

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⁾ ◆篠崎 一雄²⁾ ◆梅澤 泰史²⁾ ◆佐藤 修正³⁾ ◆近江戸 伸子⁴⁾

1) 農業生物資源研究所 2) 理化学研究所植物科学研究センター 3) かずさDNA研究所 4) 神戸大学大学院人間発達環境学研究所

<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。ダイズは四倍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構造、システムがどのように生じたか、四倍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。

<研究開始時の研究計画>

ダイズ完全長cDNAクローンの末端塩基配列解析

ダイズ品種「農林2号」を材料として、低温・塩・低温ストレス、シストセンチュウ感染、根粒菌接種、発芽時の冠水条件、リン酸欠乏条件で採取したRNA、および花芽、登熟種子のRNAをプールして、ピオチン化CAPトラップ法によって完全長cDNAライブラリーを作製した。既に約2万クローンの末端領域塩基配列を決定してあったが、さらにそれらのクローンの解析を進めて、品質の低い配列を除去し、独立クローン数を決定すると共に、新たに2万クローンを選び、両末端塩基配列を決定する。

ダイズのcDNAマーカーの作出とマッピング

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、タルウマゴヤシで単離されている根粒菌・菌根菌との共生に関わる遺伝子の塩基配列情報から特異的なプライマーを設計する。さらに完全長cDNAライブラリーの塩基配列情報、ESTデータベースを基に、窒素代謝と脂質代謝に関する酵素遺伝子および種子特異的転写制

御因子の遺伝子のマーカー化を行ない、同様に連鎖地図上に位置づける。

ダイズの連鎖地図作製

ダイズ品種「ミスズダイズ」と「秣食豆公503」を両親とするF2集団と組換え近交系を用いて連鎖地図を作製したが、さらに完全長cDNAクローンを中心に約200のマーカーを開発することを目標とする。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。

ミヤコグサの連鎖地図作製

ミヤコグサの連鎖地図はGifuとMiyakojimaを両親とするF2集団で作製され、SSRマーカー、dCAPSマーカーを基に1,390のTAC/BACクローンが位置づけられている。本研究では既にダイズ連鎖地図上にあるcDNAマーカーおよび新たに位置づけられる完全長cDNAクローンに対するミヤコグサオルソログを同定してその位置を決定する。

比較地図作製とマクロシンテニー解析

ダイズで作製されたcDNAマーカーの基になる完全長cDNAの塩基配列をミヤコグサ塩基配列データベース(ゲノムおよびEST)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。また選抜されたミヤコグサオルソログに対応するTAC/BACクローンが未解析の場合には、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。このようにして得られた各マーカー及び既に解析済みのマーカーのダイズ、ミヤコグサの連鎖地図上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ことにより、ダイズゲノムとミヤコグサゲノムの間のシンテニー関係を掌握する。

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、ダイズの同祖領域にあるBACクローンやミヤコグサのTACクローンで単一のシグナルを示すクローンとシンテニーを示すダイズのゲノム領域を含むダイズのBACクローンを用いてFISH解析を行い、染色体レベルのシンテニー解析を行う。

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。花の対称性に関わる *GmCYC3a*、*GmCYC3b*、開花期と関連している *GmphyA1*、*GmphyA2*、*FT3* (*GmPhyA4*)、*GmFT* 遺伝子群、伸育性に関わる *Dtl* などについて解析する。これらの同祖遺伝子をすでに同定しているため、それらを含むBACクローンをスクリーニングして

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。

<研究期間の成果>

ダイズ完全長cDNAクローンの末端塩基配列解析

ダイズの完全長 cDNA ライブラリーの 19,436 クローンについて末端領域塩基配列を決定した。品質の低い配列を削除して、19,103(両端 15,019、片端 4,084)が解析の対象になった。スプライズバリエーションを独立と見なすと独立クローンの数は 10,261 となり、重複率は 46.3% であった。独立クローンのアノテーションを行なった。ライブラリーの充実には既存のライブラリーからさらにクローンをピックアップすることで十分に達成できると判断し、新たに 2 万クローンを単離して末端領域塩基配列を決定した。これらの成果は論文として公表した (Umezawa et al. 2008)。

ダイズの cDNA マーカーの作出とマッピング

完全長 cDNA クローンの両端塩基配列から設計したプライマーによる PCR 産物を制限酵素の組み合わせ *Apa* I / *Rsa* I、*Alu* I / *Hae* III で処理後 SSCP 法で多型解析を行なうため、処理条件、泳動条件を検討した。その結果 PCR 産物は変性溶液 (98% formamide、0.01% xylene cyanol、0.01% bromophenol blue、10mM EDTA) に溶解して、95°C、5 分加熱後直ちに氷上に保存すること、電気泳動は非変性不連続電気泳動法 (濃縮ゲル 5% ポリアクリルアミド、Acrylamide : Bis Acrylamide = 30 : 1 0.13M Tris-HCL pH 6.8、分離ゲル 8% ポリアクリルアミド、Acrylamide : Bis Acrylamide = 50 : 1 0.4M Tris-HCL pH 8.8 10% glycerol 泳動用バッファー Tris-Glycine) を用いて 4°C で、200V、7 時間行なうことによりよい結果が得られることがわかった。この手法を CAS-SSCP (cleaved amplified sequence-single strand conformation polymorphism) 法と名づけた。泳動後のゲルは *Vistra Green* で染色して、蛍光イメージアナライザーでバンドを検出するのが効率的であった。この手法を論文として公表した (林・原田 2009)。完全長 cDNA の塩基配列から設計したプライマーで増幅産物が得られたもののうち、CAS-SSCP 法で約 40% が両親間で多型を示した。これらの cDNA はダイズの組換え近交系を用いて、マッピングを行った。またミヤコグサの根粒で強く発現している cDNA クローン 19 を RFLP 法により同じ組換え近交系を用いてマッピングした。

ダイズの連鎖地図作製

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 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 (マーカー数 1277) に統合した (Xia et al. 2007)。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 et al. 2007)、全体で 1131 マーカーから成る連鎖地図を構築した。

ミヤコグサの連鎖地図作製

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 1304、dCAPS マーカーにより位置づけられたクローン 82、SNP マーカーにより位置づけられた 125 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 674 を加えて合計 2185 クローンが位置づけられた。

比較地図作製とマクロシテニー解析

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。これらの結果は論文として公表した (Tsubokura et al. 2008)。ミスズダイズと秣食豆公 503 に由来する RIL の連鎖地図を基準にして、ミヤコグサの塩基配列情報を利用して比較地図を作製した。F2 連鎖地図を用いた結果と大きな違いはないが、ダイズの塩基配列を利用したより精度の高い比較地図が必要である。

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 箇所が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ーソログ *Gmcy3a* を含む BAC クローンをプローブとして、パキテ期染色体に貼り付けると 1 箇所強いシグナル、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。*Gmcy3a* を含む BAC クローン と *Gmcy3a* の同祖遺伝子 *Gmcy3b* 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。

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*、Nod ファクター受容体遺伝子、*GmNFR1a*、*GmNFR1b*、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* オーソログである *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た。*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、マイクロシテニーが高く保存されていることがわかった。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

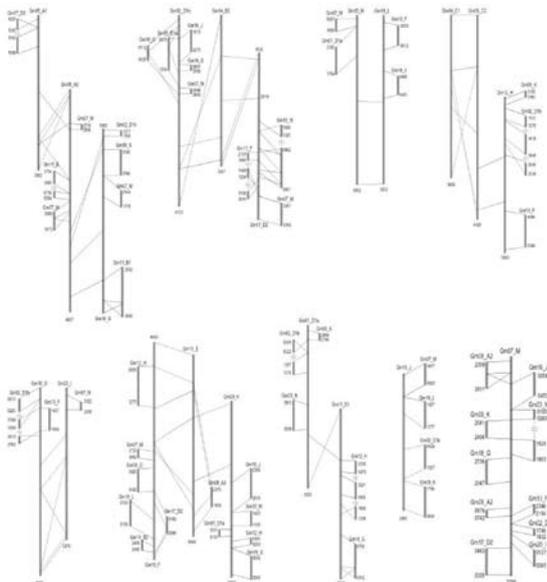


図1. ダイズの同祖領域

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公表した (Tsubokura et al. 2008)。ダイズのFTオーソログである*GmFT*については、タンデムに並んだ*GmFT1A*と*GmFT1B*が存在する領域がタンデムに並んだ*GmFT6A*、*GmFT4A*が存在する領域が高いマイクロシテニーを示した。*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、それらおよびミヤコグサとシロイヌナズナのオーソログの塩基配列、アミノ酸配列からベイズ推定により最尤系統樹を作成した。遺伝子重複の相対的な時期の分布は狭い範囲にピークが見られた。Williams82のゲノム塩基配列から同祖領域を探索したところ、領域の大きさは最大約12.4MBにわたっていることがわかった (図1.)。同祖領域の分布は極めて複雑でダイズゲノムは複数の倍加と再編成を経て形成されたと考えられる。上記の遺伝子重複の時期は最も新しいものに相当すると推定される。

<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テニーに限られていることを示した。Grant ら (2000) はダイズのA2連鎖群と *Arabidopsis* の第1染色体がほぼ全領域にわたってシテニーがあることを示した。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 $2n=4x=32$)、ミヤコグサ ($2n=2x=12$)、*Pisum sativum* (pea、エンドウ $2n=2x=14$)、*Cicer arietinum* (chickpea、ヒヨコマメ $2n=2x=16$)、リョクトウ ($2n=2x=14$)、インゲンマメ ($2n=2x=22$)、

ダイズ ($2n=4x=40$) の間のマクロシテニーを解析した。さらにダイズとのシテニーを解析するために新たなマーカーを作成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、シテニーブロックが分断されているが、高いシテニーが保存されていることが示された。一方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、断片的なシテニーしか認められなかった。Choi もダイズの多型性が低いため、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、見出されたシテニーブロックも小さい。我々は301の共通マーカーを用いてダイズとミヤコグサのシテニー解析を進展させた (Tsubokura et al. 2008)。 *Arabidopsis* との比較結果は意外であるが、これらの研究の共通する結果はダイズは他のマメ科植物と比較するとシテニーブロックが分断されていることである。マクロシ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。

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テニーが高いことを示した。Cannon ら (2003) は *apyrase* 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、マクロシ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業 (subfunctionalization) については報告が見当たらない。

かずさ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、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.)。それらの位置情報の解析も進んでおりダイズの配列情報を利用したオルソログの位置情報検索が可能となっている。また同研究所では多数の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。その結果をミヤコグサとのシンテニー解析に利用して本研究でははっきりしなかったミヤコグサの連鎖群5とダイズの連鎖群0の間で比較的長いシンテニーブロックがあることなどが明らかになった。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。

理化学研究所で開発された完全長cDNAライブラリーは大変高品質なものであり、ダイズゲノム研究の種々の場面で利用されることが期待されるが、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。また完全長cDNAの情報はアメリカのWilliams 82のゲノム解読のアノテーションにも貢献した。

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。2005年に開始されたNSFのプロジェクトでは、ESTのマッピングにより連鎖地図と物理地図の統合を行い、反復している同祖領域を同定して、塩基配列解析に基づいてダイズの進化を解明することを目的にしている。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。2008年1月には予備的なアセンブリーとアノテーションの結果を公表し、2008年11月には連鎖群に対応したバージョン (Glyma1.0) を公開した。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。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

基本的にはダイズの塩基配列の多型性が低いことが障害になるが、予想以上にcDNAマーカーの作出の効率が低かった。

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ため、この結果も考慮してマクロシンテニー解析を進める必要がある。マクロシンテニーについてもBACクロンの塩基配列を自ら決定することが必要である場合があると思われる。

<今後の課題、展望>

高精度比較地図によるマクロシンテニーの解析

ダイズの高精度連鎖地図を塩基配列情報のある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。ダイズの正確な塩基配列が前提となるので、今後もそれを得るための努力が必要である。

同祖遺伝子の同定、分岐時期の推定、機能分業の解析

開花期に関する*FT3(GmPhyA4)*、伸育性に関する*Dt1* やその他の形態形成に関わる遺伝子を同定してそれらの同祖遺伝子を解析する。遺伝子の同定は主にマップベースクロニングに基づいて

行う。対象とする遺伝子が存在する領域に共通して存在する遺伝子について最尤系統樹を作成して、これまでの解析結果と統合することにより同祖遺伝子の分岐時期を推定する。機能解析はTILLING法による変異体の探索・解析、RNAiによる発現抑制などにより行う。ダイズは同祖遺伝子の機能分業を解析するのに適した植物種である。

ダイズの祖先種、近縁種のゲノム解読

ダイズの祖先種はインゲンマメ属やササゲ属のように $n=11$ の2倍体であったと推定されている。1対の染色体が失われて後に倍加が起こり、ゲノムの再編成が起こったと考えられている。トルマメ (*G. soja*) や *Glycine* 亜属の植物が現在確認されている近縁野生種であるが、それ以前の祖先種については確認されていない。東南アジアでは *Glycine* 属に近いと考えられる植物が見つかってきているので、それらの中から祖先種に近いものを探索して、ゲノム解読が出来れば、ダイズの進化について新たな知見が得られると期待出来る。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

0911231216

林 正紀・原田久也: ダイズにおけるPCRベースのDNAマーカー開発へ向けたPCR-RF-SSCP法の適用、DNA多型、17,66(2009) 0911250551

Bertioli DJ, Moretzsohn MC, Madsen LH, Sandal N, Leal-Bertioli SC,

Guimaraes PM, Hougaard BK, Fredslund J, Schausser, L, Nielsen AM

Sato, S, Tabata S, Cannon SB, Stougaard J., An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes, BMC Genomics. 10,45. (2009)

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>

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>

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., Osa

ki, 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 (2008) www.dnaresearch.oxfordjournals.org

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) 学会発表

原田久也 ダイズゲノム研究 第46回ガンマーフィールドシンポジウム 2007年7月

原田久也 ダイズゲノム研究の動向と我が国における取り組み第3回ダイズ研究会 2006年12月

佐藤修正・金子貴一・中村保一・清水恵理香・加藤友彦・田畑哲之 ミヤコグサゲノム解析の最新情報リソース ミヤコグサ・ダイズバイオリソースワークショップ 理化学研究所横浜研究所 2005年11月

梅澤泰史 ダイズ完全長cDNAリソースの基盤整備と今後の展開 ミヤコグサ・ダイズバイオリソースワークショップ 理化学研究所横浜研究所 2005年11月

原田久也・佐藤修正 ミヤコグサとダイズのマクロ・マイクロシテニー ミヤコグサ・ダイズバイオリソースワークショップ 理化学研究所横浜研究所 2005年11月