

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06376

研究課題名(和文) 造卵器・造精器形成に基づく陸上植物基部大系統の質的分子系統解析

研究課題名(英文) Phylogenetic analysis of basal land plants based on developmental genes of antheridium and archegonium

研究代表者

小藤 累美子 (Kofuji, Rumiko)

金沢大学・生命理工学系・助教

研究者番号：40324066

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)：陸上植物の基部系統群全てが持つ造卵器、造精器の発生遺伝子を比較を目的として、近年コケ植物の基部系統群であることが明らかになったツノゴケを中心としたコケ植物での発生過程の詳細な解明と、発現する遺伝子群の網羅的探索を行った。その結果、これまで教科書で示されていた発生過程の知見を覆す発見や、従来知られていなかった造精器と造卵器の初期発生過程の類似性を見出した。ツノゴケ類の造卵器メリステムで特異的に発現する遺伝子の半数程度がゼニゴケ、ヒメツリガネゴケ、シロイヌナズナにオーソログが存在しないものであった。3種類のコケ植物の生殖器官で共通に発現している遺伝子の候補を得、うち1遺伝子はコケ植物に特有であった

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにした造精器の発生過程は、これまで50年以上も信じられていた教科書的事実を覆すものであり、教科書の記述を書き換えるとともに、ツノゴケ類の形態及び発生過程の再検討を促すものである。この発見により、これまでシダ植物の基部系統群の発生と比較されることもあった発生過程がツノゴケには存在しないことがわかった。また造精器と造卵器の初期発生過程の類似性は、両者の発生で同じメカニズムが使われている可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：To compare the developmental genes for antheridium and archegonium in all basal groups of land plants, we observed their developmental process in detail in hornworts and then performed a comprehensive search for gene expression. Recently, hornworts have been shown to be a basal group of bryophytes, and a model strain has been established. We found the developmental process of the antheridium chamber which overturned the textbook's description and found similarities in the early developmental process of both gametangia. About half of the genes specifically expressed in the archegonium meristem of hornworts had no ortholog in liverwort, *Physcomitrium patens*, and *Arabidopsis thaliana*. We obtained candidate genes commonly expressed in the reproductive organs of all three bryophyte groups, one of which was unique to bryophytes.

研究分野：植物の発生進化学

キーワード：コケ植物 造精器 造卵器 生殖発生 遺伝子発現 ツノゴケ 系統

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

陸上植物の大系統において、コケ植物のセン類、タイ類、ツノゴケ類、維管束植物の分岐順には6通りもの説があり、大規模分子データを用いた **phylotranscriptome** 解析 (**Wickett et al. 2014 PNAS**) でも決着がついていなかった。未だ解き明かされていない陸上植物基部、コケ植物セン類、タイ類、ツノゴケ類、及び維管束植物の4グループの系統関係を、造卵器・造精器の発生過程に關与する遺伝子に着目して解明することが本研究の目的である。最近の大規模データを用いた分子系統解析 (**Wickett et al. 2014, Puttick et al. 2018**) からコケ植物のセン類とタイ類が姉妹群であることが明らかとなり、さらにツノゴケ類を加えたコケ植物 3 グループが単系統であるという系統樹がもっとも支持された。ただしツノゴケ類の系統的位置については、陸上植物の最基部で分岐、維管束植物の姉妹群のどちらの可能性もまた残っており、ツノゴケ類の系統的位置が系統解明の鍵となる。

質的形質については、これらのグループのいずれかで共有されている様々な形態形質による系統樹が提案されているものの、ほとんどが外群には存在しない形質で、外群比較による原始形質なのか共有派生形質なのかの推定が出来ていない。一方、造卵器、造精器は外群にも存在し、形質状態の極性を決定出来る。

## 2. 研究の目的

造卵器、造精器は、陸上植物の基部系統群全てと外群のシャジクモ類にも存在しており、比較可能な形質であり、その形態や発生過程を詳細に見ると、コケ植物でのみ共通し、その単系統生を支持する形質 (卵細胞とジャケット細胞を形成する分裂パターンや、造精器の柄の形成など) (**Renzaglia et al. 2000 Phil Trans R Soc B**) や、セン類とツノゴケで共通する形質 (造精器始原幹細胞が柄を持つ造精器を束状に形成する) (**Shuster 1984 In New Manual of Bryology, Kofuji et al. 2018 Phil Trans R Soc B**) が存在する。本研究は、外群比較が可能な造卵器、造精器に着目し、その形態形成に關与する分子形質という質的分子データを用いて系統解析を行うことで、陸上植物の基部大系統研究にブレークスルーをもたらすことを目的とした。

## 3. 研究の方法

タイ類コマチゴケ、セン類ヒメツリガネゴケの実験系統、ツノゴケ類 *Anthoceros agrestis* の実験系統を用いて、造精器、造卵器の形成に關与する遺伝子群を解明する。実験系統が確立されていないコマチゴケについては、野外植物 (広島大 嶋村正樹博士より供与) を用いて発生過程の形態観察を行うとともに、性別不明無菌系統 (立教大学 榊原恵子博士より供与) から雄株を探索し、雌株とともに **RNA-seq** を行う。また、*Anthoceros agrestis* の実験系統 (Szövényi et al. 2015 **BMC Plant Biology**) (立教大学 榊原恵子博士より供与) を用いて、安定して造精器、造卵器形成を行う培養系を確立して形態観察を行い、その情報をもとに造精器と造卵器で **RNA-seq** 解析を行う。ヒメツリガネゴケについては、造精器、造卵器形成過程が解明できており (**Kofuji et al. 2018**; 小藤 未発表データ) また本研究の進行と同時期にその知見に基づいて行われた造精器発生過程の **RNA-seq** データを利用する。これら3種のデータを比較し、発生過程の共通性や、発現する遺伝子の共通性を探索する。

## 4. 研究成果

(1) タイ類の基部で分岐したコマチゴケ (雌雄異株) の野生株の造精器を **LSM** で観察し、茎頂に多数の造精器が形成されている生育段階では、複数の造精器が同じ細胞あるいは隣接する細胞から次々と作られることがわかった。すなわち、発生の進んだ造精器の基部から周囲に若い造精器が次々と作られるという形成パターンを示した。これは、セン類のヒメツリガネゴケ (**Kofuji et al. 2018**) や、ツノゴケ類と同じであり、コケ植物に共通する形成パターンである可能性がある。性別不明無菌株 (榊原恵子博士により作出) から雄株を探索するために培養と観察を行ったが、うち1株は雌株であることが分かり、残り2株は研究期間中に配偶子のう形成に至らず、雄株の無菌系統を得ることができなかった。

研究期間中に、ツノゴケ類がセン類とタイ類からなるクレードの姉妹群であることを支持する結果が複数のグループによって提示された (**Leebens-Mack et al. 2019; Li et al. 2020**) こともあり、以降の研究はツノゴケに絞って行なった。

(2) ツノゴケ類実験系統 *Anthoceros agrestis* Oxford strain (雌雄同株) (以下 *Anthoceros Oxford* 株) について、クノップ寒天培地を用いた無菌培養で、発生過程で均一な形態を示し一定の期間で安定してライフサイクルが回る、再現性のある培養条件を確立した。

( 3 ) **Anthoceros Oxford** 株について **LSM** による **3D** 画像の詳細な解析を行い、造精器、造卵器の発生過程を明らかにした。造精器も、造卵器同様 **notched meristem** から造精器チャンバーがつくられること、従来の見解と異なり表皮細胞が並層分裂した外側の細胞がチャンバールーフにならないことを発見した。野外から採集した **Anthoceros sp.** も同じ発生過程であったことから、実験系統や培養条件によるものではないことが示された。すなわち、シダ植物と比較されることもあった最初の並層分裂による表皮側細胞の発生運命は、シダ植物と全く異なっていた。

( 4 ) **Anthoceros Oxford** 株の造精器と造卵器はどちらも同じ細胞から同じ細胞分裂パターンで形成され、途中までは区別できないことがわかった。具体的には、どちらも葉状体の頂端幹細胞の背面に切り出された細胞から三角柱状に細胞が切り出されるまでの細胞分裂過程が共通していた。これは、造精器形成に先立つ造精器チャンバー形成と造卵器形成に共通のメカニズムが使われている可能性を示している。

( 5 ) **Anthoceros Oxford** 株は雄性先熟であるが、少なくとも( 2 )の培養条件においては、すべての個体や葉状体の頂端幹細胞から作られる最初の配偶子のうは造精器であったが、2つ目以降は造精器の場合と造卵器の場合が混在しており、連続して造精器を作り続ける雄性期は見られなかった。また、ノッチ状メリステムが発達する以前に造精器形成が開始されることから、無性期のノッチ状メリステムが存在しないことがわかった。

( 6 ) ( 5 )の結果を受けて、**Anthoceros Oxford** 株の **RNA-seq** のために、造卵器のみを形成する時期の葉状体 **19** 個体から、メリステムを含む組織片(以下造卵器メリステム)と、メリステムの周辺から伸びたローブの組織片を、それぞれ **800** 細胞程度になるように採取し、**single cell RNA-seq** 法 ( **Kubo et al. 2019** ) を用いて計 **38** 個のライブラリーを作成し、シーケンズを実施して **DEG** 解析を行なった。その結果、造卵器メリステムとローブの双方で発現する遺伝子はアクチンやチューブリンを含む **9570** 個、ローブで **2** 倍以上の発現上昇が見られた遺伝子が **1078** 個、造卵器メリステムで **2** 倍以上の発現上昇が見られた遺伝子が **1020** 個検出された。このうち、上位の遺伝子の半数程度がタイ類ゼニゴケ、セン類ヒメツリガネゴケ、被子植物シロイヌナズナにはホモログが存在しないものだった。造卵器メリステムで **2** 倍以上の発現上昇が見られた遺伝子には、ゼニゴケで造卵器・造精器形成を制御する **RKD** 遺伝子が含まれており、**RKD** 遺伝子がコケ植物で共通して生殖器官の発生に関与する可能性が示された。

( 7 ) ヒメツリガネゴケの造精器形成期と葉形成期の茎葉体茎頂の **Quarz-seq** データ ( 基礎生物学研究所 長谷部光泰教授より供与 ) の **DEG** 解析から、造精器形成の初期過程で発現している遺伝子の候補を **68** 個得た。うち **Phytozome Gene ancestry** によりコケ植物にのみ存在すると示された **2** つのグループに属する **4** 遺伝子について分子系統解析を行ったところ、いずれも維管束植物にもオースログが存在していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小藤 累美子、嶋村 正樹	4. 巻 12
2. 論文標題 ツノゴケの組織と形態	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物科学の最前線	6. 最初と最後の頁 206 ~ 222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24480/bsj-review.12d4.00217	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小藤 累美子
2. 発表標題 基部陸上植物の幹細胞
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小藤 累美子
2. 発表標題 ツノゴケの組織発生
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 亮、小林 淳平、嶋村 正樹、小藤 累美子
2. 発表標題 ツノゴケにおける雌雄の生殖器官形成過程の類似性
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 小林 淳平、小藤 累美子
2. 発表標題 ツノゴケ類の造精器発生過程における新知見
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 亮、西山 智明、久保 稔、小藤 累美子
2. 発表標題 モデルツノゴケAnthoceros agrestisの生殖メリステムにおけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	山田 敏弘  (Yamada Toshihiro)  (70392537)	大阪市立大学・大学院理学研究科・教授   (24402)	

	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
研究 協力者	中村 亮  (Nakamura Toru)		

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
---------	---------