

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22448

研究課題名(和文)陸上植物進化解析のゲノム配列比較からゲノム機能比較への革新

研究課題名(英文)Reformation of evolutionary genomics in land plant evolution: from sequence comparison to functional comparison.

研究代表者

西山 智明(NISHIYAMA, Tomoaki)

金沢大学・疾患モデル総合研究センター・助教

研究者番号：50390688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトファイツ類の代表的な系統について形質転換法を確立することはストレプトファイツ類の進化を理解するために重要である。シャジクモ*Chara braunii*についてはパーティクルボンバードメントによる一過的な遺伝子発現に成功した。コレオケーテ *Coleochaete scutata*については、その後発生をさせることができる単細胞である遊走子を再現性良く作らせることができる条件を見出した。クロロキブスについては*Chlorokybus riethii* NIES-160株を無菌化し参照ゲノムを揃え形質転換の準備ができた。いずれもハイグロマイシンによって野生株を死なせることができる条件を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレプトファイツ類が進化する中で約5億年前に陸上植物が生まれた。これまでの比較ゲノム解析によって、進化の過程で遺伝子が獲得されあるいは配列が異なってきたことがわかる様になっている。しかし、陸上植物以外のストレプトファイツ類ではヒメミカツキモ以外形質転換法が確立されておらず、形質転換系を確立する基礎条件の整備は今後の学術の進展に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Establishing transformation technique for major streptophyte lineages are pivotal to explore evolution of streptophytes. We succeeded to transiently express beta-glucuronidase in *Chara braunii* by particle bombardment. We found reproducible zoospore production condition for *Coleochaete scutata*. A zoospore cell can be propagated to a thallus, thus such cells are considered a good candidate for transformation. *Chlorokybus riethii* NIES-160 was sterilized and deposited to NIES microbial culture collection as an axenic culture and a reference genome was established. For selection of transformations, hygromycin concentration to kill each algal culture was established. These results would be foundation of establishing stable transformation techniques for streptophyte algal lineages.

研究分野：ゲノム進化学

キーワード：シャジクモ コレオケーテ クロロキブス 形質転換 パーティクルボンバードメント

1. 研究開始当初の背景

ヒメツリガネゴケのゲノム解読 (Rensing et al 2008 Science)、イヌカタヒバのゲノム解析とクラミドモナス、被子植物とのゲノム比較解析を行った (Banks et al 2011 Science)。この過程で、陸上植物の成立前に分かれたがクラミドモナスより陸上植物に近縁なストレプトファイツ類に属する藻類の重要性に気付きシャジクモのゲノム解読と比較解析をおこなった (Nishiyama et al. Cell 2018)。さらにストレプトファイツ類の主要な系統全てのゲノム解読を目指している。こうして、ゲノム解読によってゲノム比較がシーケンスレベルで可能になっている。このなかで、陸上植物で重要な機能を果たすことが知られている遺伝子のホモログおよび、シャジクモ独自の遺伝子を多数同定した。例えば、植物ホルモンのエチレンのシグナル伝達経路の要素はシャジクモと陸上植物の共通祖先で揃ったことがわかった。しかし、これらの遺伝子が実際にエチレン応答に働いているかを知るためには、それぞれの生物で遺伝子改変を行い遺伝子の機能を調べる必要がある。ゲノム編集技術の発展により、一旦遺伝子導入さえできれば、相同組換え率が特に高い生物でなくても、狙った遺伝子を改変出来るようになった一方、遺伝子導入技術には生物毎の問題があり、ごく一部の生物のみで可能になっている (陸上植物に最も近縁なホシミドロ類ヒメミカツキモの次は 10 億年以上前に分かれたクラミドモナス等の緑藻類まで離れる) のが現状である。この現状を打破するため、形質転換がうまく行かない理由の一つは、古くに別れた生物だとプロモーター活性が同じ配列では十分に高くないことであると目をつけ、ゲノム配列を活用して遺伝子組換え技術を作ることを企図した。

2. 研究の目的

本研究では、シャジクモ、コレオケーテ、クロロキプス、メソスティグマについて形質転換法を確立することを目指す。これによって、植物の大進化に係るゲノム比較を配列比較から遺伝子機能比較へ変革・転換させ、相同遺伝子の有無にとどまらず機能の変化を 5-10 億年のタイムスケールで比較出来るようにする。

3. 研究の方法

各生物について形質転換後の薬剤選抜でコロニーを形成できるか探るため、寒天でゲル化した C 培地に撒いてコロニー形成可能か調べた。また、抗生物質ハイグロマイシンまたは G418 を含む寒天培地に撒いて藻類の生育を阻害するかを調べた。

クロロキプス *Chlorokybus riethii* NIES-160 について得られていた概要ゲノムの配列を調査するとバクテリアの大きな contig があることがわかり、目立たないレベルではあったがバクテリアの存在が問題であると判断し、無菌化を試みた。チメンチン 100 mg/L を含む寒天培地に大幅に希釈した藻類の培養を撒くことにより、藻類のコロニーをバクテリアのコロニーから分離して取得することができた。このコロニーに由来する細胞懸濁液をさらに、バクテリア検定用培地にまき、バクテリアのコロニーが形成されないことを確認し無菌化に成功していると判断した。サンプルの一部を国立環境研究所微生物系統保存施設に返送し微生物系統保存施設においても無菌と評価された。

さらに培養を行い、DNA を抽出して、MinION でゲノム解読を行い、これまでに得られていた概要ゲノムにマッピングした。リードマッピング率でコンティグを分類した。

Chlorokybus riethii NIES-160 について BRAKER3 を用いて遺伝子予測を行った。

シャジクモの安定な形質転換体の選抜に向けて、シャジクモの抗生物質感受性を検討した。陸上植物の選抜によく用いられる Geneticin (G418)、Hygromycin、あるいは Zeocin を含む培地にてシャジクモを培養し、生育/死亡を評価した。

シャジクモのトランスクリプトームデータを解析し、発現量が安定している遺伝子のリストを作成し、その中から 3 つの候補遺伝子を選び隣接領域のクローニングを試みた。うち一つについてクローニングに成功し、GUS 遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子とそれぞれ融合した融合遺伝子を作成した。

遺伝子導入方法としてプラスミドをパーティクルボンバードメント法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションを試みた。

4. 研究成果

(1) 培養と薬剤の効果

薬剤選抜クロロキプス、コレオケーテ、シャジクモについては寒天上でコロニーを形成することができた。メソスティグマについては、寒天上でコロニーを形成する条件を見つけることがで

きていない。クロロキブス、シャジクモについてハイグロマイシンで選択する抗生物質として 5-10 mg/L ハイグロマイシンが有効であることがわかった。

(2) クロロキブス

クロロキブス *Chlorokybus riethii* NIES-160 について無菌化に成功し、国立環境研究所微生物系統保存施設に戻して、無菌株が広く使えるようになった。この無菌株のゲノム配列を決定し、以前の概要ゲノムに含まれていたバクテリアのコンティグを除外し、NIES-160 核ゲノムのデータセットを作った。このゲノム配列と RNA-seq データを利用して遺伝子予測を行い、推定遺伝子領域・プロモーター領域がわかるようになった。これによりプロモーターを単離しコドン使用頻度に合わせた配列設計が可能となった。

(3) コレオケーテ

コレオケーテについては、寒天培地上での培養技術を確立した。遊走子を形成させ、遊走子を含む液体培地を寒天培地の上に拡げることによって、葉状体を再生させることができるようになった。この寒天培地での培養技術は、二つの観点から重要である。一つには形質転換に供する細胞の供給源として、もう一つには、形質転換後に薬剤耐性で選抜し、単一形質転換イベント由来の個体を選抜する方法としてである。コレオケーテ *Coleochaete scutata* UTEX LB2567 株、CCAC 0493 株、NIES-4262 株について遊走子を作らせることができることを確認した。コレオケーテ *Coleochaete scutata* NIES-4262 株について新たに無菌化した。形質転換の基盤となると期待される。CCAC 0493 株についてトマトを標準にフローサイトメトリーにより核 DNA 量を測定し、ゲノムサイズは 3.05 ± 0.02 Gb と推定された。

コレオケーテについて *Coleochaete scutata* CCAC 0493 株の遊走子誘導過程の RNA-seq のデータを取得し de novo アセンブル解析し、EF1 遺伝子の転写産物候補を得た。今後この 5' 側隣接ゲノム領域を単離することによって、プロモーター候補が得られると期待される。

(4) シャジクモ

選抜条件

シャジクモの薬剤耐性について有効濃度を詳細に調べ、G418 (Geneticin)、ハイグロマイシン致死濃度を調べた。半数致死量は G418 については 2 mg/L 以下、ハイグロマイシンについては 5 mg/L 前後、Zeocin は 2 mg/L 以下であると見られる結果を得た。生存を葉緑素の量で判定する場合の選抜期間としては 1 週間では不十分で 2 週間待つ方が良いことがわかった。

DNA 導入条件

シャジクモのトランスクリプトームデータを解析し、発現量が安定している遺伝子のリストを作成し、その中から 3 つの候補遺伝子を選び隣接領域のクローニングを試みた。うち一つについてクローニングに成功し、GUS 遺伝子と融合した融合遺伝子を作成した。この融合遺伝子をシャジクモにパーティクルボンバードメントで打ち込み、組織化学的染色によって Glucuronidase 活性を検出したところ、スポット状の青色発色を認め、シャジクモへの遺伝子導入と遺伝子発現に成功していると判断した。この内生プロモーターにハイグロマイシン不活性化酵素のコード領域をつなぎ、さらに 3' 隣接領域をターミネーターとして繋いだ融合遺伝子を耐性遺伝子としてパーティクルボンバードメント法によりシャジクモ配偶体組織に導入する実験を行い、ハイグロマイシン処理したところ、一時的にハイグロマイシン耐性を獲得していると判断される結果を得た。しかしながら、そこから細胞分裂を誘導し完全な植物体を再生することはまだできていない。

シャジクモについて、ネッパジーンのレーザー熱膨張式微量インジェクターを用いて節間細胞に DNA を注入することによる GFP の一過的な発現を試みたが発現を確認できず、安定した結果を得るためにさらに条件検討が必要であることがわかった。

エレクトロポレーション法を検討した。葉状体をキュベットにいれて電気パルスを与えて再生する実験を行い、結果としては選択なしでもかなり死ぬが無パルスなら死なないのでパルス条件次第では可能性がまだあると判断した。

再生条件

また、シャジクモの節からの再生を確認するとともに、節からプロトネマを複数誘導できる培養条件を見出した。安定な形質転換体を取得するには独立に再生可能な細胞を確保することが一つの鍵と考えられ、シャジクモの安定形質転換に向けて一つの障壁を乗り越えたものと考えられる。セロハン上培養で仮根の割合が高い培養ができることがわかった。このことは仮根への形質転換への希望を抱かせる。ただし、仮根から葉状体を形成する条件についてさらに明らかにする必要があるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

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 232
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 1488 ~ 1505
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 Koshimizu Shizuka, Minamino Naoki, Nishiyama Tomoaki, Yoro Emiko, Sato Mayuko, Wakazaki Mayumi, Toyooka Kiminori, Ebine Kazuo, Sakakibara Keiko, Ueda Takashi, Yano Kentaro	4. 巻 236
2. 論文標題 Phylogenetic distribution and expression pattern analyses identified a divergent basal body assembly protein involved in land plant spermatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1182 ~ 1196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18385	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 Sekimoto Hiroyuki, Komiya Ayumi, Tsuyuki Natsumi, Kawai Junko, Kanda Naho, Ootsuki Ryo, Suzuki Yutaka, Toyoda Atsushi, Fujiyama Asao, Kasahara Masahiro, Abe Jun, Tsuchikane Yuki, Nishiyama Tomoaki	4. 巻 237
2. 論文標題 A divergent RWP RK transcription factor determines mating type in heterothallic Closterium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1636 ~ 1651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18662	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 Kawai Junko, Kanazawa Manaki, Suzuki Rie, Kikuchi Nanako, Hayakawa Yasuhiko, Sekimoto Hiroyuki	4. 巻 233
2. 論文標題 Highly efficient transformation of the model zygmatophycean alga Closterium peracerosum strigosum littorale complex by square pulse electroporation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 569 ~ 578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17763	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 Ohtaka Kinuka, Sekimoto Hiroyuki	4. 巻 134
2. 論文標題 Zygnematophycean algae: Possible models for cellular and evolutionary biology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2022.03.042	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	関本 弘之 (SEKIMOTO Hiroyuki) (20281652)	日本女子大学・理学部・教授 (32670)	
研究分担者	土金 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)	
研究分担者	坂山 英俊 (SAKAYAMA Hidetoshi) (60391108)	神戸大学・理学研究科・准教授 (14501)	
研究分担者	榊原 恵子 (SAKAKIBARA Keiko) (90590000)	立教大学・理学部・准教授 (32686)	

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
---------	---------