

## 下等植物の進化・多様性に関するゲノム研究

●福澤 秀哉<sup>1)</sup> ◆長谷部 光泰<sup>2)</sup> ◆河内 孝之<sup>1)</sup> ◆大和 勝幸<sup>1)</sup> ◆日渡 祐二<sup>2)</sup>

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（遺伝子ターゲティングが容易な植物）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、比較するとともに、遺伝子の網羅的発現情報を得ることで、（1）光合成環境応答関連遺伝子のゲノム進化と多様性、（2）生殖機能の進化と多様性、（3）植物のボディープランの進化と多様性を解明する。

### <2008年度の研究の当初計画>

3種の植物種について、支援班の協力を得て、引き続き完全長cDNA配列を決定し、ゲノム配列と比較して、遺伝子カタログを完成する。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。支援班の協力を得て次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現情報の取得を進める。

緑藻クラミドモナスについては、雌株のドラフト配列は取得できているが、雄株についてのゲノム情報が整備されていないので、雄株のゲノム配列の決定を進め、雌株ドラフトゲノム配列と比較する。さらに、完全長cDNAの種類を増やすと共に、cDNA内部配列決定により、タンパク質配列情報を取得してデータベース化する。変異株のトランスクリプトーム解析から、環境応答遺伝子の進化を考察する。光合成環境応答遺伝子、生殖関連遺伝子について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。

ゼニゴケについては、ドラフトゲノム配列・完全長cDNA末端配列の決定を進めるとともに、SNPsならびにAFLPマーカーを用いてゲノムの遺伝地図を作製する。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。

ヒメツリガネゴケについては、標準株GransdenとVellersexelエコタイプ間の交雑由来のF1個体約200ラインを用い、Solexa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）と統合して遺伝地図を作製する。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、リアンゼン、リアノテーションを行う。そのデータを閲覧できるブラウザを作成し公開する。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を探索する。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。イヌカタヒバについてはJGIによるドラフトゲノム情報に基づき、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。

### <2008年度の成果>

クラミドモナスについては、雄株（C-9株, *mt*）についてゲノム長10倍カバレッジのBACならびにFOSMIDゲノムライブラリーを作製した。そのBACクローン1万個の両末端配列（2万リード）を決定し、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間の新たな連結を明らかにした。Scaffold間の新たな連結については、ドラフト配列（17本の染色体）にアセンブルされなかった71個のScaffold中20個のScaffoldがBACクローンにより組み込まれ、そのうちテロメア配列（TAAAACCC<sup>(N)</sup>）を保持する3個のスキュフォールドが染色体に連結された。完全長cDNAの位置情報をドラフトゲノム上に表示するデータベースをin houseで立ち上げた。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、二酸化炭素の濃度の条件を設定することで、強光ストレスと低CO<sub>2</sub>ストレスの相互作用に依存することをトランスクリプトーム解析により初めて示した。また、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いた。クラミドモナス生殖サイクルにおける雌雄配偶子間の細胞認識及び接合子形成時の遺伝子発現プロファイルを取得し、新奇な接合子特異的遺伝子を見出した。接合子形成不全を起こす突然変異株を用いることで、細胞間認識によって誘導される遺伝子群及び細胞融合によって誘導される遺伝子群を明らかにした。

ゼニゴケ標準系統の雄株葉体および原系体由来の完全長cDNAの両末端配列64,380および64,523リードから、6,567の新規配列を得た。この内、タンパク質コード領域全長をもつと予想されたのは5,194配列だった。EST配列、PAC配列および遺伝子配列情報に基づくdCAPSおよびSSRマーカー113個を作成し、そのうち110個を用いて全長約900 cMの遺伝地図を作成した。連鎖群の数は8となり、ゼニゴケの常染色体数と一致した。恒常的に生殖成長を行う突然変異体の表現型に連鎖する配列を調べたところ、作成した遺伝地図の第7連鎖群の末端部にマップされた。全ゲノム解析の予備実験として、JGIと共同で27個のPACクローンの配列合計2.9 Mbを取得し、その中に213個のタンパク質遺伝子と6個のtRNA遺伝子遺伝子を見出し、遺伝子密度は0.7個/10 kbと見積もられた。レトロトランスポゾン等の転位因子の数は少なく、100 kbに1個程度であった。アセンブル時に問題となるような反復配列はみられなかった。また、アグロバクテリアを用いた簡便な形質転換法を確立し報告した。

ヒメツリガネゴケについては、SNPs収集のため、約100のF1ラインからDNA抽出を行った。現在、支援班においてSolexaを用いてindexing法により配列決定を行う準備をしている。支援班のもと、完全長cDNA全長配列、5'SAGEデータ、3'UTR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、リアノテーションを行っている。また、SOLiDを用いたデジタル発現データ、ChIP-seqデータを同時に閲覧できるようにした。ポリコム遺伝子のダイレクトターゲット探索のため、遺伝子末端にエピトープタグを挿入し、免疫沈降を行い、SOLiDによりシーケンス予定である。正遺伝学的解析のための突然変異体単離は、イオンビームを用いて茎葉体形成不全になる変異体を複数単離した。ゲノムタイリングアレイを用いて、欠失部位を特定することに成功し、約100 kb程度の欠失があることがわかった。国際コン

ソーシアムにおいてイヌカタヒバゲノムをJGIと共同で完了し、系統解析を担当した。

#### <国内外での成果の位置づけ>

クラミドモナスについては、国際共同研究で公開したドラフトゲノム配列が雌株 (CC-503株, *mt*) 由来の配列であるのに対し、本研究で新たに構築したBACならびにFOSMIDゲノムライブラリーは雄株 (C-9株, *mt*) 由来であることから、雌雄株の両者についてのゲノムリソースが整備された。得られたリソース (ゲノムライブラリーと完全長cDNAクローン) は国内外から配布依頼があり、対応が期待されている。

ゼニゴケについては、当研究室が標準系統、交配系および形質転換系を整備していることから、国内外から共同研究の申込が相次いでいる。本研究の成果として得られたEST情報、ゲノム情報、遺伝地図情報は極めて有用なリソースであり、ゼニゴケを用いた国内外の研究に今後貢献すると期待される。

ヒメツリガネゴケについては、JGIがヒメツリガネゴケを reference genome として選定し、国際コンソーシアムとしてどのようにデータを提供し、協力体制を築くか検討し始めた。イヌカタヒバはステアリングコミティーにおいて約7回の電話会議、1回のミーティング (米国) を行い、論文作成を行っている。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

クラミドモナスについては、完全長cDNAの10万を超えるリードを得たにも関わらず、完全長ライブラリー由来のcDNAは3,000程度にとどまっており遺伝子種のcomplexityが低かった。その理由として以下の可能性がある。①再合成と解析を進めている。②クラミドモナスのmRNAにおいては、5'-末端のCAP構造がRNAの精製段階で分解を受けた可能性、③ライブラリー構築時に様々なストレスにさらした細胞を混合してRNAを調製したことで、コピー数の少ないストレス特異的に発現する遺伝子のmRNAが相対的に希釈された可能性、④GC含量の高さmRNA由来cDNAのPCRが、通常のPCR条件では増幅困難であった可能性が考えられた。

ゼニゴケについては、現在までに約30万リードのゼニゴケESTが蓄積されてきた。これらをアセンブルする際、高発現と考えられる遺伝子のESTが非常に多く、アセンブリには改善の余地が多く残されている状態である。また、キメラESTの除去に労力を要した。また、4 kb以上の既知遺伝子由来のcDNAが反映されていなかった。アレイの設計に更なるcDNAの解析を進める必要があり準備を進めている。

ヒメツリガネゴケについては、ドイツからのF1ラインの輸入が難航し、直接訪問することで入手できた。Illuminaからのindexingキットの発売が遅れ、Solexaを用いたF1ラインのシーケンスが予定よりも遅れた。現在、キットを入手し、来年度前半に遺伝的地図を完成させることができると考えている。当初、ポリコム遺伝子産物に対する良い抗体が得られなかったため、ノックイン法によりエピトープタグを挿入する方法で代替した。ポリコム遺伝子は発現量が低いことから、免疫沈降するDNA量が極めて少なく、生材料を大量に用意することにより問題を克服できた。イヌカタヒバについては、メンバー間の連絡がうまくいかず、論文作成が遅れたが、2009年1月末に米国にて会議を開き、論文作成を進める予定である。

#### <今後の課題>

クラミドモナスについては、雄株由来のFOSMIDゲノムライブラリーを構築し、両末端配列を決定してドラフトゲノムとの比較を行うことで、BACライブラリーではカバーしきれなかった領域についてのゲノムリソースを整備する。性決定を支配するMID遺伝子や生殖に関与する遺伝子が存在する雄株の性決定遺伝子座 (第六番染色体上のおよそ200-kbにわたる領域) をカバーするBACクローンについて、支援班の協力により配列決定を進め、クラミドモナスの雌雄株における性決定遺伝子座の全構造を明らかにする。性決定遺伝子座上に存在する雌雄間における遺伝子種の違いや遺伝子座の構造をゲノムレベルで比較解析する。完全長cDNAライブラリーにおいては、従属栄養条件下で2日間培養した

細胞を滅菌水に懸濁した細胞からmRNAを単離し、DMSO添加のPCRを挟んだ改変オリゴキャップ法により第六番目の完全長ライブラリーを構築し、遺伝子種のcomplexityを高める。更に発現プロファイルのデータベース構築とウェブサイトの更新を進める。

ゼニゴケについては、その完全長cDNAは質の高いものであったが、その分配情報が5'および3'末端に偏っている。また、完全長cDNAライブラリーには4 kb以上の長いmRNAが反映されていない可能性もある。そこで、発現している配列をより広くカバーするため、1) 完全長cDNAクローンの内部配列決定、2) より多くのESTの取得、3) 異なる組織に由来するESTの取得、を目指す。また、現段階でのESTアセンブリを完成させ、恒常的に生殖成長を行う突然変異体の網羅的発現解析を実施する。国際共同研究によりゲノム配列が得られれば、EST情報に基づく遺伝子同定およびアノテーションを進める。

ヒメツリガネゴケについては、SNPsデータから遺伝的地図を完成し、未発表データを統合してリアアセンブル、リアノテーションを行い、データベースとして公開する。ポリコム遺伝子ターゲットを同定し、1倍体と2倍体におけるゲノムレベルでの制御機構が存在しているかを調べる。イヌカタヒバについては論文を完成させる。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

0901161006. Yamano T 他 : Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 147, 340-354 (2008)
0801232206. Kohinata T 他 : Significance of zinc in a regulatory protein, CCM1, which regulates the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Physiol. 49, 273-283 (2008)
0901161241. Kubo T 他 : Characterization of novel genes induced by sexual adhesion and gamete fusion and of their transcriptional regulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Physiol. 49, 981-993 (2008)
0901161509. Fathinejad S 他 : A carboxysomal carbon-concentrating mechanism in the cyanelles of the 'coelacanth' of the algal world, *Cyanophora paradoxa*? Physiol. Plantarum 133: 27-32 (2008)
0901192117. Ishizaki I 他 : *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. Plant Cell Physiol. 49: 1084-1091 (2008)
0901192123. Chiyoda S 他 : Direct transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. by particle bombardment using immature thalli developing from spores. Plant Cell Rep. 27: 1467-1473 (2008)
0901161434. Kajikawa M 他 : Production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in plants using bryophyte fatty acid delta6-desaturase, delta6-elongase, and delta5-desaturase genes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72, 435-444 (2008)
0901191737. Kofuji R 他 : Gametangia development in the moss *Physcomitrella patens*. In Cove, D., Perroud, F., and Knight, C. eds. "The moss *Physcomitrella*". 167-181. Black Well. (2009)

##### 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>)