

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 5月27日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770062

研究課題名（和文） 多数の核マーカーによる陸上植物の初期系統分化の解明

研究課題名（英文） Inference of Basal Relationships of Land Plants Based on Multiple Nuclear Gene Markers

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

研究成果の概要： 陸上植物の初期分岐等の系統が未だはっきり解明出来ない分岐を解明するため、単一遺伝子として維持されやすく、保存される領域が十分に長い遺伝子をゲノムから選抜し *CHLH*, *RAD50*, *TOR*, *RRP5*, *ATM*, *BIG* の6遺伝子についてシャジクモ(緑藻類)および陸上植物を含む多様な植物について配列決定可能なプライマーセットを開発し配列決定を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：系統、陸上植物、緑藻類、コケ植物、小葉類、維管束植物、シャジクモ藻類、核コード遺伝子

1. 研究開始当初の背景

現在では、30万種以上の陸上植物が地球を覆い一次生産の多くを担っている。陸上植物に最も近縁な生物は、形態・分子データの解

析からシャジクモ藻類の、コレオケーテ (*Coleochaete*) やシャジクモであると考えられている。現生陸上植物の祖先は微化石の情報から約4億7千万年前にあらわれたと考えられている。陸上植物の特徴は、2倍体世

代に多細胞体制を作ることであり、はっきりした単系統群である。その初期進化の過程について、一般的には、コケ植物が多系統的に初期に分岐し、維管束植物は単系統であると考えられて来た (Mishler & Churchill 1984, 1985 等)。分子系統解析は主に葉緑体の遺伝子を用いて数多く行われたが、塩基頻度の偏りの影響を排除するべくアミノ酸に翻訳して解析すると最も初期の分岐に関しては統計的に確からしい支持はなかなか得られなかった (Nishiyama & Kato 1999)。さらに、葉緑体ゲノム上に共通にコードされた全タンパク質の系統解析を行うと、コケ植物が単系統である可能性が強く示された一方、維管束植物の単系統性については強い支持が得られなかった (Nishiyama et al. 2004)。さらに、その後得られた小葉類の *Huperzia lucidata* (ヒカゲノカズラ科)、コンテリクラマゴケ (イワヒバ科) の配列を用いても維管束植物の単系統性については高い支持が得られていない (unpublished)。従って、陸上植物の基部の系統関係を明らかにするには、葉緑体ゲノム以外のデータを集積する必要がある。これまで、コケ植物セン類のモデル植物ヒメツリガネゴケで単離し系統解析を行って来た核遺伝子はヒメツリガネゴケの系統、維管束植物の系統それぞれで遺伝子重複によって多様化しているものが多く (ホメオボックス遺伝子: Sakakibara et al. 2001, MADS 遺伝子: Tanabe et al. 2005 等) 解析に用いることの出来る長さも短いものが多く遠縁な系統関係を解析するのに適した遺伝子は知られていなかった。申請者は、陸上植

物の進化を比較ゲノムのアプローチから解析するため、コケ植物セン類ヒメツリガネゴケと小葉類イワヒバ科イヌカタヒバの全ゲノムショットガン法によるシークエンスデータを利用して容易に系統推定が行えるシステムを構築し、約 700 遺伝子の系統解析を行ってきた。この中で、解析に用いることの出来る領域が長く、遺伝子数がどの生物でも基本的に 1 つ、まれに高々 2 つであるような遺伝子を多数見つけた。しかも、全ゲノム配列データがありパラログの見落としがなないと考えられる、シロイヌナズナ、イネ、イヌカタヒバ、ヒメツリガネゴケの遺伝子の系統関係を調べると、従来の説と異なりヒメツリガネゴケとイヌカタヒバの遺伝子が単系統群を形成する例が多いことがわかった。これが、コケ植物 (ヒメツリガネゴケ) と小葉類 (イヌカタヒバ) が近縁であることを意味するならば、コケ植物は維管束植物から退化して出来た植物であることを示唆する。しかし、上記の解析では、分類群のサンプリングが不十分であり陸上植物の主要な分類群の関係を十分に解明出来ているとは言えなかった。

2. 研究の目的

本研究では、核ゲノムデータが揃っている生物のゲノムワイドな系統解析から系統解析に適した核にコードされた遺伝子を選抜し、陸上植物の主要な分類群および外群のシャジクモ藻類からその相同遺伝子を単離し、アミノ酸配列による系統解析を行い、陸上植物

の主要分類群間の系統関係を検証する事を目的とした

3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバの全ゲノムショットガンシーケンスを用いた大規模な系統解析にもとづき、パラログが少なく、良く保存されている領域が長い遺伝子を選定した。

選定した 12 遺伝子についてそれぞれ多重アラインメントから N 末端付近 C 末端付近の保存領域を同定し、縮重プライマーを合成し、シャジクモ、ホウライツノゴケ、スギナにおいてそれぞれの相同遺伝子の部分断片を増幅、クローニング、塩基配列決定をおこなった。

ほぼ全長の配列決定にあたっては、RGCY の 4 塩基を認識し、平滑末端を生じる制限酵素 CviKI-1 を用いて部分消化した断片のクローニングシーケンスと、ほぼ全長クローンの特異的プライマーによる塩基配列決定を併用し、効率化を図った。得られた個別の配列は KB_Basecaller を用いて phd.1 ファイルに変換し、cap3 によってアセンブルした。cap3 で処理するにあたり、前処理としてベクター及び品質の低い部分を除去するプログラムを開発し効率を高めた。

得られた部分配列にもとづいて種特異的プライマーを設計し、N 末端付近から C 末端付近までをつなぐほぼ全長を増幅、塩基配列決定を行った。N 末端領域がうまく増幅出来ない遺伝子についてはシャジクモについて

当該遺伝子の配列を 5'-RACE によって決定し、その塩基配列を考慮した縮重プライマーを設計することによって他の陸上植物の相同遺伝子単離を進めることとした。

得られた塩基配列から、アミノ酸配列を導出し多重アラインメントの後系統解析を行った。

4. 研究成果

12 遺伝子中 *CHLH* (1381 残基), *RAD50* (1316 残基), *TOR* (2481 残基), *RRP5* (1838 残基), *ATM* (3856 残基), *BIG* (5098 残基) の 6 遺伝子(カッコ内はシロイヌナズナの当該遺伝子の長さ)で、シャジクモの相同遺伝子の同定に成功し、*CHLH*, *RAD50*, *TOR*, *RRP5* の 4 遺伝子についてはほぼ全長の塩基配列を決定した。*ATM*, *BIG* については後半部分のみの配列を取得した。

このうち、*CHLH*, *TOR* の 2 遺伝子については、ホウライツノゴケ、スギナについてもほぼ全長の配列を取得に成功し、陸上植物の最基部の系統解析を行う基盤が整った。それぞれの遺伝子で系統解析を行ったところ、いずれでもヒメツリガネゴケとホウライツノゴケが単系統群を形成し、コケ植物が単系統であるという仮説に合う結果となった。この分岐は *CHLH* では高いブートストラップ確率で支持されるが *TOR* では低かった。また陸上植物最初の分岐については、両系統樹は一致せず、*TOR* では低いブートストラップ確率でコケ植物と小葉類が単系統群を形成したが、*CHLH* ではコケ植物と維管束植物で分

かれるという解析結果となった。また、*TOR*では Euphyllophytes の単系統性が認められるのに対して、*CHLH*では小葉類とスギナが低いブートストラップ確率で単系統群を形成した。これは、やはり単一遺伝子では情報が不十分である事を示しており、多数の遺伝子を系統解析に用いるべきことを支持している。

RAD50, *RRP5* についてはシャジクモ、ホウライツノゴケでほぼ全長の塩基配列を決定できた。

ATM, *BIG* についてはいずれの植物でも C 末端付近のみの配列を取得しているが、シャジクモで 5'-RACE によりより N 末端側の配列を取得し、再度縮重プライマーを設計して、他の植物の遺伝子を増幅するという方法で N 末端に向けて解読領域を拡大しつつある。これまでシャジクモでは *ATM* について 2.8 kb 分、*BIG* については 4.8 kb 分の配列を取得している。

これまでの解析では、まだ分類群の数が不十分なので、現在、タイ類の、オオホウキゴケ(*Jungermannia infusca*)について上記 6 遺伝子の相同遺伝子の解読を進めている。また、裸子植物のシダ類、さらに追加的な小葉類(ヒカゲノカズラ *Lycopodium*, ミズニラ *Isoetes*),コケ植物 (ミズゴケ *Sphagnum*, ナンジャモンジャゴケ *Takakia* 等) , シャジクモ藻類(コレオケーテ *Coleochaete* など)の配列を加える事により、陸上植物の初期分岐が広く受け入れられる信頼性で明らかになると考えられる。

また、本研究で確立した複数の独立な単一

コピー遺伝子核マーカーは、集団遺伝学的解析にも有用であると期待される。

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 0 件)

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

なし

(3)連携研究者

なし