

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770070

研究課題名(和文) Y染色体微細加工と顕微発現プロファイリングを用いた植物性決定遺伝子の完全解明

研究課題名(英文) Elucidation of the plant sex-determining gene using minute processing of the Y chromosome and expression profiling.

研究代表者

風間 裕介 (KAZAMA YUSUKE)

独立行政法人理化学研究所・イオンビーム育種研究チーム・研究員

研究者番号：80442945

研究成果の概要(和文)：

雌雄異株植物ヒロハノマンテマに重イオンビームを照射し、両性花変異体 17 株、無性花変異体 10 株を得た。次世代シーケンサー解析により Y 染色体連鎖 DNA 断片を 1741 同定し、その中から両性花変異体、無性花変異体でそれぞれ共通して欠失する断片を特定、性決定遺伝子の座乗領域を絞り込んだ。また、レーザーマイクロダイセクションの実験系を確立、現在、性決定遺伝子が働くステージにおける発現アレイ解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：

Seventeen hermaphrodite mutants and ten asexual mutants that have deletions on the Y chromosome were produced by heavy-ion irradiation in the dioecious plant *Silene latifolia*. By performing next-generation sequencing, 1741 of Y-linked fragments were identified. The regions for sex determining genes were narrowed down by identifying commonly deleted fragment in hermaphrodite or asexual mutants, respectively. Expression-profiling method using laser microdissection was developed to determine genes expressing in the sex-specific tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

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、突然変異

1. 研究開始当初の背景

イチョウやキウイフルーツで知られるように、植物のなかに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雌雄異株植物が存在する。雌雄異株は種子植物 25 万種のうち 6% を占め、なかには動物と同じように XY 性染色体で性を決定するものがある。1923 年に植物性染色体が初めて発見されて以来、米国ではパパイヤ、ドイツではアスパラガス、チェコ、日本ではナデシコ科の植物ヒロハノマンテマを用いて植物性決定遺伝子の同定を目指した研究を進めてきた。哺乳類では Y 染色体上に性決定遺伝子 SRY が存在

し、SRY 遺伝子が未分化な生殖腺で発現することにより、精巢の発達と分化を誘導することが知られている (Gubbay et al., Nature 346:245-250, 1990; Sinclair et al., Nature 346: 240-244, 1990)。植物の場合、おしべとめしべを両方もつ両性花が祖先系と考えられており、両性花からオスとメスに二系化するためには、Y 染色体上に「おしべの発達を促進する遺伝子」と「めしべの発達を抑制する遺伝子」の 2 種類が必要である (Charlesworth, Science 251: 1030-1033, 1991)。すなわち、植物 Y 染色体には性決定遺伝子が 2 つ存在する。ヒロハノマンテマの

Y染色体はヒトY染色体の10倍(570 Mb)と大きい。顕微鏡下で観察しやすく、細胞遺伝学的解析に適している。その反面シーケンス情報を基とする分子生物学には不向きであり、世界中の研究者が性決定遺伝子の単離に苦心してきた。雄花特異的発現遺伝子(Mastunaga et al., Plant J 10:679-689, 1996; Robertson et al., Plant J 12: 155-168, 1997)、Y染色体連鎖遺伝子(Delichere et al., Embo J 18: 4169-4179, 1997)、メス特異的に発現し、雌花(♀)のおしべ発達を抑制する遺伝子などが精力的にクローニングされたが、性決定遺伝子は未だに単離されていない。

巨大性染色体から性決定遺伝子を単離するため、申請者は「Y染色体欠失・性転換変異体ライブラリー」を構築し、共通して欠失をもつ領域を絞り込むことで、性決定遺伝子の座上領域を特定する手法を考案した。ヒロハノマンテマに理化学研究所のリングサイクロトロンで発生する重イオンビームを照射し、おしべとめしべをもつ両性花変異体を10個体、どちらももたない無性花変異体を8個体選抜し、Y染色体欠失・性転換ライブラリー構築した。雄蕊の発達を促進する性決定遺伝子(SPF)の近傍と言われるSTSマーカー(ScQ14)を含むBACクローンをシーケンスし無性花変異体の欠失領域のマッピングを行い、どの無性花でも欠失するSPF性決定遺伝子最近傍マーカー(STS30a8c)を同定した。さらに、570MbのY染色体のうちSPF性決定遺伝子の候補領域をSTS609とSmicSy6に挟まれた領域に絞り込んだ。

2. 研究の目的

オス特異的に発現する遺伝子の選抜からではSPF遺伝子が同定できなかった反省を生かし、SPFおよびGSF周辺のゲノム配列を獲得することを主な目的とした。そのため、ヒロハノマンテマBACライブラリーを完成させる。また、SPFおよびGSF周辺領域のマーカーを探索するため、次世代シーケンサーを活用してY特異的断片の網羅的取得を行う。より多くのY染色体欠失性転換変異体を得て、共通して欠失する領域を絞り込むことで、SPFおよびGSF領域を絞り込む。さらに、雄花の発達過程において、組織特異的発現をする遺伝子を性決定遺伝子の候補とする。

3. 研究の方法

研究の方法を以下(1)~(4)にまとめる。

(1) Y染色体欠失・性転換ライブラリーの拡充

理化学研究所のリングサイクロトロンで発生させた、炭素イオンビーム(LET: 30keV/ μ m)をヒロハノマンテマ花粉に最適線量(20Gy)で照射し、人工受粉して後代種子を得た。播種後、Y染色体特異的STSマーカーで雌雄を実生で判別し、オスのみを圃場で栽培

した。また、ScQ14とMK17でPCRを行い、性染色体近傍に欠失を持つ個体をスクリーニングした。圃場に植えた個体は、春と秋の花の咲く時期に形態観察を行い、性転換変異体を選抜した。

(2) BACライブラリーの拡充

ゲノム支援からの援助を受け、ヒロハノマンテマ近郊系ライン(K-line)のオスの葉より細胞核を抽出し、BACライブラリーを構築した。

(3) 顕微発現プロファイリング法の開発

雄蕊原器が発達する時期(Stage7)のオスの蕾みから切片を作製し、SPF遺伝子が発現すると予測される組織をレーザーマイクロダイセクションで回収する系をヒロハノマンテマに導入した。組織の固定法、包埋法、切片作製法を検討した。

(4) 次世代シーケンスを用いたY染色体配列の網羅的単離

より多くのY染色体マーカーを得るため、英国エジンバラ大とオックスフォード大との共同研究により、オス株とメス株のゲノムDNA、及び雌雄のつぼみ由来のcDNAを次世代シーケンサーで解析した。オスの蕾のみで発現する遺伝子+オスのゲノムだけに存在するDNA断片を収集した。収集した断片を元にプライマーを設計し、オスのゲノムDNAからのみ増幅される断片あるいは遺伝子をPCRでスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) Y染色体欠失・性転換ライブラリーの拡充

炭素イオンビーム(LET: 30keV/ μ m)をヒロハノマンテマ花粉に20Gy照射し、人工受粉して、後代種子を約2000粒得た。PCRによるスクリーニングと圃場での形態観察を行い、新たに両性花変異体を7株、無性花変異体を2株得、合計で両性花変異体17株、無性花変異体10株とした。

(2) BACライブラリーの拡充

平均インサートサイズ105 kb、130,000クローンからなるBACライブラリーを完成させ、スクリーニング用プールを構築した。(4)で得られたマーカーを用いたスクリーニングを実施、GSF近傍領域のBACを4クローン、SPF周辺領域のBACを3クローン得た。

(3) 顕微発現プロファイリング法の開発

条件検討の結果、ヒロハノマンテマの蕾の場合、カルノア固定液(酢酸:エタノール=1:3)で固定後、RNase free水に置換し、凍結切片を作製する系が望ましいことがわかった。切片の作製には川本法(Kawamoto, Arch Histol Cytol 66: 123-143, 2003)を用いた。実際に、レーザーマイクロダイセクションを用いて厚さ8 μ mの切片を合計1.1mm²切り出し、RNAを4.2 ng抽出することができた。(4)で得た1741断片から発現アレイを構築し、

雄しべの発達が促進される領域、雌しべの発達が抑制される組織をそれぞれ回収して(図1)、アレイに供試する予定である。

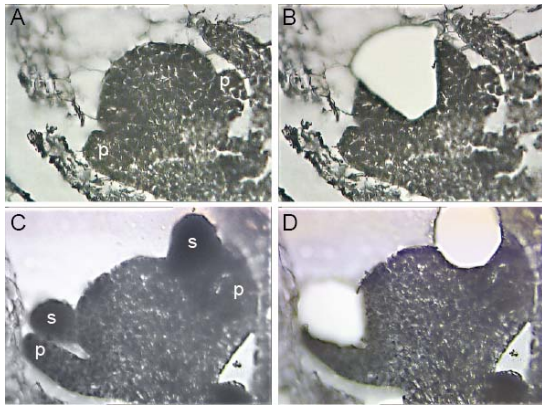


図1、レーザーマイクロダイセクションによる標的組織の回収。組織回収前(A, C)、組織回収後(B, D)をそれぞれ示すSPGが発現すると予測される領域(A, B)と、GSFが発現する都考えられる領域(C, D)をそれぞれ回収した。

(4) 次世代シーケンスを用いたY染色体配列の網羅的単離

BACライブラリーの構築が予定よりも遅れたため、研究対象をY染色体全体に広げ、より多くのY染色体連鎖遺伝子、あるいはマーカーを得ることにした。オックスフォード大とエジンバラ大との共同研究として、次世代シーケンス解析を行い、オスだけで発現する遺伝子、あるいはオスだけで解読されたゲノムDNA断片を収集した。その結果、1,741のDNA断片を得た。プライマーを設計し、Y染色体座乗が確認できた断片を新たなY染色体STSマーカーとした。合計で、新たに92個のSTSマーカーを獲得した。Y染色体欠失・性転換変異体ライブラリーのDNAを用いて欠失しているマーカーを探索した。その結果、SPF周辺に位置しているマーカーを3つ、GSF近傍と考えられるマーカーを3つ得た。これらのマーカーを用いて完成したBACライブラリーをスクリーニングし、目的のBACクローンを得ることができた。現在、BACクローンの解析を進めている。

シーケンス解析の課程で、X染色体に連鎖する遺伝子 *SIWUS1* を得た。サザンブロット解析、および、*SIWUS1* 遺伝子上のSNPsの遺伝様式を解析し、X染色体連鎖であることを確認した。*SIWUS1* 遺伝子は、シロイヌナズナで茎頂分裂組織の維持に関わる *WUSCHEL* のオーソログと考えられる。ヒロハノマンテマのX染色体に存在するという事は、オス個体では *SIWUS1* はヘミ接合である。定量的PCRを行った結果、発達初期の蕾では、*SIWUS1* はメスでオスの2倍量発現していることがわかった(図2)。メスの蕾では、第4Whorlの大き

さがオスの蕾のそれよりも大きい、*SIWUS1* の雌雄の発現量の違いは、第4Whorlの大きさの違いを説明できる結果であった。さらに、この結果は、ヒロハノマンテマのX染色体上の遺伝子が遺伝子量補正を受けていないことを示唆する結果となった。ヒロハノマンテマの近縁雌雄異種である *S. diclinis*、*S. doica* はどちらもY染色体に *SIWUS1* ホモログを持たないこと、さらに、性染色体を持たない近縁種 *S. vulgaris* の祖先性染色体には *SIWUS1* のホモログが存在することから、*SIWUS1* は、ヒロハノマンテマが性染色体を獲得した時にY染色体から失われたと考えられる。

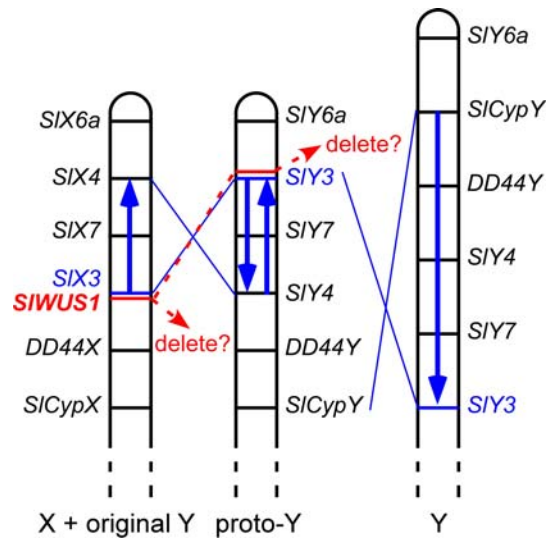


図2、*SIWUS1* のマッピングから推測されたヒロハノマンテマY染色体のリアレンジメント

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16件)

- ① Kazama Y, Ma L, Hirano T, Ohbu S, Shirakawa Y, Hatakeyama S, Tanaka S, Abe T. (2013) Evaluation of LET-dependent effect in heavy-ion mutagenesis using rapid mutation detection system in *Arabidopsis thaliana*. RIKEN Accel Prog Rep 46 査読有、印刷中
- ② Kazama Y, Fujiwara MT, Takehisa H, Ohbu S, Saito H, Ichida H, Hayashi Y, Abe T. (2013) A DFR-deficient mutant of *Nicotiana tabacum* induced by C-ion beam irradiation. RIKEN Accel Prog Rep 46 査読有、印刷中
- ③ Kazama Y, Fujiwara MT, Takehisa H, Ohbu S, Saito H, Ichida H, Hayashi Y, Abe T.

- (2013) Characterization of a heavy-ion induced white flower mutant of allotetraploid *Nicotiana tabacum*. Plant Cell Rep. 32: 11-19 査読有、DOI: 10.1007/s00299-012-1336-7
- ④ Kazama Y, Nishihara K, Bergero R, Fujiwara MT, Abe T, Charlesworth D, Kawano S. (2012) *SIWUS1*; An X-linked Gene Having No Homologous Y-Linked Copy in *Silene latifolia*. G3: Genes, Genomes, Genetics 2: 1269-1278 査読有、DOI: 10.1534/g3.112.003749
- ⑤ Kazama Y, Ma L, Hirano T, Ohbu S, Shirakawa Y, Hatakeyama S, Tanaka S, Abe T. (2012) Rapid evaluation of effective linear energy transfer in heavy ion mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Plant Biotechnology 29: 440-444 査読有、DOI:10.5511/plantbiotechnology.12.0921a
- ⑥ Fujita N, Torii C, Ishii K, Aonuma W, Shimizu Y, Kazama Y, Abe T, Kawano S. (2012) Narrowing down the mapping of plant sex-determination regions using new Y-chromosome-specific markers and heavy-ion beam irradiation-induced Y-deletion mutants in *Silene latifolia*. G3: Genes, Genomes, Genetics 2:271-278 査読有、DOI: 10.1534/g3.111.001420/-/DC1
- ⑦ Hirano T, Kazama Y, Ohbu S, Shirakawa Y, Liu Y, Kambara T, Fukunishi N, Abe T. (2012) A novel method of utilizing heavy-ion beams for efficient induction of large deletions in *Arabidopsis thaliana*. RIKEN Accel Prog Rep 45: 210 査読有
- ⑧ Kazama Y, Hirano T, Saito H, Liu Y, Ohbu S, Hayashi Y, Abe T. (2012) Characterization of DNAs mutated by C-ion beam with highly efficient LET in mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. RIKEN Accel Prog Rep 45: 209 査読有
- ⑨ Takahara M, Ebina M, Morita R, Kazama Y, Abe T, Takamizo T, Nakagawa H. (2012) Effect of linear energy transfer on deletion induction by irradiation with heavy-ion beams in the apomictic plant *Panicum maximum*. RIKEN Accel Prog Rep 45: 215 査読有
- ⑩ Hirano T, Kazama Y, Ohbu S, Shirakawa Y, Liu Y, Kambara T, Fukunishi N, Abe T. (2012) Molecular nature of mutations induced by high-LET irradiation with argon and carbon ions in *Arabidopsis thaliana*, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 735:19-31 査読有、DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2012.04.010
- ⑪ Fujiwara M, Yoshioka Y, Hirano T, Kazama Y, Abe T, Hayashi K, Itoh R. (2012) Visualization of plastid movement in the pollen tube of *Arabidopsis thaliana*, Plant Signal Behav 7:34-37
- ⑫ 阿部知子, 平野智也, 風間裕介 (2012) 重イオンビームによる品種改良技術の開発から遺伝子機能解明へ、日本物理学会誌 67:680-684 査読有
- ⑬ Kazama Y, Hirano T, Saito H, Liu Y, Ohbu S, Hayashi Y, Abe T. (2011) Characterization of highly efficient heavy-ion mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biol 11:161 査読有、DOI: 10.1186/1471-2229-11-161
- ⑭ Kazama Y, Hirano T, Ohbu S, Shirakawa Y, Abe T. (2011) Mutation frequency analysis of M₁ plants irradiated with heavy-ion beams. RIKEN Accel Prog Rep 44: 267 査読有
- ⑮ Hirano T, Kazama Y, Ohbu S, Shirakawa Y, Abe T. (2011) Effect of LET on mutation induction by heavy-ion beam irradiation in imbibed seeds of *Arabidopsis thaliana*. RIKEN Accel Prog Rep 44: 268 査読有
- ⑯ Aonuma W, Ishii K, Torii C, Fujita N, Shimizu Y, Nishihara K, Kazama Y, Abe T, Kawano S. (2011) Production of bisexual flower-producing mutants of the dioecious plant, *Silene latifolia*, by using γ -ray and the heavy-ion. RIKEN Accel Prog Rep 44: 271 査読有
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 風間裕介、「重イオンビームを用いたシロイヌナズナタンデム遺伝子破壊ラインの構築」日本育種学会第 123 回講演会、2013 年 3 月 28 日、東京
- ② 風間裕介、「重イオンビームによるオンデ

マンド変異誘発法の開発とタンデム遺伝子破壊ラインの構築」日本植物生理学会第54回年会、2013年3月21日、岡山

- ③ Kazama Y, "LET-dependent effects of heavy-ion irradiation on mutation induction in *Arabidopsis thaliana*" 8th International Symposium on Swift Heavy Ions in Matter (SHIM 2012), Oct 26, 2012 Kyoto
- ④ 石井公太郎、「ヒロハノマンテマ性染色体の組換え抑制によって生じた *SIAP3X/Y* 周辺の構造変化」日本植物学会第76回大会、2012年9月15日、姫路
- ⑤ 青沼航、「ヒロハノマンテマの *SIAP3* 欠損変異体を含む Y 染色体部分欠損変異体の網羅的単離」日本植物学会第76回大会、2012年9月15日、姫路
- ⑥ 風間裕介、「ヒロハノマンテマの2つのホモログ遺伝子 *SISUP* と *SIWUS* の発現と性染色体座乗」日本植物学会第76回大会、2012年9月15日、姫路
- ⑦ 石井公太郎、「雌雄異株植物ヒロハノマンテマの効率的な染色体標本の作製」日本植物形態学会第24回総会・大会、2012年9月14日、姫路
- ⑧ 風間裕介、「重イオンビーム誘発性転換変異体を用いた植物 Y 染色体性決定領域の解析」新学術領域「ゲノム支援」2012年度 拡大班会議、2012年8月29日、御殿場
- ⑨ Kazama Y, "Optimization of ion-beam irradiation for highly efficient mutagenesis using a rapid detection method of mutation." EMBO Workshop: Genetic stability and change: Genome maintenance mechanisms in plants. May 3-4, 2012, Roscoff, France
- ⑩ 高原学、「重イオンビーム照射によるアポミクシス遺伝子領域での欠失変異誘発と線量・LET の影響」日本育種学会第121回講演会、2012年3月30日、宇都宮
- ⑪ 風間裕介、「シロイヌナズナの M_1 世代での迅速な突然変異検出系を用いた LET 効果の解析」日本育種学会第120回講演会、2011年9月24日、福井
- ⑫ 平野智也、「シロイヌナズナを用いた DNA 突然変異への LET 効果の解析(2)」日本育種学会第120回講演会、2011年9月24日、福井
- ⑬ 風間裕介、「ヒロハノマンテマ X 染色体連鎖遺伝子 *SIWUS1* は性染色体進化の過程で Y 染

色体から消失した？」日本植物学会第75回大会、2011年9月19日、東京

- ⑭ 風間裕介、「アルビノ変異セクターを指標とした重イオンビーム変異迅速検出系の確立」日本植物形態学会第23回総会・大会、2011年9月16日、東京
- ⑮ 平野智也、「重イオンビーム誘発突然変異に対する LET 効果の解析」第29回日本植物細胞分子生物学会大会、2011年9月7日、福岡
- ⑯ Kazama Y, "Ion-beam mutagenesis: New technology for the control of deletion-size by heavy-ion beam irradiation", 18th International Botanical Congress (IBC2011), Jul 23-30, 2011, Melbourne, Australia
- ⑰ Abe T, "Ion beam mutagenesis: new innovative technology for mutation breeding", 18th International Botanical Congress (IBC2011), Jul 23-30, 2011, Melbourne, Australia

[図書] (計1件)

- ① Kazama Y, Matsunaga S. (2012) The role of repetitive sequences in the evolution of plant sex chromosomes, In: New Insights on Plant Sex Chromosomes. Rafael Navajas-Pérez (ed), Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, U.S.A. 21-34

[その他] (計3件)

- ① 受賞
風間 裕介、平野 智也、理研・研究奨励賞、2013年4月5日
- ② アウトリーチ活動
風間 裕介、出前授業、「オスが子供を産む？重イオンビームで迫る植物 Y 染色体の不思議」、唐津東高校 40 名、2013年3月19日、唐津
- ③ アウトリーチ活動
風間 裕介、理研 DAY: 研究者と話そう、科学技術館、約 40 名、2013年3月17日、北の丸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

風間 裕介 (KAZAMA YUSUKE)
独立行政法人理化学研究所・イオンビーム育種研究チーム・研究員
研究者番号: 80442945

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

河野 重行 (KAWANO SHIGEYUKI)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：70161338

石井 公太郎 (KOTARO ISHII)
独立行政法人理化学研究所・生物照射チーム・特別研究員
研究者番号：50632965

Deborah Charlesworth
Institute of Evolutionary Biology, School
of Biological Sciences, University of
Edinburgh, UK

Dimitry Filatov
Department of Plant Science, University of
Oxford, UK