

生態進化発生学研究センター活動報告

平成 28 年 4 月 19 日受付

木 村 成 介*
金 子 貴 一*
本 橋 健*
河 邊 昭*

要 旨

地球上の多彩な生物の形の多様性が生じる仕組みを、「発生」、「進化」、「環境」という3つの異なる観点から総合的に理解しようとするのが「生態進化発生学（エコ-エボ-デボ）」である。総合学術研究所生態進化発生学研究センターは、生物のゲノムやトランスクリプトームなどのオミックス情報を統合的に解析することで、生物の形の多様性が生じる仕組みを理解することを目的として、平成27年10月に発足した。生態進化発生学を標榜した研究拠点は国内外に見当たらず、オミックス研究で十分な実績を持つ教員が連携して技術やノウハウを結集することで、我が国を代表する先進的な研究拠点の形成を目指している。

キーワード：生態進化発生学，次世代シーケンサー，統合オミックス解析，表現型可塑性，*Rorippa aquatica*

1. はじめに ー生態進化発生学研究センターの概要ー

地球上の多彩な生物が見せる驚くべき「形の多様性」は、古くから多くの人々を惹きつけてきた。個体の形は、「発生」の過程を経て形成され、種間に見られる形の多様性は、「進化」の過程で発生のプログラムが変化することで生じる。また、生物をとりまく「環境」は一定でなく、多くの生物は生育環境に合わせてその形を変化させる。つまり、生物の「形の多様性」が生じる仕組みを明らかにするためには、「発生」、「進化」、「環境」という3つの異なる観点から理解しなければならない。「生態進化発生学（エコ-エボ-デボ）」は、この3つの観点から生物の形の多様性を総合的に解き明かそうとするものであり、近年花開きつつある新しい研究領域である。

生物の形などの形質は、ゲノムに書き込まれた情報が、階層的かつ複合的に制御されることで発現する。したがって、生物の形の多様性が生じる仕組みを理解するためには、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームなど各階層のオミックス情報を統合的に解析する必要がある（「統合オミックス解析」）。一方、生態進化発生学の対象は変わった特徴をもつ非モデル生物になりがちで、

* 京都産業大学総合生命科学部，生態進化発生学研究センター

これまで、ゲノム配列や転写産物の解読などのオミックス研究は技術的に困難であった。しかしながら、次世代シーケンサーの登場による技術革新により、最近になって、非モデル生物でもオミックス研究が実施できるようになってきている。

そこで、平成 27 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の支援を受け、総合学術研究所に生態進化発生学研究センターが設置された。本センターでは、オミックス研究において十分な実績を持つ教員が連携し、その技術やノウハウを結集することで、これまで困難であった生態進化発生学研究を展開することを目指している。特に植物の形と環境の関係に着目し、「表現型可塑性」という現象を研究することで生態進化発生学という研究分野をリードする拠点としたい。さらに、本研究プロジェクトにより整備される統合オミックス解析の研究基盤を生かして、学内における研究の活性化や学外との共同研究を推進したいと考えている。

本報告では、平成 27 年度における生態進化発生学研究センターの研究成果について概説する。

2. 研究体制

本センターは、京都産業大学総合生命科学部生命資源環境学科に所属する以下の教職員や研究員を学内メンバーとしている。それぞれの所属や専門、本センターにおいて果たす役割は以下の通りである。

木村成介（准教授）

植物分子発生学 研究の統括およびトランスクリプトーム解析

坂本智昭（研究助教）

生物情報学 次世代シーケンス解析およびバイオインフォマティクス解析

金子貴一（教授）

ゲノム科学 ゲノム解析およびバイオインフォマティクス解析

板倉学（ポスドク）

植物微生物相互作用 メタゲノム解析

河邊昭（准教授）

集団遺伝学 エピゲノム解析および進化解析

川辺隆大（研究助教）

育種学 エピゲノム解析および進化解析

本橋健（教授）

植物生理学 プロテオーム解析および生化学的解析

桶川友季（研究助教）

植物生理学 光合成解析

また、学外から 3 名の研究者が参加している。それぞれの所属と本センターにおいて果たす役割は

以下の通りである。

塚谷裕一（教授）

東京大学大学院理学研究科生物科学専攻発生進化研究室 進化発生学的研究に関する支援
Neelima Sinha（教授）

カリフォルニア大学デービス校植物学科 進化発生トランスクリプトーム解析に関する支援
矢野健太郎（准教授）

明治大学農学部生命科学部バイオインフォマティクス研究室 バイオインフォマティクス解析の
支援

3. 研究装置および研究設備の整備

本センターが目指す統合オミックス研究は、次世代シーケンサーによる大量かつ並列的な DNA の塩基配列決定技術を基礎としている。これまで本学は、次世代シーケンサーを所有しておらず、解析はすべて外部委託で実施していたため、コストの高さや時間がかかることが問題となっていた。また、次世代シーケンサーから出されるデータは膨大であり、データ解析のためには解析サーバが必要であった。そこで、本センターの設置にあたっては、次世代シーケンサー用のライブラリ作成からランの実施、データの解析まで一貫して実施できる体制を整えることとし、次世代シーケンサーとしては、illumina 社の NextSeq500 システム、次世代シーケンサー用のライブラリ自動作成装置として NeoPrep システム、また、解析サーバとして TAKERU for Sequencer V を導入して運用を開始した（図 1）。また、技術的な支援をすることで、学内外の研究者が共通利用機器として利用しやすいような体制を整えた。以下、それぞれの研究装置および設備について概説する。

(1) NextSeq500 システム

本プロジェクトでは、次世代シーケンサーとして illumina 社の NextSeq500 システムを導入した。NextSeq500 システム全ゲノム解析、エクソーム解析およびトランスクリプトーム解析が可能な唯一のデスクトップ型次世代シーケンサーであり、機器の操作も専用のオペレーター人員を必要としない最先端の機器である。最大で 4 億リード、300 bp のシーケンスが可能であり、1 回のランで 120 Gb のシーケンスデータを出力する。遺伝子発現プロファイル解析であれば、40 サンプル程度を 1 度に 1 日で処理することが可能である。その幅広いアプリケーション、操作性、コストパフォーマンスを考慮すると、本プロジェクトには現段階で最適の機器であるといえる。また、NextSeq500 システムには、BaseSpace Onsite という簡易解析サーバが付属しており、データの保管や簡単な解析を実施することができる。

(2) NeoPrep システム

次世代シーケンス解析のためには、解析対象となっている DNA や RNA から解析に供するためのシーケンスライブラリを作成する必要がある。NeoPrep システムはライブラリの自動作成装置であり、ライブラリの作成から濃度調整までのライブラリ作成の全行程を1つの装置で行うことができる。本センターでは、この装置を導入し、ライブラリ作成にかかる時間と手間を大幅に削減することが可能になった。

(3) 解析サーバ TAKERU for Sequencer V

次世代シーケンサーから出されるデータは膨大であり、そのデータ解析はいわゆるパーソナルコンピュータでは不可能で、解析サーバを設置することが必要となる。本センターでは、解析サーバとして、ナベインターナショナル社sのTAKERU for Sequence Vを導入した。最新のCPUと高速ネットワークで性能を確保し、十分なストレージを備え、1TB 大容量メモリと6台の計算ノードを構成することで、統合オミックス研究に必要な能力を十分に確保している。解析系と独立して Gateway server とセキュリティ アプライアンスにより、セキュリティにも考慮されたシステム構成となっている。



図 1. 生態進化発生学研究センターで運用している研究装置および研究設備

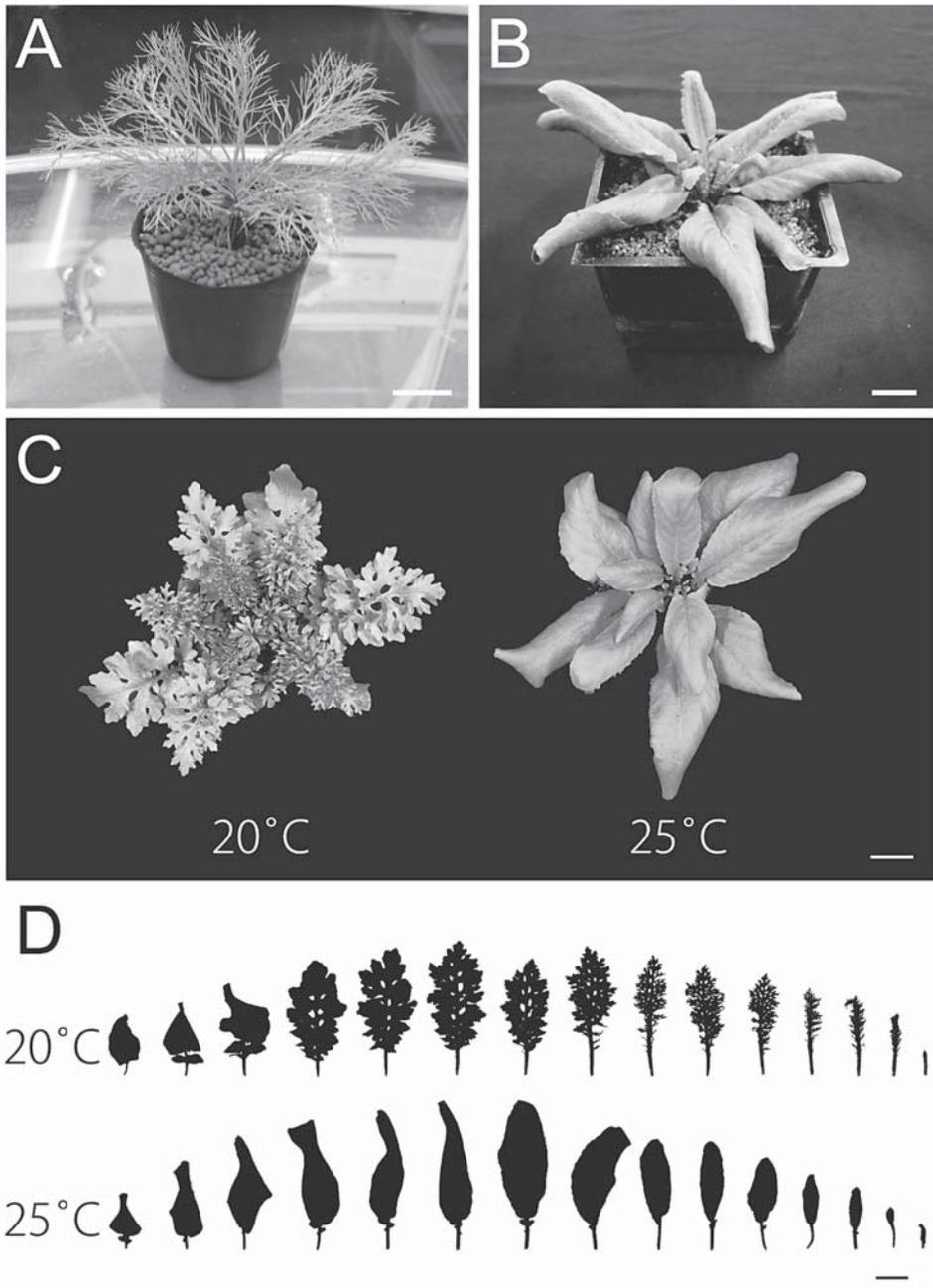
(A) NextSeq500 システム, (B) NeoPrep システム, (C) 解析サーバ TAKERU for Sequencer V

4. 研究内容の概要

生物の発生は遺伝的に規定された頑強性の高いプログラムである一方、環境により変化する柔軟性をも併せ持つ。一般に、生物が環境にตอบสนองして形態などの表現型を変化させることを「表現型可塑性」という。この現象は、器官発生を行いながら成長する植物に顕著に観察されるものであり、発生と環境の関係を理解する上で重要である。北米に分布する半水生植物 *Rorippa aquatica* は、生育環境にตอบสนองして葉の形態を変化させる表現型可塑性を示す。この植物は、水没すると葉身が針状になった羽状複葉（ギザギザの葉）を発生する一方、陸上では生育環境に依存して単葉（丸い葉）から複葉まで様々な形の葉を発生する（図2）。このような葉形の変化は、水の抵抗を軽減したり、効率良く光合成を行なうために役立っていると考えられ、発生と環境の相互作用を理解し、生態進化発生学研究を推進するための最良のモデルとなる。これまで、この植物が温度や光強度の変化で葉形を変化させることや、環境にตอบสนองして単葉と複葉の発生のメカニズムが遺伝子発現レベルで切り替わっていることなどを明らかにしてきた。しかしながら、表現型可塑性の鍵となる遺伝子の同定には至っておらず、また、葉形変化の意義については全くわかっていない。そこで本センターでは、生育環境にตอบสนองして葉の形態を変化させる *R. aquatica* を研究対象とし、統合オミックス解析により表現型可塑性のメカニズムを解明することを目的として研究を進めている。

R. aquatica には、環境にตอบสนองして葉形が大きく変化する A 株と、ほとんど変化しない J 株という 2 つの地域集団が存在する。この表現型可塑性の程度の差に着目し、A 株と J 株のオミックス情報を比較することで表現型可塑性の詳細なメカニズムの解明につなげる。また、*R. aquatica* が属するイヌガラシ属には約 75 種の植物が含まれるが、これまでに葉の形態の表現型可塑性は属内で 2 回独立に進化していることを明らかにしている。イヌガラシ属植物の系統関係を明らかにし、葉形が変化しない近縁種との間で形質情報やオミックス情報を比較することで、表現型可塑性の進化過程も明らかにしたい。さらに、葉形と光合成能の相関などの生理生態学的特性の解析により、葉形変化の意義を明らかにする。以上の研究により、葉の形態の表現型可塑性のメカニズムを生態進化発生学的な観点から解明することを目指す。また、本研究で同定される表現型可塑性に重要な遺伝子群は、温暖化、冷害、乾燥（砂漠化）、水没（洪水）などの環境ストレスに耐性のある植物を作出するために有用であると考えられる。そこで、これらの遺伝子を利用することで、環境ストレス耐性植物や不良環境でも生育できる植物の作出などの応用研究を進める予定である。

また、*R. aquatica* の表現型可塑性の研究以外にも、植物と環境の関係や、植物の適応進化などに着目した研究を広く展開していきたい。



Nakayama et al, *The Plant Cell* (2014) を改変

図 2. *Rorippa aquatica* にみられる葉の形態の表現型可塑性

(A) 水中で育てた個体。(B) 気中で育てた個体。(C) 20°Cもしくは25°Cで一ヶ月間育てた個体。図は植物体を上から見たもの。(D) Cの個体の葉をそれぞれ一枚ずつ発生順(葉位順)に並べたもの。右側がより若い葉。Bar は全て 2 cm。

5. 本年度の研究成果

ここでは、本年度センターが取り組んだ研究課題のうち、*R. aquatica* の表現型可塑性に関する研究成果について報告する。

(1) トランスクリプトーム参照配列の作成とデータベース化

R. aquatica に見られる葉の形態の表現型可塑性の発現に重要な遺伝子を同定するために、トランスクリプトーム解析による網羅的な遺伝子発現解析を進めている。*R. aquatica* ではゲノム配列およびアノテーション情報が得られていないため、まず、RNA-seq で得られたリードの *de novo* アセンブリによりトランスクリプトーム参照配列 (mRNA 情報) を作成した。アセンブルに使用したソフトは Trinity で、アセンブルの結果は表 1 に示す。また、既知の遺伝子との相同性検索をおこない各遺伝子の機能を推定するとともに、Gene Ontology (GO) の関連付けを行った。これらの情報はデータベース化し、研究室内のパソコンから簡単にアクセスして情報を利用できるように整備した。

(2) トランスクリプトーム解析による網羅的遺伝子発現解析

これまでの研究により、*R. aquatica* は、低温もしくは強光条件下では葉が複葉になり、高温もしくは弱光条件下では葉が単葉になることがわかっていた。また、北米大陸の南部由来の地域集団の J 株は、北部由来の A 株と比較して葉形変化の程度が著しく低い。そこで、まず、さまざまな温度 (20, 25, 30 °C) および光強度 (60, 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で A 株と J 株を生育させ、発生初期の葉原基を含む茎頂をサンプリングして RNA-seq 解析を行った。得られたリードはトランスクリプトーム参照配列にマッピングし、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

まず、A 株と J 株で発現の挙動が異なる遺伝子を同定するために Expression Difference 解析をおこなった。これは主成分分析 (PCA) をベースにした解析法で、各遺伝子の PC 空間上での位置を A 株と J 株で比較してクラスタリングすることにより、発現パターンに違いがある遺伝子群を抽出する方法である。この方法で A 株と J 株の遺伝子発現パターンを比較したところ、ストレス応答関係の遺伝子や、花成関連遺伝子また光合成関連遺伝子などに A 株と J 株の間で違いが見られた。A 株と J 株では、葉の形態の表現型可塑性の程度に差があり、つまり、環境変化に対する応答が異なるので、ストレス応答関係の遺伝子の発現に差異がある結果と一致している。また、J 株は花が咲くが、A 株は花が咲かない。この違いも花成関連遺伝子の発現に差があることに起因している可能性がある。さらに、A 株と J 株の光合成活性を測定すると、両者で環境変化への応答性に差があることがわかった。このことも光合成関連遺伝子の発現に差異があるからと考えられる。以上の結果は、2つの地域集団の比較トランスクリプトーム解析により、表現型の違いを推定可能であることを示しており興味深い。

次に、表現型と遺伝子発現の相関を解析することで表現型可塑性の発現に重要な遺伝子の同定を試みた。*R. aquatica* の葉形は環境変化にตอบสนองして連続的に変化するので、葉の形態変化と相関して発現

が変動する遺伝子群を同定すれば、重要な遺伝子が単離できるはずである。そこで、葉の形態を定量化し、遺伝子発現プロファイルとの相関分析（ピアソンの相関分析）を行った。その結果、これまでに葉の発生に関わることが知られている遺伝子や、転写因子、植物ホルモン関係の遺伝子などが同定された。興味深いことに、植物の光受容体であるフィトクロムに相互作用する因子（フィトクロム相互作用因子）の発現が、葉の形態変化に強く相関して変動していることを見出した。最近、フィトクロム相互作用因子が、植物の光応答だけでなく、温度の応答にも関わっていることが明らかとなっている。*R. aquatica* は、光強度や温度の変化により葉の形態を変化させるため、フィトクロム相互作用因子が表現型可塑性の発現に重要な役割を果たしている可能性がある。現在、これらの遺伝子についての機能解析を行っている。

(3) *R. aquatica* のゲノム解析

本年度は、*R. aquatica* のゲノム解析を開始した。*R. aquatica* には、表現型可塑性の程度が著しく異なる2つの地域系統（A株およびJ株）が存在する。そこで、A株およびJ株のゲノム配列を、イルミナ社の次世代シーケンサーであるMiSeqおよびNextSeq500で解析した。また、1分子リアルタイムDNAシーケンサーであるPacBioでも解析中である。これまで得られたデータでK-mer頻度解析をおこなったところ、ゲノムサイズは460Mbase程度で、二倍体であると推定された。*R. aquatica* は、自然環境では種子を作らず、栄養繁殖により繁殖している。これまで、種子を作らない理由は三倍体だからではないかと推察されていたが、本研究により否定することができた。花粉は作られているので、種子ができないのはおそらく自家不和合性によるものと考えられる。今後、ゲノム配列が明らかとなれば、これまでに行ってきたトランスクリプトーム解析の結果と合わせて、葉の形態の表現型可塑性を明らかにしていきたい。また、*R. aquatica* はアブラナ科に属し、ゲノム配列がすでに決定しているシロイヌナズナやハクサイと比較的近縁であるので、遺伝子情報をこれらの植物と網羅的に比較解析する予定である。

6. 共同研究の実施

本センターでは、学内の共同研究だけでなく、学外の研究機関との共同研究を積極的に進めている。現在共同研究を実施している研究機関は以下の通りである。

名古屋大学
広島大学
東京理科大学
理化学研究所
東京大学
明治大学

中国科学院水生生物研究所 (中国)
Masaryk University (チェコ共和国)
University of California, Davis (米国)
University of Edinburgh (イギリス)
National Autonomous University (メキシコ)

7. シンポジウム等の開催

平成 28 年 1 月 22 日に京都産業大学で第 41 回植物バイテクシンポジウム「これからの植物科学」を開催した。このシンポジウムは、植物研究の分野で活躍している若手研究者をお招きして、今後の植物科学の展開について考えることを目的に、京都植物バイテク談話会および本学京都産業大学生態進化発生学研究センターとの共催で開催された。近隣の大学や企業から 92 名の参加者があり、「植物」をキーワードにした多様な研究について活発な議論が行われた。

8. 研究業績 (本学関係者のみ) (2015 年以降)

(1) 学術論文

1. 木村成介, 川勝弥一: 水菜と壬生菜の来歴について—文献と遺伝子から探る葉形変化の歴史—京都産業大学論集人文科学系列 (2016) **49**: 161-181
2. Hokuto Nakayama and Seisuke Kimura: Leaves may function as temperature sensors in the heterophylly of *Rorippa aquatica* (Brassicaceae). *Plant Signaling and Behavior* **10**: e1091909 (2015)
3. Rumi Amano, Hokuto Nakayama, Yurika Morohoshi, Yaichi Kawakatsu, Ali Ferjani, and Seisuke Kimura: A Decrease in ambient temperature induces post-mitotic enlargement of palisade cells in North American Lake-Cress. *PLOS ONE* **10**: e0141247 (2015)
4. Hokuto Nakayama, Kensuke Kawade, Hirokazu Tsukaya, and Seisuke Kimura: Detection of the cell proliferation zone in leaves by using EdU. *Bio-protocol* **5**: e1600 (2015)
5. José Antonio Aguilar-Martinez, Naoyuki Uchida, Brad Townsley, Donnelly Ann West, Andrea Yanez, Nafeesa Lynn, Seisuke Kimura, Neelima Sinha: Transcriptional, post-transcriptional and post-translational regulation of *SHOOT MERISTEMLESS* gene expression in Arabidopsis determines gene function in shoot apex. *Plant Physiology* **167**: 424-442 (2015)
6. Asuka Higo, Masaki Niwa, Katsuyuki Yamato, Lixy Yamada, Hitoshi Sawada, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Makoto Shirakawa, Motomu Endo, Shuji Shigenobu, Katsushi Yamaguchi, Kimitsune Ishizaki, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi and Takashi Araki: Transcriptional Framework of Male Gametogenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* **57**:325-338, (in press)
7. Daisuke Ikeue, Christian Schudoma, Wenna Zhang, Yoshiyuki Ogata, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Takeshi Furuhashi, Friedrich Kragler and Koh Aoki: A bioinformatics approach to distinguish plant parasite and host transcriptomes in interface tissue by classifying RNA-Seq reads. *Plant Methods* **11**:34, (2015)
8. Mitsutomo Abe, Hidetak Kaya, Ayako Watanabe-Taneda, Mio Shibuta, Ayako Yamaguchi, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Israel Ausin, Takashi Araki and Carlos Alonso-Blanco: FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of *FLOWERING LOCUS T* and *FLOWERING*

- LOCUS T INTERACTING PROTEIN 1*. *Plant J* 83:1059-1068, (2015)
9. Kim L Johnson, Sascha Ramm, Christian Kappel, Sally Ward, Leyser Leyser, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Michael W Bevan and Michael Lenhard: The *Tinkerbell* (*Tink*) Mutation Identifies the Dual-Specificity MAPK Phosphatase INDOLE-3-BUTYRIC ACID-RESPONSE5 (IBR5) as a Novel Regulator of Organ Size in Arabidopsis. *PLoS One* 10:e0131103, (2015)
 10. Kaoru Kawafune, Yuichi Hongoh, Takashi Hamaji, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Shunsuke Hirooka, Shin-ya Miyagishima and Hisayoshi Nozaki: Two Different Rickettsial Bacteria Invading *Volvox carteri*. *PLoS One* 10:e0116192, (2015)
 11. Shojiro Tamaki, Hiroyuki Tsuji, Ayana Matsumoto, Akiko Fujita, Zenpei Shimatani, Rie Terada, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata and Ko Shimamoto: FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 24:112 (8):E901-10, (2015)
 12. Y.Hirose, K.Suda, Y.-G.Liu, S.Sato, Y.Nakamura, K.Yokoyama, N.Yamamoto, S.Hanano, E.Takita, N.Sakurai, H.Suzuki, Y.Nakamura, T.Kaneko, K.Yano, S.Tabata, D.Shibata: The Arabidopsis TAC Position Viewer: A high-resolution map of transformation-competent artificial chromosome (TAC) clones aligned with the *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 genome. *Plant Journal*, 83: 1114-1122 (2015)
 13. O.M.Faruque, H.Miwa, M.Yasuda, Y.Fujii, T.Kaneko, S.Sato, S.Okazaki: Identification of *Bradyrhizobium elkanii* genes involved in incompatibility with soybean plants carrying the *Rj4* allele. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 6710-6717 (2015)
 14. Kosugi A, Tamaru J, Gotou K, Furihata H, Shimizu A, Kawabe A, Harada E. Metal accumulation by Arabidopsis halleri subsp. gemmifera at a limestone mining site. *Aust. J. Botany* 63: 134-140 (2015).
 15. Furihata HY, Suenaga K, Kawanabe T, Yoshida T, Kawabe A. Gene duplication, silencing and expression alteration shape the molecular evolution of the PRC2 genes in Plants. *Genes and Genetic Systems*, accepted
 16. Kosugi A, Nishizawa C, Kawabe A, Harada E. Zinc accumulation and vegetation ecology in the allotetraploid, Arabidopsis kamchatica ssp. kawasakiana. *Plant Biotechnology*, in press
 17. 小杉亜希・高倉耕一・野間直彦・河邊昭・原田英美子「絶滅危惧種タチスズシロソウ (*Arabidopsis kamchatica* ssp. *kawasakiana*) 個体群の個体数推定」*地域自然史と保全* (印刷中)
 18. Molecular and cellular characteristics of hybrid vigour in a commercial hybrid of Chinese cabbage. Saeki N†, Kawanabe T†, Ying H, Shimizu M, Kojima M, Abe H, Okazaki K, Kaji M, Taylor JM, Sakakibara H, Peacock WJ, Dennis ES, Fujimoto R. *BMC Plant Biol.* 2016 16 (1):45. doi: 10.1186/s12870-016-0734-3. (†Contributed equally)
 19. Genetic characterization of inbred lines of Chinese cabbage by DNA markers; towards the application of DNA markers to breeding of F₁ hybrid cultivars. Kawamura K†, Kawanabe T†, Shimizu M, Okazaki K, Kaji M, Dennis ES, Osabe K, Fujimoto R. *Data Brief.* 2015 11 (6):229-237. doi: 10.1016/j.dib.2015.11.058. (†Contributed equally)
 20. Genetic distance of inbred lines of Chinese cabbage and its relationship to heterosis. Kawamura K†, Kawanabe T†, Shimizu M, Nagano AJ, Natsumi Saeki N, Okazaki K, Kaji M, S. Dennis ES, Osabe K, Fujimoto R. *Plant Gene* 2016 5:1-7. doi:10.1016/j.plgene.2015.10.003. († Contributed equally) †
 21. Development of primer sets that can verify the enrichment of histone modifications and their application to examining the vernalization mediated chromatin changes in *Brassica rapa* L. Kawanabe T, Osabe K, Itabashi E, Okazaki K, Dennis ES, Ryo Fujimoto R. *Genes Genet. Syst.* (accepted)

22. Y. Okegawa, K. Motohashi: Expression of spinach ferredoxin-thioredoxin reductase using tandem T7 promoters and application of the purified protein for *in vitro* light-dependent thioredoxin-reduction system. *Protein Expr. Purif.* **121**, 46-51 (2016)
23. Y. Okegawa¹, M. Koshino¹, T. Okushima, K. Motohashi: Application of preparative disk gel electrophoresis for antigen purification from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* **118**, 77-82 (2016) ¹These authors contributed equally to this work.
24. Y. Okegawa, K. Motohashi: Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis *in vivo*. *Plant J.* **84**, 900-913 (2015)
25. Y. Okegawa, K. Motohashi: A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochem. Biophys. Rep.* **4**, 148-151 (2015)
26. Y. Okegawa, K. Motohashi: Evaluation of seamless ligation cloning extract (SLiCE) preparation methods from an *Escherichia coli* laboratory strain. *Anal. Biochem.* **486**, 51-53 (2015)
27. K. Motohashi: A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol.* **15**, 47 (2015)

(2) 招待講演

1. 環境に応じて葉の形態を変化させる植物 *Rorippa aquatica* を用いた表現型可塑性の研究, 木村成介, 東京理科大学応用生物科学科セミナー, 東京理科大学, 2016年3月7日
2. 葉っぱの形の遺伝と進化 —メンデル遺伝学で解き明かす多様な葉の形ができるしくみ—, 木村成介, 京都産業大学リエゾンオフィス主催シンポジウム「遺伝と進化の不思議～ダーウィンとメンデルから学んだこと～」, 京都産業大学むすびわざ館, 2016年3月5日
3. 切っても切っても生えてくる! 葉断面からの栄養繁殖, 天野瑠美 (木村研究室), 第41回植物バイテクシンポジウム「これからの植物科学」, 京都産業大学, 2016年1月22日
4. 京野菜であるミズナとミブナの葉形変異と育種の歴史の解析, 川勝弥一 (木村研究室), 農学中手の会, 小田原, 2015.12.12.
5. 環境に応じて葉の形態を変化させる植物 *Rorippa aquatica* を用いた表現型可塑性の研究, 木村成介, 第59回細胞のかたちと機能プロジェクト研究センターセミナー, 広島大学, 2015.10.19.
6. Impact on Environment on Leaf Development: Studies on Heterophylly of *Rorippa aquatica*, Seisuke Kimura, IHB seminar, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan, China, 2015.9.17.
7. Diversity of leaf shape and its relation to environment, Seisuke Kimura, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan, China, 2015.9.15.
8. QTL analysis of leaf morphological traits in Japanese traditional leafy vegetables, Mizuna and Mibuna, Yaichi Kawakatsu, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Hokuto Nakayama, Masaki Yasugi, Hiroshi Kudoh, Atsushi J. Nagano, Kentaro Yano, Nakao Kubo, Seisuke Kimura, The 35th Plant Biotechnology Symposium “International Plant Meeting in Kyoto – Messages from young scientists II-“, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 2015.1.16.

(3) 学会発表

1. 京野菜であるミズナとミブナに見られる葉形変異のQTL解析, 川勝弥一, 中山北斗, 上ノ山華織, 五十嵐香理, 八杉公基, 工藤洋, 永野惇, 矢野健太郎, 久保中央, 木村成介, 第57回日本植物生理学会年会, 岩

- 手大学, 2016年3月18日~20日
- 異形葉性を示す *Rorippa aquatica* の二つの地域系統を用いたトランスクリプトーム解析, 中山北斗, 坂本智昭, 市橋泰範, 藤江学, 倉田哲也, Neelima Sinha, 木村成介, 第57回日本植物生理学会年会, 岩手大学, 2016年3月18日~20日
 - シロイヌナズナにおける DNA 損傷応答と SOG1 のリン酸化の関係, 岡本郁, 木村成介, 第57回日本植物生理学会年会, 岩手大学, 2016年3月18日~20日
 - 水生シダ *Microsorium pteropus* とその変種の葉の形態に関わる分岐構造の多様性について, 三好彩央里, 中益朗子, 木村成介, 第57回日本植物生理学会年会, 岩手大学, 2016年3月18日~20日
 - アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* にみられる葉断面からの栄養繁殖機構の解析, 天野瑠美, 中山北斗, 桃井理沙, 郡司玄, Ali Ferjani, 木村成介, 第38回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアアイランド, 2015.12.1-4
 - 環境に応じて葉の形態を変化させる植物 *Rorippa aquatica* を用いた表現型可塑性の研究, 中山北斗, 坂本智昭, 市橋泰範, 藤江学, 倉田哲也, 木村成介, 第38回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアアイランド, 2015.12.1-4.
 - 植物における DNA 損傷応答の統括因子 SOG1 の制御メカニズム, 愿山(岡本) 郁, 木村成介, 日本遺伝学会第87回大会, 東北大学川内北キャンパス, 2015.9.24-26.
 - 京野菜であるミズナとミブナに見られる葉形変異の QTL 解析, 川勝弥一, 上ノ山華織, 五十嵐香理, 中山北斗, 八杉公基, 工藤洋, 永野敦, 矢野健太郎, 久保中央, 木村成介, 日本植物学会第79回大会, 朱鷺メッセ(新潟県), 2015.9.6-8.
 - 水生シダ *Microsorium pteropus* とその変種の葉の形態に関わる枝分かれ構造の多様性について, 三好彩央里, 中益朗子, 木村成介, 日本植物学会第79回大会, 朱鷺メッセ(新潟県), 2015.9.6-8.
 - Rorippa aquatica* の葉形制御機構の RNA-seq による網羅的解析, 坂本智昭, 中山北斗, 市橋泰範, 藤江学, 倉田哲也, 木村成介, 日本植物学会第79回大会, 朱鷺メッセ(新潟県), 2015.9.6-8.
 - アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* にみられる葉断面からの栄養繁殖の発生学的解析, 天野瑠美, 中山北斗, 桃井理沙, 郡司玄, Ferjani Ali, 木村成介, 日本植物学会第79回大会, 朱鷺メッセ(新潟県), 2015.9.6-8.
 - ダイコンの品種間に見られる葉形の変異に寄与する遺伝子の同定, 久保俊彰, 上ノ山華織, 川勝弥一, 五十嵐香理, 矢野健太郎, 木村成介, 日本植物学会第79回大会, 朱鷺メッセ(新潟県), 2015.9.6-8.
 - Theoretical analysis of asymmetric branched structures in dissected leaves, Akiko Nakamasu, Nobuhiko J. Suematsu, Seisuke Kimura, 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba International Congress Center, 2015.6.2-5
 - 葉の枝分かれに見られる非対称性について, 中益朗子, 末松 J 信彦, 木村成介, 第79回形の科学シンポジウム, 千葉工業大学, 2015.6.12-14.
 - 京野菜であるミズナとミブナに見られる葉形変異の QTL 解析, 川勝弥一, 上ノ山華織, 五十嵐香里, 中山北斗, 八杉公基, 工藤洋, 永野淳, 矢野健太郎, 久保中央, 木村成介, 日本育種学会第127回講演会(平成27年度春季大会), 玉川大学, 2015.3.21-22.
 - Developmental and molecular studies on the mechanism of vegetative propagation in *Rorippa aquatica*, Rumi Amano, Hokuto Nakayama, Shizuka Gunji, Ali Ferjani, Seisuke Kimura, 第56回日本植物生理学会年会, 東京農業大学, 2015.3.16-18.
 - QTL analysis of leaf morphological traits in Japanese traditional leafy vegetables, Mizuna and Mibuna, Yaichi Kawakatsu, Kaori Kaminoyama, Kaori Igarashi, Hokuto Nakayama, Masaki Yasugi, Hiroshi Kudoh, Atsushi J. Nagano, Kentaro Yano, Nakao Kubo, Seisuke Kimura, 第56回日本植物生理学会年会, 東京農業大

- 学, 2015.3.16-18.
18. Genetic analysis for natural variation in leaf shape of Daikon radish (*Raphanus sativus* var. longipinnatus), Toshiaki Kubo, Kaori Kaminoyama, Yaichi Kawakatsu, Kaori Igarashi, Hokuto Nakayama, Kentaro Yano, Seisuke Kimura, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京農業大学, 2015.3.16-18.
 19. Molecular mechanism of SOG1 activation in response to DNA damage, Kaoru Yoshiyama (Okamoto), Seisuke Kimura, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京農業大学, 2015.3.16-18.
 20. 日下部翔平, 金子貴一, 安田美智子, 三輪大樹, 岡崎伸, 佐藤修正: ミヤコグサにエフェクター誘導免疫反応を誘導する *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株の III 型分泌エフェクターの解析. 日本植物生理学会 第 57 回年会, 盛岡市, 2016.3.18-20
 21. 三屋公佑, 金原一真, 菅原雅之, 南澤究, 金子貴一, 板倉学: 根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* の種内比較ゲノム解析. 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会, 目黒区, 2016.3.4-5
 22. 南智之, 按田瑞恵, 池田成志, 菅原雅之, 金子貴一, 佐藤修正, 田畑哲之, 三井久幸, 南澤究: 植物共生細菌 *Methylobacterium* 属内のメタゲノム解析. 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会, 目黒区, 2016.3.4-5
 23. 金原一真, 板倉学, 鶴丸博人, 星野裕子, 秋山博子, 早津雅仁, 南澤究: ゲノムマッピングによるダイズ根粒菌の種の判定と接種菌群の追跡. 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会, 目黒区, 2016.3.4-5
 24. 三輪大樹, Faruque Omar, 増田幸子, 安田美智子, 金子貴一, 佐藤修正, 岡崎伸: 根粒菌 3 型分泌系による根粒形成の制御機構. 植物微生物研究会 第 25 回研究交流会, つくば市, 2015.9.14-16
 25. Faruque Omar, 三輪大樹, 安田美智子, 増田幸子, 藤井義晴, 金子貴一, 佐藤修正, 岡崎伸: *Rj4* 遺伝子型ダイズに根粒形成する *Bradyrhizobium elkanii* トランスポゾン変異体の解析. 植物微生物研究会 第 25 回研究交流会, つくば市, 2015.9.14-16
 26. 日下部翔平, 金子貴一, 安田美智子, 三輪大樹, 岡崎伸, 佐藤修正: ミヤコグサを用いた *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株との相互作用に関与する宿主側因子の解析. 植物微生物研究会 第 25 回研究交流会, つくば市, 2015.9.14-16
 27. 辻村真衣, 金子貴一, 執行正義, 出雲谷遥, 寺地徹: 雄性不稔タマネギのミトコンドリアゲノムの解読. 日本育種学会 第 128 回講演会, 新潟市, 2015.9.11-12
 28. Aki Kosugi, Chiaki Nishizawa, Akira Kawabe, Emiko Harada, Heavy metal accumulation and vegetation ecology in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica* subsp. *kawasakiana*, The Vth International Symposium on Metallomics, Beijing, China, September 9-12, 2015
 29. 河邊昭, 野生植物集団の遺伝的多様度と変異の維持機構, 日本遺伝学会第 87 回大会, 仙台, 2015 年 9 月 24 日
 30. 薄伊納, 吉田貴徳, 河邊昭, *Brassica rapa* におけるゲノムインプリンティング候補遺伝子の探索, 日本遺伝学会第 87 回大会, 仙台, 2015 年 9 月 25 日
 31. 河邊昭, 降旗初佳, 吉田貴徳, シロイヌナズナ属における葉緑体の RNA エディティングの種間変異, 日本遺伝学会第 87 回大会, 仙台, 2015 年 9 月 26 日
 32. 川邊隆大, 宮路直美, 高田紗都子, 板橋悦子, 安田剛志, 藤本龍: シロイヌナズナの雑種強勢の分子機構の解明に向けた RIL の整備. 日本育種学会第 129 回講演会, 横浜市, 2016.3.21-22.
 33. 桶川友季, 本橋健: Chloroplastic *m*-type thioredoxins as major regulators of Calvin cycle during photosynthesis. 第 57 回日本植物生理学会年会, 盛岡市, 2016.3.18-20
 34. 本橋健, 桶川友季: A simple and efficient seamless DNA cloning method using cell lysates from laboratory *Escherichia coli* strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. 第 57 回日本植物生理学会年会, 盛岡市, 2016.3.18-20

35. 桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナ *m* 型チオレドキシンはカルビンサイクル酵素の主たるレドックス制御因子として機能する. 第 38 回日本分子生物学会年会および第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸市, 2015.12.1-4
36. 本橋健, 桶川友季: 大腸菌粗抽出液を用いた簡便かつ高効率な Seamless DNA cloning 法. 第 38 回日本分子生物学会年会および第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸市, 2015.12.1-4
37. 桶川友季, 本橋健: シロイヌナズナの *m* 型チオレドキシンの欠損はカルビンサイクルの酵素の活性化に影響を与える. 第 6 回日本光合成学会年会, 岡山市, 2015.5.22-23
38. 本橋健: 大腸菌抽出液を用いた簡便かつ高効率な Seamless DNA cloning 法. 第 6 回日本光合成学会年会, 岡山市, 2015.5.22-23

(4) その他特筆すべき成果

1. Best paper award “Aki Kosugi, Chiaki Nishizawa, Akira Kawabe, Emiko Harada, Heavy metal accumulation and vegetation ecology in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica* subsp. *kawasakiana*, The Vth International Symposium on Metallomics, Beijing, China, September 9-12, 2015”
2. 河邊昭 日本遺伝学会奨励賞受賞

9. 図の説明

図 1. 生態進化発生学研究センターで運用している研究装置および研究設備

(A) NextSeq500 システム, (B) NeoPrep システム, (C) 解析サーバ TAKERU for Sequencer V

図 2. *Rorippa aquatica* にみられる葉の形態の表現型可塑性

(A) 水中で育てた個体。(B) 気中で育てた個体。(C) 20°C もしくは 25°C で一ヶ月間育てた個体。図は植物体を上から見たもの。(D) C の個体の葉をそれぞれ一枚ずつ発生順 (葉位順) に並べたもの。右側がより若い葉。Bar は全て 2 cm。

Center for Ecological Evolutionary Developmental Biology: Research Activity Annual Report 2015

Seisuke KIMURA
Takakazu KANEKO
Ken MOTOHASHI
Akira KAWABE

Abstract

Center for Ecological Evolutionary Developmental Biology is established as one of the research center in Institute of Comprehensive Academic Research in 2015. The center is supported by Grants-in-Aid from MEXT-Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities. The center's research efforts focus on several areas to understand the relationship between plant and environment and its evolutionary background. Especially we study the mechanism of phenotypic plasticity on leaf shape of North American Lake Cress, *Rorippa aquatica* by Omics approaches. Here we report the progress of our research in 2015.

Keywords : Ecological Evolutionary Developmental Biology, Next-generation sequencing, Omics, Phenotypic plasticity, *Rorippa aquatica*

