

ゼニゴケY染色体トランスクリプトームの解析

●大山 莞爾¹⁾ ◆島田 多喜子¹⁾ ◆大谷 基泰¹⁾ ◆森 正之¹⁾ ◆濱田 達朗¹⁾
◆福澤 秀哉²⁾ ◆大和 勝幸²⁾

1) 石川県農業短期大学 農業資源研究所 2) 京都大学大学院 生命科学研究所

＜研究の目的と進め方＞

多くの生物にとって、有性生殖は個体を増やしつづ遺伝的多様性を保つためになくしてはならない機構である。有性生殖には性が必要であり、多くの生物種において性は性染色体により遺伝的に決定される。大部分の陸上植物は両性花あるいは単性花を同一個体上に形成する雌雄同株であるが、一部の種は1個体に雌雄いずれかの単性花のみを形成する雌雄異株である。雌雄異株性を示す植物種としてはイチョウ目のイチョウ、ナデシコ目のヒロハノマンテマ、タデ目のスイバ、イラクサ目のアサ、スミレ目のパパイヤ、そして蘚苔類の一部などが知られ、分類学的に広範囲に渡る。雌雄異株の植物種の中には異型の性染色体の存在が確認されているものがある。例えば、ヒロハノマンテマにおける性染色体構成は哺乳類同様XX/XY型であり、Y染色体に雄性決定・稔性因子が存在することが古くから知られている。そのため、植物性染色体の構造および機能については、ヒロハノマンテマを用いた研究が多い。実際、ヒロハノマンテマ性染色体上の遺伝子として、MROS3 (Guttman and Charlesworth, Nature 393:263-266, 1998)、SIY1およびSIX1 (Delichere et al., EMBO J. 18:4169-4179, 1999) が単離されている。しかし、それらの機能は明らかにされておらず、哺乳類の雄決定遺伝子Sryに相当する遺伝子は植物では見つからない。また、植物性染色体の構造、網羅的な遺伝子探索・発現解析に関する研究は、国の内外を問わず報告されていない。一方、全ゲノム解析を通じて性染色体の構造解析がなされている動物種の数も年々増えているものの、Y染色体に限れば、包括的な研究成果が報告されているのはヒト (Skaletsky et al., Nature 423:825-837, 2003) とチンパンジー (Hughes et al., Nature 437:101-104, 2005) のみである。

苔類ゼニゴケは雌雄異株植物であり、異型の性染色体をもつ。その生活環のほとんどを半数体として過ごすため、XX/XY型のヒトやヒロハノマンテマなどと異なり、ゼニゴケ雄株は性染色体としてY染色体のみ、雌株はX染色体のみを有する。すなわち、ゼニゴケではY染色体およびX染色体を調べることで、雄および雌のそれぞれに特異的な遺伝情報を個別に解析できる。また、ゼニゴケの性染色体のサイズはY染色体で約10 Mb、X染色体で約20 Mbと小さく、全一次構造解析を実施するのに有利である。さらに、ゼニゴケは「最初の陸上植物」として進化的に位置づけられている (Qiu et al., Nature 394:671-674, 1998)。そのため、ゼニゴケの有性生殖機構が、現存する陸上植物の有性生殖機構の原型を保持していると期待される。そして、ゼニゴケ性染色体上にはその機構を構成する遺伝子群の少なくとも一部が存在すると考えられる。

性染色体の構造および遺伝子群の全貌はどの植物種においても未だ明らかにされておらず、動物を含めてもその例は極めて少ない。我々はゼニゴケY染色体の小さなサイズに注目し、その全遺伝情報を明らかにすることで、植物性染色体の構造と機能に関する網羅的な知見を提供

することを目指した。

＜研究開始時の研究計画＞

本研究の実施計画は、以下に示す3つの段階で構成される。なお、各段階は研究期間の年度毎の研究課題にもおおむね対応している。

1. 一次構造の解明
(「ゼニゴケY染色体の全構造の解明」、2002年度)
2. 遺伝子の探索
(「ゼニゴケY染色体の全配列決定・アノテーション・遺伝子発現プロファイル」、2003年度)
3. 遺伝子発現プロファイルの解析
(「ゼニゴケY染色体トランスクリプトームの解析」、2004年度)

また、本研究を開始した時点で、

- P1由来人工染色体 (PAC) ベクターを用いた整列化ゲノミックライブラリの作成 (Okada et al., Plant J. 24:421-428, 2000)
- Y染色体特異的反復配列の同定 (Okada et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:9454-9459, 2001)
- RDA (Representational Difference Analysis) 法を用いたY染色体特異的マーカーの単離 (Fujisawa et al., Genetics 159:981-985, 2001)
- 雌雄生殖器官由来ESTの取得 (Nagai et al., DNA Res. 6:1-11, 1999; Nishiyama et al., DNA Res. 7:165-174, 2000)

を実施しており、これらのリソースを用いてY染色体の部分的なコンティグ地図を作成していた。

1. 一次構造の解明

本研究におけるゼニゴケY染色体の塩基配列決定作業の基本的な流れは以下の通りである。

①Y染色体マーカーを用いたゲノミッククローンの単離・整列化 (コンティグ地図の作成)

本研究開始時までに取得していたマーカーおよびゲノミックライブラリを用いて染色体歩行を行い、既に作成していた部分的なコンティグ地図を伸長する。

②ショットガン法による塩基配列決定

前項で得られたコンティグ地図から選んだ個々のPACクローンについてショットガン法により塩基配列を取得する。この際、総括班の大量シーケンシング支援事業を利用する。ショットガン配列のアセンブルは、Paracel社のParacel GenomeAssembler (PGA) を用いる。

2. 遺伝子の探索

遺伝子コード領域の探索は、既知配列に対する相同性により同定する。GenBankなどに登録されている配列と比較することで、他生物種にも共通する遺伝子を見つけることができる。ゼニゴケに特異的な遺伝子を発見するためにはEST情報を利用する。本研究開始時までに、未熟生殖器官由来ESTを雄株・雌株それぞれについて約1,000個ずつ取得していたが、雄株葉状体および生殖器官

由来のcDNAライブラリを新たに作成し、総括班の大量シーケンシング支援事業により約30,000のESTを追加する。

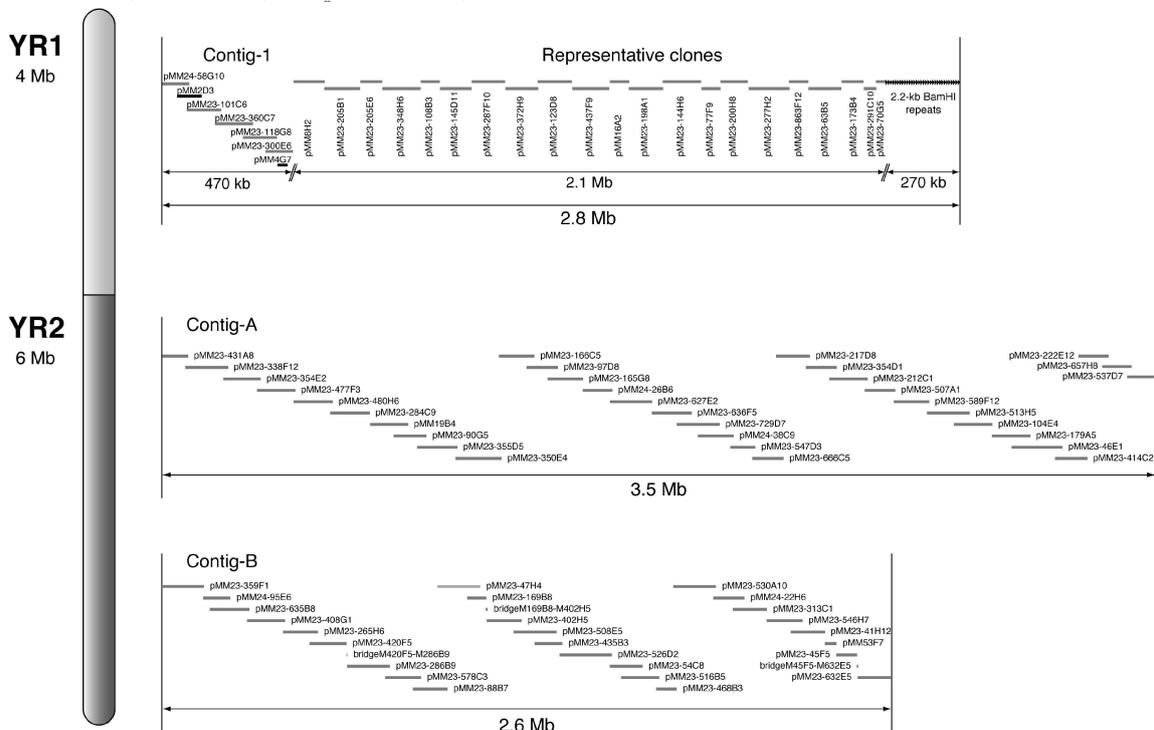
3. 遺伝子発現プロファイルの解析

得られる塩基配列情報を元にDNAマイクロアレイを作成し、Y染色体遺伝子群の発現プロファイルを明らかにする。

〈研究期間の成果〉

1. 一次構造の解明

ゼニゴケ Y 染色体は、Y 染色体特異的反復配列が蓄積している領域 YR1 (約4 Mb) と、その他の領域 YR2 (約6 Mb) に大別される (下図)。まず YR1 について全長約470 kb のコンティグ (Contig-1) を作成した。しかし、高度に保存された反復配列が多数存在するため、染色体歩行によるさらなるコンティグ地図の作成は極めて困難であった。そこで、YR1 に由来する PAC クローンをゲノミックライブラリより網羅的に収集し、YR1 の異なる領域をカバーするクローンについて塩基配列を決定することにした。この戦略により、個々のクローンを整列化させることなく YR1 の正味の遺伝情報を得ることができる。既に同定していた Y 染色体特異的反復配列をプローブとするコロニーハイブリダイゼーション法により、YR1 由来のクローン429個を単離した。これらの制限酵素切断パターンを比較し、YR1 の異なる領域に由来するクローン21個を抽出した (図中の "Representative clones")。次いで Contig-1 に属する7個を含む合計28個の YR1 由来クローンについて概要塩基配列を得た。これらのクローンが合計で約2.6 Mb に相当する領域をカバーすること、YR1 には多数の反復配列が存在することを考慮すると、得られた配列情報は約4 Mb の YR1 の大部分を網羅すると期待される。



YR2については、本研究開始時に作成されていたコンティグ地図をさらに伸長させて2個のコンティグ、Contig-A (約3.5 Mb、245クローン) およびContig-B (約2.6 Mb、168クローン) を作成した。互いの重なりが可能

な限り小さくなるようにしてContig-Aから33クローン、Contig-Bから25クローンを選び、それぞれ3,467,261 bpおよび2,530,874 bpの概要塩基配列を得た。

2. 遺伝子の探索

まず雄株葉状体および生殖器官cDNAライブラリより、それぞれ約15,000のESTデータを得た。既に得ていた約2,000のESTを合わせてアセンブルしたところ、10,483個の互いに重複しない配列を得た。これらのうち、YR2の配列をもつものは31個で、これらはYR2に存在する遺伝子に由来すると思われる。一方、YR1の配列をもつESTは見つからなかった。GenBankなどの公開データベースに登録されているアミノ酸配列との同源性検索の結果も合わせて、YR1については9個、YR2についてはContig-Aで34個 (うち4個はゼニゴケEST情報のみに基づく)、Contig-Bで21個 (うち1個はゼニゴケEST情報のみに基づく)、計64個の遺伝子を見いだした。YR1に存在する遺伝子のうち少なくとも6個はマルチコピー遺伝子であった。ゲノミックPCRにより、64個のY染色体遺伝子のうち39個は雌ゲノムでは検出されなかった。PCRでは検出できない程度に配列が変化したコピーが雌ゲノム中にも存在することは现阶段では否定できないものの、このような遺伝子が雄の性決定・性分化に関与している可能性が高い。

ゼニゴケ Y 染色体遺伝子が同源性を示した他生物種の遺伝子には、シグナル伝達や遺伝子発現調節に関与すると考えられるタンパク質をコードするものが含まれていた。以下にそれらの例を示す。

MAPKKK、Fimbriata-like protein、RNA-binding protein、Ras-like protein、Phosphatidylinositol 3-kinase、LOV-domain protein など

なお、これまでに報告されている他生物種の Y 染色体遺伝子のホモログは含まれていなかった。

64個の Y 染色体遺伝子のほとんどはシロイヌナズナなどの高等植物の遺伝子と最も高い同源性を示した。しかし、興味深いことに、6個の遺伝子はODF3 (Outer Dense Fiber 3; h-Shippo1) などの動物由来の遺伝子とは同源性を

示したが、高等植物に存在する遺伝子とは相同性を示さなかった。ODF3およびその他3個の遺伝子が精子の鞭毛に局在するか精巣特異的に発現していることが報告されていること、ゼニゴケが雄性配偶子として精子を形成すること、そしてこれら6個の遺伝子がゼニゴケ雌ゲノムには存在しないことから、これら6個の遺伝子がゼニゴケにおいても精子形成に関与している可能性がある。

YR1にはY染色体特異的反復配列が蓄積していたが、YR2には他の真核生物ゲノムと同様、LTR (Long Terminal Repeat) 型レトロポゾンなどの転移因子が多数存在していた。ゼニゴケY染色体で見いだされたLTR型レトロポゾンの1種はDNAメチルトランスフェラーゼ (DNMT) ドメインを有していた (DRE: DNMT-containing repetitive element)。DNMTドメインをもつ転移因子は大腸菌とショウジョウバエで1例ずつ報告があるのみで、植物ではDREが初めての報告である。また、植物と動物ではDNMTドメイン内のサブドメインの順序が異なることが知られているが、DREのDNMTドメインは動物型であった。

3. 遺伝子発現プロファイルの解析

当初DNAマイクロアレイを作成する予定であったが、塩基配列決定作業の遅れなどから実施できなかった。しかし、ゼニゴケY染色体において見いだされた64個の遺伝子全てについてRT-PCRによる発現解析を行った。これらのうち少なくとも39個は雄生殖器官および葉状体で発現しており、前述の精子形成に関与する可能性のある6遺伝子を含む19遺伝子が雄生殖器官特異的に発現していた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

一部の植物種に見られる性染色体は、進化の過程でそれぞれ独立に生じたと考えられている。例えば、パパイヤのY染色体は常染色体から分化して間もないことが最近示された (Liu et al., Nature 16:348-352, 2004)。そして、植物性染色体研究に長く用いられているヒロハノマンテマのY染色体も比較的最近に分化してきたと考えられている。一方、ゼニゴケにおいては、Y染色体にはY染色体特異的反復配列が多量に蓄積し、X染色体にはX染色体特異的な配列をもつrDNAクラスターが存在するため、ゼニゴケの性染色体はパパイヤやヒロハノマンテマに比べてかなり早い時期に分化したと考えられる。ゼニゴケの「古い」Y染色体の知見を得ることで、性染色体の機能・進化一般について理解を深めることができると期待される。実際、我々のこれまでのゼニゴケY染色体に関する研究成果が総説で取り上げられ (Tanurdzic and Banks, Plant Cell 16:S61-S71, 2004)、その成果が国際的に待ち望まれている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

大腸菌での増幅が困難なPACクローンがあり、それらについては塩基配列情報を得ることができなかった。また、反復配列のためにショットガン配列のアセンブルが難しい領域、通常のシーケンシング・プロトコルでは解読できない領域があった。

〈今後の課題〉

本研究により、ゼニゴケY染色体にコードされる遺伝子群を明らかにし、発現解析から性決定・性分化に関与する可能性のある遺伝子群を同定した。今後はこれらの遺伝子について機能解析を実施し、実際に性決定・性分

化に関わっているかどうかを検証する必要がある。

Y染色体とX染色体 (鳥類ではW染色体とZ染色体) といった性染色体は、元は同一の常染色体から分化したと考えられている。ヒトを含む倍数体生物の雄個体において、Y染色体とX染色体間の相同組換えはpseudoautosomal regionは除いて抑制されているため、Y染色体に生じた有害な変異を修復することができない。しかし、X染色体に正常な遺伝子セットがあるために個体としてはその影響を受けることはなく、雄としての生殖機能を低下させない限りY染色体の変異は次世代以降にも受け継がれる。そのため、倍数体生物では、Y染色体のみがその遺伝子を失う方向で進化していると考えられている ("Muller's Ratchet"など)。この仮説はヒトやショウジョウバエなど、全ゲノム構造が明らかにされた生物種で確認されている。

半数体生物の性染色体は、X染色体-Y染色体間の相同組換えが起こらないのは倍数体生物と共通であるが、雄個体にはY染色体のみ、雌個体にはX染色体のみが存在する点が異なる。そのため、半数体生物における性染色体の進化について以下のような仮説が提唱されている。

- ・ Y染色体もX染色体も性染色体としては同等
- ・ 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

しかし、半数体生物の性染色体に関する網羅的な研究は本研究以外に報告されていない。今後ゼニゴケX染色体の塩基配列情報を得て、本研究で明らかにしたY染色体の塩基配列情報と比較することができれば、これらの仮説を検証することができる。半数体における性染色体の進化機構の理解は、ヒトを含む倍数体における性染色体あるいはゲノム進化機構一般のより深い理解にもつながると期待される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0303201725
Ishizaki, K., Shimizu-Ueda, Y., Okada, S., Yamamoto, M., Fujisawa, M., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., and Ohyama, K., Multicopy genes uniquely amplified in the Y chromosome-specific repeats of the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Nucleic Acids Research*, 30, 4675-4681 (2002).
- 0404010934
Fujisawa, M., Nakayama, S., Nishio, T., Fujishita, M., Hayashi, K., Ishizaki, K., Kajikawa, M., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., and Ohyama, K., Evolution of ribosomal DNA unit on the X chromosome independent of autosomal units in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Chromosome Research*, 11, 695-703 (2003).
- 0404011803
Yamaoka, S., Takenaka, M., Hanajiri, T., Shimizu-Ueda, Y., Nishida, H., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., and Ohyama, K., A mutant with constitutive sexual organ development in *Marchantia polymorpha* L. *Sexual Plant Reproduction*, 16, 253-257 (2004).