

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07185

研究課題名(和文) シャジクモ藻類の比較ゲノムと遺伝子機能解析から探る植物の多細胞体制進化

研究課題名(英文) Investigation on the evolution of the multicellular body plan in plants by focusing on comparative and functional genomics in charophycean algae

研究代表者

坂山 英俊 (Sakayama, Hidetoshi)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60391108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では植物多細胞体制の進化過程を解明するために、陸上植物とシャジクモ藻類が持つ1倍体多細胞体制と2倍体多細胞体制を遺伝子情報から比較した。その結果、シャジクモ藻類の発生段階や器官/細胞毎に特異的に発現する遺伝子を特定した。また、いくつかの遺伝子について詳細な発現解析と機能解析を実施し、その祖先的な性質と進化過程を推定し、シャジクモ藻類と陸上植物が持つ多細胞体制の進化過程を考察した。また、シャジクモのネイティブな遺伝子プロモーターを用いた外来遺伝子を発現させるコンストラクトを用い、マイクロインジェクション法、パーティクル・ボンバードメント法を用いた一過的な遺伝子導入系の検討を進めた。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the evolution of the multicellular body plan in land plants and charophycean algae, in this study, we compared their multicellular gametophyte and sporophyte generations based on their genes and genomes. We identified the developmental genes specifically expressed in different tissues/cells of *C. braunii*. Moreover, we explored the expression/function of these developmental genes in charalean algae in detail and discussed the evolution of the multicellular body plan in land plants and charophycean algae. We were also tried to introduce the exogenous gene into Chara cells using the native promoter of the Chara gene by microinjection and particle bombardment.

研究分野：藻類学、系統分類学

キーワード：進化 比較ゲノム シャジクモ藻類 ストレプト植物 多細胞体制

1. 研究開始当初の背景

陸上植物は約 4.8 億年前に水中生活をする藻類から進化した。これまでの形態学的研究と分子系統学的研究の結果から、シャジクモ藻類 (シャジクモ、コレオケータ、ヒメミカヅキモ、クレブソルミディウム等) が陸上植物に最も近縁だと考えられている。

陸上植物はすべて孢子体とよばれる 2 倍体多細胞体と配偶体とよばれる 1 倍体多細胞体からなる世代交代を行っており、陸上植物の 1 倍体と 2 倍体はどちらも多細胞である。一方、シャジクモ藻類では 1 倍体多細胞体はあるが 2 倍体多細胞体はない。では、陸上植物および各シャジクモ藻類の多細胞体制の発生システムにどのような違いがあるのであろうか。生物進化において、「新規に獲得した遺伝子」と「既存の遺伝子の流用」による多様化が、その後の形態進化に大きく寄与したと考えられている。

これまでに、主要な陸上植物の概要ゲノム解読が完了し、ごく最近、クレブソルミディウムの概要ゲノムが解読されたことから植物の多様性はゲノムレベルで比較できるようになってきた。研究代表者らは確立した培養株を用いて国際共同研究により概要ゲノムとトランスクリプトームを解読し、参照ゲノム配列の解明を進めている。現時点でのシャジクモゲノムをトランスクリプトームと陸上植物ゲノムとのホモロジーに基づきアノテーションした結果、シャジクモは 35,883 遺伝子を持つと推定された。それらの中から多数の植物特異的と考えられていた発生遺伝子がシャジクモ藻類から新たに見つかった。また、陸上植物とシャジクモに存在し、クレブソルミディウムに存在しない発生遺伝子も多数見つかった。したがって、シャジクモ藻類において、どの遺伝子が各器官/細胞、各発生ステージに特異的に発現するのか、発現する場合にどのような役割を果たしているかを解明し、陸上植物と比較し、それぞれの多細胞体制で「流用した遺伝子」と「新規に獲得した遺伝子」を明らかにすることにより、1 倍体 2 倍体多細胞体制の進化過程を解明できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では植物多細胞体制の進化過程を解明するために、陸上植物とシャジクモ藻類が持つ 1 倍体多細胞体制と 2 倍体多細胞体制を遺伝子情報から比較する。シャジクモにおいて研究代表者らが確立した培養株と概要ゲノムを基礎とし、さらにシャジクモ、クレブソルミディウムの器官/細胞毎、発生ステージ毎の発生遺伝子の発現パターンを網羅的に抽出し、どの遺伝子が各器官/細胞、各発生ステージに特異的に発現するのかを解明する。シャジクモにおける遺伝子導入系を確立し、器官/細胞、発生ステージ特異的に発現する遺伝子がシャジクモ藻類においてどのような役割を果たしているのかを解明し、陸

上植物とシャジクモ藻類に存在する発生遺伝子が、それぞれの多細胞体制獲得前後でどのように進化したのかを特定し、植物多細胞体制の進化過程を解明する。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq 法により、シャジクモ、クレブソルミディウムの各器官/細胞、各発生ステージを網羅する発生遺伝子の発現解析を実施し、器官/細胞特異的、発生ステージ特異的に発現する遺伝子群を同定する。

(2) シャジクモの遺伝子機能解析系を確立し、シャジクモにおいて遺伝子導入による機能解析を目指す。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、直接的に細胞レベルの発現場所を特定し、十分な遺伝子の動的情報を得ることにより、遺伝子機能を推定する。

(3) 陸上植物とシャジクモ藻類に存在する発生遺伝子が、それぞれの多細胞体制獲得前後でどのように進化したのかを特定する。

4. 研究成果

シャジクモの発生段階/器官/細胞毎のサンプルを集めるために、藻体の同調的培養方法を検討した。藻体の頂端部を切除し、新たに形成される葉状体の成長過程を観察した結果、頂端部切除から約 7 日目において、主軸の節部から新しい葉状体の形成が開始することが観察された。また、約 10 日後には、生殖器官の形成が開始することが観察された。約 14 日後には、生殖器官は肉眼で確認できるサイズに成長し、約 30 日後には、造精器からの精子の放出が観察された。さらに、約 40 日後には卵胞子の形成が観察された。

シャジクモの 11 条件 (各 3 検体) のサンプルから抽出した RNA を用いて RNA-seq 解析を実施した結果、シャジクモにおいて、合計 1,663,575,310 リード、161,120 Mbases のデータが得られた。また、生殖器官のみの解析を行ったオーストラリアシャジクモのサンプルにおいては、合計 325,964,092 リード、31,455 Mbases のデータが得られた。クレブソルミディウムにおいては 3 条件 (各 3 検体) のサンプルを解析し、合計 482,220,084 リード、47,214 Mbases のデータが得られた。

シャジクモから得られたリードをシャジクモの概要ゲノムにマッピングし、全転写産物の発現量を定量した。その結果、解析した全 11 条件において、特徴的な遺伝子発現パターンが観察された。

さらに、RNA-seq 解析の結果に基づき、条件間で変動する発現遺伝子数を調べた。栄養成長期をコントロールとした時の、生殖器官形成直後、生殖器官成熟期前期、生殖器官成熟期後期で変動する遺伝子を調べた結果、生殖器官形成直後で 6 個、生殖器官成熟期前期で 1896 個、生殖器官成熟期後期で 1917 個の発現変動遺伝子が確認され、それらには多くの転写因子が含まれていた。

また、主軸をコントロールとした時の、仮

根、卵胞子、生卵器、造精器、プロトネマの発現変動遺伝子についても同様の解析を行った結果、仮根で1561個、造精器で4543個、生卵器で4252個、発芽処理直後の卵胞子で7723個、発芽直前の卵胞子で7607個、プロトネマで4426個の発現変動遺伝子が確認され、それらには多くの転写因子が含まれていた。

さらに、各条件間での発現変動遺伝子数を比較した結果、生殖器官に着目すると、造精器で1870個、生卵器で440個の遺伝子が特異的に変動していた。また2倍体の卵胞子では2579個の遺伝子が特異的に変動していた。オーストラリアシャジクモのデータにおいても類似する結果が得られた。また、クレブソルミディウムにおいても同様の解析を進めている。

シャジクモの生殖器官形成過程と接合子に特異的な発現パターンを持つ遺伝子について陸上植物、シャジクモ藻類、緑藻類の配列を用いて分子系統解析を実施し、シャジクモの配列の系統的な位置づけを明らかにした。また、これらの遺伝子について、シャジクモにおける発現様式をRT-PCR法、*in situ*ハイブリダイゼーション法によって解析し、発生段階/器官毎に特異的に発現する遺伝子を特定した。また、シャジクモの遺伝子をシロイヌナズナに導入し機能解析を行い、遺伝子の構造や機能、およびシャジクモ藻類と陸上植物が持つ多細胞体制の進化過程を考察した。

シャジクモのゲノム配列情報に基づき、生活環を通して高い発現を示すと考えられる遺伝子のプロモーターが含まれるゲノム領域を用い、外来遺伝子を発現させるコンストラクトを作製し、シャジクモにおけるマイクロインジェクション法、パーティクル・ボンバードメント法を用いた一過的な遺伝子導入系の検討を進めた。

以上の研究を通して、シャジクモ藻類の発生遺伝子の発現プロファイルと、シャジクモ藻類と陸上植物の遺伝子レベルの違いの外観が見えてきた。また、個々の遺伝子の解析により、その祖先的な性質と進化過程を推定することができた。今後、シャジクモのこれらの遺伝子のより詳細な発現解析と機能解析を実施するとともに、RNA-seq解析の結果から明らかとなった、各発生段階/器官に特異的な発現パターンを示す多くの遺伝子について、同様の解析を実施することで、ストレプト植物の多細胞体制の進化過程の解明に繋げることが出来ると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

① Urbaniak, J. and Sakayama, H. Taxonomical analysis of closely related species of *Chara* L. section *Hartmania* (Streptophyta: Charales)

based on morphological and molecular data. *Fottea* 17: 222–239 (2017). (査読有り)
DOI: 10.5507/fot.2017.004

② 坂山英俊. シャジクモ類の和名について. *海洋と生物* 230: 229–234 (2017). (査読無し)

③ Kasahara, M., Suetsugu, N., Urano, Y., Yamamoto, C., Ohmori, M., Takada, Y., Okuda, S., Nishiyama, T., Sakayama, H., Kohchi, T. and Takahashi, F. An adenyllyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system. *Scientific Reports* 6: 39232 (2016). (査読有り)
doi:10.1038/srep39232

④ Suzuki, M., Segawa, T., Mori, H., Akiyoshi, A., Ootsuki, R., Kurihara, A., Sakayama, H., Kitayama, T., Abe, T., Kogame, K., Kawai, H. and Nozaki, H. Next-generation sequencing of an 88-year-old specimen of the poorly known species *Liagora japonica* (Nemaliales, Rhodophyta) supports the recognition of *Otohimella* gen. nov. *PLOS ONE* 11: e0158944 (2016). (査読有り)
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158944>

⑤ Breuninger, H., Thamm, A., Streubel, S., Sakayama, H., Nishiyama, T. and Dolan, L. Diversification of a transcription factor family led to the evolution of antagonistically acting genetic regulators of root hair growth. *Current Biology* 26: 1622–1628 (2016). (査読有り)
DOI: 10.1016/j.cub.2016.04.060.

⑥ Iida, S., Ikeda, M., Amano, M., Sakayama, H., Kadono, Y. and Kosuge, K. Loss of heterophylly in aquatic plants: not ABA-mediated stress but exogenous ABA treatment induces stomatal leaves in *Potamogeton perfoliatus*. *Journal of Plant Research* 129: 853–862 (2016). (査読有り)
DOI 10.1007/s10265-016-0844-x

⑦ Komuro, T., Sakayama, H., Kamiya, H. and Yamamuro, M. Reconstruction of the former charophyte community out of the oospores identified in Lake Shinji sediments. *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, 417, 12 (2016). (査読有り)
<http://dx.doi.org/10.1051/kmae/2015045>

⑧ Sakayama, H., Kai, A., Nishiyama, M., Watanabe, M. M., Kato, S., Ito, M., Nozaki, H. and Kawai, H. Taxonomy, morphology and genetic variation of *Nitella flexilis* var. *bifurcata* (Charales, Characeae) from Japan. *Phycological Research* 63: 159–166 (2015).

(査読有り)

DOI: 10.1111/pre.12085

[学会発表] (計 29 件)

- ①渡邊みゆき・山田敏弘・西山智明・川井浩史・伊藤元己・坂山英俊. シャジクモ藻類 シャジクモにおける *LEAFY* 遺伝子ホモログの発現・機能解析. 日本藻類学会第 42 回大会, 東北大学 (仙台), 2018 年 3 月 24 日.
- ②吉田智弘・内貴章世・佐藤拓哉・坂山英俊. 西表島の淡水湿地林における着生植物オオタニワタリの空間分布. 第 65 回日本生態学会大会, 札幌コンベンションセンター (札幌), 2018 年 3 月 17 日.
- ③坂山英俊・宮田大輔・加藤 将・川井浩史・西山智明. 培養株を用いたシャジクモの種内系統と生態型の遺伝的基盤に関する研究. 日本植物分類学会第 17 回大会, 金沢歌劇座 (金沢), 2018 年 3 月 8 日.
- ④西山智明・鎌田寛彬・宮田大輔・山口勝司・重信秀治・坂山英俊・笠原雅弘. 分離集団の薄いショットガンシーケンシングによるシャジクモ遺伝学的地図の構築. 日本植物分類学会第 17 回大会, 金沢歌劇座 (金沢), 2018 年 3 月 8 日.
- ⑤Sakayama, H. and Nishiyama, T. The genome and ecological evolution of a charalean alga *Chara braunii*. 65th NIBB Conference Marchantia Workshop 2017, Renaissance of Marchantia polymorpha -the genome and beyond-, Okazaki, Japan, Dec. 16-18, 2017.
- ⑥Nishiyama, T, Kamada H., Miyata D., Yamaguchi K., Shigenobu S., Sakayama H. and Kasahara M. Genetic map construction with low depth segregant sequencing in *Chara braunii*. 65th NIBB Conference Marchantia Workshop 2017, Renaissance of Marchantia polymorpha -the genome and beyond-, Okazaki, Japan, Dec. 16-18, 2017.
- ⑦板橋 武・橋本研志・坂山英俊・西山智明・北畑信隆・Bonnot Clemence・Hetherington Sandy・Dolan Liam・朽津和幸. 緑色植物の活性酸素生成酵素 NADPH oxidase/Rboh の分子進化における Ca²⁺依存的活性制御機構の獲得起源. 日本植物学会第 81 回大会, 東京理科大 (野田), 2017 年 9 月 8 日.
- ⑧原口武士・木下佳菜・玉那覇正典・坂山英俊・西山智明・富永基樹・伊藤光二. 高速化ミオシン XI 導入による単子葉植物ブラキポディウムの表現型解析. 日本植物学会第 81 回大会, 東京理科大 (野田), 2017 年 9 月 10 日.
- ⑨坂山英俊・宮田大輔・加藤 将・西山智明. シャジクモの生態型の進化に関する研究. 日本藻類学会第 41 回大会, 高知大学 (高知), 2017 年 3 月 25 日.
- ⑩上嶋崇嗣・中村誠司・加藤 将・坂山英俊・芹澤(松山)和世・芹澤如比古. 富士五湖における最近の車軸藻類の分布状況. 日本藻類学会第 41 回大会, 高知大学 (高知), 2017 年 3 月 24 日.
- ⑪西山智明・鎌田寛彬・宮田大輔・山口勝司・重信秀治・坂山英俊・笠原雅弘. 分離集団の薄いショットガンシーケンシングによるシャジクモ遺伝学的地図の構築. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学 (鹿児島), 2017 年 3 月 16 日.
- ⑫笠原賢洋・末次憲之・浦野裕貴・山本千愛・大森未樹矢・高田侑季・奥田修二郎・西山智明・坂山英俊・河内 孝之・高橋文雄. 精子を持つ植物で見つかったアデニル酸シクラーゼ. 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学 (鹿児島), 2017 年 3 月 16 日.
- ⑬Nishiyama, T., Kamada, H., Miyata, D., Kasahara, M. and Sakayama, H. *De novo* sequencing of *Chara braunii* genome and construction of genetic map. Advanced Genome Science International Symposium, The Start of New Genomics, Tokyo, Japan, 10 January, 2017.
- ⑭Sakayama, H. and Nishiyama, T. Genome and transcriptome of charophytes. 7th International Research Group on Charophytes Symposium, Astana, Kazakhstan, 31 August–2 September, 2016.
- ⑮García, A. and Sakayama, H. Charophytes, origin of land plants and terminology. 7th International Research Group on Charophytes Symposium, Astana, Kazakhstan, 31 August–2 September, 2016.
- ⑯Nishiyama, T., Sakayama, H. and Sakakibara, K. Genomes of bryophytes and charophyceans. ICAR 2016 International Conference on Arabidopsis Research, Gyeongju, Korea, 29 June–3 July, 2016.
- ⑰Nishiyama, T., Sakayama, H., Sakakibara, K., et al. Genome sequencing charophyceans, liverworts, and hornworts: making model systems. EMBO Workshop, New model systems for early land plant evolution, Vienna, Austria, June 22-24, 2016.

- ⑱ Sakayama, H., Miyata, D., Kato, S. and Nishiyama, T. Evolutionary analyses on ecological differentiation of a cosmopolitan freshwater alga *Chara braunii* (Charales, Streptophyta). EMBO Workshop, New model systems for early land plant evolution, Vienna, Austria, June 22–24, 2016.
- ⑲ 西山智明・坂山英俊. シャジクモの生殖器官のトランスクリプトーム解析. 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター (沖縄), 2016 年 9 月 16 日.
- ⑳ 渡邊みゆき・西山智明・鈴木 穰・坂山英俊. シャジクモの発生遺伝子の発現プロファイリングに関する研究. 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター (沖縄), 2016 年 9 月 16 日.
- ㉑ 原口武士・木下佳菜・玉那覇正典・坂山英俊・西山智明・富永基樹・伊藤光二. 速度変型ミオシン XI 導入による単子葉植物ブラキポ ディウム^ポの成長促進. 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター (沖縄), 2016 年 9 月 16 日.
- ㉒ 玉那覇正典・原口武士・木下佳菜・坂山英俊・西山智明・富永基樹・伊藤光二. 生物界最速ミオシンである *Chara braunii* (シャジクモ) のミオシン XI の機能解析. 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター (沖縄), 2016 年 9 月 16 日.
- ㉓ 板橋武・橋本研志・坂山英俊・西山智明・北畑信隆・Bonnot Clemence・Hetherington Sandy・Dolan Liam・朽津和幸. 藻類・陸上植物の細胞壁空間に ROS を産生する酵素 Rboh の分子進化. 日本植物学会第 80 回大会, 沖縄コンベンションセンター (沖縄), 2016 年 9 月 16 日.
- ㉔ 飯田聡子・坂山英俊・角野康郎・小菅桂子. 水生植物の気孔形成と塩ストレス応答. 日本生態学会第 63 回大会, 仙台国際センター (仙台), 2016 年 3 月 24 日.
- ㉕ 坂山英俊・Michelle T. Casanova・Kenneth G. Karol・加藤 将・樋口澄男・野崎久義・川井浩史. 日本とオーストラリアから発見された車軸藻類シャジクモ属の新種の形態, 系統, 分類. 日本藻類学会第 40 回大会, 日本歯科大学 (東京), 2016 年 3 月 20 日.
- ㉖ 藤原ひとみ・坂山英俊・大西美輪・石崎公庸・豊倉浩一・郷 達明・関本弘之・西山智明・池谷仁里・菅野里美・手塚あゆみ・永野 惇・小菅桂子・深城英弘・三村徹郎. 植物細胞リン酸輸送機構とその進化について. 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学上田キャンパス (盛岡), 2016 年 3

月 19 日.

- ㉗ 宮田大輔・西山智明・川井浩史・坂山英俊. シャジクモの遺伝学的解析に向けた交配実験系の確立. 日本植物学会第 79 回大会, 朱鷺メッセ (新潟), 2015 年 9 月 8 日.
- ㉘ 飯田聡子・坂山英俊・角野康郎・小菅桂子. 水生植物の異形葉形成と海水適応. 第 4 回近畿植物学会講演会, 大阪市立大学理学部附属植物園 (交野), 2015 年 11 月 7 日.
- ㉙ 西山智明・豊田 敦・宮田大輔・鈴木 穰・藤山秋佐夫・坂山英俊. シャジクモのゲノム解説. NGS 現場の会第 4 回研究会, つくば国際会議場 (つくば), 2015 年 7 月 1–3 日.

[図書] (計 1 件)

- ① 坂山英俊. シャジクモ科. 新牧野日本植物図鑑. pp. 1366–1371. 北隆館 (2017). (改訂・分担執筆、22 分類群を担当)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂山 英俊 (SAKAYAMA, Hidetoshi)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 60391108

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山田 敏弘 (YAMADA, Toshihiro)
金沢大学・自然システム学系・准教授
研究者番号: 70392537

石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 00452293

(4) 研究協力者

西山 智明 (NISHIYAMA, Tomoaki)
鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)
川井 浩史 (KAWAI, Hiroshi)
三村 徹郎 (MIMURA, Tetsuro)
渡邊みゆき (WATANABE, Miyuki)