

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370095

研究課題名(和文) シャジクモ概要ゲノムの解読と遺伝学的地図の同時構築による陸上植物進化の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Land plant evolution by draft genome sequencing and genetic map construction of Chara braunii

研究代表者

西山 智明(Nishiyama, Tomoaki)

金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号：50390688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：シャジクモ(Chara braunii)の概要ゲノム配列を解読した。シャジクモはストレプトフィツ類の中で陸上植物について複雑な体制をもつ藻類であるシャジクモ類の中では小型の藻類で、実験室内で短時間に世代を完了する事が可能である。この概要ゲノム配列は、11,808本のスキュッフォールドからなり、35883遺伝子座上に36887個の遺伝子モデルが予測された。染色体スケールのスーパースキュッフォールドを得るため二つの系統間の交配を行い、子孫が外交配によっている事をSNPにもとづいて設計したPCR-RFLPによって同定した。この子孫株について遺伝学的地図を作成するためのランダムシーケンスを行った。

研究成果の概要(英文)：A draft genome sequence of Chara braunii was determined. Chara braunii is a relatively small monoecious alga in Charales, which we can culture in lab condition and induce reproductive organs in a short time. The draft genome consisted of 1.75 Gbp in 11,808 scaffolds. Half of the sequence is contained in 234 scaffolds at least 2.26 Mb long and 90% is contained in 813 scaffolds at least 551,793 bp long. Gene prediction using RNA-seq data and homology to plant proteomes resulted in 36,887 gene models in 35,883 loci. Further to establish the chromosome scale super scaffold, genetic cross between two accessions were performed. PCR-RFLP primers were designed based on SNP data and progeny derived from out-crossing were determined. Random sequencing of the progeny are performed to construct genetic map based superscaffolds.

研究分野：進化学

キーワード：シャジクモ ストレプトフィツ類 全ゲノムシーケンス 遺伝学的地図

1. 研究開始当初の背景

これまで、シロイヌナズナ、イネ等の被子植物の他コケ植物のヒメツリガネゴケ、シダ植物のイヌカタヒバのゲノムが解読され、陸上植物の多様性はゲノムレベルで比較できるようになって来た。しかし、藻類のデータはクロロファイト類にとどまり、シャジクモ藻類のゲノム情報が欠落していることが進化理解の障害となっていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では陸上植物に近縁なシャジクモ藻類のシャジクモ (*Chara braunii*) の概要ゲノム解読と遺伝学的地図の作成とを次世代シーケンサーを用いて同時に行い、陸上植物の発生に関わる遺伝子の相同遺伝子の有無を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

シャジクモの単藻培養株 S276 より高分子 DNA を抽出し、インサート長 250bp のペアエンドライブラリー及び、インサート長 2kb, 3kb, 8kb のメイトペアライブラリーを作成しアセンブリーを作製した。このライブラリーをペアエンドについて両端から 150 塩基の条件で 5 レーン、メイトペアについて各 1 レーン解読し、ALLPATHS-LG によるアセンブリーを行った。この段階では十分な scaffold size が得られなかったため、メイトペアライブラリーについて DNA 量を増やしてより高分子のライブラリーを作ることとし、20 マイクログラムから 12 及び 18kb, 8 マイクログラムから 5, 8, 10, 12 及び 17 kb, 6 マイクログラムから 5, 8, 10, 14 及び 17 kb のライブラリーを作製し解読した。このうち、6 マイクログラムから 17kb のライブラリーについてはインサート長分布が想定通りのピークがなかったため除き、ヨーロッパの共同研究者が提供した Crelox 法を用いたメイトペアライブラリー 3 セットのデータを加えて、アセンブリ

を行った。

異なる地点で採集された株 S277 について PE150, 1 レーンの解読を行った。このデータと S276 のデータを前記アセンブリーで得た scaffold にマッピングし、各 scaffold にマップされるリード数を得て、S277 のリードがマッピングされた数が小さい scaffold について、共存バクテリア由来の可能性有りとしてマークした。

また、この S277 と S276 のマッピングデータより塩基配列多型を抽出した。このうち BamHI サイトの多型となっている領域を増幅するプライマーを設計し、S276 と S277 のゲノム DNA を増幅して BamHI で消化したときのパターンが異なる事を確認した上で、S276 と S277 を共培養し、それぞれから得られた接合子に由来する株において同様の PCR-RFLP 実験を行い、一部の株で領域ごとに異なる組合せが確認され、確かに交配に由来する株である事を確認した。

遺伝子モデルを推定するため、シャジクモの RNA-seq データと他の植物のゲノムにコードされている遺伝子とのホモロジー情報をヒントとして augustus を用いて遺伝子構造予測を行った。

4. 研究成果

シャジクモの概要ゲノムアセンブリーを得た。バクテリアと疑われる部分を除き、総延長 1.75 Gb である。半分が 2.26Mb 以上の scaffold に 90% が 550 kb 以上の scaffold に含まれた。

この概要ゲノム配列について、遺伝子アノテーションを行い、35883 遺伝子 36877 モデルが予測された。

このセットでどれだけ超保存的な遺伝子 248 個のうちどれだけのホモログが含まれているかを調べると、Partial が 228 個 (92%), Complete が 217 個 (88%) 見つかり、高精度なゲノムができている事が確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 20 件)

- (1) 「シャジクモの遺伝学的解析に向けた交配実験系の確立」 宮田大輔、西山智明、川井浩史、坂山英俊 日本植物学会第79回大会(新潟) 2015年9月
- (2) 「シャジクモのゲノム解読」 西山智明、豊田敦、宮田大輔、鈴木穰、藤山秋佐夫、坂山英俊 NGS現場の会第4回研究会(つくば) 2015年7月
- (3) 藤原ひとみ、大西美輪、坂山英俊、石崎公庸、豊倉浩一、郷達明、関本弘之、西山智明、七條千津子、小菅桂子、深城英弘、三村徹郎「植物細胞リン酸輸送機構とその進化について」 第56回日本植物生理学会年会(東京), 2015年3月
- (4) 宮田大輔、西山智明、川井浩史、坂山英俊「シャジクモの遺伝地図構築に向けたジェノタイプングを用いた交配実験系の確立」 日本藻類学会第39回大会(福岡), 2015年3月
- (5) Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama, Stefan A. Rensing, Hidetoshi Sakayama. "The *Chara braunii* genome" International Symposium on Genome Science 2015 "Expanding Frontiers of Genome Science II", Tokyo, 2015年1月
- (6) Hidetoshi Sakayama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama, Stefan A. Rensing, Tomoaki Nishiyama "The *Chara braunii* Genome Sheds Light on the Origin of Land Plants". PAG2015, San Diego, 2015年1月(Poster)
- (7) Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama, Stefan A. Rensing, Hidetoshi Sakayama "The *Chara braunii* genome" PAG2015, San Diego, 2015年1月(招待講演)
- (8) 西山智明、豊田敦、鈴木穰、藤山秋佐夫、坂山英俊「シャジクモゲノムにみる陸上植物の制御因子ホモログ」 日本植物学会第78回大会(川崎), 2014年9月
- (9) 西山智明、豊田敦、鈴木穰、藤山秋佐夫、坂山英俊「陸上植物に近縁な緑色藻類シャジクモのゲノム解読とアノテーション」日本進化学会第16回大阪大会, 2014年8月
- (10) Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama and Hidetoshi Sakayama. "Genome Sequencing of the Charophycean Green Alga, *Chara braunii*" Ectocarapus 2014. Kobe, March 2014
- (11) 西山智明、豊田敦、鈴木穰、藤山秋佐夫、坂山英俊「シャジクモのゲノム解読」日本植物分類学会第13回大会(熊本) 2014年3月
- (12) 藤原ひとみ、大西美輪、坂山英俊、石崎公庸、関本弘之、西山智明、七條千津子、深城英弘、三村徹「植物細胞リン酸輸送機構とその進化について」 第55回日本植物生理学会年会(富山) 2014年3月
- (13) 西山智明、豊田敦、鈴木穰、藤山秋佐夫、坂山英俊「陸上植物に近縁な藻類シャジクモ: 2.3Gb ゲノムの解読・アセンブリー」 生命情報科学若手の会第5回研究会(検見川) 2014年2月
- (14) Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama and Hidetoshi Sakayama. "Genome Sequencing of the Charophycean Green Alga, *Chara*

braunii.” Plant & Animal Genomes XXII,
San Diego, January 2014

- (15) 西山智明, 豊田敦, 鈴木穰, 坂山英俊.
「陸上植物に近縁な藻類シャジクモの
ゲノム解読」日本植物学会第 77 回大会
(札幌) 2013 年 9 月
- (16) 西山智明, 豊田敦, 鈴木穰, 坂山英俊.
「陸上植物に近縁な藻類シャジクモの
ゲノム解読。」NGS 現場の会第三回研究
会(神戸) 2013 年 9 月
- (17) 西山智明, 豊田敦, 鈴木穰, 坂山英俊.
「陸上植物に近縁な藻類シャジクモの
ゲノム解読」北陸植物学会 平成 25
年度大会 (金沢) 2013 年 6 月
- (18) 坂山英俊, 山田敏弘, 西山智明, 川井
浩史, 伊藤元己「シャジクモ藻類シャジ
クモ (*Chara braunii*) における LEAFY
遺伝子ホモログの発現解析」日本藻類学
会第 37 回大会(山梨) 2013 年 3 月
- (19) 西山智明「陸上植物に近縁な藻類: ジ
ャジクモ藻類のゲノム解析」生命情報科
学若手の会第 4 回研究会(岡崎) 2013
年 3 月
- (20) 坂山英俊, 西山智明「ゲノム解析から
見たシャジクモ類の多細胞化進化」日本
植物学会第 76 回大会(姫路) 2012
年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 智明 (NISHIYAMA, Tomoaki)
金沢大学・学際科学実験センター・助教
研究者番号: 50390688

(2) 研究分担者

坂山 英俊 (SAKAYAMA, Hidetoshi)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 60391108

(3) 研究協力者

宮田大輔 (MIYATA, daisuke)
神戸大学・大学院理学研究科・大学院生