

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570100

研究課題名(和文) シャジクモ藻類のゲノムから探る植物多細胞体制の起源と進化過程

研究課題名(英文) Investigation on the origin and evolution of the multicellular body plan in plants by focusing on the charophycean algal genomes

研究代表者

坂山 英俊 (Sakayama, Hidetoshi)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60391108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では植物多細胞体制の起源と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、シャジクモ藻類と陸上植物の共通祖先の段階で共有していたと考えられる遺伝子を推定した。また、植物特異的だと考えられていた多くの発生遺伝子のホモログをシャジクモ藻類から見いだした。いくつかの遺伝子について、シャジクモにおける発現様式を解析し、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、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。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the origin and 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 shared genes among land plants and charophycean algae, as well as homologues of the important developmental genes, which have been identified in model species of land plants, from charophycean algae. Moreover, we explored the expression/function of these developmental genes in charalean algae and discussed the origin and evolution of the multicellular body plan in land plants and charophycean algae.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：生物学 進化 比較ゲノム 多細胞体制 植物 シャジクモ藻類

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、コレオケーテ、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。いっぽう、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の多様化が、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、主要な陸上植物の全ゲノム解読が完了し、陸上植物の多細胞体制形成に関与する発生遺伝子が明らかになっている。このような中、陸上植物だけで相同遺伝子が見つかりゲノムが決定されている緑藻類では相同遺伝子が見つからない例が多く見つかっている。シャジクモ藻類では、先行研究により、いくつかの陸上植物特異的な発生遺伝子がシャジクモ藻類にも存在することが報告されている。したがって、さらに形態的に異なる体制を持つ各シャジクモ藻類の発生遺伝子をゲノムレベルで網羅的に収集し、どの遺伝子が陸上植物と各シャジクモ藻類との共通祖先に存在するか、存在する場合にどのような役割を果たしているかを解明することにより、1 倍体 2 倍体多細胞体制の起源と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起源と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。シャジクモ藻類において申請者らが確立した培養系と遺伝子情報を基礎とし、さらに形態的に異なる 1 倍体体制を持つシャジクモ藻類を研究対象に加え、ゲノム解読により発生に関わる遺伝子を網羅的に収集する。どの遺伝子が陸上植物と各シャジクモ藻類との共通祖先に存在するか、存在する場合にどのような役割を果たしているかを解明し、多細胞体制獲得前後での遺伝子進化を特定する。

3. 研究の方法

(1) シャジクモに加え、新たにコレオケーテ、クレブソルミディウム等のシャジクモ藻類の主要な系統から遺伝子情報を取得する。
(2) 各シャジクモ藻類のゲノムとトランスクリプトームデータから、植物の発生遺伝子の相同遺伝子を網羅的に抽出し、遺伝子全長配列を単離し、遺伝子系統樹を構築し、相同遺伝子間の系統関係と遺伝子重複パターンを

確認する。

(3) 多細胞体制進化に重要と思われる遺伝子について生活環における発現ステージを特定する。

(4) 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。

4. 研究成果

シャジクモについて、共同研究により明らかにした概要ゲノムをもとに、シャジクモの発生段階をほぼ網羅する RNA-seq データ、および陸上植物のタンパク質のアミノ酸配列を用い遺伝子モデル構築を行い、35,883 遺伝子、36,887 転写産物を予測した。

シャジクモに加え、コレオケーテ類、ホシミドロ類、クレブソルミディウム、クラミドモナスのゲノム・トランスクリプトームデータを含め、陸上植物 (シロイヌナズナ、イヌカタヒバ、ヒメツリガネゴケ) のゲノム配列との比較解析を行った。その結果、シャジクモ藻類と陸上植物の共通祖先の段階で 6,300 前後の遺伝子を共有していたと推定された。また、植物特異的だと考えられていた多くの発生遺伝子のホモログをシャジクモ藻類から見いだした。いっぽう、シャジクモ藻類の各系統に特異的な遺伝子の数が多いことや、シロイヌナズナとイヌカタヒバに存在し、ヒメツリガネゴケに存在しないと考えられていたいくつかの発生遺伝子がシャジクモ藻類に存在することが明らかになった。

また、シャジクモ藻類と陸上植物のゲノムを比較した結果、シャジクモ藻類ゲノムは GC 含量が比較的高い傾向にあり、コドン使用頻度の偏りは系統間で大きく異なる場合が確認された。

シャジクモ藻類と陸上植物が共有する発生遺伝子について遺伝子系統樹を構築し、相同遺伝子間の系統関係と遺伝子重複パターンを解析した。その結果、シャジクモ藻類の遺伝子は、各遺伝子ファミリーやそのサブファミリーにおいて系統的に基部に位置することや、陸上植物の段階で多様化が進んでいる遺伝子ファミリーの多くは、シャジクモ藻類の段階では冗長性が低く多様化が進んでいないことが確認された。

いくつかの遺伝子について、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、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、遺伝子導入の条件検討を進

めた。

以上の研究を通して、シャジクモ藻類のゲノムの特徴と、シャジクモ藻類と陸上植物のゲノム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、シャジクモの発生過程における網羅的な遺伝子発現解析や個々の遺伝子の機能解析が進展し、系統間での比較が可能になることにより、シャジクモ藻類と陸上植物における多細胞体制の起源と進化過程が明確になってくると期待される。

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5件)

- ① 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* (in press). (査読有り)
- ② Kato, S., Kawai, H., Takimoto, M., Suga, H., Yohda, K., Horiya, K., Higuchi, S. and Sakayama, H. Occurrence of the endangered species *Nitellopsis obtusa* (Charales, Charophyceae) in western Japan and the genetic differences within and among Japanese populations. *Phycological Research* 62: 222–227 (2014). (査読有り)
DOI: 10.1111/pre.12057
- ③ Sato, M., Sakayama, H., Sato, M., Ito, M. and Sekimoto, H. Characterization of sexual reproductive processes in *Chara braunii* (Charales, Charophyceae). *Phycological Research* 62: 214–221 (2014). (査読有り)
DOI: 10.1111/pre.12056
- ④ Hackenberg, D., Sakayama, H., Nishiyama, T. and Pandey, S. Characterization of heterotrimeric G-protein complex and its regulator from the green alga *Chara braunii* expands the evolutionarily breadth of plant G-protein signaling. *Plant Physiology* 163: 1510–1517 (2013). (査読有り)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.230425>
- ⑤ Hoepflinger, M. C., Geretschlaeger, A., Sommer, A., Hoeflberger, M., Nishiyama, T., Sakayama, H., Hammerl, P., Tenhaken, R., Ueda, T. and Foissner, I. Molecular and biochemical analysis of the first ARA6 homologue, a RAB5 GTPase, from green algae. *Journal of Experimental Botany* 64: 5553–5568 (2013). (査読有り)
DOI: 10.1093/jxb/ert322

[学会発表] (計33件)

- ① 宮田大輔・西山智明・川井浩史・坂山英俊. シャジクモの遺伝地図構築に向けたジェノタイプングを用いた交配実験系の確立. 日本藻類学会第39回大会, 九州大学箱崎キャンパス (福岡県), 2015年3月21日.
- ② Nishiyama, T., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A., Rensing, S. A. and Sakayama, H. The *Chara braunii* genome. International Symposium on Genome Science 2015, Tokyo, Japan, 20–21 January, 2015.
- ③ Sakayama, H., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A., Rensing, S. A. and Nishiyama, T. The *Chara braunii* genome sheds light on the origin of land plants. International Plant & Animal Genome XXIII Conference, San Diego, USA, 10–14 January, 2015.
- ④ Nishiyama, T., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A., Rensing, S. A. and Sakayama, H. The *Chara braunii* genome. International Plant & Animal Genome XXIII Conference, San Diego, USA, 10–14 January, 2015.
- ⑤ Sakayama, H. and Nishiyama, T. De novo assembly and analysis of RNA-seq data from charalean alga, *Chara braunii*. *Marchantia Workshop 2014*, Kobe, Japan, 8–10 December, 2014.
- ⑥ 坂山英俊・甲斐厚・西山未理・渡邊信・加藤将・伊藤元己・野崎久義・川井浩史. 再発見された絶滅種チュウゼンジフラスコモの形態, 遺伝的多様性および分類. 日本植物学会第78回大会, 明治大学生田キャンパス (神奈川県), 2014年9月14日.
- ⑦ 西山智明・豊田敦・鈴木穰・藤山秋佐夫・坂山英俊. シャジクモゲノムにみる陸上植物の制御因子ホモログ. 日本植物学会第78回大会, 明治大学生田キャンパス (神奈川県), 2014年9月12日.
- ⑧ 藤原ひとみ・大西美輪・坂山英俊・石崎公庸・豊倉浩一・関本弘之・西山智明・七條千津子・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. 日本植物学会第78回大会, 明治大学生田キャンパス (神奈川県), 2014年9月12日.
- ⑨ 西山智明・豊田敦・鈴木穰・藤山秋佐夫・坂山英俊. 陸上植物に近縁な緑色藻類シャジクモのゲノム解読とアノテーション. 日本進化学会第16回大会, 高槻現代劇場 (大阪府), 2014年8月22日.

- ⑩ Kato, S., Kawai, H. and Sakayama, H. Evolutionary analyses on the two ecologically differentiated types of freshwater alga *Chara braunii* (Charales). *Ectocarpus* 2014, Kobe, Japan, 29 March 2014.
- ⑪ Sakayama, H. and Nishiyama, T. *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data from charalean algae *Chara braunii*. *Ectocarpus* 2014, Kobe, Japan, 29 March 2014.
- ⑫ Nishiyama, T., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A. and Sakayama, H. Genome sequencing of the charophycean green alga, *Chara braunii*. *Ectocarpus* 2014, Kobe, Japan, 29 March, 2014.
- ⑬ 西山 智明・豊田 敦・鈴木 穰・藤山秋佐夫・坂山英俊. シャジクモのゲノム解読. 日本植物分類学会第13回大会, 熊本大学(熊本県), 2014年3月22日.
- ⑭ 藤原ひとみ・大西美輪・坂山英俊・石崎公庸・関本弘之・西山智明・七條千津子・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55回日本植物生理学会年会, 富山大学(富山県), 2014年3月18日.
- ⑮ 西山智明・豊田 敦・鈴木 穰・藤山秋佐夫・坂山英俊. 陸上植物に近縁な緑色藻類シャジクモのゲノム解読. 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学(富山県), 2014年3月18日.
- ⑯ 藤原陽一郎・加藤 将・坂山英俊・福岡豪・小林真吾. 愛媛県レッドデータブックに掲載予定の車軸藻類. 第38回日本藻類学会, 東邦大学(千葉県), 2014年3月16日.
- ⑰ 溝渕 綾・坪田博美・加藤 将・坂山英俊・関 太郎・向井誠二・半田信司. 広島県宮島で見つかったフラスコモダマシ(車軸藻綱, シャジクモ目)の形態と系統. 第38回日本藻類学会, 東邦大学(千葉県), 2014年3月15日.
- ⑱ Nishiyama, T., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A. and Sakayama, H. Genome sequencing of the charophycean green alga, *Chara braunii*. International Plant & Animal Genome XXII Conference, San Diego, USA, 11–15 January 2014.
- ⑲ Ishimoto, M., Mori, F., Yumoto, K., Sakayama, H., Kasai, F. and Kawachi, M. *Ex-situ* preservation of charophytes in MCC-NIES. 5th Asian Network of Research Resource Centers (ANRRC) International Meeting, Hayama, Japan, 30 October – 1 November 2013.
- ⑳ 西山智明・豊田 敦・鈴木 穰・藤山秋佐夫・坂山英俊. 陸上植物に近縁な藻類シャジクモのゲノム解読. 日本植物学会第77回大会, 北海道大学(北海道), 2013年9月13日.
- ㉑ 西山智明・豊田 敦・鈴木 穰・藤山秋佐夫・坂山英俊. 陸上植物に近縁な藻類シャジクモのゲノム解読. NGS現場の会・第三回研究会, 神戸国際会議場(兵庫県), 2013年9月4–5日.
- ㉒ 加藤 将・永野 萌・畠田 智・川井浩史・坂山英俊. シャジクモ(*Chara braunii*)におけるEST-SSRマーカーの開発. 第37回日本藻類学会, 山梨大学(山梨県), 2013年3月29日.
- ㉓ 坂山英俊・山田敏弘・西山智明・川井浩史・伊藤元己. シャジクモ藻類シャジクモ(*Chara braunii*)におけるLEAFY遺伝子ホモログの発現解析. 第37回日本藻類学会, 山梨大学(山梨県), 2013年3月28日.
- ㉔ 石本美和・森史・湯本康盛・坂山英俊・笠井文絵・河地正伸. 国立環境研究所におけるシャジクモ類保存の取り組み. 第37回日本藻類学会, 山梨大学(山梨県), 2013年3月28日.
- ㉕ 藤原陽一郎・加藤 将・坂山英俊・小林真吾. 愛媛県で確認されたシャジクモ属(*Chara*)について. 第37回日本藻類学会, 山梨大学(山梨県), 2013年3月28日.
- ㉖ 坂山英俊・西山智明. ゲノム解析から見たシャジクモ類の多細胞化進化. 日本植物学会第76回大会, 兵庫県立大学(兵庫県), 2012年9月17日.
- ㉗ 加藤 将・須賀瑛文・養田勝則・堀家健司・滝本雅之・川井浩史・坂山英俊. 絶滅危惧車軸藻類ホシツリモの新産地発見. 日本植物学会第76回大会, 兵庫県立大学(兵庫県), 2012年9月15–16日.
- ㉘ 坂山英俊. 日本産車軸藻類の分類と生育分布の現状. 水草研究会第34回大会, 愛媛県総合科学博物館(愛媛県), 2012年8月25日.
- ㉙ 坂山英俊・西山智明. シャジクモ藻類シャジクモ(*Chara braunii*)のRNA-seq解析. 日本藻類学会第36回大会, 北海道大学(北海道), 2012年7月15日.
- ㉚ 加藤 将・川井浩史・坂山英俊. シャジク

モの保全遺伝学に向けた SSR マーカーの
新規開発. 日本藻類学会第 36 回大会, 北
海道大学 (北海道), 2012 年 7 月 15 日.

⑳柴田 葵・加藤 将・川井浩史・坂山英俊.
車軸藻類 *Chara fibrosa* 群の分子系統学的解
析. 日本藻類学会第 36 回大会, 北海道大
学 (北海道), 2012 年 7 月 15 日.

㉑比嘉 敦・坂山英俊・加藤 将・香村眞徳・
熊野 茂. 沖縄本島における車軸藻類と淡
水産大型紅藻類の産地報告. 第 36 回日本
藻類学会, 北海道大学 (北海道), 2012 年
7 月 14 日.

㉒Höpflinger, M., Geretschläger, A., Höftberger,
M., Sommer, A., Nishiyama, T., Sakayama, H.,
Tenhaken, R., Ueda, T. and Foissner, I.
Characterization of the first ARA6 homolog, a
Rab5 GTPase, from green algae possibly
involved in wound healing. SEB Meeting 2012,
Salzburg, Austria, 29 June – 2 July 2012.

〔図書〕 (計 4 件)

①坂山英俊. シヤジクモ科. レッドデータブ
ック 2014 –日本の絶滅のおそれのある野生
生物–, 植物 II (蘚苔類, 藻類, 地衣類, 菌
類) (環境省編). ぎょうせい. 580 pp. (2015)
(分担執筆, 50 分類群を担当)

②加藤 将・坂山英俊. 車軸藻類. 京都府レ
ッドデータブック 2015 第 2 巻 (野生植
物・菌類編). pp. 517–528. 京都府自然環境
保全課 (2015).

③坂山英俊. レッドリストに載ったシヤジク
モ目藻類. 藻類ハンドブック. pp. 372–375.
エヌ・ティー・エス (2012).

④坂山英俊. シヤジクモ藻類 (シヤジクモ目).
藻類ハンドブック. pp. 41–45. エヌ・ティ
ー・エス (2012).

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・講師
研究者番号: 60391108

(2) 研究分担者

西山 智明 (NISHIYAMA, Tomoaki)
金沢大学・学際科学実験センター・助教
研究者番号: 50390688

(3) 連携研究者

なし