

# 植物SRY遺伝子：ヒロハノマンテマのY染色体特異的ゲノム構造と雄性決定遺伝子

●河野 重行<sup>1)</sup> ◆松永 幸大<sup>2)</sup>

1) 東京大学大学院新領域創成科学研究科 2) 大阪大学大学院工学研究科

## ＜研究の目的と進め方＞

高等植物のゲノムサイズは極めて大きい。モデル植物とされるシロイヌナズナ (125Mbp) やイネ (415～463Mb) は高等植物としては例外的で、穀類などの有用作物のゲノムサイズは大きくなる傾向がある。トウモロコシ (2,300～2,700Mb)、オオムギ (4,900Mb)、コムギ (16,000Mb) と、ヒトのゲノムサイズ (3,000Mb) を遥かに超えるものもある。ポストゲノム時代の植物科学では、ヒトを凌ぐ巨大ゲノムをいかにして解析するか、その方法論の確立が早急に望まれている。

移動性に乏しい植物は、配偶者に遭遇できない危険性を避け、その多くが雌雄同株の両性花となっている。一方では、ナデシコ科のヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) のように、雌雄異株でXY型の性染色体をもつ性に積極的な植物もいる。本研究の目的は、ヒロハノマンテマ (4,700Mb) のY染色体 (860Mb) の雄性決定領域とそこにコードされた雄性決定遺伝子 (植物SRY遺伝子) を同定することにある。こうした研究を通じて、1) 植物の巨大ゲノムの一部 (本研究課題ではY染色体) のみを研究対象として取り扱う手法を確立し、2) 花芽形成に続いて起こる生殖器官原基の形成に関わる性染色体と「植物SRY遺伝子」の役割を明らかにする。

A



B

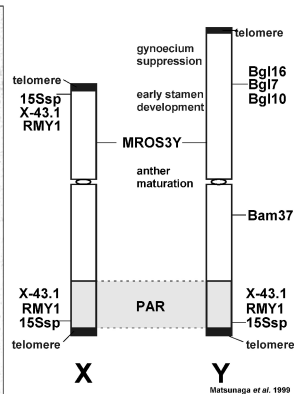


図1 ナデシコ科雌雄異株植物ヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) の前中期染色体像 (A) と2001年当時明らかにされていたXY染色体構造とSTSマーカー (B) 染色体末端 (テロメア) は最後に凝縮する。この凝縮には時期にズレがあり、Y染色体は一方の末端が早く凝縮してもう一方の凝集は遅れる (AのY染色体)。これに対してX染色体の末端の凝縮は両末端とも遅く凝縮する (AのX染色体)。そのため、Y染色体では片方の末端が、X染色体では両方の末端が抜いて見える。Y染色体の偽常染色体領域 (PAR: Pseudo Autosomal Region) は、凝縮が遅い末端のほうだということがわかる (A)。この領域にはいくつかのマーカー知られているので (B)、それを手掛かりに、Y染色体の機能領域 (偽常染色体領域やX染色体との非組換え領域など) のBACクローンを獲得しようとするのが本研究の

当初の目的である。

## ＜研究開始時の研究計画＞

- 1) 純系種を確立する。ヒロハノマンテマの花粉親を決め、屋内で少なくとも年4回の交配実験が可能になるような交配システムを確立する。
- 2) RAPD-PCR法によるY染色体特異的STSプライマーを確立する。RAPD-PCR法をより高感度に最適化し、雌 (2A+XX) と雄 (2A+XY) のゲノム構成の差異を検出し、Y染色体特異的なSTSプライマーを制作する。
- 3) BACライブラリーの構築とスクリーニング法を試行する。BACライブラリーを構築し、Y染色体STSマーカーを用いたPCRとFISH解析によって、Y染色体断片を含むBACクローンを同定する。
- 4) 雄 (♂) 特異的に発現する遺伝子をスクリーニングするため、雄 (♂) の蕾から完全長cDNAライブラリーを複製する。
- 5) 2002年度には、2001年度に単離したSTSマーカーを含むY染色体マーカーを用いてPCRとFISH解析によるスクリーニングを行い、十数クローン程度のY染色体断片を含むBACクローンを同定する。2003年度には、ヒロハノマンテマBACライブラリーを拡充し、ゲノム全体をカバーする。
- 6) BACクローンの塩基配列決定を行い、遺伝子候補を絞り込むとともに、ノーザンハイブリダイゼーション法およびin situハイブリダイゼーション法 (HIS法) で、雄蕊原基あるいは雄蕊で発現している遺伝子を探索する。
- 7) BACクローンの塩基配列決定を行うとともに、遺伝子候補に関しては、2003年度に作成した雄花蕾全長cDNAライブラリーを利用することで、雄特異的発現遺伝子の全長を同定する。
- 8) FISH法を用いたY染色体特異的遺伝子領域および繰返し領域の単離同定とそれらを用いた新たなBACクローンのスクリーニング法を確立する。
- 9) 単離したBACクローンを、Y染色体の部分欠損変異体のゲノムDNAをテンプレートにしたAFLP解析を用いて、Y染色体上にマップする。
- 10) 遺伝子発現に関する通常の解析に加え、ISH法を用いた発現解析と、さらに形質転換植物作成によって、雄性決定遺伝子の候補を絞り込む。
- 11) 雄性決定遺伝子の同定に関しては、雄蕊原基や雄蕊での発現の有無を調べるとともに、遺伝子導入による植物の性転換実験を試みる。

## ＜研究期間の成果＞

- 1) 2003年度までに10回の交配を繰り返し、ヒロハノマンテマの純系株 (K-line) を確立した。
- 2) 2001年度には新規Y染色体特異的STSマーカーを2種類単離した (#2-2, YSWE1)。#2-2を含む8kbpのY染色体領域を解析し新規のOFRを同定した。
- 3) 雄ゲノムのBACライブラリーの拡大を進めている。2001年に構築したライブラリーの中から、Y染色体マ

ーカーのSTS配列をもつクローン(#19B12)を得た。また、2つのORFとcDNAクローンに相同性のある領域を見出した。

- 4) 初期の雄の蕾から、全長cDNAライブラリーを構築し、80%のクローンがcDNAの全長を含んでいた。さらに、BACライブラリーから新規の反復配列を得た(#15C12)。この配列はY染色体にも蓄積が見られ、Y染色体マーカーとなる可能性があり、現在解析を進めている。
- 5) 2002年の段階で、32,540クローン(ゲノムサイズの0.8倍、カバー率55%)まで、BACライブラリーを拡充した。このBACライブラリーの有用性を早めに評価する必要もあって、2001年度までに単離したY染色体特異的STSマーカー11を用いて、18,432クローンに対してPCRによる高速スクリーニング(4D-PCR法)で、3つのポジティブクローン(9d12F, 15b4D, 23b9G)を単離することに成功した。
- 6) 2003年の段階で、上記クローンを、雄花蕾全長cDNAライブラリーを用いて雄特異的発現遺伝子の有無をスクリーニングしている。カバー率55%の段階でも、スクリーニングとシーケンスに良好な結果が出たので、BACライブラリーをさらに拡充することを検討中である。
- 7) BACクローンのFISH法によるスクリーニングを試みた。繰返し配列を含むBACクローンに関しては良好な結果が出ており、染色体末端(X染色体は両腕、Y染色体は片腕のみ)に特異的な繰返し配列(SI-distal-satDNA)の単離などにも成功した。
- 8) 2003年には、平均インサートサイズ115kb、クローン数32,642のBACライブラリーを構築した。重なりを無視すれば、ヒロハノマンテマのゲノムサイズ(2,350~3,000 Mb/C)の約1.6倍に相当する。
- 9) Y染色体特異的STSマーカー11個を用いて、4D-PCR法によるスクリーニングを行い、7つのY染色体断片を含むBACクローンを同定した。
- 10) Y染色体の部分欠損変異体のゲノムDNAをテンプレートにしたAFLP解析で、上記7つのBACクローンをY染色体上にマッピングした。MS2-9d12FがY染色体の「雌蕊の成熟を促進する因子」の近くにあることがわかった。このBACクローンに関しては127kb全長をシーケンスした。アミノ酸残基100以上のORFは47あった。
- 11) レトロトランスポゾンやDNAトランスポゼーズに相同性のあるORFを除いて発現解析した。しかし、発現が確認できたORFについては、Y染色体以外にもコピーをもつことが明らかとなった。現在は、ISH法を用いて、雄花と雌花での発現解析を行っている。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

性に関して動物とは全く異なる戦略を採用する植物の視点から、性と染色体との関係を明らかにすることは、生物の生存戦略を明らかにする上で極めて重要である。こうした認識から、ヒロハノマンテマのY染色体にコードされた雄性決定遺伝子は、世界的にも注目され、“XII International Conference of Plant Embryology in Cracow (2005)” などでも取り上げられている。

- 1) 高等植物のY染色体では、STSマーカーを用いたBACライブラリーの解析は今までなかった。今回の成果は、哺乳類の性決定因子やY染色体の構造との比較を含め、国内外で待ち望まれており、BACライブラリー譲渡の引合いも多い。他の高等植物に比べても、ヒロハノマ

ンテマのゲノムサイズは、4,700Mbと極めて大きいのが、BACライブラリーの拡充を目指した成果は以下のように位置づけられるだろう。

- 2) 性に関して動物とは全く異なる戦略を採用する植物の視点から、性と染色体との関係を明らかにすることは、生物の生存戦略を明らかにする上で極めて重要である。こうした認識から、ヒロハノマンテマのY染色体にコードされた雄性決定遺伝子は、ダーウィンによって最初示唆された雌雄異株植物の起源を探る手掛かりにもなると注目されている。

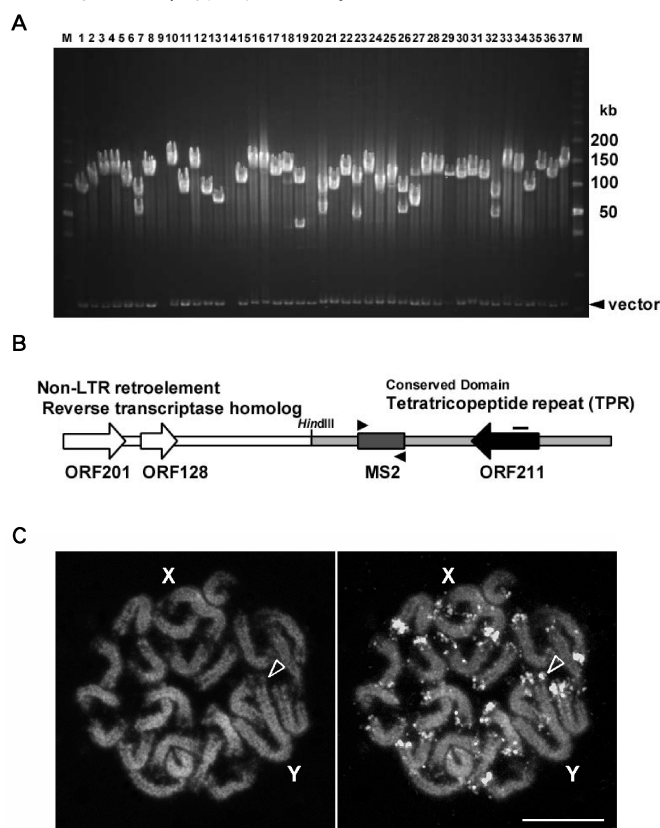


図2 ヒロハノマンテマのBACライブラリー(A)、BACクローン9d12FのY染色体特異的STS (MS2)の周辺(B)、Y染色体片腕にあるサテライトDNAのFISH (C) BACライブラリーのインサートサイズはパルスフィールド電気泳動で確認した。無作為に選んだBACクローン105個について、NotIによってインサートを切り出し、パルスフィールド電気泳動でサイズを確認した。図はその一部で、インサートサイズは50~200kbの範囲で、平均は115kbであった(A)。BACクローン9d12Fには100以上のアミノ酸残基からなるORFが64あった。33はレトロエレメント様の配列で、27はデータベース上の配列と相同性がなかった。そのMS2マーカー近傍を示した(B)。BACライブラリーをスクリーニングしてSI-distal-satDNAを含むクローンを10単離した。そのうちの#15B12の150kbのインサートには約300bpの繰返し単位が420回繰返し130kbにおよぶサテライトDNAがあった。それをプローブにFISHを行うとY染色体の凝縮が遅い末端、すなわちPARをラベルすることができる(C)。Cのバーは5 $\mu$ mを示す。

2005年になって、FISHのプローブのラベルと検出に工夫を加えたマルチカラー競合FISH法を開発した。この方法を用いて、X染色体のPARがこれまでの見解とは逆のP腕にあることを確認できた。(Kazama, et al. The clustering of four subfamilies of satellite DNA at individual chromosome ends in *Silene latifolia*. Genome, in press, 2006)

- 3) ゲノムDNAを無傷で単離することが難しいため、高等植物でのBACライブラリー構築例は極めて少ない。ヒロハノマンテマのY染色体由来のBACクローンは、植物の性と染色体との関係を明らかにするために世界的にも注目されており、幾つかの国際共同研究を計画中である。
- 4) Y染色体の部分欠損突然変異体を用いたAFLPマッピングとSTSマーカーを用いたY染色体特異的BACクローン同定法を用いることで、巨大ゲノムのヒロハノマンテマのY染色体特異的配列の情報を効果的に得られるようになり、ヨーロッパの研究グループとの共同研究が可能となった。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ヒロハノマンテマのゲノムDNAは、従来のBACライブラリー作成法では断片化しやすく、ライブラリー構築に必要な150~300kbpのDNAを十分量確保するのが難しく、DNAの調整法に新たな工夫が必要であった。ライブラリーの拡大が遅れたことは、本研究計画の進捗に大きな影響を及ぼした。しかし、単離用緩衝液中のDNAを安定化させるために、スペルミンとスペルミジンの量を通常の10倍にすることで、核の形状は不安定であるもののDNAの物理的切断の少ない画分を単離することに成功しており、2003年までには100~350kb程度のDNAの単離には問題がなくなっている。これによって、BACライブラリーが拡充され（カバー率80%）、遺伝子やサテライトDNAのスクリーニングに用いられている。こうしたY染色体由来のBACクローンの全塩基配列は2004年になって決められるようになった。研究計画が採択されていた2001年度~2003年度に、Y染色体特異的に発現する遺伝子を同定できなかったのは残念である。

#### 〈今後の課題〉

ヒロハノマンテマのBACライブラリーをさらに拡充しゲノム全体を完全にカバーするものを構築すべきだろう。そのなかからY染色体特異的BACクローンを多数単離して、雄花蕾全長cDNAライブラリーとの間で、Y染色体特異的遺伝子候補をスクリーニングすべきだろう。Y染色体特異的断片を含むBACクローンのスクリーニングを今回行ったSTSマーカーに加え、FISH法で行う方法を確立する。FISH法の改良を行うために、当面は、Y染色体特異的繰返し配列も考慮する必要があるだろう。また、Y染色体の部分欠損変異体を用いたAFLP解析は、BACクローンのY染色体マッピングに極めて有効だったので、ヒロハノマンテマ欠損変異体の単離とその拡充を目指す。ヒロハノマンテマには形質転換系がまだない。形質転換植物を作成することで、雌(♀)を雄(♂)に性転換する植物SRY遺伝子の候補を絞り込みたいと考えている。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1.0201221929  
Matsunaga, S., and Kawano, S., Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants, *Plant Biology*, 3, 481-488 (2001).
- 2.0202151122  
Kejnovsky, E., Vrana, J., Matsunaga, S., Soucek, P., Siroky, J., Dolezel, J., and Vyskot, B., Localization of male-specifically expressed MROS genes of *Silene latifolia* by PCR on flow-sorted sex chromosomes and autosomes, *Genetics*, 158, 1269-77 (2001).
- 3.0202151129

- Nakao, S., Matsunaga, S., Sakai, A., Kuroiwa, T. and Kawano, S., RAPD isolation of a Y chromosome-specific ORF in a dioecious plant, *Silene latifolia*, *Genome*, 45, 413-420 (2002).
- 4.0202151144  
Uchida, W., Matsunaga, S., Sugiyama, R. and Kawano, S., Interstitial telomere-like repeats in the genome of *Arabidopsis thaliana*, *Genes Genet. Syst.* 77, 63-67 (2002).
- 5.0210101707  
Matsunaga, S., Yagisawa, F., Yamamoto, M., Uchida, W., Nakao, S. and Kawano, S., LTR retrotransposons in the dioecious plant *Silene latifolia*, *Genome* 45, 745-751 (2002).
- 6.0210101713  
Janousek, B., Matsunaga, S., Kejnovsky, E., Zluvova, J., and Vyskot B., DNA methylation analysis of a male reproductive organ specific gene (MROS1) during plant development, *Genome*, 45, 930-938 (2002).
- 7.0210101723  
Uchida, W., Matsunaga, S., Sugiyama, R., Shibata, F., Kazama, Y., Hizume, M. and Kawano, S., Distribution of internal telomere-like repeats and their adjacent sequences in a dioecious plant, *Silene latifolia*, *Chromosoma*, 111, 313-320 (2002).
- 8.0210101729  
Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H. and Watanabe A., G2/M phase specific transcription during the plant cell cycle is mediated by cMyb like transcription factors, *Plant Cell*, 13, 1891-1905 (2001).
- 9.0304281552  
Obara, M., Matsunaga, S., Nakao, S. and Kawano, S., A plant Y chromosome-STS marker encoding a degenerate retrotransposon, *Genes Genet. Syst.* 77, 393-398 (2002).
- 10.0304281620  
Miyazawa Y., Sakai A., Matsunaga S., Asami, T., Kawano S., Kuroiwa T., and Yoshida S., Isolation, and expression of novel starch-storing cell specific gene containing KH RNA binding domain from tobacco cultured cells BY-2, *J. Exp. Bot.* 53, 2451-2452 (2002).
- 11.0304281711  
Matsunaga S., Isono E., Kejnovsky E., Vyskot B., Dolezel J., Kawano S., and Charlesworth D., Duplicative transfer of a MADS box gene to a plant Y chromosome, *Mol. Biol. Evol.* 20, 1062-1069 (2003).
- 12.0401271658  
Kazama, Y., Sugiyama, R., Matsunaga, S., Shibata, F., Uchida, W., Hizume, M., and Kawano, S., Organization of the KpnI family of chromosomal distal-end satellite DNAs in *Silene latifolia*, *J. Plant Res.* 116, 317-326 (2003).
- 13.0401271704  
Miyazawa, Y., Nakajima, N., Abe, T., Sakai, A., Fujioka, S., Kawano, S., Kuroiwa, T., and Yoshida S., Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression, and organellar DNA contents, *J. Exp. Bot.* 54, 2669-2678 (2003).
- 14.0401271711  
Uchida, W., Matsunaga, S., Sugiyama, R., Kazama, Y., and Kawano, S., Morphological development of anthers induced by the dimorphic smut fungus *Microbotryum*

violaceum in female flowers of the dioecious plant *Silene latifolia*, *Planta*, 218, 240-248 (2003).

15.0401271716

Sugiyama, R., Kazama, Y., Matsunaga, S., and Kawano, S., CCLS96.1, a member of a multicopy gene family, may encode a non-coding RNA preferentially transcribed in reproductive organs of *Silene latifolia*, *DNA Res.* 10, 213-220 (2003).

16.0401271721

Ageez, A., Matsunaga, S., Uchida, W., Sugiyama, R., Kazama, Y., and Kawano, S., Isolation and characterization of two homeodomain leucine zipper genes from the dioecious plant *Silene latifolia*, *Genes Genet. Syst.* 78, 353-361 (2003).