

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02549

研究課題名(和文)メリステム関連遺伝子から迫る陸上植物の共通祖先

研究課題名(英文)Elucidation of last common ancestor of land plants based on meristem related genes

研究代表者

西山 智明(Nishiyama, Tomoaki)

金沢大学・疾患モデル総合研究センター・助教

研究者番号：50390688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメミカツキモから、YABBY遺伝子の遺伝子破壊株候補を得た。ナガサキツノゴケ KNOX2遺伝子及びBELL遺伝子の過剰発現株を得て表現型を観察した。シャジクモLEAFYをクローニングしてコード領域全体の配列を確定し、ナガサキツノゴケで形質転換を行なっている。ナガサキツノゴケの遺伝子破壊システムは計画の株を作成したがゲノム編集が確認できておらず、今後各要素の発現を確認する。シャジクモの形質転換についてプロモーター・ターミネーターとして有効な配列を新たにパーティクルボンバードメントで確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コケ植物、シャジクモ藻類のゲノム解読からわかってきた被子植物のメリステム制御に関わる遺伝子の機能解明を進めている。この研究により、陸上植物の共通祖先はどのようなものであったのか、藻類からどのようにして陸上植物が成立し、陸上植物が多様化したかの過程についてより具体的に推定するのにつながる。またこれらの生物での遺伝子機能解析技術の向上は他の遺伝子の機能解析にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：Closterium yabby knockout candidate strains were obtained. Anthoceros agrestis KNOX2 and BELL ectopic expression strains were obtained and their phenotypes were observed. Chara braunii LEAFY cDNA containing complete coding sequence was cloned and its nucleotide sequence was determined. The cDNA were transformed to A. agrestis for ectopic expression. CRISPR-Cas9 construct with A. agrestis U6 promoter candidate was introduced to A. agrestis, but editing was not confirmed. Confirmation of expression of each component should be performed. A new promoter terminator combination for C. braunii was confirmed to be able to drive an exogenous reporter gene by particle bombardment.

研究分野：植物進化学

キーワード：ナガサキツノゴケ シャジクモ ヒメミカツキモ YABBY LEAFY

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸上植物の最後の共通祖先がどのようなものであったかは陸上植物の進化を理解する上で重要である。1980年代(Mishler & Churchill 1984, DOI:10.2307/2806602) から2000年代くらい(Qui et al. 2006; PMID: 17030812)まで、コケ植物が維管束植物に対して側系統的に順次分岐し、タイ類が最初期に分岐するとして、タイ類の様に葉状体と単純な孢子体を持つような植物が共通祖先であるというように考えられてきた。しかし、代表者らは、葉緑体にコードされる遺伝子の解析からセン類とタイ類は単系統になることを示し(Nishiyama et al. 1999 PMID: 10474899, Nishiyama et al. 2004 PMID: 15240838)、transcriptome のデータによるゲノム遺伝子の解析(Wickett et al. 2014 PMID:25355905)でもそのことが認められるようになってきた。ツノゴケゲノム解読で得られたオーソログに限っての解析でも単系統性が再確認された(Li et al. 2020 PMID:32170292; Zhang et al. 2020 PMID: 32042158)(図1)。

また、通導組織(Xu et al. 2014 PMID: 24652936)や孔辺細胞(Chater 2016 PMID: 27892923)の分化制御にヒメツリガネゴケと被子植物で共通の遺伝子が使われていることが示されてきた。また孔辺細胞の分化に関わる遺伝子のオーソログはツノゴケ類でも見つかっている(Chater et al. 2017 PMID: 28356502 及び Li et al. 2020; Zhang et al. 2020)。こうしたことから、陸上植物の共通祖先がゼニゴケなどタイ類の様に葉状体と単純な孢子体を持つという認識は覆され、現生陸上植物の共通祖先はすでに気孔をもっていたが、ゼニゴケなどでは退化して失ったものと考えられるべきであることが明らかである。現生陸上植物の共通祖先は、気孔を持っていて、配偶体が独立生活し、鞭毛をもって泳ぐ精子と大きい卵細胞を持っていたであろうことはコンセンサスとして良いと考えられる。一方、ヒメツリガネゴケにおいてCLFを破壊すると、孢子体様の器官が形成され、この器官が分枝をする(Okano et al. 2009 PMID: 19805300)ことから、もともと共通祖先で孢子体に分枝する能力を持っていたであろうとも考えられ、決定的な証拠を示すには至っていないが、化石記録としてはコケ植物と同定されるものより、多孢子嚢植物 Polysporangiophytes とされる Horneophyton や Aglaophyton の方が古い時代から得られていることとは整合する。維管束植物は通常、孢子体にシュート頂分裂組織を持ち無限成長をすることができるのに対して、セン類・タイ類の孢子体は一過的に分裂活性を持つものの、単一の孢子嚢を形成して世代を終える。これに対して、ツノゴケ類では、孢子嚢の基部に持続的な分裂を継続する分裂組織をもち、そこから孢子嚢を作るといった特徴があり、この持続する分裂組織が共通の起源を持つと考える仮説が考えられている。

近年、陸上植物の基部で分岐した植物及び陸上植物に近縁なシャジクモ藻類のゲノム解読が進んできた。例えば、クレブソルミディウム(Hori et al. 2014 PMID: 24865297), シャジクモ(Nishiyama et al. 2018 PMID: 30007417), ヒメツリガネゴケ(Rensing et al. 2007 PMID: 18079367), ゼニゴケ(Bowman et al. 2017 PMID: 28985561), イヌカタヒバ(Banks et al. 2011 PMID: 21551031), ニシノオオアカウキクサ及びサンショウモ属 *Salvinia cucullata* (Li et

al 2018 PMID: 29967517),ナガサキツノゴケ(Li et al. 2020)ならびにホウライツノゴケ(Zhang et al.) について出版されている(系統関係については図1を参照)。

これらのゲノムを比較することによって、陸上植物成立の過程で、いつどのような遺伝子群が獲得されてまた増加あるいは喪失したかというようなことがゲノム比較によってわかってきた。例えば、エチレンのシグナル伝達系に関わる遺伝子の相同遺伝子はシャジクモと陸上植物の共通祖先で獲得された一方、エチレン合成の最終段階にあたる ACC oxidase 酵素は上記のシャジクモ藻類~シダ植物のゲノムにはなく、種子植物のみで見られることがわかり、乾燥などのストレス応答に関わる植物ホルモン アブシジン酸の受容に関わる中心的な受容体 PYR/PYL は、接合藻類と陸上植物のみで見ついている。また、シロイヌナズナで側生器官の背腹性制御に関わる YABBY 転写因子ファミリーは種子植物でのみ知られていたが、ツノゴケゲノムの解析から見つかリ、ヒメミカツキモにおいても類似の C2C2 Zn-finger motif と YABBY に高い類似性を示す HMG domain を持つ遺伝子も見つかっている。このことは、陸上植物の共通祖先で既に YABBY が獲得されていたが、セン類・タイ類やイヌカタヒバでは YABBY 遺伝子が喪失されているということを意味する。一方、ツノゴケ類では、シュート頂分裂組織の形成維持に関わる因子の一つであるクラス1 KNOX 転写因子が失われており、コケ植物ではそれぞれ別の遺伝子が失われているために、共通祖先がどのような植物であったかを推定するには、ツノゴケ類、セン類、タイ類、それぞれのゲノムでどれかにはなくても共通祖先にあった遺伝子はどれかということを考えて行く必要がある。さらに、これら、被子植物で重要な機能を果たしている遺伝子の相同遺伝子がシャジクモ藻類やコケ植物で発見されても、それらの相同遺伝子がどのような機能をもっているのかは実は明らかではない。たとえば、LEAFY タンパク質については、クレブソルミディウム、ツノゴケ類、セン類はタイ類や維管束植物とは異なる DNA 配列を認識して結合することが *in vitro* で示されている(Sayou et al. 2014, PMID:24436181)。特にツノゴケ類の配列は、藻類型の配列にもセン類型の配列にも、タイ類・維管束植物型の配列にも結合しうするため、進化の過程で遷移中間型として働いた可能性が指摘されている。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム解析から見えてきた陸上植物進化の諸問題を各種における YABBY, LEAFY などのメリステム関連因子の遺伝学的解析を進めることによって解明することを目指す。また、これを実現するため、シャジクモ、ヒメミカツキモ、ツノゴケの遺伝子機能解析系を洗練させる。

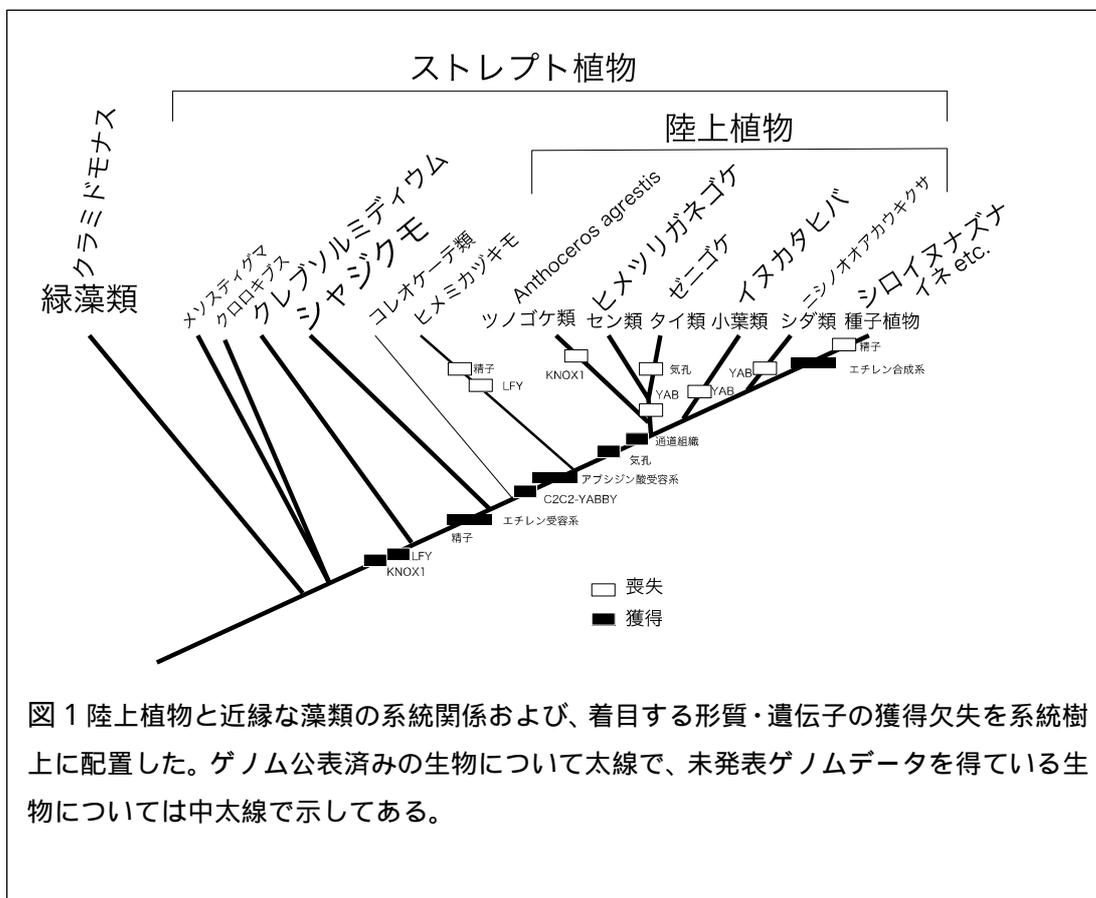


図1 陸上植物と近縁な藻類の系統関係および、着目する形質・遺伝子の獲得欠失を系統樹上に配置した。ゲノム公表済みの生物について太線で、未発表ゲノムデータを得ている生物については中太線で示してある。

3. 研究の方法

栄養生殖期のヒメミカツキモから、*YABBY* 遺伝子 (*CpYabby*) をコードする cDNA の全長クローニングを行い塩基配列を確認した。この遺伝子の機能を調べるために、ゲノム編集による遺伝子破壊用コンストラクトを作成した。このコンストラクトを用いて、ヒメミカツキモのプラス型 (NIES-67) およびマイナス型 (NIES-68) 株に形質転換を試みた。

ナガサキツノゴケ *Anthoceros agrestis* の *YABBY* 遺伝子、*LEAFY* 遺伝子の 5' 隣接領域を推定プロモーター候補領域としてクローニングし、ゲートウェイ技術を用いてゼニゴケ向けに開発されたプロモーターレポーター解析用のプラスミドに組み込んだコンストラクトを作成した。このコンストラクトをアグロバクテリウムを介してナガサキツノゴケに導入した。

シャジクモ *LEAFY* 遺伝子の cDNA を RT-PCR 法により増幅しクローニングした。また、その配列に基づいて設計したプライマーを用いて RT-qPCR 法により器官・発生段階毎の発現レベルを測定した。

ツノゴケ CRISPR-Cas9 プラスミドとして、ゼニゴケのための CRISPR-Cas9 系のためのプラスミドの Cas9 誘導プロモーターをツノゴケの EF プロモーターへ、sgRNA 誘導のためのプロモーターをツノゴケ U6 遺伝子の 5' 隣接配列に置き換えたプラスミドを作製した。

4. 研究成果

ヒメミカツキモ遺伝子破壊用コンストラクトの導入により、薬剤耐性株を数株取得した。ヒ

メミカツキモ *YABBY* 遺伝子の破壊を NIES-68 株で試み遺伝子破壊されている可能性が高い候補株 2 株を得た。そのクローン化とともに NIES-67 株での遺伝子破壊が進行中である。今後、あわせてクローン化と表現型解析を行う。

ナガサキツノゴケの *YABBY* 遺伝子 *LEAFY* 遺伝子についてプロモーターレポーター株を作成した。しかし、レポーターの発現を検出するにはいたらなかった。今後より長いゲノム領域を含むレポーター導入を試みるべきであろうと考えた。

シャジクモの概要ゲノム解読における遺伝子予測ではシャジクモは *LEAFY* 遺伝子を 1 つ持つ (*CbLFY1*) と考えられていた。*CbLFY1* をクローニングする過程で概要ゲノム解読で予想された配列と異なるアイソフォーム (選択的スプライシングにより後半のエクソンが異なる) が見つかり、両方のアイソフォームの全長配列のクローニングを進めた。しかし、特異的プライマーを作成して検討したところ、一方のみを増幅することができた。このクローニングできた cDNA が主要な mRNA に対応すると考えた。このシャジクモ *LFY* 遺伝子の器官・発生段階毎 (生殖器官成熟前期、生殖器官成熟後期、造精器、生卵器、接合子の 5 種類) の発現様式を RT-qPCR により確認した。さらに、シャジクモ *LFY* 遺伝子をナガサキツノゴケに導入して過剰発現株の作出を進めている。

ヒメミカツキモの遺伝子解析システムの高度化を目指してエストロゲン受容体の制御領域をヒメミカツキモのコドン使用率に合わせて調製した配列を合成した。

ナガサキツノゴケにおいてゲノム編集を実現するため、形質転換法の効率を高めるとともに、ガイド RNA を発現させるための U6 プロモーターについてナガサキツノゴケ内在の U6 を同定してその 5' 隣接配列を候補として用いた。作製したツノゴケ CRISPR-Cas9 プラスミドを用いて、既存の GFP 発現株の GFP コード配列のゲノム編集を試みたが成功していない。また、ナガサキツノゴケ *KNOX2* 遺伝子及び *BELL* 遺伝子の過剰発現株を作製したところ、いずれも胞子体が短くなるという表現型を示した。

シャジクモ形質転換系の確立を目指して、パーティクルガンによる遺伝子導入系において、新たなシャジクモの内生プロモーター、ターミネーターの組み合わせを同定し、パーティクルガンによる遺伝子導入は再現性があることを確認した。アグロバクテリウムを用いた形質転換体の作出も試みたが、成功には至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sekimoto Hiroyuki, Komiya Ayumi, Tsuyuki Natsumi, Kawai Junko, Kanda Naho, Ootsuki Ryo, Suzuki Yutaka, Toyoda Atsushi, Fujiyama Asao, Kasahara Masahiro, Abe Jun, Tsuchikane Yuki, Nishiyama Tomoaki	4. 巻 237
2. 論文標題 A divergent RWP RK transcription factor determines mating type in heterothallic <i>Closterium</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1636-1651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18662	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 -

1. 著者名 西山智明, 嶋村正樹, 榎原恵子	4. 巻 76
2. 論文標題 ツノゴケ ゲノム解読と形質転換技術が拓く植物進化研究の新機軸	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物の科学 遺伝	6. 最初と最後の頁 183-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Fringedakis Eftyhios, Waller Manuel, Nishiyama Tomoaki, Tsukaya Hirokazu, Xu Xia, Yue Yuling, Tjahjadi Michelle, Gunadi Andika, Van Eck Joyce, Li Fay Wei, Szovenyi Peter, Sakakibara Keiko	4. 巻 232
2. 論文標題 An <i>Agrobacterium</i> mediated stable transformation technique for the hornwort model <i>Anthoceros agrestis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1488 ~ 1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17524	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 Kawai Junko, Kanazawa Manaki, Suzuki Rie, Kikuchi Nanako, Hayakawa Yasuhiko, Sekimoto Hiroyuki	4. 巻 233
2. 論文標題 Highly efficient transformation of the model zygnetophycean alga <i>Closterium peracerosum strigosum littorale</i> complex by square pulse electroporation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 569 ~ 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17763	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 -

1. 著者名 Ohtaka Kinuka, Sekimoto Hiroyuki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Zygnematophycean algae: Possible models for cellular and evolutionary biology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2022.03.042	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 西山智明, 榊原恵子, 嶋村正樹	4. 巻 59
2. 論文標題 ゲノム解析から見たツノゴケの二酸化炭素濃縮機構とシアノバクテリア, 菌類との共生: 植物の陸上進出を可能にした生存戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 484 - 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 嶋村 正樹, 西山 智明, 榊原 恵子	4. 巻 12
2. 論文標題 陸上植物起源研究の最後のフロンティア、ツノゴケの生物学	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 183 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.12d1.00214	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 -

1. 著者名 西山 智明, 嶋村 正樹, 榊原 恵子	4. 巻 12
2. 論文標題 ツノゴケゲノムと陸上植物の発進進化	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 186 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.12d2.00215	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Eftychios Frangedakis、Manuel Waller、西山智明、塚谷裕一、Peter Szovenyi、榊原恵子
2. 発表標題 ツノゴケAnthoceros agrestisのアグロバクテリウムを介した形質転換系の確立
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021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	関本 弘之 (Sekimoto Hiroyuki) (20281652)	日本女子大学・理学部・教授 (32670)	
研究分担者	坂山 英俊 (Sakayama Hidetoshi) (60391108)	神戸大学・理学研究科・准教授 (14501)	
研究分担者	榊原 恵子 (Sakakibara Keiko) (90590000)	立教大学・理学部・准教授 (32686)	

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