

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570122

研究課題名(和文)植物の染色体サイズの変化に起因するDNAの解析

研究課題名(英文)DNA analysis for chromosome size changing in plant

研究代表者

星 良和 (Hoshi, Yoshikazu)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：70332088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物は異例で2000倍もの幅広いゲノムサイズレンジを示す。広いゲノムレンジをもつ種は、キク科、マメ科、ユリ科、イネ科などのいくつかの科に限られている。しかしながら、食虫植物であるモウセンゴケ科は歴史的にたった4属しかないが、小さい染色体から巨大染色体をもち、ゲノムサイズのバリエーションも高い。そこで、キク科シオン属ならびに食虫植物モウセンゴケ属を材料に、染色体サイズの減少がどのようにして生じたのかを調査し、これに關する配列を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Angiosperms show unusually wide range of genomes size with nearly 2,000-fold. The largest DNA amount measured is found in *Fritillaria* species (Liliaceae) with about 130 pg (130,000 Mbp) in the genome, possessing gigantic chromosomes with 10 to 20 μ m. In contrast, the smallest genome is recently found in two carnivorous plant species of *Genlisea* (Lentibulariaceae) with just 0.06 pg (63 Mbp). The plant groups with wide genome ranges are restricted to some large families such as Asteraceae, Fabaceae, Liliaceae, Orchidaceae and Poaceae. Whereas sundew carnivorous plant group, the Droseraceae and its closely related family Drosophyllaceae, show unexpectedly high genome size variation with tiny to giant chromosomes. New insight was obtained after analyzing large (L-type) and small (S-type) chromosome sets in the genome composition in *Aster* (Asteraceae) and *Drosera* (Droseraceae).

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性、分類

キーワード：種分化 染色体

1. 研究開始当初の背景

種分化と染色体進化が大きく関連している被子植物の中で、各染色体の形態(動原体の位置や二次狭窄の有無)、すなわち核型がほとんど変わることなくサイズのみが大幅に異なっているゲノムセットをもつ種およびその近縁種が知られている。

シオン属(*Aster*)は、これまでに種分化及び核型進化の解析のため、染色体を用いた詳細な比較研究が数多くされている。本属の中のヨメナ節は、瘦果の冠毛が短いという形態的特徴をもつことから別属(*Kalimeris*: ヨメナ属)として区別されることもあり、染色体核型でも特徴的であることが知られている(以下ヨメナ属と称する)。日本に分布するヨメナ属植物は、他のシオン属(以下狭義としてシオン属と称する)植物と比べて明らかに小さな染色体を持ち、近縁と考えられるシロヨメナと比較すると、その染色体サイズは約半分で、核型は相似的であることが示されている。これまでのシオン属の研究では、以下のことが明らかになっている。

(1) 葉緑体 DNA を使った分子系統解析と染色体による細胞遺伝学的解析により、ヨメナ属の小型の染色体(Sタイプ)がシオン属の大型の染色体(Lタイプ)よりも派生的であることが示された。

(2) フローサイトメトリーを用いた DNA 量測定の結果から、染色体サイズ変化の要因として想定されていた仮説のうち、染色体凝縮差異によるサイズ変化ではなく、染色体を構成する DNA 自体が減少しているという仮説を強く支持した。

(3) シオン属に含まれるノコンギクは、LSタイプ染色体を持つ異質四倍体であり、この倍数体植物のゲノム構成をゲノミック *in situ* hybridization (GISH) 法により調べた結果、36本の染色体のうち、18本のLタイプ染色体にはシロヨメナ(Lタイプ)核ゲノムのプローブがハイブリダイズし、残り18本のSタイプ染色体にはユウガギク(Sタイプ)核ゲノムのプローブがハイ

ブリダイズした。このことからノコンギク(LSタイプ)はシロヨメナとユウガギクの交雑を起源とする複二倍体種であることを支持した。これに対し、モウセンゴケ属は、1960年代から先駆的に染色体の研究が行われ、本属のコモウセンゴケ複合種においてみられるゲノムセットの各染色体サイズが上記同様、モウセンゴケと近縁なコモウセンゴケと比べその染色体サイズは半分以下であることは古くから知られている。また分子生物学的手法を用いた研究によりその雑種起源と推定される両親種の特定が行われてきた。

近年の染色体サイズの変化にかかわる DNA の配列研究では、相似的に染色体サイズの違いを示す同様の種分化には、モウセンゴケ属のように染色体サイズを増大させているものがあり、シオン属とは逆の染色体進化の方向に関連する新規 DNA 配列がさらに見つかる可能性が高いこともわかってきた。一般的にゲノムサイズはトランスポゾン等の蓄積により、進化とともに増加の傾向を示すが、ゲノムサイズが均質に減少・増加するシステムも含め不明な点は多い。

2. 研究の目的

大きな染色体から小さな染色体への染色体サイズ変化、あるいは反対のS染色体からL染色体へのサイズ変化に関し興味深い点は、(1)各染色体の形態(動原体の位置や二次狭窄の有無)、すなわち核型がほとんど変わることなくサイズのみが大幅に違うこと、(2)ハプロイドあたりのゲノムを構成する染色体セットはどちらか一方のサイズの染色体から構成されており、すなわちL染色体のみから構成されるゲノム(以下1ゲノムを「L」で表記し、二倍体であれば体細胞に存在する2ゲノムを「LL」とあらわす)またはS染色体のみから構成されるゲノム(以下1ゲノムを「S」で表記する)が存在し、1ゲノム内にSとLが混在するといった

例外はないこと、(3)このような染色体進化と種分化との関係は系統的に独自に進化した全く異なる起源から派生した複数の分類群間において共通に見られることにある。互いの核型は相似的なのだが、そうなるためには、Lタイプの全染色体上に均一に分散している反復配列が脱落あるいは挿入したという変化の可能性が考えられる。

そこで、シオン属およびモウセンゴケ属のL・SゲノムDNAを用いたRAPDディファレンシャル法により、L染色体特異的な配列を決定する。また、シオン属およびモウセンゴケ属から単離した反復配列を用いて、染色体サイズの減少および増加の原因因子であるDNA配列の染色体上への分布パターンを解析する。

3. 研究の方法

本研究では、独立した分類群に位置し、かつそれぞれの分類群において異なる染色体サイズをもっているゲノム構成の明らかな複2倍体種とその起源となる親種を材料に用いた。モウセンゴケ属では、モウセンゴケおよびトウカイコモウセンゴケを、またヨメナ属ではシロヨメナ、ユウガギクを対象に、それぞれのゲノムから、大型の染色体サイズに特異的な配列を検出するため、RAPDによるディファレンシャルディスプレイを行った。

ディファレンシャルディスプレイ法については、シオン属およびモウセンゴケ属それぞれ3種を材料に、ゲノムDNAの調整を行い、また使用するRAPDプライマーは、全1200プライマーについて実施した。

ディファレンシャルディスプレイ解析後、LタイプとSタイプ染色体の間で異なる反復配列を検出するとともに、このDNA断片をゲルから回収し、シーケンシングによって配列を決定した。そして、染色体観察によって、LSゲノムであることがわかっている種の植物個体を多数増殖させ、FISH用の染色

体標本を作製し、Lタイプ染色体を有する種でのみバンド増幅が認められたDNA断片およびクローニングによって単離したDNAをラベルし、これをプローブにFISH解析を行った。

4. 研究成果

大型染色体のみに存在する分散配列を単離できた研究背景として、キク科を中心に染色体サイズの変化に関与する効率的なスクリーニング法をいくつか検討し、このうちRAPDによるゲノムディファレンシャルディスプレイ法が、大型の染色体にのみ存在する反復配列を最も効果的に検出する方法であることをつきとめた。

この研究期間には、モウセンゴケ属とシオン属の大型染色体に特異的なDNA配列を、それぞれの属で10以上検出することができた。そして、それに続く研究では、同方法によって大量のスクリーニングを行った。これにより、モウセンゴケ属では1200種類のプライマーを用いて684個の大型染色体特異的なDNA配列を検出することができた。一方、シオン属では180種類のプライマーを用いて84個の大型染色体特異的なDNA配列を検出した(図1)。

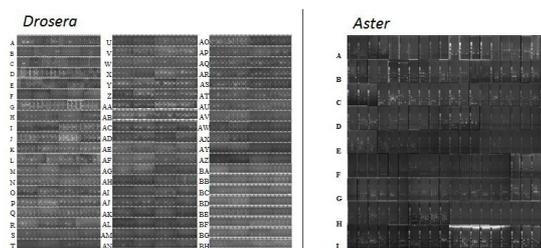


図1. モウセンゴケ属(左:1200プライマー)およびシオン属(右:180プライマー)のL/Sゲノムディファレンシャルディスプレイ解析

またモウセンゴケ属とシオン属間で、同じプライマーから大型染色体特異的なDNA断片

が 8 個検出された。さらに、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法(FISH 法)により、これら特異的な配列(図 2)は大型染色体全体に分散して分布していることが明らかになった(図 3)。

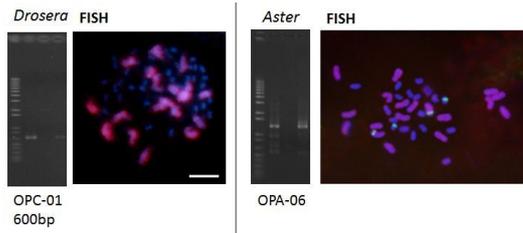


図 2 モウセンゴケ属(左)およびシオン属(右)における FISH に用いたプライマーの泳動写真および FISH

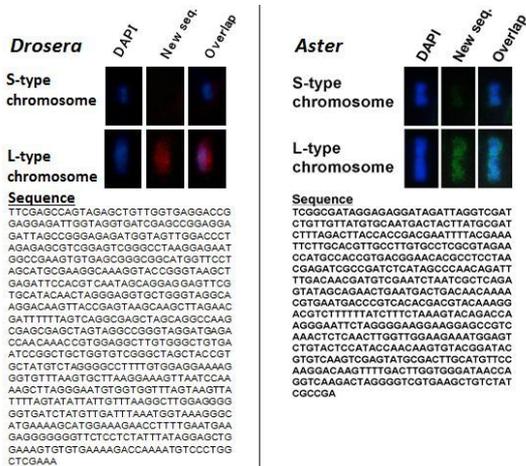


図 3 モウセンゴケ属(左)および新たに得られたシオン属(右)の大型染色体特異的配列と FISH 解析

これまでの研究では 10 個程度の配列タイプしか見つかっていなかったが、今回の研究により、染色体サイズ変化に関わっている DNA 断片として、1000 個近い数の配列が検出されてきた。また現行の研究結果から、さらに多くの関連配列が大型染色体ゲノムに存在していることが予測された。

ゲノムサイズは一般的にトランスポゾン

等の蓄積が関係しているが、トランスポゾンによる DNA の蓄積には、配列内部にトランスポゼースと呼ばれる転移遺伝子を持ち、かつ配列の両端に特異的な逆向きあるいは順向きの配列が存在していることが知られている。しかしながら、モウセンゴケ科とキク科で検出された配列には、そのようなモチーフを見つけることはできていない。ゆえに、現行の研究で決定した配列の DNA 断片には、染色体サイズを変化させる(1)未知の機能配列が存在している可能性、もしくは(2)断片の外側にあたる周辺配列にトランスポゾンに関する既知の配列が存在すると推察される。

染色体進化に関するこれまでの研究は主にロバートソニアン型の fusion-fission による異数性化現象や転座・転移などについて核型や分染法を用いた解析や、レトロトランスポゾン等の FISH 法による解析などである。

キク科に見られるような染色体サイズの減少という進化はあまり例がなく、またモウセンゴケ科を含めその分子レベルでの染色体サイズ増減の変化やメカニズムについての研究もほとんど行われていない。

さらに、近年、小さなゲノムサイズをもつ 2 倍体のコモウセンゴケ(イネの半分以下のゲノムサイズ)が近年発見されている。モウセンゴケにおいては、小型染色体のみから構成される種はこれまで全てが 4 倍体であり、2 倍体がみつかった例はない。このためモウセンゴケ属における本 2 倍体種は、ゲノムを解析する上で重要な種となる。これにより、染色体の大きさの増減に関する DNA 配列やその機構を解明する上でも重要な情報が得られることが期待されている。

今後は、脱落および挿入配列の特定やマッピングを行い、染色体進化が起こるメカニズムの解明を行うことが重要である。

(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1件)

Shirakawa, J., Nagano, K. and Hoshi, Y.
2012. Polyploid genome structure of
Drosera spatulata complex
(Droseraceae). *Cytologia* 77: 97-106.
査読有

[学会発表](計5件)

Genome constitution effect of *Drosera spatulata* complex on type I allergy.
Inagaki, A., Shirakawa, J., Hoshi, Y.,
and Kobori, M. The Eighth International
Conference of Chromosome Botany,
Hiroshima Jogakuin University,
Hiroshima, Japan, November 23, 2013

DNA polymorphic analysis of *Drosera spatulata* complex (Droseraceae).
Tungkajiwangkoon, S., Inagaki, A.,
Shirakawa, J. and Hoshi, Y. The Eighth
International Conference of Chromosome
Botany, Hiroshima Jogakuin University,
Hiroshima, Japan, November 23, 2013

Cytogenetic study for genome
organization of artificial triploidal
hybrid between *Drosera rotundifolia* and
D. spatulata. Hoshi, Y., Shirakawa, J.
and Kobori, M. The Eighth International
Conference of Chromosome Botany,
Hiroshima Jogakuin University, Hiroshima,
Japan, November 23, 2013

RAPD profiling of *Drosera spatulata* and
its related species. Inagaki, A.,
Shirakawa, J. and Hoshi, Y. (Oral
Presentation). The Seventh International

Conference of Chromosome Botany, Tokai
University (Aso Campus), Kumamoto, Japan,
October 14, 2012

RAPD fragment FISH analysis of *Drosera spatulata* complex (Droseraceae).
Shirakawa, J., Hoshi, Y., Nagano, K. and
Kondo, K. (Oral Presentation). The Sixth
International Conference of Chromosome
Botany, Tokyo University of Agriculture,
Kanagawa, Japan, November 20, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星 良和 (Hoshi Yoshikazu)
東海大学・農学部・准教授
研究者番号：70332088

(2) 研究分担者

副島 顕子 (Soejima Akiko)
熊本大学大学院・自然科学研究科・教授
研究者番号：00244674