

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：14403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20780240

研究課題名（和文） 植物における混数性（mixoploidy）のエピジェネティクス

研究課題名（英文） Epigenetics of plant mixoploidy

## 研究代表者

鈴木 剛（SUZUKI GO）

大阪教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：10314444

研究成果の概要（和文）：混数性現象が遺伝することが明らかになっている形質転換タバコを用いて、免疫染色などの細胞遺伝学的解析により染色体レベルで DNA メチル化やヒストン修飾程度を比較した。さらに、BAC クローンを利用して FISH や塩基配列を解析することにより、混数性染色体のゲノム特性を調べた。これらの解析から、染色体レベルや DNA レベルでの混数性タバコのエピジェネティックな状態を明らかにし、混数性を生み出すメカニズムについて考察した。

研究成果の概要（英文）：We showed that mixoploidy is inherited in the transgenic tobacco, and analyzed epigenetic status at a chromosomal level. We also performed FISH and sequencing analyses of mixoploid plants with tobacco BAC clones. From these analyses, we discussed the mechanisms of producing mixoploidy in the tobacco, which might be related to the epigenetic status at chromosomal and DNA levels.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：遺伝子・染色体工学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物細胞を培養したときに生じるソマクローナル変異は、植物育種分野で影響力が高いが、その分子機構はよく分かっていない。培養過程で変異する原因としては、トランスポゾンの活性化やゲノム全体のメチル化パターンの変化することが報告されている。

(2) ソマクローナル変異の一つとして、染色体数の変異も知られており、薬培養などで

様々な染色体数の細胞が混在する個体が再生されることが報告されている。このような混数性（mixoploidy）は、細胞遺伝学的にもきわめて面白い現象であるが、そのメカニズムについては全く分かっておらず、分子レベルで解析した例もない。

(3) 申請者は、コムギレトロトランスポゾン様配列を導入したタバコにおいて、混数性を示す形質転換体（9-1 系統）を見出した。研

究を開始した当初、この混数性は遺伝することが明らかとなっていた。

## 2. 研究の目的

(1) 混数性を引き起こしている要因を探るため、9-1 系統においてゲノムのメチル化程度やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化が染色体レベルでどのように生じているかを、細胞遺伝学的アプローチにより明らかにする。

(2) タバコの BAC クローンを利用して、FISH 解析や塩基配列解析を行い、混数性とゲノム構成の関連を明らかにする。

(3) サザン分析や Bisulfite sequence 解析などにより、DNA レベルのエピジェネティックな変化や遺伝子発現の変化が混数性個体でどのように起こっているかを調べる。

## 3. 研究の方法

(1) タバコ染色体をメチル化感受性制限酵素で消化したプレパレートを作成し、混数性 9-1 系統とコントロール SR1 の in-situ nick translation 法を行った。また、5 メチルシトシン抗体・H3K4me2 抗体・H3K9me2 抗体を用いてタバコ染色体上に免疫染色を行った。

(2) タバコ (SR1) を材料に用いて高分子量 DNA を調整し、BAC ライブラリーを作成した。それらのクローンを用いて BAC FISH を行い、また塩基配列を決定することでゲノム特性を明らかにした。

(3) 混数性 9-1 系統とコントロール SR1 のタバコゲノムをメチル化感受性制限酵素で消化してトランスポゾン配列などをプローブに用いてサザン分析を行った。また、Bisulfite sequence 解析を行い、DNA レベルのメチル化を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 本研究では、in-situ nick translation 法をタバコ根端分裂細胞に適用することができ、混数性個体と正常個体のメチル化程度の差を染色体レベルで検出することができた。また、5 メチルシトシン抗体を用いた免疫染色解析にも成功した。ヒストン修飾についても、H3K4me2(ユークロマチン化傾向を示す)と H3K9me2(ヘテロクロマチン化傾向を示す)に対する抗体を併用し、検出シグナルを数値化することにより、混数性個体のヘテロクロマチン化傾向度を明らかにすることができた。このように、細胞遺伝学的アプローチを用いて混数性個体のエピジェネティックな変化を明らかにした。これらの結果を総

合すると、染色体レベルでのエピジェネティックな状態の差は、混数性個体と正常個体の間で比較的小さいことが分かった。

(2) タバコの BAC ライブラリーを作成し、無作為に選んだ BAC クローンをプローブに用いて BAC FISH を行うことにより、S ゲノム・T ゲノム特異的な BAC クローンを選抜できた。これらのクローンについて次世代シーケンスにより塩基配列を決定した。また、S ゲノム・T ゲノム特異的な BAC FISH により、混数性個体のゲノム特性を調べたところ、混数性の染色体に S または T ゲノムへの偏りは見られないことが分かった。

(3) タバコで活性のあると言われているトランスポゾン配列のメチル化程度は、サザン分析レベルでは差を検出できなかった。しかしながら、アクチン遺伝子について Bisulfite sequence でシトシンのメチル化を調べることができたので、今後は、より多くの遺伝子についてメチル化を調べることが重要である。そのための遺伝子選抜を目的として、マイクロアレイ実験を行い、混数性個体とコントロール個体で遺伝子発現に差のある遺伝子を抽出することができた。

このように、本研究を通して、混数性個体におけるエピジェネティックな変化を染色体レベル・DNA レベルで解析することができ、様々な基礎的知見を集めることができた。

## 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 11 件)

- ① 鈴木剛 (2008) 大きな植物染色体上で DNA を光らせる挑戦. 生物の科学・遺伝 62: 73-77. 査読無
- ② Jakse, J., Meyer, J.D.F., Suzuki, G., McCallum, J., Cheung, F., Town, C.D. and Havey, M.J. (2008) Pilot sequencing of onion genomic DNA reveals fragments of transposable elements, low gene densities, and significant gene enrichment after methyl filtration. Mol. Genet. Genomics 280: 287-292. 査読有
- ③ Suwabe, K., Suzuki, G., Takahashi, H., Shiono, K., Endo, M., Yano, K., Fujita, M., Masuko, H., Saito, H., Fujioka, T., Kaneko, F., Kazama, T., Mizuta, Y., Kawagishi-Kobayashi, M., Tsutsumi, N., Kurata, N., Nakazono, M. and Watanabe, M. (2008) Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM)

microarray. Plant Cell Physiol. 49: 1407-1416. 査読有

- ④ Imazawa, T., Suzuki, G., Nakano, A., Yamamoto, M., and Mukai, Y. (2009) Visualization of multiple T-DNA loci by FISH on extended DNA fibers. Plant Biotech. 26: 421-425. 査読有
- ⑤ Suzuki, G. (2009) Recent progress in plant reproduction research: the story of the male gametophyte through to successful fertilization. Plant Cell Physiol. 50: 1857-1864. 査読有
- ⑥ Wada, N., Kajiya, S., Akiyama, Y., Kawakami, S., No, D., Uchiyama, S., Otani, M., Shimada, T., Nose, N., Suzuki, G., Mukai, Y., and Fukui, K. (2009) Bioactive beads-mediated transformation of rice with large DNA fragments containing Aegilops tauschii genes. Plant Cell Rep. 28: 759-768. 査読有
- ⑦ Suzuki, G., Shiomi, M., Morihana, S., and Mukai, Y. (2010) Characterization of CDC48 in Allium cepa. Chromosome Sci. 13: 27-29. 査読有
- ⑧ Suzuki, G., Shiomi, M., Morihana, S., Yamamoto, M., and Mukai, Y. (2010) DNA methylation and histone modification in onion chromosomes. Genes Genet. Syst. 85: 377-382. 査読有
- ⑨ Nagaki, K., Shibata, F., Suzuki, G., Kanatani, A., Ozaki, S., Hironaka, A., Kashihara, K., and Murata, M. (2011) Coexistence of NtCENH3 and two retrotransposons in tobacco centromeres. Chromosome Res. 19: 591-605. 査読有
- ⑩ Suzuki, G., Wada, H., Goto, H., Nakano, A., Oba, H., Deno, T., Rahman, S., and Mukai, Y. (2011) Transgenic rice plants harboring the grain hardness-locus region of Aegilops tauschii. Plant Cell Rep. 30: 2293-2301. 査読有
- ⑪ Suzuki, G., Ogaki, Y., Hokimoto, N., Xiao, L., Kikuchi-Taura, A., Harada, C., Okayama, R., Tsuru, A., Onishi, M., Saito, N., Do, G.S., Lee, S.H., Ito, T., Kanno, A., Yamamoto, M., and Mukai, Y. (2012) Random BAC FISH of monocot plants reveals differential distribution of repetitive DNA elements in small and large chromosome species. Plant Cell Rep. 31: 621-628. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Suzuki, G., Tsujii, Y., Miwa, M., Saito, Y., Imazawa, T., Nakano, A., Yamamoto M. and Mukai, Y. (2008)

Mixoploidy in transgenic tobacco. 3rd Asian Chromosome Colloquium, Osaka, Japan, 2008-12-1.

- ② 佐々井直人, 斉藤優, 三輪美佳, 辻井由香, 鈴木剛 (2009) 形質転換タバコに見られる混数性. 第60回染色体学会年会, 松江, 2009-11-12.
- ③ 長岐清孝, 柴田洋, 鈴木剛, 村田稔 (2010) タバコ動原体由来BACの塩基配列解析によるタバコ動原体特異的反復配列の同定. 第61回染色体学会年会, 船橋, 2010-11-7.

[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:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 剛 (SUZUKI GO)  
大阪教育大学・教育学部・准教授  
研究者番号: 10314444

### (2)研究分担者

なし ( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

なし ( )

研究者番号: