

植物に特徴的な倍数性ゲノム間相互作用に関する研究

●村井 耕二¹⁾ ◆萩原 保成²⁾

1) 福井県立大学生物資源学部 2) 横浜市立大学木原生物学研究所

＜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。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。倍数種のゲノム構成および遺伝子発現調節はそれぞれのゲノムの単なる足し算ではなく、高次な制御機構による相互作用が働いているに違いない。本研究は、パンコムギをモデルとして、倍数種が成立した結果生じたジェネティックおよびエピジェネティックな変化をゲノム科学的に解析することを目的とする。研究は以下のように進める：（1）コムギの生活環で発現する EST の大量解析を行い、コムギ発現遺伝子のボディマップを作成し、各組織における発現遺伝子パターンを視覚化した（Virtual Display: VD）。このボディマップをもとに、ストレスにตอบสนองして発現する遺伝子の特徴付ける。（2）コムギの発育生理的に重要な花成関連、発芽関連、貯蔵タンパク質遺伝子等を体系的にクローニングする、（3）コムギのトランスクリプトの SNPs に基づき 3 種ゲノム由来の遺伝子が各組織で相対的にどの程度発現しているかをモニターするシステムを開発した。このシステムを駆使し、それぞれのゲノムの遺伝子が発生段階・環境の変化にตอบสนองしてどのように発現パターンを使い分けて変化させるかを調べる、（4）作製したパンコムギの高分子ゲノミック DNA を含むライブラリー（TAC ライブラリー）を用い、トランスクリプトが座乗する染色体領域の塩基配列を可能な限り決定する。倍数種における 3 種ゲノムの遺伝子構造の特徴を解析する、（5）これらのパンコムギで解析した遺伝子構造を祖先種と比較し、異種間交雑とその後の染色体倍加がゲノム構造に及ぼす影響を体系的に調べる、（6）コムギ遺伝子がスポットされたオリゴ DNA マイクロアレイを駆使し、花器官形成過程・種子登熟過程・発芽過程における倍数体とその祖先種における遺伝子発現パターンを解析する。ゲノムの倍数化に伴い、これらの諸過程に関連して発現が変化する遺伝子をゲノムワイドに特徴付ける。

＜2007 年度の研究の当初計画＞

異質倍数性であるパンコムギの 3 種ゲノム上の遺伝子がどのように制御されて発現されるのか、を比較ゲノム科学的方法で解析する。具体的な計画は、（1）6 倍性パンコムギにおいての同祖遺伝子の SNPs 解析に基づいた異種ゲノムの発現パターンをモニタリングする、（2）花成関連、貯蔵タンパク質遺伝子をクローニングする。花成関連遺伝子、貯蔵タンパク質遺伝子の発現パターンを EST 発現データベース、特異的プローブによるリアルタイム PCR 法により解析し、これらの遺伝子のゲノム別使い分けを明らかにする、（3）ゲノム別の発現パターンを解析した EST コンティグのゲノミッククローンを選抜し、プロモーター領域を解析する、（4）エピジェネティックな遺伝子発現制御機構を調べる、（5）オリゴ DNA マイクロアレイにより倍数性コムギとその祖先 4 倍種、2 倍種の遺伝子発現パターンをモニタリングし、倍数体の遺伝子発現パターンの特徴を明らかにする、ことである。

＜2007 年度の成果＞

（1）コムギ EST の大量解析：昨年度までに、コムギの生活環の代表的な組織、および生物的・非生物学的ストレスをかけた組

織、都合 46 組織からそれぞれ cDNA ライブラリーを構築し、cDNA クローンの両側から塩基を決定し、約 63 万の EST シークエンスをえた。これらの塩基配列を CAP3 法にて整列化した。整列化した contig は各ゲノムから発現した遺伝子（同祖遺伝子）に相当している。これらの ESTcontig は、コムギの遺伝子総数の 90% 以上をカバーしているの見積もっている。これらの遺伝子の発現パターンを In silico で解析できるようにした。これは、倍数性ゲノム間の相互作用を遺伝子発現レベルで研究する貴重な遺伝資源となっている。

本年度はさらにこのコムギ遺伝子発現データベースを充実させるため、いもち病菌に感染させたコムギ系統から、都合 85,407 シークエンスをえた。いもち病菌感染により特異的に発現する遺伝子が数多くえられ、現在、詳細を解析している。

（2）花成関連遺伝子のクローニングと発現解析：生殖成長に関連する遺伝子の多くは MADS ボックスと呼ばれる高度に保存された領域を持つ転写因子をコードする。コムギ EST データベースから MADS ボックス遺伝子を抽出したところ、同祖遺伝子のセットを一つと勘定して 57 遺伝子が得られた。57 遺伝子中 18 遺伝子（32%）について、3 つの同祖遺伝子が確認され、A、B、D 各ゲノムの同祖遺伝子が全て発現していることが判明した。コムギにおいても、私たちの解析により、クラス B、C、D、E 遺伝子が外類/内類、りん被、雄ずい、雌ずいの形成に関与することが明らかとなってきた。（クラス A 遺伝子は不明）。クラス E 遺伝子は、シロイヌナズナでは、*SEPALLATA* (*SEP*) 遺伝子グループとして一つであるが、コムギやイネなどの単子葉類では、2 つのグループに分かれている。コムギ EST 解析の結果、コムギではクラス E 遺伝子として、シロイヌナズナ *SEP* に相同な遺伝子 *WSEP* とイネ *OsMADS1/LEAFY HULL STERILE1* (*LHS1*) に相同な遺伝子 *WLHS1* を同定した。さらに、両遺伝子について、A、B、D 各ゲノムに座乗する同祖遺伝子をそれぞれ同定した。*WSEP* の同祖遺伝子間では、遺伝子ゲノム構造に大きな変異はなく、また、各組織における発現にも差異は見られなかった。一方、*WLHS1* の同祖遺伝子間では、ジェネティックおよびエピジェネティックに制御機構の分化が起こっていることが明らかとなった。つまり、A ゲノム同祖遺伝子 (*WLHS1-A*) では遺伝子構造に変化が生じ、機能タンパク質をコードしていない。また、B ゲノム同祖遺伝子 (*WLHS1-B*) では DNA メチル化によりサイレンシングが起こっている。その結果、D ゲノム同祖遺伝子 (*WLHS1-D*) のみが正常に機能している。このことは、6 倍体コムギにおいてゲノム間の同祖遺伝子が機能分化していることを示唆する。（The Plant Cell に論文掲載）

現在、クラス B、C、D 遺伝子についても同祖遺伝子別の発現パターン解析を進めている。クラス B 遺伝子は 3 つ (*WAP3*, *WPI-1*, *WPI-2*) が存在するが、*WAP3* では組織により同祖遺伝子の使い分けが行われており (subfunctionalization)、また、*WPI-1* では A ゲノムのみが発現し、*WPI-2* では全同祖遺伝子が発現するという興味深い知見が得られている。

（3）パンコムギの栽培化に関わる遺伝子の発現機構の解析：パンコムギの Q 遺伝子は、脱穀性、穎のかたさ、穂軸の折れやすさおよび穂の形態を支配する多面効果をもつ。粒の脱穀性がコムギの栽培化に決定的に働いたと推測されているために、Q 遺伝子が倍数性コムギの栽培化に最も重要であると考えられている。Q

遺伝子は植物固有の転写因子である *APETALA2* (*AP2*) 様遺伝子としてクローニングされた。Q 遺伝子はパンコムギの 5A 染色体に座乗し、量的効果があることが知られている。*AP2* は、MADS ドメインをもたないが、クラス A に属する。*AP2* 様遺伝子はパンコムギの 3 種ゲノムからクローニングし、発現様式を解析した。B ゲノム由来の遺伝子は、エクソン中に欠失がみられた。A ゲノム由来の遺伝子 (*WAP2-A*) の mRNA が最も蓄積しており、欠失をもつ B ゲノム由来の遺伝子 (*WAP2-B*) も転写されていた。ゲノムのプロモーター領域に転写を促進するシス配列が見出された。シス配列に由来する転写量の違いだけでは、Q 遺伝子の量的効果を説明できない。遺伝子配列を詳細に比較したところ、3 末近傍に miRNA のターゲットサイトを見出した。現在、RNAi によるシステムの検証を行っている。

(4) 同祖遺伝子のゲノム別発現様式のバイオインフォマティクスの解析：比較的発現量の多い 5199 遺伝子の contig の同源性解析により、全体の約 58% 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ると推定した。6 倍体のパンコムギでこれらの遺伝子は 2 倍体のように発現している。

そこで、1 ゲノムからのみ発現されている遺伝子の座乗染色体を継続して行った。昨年度までのデータに追加すると、A ゲノムに 10 遺伝子、B ゲノムに 23、D ゲノムに 26 遺伝子が帰属し、A ゲノムの遺伝子が比較的抑制される傾向がみられた。相同染色体ごとに座乗遺伝子数をみると、第 2 染色体に 14 遺伝子と最も多く、第 1 染色体に 13、第 3 染色体上に 12 遺伝子が座乗していた。一方、第 5 染色体には、2 遺伝子の座乗しか検出できなかった。遺伝子数を増やして、この傾向を統計的に検定する必要がある。

(5) 貯蔵タンパク質遺伝子座領域のゲノム構造解析：コムギ貯蔵タンパク質遺伝子は多重遺伝子族を構成する。貯蔵タンパク質遺伝子の一種であるグリアジン遺伝子が座乗するコムギ染色体第 6 群単腕領域を解析している。6 群染色体に座乗するグリアジン、グルテニン遺伝子は、第 1 染色体上に座乗する同遺伝子が比較的最近、転座してきたものと予測され、進化的にも興味深い。グリアジン遺伝子は種子の登熟過程で特徴的な発現パターンを示す。これらの特徴的な発現パターンを示すグリアジン遺伝子に相当する 6 つの BAC クローンを選抜して、塩基配列を決定した。構造を解析している。

(6) オリゴ DNA マイクロアレイを用いた塩処理に反応する遺伝子の体系的解析：22K アジレント社コムギオリゴ DNA マイクロアレイに加え、さらに 10,263 プローブを登録した新たに作成した 11K オリゴ DNA マイクロアレイを用いて、塩処理に反応するコムギ遺伝子を網羅的に解析した。全体で約 32K の遺伝子のうち、塩に反応するものは 5,996 遺伝子であり、全体の約 19% の遺伝子が反応していた。これらの遺伝子のなかから、転写因子を抽出し、イネと発現パターンを詳細に解析した。コムギ独自に反応する転写因子を見出した。これらの転写因子の機能解析にとりかかった。

<国内外での成果の位置づけ>

コムギ EST の大量解析で、国際的に重要な貢献をしている。2008 年 1 月 18 日の NCBI dbEST で、コムギ EST の登録数は、全生物種で 10 位、植物では第 4 位である。約 105 万の登録 EST のうち、約 60% を我々の日本のグループが貢献している。日本はコムギ標準品種 (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring) の単一品種を用いており、この品種に関する発現遺伝子のボディマップを作成している。これらの貢献に対しては世界的に評価されている。さらに、これらの EST を用いて、アジレント社、アフィメトリクス社の DNA マイクロアレイないしは DNA チップが作成され、世界中の研究者に配布されている。特に、アジレント社のアレイを NBRP の活動として国内の研究者に積極的に配布しており、その活動の評価は高い。また、コムギの発育生理的に重要な花成関連、貯蔵タンパク質遺伝子を体系的にクローニングし、その発現パターンを詳細に解析した。異質 6 倍体であるパンコムギの 3 種ゲノム由来の遺伝子の発現パターンを詳細に解析した例

は未だ少なく、貴重なデータベースとなっている。

日本が国際コムギゲノムシーケンズコンソーシアム (IWGSC) からコムギ完全長 c DNA 解析を依頼されている。現在約 4 万の端読みのデータを公開し、シーケンズデータとして IWGSC に評価されているが、さらなる貢献が求められている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

コムギの遺伝子発現に関するプロファイル解析が進んでいる。特徴的な遺伝子発現を制御するプロモーター配列の効率的な解析はどうしても必要になってきている。パンコムギ Chinese Spring (CS) のゲノミックライブラリは挿入断片を直接イネ科植物に導入できるベクターを用いて作成した (TAC ライブラリ)。しかし、挿入断片が平均数十 kbp とそれほど長くなく、十分なゲノム領域の解析ができない。百 kbp 以上の DNA 断片を含む BAC ライブラリの構築が求められる。BAC ないしは TAC クローンの塩基配列を決定しなければならない。大学の研究室ではこの活動には限界があります。総括班で支援して頂きたい。

アジレント社製 22K オリゴ DNA マイクロアレイを活用して、6 倍体コムギと、その祖先 4 倍体、祖先 2 倍体でのゲノム構造の比較をゲノムワイドで解析することを試みた。それぞれの系統の代表的な組織から全 RNA を抽出し、マイクロアレイにハイブリダイズさせ、発現プロファイルを体系的・網羅的に解析している。

選抜したコムギ遺伝子の機能を推定するために、遺伝子をコムギに形質転換している。現在までのところ世界的にもパーティクルガンで導入する方法が一般的である。しかし、導入効率が極端に低く、また Co-suppression が頻繁にみられる。アグロバクテリウムを介した効率のよいコムギ形質転換系の確立が求められる。

<今後の課題>

- (1) コムギの染色体腕ごとの巨大 DNA 断片挿入 BAC ライブラリの構築：ゲノムシーケンズプロジェクトに対応して、選抜した遺伝子領域を含む染色体腕ごとの BAC ライブラリの構築が求められる。この BAC クローン (1 遺伝子に関して 3 ゲノム相当領域のうち、このライブラリをもちいれば 2 倍体のように染色体歩行が可能となる) に関して遺伝子領域近傍を構造解析する。
- (2) コムギにおける効率的な形質転換系の確立：コムギにおける効率のよい形質転換系を確立する。特に、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入系の確立をはかりたい。

<成果公表リスト>

1. 0601301713
Kawaura, K. et al.: Transcriptome analysis of salinity stress responses in common wheat using a 22k oligo DNA microarray. *Funct. Integr. Genomics* 6: 132-142 (2006)
2. 0710111206
Shitsukawa, N. et al.: Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat. *The Plant Cell* 19(6): 1723-1737 (2007)