

裸子植物スギの完全長 cDNA の大規模収集と機能解析

二村 典宏 ((独) 森林総合研究所)

futa@ffpri.affrc.go.jp

スギ花粉症は日本における社会問題の一つになっている。林業分野におけるスギ花粉症対策として、遺伝子組換え技術を用いた花成制御技術の開発や、雄性不稔スギ等新品種作出の選抜効率を高めるための DNA マーカー開発が急務となっている。そのためには、雄花や花粉の発達過程で働く遺伝子の詳細な情報が必要である。本研究では、スギ雄花や花粉の cDNA ライブラリーから EST (Expressed Sequence Tags) 情報を収集し、これらの器官で働く遺伝子群を解析した。既知の遺伝子との相同性検索による転写産物の機能付けにより、花粉アレルゲンとして働く可能性のある遺伝子や開花制御に関連する転写因子を明らかにした。

はじめに

スギ花粉症患者は国民の 10%を超え、都市部では2割以上の人が発症しているといわれている。その背景として、スギ林が全国の森林の 18%、国土の 12%という広大な面積を占めるばかりでなく、戦後に造林された個体が着花年齢に達したことにより、花粉飛散量が急激に増加したことが挙げられる。林業分野における長期的な花粉症対策として、花粉を飛散しない雄性不稔スギや花粉の少ないスギに転換することにより、花粉飛散量を抑制することが有効であると考えられている。

しかし、スギの雄花や花粉形成の分子メカニズムは明らかでなく、選抜に有効な DNA マーカーも開発されていない。有用品種の迅速な開発や、遺伝子組換え技術によるスギ品種の無花粉化を進めるためには、スギの花粉形成に関連する遺伝子の単離や DNA マーカーの開発が必要である。そのためには、スギで発現する遺伝子の情報を可能な限り多く収集し、その中から花粉形成を含む器官形成等に関わる遺伝子を探索する必要がある。しかし、スギ等の針葉樹はゲノムサイズが非常に大きいためゲノムの全塩基配列解読は困難であり、遺伝子の全体像を把握することができない。発現遺伝子の断片的な塩基配列情報 (EST) は、機能遺伝子の情報を効率よく取得し、有用な遺伝子の探索や DNA マーカーの開発に役立てることができる。本研究では、雄花や花粉の cDNA ライブラリーから EST 情報を収集して、それらの機能を解析し、裸子植物の基盤的な遺伝子情報として一般に提供した。

スギ花粉及び雄花からの EST 収集

スギの成熟花粉及び発達段階の異なる雄花から抽出した mRNA を用いて、2種類の cDNA ライブラリーを作製した。一つ目は成熟花粉から通常の方法で作製した cDNA ライブラリー、もう一つは雄花に由来する均一化した完全長 cDNA ライブラリーである。完全長 cDNA からは完全な機能を有するタンパク質の合成が可能であり、ゲノム配列情報との比較により構造遺伝子やプロモーター領域を決定できるという利点がある。さらに、均一化された cDNA ライブラリーでは、cDNA の重複が少ないために一度に多くの種類の遺伝子情報を取得できる。

本研究では、通常の方法で作製した花粉 cDNA ライブラリーから 1,929 クローンに由来する 3,655 の EST を、雄花の完全長 cDNA ライブラリーから 19,437 クローンに由来する 36,011 の EST を収集した¹⁾。

EST 情報から予測されるタンパク質の機能解析

花粉 cDNA ライブラリーから収集した EST をクラスタ解析した結果、1,926 クローンは 1,365 の転写産物にまとめられた。また、雄花完全長 cDNA ライブラリーに由来する 19,437 クローンの EST 情報は、10,463 の転写産物に相当した。雄花完全長 cDNA ライブラリーからの EST 収集では、均一化により EST の重複を低いレベルに抑え、効率的に一万以上の転写産物を収集できた。マツやポプラの EST と同一性検索を行ったところ、花粉由来と雄花由来の転写産物ともにマツとは約 81%、ポプラとは約 74% が同一性を示した。この結果は、スギの遺伝子は被子植物よりも針葉樹の遺伝子に高い同一性を示す傾向があることと、既知の遺伝子と同一性を示さないスギに特徴的な遺伝子が存在することを裏付けている。

さらに、花粉由来の転写産物と雄花由来の転写産物のそれぞれについて機能付けを行い、タイプ別に分類した (図 1)。花粉 EST に由来する転写産物は、タンパク質の翻訳 (タイプ J) や翻訳後修飾 (タイプ O) に関わる遺伝子情報が比較的多かったが、雄花 EST に由来する転写産物の情報からはそのような傾向は見られなかった。花粉と雄花という組織による違いと、雄花からは発現量の少ない遺伝子を含む数多くの遺伝子情報を得たことが影響していると考えられる。

タンパク質のモチーフデータベースである Pfam を用いて雄花由来の転写産物を解析した結果、1,644 ものタンパク質ファミリーとの同一性が確認された。本研究により収集した EST 情報は、非常に多様な遺伝子に由来するといえる。この中には、実験植物の雄ずいや花粉で特異的に発現する遺伝子も数多く含まれていた。シロイヌナズナの雄ずいで特異的に発現する 1,145 遺伝子のうち 754 遺伝子 (66%)、雄性配偶体で特異的に発現する 1,274 遺伝子のうち 617 遺伝子 (48%) は、スギ雄花の転写産物と高い同一性を示した。

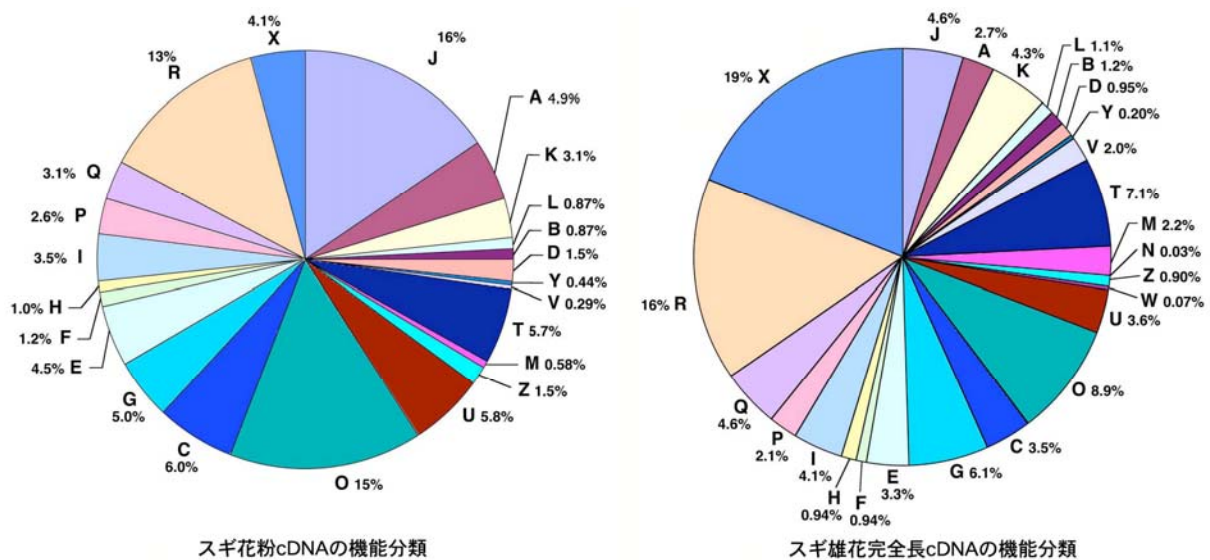


図 1 スギ花粉 cDNA 及び雄花完全長 cDNA の機能分類

クラスタ解析によってまとめたスギ花粉及び雄花の EST について COG データベースと比較した。686 (50%) の花粉転写産物及び 7,369 (70%) の雄花転写産物について機能分類できた。分類のカテゴリーは以下の通り。J: タンパク質の翻訳、A: RNA のプロセッシングと修飾、K: 転写、L: DNA の複製・組換え・修飾、B: クロマチンの構造変換、D: 細胞周期・細胞分裂の制御、Y: 核構造、V: 防御機構、T: シグナル伝達、M: 細胞壁・細胞膜の合成、Z: 細胞骨格、U: 細胞内輸送・分泌、O: タンパク質の翻訳後修飾・代謝、C: エネルギー生産・変換、G: 炭水化物の輸送・代謝、E: アミノ酸の輸送・代謝、H: 補酵素の輸送・代謝、I: 脂質の輸送・代謝、P: 無機イオンの輸送・代謝、Q: 二次代謝成分の合成・輸送、R: 一般的な機能推定のみ、X: 機能不明

また、雄花由来の転写産物のうち 207 遺伝子 (2%) は転写因子であることも判明した。これらの転写因子は 26 のタンパク質ファミリーに分類され、生殖器官の形成に関わることが知られている MADS ボックス遺伝子ファミリーも存在していた。MADS ボックス遺伝子については cDNA の全長を解析し、6 つのサブファミリーに分類される 12 の MADS ボックス遺伝子を同定した¹⁾。今後、スギ EST 情報をもとにした遺伝子機能の解明を進めることにより、被子植物と裸子植物の生殖器官形成にどの程度共通の遺伝子が働いているか明らかになると期待される。

EST 情報を利用したスギ花粉アレルゲンの解析

アレルゲンとは、くしゃみ、鼻みず、鼻づまりといった I 型アレルギー反応に関わる IgE 抗体を作らせる抗原のことである。スギ花粉症を引き起こすアレルゲンとして Cryj1, Cryj2 等が知られているが、同定されていない未知のアレルゲンの存在が指摘されている。アレルゲンデータベース (Allergome) から既知の花粉アレルゲン遺伝子の情報を取得し、スギ花粉や雄花の転写産物との相同性を調べた結果、22 種類の花粉アレルゲンと相同性を示した¹⁾。このうち、スギの花粉アレルゲンとして知られていた遺伝子は 5 種類で、残りの 17 種類はスギ以外の花粉アレルゲンと相同性を示した。スギ花粉アレルゲンのひとつ Cryj3.8 は、この雄花完全長 cDNA ライブラリーからの解析によって、アレルゲン活性をもつタンパク質の全長が明らかになった³⁾。Cryj3.8 にはアレルゲン活性をもたないタンパク質ファミリーが存在すること^{4,5)}、代表的なスギアレルゲンのひとつである Cryj2 にはアミノ酸配列の置換を伴う多型が存在することも明らかにした⁶⁾。このように、スギ EST 情報は新たなアレルゲンの発見や解析に利用することができ、将来的にはスギ花粉症の新たな治療法や診断法の開発、機能性食品の開発につながると期待される。

スギ EST 情報の公開

本研究で収集した EST は、既知のスギ EST 情報と共にカタログ化して、森林生物遺伝子データベース (ForestGEN: <http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp>) を通じて一般に公開している (図 2)。EST 情報を統合したクラスタ配列の情報を示すことにより、重複なく整理された遺伝子配列情報を取得できる。相同性検索やキーワード検索等の機能も充実しており、裸子植物の基盤的バイオリソースとして活用できる。今後、様々な有用遺伝子の探索や DNA マーカーの開発に役立つと期待される。

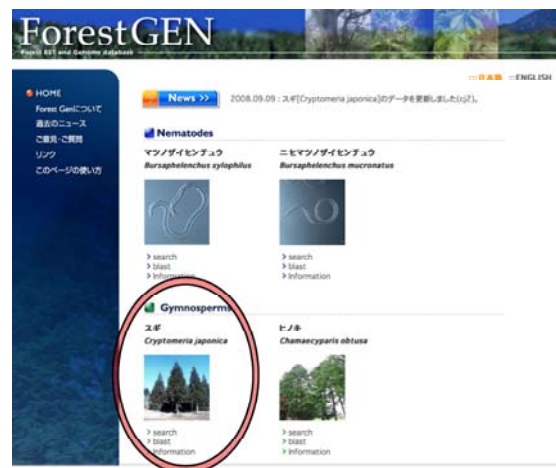


図 2 森林生物 EST データベース ForestGEN の画面
円内で示したところから、スギの EST に関する相同性検索やキーワード検索を行うことができる。

今後の展望

現在、スギの針葉や雌花からも完全長 cDNA ライブラリーを作製し、EST 情報の更なる充実を図っている。近年、DNA シーケンサの能力が急速に向上し、ゲノムサイズが大きい裸子植物のゲノム DNA 配列の解読も進展がみられている。完全長 cDNA の情報は、ゲノム上の遺伝子の構造や機能の決定に活用できる。

また、スギの EST 情報は、遺伝子の網羅的解析を行うための DNA マイクロアレイの作製に役立つ。DNA マイクロアレイとは、ガラスや樹脂の基盤上に DNA の部分配列を高密度に並べて固定したもので、これを使うことにより数千以上の遺伝子の発現を一度に解析できる。スギ DNA マイクロアレイ作製のため、本研究の成果を含む既知のスギ EST 情報を統合した結果、22,882 のクラスタ配列にまとめることができた。各配列からセンス鎖とアンチセンス鎖に対応するプローブを複数設計し、DNA マイクロアレイに搭載した。現在、このスギ DNA マイクロアレイを用いて、花粉形成過程で働く遺伝子の網羅的解析を行っている。雄性不稔スギと正常な花粉形成をするスギの雄花で発現する遺伝子の違いを解析することにより、正常な花粉形成に必要な遺伝子群を明らかにすることを目指している。

今後、新たな完全長 cDNA に由来する EST 情報を加えることにより、さらに多数の遺伝子の発現を網羅的に解析できる DNA マイクロアレイの作製が可能となる。スギ DNA マイクロアレイは、生殖器官の発達に関する研究にとどまらず、裸子植物のストレスフィジオロジーなど様々な研究分野での活用が期待される。

謝辞

本受賞に当たり、日本森林学会並びに独立行政法人森林総合研究所から推薦をいただきました。関係の諸先生方に御礼申し上げます。本研究の遂行にあたっては、篠原健司博士をはじめとする森林総合研究所、理化学研究所、千葉大学、岐阜大学の多くの共同研究者に御指導いただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Futamura, N., Totoki Y., Toyoda, A., Igasaki, T., Nanjo, T., Seki, M., Sakaki, Y., Mari, A., Shinozaki, K., Shinohara, K. (2008) Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili. *BMC Genomics* 9: 383
- 2) Futamura, N., Ujino-Ihara, T., Nishiguchi, M., Kanamori, H., Yoshimura, K., Sakaguchi, M., Shinohara, K. (2006) Analysis of expressed sequence tags from *Cryptomeria japonica* pollen reveals novel pollen-specific transcripts. *Tree Physiol.* 26: 1517-1528
- 3) Fujimura, T., Futamura, N., Midoro-Horiuchi, T., Togawa, A., Goldblum R.M., Yasueda, H., Saito, A., Shinohara, K. Masuda, K., Kurata K., Sakaguchi, M. (2007) Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy* 62: 547-553
- 4) Futamura, N., Mukai, Y., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Inouye, S., Midoro-Horiuchi, T., Goldblum R.M., Shinohara, K. (2002) Isolation and characterization of cDNAs that encode homologs of a pathogenesis-related protein allergen from *Cryptomeria japonica*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 66: 2495-2500
- 5) Futamura, N., Tani, N., Tsumura, Y., Nakajima, N., Sakaguchi, M., Shinohara, K. (2006) Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiol.* 26: 51-62
- 6) Futamura, N., Kusunoki, Y., Mukai, Y., Shinohara, K. (2007) Characterization of genes for a pollen allergen, Cry j 2, of *Cryptomeria japonica*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 143: 59-68

Collection and characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica*

Norihiro Futamura (Forestry and Forest Products Research Institute)

futa@ffpri.affrc.go.jp