

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291081

研究課題名(和文) コマチゴケとナンジャモンジャゴケのゲノム情報を基盤とした総合的研究

研究課題名(英文) Comprehensive research on Takakia and Haplomitrium based on genomic information

研究代表者

嶋村 正樹 (Shimamura, Masaki)

広島大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00432708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：コケ植物の系統基部に位置するナンジャモンジャゴケとコマチゴケを用いて陸上植物の初期進化を明らかにするための研究基盤整備を進めた。ナンジャモンジャゴケの葉緑体全ゲノム配列情報を公開した。ナンジャモンジャゴケの粘液毛内部のハルティヒネット様構造から単離された菌類は、ツツジ科植物から単離された子嚢菌と近縁であることが示された。これまでのところコマチゴケのゲノムサイズは約3.5Gbと推定している。多くの発生、形態形成関連遺伝子について、タイ類のモデル植物であるゼニゴケゲノムと同様、遺伝子重複が少ないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive studies based on genome information of Takakia and Haplomitrium were conducted. Complete sequence of chloroplast genome of *T. lepidozoides* was annotated and submitted to the database with accession number NC_028738.1. DNA barcoding and phylogenetic analysis of isolated fungi hyphae in mucilage hairs of *Takakia lepidozoides* indicated that the fungi forming the labyrinthine structure are closely related to Helotiales species isolated from the roots of the Ericaceae species. Although *Haplomitrium mnioides* has a relatively large genome size (ca. 4.4Gb), it shows relative simplicity of genetic networks, like a model liverwort *Marchantia polymorpha*.

研究分野：植物形態学

キーワード：進化 コケ植物 比較ゲノム 発生進化 植物 ナンジャモンジャゴケ コマチゴケ

1. 研究開始当初の背景

(1) コケ植物は世界に約2万種が知られており、タイ類(タイ門)、セン類(セン門)、ツノゴケ類(ツノゴケ門)の3つの植物群を含んでいる。セン類ではヒメツリガネゴケ、タイ類ではゼニゴケがモデル生物としての地位を確立しているが、ゼニゴケが属するゼニゴケ目、ヒメツリガネゴケ属するヒョウタンゴケ目は、それぞれタイ類、セン類の中でも比較的最近に分化した、形態的にも派生的な分類群とされる。陸上植物の基部系統群の系統関係、陸上植物の創世記に生じた形態進化を理解するために、コケ植物の系統最基部の分類群、ナンジャモンジャゴケ、コマチゴケに注目した。

(2) ナンジャモンジャゴケは茎に棒状の葉を不規則につけた様に見える単純な植物で、その特異な形態のせいで、発見当初から分類学的所属に関する議論が絶えなかった。当初は分類の決め手となる生殖器官や胞子体が不明で、藻類なのか、コケなのか、シダなのか確実な判断ができなかった。後に造卵器が発見され、その形態からコケ植物であることは確実視された。そして、造卵器を保護するための特別な葉的器官をもたない、仮根を持たず、横走あるいは地下に伸びる葉を持たないシュート(根茎)が植物体を支えているなどの点はタイ類のコマチゴケと似ていたため、長年、タイ類として分類されていた。しかし、1990年に、ヒマラヤナンジャモンジャゴケにおいて胞子体が発見され、胞子体が丈夫な柄や帽をもつこと、内部にコルメラをもつことなどセン類に特徴的な形質をもつことが判明した。以降はセン類として分類されており、分子系統学的解析もそれを支持している。細胞分裂が盛んな栄養組織では細胞中の葉緑体が、1個になっているという陸上植物としては例外的な形質をツノゴケ類や一部のシダ植物と共有している点は、ナンジャモンジャゴケのセン類における特異性を示している。ナンジャモンジャゴケ綱は現在の一般的なセン類の形態が確立するより前に分岐した遺存的な分類群と考えられている。

(3) コマチゴケ綱は、葉状体の体制をもつゼニゴケとは異なり、茎に対して葉を3列に配置する茎葉体の体制をもつ。造卵器や造精子器を保護するための特別な葉的器官をもたない、仮根を持たず、葉をつけない根茎で生育基物にとりつくなど、コケ植物として例外的な特徴をもっている。これらの形質はナンジャモンジャゴケと共有しており、コケ植物の中でも祖先的な形態と考えられている。この

体制は、胞子体が分岐しないことをのぞけば、古生代デボン紀に栄えた、リニア植物(維管束植物・多胞子嚢植物)の配偶体・胞子体と似た点がある。コマチゴケ綱とナンジャモンジャゴケ綱は4億年以上前に獲得した、初期の陸上植物の体制を、現在までとどめている「生きた化石」の可能性はある。

2. 研究の目的

コケ植物の中で、系統的に最も基部に位置すると考えられているコマチゴケ綱(タイ類)とナンジャモンジャゴケ綱(セン類)について、全ゲノム配列解読に基づいた比較ゲノム研究、シュートや葉の発生、細胞分裂に着目した形態学的研究、形態形成に関わる転写因子群に注目した発生進化学研究を行う。両群の植物進化における「生きた化石」の地位を、新たに得られたデータをもとに検証し、初期陸上植物の進化ストーリーを総合的に再構築することを目的とする。

3. 研究の方法

3人の研究者(嶋村・榎原・西山)が中心となって、それぞれ自分の得意とする研究手法である、形態学、遺伝子発現調節、比較ゲノムの視点でアプローチし、総合的な議論を深める。

タイ類のコマチゴケ、セン類のナンジャモンジャゴケで、シュートや葉の組織レベル、細胞の構造を詳細に調べ、比較形態学的研究を進める。全ゲノム解析、RNAseq解析を行い、研究の基盤情報とする。コマチゴケとナンジャモンジャゴケのゲノム情報を他の陸上植物やシジク藻類のゲノム情報と比較することで、植物が陸上生活へ適応した最初期に起きたと考えられる、ゲノムの構造や遺伝子の数や種類、遺伝子調節領域の変化について情報を得る。コマチゴケ、ナンジャモンジャゴケで、被子植物やヒメツリガネゴケで知られている発生や形態形成に関わる転写因子群のオーソログをカタログ化し、コマチゴケやナンジャモンジャゴケの特異な器官での発現パターンを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ナンジャモンジャゴケの無菌培養株を作成したが、無菌培養株では成長や組織分化が著しく抑制された。ゲノム解析のためのナンジャモンジャゴケの無菌培養株の確立は困難な可能性があると考え、共生していると

考えられる菌類の分離培養を並行して行い、ナンジャモンジャゴケの無菌株と共培養したものをゲノム解析に用いることを検討した。この過程で、ナンジャモンジャゴケと菌類の密接な関係が明らかになり、当初の研究計画になかったが、菌類との関係について詳細に研究を進めることとなった。

(2) ナンジャモンジャゴケの根茎の発生、発達過程を走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡、FIB-SEM を用いて観察した。ナンジャモンジャゴケの茎頂にはっきりとした頂端細胞が存在するかどうかについては長年議論があったが、葉をつけ直立したシュート、側生器官がない横走茎、どちらの頂端部においても明瞭な頂端細胞が存在することを確認した。頂端細胞から生じた細胞(メロファイト)からの各組織の発生パターンは、他のセン類よりもむしろタイ類に似ていることがわかった。また、根茎に存在する粘液毛の頂端部の粘液分泌孔が植物体内部への菌類の侵入経路となっていることを確認し、侵入した菌糸が粘液毛内部で維管束植物の菌根で知られるハルティヒネット様の構造を形成することを明らかにした。

(3) ナンジャモンジャゴケは脱落した葉から植物体が容易に再生・分化することを発見した。脱落した葉からは植物体の再生・分化に先立って、まず、菌類の植物体への進入口となる粘液毛が発生することがわかった。ナンジャモンジャゴケの生育は共生菌の存在に大きく依存しており、散布体からの植物体の発生・再生過程も菌類との共生に適応したものとなっていることが示された。粘液毛内部に生育する菌類を単離し、無菌化した植物体断片と共培養を行ったところ、新たに形成された粘液毛での菌根様構造を再構成する2種類の菌株を得た。これらの単離された菌類について、ITS 領域を利用した分子同定を行い、ツツジ科植物から単離された子嚢菌と近縁であることを示した。ナンジャモンジャゴケは、高山の岩礫地で、ツツジ科の矮性木と同所的に生育することもあり、両者は共生菌を共有している可能性が示唆された。

(4) ナンジャモンジャゴケの胞子の形態について新たに観察し、基部コケ植物の胞子の特徴について議論した原著論文としてまとめた。

(5) ナンジャモンジャゴケの葉緑体全ゲノム配列のアノテーションを行いデータベースに情報を公開した(NC_028738.1)。ナンジャモンジャゴケのゲノム解析については、海外のグループとのデータの重複もあること

を考慮して、オルガネラゲノムの解析にとどめた。

(6) 南アルプス北岳周辺で、コマチゴケ綱のコマチゴケ、ヒメトロイブゴケ、キレハコマチゴケの生鮮試料を得て、無菌培養株を作成した。コマチゴケに関しては実験環境下で雌性生殖器官の誘導に成功した。

(7) コマチゴケの造精器形成過程や精子形成過程を観察し、ゼニゴケとは造精器形成時の細胞分裂パターンや精子核の凝集の程度に違いがあることを明らかにした。

(8) RNA-seq のために、コマチゴケ原系体、ナンジャモンジャゴケ根茎、ナンジャモンジャゴケ茎葉体に関して、異なるタグをつけてそれぞれの種ごとにまぜて cDNA ライブラリーを作成した。

(9) 一孢子由来のコマチゴケ半数体培養株を確立し、平均 450 bp のインサートサイズの PCR Free ライブラリーを作成し HiSeq 2500 で両端から 250 塩基ずつ合計で 130Gb のデータを取得した。K-mer 解析からはゲノムサイズは 3.5 Gb と推定された。また、Discover によってアセンブルしたところ、全部で 3.8Gb の Scaffold が得られた (1kb 以上の配列だと 3Gb)。N50 scaffold size = 23,363, N50 contig size = 19,745 である。CEGMA によって真核生物に超保存的な 248 の遺伝子のどれだけが見つかるかを調べると、完全長 191 個(77.02%), 部分配列 220 個(88.71%) とゲノムサイズの割には比較的高い値が得られた。さらに、6 通りのインサートサイズのメイトペアライブラリー、10X Genomics Chromium による連鎖リードデータを取得し、abyss, arcs によって scaffolding し、259 万本のスキヤッフールド計 4.25 Gb (N50 長 245kb) を得た。1kb より長い scaffold は 13 万 7 千本で計 3.53 Gb, 5kb より長い scaffold は 2 万 6 千本で 3.35 Gb である。ここで、CEGMA で完全と評価される数は 198 (79.84%), 部分的に発見とされた数は 228 個(91.94%) と向上した。

(10) コマチゴケのオルガネラゲノムは NOVOPlasty を用いて Illumina のデータから 178,903 bp の環状 mitochondria ゲノムと 3 本計 130kb の色素体 Genome コンティグを得た。

(11) 現在のところ、コマチゴケのゲノムサイズは約 3.5 Gb と推定され、これまでに知られているコケ植物のものよりはかなり大きなものである。しかし、多くの発生、形

態形成関連遺伝子について、タイ類のモデル植物であるゼニゴケゲノムと同様、遺伝子重複が少ないことが明らかになった。コマチゴケは主要なオーキシン応答遺伝子がゲノム中に1コピーずつであるなど、多くの発生、形態形成関連遺伝子についてタイ類のモデル植物であるゼニゴケゲノムと同様、遺伝子重複が少ないことが明らかになった。ゲノム配列に関してはさらなる解析が必要であるが、これまでに得られた配列をもとに、各形態形成関連遺伝子の組織特異的発現解析についての足がかりを得ることができた。

(12) コケ植物における地下性シュート(根茎)の進化を理解するために、コマチゴケゲノム中から、被子植物の根毛形成遺伝子及びコケ植物の仮根形成遺伝子として知られる RLS (ROOTHAIR DEFECTIVE SIX-LIKE) と LRL (*Lotus japonicas* ROOTHAIRLESS LIKE) を探索し、新たに LRL 相同遺伝子のみを見いだすことができた。また、この遺伝子を用いた予備実験により、コマチゴケの *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析が可能なることを確認した。

(13) コケ植物の配偶体に形成されるシュートの進化を理解するために、コマチゴケゲノムからヒメツリガネゴケ配偶体のシュート形成遺伝子である APB(AINTEGUMENTA, PLETHORA, BABY BOOM) と C3HDZ を探索し、それぞれの相同遺伝子を見いだした。

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 1 件)

Brown, R.C., Lemmon, B.E., Shimamura, M., Villarreal, J.C., & Renzaglia K.S. 2015. Spores of relictual bryophytes: Diverse adaptations to life on land. Review of Palaeobotany and Palynology. 216: 1-17. 査読有

<https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2015.01.004>

[学会発表](計 8 件)

嶋村正樹、コケ植物の精子形成過程と細胞骨格、日本植物学会、2017 年

Zheng Tianxiong, Maki Murakami, Yukari Kuga, Masaki Shimamura. The role of infection of symbiotic fungi through the

asexual reproduction by deciduous leaves of *Takakia lepidozoides*. 日本蘚苔類学会 第 46 回群馬大会 2017 年

Tianxiong Zheng, Maki Murakami, Yukari Kuga, Masaki Shimamura. Morphological Study on the vegetative propagation by deciduous leaves in *Takakia lepidozoides*. XIX International Botanical Congress, Shenzhen, China. 2017 年

村上真祈・久我ゆかり・嶋村正樹、ナンジャモンジャゴケにおける真菌との菌根様構造の形成、日本植物学会第 80 回大会、2016 年

Masaki Shimamura, Tomoaki Nishiyama, Keiko Sakakibara. *Takakia* and *Haplomitrium*, as the model for studying the earliest evolution of land plants. EMBO Workshop: New model systems for early land plant evolution. 2016 年

村上真祈・久我ゆかり・嶋村正樹、セン類ナンジャモンジャゴケと共生菌の形態学的研究、日本蘚苔類学会第 44 回大会、2015 年

村上真祈・久我ゆかり・山口富美夫・嶋村正樹、ナンジャモンジャゴケと共生菌の形態学的研究、中国四国地区生物系三学会合同大会、2015 年

村上真祈・久我ゆかり・嶋村正樹、セン類ナンジャモンジャゴケの粘液毛からの共生菌の侵入、日本植物形態学会、2014 年

[図書](計 1 件)

榊原恵子、慶應義塾大学出版会、植物の世代交代制御因子の発見、170 頁、2016 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋村正樹 (Masaki Shimamura)
広島大学・理学研究科・准教授
研究者番号: 00432708

(2) 研究分担者

榊原 恵子 (Keiko Sakakibara)
立教大学・理学部・准教授
研究者番号: 90590000

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