

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06382

研究課題名(和文) シャジクモのゲノムと変異体解析から探る植物の多細胞体制の進化過程

研究課題名(英文) Investigation on the origin and evolution of the multicellular body plan in plants by focusing on genomes and mutant analyses in *Chara braunii* (Charophyceae, Streptophyta)

研究代表者

坂山 英俊 (Sakayama, Hidetoshi)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60391108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体材料として、シャジクモの生態型が異なる複数の系統株を用いた。突然変異原としてEMS(エチルメタンサルホン酸)を用い、シャジクモの葉状体をEMS水溶液に浸漬し変異誘発するための条件検討を実施した。条件検討を重ねた結果、葉状体の形態変異を示す株を単離することができた。また、長期培養株の中から、正常な形態を示さない変異体と思われる株を発見した。これらの形態変異を示す株について詳細な表現型解析、野生株との交配実験、ゲノム配列の比較を進めた。さらに、シャジクモにおける恒常的な遺伝子導入系を確立するため、栄養繁殖器官から葉状体が再生する過程を詳細に解析し、遺伝子導入の実験に関する条件検討を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陸上植物とシャジクモ藻類の多細胞体制の発生システムにどのような違いがあるのかを特定し、植物多細胞体制の進化過程を解明するためには、単なるゲノム配列比較では不十分であり、シャジクモ等の多細胞体制を持つシャジクモ藻類において遺伝子機能解析を行うことが必要不可欠である。本研究で得られたシャジクモにおける変異体の遺伝学的解析、遺伝子導入に関する知見は、シャジクモでこれまで困難であった遺伝子機能解析を実現するための糸口となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined two strains of *Chara braunii*, representing two ecotypes. We tried to obtain mutants by treating vegetative cells and oospores with ethylmethanesulfonate (EMS). A mutant with a phenotype of interest is obtained by screening thalli under a specific condition. We also obtained a mutant from long-term cultured material. We compared their phenotypic characteristics with wild type strains, and moved forward with mating experiments and genome analyses using mutant and wild type strains. In order to establish a gene introduction and stable expression system in *Chara*, moreover, we explored the developmental processes of thalli reproduced from stem cells of vegetative organs in detail, and tried to introduce the exogenous gene into *Chara* cells.

研究分野：進化系統学、植物分類学

キーワード：進化 比較ゲノム シャジクモ藻類 ストレプト植物 多細胞体制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸上植物は約 4.8 億年前に水中生活をする藻類から進化した。これまでの形態学的研究と分子系統学的研究の結果から、シャジクモ藻類 (シャジクモ、コレオケーテ、ヒメミカツキモ、クレブソルミディウム等) が陸上植物に最も近縁だと考えられている。陸上植物はすべて孢子体とよばれる 2 倍体多細胞体と配偶体とよばれる 1 倍体多細胞体からなる世代交代を行っており、陸上植物の 1 倍体と 2 倍体はどちらも多細胞である。一方、シャジクモ藻類では 1 倍体多細胞体はあるが 2 倍体多細胞体はない。

生物進化において、「新規に獲得した遺伝子」と「既存の遺伝子の流用」による多様化が、その後の形態進化に大きく寄与したと考えられている。最近、申請者らの研究により、シャジクモの 1 倍体の各器官/発生ステージで特徴的に発現する遺伝子と 2 倍体で特徴的に発現する遺伝子が明らかになってきた。したがって、シャジクモにおいて、1 倍体多細胞体の各器官の形態形成がどのような遺伝子によって制御されているのかを解明し、陸上植物と他のシャジクモ藻類と比較し、それぞれの多細胞体制で「流用した遺伝子」と「新規に獲得した遺伝子」を明らかにすることにより、植物の多細胞体制の進化過程を解明できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、シャジクモ藻類シャジクモにおいて申請者が確立した生態型の異なる系統株の概要ゲノム、遺伝地図、遺伝子発現情報を基礎とし、さらに変異誘発処理によりシャジクモ 1 倍体多細胞体の栄養器官、生殖器官の表現型変異を示す突然変異体を分離し、その変異体の責任遺伝子の特定を目指した。また、本研究で着目した遺伝子がシャジクモにおいてどのような役割を果たしているのかを解明し、陸上植物とシャジクモ藻類の多細胞体制の発生システムにどのような違いがあるのかを解析し、植物多細胞体制の進化過程を考察した。

3. 研究の方法

生体材料として、シャジクモ藻類のモデル種として認められている、シャジクモ (*Chara braunii*, 雌雄同株) の生態型が異なる 2 系統 (水田型 S276 株と湖沼型 S277 株) を用いた。シャジクモの培養方法、核酸抽出法は既に確立済みである。

突然変異原として EMS (エチルメタンスルホン酸) を用い、シャジクモの接合子および葉状体を EMS 水溶液に浸漬し変異誘発した。各変異体を生態型が異なる個体と交配した。交配によって分離している子孫と自家受精による子孫を区別する方法は既に確立済みである。

次世代シーケンサーを用いた WGS (ホールゲノムショットガン) 法により、シャジクモで連鎖解析と遺伝地図構築を行う実験系を既に確立している。変異体について WGS 用ライブラリーを調整し、次世代シーケンサーによりシーケンシングし、得られたリードを申請者らの先行研究により既に決定されている概要ゲノム/遺伝地図にマッピングして、系統間のゲノム全体に分布する SNP を効率的に抽出することによって、変異体由来である責任領域と連鎖する SNP マーカーの特定を進めた。また、変異を示す栄養器官、生殖器官の経時的サンプルのトランスクリプトーム解析を進めた。

シャジクモでは恒常的な遺伝子導入系は報告されていないが、申請者は恒常的に高い発現を示すネイティブな遺伝子プロモーターを利用した発現コンストラクトを作成し、マイクロインジェクション法による一過的な遺伝子導入系を確立している。本研究では、さらにパーティクルボンバートメント法による遺伝子導入の条件と薬剤選抜を検討し、恒常的または一過的に外来遺伝子を発現させた機能解析系の確立を目指した。

シャジクモの栄養繁殖機構を理解することと、シャジクモの幹細胞をターゲットとした遺伝子導入系を確立することを目的として、栄養繁殖器官である主軸節部の分化過程の詳細な観察を実施した。

4. 研究成果

生体材料として、シャジクモの生態型が異なる複数の系統株を用い、突然変異原として EMS を用い、シャジクモの葉状体を EMS 水溶液に浸漬し変異誘発するための条件検討を実施した。条件検討を重ねた結果、葉状体の形態変異を示す株を単離することができた。また、野外調査により収集したシャジクモの培養サンプルの中から、正常な形態の個体と形態が著しく異なる個体が混ざった株を発見した。この培養株について、両個体の葉緑体 DNA 配列を確認した結果、両個体は同一のクローンに由来する可能性が示唆された。これらの葉状体の形態変異を示す株について、ゲノム解析および交配実験を進めた。

また、シャジクモの栄養繁殖機構を理解することを目的として、栄養繁殖器官である主軸節部の分化過程の詳細な観察を実施した。シャジクモは卵生殖によって有性生殖を行うが、成長した藻体の節部から葉状体をつくることで栄養的にも繁殖する。シャジクモの栄養繁殖において、通常は 1 つの節部から 1 つの葉状体しか生じず、その葉状体が成長しきると新たな葉状体が生えてくると考えられている。一方、先行研究において、シャジクモ属の別の種において、単離した節部から二次的にプロトネマが生じることが報告されているが、シャジクモにおいて二次的な

プロトネマの分化はまだ確認されていない。観察の結果、シャジクモにおいて主軸節部の幹細胞から葉状体またはプロトネマが生じる過程を明らかにすることができた。本研究によって、シャジクモにおいて有性生殖による卵胞子の発芽を経ずに、単離した節部からプロトネマを得ることが可能になったため、今後、節部から生じてきたプロトネマに焦点を絞り、詳細な形態学的解析を行い栄養繁殖機構について解明を進めていくとともに、多くのプロトネマを効率よく作成する方法を検討することにより、プロトネマをターゲットとした遺伝子導入系の確立に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishiyama, T., Sakayama, H., de Vries, J., Buschmann, H., Saint-Marcoux, D., et al. (他55名)	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 Higo, A., Kawashima, T., Borg, M., Zhao, M., Lopez-Vidriero, I., Sakayama, H., et al. (他18名)	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcription factor DU01 generated by neo-functionalization is associated with evolution of sperm differentiation in plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07728-3	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 Takano, T., Ikegaya, H., Nozaki, H. and Sakayama, H.	4. 巻 68
2. 論文標題 Induction of sexual reproduction reveals the presence of heterothallic Spirogyra strains (Zygnematophyceae, Streptophyta)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 263-268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12436	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 -
1. 著者名 Kato, S., Tanaka, J., Tanaka, N., Yokoyama, J., Ito, Y., Fujiwara, Y., Higa, A., Kobayashi, S., Watanabe, M. M. and Sakayama, H.	4. 巻 14
2. 論文標題 New distributional records, taxonomy, morphology, and genetic variations of the endangered brackish-water species Lamprothamnium succinctum (Charales, Charophyceae) in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Asia-Pacific Biodiversity	6. 最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.japb.2020.09.005	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 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Sakayama, H. and Nishiyama, T.
2. 発表標題 The genome and ecological evolution of <i>Chara braunii</i> (Charophyceae, Streptophyta)
3. 学会等名 The 5th International Volvox Conference, Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takano, T. and Sakayama, H.
2. 発表標題 First discovery of heterothallic sexuality in the genus <i>Spirogyra</i> using culture strains
3. 学会等名 The 5th International Volvox Conference, Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂山 英俊・玉置 千紘・Adriana Garcia・Zhongmin Sun・川井 浩史・西山 智明
2. 発表標題 車軸藻類シャジクモ(<i>Chara braunii</i>)とその近縁種の分類学的再検討
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会、東北大学(仙台)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野 智之・野崎 久義・坂山 英俊
2. 発表標題 接合藻類アオミドロ属の西日本産を中心とした新規株の系統解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会、東北大学(仙台)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野 智之・野崎 久義・坂山 英俊
2. 発表標題 接合藻類アオミドロ属の日本新産種における細胞間隔壁の特徴と系統的位置
3. 学会等名 日本植物分類学会第19回大会、岐阜大学（岐阜）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 智之・野崎 久義・坂山 英俊
2. 発表標題 接合藻類アオミドロ属の新規培養株についての形態観察及び系統解析
3. 学会等名 日本藻類学会第44回大会、鹿児島大学（鹿児島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 望月伸悦・坂山英俊・西山智明・長谷あきら
2. 発表標題 プラスチドシグナルとGUN1機能の進化
3. 学会等名 日本植物生理学会第61回年会、大阪大学（吹田キャンパス）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakayama, H., Kato, S. and Nishiyama, T.
2. 発表標題 The genome and ecological evolution of a cosmopolitan freshwater alga <i>Chara braunii</i> (Charales, Streptophyta)
3. 学会等名 East Asian Plant Diversity and Conservation 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三村徹郎・大西美輪・村西直樹・藤原ひとみ・石崎公庸・深城英弘・西山智明・坂山英俊・Reid Rob J.・且原真木
2. 発表標題 シャジクモ細胞膜リン酸輸送体の分子機能解析
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 橋爪駿・高谷彰吾・日渡祐二・坂山英俊・西山智明・高橋卓・本瀬宏康
2. 発表標題 NIMA関連キナーゼファミリーによる細胞伸長制御の進化的な保存性
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 Nishiyama, T., Kamada, H., Kasahara, M., Sakayama, H., Tsuchikane, Y. and Sekimoto, H.
2. 発表標題 Progress in Streptophyte Algae Genomics and Genetics
3. 学会等名 Plant and Animal Genome XXVII Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉置千紘・Adriana Garcia・Zhongmin Sun・Wuttipong Mahakham・川井浩史・坂山英俊
2. 発表標題 シャジクモ (Chara) 属 Charopsis 節の分類学的再検討
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口ゆりの・Adriana Garcia・坂山 英俊
2. 発表標題 車軸藻類 <i>Nitella sonderi</i> とその近縁種の分類学的再検討
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会，オンライン開催（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 智之・野崎 久義・坂山 英俊
2. 発表標題 接合藻類アオミドロ属の日本新産種 <i>Spirogyra unduliseptum</i> の分類学的再検討
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会，オンライン開催（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 智之・野崎 久義・坂山 英俊
2. 発表標題 新規培養株を用いた接合藻類アオミドロ属及びシロゴニウム属の分子系統と形態比較
3. 学会等名 日本植物分類学会第20回大会，オンライン開催（東京）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野 智之・野崎 久義・坂山 英俊
2. 発表標題 兵庫県及び京都府から発見された接合藻類アオミドロ属における一未記載種
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会，オンライン開催（東京）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	加藤 将 (Kato Syou) (30624738)	新潟大学・人文社会科学系・特任准教授 (13101)	

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			
ドイツ	University of Marburg	Heinrich Heine University	Osnabruck University	
英国	University of Oxford	University of Leicester		
米国	University of Maryland	The New York Botanical Garden		
オーストリア	Gregor Mendel Institute			
ベルギー	Gent University			