

ヒメアオキの花成関連性遺伝子領域の探索

齋藤弘実（三重大生資）・鳥丸猛（三重大院生資）

雌雄異株性樹木ヒメアオキ (*Aucuba japonica* var. *borealis*) において花成関連性遺伝子の一つである *APETALA3* (以下, *AP3*) のホモログを探索し, そのゲノム上の遺伝子構造を推定した。雌雄 1 個体ずつを分析に供試し, 約 9kbp の塩基配列が雌雄各 2 種類得られた。どの配列も第 4 イントロンが最も長く (約 7kbp~8kbp), その中には LTR 配列が検出され, レトロトランスポソンの存在が推察された。供試した雄ゲノムの *AP3* 様配列の第 4 イントロン領域に固有の配列が検出されたが, 雌雄ともに同じ PCR 増幅パターンが認められたため, 雌雄で共通するゲノム領域であると考えられた。以上から, ヒメアオキの *AP3* 様配列に構造変異をとともなう雌雄間差が存在する可能性は低いことが示唆された。

キーワード: ヒメアオキ, 雌雄異性株樹木, *APETALA3* (*AP3*), Amplicon-seq, RNA-seq

I はじめに

雌雄異株植物は雄株と雌株に分かれており, 集団内の性比が繁殖に影響を及ぼしている (12)。そのため, 性表現に影響を及ぼす要因の解明は, 次世代を担う種子の生産可能性の早期予測に貢献するものと考えられる。これまで性表現に影響を及ぼす要因として, カントウマムシグサ (6) やキュウリ (10) などの生育環境, ウリハダカエデ (9) などの生活史段階, あるいはアスパラガスやヒロハノマンテマ (4), マメガキ (1), キウイフルーツ (2) などの性染色体上の遺伝子による影響が挙げられる。性表現と関係するゲノムの特徴は繁殖器官の形成に関わる遺伝子において認められており, 雄蕊形成と関係する *APETALA3* (以下, *AP3*) では, 例えば雌雄異株性植物であるヒロハノマンテマの Y 染色体上のホモログ (*SIAP3Y*) にのみレトロトランスポソンが認められている (3)。また, 雌雄異株性樹木のトチュウ (*Eucommia ulmoides*) では, *AP3* のホモログ (*AP3* 様配列) に一塩基多型が存在し, 雌雄で配列が異なることが報告されている (14) など, 雌雄異株植物では *AP3* 様配列の変異が性表現と関連する可能性が推察される。そこで本研究では, 性表現を規定する遺伝的基盤の解明の端緒として, 雌雄異株性樹木のヒメアオキの *AP3* 様配列を探索し, そのゲノム上の遺伝子構造を推定することを目的とした。

II 材料と方法

2019 年 11 月, スギ人工林内 (福井県大野市上打波) に生育するヒメアオキの花芽を切開し, 葯の有無で雌雄を判別し, 雄 1 個体から花芽と葉, 雌 1 個体から葉を採取した。採取した花芽は即座に RNA later (Thermo Fisher Scientific) に浸して実験室に搬送した後, RNA 抽出キット (NucleoSpin[®]RNA, タカラバイオ) を用いて全 RNA を抽出した。また, 改変 CTAB 法 (13) を用いて葉から DNA を抽出した。

ヒメアオキの *AP3* のホモログを探索するため, 抽出し

た RNA から mRNA を選別し, 次世代シーケンサーにて読み取った (RNA-seq, 100bp paired end)。ソフトウェア Trinity v.2.9.1. (5) を用いた新規アセンブリによってコンティグに拡張し, BLASTX によるホモロジー検索を行って *AP3* 様配列の mRNA を抽出した。次に, この mRNA 配列をシロイヌナズナの *AP3* 配列 (*AT3G54340.1*) と比較してエキソン領域を決定した。得られた mRNA 配列の妥当性を検証するため, BLASTX によるホモロジー検索を行い, 複数の植物種から *AP3* の相同配列を収集した。そして, ソフトウェア MEGAX (7) を用いて最尤法に基づく系統樹を作成した。

ヒメアオキの *AP3* 様配列のゲノム上の遺伝子構造を推定するため, 第 1 エキソンから第 7 エキソンの間を増幅するプライマー (Ajb_AP3_F: 5'-TGCGATGCCAAAGTCTCCAT-3', Ajb_AP3_R: 5'-GAAGGTGGTGCCTGCTGGTTA-3') を設計し, 抽出した DNA に対して PCR 増幅を行った。10 μ L の反応液の組成は, Tks Gflex[™] DNA Polymerase, 2 \times Gflex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus), 各プライマー (0.2 μ M), 鋳型 DNA (0.5~1.5ng) とした。反応条件は最初の熱変性を 98 $^{\circ}$ C で 1 分間行った後, 熱変性を 98 $^{\circ}$ C で 10 秒間, アニーリングと伸長反応を 68 $^{\circ}$ C で 5 分間行うサイクルを 30 回行った。0.85% アガロースゲルから切り出した増幅産物を次世代シーケンサーで読み取り (Amplicon-seq, 150bp paired end), ソフトウェア MEGAHIT v.1.2.9. (8) を用いてコンティグに拡張した。新規アセンブリは, 第 1 エキソンから第 7 エキソンへ拡張する場合 (以下, F 配列) と第 7 エキソンから第 1 エキソンへ拡張する場合 (以下, R 配列) の 2 通りで行い, 雌雄各 2 種類, 計 4 種類のコンティグ配列を作成した。そして, ドットプロット法を用いて総当たりでコンティグの配列構造を分析した。

上記の次世代シーケンサーの利用は, 全て (株) マクロジェンジャパン社に受託した。推定されたゲノム上の *AP3* 様配列には非公開の研究結果が含まれるため, DDBJ

SAITOH Hiromi, * TORIMARU Takeshi

Exploration for genomic regions related to flowering of *Aucuba japonica* var. *borealis*

torimaru@bio.mie-u.ac.jp

等の公共のデータベースには未登録であり（2021年1月時点）、今後の研究成果の公開とともに登録予定である。

III 結果と考察

ヒメアオキのmRNAのコンティグの中からヤマボウシのAP3様配列と高い相同性を示すものが検出され（ E 値 = 5×10^{-124} ）、その塩基配列長は690bp、アミノ酸配列長は229aaであった（DDBJ Accession No.: LC597548）。このmRNAのアミノ酸翻訳配列と24種の植物種のAP3様配列を用いて系統樹を作成した結果、双子葉類と単子葉類の二つのクレードが認められ、ヒメアオキは双子葉類に分類された（図-1）。さらに、この翻訳配列はヒメアオキと同じガリア目のトチュウ（*E. ulmoides*）と最も近い配列として分類された（図-1）。以上から、本研究で同定されたmRNA配列は系統を反映したものであるため、ヒメアオキにおけるAP3遺伝子のホモログである可能性が高いと考えられた。

エキソン間を増幅するプライマーでヒメアオキのゲノムをPCR増幅した結果、雌雄のゲノム両方において約9,000bpの増幅長が確認された（図-2）。雌ゲノムでは、F配列で9,371bp、R配列で8,557bpの配列が得られた（図-3）。同様に、雄ゲノムではそれぞれ9,202bp（F配列）と8,700bp（R配列）の配列が得られた（図-3）。7個のエキソンと6個のイントロンが推定された（図-3）。エキソンの配列長は雌雄にかかわらずアセンブリされた配列間で類似しており、特に雌のF配列と雄のR配列で配列長が完全に一致していた。この配列長を基準にすると、雌のR配列では第3、第5エキソンは10bp、1bp長かった。雄のF配列では第1エキソンが9bp長かった。雌のF配列におけるイントロンの配列長は96~8,164bpであり（図-3）、これを基準にすると、雌のR配列では第2イントロンは36bp長く、第3、第4イントロンは76bp、784bp短かった。同様に、雄のF配列（図-3）を基準にすると、雄のR配列は第4イントロンが493bp短かった。これら4種類の配列全てにおいて第4イントロンが非常に長く、各配列の約9割を占めていた。雌のF配列のドットプロットの結果、対角線と並行な2本の短い直線が認められ、前半部分（1,000~3,000bp）の2カ所と後半部分（6,000~8,000bp）の1カ所が類似した配列であることが判明し、第4イントロン内に反復配列が存在することが明らかになった（図-4）。同様に、雄のF配列とR配列、および雌のR配列では反復配列が前半部分と後半部分に1カ所ずつ確認された。さらに、第4イントロン配列をBLASTXによってホモロジー検索したところ、シロイヌナズナをはじめとする様々な植物のcopia様配列、インテグラーゼやgag-pol様ポリプロテインと高い相同性（ E 値 $< 1 \times 10^{-150}$ ）を示した。これらから、第4イントロンにLTR型レトロトランスポゾンが存在することが示唆された。ゲノム上のAP3の配列長はモデル植物のシロイヌナズナでは2,175bpであるが、一方、ナデシコ科マンテ

マ属では約2.6kbp~29kbpと種内・種間で変異に富んでいる（3）。特にヒロハノマンテマでは、Y染色体のAP3様配列（約29kbp）はX染色体（約3.6kbp）よりも極めて長く、その原因として第2イントロンに24kbpのLTR型レトロトランスポゾンが挿入されていることが報告されている（3）。

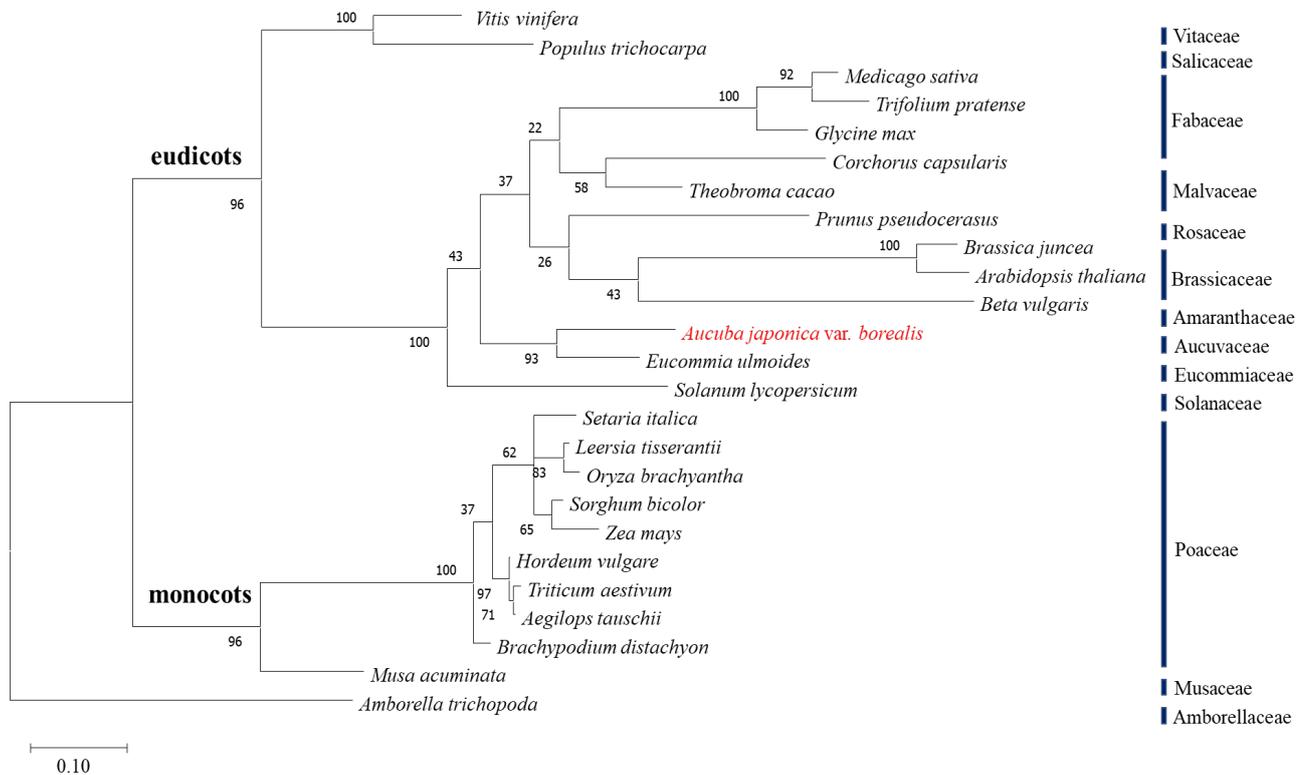
雌雄のF配列を比較したところ、およそ200~1,800bpの領域で対角線よりも雄の配列側に427bpスライドした位置に平行線が出現していた（図-5）。同様のドットプロットは、雄のF配列を雌のR配列や雄のR配列と比較した場合にも確認され、雄のF配列にはアセンブリされた他の配列にない配列が認められた。一方、雌のF配列とR配列の間には特徴的な配列の違いは認められなかった。そこで、その427bpの配列を挟むようにプライマーを設計してPCR増幅を試みた（実験方法は著者に問い合わせ可）ところ、雌雄のDNAサンプルにおいてそれぞれ353bpと834bpの単一の増幅産物の検出が予想されたが、実際には雌雄ともにそれら両方の増幅が確認された（図-6）。本研究では、Amplicon-seqで生成されたリードを新規アセンブリする際、複数のコンティグが作成された場合に最も長いものを選択してアセンブリを進め、1個体あたり2種類のドラフト配列を取得した。ヒメアオキの交配システムは他殖であることを考慮すると、個体あたりに認められた異なる配列長は対立遺伝子の違いによるものと考えられる。さらに、ヒメアオキは4倍体ゲノムを保持している（II）ため、個体あたり最大で4種類のアセンブリ済み配列が得られる可能性がある。一方、不正確なアセンブリは対立遺伝子の正確な検出を妨げてしまう。したがって、今後、複数のアセンブラーを用いて生成されたコンティグ配列の妥当性を検証するとともに、最長のコンティグ以外のものを使ってアセンブリを進める方法やPacBio等のロングリードを生成する次世代シーケンシングを活用し、残りのゲノム上のAP3様配列を高い精度で探索する必要があるだろう。一方、上記の結果やヒメアオキのAP3様配列をターゲットにしたPCRによる増幅産物長が雌雄間で同程度であったことから、ヒメアオキにおけるAP3遺伝子に相当するゲノム領域には構造変異をとまなう雌雄間での差が存在する可能性は低い可能性が示唆された。今後、AP3様配列の転写に関わるプロモーター領域やエンハンサー領域を同定するとともに、分析する個体数を増やして個体変異の影響を低減し、それらの領域の性差を探索する必要があるだろう。

謝辞

本研究を進めるにあたり、情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所が有する遺伝研スーパーコンピュータシステムを用いてアセンブリを行った。また、三重大学生物資源学部森林保全生態学研究室の皆さまに協力いただいた。関わってくださった皆さまに深く謝意を申し上げます。

引用文献

- (1) Akagi T, Henry I, Tao R, Comai L (2014) A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* 346:646-650
- (2) Akagi T, Henry IM, Ohtani H, Morimoto T, Beppu K, Kataoka I (2018) A Y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit. *Plant Cell* 30:780-795
- (3) Cegan R, Marais GA, Kubekova H, Blavet N, Widmer A, Vyskot B, Dolezel J, Safar J, Hobza R (2010) Structure and evolution of *Apeta13*, a sex-linked gene in *Silene latifolia*. *BMC Plant Biol* 10:180
- (4) Grant S, Houben A, Vyskot B, Siroky J, Pan W, Macas J, Saedler H (1994) Genetics of sex determination in flowering plants. *Dev Genet* 15:214-230
- (5) Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, LeDuc RD, Friedman N, Regev A (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc* 8: 1494-1512
- (6) Kinoshita E (1987) Sex change and population dynamics in *Arisaema* (Araceae) I. *Arisaema serratum* (Thunb.) Schott. *Plant Spec Biol* 2:15-28
- (7) Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549
- (8) Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, Lam T-W (2015) MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31:1674-1676
- (9) Nanami S, Kawaguchi H, Yamakura T (2004) Sex change towards female in dying *Acer rufinerve* trees. *Ann Bot* 93:733-740
- (10) Shifriss O (1961) Sex control in cucumbers. *J Hered* 52:5-12
- (11) 津坂真智子・山本伸子・池田博・堤原健太・小林史郎・小川 誠・星野卓二 (2011) アオキ (アオキ科) の細胞地理学的研究 -特に境界付近の分布について-. *Naturalistae* 15:13-22
- (12) Torimaru T, Tomaru N (2006) Relationships between flowering phenology, plant size, and female reproductive output in a dioecious shrub, *Ilex leuococlada* (Aquifoliaceae). *Can J Bot* 84:1860-1869
- (13) Torimaru T, Tomaru N, Nishimura N, Yamamoto S (2003) Clonal diversity and genetic differentiation in *Ilex leuococlada* M. patches in an old-growth beech forest. *Mol Ecol* 12:809-818
- (14) Wang W, Zhang X (2017) Identification of the sex-biased gene expression and putative sex-associated genes in *Eucommia ulmoides* Oliver using comparative transcriptome analyses. *Molecules* 22:2255



図一. AP3 のホモログの系統樹

ノード上の数字は、100回のブートストラップ法による塩基配列のサンプリングによって構築された系統樹のうちで実際の系統樹と同じクラスターが形成された回数を示す。

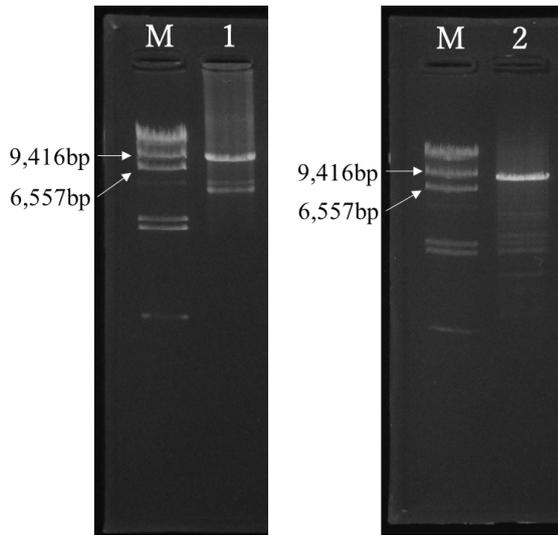


図-2. 第1エクソンから第7エクソンまでのPCR増幅の電気泳動の結果
M: λ DNA/HindIII (2,027~23,130bp)
1: 雌個体 2: 雄個体を示す。

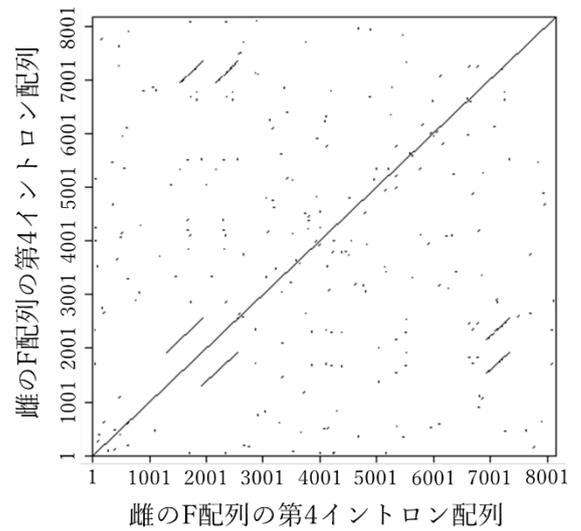


図-4. ドットプロットを用いた第4イントロンの配列構造の特徴
横軸, 縦軸はどちらも雌のF配列の第4イントロン配列を使用。

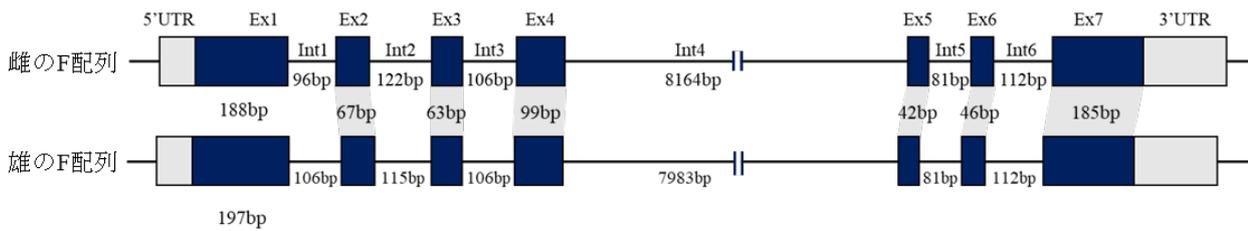


図-3. ヒメアオキのAP3様配列で推定された遺伝子構造
得られた4種類の配列のうち, 雌雄でそれぞれ代表的なF配列(上段: 雌, 下段: 雄)を掲載。

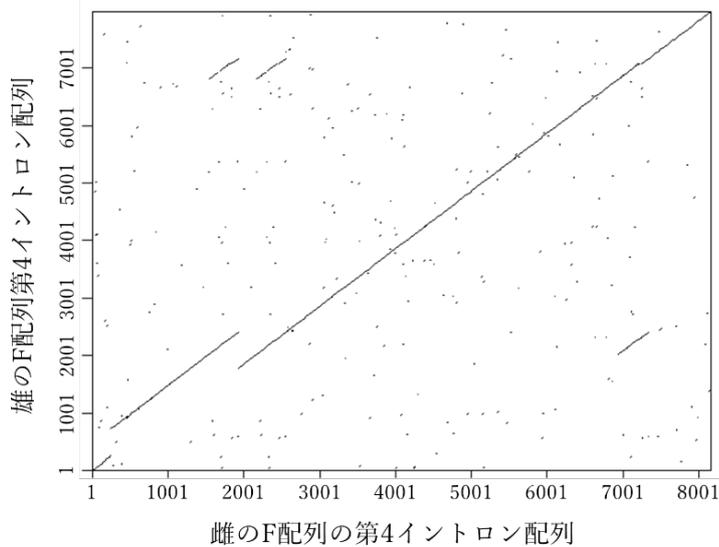


図-5. ドットプロットを用いた雌雄間における第4イントロンの配列の比較
横軸: 雌のF配列の第4イントロン配列
縦軸: 雄のF配列の第4イントロン配列を使用。

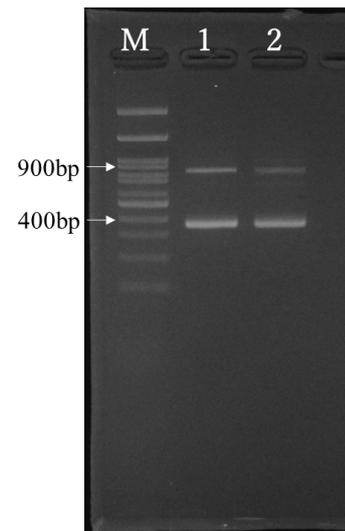


図-6. 雄のF配列に特異的に認められたゲノム領域に対して開発されたプライマーを適用したPCR増幅の電気泳動の結果
M: 100bp ラダーマーカー (100~3,000bp)
1: 雌個体 2: 雄個体を示す。