

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H04413

研究課題名(和文) シャジクモ藻綱全目ゲノム解読にもとづく陸上植物への進化解明

研究課題名(英文) Elucidation of evolution toward land plants based on genome sequene of every charophycean order

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：シャジクモの概要ゲノムとクレブソルミディウム、陸上植物などの比較で、シャジクモ以前に獲得された遺伝子、シャジクモと陸上植物の分岐以降に陸上植物の系統で獲得された遺伝子、シャジクモの系統で独自に増加した遺伝子を区別できるようになった。さらに、広義のシャジクモ藻綱の藻類(ストレプトファイツ藻類)のゲノム解読がすすみ、コレオケーテ以外の主要な系統すべてについて、概要ゲノムにアクセスできるようになった。コレオケーテについては次世代シーケンサーによるcDNA配列大量決定を行い発現している遺伝子はアクセスできるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれ人間は陸上で生活し、主に陸上で育つ植物と植物を食べる動物を食べることによって生きている。また二酸化炭素の固定の多くも陸上植物によってなされる。この陸上植物がどのようにして生じたのかの成り立ちを知る上では、陸上植物に近縁な藻類のことをよく知る必要がある。その一環として、陸上植物にある程度近い藻類の全遺伝子配列の決定を進めた。これにより、陸上植物がどのようにして成立したのかの理解が深まる。また、陸上環境への適応メカニズムについてもよりよく考えられるようになる。

研究成果の概要(英文)：Comparison of Chara braunii draft genome and Klebosrmidum nitens, land plant genomes clarified which gene are present before the divergence of Charophyceae and land plants and lineage specific gain/expansion in each of Charophyceae and land plant lineages. Further, with the progress of genome sequencing, draft genomes of all major phyla except Coleochaetophyceae have become available. For Coleochaete, RNA-seq analyses have been done and most of expressed gene sequence data are made accessible.

研究分野：植物進化学

キーワード：シャジクモ類 ゲノム ストレプトファイツ類

1. 研究開始当初の背景

陸上植物は、シャジクモ藻類の一群から進化したと考えられている。これまでの研究において、申請者は陸上植物の基部のヒメツリガネゴケゲノム(Rensing et al. 2007 Science)とイヌカタヒバゲノムの解読の国際プロジェクトの中で中心的な役割を担い、ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバのゲノムとクラミドモナス及び、被子植物とのゲノム比較によって陸上植物成立以前に、陸上植物の発生に関わる多くの遺伝子が獲得されていたことを明らかにした(Banks, Nishiyama et al. 2011 Science)。

ここで外群として用いたクラミドモナスはクロロファイツ類に分類され、12億1千万年(Herron et al. 2009, PNAS 106 :3254-) ~ 7億3千万年前(Douzery et al. 2004 PNAS 101:15386-)に陸上植物の系統と分岐したと考えられており、進化過程の解明にはシャジクモ藻綱の藻類ゲノムが重要である。シャジクモ藻綱の藻類は、6つの目に分けられており(メソスティグマ+クロロキプス)、クレブソルミディウム目、シャジクモ目、コレオケーテ目、接合藻類、からなる多系統群であると考えられているが、これまでにクレブソルミディウムが東工大のグループによって(Hori et al. 2014 Nature comm. 5:3978)、シャジクモのゲノムが代表者らによって概ね解読されているが、系統を網羅するに至っていない。

2. 研究の目的

クラミドモナスを含むクロロファイツ類より陸上植物に近縁なシャジクモ藻綱の主要なクレード全てについて代表種を一種以上概要ゲノムを解読し、陸上植物と比較することによって、陸上植物がどのように進化したかをゲノムレベルで明らかにする。陸上植物への進化の過程であったゲノムレベルの変化を明らかにするため、陸上植物につらなる系統ストレプトファイツ類で陸上植物の系統から分かれた各系統を順にどの遺伝子を持っているかを解析出来るように、シャジクモ藻綱の各目のゲノム情報を解読し、比較解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Mesostigma viride* NIES-475 株について Illumina 社 HiSeq による塩基配列決定、oxford nanopore 社 MinION によるシーケンシング、PacificBiosciences 社 Sequel II によるシーケンスを得てアセンブリーを行った。

(2) *Chlorokybus* NIES-160 株について、セロハンを持ちいて寒天と分けて回収する方法を確立し DNA を抽出して、Illumina 社 HiSeq および PacificBiosciences 社 Sequel II によるシーケンスを得てアセンブリーを行った。

(3) シャジクモの配列について、クレブソルミディウムと陸上植物などのデータと合わせて比較解析を行った

(4) コレオケーテ *Coleochaete scutata* UTEX-2567 について Illumina 社 HiSeq によってサーベイシーケンスにより 17.5Gb のデータを得た。

(5) 野外で採集したコレオケーテから培養を確立して、条件検討を行い、遊走子形成を誘導できる条件を見出した。

(6) (5)で判明した条件にもとづき、CACC0493 株を用いて遊走子形成の実験を再現し、そのタイムコースの RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。

(7) 陸上植物に最も近縁であると考えられる接合藻類のアオミドロ 3 株についてサーベイシーケンスを行った。

(8) 陸上植物の系統で未解読だったツノゴケゲノムを解析し、シャジクモを含めた比較を行った。

(9) シャジクモのミオシン遺伝子を解析し、RNA-seq にもとづき遺伝子構造を手動で確認するとともに、分子系統解析を行った。

(10) ストレプトファイツ類で精子形成に関与すると思われる遺伝子について、メソスティグマ・クロロキプスの相同遺伝子を検索し解析した。

4. 研究成果

(1) ストレプトファイツ類進化の最初期に陸上植物の系統と分岐したと考えられるメソスティグマ目の *Mesostigma viride* について、メソスティグマ NIES-475 株を用いて Illumina

HiSeq で塩基配列決定を行ったペアエンドおよびメイトペアのデータを Allpaths-LG でアセンブルし、全 scaffold 長 195Mb, N50 scaffold size 81kb を得たが、Contig N50 size が 4.4 kb にとどまり、また、CEGMA による超保存的な遺伝子の検出でも、Complete 44%, Partial 72% にとどまった。このため、より長い 500bp 程度のインサート長を持つペアエンドライブラリーを PCR free プロトコールで作成し、MiSeq で両端から 300 塩基解読して加える事とし現在解読中である。Mesostigma viride NIES-475 株について Illumina シーケンスの解析で十分にアセンブリーが伸びなかった。また、この解析の過程で、得られている配列にリケッチャー様の配列が多い事がわかった。このため、細胞分画によって Mesostigma 本体の核を集めることおよび、個々のシーケンス長が長い単一分子シーケンサーの利用を試みることにした。細胞分画でリケッチャーを除くことは十分にはできなかったが、オックスフォード・ナノポア社の MinION によるシーケンシングを行った。2 通りのシーケンシングキットを用いて 1 フローセルずつ解読し、ligation kit で 312 Mb (N50 12.3 kb, 最長 92 kb), rapid kit で 155 Mb (N50 13.2 kb, 最長 82.5 kb) の配列が得られた。この量は大体 1X ゲノムのオーダーであり、数十 X は欲しいという前提のもと、得られるリード長は長いものの、DNA 量に対して得られるリードの量が不足すると評価した。Mesostigma viride NIES-475 株について、PacificBiosciences 社 Sequel によるシーケンシングを 2 cell 分を行い、6.6 Gbp (Subread N50 14kb) 及び 7.0 Gbp (Subread N50 15 kb) 計 13.6 Gbp の配列情報を取得した。

メソスティグマ NIES-475 について、単一分子シーケンサー Sequel による配列を解析し、細胞内に共存するリケッチャー様細菌のゲノムについては染色体レベルで高精度のアセンブリーを得たが、核ゲノムについては十分な厚みに達していないと判断し、核ゲノムについても厚みが得られると期待される 10X Genomics による linked read のデータを取得した。

(2) クロロキブス *Chlorokybus* sp. NIES-160 株について培養法を検討し、寒天表層で培養出来る事を確認した。液体培養は成功しなかった。このため、藻体と培地の分離が困難であったが、寒天培地上にセロハンを敷いた上で培養することにより、藻体を培地と分離して回収出来る事が確認出来た。*Chlorokybus* sp. NIES-160 株、Illumina システム向け PCR フリーペアエンドライブラリーを調整し、Illumina 社 HiSeq X によりサーベイシーケンシングを行い、*Chlorokybus* sp. NIES-160 について 15.9 Gbp の配列を得た。さらに、単一分子シーケンサー Sequel による配列を解析し 222 Contigs (N50: 857 kb), 全長 85Mb と相当接続性の高いのアセンブリーを得た。SRA に登録されている別系統 (SAG34.98) のクロロキブスの RNA-seq データをマッピングしたところ、マップ率が低く、クロロキブス類内でも大幅に配列が異なっていることがわかった。このため、アノテーションにあたっては、NIES-160 自身の RNA-seq データを得て進める必要があると判断された。

(3) シャジクモのゲノムとクレブソルミEDIUM、陸上植物等のゲノムを比較し、エチレン関連のシグナル伝達因子などがシャジクモ類と陸上植物の共通祖先がクレブソルミEDIUM類と分岐して行こうに揃ったと推定されること、シャジクモ類で独自に遺伝子重複による遺伝子の増加があったことなどを取りまとめ論文として出版した。シャジクモのゲノムとクレブソルミEDIUM、陸上植物等のゲノムを比較し、エチレン関連のシグナル伝達因子などがシャジクモ類と陸上植物の共通祖先がクレブソルミEDIUM類と分岐して行こうに揃ったと推定されること、シャジクモ類で独自に遺伝子重複による遺伝子の増加があったことなどを取りまとめ論文として出版した。

(4) *Coleochaete scutata* UTEX-2567 についてサーベイシーケンシングにより 17.5 Gbp を得て k-mer 解析を行ったが、十分な倍率は読まれていないと推定された。

(5) コレオケータについては、既存培養株が生殖器をつけるかどうかかわからないので、シャジクモ藻綱藻類新規株を千葉県印旛沼を中心とした淡水から探索し、水田の土から円盤状の藻体を形成するものを発見した。119 株の単細胞藻のクローン化を行い、18S rRNA 遺伝子のシーケンス解析と形態観察から接合藻類のミカツキモ属と同定した 30 系統の確立・維持に成功している。また、印旛沼から採取した円盤状藻類についても培養に成功し、18S rRNA 遺伝子のシーケンスからコレオケータであると確認した。さらに、培養条件の検討を行い遊走子が得られる条件を確立した。

(6) コレオケータについてゲッティンゲン大学藻類カルチャーコレクション (SAG) から CACC0493 株を取り寄せ、培養条件の検討を行い、遊走子が得られる条件が見つかった。コレオケータ CACC0493 株を用いて遊走子形成の実験を再現し、遊走子形成のタイムコースサンプルについて RNA を抽出し、High throughput cDNA シーケンシング解析を行った。今後、このデータを解析することにより、ゲノムが未公開の最後の系統であるコレオケータについてより高精度の理解が得られると期待される。

(7) アオミドロ 3 株についてゲノム DNA を抽出し、Illumina HiSeq X によるサーベイシーケンスを行い、それぞれ 35.6, 18.2, 30.2 Gbp の配列を得た。

(8) ツノゴケゲノムを解析し、ツノゴケ類に YABBY 遺伝子があること、KNOX1 遺伝子がないこと

と、気孔形成に関与する遺伝子などが揃っていることが明らかになった。また、シャジクモの配列などと合わせた系統解析によりコケ植物が単系統であるらしいという結果が得られ、Nature Plantsに出版した(Li et al 2020)。また、EF1 などの遺伝子を同定し、その5' 隣接配列が明らかになり、形質転換によってその活性が確認された(2021)。

(9) ストレプトファイツ類の中で、シャジクモ類は数cm乃至数十cmにもなる巨大な細胞を作り、細胞内を速い原形質流動で物質を輸送していることが知られている。この輸送に関与するモーターの候補であるミオシンIX遺伝子の構造について解析し、遺伝子予測が不正確であった遺伝子についてRNA-seqのデータと比較してほぼ完全な構造を再構成した。その上でストレプトファイツ類におけるミオシンIX遺伝子系統解析を行いその進化について考察した。シャジクモ類のミオシンは陸上植物のミオシンとは独立に遺伝子重複により遺伝子数が増加し、そのうち速い動きに関わると推定される一群では特に進化速度が増大し、またコードされている蛋白質の大きさが大きくなったことがわかった。

(10) ストレプトファイツ類の特徴の一つは鞭毛基部装置が多層構造(MLS)を持つことおよび、2本の鞭毛がほぼ並行につくという特徴を持つ。しかし、鞭毛は、接合藻類、被子植物、針葉樹・グネツム類では独立に失われている。ストレプトファイツ類の最初期に分岐した、メソスティグマ、クロロキプスのゲノムデータについて、精子形成に関与する遺伝子の検索を行い断片的にホモログを検出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishiyama Tomoaki, Sakayama Hidetoshi, ...、Rensing Stefan A.	4. 巻 174
2. 論文標題 The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 448 ~ 464.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2018.06.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuchikane Yuki, Hamaji Takashi, Ota Katsumi, Kato Syou	4. 巻 137
2. 論文標題 Establishment of a Clonal Culture of Unicellular Conjugating Algae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e57761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/57761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Li Fay-Wei, Nishiyama Tomoaki, Waller Manuel, Frangedakis Eftychios, Keller Jean, Li Zheng, Fernandez-Pozo Noe, Barker Michael S., Bennett Tom, Blazquez Miguel A., Cheng Shifeng, Cuming Andrew C., de Vries Jan, de Vries Sophie, Delaux Pierre-Marc, Diop Issa S., Harrison C. Jill, ...、Sakakibara Keiko, Szovenyi Peter	4. 巻 6
2. 論文標題 Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 259 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-020-0618-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Frangedakis Eftychios, Waller Manuel, Nishiyama Tomoaki, Tsukaya Hirokazu, Xu Xia, Yue Yuling, Tjahjadi Michelle, Gunadi Andika, Van Eck Joyce, Li Fay Wei, Szovenyi Peter, Sakakibara Keiko	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 An Agrobacterium mediated stable transformation technique for the hornwort model Anthoceros agrestis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Haraguchi Takeshi, Tamanaha Masanori, Suzuki Kano, Yoshimura Kohei, Imi Takuma, Tominaga Motoki, Sakayama Hidetoshi, Nishiyama Tomoaki, Murata Takeshi, Ito Kohji	4. 巻 なし
2. 論文標題 Discovery of the fastest myosin, its amino acid sequence, and structural features	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.05.06.442907	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Tomoaki Nishiyama
2. 発表標題 Evolution of Genetic Toolkits in Land Plants: Implication by Streptophyte Genomes
3. 学会等名 Japan Taiwan Plant Biology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoaki Nishiyama, Yuki Tsuchikane and Hiroyuki Sekimoto
2. 発表標題 Genome Sequencing of Divergent Streptophyte Algae
3. 学会等名 Plant & Animal Genomes XXVII (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoaki Nishiyama
2. 発表標題 Progress in Streptophyte Algae Genomics and Genetics
3. 学会等名 Plant & Animal Genomes XXVII (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山智明, 土金勇樹, 山口勝司, 重信秀治, 野崎久義
2. 発表標題 多様なストレプトファイツ類のゲノム解読
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山智明, 坂山英俊
2. 発表標題 シャジクモ概要ゲノム解読により明かされた陸上植物の起源
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Sakakibara, Emiko Yoro, Tomomi Nakagawa, Eftychios Frangedakis, Masaki Shimamura, and Tomoaki Nishiyama
2. 発表標題 Making New Bryophyte Model System Using Genome Sequencing and Transformation Technique
3. 学会等名 EMBO Workshop “New shores in land plant evolution” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoaki Nishiyama, et al.
2. 発表標題 Sequencing Genomes of Divergent Streptophytes to Reveal their Early Evolution
3. 学会等名 EMBO Workshop “New shores in land plant evolution” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 智明, 大槻 涼, 榊原 恵子, 川井 絢子, 嶋村 正樹, 関本 弘之
2. 発表標題 植物からの高分子DNA調整法
3. 学会等名 NGS現場の会第5回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林弘佳, 関本弘之, 土金勇樹
2. 発表標題 ヒメミカツキモの失われた交配群とその再発見
3. 学会等名 日本植物分類学会第17回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土金 勇樹, 土松 隆志, Shakya Mungal Man, 関本 弘之
2. 発表標題 性特異的遺伝子から明らかにするミカツキモの進化
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoaki Nishiyama, Hidetoshi Sakayama, Keiko Sakakibara
2. 発表標題 Genomes of Bryophytes and Charophyceans
3. 学会等名 ICAR 2016 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tomoaki Nishiyama
2. 発表標題 Genome sequencing charophyceans, liverworts, and hornworts: making model system
3. 学会等名 EMBO workshop: New model systems for early land plant evolution (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小林弘佳、加藤万智、関本弘之、土金勇樹
2. 発表標題 接合藻ヒメミカヅキモの性フェロモンによる生殖隔離と生殖干渉
3. 学会等名 日本植物分類学会第16回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土金勇樹
2. 発表標題 自殖するヒメミカヅキモの有性生殖とCpMinus1相同遺伝子
3. 学会等名 日本植物学会第80回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西山 智明, 嶋村 正樹, 榊原 恵子
2. 発表標題 ツノゴケゲノムの特徴
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山智明
2. 発表標題 シャジクモ・ツノゴケ類ゲノムの解読：ストレプトファイツ類・陸上植物進化のギャップを繋ぐ
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>シャジクモの全ゲノム解読により陸上植物進化の起源を探る https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/59093 陸上植物の起源を探る比較ゲノム解析の謎である「ツノゴケ」の高精度ゲノム解読に成功 https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/77138</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	士金 勇樹 (Tsuchikane Yuki) (20434152)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------