

機関番号：33910

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770194

研究課題名 (和文) 窒素環境の変化に応答した適応進化の研究

研究課題名 (英文)

Verification of adaptive evolution in response to changes in nitrogen availability

研究代表者

愛知 真木子 (AICHI MAKIKO)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：00340208

研究成果の概要 (和文)：食虫植物は貧栄養な湿地に生育するが、窒素肥料や NO<sub>x</sub> 降下により地球全体が富栄養化し、その生育地は減少傾向にあるといわれている。全国に自生する食虫植物モウセンゴケ (*Dr*) は貧栄養地でのみ生育しており、東海地方でコモウセンゴケとの雑種として成立したトウカイコモウセンゴケ (*Dt*) は比較的富栄養な土地でも生育していることを水質調査から明らかにした。次に、栽培実験を行って、*Dt* は *Dr* より富栄養環境下でも生育でき、環境の富栄養化に適応していることを明らかにした。さらに、高硝酸培地で生育させた植物体中の亜硝酸イオン濃度が *Ds, Dt* より *Dr* で高かったことから、高硝酸培地での *Dr* の生育不良が細胞内への亜硝酸イオンの蓄積に起因する可能性が示唆された。また、硝酸還元酵素遺伝子の解析にも着手した。

研究成果の概要 (英文)：

Carnivorous plants grow in low-nutrient wetlands, but as a result of eutrophication due to the combustion of fossil fuels and agricultural fertilization, habitat area is reduced. We analyzed NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations, pH and electrical conductivity of interstitial water collected from areas inhabited by *Drosera rotundifolia* (*Dr*) and *D. tokaiensis* (*Dt*), which is a hybrid between *Dr* and *D. spatulata* (*Ds*). These results showed that *Dr* grows in oligotrophic conditions, and *Dt* grows in eutrophic conditions. *Dt*, but not *Dr*, could grow in both oligotrophic and eutrophic conditions and has the ability to adapt to both conditions. In this study, we also raised these 3 species of *Drosera* in a greenhouse. *Dt*, but not *Dr*, was able to grow in oligotrophic and eutrophic conditions and has the ability to adapt to both oligotrophic and eutrophic conditions. Further analysis of accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, which is the toxic and reduced form of nitrate, following culturing in 5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> medium showed that *Dr* accumulated more NO<sub>2</sub><sup>-</sup> than *Ds* or *Dt*. We are now characterizing the structure of nitrate reductase of the 3 *Drosera* species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学，植物生理学，分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：機能進化・遺伝子発現制御・富栄養化・水環境・環境適応

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

周伊勢湾地域周辺にのみ分布する東海丘陵要素植物群の一つで、交雑起源種であるトウカイコモウセンゴケ(*Drosera tokaiensis* 以下 *Dt*)は、かつて関西型コモウセンゴケ(*D. spatulata* Labill. ssp. *Takaiensis* Komiya & C. Shibata)としてコモウセンゴケ(*D. spatulata* Labill 以下 *Ds*)の亜種に分類されていたが、葉の形態および核型の研究から複二倍体種であることが示され、独立種として再分類された(中村・植田 1991.)。さらに、*in situ* サザンハイブリダイゼーションにより、*Dt* (2n=60) は二倍体モウセンゴケ (*D. rotundifolia* L. 以下 *Dr*)(2n=20) と四倍体 *Ds* (2n=40) の交雑起源種であることが示された(Hoshi *et al.* 1994)。雑種形成による種分化は、一度分岐した種が交雑して雑種が形成され、その雑種が種として確立することを示す。そのため、どのような系統的背景の下に新種が誕生するのか、また、新種がどのように種として存続するのかを明らかにすることは、種分化および種の多様性を理解する上で重要である。*Dt* とその両親種は共に自殖性であるが、これらは交雑が可能であることが示されているので(光田・村田 2001)、*Dt* が種として確立していることは、両親種より優れた新規な形質「超越形質(Transgressive traits)」を保持していると考えられる。しかしながら、これまで同一条件下でトウカイコモウセンゴケとその両親種を比較した研究はなく、*Dt* が両親種から生態的地位を分化し、種として確立している要因は明らかでない。

一方、湿原の性質は、一般に貧栄養で酸性であるが、国連のミレニアム生態系アセスメントで指摘されているように(Millennium Ecosystem Assessment, 2005)、地球規模での富栄養化が進んでいること、*Dr* および *Dt* 自生地の水質を調査したところ、電気伝導度はそれぞれ 20~80 $\mu$ S/cm、25~195 $\mu$ S/cm および硝酸イオン濃度は、それぞれ 0~18 $\mu$ M、0~195 $\mu$ M であり、*Dt* の方が富栄養な環境でも生育が可能であった。このことから、*Dt* が両親種から生態的地位を分化し、種として確立している要因は、富栄養環境に適応しているためであるという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

(1) *Dt* が両親種から生態的地位を分化し、種として確立している要因は、富栄養環境に適応しているためであるという仮説を検証する。

(2) *Dr* の貧栄養適応機構の解明および *Dt* の富栄養耐性機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)①栽培方法：窒素負荷培地での生育調査のために、*Dt*, *Ds*, *Dr* 各 144 個体を 2006 年、2008 年、2009 年 5 月から中部大学構内(愛知県春日井市)のガラス温室にて生育させた。モウセンゴケ属植物体 1 個体ずつを、ピートモスと矢作砂 2 号を 2:1 の割合で混合したものを敷き詰めたジフィーストリップ(ピートモス・ウッドパルプ、角型 5cm、12 個連結)に植え、育種箱に入れた。育種箱をさらにトレイに入れて腰水栽培し、6 月から窒素栄養条件の異なる培地(硝酸培地:硝酸カリウム 1, 5, 15mM, アンモニア培地:硫酸アンモニウム 1, 5, 15mM) および対照区として、水道水のみ、塩化カリウム(1, 5, 15mM)を含む水道水の培地で腰水栽培した。硝酸培地が葉内硝酸イオン・亜硝酸イオン含量に及ぼす影響を調べるためには、モウセンゴケ属植物を植物育成チャンバー(Sanyo)にて生育させた。植物体は土壌や昆虫類を水道水および蒸留水で洗浄したのち、カット綿上にガーゼを敷きミリ Q 水で浸したトレー上で生育、養生した。養生後、ミリ Q 水に硝酸カリウムを 5mM とするよう添加した培地に移動し、栽培した。

②モウセンゴケ属の形態観察：デジタルノギスを用いて、2 週間に 1 度、個体の葉(腺毛を含まない)の長径(mm)と短径(mm)の長さを測り、平均をとることで個体の大きさの指標とした。また、葉の測定可能な個体を「生存」と判断し、生存個体数を求めた。花茎の形態測定には、金定規を用いて、全個体の花茎長(根元から先端までの長さ:mm)を測定した。また、種子の形成が見られた場合は記録し、生育の指標とした。

③細胞内の硝酸濃度測定：ミリ Q 水あるいは硝酸培地で生育させたモウセンゴケ属 3 種の葉を採取し、1.5ml または 2.0ml のマイクロチューブに移し重量を測定した。サンプルの重量に合わせて超純水で 20~40 倍に希釈し、オートクレーブ(121 $^{\circ}$ C, 15 分)によって細胞内の硝酸を抽出した。抽出液を遠心(4 $^{\circ}$ C, 10 分, 15000rpm)し、上澄み液をサンプルバイアルに移し、ENO-20 NO $\times$  ANALYZER(EICOM)にて硝酸濃度を測定した。なお、これらの操作はできるかぎり氷上で行なった。

④培地の化学的性質測定法：培地の硝酸濃度は、ENO-20 NO $\times$  ANALYZER(EICOM)によって測定した。培地の pH 測定は、B-212twinph (HORIBA)を用いた。EC は Twin Cond(B-173, 堀場製作所)(交流 2 極法, 測定範囲 0~19.9mS/cm, 自動校正機能)を用いて測定した。

(2) 硝酸同化系遺伝子の cDNA 構造解析：*Dt* の硝酸同化系遺伝子の発現を誘導するために、脱脂綿上に 5mM の KNO $_3$  培地で 1 時間培養後、約 1.0g を Tissue Lyser(QIAGEN)

で粉碎し、Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) のプロトコールに従い RNA 抽出を行った。抽出された RNA は、RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) を使用し全量クリーンアップした。精製された RNA のうち 5µg を使用し、First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare) を用いて cDNA 合成を行った。生成した cDNA を鋳型として Mighty Amp™ DNA Polymerase (TAKARA) を用いて、3 種の NR の増幅を試みた。プライマーは各 100µM を使用し、PCR はサーマルサイクラー (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) を用いた。その後、PCR 産物を 10 倍または 20 倍に希釈したものを鋳型とし、LA with GC Buffer (TAKARA) を用いて再び PCR を行った。クローニングは、pGEM®-T-Easy Vector Systems (Promega) と ECOS™ Competent *E.coli* (ニッポン・ジーン) を用いた。Big Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) およびオートシーケンサー (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、DDBJ のブラスト検索を行い、既存の NR との相同性について確認し、GENETYX Ver.9 を用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 窒素負荷培地が生育に及ぼす影響

窒素栄養条件を変えてモウセンゴケ属を栽培した2008年の地上部生存個体数の変化を図1に示した。コントロールの水道水のみで生育させた場合の *Dr* において、7月にいったん地上部の枯死が見られたが、温度の上昇に対応して地上部を枯死させることにより蒸散を防ぎ乾燥から身を守るための防御機構が働いたと考えられた。1mMの硝酸培地およびアンモニア培地で生育した個体においては、生育の悪化は観察されなかったが、15mM硝酸培地では3種とも7月初旬から地上部の枯死が観察され、8月には、*Dr* 3個体を除いてすべての個体の地上部が枯死した。これに対して5mM硝酸培地、5mMアンモニア培地では、*Dr* が7月中旬から地上部の枯死が見られ始め、8月には8割以上が枯死したのに対して、*Dt* と *Ds* は8月初旬から地上部の枯死が始まり、8月下旬になっても枯死個体数は50%以下であった。15mM

塩化カリウム培地では、*Ds* は6月初旬から、*Dt* は7月初旬から枯死が始まり、8月下旬の時点で、*Ds*, *Dt*, *Dr* の順に枯死する個体が増加する傾向にあった。

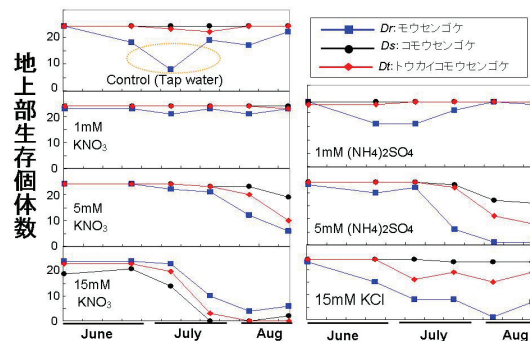


図1. 培地の種類とモウセンゴケ属植物の地上部生存個体数との関係

培地条件と地上部枯死個体数の関係について、さらに詳しく解析するために、2006年度、2008年度、2009年度の8月上旬の地上部生存個体数の割合の結果を用いて、t検定を行った。塩化カリウム培地では、*Dr* は培地中の塩化カリウム濃度が高くなるほど枯死する個体数が増加したが、*Dt* および *Ds* は顕著な枯死個体数の増加は観察されず、良好に生育した (図2)。

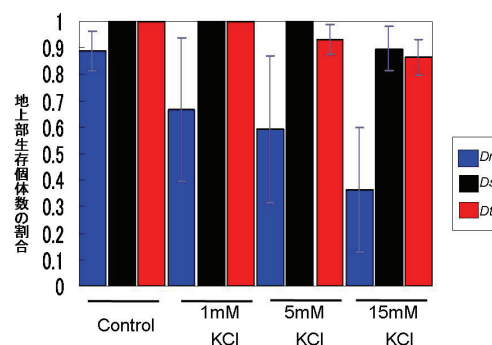


図2. KCl濃度と地上部生育個体数の関係

このことから、*Dt* および *Ds* は、*Dr* に比べて耐塩性および高浸透圧耐性があることが示唆

され、次に示す硝酸培地やアンモニア培地での枯死個体数の増加は塩濃度や浸透圧が上昇したことによるものではなく、それぞれの窒素成分に対する応答であることを支持するものであると考えた。アンモニア培地では、5mM以下での生育は良好であったが、15mMで*Dr*、*Ds*、*Dr*の順に枯死する個体数が上昇する傾向にあった(データ示さず)。一方、硝酸培地では、*Dr*は5mM以上で枯死する個体数が1mMに比べて有意に多く( $p<0.01$ )、*Dr*においても15mM以上で枯死する個体数が有意に多かった( $p<0.01$ ；図3)。*Ds*も*Dr*と同様15mM以上で枯死する個体数が多かったが、有意差を見出すことはできなかった。以上の結果から、*Dr*と*Ds*は硝酸濃度と、アンモニア濃度に対する許容範囲が広いと結論した。

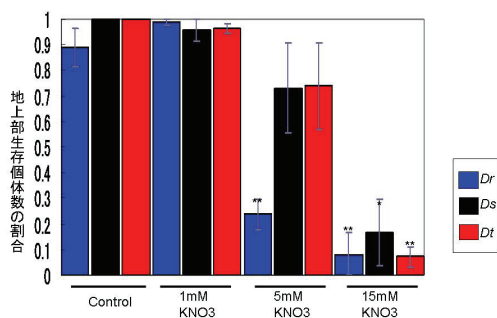


図3.KNO<sub>3</sub>濃度と地上部生育個体数の関係

次に、地上部生存個体の葉長（長径と短径の平均値）を分析したところ、1mMのいずれの培地においても*Dr*、*Ds*、*Dr*の順に葉長は大きくなり、3種ともコントロールと塩化カリウム培地より硝酸培地、さらにアンモニア培地で大きくなった。このことは、3種とも無窒素培地より窒素を1mM含む培地の方が生育に適しており、窒素源としては硝酸培地よりアンモニア培地をより好むことが明らかとなった。以上の結果から、*Dr*の窒素濃度および塩濃度に対する許容範囲の広さは両親種のうち母親

種である*Ds*から受け継いだものであると示唆された。

(2) 硝酸培地が葉内硝酸イオン・亜硝酸イオン含量に及ぼす影響

ミリQ水で栽培していた3種のモウセンゴケ属植物を5mM硝酸培地へ移動させ、2日後に細胞内硝酸イオン濃度と亜硝酸イオン濃度を測定した。硝酸イオンの蓄積量は2日目には、*Dr*が1.0 $\mu\text{mol/gFW}$ で、*Ds*は0.1 $\mu\text{mol/gFW}$ 、*Dr*は2.0 $\mu\text{mol/gFW}$ であった。一方、亜硝酸イオン濃度は2日目において、*Dr*が0.03 $\mu\text{mol/gFW}$ と最も高く、*Ds*と*Dr*は共に、0.015 $\mu\text{mol/gFW}$ であった。このように、高硝酸培地で生育が制限される*Dr*が亜硝酸イオンを細胞内に多く蓄積するという結果から、亜硝酸イオンの蓄積が高硝酸培地での生育を制限する要因である可能性が推察された。

(3)硝酸還元酵素構造遺伝子の構造解析

モウセンゴケ属植物3種から硝酸還元酵素遺伝子の一部のcDNAクローンを得て、塩基配列を決定した。NRは、Mo-co結合ドメイン、シトクロム結合ドメイン、NADH結合ドメインの3つのドメインから構成されており、それらはヒンジIとヒンジIIによってつながれている。NRは硝酸同化過程の調節酵素で、明暗条件や窒素環境によって転写調節と翻訳後調節を受けている (Lillo et al, 2004)。光による調節は、実際には光合成の結果生じる還元力や糖がシグナルとなっており、これらが不足するとプロテインキナーゼによりリン酸化され、引き続いて14-3-3タンパク質が結合することにより不活化されることが明らかとなっている (Moorhead G et al, 1999; Kaiser and Huber, 2001; MacKintosh & Meek, 2001)。そこで、モウセンゴケ属3種のMo-co結合ドメインとシトクロム結合ドメインをつなぐヒンジI領域のある部位の取得を試み、*Dr*と*Dr*の2種について取得した。ヒンジI領域は、NRの転

写後調節に関わるリン酸化部位があり、リン酸化部位周辺には保存された配列がある (R/K-S/T-X-pS-X-P)。転写後調節に関わる領域としては、*A. thaliana*では534番目、ホウレンソウでは521番目、*N. plumbaginifolia*では521番目のセリン残基が関与していることが明らかとなっており (Douglas et al, 1995; Bachmann et al, 1996; Lillo et al 2004), 菌類やクロレラのNRにはセリン残基が保存されていないことから高等植物にのみ保存されている残基であることがわかる。解析した結果、*Dt*と*Dr*の配列は他の高等植物の配列と同様にセリン残基があり、リン酸化部位が保存されていた。このことから、当初仮定した*Dr*と*Ds*、*Dt*の窒素感受性の差異は、硝酸還元酵素活性の調節が不十分である可能性を今回の結果からは裏付けることはできなかった。今後さらに解析を進めて活性制御に必要な部位を見出すか、*Dr*と*Ds*、*Dt*の窒素感受性の差異の原因について精査していく必要がある。

<引用文献>

- Bachmann M., Shiraishi N., Campbell W.H., Yoo B. C., Harmon A. , and Huber S.C., 1996, Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell*, 8, 505-517.
- Douglas P, Morrice N, MacKintosh C. Identification of a regulatory phosphorylation site in the hinge 1 region of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves. *FEBS Lett.* 1995, 377, 113-7.
- Hoshi, Y. Hizume, M. and Kondo, K. 1994. Genomic *in situ* hybridization to improve a hypothesis on natural-hybrid origin of the hexaploid *Drosera spatulata* 'Kansai type'. *La Chromosome II* -75-76, 2619-2623
- Kaiser and Huber, 2001, Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Botany*, 52, 1981-89
- 光田・村田 2001. 京都府のコモウセンゴケとトウカイコモウセンゴケ. *京都植物* 25, 6-11
- Lillo C., Meyer C., Lea U, S., Provan F. and Oltedal S. 2004, Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *J. Exp. Botany*, 55, 1275-82
- MacKintosh & Meek, 2001, Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 205-214.
- Millennium Ecosystem Assessment (MEA) 2005. *Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis.* Island Press, Washington. 155pp.
- Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, Meek S, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C. Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J.* 1999 18, 1-12.
- 中村・植田 1991. 東海丘陵要素の植物地理 II. トウカイコモウセンゴケの分類学的研究. *Acta Phytotax. Geobot.* 42, 125-137

## 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 3 件)

- ① Ohashi Y, Shi W, Takatani N, Aichi M, Maeda S, Watanabe S, Yoshikawa H, Omata T. Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. 2011. *J Exp Bot.* 62(4):1411-24. 査読有
- ② 味岡ゆい, 愛知真木子, 上野薫, 寺井久慈, 南基泰, 米村惣太郎. 那須守, 横田樹広, 小田原卓郎. 2007-2009 年に構築したハルリンドウ HSI モデルの年間比較. *環境アセスメント学会誌* 9 (1) : 64-72 (2011). 査読有
- ③ 愛知真木子, 市橋恭範, 南基泰. 食虫植物トウカイコモウセンゴケとその両親の話. 2009年12月. 中部大学「アリーナ」. 第7号 389-396. 査読無

[学会発表] (計 24 件)

- ① 豊田歩, 井原邦夫, 上坂一馬, 上野薫, 南基泰, 小俣達男, 小田原卓郎, 那須守, 米村惣太郎, 横田樹広, 愛知真木子. 2011年3月20日. 東海丘陵要素トウカイコモウセンゴケとその両親種の硝酸同化系遺伝子の解析. 日本植物生理学会年会 (仙台)
- ② Makiko Aichi Hideo Iwasaki, Takumi Ohishi, Takao Kondo, Mamoru Sugita, Kazuo Nagai and Tatsuo Omata. 2010.7.26-30. Network of gene regulation involved in the response of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* to nitrogen limitation Nitrogen 2010. P59 (Inuyama)
- ③ Yoshitake Ohashi, Nobuyuki Takatani, Makiko Aichi , Shin-ichi Maeda, Satoru

- Watanabe, Hirofumi Yoshikawa and Tatsuo Omata. 2010.7.26-30. Post-translational regulation of the cyanobacterial nitrate reductase involves the FeS center-binding domain of the enzyme. Nitrogen 2010. P64 (Inuyama)
- ④ Yui Ajioka・Makiko Aichi・Kaoru Ueno・Hisayoshi Terai・Motoyasu Minami・Takurou Odawara・Mamoru Nasu・Shigehiro Yokota・Soutarou Yonemura. 2010.5. 18-22. Evaluation of environmental factors for the conservation of genetic diversity in *Gentiana thunbergii*, the SATOYAMA indicator species. 2nd International Conference of Urban Biodiversity and Design (URBIO2010). p.343.
- ⑤ Shigehiro Yokota・Takurou Odawara・Mamoru Nasu・Soutarou Yonemura・Motoyasu Minami・Makiko Aichi・Kaoru Ueno・Hisayoshi Terai. 2010.5.18-22. Evaluation of Species Diversity and Potential Habitats of the SATOYAMA Indicator Species in Toki-Shonai River Basin. 2nd International Conference of Urban Biodiversity and Design (URBIO2010). p.276.
- ⑥ 豊田歩・市橋泰範・吉村久・中辰元・上野薫・南基泰・小俣達男・小田原卓郎・那須守・米村惣太郎・横田樹広・愛知真木子. 2010年9月9-11日. 東海丘陵要素トウカイコモウセンゴケの窒素応答性は母親種であるコモウセンゴケに類似している. 植物学会 (春日井). p.225.
- ⑦ 豊田歩, 市橋泰範, 近藤香苗, 中辰元, 吉村久, 上野薫, 南基泰, 小俣達男, 小田原卓郎, 那須守, 米村惣太郎, 横田樹広, 愛知真木子. 2010年3月21日. 東海丘陵要素植物トウカイコモウセンゴケとその両親種における窒素感受性の違いについて. 植物生理学会年会 (熊本).
- ⑧ 愛知真木子・市橋泰範・小林明広・近藤香苗・吉村久・上野薫・永井和夫・南基泰・小俣達男. 2008年9月25-27日. 交雑起源種トウカイコモウセンゴケは, 両親種より富栄養耐性である. 日本植物学会第72回年会 (高知).

[その他] (計 11 件)

<新聞>

- ① 愛知真木子. 地域生態系保全で共同研究 中部大学・清水建設, 遺伝的多様性まで考慮. 2008年7月24日. 日刊建設産業新聞.
- ② 愛知真木子. 地域生態系保全で共同研究 中部大学・清水建設, 産学連携新しいあり方を提示. 2008年7月24日.

建設通信新聞.

- ③ 愛知真木子. 土岐川・庄内川流域圏で遺伝子調査 中部大学・清水建設, 豊かな生物多様性実証. 2008年7月. 読売新聞 (朝刊).
- ④ 愛知真木子. 東濃に命のゆりかご. 中部大学・清水建設. 2008年8月. 朝日新聞 (夕刊).
- ⑤ 愛知真木子. 産学官で里山生態研究 COP10 白鳥地区. 2010年10月16日. 朝日新聞.

<シンポジウム>

- ① 愛知真木子. 交雑起源種トウカイコモウセンゴケは両親種より環境適応力に優れている. 2009年3月. 中部大学環境シンポジウム-COP10 にむけて- (春日井).
- ② 愛知真木子・味岡ゆい・南基泰. 遺伝的多様性まで考慮した生物多様性評価 Part2 同じであって同じでない植物達. 2010年9月. 中部大学週 in2010 上海国際博覧会「DEVNET 国際交流館」研究シーズ発表 (上海)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

愛知 真木子 (AICHI MAKIKO)  
中部大学・応用生物学部・講師  
研究者番号：00340208

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：