

令和 元年 9 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0264

研究課題名（和文）重イオンビーム欠失変異マッピングによる組換え抑制領域からの有用遺伝子同定（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Identification of beneficial genes on non-recombining regions by using heavy-ion deletion mapping(Fostering Joint International Research)

研究代表者

風間 裕介（Kazama, Yusuke）

国立研究開発法人理化学研究所・仁科加速器科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：80442945

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：植物のなかにはオスとメスの区別がある種がある。ナデシコ科のヒロハノマンテマもその1つで、XY型の性染色体をもつ。重イオンビームでY染色体に様々な大きさの欠失を誘発し、欠失した遺伝子の並び方を手がかりにY染色体の遺伝子地図を構築した。欠失の大きさが最も小さく、雄花が両性花に変異した変異体のゲノム解析を行い、めしべの発達を抑制する遺伝子の候補を絞り込んだ。一方、欠失の大きな変異体で網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、Y染色体のある領域が欠落するとX染色体の遺伝子の発現量が2倍になることを発見した。植物性染色体がオスとメスの中でX染色体の遺伝子の発現量を均一に保つ遺伝子量補正を持つことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、独自に作製したY染色体地図を活用することで、植物性染色体がオスとメスのX染色体連鎖遺伝子の発現量を均一に保つ「遺伝子量補正機構」をもち、それはY染色体上の一部の領域が欠落するとすぐに働くことを発見した。本発見は、植物性染色体が動物と同様の遺伝子量補正機構を獲得していることを示した。さらに、遺伝子量補正は進化の過程で遺伝子ごとに徐々に起るのではなく、ひとたびY染色体上の相同遺伝子がなくなると即座に生じることを初めて捉えたという点で学術的に意義深い研究成果といえる。

研究成果の概要（英文）：Some plants have distinct male and female individuals. One of them, *Silene latifolia* has XY-type sex chromosomes. We induced large deletions in the Y chromosome with heavy-ion beams, and constructed a gene map of the Y chromosome based on the arrangement of the deleted genes. Gene sequencing of mutants with small deletions which have hermaphroditic flowers was conducted to identify the candidate genes that suppress the development of pistil. On the other hand, exhaustive gene expression analysis was carried out on large deletion mutants, revealing that the expression levels of the X-linked genes were doubled if a specific Y chromosome region was deleted. This result suggests that plant chromosomes have the gene dosage compensation which balances the expression level of X chromosome gene uniform between male and female and that the dosage compensation occurs immediately after loss of Y-linked genes.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：重イオンビーム 雌雄異株植物 ヒロハノマンテマ 性染色体 性決定 遺伝子量補正

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

ナデシコ科草本のヒロハノマンテマは、雄花を咲かせるオスと雌花を咲かせるメスの区別がある植物（雌雄異株植物）である（図1）。顕微鏡で染色体を観察すると、オスには巨大なY染色体がみられる。その大きさは570 Mbと推定されている。Y染色体上には、めしべの発達を抑制する遺伝子（GSF）と、おしべの発達を促進する遺伝子（SPF）との、2つの性決定遺伝子の存在が推定されている。ヒロハノマンテマのXY染色体が出現したのはわずか1100万年前であり、これはほ乳類の性染色体の出現が1億6千万年前であるのと比較して新しい。そのため、XY間には1000を超える相同遺伝子対が保存されている。性染色体は、1対の常染色体が互いに組換え（DNA鎖の交換）を止めることで誕生したと考えられるが、相同遺伝子対の多型頻度を計算することにより、染色体の部位ごとの組換え停止のタイミングが推定できる。ヒロハノマンテマで性決定遺伝子が同定できれば、2つの性決定遺伝子がどの順番で獲得され、性染色体が誕生したのかを理解することができると期待されている。



図1 ヒロハノマンテマの雄花（左）と雌花（右）
Bar は 1cm を示す。

組換え抑制領域はヒロハノマンテマのY染色体の大部分を占める。そのため、Y染色体では、組換え価を求めて遺伝子同士の距離を計算する従来法による遺伝子地図の作製ができない。そこで我々は、様々な大きさの欠失を誘発できる重イオンビームを照射して変異体を多数作出し、それらの欠失パターンからY染色体の遺伝子地図を作製する新たな手法を確立した。

本研究では、作製した遺伝子地図とOxford大学が保有するヒロハノマンテマのゲノムやトランスクリプトームのドラフト配列を活用し、以下2つの研究を実施した。1つは、性決定遺伝子GSFの候補の絞り込みである。Y染色体の欠失変異体のうち、最も欠失サイズが小さく両性花を咲かせる変異体2個体を選び、ゲノム解析と遺伝子発現解析を併用して欠失遺伝子を絞り込んだ。もう1つは、遺伝子量補正の研究である。遺伝子量補正とは、X染色体上の遺伝子の発現量のオスメス間での違いを補正する機構のことである。X染色体はオスに1本、メスに2本存在するため、X染色体上の遺伝子の数はメスの方が2倍多いことになる。哺乳類の場合、メスの2本のX染色体のうちの片方が不活性化することで、X染色体上の遺伝子の発現量を雌雄で調整している（図2左）。ショウジョウバエでは、オスのX染色体上の遺伝子の発現量が2倍になることで、X染色体上の遺伝子の発現量を雌雄で調整している（図2中央）。ヒロハノマンテマの場合、Y染色体が新しいため、Y染色体上の遺伝子もX染色体上の遺伝子と同等に機能している場合が多い。そのため、遺伝子量補正機構が存在するかどうかは長年議論されてきた（図2右）。我々は、Y染色体上に巨大な欠失を誘発し、Y染色体連鎖遺伝子（Y遺伝子）を人工的に欠落させた場合に、X染色体上連鎖遺伝子（X遺伝子）の発現量がどのように変化するかを調査した。

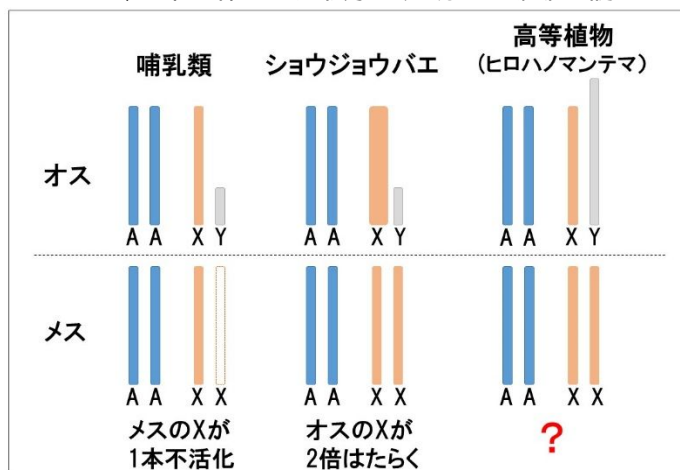


図2 動物と植物の遺伝子量補正 A: 常染色体、X:X染色体、Y:Y染色体

2. 研究の目的

本研究では、1) ヒロハノマンテマのY染色体上の遺伝子GSFの絞り込み、および、2) Y染色体に欠失が生じた場合のX染色体連鎖遺伝子の発現変動の調査を目的とした。

3. 研究の方法

1) ヒロハノマンテマのY染色体上の遺伝子GSFの絞り込み

オス1個体、メス5個体、および両性花変異体2個体からゲノムDNAを抽出し、Hi-Seq2500による高速シーケンスを行なった。これらのゲノムの生データから目的の遺伝子を抽出するため以下のように解析した。目的の遺伝子は、「オスのY染色体に存在するが、メスおよび両性花変異体2個体には存在しない」はずである。オスと両性花変異体のゲノム情報を比較すればよいはずだが、両性花変異体2個体はいずれも重イオンビームで作出した変異体であるため、単純にゲノム配列を比較してオスだけに存在する配列を抽出すると、常染色体上に存在する変異領域を

全て抽出してしまうことになる。そこで、メス5個体由来のゲノム配列を利用した。オスのゲノム配列からメス5個体のゲノム配列を引き算することで、ほぼ全てのオスメス共通の配列は削除できるはずである。その上で、両性花変異体2個体と共通な配列を引き算することにした。計算量を少なくするため、Akagi et al. (2014)のプログラムを用いて獲得したリードを35bpの長さにコンピューター上で切断し、それぞれの断片を網羅的に比較した。「オスに存在するが、メスおよび両性花変異体2個体には存在しない」という35bpの断片を含むリードだけを抽出し、それらをSOAPdenovo v.2.0.4(Luo et al. 2012)でアセンブルした。得られたコンティグに元のゲノム配列をBWAでマッピングし、「オスに存在するが、メスおよび両性花変異体2個体には存在しない」コンティグを絞り込んだ。

オス、メス、両性花2個体の0.5mm以下の極小さな蕾にサンプリングしてRNAseq解析を行なった。オスのリードをTrinity v2.5.0 (Grabherr et al. 2011) でアセンブルしトランスクリプトームを得た。本トランスクリプトームとOxford大がもつトランスクリプトームに対し、上記のオス特異的コンティグでBLAST解析を行い、蕾で発現している遺伝子群を絞り込んだ。全てのRNAseqのリードを用いてRSEM v.1.2.31(Li et al. 2009)により発現解析を行い、オスで発現するが、メスおよび両性花2個体では発現しない遺伝子を絞り込んだ。

2) Y染色体に欠失が生じた場合のX染色体連鎖遺伝子の発現変動の調査

Y染色体欠失マップの拡充

Y遺伝子が欠失した場合のX遺伝子の発現変動をみる実験では、Y染色体の地図に則ることで部位ごとの変化を追うことができる。そこで、なるべく多くの遺伝子をY染色体地図に加えるため、Y染色体欠失マップを拡充した。Oxford大がもつドラフトゲノム配列からオスに特異的な配列をもつコンティグをピックアップし、PCR用プライマーを設計した。オス、メスのDNAを鋳型としてPCRを行いオスのみで増えるプライマーセットを選んだ。PCRで各変異体の欠失情報を収集し、欠失マッピングソフトウェアDeMapper (Kazama et al. 2016) でマッピングを行った。

巨大Y染色体欠失変異体のRNAseq

Y遺伝子の欠失によるX遺伝子の発現量の変化を調査するため、大きな欠失をもつ変異体を選択し、それぞれ葉と蕾をサンプリングしてRNAseq解析を行った。RSEMを用いてでFPKM値を求めて発現解析を行い、X染色体連鎖遺伝子の発現量を野生型および変異体間で比較した。

4. 研究成果

1) ヒロハノマンテマのY染色体上の遺伝子 GSF の絞り込み

ここで、これらのリードをアセンブルしたところ、オス特異的な67481個のコンティグを得た。このうちオスのつぼみで発現するコンティグは1749個であった。さらに、オス、メス、両性花変異体2個体について、直径0.5mm以下の極小さな蕾をサンプリングしてRNAseq解析を行った。得られたリードおよびゲノムシーケンスのリードを1749個のコンティグにマッピングすることで、「オスに存在し発現するが、メスおよび両性花変異体2個体では存在せず発現しない」コンティグを絞り込んだ。得られたコンティグをもとにプライマーを設計し、14個体の両性花変異体に共通して存在しないコンティグを絞り込むことで、GSF遺伝子の候補を得た。

2) Y染色体に欠失が生じた場合のX染色体連鎖遺伝子の発現変動の調査

Y染色体欠失マップの拡充

新たにY染色体特異的マーカーを163個作製し、104変異体についてPCRを行い、それぞれのマーカーが増幅するかどうかを調査した。DeMapperを用いてY染色体地図を作製したところ、前回の地図と同様にSPFとGSFがY染色体の同じ腕に位置する地図が完成した。

巨大Y染色体欠失変異体のRNAseq

野生型のオスと、Y染色体に部分欠失をもつ変異体17個体について、つぼみと葉からRNAを抽出してRNAseq解析を行った。野生型と変異体の遺伝子発現量を比較したところ、常染色体連鎖遺伝子に発現変動はなかった。また、X遺伝子のうちそれと相同なY遺伝子が欠失していない遺伝子群についても有意な発現変動は見られなかった。ところが、Y上の相同遺伝子を欠失しているX遺伝子では、発現が約2倍に上昇する遺伝子と発現が変動しない遺伝子に分類された。この現象は、葉でも蕾でも同様に観察された。次に、同様な現象が常染色体にヘテロ接合で巨大欠失を誘発してヘミ接合な領域を作った場合でも生じるかどうかを調査するため、重イオンビームを花粉に照射し、正常なメスに受粉して得た変異体の全ゲノム解読を行った。その結果、常染色体の相同染色体対のうちの1本の遺伝子が欠失した場合には、上記のような発現上昇は生じなかった。次に、Y染色体の欠失領域を遺伝子地図により3つに分類して解析した。A) GSF領域を主に欠失している変異体、B) SPFを主に欠失している変異体、C) 染色体の逆側の腕を大きく欠失している変異体、である。その結果、興味深いことに2) SPFを主に欠失している変異体においてのみ、X遺伝子の発現上昇が見られた(図3)。さらに興味深いことに、2)の変異体では、Y遺伝子が欠失していないX遺伝子の発現量も有意に上昇した。ヒロハノマンテマの性染色体は誕生して1100万年程度と比較的新しく、XY間で相同遺伝子対を多くもっておりY遺伝子も機能しているものが多いため、遺伝子量補正は必要無いようにも思える。しかし我々は、Y遺伝子が突然欠失するとそれを補うようにX遺伝子の発現量が上昇することを見いだした。この効果がY染色体の一部の領域にとどまっていることも興味深い。

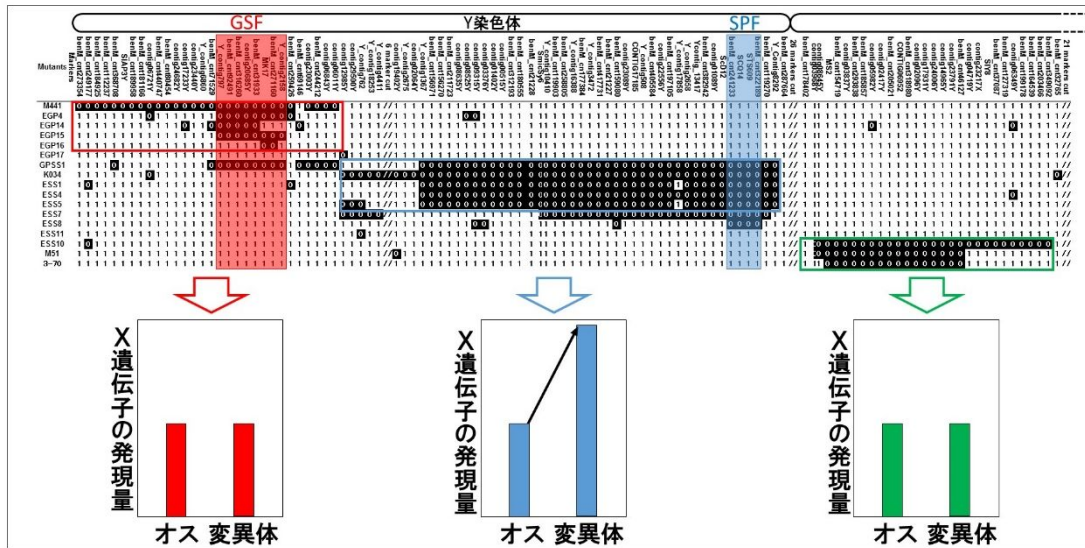


図3 Y染色体地図で明らかにしたY染色体の部位特異的な即時遺伝子量補正 SPFを含む領域を欠失した場合のみ、X遺伝子の発現上昇が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

1. Krasovec M, Kazama Y, Ishii K, Abe T, Filatov DA. (2019) Immediate dosage compensation is triggered by the deletion of Y-linked genes in *Silene latifolia*. *Curr. Biol.* 査読有、印刷中
2. Fujita N, Kazama Y, Yamagishi N, Watanabe K, Ando S, Tsuji H, Kawano S, Yoshikawa N, Komatsu K. (2019) Development of the VIGS System in the Dioecious Plant *Silene latifolia*. *Int. J. Mol. Sci.* 20: E1031. 査読有
3. Kazama Y, Hirano T, Abe T, Matsunaga S. (2018) Chromosomal rearrangement: from induction by heavy-ion irradiation to in vivo engineering by genome editing. *Cytologia.* 83:125-128. 査読有
4. Kazama Y, Ishii K, Hirano T, Wakana T, Yamada M, Ohbu S, Abe T. (2017) Different mutational function of low- and high-linear energy transfer heavy-ion irradiation demonstrated by whole genome re-sequencing of *Arabidopsis* mutants. *Plant J.* 92: 1020-1030. 査読有
5. 風間裕介、石井公太郎、阿部知子、半本秀博、河野重行、(2017)「高校生物と植物の性染色体」*生物の科学 遺伝* 71: 262-268. 査読無し
6. 風間裕介、石井公太郎、阿部知子 (2017)「植物巨大Y染色体の遺伝子地図作成に成功—Y染色体は進化の過程で大きな逆位を起こしていた」*生物の科学 遺伝* 70: 394-397. 査読無し
7. 風間裕介、平野智也、大田修平、佐藤陽一、村井耕二、河野重行、小野克徳、阿部知子、(2016)「重イオンビーム育種によるグリーンイノベーションの創出」*作物研究* 61: 73-79. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

1. 風間裕介、「重イオンビーム誘発変異体を用いた植物性染色体の研究」第1回重・クラスターイオンビーム利用による微生物由来高生産性、エネルギー、環境シンポジウム、2019年1月、つくば(招待講演)
2. 風間裕介、「難しいけど面白い!植物巨大Y染色体の研究」第4回農学中手の会、2018年12月、大津
3. 藤田尚子、風間裕介、山岸紀子、安藤咲、辻寛之、吉川信幸、小松健、「ウイルスベクターを利用したヒロハノマンテマの遺伝子機能解析系の確立」日本植物学会第82回大会、2018年9月、広島
4. Kazama Y, Ishii K, Hirano T, Yamada M, Ohbu S, Abe T., “Highly efficient induction of chromosomal rearrangement by heavy-ion irradiation in the model plant *Arabidopsis thaliana*.” EMBO|EMBL Symposium: Principles of Chromosome Structure and Function, Heidelberg, Germany, Sep 2017
5. 風間裕介、「重イオンビームの変異特性に関する研究とそれを利用した植物巨大Y染色体の精密マッピング」日本植物学会第81回大会、日本植物学会奨励賞受賞講演、2017年9月、野田(招待講演)
6. Kazama Y, “Deletion mapping of the plant huge Y chromosome by employing traveling salesman problem.” Oxford Congress on Plant Sciences 2017, Oxford, UK, Sep 2017(招待講演)

〔その他〕

受賞(計 2件)

1. 風間裕介、第4回農学中手の会 中手の中の中手賞 「難しいけど面白い!植物巨大Y染色体の研究」2018年12月

2. 風間 裕介、日本植物学会 日本植物学会賞奨励賞 「重イオンビームの変異特性に関する研究とそれを利用した植物巨大 Y 染色体の精密マッピング」2017 年 9 月

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ディミトリー エー フィラトフ

ローマ字氏名：Dmitry A. Filatov

所属研究機関名：オックスフォード大学

部局名：植物科学部

職名：教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：マーク クラソヴェック

ローマ字氏名：Marc Krasovec

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。