

## 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<sup>1)</sup> ◆佐藤 修正<sup>2)</sup> ◆近江戸 伸子<sup>3)</sup>

1) 農業生物資源研究所 2) かずさ DNA 研究所 3) 神戸大学大学院人間発達環境学研究科

### <研究の目的と進め方>

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。ダイズ(*Glycine max*)は同じ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われたかを知る手がかりを得たいと考えている。

そのため、両種の連鎖地図とゲノム配列情報、ダイズの重要遺伝子近傍の配列情報を利用したシンテニー解析、ダイズと同祖領域の解析、マルチカラーFISH法による染色体レベルでのシンテニー解析により、ダイズのゲノム構造の特性を解明する。

### <2008年度の研究の当初計画>

#### 1. 高精度比較地図によるマクロシンテニーの解析

既に構築した「ミスズダイズ」と「秣食豆公503」を両親とするF2連鎖地図と組換え近交系の連鎖地図を統合して高密度連鎖地図を作製する。この地図に基づき、米国JGIが公表した予備的なダイズゲノム塩基配列のアセンブリーデータとミヤコグサの連鎖地図、ゲノム解読情報を利用した高精度比較地図を作出する。

#### 2. ミヤコグサのTACクローン、ダイズのBACクローンを用いたマルチカラーFISH法によるダイズ染色体の解析

ダイズの若蕾の大きさと花粉母細胞の細胞周期の対応がほぼつかめたので、適当な時期の若蕾から減数分裂期の染色体標本作製する。この標本を用いて、ダイズと同祖領域にあるBACクローンやミヤコグサとダイズのシンテニーブロックに存在するミヤコグサのTACクローンで単一のシグナルを示すことがわかっているものをプローブとしたマルチカラーFISH法を行う。

#### 3. ダイズの重要遺伝子の重複領域およびミヤコグサの相同領域の塩基配列比較

農業上、生物学的に重要なダイズイ遺伝子(多くはパラログが存在する)近傍の塩基配列とミヤコグサとシロイヌナズナオルソログ近傍の塩基配列を比較して、マイクロシンテニーの程度、各遺伝子の相同性と分岐時期の推定を行う。2008年は花の対称性に関わる*GmCYC3a*、*GmCYC3b*、開花期と関連している*GmphyA1*、*GmphyA2*などについて解析する

### <2008年度の成果>

#### 1. 高精度比較地図によるマクロシンテニーの解析

共生関連遺伝子3、完全長cDNA 53、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 Xiaら2007)に統合した。また同じ両親に由来する組換え近交系(RIL)を用いてEST由来のSSRマーカーを中心とした935のマーカーを位置づけ(Hisanoら2007)、全体で1131マーカーから成る連鎖地図を構築した。これら2つの地図の統合を行っているが、まだ終了していない。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。さらにgene spaceの91.3%をカバーするミヤコグサのゲノム塩基配列解読が公表された(Satoら2008)。ダイズではJGIが「Williams 82」のショットガンシーケンスのミスアセンブリーを修正して連鎖地図と対応した塩基配列Glyma1を公表した(<http://www.phytozome.net/soybean>)。これらの情報を利用して、連鎖地図と物理地図の対応、ミヤコグサとダイズの比較地図作製を試みているが、まだ未完成である。

#### 2. ミヤコグサのTACクローン、ダイズのBACクローンを用いたマルチカラーFISH法によるダイズ染色体の解析

ダイズのヘテロクロマチンは各染色体の特定の領域に集中して存在すること、45SrDNAは1対2箇所に存在することがわかった。ミヤコグサの花の対称性に関わる遺伝子のダイズオソログ*GmCYC3a*を含むBACクローンをプローブとして、パキテン期染色体に貼り付けると1箇所に強いシグナル、もう1箇所に弱いシグナルが見られた。同じことが、開花期関連遺伝子*FT2*を含むBACクローン、*FT3*を含むTACクローン、*Nod*ファクター受容体遺伝子*NFR1a*、*NFR1b*を含むそれぞれのBACクローンでも観察された。*GmCYC3a*を含むBACクローンと*GmCYC3a*の同祖遺伝子*GmCYC3b*を含むBACクローンを異なる蛍光色素でラベルしてパキテン期染色体に同時に貼り付けるとそれぞれ同じ領域にシグナルが観察され、一方のシグナルが強いところは他方のシグナルが弱く見かけ上2つのシグナルがはっきりと認められた。同じことが、同祖遺伝子*NFR1a*、*NFR1b*でも観察された。これらのことから、これらの同祖遺伝子は2つずつ存在するが、それらを含むゲノム領域が完全に一致する配列ではないことを示している。また開花期関連遺伝子*FT3*を含むダイズのTACクローンと相同なミヤコグサのTACクローンは同じ位置にシグナルが見られ強弱が逆転していた。一般にミヤコグサのTACクローンはダイズのBACクローンに比較してシグナルが弱かった。

#### 3. ダイズの重要遺伝子の重複領域およびミヤコグサの相同領域の塩基配列比較

根粒着生調節遺伝子*Nts1*とその同祖遺伝子*GmClav1*、開花期関連遺伝子*FT2a*とその同祖遺伝子*FT2b*、ミヤコグサの花の対称性に関わる遺伝子*CYC3*オソログである*GmCYC3a*とその同祖遺伝子*GmCYC3b*、フィトクロム遺伝子*GmphyA2*とその同祖遺伝子*GmphyA1*を含む領域100-200kbの塩基配列を決定して、そこに存在する遺伝子を推定して、マイクロシンテニーの程度、相同性、同祖遺伝子の機能分化、分岐時期の推定を行っている。*GmClav1*の機能は未知であるが、根粒着生や帯化には

関わっていないことがわかった。*FT2b*の機能は未知であるが、開花には関わっていないようであった。*GmCYC3a*、*GmCYC3b*の機能は現在のところわかっていない。*GmphyA2*は日長感応性に関わっているが、*GmphyA1*は日長感応性に関与せず、光形態形成に関わっていることが推定された (Liu ら 2008)。これらの同祖遺伝子を含むダイズの2つの領域、対応するミヤコグサ、シロイヌナズナの相同領域を比較して、マイクロシンテニーが高く保存されていることがわかった。*Nts1/GmClav1*領域から11、*FT2a/FT2b*領域から10、*GmCYC3a/GmCYC3b*から5、*GmphyA1/GmphyA2*領域から6の共通の遺伝子を取り出し、それらの塩基配列、アミノ酸配列から最尤系統樹を作成している。最終的には分岐時期の推定を行う予定である。

#### <国内外での成果の位置づけ>

Yan ら (2003, 2004) はダイズとタルウマゴヤシの BAC コンテイン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イ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着生調節遺伝子 *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、花の対称性に関わる遺伝子 (*GmCYC3a/CYC3a*)、フィトクロム遺伝子 (*PhyA/GmphyA2*) 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。

ダイズの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。我々は上記の遺伝子について同祖遺伝子を見出し、それらを含む同祖領域の遺伝子を推定して、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。

BAC クローンをプローブにした FISH 法を用いて染色体レベルで同祖領域が同定されている (Pagel ら 2004、Walling ら 2006) が大規模な解析は行われていない。

遺伝子重複の時期の推定は EST の同義置換から行われており、最近の重複時期が1400万年前 (Schlueter ら、2004)、330-500万年前 (Blank and Wolfe 2004) と大きな隔りがある。我々はシロイヌナズナをアウトグループとして遺伝子構造の最尤系統樹から分岐時期を推定しようとしている。また同祖遺伝子の機能分化については報告が見当たらない。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

JGI が公表したダイズの連鎖群ごとの塩基配列と連鎖地図を対応させようとするると部分的に順序が逆転している領域が存在する。これがアセンブリーの誤りによるのか、染色体の逆位など品種間差異によるものか判断がつかなかった。農業生物資源研究所では日本品種「エンレイ」のゲノム解読を行っているので、この結果も考慮して解析を進める必要がある。マイクロシンテニーについても、公表された塩基配列を利用しないで BAC クローンの

塩基配列を自ら決定することが必要であると思われる。

#### <今後の課題>

1. 高精度比較地図によるマクロシンテニーの解析  
「ミスサイズ」と「秣食豆公503」を両親とした F2、RIL の連鎖地図を統合する。統合地図を物理地図と対応させ、塩基配列情報の整ったミヤコグサの連鎖地図と比較することにより、高精度比較地図を作製する。
2. ミヤコグサの TAC クローン、ダイズの BAC クローンをを用いたマルチカラー FISH 法によるダイズ染色体の解析  
ミヤコグサの TAC クローンで単一のシグナルを示すことがわかっているものとシンテニーを示すダイズのゲノム領域を同定して、その領域を含むダイズの BAC クローンをスクリーニングしている。今後はこの BAC クローンをを用いて FISH 解析を行い、染色体レベルのシンテニー解析を行う。
3. ダイズの重要遺伝子の重複領域およびミヤコグサの相同領域の塩基配列比較  
開花期に関する *FT3 (GmPhyA4)*、*GmFT* 遺伝子群、伸育性に関わる *Dt1* などを中心に解析する。これらの同祖遺伝子をすでに同定しているので、それらを含む BAC クローンをスクリーニングして今までと同様に塩基配列解析を進める。共通している遺伝子について最尤系統樹を作成して、それまでの解析結果を総合することにより同祖遺伝子の分岐時期を推定する。機能分化については関連する基盤研究などの情報を利用する。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

0806141456

Tsubokura, Y., Onda, R., Sato, S., Xia, Z., Hayashi, M., Fukushima, Y., Tabata, S., and Harada, K.: Characterization of soybean genome based on synteny analysis with *Lotus japonicus*, *Breeding Science*, 58, 157-167 (2008) <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsbbs>

0901042225

Liu, B., Kanazawa, A., Matsumura, H., Takahashi R., Harada, K., and Abe, J.: Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene. *Genetics*, 180, 995-1007 (2008) <http://www.genetics.org>

0901041544

Umezawa, T., Sakurai, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Seki, M., Ishiwata A., Akiyama, K., Kurotani, A., Yoshida, T., Mochida, K., Kasuga, M., Todaka, D., Maruyama, K., Nakashima, K., Enju, A., Mizukado, S., Ahmed, S., Yoshiwara, K., Harada, K., Tsubokura, Y., Hayashi, M., Sato, S., Anai, T., Ishimoto, M., Funatsuki, H., Teraishi, M., Osaki, M., Shinano, T., Akashi, R., Sakaki, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki K.: Sequencing and analysis of approximately 40000 soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library, *DNA Research*, 15, 333-346 [www.dnaresearch.oxfordjournals.org](http://www.dnaresearch.oxfordjournals.org)