

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号： 14301

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2010 ~ 2011

課題番号： 22657013

研究課題名（和文）

基部陸上植物苔類ゼニゴケを用いた順遺伝学研究手法の確立

研究課題名（英文） Development of molecular tools for forward genetics in the liverwort *Marchantia polymorpha*

研究代表者

河内 孝之 (KOHCHI TAKAYUKI)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号： 40202056

研究成果の概要（和文）：陸上植物進化の基部に位置する苔類ゼニゴケを材料に順遺伝学的な分子遺伝学研究の基盤技術を開発した。標準株（宝ヶ池系統）と比較対照株（北白川系統）の間の DNA 多型を網羅的に抽出し、高密度遺伝地図の作成を進めた。T-DNA タギング法を応用し、形態異常を示す変異体や植物ホルモンオーキシン応答変異体を分離し、その原因遺伝子を同定した。ゼニゴケの突然変異体から原因遺伝子を単離する技術の基盤が整備できた。

研究成果の概要（英文）： The liverwort *Marchantia polymorpha* is an emerging model of evodevo studies in land plants. We developed molecular tools for forward genetics for *M. polymorpha*. DNA polymorphism between the standard accession Takaragaike-1 and the reference accession Kitashirakawa was systematically detected and used for genetic mapping with high resolution. We also applied the T-DNA tagging to isolate developmental mutants and to identify causal genes in *M. polymorpha*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 植物分子生物・生理学

キーワード：苔類、比較ゲノム、陸上植物進化・モデル生物

1. 研究開始当初の背景

近年、植物発生・植物生理学研究に、進化的な変遷過程を考慮する比較ゲノム手法が導入され注目されている。苔類は、陸上植物進化の基部に位置し、植物の陸上進出過程を知る上で鍵となる生物群である。なかでもゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) は、生活史の大半が配偶体世代であること、雌雄異株

植物であること、世代時間が比較的短いこと、葉状体の1細胞に由来する栄養繁殖形態である無性芽をもつことといった研究材料として多くのユニークな特長をもつ。19世紀後半から生物学の研究対象とされ、これまでに突然変異体の記述も多数存在する。

遺伝子解析においてもゼニゴケは優れた材料であることが示されてきた。葉緑体ゲノ

ム (1986) やミトコンドリアゲノム (1992) の DNA 塩基配列解析は、植物としては先導的な研究であった。被子植物のオルガネラゲノムがコケ植物のものと基本的に共通する点が多く、植物科学研究全般にも大きな情報を与えることも示された。また、我々は、さまざまな組織や培養条件における EST 情報の解析と Whole Genome Shotgun ゲノム解析によって、ゼニゴケが陸上植物に基本的な遺伝子セットを持ちながらも遺伝子重複が少なく単純なゲノム構成をもつことを見出していた。遺伝的な冗長性の低さは、これまでに解析されてきた植物のなかでも際立っており、潜在的に優れた遺伝学研究材料であることが示された。

更に、我々は実験室条件で胞子が安定的に取得できるようになったことをきっかけに、胞子由来の分裂盛んな細胞を材料としたアグロバクテリアを介する簡便かつ高効率な形質転換法を開発していた。これらのモデル植物としての魅力をアピールすることによって米国エネルギー省の Joint Genome Institute (JGI)によりゲノムの全塩基配列決定にも研究提案が採択され、ゲノム解析が進行中である。このような状況のもと国内外にゼニゴケを材料とする研究者人口が増加しはじめた。現在は逆遺伝学的な解析が盛んに行われているが、順遺伝学的な研究手法への期待も大きい。特に、ゼニゴケを材料に突然変異体の分離と原因遺伝子同定が容易になることによって植物科学への新たな研究展開がもたらされることが期待された。

2. 研究の目的

近年、シロイヌナズナ、イネ、ヒメツリガネゴケ、クラミドモナスなどをモデル植物とした分子遺伝学が確立し、次々と大きな発見につながっている。また、ゲノム解析技術の発展を背景に植物発生や生態生理応答研究に生物進化の視点を取り入れた Evodevo-Eco 研究や比較ゲノム研究が注目されている。実験材料が広がりを見せるなか、分子遺伝学の実験とインフォマティクスが融合することが求められている。そこで、遺伝子重複が少なく半数体世代が優占的であるゼニゴケを用いて、遺伝学を自由自在に操る実験系確立を目指した。なかでも、正統的な突然変異体の分離と原因遺伝子の解析手

法を確立し、実際に研究に利用できることを示すことが重要であると考えた。そこで、ゲノムの遺伝地図の高密度化のために必要な情報の効率的収集と変異体分離・原因遺伝子同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝地図の高密度化：ゼニゴケの標準系統である宝ヶ池株については、これまでにゲノム塩基配列情報がほぼ解読されている。そこで、マッピング対照系統である北白川株について、次世代シーケンサーを利用して、ゲノム塩基配列情報を取得した。両者のデータ比較により、DNA 多型 (塩基置換、欠失・挿入) を検出した。これまでに 100 の dCAPS マーカーによって構築された 8 本の常染色体を表す遺伝地図が得られていた。染色体上の多型検出分子マーカーの数を格段に増加することによって、マッピング精度の大幅な向上を目指した。

(2) T-DNA タギングによる変異体と原因遺伝子同定：ゼニゴケはアグロバクテリアを介する形質転換が極めて効率的で簡便である。また、配偶体世代をつかかって、突然変異体が容易に解析できる。そこで、アグロバクテリアを介する形質転換によって植物ゲノム中へ導入される T-DNA を変異原および遺伝子分離のタグとして利用する T-DNA タギングを行った。突然変異体としては形態的な変異体および植物ホルモンの感受性が変化した変異体の分離を進めた。変異表現型の現れる頻度情報、タグ挿入数と変異表現型へのリンク効率、および、網羅的なスクリーニングに対する有効性を検証した。

(3) 変異原処理による突然変異体分離と原因遺伝子同定：ガンマ線や EMS といった突然変異原は、小さな欠失や点変異を誘起し、T-DNA とは異なった変異体が分離できることが期待される。そこで、胞子を対象に古典的な変異原を使用して変異処理を行い、胞子からの発生過程で突然変異体を分離した。具体的には、環境応答として重要である青色光に対する光屈性応答に注目し、一次スクリーニングを行った。その後、系統化して、さまざまな光応答に関する表現型の観察を行った。表現型の観察によってある程度の評価が進んだ

系統を題材に遺伝子マッピングあるいは直接的な候補遺伝子の変異検索によって、原因遺伝子を単離した。これらの方法によって、古典的な変異原処理の突然変異体分離と分子遺伝学解析の材料づくりへの有効性を検証する。

4. 研究成果

(1) ゼニゴケの遺伝マッピングの対照株 である北白川株よりゲノムを抽出し、特定領域研究ゲノム支援を得て次世代シーケンサーによるゲノムリシーケンスを行った。得られた情報をこれまでに取得した宝ヶ池株のゲノム塩基配列に対してマッピングを行った。宝ヶ池株のゲノムスキファールドに高密度にマップされ、約 60x の網羅率であることがわかった。

更に、両者の間の多型を検索した。スキファールドごとにある程度の偏りはあるものの数多くの多型がゲノム全体にわたって貼り付けられた。つまり、順遺伝学的に遺伝子単離を進める時に必要なマーカー配列情報は十分に得られたといえる。尚、当初の計画では、得られた多型情報を使ってマッピングのための分子マーカーをデザインし、F1 系統に対して多型を検出し、遺伝地図の高密度化を行う予定であったが、次世代シーケンサーの技術革新により、F1 系統を解析することによって、従来法と比較して迅速に質の高いマッピングが進むと判断した。現在、>100 系統の F1 個体より DNA を抽出、F1 個体のゲノム配列取得とマッピングを進めている。

(2) ゼニゴケの変異体分離と原因遺伝子同定に対する T-DNA タギング法の有効性を検証した。胞子から培養したゼニゴケを 1 万株のなかから形態的な異常を示す株を選抜した。遺伝子の挿入数や薬剤体制タグと変異表現型のリンクを調べた。その結果、数コピーの T-DNA 挿入があるラインも存在するが、1 コピーのものが主であることがわかった。このなかから、気室を形成しない変異体を対象に TAIL PCR 法により T-DNA の隣接配列を得た。変異原因遺伝子候補が得られ、その領域の野生型ゲノム断片を付与する相補実験により、候補遺伝子の変異の原因であることを確定した。迅速に変異体分離と遺伝子同定が可能であることがわかった。

次に、突然変異体の網羅性を検証するため、変異体の強力な選抜法として、薬剤処理で生き残る変異体を選抜するという手法で変異体の分離を実施した。これによって多数の個体を比較的少ない労力で扱うことが可能となる。ゼニゴケは高濃度のオーキシンを付与すると枯死する。その条件で生存するオーキシン低感受性株を分離した。計算上 20 万の形質転換体スクリーニングを行った。そして、比較的強いオーキシン耐性株約 10 系統を分離・解析した。TAIL-PCR 法で挿入 DNA に隣接するゲノム領域を調べた。得られた変異体のなかには、特定の遺伝子が繰り返し独立に破壊された株が 2 遺伝子に対して含まれていた。すなわち約 20 万の独立した形質転換体を扱うことで、ある程度網羅的に変異体スクリーニングが実施できることがわかった。20 万という形質転換体数は、ゼニゴケでは格別取得に労力を要する数ではない。また、ゼニゴケの半数体世代を対象としているため、形質転換当代で変異表現型を検出できるという利点もある。ゼニゴケの順遺伝学的な分子遺伝学解析に T-DNA タギングが有効な手法であることがわかった。

(3) 従来の突然変異体分離では、さまざまな化学物質が変異原として利用されてきた。これらの物質は点変異や欠失変異といった T-DNA タギング法とは異なる変異が期待できることと、胞子からの発生過程でスクリーニングが可能であるといった点で有効な手法であると期待された。

そこで、ゼニゴケの変異体分離に有効であるか、原因遺伝子同定が短期間で可能かをガンマ線照射によって変異を誘導した胞子の青色光応答を用いて検討した。変異処理した胞子を、一方向から青色光を照射し、培地上で栽培した。ゼニゴケの胞子発芽は青色光に正の光屈性を示す。この応答が観察されない系統を約 1 万の胞子から 25 系統選抜した。その後、白色光で栽培し、無性芽の分離により純系化した。各系統について、さまざまな青色光応答を調べた。光屈性、変光屈性、葉緑体定位運動といった青色光応答がすべて異常になった株を同定した。

この変異体の中には、光受容体に変異をもつものが存在することが期待された。そこで、変異体からゲノム DNA を抽出し、光受容体遺伝子に変異が存在するかを調べた。その結果、

ゲノム遺伝子領域の小さな欠失をもつ系統を同定した。これによって、ガンマ線も変異原として有効であり、変異体が同定できることがわかった。変異処理により得られる多数の変異体には候補遺伝子が予測できない系統も多い。これらは、マッピングあるいは次世代シーケンサーによる直接的変異同定によって遺伝子同定が簡便になると期待される。変異現処理によって得られた広いスペクトル、例えば表現型の強弱を示す変異体は、個別の解析に有効に利用できることが期待された。

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 2 件)

- ① Ishizaki, K., Nonomura, M., Kato, H., Yamato, K. T., and Kohchi, T., Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*, *J. Plant Res.*, 査読有, Vol. 125, 2012. doi: 10.1007/s10265-012-0477-7
- ② Tougane, K., Komatsu, K., Bhyan, S. B., Sakata, Y., Ishizaki, K., Yamato, K. T., Kohchi, T., and Takezawa, D., Evolutionarily conserved regulatory mechanisms of abscisic acid signaling in land plants: characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-like type-2C protein phosphatase of the liverwort *Marchantia polymorpha* L., *Plant Physiol.*, 査読有, Vol. 152, 2010, 1529-1543. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.153387>

[学会発表] (計 10 件)

- ① 河内孝之、モデル植物ゼニゴケで探る陸上植物の普遍原理と多様性、第 53 回日本植物生理学会年会 (招待講演)、2012.3.16、京都産業大学
- ② 石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、遺伝子機能を自在に研究できるモデルへ〜ゲノム・突然変異体・形質転換〜、第 53

回日本植物生理学会年会 (招待講演)、2012.3.16、京都産業大学

- ③ 武田真由子、加藤大貴、石崎公庸、河内孝之、T-DNA タギング法による苔類ゼニゴケオーキシン低感受性変異体の単離と解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.3.16、京都産業大学
- ④ Ishizaki, K. and Kohchi, T., Transgenesis of the liverwort *Marchantia polymorpha* and its application to developmental genetics, XVIII International Botanical Congress (招待講演)、2011.7.25、メルボルン (オーストラリア)
- ⑤ 石崎公庸、増田晃秀、齊田有桂、水谷未耶、大和勝幸、河内孝之、半数体植物ゼニゴケにおける順遺伝学的解析手法の確立、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011.3.27、京都女子大学 (要旨集による)
- ⑥ 久保田茜、久保田佐綾、村中智明、石崎公庸、大和勝幸、青木摂之、小山時隆、河内孝之、苔類ゼニゴケにおける時計機構と生長相制御の解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.3.22、東北大学 (要旨集による)
- ⑦ 増田晃秀、石崎公庸、齊田有桂、水谷未耶、大和勝幸、河内孝之、苔類ゼニゴケにおける分子遺伝学の基盤整備: T-DNA タギング法による順遺伝学的解析手法の確立、第 52 回日本植物生理学会年会、2011.3.22、東北大学 (要旨集による)
- ⑧ 野々村麻衣子、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、 γ 線照射孢子より単離したゼニゴケオーキシン耐性株の解析、第 52 回日本植物生理学会年会 2011.3.22、東北大学 (要旨集による)
- ⑨ 河内孝之、ゼニゴケのモデルとしての特長、日本植物学会第 74 回大会、2010.9.10、中部大学
- ⑩ 河内孝之、苔類ゼニゴケの環境応答と発生制御、日本植物学会第 74 回大会、2010.9.9、中部大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/plantmb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 孝之 (KOHCHI TAKAYUKI)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号： 40202056

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

石崎 公庸 (ISHIZAKI KIMITSUNE)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号： 00452293

大和 勝幸 (YAMATO KATSUYUKI)
近畿大学・生物理工学部・准教授
研究者番号： 50293915