

令和元年9月2日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07588

研究課題名(和文) イチゴの2倍体及び8倍体種における分子細胞遺伝学的手法によるゲノム再編の検出

研究課題名(英文) Detection of genomic rearrangement in diploid and octoploid strawberries revealed by molecular cytogenetic techniques

研究代表者

木庭 卓人 (Koba, Takato)

千葉大学・大学院園芸学研究科・名誉教授

研究者番号：40170302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イチゴの染色体マーカーの開発、ゲノム組成の解明を目的として、野生二倍体イチゴのBACクローンを用いて、BAC-FISH法により、染色体を識別するための染色体マーカーを開発し、八倍体栽培イチゴのゲノム組成を明らかにした。まず、栽培イチゴの起源となった2種の二倍体イチゴにおいて、その前中期染色体による核型を決定した。次に、BAC-FISH法によりBACクローンを各染色体に位置付けた。これにより、遺伝子連鎖群と染色体との関係を決定することができた。さらに2種の二倍体種のゲノムDNAをプローブとしてGISHを行ったところ、起源種のゲノム染色体間で再編成が生じていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、分子細胞遺伝学的手法により倍数性植物のゲノム構成を明らかにすることが可能となった。本研究では、多様な倍数性を包含するイチゴ属において染色体標識を開発するとともに、倍数性に伴うゲノムの変異を明らかにした。その結果、倍数種においては染色体数は規則的に倍加しているものの、異なるゲノム染色体間で大きな再編成が生じ、その染色体組成は大きく変化していた。これは、倍数性植物の進化過程におけるゲノムのダイナミックな変化の可能性を示唆している。本研究は、開発した染色体標識の方法を用いることにより倍数性栽培イチゴと野生イチゴの染色体の同祖関係を明らかにし、有用遺伝子の効率的な導入に道を開くものである。

研究成果の概要(英文)：The species in the genus *Fragaria* diversified into various ploidy levels, i. e. diploid to decaploid. However, karyotypes of these species have not been determined yet because of small sizes of their chromosomes. In the present investigation, karyotypes of two diploid species, *F. vesca* and *F. iinumae*, which are thought to be the ancestors of the present cultivated octoploid strawberry *F. × ananassa*, were clarified using pro-metaphase chromosomes and by means of BAC-FISH analysis. Application of BAC-FISH to *F. × ananassa* suggested chromosome rearrangements due to discrepancies of signal numbers from the expected eight signals. GISH analysis applied to *F. × ananassa* with the probes of genomic DNAs of the two diploid species showed wide range of rearrangements among the chromosomes, suggesting the flexibility of strawberry genomes in the process of evolution, namely, hybridization and polyploidization from diploid to octoploid.

研究分野：遺伝学、細胞遺伝学

キーワード：ゲノム 染色体 倍数性 BAC FISH GISH 染色体マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

栽培八倍体イチゴ(*Fragaria ×ananassa*)は野生型八倍体イチゴ *F. chiloensis* と同じく八倍体の *F. virginiana* との雑種起源であることが判明している(Staudt 2009)。しかし、その二倍体起源種の特定は不明確であり、*F. vesca* と *F. iinumae* が関与していることが推定されている(Davis 2006, Hirakawa et al. 2013)。これまでの分子遺伝学的解析によれば、二倍体の系統分化あるいは倍数体の形成段階においてかなりのゲノム再編成が生じた可能性が指摘されている(Chen et al. 2006, Chester et al. 2011, Liu et al. 2011)。一方、染色体の小さな植物において、その核型を明らかにする手法として、前中期染色体を用い、ヘテロクロマチンの凝縮度の違いを利用した核型分析法が開発され(Kato et al. 2009)、多くの植物で解析が行われてきた(Akasaka et al. 2002, Akasaka et al. 2003, Ito et al. 2000, Ohmido et al. 2013, Sato et al. 2008)。

2. 研究の目的

本研究では、イチゴの野生二倍体種において、前中期染色体を用いたヘテロクロマチンの分布による核型分析と、各染色体を標識する DNA 配列 (BAC クローン) を用いた FISH 法により染色体とゲノム解析による連鎖群との関係を明らかにする。また、八倍体栽培種において、FISH 法による BAC クローンの位置付けと二倍体種のゲノム DNA を用いた GISH 法により、ゲノム再編成の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 二倍体種における核型分析と染色体標識の開発

イチゴの二倍体種である *F. vesca* と *F. iinumae* の根端分裂組織から体細胞分裂前中期染色体標本を作製した。染色体解析ソフトウェア CHIAS IV (Kato et al. 2009) を用いて核型分析を行った。二倍体種の FISH 解析ではプローブとして 5SrDNA、45SrDNA、及び *F. vesca* のゲノム解析で明らかとなった連鎖群ごとに作成された BAC クローンを使用した。

(2) 倍数性進化の過程における染色体変異の検出

八倍体イチゴである *F. ×ananassa* における同祖関係の同定とゲノム再編成の検出を行った。*F. vesca* の BAC クローンの染色体上への位置づけを八倍体イチゴである *F. ×ananassa* に適用した。また、*F. vesca* と *F. iinumae* のゲノム DNA をプローブとして GISH を行った。

4. 研究成果

(1) 二倍体種における核型分析と染色体標識の開発

まず、FISH に用いる BAC クローンの選抜を行った。*F. vesca* で作成された連鎖地図のうち、7つの連鎖群それぞれについて両端にシグナルが検出できるように、計 22 の BAC クローンを選抜した。しかし、そのうち 12 のクローンは不特定多数の染色体上にシグナルが出たため、最終的に 10 個の BAC クローンを使用した。*F. vesca* において BAC-FISH を行ったところ各 BAC クローンについて 1 対 2 本の中期染色体上に明瞭なシグナルを検出することができた。また、同じ BAC クローンを用いて *F. iinumae* で BAC-FISH を行ったところ、同様に 1 対 2 本の染色体上に明瞭なシグナルを検出することができた(図 1)。これにより、それぞれの種において、7 対の染色体を識別することが可能となった。

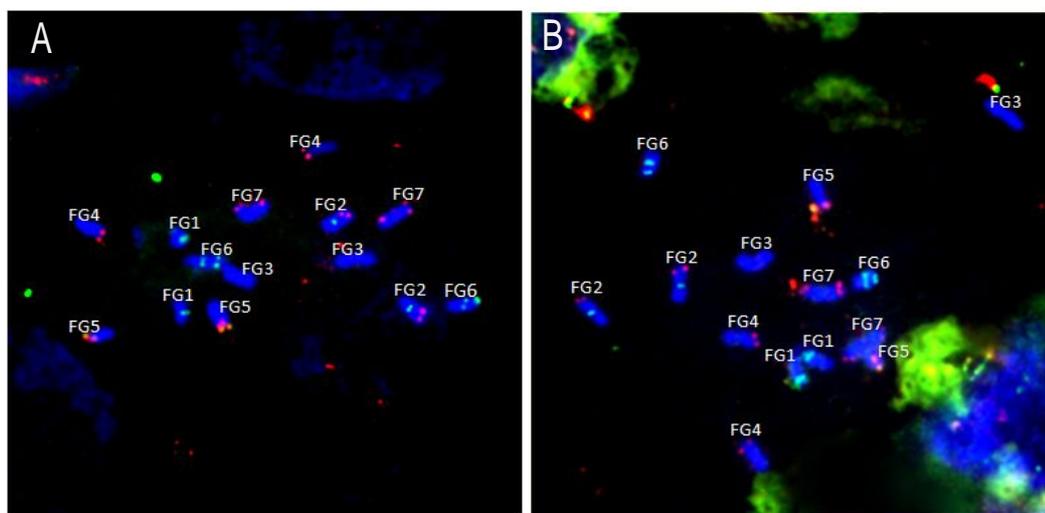


図 1 .*Fragaria vesca* の連鎖群特異的 BAC クローンを用いた中期染色体の識別。(A) *F. vesca*、(B) *F. iinumae*。 FG1~7 は BAC クローンが由来する連鎖群 1~7 を示す。

次に、*F. vesca*と*F. iinumae*の2種において、染色体の識別が可能な前中期染色体にBAC-FISHを適用し、核型と連鎖群の対応関係の決定を試みた。同じBACクローンをを用いたため、同祖染色体のイデオグラムの比較が可能である(図2)。それぞれの同祖染色体と考えられる染色体において、2種の間で染色体の長さ、短腕・長腕の比、クロマチンの凝縮の度合いに違いがあることが明らかとなった。

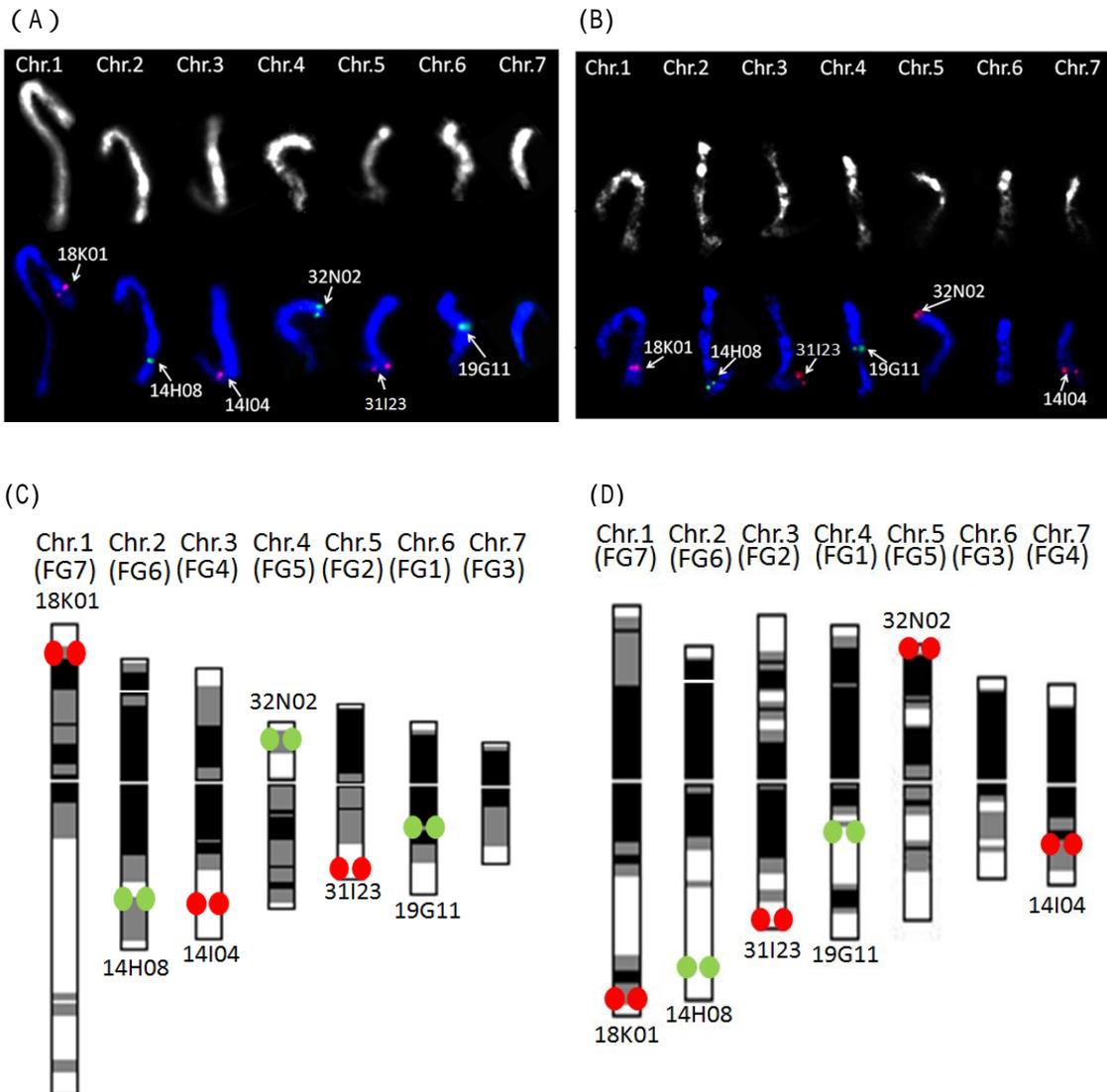


図2 . 二倍体野生イチゴ *Fragaria vesca* (A, C)と *F. iinumae* (B, D)の前中期染色体核型とBAC-FISH法による *F. vesca* のBACクローンのそれぞれの染色体上への位置付け(A, B)とイデオグラム(C, D)。Chr.1~7はそれぞれの種において染色体長の大きい順に命名。矢印で示す記号は *F. vesca* のBACクローン名を示す。

(2) GISH及びBAC-FISHによる八倍体栽培イチゴにおける染色体再編成の検出

八倍体栽培イチゴ *F. ×ananassa* のゲノム構成を明らかにするため、*F. vesca*と*F. iinumae*のゲノムDNAをプローブとしてGISHを行った。その結果、*F. ×ananassa*の染色体全体に渡ってモザイク状にシグナルが検出された(図3)。シグナルの多くは、重複されて検出されたが、部分的に*F. vesca*と*F. iinumae*のそれぞれにユニークな領域が見られた。また、極一部にシグナルが検出されない領域、すなわち *F. ×ananassa* にユニークな領域も見られた。

次に、*F. vesca*のBACクローンをを用いて、*F. ×ananassa*でBAC-FISHを行ったところ、八倍体に期待される8つのシグナルが見られたクローンがあったが、6つから14のシグナルが検出された。また、それぞれのシグナルにおいては蛍光強度に差異が見られた。

これらのことは、栽培イチゴが八倍体として形成される過程において、二倍体種間の交雑の後、染色体部分の欠失、重複、転座等の染色体のマクロな構造変異とともに、DNAレベルでのミクロな構造変異が生じたことを示唆している。

植物の倍数性による進化については、基本染色体数を基本とする倍数性によるところが大きいことはすでに知られている。しかし、その過程において染色体はダイナミックに変化してい

ることが本研究により示された。このことは、栽培植物の育種において野生植物から有用遺伝子を導入する際の有用な情報となりうる。

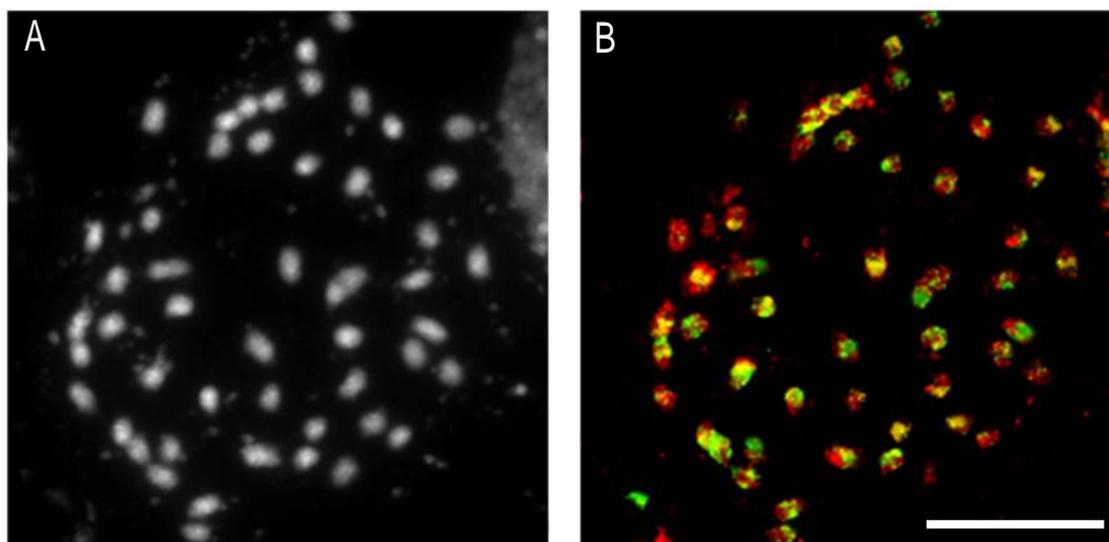


図3 . 八倍体栽培イチゴ *F. xananassa* における GISH 像。(A) DAPI 染色による体細胞中期染色体像。(B) *F. vesca*(赤色)と *F. iinumae*(黄色)をプローブとした GISH 画像。緑色は *F. vesca*(赤色)と *F. iinumae*(黄色)のゲノム DNA が混在していることを示す。バーは 10 μ m を示す。

<引用文献>

Akasaka, M., Ueda, Y. and Koba, T. (2002) Karyotype analyses of five wild rose species belonging to septet A by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Sci.* 6:17-26

Akasaka, M., Ueda, Y. and Koba, T. (2003) Karyotype analyses of wild rose species belonging to septets B, C, and D by molecular cytogenetic method. *Breed. Sci.* 53:177-182

Chen Z. J. and Ni, Z. (2006) Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays* 28:240-252

Chester, M., Gallagher, J., Symonds, V. V., da Silva, A. V. C., Mavrodiev, E. V., Leitch A. R., Soltis, P. S. and Soltis, D. E. (2011) Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:1176-1181

Davis, T. M., DiMeglio, L. M., Yang, R., Styan, S. M. N. and Lewers, K. S. (2006) Assessment of SSR marker transfer from the cultivated strawberry to diploid strawberry species: functionality, linkage group assignment and use in diversity analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131:506-512

Hirakawa, H., Shirakawa, K., Kosugi, S. et al. (2013) Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genome of *Fragaria* species. *DNA Res.* 20:1-13

Ito, M., Ohmido, N., Akiyama, Y., Fukui, K. and Koba, T. (2000) Characterization of spinach chromosomes by condensation patterns and physical mapping of 5S and 45S rDNAs by FISH. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125:59-62

Kato, S., Ohmido, N., Hira, M., Kataoka, R. and Fukui, K. (2009) Image analysis of small plant chromosomes by using an improved system, CHIAS IV. *Chromosome Sci.* 12:43-50

Liu, B. and Davis, T. M. (2011) Conservation and loss of ribosomal RNA gene sites in diploid and polyploid *Fragaria* (Rosaceae). *BMC Pl. Biol.* 11:157-170

Staudt, G. (2009) Strawberry biogeography, genetics and systematic. *Acta Hort.* 842:71-84

Ohmido, N., Shimura, A., Kato, S., Isobe, S. and Tabata, S. (2013) Kudzu (*Pueraria*

lobate Ohwi) karyotyping using FISH and Chromosome Image Analysis System IV. Chromosome Sci. 16:17-21

Sato, H., Kurozumi, K. and Koba, T. (2008) Karyotype analysis of a Japanese cucumber cultivar by fluorescence *in situ* hybridization. Chromosome Sci. 10:65-69

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Wibowo, A., Setiawan, A. B., Purwanto, A., Kikuchi, S. and Koba, T.: Cytological variation of rRNA genes and subtelomeric repeat sequences in Indonesian and Japanese cucumber accessions. Chromosome Science 査読有 Vol. 21, No.2-4, pp. 67-73, 2018

Setiawan, A. B., Teo, C. H., Kikuchi, S., Sassa, H., Kato, K. and Koba, T.: Cytogenetic variation among *Cucumis* accessions revealed by fluorescence *in situ* hybridization using ribosomal RNA genes as the probes. Chromosome Science 査読有 Vol. 21, No.2-4, pp. 81-87, 2018

Setiawan, A. B., Teo, C. H., Kikuchi, S., Sassa, H., Kato, K. and Koba, T.: An improved method for inducing prometaphase chromosomes in plants. Molecular Cytogenetics 査読有 Vol. 11, 32, 2018, <https://doi.org/10.1186/s13039-018-0380-6>

〔学会発表〕(計3件)

木庭卓人 コムギと園芸植物の細胞遺伝学 日本育種学会 2018

Koba, T. Molecular cytogenetics and genome science of plants. BIT 's 2nd annual International Congress of Genetics, Xi 'an, 2017

Koba, T., Nagayama, I., Kikuchi, S. and Sassa, H. Chromosome discrimination in diploid *Fragaria vesca* and *F. iinumae* by BAC-FISH technique and its application to octoploid strawberry *F. x ananassa*. The 21st International Chromosome Conference, Foz do Uguacu, Brasil, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

研究分担者氏名: 菊池真司

ローマ字氏名: Kikuchi, Shinji

所属: 千葉大学

部局: 大学院園芸学研究科

職名: 准教授

研究者番号: 80457168

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。