

次世代シーケンサーがスポットライトを当てた 「なまら」面白い生き物たち

高林厚史^{1,2}

¹北海道大学低温科学研究所

²北海道大学大学院環境科学院

〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目

Next-generation sequencers spotlight the "Very" interesting organisms

Atsushi Takabayashi^{1,2}

¹Institute of Low Temperature Science

²Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University,
Kita-19, Nishi-8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-0819 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.15b1.00259

幼い頃に、生き物の図鑑を調べるのがきっかけで、もしくは、身近なさまざまな生き物に触れるのがきっかけで、生命の多様性に驚異の念を抱いた人は少なくないだろう。そして、それが生物学への憧れの礎になったという研究者もやはり少なくないのではないだろうか。しかし、生物学、例えば細胞生物学や分子生物学、生化学などを学ぶにつれて、モデル生物を用いた分子レベルでの機構の解明の魅力にとらわれ、主にモデル生物を材料とした研究を行ってきたという研究者はきっと多いと思われる。私見ではあるが、生命の本質は共通性と多様性にあり、限られた数のモデル生物を用いた研究は分子レベルでの共通性の深い理解をもたらしたが、一方でそのモデル生物の数が現存する生物種の数と比べて極めて限られていることが多様性の理解の限界になっていることは疑いようもないものと思われる。

そして、現在はモデル生物を研究している皆さまの中にもモデル生物以外にも興味のある生物をお持ちの方も少なくないのではないだろうか。では研究者がその興味深い特質を持つ非モデル生物を「自らの」モデル生物にするために必要なものは何であろうかと考えると、おそらく現代の生物学者にとって最も必要な情報はゲノム情報だろう。

約 20 年にわたる次世代シーケンサーの絶え間ない技術革新により、現在ではゲノム解析や RNA seq 解析のコストは wet な研究室の手の届くところまで降りてきた。一方で、データ解析の手法やノウハウについてはまだ十分に行き渡ったとは言えないが、ユニークで魅力あふれる生物を「自らの」モデル生物にするためのハードルが大きく下がったのは間違いない。さらに言えば、植物学会には分類学や生態学の研究者も広く参加されておられるが、今後は異なる分野の研究者同士の共同研究により、非モデル生物の生き物の魅力を探したり、入手したりする動きもより活発になるのだろうと期待している。

本総説集は日本植物学会第 87 回大会（2023 年 9 月）で開催されたシンポジウム「次世代シーケンサーがスポットライトを当てた「なまら」面白い生き物たち」の内容をまとめた

ものである。講演者にはこの総説集への執筆を快くお引き受けいただいた。講演順に、中村保一先生にはゲノム解読の歴史に加えイエネコ、アカシソ、ベンサミアナタバコの、松永幸大先生にはメダカ水槽から見つかったメダカモの、神川龍馬先生には非光合成性珪藻 *Nitzschia putrida* の、榊原恵子先生には陸上植物の進化の初期に維管束植物とも蘚苔類とも分かれ、独自の進化を辿ったツノゴケの、坂本智昭先生には水陸両生植物 *Rorippa aquatica* の、それぞれの生き物の魅力やゲノム解析についてご執筆いただいた。また、高林は非モデル光合成緑藻の RNA seq について執筆させていただいた。本総説で取り扱われた非モデル生物はそれぞれに「なまら」面白い生き物であり、しかも本総説はその非モデル生物のゲノム解析の実際についての貴重な情報を満載していることから、ぜひお読みいただきたい。

最後に、執筆の機会を提供してくださった植物学会の電子出版物編集委員の方々に、この場を借りて感謝する。

非モデル生物のシーケンス解析・インフォマティクス解析

中村 保一

国立遺伝学研究所 情報研究系
〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111

Sequence and informatics analysis of non-model organisms

Yasukazu Nakamura

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

Keywords: genome analysis, NGS, non-model species

DOI: 10.24480/bsj-review.15b2.00260

1. はじめに

この原稿では次世代シーケンサ（NGS）の出現とそれに伴う全ゲノム塩基配列決定法の変遷と現在の到達点を示し、最後にそれでもなおゲノム塩基配列を解釈する努力が必要であることを述べる。

2. 全塩基配列決定プロジェクトの変遷

2-1. NGS 以前の塩基配列決定プロジェクト

まず、過去のキャピラリー型蛍光シーケンサを用いた植物のゲノム塩基配列「完全」決定手法について概観しよう。1996 年から、日欧米の研究機関が参加した国際共同プロジェクトにより、シロイヌナズナの全ゲノムの完全解読が進められた。このプロジェクトは、世界初の植物の全ゲノム構造解析としてその成果は 115 Mb, 25,498 遺伝子の決定論文として 2000 年 12 月 14 日号の *Nature* 誌に掲載された（AGI 2000）。このプロジェクトでは、各参加グループが若干の違いを持ちつつも、基本的には以下の手法が用いられた。まず、平均 80-100 kb 程度のインサート長をもつ P1 ないし BAC クローンライブラリを構築し、そのクローンの末端配列を使用して遺伝地図と物理地図を作成した。それらのクローンの挿入断片の塩基配列をショットガン法により短鎖で決定し、クローン単位でのアセンブル配列を完成させた。さらに、情報処理により遺伝子発見等のアノテーションを実施し、配列と解析情報を前述の地図情報に基づき染色体に沿って連結し染色体仮想的分子 *pseudomolecule* を再構築した。このように、全ゲノムショットガン（WGS）ではなく「クローンショットガン」の手法が必要だった理由は、現在のような全ゲノムショットガンを行うために必要な 2 つの要素技術、すなわち（1）全ゲノムで 10 以上の深度のリードを一気に読むことのできるハイスループットな塩基配列決定技術と（2）そのようにして得られた大量の塩基配列の断片を一気にアセンブルできる大容量かつ高速な計算機が当時存在しなかったことによる。

2-2. 次世代シーケンサ (NGS) 時代の塩基配列決定

2-2-1. NGS のインパクト

しかし、2007 年に出現した次世代シーケンサ (NGS) は塩基配列決定のあり方を劇的に変えた。NGS の配列決定法は、基板上での PCR による増幅とその増幅スポット上での配列合成の蛍光観察、または固相基盤上にあいたポアを核酸の単分子が通過する際の塩基により異なる電位差を検出するものであり、それまでの Sanger 法でのゲルという「液相」でサイズ分画していた配列決定法から「固相」をベースとする検出法により数桁オーダー密度を高めた配列決定を可能とし、高速かつコスト効率良く大量の塩基配列データを得ることができるようになった。筆者が事業に関わる DDBJ, ENA, GenBank からなる国際塩基配列データベース共同体 (INSDC) が NGS のローデータアーカイブである SRA を始めた当初 (2008 年頃) は、NGS で決定できる塩基配列長は最長で 30 塩基程度といった短いものしか得られなかったが、現在では PacBio あるいは Oxford Nanopore Technology 社による単分子シーケンサは数十キロベースオーダー以上の長鎖の解読を可能としており、とくに後者の配列決定長には理論上の限界が存在せず、サンプルの調整法でどれだけ長い DNA が得られるかが解析リードの長さを決定すると言われている。余談になるが当初、INSDC の SRA は Short Read Archive の略称をもってデータベース名としたが、後に同じ略称だが Sequence Read Archive に名称変更している。これは、解析長がかならずしも短鎖ではなくなっていたことと、受け入れる塩基配列の決定技術が NGS にほぼ完全に移行したことによるものである。

2-2-2. 短鎖決定型 NGS による大量スキャフォールド時代

話を戻すと、NGS で長鎖が決定できなかった 2010 年代前半の「全塩基配列決定」プロジェクトの報告群を眺めてみると、この時代には植物・動物を問わず、計算機とアルゴリズムの進歩により一気に全ゲノムをアセンブルする WGS の試みは可能となったものの、リードとしては短鎖しか得られないため、そのアセンブルの完成度は低いものが多く、数百 Mb から数 Gb のゲノムに対し、本来の染色体の本数を遥かに上回る数万〜十万本単位のスキャフォールドからなる、まとまりの悪いアセンブル結果をもって発表されていることが多い。そこでは同じ生物から得た転写産物の 95% がそれらのスキャフォールド上にマッピングされるのであれば「コーディング領域の 95% を決定した。すなわち”ほぼ”全塩基配列が決定された」というロジックを用いており、今からみるとゲノム塩基配列プロジェクトとしては著しく完成度が低いと思える結果が散見される (もちろんこれらはテクノロジーの限界によるものでプロジェクト参加者の問題ではなく、またその生物種の遺伝子塩基配列の概観を与える等の成果によりその後の研究の発展に役だったものであり、単純に否定されるべきものではないことは言うまでもない。)

3. 全塩基配列決定の現在

3-1. ロングリード時代のアセンブル

さて、本稿を執筆している現在では NGS 技術の進歩により、極めて高精度なゲノム塩基配列が低コストで得られるようになってきており、染色体 pseudomolecule の再現という意味では、大規模かつ莫大な資金により決定されたシロイヌナズナやヒトゲノムの塩基配列に比肩

しさらにそれを超える精度での配列決定が単独研究室レベルで可能となってきた。すなわち、数万以上のスキファールドから成る「理論上」完成した塩基配列決定の時代が終わり、再び *pseudomolecule* の再構築が可能になったとなると見るや、現在では染色体のテロメアからテロメアまでの真の全長を意味する「T2T 配列」が再構成されるようになり (Nurk et al. 2022), また一旦はハプロタイプの差異を解消して単一の配列にまとめ上げることを目指したアセンブル技術であったが、正確な長鎖配列を活用してアセンブルをすることにより、それぞれのハプロイドゲノムを分離して個別にアセンブルするフェージングや、また植物で過去にしばしば問題となった多倍数性のゲノムの正確なアセンブルも同様に、以前に比べ多くの資金を投入しなくても可能となりつつある。

3-2. 非モデル生物のアセンブル事例

我々の最近の非モデル生物の *de novo* ゲノム塩基配列決定を、用いた技術と併せ紹介する。いずれも近縁種や同種での塩基配列決定事例はあったとはいえ、過去に大規模プロジェクトとして実施されてきたモデル生物の塩基配列決定事例ではなく、比較的小規模のグループにより、短期間に実施されたプロジェクトである。

3-2-1. イエネコゲノム

ネコは国内で 1,000 万頭近く飼育されている最も人気の高い伴侶動物であり、その健康を守るためのゲノム獣医療を推進するため、人気が高く遺伝的に多様性が高い猫種であるアメリカンショートヘア種を対象に高精度なゲノム配列の解読を目的として解読した。ゲノム塩基配列の高精度化のために当時利用可能な技術として Pacbio, illumina, Hi-C, 光学マッピングを活用したゲノムアセンブルを実施し、2020 年 5 月にプレプリントと塩基配列を公開した (Isobe et al. 2020)。塩基配列決定法としては、後述のアカシソやベンサミアナタバコで活用した Hifi 技術がまだ存在しなかったため、当時エラー率の高かった Pacbio のロングリード配列に illumina のリードを用いてエラー補正を行う手法を用いた。Hi-C と光学マッピングは共にスキファールドを行う手法である。Hi-C 解析は、核内で空間的に近い距離にある塩基配列同士を連結し、その DNA 断片ペアの塩基配列情報を NGS により網羅的に解読し膨大な DNA 断片ペアからゲノム上で近接関係にある配列ペアの情報を得る手法である。本来この手法はゲノムの三次元構造の研究のために開発された手法であるが、原理的に、アセンブル配列同士のスキファールディング（連続しない配列間の向きと距離をギャップを挟んで位置づけること）が可能となる。この手法により以前は困難であった染色体レベルの遠距離間のスキファールディングが可能となった。また、光学マッピングは配列特異的な制限酵素で蛍光標識した単分子のゲノム DNA をチップ上に整列させ、蛍光標識の出現パターンを画像解析することで直接観察による制限酵素地図（ゲノムマップ）を作成する手法である。これらの方法により、ほぼ全長の *pseudomolecule* から構成される 19 本の染色体を再現できた。解読されたゲノムの全長は 2.49 Gb であり、23,119 のタンパク質コード遺伝子を予測した。

3-2-2. アカシソゲノム

三島食品株式会社が育種を進めてきたアカシソ *Perilla frutescens* 「豊香 3 号」株について Pacbio HiFi reads を取得してアセンブルを実施、スキファオールディングには Hi-C 解析を用い、併せて先行研究で報告された中国の青ジソ品種のゲノム配列とのシンテニーを利用することでシソゲノムの 20 本の染色体に対応した 20 本の pseudomolecule により、1.26 Gb の赤シソゲノムの 99.2% をカバーした (Tamura et al. 2022)。配列未決定領域であるギャップは 1 染色体あたり平均 4 か所以内、7 染色体はギャップの存在しない完全に再現されたと言える染色体塩基配列であった。この研究に於いて高精度な解読を可能としたポイントは PacBio 社の HiFi 技術である。HiFi はゲノム DNA を 10~20 kbp の環状 DNA とし、円環状の同一分子を繰り返し配列決定してランダムなエラーを除去することで、長鎖型シーケンサーの最大の欠点である読み取り精度の問題が解決されている。ここでは前項のネコゲノム解析で必要とした illumina リード による配列のエラー補正を実施していない。

3-2-3. ベンサミアナタバコゲノム

ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) はナス科タバコ属に属し実験植物として長年利用されてきた。近年、とくに「接ぎ木」を成立させる機構の研究で注目されている (Notaguchi et al. 2020)。タバコ属植物は近縁種との交雑が繰り返され複雑なゲノム構造を持つため、それまで断片的なゲノム情報しか得られていなかった。本研究では、前項のアカシソゲノム決定同様、Pacbio HiFi リードを用いて *de novo* 全ゲノムアセンブリを行い、1,668 コンティグ、全長 3.1 Gb を構築した (Kurotani et al. 2023)。染色体の pseudomolecule と考えられる最長から 21 本目までのスキファオールドに 2.8 Gb の配列が含まれ、アセンブルされたゲノム長の 95.6% を占めた。

3-3. それでも必要な地道な遺伝子「機能」予測の努力

上記の 3 プロジェクトはここ数年の間に行われたものであるが、その間も配列決定のコストは下がり続けており、リード取得だけのコストで言えば、これらの生物種の配列決定の規模感はずでに 100 万円を切っており、情報解析を担う共同研究先さえあれば、非モデル生物のゲノム塩基配列完全決定は研究室単位で実施できる研究となりつつある。昨今機械学習・人工知能技術を用いた遺伝子構造予測技術や機能予測技術も利用可能となっており、より多くのゲノム塩基配列が低コストで基盤情報として得られるようになったことで、塩基配列の解釈という行為であるアノテーションも次第に簡便にできるようになってきた。しかし、配列決定後の一次アノテーションは、代表的かつ生物種間で保存性の高い遺伝子は網羅しているが、限られた組織や発生のステージでのみ発現する遺伝子は記載されていないことがままある。我々はフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の神経ペプチドの発現解析を実施する過程で、そのゲノムドラフト塩基配列上に、我々が解析したい遺伝子群のうち 2 遺伝子しかアノテーションされていないことに気づいた。そこで、昆虫で既知の 43 神経ペプチドをリードとして精度の高い配列のマッピングとその結果のアラインメントをもとに、長期間に渡る継続的なウェット研究者との検討・確認によるマニュアルキュレーションを実施することにより 41 の未記載の神経ペプチド遺伝子をアノテーションし、そのセットを昆虫の神経ペプ

チド研究に寄与する基盤データとして手順のワークフローと共に報告した (Mochizuki et al. 2023)。神経ペプチドのように時期・組織特異的に発現し、また最終産物が数ペプチドであるような発見ににくい (しかし興味深い現象を司るような) 遺伝子群については、こうした地道な情報処理とその確認という手順を経て初めて、網羅的な実験のための基礎データが得られるのである。

4. おわりに

本稿では近年極めて短期間かつ低コストで実現できるようになった全ゲノム塩基配列決定により、これまで未確定であった非モデル生物のゲノムに光をあてることができるようになったことを紹介し、しかしそれでもなお「泥くさい」しかし実はそこが「面白い」生物学者と情報生命学者との密接な連携による、塩基配列上の意味を解釈する努力の必要性を述べた。本学会の非モデル植物研究者の皆様にゲノムを決定しまたそれを活用することを考えていただく一助となれば幸いである。

引用文献

- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815. doi: 10.1038/35048692
- Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bzikadze AV, Mikheenko A, Vollger MR, Altemose N, Uralsky L, Gershman A et al. (2022) The complete sequence of a human genome. *Science* 376: 44–53. doi: 10.1126/science.abj6987
- Isobe S, Matsumoto Y, Chung C, Sakamoto M, Chan T-F, Hirakawa H, Ishihara G, Lam H-M, Nakayama S, Sasamoto S et al. (2020) AnAms1.0: A high-quality chromosome-scale assembly of a domestic cat *Felis catus* of American Shorthair breed. *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.05.19.103788
- Tamura K, Sakamoto M, Tanizawa Y, Mochizuki T, Matsushita S, Kato Y, Ishikawa T, Okuhara K, Nakamura Y, Bono H. (2022) A highly contiguous genome assembly of red perilla (*Perilla frutescens*) domesticated in Japan. *DNA Res* 30: 1–8. doi: 10.1093/dnares/dsac044
- Kurotani K, Hirakawa H, Shirasawa K, Tanizawa Y, Nakamura Y, Isobe S, Notaguchi M. (2023) Genome Sequence and Analysis of *Nicotiana benthamiana*, the Model Plant for Interactions between Organisms. *Plant and Cell Phys* 64: 248–257. doi: 10.1093/pcp/pcac168
- Mochizuki T, Sakamoto M, Tanizawa Y, Seike H, Zhu Z, Zhou YJ, Fukumura K, Nagata S, Nakamura Y. (2023) Best Practices for Comprehensive Annotation of Neuropeptides of *Gryllus bimaculatus*. *Insects* 14: 121–121. doi: 10.3390/insects14020121
- Notaguchi M, Kurotani K, Sato Y, Tabata R, Kawakatsu Y, Okayasu K, Sawai Y, Okada R, Asahina M, Ichihashi Y et al. (2020) Cell-cell adhesion in plant grafting is facilitated by β -1,4-glucanases. *Science* 7: 698-702. doi: 10.1126/science.abc3710

非モデル緑藻の光化学系解析のための RNA seq 解析

亀尾辰砂^{1,2}, 高林厚史^{1,2}

¹ 北海道大学低温科学研究所

² 北海道大学大学院環境科学院

〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目

RNA seq analysis for photosystem analysis of non-model green algae

Shinsa Kameo^{1,2}, Atsushi Takabayashi^{1,2}

¹Institute of Low Temperature Science

²Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University,

Kita-19, Nishi-8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-0819 Japan

Keywords: green algae, Iso-seq, non-model organism, photosystem, RNA seq

DOI: 10.24480/bsj-review.15b3.00261

1. はじめに

約 20 年にわたる次世代シーケンサーの絶え間ない技術革新により、ゲノム解析や RNA seq 解析のコストは私たちのような wet な研究室の手の届くところまで降りてきた。一方で、データ解析の手法やノウハウについてはまだ十分に行き渡ったとは言えないのが現状と思われる。

私たちの研究室では長年にわたり、モデル光合成生物を用いた逆遺伝学的な解析を中心にクロロフィル代謝や光合成の研究を行ってきた。しかし近年では光合成生物の環境適応能の多様性に興味に移りつつあり、非モデル光合成生物を用いた研究が研究室の軸になってきた。そこで問題になったのが配列情報の不足であった。端的に言えば、私たちの解析に配列情報が必須であるものの、私たちにはその配列情報を得るためのノウハウがなかったのである。そこで、私たちは、この 5 年間、手探りで RNA seq を進めてきた。試行錯誤を繰り返し、ロングリードやショートリードを組み合わせた RNA seq 解析を行ってきた結果、私たちは、非モデル光合成生物の遺伝子/タンパク質の配列や機能を予測するとともに、トランスクリプトームの変動を見ることも可能になった。これらの解析結果は、私たちの研究プロジェクトの基盤となっている。

本稿では、私たちが研究材料としている非モデル光合成生物の魅力や研究意義、そして RNA seq 解析を利用した研究成果を紹介するとともに、現行の解析スキームについても紹介する。

2. モデル生物を用いた光合成研究が主流の中、非モデル緑藻であるプラシノ藻類やストレプト藻類に着目した理由

ゲノム解読が行われる前のモデル真核光合成生物は、クロレラ、エンドウ、ホウレンソウなど培養や栽培が容易であり、同時に、葉緑体やチラコイド膜の単離が容易な生物種であっ

た。そのような研究状況の中で、最初に真核光合成生物のゲノム解読が光合成研究に大きな影響を与えたのは、タバコおよびゼニゴケの葉緑体ゲノムの解読 (Shinozaki et al. 1986; Ohyama et al. 1986) だろう。葉緑体ゲノムの解読により光化学系 (PS) I や II の反応中心タンパク質群などの配列情報が明らかになったことに加え、その後確立された葉緑体ゲノムの形質転換系を組みわせることで、葉緑体ゲノムコードの機能未知遺伝子群の解析も大きく進展することになった。

次の飛躍は言うまでもなく 2000 年のシロイヌナズナの全ゲノム解読である (Arabidopsis Genome Initiative 2000)。配列情報が得られること、形質転換系が容易であること、またノックアウトラインが容易に入手できること、など今日に至るまでモデル植物の代表であるシロイヌナズナは瞬く間に光合成研究のモデル植物として利用されるようになり、数多くの研究がこの植物を材料として行われた。また、光合成研究のモデル緑藻としてはクラミドモナスが広く用いられている。

また近年特筆すべきこととして、CryoEM 技術の発展により、より幅広い生物種で光化学系の構造解析が行われるようになった。特に陸上植物やコア緑藻類の光化学系については精力的に構造解析が行われており、その結果としてコケ植物の PSI の構造が維管束植物とは異なること、コア緑藻類の光化学系には予想以上の多様性が見られること、などが明らかになってきた (Suga and Shen 2020; Bai et al. 2021)。しかし、依然として、ストレプト藻類やプラシノ藻類の光合成の研究は進んでおらず、光化学系の構造が明らかになっているのは、プラシノ藻 *Ostreococcus tauri* の PSI (Ishii et al. 2023) のみである。そこで、私たちは、ストレプト藻類やプラシノ藻類の光化学系の解析を進めている。

では、光合成研究材料としてのストレプト藻類やプラシノ藻類の魅力はどこにあるのだろうか？まずストレプト藻類に関しては、陸上植物の祖先であるということは大きな魅力である (図 1)。陸上植物の誕生は地球の生命史の中でも最大級のイベントであり、陸上環境や大気環境を大きく変えることになった。陸上植物へと進化したのは淡水性緑藻のストレプト藻類の一系統であると考えられている (Bowles et al. 2020)。しかし、ストレプト藻類から顕花植物への進化に伴う光合成システムの変遷については未解明の点が多い。緑藻と顕花植物の中間的な形質を持つコケ植物の光化学系の解析はまさにその観点から興味深いものであり、実際にコケ植物の光化学系の構造には維管束植物やコア緑藻類との違いも見出されてきた (Iwai et al. 2015; Pinnola et al. 2018)。ではコケ植物とストレプト藻類の光化学系に違いはあるのだろうか？私たちは、後述のように、最も早く分岐した「古い」ストレプト藻類の *Mesostigma viride* の光化学系はコア緑藻類と陸上植物の中間的な形質を持っていると考えている。そして、その後の陸上植物に至るまでの進化の道筋において光化学系がどのような変遷を遂げているのかは不明である。そのため、筆者は、今後ストレプト藻類からコケ植物への進化に伴う光合成システムの変遷についても、研究が進展する中で、興味や関心を集めるのではないかと考えている。

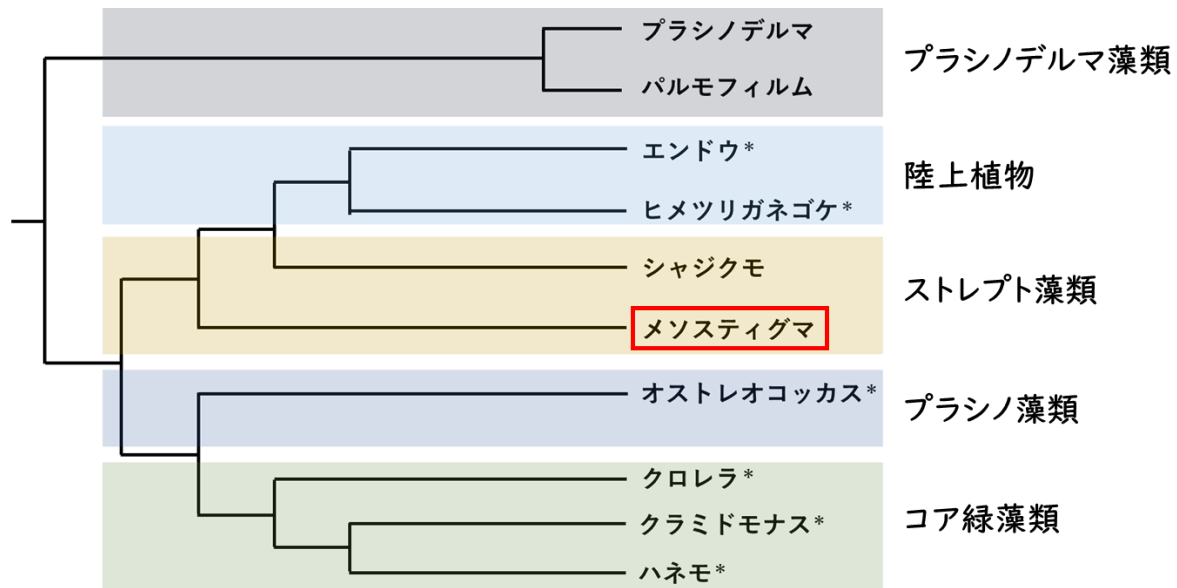


図1 緑色植物（緑藻と陸上植物）の系統関係

アスタリスクは PSI もしくは PSII の構造が既に公開されている種を示している。プラシノ藻類ではオストレオコッカス (*Ostreococcus tauri*) の PSI のみが公開されており、ストレプト藻類に関しては現時点では光化学系の構造が公開された種はない。

一方のプラシノ藻類は、コア緑藻類の祖先にあたる系統群であり、おもに海洋性の緑藻である（図1）。光合成という観点から特に興味深いのは、光合成色素の多様性である。まず、カロテノイド色素の多様性は光合成生物の中でも特筆すべきレベルである (Latasa et al. 2004)。また、クロロフィルの代謝中間体でありクロロフィル *c* とよく似た吸収スペクトルを持つジビニルプロトクロロフィリド (MgDVP) を例外的に集光に用いることも知られている (Ishii et al. 2023)。このような光合成色素の多様性はおそらくは海洋の多様な光環境への適応機構を反映したものである。また、集光アンテナタンパク質にもユニークな特徴があり、LHCP (prasinophyte-specific LHC) はプラシノ藻類に特有の LHC (light-harvesting complex) タンパク質である (Ishii et al. 2023)。この LHCP は通常の LHC よりも多くのカロテノイド色素を結合すると報告されており、弱光環境の海洋での集光に有利な LHC であると考えられる。一方で LHCP を持たないプラシノ藻類も存在すること、カロテノイドの多様性、などから判断すると、プラシノ藻類の集光系には高度な多様性があるのではないかと予想される。

このように、ストレプト藻類やプラシノ藻類には他の緑藻や陸上植物と異なる興味深い特長があるものの、現時点では知見が不足している。そして、そのことが緑藻の光化学系の進化や環境適応機構についての理解を妨げている。そこで、著者らはストレプト藻類やプラシノ藻類の中で、比較的初期に分岐した種にフォーカスして、光化学系の構造解析を進めている。

3. ショートリードを用いた RNA seq 解析とロングリードを用いた RNA seq 解析

非モデル緑藻の光化学系の解析を行う上で問題になるのはゲノム情報がないことである。緑藻のゲノムプロジェクトは急速に広がり着実に進んでいるものの、まだ陸上植物と比べるとゲノムが明らかになった種は限られている。そのため、著者らは興味のある緑藻の光合成遺伝子の配列を入手するために、ロングリードとショートリードを組み合わせた解析を行っている。

まず、ショートリードを用いた RNA seq 解析のメリットは、リード数が多く、配列正確性が高く、コストが安いことである。一方デメリットとしてはリード長が短いため、非モデル生物で RNA の全長を読むためには *de novo assembly* が必要になることが挙げられる。*De novo assembly* はマシンパワーを要求する解析であり、一般的なノート PC では解析が難しい。また、遺伝子の全長を得ることは容易ではなく、しかもキメラ配列を比較的多く含むことにも注意が必要である。

一方、ロングリードを用いた RNA seq 解析 (Isoform sequencing: Iso-seq) の特徴は、全長 cDNA が得られることである。配列の正確性はショートリードに比べれば低いものの、エラーはランダムに生じるため、クラスタリングによって得られたコンセンサス配列については高い正確性を得ることが可能である。ショートリードに比べてリード数は劣るため、発現量の低い mRNA の情報を得ることは難しいものの、光合成遺伝子のように比較的発現量の多い遺伝子についてはより長い配列情報を得ることが期待できる。

筆者は非モデル生物の光合成の解析のため、両方の解析を組み合わせることが多い。具体的には、Iso-seq 解析で構築した全長 cDNA をテンプレートとし、ショートリードを疑似マッピングすることで遺伝子発現解析を行うのが一例である。また、*de novo assembly* 解析は Iso-seq 解析では検出できなかった (比較的発現量が低い) 遺伝子の検出や配列の正確性の検証にも有用である。

4. ロングリードを用いた RNA seq 解析の実際

筆者は PacBio sequel を利用した Iso-seq 解析をよく行っているのですが、ここではそれについて紹介する。まず、私たちが材料としている樹木や藻類の中には市販のキットで total RNA を抽出すると、多糖類の混入が多く、解析に十分な品質が得られない場合もめずらしくない。そこで私たちがよく利用しているのは、ニッポンジーン社の Assist buffer と ISOSPIN Plant RNA を組み合わせた抽出キットである。このキットは多糖類などが多く含まれているサンプルに対して非常に有効であり、実際にカエデなどの樹木類や緑藻類で成果を挙げている。また、さらに精製が必要な場合には Qiagen 社などのクリーンアップキットを使っている。

Iso-seq を受託解析する際には、複数の (〜4 種類の) 生物種のサンプルを同時に依頼することが多い。これは1種あたりの解析コストを下げるためであり、著者らの研究対象が発現量の比較的多い光合成遺伝子であるため、仮にリード数が 1/4 になっても目的遺伝子が得られることを期待してのことである。ただ、リード数が多いとは言えない Iso-seq において、さらにリード数を下げることに葛藤もあり、それが理由で目的の遺伝子が検出できないこと

もあれば、断片的な遺伝子配列しか入手できないこともある。研究目的に応じて個別に判断する必要があると思われる。

データ解析も受託することが可能であるが、解析コストを下げるためデータ解析を頼まず、成果物の bam ファイルを自分で解析することが多い。その際、筆者は、Windows11 の WSL2 (Windows Subsystem for Linux) に Ubuntu 環境を導入し、PacBio 社の Iso-seq パイプライン version 3 (<https://github.com/PacificBiosciences/pbbioconda>) を利用して解析している。このパイプラインは Anaconda/Miniconda の Bioconda チャンネルに登録されているが、python3 ではなく python 2 を必要とするため、仮想環境に python 2.7 を導入する必要がある。Iso-seq 解析で得られた full-length cDNA 配列は GeneMarkS-T (Tang et al. 2015) や TransDecoder (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>) などのソフトウェアでタンパク質アミノ酸配列に転換し、BLASTP (Camacho et al. 2009) や Diamond (Buchfink et al. 2021) などの相同検索ソフトを用いて自分の研究対象である光合成タンパク質を抽出している。もしくは、eggNOG-mapper (Cantalapiedra et al. 2021) や KofamKOALA (Aramaki et al. 2020) などのソフトウェアを利用して Gene Ontology (GO) や KEGG Orthology (KO) などの機能アノテーションを行い、full-length cDNA 配列をテンプレートとしショートリードを用いた発現解析に利用している。

5. ショートリードを用いた RNA seq 解析の実際

著者らはロングリードに加えて Illumina 社の NovaSeq や MGI 社の DNBSEQ などを利用したショートリードを用いた解析も行っている。目的の 1 つは *de novo assembly* を用いた遺伝子探索であり、著者らは Iso-seq 解析に加えてこれも併用している。例えば、筆者の主なターゲットの LHC 遺伝子群では LHCb7 などの発現量の低い遺伝子が Iso-seq で単離できず *de novo assembly* で検出できることはめずらしくない。また、複数の手法で遺伝子の存在や配列を検証できること自体が有益である。

De novo assembly の際には、ソフトウェアによって結果が異なるため、複数のソフトウェアを用いて結果を比較するように心がけている。また TransRate (Smith-Unna et al. 2016) で *de novo assembly* で組み立てた contig の質を評価し、質の高い contig のみを下流の解析に用いるようにしている。得られた contig の機能推定については、ロングリードの際に用いたソフトウェアを用いて同様の解析を行っている。

6. *Mesostigma viride* の光化学系の解析結果 (Iso-seq 解析の実際と応用)

ここではロングリードを用いた Iso-seq 解析の具体例として *Mesostigma viride* (*M. viride*) の解析結果を紹介したい。先述の通り *M. viride* は陸上植物の祖先でもあるストレプト藻類の 1 種であり、その中でも最も早く分岐した「古い」ストレプト藻類である。筆者らはストレプト藻類から陸上植物への進化に伴う光化学系の特に集光系の分子進化に興味があったため、解析を始めた。現在では *M. viride* のゲノムが公開されているが、筆者らが解析を始めた際にはゲノムが公開されていなかった。そのため、*M. viride* の光化学系がどのような LHC を集光アンテナとして利用しているのかを調べるために RNA seq 解析による LHC 遺伝子の探索を

試みた。具体的には、*M. viride* の total RNA を用いて、PacBio sequel による Iso-seq 解析を行った後、その full-length cDNA 配列の中から既存の *LHC* 遺伝子と有意な相同性を持つ遺伝子を探索し、*LHC* タンパク質群の系統樹を作成することで、*M. viride* が持つ *LHC* 遺伝子を推定した (Aso et al. 2021)。

緑藻類の持つ *LHC* 遺伝子セットを比較すると、*M. viride* は同じストレプト藻類とは大きく異なることが明らかになった。例えば、*M. viride* はクラミドモナスの *CrLHCA2* 遺伝子のホモログ (*algae LHCA2*) や *CrLHCA9* 遺伝子のホモログ (*algae LHCA9*) を持つが、これらの *LHC* 遺伝子群はプラシノ藻類やコア緑藻類に保存されているものの他のストレプト藻類には見られない。また、一部のプラシノ藻類のみに見られる *LHCP* 遺伝子も持つが、これも他のストレプト藻類には見られない。逆に、ストレプト藻類や陸上植物によく保存されているシロイヌナズナ *LHCB6* 遺伝子のホモログを持たない。この結果は、*M. viride* の *LHC* セットがストレプト藻類ではなく、むしろプラシノ藻類の *LHC* セットに近いことを示しており、*M. viride* の系統的な位置を踏まえると、*M. viride* が他のストレプト藻類から分岐した後で、ストレプト藻類が植物型の *LHC* セットを持つようになったことを示唆している。なお、シャジクモ類よりも早く分岐した *Klebsormidium nitens* は植物型の *LHC* セットを持つ。つまり、*K. nitens* が他のストレプト藻類から分岐する前にすでに植物型の *LHC* セットを獲得していたと考えられる。これらのことから、*M. viride* はストレプト藻類としてはユニークな光化学系の集光系を持つことが明らかになった (図 2)。

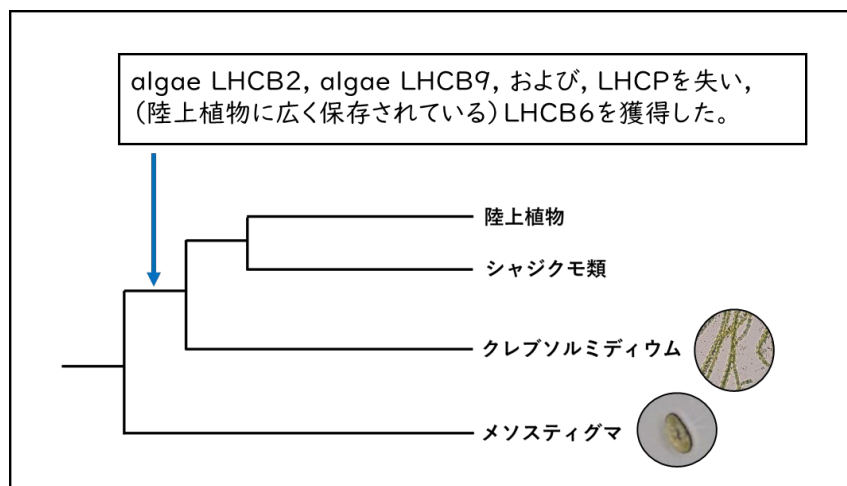


図 2 メソスティグマとクレブソルミディウムの *LHC* セットの違い

メソスティグマの *LHC* セットに関してはプラシノ藻類との共通点が多く見られたが、クレブソルミディウムの *LHC* セットは陸上植物とよく似ている。このことから、メソスティグマが他のストレプト藻類から分岐した後、クレブソルミディウムが分岐する前に、陸上植物型の *LHC* セットを獲得したのだろうと考えている。

次に、*M. viride* の *LHC* タンパク質群が *PSI* と *PSII* のどちらに結合しているのかを調べるために、Clear-Native (CN) -PAGE で分離した *PSI* と *PSII* のバンドのタンパク質組成を質量分析で解析した (Aso et al. 2021)。その際、ペプチドの同定のためのデータベースには、Iso-

seq 解析を利用して構築したタンパク質配列とすでに公開されていた葉緑体ゲノムデータを用いた。その結果から、PSI に結合する LHC タンパク質群と PSII に結合する LHCII タンパク質群を推定し、既知の PSI や PSII の構造と比較することで *M.viride* の光化学系の集光系の構造を予測した (図 3)。LHCP は PSI ではなく PSII に結合していることを見出した。オストレオコッカスと異なり LHCP は 3 量体を形成しているのではなく、マイナー-LHCII として機能しているのだらうと予想している。また algae LHCA2 と algae LHCA9 は陸上植物には見られないことから、クレブソルミディウムへの進化の過程で失われたのだらうと考えている。

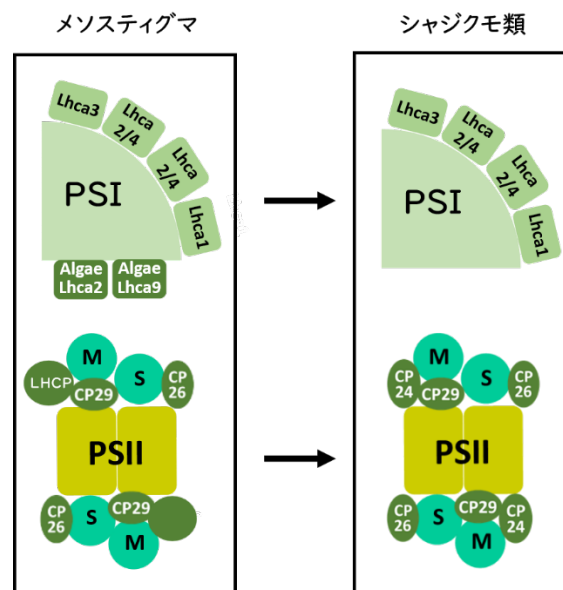


図 3 メソスティグマと他のシャジクモ類の光化学系の構造の違い (予測)

7. まとめ

光化学系の色素やアンテナの多様性は光合成生物の光環境適応に重要な役割を担うと考えられている。近年の CryoEM 技術の進展により、光化学系の構造解析は飛躍的に進んでいるものの、ゲノムプロジェクトが進んでいる現在においても、ゲノム情報が公開された緑藻種の数を決して十分ではなく、光化学系の構造解析の一つの制約になっている。本研究の RNA seq, 系統解析, Native-PAGE, MS 解析を組み合わせた解析は光化学系に限らず、タンパク質複合体のタンパク質組成を予測するうえで強力な手法と考えており、今後は、*de novo* assembly もしくは Iso-seq で構築したタンパク質アミノ酸配列の長さや精度が CryoEM 解析による光化学系の構造解析のためにどの程度有効であるのかどうかを試みていきたい。同時に、さらなるゲノムプロジェクトの発展にも期待したい。

引用文献

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:796–815. doi: 10.1038/35048692

- Aramaki T, Blanc-Mathieu R, Endo H, Ohkubo K, Kanehisa M, Goto S, Ogata H. (2020) KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics* 36:2251–2252. doi: 10.1093/bioinformatics/btz859
- Aso M, Matsumae R, Tanaka A, Tanaka R, Takabayashi A. (2021) Unique Peripheral Antennas in the Photosystems of the Streptophyte Alga *Mesostigma viride*. *Plant Cell Physiol* 62:436–446. doi: 10.1093/pcp/pcaa172
- Bai T, Guo L, Xu M, Tian L (2021) Structural Diversity of Photosystem I and Its Light-Harvesting System in Eukaryotic Algae and Plants. *Front Plant Sci* 12:781035. doi: 10.3389/fpls.2021.781035
- Bowles AMC, Bechtold U, Paps J (2020) The Origin of Land Plants Is Rooted in Two Bursts of Genomic Novelty. *Curr Biol* 30:530–536.e2. doi: 10.1016/j.cub.2019.11.090
- Buchfink B, Reuter K, Drost HG (2021) Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nat Methods* 18:366–368. doi: 10.1038/s41592-021-01101-x
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421
- Cantalapiedra CP, Hernández-Plaza A, Letunic I, Bork P, Huerta-Cepas J. (2021) eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Mol Biol Evol* 38:5825–5829. doi: 10.1093/molbev/msab293
- Ishii A, Shan J, Sheng X, Kim E, Watanabe A, Yokono M, Noda C, Song C, Murata K, Liu, et al. (2023) The photosystem I supercomplex from a primordial green alga *Ostreococcus tauri* harbors three light-harvesting complex trimers. *Elife* 12:e84488. doi: 10.7554/eLife.84488
- Iwai M, Yokono M, Kono M, Noguchi K, Akimoto S, Nakano A. (2015) Light-harvesting complex Lhcb9 confers a green alga-type photosystem I supercomplex to the moss *Physcomitrella patens*. *Nat Plants* 1:14008. doi: 10.1038/nplants.2014.8
- Latasa M, Scharek R, Gall FL, Guillou L (2004) Pigment suites and taxonomic groups in Prasinophyceae. *J Phycol* 40:1149–1155. doi: 10.1111/j.1529-8817.2004.03136.x
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, et al (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322:572–574. doi: 10.1038/322572a0
- Pinnola A, Alboresi A, Nosek L, Barozzi F, Kouřil R, Dall'Osto L, Aro EM, et al. (2018) A LHCB9-dependent photosystem I megacomplex induced under low light in *Physcomitrella patens*. *Nat Plants* 4:910–919. doi: 10.1038/s41477-018-0270-2
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5:2043–2049. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04464.x
- Smith-Unna R, Boursnell C, Patro R, Hibberd JM, Kelly S. (2016) TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Res* 26:1134–1144. doi: 10.1101/gr.196469.115

- Suga M, Shen JR (2020) Structural variations of photosystem I-antenna supercomplex in response to adaptations to different light environments. *Curr Opin Struct Biol* 63:10–17. doi: 10.1016/j.sbi.2020.02.005
- Tang S, Lomsadze A, Borodovsky M (2015) Identification of protein coding regions in RNA transcripts. *Nucleic Acids Res* 43:e78. doi: 10.1093/nar/gkv227

メダカの水槽で発見された新種の最小ゲノム淡水産緑藻メダカモ

松永 幸大¹

¹ 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・先端生命科学専攻
〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

A new species of freshwater green algae with the smallest genome, *Medakamo hakoo*, was discovered in the aquarium of *Oryzias latipes*

Sachihiro Matsunaga¹

¹Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa 277-8562, Chiba, Japan

Keywords: algae, evolution, Medakamo, minimum genome, *Oryzias latipes*,

DOI: 10.24480/bsj-review.15b4.00262

1. 多言語で国際的に報道されたメダカモの発見

2023 年 1 月 30 日にメダカモ・ゲノム解析の論文が発表されると、「家庭の水槽から新種の藻類が見つかった」というメダカモ発見の経緯がインパクトをもたらし、多くのメディアに取り上げていただいた。さらに嬉しかったことは、多言語（英語、中国語、ドイツ語、フランス語、スペイン語、ロシア語、ポーランド語など）により、メダカモを各国のメディアが紹介したことである。さらに、外国の知らないどなたかがすぐに、Wikipedia にメダカモのページを作ってくださった。私たちの発見が科学界のみならず、国際社会の方々の興味を引いたことは、研究者冥利に尽きると言えよう。すでに、英語論文 (Kato et al. 2023) の他、ゲノム解析論文の筆頭著者である加藤翔一博士による和文総説 (加藤 and 松永 2023a, b) などでも、メダカモの科学的な紹介をしているので、この BSJ review では、メダカモ発見の経緯や苦労話など、今後、新種生物を発見してゲノム解析結果を発表しようと野望を抱く研究者の方々に少しでも参考になりそうな話題を提供したい。

2. メダカモ発見の経緯

黒岩常祥先生はご自宅を改築しシズン研究所を開設され、現在も細胞生物学研究を継続されている。私も定期的にシズン研究所を訪問し、談話室で研究のディスカッションを楽しませていただいている。談話室の窓際には、かつて大きな水槽が設置してあり、金魚とメダカが飼育されていた。黒岩先生にお話を伺ったところ、2014 年初頭に、メダカと水草を購入し飼育し始めて 1 か月ほど経過すると、その水槽の水が



図 1. メダカモが発見された水槽の写真

親のヒメダカ (*Oryzias latipes*)・3 匹と針子と呼ばれる幼魚のヒメダカ・2 匹がグリーンウォーターの中を遊泳している。
(黒岩常祥先生より提供)

緑色に濁った。そこで、緑色の水を採取して顕微鏡で観察したところ、今まで見たこともない、小さな緑藻を発見したとのことであった。DNA 蛍光染色剤 DAPI により緑藻の細胞核を染色して、紅藻のシゾンと出芽酵母の細胞核の蛍光輝度を定量的に比較したところ、極めて小さいゲノムを持つ藻類であることがわかった (Kuroiwa et al. 2015, 2016; 黒岩 2017)。身近な現象にも探求心を持ち続ける黒岩先生から、絶えることのない研究者魂の神髄を、今回も学ぶことができた。黒岩先生は、メダカを飼育されていた水槽から発見された経緯から、この緑藻の属名を *Medakamo*、黒岩先生の奥様であり共同研究者の黒岩晴子先生のニックネームから種小名を *hakoo* と命名された。

後日、メダカの研究者である東北大学の竹内秀明教授と安齋賢助教（現・京都大学特任准教授）にメダカモの話をする、メダカ研究者の間では、藻類が増殖した緑色の水のことを「グリーンウォーター」と呼び、メダカの生育が良くなる水として研究者内では既知の事実であると教えていただいた。実際に、ネット検索してみると、「グリーンウォーター」の効能はメダカの飼育愛好家の間でも、よく知られていた。メダカ研究者はメダカの研究を推進するため、わざわざメダカを飼育している水に生育する藻類を調べることはなかったであろう。注目する生物対象が違えば、目の前にいる新種に気づかないこともあることを思い知らされた次第である。

3. ゲノム解析技術が進歩しても純培養技術は重要である

メダカモが新種であるかどうかを検証し、今後のメダカモの研究展開を図るには、ゲノム配列を決定しなければならない。多くの藻類、真菌、細菌などが混在する水槽の水から、メダカモのみが生育する純培養を確立することは容易ではなかった。メダカモを単離した後、顕微鏡で他の生物がいないことを確認した培養液から DNA を抽出して、シーケンス解析を行った。しかし、その結果得られたシーケンスデータには、カビのゲノムが一定の割合、含まれていた。バイオインフォマティックス的にカビのゲノム情報を除去することは可能であったが、遺伝子の水平伝播の可能性を排除できず、科学的な観点からも恣意的な解析を避ける必要があった。そこで、線画培養が得意な乾弥生研究員に半年間、寒天プレート上で線画培養を徹底的に繰り返してもらい、ついにメダカモの純培養を確立することに成功した。純培養したメダカモからゲノムを抽出してシーケンス解析をやり直したところ、コンタミネーションした生物由来の DNA シーケンスはなくなり、メダカモのゲノムを完全解読することができた。ゲノム解析技術は日進月歩で急速に進むが、ゲノム解析対象を純培養して、ほかの生物のコンタミネーションをなくす基本的な細胞生物学的技術は、今後にも必要になるといえよう。

4. 生物界トップレベルの GC リッチゲノム

PacBio RS II system を使用したロングリードシーケンスの結果、メダカモの細胞核は16本の染色体からなる15.8 Mbp のゲノムを持ち (Kato et al. 2023)、ミトコンドリアと葉緑体は、それぞれ36.5 kb と90.8 kb の環状DNAをもつことがわかった (Takusagawa et al. 2024)。核ゲノムのGC含量は72.7%であり、真核生物中、メダカモはトップクラスのGC-richゲノムを持つ生物

であることがわかった。なぜ、メダカモがGC-richゲノムを持つのか、その理由はわからない。一般的にゲノムにおけるGC含量の高さは、塩基間の水素結合の本数が多くなるために、ゲノムの熱安定性をもたらす (von Hippel et al. 2013) と言われるが、メダカモは高温環境下に生息しているわけではない。

メダカモのGC-richゲノムの機能を推測するために、G4構造 (Gカルテット, グアニン4重鎖) のコンセンサス配列を予測した。G4構造は、グアニン塩基が豊富なゲノム領域において形成されるDNA4重鎖構造のことである (Bochman et al. 2012)。DNA複製やRNA転写などに影響を与えるほか、ヌクレオソームやクロマチン構造制御にも関係し、神経疾患を含む広範な生命現象に関係することが示唆されている (Esnault et al. 2023)。G4構造予測ソフトウェア pqsfinder (Hon et al. 2017) を用いてメダカモのゲノムに含まれるG4コンセンサス配列を同定した結果、非常に高い割合でゲノム内にG4構造が予測された。メダカモと同等の73%のGC-



Home | Index search

Search

Filter

Identifier

Scientific name

Medakamo

Publication

Type designation status

- none -
isoeptotype
isotype
not applicable

Ctrl + Click to unselect

Taxon graph

Registration Id: <http://phycobank.org/103507>

Event: new name, new nomenclatural type

Medakamo hakoo T.Kuroiwa in Communications Biology 6(89): Suppl. 20. 23 Jan 2023[†]
Holotype: Japan, Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo, 35°42'9.702"N, 139°44'15.028"E, 11 Mar 2014 (NIES: NIES-50025)²

1. Etymology: The specific epithet "hakoo" refers to the nickname given to Dr. Haruko Kuroiwa, who loves plants and algae. Treated as a feminine noun. , 2. Authentic culture: M-hakoo 311. This culture is maintained as NIES-4000 in MCC-NIES.

published in: Kato, S., Misumi, O., Maruyama, S., Nozaki, H., Tsujimoto-Inui, Y., Takusagawa, M., Suzuki, S., Kuwata, K., Noda, S., Ito, N., Okabe, Y., Sakamoto, T., Yagisawa, F., Matsunaga, T.M., Matsubayashi, Y., Yamaguchi, H., Kawachi, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. & Matsunaga, S. 2023: Genomic analysis of an ultrasmall freshwater green alga, Medakamo hakoo. – Communications Biology 6(89): 1-13 [Suppl. 1-22]



図2. PhycoBank のメダカモ登録ページ

PhycoBank の Web ページ (<https://www.phycobank.org/>) より転載。東京・神楽坂が採集地として地図上に記載されている。

richゲノムをもつ放線菌*Streptomyces coelicolor*よりも高い頻度で、メダカモのゲノム内には、G4コンセンサス配列が存在することがわかった。メダカモを研究すれば、G4構造の新たな生物学的意義を明らかにすることができるかもしれない。

また、メダカモの核ゲノム中に含まれるタンパク質コーディング遺伝子は7629個しかなく、メダカモは、淡水に生息する緑藻の中では最小の遺伝子数しか保持していない緑藻であることがわかった (Kato et al. 2023)。そのゲノム中には、熱放散に働く調節因子・LHCSR、構造が光変換する色素タンパク質・フィトクロム、RNAi 関連タンパク質、クロマチン構成タンパク質・ヒストン H1などをコードする遺伝子が存在していなかった (Kato et al. 2023)。

5. メダカモの新種登録

メダカモが新種であることを証明するために、79 個の葉緑体遺伝子がコードするアミノ酸配列を用いて最尤法によりメダカモと 62 種の緑藻の系統解析を行った。その結果、メダカモはトレボクシア藻綱の系統に含まれており、*Choricystis* 属と小さなクレードを形成していた。さらに、*Choricystis* 属の 57 系統の *rbcL* 遺伝子配列 (Pröschold and Darienko 2020) を用いて系統解析した結果、2 つの姉妹群が再現性高く分離された。メダカモが属する群には、*M. hakoo* と、*Choricystis limnetica* (のちに *Medakamo* 属設定により *M. limnetica* comb. nov. に変更) が属していた。この群の微細藻類が有する *rbcL* 配列や細胞形態は他の緑藻類と明確に区別できることから、本群はトレボクシア藻綱の新属として認められ、野崎久義博士により PhycoBank に登録された。PhycoBank のメダカモ採集地には、東京の神楽坂にある黒岩先生のご自宅が記されている (図 2)。

6. メダカモ研究の今後の展開

メダカモを含む微細藻類のオルソグループの情報を活用し、すべての微細藻類で共有されているオルソグループを同定することで、1268 個からなる微細藻類のコア遺伝子群を絞り込んだ (Kato et al. 2023)。このコア遺伝子群は藻類のミニマムゲノムを規定していると考えられる。今後、藻類のミニマムゲノムを使用して代謝パスウェイ解析をすることで、「植物たらしめている」代謝の実態が明らかになるであろう。

また、最小サイズかつ最少遺伝子数を持つメダカモは、合成生物学的手法に活用できる最適な微細藻類ともいえる (Okabe and Matsunaga 2022)。実際に、我々はメダカモをメダカにマイクロインジェクションすることで光共生系の人工モデル系を確立している。身近な水槽から発見されたメダカモが様々な研究の進展に貢献することに期待したい。

謝辞

本稿の内容は、黒岩常祥博士 (日本学士院)、黒岩晴子博士 (日本女子大学)、野崎久義・丸山真一郎・乾弥生・松永朋子博士 (東京大学)、三角修己博士 (山口大学)、田草川真理博士 (京都大学)、鈴木重勝・山口晴代・河地正伸博士 (国立環境研) 等との共同研究成果である。また、本研究は JST-CREST「ゲノムスケールの DNA 設計・合成による細胞制御技術の創出」(JPMJCR20S6)、JST-OPERA「低 CO₂ と低環境負荷を実現する微細藻バイオリファイナ

リーの創出」(JPMJOP1832), JST-GteX「先端的植物バイオものづくり基盤の構築」(JPMJGX23B0)などの支援を受けた。

引用文献

- Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA. (2012) DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Rev Genet* 13: 770–780. doi: 10.1038/nrg3296
- Esnaault C, Magat T, Zine El Aabidine A, Garcia-Oliver E, Cucchiaroni A, Bouchouika S, Lleres D, Goerke L, Luo Y et al. (2023) G4access identifies G-quadruplexes and their associations with open chromatin and imprinting control regions. *Nature Genet* 55: 1359–1369. doi: 10.1038/s41588-023-01437-4
- Hon J, Martínek T, Zendulka J, Lexa M. (2017) pqsfinder: an exhaustive and imperfection-tolerant search tool for potential quadruplex-forming sequences in R. *Bioinformatics* 33: 3373–3379. doi: 10.1093/bioinformatics/btx413
- Kato S, Misumi O, Maruyama S, Nozaki H, Tsujimoto-Inui Y, Takusagawa M, Suzuki S, Kuwata K, Noda S, Matsubayashi Y et al. (2023) Genomic analysis of an ultrasmall freshwater green alga, *Medakamo hakoo*. *Commun Biol* 6: 89. doi:10.1038/s42003-022-04367-9
- 加藤翔一, 松永幸大 (2023a) 緑藻メダカモの発見とその特徴. *藻類* 71: 173-178.
- 加藤翔一, 松永幸大 (2023b) 身近にいた新種の微細藻類 淡水性の単細胞性緑藻類メダカモのゲノム解析. *CROSS T&T* 74: 5–8.
- Kuroiwa T, Ohnuma M, Nozaki H, Imoto Y, Misumi O, Kuroiwa H. (2015) Cytological evidence of cell-nuclear genome size of a new ultra-small unicellular freshwater green alga, “*Medakamo hakoo*” strain M-hakoo 311 I. Comparison with *Cyanidioschyzon merolae* and *Ostreococcus tauri*. *Cytologia* 80: 143–150. doi: 10.1508/cytologia.80.143
- Kuroiwa T, Ohnuma M, Imoto Y, Misumi O, Nagata N, Miyakawa I, Fujishima M, Kuroiwa H. (2016) Cell-nuclear genome size of the ultrasmall unicellular freshwater green alga, *Medakamo hakoo* 311 as studied by DAPI staining after microwave oven treatments: II. Comparison with *Cyanidioschyzon merolae*, *Saccharomyces cerevisiae* (n, 2n) and *Chlorella variabilis*. *Cytologia* 81: 69–76. doi: 10.1508/cytologia.81.69
- 黒岩常祥 (2017) シズンとメダカモから探る真核生物の増殖の基本原則. *Plant Morphology* 29: 63–71.
- Okabe Y, Matsunaga S. (2022) Natural and artificial photosymbiosis in vertebrates. *Cytologia* 87: 69–72. doi: 10.1508/cytologia.87.69
- Pröschold T, Darienko T. (2020) *Choricystis* and *Lewinosphaera* gen. nov. (Trebouxiphyceae Chlorophyta), two different green algal endosymbionts in freshwater sponges. *Symbiosis*. 82: 175–188. doi: 10.1007/s13199-020-00711-x
- Takusagawa M, Misumi O, Nozaki H, Kato S, Maruyama S, Tsujimoto-Inui Y, Yagisawa F, Ohnuma M, Kuroiwa H, Kuroiwa T et al. (2024) Complete mitochondrial and chloroplast DNA sequences of the freshwater green microalga *Medakamo hakoo*. *Genes Genet Syst* 98: 353–360. doi: 10.1266/ggs.23-00275

von Hippel PH, Johnson NP, Marcus AH. (2013) Fifty years of DNA "breathing": Reflections on old and new approaches. *Biopolymers* 99: 923–954. doi: 10.1002/bip.22347

光合成能喪失に伴う藻類ゲノムの進化

神川 龍馬

京都大学 大学院農学研究科
〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

Algal genome evolution after loss of photosynthesis: as a case study of *Nitzschia putrida*

Ryoma Kamikawa

Graduate School of Agriculture, Kyoto University
Kitasirakawa Oiwake cho, Sakyo ku, Kyoto, Kyoto 606-8502, Japan

Keywords: diatom, gene duplication, osmotroph, plastid, photoreceptors

DOI: 10.24480/bsj-review.15b5.00263

1. はじめに

1-1. 真核藻類の多様性と光合成能獲得進化

水圏，特に海洋における純一次生産量は炭素量換算でおよそ 48.5 Pg/年であり，56.4 Pg/年である陸上の純一次生産量に匹敵する (Field et al. 1998)。陸上の主要一次生産者は陸上植物であるが，水圏での主要一次生産者は微細藻類である。微細藻類はシアノバクテリアや光合成性真核生物からなり，特に光合成性真核生物の光合成能の獲得進化は多様である。

緑藻類，紅藻類，灰色藻類は陸上植物と単系統群を形成する光合成性真核生物であり，これらをまとめたグループをアーケプラスチダと呼ぶ。真核生物における最初の光合成能の獲得はアーケプラスチダの共通祖先で生じたと考えられている。従属栄養性であったアーケプラスチダの共通祖先と，すでに誕生していた光合成性原核生物であるシアノバクテリアの一種との間の細胞内共生とその後の絶対共生関係の確立やオルガネラ化を経て光合成用のオルガネラである色素体が誕生したと考えられている。この共生現象を一次共生と呼ぶ。ただし，どのような機構でそのシアノバクテリアが真核細胞内に侵入したのかは不明である (Miyagishima 2023)。

その後，紅藻類や緑藻類の細胞が従属栄養性真核生物との間に細胞内共生関係を確立した。この共生現象を二次共生と呼ぶ。二次共生によって誕生したのがクリプト藻類 (クリプチスタ) とクロララクニオン藻類 (リザリア, SAR)，ユーグレナ藻類 (ディスコバ) とされている。クリプト藻類は紅藻細胞との二次共生，後者 2 系統はそれぞれ異なる緑藻細胞との二次共生に由来する色素体を有する。その他の光合成性真核生物系統に，ハプト藻類 (ハプチスタ)，不等毛藻類 (ストラメノパイル, SAR)，渦鞭毛藻類 (アルベオラータ, SAR)，コルポデラ類 (アルベオラータ, SAR) が知られ，これらは紅藻由来色素体を有する。過去には「紅藻由来色素体を有する系統は単系統であり，その共通祖先で紅藻細胞との二次共生により光合成能を獲得した」とするクロムアルベオラータ仮説 (Cavalier-Smith 2002) が主流であ

った（神川 2023）。しかし、現在は「それぞれ離れた系統であり、独立した色素体獲得進化を経て光合成能を獲得した」とする説が大勢を占めている（神川 2023）。なお、これらの紅藻由来色素体が二次共生由来であるのか、それともクリプト藻など二次共生由来色素体を有する細胞との三次共生由来や四次共生由来であるのか不明である（Kamikawa 2021）。

1-2. 光合成能喪失藻類の生態学的多様性

上述のように多様な真核生物系統で光合成能の獲得進化が生じてきた。その一方で光合成能喪失進化もほぼ全ての光合成性系統で起きている（Hadariová et al. 2018）。ハプト藻類および灰色藻類、クロララクニオン藻類のみ、光合成能を喪失する進化を生じた種が知られていない。ここで言う光合成能の喪失とは、文字通り光合成という性質の喪失であって、色素体の喪失を意味しない。むしろそのような例は少なく、現在知られている真核生物の多様性の中で、色素体喪失進化の可能性が議論されているのはわずか4例である（後述）。

このような非光合成性種は光合成による独立栄養性ではなく、外部の炭素源やエネルギー源に依存する種へと進化を遂げている。ただし、光合成能喪失後の生態は、系統ごとに異なる。ヒトに感染する寄生能を有する代表例はアピコンプレクサ類 *Plasmodium falciparum* である（Kamikawa 2021）。同様に寄生性なのは光合成性陸上植物の根に寄生するハマウツボ科植物 *Orobancha minor* や紅藻類に寄生する紅藻 *Choreocolax polysiphoniae* などが知られる（Hadariová et al. 2018）。非光合成性緑藻類の一種 *Helicosporidium* sp. は昆虫の腸内に寄生し、非光合成性渦鞭毛藻類 *Hematodinium* sp. は甲殻類に寄生する種である（Kamikawa 2021）。一方で、不等毛藻類の一つである黄金色藻類（例：*Spumella* 属）やディクチオカ藻類（例：*Pteridomonas* 属）の非光合成性種は原核生物を捕食する捕食性種として知られる（Dorrell et al. 2019; Kayama et al. 2020b）。また光合成能喪失緑藻類 NrCl902 株や光合成能喪失クリプト藻類、光合成能喪失珪藻類種は吸収栄養性である（Kamikawa et al. 2015a; Kayama et al. 2020a; Tanifuji et al. 2020）。これらは水圏に溶存している物質から炭素源やエネルギー源を得ている。本稿では、多細胞性の陸上植物や紅藻は除き、単細胞の真核微生物に着目して紹介する。

1-3. 非光合成性珪藻類 *Nitzschia putrida*

不等毛藻類に属する系統の一つである珪藻類はガラス（シリカ）を主成分とした細胞壁を有する単細胞の光合成性真核生物グループである。10 万種以上存在し、その純一次生産量は地球全体の約 20% を占めると言われている（Nelson et al. 1995; Field et al. 1998; Falkowski et al. 1998）。色素体は 4 重包膜で、最外膜は小胞体と融合している。チラコイドは 3 重で、主要な光合成色素はクロロフィル *a*, クロロフィル *c*, そしてフコキサンチンである（神川 2023）。光合成性珪藻の一部には、ロドプシンを介した、光合成とは異なる光利用能も存在する（Yoshizawa et al. 2023）。

Nitzschia putrida は、1854 年に *Synedra putrida* として記載され、1900 年に Benecke が *Nitzschia* 属に移した無色の珪藻であり（Benecke 1900）、上述 3 色素を欠く。非光合成性珪藻は *N. putrida* を始めとしてこれまでに 10 種が記載され、そのうち 6 種が *Nitzschia* 属、1 種が *Hantzschia* 属、4 種が *Tursicola* 属である（Benecke 1900; Li and Volcani 1987; Frankovich et al.

al. 2018)。これらに加えて未記載 *Nitzschia* 属単離培養株や、属が未同定の培養株が存在する (Kamikawa et al. 2015a, Mayama and Kamikawa 未発表)。非光合成性珪藻種の少なくとも一部では 4 重包膜を有する色素体が未だ保持されていることが電子顕微鏡観察から明らかになっている (Kamikawa et al. 2015a)。本色素体の名残には、縮退したチラコイド様構造が観察されている。また珪藻において複数の属内に非光合成性種が存在することから、光合成能の喪失進化は独立して複数回生じてきたと考えられる (Kamikawa et al. 2015a; Frankovich et al. 2018)。ただし、28S rRNA 遺伝子分子系統樹において、*Nitzschia* 属内における非光合成性種が多系統なのか単系統なのか、その系統関係はまだ結論が出ておらず、解析に用いるタクソサンプリングによっても得られる結果に影響がある (Kamikawa et al. 2015a; Onyshchenko et al. 2018)。そのため *Nitzschia* 属内で光合成能の喪失が 1 度だけ生じたのか複数回生じたのか議論の最中である。

日本において、*N. putrida* を始めとする *Nitzschia* 属非光合成性種の多くは沖縄県マングローブ林河口域の落ち葉から単離され、その増殖特性が調査されてきた (Kamikawa et al. 2015a; Ishii and Kamikawa 2017)。上述種は 5°C から 35°C まで増殖可能であり、0.5% から >10% までの海水塩濃度下でも増殖可能である。これは潮汐や蒸発、淡水河川の流入によって激変する環境で生息しているのに適していると考えられる (Ishii and Kamikawa 2017)。このように温度や塩濃度などの環境変動に適応できる *N. putrida* は吸収栄養を行う従属栄養性で光合成能を喪失している。そのため栄養塩が豊富な培養液中や寒天培地上で無菌培養が容易であるため多様な研究に適している。

1-4. 光合成能喪失＝ゲノム縮退？

これまでに詳細なゲノム解析に供された光合成能喪失真核微生物の多くは寄生性である。例えばヒトに感染し年間数億人が罹患し、数百万人が命の危機にさらされているマラリア原虫 *P. falciparum* は 23 Mbp のゲノムを有し (Gardner et al. 2002)、一方でマラリア原虫に比較的近縁な光合成性種であるコルポデラ類 *Chromera velia* は 193.6 Mbp のゲノムをもつ

(Woo et al. 2015)。*C. velia* の系統と分岐した後に *P. falciparum* の祖先が 3800 以上もの相同遺伝子を喪失したことが示唆されていることから明らかにゲノム縮退が生じてきたはずである (Woo et al. 2015)。しかし、この非光合成性・寄生性真核微生物におけるゲノム縮退が光合成能喪失そのものによって引き起こされたのか、それとも寄生性という生存戦略による選択圧なのかは不明であった。

そこで寄生性ではない *N. putrida* のゲノム解析を行うことで、光合成能の喪失は寄生性種同様にゲノム縮退に影響を与えているのか、そして *N. putrida* の光合成能喪失に伴う生態学的役割の変化 (独立栄養から吸収栄養による従属栄養性) をサポートするゲノム進化は生じているのかについて調べることにした。

2. *N. putrida* ゲノムとコードされた機能

2-1. ゲノム構造

光合成性珪藻は2倍体ゲノムを有し、一部の種はヘテロ接合度が高い (Mock et al. 2017)。そのようなゲノムのアッセンブルは困難な場合が多く、適切なアッセンブルツールの選別と1倍体分ゲノムの適切な抽出が必要不可欠である (Mochizuki et al. 2023)。そこで Illumina HiSeqX のショートリードを用い *N. putrida* 核ゲノムにおける倍数性を確認した結果、本種の核ゲノムは二倍体ゲノムであり、またその一部がヘテロなアレルを有していることが推定された (Kamikawa et al. 2022)。そのため、本種の PacBio RSII データを二倍体ゲノムのアッセンブルに用いられるツールである Falcon および Falcon_unzip ver. 0.5 に供しアッセンブルを行い、その後ショートリードデータを使った Pilon (ver. 1.2.2) による補正を行った。その結果、オルガネラゲノムを除くと、1倍体分の核ゲノムサイズが約 35 Mb のドラフトゲノムが構築された (Kamikawa et al. 2022)。

次にトランスクリプトームデータと Braker2 (version 2.0.3) を用いた遺伝子予測を行った結果、1倍体分の核ゲノム中にタンパク質をコードする 15003 遺伝子が予測された (Kamikawa et al. 2022)。例えば光合成性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* は 27 Mbp の核ゲノム中に 10402 遺伝子を有し (Bowler et al. 2008)、同 *Thalassiosira pseudonana* は 32 Mbp 核ゲノム中に 11776 遺伝子を有する (Armbrust et al. 2004)。自由生活性従属栄養性の珪藻核ゲノムサイズや遺伝子数は、光合成性珪藻のそれと比較しても特段縮退しているように見られなかった。そのため、寄生性非光合成性種の核ゲノム縮退は光合成能喪失がトリガーとなるのではなく寄生性などの他の性質に起因すると考えられる (Kamikawa et al. 2022)。

2-2. 非光合成性種にはなぜ色素体ゲノムが検出されるのか

珪藻類光合成性種におけるミトコンドリアゲノムは 35 kb 程度の環状または線状 DNA であり、色素体ゲノムは 120 kb 程度の環状 DNA である。特に色素体ゲノムには rRNA 遺伝子オペロンを含む領域が逆位反復配列として 2 コピー存在する四分割構造である。ミトコンドリアにコードされているタンパク質は電子伝達系複合体 I、複合体 III、複合体 IV、複合体 V、翻訳、タンパク質輸送に関わる 35 種類である。色素体ゲノムでは、光化学系 I 及び II、シトクロム b6/f 複合体、ATP 合成酵素複合体、クロロフィル合成酵素、二酸化炭素固定、翻訳・転写、タンパク質輸送、鉄硫黄クラスター合成、分子シャペロン、タンパク質分解、チアミン合成、保存された未知機能 (Ycf) に関わる 120 種類あまりのタンパク質がコードされている (Ruck et al. 2014)。

N. putrida を始めとする非光合成性種においては、ミトコンドリアゲノムの構造、サイズ、遺伝子数が光合成性種のそれと同様であり、縮退進化は生じていない (Kamikawa et al. 2018)。一方で、非光合成種色素体ゲノムにおいては光化学系やシトクロム複合体、ATP 合成酵素複合体、クロロフィル合成酵素、二酸化炭素固定、チアミン合成、保存された未知機能 (Ycf) を中心とした機能を司る遺伝子が喪失している (Kamikawa et al. 2015b; Kamikawa et al. 2018)。光合成や色素合成、二酸化炭素固定に関わる遺伝子が喪失していることは、非光合成性という性質と極めてよく一致している。一方で、チアミン合成のような代謝に関わる遺伝子の喪失も同時に生じており、これは色素体の代謝機能縮退を示唆する (Kamikawa et al. 2018)。

同様の色素体ゲノム縮退は珪藻以外の系統における非光合成性種でも（程度こそ違い）生じてきた。クリプト藻類の非光合成性種では非光合成性珪藻種と同様に ATP 複合体酵素遺伝子に加え、二酸化炭素固定に関わる遺伝子であるリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（ルビスコ）大サブユニット、小サブユニット、ルビスコ活性化酵素が光合成能を喪失しているにもかかわらず保持されている（Tanifuji et al. 2020）。

アピコプラストゲノムは 36 kb 程度の環状 DNA であり、rRNA 遺伝子オペロンの逆位反復配列構造を有し、転写・翻訳に関わる遺伝子以外は鉄硫黄クラスター合成酵素 SufB のみがアピコプラストゲノムにコードされている。同様に黄金色藻色素体ゲノムにコードされているのは鉄硫黄クラスター合成（SufB、SufC）、そして電子伝達（フェレドキシン PetF）が転写・翻訳以外の機能である（Dorrell et al. 2019）。ディクチオカ藻綱非光合成性種 *Pteridomonas* 属の色素体ゲノムには上記の縮退色素体ゲノムが有する SufB などの代謝に関わる遺伝子は検出されず、転写・翻訳に関与するタンパク質遺伝子と rRNA 遺伝子、そして tRNA 遺伝子のみが存在した。おそらく *trnE* 遺伝子の転写産物から合成される tRNA-Glu がヘム合成の初期基質として用いられるため、*trnE* 遺伝子を保持する本色素体ゲノムが喪失していないと考えられる（Kayama et al. 2020b）。

上述したように色素体ゲノムは様々な非光合成性種に存在し、生存に必須な機能をコードしている。そしておそらくであるが、その生存に必須な機能を司る遺伝子の存在が色素体ゲノムの喪失・保持を決定する要因となっていると考えられる。ただし、二次的な光合成能を喪失した非光合成性植物であるラフレシアや非光合成性緑藻 *Polytomella* 属種、非光合成性黄金色藻 *Paraphysomonas* sp. などでは色素体はあるものの色素体ゲノムは検出できず、おそらく喪失したと考えられる（Molina et al. 2014; Smith and Lee 2014; Dorrell et al. 2019）。上述のように、少なくとも色素体ゲノムにコードされた tRNA-Glu は緑藻色素体でのヘム合成に必須である。そのため、色素体ゲノムの喪失には少なくともヘム合成をサポートする代替機構が必要であると考えられる（Smith and Lee 2014）。

2-3. *N. putrida*におけるオルガネラ機能進化

光合成性色素体は光エネルギー伝達による ATP 合成や還元力生成、カルビンベンソン回路による二酸化炭素固定に加え多岐に渡る合成系の機能する場であり、それゆえ多くの光合成性種の独立栄養性を司っている。カルビンベンソン回路とその派生経路によって合成された種々の糖リン酸が基質となる。陸上植物や緑藻類では欠くものの、珪藻などでは色素体内でも解糖系が機能し、カルビンベンソン回路で合成された 3-ホスホグリセリン酸からホスホエノールピルビン酸やピルビン酸、アセチル CoA が産生される。ピルビン酸やアセチル CoA は分枝鎖アミノ酸合成や脂肪酸合成、脂質合成、イソプレノイド合成の基質となり、ホスホエノールピルビン酸はエリスローズ 4-リン酸とともに芳香族アミノ酸の基質となる。同様に、色素体で合成されたアミノ酸や糖リン酸を基質としてヘム、クロロフィルやカロテノイドといった光合成色素、チアミン（ビタミン B1）、リボフラビン（ビタミン B2）が合成される。

では光合成能を喪失した珪藻 *N. putrida* ではどうだろう？ *N. putrida* の色素体機能を推定するため、核コードタンパク質セットから色素体局在タンパク質を抽出した。四重包膜を有する色素体内に細胞質で翻訳されたタンパク質が輸送されるには、N 末端にシグナルペプチドとトランジットペプチド様領域、そして特定のアミノ酸モチーフが必要である。*N. putrida* からは、そのような特徴をもつタンパク質は 600 程度検出され、これは同じ手法で推定した光合成性種珪藻の核コード色素体タンパク質数の約半分である。特に光合成性種に共通したオーソログのうち、200 を超えるオーソロググループが *N. putrida* から検出されなかった。このことは *N. putrida* の非光合成性という性質に伴う色素体機能の縮退が生じていることを示唆している。しかし、上述したような代表的な合成経路のうち、該当する代謝反応を担う色素体局在タンパク質がゲノムから検出されなかったのはイソプレノイド合成、光合成色素合成、チアミン合成のみである。その他の色素体代謝機能であるアミノ酸合成経路やヘム合成、脂肪酸合成、脂質合成は色素体内で生じていると考えられる。カルビン回路に関わる遺伝子においても、ルビスコおよびホスホリブロキナーゼのみを欠いており、その他の遺伝子はすべてゲノム中に保存されていた。特に、色素体でのみ合成される脂質（スルホキノボシルジアシルグリセロールなど）がガスクロマトグラフィー分析で細胞抽出液から検出されていることから、少なくとも色素体脂質合成ならびに関連経路は機能していると考えられる (Kamikawa et al. 2020)。

N. putrida では二酸化炭素固定が行われなため、色素体内における代謝機能の炭素源は細胞質から輸送される必要がある。*N. putrida* では糖リン酸輸送体 (Triose Phosphate Transporter; TPT) が 4 遺伝子検出されており、そのうちの 1 つは最外膜、1 つは外側から 2 枚目の膜、そして残り 2 つは最内膜に局在する TPT をコードすることがヘテロな形質転換系を用いた実験から示唆されている (Moog et al. 2020)。そしてこれらの糖リン酸輸送体はホスホエノールピルビン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸、ホスホグリセリン酸といった複数の糖リン酸を輸送可能であることが生化学的実験から示されている (Moog et al. 2020)。これらの基質が細胞質から非光合成性色素体へと輸送され、上述した様々な代謝経路に寄与している可能性が考えられる。

カルビンベンソン回路ではルビスコが主要酵素として二酸化炭素固定を行うが、ルビスコは二酸化炭素とリブローズ 1,5-ビスリン酸を基質として 2 分子の 3-ホスホグリセリン酸を合成する一方で、酸素とリブローズ 1,5-ビスリン酸を基質として反応が生じた場合は 3-ホスホグリセリン酸と 2-ホスホグリコール酸を生じる。2-ホスホグリコール酸はペルオキシソームやミトコンドリアの代謝経路を介して TCA 回路などでエネルギー源として回収される。上述のように *N. putrida* はルビスコをもたず色素体での二酸化炭素固定能を欠き 2-ホスホグリコール酸は色素体では合成されない。加えて、色素体やペルオキシソームにおける 2-ホスホグリコール酸を中心とした代謝に関わる遺伝子も検出されなかった (Kamikawa et al. 2022)。すなわち、非光合成性色素体とペルオキシソームの間の代謝レベルの相互作用は喪失していると考えられる。一方で、TCA 回路で基質となるリンゴ酸を介したペルオキシソームとミトコンドリア間の、そしてオルニチンやグルタミンなどのアミノ酸輸送を通じた非光合成性色

素体とミトコンドリア間の代謝レベルの相互作用は維持されていると考えられる (Kamikawa et al. 2022)。

水圏に溶存する炭素源には十分量の色素体代謝産物が含まれていないことは想像に難くなく、仮に存在したとしても原核生物と競合するため色素体代謝経路の多くや色素体そのものの喪失を可能にするほどの量を吸収栄養によって確保することは困難であろう (Kamikawa et al. 2017)。一方で、寄生性種は少なくとも一部の代謝産物を宿主に依存している。そして依存している代謝産物は、寄生生物の系統および宿主の代謝機能によっても異なるはずである。例えば、もしも糖だけが宿主から得られるのであれば、寄生性種はそれを基質として自らアミノ酸や脂肪酸、脂質などを細胞内で合成しなければ寄生性種であっても生存はできない。すなわち、生存し、増殖する過程で色素体代謝関連遺伝子に変異を蓄積し、最終的に色素体関連遺伝子が偽遺伝子化または欠失した子孫を残すという進化の「きっかけ」は生じない。この場合、色素体内で機能するこれらの合成経路を喪失するような変異は次世代に遺伝することはないため色素体機能縮退進化も生じないだろう。別の言葉を使うのであれば、色素体で合成される生存に必須な代謝産物がすべて捕食や寄生宿主から得られるとしたら、上記のような機能的な制約が外れるため、色素体の代謝経路および色素体そのものがなくなる進化が生じることもあるということになる。そのような可能性のある例としてヒト腸管寄生性アピコンプレクサ類 *Cryptosporidium* 属、捕食性ピコゾア類 *Picomonas* 属や甲殻類寄生性渦鞭毛藻 *Hematodinium* 属、捕食性ストラメノパイル類 *Actinophrys sol* が知られている

(Azuma et al. 2022)。吸収栄養性ではそのような例が未だ知られていないことは注目に値する。色素体の機能進化とは、その色素体を有する生物がどのような生態を有し、どのような産物を外部から獲得する能力を有するかによって影響を受けることが示唆される

(Kamikawa et al. 2017; Kamikawa et al. 2019; Kamikawa et al. 2022)。

2-4. *N. putrida*における光受容による転写制御

光は光合成によって ATP や還元力といった形でエネルギー保存に利用されるのみではなく、細胞周期や日周性などの制御にも利用される。光合成性珪藻の細胞周期制御に機能するタンパク質として例えば BUB1/MAD3, Cdc20, CYCB1, CYCH1, dsCYC2, PCNA が同定されている。(理想的な条件下で同調されていれば) これらのタンパク質が機能する結果、光合成性珪藻では明暗周期に応じて細胞分裂のタイミングが制御され一日の中の限定された時間帯で細胞数が増加する。しかし *N. putrida* 増殖実験の結果、細胞数は1日を通じて増殖を続け、日周性が存在するようには考えられなかった (Kamikawa et al. 2022)。この細胞増殖のタイミングに日周性が見られないという現象は、珪藻の日周性制御におけるマスター因子である bHLH-1a (RITMO1) が従属栄養性珪藻には存在しないという探索結果からもさらに支持された (Kamikawa et al. 2022)。RITMO1 に加え、青色光受容体である転写因子 Aureochrome 1a および 1b を始めとした光受容ドメインをもつタンパク質のほとんどを *N. putrida* は欠くことがゲノム中の遺伝子探索から明らかとなった。一方で、少なくとも代表的な細胞周期制御タンパク質に加え、Aureochrome 1c や bHLH-1b, Cryptochrome-DASH/CPF2 といった光受容タンパク質のごく一部は未だ *N. putrida* ゲノム中にコードされており、ここ

から細胞周期や増殖制御以外の機能に光を利用している可能性が示唆された (Kamikawa et al. 2022)。

そこで 12 時間明期, 12 時間暗期の条件下で *N. putrida* 細胞を培養し, 4 時間ごとに RNAseq を行うことで光によって遺伝子発現が制御されているかどうか検証した (Kamikawa et al. 2022)。その結果, ハプロイドゲノム中の 15000 あまりのタンパク質コード遺伝子のうち, 64 遺伝子が明期で, 93 遺伝子が暗期から明期に切り替わるタイミングで, 187 遺伝子は暗期で特に強く発現していた。特に明期に強く発現する遺伝子群には炭素源の取り込みと代謝に関わるものがより多く含まれていた。これらの遺伝子群の発現制御は明期で活発になる他の光合成性種による一次生産産物を利用するための適応かもしれない。時系列遺伝子発現比較から, *N. putrida* は光合成能を失い, 細胞分裂制御も光とは独立したものになっている一方で, 核ゲノムコードタンパク質の 2.3% というごくわずかな遺伝子発現制御には光や明暗シグナルを利用していることが示唆された。別の言葉で言えば, ほとんどの遺伝子発現制御は光から独立しており, 別の環境刺激によって生じている可能性がある。この点において, 光や低分子を感知する Per-Arnt-Sim (PAS) ドメインを有する basic leucine zipper 転写因子 (bZIP-PAS) が, *N. putrida* ゲノム内で遺伝子重複を起こし, 光合成性近縁種の 10 倍程度コピー数が増加していることは注目に値する (Kamikawa et al. 2022)。同様に, シグナルトランスダクションに関わる因子, 環境ストレスを感知する因子, 基質を取り込むトランスポーター, 細胞外で高分子炭水化物を分解する酵素も遺伝子数が増加している (Kamikawa et al. 2022)。

本研究により, 光合成能喪失によるゲノム進化への影響は寄生性による影響と比較すると限定的であり, ゲノム縮退などには結びつかないことが示唆された。一方で, 光合成能喪失は, 光合成能喪失によるオルガネラ機能および機能ネットワーク, 細胞周期や増殖制御, 遺伝子発現制御のリモデリングを引き起こす。すなわち, 光合成能の喪失とは, 色素体での ATP および還元力産生への光利用が制限されることに止まらない。ただし上述した光合成能喪失による影響は, 非光合成性珪藻 *N. putrida* という 1 種の吸収栄養性種から得られた示唆であり, 同様の吸収栄養性珪藻他種においてどのようなゲノム進化や細胞機能のリモデリングが生じているのか, などまだまだ興味も問いも尽きない。そしてそれゆえ, 終わりのない光合成能喪失研究の旅路は続いていく。

謝辞

ここで紹介した研究は非常に多くの方々に支えられて行ってきたものであり, 関係者の皆様に深く感謝いたします。同時に, スペースの関係上それぞれの方々にここに挙げることは叶わないため謹んでお詫び申し上げます。また, シンポジウム“次世代シーケンサーがスポットライトを当てた「なまら」面白い生き物たち”を企画し, 執筆の機会をくださった東京大学の松永幸大先生と北海道大学の高林厚史先生に感謝申し上げます。本研究及び関連研究は, 以下の研究費またはその一部を用いて行われました: 公益財団法人発酵研究所一般研究助成 (G-2014-1-036), 科学研究費助成事業・若手 A (15H05606), 昭和聖徳祈念財団学術

研究助成, 第6回(2019年度)ヤンマー資源循環支援機構 助成(KI019045), 科学研究費助成事業・基盤研究B(代表: 19H03274)。

引用文献

- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M et al. (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306: 79–86. doi: 10.1126/science.1101156
- Azuma T, Pánek T, Tice AK, Kayama M, Kobayashi M, Miyashita H, Suzaki T, Yabuki A, Brown MW, Kamikawa R. (2022) An enigmatic stramenopile sheds light on early evolution in Ochrophyta plastid organellogenesis. *Mol Biol Evol* 39: msac065. doi: 10.1093/molbev/msac065
- Benecke W. (1900) Über farblose Diatomeen der Kieler Föhrde. *Jahrb wiss Bot* 35: 535-572.
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otillar RP et al. (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456: 239–244. doi: 10.1038/nature07410
- Cavalier-Smith T. (2002) Genomic reduction and evolution of novel membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 109–134. doi: 10.1098/rstb.2002.1194.
- Dorrell R, Azuma T, Nomura M, Audren de Kerdel G, Paoli L, Yang S, Bowler C, Ishii K, Miyashita H, Gile GH et al. (2019) Principles of plastid reductive evolution illuminated by nonphotosynthetic chrysophytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 6914–6923. doi: 10.1073/pnas.1819976116
- Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* 281: 200–207. doi: 10.1126/science.281.5374.200
- Field B, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P. (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237-240. doi: 10.1126/science.281.5374.237
- Frankovich TA, Ashworth MP, Sullivan MJ, Theriot EC, and Stacy NI. (2018) Epizoic and apochlorotic *Tursiocola* species (Bacillariophyta) from the skin of Florida Manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Protist* 169: 539–569. doi: 10.1016/j.protis.2018.04.002
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S. et al. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498–511. doi: 10.1038/nature01097
- Ishii K, Kamikawa R. (2017) Growth characterization of non-photosynthetic diatoms, *Nitzschia* spp., inhabiting estuarine mangrove forests of Ishigaki Island, Japan. *Plankton Benthos Res* 12: 164–170. doi: 10.3800/pbr.12.164
- Kamikawa R, Yubuki N, Yoshida M, Taira M, Nakamura N, Ishida K, Leander BS, Miyashita H, Hashimoto T, Mayama S et al. (2015a) Multiple losses of photosynthesis in *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *Phycol Res* 63: 19–28. doi: 10.1111/pre.12072
- Kamikawa R, Tanifuji G, Ishikawa SA, Ishii K, Matsuno Y, Onodera NT, Ishida K, Hashimoto T, Miyashita H, Mayama S, et al. (2015b) Proposal of twin arginine translocator system-mediated

- constraint against loss of ATP synthase genes from nonphotosynthetic plastid genomes. *Mol Biol Evol* 32: 2598–2604. doi: 10.1093/molbev/msv134
- Kamikawa R, Moog D, Zauner S, Tanifuji G, Ishida K, Miyashita H, Mayama S, Hashimoto T, Maier UG, Archibald JM et al. (2017) A non-photosynthetic diatom reveals early steps of reductive evolution in plastids. *Mol Biol Evol* 34: 2355–2366. doi: 10.1093/molbev/msx172
- Kamikawa R, Azuma T, Ishii K, Matsuno Y, Miyashita H. (2018) Diversity of organellar genomes in non-photosynthetic diatoms. *Protist* 169: 351–361. doi: 10.1016/j.protis.2018.04.009
- Kamikawa R. (2021) No photosynthesis, no life? Plastid evolution in non-photosynthetic algae. *J Jpn Soc Photosynth Res* 31: 37–49.
- Kamikawa R, Mochizuki T, Sakamoto M, Tanizawa Y, Nakayama T, Onuma R, Cenci U, Moog D, Speak S, Sarkozi K et al. (2022) Genome evolution of a nonparasitic secondary heterotroph, the diatom *Nitzschia putrida*. *Sci Adv* 8: abi5075. doi: 10.1126/sciadv.abi5075
- 神川龍馬 (2022) 真核生物の多様性 系統ゲノミクス, ミトコンドリア, 色素体から. 化学と生物 60: 393–401
- 神川龍馬 (2023) 葉緑体. 矢崎 裕規・新倉 保・猪飼 桂・矢吹 彬憲・永宗 喜三郎・松崎 素道・白鳥 峻志・島野 智之・小林 富美恵 (編) 原生生物学事典. 230–235. 朝倉書店. 東京.
- Kayama M, Chen JF, Nakada T, Nishimura Y, Shikanai T, Azuma T, Miyashita H, Takaichi S, Kashiwayama Y, Kamikawa R. (2020) A non-photosynthetic green alga illuminates the reductive evolution of plastid electron transport systems. *BMC Biol* 18: 126. doi: 10.1186/s12915-020-00853-w
- Kayama M, Maciszewski K, Yabuki A, Miyashita H, Karnkowska A, Kamikawa R. (2020) Highly Reduced plastid genomes of the non-photosynthetic dictyochophyceans *Pteridomonas* spp. (Ochrophyta, SAR) are retained for tRNA-Glu-based organellar heme biosynthesis. *Frontiers Plant Sci* 11: 602455. doi: 10.3389/fpls.2020.602455
- Li CW, Volcani BE. (1987) Four new apochlorotic diatoms. *Br. Phycol. J.* 22: 375–382.
- Miyagishima S. (2023) Taming the perils of photosynthesis by eukaryotes: constraints on endosymbiotic evolution in aquatic ecosystems. *Commun Biol* 6:1150. doi: 10.1038/s42003-023-05544-0
- Mochizuki T, Sakamoto M, Tanizawa Y, Nakayama T, Tanifuji G, Kamikawa R, Nakamura Y. (2023) A practical assembly guideline for genomes with various levels of heterozygosity. *Brief Bioinform* 24: bbad337. doi: 10.1093/bib/bbad337
- Mock T, Otiillar RP, Strauss J, McMullan M, Paaanen P, Schmutz J, Salamov A, Sanges R, Toseland A, Ward BJ et al. (2017) Evolutionary genomics of the cold-adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature* 541: 536–540. doi: 10.1038/nature20803
- Molina J, Hazzouri KM, Nickrent D, Geisler M, Meyer RS, Pentony MM, Flowers JM, Pelsner P, Barcelona J, Inovejas SA et al. (2014) Possible loss of the chloroplast genome in the parasitic flowering plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). *Mol Biol Evol* 31: 793–803. doi: 10.1093/molbev/msu051

- Moog D, Nozawa A, Tozawa Y, Kamikawa R. (2020) Substrate specificity of plastid phosphate transporters in a non-photosynthetic diatom and its implication in evolution of red alga-derived complex plastids. *Sci Rep* 10: 1167. doi: 10.1038/s41598-020-58082-8
- Nelson DM, Treguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Queguiner B. (1995) Production and dissolution of biogenic silica in the ocean—Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cycles* 9: 359–372. doi: 10.1029/95GB01070
- Onyshchenko A, Ruck EC, Nakov T, Alverson AJ. (2018) A single loss of photosynthesis in the diatom order Bacillariales (Bacillariophyta). *Am J Bot* 106: 560–572. doi: 10.1002/ajb2.1267
- Ruck EC, Nakov T, Jansen RK, Theriot EC, Alverson AJ. (2014) Serial gene losses and foreign DNA underlie size and sequence variation in the plastid genomes of diatoms. *Genome Biol Evol* 6: 644–654. doi: 10.1093/gbe/evu039
- Smith DR, Lee RW. (2014) A plastid without a genome: evidence from the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella*. *Plant Physiol* 164: 1812–1819. doi: 10.1104/pp.113.233718
- Tanifuji G, Kamikawa R, Moore CE, Mills T, Onodera NT, Kashiya Y, Archibald JM, Inagaki Y, Hashimoto T. (2020) Comparative Plastid genomics of *Cryptomonas* species reveals fine-scale genomic responses to loss of photosynthesis. *Genome Biol Evol* 12: 3926–3937. doi: 10.1093/gbe/evaa001
- Woo YH, Ansari H, Otto TD, Klinger CM, Kolisko M, Michalek J, Saxena A, Shanmugam D, Tayyrov A, Veluchamy A et al. (2015) Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. *eLife* 4: e06974. doi: 10.7554/eLife.06974
- Yoshizawa S, Azuma T, Kojima K, Inomura K, Hasegawa M, Nishimura Y, Kikuchi M, Armin G, Tsukamoto Y, Miyashita H et al. (2023) Light-driven proton pumps as a potential regulator for carbon fixation in marine diatoms. *Microbes Environ* 38: ME23015. doi: 10.1264/jsme2.ME23015

ツノゴケ特異性のゲノム基盤と新たな謎

榊原 恵子, 江崎 和音

立教大学理学部生命理学科
〒171-8501 東京都豊島区西池袋 3-34-1

Unique traits in hornworts and new enigmas in post-genome age

Keiko Sakakibara, Kazune Ezaki

3-34-1 Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo, 171-8501, Japan

Keywords: Anthoceros, Genome, Hornworts, Transformation

DOI: 10.24480/bsj-review.15b6.00264

1. はじめに

ツノゴケ類はセン類とタイ類とともにコケ植物に属する陸上植物の分類群である。他のコケ植物の分類群であるセン類からはヒメツリガネゴケ (*Physcomitrium patens*) , タイ類からはゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) がモデルとして確立され、コケ植物特有の生命現象や、単純な体制に着目した分子生物学、細胞生物学、生理学、発生学、維管束植物との比較進化研究など、様々な研究分野に用いられてきた。一方で、ツノゴケ類は後述する多くの興味深い特徴を持ちながら、代表的なモデルがなかったため、研究が立ち遅れてきた。2020年にホウライツノゴケ (*Anthoceros angustus*) , 及びナガサキツノゴケ (*A. agrestis*, *A. punctatus*, この2種は近縁のため、いずれも和名はナガサキツノゴケ) の3種のツノゴケゲノムが公開され (Li et al. 2020; Zhang et al. 2020; 西山他 2021) , 2021年にアグロバクテリウムを介した *A. agrestis* の形質転換が可能になったことから、ツノゴケの興味深い性質を裏付ける遺伝子の機能解析が可能となった (Frangedakis et al. 2021) 。本稿では、ツノゴケのユニークな特徴とそれを裏付けるゲノム特性について紹介し、着目する遺伝子の機能解析に有効なツールとなるツノゴケの形質転換方法について紹介する。

2. ツノゴケのユニークな特徴を裏付ける分子基盤

ツノゴケ類は他のコケ植物や陸上植物にないユニークな特性を持つ (図1) 。その特異的な特徴から、ツノゴケ類は陸上植物の中で最も緑藻類に近縁であるとする説、他のコケ植物と単系統であるという説、維管束植物と姉妹群であるとする説があり、長年、その系統的位置が議論されてきた (長谷川 2021) 。現在では、ツノゴケゲノム情報を含めた分子系統解析から、ツノゴケ類は他のコケ植物であるセン類とタイ類の単系統群と姉妹群となり、コケ植物は単系統とする説が支持されている (Li et al. 2020; Zhang et al. 2020; 西山他 2021) 。ツノゴケ類とその他の陸上植物、及び近縁な緑藻類とのゲノム比較から、ツノゴケ類のユニークな特性に関連する遺伝子について議論されているので、代表的なものを紹介する。

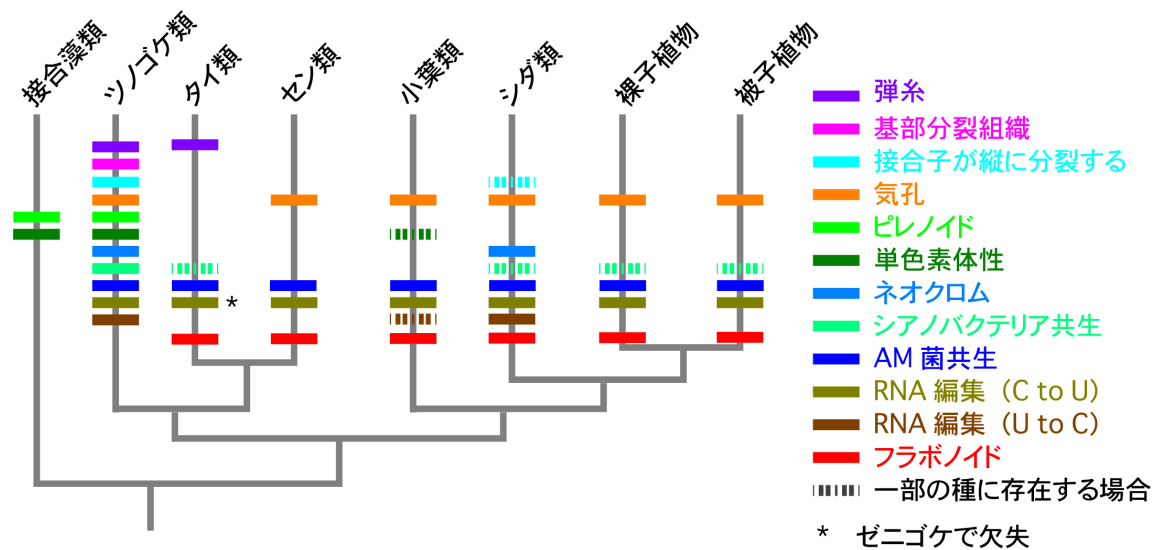


図 1. ツノゴケの特徴的な形質の他の陸上植物での有無。

陸上植物の系統樹 (Li et al., 2020) 上に形質の有無を、形質が存在する場合は線で、限られた種にのみ存在する場合は破線で示した (Frangedakis et al. 2023 を改変)。

2-1. 特徴的な孢子体形態と接合子の分裂様式

ツノゴケ類は他のコケ植物と同じく、単相の配偶体優先の生活環を示すが、複相に特徴的なツノ状の孢子体を持つ。ツノゴケ類の孢子体は発生初期から他の陸上植物と異なる特徴を持っており、他のコケ植物の接合子（受精卵）では造卵器の長軸に対して横に最初の分裂面が入るのに対して、ツノゴケでは縦に分裂面が入る（小藤と嶋村 2021）。また、他のコケ植物であるタイ類では孢子体に明確な分裂組織がみられず、セン類の孢子体分裂組織は一時的にしか維持されないのに対して、ツノゴケ類では孢子体の基部に介在分裂組織を持ち、継続的に維持する一方で、先端から成熟した孢子を放出することから、維管束植物の茎頂分裂組織との類似性が指摘されてきた。しかし、興味深いことに、維管束植物の茎頂分裂組織の維持に機能している転写因子である *KNOX1* はツノゴケゲノムからは消失しており (Li et al. 2020; 西山他 2021), ツノゴケ類の孢子体分裂組織の制御機構については不明である。ツノゴケ類の分裂組織研究により、新規の分裂組織維持機構が見出される可能性も期待される。接合子の分裂様式の違いに関する知見としては、セン類であるヒメツリガネゴケで接合子の第一分裂を制御する因子として *PpLFY1* および 2 が知られている (Tanahashi et al. 2005)。 *PpLFY1* および 2 は *LEAFY/FLORICAULA* (*LFY/FLO*、以下 *LFY*) のオルソログであり、*LFY* は、元々被子植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) とキンギョソウ (*Antirrhinum majus*) において花芽形成マスター制御因子として報告された、陸上植物とストレプト藻類に広く保存された転写因子である (荒木 2012)。ツノゴケ類の *LFY* は他の陸上植物とは異なる DNA 認識特異性を持つことが報告されており (Sayou et al. 2014), このような違いがツノゴケ類の孢子体の表現型の特異性をもたらしているのかもしれない。

2-2. ピレノイドを持つ単色素性葉緑体

ツノゴケ類の多くはピレノイドを持つ葉緑体を細胞内に1~2個持つ。ピレノイドは葉緑体内部のルビスコ（リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ）を主成分とする顆粒状のタンパク質集合体であり、二酸化炭素濃縮機構として機能すると考えられている。ピレノイドは多くの単細胞藻類に見られるが、陸上植物で葉緑体にピレノイドを持つものはツノゴケ類だけである（Frangedakis et al. 2021）。この特徴に関連したゲノム特性として、藻類で二酸化炭素濃縮に機能する遺伝子として知られる *low-CO₂ inducible B (LCIB)* が陸上植物では、ツノゴケゲノムにのみ存在することがあげられる（Li et al. 2020）。この遺伝子が実際にツノゴケ葉緑体のピレノイド形成に機能するかについては今後の機能解析が待たれる。陸上植物の多くは細胞内に多数の葉緑体を持つ。単色素体性に関連があるゲノム特性として、ツノゴケゲノムでは色素体分裂関連因子ARC3とFtsZ2が欠失しており、これらの遺伝子の欠失により、単色素性を示していると推測される（MacLeod et al. 2022）。

2-3. ネオクロム

ネオクロムは赤色光/遠赤色光の受容体であるファイトクロムと青色光の受容体であるフォトトロピンが融合したキメラ受容体であるが、陸上植物ではツノゴケ類とシダ類にのみ存在する。ネオクロムはもともとシダ類で発見されたが（Nozue et al. 1998）、その後の包括的な分子系統解析により、陸上植物ネオクロムはツノゴケ類の共通祖先においてレトロトランスポジションによる遺伝子融合によって成立した後、シダ植物に水平伝播したことにより実現し、弱光環境への適応に貢献したのではないかと考えられている（Li et al. 2014）。

2-4. シアノバクテリアともアーバスキュラー菌根菌とも共生する多様な共生能力

ツノゴケ類はアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）ともシアノバクテリアとも共生する多様な共生能力を持っている。多くの陸上植物はアーバスキュラー菌根菌と共生し、糖を提供する一方で、菌側からリン酸や水分の供給を受けている。ツノゴケゲノムには AM 菌共生に機能する遺伝子ホモログがすべてそろっている（Li et al. 2020）。このことから、これらの遺伝子ホモログは陸上植物の共通祖先においてすでに獲得されており、陸上植物と菌類との共生に機能していたと推測される。一方で、シアノバクテリアとの共生に機能する因子はまだ不明であるが、窒素飢餓状態で *A. agrestis* をシアノバクテリアと共培養したところ、植物側で SWEET16/17 クレードに属する糖輸送体をコードする遺伝子の発現が特異的に誘導されることが見出されており、シアノバクテリアとの共生時に植物側からの炭素源供給にこの糖輸送体が機能していると推測される（Li et al. 2020）。

2-5. RNA 編集

植物の RNA 編集はオルガネラ DNA 上の遺伝子から転写された mRNA において翻訳前にシトシン（C）がウラシル（U）へと変換される現象であるが、まれに U が C へと変換され

る場合も報告されている。C から U への RNA 編集はツノゴケ類を含む陸上植物で広く報告されており、U から C への RNA 編集はツノゴケ類とシダ類で報告されているが、いずれも藻類にはみられない。植物のオルガネラの RNA 編集は植物の陸上進出にあたって紫外線による変異に対する防御として機能したことが示唆されている（由良と郷 2009）。RNA 編集を受ける C の直前の RNA 塩基配列は U であることが多い。すなわち、この mRNA 分子をコードする DNA 分子は TC であるが、これが RNA 編集を経て、最終的に UU に置き換えられる。もし、RNA 編集が起こらない場合、同じアミノ酸をコードするには、DNA 分子は TT である必要があるが、連続するチミン（T）配列は紫外線によって 2 量体化しやすく、その結果、遺伝情報が変化してしまう可能性がある。RNA 編集はこのような状況から、ゲノムの保護に機能していると推測されている。ツノゴケ類は陸上植物で最も多く、葉緑体 DNA の RNA 編集が報告されている（Kugita et al. 2003）。陸上植物に広く見られる RNA 編集についてはモデル植物を用いてよく研究されており、核にコードされる Pentatricopeptide Repeat (PPR) タンパク質が関与している。ツノゴケゲノムでは PPR 遺伝子群の増加が確認されている。一方、U から C への RNA 編集についてはツノゴケ類のモデルである *A. agrestis* を用いた研究が始められており、研究の進展が期待される。

3. ツノゴケの形質転換系

ツノゴケのユニークな特徴を裏付ける遺伝子特性が明らかになる一方で、実際にそれらのゲノム特性と表現型とが関連したものであるか、個々の興味深い遺伝子の機能解析が待たれる。現在までに、2021 年に *A. agrestis* で報告した形質転換法の改良版が報告され、より少量の組織を用いた高効率の形質転換法が可能になっている（Waller et al. 2023）。具体的な方法を図 2 に示す。まず、弱光下で 1 カ月程度培養したツノゴケの配偶体組織を、少量の滅菌水中でカミソリを用いて細かく刻み、滅菌水で洗浄した組織片にアグロバクテリウムを感染させる。感染後、抗生物質入り培地による 4~6 週間程度の一次選抜を行ない、さらに新しい抗生物質入り培地に移植したのち、数週間の二次選抜を行なうことで擬陽性を除き、目的の導入 DNA がゲノムに組み込まれた株を高確率で得ることができる。形質転換効率にはばらつきが見られるものの、我々がこれまで行なってきた *A. agrestis* での形質転換では、概ね 0.5 g 程度の配偶体組織を使用することで複数の形質転換体を取得することができている。現在、形質転換可能なツノゴケは *A. agrestis* に加え、*A. punctatus*, スジツノゴケ

（*Leiosporoceros dussii*）、ニワツノゴケ（*Phaeoceros carolinianus*）である。現在の最適化された形質転換方法は簡便であり、他のツノゴケ類や他の植物にも応用できる可能性がある。今後、この方法を活用して、ツノゴケの興味深い特性を裏付ける遺伝子の機能解析へと研究を進めていきたい。この機会に多くの方にこのなまらおもしろい植物、ツノゴケに興味を持っていただければ幸いである。

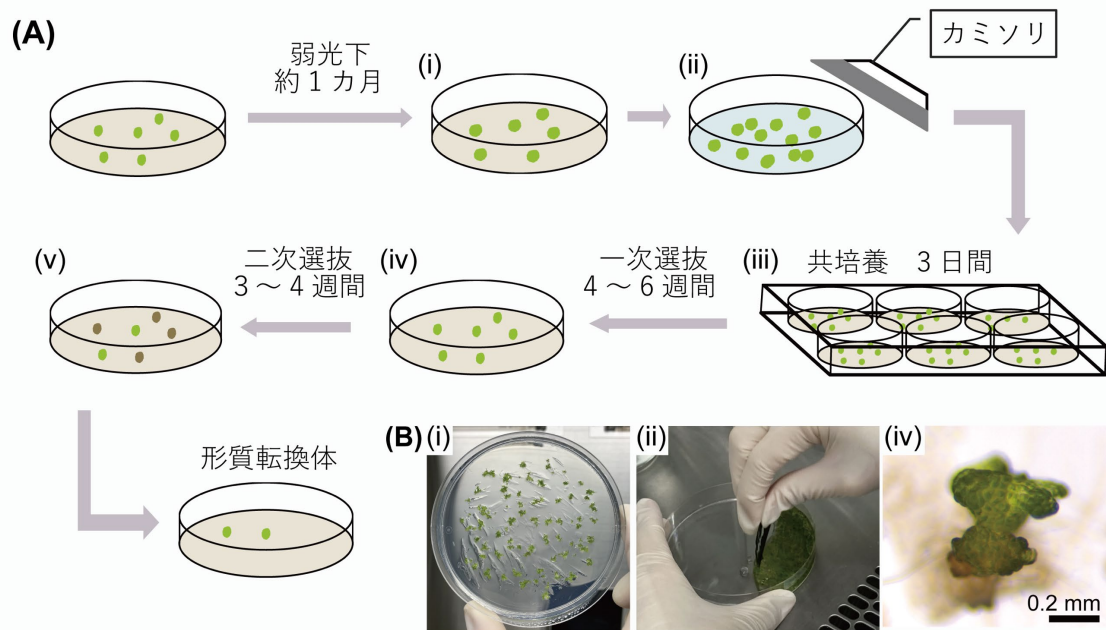


図 2. ツノゴケの形質転換

(A) 形質転換の流れ。ツノゴケを弱光下で約 1 カ月培養する (i)。回収した組織に少量の水を添加し、滅菌したカミソリで約 5 分間刻む (ii)。6 ウェルプレートで、刻んだツノゴケ配偶体組織とアグロバクテリウムを 3 日間共培養する (iii)。選択培地に 4~6 週間置いて一次選抜を行なう (iv)。生き残った組織を新しい選択培地に置いて二次選抜を行ない (v)、形質転換体を得る。(B) 形質転換に用いるツノゴケ組織 (i)、カミソリで組織を刻む様子 (ii)、一次選抜で得られた候補株 (iv)。各番号は(A)の図と対応。

謝辞

ツノゴケのゲノム解読に関しては、Peter Szövényi 博士 (University of Zurich) , 嶋村正樹博士 (広島大学) , 西山智明博士 (金沢大学) との、ツノゴケの形質転換系の確立に関しては Peter Szövényi 博士, Eftychios Frangedakis 博士 (University of Cambridge) との共同研究により実施した。図 2 は樋口小菊さん (立教大学理学部生命理学科) の作成した図を参考とした。本研究の一部は科研費 (26650143, 22H05177, 22K21352) の支援を得て遂行した。

引用文献

- Frangedakis E, Shimamura M, Villarreal JC, Li FW, Tomaselli M, Waller M, Sakakibara K, Renzaglia KS, Szövényi P (2021) The hornworts: morphology, evolution and development. *New phytologist* 229: 735–754. doi: 10.1111/nph.16874
- Frangedakis E, Waller M, Nishiyama T, Tsukaya H, Xu X, Yue Y, Tjahjadi M, Gunadi A, Van Eck J, Li FW, et al. (2021) An *Agrobacterium*-mediated stable transformation technique for the hornwort model *Anthoceros agrestis*. *New Phytologist* 232: 1488–1505. doi: 10.1111/nph.17524

- Frangedakis E, Marron AO, Waller M, Neubauer A, Tse SW, Yue Y, Ruaud S, Waser L, Sakakibara K, Szövényi P. (2023) What can hornworts teach us? *Front Plant Sci.*14: 1108027 doi: 10.3389/fpls.2023.1108027
- Gao B, Chen M, Li X, Zhang J (2019) Ancient duplications and grass-specific transposition influenced the evolution of LEAFY transcription factor genes. *Commun Biol* 2: 237. doi: 10.1038/s42003-019-0469-4
- 長谷川二郎 (2021) ツノゴケの分類と系統. *BSJ Review* 12D: 223–242. doi: 10.24480/bsj-review.12d5.00218
- 小藤 累美子, 嶋村 正樹 (2021) ツノゴケの組織と形態. *BSJ Review* 12D: 206–222. doi: 10.24480/bsj-review.12d5.00217
- Kugita, M., Yamamoto, Y., Fujikawa, T., Matsumoto, T., Yoshinaga, K. (2003). RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic acids research* 31: 2417–2423. doi: 10.1093/nar/gkg327
- Li FW, Villarreal JC, Kelly S, Rothfels CJ, Melkonian M, Frangedakis E, Ruhsam M, Sigel EM, Der JP, Pittermann J, et al. (2014). Horizontal transfer of an adaptive chimeric photoreceptor from bryophytes to ferns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 6672–6677. doi: 10.1073/pnas.1319929111
- Li FW, Nishiyama T, Waller M, Frangedakis E, Keller J, Li Z, Fernandez-Pozo N, Barker MS, Bennett T, Blázquez MA, et al. (2020) Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nature plants* 6: 259–272. doi.org/10.1038/s41477-020-0618-2
- MacLeod, AI, Raval PK, Stockhorst S, Knopp MR, Frangedakis E, Gould SB (2022) Loss of plastid developmental genes coincides with a reversion to monoplastidy in hornworts. *Frontiers in plant science* 13: 863076. doi: 10.3389/fpls.2022.863076
- 西山智明, 嶋村正樹, 榊原恵子 (2021) ツノゴケゲノムと陸上植物の発生進化. *BSJ Review* 12D: 186–195. doi: 10.24480/bsj-review.12d2.00215
- Nozue K, Kanegae T, Imaizumi T, Fukuda S, Okamoto H, Yeh KC, Lagarias JC, Wada M. (1998) A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 15826–15830. doi: 10.1073/pnas.95.26.15826
- Puttick MN, Morris JL, Williams TA, Cox CJ, Edwards D, Kenrick P, Pressel S, Wellman CH, Schneider H, Pisani D, Donoghue PCJ (2018) The Interrelationships of Land Plants and the Nature of the Ancestral Embryophyte. *Current Biology.* 28: 733–745. doi: 10.1016/j.cub.2018.01.063
- Sayou C, Monniaux M, Nanao MH, Moyroud E, Brockington SF, Thévenon E, Chahtane H, Warthmann N, Melkonian M, Zhang Y et al. (2014) A promiscuous intermediate underlies the evolution of LEAFY DNA binding specificity. *Science* 343: 645–648.
- Tanahashi T, Sumikawa N, Kato M, Hasebe M (2005) Diversification of gene function: homologs of the floral regulator FLO/LFY control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 132: 1727–1736. doi: 10.1242/dev.01709

- Waller M, Frangedakis E, Marron AO, Sauret-Güeto S, Rever J, Sabbagh CRR, Hibberd JM, Haseloff J, Renzaglia KS, Szövényi P (2023) An optimized transformation protocol for *Anthoceros agrestis* and three more hornwort species. *Plant journal* 114: 699–718. doi: 10.1111/tpj.16161
- 由良 敬, 郷 通子 (2009) 陸上植物オルガネラの RNA 編集の役割. *生物物理*, 49, 244-245.
- Zhang J, Fu XX, Li RQ, Zhao X, Liu Y, Li MH, Zwaenepoel A, Ma H, Goffinet B, Guan YL, et al. (2020) The hornwort genome and early land plant evolution. *Nature plants* 6: 107–118. doi: 10.1038/s41477-019-0588-4

アブラナ科水陸両生植物 *Rorippa aquatica* のゲノム解読と比較解析

坂本 智昭^{1,2}, 木村 成介^{1,2}

¹京都産業大学 生命科学部
〒603-8555 京都市北区上賀茂本山
²京都産業大学 植物科学センター
〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

Genome assembly and analyses of evolutionary pathway in amphibious plant *Rorippa aquatica*

Tomoaki Sakamoto^{1,2}, Seisuke Kimura^{1,2}

¹Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University,
Kamigamo-Motoyama, Kita-Ku, Kyoto 603-8555, Japan
²Center for Plant Sciences, Kyoto Sangyo University,
Kamigamo-Motoyama, Kita-Ku, Kyoto 603-8555, Japan

Keywords: Genome assembly, *Rorippa aquatica*

DOI: 10.24480/bsj-review.15b7.00265

1. はじめに

自然条件において植物は様々な環境に生息している。移動することが出来ない植物はそれぞれの生息環境に適応するために特異な形質を獲得する場合がある。北アメリカの湿地環境に生息するアブラナ科植物 *Rorippa aquatica* もその生息環境で生存していくために必要な特異な形質を獲得している植物である。

2. *Rorippa aquatica*における特異な形質

2-1. アブラナ科水陸両生植物としての *Rorippa aquatica*

Rorippa aquatica は他の陸生植物と同様に陸上で生育でき、さらに植物全体が水没した条件でも生育できる水陸両生植物である。この種はアクアリウムに用いられる水草としてウォーターナスタチウムの名前で流通することもある。アブラナ科にはモデル植物であるシロイヌナズナや野菜のキャベツ、ハクサイ、カブなどの様々な種が含まれているが、そのほとんどは水没条件では長期間生存出来ない。*R. aquatica* が属する *Rorippa* 属には日本の水田雑草として広く見られるイヌガラシ (*R. indica*) のように湿った環境に生育する種が多く含まれるが、*R. aquatica* ほど水中条件に適応した種は明らかになっていない。また、アブラナ科全体で見ても水中条件で長期間育成できる種は本種の他にはミズタガラシ (*Cardamine lyrata*) 程度であり、陸上植物でありながら水中でも生育できるという特徴はアブラナ科の中では特異な形質であるといえる。

また、水陸両生植物にしばしば見られる特徴として水中では陸上と異なる形の葉を形成するというものがある。*R. aquatica* においてもこの現象は見られ、水没条件下で新たに発生した葉は陸上条件より葉身が細くなり切れ込んだ複葉を形成する (図 1)。

2 - 2. 温度応答性異形葉性

先程, *R. aquatica* の水没に応答して異なる形態の葉を発生させる性質 (水没応答性の異形葉性) について述べたが、本種は水没以外の環境因子にも応答して葉の形態を変化させることが過去の研究によって明らかになっている (Nakayama et al. 2014b)。特に形態に与える影響が大きい因子は温度である。本種は陸上 30°C の高温条件では葉に切れ込みのない単一の楕円状の葉身をもつ単葉を形成する。生育温度条件を低下させると形成される葉に切れ込みが入るようになり、1 枚の葉に複数の葉身をもつ複葉を形成する。さらに低い温度で育成すると葉身は細くなり、葉脈周辺に細い葉身を持つ羽毛状の複葉を形成する。

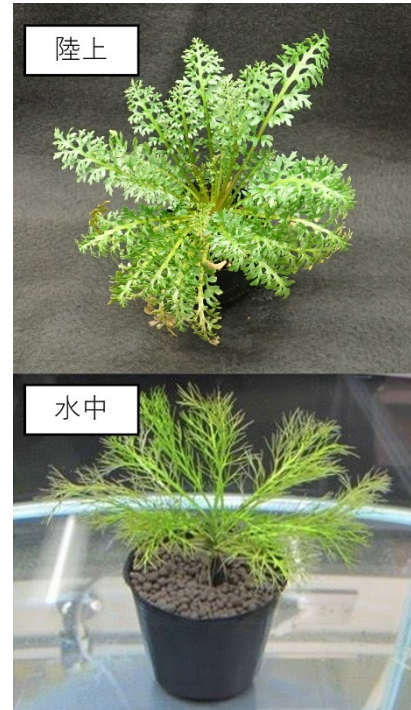


図 1. 陸上および水上での *R. aquatica* の形態

2 - 3. 葉断片からの栄養繁殖

栄養繁殖とは有性生殖を用いずに植物個体が増殖する繁殖形態のことである。具体的な例としてはジャガイモの塊茎やサツマイモの塊根などのイモによる増殖が知られている。植物の頂芽や茎を切り取って増殖を行う挿し木なども人為的な栄養繁殖の手法である。しかしながら、どんな植物のどんな組織からでも栄養繁殖が行えるという訳では無い。アブラナ科モデル植物であるシロイヌナズナは、葉片を湿らせた状態で維持することで葉柄断面から根を発生させる。しかし、完全な植物体を発生させるためには外部からの植物ホルモン添加等の追加の処置を行う必要がある。一方で *R. aquatica* は外部からの植物ホルモン添加を行わずとも葉断片から新たな植物体を再生させることができる (図 2)。本種の葉またはそれを分割した葉断片を湿った条件に置いておくと切断面から新たな植物体を発生させる。



図 2. 葉断片から再生した植物分体

3. *Rorippa aquatica* のゲノム・遺伝子配列情報基盤の構築

上記のように興味深い特徴を示す本種であるが、モデル生物ではないため遺伝子情報基盤が整備されていなかった。形質の根底にあるメカニズムを分子遺伝学的に解析するためには遺伝子配列情報の取得が不可欠であり、これまでに様々な手法を用いてゲノム・遺伝子情報基盤の整備を進めてきた。最終的に複数の次世代シーケンサー技術を用いることで染色体レベルのゲノム配列を取得することが出来た (Sakamoto et al. 2022)。イルミナのショートリード genome-seq データと Pacbio のロングリードデータを組み合わせて長鎖コンティグ配列を得た。これをもとに Hi-C seq リードを用いて染色体レベルに分類・再構成することで、15本の染色体配列を含む総塩基長約 450 Mbp のゲノム配列を取得した。さらに様々な条件の *R. aquatica* の RNA-seq リードデータをゲノム上にマッピングして得られた遺伝子領域情報とシロイヌナズナの遺伝子データセットを用いた遺伝子推定を統合することで 46,197 個の遺伝子座を推定した。BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologue) によるゲノム・遺伝子情報の妥当性チェックにおいても、陸上植物でシングルコピーとして保存されている遺伝子の 90%以上が *R. aquatica* ゲノム上から発見され、構築したゲノム・遺伝子基盤が十分に信頼できるものであることが示された。このように、複数の次世代シーケンサー技術を組み合わせることによって研究室レベルで染色体レベルでのゲノム解読が可能であり、研究材料として一般的でない植物においても全遺伝子レベルでの解析・情報基盤の構築を行う事ができた。

4. *Rorippa aquatica* の起源解析

ゲノムアセンブリでは 15 本の染色体配列が得られ、顕微鏡下での染色体観察において *R. aquatica* の体細胞染色体数が 30 本であったことから (Nakayama et al., 2014a), *R. aquatica* は $2n = 30$ の染色体構造を持つことが示唆された。しかしながら、近縁な *Cardamine* 属や *R. islandica* では染色体基本数 X は 8 である。*R. aquatica* における染色体数の増加は本種の進化過程において倍数化を経験していることを示唆しているが、染色体数が近縁種の染色体基本数の倍数でないことから単純な倍加のみでは説明できない。そこで得られた *R. aquatica* ゲノム遺伝子情報と既知の近縁種データとの比較ゲノム解析によって、どのような進化過程を経て現在の *R. aquatica* に至ったを明らかにすることを試みた。

最初に *R. aquatica* と近縁かつ染色体レベルゲノム配列が得られている *Cardamine hirsuta* とのゲノム相同性比較を行った。*C. hirsuta* の各染色体はそれぞれ 2 本の *R. aquatica* 染色体との相同性を示した。*R. aquatica* の染色体のうち 15 番染色体は *C. hirsuta* の 2 番染色体と 8 番染色体の 2 本の染色体と相同な領域を持つことが示された。これは *R. aquatica* 15 番染色体がもともとは別の 2 本の染色体であったものが 1 本の染色体に結合した融合染色体であることを示唆している。*R. aquatica* は倍数化による染色体数の倍加と染色体融合による染色体数の減少を経て現在の $X = 15$ の染色体様式に至ったことを示している。

さらに全ゲノムレベルの遺伝子情報が得られたことにより分岐年代推定が可能になった。種間または種内の相同遺伝子の配列を比較することで同義置換率を算出することができる。同義置換率は種分岐などに伴う相同遺伝子の分岐が古いほどその値が大きくなる傾向がある

ため、進化的距離の推定に用いることができる。その結果、*Rorippa* 属は *Barbarea* 属と最も近縁であり、次いで *Cardamine* 属と近縁であった。この結果はゲノム上の複数の遺伝子を用いた系統分類の結果 (Huang et al., 2016) と一致しており、解析の妥当性が高いことが示された。また、化石に基づく種分岐年代推定を組み込むことで、同義置換率から分岐年代を推定することができる。*Rorippa* 属と *Cardamine* 属、*Barbarea* 属の分岐年代はそれぞれ 1400 万年前および 1000 万年前であることが示された。さらに *R. aquatica* と同属で 2 倍体である *R. islandica* のドラフトゲノムデータを加えた解析では、*R. aquatica* と *R. islandica* の分岐年代は 560 万年前であると推定された。同様に *R. aquatica* のゲノム倍数化によって生じたと考えられるパラログ間の分岐年代は 780 万年前であると示された。しかしながら、ゲノム倍数化が *R. aquatica* と *R. islandica* の分岐の前に生じたとすると、共通の 4 倍体祖先から 2 倍体植物である *R. islandica* が生じた事になり、これは通常では考えにくい事象である。

この実験結果と仮説との齟齬の原因を明らかにするために *R. aquatica* と *R. islandica* の同義置換率 (Ks) 比較による進化的距離の推定を *R. aquatica* 染色体ごとに行った。その結果、*R. aquatica* 染色体は *R. islandica* との分岐年代が異なる 2 つの染色体グループに分かれることが明らかになった (図 3)。

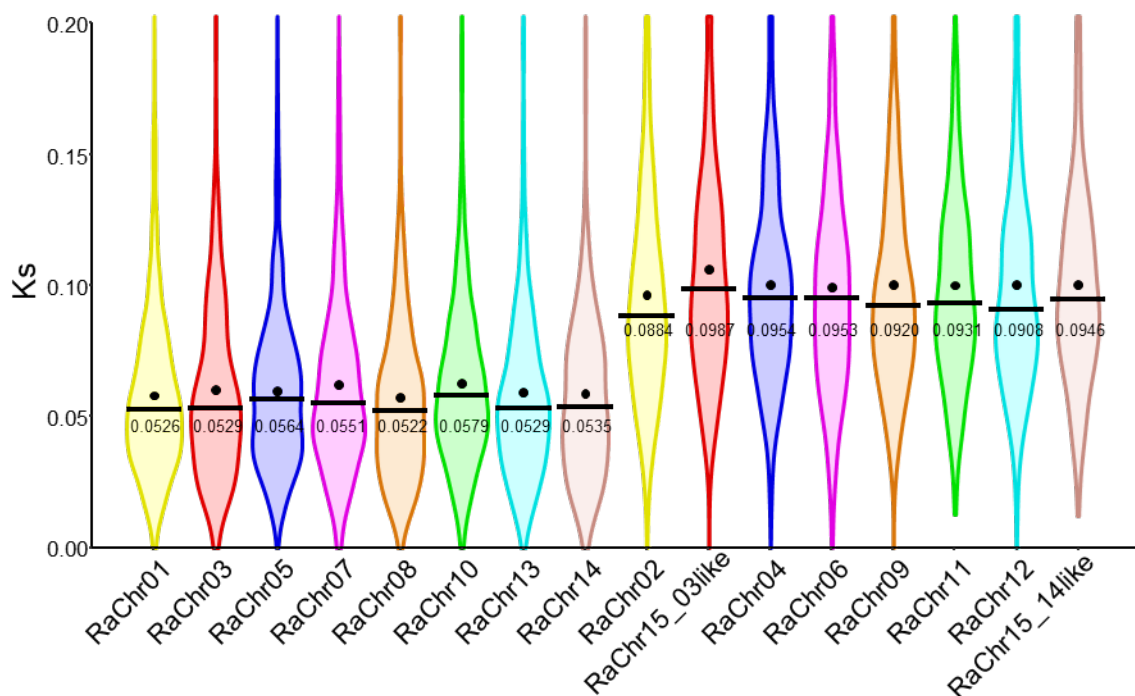


図 3. *R. aquatica* 染色体ごとの *R. islandica* との同義置換率分布

同色の染色体は相同な染色体を示す。各プロット上の黒丸は平均値を、横棒と数値は中央値を示す。

それぞれのグループには相同な染色体が各一本ずつ含まれていたことから *R. aquatica* は 2 組のゲノムセット (サブゲノム) をもつことが明らかになった。1 つ目のサブゲノム A グループは Ks 中央値約 0.05 で *R. islandica* と約 420 万年前に分岐した染色体、もう一方のサブゲノム B グループは Ks 中央値約 0.10 で約 780 万年前に *R. islandica* と分岐した染色体から構成

されていた。この結果により、ゲノム全体での解析によって推定された 560 万年前という *R. islandica* との分岐年代は、異なる分岐年代をもつ 2 つのサブゲノムを混合して解析してしまったことによる偽的分岐年代であることが示された。また、融合染色体である 15 番染色体は後者のグループに、それと相同な領域をもつ 3 番染色体および 14 番染色体は前者のグループに分類されていた。

これまでの解析結果をまとめると *R. aquatica* は以下のような進化過程を経て現在の *R. aquatica* という種として確立されたと考えられる (図 4)。

- 1000 万年前に *Barbarea* 属と *Rorippa* 属が分岐
- 780 万年前に *Rorippa* 属内でサブゲノム A グループとサブゲノム B グループが分岐
- 420 万年前にサブゲノム A グループ内で *R. aquatica* と *R. islandica* が分岐
- これ以降のいずれかの時期に *R. aquatica* サブゲノム A 祖先種とサブゲノム B 祖先種が交雑した後、倍数化して 4 倍体様の種として確立

15 番染色体における同義置換率の分布から 15 番染色体はサブゲノム B グループ内の染色体融合によるものであることが示された。サブゲノム B グループでは染色体融合が見られず 8 本の染色体構造を維持していることから、この染色体融合は 2 つのグループが分岐した 780 万年前より後の年代に生じたと思われる (図 4 青太線)。

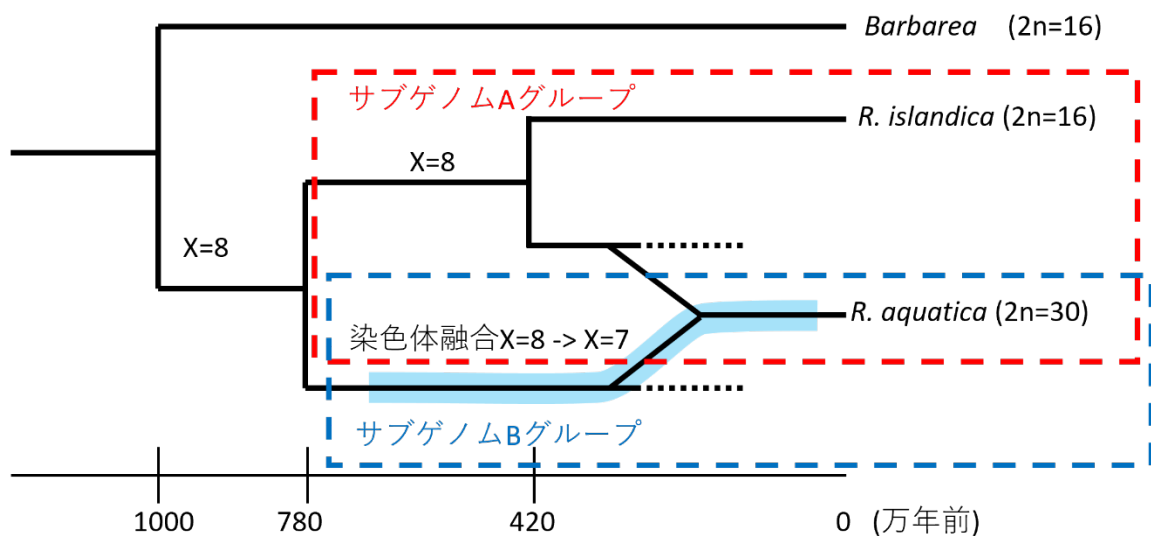


図 4. *R. aquatica* の進化経路

5. まとめ

次世代シーケンサーデータを用いた解析により、*R. aquatica* での染色体レベルでのゲノム配列情報の取得と遺伝子情報基盤の構築に成功した。これにより本種でのより詳細な分子遺伝学的解析を行うための基礎を確立できた。また、*R. aquatica* が 2 種の *Rorippa* 属植物の交雑により生じた種であることが明らかになったことから、本種に見られる特徴がいかにして生じたかについて以下のような仮説を提唱する事ができる。1 つの説は単純にどちらかの親からの遺伝により受け継いだというものである。しかしながら、他の *Rorippa* 属植物では水没

へ適応や温度に応答した異形葉性は確認できていない。2 つ目の説は 2 種の交雑による雑種強勢である。交雑種においては親となった種より強い表現型を示すことがあり、この現象は雑種強勢と呼ばれている。もし *R. aquatica* の表現型が雑種強勢に基づくものなら、*R. aquatica* の各サブゲノム親株種およびその近縁種を用いた解析によって明らかにすることができる可能性がある。しかし、サブゲノム B 親株やその近縁種は未だに明らかになっていない。より詳細な解析のためにもサブゲノム B グループに含まれる *Rorippa* 属植物を今後探索していく必要があるだろう。3 つ目の説はゲノム倍数化に由来する突然変異速度の加速化による新たな遺伝子の発生を原因とするものである。遺伝子のコピー数の増加はその冗長化の影響により、しばしば増加した遺伝子の一部に突然変異の蓄積を許容する。その結果、遺伝子の機能変化や新たな機能獲得が起こりうる。

R. aquatica で見られた特徴的な形質については特に生理学的側面からの解析が進められている。しかしながら、それらの根底にある分子生物学的機構については未だに不明な点が多い。ゲノムアセンブリにより遺伝子情報基盤が構築され、遺伝子操作を含めた遺伝子レベルでの解析環境の基礎が整った。近縁種との比較解析および全ゲノムレベルでの遺伝子解析によってこれらの特徴的な形質の分子機構の解明が進められている。

引用文献

- Huang CH, Sun R, Hu Y, Zeng L, Zhang N, Cai L, Zhang Q, Koch MA, Al-Shehbaz I, Edger PP et al. (2016) Resolution of Brassicaceae Phylogeny Using Nuclear Genes Uncovers Nested Radiations and Supports Convergent Morphological Evolution. *Mol Biol Evol* 33: 394–412. doi: 10.1093/molbev/msv226
- Nakayama H, Fukushima K, Fukuda T, Yokoyama J, Kimura S (2014a) Molecular Phylogeny Determined Using Chloroplast DNA Inferred a New Phylogenetic Relationship of *Rorippa aquatica* (Eaton) EJ Palmer & Steyermark (Brassicaceae)—Lake Cress. *AJPS* 05: 48–54. doi: 10.4236/ajps.2014.51008
- Nakayama H, Nakayama N, Seiki S, Kojima M, Sakakibara H, Sinha N, Kimura S (2014b) Regulation of the KNOX-GA gene module induces heterophyllic alteration in North American lake cress. *Plant Cell* 26: 4733–4748. doi: 10.1105/tpc.114.130229
- Sakamoto T, Ikematsu S, Nakayama H, Mandáková T, Gohari G, Sakamoto T, Li G, Hou H, Matsunaga S, Lysak MA et al. (2022) Chromosome-level genome assembly of *Rorippa aquatica* revealed its allotetraploid origin and mechanisms of heterophylly upon submergence. doi: 10.1101/2022.06.06.494894