

課題名 (タイトル) :

## 雌雄異株植物ヒロハノマンテマの性染色体連鎖遺伝子の単離

利用者氏名 : 石井 公太郎

所属 : 本所 仁科加速器研究センター 生物照射チーム

## 1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

ナデシコ科の雌雄異株植物ヒロハノマンテマ (*Silene latifolia*) は、XY 型の性染色体をもつ性決定のモデル植物である。Y 染色体には 2 つの雄性決定機能領域があり、(1) 雌蕊発達抑制機能領域 (GSF)、(2) 雄蕊伸長促進機能領域 (SPF) と呼ばれる。重イオンビーム照射でそれぞれの遺伝子領域を欠失させると、(1) では両性花、(2) では無性花となると考えられる。これまでに、両性花を 17 個体、無性花を 10 個体得ている。近年、次世代シーケンシングにより、数百を超える Y 染色体連鎖マーカーがヒロハノマンテマで単離された。これらのマーカーが Y 染色体上にマッピングできれば、性決定領域周辺の高解像度な地図を作製できると期待できる。しかし、組換え抑制領域が大部分を占める Y 染色体では組換え価によるマッピングは行えない。そこで本研究では、複数の Y 染色体部分欠失変異体についてそれぞれのマーカーの欠失を調査し、各変異体でなるべく欠失の数が少なくなるようなマーカーの順列を求める欠失マッピングを行い、Y 染色体連鎖マーカー (遺伝子) を得るとともに Y 染色体地図の高解像度化を図った。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

欠失マッピングを巡回セールスマン問題に帰着することにより行った。重イオンビーム照射個体を  $n$  個体、マーカー数を  $m$  個とすると、マーカーの欠失状況を  $n$  行  $m$  列の行列に対応させた。各個体、各マーカーの欠失状況を PCR で調査し、欠失していた場合は対応する要素に 0 を欠失していない場合は 1 を設定した。次に、考え得る全てのマーカーの順列に対応する行列についてスコアリングを行った。スコアリングは 2 通りの方法で行った: (A) 各行において、欠失が出現した ( $k$  列目が 1 かつ  $k+1$  行目が 0 だった) 場合に負のスコアを、欠失が続いた ( $k$  列目が 0 かつ  $k+1$  列目が 0 だった) 場合に正のスコアを与えた。全てのマーカーの順列のうち、対応する行列が最も高いスコアをもつ、つまり最も欠

失の数が少なくなるマーカーの順列を求めた。(B) 各行において、欠失/非欠失の状態遷移が生じた ( $k$  列目が 1 かつ  $k+1$  行目が 0 だった、あるいは  $k$  列目が 0 かつ  $k+1$  行目が 1 だった) 場合に正のスコアを加算した。全てのマーカーの順列のうち、対応する行列が最も低いスコアをもつ、つまり染色体の切断数が最も少なくなるマーカーの順列を求めた。プログラムは C++ で記述し、RICC 上で実行した。

マーカーの数が増加するにつれ計算量が劇的に増加することが予想されたため、似た欠失状況をもつマーカー (列) ward 法によりクラスタリングした。各クラスターを仮想的な 1 つのマーカーとして扱い、欠失マッピングを行って、クラスターの最適な順列を決定した。次に、各クラスター内部でマーカーの順列を再帰的に欠失マッピングすることにより全体のマップを決定した。

## 3. 結果

昨年度作製したマップをさらに精密にするため、ヒロハノマンテマの重イオンビーム照射個体 96 個体 (昨年度 90 個体) について、146 個 (昨年度 86 個) のマーカーの欠失の有無を PCR で調査した。得られたデータセットについて、方法 (A) による欠失マッピングを行った。146 個のマーカーを 12 個のクラスターに分類し、クラスターの最適な順列を求め、その後各クラスター内部でのマーカーの最適な順列を求めた。マッピングの結果、GSF 近傍マーカーを 8 個、SPF 近傍マーカーを 5 個同定した。

方法 (A) では欠失の長さによってスコアが過剰に高くなる場合があり、行列の大きさによりスコアリング時の重み付けを調整する必要があった。そこで、行列の大きさによらずマッピングを行う方法 (B) を考案した。方法 (B) によるマッピングの精度を調査するため、71 個のマーカーと、ランダムに染色体欠失を生じさせた 40 個の変異体を模した仮想的な染色体マップを作製した。このデータをマッピングし、元のマップを再構築できるかを調査した。71 x 40 = 2,840 個の要素に含

まれる欠失の数を変化させ、各 10 回マッピングを試行したところ、200 個の欠失要素をもつデータでの正解率は 0%で、300 個、400 個、500 個ではそれぞれ 30%、80%、100%と上昇した。また、行列中の欠失要素の割合を一定 (14.7%: 全 2,840 個の要素の場合 417 個の欠失) とし、変異体数 (行数) とマーカー数 (列数) を変化させた場合それぞれについて正解率を調査した。変異体数を 20、30、40、50、60 個体と変化した場合の正解率はそれぞれ 10、60、80、80、100%であった。マーカー数を 30、50、90、110 個と変化した場合の正解率はそれぞれ 90、100、80、80%であった。行列に含まれる欠失の要素の数の割合と、変異体数がマッピングの精度に大きく影響することがわかった。

#### 4. まとめ

重イオンビーム照射個体 96 個体、マーカー146 個による欠失マッピングにより、昨年度よりも高密度な性決定領域のマッピングができた。変異体数・マーカー数によらず、一定の条件で欠失マッピングが行えるよう計算手法を改良した。

#### 5. 今後の計画・展望

新たな変異体の単離を試み、新規手法によるマッピングによりさらに精密なマップを構築する。さらに、現在、Y 染色体上の遺伝子群の遺伝子の発現解析を行っている。性染色体の大部分は組換え抑制領域であるが、始原性染色体の組換え抑制領域は 2 つの性決定遺伝子間のみに限られており、進化の過程で徐々に拡大したとされる。遺伝子発現とマップを比較することで、Y 染色体の退化 (degeneracy) の度合いと遺伝子発現の関係を調べることができる。退化している Y 染色体上の遺伝子の中でなお活発に発現している遺伝子に注目することで、雄の表現型の発現に寄与する遺伝子や性決定遺伝子そのものを抽出できるに違いない。

平成 26 年度 RICC 利用研究成果リスト

**【国際会議、学会などでの口頭発表】**

1. 風間裕介, 石井公太郎, 池田時浩, 川元寛章, 河野重行, 阿部知子, "巡回セールスマン問題を応用した重イオンビーム欠失マッピング" 第 10 回イオンビーム育種研究会 水戸 2014 7
2. 風間裕介, 石井公太郎, 池田時浩, 川元寛章, 河野重行, 阿部知子 "巡回セールスマン問題を応用したヒロハノマンテマ雄性決定領域の欠失マッピング" 日本植物学会第 78 回大会 川崎 2013 9
3. 石井公太郎, 風間裕介, 川元寛章, 河野重行, 阿部知子, "Y 染色体遺伝子アレイを用いたヒロハノマンテマ性分化ステージの発現プロファイリング" 日本植物学会第 78 回大会 川崎 2013 9
4. 風間裕介, 石井公太郎, 池田時浩, 川元寛章, 河野重行, 阿部知子, "巨大 Y 染色体との格闘～ヒロハノマンテマの性決定遺伝子の探索～" 日本育種学会第 126 回講演会 宮崎 2014 9