

倍数性コムギの比較機能ゲノム解析

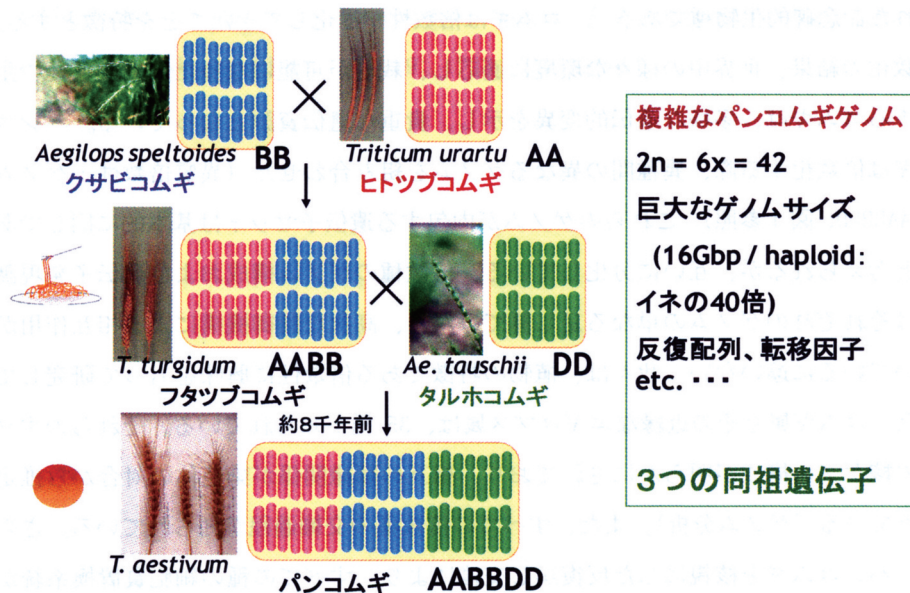
Comparative functional genomics of common wheat

萩 原 保 成

(横浜市立大学木原生物学研究所)

1. はじめに

植物は、遺伝学の発展に多くの貢献をしているが、コムギはゲノムの概念が確立された記念碑的生物種である¹⁾。コムギは倍数性で進化してきたことを特徴とする。倍数化の結果、世界中の様々な環境に適応し、栽培が可能になった。世界各地で生育するコムギは、多様な遺伝的変異を示し、貴重な遺伝資源となっている。パンコムギは倍数化する際、異種間の異なるゲノムを組み合わせた（異質倍数性：ゲノム式AABBDD、図1参照）。これらのゲノムが内包する遺伝子セットは基本的に同じであると考えられるが、互いに分化している。倍数種のゲノム構成および遺伝子発現調節はそれぞれのゲノムの単なる足し算ではなく、高次な制御機構による相互作用が働いているに違いない。我々は、植物の特徴である倍数性に興味をもって研究してきた。コムギ属とその近縁なエギロプス属は、35種が知られている。それらのすべての核ゲノム構成が明らかにされており、相互の類縁関係が染色体の対合から推定されている（ゲノム分析）。また、すべての倍数種の交雑過程が知られている。さらに、パンコムギを核親にした反復戻し交雑により、すべての種の細胞質置換系統が作出され、細胞質ゲノムのパンコムギに及ぼす形態的・生理的形質が詳細に解析されている²⁾。これらの遺伝的効果をもたらす細胞質ゲノム（プラズモン）の分子的基礎として、それぞれの細胞質に含まれる葉緑体DNAとミトコンドリアDNAの制限酵素断片（RFLP）分析により、葉緑体ゲノム（プラストーム）とミトコンドリアゲノム（コンドリオーーム）のタイプが特徴づけられ、相互の類縁関係が推定されている^{3)・4)}。このような生物種は、他に類をみない。従って、コムギ・エギロプス属植物は、倍数性を研究する上で、モデル植物となると思われる。しかし、ムギ類は、ゲノムサイズが巨大であるため（各ゲノムともイネの約10倍、図1）、まず発現遺伝子（Expressed sequence tags: EST）の大量解析（トランスクリプトーム解析）に集中した。



コムギは異質倍數性により進化してきたことを特徴とする。コムギのゲノムサイズは巨大で多くのジャンクDNAを含む。

図1 異質倍數性によるコムギの進化とコムギゲノムの特徴

2. コムギにおけるトランスクリプトーム解析

2. 1 発現遺伝子の大量解析

コムギの生活環の代表的な18組織、および非生物的ストレスをかけた23組織、生物的ストレスをかけた4組織からそれぞれcDNAライブラリを構築し、cDNAクローンの両側から塩基を決定した（都合約90万シークエンスがえられている）。これらの塩基配列をCAP3/phrap法にて整列化した。パラメーターを設定し、整列化したそれぞれのcontigは各ゲノムから発現した遺伝子（同祖遺伝子）に相当するバイオインフォマティクス手法を開発した。現在、収集したコムギの発現遺伝子は遺伝子総数の90%以上をカバーしているとい積もっている。これらのcontigのうちから比較的発現量の多いものを選抜し、遺伝子の発現頻度に基づいてコムギの各組織・処理におけるボディーマップを作成し⁵⁾、*In silico*で解析できるようにした。生物的⁶⁾・非生物的ストレス⁷⁾に応答する遺伝子を体系的にコンピューター上で解析できる（図2）。これは、パンコムギにおける環境に応答した種々の組織における遺伝子発現を*In silico*で研究する貴重な遺伝資源となっている。

また、これらのESTを整列化し、約3万8千のコムギ遺伝子を登載したcDNAマイクロアレイを作成した。このDNAマイクロアレイを塩に応答する遺伝子の発現解析に応用して耐塩性に関連する遺伝子を体系的に解析し、コムギにおける塩応答遺伝子の発現パターンの特徴を明らかにした^{8),9)}。

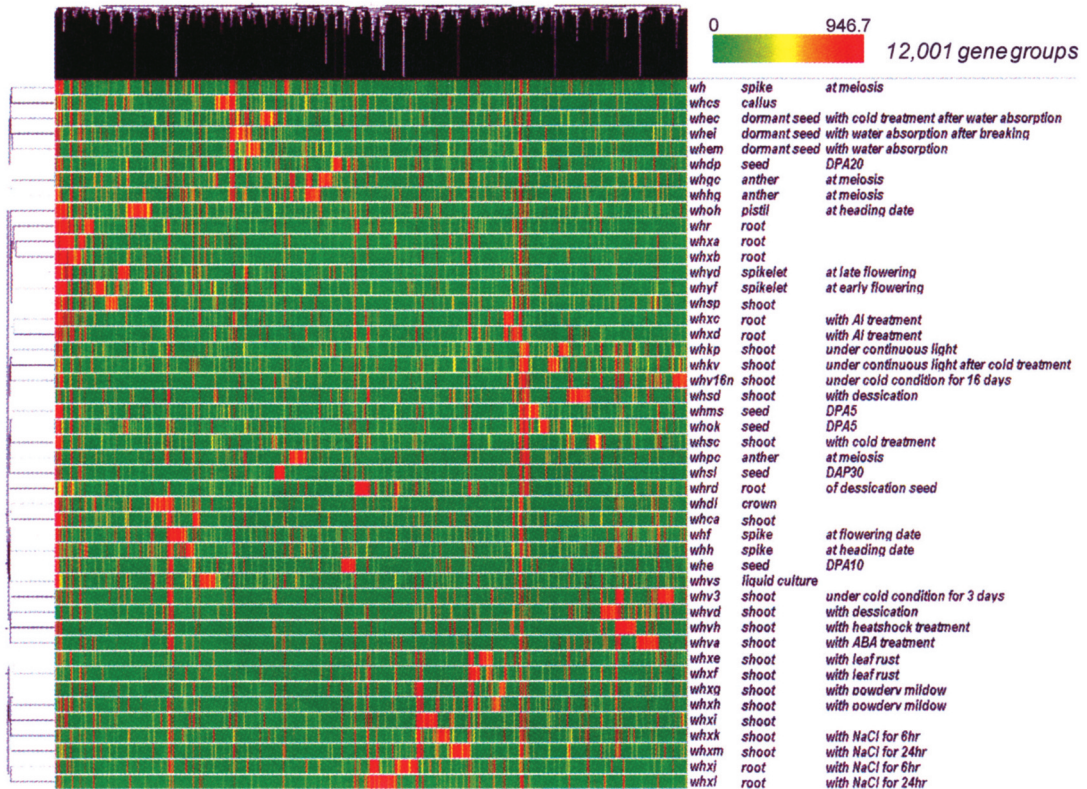


図2. コムギ組織の全体的な発現遺伝子ボディマップ2): 生物的・非生物のストレスを処理した組織を含む

2. 2 同祖遺伝子のゲノム別発現様式

パンコムギの発現遺伝子のうち、比較的発現量の多い5199遺伝子のcontigの相同性解析により、全体の約45%の遺伝子が3種類のゲノムのうち、1つのゲノムからのみ発現していると推定した。6倍体のパンコムギでこれらの遺伝子は2倍体のように発現している(図3)。そこで、1ゲノム、2ゲノム、3ゲノムから発現している、都合113遺伝子についてそれぞれの同祖遺伝子の帰属染色体を決定した。また、ESTデータベースと対応させることにより、各組織におけるゲノム別発現パターンを明らかにした。3種類すべてのゲノムから発現している遺伝子は、7本の相同染色体に偏りなく存在していた。一方、2ゲノム、1ゲノムから発現している遺伝子は、Aゲノム由来の同祖遺伝子の発現が抑制される傾向がみられた¹⁰⁾。

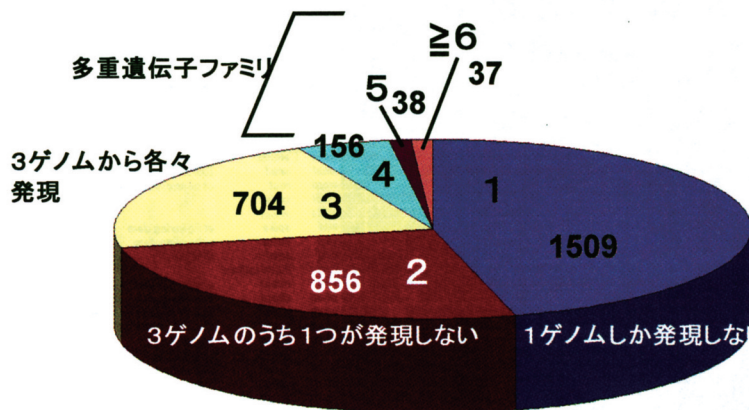


図3. 3種ゲノムに座乗する同祖遺伝子の発現プロフィール
生活環の10組織で発現する比較的転写量の多い3300同祖遺伝子に関して
発現パターンを調べた。約半数の遺伝子が一つのゲノムしか発現していない。

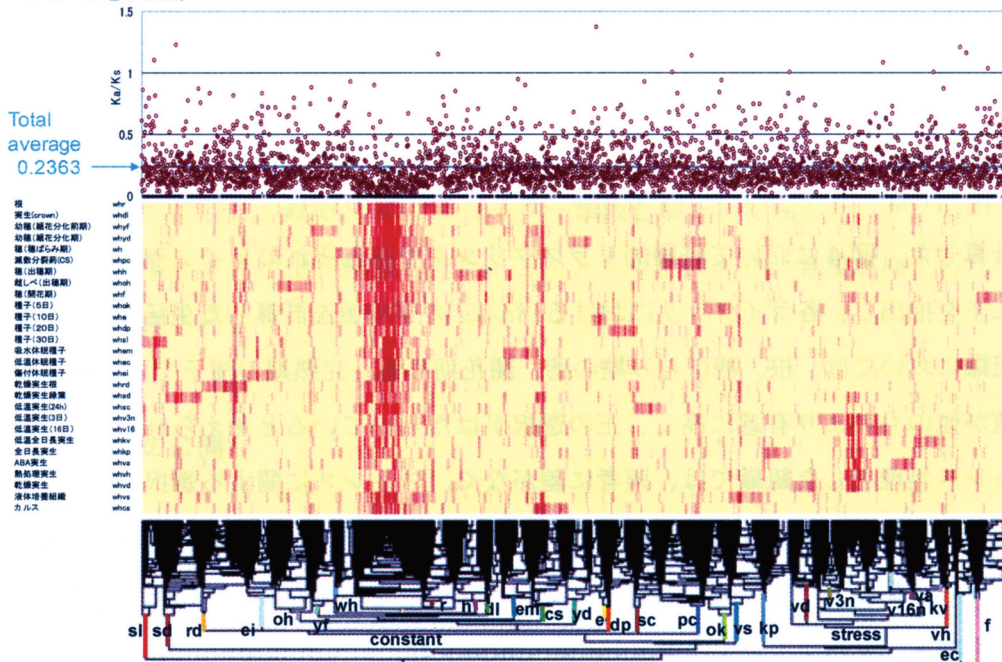
3. 完全長cDNAシーケンスを用いたコムギの比較ゲノム解析

コムギとイネは同じイネ科に属しているが、生育特性・穂の形態・日長感性など対照的な表現型を示す。コムギとイネの生育環境における自然淘汰とその後の栽培過程における人為淘汰の結果、どのような遺伝子に選抜がかかったかをパンコムギにおける完全長cDNAライブラリを構築して遺伝子全長の推定アミノ酸をイネと比較することにより解析した¹¹⁾。

パンコムギの生活環における代表的な組織、非生物的なストレスをほどこした組織、都合17の組織から全RNAを抽出し、これらを混合して出発材料としてCAP-Trapper法により完全長cDNAライブラリを作成した。作成した完全長cDNAライブラリから約2万のcDNAクローンを任意に抽出し、挿入断片を両側から塩基配列を決定した。これらの塩基配列をグループ化すると7149の遺伝子クラスターに分類できた。このうち、6162の独立な遺伝子について挿入断片を完全解読した。全ゲノムの塩基配列が決定されているイネの予測遺伝子と相同性を検索してみると ($e < 1e^{-10}$)、約8%のコムギ遺伝子がイネにヒットしなかった。残りの相同性のあるコムギ遺伝子をGene Ontology (GO) により機能を予測してみると、GOの機能分類のパターンがイネ、およびシロイヌナズナのそれに類似していた。このことにより、コムギ遺伝子のイネとの比較が可能であると考えられる。イネと対応するオーソログであると考えられる4321コムギ遺伝子の発現パターンを調べるため、上記35,604遺伝子クラスターと相同性を検索した ($e < 1e^{-60}$)。その結果、3487コムギ遺伝子がイネのオーソログであり、遺伝子

図4 イネとの対応関係があるコムギ遺伝子の発現プロファイル

イネとオーソローガスなコムギ遺伝子の塩基置換率(Ka/Ks)を計算し、その遺伝子の28の組織／処理区における発現パターンを示した。



発現パターンを28組織／処理において解析可能であった (図4)。また、3487遺伝子に関して、イネのオーソログと塩基置換率 (Ka/Ks) を計算した。図4において階層的クラスタリングでそれぞれのライブラリに属する遺伝子を抽出し、各ライブラリにおける Ka/Ks の平均値を計算した生活環の代表的な組織においては、根、穂ばらみ期の穂、開花期の穂、完熟期の種子で Ka/Ks の平均値が他のものより有意に高く、正の選択がはたらいていると考えられる。一方、ストレス処理をした組織では、両者に差がなく、ストレスに関する選択ははたらいていないものと推察される。生理特性として、根は乾燥／冠水、穂ばらみ期の穂は減数分裂／配偶子形成、開花期の穂は開花／受粉、完熟期の種子は休眠／発芽に関係しており、コムギ・イネの淘汰がかかる遺伝子群として興味深い。

これまで、パンコムギ完全長cDNAライブラリーを構築して、都合、独立な約1万5千遺伝子を完全解読した^{11), 12)}。この配列は、国際コムギゲノムシーケンシングコンソーシアムに提供し、遺伝子領域の予測に活用されている¹³⁾。

4. 倍数化によるゲノムシャッフリング

前述のようにコムギは異なるゲノムをもつ種が交雑・倍数化して進化してきた。異なる種のゲノムが遭遇する雑種では、ゲノムシャッフリングがおこることが推測される。比較的転写量の多い遺伝子について3種ゲノムの使い分けを調べてみると(図3)、約半数の遺伝子が一つのゲノムしか利用していない。利用されていないゲノムの遺伝子には、ジェネティックな変化とエピジェネティックな制御が考えられる。

4. 1 ジェネティックな変化

ジェネティックなシャッフリングの変化としては、転位因子等のゲノムの不安定性をもたらす因子の作用と偶発的な構造変化があるだろう。Chantretら¹⁴⁾はコムギの種子硬軟質性に関与するピュロインドリノ遺伝子の構造を解析し、AゲノムとBゲノムの両者の同遺伝子が4倍体が形成された際、トランスポゾンの作用により、欠失したことを示した。一方、シロイヌナズナのCONSTANSに相同なコムギTaHd1遺伝子は、第1エクソンの欠失がBゲノムに、第1イントロンでの挿入がAゲノムでみられる¹⁵⁾。Bゲノムの欠失は4倍体が形成された際、生じたが、欠失近傍領域に特徴的な構造変異がみられないことから偶発的な変異と考えられる。Aゲノムの挿入は、倍数化によって変化せず安定である。

4. 2 エピジェネティックな制御

花器官形成過程ではたらくA, B, C, D, EモデルのEクラスに属するコムギのWLHS1の構造を調べたところ、構造変異はみられなかったが、Bゲノム由来のWLHS1bの発現が抑えられていた。WLHS1bのプロモーター領域を解析してみると、ゲノムのプロモーター領域にメチル化が観察された。このメチル化により、発現が抑えられているものと推測される¹⁶⁾。

5. データの公開

上述のパンコムギのクローン、配列情報は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)の支援を受けて、国立遺伝学研究所にあるNBRP・コムギのサイトから公開され、ユーザーの求めに応じて提供している。

6. おわりに

パンコムギのESTの大量解析により、コムギの発現遺伝子を網羅できるようになってきた。また、完全長cDNAの解析により、比較ゲノム科学的に有用な塩

基配情報が供給されている。

パンコムギは、6倍体であるため、特にDNAマーカーの開発に苦勞する。是非とも全染色体にわたるゲノム配列情報が必要となっている。この状況下、国際コムギゲノムシーケンシングコンソーシアム (IWGSC) が中心になって、国際分担で21対の染色体DNAの塩基配列を決定するプロジェクトが進行している。日本では、国内コンソーシアムにより、6B染色体を分担している。6B染色体の構造解析により、コムギ染色体の特徴を解明するとともに、国際協力により、コムギゲノムの全貌を明らかにして、ゲノム育種に活用することを希望している。

本研究は、主に、横浜市立大学木原生物学研究所で行われたものである。これらの研究の遂行は、基礎的な研究活動とそれを支える協力があって初めて可能となった。直接・間接的に支援していただいた教員、学生、技術員また関係する方々に深く感謝の意を表したい。

引用文献

- 1) Kihara, H.: Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. Cytologia 1: 263-284 (1930)
- 2) Tsunewaki, K.: Genome-plasmon interactions in wheat. Jpn. J. Genet. 68: 1-34 (1993)
- 3) Ogihara, Y. and K. Tsunewaki: Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. Theor. Appl. Genet. 76: 321-332 (1988)
- 4) Terachi, T., Y. Ogihara and K. Tsunewaki: The molecular basis of genetic diversity among cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops*. 7. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNAs from polyploidy wheats and their ancestral species. Theor. Appl. Genet. 80: 366-373 (1990)
- 5) Ogihara, Y., K. Mochida, Y. Nemoto, K. Murai, Y. Yamazaki, T. Shin-I and Y. Kohara: Correlated clustering and virtual display of gene expression patterns in the wheat life cycle by large-scale statistical analyses of expressed sequence tags. Plant J. 33: 1001-1011 (2003)
- 6) Manickavelu, A., K. Kawaura, K. Oishi, T. Shin-I, Y. Kohara, N. Yahiaoui, B. Keller, A. Suzuki, K. Yano and Y. Ogihara: Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines in common wheat infected by *Puccinia triticina*. DNA Res. 17: 211-222 (2010)
- 7) Mochida, K., K. Kawaura, E. Shimosaka, N. Kawakami, T. Shin-I, Y. Kohara, Y. Yamazaki and Y. Ogihara: Tissue expression map of comprehensive expressed sequence tags and its application to *in silico* screening of stress response genes in common wheat. Mol. Genet. Genomics 276: 304-312 (2006)

- 8) Kawaura, K., K. Mochida, Y. Yamazaki and Y. Ogihara: Transcriptome analysis of salinity stress responses in common wheat using a 22k oligo DNA microarray. *Funct. Integr. Genomics* 6: 132-142 (2006)
- 9) Kawaura K., K. Mochida, Y. Ogihara: Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. *Funct Integr Genomics*. 8: 277-286 (2008)
- 10) Mochida, K., Y. Yamazaki and Y. Ogihara: Discernment of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Mol Genet. Genom.* 270: 371-377 (2003)
- 11) Kawaura, K., K. Mochida, A. Enju, Y. Totoki, A. Toyoda, Y. Sakaki, C. Kai, J. Kawai, Y. Hayashizaki, M. Seki, K. Shinozaki and Y. Ogihara: Assessment of adaptive evolution between wheat and rice as deduced from the full-length cDNA sequence data and the expression patterns of common wheat. *BMC Genomics* E. Pub. June 18, 2009; 10: 271
- 12) Ogihara, Y., K. Mochida, K. Kawaura, K. Murai, M. Seki, A. Kamiya, K. Shinozaki, P. Carninci, Y. Hayashizaki, T. Shin-I, Y. Kohara and Y. Yamazaki: Construction of a full-length cDNA library from young spikelets of hexaploid wheat and its characterization by large-scale sequencing of expressed sequence tags. *Genes & Genet. Syst.* 79: 227-232 (2004)
- 13) Mochida, K., T. Yoshida, T. Sakurai, Y. Ogihara and K. Shinozaki: TriFLDB: A database of clustered full-length coding sequences from Triticeae with applications to comparative grass genomics. *Plant Physiol.* 150: 1135-1146 (2009)
- 14) Chantret, N., J. Salse et al.: Molecular basis of evolutionary events that shaped the Hardness locus in diploid and polyploidy species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* 17: 1033-1045 (2005)
- 15) Nemoto, Y., M. Kisaka, T. Fuse, M. Yano and Y. Ogihara: Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice. *Plant J.* 36: 82-93 (2003)
- 16) Shitsukawa, N., C. Tahira, K. Kassai, C. Hirabayashi, T. Shimizu, S. Takumi, K. Mochida, K. Kawaura, Y. Ogihara and K. Murai: Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat. *Plant Cell* 19: 1723-1737 (2007)