

平成30年6月26日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04393

研究課題名(和文) ゲノムと表層脂質の解析から分かった車軸藻ワックスの存在と陸上環境適応における意義

研究課題名(英文) Presence of wax components of Charophytes revealed by Genome and surface lipid analyses and their importance in adaptation to land environment

研究代表者

太田 啓之(Ohta, Hiroyuki)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：20233140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では藻類が陸上進出の初期に原始的な表層脂質としてトリアシルグリセロールによるソフトな撥水性バリアを形成し陸上環境に適応したという仮説を提唱し、実験的に明らかにすることを旨とした。そのため、陸上植物に近縁である車軸藻植物門の中で比較的初期に分岐したと考えられているクレブソルミディウムの表層脂質の解析と乾燥適応に関わる遺伝子群の解析を行った。その結果、陸上環境への適応過程においてトリアシルグリセロールを撥水性のバリアとして用いつつ表層構造や、その制御系を段階的に進化させていった事が推定され、陸上植物の出現過程と表層脂質の進化の関連を明らかにするための足掛かりを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we proposed that charophyte algae, which are the closest algae to land plants, acquired a cuticle-like hydrophobic layer composed of triacylglycerol to adapt to a terrestrial environment by initial land colonization. To demonstrate the hypothesis, we analyzed surface lipids and transcriptome of Klebsormidium, which early diverged from charophyte algae ancestor. As a result, it is assumed that surface structure and its related gene regulation were evolved in a stepwise manner during land colonization while using triacylglycerol as hydrophobic barrier. These results will provide information to clarify relation between process of land colonization by plants and evolution of its surface lipid.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：細胞外皮 細胞壁 ワックス 植物陸上進出 車軸藻植物門 クレブソルミディウム

1. 研究開始当初の背景

陸上植物は、主に水中で生活していた真核藻類の一種が、乾燥、高温、低温、強光など、水中には見られない様々なストレスへの適応の仕組みを獲得することで進化し、生まれたと考えられている。中でも乾燥耐性の獲得は植物が水中環境から離れ陸上環境に適応できるようになった大きな要因として考えられるが、その獲得過程は明らかではない。そこで近年、藻類と陸上植物をつなぐ植物として、車軸藻植物門が注目されている。細胞分裂機構や代謝系の特徴などから、陸上植物は車軸藻類から出現したと考えられており、陸上植物の出現に至る進化過程を解明する手がかりとして車軸藻類の解析が進められつつある。

そこで我々は車軸藻類の中でも初期に分岐し、糸状性の単純な体制を持つ陸生藻類であるクレブソルミディウム (*Klebsormidium nitens* NIES-2285) のドラフトゲノム解析を行った。その結果、クレブソルミディウムの同定された遺伝子の内、7.7%に当たる 1,238 の遺伝子が、他の藻類が持たない植物型の遺伝子群であることが明らかとなった。また、乾燥応答に関わる植物ホルモンのアブシジン酸の合成系の遺伝子群がゲノムにコードされており、アブシジン酸が乾燥時に増加することも明らかにした。さらに、陸上植物で水の蒸発を防ぐバリアとして機能しているとされるワックスの合成に関わる遺伝子の一部がゲノム上にコードされていることを見出した。

したがって、クレブソルミディウムは陸上植物のワックスバリアの起源となるような表層構成物質が存在するのではないかと考え、表層脂質の定量を行ったところ、植物のワックスとは大きく異なり、液状の脂質であるトリアシルグリセロールが主成分であることが分かった。

2. 研究の目的

本研究では「植物が陸上に進出する過程で液状のフレキシブルなワックスバリアを獲得して初期陸上環境に適応し、その液性ワックスが結晶性のワックスに置き換わることで表面を固く保護し、さらに3次元的な個体の維持と伸長に貢献した。」という新たな仮説を提唱する。その仮説を検証するために、クレブソルミディウムの表層脂質を解析し、このようなワックスが細胞の水分保持や強光の遮断に果たす役割を高等植物のワックス合成と比較しつつ実験的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、クレブソルミディウムの表層脂質の解析を進め、さらに乾燥や強光への順化過程を特にワックス形成との関係に着目して RNA-seq 解析により明らかにする。またクレブソルミディウムでの遺伝子操作系の確立とそれを用いた解析や、クレブソルミディウムの遺伝子による、高等植物ワックス変異体の機能相補を活用した解析も補完的に推進し、植物の陸上環境への適応機構がどのように獲得され、進化してきたかを検証する。

4. 研究成果

(1) クレブソルミディウムの表層脂質の解析

クレブソルミディウムの表層構造を明らかにするために、細胞外の脂質を細胞内の脂質と明確に分離し解析を行う必要があった。そこでシリカゲルプレートを用いて、微細藻類においても表層脂質のみを精度よく効率的に採取する実験手法を確立した。本手法は従来の短時間の有機溶媒処理による細胞外脂質の抽出法より、より表層の細胞外脂質のみを抽出できる。本手法によってクレブソルミディウムの外皮構造の最外層にはアルカ

ンや、トリアシルグリセロール (TAG) が細胞外脂質の主成分として存在することが明らかとなった。またクレブソルミEDIUMにクチクラに相当する構造があるかどうかを探るため、細胞壁画分から強塩基処理により溶出する脂質を解析し、クレブソルミEDIUMの細胞壁画分には脂肪酸が大量に結合していることを示した。さらに ATR FT-IR による細胞表層の解析の結果、糖タンパク質の骨格の中に多くの脂肪酸を結合させていることが推定された (図 1)。加えて表層構造の SEM による観察からクレブソルミEDIUMは固体培地での気相条件においてフィルム上の構造体を形成する事も明らかとなった。

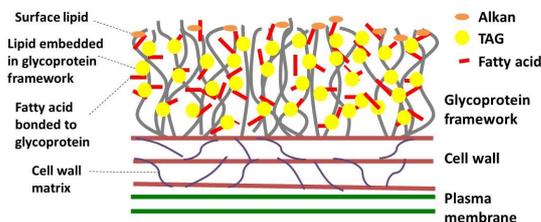


図 1 本研究から推定されたクレブソルミEDIUMの表層構造

本研究によりクレブソルミEDIUMの表層構造は、既知の種子植物に見られる表層構造とは隔たりがある事が明らかとなってきたため、進化の時間軸を広げて解析を行うために、基部陸上植物の一つであるゼニゴケの表層脂質の解析も進めた。その結果、ゼニゴケの表層脂質を抽出した画分からも多くのTAGが検出され、クレブソルミEDIUMと同様にTAGを液状のフレキシブルなワックスバリアとして用いている可能性が考えられた。また、クレブソルミEDIUMのワックスエステルは脂肪酸とイソプレノイドのエステルであったが、表層脂質合成遺伝子の比較解析などから、ゼニゴケはより陸上植物に近い脂肪酸を主成分としたワックスエステルを合成していることが期待された。しかしながら、クレブソルミEDIUMにおい

て推定される表層脂質合成遺伝子の機能解析については、クレブソルミEDIUMの遺伝子操作系の確立が難航し、研究期間内に機能解析には至らなかった。したがって、クレブソルミEDIUMの遺伝子操作系を確立し、表層脂質合成遺伝子の機能を実証する事が今後の重要な課題となった。

(2) RNA-seq 解析による乾燥、強光適応に関わる遺伝子群の同定

「液状のフレキシブルなワックスバリア」の主成分と考えられたトリアシルグリセロール(TAG)の合成経路や制御系を明らかにするために、乾燥ストレスや固体培養、液体培養の水相などにおける RNA-seq データや、固体培養における TAG 蓄積量の変化を測定し、解析を行った。

その結果、クレブソルミEDIUMには乾燥や長期の気相培養など、異なった環境に応じて異なる応答するトリアシルグリセロール合成酵素遺伝子群(DGAT2)が存在しており、乾燥ストレスによって誘導される DGAT2 が細胞外のワックスバリアの形成に関与する事が期待された。

また我々はクレブソルミEDIUMにおいて乾燥時にアブシジン酸が蓄積することを明らかにしており、アブシジン酸がワックスバリア形成のトリガーとなっている可能性を考えた。そこで、クレブソルミEDIUMにアブシジン酸処理を行った後、乾燥処理を行ったが、乾燥耐性に顕著な差異は見られなかった。また、シロイヌナズナにおいてアブシジン酸に応答する事が知られている RD20、PP2Cの類似遺伝子の蓄積量を解析した結果、これらの遺伝子はクレブソルミEDIUMにおいても乾燥に応答して誘導されるが、アブシジン酸処理では顕著な誘導は見られなかった。したがってアブシジン酸が乾燥ストレスシグナルとしてワックスバリア形成のト

リガーとして用いられるようになったのは、クレブソルミEDIUMが分岐した以降である可能性が考えられた。そこでクレブソルミEDIUMにおいて乾燥応答に関わる制御系を明らかにするために、RNA-seq データに基づいて抽出した気相-液相間で蓄積量が変化する 1126 遺伝子の中から転写因子の探索を行った。その結果 13 ファミリー、総計 29 遺伝子の転写因子が気相-液相間で蓄積量が変化することを明らかにした(図2)。その中でも、クレブソルミEDIUMが分岐する直前に大幅に多様化した HD-ZIP ファミリーの中で 3 遺伝子が液相培養から気相培養に移した際、顕著に蓄積量が抑制されることが明らかとなった。したがって、クレブソルミEDIUMにおいて HD-ZIP は気相-液相環境での環境変動に適応するために発達した重要な調節因子である可能性が示唆された。これらのことから、HD-ZIP がワックスバリア形成の制御への関与も期待された。

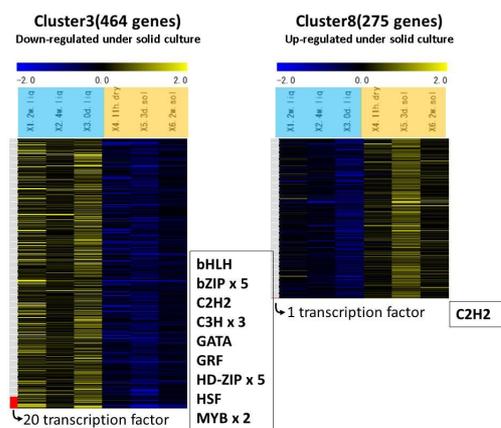


図2左が気相培養で発現が抑制される遺伝子群のヒートマップ、右が気相培養で発現が誘導される遺伝子群のヒートマップ。それぞれのヒートマップにおいて左3列が液体培養、右3列が気相培養での mRNA 蓄積量の変化を示す。またこれらの遺伝子群に含まれる転写因子ファミリーを表記した。

以上の解析結果から陸上植物の表層脂質は下記のように段階的に進化していった事が

推定された。

- ・藻類が陸上進出の初期に原始的な表層脂質として TAG によるソフトな撥水性バリアを形成し陸上環境に適応した。この段階の藻類において、乾燥ストレスは表層構造の変化を誘導するが、乾燥ストレスシグナルはアブシジン酸非依存の経路で伝達され、その後の進化によりアブシジン酸が乾燥ストレスシグナルとなり、ワックスバリア形成に影響するようになったと考えられる。

- ・陸上植物が発達していく過程において、初期の陸上植物においても TAG が「液状のフレキシブルなワックスバリア」として用いられた。

- ・陸上進出後にワックスエステルなど表層構造を形成する代謝産物を進化させていき、最終的に現在の種子植物では TAG による液状のワックスバリアは、固いワックスバリアに置き換わった。

今後より詳細な陸上植物の出現過程と表層脂質およびその制御系の進化を明らかにするために、大きな足掛かりを得ることができた。

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7件)

1. Kobayashi Y, Takusagawa M, Harada N, Fukao Y, Yamaoka S, Kohchi T, Hori K, Ohta H, Shikanai T, Nishimura Y (2016) Eukaryotic Components Remodeled Chloroplast Nucleoid Organization during the Green Plant Evolution. *Genome Biol Evol.*, 8, 1-16. (査読有)

DOI: 10.1093/gbe/evv233

2. 堀孝一、太田啓之 (2016) 車軸藻クレブソルミEDIUMのゲノムから見た植物の陸上化、*植物科学最前線* 7:65(査読無)

DOI: 10.24480/bsj-review.7b2.00081

3. Hori K, Nobusawa T, Watanabe T, Madoka Y, Suzuki H, Shibata D, Shimojima M, Ohta H (2016) Tangled evolutionary processes with commonality and diversity in plastidial glycolipid synthesis in photosynthetic organisms. *Biochim. Biophys Acta*, 1861, 1294-1308. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbali.2016.04.015.

4. Kondo S, Hori K, Sasaki-Sekimoto Y, Kobayashi A, Kato T, Yuno-Ohta N, Nobusawa T, Ohtaka K, Shimojima M, Ohta H. (2016). Primitive Extracellular Lipid Components on the Surface of the Charophytic Alga *Klebsormidium flaccidum* and Their Possible Biosynthetic Pathways as Deduced from the Genome Sequence. *Frontiers in Plant Science.*, 7, 952. (査読有)
DOI: 10.3389/fpls.2016.00952.

5. Ohtaka K, Hori K, Kanno Y, Seo M, Ohta H (2017) Primitive Auxin Response without TIR1 and Aux/IAA in the Charophyte Alga *Klebsormidium nitens.*, *Plant Physiology*, pp-00274. (査読有)
DOI: 10.1104/pp.17.00274

6. Koshimizu S, Kofuji R, Sasaki-Sekimoto Y, Kikkawa M, Shimojima M, Ohta H, Shigenobu S, Kabeya Y, Hiwatashi Y, Tamada Y, Murata T, Hasebe M, (2018). *Physcomitrella* MADS-box genes regulate water supply and sperm movement for fertilization. *Nature plants*, 1. (査読有)
DOI: 10.1038/s41477-017-0082-9

7. de Mendoza A, Bonnet A, Vargas-Landin DB, Ji N, Li H, Yang F, Li L, Hori K, Pflueger J, Buckberry S, Ohta H, Rosic N, Lesage P, Lin S, Lister R (2018). Recurrent acquisition of cytosine methyltransferases into eukaryotic retrotransposons. *Nature communications*, 9, 1341. (査読有)
DOI: 10.1038/s41467-018-03724-9

〔学会発表〕(計12件)

1. 堀 孝一 植物の陸上進出と遺伝子発現ネットワークの変遷、第5回植物RNAネットワークシンポジウム 2016年1月

2. 佐々木(関本) 結子、近藤智、堀孝一、小林厚子、信澤岳、下嶋美恵、太田啓之 気生藻類 *Klebsormidium flaccidum* が陸上条件で形成する表層脂質層の解析、日本植物生理学会第57回年会 2016年3月

3. 大高きぬ香、堀孝一、太田啓之 車軸藻植物門クレブソルミディウムにおける原始的なオーキシン応答の解析、日本植物生理学会第57回年会 2016年3月

4. K Hori, J Umetsu, H Mori, K Kurokawa, H Ohta (2016) Revision of *Klebsormidium flaccidum* Gene models (version 1.1), EMBO workshop New model systems for early land plant evolution

5. S Kondo, K Hori, Y Sasaki-Sekimoto, A Kobayashi, T Kato, N Yuno-Ohta, T Nobusawa, K Ohtaka, M Shimojima, H Ohta (2016) Primitive adaptation mechanisms to land environments revealed by the genome of a charophyte alga *Klebsormidium flaccidum* EMBO workshop New model systems for early land plant evolution

6. Y Sasaki-Sekimoto, S Kondo, K Hori, A Kobayashi, T Nobusawa, M Shimojima, H Ohta (2016) Surface lipid remodeling of an aerial alga *Klebsormidium flaccidum* during land adaptation processes, 22nd International Symposium on Plant Lipids

7. S Kondo, K Hori, Y Sasaki-Sekimoto, A Kobayashi, T Kato, N Yuno-Ohta, T Nobusawa, K Ohtaka, M Shimojima, H Ohta (2016) Primitive extracellular lipid components on the surface of the Charophytic Alga *Klebsormidium flaccidum*, 22nd International Symposium on Plant Lipids

8. 堀孝一、太田啓之 車軸藻クレブソルミディウムの気相、液相培養によるトランスクリプトーム解析第58回日本植物生理学会 2017年3月

9. 佐々木(関本)結子、近藤智、堀孝一、小林厚子、信澤岳、下嶋美恵、太田啓之 車軸藻植物門 Klebsormidium flaccidum と陸上植物の細胞壁に存在する表層脂質層の解析 第58回日本植物生理学会 2017年3月

10. 中村将、北浦銀河、佐々木(関本)結子、堀孝一、井雅子、太田啓之、石崎公庸、下嶋美恵 ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* におけるリン欠乏時の膜脂質転換機構の解析 第59回日本植物生理学会年会 2018年3月

11. 越水静、小藤累美子、佐々木(関本)結子、吉川雅英、下嶋美恵、太田啓之、重信秀治、壁谷幸子、日渡祐二、玉田洋介、村田隆、長谷部光泰 ヒメツリガネゴケ MADS-box 遺伝子は受精に必要な水供給と精子運動を制御する 第59回日本植物生理学会年会 2018年3月

12. 清水信介、渡邊汀、堀孝一、円由香、下嶋美恵、太田啓之 車軸藻植物クレブソルミディウムのオリゴ糖脂質合成酵素の機能解析 第59回日本植物生理学会年会 2018年3月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~official/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 啓之 (Hiroyuki Ohta)

東京工業大学, 生命理工学院, 教授

研究者番号: 20233140

(2) 研究分担者

佐々木 結子 (Yuko Sasaki-Sekimoto)

東京工業大学, 生命理工学院, 研究員

研究者番号: 60422557

堀 孝一 (Koichi Hori)

東京工業大学, 生命理工学院, 助教

研究者番号: 70453967

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし