

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18589

研究課題名(和文) 寄生植物の収斂進化を支える分子基盤

研究課題名(英文) Molecular Basis for the Convergent Evolution of Parasitism in Plants

研究代表者

市橋 泰範 (Ichihashi, Yasunori)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：20723810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：収斂進化とは、異なる生物が類似した形質を進化させる現象だが、その分子基盤は未解明である。寄生植物は11回以上も異なる系統から進化しているが、寄生の機能を担う「吸器」を共通して発達させる。本研究では、独立進化系統のストライガ、ネナシカズラ、カナビキソウの吸器形成における比較トランスクリプトーム解析をした。その結果、系統を超えて共通した相同遺伝子群が発現し、共発現ネットワーク上の重要な位置に植物特異的な転写因子LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD)遺伝子があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Convergent evolution is the independent evolution of similar traits in species of different lineages, but the molecular basis remains unknown. Parasitic plants have originated independently at least 11 times in angiosperms, showing the ability to obtain nutrients directly from host plants through a multi-cellular organ called haustorium. Our comparative transcriptomics revealed that common orthologous genes are expressed during the haustorial formation even in the phylogenetically independent parasitic plants, genera *Striga*, *Cuscuta*, and *Thesium*. In addition, we found that a plant-specific LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) gene was located in a key position of the gene co-expression network. Our transformation experiment using *Phtheirospermum japonicum* hairy roots demonstrated that the promoter activity of LBD gene was activated at the specific cells of a haustorium, suggesting that the LBD gene could play an important role for the convergent evolution of parasitic plants.

研究分野：植物科学

キーワード：形態進化 トランスクリプトーム ネットワーク 寄生植物 収斂進化

1. 研究開始当初の背景

(1) 「収斂進化」は、異なる生物が独立に変異を蓄積して類似した形質を進化させるため、稀な現象と考えられるが、翼竜・鳥類・コウモリの翼、脊椎動物・頭足類の目、食虫植物群の捕虫習性など予想外によく観察されている。近年のゲノム解読により、今まで知られていなかった収斂進化の事例も記載され始め (Denoeud et al., Science 2014)、収斂現象はアミノ酸配列レベルでも確認されている (Parker et al., Nature 2013)。しかし、どのようなメカニズムによって異なる生物が似た形質を進化させたのか明らかでなく、収斂進化を可能とした分子基盤は現在の進化学に残された大きな問題の一つである。

(2) 寄生植物は 4000 種を超え、11 回以上も異なる系統から進化しているが (Barkman et al., BMC Evol. Biol. 2007)、全ての寄生植物は、「吸器」という寄生の機能を担う共通の器官を発達させ、宿主と自身の維管束を連結させることで、水や栄養などを収奪する。そのため寄生という形質は吸器の形成に絞ることができ、種間での比較が容易である。これまでの研究により寄生植物に関する多くの知見が蓄積していることを併せると (Yoshida et al., Science 2010 等)、寄生植物は収斂進化の研究に適した実験材料であると申請者は考えた。

2. 研究の目的

(1) 独立進化系統の寄生植物 (ストライガ、ネナシカズラ、カナビキソウなど) について、吸器形成時の全遺伝子発現パターンを明らかにする。

(2) 寄生植物で共通に吸器形成に使われている相同遺伝子群を単離し、共発現ネットワーク構造を明らかにする

(3) 形質転換系を用いて、(2) から得られるネットワーク上で特異な位置にある遺伝子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 申請者が開発したハイスループットな RNA-seq ライブラリー作成法 (Kumar*, Ichihashi* et al., Front. Plant Sci. 2012) を使って、ストライガ、ネナシカズラ、カナビキソウ、ヤドリギ、スナヅルにおける吸器形成の時系列に沿ったトランスクリプトーム解析を行う。

(2) RNA-seq から得られる配列情報から、寄生植物由来の配列情報のみを取り出し、植物種ごとに *De novo assembly* して参照配列情報を確立する。特に吸器が形成される時に特異的に発現する遺伝子群に着目し、種間で共通の相同遺伝子を OrthoMCL 解析により単離

する。これらの遺伝子群について共発現ネットワーク解析を行い、相同遺伝子群で構成された遺伝子制御ネットワーク内のキー遺伝子を推定する。

(3) 形質転換系は分子遺伝学的解析に必要な技術である。ストライガについて *Agrobacterium rhizogenes* を介した Hairy root 形質転換系を確立する。またネナシカズラについては、寄生-宿主間で大規模な RNA 分子の移動が検出されているので (Kim et al., Science 2014)、形質転換した宿主から silencing RNA を送り込む Trans-specific gene silencing 系を、モデル植物であるシロイヌナズナを使って確立する。しかし、形質転換系の確立はリスクがあるため、モデル寄生植物であるコシオガマの Hairy root 形質転換系 (Ishida et al., PLoS one 2011) も代替案として検討する。上記のいずれかの方法を用いて(2)から得られる候補因子の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 想定していた寄生植物のうちカナビキソウ、ヤドリギ、スナヅルの栽培系はいずれにおいても確立することができなかったが、カナビキソウについては野外から十分量のサンプルを得ることができたため、RNA-seq 解析を行った。この野外からのサンプルは、種同定が困難な宿主の根を含む組織のため解析が困難であったが、生物学的反復を増やした実験デザインと Bioinformatics 解析上での厳密なフィルタリングにより、カナビキソウ由来のトランスクリプトームデータを取得することができ、高い精度の *De novo assembled contigs* を得ることに成功した。

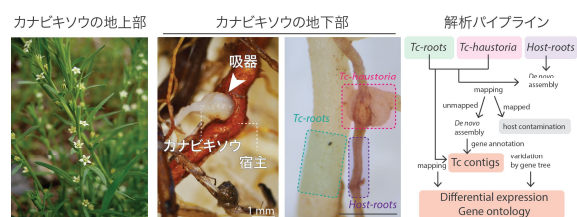


図1 カナビキソウ *De novo assembly* の概要

(2) 先行して行ったストライガとネナシカズラのトランスクリプトームデータに加えて、カナビキソウのデータを比較解析することで、寄生のキー遺伝子候補をさらに絞ることができた。驚くべきことに、ストライガ、ネナシカズラ、カナビキソウは寄生戦略が全く異なるにも関わらず、吸器で共通の相同遺伝子群が利用されていた。脊椎動物が示す発電器官の収斂進化を対象とした比較トランスクリプトーム解析で同様な結果が報告されているため (Gallant et al., Science 2014)、収斂器官において共通の相同遺伝子群が利用されることは、生物種によらず普遍

的な現象かもしれない。

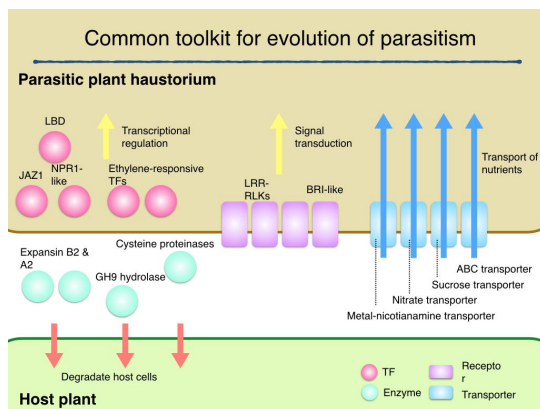


図 2 吸器形成で発現する共通の相同遺伝子

(3) 吸器形成で発現する遺伝子群における共発現ネットワーク解析から、特定の機能を示す遺伝子群（モジュール）の間をつなぐ位置に植物特異的な転写因子 *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD)* 遺伝子があることがわかり、この遺伝子がネットワーク全体を制御している可能性が考えられた。これは吸器形成の遺伝子制御ネットワークを制御する上流因子が進化上繰り返し変化することで寄生植物の収斂進化が生じたことを示唆する。

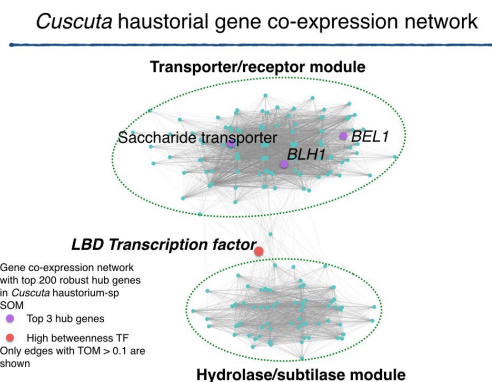


図 3 ネナシカズラの吸器形成における共発現ネットワーク

(4) *LBD* 遺伝子について、機能破壊の CRISPR、過剰発現、転写抑制 SRDX、プロモーター活性の解析用コンストラクションを行い機能解析の準備を進めた。計画していたストライガとネナシカズラの形質転換系の確立においても幾つかの条件検討をしたが実用できるほどの改良に至らなかった。そこで代替案として計画していたコシオガマでの Hairy root 形質転換系を利用した。現在までにプロモーター活性における結果を得ることができ、この転写因子のプロモーターは吸器内の分裂細胞と分化細胞の境界付近の特定の細胞群に活性を示すことが再現よく観察された。こ

れは今までにない新規の発現パターンであり、この転写因子の吸器形成に特異な機能を示していることを示唆する。

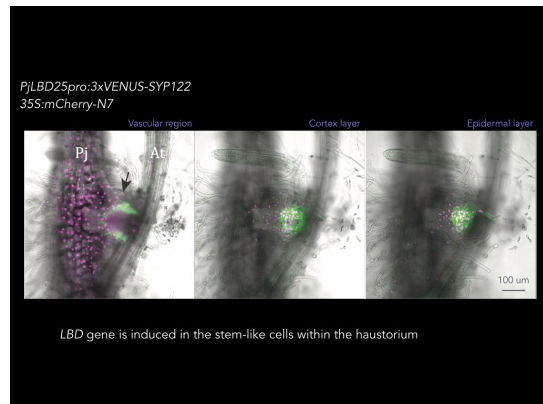


図 4 コシオガマ吸器における *LBD* 遺伝子のプロモーター活性

(5) 吸器形成のような環境にตอบสนองして発動する形態形成の現象（根粒形成やカルス形成など）について公共データベースを使用して比較トランスクリプトーム解析した結果、*LBD* 遺伝子が誘導されることがわかり、*LBD* 転写因子は寄生植物の吸器形成だけでなく植物の進化発生に関わる現象全般においてもキーとなることが示唆された。

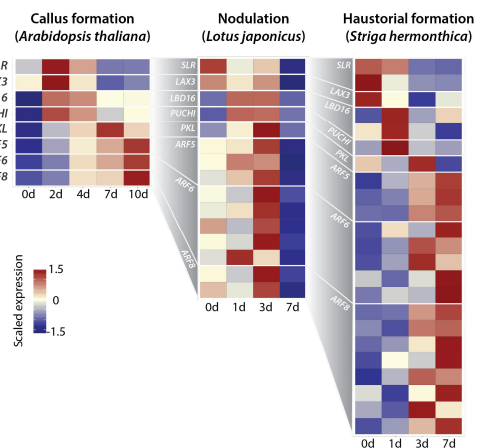


図 5 環境にตอบสนองした形態形成（カルス形成、根粒形成、吸器形成）の遺伝子発現

< 引用文献 >

Denoeud et al., Science 345:1181-4, 2014
 Parker et al., Nature 502:228-31, 2013
 Barkman et al., BMC Evol. Biol.7:248, 2007
 Yoshida et al., Science 328:1128, 2010
 Kumar*, Ichihashi* et al., Front. Plant Sci. 3:202, 2012
 Kim et al., Science 345:808-11, 2014
 Ishida et al., PLoS one 6: e25802, 2011
 Gallant et al., Science 344:1522-5, 2014

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. [Ichihashi Y.](#) Evolutionary developmental studies of leaf shape. *BSJ-Review* 7, 288 (2016) http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ-review_7F_288-300_low_resolution.pdf 査読有り
2. An CI*, [Ichihashi Y*](#), Peng J, Sinha NR, and Hagiwara N. Transcriptome Dynamics and Potential Roles of Sox6 in the Postnatal Heart. *PLoS ONE* 11, 1-26 (2016) DOI:10.1371/journal.pone.0166574 査読有り
3. Fulop D, Ranjan A, Ofner I, Covington MF, Chitwood DH, West D, [Ichihashi Y](#), Headland L, Zamir D, Maloof JN, and Sinha N. A New Advanced Backcross Tomato Population Enables High Resolution Leaf QTL Mapping and Gene Identification. *G3* 6, 3169-3184 (2016) DOI: 10.1534/g3.116.030536 査読有り
4. Ranjan A, Budke J, Rowland SD, Chitwood DH, Kumar R, Carriedo LG, [Ichihashi Y](#), Zumstein K, Maloof JN, and Sinha N. eQTL regulating Transcript Levels Associated with Diverse Biological Processes in Tomato. *Plant Physiol.* 172, 328-340 (2016) DOI:10.1104/pp.16.00289 査読有り
5. Sinha NR, Rowland SD, and [Ichihashi Y](#). Using gene networks in EvoDevo analyses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 133-139 (2016) <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.016> 査読有り
6. Kondo Y, Nurani AM, Saito C, [Ichihashi Y](#), Saito M, Yamazaki K, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, and Fukuda H. Vascular Cell Induction Culture System Using Arabidopsis Leaves (VISUAL) Reveals the Sequential Differentiation of Sieve Element-like Cells. *Plant Cell* 28, 1250-1262 (2016) DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.16.00027> 査読有り
7. [Ichihashi Y](#) and Fukushima A. *Frontiers of Transcriptomics in Plant Science*. *BSJ-Review* 7, 110 (2016) http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ-review_7C_110-123.pdf 査読有り
8. Yoshida S, Cui S, [Ichihashi Y](#), and Shirasu K. The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *Annual Review of Plant Biology* 67, 643-667 (2016) DOI: 10.1146/annurev-arplant-043015-111702 査読有り
9. Ostria-Gallardo E, Ranjan A, Chitwood DH, Kumar R, Townsley BT, [Ichihashi Y](#), Corcuera LJ, and Sinha NR. Transcriptomic analysis suggests a key role for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE, NAC and YUCCA genes in the heteroblastic development of the temperate rainforest tree *Gevuina avellana* (Proteaceae). *New Phytologist* 210,694-708 (2015) DOI: 10.1111/nph.13776 査読有り
10. Chitwood DH, Kumar R, Ranjan A, Pelletier JM, Townsley B, [Ichihashi Y](#), Martinez CC, Zumstein K, Harada JJ, Maloof JN, and Sinha N. Light-induced indeterminacy alters shade avoiding tomato leaf morphology. *Plant Physiol.* 169, 2030-2047 (2015) doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.15.01229> 査読有り
11. [Ichihashi Y](#), Tsukaya H. Behavior of Leaf Meristems and Their Modification. *Front Plant Sci.* 6, 1060 (2015) <doi.org/10.3389/fpls.2015.01060> 査読有り
12. [Ichihashi Y](#). Developmental mechanism underpinning leaf shape evolution. *Plant Morphology* 26, 43-50 (2015) https://www.jstage.jst.go.jp/article/plmorphol/27/1/27_43/_pdf 査読無し
13. [Ichihashi Y](#), Mutuku JM, Yoshida S, Shirasu K. Transcriptomics exposes the uniqueness of parasitic plants. *Briefings in Functional Genomics* 14, 275-282 (2015) doi: 10.1093/bfgp/elv001 査読有り

14. Townsley BT, Covington MF, Ichihashi Y, Zumstein K, Sinha NR. BrAD-seq: Breath Adapter Directional sequencing: a streamlined, ultra-simple and fast library preparation protocol for strand specific mRNA library construction. *Front Plant Sci.* 6, 366 (2015) <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00366> 査読有り
15. Mutuku JM, Yoshida S, Shimizu T, Ichihashi Y, Wakatake T, Seo M, Takahashi A, Shirasu K. The WRKY45-dependent signaling pathway is required for resistance against *Striga* parasitism. *Plant Physiol.* 168,1152-1163 (2015) doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.256404> 査読有り
16. Nozue K, Tat A, Devisetty UK, Robinson M, Ichihashi Y, Lekkala S, Maloof J. Shade avoidance components and pathways in adult plants revealed by phenotypic profiling. *PLOS Genet.* 11, e1004953 (2015) <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004953> 査読有り
- [学会発表](計9件)
1. 市橋泰範、白須賢. 寄生植物の吸器形成における進化発生学的研究. 日本植物学会第80回大会. 2016/09/16, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県, 宜野湾市)
2. Ichihashi Y, Wakatake T, Yoshida Y, Spalek T, Maki N, Shibata A, Kyojuka J, Shirasu K. Transcriptomic homeostasis of host-parasitic plant interactions. *Frontiers in parasitic plant and host interactions*, 2016/08/30, NAIST (Nara, Ikoma)
3. 市橋泰範, 福島敦史, Chitwood DH, Headland LR, Kao J, Peng J, 白須賢, Sinha N. 転写制御ダイナミクスの比較解析 - 葉の発生の種間変異を例に. 日本植物学会第79回大会. 2015/09/06, 新潟コンベンションセンター(新潟県, 新潟市)
4. 市橋泰範, Aguilar-Martínez JA, Farhi M, Chitwood DH, Kumar R, Millon LV, Peng J, Maloof JN, Sinha NR. 共発現ネットワーク解析で明らかにするトマト近縁種の葉の形態進化. 日本植物学会第79回大会. 2015/09/07, 新潟コンベンションセンター(新潟県, 新潟市)
5. 市橋泰範, 吉田聡子, Sinha N, 白須賢. 寄生植物 収斂進化を可能とした遺伝的メカニズム. 日本植物形態学会第27回大会. 2015/09/05, 新潟コンベンションセンター(新潟県, 新潟市)
6. 市橋泰範. 植物の進化発生学における比較トランスクリプトーム解析. 日本線虫学会第23回大会. 2015/09/03, 中部大学(愛知県, 名古屋市)
7. Ichihashi Y, Yoshida S, Sinha N, Shirasu K. Molecular Basis for the Convergent Evolution of Parasitism in Plants. The 13th World Congress on Parasitic Plants, 2015/07/06, Kunming (China)
8. 市橋泰範, 吉田聡子, Sinha N, 白須賢. 寄生植物の収斂進化を支える分子基盤. 第8回 Evo-devo 青年の会. 2015/06/27, 名古屋大学(愛知県, 名古屋市)
9. Ichihashi Y, Wakatake T, Yoshida Y, Spalek T, Maki N, Shibata A, Kyojuka J, Shirasu K. Dissecting an opportunistic relationship between parasitic plant and host. 第57回日本植物生理学会年会. 2016/03/18, 岩手大学(岩手県, 盛岡市)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
市橋 泰範 (ICHIHASHI, Yasunori)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号: 20723810