

機関番号：3 2 6 4 4

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570099

研究課題名 (和文) シオン属の染色体サイズの減少はどのような DNA 配列が関与しているのか

研究課題名 (英文) What kind of DNA sequences is involved in chromosome size reduction in genus *Aster*?

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

研究成果の概要 (和文): 染色体サイズの減少がどのようにして生じたのかを明らかにするため、シオン属がもつ L タイプおよび S タイプのゲノム DNA を材料に、DNA プロファイリングによるディファレンシャルディスプレイ解析を行い、これら 2 タイプにおける異なるゲノム構成または染色体の進化について新たな知見を得た。

研究成果の概要 (英文): To analyze the size difference between large (L-type) and small (S-type) chromosome sets in *Aster*, FISH with new screened DNA sequences from L-type parental genome was performed. An insight obtained from the result suggested that the new DNA sequences were involved in the chromosome size change.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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

シオン属 (*Aster*) では、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 (S タイプ染色体) を持ち、近縁と考えられるシロヨメナ *Aster ageratoides* とがもつ大型の染色体 (L タイプ染色体) 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。本研究では、シロヨメナおよびユウガギクを材料に、核ゲノム DNA ディファレンシャル解析を行い染色体サイズの減少に関与する DNA を特定し、分子レベルから種分化と染色体の進化について推察する。

2. 研究の目的

L タイプから S タイプへの染色体サイズ減少の遺伝的要因である構成 DNA の変化において興味深い点は、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短くなっていることである。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。ヨメナ属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、その分子レベルで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。本研究は、脱落配列の特定やマッピングを行い、これまでとは異なる染色体進化の様式、およびこの進化が起こるメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

九州、関東地域および東北地域から調査・採取した植物材料について系統分類学的解析ならびに倍数体の分布を明らかにする細胞生物学的調査および染色体特性評価を行い、必要となる植物材料を選抜した。この材料を用いて、蛍光顕微鏡設備を使用して、シロヨメナ、ユウガギクのそれぞれのゲノムに対して特異的配列を用いたゲノミック *in situ* hybridization (GISH) 法を行い、その染色体上での分布を検討し、過去の報告と比較した。具体的には、DNA プロファイリング

によるディファレンシャルディスプレイおよびサザン解析から 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、レトロトランスポゾン因子を増幅させるプライマーを用いて、それぞれの種から分散型のレトロトランスポゾン反復配列を検出した。その後、DNA 断片をゲルから回収し、クローニングした後、シーケンシングによって配列を決定した。また、得られた配列情報を既知の配列と比較するため、特にレトロトランスポゾンとして知られている高頻度反復配列についての情報解析を行った。最終的に、染色体プレパレート作成のための L S タイプ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 解析を行い、FISH シグナルから染色体上でのこれら DNA の分布パターンを解析することで染色体サイズ減少の過程で脱落した領域を推定した。

4. 研究成果

L タイプ染色体と S タイプ染色体のゲノム DNA をプローブとした GISH により、以前我々が示した結果と同様に、他地域の系統においても、これら 2 タイプの染色体を染め分けることができ、このことからゲノム間の異質性が個体群とは関係なくその染色体のサイズに依存していることを強く支持した。また、サザン解析および FISH 解析を用いて、分散型のレトロトランスポゾン反復配列解析を行ったところ、L タイプおよび S タイプ両方に同程度存在していることが明らかとなった。さらに異なる体細胞染色体構成をもつシロヨメナ (L タイプ)、ユウガギク (S タ

タイプ) およびノコンギク (LS タイプ) 3 種を材料に、Fluorescence Representational Genomic Profiling (FRGP) 法や異なる種類のプライマーを用いての DNA プロファイリングによるディファレンシャルディスプレイ法を試み、目的 DNA を効率よく検出する方法を検討したところ、RAPD プライマーを用いたディファレンシャルディスプレイ法が、シオン属だけでなく、同様の染色体サイズが相似的に異なる分類群もつモウセンゴケ属においても大型の染色体から優先的に DNA 断片が高頻度に増幅された (図 1)。

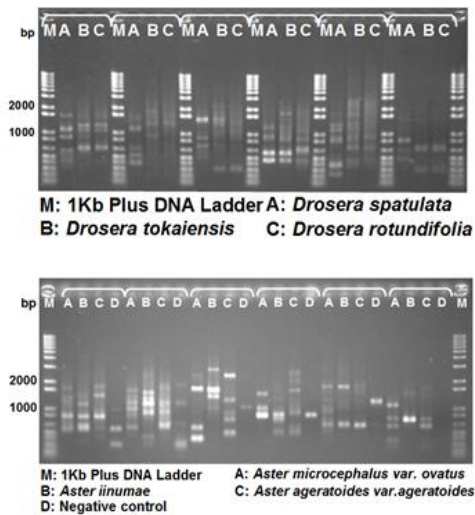


図 1 DNA プロファイリングによるディファレンシャルディスプレイ法 (上段: モウセンゴケ属 下段: シオン属)

また、これら得られた配列のいくつかは、既知の配列情報と比較解析をしたところ新規配列であることがわかった。このことから、サイズの異なる染色体から構成されるゲノムを有する植物体を用いた RAPD ディファレンシャルディスプレイ法が、染色体サイズ変化に起因する DNA をスクリーニングする有効な方法であることを明らかにした (Hoshi *et al.* 2010)。また、RAPD 法を用いることによって、

L タイプの染色体をもつシロヨメナとノコンギクに共通する特異的なバンドが存在することがわかった。そこで、RAPD 法によって得られたシロヨメナからスクリーニングした DNA 断片をプローブに用いて、ノコンギク (LS タイプ) の植物体で染色体標本作製し、FISH 解析を行った結果、得られた配列のいくつかは、L 染色体に多く分散して存在していることが確認された (図 2)。

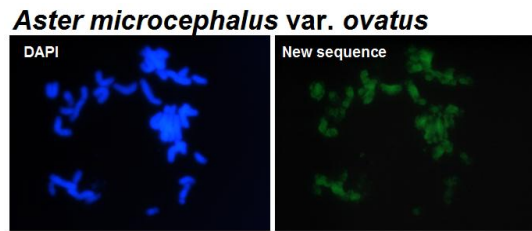


図 2 ノコンギクでの L-染色体特異的 DNA 配列による FISH 解析

本研究の過程で対照実験として必要と判断したモウセンゴケを材料に染色体サイズの配列を同様の方法で探索した結果、ヨメナ大型の染色体にのみ存在する配列を得ることが確認できている (図 3)。

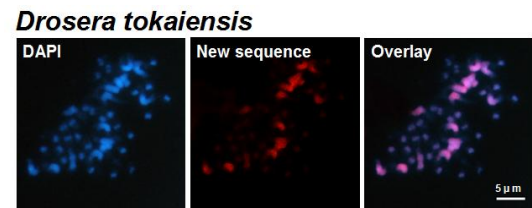


図 3 トウカイコモウセンゴケでの大型染色体特異的 DNA 配列による FISH 解析

ヨメナ属植物は、シオン属植物と比べて明らかに小さな染色体を持ち、その染色体サイズは約半分、核型は相似であることが示されている。これまでに、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、ヨメナ属の小型染色体 (S タ

イプ) がシオン属の大型染色体(L タイプ)よりも派生的であることが示されている。このことは、シオン属からヨメナ属への進化の過程で染色体サイズの減少がおこった事を示すものである。Ito *et al.* (1995, 1998)、および平成 18-19 年度の基盤研究 (C) から以下の3つのことが明らかになっている。第1に、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ている。第2に、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の仮説 (以下、凝縮説と称する) 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 (以下、減少説と称する) を強く支持されている。第3に、シオン属に含まれるノコンギク (*A. microcephalus* var. *ovatus*) 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、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が支持されている。以上の成果は、シオン属からヨメナ属への進化の過程で染色体サイズの減少がおこった事を示している。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、ゲノムサイズが減少するシステムはこれまでのところ不明である。

本研究では染色体サイズの変化が種分化と大きく関連している材料を用い、サイズの減少がどのような配列の減少によるものなのかを明らかにする目的で、凝縮説を検証するためにメチル化サイトを検出する方法として FRGP 法を採用し、また減少説を検証するために RAPD ディファレンシャルディスプレイ法を採用した。その結果、FRGP 法で得られた配列はわずかであり、かつ得られた配列はオルガネラゲノム由来であったのに対し、RAPD ディファレンシャルディスプレイ法では大型染色体特異的な配列が多数検出され、多くのものが新規はいれつであったこと、また FISH 解析による染色体上での配列分布パターンの結果からL染色体のみ、またはL染色体に多く存在していることから、染色体のサイズの変化は凝縮による差異ではないと結論づけた。

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1件)

①Hoshi, Y., Shirakawa, Junichi., Takeo, Mio. and Nagano, Katsuya., 2010. A molecular genetics of *Drosera spatulata* complex by using of RAPD analysis. *Chromosome Botany*: 5. 23-26

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