

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510272

研究課題名(和文)ゼニゴケにおける性決定遺伝子の探索

研究課題名(英文)Search for sex determination genes in Marchantia polymorpha

研究代表者

大和 勝幸(YAMATO, Katsuyuki)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：50293915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ドラフト・雌ゲノム・データからX染色体に連鎖する配列を抽出した。雄ゲノムとの比較によりX染色体由来候補配列を選抜し、F1世代での連鎖解析を行ったところ、X染色体に由来する5配列を同定した。

次に、様々な組織に由来するRNA-seqデータを用いてX染色体遺伝子の発現パターンの比較を行い、雌生殖器特異的発現パターンを示す遺伝子を選抜した。それらの遺伝子についてRT-PCRを行って発現特異性を評価したところ、これまでに1個の遺伝子が雌生殖器特異的に発現していることが確認された。類似性検索により、当該遺伝子はDNAメチル化の制御に関わるタンパク質をコードしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Five sequences of a female genomic data were identified as X-linked by comparing with a male genomic data. RNA-seq data obtained from a variety of tissues were mapped onto the X-linked sequences, and genes expressed specifically in female sexual organs were searched. RT-PCR revealed one of the candidate genes was indeed expressed specifically in female sexual organs. The candidate X-linked gene is similar to those involved in regulation of DNA methylation.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：X染色体 性決定

1. 研究開始当初の背景

性染色体は雌雄で非対称に存在し、個体の性決定および性分化を制御する。例えば、ほ乳類など XX/XY 型の性決定様式をとる二倍体生物において、Y 染色体は雄の個体のみが存在し、雌には X 染色体が 2 本存在する。ほ乳類では、精巣決定因子をコードする SRY 遺伝子が Y 染色体に存在するため (Sinclair et al. Nature 346:240-244, 1990) Y 染色体をもつ個体が雄となり、もたない個体は雌となる。他に、メダカの DMY 遺伝子などが雄決定遺伝子として報告されている (Matsuda et al. Nature 417:559-563, 2002)。一方、ショウジョウバエなどに見られる XX/XO 型の性決定様式では、常染色体に対する X 染色体の割合が性を決定する (Liu & Belote, Mol. Gen. Genet. 248:182-189, 1995)。これらの雄ヘテロ型に加え、鳥類では ZW/ZZ 型といった雌ヘテロ型が一般的である。

一方、半数体生物の性染色体は、雄には Y 染色体のみ、雌には X 染色体のみが存在する (注: 半数体生物において、雌のみに存在する性染色体を「W 染色体」とする場合もある)。また、半数体生物の雌には X 染色体が 1 本しか存在しないので、X 染色体間の相同組換えは起こりえない。そのため、半数体生物においては、「Y 染色体も X 染色体も性染色体としては同等であり、退化していく遺伝子は基本的にそれぞれの性にとって必要のない遺伝子のみである」と考えられる。筆者らは半数体生物であるゼニゴケを用いてこのような半数体生物特有の性染色体の進化プロセスが実際に進行していることを、他の生物種に先駆けて示した (PNAS 104:6472-6477, 2007)。

しかし、ゼニゴケにおいて性染色体にそのアイデンティティーを与える性決定遺伝子は未同定、すなわち、性染色体のなりたちおよび機能を理解する上で最も重要な知見が得られていない。

2. 研究の目的

性染色体のなりたちおよび機能を理解する上で、性染色体にそのアイデンティティーを与える性決定遺伝子の同定は必要不可欠である。本研究は、半数体生物ゼニゴケをモデルとし、その性染色体に存在すると予想される性決定遺伝子の同定を行う。

3. 研究の方法

まず X 染色体全体の塩基配列を獲得し、既に決定した Y 染色体の塩基配列と比較する。

近年、ゼニゴケは新たなモデル生物として認知されつつあり、これを受けて、米国 Joint Genome Institute (JGI)、豪国 Monash 大学および申請者らの共同研究として、ゼニゴケ・ゲノムプロジェクトが進められている (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/99191.html>)。既に研究代表者らが Y 染色体の塩基配列を解読したことから、当該プロジェクト

では、X 染色体をもつ雌株 (研究代表者が作成した標準雌系統) のゲノムを解読している。さらに、連携研究者の河内は、国立遺伝学研究所 (NIG) との共同研究により、別の標準雌系統の全ゲノムをカバーする配列データを取得している。以上のように、現在複数のゼニゴケ雌ゲノムデータが利用可能となっている。

ゼニゴケ X 染色体のサイズは約 20 Mb であるが、その約 60% は X 染色体特異的 rDNA クラスタ (領域 XR1; 約 12 Mb) で占められることが明らかにされている (Chromosome Res. 11:694-703, 2003; PNAS 104:6472-6477, 2007)。X 染色体の残り約 40% の領域 (約 8 Mb) は XR2 と呼ばれている。本研究は、X 染色体については、その遺伝子が集中して存在すると考えられる XR2 のみ解析する。JGI のドラフト・データおよびゲノム支援の未アセンブル・データには、常染色体と X 染色体の配列情報が混在しているため、まずこれらのデータから XR2 に由来する配列を抽出・整列化する。その後、Y 染色体の配列と比較を行い、X 染色体あるいは Y 染色体に特異的な遺伝子を同定する。申請者らは Y 染色体上に 64 個の遺伝子を見いだしているが、そのうち少なくとも半数は Y 染色体に特異的ではないことが判明している (PNAS 104:6472-6477, 2007)。また、Y 染色体特異的遺伝子であっても、精子鞭毛の構成タンパク質のホモログといった、性決定後に機能すると考えられるものも多い。限定的な解析結果ではあるものの、X 染色体についても同様の傾向が見られることから、性決定遺伝子の候補の数は X および Y 染色体それぞれについて 10 個程度に絞り込めると推測している。

得られた性決定遺伝子の候補については組換え体を作成し、性決定への関与を評価する。具体的には、反対の性における発現および候補遺伝子の破壊を行い、性決定への影響を観察する。ゼニゴケの高効率形質転換系は既に確立しており (Plant Cell Physiol. 49:1084:1091, 2008)、研究代表者らの研究室に限らず多数の実績がある。さらに、連携研究者の石崎・河内が遺伝子破壊系の開発に成功している。性決定遺伝子が同定できれば、その分子レベルでの機能解析および系統解析を実施する。

4. 研究成果

研究代表者らは既にゼニゴケ Y 染色体の構造を明らかにし、さらに X 染色体特異的マーカーを単離して X 染色体の部分構造を明らかにしている。これらの成果に基づいて上記の課題に取り組むため、本研究では、まず X 染色体に由来する塩基配列を収集し、Y 染色体遺伝子情報および RNA-seq 情報を用いて X 染色体遺伝子を探索した。

ゼニゴケ X 染色体のサイズは約 20 Mb であるが、その約 60% は X 染色体特異的 rDNA クラスタで占められる (Chromosome Res. 11:694-703, 2003; PNAS 104:6472-6477, 2007)。

本研究では、X 染色体のうち、rDNA クラスター以外の部分約 8 Mb のみを対象とした。米国 Joint Genome Institute (JGI) から提供されたドラフト・ゲノム・データには、常染色体と X 染色体の配列情報が混在しているため（雌株を用いたため）、まずこれらのデータから X 染色体に連鎖する配列を抽出した。雄ゲノムとの比較および遺伝子発現パターンの比較により X 染色体由来候補配列を探索した。

まず、X および Y 染色体に共通する遺伝子に基づく方法で X 染色体に由来する配列を探索した。具体的には、既に得られている Y 染色体遺伝子の配列情報を用い、JGI より提供された雌のゲノム配列中に Y 染色体遺伝子のホモログを探索した。その結果、10 個ずつのホモログが scaffold00017 (約 1.9 Mb) および scaffold00022 (1.8 Mb) に見いだされた。それぞれの scaffold の塩基配列について、標準雄株 Takaragaike-1 (Tak-1) および雌株 Takaragaike-2 (Tak-2) の F1 個体を用いて遺伝解析を実施したところ、両者とも X 染色体に連鎖していることを確認した。今回ゼニゴケ X および Y 染色体に共通して存在することが明らかとなった遺伝子 20 個について、性染色体間のシンテニーを調べたところ、保存されている部分はわずかであった（図 1）。これは、X および Y 染色体が分岐したあと、それぞれにおいて染色体レベルの再編が起こったことを示唆している。

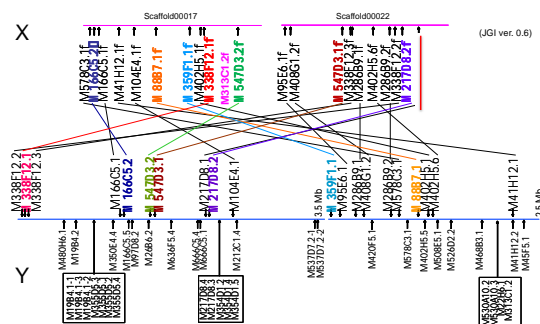


図 1 ゼニゴケ性染色体のシンテニー起源が同じと考えられる遺伝子を同じ色で示し、直線で対応させた。

次に Representational Difference Analysis (RDA) 法を用いて X 染色体連鎖マーカーの単離を試みた。ゲノムを切断する制限酵素として *Hind*III を用いて解析を行ったところ、X 染色体に連鎖し、かつ前述の scaffold に含まれない配列が 1 つ見つかった。この配列は、約 75 kb の scaffold00225 に含まれていた。従って、X 染色体について全部で 4 Mb 近い配列情報が得られたことになる。

Scaffold00017 および 00022 に対して、EST 情報および類似性に基づく遺伝子探索を行ったところ、前者で 20 個、後者で 19 個の遺伝子を見いだした。これより、X 染色体の遺伝子密度は 100 kb 当たり約 1 遺伝子となる。これは Y 染色体とほぼ同じであり、両者が類

似した進化の過程を経てきたことを示唆している。

雌ゲノム (BC4; Tak-2 を Tak-1 で 4 回戻し交配して得られた株) 情報から雄ゲノム (Tak-1) 情報を差し引き、X 染色体配列を探索した。その結果、8 kb 以上の配列が 12 本得られた。各 X 染色体候補配列について、Tak-1 株、Tak-2 株およびそれらの F1 個体を用いたゲノミック PCR を行い、新たに 5 配列が X 染色体に連鎖することが判明した。

次に、様々な組織に由来する RNA-seq データを用いて X 染色体遺伝子の発現パターンの比較を行い、雌生殖器官特異的発現パターンを示す遺伝子を選抜した。それらの遺伝子について RT-PCR を行って発現特異性を評価したところ、これまでに 1 個の遺伝子が雌生殖器官特異的に発現していることが確認された。類似性検索により、当該遺伝子は DNA メチル化の制御に関わるタンパク質をコードしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Komatsu, A., Terai, M., Ishizaki, K., Suetsugu, N., Tsuboi, H., Nishihama, R., Yamato, K.T., Wada, M., Kohchi, T. Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast photorelocation movements in the liverwort *Marchantia polymorpha* L., *Plant Physiol.*, 166:411-427, 2014 (査読有)

Kihara, H., Tanaka, M., Yamato, K.T., Horibata, A., Yamada, A., Kita, S., Ishizaki, K., Kajikawa, M., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Akakabe, Y., Matsui, K., Arachidonic acid-dependent carbon-eight volatile synthesis from wounded liverwort (*Marchantia polymorpha*), *Phytochem.*107:42-49, 2014 (査読有)

大和勝幸、生殖研究のモデル植物としてのゼニゴケ、作物研究、59:1-10, 2014 (査読無)

Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T., Kohchi, T. Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution, *Nat. Comm.*, 5:3668, 2014 (査読有)

Chiyoda, S., Yamato, K.T., Kohchi, T., Plastid transformation of sporelings and suspension-cultured cells from the liverwort *Marchantia polymorpha* L., *Methods Mol. Biol.*, 1132-439-47, 2014 (査読無)

大和勝幸、河内孝之、見えてきたゼニゴケゲノム、植物科学の最前線 *BSJ Review*, 3:71-83, 2012 (査読無)

〔学会発表〕(計 7件)

Yamato, K.T., The *Marchantia* genome: the final progress report, *Marchantia* Workshop 2014, Kobe University, 2014年12月8日(神戸大学、兵庫県神戸市)

Tsukamoto, S., Motohashi, T., Hirao, S., Ishizaki, K., Kohchi, T., Yamada, L., Sawada, H., Yamato, K.T. Characterization of a protamine-like protein from the liverwort *Marchantia polymorpha* L., 第55回日本植物生理学会年会、2014年3月19日(富山大学、富山県富山市)

Yamato, K.T., Sex in *Marchantia polymorpha*, *Marchantia* Workshop 2013, 2013年12月9日(Buln Buln Cabins, Yanakee, Australia)

大和勝幸, 生殖研究のモデル植物としてのゼニゴケ, 近畿作物・育種研究会、第175回例会、2013年7月13日(近畿大学、和歌山県紀の川市)

Tsukamoto, S., Hirao, S., Yamada, L., Sawada, H., Ishizaki, K., Kohchi, T., Yamato, K.T., Transcriptomic and proteomic analyses of sperm of *Marchantia polymorpha* L., 第54回日本植物生理学会年会、2013年3月23日(岡山大学、岡山県岡山市)

Yamato, K.T., Sexual reproduction in *Marchantia polymorpha* - sex chromosomes and sperm chemotaxis, *Marchantia* Workshop 2012, 2012年11月16日(グリーンピア南阿蘇、熊本県阿蘇郡)

Yamato, K.T., Sperm Chemotaxis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L., International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants. Joint Meeting of the 2nd Allo-Authentication Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting, 2012年11月15日(ホテル名古屋ガーデンパレス、愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 1件)

大和勝幸, 「コケ・シダ植物の受精」、動植物の受精学(澤田均編)化学同人、pp.76-86、2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

大和 勝幸 (YAMATO, Katsuyuki)
近畿大学・生物理工学部・准教授
研究者番号：50293915

(2)連携研究者

河内 孝之 (KOHCH, Takayuki)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：40202056

石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00452293