

# 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<sup>1)</sup> ◆関本 弘之<sup>2)</sup> ◆坂山 英俊<sup>3)</sup>

1) 金沢大学学際科学実験センター 2) 日本女子大学理学部 3) 東京大学大学院総合文化研究科

## <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。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

本研究では、陸上植物に近縁なシャジクモ藻類のゲノム配列を新型シーケンサーを用いて決定し、陸上植物の発生に関わる遺伝子の相同遺伝子の抽出、系統解析を行い、そのうちどれだけがシャジクモ藻類との共通祖先で存在したかを解明する。また、それぞれの遺伝子が、各生物の1倍体2倍体いずれで発現しているかを解析し、系統解析の結果と合わせ、1倍体から2倍体に流用した遺伝子と2倍体でde novoに獲得した遺伝子を明らかにすることを目的とする。

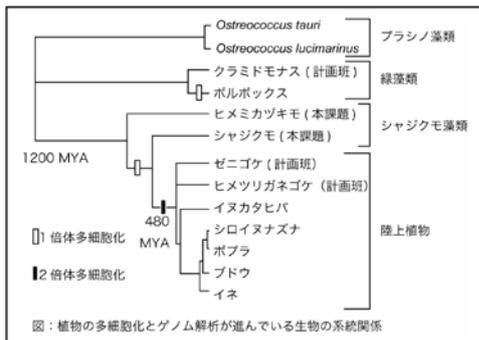
## <2008年度の研究の当初計画>

完全長cDNAライブラリーの作成とESTシーケンス  
両種の完全長cDNAライブラリーを作成する。

ヒメミカツキモについては十型、一型のそれぞれの培養株の通常の条件下及び、有性生殖誘導開始後、受精後減数分裂前の計5条件のライブラリーを作成する (培養 & RNA 調製: 関本)。

シャジクモについては、栄養生殖期の仮根、葉状体と生殖器官受精前、受精後の4ライブラリーを作成する (培養 & RNA 調製: 坂山)。

それぞれのライブラリーから両末端のEST配列を決定する。



決定されたESTはこれまで取得したESTとともにアセンブルし、ヒメツリガネゴケESTと同様 transcript の種類ごとに分類する。この遺伝子配列を、nr データセットに対し類似性検索を行い、データベース化する。結果はデータベースを作成した後、迅速に公開することにより国際的に情報を共有し、他の研究の進展に利用可能とする。さらに、計画班で作成する植物ゲノム統合ブラウザに反映させる。

## ヒメミカツキモ完全長cDNAの全長配列決定

上記ライブラリーから各 transcript について代表クローンを選定し、3' EST と 5' EST がつながらず transcript の代表クローンについて454システムを用いて全長配列を決定する。

各クローンのinsertをvector primerで増幅し混合したサンプルのライブラリーを454システムで配列決定し、得られた配列データを計算機上でアセンブルする。

## 新型シーケンサーを用いた網羅的発現解析

ヒメミカツキモの生殖誘導開始からのタイムコース各ポイントでのmRNA (独立2組) からそれぞれcDNAを合成し、2種類の異なる制限酵素を用いてSolexaで1レーン500万タグずつの配列情報を取得する。平成20年度までに得ているcDNA/genome配列にマッチさせ、どの遺伝子のタグが何回出現するかにもとづき発現プロファイリングを行う。これによって、2倍体特異的に発現するあるいは特異的に発現が消えるという特徴的なパターンを示した因子について各遺伝子特異的プライマーおよびプローブを用いて、リアルタイムPCR法にて確認を行う。

## ゲノム配列決定

ヒメミカツキモのゲノムサイズは約700Mbと推定されている。ヒメミカツキモ十型、一型それぞれのstrainについて454システムで2Xgenome (12 run) ずつの配列を決定し、Solexaで、1kb, 3kb, 10kbのmate pair libraryを2スライドずつ決定する(10Xゲノム)。

以上のデータをあわせてゲノムをアセンブルすることを試みる。

シャジクモのゲノムサイズは約7Gbと推定される。これは、新型シーケンサーを持ってしても直ちに全体を決定するのは困難であるが、ゲノムサイズが大きいのは、repetitive sequenceが多いためと予想される。

そこで、Solexaでfragment libraryをプレート1枚36ntシーケンシングしassembleする。これにより、repetitive DNAについて配列及び、ゲノムのどの程度の割合を特定のrepetitive DNAが占めているかを推定する。メジャーなrepetitive DNAをクロニングし、repetitive DNAをsubtractしたライブラリーの作成

を検討する。

#### <2008年度の成果>

cDNA ライブラリーを作製するステージを検討し、A1 ヒメミカヅキモ NIES-67&68 株 栄養増殖ステージ A2 ヒメミカヅキモ NIES-67 株 (接合型プラス) 性分化誘導ステージ A3 ヒメミカヅキモ NIES-68 株 (接合型マイナス) 性分化誘導ステージ A4 ヒメミカヅキモ NIES-67&68 株 有性生殖誘導ステージ A5 ヒメミカヅキモ NIES-67&68 株 接合子発芽ステージ B1 シャジクモ 栄養増殖ステージ B2 シャジクモ 生殖器官形成直前ステージ B3 シャジクモ 受精直前ステージ B4 シャジクモ 卵胞子 (受精後) ステージを設定した。

ヒメミカヅキモ A1, NIES-66 株及び NIES67 株の栄養増殖ステージの完全長 cDNA ライブラリーを作製し 1 万 9 2 0 0 クローンについて両端からの EST シークエンスを行った。これにより約 3 万 5 千配列の EST が得られた。この配列を以前からえられていた EST とともにアセンブルし 6980 個の contig を得た。

A2, A3 については一度 RNA を抽出したが、cDNA ライブラリー作製で失敗があり、再度生育調整中である。

シャジクモについては、B2, B3 ステージの RNA を抽出完了し cDNA ライブラリー作製中、B1, B4 ステージについて RNA 抽出中である。

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データにもとづいて相同遺伝子推定と系統解析を行ってデータについてイヌカタヒバの全ゲノムアセンブリーと対応させ、ほぼ一致する推定ができていたことを確認するとともに約 1500 のイヌカタヒバ遺伝子についてアノテーションを行った。

#### <国内外での成果の位置づけ>

ヒメミカヅキモについては世界的にユニークな研究リソースとなっている。植物の進化を考える上でも、有性生殖のメカニズムを解明する上でも重要である。

シャジクモについては、進化上最も重要な位置にあって注目される他、電気生理的研究の対象としても研究されており、電気生理の研究者からも注目されている。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

サンプルをとるステージを厳密に検討した結果、ライブラリーを作製するのに必要な量の RNA をとるのに予想以上の時間を要した。

特に B4 の卵胞子については、多糖類が多いためか RNA の収率が悪く、抽出法自身について更なる検討を加える。

ゲノム配列については、大腸菌等での結果から 36 nt の short read だけではアセンブルが当初予定以上に困難であることが予想されたので見合わせ、454 の titanium へのアップデートを待つ事とした。

#### <今後の課題>

全長配列決定について、当初はクロンの PCR 産物をシークエンスする事を計画していたが、平均化 cDNA プールを 454 titanium で直接シークエンスすることによって cDNA 内部までの配列を多数読むことによって、より簡便にかつ多数の mRNA の配列を決定する事が可能となるという着想を得た。この方法を実現するための平均化 cDNA プールとシークエンシング用ライブラリーの調整を進める。

#### <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. 0901121158

Sakakibara, K., Nishiyama, T., Deguchi, H., and Hasebe, M.: Class 1 KNOX genes are not involved in shoot development in the moss *Physcomitrella patens* but do function in sporophyte development, *Evolution & Development*, 10 (5) , 555 - 566 (2008) .