

# 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<sup>1,2</sup>, 木村 成介<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>京都産業大学 生命科学部  
〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

<sup>2</sup>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<sup>1,2</sup>, Seisuke Kimura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University,  
Kamigamo-Motoyama, Kita-Ku, Kyoto 603-8555, Japan

<sup>2</sup>Center 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。

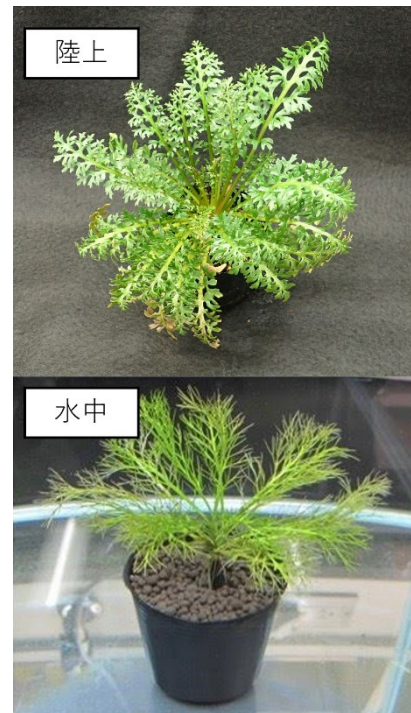


図 1. 陸上および水上での *R. aquatica* の形態

## 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* に至ったか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 *Barbrea* 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)。

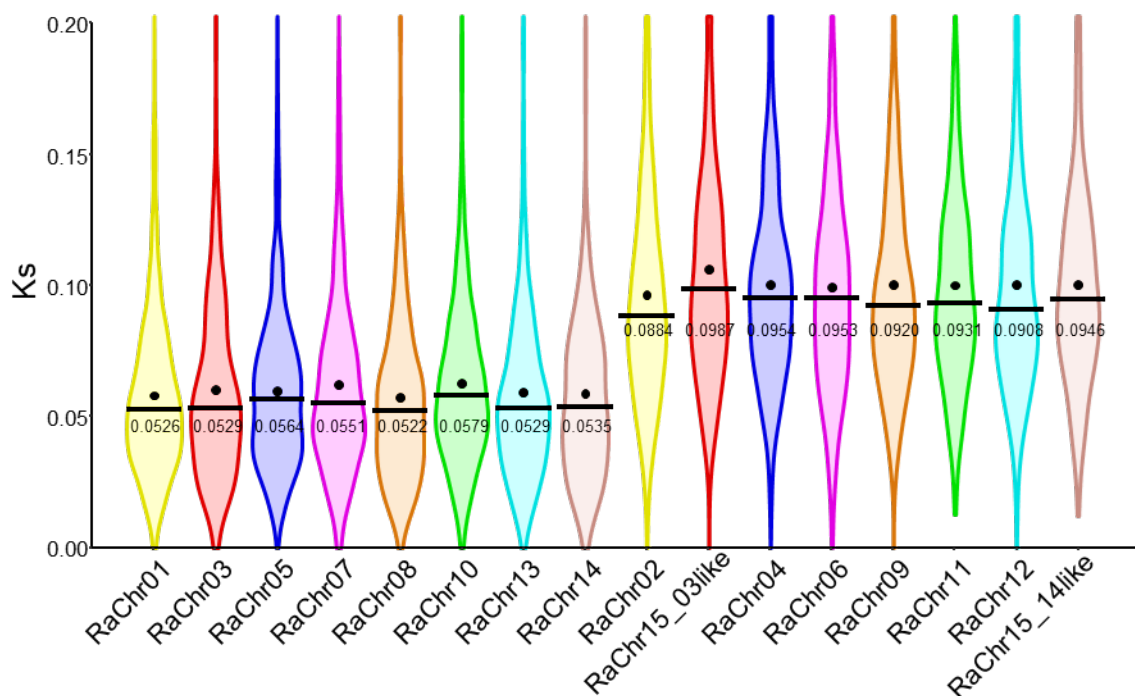


図 3. *R. aquatica* 染色体ごとの *R. islandica* との同義置換率分布

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)。

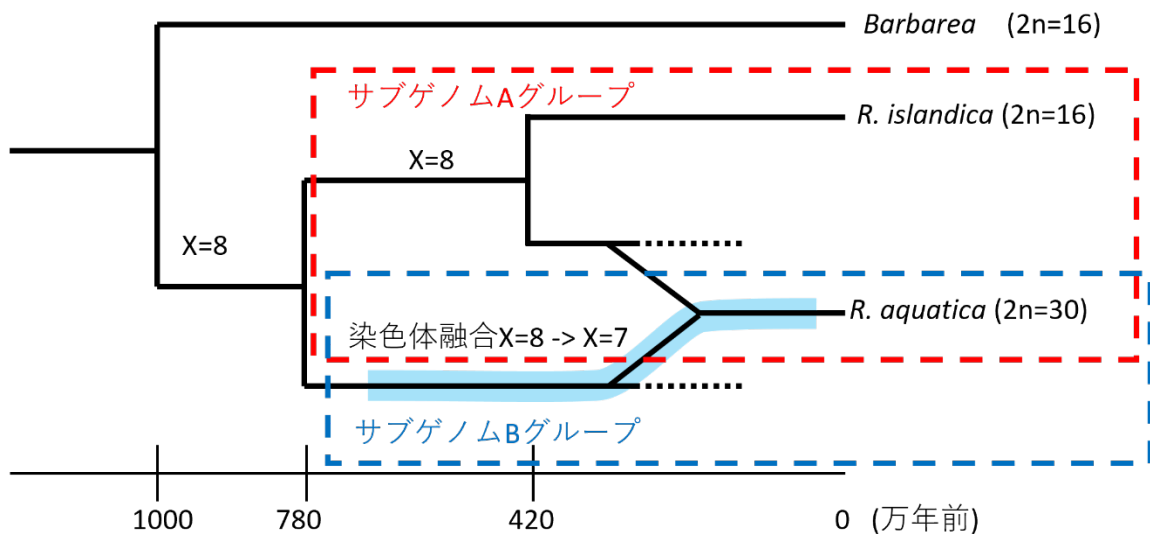


図 4. *R. aquatica* の進化経路

## 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ん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