

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25250025

研究課題名(和文)単為発生線虫の比較ゲノム解析

研究課題名(英文)Comparative genome analysis of parthenogenetic nematode

研究代表者

小原 雄治 (KOHARA, Yuji)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任教授

研究者番号：70135292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物では有性生殖が一般的であるが、モデル線虫*C.エレガンス*の近縁種の *Diploscapter coronatus* は単為生殖を示す。雄も精子も観察されず、減数分裂は不完全である。単為生殖のゲノム基盤を明らかにするために、この線虫の比較ゲノム解析を行った。得られた170Mbpのドラフトゲノム配列は、ほぼ90%が平均5.7%ヘテロ接合性を示す相同対を構成し、二倍体ゲノムに対応すると考えられた。半数体相当ゲノムは染色体1本であった。*C.エレガンス*との比較から、性決定や減数分裂に関わる遺伝子の欠損や異常が見られ、特に *rec-8* など減数分裂 *kleisin* の欠損は単為生殖機構に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although sexual reproduction is prevailing among eukaryotes, the nematode *Diploscapter coronatus*, a close relative of the model *C. elegans*, reproduces parthenogenetically. Neither males nor sperm have been observed and some steps of meiosis are apparently skipped in this species. To uncover the genomic changes associated with parthenogenetic reproduction, we carried out a genome analysis and we found that nearly 90% of the 170 Mbp draft genome sequences constitute homologous pairs with a 5.7% heterozygosity on average, meaning that the 170 Mbp sequences correspond to the diploid genome. Fluorescent staining showed that the *D. coronatus* genome consists of two chromosomes ($2n = 2$). Although 59% of the *C. elegans* genes were found in the genome, many genes including those involved in sex determination and meiosis were missing or very divergent. Among them the defect of meiotic *kleisins* (*rec-8* and *coh-3/4*) may be related to parthenogenetic reproduction.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ゲノムアセンブリ 線虫 単為生殖 進化 減数分裂 ゲノム多様性

1. 研究開始当初の背景

線虫の中には多様な細胞分裂パターン・細胞配置を示すものが知られている。そのひとつの線虫 *Diploscapter coronatus* は単為生殖を行うことが知られていた。雄や精子は見つからず、*C. elegans* のように自家受精（精子と卵子を共に持つ）ではなく、卵ゲノムのみで次世代を作っている。このような場合、通常の減数分裂をするとゲノムはホモ接合体になり、遺伝子多様性が無くなることから、進化的に消滅すると言われている。しかし *D. coronatus* では EST 解析等から非常に高いヘテロ性を持つゲノムである可能性が出てきた。

一方、2000年に M. Meselson は長期間単為生殖を続けてきたワムシの一種の遺伝子を解析し、ヘテロ性が非常に高まっている（3-50%）ことを見だし、ゲノムの双方に独立に変異を蓄積していくこと（Meselson effect）で有性生殖なしに進化を生き延びることを提案した。

我々が見出した *D. coronatus* の高いヘテロ性は Meselson effect なのか？豊富な情報が使える *C. elegans* と比較することにより、どのような遺伝子変化が単為生殖（及びそれによる進化）を可能にしているのかなど解明できる可能性がある。このようなことから、*D. coronatus* ゲノムの詳細な比較解析を行いたいと考えた。

2. 研究の目的

有性生殖の意義は生物学における長年の課題であるが、モデル生物の線虫 *C. elegans* グループに最も近い種である *D. coronatus* は長期にわたり単為発生のみで進化してきた可能性が出てきた。そこで本研究では、この現象のゲノム基盤を明らかにすることを目的とする。また、この線虫は初期卵割のパターンが *C. elegans* と異なるが原腸陥入時までは同様の細胞配置になることなど、細胞間相互作用による細胞運命決定機構の多様化が知られている。そこで、*C. elegans* 遺伝子発現パターンとの比較などから、初期胚発生メカニズムの多様性機構を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゲノムアセンブリとゲノム構造

当初 EST (cDNA クローンの両末端配列) 解析を行ったところ、EST の大部分がグループ内で明確なヘテロ接合性を示した。このヘテロ接合性は、体細胞株のように対立遺伝子の差異が蓄積され維持される単為生殖と関連していると推定した。続いて、サンガー法から次世代シーケンサーさらには fosmid 末端配列を含め様々な方法で得たゲノムショットガンリードを Celera アセンブラを用いてアセンブルを行い、総延長 170Mbp (511 scaffolds、N50 : 1.0Mbp) のドラフトゲノムを得た。この値は、k-mer 分布から計算され

たゲノムサイズと一致する。

scaffold 間で同源性検索を行ったところ、ドットプロット (図 1a) に示すように自己間の 100%一致 (赤線) 以外に、同源性の高い領域 (~94%の類似性、紫色の線) が見いだされ、scaffold の順序を並べ替えることにより、ほぼ 45度の傾斜で並ぶことがわかった。この場合、scaffold 配列の 89.3%は相互にベストマッチの相手が存在していた。これらのことから、このゲノムは高いヘテロ接合性を有する対立遺伝子配列の対からなることがわかった。全体の頻度は SNV (単一ヌクレオチド変異) は 5.7%であり、In/Del (挿入/欠失) は 0.66%であった。SNV はイントロン領域において比較的高い傾向を示した。

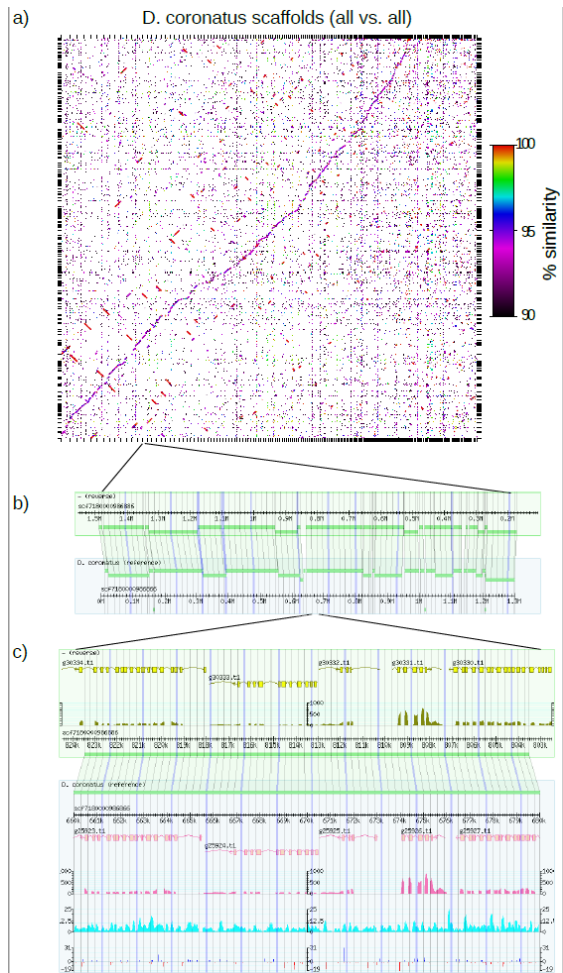


図1. ドラフトゲノム a)すべての scaffold 間の dot blot. b)相同領域の拡大図。上下緑のバーが相同領域。c)相同領域のさらなる拡大図。上から、遺伝子モデル、RNA-seq (ヒストグラム) コンティグ 2 本、遺伝子モデル、RNA-seq、SNV 頻度、In/Del 頻度。

フローサイトメトリーによる核 DNA 含量を測定し、また蛍光標識された核 DNA の顕微鏡測定を行い、それらの結果から 170Mbp が体細胞核 DNA 量に相当することが分かった。また、染色体の蛍光染色により、卵母細胞においては 4 染色分体を観察でき (図 2c)、初期胚細胞では、2 本の染色体しか観察されなかった (図 2f)、これらの結果から、*D. coronatus*

の二倍体ゲノムは 2 本の染色体合計 170Mbp からなることを明らかにした。

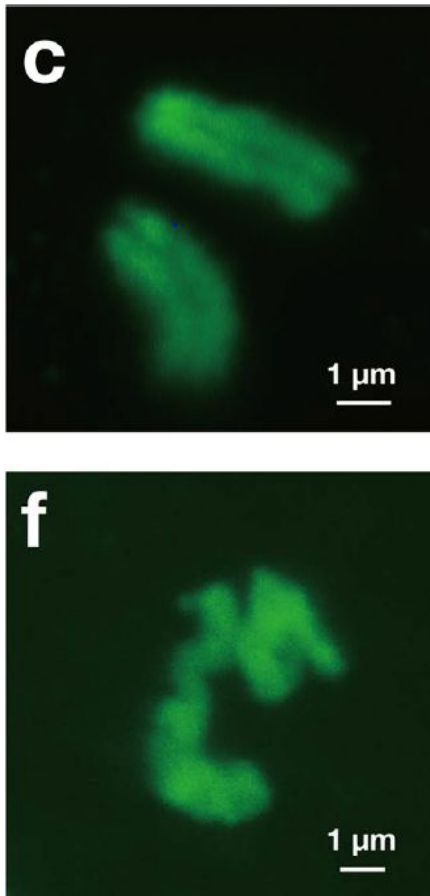


図 2 . *D. coronatus* の染色体 (c) 卵母細胞、(f) 初期胚細胞。いずれも DAPI 染色。

(2) 遺伝子組成 反復配列等

反復配列は、*D. coronatus* ゲノムの 17.4% を占めた。これらの反復において、トランスポゾン様配列が同定され、これらの数は *C. elegans* に匹敵した。今のところ水平伝達遺伝子の直接の証拠は見られていない。

タンパク質コード遺伝子

RNA-Seq データを用いた Augustus 解析により 34,421 個のタンパク質コード遺伝子が予測された。そのうち 20,264 (59%) は *C. elegans* 遺伝子のオーソログであることが示された。これらのうち 16,092 の遺伝子は、*C. elegans* の単一遺伝子に対してオーソログである 8,046 の対立遺伝子の組 (2:1 の関係と呼ぶ) であった。残りは様々な数の組み合わせのホモログ関係を示した。

C. elegans 遺伝子に対してオーソログではない 14,157 (41%) のタンパク質コード遺伝子のうち、5,850 が対を形成し、191 のグループの 743 の遺伝子は三つ組以上を形成した。残りの 7,564 の遺伝子は相手なしの単一遺伝子であった。

従来の二倍体ゲノムの基準でいうと、*D. coronatus* ゲノムの遺伝子数は 21,098 (= 11,345 + 7,774 + 3,957 / 2) と言える。こ

の数は *C. elegans* の遺伝子数に近い。

遺伝子の順番と転写方向は、2 つの対立遺伝子領域間でよく保存されていた。

タンパク質コード遺伝子の変化

単為生殖において、対立遺伝子領域は互いに独立に変化していくので、遺伝子対間で進化選択があるかどうかを見るために、2:1 の関係を示した遺伝子対の間の塩基置換率を解析した。対合遺伝子の CDS 領域に関して、同一性は 97.2%、第 3 文字で 93.7%、4-fold degenerated 部位で 93.0% であった。この配列の変化は、真核生物において最も多様性の高いものの 1 つである *Caenorhabditis remanei* で観察される多様性に匹敵する。これらの対の dN/dS 値 (非同義部位および同義部位における置換速度の比) を算出したところ、6,760 対について有意な dN/dS 値 ($P < 0.05$) が得られた。値の中央値は 0.12 であり、いずれも 1 を超えておらず、遺伝子の大部分が負の選択下で多様化したと考えられ、正の選択の徴候は見られなかった。

性決定経路遺伝子組成の異常

D. coronatus において、*C. elegans* に見られる性決定経路におけるいくつかの重要な遺伝子 *xol-1*、*tra-2* 等が見つからなかった。単為生殖種が性決定経路の遺伝子を失ったことは驚くことではないが、SEX-1 および FOX-1 (X 染色体計数因子) および HER-1 (TRA-2 リガンド) のようなこの経路のオーソログが相当程度に保持されることは興味深い。*D. coronatus* では、これらは元の性決定経路以外の経路で機能しているのかもしれない。

減数分裂関連遺伝子の異常

InParanoid による最初のスクリーニングでは *rec-8*、*coh-3/4*、*zim-1/2/3*、*him-8*、*syp-1/2/3/4* などの減数分裂過程に関わる多くの重要遺伝子のオルソログを検出することができなかった。そこで、これらの遺伝子のホモログを Pfam データベースを用いて検索し、系統樹解析を行ったところ、mitotic kleisin (SCC-1 / COH-1) ホモログの 3 組の対立遺伝子、及び meiotic kleisin (REC-8) ホモログの 1 つの単一遺伝子を見出した。しかし、この meiotic kleisin (REC-8) ホモログは以下の異常を示した (図 3) () ゲノム中に対立遺伝子が見られない (単一遺伝子) () REC-8 の N 末端ドメインのみを含み、コヒーシ複合体中の kleisin の相互作用構造タンパク質である HIM-1 (SMC-1) と融合遺伝子を形成していた、() Rad21 / Rec8 様ドメイン (IPR023093) として知られている C 末端ドメインは欠損していた。通常、kleisin の N 末端および C 末端ドメインは、それぞれ SMC-3 および HIM-1 (SMC-1) と相互作用する。しかし、*D. coronatus* の REC-8 ホモログは、SMC-1 結合のための C 末端ドメインを失っており、代わりに SMC-1 に直接融合

している。meiotic kleisin は、減数分裂中に姉妹染色分体を保持するために不可欠な因子であり、したがってそれらの欠損や変異は単為生殖に関連する可能性がある。

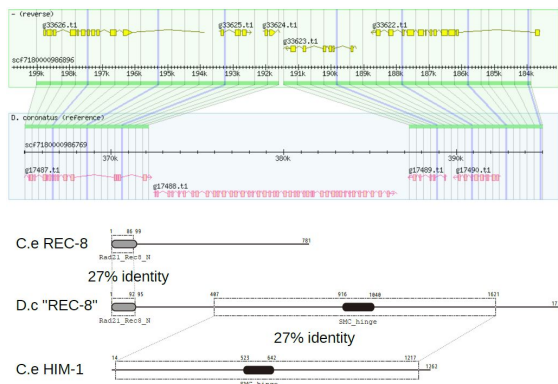


図3 . *D. coronatus* の *rec-8* ホモログ

D. coronatus には相同染色体対合拠点認識タンパク質である ZIM-1/2/3 および HIM-8 は存在しないが、それらの相互作用タンパク質 SUN-1 および ZYG-12 が存在した。このことから未知のタンパク質が染色体-核膜相互作用を介在していることが示唆される。シナプトネマ複合体 (SYP-1/2/3/4) は見つからないが、相同染色体対形成とは必ずしも合わず、SC タンパク質は進化的に変化しやすく、低い類似性しか持たないことに原因するかもしれない。

4. 研究成果

(1) 減数分裂異常と単為生殖

減数分裂 I では、相同染色体の分離が起こり、一次卵母細胞は 2 つの娘細胞 (二次卵母細胞および第 1 極体) に分裂し、それぞれ同一の姉妹染色分体を保持する。*D. coronatus* では減数分裂 II が抑制されていると考えられているが、その場合はたとえ交叉が起こっても娘細胞は同一の姉妹染色分体を保持するのでホモ接合体になる。しかし、実際には *D. coronatus* のゲノムは非常に高いヘテロ接合性を示したので、姉妹染色分体分離のプロセスに何かが起こっていると考えられる。*C. elegans* においてはこのプロセスは meiotic kleisin (REC-8, COH-3 および COH-4) の機能を必要とする。これらのタンパク質は姉妹染色分体をつなぎとめることにより、相同染色体の分離を確実にしている。*C. elegans* では meiotic kleisin の欠損変異体は早期の姉妹染色分体分離をもたらすことが知られている。本研究では、一つの異常 *rec-8* 以外に *D. coronatus* ゲノムに減数分裂 kleisin オーソログが存在しないことを明らかにした。このことが減数分裂に異常をもたらした可能性があり、単為生殖とも関係があるかもしれない。

(2) 単為生殖 / 高ヘテロ接合性の起源

単為生殖は主として種間交雑により起こると主張されている。植物寄生線虫

Meloidogyne incognita は、そのような種間交雑に由来すると考えられているが、*D. coronatus* とは違いも見出した。例えば無性生殖様式に関連していると考えられている転移因子および反復配列は、*M. incognita* ゲノムの 36% を構成するが、*D. coronatus* ゲノムの 17.5% のみを占める。この値は有性生殖を示す線虫 (16.5% : *C. elegans*, 22.4% : *C. briggsae*) と類似している。

D. coronatus ゲノムでは、対になった構造を有する相同配列領域は長い範囲にわたって遺伝子の並び方と向きは保存されていた。また、高いヘテロ接合性にもかかわらず、発現レベルは対立遺伝子間で類似していた。これらのことから、*D. coronatus* が種間雑種の産物であった場合、それは非常に近い種間で起こったにちがいない。この種の近縁種 *Protorhabditis* 属の染色体は 2 系統が *D. coronatus* ($2n = 2$) タイプであり、1 系統は *C. elegans* ($2n = 12$) タイプであり興味深い。高いヘテロ接合性は WGD (全ゲノム重複) モデルでも起こりえる。また「Meselson 効果」すなわち単為生殖の結果としての突然変異、逆位および転座の独立した蓄積は、観察された遺伝子プールの多様性の原因となる可能性がある。*D. coronatus* におけるヘテロ接合性の起源については dN/dS 比は手がかりを与えるかもしれない。*D. coronatus* が種間雑種の結果である場合、2 つの遺伝子コピー間の相違はおそらく 2 つの親種間の相違を反映するので、ネガティブ選択の徴候が予想される。WGD モデルでは、ohnolog は有害な突然変異を獲得して、比較的高い dN/d 比をもたらさであろうし、Meselson 効果の場合も同様である。*D. coronatus* の dN/dS 比は 1 を超えず、中央値は 0.12 であり、ネガティブ選択を示した。従って、種間雑種起源の可能性を示している。

本研究で得られたゲノム配列は、単為生殖のメカニズムと線虫の多様性の進化をさらに探求するための基礎を提供する。

以上の成果は論文発表し、本ゲノム配列データは BioProject accession PRJDB3143 で DDBJ から公開した。下記ゲノムブラウザで閲覧することもできる。

これら以外に、*C. elegans* との比較研究のために、*C. elegans* での遺伝子発現機構や制御機構に関する研究や方法開発も進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件) すべて査読有り

Hiraki H, Kagoshima H, Kraus C, Schiffer PH, Ueta Y, Kroiher M, Schierenberg E, Kohara Y: Genome analysis of *Diploscapter coronatus*: Insights into molecular peculiarities of a nematode with parthenogenetic reproduction. **BMC Genomics** (2017 in press)
DOI: 10.1186/s12864-017-3860-x

Andachi Y and Kohara Y: A whole-mount in situ hybridization method for microRNA detection in *Caenorhabditis elegans*. *RNA* 2016 (7):1099-106,
DOI: 10.1261/rna.054239.115

Rastogi S, Borgo B, Pazdernik N, Fox P, Mardis E, Kohara Y, Havranek J, Schedl T: *C. elegans glp-4* Encodes a Valyl Aminoacyl tRNA Synthetase. **G3-Genes Genomes Genetics** 2015 (12): 2719-2728.
DOI: 10.1534/g3.115.021899

Kagoshima H and Kohara Y: Co-expression of the transcription factors CEH-14 and TTX-1 regulates AFD neuron-specific genes *gcy-8* and *gcy-18* in *C. elegans*. **Developmental Biology** 399, 325-336 (2015)
DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.01.010

〔学会発表〕(計3件)

金野宏之、野口浩毅、小原雄治:

C. elegans 初期胚における母性 *mex-3* mRNA の局在化は細胞運命の確実な決定に必要である。第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日 横浜

Konno H, Noguchi K, Kohara Y: Mechanism and significance of the maternal *mex-3* mRNA localization in *C. elegans*. 20th International *C. elegans* Meeting, June 24-28, 2015, UCLA, CA USA

Hiraki H, Kagoshima H, Shin-i T, Ueta Y, Kraus C, Schiffer P, Schierenberg E, Kohara Y: Genome and transcriptome analysis of the parthenogenetic nematode *Diploscapter coronatus*. 日本分子生物学会第36回年会 2013年12月3日~6日 神戸ポートアイランド

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

D.coronatus ゲノムブラウザ

http://nematode.lab.nig.ac.jp/d_coronatus/

線虫遺伝子発現データベース (NEXTDB)
<http://nematode.lab.nig.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 雄治 (KOHARA, Yuji)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任教授

研究者番号: 70135292