

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 3 月 31 日現在

機関番号：82508

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26650139

研究課題名(和文)数億年の進化の時を経てゲノムが会おうとどうなるか？

研究課題名(英文)What happens when a plant genome meets with other genome?

研究代表者

柴田 大輔 (SHIBATA, DAISUKE)

公益財団法人かずさDNA研究所・バイオ研究開発部・部長

研究者番号：10370925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：4億年前にコケ類から進化してきた高等植物シロイヌナズナのゲノムDNA断片100kbpをコケ類ゼニコケに遺伝子導入して発現を調べた。ゼニコケとしては、光応答性を欠損した変異株を用い、導入するシロイヌナズナ遺伝子として、カウンターパートと考えられる光応答性遺伝子を含むシロイヌナズナのゲノムDNA断片(12遺伝子を含む)を用いた。その結果、ゼニコケの光応答性が回復した。この結果は、ゼニコケがシロイヌナズナ遺伝子を認識し、転写したことを示している。

研究成果の概要(英文)：A genomic DNA fragment of *Arabidopsis thaliana* (~100 kbp, containing 12 genes) was introduced into a photoreceptor mutant of *Marchantia polymorpha* L, which diverged 400 million years ago. The transformed *Marchantia polymorpha* recovered the deficiency of photo reception. The result indicates that the *M. polymorpha* still recognizes the *Arabidopsis* gene.

研究分野：バイオテクノロジー

キーワード：ゲノム進化

1. 研究開始当初の背景

近年の急速なオミクス解析の進展により、植物ゲノムの進化研究も新たな局面に入っているが、幾つかの課題に直面している。主な植物種のゲノム解読が進み、また、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析も一般化し、また、最近では、次世代シーケンサーを使った RNA 発現解析(以下、RNA-Seq 法)が高精度かつ比較的安価に行なえるようになり、遺伝子発現レベルでの植物種間の差異が容易となってきた。その結果、網羅的な遺伝子発現解析によるデータの集積によって、個々の遺伝子間の発現相関のデータベース化が進み、類似の遺伝子発現パターンと転写開始点上流の塩基配列との相関性研究が進み、転写制御エレメントの予測が研究され、比較ゲノム研究が進展している。それらにより、共通祖先をもつ生物種間での遺伝子発現の相違をコンピュータ解析によって比較検討する研究が盛んに行われている。一方で、進化的な相違点を実験的に検証することは容易ではない。例えば、ある遺伝子 A のプロモーター領域をレポーターに接続して、共通祖先をもつ生物種に遺伝子導入する場合を考えると次の問題点に直面する；1)そもそも、どこからどこまでがその遺伝子領域であり、プロモーターであるのかが自明ではない、また、2)そのレポーター遺伝子が挿入された染色体領域の環境から受ける影響(染色体上の位置効果)を排除することが困難である。最近、代謝系の遺伝子においては、真核生物においても、その代謝に関係する遺伝子が近傍に配置している例が知られるようになったが、そのような進化的関係は単一のプロモーター+レポーター遺伝子の仕組みでは解明できない。また、個々の遺伝子のプロモーター領域配列をレポーター遺伝子に接続し、遺伝子導入によって検証することは理論的には可能であるが、導入遺伝子(Transgenes)は導入された染色体上の位置の効果によって発現が大きく変化することが知られているので、それらの影響を考慮した結論を得るためには、一つの遺伝子プロモーター領域毎に多くの形質転換体を精査することが必要となり、大規模に検証していくには相当な労力が必要となる。

私たちは、ゲノム進化の様相を探るための実験的な手段として、「長鎖ゲノム DNA 断片を用いて、進化した子孫同士を“対面させる”」という斬新な方法論を提案している。つまり、ゲノムが解読されている生物から長鎖ゲノム断片(100kbp 前後)を調製し、それを数億年ほど前に分化した生物種に遺伝子導入し、挿入した生物での遺伝子発現を調べることによって、その数億年の間に起った塩基配列の変化を探ろうという手法である。

私たちは、長鎖ゲノム断片をそのまま遺伝子導入できるバイナリーベクター-TAC を開発し、シロイヌナズナの約 100kbp のゲノム断片を組み込んだライブラリーを作製した

(Liu et al., PNAS, 1999, Shibata & Liu, Trends in Plant Science, 2000)。これまでの私たちの予備的な研究で分かったことは、アブラナ科シロイヌナズナの複数のゲノム断片(80~100kbp)を、1億5000万年前にアブラナ科と分化したナス科トマトに遺伝子導入したところ、多くのシロイヌナズナ遺伝子において、葉と根の発現特異性がトマトで保存されていたが、幾つかの遺伝子では保存性が失われていた。これらの結果は、植物ゲノム進化を探るための斬新な実験手法として使える可能性を示している(以下では、この手法を「長鎖ゲノム DNA 断片対面法」と称する)。

本研究では、海から陸上に這い上がった時代の姿を残すコケ類にこの実験系は適用できるのだろうか？もし出来るとすれば、高等植物の進化の謎に実験レベルで迫れるのではないかと発想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、進化的に相当に離れたゲノム配列を“実験的に対面させる”という斬新な発想のもとで、4億年ほど前に共通の先祖を持っていた下等植物ゼニゴケと高等植物シロイヌナズナを研究対象として、後者のゲノム断片をゼニゴケ内で“対面させる”ことによって、4億年たっても認識される共通の痕跡を探る実験系を構築する。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの長鎖ゲノム断片を含む形質転換可能な TAC クローンの両端の DNA 配列を解読し、それらをシロイヌナズナゲノム配列と比較することにより、各クローンのゲノム上での位置を決定した。これらの情報を視覚化するために、コンピュータプログラムを作成して、どの位置においてもクローン情報を得られるように工夫した。また、シロイヌナズナ遺伝子との関連性がわかるように工夫をした。本研究にあたっては、明治大学の矢野健太郎准教授の協力を得て、ブラウザーを構築した。

京都大学大学院生命科学研究科の河内孝之教授の協力を得て、ゼニゴケとシロイヌナズナのゲノム配列を比較して、形態形成や代謝にかかわる多様な遺伝子群の進化的相違(ホモログの分類)を配列レベルおよび遺伝子発現レベルで明らかとする。次に、それらの中から候補遺伝子群を選び出し、それらを含むシロイヌナズナ TAC クローン(平均 80kbp)を選抜し、ゼニゴケに遺伝子導入する。得られた形質転換体の形質や遺伝子発現を解析して、“ゲノムを対面させる”実験系として利用できるかどうかを検証した。形質転換体の作製は、河内研究室にて実施した。

形質転換体の遺伝子発現は、RNA-seq 法を用いた網羅的解析によって行った。また、導入した遺伝子発現などの確認は、RT-PCR 法を用いて行った。

4. 研究成果

シロイヌナズナの長鎖ゲノム断片を含む形質転換可能な TAC クローンの端配列に基づいて、それらのゲノムの位置を染色体上に配置したビューワーTACViewer を作成した。これに関する論文を発表した (Hirose et al., *Plant J* 2015)。この研究によって、シロイヌナズナ染色体の 90% 以上を TAC クローンでカバーすることが可能になり、多くの遺伝子領域をカバーしていることから、遺伝子単離の研究が進むと期待される。特に、組み換えが起こりにくいコールドスポットでの遺伝子単離に威力を発揮する。また、本研究のように、他の植物種に遺伝子導入する実験に活用することができる。

TACViewer を利用して、ゼニゴケの光応答性変異形質を引き起こしている遺伝子のパラログであるシロイヌナズナ遺伝子を含む TAC クローン K21L19 (At5g58020 から At5g58160 までの 13 個の遺伝子が乗っている) を特定した。複数の TAC クローンが、見出されたが、目的の遺伝子が、なるべくクローン全体の中央に位置する TAC クローンを選抜した。この TAC クローンを用いて、河内研究室にて、ゼニゴケの形質転換法にて遺伝子導入した。当初は、遺伝子組み換え体が得られなかった。

これは、TAC クローンの選抜マーカー遺伝子をドライブしているプロモーターが Nos プロモーターに由来しているために、形質転換効率が低いことが考えられた。そこで、遺伝子導入の回数を通常よりも増やして、最終的に 4 系統の形質転換ゼニゴケをえることに成功した。これらの形質転換ゼニゴケでの光応答性の検討を河内研究室にて行い、それらの形質転換ゼニゴケの遺伝子発現をかずさ DNA 研究所に行った。

シロイヌナズナの DNA 発現解析データをみると TAC クローン K21L19 に乗っている遺伝子のうちで 6 つは発現が検出されているので、これらの PCR プライマーを設計して、ゼニゴケ形質転換体の遺伝子発現を調べた。それに先立って、これらの遺伝子がゼニゴケ染色体に挿入されていることはゲノム DNA の PCR にて確認した。4 系統のうち 3 系統については、これらの遺伝子が発現していることを確認した。また、光応答性が回復していることから、シロイヌナズナの光応答遺伝子が機能的にも動いていることが、ゼニゴケの光応答の観察から示された。

すなわち、ゼニゴケの発現制御系によって 4 億年前に分化したシロイヌナズナの遺伝子発現が制御されていることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

The Arabidopsis TAC Position Viewer: a high-resolution map of transformation-competent artificial chromosome (TAC) clones aligned with the Arabidopsis thaliana Columbia-0 genome.

Hirose Y, Suda K, Liu YG, Sato S, Nakamura Y, Yokoyama K6, Yamamoto N, Hanano S, Takita E, Sakurai N, Suzuki H2, Nakamura Y, Kaneko T, Yano K, Tabata S, Shibata D. *Plant J*. 2015 Sep;83(6):1114-22. doi: 10.1111/tbj.12949.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 大輔 (SHIBATA, Daisuke)
(公財) かずさ DNA 研究所・バイオ研究開発部・部長
研究者番号: 10370925

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

河内 孝之 (KOUCHI, Takayuki)
京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号: 40202056

花野 滋 (HANANO, Shigeru)
(公財) かずさ DNA 研究所・技術開発研究部・特別研究員
研究者番号: 30463467

(4)研究協力者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)

小松 愛乃 (KOMATSU, Aino)