

苔類ゼニゴケの性染色体にコードされた
性決定因子の同定と機能解析

岩崎 美雪

目次

要旨	2
略語一覧	3
緒言	4
第一章 苔類ゼニゴケにおける性決定因子Feminizerの同定	8
結果	<i>BPCU</i> は雌性化に必要・十分である <i>BPCU</i> と性染色体間ホモログ <i>BPCV</i> は共通して有性生殖誘導に必要である <i>BPCU</i> は性決定機能を持っているが <i>BPCV</i> は性決定に関与しない <i>BPCU</i> は常染色体上の性分化モジュール <i>SUF/FGMYB</i> を介して雌性化を行う <i>BPCU</i> と <i>BPCV</i> は4億3000万年前に分岐した
考察	<i>BPCU</i> による <i>SUF/FGMYB</i> の制御 機能的な性染色体間ホモログを持つ性決定因子 <i>BPCU</i>
第二章 苔類ゼニゴケの性決定因子 <i>BPCU</i> と性染色体間ホモログ <i>BPCV</i> の性決定における機能差を生み出すアミノ酸配列の解析	24
結果	<i>BPCU</i> と <i>BPCV</i> の転写パターンやアミノ酸配列の比較 <i>BPCU</i> のC末端のアミノ酸は雌性化に重要である コケ植物の <i>BPC</i> におけるC末端領域の祖先型配列の推定 コケ植物の祖先型 <i>BPC</i> のC末端配列はゼニゴケにおいて不完全な雌性化機能を持つ
考察	ゼニゴケの性決定因子の進化
結語	42
材料と方法	43
補足表	46
引用文献	52
謝辞	55

要旨

雌雄の制御は有性生殖の根幹ともいべき過程である。個体の性を決定する性決定遺伝子をもつ染色体は性染色体と呼ばれ、二倍体生物の性染色体や性決定様式は広く研究がおこなわれ、性決定遺伝子も同定されている。しかし、X/Y染色体やZ/W染色体と呼ばれる二倍体の性染色体と、U/V染色体と呼ばれる半数体の性染色体と性決定遺伝子は異なる進化をたどると考えられており、半数体の性染色体による性決定に関する知見が極めて不足している。

本研究では逆遺伝学的にU染色体上の転写因子などの変異体を作成することで、苔類ゼニゴケのU染色体上の性決定遺伝子*Feminizer*の同定を目指した。雄株に導入すると雌性化を引き起こす遺伝子として同定された性決定遺伝子は植物に特異的な転写因子であるBASIC PENTACYSTEINE (BPC) 転写因子ファミリーをコードしており、*BASIC PENTACYSTEINE ON THE U CHROMOSOME (BPCU)*と命名した。BPCUは、常染色体上の性分化モジュールである*SUPPRESSOR OF FEMINIZATION (SUF) / FEMALE GAMETOPHYTE MYB (FGMYB)*遺伝子座の発現制御を介して雌性化をおこなっていた。このBPCU遺伝子を欠損させると、UV染色体をもつ異数性株は雌性表現型が雄性に転換し、半数体個体では有性生殖誘導が阻害された。BPCUには性染色体間ホモログとしてV染色体上に*BASIC PENTACYSTEINE ON THE V CHROMOSOME (BPCV)*が存在し、BPCV遺伝子を欠損させた半数体個体でも有性生殖誘導が阻害され、2つのBPCは共通した機能として有性生殖誘導に関与していることが分かった。コケ植物を中心としたBPCの分子系統解析では苔類のBPCはBPCU型とBPCV型に分岐しており、ゼニゴケの性染色体はおおよそ4億3000万年前に確立されたことが推測された。さらに、ドメインスワッピング実験により、高度に保存されたBPCドメイン中の特定のアミノ酸残基がBPCUとBPCVの雌性化機能の違いに特に寄与していることが分かった。また、アミノ酸置換実験でこの領域のアミノ酸配列をBPCUとBPCVが分岐する以前の推定祖先型に置換したゼニゴケは雌雄混合した生殖器官を形成した。このためBPCUとBPCVが分岐する以前の祖先型BPCは雌性分化能力を有していた可能性が考えられ、進化の過程でBPCVは雌性化能力を失ったのに対して、BPCUは雌性化能力を保持または強化しているという仮説が立てられた。

これまで二倍体生物において同定された性決定遺伝子は性決定機能に特化した遺伝子であったが、本研究で同定された苔類ゼニゴケの性決定遺伝子BPCUは性決定機能と生存に重要な機能をあわせ持ち、機能的な性染色体間ホモログBPCVが存在していた。さらに、BPCVの雌性分化機能の喪失がBPCUの性決定遺伝子としての成立に重要であった可能性が示唆された。対立遺伝子の片方が機能を喪失することで性決定因子が進化した例は二倍体の性決定でもしばしば報告されているが、半数体の性染色体上の性決定遺伝子においては対立遺伝子の一方が性分化機能を失うことで性決定遺伝子・性染色体が誕生した後も、性染色体間相同遺伝子の生存に重要な機能は保存されることが示唆された。

略語一覽

bHLH	basic helix-loop-helix
BNB	BONOBO
BPC	BASIC PENTACYSTEINE
Cas9	CRISPR-associated endonuclease
cDNA	complementary DNA
CDS	coding sequence
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CUT & RUN	Cleavage Under Target & Release Using Nuclease
DEX	dexamethasone
FGMYB	FEMALE GAMETOPHYTE-SPECIFIC MYB
FR	far red light
GR	glucocorticoid receptor
gRNA	guide RNA
H3K27me3	histone H3 lysine 27 trimethyl
MYB	MYELOBLASTOSIS
mRNA	messenger RNA
NLS	nuclear localization signal
PCR	polymerase chain reaction
PRC	POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
RNA	ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing
PAM	protospacer adjacent motif
SUF	SUPPRESSOR OF FEMINIZATION
Tak-1	Takaragaike-1
Tak-2	Takaragaike-2
WT	wild type

緒言

有性生殖では2つの配偶子が接合することで新たな個体が生み出される。この生殖方法では別個体の遺伝的変異が混合されることで遺伝的多様性が保持され、生物は環境の変化に直面した際に自らの子孫が生き残る可能性を高めることができる (Otto, 2009)。また、有害な突然変異が排除されやすいことも有性生殖の利点として考えられている (Charlesworth B. and Charlesworth D., 1978)。単細胞生物の多くは同型配偶子の接合によって有性生殖をおこなうが、ほとんどの多細胞生物の有性生殖はサイズの異なる雌性配偶子と雄性配偶子の接合によっておこなわれ、どちらの配偶子を生成するかという性を個体レベルや組織レベルで制御する。

これまでの性決定研究

性が個体ごとに決定される雌雄異体・雌雄異株の種は常染色体に由来する性染色体を獲得することで雌雄同体・雌雄同株から繰り返し進化してきたと考えられ、多様な性決定機構はこれまで動物や被子植物で広く研究されてきた。哺乳類ではY染色体上に存在する *sex-determining region Y (Sry)* によって性が決定することが知られている。Sry は常染色体上の *Sox9* を含む様々な転写調節因子や細胞増殖因子に働きかけることで精巣への分化を促進するとともに卵巣の発達を抑制する (Larney et al., 2014)。魚類のメダカ *Oryzias latipes* ではDMドメインを持つ転写因子DMYが性決定因子である (Matsuda, et al. 2002、Matsuda, et al. 2007)。被子植物においては、カキ *Diospyros lotus* ではY染色体に由来するsmall RNAの *OGI* が相同な配列を持つ常染色体上の *MeGI* 遺伝子の発現を抑制する。*MeGI* は雄蕊の発達を阻害するので、Y染色体を持たない場合は雌花となりY染色体を持つ場合は雄花となる (Akagi et al., 2014)。また、Y染色体上の二つの遺伝子によって雌雄の制御を行う例も発見されており、アスパラガス *Asparagus officinalis* ではY染色体上の *Male Specific Expression 1 (MSE1)/ DEFECTIVE IN TAPETUM DEVELOPMENT AND FUNCTION 1 (TDF1)* 遺伝子と *SUPPRESSOR OF FEMALE FUNCTION (SOFF)* 遺伝子によって性が決定される。雄個体ではMYB転写因子をコードする *MSE1/TDF1* がおしべの発達を促進し、*SOFF* がめしべの発達を抑制することで雄花となる。雌個体では二つの性決定遺伝子がないため、めしべの発達が抑制されずに大きくなる一方で雄しべの形成が途中で止まり雌花が形成される (Harkess et al., 2017、Murase et al., 2017)。被子植物では花器官の一部である雄蕊・雌蕊の発達を抑制したり促進したりすることで性決定を行っていると言える。以上のように動物や被子植物の性決定とは二倍体の細胞組織における性決定であり、雌雄が決定されてから減数分裂し半数体である雌性/雄性配偶子がつくられる。

二倍体の性染色体と半数体の性染色体

先に述べたように、性決定研究はこれまで動物や被子植物で広く研究されてきた。こうした生物では減数分裂前の二倍体の組織で性が決定し、雄ヘテロ型の性染色体はX/Y染色体、雌ヘテロ型の性染色体はZ/W染色体と呼ばれる。対して、半数体組織で性が決定する生物の性染色体はU/V染色体と呼ばれ、二倍体の性染色体とは異なった進化をたどる(図0-1)。二倍体のXX/XY様式の性決定では、雌個体ではX染色体が二本存在し組み換えが起こるのに対して、雄個体ではX染色体とY染色体が一本ずつなので組

み換えが制限される。この非対称性がY染色体のみでの変異を蓄積させると、X染色体とY染色体のサイズが大きく異なる異形の性染色体が誕生すると考えられている (Muller, 1918, Bachtrog, 2008)。一方で、半数体であるUV染色体の場合は二倍体世代の孢子体で常にUV染色体の組み合わせで存在するので変異はU・Vどちらの性染色体にも蓄積する。半数体世代においては対立遺伝子座が欠如しているために生存に不利な変異は定着しづらい。したがってUV染色体では両染色体ともに重要な遺伝子を欠失しにくく、比較的対称に進化する。こうした進化を経たUV性染色体では生存に必須な遺伝子は両方の染色体で保存され、雌性配偶子形成に必要な遺伝子はU染色体のみに残り、雄性配偶子形成に必要な遺伝子はV染色体のみに残ると考えられている (Bull, 1978)。このような違いがあるにもかかわらず、半数体で一生のほとんどを過ごし性決定をおこなう生物ではクラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* など緑藻の性決定因子 *MID* (Galloway and Goodenough, 1985) の報告は存在するものの性決定遺伝子の同定例は限られており、陸上植物での報告はこれまでなかった。



図0-1 XY染色体の進化とUV染色体の進化の比較

(上段) XY染色体の進化

- ① もとの一对の常染色体上の一方に性決定領域 (青線) が生じるとY染色体が誕生する。
- ② 性決定領域周辺に雄性配偶子形成に関与する遺伝子や、雄個体に有利な形質が集まった組み換えの起こらない領域が生じる (水色部分)。対応するX染色体上の領域は雌個体で組み換えが起こっているため比較的变化は少ない。
- ③ 組み換えの起こらない領域が拡大し、繰り返し配列などの変異を多く蓄積したY染色体はX染色体よりもサイズが大きい。
- ④ 繰り返し配列は失われやすいので、極端なY染色体の退化がみられるようになる。

(下段) UV染色体の進化

- ① もとの一对の常染色体上の一方に性決定領域 (青線) が生じるとV染色体が誕生する。
- ② 性決定領域周辺に雄性配偶子形成に関与する遺伝子や、雄個体に有利な形質が集まった組み換えの起こらない領域が生じる (水色部分)。対応するU染色体上の領域にも同様に雌性配偶子形成に関与する遺伝子や、雌個体に有利な形質が集まってくる (桃色部分)。
- ③ 組み換えの起こらない領域が拡大し、U染色体・V染色体ともに変異が蓄積していく。ただし、生存に重要な遺伝子は欠失しづらいので極端な欠失は起こりにくい。

モデル植物としての苔類ゼニゴケと性染色体

苔類ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* は生活環のほとんどを葉状体と呼ばれる半数体世代で過ごす雌雄異株植物であり、近年分子遺伝学のモデル植物として注目されている。無性生殖では無性芽として大量にクローン個体が得られるため、遺伝的背景が同じ個体を取得しやすいことに加え、ゲノムの解読や形質転換法、相同組み換えやゲノム編集技術の確立など分子遺伝学解析のための基盤が整備されている (Shimamura, 2016、Bowman et al., 2017、Ishizaki et al., 2008、Ishizaki et al., 2013、Sugano et al., 2014)。こうした背景を踏まえ、本研究ではゼニゴケを用いることで未だ知見の不十分な半数体世代における性決定機構の解明を目指した。

ゼニゴケの性は性染色体によって決定され、雌株はU染色体、雄株はV染色体を持つ。U・V染色体は互いに相同な遺伝子を持つためこれらの性染色体も常染色体に由来すると推測されるが、両染色体ともに常染色体よりも遺伝子密度が低く、互いに相同な遺伝子位置にある遺伝子はほとんどないため組み換えは起こっておらず、それぞれ独立に進化してきたと考えられている (Yamato et al., 2007)。これらの性染色体は苔類のオーソログの系統発生分析の結果、ゼニゴケ綱の分岐よりも以前に獲得されたと考えられている (Allen, 1917、Berrie, 1960、Bowman et al., 2017)。遺伝子構成としては、U染色体とV染色体には20の相同遺伝子が存在し、葉状体で発現しているために生存に必須な機能を持つと考えられる (Bowman et al., 2017)。一方で、U染色体・V染色体に特有な遺伝子は生殖器官特異的に発現しており (Bowman et al., 2017)、性染色体の進化の過程で雌性/雄性いずれかの配偶子形成に必要な遺伝子が残るという予測 (Bull, 1978) が当てはまる。実際にV染色体特異的な遺伝子のいくつかは精子の運動能に関与することが報告されている (Yamato et al., 2007、Bowman, 2016)。その他にはU染色体には常染色体と相同な遺伝子も見られ、これらは比較的最近になってU染色体上に移動してきたと考えられている (Bowman et al., 2017)。

苔類ゼニゴケの有性生殖と性決定

ゼニゴケでは、遠赤色光 (FR) 補光された長日条件下においてU染色体を持つ雌株は造卵器および卵を含む雌器托を形成し、V染色体を持つ雄株は造精器および精子を含む雄器托を形成する。ゼニゴケで栄養成長から生殖成長への切り替えに関与する因子としてbHLH転写因子BONOBO (BNB) が生殖系列細胞を規定することが明らかになっている。BNBの過剰発現株では恒常白色条件下においても生殖器官が誘導され、*bnb*機能欠損株ではFR補光した長日条件下でも生殖器官は誘導されない。従ってBNBは有性生殖誘導に必要な十分な遺伝子だと言える (Yamaoka et al., 2018)。BNBは雌雄に共通な因子であり、その下流で雌雄の配偶子がつくり分けられると考えられる。

近年モデル植物として注目を浴びているが、古くからゼニゴケは研究対象として用いられ、性染色体の観察結果から染色体の分配異常によりUV両方の性染色体を持つ個体は雌の表現型を示すことが知られていた (Haupt, 1932)。U染色体が優性であることからU染色体上には雌性を決定する遺伝子 *Feminizer* が存在すると考えられてきた (Bowman et al., 2017)。さらに、最近の分子遺伝学的な研究により、常性染色体上で配偶子の雌性を制御する因子も発見されており、FEMALE GAMETOPHYTE MYB (FGMYB) として同定されている (Hisanaga et al., 2019)。ゼニゴケの *fgmyb* 機能欠損株ではU染色体を有するにもかかわらず雄器托を形成し、運動性はないものの精子がつくられる。一方で雄株ではFGMYBは自身のコード領域の逆鎖から転写される long non-coding RNA である *SUPPRESSOR OF FEMINIZATION (SUF)* によって抑制され雄性化する。*suf* の機能欠損株でもV染色体を持つにもかかわらず雌器托を形成し、成熟した卵は観察されないものの造卵器を形成する。これらのことからゼニゴケの性分化は常染色体上の *SUF/FGMYB* モジュールによって制御されていることが分かった。なお、雌性化抑制因子 *SUF* の発現の雄特異性は生殖成長期だけではなく、栄養成長期においても確認されている (Hisanaga et al., 2019)。*SUF/FGMYB* モジュールと、ゼニゴケの雌雄が性染色体によって決まることを考え合わせると性染色体上には *SUF/FGMYB* モジュールを介して雌雄を司る存在があるはずである。つまり、雌株ではU染色体上の雌性を決定する遺伝子 *Feminizer* が *SUF* を抑制することで *FGMYB* を発現させ雌性分化をおこなっていると考えられる (図0-2)。本研究では、この *Feminizer* を同定することで半数体世代における性決定機構の解明を目指した。

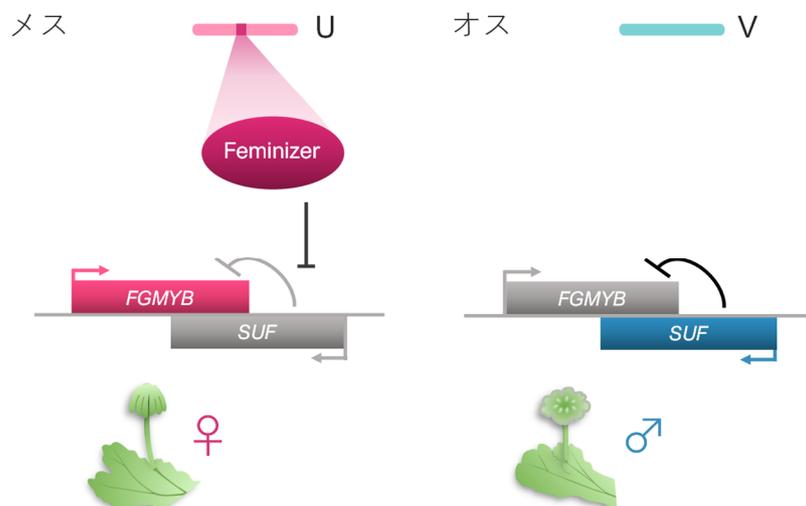


図0-2 ゼニゴケの性決定モデル

第一章

苔類ゼニゴケにおける性決定因子**Feminizer**の同定

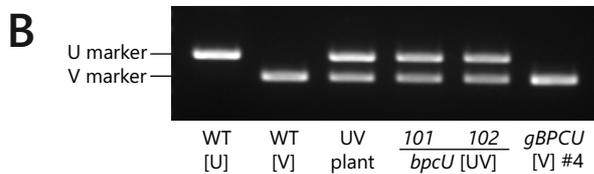
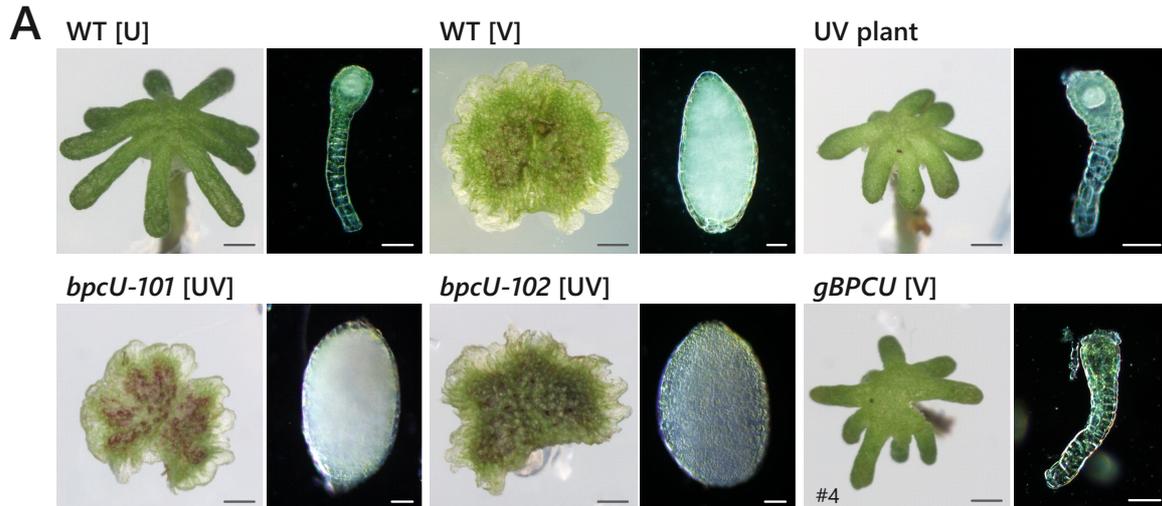
本章ではCRISPR/Cas9システムを用いて逆遺伝的に候補遺伝子の機能欠損株を作製することで、U染色体に座し性決定を行っていると考えられる性決定遺伝子*Feminizer*を探索し、いまだ知見の乏しい半数体世代における性決定の機構の解明を目指した。野生型雄株に異所的に*BPCU*を発現させることで*BASIC PENTACYSTEINE ON THE U CHROMOSOME (BPCU)*が*Feminizer*であることを示し、*BPCU*とその性染色体間ホモログ*BASIC PENTACYSTEINE ON THE V CHROMOSOME (BPCV)*はともに有性生殖誘導に関与することを示した。また、*BPCU*導入株で*SUF/FGMYB*の発現量を定量することで、*BPCU*は*SUF/FGMYB*モジュールを介して雌性を決定することを明らかにした。

結果

***BPCU*は雌性化に必要・十分である**

ゼニゴケの性決定因子*Feminizer*を探索するにあたって、ゲノム解析により明らかとなったU染色体上の遺伝子 (Bowman et al., 2017) が候補として考えられた。ここで、雌性化抑制因子*SUF*が栄養成長期においても雌では発現しておらず、雄では比較的発現量が高いという結果 (Hisanaga and Okahashi et al., 2019) に注目した。*Feminizer*遺伝子は生殖成長期だけでなく栄養成長期においても発現し、*SUF*の転写を抑制している可能性が高いと考えた。そこでV染色体上にホモログが存在する遺伝子も含めて栄養成長期・生殖成長期両方で発現するU染色体上の遺伝子35個を候補とした (補足表1)。このうち、転写調節に直接関与すると考えられる転写因子などのDNA・RNA結合すると推定されるタンパク質をコードする遺伝子10個をCRISPR/Cas9システムによって機能欠損させることを試みた (補足表2)。胞子を背景として形質転換をそれぞれ行ったところ、8種類の遺伝子の変異体が獲得できた。得られた変異体をFR照射した恒常白色条件下で生殖器托を誘導し、雌雄の表現型を確認した (補足表2)。

このうち、*bpcU*変異体は雄の表現型を示した (補足表2/図1-1A, C)。性染色体判定を行ったところ、*bpcU*変異体では2ラインともUV両方の性染色体を持っていた (図1-1B)。ゼニゴケでは偶発的にUV両方の性染色体を持っている個体は雌の表現型を示すことが以前から知られている (Haupt, 1932、図1-1A)。これらの*bpcU*変異体はU染色体を持つにもかかわらず造精器を形成することから (図1-1A)、*BPCU*は雌性化に必要であることが分かった。次に、雌性化に必要であることが明らかとなった*BPCU*のゲノム断片 (*gBPCU*) を、V染色体を持つ野生型雄株に導入した。この*gBPCU*[V]は雌の表現型を示した (図1-1A)。このことから*BPCU*は一遺伝子で雌性化に十分であることが分かった。以上のことから、*BPCU*は雌性化に必要・十分であることが分かった。



C

WT 5'-AAAGG**CCA**CCTGAGCAGAAGCTCCTGATCTATCA-3'

bpcU-101 [UV] 5'-AAAGGCCACCT-AGCAGAAGCTCCTGATCTATCA-3' 1塩基欠失

bpcU-102 [UV] 5'-AAAGGCCACC-----CTGATCTATCA-3' 13塩基欠失

図1-1 BPCUの雌性化機能

A 野生型 (WT) および *bpcU* [UV] 変異体、*gBPCU* [V] の生殖器官の表現型

FR補光した恒常白色光下で観察した生殖器托 (左) と造精器/造卵器 (右)。 *gBPCU* [V] については代表的な表現型を示す個体の写真を示す。スケールバーは左1 mm、右50 μ m。

B 野生型および *bpcU* [UV] 変異体、*gBPCU* [V] の性染色体判定結果

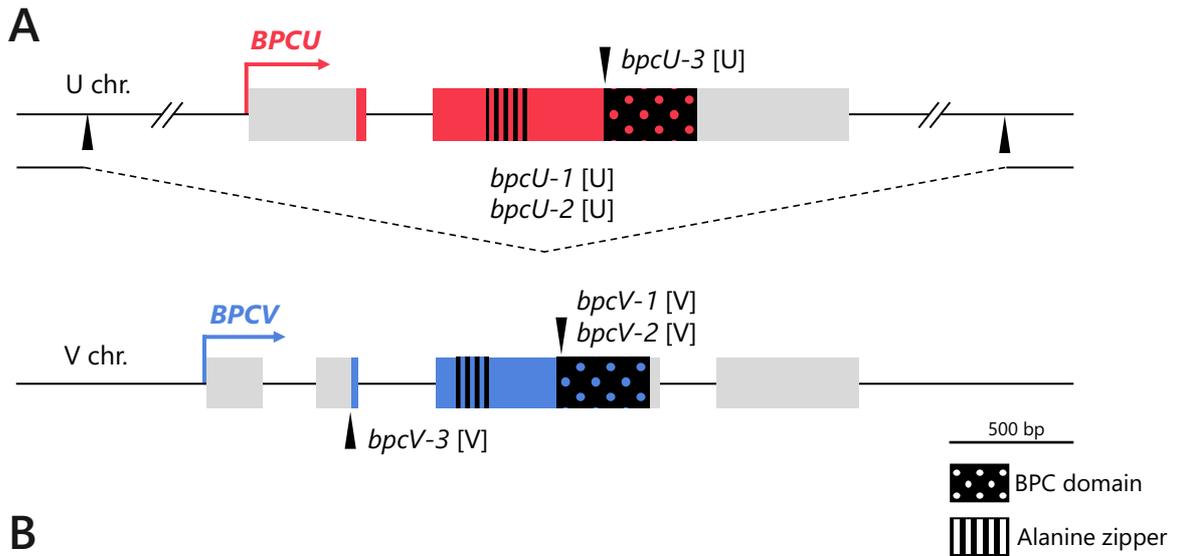
長いバンドはU染色体特異的領域の増幅、短いバンドはV染色体特異的領域の増幅を表す。

C シークエンス解析によって明らかになった *bpcU* [UV] 変異体の変異箇所の配列

下線はgRNAの配列を、太字はPAM配列を示す。右に *bpcU* [UV] 変異体の変異の詳細を示す。

***BPCU*と性染色体間ホモログ*BPCV*は共通して有性生殖誘導に必要である**

U染色体上の性決定遺伝子として同定された*BPCU*には、V染色体上に性染色体間ホモログとして*BPCV*が存在する(補足表2)。したがってスクリーニングで得られたUV両方の性染色体を持つ*bpcU*変異体では、U染色体上の*BPCU*は機能を欠損している一方でV染色体上の*BPCV*は機能していると考えられた。そこで、一本の性染色体のみを持つ個体での*BPCU*、*BPCV*の機能を確かめるため、U染色体を持つ雌の野生株であるTak-2背景およびBC3-38背景で*bpcU*[U]変異体を、V染色体を持つ雄の野生株であるTak-1背景で*bpcV*[V]変異体を作成した(図1-2)。これらの変異体を用いてFR補光した恒常白色条件下で生殖器托を誘導した。V染色体を持つ野生型雄株ではFR補光を始めてから10日程度で、U染色体を持つ野生型雌株では2週間程度で生殖器托を形成したが、*bpcU*[U]変異体および*bpcV*[V]変異体はいずれも60日を経過しても生殖器托を形成しなかった(図1-3A, B)。また、*bpcU*[U]変異体を背景として*BPCU*を相補した*gBPCU/bpcU*[U]は生殖器托形成日数が野生型雌株と同程度に回復し、雌の表現型を示した(図1-3A, B, C)。*bpcU*[U]変異体を背景として*BPCV*を相補した*gBPCV/bpcU*[U]は生殖器托形成日数が野生型雄株と同程度に回復し、雄の表現型を示した(図1-3A, B, C)。これらのことから、性染色体上の2つの*BPC*は共通して有性生殖誘導に関与することが示唆された。



B

WT 5'-GGTTCATGTGAGAGA ~ CCTTTGTGGTTAGTGT-3'
bpcU-1 [U] 5'-GGTTCAT----- ~ -----GTTAGTGT-3' 6513塩基欠失

WT 5'-GAGATCTAAATCTGCC ~ ----- ~ CCTTTGTGGTTAGTGT-3'
bpcU-2 [U] 5'-GAGATCTA----- ~ **GTTGGTATAGTGTGTTTAGCAAGCACTAG** ~ -----TTTGTGGT-3'
 6713塩基欠失+29塩基挿入

WT 5'-AAAGG**CCA**CCTGAGCAGAAGCTCCTGATCTATCA-3'
bpcU-3 [U] 5'-AAAGGCCACCT-AGCAGAAGCTCCTGATCTATCA-3' 1塩基欠失

WT 5'-AAAGGCCACCTGAGCAGAAGCTCCTG-----
bpcV-1 [V] 5'-AAAGGCCACCTGAGCAGAAGCTCCTG**TTTAGGTGATGGGGAGGAACTGATCACTACTATGATC**
 -----CGAGGGCACGA-3'
TCCATGTACCCGCTGCCGATGAATCCAACCAAAAGGGGATCAAGGTTGGCTGGTCGAGGGCACGA-3'
 92塩基挿入

WT 5'-CTTACCTTTCTGCCAATGAAGAGCGA**GGG**CACGA-3'
bpcV-2 [V] 5'-CTTACCTTTCTGCCAATGAAGAG--AGGGCACGA-3' 2塩基欠失

WT 5'-TTGC**CCA**TGCAATTGTCTATGTACGATCCACGA-3'
bpcV-3 [V] 5'-TTGCACCATGCA-TTGTCTATGTACGATCCACGA-3' 1塩基欠失

図1-2 用いた *bpcU*[U] および *bpcV*[V] 変異体

A *BPCU* および *BPCV* 遺伝子の模式図

CRISPR/Cas9システムによる変異体の作出に使用したgRNAのターゲットサイトを矢じりで示す。転写される部分をボックスで示す。タンパク質として翻訳される部位は赤 (*BPCU*) もしくは青 (*BPCV*) で、非翻訳領域をグレーで示す。縦線はアラニンジッパーを、ドットはBPCドメインの領域を示す。

B シークエンス解析によって明らかになった変異体の配列

下線はgRNAの配列を、太字はPAM配列を示す。右または右下に *bpc* 変異体の変異の詳細を示す。

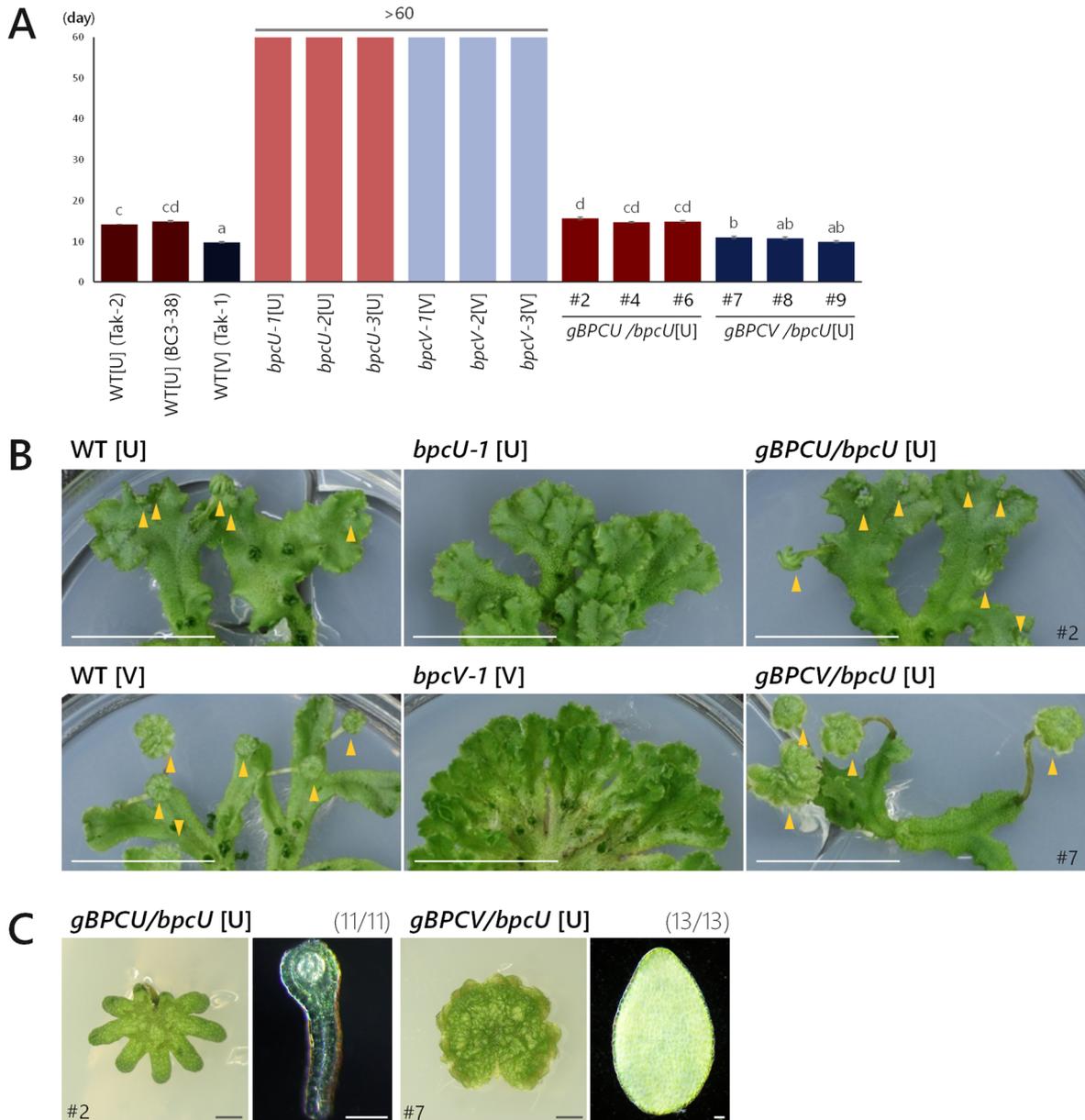


図1-3 *bpcU*[U]および*bpcV*[V]変異体は生殖器托を形成しない

A 野生株および*bpc*変異体、相補株の生殖器托形成までにかかる日数

恒常白色光で4日間生育させたのち、FR補光を始めてから初めに生殖器托を肉眼で確認できるまでに要した日数を測定した。グラフは各ライン15個体ずつ観察を行った平均値を示す。バーは±SEを示す。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。

B 誘導開始後4週間後の生殖器托形成

黄の矢じりは生殖器托を示す。*gBPCU/bpcU*[U]および*gBPCV/bpcU*[U]は代表的な表現型を示す個体の写真を示した。スケールバーは5 cm。

C 相補株の生殖器官の表現型

FR補光した恒常白色光下で観察した生殖器托(左)と造精器/造卵器(右)。*gBPCU/bpcU*[U]および*gBPCV/bpcU*[U]の代表的な表現型を示す個体の写真を示した。括弧内の数字は独立に取得した形質転換体のうち代表的な表現型を示した個体数の割合を示す。スケールバーは左1 mm、右50 μm 。

BPCUは性決定機能を持っているがBPCVは性決定に関与しない

性染色体を一本だけ持つ*bpcU*[U]変異体も、*bpcV*[V]変異体も生殖器托の観察ができず雌雄の表現型を確認することができなかった。ゼニゴケでは有性生殖誘導のマスター因子であるBNBを過剰発現させるとFR補光を行っていない、本来生殖器官が誘導されない条件においても生殖器官を形成するようになることが知られている (Yamaoka et al., 2018)。そこで、生殖器官が誘導されなかった*bpcU*-3[U]・*bpcV*-1[V]を背景としてBNBの機能がデキサメタゾン (DEX) 依存的に活性化される*BNB-GR*株を作出した (*BNB-GR/bpcU*[U]および*BNB-GR/bpcV*[V])。 *BNB-GR/bpcU*[U]は5ライン得られ、*BNB-GR/bpcV*[V]は2ライン得られた。DEXを添加しBNBを活性化させると*BNB-GR/bpcU*[U]は雄器托を形成し、*BNB-GR/bpcV*[V]も雄器托を形成した (図1-4)。BNBを活性化させることで*bpcU*[U]変異体および*bpcV*[V]変異体が生殖器官を形成したことから、*BPCU*と*BPCV*はBNBを活性化させることで生殖器官の形成をおこなっていると考えられた。また、*BPCV*の機能を欠損していても雄の表現型を示したことから、*BPCV*は雄性化に必要なことが示された。性決定に関与しているのは*BPCU*のみで、*BPCV*は性決定に関与していないことが示唆された。

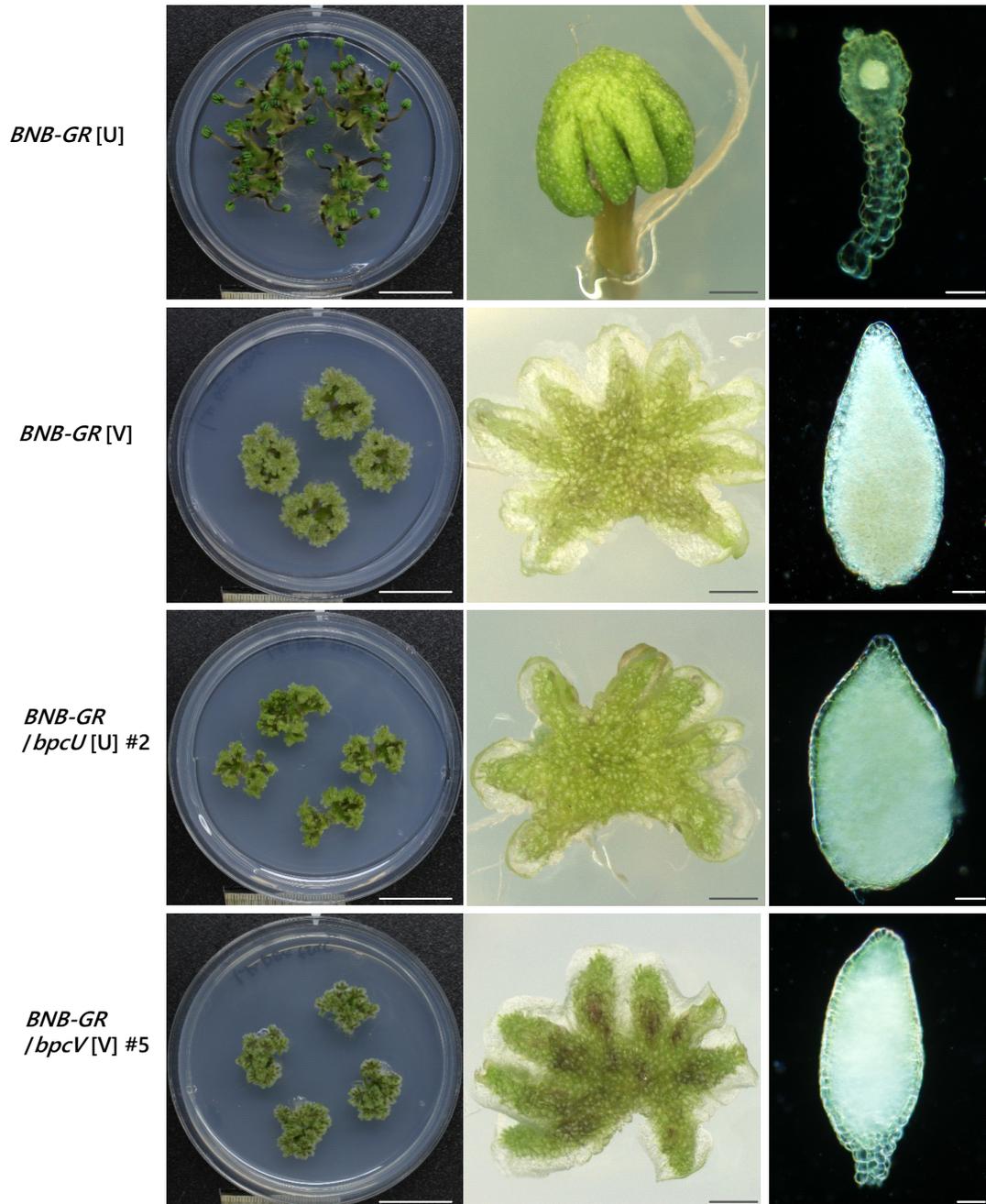


図1-4 *BNB-GR/bpcU* [U]、*BNB-GR/bpcV* [V]の生殖器托

野生型を背景とした*BNB-GR*雌株 (*BNB-GR* [U]) および*BNB-GR*雄株 (*BNB-GR* [V])、*BNB-GR/bpcU* [U]、*BNB-GR/bpcV* [V]のジェノマを1 μ M DEX含有培地上に置いて恒常白色光下で生育させて観察した。左列はDEXによって生殖器托が誘導された植物体の写真、中央はその生殖器托の写真、右列は造精子器/造卵器の写真。スケールバーは左列5 cm、中央列1 mm、右列50 μ m。

BPCUは常染色体上の性分化モジュールSUF/FGMYBを介して雌性化を行う

ゼニゴケの配偶子の雌雄は常染色体上の性決定分化モジュールSUF/FGMYBに制御されることが明らかとなっている (Hisanaga and Okahashi et al., 2019)。BPCUがこのモジュールを介して雌性化をおこなっているのかを調べるため、*bpcU*[UV]変異体、*gBPCU*[V]の生殖器官を用いてSUFおよびFGMYBの定量を行った。*bpcU*[UV]変異体ではU染色体を持つにもかかわらずSUFが発現しFGMYBが発現が抑制されていた(図1-5A)。一方で、*gBPCU*[V]ではV染色体を持つにもかかわらずSUFの抑制とFGMYBが発現が見られた(図1-5A)。これらの発現パターンは生殖器官の雌雄の表現型と合致しており(図1-1A)、BPCUはSUFの発現を抑制しFGMYBを発現させることで雌性化していることが示唆された。その他の雄特異的に発現する遺伝子や雌特異的に発現する遺伝子の発現の有無についてもRT-PCRによって確認したところ、*bpcU*[UV]変異体が雄の生殖器官を形成することと合致して(図1-1A)、*bpcU*[UV]変異体では雄特異的に発現する遺伝子は発現しており、雌特異的に発現する遺伝子の発現は見られなかった(図1-5B)。

gBPCU[V]では雌特異的に発現する遺伝子は発現しており、雄特異的に発現する遺伝子の発現は確認できなかった(図1-5B)。これらの結果は*gBPCU*[V]が雌の生殖器官を形成すること(図1-1A)と合致している。

また、BPCUによるSUFの発現制御が生殖成長段階に移行する以前の栄養成長の段階で既に行われているのかを確かめるため、*gBPCU*[V]、*bpcU*[U]変異体、*bpcV*[V]変異体の葉状体におけるSUFの定量も行った。*gBPCU*[V]におけるSUFの抑制は葉状体の段階でも観察され、SUFの発現は見られなかった(図1-5C)。*bpcU*[U]変異体ではSUFの抑制の解除が見られた(図1-5C)。このことから葉状体の生殖系列細胞が規定される前の段階から既にBPCUのSUFを介した雌性の決定が行われていることが示唆された。また、*bpcV*[V]変異体の葉状体でもSUFは発現しており(図1-5C)、*bpcV*[V]変異体を背景にBNBを活性化させて観察される表現型は雄であること(図1-4)と一致してBPCVは性決定には関与しないと考えられた。なお、*bpcV*[V]変異体におけるSUFの発現量は野生型雄株と比較してやや低い傾向が確認されたが、*bpcU*[U]変異体と同程度であるため、この違いは雌雄の制御としてBPCVがSUFの発現量に影響しているためではなく、BPCとしての葉状体における機能が植物体の生育に影響を与えたためであると考えられた。実際、これらの*bpc*変異体の葉状体は二分岐の角度が狭いように見られることから(図1-6)、BPCUとBPCVは葉状体の段階でも細胞分裂や細胞の成長に関する共通した機能を持つと考えられる。

BPCはシロイヌナズナにおいてポリコム複合体2(PCR2)と相互作用し、H3K27me3を付加することによって遺伝子を抑制することが知られている (Hecker et al., 2015、Xiao et al., 2017)。ゼニゴケにおいても、BPCUによるSUFの抑制にH3K27me3を介したクロマチン構造の制御が関与している可能性を検討するため、吉竹博士によりCUT&RUN実験がおこなわれ、野生型および*bpcU*[U]変異体におけるH3K27me3の分布が確かめられた(図1-7中段)。野生型雌株ではSUFの遺伝子領域にH3K27me3ピークが検出されたのに対して、野生型雄株では同じ領域にH3K27me3ピークは検出されなかった。

bpcU[U]変異体でも野生型雄株と同様にSUFの遺伝子領域にH3K27me3ピークは検出されなかった。これらの結果はRNA-seqによって検知されたSUF領域の転写状況とも一致しており(図1-7下段)、BPCUはH3K27me3を介してSUFの発現制御をおこなっていることが示唆された。

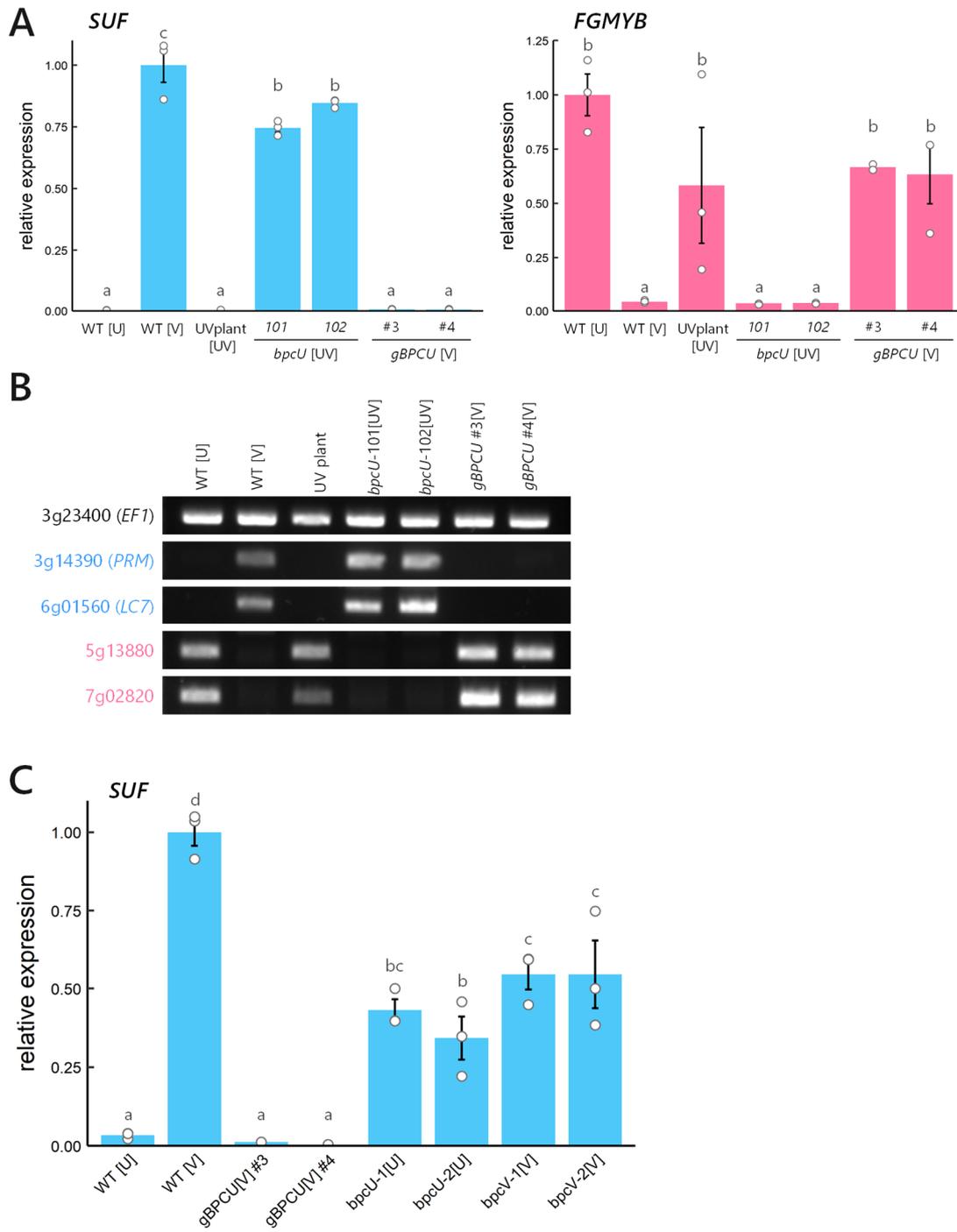


図1-5 BPCUの有無と *SUF*/*FGMYB*の発現量の関係

A *bpcU*[UV]変異体、*gBPCU*[V]の生殖器官における*SUF*/*FGMYB*の発現量

左のグラフは野生型雄株における発現量を1とした時の*SUF*の相対発現量を、右のグラフは野生型雌株における発現量を1とした時の*FGMYB*の相対発現量を示す。*EF1*を内部標準として用いた。バーは±SEを示す。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。N=3

B *bpcU*[UV]変異体、*gBPCU*[V]における雌雄特異的な遺伝子のRT-PCR結果

*EF1*は恒常的に発現している遺伝子、*PRM*および*LC7*は雄特異的に発現している遺伝子、*5g13880*、*7g02820*は雌特異的に発現している遺伝子である。

C 恒常白色条件下10日目葉状体における*SUF*の発現量

野生型雄株における発現量を1とした時の*gBPCU*[V]、*bpcU*[U]変異体、*bpcV*[V]変異体における*SUF*の相対発現量を示す。*EF1*を内部標準として用いた。バーは±SEを示す。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。N=3

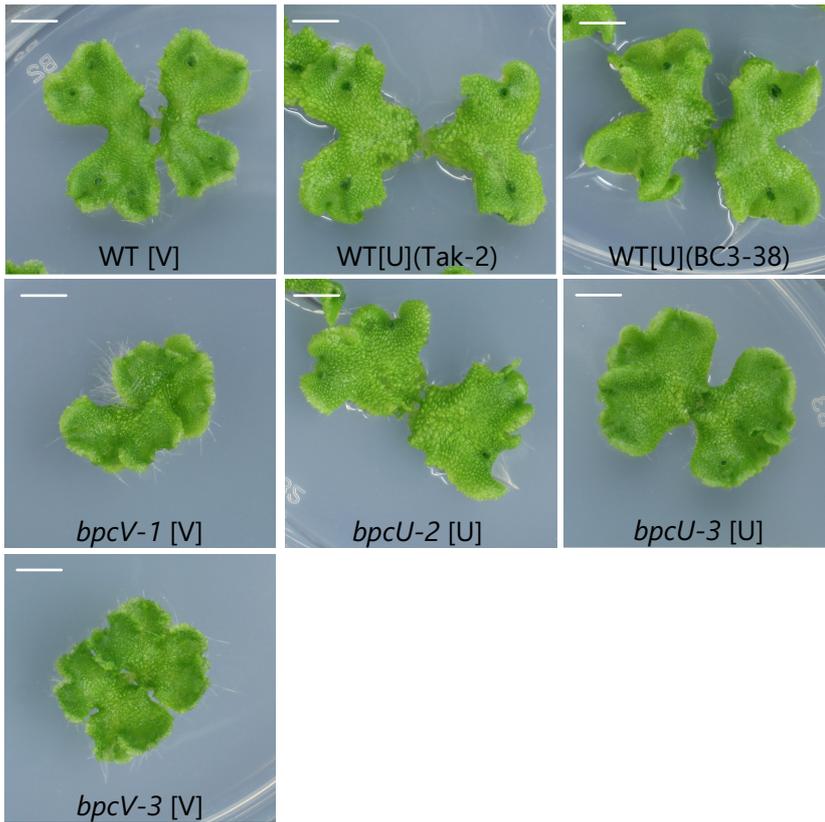


図1-6 野生型および**bpc**変異体の葉状体

いずれも恒常白色条件で16日間生育させて観察を行った。スケールバーは1cm。

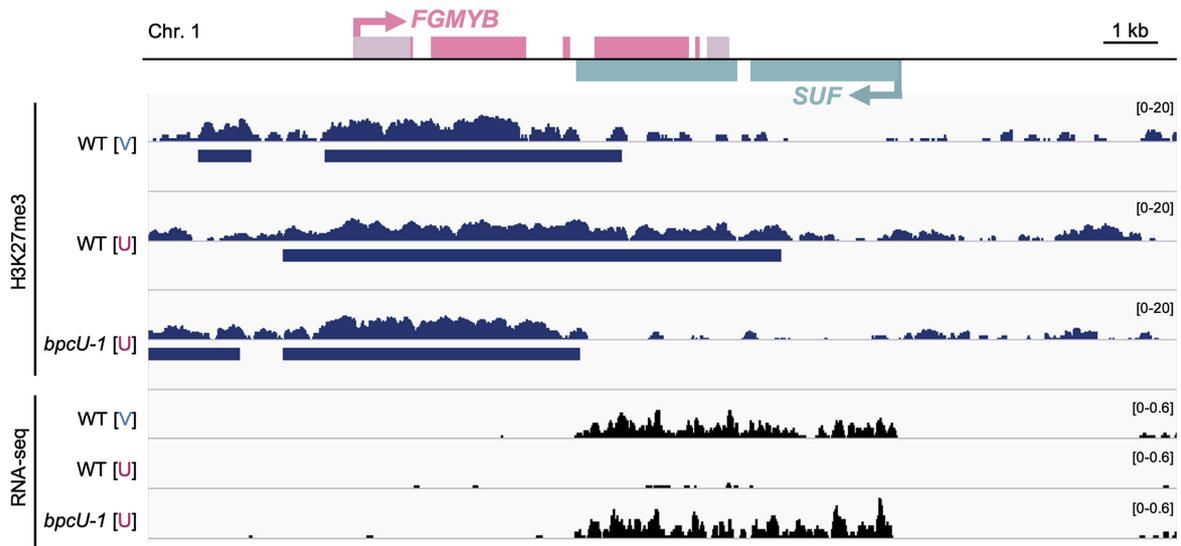


図1-7 野生型および**bpcU**[U]におけるH3K27me3分布および**SUF**の発現状況

最上段は**SUF**/**FGMYB**の遺伝子座の模式図を、中段はCUT&RUNによって確かめられた**SUF**/**FGMYB**遺伝子座のH3K27me3の分布、下段はRNA-seqによる転写をIGVブラウザを用いて示した。H3K27me3分布を示す図中の青いバーはH3をコントロールとしてSICER230によって検出されたピークの位置を示す。植物体はいずれも恒常白色条件14日目の葉状体を用いられている。(梶原氏作図)

BPCUとBPCVは4億3000万年前に分岐した

ゼニゴケの性決定遺伝子として明らかとなった*BPCU*と、その性染色体間ホモログである*BPCV*の起源を調べるため、モナシュ大学のSingh氏、Bowman博士によってコケ植物のBPCの配列が収集され、系統樹が作成された(図1-8)。その結果、苔類のBPCはBPCU型とBPCV型に分かれ、苔類が分岐するより以前にBPCU型とBPCV型が分岐したことが推測された。ツノゴケ類、蘚類はBPCを1分子種持つことや、苔類の系統関係を考え合わせると、苔類のBPCU型およびBPCV型はもともと常染色体上の対立遺伝子として存在していたものが分岐したもので、コマチゴケ綱(Haplomitriopsida)とゼニゴケ綱(Marchantiopsida)の分岐より以前に分化していることが推測された。年代としては苔類のBPCU型とBPCV型は4億2000万年前から4億5000万年前に分岐したことが推測された。他の苔類ゼニゴケの性染色体間ホモログでも同様の解析がなされたが、*BPCU*と*BPCV*はゼニゴケの性染色体間ホモログの中でも最も早い段階で分岐したと考えられる7対の遺伝子のうちの1対であることが明らかとなった(図1-9)。このことから、*BPCU*と*BPCV*の分化によって苔類の性染色体が誕生した可能性が考えられる。

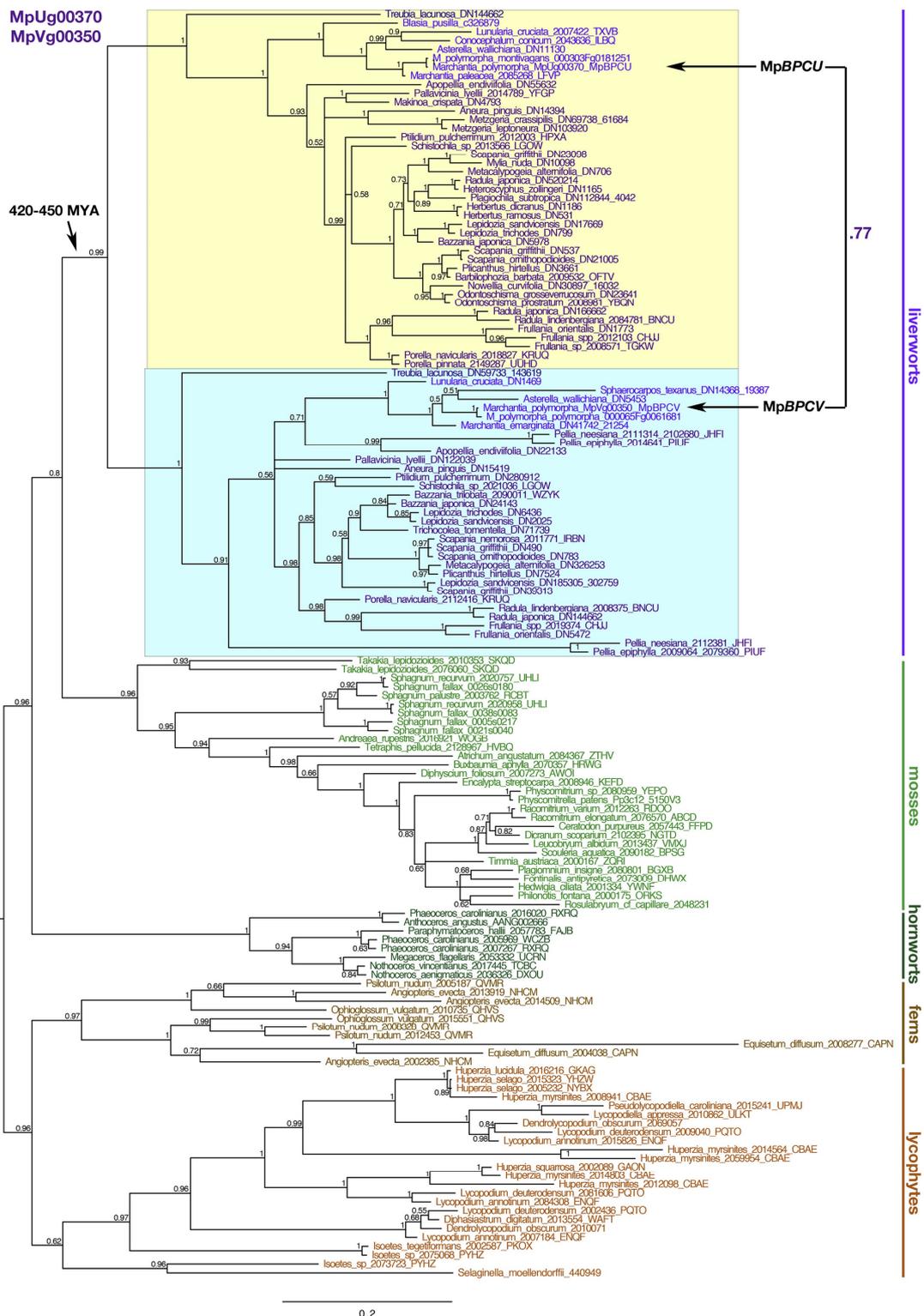


図1-8 BPCUとBPCVの系統関係(Singh氏、Bowman博士作成)

系統樹はトランスクリプトームから得られたコーディング領域全長の塩基配列をアラインメントして作成された。苔類の配列は紫で表示され、コマチゴケ綱は濃い紫色、ゼニゴケ綱は明るい紫色、ウロコゴケ綱は赤紫となっている。BPCUとBPCVを含むクレードはそれぞれ黄色と水色で強調されている。蘚類は薄緑色、ツノゴケ類は濃い緑色、シダ植物は茶色、小葉植物はオレンジで示されている。系統樹内の数字は事後確率を示している。また、苔類のBPCU型とBPCV型が系統的岐化したと推測される位置を矢印で示している。苔類ゼニゴケの性染色体間モログBPCUとBPCVを結ぶ矢印の近傍の数字0.77はpS値である。

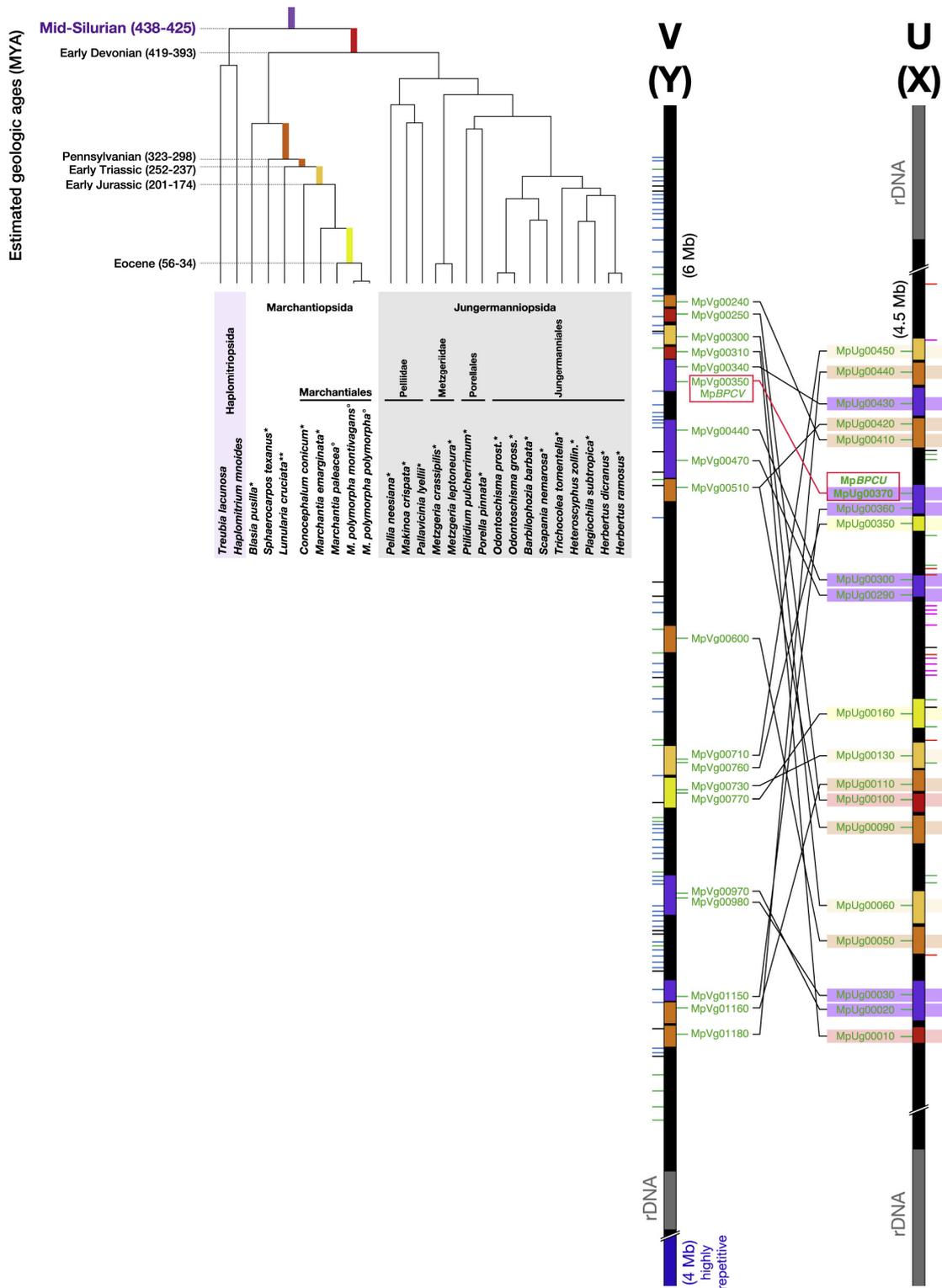


図1-9 苔類ゼニゴケの性染色体間ホモログの分岐年代(Singh氏、Bowman博士作成、改変)
 左に苔類の系統関係と、推定される分岐年代を示す。右に苔類ゼニゴケのU染色体とV染色体の性染色体間ホモログの位置関係を示している。性染色体中の色はそれぞれのホモログが分岐したと推定される時期を表し、左に示す系統樹中の色とリンクしている。

考察

BPCUによるSUF/FGMYBの制御

本研究は*Feminizer*候補遺伝子の変異体を作成することで、苔類ゼニゴケにおける性決定遺伝子*Feminizer*がU染色体上に座する*BPCU*であることを明らかにした(図1-1)。また、*BPCU*は常染色体上の*SUF*の発現を抑制し雌性化因子*FGMYB*の発現を促進することで雌性化することが示された(図1-5)。*BPC*は植物に特有な転写因子であり、GAリピート配列に結合し他の因子と相互作用することでクロマチン構造を変化させ、標的遺伝子の発現を制御すると考えられている(Kooiker et al., 2005)。シロイヌナズナにおいては、*PRC2*と相互作用することでH3K27me3を誘導し標的部位をヘテロクロマチン化することで遺伝子を抑制することも知られている(Hecker et al., 2015、Xiao et al., 2017)。*SUF*の転写開始点付近にはGAリピート配列が多数存在することから、*BPCU*が直接*SUF*領域に結合し発現を抑制している可能性が十分に考えられる。CUT&RUN実験による*bpcU*[U]変異体におけるH3K27me3の分布も、野生型雌株に見られる*SUF*領域のH3K27me3ピークが*bpcU*[U]変異体では見られなくなっており(図1-7)、このモデルを支持している。つまり、*BPCU*は*SUF*領域のGAリピート配列に結合し、*PRC*等のH3K27me3を誘導する因子と相互作用することで*SUF*の発現を抑制していると考えられる。

上述のような*BPCU*による*SUF*の発現抑制と植物の生育段階の関係については、先行研究で配偶子の雌性分化を制御する*FGMYB*は主に卵細胞を中心とした雌性配偶子で発現するが、*FGMYB*の発現を抑制する*SUF*は栄養成長期においても雌より雄で発現量が高いという結果が示されている(Hisanaga and Okahashi et al., 2019)。本研究においても、葉状体で*bpcU*[U]変異体におけるH3K27me3の分布の雌雄差が確認されるとともに(図1-7)、*BPCU*依存的な*SUF*の発現量の変化も確認された(図1-5C、図1-7)。これらのことから、*BPCU*による*SUF*の抑制は栄養成長の段階で既に始まっていることが示唆されている。

機能的な性染色体間ホモログを持つ性決定因子BPCU

本研究において性決定因子として同定されたU染色体上の*BPCU*はV染色体上に性染色体間ホモログ*BPCV*が存在する。この2つの*BPC*は有性生殖誘導に寄与することが明らかになっており(図1-3)、共通して種の保存に重要な機能を持っていると言える。しかし、変異体における*SUF*の定量結果(図1-5C)や*bpc*変異体でBNBを活性化させた実験結果(図1-4)から、性決定に機能するのは*BPCU*のみで、*BPCV*は性決定には関与していないことが考えられた。つまり、性染色体上の2つの*BPC*は共通して有性生殖誘導の機能を持ち、加えて*BPCU*は性決定機能を持っていると言える。このような遺伝子が性決定遺伝子として報告されたことはこれまでなかった。従来の考え方では性決定因子は性決定の機能に特化していると考えられ、これまで実際に二倍体生物での知見でもその見解が否定されることはなかった。例えばアスパラガスにおいては、Y染色体上の雄性機能を持つ性決定因子*MSE1/TDF1*遺伝子は雄蕊特異的に発現するMYB転写因子であり、X染色体にもその痕跡はあるものの遺伝子としての機能が失われていた(Murase et al., 2017)。しかし、ゼニゴケの性決定因子*BPCU*は機能的な性染色体間ホモログ*BPCV*が存在する。半数体の性染色体は祖先となる常染色体に性決定領域が誕生したのち、2

種類の性染色体が独立に進化していく中で雌雄一方のみの配偶子形成に必要な遺伝子が特異的な遺伝子として残り、種の保存に必須な遺伝子は両方の性染色体に共通して残ると考えられている (Bull, 1978)。遺伝子の重複が少ないゼニゴケでは、このような性染色体進化の過程で種の保存に重要な機能を持つ*BPC*遺伝子が性決定遺伝子として進化しても、配偶子の雌雄分化以外の面で代わりに機能を代替するような遺伝子が不足していたために、*BPCU*と*BPCV*に共通した有性生殖誘導の機能は失われなかったと考えられる。

祖先型の*BPC*から*BPCU*と*BPCV*に分岐した年代に関しては、コケ植物の配列を多く含んだ系統樹 (図1-8)の結果からおおよそ4億3000万年前に分岐したと推測され、苔類ゼニゴケの性染色体は現在知られている性染色体のうち最も古い起源を持つことが明らかにされた。収集された苔類の*BPC*の配列はいずれも*BPCU*型または*BPCV*型に属していたことから、*BPC*による性決定もしくは性分化が苔類である程度広く保存されている可能性も考えられる。

第二章

苔類ゼニゴケの性決定因子**BPCU**と

性染色体間ホモログ**BPCV**の性決定における機能差を
生み出すアミノ酸配列の解析

転写因子BPCとポリコーム複合体

第一章でゼニゴケの雌性を決定していることが明らかとなったBPCUは植物に特有な転写因子であるBPCをコードする。BPCは2002年にダイズ *Glycine max* でGAGA-binding protein (GBP)として、2003年にオオムギ *Hordeum vulgare* でbarley b recombinant (BBR)として発見されたGAリピート配列に結合する転写因子である (Sangwan and O'Brian, 2002、Santi et al., 2003)。シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* においてもBPCは7遺伝子座存在し、クロロフィルや花器官の形成に関わるMADS-box 遺伝子の発現を制御するなど、葉や茎頂の形成、花成を含む多面的な機能を持つ (Sangwan and O'Brian, 2002、Meister et al., 2004、Monfared et al., 2011)。BPCの起源としては接合藻 *Spirogloea muscicola* ではBPC遺伝子が発見されているので、陸上植物が誕生する以前のZygnematophyceae綱が分岐した頃にBPC遺伝子が獲得されたと考えられている (Cheng et al., 2019)。陸上植物ではコケ植物の蘚類ヒメツリガネゴケやツノゴケ類でBPCは1分子種のみ保存されており、陸上植物の祖先はBPCを1分子種持っていたと考えられている (Bowman et al., 2017、Li et al., 2020)。分子構造としては種子植物のBPCは分子系統解析からグループI~IIIに分類され、全てのグループでC末端側に5つのシステイン残基を含むBPCドメインが高度に保存されているが、N末端側はグループごとに配列が異なっている (Meister et al., 2004)。特にグループIIではアラニンと酸性・塩基性の残基が規則正しく並んでいるアラニンジッパーが存在し、ホモダイマーを形成することが明らかとなっている (Wanke et al., 2011)。シダ植物やコケ植物のBPCもこのアラニンジッパー構造を保存しているが、系統的にグループI~IIIには属さず、グループIVとして分類されている (Theune et al., 2019)。BPCはクロマチン構造を変化させる他の因子と相互作用し、BPCドメインを介してGAリピート配列へ結合することで標的遺伝子の発現をエピジェネティックに制御すると考えられている。BPCの代表的な相互作用因子として、ポリコーム複合体が知られている (Hecker et al., 2015、Xiao et al., 2017)。中でもPRC2は代表的なヒストン修飾マークであるヒストンH3の27番目のリジン残基のメチル化 (H3K27me3)を触媒する因子で、H3K27me3の修飾が見られる領域はヘテロクロマチン化され遺伝子発現が抑制されることが知られている。

本研究では第一章でゼニゴケの性決定遺伝子 *Feminizer* はBPCUであり、*SUF/FGMYB* モジュールを介して雌性化をおこなっていることを明らかにした。さらに、U染色体上のBPCUには性染色体間ホモログとしてV染色体上にBPCVが存在し、2つのBPCは共通して有性生殖誘導に関与することを示した。本章では、共通な機能を持ちながら一方のみが性決定機能を有するBPCUとBPCVについて、性決定機能に差を生み出すアミノ酸残基をドメインスワッピング、アミノ酸置換の実験によって同定し、ゼニゴケの性決定因子の誕生について考察した。

結果

BPCUとBPCVの転写パターンやアミノ酸配列の比較

共通な機能を持ちながら一方のみが性決定機能を有するBPCUとBPCVの機能差を生み出す領域を特定するため、まずBPCUとBPCVの転写パターン及びアミノ酸配列を比較した。まず、どちらもスプライシングバリエーションが2つあった(図2-1A)。この二つのスプライシングバリエーションから翻訳されるタンパク質はBPCUでは開始メチオニンから12番目までのアミノ酸残基、BPCVでは7番目までの残基に違いがある(図2-1B,C)。図2-2に示すアラニンジッパーを有するグループIIに属するシロイヌナズナBPCとのアラインメントから分かるように、BPCUとBPCVのドメイン構造としては、N末端のドメインであるアラニン・酸性・塩基性アミノ酸が規則正しく並ぶアラニンジッパーも、C末端の5つのシステインを含むBPCドメインもBPCUとBPCVの両方に保存されていると考えられた。また、アラニンジッパーとBPCドメインの間にはBPCUとBPCV間で保存された塩基性アミノ酸KRKIやKRが見られ、シロイヌナズナのAtBPC6で推測されているようなNLSモチーフKRxxK(Wanke et al., 2011)ではないものの、この領域は核局在を示していることが考えられた(図2-2)。これらの保存されたドメイン構造はBPCU・BPCVいずれにおいても2つのスプライシングバリエーションの共通部分に存在していた(図2-1B,C)。ドメイン構造という観点からは、BPCUとBPCVには大きな違いは確認できなかった。

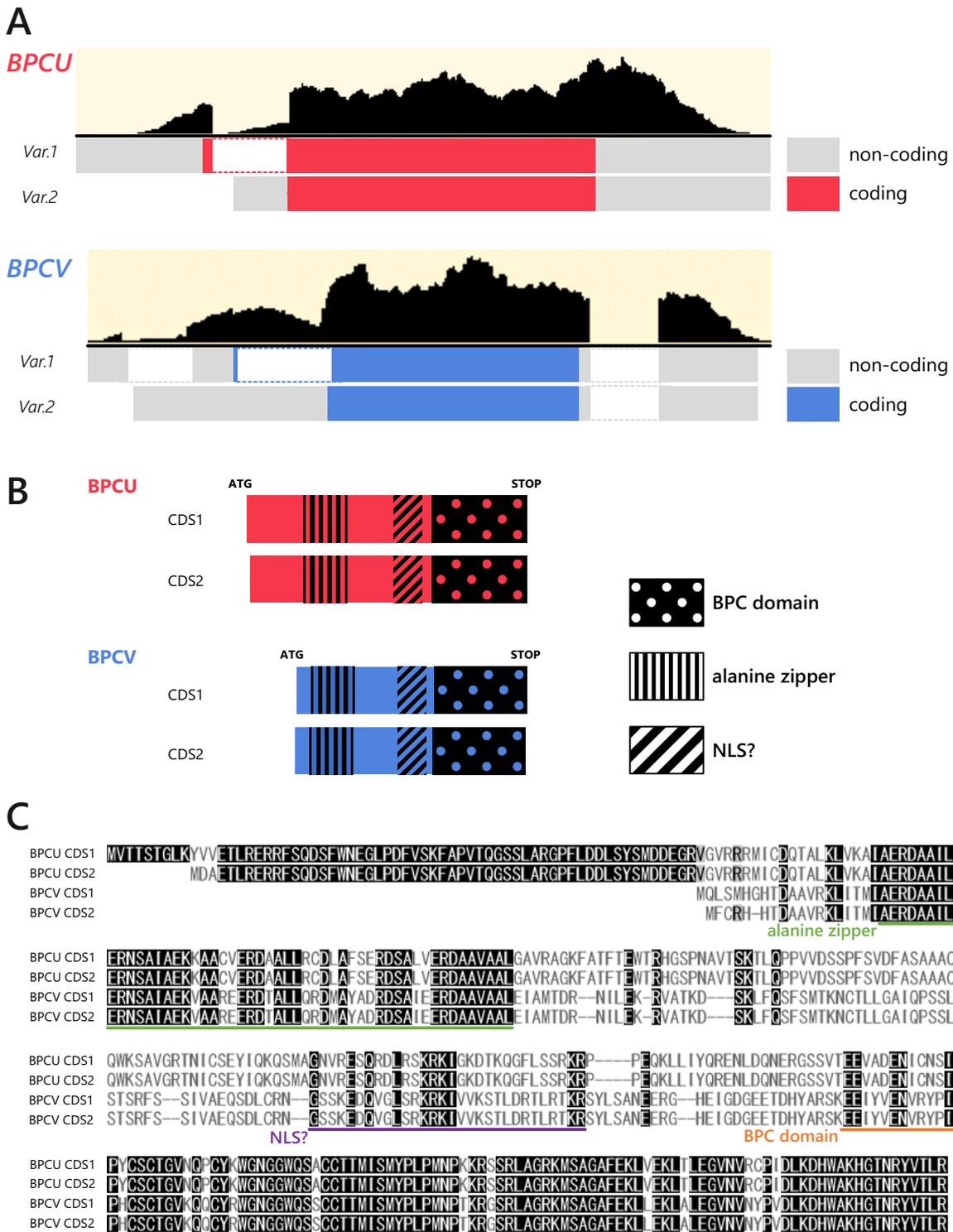


図2-1 BPCUとBPCVの転写パターンおよびアミノ酸配列の比較

A BPCUおよびBPCVのmRNAパターン

上段はmRNAseqのリード (Bowman et al., 2017) を、下段は2種類のスプライシングバリエーションのエキソン部分をボックスで示す。グレーは非翻訳領域、赤 (BPCU) および青 (BPCV) は翻訳領域を示す。転写物の量から、var.1が主なmRNA配列であると思われる。

B 異なるスプライシングバリエーションからできた2種類のBPCタンパク質のドメイン構造翻訳されたときのタンパク質全長をボックスで示す。縦線部はアラニンジッパーを、ドット部はBPCドメインを示す。斜線部は塩基性アミノ酸が多くNLSの可能性のある領域を示す。主なmRNA配列であるvar.1から翻訳されたタンパク質をCDS1、var.2から翻訳されたタンパク質をCDS2で示す。

C BPCUとBPCVのアミノ酸配列のアラインメント

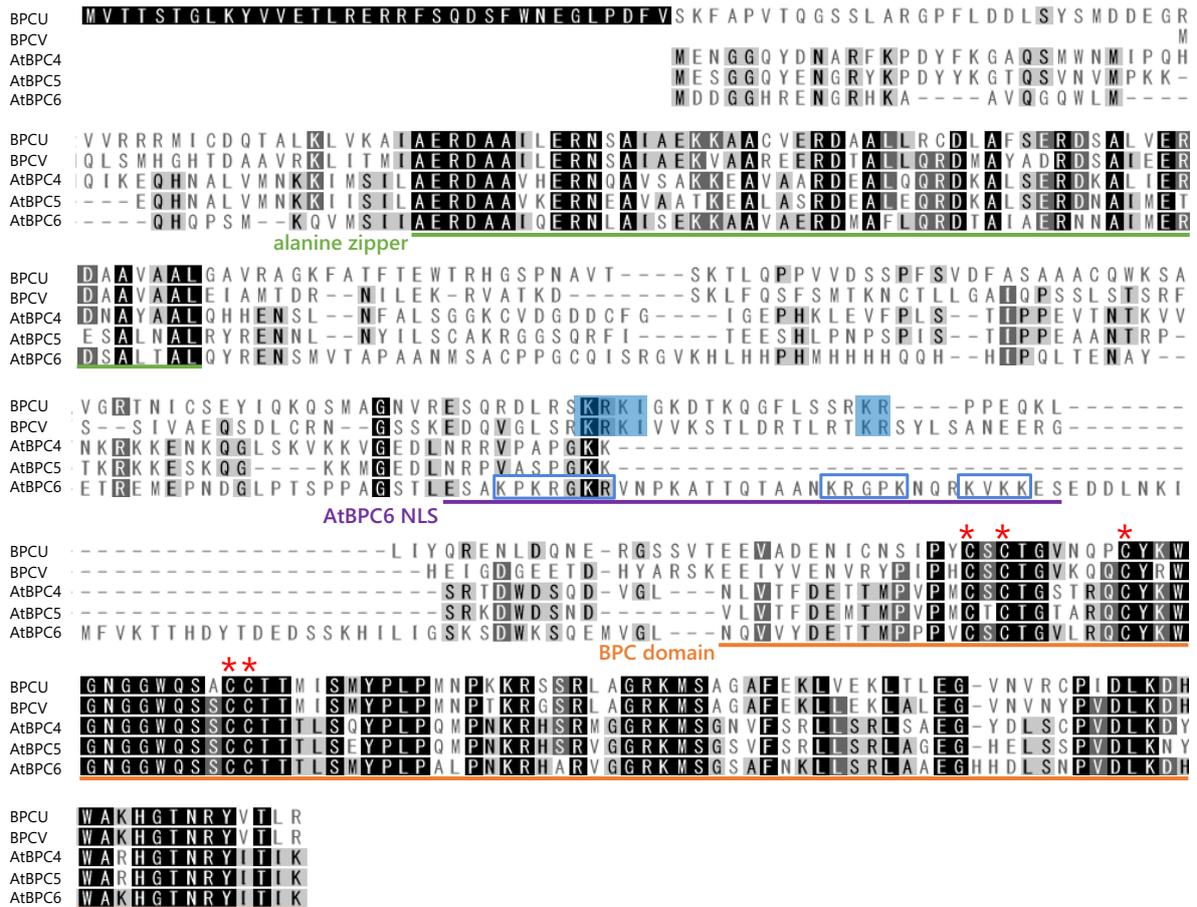


図2-2 BPCU・BPCVとシロイヌナズナのグループII BPCのアミノ酸配列の比較

N末端領域にアラニンジッパー構造が存在するグループIIに属するシロイヌナズナのBPC (AtBPC4, AtBPC5, AtBPC6)と、BPCU・BPCVのアミノ酸配列のアラインメント。BPCドメインにおいて特に保存されている5つのシステインを*で、BPCUとBPCVで保存された塩基性残基を青の網掛けで示す。AtBPC6で推測されているNLSモチーフKRxxK(Wanke et al., 2011)は青で囲んでいる。

BPCUのC末端のアミノ酸は雌性化に重要である

BPCUとBPCVの雌性化機能の違いを生み出す領域を明らかにするため、ドメインスワッピング実験を行った。具体的にはBPCUのゲノム断片の一部をBPCVに置き換え、*bpcU*[U]変異体に導入した。コーディング領域全てをBPCVにしたBPCU_{pro}:BPCVでは生殖器官を誘導すると雄の生殖器官を形成した(図2-3A,B)。次に、BPCUとBPCVの配列を、アラニンジッパーを含むN末端領域とBPCドメインを含むC末端領域2つの領域に分割し、スワッピングした(図2-3A)。BPCUの238番目のアミノ酸残基を境界としてスワッピングし、N末端側がBPCU由来でC末端側がBPCV由来の断片をBPCU(238)V断片と、N末端側がBPCV由来でC末端側がBPCU由来の断片をBPCV(238)U断片を*bpcU*[U]に導入した。BPCU(238)V株は生殖器官を誘導すると雄の生殖器官を形成した(図2-3A,B)。一方でBPCV(238)U株は雌の生殖器官を形成した(図2-3A,B)。これらの結果からBPCUの238番目以降のC末端領域のアミノ酸配列の違いが雌性化に寄与していることが明らかとなった。同様にBPCUの272番目のアミノ酸残基を境界としてスワッピングした。N末端がBPCU由来であるBPCU(272)V株は多くの造精器とわずかな造卵器を含む生殖器官を形成した(図2-3A,B)。一方で、272番目以降のC末端側のBPCU配列を持つBPCV(272)U株は完全に雌の生殖器官を形成した(図2-3A,B)。これらの結果は、272番目以降のC末端側のBPCU配列が雌性化に特に重要であることを示唆している。第一章でBPCUはSUF/FGMYBの発現制御を介して雌性化することが明らかとなっている。そこで、ドメインスワッピングした植物体の表現型とSUF/FGMYBの発現量が相関するのかを調べるため、SUF/FGMYBの発現定量を行った(図2-4A,B)。BPCU相補株(*gBPCU/bpcU*[U])ではSUFは発現しておらず、FGMYBも野生型雌と同程度に高い発現量を示していた(図2-4A,B)。この結果はこの植物が雌の生殖器官を形成すること(図2-3B)と一致している。一方で、BPCU_{pro}:BPCVとBPCU(238)V株ではSUFは野生型雄株と同程度発現していたが、FGMYBは野生型雄株より少し高く野生型雌株に比べると低い発現量を示した(図2-4A,B)。これらの植物は雄の生殖器官を形成していた(図2-3B)。同様に多数の造精器と少しの造卵器が観察されたBPCU(272)V株(図2-3B)でもSUFは野生型雄株と同程度発現しており、FGMYBは野生型雄株より少し高く野生型雌株に比べると低い発現量を示した(図2-4A,B)。完全に雌の生殖器官を形成したBPCV(272)U株(図2-3B)では、SUFは野生型雄株と比較するとある程度抑制されており、FGMYBは野生型雌株と同程度発現していた(図2-4A,B)。さらに、SUFとFGMYBの量的関係を包括的に調べるため、 $\log_2(FGMYB/SUF)$ を計算した。定量化の結果、雄の生殖器官を形成した野生型雄株およびBPCU_{pro}:BPCV株、BPCU(238)V株の $\log_2(FGMYB/SUF)$ は負の値を示した(図2-4C)。多数の造精器と少しの造卵器が観察されたBPCU(272)V株も、野生型雄株やBPCU_{pro}:BPCV株よりやや値は0に近い傾向が見られたが負の値を示していた(図2-4C)。一方で、雌の生殖器官を形成した野生型雌株やBPCU相補株(*gBPCU/bpcU*[U])は正の値を示しており、同様にBPCV(272)U株も値は小さいながらも正の値を示した(図2-4C)。これらのことから、ドメインスワッピングした植物体における性表現とSUF/FGMYBの発現は相関しており、BPCUのC末端領域がSUFの発現制御を介して雌性化に寄与していると考えられた。全体として、ドメインスワッピング植物の実験結果は、BPCUのC末端領域がSUF/FGMYBの発現調節を介して雌性化に寄与していることを示しており、中でもBPCUの272番目以降のアミノ酸配列が特に雌性化に重要であることが示唆された。

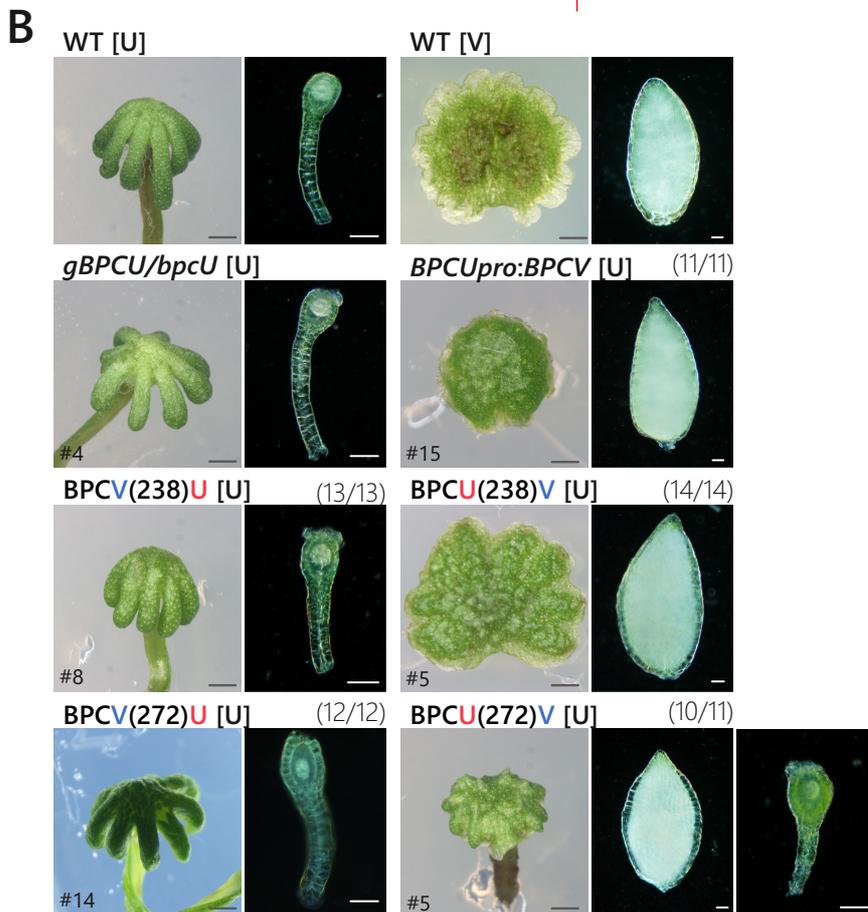
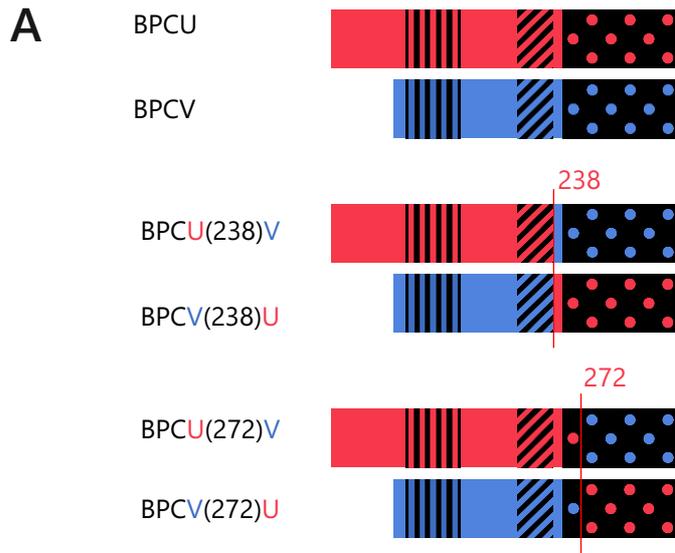


図2-3 ドメインスワッピング植物体の表現型

A ドメインスワッピングした植物体で翻訳されると考えられるBPCタンパク質の模式図
 ボックスの縦線はアラニンジッパードメインを、ドットはBPCドメインの領域を示し、斜線は
 NLSの可能性のある領域を示す。赤い縦線および数字はそれぞれスワッピングした箇所とBPCU
 のアミノ酸残基番号を表す。

B ドメインスワッピングした植物体の生殖器官の表現型

FR補光した恒常白色光下で観察した生殖器官 (左) と造精器/造卵器 (右)。それぞれ代表的な表現
 型を示す個体の写真を示す。括弧内の数字は独立に取得した形質転換体のうち写真と同じ性別
 を示した個体数の割合を示す。スケールバーは左1 mm、右50 μ m。

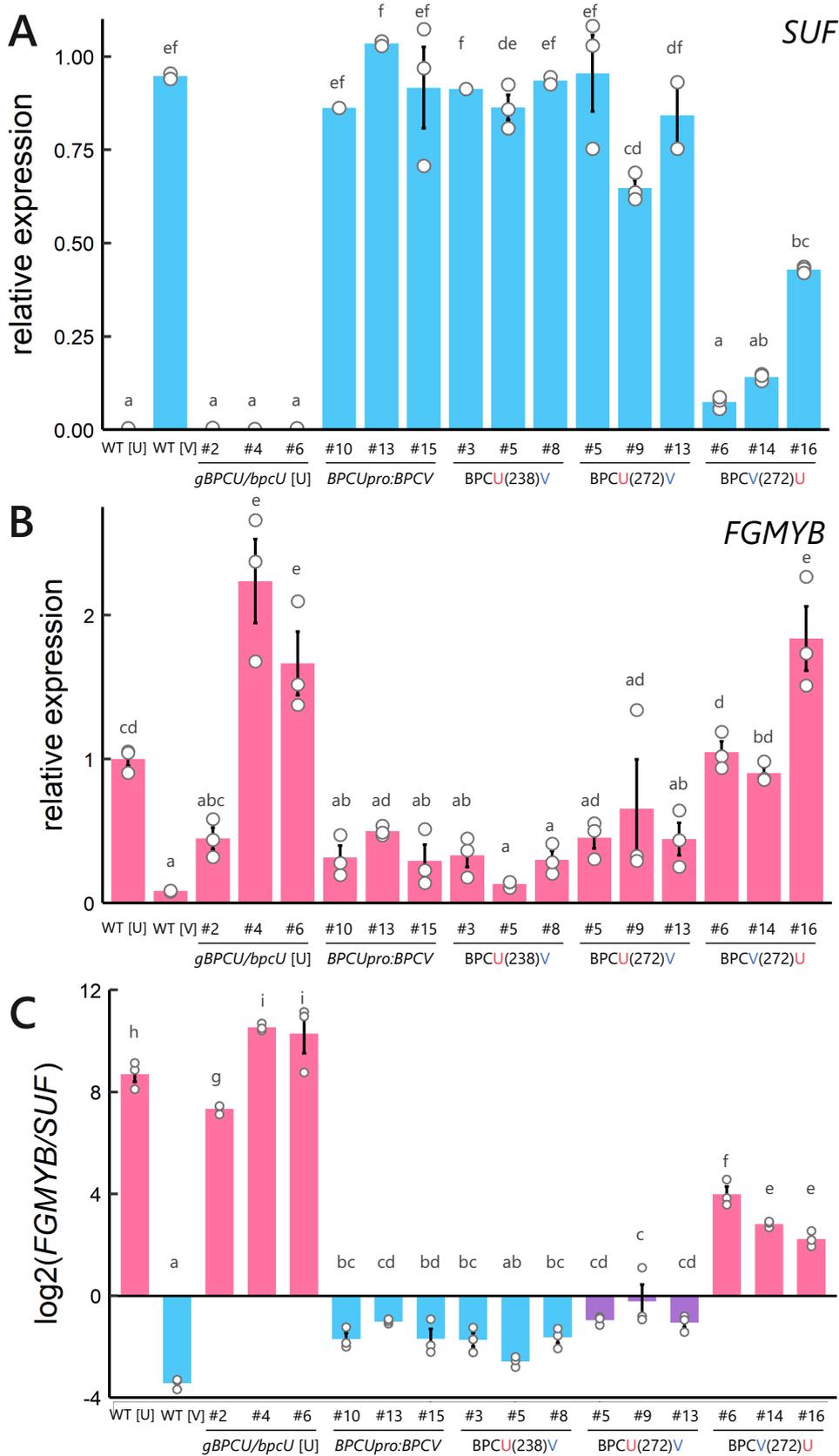


図2-4 ドメインスワッピング植物体における*SUF*/*FGMYB*の発現

A 生殖器官における*SUF*の発現量

野生型雄株における発現量を1とした時のドメインスワッピング植物体における*SUF*の相対発現量を示す。*EF1*を内部標準として用いた。バーは±SEを示す。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。N=3

B 生殖器官におけるFGMYBの発現量

野生型雌株における発現量を1とした時のドメインスワッピング植物体におけるFGMYBの相対発現量を示す。EF1を内部標準として用いた。バーは±SEを示す。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。N=3

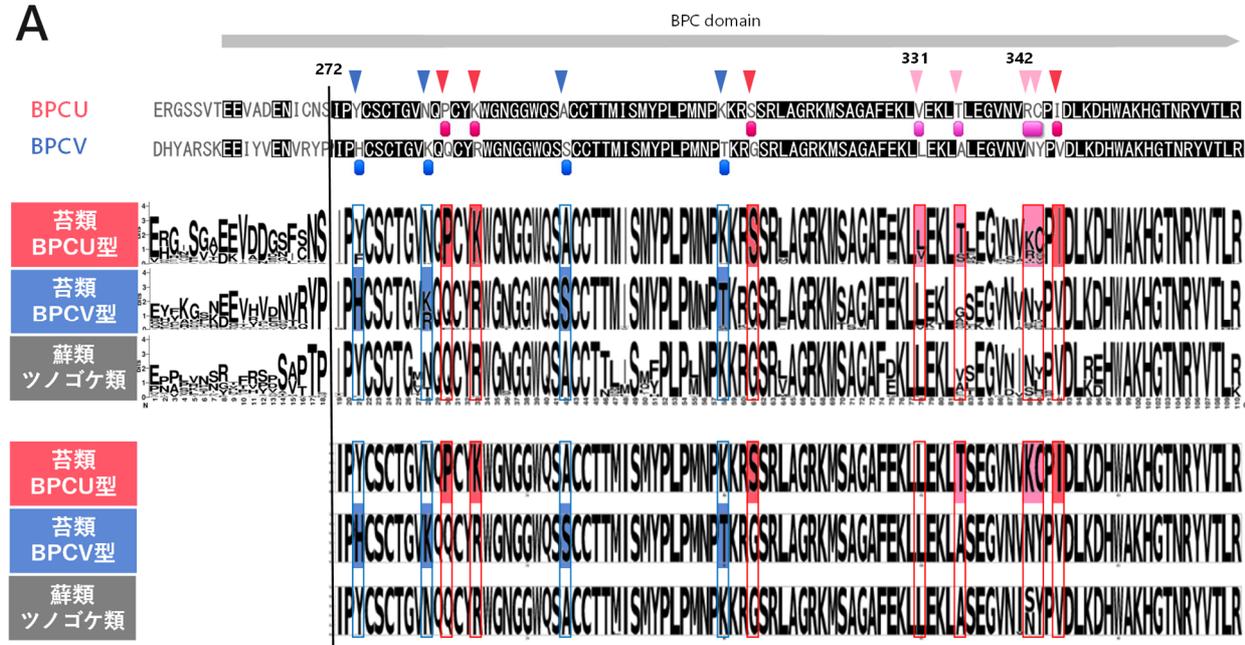
C 生殖器官におけるSUF/FGMYBの発現の量的関係性

AおよびBで示した定量に用いたデータから、SUFの発現量に対するFGMYBの発現量の比を $\log_2(FGMYB/SUF)$ として算出した。棒グラフの塗分けは、雌の生殖器官を形成した株については桃色、雄の生殖器官を形成した株については水色、造精器・造卵器の混合した株については紫色で示している。バーは±SEを示す。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。

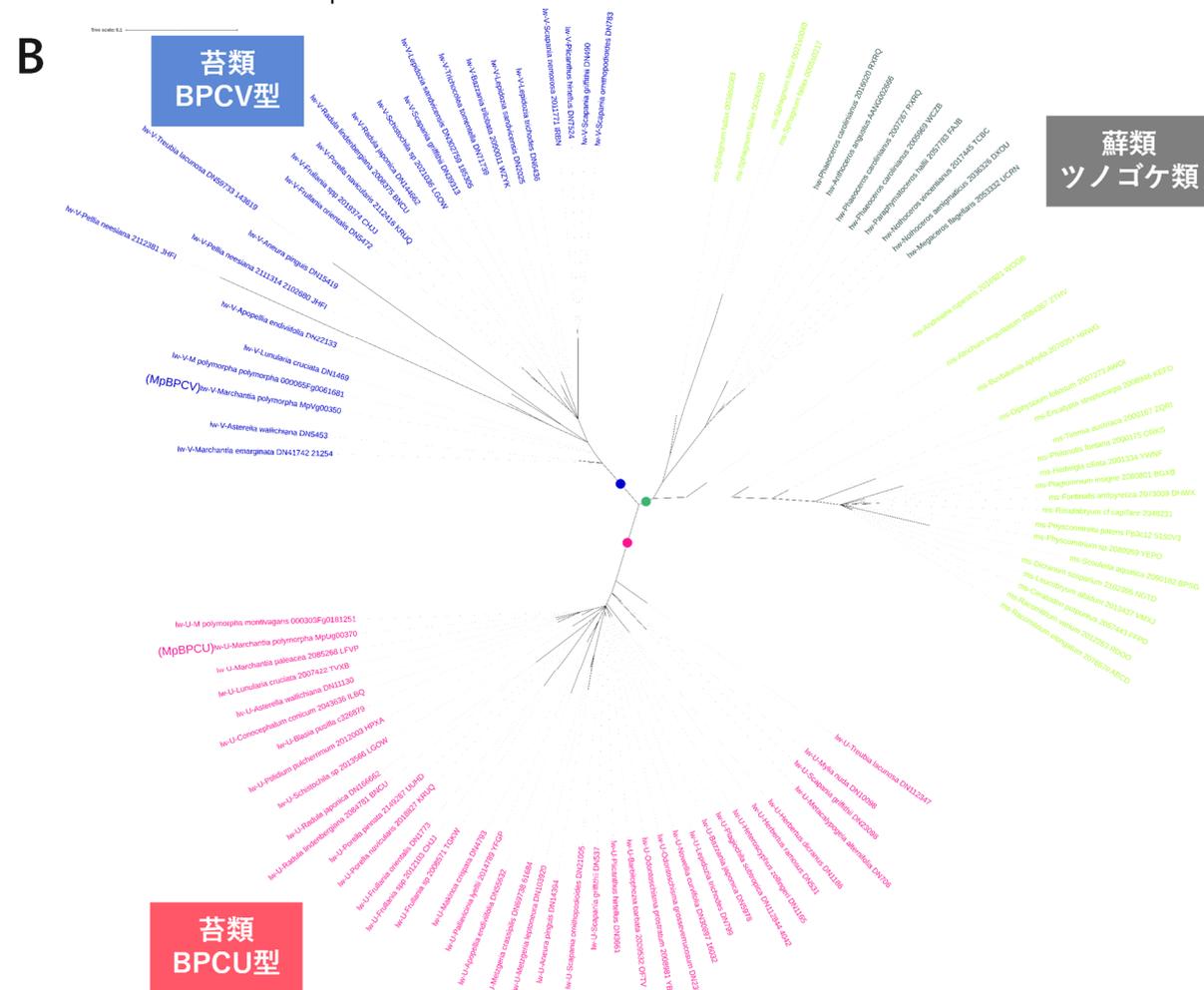
コケ植物のBPCにおけるC末端領域の祖先型配列の推定

ドメインスワッピング実験の結果から、BPCUのC末端側のBPCドメインに相当する領域が雌性化に重要であることが明らかになったため、その配列をBPCVの配列と詳細に比較した。特に雌性化に重要であることが明らかになったBPCUの272番目以降の領域中ではBPCUとBPCVの間で異なるアミノ酸残基は12残基あった(図2-5A 上段; 矢じりのアミノ酸)。これらのアミノ酸残基のうち、どのアミノ酸残基がコケ植物の祖先のBPC配列から変化したかを知るため、コケ植物のBPCの系統樹を作成しC末端領域の祖先のコケ植物の配列を推測した。系統樹からコケ植物のBPCが苔類のBPCU型、苔類のBPCV型、蘚類およびツノゴケ類の3つのグループに分類できた(図2-5B)。各3グループのアミノ酸配列の保存性を調べたところ(図2-5A 中段)、BPCUとBPCVの異なる12残基のほとんどがそれぞれBPCU型とBPCV型の間で高度に保存されており、これらの12残基がBPCU型とBPCV型の異なる機能に寄与している可能性が考えられた。この12残基のうち8残基はBPCU型に特異的な残基であると考えられ(赤色と桃色の残基)、4残基はBPCV型に特異的な残基であると考えられた(青色の残基)。ただし、BPCUの331番目の残基にあたるVに関しては保存性がかなり低かった。また、BPCUの342番目の残基にあたるRに関してはKも同程度保存されており、いずれも塩基性残基でBPCU型に特異的であることから、これらのKとRは同等の機能を有することが予想された。系統樹から推測された祖先型配列(図2-5A 下段)でも各グループのアミノ酸の保存性で確認できたように、7残基が苔類のBPCU型の祖先配列で既に獲得されていたと推測されており(赤色と桃色の残基)、苔類のBPCV型の祖先配列においても特異的な4残基が既に獲得されていたと推測された(青色の残基)。注目した12残基以外ではBPCU型、BPCV型、蘚類とツノゴケ類で基本的に全く同じ祖先型配列が推測されており、コケ植物の祖先型のBPC配列のC末端領域から、それぞれ7残基、4残基のアミノ酸置換を経ることでBPCU型とBPCV型に分岐したということが推測された。これらの解析に基づいてBPCU特異的な残基とBPCV特異的な残基、祖先型残基の分類を図示したものが図2-5Cである。

A



B



C



図2-5 コケ植物のBPCのC末端領域の祖先型配列の推定

A コケ植物のBPCのC末端領域のアラインメント

上段にBPCUとBPCVの配列を示す。矢じりはBPCUの272番目以降のアミノ酸残基でBPCVと異なる12残基を表している。中段に苔類のBPCU型、苔類のBPCV型、蘚類とツノゴケ類のBPCの3つのグループ別のアミノ酸残基の保存性を表すロゴを示す。文字の大きさが保存性の高さを示している。下段にBで示す系統樹に基づいて推測された苔類のBPCU型、苔類のBPCV型、蘚類とツノゴケ類のBPCの3つのグループの祖先型配列のロゴを示す。文字の大きさが可能性の高さを示している。それぞれ図2-6で示す系統樹で桃色、青色、緑色の点で推定されている。この祖先型配列は川村氏によって作成された。BPCU型に特異的な残基のうち100%近く保存されている残基は赤色で、それ以外のBPCU型に特異的な残基は桃色、BPCV型に特異的な残基は青色で表されている。

B コケ植物のC末端領域で作製された系統樹 (川村氏作成)

コケ植物の塩基配列のアラインメントのうち、BPCUの272番目以降のアミノ酸配列に相当する部分を使用して作成された。苔類のBPCU型は桃色、苔類のBPCV型は青、蘚類は黄緑、ツノゴケ類は深緑で示されている。丸印はそれぞれ祖先型配列を推定した節を表している。

C アミノ酸の保存性および推測された祖先型配列をもとに分類されたBPCUおよびBPCVのアミノ酸と推定される祖先型配列

BPCUの272番目以降のアミノ酸配列においてBPCVと異なっているアミノ酸12残基を抽出してBPCVの残基、祖先型BPCの残基と並べて表示した。BPCUに特異的な残基のうち苔類のBPCU型で100%近く保存されている残基は赤色で、それ以外のBPCUに特異的な残基は桃色で示した。BPCVに特異的な残基は青色で示した。祖先型アミノ酸と考えられるアミノ酸は黄色で示した。上部の数字はBPUのアミノ酸残基の番号を示す。

図2-6 コケ植物のC末端領域で作製された系統樹とアラインメント(次ページ)

図2-5Bで示した系統樹と、作成に使用したコケ植物のBPCのC末端領域のアラインメントを並べた。ツノゴケ類は深緑、蘚類は黄緑、苔類のBPCV型は青、苔類のBPCU型の配列名は桃色で示している。丸印はそれぞれ祖先型配列を推定した節を表している。アラインメント中の網掛けは、BPCVに特異的なアミノ酸を青で示し、BPCUに特異的なアミノ酸を赤で網掛けしている。さらに、MAEditor (<https://www.bioinformatics.nl/~berndb/aacolour.html>)を参考に、BPCVの残基に類似した性質を持つアミノ酸であると推測される281番目のR、311番目のSを水色で網掛けした。同様に、BPCUの残基に類似した性質を持つアミノ酸であると推測される335番目のS、342番目のKを桃色で網掛けした。これらのアミノ酸残基の番号は便宜的に、対応するBPUのアミノ酸残基の番号で記述した。

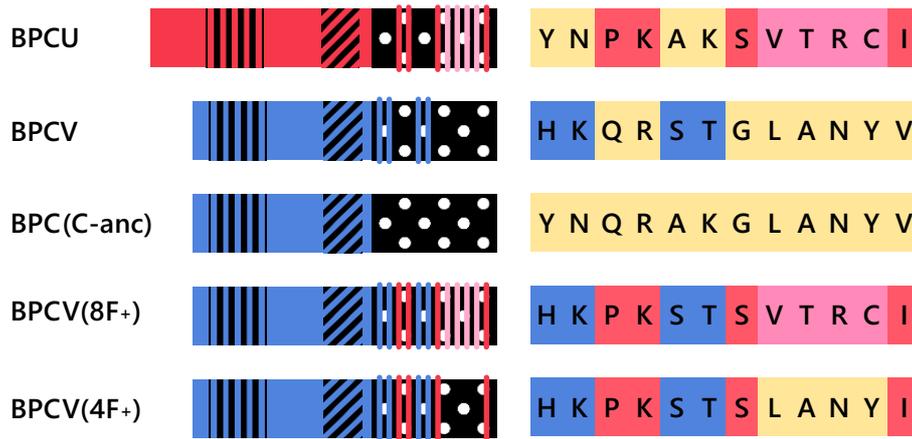
コケ植物の祖先型BPCのC末端配列はゼニゴケにおいて不完全な雌性化機能を持つ

BPCUの雌性化機能に重要なアミノ酸残基を特定するために、*BPCV*遺伝子の配列を改変してアミノ酸置換実験をおこなった。祖先型アミノ酸推定の結果に基づき、*BPCV*型の4つの特異的なアミノ酸を祖先型アミノ酸に置換した*BPC(C-anc)*株を作出した。コケ植物の祖先型のC末端領域を有する*BPC(C-anc)*株は、造精器と造卵器の混在した雌雄混合の生殖器官を形成した(図2-7A,B)。この結果から、導入された4残基の祖先型アミノ酸は不完全ながらも雌性化機能を持つことが分かった。*BPCU*に特有な8つのアミノ酸残基全てを持っている*BPCV(8F+)*株は造卵器のみを持つ雌の生殖器官を形成した(図2-7A,B)。*BPCV(4F+)*株は、入手した*BPCU*型の*BPC*配列のうち*Treubia lacunosa*以外の全ての配列で完全に保存されている4つの残基が導入されており(図2-7A)、ほとんどの*BPCV(4F+)*株が雌の生殖器官を形成した(図2-7B)。これらの結果から*BPCU*型に特異的な残基が雌性化に大きく寄与していることが示唆された。

アミノ酸置換した植物体においても表現型と*SUF/FGMYB*の発現量が相関するのかを調べるため、*SUF/FGMYB*の発現定量を行った(図2-8A,B)。*bpcU[U]*を*BPCV*ゲノム断片で相補した株(*gBPCV/bpcU[U]*)では*SUF*は野生型雄株の約7割程度発現しており、*FGMYB*も野生型雄と同程度検出された(図2-8A,B)。この結果は*gBPCV/bpcU[U]*が雄の生殖器官を形成することと一致している(図2-7B)。造精器と造卵器の混在した生殖器官を形成していた*BPC(C-anc)*株では、野生型雄株や*gBPCV/bpcU[U]*と比較して*SUF*は発現量が低く、*FGMYB*の発現量は高い傾向を示していた(図2-7B、図2-8A,B)。一方で、造卵器のみの雌の生殖器官を形成した*BPCV(8F+)*株と*BPCV(4F+)*株では*SUF*の発現量はかなり低く、*FGMYB*の発現量も野生型雌株の7割程度に回復していた(図2-7B、図2-8A,B)。さらに、*SUF*と*FGMYB*の量的関係を包括的に調べるため、 $\log_2(FGMYB/SUF)$ を計算した。アミノ酸置換植物体においても、雄の生殖器官を形成した野生型雄株および*gBPCV/bpcU[U]*の $\log_2(FGMYB/SUF)$ は負の値を示した(図2-8C)。造卵器と造精器が混在していた*BPC(C-anc)*株も、野生型雄株や*gBPCV/bpcU[U]*より0に近い負の値を示した(図2-8C)。一方で、雌の生殖器官を形成した*BPCV(8F+)*株と*BPCV(4F+)*株では野生型雌株よりも値は小さいながらも正の値を示した(図2-8C)。また、*SUF*および*FGMYB*の定量においても $\log_2(FGMYB/SUF)$ の計算結果においても*BPCV(4F+)*株よりも*BPCV(8F+)*株の方が野生型雌株に近い値を示しており、保存性が比較的良かった4残基も*SUF*の抑制による雌性化において補助的な役割を担っている可能性が考えられた。これらの結果からアミノ酸置換した植物体における性表現と*SUF/FGMYB*の発現は相関していることが分かった。従って導入された4残基の祖先型アミノ酸は*SUF*の発現抑制に関与しており、*BPCU*型の8つのアミノ酸残基も強い*SUF*の発現を抑制する能力を有していることが分かった。

アミノ酸置換植物の生殖器官の表現型と*SUF/FGMYB*の定量結果から、*BPCU*と*BPCV*が分岐する以前の祖先型*BPC*のC末端領域に*SUF*の抑制を介した雌性化能力が認められる一方で、*BPCU*型に特異的なアミノ酸残基にも*SUF*の抑制を介した強い雌性化能力があることが明らかとなった。この結果は、*BPCU*と*BPCV*に分岐する前の苔類の祖先植物の*BPC*の雌性化機能を示唆している可能性がある。つまり、祖先型*BPC*からC末端領域の4残基の変化を経たことで*BPCV*は雌性化能力を喪失した一方で、*BPCU*は先祖型の*BPC*から進化後も雌性化機能を保持していた、もしくは雌性化能力をさらに強化したことが予測された。

A



B

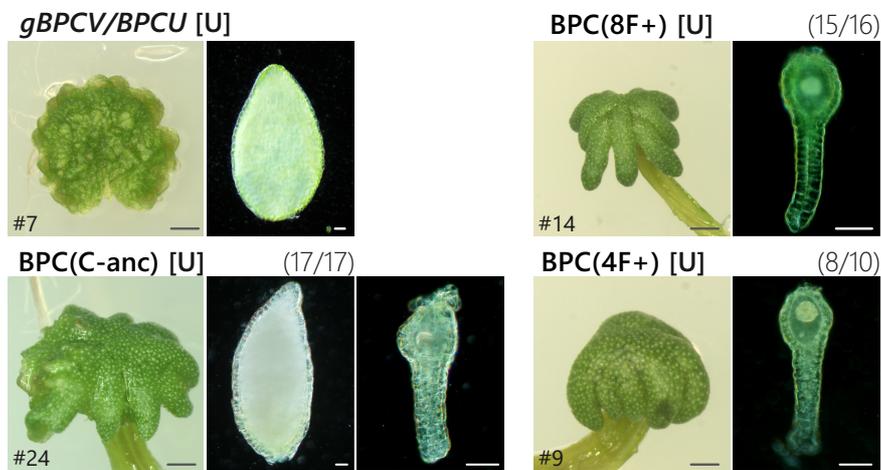


図2-7 アミノ酸置換植物体の表現型

A アミノ酸置換した植物体で翻訳されると考えられるBPCタンパク質

左にアミノ酸置換した植物体で翻訳されると考えられるBPCタンパク質の模式図をボックスで示す。ボックス中の縦線はアラニンジッパードメインを、ドットはBPCドメインの領域を示し、斜線はNLSの可能性のある領域を示す。BPCドメイン領域の赤色と桃色、青色の縦線はそれぞれBPCU特異的アミノ酸、BPCV特異的アミノ酸を示す。右に雌性化に特に重要なC末端領域中でBPCUとBPCV間で差のある12残基のアミノ酸残基のみ抽出した配列を示す。

B アミノ酸置換した植物体の生殖器官の表現型

FR補光した恒常白色光下で観察した生殖器托(左)と造精器/造卵器(右)。それぞれ代表的な表現型を示す個体の写真を示す。括弧内の数字は独立に取得した形質転換体のうち写真と同じ性別を示した個体数の割合を示す。スケールバーは左1 mm、右50 μ m。

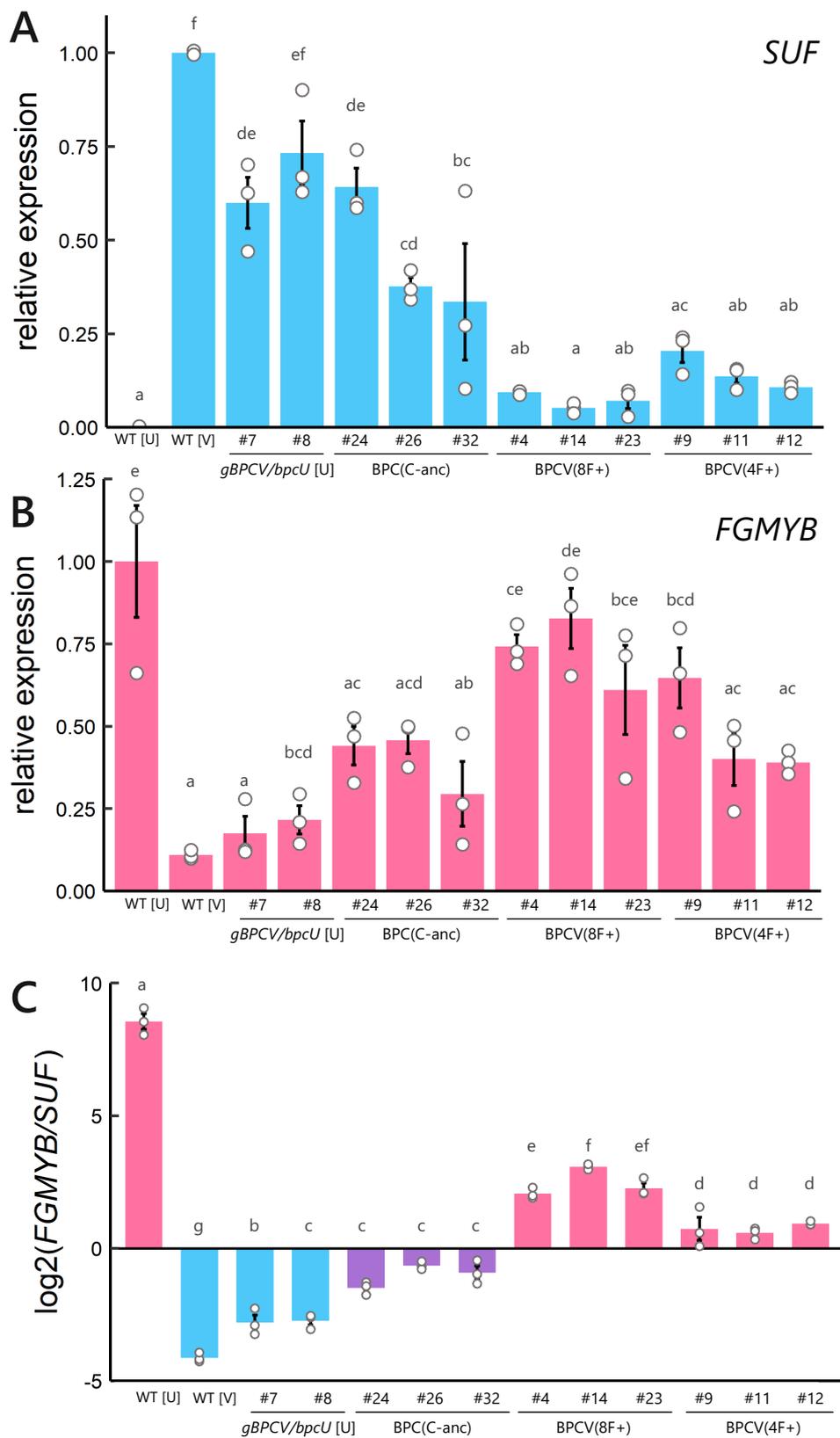


図2-8 アミノ酸置換植物体における*SUF*/*FGMYB*の発現

A 生殖器官における*SUF*の発現量

野生型雄株における発現量を1とした時のアミノ酸置換植物体における*SUF*の相対発現量を示す。*EF1*を内部標準として用いた。バーは±SEを示す。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。N=3

B 生殖器官における*FGMYB*の発現量

野生型雌株における発現量を1とした時のアミノ酸置換植物体における*FGMYB*の相対発現量を示す。*EF1*を内部標準として用いた。バーは±SEを示す。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。N=3

C 生殖器官における*SUF/FGMYB*の発現の量的関係性

AおよびBで示した定量に用いたデータから、*SUF*の発現量に対する*FGMYB*の発現量の比を $\log_2(FGMYB/SUF)$ として算出した。棒グラフの塗分けは、雌の生殖器官を形成した株については桃色、雄の生殖器官を形成した株については水色、造精器・造卵器の混合した株については紫色で示している。上部の記号はTukey-Kramer検定において $P < 0.05$ で有意差のあるグループを示す。

考察

ゼニゴケの性決定因子の進化

本研究では、BPCUとBPCVのアミノ酸配列を詳細に比較してコケ植物の祖先型BPC配列を推定することで、苔類ゼニゴケにおいてどのように性決定因子BPCUが進化したのかを推測した。まず、ドメインスワッピング実験によってBPCUのC末端領域が雌性化に重要であることが明らかになった(図2-3)。このうち高度に保存されたBPCドメイン中の12残基が特に雌性化に重要であることが示唆された(図2-3、図2-5A上段)。祖先型アミノ酸残基の推定によって、BPCUとBPCVの機能差を生み出すC末端領域では祖先型BPCからゼニゴケのBPCUへ進化する過程で8残基のアミノ酸置換が起こった一方で、BPCVへの進化の過程で4残基のアミノ酸置換が起こったと考えられた(図2-5)。アミノ酸置換実験では、このC末端領域を祖先型に置換したBPCVは現在の苔類ゼニゴケにおいて不十分な雌性化機能を獲得した一方で、BPCUに特異的な残基への置換によってゼニゴケは雌の生殖器官を形成した(図2-7)。この結果から、BPCUとBPCVに分岐する以前の祖先型BPCは雌性分化機能を持っていた可能性が考えられ、BPCVは祖先型BPCから雌性化機能を失う進化を辿った一方で、BPCUは祖先型BPCからの進化を経ても雌性化機能を保持もしくは強化していると考えられた。苔類の祖先植物が性決定遺伝子を獲得するために、BPCVが雌性分化機能を喪失したことが重要であるという仮説が立てられる。そして、ゼニゴケは雌個体のBPC(BPCU)と雄個体のBPC(BPCV)を使い分けており、得られた苔類のBPCは全てBPCU型もしくはBPCV型に分類される(図1-7、図2-5B、図2-6)。BPCUとBPCVの分岐が性決定遺伝子を成立させると同時に、苔類の分岐を促進した可能性は十分にあると考えられる。

本研究における苔類ゼニゴケのように、被子植物においても対立遺伝子の片方が機能を喪失することで性決定因子が進化した例は報告されている。アスパラガスでは、Y染色体上に*SOFF*と*TDF1*という2つの性決定因子が存在しており、*SOFF*が雌性分化を抑制し、*TDF1*が雄性分化を促進する(Harkess et al., 2017、Murase et al., 2017)。このうち、*TDF1*と相同な配列がX染色体上に存在しており、*TDF1*の対立遺伝子座の痕跡であると考えられている(Murase et al., 2017)。したがって、X染色体上の*TDF1*が失われたことでY染色体上の*TDF1*が性決定因子になったと考えられる。同様の例は動物においても知られている。フグ*Takifugu rubripes*ではY染色体上の*Amhr2*によって性が決定されるが、Y染色体上の*Amhr2*とX染色体上の*Amhr2*は一塩基のみ異なっている(Kamiya et al., 2012)。Y型*Amhr2*に比べてX型*Amhr2*のシグナル伝達活性は有意に低いことが確認されており(Kamiya et al., 2012)、X染色体上の*Amhr2*の機能の喪失がフグにおける性決定因子を誕生させたことを示唆している。このように、対立遺伝子の片方の機能喪失は性決定因子進化の主なパターンのひとつであると考えられる。

BPCUとBPCVの配列の違いはどのようにBPCUとBPCVの機能差を生み出すか

本研究においてBPCUのC末端領域が雌性化に重要であることが明らかにされたが、それが転写因子であるBPCUおよびBPCVのDNA結合能に影響を及ぼすのか、他の因子との相互作用に影響を与えるのかは明らかになっていない。雌性化に重要な残基は高度に保存されたC末端領域のBPCドメインに集中しており、BPCドメインの存在するC末端領域はDNA結合に関与していると考えられている (Meister et al., 2004)。BPCUとBPCVの雌性化機能の差がDNA結合能力の違いに由来していることを確認するには、BPCVが実際にBPCUの雌性化における標的部位に結合しないことを示す必要がある。

結語

本研究の第一章では、ゼニゴケの性決定遺伝子*Feminizer*がBPCUであることが明らかになった。BPCUは常染色体上の雌雄分化モジュールである*SUF/FGMYB*を介して雌性化していた。U染色体上のBPCUには性染色体間ホモログとしてV染色体上にBPCVが存在しており、2つのBPCは共通して有性生殖誘導に関与していた。第二章では、共通な機能を持ちながら一方のみが性決定機能を有するBPCUとBPCVの雌性化機能の差を生み出す重要なアミノ酸残基がC末端領域のBPCドメイン中に存在することが示された。祖先型アミノ酸残基の推定とアミノ酸置換実験により、BPCUとBPCVの分岐する以前の祖先型BPCは雌性分化機能を有していた可能性が考えられ、BPCVが雌性分化機能を失ったことがBPCUの性決定因子としての進化に重要であったという仮説が立てられた。このような対立遺伝子の片方が機能を喪失することで性決定因子が進化した例は二倍体である植物・動物においても報告されているが、遺伝子重複の少ない半数体のゼニゴケにおいてはBPCVが雌性分化機能を失っても、有性生殖誘導を含む種の保存に重要な機能で代わりを果たす遺伝子が存在しなかったために、BPCVは失われなかったと考えられる。苔類ゼニゴケはこのようにして、機能的な性染色体間ホモログBPCVを持つ、種の保存に重要な機能と性決定機能の両方に機能するBPCUというユニークな性決定遺伝子を獲得したのだろう。

材料と方法

用いた植物体と生育条件

苔類ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* L. の野生型雄株として Takaragaike-1 (Tak-1)、野生型雌株として Takaragaike-2 (Tak-2)、BC3-38 を用いた。BC3-38 は Tak-1 と Tak-2 を交配させて得られた F1 胞子から生育した雌株を Tak-1 と 3 回戻し交配することで得られた。また、UV 両方の性染色体を持つ野生型株として BC4-2 および BC4-19 を用いた。これらの株は Tak-1 と Tak-2 を交配させて得られた F1 胞子から生育した雌株を Tak-1 と 4 回戻し交配することで得られた。ゼニゴケの生育には Gamborg's B5 培地 (Gamborg et al., 1968) を 2 倍希釈し 1% (w/v) Agar を加えた寒天培地 (1/2 B5 培地) を使用し、必要に応じて sucrose は 1% (w/v)、hygromycin は終濃度 10 mg/L、chlorsulfuron は終濃度 0.5 μM となるように添加した。培養は 22°C 恒常白色光下 ($50\sim60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で生育させた。

生殖器托誘導

生殖器官の観察は恒常白色条件に FR 補光 ($40\sim50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) して生殖器官を誘導した。生殖器官の誘導に要した日数は FR 補光開始後から生殖器托が葉状体の先端に肉眼で観察できるまでの日数を計測した。*BNB-GR/bpcU*[U] および *BNB-GR/bpcV*[V] の生殖器托の誘導は DEX 1 μM 含有 1/2 B5 培地を用いて恒常白色条件下で生殖器托を誘導した。

ゼニゴケの形質転換および形質転換体の作出

bpcU-101[UV] および *bpcU-102*[UV] の作出は Ishizaki et al., 2008 に従い F1 胞子を用いて作出した。*bpcU-3*[U] および *bpcV-1*[V]、*bpcV-2*[V]、*bpcV-3*[V] は BC3-38 および Tak-1 の葉状体を用いて作出した。*bpcU-1*[U]、*bpcU-2*[U] は Tak-2 の葉状体を用いて末次博士により作出された。G1 世代の植物組織を用いてジェノタイピングがおこなわれ、シーケンシングで変異の確認がおこなわれた。*gBPCU*[V] は Tak-1 の葉状体を用いて作出した。*gBPCU/bpcU*[U]、*gBPCV/bpcU*[U]、ドメインスワッピングおよびアミノ酸置換実験で作出された植物体は *bpcU-1*[U] の葉状体を用いて作出した。これらの葉状体を用いた形質転換は Kubota et al., 2013 に従って行われた。G1 世代の植物組織を用いてジェノタイピングがおこなわれた。*BNB-GR/bpcU*[U] および *BNB-GR/bpcV*[V] は 35Spro:*BNB-GR* ベクター (デスティネーションベクター pMpGWB314、山岡博士作製) を *bpcU-3*[U] および *bpcV-1*[V] の葉状体断片に形質転換した。

形質転換体のジェノタイピングおよび雌雄判定

ゲノム DNA は約 3 mm 四方に切断したゼニゴケ葉状体を 100 μl の Buffer A (100 mM Tris-HCl pH 9.5、1 M KCl、10 mM EDTA) で破碎して抽出された。得られたゲノム抽出液を鋳型として KOD FX NeO または KOD One Master Mix (東洋紡) を使用し PCR で増幅した。用いたプライマーセットは補足表 3 に示す。

bpc 変異体作出のためのプラスミド作製

bpcU-101[UV] および *bpcU-102*[UV]、*bpcU-3*[U]、*bpcV-1*[V]、*bpcV-2*[V]、*bpcV-3*[V] の作出のため、Sugano et al., 2018 に従って補足表 4 に示すオリゴ DNA を pMpGE_En03 にクローニングし、pMpGE010 と LR 反応し (Thermo Fisher Scientific) ベクターを作製した。*bpcU-1*[U]、*bpcU-2*[U] の作出のため、補足表 4 に示すオリゴ DNA が pMpGE_En04、

pBC-GE12、pBC-GE23、pBC-GE34にクローニングされ、4つのgRNAを含むエントリーベクターとして結合された後、pMpGE017とLR反応し (Thermo Fisher Scientific)ベクターが作製された。

BPCUおよびBPCV発現プラスミド作製

補足表5に示すプライマーセットを用いて、*BPCU*のゲノム断片 (コーディング領域の上流約2 kbpから下流3 kbp)と*BPCV*のゲノム断片 (コーディング領域の上流約2 kbpから下流2.6 kbp)をTak-2およびTak-1のゲノム抽出液を鋳型としてKOD FX NeO (東洋紡)で増幅し、pENTR/D-TOPO (ThermoFisher)にクローニングした。できたエントリーベクター (*BPCU*-gene-pENTRdTOPO、*BPCV*-gene-pENTRdTOPO)をpMpGWB101、pMpGWB301 (Ishizaki et al., 2015)とLR反応させ (Thermo Fisher Scientific)、*BCU*-gene-pMpGWB101、*BPCU*-gene-pMpGWB301、*BPCV*-gene-pMpGWB301を作製した。

ドメインスワッピング・アミノ酸置換植物体作出のためのプラスミド作製

ドメインスワッピング実験のため、補足表5に示すプライマーセットを用いて、*BPCU*-gene-pENTRdTOPOおよび*BPCV*-gene-pENTRdTOPOを鋳型として*BPCU*および*BPCV*断片をKOD One PCR Master Mix (東洋紡)で増幅した。これらの断片を、SLiCE (Motohashi, 2015)を用いて結合させてエントリーベクター (*BPCU*pro:*BPCV*-pENTRdTOPO、*BPCU*(238)V-pENTRdTOPO、*BPCV*(238)U-pENTRdTOPO、*BPCU*(272)V-pENTRdTOPO、*BPCV*(272)U-pENTRdTOPO)を作製した。アミノ酸置換実験のため、補足表5に示すプライマーセットを用いて、*BPCV*-gene-pENTRdTOPOを鋳型とし変異の入った*BPCV*断片をKOD One PCR Master Mix (東洋紡)で増幅した。また、補足表5に示すオリゴをアニーリングして変異の入った*BPCV*断片とした。これらの断片を、SLiCE (Motohashi, 2015)を用いて結合させてエントリーベクター (*BPC*(C-anc)-pENTRdTOPO、*BPCV*(4F+)-pENTRdTOPO)を作製した。*BPCV*(8F+)-pENTRdTOPOについては、*BPCV*(4F+)-pENTRdTOPOを鋳型として同様の手順で作製した。これらのエントリーベクターをGateway LR clonase II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific)を使用してpMpGWB301とLR反応させ、*BPCU*pro:*BPCV*-pMpGWB301、*BPCU*(238)V-pMpGWB301、*BPCV*(238)U-pMpGWB301、*BPCU*(272)V-pMpGWB301、*BPCV*(272)U-pMpGWB301、*BPC*(C-anc)-pMpGWB301、*BPCV*(8F+)-pMpGWB301、*BPCV*(4F+)-MpGWB301を作製した。

生殖器官および造精器・造卵器の観察

生殖器官は成熟したものを採取し、寒天培地にさして顕微鏡 (SZX16)を用いて撮影した。造卵器および造精器はスライドガラス上で生殖器官から針で掻き出し、顕微鏡 Axiophot (ZEISS)を用いて撮影した。

RNA抽出及び逆転写反応

植物体は恒常白色条件下10日目の葉状体またはstage1-2 (Higo et al., 2016)の未成熟な生殖器官 (生殖器官)を用いた。RNAはTRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて付属のプロトコルに従って抽出し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega)で37 °C15分処理した。得られたRNAの1 µg相当を95 °Cで5分間処理し、ReverTra Ace (東洋紡)、oligo(dT)20プライマーを用いて付属プロトコルに従い逆転写反応を行った。得られた

cDNA溶液は10倍希釈してRT-PCRおよびqRT-PCRに用いた。

RT-PCR・qRT-PCR

qRT-PCRはCFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories)を使用し、SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Lonza)で二本鎖DNAの合成を検知した。*EF1* (Mp3g23400)を用いて標準化し解析を行った。用いたプライマーセットは補足表6に示す。PCR反応は2ステップサイクル；95°C 30 sec, (95°C 5 sec, 60°C 30 sec)×40サイクルで行った。

RT-PCRはKOD One PCR Master Mix(東洋紡)を用いた。*PRM* (Mp3g14390)と*LC7* (Mp6g01560)は3ステップサイクル；94°C 2 min, (98°C 10 sec, 58°C 5 sec, 68°C 1 sec)×37サイクルで行われた。同様にMp5g13880およびMp7g0282は35サイクル、*EF1* (Mp3g23400)は31サイクルで行われた。用いたプライマーセットは補足表6に示す。

祖先型配列推測のためのアラインメント及び系統解析、祖先型配列の推測

図1-7で使用したコケ植物のBPC配列を翻訳し、MUSCLE programでアラインメントを作製し手動で整形した後、C末端領域のBPCドメイン領域を抽出した。この配列を用いて川村氏によりAICc criteria modeltest-ng version 0.1.7でK80+I+G4モデルが推定され、raxml-ng version 1.1.0を用いて1000回のブートストラップでコケ植物のBPCドメインの系統樹が作製された。系統樹およびアミノ酸のアラインメントはITolを用いて可視化された。コケ植物の各グループの祖先型BPCのC末端配列は川村氏によりraxml-ng version 1.1.0を用いて--ancestral functionで推測された。これにより推測された祖先型配列はlogomakerによって可視化された。

保存性の確認のためのアラインメント及びロゴの作製

図1-7で使用したコケ植物のBPC配列を翻訳し、MUSCLE programでアラインメントを作製し手動で整形したものから、BPCU型・BPCV型・蘚類とツノゴケ類の3グループごとにC末端領域のBPCドメイン領域を抽出した。それぞれのアラインメントからWebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)を用いて保存性を可視化した。

補足表

補足表1 *Feminizer*候補遺伝子として考えた栄養成長段階で発現している遺伝子

遺伝子	機能	遺伝子	機能
<i>Mapoly0017s0001</i>	核輸送受容体	<i>Mapoly0018s0001</i>	HSF転写因子
<i>Mapoly0017s0003</i>	RNA結合タンパク質 (musashi)	<i>Mapoly0018s0002</i>	ホスファターゼ
<i>Mapoly0017s0004</i>	スプライシング因子	<i>Mapoly0018s0004</i>	RNA結合タンパク質
<i>Mapoly0017s0006</i>	リボソームS6キナーゼ	<i>Mapoly0018s0006</i>	機能不明
<i>Mapoly0017s0008</i>	機能不明	<i>Mapoly0018s0007</i>	スプライシング因子
<i>Mapoly0017s0009</i>	ZIM転写因子	<i>Mapoly0018s0008</i>	Gタンパク質
<i>Mapoly0017s0011</i>	機能不明	<i>Mapoly0018s0010</i>	機能不明
<i>Mapoly0017s0012</i>	膜タンパク質	<i>Mapoly0018s0011</i>	BPC転写因子
<i>Mapoly0017s0014</i>	機能不明	<i>Mapoly0018s0014</i>	機能不明
<i>Mapoly0017s0015</i>	機能不明	<i>Mapoly0018s0015</i>	機能不明
<i>Mapoly0017s0019</i>	カルモジュリン結合様タンパク	<i>Mapoly0018s0016</i>	加水分解酵素
<i>Mapoly0017s0020</i>	RNA結合タンパク質	<i>Mapoly0018s0017</i>	カルモジュリン結合様タンパク
<i>Mapoly0017s0021</i>	プロテインキナーゼ	<i>Mapoly0018s0018</i>	DNA結合タンパク
<i>Mapoly0017s0022</i>	機能不明	<i>Mapoly0018s0020</i>	機能不明
<i>Mapoly0017s0023</i>	膜タンパク質	<i>Mapoly0018s0021</i>	CC4-NOTタンパク質
<i>Mapoly0017s0024</i>	ホスファターゼ	<i>Mapoly0018s0023</i>	メディエーター
<i>Mapoly0017s0026</i>	GYFドメインを持つタンパク質	<i>Mapoly0018s0025</i>	カチオン輸送体
<i>Mapoly0017s0028</i>	プロテインキナーゼ		

Bowman et al., 2017 の解析において葉状体で発現していることが明らかにされていたU染色体上の遺伝子をリストアップし、Blast検索で遺伝子の機能を予測した。

補足表2 *Feminizer*候補遺伝子として変異体作出を試みた遺伝子と変異体の表現型

候補遺伝子	V性染色体ホモログ	機能	変異体数	表現型
<i>Mapoly0017s0009</i>	<i>MapolyY_B0021</i>	ZIM転写因子	2	メス
<i>Mapoly0018s0001</i>	<i>MapolyY_B0005</i>	HSF転写因子	2	メス
<i>Mapoly0018s0011</i> (BPCU)	<i>MapolyY_B0017</i> (BPCV)	BPC転写因子	2	オス
<i>Mapoly0017s0003</i>	<i>MapolyY_A0025</i>	RNA結合タンパク質 (musashi)	2	メス
<i>Mapoly0017s0004</i>	<i>MapolyY_A0024</i>	スプライシング因子 (RRMドメイン)	なし	No Data
<i>Mapoly0017s0020</i>	<i>MapolyY_B0025</i>	RNA結合タンパク質	1	メス
<i>Mapoly0018s0004</i>	-	RNA結合タンパク質 (RRMドメイン)	2	メス
<i>Mapoly0018s0021</i>	<i>MapolyY_A0004</i>	RNA結合タンパク質 (RINGドメイン)	1	メス
<i>Mapoly0018s0007</i>	-	スプライシング因子 (cwfドメイン)	1	メス
<i>Mapoly0018s0023</i>	<i>MapolyY_A0045</i>	メディエーター (Med12)	なし	No Data

*Feminizer*候補遺伝子として胞子を用いて変異体作出を試みた遺伝子をまとめた。表現型の列にFR補光し生殖器官を誘導して確認できた性別を示した。

補足表3 ジェノタイピングおよび雌雄判定に用いたプライマーセット

変異の確認に用いたプライマーセット		
変異体名	プライマー名	配列(5'→3')
<i>bpcU-1</i> [U]、 <i>bpcU-2</i> [U]	X18-11 LD seqF	CATGGGTTTCAGTCGTCAAGC
	X18-11 LD seqR	ATCTATCTCAACGCGTACTAATGTCATC
<i>bpcU-101</i> [UV]、 <i>bpcU-102</i> [UV]、 <i>bpcU-3</i> [U]	X18-11.1 gRNA seqF	CGTGACCAGCAAGACACTTC
	X18-11.1 gRNA seqR	CCTTCGAGAGTGAGTTTCTCCAC
<i>bpcV-1</i> [V]、 <i>bpcV-2</i> [V]	YB-17.1 gRNA seqF	CTTGAAATAGCAATGACTGACCG
	YB-17.1 gRNA seqR	GATCGACAGGATAGTTCACGTTG
<i>bpcV-3</i> [V]	YB-17.2 gRNA seq2F	CAGTCGGTACAACGGATTGAC
	YB-17.2 gRNA seq2R	TCCCATCCACACAGCTACAAC
雌雄判定に用いたプライマーセット		
プライマー名	配列(5'→3')	
rbm27-F	ACTTTTGCAACAGCGACTTC	
rbm27-R	GCCTGCAATATAGCCTTCAA	
rhf73-F	GAACCCGAAACTCAGGTTTT	
rhf73-R	ATAACAGCCAAACGGATCAA	

補足表4 変異体作製に使用したオリゴ

変異体名	オリゴ名	配列(5'→3')
<i>bpcU-1</i> [U]、 <i>bpcU-2</i> [U]	X18-11.LDs1 gRNA F	CTCGGATAGATGTAGTCTCTCACA
	X18-11.LDs1 gRNA R	AAACTGTGAGAGACTACATCTATC
	X18-11.LDs2 gRNA F	CTCGACAACATTGGATGTGACGGC
	X18-11.LDs2 gRNA R	AAACGCCGTCACATCCAATGTTGT
	X18-11.LD3 gRNA F	CTCGTATCAACACTAACCACAA
	X18-11.LD3 gRNA R	AAACTTGTGGTTAGTGTTGATA
	X18-11.LD4 gRNA F	CTCGTACCTGTAGGATTAGAGT
	X18-11.LD4 gRNA R	AAACACTCTAATCCTACAGGTA
<i>bpcU-101</i> [UV]、 <i>bpcU-102</i> [UV]、 <i>bpcU-3</i> [U]	X18-11.1 gRNA R	AAACCCTGAGCAGAAGCTCCTG
	X18-11.1 gRNA F	CTCGCAGGAGCTTCTGCTCAGG
<i>bpcV-1</i> [V]、 <i>bpcV-2</i> [V]	YB-17.1 gRNA F	CTCGTCTGCCAATGAAGAGCGA
	YB-17.1 gRNA R	AAACTCGCTCTTCATTGGCAGA
<i>bpcV-3</i> [V]	YB-17.2 gRNA R	AAACTGCAATTGTCTATGTACG
	YB-17.2 gRNA F	CTCGCGTACATAGACAATTGCA

補足表 5 BPCU および BPCV 断片のクローニングに用いたプライマーセット

BPCU ゲノム断片のクローニングに用いたプライマーセット

プライマー名	配列(5'→3')
X18-11 genehead+2 F	CACCGTTGTA CTTCGGAGAGG TAGAGGAC
X18-11 geneback+3 R	CCTCAGGTCATTACACATGATTAATCTC

BPCV ゲノム断片のクローニングに用いたプライマーセット

プライマー名	配列(5'→3')
YB-17 genehead+2 F	CACCAACCAGCGTACATTTCCAATCTTG
YB-17 geneback+2.6 R	TTCCATACACTGCAATTTGACTCATA C

ドメインスワッピングベクターの作製に用いたプライマーセット

プライマー名	配列(5'→3')
BPCUpro:BPCV-pENTRdTOPO	
X18-11 ter F	GTCACTCTCAGATGATGATATTCGCCTATGCGACC
X18-11 pro R	CATAGACAATTGCATCTCGTCAAATAATCACTCCC
YB-17 cds(g) F	ATGCAATTGTCTATGTACGATCCAC
YB-17 cds R	TCATCTGAGAGTGACATAGCGATTTG

BPCU(238)V-pENTRdTOPO

X18-11 ter F	GTCACTCTCAGATGATGATATTCGCCTATGCGACC
X18-11 reswap3 R	ATTGGCAGAAAAGGTATGGCCTTTTCCTCGATGAC
YB-17 reswap3 F	TACCTTTCTGCCAATGAAGAGC
YB-17 cds R	TCATCTGAGAGTGACATAGCGATTTG

BPCV(238)U-pENTRdTOPO

X18-11 reswap3 F	CGAACAAAAAGATCTCCTGAGCAGAAGCTCCTGATC
X18-11 pro R	CATAGACAATTGCATCTCGTCAAATAATCACTCCC
YB-17 cds(g) F	ATGCAATTGTCTATGTACGATCCAC
YB-17 reswap3 R	AGATCTTTTGTTCGTAAGTTTCGATC

BPCU(272)V-pENTRdTOPO

X18-11 ter F	GTCACTCTCAGATGATGATATTCGCCTATGCGACC
X18-11 zinc finger down R	TGAACAATGTGGTATGGAATTGCAAATGTTTTTCATCG
YB-17 zinc finger down F	ATACCACATTGTTTCATGTACAGGTGTG
YB-17 cds R	TCATCTGAGAGTGACATAGCGATTTG

BPCV(272)U-pENTRdTOPO

X18-11 zinc finger down F	AATGTACGTTATCCTATACCCTACTGCTCATGTACTGGTG
X18-11 pro R	CATAGACAATTGCATCTCGTCAAATAATCACTCCC
YB-17 cds(g) F	ATGCAATTGTCTATGTACGATCCAC
YB-17 zinc finger down R	AGGATAACGTACATTCTCCACATATATTTCC

アミノ酸置換ベクターの作製に用いたプライマーセット・オリゴ

プライマー/オリゴ名	配列(5'→3')
BPC(C-anc)-pENTRdTOPO	
YB-17 B4rep F	CCGCTGCCGATGAATCCAAAGAAAAGGGGATCAAGGTTG
YB-17 B1rep R	ACCTGTACATGAACAGTATGGTATAGGATAACGTACATTC
YB-17 B2rep F ※1	TGTTTCATGTACAGGTGTGAACCAGCAGTGTTACAGGTGGGGCAA TGGAGGCTGGCAGTCC

YB-17 B2rep R ※1	GGACTGCCAGCCTCCATTGCCCCACCTGTAACACTGCTGGTTCACACC TGTACATGAACA
YB-17 B3rep F ※2	GGAGGCTGGCAGTCCGCTTGCTGCACTACTATGATCTCCATGTACCCG CTGCCGATGAAT
YB-17 B3rep R ※2	ATTCATCGGCAGCGGGTACATGGAGATCATAGTAGTGCAGCAAGCGGA CTGCCAGCCTCC
<hr/>	
BPCV(4F+)-pENTRdTOPO	
YB-17 R4rep F	CCTATAGATCTGAAGGATCACTGGGC
YB-17 R1-2rep R	ACTTGTAACATGGCTGCTTCACACCTGTACATG
YB-17 R1-2rep F	AGCCATGTTACAAGTGGGGCAATGGAGGCTG
YB-17 R3rep R	CCTTGAACTCCTTTTGGTTGGATTCATCGG
YB-17 R3rep F	AAAAGGAGTTCAAGGTTGGCTGGTCGC
YB-17 R4rep R	CTTCAGATCTATAGGATAGTTTCACGTTGACCCCTTC
<hr/>	
BPCV(8F+)-pENTRdTOPO	
YB-17 R4rep F	CCTATAGATCTGAAGGATCACTGGGC
YB-17 P1rep R	CTTCTCCACGAGCTTCTCAAAGCACCG
YB-17 P1-4R4rep F ※3	AAGCTCGTGGAGAAGCTTACTTTGGAAGGGGTCAACGTGAGATGCCCT ATAGATCTGAAG
YB-17 P1-4R4rep R ※3	CTTCAGATCTATAGGGCATCTCACGTTGACCCCTTCAAAGTAAGCTTC TCCACGAGCTT

※1、※2、※3 のペアはそれぞれアニーリングして使用したオリゴである。

補足表 6 qRT-PCR および RT-PCR 解析に用いたプライマーセット

qRT-PCR 解析に用いたプライマーセット		
遺伝子名	プライマー名	配列 (5'→3')
<i>EF1</i>	MpEF1-qPCR-F	AAGCCGTCGAAAAGAAGGAG
	MpEF1-qPCR-R	TTCAGGATCGTCCGTTATCC
<i>SUF</i>	SUF-qPCR-F1	CGGGCTGAGTTTCACCTTCT
	SUF-qPCR-F1	AAGCCCTGGAATCGACAAGG
<i>FGMYB</i>	MpFGMYB-qPCR-F11	ACAGGCAGTCAGTCAGACAAGG
	MpFGMYB-qPCR-R11	GAGAGTAGGGCGATCCCAAG
RT-PCR 解析に用いたプライマーセット		
遺伝子名	プライマー名	配列 (5'→3')
<i>EF1</i>	Mplg01fw	TCACTCTGGGTGTGAAGCAG
	Mplg01rv	GCCTCGAGTAAAGCTTCGTG
<i>PRM</i>	MpPRM-Fw	ATCCAGCGGCGTGAGCCAGA
	MpRPM-Rv	CGAAGAATGCGGAAGACTGA
<i>LC7</i>	MpLC7-Fw	ATGTTGACCTTGACAGAAGCCGAAG
	MpLC7-Rv	CTAGAATTCCTCGTCATCTTCTTTC
5g13880	Mapoly0032s0078-RT-Fw2	CCATATCGGTCCAGCTGCGG
	Mapoly0032s0078-RT-Rv2	TTCATCGCCTTTGCGGCCG
7g02820	Mapoly0088s0005-RT-Fw	CFACTCTGCGGAGTGCTGAC
	Mapoly0088s0005-RT-Rv	ATCTCGAGGACGCATGCGGC

引用文献

Akagi T, Henry IM, Tao R, Comai L (2014). A Y-chromosome–encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* (80-) **346**: 646–650

Allen CE (1917). A chromosome difference correlated with sex differences in sphærocarpos. *Science* (80-) **46**: 466–467

Bachtrog D (2008) The temporal dynamics of processes underlying Y chromosome degeneration. *Genetics* **179**:1513–1525

Berrie, G.K. (1960). The chromosome numbers of liverworts (Hepaticae and Anthocerotae). *Trans. Brit. Bryol. Soc.* 3, 688–705.

Bowman JL (2016). A brief history of marchantia from Greece to genomics. *Plant Cell Physiol* **57**: 210–229

Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, Jenkins J, Shu S, Ishizaki K, Yamaoka S, Nishihama R, Nakamura Y, Berger F, et al (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* **171**: 287-304.e15

Bull JJ (1978). Sex Chromosomes in Haploid Dioecy- A Unique Contrast to Muller’s Theory for Diploid Dioecy. *Am Nat* **112**: 245–250

Charlesworth B., Charlesworth D. (1978) A Model for the Evolution of Dioecy and Gynodioecy. *American Naturalist* **112**:975-997

Cheng, S., Xian, W., Fu, Y., Marin, B., Keller, J., Wu, T., Sun, W., Li, X., Xu, Y., Zhang, Y., Wittek, S., Reder, T., Günther, G., Gontcharov, A., Wang, S., Li, L., Liu, X., Wang, J., Yang, H., ... Melkonian, M. (2019). Genomes of Subaerial Zygnematophyceae Provide Insights into Land Plant Evolution. *Cell* 179(5), 1057-1067.e14.

Galloway RE, Goodenough UW (1985). Genetic analysis of mating locus linked mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **111**: 447–461

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151–158

Harkess A, Zhou J, Xu C, Bowers JE, Van Der Hulst R, Ayyampalayam S, Mercati F, Riccardi P, McKain MR, Kakrana A, et al (2017). The asparagus genome sheds light on the origin and evolution of a young Y chromosome. *Nat Commun.* doi: 10.1038/s41467-017-01064-8

Haupt G (1932). Beiträge zur Zytologie der Gattung *Marchantia* (*L.*). *Z Indukt Abstamm Vererbungsl* **62**: 367–428

Hecker A, Brand LH, Peter S, Simoncello N, Kilian J, Harter K, Gaudin V, Wanke D (2015). The Arabidopsis GAGA-binding factor BASIC PENTACYSTEINE6 recruits the POLYCOMB-REPRESSIVE COMPLEX1 component LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 to GAGA DNA motifs. *Plant Physiol* **168**: 130–141

Higo, A., Niwa, M., Yamato, K. T., Yamada, L., Sawada, H., Sakamoto, T., Kurata, T., Shirakawa, M., Endo, M., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Ishizaki, K., Nishihama, R., Kohchi, T., & Araki, T. (2016). Transcriptional framework of male gametogenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* *L.* *Plant Cell Physiol* **57**(2),325–338.

- Hisanaga T, Okahashi K, Yamaoka S, Kajiwara T, Nishihama R, Shimamura M, Yamato KT, Bowman JL, Kohchi T, Nakajima K** (2019). A cis -acting bidirectional transcription switch controls sexual dimorphism in the liverwort. *EMBO J* **38**: e100240
- Ishizaki K, Chiyoda S, Yamato KT, Kohchi T** (2008). Agrobacterium-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol* **49**: 1084–1091
- Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S., & Kohchi, T.** (2013). Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Scientific Reports* **3**, 1532.
- Ishizaki K, Nishihama R, Ueda M, Inoue K, Ishida S, Nishimura Y, Shikanai T, Kohchi T** (2015). Development of gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS One* **10**: 1–13
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., & Kikuchi, K.** (2012). A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*, **8**(7).
- Kooiker M, Airoidi CA, Losa A, Manzotti PS, Finzi L, Kater MM, Colombo L** (2005). Basic Pentacysteine1, a GA binding protein that induces conformational changes in the regulatory region of the homeotic Arabidopsis gene Seedstick. *Plant Cell* **17**: 722–729
- Kubota A, Ishizaki K, Hosaka M, Kohchi T** (2013). Efficient Agrobacterium -Mediated Transformation of the Liverwort *Marchantia polymorpha* Using Regenerating Thalli. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**: 167–172
- Larney C, Bailey TL, Koopman P** (2014). Switching on sex: Transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Dev* **141**: 2195–2205
- Li, F. W., Nishiyama, T., Waller, M., Frangedakis, E., Keller, J., Li, Z., Fernandez-Pozo, N., Barker, M. S., Bennett, T., Blázquez, M. A., Cheng, S., Cuming, A. C., de Vries, J., de Vries, S., Delaux, P. M., Diop, I. S., Harrison, C. J., Hauser, D., Hernández-García, J., ... Szövényi, P.** (2020). Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nature Plants*, **6**(3), 259–272.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C. E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M.** (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417**(6888), 559–563.
- Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau EL, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Nagahama Y** (2007). DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 3865–3870
- Meister RJ, Williams LA, Monfared MM, Gallagher TL, Kraft EA, Nelson CG, Gasser CS** (2004). Definition and interactions of a positive regulatory element of the Arabidopsis Inner No Outer promoter. *Plant J* **37**: 426–438
- Monfared MM, Simon MK, Meister RJ, Roig-Villanova I, Kooiker M, Colombo L, Fletcher JC, Gasser CS** (2011). Overlapping and antagonistic activities of *BASIC PENTACYSTEINE* genes affect a range of developmental processes in Arabidopsis. *Plant J* **66**: 1020–1021

- Motohashi, K.** (2015). A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnology*, 15(1).
- Muller HJ** (1914). A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*. *J Exp Zool* 17:325–336
- Murase K, Shigenobu S, Fujii S, Ueda K, Murata T, Sakamoto A, Wada Y, Yamaguchi K, Osakabe Y, Osakabe K, et al** (2017). MYB transcription factor gene involved in sex determination in *Asparagus officinalis*. *Genes to Cells* 22: 115–123
- Otto, S. P.** (2009). The evolutionary enigma of sex. *American Naturalist*, 174 Suppl 1:S1–S14.
- Sangwan I, O'Brian MR** (2002). Identification of a soybean protein that interacts with GAGA element dinucleotide repeat DNA. *Plant Physiol* 129: 1788–1794
- Santi L, Wang Y, Stile MR, Berendzen K, Wanke D, Roig C, Pozzi C, Müller K, Müller J, Rohde W, et al** (2003). The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*. *Plant J* 34: 813–826
- Sean A. Montgomery, Yasuhiro Tanizawa, Bence Galik, Nan Wang, Tasuku Ito, Takako Mochizuki, Svetlana Akimcheva, John Bowman, Valérie Cognat, Laurence Drouard, ... Frédéric Berger** (2020) Chromatin organization in early land plants reveals an ancestral association between H3K27me3, transposons, and constitutive heterochromatin. *Curr. Biol.* 30, 573–588.e7.
- Shimamura, M.** (2016). *Marchantia polymorpha*: Taxonomy, phylogeny and morphology of a model system. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 230–256.
- Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T** (2014). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* 55: 475–481
- Theune ML, Bloss U, Brand LH, Ladwig F, Wanke D** (2019). Phylogenetic analyses and GAGA-motif binding studies of BBR/BPC proteins lend to clues in GAGA-MOTIF recognition and a regulatory role in brassinosteroid signaling. *Front Plant Sci* 10: 1–20
- Wanke D, Hohenstatt ML, Dynowski M, Bloss U, Hecker A, Elgass K, Hummel S, Hahn A, Caesar K, Schleifenbaum F, et al** (2011). Alanine zipper-like coiled-coil domains are necessary for homotypic dimerization of plant GAGA-factors in the nucleus and nucleolus. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0016070
- Xiao J, Jin R, Yu X, Shen M, Wagner JD, Pai A, Song C, Zhuang M, Klasfeld S, He C, et al** (2017). Cis and trans determinants of epigenetic silencing by Polycomb repressive complex 2 in *Arabidopsis*. *Nat Genet* 49: 1546–1552
- Yamaoka Shohei, Ryuichi Nishihama, Yoshihiro Yoshitake, Sakikoishida, Keisuke Inoue, Misaki Saito, Keitaro Okahashi, Haonan Bao, Hiroyuki Nishida, Katsuyuki Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Kimitsune Ishizaki, Katsuyuki T. Yamato TK** (2018). Generative Cell Specification Requires Transcription Factors Evolutionarily Conserved in Land Plants. *Curr Biol* 1–8
- Yamato KT, Ishizaki K, Fujisawa M, Okada S, Nakayama S, Fujishita M, Bando H, Yodoya K, Hayashi K, Bando T, et al** (2007). Gene organization of the liverwort Y chromosome reveals distinct sex chromosome evolution in a haploid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6472–6477

謝辞

本研究は京都大学大学院生命科学研究科遺伝子特性学分野にて行われました。指導教員である河内孝之教授には本研究に従事させていただく機会を与えていただくとともに、長年にわたり多くのご指導とご鞭撻を賜りました。心より御礼申し上げます。山岡尚平准教授(京都大学生命科学研究科)、福澤秀哉教授(京都大学生命科学研究科)には副指導教員としてご指導いただきました。深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くの方々のご協力を頂きました。オーストリア Gregor Mendel InstituteのSean A. Montgomery博士(現Centre for Genomic Regulation, Barcelona)、Frédéric Berger博士にはクロマチンアセンブリを行っていただき、CUT&RUNによるヒストン修飾状況の実験・解析にもご協力いただきました。オーストラリア モナシュ大学のShilpi Singh氏、John L. Bowman博士にはコケ植物を中心とした多数のBPC配列の収集とBPC全長の系統樹を作成していただきました。ドイツ ミュンヘン・ルートヴィヒ=マクシミリアン大学のDierk Wanke博士と、橋本研志助教、朽津和幸教授(東京理科大学理工学部応用生物科学科)にはBPCU・BPCVのDNA結合実験をおこなっていただきました。谷澤靖洋助教(国立遺伝学研究所)、Chang Liu博士(ドイツ ホーエンハイム大学)、大和勝幸教授(近畿大学生物理工学部)にはクロマチンアセンブリを行っていただきました。国立遺伝学研究所の矢倉勝博士、望月孝子氏、坂本美佳博士、谷澤靖洋助教、中村保一教授にはゲノムデータベースの構築とアノテーションを行っていただきました。深く御礼申し上げます。

末次憲之教授(現東京大学大学院総合文化研究科教授)には当研究室ご在籍中に**bpCU**変異体を作成していただきました。吉竹良洋助教にはCUT&RUNによるヒストン修飾状況の実験を行っていただきました。お二人には実験を進める上で大変有用なアドバイスもいただきました。川村昇吾氏にはBPCドメインの系統樹の作成と祖先型配列の推定をおこなっていただき、ヒストン修飾状況やRNA-seqデータの解析にもご助力いただきました。梶原智明氏にはヒストン修飾状況およびRNA-seqデータの解析をしていただき、RT-PCRのデータ取得にもご協力いただきました。山岡尚平准教授(京都大学生命科学研究科)にも多くの実験指導やご助言を賜りました。心より御礼申し上げます。また、安居佑季子准教授には論文執筆の際に多くのご指導とご提言をいただきました。西浜竜一教授(現東京理科大学理工学部教授)、荒木崇教授(京都大学生命科学研究科)には様々なご助言をいただきました。深く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究がおこなわれた遺伝子特性学分野の皆様には研究生生活を通じて多くのご支援、ご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Miyuki Iwasaki, Tomoaki Kajiwara, Yukiko Yasui, Yoshihiro Yoshitake, Motoki Miyazaki, Shogo Kawamura, Noriyuki Suetsugu, Ryuichi Nishihama, Shohei Yamaoka, Dierk Wanke, Kenji Hashimoto, Kazuyuki Kuchitsu, Sean A. Montgomery, Shilpi Singh, Yasuhiro Tanizawa, Masaru Yagura, Takako Mochizuki, Mika Sakamoto, Yasukazu Nakamura, Chang Liu, Frédéric Berger, Katsuyuki T. Yamato, John L. Bowman, Takayuki Kohchi

Identification of the sex-determining factor in the liverwort *Marchantia polymorpha* reveals unique evolution of sex chromosomes in a haploid system.

Current Biology 31(24) 5522-5532.e7. December 2021