

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25日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20570096

研究課題名（和文）倍数化により重複した酵素遺伝子群は倍数体の適応的種分化を促進したか

研究課題名（英文）Did duplicated genes of enzymes promote adaptive speciation in polyploids?

研究代表者

西野 貴子（NISHINO TAKAKO）

大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：20264822

研究成果の概要（和文）：

キク科植物において、ADH アイソザイム数の少ない分類群と多い分類群の cDNA の塩基配列を決定、比較を行ったところ、相同な遺伝子間では 90%以上の相同性を示し、そのほとんどが同義置換だった。ADH タンパクの Gro-ES、亜鉛保存部位、NAD(P)結合ドメインなどの機能上の重要な部分には非同義置換はなく、分子進化速度の暫定的な計算結果からも純化選択は棄却された。

研究成果の概要（英文）：

In Asteraceae, we determined and compared the sequence of cDNA of ADH between the taxa with a little number of ADH isozymes and with the many number. Homologous genes are shown more than 90% homology and most substitutions are synonymous. The important functional regions of ADH proteins are preserved without non-synonymous substitutions. Furthermore purifying selection would be rejected by predictive estimation of speed of molecular evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：種分化

1. 研究開始当初の背景

遺伝子重複は、一方の遺伝子が従来の機能を保持する間に、他方の重複している遺伝子において突然変異が蓄積し、新たな機能を生み出すことが可能になるため、遺伝子の機能分化を促進する重要な

機構である。

このような遺伝子重複によって生じる多重遺伝子族としてアイソザイムが知られている。遺伝子重複の後にサイレンシングが起こらず、機能分化したアイソザイムが保存されているということは、そのアイソザ

イムが中立、もしくは適応進化に正の方向にはたらいた可能性を示唆するが、アイソザイムの遺伝子重複の進化的意義の研究は、分子進化の例としてモデル生物を中心にした報告例が多く、実際の種分化と関係づけた研究例はまだ多くない。

また、系統学や分類学の分野では、野生植物におけるアイソザイムの遺伝子重複は古くから明らかになっているが、遺伝子重複という現象を単にゲノムのマーカーとして用いていることが多く、アイソザイムが生理活性に関わる機能的タンパク質であるという一面から、種分化の重要なメカニズムである適応の問題と関連づけた事例は少ない。

そこで、本研究ではアイソザイムにおける遺伝子重複が機能分化に関与する可能性に着目し、アルコール脱水素酵素 (*adh*: EC 1.1.1.1) の遺伝子重複が適応的な種分化に寄与した可能性について、野生植物を材料に分子進化学の観点から検討する。

本研究が ADH に対する遺伝子コードに焦点を当てている理由について、まず一つ目に植物分子集団遺伝学の多くの研究が *adh* 遺伝子に集中し、膨大な比較データがあるからである (Gaut, B. S. & Clegg, M. T. 1993, Hanfsting, U. *et al.* 1994, Innan, H. *et al.* 1996, Cummings, M. P. & Clegg, M. T. 1998, Charlesworth, D. *et al.* 1998, Lin, J.-Z. *et al.* 2002)。また、二つ目として、ADH は通常高次植物において小さな多重遺伝子ファミリーによってコードされているため、同一ゲノム内における遺伝子重複のふるまいを研究することが容易となるためである。さらに、*adh* 遺伝子は解糖系酵素をコードしており、植物の嫌

氣的代謝において重要な酵素であるため (Freeling, M. & Bennett, D. C. 1985, Dolferus, R. *et al.* 1994)、遺伝子重複と適応との問題とダイレクトに結びつけることが可能となるからである。

adh の遺伝子座を一つしか持たないシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. は例外であるが (Chang, C. & Meyerowitz, E. M. 1986)、2つから3つのアイソザイムが双子葉と単子葉の被子植物で観察されている (Gottlieb, L. D. 1982)。これまで、ADH プロモーターからの転写はトウモロコシ *Zea mays* とシロイヌナズナの低温ストレスに対する応答や、シロイヌナズナの脱水状態に対する応答と同様に、酸素ストレス下で増加することが知られている (Dolferus, R. *et al.* 1994)。*adh* 遺伝子の 5'側領域には嫌気誘導因子の結合部位 (*cis-element*) があり、トウモロコシの *adh 1* 遺伝子の場合、転写開始点の上流 140bp が嫌気誘導の制御に関与していることも知られており、*cis-element* の配列もすでに複数同定されている (Walker *et al.* 1987, Ferl & Nick 1987, Paul & Ferl 1991)。このように、イネ科植物の *adh* 遺伝子については発現制御の機構の研究まで進んでいるが、イネ科植物に比べ他の、特に野生植物における *adh* 遺伝子の研究は少ない。

これまでおこなったキク科の ADH アイソザイムの発現スクリーニングから、ミヤマヨメナ (*Aster savatieri* Makino) とコウゾリナ (*Picris echinoides* subsp. *japonica* Krylov.) において、それぞれ誘導特異性と器官特異性を示すアイソザイム数の増加が見つかっている。これらの発現に変異のある ADH の遺伝子情報を調べること、誘導性における表現型の分化が重複

した遺伝子の進化とどのような関連があるのか調べるのが可能だと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、キク科植物の *adh* 遺伝子をコードしている mRNA からプライマーを作製することと、そして、そのプライマーを用いて cDNA 断片を増幅し、ADH アイソザイム数の少ないキク科植物と多いキク科植物における cDNA の塩基配列を決定、比較を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

材料

ADH アイソザイム数の少ないものからカンサイタンポポ (*Taraxacum japonicum* Koidz.) を、ADH アイソザイム数の多い植物にユウガギク (*Aster iinumae* Kitam.)、ミヤマヨメナ (*Aster savatieri* Makino)、コウゾリナ (*Picris hieracioides* ssp. *japonica* Krylov.) を用いた。

・材料からの RNA 抽出

新鮮な葉片 (100 mg 以下) から Invitrogen 社の RNeasy Plant MiniKit を用いて total RNA を抽出した。操作手順は QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini Kit のプロトコールに従った。

抽出して得られた total RNA は濃度測定後、目的に応じて希積分注し、 -80°C のディープフリーザーで保存した。

・RT-PCR

キク科において、その塩基配列が決定されているレタス (*Lactuca sativa* ‘Grand Rapids’, GeneBank ; D44449.1) *adh* の mRNA 全長 1302 bp を基にプライマーを作製した。さまざま

なプライマーを組合せることで、レタスのあらゆる領域を標的とすることができるよう、計 18 個のプライマーを作製した。作製したプライマーの詳細は表 3 に、その方向と位置関係は図 1 に示した。プライマーの作製には作製ソフト Primer 3 を用いた。

タカラバイオ株式会社の TaKaRa PrimeScript[®] One Step RT-PCR Kit Ver.2 を用いて、得られたトータル RNA を RT-PCR により目的領域を逆転写し、cDNA にして増幅させた。操作手順は TaKaRa PrimeScript[®] One Step RT-PCR Kit Ver.2 のプロトコールにしたがって行った。

増幅した cDNA 断片はアガロースゲル (1×TAE-1% NuSieve GTG Agarose, FMC Bioproducts, USA) で電気泳動したゲルから目的領域を切り出し、TaKaRa RECOCHIP を用いて精製した。

・TA クローニング

得られた cDNA を invitrogen 社の TOPO TA Cloning[®] Kit を用いてサブクローニングした。

・塩基配列決定

得られたプラスミド DNA をアガロースゲルを用いて電気泳動し、目的とする長さを表わすバンドを確認することでインサートチェックを行った。インサートチェック後、Big Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit を用いてサイクルシーケンスを行った。

4. 研究成果

・RT-PCR

さまざまなプライマーと温度サイクル条件を組合せた結果、複数の PCR 産物が生じたものの、カンサイタンポポとコウゾリ

ナでは目的領域の増幅に成功した。アニーリング温度を 55 °C~65 °C の範囲で変更した結果、59 °C~62 °C において PCR 産物が生じ、本研究では ad2F432 と ad2R800、adh7F295 と adh7R674 の組合せのプライマーで、60 °C を最適アニーリング温度とした。

カンサイタンポポはプライマー adh7F295 と adh7R674 により、レタスの 295 bp~674 bp 領域で増幅し、想定サイズ 380 bp の cDNA が得られた。コウゾリナはプライマー ad2F432 と ad2R800 により、レタスの 432 bp~800 bp 領域で増幅し、想定サイズ 369 bp の cDNA が得られた。得られた cDNA のうち、カンサイタンポポとコウゾリナ間の共通領域の長さは 243 bp であった。ユウガギクとミヤマヨメナは、増幅したカンサイタンポポとコウゾリナと同じ反応条件下において増幅しなかった。また、カンサイタンポポとコウゾリナが増幅した 60 °C アニーリング温度条件よりも 1 度刻みの上下 5 °C の幅で温度を高温、低温に変更し、反応液に含まれる RNA の最終濃度をカンサイタンポポとコウゾリナと比べて半量~倍量にするなどの、異なる反応条件下においてもユウガギクとミヤマヨメナは増幅しなかった。

・得られた cDNA の相同性検索

サイクルシーケンスによってコウゾリナ 1 つ、カンサイタンポポ 6 つ (カンサイタンポポ a、カンサイタンポポ b、カンサイタンポポ c、カンサイタンポポ d、カンサイタンポポ e、カンサイタンポポ f) の計 7 つの cDNA 塩基配列が得られた (表 4)。得られた塩基配列を BLAST により相同性検索したところ、adh をコ

ードしたレタスの mRNA と各サンプルの相同性は、カンサイタンポポ a はレタスの 365 bp~674 bp 領域において 92 % の相同性を示した。1 塩基のギャップがあるカンサイタンポポ b は 409 bp~600 bp 領域と 89 %、カンサイタンポポ c は 371 bp~674 bp 領域と 91 %、カンサイタンポポ d は 389 bp~674 bp 領域と 92 %、カンサイタンポポ e は 390 bp~674 bp 領域と 92 %、1 塩基のギャップがあるカンサイタンポポ f は 364 bp~674 bp 領域と 90 %、そしてコウゾリナは 411 bp~695 bp 領域と 93 % の相同性を示した (表 4)。

なお、相同性検索する際には、N として読み込まれた波長のピークが、A、T、C、G のどの塩基に対応するのか、得られた波長のピークから自分の目で読み取り塩基配列を修正している。

本研究で決定した塩基配列の長さは、カンサイタンポポは 155 bp、コウゾリナは 330 bp である。本研究で行う比較は同一遺伝子座間での変異であるため、6 つのカンサイタンポポの塩基配列を CLASTALW によりアライメントし、155 bp のコンセンサス配列 (レタスの 424bp~578 bp 領域で 92 % の相同性を示す) を本研究におけるカンサイタンポポの塩基配列とした。以下、コンセンサス配列から決定したカンサイタンポポをカンサイタンポポ*と表記する (図 2, 3)。カンサイタンポポ a~f をアライメントした際にギャップとなった個所があったため、ギャップであるのか A、T、C、G の塩基どれかに対応するのか、得られたもとの波長から再度確認し修正を施した。図 3 では N から修正して読み取った塩基を青色、ギャップ箇所から修正した塩基を緑色、変異のある塩基を赤色で示した。橙色は N の修正後も変異のある塩基である。

その結果、6つのカンサイタンポポの塩基配列とコンセンサスの塩基配列との変異が多いものの順にカンサイタンポポ b (14 塩基)、次いでカンサイタンポポ a (5 塩基)、カンサイタンポポ e (1 塩基) となった。カンサイタンポポ c、d、f には変異がなく、これらの配列がコンセンサス配列となった。コンセンサス配列とそれぞれの配列との相同性は、カンサイタンポポ e は 99%、カンサイタンポポ a は 97%、カンサイタンポポ b は 92% を示した。

また、BLAST による相同性検索より、カンサイタンポポ*の塩基配列がトウモロコシやキク科エキナセア属 *Echinacea* の植物の *adh2* と高い相同性を示すことから、*adh2* である可能性が高い結果となった。コウゾリナとカンサイタンポポ*をアライメントした結果、共通配列 155 bp においてその相同性は 92% であった。また、挿入・欠失はなかった (表 4)。

・アミノ酸配列の推定

本研究で参照にしたレタスと得られた cDNA をアライメントし、変異のある塩基とそのサイトを調べた (図 4)。アライメント後の長さは 155 bp となった。レタス、カンサイタンポポ*、コウゾリナの 3 種間において 19 塩基の変異があった。レタスとカンサイタンポポ*間における変異は 12 塩基あり、そのうち非同義置換が 2 塩基、同義置換が 10 塩基あった (図 4)。レタスとコウゾリナ間は 9 塩基の変異があり、全て同義置換だった。

adh をコードしたレタスの mRNA 塩基配列 424 bp~578 bp 領域に今回得られたカンサイタンポポ*の塩基配列 155 bp を組み込み、アミノ酸推定を行った。

レタスの 469 番目と 529 番目のグアニンが、カンサイタンポポ*ではアデニンとなっており、レタスの 145 番目と 529 番目のバリンがカンサイタンポポ*ではイソロイシンとなっていた (表 5)。

さらに得られたアミノ酸配列から InterPro によりタンパク質の推定を行った。その結果から、得られたタンパク質は ADH ファミリーであり、Gro-ES、亜鉛保存部位、NAD(P)結合ドメインなどが保存されていることがわかった。この結果はレタスの全アミノ酸配列から得られる結果とまったく同じ結果となり、ゆえにレタスとカンサイタンポポ*間での非同義置換は ADH の機能部分には影響を与えない変異であった。

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 7 件)

- (1) 西内美穂子、矢原徹一、西野貴子. キク科二倍体におけるアルコール脱水素酵素の重複遺伝子の配列比較. 日本植物分類学会第11回大会. 2012年3月22-25日 (大阪学院大学)
- (2) 大久保理子、西内美穂子、船木拓也、藤井伸二、中山祐一郎、西野貴子. サワシロギクと蛇紋岩性近縁種シブカワシロギクの繁殖様式 ~結実率やアロメトリーをもとに~. 日本植物分類学会第11回大会. 2012年3月22-25日 (大阪学院大学)
- (3) Takako Nishino et al., Variation and functional differentiation of duplicated alcohol Dehydrogenase in diploid plants of Asteraceae. XVIII International Botanical congress, 23-30 July, 2011, Melbourne, Australia
- (4) 大久保理子、西内美穂子、藤井伸二、中山祐一郎、西野貴子. アロザイム多型によるサワシロギク集団の遺伝的分化の解析. 日本植物学会第75回大会. 2011年9月17-19日 (東京大学)

- (5) Takako Nishino et al., Genetic diversity of the endangered endemic species *Aster rugulosus* growing in two different habitats, acidic swamps and a serpentine area. **East Asian Botany: International Symposium 2011. 18-21 March, 2011** (Tsukuba Univ.)
- (6) 西野貴子、銭谷美乃里、山崎奈津子. カワラヨモギ集団における河川の氾濫による遺伝的多様性の維持機構. 日本植物分類学会第9回大会. 2010年3月26日 (愛知教育大学)
- (7) 松尾朝子、西野貴子、藤井伸二、中山祐一郎、副島顕子. サワシロギク *Aster rugulosus* とシブカワシロギク *A. rugulosus* var. *shibukawaensis* 集団における遺伝的多型の解析. 日本植物分類学会第8回大会. 2009年3月14日 (東京エレクトロンホール宮城(宮城県民会館))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 貴子 (NISHINO TAKAKO)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：20264822

(2) 研究分担者

中山 祐一郎 (NAKAYAMA YUICHIROU)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：50322368

(3) 連携研究者

()

研究者番号：