

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580006

研究課題名 (和文) 他殖性アカクローバ染色体地図のインテグレーション

研究課題名 (英文) Integration of chromosome maps of allogamous diploid red clover.

研究代表者 近江戸 伸子 (OHMIDO NOBUKO)

神戸大学・人間発達環境学研究所・教授

研究者番号：30343263

研究成果の概要 (和文)：マメ科他殖性の飼料作物アカクローバ (*Trifolium pratense* L., HR; $2n=2x=14$; 440 Mb) の体細胞分裂前中期染色体上に、26S および 5S ribosomal RNA gene (rDNA) と遺伝的連鎖地図上のマーカーを含む BAC クローンを用いて FISH 法を行った。各連鎖群は対応する染色体に位置付けられ、LG1, LG2, LG3, LG4, LG5, LG6, LG7 は、第 4, 2, 6, 5, 1, 7, 3 番染色体に相当した。また、染色体画像解析プログラム CHIAS4 によって、染色体長、相体長、腕比、シグナル位置を計測し、平均化を行ってイディオグラムを作成し、アカクローバの定量的染色体地図と高精細遺伝的連鎖地図を統合 (インテグレーション) した。染色体統合地図は、マメ科植物のマーカー育種や分子育種研究のための有効な遺伝情報を得ることに寄与する。

研究成果の概要 (英文)：Red clover (*Trifolium pratense* L.) is a forage legume, an allogamous diploid ($2n = 2x = 14$) with 440 Mb genome size. Seven prometaphase chromosomes were identified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using 26S and 5S rDNA probes and bacterial artificial chromosome (BAC) clones and chromosome image analysis system ver.4.0 (CHIAS4). 14 BAC clones located close to the both end of each linkage group (LG), representatively LG1-7, exclusively hybridized to the distal regions of Chromosome 4, 2, 6, 5, 1, 7 and 3, respectively. Chromosomes images of FISH mapping were quantitatively analyzed based on CHIAS4 and construct of quantitative idiogram. This is the first complete chromosome map of red clover and integration of the genetic linkage maps and the quantitative chromosome maps provides valuable information on the genetic data and insight into the legumes genetics. This study should contribute to provide significant data for DNA markers and molecular breeding in legume varieties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：植物染色体工学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：マメ科植物・染色体地図・遺伝子地図・FISH・画像解析

1. 研究開始当初の背景

アカクローバは温暖地域で栽培される他殖性二倍体種 ($2n=14$, 486 Mb) 牧草である。

特に他殖性植物の育種において、効率的にゲノム情報を利用する際の問題は、分子マーカーが連鎖群の染色体地図上に正しく配置さ

れるかどうかである。アカクローバゲノム研究において、7つの連鎖群に相当する染色体の識別ができないと、遺伝子地図上に構築されていく様々な遺伝子や反復配列について、正確な順序や組換え価の確証を得ることは難しい。そこで、マーカーの連鎖群と染色体地図の統合が必要となる。

2. 研究の目的

他殖性マメ科のモデル植物であるアカクローバについて、ゲノム内の多数のDNAマーカーを可視的に位置づける蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法をもちいて、BAC クローンをマッピングする。自動化画像解析プログラム (CHIAS4) を構築し、定量的染色体地図を構築する。それによって、他殖性作物で世界初の組換え価の情報を統合したアカクローバ染色体インテグレーション地図を作製する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法によるアカクローバ連鎖群と染色体の対応付け

連鎖解析で用いられている2種の親系統HRならびにR130について、アカクローバ染色体標本上にリボゾームRNA (26SrDNA、5SrDNA) 遺伝子、種特異的反復配列、BAC クローンを FISH 法により位置づける。連鎖解析ソフト JoinMap ver3.0 の組み換え価の解析により、アカクローバの7連鎖群に位置づけられた SSR マーカーから選抜した BAC クローン (かざさ DNA 研究所が構築) をプローブにして、7染色体の各末端の BAC を染色体上に位置づける。

14種のBACプローブについては、蛍光顕微鏡下で観察を行ない、高感度 CCD カメラを用いて、デジタル情報として取り込み、2の画像解析に供する。その後、連鎖群の決まっていなクローンについても所属する連鎖群を決めていき、7組のアカクローバ染色体地図に相当する7つの連鎖群を決定する。

(2) 自動染色体解析システム (CHIAS4) の開発と定量的染色体地図の作成

ミヤコグサで開発された染色体画像解析システム (CHIAS3) をさらに、アカクローバ用にマクロプログラムを改良、自動化し、CHIAS4 システムを開発する。これまで、染色体の凝縮程度に従って、ヘテロクロマチン、ユウクロマチン領域に分け、分布様式の抽出をおこなう。1によって、マッピングされた反復配列やBACクローンの位置をCHIAS4により解析し、定量的に染色体地図上に位置づける

(3) マメ科植物の系統間ならびに種間の遺

伝子地図と染色体地図の比較

アカクローバ (*Trifolium pratense* L.) の高密度連鎖地図、コンセンサス地図で用いられている両親系統を用いる6つの系統 (HR、R130、H17L、NS10、M366、Violleta) を用いて、体細胞分裂前中期染色体上に、26Sおよび5S rDNA をプローブとした FISH 法を行い、系統間の多型性について明らかにした。また、BAC クローンについてマルチカラー FISH 法を用いて、染色体レベルでの転座の有無について、検証する。

同じマメ科のミヤコグサ染色体上でアカクローバのマーカーの位置ならびにマーカー間の距離関係について考察する。

4. 研究成果

FISH 法により、まず遺伝的連鎖地図の各連鎖群 (Linkage group ; LG) の両末端側に相当する BAC クローンを対応する染色体に位置付けた。そして、染色体画像解析プログラム CHIAS4 により、染色体の凝縮型 (condensation pattern; CP) を計測し、染色体長、相体長、腕比、両末端側に相当する BAC クローンのシグナル位置を計測し、平均化を行って定量的染色体地図を作成した (図 1、図 2)。

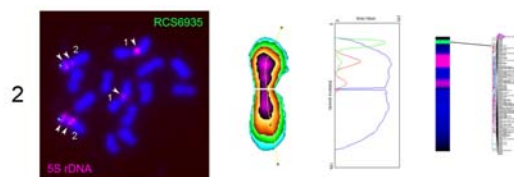


図 1 FISH マッピングならびに CHIAS4 による解析。左から第 2 染色体の FISH 像、染色体の疑似カラー像、CP、定量的染色体像、連鎖地図を示す。

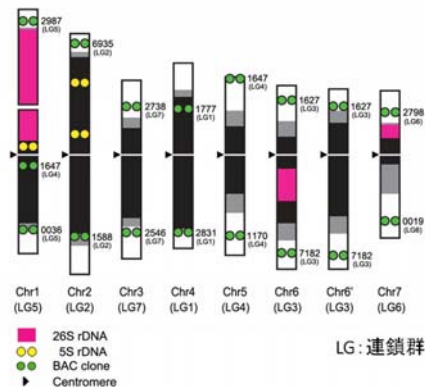


図 2 アカクローバの定量的染色体地図

その結果、7つの LG の両末端側に相当する 14 の BAC クローンは、1 対 1 対応で、染色体に位置付けられた。結果として、LG1、LG2、LG3、LG4、LG5、LG6、LG7 は、第 4、2、6、5、1、7、

3 番染色体に相当した(図 2)。

アカクロバの反復配列の存在様式については、種特異的な動原体局在性の反復配列が存在することを証明した。アカクロバの 6 つの系統(HR、R130、H17L、NS10、M366、Violetta)に共通して第 1、第 7 染色体に 26S rDNA 座が検出された。そのうち HR では第 6 染色体にヘテロな 26S rDNA 座が検出され、M366 では第 1 染色体にのみ 26S rDNA 座が検出された。ペリセントロメア特異的クローンおよび BAC クローンは NS10、および HR で同じ位置に座乗した。また、HR、NS10 にアラビドプシス型(TTTAGGG)*n* テロメア配列の FISH を行い、染色体末端に検出した。

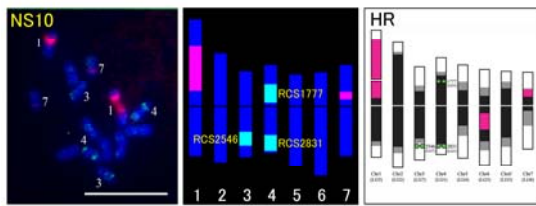


図4 NS10 への BAC クローンのマッピング
赤は 26SrDNA、緑は BAC クローンを示す。

ミヤコグサ TAC クローンを FISH によってアカクロバ HR の染色体上に位置付けた。ミヤコグサ第 5 染色体に位置する TM0048(LG5)は、アカクロバ第 3 染色体長腕介在部に検出された。次に、遺伝子座の多型性についてみたところ、HR 系統は 26S rDNA 遺伝子座にヘテロ性が認められた。しかし、ヘテロな領域には、遺伝的連鎖地図上に連鎖解析の歪みは表れない(表 1)。

また、7 連鎖群に相当する BAC クローンは、各系統の染色体上で同じ位置に座乗した。これにより、アカクロバ系統間で染色体の相互転座は起きていないと考えられる。

表 1 アカクロバ 6 系統における 26SrDNA 遺伝子座の多型

Varieties	Distribution	Number of 26S rDNA sites	Number of Chromosome		
			1	6	7
<i>Trifolium pratense</i> L.					
HR	Hokkaido, Japan	3	++	+-	++
R130	Russia	2	++	--	++
NS10	Hokkaido, Japan	2	++	--	++
H17L	Hokkaido, Japan	2	++	--	++
Violetta	Swiss	2	++	--	++
M366	Swiss	1	++	--	--

染色体レベルでの比較マッピングに、マメ科共通マーカーとしてミヤコグサの TAC クローンが使用可能であることが本研究によって初めて証明された。連鎖地図上のマメ科共通マーカーを用いて染色体レベルでマメ科の遺伝子配置の保存性(シンテニー)を解明し、他のマメ科植物との比較地図の作製が可能である。ミヤコグサ(2*n* = 12)、牧草のアカクロバ(2*n* = 14)、作物のタルウマゴヤシ(2*n* = 16)、ダイズ(4倍体 2*n* =

40)のシンテニーを解明し、マメ科の進化を解明する上で不可欠な情報を提供することも可能である。

他殖性マメ科の特徴を生かした品種の育成が望まれており、効率的な品種改良のために、DNA マーカーを利用したマーカー育種や遺伝子組換えなどの分子育種が注目されている。分子育種には、ゲノム情報の蓄積が不可欠であり、染色体構成を元にして効率的な遺伝子解析を行うことが必要となる。

本研究で行った染色体地図と遺伝的連鎖地図を統合したアカクロバ染色体インテグレーションは、このアカクロバ高精細遺伝的連鎖地図の正確さを証明した。得られた研究成果を基盤として、他のマメ科植物のゲノム解析に応用し、分子育種を推進することが期待される。

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)

1. N. Ohmido, K. Fukui, and T. Kinoshita Recent advances in rice genome and chromosome structure research by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) The Proceedings of the Japan Academy, Series B12., 86: 103-116 (2010)

2. M. Witkowska, N. Ohmido, J. Cartagena, N. Shibagaki, S. Kajiyama, and K. Fukui Physical mapping of ribosomal DNA genes on *Jatropha curcas* chromosomes by multicolor FISH. Cytologia, 74: 133-139 (2010)

3. N. Ohmido, A. Ishimaru, S. Kato, S. Sato, S. Tabata, and K. Fukui Integration of cytogenetic and genetic linkage maps of *Lotus japonicus*, a model plant for legumes. Chromosome Res, 18: 287-299 (2010)

4. M. Nakagawa, N. Ohmido, K. Ishikawa, S. Uchiyama, K. Fukui, and T. Azuma Anti-peptide antibodies for examining the conformation, molecular assembly, and localization of an intracellular protein, ribosomal protein S6, in vivo. J. Biochem., 143:325-332 (2008)

5. S. Sato, Y. Nakamura, T. Kaneko, E. Asamizu, T. Kato, M. Nakao, S. Sasamoto, A. Watanabe, A. Ono, K. Kawashima, T. Fujishiro, M. Katoh, M. Kohara, Y. Kishida, C. Minami, S. Nakayama, N. Nakazaki, Y. Shimizu, S. Shinpo, C. Takahashi, T. Wada, M. Yamada, N. Ohmido, M. Hayashi, K. Fukui, T. Baba, T. Nakamichi, H. Mori, and S. Tabata Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. DNA Res., 15: 227-239 (2008)

〔学会発表〕(計7件)

1. 西川岳志・牧ヶ野衣里・姫野真由美・Cartagena Joyce・Witkowska Magdalena・土本卓・福井希一・近江戸伸子 新規油糧植物ジャトロファの組織培養と染色体構造の解析 日本育種学会第117回講演会 京都市 2010年3月27日
2. 荒木哲朗・近江戸伸子・清水顕史・長谷川博ヨシの倍数性と栄養成長に関する変異について 日本育種学会第117回講演会 京都市 2010年3月27日
3. M. Tuna, A. Büyükbaşar, E. E. Teykin, H. Budak, N. Ohmido, T. Yamada Characterization of *Dactylis* subspecies by using some classical and molecular cytogenetic methods. Plant and Animal Genome XVIII San Diego 2010年1月15日
4. 近江戸伸子・佐藤修正・原田久也 マメ科植物のシンテニーを利用したダイズ染色体の解析 第60回染色体学会 松江市 2009年11月14日
5. 近江戸伸子 マメ科3植物の染色体とゲノム研究 日本育種学会第114回講演会 シンポジウム 彦根市、2008年10月10-11日
6. R. Kataoka, M. Hara, S. Kato, S. Isobe, S. Sato, S. Tabata and N. Ohmido Comprehensive chromosome map of red clover (*Trifolium pratense* L.) The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Osaka 2008年12月1-3日
7. High-resolution FISH for gene mapping and molecular analysis of plant chromosomes. The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Osaka 2008年12月1-3日

〔その他〕

ホームページ

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~ohmido/Ohmido%20Lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近江戸 伸子 (OHMIDO NOBUKO)

神戸大学・人間発達環境学研究科・教授

研究者番号：30343263