

(別紙様式第3号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: 菊池 真司

題目:

Genetic studies on reproductive barriers and chromosome dynamics in *Torenia* interspecific hybridization (トレニア種間交雑における受精障壁と染色体動態の遺伝学的研究)

異種間交雑を行うと交雑障壁が生じる。このため異種間交雑の可否には、交雑障壁の分子機構を理解する必要がある。交雑障壁の中には、染色体レベルで起こる現象が存在する。それには、染色体の脱落、細胞核内での異種染色体の位相的分離(ゲノム分離)、異種染色体対合が含まれる。これらの交雑障壁は、ゲノムの安定性や遺伝子発現に関係するが、その分子機構はわかっていない。そこで本研究では、異種間交雑後の異種染色体の核内配置や挙動を解析した。植物材料には、胚のうが胚珠から突出し、受精過程の観察に適したゴマノハグサ科の *Torenia fournieri* を用いた。異種染色体の挙動から、ゲノム分離や染色体対合の分子機構を考察した。

### トレニア属における種特異的動原体配列の単離とホールマウント FISH 法の開発

*T. fournieri* および *T. baillonii* から抽出したゲノム DNA を制限酵素 *AluI* で消化した時に検出したラダー状のバンドをクローン化した。これらの配列は DNA ブロットと配列解析から 52 bp を反復単位とする新規の縦列型反復配列であることがわかった。さらに FISH (蛍光 *in situ* hybridization) 解析で動原体への局在を示したため、TCEN (*Torenia centromere tandem repetitive sequence*)、BCEN (*T. baillonii centromere tandem repetitive sequence*) 配列と名づけた。DNA ブロット解析から、TCEN 配列は *T. fournieri* および近縁種で、BCEN 配列は *T. baillonii* でのみ存在することがわかった。さらに TCEN、BCEN 配列は、系統樹では離れたクラスターを形成した。配列の相同性は 52% と低いにもかかわらず、ともに 52 bp の反復単位から構成されることから、①共通の起源を持つこと、②ヘテロクロマチン化に重要であることが明らかになった。間期核において、動原体は核全体に散在し、核内で染色体が特異な Rab1 配向を取らないことが明らかになった。核を立体観察するために、胚のう細胞を固定し、スライド上でアクリルアミドゲルに包埋後、直接標識したプローブを用いて FISH を行った。その結果、明瞭なシグナルの立体検出が可能になった。トレニアの染色体は、卵核においても Rab1 配向を取らず、動原体は核内に散在していることがわかった。

### 種間雑種の育成と、*T. fournieri* および *T. baillonii* の核型、ゲノムサイズの決定

*T. fournieri* に近縁種 13 種の花粉を人工交雑したところ、*T. fournieri* (♀) と *T. baillonii* 間においてのみ種間雑種を得ることができた。TCEN、BCEN 配列をプローブにした FISH 解析で、異種染色体を識別することが可能であった。フローサイトメトリーを用いて、ミヤ

コグサ (*Lotus japonicus* 'Gifu B-129') で検量線を引き、*T. fournieri* と *T. baillonii* のゲノムサイズを測定したところ、それぞれ  $1C=171$  Mbp と  $167$  Mbp と互いに類似していた。これは *Arabidopsis thaliana* の  $125$  Mbp に匹敵するほど小さく、染色体あたりの DNA 量はトレニア 2 種の方が小さかった。一方、これらの種の染色体数は、 $2n=2x=18$ 、 $2n=2x=16$  であり、動原体配列や 5SrDNA の遺伝子領域数が異なっていた。このことから、*T. fournieri* と *T. baillonii* は、ゲノムサイズは類似しているが染色体分化の進んでいることが明らかになった。

#### 雑種細胞核における異種動原体の挙動 - 動原体分離、融合、集合 -

*T. fournieri* と *T. baillonii* の雑種における異種染色体の挙動について TCEN、BCEN 配列の観察を行った。2 種の染色体は雑種核内でも Rab1 構造をとらず、動原体配列を中心に DNA がループ状に存在すると考えられた。そのため、動原体配列を用いることで、'点' として染色体の位置を表し、統計学的に解析することが可能であった。*T. fournieri* と *T. baillonii* の種間受精後の受精卵核を観察したところ、異なる種の動原体は核内で完全に分離して配置しており、第一分裂まで分離構造が観察された。雑種植物体において、分裂細胞ではこの分離構造が引き続き観察され、体細胞分裂が動原体の分離構造形成のフォースになっていることが明らかになった。さらに分裂後期の染色体分配のタイミングで種間差がなかったことは、少なくともトレニアでは、染色体分配において分離構造が構築されないことを示唆している。分裂細胞から離れた G0 期では、動原体のシグナルの数が減少していたが、これは動原体同士が接近し、融合したためとわかった。動原体融合は、雑種の茎頂分裂細胞ではランダムであるが、茎表皮細胞や葉表皮細胞では同種間でより多く生じていた。減数分裂細胞では、レプトテンからサイゴテン期において、核内に散在していたすべての動原体が一つに集合する現象が見られた。パキテン期に移行すると、対合が完了し、動原体は再び散在することから、動原体集合の相同染色体対合への関与の可能性が考えられた。実際に、雑種やその複二倍体では、パキテン期に移行しても動原体の集合が強固に観察されたが、これは複雑となった相同染色体対合が、集合の遅延をもたらしていると考えられる。

#### *T. fournieri* の遺伝子数の少ない過剰染色体とトレニア属のゲノム進化

種間雑種の減数分裂細胞において、ゲノム基本数の異なる *T. fournieri* ( $2n=2x=18$ ) と、*T. baillonii* ( $2n=2x=16$ ) の染色体対合を解析したところ、パキテン期や減数分裂中期において、全ての細胞が  $8^{II}+1^I$  の対合を示した。FISH によって、二価染色体は異種染色体間で対合し、ループや非対合な領域は観察されなかった。一方、一価染色体は TCEN 配列を持つ *T. fournieri* 由来で、rDNA が座乗しない染色体であった。他の染色体と全く対合しないことから、この染色体の起源は単純な染色体の重複によるものではないことがわかった。また GISH 解析において、他の染色体との DNA 配列の類似性を示し、添加染色体ではないことが明らかになった。さらに *T. fournieri* でその染色体数が増加しないことから、B 染色体の可能性も否定された。この染色体がなくても配偶子に異数性の影響が現れないことから、*T. fournieri* のゲノムは *T. baillonii* のゲノムに、起源の不明な遺伝子数の少ない 1 本の染色体が付加されて進化した可能性を示唆している。

本研究から、細胞分化により動原体は活発にその核内配置を換え、分裂装置とは別の機能を細胞核内で担っていると考えられる。さらに種間雑種の核では、動原体は同異種間を認識しており、遺伝子発現などの細胞機能を異種間で分け隔てる役割を有している可能性が考えられた。一連の研究は、雑種形成における、核内の異種染色体の挙動の重要性を示めしており、新しい研究領域の可能性が示唆された。