

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25711024

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?(II) 比較ゲノム解析と再現系からの検証

研究課題名(英文) Is there aneuploid evolution? (II) Comparative genome analysis and verification by production of alien chromosome addition line

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：トレニア・フルニエリ( $2n=2x=18$ )とトレニア・バイロニー( $2n=2x=16$ )の種間雑種の減数分裂で、異種の染色体が対合した8本の二価染色体とフルニエリ染色体由来の1本の一価染色体が観察される。分子系統解析の結果、 $2n=18$ から $2n=16$ への染色体減数が生じた可能性が高いことが分かっている。2種の種分化の過程において一価染色体を形成するフルニエリ染色体が与えた影響を考察するために、2種の全ゲノム配列を比較した。その結果、バイロニーのゲノムDNAに類似する配列がフルニエリの9本の染色体に散在して検出され、特定の染色体が脱落して種分化に至った可能性は低くなった。

研究成果の概要(英文)：During meiosis in interspecific hybrids of *T. fournieri* ( $2n=2x=18$ ) x *T. baillonii* ( $2n=2x=16$ ), eight bivalents by interspecific pairing and a univalent of *T. fournieri* chromosome were observed. Phylogenetic analysis suggests a hypothesis that *T. baillonii* lost the chromosome during the speciation. In order to verify the hypothesis, comparative genome analysis of *T. fournieri* and *T. baillonii* was conducted. The results indicated that *T. baillonii* genomic DNAs can find on all nine of *T. fournieri* chromosomes and the loss of a chromosome pair might be not true during the speciation.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：異数体 トレニア 染色体 種分化 FISH解析 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、ヒトでは致死的である。一方、植物では自然下の集団内で出現したり、人為的に育成することができる。植物が持つ異数性への耐性機構については研究が進んでいなかった。

(2) アゼナ科のトレニア属植物の 2 種であるフルニエリ種 (*Torenia fournieri*,  $2n=2x=18$ ) とパイロニー種 (*Torenia baillonii*,  $2n=2x=16$ ) は異なる染色体数を持つ。種間雑種の減数分裂では、異種間で対合した二価染色体とフルニエリ由来の一価染色体の形成が観察された (Kikuchi *et al.* 2006)。これは 9 本のフルニエリ染色体のうちの 8 本がパイロニー染色体の 8 本と類似しており、残りの 1 本 (以下、Tf 一価染色体とよぶ) はパイロニー染色体とは類似せずに対合しないことを示している。2 種の間で Tf 一価染色体の添加または欠失が生じて異数性ゲノムを形成して種分化したかは不明であった。また、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) 東南アジア諸国においてトレニア属植物 10 種 20 系統を収集し、核遺伝子およびプラスチド遺伝子の DNA 配列に基づく分子系統樹をそれぞれ作成した。加えて、各系統の染色体数を決定した。それらの結果から、トレニア属植物の染色体数は  $2n=18$  と  $2n=34$  に大別でき、パイロニー種のみで見られる  $2n=16$  の染色体数は  $2n=18$  の系統群から分岐した可能性が高いことが分かった。パイロニー種に最も近い *Torenia hirsutissima* ( $2n=18$ ) の動原体配列はフルニエリ種の TCEN 配列やパイロニー種の BCEN 配列とは異なっており、パイロニー種との共通祖先ゲノムにおいて、大規模なゲノム内の変異が生じていた可能性が高い。

(4) フルニエリ種の fosmid クローン配列と cDNA ライブラリーの DNA 配列から SSR を検出してプライマーを設計し、近縁のピオラセア種 *Torenia violacea* ( $2n=2x=18$ ) の間で多型が生じる SSR マーカーを開発した後に、2 種の F<sub>2</sub> 集団を用いて 14 連鎖群を含む遺伝地図を作成されていた。

(5) フルニエリ種の fosmid クローン配列を用いて、フルニエリ種の染色体上に各クローン配列を FISH 検出することが可能になっていた。

## 2. 研究の目的

本研究はフルニエリ種とパイロニー種のゲノムを比較解析して、Tf 一価染色体の構造と起源を探ることを目的に、以下の 3 つの研究を遂行した。

(1) フルニエリ種のレファレンスゲノムの整備とパイロニー種のゲノムのショットガンシーケンスの後に比較ゲノム解析を行って、Tf 一価染色体の特定と保有する DNA 配列を決定する。

(2) 野生種の収集を引き続き行い、トレニア属植物の遺伝資源コレクションの完成と、Tf 一価染色体の形成時期を明らかにする。

(3) 異種染色体添加系統または Tf 一価染色体のナリソミック系統の育成を試みて、過剰な Tf 一価染色体の増減の影響評価を行う。

## 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 scaffold 配列について、連鎖解析と fosmid-FISH 解析を用いて連結し、レファレンスゲノムを構築する。まず、フルニエリ種と特異の形態を示すフルニエリ種の Thai-1 系統の間で F<sub>2</sub> 集団を育成する。Thai-1 系統と F<sub>2</sub> 集団の中からランダムに選んだ 20 個体で次世代シーケンス解析を行って DNA 配列情報を得た後に、フルニエリの DNA 配列情報も用いて、2 種の間で多型を示す一塩基多型 (SNP) を検索する。それら多数の SNP を用いた F<sub>2</sub> 集団の多型解析の結果から、フルニエリ種の scaffold 配列の連鎖を見出して、Scaffold の数を縮小させる。さらにフルニエリの体細胞中期染色体および減数分裂のパキテ期染色体に対して fosmid クローンを FISH 解析で検出し、それぞれの染色体に座乗する Scaffold とその向きを明らかにする。テロメア配列を含む fosmid クローンが約 18 クローン (フルニエリ染色体の末端は全部で 18 ある) 選抜されていたので、それらを fosmid-FISH 解析で検出することで、各染色体の識別を試みる。

(2) パイロニーのゲノム DNA を次世代シーケンサー (主にイルミナと 454 を使用) で解析して配列情報を得る。質の悪いリードやオルガネラ DNA 等の核 DNA 配列以外は除外したショートリード DNA 配列を、Bowtie 等を利用してフルニエリのレファレンスゲノムへマッピングする。

(3) トレニア属の植物標本の情報を参考に、本研究は、タイを中心に近縁野生種の採集調査を行う。他研究機関に未収集のものがあれば分譲を依頼し、導入する。それら植物の形態調査およ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。並行して染色体数および動原体配列の決定を行い、トレニア属の進化過程の中で Tf 一価染色体の形成時期を推察する。

(4) フルニエリ種とパイロニー種の種間雑種を複数個体育成し、連続戻し交雑でフルニ

エリ染色体 (Tf 一価染色体) 添加パイロニー系統の育成を行う。また、フルニエリ種にイオンビーム照射を行って、後代系統から Tf 一価染色体が消失したナリソミック系統の選抜を試みる。

(5) フルニエリのゲノムを2つ持ち、パイロニーのゲノムを1つ持つ二基三倍体の植物体を育成し、FISH 解析で2種の染色体を識別しながら、減数分裂の対合様式を決定する。

#### 4. 研究成果

(1) フルニエリ種の紫花系統と Thai-1 系統の F1 雑種を自殖させて F2 種子を収穫した。Thai-1 系統のショートリードシーケンスとフルニエリ種のゲノム DNA 配列の比較から SNP 情報を抽出した。それら SNP マーカーと F2 を用いた連鎖解析から、フルニエリ種のゲノムを63の連鎖群までつなぎ合わせた。

テロメア配列を含む18の Scaffoldの中から fosmid クローンを選抜して FISH 解析を行うと、染色体末端に明瞭なシグナルが検出された。いくつかの Fosmid クローン DNA は内在の反復配列の影響で非特異的シグナルを形成した。体細胞中期染色体を用いて、18の fosmid クローンの総当たり組み合わせで FISH 解析を行い、9本のフルニエリ染色体の両末端に存在する fosmid クローン配列(染色体マーカー)を明らかにし、初めてトレニアの各染色体の明確な識別が可能になった。減数分裂パキテン期の染色体を用いて、9本のフルニエリ染色体の長さや碗比、各染色体の DNA 量を算出し、イデオグラムを作成した。

63の連鎖群をフルニエリの9本の染色体数までつなぎ合わせるために、各染色体を識別する上記の染色体マーカーと同時検出して染色体ごとにそれらの連鎖群を振り分けた。さらに同じ染色体に大別された連鎖群の fosmid クローン配列を同時検出して、Scaffoldの並びや向きを明らかにした。最終的にアセンブルが完了した63の連鎖群のうち長い Scaffold を含む25の連鎖群(63の連鎖群の約97%を占める。トレニアゲノムの約75%を占める)を9本の pseudomolecule につなぎ合わせた細胞遺伝学的地図を作成した。

(2) パイロニーのゲノム DNA からシーケンスライブラリーを作製し、ペアエンド(64bp)とシングルリード(36bp)それぞれでイルミナおよび454シーケンスを行った。約9700万リードが得られた。葉緑体やミトコンドリアを除いた、フルニエリのレファレンスゲノムへマップされたパイロニーゲノム DNA のショートリードの合計は、パイロニーやフルニエリのゲノムの約5倍の約1.59 Gbp(約3242万リード)となった。パイロニーの DNA がマップされなかったフルニエリの染色体領域(非マップ染色体領域)は、1Mbp~10Mbpの範囲では102領域が存在した。一方、10Mbp

を超えた長距離の非マップ染色体領域は存在しなかった。繰り返し配列やレファレンスゲノムのギャップが長距離の非マップ領域の検出を妨げている可能性も考えられるが、一对の染色体の増減ではなく、転座などの染色体突然変異によって、パイロニーで染色体減数が生じた可能性が高まった。

(3) 2013年8~9月にタイの Chaiyaphum 県、Phetchabun 県、Phitsanulok 県でトレニア野生種の探索調査を行った。すでに収集済みのトレニア属10種以外の種は見つからなかったが、フルニエリ種に似た形態的特徴を持つ個体を多数収集した。この中には、うどん粉病に抵抗性を示す Thai-1 系統や矮性系統などが含まれる。収集した全ての系統はフルニエリと同じ  $2n=18$  の染色体を持っていた。現在のところ、 $2n=16$  の染色体減数はパイロニー種でのみ生じた可能性が高い。

(4) 千葉大学と栽培環境が適する原産地であるタイにおいて交雑実験を行った。始めにパイロニー(種子親)×フルニエリ(花粉親)の種間雑種の中からパイロニーの戻し交雑で後代が得られる3個体を選抜した。染色体の調査からそれぞれ、F1 雑種、三倍体(2つのフルニエリゲノム+1つのパイロニーゲノム)、複二倍体に近いゲノム構成の異数体であることが分かった。この3個体それぞれで1000以上の花にパイロニーの花粉を受粉し、肥大した胚珠全てを胚珠培養した結果、18の BC1F1 が得られた。全交配のうち約3%で BC1F1 が得られた。それらの個体に繰り返し戻し交雑を行った結果、BC2F1 が1個体得られた(交雑成功率は2%)。これらの結果から、トレニア2種間で異種染色体添加系統を育成するのは困難であることが分かった。

胚珠培養で得られた上記の19個体のうち長期栽培できたのは6個体であった。全て  $2n=34$  の染色体数を持ち、パイロニーの戻し交雑を行っているにもかかわらず全6個体でフルニエリ種の染色体が19~21本と多く含まれることが分かった。戻し交雑でパイロニーのゲノムに近づけていくことが困難であることが明らかになった。

(5) 二基三倍体でゲノム分析を行ったところ、 $5.60I+6.74II+2.44III$  の対合が観察された。ゲノム親和性を表す  $c$  値 (Chapman and Kimber 1992) は  $c=0.79$  となり、フルニエリとパイロニーのゲノムが極めて類似していることが明らかになった。また、フルニエリの Thai-1 系統とパイロニーの交雑で新たに育成した F1 雑種の減数分裂で、Tf 一価染色体は出現せず、三価染色体が形成される細胞が46.7%の割合で観察された。フルニエリの栽培品種と Thai-1 系統の間で染色体の構造変異が存在する可能性があり、形態変化にも影響した可能性がある。

## 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 7 件)

- ① Nuntha B, Kikuchi S, Taychasinpitaak T, Sassa H, Koba T, High genomic affinity between *Torenia baillonii* and *Torenia fournieri* revealed by genome analysis using a triploid hybrid, *Cytologia*, Vol. 82, pp. 213-218, 2017 年 (査読有り)
- ② Nuntha B, Kikuchi S, Taychasinpitaak T, Sassa H, Koba T, New karyotypes of an interspecific hybrid of *Torenia fournieri* and *Torenia baillonii* and its progenies, *Chromosome Science*, Vol. 19, pp. 37-40, 2016 年 (査読有り)
- ③ Ragasova L, Ondrasek I, Taychasinpitak T, Pinthong S, Pensuriya B, Suwanseree VW, Kikuchi S, Chanchula N, Chromosome number increasing in *Torenia* hybrid by application of colchicine tablet, *Thai Journal of Science and Technology*, Vol. 5, pp. 200-212. 2016 年 (査読有り)
- ④ Taychasinpitak T, Kikuchi S, Jala A, Thanananta T, Chanchula N, Mutation breeding of Thai native torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by  $\gamma$ -ray irradiation, *Thai Journal of Science and Technology*, Vol. 5, pp. 190-199, 2016 年 (査読有り)
- ⑤ Chanchula N, Taychasinpitak T, Jala A, Thanananta T, Kikuchi S, Induction of somatic embryogenesis in *Torenia fournieri* Lind., *International Transaction Journal of Engineering, Management & Applied Science & Technologies*, Vol. 6, pp. 165-171, 2015 年 (査読有り)
- ⑥ Chanchula N, Taychasinpitak T, Jala A, Thanananta T, Kikuchi S, Radiosensitivity of in vitro cultured *Torenia fournieri* Lind. from Thailand by  $\gamma$ -ray irradiation, *International Transaction Journal of Engineering, Management & Applied Science & Technologies*, Vol. 6, pp. 157-164, 2015 年 (査読有り)
- ⑦ Boonbongkarn S, Taychasinpitak T, Wongchaochant S, Kikuchi S, Effect of colchicine tablets on morphology of *Torenia fournieri*, *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Science & Technologies*, Vol. 4, pp. 299-309, 2013 年 (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

- ① 菊池真司 (2016) トレニアの種間雑種における染色体行動の解析. 染色体学会第 65 回年会
- ② Nuntha B., Kikuchi S., Sassa H., Koba T. (2016) Genomic affinity level between *Torenia baillonii* and *Torenia fournieri*

measured by genome analysis with a triploid hybrid. 染色体学会第 65 回年会

- ③ 宮田千翠、菊池真司、長岐清孝 (2016) 免疫染色法によるトレニア CENH3 の細胞内局在の観察. 染色体学会第 65 回年会
- ④ Chanchula, N., Taychasinpitak, T., Jala, A., Thanananta, T., Kikuchi, S. (2015) Application of detached-leaf technique and gout drug treatment to induced tetraploid in *Torenia hybrida* (*T. fournieri* x *T. asiatica*). The 5th Asian Chromosome Colloquium CB-PP6
- ⑤ 小澤翔太、菊池真司、鈴木孝征、豊田敦、藤山秋佐夫、東山哲也、佐々英徳、木庭卓人 (2014) *Torenia fournieri* における各染色体の識別及び核型解析. 染色体学会第 65 回年会 (O3)
- ⑥ 菅野健太、菊池真司、佐々英徳、木庭卓人 (2013) トレニア 10 種の系統関係と染色体進化. 日本育種学会講演会 (育種学研究 15 別冊 1 号 : 84)

ホームページ等

<http://www.h.chiba-u.jp/lab/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