

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：14403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450006

研究課題名(和文) 四倍体化によるラン科植物のゲノム安定性とその分子細胞遺伝学的機構の解明

研究課題名(英文) Genomic stability by tetraploidization in orchids and elucidation of its molecular cytogenetic mechanism

研究代表者

向井 康比己 (Mukai, Yasuhiko)

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号：30110795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：園芸的利用価値が高いバンダ系着生ランにおいてゲノムを倍加させた四倍体や多元雑種の複二倍体が遺伝的に安定する機構を解明した。DNAのメチル化やヒストン修飾によるエピジェネティックなクロマチン動態をGISH法や免疫染色法を用いて、染色体およびDNAレベルで可視化した。四倍体の安定化に関わる分子的機構として、動原体の構造が関係していると思われたので、フウラン等のBACライブラリーの作製や動原体蛋白質の1つであるCENH3を同定することにより、その糸口を得た。

研究成果の概要(英文)：We have elucidated the mechanism of genetic stabilization of tetraploids and amphidiploids from inter- and intra-generic hybrids in the subtribe Aeridinae of tribe Vandae which is monophyletic, mostly epiphytic and comprises horticultural valued genera including Vanda, Neofinetia, Ascocentrum, Rhynchostylis. Epigenetic chromatin dynamics by DNA methylation and histone modification were visualized at the chromosome and DNA level using the GISH and immunological staining method. As the molecular mechanism involved in the stabilization of tetraploid seems to be related to the structure of kinetochores, and as clue to uncovering it has been found by conducting the construction of BAC library such as Neofinetia falcata and the identification of CENH3.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：ラン科植物 四倍体 GISH法 動原体 CENH3 メチル化 ヒストンリン酸化抗体 BACライブラリー

1. 研究開始当初の背景

(1) ラン科植物は 800 属からなる 25000 種以上が知られており、単子葉植物で最も進化していると言われている。属を超えての交配が容易であり、多くの属間雑種が育成されている。単軸性着生ランであるバンダ系では、花の青色、芳香、耐寒性などの有用形質を導入するため属間交雑が頻繁に行われている。

(2) ラン科植物では、メリクロン培養により四倍体が見出され、培養下でのストレスによってゲノム単位での倍加が起こることが知られている。一般的に四倍体は園芸的価値が高いものが多いが、その原因については不明のままである。ラン科植物においては、染色体倍加の遺伝的または分子のメカニズムや倍加後のクロマチンのエピジェネティックな変化についての研究はまだない。

2. 研究の目的

(1) 花として商業的価値の高いバンダ系ランやその雑種において、四倍体化に伴うエピジェネティックな変化を調べることで、四倍体の安定化に関わる分子の機構を解明する。具体的には、DNA のメチル化やヒストン修飾によるエピジェネティックなクロマチン動態を FISH 法や免疫染色法を用いて、染色体および DNA レベルで可視化する。

(2) 品種改良が重ねられてきた複雑な来歴をもつラン科雑種植物について、染色体のゲノム構成を明らかにすることは園芸植物の育種において重要であると述べるとともに、今なお進化し続けているラン科植物独特のゲノム戦略についての知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 同質倍数体安定性の分子的基础の解明のために、もとの二倍体(ヘテロ接合体または多元雑種)と染色体を倍加した四倍体を減数分裂時の染色体の挙動と GISH 法を用いた分子細胞学的手法により比較する。

(2) 四倍体において、四倍体になった時にエピジェネティックな変化が起きたかどうか、既知のヒストン修飾抗体や DNA の抗メチル化シトシン抗体を用いた免疫染色実験を行う。

(3) 四倍体の遺伝的な安定につながる多価染色体の形成を妨げる遺伝的システム(二倍体化)について、動原体の構造から明らかにする。

4. 研究成果

(1) ラン科植物(バンダ亜連)の四倍体の作製と収集: コルヒチン処理による四倍体作製を目指したが、細胞学的な四倍体を得ることができなかったため、育種家や市販されている系統の中から四倍体を細胞遺伝学的に確

認した。純系では、*Rhynchosstylis retusa*、*Ascocentrum amplullaceum*、雑種起原では、*Vanda hybrid*、*Neostylis*、*Ascocinetia*、*Dawinara* で四倍体を得た。



図 1. *Rhynchosstylis retusa* の植物体(左 = 二倍体、右 = 四倍体)

(2) GISH 法による多元雑種のゲノム構成の可視化: *Neofinetia*、*Vanda*、*Ascocentrum*、*Rhynchosstylis* の 4 属に由来する植物の交雑によって作られた多元雑種の染色体数とそのゲノム構成を多色 GISH (Multi-color Genomic In Situ Hybridization) 法で調べた。

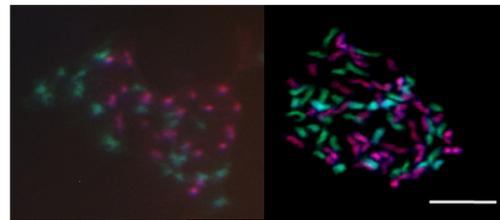


図 2. *Ascocinetia* の二倍体 ($2n=38$) と四倍体 ($2n=76$) (赤: *Ascocentrum* 由来の染色体、緑: *Neofinetia* 由来の染色体)

(3) ラン科植物における減数分裂時染色体の挙動

Neofinetia、*Vanda*、*Ascocentrum*、*Rhynchosstylis* の 4 属のうち、異なる属の 2 種を組み合わせさせた雑種の減数第一分裂中期では染色体の対合が見られた。これらの事実は、4 属の間ではゲノムがよく似ていることが示唆され、最近の分子系統に基づく *Vanda* 属への統合の根拠にもなる。

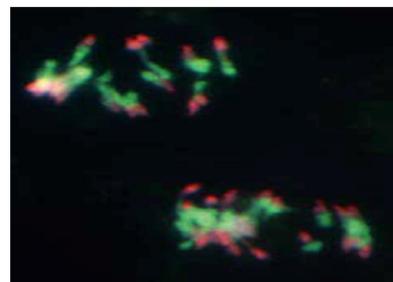


図 3. *Neostylis Lou Sneary* (*Neofinetia* x *Rhynchosstylis* F1) における減数第一分裂中期における染色体の対合

Rhynchosstylis retusa の二倍体と四倍体に

において減数分裂の各過程を細胞学的に比較した。一般的に同質四倍体では、相同染色体を4本もつことになるので、四価染色体を形成するために染色体の均等分配がおこらず、稔性が低下するが、この種の四倍体では四価染色体はほとんど見られず、二価染色体が多く見られた。このことは、受精能力のある配偶子を作るのに重要であり、四倍体の遺伝的な安定に繋がる根拠となった。一方、他種の二倍体植物や雑種において多様な配偶子形成を行うことがあり、非還元配偶子の形成が見られ、このことが倍数体形成の要因の一つと考えられる。

(4) 免疫染色によるエピジェネティックなクロマチン動態の変化：二倍体に比べて四倍体ではDNAのメチル化がより広範囲に起こるが、ヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化の程度において違いは見られなかった。リン酸化の程度を調べている過程において、ヒストンリン酸化抗体（H3S10ph、H3S10phK14ac）で中期染色体の動原体周辺を検出することができ、細胞分裂が進行するにつれてリン酸化されたヒストンは減少することがわかった。特に、H3S10phK14acは植物における染色体のセントロメアを同定する細胞学的マーカーとして利用することができる。

(5) バンダ系基本2倍種のBACライブラリー作製：染色体マーカーや動原体配列のクローンを得るために、*Neofinetia falcata*(フウラン)と*R. coelestis*の2種においてバクテリア人工染色体(BAC)ライブラリーを作製した。前者においては、ストックしたクローン数は21000個、平均インサートサイズは75kbで、これは0.67ゲノム分をカバーすることになる。後者においては、ストックしたクローン数10600個、平均インサートサイズは51kbで、カバーした情報量は0.21ゲノム分であった。BAC FISHの結果、染色体特異的なシグナルや反復配列のマーカーが得られたので、染色体の同定等に今後利用できる。

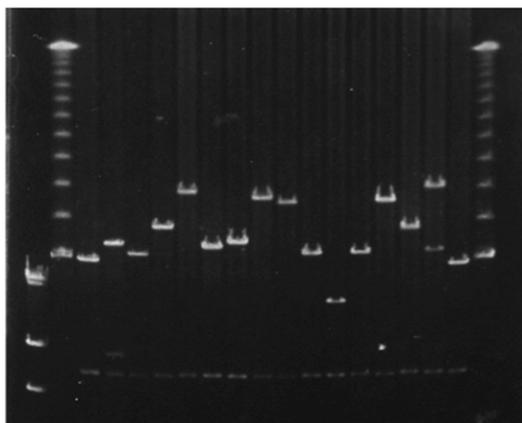


図4. *R. coelestis*のバクテリア人工染色体(BAC)におけるパルスフィールド電気泳動によるインサートサイズの測定

(6) 動原体解析：フウランにおいてセントロメアに特異的なヒストン H3 (CENH3) 遺伝子の構造を決定した。このアミノ酸情報からN末端ヒストンテール部分のペプチド抗体を作製した。この CENH3 のペプチド抗体はフウラン以外の他のラン科植物、*Vanda coerulea*、*Rhynchostylis coelestis*、*Ascocentrum ampullaceum*などのバンダ系植物の動原体にも結合した。CENH3のペプチド抗体を用いたCHIP解析で得たDNA断片をクローニングしてFISH解析を行った。また、によるChIP-SeqでCENH3抗体を利用した次世代シーケンサー網羅的に解析した結果では、動原体DNA候補配列が予想することができた。

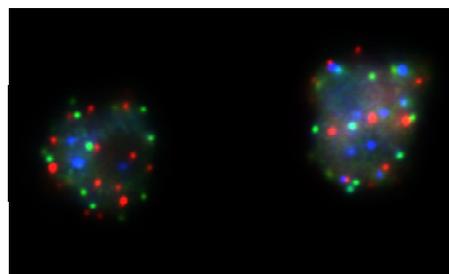


図5. フウランの核におけるCENH3の検出

(7) 四倍体化にともなう有用形質の比較：4倍体化により、花や植物体のサイズが大きくなる傾向が見られた。また、フウランと*Rhynchostylis*の雑種の場合では、四倍体の方がより芳香が強くなる組合せが見られた。



図6. *Rhynchostylis retusa*の花(左=2x, 右=4x)

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 5件)

Sharma S.K., Yamamoto M., Mukai Y. Immuno-cytogenetic manifestation of epigenetic chromatin modification marks in plants. *Planta*. 241: 291-301 (2015) 査読有

Sharma S.K., Mukai Y. Chromosome research in orchids: current status and future prospects with special emphasis from molecular and epigenetic perspective. *Nucleus* 58(3): 173-184 (2015) 査読有 DOI 10.1007/s13237-015-0152-1.

Matsuba A., Fujii M., Lee S.S., Suzuki

G., Yamamoto M., Mukai Y. Molecular cytogenetic use of BAC clones in *Neofinetia falcata* and *Rhynchostylis coelestis*. *Nucleus* 58 (3): 207-210 (2015) 査読有 DOI 10.1007/s13237-015-0147-y.

Sharma S.K., Yamamoto M., Mukai Y. Distinct chromatin environment associated with phosphorylated H3S10 histone during pollen mitosis I in orchids. *Protoplasma*. (2016) 査読有 DOI 10.1007/s00709-015-0925-z.

Sharma S.K., Yamamoto M., Mukai Y. Dual modified anti-phospho(Ser10)-acetyl (Lys14)-histone H3 predominantly mark the peri-centromeric chromatin during mitosis in monokinetic plants. *J. Genetics*. (2016) 査読有 DOI 10.1007/s12041-016-0723-1

〔学会発表〕(計 8件)

向井康比己、山崎春加、横河由樹子、山本真紀 ラン科交配雑種 *Neostylis Lou Sneyry* における分子細胞遺伝学的解析、染色体学会、富山大学、富山、2013年11月8日～10日

向井琴美、横河由樹子、加藤成二、山本真紀、向井康比己 コチョウラン‘なごり雪’の GISH 解析、染色体学会第 65 回年会、岡山大学資源植物科学研究所、倉敷、2014年10月25日

松葉篤、藤井美樹、鈴木剛、山本真紀、向井康比己 ラン科植物属の細胞遺伝学的解析のための BAC ライブラリー構築、染色体学会第 65 回年会、岡山大学資源植物科学研究所、倉敷、2014年10月25日
Sharma S.K. and Mukai Y. A glimpse of male-meiotic and pollen-mitotic chromosomal landmarks in *Dendrobium* (Orchidaceae). Annual Meeting of The Society of Chromosome Research held at Okayama University, Kurashiki, Okayama, Japan (25 October 2014) *Chromosome Science* 17(1-4): 23pp (*Oral Presentation*)

Mukai Y. Recent trends in orchid chromosome research. At 5th Asian Chromosome Colloquium “New horizon by unifying of chromosome research” held at Kasetsart University, Bangkok, Thailand (April 28-30,2015)

Sharma S.K., Mukai Y. Cytogenetic landscape of epigenetic signatures in *Cymbidium sinense* (Orchidaceae). 5th Asian Chromosome Colloquium, Kasetsart University, Bangkok, Thailand (April 28-30,2015)

Suzuki G. Mukai Y. et al. Orchid BAC libraries for molecular cytogenetic research. 5th Asian Chromosome Colloquium, Kasetsart University, Bangkok, Thailand (April 28-30,2015)

Lee Shan Shan, Suzuki G., Mukai Y. et al. BAC-FISH analysis in *Rhynchostylis* and *Neofinetia* (Orchidaceae) 5th Asian Chromosome Colloquium, Kasetsart University, Bangkok, Thailand (April 28-30,2015)

〔図書〕(計 1件)

Sharma S.K., Yamamoto M., Mukai Y. Molecular cytogenetic approaches in exploration of important chromosomal landmarks in plants. In: *Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement, Sustainable Development and Biodiversity Vol. 11* (eds. Vijay Rani Rajpal, S. Rama Rao and S.N. Raina). Springer Verlag, pp. 127-148. (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

アウトリーチ活動

スーパーサイエンスハイスクール出前授業:「遺伝子・ゲノムを見る」、奈良学園高等学校、2016年11月18日

特別講演、「Chromosome biology in orchids: insights from molecular cytogenetics」、中央研究院植物微生物学研究所、台北、2016年12月27日

6. 研究組織

(1)研究代表者

向井 康比己 (Mukai, Yasuhiko)
大阪教育大学・教育学部・教授
研究者番号: 3 0 1 1 0 7 9 5

(2)研究分担者

鈴木 剛 (Suzuki, Go)
大阪教育大学・教育学部・教授
研究者番号: 1 0 3 1 4 4 4 4

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()