

機関番号：82617

研究種目：若手スタートアップ

研究期間：2009～2010

課題番号：21870051

研究課題名（和文） チャルメルソウ属の送粉様式を支配する「種分化遺伝子」の単離および進化生態学的解析

研究課題名（英文） Isolation and Evolutionary Ecological Analysis of the “Speciation Gene” of the genus *Mitella*

研究代表者

奥山雄大（OKUYAMA YUDAI）

国立科学博物館植物研究部・研究員

研究者番号：40522529

研究成果の概要（和文）：チャルメルソウ節を構成する種の大部分である10種において、SuperSAGE法により今まさに匂いを放出している花についてトランスクリプトーム解析を行った。得られたタグ配列を、Perlを用いたバイオインフォマティクスの手法で解析した。その結果、近縁な別種間でのゲノムワイドかつ網羅的なトランスクリプトーム比較にはじめて成功した。さらなる解析により、遺伝子配列と遺伝子発現の両面から実際にチャルメルソウ節の送粉様式を支配する『種分化遺伝子』である可能性が高い遺伝子を特定した。

研究成果の概要（英文）：I conducted a transcriptome analysis of the scent-emitting flowers of 10 *Asimitellaria* species, which comprises the vast majority of the section, using SuperSAGE. I analyzed the obtained SuperSAGE tags using perl-based bioinformatics and succeeded the genome-wide comprehensive transcriptome comparisons among closely related plant species. Further analyses based on gene expression and sequence data revealed some candidate genes dominating pollination systems of *Asimitellaria*, which were thus likely to be the “speciation genes”.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：進化生物学

キーワード：種分化、SuperSAGE法、トランスクリプトーム、次世代DNAシーケンサー、遺伝マーカー、花香成分

1. 研究開始当初の背景

日本産チャルメルソウ属はほぼ全ての種が数種のキノコバエ類と特異的な送粉共生の関係にある(Okuyama et al., 2004; 2008)。中でも特筆すべきことに、同所的に生育する種間では、送粉者となるキノコバエ科昆虫の種

が異なっており、それによって雑種形成が妨げられている(図1)。分子系統解析の結果からはこのような生殖隔離の原因となる送粉者の変化は日本産チャルメルソウ属の中で複数回起こっていることが明らかになっている(Okuyama et al., 2008)。すなわち、日本

産チャルメルソウ属において送粉者の変化は種分化の直接の原因となった可能性が示唆されていた。

日本産チャルメルソウ属の同所的な種間で生殖隔離が達成される理由として、特定の花の匂い成分が関与していることが引き続いた研究から明らかになっていた。これは日本産チャルメルソウ属の各種の送粉様式と匂い成分に有意な対応関係が確認されたためである。

すなわちこれらの匂い成分が本属の生殖隔離を支配していることになる。従って、これらの生合成能力の有無を支配する遺伝子(群)こそが、チャルメルソウ属における種分化の原因遺伝子である可能性が極めて高いと言える。

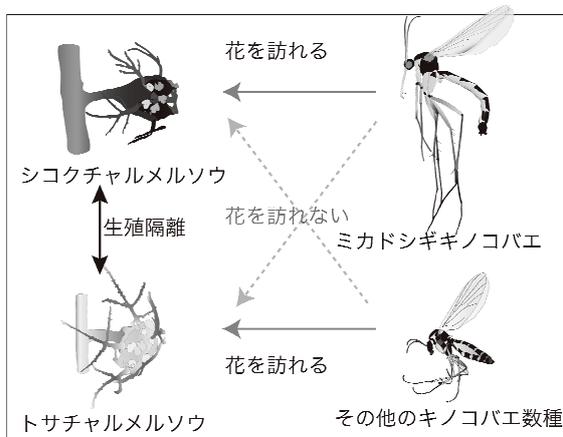


図1・同所的な種間での送粉者の違いによる隔離の例

2. 研究の目的

これら花の匂い成分の生合成を支配する遺伝子こそがチャルメルソウ属における「種分化遺伝子」であるとみなし、これらを単離、同定することを目指した。

本研究はチャルメルソウ-キノコバエ送粉共生系の研究にとどまる物ではなく、発現遺伝子の特定の形質に対する系統的連関解析を行うと同時に、これら発現遺伝子を遺伝マーカー化することによって連鎖解析をも可能とすることで、双方向から候補遺伝子を絞り込むという、非モデル生物においても適用可能かつ強力な適応遺伝子単離法を提示するものである。

3. 研究の方法

SuperSAGE法は、あらかじめ対象生物のゲノム情報を必要とするマイクロアレイによる遺伝子発現解析と異なり、どのような真核生物にも適用可能であり、かつゲノムワイドに一万を超える発現遺伝子の配列情報を、同時に多数の検体について得ることが出来る

画期的な方法論である。SuperSAGE法は組織で発現している mRNA それぞれを、遺伝子に固有な 26 塩基のタグ配列として代表させ、タグ配列の数を種類ごとに数えることによって対象の遺伝子発現プロファイルを得る方法である。

花の匂い成分は組織中で恒常的に生合成されていることから、種間の匂い成分プロファイルと遺伝子発現プロファイルに相関関係があることを想定し、日本産チャルメルソウ属全種に対し SuperSAGE 法を行い、系統的独立比較の手法を用い種の花成分プロファイルと発現パターンが連関する遺伝子を、チャルメルソウ-キノコバエ類送粉共生系の特異性を決定している候補遺伝子として絞り込むことを目指した。

その上で、発現遺伝子を連鎖地図上にマッピングし、遺伝解析によって表現型との関連付けを行うことで、実際に適応進化に関わった遺伝子を同定する。このために発現遺伝子に関する連鎖地図作製をゲノム情報なしに容易に達成する方策として SuperSAGE-タグマーカー法を考案した。これは SuperSAGE 法で得られたタグ配列をもとに、ゲノムワイドに数千の遺伝マーカーを簡便に開発する手法である。

4. 研究成果

それぞれの花香成分の放出パターンと強く相関する発現パターンを示す遺伝子を物質ごとにそれぞれ2-46遺伝子特定した。これらのうち、モノテルペンであるライラックアルデヒドの放出パターンと相関していた13遺伝子について、その周辺配列を決定し、遺伝子アノテーションを行ったところ、この中にはチトクロムP450遺伝子やテルペノイド生合成MEP経路の起点となる遺伝子DXSなど、明らかにLALsの生合成に関与すると考えられる遺伝子群が含まれていた。

特にここで得られた1遺伝子についてさらなる解析を進め、この遺伝子が正の自然淘汰を受けた痕跡である加速分子進化パターンを示し、さらにLALsを生合成できないチャルメルソウ属3種において独立に擬遺伝子化していることを突き止めた。すなわち本研究で新規に得られた遺伝子は、遺伝子配列と遺伝子発現の両面から実際にLALs生合成の鍵になる完全な新規遺伝子である可能性が高いことが示された。

またこの結果を遺伝学的に確認するため、ライラックアルデヒドを放出するミカワチャルメルソウと放出しないコチャルメルソウの間の雑種F2世代を230個体作成した。またこれらの開花個体すべてから花の匂い成分プロファイルを得るための大規模匂い捕集システム

を開発した。

また、申請者が考案したSuperSAGEタグマーカー法のプロトコルを確立した。

SuperSAGE法のデータで得られる10000を超えるタグのうち、8割以上についてゲノムからの近傍配列の増幅が可能であり、またこれらの大部分にゲル電気泳動でも十分に確認できるほどの大きなサイズ多型が存在することを明らかにした。これにより、ひとたびSuperSAGE法による解析データを得れば、あとはどのような生物種であっても無尽蔵に多型性の高いマーカーを開発できるようになった。

なお本研究計画と直接の関係はないが、SuperSAGE法やその他の分子生物学的研究手法の上で協力関係にある寺内良平（財団法人岩手生物工学研究センター）や西村いくこ（京都大学大学院理学研究科）との共同研究によって、イネのいもち病抵抗性遺伝子*Pia*や液胞で働くシロイヌナズナの遺伝子*SYP2*の単離および機能解析、進化解析なども行った(Shirakawa et al. 2010; Okuyama et al. 2011)。

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4件）

1. Yudai Okuyama, Hiroyuki Kanzaki, Akira Abe, Kentaro Yoshida, Muluneh Tamiru, Hiromasa Saitoh, Takahiro Fujibe, Hideo Matsumura, Matt Shenton, Dominique Clark Galam, Jerwin Undan, Akiko Ito, Teruo Sone, Ryohei Terauchi (2011) A multi-faceted genomics approach allows the isolation of rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *The Plant Journal* 66: 467-479. (査読有り)
2. Makoto Shirakawa, Haruko Ueda, Tomoo Shimada, Yasuko Koumoto, Takashi L. Shimada, Maki Kondo, Taku Takahashi, Yudai Okuyama, Mikio Nishimura, Ikuko Hara-Nishimura (2010) *Arabidopsis* Qa-SNARE SYP2 proteins localized to different subcellular regions function redundantly in vacuolar protein sorting and plant development. *The Plant Journal* 64: 924-935. (査読有り)
3. Yudai Okuyama (2010) Which genus to study? In search of plant genera underrepresented or overrepresented in the research from the flora of Japan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 36:82-89. (査読有り)

4. Yudai Okuyama, Makoto Kato (2009) Unveiling cryptic species diversity of flowering plants: successful biological species identification of Asian *Mitella* using nuclear ribosomal DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology* 9: 105 (査読有り)

〔学会発表〕（計8件）

1. 奥山雄大(2011) 形質、遺伝子、適応をつなぐー新しい多様性生物学への挑戦ー 日本生態学会第58回全国大会 札幌市札幌コンベンションセンター 2011年3月10日
 2. 奥山雄大(2011) 多様な生活史形質を決定する遺伝子の探索：非モデル生物で行う多種間比較オミクス 日本分類学会連合第10回公開シンポジウム 国立科学博物館新宿分館 2011年1月9日
 3. Yudai Okuyama, Tomoko Okamoto, Ryutaro Goto, Makoto Kato (2010) Use of phylogenetic-based multi-species comparison to identify the key determinants in plant-pollinator interactions. Memorial Symposium for the 26th International Prize for Biology "Biology of Symbiosis" -Celebrating Dr. Nancy A. Moran- 茨城県つくば市エポカルつくば 2010年12月7日
 4. 奥山雄大(2010) 分子系統樹を用いた比較法と祖先形質復元：膨大な生物多様性情報を活用するために 進化学・夏の学校 日本進化学会第12回東京大会 東京工業大学大岡山キャンパス 2010年8月2日
 5. 奥山雄大(2010) ゲノム時代の多様性生物学：チャルメルソウ属の進化・自然史研究からの展望 第35回駒場進化セミナー 東京大学駒場キャンパス 2010年2月22日
 6. 奥山雄大(2009) モデル生物からの脱却：次世代シーケンサー/SuperSAGE法の応用によるゲノム系統学の試み、第41回種生物シンポジウム 八王子セミナーハウス 2009年12月12日
 7. Yudai Okuyama (2009) Speciation at a single chemical: an extensive multi-species comparison revealed a key floral volatile for pollinator isolation in Asian *Mitella*. National Museum of Nature and Science, International Symposium 2009. 国立科学博物館新宿分館 2009年11月22日
 8. Yudai Okuyama, Tomoko Okamoto, Makoto Kato (2009) Phylogenetic dissection of pollination syndrome of floral volatiles in Asian *Mitella*. Evolution 2009 American Society of Naturalists, Society for the Study of Evolution, and Society of Systematic Biologists, Annual Meetings. University of Idaho, Moscow, ID USA 2009年6月15日
- 〔図書〕（計2件）
- 加藤雅啓、海老原淳 編 奥山雄大他 共著 (2011) 日本の固有植物 東海大学出版会誌

ページ数 503p

Sujay Rakshit, Hiroyuki Kanzaki, Hideo Matsumura, Arunita Rakshit, Takahiro Fujibe, Yudai Okuyama, Kentaro Yoshida, Muluneh Oli, Matt Shenton, Hiroe Utsushi, Chikako Mitsuoka, Akira Abe, Yutaka Kiuchi, Ryohei Terauchi.(2010) The Handbook of Plant Mutation Screening: Mining of Natural and Induced Alleles. Chapter 11. Use of TILLING for Reverse and Forward Genetics of Rice. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. pp 185-197. 総ページ数 460p

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.kahaku.go.jp/research/researcher/researcher.php?d=yokuyama>

<https://sites.google.com/site/okuyamanokenkyuupeji/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山雄大 (OKUYAMA YUDAI)

国立科学博物館植物研究部・研究員

研究者番号 : 40522529

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :