP	O64511	TLP1
<i>Selaginella moellendorffii</i> *1		
SmPHK	405045	SmPAS-HK
<i>Physcomitrella patens</i>		
PpPHK1	LC325738	PpPAS-HK1
PpPHK2	LC325739	PpPAS-HK2
PpPHY1	AY123146	Phypa;PHY;1
PpPHY2	AY123147	Phypa;PHY;2
PpPHY3	AY123148	Phypa;PHY;3
PpPHY4	AY123145	Phypa;PHY;4
PpANR	5IU1	
PpLLP1	AB576160	LOV/LOV protein1
PpLLP2	AB576161	LOV/LOV protein2
PpPHOTA1	AB163420	Phototropin
PpPHOTA2	AB163421	Phototropin
PpPHOTB1	AB163422	Phototropin
PpPHOTB2	AB163423	Phototropin
<i>Sphagnum fallax</i> *1		
SfPHK	Sphfalx0047s0109.1	SfPAS-HK
<i>Marchantia polymorpha</i> *1		
Mp0082	Mapoly0082s0006.1	
Mp0011	Mapoly0011s0086.1	
<i>Megaceros tosanus</i> *2		
Mt2005453	UCRN_scaffold_2005453	Megaceros_tosanus
<i>Paraphymatoceros hallii</i> *2		
Ph2001990	FAJB_scaffold_2001990	Paraphymatoceros_hallii
<i>Klebsormidium flaccidum</i> *3		
Kf00624	kfl00624_0010	
Kf00954	kfl00954_0010	
Kf01121	kfl01121_0020	
Kf00003	kfl00003_0010	
Kf00041	kfl00041_0230	
Kf00271	kfl00271_0210	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> *1		
Cr571200	Cre13.g571200.t1.1	
Cr079750	Cre02.g079750.t1.1	
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169*1		
Cs46955	46955	

表3. 続き

図6中の表記	アクセッション番号	タンパク質名
<i>Dunaliella salina</i> *1		
Ds0453	Dusal.0453s00005.1	
<i>Ostreococcus tauri</i>		
OtLOVHK	Ot09g02160	LOV-HK
<i>Neurospora crassa</i>		
NcVVD	AAK08514	VVD
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		
SynPhy	BAA10307	Phytochrome
<i>Mastigocoleus testarum</i>		
Mt058184362	WP_058184362.1	
Mt058184859	WP_058184859.1	
<i>Leptolyngbya valderiana</i>		
Lv082901581	WP_082901581.1	
Lv61145	OAB61145	
<i>Halorubrum lacusprofundi</i>		
Hi088901597	WP_088901597	
Hi015910083	WP_015910083	
<i>Aquaspirillum</i> sp. LM1		
AsPAS077301325	WP_077301325	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
BjFixL	CAA40143	FixL
<i>Brucella melitensis</i> bv. 1 str. 16M		
Bm53921	AAL53921	
<i>Chthoniobacter</i> sp. 12-60-6		
Ch31371	OYW31371.1	
<i>Desulfovibrio africanus</i>		
Da014258666	WP_014258666.1	
<i>Leptospira vanthielii</i>		
Lv002978823	WP_002978823.1	
<i>Nitrospirae bacterium</i> RIFCSPLOWO2_01_FULL_62_a7		
Nb67410	OGW67410	
<i>Nitrospira moscoviensis</i>		
Nm053378359	WP_053378359.1	
<i>Rhodospirillales bacterium</i> 20-64-7		
Rb33558	OYV33558	
<i>Rhodospirillum centenum</i> SW (Rhodocista centenaria SW)		
RcPpr	ACJ00586	Bacteriophytochrome Ppr
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>		
RpBact-Phy	ABI96248	Bacteriophytochrome
<i>Verrucomicrobia bacterium</i> 12-59-8		
Vb73868	OYW73868.1	
Name in figure	Accession #	Protein name

*1 ~ *3を除いてGeneBankのアクセッション番号を示す。*1: Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>); *2: OneKP (<https://sites.google.com/a/ualberta.ca/onekp/>); *3: *Klebsormidium nitens* NIES-2285 genome project (http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/)

表4. *PHK*破壊株におけるカウロネマ側枝形成

White light (45)				
	average (%)	s.d.	ANOVA	t-test
WT	16.8	14.9	$p < 0.01$	-
<i>phk1-13</i>	70	17.2		$p < 0.01$
<i>phk1-22</i>	54.1	14.5		$p < 0.01$
<i>phk2-26</i>	52.5	11.5		$p < 0.01$
<i>phk2-44</i>	59.4	13.9		$p < 0.01$
<i>phk1 phk2-7</i>	54.5	13.5		$p < 0.01$
<i>phk1 phk2-20</i>	64.4	12.9		$p < 0.01$
BL (30)				
	average (%)	s.d.	ANOVA	t-test
WT	53.8	15.2	n.d.	-
<i>phk1 phk2-7</i>	58.3	14.3		n.d.
<i>phk1 phk2-20</i>	58.9	16.7		n.d.
RL (30)				
	average (%)	s.d.	ANOVA	t-test
WT	25.2	12.6	$p < 0.01$	-
<i>phk1 phk2-7</i>	52.7	13.1		$p < 0.01$
<i>phk1 phk2-20</i>	48.6	13.5		$p < 0.01$

光に誘導されて生じたカウロネマ側枝の数をWTと*PHK*破壊株の間で比較した。実験は図12と同様に行った。上段: 白色光 (WL: $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) ; 中段: 青色光 (BL: $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) ; 下段: 赤色光 (RL: $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 。 27から44の異なるカウロネマ細胞から算出された分岐率の平均 (average (%)) と標準偏差 (s.d.)を示す。WTの値と各破壊株の値の間に統計的に有意な差 ($p < 0.01$) があるか検定した (t-test, ANOVA) 。 n.d. : 有意差なし。生物学的に独立な2回の実験を行い、同様の結果を得た。

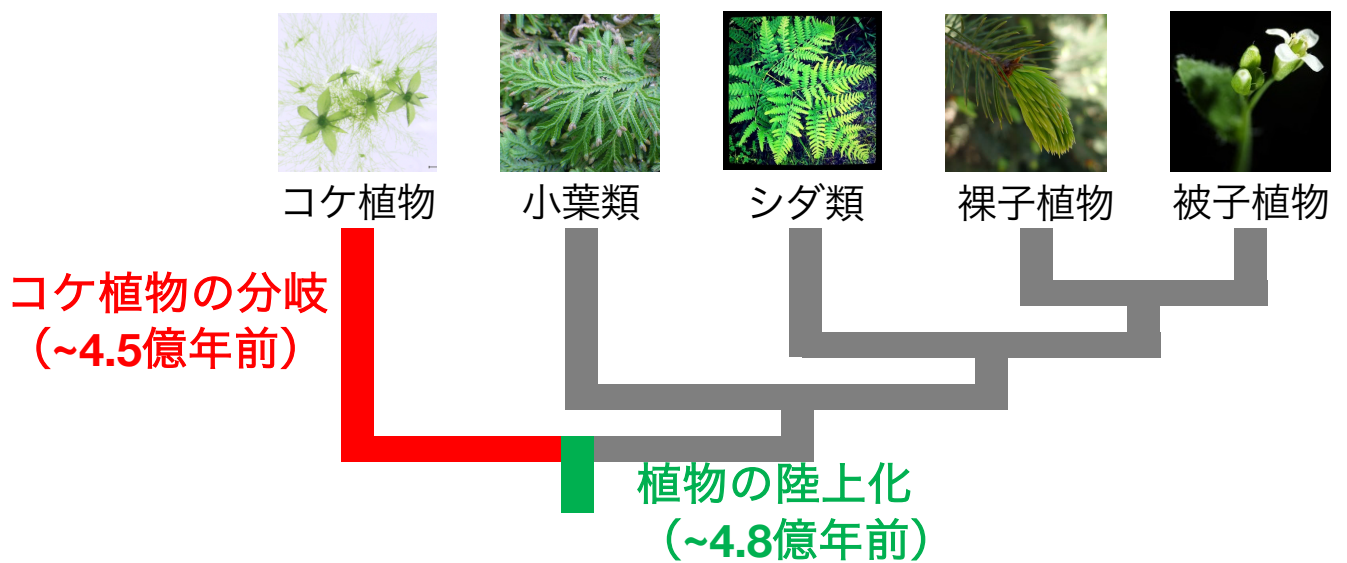


図1. 陸上植物の系統関係

陸上植物の系統樹。陸上植物は約4.8億年前に接合藻類から分岐したと考えられている。コケ植物は約4.5億年前に被子植物の祖先と枝分かれしており、系統的に最も隔たっている。

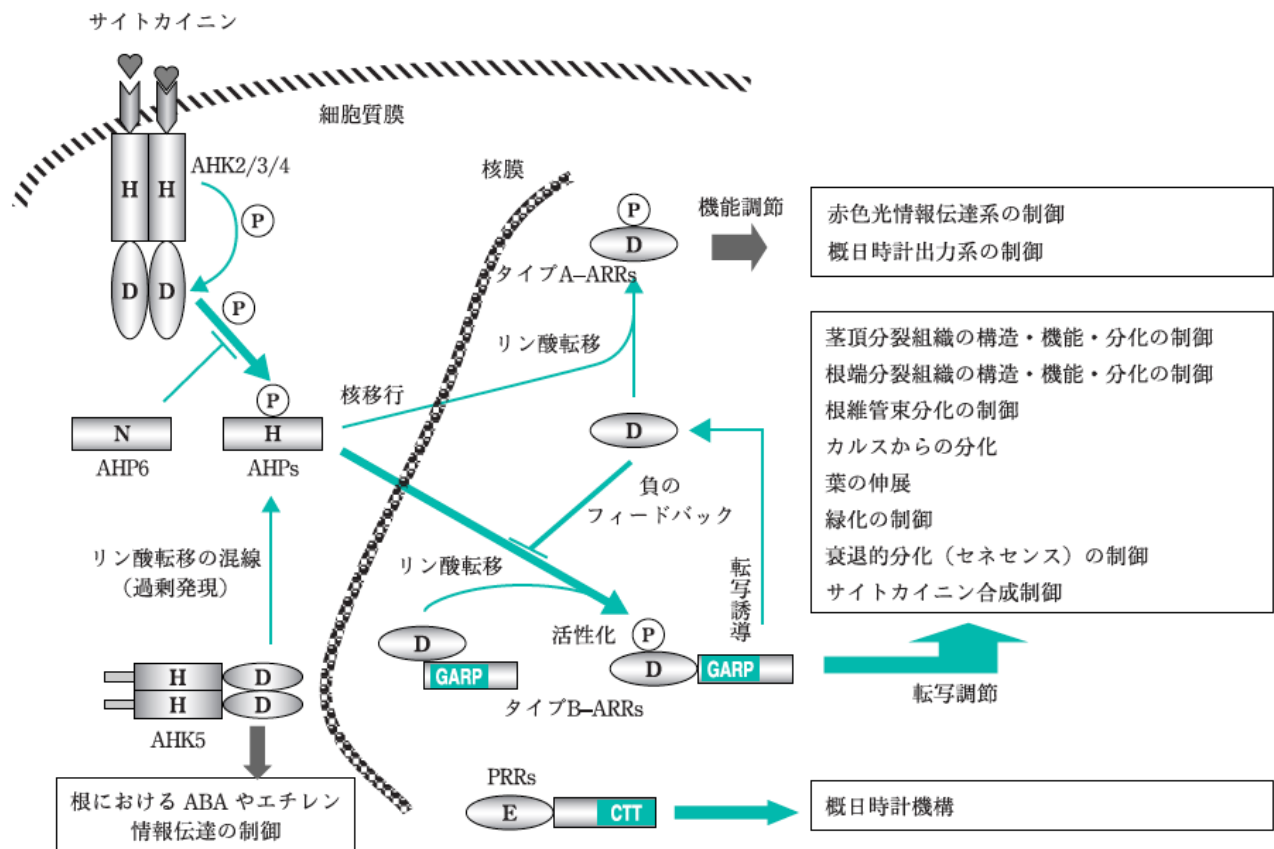


図2. 二成分制御系の概要（サイトカイニンの情報伝達系）

シロイヌナズナにおけるサイトカイニン応答系の概要図。サイトカイニンは、細胞膜に局在するHKであるAHK2/3/4のCHASEドメインに結合する。AHK2/3/4は自己リン酸化し、自身のヒスチジン残基からアスパラギン酸残基にリン酸を転移させ、AHPsのヒスチジン残基にリン酸を転移する。AHPsは細胞質から核内に移動し、タイプB-ARRのアスパラギン酸残基にリン酸を転移する。タイプB-ARRが下流の遺伝子発現を制御し、発生などが調整される。図は山篠と水野（2009）から日本農芸化学会の許諾を得て転載した。

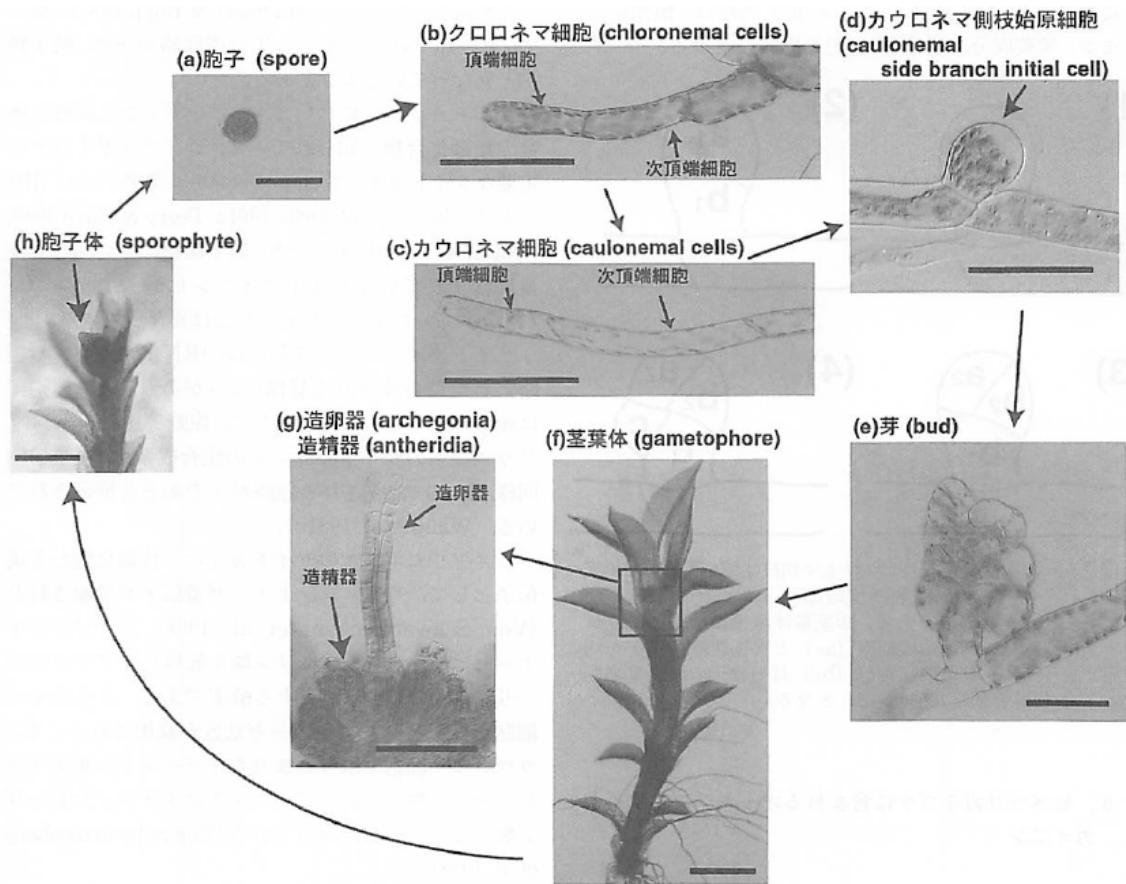


図3. ヒメツリガネゴケの生活環

ヒメツリガネゴケの生活環。孢子 (a) からクロロネマ細胞 (b) が発生し、糸状に伸長する。クロロネマ細胞はカウロネマ細胞 (c) に分化する。クロロネマ細胞とカウロネマ細胞を合わせて、原糸体とよぶ。カウロネマ細胞は、カウロネマ側枝始原細胞 (d) を形成し、その一部 (5%) が芽 (e) とよばれる細胞塊に分化する。芽はさらに茎葉体頂端細胞に分化し、茎葉体 (f) が発生する。茎葉体の茎頂に造卵器と造精器 (g) が形成される。精子は造精器から放出されると、茎葉体表面の水の膜を通して造卵器に移動して受精が起き、孢子体 (h) ができる。原糸体と茎葉体は一倍体の配偶体であり、生活環のほとんどを配偶体が占める。

「背景」のヒメツリガネゴケの項に詳述する。図は日渡ら (2000) から日本蘚苔類学会の許諾を得て転載した。

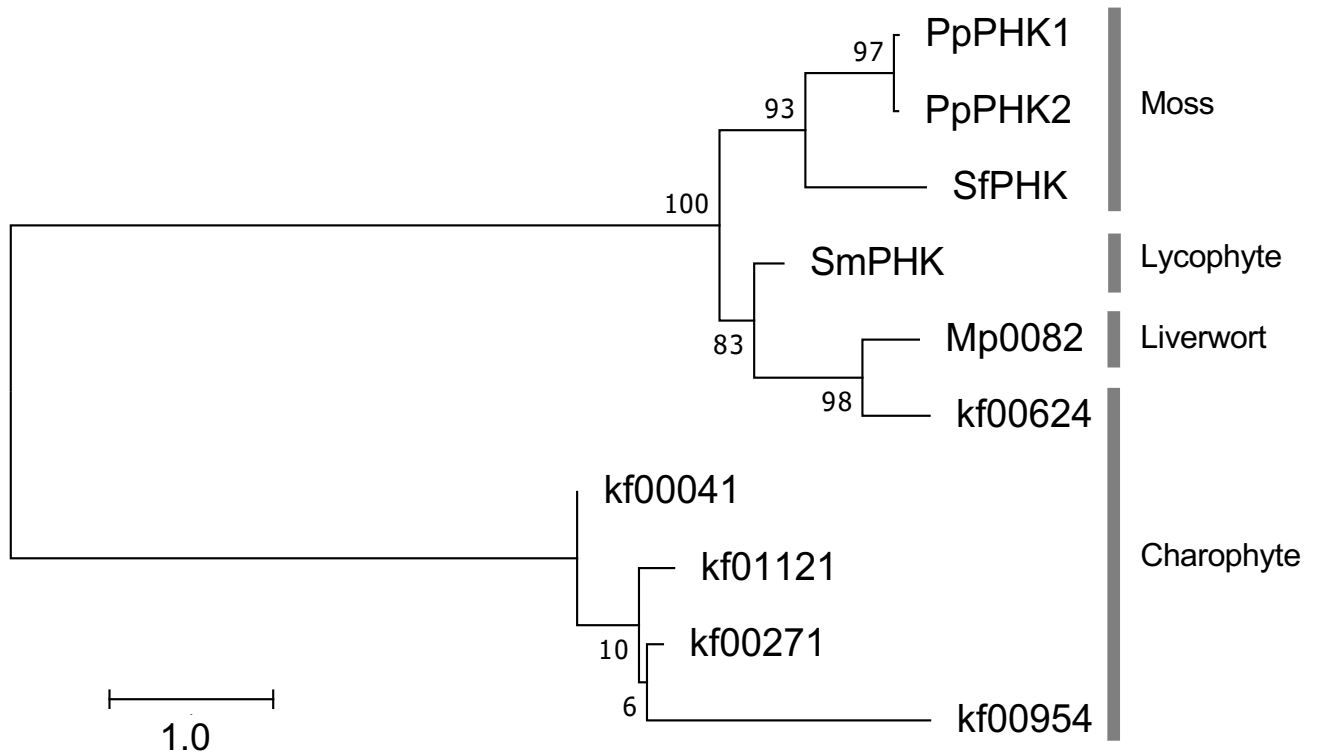


図5. 陸上植物と車軸藻におけるPHKホモログの系統樹

陸上植物と車軸藻において、次のドメイン構造を持つタンパク質のアミノ酸配列を用い、最尤法で系統樹を作成した: PASドメイン2つ (PAS AとPAS B) -HisKA-HATPase_C-REC。系統樹の作成には、各ドメインのアミノ酸配列のみを繋げた配列を用いた。ミズゴケのSphfalx0047s0109.1とSphfalx0047s0109.2はSfPHKとしてまとめた (「結果」の系統解析の項を参照)。系統樹は最も尤度の高いものを示した。系統樹の枝の長さは、サイトにおける変異の数を示す。各ノードにおける数字は、500回の試行から計算されたブートストラップ値を示す。より詳細な情報は「材料と方法」の系統解析の項に示した。系統学的なグループを右端に示す。解析に用いたアミノ酸配列を示す: ヒメツリガネゴケのPpPHK1 (LC325738), PpPHK2 (LC325739); イヌカタヒバのSmPHK (405045); ミズゴケのSfPHK (Sphfalx0047s0109.1; ゼニゴケのMp0082 (Mapoly0082s0006.1; 車軸藻 (*K. nitens*) のkf00624 (kfl00624_0010), kf00954 (kfl00954_0010), kf01121 (kfl01121_0020), kf00041 (kfl00041_0230), kf00271 (kfl00271_0210)。詳細は表3と表4に示す。

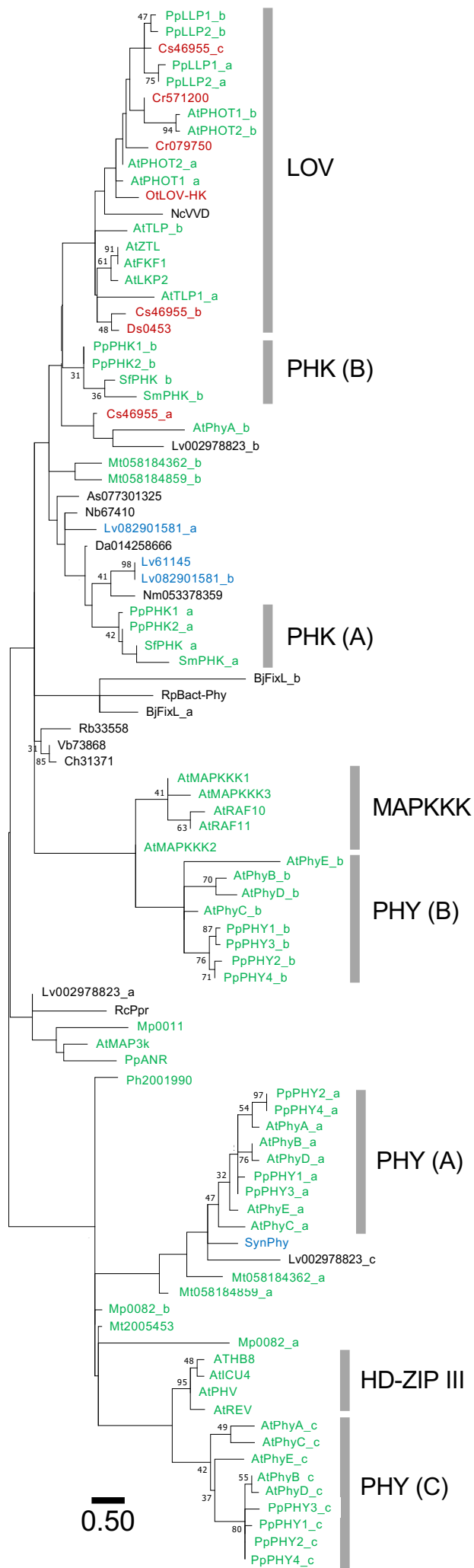


図6. 様々なPAS含有タンパク質の系統樹

様々な生物種のPAS含有タンパク質のPASドメインのアミノ酸配列を用い、最尤法で系統樹を作成した。系統樹は図5と同様の方法で作成した。ただし、ブートストラップ値は30以上のみ示す。複数のPASドメインを持つ場合は、Möglichら(2009)に基づき、N末端側からPAS_a, PAS_b...とした（それぞれPAS AとPAS Bに対応）。緑色の字は陸上植物の、赤色の字は緑藻の、青色の字はシアノバクテリアの、黒色の字は真正細菌の配列を示す。VogtとSchippers (2015)に準じて、シロイヌナズナのPASドメインのグループを右端に示す。解析に用いたアミノ酸配列は次の通りである: ヒメツリガネゴケのPpPHK1 (LC325738), PpPHK2 (LC325739), PpANR (5IU1), PpPHY1 (AY123146), PpPHY2 (AY123147), PpPHY3 (AY123148), PpPHY4 (AY123145), PpLLP1 (AB576160), PpLLP2 (AB576161); シロイヌナズナのAtPhyA (P14712), AtPhyB (P14713), AtPhyC (P14714), AtPhyD (P42497), AtPhyE (P42498), ATHB8 (Q39123), AtICU4 (Q9ZU11), AtPHV (O04292), AtREV (Q9SE43), AtMAP3K (AEE84700), AtMAPKKK1 (AEE74423), AtMAPKKK2 (AEE74424), AtMAPKKK3 (AEE74425), AtRAF10 (AED95818), AtRAF11 (AEE34716), AtZTL (Q94BT6), AtFKF1 (Q9C9W9), AtLKP2 (Q8W420), AtPHOT1 (O48963), AtPHOT2 (P93025), AtTLP (O64511); イヌカタヒバのSmPHK (405045); ミズゴケのSfPHK (Sphfalx0047s0109.1); *M. tosanus*のMt2005453 (UCRN_scaffold_2005453); *Paraphymatoceros hallii*のPh2001990 (FAJB_scaffold_2001990); ゼニゴケのMp0082 (Mapoly0082s0006.1), Mp0011 (Mapoly0011s00086.1); クラミドモナスのCr571200 (Cre13.g571200.t1.1), Cr079750 (Cre02.g079750.t1.1); *C. subellipsoidea* C-169のCs46955 (46955); *D. salina*のDs0453 (Dusal.0453s00005.1); プラシノ藻のOtLOVHK (Ot09g02160); *Neurospora crassa*のNcVVD (AAK08514); *Synechocystis* sp. PCC 6803のSynPhy (BAA10307); *Mastigocoleus testarum*のMt058184362 (WP_058184362.1), Mt058184859 (WP_058184859.1); *Leptolyngbya valderiana*のLv082901581 (WP_082901581.1), Lv61145 (OAB61145); HI088901597 (WP_088901597), *Halorubrum lacusprofundi*のHi015910083 (WP_015910083); *Aquaspirillum* sp. LM1のAsPAS077301325 (WP_077301325); *Bradyrhizobium japonicum*のBjFixL (CAA40143); *Brucella melitensis* bv. 1 str. 16MのBm53921 (AAL53921); *Chthoniobacter* sp. 12-60-6のCh31371 (OYW31371.1); *Desulfovibrio africanus*のDa014258666 (WP_014258666.1); *Leptospira vanthielii*のLv002978823 (WP_002978823.1); *Nitrospirae bacterium* RIFCSPLOWO2_01_FULL_62_a7のNb67410 (OGW67410); *Nitrospira moscoviensis*のNm053378359 (WP_053378359.1); *Rhodospirillales bacterium* 20-64-7のRb33558 (OYV33558); *Rhodospirillum centenum* SWのRcPpr (ACJ00586); *Rhodopseudomonas palustris*のRpBact-Phy (ABI96248); *Verrucomicrobia bacterium* 12-59-8のVb73868 (OYW73868.1)。詳細は表3に示す。

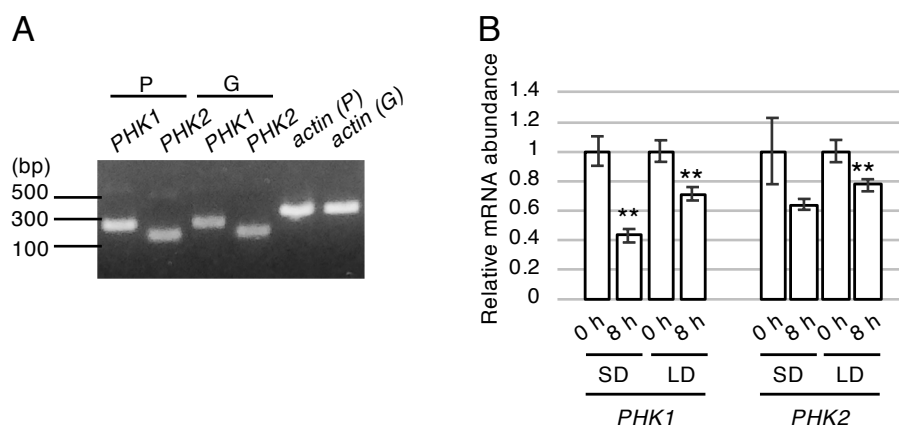
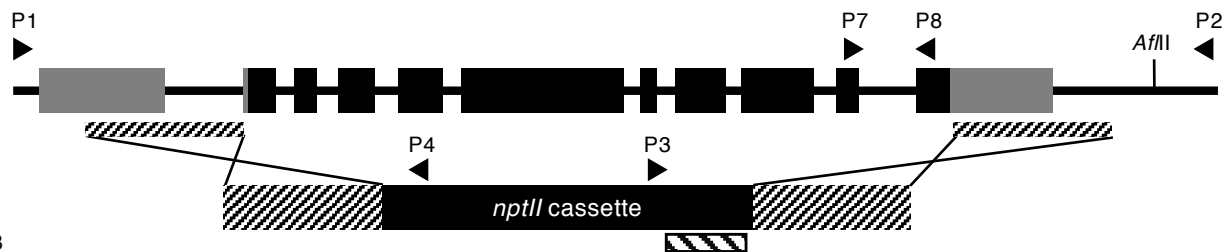


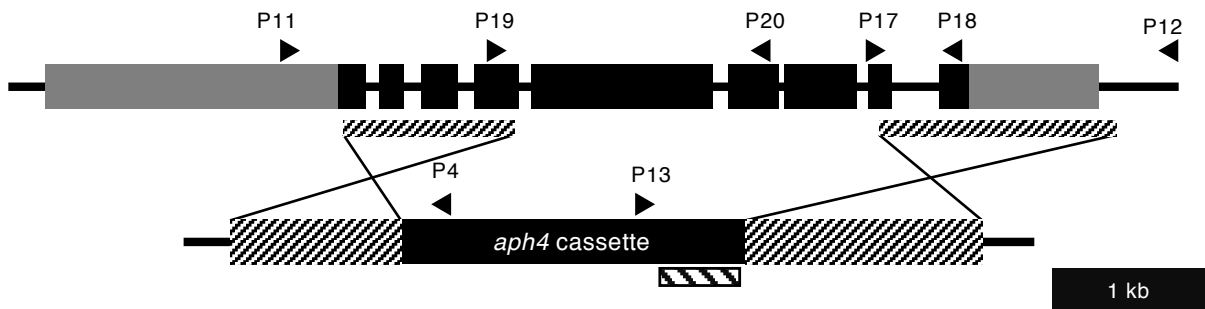
図7. *PHK1*と*PHK2*の発現解析

(A) RT-PCRによる*PHK1*と*PHK2*の転写産物の検出。原糸体(P)と茎葉体(G)それぞれから抽出した全RNAを反応の鋳型として用いた。ポジティブコントロールとしてアクチン遺伝子(AW698982)を増幅した。反応に用いたプライマーは表2に示す。各PCR断片は1%アガロースゲルで電気泳動し、分離した。(B) 定量PCRによる*PHK1*と*PHK2*の相対的な発現量の定量。原糸体をLDまたはSDで培養し、明期が始まる時間を0時間として、それぞれの0時間目と8時間目に全RNAを抽出した。内性コントロールとして α -チューブリン遺伝子を用いた。全RNAを反応の鋳型として用い、それぞれの0時間目の値を1とした相対値をプロットした。各グラフは3回の試行から算出された平均と標準偏差の値を示す。**は0時間目と8時間目の値に統計的に有意な差があることを示す(t検定 ($p < 0.01$))。3回の独立した実験を行い、同様の傾向になることを確かめた。反応に用いたプライマーを表2に示す。

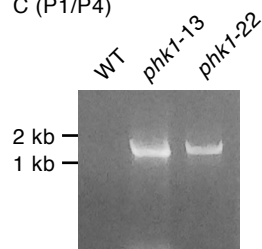
A



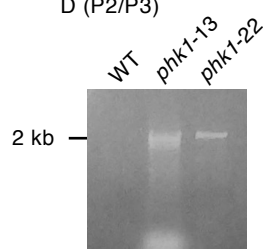
B



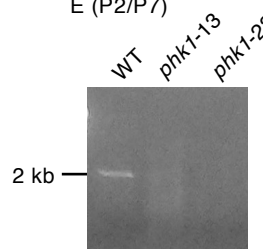
C (P1/P4)



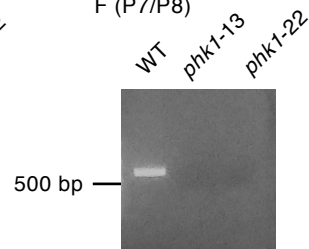
D (P2/P3)



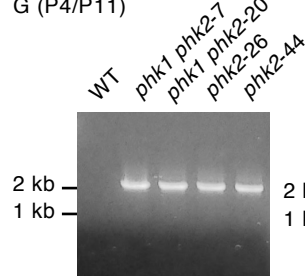
E (P2/P7)



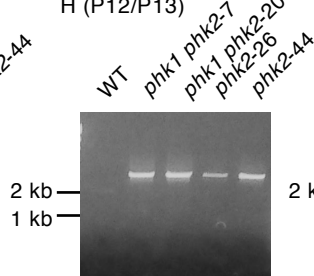
F (P7/P8)



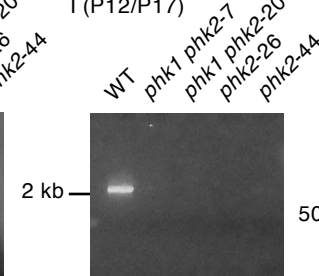
G (P4/P11)



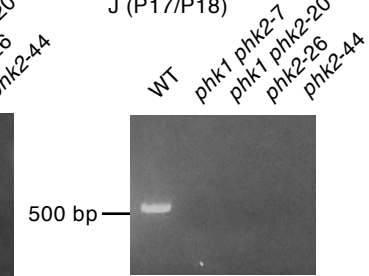
H (P12/P13)



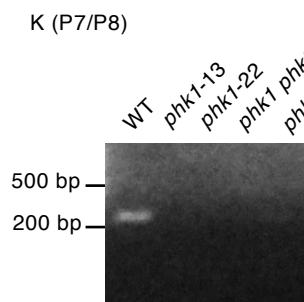
I (P12/P17)



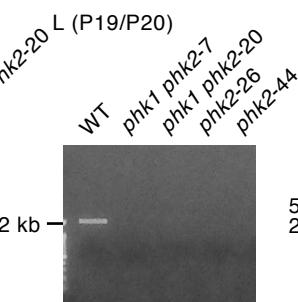
J (P17/P18)



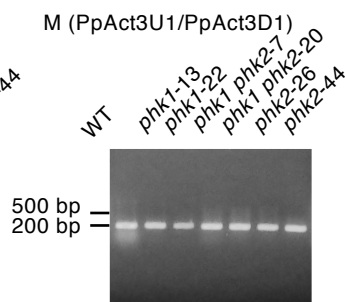
K (P7/P8)



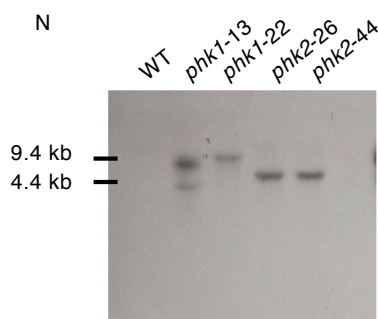
L (P19/P20)



M (PpAct3U1/PpAct3D1)



N



O

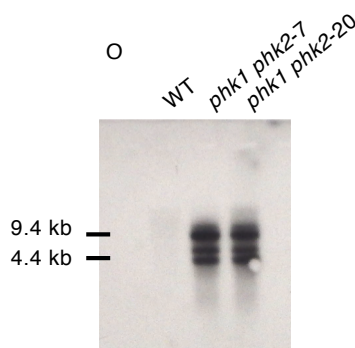
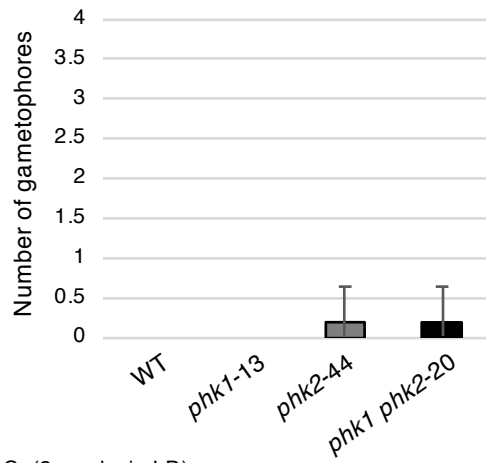


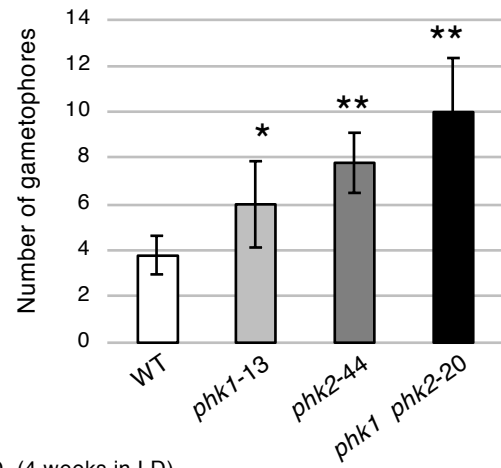
図8. *PHK*破壊株の作出

WTのゲノムDNAにおける*PHK1* (A上)と*PHK2* (B上)の領域と、それぞれの遺伝子破壊用コンストラクトの構造 (A下、B下)。非翻訳領域: 灰色の長方形; コード領域 (エキソン): 黒色の長方形; インترون: 黒色の実線。相同組換えのターゲット領域は網かけの黒色の長方形で示す。サザンブロッティング解析のプロブ領域を白色の長方形で示す。ゲノムPCRに用いたプライマーは矢頭で示す。ゲノムPCRの結果: *PHK1*の破壊 (C: プライマーセット, P1/P4; D: P2/P3; E: P2/P7; F: P7/P8); *PHK2*の破壊 (G: P4/P11; H: P12/P13; I: P12/P17; J: P17/P18)。 *PHK1*または*PHK2*のゲノム領域とnptIIカセットまたはaph4カセットの内部にデザインされたプライマーを用いたPCRにおいて、破壊株では予想されたサイズのバンドが検出されたが、WTではされなかった (C, D, G, H)。一方で、*PHK1*または*PHK2*のコード領域内にデザインされたプライマーを用いたPCRにおいて、WTでは予想されたサイズのバンドが検出されたが、破壊株では検出されなかった (E, F, I, J)。RT-PCRによる転写産物の検出: *PHK1* (K: P7/P8); *PHK2* (L: P19/P20); *actin* (コントロール, M: PpAct3U1/PpAct3D1 (Ichikawa et al., 2004))。 *PHK1*または*PHK2*の転写産物はWTのみで検出され (K, L)、全ての株でアクチン遺伝子は検出されたことから、各破壊株で*PHK1*または*PHK2*遺伝子は破壊されたことが示唆された (M)。(N, O) サザンブロッティング解析の結果。各株のゲノムDNAを*Afl*IIIで切断し、nptIIカセットまたはaph4カセットの内部にデザインされたプロブを用いてサザンブロッティング解析を行った。WTではバンドが検出されなかったが、*PHK1*単独破壊株では約9.4 kbのバンドが、*PHK2*単独破壊株では約5 kbのバンドが、*PHK1 PHK2*二重破壊株では約9.4 kbと約5 kbのバンドが検出された。したがって、相同組換えによって*PHK1*または/および*PHK2*のコード領域が薬剤耐性カセットに置換され、それぞれの遺伝子が破壊されたことを確認できた。

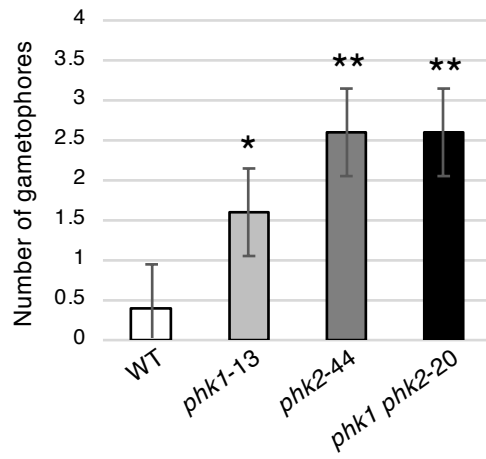
A (2 weeks in SD)



B (4 weeks in SD)



C (2 weeks in LD)



D (4 weeks in LD)

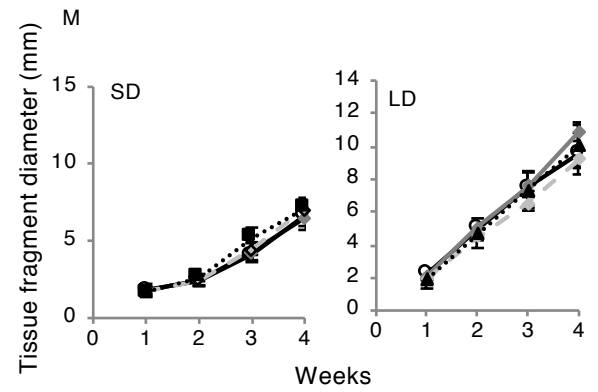
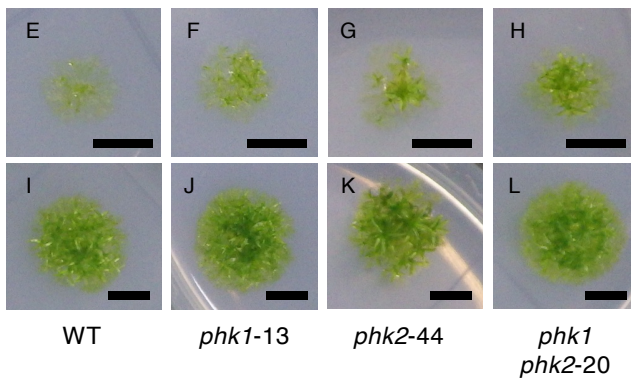
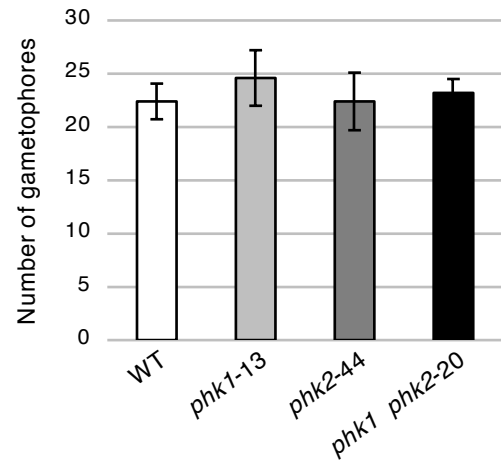
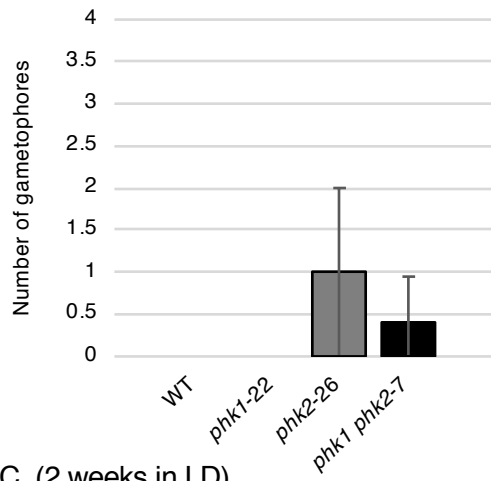


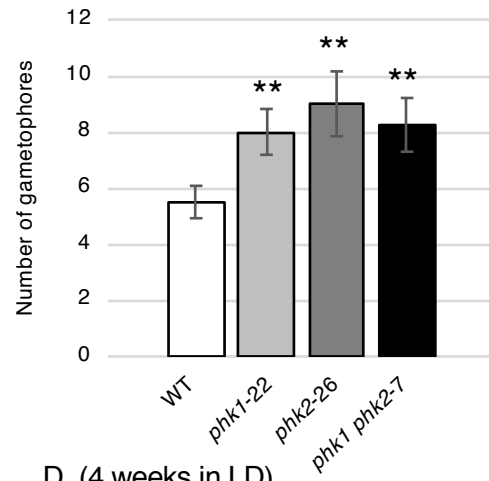
図9. *PHK*破壊株における茎葉体の形成と原糸体の生育

明暗条件下で形成された茎葉体の数をWTと*PHK*破壊株で比較した。(A, B) SDまたは(C, D) LDで原糸体の組織片を2週間(A, C)あるいは4週間(B, D)生育させ、発生した茎葉体の数を示す。各株の小さな原糸体の組織片(直径約1 mm)をBCDAT培地上に植えつけ、それぞれの明暗条件・期間で培養し、発生した茎葉体の数をWTと*PHK*破壊株の間で比較した。グラフの各値は、5つの独立なコロニーから算出された平均と標準偏差を示す。アスタリスクは各グラフのWTの値に対して統計的に有意な差があることを示す(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, analysis of variance (ANOVA))。(E-L) 各コロニーの代表的な写真を示す; WT: (E, I), *PHK1* 単独破壊株: (*phk1*-13; F, J), *PHK2* 単独破壊株: (*phk2*-44; G, K), *PHK1 PHK2* 二重破壊株: (*phk1 phk2*-20; H, L)。スケールバー: 5 mm。(M) 各株におけるコロニーの成長の比較。6つの独立なコロニーの直径を測定し、算出された平均と標準偏差を示す。ANOVAにより、WTと各破壊株の間に統計的な差がないことを確認した。白丸と黒線: WT; 黒色のダイヤと灰色の破線: *phk1*-13; 黒色の三角形と黒色の破線: *phk2*-44; 黒色の四角形と黒色の点線: *phk1 phk2*-20。測定にはImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いた。生物学的に独立な実験を3回行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

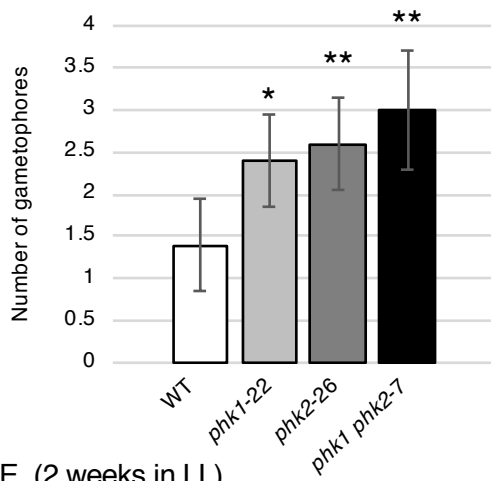
A (2 weeks in SD)



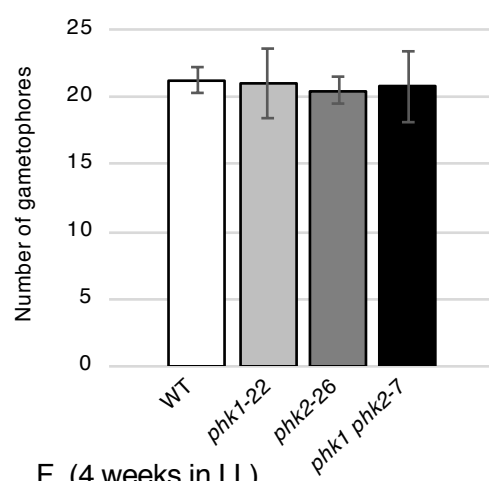
B (4 weeks in SD)



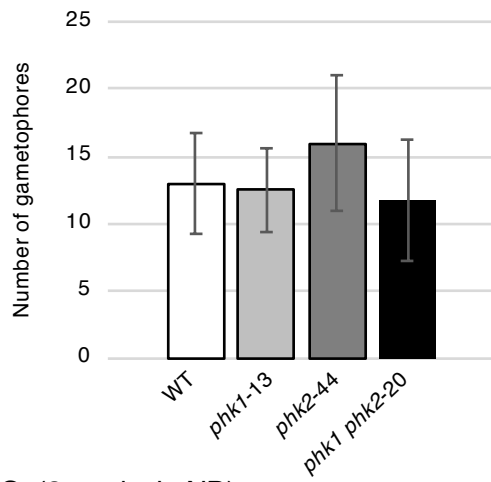
C (2 weeks in LD)



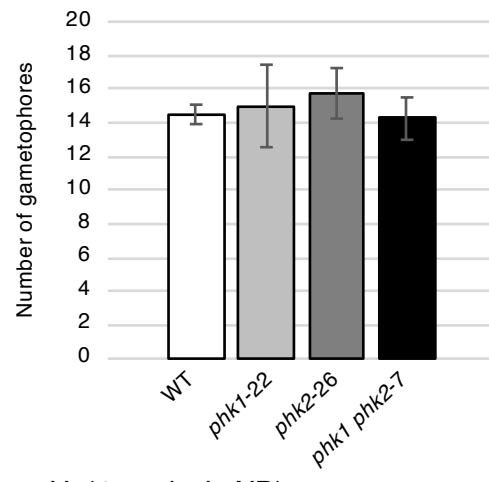
D (4 weeks in LD)



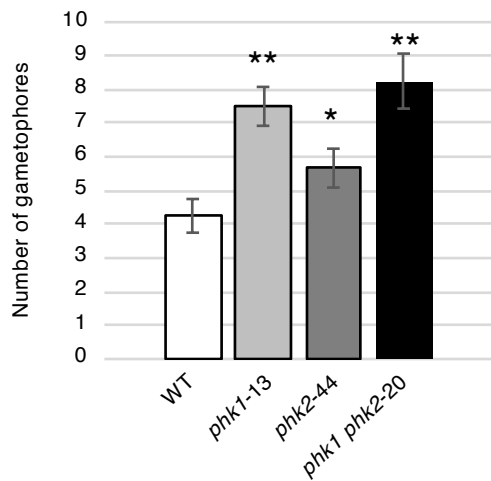
E (2 weeks in LL)



F (4 weeks in LL)



G (2 weeks in ND)



H (4 weeks in ND)

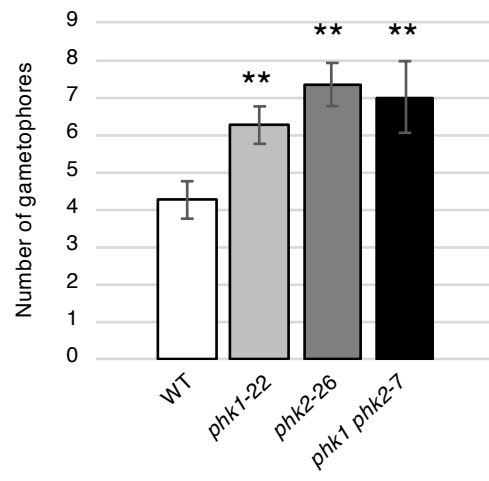


図10. 様々な明暗条件における*PHK*破壊株の茎葉体形成と原糸体の生育

各株の原糸体をSD (A, B)、LD (C, D)、LL (E, F)、ND (G, H) で2週間 (A, C, E, G) 培養または4週間培養 (B, D, F, H) し、発生した茎葉体の数を比較した。実験は図9と同様に行った。4つから5つの独立なコロニーの直径を測定し、算出された平均と標準偏差を示す。アスタリスクは各グラフのWTの値に対して統計的に有意な差があったことを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, analysis of variance (ANOVA))。生物学的に独立な実験を2回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

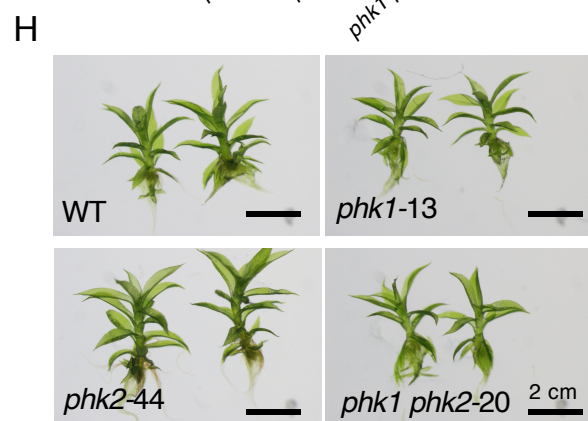
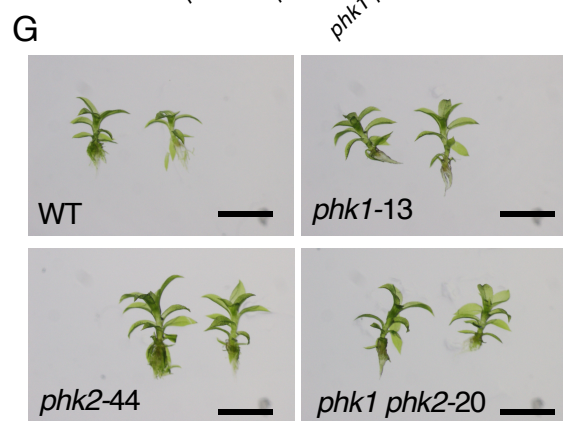
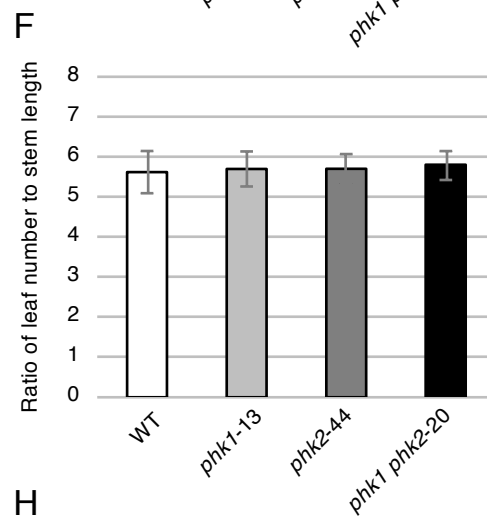
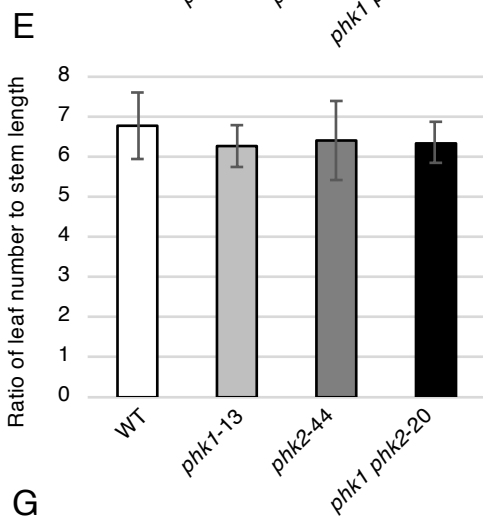
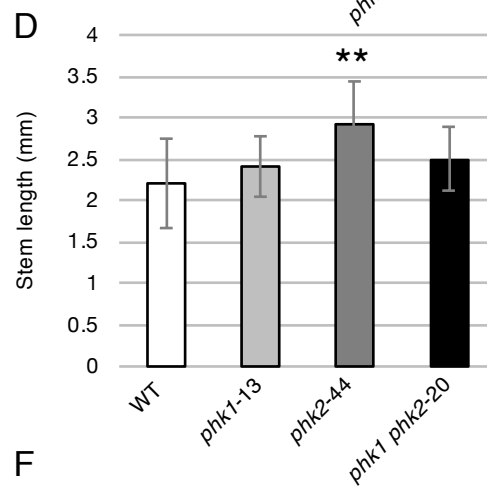
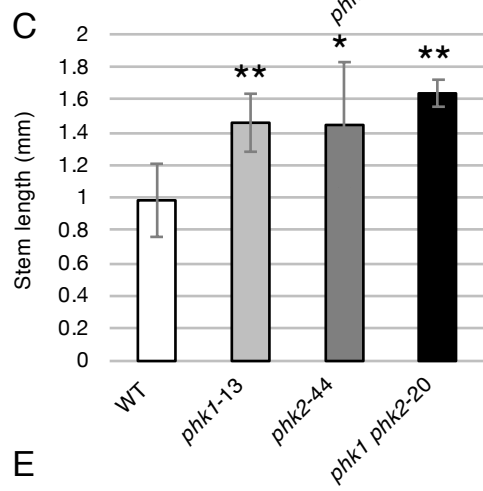
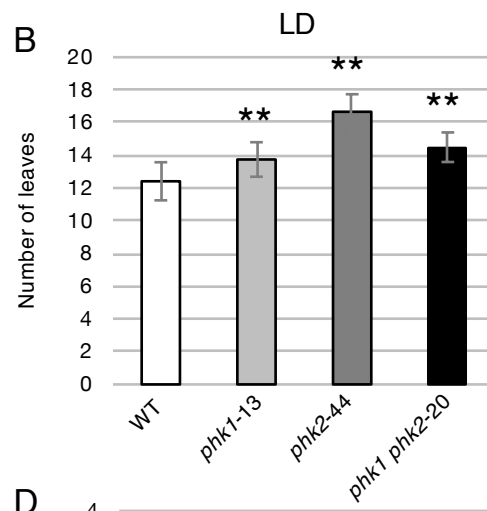
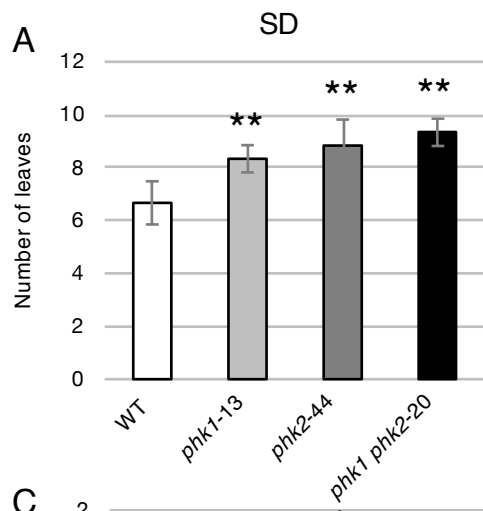


図11 *PHK*破壊株の茎葉体の形態

4週間生育させたWTと各破壊株の原糸体から発生した茎葉体の葉の数 (A, B) 、茎の長さ (C, D) 、茎の長さに対する葉の数の比 (E, F) の比較。実験は図9と同様に行った。SD: A, C, E; LD: B, D, F。6つ以上の異なる茎葉体から算出された平均と標準偏差を示す。アスタリスクは、各グラフのWTの値に対して統計的に有意な差があったことを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, ANOVA) 。各コロニーの代表的な写真を示す; SD: G; LD: H。スケールバー: 2 cm。

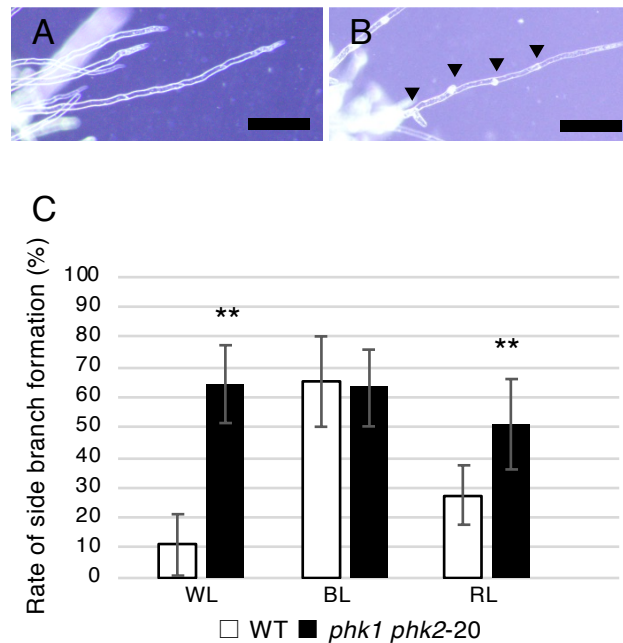


図12. *PHK*破壊株におけるカウロネマ側枝形成

光に誘導されるカウロネマ側枝の数をWTと*PHK*二重破壊株 (*phk1 phk2-20*) の間で比較した。2日間白色光を照射したカウロネマ細胞の代表的な写真を示す: (A) WT; (B) *phk1 phk2-20*。スケールバー: 100 μm 。矢頭は側枝（側枝始原細胞を含む）を示す。(C) WTと*phk1 phk2-20*におけるカウロネマ側枝形成率の比較。カウロネマ頂端細胞から6細胞（側枝ができない頂端細胞を除く）についての側枝を数え、細胞数に対する側枝の形成率を算出した。27から44のカウロネマ細胞から算出された平均と標準偏差を示す。**は、各グラフのWTの値に対して統計的に有意な差があったことを示す ($p < 0.01$, t検定)。直径1 mmほどの原糸体の組織片をBCD培地上で横から赤色光 ($\sim 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) を照射して10日間培養した。その後、白色光 (WL: $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)、青色光 (BL: $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)、赤色光 (RL: $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) の下に移し、さらに2日間培養して側枝形成を誘導した。生物学的に独立な3回の実験を行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

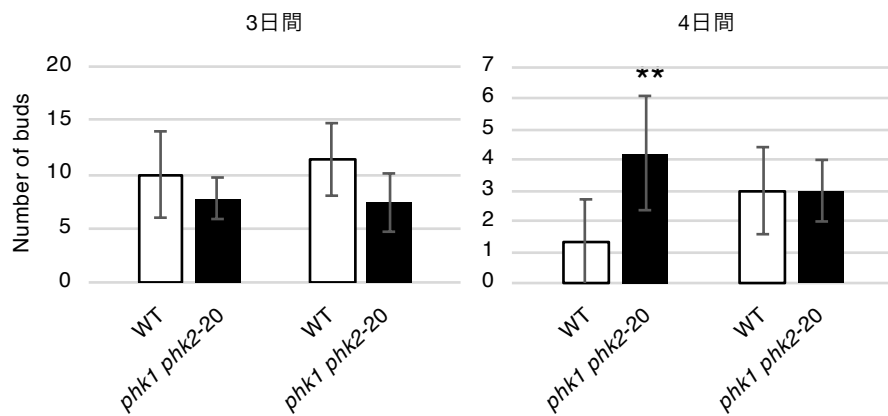


図13. *PHK*二重破壊株における芽の形成

白色光に誘導される芽の数をWTと*PHK*二重破壊株 (*phk1 phk2-20*) の間で比較した。図12と同様の方法で直径1 mmほどの原糸体の組織片を単独培養し、10日間弱赤色光を照射したのち、3日間（左）または4日間（右）白色光を照射し、コロニーあたりの芽の数を数えた。10の異なるコロニーから算出された平均と標準偏差を示す。**は、各グラフのWTの値に対して統計的に有意な差があったことを示す ($p < 0.01$, t検定)。生物学的に独立な4回の実験の結果を示す。

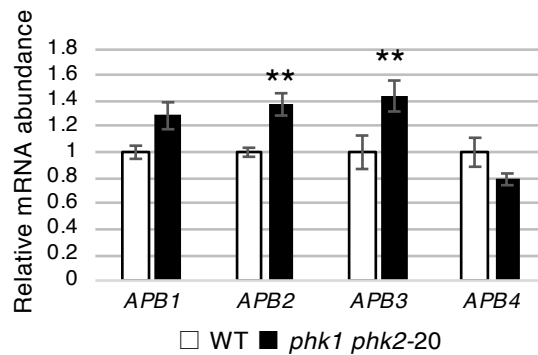
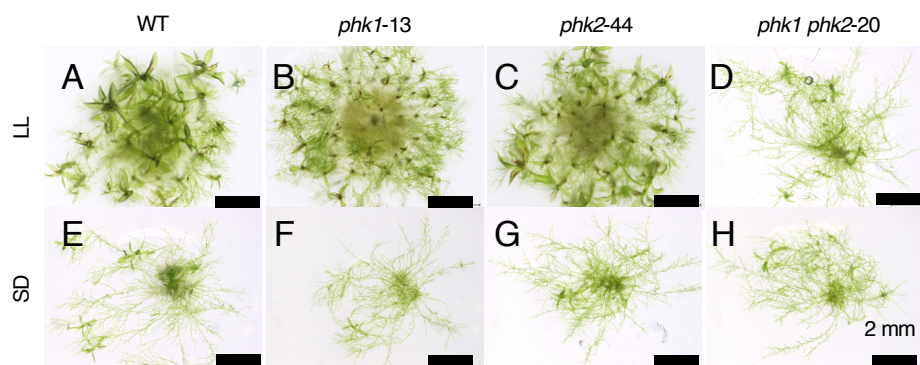
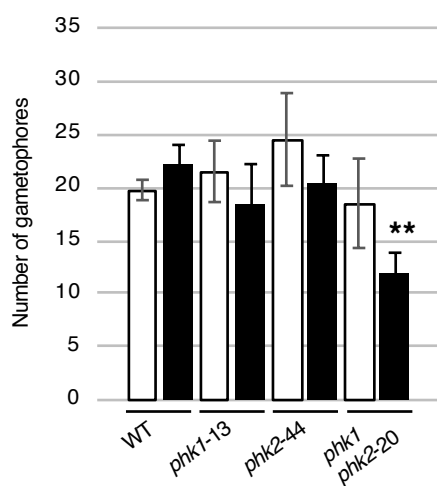


図14. *PHK*破壊株における*APB*遺伝子の発現

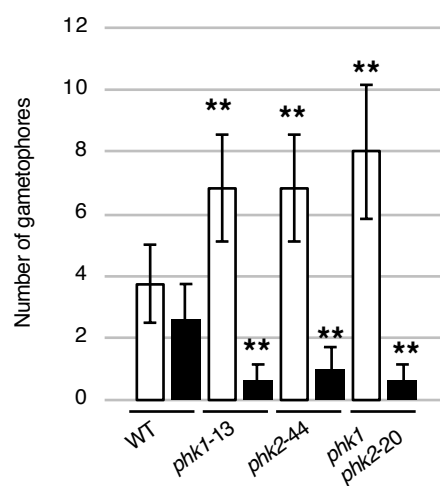
定量PCRにより*APB1*, *APB2*, *APB3*, *APB4*の相対的な発現量をWTと*phk1 phk2-20*の間で比較した。各原系体をSDで培養し、明期が始まる時間を0時間として、5時間目にそれぞれの全RNAを抽出した。内性コントロールとして α -チューブリン遺伝子を用いた。全RNAを反応の鋳型として用い、それぞれのWTの値を1とした相対値をプロットした。3回の試行から算出された平均と標準偏差の値を示す。**はWTと*phk1 phk2-20*の値に統計的に有意な差があることを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (t検定))。3回の独立した実験を行い、同様の傾向になることを確かめた。反応に用いたプライマーを表2に示す。



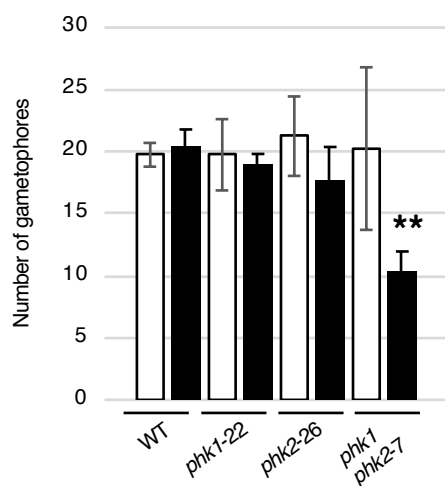
I (LL)



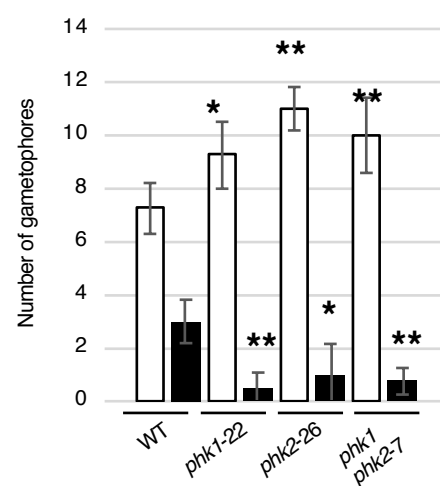
J (SD)



K (LL)



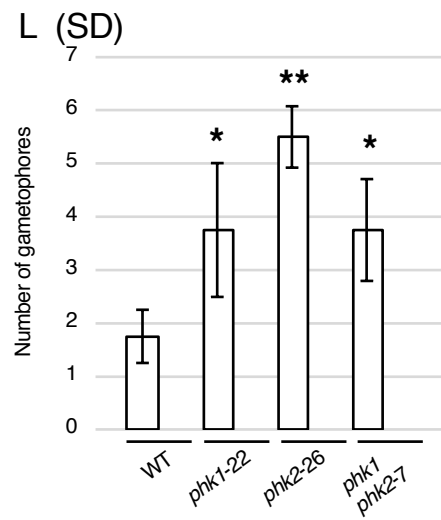
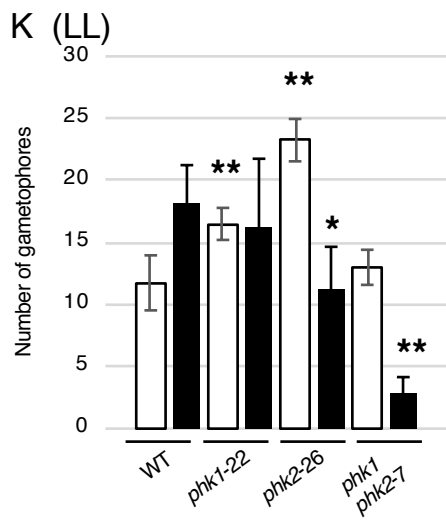
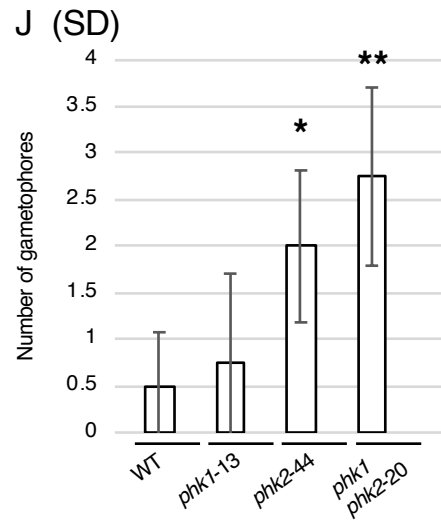
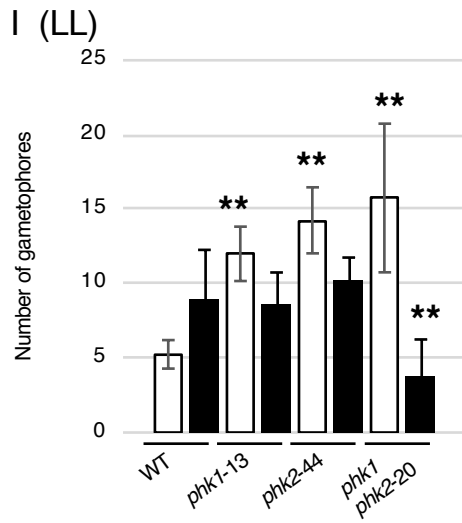
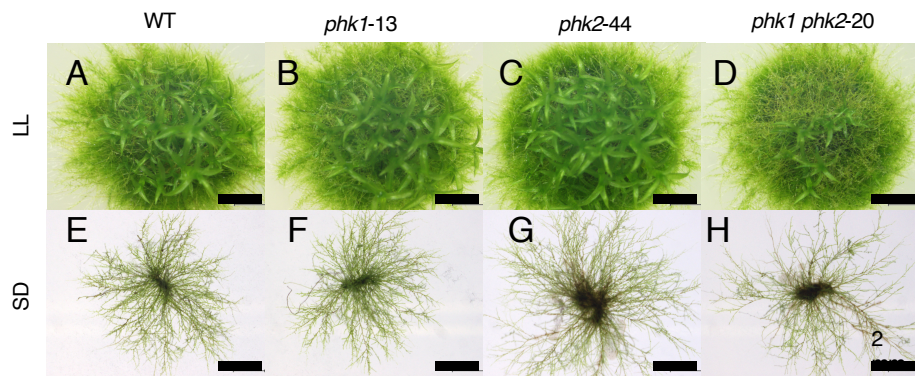
L (SD)



□ 好気条件 ■ 沈水条件

図15. 沈水条件下における*PHK*破壊株の茎葉体の形成と原糸体の生育

各株の原糸体をLL (A-D, I, K) またはSD (E-H, J, L) の沈水条件で培養し、発生した茎葉体の数を比較した。図9と同様に原糸体を1週間培養し、純水で完全に水没させ、さらに3週間培養した。各コロニーの代表的な写真を示す。WT: A, E; *phk1*-13: B, F; *phk2*-44: C, G; *phk1 phk2*-20: D, H。スケールバー: 2 mm。5つの独立なコロニーの直径を測定し、算出された平均と標準偏差を示す。アスタリスクは各グラフのWTの値に対して統計的に有意な差があったことを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, ANOVA)。生物学的に独立な実験を2回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。



□ 好気条件 ■ 低酸素条件

図16. 低酸素条件下における*PHK*破壊株の茎葉体の形成と原糸体の生育

各株の原糸体をLL (A-D, I, K) またはSD (E-H, J, L) の低酸素条件で培養し、発生した茎葉体の数を比較した。図9と同様に原糸体を酸素濃度6~12%の低酸素条件下で3週間培養した。低酸素条件の詳細は「材料と方法」の項に示した。各コロニーの代表的な写真を示す。WT: A, E; *phk1*-13: B, F; *phk2*-44: C, G; *phk1 phk2*-20: D, H。スケールバー: 2 mm。4つの独立なコロニーの直径を測定し、算出された平均と標準偏差を示す。アスタリスクは、各グラフのWTの値に対して統計的に有意な差があったことを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, ANOVA)。生物学的に独立な実験を2回以上行い、いずれにおいても同様の結果を得た。

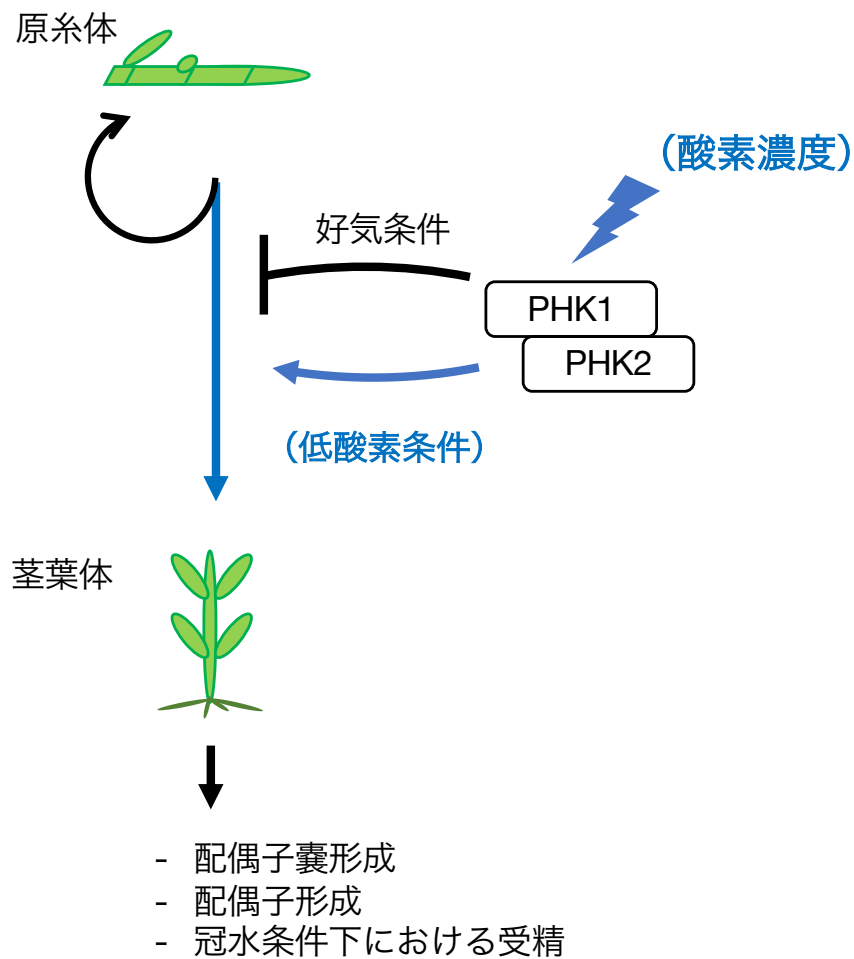


図17. 酸素濃度に依存した茎葉体形成の制御機構

PHK1/PHK2は茎葉体形成を好気条件では遅延させ、その一方で冠水条件ではおそらく低酸素状態を検知することによって促進させる。コケ植物は茎葉体上に配偶子嚢（造精器と造卵器）を形成する。精子が茎葉体表面の水の膜を泳いで卵子まで移動して受精し、胞子体が発生して胞子嚢ができる。