

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19238

研究課題名（和文）アスパラガスにおける性決定遺伝子の探索と性進化の解明

研究課題名（英文）Screening of sex-determination gene in *Asparagus officinalis*

研究代表者

村瀬 浩司（Murase, Kohji）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任准教授

研究者番号：50467693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではアスパラガスの有力な性決定遺伝子候補であるMSE1およびSOFF遺伝子の他、性決定領域の解析から未報告の5遺伝子を発見した。候補遺伝子のmRNAの発現解析ではMSE1が花の発達初期に雄ずいで発現し、推定される機能と一致するパターンを示したのに対し、SOFF遺伝子は花発達中期の雄ずいで発現しており、推定される発現パターンとは異なっていた。クサスギカズラ属の祖先種ではMSE1は雌雄とも存在していること、SOFFは存在していないことから、クサスギカズラ属における雌雄異株の進化は複雑な過程を経ている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスパラガスの雄株は雌株と比較して収量が多く、寿命も長いこと、全雄の品種も開発されるなど、生産現場では雄株が重宝されていた。一方で、雄株がなぜそのような優れた性質を示すのかは分子レベルでは不明であった。本研究では性決定領域の解析によって複数の遺伝子がそこに座乗していることを発見した。今後これらの遺伝子の解析によってアスパラガスの生産性を司る遺伝子が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We found 5 unreported genes and 3 small RNAs from sex-determination locus in *Asparagus officinalis*. MSE1 was expressed in male organ at early stage of flower development, while SOFF was expressed in male organ at intermediate stage, which was unexpected result because SOFF should work female organ. MSE1 gene was PCR amplified both male and female in ancestral dioecy species, while SOFF was not amplified. These results suggest that the evolution of dioecy in genus *Asparagus* is more complex rather than two-gene model.

研究分野：植物科学

キーワード：アスパラガス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

被子植物の多くは一つの花に雄ずいと雌ずいをもつ両性花であり、自家受精しやすい性質をもつ。そのため、植物は様々な方法で自家受精を防ぐシステムを進化させてきた。その中の一つに種の個体が雄花のみをつける雄株と雌花のみをつける雌株に分かれる雌雄異株と呼ばれるシステムがある。雌雄異株は単子葉植物から双子葉植物まで広く分布し、167科、約 15,000 種の植物にあるとされており、少なくとも 100 回は独立して進化したと推定されている。チャールズ・ダーウインは雌雄異株は両性花の植物から段階的に進化した植物であり、雌性両性異株、雄性両性異株はその中間段階であるという進化仮説を著書に記している。この進化仮説はおおむね受け入れられているが、これまでにダーウインの進化仮説を裏付ける証拠は見つかっておらず、その進化理論の是非をめぐる論争に決着をつける実験結果が待たれている。

また、雌雄異株植物の性は性染色体によって支配されており、性染色体上にある性決定遺伝子がそれを制御していることが予想されてきたが、これまでに性決定遺伝子が同定された例はわずかである。本研究ではアスパラガスが比較的小型であること、Y 染色体の有無で性決定が行われるシンプルな性決定システムであること、形質転換の報告が複数有り、遺伝子機能の解析が可能であることから、雌雄異株植物のモデル植物としてアスパラガスの研究を行っている。

2. 研究の目的

本研究ではアスパラガスを植物の性決定機構を研究するためのモデル植物として用い、アスパラガスの性染色体上にある性決定遺伝子の同定とその進化経路の解明を目的とする。アスパラガスを用いたこれまでのトランスクリプトーム解析から、*male inducer* 遺伝子の有力候補として *MSE1* が見出した。応募者は *MSE1* は雄株のみ PCR 増幅され、Y 染色体上の遺伝子であること、発達初期の雄ずいで特異的に発現していること、シロイヌナズナにおいて *MSE1* オルソログを CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によりノックアウトすると雄性不稔になることを明らかにしている。*MSE1* は全ゲノム配列が解読されたモデル植物すべてにオルソログが保存されていることから、*MSE1* がコードする MYB 転写因子は被子植物に共通して存在する雄ずいの発達に必須の転写因子であり、アスパラガスの祖先では *MSE1* に変異が生じたことにより、正常な雄ずいの形成ができなくなって、雌ずいのみを形成する雌株になったと考えている。

実際にショートリードのゲノムシーケンスを用いた全ゲノムアセンブルにより、X 染色体にある *MSE1* 遺伝子座領域が得られている。X 染色体の *MSE1* 領域は Y 染色体の *MSE1* と非常に高い相同性を示しているが、そのコード領域には塩基の挿入もしくは欠失によってフレームシフトを起こす変異が 7 カ所、その他 SNP が 16 カ所見つかると、その機能を失っていることが明らかになった。これらの変異のいずれかがアスパラガスの祖先で起こった雌雄異株誕生の重要なイベントであったと考えられる。アスパラガスが属するクサスギカズラ属は約 300 種から構成され、系統学的に雌雄異株と両性花のグループに分かれることから、クサスギカズラ属では両性花から雌雄異株への進化が 1 度だけ起こったと考えられている。そのため、雌雄異株のグループが種分化する前に起きた変異は雌雄異株の種間でも保存されているはずであり、これを突き止めれば、アスパラガスが雌雄異株に進化した行程が解明できると期待される。そこで、本研究ではアスパラガスの近縁種における *MSE1* の配列を解析することによって、*MSE1* が機能を喪失したきっかけとなった変異を見つけ出し、その進化経路を明らかにすることを目標とする。

アスパラガスにおける雌雄異株の進化を明らかにするためには、未だ同定されていない *female suppressor* 遺伝子を見つける必要がある。*female suppressor* は *MSE1* 遺伝子座の周辺にコードされていると考えられるが、現在アセンブルされているコンティグの N50 は 5 kb 程度であり、さらにコンティグを繋げていく必要がある。ゲノムサイズの 70 倍のシーケンスをアセンブルしているにもかかわらず、コンティグが伸びないのはアスパラガスのゲノム中にリピート配列が多いのが原因であると予想された。そこで、本研究ではロングリードシーケンスを用いて、これらのコンティグを繋げて Y 染色体の配列を決定し、そこにコードされる遺伝子を解析することによって、*female suppressor* の候補遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

これまでに雄株 1 個体由来の DNA から HiSeq を用いたショートリードのシーケンスがゲノムサイズの 70 倍量得られており、メイトペアシーケンスを用いてアセンブルまで終了している。ゲノムアセンブルではコンティグが十分繋がらず、性染色体のゲノム構造はいまだ不明瞭である。雄株特異的なコンティグは約 2 Mb あり、*female suppressor* が存在するはずの Y 染色体非組み換え領域はその程度のサイズと予想された。本研究ではアスパラガスゲノムをより正確にアセンブルするために、PacBio RSII のシーケンスを用いて全ゲノムアセンブルを行い、ドラフトシーケンスを完成させる。具体的にはゲノムサイズ(1.3 Gb)の約 10 倍量のシーケンスをして、作製したコンティグとともにアセンブルを行う。次にドラフトシーケンスに雄株および雌株由来のゲノムシーケンスをマッピングして、雄株のリードが特異的にマップされる性染色体の配列を抽出する。目的のシーケンスが得られたら、遺伝子予測を行い、性染色体上の遺伝子を抽出する。予測された遺伝子についてはアノテーションの付加を行い、*female suppressor* の候補がないかを調べる予定である。また、発達初期の雌雄つぼみの RNA リードのマッピングや small RNA 予測ソフトを使用して、座乗する non coding RNA や small RNA の探索を行う。

また、アスパラガス 5 品種 (cv. Super Welcome, Welcome, Mary Washington, Pole Tom, Hidel) および雌雄異株の近縁種 4 種 (*A. pseudoscaberr*, *A. veriticillatus*, *A. acutifolius*, *A. kiusianus*) において *MSE1* による性決定システムが保存されていることを示すために、雌雄異株については雄株 4 個体、雌株 4 個体を用いてゲノム PCR により、*MSE1* が雄株でのみ増幅されることを示す。また、両性花については 8 個体から *MSE1* を PCR 増幅して、すべての個体に *MSE1* があることを確認する。すでにいくつかの系統では予備的な実験を行い、雌雄異株では雄株特異的に *MSE1* が増幅されること、両性花ではすべての個体が *MSE1* をもっていることを確認している。次に、それぞれの雌株から X 染色体由来の *MSE1* 領域をシーケンスして、アライメントを行い、アスパラガスとその近縁種で共通した変異を探す。雌雄異株の近縁種から抽出した DNA をさらに 3 種 (*A. schoberioides*, *A. stipularis*, *A. cochinchinensis*) 入手したので、これも解析に追加する。

4. 研究成果

雌ずい側の性決定遺伝子を探索するために、ゲノム解析を行った。これまでにゲノムサイズの約 70 倍のイルミナゲノムシーケンスを用いたアセンブルデータが作製されており、519 Mb のアセンブルデータが作製された。アセンブルデータにない残りの部分はリピートシーケンスである。このアセンブルデータに雌雄のイルミナゲノムシーケンスリード約 32 Gb をマッピングして、雄株のリードが雌株の 5 倍以上マッピングされているスカフォールド 3,211 個を得た。さらにこれらにスカフォールドに対し雌雄のつぼみ由来 RNA リード

11 Gb をマッピングして、雄株由来の RNA が雌株より 5 倍以上マッピングされた 44 個のスカフォールドを得た。これらのスカフォールドに対して座乗する遺伝子のアノテーションを行い、トランスポゾンとアノテーションの付かなかったものを除いた 10 個の候補遺伝子を得た。ゲノム PCR をして Y 染色体にコードされるかを確認したところ、2 つの遺伝子が Y 染色体上に存在しており、1 つは *MSE1* であった。もう 1 つの遺伝子は DUF247 ドメインをもつ機能未知の遺伝子であったが、最近になってアメリカの研究グループからアスパラガスの全ゲノムシーケンスが報告され、雌ずい側の性決定候補遺伝子 *SOFF* であると報告された。

そこで、公開された Y 染色体の配列に雌雄のゲノムをマッピングして、Y 染色体に特異的な領域を特定することにより、染色体上の性決定領域の特定を試みた。性決定領域は約 700 kb と報告されていたが、本解析により、約 2 Mb の領域に雄株特異的に DNA リードがマッピングされている領域が観察され、より広い領域が組み換えの抑制を受けていると推察された。次にこの領域から雄株特異的に発現する遺伝子を特定するために、雌雄の形態差が顕れる未熟なつぼみ由来の RNA リードをマッピングした。今回解析した 2 Mb の領域には *MSE1* とアメリカのグループにより報告されている *Nudix hydrolase* が雄株特異的な発現を示しており、他に未報告の遺伝子が 5 つ雄株特異的な発現を示していた。興味深いことに、雌ずい側の候補遺伝子として報告されている *SOFF* 遺伝子はマップされたリードがほとんど観察されなかった。また、*SOFF* には約 90% の相同性をもつ遺伝子 (*SOFFL*) が染色体 5 番に存在する。そこで、この *SOFFL* が発現しているかを同様に調べたところ、雌雄両方で発現していることが明らかになった。

MSE1, *SOFF* および新たに同定した Y 染色体の性決定領域にコードされている 5 つの遺伝子 (*F-box*, *ncRNA2*, 5, 6, 7) について mRNA の発現パターンを定量 PCR 法により調べた。雌雄つぼみの発現比較では、*MSE1*, *SOFF*, *F-box* の 3 つの遺伝子が雄株特異的な発現を示し、*ncRNA2*, *ncRNA5*, *ncRNA6* 遺伝子が雄株で強い発現を示した。つぼみの発達段階における発現解析では *MSE1* が発達初期で発現しているのに対し、*SOFF* は発達中期から後期にかけて発現していた。*ncRNA5*, *ncRNA6* は開花した花で最も強い発現を示し、*ncRNA2* は発達初期から中期にかけて強く発現していた。*F-box* 遺伝子は発達初期から中期にかけて発現し、開花した花でまた発現量が増加していた。次につぼみの各器官における発現量を調べたところ、*MSE1* と *SOFF* は薬で特異的に発現しており、*SOFF* については本来機能すべき組織での発現が極めて低いことが明らかになった。*F-box* と *ncRNA2* は雌ずいで発現が強く、*ncRNA6* は薬で強い発現を示した。次に、雌雄つぼみから small RNA を抽出して small RNA シーケンスを行った。18 から 27 残基の small RNA を Y 染色体にマッピングして性決定領域で small RNA が多くマッピングされる領域を探索したところ、3 カ所で small RNA が多くマップされる領域が見つかった。

アスパラガスの雌雄異株近縁種について *MSE1* と *SOFF* 遺伝子を PCR によって雌雄それぞれから増幅したところ、*MSE1* については *A. pseudoscaber*, *A. veriticillatus*, *A. kiusianus*, *A. schoberioides* で雄株特異的な増幅がみられ、*A. acutifolius*, *A. stipularis*, *A. cochinchinensis* では雌雄共に増幅した。一方、*SOFF* は *A. pseudoscaber*, *A. veriticillatus*, *A. kiusianus*, *A. schoberioides*, *A. cochinchinensis* では雄株特異的に増幅したが、*A. acutifolius*, *A. stipularis* では複数のプライマーセットで増幅が認められなかった。これらの結果はクサスギカズラ属における雌雄異株の進化が *MSE1* と *SOFF* の誕生という単純なモデルでは説明できず、より複雑な進化をした可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kohji Murase, Shuji Shigenobu, Sota Fujii, Kazuki Ueda, Takanori Murata, Ai Sakamoto, Yuko Wada, Katsushi Yamaguchi, Yuriko Osakabe, Keishi Osakabe, Akira Kanno, Yukio Ozaki and Seiji Takayama
2. 発表標題 Identification of sex-determination gene in <i>Asparagus officinalis</i> .
3. 学会等名 aiwan Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kohji Murase, Shuji Shigenobu, Sota Fujii, Kazuki Ueda, Takanori Murata, Ai Sakamoto, Yuko Wada, Katsushi Yamaguchi, Yuriko Osakabe, Keishi Osakabe, Akira Kanno, Yukio Ozaki and Seiji Takayama
2. 発表標題 A MYB transcription factor gene involved in sex determination in <i>Asparagus officinalis</i> .
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>アスパラガスの雌雄を分ける性決定遺伝子を世界で初めて発見 植物の性の進化、ダーウィンの予測を裏付け http://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=1453</p>

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
---------------------------	-----------------------	----