

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23657066
 研究課題名（和文）植物系統分類に新規SINE配列Auファミリーは利用できるか？
 研究課題名（英文）A novel SINE sequence Au family is useful to study plant phylogeny？
 研究代表者
 河原 太八（KAWAHARA TAIHACHI）
 京都大学・大学院農学研究科・准教授
 研究者番号：20115827

研究成果の概要（和文）：レトロエレメントの一種SINE配列が生物の系統解析に有用であることは、多くの脊椎動物で実証されている。植物で新たに発見したAuファミリーが、同様に利用できるかを調査したところ、裸子植物を含む多くの種子植物(17科38種)に存在することが明らかとなった。そのためこれらの植物においても、SINE配列を利用した系統解析手法が適用できることを確認した。

研究成果の概要（英文）：SINE sequence, one of retroelement DNAs, is a powerful tool for phylogenetic analysis in Vertebrates. Recently, we found a novel plant SINE, Au family in relatives of wheat. We searched this family in many plant species by PCR method and found out in 38 species covering 17 families. It became possible to study SINE sequence in many plant taxa including gymnosperm by using Au family.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：系統・進化

1. 研究開始当初の背景

我々はイネ科のコムギ近縁野生種 *Aegilops umbellulata* において新規SINE配列，Auファミリーを発見し，これが類縁関係の遠いナス科のタバコおよびトマトにも存在することを確認した (Yasui *et al.* 2001)。さらに，原始的な被子植物であるバンレイシ科のポーポー (*Asimina triloba*) にも存在することを発表した (Faucett *et al.* 2006)。レトロトランスポズンはゲノム中に挿入されると切り出されることがないと考えられるため，特定の遺伝子座

に存在するかどうかを調査することによって，それを共有派生形質として系統関係を推定することが出来る。これまでに植物で見いだされたSINE配列は，特定の科あるいはその中でも限られた分類群のみに存在するので，その内部の系統関係を推定することにしか応用できなかったが，この新規SINE配列は単子葉植物のイネ科と真性双子葉植物のナス科以外にも広く植物界に存在することから，それ以外の様々な分類群で発見される可能性が大きい。また上記の *Aegilops umbellulata* において，

特定遺伝子座における挿入の有無によって種内に変異のあることも明らかになっており、種内変異の解析にも利用できるため、分類群の上位下位を問わず同様な実験手法が適用できる。このように原理的には広範な応用が可能であるが、実際にこれまでに我々が明らかにした以外に、どのような植物群にこの配列が存在するか、まったく不明であった。またスクリーニングという地味な作業を必要とするせいか、2001年に論文を発表したにもかかわらず、今のところ我々以外にこの配列を新規分類群に応用した、という研究は見あたらなかった。そのため、植物の系統解析に新しい手法を持ち込むため、幅広い植物群でスクリーニングをすることを決意した。

レトロトランスポゾン的一种SINE (Short Interspersed repetitive Element) 配列は、ヒトなど哺乳類のゲノム中に多数存在し、ゲノムの構成要素として重要であることが明らかになってきている。また一方SINEの特性を利用した系統解析は、脊椎動物のうち鯨や偶蹄類などの哺乳類、サケなどの魚類で数多くの実績がある。植物でもSINEは発見されているが、広範に分布する配列が見い出されなかったため、研究の対象が特定の科内に限定されていた。申請者らの見いだした新規SINE配列は、植物では初めて被子植物の複数の科に存在することが確認されたものである。本研究は植物界全体でこのSINE配列、Auファミリーを利用した研究を行うという、新しい可能性を提案するものであるが、今のところ観察した分類群の数が少ないこともあり、単子葉植物や真性双子葉では複数の科で見つかっているが、その他のモクレン類では一例に留まっていた。脊椎動物ではSINEなどレトロエレメントがゲノムの40%を占めるなど、このグループがゲノム進化に大きな役割を果たしたことが明らかになっているが、植物界では個々の植物群でそれぞれ固有のSINE配列を扱わざるを得なかったため、研究が大きく立ち後れていた。そのため幅広い植物を対象とすることで、植物界全体でAu SINEを使った研究が可能であるかを探り、植物において新しい系統分類手法の開発を目指した。またさらに、植物ゲノム内でSINE配列を含むレトロエレメントが、その進化にどのような役割を果たしたかを探ること、を目標と

した。

2. 研究の目的

コムギ近縁種で新たに見いだしたレトロエレメントのAu SINE配列が、植物界全体でどのような分類群にどの程度見いだされるか、明らかにするのが最大の目的である。今のところ、裸子植物から単子葉のイネ科・真性双子葉のマメ科・ナス科に存在するが散発的であり、科内の下位分類群ごとの研究はまだである。またツユクサ科・バンレイシ科では各1例ずつで、これらの科内でAu SINEファミリーの研究が出来るかどうか不明である。そのため植物界のどのような分類群で有効か確かめるため、イネ科・マメ科・ナス科のこれまで扱わなかったグループ、およびSINEの見出された種の周辺の分類群を対象に、それが存在するかどうかスクリーニングを行い、発見された場合その塩基配列を明らかにし、そのコピー数を推定する。さらに既知の配列情報とあわせて、植物界全体でのAu SINEの進化を考察する。

3. 研究の方法

さまざまな植物種からDNAを抽出したが、一般に数枚の若葉があれば十分であり、植栽された植物を利用した。この点については、日本新薬山科植物資料館の秋田館長のご協力で多種多様な植物を対象とすることが出来た。また実験について、大学院博士課程学生1名の全面的な協力が得られた。

まず研究対象としてシダ植物から約30種、被子植物から約40種、別にイネ科を主体とした単子葉のグループから約30種、マメ科の広範囲な属から約20種、合計でおよそ120種を選びDNAを抽出した。このとき、被子植物ではナス科・ツユクサ科・バンレイシ科に重点を置き、残りは可能な限り多くの目を網羅するように、また単子葉のグループではイネ科の様々な連 (Tribe) をなるべく多く含むよう材料の収集を行なった。これは、従来ほとんど一科で一種しか観察していないため、サンプリングエラーを除くためである。なおイネ科は植物園で扱うことが少なく、多年生の一部の種を除いて既に植栽されたものを利用するのは困難であるため、各国の研究者やジーンバンクなどに依頼して種子を取り寄せ、実際に栽培して幼

植物よりDNAを抽出したものもある。マメ科の一部についても、同様に種子からの幼植物を利用した。

SINE配列が、ある植物種に存在するかどうかの確認は、その塩基配列を基準とし内部で増幅するプライマーを設計し、PCRベースで行った。SINE配列の塩基配列の変異は比較的大きいが、これまで同様二組のプライマーセットを使うことにより、ほとんどの場合で増幅可能であった。さらにこれまでの研究で複数種での配列情報が得られており、単子葉類・真性双子葉類というように、植物群に応じたプライマーを設計することもあった。こうして得られたPCR産物をダイレクトシーケンスし、塩基配列の情報を得た。

それに加え、DNA配列のデータ・ベースに納められているAu SINEを探索するため、BLASTを用いた検索を行った。

また配列自体の存在のほかに、そのコピー数は過去の挿入活動が活発であったかどうかを示す有力な情報であるので、サザンドットプロットを利用しコピー数の推定を行った。

4. 研究成果

まず被子植物以外に存在するか確認するため、シダ植物21種・裸子植物20種を対象としてDNAを抽出し、既知のSINE配列よりプライマーを作成し、PCR法で検出を試みた。シダ植物には見出されなかったが、マオウ科の裸子植物 *Ephedra ciliata* で新規Au SINEが発見された。これをクローニングし、数個の塩基配列を得てコンセンサス・シーケンスを作成した。*Ephedra* のAu SINEとこれまでに得られている被子植物のAu SINE配列を比較した結果、*Ephedra ciliata* のAu SINE配列は、これまでGlysine-typeとしていたダイズ (*Glycine max*) の配列と部分的に同じ挿入もしくは欠失が見られた。そのため、Glysineと *Ephedra* の配列を short-type と呼ぶこととし、より長い従来の *Medicago*-type を long-type と改称した。

つぎに、被子植物での分布域をより詳細に調べるため、基部被子植物5種・単子葉植物36種・真性双子葉植物71種の合計112種を対象として、PCR法を用いたスクリーニングを実施した。その結果、PCR実験で10科10種から見出すことが出来た。またBLASTを用いた解析からは、17科87種でAu SINEファミリーと考えられる配列を見出した。PCR実験の10種からは、クローニングによりすべ

てコンセンサス配列が得られたが、BLASTでは少数の配列しか得られない場合もあり、コンセンサス配列が得られた種は半分以下に留まった。コンセンサス配列を基準とすると、これまでは4科でしか見られていなかったが16科となり、とくにイネ科・マメ科・ナス科など経済的に重要な科では4種以上で見つかり、これらの科では普遍的であると考えても良いことが明らかになった。また short-type の新規配列も多く種で見出され、従来の結果と裸子植物で得られた結果を含め、今回新たに明らかになったものを総合し、short-type 21種、long-type 20種についてそれぞれのコンセンサス配列を作成した。

それらの配列から、近隣結合法により分子系統樹を作成した結果、short-type と long-type の分岐が強く示唆された。さらに、同一種で両方のタイプを持つ場合がイネ科で3例見られた。またイネ科とマメ科では、short-type を持つ種と long-type を持つ種の両方を見出された。しかしこのような場合でも、short-type と long-type のあいだに配列の類似は見られないため、それらが挿入/欠失に由来するものではなく、それぞれが互いに独立して共通祖先に由来していることが強く示唆された。

さらに個々の種のSINEの塩基配列から描いた系統樹は、植物自体の系統樹と同様なパターンとなり、SINEの系統樹とそれを持つ植物の系統樹に大きな矛盾は無かった。近縁の植物で見出されるSINEがお互いに似ていることから、Au SINE配列は親から子へと垂直的に、植物の共通祖先から伝えられてきたとの結論に達した。また裸子植物と被子植物の両方に見られることから、Au SINEはその2つの群の共通祖先で既に存在していたことが強く示唆された。

SINE配列は系統関係の推定に使えるだけでなく、この配列を利用したマーカー開発も可能である。実際に中国の研究者がダイズを対象とし、SINE法によりマーカーの開発を行ったことを報告している (Shu *et al.* 2011)、本研究により多種多様な植物に存在することが確認されたことから、広く植物界全体でAu ファミリーのSINEを対象とした研究が活発になってゆくことが期待される。

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)

[雑誌論文] (計1件)

Yagi, Eiki, Toru Akita and Taihachi Kawahara (2011) A novel Au SINE sequence found in a gymnosperm. Genes & Genetic Systems 86, 19-25.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 太八 (KAWAHARA TAIHACHI)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：20115827