

## 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<sup>1)</sup> ◆荻原 保成<sup>2)</sup>

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

## &lt;研究の目的と進め方&gt;

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算ではなく、高次の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、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・種子登熟過程等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。

## &lt;2008年度の研究の当初計画&gt;

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ける同祖遺伝子の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培種、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。

## &lt;2008年度の成果&gt;

2008年度の成果は以下のとおり。

(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・非生物的ストレスをかけた組織、都合50組織からそれぞれcDNAライブラリを構築し、cDNAクローンの両側から塩基を決定し、約63万のESTシーケンスを得た。これらの塩基配列をCAP3法にて整理化した。整理化した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EST contig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、ホウ素処理をしたコムギ系統から、約4万シーケンスを得た。ホウ素処理により特異的に発現する遺伝子が数多く得られ、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。クラスABCDEに属するMADSボックス遺伝子は花器官のidentityの決定や発達に関与する。これまでの研究から、コムギにおけるクラスABCDE MADSボックス遺伝子として、クラスB遺伝子としてWAP3、WPI-1、WPI-2を、クラスC遺伝子としてWAG-1とWAG-2をクラスD遺伝子としてWSTKを、クラスE遺伝子としてWLHS1とWSEPを同定している。さらに、今年度、ESTデータベースの解析からそれぞれの遺伝子について、ABD各ゲノムに座乗する同祖遺伝子を抽出した。これらの同祖遺伝子特異的なプライマーによるリアルタイムPCR解析の結果、以下のように発現する同祖遺伝子が遺伝子ごとに異なることが明らかとなった。(発現する遺伝子の座乗ゲノムをハイホンの後に示す。)クラスB遺伝子:WAP3-B/D, WPI-1-A, WPI-2-A/B/D、クラスC遺伝子:WAG-1-A, WAG-2-A、クラスD遺伝子:WSTK-B/D、クラスE遺伝子:WSEP-A/B/D, WLHS1-D。昨年度報告したように、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。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。以上の結果は、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(sub-functionalization)している可能性を示唆するが、どのゲノムの同祖遺伝子が選択されるかは、法則性は見られない。今後、WLHS1以外の遺伝子の同祖遺伝子特異的silencingがジェネティックあるいはエピジェネティックのどちらかで制御されているのかを明らかにする。さらに、Chinese Spring以外の品種あるいは合成パンコムギにおける同祖遺伝子特異的silencing patternも明らかにしたい。

(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)ドメイン遺伝子の1つで、5A染色体に座乗し、量的効果があることが知られている。シロイヌナズナAP2は、花器官形成に関与する遺伝子である。Q遺伝子に対応するAP2様遺伝子(WAP2:Wheat AP2)をパンコムギの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(WAP2-B)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を調べたところ、転写を促進するシス配列が見出された。また、WAP2-Aのプロモーター領域のメチル化頻度が低かった。さらに、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 による発現制御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フィ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 の相同性解析により、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、2 ゲノム、3 ゲノムから発現している、都合 113 遺伝子についてそれぞれの同祖遺伝子の帰属染色体を決定した。また、EST データベースと対応させることにより、各組織におけるゲノム別発現パターンを明らかにした。3 種類すべてのゲノムから発現している遺伝子は、7 本の相同染色体に偏りなく存在していた。一方、2 ゲノム、1 ゲノムから発現している遺伝子は、A ゲノム由来の同祖遺伝子の発現が抑制される傾向がみられた。

**(5) 貯蔵タンパク質遺伝子座乗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祖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 42 の BAC クローンを選抜して構造を解析し、そのうち、5 つの BAC クローンの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倍数性コムギにおける遺伝子発現解析**：6 倍体、その祖先 4 倍体および祖先 2 倍体コムギの実生、幼穂、開花期の穂から RNA を抽出し、オリゴ DNA マイクロアレイにより遺伝子発現パターンをモニタリングした。倍数性により、発現が誘導されるもの、抑制されるものを抽出し、遺伝子の特徴をつけた。倍数化による雑種強勢の原因遺伝子をさぐりたい。また、DNA マイクロアレイを用い、塩処理に反応するコムギ遺伝子を網羅的に解析した。塩に反応した遺伝子のなかから、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うちから、NAC 遺伝子の機能解析に取りかかった。

#### <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。2009 年 1 月 9 日の NCBI dbEST で、コムギ EST の登録数は、全生物種で 12 位、植物では第 5 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 cDNA 解析を依頼されている。現在約 4 万の端読みデータを公開し、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るので、総括班で支援して頂きたい。

パンコムギにおける特徴のある発現遺伝子のゲノムにおける構造を解析しようとすると基本的に、A, B, D ゲノムそれぞれに座乗する遺伝子、祖先 4 倍種、2 倍種のゲノムでクローニングして、塩基配列を決定する必要がある。この作業に多大の労力と費用がかかり、研究を推進するネックになっている。

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。日本のコンソーシアムとして、パンコムギ Chinese Spring の 6B 染色体を取り上げることとし、国際組織 IWGSC で認知された。この事業を大きく展開する必要がある。

(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図りたい。

#### <成果公表リスト>

- 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: 1723-1737 (2007)
- 0901161033  
Kawaura, K. et al.: Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. *Funct. Integr. Genomics*. 8: 277-286 (2008)
- 0901161058  
Tsunewaki, K. et al.: Evolutionary dynamics of wheat mitochondrial gene structure with special remarks on the origin and effects of RNA editing in cereals. *Genes Genet. Syst.* 83: 301-320 (2008)
- 0901161121  
Nomura, T. et al.: Structures of the three homoeologous loci of wheat benzoxazinone biosynthetic genes TaBx3 and TaBx4 and characterization of their promoter sequences. *Theor. Appl. Genet.* 116: 373-81 (2008)