

植物の多細胞体制進化の鍵となったゲノム進化の特定

●西山 智明

金沢大学学際科学実験センターゲノム機能解析分野

<研究の目的と進め方>

多細胞生物は単細胞生物から独立に複数回進化した。では、生物が多細胞体制を確立する過程でどんなゲノム上の変化が起こるのだろうか。動物のカンブリア大爆発よりも遅れて、植物は陸に上がった。陸上植物の祖先であった緑藻は1倍体世代のみに多細胞体制を持ち、2倍体は受精卵だけだったと推定されている。そして、陸上植物の進化の過程で、1倍体は徐々に縮小し、2倍体が多細胞化しやがて1倍体よりも巨大化した。陸上植物の中で最も高度な体制を持つ被子植物は2倍体に茎葉を形成し、1倍体は数細胞にまで退化している。一方で、原始的体制を保持しているコケ植物セン類は1倍体に茎葉を形成し、2倍体は1倍体の1/10以下の大きさで1倍体に寄生している。従って、コケ植物セン類は、多細胞体制進化の観点で緑藻と被子植物の中間点にあるといえる。これまで植物の2倍体多細胞体制進化について2つの仮説が提唱されている。一つは、2倍体多細胞体はそれ以前にあった1倍体多細胞体制で用いられていた発生システムを cooption(流用)して進化したという仮説。もう一つは、1倍体多細胞体制とは関係なく、de novo(新規)に2倍体多細胞体制が進化したという仮説である。そこで、本研究課題では、EST, SAGE 解析によって2倍体に特異的な発現を示すことが示された候補遺伝子について、real-time PCR、マーカー遺伝子のノックインにより発現パターンを検証し、ノックアウトによって2倍体の多細胞化における役割を明らかにする。この2倍体の多細胞化に関与している遺伝子について、相同遺伝子の他の生物およびヒメツリガネゴケ1倍体における発現・機能に関する知見を調べ、2倍体多細胞体制がどのように進化したか考察する

<2007年度の研究の当初計画>

系統解析の結果を整理確認の上論文にまとめ投稿する。

系統解析の結果に基づき、2倍体の多細胞化に関わる可能性のある候補遺伝子について real time PCR による発現特異性の確認と、マーカー遺伝子融合コンストラクトの作成、およびヒメツリガネゴケへの導入を行い、詳細な発現パターンを解析する。

SAGE, 大量シーケンシングにより、2倍体特異的に発現している遺伝子を特定し、real time PCR による特異性の確認と、マーカー遺伝子融合コンストラクトの作成、およびヒメツリガネゴケへの導入を行い、詳細な発現パターンを解析する。

以上から、植物において2倍体が多細胞化した進化機構について考察する。

<2007年度の成果>

現在までに、配偶体の SAGE ライブラリーを1つ作成し、現在、支援班でシーケンシングを進めて頂いている。ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバの全ゲノムショットガンシーケンスリード断

片配列データから相同遺伝子の配列を探索、構造を予測し、アミノ酸配列データベースから探索した相同遺伝子の配列とともに遺伝子系統樹を再構築するシステムを作成した。システムは相同遺伝子を探索しアラインメントを作成し、MacClade で処理可能な NEXUS 形式のファイルを出力するサブシステムと、NEXUS 形式のファイルから自動的に系統樹を再構築し、距離あるいは分類にもとに図上で根を置く節を選択し、分類に応じた色のラベルを付した編集可能なファイルを生成するサブシステムからなる。これにより、オーソドックスな系統解析が高い効率で出来るようになった。系統解析については、基礎生物学研究所生物進化研究室と共同で大規模に進め、被子植物で発生に関わる遺伝子を含む460 遺伝子ファミリーについて系統解析を行い、ヒメツリガネゴケにおける相同遺伝子との関係を調べた。結果として、シロイヌナズの発生に関わる遺伝子の約80%についてヒメツリガネゴケでもオーソログ候補が見つかり陸上植物進化の初期から保存されていることがわかった。さらに、遺伝子ファミリーを構成する遺伝子が、系統の分岐後に系統毎に遺伝子数を増加させている例が多数見つかった。こうした例は特に転写因子に多く見られた。また、これとは逆にほとんどの系統で、数が少数に維持されている遺伝子群を同定した。こうした遺伝子は、細胞周期、細胞骨格、クロマチン修飾、光シグナル伝達に関わる因子に多かった。こうした遺伝子は、植物の生命活動維持に本質的に関わる物であって、ヒメツリガネゴケでは少数しかないが、被子植物の系統では多数に増えているような遺伝子が2倍体の多細胞体制の進化、特に2倍体の複雑化に関与していると予想される。

これら系統樹を Web インタフェースから検索ダウンロード可能なデータベースを作成し、さらにゲノムアセンブリー上の Gene model との関連付けを行った。

上記系統解析で浮かび上がって来た植物ホルモン、ジベレリン信号伝達系について共同研究を行い、ヒメツリガネゴケでは、被子植物と同様のジベレリン信号伝達系は働いていない事を明らかにした(2)。

5' SAGE に加え、計画班「下等植物の進化・多様性に関するゲノム研究」と共同で2倍体1ライブラリー1倍体4ライブラリーについて454システムを用いた3'末端配列決定を行い、各ライブラリーについて約40万個の mRNA の3'末端配列を決定した。このデータと、国際コンソーシアムと JGI と共同で進めたヒメツリガネゴケ概要ゲノム上の遺伝子に対応づけることで2倍体特異的に発現している遺伝子の同定を進めつつある。

<国内外での成果の位置づけ>

従来、系統解析は、一般に配列収集や、アラインメント選択後のデータ処理にも知識と人手を要しており、多数の遺伝子につい

て解析するのは困難であった。これを、自動化する試みは、いくつかのグループでなされているが、完全自動化を目指す結果として、解析の信頼性に難があった。特にアラインメントの曖昧な領域の判定については確立した方法がなく、完全自動化を目指すとは無理が生じるポイントである。その部分だけに解析者が集中すればいい半自動システムにすることにより、多数の系統解析を可能にした点はユニークである。この事によって他に例を見ない、高精度で大規模な系統解析を達成した。また、通常、ゲノム情報のデータ解析は全ゲノムのデータをアセンブルして、遺伝子構造予測を行ってから行われることが多いが、相同遺伝子を検出して遺伝子系統解析を行う上では、計算コストのかかる全ゲノムのアセンブリーを行わず、全ゲノムショットガンシーケンスのうち注目遺伝子に類似性の高い領域だけでアセンブリーを行うことで解析が可能なることに着目し、実証したことにより、今後とも増えるであろう全ゲノムショットガン配列の効率的な解析につながると期待される。ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバはともに陸上植物の進化を解明する上で重要な位置を占めており、全ゲノムショットガンシーケンスの解析によってこの両者を同時に解析で来たことも重要である。系統分岐後に各系統で遺伝子重複によって遺伝子が増加して、多対多のオーソログ関係が観察されることは、これまででもいくつかの転写因子の解析で知られていたが、大規模な系統解析でどのような遺伝子で多対多のオーソログ関係が見られるかを明らかにした点は新奇である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

5' SAGE と 454 シークエンスによるタグから特異的な遺伝子を同定するにあたり、それぞれのタグがゲノム上のどこにあるかは、わかるものの、Gene model が確実でないために、どこまでが同一の遺伝子と考えるべきかが明らかでなく、タグを積算して発現の特異性を決定するに至らなかった。

計画班と共同で完全長 cDNA シークエンスを進めており、完全長 cDNA 配列にもとづいて、より確からしい Gene model を作ることで、より明瞭なデータ解釈が可能になると期待される。

<今後の課題>

これまでにこの全ゲノムショットガンデータを用いて植物の発生に関与する遺伝子の大量な系統解析を行い、陸上植物の進化過程での遺伝子の変動を解析するとともに、ヒメツリガネゴケの 2 倍体で働く遺伝子の同定を進めて来た。こうした中で、陸上植物だけで相同遺伝子が見つかりクラミドモナス等のゲノム決定済み生物では相同遺伝子が見つからない例が多くみつかった。したがって、今後は、より、陸上植物に近縁である藻類すなわちシャジクモ藻類のゲノム解析をすすめ、シャジクモ藻類のデータを含めた系統解析を行うことが重要になってくると考えられる。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0801290911

Stefan A. Rensing, Daniel Lang, Andreas D. Zimmer, Astrid Terry, Asaf Salamov, Harris Shapiro, Tomoaki Nishiyama, Pierre-François Perroud, Erika A. Lindquist, Yasuko Kamisugi et al.: The Physcomitrella Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* 319: 64 - 69 (2008).

2. 0602082154

Hirano K, Nakajima M, Asano K, Nishiyama T, Sakakibara H, Kojima M, Katoh E, Xiang H, Tanahashi T, Hasebe M, Banks JA, Ashikari M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M.: The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the Lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 19(10):3058-79 (2007).