

論文内容の要旨

論文題目 Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and characterization of genes encoded on the Y chromosome-specific DNA fragments from *Silene latifolia*

(雌雄異株植物ヒロハノマンテマの BAC ライブラリー構築と性染色体の構造に関する研究)

氏名 杉山 立志

序論

高等植物のほとんどは雄しべと雌しべを同一の花にもつ両性花である。しかし、系統とは無関係に雌雄異株となる植物が存在する。性決定に関する研究において、哺乳類では睾丸決定因子 *SRY* が同定されているが、XY 型の性決定を行う高等植物においては Y 染色体の構造に関する解析も、性決定因子を含めた Y 染色体上の遺伝子の解析も進んでいない。雌雄異株植物のナデシコ科ヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) は、Westergaard(1954) によってホルモンの影響を受けず Y 染色体によって性が決まること、Y 染色体には「雌しべの分化抑制」「雄しべの初期の分化」「葯の成熟」に関わる遺伝子が存在することが示された。性決定に関わる遺伝子は発現解析から探索され、これまでに 117 の遺伝子が報告されている。そのうち 4 つが Y 染色体上に存在していた。しかし、これら 4 つの遺伝子は、X 染色体上に相同な遺伝子を持ち、雄花特異的な発現を示さず性決定には関わっていない。本論文では、ヒロハノマンテマを用いて、BAC ライブラリーを構築し、Y 染色体断片をスクリーニングすることで、直接、Y 染色体上の遺伝子とその周辺構造について明らかにし

た。

第 1 章 BAC ライブラリーの構築と Y 染色体由来クローンの同定

1) BAC ライブラリーの構築

S. latifolia は、当研究室において近親交配を 11 回繰り返して、遺伝的に安定になった個体を使用した。構築した BAC ライブラリーは、平均インサートサイズが 115 kb で、クローン数は 32,642 であった。*rbcL* 遺伝子と *coxI* 遺伝子をプローブに用い、葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA の混入を算出した。無作為に選んだ 73 クローンにおいて、葉緑体 DNA が 2 クローン検出されたが(2.7%)、ミトコンドリア DNA は検出されなかった。その結果、ライブラリーは重なりを無視すると *S. latifolia* のゲノムサイズ(2,600 Mb/C と推定)の 1.3 倍に相当する。重なりを考慮したカバー率では 74%となる。

2) BAC ライブラリーのスクリーニングと Y 染色体特異性の評価

BAC ライブラリーのスクリーニングは Asakawa *et al.* (1997)により開発された 4D-PCR 高速スクリーニングを用いた。ライブラリーの 85%にあたる 27,648 クローンをスクリーニングした結果、7 個の Y 染色体由来 BAC クローンをえた(DD44Y-31b4G, MS2-9d12F, MS4b-15b4D, ScD05-57c8E, ScQ14-71c10C, ScX11-23b9G, SIAP3Y-7a8D)。同時に常染色体あるいは X 染色体の相同領域を含むと思われるクローンを 3 個同定した(MS4a-31d12A, SIAP3A-2b5E, SIAP3A-13d11E)。これらの断片の Y 染色体特異性を評価するために、BAC クローンをプローブとしたゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、すべてのクローンで雌雄のゲノム DNA に高分子量から低分子量までスミアなシグナルが観察された。これは 7 つの Y 染色体由来クローンが、常染色体、X 染色体にも存在する繰り返し配列を含んでいることを示している。

これらのうち雌雄でシグナル強度の差が大きかった MS2-9d12F、MS4b-15b4G と ScX11-23b9G クローン、また X 染色体上にホモログが存在すると考えられる STS マーカー MS4 を含む MS4a-31d12A の計 4 クローンを選び、ショットガンシーケンス解析を行った。その結果、インサートの 45~93%の情報をえた。これらの配列を BLASTN、BLASTX 検索を用いて相同性検索を行った結果、80%がデータベースに相同性のない配列、11~18%がレトロエレメントと相同性の高い配列という共通の特徴が見られた。

第 2 章 Y 染色体由来クローン MS2-9d12F の構造とそこにコードされる遺伝子

1) FISH 解析と Y 染色体部分欠失変異体を用いた MS2-9d12F クローンのマッピング

Y 染色体由来クローンのインサート全長の塩基配列を決定するため、ゲノミックサザン解析により

もっともシグナル強度に差のみられた MS2-9d12F クローンを選んだ。最初に、MS2 の Y 染色体上の局在を確認した。MS2-9d12F クローンの FISH 解析から、全ての常染色体ではなく一部の染色体に蓄積が見られる繰り返し配列が含まれていることが明らかになった。また Y 染色体上の局在としては片腕を染めるようなシグナルが得られた。FISH 解析ではクローンの局在が明確にならなかったため、Y 染色体部分欠失変異体を用いたマッピングを行った。University of North Carolina の Sarah R. Grant 博士らはガンマ線を花粉に照射することで、Y 染色体の一部を欠失した変異体を作成し、変異体の表現型と AFLP マーカーの有無から、欠失部位をマッピングした (Lebel-Hardenack *et al.* 2002)。この変異体のゲノム DNA を Sarah R. Grant 博士から分与いただき、MS2 の STS プライマーを用いて PCR を行った。その結果、3 つの両性花変異体と 1 つの無性花変異体で増幅が見られなかった。共通する欠失部位は「葯の成熟」の機能を持つ領域であった。このことは Y 染色体片腕にシグナルが見られた FISH 解析と一致する。

2) MS2-9d12F クローンのショットガンシーケンス解析

ショットガンシーケンス解析により、約 1,800 リードのシーケンスを行い、109,500 bp の Y 染色体断片の配列を決定した。これらの配列を BLASTX、BLASTN 検索を用いて既存の DNA、タンパク質配列情報と比較した結果、新規の配列が 79.7%、レトロエレメントと相同な配列が 13.3%、当研究室で単離した 8 kb の Y 染色体断片 (Nakao *et al.* 2002) と相同な配列が 2.3%、既存の遺伝子と相同な配列が 3.3% (CCLS96.1, *DD44X*, *SIX4*)、新規の ORF が 1.4% という組成を示した。

3) MS2-9d12F クローンにコードされる ORF

ORF 検索の結果、100 アミノ酸残基以上連続するものは 47 個存在した。そのうち 22 個はレトロトランスポゾンの配列と高い相同性を示した。また 3 つの ORF (ORF128a, ORF150, ORF211) は既存の ORF との相同性を示した。残りの 22 個は相同性を示さなかった。雌雄の葉と蕾の mRNA を用いた RT-PCR の結果、発現を確認できたのは ORF128a, ORF211, ORF223a, ORF347 の 4 つであった。4 つの ORF はすべて、雌雄の葉と蕾で発現しており、ハウスキープ的といえる。発現を確認した 4 つの ORF についてコピー数をゲノミックサザン解析によって検定した。ORF128a はゲノム内に 6 コピーあり、Y 特異的なシグナルは確認できなかった。ORF211 は Y 特異的な 2 つのバンドと雌雄共通な 2 つのバンドが見られた。ORF223a と ORF347 は雌雄のゲノムにスミアなバンドがみられ多コピーであることがわかったが、雌雄の差は見られなかった。

第3章 Y染色体上の蓄特異性を示す CCLS96.1 遺伝子

MS2-9d12F クローンには、*S. latifolia* で発現が確認されている mRNA 配列 CCLS96.1 のホモログが存在した。CCLS96.1 は雄しべを失った変異体と雄株の蓄分化初期の RNA を用いたサブトラクションからえられ、薬特異的に発現していると報告されている(Barbacar *et al.* 1997)。しかしながら、報告されている断片には多くの終止コドンが存在し、連続した ORF は組めない。Y 染色体上の配列を用いたノザン解析の結果、雌雄の蓄でわずかに発現していることがわかったが、雌雄の発現の差を確認できなかった。そこで RT-PCR を行ったところ、葉でも発現していることが明らかになった。定量的 RT-PCR により蓄積量を比較したところ、雄では葉より蓄での発現量が多いのに対して(葉の 2.2 倍)、雌では蓄での発現が極端に少なく(葉の 0.05 倍)、雌雄で異なる mRNA の蓄積がみられた。ゲノミックサザン解析から CCLS96.1 が Y 染色体特異的ではなく、ゲノム全体に多数のコピーをもつことが明らかになった。

CCLS96.1 は Y 染色体配列上でも長い ORF を組むことができない。そこで、RACE 解析を行い、10 個の CCLS96.1 遺伝子を同定した。mRNA の全長は 626 bp から 1941 bp と多様性を示した。これらの cDNA 配列は、すべての読み枠において 100 アミノ酸残基以上の ORF を組むことができなかった。一つの可能性として短いペプチドとして機能しているといえる。しかし、10 個の配列の間に共通のアミノ酸配列は存在しない。塩基配列レベルの相同性は 81~91% であるのに対して、アミノ酸配列レベルでは相同性がないことから CCLS96.1 はタンパク質をコードしていない遺伝子、non-coding RNA (ncRNA) である可能性がある。

結論及び展望

本研究では雌雄異株植物ヒロハノマンテマの BAC ライブラリーを構築し、Y 染色体由来クローンを同定した。Y 染色体特性の高いクローンを選び、塩基配列を決定し、Y 染色体上の遺伝子として 5 つの遺伝子の発現を確認した。これらの遺伝子は X 染色体・常染色体にもコピーを持つことから、ヒロハノマンテマの Y 染色体が、X 染色体よりも 40% 大きいものにも関わらず、特異的遺伝子の獲得が進んでいないことが示された。今後は、BAC クローンをを用いた Y 染色体構造の可視化と、サブトラクション法によらない発現遺伝子の単離による性決定因子の同定が必要である。