

植物系 NBRP リソースとその活用研究最前線

オーガナイザー

山口晴代¹, 佐藤豊²

¹ 国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

² 国立遺伝学研究所

〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111

Haruyo Yamaguchi¹ and Yutaka Sato²

Introduction of plant resources in National BioResource Project (NBRP) and frontiers of research using the resources

Key words: algae, culture collection, land plant, National BioResource Project, slime mold

¹ Center for Environmental Biology and Ecocystem Studies, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

² National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c1.00161

バイオリソース（生物遺伝資源）とは、ライフサイエンス研究で利用される動物・植物・微生物等の研究材料のことであり、国内外の研究者に利用され、研究の発展に欠くことの出来ない研究基盤である。バイオリソースはもともと研究者個人の努力によって得られた研究成果をもとに開発されていたが、折角開発された素晴らしいバイオリソースであっても個人ベースや研究室単位の管理では大事な材料が失われてしまう危険性を常に孕んでいた。ナショナルバイオリソースプロジェクト（National BioResource Project: NBRP, <http://nbrp.jp/>）は、我が国が有するバイオリソースのうち、国が戦略的に整備することが必要だとしたものについて、公的研究機関を実施機関として、収集・保存・提供等の体制整備を行うものである。NBRP は、文部科学省の委託事業として平成 14 年度に発足し、平成 21 年度からは補助事業として継続されてきた。その後、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）が創設され、平成 27 年度からは AMED の補助事業として実施されている。現在、第 4 期 NBRP（平成 29 年度～令和 3 年度）を実施しており、30 のバイオリソースの中核拠点整備プログラムが行われている。このように国が我が国におけるバイオリソースの収集・保存・提供等の体制整備を支援することで、研究者が開発してきた貴重なバイオリソースが守られているという現状がある。

日本植物学会第 82 回大会（2018 年 9 月）では、「植物系 NBRP リソースとその活用研究最前線」と題してシンポジウムを行った。“植物系 NBRP リソース”という括りには、いろいろな捉え方もあるが、藻類と細胞性粘菌は、国際植物命名規約（現在の国際藻類・菌類・植物命名規約）において陸上植物と同じ規約で扱われていることから、これらを含め、シロイヌナズナ、イネ、コムギ、オオムギ、藻類、広義キク属、アサガオ、ミヤコグサ・ダイ

ズ、トマト、細胞性粘菌の10のバイオリソースを含めて考えた。シンポジウムでは、このうち藻類、細胞性粘菌、広義キク属、アサガオ、ミヤコグサ・ダイズ、コムギの6つのバイオリソースから話題提供を受けた。シンポジウムでは“植物系 NBRP リソース”の特徴と魅力について、各バイオリソースの課題管理者等からご紹介いただくとともに、バイオリソースを活用して行われた最新で独創的な研究成果について、各リソース選りすぐりのユーザーの研究者からご講演いただいた。本総説集は、当該シンポジウムでの講演内容を日本語で体系的にまとめたものである。本総説集を通して、植物科学研究における NBRP リソースの重要性と魅力について、認識を新たにいただける機会となれば幸いである。

また、国内外の研究コミュニティに世界最高水準のバイオリソースを提供・管理し続けるためには、バイオリソース担当機関とユーザーの研究者との連携が欠かせない。連携の場として、このようなシンポジウムでの意見交換等が挙げられるが、その他に、バイオリソースを利用した成果のバイオリソース担当機関へのフィードバックも連携の一つの手段である。利用成果がフィードバックされ、蓄積されることによって、バイオリソースに新たな付加価値が付けられることになり、この積み重ねを続けることによって、日本発のユニークで有用なバイオリソースの益々の利活用に繋がっていく。NBRP では、ユーザーからの成果のフィードバックの場として Research Resource Circulation (RRC) というサイト

(<https://rrc.nbrp.jp/>) を用意している。このサイトでは、NBRP リソースを利用した成果論文を検索したり、バイオリソースを利用して出版した成果論文を研究者自身で直接入力できるようになっている。このように様々な方法で、日常的にユーザーの研究者と連携し、議論することで、バイオリソースのさらなる戦略的整備と利活用に繋がっていききたい。

最後に、シンポジウムの開催にあたってお世話になった大会実行委員の先生方、レビュー執筆の機会を与えてくださった電子出版物編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。また、本シンポジウムは、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) のナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の支援を受けて行われた。

植物科学における藻類リソースの魅力について

河地正伸¹, 小亀一弘², 川井浩史³

¹ 国立環境研究所生物生態系環境研究センター

〒305-8506 つくば市小野川 16-2

² 北海道大学大学院理学研究院

〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目

³ 神戸大学内海域環境教育研究センター

〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

Masanobu Kawachi¹, Kazuhiro Kogame² and Hiroshi Kawai³

Fascination points of algal resource in plant science

Key words: algae, diversity, protist, resource, seaweeds

¹ Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

² Faculty of Science, Hokkaido University,
Kita 10-jo, Nishi 8-chome, Kita-ku, Sapporo 060-0810 Japan

³ Kobe University Research Center for Inland Seas
1-1 Rokkoudaicho, Nada-ku, Kobe 657-8501 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c2.00162

1. 多様な藻類と NBRP 藻類

藻類は「主に水中で生活し酸素発生型の光合成を行う」という特性でくくられた生物である。コケ、シダ、種子植物のいわゆる陸上植物を除いた残りの全ての「酸素発生型の光合成」を行う生物が藻類というカテゴリーの中に含まれている。藻類からは区別されている陸上植物ですら、その起源を辿ると車軸藻と近縁の藻類から進化したことが分かっている。藻類には原核生物や真核生物、単細胞性から、海藻のように多細胞で複雑な体制・生活史をもつものまで、多種多様な生物が含まれており、進化的には大きく離れた系統群の総称である。藻類は、湖沼や沿岸、海洋といった普通の水環境だけでなく、温泉、雪氷、高塩環境、乾燥地帯などの様々な極限環境にも生育している。海洋や湖沼の一次生産者として、炭素循環に大きく寄与するほか、水界の窒素循環・硫黄循環への貢献も大きく、富栄養化した環境で大量繁殖するアオコや赤潮は身近な水環境問題としてしばしば話題にあがる。サンゴや地衣類で知られているように共生関係を営む藻類も数多く、それぞれの生態系において重要な構成要素となっている。さらには、葉緑体に退化した核が残っているグループや二次的に光合成能力を失った系統の例が多数知られるなど、葉緑体進化のダイナミズムを実感することができる生物群も含まれている。このように藻類リソースの最大の特徴は、進化系統的な多様性と多様な生育環境への適応によって藻類が獲得した多様な生物学的特性にあると言えるだろう。

M. Kawachi, K. Kogame & H. Kawai -1

ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の一員として、藻類リソースは第 1 期より参画して、収集・保存・提供を行っている。NBRP における活動として、これまでに国内における藻類リソースの収集・集約と保存・提供体制の整備、リソースの高品質化や付加情報の整備等を行いつつ、広報・展示活動による啓蒙と利用拡大、国際的データベースへの登録等の国際展開を図ることで、ライフサイエンスの基盤的研究を推進するに資する高水準のリソース整備に取り組んできた。

2. NBRP 藻類の体制と最近の実績

現在、代表機関である国立環境研究所 (以下, NIES コレクション) では、微細藻類と絶滅危惧藻類, そして藻類と系統的に近いプロティストといったリソースの収集・保存・提供を行っている (<http://mcc.nies.go.jp>)。そして分担機関の神戸大学 (以下, KU-MACC) は大型藻類リソースの収集・保存・提供を担当 (<http://ku-macc.nbrp.jp>)、北海道大学は、両コレクションの重要な継代培養保存株のバックアップを担当している。

NBRP 藻類における 2018 年度の実績を例として挙げておこう。2018 年度には研究コミュニティ他から 86 株の保存株の寄託受け入れを行い, NIES コレクションでは 2,925 株, KU-MACC では 1,095 株を公開, そして国内 920 株, 国外 219 株の提供を行った。これらの提供株はアオコ・赤潮対策, AGP 試験, 生態毒性試験等の環境研究, 藻類バイオマス研究や生理活性物質の探索等の応用利用, 光合成や生理・代謝機能の解析, ゲノム解析, 分類, 系統進化といった基礎研究, そして教育利用など, 様々な目的で利用されており, 2018 年度には合計 120 報 (平均 IF 値は 4.17) の成果論文が利用者により発表された。



図 1 凍結保存 (左, 国立環境研究所の凍結保存タンク) および継代培養保存による藻類リソースのバックアップ (右, 北海道大学の培養棚)。

震災等によるリソースの消失を防ぐための危険分散相互バックアップとして、凍結保存株は複数の施設で保存しており (図 1 左), NIES コレクションから KU-MACC へ新たに 81 株を, KU-MACC から NIES コレクションへ新たに 70 株を輸送して, 相互にバックアップし, その累計は NIES 株 1,620 株, KU-MACC 株 766 株に達している。また凍結保存が困難で, か

つ重要性が高い株については北海道大学で継代培養によるバックアップ（図 1 右）を行っており、これらは NIES コレクションからの 430 株および KU-MACC からの 120 株の合計 550 株となっている。

広報・展示活動においては、日本植物学会大会、日本分子生物学会年会等、5 件の関連集会において NBRP 藻類の活動について紹介した。またそのほかにも利用拡大に向けた活動として、GBIF（地球規模生物多様性情報共有 DB）への 57 株の地理情報の登録（合計 935 件）、20 株の DNA バーコード情報の整備、12 株の全ゲノムやオルガネラゲノム情報の整備といった付加情報の整備に加えて、メールニュース配信（年 3 回）、藻類培養トレーニングコースの開催（年 2 回）、藻類・プロティストムービーの YouTube 公開（年 10 件程度）、施設および事業のパンフレット作成と配付、ツイッター発信（179 件）等を行った。

3. 藻類リソースの魅力と付加情報整備

3-1. 系統的多様性から見る藻類の特色

藻類はもともとその単純な体制や水中という生活環境から、陸上植物の祖先的な生物群であると考えられてきた。しかしながら近年の分子系統学的研究から、藻類の多くは陸上植物とは系統的に大きく異なるグループで構成されることが分かってきた。現在、真核生物は少なくとも9つのスーパーグループからなることが分かっている（図2）。

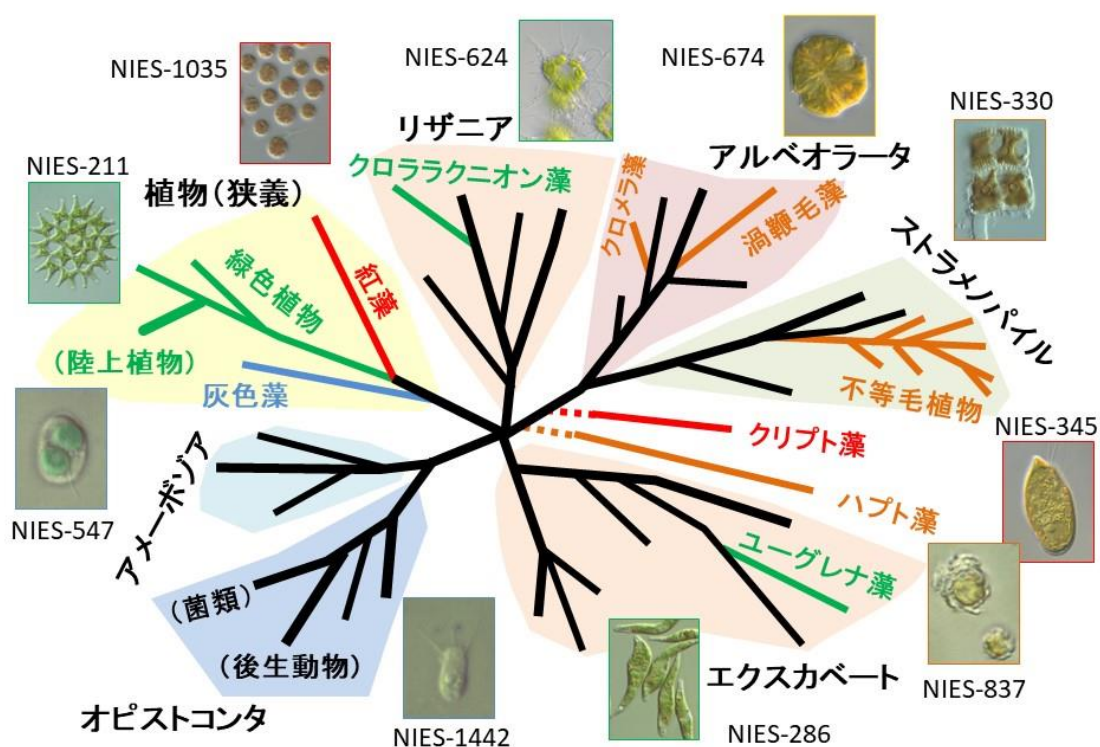


図2 真核生物の多様な系統

Baldauf (2003)をもとに改変。色の付いた枝は藻類と陸上植物。黒い枝の大部分は無色プロテ
イスト。

その多くは顕微鏡的な微生物で、これらのグループのうち、アメーボゾアとオピストコンタを除く全てのグループで、藻類と呼ばれる系統群が含まれることが知られている。この模式的な系統樹の中で、さまざまな色で示した藻類を含む系統の枝が散在しているのは、各グループで独立して葉緑体が獲得されたことによると考えられている。前述したように光合成を行うという共通の特徴をもつ藻類は、実は進化・系統的に遠く離れたものを含んでいる生物群である。こうした系統の違いは、細胞構造や生理学・生化学的特徴、その他のさまざまな生物学的特性の違いとして現れることになる。真核生物全体に跨がる藻類の多様性が、まさに研究リソースとしての藻類の魅力の1つと言えるだろう。

3-2. 葉緑体の進化，成立機構解明のためのリソース

藻類には、各々のグループに特徴的な葉緑体が確認されている。クリプト藻（図 3A）とクロララクニオン藻（図 3B）という系統的に大きく異なる藻類の葉緑体では、葉緑体の元となった真核生物の核の名残り（ヌクレオモルフ）が存在する。クリプト藻は紅藻，クロララクニオン藻は緑藻に由来する葉緑体を有すること、そしてクリプト藻のヌクレオモルフは、3 染色体でゲノムサイズが 0.55Mb、約 600 の遺伝子をコードすることが明らかになっている。こうしたヌクレオモルフの存在は葉緑体の由来とオルガネラの進化プロセスを直接示す証拠となっている。*Paulinella chromatophora* という藻類（図 3C）では、他の藻類の葉緑体とは起源の異なる葉緑体（区別のためシアネレと呼ばれている）が存在する。興味深いことに *Paulinella* のシアネレでは、他の藻類の葉緑体で既に核ゲノムに移行した光合成関連遺伝子等が残っており、葉緑体というオルガネラに移行する途中段階にあると考えられている。



図 3 葉緑体の進化，成立機構解明のためのリソース例

A. クリプト藻 (*Cryptomonas rostratiformis*, NIES-345), B. クロララクニオン藻 (*Chlorarachnion reptans*, NIES-624), C. *Paulinella chromatophore* (NIES-2635)。

他にもいろいろな藻類やプロティストで細胞内共生や盗葉緑体とも呼ばれる興味深い現象が見つかっている。例えば、ハテナ (*Hatena arenicola*) というプロティストは、一見すると緑色の葉緑体をもつ鞭毛性の藻類のように見えるが、実は自由生活性のプラシノ藻を細胞内に取り込んで、サイズと形を改変することで、あたかも葉緑体のように利用している生物なのである。このプラシノ藻は *Nephroselmis* の一種であることが分かっている。ハテナは取り込

んだ *Nephroselmis* をどのように改変・コントロールしているのか、ハテナの核には *Nephroselmis* のゲノムの一部がすでに移行しているのかなど、ハテナは葉緑体成立の初期過程を解明する上で、興味深い研究対象となっている。更に藻類や藻類に近縁な無色プロティストでは、二次的に葉緑体を失った後、再び葉緑体を獲得するような例も多数見つかっている。葉緑体というオルガネラの進化や成立過程を研究する上で、藻類は格好の魅力的なリソースといえるだろう。

3-3. 光合成研究・応用研究のための藻類リソースの魅力

藻類リソースには、増殖能に優れ、高密度に増殖して、実験的な取り扱いの容易な種がいる。光合成研究や生理・生化学的研究、そして応用利用を目指した開発研究など、様々な研究分野で用いられてきた *Chlorella* (図 4A) や *Euglena* (図 4B) は、その代表的な藻類である。後者はユーグレナとも呼ばれ、バイオ燃料や食品等の応用利用を目指した開発研究が近年盛んに行われている。*Dunaliella* (図 4C) は高塩環境に適応した緑藻の一種で、開放的なプールのような培養池 (図 4D) でも高塩環境を維持することで、純粋培養に近い状態で大量培養することが可能である。増殖能はそれ程高くはないが、細胞外に重油相当のオイルを蓄積する *Botryococcus braunii* (図 4E), アスタキサンチンという有用物質を生産する *Haematococcus lacustris* (図 4F) など近年よく応用研究分野で使われるようになったリソースである。

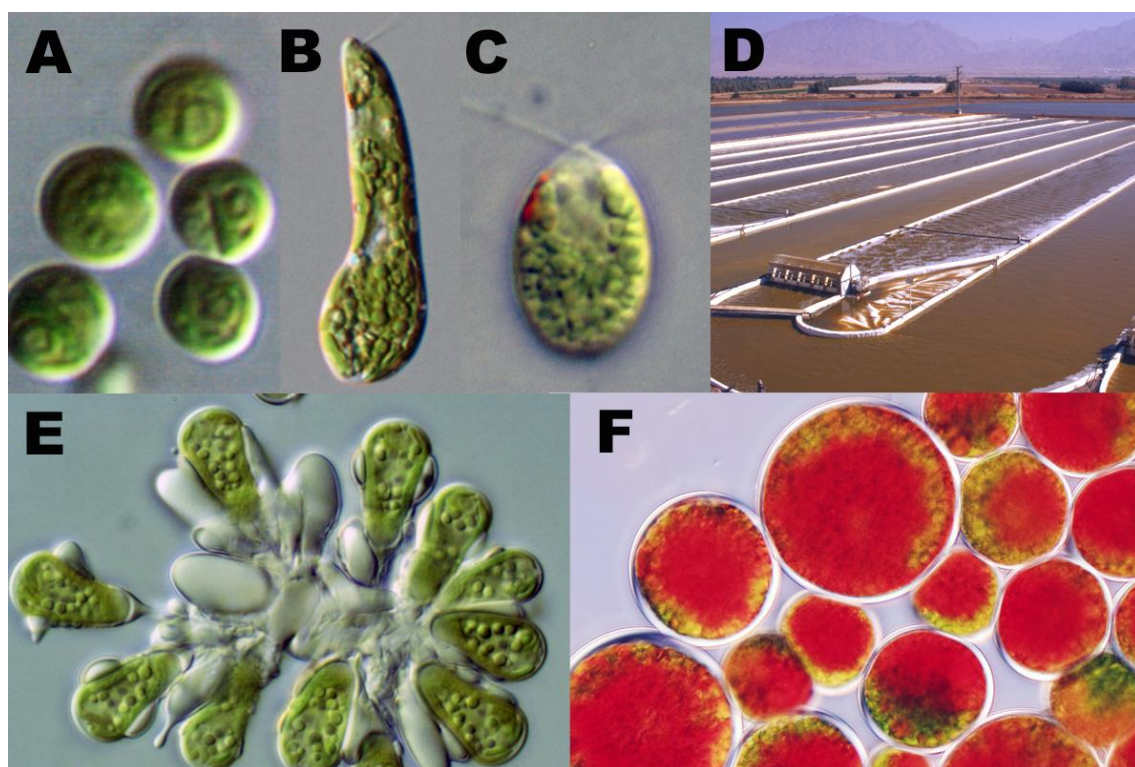


図 4 光合成研究・応用研究のための代表的な藻類リソース

A. *Chlorella vulgaris* (NIES-2170), B. *Euglena gracilis* (NIES-48), C. *Dunaliella tertiolecta* (NIES-2258), D. イスラエルの *Dunaliella* ファーム, E. *Botryococcus braunii* (NIES-836), F. *Haematococcus lacustris* (NIES-2164)。

3-4. 海藻リソースの魅力

海藻は主に海で生活する大形藻類であり、沿岸域生態系の重要な構成要素であるほか、日本人にとっては古くから食用のみならず糊料として、また、「藻塩焼（もしおやき）」と呼ばれる製塩やワカメ刈りの神事、神社の祭礼の際の供物など、宗教行事に至るまでさまざまな用途に用いられてきたなじみ深い生物資源である。「海藻」も「藻類」と同じく、進化的には多様な系統群の総称であり、紅藻（図 5A,B）、アオサ藻（緑藻）（図 5C）、および褐藻（図 5D,E）が含まれる。一方、アマモやスガモなども海藻と同じく海で生活する大形の光合成生物であるが、それらは陸上植物（被子植物）であることから、海藻には含めず、「海草」として区別している。

アオサ藻（緑藻）、褐藻および紅藻はそれぞれ系統的に大きく離れた単細胞の藻類（いわゆる植物プランクトンや底生微細藻類）を祖先として、定着・大形化する進化をとげた生物群である。このためその構造や機能は、細胞レベルやそれ以下の生理・生化学レベルでは祖先の単細胞藻類と基本的に共通している。一方、大形化・多細胞化する過程でさまざまな新たな構造や機能を獲得しており、これらの特徴やそれらを実現している遺伝子はほとんどのものが新奇であり、またアオサ藻、褐藻、紅藻の間でも著しく異なっていることが多い。たとえば定着・大形化の過程で必須の役割を果たす細胞壁の構成多糖や構造は系統群毎に大きく異なる。構成多糖は陸上植物を含む緑色植物では、セルロースを主体にするものが多いが、アオサ藻類にはセルロースではなくマンナン、キシラン、グルカンなどを主成分とするものが見られる。一方、褐藻ではアルギン酸、フコイダン、セルロースが、紅藻では寒天、フノラン、カラギナン、セルロースなどが主成分となっている。また、多くの海藻は陸上植物と同様に、多細胞化することで大形化し、また複雑な組織を発達させているが、アオサ藻では多核化することで直径数 cm を超える巨大細胞や長さ数 m を超える長い囊状の体を発達させるものも見られる。また、海藻類は定着生活をおくることから、水温、光強度、光質、紫外線、乾燥、淡水や高塩環境等の環境ストレスや季節性に適応するための多様な生理・生化学的なメカニズムと生活史型を進化させてきた。これらの性質について、これまでは一部の実験生物として確立した種を除くと、もっぱら自然下で観察・実験するか、野外から採集してきた藻体を実験材料として用いて研究が行われてきた。一方、1960~70 年代に多くの藻類の単藻培養株を室内で培養し、生活環を完結させるとともに実験生物として利用する技術が確立された。しかし、多様な研究領域の研究者が、それぞれの研究目的にあった種を採集し、単藻化し、また長期間保持することはしばしば困難を伴い、あまり大きな広がりとはならなかった。これは海藻類の系統分類学的な研究においても同様で、1980 年代から始まった海藻の分子系統学的研究においても、もっぱら野外から採集された試料が用いられてきた。

これに対し、神戸大学では所属する研究者が自らの研究において確立した培養株を基礎に、NBRP の第 1 期において神戸大学と北海道大学で収集した株、さらに国内外の研究者（たとえば D.G. Müller, E.C. Henry, A.F. Peters, J.A. West, J.R. Waaland, 菊地則雄博士ら）が収集した株の寄託を受け、保有株の充実を図ってきた。その結果、アオサ藻、褐藻、紅藻を含めると、約 30 目、約 70 科、約 160 属、約 340 種の 1,095 株を保有・公開しており、KU-MACC は網羅している系統群の多様さ、提供可能な株数のいずれにおいても世界随一の海藻カルチ

ヤーコレクションとなった。特に褐藻類については、培養保存が困難な一部の分類群を除き、保有している培養株だけで褐藻類全体の系統樹が構築できるほど、多様な系統群を網羅的に収集しており、また後述する全ゲノム解析が終了した種についても可能な限り収集・提供している。また、これらの公開株についてはその約 90%については *rbcL* または *cox3* の塩基配列を取得して、分類学的な位置の確定と品質保証のためのタグ情報として用いているほか、約 75%は凍結保存されている。

大形海藻全体を通じて海藻の全ゲノムが解読されたのは 2010 年に発表された褐藻シオミドロ属 (図 5D) のシオミドロ *Ectocarpus siliculosus* が初めてであり、海藻のゲノム研究は微細藻類を含む多くのモデル生物と比べるとそのスタートがかなり遅れた。しかしながら、その後、紅藻ではツノマタ属の一種 *Chondrus crispus* (図 5B)、スサビノリ *Pyropia yezoensis* (図 5A)、褐藻ではマコンブ *Saccharina japonica*, オキナワモズク *Cladosiphon okamuranus*, モズク *Nemacystus descipiens*, アオサ藻ではアオサ属 (図 5C) の一種 *Ulva mutabilis* などの全ゲノムが相次いで報告され、さらにはそれぞれの系統群で多数の種について網羅的にゲノム解析を行うプロジェクトも進行している (たとえば 'Phaeoexplorer Project')。残念ながら、紅藻類や褐藻類では現時点では有効な遺伝子組み換えやゲノム編集の手法が確立されておらず、陸上植物や動物で一般化した分子生物学的な研究手法を用いることができないことが多い。しかし、各系統群のゲノム情報が整備されてきたことで、さまざまな研究領域において海藻に対してこれまでよりはるかに多様な解析手法を用いることが可能になった。このため、KU-MACC のリソースを活用した研究が進み、生物資源としての海藻の重要性がこれまでもまして高まることを期待している。

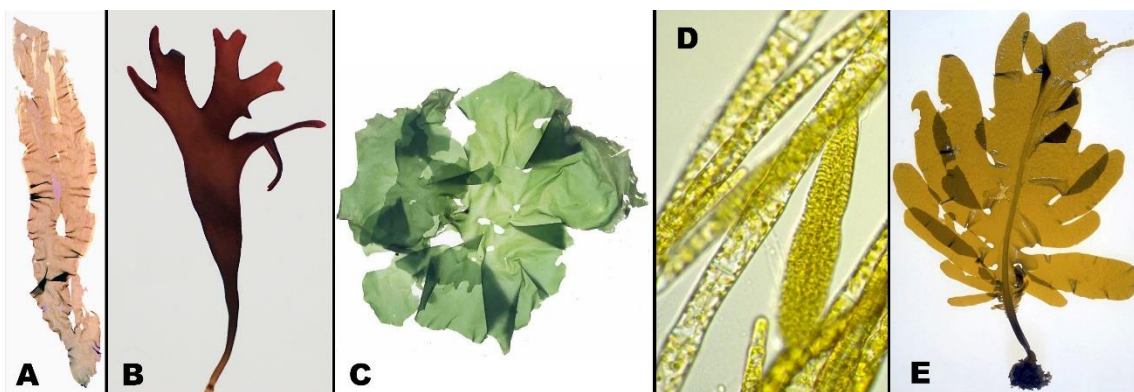


図 5 代表的な海藻リソース。A. スサビノリ *Pyropia yezoensis*, B. ツノマタ属の一種 *Chondrus crispus*, C. アナアオサ *Ulva australis*, D. シオミドロ属の一種 *Ectocarpus* sp., E. ワカメ *Undaria pinnatifida*。

3-5. 付加情報整備

NBRP 藻類の基本的な役割は、ライフサイエンスに重要な保存株の収集、保存、提供を行うことを通じて、関連研究分野の発展と社会貢献を行うことにある。こうした基本的な役割に加えて、様々な研究分野で利用されている保存株を対象として、利用者の利便性を高め、利用拡大にも繋がるような付加情報の整備も重要といえるだろう。藻類では、伝統的に形態分

類に基づいて種同定が行われており、NBRP 藻類リソースの多くでも同様である。一方、近年の分子系統学的研究に基づいて、分類体系の見直しや整理が行われる中で、種名改訂、目や綱と言った高次分類群レベルでの変更が必要となるケースも増えている。NBRP 藻類では、こうした分類情報の変更について、文献等の情報収集や有識者へのヒアリングを行い、変更内容を精査した上で、必要に応じて、速やかに保存株の分類名を変更してきた。また形態的な特徴に乏しく、種同定の困難なグループなどを優先的な対象として、分類情報の確からしさを保証するための作業として独自に DNA バーコーディング情報 (18S rDNA, 16S rDNA 配列, COI, *cox3*, *rbcL* 遺伝子等) の取得を行い、保存株の付加情報として整備、更に DDBJ 等の国際塩基配列データベースへの登録、公開を行った上で、ホームページ上の保存株情報でもデータベースへのリンクを整備してきた。将来的には、全保存株について、DNA バーコーディング情報を整備していく必要があるだろうと考えている。

保存株において、長年の継代培養の過程で、世代交代が生じて別ステージの細胞が混在したり、形態異常が起きたりすることもある。また他種がコンタミネーションして、もとの種に置き換わるといったことが発生するリスクについても配慮しておく必要があるだろう。こうしたリスクを回避するために、保存株を提供する際には、光学顕微鏡による形態観察等の検査を行ってきた。また保存株の付加情報として、光学顕微鏡、電子顕微鏡による細胞観察画像や動画、そして試験管内での生育状況の写真などについても整備を進めており、ホームページ上の保存株情報からいつでも閲覧・参照できるようになっている。DNA バーコード情報と同様、こうした細胞状態を示す画像等の情報についても、全ての保存株を対象として整備していく予定であり、NIES コレクションの重要なルーチンワークとなっている。

最近では、国際的な生物多様性データベースである GBIF (地球規模生物多様性情報共有 DB) への藻類保存株の地理情報登録も進めている。毎年 100 前後のペースで保存株の登録を進めており、2018 年 4 月の段階で 878 件が登録されている。こちらも全保存株を対象としており、登録数が増えるに従って、様々な形でデータベースが活用されるだろう (GBIF 内の NIES コレクションのページ: <http://www.gbif.org/dataset/c26bed28-1ac2-4c07-a18e-c801f3f188c1>)。更に NIES コレクションでは、研究に利用され、研究成果として発表された論文リストが、保存株情報内に格納されている。論文で使われた他の株番号や PubMed そして DOI 情報もリンク付きで整備されている。こうした成果論文の情報ソースは、利用者に定期的に連絡して情報収集するとともに、Google Scholar 等の文献検索で能動的に把握するようにしている。

4. NBRP 藻類の今後の取り組み

4-1. 多様な藻類リソースの抱えるジレンマ

藻類のもつ多様性は、リソースとしての魅力となっているが、リソースを保存する立場からすると、悩みの種となることがある。NIES コレクションの場合、公開株 2,339 株のうち、786 株が凍結保存、約 1,553 株が継代培養で管理・維持されている。約 2/3 の継代培養保存株のために、76 種類の培地と 7 種類の培養容器が使われ、様々な温度、光条件が設定されている。植え継ぎ間隔はリソースによっていろいろで、毎週の生育検査や定期的な無菌検査が欠

かせない。長年培ってきた独自のノウハウで多様なリソースを継代培養保存しているが、それでも毎年のように死滅してしまうリソースが出るのが現状である。継代培養で維持されている株の中には、現在の技術では凍結保存が不可能なもの、生存率が低いながらも何とか凍結保存が可能なものが含まれている。今後はこれまで以上に条件検討に工夫を重ねて、生存率の向上や、たとえ低い生存率でも安定した凍結保存に移行できる検査法を確立したいと考えている。NBRP のいろいろな保存機関の研究者の方々とも情報交換、技術交流することで、新しい凍結保存技術の開発にも取り組んでいきたい。

4-2. ゲノム情報の拡大・無菌株の拡大

ゲノム情報が整備された保存株は、様々な研究目的で利用されることにも繋がり、結果として提供数を増やすことに大きく貢献している。これまで一度も利用されなかった株であっても、ゲノム情報が整備されることで、利用されはじめることになる。保存株の付加情報としてのゲノム情報の整備は、コレクションにとっても重要なミッションとして取り組む必要があると考えており、近年のゲノム解析にかかるコストの低減もそれを後押ししてくれている。2016 年には、課題名「NIES コレクションのシアノバクテリアのゲノム情報整備」が、NBRP ゲノム情報等整備プログラムで採択された（事業代表：広瀬侑・豊橋技術科学大学）。豊橋技術科学大学、国立遺伝学研究所、国立環境研究所が連携して取り組むことで、ゲノムサイズが大きく、高精度なゲノム情報の整備が世界的に遅れているヘテロシスト形成グループの 31 株のゲノム解析を効率よく終了することができ、ゲノム情報をデータベース CyanoBase にて公開した (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>)。

ところで、ゲノム解析を行うには、保存株がクローナルでしかも無菌であることが望ましいのは言うまでも無い。現在の NIES コレクションの無菌株の占める割合は約 20%であるが、この割合を効率的に増やしていくことが、今後の課題となっている。藻類保存株を用いた研究の多くが、バクテリア混在下で行われてきたこと、保存株によっては無菌状態とすることで増殖が不安定になったり、場合によっては死滅したりする事例もある。また種によっては、多糖で細胞が覆われていて、細胞表面に強固に付着しているバクテリアを取り除くことが物理的に困難なこと、抗生物質や化学物質（次亜塩素酸等）による耐性が低く、化学的な除菌作業の困難な場合のあることなどが無菌化を阻む障壁となっている。将来に渡り、コンスタントにゲノム解析を進めるために、そしてゲノム解析だけでなく、安定的な保存や再現性の高い実験を行うためにも、保存株の無菌化は積極的に取り組むべき業務の一つとなっている。残念ながら、効率よく無菌株を増やすための画期的な方法は今のところ存在しない。我々がこれまでに行ってきたのは、種々の抗生物質処理、次亜塩素酸処理、超音波処理による多糖類や細胞表面に付着したバクテリアの除去、フローサイトメトリによる細胞ソーティング等の無菌化に有効な方法を単独で、あるいは複数を組み合わせて試行することで、種々の保存株の無菌化にケースバイケースでの対応を行ってきた。無菌化に成功しても、増殖能が低下して、死滅するような保存株も存在する。培地には含まれない、バクテリア由来の何らかの栄養素を必要としているのかもしれない。現在、こうした無菌化の困難な保存株について、バクテリア混在下でのトランスクリプトーム解析等を行っており、必須栄養素に関する手が

かりが得られ始めている。こうした情報は培地改良にも繋がることが期待されている。

5. おわりに

5-1. 震災から学んだこと

2011年3月11日に発生した東日本大震災は、国立環境研究所のNIESコレクション保存施設にも大きな影響を与えた。電気、水、ガスのライフラインが長期間停止して、植え継ぎ等の作業が困難な状況となった。培養に必要な照明も温度も制御できずに、いつ復旧されるのかも解らない不安の中で、昼間は保存株を日の当たる場所に移動するなどの切迫した対応が必要だった。一方、凍結保存株を保管していた液体窒素保存タンクは、長期の停電でもタンク内温度が保持され、震災の影響を免れることができた。神戸大学の海藻培養装置が大きな被害を被った1995年の阪神・淡路大震災を教訓に、2008年から神戸大学KU-MACCと国立環境研究所NIESコレクションの間で凍結保存株を相互に保管する取り組みが始められていたのも大きな安心材料であった。こうした震災経験は、NBRP藻類リソースにおいて、貴重なリソースを守るための危険分散の取り組みの重要性を考える教訓となっている。

5-2. 世界一多様な藻類コレクションを目指して

世界には大小様々な規模の藻類コレクションが存在する。その中で2,000株以上の保存株を保有するコレクションとして、USAのNCMA(旧CCMP)とUTEX, ヨーロッパのCCAP, RCC, SAG, そして国立環境研究所のNIESコレクションがある。NCMAは海産の微細藻類, UTEXは陸水産の藻類, RCCは海産ピコプランクトンといった特色をもつ。NIESコレクションの場合、当初は赤潮やアオコなど環境問題に関わる微細藻類コレクションであった。その後、NBRPの開始とともに、国内の研究機関、保存機関からの移管が進むことで、光合成研究や細胞分裂のモデル生物、生態毒性試験株、新奇分類群や新種記載に用いられた分類学上重要な保存株、絶滅の危機に瀕する淡水産大型藻類、藻類と近縁な無色プロティスト、水産養殖の餌料藻、有用物質を産生する藻類など、多岐にわたる保存株を管理、保存するようになった。神戸大学KU-MACCの場合、参画する研究者自らが多様な保存株を確立・収集するとともに、前述したように海藻の保存株を用いた研究で世界をリードしてきた研究者の収集した保存株の寄託を受け入れることで、多様な系統群の収集を行ってきた。また、コンブ類やアマノリなどの経済的に重要な海藻や、全ゲノム解析の進展をふまえた収集も行い、系統解析を始めとする株情報の充実を図ってきた。以上のように、NBRPにおける活動を通じて、ライフサイエンスや応用研究に重要な保存株がNBRP藻類に整備されるようになった。国立環境研究所と神戸大学の両機関の保存株を併せると、世界有数の規模の藻類コレクションである。

地球上で最も多様に分化、繁栄している生物は、多細胞化して複雑な組織が作られ、大型化していった陸上植物と後生動物と言えるだろう。しかし元を辿れば、陸上植物は車軸藻という藻類の仲間から、そして後生動物は単細胞性の襟鞭毛虫の仲間から派生したグループである。真核生物全体の多様性から見ると、微生物の一部の系統から多様化したということになる。地球上の生物の多様性を真に理解するには、もっと藻類や微生物の世界に目を向ける

必要がある。真核生物全体の系統樹の中で、藻類は無色プロティストの枝の中に点在している（図2）。藻類の多様性や進化について研究する上でも、こうした無色プロティストは貴重な存在であるが、培養に有機物や餌となる生物を必要とすることから、一般的な藻類株の培養保存とは勝手が異なる。とは言え、藻類の中にも、光合成だけでなく、有機物やバクテリアを資化する混合栄養性の種や葉緑体を二次的に失った種が少なからず存在しており、こうした藻類の培養ノウハウの蓄積とともに、無色プロティストの培養にも次第に対応できるようになってきた。真核生物全体を網羅する多様なコレクションの整備は、NBRP 藻類でしか行えないことだろう。利用者や研究コミュニティからの意見・要望に耳を傾けて、研究に必要とされている多様な藻類リソースプラス無色プロティストを今後も収集、拡充するとともに、品質向上やゲノム情報等の様々な付加情報の整備を、そして広報・展示活動を継続することで、世界一多様な藻類コレクションを目指していきたいと考えている。

6. 謝辞

NBRP 藻類は日本医療研究開発機構（AMED）の助成を受けて実施している（18km0210116j0002）。本稿執筆の機会を頂いたお二人のオーガナイザーに感謝申し上げます。

引用文献

Baldauf, S. L. 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science* 300:1703-1706.

ゾンビ化実験で明らかになったボルボックス走光性機構

植木紀子¹, 若林憲一²

¹法政大学自然科学センター 〒102-8160 東京都千代田区富士見 2-17-1

²東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所

〒226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259 番地 R1-7

Noriko Ueki¹, Ken-ichi Wakabayashi²

“Zombified *Volvox*” revealed the phototactic mechanism as an emergent phenomenon

Keywords: calcium, demembranated cell model, flagella, phototaxis, *Volvox*

¹Hosei University, Science Research Center, 2-17-1 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8160, JAPAN

²Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta-cho 4259-R1-7, Midori-ku, Yokohama 226-8503, JAPAN

DOI: 10.24480/bsj-review.10c3.00163

1. はじめに

たった数千の細胞から成る小さな多細胞生物ボルボックスは、細胞どうしの情報伝達がないにも関わらず個体として調和のとれた環境応答行動を行うことができる。本稿では、ボルボックスのひとつひとつの細胞が環境の光にどのように反応するか、そして、そのような細胞が規則的に配置されてひとつの個体となったときに、どのようにして走光性という美しい機能が現れるかを説明する。また、その研究の手法や歴史、そして今後の展望についても述べる。

2. ボルボックスの走光性

2-1. ボルボックスのからだのつくり

ボルボックス（和名：オオヒゲマワリ）は、春から夏にかけて湖や田に現れる淡水性の多細胞緑藻である（図 1 A 左）。我々は、その最も大型のグループの 1 種ボルボックス・ルーセレティ（*Volvox rousselletii* strain MI01, NIES-4029）を用いている。1 つ 1 つの細胞の構造は近縁の単細胞緑藻クラミドモナス（図 1 B）によく似ており、各細胞は水を掻くための鞭毛を 2 本ずつ持っている（図 1 A 中）。ただし、単細胞性のクラミドモナスは 2 本を平泳ぎのように動かして前進するのに対し、ボルボックスの細胞は 2 本を鞭のように同じ方向へと打つ。そのため、ボルボックスから細胞一つだけを単離すると、その場で回転するだけで移動することができない。しかし実際のボルボックスは、約 5,000 の体細胞が球状の体の表面に一層に並ぶ形をした多細胞生物である。それぞれの鞭毛は球の外側に向かって生えている。この球状の体にははっきりとした前後軸があり、合計約 1 万本の鞭毛が全て前から後ろに向かって打つように細胞が配置されている。こうして全体として大きな水流が生じ、ボルボックスは

前へ向かってスイスイと泳ぐ(図1A右)。1つの細胞から生える2本の鞭毛が同じ方向へと打つのは、その細胞ひとつが移動するためではない。その細胞が属する個体全体が移動するためである。しばしば「クラミドモナスが集まるとボルボックスになる」、「ボルボックスがバラバラになるとクラミドモナスになる」という言説を聞くことがあるが、これが誤りであることは、この鞭毛による移動方法を考えるだけでも明らかであろう。両者は近縁ではあるが別の生物である。

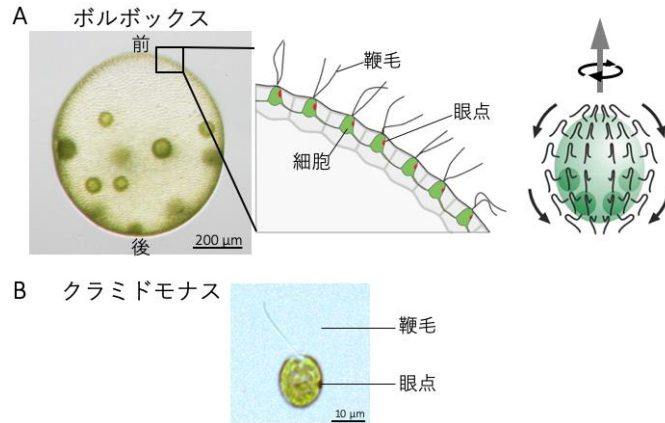


図1. ボルボックスとクラミドモナス。
A. *Volvox rousseletii* の光学顕微鏡写真(左)と個体表面の体細胞の模式図(中)、鞭毛の打つ方向と個体の動きを示した模式図(右)。(Ueki et al. (2010)より引用して改変) B. *Chlamydomonas reinhardtii* の光学顕微鏡写真。

2-2. ボルボックスの光受容

ボルボックスの細胞は葉緑体を一つずつ有し、光合成によりエネルギーを得ている。ボルボックスが水中を泳ぐ大きな目的は、光合成に適した環境へと移動することだと考えられる。そのためには、周囲の光の強さと方向を捉えることが重要になる。これを担うのが細胞の表面に位置する光受容装置、眼点である(図2)。眼点の部分の細胞膜には、チャネルロドプシンという光受容タンパク質が存在する。これは光を受容すると開く陽イオンチャネルである(Kianianmomeni et al., 2009; Nagel et al., 2002; Nagel et al., 2003)。光受容タンパク質自体が検出するのは光の強さだけであり、光の方向は検出しない。ところが、これを裏打ちするように色素顆粒が積層して配置しているため、眼点は特定の方向からの光を強く感知する構造になっている。詳しく言うと、色素顆粒層は光をよく反射および遮蔽する性質を持つため、細胞の外側から来た光は反射されて増幅され、逆に細胞の内側を通過してきた光は色素顆粒層に遮蔽されて光受容タンパク質に届かない(Schaller and Uhl, 1997)。このように、眼点は指向性の高い光受容を行うのである。

ここで、ボルボックス全体の動きを考えてみる。それぞれの細胞の眼点は、大まかには球の外側を向いて位置している。そのため、球の表面に垂直に入射する光を最も強く捉える。各鞭毛は個体の前から後ろに向けて打つが、実は、その方向は個体の前後軸に対して少しだけ傾いている(図4A)。そのため、ボルボックスは遊泳する際にならず進行方向後方からみて反時計周りに自転する(図1A右)。例えば光がこの回転軸に対して右側から当たる状況を仮定すると、各細胞は右側を向いたときには光を感受し、個体が半回転して左側を向いたときには光を感受しなくなる。このように、高指向性光受容と自転遊泳を組み合わせることによって、ボルボックスはレーダーのように光源方向を正確に認識する。ボルボックスとい

う属名は「勢いよく回転するもの」という意味のラテン語に由来するが、この回転にはこのような重要な意味があるのである。

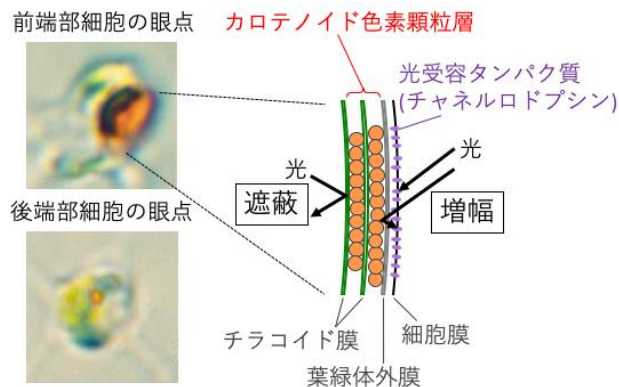


図 2. ボルボックスの眼点。個体前端部付近と後端部付近の細胞の眼点の光学顕微鏡写真，眼点の模式図を示す。(Ueki et al. (2010) より引用して改変)

2-3. ボルボックスの走光性研究の歴史

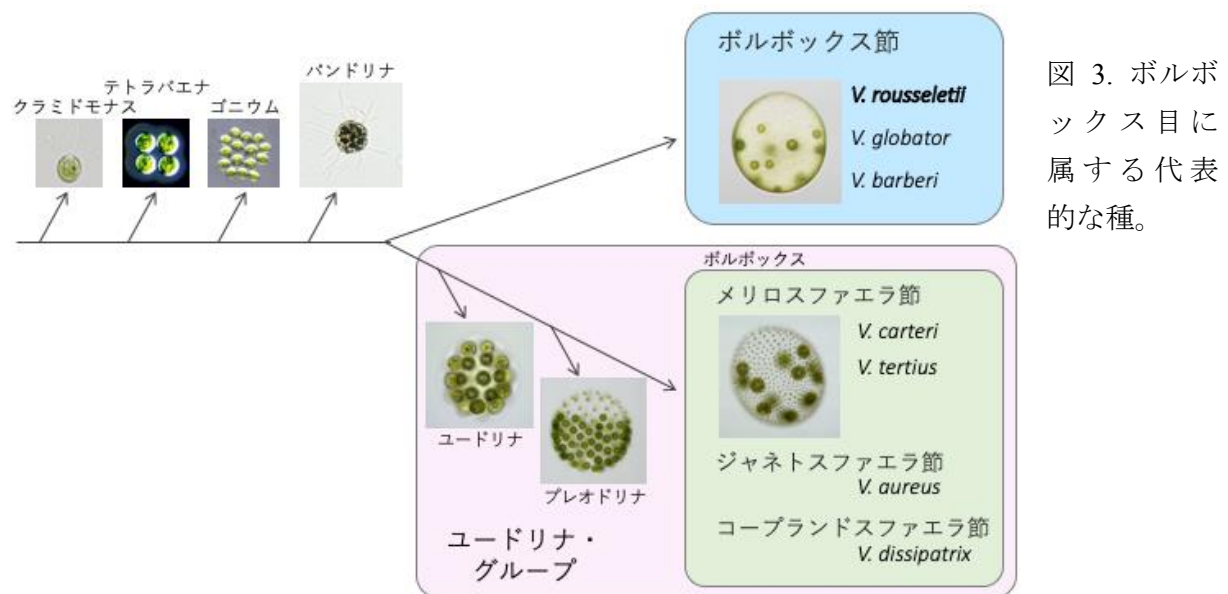
ボルボックスは各細胞の眼点で光を感受したのち，流入した陽イオンがもとなる反応経路によって鞭毛運動調節を行い，走光性行動を見せる。これは光源の方向に向かって，あるいは光源から逃げる方向に向かって遊泳する反応である。ボルボックスは，通常の条件下では主として光源に向かう正の走光性を行う。

ボルボックスが走光性を示すとき，約 5,000 もの細胞がどのように協調しているのか。そして，そのとき鞭毛はどのように動いているのか。これらの問題については 100 年以上も前から議論されてきた (Holmes, 1903; Mast, 1907, 1911, 1916)。細胞間の情報伝達が必要なのではないかと思われるが，細胞どうしが細胞間連絡という構造でつながっている種でもつながっていない種でも，同じように明確な走光性を示す。したがって，走光性のためには細胞どうしの情報のやり取りは必須ではないと考えられる。では細胞どうしの情報伝達がなくても，なぜ全体として調和のとれた動きをすることができるのだろうか。

走光性というのはつまり，光源の方向に向かって（もしくは光源とは逆方向に）進行方向を変えることである。進行方向が変わっているからには，鞭毛が生み出す力が球体の前後軸に対して非対称になっているはずである。このことを確かめるために，以下の一連の研究が行われた。まず，ボルボックスの周りの溶液にポリスチレンビーズを加えることで，鞭毛によって作られる水流をビーズの動きとして可視化する実験が行われた。ボルボックスをカバーガラスとスライドガラスで挟んで動かないようにし，周囲を前から後ろに流れる水流を観察したところ，光をあてると水流が一時的に停止するという報告がなされた (Hand and Haupt, 1971)。その反応は球の前端に近いほど起こりやすく，より長時間続いたという。このことは，球の前方の細胞ほどその眼点が大きいうというそれ以前の報告 (Fritsch, 1935) とも一致する (図 2)。Hand と Haupt は，光をあてる方向によって反応する範囲がわずかにずれることから走光性行動を説明しようとしたが，そのずれは個体の方向転換をもたらすにはあまりにも小さく，説得力のあるものではなかった。その後坂口らによって，球の前方の光源側でのみ水流が停止することで方向転換が起こるとする説が提唱された。個体は常に自転しているため，細胞一つ一つは光の増減を繰り返し感知して光源側では水流を停止させ，反対側では再開す

る。特に、反応性の高い球の前方でこの反応が起こる。その結果、光側の推進力の方が反対側より弱くなり、光源の方へと舵を切るという説明である (Sakaguchi and Tawada, 1977; Sakaguchi and Iwasa, 1979)。しかしこれを直接観察しようとする、水中を猛スピードで移動するボルボックス表面の一本一本の鞭毛の動きやそれによる水流の変化を捉えなければならず、これは非常に難しい。そこで我々は、自転を模した繰り返し増減する光を固定したボルボックスに照射することで、自転遊泳中にそれぞれの細胞が感知する増減光を再現した。その結果、光強度が増加した時は水流が停止し、減少した時は再開するということが見事に繰り返され、坂口らの説が実証された (Ueki et al., 2010)。

また、走光性を担う鞭毛運動の変化が具体的にどのような変化なのかについては、意見が真っ二つに分かれていた。一つは「頻度変化モデル」で、細胞が受容する光強度が増すと鞭毛の打つ頻度が低下する、もしくは停止するというモデルである (Holmes, 1903; Huth, 1970; Hand and Haupt, 1971; Sakaguchi and Tawada, 1977; Sakaguchi and Iwasa, 1979)。一方、光刺激に対して鞭毛の打つ方向がより水平方向へ 90 度ほど変化するという「方向変化モデル」も無視できないものであった (Mast, 1926)。これらの相反する 2 つのモデルの検証が行われ、間接的な証拠から頻度変化モデルが支持されたものの、方向変化モデルを完全に否定することはできなかった (Hoops et al., 1999)。このような状況で、我々は光刺激に対する鞭毛の反応を直接観察し、ボルボックス目のうちユードリナ・グループと呼ばれるグループに属する比較的小型の種を用いたこれまでの報告は「頻度変化モデル」と一致し、最も大型のグループであるボルボックス節に属する種を用いた報告は「方向変化モデル」に合うことを明らかにし、この論争に終止符を打った (Ueki et al., 2010) (図 3, 図 5 A)。ただし驚くべきことに、その方向変化は 90 度にとどまらず、およそ 180 度と、ほぼ逆転するほどの変化が観察された。



ここまでの発見をまとめると、ボルボックス節に属する種は、以下のように走光性を行うことがわかる。細胞が光強度の増加を感じると、鞭毛の打つ角度を変化させる。その角度変化の度合いは球体の前方ほど大きく、最大で約 180 度に達する (図 4 B)。進行方向の横から光が当たる場合、ボルボックス球体は自転しているので、細胞が光源側を向いた時にのみ光強度の増加を感知し、鞭毛の打つ方向を変化させることになる。全体として見ると、反応性

の高い前方かつ光源側の鞭毛が打つ方向を変化させることで、球体の軸が光源方向へと傾く力が生じる（図 4 C）。

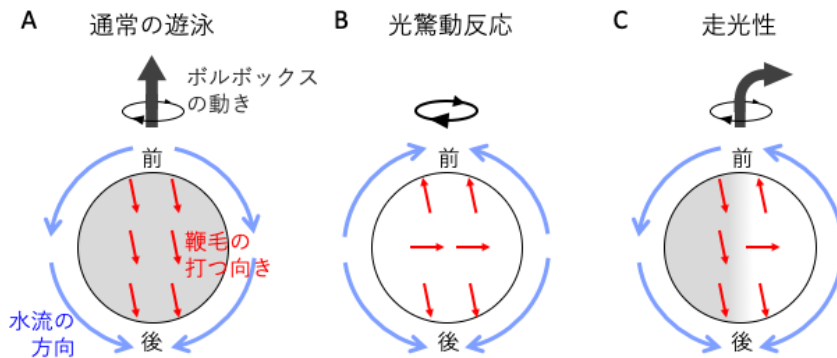


図 4. ボルボックス個体の各遊泳様式における鞭毛の打つ方向と周囲の水流の方向、個体の動きを示す模式図。

ここで強調しておきたいのは、「頻度変化モデル」でも、「方向変化モデル」でも、個体全体が光に向かって舵を切るために、一部の細胞が司令塔としてはたらく必要も、細胞どうしで情報伝達する必要もないという点である。一つ一つの細胞が決まった方法で光に反応しているだけである。このような意味で、ボルボックスの走光性は創発現象とみなすことができるだろう。この方法であれば、球を構成する細胞数が数十であろうが数千、数万であろうが走光性の方向転換は可能である。また、仮に球体の一部が欠けてしまったとしても走光性行動には何の影響もない。光から逃げたいときは、坂口らが示したように、それぞれの細胞が光強度の増加ではなく減少に対して反応するようになればよいだけである（Sakaguchi and Tawada, 1977）。なんとなくうまくできたしくみだろうか。

光刺激に対して鞭毛の打つ方向が逆転する例は、植物細胞ではこれが初めての報告であった。では、眼点が光の変化をとらえ、鞭毛の打つ方向が逆転する際、細胞内で何が起きているのだろうか。それまでの個体レベル、細胞レベルの知見から分子レベルの知見へと進めるためには、ボルボックスを用いた新たな実験系を確立する必要があった。

3. ゾンビ・ボルボックス法

3-1. 除膜細胞モデル実験の歴史

我々は、鞭毛が打つ方向の変化をもたらす調節因子を明らかにするため、ボルボックスを用いた除膜モデルの試験管内での運動再活性化実験、通称“ゾンビ・ボルボックス法”の確立を試みた。ここで、この実験法の歴史を簡単に紹介する。

除膜細胞モデルを用いた実験は、Szent-Györgyi によって行われたグリセリン筋の収縮実験に端を発する生物学の伝統的な手法である（Szent-Györgyi, 1949）。筋細胞をグリセリン処理すると、膜が溶け、細胞は死ぬ。しかし、運動のために本質的に必要な、アクチンとミオシンを含むサルコメア構造は保たれている。このグリセリン筋に ATP を添加すると、あたかも生きているかのように筋肉は収縮する。これは生体の外で生体運動を再現させた最初の例であり、ATP が筋収縮のエネルギー源であることを直接示した重要な実験であった。

Hoffmann-Berling はすぐにこの手法を精子鞭毛に適用した（Hoffman-Berling, 1954）。鞭毛を除膜しても、主として微小管とダイニンから成る鞭毛内部構造「9 + 2 構造」はやはり保たれている。ここに ATP を添加することで、試験管内で波打ち運動が生じるのである。その

後、鞭毛の除膜にはグリセリンよりも Triton X-100 などの非イオン性界面活性剤が適当であることが分かり、そのような除膜細胞はトリトンモデル、あるいは細胞モデル (cell model) と呼ばれるようになった (Gibbons and Gibbons, 1972; Naitoh and Kaneko, 1972)。細胞モデルは細胞の運動機構だけを残した抽出物であると考えられ、外液の条件を自由に変えられることから、運動の ATP 濃度依存性や Ca^{2+} などによる運動調節機構を調べる上での基礎的な研究手段として現在でも広く使われている。

3-2. クラミドモナスの除膜細胞モデル

クラミドモナスを用いた運動再活性化実験は、最初は細胞モデルをさらに解体した単離鞭毛を用いて行われた (Witman et al., 1978)。このときクラミドモナス鞭毛の除膜には界面活性剤として Nonidet P-40 が適していることが見出され、現在ではその同等品である Igepal CA-630 がよく用いられる。この単離鞭毛を用いた実験によって、クラミドモナスが光驚動反応によって後退遊泳を示す際の鞭毛波形変換が Ca^{2+} によって調節されていることが明らかにされた (Bessen et al., 1980)。外液の Ca^{2+} 濃度が 10^{-6} M よりも低いときには、単離鞭毛は非対称波形と呼ばれる波形で打つ。これは、クラミドモナスが鞭毛側を前にして平泳ぎのように鞭毛を動かして泳ぐときの波形である。一方、 10^{-4} M になると、対称波形と呼ばれる波形で打つ。これはクラミドモナスが細胞側を前にして後退遊泳するときの波形である。その中間の 10^{-5} M のときには ATP が存在していても鞭毛は静止しており、波形の切り替えの制御が行われる濃度であると考えられている (図 5 A)。

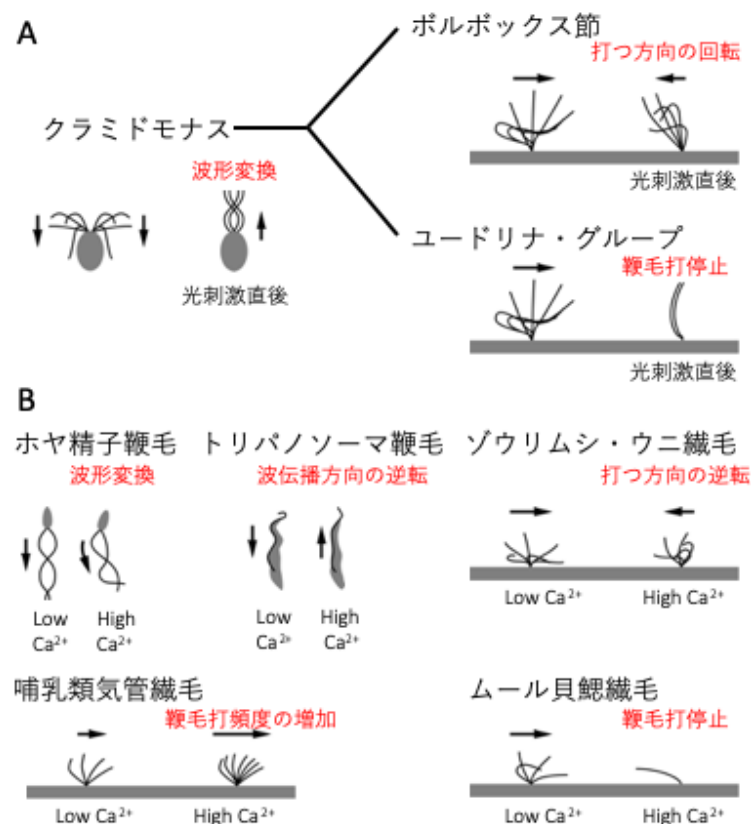


図 5. 多様な鞭毛運動変換パターン。A. ボルボックス目に属する種における光刺激に対する鞭毛の反応様式。B. 異なる種や組織における Ca^{2+} 依存的に変化する鞭毛運動様式 (Ueki and Wakabayashi (2018) より引用して改変)。矢印はそれぞれの鞭毛・繊毛が周囲につくる流れの方向を示す。

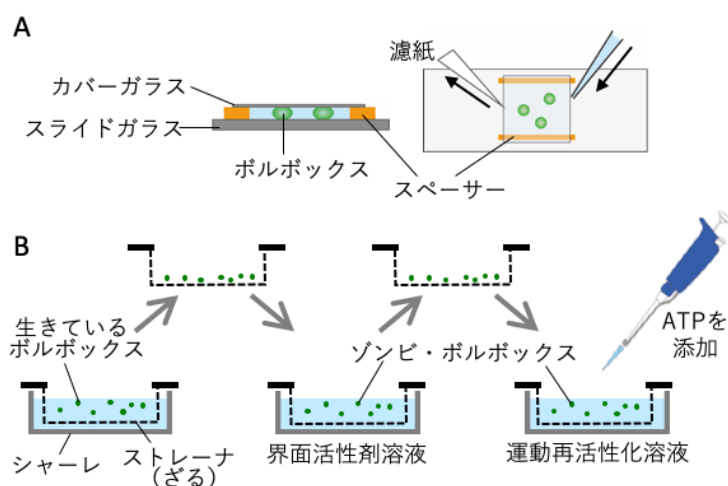
この鞭毛除膜条件を応用して細胞モデル調製法が確立された。細胞モデルに対する Ca^{2+} の効果を検証した実験の結果、クラミドモナスのもつ 2 本の鞭毛の違いが明らかになった

(Kamiya and Witman, 1984)。クラミドモナスの2本の鞭毛は、眼点に近い側がシス鞭毛、遠い側がトランス鞭毛と呼ばれる。 10^{-8} M 程度の Ca^{2+} 濃度を境にして、より低い濃度ではシス鞭毛が、より高い濃度ではトランス鞭毛がそれぞれ他方よりも強く打ち、細胞モデルがその場で回転するような運動を見せるのである。クラミドモナスの場合、この2本の鞭毛の Ca^{2+} への応答性の違いが走光性に重要だと考えられている。クラミドモナスは2本の鞭毛の打面がわずかにずれていることなどから、自転しながら遊泳する。遊泳中のクラミドモナスの眼点が光を受容すると、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇する。眼点のカロテノイド色素層による光の反射を考慮すると、眼点が光を受容した瞬間とは、すなわち眼点が光源側を向いた瞬間である。このとき Ca^{2+} 濃度が上昇すると、トランス鞭毛が強く打ち、細胞は光源側に傾く。細胞が半回転して光が遮蔽されると Ca^{2+} 濃度が低下し、シス鞭毛が強く打ち、細胞はさらに光源側に傾く。これを繰り返せば、細胞は正の走光性を示せるというわけである。

クラミドモナスの細胞モデル実験ではその後他の調節因子の効果も確かめられ、cAMP も2本の鞭毛打のバランス制御に寄与すること、 Ca^{2+} や酸化還元電位が鞭毛打頻度調節をするなどが明らかにされた (Saegusa and Yoshimura, 2015; Wakabayashi and King, 2006; Wakabayashi et al., 2009)。

3-3. ボルボックスの除膜モデル実験系の確立

クラミドモナスの鞭毛波形変換や二本の鞭毛のバランス調節に Ca^{2+} が関与することから、ボルボックスの鞭毛運動調節因子の第一候補は Ca^{2+} であり、除膜モデル運動再活性化実験系が確立できればそれを直接確かめることができる。ボルボックスはクラミドモナスと近縁であるものの、全く同じ手順では成功せず、以下のような幾つもの修正や工夫をする必要があった。(1)ボルボックスは遠心によって藻体を集めることができないため、還流で、もしくはストレーナー（ざる）を用いて溶液交換を行った。(2)クラミドモナス細胞の除膜に使われる界面活性剤の濃度ではボルボックスの鞭毛が抜け落ちてしまうため、最適濃度を検討する必要があった。(3) 再活性化率を上げるために添加するポリエチレングリコール (PEG) によってボルボックス球体が大きく凹んでしまうことがわかり、PEG 無添加とした。(4) 一般に鞭毛運動観察に用いられる暗視野顕微鏡では球体のハレーションにより鞭毛の根元を観察できないため、位相差顕微鏡を用いた。このような修正の結果、界面活性剤処理で死んだボルボックスが、添加した ATP によって動く“ゾンビ・ボルボックス法”が確立した。



いたため、位相差顕微鏡を用いた。このような修正の結果、界面活性剤処理で死んだボルボックスが、添加した ATP によって動く“ゾンビ・ボルボックス法”が確立した。

図 6. ゾンビ・ボルボックス法の二つの様式。A. トラップ法, B. ざるすくい法。(Ueki and Wakabayashi (2018)より引用して改変)

このために、次の二つの方法で実験を行なった。一つはスライドガラスとカバーガラスでボルボックス個体を挟んでトラップし鞭毛（軸糸）運動を観察する方法（トラップ法；図 6 A），もう一つは自由遊泳するボルボックスを丸ごと用いる方法（ざるすくい法；図 6 B）である。

まずトラップ法で、鞭毛運動を観察しながら界面活性剤を還流して除膜する。鞭毛がやや細くなり、そして全く動かなくなったことを確認してから、ATP を含む溶液に入れ替える。すると再び除膜前とよく似た波形で鞭毛軸糸が動き出した（図 7）。そして次にこれを Ca^{2+} 存在下で行うのである。 10^{-6}M 程度の Ca^{2+} 存在下で運動を再活性化させたところ、鞭毛軸糸の打つ方向が逆転していることを観察できた（図 7）。これは生きているボルボックスが光強度の増加を感知した時の反応に相当する。つまり、これまで観察されていた鞭毛の打つ方向の逆転は Ca^{2+} によることが明確に示されたのだ。さらに興味深いことに、この変化の大きさは球の前後で大きく違い、前端付近ではほぼ 180 度の逆転、赤道面付近は約 90 度で、後端付近では変化が見られなかった。これは生きているボルボックスで見られる前後の差と同じであるが、この差はこれまで光を受容する眼点の大きさの差を反映したものだと考えられてきた。ところが今回、鞭毛軸糸そのものの性質にも前後にかけて差があることが初めて明らかになった。実際それに加えて、界面活性剤で除膜される感度は前方の方が高いことや、生きているボルボックスにおいてもゾンビ・ボルボックスにおいても鞭毛打頻度は球の前方の方が後方よりも高いこともわかり、一見全く同じに見えるボルボックスの鞭毛は、予想以上に分化していることが判明した。

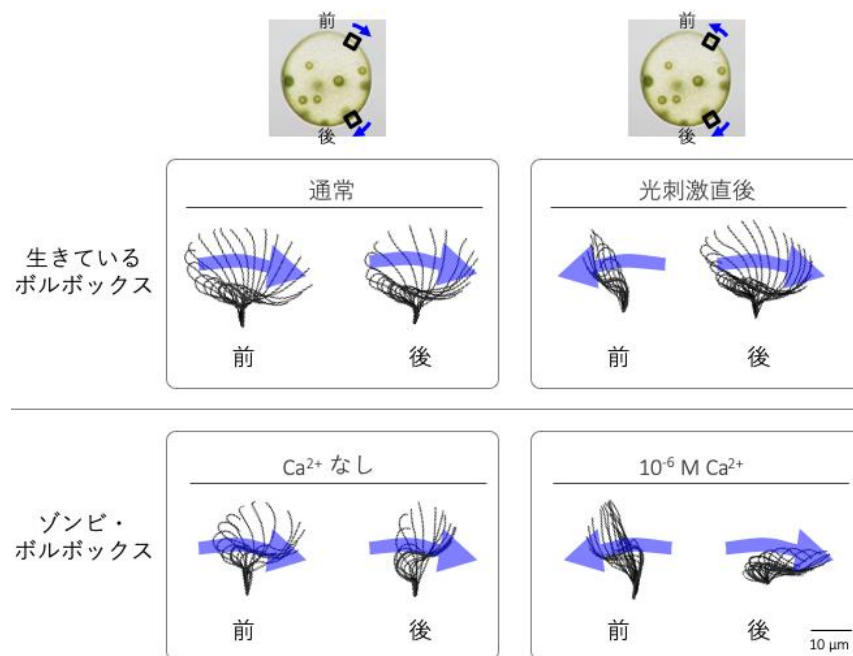


図 7. 生きているボルボックスとゾンビ・ボルボックスにおける鞭毛運動の比較。1/500 秒ごとにトレースした鞭毛波形を示す。青矢印は鞭毛の打つ方向を示す。光刺激直後のボルボックスと Ca^{2+} 存在下のゾンビ・ボルボックスでは、個体前方の細胞で鞭毛の打つ向きが異なる。

トラップ法で鞭毛運動の再活性化に成功した我々は、この運動によってゾンビ・ボルボックスは泳ぐことができるのではないかと考え、ざるすくい法によってできるだけ温和に除膜と運動再活性化の作業を行なった（図 6 B）。すなわち、ストレイナー（ざる）の上でボルボックスを泳がせた後、ざるを持ち上げ、界面活性剤溶液に浸して除膜する。これでボルボックスは死に、鞭毛は運動を停止し、個体は全く動かなくなる。再びざるを持ち上げて界面活

性剤のない溶液にそっと浸し、ATP を加えたところ、これらの除膜ボルボックスは死んでいるにも関わらず、まるで生きているかのように泳ぎだしたのだ。さらに、 Ca^{2+} 存在下で同じ実験をしたところ、遊泳速度が半分程度に減少していた。生きているボルボックスに急に強い光を当てると、全ての細胞が鞭毛の打つ方向を一時的に変化させ、数秒間だけ遊泳速度を半分程度に落とす（光驚動反応，図4B）。それと同じ変化がこの Ca^{2+} 存在下で自由遊泳するゾンビ・ボルボックスでも起きていると考えられる。

4. おわりに

ボルボックスの走光性においては、数千もの細胞が、特に細胞間の連絡はなくとも個体として調和のとれた行動を行う。一つ一つの細胞はそれぞれ眼点で受容した光に反応して鞭毛を打つ方向を回転させているだけである。しかし、そこに球体前後軸にそった勾配があることで、個体全体が光に向かって効率よく舵を切ることにつながる。その勾配は、ボルボックスの細胞の、第一に眼点の大きさ、第二に鞭毛の Ca^{2+} 応答性という二つの前後方向の分化によって実現している。この前後分化により、前方の細胞ほど周囲の環境変化に対応して舵取りやブレーキを行う機能が高くなり、後方の細胞ほど環境変化にかかわらず前へ進む推進力に特化していると言える。ボルボックスの前後分化は、多細胞化によって巨大化した体で高い推進力を得ると同時に、単細胞緑藻のように機敏な光行動を行うために獲得した重要な機能であると言える。

ボルボックス目にはより少ない細胞数のさまざまな近縁種が存在する（図3）。この“ゾンビ・ボルボックス法”をそれらに適用できれば、多細胞生物の成立において光行動システムがどのように変遷したのかを探ることが可能になる。さらに、 Ca^{2+} による鞭毛運動調節は、ヒトを含む多様な生物で見られる（Inaba, 2015; 図5B）。ヒトの体内には、脳室、気管上皮、輸卵管上皮、精子など、さまざまな器官に鞭毛（繊毛）が生えている。これらの器官で鞭毛運動調節に異常が起きると、慢性呼吸器疾患や不妊症などの疾患につながる。今後、我々の開発した温和な除膜法を用いて多様な生物における鞭毛運動調節の分子機構をさらに詳しく研究することで、鞭毛運動不全によるヒトの疾患の理解に貢献することも期待できる。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金（15H01206, 15H01314, 16K14752）、東洋紡バイオテクノロジー研究財団長期研究助成、日本学術振興会海外特別研究員制度、日本分子生物学会若手研究助成富澤純一・桂子基金、日本動物学会女性研究者奨励 OM 賞、大隅基礎科学創成財団の支援を得て行われた。

引用文献

- Bessen M, Fay RB, Witman GB (1980) Calcium control of waveform in isolated flagellar axonemes of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* 86: 446–455.
- Fritsch FE (1935) Introduction. *The Structure and Reproduction of the Algae* (Cambridge Univ Press, N. Ueki & K. Wakabayashi -9

- Cambridge, UK), Vol 1, pp 1–59.
- Gibbons BH, Gibbons IR (1972) Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with triton X-100. *J Cell Biol* 54: 75–97.
- Hand WG, Haupt W (1971) Flagellar activity of the colony members of *Volvox aureus* Ehrbg. during light stimulation. *J Eukaryot Microbiol* 18: 361–364.
- Hoffman-Berling H (1954) Adenosintriphosphat als betriebsstoff von zellbewegungen. *Bio-chimica et Biophysica Acta* 14: 182-194.
- Holmes SJ (1903) Phototaxis in *Volvox*. *Biol Bull.* 4: 319–326.
- Hoops HJ, Brighton MC, Stickles SM, Clement PR (1999) A test of two possible mechanisms for phototactic steering in *Volvox carteri* (Chlorophyceae). *J Phycol.* 35: 539-547.
- Huth K (1970) Bewegung und Orientierung bei *Volvox aureus* Ehrb. I. Mechanismus der phototaktischen Reaktion. *Z Pflanzenphysiol.* 62: 436–450.
- Inaba K (2015) Calcium sensors of ciliary outer arm dynein: Functions and phylogenetic considerations for eukaryotic evolution. *Cilia* 4: 6.
- Kamiya R, Witman GB (1984) Submicromolar levels of calcium control the balance of beating between the two flagella in demembranated models of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* 98: 97–107.
- Kianianmomeni A, Stehfest K, Nematollahi G, Hegemann P, Hallmann A (2009) Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer. *Plant Physiol.* 151: 347–366.
- Mast SO (1907) Light reactions in lower organisms. II. *Volvox globator*. *J Comp Neurol Psychol.* 17: 99–180.
- Mast SO (1911) Light and the behavior of organisms. New York: J. Wiley & Sons, 1
- Mast SO (1916) The process of orientation in the colonial organism, *Gonium pectorale*, and a study of the structure and function of the eye-spot. *J Exp Zool.* 20: 1–17.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296: 2395–2398.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13940–13945.
- Naito Y, Kaneko H (1972) Reactivated triton-extracted models of paramecium: Modification of ciliary movement by calcium ions. *Science* 176: 523–524.
- Saegusa U, Yoshimura K (2015) cAMP controls the balance of the propulsive forces generated by the two flagella of *Chlamydomonas*. *Cytoskeleton* 72: 412–421.
- Sakaguchi H, Tawada K (1977) Temperature effect on the photo-accumulation and phobic response of *Volvox aureus*. *J Protozool* 24: 284–288.
- Sakaguchi H, Iwasa K (1979) Two photophobic responses in *Volvox carteri*. *Plant Cell Physiol* 20: 909–916.
- Schaller K, Uhl R (1997) A microspectrophotometric study of the shielding properties of eyespot and cell body in *Chlamydomonas*. *Biophys J* 73(3): 1573–1578.

- Solari CA, Drescher K, Goldstein RE (2011) The flagellar photoresponse in *Volvox* species (Volvocaceae, Chlorophyceae). *J Phycol* 47: 580–583.
- Szent-Györgyi, A (1949) Free-energy relations and contraction of actomyosin. *Biological Bulletin* 96: 140–161.
- Ueki N, Matsunaga S, Inouye I, Hallmann A (2010) How 5000 independent rowers coordinate their strokes in order to row into the sunlight: Phototaxis in the multicellular green alga *Volvox*. *BMC Biol* 8: 103.
- Ueki N, Wakabayashi K (2018) Detergent-Extracted *Volvox* model exhibits an anterior-posterior gradient in flagellar Ca^{2+} sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E1061–E1068.
- Wakabayashi K, King SM (2006) Modulation of *Chlamydomonas reinhardtii* flagellar motility by redox poise. *J Cell Biol* 173(5): 743–54.
- Wakabayashi K, Ide T, Kamiya R (2009) Calcium-dependent flagellar motility activation in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to mechanical agitation. *Cell Motil Cytoskeleton* 66(9):736–42.
- Witman GB, Plummer J, Sander G (1978) *Chlamydomonas* flagellar mutants lacking radial spokes and central tubules. Structure, composition, and function of specific axonemal components. *J Cell Biol* 76: 729–747.

細胞性粘菌 リソースの研究への利用

上村陽一郎

理化学研究所 生命機能科学研究センター 細胞シグナル動態研究チーム
〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3

Yoichiro Kamimura

***Dictyostelium discoideum* as a model organism for various research fields**

Key words: *Dictyostelium discoideum*, eukaryote, model organism, NBRP, slime mold

RIKEN, Center for Biosystems Dynamics Research

6-2-3 Furuedai, Suita, Osaka, 565-0874, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c4.00164

1. はじめに

細胞性粘菌は土壤中に生息する真核微生物でモデル生物として利用されてきた。その生活環には、バクテリアを餌として過ごす単細胞期と、栄養飢餓によって引き起こされる多細胞期をもつユニークな生き物である。単細胞期には、アメーバ運動をしながら、さながら動物細胞のように振舞うが、多細胞体になるとまるで小さな植物様の子実体を形成する。これまで細胞性粘菌は細胞運動や、細胞増殖・分裂、バクテリアの食食、細胞分化の研究に使われてきた。最近では、その特徴的な二次代謝産物を利用した創薬分野での利用なども始まっており、新しい分野での活用が期待されている。このような研究を支えるため、細胞性粘菌は NBRP 事業の課題として採択され、日本独自のリソースを中心にそれらの収集、提供をおこなっている。

2. 細胞性粘菌とは

細胞性粘菌とは一体どのような生き物であろうか。細胞性粘菌の一種であるキイロタマホコリカビは高等学校の教科書にも記載があるが、すぐにわかる人は少ないのではなかろうか。実は、細胞性粘菌は土壤に生息する微生物で、花壇の植え込みなどありふれた場所で見つかる大変身近な生き物である。粘菌として知られているものには、真性粘菌（あるいは変形菌）があり、日本のナチュラリストとして有名な南方熊楠がコレクションしたことで知られる。この生き物は変形体と呼ばれる時期に大きな多核の細胞体を形成し、多様な形や色で森のハイカーを楽しませてくれる。細胞性粘菌と真性粘菌の両者は名前が似ているものの、生物としては大きく離れており全く別ものである。

細胞性粘菌は、真核生物に属し、1869 年の Brefeld による発見以来これまでに 110 種類以上の報告がある (Brefeld 1869)。これらの和名に「カビ」という名称が含まれるものの、いわゆるカビである菌類ではなく、進化的により早い段階で分岐したアメーボゾーアに属する。これらはリボゾームの小サブユニット RNA 遺伝子の塩基配列情報から、グループ 1 (Parvisporids)、グループ 2 (Heterostelids)、グループ 3

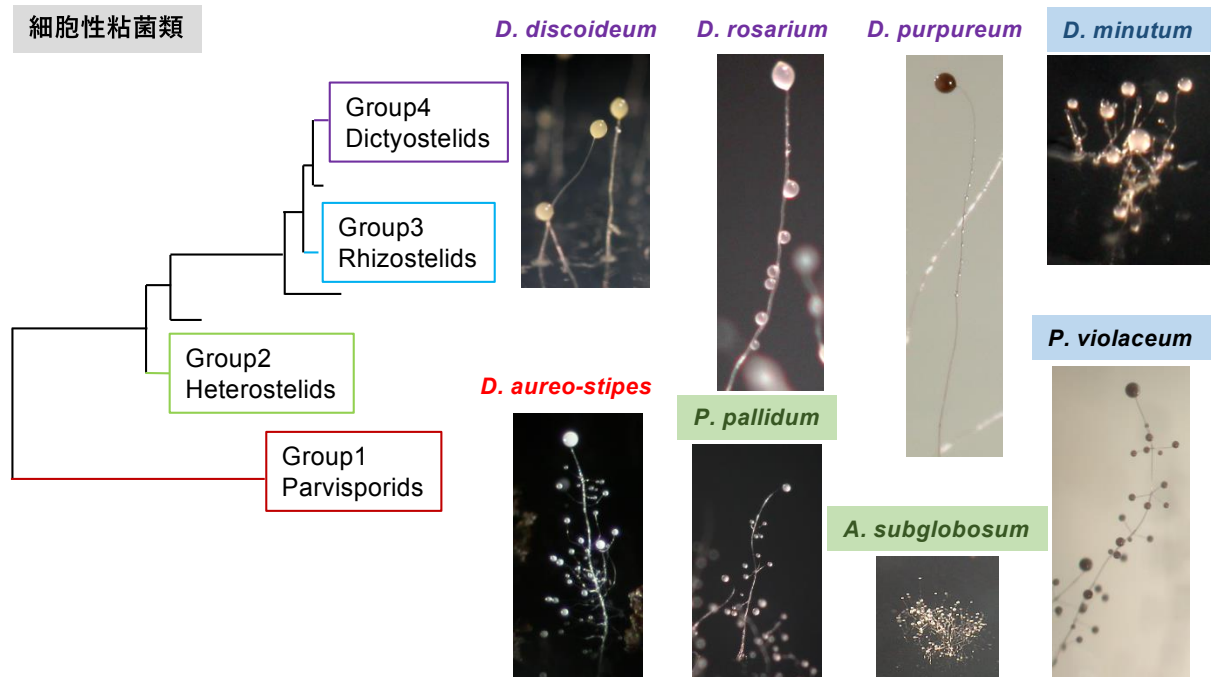


図 1. 異なる 4 つのグループに属する様々な細胞性粘菌の子実体。写真は井上敬博士のご厚意による。

(Rhizostelids) , グループ 4 (Dictyostelid) の 4 グループに大別される (図 1)

(Schaap 2011, 川上 2012, Schilde 2019) 。細胞性粘菌は、単細胞アメーバとして土壌中のバクテリアを食食して分裂・増殖する。しかし、餌であるバクテリアが枯渇するとアクラシン (acrasin) と総称される化学物質を分泌し、周りの細胞を誘引する走化性応答を引き起こす。キイロタマホコリカビを含むグループ 4 ではアクラシンとして 3',5'環状 AMP (cAMP) を利用しているが、それ以外の種類では葉酸やジペプチドであるグルリンなどを用いている (川上 2012) 。粘菌細胞はアクラシンを受け取ると、自身でもアクラシンを合成、分泌し、その情報は次々と伝搬していく。このようなシグナルリレーにより、細胞は効率的に集合することができる。多細胞からなる集合体は、一連の形態変化を経て、最終的に子実体 (fruiting body) を形成する。子実体は、胞子を含む胞子塊 (sorus) が柄の先端に形成されたもので、細胞性粘菌の種類によって多様な形態を示す (図 1) 。例えば、キイロタマホコリカビでは、柄の上に黄色い胞子塊を 1 つ持ち、その大きさは 1 ~ 2 mm である。一方、ムラサキタマホコリカビではその名の通り胞子塊が紫色をしている。また、シロカビモドキは柄の上に周期的に輪生枝を形成し、小さな白い胞子塊を多数形成する。これらの細胞性粘菌は胞子塊を支える柄も細胞によって作られているが、アキトステリウム科に属する種では柄は非細胞性のセルロースでできており、細胞性のものと比較して短くなっている。胞子はアメーバ細胞がセルロースの細胞壁で覆われ休眠状態になっているが、周りの環境が好転すると発芽し、単細胞アメーバとしての生活環境に戻る。このように細胞性粘菌は単細胞と多細胞期を行き来し、ある時は動物細胞のようにまたある時は植物様の振る舞いをする、不思議な生き物である。

3. モデル生物としての細胞性粘菌

細胞性粘菌の中で主にモデル生物として利用されてきたのはキイロタマホコリカビ (*Dictyostelium discoideum*) である。ここでは、その特徴をご紹介します。キイロタマホコリカビは半数体のゲノムを持つ真核生物である。2005年にはその全ゲノムシーケンスが完了しており、6本の染色体の全長は約34 Mbpであった (Eichinger et al. 2005)。その (A+T) 含有量は非常に高く、最終的に77.6%にも及ぶ。このゲノム中には約12,500の遺伝子が推定されている。2019年現在、キイロタマホコリカビ以外にも細胞性粘菌の各グループから *Acytostelium subglobosum*, *Dictyostelium fasciculatum*, *Dictyostelium purpureum*, *Polysphondylium pallidum* を含めた複数の全ゲノム配列が決定されており、比較進化という観点からの解析も可能になっている (Sucgang et al. 2011, Heide et al. 2011, Urushihara et al. 2015, Hayakawa & Inouye 2018)。これらのゲノム情報はアメリカ NIH の基金により運営されている DictyBase (<http://dictybase.org/>) に整備されている。このデータベースには、各遺伝子についてタンパク質情報、変異株の表現型を含む注釈、参考文献に加えて、種々の条件で取得された遺伝子発現プロファイルが閲覧できるようになっている。

キイロタマホコリカビは22℃付近であれば、二酸化炭素培養器などの特殊な装置を必要とせず増殖する。この生き物の利用価値が高まった要因の一つは無菌的に培養可能な AX 株の分離が挙げられる。これにより、大量の細胞を調整できるようになり、生化学実験を含む多様な解析を容易にした。キイロタマホコリカビでは遺伝子導入が容易で、分子遺伝学的な解析のためのツールも揃っている。例えば遺伝子発現系としてキイロタマホコリカビのプラスミドを基本とした大腸菌とのシャトリングベクターが開発されており、細胞内でエピゾーマルに維持される (安川ほか 2012)。遺伝子導入細胞の選択には G418, Blasticidin S, hygromycin が用いられる (Knecht et al. 1986, Egelhoff et al. 1989, Sutoh 1993)。また、相同組換えに基づいた遺伝子破壊も可能であり、分子遺伝学的解析が精力的に実施されてきた。加えて、近年 CRSIPR/Cas9 によるゲノム改変技術も細胞性粘菌において確立された (Sekine et al. 2018)。さらに、ゲノムワイドなスクリーニングに適した方法も確立している。Restriction Enzyme-Mediated integration (REMI) 法では、薬剤耐性遺伝子カセットと制限酵素を同時に細胞に導入することで、ランダムに切断されたゲノム DNA 中に薬剤耐性遺伝子カセットが挿入された変異ライブラリーを作製できる (Kuspa 1992)。これまでにこの手法を用いて、細胞分裂や栄養飢餓応答など多数の変異株が分離されている。

4. 細胞性粘菌コミュニティと NBRP 細胞性粘菌事業

細胞性粘菌研究の国内コミュニティを支える中心的な組織が日本細胞性粘菌学会である。本学会では毎年例会を開催し、国内研究の奨励に努めると同時に、ホームページ (dicty.jp) では一般の方々を対象に細胞性粘菌の魅力を知っていただくため、興味深いムービーが見られるよう工夫されている。また、YouTube にも学会が管理する dicty.jp 細胞性粘菌学会というチャンネルを持ち、多くのムービーが閲覧可能である。

細胞性粘菌の整備事業は国内の粘菌研究者からの要望を受ける形でナショナルバイオリソースプロジェクト

(NBRP) に応募し、第2期2007年に採択された(漆原2012)。現在は日本医療研究開発機構(AMED)の支援の下、2017年より第4期事業を継続している。これまでに日本国内でも幅広い研究分野で細胞性粘菌が用いられ、有用なリソースが多数作製されてきた。NBRP 細胞性粘菌事業では、これら日本固有のリソースを喪失することなく収集し、利用者の依頼に応じて高度な品質管理のもと提供できる体制を整えている。現在、保存している細胞株は1,333株、プラスミドDNAは492

点に及ぶ。また、細胞株については実験株に加え、野外で採取された野外採取株200株以上を保有している。野外採取株は有用な生理活性物質を探索するための生物資源としての利用価値が期待される。NBRP 細胞性粘菌へのリソースの寄託や提供依頼はホームページ(<https://nenkin.nbrp.jp>)からおこなえるようになっており、このホームページでは粘菌を研究に利用したい初心者向けの案内も掲載されている(図2)。

5. キイロタマホコリカビの生活環

キイロタマホコリカビは栄養増殖期には動物細胞のように増殖するが、栄養飢餓を契機に多細胞体化し子実体をわずか24時間で形成する。このような生活環には細胞生物学や発生学の基盤をなす多くの現象を含んでおり、これらの研究のモデル生物として広く利用されてきた。ここでは、キイロタマホコリカビの生活環を概観しながら、どのような研究と関連しているか見ていきたい(図3)。

前節で紹介したようにキイロタマホコリカビも土壌中の浅い部分でバクテリアを餌にして分裂・増殖している(図3中①②)。アメーバ細胞は、バクテリアから放出される葉酸を手掛かりに(葉酸に対する走化性)、その居場所を突き止めると、貪食により取り込み栄養とする。しかし、バクテリアを食べ尽くし飢餓状態になると、細胞はcAMPを細胞外に分泌し、周りの細胞を誘引する(cAMPに対する走化性)(図3中③)。



図2. NBRP 細胞性粘菌のホームページのトップ画面。必要なりソースは検索機能を使って簡単に検索でき、カートに入れて注文できる。

cAMP 情報を受け取った細胞は自分でも cAMP を合成・分泌し、このシグナルリレーによって離散している約 10 万個の細胞が集合してくる。この間、細胞は様々な細胞間接着分子を発現しており、例えば細胞の運動方向に沿った前後には contact site A (CsA) タンパク質が、また、その側面には Dd-Cad1 タンパク質の局在が観察される (Muller & Gerisch 1978, Wong et al. 1986, Wong et al. 1996)。CsA, Dd-Cad1 は共に糖タンパク質であるがその性質は異なっており、CsA は EDTA/EGTA に抵抗性であるが、Dd-Cad1 は感受性を示す。これらの接着分子により、細胞は集合流あるいはストリームという構造 (図 3 中④) を示し、効率的に細胞の塊 (マウンド) を形成する。

次にマウンドは細胞から分泌されるセルロースや糖タンパク質を主成分とする粘液鞘 (slime sheath) で覆われることで、細胞間の結合が比較的ゆるいルースマウンド (loose mound, 図 3 中⑤) からしっかりとした組織であるタイトマウンド (tight mound, 図 3 中⑥) に変化する。この際、マウンド内では細胞の分化が始まり、後の子実体で各々柄細胞と孢子細胞になる予定柄細胞、予定孢子細胞の二種類に別れる (井上 2012)。また、マウンド内では空間的にダイナミックな細胞の移動が起こっており、予定柄細胞はマウンドの頂上部分に選別され突起を形成する (tipped mound, 図 3 中⑦)。

この突起が上に伸びるとその形態は長細くなり、やがて地面に横倒しになると這い回り回るようになる。このような状態は移動体 (slug) と呼ばれ、明確な前後軸を持っており、移動方向の先端側を予定柄細胞が占め、それ以外はほぼ予定孢子細胞である (図 3 中⑧)。また、興味深いことに移動体内での予定柄細胞と予定孢子細胞の比率は概ね決まっており、1 : 4 である。このような分化比率の調節には、cAMP、アンモニア、DIF-1 といった要素が重要であると考えられる。移動体の先端から出ている cAMP の信号は予定柄細胞へ細胞の分化を抑制すると共に、予定孢子細胞の分化状態の維持に必要とされる (Wang et al. 1988, 井上 2012)。アンモニアは予定柄細胞の分化を阻害すると考えられている。飢餓状態にある移動体内で細胞は自らのタンパク質や RNA を代謝し

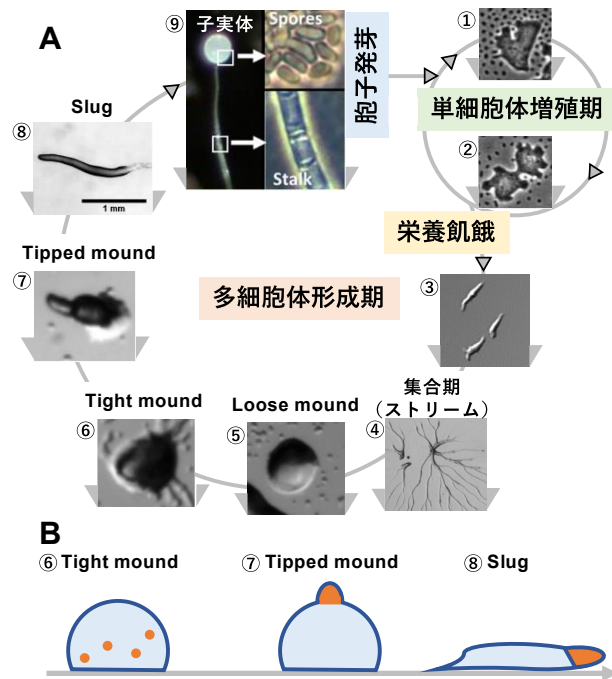


図 3. キイロタマホコリカビの生活環。A. 詳細は本文参照。B. 多細胞体の構造を模式的に表示。オレンジ色は予定柄細胞を、そのほかの水色部分には予定孢子細胞の存在を示している。Tight mound 内で予定柄細胞は上側に移動し、Tipped mound となる。Slug 内では移動方向の前端に予定柄細胞が局在する。写真は井上敬博士、橋村秀典博士のご厚意による。

てエネルギーを獲得しており、その際にアンモニアを生成する (Scindler & Sussman 1977)。特に予定柄細胞ではエネルギー消費が高く、アンモニアを多く発生する

(Walsh & Wright 1978, Cotter et al. 1992)。DIF-1 (differentiation-inducing factor 1) は予定柄細胞の分化を促進する因子として発見された分子量 307 のポリペプチドの一種である (Town et al. 1976, Morris et al. 1987)。DIF-1 は予定胞子細胞によって合成・分泌されることから、移動体内で予定柄細胞が予定胞子細胞に分化することを阻害すると推測される (Brookman et al. 1987)。

移動体は外的な刺激がない条件でも自律的に極性運動をしているが、光や温度といった外的条件によって影響を受けることが知られている。光に対する運動性は走光性として知られており、青 (ピーク波長 420 nm, 440 nm) や緑 (ピーク波長 560 nm) の光に強く反応する (Francis 1964, Poff & Hader)。移動体は側面から光を受けると空気との屈折率の違いから透明な組織体がレンズの効果を果たし、照光面と反対側で集光する。このようなレンズ効果が走光性を引き起こすと考えられている (Francis 1964)。温度に対しても鋭敏に反応し、移動体はわずか 0.05°C/cm の差を検出することができる。これまでの研究から、光や温度は異なるメカニズムで感知されると考えられているが、両者ともその実態は明らかでない。いずれにせよ、このような走光性、走温性は最終的な子実体形成を地表付近でおこない、胞子を効率よく拡散するための生存戦略の一つと考えられる (Whitaker & Poff 1980)。

移動体は適当な場所に移動すると動きを止め、団子状の上に突起を持った形態に変化する。突起部分には予定柄細胞が位置しており、その内部でセルロースを主成分とする柄が作られる (Raper & Fennell 1952)。この柄は予定胞子領域を貫通して下向きに伸びながらその中に予定柄細胞が入り細胞内の液胞化を特徴とした柄細胞に分化する。柄は底に到達すると、次に頂上に残されている予定柄細胞が柄に積み重なり上方向に伸長する。これに伴い、予定胞子細胞も上側に持ち上げられる。この上昇中に予定胞子細胞はセルロースの細胞壁で囲まれることで、物理的、化学的に抵抗性の胞子細胞に分化する (図 3 中⑨)。

胞子は外環境が整うとアメーバ細胞が細胞壁を破り発芽し、新たな増殖サイクルを開始する。子実体の胞子嚢のような高浸透圧下や発芽阻害因子であるディスカデニン

(discadenine) は胞子内のプロテインキナーゼ A (PKA) 活性を高く維持し、発芽を抑制する。ディスカデニンは植物ホルモンであるサイトカイニンの一つ zeatin と構造上の類似性を持ち、ヒスチジンキナーゼである DhkB を介した過程が関与する。また、新たな増殖サイクルの開始という観点から大変興味深い発見があった。野外からキイロタマホコリカビを採取すると、そのいくつかの株では胞子嚢に餌であるバクテリアを持ち運んでおり、胞子が発芽した際に餌であるバクテリアも増えるようになっているのである。このような現象は原始的な農業として紹介された (Brock et al. 2011)。

6. 細胞性粘菌を用いた走化性応答の仕組み

ここでは、細胞性粘菌の研究例として筆者が専門としている走化性について紹介したい。細胞は様々な環境の状態を認識し、適切に応答する仕組みを備えている。走化性では化学物質の濃度勾配を入力とし、その出力として誘引あるいは忌避運動を示し、初期発生や免疫応答など多くの場面で重要な役割を果たす (Servant et al. 2000, Trepap et al. 2012, Kolaczowska et al. 2013, Artemenko et al. 2014)。すでに説明したようにキイロタマホコリカビは葉酸や cAMP に対して顕著な走化性を示し、わずか 1–2 % の濃度勾配を約 10 万倍以上の広い濃度範囲にわたって認識できる (Fisher et al. 1989, Song et al. 2006)。しかし、このような特性がどのような分子機構によって構築されているかは不明であった。

走化性物質である cAMP は粘菌の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である cAR1 に結合し、下流の三量体 G タンパク質を活性化する (Devreotes et al. 2017)。我々は最近、三量体 G タンパク質シャットリングと名付けた空間制御が走化性応答のダイナミックレンジ拡張に関与することを見出した (図 4 A)。この制御の中心となるタンパク質が三量体 G タンパク質結合因子 (trimeric G protein interacting protein 1) Gip1 である (Kamimura et al. 2016)。三量体 G タンパク質は脂質修飾を受けることで細胞膜に係留され受容体からのシグナルを効率よく受け取るが、Gip1 との結合によりその一部は細胞質にも局在することがわかった (図 4 B)。また、この細胞質 G タンパク質

は cAMP 刺激により細胞膜へと移行した (図 4 B)。このような三量体 G タンパク質シャットリング機構が破綻している Gip1 欠損株では cAMP の勾配情報を特に高濃度側で識別できなかった。次に、G タンパク質シャットリング機構の分子基盤を理解するため Gip1 の構造解析をおこなった。その結果、Gip1 は 6 つの α ヘリックスがカゴ状の構造を構築

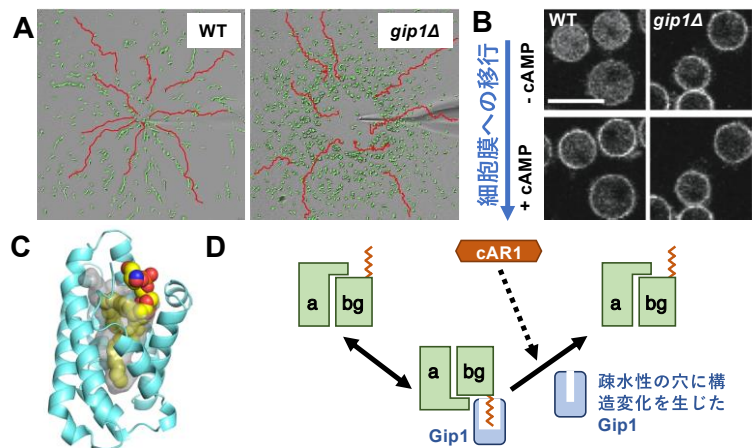


図 4. 走化性応答に関与する三量体 G タンパク質シャットリング。A. ピпетの先端から走化性物質である cAMP を拡散することで濃度勾配を形成。細胞は緑色の擬似カラーで表示。赤色の線は細胞の典型的な運動の軌跡。野生株 (WT) はピペットの先端まで集合するが、Gip1 欠損株 (*gip1Δ*) その途中で運動を止める。この結果は、Gip1 欠損株が cAMP の濃度勾配の高い領域で走化性能が低下していることを示す。B. 三量体 G タンパク質の局在を観察。WT では細胞膜に加えて細胞質にもシグナルが観察されるが、Gip1 欠損株では細胞質のシグナルが特異的に喪失している。これは、三量体 G タンパク質が Gip1 と複合体を形成し細胞質に係留されていることを示す。C. Gip1 の立体構造、疎水性の穴に大腸菌由来の脂質 (黄色) がはまっている。D. Gip1 による三量体 G タンパク質シャットリングのモデル。詳細は本文参照。

し、その中央に疎水的な穴が空いていることがわかった（図 4 C）（Miyagawa et al. 2018）。穴に立体障害をもたらす変異を導入すると G タンパク質との結合が起こらなくなった。一方、G タンパク質は β サブユニット上の脂質修飾部位であるゲラニルゲラニル基を介して Gip1 と結合していた。これらの事実より、脂質修飾部位で細胞膜に局在している三量体 G タンパク質が膜から解離すると、このゲラニルゲラニル基が Gip1 の疎水性の穴に刺さることで細胞質でも安定して複合体形成できることがわかった。また、Gip1 は疎水性の穴の大きさを変化させることで三量体 G タンパク質との相互作用を調節し、細胞膜への局在量、すなわち G タンパク質シャトリングを制御していると考えられた（図 4 D）。GPCR シグナリングは動物植物を問わず真核生物で広く利用されており、今回我々が発見した三量体 G タンパク質の細胞内空間制御機構が他の細胞でも保存されている可能性が示唆される。

7. おわりに

本稿では細胞性粘菌を紹介し、モデル生物としての利点を概観した。これまでに細胞性粘菌は細胞生物学、発生学、生物物理学など幅広い分野で利用されており、関連する有用なリソースは NBRP 細胞性粘菌事業によっていつでも利用できるように整備されている。細胞性粘菌は土壤中でバクテリアを餌に生息しており、バイオマスのホメオスタシスにとって重要な寄与が考えられる。また、細胞性粘菌は多様な生理活性物質を持つことも明らかになってきており、これらを応用した技術の開発なども期待される。実際、次項の上智大学・齊藤先生のネコブセンチュウの駆除はその好例である（Saito et al. 2018）。今後は、これまでにあまり利用されてこなかった分野でも是非細胞性粘菌を活用した研究が広がるよう、NBRP 細胞性粘菌事業として尽力していきたい。

謝辞

本稿に掲載した写真の利用をご許可いただいた井上敬博士と橋村秀典博士に感謝いたします。また、お二人には本稿に対して貴重なご意見を賜りここに深謝いたします。

NBRP 細胞性粘菌事業は日本医療研究開発機構（AMED）の助成を受けて実施（19km0210120j0003）。

8. 引用文献

- Artemenko, Y., Lampert, T.J. & Devreotes, P.N. 2014. Moving towards a paradigm: Common mechanism of chemotactic signaling in *Dictyostelium* and mammalian leukocytes. *Cell Mol. Life Sci.* 71: 3711-3747.
- Brefeld, O. 1869. *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer Organismus und der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abh. Senckenberg Naturf. Ges.* 7: 85-107.
- Brock, D.A., Douglas, T.E., Queller, D.C., & Strassmann, J.E. 2011. Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature*. 469: 393-396.

- Brookman, J.J., Jermyn, K.A., Queller, D.C., & Kay, R.R. 1987. Nature and distribution of the morphogen DIF in the *Dictyostelium discoideum* slug. *Development*. 100: 119-124.
- Cotter, D.A., Sands, T.W., Viridy, K.J., North, M.J., Klein, G., & Satre, M. Patterning of development in *Dictyostelium discoideum*-Factors regulating growth, differentiation, spore dormancy, and germination. *Biochem. Cell Biol.* 70: 892-919.
- Devreotes, P. N., Bhattacharya, S., Edwards, M., Iglesias, P. A., Lampert, T. & Miao, Y. 2017. Excitable signal transduction networks in directed cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33: 103-125.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Lounsbury, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B., & Kuspa, A. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 435: 43-57.
- Egelhoff, T.T., Brown, S.S., Manstein, D.J., & Spudich, J.A. 1989. Hygromycin resistance as a selectable marker in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1965-1968.
- Fisher, P.R., Merkl, R., & Gerisch, G. 1989. Quantitative analysis of cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium discoideum* by using an image processing system and a novel chemotaxis chamber providing stationary chemical gradients. *J. Cell Biol.* 108: 973-984.
- Francis, D.W. 1964. Some studies on phototaxis of *Dictyostelium*. *J. Cell. Compar. Physiol.* 64: 131-138.
- Hayakawa, I.S., & Inouye, K. 2018. Species recognition in social amoebae. *J. Biosci.* 43: 1025-1036.
- Heidel, A.J., Lawal, H.M., Felder, M., Schilde, C., Helps, N.R., Tunggal, B., Rivero, F., John, U., Schleicher, M., Eichinger, L., Platzer, M., Noegel, A.A., Schaap, P., & Glöckner, G. 2011. Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication. *Genome Res.* 21: 1882-1891.
- 井上敬 2012. 多細胞体における分化・パターン形成のしくみ. 阿部知顕・前田靖男 (編) 細胞性粘菌: 研究の新展開〜モデル生物・創薬資源・バイオ〜. pp. 273-316. アイピーシー. 東京.

- Kamimura, Y., Miyanaga, Y., & Ueda, M. 2016. Heterotrimeric G-protein shuttling via Gip1 extends the dynamic range of eukaryotic chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 113: 4356-4361.
- 川上新一 2012. 細胞性粘菌の生きざまと系統・進化. 阿部知顕・前田靖男 (編) 細胞性粘菌: 研究の新展開〜モデル生物・創薬資源・バイオ〜. pp. 1-10. アイピーシー. 東京.
- Knecht, D.A., Cohen, S.M., Loomis, W.F., & Lodish, H.F. 1986. Developmental regulation of *Dictyostelium discoideum* actin gene fusion carried on low-copy and high-copy transformation vectors. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3973-3983.
- Kolaczowska, E. & Kubes, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 159-175.
- Kuspa, A., & Loomis, W.F. 1992. Tagging developmental gene in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89: 8803-8807.
- Miyagawa, T., Koteishi, H., Kamimura, Y., Miyanaga, Y., Takeshita, K., Nakagawa, A., & Ueda, M. 2018. Structural basis of Gip1 for cytosolic sequestration of G protein in wide-range chemotaxis. *Nat. Commun.* 9: 4635.
- Morris, H.R., Taylor, G.W., Masento, M.S., Jermyn, K.A., & Kay, R.R. 1987. Chemical structure of the morphogen differentiation inducing factor from *Dictyostelium discoideum*. *Nature.* 328: 811-814.
- Muller, K., & Gerisch, G. 1978. A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregation *Dictyostelium* cells. *Nature.* 274: 445-449.
- Poff, K.L., & Hader, D.P. 1984. An action spectrum for phototaxis by pseudoplasmodia of *Dictyostelium discoideum*. *Phytochem. Photobiol.* 39: 433-436.
- Raper, K.B., & Fennell, D.I. 1952. Stalk formation *Dictyostelium*. *Bull. Torrey Bot. Club.* 79: 25-51.
- Saito, Y.F., Miyazaki, S.H., Bartlem, D.G., Nagamatsu, Y., & Saito, T. 2018. Chemical compounds from *Dictyostelium discoideum* repel a plant-parasitic nematode and can protect roots. *PLoS. One.* 13: e0204671.
- Schaap, P. 2011. Evolution of developmental cyclic adenosine monophosphate signaling in the Dictyostelia from an amoebozoan stress response. *Dev. Growth. Differ.* 53: 452-462.
- Schilde, C., Lawal, H. M., Kin, K., Shibano-Hayakawa, I., Inouye, K., & Schaap, P. (2019). A well supported multi gene phylogeny of 52 dictyostelia. *Molecular phylogenetics and evolution*, 134: 66-73.
- Schindler, J., & Sussman, M. 1977. Ammonia determines the choice of morphogenetic pathways in *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 116: 161-169.
- Sekine, R., Kawata, T., & Muramoto, T. 2018. CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in *Dictyostelium*. *Sci. Rep.* 8: 8471.
- Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W. & Bourne, H.R. 2000. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science.* 287: 1037-1040.

- Song, L., Nadkarni, S.M., Bödeker, H.U., Beta, C., Bae, A., Franck, C., Rappel, W.J., Loomis, W.F., & Bodenschatz, E. 2006. *Dictyostelium* by restriction chemotaxis: threshold for direct motion. *Eur. J. Cell Biol.* 85: 981-989.
- Sucgang, R., Kuo, A., Tian, X., Salerno, W., Parikh, A., Feasley, C.L., Dalin, E., Tu, H., Huang, E., Barry, K., Lindquist, E., Shapiro, H., Bruce, D., Schmutz, J., Salamov, A., Fey, P., Gaudet, P., Anjard, C., Babu, M.M., Basu, S., Bushmanova, Y., van der Wel, H., Katoh-Kurasawa, M., Dinh, C., Coutinho, P.M., Saito, T., Elias, M., Schaap, P., Kay, R.R., Henrissat, B., Eichinger, L., Rivero, F., Putnam, N.H., West, C.M., Loomis, W.F., Chisholm, R.L., Shaulsky, G., Strassmann, J.E., Queller, D.C., Kuspa, A., & Grigoriev, I.V. 2011. Comparative genomics of the social amoebae *Dictyostelium discoideum* and *Dictyostelium purpureum*. *Genom Biol.* 12: R20.
- Sutoh, K. 1993. A transformation vector for *Dictyostelium discoideum* with a new selectable marker bsr. *Plasmid.* 30: 150-154.
- Town, C.D., Gross, J.D., & Kay, R.R. 1976. Cell differentiation without morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Nature.* 262: 717-719.
- Trepat, X., Chen, Z. & Jacobson, K. 2012. Cell migration. *Compr. Physiol.* 2: 2369-2392.
- 漆原秀子 2012. ゲノム情報とリソース提供. 阿部知顕・前田靖男 (編) 細胞性粘菌: 研究の新展開〜モデル生物・創薬資源・バイオ〜. pp. 91-104. アイピーシー. 東京.
- Urushihara, H., Kuwayama, H., Fukuhara, K., Itoh, T., Kagoshima, H., Shin-I T, Toyoda, A., Ohishi, K., Taniguchi, T., Noguchi, H., Kuroki, Y., Hata, T., Uchi, K., Mohri, K., King, J.S., Insall, R.H., Kohara, Y., & Fujiyama, A. 2015. Comparative genome and transcriptome analyses of the social amoeba *Acytostelium subglololum* that accomplishes multicellular development without germ-soma differentiation. *BMC Genomics.* 16: 80.
- Walsh, J., & Wright, B.E. 1978. Kinetics of net degradation during development in *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* 108: 57-62.
- Wang, M., van Driel, R., & Schaap, P. 1988. Cyclic AMP-phosphodiesterase induces dedifferentiation of prespore cells in *Dictyostelium discoideum* slugs: evidence that cyclic AMP is the morphogenetic signal for prespore differentiation. *Development.* 103: 611-618.
- Whitaker, B.D., & Poff, K.L. 1980. Thermal adaptation of thermosensing and negative thermotaxis in *Dictyostelium*. *Exp. Cell Res.* 128: 87-93.
- Wong, E.F., Brar, S.K., Sesaki, H., Yang, C., & Siu, C.H. 1996. Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule, in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 271: 16399-16408.
- Wong, L.M., & Siu, C.H. 1996. Cloning of cDNA for the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83: 4248-4252.
- 安川洋生, 足立博之, 桑山秀一. 2012. 解析手法にみる材料としても有用性. 阿部知顕・前田靖男 (編) 細胞性粘菌: 研究の新展開〜モデル生物・創薬資源・バイオ〜. pp. 11-35. アイピーシー. 東京.

細胞性粘菌の化学生態学

齊藤佑美子¹, 齊藤玉緒²¹ 上智大学大学院理工学専攻² 上智大学理工学部

〒102-8554 千代田区紀尾井町 7-1

Yumiko F. Saito¹, Tamao Saito²

Chemical ecology of the cellular slime mold

Keywords: cellular slime mold, nematode, bacteria, interspecies communication

¹ Faculty of Science and Technology, Sophia University,

7-1 Kioicho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8554, JAPAN

² Graduate School of Science and Technology, Sophia University,

7-1 Kioicho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8554, JAPAN

DOI: 10.24480/bsj-review.10c5.00165

1. はじめに

細胞性粘菌は、水平方向にも垂直方向にも広く分布することが報告されている原生生物で、林床などの土壌表層に生息することが知られている(Raper 1984)。その生活史は単細胞アメーバとして細菌などを捕食し分裂を繰り返す単細胞期と、飢餓刺激によって引き起こされる細胞集合とそれに続く一連の形態形成ののち、子実体と呼ばれる柄細胞と孢子からなる最終形態を形成する多細胞期の二つのステージを持っている。最もよく研究されている *Dictyostelium discoideum* では子実体の大きさは 5 mm 程度で、次の世代に命をつなぐ孢子塊を空胞化した柄細胞が支える構造を持つ。子実体形成は飢餓に対する応答で、より高くしっかりと孢子塊を支える方向に向かって進化している(Schaap et al. 2006)。これまで細胞性粘菌は発生・分化のモデル生物として長年研究対象とされてきた。しかし近年は、細胞運動、天然物化学、利他行動、macropinocytosis など多岐にわたる研究が展開されている。ここでは緒についたばかりの細胞性粘菌の化学生態学的研究について紹介したい。

2. 細胞性粘菌と線虫: 誘引—忌避の関係の発見

細胞性粘菌の生き残り戦略のうち、重要な課題の一つが「いかに孢子を遠くに拡散して生息域を拡大するか」である。細胞性粘菌の孢子は、乾燥すると柄から離れにくくなるため、菌類の孢子とは異なり、風による拡散に不向きであると考えられている(Smith et al. 2014)。そこで、孢子拡散の手段として有力な候補となるのが運動性の高い他の土壌生物を利用した拡散である。体表への付着や、摂食された場合も孢子は消

化されずに排泄されることを利用して、他の土壌生物の移動先を新たな生息域とすることができると考えられている (Huss 1989, Kessin et al. 1996)。

土壌生物の中でも線虫は、細胞性粘菌の孢子拡散の担い手として以前から注目をされてきた (Kessin et al. 1996)。線虫とは線形動物門の一般的な名称であり、細菌等を捕食しながら自由生活をする自活性線虫と、動物・植物に寄生する寄生性線虫に大別される。地球上のあらゆる場所に生息することで知られており、土壌中においては自活性線虫の数だけでも 1 m² あたり少なくとも 100 万個体程度が存在するとされる (石橋 2003)。筆者らが土壌中から細胞性粘菌を単離する際も、必ずと言っていいほど線虫と一緒に観察することができる。土壌中に多数存在すると共に、特に細菌捕食性の線虫の場合は細胞性粘菌が餌とする細菌が存在する場所に移動するため、細胞性粘菌にとって線虫は格好の孢子の運び手であると言える。一方、アメーバ状態の細胞性粘菌にとって、細菌捕食性線虫は捕食者でもある。つまり、孢子の殻に守られている状態では利用価値のある線虫が、発芽後の増殖期には脅威となる。1996 年には Kessin らによって、細菌捕食性線虫が細胞性粘菌の子実体を集まる一方、アメーバに対しては忌避行動をとることが観察された (Kessin et al. 1996)。これは、細胞性粘菌と線虫の間に化学コミュニケーションが存在し、細胞性粘菌にとって線虫が自身の脅威である時期は近くに寄せ付けず、捕食・消化に対する防御が可能である時期には孢子拡散のために誘因していることを示唆している。

また、土壌中には自活性線虫とは別に寄生性線虫も存在する。その中でも、植物寄生性であるネコブセンチュウ *Meloidogyne* spp. は、農業被害額の大きさから高い注目を集めてきた (Jones et al. 2013)。そこで筆者らは、細胞性粘菌とネコブセンチュウの関係について検討を行った。その結果、細胞性粘菌が子実体形成過程で分泌する物質に対してネコブセンチュウが忌避することを発見した (Saito et al. 2018)。これは、前述の細菌捕食性線虫とは全く逆の結果である。

では、なぜ細胞性粘菌はネコブセンチュウを忌避させるのだろうか。これは、ネコブセンチュウの移動先が、細胞性粘菌の生息場所として適していないからであると推測できる。ネコブセンチュウは卵から孵化した後、根の先端から 2-3 mm 後方から宿主に侵入する (石橋 2003)。そのため分布域は地表から地下 35 cm 程度までと報告されており (Teruya et al. 1984, Baidoo et al. 2017)、これは好気性の細胞性粘菌が増殖する環境として適しているとは言えない。つまり、細胞性粘菌は孢子がネコブセンチュウの体表に付着して植物の中や地中深くに運ばれるのを防ぐため、ネコブセンチュウを忌避させているのではないだろうか。

以上の様に、細胞性粘菌と線虫には粘菌の発生ステージや線虫の生態ごとに異なる相互関係が存在する。そして、細胞性粘菌は化学コミュニケーションによって線虫の誘因、忌避を引き起こし、自身の生存戦略のために利用していると考えられる。

3. 細胞性粘菌と細菌: 捕食—被食の関係を超えて

細胞性粘菌は前記の通り単細胞の時期には細菌を餌として増殖を繰り返す。つまり細胞性粘菌と細菌の間には捕食—被食関係がある。それでは餌となる細菌はただ食べられているだけなのか？この問題に取

り組んだのはドイツの Stallforth の研究グループである。彼らは細胞性粘菌と二員培養した際に、細胞性粘菌が餌として捕食することができない細菌として *Pseudomonas fluorescens* HKI0770 株を単離した (Klapper et al. 2016, Götze et al. 2017)。この細菌を使って 2 つのチャンバーを半透膜を挟んでつなげ、一方に細菌の培養液を、もう一方には細胞性粘菌の培養液を入れて培養するという巧妙な培養法を用いて、両者の間の化学物質によるコミュニケーションを調べた。この培養法を使うことによって半透膜を透過できる低分子物質は両者の間を移動できるが、細胞性粘菌と細菌の細胞自体は直接接触しないという状態を作り出した。その結果、細胞性粘菌アメーバのチャンバーで、細胞が急激に減少することを発見し、細菌由来の殺アメーバ物質 (amoebicide) として 4 種類の pyreudione (アルカロイド) と anikasin (環状リポペプチド) を同定した。これらの化合物はともに非リボソーム型ペプチド合成酵素によって合成されることがわかっている。Pyreudione は anikasin よりも強い殺アメーバ活性を有しているが、両者は作用する細胞性粘菌の種が異なっており、細菌が両者を合成することにより、より効率的に生き残りを図っていることがわかる。

一方で、細胞性粘菌と細菌の関係は捕食—被食関係や、殺アメーバ物質による自己防衛だけではない。アメリカの Queller と Strassman のグループは、細胞性粘菌の中には餌となる細菌を一部胞子細胞の中に取り込んでいるものがあることを発見した (Brock et al. 2011)。これは farmer と呼ばれている共生の一つである (primitive farming symbiosis)。さらに、farmer と呼ばれる細胞性粘菌の中には、自らの餌とはならない細菌を持っているものも見つかった (Stallforth et al. 2013)。このような細菌の一つである *Pseudomonas fluorescens* PfA 株由来の Pyrrolnitrin は抗菌活性を持つことが知られており、宿主となる細胞性粘菌の菌類による感染を阻止していると考えられている。2018 年には、細胞性粘菌はレクチン (discoidin I) を使って細菌を共生させていることが報告された (Dinh et al. 2018)。このように、細胞性粘菌と細菌の間だけでも決して単純ではない相互関係があり、それを裏付ける化学物質があることがわかる。

4. 終わりに: 化学生態学から見た細胞性粘菌

図1は細胞性粘菌を中心として、線虫、細菌との関係をまとめたものである。この図からも生物間コミュニケーションが決して単純ではないことが想像できる。これらの関係を裏付けるように、細胞性粘菌では数多くの二次代謝産物の合成酵素遺伝子が見つかった。2005 年に報告された、細胞性粘菌 *D. discoideum* の全ゲノム解析によると、そのゲノムの中には45個ものポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子が存在することがわかった (Eichinger et al. 2005)。そのうち4つは偽遺伝子と考えられるが、それでも41個の PKS 遺伝子があることになる。さらにそのうちの2つは I 型と III 型が融合した特異な構造を持つ PKS で、Steely と呼ばれる酵素であった (Austin et al. 2006)。また、テルペン合成酵素と考えられるものが11配列あり、うち9個が全長配列を持つと考えられている (Chen et al. 2016)。細胞性粘菌は「化学物質の戦場」と呼ばれる土壌の中で、巧みな生存戦略を展開しながら生きている。したがって、細胞性粘菌の作り出す化合物を、その生態学にどのように関わるかを見ていくことによって、これまでのランダムスクリーニングでは見つけ出せなかったような、新たな機能を見いだすことができると思われる。細胞性粘菌の化学生態学を考えた時、これまでのよう

な実験室株だけの実験では見つけ出せないものが数多くあることがわかる。その意味でも野外から単離した野生株から、変異株までの多様性に富んだバイオリソースを持つ NBRP の重要性が強調される。

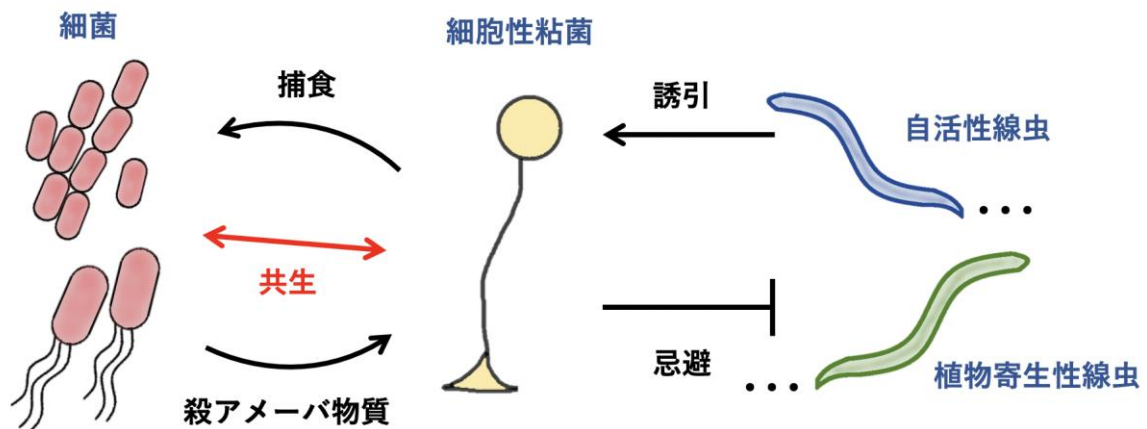


図1 細胞性粘菌とそれを取り巻く微生物(細菌、線虫)の関係
細胞性粘菌は単細胞期には細菌を捕食し二分裂によってその数を増やす。一方、細菌は殺アメーバ物質によって生き残りを図る。餌がなくなると細胞性粘菌は集合を開始し、柄と孢子からなる子実体を形成する。Farmerと呼ばれる細胞性粘菌は孢子の中に細菌を共生させる。子実体は孢子を分散させるため自活性線虫を利用するが、地中に潜る植物寄生性線虫(ネコブセンチュウ)は忌避させる。

引用文献

- Austin, MB., Saito, T., Bowman, ME., Haydock, S., Kato, A., Moore, BS., Kay, RR., & Noel, JP. 2006. Biosynthesis of *Dictyostelium discoideum* differentiation-inducing factor by a hybrid type I fatty acid-type III polyketide synthase. *Nat. Chem. Biol.* 2: 494-502.
- Baidoo, R., Mengistu, TM., Brito, JA., McSorley, R., Stamps, RH., & Crow, WT. 2017. Vertical Distribution of *Pasteuria penetrans* Parasitizing *Meloidogyne incognita* on *Pittosporum tobira* in Florida. *J. Nematol.* 49: 311-315
- Brock, DA., Douglas, TE., Queller, DC., & Strassmann, JE. 2011. Primitive agriculture in a social amoeba. *Nature* 469: 393-396
- Chen, X., Köllner, TG., Jia, Q., Norris, A., Santhanam, B., Rabe, P., Dickschat, JS., Shaulsky, G., Gershenzon, J., & Chen, F. 2016. Terpene synthase genes in eukaryotes beyond plants and fungi: Occurrence in social amoebae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 12132-12137
- Dinh, C., Farinholt, T., Hirose, S., Zhuchenko, O., & Kuspa, A. 2018. Lectins modulate the microbiota of social amoebae. *Science* 361: 402-406
- Eichinger, L., Pachebat, JA., et al. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435: 43-

- Götze, S., Herbst-Irmer, R., Klapper, M., Görls, H., Schneider, KRA., Barnett, R., Burks, T., Neu, U., & Stallforth, P. 2017. Structure, Biosynthesis, and Biological Activity of the Cyclic Lipopeptide Anikasin. *ACS Chem. Biol.* 12: 2498-2502
- Huss, MJ. 1989. Dispersal of Cellular Slime Molds by Two Soil Invertebrates. *Mycologia* 81: 677-682
- 石橋信義 2003. 線虫の生物学. 東京大学出版会. 東京
- Jones, JT., Haegeman, A., Danchin, EG., Gaur, HS., Helder, J., Jones, MG., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, JE., Wesemael, WM., & Perry, RN. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14: 946-961
- Kessin, RH., Gundersen, GG., Zaydfudim, V., & Grimson, M. 1996. How cellular slime molds evade nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4857-4861
- Klapper, M., Götze, S., Barnett, R., Willing, K., & Stallforth, P. 2016. Bacterial Alkaloids Prevent Amoebal Predation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55: 8944-8947.
- Raper, KB. 1984. The Dictyostelids. Princeton University Press, New Jersey.
- Saito, YF., Miyazaki, SH., Bartlem, DG., Nagamatsu, Y., & Saito, T. 2018. Chemical compounds from *Dictyostelium discoideum* repel a plant-parasitic nematode and can protect roots. *PLoS One* 13: e0204671
- Schaap, P., Winckler, T., Nelson, M., Alvarez-Curto, E., Elgie, B., Hagiwara, H., Cavender, J., Milano-Curto, A., Rozen, DE., Dingermann, T., Mutzel, R., & Baldauf, SL. 2006. Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science* 314: 661-663
- Smith, J., Queller, DC., & Strassmann, JE. 2014. Fruiting bodies of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* increase spore transport by *Drosophila*. *BMC Evol. Biol.* 14: doi: 10.1186/1471-2148-14-105.
- Stallforth, P., Brock, DA., Cantley, AM., Tian, XJ., Queller, DC., Strassmann, JE., & Clardy, J. 2013. A bacterial symbiont is converted from an inedible producer of beneficial molecules into food by a single mutation in the *gacA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 14528-14533
- Teruya, R., Abe, J., Nagamine, M., & Nakamura, H. 1984. Nematological Survey on Winged Bean Fields in Okinawa with Special Reference to Varietal Difference in Susceptibility to Root-knot Nematodes. *Jpn. Agric. Res. Q.* 18: 142-147

NBRP 広義キク属：キク属モデル系統の開発と植物多様性研究への展開

中野道治, 増田優, 谷口研至, 草場信
広島大学大学院統合生命科学研究科附属植物遺伝子保管実験施設
〒739-8526 広島県東広島市鏡山 1-4-3

Michiharu Nakano, Yu Masuda, Kenji Taniguchi, Makoto Kusaba

NBRP *Chrysanthemum*: Development of the model strain in the genus *Chrysanthemum* and contribution to the plant diversity research

Keywords: Asteraceae, *Chrysanthemum*, Model strain

Graduate school of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University

1-4-3, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-8526

DOI: 10.24480/bsj-review.10c6.00166

1. はじめに

栽培ギク (*Chrysanthemum morifolium*) は日本の花き生産において、切り花類の産出額の約 30%を占める最も重要な植物種である (平成 28 年花木等生産状況調査)。多様な花の色、形から、日本及び海外で観賞用として広く栽培されている。栽培ギクは日本・中国等に自生するキク属野生種が交雑することで成立したと考えられている。NBRP 広義キク属では、日本を中心とした東アジア地域よりキク属野生種及びキク属近縁種を収集すると共に実験系統を開発し、研究材料として提供している。本総説では NBRP 広義キク属のリソースについて紹介すると共に、植物多様性研究への展望をまとめた。

2. NBRP 広義キク属のコレクション

広島大学では長年にわたってキク属を用いた研究が行われてきたが、その歴史は 1929 年に着任した下斗米直昌教授までさかのぼる。野生ギクを中心とした細胞遺伝学研究が取り組まれる中で、多様な野生ギク遺伝資源が収集された。附属植物遺伝子保管実験施設 (当施設) は、収集された遺伝資源を元に NBRP 広義キク属の中核機関として活動している。

当施設は、野生ギク遺伝資源保存機関として国内外で最大であり、同様の施設は世界に類を見ない。当プロジェクトの「広義キク属」という名称は広島大学でキク属の細胞遺伝学研究が始められた当初から Linne (1753) によって命名されたキク属 (*Chrysanthemum*) を研究対象としてきたことに基づく。キク属の分類は北村によって確立されたが (Kitamura 1940), キク属の属名はその後に *Dendranthema* へと変更され、ここで定義された *Dendranthema* 属に対して再び *Chrysanthemum* の属名が与えられるという変遷を経た。再整理された *Chrysanthemum* 属については, Ohashi & Yonekura (2004) にまとめられている。「NBRP 広義キク属」では再整理されたキク属に加えて, Linne の分類によりキク属に含まれていたキク連 (*Anthemideae*) に分類される植物の収集・保存・提供を行っているため, 広義キク属という名称を用いている。

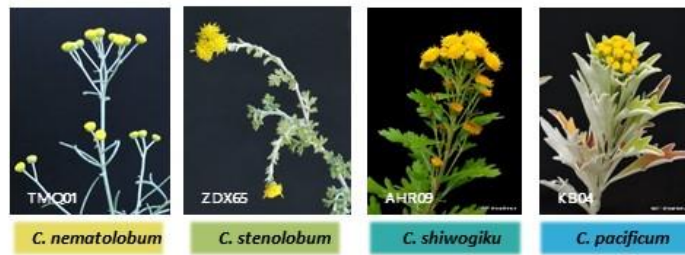
広義キク属リソースの分類に関して、北村による分類 (Kitamura 1940) に細胞遺伝学的な観点を加えた中田らの分類 (Nakata et al. 1987) を採用している。当施設で保有する遺伝資源のうち、キク属の野生系統 (自生地から採取してきた株または種子に由来するもの) を示す (表 1, 図 1 及びホームページ (<http://shigen.nig.ac.jp/chrysanthemum/>) を参照)。現在、日本国内に自生するキク属については、*C. rupestre* (イワインチン) と *C. pallasianum* (オオイワインチン) を除く全ての種を保有しており、中国、韓国、台湾に自生するキク属種についても保有している。またキク属以外にもノコギリソウ属 (*Achillea*)、ヨモギ属 (*Artemisia*)、ミコシギク属 (*Leucanthemella*)、ハマギク属 (*Nipponanthemum*)、ヨモギキク属 (*Tanacetum*) 等のキク属に近縁の種を保有している。またキク連には含まれないが、古くから細胞遺伝学研究に用いられてきた少染色体種の *Crepis capillaris* ($2n=6$)、*Xanthisma gracile* (*Haplopappus gracilis*) ($2n=4$) も保有している。これらの野生系統に加えて、人為交雑等により作製した実験系統も提供している。

表 1 NBRP 広義キク属で保有するキク属野生種

種名 (和名)	倍数性	採集国
<u>Ajania 群(無舌状花)</u>		
<i>C. nematolobum</i>	2x	C
<i>C. potaninii</i>	2x	C
<i>C. stenolobum</i>	4x	C
<i>C. glabriusculum</i>	6x	C
<i>C. shiwogiku</i> (シオギク)	8x	J
<i>C. pacificum</i> (イソギク)	10x	J
<u>Indicum 群(黄色舌状花)</u>		
<i>C. seticuspe</i> (キクタニギク)	2x	J
<i>C. lavandulifolium</i> (ホソバアブラギク)	2x	C
<i>C. nankingense</i>	2x	C
<i>C. indicum</i>	2x	C
<i>C. potentilloides</i>	4x	C
<i>C. indicum</i> (シマカンギク)	4x, 6x	JC
<u>Makinoi 群(白色舌状花)</u>		
<i>C. makinoi</i> (リュウノウギク)	2x	J
<i>C. rhombifolium</i>	2x	C
<i>C. horaimontanum</i>	2x	T
<i>C. wakasaense</i> (ワカワハマギク)	4x	J
<i>C. yoshinaganthum</i> (ナカガワノギク)	4x	J
<i>C. japonense</i> (ノジギク)	6x	J
<i>C. vestitum</i> (ウラゲノギク)	6x	C
<i>C. morii</i> (モリギク)	8x	T
<i>C. ornatum</i> (サツマノギク)	8x	J
<i>C. crissum</i> (オオシマノジギク)	10x	J
<u>Zawadskii 群(白色舌状花)</u>		
<i>C. chanetii</i>	2x, 4x	C
<i>C. zawadskii</i> (イワギク)	4x, 6x	JCKR
<i>C. zawadskii</i> ssp. <i>latilobum</i> (チョウセンノギク)	6x	JK
<i>C. maximowiczii</i>	6x	C
<i>C. weyrichii</i> (ピレオギク)	8x	JR
<i>C. coreanum</i>	8x	K
<i>C. yezoense</i> (コハマギク)	10x	J

J: 日本, C: 中国, K: 韓国, R: ロシア, T: 台湾。命名者は <http://shigen.nig.ac.jp/chrysanthemum/> に記載している。

Ajania群(無舌状花)



倍数性

2x

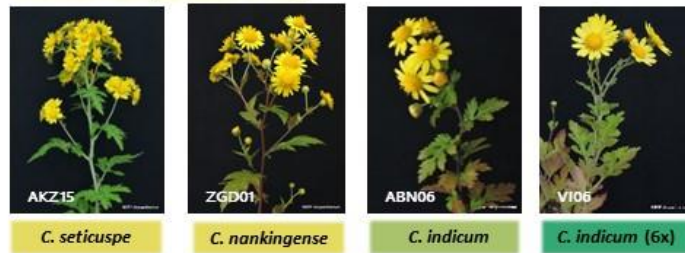
4x

6x

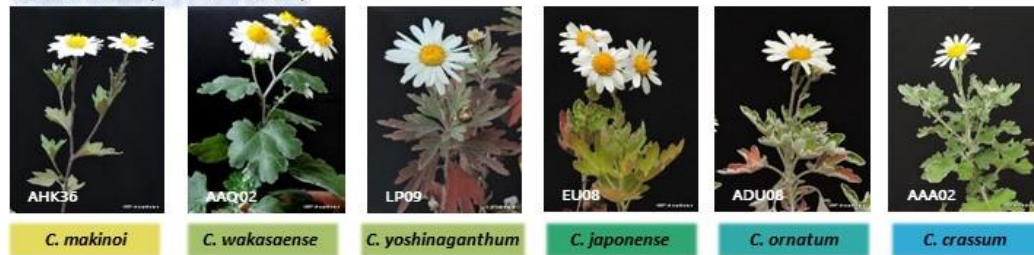
8x

10x

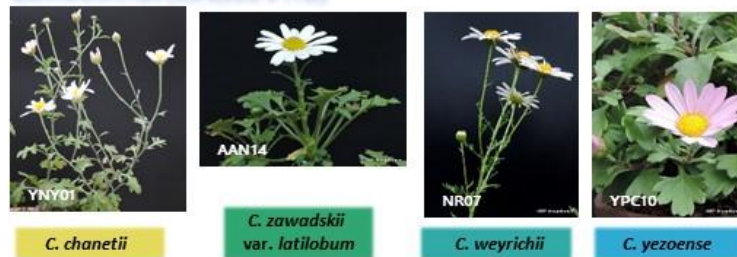
Indicum群(黄色舌状花)



Makinoi群(白色舌状花)



Zawadskii群(白色舌状花)



キク属以外

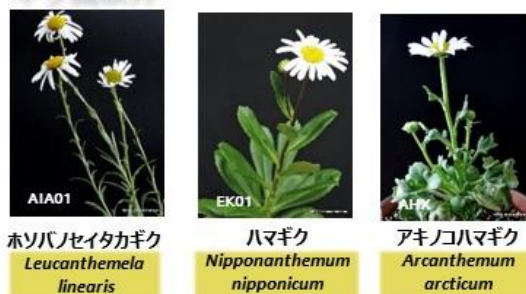


図1 NBRP 広義キク属が保有する野生系統

3. キク属植物の多様性

栽培ギクの起源に関しては諸説あるものの、いずれの説においても東アジア地域の野生種間の交雑により成立したとされる（北村 1948, 谷口 2013）。一方、日本を含めた東アジア地域には様々なキク属野生種が分布している。キク科は小花が集合した頭状花序を有することが特徴であるが、キク属の頭状花序は、両性花で花弁が短く放射相称の筒状花、雌性花で長い花弁を持つ左右相称の舌状花から構成される。キク属はこの頭状花序の形態と花色により、舌状花を持たない *Ajanía* 群、黄色舌状花を持つ *Indicum* 群、白色舌状花を持つ *Makinoi* 群、さらに白色舌状花を持ちロゼット性の強い *Zawadskii* 群の4群に区分される（田中・下斗米 1978, 谷口 2013, 表1・図1）。

キク属の特徴の一つは倍数性進化が顕著なことである。それぞれの分類群において二倍体から四、六、八、十倍体という高次倍数体が認められ、キク属の進化の過程において高次倍数体化が度々起こったものと考えられる。高次倍数体種は日本国内において特徴的な分布を示し、*Ajanía* 群のイソギク（十倍体）は千葉県から和歌山県南端の潮岬、シオギク（八倍体）は潮岬から四国南東に分布しており、形態的に類似した種が太平洋沿岸で異なる地域に分布している。また *Makinoi* 群では、ノジギク（六倍体）は兵庫県以西から九州南部、サツマノギク（八倍体）は九州南部から屋久島、オオシマノジギク（十倍体）は奄美群島というように、倍数性の異なる種が近接する地域に異なって分布している。キク属に見られる倍数性進化には日本列島の成立過程に伴う地理的な要因が関与した可能性が考えられ興味深い。

図1に示すように、キク属には頭状花序の形態以外にも様々な種間差異が認められる。例えば葉の形態に関して、*C. nematolobum* や *C. stenolobum* は極端に細い裂片を有する。シオギク、イソギク、サツマノギク、オオシマノジギク、*C. vestitum* は葉の背軸側に毛が密生しており、外見的に白く見える。環境適応性に関して言えば、イワインチン、オオイワインチン、イワギクなど高山に自生する種、ピレオギク、コハマギクなど北海道などの寒冷地に自生する種、イソギク、シオギクなど海岸沿いの環境で自生する種、オオシマノジギクのように奄美群島に自生する種があり、日本国内の様々な環境に適応して種分化を行っている。また東アジア地域全体では、*C. morii* は台湾の亜熱帯地域に、*C. nematolobum* は中国の乾燥地帯に、*Zawadskii* 群の種はモンゴル・ロシアなど亜寒帯からツンドラ気候の地域に自生するなど、様々な環境に適応しており興味深い。

4. キク属二倍体種キクタニギク

栽培ギクは産業的に重要であると共に遺伝的に多様な形質を持つ。しかしながら、栽培ギクは六倍体を中心とした高次倍数性の品種構成となっており、解析が困難なため、多様な形質の遺伝学的メカニズムはほとんど明らかになっていない。一方でキク属にはいくつもの二倍体種が存在している。キクタニギクは、日本国内において東北南部～九州北部に隔離分布している *Indicum* 群の二倍体種である。NBRP 広義キク属は、日本各地（福島、東京、神奈川、奈良、和歌山、山口、佐賀、長崎）に自生するキクタニギク系統を保有している。これらの系統には舌状花や葉の形態などに変異が見られる（図2A）。キクタニギクは短日条件において明確な開花反応を示すが、日本国内に自生する系統には系統間差が認められ NBRP 広義キク属の保有する系統の開花期は10月中旬から11月下旬までと変動が見られる。

キク属は一般に自家不和合性であり、キクタニギクも明確な自家不和合性を示す。自家不和合性は、高次倍数性に加えてキク属の遺伝学的解析を困難にしている。我々は、奈良県五條市に自生している

キクタニギクより自家和合性変異体 AEV02 を単離した (図 2B,C)。AEV02 は、開花前に他家受粉を防ぐ袋をかけた場合でも頭状花 1 個当たり 10 個以上の自殖種子を形成する。その性質は自殖を繰り返した後代においても維持されている。AEV02 の自殖後代ではアルビノが分離するが、その分離比は劣性 1 遺伝子を仮定した分離比によく適合しており、このことは AEV02 が持つ劣性変異が自殖により顕在化したこと、つまり自殖種子の形成がアポミクシスの結果生じたのではないことを意味している (図 2D)。キク属において、栽培ギクで自家和合性系統の報告例があるが (Ronald & Ascher 1975, 河瀬・塚本 1977), 世代を重ねる中で和合性が失われる傾向があり、この AEV02 系統がキク属で初めて得られた安定な自家和合性系統である。

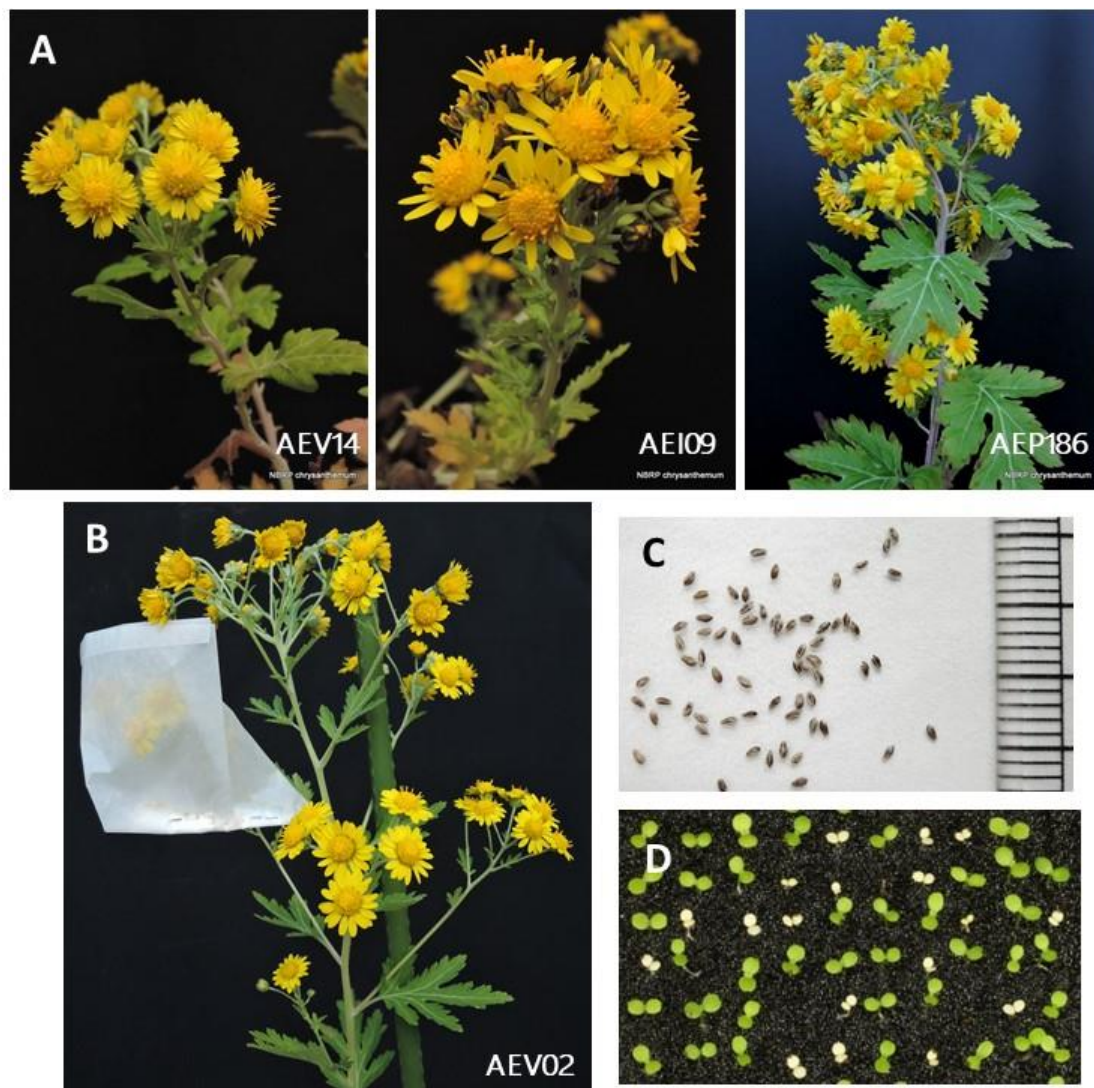


図 2 : キクタニギク遺伝資源と自家和合性系統 AEV02 の特性

(A) キクタニギク野生系統の例。頭状花の形態に系統間差異が認められる。(B) キクタニギク自家和合性変異体 AEV02。開花時に袋をかけて他株との交雑を防いでも多数の種子が形成される (C)。AEV02 自殖第 1 代ではアルビノが分離する (D)。

5. キク属モデル系統 Gojo-0 の開発と研究基盤の整備

多くのモデル植物は二倍体かつ自殖性であり、遺伝解析を容易に行うことができる。既述のように産業的に重要な栽培ギクは高次倍数性であると共に他殖性のためヘテロ接合性が高く、多くの植物種と比べて遺伝解析には困難を伴う。そのため、自家和合性の二倍体種を純系化してモデル系統化することは、キク属において様々な形質の遺伝解析を行う上で重要と言える。

我々の単離した AEV02 の持つ自家和合性変異は自殖を繰返しても失われることはないため、AEV02 より自殖を繰返して選抜することで純系化を進めた。自殖を繰返すことで確立した第 6 代以降の系統について採取地の地点名にちなみ Gojo-0 と命名した (図 3)。Gojo-0 は、AEV02 以降 10 世代以上の自殖を繰返した場合にも自殖により 1 頭状花当たり 10 個以上の種子を形成する能力を維持している。また、野生のキクタニギクに見られる標準的な特徴を概ね保持している (図 3A-D)。Gojo-0 は人工気象器内でライフサイクルを完結させることが可能であり、播種から約 3 か月間 16 時間日長で育成した後、10 時間日長に 1 か月おくことで着蕾、更に 1 か月で開花し、開花後 1 か月経過すると瘦果が完熟する。園芸用の培養土を用いて 6 cm 径ポットで育成した場合には草丈が最大 50 cm 程度となり、実験用には十分な規模の栽培を室内で行うことができる (図 3E)。

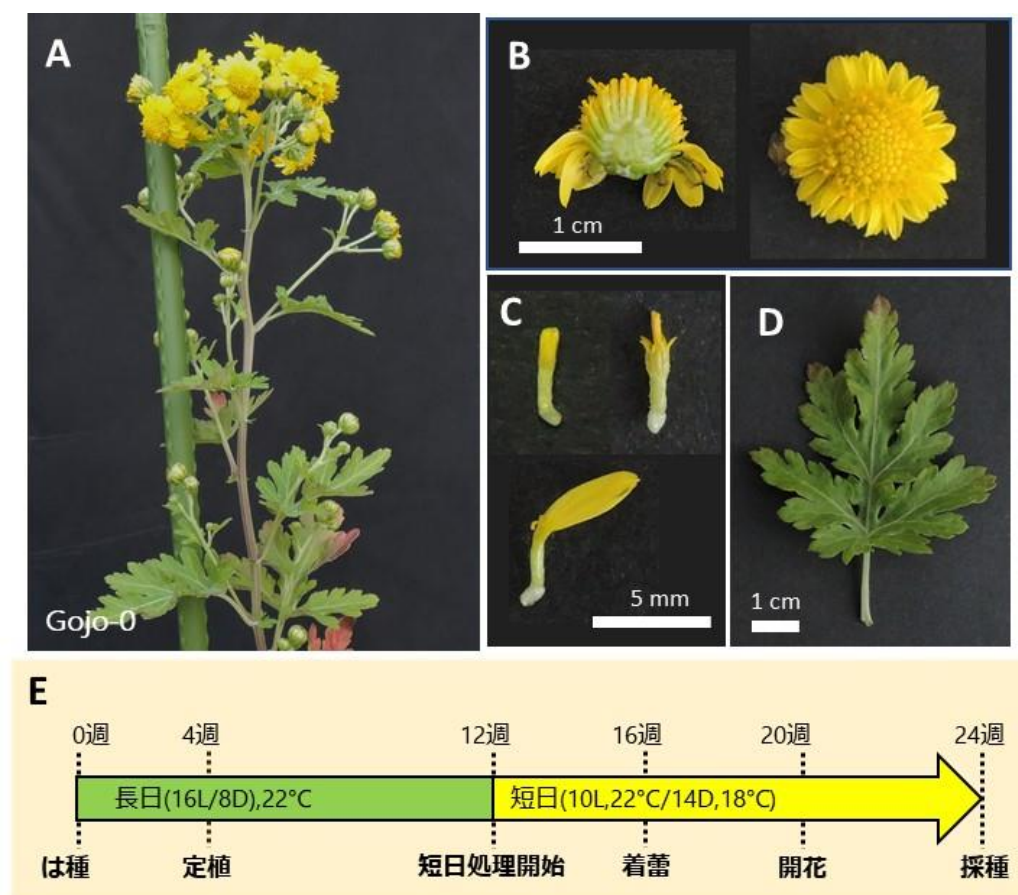


図 3 キク属モデル系統 Gojo-0

(A) 開花時の花序。(B) 頭状花。(C) 筒状花及び舌状花。(D) 葉。(E) 室内栽培条件とライフサイクル

純系化した二倍体系統である Gojo-0 は、これまでキク属では困難であった劣性突然変異体の単離

を可能とすることから、 γ 線照射あるいはEMS 処理を行うことで変異体作出を進めている。キク属はゲノムサイズが大きいこともあり全ゲノム塩基配列の決定は進んでいなかったが、最近、2種のキク属二倍体の全ゲノム塩基配列が決定された。日本のグループはキクタニギク自家和合性変異系統 AEV02 の自殖第5代 XMRS10 系統を用い、ゲノム全長をほぼカバーする約 2.7 Gbp の塩基配列を得た (MumGarden: <http://mum-garden.kazusa.or.jp/> よりデータが公開されている)。もう一方は、同じ Indicum 群の二倍体である *C. nankingense* であり、中国のグループにより 2.53 Gbp の配列が得られている (Song et al. 2018)。これら2種のゲノム配列のクオリティを加重平均 (N50) で表すと、キクタニギクについて 44.7 kbp, *C. nankingense* について 130.7 kbp となっており、両者とも仮想的な染色体レベルを表す pseudomolecule の配列には至っていない。しかしながら、遺伝子領域については高精度の塩基配列が得られており、遺伝子機能解析においては十分に使用可能である。また、キクタニギクでは、リーフディスク法を用いた形質転換系が確立されている (Oda et al. 2012)。Gojo-0 を用いて分子遺伝学的解析を行うための研究環境が整いつつある。

6. 広義キク属リソースの研究への活用

キク科は植物最大の科であり、ヒマワリ・レタスなど産業上の重要な植物種を含めて 1,600~1,700 属の約 24,000 種が属す (Funk et al. 2009)。しかしながら、分子レベルでの研究は十分に進んでおらず、ゲノム研究の進展を見ても NCBI の Genome データベースに登録されている種はキクタニギクやヒマワリ、レタスを含めて 9 種のみである (2019 年 5 月時点)。我々の開発したモデル系統 Gojo-0 はキク科における分子遺伝学的研究アプローチの扉を開く材料になることが期待される。以下に、主に広義キク属に分類される植物種が用いられた研究例を挙げる。

6-1. 頭状花序形成のメカニズム

キク科最大の特徴は、小花が集まった集合花である頭状花序を形成することである。頭状花序形成について、*Senecio vulgaris* や *Gerbera hybrida* では舌状花/筒状花形成に TCP 転写因子が重要な役割を果たすことが示されている (Broholm et al. 2008; Kim et al. 2008)。また最近、*Matricaria inodora* では、頭状花にオーキシンを塗布することで筒状花が舌状花に変化することが示され、頭状花序における時系列的なオーキシン濃度勾配が総苞片、舌状花、筒状花の分化を決定づけるというモデルが示されている (Zoulas et al. 2019)。これらの逆遺伝学的アプローチに加えて、Gojo-0 を用いて頭状花序形成に異常を示す突然変異体を単離し遺伝学的解析を行うことでできれば、キク科に共通の頭状花序形成のメカニズムを詳細に解明することができると期待される。

6-2. 開花制御のメカニズム

キク属において最も研究の進んでいる分野として開花制御メカニズムの解析がある。キクは電照ギクに見られるように厳密な日長応答を示すため、産業上の重要性から研究が進んでいる。フロリゲンをコードする *FTL3* 遺伝子 (Oda et al. 2012) の同定や、他の植物に先駆けて同定された長距離移動する花成制御因子のアンチフロリゲンをコードする *AFT* 遺伝子の単離 (Higuchi et al. 2013, 本総説集の樋口ら 2019 BSJ-Review 10C7) にはキクタニギクが用いられた。

6-3. 二次代謝産物の研究

キク属の近縁種では、古くから殺虫剤ピレスリンの原料として用いられる除虫菊 (*Tanacetum cinerallifolium*)、抗マラリア薬として用いられるクソニンジン (*Artemisia annua*)、日本において生薬として古くから用いられているヨモギなど特徴的な二次代謝産物を含む植物種が存在する。キク属では古くから漢方薬である菊花の原料としてシマカンギクが利用されてきたが、現代においても中国、韓国では薬用成分が注目され、関連する論文が多く発表されている (Kim et al. 2018, Nepali et al. 2018)。一方で日本国内の野生ギク遺伝資源について、薬用成分に関する報告は少なく、未利用な遺伝資源として創薬研究等への活用から新たな価値を生み出すことができるかもしれない。Uehara et al. (2009) は日本産野生ギク 17 種の葉に含まれるフラボノイドを網羅的に分析し、キク属野生種はフラボンのみを含む種、フラボン・フラバノンを含む種、フラボン・フラバノン・フラボノールを含む種に区分され、その組成には鎮静作用を持つリナリンや抗肥満・抗糖尿病・抗炎症作用を持つルテオリンなどが含まれることが示されている。

6-4. 病害抵抗性の研究

ウイルス・ウイロイドに起因する病害防除は栽培植物における重要課題である。キクにおいてはキク矮化病を引き起こすキク矮化ウイロイド (*Chrysanthemum Stunt Viroid*, CSVd) が知られ、日本全国のキク産地で問題となっている。Matsushita & Osaka (2019) はキクタニギクの野生株 20 系統を用いて、CSVd 感染株に接ぎ木した際に CSVd の移行が起こらない株のスクリーニングを行い、キクタニギクの野生系統 AET19 が抵抗性を示すことを明らかにした。この結果は、キクタニギク野生系統の利用が新たな遺伝子資源のスクリーニングに有効であることを示している。

6-5. 自家不和合性の研究

前述のように AEV02 の自家和合性の特性はモデル系統の確立に利用されている。一方、この自家和合性変異はキク属の自家不和合性メカニズムの解析にも利用可能である。孢子体型のアブラナ科、配偶体型のナス科、バラ科、ケシ科などの自家不和合性が詳細に研究されているが、その分子メカニズムは科によって大きく異なる。キク科では、*Senecio squelidus* を用いて組織学・遺伝学的解析が行われ、孢子体型 S 遺伝子座が存在すると考えられることが示されている (Hiscock et al. 2011)。また *Tolpis coronopifolia* においては、自家和合性系統と不和合性系統の交雑に由来する F₂ 集団を用いて自殖種子形成について QTL 解析が行われ、単一の主要 QTL が検出されている (Koseva et al. 2017)。しかしながら、キク科における自家不和合性について分子メカニズムは明らかでない。我々の単離した AEV02 及びそこから育成された Gojo-0 は安定な自家和合性変異を有しており、自家不和合性系統との交雑により分離集団を育成しポジショナルクローニングを行うことで、キク科・キク属における自家不和合性分子機構の実体に迫ることができると期待される。

6-6. キク属野生種を用いた遺伝学的解析の可能性

キク属は形態的に 4 群に大別され、これらは更に倍数性の違いにより区分される。しかしながら、異なる群の間、さらには異なる倍数性の種間であっても交雑と分離集団の育成が可能である (Nakata et al. 1987)。このことは、キク属の種間差異を決定づける形態的な特徴 (例えば頭状花や葉の形態) をもたらす遺伝子を分子遺伝学的アプローチにより解析可能なことを意味する。特にそれぞれの群

には二倍体種が存在している。これらの二倍体種は群を区分する形質に差があるだけでなく、それぞれ興味深い性質を持つ。二倍体種の中で *Ajania* 群のイワインチン, *C. nematolobum* は細い裂片を持ち、イワインチンは更に高山部の気候へ適応している。*Makinoi* 群のリュウノウギクは単生的な花序を有し樟脳に似た特有の香りを持つ。これらの二倍体種と Gojo-0 との間の交雑後代を育成することで、自家和合性の導入による単純な遺伝様式での二倍体レベルでの解析が可能となり、キク属の種間に見られる自然変異の分子遺伝学的解析が容易となる。キク属は東アジア地域の様々な環境に適応しているが、この環境適応能力に関わるメカニズムの解明、更には倍数性種へと研究を展開することで倍数性進化との関連も論じることが可能となる。これらの解析から得られる知見は栽培ギクが有する様々な遺伝的特性の理解、新たな栽培ギク育種にもつながることが期待される。

7. おわりに

これまでキク科では分子レベルでの研究の進展は必ずしも十分とは言えないが、その理由の一つにモデル植物が存在しなかったことが挙げられる。Gojo-0 はキク属のみならずキク科を研究するためのモデルとなり、キク科特有の様々な現象を解明するための強力なツールとなる。植物科学研究はシロイヌナズナ、イネを中心として進んだが、近年では様々な植物種での多様性研究が大きく展開している。Gojo-0 をプラットフォームにして全ゲノム塩基配列などの様々な情報や突然変異体コレクションが集積し研究に利用されることで、キク属・キク科が持つ特徴的な形質の分子レベルでの理解が進むことが期待される。またキク科という被子植物最大の科で知見を得ることは、シロイヌナズナ等のモデル植物で構築されてきた植物の分子メカニズムの一般性の検証にもつながる。このような意味において、Gojo-0 はキク属のモデル系統となるだけでなく、植物の多様性研究のための有用な材料となることが期待される。

引用文献

- Brennan, A.C., Tabah, D.A., Harris, S.A., Hiscock, S.J. 2011 Sporophytic self-incompatibility in *Senecio squalidus* (Asteraceae): S allele dominance interactions and modifiers of cross-compatibility and selfing rates, *Heredity*. 106 : 113–123.
- Broholm, S., Tahtiharju, S., Laitinen, R., Albert, V., Teeri, T., Elomaa, P. 2008. A TCP domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the *Gerbera* (Asteraceae) inflorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105: 9117-9122.
- Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F., Robinson, H. 2009. Classification of Compositae. In: V. Funk, A. Susanna, T. Stuessy, R. Bayer (eds.) *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. pp. 171–189. International Association for Plant Taxonomy, Vienna.
- Higuchi, Y., Narumi, T., Oda, A., Nakano, Y., Sumitomo, K., Fukai, S., Hisamatsu, T. 2013. The gated induction system of a systemic floral inhibitor, antiflorigen, determines obligate short-day flowering in chrysanthemums. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 17137–17142.
- 樋口洋平, 中野善公, 久松完 2019. キクの光周性花成制御機構の解明と計画生産技術への応用. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 10C7: 158-168.
- Kawase, K., Tsukamoto, Y. 1977. Studies on breeding in chrysanthemum, *Chrysanthemum morifolium* Ramat. I. self-fertility, *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 46 : 101-112.

- Kitamura, S. 1940. Compositae Japonicae. Pars secunda, *Mem. Coll. Sci. Kyoto Univ.* 15, Art 9, 258-446.
- 北村四郎 1948. 菊. 平凡社. 東京.
- Kim, M., Cui, M., Cubas, P., Gillies, A., Lee, K., Chapman, M., Abbott, R., Coen, E. 2008. Regulatory genes control a key morphological and ecological trait transferred between species. *Science*. 322: 1116-1119.
- Kim, D., Won, K., Hwang, D., Park, M., Kim, B., Myung, H. 2018. Chemical composition, antioxidant and anti-melanogenic activities of essential oils from *Chrysanthemum boreale* MAKINO at different harvesting stages. *Chem. Biodivers.* 15: e1700506
- Koseva, B., Crawford, D.J., Brown, K.E., Mort, M.E., Kelly, J.K.. 2017. The genetic breakdown of sporophytic self-incompatibility in *Tolpis coronopifolia* (Asteraceae), *New Phytol.* 216 : 1256–1267.
- Linnaeus, C. 1753. Species Plantarum. Holmiae: Impensis Laurentii Salvii.
- Matsushita, Y. & Osaka, M. 2019. Screening of *Chrysanthemum seticuspe* accessions reveals different degrees of resistance to chrysanthemum stunt viroid, *Eur. J. Plant Pathol.* doi:10.1007/s10658-019-01726-x.
- 中田政司, 田中隆荘, 谷口研至, 下斗米直昌 1987. 日本産キク属の種 : 細胞学および細胞遺伝学からみたその実体. *Acta. Phytotax. Geobot.* 38 : 241-259
- Nepali, S., Cha, J., Ki, H., Lee, H., Kim, Y., Kim, D., Song, B., Lee, Y. 2018. *Chrysanthemum indicum* inhibits adipogenesis and activates the AMPK pathway in high-fat-diet-induced obese mice. *Am. J. Chin. Med.* 46:119–136.
- Oda, A., Narumi, T., Li, T., Kando, T., Higuchi, Y., Sumitomo, K., 2012. CsFTL3, a chrysanthemum *FLOWERING LOCUS T*-like gene, is a key regulator of photoperiodic flowering in chrysanthemums. *J. Exp. Bot.* 63:1461–1477.
- Ohashi, H. & Yonekura, K. 2004. New combination in *Chrysanthemum* (Compositae–Anthemideae) of Asia with a list of Japanese species. *J. Japan Bot.* 79: 186–195.
- Ronald, W.G., Ascher, P.D. 1975 Self compatibility in garden *Chrysanthemum*: occurrence, inheritance and breeding potential, *Theor. Appl. Genet.* 46: 45–54.
- 田中隆荘, 下斗米直昌 1978. 日本産野生菊の種類. 植物と自然 12: 6-11.
- 谷口研至 2013. 第7章 イエギク—東アジアの野生ギクから鮮やかな栽培品種へ. 山口裕文編著 栽培植物の自然史 II 東アジア原産有用植物と照葉樹林帯の民族文化. 北海道大学出版会 pp.139-158.
- Uehara, A., Nakata, M., Kitajima, J., Iwashina, T. 2012. Internal and external flavonoids from the leaves of Japanese *Chrysanthemum* species (Asteraceae). *Biochem. Syst Ecol.* 41, 142–149.
- Zoulias, N., Duttke, S., Garcés, H., Spencer, V., Kim, M. 2019. The role of auxin in the pattern formation of the Asteraceae flower head (capitulum) *Plant physiol.* 179: 391-401.

キクの光周性花成制御機構の解明と計画生産技術への応用

樋口洋平¹, 中野善公², 久松完²

¹ 東京大学大学院 農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

² 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門

〒305-0852 茨城県つくば市藤本 2-1

Yohei Higuchi¹, Yoshihiro Nakano², Tamotsu Hisamatsu²

Mechanisms of photoperiodic flowering of chrysanthemum and its application to stable commercial production

Key words: anti-florigen, chrysanthemum, florigen, night-break, photoperiod

¹ Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

² Institute of Vegetable and Floriculture Sciences, NARO, 2-1 Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-0852, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c7.00167

1. はじめに

1920 年にガーナーとアラードによって発表された光周性の概念は、今日の農業生産現場における効率的な作物栽培技術や育種技術の発展、とりわけ観賞用花きの計画的生産に大きく貢献してきた。例えば、光環境（光周期）を人為的に制御することにより、本来は秋に咲くキクを 1 年中栽培し開花させることが可能となっている。キクは鋭敏に光周期に応答することから古典的な花成生理学研究のモデル植物として用いられ、かつ光周性の知見が商業生産現場において最も効果的に応用されている好事例として知られているが、分子遺伝学的な解析基盤の不足等により、開花制御の分子機構についてはほとんど明らかになっていなかった。本稿では、キク属モデル植物として NBRP で整備されつつある二倍体野生ギクのキクタニギクにおいて最近明らかになった光周性花成制御の分子機構について紹介する。

2. キクの産業上の重要性

キク（栽培ギク：*Chrysanthemum morifolium*）はバラ、カーネーションとならび世界 3 大花きに数えられ、日本における切り花出荷量の約 4 割を占める重要品目である（2018 年農林水産統計）。供花や仏事用、および葬儀需要が最も多く年間を通して需要があることに加え、盆や年末年始、春・秋の彼岸といった特定の短い期間に大量の需要が集中することから、高精度な開花調節が求められている。日本における自然環境下では、キクは日の長い（長日条件）春から夏にかけて栄養成長し、日が短くなる秋に花芽分化・開花する短日植物である。短日条件の真夜中に人工的に光を照射（暗期中断または光中断）することにより花芽分化を長期間抑制することが可能であり、この性質を利用した「電照菊」栽培が広く普及し、キクの計画生産（安定供給）を支えている。

Y. Higuchi, Y. Nakano & T. Hisamatsu -1

3. 光周性花成

1920 年にアメリカ農務省のガーナーとアラードは、遅咲きのタバコ変異体 (Maryland Mammoth) や晩生的大豆品種を使った実験から、これらの植物が光の強さや温度、栄養条件でなく光周期 (昼または夜の長さ) に反応して開花することを発見した (Garner and Allard 1920)。その後の研究から、植物は光周期に対する応答性から大きく分けて、長日植物 (長日条件下で開花が促進される)、短日植物 (短日条件下で開花が促進)、中性植物 (開花が光周期に依存しない) に分類されることが明らかになった (Thomas and Vince-Prue 1997)。1936 年にはロシアのチャイラヒヤンが局所的な光周期処理実験 (植物体の一部、例えば葉や茎頂部のみを遮光性の布で覆うなどした) や接ぎ木実験の結果から、適切な光周期条件下の葉で合成され、茎頂部へと長距離移動する花成誘導物質 (フロリゲン) の存在を予言した (Chailakhyan 1936)。同じ頃、ドイツのビュニングは、植物は内在性の概日時計により日長を計測しているとする画期的な説を提唱した (Bünning 1936)。1990 年代に入り、シロイヌナズナの花成時期に関する変異体を用いた分子遺伝学的解析から、光周性花成制御に重要な役割を果たす光受容体や概日時計構成因子、シグナル伝達因子をコードする遺伝子が次々と単離された。国内外の研究グループによる一連の解析から、遅咲き変異体の原因遺伝子として同定された *FLOWERING LOCUS T (FT)* は花成促進的 (長日) 条件下の葉の師部組織で発現が誘導され、茎頂部において bZIP 型の転写制御因子である FD と複合体を形成し、花芽分裂組織決定遺伝子 *APETALA1/FRUITFULL (API/FUL)* の発現を活性化することが明らかになった (Kardailsky et al. 1999, Kobayashi et al. 1999, Abe et al. 2005, Wigge et al. 2005)。2007 年には、シロイヌナズナとイネにおいて、FT および Heading date 3a (Hd3a : イネの FT オルソログ) の GFP 融合タンパク質が葉の師部組織から茎頂まで長距離移動することが示され、FT/Hd3a タンパク質がフロリゲンの分子実体であることが示された (Corbesier et al. 2007, Tamaki et al. 2007)。

フロリゲン説の提唱と同時期から、ヒヨス、イチゴ、ドクムギ、キク、タバコ、アサガオなど様々な植物において、花成に不適切な日長条件下の葉で合成される花成抑制物質の存在を示唆する結果が次々と示された (Lang and Melchers 1943, Guttridge 1959, Evans 1960, Weise and Seeley 1964, Tanaka 1967, Lang et al. 1977, Ogawa and King 1990)。例えば、キクでは茎先端部の日長条件にかかわらず、すべての葉を短日条件におくと花芽分化するが、上位葉を暗期中断すると花芽分化が抑制される。また、タバコでは、短日条件でも花芽分化する中性系統に長日性の系統を接ぎ木して短日条件下で栽培すると、中性系統の花芽分化が抑制された (Lang et al. 1977)。これらの結果から、花成非誘導条件の葉で長距離移動性の花成抑制物質 (アンチフロリゲン) がつくられると想定された。しかし、アンチフロリゲンの分子実体はフロリゲンと同様、長い間謎のままだった。シロイヌナズナにおける研究から、FT と同じフォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (phosphatidylethanolamine binding-like protein, PEBP) ファミリーに属する TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) が茎頂部において FT と拮抗的に作用し、花序分裂組織の維持および花成抑制的に機能することが明らかになった (Bradley et al. 1997, Abe et al. 2005)。TFL1 は FT と拮抗的に作用するものの、茎頂分裂組織において局所的に機能することから、当初想定されたアンチフロリゲンの条件を満たしてはいなかった。後述するように、2013 年にキクタニギクにおいて光周期に応答して葉で誘導される長距離移動性の

TFL1 様因子が同定され、アンチフロリゲンの存在が分子レベルで初めて明らかになった (Higuchi et al. 2013)。

4. キクの光周性花成制御機構～フロリゲンとアンチフロリゲン～

キク（栽培ギク）は光周性の基礎知見が産業的に応用されている一方で、高次倍数性（六倍体）や自家不和合性などの問題から、開花制御の分子機構についてはほとんど明らかになっていなかった。なぜキクの花成は短日条件で誘導され、反対に真夜中の電照により効果的に抑制できるのだろうか？近年、二倍体野生種のキクタニギク (*Chrysanthemum seticuspe*) において網羅的な発現遺伝子情報の収集や形質転換系の確立、およびナショナルバイオリソースとして自家不和合性自殖系統の整備と全ゲノム解読が進められ (Hirakawa et al. 2019), 分子遺伝学的な解析基盤が急速に整いつつある (本総説集の中野ら 2019 BSJ-Review 10C6 を参照)。このキクタニギクをモデル系として用い、キクの花成応答の分子機構を理解する上でまず初めに着目したのが、当時フロリゲンの分子実体として明らかになって間もない *FT* 遺伝子である。キクタニギクにおいて *FT* 相同遺伝子を探索したところ、3 種類の遺伝子 (*CsFTL1*, 2, 3) が単離された。このうち、*CsFTL3* の発現は暗期中断条件下と比較して短日条件下の葉で高く誘導されたことに加え、*CsFTL3* を過剰発現させたキクは通常開花しない長日条件下でも開花したことから、*CsFTL3* がキクのフロリゲンとして機能すると考えられた (Oda et al. 2012)。一方で、*CsFTL1* および 2 は花成抑制的な暗期中断条件の葉でより多く発現し、機能解析の結果から弱い花成促進活性が確認されたことから、フロリゲン遺伝子の挙動のみではキクの質的な短日応答性を説明するのには不十分であった。キクタニギクのカスタムマイクロアレイを用い、短日条件と暗期中断条件の葉における遺伝子発現を網羅的に探索したところ、暗期中断条件の葉で特異的に発現する *FT/TFL1* 様遺伝子が単離され、*Anti-florigenic FT/TFL1 family protein (CsAFT)* と命名された。*CsAFT* の発現は長日条件や暗期中断条件の葉で高く、短日条件に移すと速やかに抑制された。*CsAFT* を過剰発現するキクは短日条件下でも不開花となり、一方で RNAi による発現抑制体は電照下で早期に発蕾したことから、*CsAFT* が強い花成抑制活性を持つと考えられた。加えて、*CsAFT* タンパク質が葉から茎頂部へと接ぎ木面を横断して長距離移動すること、フロリゲン複合体 (*CsFTL3*-*CsFDL1*) の形成を阻害することにより花成抑制的に機能することが実験的に示されたことから、キクにはフロリゲンによる花成促進機構に加えて、花成抑制的な条件下ではアンチフロリゲンによる積極的な花成抑制機構が存在することが明らかになった (Higuchi et al. 2013)。加えて、キクの *TFL1* 相同遺伝子 (*CsTFL1*) は茎頂部において恒常的に発現しており、AFT と同様に *FTL3* と拮抗的に作用することで花成抑制的に機能することが示されている (Higuchi and Hisamatsu 2015)。これらの結果から、キクの質的な開花応答は、適切な日長下で誘導されるフロリゲン (*FTL3*) に加え、不適切な日長下で誘導される長距離移動性のアンチフロリゲン (AFT)、および、茎頂部における恒常的・局所的な抑制因子 (*TFL1*) による二重の花成抑制システムにより制御されていると考えられる (図 1, Higuchi 2018)。

最近明らかになったキクタニギクの全ゲノム配列に対し *FT/TFL1* が属する PEBP ファミリー遺伝子を網羅的に探索したところ、新たに二種類の *TFL1* 様遺伝子が見つかった。シロイヌ

ナズナにおいて報告のある花成促進および抑制活性に必須なアミノ酸残基を比較した結果、これら2つの遺伝子はともに花成抑制活性を持つと予測された。興味深いことに、これらのうち *CsTFL1* と高い相同性を示した *CsCEN-like* 遺伝子の発現は、ロゼット形成時（冬季の休眠・越冬状態）の茎頂部で高く誘導され、休眠打破に必要な低温遭遇後に抑制されていた (Hirakawa et al. 2019)。このことから、新たに単離された *CsCEN-like* は多年生宿根草としてのキクの生活環において、冬季の休眠状態における花成抑制因子として機能する可能性が考えられている。

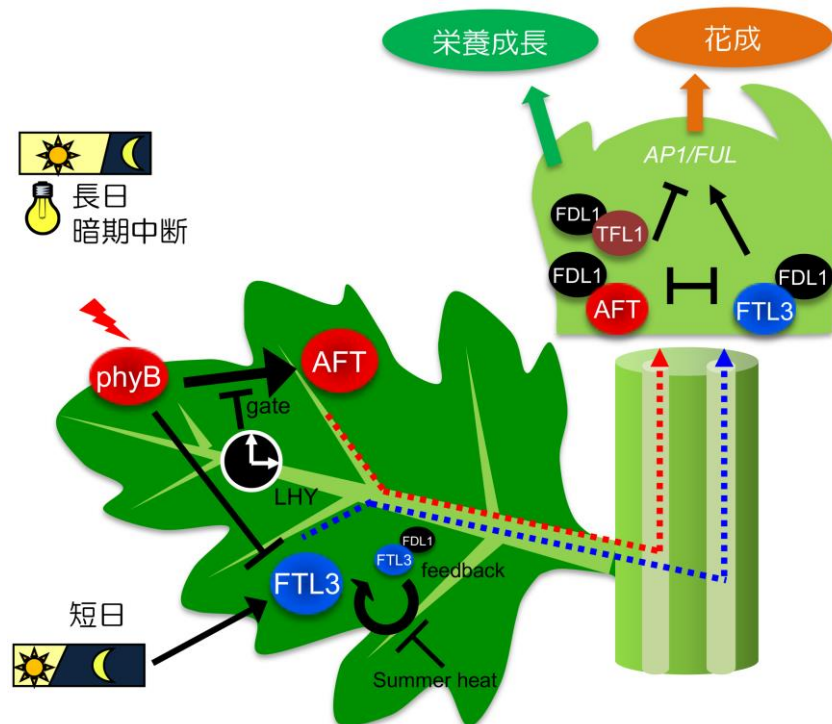


図1. キクタニギクにおける光周性花成制御機構のモデル

短日条件下の葉で *FTL3* の発現が誘導され、茎頂部へと長距離移動して花芽分裂組織決定遺伝子 (*AP1/FUL*) の発現を誘導する。長日条件や暗期中断(電照)条件下の葉では *AFT* の発現が誘導され、茎頂部へと移動した後に *FTL3* と拮抗的に作用することで花成抑制的に機能する。光周期依存的なこれら因子の発現誘導には赤・遠赤色光受容体のフィトクロム (*phyB*) と概日時計が関与する。繰り返しの短日条件下における *FTL3* の発現誘導には自身によるフィードバック制御が存在し、高温により抑制される。茎頂部では *TFL1* が局所的・恒常的な花成抑制因子として機能している。

5. 電照を感知する光センサーと暗期の認識機構

多くの短日植物と同様にキクの暗期中断電照には赤色光が最も効果的であり、この効果は直後の遠赤色光によって部分的に抑制されることから、赤・遠赤色光受容体であるフィトクロムの関与が示唆されてきた (Thomas and Vince-Prue 1997, Higuchi et al. 2012, Sumitomo et al. 2012)。キクタニギクにおいてフィトクロムの一種をコードする *CsPHYB* 遺伝子の発現をRNAi法により抑制したところ、赤色光による暗期中断に低感受となり、極早期に開花した。この結果から、*CsPHYB* がキクの暗期中断を感知する主要な光受容体として機能し、電照下では

フロリゲン (*FTL3*) の発現を抑制し、一方でアンチフロリゲン (*AFT*) の発現を誘導することで花成抑制的に機能していることが明らかになった (図 1, Higuchi et al. 2013)。

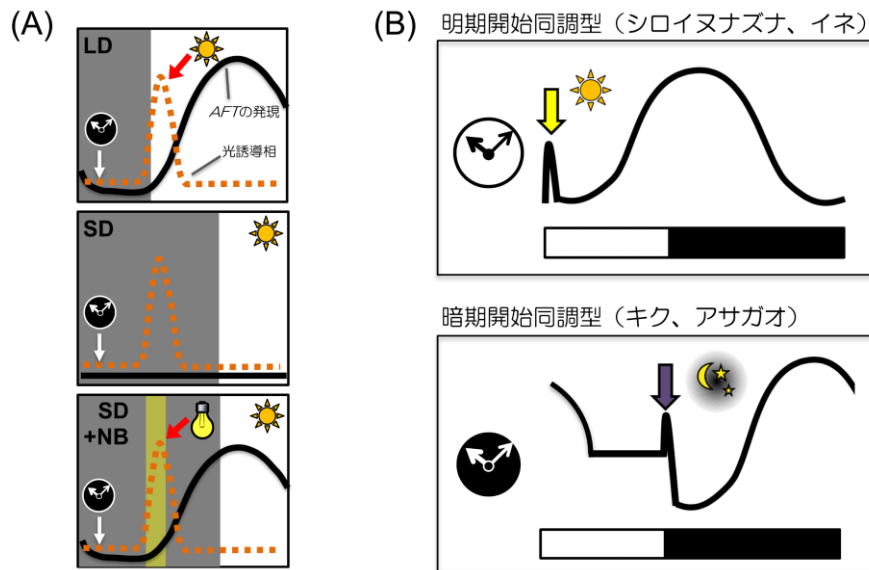


図 2. 光に敏感な時間帯と暗期の認識メカニズム

(A) 長日 (LD), 短日 (SD), 電照 (NB) 下における AFT の発現誘導モデル。明期の長さに関わらず、日没から一定時間後に AFT の光誘導相が出現する。長日下では光誘導相と夜明けの光が相互作用し、AFT の発現が誘導される。短日下では光誘導相の出現時刻には光が当たらず AFT は誘導されない。暗期中断電照下では光誘導相と夜中の人為的な光照射が相互作用し、AFT が誘導される。

(B) 花成制御に関与する概日リズムの同調機構の違い。フロリゲンもしくはアンチフロリゲンの合成に直接的に関与する概日リズムは、シロイヌナズナやイネでは明期開始時に強くリセットされるのに対し、キクやアサガオでは暗期開始時に強くリセットされる。白いバーは明期、黒いバーは暗期をそれぞれ表している。

キクの花成抑制をコードする *FTL3* の発現は短日条件下で誘導され、反対に *AFT* の発現は長日的条件下でより多く誘導される。光周期依存的なこれら遺伝子の発現調節は明期の長さや暗期の長さ、どちらに強く依存しているのだろうか？花成誘導に十分な長さの暗期(14時間)とさまざまな長さの明期を組み合わせ、非 24 時間周期の光周期でキクを栽培した結果、明期の長さに関わらず花芽分化が観察された。また、同様の条件下で *CsFTL3* と *CsAFT* の発現解析を行った結果、明期ではなく暗期の長さに依存して発現量の変化が観察された。以上の結果から、キクは絶対的な暗期の長さを計測していることが明らかになった。これに加え、*CsAFT* の発現誘導が 1 日のうちのどの時間帯の赤色光照射によって最も強く誘導されるかを解析した結果、明期の長さに関わらず、暗期開始から一定 (8~10) 時間後に最も効果的な時間帯 (光誘導相) が出現した (Higuchi et al. 2013)。この結果は、キクの花成制御に重要な光誘導相は、暗期開始を起点とした概日時計機構によって制御されていることを示している (図

2)。シロイヌナズナやイネで明らかになった日長認識モデル（外的符合モデル）では、明期開始を起点とした概日リズム遺伝子発現と、夕方の光との相互作用の有無が重要であることが示されている（Yanovsky and Kay 2002, Izawa et al. 2002）。キクで明らかになった暗期開始を起点とする概日リズムの存在は、同じ絶対的短日植物であるアサガオにおいても報告されている（Hayama et al. 2007）。これらの結果から、植物ごとに概日時計の同調機構は異なっており、キクやアサガオに特徴的なメカニズムが存在すると考えられるが、詳細は明らかになっていない（図 2）。キクにおける概日時計関連遺伝子の機能解析としては唯一、*LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* の相同遺伝子 (*CsLHY*) が報告されている。形質転換体を用いた機能解析の結果から、*CsLHY* は *CsFTL3* および *CsAFT* の発現制御に関与することが示唆された（Oda et al. 2017）。最近、キクタニギク的全ゲノム配列が解読され、予測された遺伝子モデルから光周性花成関連の遺伝子を探索した結果、シロイヌナズナにおける概日時計関連遺伝子のほとんどがキクタニギクでも高度に保存されており、光入力から概日時計の同調（リセット）に関わる遺伝子も複数見つかった（Hirakawa et al. 2019）。今後、これら概日時計関連遺伝子の機能解析を通じ、キクの暗期長認識機構が明らかになることが期待される。

キクタニギクで明らかになった日没を起点とした *AFT* の光誘導相の発見は、キクの生産現場における電照栽培技術の省エネルギー化・効率化に直結する可能性を秘めている。慣行の電照栽培では、季節を問わず午前 0 時を中心として 4~5 時間程度の電照方法が広く普及している。栽培ギクにおいて電照時間帯と花芽分化抑制効果の関係を詳細に解析した結果、最も抑制効果の高い時間帯は *AFT* の光誘導相と同様、日没から一定時間後に現れることが明らかになった（白山・郡山 2013）。この結果は、二倍体野生ギクで得られた知見が栽培ギクにも適用可能であることを示しており、将来的には季節ごとに変動する日没からの経過時間を考慮することにより、電照技術の最適化が進むことが期待される。

6. 開花までの短日繰り返し要求：*FTL3* のフィードバック制御メカニズム

キクでは、フロリゲンをコードする *FTL3* 遺伝子の発現量が短日条件下で徐々に上昇するというユニークな現象が存在する。シロイヌナズナやアサガオ等のモデル植物では一回から数回の適日長遭遇により急激な *FT* 誘導が起こり、その後の日長にかかわらず開花する（Hayama et al., 2007; King et al., 2008）。一方、キクは数日の短日遭遇で不可逆的に花序を分化するが、その後の花芽発達・開花には連続した短日条件を必要とする（Adams et al., 1996）。4. で述べたように花芽分化の質的短日応答は葉における *AFT* の急激な抑制に依るところが大きい一方、*FTL3* 発現は繰り返しの短日条件下で日々上昇していき、頭状花の発達および開花に必要なレベルに達すると考えられる（Nakano et al., 2013）。*FT/TFL1* は *PEBP* と呼ばれるタンパク質ファミリーに属する。いくつかの植物では日長誘導された *PEBP* による *PEBP* の発現制御が知られており、*bZIP* 型転写制御因子の関与が示されている例もある（図 3）。キクにおいて、*FTL3* と *bZIP (FDL1)* に着目して *FTL3* 発現との関連を調べたところ、連続した短日の間、葉において *FTL3* は *FTL3-FDL1* 複合体による正のフィードバック制御を受け、*FTL3* 自身の発現レベルが上昇することが明らかになった（Nakano et al., 2019）。これまでの知見と併せると、*PEBP* による *PEBP* 制御は 4 つのパターンに大別される（図 3）。①適日長下の葉で生合

成された PEBP が頂部に移行し PEBP 発現を誘導する（ジャガイモ，エンドウ）。②適日長ではない条件下の葉で誘導された PEBP がフロリゲン機能を持つ PEBP の発現を抑制する（ビート）。③適日長下の葉で誘導された PEBP が転写抑制型 bZIP とともに PEBP 発現を抑制する（イネ）。そして④適日長下の葉で誘導された PEBP が bZIP とともに PEBP 発現を誘導する（キク）である。キクのしくみでは、*AFT* による花芽分化抑制とその解除による花芽分化期の決定、および花芽分化後の日長条件による *FTL3* の発現量調節と最終的な開花期の決定が起こっていると考えられる。

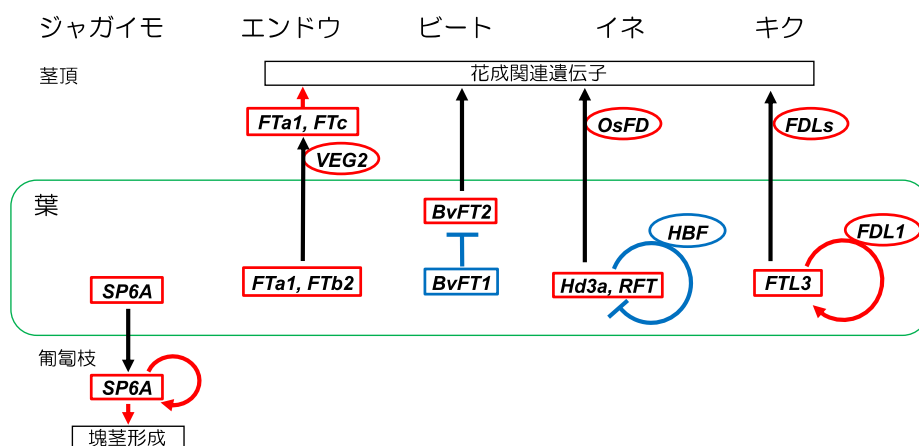


図3. PEBPによるPEBPの制御を介した花成および貯蔵器官形成のモデル

ジャガイモ (Navarro et al. 2011), エンドウマメ (Sussmilch et al. 2015), ビート (Pin et al. 2010), イネ (Brambilla et al. 2017), キク (Nakano et al. 2019)で報告されている PEBP による PEBP 制御。□: フロリゲン活性を有する PEBP。□: フロリゲン活性を有さない PEBP。○: 転写促進能を有する bZIP。○: 転写抑制能を有する bZIP。→: 発現誘導。T-bar: 発現抑制。→: タンパク質輸送後の発現誘導。

7. 高温開花遅延：光周性花成に対する生育気温の影響

ここまで述べてきたようにキクの花成は光周期によって厳密に制御され、人為的日長調節による周年開花が可能である。キクが我が国の花き類の最大品目となったのも周年生産体制の確立に依るところが大きい。しかし、欧米の「電照－シェード」技術を我が国に導入する過程において、夏季に短日処理を行っても開花に至らないことが問題となった。実はキクの開花は高温によって抑制される性質（高温開花遅延）があったためである。この問題を解決するため、柴田（1997）の研究と品種選抜に代表されるように、高温でも開花可能な形質（高温開花性）の品種群が選抜されてきている。キクタニギクや開花の高温感受性が異なる栽培ギク品種を活用することで高温開花遅延について明らかになったことを紹介する。キクの高温開花遅延では花序決定よりもその後の花器官の分化・発達が高温の影響を大きく受ける（Nakano et al., 2013）。このとき、茎頂部における Floral pathway integrator に属する遺伝子や花器官形成に関わる ABC クラス遺伝子の発現パターンが遅延することから、葉からのフロリゲ

ンシグナルが弱くなっていると考えられた。そこで、*FTL3* の短日誘導と温度の関係に着目したところ、高温によってその発現が抑制されることが開花遅延要因の一つであることが明らかになった (Nakano et al., 2013)。なお、高温による *AFT* の発現上昇はみられなかったため、積極的な花成抑制が働いている可能性は低いと考えられた。高温による *FTL3* 発現抑制機構としては、6.で述べたフィードバック制御の阻害である可能性が高いと考えられる。*FTL3* の高温による発現抑制はフィードバック制御のかかる繰り返し短日中に見られ、長日から短日へ転換した直後の発現誘導は高温でも阻害されないからである (Nakano et al., 2013)。また、高温感受性は暗期後半に高くなるというリズムを有しており、フィードバック制御のうちでも暗期長計測とリンクした発現誘導過程が阻害されているのかもしれない (Nakano et al., 2015)。キクタニギクの系統には日長応答性だけでなく、高温開花性にもバリエーションがあるため、キクタニギクの系統とともに最近明らかになったキクタニギクゲノム配列 (Hirakawa et al., 2019) を活用することが機構解明の一助となると考えられる。

8. おわりに

2000 年台後半から始まった次世代型シーケンサーの急速な普及により、これまで解析が困難であったさまざまな植物においてゲノム情報や遺伝子発現情報の整備が急速に進んでいる。キクタニギクで最近明らかになった光周性花成制御機構の一端もまた、この技術革新によるところが大きい。また、近年開発された CRISPR/Cas9 等のゲノム編集技術により目的とする遺伝子を直接的に改変することが可能となっている。栽培ギクにおいても既に CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊が可能であるとの報告があり (Kishi-Kaboshi et al. 2017)、今後さらなる効率化が期待される。今後は、二倍体のキクタニギクをモデルとしてキクの産業上の重要形質に関する分子機構を次々と明らかにしていくことに加え、得られた知見を六倍体である栽培ギクの効率的育種に応用・実用化していくことで、これまでにない画期的な新品種の育成や栽培技術の開発が実現していくと期待される。

謝辞

本研究の一部は、科学研究補助金・基盤研究 B (16H04877) の助成によって行われた。

引用文献

- Abe, M., Y. Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., & Araki, T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309: 1052-1056.
- Adams, S.R., Pearson, S., & Hadley, P. 1998. An appraisal of the use of reciprocal transfer experiments: assessing the stages of photoperiod sensitivity in chrysanthemum cv. Snowdon (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *J. Exp. Bot.* 49:1405-1411.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R., & Coen, E. 1997. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275:80-83.
- Brambilla, V., Martignago, D., Goretti, D., Cerise, M., Somssich, M., de Rosa, M., Galbiati, F., Shrestha,

- R., Lazzaro, F., Simon, R., & Fornara, F. 2017. Antagonistic transcription factor complexes modulate the floral transition in Rice. *Plant Cell* 29:2801-2816.
- Bünning, E. 1936. Die endogene tagesrhythmik als grundlage der photoperiodischen reaktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 54: 590-607.
- Chailakhyan, M. 1936. New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 13:79-83.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, O., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., & Coupland, G. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030-1033.
- Evans, L. 1960. Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. II. Evidence for inhibitory and promotive photoperiodic processes involving transmissible products. *Aust. J. Biol. Sci.* 13: 429-440.
- Garner, W., & Allard, H. 1920. Effects of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.* 18: 553-606.
- Guttridge, C. 1959. Further evidence for a growth-promoting and flower-inhibiting hormone in strawberry. *Ann. Bot.* 23: 612-621.
- 白山竜次・郡山啓作 2013. キクの電照栽培における暗期中断電照時間帯が花芽分化抑制に及ぼす影響. *園学研* 12: 427-432.
- Hayama, R., Aagashé, B., Luley, E., King, R., & Coupland, G. 2007. A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. *Plant Cell* 19: 2988-3000.
- Higuchi, Y., Sumitomo, K., Oda, A., Shimizu, H., & Hisamatsu, T. 2012. Day light quality affects the night-break response in the short-day plant chrysanthemum, suggesting differential phytochrome-mediated regulation of flowering. *J. Plant Physiol.* 169: 1789-1796.
- Higuchi, Y., Narumi, T., Oda, A., Nakano, Y., Sumitomo, K., Fukai, S., & Hisamatsu, T. 2013. The gated induction system of a systemic floral inhibitor, antiflorigen, determines obligate short-day flowering in chrysanthemums. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 17137-17142.
- Higuchi, Y., & Hisamatsu, T. 2015. CsTFL1, a constitutive local repressor of flowering, modulates floral initiation by antagonising florigen complex activity in chrysanthemum. *Plant Sci.* 237: 1-7.
- Higuchi, Y. 2018. Florigen and anti-florigen: Flowering regulation in horticultural crops. *Breed. Sci.* 68:109-118.
- Hirakawa, H., Sumitomo, K., Hisamatsu, T., Nagano, S., Shirasawa, K., Higuchi, Y., Kusaba, M., Koshioka, M., Nakano, Y., Yagi, M., Yamaguchi, H., Taniguchi, K., Nakano, M., & Isobe, S. 2019. *De novo* whole-genome assembly in *Chrysanthemum seticuspe*, a model species of Chrysanthemums, and its application to genetic and gene discovery analysis. *DNA Res.* 26: 195-203.
- Izawa, T., Oikawa, T., Sugiyama, N., Tanisaka, T., Yano, M., & Shimamoto, K. 2002. Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev.* 16: 2006-2020.
- Kardailsky, I., Shukl, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison,

- M.J., & Weigel, D. 1999. Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* 286:1962-1965.
- King, R.W., Hisamatsu, T., Goldschmidt, E.E., & Blundell, C. 2008. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. I. Photosynthesis and a far-red photoresponse independently regulate flowering by increasing expression of *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *J. Exp. Bot.* 59:3811-3820.
- Kishi-Kaboshi, M., Aida, R., & Sasaki, K. 2017. Generation of gene-edited *Chrysanthemum morifolium* using multicopy transgenes as targets and markers. *Plant Cell Physiol.* 58: 216-226.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., & Araki, T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286:1960-1962.
- Lang, A., & Melchers, G. 1943. Die photoperiodische reaktion von *Hyoscyamus niger* (in German). *Planta* 33:653-702.
- Lang, A., Chailakhyan, M.K., & Frolova, I. 1977. Promotion and inhibition of flower formation in a day neutral plant in grafts with a short-day plant and a long-day plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:2412-2416.
- Nakano, Y., Higuchi, Y., Sumitomo, K., & Hisamatsu, T. 2013. Flowering retardation by high temperature in chrysanthemums: involvement of *FLOWERING LOCUS T*-like 3 gene expression. *J. Exp. Bot.* 64: 909-920.
- Nakano, Y., Higuchi, Y., Sumitomo, K., Oda, A., & Hisamatsu, T. 2015. Delay of flowering by high temperature in chrysanthemums: heat-sensitive time-of-day and heat effects on *CsFTL3* and *CsAFT* gene expression. *J. Hort. Sci. Biotech.* 90: 143-149.
- Nakano, Y., Takase, T., Takahashi, S., Sumitomo, K., Higuchi, Y., & Hisamatsu, T. 2019. *Chrysanthemum* requires short-day repeats for anthesis: Gradual *CsFTL3* induction through a feedback loop under short-day conditions. *Plant Sci.* 283:247-255.
- 中野道治, 増田優, 谷口研至, 草場信 2019. NBRP 広義キク属:キク属モデル系統の開発と植物多様性研究への展開. 植物科学の最前線 (BSJ-Review) 10C6: 148-157.
- Navarro, C., Abelenda, J.A., Cruz-Oro, E., Cuellar, C.A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., & Prat, S. 2011. Control of flowering and storage organ formation in potato by *FLOWERING LOCUS T*. *Nature* 478:119-122.
- Oda, A., Narumi, T., Li, T., Kando, T., Higuchi, Y., Sumitomo, K., Fukai, S., & Hisamatsu, T. 2012. *CsFTL3*, a chrysanthemum *FLOWERING LOCUS T*-like gene, is a key regulator of photoperiodic flowering in chrysanthemums. *J. Exp. Bot.* 63: 1461-1477.
- Oda, A., Higuchi, Y., & Hisamatsu, T. 2017. Photoperiod-insensitive floral transition in chrysanthemum induced by constitutive expression of chimeric repressor *CsLHY-SRDX*. *Plant Sci.* 259: 86-93.
- Ogawa, Y., & King, R. 1990. The inhibition of flowering by non-induced cotyledons of *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiol.* 31: 129-135.
- Pin, P.A., Benlloch, R., Bonnet, D., Wremerth-Weich, E., Kraft, T., Gielen, J.J., & Nilsson, O. 2010. An antagonistic pair of *FT* homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. *Science* 330:1397-1400.
- 柴田道夫 1997. 夏秋ギク型スプレーギクの温度・日長反応と育種に関する研究. 野菜茶試験

報. 12:1-71.

- Sussmilch, F.C., Berbel, A., Hecht, V., Vander Schoor, J.K., Ferrándiz, C., Madueño, F., & Weller, J.L. 2015. Pea *VEGETATIVE2* is an *FD* homolog that is essential for flowering and compound inflorescence development, *Plant Cell* 27:1046-1060.
- Sumitomo, K., Higuchi, Y., Aoki, K., Miyamae, H., Oda, A., Ishiwata, M., Yamada, M., Nakayama, M., & Hisamatsu, T. 2012. Spectral sensitivity of flowering and *FT*-like gene expression in response to a night break treatment in the chrysanthemum cultivar 'Reagan'. *J. Hort. Sci. Biotech.* 87: 461-469.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S., & Shimamoto, K. 2007. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316: 1033-1036.
- Tanaka, T. 1967. Studies on the regulation of Chrysanthemum flowering with special reference to plant regulators I. The inhibiting action of non-induced leaves on floral stimulus. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 36: 77-85.
- Thomas, B., & Vince-Prue, D. 1997. *Photoperiodism in Plants*, Ed 2. Academic Press, London
- Weise, A.H., & Seeley, J.G. 1964. Translocation of floral stimulus in Chrysanthemum. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 85: 574-583.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U. & Weigel, D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309: 1056-1059.
- Yanovsky, M., & Kay, S.A. 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 308-312.

アサガオの多様な変異体リソースと高精度ゲノム情報

仁田坂 英二¹, 星野 敦²¹九州大学大学院理学研究院

〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

²基礎生物学研究所

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

Eiji Nitasaka¹, Atsushi Hoshino²Various mutant resources and near-complete genomic
information of the Japanese morning gloryKeywords: anthocyanin, genome, *Ipomoea nil*, morphogenesis, transposable element¹Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Motoooka 744, Nishi-ku, Fukuoka
819-0395, Japan²National Institute for Basic Biology, Nishigonaka 38, Myodaiji, Okazaki 444-8585 Aichi, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c8.00168

1. はじめに

アサガオ(*Ipomoea nil*, 英名 Japanese morning glory)は日本人にとっては馴染み深い植物である。メンデルの法則の再発見以降、日本において、いち早く遺伝学の実験材料として利用され、短日条件に鋭敏に反応し花を付ける性質から、植物生理学の実験材料としても広く用いられてきた。200 年ほど前の江戸時代から保存されてきたアサガオの変異体も、ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)によって整備が進み、一分子リアルタイム DNA シーケンサーも利用することで、アサガオの染色体数に相当する 15 本の疑似染色体として整列させた高精度のゲノム配列が得られている。ここではアサガオのバイオリソースとしての歴史や特性を紹介することで、今後のリソースの利用拡大に結び付けることを目指している。

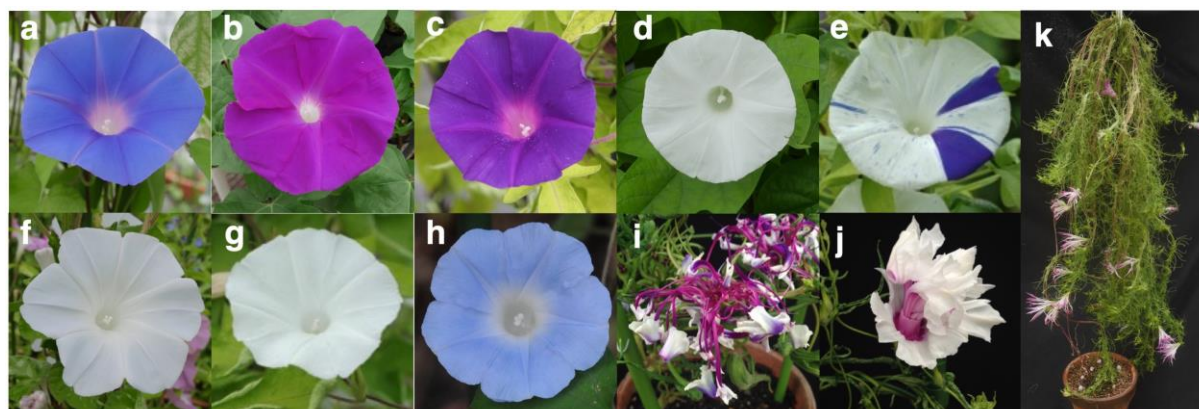


図1. アサガオの多様な変異体

a. 東京古型標準型 (TKS)。内在のトランスポゾンが動いておらず、ゲノム解読でも用いられた野生型の標準系統。b. ムラサキ。生理学研究など広く用いられる標準系統。花色は紫色ではなく、暗紅色で、葉形に関する蜻蛉葉変異を持つ。c. 紫変異体。液胞内 pH を高める *InNHX1* 遺伝子の変異体で、野生型より低い pH のためにアントシアニン色素が赤く発色している。d. 薬用白花。花だけでなく種子まで白い *ca* 変異を持つ。e. 雀斑。アントシアニンの生合成遺伝子 *DFR-B* にトランスポゾン *Tpn1* が挿

入しており、この転移により絞り模様が生じる。f. 淡色の *epf* 変異を持つ、肥後朝顔の一品種（磯打波）。g. *cl* 白花。転写因子である *lnMYB1* 遺伝子の変異体で、つるは着色する。h. アフリカ系統。アフリカ、ギニアで 1956 年に 採集された系統。短日感受性が鈍く、中南米の系統に酷似している。i. 獅子咲牡丹。獅子と牡丹の 2 重変異体で、葉や花卉の向軸化を亢進する未同定の変異も持っている。牡丹は C 機能 MADS-box 遺伝子の変異。j. 車咲牡丹。縮緬、立田、牡丹の 3 重変異。k. 石化枝垂糸柳牡丹。柳と笹の 2 重変異体は花卉や葉が糸状になり、つるの性質に関しても、重力感受性を失う枝垂変異および分裂組織が広がりリボン状になる帯化（石化）変異を持っている。この株はムラサキ(b)の台木に接ぎ木して維持している。

2. アサガオの来歴

アサガオは、他の *Ipomoea* 属の植物同様、メキシコなど、中央アメリカに起源する植物であるが、日本へは奈良時代に中国から薬草（下剤）として利用するために導入されたと考えられている。その後、花を觀賞する目的でも栽培されるようになった。ただし、新大陸の植物がコロンブス以前に旧大陸に導入されている点については異論もあるが、複数の文献記録からも少なくともコロンブス以前に日本に導入されていたのは間違いなく (Austin et al. 2001)。また、薬用植物として、黒丑、白丑の 2 種が利用されており、従来、後者は白い種子を持つハリアサガオ等の近縁種を指すと考えられていたが、白種子（純白ではなく、象牙色）の *ca* 変異体を指す場合もあることが最近の研究から示されている (図1d) (Hoshino et al. 2016b)。

渡来後、江戸時代後期に至るまでの長い期間、白花や矮性変異等、数えるほどの変異体しか記録されていないが、文化文政期(1804-1830)になると、多数の変異体が木版刷りの書籍(図譜)に記録されている (図2a~c)。この時期の変異体の多くは比較的シンプルな形態で稔性のあるものであるが、現在見ることができる変異のほとんどがこの時期に生じている。その後、嘉永安政期(1848-1860)に栽培の第二次ブームが起こり、当時の図譜を見ると、不稔の多重変異体を専ら觀賞していたことが分かる (図2d~f)。しかし、人工交配についての記録がないことや、明治中期ごろに初めて人工交配の方法が驚きと共に紹介され急速に広まったことから、当時の日本人は植物の受粉の仕組みを知らなかったようである。そのため、多数の栽培個体から昆虫による自然交雑を起こした複雑な多重変異体を選抜していたことが推測される。また、アサガオは自家受粉によって種子を結ぶため不稔の変異体でも、ヘテロ接合の状態でも容易に維持することが可能であった。



図2. 江戸時代の木版画 (図譜) に見るアサガオの変異体

a. 極黄采。色は菜の花のように(黄色い)とある。あさがはら(1817) 国会図書館デジタルコレクションより。
b. 乱獅子。獅子の単独変異はこのような形態をしており、わずかに稔性がある。c. 雀斑模様の立田変異体。b と c は花壇朝顔通(1815)より。
d. 台咲牡丹。e. 風鈴獅子咲。b のような単純な獅子に変異形質を強める修飾変異が加わったもの。f. 糸柳葉毛咲。松葉等の立田変異の強いアレルまたは柳と笹変異との 2 重変異体。d~f は朝顔三十六花撰(1854)より。

3. アサガオの研究史・リソースの系譜

明治以降も再度アサガオの栽培ブームが起こるが、時を同じくして、メンデルの法則が再発見され、日本にもその情報が導入された。カイコを用いた遺伝研究の先駆けとして有名な外山亀太郎、および竹崎嘉徳がアサガオに着目し、アサガオを用いた最初の遺伝研究の論文を発表した(外山亀太郎 1916; 竹崎嘉徳 1916)。その後、今井喜孝、萩原時雄に代表される日本人の遺伝学者によって、変異体の遺伝学的解析が進み、200 報を超える論文が発表され、219 の変異(アレルも含む)の記載、15 群のうち 10 群の連鎖地図の作成が行われた(Hagiwara 1956; Imai 1938)。これは、当時アメリカで進んでいたトウモロコシの遺伝学に基づいて作成された連鎖地図に次いで詳細なものであった。

戦後は、京都大学の今村駿一郎らによって、アサガオの鋭敏に短日に反応する性質が利用され、花芽の分化に関する植物生理学研究が進んだ(Imamura 1953)。現在でも広く利用されているアサガオの標準系統である、ムラサキ(英名 Violet)も彼によって確立された系統である(木原均 1934)(図1b)。

国際遺伝学会議(International Genetics Symposia)が 1956 年に日本で開催されることになり、国立遺伝学研究所の竹中要がこの会議でアサガオを展示するために、アサガオ系統の収集に着手した。第二次世界大戦を経て、2, 3 人の趣味家しか種子を保存していなかったが、幸いなことに彼らの保存系統はほとんどの変異を網羅していたため、失われたものは僅かである。これ以後、国立遺伝学研究所においてアサガオの系統保存が始まり、竹中の没後も田村仁一によって 1993 年まで系統が維持されていた。その後、1997 年に仁田坂がこれらの種子(550 系統)を九州大学に移管し、系統の調査と更新を再開し、2002 年より発足した NBRP の整備対象生物に指定されることで再び系統の収集や整備が進められている。

4. アサガオの変異原としてのトランスポゾン

日本にアサガオが渡来して 1000 年間にはほとんど変異が起こっていなかったのに、なぜ江戸時代の文化文政期に突然多数の変異体が生じたのであろうか。これまで解析されたアサガオの変異体の原因遺伝子を調べてみると約半数には共通の末端配列を持つトランスポゾンが挿入していた。また、残りの大部分の変異遺伝子にも、トランスポゾンが一度挿入して飛び出した際の特徴である、数塩基(フットプリント)の挿入等が見られた。このトランスポゾンは *CACTA (En/Spm)* スーパーファミリーに属する、*Tpn1* ファミリーと呼ばれるトランスポゾンであり、両末端には数百塩基対の共通の反復配列を持ち、その内側にはアサガオの遺伝子をコピーした特殊な構造を持っている(Inagaki et al. 1994; Kawasaki & Nitasaka 2004)。CACTA スーパーファミリーのこれまでの知見によると、この両端の反復配列を認識する共通の転移酵素によってこれらのトランスポゾンが転移すると考えられている。ゲノム解読により、東京古型標準型(図1a)のゲノム配列が解読されたが、このゲノムには 339 コピーの *Tpn1* ファミリーが存在し、転移酵素をコードしているトランスポゾンとして、*TpnA1* と *TpnA2* が存在していることが示された(Hoshino et al. 2016a)。特に後者は転移に必需な 3' 側末端が欠失していた。転移が活性化した系統では、*TpnA1* はフレームシフト変異等により不活性化したものも見られるが、*TpnA2* は自分自身で転移できないため、安定した転移酵素の供給元として働いているのであろう。転写産物の解析から、ゲノム解読に用いられた東京古型標準型は日本産のアサガオの中でも数少ない、*Tpn1* ファミリーが活性化していない系統で、それ以外のほとんどの日本産の変異系統は *Tpn1* ファミリーが活性化し転移が続いていることも明らかになっている(Hoshino et al. 2016a; Kawasaki & Nitasaka 2004)。

江戸時代の記録を紐解くと、備中松山藩(現在の岡山県高梁市)において、18 世紀中頃、松山朝顔と呼ばれる絞り模様のアサガオが生じたという記録がある(図 1e, 図 2c)。これは当時、京都や江戸の文献にも記録されており、その珍しい模様から全国に広まったと考えられる。この絞り模様こそが、花の色素であるアントシアニンの生合成系遺伝子に、トランスポゾンが挿入し体細胞で離脱することでこのような模様が生じていることを示している。おそらく、この松山朝顔の出現が契機となり、トランスポゾンによって誘発された劣性変異がアサガオの自家受粉する性質によって可視化され、江戸期の園芸ブームによって高い鑑識眼を持つ愛好家の目に留まり、保存されたのであろう。



図 3. 再現された幻の黄色いアサガオ

左は再現された黄色いアサガオで、キンギョソウに由来するオーロン合成系の酵素遺伝子を過剰発現させた形質転換体である。右はホストに用いた 54Y 系統。54Y 系統はカルコン異性化酵素遺伝子(*CHI*)が *Tpn1* ファミリーのトランスポゾンで破壊された変異体。*CHI* はオーロン合成の基質となるカルコンをアントシアニンの前駆体であるフラバノンに変換するが、変異体では変換がほとんど進まないため、カルコンの派生物が蓄積する。

5. アサガオの特性とそれを生かした研究

アサガオの野生型花色は青色であるが、白花をはじめ、多様な花色や花の模様が知られている。この花色の発現機構もシロイヌナズナでは研究できない分野である。アサガオの花の色素であるアントシアニンは特有の複雑な構造をしている(Lu et al. 1991)。江戸期に起源する花色の変異の多くは、この色素の生合成に関わる酵素遺伝子、あるいはその転写活性化因子の遺伝子の欠損であり、多彩な模様はトランスポゾンの転移だけでなく、遺伝子重複、RNA サイレncingやエピジェネティクスに関わることも明らかにされつつある(Morita & Hoshino 2018)。

アサガオは興味深いことに青い花がないバラと同じシアニジン系アントシアニンしか持たないが、青い花色を呈する。これは開花する際に液胞の Na^+/H^+ 交換輸送体(*InNHX1*)が働き、一般的には弱酸性～酸性側である液胞内を弱アルカリ性(pH8 程度)に上昇させることで青い花色を呈すようになることが明らかになった(Fukada-Tanaka et al. 2000; Yamaguchi et al. 2001)(図 1c)。また、陸上植物で保存されているアントシアニンの生合成を促進する *EFP* 遺伝子が世界に先駆けて発見されており、その変異体は花色が薄くなることも報告されている(Morita et al. 2014)(図 1f)。一方、つるではアントシアニンが発現するが、花では発現しないため白い花を付ける *c1* 変異の原因となる、*InMYB1* 遺伝子が同定されている(Morita et al. 2006)(図 1g)。この遺伝子の花弁のみで特異的に発現するという特性は、シロイヌナズナ等でも利用されており、他の花きにおける園芸分野での応用も期待されている(Azuma et al. 2016; Azuma et al. 2018)。

アサガオの花色は多彩であるが、バラに青い花がないように、アサガオには黄色い花がない。江戸期の図譜には極黄采(図 2a)等、黄色い花が記録されているため絶滅した幻のアサガオとされている。星野らは、淡いクリーム色の花を咲かせるアントシアニンの生合成系遺伝子の変異体に、黄色いキンギョソウの花色色素であるオーロンの生合成に必要な 2 つの酵素遺伝子を導入することで、幻の黄色いアサガオを再現することに成功している(Hoshino et al. 2019)(図 3)。



図4. 日長条件によるアサガオのサイズの違い

a. 短日条件(10 時間明期／14 時間暗期)ではシロイヌナズナ(Colombia)よりも早く、小型で開花する。b. 長日条件(16時間明期／8 時間暗期)では、ほぼ無限に成長を続ける。左上の白いバーは5mを示している。

アサガオは典型的な短日性植物であり、ほとんどの日本産の系統は、わずか1日の短日条件に置くことで花芽を分化する。この特性が利用されて、これまで植物生理学(花成)研究に広く用いられてきた。また、日長によってサイズを自在にコントロールすることができるため、人工気象器内でも多数を栽培することができる(図4)。花成機構についてはシロイヌナズナやイネで研究が進んでいたが、アサガオにおける分子基盤も明らかになっている(Hayama et al. 2007)。

江戸期から保存されている変化朝顔と呼ばれるアサガオの形態形成変異体の原因遺伝子も次第に明らかになっており、獅子遺伝子をはじめ、主要な変異は、植物の体軸(向背軸、中央側方軸)の形成に関わる変異であることが示されている(Iwasaki & Nitasaka 2006)(図5)。園芸家は経験的にこれらの多重変異体の中で、相互作用があり、表現型が亢進する変異の組み合わせを見出していたようである(図1i~k)。

アサガオはよく利用されているモデル植物の中では唯一のつる性植物である。重力感受性を失った、枝垂(weeping)と呼ばれる変異が見つかっており、この原因はシロイヌナズナでも重力感受に関わる内皮細胞の形成に関わる転写因子であることが明らかになっているが、つる性植物の特徴である、支柱に巻き付く性質も同時に失われていることが明らかになっている(Kitazawa et al. 2005)(図1k)。多くのモデル植物は抽苔して、無限花序を付けるが、実際にはその後終結してしまう。アサガオは長日条件で維持すれば、

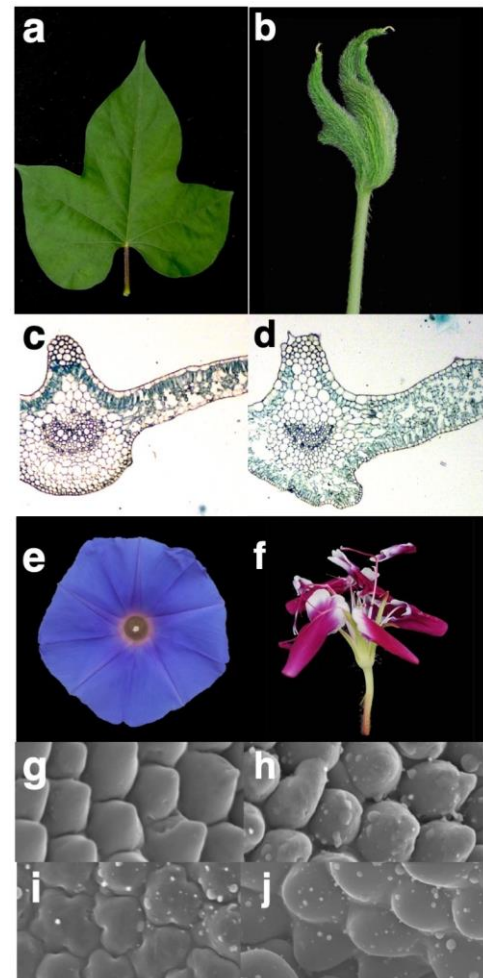


図5. 獅子変異体の形態

a, c, e, g, i は野生型(東京古型標準型)。b, d, f, h, j は獅子変異体(Q441)。a, b. 本葉。c, d. 葉の維管束を含む横断面。獅子変異体では葉の両側に柵状組織が形成されている。e, f. 花冠。g, h. 花弁の向軸側(表側)。円錐形の細胞から構成されている。i, j. 花弁の背軸側(裏側)。野生型ではフラットな形なのに対し、獅子では円錐形に近い形をしている。

ほぼ無限に成長を続けるため、この性質を不稔系統の維持に利用している。また、シュートは容易に接ぎ木をすることができるため、脆弱な系統を丈夫な台木系統に接ぎ木して成長促進や維持に利用することができるが、物質輸送の研究等への利用も期待される(図 1k, 図 4)。

アサガオは朝咲いて午前中には萎む典型的な一日花である。この脆弱な花卉を持つことを利用して花卉の老化に関する研究も進められており、細胞死を支配する転写因子である *EPHI* 遺伝子のノックダウン系統では花卉の寿命が著しく延びることも示されている(Shibuya et al. 2014)。

ゲノム編集は今後、生物学をリードしていく非常に重要な技術であるが、アサガオでも非常に高い効率で変異を導入できることが示されており、アントシアニン合成に関わる遺伝子や前述の *EPHI* 遺伝子のノックアウト系統が作製されている(Shibuya et al. 2018; Watanabe et al. 2017)。

6. ゲノム配列の解読と特徴

我々は 2016 年 11 月に、アサガオとしては初めて東京古型標準型(図 1a)のゲノム配列を公表した(Hoshino et al. 2016a)。アサガオの染色体数は $2n=30$ で(Yasui 1928)、そのゲノムサイズはミヤコグサ(442 Mb)とトマト(958 Mb)との比較解析から 752 Mb と推定できた。当時最新鋭だった一分子リアルタイム DNA シーケンサー(Pac Bio RSII)で産出した平均 6.8 kb のロングリードをつなぎ合わせ、全ゲノムの 98 % をカバーする 735 Mb の配列を、3,416 本の配列にまとめた。この配列のセットが、DDBJ などに登録しているバー

ジョン Asagao_1.1 である。さらに、東京古型標準型とアフリカ系統(図 1h)の F2 集団の部分的なゲノム配列を解析して、3,733 の SNP マーカーからなる連鎖地図を作成し、その上にゲノム配列を配置することで、疑似的な 15 本の染色体配列(疑似染色体, pseudo-molecule)も作成した(図 6)。この 15 本の配列には、3,416 本の配列のうち 321 本が含まれており、その総延長は解読した 735 Mb のゲノム配列の 91 % に当たる 672 Mb である。この 15 本の疑似染色体と、そこに含まれない 3,095 本を合わせた配列のセットはバージョン Asagao_1.2 であり、後述する NBRP のゲノム情報データベースから参照できる。Asagao_1.1 と Asagao_1.2 は、どちらも解読したゲノム配列の全てを含み、321 本の配列を疑似染色体としてまとめたかどうかだけの違いである。また、この核ゲノムの配列のほか、BAC クローンをサンガーシーケンサーで解読して 2 つのオルガネラ配列も全長を決定してい

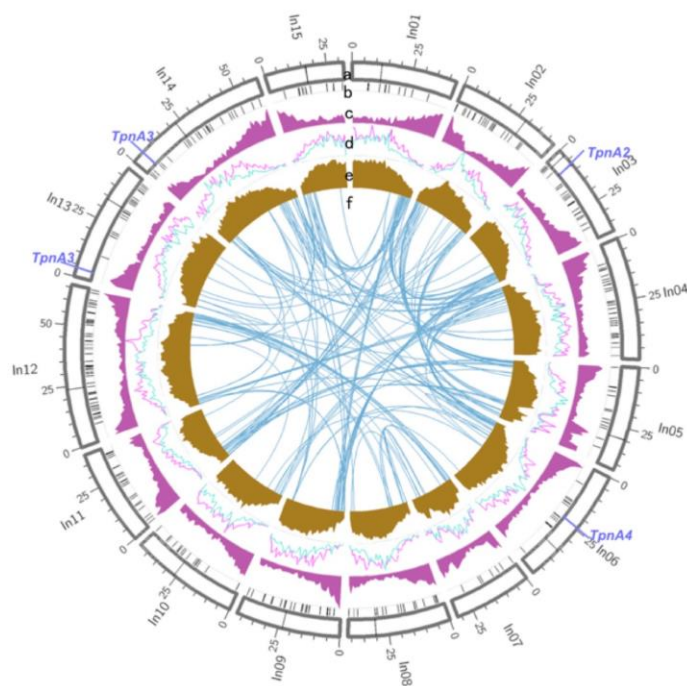


図 6. ゲノム配列の概要 (Hoshino et al. (2016a)より転載)

- 疑似染色体。In01～In15 は染色体番号。5 Mb 毎の目盛りと、*TpnA2*～*A4* の挿入位置。
- Tpn1* ファミリーのトランスポゾン挿入位置。
- 遺伝子の密度。
- LTR 型レトロトランスポゾンの密度。ピンクと水色の線は、それぞれ copia と gypsy を表す。
- 反復配列の密度。
- パラログが集まったシンテニー領域の位置関係。各配列の密度は、1 Mb 当たりのコピー数で計算している。

る。

解読したゲノム配列には、以下 5 つの特徴がある。

- (1) 一つ一つ DNA 配列が長い。全体の半分にあたる 375 Mb は、2.88 Mb より長い配列である。この値 (N50 = 2.88 Mb) は、解読時に公表されていた動植物のゲノム配列の中ではトップクラスである。
- (2) 古典連鎖地図と一致する。1956 年に作成された古典連鎖地図は 10 の連鎖群に 146 遺伝子座がマップされている(Hagiwara 1956)。そのうち対応する遺伝子がクローニングされている配列を目印として、疑似染色体の配列に染色体番号を割り当て、南北の方向を合わせた(表 1)。ただし、古典連鎖地図に染色体数より少ない連鎖群しかないことなどから、一致しない部分も残されている。
- (3) 我々の推定遺伝子の ID には染色体番号が付加されている。ID は INIL のあとに、染色体番号と「g」が続く、染色体の端から順に割り振った 5 桁の数字でおわる。例えば、INIL12g08537 は、染色体 12 の 8537 番目の遺伝子である。なお、疑似染色体にない遺伝子は、染色体番号を「00」としている。
- (4) テロメア、セントロメア、rDNA といった高度反復配列も一部が解読されている。
- (5) *TpnI* ファミリーのトランスポゾンが 339 コピー推定されている。

ところで我々はアノテーションのツールとして AUGUSTUS を利用して推定した 42,783 の遺伝子を論文 (Hoshino et al. 2016a) に公表したが、NCBI も Gnomon を利用して 35,151 の遺伝子を推定している。NCBI や後述する KEGG のデータベースは後者だけを登録しているため、論文の推定遺伝子とは相違がある。この相違の一部を比較したところ、NCBI の方が正しく推定されている場合が多くみつかった。我々の推定では、1 つの遺伝子を 2 つの遺伝子として推定したケースが散見された。逆に NCBI の推定でも、本来 2 つの遺伝子を 1 つの遺伝子としているケースがみつまっている。どちらの推定遺伝子を利用する場合にも注意が必要である。なお、NCBI はタンパク質をコードする遺伝子のほかにも、11,254 のノンコーディング遺伝子、1,272 の偽遺伝子なども推定しており、以下のサイトで詳細が公表されている。

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/Ipomoea_nil/100/

染色体	古典連鎖地図	同定済みの遺伝子(変異)
1	1	捻梅
2	2	獅子、丸葉
3	3(北)	柿、黄葉、立田
4	4	南天、暗紅、枝垂(新)
5	5	a3白、渦、節間緑、白種(1)、淡色(不明)
6	6	牡丹
7	7	桔梗渦(不明)
8	8	
9	9	笹、木立
10	10	偽柿、紫(5)
11	3(南)	c1白、吹掛紋
12		r1白(3)
13		r3白(不明)
14		吹詰(新)
15		枝垂2(新)

表 1. 染色体と古典連鎖地図の関係

古典連鎖地図の第 3 連鎖群は、2 つの染色体を誤って 1 つにまとめていたと考えられる。その北側を 3 番、南側を 11 番の染色体に割り当てた。遺伝子名の右側の括弧内は、古典連鎖地図上の連鎖群。最新のデータから、第 14 染色体が古典連鎖地図の第 7 連鎖群に相当する可能性が指摘されている。遺伝子の後ろの括弧内は古典連鎖地図の連鎖群で、染色体番号と食い違う場合に記載。(不明)は古典地図の連鎖群が不明なもの、(新)は古典地図作成以降に見つかった変異を示している。

7. ゲノム関連のデータベースとツール

アサガオのゲノム情報を利用できる、おもなデータベースとツールを章末にまとめた。いずれも、ライフサイエンス関連のデータベースに馴染みのある方であれば、直感的に利用することができる。各データベースやツールは、その用途や特徴を考慮した上での使い分けが必要である。NBRP で整備しているデータベース(下のリストの 1)は、DNA クローンや系統などのバイオリソースにアクセスしやすいように構築しており、疑似染色体を含む Asagao_1.2 のゲノム配列を参照できる唯一のデータベースである。NCBI のデータベース(リスト 3)は、すでに利用されている方が大多数だと思うが、ほかの植物の DNA やアミノ酸配列だけでなく、文献などの膨大な情報が利用可能である。また、プライマー検索ツール、Primer-BLAST(リスト5)を使えば特異性を考慮した上で、アサガオの DNA 断片を増幅できるプライマーの設計が可能だ。ほかの有用なデータベースとしては、代謝経路のマッピングなどを利用できる KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)が挙げられる(リスト 4)。例えば、ある植物ホルモンに興味があるという方は、その植物ホルモンの生合成に関わるアサガオの遺伝子を代謝経路のマッピング上から探すことができる。日本のライフサイエンス統合データベースセンター(DBCLS)も、ウェットな実験に有用なツールを提供している(リスト 6 と 7)。

(1) NBRP・ゲノム情報データベース

<http://viewer.shigen.info/asagao/>

2 つのゲノム配列(Asagao_1.1, Asagao_1.2)と、2 種類の推定遺伝子(AUGUSTUS, Gnomon)を搭載。ゲノムブラウザー、BLAST と BLAT による検索、系統情報データベースとの相互リンク、RNA-seq を元にした発現情報が備わっており、遺伝子名からの配列検索や、DNA 配列の切り出しなども可能。

(2) NBRP・旧ゲノム情報データベース

<http://ipomoeanil.nibb.ac.jp/>

Asagao_1.1 を参照可能で、BLAST による EST や BAC クローンの検索に便利。

(3) NCBI・アサガオ関連データベース

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=35883>

Asagao_1.1, NCBI の推定遺伝子(Gnomon)を参照可能。NCBI の各種データベースや検索ツールと連携しており、生物種横断的な検索などに便利。ただし、ゲノムブラウザー機能は動作が遅いので、(1)の NBRP のゲノムブラウザーを利用いただきたい。

(4) KEGG・アサガオ関連データベース

https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=ini

Asagao_1.1, NCBI の推定遺伝子を参照可能。代謝経路のマッピングなどを利用できる。

(5) NCBI・Primer-BLAST

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

プライマー検索ツール。生物種(Organism)に「*Ipomoea nil*」を入力して使用する。

(6) DBCLS・CRISPRdirect

<http://crispr.dbcls.jp/>

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集のためのガイド RNA を設計するツール。Specificity check で「Japanese morning glory (*Ipomoea nil*) Tokyo Kokei Standard (TKS) genome (Sep, 2016)」を選択して使用。

(7) DBCLS・GGGenome

<http://gggenome.dbcls.jp/asagao/>

BLAST が苦手とする短い塩基配列の類似性検索を“超高速”で行えるツール。アサガオ以外の生物種にも対応。

7. おわりに

アサガオは日本を代表する園芸植物としてだけでなく、モデル植物としても 100 年以上の長きにわたり、遺伝学や生理学分野の研究材料として利用されてきた。第二次世界大戦による研究や系統維持の中断を境にして、変異系統も散逸し、研究者も減少していた。しかし、NBRP を契機として変異系統や遺伝子情報の整備が進み、特に遅れていたゲノム解読に関しても高等植物の中でも最高レベルの高精度な配列が得られている。ゲノム配列とリソースの情報がリンクしたデータベースも整備が進んでおり、ゲノム編集も可能になるなど新規参入がしやすい環境が整ってきた。これらの情報やアサガオリソースの特性を利用した研究がさらに増えてくることを願ってやまない。

8. 参考文献

- Austin D.F., Kitajima K., Yoneda Y., & Qian L.F. 2001. A putative tropical American plant, *Ipomoea nil* (convolvulaceae), in pre-Columbian Japanese art. *Econ. Bot.* 55: 515-527.
- Azuma M., Morimoto R., Hirose M., Morita Y., Hoshino A., Iida S., Oshima Y., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., & Shiratake K. 2016. A petal-specific *InMYB1* promoter from Japanese morning glory: a useful tool for molecular breeding of floricultural crops. *Plant Biotechnol. J.* 14: 354-363.
- Azuma M., Oshima Y., Sakamoto S., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Otagaki S., Matsumoto S., & Shiratake K. 2018. Dissecting promoter of *InMYB1* gene showing petal-specific expression. *Plant Biotech.* 35: 243-248.
- Fukada-Tanaka S., Inagaki Y., Yamaguchi T., Saito N., & Iida S. 2000. Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* 407: 581.
- Hagiwara T. 1956. Genes and chromosome maps in the Japanese morning glor. *Bull. Res. Coll. Agric. Vet. Sci. Nihon Univ.* 5: 34-56.
- Hayama R., Agashe B., Luley E., King R., & Coupland G. 2007. A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. *Plant Cell* 19: 2988-3000.
- Hoshino A., Jayakumar V., Nitasaka E., Toyoda A., Noguchi H., Itoh T., Shin I.T., Minakuchi Y., Koda Y., Nagano A.J., Yasugi M., Honjo M.N., Kudoh H., Seki M., Kamiya A., Shiraki T., Carninci P., Asamizu E., Nishide H., Tanaka S., Park K.I., Morita Y., Yokoyama K., Uchiyama I., Tanaka Y., Tabata S., Shinozaki K., Hayashizaki Y., Kohara Y., Suzuki Y., Sugano S., Fujiyama A., Iida S., & Sakakibara Y. 2016a. Genome sequence and analysis of the Japanese morning glory *Ipomoea nil*. *Nat. Commun.* 7: 13295.
- Hoshino A., Mizuno T., Shimizu K., Mori S., Fukada-Tanaka S., Furukawa K., Ishiguro K., Tanaka Y., & Iida S. 2019. Generation of yellow flowers of the Japanese morning glory by engineering its flavonoid biosynthetic pathway toward aurones. *Plant Cell Physiol.*: (in press).
- Hoshino A., Yoneda Y., & Kuboyama T. 2016b. A *Stowaway* transposon disrupts the *InWDR1* gene controlling flower and seed coloration in a medicinal cultivar of the Japanese morning glory. *Genes Genet. Syst.* 91: 37-40.

- Imai Y. 1938. Genetic literature of the Japanese morning glory. *Jpn. J. Genet.* 14: 91-96.
- Imamura S. 1953. Photoperiodic initiation of flower primordia in Japanese morning glory, *Pharbitis nil* Chois. *Proc. Jap. Acad.* 29: 368-373.
- Inagaki Y., Hisatomi Y., Suzuki T., Kasahara K., & Iida S. 1994. Isolation of a *Suppressor-mutator/Enhancer*-like transposable element, *Tpn1*, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Plant Cell* 6: 375-383.
- Iwasaki M., & Nitasaka E. 2006. The *FEATHERED* gene is required for polarity establishment in lateral organs especially flowers of the Japanese morning glory (*Ipomoea nil*). *Plant Mol. Biol.* 62: 913-925.
- Kawasaki S., & Nitasaka E. 2004. Characterization of *Tpn1* family in the Japanese morning glory: *En/Spm*-related transposable elements capturing host genes. *Plant Cell Physiol.* 45: 933-944.
- 木原均. 1934. 朝顔の「雀斑」品種の遺傳研究. 植物及動物 (2): 1801-1814.
- Kitazawa D., Hatakeda Y., Kamada M., Fujii N., Miyazawa Y., Hoshino A., Iida S., Fukaki H., Morita M.T., Tasaka M., Suge H., & Takahashi H. 2005. Shoot circumnutation and winding movements require gravisensing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 18742-18747.
- Lu T.S., Saito N., Yokoi M., Shigihara A., & Honda T. 1991. An acylated peonidin glycoside in the violet-blue flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry* 30: 2387-2390.
- Morita Y., & Hoshino A. 2018. Recent advances in flower color variation and patterning of Japanese morning glory and petunia. *Breed. Sci.* 68: 128-138.
- Morita Y., Saitoh M., Hoshino A., Nitasaka E., & Iida S. 2006. Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of *c* and *ca* mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol.* 47: 457-470.
- Morita Y., Takagi K., Fukuchi-Mizutani M., Ishiguro K., Tanaka Y., Nitasaka E., Nakayama M., Saito N., Kagami T., Hoshino A., & Iida S. 2014. A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation. *Plant J.* 78: 294-304.
- Shibuya K., Shimizu K., Niki T., & Ichimura K. 2014. Identification of a NAC transcription factor, *EPHEMERAL1*, that controls petal senescence in Japanese morning glory. *Plant J.* 79: 1044-1051.
- Shibuya K., Watanabe K., & Ono M. 2018. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *EPHEMERAL1* locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory. *Plant Physiol. Biochem.* 131: 53-57.
- 竹崎嘉徳. 1916. 朝顔の遺傳. 日本育種学会会報 (1): 12-13.
- 外山亀太郎. 1916. 一二の MENDEL 性質に就て. 日本育種学会会報 (1): 1-9.
- Watanabe K., Kobayashi A., Endo M., Sage-Ono K., Toki S., & Ono M. 2017. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *dihydroflavonol-4-reductase-B* (*DFR-B*) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*. *Sci. Rep.* 7: 10028.
- Yamaguchi T., Fukada-Tanaka S., Inagaki Y., Saito N., Yonekura-Sakakibara K., Tanaka Y., Kusumi T., & Iida S. 2001. Genes encoding the vacuolar Na^+/H^+ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol.* 42: 451-461.
- Yasui K. 1928. Studies on *Pharbitis Nil*, CHOIS. II Chromosome number. *Bot. Mag. Tokyo* 42: 480-485.

マメ科植物研究のためのミヤコグサバイオリソース

橋口正嗣¹, 佐藤修正², 橋口拓勇¹, 田中秀典¹, 明石 良¹

¹宮崎大学農学部

〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

²東北大学大学院生命科学研究科

〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

Masatsugu Hashiguchi¹, Shusei Sato², Takuyu Hashiguchi¹, Hidenori Tanaka¹
and Ryo Akashi¹

Development of *Lotus japonicus* bioresources for legume plant research

Keywords: Bioresource, legume, LegumeBase, *Lotus japonicus*, NBRP

¹Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan

²Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8577, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c9.00169

1. はじめに

マメ科植物は、730 属 20,000 以上の種からなる多様な分類群の 1 つであり (Doyle & Luckow 2003), 生物窒素固定の大部分を担い、ダイズ (*Glycine max*), エンドウ (*Pisum sativum*), アズキ (*Vigna angularis*) など主要な作物を多く含んでいる。マメ科植物の一つであるミヤコグサ属 (*Lotus* spp.) は地中海を原産として 200 以上の種から構成され、牧草や観賞用の他、薬用植物としても利用される種が存在する。ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は、日本、韓国、中国を含む東アジアと中央アジアに分布し、西はアフガニスタンまで広く分布しており (Pajuelo & Stougaard 2005), ゲノムサイズが小さい (442 Mb) (Ito et al. 2000) こと、世代期間が 3~4 ヶ月と短く種子生産が多いこと、植物サイズが小さいこと、人工受粉が容易であること、更に、アグロバクテリウムによる形質転換が可能であることからマメ科植物における最初のモデル植物として提唱された (Handberg & Stougaard 1992)。この Handberg & Stougaard (1992) の報告以降、日本とデンマークを中心とする研究グループによりマメ科の最大の特徴である共生窒素固定に関する研究が躍進してきた。さらに、Sato ら (2008) は、ミヤコグサの実験系統である Miyakojima MG-20 を用いてマメ科植物で初となる全ゲノム配列の決定を報告したことから、ミヤコグサのモデルマメ科植物としての地位は確固たるものとなった。

このような研究背景の中で、ミヤコグサの実験生物としての重要性が高まり、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ミヤコグサ・ダイズが開始された。ミヤコグサ・ダイズ課題は、2002 年の NBRP 発足の翌年 2003 年の下半期に採択・開始された課題であり、第 4 期となった現在は宮崎大学を代表機関、東北大学を分担機関として「基盤情報の再構築と拡充」をテーマに事業を進めている。本総説では、NBRP ミヤコグサ・ダイズのデータベー

ス LegumeBase (<https://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/>) で整備しているミヤコグサリソース (表) の概要について紹介する。

表. LegumeBase で保存中のミヤコグサリソース

リソースの種類	保存数	寄託元
ミヤコグサ植物リソース		
野生系統 (※一部)	208	ミヤコグサ研究者コミュニティ・NBRP
実験系統 (B-129, MG-20, B-303)	3	川口氏, Grant 氏
RI 系統(Gifu B-129×Miyakojima MG-20)	205	かずさ DNA 研究所
RI 系統(Gifu B-129× <i>L. burttii</i> B-303) ※	163	オーフス大学
RI 系統(<i>L. filicaulis</i> B-37×Gifu B-129) ※	100	オーフス大学
EMS 突然変異体	170	理化学研究所
アクティベーションタグライン※	960	日本大学
SR 根培養系	1	宮崎大学
EMS M2 バルク種子	162	NBRP
LORE1 タグライン (※一部)	975	農業生物資源研究所
合計	1,000	オーフス大学
合計	3,947	
ミヤコグサ根粒菌リソース		
野生種および実験系統	17	奈良女子大学
STM 変異株	6,671	かずさ DNA 研究所
内生菌プラスミドクローン※	3,072	京都産業大学
根粒菌プラスミドクローン	11,520	かずさ DNA 研究所
合計	21,280	
ミヤコグサ DNA リソース		
TAC クローン	72,192	かずさ DNA 研究所
BAC クローン (Miyakojima MG-20 由来)	14,976	かずさ DNA 研究所
cDNA クローン	140,544	かずさ DNA 研究所
BAC クローン (Gifu B-129 由来) ※	32,000	オーフス大学
形質転換ベクター	6	林 氏
完全長 cDNA クローン	104,064	かずさ DNA 研究所
合計	363,782	
総計	389,009	

※：配布準備中

詳細は LegumeBase (<https://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/>) を参照されたい。

2. 植物リソース

2-1. 実験系統

ミヤコグサの 2 つの重要な系統である Gifu B-129 (図 1a) および Miyakojima MG-20 (図 1b) は、本草種の実験 (標準) 系統として広く利用されている。Gifu B-129 は、Handberg & Stougaard (1992) により最初に確立された実験系統であり、岐阜県で平吉功氏により収集され、William Grant 氏によりアクセッション番号が付与された後、Stougaard らにより 9 回自家受粉され固定された (Stougaard & Beuselinck 1996)。さらに Kawaguchi (2000) は、日本の沖縄県宮古島由来の Miyakojima MG-20 を新たな実験系統として確立した。本株は、Gifu B-129 に比べて世代期間が短く (3

	Gifu B-129	Miyakojima MG-20	<i>L. burttii</i> B-303
ゲノムサイズ	442 Mb (Ito et al. 2000)	472 Mb (Ito et al. 2000)	Almost same as Gifu B-129
世代期間	3-4 カ月	2-3 カ月	2-3 カ月
室内での開花	蛍光灯下で開花が困難	蛍光灯下で開花が容易	蛍光灯下で開花が容易
花色	黄色、ペインが鮮明	黄色 (Gifu より若干薄い)、ペインが薄い	薄黄色～ピンク。成熟につれてピンク色が増す
種皮色	褐色	黒褐色	薄緑褐色
アントシアニン	茎と花柄に蓄積	蓄積無し	茎と花柄に少量蓄積
トライコーム	多い (頸周辺が顕著)	非常に少ない	少ない
その他	基部が木化する 		耐裂葉性が高い・葉が細い 

図 1. 3 種のミヤコグサ実験系統の特性と写真の比較

a : Gifu B-129 系統, b : Miyakojima MG-20 系統, c : *Lotus burttii* B-303 系統。

ヶ月程度) 蛍光灯などの弱い光の下でも容易に開花することが大きな特徴であり, 2008 年に発表されたミヤコグサのゲノム解析に用いられた (Sato et al. 2008)。3 番目の実験系統である *Lotus burtii* B-303 (図 1c) は, Burt によってパキスタンで収集され (Sz.-Borso et al. 1972), W. F. Grant によりアクセッション番号が付与された後, Kawaguchi (2005) によって 9 回自家受粉された。本系統は, Miyakojima MG-20 と同様に室内環境で開花が容易で, 高い耐裂莢性を有している。これらの実験系統を交配した組換え自殖系統 (後述) の開発も進んでいる。

2-2. 野生系統

ミヤコグサ野生種は様々な環境への適応能力が高いことから, 大きな遺伝的および形態的変異を有している。LegumeBase では, 北は北海道の礼文島から南は沖縄県の宮古島までの広い地域に由来する野生系統を保存している (図 2)。これらの系統は日本大学の青木らが 1998 年に一元化しアクセッション番号を付与した系統群と, 本プロジェクトの推進により収集された系統群の 2 つがある。また前者には, マメ科牧草としての有用性を評価することを目的として帯広畜産大学の嶋田 (板谷, 1982) および農水省ジーンバンク事業により収集された系統 (杉信ら 1988), さらに, モデル植物としての再評価に伴い 1996 年以降に青木および川口 (現, 基礎生物学研究所) らにより収集された系統が含まれている。現在, LegumeBase には 200 を超える野生系統が保存されており, 108 系統が分譲可能である (表)。我々は, これらのミヤコグサ野生型における 9 つの形態学的特性を調査し, それらの情報をデータベース (LegumeBase -*Lotus japonicus*-: <https://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/lotus/>) に公開している。本データベースでは, 採種地の地点・気象情報の他に, 宮崎県宮崎市 (北緯 31 度, 東経 131 度) および北海道札幌市 (北緯 43 度, 東経 141 度) で評価した形質データから系統の検索が可能である。



図 2. 日本に自生する 3 種のミヤコグサ属野生種の生息地と保存系統の草型と種子
a: 宮崎県日南海岸に生息するミヤコグサ。b, e, f, j: 長崎県平戸市 (b), 対馬諸島の岬の断崖 (e) と石灰岩 (j), 小値賀島 (f) に自生するミヤコグサ。i: 沖縄県波照間島の海岸に自生するシロバナミヤコグサ。c, d: 愛媛県由来の MG-74 直立型で種子が小さい g, h: 北海道由来の MG-34, ほふく型。k, l: 青森県由来の MG-23, 矮性型。Hashiguchi & Akashi (2014) を改変。

2-3. 組換え自殖系統

組換え自殖系統 (RILs : Recombinant inbred lines) は, 純系同士の F_2 を自殖させ遺伝子型の固定を行うことにより, 純系統間のマッピング集団を恒久的に維持できる実験材料である。また, RILs における形質変異の遺伝解析では, 系統による形質評価と反復実験が可能であるため, データの精度を高めることができる。ミヤコグサでは, Miyakojima MG-20 と Gifu B-129 の交雑から 205 系統の RIL が確立された。Gondo ら (2007) はこれらの RIL を利用して, 13 の表現型形質の量的形質遺伝子座 (QTL) 分析を行った。この報告で評価された表現型データは, LegumeBase で閲覧可能である。また, Tominaga ら (2012) は, 窒素固定に関する遺伝子の QTL 解析も報告している。これらの RIL の 187 個体はリシーケンスによって遺伝子型が決定され, さらに, 1,929 個の recombination breakpoints (組換え切断点) を有する高解像度遺伝子地図が構築された (Shah et al. 2016)。

2-4. EMS 変異体と M2 バルク種子

ミヤコグサにおけるメタンスルホン酸エチル (EMS) 処理変異株は, Miyakojima MG-20 を背景に理研植物科学研究センターで作出された。突然変異体には, 地上部形態突然変異体 (小植物体, 葉, 茎, 花など) および地下部 (根) 形態学的突然変異体 (根の伸長, 根の太さ, 根の毛の長さおよび根毛の数など) の 2 種類があり, 現在, 98 系統のホモ接合変異体が入手可能である (図 3)。Suzuki ら (2011) は, 変異株 01-0017 (図 3 f) と 01-1428 を用いて, 根粒形成はジャスモン酸シグナリングを通して赤/遠赤の比率を感知することによって光形態形成的に制御されることを報告した。また同じく, Miyakojima MG-20 の EMS 処理バルク M2 種子も整備している (図 3, 表)。各セットは, 0.4%EMS 溶液で 8 から 10 時間処理された 1,000 から 2,000 個体の M1 植物に由来する 5,000 から 9,000 粒の M2 バルク種子である。利用者は, 自身で目的とする突然変異体をスクリーニングすることができる。本リソースを利用して単離された変異体は, 自身の研究論文発表後に LegumeBase に寄託することが MTA に定められている。Nishida ら (2018) は, 本 M2 バルク種子から変異体 *nrsym1* を単離し, *NRSYMI* 遺伝子は高濃度硝酸に応答した根粒着生の抑制を制御する因子であることを明らかにした。

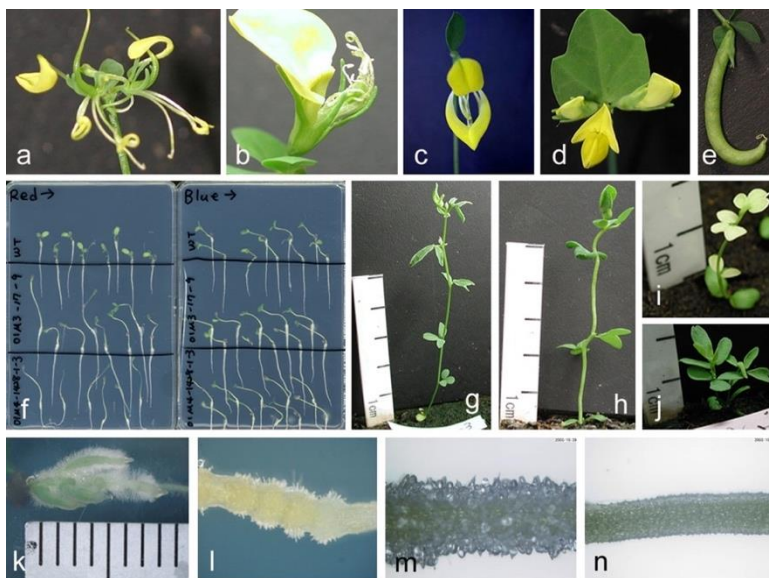


図 3. ミヤコグサ Miyakojima MG-20 に由来する EMS 処理突然変異体
a, k: (212-003) 花の形態異常 (a) と多くの短い根 (k)。b, e, h: (212-103) 花の形態異常 (b), 曲がった莢 (e), 捻れた茎 (h)。c: (01-0210) 花の形態異常。d: (212-596) 結合した包葉。f: (01-0017) 赤色光照射による長い胚軸および不完全な胚軸伸長。g: (207-008) 細い葉。i: (206-105) 白い葉。j: (01-0196) 矮性。l: (207-034a) 異常な根の形と短い根毛。m: (01-0348) 膨潤した根毛。n: (01-1066) 短い根毛。これらの変異株は理化学研究所の酒井氏 (現, 新潟大学) によって開発された。説明中の括弧内の数字は変異体の系統番号を示す。Hashiguchi & Akashi (2014) を改変。

2-5. 根培養系（セイヨウミヤコグサ由来スーパールート）

スーパールート（SR）（図 4）は、セイヨウミヤコグサ（*Lotus corniculatus*）から単離された植物ホルモン非存在下で無限的に伸長可能な培養根であり、発見から約 20 年を経過した現在でもその特性を維持している（Akashi et al. 1998）。培養根は光を当てることで根から直接的に体細胞不定胚を形成し植物体へと再生可能である。また、SR は根のクローニング、植物体再分化（Akashi et al. 1998）、プロトプラスト培養（Akashi et al. 2000）、および *Agrobacterium* 法による形質転換（Tanaka et al. 2008, Jian et al. 2009）が可能などの特徴から、植物ホルモンに關与する形質発現や根粒形成に關する根の生理学的研究の他、形質転換系による遺伝子の機能解析（Himuro et al. 2010）等に有用な材料である。

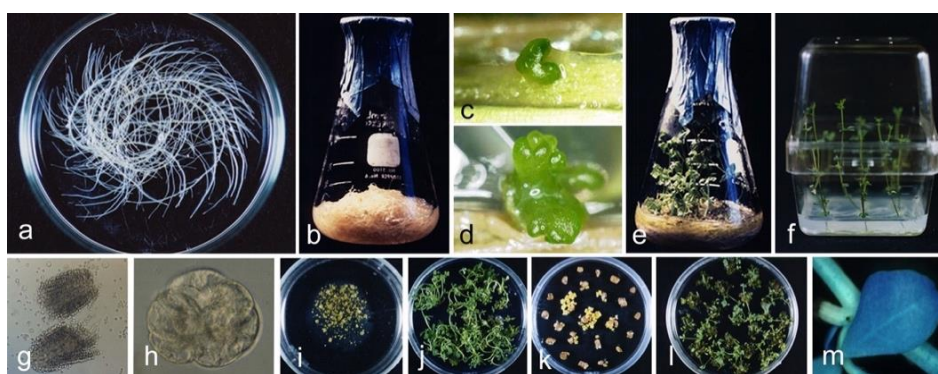


図 4. セイヨウミヤコグサ(*Lotus corniculatus*) 由来スーパールート (SR)

a: 継代培養 28 日目の 10 本の側根に由来する根培養物(φ9 cm シャーレに移したもの)。b: 継代培養 28 日目(側根約 30 本)の SR 培養。c, d: 明条件に設置後、培養根から再分化した体細胞胚。e: 明条件に設置後の根から再生したシュート。f: 再分化植物体。g: 酵素処理 2 時間後に分解された根端とプロトプラスト。h: プロトプラストからの微小カルス。i: 寒天ディスク中で増殖したカルス(φ6 cm シャーレ 4 週間目)。j: プロトプラスト由来カルスからのシュート形成と伸長(φ9 cm シャーレ)。k: 100 mg/L カナマイシンを含む MS 培地上の耐性カルス。l: 培養 8 週間後の葉外植片由来のシュート。m: 再分化植物体の葉における GUS 活性。(Akashi et al. 1998, 2003 および Tanaka et al. 2008 から抜粋・改変)

2-6. LORE1 タグライン

ミヤコグサの突然変異体の解析の過程で、ミヤコグサの内在性のレトロトランスポゾンである *LORE1* の 1 つがカルス化から植物体再分化の過程で活性化することが見出された。その後の詳細解析の結果、*LORE1* の転移は生殖細胞形成過程で起こるため、活性化個体から収集した種子はそれぞれ独立の新規挿入をもつこと、挿入部位は遺伝子領域の頻度が高いことが確認された（Madsen et al., 2005）。この性質を利用することにより、大規模な挿入タグラインの構築が日本とデンマークとの共同で行われ、合わせて 10 万系統を超えるタグラインが作製された（Fukai et al. 2012, Urabański et al. 2012）。作製されたタグラインの *LORE1* 挿入部位の情報について、サンプルのバルク化と新型シーケンサーを用いた大規模解析で同定し、ミヤコグサのゲノムデータベースである *miyakogusa.jp* (<https://www.kazusa.or.jp/lotus/>) および *LotusBase* (<https://lotus.au.dk/>) で検索可能になっている。日本で作製された系統については種子増殖ができた系統から順次 NBRP リソースとして提供されており、デンマークで作製された系統については *LotusBase* を通して入手することができる（Hashiguchi et al. 2018）。

3. DNA リソース

3-1. cDNA, TAC および BAC クローン

Sato ら (2008) は Miyakojima MG-20 を用いてミヤコグサの全ゲノム配列を決定した。Transformation-competent artificial chromosome (TAC) (Asamizu et al. 2003, Kaneko et al. 2003, Kato et al. 2003, Sato et al. 2001), Bacterial Artificial Chromosome (BAC) (Sato et al. 2007, 2008) および cDNA ライブラリー (Asamizu et al. 2000, 2004) はミヤコグサゲノムプロジェクトで開発され, その情報はかずさ DNA 研究所のデータベースサイト miyakogusa.jp や *Lotus japonicus* EST Index (<http://est.kazusa.or.jp/en/plant/lotus/EST/index.html>) で利用可能である。これらの DNA クローンは LegumeBase に寄託され公開されている (表)。

3-2. 完全長 cDNA

完全長 cDNA は遺伝子またはタンパク質の機能解析に有用な情報であり, シロイヌナズナ (Seki et al. 1998), イネ (Kikuchi et al. 2003), コムギ (Ogihara et al. 2004), ダイズ (Umezawa et al. 2008), トウモロコシ (*Zea mays*; Soderlund et al. 2009), トマト (Aoki et al. 2010) およびオオムギ (Matsumoto et al. 2011) などの主要な植物で整備されている。ミヤコグサの完全長 cDNA は, かずさ DNA 研究所で開発され, LegumeBase に寄託されている (表)。多様な処理条件の下で培養されたミヤコグサの培養細胞や, 地上部および根から誘導された完全長濃縮 cDNA ライブラリーからの 3,874 の全長配列を含む, 約 100,000 のミヤコグサ cDNA クローンを保存している。

3-3. 形質転換ベクター

本ベクターは, CAMBIA 社のベクター pCAMBIA1300 を骨格にプロモーター領域をミヤコグサ由来の polyubiquitin 1 (*Ljubq1*) プロモーターに改良し, ミヤコグサ専用の形質転換ベクターとして開発されたものである (Maekawa et al. 2008)。ミヤコグサ由来のプロモーターを使用しているため, ミヤコグサの葉, 茎, 根, 根粒および花粉において CaMV 35 S プロモーターよりも高い活性を有することが報告されている。さらに, *Ljubq1* プロモーター制御下に GATEWAY システムを組み込んでいるため目的遺伝子の挿入が容易であり, 強発現や RNA 干渉などに利用可能である。LegumeBase では, ミュンヘン大学 (現, 理化学研究所) の林誠氏が寄託した 6 種類のベクターを公開している (表)。

3-4. ミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) プラスミドクローン

LegumeBase では, 4,196 の *Mesorhizobium loti* プラスミドクローンが保存されている。かずさ DNA 研究所から寄託された本クローンは, ミヤコグサ根粒菌のゲノムプロジェクトで使用されたクローンを含んでおり, ミヤコグサ根粒菌のゲノム DNA の扱いやすいサイズを pUC プラスミドにクローニングしたものである (Kaneko et al. 2000)。これらの DNA クローン情報は, 根粒菌ゲノム情報に関するデータベースである RhizoBase のゲノムブラウザ (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>) で確認することが出来る。このゲノムブラウザでは, 目的の DNA クローンを選択し, そのクローンの DNA 配列を他の遺伝子座やドメインと比較することが可能である。

4. 根粒菌リソース

4-1. *Mesorhizobium loti* STM 変異株

ミヤコグサ根粒菌 (*M. loti*) の突然変異体ライブラリーは、かずさ DNA 研究所から寄託されたものであり、ミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株のゲノム上にトランスポゾン挿入し作製した変異株集団である。変異の導入には Signature-Tagged Mutagenesis (STM) を用い、21 bp のタグ配列で標識した Tn5-mini transposon (27 種類) を挿入したミュータントライブラリーが構築された (Shimoda et al. 2008)。現在、6,671 個の *M. loti* STM 変異株が LegumeBase から入手可能である (表)。オペロン構造、予測タンパク質ドメイン、オルソログタンパク質グループなどの *M. loti* ORF に関する詳細な情報は、データベース RhizoBase (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>) で確認可能である。

5. 遺伝子情報 (データベース)

ミヤコグサのゲノム情報はかずさ DNA 研究所のデータベースである miyakogusa.jp (<https://www.kazusa.or.jp/lotus/>) とデンマーク、オーフス大が整備している LotusBase (<https://lotus.au.dk/>) で公開されている。どちらのデータベースも基本的な情報は共通のものを提供しているが、miyakogusa.jp は個別遺伝子の詳細情報を入手しやすい構造になっており、LotusBase はゲノム構造の情報が把握しやすいゲノムブラウザの機能が充実しているため使用目的により使い分けると良い。また、NBRP のゲノム情報整備プロジェクト等で整備したミヤコグサ野生系統の SNPs 情報は統合データベースプロジェクトで整備された Plant Genome DataBase Japan (<http://pgdbj.jp/index.html?ln=ja>) から入手可能であり、これらの SNP 情報を基にゲノムワイド関連解析を行うことができるウェブサイトが LotusBase から提供される計画である。

7. まとめ

NBRP ミヤコグサ・ダイズは、マメ科植物研究のための貴重な資源を収集・保存し、良質な実験材料と情報を提供することを目的としている。また、我々のリソースを利用する際は、ユーザーは生物遺伝資源提供同意書 (MTA ; Material Transfer Agreement) に署名し、提供されたリソースを用いた研究成果には本リソースセンターから提供されたことを明記することが定められている。さらに、ミヤコグサ・ダイズ課題における提供手数料の徴収は 2010 年 4 月から開始したが、利用者は、オンラインショッピング形式でクレジットカードまたは銀行振込 (国内のみ) によって支払うことができる。なお、いくつかのリソースは研究者から寄託されたもので、寄託者によって規定された利用条件が定められたリソースも含まれていることをご了承願いたい。

これまで、実験株、突然変異体や DNA ライブラリーのような多量の重要な研究材料 (バイオリソース) が独立した研究資金により開発されてきたが、多くのバイオリソースはそれぞれの研究者が保有し散在している。これらのバイオリソースは、基礎研究や応用研究のための貴重な材料として今後も重要である一方で、開発者 (研究者) はこれらのリソースを自身で維持または分譲するために多くの時間と労力を費やしているものもある。本プロジェクト

トでは、これらの貴重な研究材料の寄託を受け入れ、一元化して保存、増殖および配布することによりこれらのサポートが可能である。

今後も引き続き良質なバイオリソースの収集・保存（維持）および提供を行い、ミヤコグサ・ダイズバイオリソースを用いた研究分野の発展に貢献したいと考えている。

8. 謝辞

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）のナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）の援助により実施した。LegumeBaseの構築と維持はNBRP情報センター整備プログラムの川本祥子博士をはじめとする国立遺伝学研究所系統情報研究室のスタッフの方々にご協力頂いた。また、プロジェクトの運営についてNBRPミヤコグサ・ダイズ運営委員の皆様が助言を賜った。さらに、ミヤコグサ・ダイズ研究コミュニティの多くの皆様にはリソースの利用や寄託等でご協力を頂いた。ここに記してお礼申し上げる。

9. 引用文献

- Akashi, R., Hoffmann-Tsay, S-S. & Hoffmann, F. 1998. Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theor. Appl. Genet.* 96: 758-764.
- Akashi, R., Harris, S., Hoffmann-Tsay, S-S. & Hoffmann, F. 2000. Plants from protoplasts isolated from a long-term root culture (Super Root) of *Lotus corniculatus*. *J. Plant Physiol.* 157: 215-221.
- Akashi, R., Kawano, T., Hashiguchi, M., Kutsuna, Y., Hoffmann-Tsay, S-S., & Hoffmann, F. 2003. Super roots in *Lotus corniculatus*: A unique tissue culture and regeneration system in a legume species. *Plant and Soil.* 255: 27-33
- Aoki, K., Yano Kentar, Suzuki, A., Kawamura, S., Sakurai, N., Suda K., Kurabayashi, A., Suzuki, T., Tsugane, T., Watanabe, M., Ooga, K., Torii, M., Narita, T. Shin-i, T., Kohara, Y., Yamamoto, N., Takahashi, H., Watanabe, Y., Egusa, M., Kodama, M., Ichinose, Y., Kikuchi, M., Fukushima, S., Okabe, A., Arie, T., Sato, Y., Yazawa, K., Satoh, S., Omura, To., Ezura, H. & Shibata, D. 2010. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC Genomics* 11: 210.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. & Tabata, S. 2000. Generation of 7137 Non-redundant Expressed Sequence Tags from a Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 7: 127-130.
- Asamizu, E., Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T. & Tabata, S. 2003. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. IV. Sequence features and mapping of seventy-three TAC clones which cover the 7.5 mb regions of the genome. *DNA Res.* 10: 115-122.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. & Tabata, S. 2004. Characteristics of the *Lotus japonicus* gene repertoire deduced from large-scale expressed sequence tag (EST) analysis. *Plant Mol. Biol.* 54: 405-514.
- Gondo, T., Sato, S., Okumura, K., Tabata, S., Akashi, R. & Isobe, S. 2007. Quantitative trait locus analysis of multiple agronomic traits in the model legume *Lotus japonicus*. *Genome* 50:627-637

- Doyle, J.J., Luckow, M.A. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131: 900-910.
- Fukai, E., Soyano, T., Umehara, Y., Nakayama, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Sato, S. & Hayashi, M. 2012. Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon *LOREI*. *Plant J.* 69: 720-730.
- Handberg, K. & Stougaard, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2: 487-496.
- Hashiguchi, M., Tanaka, H., Muguerza, M., Akashi, R., Sandal, N.N., Andersen, S. U. & Sato, S. 2018. *Lotus japonicus* genetic, mutant, and germplasm resources. *Current Protocols in Plant Biology*, 3, e20070.
- Hashiguchi, M. & Akashi, R. 2014. The National BioResource Project in Japan. In: Tabata, S. & Stougaard, J. (eds.) *The Lotus japonicus genome*. pp. 245-258. Springer, Berlin.
- Himuro, Y., Tanaka, H., Hashiguchi, M., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Akashi, R. & Hoffmann, F. 2010. FOX-superroots of *Lotus corniculatus*, overexpressing Arabidopsis full-length cDNA, show stable variations in morphological traits. *J. Plant Physiol.* 168: 181-187.
- Ito, M., Miyamoto, J., Mori, Y., Fujimoto, S., Uchiumi, T., Abe, M., Suzuki, A., Tabata, S. & Fukui K. 2000. Genome and chromosome dimensions of *Lotus japonicus*, *J Plant Res.* 113: 435-442.
- 板谷守 1982. ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* var. *japonica* Regel) の種生態学的研究. 帯広畜産大学大学院修士論文.
- Jian, B., Hou, W., Wu, C., Liu, B., Liu, W., Song, S., Bi, Y. & Han, T. 2009. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Superroot-derived *Lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics. *BMC Plant Biol.* 9: 78.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. 2000. Complete Genome Structure of the Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338.
- Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y. & Tabata, S. 2003. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. III. Sequence features and mapping of sixty-two TAC clones which cover the 6.7 Mb regions of the genome. *DNA Res.* 10: 27-33.
- Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. & Tabata, S. 2003. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. V. Sequence features and mapping of sixty-four TAC clones which cover the 6.4 mb regions of the genome. *DNA Res.* 10: 277-285.
- Kawaguchi, M. 2000. *Lotus japonicus* 'Miyakojima' MG-20': An early-flowering accession suitable for indoor handling. *J. Plant Res.* 133: 507-509.
- Kawaguchi, M., Andrea, P.H., Koji, Y., Hayashi, M., Murooka, Y., Saito, K., Nagata, T., Namai, K., Nishida, H., Shibata, D., Sato, S., Tabata, S., Hayashi, M., Harada, K., Sandal, N., Stougaard, J.,

- Bachmair, A. & Grant, F. W. 2005. *Lotus burtii* takes a position of the third corner in the *lotus* molecular genetics triangle. *DNA Res.* 12: 69-77.
- Kikuchi, S. et al (The Rice Full-Length cDNA Consortium) 2003. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from *japonica* rice. *Science* 301: 376-379.
- Madsen, L.H., Fukai, E., Radutoiu, S., Yost, C.K., Sandal, N., Schauser, L. & Stougaard, J. 2005. *LORE1*, an active low-copy-number TY3-gypsy retrotransposon family in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant J.* 44: 372-381.
- Maekawa, T., Kusakabe, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Murooka, Y. & Hayashi, M. 2008. Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant. Microb. Interact.* 21: 375-382.
- Matsumoto, T., Tanaka, T., Sakai, H., Amano, N., Kanamori, H., Kurita, K., Kikuta, A., Kamiya, K., Yamamoto, M., Ikawa, H., Fujii, N., Hori, K., Itoh, T. & Sato, K. 2011. Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiol.* 156: 20-28.
- Nishida, H., Tanaka, S., Handa, Y., Ito, M., Sakamoto, Y., Matsunaga, S., Betsuyaku, S., Miura, K., Soyano, T., Kawaguchi, M. & Suzaki, T. 2018. A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nat Commun.* 9: 499.
- Ogihara, Y., Mochida, K., Kawaura, K., Murai, K., Seki, M., Kamiya, A., Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shin-I, T., Kohara, Y. & Yamazaki, Y. 2004. Construction of a full-length cDNA library from young spikelets of hexaploid wheat and its characterization by large-scale sequencing of expressed sequence tags. *Genes. Genet. Syst.* 79: 227-232.
- Pajuelo, E. & Stougaard, J. 2005. *Lotus japonicus* as a model system. In: Márquez, A.J. (eds.) *Lotus japonicus* Handbook. pp 3-24. Springer, Netherlands.
- Sandal, N., Jin, H., Rodriguez-Navarro, D. N. Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, E. J., Andersen, U. S. & Stougaard, J. (2012) A Set of *Lotus japonicus* Gifu × *Lotus burtii* Recombinant Inbred Lines Facilitates Map-based Cloning and QTL Mapping, *DNA Res.* 19: 317-323.
- Sato, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Asamizu, E., Kato, T. & Tabata, S. 2001. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome. *DNA Res.* 8: 311-318.
- Sato, S., Nakamura, Y., Asamizu, E., Isobe, S. & Tabata, S. 2007. Genome Sequencing and Genome Resources in Model Legumes. *Plant Physiol.* 144: 588-593.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H. & Tabata, S. 2008. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 15: 227-239.
- Seki, M., Carninci, P., Nishiyama, Y., Hayashizaki, Y. & Shinozaki, K. 1998. High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant J.* 15: 707-720.

- Shah, N., Hirakawa, H., Kusakabe, S., Sandal, N., Stougaard, J., Schierup, M.H., Sato, S. & Andersen, U. S. 2016. High-resolution genetic maps of *Lotus japonicus* and *L. burtii* based on re-sequencing of recombinant inbred lines. *DNA Res.* 23: 487–494.
- Shimoda, Y., Mitsui, H., Kamimatsuse, H., Minamisawa, K., Nishiyama, E., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M., Shinpo, S., Watanabe, A., Kohara, M., Yamada, M., Nakamura, Y., Tabata, S. & Sato, S. 2008. Construction of Signature-tagged Mutant Library in *Mesorhizobium loti* as a Powerful Tool for Functional Genomics. *DNA Res.* 15: 297-308.
- Soderlund C, Descour A, Kudrna D, Bomhoff, M., Boyd, L., Currie, J., Angelova, A., Collura, K., Wissotski, M., Ashley, E., Morrow, D., Fernandes, J., Walbot, Vi. & Yu Y, 2009. Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs. *PLoS Genet.* 5: e1000740.
- Stougaard, J. & Beuslink, P.R. 1996. Registration of GIFU B-129-S9 *Lotus japonicus* germplasm. *Crop Sci* 36:476.
- 杉信賢一, 鈴木信治, 小松敏憲. 1988. ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* L. var. *japonicus* Regel) の特性評価. 3. 収集地を異にするミヤコグサの特性比較. 日草誌 34:13-19.
- Suzuki, A., Suriyagoda, L., Shigeyama, T., Tominaga, A., Sasaki, M., Hiratsuka, Y., Yoshinaga, A., Arima, S., Agarie, S., Sakai, T., Inada, S., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Uchiumi, T., Abe, M., Hashiguchi, M., Akashi, R., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S. & Hirsch M. A. 2011. *Lotus japonicus* nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 16837-16842.
- Sz-Borso, O., Somaroo, B.H. & Grant, W.F. 1972. A new diploid species of *Lotus japonicus* (Leguminosae) in Pakistan. *Can. J. Bot.* 50:1865-1870.
- Tanaka, H., Toyama, J., Hashiguchi, M., Kutsuna, Y., Tsuruta, S., Akashi, R. & Hoffmann, F. 2008. Transgenic superroots of *Lotus corniculatus* can be regenerated from superroot-derived leaves following *Agrobacterium*-mediated transformation. *J. Plant Physiol.* 165:1313-1316.
- Tominaga, A., Gondo, T., Akashi, R., Zheng, S., Arima, S. & Suzuki, A. 2012. Quantitative trait locus analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. *J. Plant. Res.* 125: 395–406.
- Umezawa, T., Sakurai, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Seki, M., Ishiwata, A., Akiyama, K., Kurotani, A., Yoshida, T., Mochida, K., Kasuga, M., Todaka, D., Maruyama, K., Nakashima, K., Enju, A., Mizukado, S., Ahmed, S., Yoshiwara, K., Harada, K., Tsubokura, Y., Hayashi, M., Sato, S., Anai, T., Ishimoto, M., Funatsuki, H., Teraishi, M., Osaki, M., Shinano, T., Akashi, R., Sakaki, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. 2008. Sequencing and analysis of approximately 40,000 Soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library. *DNA Res.* 15: 333-346.
- Urbański, D.F., Małolepszy, A., Stougaard, J. & Andersen, U.S. 2012. Genome-wide *LOREI* retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 69: 731–741.

ミヤコグサ国内野生系統が示す開花時期の違いとその遺伝基盤の解明

～全ゲノム関連解析による責任遺伝子の検出～

若林智美^{1,2}, 瀬戸口浩彰^{1,3}

¹ 京都大学大学院人間・環境学研究科

〒606-8501 京都府京都市左京区吉田二本松町

² 奈良女子大学理系女性教育開発共同機構

〒630-8506 奈良県奈良市北魚屋東町

³ 京都大学大学院地球環境学学

〒606-8501 京都府京都市左京区吉田二本松町

Tomomi WAKABAYASHI^{1,2}, Hiroaki SETOGUCHI^{1,3}

Detecting loci contributing to flowering time variation in *Lotus japonicus* by genome-wide association study

Keywords: flowering time, genome-wide association study, *Lotus japonicus*, wild accession

¹ Graduate school of Human and Environmental Studies, Kyoto University

Yoshida Nihonmatsu-cho, Sakyo-ku, Kyoto city, Kyoto 606-8501, Japan

² CORE of STEM, Nara Women's University

Kitauoya Higashi-machi, Nara city, Nara 630-8506, Japan

³ Graduate school of Global Environmental Studies, Kyoto University

Yoshida Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto city, Kyoto 606-8501, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c10.00170

1. 開花時期の種内多型

身の回りの植物に目を向けると、美しい花によって季節を感じることができる。適切な時期に花を咲かせ実を結ぶことは、次の世代の質や量、つまり繁殖成功に関わる重要な要素の1つである (Schemske et al. 1986)。植物の生活環は4つの段階に分けることができるが、特に発芽と開花のタイミングは日長や温度などの外的なシグナルを感じ取って決められている。一度根ざした場所から動くことのできない植物にとって、生育する環境に適した開花時期を測ることは種子生産を左右する大切な鍵となる。開花時期を決める経路のうち、日長や温度に関わる経路は植物が野外環境で開花時期を測る上で特に重要である (Henderson and Dean 2004)。

適切な開花時期は植物種によって異なるが、同種内であってもそれぞれの個体が生育する環境によって異なることが知られている。例えば、同じ種であっても異なる環境に分布するエコタイプ間では、それぞれの環境に適応した結果、開花時期を測る機構に違いが生じている場合がある。このようなエコタイプは、同一条件下で栽培した場合であっても開花時期の違いを観察することができる。

2. ミヤコグサが示す開花時期多型

筆者らが研究対象としているミヤコグサはマメ科の多年草草本で、道端や海岸などの低い草原によく見られ、匍匐性の茎を有し黄色い花をつける。日本国内では沖縄県宮古島から北海道利尻島まで広く分布している。分布の緯度差は20度以上にもなり、様々な日長や温度の環境に自生している。本種は様々な形質の種内多型を有し、開花時期に関してもその広い分布域に伴ってエコタイプ間で違いが見られる。長日植物である本種は自生地での様子を観察すると、沖縄などの南の地域では1月末ごろに咲き始めるのに対し、北海道や東北などの北の地域では7月ごろに開花が始まる。さらに、国内各地から採取された多数の系統を同一条件下で栽培した場合でも、採取地の緯度に沿った開花時期の顕著な違いが見られる(Shah et al. 2018, Wakabayashi et al. unpublished)。図1に示す2個体は、温室内の25℃一定／自然光の同一条件下において発芽から1ヶ月半ほど栽培されたものである。北海道由来の系統では栄養成長を続けているのに対し、宮古島由来の系統は多くの花をつけている様子が観察された。



北海道由来の系統



宮古島由来の系統

図1. 温室内の同一条件下で栽培された2系統のミヤコグサを示す。それぞれ北海道由来の系統と宮古島由来の系統で、播種から1ヶ月半の様子を示す。

上記の条件下において筆者らが計測した127系統の開花時期データと、由来地の緯度との相関係数は約0.67となり、開花時期と由来地の緯度に正の相関関係があることが示された(Wakabayashi et al. unpublished)。分散分析による遺伝率は0.96となり、本種に見られる開花時期多型は遺伝的要因によるものということが示された。これらの結果から、ミヤコグサの種内に維持される開花時期は日長や温度などの緯度に沿った環境要素に関連しており、本種が開花時期を通して各自生地の環境に適応している可能性が考えられる。

3. モデル植物としてのミヤコグサ

塩基配列解読技術の発展により、近年では様々な生物種のゲノム配列が解読されている。また、品種やエコタイプの全ゲノム配列を決定することで、種内に保存されている塩基多型を利用した解析が可能となっている。全ゲノム関連解析では、種内の品種やエコタイプ間で見つかったゲノム網羅的な塩基多型情報を用いて、注目した形質の多型に関わるゲノム領域をゲノム網羅的に探索することができる。この解析では、形質との相関関係から形質に関連の高い遺伝マーカー(一塩基多型など)を検出する(図2)。検出された遺伝マーカーの近傍には、注目している形質に関わる責任遺伝子が存在すると考えられる。近年、植物ではシロイヌナズナやイネ、ダイズなどのモデル植物を用いて、開花時期を含む様々な形質の責任遺伝子の検出がなされている(シロイヌナズナ, Atwell et al. 2010; イネ, Zhao et al. 2011; ダイズ, Zhang et al. 2015

など)。

早咲き	1	A	G	C	T	G	T
	2	T	G	C	T	G	T
	3	T	C	C	C	A	G
	4	A	G	C	T	A	T
	5	T	G	C	T	A	G
遅咲き	6	T	G	A	T	A	G
	7	A	C	A	T	G	G
	8	T	C	A	T	A	T
	9	T	G	A	T	G	T
	10	T	G	A	T	G	G
SNPマーカー		1	2	3	4	5	6

↑
早咲き・遅咲きで分離している。
(形質に関連している。)

各系統の
遺伝子型

図2. 全ゲノム関連解析の概念を示す。例として10系統（早咲き・遅咲き各5系統）における6つの遺伝マーカーと遺伝子型を示す。赤枠で囲われている遺伝マーカーが形質に関連していることを示す。

ミヤコグサはマメ科のモデル植物として、これまで共生研究などの材料とされてきた。ゲノムサイズは0.47 Gbpと小さく、またライフサイクルの短さなどの利点を持ち、マメ科のモデルとして有用な植物である。ゲノム配列の全長が解読されゲノムリファレンスが公開されている (Sato et al. 2008)。National BioResource Project ミヤコグサ・ダイズ中核機関である宮崎大学により実験系統や日本国内で採取された国内野生系統が保存されており、研究に利用することが可能である。さらに136系統の国内野生系統について、全ゲノム配列のリシーケンスが行われており、種内に保存されている一塩基多型 (SNP) 情報を用いて、全ゲノム関連解析を含めたいくつかの解析が行われている (Shah et al. 2018)。筆者らは温室で得られたミヤコグサの開花時期多型に対して、このSNP情報を用いた全ゲノム関連解析を行うことで、ミヤコグサの開花時期多型に関わる責任遺伝子の候補を検出することを試みた。全ゲノム関連解析では、上述のように注目する形質に関連の高いゲノム領域を、ゲノム網羅的に探索することが可能であり、また筆者らは野生集団に保存される塩基多型を用いることで、将来的にはミヤコグサの環境適応に関わる遺伝的要因の解明を目的としている。

4. 全ゲノム関連解析による開花関連遺伝子の検出

筆者らは116系統の国内野生系統を用いて全ゲノム関連解析を行い、開花時期との関連の高いゲノム領域の検出を行なった。解析モデルにはAMM (Kang et al., 2008, Seren et al., 2012) とLFMM (Frichot et al., 2013) の2つを用いて解析の信頼性を高めた。まずそれぞれのモデルによる解析を行い、その結果をもとに2つのモデル間で共通して開花時期に高い関連を示した遺伝マーカーを抽出して候補遺伝子を絞り込んだ。43 SNPsが2つのモデル間で共通して高い関連を示した遺伝マーカーとして検出され、これらの近傍に存在した81遺伝子を候補遺伝子として挙げた (図3)。これらの遺伝子のアミノ酸配列を基に相同性検索を行い機能推定を行ったところ、候補遺伝子には4つの開花時期関連遺伝子の相同遺伝子が含まれており、Enrichment解析の結果、有意に開花時期関連遺伝子の相同遺伝子を検出したことが示された (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。4つの開花時期関連遺伝子の相同遺伝子はそれぞれ *PLD alpha1-like*, *SUMO1-2*, *SUVR2*, *AKT2-3* に相同な遺伝子であった (図3にゲノム上の位置を示す)。これらの遺伝子はいずれも変

異体の開花時期が野生株に比べて異なっていることが、シロイヌナズナなどの他種を用いた先行研究で実験的に示されている (Lu *et al.*, 2013, Murtas *et al.*, 2003, Stroud *et al.*, 2013, Held *et al.*, 2011)。また、遺伝子の変異と開花時期との直接的な関連は明らかになっていないが、推定された機能を考慮すると開花時期制御に関連する可能性のある遺伝子が3つ含まれていた。それぞれ *CAX4*, *ADF7-like*, *Importin-4* 遺伝子の相同遺伝子で、*CAX1* と *ADF7-like* はパラログが開花時期制御に関わっていることが知られている (Cheng *et al.*, 2003, Dong *et al.*, 2001)。また、*Importin-4* については光受容体であるフィトクロムの核輸送に関わることが明らかになっており (Kevei *et al.*, 2007), 日長経路において開花時期決定に関連している可能性も考えられる。

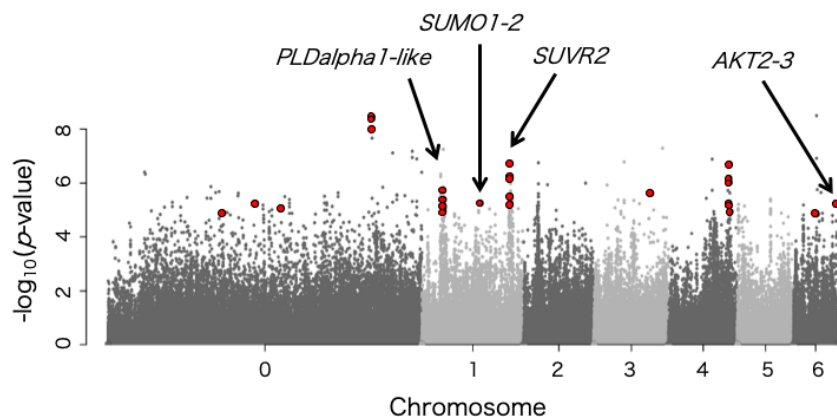


図 3. プロットは各 SNPs の染色体上の位置と開花時期との関連の高さを示す。横軸・縦軸はそれぞれゲノム上の位置と開花時期との関連の高さを示す。赤で示したプロットは2つのモデルで共通して上位に含まれた SNPs を示す。遺伝子名は、検出された SNPs の近傍に位置する遺伝子と相同性が高かった遺伝子を示す。

5. 今後の展望

ミヤコグサはこれまでもモデル植物として利用されてきているため、形質転換やゲノム編集などの実験技術の実績が蓄積されている。上記の解析で得られた候補遺伝子は、あくまでも開花時期と相関関係にある遺伝子である。現在、開花時期決定に関与しているかどうかを形質転換技術やゲノム編集技術を用いて実験的に明らかにすることを計画している。

また、本稿でも紹介したように、本種に見られる開花時期多型は由来地の緯度に沿った連続的な値を示す。このことから複数の要因が開花時期の違いに関わっていることが考えられる。そこで、筆者らは本稿で紹介した以外の条件下においても開花時期データの収集を行っており、これまでに得られている開花時期データと合わせて、複数の形質データを考慮した全ゲノム関連解析を進めている。複数の形質データを考慮することにより、より解析力の高い解析を行うことが可能になる。これにより新たな候補遺伝子を検出することを目指している。

国内野生系統を用いることで、野生集団に維持される遺伝的変異をゲノム網羅的に利用することができるため、本種の開花時期多型を制御する遺伝的要因だけでなく、さらに将来的には開花時期を通じた環境適応機構の解明も可能であると考えられる。こうしたリソースの利用により遺伝学や生理学だけでなく、進化生物学や多様性生物学の研究がさらに発展することを期待する。

6. 謝辞

本稿で紹介した研究内容については、基礎生物学研究所の川口正代司教授、東北大の佐藤修正准教授、Aarhus 大学の Stig U. Andersen 准教授によるご支援に心より感謝いたします。

National BioResource Project ミヤコグサ・ダイズ中核機関におかれましては、多数の国内野生系統のリソースの提供にてご協力いただき御礼申し上げます。また、本稿の執筆の機会を与えてくださったオーガナイザーの皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, et al. 2010. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465:627–631.
- Cheng N, Pittman JK, Barkla BJ, Shigaki T, Hirschi KD. 2003. The *Arabidopsis* *cax1* Mutant Exhibits Impaired Ion Homeostasis, Development, and Hormonal Responses and Reveals Interplay among Vacuolar Transporters. *The Plant cell* 15: 347–364.
- Dong C-H, Xia G-X, Hong Y, Ramachandran S, Kost B, Chua N-H. 2001. ADF Proteins Are Involved in the Control of Flowering and Regulate F-Actin Organization, Cell Expansion, and Organ Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1333–1346.
- Held K, Pascaud F, Eckert C, Gajdanowicz P, Hashimoto K, Corratgé-Faillie C, Offenborn JN, Lacombe B, Dreyer I, Thibaud JB, et al. 2011. Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Research* 21: 1116–1130.
- Henderson IR, Dean C. 2004. Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development* 131:3829–3838.
- Kang, H.M.H., Sul, J.H.J., Zaitlen, N.N. a, et al. 2010. Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42: 348–354.
- Kevei E, Schafer E, Nagy F. 2007. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* 58: 3113–3124.
- Lu S, Bahn SC, Qu G, Qin H, Hong Y, Xu Q, Zhou Y, Hong Y, Wang X. 2013. Increased expression of phospholipase Dα1 in guard cells decreases water loss with improved seed production under drought in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal* 11: 380–389.
- Murtas G, Reeves PH, Fu Y-F, Bancroft I, Dean C, Couplan G. 2003. A Nuclear Protease Required for Flowering-Time Regulation in *Arabidopsis* Reduces the Abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER Conjugates. *the Plant Cell Online* 15: 2308–2319.
- Schemske DW, Willson MF, Melampy MN, et al. 1978. Flowering Ecology of Some Spring Woodland Herbs. *Ecology* 59: 351–366.
- Seren, U., Vilhjálmsson, B.J., Horton, M.W., Meng, D., Forai, P., Huang, Y.S., Long, Q., Segura, V. and Nordborg, M. 2012. GWAPP: A Web Application for Genome-Wide Association Mapping in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 4793–4805.
- Shah N, Wakabayashi T, Kawamura Y, et al. 2018. Extreme genetic signatures of local adaptation during plant colonization. *bioRxiv* 485789.

- Stroud H, Greenberg MVC, Feng S, Bernatavichute Y V., Jacobsen SE. 2013. Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the Arabidopsis methylome. *Cell* 152: 352–364.
- Zhang J, Song Q, Cregan PB, et al. 2015. Genome-wide association study for flowering time, maturity dates and plant height in early maturing soybean (*Glycine max*) germplasm. *BMC Genomics* 16:1–11.
- Zhao K, Tung C-W, Eizenga GC, et al. 2011. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nat Commun* 2:467.

NBRP・コムギ：日本のコムギ遺伝資源センター

那須田周平

京都大学大学院農学研究科 応用生物科学専攻 植物遺伝学分野
〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

Shuhei Nasuda

National BioResource Project (NBRP)-Wheat: the genebank of wheat and its relatives in Japan

Key words: core collection, genetic diversity, landrace, wheat, wild relatives
Laboratory of Plant Genetics, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,
Kitashirakawaoiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8502 Japan
DOI: 10.24480/bsj-review.10c11.00171

1. はじめに

2002年に始まった文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)は日本国内の研究機関にある遺伝資源を保全し、ライフサイエンスの研究現場に提供する基盤を形成することを企図している。国内外での長い研究史を反映して豊富な遺伝資源が蓄積しているコムギとその近縁種はNBRP発足以来継続して対象生物種としてサポートを受け続け、現在、約12,000系統の種子系統をストックし、世界各国の研究者に供給している。

我々の遺伝資源は、(1)在来系統・野生種と(2)遺伝学実験系統に大別される。前者は、世界三大穀類の一つであるコムギ(パンコムギとマカロニコムギ)に代表される栽培コムギの世界の各地から採集された近代品種の導入以前に栽培されていた系統(在来系統)および、栽培コムギの祖先である野生コムギ、並びにその近縁野生種(野生種)である。これらは、京都大学が1955年から数次にわたって派遣した探検隊が現地で採集した植物サンプルに源を遡ることができる(総説 阪本 1992)。その後、世界的な気候変動、近代品種の導入、紛争や騒乱によってこれらの在来系統・野生種の採集地の環境は激変しており、我々の保全するストックはex situ conservationとして世界的に高い評価を得ている。後者は、100年以上にわたる長いコムギ研究史の中で育成された実験用の系統であり、その時々の研究の潮流を反映する異数体系統や細胞質置換系統や染色体部分欠失系統を含んでいる。

NBRP全体の理念とこれまでの経緯についてはシンポジウムのオーガナイザーによる本総説集の巻頭言に詳しく述べられている(本総説集の山口 & 佐藤 2019 BSJ-Review 10C1)。また、コムギリソース整備については、2009年に細胞工学別冊「バイオリソース&データベース活用術」に当時の状況が記述されている(遠藤ら 2009)。従って、本稿では2009年度以降の整備状況、特にリソースの高品質化に関わる事項について概説する。

2. 保有リソース

国内のコムギ研究者が個別に保存していたリソースを 2002 年に開始した第 1 期 NBRP 以来、NBRP・コムギの実施機関に集約して来た。種子リソースは、京都大学と鳥取大学と横浜市立大学に系統の属性ごとに分散されて収蔵され、また、DNA リソースは横浜市立大学一箇所に収蔵した。第 4 期になって大幅な組織の改変を行い、種子系統は京都大学に集中し、DNA リソースについては横浜市立大学で保存を継続しているが、リソースの配布自体は休止した。阪神淡路大震災や東日本大震災による甚大被害を教訓として、リソースのバックアップは西日本（京都市 京都大学）と東日本（横浜市 横浜市立大学）で連携して保存している。

2-1. 種子系統

2009 年以来、種子系統の保存数に大幅な変化はない。国内外のコムギ研究でいま現在使われている系統の寄託を受け入れて、アクティブな材料を収集・保存・配布することが重要である。フランスのパリで開催された G20 農相会議の合意に基づき、コムギゲノム解読を推進し世界のコムギ研究をコーディネートする目的で Wheat Initiative (WI) という研究者組織が形成された。NBRP・コムギの課題管理者は WI の中の専門家ワーキンググループ (Expert Working Group; EWG) である Global wheat germplasm conservation and use community のメンバーに名を連ねるが、種子保存と利用に関する国際的な協調体制はうまく機能しているとは言い難い。所属するもう一つの EWG である Improving wheat quality for processing and health では小麦粉の品質に関連するコムギの種子貯蔵タンパク質のアレルを保持する系統群のコアコレクション化を進めており、NBRP・コムギからもセットで種子を配布できるように準備を進めている。この例の様に、アレル、ジェノタイプなど系統に関する遺伝子型や表現型情報のついた系統群の寄託を受け、ユーザーに提供していくことが今後ますます重要になると見込んでいる。

NBRP・コムギの種子系統は遺伝学的研究の材料とすることを念頭に袋掛け受粉による自殖で世代更新をして維持して来たため、純系化が進んでおり、他のジーンバンクと比較して誤分類やコンタミネーションが少ない良質の実験材料として、世界のコムギ研究者から評価されている。特に様々な技術で精度高く（部分）ゲノム配列が決定できるようになった今日、材料の精度は研究の成否を左右しかねず、今後も純度を高く保つ努力を続けていく。

2-1-1. 在来系統および野生種

我々のストックの特色の一つとして、コムギの在来系統や品種の保存数が少ない。これは、研究材料が、品種の育成という観点より、生物学的な観点から集められて来たことを反映する。特に、国内の栽培品種、育成系統は、農業生物資源ジーンバンクにより多くの系統が保存されている。一方で、野生種については保存系統の網羅性、多様性と系統数の多さから世界的にも一目置かれている。特に、パンコムギ (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$,

ゲノム構成 AABBDD) に B と D ゲノムを供与した種を含む *Aegilops* 属植物(すべて野生種)については国際乾燥地農業研究所 (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas; ICARDA) について世界で 2 番目に多い系統数を保存する。ICARDA はシリアのアレッポに中心的研究機関を持っていたが、近年の紛争により大きなダメージを受け、2012 年にレバノンのベイルートに中心を移転した。このような社会情勢の変動は、*ex situ* conservation として政情の安定した場所・機関 (たとえ本来の自生地と栽培環境が異なる場所に所在していようと) にリソースを保存する意義を教えてくれる。NBRP・コムギの *Aegilops* 属植物のコレクションの大部分は京都大学の派遣した探検隊が日本に持ち帰った植物試料の自殖後代で、その採集地点に関する詳細な記録が整っている。それぞれの種の分布域をほぼカバーしているため、野生種の多様性や適応進化、倍数化と栽培化の機構に関する研究の格好の材料だと言える。

2-1-2. 実験系統

パンコムギは異質六倍体で、一つの核の中に祖先を同じくする (同祖の) ゲノムを 3 コピーもつ。このため、染色体もしくは遺伝子の数の変動をバッファーする能力が二倍体に比して高く、異数体や異種染色体添加系統や置換系統といった様々な細胞遺伝学的ストックが蓄積している。この点が、二倍体生物であるシロイヌナズナやイネやオオムギと対照的で、異数体や倍数性シリーズを使ったゲノム倍加や遺伝子重複による遺伝子発現調節機構の解明などのユニークな研究を展開できるポテンシャルがある。その他、細胞質置換系統 (核-細胞質雑種) や種間雑種に由来する複二倍体などを現有している。実験系統の中には遺伝的に不安定な材料もあるので、研究材料として用いる前に遺伝的構成の再確認が必要な場合も少なくない。

異数体や染色体欠失系統は興味・関心のある遺伝子がどの染色体に座乗するのかを決定するのに使われて来た。特に初期のゲノミクスにおいて DNA マーカーの座乗染色体 (腕) の決定にはなくてはならない研究材料であった。パンコムギのゲノム配列の解読 (IWGSC 2018) にも一定の役割を果たした。参照ゲノム配列が決定した今、遺伝子座のゲノム中の位置はデータベース検索でたやすく知れるわけだが、それでは遺伝学的ストックはもはや保存する価値のない過去の遺物なのであろうか? 答えは否である。特定の染色体を欠くコムギ植物の表現型はその系統を栽培して調べるほかに、遺伝学的ストックは今後、遺伝子型-表現型相関を調べる材料として再び研究の場で使われていくことと予想している。

異質六倍体であるパンコムギでは突然変異体の単離は困難であるとして、長く、変異体の集積は行われてこなかった。我々は、NBRP・コムギにストックされていた一粒系コムギ (二倍体のコムギ, AA ゲノムを持つ) の X 線照射早生突然変異体の解析から早生突然変異が概日時計関連遺伝子の *Phytoclock1* (*PCL1*) 遺伝子のオーソログの機能欠損であることを報告した (Mizuno et al. 2012)。このように、コムギにおいても二倍体を用いれば機能欠損突然変異体の同定は可能である (村井ら 私信)。さらに、六倍体においても優性遺伝

子の機能欠損は得られている (Friebe et al. 2002)。参照ゲノム配列を利用できるので、突然変異体を体系的に保存していくことが今後のコムギ研究において重要だと考えている。

2-2. DNA リソース

第3期まで分担機関として業務を分担した横浜市立大学では、コムギゲノミクスの進展と軌を一にして、EST, 完全長 cDNA, 長鎖 DNA 断片クローンライブラリーなどの DNA リソースを整備・保存・配布して来た。関連する塩基配列情報や発現遺伝子情報は公的データベースにデポジットされているのと同時に、リソースのホームページである KOMUGI (<https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>) から閲覧可能である。これらのゲノムリソースはパンコムギの参照ゲノム配列の決定にも重要な役割を果たした。NBRP 第4期になって組織の改変を行ったのに伴い、DNA リソースの配布業務を休止した。現在までに、再配布の希望は寄せられていない。コムギのゲノミクスの進展に伴い、物としての DNA リソースの役割は終わったと考えている。とはいえ、クローンとそのバックアップの保存は横浜市立大学と京都大学で今後も継続していく。

3. 高品質化への取り組み

2017 年から始まった第4期 NBRP・コムギではライフサイエンスに即戦力の研究試料を提供するためリソースの高品質化を図っている。リソースの高品質化の鍵は、真正さを保ち、ジェノタイプ (遺伝子型) 情報を付加することであると考えている。我々が取り組んでいる実施内容を以下に説明する。

3-1. 種子管理システムの一元化

NBRP・コムギでは第2期まで分散型のリソース管理体制を取っていた。国内の大学等の研究機関に所蔵されていたリソースを京都大学、鳥取大学、横浜市立大学にリソースの属性ごとにまとめて保存していた。さらに京都大学においては、遺伝学的な実験系統を分担する研究室と野生種・在来系統を分担する研究室で、独自の台帳で管理していた。この状況が事業の推進の要所要所で事務の煩雑さを引き起こしていた。例えば、ユーザーからリクエストがあっても、一度、それぞれの担当者に在庫の確認をしてからでなければ、分譲の可否を伝えることができなかった。さらに、定期的な種子増殖も在庫数を反映していなかったため、ある系統は在庫が潤沢で、別の系統は常に在庫過少という様な状況であった。NBRP・コムギの第3期に、データベースの共有化をして上記の状況を解消できたことは、課題管理者として最低限のインフラ整備ができたと胸をなで下ろしている。現在では、即座に配布の可否が判断できるし、各年度に増殖対象にすべき系統も在庫量と直近の増殖履歴から選抜することができる。

種子管理システムの一元化の作業の過程で、京都大学にストックを集約し、さらに、配布用ストックと保存用ストックとを分けて階層化して保存している。これは学内にバックアップを保存していることに他ならず、リソースの長期保存の観点からも望ましい。さら

に、保存容器にバーコードを付して管理しているため、人為的なミス削減にもつながっている。

3-2. 細胞遺伝学によらない系統の確認方法

コムギの染色体は光学顕微鏡で容易に観察できるため、細胞遺伝学の好材料として研究に用いられてきた。遺伝学的な実験系統の多くは、染色体の数の変異体である異数体や染色体置換系統、そして部分欠失系統である。これらの系統の維持管理には、従来、C-banding や N-banding といった染色体分染法による当該染色体の確認が必要であった。染色体分染法は極めて職人的な実験技術で、誰もが気楽に適用できるテクニックではない。我々は、コムギゲノミクスの成果を取り入れて、DNA マーカーの有無で当該染色体の構成を確認する方法を適用し始めた。

3-3. 保存系統へのジェノタイプ情報の付加

シロイヌナズナやイネの分子生物学が進んだ背景の一つにゲノム情報があったことを否定できる人はいないと思う。他の生物種から研究をコムギに展開する人にとってゲノム情報を使えないことは大きな障壁となっている。六倍性のパンコムギ品種 Chinese Spring の参照ゲノム配列が 2017 年に決定され、2018 年に論文として公表された (IWGSC 2018)。アセンブル配列 (The IWGSC RefSeq v1.0 assembly)、アノテーション情報 (IWGSC RefSeq v1.1 annotation) は公開データベース (それぞれ

<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies> と

<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Annotations>) から利用可能である。

我々の保存する系統にもジェノタイプ情報を付加してきた。古くはマイクロサテライト配列 (SSR) の増幅パターンを代表的な保存系統 (48 系統) に付加して公開した

(<https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/strains/aboutNbrpMarker.jsp>)。マーカーの座乗位置を考慮して染色体あたり 10 マーカーを推奨マーカーとして提案している。SSR は多型度が高いため、研究の目的によってはいまだに利用価値の高いマーカーである。

第 3 期においては、保存系統のコアコレクションを進めることとした。六倍性コムギコアコレクションとはコレクションの包含する遺伝的多様性の幅を損なうことなく、対象とすべき系統数を圧縮したコレクションである。六倍性コムギ (ゲノム構成 AABBDD) については採集地の地理的情報と分類学的特性を考慮に入れてコアコレクションを選定した。選定したコアコレクション系統 (188 系統) には DArTseq によるゲノムワイドなマーカー情報を付加してある (Takenaka et al. 2018)。四倍性 (ゲノム構成 AABB と AAGG) と二倍性 (ゲノム構成 AA) のコムギ系統についてもコアコレクションの選定を終え、公表へ向けて準備を進めている。これらの系統群については高密度ゲノム情報が利用可能なので、表現型データさえ取れば、すぐに Genome-wide association study (GWAS) で表現型と相関する遺伝子型を探索する事ができる。

比較ゲノム解析の基盤形成を目的として、国際コムギ 10+ゲノムプロジェクトが進められている (<http://www.10wheatgenomes.com>)。我々 NBRP・コムギも横浜市立大学や農研機構、そして国外の研究機関と協力して、日本の西南暖地で長く基幹品種であった農林 61 号の *de novo* アセンブルを進めている。農林 61 号が取り立てて顕著な品種としての特性を持たないのにもかかわらず広く栽培されて来たのは広域適応性があるからとされている。ゲノム解読を端緒として、「広域適応性」のようなこれまで理解の進まなかった漠とした形質の本質に迫ることができれば面白い。NBRP・コムギで我々は、六倍性コムギのコアコレクション (Takenaka et al. 2018) の中から、東アジアのパンコムギ系統に着目をして、それらに農林 61 号を父親として交雑した個体の自殖後代の組換え近交系統群 (これを Nested Association Mapping (NAM) 集団と呼ぶ (Yu et al. 2008)) を育成している。世界の近代コムギ育種の中で東アジアの小麦系統の遺伝的多様性は限定的にしか使われておらず、それゆえに、新しいアレルを提供するポテンシャルを秘めている (Balfourier et al. 2019)。かつて、日本のコムギ品種農林 10 号に由来する半矮性遺伝子と多施肥農法の組み合わせが緑の革命を起こしたように、我々のジーンバンクに長期間保存されてきた遺伝資源が世界のコムギ育種に利用されれば無上の喜びである。

4. 終わりに

長く、ゲノムが大きく複雑なコムギは研究材料として遠ざけられて来た。参照ゲノム配列が決定し、比較ゲノム解析も進みつつある現状で、コムギで長く知られて来たけれど解析されていない生命現象 (倍数性ゲノム、遺伝子重複、倍数化、非還元配偶子形成、核と細胞質の相互作用、開花生理、交雑親和性、同祖染色体対合抑制、雑種致死、などなど枚挙にいとまがない) はまだまだ多く眠っている。シロイヌナズナやイネで確立した研究手法を携えて、コムギを研究材料として精力的に解析してくれる人が増えて行ってくれることを願っている (麦を主食とする欧米では、実際にそんな潮流になっている)。リソースセンターとして、種子の提供だけでなく栽培方法などのノウハウの提供や共同研究も積極的に行っていきたいと考えている。

NBRP・コムギの業務は京都大学大学院農学研究科植物遺伝学分野特定研究員の新田みゆき氏と農学研究科技術職員の太田敦士氏のこの事業にかけるピュアな情熱無しには成り立たない。ここに特別に記して、お二人の尊敬すべきエキスパートに心よりの感謝の意を表したい。前任の課題管理者からコムギリソースの維持管理を引き継いでから早くも 7 年が経とうとしている。先人の努力の賜物である遺伝資源を引き継ぎ、世のライフサイエンスの発展に材料を提供することで貢献すること、そして前よりも悪くない状態でリソースを後世に引き継いでいくことが与えられた責務であると心得ている。

引用文献

Balfourier, F., Bouchet, S., Robert, S., De Oliveira, R., Rimbart, H., Kitt, J., Choulet, F, IWGSC, BreedWheat Consortium, & Paux, E. 2019. Worldwide phylogeography and history of wheat

- genetic diversity. *Sci. Adv.* 29: eaav0536
- 遠藤隆, 河原太八, 那須田周平, 辻本壽, 笹沼恒男, 荻原保成 2009. コムギ 倍数体のモデル植物. ナショナルバイオリソースプロジェクト情報運営委員会 (監修) バイオリソース&データベース活用術. pp. 193-196. 秀潤社. 東京.
- Friebe, B., Zhang, P., Nasuda, S., & Gill, B.S. (2002) Characterization of a knock-out mutation at the *Gc2* locus in wheat. *Chromosoma* 111: 509-517.
- IWGSC (Appels, R. et al.) 2018. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361: eaar7191
- Mizuno, N., Nitta, M., Sato, K., & Nasuda, S. (2012) A wheat homologue of *PHYTOCLOCK 1* is a candidate gene conferring the early heading phenotype to einkorn wheat. *Genes Genet. Syst.* 87: 357-367.
- 阪本寧男 1992. 植物遺伝資源の探索, 収集および保存. 日本農薬学会誌 17: S213-S219.
- Takenaka, S., Nitta, M., & Nasuda, S. 2018. Population structure and association analyses of the core collection of hexaploid accessions conserved ex situ in the Japanese gene bank NBRP-Wheat. *Genes Genet. Syst.* 93: 237-254.
- 山口晴代 & 佐藤豊 2019. 植物系NBRPリソースとその活用研究最前線. 植物科学の最前線 (*BSJ-Review*) 10C1: 108-109.
- Yu, J.-M., Holland, J.B., McMullen, M.D. & Buckler, E.S. 2008. Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics* 178: 539-551.

パンコムギの冠水応答にみられるコムギ・エギロプス属細胞質の多様性

竹中祥太郎¹, 山本涼平¹, 中村千春¹

¹龍谷大学農学部

〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5

Shotaro Takenaka¹, Ryohei Yamamoto¹, Chiharu Nakamura¹

Diversity of *Triticum-Aegilops* cytoplasm based on submergence tolerance

Key words: *Aegilops*, nucleus-cytoplasm hybrid, submergence tolerance, superoxide dismutase activity, wheat

Faculty of Agriculture, Ryukoku University

1-5 Yokotani, Seta Oe-cho, Otsu-shi, Shiga 520-2194 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c12.00172

1. 研究の背景

世界三大穀物の1つであるコムギ (*Triticum* spp.) は、近縁の *Aegilops* 属野生種との自然交雑、染色体倍化とゲノム統合を経て進化した異質倍数性を特徴とする植物種である (Matsuoka, 2011)。コムギでは細胞質ゲノムに特徴的な母性遺伝様式を利用した、連続戻し交配によって育成された、核細胞質雑種系統が核ゲノムと細胞質ゲノムの相互作用を解析するための遺伝資源として利用可能である (図1)。特にパンコムギでは、46系統の異種細胞質と12系統の核ゲノムを組み合わせた552系統もの核細胞質雑種が育成されている (Tsunewaki *et al.*, 2002)。近年、気候変動による環境変化が農業生産に深刻な影響を及ぼしている。半乾燥地が起源であるコムギは、過剰な水分によるストレスに対して弱く、世界のコムギ作付面積約200万haのうち、およそ15~20%が冠水による生産減の影響を受けており、特にアジアのイネ・コムギ輪作地帯での被害は甚大である (Setter and Waters, 2003)。そこで我々は、パンコムギの冠水ストレス応答に着目し、農業上重要なこの環境応答形質に与える細胞質ゲノムの効果と役割を、パンコムギ核細胞質雑種系統を活用することによって明らかにした。

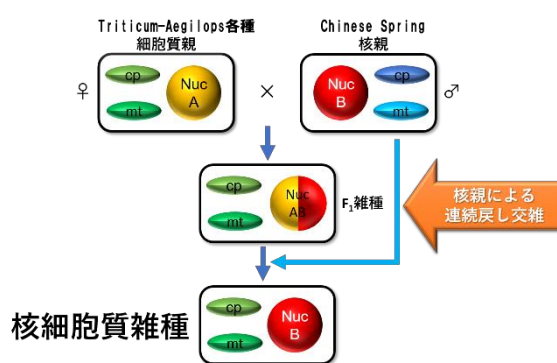


図1. 連続戻し交配による核細胞質雑種の作出法.

2. 冠水ストレスの生物検定法の確立

2-1. 試験管を用いた冠水ストレステスト法

イネで開発された試験管を用いた生物検定法 (Manangkil, O.E. *et al.*, 2008) を本研究に合わせて改良を行った。脱イオン水 (深さ 15 cm) を入れた試験管内に種子 (各試験管に 1 粒) を

1～2 日間沈め、種子に十分な吸水を行った。吸水種子を同条件下に置くことで冠水ストレス環境とし、また、種子が水没しない程度まで脱イオン水を減らす (種子の 1/3 程度の水位) ことで非ストレス環境とした。なお、培養は 15°C/20°C ; 12hL/12hD に設定した植物培養室で、各系統あたり 30 種子以上の反復検定を行った。

2-2. 冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える影響

パンコムギの実験標準系統である Chinese Spring (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring, 以下 CS) を対象に、冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える影響を調査した。1 日間吸水させた種子を非ストレス環境下で 3～10 日間幼苗した後、7 日間冠水ストレス環境下で幼苗し、子葉長、根長、新鮮重を測定した。吸水種子を非ストレス条件下で幼苗した結果との比較から、冠水ストレス条件下では幼苗の生育、特に子葉長の伸長がほぼ停止することが明らかになった (図 2A, B, C)。

2-3. 発芽時の冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える影響

次に、1～11 日間の冠水ストレスを種子に与えた後、10 日間非ストレス環境下で培養を行うことで、発芽時の冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える影響を調査した。冠水期間が 2 日間の時に、その後の幼苗の生育が最もよく、冠水期間が 5 日を超えると、発芽率が低下すると共に発芽した個体の生育もわるくなった。以上の結果から、種子に対する吸水期間は 2 日間が最適であり、これ以降の冠水状態はストレスとなり、発芽後の幼苗の生育を阻害することが明らかになった (図 2D)。

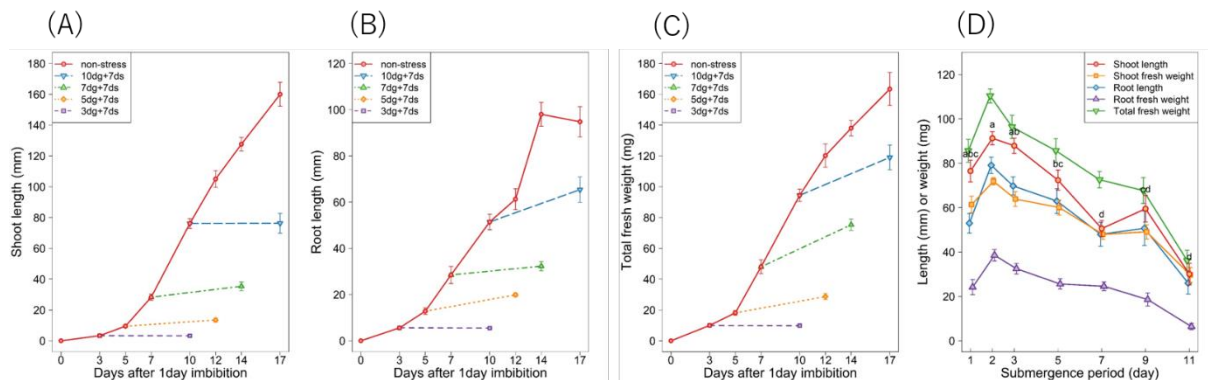


図 2. 冠水ストレスが CS の発芽および初期成育に与える影響。(A) 冠水ストレスが幼苗の子葉の伸長に与える影響。(B) 冠水ストレスが幼苗の根の伸長に与える影響。(C) 冠水ストレスが幼苗の新鮮重の増加に与える影響。(D) 発芽時の冠水ストレスの期間がその後の幼苗の生育に与える影響。(Takenaka *et al.* 2018, 一部改変)

3. 細胞質が幼苗の初期成育および冠水応答に与える影響

CS を共通核親とし、*Triticum*・*Aegilops* 属の保有する細胞質ゲノムを組み合わせた 37 系統の核細胞質雑種を用いた (表 1)。

表 1 本研究に用いた核細胞質雑種系統。Tsunewaki (2009) を改変

コード	細胞質型	細胞質親	コード	細胞質型	細胞質親
CS	B	(<i>T. aestivum</i> cv. Chinese Spring)	C26	U	<i>Ae. triuncialis</i>
C01 ^{mf}	A	<i>T. boeoticum aegilopoides</i>	C28	D'	<i>Ae. cylindrica</i>
C02	C	<i>Ae. caudata polythera</i>	C29	U	<i>Ae. biuncialis</i>
C03	U	<i>Ae. umbellulata</i>	C30	U'	<i>Ae. columnaris</i>
C04	D	<i>Ae. tauschii typica</i>	C31	M ^o	<i>Ae. geniculata</i>
C05	M	<i>Ae. comosa thessalica</i>	C32	U	<i>Ae. neglecta</i>
C07	N	<i>Ae. uniaristata</i>	C33	S ^v	<i>Ae. kotshyi</i>
C08	S	<i>Ae. speltooides</i> ssp. <i>ligustica</i>	C34	S ^v	<i>Ae. peregrine</i>
C10	S ⁱ	<i>Ae. sharonensis</i>	C35	D ²	<i>Ae. crassa</i>
C11	B	<i>T. aestivum</i> cv. Panjamo	C36	D	<i>Ae. ventricosa</i>
C12	S ^b	<i>Ae. bicornis</i>	C37	U	<i>Ae. biuncialis macrochaets</i>
C13	T	<i>Ae. mutica</i>	C38	C'	<i>Ae. triuncialis</i>
C14	T ²	<i>Ae. mutica</i>	C39	S ^v	<i>Ae. kotshyi</i>
C17	S	<i>Ae. speltooides</i> ssp. <i>speltooides</i>	C53	D ²	<i>Ae. juvenalis</i>
C18	S ^v	<i>Ae. searsii</i>	C54	U	<i>Ae. neglecta</i>
C19	D	<i>Ae. tauschii anathera</i>	C55	D ²	<i>Ae. crassa</i>
C20	S ⁱ	<i>Ae. longissimi</i>	C56	D ²	<i>Ae. vavilovii</i>
C21	B	<i>T. dicoccoides spontaneonigum</i>	C57	U	<i>Ae. neglecta recta</i>
C22	B	<i>T. dicoccum</i> 'Vernal'	C58	B	<i>T. aestivum tibetanum</i>

3-1. 細胞質が幼苗の初期成育に与える影響

本研究では、非ストレス環境下で 10 日間育成した個体の子葉長を (a)、非ストレス環境下で 13 日間育成した個体の子葉長を (b) し、(b) と (a) の平均値の差分すなわち、(b) - μ (a) を吸水後 10~13 日間の生育量、 $\{(b) - \mu (a)\} / \mu (a)$ を吸水後 10 日間の生育量に対する 10~13 日間の生育量の割合と定義し、これらの値を CS を基準とした Steel 検定によって比較することで、細胞質が幼苗の初期成育に与える影響を検証した。

育苗 10 日目では 3 系統の核細胞質雑種、C13 (T 型細胞質)、C31 (M^o)、C35 (D²) で、育苗 13 日目では 2 系統の核細胞質雑種、C14 (T²)、C30 (U') で CS との有差が検出されなかった (図 3A, B)。これら以外の系統では有意に生育量が CS より小さく、ほとんどの細胞質が幼苗の初期成育に負の効果をもたらすことが明らかになった。一方で、吸水後 10 日間の生育量に対する 10~13 日間の生育量の割合では、A、T²、U、U' タイプの細胞質が CS より有意に大きくなった (図 3D)。これらの結果から、細胞質のタイプにより、幼苗の初期成育のペースが異なることが示唆される。

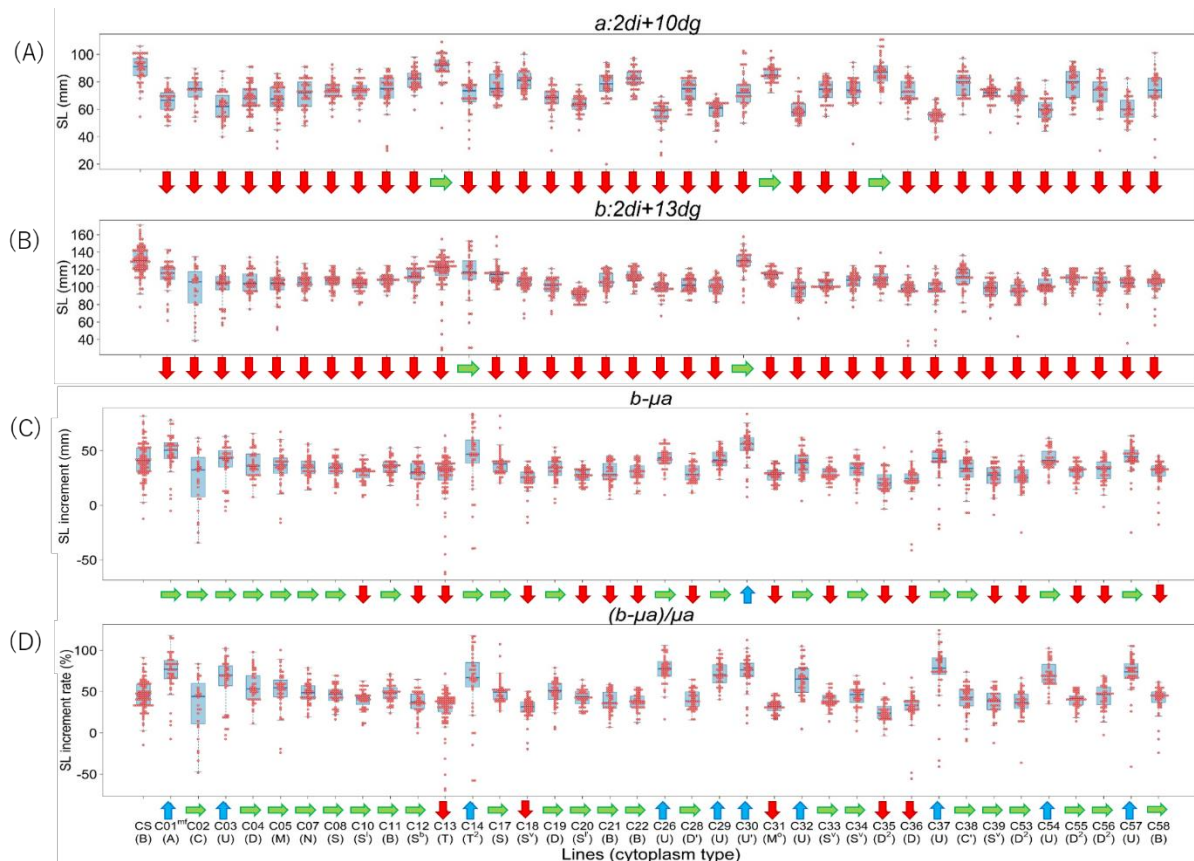


図 3. 細胞質が幼苗の初期成育に与える影響。矢印は CS を基準とした Steel 検定。(A) 吸水後 10 日目の子葉長の分布。(B) 吸水後 13 日目の子葉長の分布。(C) 吸水後 10~13 日間の子葉長生育量の分布。(D) 吸水後 10 日目の子葉長に対する 10~13 日間の子葉長の生育量の割合。(Takenaka *et al.* 2018, 一部改変)

3-2. 冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える効果

本研究では幼苗に対する冠水ストレス処理として、吸水後 3 日間ストレス条件下に置いた後、10 日間非ストレス条件下で幼苗を行った。この時の各個体の子葉長を (c) とする。CS の幼苗を用いた調査から、冠水ストレス環境下では幼苗の生育が停止することが明らかになっている。もし冠水ストレスがストレス解除後の幼苗の生育に影響を与えないと仮定した場合、ストレス解除後 10 日目の幼苗の生育量は非ストレス環境下で 10 日間培養した幼苗の生育量と等しくなると期待できる。よって、冠水ストレス処理した個体と非ストレス環境下で 10 日間

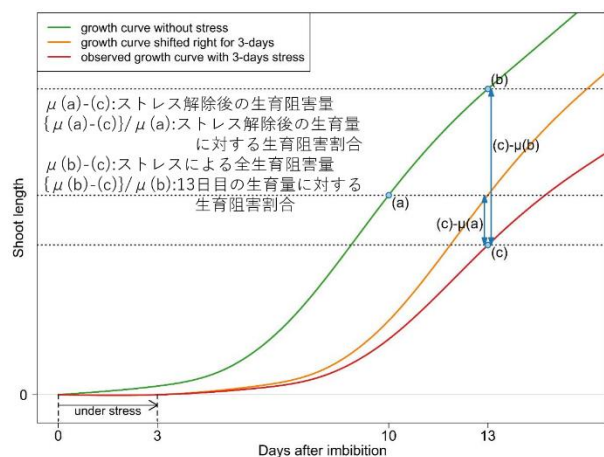


図 4. 幼苗の生長曲線に基づく冠水ストレスによる生育阻害の定義。緑線は非ストレス条件下の生長曲線。黄線は緑線を 3 日分右に平行移動したもの。赤線はストレス条件下の生育曲線。

育成した個体の生育量との差分すなわち $\mu(a) - (c)$ を冠水ストレス解除後の生育阻害量, $\mu(a) - (c) / \mu(a)$ を冠水ストレス解除後の生育阻害率と定義する。一方, 種子吸水後からの育成日数が同じである冠水ストレス処理した個体と非ストレス環境下で 13 日間育成した個体の生育量との差分すなわち $\mu(b) - (c)$ を冠水ストレスによる全生育阻害量, $\mu(b) - (c) / \mu(b)$ を全生育阻害率と定義する (図 4)。これらの値を CS を基準とした Steel 検定によって比較することで, 細胞質が幼苗の冠水ストレス応答に与える影響を検証した。

冠水ストレス条件下では, 核親を含むほぼすべての系統で初期成育の阻害が確認された。*Ae. mutica* の細胞質を持つ個体 C13(T), C14(T²) は, 核親である CS とストレス条件下での生育量に有意差が確認できなかった (図 5A)。

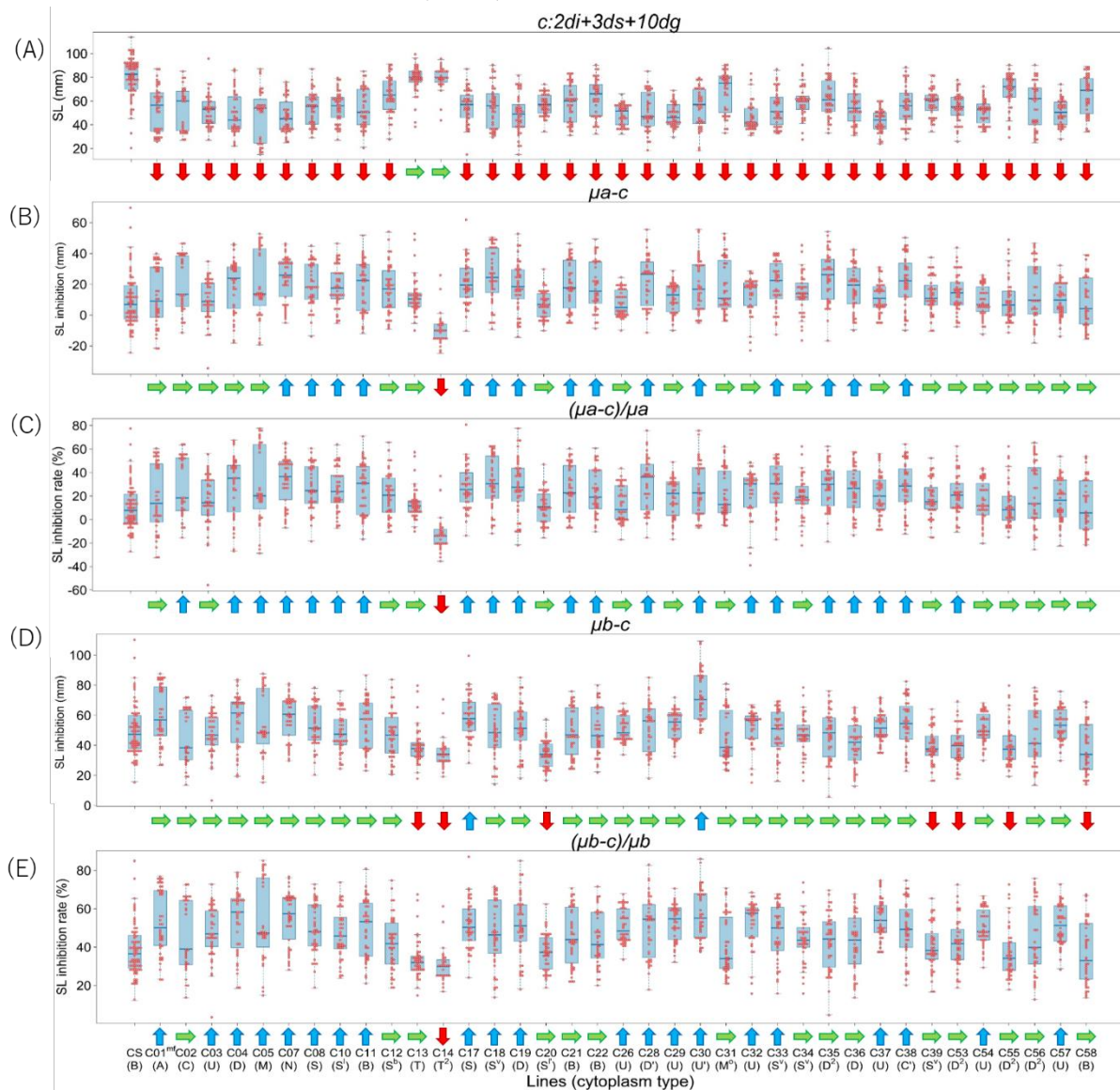


図 5 細胞質が冠水ストレス感受性に与える影響。矢印は CS を基準とした Steel 検定。(A) 吸水後 3 日間のストレス処理後 10 日目の子葉長の分布。(B) 吸水後 10 日目の子葉長に対する生育阻害量。(C) 吸水後 10 日目の子葉長に対する生育阻害量割合。(D) 吸水後 13 日目の子葉長に対する生育阻害量。(E) 吸水後 13 日目の子葉長に対する生育阻害量割合。

(Takenaka *et al.* 2018, 一部改変)

冠水ストレス解除後の生育阻害量および生育阻害率では C14(T²) だけが CS に対して有意に小さく、C14(T²) では冠水ストレス解除後の生育阻害が検出されなかった。これは C14(T²) が発芽時に受けた冠水ストレスで幼苗生育が阻害されない、または冠水解除後に急速に生育していることを示唆している (図 5B, C)。

一方、冠水ストレスによる全生育阻害量では C13(T), C14(T²), C20(S^I), C39(S^V), C53(D²), C55(D²), C58(B) の 6 系統の核細胞質雑種が核親である CS よりも有意に小さかった。これらの系統では冠水ストレスからの回復が CS と同等または早いことを示唆している (図 5D, E)。

これらの結果から、細胞質ゲノムは冠水ストレス感受性に寄与しており、細胞質置換により、核親の冠水ストレス感受性が変化すること。特に *Ae. mutica* の T² 型細胞質は CS の核ゲノムで冠水耐性レベルを上昇させると考えられる。

4. 冠水ストレスによって細胞内で何が起こっているのか？

4-1. 網羅的発現解析

CS を対象に RNA-Seq 解析により網羅的な発現解析を行った。解析には、吸水後 5 日間冠水ストレスを与えた後 10 日間非ストレス環境下で育成した個体と、非ストレス環境下で 15 日間育成した個体を用いた。各試験区で 3 個体をバルクして Total RNA を抽出した。RNA-Seq 解析の結果、148 遺伝子の発現が変化しており、これらの GO term を調べたところ、酸化還元に関わる遺伝子の発現レベルが変化していることが明らかになった。この結果は冠水ストレスとは、水没および脱水没による低酸素状態と急激な酸化状態が原因となる酸化ストレスである可能性を示すものであると考えられる。

4-2. SOD 活性

網羅的発現解析から、CS は冠水応答として、酸化還元に関わる遺伝子の発現が変動していることが示唆された。そこで CS に加え、生物検定で特徴的な冠水応答性をしめした 3 系統の核細胞質雑種を対象に SOD (Superoxide dismutase) 活性の測定をおこなった (SOD とは細胞内で発生した活性酸素を除去する主要な酵素のひとつ。植物では、様々なストレスが引き金となって活性酸素が発生し蓄積する。ミトコンドリアや葉緑体に存在する)。ここで用いた 3 系統は冠水ストレスによる幼苗の生育阻害が CS と同等の C13(T), CS よりも小さい C14(T²), CS よりも大きい C26(U) である。SOD は液体窒素で凍結破砕した植物体から PBS buffer (pH 7.4) で抽出し、活性は SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を用いた。

冠水ストレス感受性系統である C26(U) で CS や冠水ストレス感受性の低い C13(T), C14(T²) と比べて顕著な活性上昇が確認できた。この結果から、冠水ストレスによる生育阻害は高レベルの活性酸素種の蓄積に起因することが示唆された (図 6)。

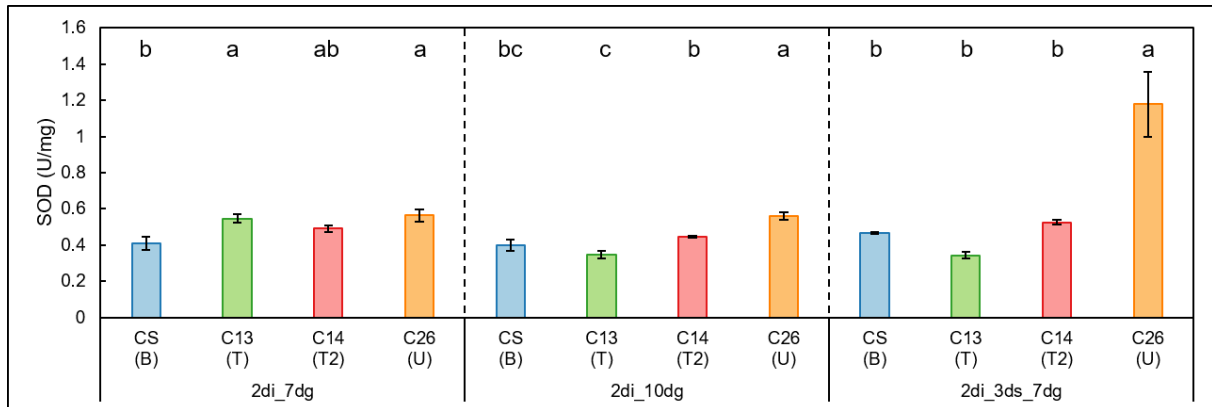


図 6. CS と核細胞質雑種 3 系統の SOD 活性の比較。(左) 種子吸水後非ストレス条件下で 7 日間育成。(中) 種子吸水後非ストレス条件下で 10 日間育成。(右) 種子吸水後 3 日間ストレス条件下の後 7 日間非ストレス条件下で育成。

5. まとめ

本研究では、ジーンバンクで維持されていたパンコムギ核細胞質雑種を用いることにより、*Triticum・Aegilops* 属の細胞質において、冠水応答性に大きな多様性が存在することを示すことができた。また、冠水ストレスによる生育阻害には活性酸素が関与していることが強く示唆された。本研究で用いた核細胞質雑種は、核親が CS である系統のみであったが、現在、CS とは異なる核ゲノムをもつ核細胞質雑種を用いることで、核ゲノムと細胞質ゲノムの組合せが冠水応答性に与える影響を調査している。

6. 謝辞

本小論を執筆する機会をくださった国立環境研究所の山口晴代博士，国立遺伝学研究所の佐藤豊博士，日本植物学会，電子出版物編集委員の方々に深く感謝いたします。本研究で用いた遺伝資源は全て NBRP・コムギで系統保存されているものです。本研究を遂行するにあたり種子を提供していただいた京都大学的那須田周平准教授，常脇恒一郎名誉教授には深く感謝申し上げます。本研究は龍谷大学 食と農の総合研究所プロジェクト『コムギの冠水ストレス応答に及ぼす異種細胞質の効果と細胞質相互作用に関する解析』の支援によってすすめられました。

引用文献

- Manangkil, O.E., Vu, H. T. T., Yoshida, S., Mori, N. & Nakamura, C. 2008. A simple, rapid and reliable bioassay for evaluating seedling vigor under submergence in *indica* and *japonica* rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 163(2): 267-274.
- Matsuoka, Y. 2011. Evolution of polyploid *Triticum* wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant and cell physiology* 52(5): 750-764.

- Setter, T.L. & Waters, I. 2003. Reviews of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant and Soil* 253(1): 1-34.
- Takenaka, S., Yamamoto, R. & Nakamura, C. 2018 Genetic diversity of submergence stress response in cytoplasm of the *Triticum-Aegilops* complex. *Scientific reports* 8(1): 16267.
- Tsunewaki, K. 2009. Plasmon analysis in the *Triticum-Aegilops* complex. *Breed. Sci.* 59(5): 455-470.
- Tsunewaki, K., Wang, G.Z. & Matsuoka, Y. 2002. Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*.
2. Characterization and classification of 47 plasmons based on their effects on common wheat phenotypes. *Genes Genet. Syst.* 77(6): 409-427.