

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻生物情報工学研究室

平成 26 年度 博士課程 進学

氏名 孫 建強

指導教員名 清水 謙多郎

論文題目 異質倍数体の環境ストレス応答に関する遺伝子発現解析

### 序論

異質倍数体は、異なる親種に由来する複数のゲノムを 1 つの核内に持つ倍数体である。近縁種同士が交雑するとき、倍数化が起こり、異質倍数体が誕生することがある。例えば、河川沿いなどの水辺に生息する *Cardamine amara* (AA,  $2x=16$ ) は、比較的乾燥した場所で生息する *C. rivularis* (RR,  $2x=16$ ) と、約 150 年前に自然交雑し、異質倍数体の *C. insueta* (RRA,  $3x=24$ ) が誕生した。*C. amara* は比較的乾燥した場所で生存できなく、また、*C. rivularis* は水辺で生存できなくなるのに対し、*C. insueta* は、水辺から比較的乾燥したニッチまで幅広く生息している。本研究では、異種倍数種が親種と比べて、環境ストレスに対する応答様式がどのように異なっているかを調べるため、異種倍数種の *C. insueta* と、その親種 *C. amara* および *C. rivularis* の冠水ストレスに対する応答を比較・解析した。*C. insueta* を用いた理由は、その親種である *C. amara* と *C. rivularis* は水に対して明確に異なる形質を示すため、*C. insueta* の水に対する形質がどちらか片方の親に似ているのか、あるいはどちらにも似ていないのかを判断しやすいからである。

また、本研究では、ストレス応答の時系列的な変化の解析を行い、より詳細な比較を行っている。これまで、異質倍数体の環境ストレス応答を調べた研究の多くは、ストレス処理群と対照群の比較に重点が置かれており、異質倍数体と親種との比較はあまり行われてこなかった。また、異質倍数体の環境ストレス応答において、時系列的な変化を解析した研究も筆者の知る限り存在しない。

## 方法

本研究では、*C. amara*、*C. rivularis* および *C. insueta* の葉を水中に浸した後、0 時間後、2 時間後、4 時間後、8 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後および 96 時間後の 9 時点における遺伝子発現量を、RNA-Seq により観測し、解析した。

はじめに、RNA-Seq ライブラリーのデータから遺伝子発現量を定量した。*C. insueta* は *C. amara* に由来する A ゲノムと *C. rivularis* に由来する R ゲノムを同時に持つため、異なる親種に由来する同一遺伝子（ホメオログ）を持つ。本研究では *C. insueta* のライブラリーから計算された遺伝子発現量を、A ゲノム上に由来するものと R ゲノム上に由来するものに区別し、解析を行った。ここでは、前者を CiA クラス、後者を CiR クラスと区別して呼ぶことにした。また、表記を揃えるために、*C. amara* と *C. rivularis* のライブラリーから計算された遺伝子発現量をそれぞれ CaA クラスと CrR クラスと呼ぶこととする。

遺伝子発現量を数値化した後、各クラスそれぞれについて、冠水前に比べて冠水後に発現量が有意に変化した遺伝子（DEG）を検出した。次に、冠水後、各時間時点において、発現量が増加した DEG (up-regulated DEG) と減少した DEG (down-regulated DEG) の遺伝子機能を推測するために、各クラスの各時点それぞれの DEG セットに対して GO エンリッチメント解析を行った。

## 結果

### 発現遺伝子

CaA、CrR、CiA および CiR クラスにおいて、正規化された発現量 FPKM (fragment per kilobase of transcript per million mapped reads) が 1 よりも大きい遺伝子（発現遺伝子）の数は、それぞれ 19,442 個、20,154 個、20,040 個と 19,745 個であり、その和集合は 21,978 個であった。このうち、4 つのクラスに共通して発現した遺伝子の数は 17,642 個であったのに対し、いずれかのクラスでしか発現しなかった遺伝子については、CaA クラスでは 298 個、CrR クラスでは 240 個、CiA クラスでは 498 個、CiR クラスでは 288 個と全発現遺伝子の 1.1~1.9% を占めていた。クラス間に見られる発現遺伝子の差はわずか数パーセントに限られるものであった。

次に、4 つのクラスそれぞれにおいて観測できた発現遺伝子の発現量を利用して、総当たりで 2 ライブラリー間の相関 ( $R^2$ ) を調べた。その結果、同じクラスに属する冠水前と冠水後のライブラリー間の  $R^2$  は、4 クラスともに 0.74 以上であった。また、異なるクラスに属するライブラリー間の  $R^2$  は、CiA と CiR クラスは同じ種 *C. insueta* 由来であるにもかかわらず、その  $R^2$  ( $0.59 \leq R^2 \leq 0.75$ ) は、CaA と CiA クラス間の  $R^2$  ( $0.66 \leq R^2 \leq 0.83$ ) および CrR と CiR クラスのライブラリー同士の  $R^2$  ( $0.67 \leq R^2 \leq 0.89$ ) に比べ、相対的に低かった。このことは、異種間交雑により 1 つの核に取り込まれた A

ゲノムと R ゲノム上のホメオログの発現量が、それぞれの親種の特徴を引き継いでいることを示唆している。

### 冠水ストレスに応答する DEG

冠水ストレス応答の違いを調べるために、冠水後 0 時と残りの 8 時間点の発現変動解析を行い、up-regulated DEG と down-regulated DEG の数を調べた。その結果、CaA クラスにおいて、up-regulated DEG と down-regulated DEG の数は平均でそれぞれ 710 個と 957 個であった。同様に、CrR クラスではそれぞれ 695 個と 716 個、CiA クラスではそれぞれ 926 個と 906 個、CiR クラスではそれぞれ 1,114 個と 1,032 個であった。CaA と CrR クラスに比べ、異質倍数体 *C. insueta* に由来する CiA と CiR クラスの DEG 数が多かった。異質倍数体は、親種に比べより多くの遺伝子を利用してストレスに応答していることを示唆している。

次に、DEG に対する GO エンリッチメント解析を行い、DEG の機能を調べた。その結果、エチレン応答、養分レベルに対する応答やジャスモン酸応答などに関連する GO term が、すべてのクラスの、いずれかの up-regulated DEG セットにエンリッチしていた。また、光合成や乾燥耐性などに関連する GO term が、すべてのクラスの、いずれかの down-regulated DEG セットにエンリッチしていた。冠水ストレスにさらされた植物の個体内にエチレンが蓄積し、また植物個体を乾燥から守る必要がなくなることを考慮すれば、これらの term がすべてのクラスにおいてエンリッチしたのは妥当である。

また、あるクラスの DEG セットのいずれかにエンリッチし、かつほかのクラスのすべての DEG セットにエンリッチしていないような、クラス特異的にエンリッチした GO term を調べた。CaA クラスの up-regulated DEG にはオーキシン応答や窒素応答などに関わる GO term がエンリッチしていた。CaA クラスの down-regulated DEG には、サイトカイニンや DNA メチル化などに関わる GO term がエンリッチしていた。CrR クラスの up-regulated DEG には、酸素ストレス応答や生殖器官の形成などに関わる GO term がエンリッチし、down-regulated DEG には有機物代謝などに関わる GO term がエンリッチしていた。CiA クラスの up-regulated DEG には DNA 修復、細胞壁の形成などに関わる GO term がエンリッチしていた。CiA クラスの down-regulated DEG にエンリッチし、かつ他のクラスの down-regulated DEG にエンリッチしていないような GO term はなかった。また、CiR クラスの up-regulated DEG には生殖器官の形成に関わる GO term がエンリッチし、down-regulated DEG には栄養関連などの GO term がエンリッチしていた。先行研究では、冠水された植物は、種によって伸長成長の早めたり遅めたりすることが報告されている。このため、本研究においてオーキシン、サイトカイニンなどの植物ホルモン応答や DNA 複製などに関係する GO term がクラス間に差が見られたのは、冠水ストレスに対してクラス間で異なる耐性を持つ可能性があることを示唆していた。また、一部のクラスに生殖器官の形成などの冠水ストレスと関係のない term も含まれ、本研究では解釈できなかった。

さらに、クラス特異的にエンリッチした GO term に含まれる遺伝子発現量の冠水後の変化パターンを調べた。その結果、*C. insueta* に由来する CiA と CiR クラスの遺伝子発現量の変化は互いに似た傾向を示し、かつその傾向は CaA と CrR クラスのいずれにも似ていなかった。例えば、GO:0009723 (response to ethylene)に関連付けられた DEG の変化量を調べると、ほとんどの DEG は冠水後に CaA と CrR クラスにおいて発現量が増加したのに対して、CiA と CiR クラスでは増加したものと減少したものの両方が見られた。また、CiA クラスの up-regulated DEG のみにエンリッチした GO:0016998 (cell wall macromolecule catabolic process)に関連付けられた DEG の変化量を調べると、これらの DEG は冠水後に CiR クラスにおいても発現量の増加が見られ、その度合いは CiA クラスと同じであった。このように、CiA と CiR クラスの片方だけに特異的にエンリッチした GO term に関連付けられた DEG も、その冠水後の発現量の変化は CiA と CiR クラスで同じ傾向を示していた。

以上のことから、GO term レベルで見た時に、冠水ストレス耐性はクラス間で異なることが示唆された。しかしながら、遺伝子発現量レベルで見た時に、CiA と CiR クラスの差がほとんどないために、冠水ストレス耐性は種間で異なることが示唆された。また、冠水後の発現量の変化が CiA と CiR クラスで同じ傾向を示したという結果は、*C. insueta* が冠水ストレスに応答するとき、A ゲノムと R ゲノムに由来するホメオログをほぼ同じように利用していることを示唆している。*C. insueta* の A ゲノムは *C. amara* に由来しているが、*C. amara* と同じような使われ方をしていないことが明らかとなった。同様に、*C. insueta* の R ゲノムも、*C. rivularis* のそれと同じような使われ方をしていないことが明らかとなった。

## 総括

本研究では、*C. amara*、*C. rivularis* および両者の交雑種である異質倍数体 *C. insueta* の冠水ストレスに対する応答様式を調べた。その結果、*C. insueta* の A ゲノムと R ゲノム上にあるホメオログの発現量は、それぞれの親種と似ていたことがわかった。しかし、冠水ストレスにさらされたとき、A ゲノムと R ゲノム上にあるホメオログは、ほぼ同じパターンで発現量を変化させ、しかも親種と異なるパターンで、冠水ストレスに応答していることがわかった。すなわち、*C. insueta* の遺伝子発現は親種の特徴を引き継ぎながら、ストレスに対して独自の調節様式を持つことが示唆された。今後、異質倍数体の発現調節様式と親種の発現調節様式の理解をさらに深め、異質倍数体の発現調節様式を親種の発現調節様式で予測できるようにモデル化を行う予定である。また、異質倍数体は、干ばつへの耐性を強くしたり、生産量を上げたりするために異種間交雑により作成された農作物にも多く見られる。異質倍数体の適応メカニズムをさらに広範に解析することで、将来は、農作物の効率的な品種改良に役立つものと期待される。