様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ９ 日現在

機関番号：１３６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４５０００４

研究課題名（和文）性染色体ゲノムの比較によるパパイヤ性決定遺伝子の探索

研究課題名（英文）Identification of sex determination genes in papaya by comapring sex chromsome sequences

研究代表者
松村　英生（MATSUMURA, Hideo）

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：４０３９０８８５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：三性異株であるパパイヤについてその性決定機構を解明すべく、性染色体のゲノム配列の比較解析を行った。YおよびYh染色体のゲノム配列を独自に解析して両配列の比較を行った結果、遺伝子領域に構造違いが見られたのはMADS-boxドメインを有するSVP-like遺伝子のみであった。Yh染色体上の同遺伝子はトランスポゾン挿入が見られ、Y染色体上の遺伝子と比較するとその産物はMADS-boxドメインが欠損していた。発現解析や一過的発現解析から、本遺伝子がパパイヤにおける性決定に関わる可能性が示唆された。またX染色体上の遺伝子発現解析を雌/両性間で比較した結果、遺伝子量補正が働いていることが示された。

研究成果の概要（英文）：Papaya (Carica papaya) is a trioecious plant species, and its sex types were determined by sex chromosomes (X, Y, Yh). In the present study, genome sequences of Y and Yh chromosomes were analyzed and their structural differences were identified. Consequently, only a SVP-like gene, harbouring MADS-box domain, showed apparent structural difference between Y and Yh chromosomes. In its allele on the Yh chromosome, a transposon was inserted and 5' region was truncated in its transcript, resulting in loss of MADS-box domain in its encoded protein. RT-PCR analysis and transient expression study in Nicotiana benthamiana leaves demonstrated that expression product from its allele in Yh chromosome was possibly unstable. Therefore, this SVP-like gene was supposed to be a candidate gene for male/hermaphrodite determination in papaya. Additionally, RNA-seq analysis of X chromosomal genes showed possibility of gene dosage compensation between female and hermaphrodite.

研究分野：植物育種学

キーワード：性決定　性染色体　ゲノム解析　MADS-box　パパイヤ

１．研究開始当初の背景

高等植物における性（雌雄）の様式は多様であり、遺伝的多様性の維持に大きく関わっている。とくに雌雄異株の植物種は農作物にも多く見られるが、その性決定機構の多くは未解明である。雌雄異株の植物のうち 48 種は性染色体が性を決定することが知られている（Ming et al., 2011）。性染色体上には雄性、雌性を決定する遺伝子が座乗し、それらの遺伝子を含む領域が対合染色体間で組換え抑制されているが、それら性決定遺伝子は同定されていない。性染色体を持つ植物の中で最も遺伝学、分子生物学的研究が進められている種の一つがパパイヤ(*Carica papaya*)であり、ドラフトゲノム配列情報が公開されている。パパイヤには雌雄に加えて両性が存在し、両性の果実のみが商品価値を持つことからその性の分離が農業生産に大きく影響を及ぼしている。その性決定には X、Y、Y^h の３つの性染色体が関与し、XX(雌)、XY(雄)、XY^h(両性)となる。今までの研究から、部分的な配列情報ではあるが X と Y^h 間では構造がかなり異なっている事が示され、一方、Y^h は Y から派生したと推定され（Yu *et al.*, 2008）、部分的なゲノム配列の比較からも両染色体の類似性が示されている。このような性染色体、特に Y^h における MSY 領域には多くのトランスポゾンなど redundant な配列が多く、解析が困難であったが最近の論文では配列から遺伝子予測が行われている（Wang *et al.*, 2012）。今までの研究からパパイヤ性染色体構造の解析は進められていたが、実際の遺伝子発現解析や座乗する個別の遺伝子の解析に関する知見はあまり得られていなかった。

２．研究の目的

本研究では、パパイヤにおける性決定機構の解明を目標として、性染色体のゲノム配列構造の比較解析や遺伝新発現解析を行うことで性染色体間で構造の異なる遺伝子や発現の異なる遺伝子を見出し、性決定の候補となる遺伝子を同定する。さらに候補となる遺伝子について性決定に関与する事を示す機能解析を行うことも目的とした。

３．研究の方法

(1) 研究材料

パパイヤ両性株品種である Sunrise Solo の自殖後代から両性株と雌株を、雄株として TM1 系統を沖縄県農業研究センターおよび信州大学ヒト環境科学研究支援センター遺伝子実験部門において育成し、ゲノム DNA 及び RNA 抽出に供試した。

(2)全ゲノム配列解析

雌、両性、雄株の各々の葉からゲノム DNA を抽出し、イルミナ社次世代シークエンス解析のため 300-500 塩基長に断片化した後に両端にアダプターを結合したライブラリを作製した。これらのライブラリをイルミナ GAIIx によりペアエンドシークエンス解析（110bx2）を行った。

(3) 性染色体ゲノム配列の構築

上記で解析した各性の全ゲノム配列データは CLC assembly cell (CLC Bio)を用いて de novo アッセンブルを行い、scaffold を構築した。さらに GenBank（DNA データベース）中のパパイヤ X および Y^h 染色体ゲノムの BAC クローン配列データを取得し、それらの配列と上記の de novo アッセンブルで得られた scaffold 配列をアッセンブルして K および Y^h h 染色体の contig 配列を作製した。

Y 染色体については上記で構築した Y^h 染色体配列に対して雄ゲノム DNA シークエンスデータ（(2)で取得）をマッピングしてコンセンサス配列を得ることで同染色体のゲノム配列とした。

(4)遺伝子予測

上記で構築した各性染色体 DNA 配列は fgenesh(Softberry)を用いて遺伝子予測を行い、また Y^h 染色体については TransposonPSI によりトランスポゾンコード遺伝子を同定した。

(5) 遺伝子発現解析（RNA-seq 解析）

パパイヤ雌および両性株の成葉から RNA を抽出し、リボソーム RNA の除去を行って mRNA を精製した。各 mRNA は断片化した後に逆転写して cDNA を合成し、イルミナ社シークエンス解析用のアダプターを結合してライブラリ（RNA-seq ライブラリ）を作製した。これらのライブラリは次世代 DNA シークエンサーMiSeq(信州大学設置)を用いてシークエンス解析を行った。得られた配列データは CLC Genomics Workbench（CLC Bio）を用いてアッセンブルを行い、Splign（NCBI）により X および Yh 染色体ゲノム配列にマップした。アッセンブルで作製した contig（cDNA contig)に対して雌及び両性の各々のシークエンスリードをマップし、各 contig にマップされたリード数を数える事で各遺伝子の発現量を定量化した。この数値は各 contig(遺伝子)の長さおよびマップされた総リード数によって補正を行った RPKM(read per kilobase per million)値で標準化した。

(6) *SVP-like*遺伝子の単離とバイナリベクターへの組み込み

パパイヤにおける SVP-like 遺伝子（*CpSVP-like*、*CpSVPlike-h*）の cDNA は雄および両性の葉の RNA から合成した cDNA を鋳型にして RT-PCR により増幅した。単離した雄由来の cDNA 配列の末端に HA タグを、両性由来の cDNA 配列の末端には His タグの配列

を付加し、バイナリベクター(pRI201)の 35S プロモーター配列下に組み込んだ。

(7) *SVP-like*遺伝子のタバコ葉での一過的発現

上記で作製したバイナリベクターを導入したアグロバクテリウム（GV3101）は液体培養を行い、アセトシリンゴンを加えてベンサミアナタバコ（*Nicotiana benthamiana*）葉に注入した（アグロインフィルトレーション)。注入後 1-2 日目の葉をサンプリングしてタンパク質を抽出し、PVDF 膜にブロットした。タンパク質をブロットした膜は抗 HA タグもしくは抗 His タグ抗体を利用して検出を行った。

４．研究成果

(1) パパイヤ Y^h 及び Y 染色体間のゲノム比較

パパイヤ雄株および両性株よりゲノム DNA を抽出し、イルミナ社次世代シークエンサーによるペアエンドシークエンス解析（40x 相当）を行い、得られた配列データについて de novo アッセンブル解析を行った。その結果、雄、両性の各々で総塩基長約 280Mb のスキャッフォルド配列が得られ各 N50 は雄では 11Kb、両性では 20kb 程度であった（表 1)。

表１ 雄、両性株のゲノム配列解析結果

	depth (x)	scaffold の全長（bp)	N50
雄	43.9	285,683,349	11,189
両性	46.5	282,701,114	19,960

次に両性における Y^h 染色体配列を再構築するため、既知の Y^h 染色体ゲノムの BAC クローン配列（63 クローン）と上記の両性のゲノム配列をアッセンブルした scaffold 配列を一緒にアッセンブルする事を試みた。その結果、7.7Mb に渡る 12 の Y^h 染色体 contig 配列が構築され、それらの配列と Yh 染色体のリファレンス配列（HSY_Ref）とした（表 2)。

これら HSY_Ref 配列からプログラム（Geneid）を用い解析と共に、パパイヤ unigene 配列のマッピングにより遺伝子予測を行った。また同配列を TransposonPSI プログラムで解析する事でトランスポゾン予測も行った。その結果、545 遺伝子がトランスポゾン以外の予測遺伝子として同定された。さらに以前の研究で解析したパパイヤ花芽の HtSuperSAGE 法によるトランスクリプトームデータをマップした結果、Y^h 染色体上の 183 遺伝子が花芽で発現し、うち 45 遺伝子が Y^h もしくは Y 染色体特異的であることが示された。

表２ Y^h 染色体 contig 配列のリスト

contig ID	長さ（bp)
HSY_Ref1	2,543,606
HSY_Ref2	2,028,808
HSY_Ref3	736,124
HSY_Ref4	637,403
HSY_Ref5	557,735
HSY_Ref6	336,922
HSY_Ref7	245,996
HSY_Ref8	209,725
HSY_Ref9	155,172
HSY_Ref10	110,712
HSY_Ref11	86,650
HSY_Ref12	64,215
Total	7,713,068

この HSY_ref 配列に対して上述の雄株のゲノムシークエンスデータをマッピングすることで Y^h 染色体と Y 染色体間のゲノム配列の比較を行った。その結果、14,528 箇所の塩基置換と 965 箇所の(7 塩基以下の挿入／欠失）が見出された。また両染色体間では３箇所の大きく配列構造が異なる箇所が見られた。

(2) 雄と両性間で構造の異なる遺伝子の同定

上記で比較した Y^h 及び Y 染色体間で配列構造に違いが見られる遺伝子を見出すため、特に同染色体上の花芽で発現している 45 遺伝子に着目した。これらの遺伝子配列を両染色体間で比較した結果、14 遺伝子の配列に性間多型が見られた。しかしそれらの多型は全て同義置換であったため、さらに遺伝子へのトランスポゾン増入の有無について両染色体間での比較を行った。その結果、MADS-box ドメインを有する遺伝子領域に Y^h 染色体特異的な Copia-like トランスポゾン増入が見出された（図 1A)。この遺伝子はシロイヌナズナの SVP(short vegetative phase)遺伝子と相同性があり、以前の私たちの研究から X 染色体上に対立遺伝子が見られないことが確認された遺伝子であった。結果として、この SVP-like 遺伝子のみが Y^h 染色体と Y 染色体間でタンパク質レベルでの配列構造が異なる唯一の発現遺伝子であった。

この遺伝子について RT-PCR により cDNA を単離してその配列を解析すると、雄（Y 染色体）の同遺伝子では MADS-box と K-Box のドメインを含む 1.1kbp の cDNA が発現していた。一方両性（Y^h）の RNA から単離した同遺伝子の cDNA 配列は全長が 1.5kbp と長くなってお

り、5‘側の配列が雄の *SVP-like* 遺伝子のcDNA配列とは大きく異なっていた。その予測翻訳配列では MADS-box ドメインが見られずK-Box ドメインのみを持つタンパク質である事が推定された（図 1B）。従って、雄では正常な機能を持つ SVP-like タンパク質が生産され、両性では転写はされるものの MADS-box ドメインを欠いたタンパク質となり恐らくDNA 結合能を失い、正常な機能を果たせないと考えられる。

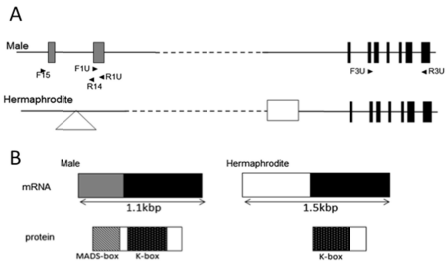

図1　パパイヤSVP-like遺伝子の構造（A）と
発現産物の構造（B）

(3) 雄/両性決定に関わる候補遺伝子の機能解析の試み

上記で見出した *SVP-like* 遺伝子のパパイヤ組織での転写レベルの発現を確認するため、雄株と両性株の葉、葉柄、花芽の RNA について各々RT-PCR を行った。その結果、雄株では各組織で同程度の発現が見られ、両性株でも発現が見られたが相対的に雄株より低い増幅産物量であったことから、両性における同遺伝子は転写量が低いか、RNA の安定性が低い可能性が示唆された（図 2）。

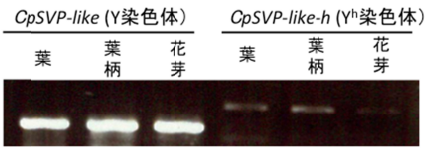

図2　*SVP-like*遺伝子のパパイヤ組織における
発現（RT-PCR）

SVP-like 遺伝子がパパイヤにおける性決定に関連する事を示すための基盤となる解析として植物体における発現ベクターの構築と植物細胞内での発現確認を行った。雄のSVP-like 遺伝子（*CpSVP-like*）アリルと両性のアリル（*CpSVP-like-h*）の cDNA の末端に各々HA タグと 6xHis タグ配列を PCR によって付加し、35S プロモータにより発現を行うバイナリベクターへクローニングを行った（図3）。これらのベクターをアグロバクテリウムGV3101 株に導入し、アグロインフィルトレーション法によって *Nicotiana benthamaina* 葉に一過的な形質転換を行った。比較対照としてGFP を発現するベクターを導入したアグロバクテリウムによるインフィルトレーションも実施し、接種後 1-2 日の葉をサンプリングしてタンパク質抽出を行った。各サンプルは抗 HA タグ抗体、および抗 HA タグ抗体によるドットブロット法によって発現タンパク質の検出を行った。その結果、HA タグを付加した CpSVP-like タンパク質、His タグを付加した CpSVP-like-h タンパク質とも特異的な発現が確認できた。しかし CpSVP-like-h タンパク質では低い発現量であった。この結果から、植物細胞内で両遺伝子は発現しタンパク質を生産が可能である事が示された。

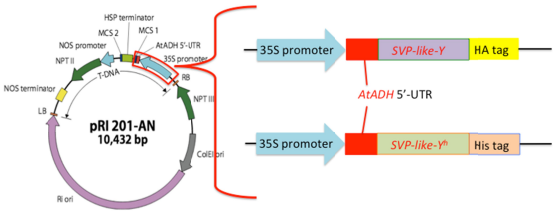

図3　パパイヤ*SVP-like*遺伝子発現ベクターの構造

(4)　X 染色体上の遺伝子発現の性間比較

パパイヤにおいて性の違いは花器官以外で識別が困難であり、特に栄養生長期では可視的な識別が困難である。そこで遺伝子発現レベルで性を識別する事が可能であるか、また動物等の性染色体で見られる X 染色体上遺伝子の遺伝子量補正現象が見られるかどうかの解析を試みた。そのため、雌と両性株の栄養生長期の植物の葉から RNA を抽出して RNA-seq による大規模発現解析により比較を行った。雌、両性のサンプルについて RNA-seq を行い、各々約 1000 万リードずつのシークエンスデータを取得して *de novo* アッセンブルを行った。その結果、48,195 個の contig (cDNA contig)が得られ、これらの contig に対して各サンプルのリードをマップして発現量を定量化した。その RPKM 値を雌と両性で比較した結果、151 の contig（遺伝子）で有意に（z 検定で P<0.05）発現量に差が見られた。これは全体として発現量に差が見られた遺伝子は限定的である事を示している。

さらにパパイヤ雌株の全ゲノムシークエンス解析を前述の両性株や雄株同様に行い、GenBank 中の 38 個のパパイヤ X 染色体 BAC クローン配列と共にアッセンブルを行って X 染色体 contig 配列を構築した。この配列に対して、上記の cDNA contig をマップして X 染色体上の発現遺伝子を見出した。その結果、399 contig（遺伝子）がマップされ、うち 172 遺伝子が X 染色体特異的であると推定された。この X 染色体特異的遺伝子について雌と両性での発現量比を見ると、有意に発現量に差が見られたのは 2 遺伝子であり、平均の RPKM 値は雌では 4.72、両性では 4.07 とほぼ同程度であった。これら X 染色体特異的遺伝子の RPKM 値の雌／両性の比と遺伝子数についてヒストグラムを作成すると 1 付近がピークになる事からも両サンプルで発現量に偏りは無いと推定された（図 4 ）。これは X 染色

体数が雌と両性で異なるにも関わらず遺伝子発現量が同程度に保たれている遺伝子量補正が行われていると推測できる。

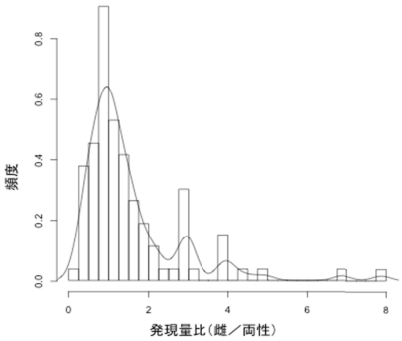

図4　X染色体上の遺伝子の雌-両性間の発現量比

以上の研究結果から、パパイヤの性とくに雄と両性の分化に関わると推定されるSVP-like 遺伝子を初めて同定する事が出来た。その機能解析をさらに進める必要があるが、これは性染色体を持つ植物種で初めて見出される性決定遺伝子となる可能性がある。またX染色体上の遺伝子発現比較から、パパイヤにおいても動物のX染色体と同様な遺伝子量補正がある事が示された。その機構を解明する事で、性染色体進化の機構などを知る手がかりになるであろう。

＜引用文献＞

① Ming R、 Bendahmane A、 Renner SS、 Sex Chromosomes in Land Plants. Annu Rev Plant Biol, 62、2011、485-514

② Yu Q、 Navajas-Pérez R、 Tong E, Robertson J、 Moore PH、 Paterson AH、 Ming R 、 Recent origin of dioecious and gynodioecious Y chromosomes in papaya. Trop Plant Biol 1、2008、49-57

③ Wang JP ら、Sequencing papaya X and Yh chromosomes reveals molecular basis of incipient sex chromosome evolution.、 Proc Natl Acad Sci USA、 109、2012、13710-13715

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）

① Matsumura H、Krueger DH、Kahl G、Terauchi R、SuperSAGE as an analytical tool for host and viral gene expression、Methods in Molecular Biology、査読無、2015、1236、181-195
doi: 10.1007/978-1-4939-1743-3_14

② Ueno H、Urasaki N、Natsume S、Yoshida K、 Tarora K、 Shudo A、Terauchi R、Matsumura H、Genome sequence comparison reveals a candidate gene involved in male-hermaphrodite differentiation in papaya (*Carica papaya*) trees. 、Molecular Genetics and Genomics、査読有、290、2015、661-670
doi: 10.1007/s00438-014-0955-9

③ 松村英生、寺内良平、次世代シーケンサーを利用したタグによる発現解析、生物科学、査読無、64 巻、2013、151-158

〔学会発表〕（計　4 件）

① 太郎良和彦、安田慶次、河野伸二、上野広樹、浦崎直也、松村英生、属間雑種（パパイア x マウンテンパパイア）の戻し交雑個体における性型と倍数性、日本育種学会第 129 回講演会、2016 年 3 月 22 日、横浜市立大学（神奈川県横浜市）

② 上野広樹、浦崎直也、太郎良和彦、松村英生、パパイア X 染色体上の遺伝子における遺伝子量効果についての評価、日本育種学会第 127 回講演会、2015 年 3 月 22 日、玉川大学（東京都町田市）

③ 上野広樹、浦崎直也、吉田健太郎、夏目俊、太郎良和彦、首藤亜耶乃、寺内良平、松村英生、パパイア性決定領域上の遺伝子におけるトランスポゾン挿入、日本育種学会第 126 回講演会、2014 年 9 月 27 日、南九州大学（宮崎県都城市）

④ 上野広樹、浦崎直也、吉田健太郎、夏目俊、太郎良和彦、首藤亜耶乃、寺内良平、松村英生、パパイア Yh、Y 染色体上の遺伝子の比較解析、日本育種学会第 125 回講演会、2014 年 3 月 22 日、東北大学（宮城県仙台市）

６．研究組織

(1)研究代表者

松村　英生（MATSUMURA, Hideo）
信州大学･学術研究院繊維学系･准教授
研究者番号：40390885

(2)研究分担者

（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者

浦崎　直也（URASAKI, Naoya）
沖縄県農業研究センター･研究企画班･上席主任研究員
研究者番号：20504591

太郎良 和彦（TARORA, Kazuhiko）
沖縄県農業研究センター･研究企画班･主
任研究員
研究者番号：10504772