

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03609

研究課題名(和文) 線虫を用いた単為生殖のゲノム基盤解明

研究課題名(英文) Studies on genomic basis for parthenogenesis in nematodes

研究代表者

小原 雄治 (KOHARA, Yuji)

国立遺伝学研究所・先端ゲノミクス推進センター・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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：有性生殖の意義は生物学における長年の課題である。モデル生物*C. elegans*に最も近い種である線虫*Diploscapter coronatus*は長期にわたり単為発生を続けてきたと考えられる。この線虫のゲノムを解析したところ、染色体は1対(2n=2)であり、相同染色体が互いに約6%という高いヘテロ性を示すことがわかり、減数分裂に関わる遺伝子の欠損や異常が見つかった。

本研究では、さらに長鎖シーケンスの手法を用いて染色体レベルに近いphasing(相同染色体毎の完全配列決定)を行い、*C. elegans*ゲノムとの関係を明らかにした。その結果、染色体融合を含めた複雑なゲノム進化が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線虫は多様な生殖様式を示す種があり、今後ゲノム解析が進展し、多くの近縁種との比較ができれば、単為生殖へのプロセスを明らかにし、有性生殖の意義にも迫れるかもしれない。生殖は社会的に興味を持たれる課題であり、生物学における長年の課題である有性生殖について手がかりを得られればインパクトは大きい。

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 organism, *C. elegans*, reproduces parthenogenetically. Neither males nor sperm have been observed and some steps of meiosis are apparently skipped in this species. Our draft genome sequencing showed that there was about 6% heterozygosity between the diploid genome, which consists of two chromosomes (2n=2). Many genes involved in sex determination and meiosis are missing or very divergent.

In this study we carried out the phasing of the genome taking advantages of long read sequencing technology including PacBio and Irys to obtain clues to understand the evolution of the genome. The relationship of gene arrangements with the *C. elegans* genome suggests complex process of the genome evolution including chromosome fusion. Genome comparison with other close relatives will provide more clues to understand the basis for the occurrence of parthenogenesis.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ゲノム進化 ロングリードシーケンス PacBio Irys ハプロタイプ

## 1. 研究開始当初の背景

減数分裂と組換え、引き続く卵子と精子の融合による有性生殖は真核生物の基本であり、生物が厳しく変化する環境に対応して進化する戦略である。有性生殖によって生物は遺伝子プールを最大化でき、遺伝子多様性を維持できる。しかし有性生殖は生物にとってコストも高い。例えば、減数分裂時の組換えは有用遺伝子を壊すことがあるし、精子は産生のプロセスも複雑であるが、卵子とは違い、すべてが子孫になるわけではなくムダが多い。いくつかの動物では有性生殖を経ない、単為生殖で増殖するものがあるが、大部分は常にはではなく環境変化に応じて単為生殖を行う。環境が良ければ単為生殖のみで増殖し、環境が悪くなると有性生殖に転換する。単為生殖では Müller's ratchet により有害な変異が不可逆的に蓄積していき、良好な遺伝子多様性を維持できず、環境の変化に適応できずに絶滅してしまうからと考えられる。しかしながら自然は多様であり、例えばワムシやカイムシ、ダニ、ネコブ線虫では長期間にわたって(ワムシでは何百万年も)単為生殖をしてきたことが報告されている。ワムシのゲノムは解読され、有性生殖においてみられるゲノムの交雑や多様化が遺伝子の逆位や水平伝播で獲得されてきたと考えられているが、単為生殖のゲノム基盤の解明はまだ不十分である。

線虫では様々な生殖様式が見られる。雌雄異体(雄と雌)、雌雄同体(自家受精の雌)そして単為生殖(非受精卵から発生)である。単為生殖では悪環境下でまれに雄が出現することがあるが、*Diploscapter coronatus* ではこれまで見つかっておらず、熱ストレスなどの悪環境下でも出現しない。*D. coronatus* の最も特徴的な現象は減数分裂の異常である。*C. elegans* 等通常の場合、二段階の減数分裂が起こり、極体放出が2回起こるが、この線虫では1回しか見られず、減数分裂の1回がスキップされている。*Caenorhabditis* 属では単為生殖は見つかっておらず、*Diploscapter* は *Caenorhabditis* に最も近い outgroup であることから、そのゲノム比較により単為生殖の機構や意義の手がかりが得られることを期待して、*D. coronatus* のゲノム解析をドイツ・ケルン大学の E. Schierenberg 教授との共同研究でゲノム解読を行った(Hiraki et al. 本研究期間中に論文発表)。その結果、総延長 170Mb のドラフトゲノム配列を得た。511 の scaffold からなり、N50 は 1 Mb を超えている。この scaffold の 90% は互いに平均 5.7% の塩基配列の違いと多くの逆位や転座をもつ相同なペアを形成していた。このことは総延長 170Mb の配列が二倍体ゲノムに相当することを意味している。DAPI 染色による染色体観察をしたところ、この線虫の染色体は 1 対 ( $2n=2$ ) であることが分かった。ゲノム配列のアノテーションからは *C. elegans* 遺伝子の 59% のオルソログが見出されたが、例えば性決定 (*xol-1*, *tra-2* 等) や減数分裂 (*kleisins rec-8* and *coh-3/4* 等) に関連する遺伝子が欠けたり、多様化しており、精子が無いことや減数分裂の異常につながる可能性が考えられた。また、このような高いヘテロ性は相同染色体の遺伝子ペアのそれぞれについての RNA-seq による遺伝子発現レベルの比較も可能にした。大部分の遺伝子ペアはほぼ同じ発現レベルを示したが、2-5 倍以上の違いを示す遺伝子ペアも見出された。

単為生殖は雑種形成から始まると言われているが、本線虫の元となる可能性のある線虫種が推定されているので、それらの線虫のゲノム配列決定を行い、形成過程の手がかりを得るために *D. coronatus* ゲノム配列の phasing(相同染色体毎の完全配列決定)を行う必要がある。さらには、多様な線虫の系統樹には他にも単為生殖線虫が見られる。これらのゲノム解読も進め、単為生殖のゲノム基盤を明らかにすることが期待される。

## 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。モデル生物 *C. elegans* に最も近い種である線虫 *Diploscapter coronatus* は長期にわたり単為発生を続けてきたと考えられる。この線虫のゲノムを解析したところ、相同染色体が互いに約 6% という高いヘテロ性を示すこと、減数分裂に関わる遺伝子の欠損や異常が見つかった。単為生殖は雑種形成から始まると言われていることから、本線虫の元になりえると推定されている線虫のゲノム配列決定及び本線虫ゲノム配列の phasing(相同染色体毎の完全配列決定)を行い、ゲノム比較により単為生殖への分岐の手がかりを得たい。また他の単為生殖線虫の解析も進め、単為生殖のゲノム基盤解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

以下を計画した。

- 1) *D. coronatus* ゲノムの phasing(相同染色体毎の配列決定)を PacBio シーケンサによる 1 分子長鎖配列や Irys system による 1 分子長距離マッピング等を駆使して行う。
- 2) Phasing された *D. coronatus* ゲノムの遺伝子組成を確定し、単為生殖との関連を探る。
- 3) *D. coronatus* に最も近い属として見出された線虫のゲノム解読を行い、ゲノム比較によって、雑種形成を経ると考えられている単為生殖化の手がかりを得る。
- 4) 他の単為生殖線虫のゲノム解読を進め、単為生殖に共通したゲノム基盤を解明する。

## 4. 研究成果

- 1) *D. coronatus* ゲノムの phasing

*D. coronatus* ゲノムの phasing(相同染色体毎の配列決定)に向け、PacBio ロングリードと Irys

システムを用いてハイブリッドアセンブリを行った(ゲノム・進化研究系、豊田敦特任教授の協力を得た)。得たデータは以下である。

- Illumina Hiseq  
250bp×2 ペアエンド, インサートサイズ約 600bp, 3,867,5919 pairs
- PacBio Sequel  
断片サイズおおよそ 30-80kb, 6 cells, 3,423,476 subreads
- Irys(1 分子 Nickase サイトマッピング)  
BspQI(GCTCTTC) 平均 221kb 124,762 本 → 417 maps, 171Mb  
BssSI(GACGAG) 平均 215kb 102,479 本 → 532 maps, 121Mb

PacBio Sequel で得た断片サイズ 30 - 80Kb のライブラリーを用いた約 340 万リードについて、まず HBAP4 でアセンブルした結果、35 本の scaffold を得た。次いで、Canu でアセンブルし、Illumina Hiseq のショートリードを用いて pilon で修正し、30 本の scaffold (全長 170Mb、最長 36Mb、N50 14.7Mb) を得た。これに Irys データ (2 種類の nickase のサイトマップのデータ) のアセンブル結果を合わせた結果、最長 69.1Mb、N50 が 22.8Mb の非常に大きい scaffold が得られた。

## 2) *D.coronatus* ゲノムの組成と単為生殖との関連

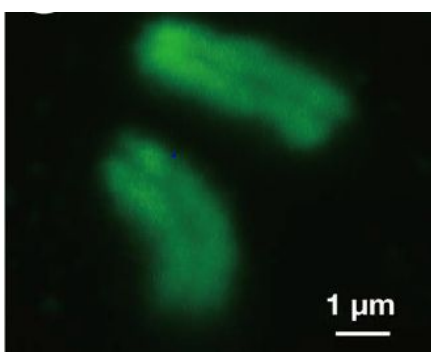


図1 . *D.coronatus* 卵母細胞における染色体。相同染色体の姉妹染色体と考えられる。DAPI 染色。

図1のように、*D.coronatus* は2本1対の相同染色体(ただし、組み換えは抑えられていて、約6%の高いヘテロ性や、多くの転座が見られる)から成っていることから、それぞれを互いに相同の順番とすると、一方は3つの scaffold (長さは2~69Mb)、他方は9本の scaffold (1.5~22.7Mb) でカバーされた。*D.coronatus* (Dc) の遺伝子はヘテロ性が高いので *C.elegans* (Ce) のゲノムと比較すると多くが、Dc:Ce=2:1 の関係になる。このような遺伝子間を結ぶ線をプロットして、Circos で表示したのが図2である。

*D.coronatus* は *C.elegans* の最も近縁の種の一つと言われているが、単為生殖の場合は雑種による種形成が考えられる。また、*C.elegans* は染色体が6本であり、多くの線虫も同程度の数であることから、染色体融合の可能性も考えられる。実際、*P.pacificus* の論文では、*Caenorhabditis* の祖先で染色体Vの一部が転座してX染色体の一部になったと指摘されている。また、*D.coronatus* とほぼ同種と考えられる *D.pachys* のゲノム解読論文では、*Diploscapter* の祖先で染色体IとX、XとIII、IIIとIIが結合したのではないかと主張がされている。図2の結果を詳細に検討すると、そのような染色体融合が起こったことに合うところが見られる。また、このシーケンスデータを Flye2 でアセンブルし、Bandage でアセンブリグラフを可視化したところ、テロメアと思われる3単位の繰り返し配列二箇所が見つかった。これらの部位も染色体融合を示しているのかもしれない。

以上の結果は相当に長い scaffold についての解析であるが、当初目指した2本(2n=2)のアセンブリには至っていない。Irys によるマッピングの精度が十分でなかったこともある。そのために、当初計画では染色体 FISH や HiC 解析を併用することとしていた。染色体 FISH については、*C.elegans* をコントロールとして何度もトライしたが、原因不明で十分な結果が得られるまでに至っていない。HiC については試料調整にあたって、生育が極めて遅い状況に至り、結果が得られていない。今後、上記を試みて、染色体レベルのアセンブリを達成し、ゲノム進化の過程を議論できればと考えている。

## 3) *D.coronatus* に最も近い属のゲノム解読

単為生殖開始経路を検討するために、*Diploscapter* に最も近いと思われる *Protorhabditis* の2種について、ゲノム解読を計画した。共同研究者のドイツ・ケルン大学の Schierenberg 教授から供与を受け、培養を開始したが、これも極めて生育が遅く、十分な試料が得られていない状況である。

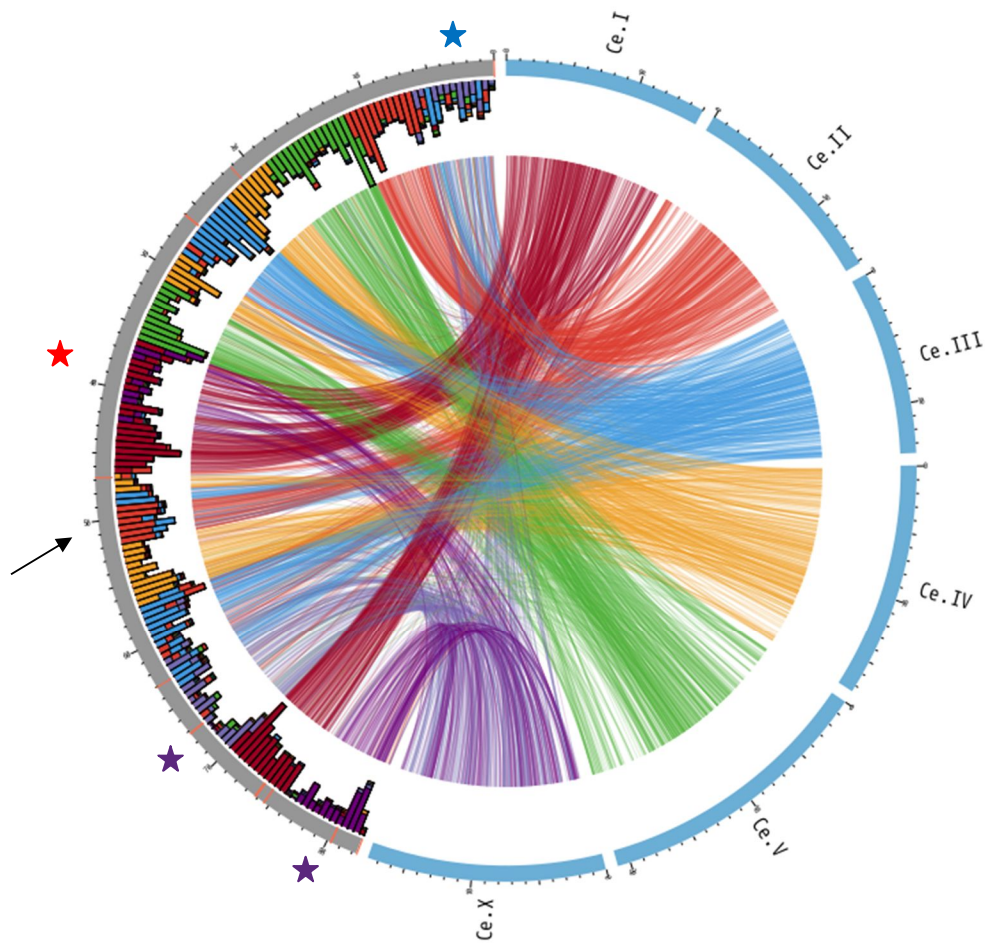


図2 . *D.coronatus* ゲノムのアッセンブル結果と *C.elegans* ゲノムとの関係

*D.coronatus* (Dc) と *C.elegans* (Ce) に加えアウトグループとして *Pristionchus pacificus* (Pp) の3種の間で Dc:Ce:Pp が 2:1:1 になっている Ce と Pp で対応する染色体に載っている遺伝子だけにして、*C.elegans* ゲノム 6 本を基準に色分けして対応する *D.coronatus* に対応する遺伝子への線を引いた。わかりやすくするために *D.coronatus* は相同染色体の一方だけにして、500kb 毎の線の本数(遺伝子数)の棒グラフを付けた。同色が連なっているところは祖先で分かれていたことが示唆される。星印及び矢印の所では二色が混じっているため、祖先で結合して染色体内再編成で混ぜられた結果と示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiraki Hideaki, Kagoshima Hiroshi, Kraus Christopher, Schiffer Philipp H., Ueta Yumiko, Kroiher Michael, Schierenberg Einhard, Kohara Yuji	4. 巻 18
2. 論文標題 Genome analysis of <i>Diploscapter coronatus</i> : insights into molecular peculiarities of a nematode with parthenogenetic reproduction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 478-478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-017-3860-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kraus C, Schiffer PH, Kagoshima H, Hiraki H, Vogt T, Kroiher M, Kohara Y, Schierenberg E.	4. 巻 8
2. 論文標題 Differences in the genetic control of early egg development and reproduction between <i>C. elegans</i> and its parthenogenetic relative <i>D. coronatus</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 EvoDevo	6. 最初と最後の頁 16-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13227-017-0081-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<ul style="list-style-type: none"> <li>・ゲノムブラウザ <a href="http://nematode.lab.nig.ac.jp/d_coronatus/">http://nematode.lab.nig.ac.jp/d_coronatus/</a></li> <li>・アノテーション : <a href="http://parasite.wormbase.org">parasite.wormbase.org</a></li> </ul>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	ケルン大学			