

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。

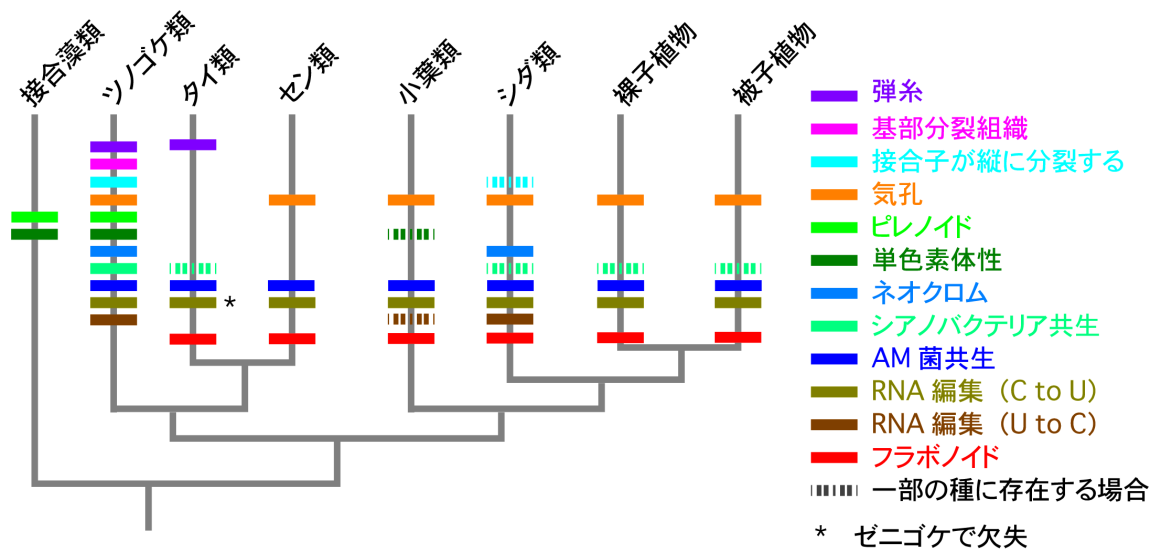


図 1. ツノゴケの特徴的な形質の他の陸上植物での有無。

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（小藤と鳴村 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（リブローズ-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相関したものであるか、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。

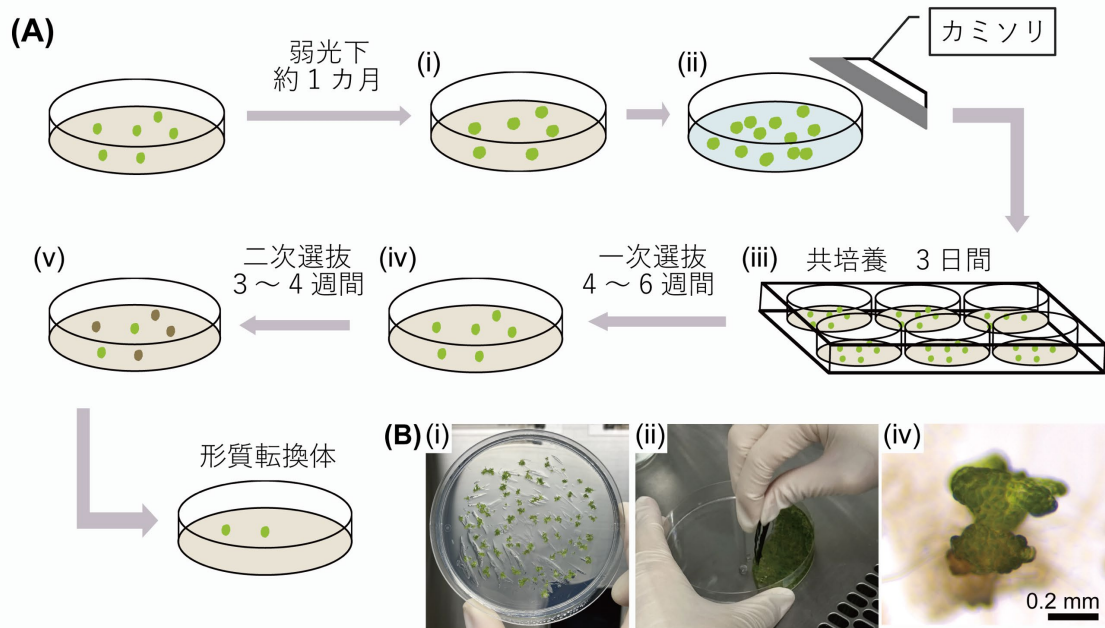


図2. ツノゴケの形質転換

(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