

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32686

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26650143

研究課題名(和文)陸上植物の孢子体進化解明に向けてのツノゴケ実験系の確立

研究課題名(英文)Establishment of hornwort model system for land plant evo-devo studies

研究代表者

榊原 恵子 (SAKAKIBARA, Keiko)

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：90590000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：コケ植物ツノゴケは陸上植物の進化研究において重要な系統的位置にあるが、遺伝子導入系など分子遺伝学的な解析技術の導入が立ち後れていた。ツノゴケ類 *Anthoceros agrestis* を用いて、ツノゴケのモデル実験系の確立を行った。 *Agrobacterium* を介した安定形質転換系を確立し、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いて、ペアエンドライブラリーによるドラフトゲノムシーケンスの取得、配偶体組織の RNA シーケンスを行なった。セン類ヒメツリガネゴケで孢子体発生に機能する KNOX 遺伝子、LFY 遺伝子、WOX 遺伝子の相同遺伝子を複数見だし、発現解析のためのプロモーター単離を行なった。

研究成果の概要(英文)：Hornworts are one of bryophyte group, which locates at an important phylogenetic position in land plants. However the molecular genetic approaches or evo-devo research in hornworts were not well studied yet, because a hornwort model system was not available like other bryophyte groups, a moss *Physcomitrella patens*, a liverwort and *Marchantia polymorpha*. We tried to establish a hornwort model system using a hornwort species, *Anthoceros agrestis*, which can be induced all developmental stages of the life cycle within 3 months under experimental condition. As the results, we established stable transformation technique via *Agrobacterium*, generated *Anthoceros agrestis* draft genome assembly with paired-end library, and perform RNA sequencing using the gametophyte tissue. Also we found KNOX, LFY, and WOX genes, which were identified as sporophyte developmental genes in the moss *Physcomitrella patens*. We isolated promoter regions of these genes for further expression analysis.

研究分野：発生進化学

キーワード：陸上植物 進化 ゲノム コケ植物 孢子体進化 ツノゴケ

1. 研究開始当初の背景

コケ植物は陸上植物の出現後、最初に分岐した現生の分類群であり、初期の陸上植物はコケ植物のような形態、生活様式を持っていたと考えられている。現在、コケ植物はセン類、タイ類、ツノゴケ類に大別されており、これまでの系統解析結果から提唱された有力な仮説の一つは、コケ植物のうち、ツノゴケ類が維管束植物に最も近縁であるというものである (Qiu et al., 2006)。コケ植物は配偶体 (n) 世代が優占するが、後に出現した維管束植物は孢子体 (2n) 世代が優占する。維管束植物の孢子体はその頂端に分裂組織を持ち、繰り返し新しい細胞を供給する無限成長を行うが、コケ植物の孢子体は孢子のうを1個だけ形成する有限成長を行うことから、維管束植物の系統で、孢子体が無限成長を行う分裂組織を獲得することにより孢子体の拡大がおこったと考えられる。ツノゴケ類は他のコケ植物と異なり、孢子体の基部に分裂組織を持ち、これがしばらく維持される一方、孢子のうの先端から分化した孢子を散布するという他のコケ植物ではみられない介在成長を行うことから、しばしば維管束植物の孢子体の茎頂分裂組織と対比される。ツノゴケ類は陸上植物の孢子体世代の形態進化を考える上できわめて重要な位置にあると考えられる。しかし、他のコケ植物であるタイ類やセン類からは有用なモデル実験系が確立され、それを利用した分子遺伝学的解析やその結果を他の陸上植物と比較することによる発生進化学的解析が進められているが、ツノゴケ類には有用なモデル実験系が存在しなかったことから研究が立ち後れて来た。

2. 研究の目的

陸上植物の進化の過程で孢子体の拡大がおこったと考えられる。コケ植物ツノゴケ類は、コケ植物の中で最も維管束植物に近縁とされ、その孢子体も他のコケ植物と維管束植物の中間の形質を持ち、陸上植物の初期進化を考える上で重要な分類群であるが、形質転換系の確立などの分子遺伝学的な研究手法の適用が他の植物群にくらべて立ち後れてきた。本研究では、遺伝子導入系の確立とゲノム情報や発現データの取得によりツノゴケの発生進化研究のモデル実験系を確立し、陸上植物の進化の過程で孢子体の拡大をもたらした分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

複数のツノゴケ類の無菌培養株から標準的なツノゴケの特徴を持ち、実験環境下において3ヶ月程度ですべての生活環を再現可能な *Anthoceros agrestis* を選択して以下の実験を行なった。アグロバクテリウムを介した形質転換系の確立、*Anthoceros agrestis* ゲノムのドラフトシーケンスの取得、*Anthoceros agrestis* の配偶体組織と孢子体組

織の RNA シークエンス解析を行ない、その結果の比較と他のコケ植物の孢子体組織で行なわれた RNA シークエンス結果との比較により、ツノゴケ孢子体に特異的に発現する遺伝子を同定する。で見いだされたツノゴケ孢子体特異的遺伝子と、他のコケ植物で同定された孢子体発生遺伝子のツノゴケオーソログの機能解析を行う。以上の実験から、ツノゴケの実験モデルを確立し、ツノゴケ孢子体の発生機構を解明する。それを他のコケ植物と維管束植物と比較することで、陸上植物の孢子体進化をもたらした分子機構を考察する。

4. 研究成果

(1) *Anthoceros agrestis* への遺伝子導入

Anthoceros agrestis の配偶体組織片からの再生過程において *Agrobacterium* を感染させる手法により、CaMV35S プロモーター下でレポーター遺伝子である GUS 遺伝子を発現するプラスミドを導入した際に GUS 染色によるシグナルを確認することができ、遺伝子導入に成功した。CaMV35S プロモーターで誘導したハイグロマイシン耐性遺伝子の導入によりハイグロマイシン薬剤による選抜が可能なることも確認した。

(2) *Anthoceros agrestis* ゲノムのドラフトシーケンス

当初は PacBio による *Anthoceros agrestis* ゲノムシーケンスを実施する予定であったが、予備実験により、*Anthoceros agrestis* のゲノムシーケンスが約 71 Mb という報告論文 (Szövényi et al., 2015) がデータ不足なため、情報が不確かな可能性が生じ、ゲノムの概要を知る必要があった。その解決のため、イルミナ社のペアエンドゲノムライブラリーを作成し、シーケンスを実施した。その結果、131.6 Mb のアセンブリーが得られ、約 25000 個の遺伝子が見いだされた。

(3) 配偶体と孢子体の比較トランスクリプトーム解析

配偶体のうち、若い葉状体と造精器、及び若い孢子体と成長途中の孢子体の RNA シークエンスライブラリーを作成し、シーケンスを実施した。配偶体の RNA シークエンス結果は良好であったが、孢子体のライブラリーに不具合があり、再度実験を行なったが、孢子体の RNA シークエンス結果を得ることができなかった。

(4) 他のコケ植物の孢子体発生遺伝子のツノゴケオーソログの解析

Anthoceros agrestis ドラフトゲノムからコケ植物セン類のヒメツリガネゴケの孢子体発生遺伝子として同定されている KNOX 遺伝子、LFY 遺伝子、WOX 遺伝子をそれぞれ見いだした。KNOX 遺伝子については cDNA をクローニングした。それぞれの推定プロモーター領域を決定し、レポーター遺伝子を用いた発現解析を進めている。

<引用文献>

Qiu et al. (2006). The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. PNAS 103 (42) 15511-15516.

Szövényi et al. (2015). Establishment of *Anthoceros agrestis* as a model species for studying the biology of hornworts. BMC Plant Biology 15:98

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 8 件)

榊原恵子 古水千尋 (2016). 「TALE 型ホメオボックス遺伝子族の進化による陸上植物複相の複雑化。」BSJ-review 7B: 66-77. 査読有

石崎公庸 榊原恵子 (2016). 「古い酒を新しい革袋に～preexisting gene regulatory network の転用による陸上植物のボディプラン革新。」BSJ-review 7B: 47-54. 査読有
John L. Bowman, Keiko Sakakibara, Chihiro Furumizu, and Tom Dierschke (2016). “Evolution in the Cycles of Life.” Annual Review of Genetics 50: 6.1-6.22. 査読有

Hoichong Karen Yip, Sandra K. Floyd, Keiko Sakakibara, and John L. Bowman (2016). “Class III HD-Zip activity coordinates leaf development in *Physcomitrella patens*.” Dev Biol 419(1):184-197. 査読有

Keiko Sakakibara (2016). “Technological Innovations Give Rise to a New Era of Plant Evolutionary Developmental Biology.” Advances in Botanical Research 78: 3-35. 査読有

Chihiro Furumizu, John Paul Alvarez, Keiko Sakakibara, and John L. Bowman (2015). Antagonistic Roles for KNOX1 and KNOX2 Genes in Patterning the Land Plant Body Plan Following an Ancient Gene Duplication. PLOS Genetics 11: ee1004980 査読有

Keiko Sakakibara, Pascal Reisewitz, Tsuyoshi Aoyama, Thomas Friedrich, Sayuri Ando, Yoshikatsu Sato, Tomoaki Nishiyama, Yosuke Tamada, Yuji Hiwatashi, Tetsuya Kurata, Masaki Ishikawa, Hironori Deguchi, Stefan A. Rensing, Wolfgang Werr, Takashi Murata, Mitsuyasu Hasebe, and Thomas Laux (2014). “*WOX13-like* genes are required for the initiation of apical stem cells from differentiated leaf cells in the moss *Physcomitrella patens*.” Development 141:1660-1670. 査読有

榊原恵子 (2014). 陸上植物の複相の巨大化と複雑化に貢献したホメオボックス遺伝

子の重複と機能分化. 細胞工学 33(8): 872-877. 査読なし

[学会発表](計 10 件)

Keiko Sakakibara, Emiko Yoro, Tomomi Nakagawa, Eftychios Frangedakis, Masaki Shimamura and Tomoaki Nishiyama (2017). “Making new bryophyte model system using genome sequencing and transformation technique” 65th NIBB conference

榊原恵子 (2016). 「ヒメツリガネゴケ胞子体幹細胞の制御機構」日本植物学会第 80 回大会

榊原恵子、西山智明、塚谷裕一 (2015). 「KNOX 遺伝子の遺伝子重複と新規機能獲得によってもたらされた陸上植物の世代交代の制御の分子機構」日本進化学会第 17 回大会

Keiko Sakakibara (2015). “Evolution of the alternation of generations in land plants” Botany 2015

榊原恵子、西山智明、塚谷裕一 (2015). 「世代交代を制御する転写因子 KNOX2 の下流遺伝子の探索」NGS 現場の会第 4 回大会

榊原恵子、西山智明、塚谷裕一 (2015). “Identification of downstream genes of KNOX2 transcription factor that regulates alternation of generations in land plants” 第 56 回日本植物生理学会

榊原恵子、古水千尋、John L. Bowman (2014). 「KNOX 遺伝子族の進化による陸上植物複相の複雑化」日本植物学会第 78 回大会

榊原恵子 (2014) 「コケ植物の再生能力とその制御因子」日本蘚苔類学会第 43 回大会

榊原恵子 (2014). 「KNOX 遺伝子は陸上植物の世代交代を制御する」日本進化学会 16 回年会

Keiko Sakakibara, Pascal Reisewitz, Tsuyoshi Aoyama, Thomas Friedrich, Sayuri Ando, Yoshikatsu Sato, Tomoaki Nishiyama, Yosuke Tamada, Yuji Hiwatashi, Tetsuya Kurata, Masaki Ishikawa, Hironori Deguchi, Stefan A. Rensing, Wolfgang Werr, Takashi Murata, Mitsuyasu Hasebe, and Thomas Laux (2014) “*WOX13-like* genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens*” 日本発生物学会第 47 回年会

[図書](計 1 件)

榊原恵子 (2016). 「世代交代制御因子の発見」慶応義塾大学出版

[その他]

受賞、アウトリーチ活動など

榊原恵子

日本進化学会奨励賞受賞(日本進化学会) 2014 年 8 月

日本植物学会でシンポジウムを企画、2014年
9月

榭原恵子 (2017). 「植物の世代を切替えるス
イッチ遺伝子」生命誌 92
[http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/
092/research/2.html](http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/092/research/2.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榭原 恵子 (SAKAKIBARA, Keiko)
立教大学・理学部・准教授
研究者番号：90590000

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

フランジェダキス・エフティキス
(FRANGEDAKIS, Eftychios)
東京大学・大学院理学系研究科・学術振興
会特別研究員(PD)