

## 倍数性コムギの比較ゲノム解析

●萩原 保成<sup>1)</sup> ◆村井 耕二<sup>2)</sup>

1) 横浜市立大学木原生物学研究所 2) 福井県立大学生物資源学部

### ＜研究の目的と進め方＞

コムギは倍数化により進化してきたことを特徴とする。倍数化の結果、世界中の多様な環境に適応し、栽培が可能になった。パンコムギは倍数化する際、異種間の異なるゲノムを組み合わせた（異質倍数性：ゲノム式 AABBDD）。これらのゲノムが内包する遺伝子セットは基本的に同じであると考えられるが、互いに分化しているに違いない。倍数体植物のゲノムは遺伝子セットの単なる加算ではなく、高次な遺伝的制御システムがはたしているにちがいない。本研究は、温帯性冬作の重要作物である6倍性パンコムギの比較ゲノム解析を目的とする。パンコムギの生活環における代表的な組織、およびストレス処理をした組織での大量EST解析を行い、コムギにおける環境応答遺伝子発現ボディマップを作成する。パンコムギで高分子DNAを挿入したゲノミックライブラリーを構築する。このライブラリーから効率よく遺伝子をスクリーニングできるシステムを開発する。環境に応答して花器官を形成する遺伝子を3種ゲノムからクロニングし、近縁なゲノム間の遺伝子構造の特徴を調べる。さらに、ゲノム特異的に発現する遺伝子の発現パターンをコムギの代表的な生活環の組織で詳細に追跡し、発育に応答して倍数種のゲノム間でどのように遺伝子発現を調節しているか、ゲノム科学的に解析する。

### ＜研究開始時の研究計画＞

コムギの生活環の代表的な10組織のcDNAライブラリーを構築し、大量EST解析を行う。さらに、コムギにおける生物的・非生物的ストレス誘導cDNAライブラリーを構築し、EST解析を行う。得られたESTシークエンスデータをグルーピングし、生活環、およびストレス処理に応答して発現が制御されるコムギ遺伝子のボディマップを作成する。これらのESTクロンのデータベースを構築し、国立遺伝学研究所のインターネットサイトから公開する。

高分子DNAを挿入でき、挿入された巨大DNAを直接イネ科植物に導入できるパンコムギのゲノミックライブラリー（TACライブラリー）を構築する。TACライブラリーから標的遺伝子のゲノミッククローンをスクリーニングする。

花成に関わる遺伝子をクロニングし、3種ゲノム間における遺伝子構造の差異と発現調節機構を解析する。

### ＜研究期間の成果＞

1) コムギの生活環で発現する遺伝子の大量解析：コムギの生活環の代表的な10組織のcDNAライブラリーを構築し、cDNAクロンの両側からの116232塩基配列をphrap法にて25971 contigに整列化した。これらのうちから、比較的発現量の多い5199 contigを選抜し、contigに含まれるESTのメンバー数に基づいて10組織における遺伝子発現のボディマップを作成した。このボディマップを視覚化（Virtual Display: VD）、In silicoでコムギの遺伝子発現パターンを解析できるよ

うにした3）。

- 2) 同祖遺伝子のゲノム別発現様式のバイオインフォーマティク解析：5199遺伝子のうち3069遺伝子をゲノムあたり単一（シングルコピー）である、と推定した。全体で約40%の遺伝子が3種類のゲノムのうち、1つのゲノムからのみ発現していた。6倍体のパンコムギでこれらの遺伝子は2倍体のように発現されている。2, および3種のゲノムから発現される遺伝子のうち、90遺伝子についてPyrosequencing法とパンコムギのナリーテトラソーム系システムを組み合わせることにより、A, B, Dゲノムの座乗染色体を決定した。さらに、10組織による3種ゲノムにおけるゲノム毎の遺伝子発現パターンの特徴を明らかにした。生活環の各組織においてゲノム間で均等に発現している遺伝子も存在したが、組織によって発現遺伝子を使い分けている遺伝子も存在し、異質倍数体ゲノム間における遺伝子発現制御の分子機構の解析が求められる6)。
- 3) ストレス応答して発現する遺伝子の大量解析：低温・高温、日長、乾燥、塩、ABA処理等の非生物的ストレス、またさび病等の病原菌等の生物的ストレスをかけ、追加の21 cDNAライブラリーを構築した。これらのcDNAライブラリーからcDNAクローンを任意に抽出し、212,504 ESTの塩基配列を決定した。これらのESTを38,048 contigにグルーピングした。また、生活環で発現される遺伝子と同様に各組織における発現遺伝子のボディマップをVDとして視覚化した。さらに、特定のストレス処理に応答する遺伝子をIn silicoでスクリーニングするシステムを開発した。生活環、ストレス応答で解析したESTの整列化によりコムギの保有する遺伝子の80%以上を獲得できたものと予測している。
- 4) 6倍性コムギの幼穂からの完全長cDNAライブラリーの構築と大量EST解析によるその特徴付け：コムギは倍数性で進化してきたことを特徴とする。コムギは巨大なゲノムサイズをもつため（各ゲノムあたり5GB）、その全ゲノム塩基配列決定は現在のところ現実的ではない。完全長cDNAシークエンスの蓄積は遺伝子のアノテーションをしたり、機能を推定するのに非常に有効なゲノム科学データベースとなる。6倍性コムギであるCSの幼穂から全RNAを抽出し、キャプトラップにて完全長cDNAライブラリーを構築した。このライブラリーから任意にクローンを抽出し、両側から24056のシークエンスを決定した。これらのシークエンスをphrap法で3605 contigにグルーピングした。これは、3種ゲノムからの転写産物を含んでいる。このcontigをblast法で1902の遺伝子クラスターに分類した。このことは、抽出した遺伝子に関して、3種類のゲノムからすべて転写されていない、ことを示唆する。この完全長cDNAには新規なものが含まれていた。シロイヌナズナのタンパク質データベースを検索し、コムギ完全長cDNA遺伝子の個々の

機能を推定した。コムギ完全長 cDNA クローンの5'—UTR 領域の GC 含量をイネのそれと比較した。43 遺伝子 (コムギ遺伝子クラスターの 3.5%) がイネのそれと有意に異なっていた。このことがコムギ・イネの生育特性の違いを説明できるかもしれない 8)。

- 4) 染色体位置情報を利用した栽培化に関わる遺伝子のクローニングの試み：パンコムギのポジショナルクローニングの試みとして AMF 法を用いてコムギ Q 遺伝子を解析した。コムギの Q 遺伝子は穂の形態および種子の脱粒性に関与した多面発現遺伝子である。Q 遺伝子を RFLP マーカーを用いてパンコムギ 5A 染色体長腕上に詳細にマッピングした。染色体位置情報に基づいて AFLP-based mRNA fingerprinting (AMF) 法による Q 遺伝子のクローニングを試みた。材料には、Q 遺伝子を保有するパンコムギ Chinese Spring (CS) と Q 遺伝子を欠く CS の染色体部分欠失系統 q-5 を用いた。両系統の幼穂より全 RNA を抽出し、AMF 法により増幅した DNA パターンを比較した。その結果、84 種類の DNA 断片が両系統間で何らかの差がみられた。このうち、パターンの差が顕著な 27 断片について塩基配列を決定し、相同性検索を行った。さらに、これらの DNA 断片の座乗染色体を推定するとともに、ノーザンブロット解析により、遺伝子発現の組織特異性を調べた。候補として 2 クローンがあがった 2)。
- 5) イネ科植物に直接遺伝子導入できるベクターを用いたパンコムギ巨大ゲノムライブラリの構築と効率的遺伝子スクリーニング：バイナリーベクターである pYLAC17 を用いてパンコムギ Chinese Spring (CS) 系統のゲノミックライブラリを構築した。3 つのサブライブラリの挿入 DNA 断片の平均長は、それぞれ 46kbp (Sublibrary I), 65kbp (Sublibrary II), 120kbp (Sublibrary III) であった。これらの 3 つのサブライブラリにクローニングされた DNA はパンコムギの 3 ゲノム分をカバーする計算になる。これらのクローンは、300~600 コロニーをまとめてタイタープレートの 1 穴に保存されている。タイタープレートは全部で 20 枚になっている。これらのタイタープレート 1 穴に含まれるクローンからプラスミド DNA を抽出して、12 枚のタイタープレートの相当する位置の DNA を 1 枚のタイタープレートにプールした。このプールした DNA を用いてパンコムギの A, B, D ゲノムに相当する単一な遺伝子スクリーニングすることができた。TAC ライブラリーが遺伝子のゲノミッククローンのスクリーニングに有効であることが示された 1)。
- 4) パンコムギの TAC ライブラリーを用いたイネ感光性遺伝子相同遺伝子の単離と機能解析：短日植物であるイネにおいて出穂期を制御する Hd1 遺伝子が単離された。Hd1 遺伝子はシロイヌナズナの花成関連遺伝子 CONSTANS(CO) に高い相同性を示す。イネと同じイネ科に属すが、長日植物であるコムギから 3 種類の Hd1 遺伝子ホモログ (TaHd1-1, TaHd1-2, TaHd1-3) を単離した。塩基配列を決定してみると、ジンクフィンガーモチーフ、核移行シグナルが保存されていた。長日条件下で生育させたパンコムギの幼植物体の葉から poly(A)+RNA を精製し、RT-PCR 産物の RFLP 解析から TaHd1-1 (6AL に座乗)、TaHd1-3 (6DL に座乗) の mRNA は検出されたが、TaHd1-2 (6BL に座乗) 遺伝子は発現していなかった。TaHd1 遺伝子の機能を推定するため、TaHd1-1 のゲノミッククローンをバイナリーベクター pPZP2H-lac にクローニング

し、イネ準同質遺伝子系統 NIL[Hd1/Hd2] に導入した。形質転換イネの出穂性を T1 個体で調査した。T1 個体では、短日条件下で親系統 (NIL) よりも約 2 週間程度出穂が早まった。また、自然条件下では親系統よりも約 10 日程度出穂が遅れた。このことは、長日植物であるコムギの TaHd1-1 遺伝子が、短日植物であるイネの個体内で適切に転写・翻訳が行われ、イネの Hd1 遺伝子と同様に機能したことを示唆する 7)。

- 5) 核・細胞質雑種コムギにみられる雄蕊の雌蕊化：異種間で核・細胞質雑種を育成すると種々の異常を示す。コムギの近縁種 *Aegilops crassa* の細胞質をもち、パンコムギ農林 26 号の核をもつ核・細胞質雑種コムギ ((cr)-N26) は、長日に反応して雄蕊が雌蕊化する日長感応性細胞質雄性不稔 (PCMS) を示す。一方、核をパンコムギ品種 Chinese Spring ((cr)-CS) にすると雄蕊の雌蕊化は起こらない。これは、CS の 7BL に *crassa* 細胞質と協調して花器官を正常に発達させる遺伝子 (Rfd1) が座乗するためである。Rfd1 が座乗する 7B 染色体長腕を欠失した系統、(cr)-CSdt7BS では、雄蕊が完全に雌蕊化する。さらに雌性稔性も不稔となる。一方、7BL 染色体が 1 本存在する系統、(cr)-CSmd7BS では、雄蕊の雌蕊化は不完全であり (花粉を形成する雄蕊が一部形成される)、雌蕊の稔性もある (70% 程度)。このように、Rfd1 には量的効果が存在し、雌雄の花器官の発達を制御している。モデル植物であるシロイヌナズナで花器官の形成に関与する遺伝子群が同定された (A, B, C モデル)。雄蕊の正常な発達には花芽の第 3 ウォールの B クラス遺伝子が制御している。APETALA (AP3) 遺伝子は B クラス遺伝子の一つで PISTILATA (PI) 遺伝子とヘテロダイマーを形成して雄蕊の発達を制御する転写因子として働いている。コムギ AP3 遺伝子 (WAP3) の組織での発現を *In situ hybridization* 法で観察してみると、異常な雌雄性器官を発生する核・細胞質雑種系統、(cr)-CSdt7BS では、正常系統で十分な発現がみられる幼穂での発現が不十分であった。このことが、正常な雌雄性器官の発達に必要な遺伝子の転写を充分に行えず、異常な雌雄性器官を発生させるものと考えられる。異常な雄性器官、雌性器官の詳細な組織学的観察を行い、異常組織を特徴付けた。
- 6) 花器官形成 C クラス遺伝子である AGAMOUS ホモログは核・細胞質雑種コムギの雌蕊化雄蕊の発達に関連している：雄蕊の雌蕊化と雌蕊の不稔が生じることが核・細胞質雑種の異数体系統 ((cr)-CSmd7BS および (cr)-CSdt7BS 系統、(cr)-CS は正常) で生じることが知られている。シロイヌナズナ・キンギョソウで提唱された被子植物の ABC モデルのうち、C クラスに属する (花芽の第 4 ウォールで発現する) シロイヌナズナの AGAMOUS 遺伝子の相同遺伝子 (Wheat AGAMOUS: WAG) の構造および発現パターンを解析した。シロイヌナズナ AG 遺伝子の相同 cDNA をコムギからクローニングした。WAG をプローブにしてコムギの異数体系統を用いたゲノミック DNA サザンブロット解析を行ってみると、WAG 遺伝子は第 1 同祖群染色体に各 1 コピーずつ座乗していることが判明した。正常系統において WAG cDNA をプローブにしてノーザンハイブリダイゼーションで発現パターンを解析した。WAP3 遺伝子の強い発現が観察された幼穂では、WAG 遺伝子の発現は比較的弱く、穂の発達に伴って発現が増加した。減数分裂期から開花期の穂

にかけてもっとも強い発現がみられた。出穂期の穂において、1.1kbの正常な転写産物が雄蕊や雌蕊といった生殖器官ばかりでなく、外穎や内穎といった非生殖器官でも見出された。一方、1.3kbの過剰な転写産物が異数体系統核置換系統((cr)-CSdt7BS)の雌蕊化した雄蕊や異数体系統 (CSdt7BS, (cr)-CSdt7BS) で検出された。このことは、1.3kbの異常な転写産物がCSの異数体系統における雌性器官で観察され、このWAG遺伝子が核・細胞質雑種異数体系統の雄蕊の雌蕊化に伴って雄蕊で異所的に誘導されることを示唆する。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

米国でパンコムギのESTの大量解析が行われていたが、本プロジェクトは特に生活環で発現する遺伝子、ストレス応答関連遺伝子を体系的に解析し、視覚化 (Virtual Display) したことがユニークである。本プロジェクトの海外での評価は極めてたかい。本プロジェクトの研究が引き金になって、米国Dupond社からコムギのEST情報が大量に公開された。現在、コムギのESTはNCBIのESTで植物で第1位 (最近トウモロコシに抜かれて植物で第2位に、全体でも第7位である)。全登録数の約3分の2を我々の成果で占めている。このことが国際的に認められてIGROW (International Genome Resource Organization of Wheat) でコムギ完全長cDNAの収集・保存を日本で行うよう、要請された。また、IGROWがコムギのゲノムシーケンズプロジェクトを遂行しており、日本からも貢献するよう求められている。巨大パンコムギゲノムDNAを直接イネ科植物に導入するベクターをもちいてゲノミックライブラリを構築した (TACライブラリ)。このライブラリから効率的にゲノムDNAをスクリーニングすることを示した。このシステムが評価されて、国際共同研究が成立した。さらに、短日植物であるイネでコムギの出穂性関連遺伝子TaHd1を世界で初めて遺伝子導入し、比較機能ゲノム解析の先鞭を付けた。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ゲノムサイズが大きい倍数性植物における遺伝子歩行が予想以上に困難である。ランドマークとなる分子マーカーから歩行する際、反復配列、他ゲノムの相同配列が邪魔をして歩行が困難を極めていた。また、クローンにレトロトランスポゾンをはじめとする多くの反復配列が含まれており、効率的な塩基配列決定を妨げている。

#### 〈今後の課題〉

遺伝子歩行を効率よく行うために、パンコムギの42種類の各染色体腕ごとのBACライブラリを構築する必要がある。これにより、特定のゲノムの特定の染色体腕を確実に歩行していくことが可能となる。倍数性コムギにおけるSNPs解析の手法を開発した。発現遺伝子をゲノムに帰属させる画期的方法である。これをフルスケールで展開したい。

国際的コムギコンソーシアムで6倍性コムギゲノムの遺伝子集中領域の全塩基配列決定プロジェクトが動き始めた。日本でも対応しなくてはならない。

完全長cDNAの収集・保存・提供を国際機関から求められている。完全長cDNAライブラリ、解析を充実させていかなければならない。

ESTがかなり充実してきた。ストレス処理に応答するcDNAライブラリを継続して解析していきたい。

えられた大量ESTを利用してcDNAマイクロアレイを作成し、コムギ研究者の利用に供したい。

コムギにおけるゲノム科学研究のパイプラインを図1に示す。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文

- 0111081244  
Liu, Y.-G., Nagaki, K., Fujita, M., Kawaura, K., Uozumi, M., and Ogihara, Y., Development of an efficient maintenance and screening system for large-insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector, *The Plant Journal* 23, 687-695 (2000)
- 0111081254  
Kojima, T., Habu, Y., Iida, S., and Ogihara, Y., Direct isolation of differentially expressed genes from a specific chromosome region of common wheat: application of the amplified fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting (AMF) method in combination with a deletion line of wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 263, 635-641 (2000)
- 0303271050  
Ogihara, Y., Mochida, K., Nemoto, Y., Murai, K., Yamazaki, Y., Shin-I, T., and Kohara, Y., Correlated clustering and virtual display of gene expression patterns in the wheat life cycle by large-scale statistical analyses of expressed sequence tags, *The Plant Journal*. 33(6), 1001-1011 (2003).
- 0303271950  
Murai, K., Takumi, S., Koga, H., and Ogihara, Y., Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. *The Plant Journals*, 29(2), 169-181 (2002).
- 0303272030  
Meguro, A., Takumi, S., Ogihara, Y., and Murai, K., WAG, a wheat AGAMOUS homolog, is associated with development of pistil-like stamens in alloplasmic wheats. *Sex Plant Reproduction*. 15, 221-230 (2003)
- Mochida, K., Yamazaki, Y., and Ogihara, Y., Discernment of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Molecular Genetics and Genomics*, 270, 371-377 (2003)
- Nemoto, Y., Kisaka, M., Fuse, T., Yano, M., and Ogihara, Y., Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the CONSTANS flowering time gene in transgenic rice. *The Plant Journal*, 36, 82-93 (2003)
- Ogihara, Y., et al., Construction of a full-length cDNA library from young spikelets of hexaploid wheat and its characterization by large scale sequencing of expressed sequence tags. *Genes & Genetic Systems* 79, 227-232 (2004).

##### 2) データベース

・コムギデータベース:

<http://shigen.lab.nig.ac.jp/wheat/est2002/>

##### 3) 特許

0303272040  
特許申請: 倍数性生物におけるSNP解析法。  
特願2002/256109

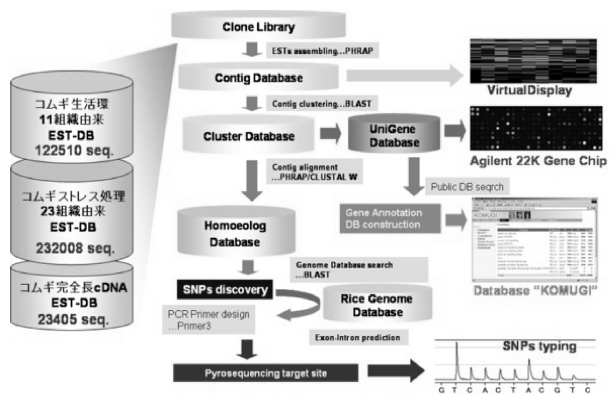


図1. コムギ機能ゲノム科学パイプライン