

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580001

研究課題名(和文)ホウレンソウにおける性決定遺伝子コード候補領域の絞り込み

研究課題名(英文)Narrowing the genomic regions responsible for sex determination in spinach

研究代表者

小野寺 康之(Onodera, Yasuyuki)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80374619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ホウレンソウからは、雄株および雌株の他に雌雄双方の機能を備えた間性株も見出される。これらの多様な「性」はホウレンソウにおける効率的F1採種に必要な受粉制御技術を確立する上で重要な形質である。本研究では、性決定遺伝子座の構造解析を試みた。

先ず、Y遺伝子座の解析からは、この遺伝子座を含む周辺領域は減数分裂期の相同組み換えが抑制された雄特異的領域であることが示唆され、この領域は少なくとも840 kbp以上である可能性が示された。さらに、この領域の一部の配列を決定した結果、大部分が新規のレトロエレメントで占められていた。その一方で、タンパク質コード候補遺伝子は僅かに4個しか見出されなかった。

研究成果の概要(英文)：Spinach is widely known to be dioecious. However, monoecious plants can also occur in this species. Sex expression in dioecious spinach plants is controlled by a single gene pair termed X and Y. Our previous study showed that a single, incompletely dominant gene, which controls the monoecious condition, is linked to X/Y.

The four Y-linked AFLP markers developed in this study were converted into sequence-characterized amplified region (SCAR) markers. Linkage analysis using the four SCAR markers and three already-known Y-linked markers suggested that recombination is suppressed around the male-determining gene (Y). Analysis of spinach genomic BAC clones isolated with the Y-linked markers suggested that the male-specific (non-recombining) region is at least larger than 840 kbp. Further, most part of this chromosomal region was found to be accounted for by interspersed repeated elements, e.g. retrotransposons, while only a few protein-coding genes were identified in this region.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物育種 F1ハイブリッド

## 1. 研究開始当初の背景

ハウレンソウは雌雄異株として一般に知られているが、雄株および雌株の他に雌雄双方の機能を備えた間性株が見出される。

これらの多様な「性」はハウレンソウにおける効率的 F1 採種に必要な受粉制御技術を確認する上で重要な形質である。今後、効率的に F1 品種の育成を進めていくには、ハウレンソウの性決定遺伝子に関するゲノム情報を充実させることに加えて、性決定遺伝子の単離(クローン化)を通じて性決定機構を解明することが必要である。

申請者はこれまでに雄性および間性決定遺伝子の単離に必要なゲノム情報およびリソースを整備するために、性決定遺伝子近傍領域の AFLP 連鎖地図および BAC ゲノムライブラリーの構築を行った。本研究ではこれらの成果を活用して、性決定遺伝子座の構造解明を試みた。

## 2. 研究の目的

(1) 雄性決定遺伝子座の構造解析：これまでに雄性決定遺伝子 (*Y*) と共分離する AFLP マーカー (4 個) および SCAR マーカー (3 個) を見出しており、当該遺伝子座近傍領域の(減数分裂における)組換えが抑制されている可能性が示された。本研究では、*Y* 近傍領域の組換え抑制に関する検証および構造の特徴付けとして塩基配列解析を試みた。

(2) 間性決定遺伝子に近接する分子マーカー開発：マップベースドクローニングには、標的領域を分子マーカーによって 1cM 以内に絞り込むことが不可欠である。しかしながら、これまでに間性遺伝子座乗領域の絞り込みにも有効な分子マーカーは開発されてこなかった。本研究では、当該遺伝子のクローン化に向けて、近接マーカーの作成を試みた。

(3) 雄性および間性決定遺伝子のマッピング：研究開始以前の段階で、雄性決定遺伝子 (*Y*) および間性遺伝子 (*M*) は同座ではなく異なる遺伝子座に座乗することを確認した。本研究では、両遺伝子の座乗位置関係を明確にするために、一つの連鎖地図上に両者を位置づけることを試みた。

(4) ハウレンソウ雄株および雌株に関する mRNA-seq 解析：詳細な形態調査に基づく先行研究からは、ハウレンソウにおける雌・雄のアイデンティティーが抽苔開始時もしくはそれ以前の発達ステージにおいて既に確立されている可能性が示唆されている。すなわち、この発達ステージで性決定遺伝子が既に発現して、その下流にある遺伝子群を制御していると考えられる。本研究では、雌・雄のアイデンティティーの分子実体を捉えることを目的として、日長処理された抽苔前の雄株および雌株に関するトランスクリプトームを明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) AFLP マーカーの SCAR マーカー変換

SCAR マーカーの設計に用いた AFLP 座の塩基配列は、以下に述べる 2 通りの方法を用いて決定した。

AFLP 分析において見出された多型バンドをポリアクリルアミドゲルから切り出し後に DNA を溶出し、これを鋳型にした Selective amplification reaction によって多型バンドを増幅させた。得られた DNA 断片をクローニング及びシーケンス解析により塩基配列を決定した。

AFLP マーカーを用いて BAC ゲノムライブラリーを選抜し、当該 AFLP マーカー座をカバーする BAC クローンを単離した。次いで、この BAC クローンのプラスミド DNA を鋳型に用いて AFLP 断片を増幅し、その塩基配列を決定した。AFLP 断片の配列に相補的なプライマーを用いて、BAC クローン DNA における当該マーカー座隣接領域の配列決定を行った。

上述の方法で取得されたマーカー座およびその隣接配列の情報に基づいて、SCAR マーカーの作成を行った。

### (2) 塩基配列アノテーション

全塩基配列を解析した BAC クローンに含まれる遺伝子予測には、Eukaryotic Gene mark. hmm

(<http://exon.gatech.edu/eukhmm.cgi>) を用いた。Gene mark によって予測された ORF のアミノ酸配列に関して、BLASTP 解析によりデータベース上に登録されている既知のタンパク質との相同性を調べた。検出された相同性を有意とする基準は  $e\text{-value} \leq 1e-20$  とした。また RepeatMasker

(<http://www.repeatmasker.org/>) を用いて反復配列をマスクした配列に関して tBLASTx 解析を行い、アカザ亜科およびマンテマ属の EST 配列と有意な相同性 ( $e\text{-value} \leq 1e-5$ ) を示す配列を検索した。有意な相同性を示した EST 配列に関しては EMBOSS Sixpack ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_sixpack/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_sixpack/)) を用いてアミノ酸配列を予測し、予測されたアミノ酸配列と相同性を示すタンパク質を用いて検索した。

反復配列の検索には RepeatMasker を利用した。反復配列の検索にあたっては、シロイヌナズナの反復配列のデータベースを用いた。また、ハウレンソウ雄特異的領域の内部で重複している配列の探索には BLAST 2 sequences

([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi)) を用いた。

### (3) バルク法を用いた間性遺伝子 (*M*) 近接 AFLP マーカー開発

03-009♀×03-336F2 集団から選ばれた間性株および雌株のゲノム DNA を用いて、個体ごとの Pre-amplification 産物を調製した。次いで、間性株または雌株由来の Pre-amplification 産物を等量ずつ混合して作成したバルク化 Pre-amplification 産物を鋳型とした Selective amplification 反応を

行うことで AFLP 分析を行った。

#### (4) 次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトームの構築

雌雄異株系統 03-009 を人工気象器にて 20 ° C, 12 時間日長の条件で 19 日間育成した後に, 3 日間日長処理 (20 ° C, 20 時間日長) した。各植物体それぞれの植物体の地上部 (シュート系) から全 RNA を抽出した。

次いで, Strand specific RNA kit (Agilent) を用いて, 上述の全 RNA からハウレンソウ cDNA ライブラリーを構築した。引き続き, HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) によるペアエンドシーケンシング (100 bp×2) を行った。さらに, 得られたリードからトリミング及びアダプター配列の除去を行い, リードのアセンブルにはソフトウェア Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>; Grabherr et al. 2011) を用いた。さらに, コンタミネーション配列 (オルガネラおよびバクテリア由来遺伝子配列等) を除去し, スプライスバリエーションとして構築された重複しているコンティグを統合することで最終的なコンティグセットを得た。

## 4. 研究成果

### (1) 雄性決定遺伝子座における組換え抑制の発見

ハウレンソウ雌株と雄株の戻し交雑集団 (BC1) において, 雄性決定遺伝子 (*Y*) と共分離する 4 個の AFLP マーカー (E29M18, E56M46, E27M46, E14M26) を BAC ライブラリーのスクリーニングに適した SCAR マーカー (SP\_0002, SP\_0014, SP\_0003, SP\_0015) に変換した。

ハウレンソウの雄性決定遺伝子を含む染色体領域の減数分裂期における組換えの抑制について検証するために, 合計 1157 個体からなる 3 種類の分離集団 (03-259 ♀ × 03-009 ♂ BC1F1 および BC2F1, 03-009 ♀ × (03-336 × 03-009 ♂), 03-009 ♀ × ((03-336 × 03-009) × 03-009 ♂)) を用いて *Y* 遺伝子と上述の 4 個の SCAR マーカーおよび既存の 3 個の SCAR マーカー (T11A, V20A, SP\_0018) との間における組換え頻度を調査した。なお, これらのマーカーは全て優性マーカーである。その結果, 当該遺伝子とマーカーとの間の組換え型個体は見出されなかった。

さらに, 世界各地から収集された 105 種類のハウレンソウ遺伝資源アクセシオンのそれぞれから任意に選ばれた雄株および雌株 (もしくは間性) から 189 個体 (雄株, 97; 雌 (もしくは間性), 92) を用いて, *Y* 遺伝子と前述の 7 個の SCAR マーカーとのアソシエーションを調査した。その結果, いずれのマーカーも, *Y* 遺伝子と強固なアソシエーション (Fisher's  $P < 2.2E-22$ ) を示した。一部のアクセシオンにおける雄株からは, SP\_0014 および SP\_0003 が増幅されなかった

一方で, 7 種類のいずれのマーカーも雌株から増幅されることはなかった。

### (2) 雄特異的組換え抑制領域の塩基配列決定

*Y* 遺伝子と共分離および強固なアソシエーションを示すことが確認された上述の 7 個の SCAR マーカーを用いて, ハウレンソウ雄株ゲノムの BAC ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果, 6 個のマーカーによって, 合計 21 個の BAC クローンが単離された。

これらのクロンの整列化を行うと共に, 当該 BAC クローンの末端配列を起点してゲノムを一キングを試みた。しかしながら, 反復配列に阻まれて BAC コンティグを僅かに伸長させることしかできなかった。最終的に 6 個の BAC コンティグが構築され, これらの総全長はおよそ 840 kbp と見積もられた。

選抜された BAC クローン (合計 25) の中から, 6 個を選んで (総全長 500Kbp) の塩基配列を決定した。その結果, この配列の約 60% が反復性の配列 (転移因子様配列, Simple repeat, Low complexity および Mini-satellite) で占められることが判明したが, その大部分が 2 種類のレトロエレメント (SpRE1 および SpRE2 と命名) であることが判明した。SpRE1 はタンパク質コード配列の配置に基づいて Ty1-copia 型に分類されたが, その LTR 配列は既知のものとは同源性を示さない新規の LTR であった。一方, SpRE2 の LTR は SpRE1 のそれらと高い同源性を示した。しかしながら, SpRE2 からはタンパク質コード配列が見出されないことから, 非自立型のレトロエレメント (LARD, Large Retrotransposon Derivatives) であることが判明した。

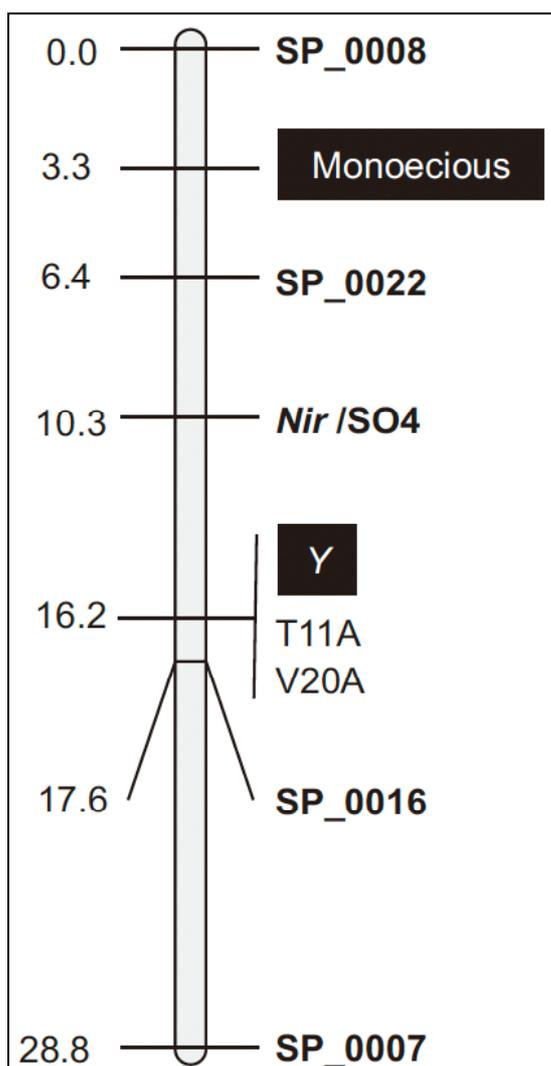
転移因子様配列および単純反復配列と関連づけられなかった配列について, 遺伝子予測を試みた結果, 僅かに 4 個の候補遺伝子しか見出されなかった。今後は, これらの候補遺伝子の特徴付けを試みる。

### (3) 間性決定遺伝子座の絞り込み

ハウレンソウの間性 (雌雄同株性) の発現にかかわる主働遺伝子 *M* のポジショナルクローニングに向けて, これに近接する 2 つの AFLP マーカー (E27M21 および E28M31) を開発し, それぞれを SCAR マーカー (SP\_0008 および SP\_0022) に変換した。このマーカーに拠って, *M* の座乗領域を 6 cM の範囲に絞り込むことができた。このマーカーを用いて単離されたハウレンソウゲノム BAC クローンを起点にクロモソームウォーキングを試みたが, SpRE1 および SpRE2 などの散在性反復配列に阻まれて BAC コンティグを拡張させることはできなかった。従って, さらに *M* に近接したマーカーを開発することが今後の課題である。その有効な方策の一つとして, 筆者は SpRE1/SpRE2 の LTR 配列を利用した TD (トランスポゾンディスプレイ) 解析によってマーカー開発を実施することを予定している。

(4) 雄性および間性決定遺伝子を含む分子連鎖地図の構築

雄性 (*Y*) および間性 (*M*, Monoecious) 決定遺伝子に関する分離集団 [03-009 ♀ × (03-336 × 03-009 ♂)] および両遺伝子に連鎖する SCAR マーカー (SP\_0008, SP\_0022, SP\_0016, SP\_0007, T11A および V20A) および SSR マーカー (S04) を用いて、分子連鎖地図の構築を行った (図参照). その結果、これらのマーカーは、*Y* および *M* を含むおよそ 29 cM の染色体領域にマップされた (図参照). また、*Y* および *M* は、およそ 13 cM 隔てて連鎖していることも判明した.



(5) ホウレンソウのトランスクリプトームの取得

ホウレンソウ雌雄異株系統 03-009 の雄株 (8 個体) 及び雌株 (8 個体) の地上部 (シュート系) から抽出した全 RNA を出発材料に用いて、次世代シーケンサー (Hi-Seq 2500, Illumina, San Diego, CA, USA) によるトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) のための cDNA ライブラリーを作成した. なお、1 個体から抽出した全 RNA に由来する雄 (M1, M2, M3) 及び雌ライブラリー (F1, F2, F3) を 3 個ずつ構築し、さらに 5 個体分のバルク化全

RNA に由来する雄 (M5) および雌バルクライブラリー (F5) も作成した.

それぞれのライブラリーについて 3,000 万リードの取得を目標にペアエンドシーケンシング (100 bp × 2) を行った. 最終的に、各ライブラリーから 2,800 万以上のリードが取得され、いずれも Quality Value の平均が 28 を超えていた.

次に、各ライブラリーから取得したペアエンドのリードをプールし、ソフトウェア Trinity を用いてリードアセンブルを行った. その後、アセンブル配列 (総延長 133,464,632 bp) からコンタミネーション配列を除去したところ、その総延長は 122,755,703 bp となった. そして、さらにスプライスバリエーションとして構築された重複しているコンティグを統合することによって、総全長 66.8 Mb、総数 190,200 本のコンティグが最終的に構築された. また、コンティグの平均長、N50 値及び最長のコンティグ長は、それぞれ 351 bp、607 bp 及び 34,073 bp であった.

今後は、本研究で構築されたトランスクリプトームを参照配列として用いたマッピング解析に拠って、雌雄間の遺伝子発現比較を行うことを予定している.

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 2 件)

- ① Yamamoto K., Oda Y., Haseda A., Fujito S., Mikami T., Onodera Y.: Molecular evidence that the genes for dioecism and monoecism in *Spinacia oleracea* L. are located at different loci in a chromosomal region, *Heredity* (2014) 112, 317-324 (査読有り)
- ② Kuwahara K., Suzuki R., Ito Y., Mikami T., Onodera Y.: An analysis of genetic differentiation and geographical variation of spinach germplasm using SSR markers (2013) *Plant Genetic Resources*, doi:10.1017/S1479262113000464 (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 藤戸聡史・鈴木侑実・星野洋一郎・近江戸伸子・小野寺康之, *Spinacia* 属から見出された同型および異型性染色体の FISH 法による特徴付け, 日本育種学会 第 125 回講演会 東北大学 2014 年 3 月 21 日-3 月 22 日
- ② 鈴木侑実・藤戸聡史・星野洋一郎・小野寺康之, *Spinacia* 属における分子系統学的解析および異型性染色体の探索, 日本育種学会 第 125 回講演会 東北大学 2014 年 3 月 21 日-3 月 22 日
- ③ 長谷田茜・織田祐二・小野寺康之, ホウレ

ンソウにおける間性決定遺伝子の量比と雌花着生比率の関連性, 日本育種学会 第124回講演会 鹿児島大学 2013年10月12日-10月13日

- ④ 織田 裕二・小野寺 康之・豊田 敦・山本 将之・三上 哲夫, ホウレンソウにおける雄特異的ゲノム領域の構造解析, 日本育種学会第123回講演会 東京農業大学世田谷キャンパス 2013年3/27-28
- ⑤ 小野寺康之・織田祐二・山本和輝・長谷田茜・藤戸聡史・三上哲夫, ホウレンソウにおける雄性および間性を支配する遺伝子の対立性検定, 園芸学会平成25年度春季大会 東京農工大学小金井キャンパス 2013年3月23-24日
- ⑥ 織田 祐二・長谷田 茜・堀 英朗・小野寺 康之・三上 哲夫, ホウレンソウから見出された連鎖関係にある二つの性決定遺伝子座のマッピング, 日本育種学会第122回講演会 2012年9/14-15 京都産業大学
- ⑦ 山本和輝・織田裕二・長谷田茜・小野寺康之・三上哲夫, 性連鎖マーカーを用いたホウレンソウの雄性および間性決定遺伝子に関する対立性検定, 日本育種学会 第121回講演会 2012年春季 宇都宮大学 2012年3月29・30日
- ⑧ 織田裕二・小野寺康之・三上哲夫, ホウレンソウ間性決定遺伝子近傍領域の連鎖地図の作成, 第120回講演会 2011年秋季 福井県立大学, 2011年9月23・24日
- ⑨ 山本和輝・小野寺康之・三上哲夫, ホウレンソウの雄性および間性発現に関わる遺伝子間の対立性検定, 日本育種学会 第120回講演会 2011年秋季 福井県立大学, 2011年9月23・24日
- ⑩ Yasuyuki Onodera, Hiroki Masumo, Itaru Yonaha, Kazuki Yamamoto, Yuji Oda, Tetsuo Mikami, Genetic analysis of the genes for dioecism and monoecism in *Spinacia oleracea* L. EUCARPIA Leafy Vegetables 2011, August 24-26, 2011, Université Lille Nord de France, Villeneuve d'Ascq, France

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野寺 康之 (ONODERA YASUYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：80374619