

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292001

研究課題名(和文) ホウレンソウ性決定遺伝子座の構造決定および進化過程の解明

研究課題名(英文) Studies on genomic structure and evolution of spinach sex-determining loci

研究代表者

小野寺 康之 (Onodera, Yasuyuki)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80374619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,800,000円

研究成果の概要(和文)：ホウレンソウはアカザ科の雌雄異株として知られるが、間性株も見られる。雌雄の決定は性染色体(XY)に座乗する遺伝子ペア(YおよびX)に支配される。間性発現を支配する遺伝子(M)は、Y座と約12 cM隔てて連鎖している。本研究では、ホウレンソウ性染色体をカバーする108 cMの分子連鎖地図を構築した。次いで、Y座に連鎖する220個の遺伝子を同定し、これらの一部は組換え抑制領域に座乗している可能性を示す証拠を得た。アカザ科のテンサイゲノムとの比較から、ホウレンソウの性決定遺伝子はペリセントロメア領域に座乗している可能性が示された。間性遺伝子座乗候補領域を約25 kbpに絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：Spinach is commonly known as a dioecious species. However, certain lines and crosses produce monoecious individuals. Dioecism and monoecism are of relevance in commercial hybrid seed production, and elucidation of the mechanisms underlying sex determination is valuable for spinach breeding programs. Sex expression in dioecious spinach plants is controlled by a single gene pair termed X and Y. Meiotic recombination was found suppressed in the vicinity of the male-determining locus (Y). A locus controlling the monoecious condition (M) is linked to X/Y locus at 12 cM. In this study, we identified 220 genes linked to X/Y locus, part of which were found to be located in the recombinationally suppressed region. The locus for monoecism was confined to a 25-kbp chromosomal segment.

研究分野：農学

キーワード：植物育種 F1ハイブリッド

1. 研究開始当初の背景

(1) ホウレンソウ ($2n = 2x = 12$) はアカザ科の雌雄異株として知られるが、雄株および雌株の他に間性株も見られる ()。これらの多様な「性」を組み合わせた授粉制御技術の上に、ホウレンソウの経済的 F_1 採種が成り立っており、ホウレンソウ F_1 採種のさらなる効率化には性決定機構の解明は不可欠である。

(2) ホウレンソウの雌雄は第 1 染色体 (性染色体) に座乗する一对の遺伝子 (X/Y) によって決定づけられる ()。すなわち、ホウレンソウでは、雄がヘテロの性 (XY) であり、雌がホモの性 (XX) である。Y 染色体の雄決定領域 (Y 座) を含む周辺領域 (Y 特異的領域) は X 染色体との相同組換えが抑制されている ()。

(3) 間性の発現を支配する遺伝子 (M) は、雌雄性を支配する X/Y 遺伝子座から約 12 cM 隔てて連鎖していることを明らかにした ()。

(4) ホウレンソウドラフトゲノム配列が既に公開されているが、その全長約 500 Mbp はゲノムのおよそ 50% をカバーするに過ぎない。また、このゲノム配列の N_{50} 値は非常に低く (19 kbp)、それを構成しているコンティグは分子連鎖地図または染色体と対応付けられていない。一方、アカザ科においては、ゲノムの 85% をカバーする DNA 配列が公開されているテンサイ (両性花株) が最もゲノム情報が充実している ()。

(5) ホウレンソウの性染色体は、テンサイ ($2n = 2x = 18$) の常染色体 (第 4、6 および 9 染色体) とシンテニーが保存されている可能性があることを見出した ()。

(6) 系統学的データは、ホウレンソウが両性株 (両性花株または雌雄同株) の祖先種から比較的最近進化したことを示唆しており、雌雄異株及び性染色体の初期進化を解明する上でこの作物は格好の材料と言える。

< 引用文献 >

Onodera Y, Yonaha I, Niikura S, Yamazaki S, Mikami T. Monoecy and gynomonocycy in *Spinacia oleracea* L.: Morphological and genetic analyses. (2008) *Scientia Horticulturae* 118 (3): 266-269

Janick J, Stevenson EC (1954) A genetic study of the heterogametic nature of the staminate plant in spinach. *Proc Am Soc Hortic Sci* 63:444-446

未発表データ

Yamamoto K, Oda Y, Haseda A, Fujito S, Mikami T, Onodera Y. Molecular evidence that the genes for dioecism and monoecism in *Spinacia oleracea* L. are located at different loci in a chromosomal region. (2014) *Heredity*, 112(3) 317-24

Dohm JC, Minoche AE, Holtgräwe D, Capella-Gutiérrez S, Zakrzewski F. et al., The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). (2014) *Nature* 505, 546-549

2. 研究の目的

(1) ホウレンソウ性染色体のゲノム情報を充実させるために、テンサイのゲノム情報を利用して、ホウレンソウ性染色体をカバーする高密度分子連鎖地図の構築を試みた。

(2) X 染色体との組換えが抑制された Y 特異的領域に座乗する遺伝子を同定することを目的として、Y 座に連鎖する遺伝子群の網羅的同定を試みた。

(3) ホウレンソウの間性発現の原因遺伝子 (M) の同定に向けて、当該遺伝子座乗領域の絞り込みを試みた。

3. 研究の方法

(1) テンサイ第 4、6 および 9 染色体のそれぞれに座乗する遺伝子 (それぞれ 22、11 および 29 個) のホウレンソウオルソログをドラフトゲノムデータベースから呼び出し、ホウレンソウ遺伝子の多型マーカーを開発した。次に、これらのマーカーおよび既知の性連鎖マーカーの連鎖解析を行った。さらに、ホウレンソウの性染色体をカバーする分子マーカー及び間性系統 03-336 と雌雄異株系統 03-009 間の F_2 集団 (82 個体) を用いて間性形質の QTL 解析を行った。

(2) 雌雄異株系統 03-009 における一組の兄妹交配から生じた雄および雌後代 (それぞれ 8 株ずつ) から取得した RNAseq リードから、190,200 本の unigene 配列セットを構築した。これらをリファレンスとして、雄および雌後代の RNAseq リードをマップし、性決定遺伝子座 (Y 座) に連鎖する SNP および unigene を同定した。

(3) 間性系統 03-336 及び雌雄異株系統 03-009 間の交雑後代 (F_4 および S4BC2F1 世代など) から、M 座近傍の組換え型個体を選抜した。次いで、当該領域をカバーする BAC コンティグを構築した。

4. 研究成果

(1) テンサイ第 4 染色体の物理地図 (pseudo

molecule) 上の遺伝子座 *crtp1* から *tsjt1* に至る 25.5 Mb 領域(当該 pseudo molecule のおよそ 80%に相当)に座乗する 19 個の遺伝子のホウレンソウオルソログは、性決定遺伝子(YおよびM)と連鎖していることが判明した。しかしながら、テンサイ第 4 染色体 pseudo molecule の両端に座乗している遺伝子の 3 個のホウレンソウオルソログ(*hma5*, *XM_010677398*, *XM_010677772*)からは性染色体との連鎖関係は見出されなかった。

テンサイ第 9 染色体 pseudo molecule 上の遺伝子座 *lc1* から *fbp* に至る 31.1 Mb 領域(当該 pseudo molecule のおよそ 66%に相当)に座乗する 24 個の遺伝子のホウレンソウオルソログは、性染色体に相当する連鎖群にマップされた。以上のデータに基づいて、テンサイ第 4 および第 9 染色体は広範な領域に亘って、ホウレンソウの性染色体とシンテニーが保存されていることが判明した。一方、テンサイ第 6 染色体とホウレンソウの性染色体の間には広範なシンテニーの保存性は見出されなかった。

アカザ科において祖先的な染色体基本数 $x = 9$ を、テンサイは持っている。また、ホウレンソウの姉妹系統群(両性株)の染色体基本数も $x = 9$ である。つまり、ホウレンソウ($2n = 2x = 12$)ゲノムの進化には染色体数の減少をもたらす再編成が関わっており、性染色体はその再編成を経て生じたことを本研究結果は示している。

ホウレンソウの雄性決定遺伝子座(Y)は、テンサイ第 4 および 9 染色体とのシンテニーブロックが重複している領域にマップされた(図 1)。マッピング集団において雄性決定遺伝子との共分離が確認された遺伝子のカウンターパートは、テンサイ第 4 および第 9 染色体物理地図上の広い領域(7.0 および 8.9 Mb; 図 1)に散在していたので、Y座の周辺は減数分裂期における物理距離あたりの組み換え頻度が著しく低い可能性が示された。また、テンサイの当該領域は、転移因子様配列が高度に蓄積されている一方で、遺伝子密度が低い特徴を有しておりペリセントロメア領域あるいはその近傍に相当すると推測された。ホウレンソウ-テンサイ間で染色体ドメインが進化的に保存されているならば、ホウレンソウの雄性決定領域(Y座)は、ペリセントロメア領域に座乗している可能性が考えられ、今後の検証が望まれる。

QTL 解析によって、間性決定遺伝子座(M座)は、テンサイ第 9 染色体との遺伝子配置順序が高度に保存されている領域に座乗する *clsy3 - clc-e* 間領域(図 1)にマップされた。

最終的に、本研究で開発された分子マーカーと既知のマーカーを用いて、108.1 cM の性染色体領域に 56 個のマーカーをマップすることに成功した(図 1)。

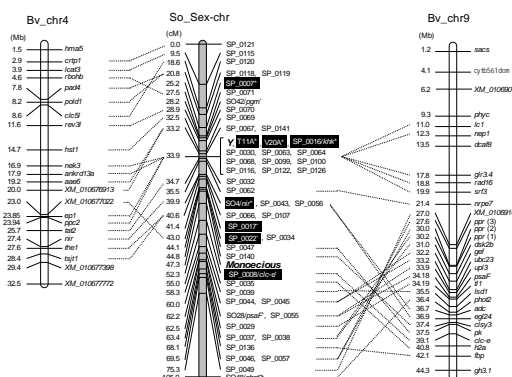


図 1 ホウレンソウ性染色体連鎖地図 (So_Sex-chr) とテンサイ第 4 および第 9 染色体物理地図 (Bv_chr4, Bv_chr9) との比較

(2) 雌後代および雄後代サンプルの全て(各 8 個体)がそれぞれホモおよびヘテロの SNP サイト(雄ヘテロ)が 98 個の unigene から 187 個同定された。雌後代サンプルの全てがヘテロであり、雄後代サンプルの全てがホモもしくはヌルアレルとのヘテロである SNP サイト(雌ヘテロ)が、125 個の unigene から 168 個の SNP が見出された。これらの中で、雄ヘテロ及び雌ヘテロの SNP サイトの両方を有する unigene が 3 個見つかった。従って、性連鎖 unigene の数は合計 220 個見出された。

220 個の性連鎖 unigene の機能を既知遺伝子との相同性 ($E\text{-value} < 1.00E-20$) に基づいて推定することを試みた。その結果、151 個が既知のタンパク質コード遺伝子と相同性を示した。それ以外の性連鎖 unigene のうち、12 個は *Spinacia* 属に固有な転移因子に由来する mRNA と相同性を示したが、残りの 57 個については既知の遺伝子と相同性を示さなかった。

性連鎖 unigene について 1,000 個体以上から構成される分離集団を用いて連鎖解析を行った結果、これらの一部は Y 特異的領域に座乗している可能性が示された。

(3) 間性系統 03-336 及び雌雄異株系統 03-009 間の F_4 世代および $S_4BC_2F_1$ 世代における M 座近傍組み換え型個体を用いて、M 候補領域を *clsy3 - clc-e* 間よりも狭い範囲(マーカー SP_0036 及び SP_0168 に挟まれた領域)に絞り込むことに成功した。さらに、系統 03-336 および 03-009 のゲノムに由来する BAC クローンを用いて、M 候補領域をカバーするコンティグを構築し、03-336 および 03-009 由来 BAC クローン(各 1 個)の全長配列を決定した。その結果、SP_0036—SP_0168 領域はおよそ 25 kbp であり、この領域には少なくとも 4 つの遺伝子が座乗することが予測された。また、SP_0036—SP_0168 領域には、03-336(間性株)および 03-009(雌株)との間で、46 個の多型サイトがあることが判明した。しかしながら、その大部分は遺伝子間領域またはイントロ

ン領域に存在しており、遺伝子発現に影響を与える可能性のある構造多型は1つの InDel 変異に絞られた。今後は、M 候補領域に関する発現解析および様々な間性系統を用いた連関解析を通じて、M 遺伝子コード配列の同定を行うことを予定している。

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3件)

Fujito S, Takahata S, Suzuki R, Hoshino Y, Ohmido N, Onodera Y., Evidence for a Common Origin of Homomorphic and Heteromorphic Sex Chromosomes in Distinct *Spinacia* Species. (2015) G3, 査読有, 5(8):1663-73

Onodera Y., Arakawa T., Yui-Kurino R., Yamamoto M. P., et al., Two male sterility-inducing cytoplasms of beet (*Beta vulgaris*) are genetically distinct but have closely related mitochondrial genomes: implication of a substoichiometric mitochondrial DNA molecule in their evolution (2015) Euphytica, 査読有, 206(2): 365-379

Takahata S., Yago T., Iwabuchi K., Hirakawa H., Suzuki Y., Onodera Y., Comparison of spinach sex chromosomes with sugar beet autosomes reveals extensive synteny and low recombination at the male-determining locus (2016), Journal of Heredity, 査読有, 107(7):679-685 DOI: 10.1093/jhered/esw055

[学会発表](計8件)

高畠 聡史, 矢後 拓己, 本間 雄二郎, 久保 友彦, 小野寺 康之: テンサイとのシンテニーを利用したホウレンソウ性染色体の構造解析, 日本育種学会 第126回講演会 宮崎県宮崎市 南九州大学 2014年9月26日~9月27日

藤戸 聡史, 鈴木 伶実, 星野 洋一郎, 近江 伸子, 小野寺 康之: 系統的に異なる *Spinacia* 属植物からの同型および異型性染色体の同定, 第37回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2014年11月25日~27日

高畠 聡史, 平川 英樹, 鈴木 穰, 小野寺 康之: トランスクリプトーム情報を利用したホウレンソウ性連鎖遺伝子群の網羅的同定, 日本育種学会 第127回講演会 玉川大学 2015年3月21日~22日

工藤 友裕, 藤戸 聡史, 豊田 敦, 鈴木 穰, 小野寺 康之: ホウレンソウ Y 染色体特異的領域に由来する BAC クローンの全長配列解析, 日本育種学会 第127回講演会 玉川大学 2015年3月21日~22日

岩淵 恵佑, 高畠 聡史, 小野寺 康之: ホウレンソウの間性主働遺伝子座の精密マッピングと物理地図作成 日本育種学会 第128回講演会 2015年秋季 新潟大学 平成27年9月11-12日

高畠 聡史, 岩淵 恵佑, 平川英樹, 小野寺 康之: ホウレンソウ性染色体とテンサイ常染色体の比較解析 日本育種学会 第129回講演会 2015年度春季 横浜市立大学 平成28年3月21-22日

岩淵 恵佑, 杉村 逸郎, 小野寺 康之: ホウレンソウの間性主働遺伝子座乗候補領域のゲノム構造解析, 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日~2016年12月2日 パシフィコ横浜

高橋光彦, 小野寺 康之: *Spinacia* 属から見出された雑種不稔性および限性遺伝を示す花序形質に関する遺伝学的特徴づけ 日本育種学会 第131回講演会 2017年3月29日~2017年3月30日 名古屋大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 康之 (ONODERA, Yasuyuki)
北海道大学 農学研究科(研究院) 講師
研究者番号: 80374619

(2) 研究分担者

近江 伸子 (OHMIDO, Nobuko)
神戸大学 人間発達環境学研究科 教授
研究者番号: 30343263

星野 洋一郎 (HOSHINO Yoichiro)
研究者番号: 50301875
北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター 准教授