

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370045

研究課題名(和文)コケ植物主要分類群の系統関係を明らかにするための葉緑体ゲノム系統学の展開

研究課題名(英文)Chloroplast phylogenomics to resolve the phylogenetic relationships of major taxonomic groups in bryophytes

研究代表者

出口 博則 (Deguchi, Hironori)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60117017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：7種のセン類, 2種のタイ類, 1種のツノゴケ類を含む, 10種類のコケ植物について, 葉緑体ゲノムの全塩基配列を新たに決定した。これまで, セン類は, タイ類やツノゴケ類と比べ, 葉緑体ゲノムの構造が大きく異なっていると考えられていたが, セン類の系統基部に位置する分類群では, タイ類やツノゴケ類と非常によく似た葉緑体ゲノム構造をもつことが分かった。進化を通じておきたいくつかの遺伝子の欠失イベントは, セン類の主要分類群の分岐順序を考える上で有効な系統マーカーとなることが示唆された。

高等植物の葉緑体で知られる, 線状ゲノム分子, 多量体ゲノム分子がコケ植物にも存在することを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chloroplast genomes of seven mosses, two liverworts and one hornworts species were newly sequenced. Comparison of the chloroplast genomes showed that *T. lepidozoides* had the largest cp genome in the mosses and the gene content was almost identical to those of liverworts and hornworts. Some gene-loss events through the evolution were indicated to be effective for considering the relationships of major moss lineages.

In addition, we firstly detected linear and circular DNA molecules of chloroplast genome in a *Sphagnum* moss. Some larger molecules seem to be derived from multimeric conformations of single genomes. The occurrence of linear and multimeric molecules also have been known in some flowering plants. Such structural plasticity of the chloroplast genome seems to be evolutionary conserved across land plants.

研究分野：分類学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：コケ植物 葉緑体ゲノム 分子系統 分類 進化

1. 研究開始当初の背景

現在のコケ植物は、形態的に大きく異なった、セン類、タイ類、ツノゴケ類の3綱(クラス)に分類されているが、これらの3綱の系統関係や、それぞれの綱の目(オーダー)間の系統関係については、分子系統解析が導入された現在でさえ様々な議論がある。その原因として、まず、サンプル数や、解析のための配列長における情報量の不足があげられる。また、コケ植物は約4億年以上前に最初に陸上に上がった植物群の未裔で、主要な分類群はそれぞれ非常に長い進化の歴史を持つため、塩基配列やアミノ酸の配列の変異が飽和状態になりがちで、系統関係に関する有意な情報が得られにくい(多重置換による系統シグナル消失)など、情報の質的問題がある。これらの問題を乗り越えるためのアプローチの1つとして、ゲノムの構造的な変化、すなわち、遺伝子組成(コードされている遺伝子の種類)・遺伝子配置(ゲノム上で遺伝子が並んでいる順序)などを指標として系統解析を行うことが考えられる。

一般的に、葉緑体ゲノムの構造は、系統的に大きく離れた植物間でも、よく保存されていることが知られている。その一方で、遺伝子の核への移行に伴う消失や偽遺伝子化、遺伝子や遺伝子群の葉緑体ゲノム中での転座や逆位など、系統解析に有用と考えられる構造的な変化が、進化の過程でしばしば生じていることが分かっている。これまでに報告された160種以上の維管束植物で、葉緑体全ゲノム情報に基づき、ゲノム構造の差異を解析した結果は、維管束植物の系統関係を良く反映していることが報告されている(Gao et al. 2010)。一方で、下等陸上植物の葉緑体ゲノムの解析は進んでおらず、シダ植物は7種、コケ植物ではわずか5種類で明らかになっているのみである(2010年10月現在)。コケ植物では、主要な3系統である、セン類(2種)、タイ類(2種)、ツノゴケ類(1種)で葉緑体ゲノム配列が決定されているが、セン類、タイ類、ツノゴケ類の中でそれぞれ原始的とされる分類群では情報を欠いており、葉緑体ゲノムの構造的情報を用いて系統関係を議論するには情報があまりに乏しい。

陸上植物の葉緑体ゲノム形状は120-160 kbの2本鎖環状分子と考えるのが常識的であるが、実際には、葉緑体ゲノム分子の実際の形態については多くの議論がある。顕微鏡による観察では、環状分子だけでなく、同等の大きさの線状分子の存在も確認されており、ゲノム同士が連結した多量体分子も存在することが最近示され

た(Lilly et al, 2001)。これらの知見は、シーケンサー反応で得られた断片配列をアSEMBLすることによって得られる環状のゲノム地図は、実際の生体内の葉緑体ゲノムの存在形態を忠実に再現していない、概念的なものである可能性を示唆している。コケ植物でも、顕花植物で知られる様々な葉緑体ゲノムの存在形態が存在するかどうかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

コケ植物の幅広い分類群で葉緑体ゲノムの全塩基配列を決定し、遺伝子の構成や配置順序などゲノムの構造を情報として、いまだ未解決の系統関係、すなわち、コケ植物の3群、セン類、タイ類、ツノゴケ類の系統関係や、その綱内の目(オーダー)間の系統関係について、決定的な情報を得ることを目的とする。さらに、コケ植物において、個々の葉緑体ゲノムの生体内での存在形態を、パルスフィールド電気泳動や蛍光顕微鏡を用いた1分子直接観察による解析で明らかにする。維管束植物で一般的に知られる、線状、多量体といった葉緑体ゲノムの存在形態の、陸上植物での普遍性や、系統的意義を検証する。

単離葉緑体の大量調製が可能な材料について、パルスフィールド電気泳動や蛍光顕微鏡を用いた観察で、葉緑体ゲノムの生体内での存在形態について解析する。顕花植物で知られる葉緑体ゲノムの多様な存在形態がコケ植物を含めた陸上植物で保存的であるのかを検証する。

3. 研究の方法

これまでの分子系統学的解析の結果から、セン類、タイ類、ツノゴケ類それぞれの分類群で比較的初期に分岐したと推定されている分類群を中心に10種類のコケ植物について葉緑体ゲノムの全塩基配列を決定し、ゲノム構造を明らかにする。具体的にはタイ類では、コマチゴケ目、トロイブゴケ目、ウロコゴケ目、フタマタゴケ目から1種ずつ、セン類ではミズゴケ目、クロゴケ目、イシヅチゴケ目、ヨツバゴケ目から1種ずつ、ツノゴケ類ではツノゴケ科とツノゴケモドキ科から1種ずつを選定し、次世代型シーケンサーを用いて葉緑体ゲノムの全塩基配列決定を行う。さらに遺伝子、偽遺伝子の有無や配置順序などを比較し、系統マーカーとなり得るゲノム構造の違いを探索する。得られた配列情報から大規模データセットに基づく分子系統解析を行う。

また、個々の葉緑体ゲノムの形態（線状、環状といった形やその大きさ）をパルスフィールド電気泳動や、蛍光顕微鏡を用いた1分子の直接観察により観察し、維管束植物で知られている、多量体葉緑体ゲノムや線状葉緑体ゲノムの存在を検証する。

4. 研究成果

研究期間を通じ、7種のセン類、2種のタイ類、1種のツノゴケ類を含む、10種類のコケ植物について、葉緑体ゲノムの全塩基配列を新たに決定した。

これまで、セン類は、タイ類やツノゴケ類と比べ、葉緑体ゲノム中の遺伝子数も少なく、遺伝子の位置も大きく異なっていると考えられていたが、セン類の系統基部に位置する分類群では、タイ類やと非常によく似た葉緑体ゲノム構造をもつことが分かった。とくにナンジャモンジャゴケの葉緑体ゲノムからは127遺伝子が同定され、セン類の葉緑体ゲノムでは初めて *cysA*, *cysT*, *ccsA*, *rps16*, *trnP-GGG* が存在することを明らかにした。他のセン類の葉緑体ゲノムでは *cysA*, *cysT* が偽遺伝子化あるいは欠失していたが、*ccsA*, *trnP-GGG* はオオミズゴケ、ガッサンクロゴケ、イシツチゴケの葉緑体ゲノム内にもみられた。またオオミズゴケとイシツチゴケの葉緑体ゲノム内に、陸上植物では初めて *tufA* が存在することを明らかにした。

これまでに明らかにされていた4種のタイ類の葉緑体ゲノムでは遺伝子構成や順序などが比較的安定しており、タイ類の葉緑体ゲノム構造は、セン類やツノゴケ類に比べて保存的と考えられていた。しかし本研究を通じて、クモノスゴケやコマチゴケでは、逆位反復配列中やその近傍での遺伝子構成などに他のタイ類とくらべて比較的大きな違いがあり、今後タイ類の他の分類群でも解析を進めることで有効な系統マーカーを見出せる可能性があることが示唆された。

他の陸上植物と共通する47遺伝子を用いて、分子系統解析を行い、コケ植物主要分類群間の分岐順序を推定した。解析の結果、コケ植物は側系統となり、タイ類、セン類、ツノゴケ類の順に分岐したという仮説が支持された。セン類の中で、ナンジャモンジャゴケ綱がミズゴケ綱と単系統となり、他のセン類と姉妹群を形成した。次いで、クロゴケ綱、イシツチゴケ綱、ヨツバゴケ綱、スギゴケ綱、マゴケ綱の順に分岐したことが示された。葉緑体ゲノムの構造比較もほぼ、この結果を支持した。

単離葉緑体を調整することができたオオミズゴケ葉緑体について、個々の葉緑体ゲノムの形態についてパルスフィールド電気泳動による多量体分子の分離、蛍光顕微鏡による直接観察による解析を行った。線状分子、環状分子、2量体、3量体に相当する分子の存在を確認し、高等植物や藻類で知られる、線状ゲノム分子、多量体ゲノム分子がコケ植物にも存在することを初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 10件)

1. 大西弥真人・山口富美夫・嶋村正樹 (2013). セン類ヨツバゴケとアリノオヤリの交雑に関する遺伝学的解析. 日本蘚苔類学会第42回大会(8月6日 岡山)
2. 友岡秀文・嶋村正樹・山口富美夫・出口博則 (2013). クモノスゴケの葉緑体ゲノムの構造. 日本蘚苔類学会第42回大会(8月6日 岡山)
3. Sadamitsu, A., Kosugi, I., Sakakibara, K., Tsubota, H., Yamaguchi, T., Deguchi, H. & Shimamura, M. (2012). The complete chloroplast genome sequences of four early divergent mosses: *Takakia lepidozioides* (Takakiopsida), *Sphagnum palustre* (Sphagnopsida), *Andreaea nivalis* (Andreaeopsida) and *Oedipodium griffithianum* (Oedipodiopsida). Third International Symposium on Molecular Systematics of Bryophytes. (6月16日 NY, USA).
4. 定光淳・嶋村正樹・榊原恵子・山口登美夫・出口博則. (2012) セン類イシツチゴケの葉緑体ゲノム構造. 日本植物学会第76回大会(9月16日 姫路)
5. 定光淳・坪田博美・嶋村正樹・榊原恵子・山口登美夫・出口博則. (2012). 葉緑体遺伝子大規模データセットに基づくセン類の分子系統解析. 日本植物分類学会第11回大会(3月24日 大阪)
6. 定光淳・小杉一誠・嶋村正樹・山口富美夫・出口博則. (2011). 葉緑体ゲノム構造からみたコケ植物セン類の系統関係. 日本植物学会第75回大会(8月17日 東京)
7. 小杉一誠・定光淳・嶋村正樹・山口富美夫・出口博則. (2011). コケ植物セン類の葉緑体ゲノム構造の多様性. 日本蘚苔類学会第40回大会(8月9日 奈良)

8. Sadamitsu, A., Shimamura, M., Yamaguchi, T. & Deguchi, H. Phylogenetic position of the Takakiopsida (Bryophyta) inferred from comparative chloroplast genomics. XVIII International Botanical Congress, Melbourne, Australia. 24-29 July 2011.

9. Kosugi, I., Shimamura, M. Yamaguchi, T. & Deguchi, H. Chloroplast genome sequencing of the moss, *Andreaea nivalis*. XVIII International Botanical Congress, Melbourne, Australia. 24-29 July 2011.

10. Shimamura, M., Sadamitsu, A., Yamaguchi, T. & Deguchi, H. Chloroplast genome structure of a primitive moss, *Sphagnum palustre* (Bryophyta): DNA sequencing and direct observation of single molecules. XVIII International Botanical Congress, Melbourne, Australia. 24-29 July 2011.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

出口 博則 (DEGUCHI HIRONORI)

広島大学・大学院理学研究科・特任教授
研究者番号：60117017

(2)研究分担者

山口 富美夫 (YAMAGUCHI TOMIO)

広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：60244290

坪田 博美 (TSUBOTA HIROMI)

広島大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：10332800

嶋村 正樹 (SHIMAMURA MASAKI)

広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：00432708

榊原 恵子 (SAKAKIBARA KEIKO)

広島大学・大学院理学研究科・特任助教
研究者番号：90590000

(3)連携研究者

倉林 敦 (KURABAYASHI ATSUSHI)

広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：00327701