

ミヤコグサとのシンテニーを利用したダイズのゲノム構造の解析

●原田 久也¹⁾ ◆佐藤 修正²⁾

1) 農業生物資源研究所基盤研究部 2) かずさ DNA 研究所植物遺伝子研究部

<研究の目的と進め方>

マメ科はキク科、ラン科と並んで、最も大きな顕花植物群で、約2万種から成っている。マメ科はマメ亜科 (Papilionoideae)、ネムノキ亜科 (Mimosoideae)、ジャケツイバラ亜科 (Caesalpinioideae) に分けられ、主要なマメ科作物やマメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*)、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) はマメ亜科に属している。最近の研究によると、マメ亜科には4つの主要な clade が存在することが示されている。Genistoid clade には *Lupinus* 属植物、aeschynomenoid/dalbergioid clade には ラッカセイ (*Arachis hypogaea*)、hologalegina clade は2つの sub-clade に分割され、一方には *Lotus* 属、他方には *Medicago* 属、ヒヨコマメ (*Cicer arietinum*)、ソラマメ (*Vicia faba*)、エンドウ (*Pisum sativum*) 等を含んでいる。phaseoloid/millettioid clade にダイズ (*Glycine max*) は含まれるが同じ clade に属する他の種と比較して特異な存在である。近縁のインゲンマメ属 (*Phaseolus*) やササゲ属 (*Vigna*) がほとんど $2n=22$ の染色体を持ち、染色体レベルで対応があるのに対して、ダイズやその直接の祖先種であるツルマメ (*Glycine soja*) の染色体は $2n=40$ で、他のマメ科植物との関連は明確ではない。ダイズは倍数体由来の二倍体と考えられており、ゲノム中に重複した領域が散在して、複雑なゲノム構造を持っている。

本研究の目的は、異なる clade に属するが、共通の祖先を持つミヤコグサを基準にして、ダイズのゲノム構造を解明することである。マメ科植物の中でこの特異なゲノムがどのように生じたか、古倍数体から二倍体への進化がどのように行なわれたかを知る手がかりを得たいと考えている。

本研究ではダイズ完全長 cDNA クローン、EST データベース、ミヤコグサの共生関連遺伝子の塩基配列情報から遺伝子座特異的な DNA マーカーを作出して、ダイズの連鎖地図上に位置付け、ゲノム解析の進んでいるミヤコグサの対応するオルソログの座乗位置を同定して、ミヤコグサとダイズの比較地図を作成する。ダイズの遺伝子座特異的な DNA マーカーの作製とマッピング、ミヤコグサのオルソログ探索と比較地図作製を柱として、2つの研究室が協力してダイズのゲノム構造を解明する。

<2007年度の研究の当初計画>

ダイズ遺伝子のマーカー化とマッピング、重複遺伝子の解析および全体のまとめ

ダイズ完全長 cDNA の両末端領域の塩基配列情報、EST データベース、ミヤコグサやタルウマゴヤシの遺伝子情報などを利用して遺伝子特異的なプライマーセットを作出する。PCR 増幅産物の断片長多型、CAPS (PCR-RFLP)、PCR 増幅産物の *Alu I* /*Hae III*、*Apa I* /*Rsa I* 処理による二重消化産物の SSCP を検出することによりマッピングを行う。またミヤコグサとの比較地図によりシンテニーブロックとダイズゲノムの重複領域を同定する。さらに重複領域に存在するいくつかの遺伝子の構造と機能の分化を解析する。

ミヤコグサオルソログの探索と座乗位置同定、比較地図の作製
ダイズで作製された DNA マーカーの基になる塩基配列をミヤコグサ塩基配列データベースに対して検索し、ミヤコグサオルソログを選抜する。選抜されたミヤコグサオルソログが既に配列解析されている TAC/BAC クローンに座乗している場合には、そ

のクローンのマップ情報を指標にして連鎖地図上の位置を把握する。また対応する TAC/BAC クローンが未解析の場合は、これらのクローンの配列解析を行い、マーカーの作製、マッピングを進めることにより、連鎖地図上の位置を把握する。このようにして各マーカーの位置情報を指標として、両者の連鎖地図の対応関係を解析する。またダイズの重複領域に対応するミヤコグサのシンテニーブロックに存在する重要な遺伝子のカタログ化を行う。

<2007年度の成果>

ミスズダイズと秣食豆公503を両親とする組換え近交系を用いて合計433マーカーから成るダイズ連鎖地図が得られた。また小糸在来と船場-3に由来する組換え近交系を用いて合計382マーカーの地図も作製した。完全長cDNAクローンと共生関連遺伝子は前者の地図上に、窒素代謝関連酵素遺伝子と種子特異的転写制御因子のホモログは後者の地図上に位置づけられた。共生関連遺伝子3、完全長cDNA53、窒素代謝関連酵素遺伝子14、種子特異的転写制御因子ホモログ6の位置情報が新たに得られた。これらのマーカーをミスズダイズと秣食豆公503を両親とするF2連鎖地図上(マーカー数1277論文として公表)に統合してシンテニー解析に用いた。一方ミヤコグサの連鎖地図はSSRマーカーにより位置づけられたクローン815、dCAPSマーカーにより位置づけられたクローン80に、これらのクローンとのオーバーラップを確認することにより位置づけられたクローン695を加えて合計1590クローンが位置づけられた。主にダイズ連鎖地図上のマーカーに対するミヤコグサオルソログの位置を同定することにより、301の共通マーカーの位置を決定した。比較地図からミヤコグサに対するダイズのシンテニーブロックは短く切断されていて、倍数体から大きなゲノム再編成により二倍体化されたことを示唆している。比較的長いシンテニーブロックが連鎖群1とL、3とH、4とA1の間に見られたが一般的にはダイズの染色体はシンテニーを示すミヤコグサのゲノム断片のモザイクとなっている。ダイズで位置づけられた共生関連のオルソログはすべてミヤコグサの対応する遺伝子の存在するシンテニーブロックに含まれていた。またダイズの連鎖群A1とA2、A1とK、A2とG、A2とL、A2とM、B1とB2、B2とC1、B2とD1b、C1とC2、D1aとD1b、GとM、IとL、IとN、NとO、LとG、LとI、LとN、NとIの間に重複している領域が存在すること、パラログがゲノム中に散在していることがわかった。Nodファクター受容体遺伝子 *GmNFR1a*、*GmNFR1b* および開花期関連遺伝子 *FT2a*、*FT2b* を含む BAC コンティグの塩基配列を決定して各遺伝子の近傍の配列とミヤコグサのオルソログ周辺の配列を比較したところダイズパラログ近傍とミヤコグサオルソログ近傍で同時に高いマイクロシンテニーがあることが明らかになった。遺伝子のコード領域のアミノ酸配列レベルではダイズパラログ間で85-100%、ダイズとミヤコグサ間で75-90%の相同性があった。この結果からダイズの倍数化は比較的新しいものが含まれていることが示唆された。これらの成果の一部については原著論文として投稿しており、受理される見通しである。*FT2a* は開花期に関わっているが、*FT2b* の機能は未知である。

<国内外での成果の位置づけ>

Boutin ら (1995) は *Vigna radiata* (mung bean, リョクトウ)、*Phaseolus vulgaris* (common bean, インゲンマメ)、ダイズの連鎖地図を比較して、リョクトウとインゲンマメの間では連鎖群全体で高いシンテニーがあるが、ダイズとの間では短い連鎖ブロックでのシンテニーに限られていることを示した。Choi ら (2004) は cross-species gene-specific マーカーを用いて、タルウマゴヤシ ($2n=2x=16$) を中心に *Medicago sativa* (alfalfa, アルファルファ)、ミヤコグサ、*Pisum sativum* (pea, エンドウ)、*Cicer arietinum* (chickpea, ヒヨコマメ)、リョクトウ、インゲンマメ、ダイズとのマクロシンテニーを解析した。さらにダイズとのシンテニーを解析するために新たなマーカーを作出して解析を行なった。このようにして 8 種のマメ科植物の比較地図が作製された。タルウマゴヤシとアルファルファの間ではほとんど完全なシンテニーがあること、エンドウはタルウマゴヤシと比較して 10 倍以上のゲノムサイズがあり、染色体数が異なるにもかかわらず高いシンテニーが保存されていること、タルウマゴヤシとミヤコグサは染色体再配列のため、シンテニーブロックが分断されているが、高いシンテニーが保存されていることが示された。しかしタルウマゴヤシとダイズおよびミヤコグサとダイズの間では、断片的なシンテニーしか認められなかった。Choi らもダイズの多型性が低いために、マーカーのマッピングが十分に行なうことが出来ず、用いたマーカーは未だ非常に少なく、見出されたシンテニーブロックも少ない。我々のマーカー数も十分ではないが、世界的に見てもダイズとミヤコグサのマクロシンテニー解析は最も進んだ段階にある。

Yan ら (2003, 2004) はダイズとタルウマゴヤシの BAC コンティグをハイブリダイゼーションレベルで比較してマイクロシンテニーが高いことを示した。Cannon ら (2003) は *aprase* 遺伝子を含む少なくとも 6 つの遺伝子の順序がダイズとタルウマゴヤシの間で保存されていることを見出した。Choi ら (2004) はダイズの *rhg1* 領域の BAC クローンとタルウマゴヤシの相同な BAC クローンの塩基配列を比較して、14 の遺伝子の順序と向きが保存されていることを報告している。Mudge ら (2005) は *rhg1* 遺伝子と *Rhg4* 遺伝子を含む大規模な塩基配列を解析して、タルウマゴヤシとのマクロシンテニーが高いことを確認した。我々はダイズとミヤコグサの根粒数調節遺伝子 *Nts1/HAR1* 領域、Nod ファクター受容体遺伝子 (*GmNFR1/NFR1*) 領域、開花期関連遺伝子 (*FT2*) 領域の塩基配列を比較して、遺伝子の順序と向きが高く保存されていることを明らかにした。ダイズとミヤコグサのマイクロシンテニーについては今後も多くの領域について解析する予定であり、世界最先端の情報を集積して行きたい。

ダイズと同祖領域についてのマイクロシンテニー解析については、BAC フィンガープリント、cross-hybridization に基づいて解析されている (Marek ら、2001、Foster-Hartnett ら、2002、Yan ら、2003)。塩基配列レベルの解析は N-hydroxycinnamoyl / benzoyltransferase (HCBT) 遺伝子領域 (Schlueter ら、2006)、fatty acid desaturase 2 (FAD2) 遺伝子領域 (Schlueter ら、2007)、LysM kinase 遺伝子領域 (Zhang ら、2007) について行われており、高いシンテニーが確認されている。最近 Schlueter ら (2007) はさらに 11 の BAC クローンの塩基配列を解析して、合計 7 つの同祖領域の比較を行い、マイクロシンテニーのレベルは領域によって異なることを示した。我々は *GmNFR1a/GmNFR1b*、*FT2a/FT2b* を含む BAC コンティグの塩基配列を比較して、この領域ではマイクロシンテニーの程度が非常に高いことを明らかにした。Schlueter らは主に酵素遺伝子領域について解析しているが、我々はダイズの生育に関する重要な遺伝子の周辺について解析している。今後も重要遺伝子領域について解析を進める予定である。

最近わずき DNA 研究所では多数の EST 由来の SSR マーカーを開発して、本研究で用いている組換え近交系集団を用いてマッピングを行った (Hisano ら、2007)。これらのマーカーのマッピングを他の集団でも進めて、より多くの EST を位置づける必要がある。理化学研究所で開発された完全長 cDNA ライブラリーは

cDNA マーカーを作出するためにも極めて優れた資源である。これを利用してダイズの cDNA マーカーを作出して、位置付けていくことも従来どおり進めていく。また USDA では SNP に基づき遺伝子が多数マッピングされたので、その情報も利用できる。これらの情報を統合することにより、ダイズとミヤコグサのマクロシンテニーの全体像が明らかになることが期待される。同時に細胞遺伝学的な解析も必要である。マクロシンテニーはダイズのゲノム構造を解明するだけでなく、ダイズの形質遺伝子のクローニングにも利用することが出来る。既に我々は根粒超着生原因遺伝子 *Nts1* を単離した (Nishimura ら 2002) が、Hwang ら (2006) はダイズモザイクウイルス抵抗性遺伝子 *Rsv4* の単離に向けた研究を展開している。

わずき DNA 研究所では、ミヤコグサゲノムの遺伝子領域の構造解析が進んでおり、断片情報を含めるとミヤコグサ EST のおよそ 9 割をカバーする領域の情報が得られている。アメリカの Soybean Community Coordination は 2003 年にダイズの塩基配列解読の対象を Williams82 と決定した。2006 年にはエネルギー省が農務省と協力してダイズゲノムの解読を開始した。現在すでに 7 倍ゲノムの全ゲノムショットガン塩基配列のアセンブリーを完了している。我が国の農林水産省でも 2007 年度からエンレイを対象としてゲノムの解読を含むダイズゲノムプロジェクトを開始した。これらの塩基配列情報はダイズとミヤコグサのマイクロシンテニー、ダイズの重複領域の詳細な解析に利用することが出来る。基盤研究でダイズ形質遺伝子領域の BAC コンティグの作製と塩基配列解析を行っており、その結果からダイズとミヤコグサのマイクロシンテニーの情報が蓄積されている。ゲノム塩基配列の情報と共にこれらを本研究を補完するものとして利用して行きたい。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ダイズの遺伝子は多型性が低いため、どのようなマーカーを用いても効率的にマッピングすることが困難であった。そのため予定していた新しい遺伝子座の数には到達できなかった。

<今後の課題>

ダイズの複数の分離集団を用いて、EST-SSR、完全長 cDNA の塩基配列、遺伝子の SNP 情報を利用して、できるだけ多くの遺伝子を位置づけてダイズとミヤコグサのマクロシンテニーの全体像を明らかにする。またダイズの BAC クローンとゲノムの塩基配列を利用して、マイクロシンテニーの情報の蓄積を図る。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0801221724

Xia, Z., Tsubokura, Y., Hoshi, M., Hanawa, M., Yano, C., Okamura, K., Ahmed, A.T., Anai, T., Watanabe, S., Hayashi, M. et al.: An integrated high-density linkage map of soybean with RFLP, SSR, STS, and AFLP markers using a single F2 population, *DNA Research*, 14, 257-269 (2007).

2) データベース/ソフトウェア

1. 0801221724

DNA マーカーのプライマー配列、5' 末端塩基配列、マップボジション
www.dnaresearch.oxfordjournals.org