

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06375

研究課題名(和文) 茎頂分裂組織を介さない葉発生制御因子の同定による植物葉発生多様化機構の解明

研究課題名(英文) Unravelling the genetics of leaf formation in unifoliates

研究代表者

西井 かなえ (Nishii, Kanae)

神奈川大学・付置研究所・研究員

研究者番号：50743770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は茎頂分裂組織により、未分化細胞を維持しつつ分化した葉と茎を繰り返し形成する。茎頂分裂組織機能の改変・多様化した葉分裂組織を持つイワタバコ科ストレプトカーパスを材料として用い、その分子機構を明らかとすることにより、植物分裂組織の機能の理解を目指した。遺伝学的解析は、未同定の分子機構を明らかにするのに有効であり、本研究では、次世代シーケンサー技術とバイオインフォマティクス解析により、非モデル植物ストレプトカーパスの遺伝学的解析を行う基盤を構築した。同時に、重イオンビーム照射による変異体集団を獲得できた。得られた成果により、ストレプトカーパスを用いた本格的な遺伝学的解析が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物の基本型から逸脱した非モデル植物に着目し、植物独自に成立した茎頂分裂組織機能の機能とその多様化機構を探ろうとした。これまで、シロイヌナズナなどのモデル植物の解析により、茎頂分裂組織の機能と分子生物学的機構が明らかとなってきた。一方、植物では茎頂分裂組織の機能が多様化し、形態多様性を生み出した一因となっている。ストレプトカーパス属はこのような植物の一つであり、本研究では、次世代シーケンサー技術を最大限に活用、また変異体集団を作成し、ストレプトカーパスの遺伝学的研究の基盤を作成した。これにより、ストレプトカーパスにおける茎頂分裂組織多様化の遺伝学的背景の探索を可能とした。

研究成果の概要(英文)：Plant morphological diversity linked to their meristem activities. This project ultimately aims to reveal the evolution and diversity of plant meristems and their diversified functions. We use the genus *Streptocarpus* as the study material that exhibits the unique leaf meristem activity instead of the conventional shoot apical meristem. Next generation sequencing method was heavily employed in the project to perform the genetic studies in *Streptocarpus*, including the developments of the high molecular weight DNA extraction methods for the genome sequencing. We also performed the heavy-ion irradiation and successfully generated the mutant population. These resources are important for future genetic studies of the plants.

研究分野：進化発生学

キーワード：次世代シーケンサー 高分子DNA抽出法 ゲノムアッセムブリ ゲノムワイド関連解析 重イオンビーム照射変異体 イワタバコ科 葉発生 茎頂分裂組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

本研究は、イワタバコ科ストレプトカーパス属を材料として、遺伝学的解析を行おうとするものである。ストレプトカーパスは、栽培が比較的容易であり、属内に多様な形態が見られ、進化発生学的解析に適した属といえる。特に無茎種グループは、茎頂分裂組織の代替として葉分裂組織が発達し、その活性の違いによるロゼット種と一葉種が進化した(文献④)。しかし、ストレプトカーパスは非モデル植物であり、遺伝学的解析を行うためのゲノム情報や、遺伝地図などの遺伝学的基盤が些少であった。

2000年代中頃より、ロゼット種 *Streptocarpus rexii* をモデル種とすることが提唱され、この種を用いた詳細な形態学的解析、進化発生学的解析が発表され(文献⑤、⑨など)、次世代シーケンサーを用いた *S. rexii* のトランスクリプトームが2013年に発表された(文献②)。さらに、我々のグループにより次世代シーケンサー解析によるドラフトゲノムアSEMBリと、異種交配システムを用いた遺伝地図が得られていた(文献①)。しかし、ゲノムはショートリードゲノムシーケンス法によるスカフォールド数が染色体数16に対し約10万と、連続性の低いものであった。より連続性の高いゲノムを得ることが本格的な遺伝学的解析を行うために重要であった。また、変異体集団は機能遺伝子の特定のため有用であるが、ストレプトカーパスでは園芸的に価値を高めるための変異体等は存在したが(文献③)、機能遺伝子を探索するための変異体集団作成は本研究が初めての試みであった。

2. 研究の目的

本研究は、属内に茎頂分裂組織・葉分裂組織の多様性が観察されるストレプトカーパス属を研究材料とし、茎頂分裂組織が植物で多様に進化した現象の遺伝的背景を探ることにより、植物分裂組織の理解を深めることを目的とした。具体的な目的は以下の三点であった。

(1) モデル種 *S. rexii* のゲノムシーケンスとアノテーション

ロゼット種 *S. rexii* をモデル種とするため、より連続性の高く、発現遺伝子などのアノテーション情報のあるゲノムを得ることを目的とした。これと関連して、ロングリードシーケンス法を行うための高分子DNA抽出法の改良が必要であった。

(2) 葉分裂組織活性をつかさどる遺伝子領域の探索

ロゼット種 *S. rexii* と一葉種 *S. grandis* の交配集団、近郊交配システムを用い、葉発生の活性を制御する遺伝子領域をゲノムワイド関連解析により特定することを試みた。

(3) 重イオンビーム照射による変異体集団作成

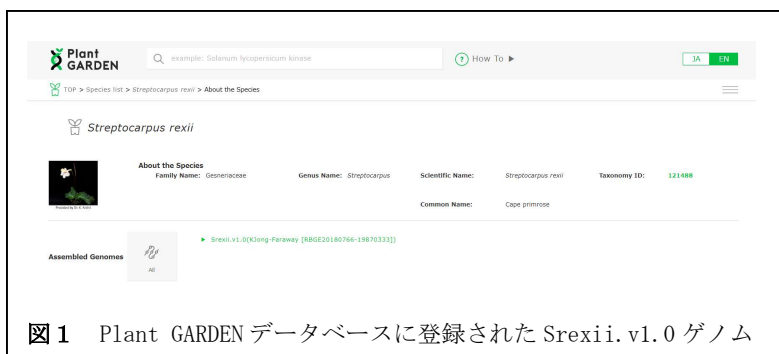
モデル種 *S. rexii* の変異体集団を重イオンビーム照射により作成することを目的とした。変異体作成の重イオンビームの最適照射強度を検出し、大規模変異体集団作成を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *S. rexii* の全ゲノムシーケンスのため、細胞核抽出とアニオン交換カラムによる高分子DNA抽出を行った。ロングリードシーケンス法である、Oxford Nanopore Technologies社のPromethIONシステムを用いて、2セルのシーケンスを行った。得られたデータは、NanoPlotにより評価した。CanuプログラムによりアSEMBリし、Racon及びMedakaプログラムによりアSEMBリエラーを改訂した。得られたアSEMBリはBlobToolsを用いて、コンタミネーションを除去した。RepeatModelerを用いてゲノムの反復配列ライブラリを作成し、NCBIよりイワタバコ科のトランスクリプトーム配列を取得、これらを用いてゲノムアノテーションを行った。さらに、全ゲノム重複解析をwgDプログラムにより解析した。並行して、本研究により開発されたPLCLパイプラインにより葉緑体とミトコンドリアゲノムのアSEMBリを行った。

(2) 無茎種ストレプトカーパスの葉分裂組織活性を司る遺伝領域を探索するため、近郊交配系を作成した。葉発生形質を目視で評価し、形質ごとにまとめ、予備的に9つのライブラリをIllumina社のHiSeqXシステムを用いてシーケンスを行った後、96個体から96ライブラリをNovaseqによりシーケンスを行った。得られた結果は、Popoolation2プログラムにより一塩基多型(SNP)解析を行い、形質に関連したSNPのフィッシャーの正確確率検定を行った。

(3) モデル種である *S. rexii* の種子に重イオンビーム照射を行った。炭素イオンを6段階とアルゴンイオンを3段階の異なる強度で照射した。得られた種子の生存率検定を行い、最適照射強度を調べた。最適照射強度を照射した種子を用い、M1大規模集団を育成し、M2種子を収穫した。



4. 研究成果

(1) 高分子・高純度 DNA 抽出法

ストレプトカーパスの植物体は、二次代謝産物、多糖類などを多く含み、従来の DNA 抽出法ではロングリードシーケンス法に必要な高品質の DNA が得られなかった。そのため、本研究では、細胞溶解前に細胞核抽出を行い、さらにソルビトール溶液による洗浄を行った。細胞溶解液には ProtinaseK を加え、アニオン交換カラムを用いて DNA を取得することで、ロングリードシーケンスデータのための高品質 DNA が抽出できた。本法は Protocols.io データベースに登録された (dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bempjcn)。

(2) *S. rexii* のゲノムアセンブリ

本研究の結果、N50 = 3,726,469 bp、スカフォールド数 5,855 である連続性の高いゲノムアセンブリが得られた。以前のショートリードシーケンスゲノムと比較すると、N50 が約 144 倍長くなり、スカフォールド数が約 1/16 となった (文献①、⑧)。*S. rexii* ゲノムと、他イワタバコ科 2 種のゲノムの反復配列ライブラリを作成し、合わせてイワタバコ科ゲノム反復配列ライブラリとし、Dfam データベース (<https://www.dfam.org/home>) に登録した。*S. rexii* ゲノムは、約 70% が反復配列であった。トランスクリプトーム配列は、*S. rexii* と他 5 種のイワタバコ科を用い、ゲノムアノテーションを行った。この結果、45,045 遺伝子がゲノム上に注釈付けられた。全ゲノム重複解析の結果、*S. rexii* ゲノムではシソ目特有の全ゲノム重複に加え、イワタバコ科 Didymocarpaceae 節特有の全ゲノム重複の可能性が示唆された。得られたゲノムとアノテーション情報は、Plant GARDEN データベースに登録された (<https://plantgarden.jp/en/index>)。

(3) PLCL パイプライン

ロングリードシーケンスデータを用いたオルガネラゲノムのアセンブリパイプラインを開発した。オルガネラゲノムのコピー数が核ゲノムと比較して高い傾向にあることを利用し、ロングリードデータをカバレッジ情報と BLAST 検索結果を合わせて解析し、得られた情報を基にアセンブリを行うものである。本法を用いて *S. rexii* の完全長葉緑体ゲノムが得られた。ミトコンドリアゲノムは線状にアセンブリされ、完全長であるかは不明であった。*S. rexii* のゲノムアセンブリと PLCL パイプラインは合わせて論文として発表された (文献⑧)。

(4) 葉発生形質の違いが見られる近郊交配系を用いたゲノムワイド関連解析の結果、 $-\log_{10}(p) > 10$ の強いシグナルが見られた。しかし、シグナルは多数のスカフォールド上に散見し、遺伝子領域特定には至らなかった。今後より連続性の高いゲノムを用いて解析、または集団の個体数を増やす必要があると考えられる。

(5) 変異体集団作成のため、照射後の生存率を確認した結果、照射結果の中では炭素イオンは 150 Gy と 200 Gy、アルゴンイオンは 20 Gy が最適であった。そこで、この強度で照射した植物体を合わせて約 1000 個体育成した。推測された M1 植物体の稔性は、約 40-60% であり、合わせて約 620 系統の M2 種子を取得できた。

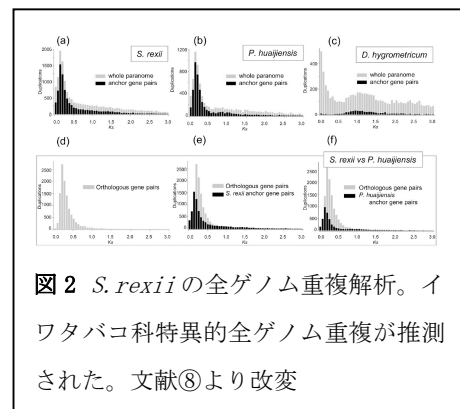


図2 *S. rexii* の全ゲノム重複解析。イワタバコ科特異的全ゲノム重複が推測された。文献⑧より改変

<主な引用文献>

- ① Chen Y-Y, Nishii K, Barber S, Hackett C, Kidner CA, Gharbi K, et al. A first genetic map in the genus *Streptocarpus* generated with RAD sequencing based SNP markers. *South African Journal of Botany*, 117 巻、2018、158-168
- ② Chiara M, Horner DS, Spada A. *De novo* assembly of the transcriptome of the non-model plant *Streptocarpus rexii* employing a novel heuristic to recover locus-specific transcript clusters. *PLoS One*, 8 巻、2013、e80961
- ③ da Silva JAT, Dewir YH, Wicaksono A, Sahijram L, Kim H, Zeng S, et al. African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.): Classical breeding and progress in the application of biotechnological techniques. *Folia Horticulture*, 29 巻、2017、99-111
- ④ Jong K, Burt BL. The evolution of morphological novelty exemplified in the growth patterns of some Gesneriaceae. *New Phytologist*, 75 巻、1975、297-311
- ⑤ Mantegazza R, Möller M, Harrison CJ, Fior S, De Luca C, Spada A. Anisocotly and meristem initiation in an unorthodox plant, *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). *Planta*, 225 巻、2007、653-663
- ⑥ Möller M, Cronk QC. Evolution of morphological novelty: a phylogenetic analysis of growth patterns in *Streptocarpus* (Gesneriaceae). *Evolution*, 55 巻、2001、918-929
- ⑦ Möller M. Nuclear DNA C-values are correlated with pollen size at tetraploid but not diploid level and linked to phylogenetic descent in *Streptocarpus* (Gesneriaceae). *South African Journal of Botany*, 114 巻、2018、323-344
- ⑧ Nishii K, Hart M, Kelso N, Barber S, Chen YY, Thomson M, et al. The first genome for the Cape Primrose. *Plant Direct*, 6 巻、2022、e388
- ⑨ Nishii K, Möller M, Kidner C, Spada A, Mantegazza R, Wang CN, et al. A complex case of simple leaves: indeterminate leaves co-express *ARP* and *KNOX1* genes. *Development, Genes and Evolution*, 220 巻、2010、25-40

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 13件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nishii Kanae, Hart Michelle, Kelso Nathan, Barber Sadie, Chen Yun Yu, Thomson Marian, Trivedi Urmi, Twyford Alex D., Moeller Michael	4. 巻 6
2. 論文標題 The first genome for the Cape Primrose <i>Streptocarpus rexii</i> (Gesneriaceae), a model plant for studying meristem driven shoot diversity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Atkins Hannah J., Bramley Gemma L.C., Nishii Kanae, Moeller Michael, Olivar Jay E. C., Kartonegoro Abdulrokhman, Hughes Mark	4. 巻 307
2. 論文標題 Sectional polyphyly and morphological homoplasy in Southeast Asian <i>Cyrtandra</i> (Gesneriaceae): consequences for the taxonomy of a mega-diverse genus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Systematics and Evolution	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00606-021-01784-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishii Kanae, Moeller Michael, Iida Hidetoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Mix and match: Patchwork domain evolution of the land plant-specific Ca ²⁺ -permeable mechanosensitive channel MCA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0249735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0249735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ogutcen Ezgi, Christe Camille, Nishii Kanae, Salamin Nicolas, Moeller Michael, Perret Mathieu	4. 巻 157
2. 論文標題 Phylogenomics of Gesneriaceae using targeted capture of nuclear genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Phylogenetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 107068 ~ 107068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ympev.2021.107068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishii Kanae, Fei Yue, Hudson Andrew, Moeller Michael, Molnar Attila	4. 巻 62
2. 論文標題 Virus-induced Gene Silencing in <i>Streptocarpus rexii</i> (Gesneriaceae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biotechnology	6. 最初と最後の頁 317 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12033-020-00248-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen Yun-Yu, Nishii Kanae, Kidner Catherine, Hackett Christine Anne, Moeller Michael	4. 巻 216
2. 論文標題 QTL dissection of floral traits in <i>Streptocarpus</i> (Gesneriaceae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10681-020-02647-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishii Kanae, Spada Alberto, Moeller Michael	4. 巻 30
2. 論文標題 Hormonal crosstalk in the regulation of meristem activity and the phyllomorph architecture in <i>Streptocarpus</i> (Gesneriaceae): a review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheedeia	6. 最初と最後の頁 96 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22244/rheedeia.2020.30.01.04	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Atkins H, Bramley G, Johnson M, Kartonegoro A, Nishii K, Kokubugata G, Moeller M, Hughes M	4. 巻 12
2. 論文標題 A molecular phylogeny of Southeast Asian <i>Cyrtandra</i> (Gesneriaceae) supports an emerging paradigm for Malesian plant biogeography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers of Biogeography	6. 最初と最後の頁 e44814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21425/F5FBG44184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Luna J, Richardson J, Nishii K, Clark J, Moeller M	4. 巻 44
2. 論文標題 The family placement of <i>Cyrtandromoea</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Systematic Botany	6. 最初と最後の頁 616 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1600/036364419X15620113920653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Huang Bing-Hong, Nishii Kanae, Wang Chun-Neng, Moeller Michael	4. 巻 76
2. 論文標題 Quantitative assessment of anisocotly in <i>Haberlea rhodopensis</i> and <i>Ramonda myconi</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Edinburgh Journal of Botany	6. 最初と最後の頁 377 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0960428619000179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishii Kanae, Kokubugata Goro, Moeller Michael, Atkins Hannah J.	4. 巻 76
2. 論文標題 Notes on <i>Cyrtandra</i> (Gesneriaceae) from Japan, Taiwan and Batan Island (Philippines)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Edinburgh Journal of Botany	6. 最初と最後の頁 333 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0960428619000106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishii Kanae, Wright Frank, Chen Yun-Yu, Moeller Michael	4. 巻 13
2. 論文標題 Tangled history of a multigene family: The evolution of ISOPENTENYLTRANSFERASE genes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0201198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0201198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen Yun-Yu, Nishii Kanae, Barber Sadie, Hackett Christine, Kidner Catherine A., Gharbi Karim, Nagano Atsushi J., Iwamoto Akitoshi, Moeller Michael	4. 巻 117
2. 論文標題 A first genetic map in the genus <i>Streptocarpus</i> generated with RAD sequencing based SNP markers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 South African Journal of Botany	6. 最初と最後の頁 158-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sajb.2018.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西井かなえ, Moeller Michael
2. 発表標題 Plant contig clustering-based genome assembly (PLCL) pipeline: assembling the chloroplast and mitochondrial genomes from Oxford Nanopore Technologies long-read sequencing
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nishii Kanae, Forrest Laura L., Bell David, Ruhsam Markus, Hollingsworth Peter M., Howard Caroline, Todorovic Maja, Hart Michelle
2. 発表標題 High Molecular Weight DNA extraction protocols for non-model plant species - the first step in long-read sequencing
3. 学会等名 The 5th European Conservation Genetics meeting (ConsGen22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西井かなえ, Moeller Michael
2. 発表標題 ストレプトカーパス属の異種交配系統における減数分裂の観察
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西井かなえ、Moeller Michael、飯田秀利
2. 発表標題 Evolutionary studies of the Ca ²⁺ -permeable mechanosensitive channel MCA
3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井かなえ、Chen Yun-Yu, Kidner Catherine, Hackett Christine A., Moeller Michael
2. 発表標題 ストレプトカルプス異種交配系統を用いた花形態形成因子のQTL解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井かなえ、Fei Yue, Hudson Andrew, Moeller Michael, Molnar Attila
2. 発表標題 ストレプトカルプス（イワタバコ科）のウィルス誘導性遺伝子サイレンシング
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西井かなえ、Huang Bing-Hong、Wang Chun-Neng、Moeller Michael
2. 発表標題 ヨーロッパ産イワタバコ科子葉の形態形成解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西井かなえ, Wright Frank, Chen Yun-Yu, Moeller Michael
2. 発表標題 サイトカニン合成遺伝子 ISOPENTENYLTRANSFERASE の複雑な進化過程
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Streptocarpus genome: Plant GARDEN database
<https://plantgarden.jp/en/search?s=Streptocarpus%20rexii>
 Gesneriaceae genome repeat library in Dfam version 3.7
<https://xfam.wordpress.com/2023/01/12/dfam-3-7-3-4-million-te-models-across-2346-taxa/>
 PLCL pipeline
<https://www.protocols.io/view/plant-contig-clustering-based-assembly-plcl-pipeli-j8nk4qw6g5r/v1>
 HMW DNA extraction for long-read sequencing
<https://www.protocols.io/view/high-molecular-weight-dna-extraction-for-long-read-n2bvjqxnvk5/v1>
 DNA extraction protocol for long read sequencing
<https://stories.rbge.org.uk/archives/30792>

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	Royal Botanic Garden Edinburgh	University of Edinburgh	
スイス	Cons. Jard. bot. Geneve		