

論文内容の要旨

論文題目 雌雄異株植物ヒロハノマンテマの性染色体の BAC
ライブラリーと重イオンビーム照射を用いた研究
(Studies on the sex chromosome of the dioecious
plant *Silene latifolia* by using the BAC library
and heavy-ion beam irradiation)

氏名 石井 公太郎

序論

ナデシコ科の雌雄異株植物ヒロハノマンテマは、800-2,400 万年前に雌雄同株から雌性両全異株を経て進化し、そのとき XY 型の性染色体も獲得したとされている (Desfeux *et al.* 1996)。XY 性染色体は本来 1 組の常染色体ペアであり、常染色体ペアに一連の出来事：1) 原 X 染色体上の遺伝子に雄性不稔変異が、原 Y 染色体上の遺伝子に雌性抑制変異が生じ、2) 変異遺伝子周辺で組換え抑制が生じ、3) 組換え抑制領域の拡大と転移因子の蓄積による性染色体の異形化が生じ、4) 新たに性決定に関与する遺伝子の出現、5) 他の染色体との組換えによる配列の転移が起こり、現在の異形性染色体が形成されたというモデルが提唱されている (図 1, Bergero and Charlesworth 2008)。

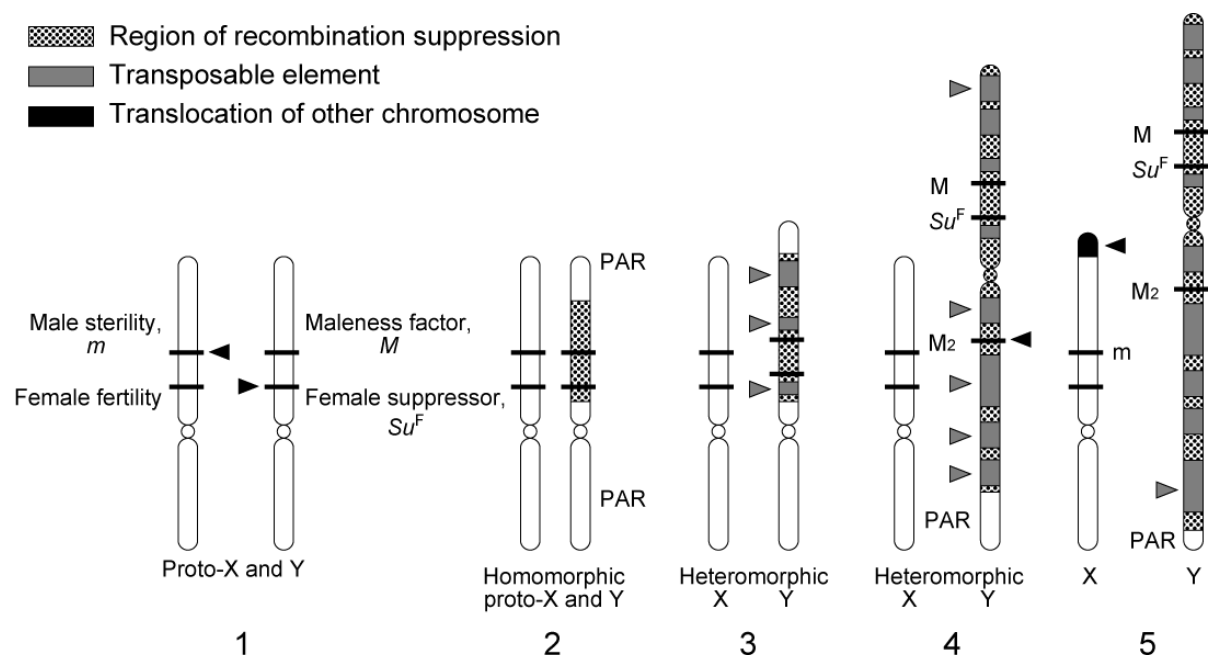


図 1 ヒロハノマンテマ性染色体の出現モデル 染色体上の線は性決定に関与する遺伝子の位置を示す。矢頭はその段階で生じた変化の位置を示す。

本研究では、PAR 近傍の領域、組換え抑制領域、PAR と反対側の末端領域の 3 つの領域に注目し、それぞれの領域の配列をもつ Bacterial Artificial Chromosome (BAC) クローンを解析し、ヒロハノマンテマの XY 染色体間の構造の差異を明らかにすることを試みた。また、それぞれの領域で性決定に関与する遺伝子の単離を試みた。さらに重イオンビームを花粉に照射して得られた個体の Y 染色体の欠失状況を網羅的に解析し、性決定に関与する領域とその原因遺伝子の探索を行った。

結果と考察

1. Xq 腕末端に由来する反復配列を含む BAC クロンの解析

染色体末端特異的サテライト DNA である *KpnI* サブファミリーは PAR と反対側の Xq 腕末端に蓄積しているが、対応する Yp 腕末端には蓄積していない(Kazama *et al.* 2003)。これは XY 染色体の末端が異なる配列をもつことを示し、性染色体と他の染色体間で配列の転移があったことを示唆する。Xq 腕末端の配列を得るために *KpnI* サブファミリーを多く含む BAC クローンとして風間ら (2003) により単離された BAC クローン#15B12 を解析した。#15B12 のインサート配列 150 kb の両端それぞれ 7.5 kb と 24 kb の配列を決定した。それぞれの配列には *KpnI* サブファミリー配列の反復した領域と非反復性配列が隣接していた。

#15B12 の配列が X 染色体に由来するかを確かめるために FISH 解析を行った。#15B12 全体をプローブとした場合には、*KpnI* サブファミリーをプローブとした場合 (Kazama *et al.* 2003) と同様、多くの染色体末端にシグナルがみられた。さらに非反復性の配列を得るため、#15B12 に隣接する配列をもつ BAC クローンを得るために 4D-スクリーニング (Asakawa *et al.* 1997) を行い、BAC クローン#56b11C を単離した。#56b11C のインサートの末端 5.8 kb の配列からなるプローブでは、多くの染色体末端にシグナルがみられたが、X 染色体末端のシグナル強度が最も強く、これらの配列が X 染色体に由来することが明らかになった。さらに、#15B12 の非反復性の 14.6 kb の配列からなるプローブでは、X 染色体の PAR と反対の Xq 腕末端と、7 番常染色体ペアの片末端にシグナルがみられた。これは Xq 腕末端の配列が 7 番常染色体の末端の配列と相同性をもつことを示し、7 番常染色体の末端と原 X 染色体の q 腕末端が共通の由来をもつことを示唆する (図 2)。

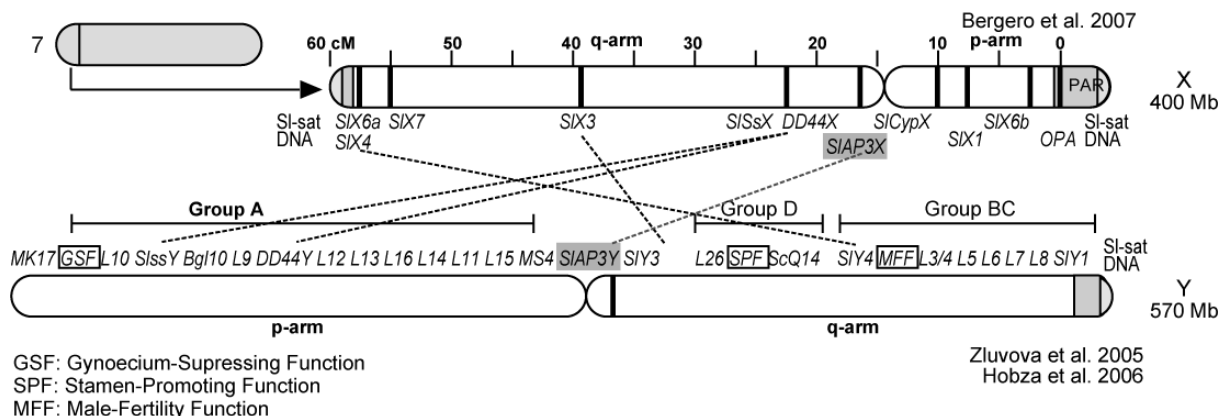


図 2 性染色体のマップ 染色体上の縦線は染色体上の位置が決定された遺伝子の位置を示す。

2. 組換え抑制領域上の対立遺伝子 *SIAP3X/Y* の配列解析と FISH 解析

シロイヌナズナの *APETALA3* (*AP3*) は雄蕊の形成に関与し、*AP3* 欠損変異体には雄蕊の代わりに雌蕊が形成されることから、ヒロハノマンテマの *AP3* ホモログ (*SIAP3*) も性決定遺伝子の一つではないかと注目されている。*AP3* ホモログ *SIAP3Y* は松永ら (2003) によって cDNA

配列が単離され、Y染色体上にあることが報告されている。X染色体上に対立遺伝子が存在するかを確かめるため、BACライブラリーから *AP3* ホモログを2つ単離した。連鎖解析から、一方はY染色体上に (*SIAP3Y*)、他方はX染色体上に (*SIAP3X*) あることがわかった。2つのBACクローンのショットガンシーケンシングにより *SIAP3X/Y* の全長配列を得た。*SIAP3X* は全長1.7kbであったが、*SIAP3Y* の第2イントロンは24.4 kbに及び、全長は26 kbであった。

内部構造の差異から2つの遺伝子は非組換え領域に存在すると考えられた。そこで性染色体上での位置を決定するためにFISH解析を試みた。*KpnI* サブファミリーのプローブとのマルチカラーFISHで、*SIAP3Y* はY染色体q腕のセントロメア近傍に位置することがわかった。一方、*SIAP3X* のFISH解析により、*SIAP3X* はX染色体q腕のセントロメア付近に存在することがわかった(図2)。このことから、性染色体の異形化の過程で、Y染色体に動原体を含んだ逆位が起きたことが示唆された。この逆位により *SIAP3X/Y* の機能分化が生じた可能性がある。

3. Y染色体 PAR 領域近傍の配列タグ部位 (STS) マーカーMS2 とその周辺配列の解析

RAPD解析により雄特異的なSTSマーカーMS2が単離されていた(Sugiyama 2003)。Y染色体欠損変異体ライブラリーをテンプレートとして、Y染色体上のマーカーを用いてPCRをするY染色体デリーションマッピングにより、MS2はPAR近傍のマーカーL8 (Lebel-Hardenack *et al.* 2002) と同じ座位にマッピングされた。

PAR近傍の対立遺伝子を単離することを期待して、4Dスクリーニング法によりBACライブラリーからMS2を含むBACクローン#9d12Fを単離し、ショットガンクローニングにより109 kbのインサート配列を決定した。BLASTX検索では既知のレトロトランスポゾンと相同な11個の配列が明らかになった。ドットマトリックスプロット解析とBLASTN検索により、14個のLTR様配列が明らかになった。さらに、ORF Finderを用いた解析により100アミノ酸残基からなる9個のORFが予測された。RT-PCR解析により内4個のORFの雌雄両方での発現が確認された。これらはPAR近傍の対立遺伝子の候補である。さらに内1個のORF211について連鎖解析を行い、Y染色体とX染色体にそれぞれ存在する対立遺伝子、*ORF211Y* と *ORF211X* を単離した。

4. 重イオンビーム照射によるY染色体欠損変異体の網羅的解析

本研究で得られた性染色体上の対立遺伝子はヒロハノマンテマの性決定への関与が疑われる。これらの欠損変異体を得ることを期待して乾燥種子に重イオンビームを照射した。種子への重イオンビーム照射で得られた変異体のY染色体の部分欠損はそのほとんどが個体中にキメラで含まれていたため解析に不向きであった。そこで染色体欠損変異を均一にもつ変異体を得るために、花粉へ重イオンビーム照射を照射した。表現型の観察と合わせて、合計5個体の両性花変異体、4個体の無性花変異体、4個体の葯発育不全変異体を得た。

得られた両性花変異体、無性花変異体のY染色体の欠損をZlucvovaら(2007)の結果と合わせて比較した。これまでの研究で得られた遺伝子の欠損はみられなかったが、 γ 線照射由来の両性花変異体、無性花変異体ではそれぞれマーカーMK17、ScQ14が共通して欠損していた。これはそれぞれのマーカーが雌蕊抑制機能(GSF: Gynoecium Suppressing Function)領域、雄蕊促進機能(SPF: Stamen-Promoting Function)領域と緊密に連鎖していることを示す。一方、重イオンビーム照射由来の両性花変異体、無性花変異体ではそれぞれのマーカーが欠損していないものがみられた(図3)。これはそれぞれの機能領域に存在する遺伝子がピンポイントに欠損していることを示唆する。

γ 線と炭素イオンビームによるDNA欠損の長さのピークがそれぞれ100 kb (Morita *et al.*

2007)、1-1000 bp (Kazama *et al.* 2007)であることを考慮すると、ScQ14の周辺100 kb以内の領域にSPF機能遺伝子が存在すると考えられる。そこでScQ14を含むBACクローンのインサート配列を454シーケンシングにより決定した。ORF FinderとBLASTXにより、合計91 kbのコンティグ配列中に3個の転移因子ではないORFが予測された。そのうち1個は既知のヒロハノマンテマの機能未知の遺伝子ORF285に類似していた。これらのORFはSPF機能遺伝子の候補である。

結論

本研究ではヒロハノマンテマの性染色体の3つの領域に着目し以下のことを明らかにした。

- 1) サテライトDNA *KpnI* サブファミリーの連続して反復する配列130 kbを同定し、配列がXq腕末端に存在すること、7番常染色体に相同な領域が存在することを明らかにした。
- 2) AP3ホモログ *SIAP3Y*のX染色体上の対立遺伝子 *SIAP3X*を単離し、内部構造の差異を明らかにした。また、FISH解析により両遺伝子が非組換え領域にあることを決定し、セントロメアを含んだ染色体再構成の可能性を示唆した。
- 3) STSマーカーMS2がY染色体PAR領域近傍に存在することを明らかにした。また、MS2周辺109 kbの配列を決定し、新規の性染色体上の対立遺伝子の候補となるORFの存在を明らかにした。その1つについて対立遺伝子 *ORF211Y*と *ORF211X*を単離した。
- 4) 重イオンビーム照射によりY染色体の部分欠失変異体を作成した。欠失マッピングにより、GSF機能領域、SPF機能領域がそれぞれマーカーMK17、ScQ14に緊密に連鎖することを明らかにした。454シーケンシングによりSPF機能遺伝子の候補を3個単離した。

発表論文

- 1) Ishii, K., Sugiyama, R., Onuki, M., Kazama, Y., Matsunaga, S., Kawano, S., The Y chromosome-specific STS marker MS2 and its peripheral regions on the Y chromosome of the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genome* 51(4); 251–260, 2008
- 2) Ishii, K., Amanai, Y., Kazama, Y., Ikeda, M., Kamada, H., Kawano, S., Analysis of BAC clones containing homologous sequences on the end of the Xq arm and on chromosome 7 in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genome in press*

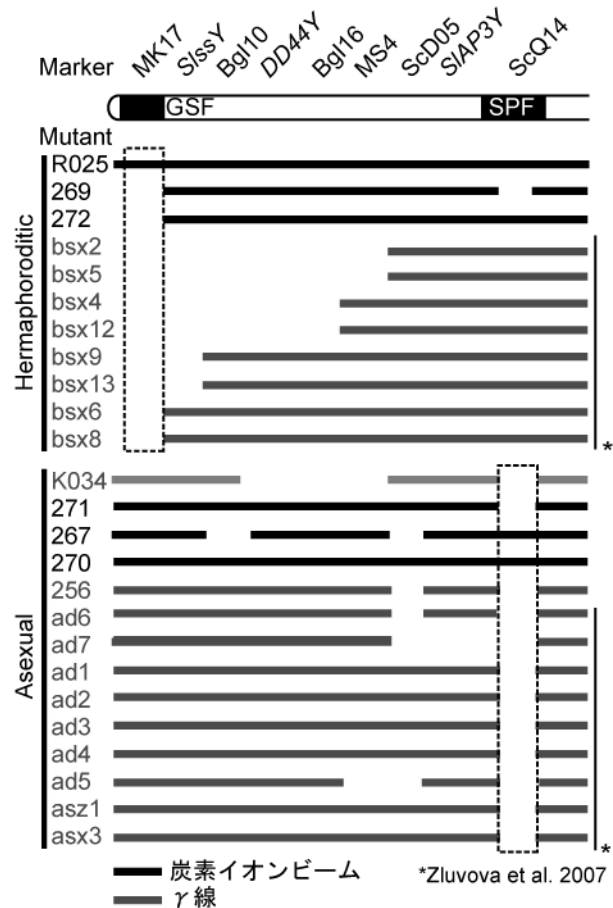


図3 Y染色体の欠失地図 実線はマーカーあるいは遺伝子が存在することを示す。K034は自然突然変異体として得られた。