

## 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14日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770078

研究課題名（和文）異数性による種分化の機構が存在するか？

研究課題名（英文）Is there aneuploid evolution?

研究代表者

菊池 真司（KIKUCHI SHINJI）

千葉大学・大学院園芸学研究科・助教

研究者番号：80457168

研究成果の概要（和文）：トレニア・フルニエリとバイロニーの雑種で見いだされた過剰染色体を DNA レベルで特定するために、フルニエリの Fosmid クローンおよび cDNA クローンの配列から 169 の SSR マーカーを開発し、フルニエリとビオラセアの F<sub>2</sub> 集団と 21 の SSR マーカーを用いて 7 連鎖群からなる連鎖地図を構築した。次に、Fosmid-FISH 解析を試みたが、これまでのところ過剰染色体由来のクローンを選抜できていない。一方、東南アジア諸国でトレニア属植物 10 種 20 系統を収集し、分子系統解析の結果、バイロニーは過剰染色体を失って種分化に至った可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To identify an extra chromosome observed in interspecific hybrid between *Torenia fournieri* ( $2n=2x=18$ ) and *Torenia baillonii* ( $2n=2x=16$ ) at DNA level, 169 SSR markers were developed using fosmid and cDNA clone sequences and a partial linkage map was constructed in F<sub>2</sub> population of *T. fournieri* and *T. violacea*. Next, fosmid-FISH analysis has been conducted to screen fosmid clones derived from the extra chromosome, but the FISH signals of 19 clones tested did not formed on the extra chromosome. In addition, phylogenetic analysis including other 7 *Torenia* species collected in south Asia suggests a hypothesis that *T. baillonii* lost the extra chromosome during the speciation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：トレニア、染色体、種分化、SSR マーカー、連鎖地図、FISH、遺伝資源

## 1. 研究開始当初の背景

（1）異数性は染色体数が増減する異常であり、遺伝病や癌細胞で見られる。ヒトでは致死的だが、植物では自生植物集団に出現したり、実験系統として育成されるなど、植物ゲノムの特徴の1つとなっている。一方、異数

性は世代を越えて安定して伝達されず、種分化の要因になるとは信じられていない。

（2）アゼナ科のトレニア（*Torenia fournieri*,  $2n=2x=18$ ）とバイロニー（*Torenia baillonii*,  $2n=2x=16$ ）は異なる染色体数を持つ。この2種の種間雑種を育成し、減数分裂を観察し

たところ、異型対合による8本の二価染色体と、フルニエリ由来の一価染色体が出現した。これは、フルニエリの染色体9本が、パイロニーの染色体8本に、由来不明の1本の染色体（過剰染色体）が加わった異数体のようなゲノム構成を持つ可能性を示している。このような特定の染色体による種分化の例は知られていない。

(3) 一方、トレニアにはDNAマーカーや連鎖地図等の遺伝学的ツールが全く存在せず、その後DNAレベルで、過剰染色体が解析されたことはなかった。「本当に異数体であるか」を検証するためには、過剰染色体の構造と起源を探ることが不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究は、トレニアの過剰染色体をDNAレベルで特定することを目的に、以下の3つの研究を遂行する。

(1) フルニエリからDNAマーカーを開発し、連鎖地図を構築することで、過剰染色体をDNAレベルで特定する。

(2) マイクロダイセクションで過剰染色体由来のペインティングプローブを作製する。Fosmid-FISHも並行して行ない、過剰染色体由来のDNA配列を決定する。

(3) フルニエリ及びパイロニーの近縁野生種を収集し、系統樹を作製する。染色体構成と比較し、過剰染色体の形成時期を推察する。

## 3. 研究の方法

(1) トレニアゲノムプロジェクトで作製されたfosmid及びcDNAクローンの配列情報のなかでSSR配列を検索し、プライマーペアを設計した後、フルニエリとピオラセア

(*Torenia violacea*,  $2n=2x=18$ )間で多型が見られるプライマーセットを選抜する。フルニエリとピオラセア間でF<sub>2</sub>集団を育成し、選抜したプライマーセットを用いて多型解析を行なう。得られた多型データをMapmakerに入力し、連鎖地図を構築する。

(2) 体細胞染色体及び減数分裂中期染色体標本作製し、顕微操作で染色体を削り取る。DOP-PCRで削り取ったDNAを増幅し、標識した後、FISH解析を行なう。並行して、fosmidクローンを標識し、FISH解析を行なう。過剰染色体に特異的な蛍光シグナルが得られれば、そのプローブのDNA配列に連鎖するSSRマーカーや連鎖群内のfosmidクローンを選抜し、過剰染色体のDNA配列を決定する。

(3) トレニア属の植物標本の情報を参考に、本研究は、タイ及びインドネシアで近縁野生種の採集調査を行なう。また、すでに収集された植物を他研究機関に依頼し、導入する。

それら植物の形態調査及び分子系統樹の作製から、各種の系統関係を明らかにする。並行して、染色体数及び動原体配列の決定を行ない、トレニア属の進化過程の中で、過剰染色体の形成時期を推察する。

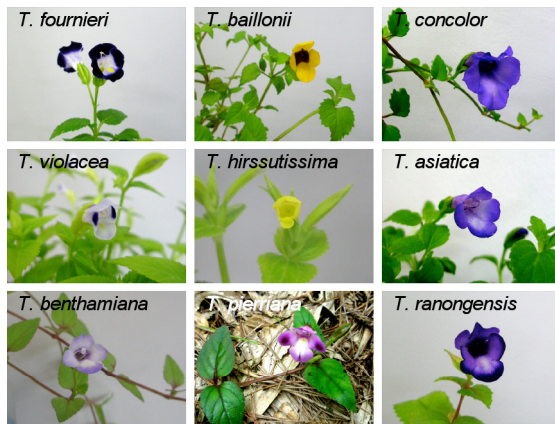
## 4. 研究成果

(1) 検索したSSRを挟み込む912のプライマーペアを設計した。フルニエリとピオラセアからスモールスケールでゲノムDNAを抽出し、PCR・ポリアクリルアミドゲル電気泳動から、2種で多型が見られる169のSSRマーカーを開発した。51のSSRマーカーとフルニエリとピオラセアのF<sub>1</sub>雑種に由来する88のF<sub>2</sub>個体を用いて多型解析をした結果、21のSSRマーカーを含む7連鎖群からなる連鎖地図が構築された。残りの30のマーカーは連鎖しなかった。この連鎖地図は、フルニエリの染色体数9本をカバーするものではなく部分的ではあるが、トレニアにおいて初めてDNAマーカーと連鎖地図が作製された。今後、残りの118マーカーの多型情報が加われば、各染色体に対応する連鎖群が得られると考えられる。

(2) 過剰染色体由来のペインティングプローブを作製するため、まず体細胞染色体標本から顕微操作で各染色体を削り取った。それぞれの染色体DNAをDOP-PCR及びシグマ社のWGAキットを用いて増幅し、標識してFISHプローブとした。FISH解析の結果、僅かに濃淡が見られるものの、特異的なシグナルは得られなかった。並行して行なったfosmid-FISHでは、3'末端にテロメア配列が連結される17のスキャフォールドからクローンを選抜しFISH解析を行なったところ、パキテン染色体の末端に明確なシグナルが観察された。そこで、減数分裂中期染色体標本に14のfosmidクローンをFISHしたが、全て二価染色体にシグナルが検出された。現在、残りのクローン配列のFISH検出を行なっている。

(3) タイのバンコク及びチェンマイ(2010年9月と2011年9月)、インドネシアのジョグジャカルタ(2011年5月)において、トレニア野生種の調査・収集をおこなった。また、国内の他研究機関から、植物体を分譲して頂いた。最終的に、収集サンプル数は、10種20系統となった。トレニア属の遺伝資源は国内外に存在しない現状において、画期的な成果といえる。染色体数を決定したところ、 $2n=18$ と $2n=34$ に大別され、 $2n=16$ は10種の中ではパイロニーのみであった。分子系統解析の結果、用いた9種は4つのクレードに大別され、パイロニーに

最も近接する *Torenia hirsutissima* は  $2n=18$  であるが、動原体配列はフルニエリやパイロニーの配列とは異なっていた。よって、パイロニーは動原体構造の変化に伴う過剰染色体の消失を経てナリソミックのゲノム構成を持った可能性が考えられた。



第1図 タイで収集されたトレンニア近縁種

#### 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6件)

- ① Jiraporn Jiranapapan\*, Shinji Kikuchi\*, Benya Manochai, Thunya Taychasinpitak, Hiroyuki Tanaka, Hisashi Tsujimoto, A simple method of chromosome doubling using colchicines in *Torenia* (Linderniaceae), and the behavior of meiotic chromosomes in amphidiploids. *Chromosome Science*. (受理済・印刷中) \* equal contribution. (査読有り)
- ② Yufeng Wu\*, Shinji Kikuchi\*, Huihuang Yan\*, Wenli Zhang, Heidi Rosenbaum, Leonardo A. Iniguez, Jiming Jiang, Euchromatic subdomains in rice centromeres are associated with genes and transcription. *Plant Cell* 23:4054-4064 (2011). \* equal contribution. (査読有り)
- ③ Wipaporn Sawangmee, Thunya Taychasinpitak, Peeranuch Jompuk, Shinji Kikuchi, Effects of gamma-ray irradiation in plant morphology of interspecific hybrids between *Torenia fourieri* and *Torenia baillonii*. *Kasetsart Journal* 45, 1-8 (2011). (査読有り)
- ④ Huihuang Yan\*, Shinji Kikuchi\*, Pavel Neumann\*, Wenli Zhang, Yufeng Wu, Feng Chen, Jiming Jiang, Genome-wide mapping of cytosine methylation revealed

dynamic DNA methylation patterns associated with genes and centromeres in rice. *Plant Journal* 63, 353-365 (2010). \* equal contribution. (査読有り)

⑤ Shinji Kikuchi, Hisashi Tsujimoto, Hidenori Sassa, Takato Koba, JcSat1, a novel subtelomeric repeat of *Jatropha curcas* L. and its use in karyotyping. *Chromosome Science* 13:11-16 (2010). (査読有り)

⑥ Mai Minamikawa, Hiroyuki Kakui, Sanhong Wang, Nobuhiro Kotoda, Shinji Kikuchi, Takato Koba, Hidenori Sassa, Apple S locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific F-box genes. *Plant Molecular Biology* 74, 143-154 (2010). (査読有り)

[学会発表] (計6件)

- ① K. Nagataki, S. Kikuchi, K. Mishina, T. Koba, Meiotic behavior and chromosome number variation in amphidiploid between *Triticum durum* and *Aegilops uniaristata*, MUSC joint seminar and graduate forum in science & technology, 2012年3月16日、タイ・マヒドン大学
- ② S. Kikuchi, An extra chromosome of *Torenia fourieri*, MUSC joint seminar and graduate forum in science & technology, 2012年3月15日、タイ・マヒドン大学
- ③ Wu Y., Kikuchi S., Yan H., Zhang W., Rosenbaum H., Iniguez L., Jiang J., イネ動原体におけるユークロマティックなヒストン修飾、第62回染色体学会年会、2011年11月11日、神奈川大学
- ④ Hidenori Sassa, Sanhong Wang, Mai Minamikawa, Hiroyuki Kakui, Shinji Kikuchi, Takato Koba, Structural features of the S locus of Apple, International workshop "Floral biology and S-incompatibility in fruit species", 2011年6月22-25日、イタリア・ボローニャ大学
- ⑤ Huihuang Yan, Shinji Kikuchi, Pavel Neumann, Zhang Wenli, Wu Yufeng, Chen Feng, Jiang Jiming, イネゲノムにおけるDNAメチル化解析、第61回染色体学会年会、2010年11月7日、東邦大学
- ⑥ Sanhong Wang, Hiroyuki Kakui, Shinji Kikuchi, Takato Koba, Hidenori Sassa, S-RNase and SFBB family F-box genes are located in sub-telomeric and heterochromatic chromosomal region in apple, XXI International Congress on

Sexual Plant Reproduction、2010年8月  
2-6日、イギリス・ブリストル大学

〔その他〕

ホームページ等：

<http://www.h.chiba-u.jp/iden/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菊池 真司 (KIKUCHI SHINJI)

千葉大学・大学院園芸学研究科・助教

研究者番号：80457168