

下等植物の進化・多様性に関するゲノム研究

●福澤 秀哉¹⁾ ◆長谷部 光泰²⁾ ◆河内 孝之¹⁾ ◆大和 勝幸¹⁾ ◆棚橋 貴子²⁾

1) 京都大学大学院生命科学研究所 2) 基礎生物学研究所生物進化研究部門

<研究の目的と進め方>

植物に特徴的な諸機能（光合成環境応答／生殖／形態形成）の進化と多様性を理解する為には、ゲノムの視点から複数のモデル植物を比較解析する必要がある。本研究では、ゲノム解読が進んだシアノバクテリアと高等植物との間の進化上の橋渡しをするキー生物種として、緑藻クラミドモナス（遺伝学が可能な単細胞真核光合成生物）・苔類ゼニゴケ（性染色体をもつ最初の陸上植物）・蘚類ヒメツリガネゴケ（植物で最も遺伝子ターゲティングが容易）に着目した。これらのモデル生物3種の完全長cDNA（発現領域情報）とゲノム情報を取得し、ゲノム比較を行う。また、遺伝子の網羅的発現情報を得ることで、植物の進化と多様性を決定づける下記の機構を理解する。

光合成環境応答関連遺伝子のゲノム進化と多様性：光合成の成立に関わる遺伝子は、シアノバクテリアからイネまで多くが共通しているが、特に種の陸上化・低CO₂・強光を含めた環境変化への適応・順化に関わる遺伝子群は、進化とともに新しく獲得されたと推定される。これらの遺伝子群を、ゲノム科学的手法を用いて解明し、光合成生物の多様化の獲得機構とゲノム進化との関連を明らかにする。

生殖機能の進化と多様性：雌雄同型配偶子で性決定領域を常染色体にもつ緑藻クラミドモナス、雌雄異型配偶子でXとYの両性染色体をもつ苔類ゼニゴケ、雌雄同体で雌雄異型配偶子をもつ蘚類ヒメツリガネゴケの3種についてゲノムレベルで比較し、生殖機構の進化・性分化関連遺伝子の獲得過程を推定する。

植物のボディープランの進化と多様性：陸上植物地上部の莖葉形成に関する遺伝子系の進化は未解明である。それは、下等植物におけるゲノム情報が不十分であることにある。陸上植物は後生動物と異なり1倍体と2倍体の両世代に多細胞体制を発達させるが、陸上植物の祖先形態を維持していると推定されている蘚苔類は、1倍体世代に莖葉（あるいは葉状体）を形成し、2倍体世代には莖葉を形成しない。一方、被子植物は2倍体世代に莖葉を形成し、1倍体世代は数細胞に退化し2倍体に寄生している。これまでの研究から、祖先植物の1倍体で用いられていたボディープランが陸上植物進化の過程で2倍体世代へとリクルートされた説（リクルート仮説）と、祖先陸上植物の1倍体で用いられたボディープランとは独立に2倍体ボディープランが新生化した説（新生仮説）がある。本研究では、祖先陸上植物形態をとるヒメツリガネゴケ、ゼニゴケの1倍体と2倍体で発現する遺伝子群を、高等植物と比較し、陸上植物のボディープランの進化を解明する。

<2007年度の研究の当初計画>

クラミドモナスとヒメツリガネゴケについては、それぞれBACや完全長cDNAなど解析進行中の配列データの取得と解析を進め、より高精度の再アセンブルと再アノテーションを行う。そして今後マイクロアレイ等を用いた発現解析の基盤とする。

ヒメツリガネゴケについては、植物のボディープラン進化の理解のために、配偶体世代と孢子体世代の発現プロファイルをマイクロアレイによって網羅的に解析する。また多くの遺伝子を含む

的に発現制御して成長相の転換を制御することが知られているポリコム遺伝子の標的遺伝子をChIP-on-chipにより網羅的に同定する。標的遺伝子には形態形成を制御する転写因子などが数多く含まれることが期待される。そして同定したすべての標的遺伝子について変異体を作成して機能解析を大規模に行う。

<2007年度の成果>

クラミドモナスについては、米国Joint Genome Institute (JGI)のドラフトゲノム配列についてアノテーション作業を行い、15,143遺伝子モデルを公開した。5種類の完全長cDNAライブラリーを作製し（菅野G）、50,000クローン両末端の配列（約10万リード）を決定した（小原G）。得られた107,970配列をアセンブルし、3,135個のclusterと1,519個のsingletonを得た。これから、新規配列を557個得た。また、107,970リードの内、ゲノム配列と対応した配列が94%の101,174リード存在した。既知遺伝子についてmRNAの5'末端の位置を調べたところ、140配列中95配列（68%）が既報のmRNA開始点より上流に位置しており、完全長cDNAの有効性が示された。またBACゲノムライブラリーを作製し、その1万クローンの末端配列（2万リード）を決定した（藤山G）。得られたBAC末端配列をドラフトゲノム配列と比較することで、訂正の必要なアセンブルミスやScaffold間の新たな連結が明らかになった。完全長cDNAの位置情報をとドラフトゲノム上に表示するサイトを立ち上げた。ストレス順化（強光、低二酸化炭素）に関わる遺伝子発現プロファイルを取得し、新奇な二酸化炭素応答性遺伝子を見出した。低温ストレス下では、新奇なRNA結合タンパク質の発現が誘導されており、植物における低温順化機構の多様性が見られた。緑藻クラミドモナスEST統合データベースChlamyBaseを改訂して公開した。葉緑体の起源を探る上で進化的に重要な位置にあるシアノフォラについて、CO₂欠乏条件での網羅的遺伝子発現データを取得し、緑藻との共通点を見出した。

ゼニゴケについてはゼニゴケE系統の雄株葉状体および原系体由来の完全長cDNAライブラリーを作成した（菅野G）。ライブラリー当たり約3万クローンの5'および3'末端配列を決定し、64,380および64,523の塩基配列を得た（小原G）。これに、以前取得していた34,183配列を加えてアセンブルしたところ、17,124の独立した配列が得られた。このうち6,567が今回新たに得られた配列であった。両末端配列のペア情報を考慮すると、全体として約14,000の遺伝子をカバーしていると期待される。今回得た完全長cDNA配列を従来のESTと比較すると、mRNAのより5'側の配列をカバーしていた。

ヒメツリガネゴケについては、1) 国際コンソーシアム、米国JGIと共同で、ゲノム配列の8倍のショットガンシーケンスとESTデータを統合し、アセンブル、アノテーションを行った。2) 発生段階の異なる5種類の完全長cDNAライブラリーを作成し、約25万ESTの収集を終了した。3) 約2万の完全長cDNA配列決定をprimer walking法で進めた。4) ゲノムアノテーションのために、7種の異なる組織由来の5'-SAGEライブラリーを作製し、配列解析を行った。5) X8のBACライブラリー作成、

末端配列決定を行い、予備的に再アセンブルを行った。6) リアノテーションのため約 40 万の 3 末 UTR 配列収集を行った。7) これまで報告の無い組織における small RNA 解析を行った。8) イヌカタヒバ、クラミドモナスなどのゲノムデータを取り入れ、約 700 の発生関連遺伝子の系統解析を行い、陸上植物の発生遺伝子の進化傾向を推定した。2) から 7) は支援班の協力のもと行った。

<国内外での成果の位置づけ>

緑藻クラミドモナスについては、ドラフトゲノム配列の一次アノテーション結果を、JGI と共同で 2007 年 10 月 Science 誌に報告した。しかし、一次アノテーション結果は、タンパク質コード領域の推定プログラムが最適化されておらず、エキソンが不足または過剰見積もりした遺伝子モデルが含まれていることが、我々とドイツのグループによるプロテオーム解析で判明した。これは、より多くの cDNA 完全配列が遺伝子モデルの推定と決定に必須であることを示しており、完全長 cDNA の全配列決定を進める必要性が認識された。環境応答の中でも光合成炭酸固定系を補助する無機炭素濃縮系が光ストレスのシグナルで誘導されない事を二酸化炭素濃度の条件を設定することで、トランスクリプトーム解析により初めて示すことができた。

ゼニゴケについては、国際コンソーシアムとして JGI と協力して WGS 解析が開始される予定となっており、本研究で得られた完全長 cDNA 配列情報は、遺伝子の同定に必須のものである。

ヒメツリガネゴケに関する研究については、国際コンソーシアム、JGI との共同研究による WGS 解析が順調に進行し、論文として発表した。また、約 700 の発生関連遺伝子の解析により、従来にない俯瞰的視野で陸上植物発生遺伝子の進化について明らかにすることができた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

当初、申請者が希望していた支援内容のうち、完全長 cDNA の内部配列決定については、Primer Walking 法ではコストに問題があることから、別の手法を開発する必要に迫られた。検討の結果、約 250 塩基解読可能な高速シーケンサー 454 を利用して内部配列の決定が可能である見通しを得ることができた。完全長 cDNA の全配列決定によって初めてペプチド配列データの網羅性が確保できることから、この配列決定を優先的に進めたいと考えている。ゼニゴケ BAC ライブラリーについては葉緑体 DNA の混入の少ない精子細胞を用いることにしたが、サンプルの大量調製に時間がかかっている。

<今後の課題>

3 種の植物種について、引き続き完全長 cDNA 末端配列ならびに全長配列を決定し、ドラフトゲノム配列と比較して、遺伝子カタログを完成する。BAC 末端配列をドラフトゲノム配列と比較し、より精度の高いゲノム配列情報を得る。発現プロファイルと遺伝子カタログ情報を、各生物特異的データベース (ChlamyDB, MarchanDB, PHYSCObase) で公開する。シーケンス法の革新的進歩により、網羅的遺伝子発現情報がアレイを作製せずに取得可能になりつつあるので、支援班の協力を得てマイクロ RNA を含めた発現解析を開始したい。

(1) 緑藻クラミドモナスについては、1) 光合成環境応答に関わる変異株の解析とトランスクリプトーム解析を進めると共に、その結果を他の植物におけるデータと比較総合して、環境応答遺伝子の進化上の意義を明らかにする。2) 生殖関連遺伝子と予測される遺伝子についても RNAi 法による発現抑制株を作製して、遺伝子機能の評価を行い、その遺伝子の進化上の意義を明らかにする。3) 完全長 cDNA 内部配列を決定することで、プロテオーム解析に用いることのできるタンパク質配列データセットを確立し、データベースとして公開する。

(2) ゼニゴケについては、1) 3 × ドラフトゲノム配列を JGI と共同で取得し、完全長 cDNA 末端配列、BAC エンド配列、更に SNPs マーカーのマッピングを行う。2) 配列情報に基づく SNPs および AFLP マーカーを用いてゲノムの遺伝地図を作製する。3) 遺伝子情報に基づきマイクロアレイ用の合成ヌクレオチド配列をデザインし、網羅的発現解析を開始する。4) 生殖誘導時の遺伝子発現パターンと生殖に関わる突然変異体を利用し、生殖機能の進化多様性に重要な遺伝子を同定する。

(3) ヒメツリガネゴケについては、1) 標準株 Gransden と Vellelex エコタイプ間の交雑由来の F2 個体約 200 ラインを用い、次世代 DNA シーケンサーによって配列決定を行うことにより SNPs を収集し、SSR データ (ドイツフライブルグ大学 Reski 教授提供)、AFLP データ (イギリスリード大学 Cumming 教授提供) と統合して物理地図を作製する。2) 1 のマップデータ、既に作成した BAC 末端配列、完全長 cDNA 全長配列、5'SAGE データ、3'UTR 配列、small RNA 配列、ならびに、公開されている WGS データを含む配列情報を取り込み、リアセンブル、リアノテーションを行う。3) 2 のデータを閲覧できるブラウザを作成し公開する。4) これまでの予備的研究よりポリコム遺伝子が 1 倍体と 2 倍体分裂組織の転換に関わることが明らかになったので、ポリコム遺伝子のダイレクトターゲットを ChIP-Seq 法により網羅的に特定し、両世代分裂組織形成に関わる因子候補を探索する。5) 1 倍体無限分裂組織形成維持に関わる遺伝子の網羅的探索のために、ファストニュートロン、ガンマ線を用いた突然変異体単離を行うとともに、ゲノムタイリングアレイを用いて欠失遺伝子の特定を行う。6) イヌカタヒバについては JGI による X12 WGS データのアセンブル、アノテーション結果に基づき、国際コンソーシアムとともに、陸上植物進化に重要と考えられる遺伝子の系統解析を行う。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

0801231435. Merchant S, (31 名), Fukuzawa H, (83 名), Grossman AR: The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions, Science 318:245-250 (2007)

0801251617. Rensing, S. et al. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. Science. 319, 64-69 (2008)

0801231443. Burey SC, Poroyko V, Ergen ZN, Fathi-Nejad S, Schöller C, Ohnishi N, Fukuzawa H., Bohnert HJ, Löffelhardt W: Acclimation to low [CO₂] by an inorganic carbon-concentrating mechanism in *Cyanophora paradoxa*. Plant Cell & Environment 30:1422-1435 (2007)

0801231452. Chiyoda S, Linley PJ, Yamato KT, Fukuzawa H, Yokota A, Kohchi: Simple and efficient plastid transformation system for the liverwort *Marchantia polymorpha* L. suspension-culture cells. Transgenic Res.16, 41-49 (2007)

0801232206. Kohinata T, Nishino H, Fukuzawa H. Significance of zinc in a regulatory protein, CCM1, which regulates the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Physiol.49(2):(2008)

2) データベース/ソフトウェア

1. ヒメツリガネゴケ統合データベース PHYSCObase (<http://moss.nibb.ac.jp>)

2. クラミドモナス統合データベース ChlamyBase (<http://chlamy.pmb.lif.kyoto-u.ac.jp/>)