

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370033
 研究課題名（和文） コモウセンゴケ複合体におけるジェネティック、エピジェネティックな種分化機構の解明
 研究課題名（英文） Speciation mechanism in *Drosera spatulata* species complex through genetic and epigenetic processing
 研究代表者
 植田 邦彦 (UEDA KUNIHICO)
 金沢大学・自然システム学系・教授
 研究者番号：60184925

研究成果の概要（和文）：

トウカイコモウセンゴケを無菌株化し、発芽および花序形成数について解析したところ、恒常的な実験条件下でも集団間および個体間の違いが見られた。また、核ゲノムにコードされる *atpG* 遺伝子の発現解析、および制限酵素を用いたメチル化の解析から、トウカイコモウセンゴケでは両親種由来の遺伝子の双方が発現している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Germination and inflorescences numbers were analyzed using axenic strains of experiment of *Drosera tokaiensis*. Differences of seed dormancy and inflorescence number were observed among populations and individuals under a controlled continuous condition, performed under the axenic controlled condition and inflorescences numbers of germinated strains were counted. In spite of controlled continuous condition, differences were observed among the populations and individuals. Expression analysis of nuclear coding encoded *atpG* gene and its methylation analysis using MSRE suggested that each both genes derived from parental species were expressed in *D. tokaiensis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	9,100,000	2,730,000	11,830,000

研究分野：植物系統学

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：種分化、植物、進化、分類学、遺伝子、コモウセンゴケ、倍数性
雑種起源種

1. 研究開始当初の背景

植物の進化、種分化には、交雑および倍数化が関与している例が多く知られており、むしろ一般的とさえ言える。自然界の植物において、倍数化とその後の染色体間組み換えや遺伝子の欠失により種分化が起ったであろうことは、様々な植物を用いた研究から示されてきている。一方、シロイヌナズナやコムギを用いた人工交雑実験により、倍数化が起るとメチル化による確率的な遺伝子のサイレンシングが起り、わずか2-6世代の内にそのエピジェネティックな変異が遺伝的に固定することが明らかにされてきている。トウカイコモウセンゴケは、葉および種子の外部形態と染色体の形態から、中村・植田 (1991 *Acta Phytotax. Geobot.* 42(2): 125-137) によりモウセンゴケとコモウセンゴケの非減数性雑種起源の分類群として記載された。モウセンゴケは大型の染色体 ($2n=20L$)、コモウセンゴケは小型の染色体 ($2n=40S$) を持ち、トウカイコモウセンゴケは両方の染色体を併せ持つ ($2n=20L40S$) こと、モウセンゴケ類の染色体は分散型動原体を持ち染色体間の組換えが起りにくいこと、コモウセンゴケ染色体をプローブとして用いたGISH法による解析から、トウカイコモウセンゴケは、両親種由来の染色体をそのまま合わせ持ち、染色体間の組換えは起こっていないと考えられた。また、葉緑体DNAおよび核のITS、*atp6*遺伝子の塩基配列を用いた解析から、トウカイコモウセンゴケは、コモウセンゴケを母親、モウセンゴケを父親とすること、母性遺伝する葉緑体を除き、塩基配列レベルの比較でも両親種由来の配列をそのまま併せ持っていることが明らかになった。より解像度の高い核の塩基配列である*LFY*ホモログ遺伝子の第2イントロンの塩基配列を用いた解析からも、トウカイコモウセンゴケは両親種由来の配列をそのまま併

せ持っており、両親種とトウカイコモウセンゴケの塩基配列間の変異は見られなかった。

2. 研究の目的

外部形態および開花特性に関しては、トウカイコモウセンゴケは、いずれの集団においても両親種の間中型を示すが種子休眠性に関しては集団間で環境条件に適応したと考えられる異なる表現型を示すことから、トウカイコモウセンゴケは、両親種から種分化した後、さらに集団間で分化しつつあることがわかっている。したがって、トウカイコモウセンゴケでは両親種由来の遺伝子が、エピジェネティックな機構により確率的にサイレンスすることで、新たな表現型を獲得した可能性を示唆していると考えに至った。またこの研究の過程で、核DNAのITS領域、*atp6*遺伝子のコード領域の研究から、日本産の4倍体のコモウセンゴケが異質倍数体である可能性が示されたが、両親種を含めたその実体は明らかになっていない。

コモウセンゴケと呼ばれている植物は、日本、中国南部、台湾、東南アジアからオセアニアにかけて、という特異な分布をしており、多様な形態や倍数性 ($2n=20, 40, 50, 58, 60$) のものを含んでいる。これらの中には、i) 日本産コモウセンゴケと同一なゲノムセットを持ちながらエピジェネティックな要因により異なる表現型を示すもの、ii) もともと同一なゲノムセットを持っていたが塩基置換や挿入・欠失によって変化したゲノムを持っているもの、iii) 日本産コモウセンゴケの一方のゲノムセットのみを持つもの(2倍体のもの)、iv) 別種と交雑したもの、v) 異なるゲノムを持つもの、のうちいずれか(複数)が含まれていると考えており、日本産のコモウセンゴケの実体を明らかにするためには、これら全てについての再検討を行うべきであるとの考え

に至った。このために広範な海外調査を行い、その実態を詳細に解決しなければならない。

このことをふまえ本研究では、これら世界のコモウセンゴケと、日本産の4倍体のコモウセンゴケを母親とする交雑起源種、すなわち異質6倍体でヘラ型の葉と赤い花を持つトウカイコモウセンゴケとをあわせて包括的に扱い、コモウセンゴケ複合体と呼ぶこととし、これら全てについて解析を行なう。

形態および倍数性に変異のあるコモウセンゴケ複合体について染色体解析と分子マーカーを用いた解析を行い、遺伝的および形態的まとまりを明らかにしたい。また、同所的に生育するコモウセンゴケについても分子マーカーを用いた解析を行ないたい。また、遺伝的に近縁であるにもかかわらず生態的変異が存在する日本のトウカイコモウセンゴケについて、トウカイコモウセンゴケの開花特性や種子休眠性が、両親種由来の性質をどのように反映しているのかを、花芽形成遺伝子群を誘導するLFY 遺伝子ホモログの発現と花芽原基の形成の解析、種子における胚発生の解析を行うことにより、詳細に検討する。エピジェネシスについては、予備的な解析として、ゲノム全体のメチル化を集団ごとおよび人工掛け合わせ個体について調査する。さらに、より広範な地域のトウカイコモウセンゴケについて、生態学的特性の解析および分子マーカーを用いた解析を行なう。

その結果、日本産コモウセンゴケの実態が明らかになるとともに、世界のコモウセンゴケ複合体の中で、交雑、同質倍数化、遺伝的交流の断絶による遺伝子進化、のいずれの原因によりどのような種分化が起りつつあるのかを解明できる。

交雑、倍数性の変化、ゲノム配列の変化、遺伝子発現の変化とその結果としての表現型の変化および適応的選択といった様々な要因

により種分化が起りつつあるコモウセンゴケ複合体を研究材料として扱うことにより、本来は同じゲノムを持つ植物が、自然界の中でどのような要因でどのような種分化が起りつつあるのか（あるいは起ったのか）を明らかにできれば成果は大きい。また、これまでの解析からは遺伝的変異が検出できないにも関わらず生態的表現型の分化を示すトウカイコモウセンゴケを用いて、遺伝的分化を詳細に解析するとともに、表現型の分化を引き起こした要因をジェネティック、エピジェネティックの両方の可能性から解明することはおおいに意義がある。特に、エピジェネティックな要因による遺伝子発現および表現型の変化は、これまでのところシロイヌナズナなどのモデル植物やコムギなどの栽培植物でのみ、研究が行われており、自然界で選択を受けながら種分化しつつある自然集団について解析されたと例はないだろう。

本研究により、自然界で起りつつある種分化において、倍数化、遺伝的变化、表現型、自然選択が、どのように関連し、影響しているのかを実際のデータによって明らかにすることができる。本研究は、自然界で、同じゲノムを持つ植物群が、倍数化（あるいは交雑により新たなゲノムがもたらされた）直後のエピジェネティックな変化から、時間を経たことによる遺伝的变化までの連続的な変化により、段階的に種分化を起こして行く様を、ジェネティック、エピジェネティックな解析を行うことにより明らかにしたい。

3. 研究の方法

①実験環境下での種子発芽特性の解析：過去の研究において異なる種子発芽特性を示すことが分かっている竜王（滋賀県）、小杉（富山県）、那谷（石川県）、武豊（愛知県）の4地点、および武豊と同様3タイプ混合型の種子

発芽特性を示すことがわかっている小鈴谷（愛知県）の、計5地点のトウカイコモウセンゴケ集団から、2007年7～12月に種子を採集した。また同時に、竜王、小杉からは、同所的に存在するモウセンゴケ、小鈴谷からは、同所的に存在するコモウセンゴケの種子を採集した。種子は、各地点において集団内の近接した個体のまとまりごとに5つに分けて採集した。採集した種子について、低温処理（4℃で4週間保存）を行なったものを行なわないものを作成し、表面を殺菌後、無菌培地（1/2MS培地）に播種し、25℃24Lの培養器内で100日間培養しながら発芽率と発芽時期を観察した。

②実験環境下での開花特性の解析：①で発芽した実生を個体ごとに試験管にわけ、20℃12L12Dの人工気象室内で1年間培養し、花序の形成の有無と形成された本数について観察した。また、各集団由来の実生から2個体ずつ選び、染色体数を確認した。

③エピジェネシスの解析：武豊、那谷、竜王、小杉由来のトウカイコモウセンゴケ、武豊由来のコモウセンゴケ、竜王由来のモウセンゴケの計12個体から、全DNAと全RNAを各々抽出した。抽出したDNAを鋳型に用いたPCR法により、核ゲノムにコードされる遺伝子である *atpG* 領域を増幅し、トウカイコモウセンゴケと両親種が持つ配列を確認した。また同じ個体から抽出した全RNAを用いて同じプライマーセットによりRT-PCRを行い、ダイレクトシーケンシングにより、得られた *atpG* 配列を確認した。また、ゲノムDNAを、同じ認識配列を持つがメチル化に対する感受性に違いがある制限酵素の二通りのペア（*Hpa*IIと*Msp*I、*Eco*RIIと*Mva*I）を用いて消化した後アガロースゲル電気泳動を行い、違いの有無を観察した。

4. 研究成果

①各地点の種子プールから低温処理をしたものと未処理のものを作成し、各地点あたり600

粒の種子について発芽を観察した。モウセンゴケについては竜王と小杉由来の計1,023粒について播種したが、低温処理の有無にかかわらず1個体も発芽しなかった。一方コモウセンゴケ種子では、低温処理をしたものがしなかったものに対して2.5倍の発芽率を示した。小杉由来のトウカイコモウセンゴケ種子の発芽率は1.7%ときわめて低く、低温処理の有無との関連は見られなかった。また武豊と小鈴谷のトウカイコモウセンゴケ種子では低温処理と発芽率の関連は見られなかったが、竜王と那谷のトウカイコモウセンゴケ種子では低温処理をしたものがしなかったものに対して各々2.4倍、1.8倍の発芽率を示した。これらの結果は、野外条件で観察された集団ごとの結果とは完全には一致しないが、恒常的な実験条件下でも、モウセンゴケと似た発芽特性を示す集団と、コモウセンゴケと似た発芽特性を示す集団が存在することを示している。

②実験条件下では、コモウセンゴケ株は、大部分が複数（2～5本）の花序を形成した。トウカイコモウセンゴケについては、武豊および小鈴谷のトウカイコモウセンゴケ種子から発芽した株のほぼ全てが花序を形成した一方、小杉の株では0、那谷の株では半数が花序を形成したのみであった。このように本実験では野外での観察とは異なり、集団ごとあるいは個体ごとに異なる開花特性を示す傾向が見られた。ただし、クローン株でも一方のみ花序が形成されていた例が2例見られたため、光環境などの要因による可能性もある。

③3種計12個体から抽出したゲノム中の *atpG* の塩基配列の解析から、今回用いたトウカイコモウセンゴケにも両親種であるモウセンゴケ由来の配列とコモウセンゴケ由来の配列の両方が存在することが確認できた。

RT-PCR法で増幅した配列をダイレクトシーケンシングした結果から、トウカイコモウセン

ゴケでは両親種由来の配列の双方が発現しており個体ごとに発現量比が異なる可能性が示唆されたが、量比に関する再現性は得られなかった。また、ゲノムDNAをメチル化感受性および非感受性の制限酵素で切断し、電気泳動によりゲノム全体のメチル化を調べたところ、顕著な違いではなかったもののモウセンゴケゲノムが最もメチル化の度合いが高いという結果が得られた。これらのことから、異質倍数体であるトウカイコモウセンゴケでは、両親種由来の遺伝子が両方発現することにより両親種の形質を併せ持つ可能性が示された。

表現型とエピジェネシスとの関連を明らかにするためには、今後、①②で異なる表現型を示す個体を用いて、実験条件下での表現型の原因となる遺伝子を特定した上で、当該遺伝子領域について解析する必要がある。

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)

[学会発表] (計3件)

1. 白河潤一、植田邦彦、須山知香、長野克也、星良和、ニュージーランド産コモウセンゴケの分子系統学ならびに細胞遺伝学的研究、日本植物学会第73回大会、2009年9月19日、山形大学(山形県)

2. 植田邦彦・須山知香・木下栄一郎・J. S. Wagstaff、日本産コモウセンゴケの分類学的再検討、日本植物分類学会第8回大会、2009年3月14日、宮城県教育会館(宮城県)

3. 植田邦彦・木下栄一郎・須山知香・J. S. Wagstaff、ニュージーランド産コモウセンゴケについて、日本植物学会第72回大会、2008年9月26日、高知大学(高知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 邦彦 (UEDA KUNIHICO)
金沢大学・自然システム学系・教授
研究者番号：60184925

(2) 研究分担者

小藤 累美子 (KOFUJI RUMIKO)
金沢大学・自然システム学系・助教
研究者番号：40324066

木下 栄一郎 (KINOSHITA EIICHIRO)
金沢大学・環日本海研究センター・准教授
研究者番号：70234317

山田 敏弘 (YAMADA TOSHIHIRO)
金沢大学・自然システム学系・講師
研究者番号：70392537

星 良和 (HOSHI YOSHIKAZU)
九州東海大学・農学部・准教授
研究者番号：70332088