

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18593

研究課題名(和文) NGSによる進化的茎頂分裂組織欠失変異植物群の原因遺伝子同定に向けた基礎研究

研究課題名(英文) NGS studies towards the isolation of genes responsible for the loss of the shoot apical meristem during plant evolution

研究代表者

西井 かなえ (NISHII, Kanae)

東京学芸大学・教育学部・研究員

研究者番号：50743770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトカルプス属ロゼット種は、茎頂分裂組織(SAM)が進化の過程で失われ、葉柄上部より葉発生が起こり偏心ロゼット種と呼ばれる。ところが、稀に規則的な葉発生が起こる中心ロゼット種が存在する。本研究では、中心ロゼット種と偏心ロゼット種の葉発生と分裂組織の違いに注目し、その背景にある分子機構解明を目的として、形態学的解析と遺伝学的資源の整備を行った。結果として、中心ロゼット種でのSAM形成が形態学的に示された。遺伝学的解析の基盤を得るため、NGSを用いてゲノムシーケンス、トランスクリプトームを得た。中心ロゼット種と偏心ロゼット種のF2集団を用いてRADシーケンスによる遺伝マッピング作成を試みた。

研究成果の概要(英文)：The majority of rosulate *Streptocarpus* (Gesneriaceae) species initiate leaves from the petiolode and form a false rosette (excentric rosulates). On the other hand, some rosulates show centralized phyllotaxy (centric rosulates). To understand the leaf formation and related meristem activities, we investigate the underlying morphogenesis and genetic mechanisms. The results of morphological analyses showed that a shoot apical meristem (SAM) is present in centric rosulates while excentric rosulates do not retain a SAM. Further, genetic resources were built for the non-model plant *Streptocarpus* using state-of the art NGS techniques: genome sequence data were obtained with DNaseq, transcriptome sequences were obtained with RNAseq, and genotype information to build the genetic map was obtained with RADseq. The obtained genetic resources provide the bases to start genetic analyses to isolate the genes regulating the shoot apical meristem formation and its evolution in the genus *Streptocarpus*.

研究分野：進化発生学

キーワード：茎頂分裂組織 葉発生 次世代シーケンス ゲノムシーケンス トランスクリプトーム イワタバコ科
ストレプトカルプス属 RADシーケンス

1. 研究開始当初の背景

栄養成長期の植物は、茎頂に存在する茎頂分裂組織 (SAM) の機能により、葉と茎を繰り返し形成する。SAMは、内部に未分化能を保ち外部から分化した器官を形成する高度に体系化された分裂組織である。

ところが、派生的な被子植物であるイワタバコ科ストレプトカルプス属では、通常のSAMが観察されない植物、無茎種が進化した。無茎種の偏心ロゼット種は、SAMの代わりに葉身と葉柄の間に一時的な介在分裂組織 (溝分裂組織: GM) を形成し、葉発生が起こる。ストレプトカルプス属ではほとんどのロゼット種が偏心ロゼット種であるが、まれに中心部より規則的な葉発生が起こる中心ロゼット種が存在する。この中心ロゼット種に関しては、これまでほとんど研究がなされていないが、形態より中心ロゼット種ではSAMが存在する可能性が考えられた (Jong 1978)。

2. 研究の目的

(1)

本研究では、ストレプトカルプス属の葉発生機構に注目しその背景にある分裂組織の多様化を解明することを目的とした。そのため、ストレプトカルプス属の中心ロゼット種と偏心ロゼット種に注目し、それぞれの葉発生機構を解析、比較することで、葉発生のための分裂組織の多様化・進化を明らかにすることを試みた。

(2)

葉発生に関わる分子機構とその多様性及び進化過程を明らかにしたく、交配実験により葉形成と分裂組織の制御が遺伝学的に制御されている可能性を試した。

(3)

遺伝学的解析は形態形成を司る未知の遺伝機構を探る有効な手法であるが、ストレプトカルプス属は非モデル植物であり、解析に用いることのできる遺伝資源が存在しなかった。そのため、大規模シーケンスを行うことが出来る次世代シーケンサーを活用し、遺伝資源を短期に大量に得ることを試みた。ストレプトカルプスでこれまで発生進化学的研究材料として多く用いられてきた *Streptocarpus rexii* をモデル種として、ゲノム配列などの遺伝資源を確立することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

中心ロゼット種 *Streptocarpus kentaniensis* と偏心ロゼット種 *Streptocarpus rexii* を実験材料として用いた。また、遺伝マップ作成には一葉種 *Streptocarpus grandis* も用いた。植物体はエジンバラ植物園から供与され、現地で育成を行った。植物体は、種子を育苗ポットに播種後、3 か月ほどインキュベーターで育成したのち、植え替えを行い、エジンバラ植物園の実験温室にて現地スタッフの協

力のもと育成を行った。

(2) 形態学的解析

種子発芽後、経時的な植物体観察を、光学顕微鏡を用いて行った。発芽直後、第一葉形成時、5~10 葉形成時の幼植物体及び成植物体を、ホルマリン固定液を用いて固定した。固定したサンプルを用い、葉発生部位に注目して走査型顕微鏡観察を行った。同時に、パラフィン切片を作成し、組織内部構造を観察した。

(3) 交配実験

中心ロゼット種 *S. kentaniensis* と偏心ロゼット種 *S. rexii* を交配し、F1 個体を得た。F1 個体の自家交配により F2 集団を作成した。F1 個体、F2 集団の葉発生過程の形態学的解析を上記の通り行い、両親型の葉発生と比較した。300 個体の大規模 F2 集団を、エジンバラ植物園園芸課の協力により育成した。F2 集団は経時的に写真撮影を行った。

また、遺伝マップ作成のため *S. grandis* と *S. rexii* を交配した 200 個体のバッククロス集団を作成した。

(4) 次世代シーケンサー・バイオインフォマティクス解析

次世代シーケンサーを用いた解析により、ストレプトカルプス属の遺伝資源構築を行った。

① ゲノムシーケンス

ゲノムレファレンス配列を得るため、*S. rexii* の DNA シーケンスを行った。植物の葉から ChargeSwitch kit (Thermo Fisher Sci.) を用いて DNA 抽出を行い、Truseq DNA library (Illumina) を作成、HiSeq X と HiSeq4000 それぞれ 1 レーンを用いてシーケンスを行った。得られた配列は、KAT プログラムにより最適 k-mer とゲノムサイズを予測した。AbySS プログラムにより国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータを用いてアセンブリを行った。

② トランスクリプトーム

ゲノム上に点在する遺伝子情報を効率的に得るため、*S. rexii* と *S. kentaniensis* のトランスクリプトームを作成した。植物葉、シュート、花、果実、根より Trizol と Purelink RNA 精製 kit (Thermo Fisher Sci.) を用いて RNA 抽出を行い、Truseq RNA library (Illumina) を作成、HiSeq4000 を用いてシーケンスを行った。得られた配列を Trimmomatic プログラムによりトリミングし、Trinity プログラムによりアセンブリを行った。

③ RAD シーケンス

遺伝子マップ作成のため、本研究で育成した大規模 F2 集団を用いて制限酵素サイトを利用した RAD シーケンス解析を行った。DNA を CTAB 法により抽出し、制限酵素により切断後、アダプター配列をライゲーション、PCR により付加したライブラリーを作成した。HiSeq2500 を用いてシーケンスを行った。これにより、遺伝型解析と遺伝マーカー作成を

同時に行った。得られた結果を STACKS、BWA、Stampy プログラムを用いてアッセムブリと遺伝型決定を行った。得られた遺伝型情報を基に、Joinmap プログラムを用いて遺伝マップ構築を行った。

4. 研究成果

(1)

偏心ロゼット種 *S. rexi* では、発芽後、大子葉が形成され、その基部から葉発生が起こる。葉発生時には、一時的な溝分裂組織 (groove meristem) が形成され、葉発生後に消滅する。未分化能を保ち継続的に葉発生をする茎頂分裂組織は形成されない (Nishii and Nagata 2007)。形態学的解析の結果、中心ロゼット種 *S. kentaniensis* は偏心ロゼット種 *S. rexi* と異なり、発芽後に大子葉と第一葉の間に、茎頂分裂組織と同様の外衣内体構造を持つドーム状の組織が形成された。この組織は茎頂分裂組織と同様の外衣内体構造を持ち、側面から規則的に葉発生が起こることから、茎頂分裂組織であると考えられる。結果として、これまで茎頂分裂組織は欠失していると考えられていたストレプトカルプス属ロゼット種でも、中心ロゼット種では茎頂分裂組織が維持、あるいは再獲得されていることが明らかとなった。

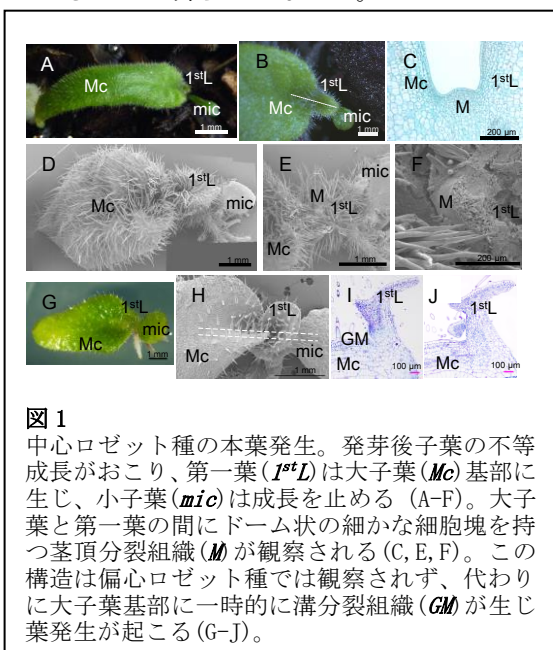


図 1

中心ロゼット種の本葉発生。発芽後子葉の不等成長がおこり、第一葉 ($1^{st}L$) は大子葉 (*Mc*) 基部に生じ、小子葉 (*mic*) は成長を止める (A-F)。大子葉と第一葉の間にドーム状の細かな細胞塊を持つ茎頂分裂組織 (*M*) が観察される (C, E, F)。この構造は偏心ロゼット種では観察されず、代わりに大子葉基部に一時的に溝分裂組織 (*GM*) が生じ葉発生が起こる (G-J)。

(2)

偏心ロゼット *S. rexi* と中心ロゼット *S. kentaniensis* を交配した F1 植物は、全てが中心ロゼット型を示した。この結果、中心ロゼット型が偏心ロゼット型に対して遺伝的に優性であることが示された。F2 植物は、中心ロゼット：偏心ロゼット型に分離したが、中心ロゼットと偏心ロゼットを合わせ持つ中間的な形質を持つ個体も観察された。

(3)

本研究の結果、ストレプトカルプス属の遺伝学的解析のための重要な遺伝資源を得ること

が出来た。

①

本研究の成果として、*S. rexi* の DNA シーケンスが得られた。シーケンスリードに存在するユニークな配列モチーフ数の解析により、核ゲノムが約 640Mbp であると予測された。アッセムブリの結果、核ゲノム配列に加え、全葉緑体配列、全ミトコンドリア配列を得た。核ゲノムアッセムブリの結果、N50 値が 35,586 bp である 95,883 個のゲノムスキュフォールドが得られ、その全長はおよそ 596 Mbp であった。ゲノムリピート配列を考慮すると、おそらく 50%-70% 程度の核ゲノム配列が得られたと予測される。

②

RNA シーケンス、アッセムブリの結果、*S. rexi* と *S. kentaniensis* のトランスクリプトーム配列が得られた。それぞれ 59,042 (*S. rexi*) 32,000 (*S. kentaniensis*) のトランスクリプトーム配列を得た。シロイヌナズナゲノムを利用した BUSCO 遺伝子モチーフ検索値は、68% (*S. rexi*) 69% (*S. kentaniensis*) であり、トランスクリプトームデータがおよそ 70% 程度の全遺伝子配列を含むことを示唆する。

③

RAD シーケンスを *S. rexi* × *S. kentaniensis* F2 集団 300 個体と、*S. grandis* × *S. rexi* のバッククロス集団 200 個体、それぞれの両親個体を用いて行った。これまでに、*S. grandis* × *S. rexi* の遺伝マップ作製を行い、結果として、599 遺伝マーカーを持つ遺伝マップを作成することが出来た。現在 *S. rexi* × *S. kentaniensis* のデータを用いた遺伝マップを構築中であり、今後シテニー解析を行う予定である。

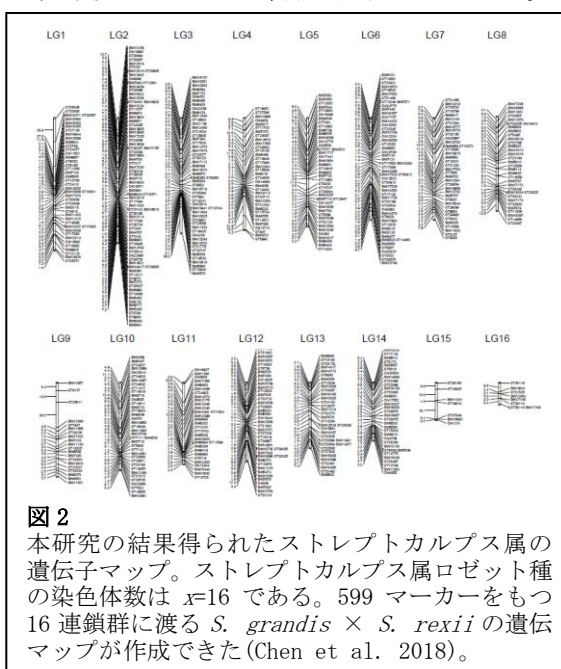


図 2

本研究の結果得られたストレプトカルプス属の遺伝子マップ。ストレプトカルプス属ロゼット種の染色体数は $x=16$ である。599 マーカーをもつ 16 連鎖群に渡る *S. grandis* × *S. rexi* の遺伝マップが作成できた (Chen et al. 2018)。

<引用文献>

① Jong K, Phyllomorphic organisation in

rosulate *Streptocarpus*, Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 36 卷、1978、369-396

② Nishii K、Nagata T、Developmental analyses of the phyllomorph formation in the rosulate species *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). Plant Systematics and Evolution, 265 卷、2007、135-145

③ Chen Y-Y, Nishii K, Barber S, Hackett C, Kidner CA, Gharbi K, Nagano AJ, Iwamoto A, Möller M (2018) A first genetic map in the genus *Streptocarpus* generated with RAD sequencing based SNP markers. South African Journal of Botany, 117 卷、2018、158-168

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 7 件)

① Yun-Yu Chen、西井かなえ、Barber Sadie、Hackett C、Kidner CA、Gharbi K、永野惇、岩元明敏、Möller M (2018) A first genetic map in the genus *Streptocarpus* generated with RAD sequencing based SNP markers. South African Journal of Botany、査読有、117 卷、2018、158-168
DOI:10.1016/j.sajb.2018.05.009

② 西井かなえ、Huang Bing-Hong、Wang Chun-Neng、Möller Michael、From shoot to leaf: step-wise shifts in meristem and *KNOX1* activity correlate with the evolution of a unifoliate body plan in Gesneriaceae. Development Genes and Evolution、査読有、227 卷、2017、41-60
DOI:10.1016/j.sajb.2016.12.010

③ Chen Yun-Yu、西井かなえ、Spada Alberto、Wang Chun-Neng、榊原均、小嶋美紀子、Wright Frank、MacKenzie Katrin、Möller Michael、Cytokinin biosynthesis *ISOPENTENYLTRANSFERASE* genes are differentially expressed during phyllomorph development in the acaulescent *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). South African Journal of Botany、査読有、109 卷、2017、96-111
DOI:10.1016/j.sajb.2016.12.010

④ 西井かなえ、Hughes Mark、Briggs Marie、Haston Elspeth、Christie Frieda、DeVilliers Margaret J.、Hanekom Thea、Roos Wiets G.、Bellstedt Dirk U.、Möller Michael、*Streptocarpus* redefined to include all Afro-Malagasy Gesneriaceae:

Molecular phylogenies prove congruent with geography and cytology and uncovers remarkable morphological homoplasies. Taxon、査読有、64 卷、2015、1243-1274
DOI:10.12705/646.8

⑤ Petrova Galya、Moyankova Daniela、西井かなえ、Forrest Laura、Tsiripidis Ioannis、Drouzas Andreas D.、Djilianov Dimitar、Möller Michael、The European paleoendemic *Harberlea rhodopensis* (Gesneriaceae) has an oligocene origin and a pleistocene diversification and occurs in a long-persisting refugial area in southeastern Europe. International Journal of Plant Sciences、査読有、176 卷、2015、499-514
DOI:10.1086/681990

⑥ Möller Michael、西井かなえ、Callmander Martin W.、Phillipson Peter B.、Poncy Odile、Rearranging specimens on herbarium type sheets of *Streptocarpus betsiliensis* Humbert (Gesneriaceae). Candollea、査読有、70 卷、2015、145-150
DOI:10.15553/c2015v701a12

⑦ Middleton David J.、西井かなえ、Puglisi Carmen、Forrest Laura、Möller Michael、*Chayamaritia* (Gesneriaceae: Didymocarpoideae), a new genus from Southeast Asia、Plant Systematics and Evolution、査読有、301 卷、2015、1947-1966
DOI:10.1007/s00606-015-1213-2

[学会発表] (計 7 件)

① 西井かなえ、Chen Yun-Yu、Möller Michael. Recent progress in one-leaf plant studies: searching for meristem regulatory factors in their genomes、2018、第 59 回日本植物生理学会年会 (招待講演)

② 西井かなえ、Huang Bing-Hong、Wang Chun-Neng、Möller Michael、Early cotyledonary meristem activity and *STM* expression appears to be ancestral in Lamiales and has diversified in Gesneriaceae、2017、Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)

③ Chen Yun-Yu、西井かなえ、Wang Chun-Neng、Spada Alberto、榊原均、小嶋美紀子、Möller Michael、Differential expression of cytokinin biosynthesis *IPT* genes in non-model Cape Primrose plants、2017、Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)

④ 西井かなえ、Chen Yun-Yu、Barbar Sadie、

岩元明敏、Möller Michael. 茎頂分裂組織を欠失したストレプトカルプス属における分子進化機構解明に向けたゲノム資源の整備、2017、日本植物学会第81回大会

⑤Chen Yun-Yu、西井かなえ、Barber Sadie、Hackett Christine、Kidner Catherine、Gharbi Karim、Nagano Atsushi、岩元明敏、Möller Michael、Applying Next Generation Sequencing for building map using RAD-seq genotyping and draft genome assembly、2017、日本植物学会第81回大会

⑥ 西井かなえ、Huang Bing-Hong、Wang Chun-Neng、Möller Michael、Isocotylous and anisocotylous Gesneriaceae share the meristem activity in lateral organs、2016、日本植物学会第80回大会

⑦ 西井かなえ、Chen Yun-Yu、Wright Frank、Mackenzie Katrin、Spada Alberto、Wang Chun-Neng、Möller Michael、Expression study of *ISOPENYLTANSFERASE* genes in the rosulate *Streptocarpus rexi* in the light of the evolution of the cytokinin biosynthesis multigene family、2016、第57回日本植物生理学会年会

〔図書〕(計0件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西井かなえ (NISHII, Kanae)
東京学芸大学・教育学部・研究員

研究者番号: 50743770

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

岩元明敏 (IWAMOTO, Akitoshi)
東京学芸大学・教育学部・准教授

永野惇 (NAGANO, Atsushi)

龍谷大学・農学部・講師

モラ マイケル (MÖLLER, Michael)

Royal Botanic Garden Edinburgh, Senior scientific officer