

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658177

研究課題名(和文) 海産被子植物アマモの繁殖戦略を決定する生態特性と分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of ecological characteristics and molecular mechanisms related to reproductive strategy in marine angiosperm *Zostera marina*

研究代表者

柿沼 誠 (KAKINUMA, MAKOTO)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：60303757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：日本沿岸域アマモ場の主要構成種であるアマモ(*Zostera marina*)には、2つの繁殖型(一年生および多年生)が存在する。一年生アマモでは種子の発芽前後の環境水温が草体の形態に大きく影響するが、多年生アマモ草体の形態に対する環境水温の影響は認められず、一年生および多年生アマモの繁殖戦略は個体レベルで全く異なっていた。アマモ発芽体および草体の各器官や花穂を対象とした発現遺伝子の比較解析により、MADSボックス遺伝子をはじめとするアマモ繁殖戦略に関与する候補遺伝子が単離・同定された。

研究成果の概要(英文)：The intertidal seagrass *Zostera marina* is one of the major components of *Zostera beds* which are distributed along the coastline of Japan. In general, *Z. marina* shows two types of reproductive strategy, annual-type and perennial-type. Although morphological characteristics of annual *Z. marina* shoots were greatly affected by environmental water temperature during seed and germination periods, the influence of environmental water temperature on those of perennial *Z. marina* shoots was not observed. These results suggest that the reproductive strategy of annual *Z. marina* is different at individual level from that of perennial *Z. marina*. Candidate genes including floral homeotic MADS-box genes, which may be responsible for the reproductive strategy of *Z. marina*, were isolated and identified by expression analysis of the genes in *Z. marina* seedlings, various organs in the shoots, and spadices.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：海産被子植物 アマモ 海草 種子 発芽 繁殖 花穂 花器官形成

1. 研究開始当初の背景

沿岸海域の砂泥底において海産被子植物アマモ属により形成されるアマモ場は、沿岸域の重要な一次生産の場であると共に、魚貝類の産卵・育成の場、すなわち魚貝類資源の生産とその生物多様性を維持する重要な役割を果たしている。しかしながら、戦後の埋め立てや干拓等による沿岸開発、近年の人間活動に起因する水質汚濁や温暖化のために、アマモ場面積は重篤な縮小傾向にあり、沿岸浅海域の生物生産・物質循環システムは崩壊の危機に直面している。近年、アマモ場の修復・保全の技術開発が進められているが、アマモの生理生態学的特性や遺伝的特性は未だ十分に把握されていない。

日本沿岸域アマモ場の主要構成種であるアマモ (*Zostera marina*) には、群落形成・維持機構が大きく異なる2つの繁殖型、すなわち静穏な閉鎖系海域において主に種子による有性生殖で群落を維持する一年生アマモと、海水交換の良い海域において主に栄養株の分枝による無性生殖によって群落を維持する多年生アマモが存在する (Morita et al. (2009) *Aquaculture Sci.* 57, 531-540)。現在取り組まれているアマモ場修復は、アマモ場から採集した種子の播種や株の移植に依存しているが、環境によって異なる繁殖様式を示すアマモ場を、環境に適した繁殖型を利用して効率良く修復・保全していくためには、一年生アマモと多年生アマモの繁殖戦略の違いを生理生態学的側面のみならず、分子レベルで把握することが必要不可欠である。

アマモの群落形成・維持や繁殖様式に関するこれまでの研究は、天然に存在するアマモ場を対象とし、主に群落規模の巨視的な調査によって進められてきた。フィールド調査や潜水調査により、年間を通じたアマモ群落の季節変化やアマモ場の環境変化(海水温、塩分濃度等)が調べられ、生育環境とアマモの群落形成・維持や繁殖様式との関係が推察されている。しかしながら、生育環境がアマモ個体の生長や繁殖様式に及ぼす影響については、未だ十分に把握されておらず、そのような取り組みも見当たらない。

そこで我々は、これまでの研究とは全く異なった観点、すなわち個体レベルで生理生態学的特性を把握し、アマモ群落の繁殖戦略を明らかにすることに重点を置き、環境条件(水質、温度等)を厳密に制御できる室内培養系を利用したアマモ種子の発芽試験、ならびに環境条件を安定して維持・管理できる大型屋外水槽を利用したアマモ発芽体の長期生長試験を行ってきた。さらに、陸上植物の種子の発芽様式を決定付ける“春化”という概念を、アマモの生理生態学的特性や繁殖特性を把握するために取り入れてきた。これまでに、春化(低温)処理を施した一年生アマモ種子の発芽試験および発芽体の長期生長試験により、アマモの種子一粒といった個体レベルで一年生アマモ群落の繁殖戦略の特

性解析を進め、一年生アマモ種子に対する春化处理の有無と発芽温度の違いによって、生長後の有性・無性生殖の割合、生殖株の長さや花穂数が増加すること、高密度群落を形成・維持する一年生アマモの繁殖様式は環境水温によって決定されることを明らかにした (Morita et al. (2010) *Aquatic Bot.* 92, 49-54)。これに対して、低密度群落で生殖株数が少ないといった群落特性をもつ多年生アマモの繁殖様式の決定機構は、一年生アマモのそれとは大きく異なることが予想されるが、多年生アマモの個体レベルでの繁殖様式と生育環境との関連性は未だ不明である。さらに、一年生アマモと多年生アマモの繁殖戦略の違いを分子レベルで把握するためには、各アマモ種子の発生過程、発芽体の生長過程、栄養株および生殖株の発生・生長過程、さらには花器官(花穂)形成過程を制御している遺伝子群を単離・同定し、各遺伝子の発現様式と群落特性との関連性を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、生育環境を厳密に制御可能な室内培養系を用いた多年生アマモ種子の発芽試験、ならびに環境条件の維持・管理を安定して行うことができる大型屋外水槽を用いたアマモ発芽体の長期生長試験を行い、環境要因が多年生アマモの繁殖戦略に与える影響を明らかにすることを目的とした。

また、種子による有性生殖で高密度群落を維持する一年生アマモと、栄養株の分枝による無性生殖で低密度群落を維持する多年生アマモでは、栄養株や生殖株の発生、生殖株における花器官(花穂)形成等が環境要因のみならず、遺伝的プログラムにより制御されていることが考えられる。そこで我々は、陸上植物における花器官形成をはじめとする様々な形態形成過程に関わる転写因子遺伝子(MADSボックス遺伝子)に着目し、アマモMADSボックス遺伝子の単離・同定に取り組んできた。本研究では、アマモの繁殖戦略を分子レベルで把握するために、アマモMADSボックス遺伝子の単離・同定をさらに進めると共に、各MADSボックス遺伝子の発現特性を調べた。さらに我々は、少なくとも一年生アマモ種子では発芽前後の環境水温により、生長後の草体における有性・無性生殖の割合、生殖株の形態や花穂形成数等が増加することを明らかにしている。そこで、一年生アマモの繁殖戦略に関わる遺伝子群を単離・同定するために、一年生アマモ草体の形態的特徴に差がみられる温度条件でアマモ種子を処理して発芽体を調製し、発現遺伝子の比較解析を行った。

3. 研究の方法

(1)室内培養による多年生アマモ種子の発芽試験

一年生アマモの繁殖様式は種子の処理温

度と発芽温度によって変化し、特に種子を春化（低温）処理した場合に一年生アマモ群落に適した繁殖様式となる。そこで本研究では、まず種子の処理温度と発芽温度が多年生アマモの繁殖様式に与える影響を調べるために、多年生アマモ群落より採集した種子を用いて発芽試験を行った。

多年生アマモ群落からアマモ生殖株を採集し、大型屋外水槽にて約2ヵ月間（5月24日～7月25日）の追熟を行った後、放出されたアマモ種子を回収して春化处理区と未処理区（各々900粒ずつ）に分けた。春化处理区の種子は、水温7℃、明期12h・暗期12hの光周期（12L/12D）、光強度50 μmol photons/m²/sに設定した培養庫にて約1ヵ月間（9月4日～10月2日）の低温処理を行った。一方、未処理区の種子については、春化处理区の種子と同時期に大型屋外水槽で保存培養した。

春化处理区および未処理区の多年生アマモ種子を、滅菌砂および1/5強度のProvasoli栄養補強海水培地を入れた角型培養瓶に30粒ずつ播種し、異なる水温（7, 10, 15, 20, 25℃）で光周期12L/12D、光強度50 μmol photons/m²/sに設定した培養庫で約2ヵ月間（10月2日～12月9日）培養し、各処理区の発芽率を測定した。

(2)屋外水槽培養による多年生アマモ発芽体の生長試験

発芽試験で得られた多年生アマモ発芽体を、春化处理区および未処理区の発芽温度別に分け、同一条件の発芽体を7個体ずつバットに移植した。アマモ発芽体を移植したバットを大型屋外水槽に移し、約19ヵ月間（12月10日～7月22日）培養した。各バットに移植した7個体のうち、ランダムに選択した3個体にタグを取り付けて個体を識別し、草体長、栄養株の分枝数、生殖株の形成数、花穂形成数を月2回測定した。

アマモ草体長は、底泥の表面から最も長い株を測定して求めた。また、全ての栄養株および生殖株はタグによる識別を行い、生殖株に形成された花枝についても形成された順に花枝番号を付した。生殖株あたりの花枝数および花枝あたりの花穂数については、生殖株が形成されている期間中、測定を行った。また、最大草体長から最下部の花枝までの茎長を引いた値を、花枝形成範囲とした。

(3)アマモ MADS ボックス遺伝子の単離・同定と発現解析

陸上被子植物の花器官形成は、複数の遺伝子群（A, B, C, D および E クラス遺伝子）によって制御されており、各クラス遺伝子は全て MADS ボックス遺伝子群に分類されている。我々はアマモ MADS ボックス遺伝子の解析を進め、これまでに5種類のアマモ MADS ボックス遺伝子（*ZmMADS1*～*ZmMADS5*）cDNA を単離・同定している。また、各 *ZmMADS* の演繹アミノ酸配列の分子系統解析の結果から、*ZmMADS1*（197 アミノ酸残基）は TM8 サブファミ

ミリー、*ZmMADS2*（217 アミノ酸残基）は SQUA サブファミリー（A クラス）、*ZmMADS3*（209 アミノ酸残基）は SOC1 サブファミリー、*ZmMADS4*（237 アミノ酸残基）は AG サブファミリー（C/D クラス）、*ZmMADS5*（246 アミノ酸残基）は SEP サブファミリー（E クラス）に属することが示唆されている。したがって、アマモの花器官（花穂）形成の分子機構においても MADS ボックス遺伝子群が重要な役割を果たしていることが考えられるが、アマモ生殖株および花穂の形成や栄養株の分枝等には、未だ単離・同定されていない MADS ボックス遺伝子が関与している可能性がある。そこで本研究では、新規アマモ MADS ボックス遺伝子の cDNA クローニングを行った。

アマモ場より採集した多年生アマモ生殖株から全 RNA を抽出・精製し、RACE PCR 用 cDNA を合成した。既に得られている5種類のアマモ MADS ボックス遺伝子（*ZmMADS1*～*ZmMADS5*）cDNA 等の塩基配列情報を基に RACE PCR 用プライマーを作製し、RACE PCR 用 cDNA を鋳型として3' RACE PCR を行い、増幅 cDNA をクローン化して塩基配列を決定した。

さらに、多年生アマモの器官別、花穂の発達段階別に *ZmMADS1*～*ZmMADS5* 遺伝子および新規アマモ MADS ボックス遺伝子の発現解析を行った。*ZmMADS1*～*ZmMADS5* 遺伝子および新規アマモ MADS ボックス遺伝子の cDNA 塩基配列情報を基に、各 MADS ボックス遺伝子発現を特異的に検出・定量するリアルタイム PCR 用プライマー・TaqMan プローブセットを作製した。解析対象はアマモ場より採集した多年生アマモとし、地下茎、生殖株の花穂、葉鞘、葉身および茎、栄養株の葉鞘および葉身を回収した。花穂についてはさらに、花穂形成期、雌蕊開花期（雌蕊の柱頭露出）、雄蕊開花期（柱頭脱落后の花粉放出前）、種子形成初期（花粉放出後）、種子形成中期、種子形成後期の発達段階別に分けた。また、種子形成後期以後の花穂から放出前の種子を回収した。各器官から全 RNA を抽出・精製してリアルタイム PCR 用 cDNA を合成し、これを鋳型として各 MADS ボックス遺伝子 cDNA に特異的なプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム PCR を行い、器官別および花穂発達段階別に各 MADS ボックス遺伝子の発現特性を調べた。

(4)環境水温に適応した一年生アマモの繁殖戦略に関わる遺伝子群の単離・同定

一年生アマモ種子では、春化处理の有無やその後の発芽温度の違いにより草体の形態や繁殖様式が変化する。春化处理・高温発芽では生殖株の花穂形成数および栄養株の分枝数が共に多くなるが、春化处理・低温発芽では栄養株の分枝数が少なくなる。一方、未処理・低温発芽では生殖株の花穂形成数および栄養株の分枝数が共に少なくなるが、未処理・高温発芽では栄養株の分枝数が多くなる。このように、一年生アマモ草体の形態を決定する主要因は種子の発芽前後の環境水温で

あり、一年生アマモ種子に対する春化处理の有無は生殖株の花穂形成数に、種子の発芽温度は栄養株の分枝数に影響を及ぼす。そこで、一年生アマモ草体の形態的特徴に差がみられる条件（春化处理・高温発芽、春化处理・低温発芽、未処理・低温発芽）で発芽体を調製して発現遺伝子の比較解析を行い、一年生アマモの繁殖戦略に関わる遺伝子群の単離・同定を試みた。

一年生アマモ種子から調製した春化处理・高温発芽体、春化处理・低温発芽体、未処理・低温発芽体から mRNA を抽出・精製し、これらを鋳型として各発芽体の cDNA ライブラリーを構築した。各 cDNA ライブラリーと PCR-Select cDNA Subtraction Kit を用いて、計 2 試験区（春化处理・高温発芽体と春化处理・低温発芽体、春化处理・低温発芽体と未処理・低温発芽体）で cDNA サブトラクション処理を行い、各サブトラクション区に用いた cDNA ライブラリー間で蓄積差のある遺伝子 cDNA プールを調製した。各 cDNA プールを挿入したプラスミドベクターで大腸菌を形質転換後、選択培地上に生育した大腸菌コロニーをランダムに選抜し、コロニー PCR により挿入 cDNA を増幅した。増幅 cDNA をナイロンメンブレンに転写後、DIG 標識した cDNA プローブをハイブリダイズさせ、各 cDNA の発現解析（ドットプロット解析）を行った。

ドットプロット解析結果から、各サブトラクション区に用いた cDNA ライブラリー間で蓄積差のある遺伝子 cDNA を特定し、それらの塩基配列を決定後、CAP3 プログラムを利用して塩基配列データのアセンブルを行った。得られたコンティグ配列データを Blast2GO プログラムを利用した配列解析に供し、一年生アマモの繁殖戦略に関わる遺伝子群を同定した。

4. 研究成果

(1) 室内培養による多年生アマモ種子の発芽試験

多年生アマモ種子を春化处理区および未処理区に分け、室内培養下で発芽試験を行ったところ、春化处理区および未処理区の種子発芽率はそれぞれ、温度 15 ($53.3 \pm 16.5\%$) および 7 ($42.2 \pm 11.7\%$) で最も高かった。春化处理区の種子発芽率は、未処理区のそれよりも有意に高い値であったが、春化处理区の温度 25 における発芽率は他の温度 (7, 10, 15, 20) よりも極めて低く、未処理区については水温 25 で発芽は認められなかった。一年生アマモ種子に対して春化处理を行うと、発芽率が飛躍的に向上することが知られている (Morita et al. (2010) Aquatic Bot. 92, 49-54)。多年生アマモ種子の発芽試験の結果から、春化处理および発芽温度は多年生アマモ種子の発芽率にも大きく影響することが明らかとなった。

(2) 屋外水槽培養による多年生アマモ発芽体の生長試験

栄養株の分枝数および生殖株の形成数

多年生アマモ発芽体を大型屋外水槽に移植して長期間培養したところ、全ての発芽体において栄養株の分枝が確認された。栄養株の分枝数は、春化处理区では発芽温度 25 (47.0 ± 19.0)、未処理区では発芽温度 15 (39.7 ± 8.9) で最も多かった。生殖株の形成数は、春化处理区では発芽温度 7 (2.3 ± 0.6)、未処理区では発芽温度 15 (4.0 ± 0.0) で最も多く、未処理区の発芽温度 20 では生殖株は形成されなかった。しかしながら、栄養株の分枝数および生殖株の形成数において、春化处理の有無や発芽温度の違いによる影響は認められなかった。

栄養株および生殖株の草体長

各試験区の栄養株および生殖株の草体長を調べたところ、それぞれ 43.7~61.6 cm および 128.9~151.0 cm の範囲内であり、栄養株の草体長は生殖株のそれよりも低い値であった。なお、春化处理区および未処理区の発芽体は共に、大型屋外水槽に移植後 2 年目で生殖株を形成し、最も早い時期に花穂の形成が認められた発芽体は、春化处理区については発芽温度 7, 15 および 20、未処理区については発芽温度 15 であった。しかしながら、栄養株および生殖株の草体長において、春化处理の有無や発芽温度の違いによる影響は認められなかった。

生殖株あたりの総花穂形成数

各試験区の生殖株における総花穂形成数を調べたところ、春化处理区については 1 株あたり 19.1~32.7、未処理区については 22.8~27.9 の範囲内であった。なお、春化处理区の発芽温度 20 の発芽体から形成された生殖株の総花穂数は 1 株あたり 28.3 ± 4.2 であったが、未処理区の発芽温度 20 の発芽体から形成された生殖株に花穂は形成されなかった。発芽温度 20 の場合を除くと、生殖株 1 株あたりの総花穂形成数について、春化处理区および未処理区の間で有意な差は認められなかった。

生殖株あたりの花枝数および花枝あたりの総花穂形成数

各試験区の生殖株 1 株あたりの花枝数は、春化处理区および未処理区において 4.3~5.3 の範囲内であり、春化处理の有無や発芽温度の違いによる影響は認められなかった。なお、春化处理区の最大花枝数 (5.0 ± 1.0) は発芽温度 20 および 25、未処理区の最大花枝数 (5.3 ± 0.5) は発芽温度 10 の発芽体で観察された。

花枝あたりの総花穂形成数は、未処理区よりも春化处理区で多く、両処理区間で有意な差が認められた。さらに、両処理区において、発芽温度の違いが花枝毎の総花穂形成数に影響を及ぼすことが明らかとなった。

生殖株における花枝形成の範囲

春化处理区および未処理区の花枝形成範囲はそれぞれ、70.3~92.3 cm および 79.3~99.3 cm の範囲内であったが、両処理区間で

有意な差は認められず、発芽温度の違いによる影響もみられなかった。

春化处理の有無および発芽温度の違いが多年生アマモ草体の形態に及ぼす影響

一年生アマモ種子の場合、春化处理の有無や発芽温度の違いにより、生長後の栄養株および生殖株の割合、生殖株の長さ、花穂数が増加することから、高密度群落を形成・維持する一年生アマモの繁殖様式は種子の発芽前後の環境水温によって決定されていると考えられる。今回、環境水温が多年生アマモの繁殖様式に与える影響を個体レベルで調べたところ、春化处理の有無や発芽温度の違いは栄養株の分枝数、生殖株の形成数、生殖株あたりの花穂形成数、草体の生長等の形態的特性に大きく影響しないことが分かった。また、一年生アマモ発芽体は大型屋外水槽に移植後1年以内に生殖株を形成するが、多年生アマモ発芽体は移植後2年目で生殖株を形成した。これらの結果から、多年生アマモと一年生アマモでは個体レベルで繁殖様式が全く異なっており、高密度群落を形成・維持する一年生アマモ草体の形態的特徴は種子の発芽前後の環境水温に大きく影響されるが、低密度群落を形成・維持する多年生アマモ草体の形態的特徴と環境水温との間に関連性のないことが明らかとなった。

(3) アマモ MADS ボックス遺伝子の単離・同定と発現解析

新規アマモ MADS ボックス遺伝子の単離・同定

3' RACE PCR により、約 0.8~0.9 kbp の cDNA 断片が増幅された。各 cDNA 断片の配列解析の結果、既に単離されている *ZmMADS1*~*ZmMADS5* cDNA とは異なる塩基配列をもつ増幅 cDNA 断片が見出され、それらは 188 および 219 アミノ酸残基をコードする 2 種類の cDNA グループ（それぞれ *ZmMADS6* および *ZmMADS7* cDNA）に分けられた。各 *ZmMADS* の部分演繹アミノ酸配列の分子系統解析により、*ZmMADS6* は SVP サブファミリー、*ZmMADS7* は FUL サブファミリーに属することが示唆された。今回、*ZmMADS6* および *ZmMADS7* の全演繹アミノ酸配列を決定するには至らなかった。今後、*ZmMADS6* および *ZmMADS7* の部分 cDNA の塩基配列情報を基にプライマーを作製し、5' RACE PCR による cDNA クローニングと配列解析を進めていく必要がある。

アマモ MADS ボックス遺伝子の発現解析

各 *ZmMADS* 遺伝子の相対定量解析（内部標準 18S rRNA、検量線法）により、生殖株・葉身における発現量に対する相対発現量を算出した。*ZmMADS1* および *ZmMADS2* 遺伝子は花穂形成期および開花期において高発現し（*ZmMADS1* 遺伝子で 35.75~74.86, *ZmMADS2* 遺伝子で 0.45~1.05）、種子形成期に両遺伝子発現量は減少する傾向がみられた（*ZmMADS1* 遺伝子で 4.08~40.92, *ZmMADS2* 遺伝子で 0.02~0.52）。なお、*ZmMADS1* 遺伝子発現レベルは、花穂以外の生殖株器官で低く

（0.93~8.47）、栄養株や地下茎で遺伝子発現は検出されなかった。一方、*ZmMADS2* 遺伝子については生殖株の葉鞘および葉身でも花穂形成期および開花期と同レベルの発現性が確認されたが（1.00~1.25）、栄養株や地下茎における発現量は低かった（0.01~0.16）。*ZmMADS3* および *ZmMADS4* 遺伝子は、花穂発達段階のうち雌蕊開花期で高発現していた（*ZmMADS3* 遺伝子で 13.75, *ZmMADS4* 遺伝子で 31.79）。なお、*ZmMADS3* 遺伝子発現は種子形成期で著しく抑制されたが（0.34~0.73）、*ZmMADS4* 遺伝子については種子形成期においても比較的高い発現レベルが維持され（4.74~10.60）、種子の発達に伴い発現増加する傾向がみられた。一方、栄養株および地下茎における両遺伝子の発現レベルは極めて低かった（0.13~0.91）。*ZmMADS5* 遺伝子は花穂形成期および開花期で高発現しており（67.89~88.61）、種子形成期においては種子の発達に伴って発現量がさらに増加する傾向がみられたが（86.12~213.09）、花穂以外の器官・組織における発現量は著しく低かった（0.48~11.39）。新規 *ZmMADS* 遺伝子の発現様式は、*ZmMADS1*~*ZmMADS5* 遺伝子のそれとは大きく異なっていた。*ZmMADS6* および *ZmMADS7* 遺伝子の発現レベルは生殖株の茎で特に高く（2.17~3.27）、生殖株の他器官、花穂、栄養株および地下茎では低い傾向がみられた（0.03~1.46）。

ZmMADS1~*ZmMADS5* 遺伝子は花穂の発達過程で、*ZmMADS6* および *ZmMADS7* 遺伝子は生殖株の茎で高発現していることが明らかとなった。器官別および花穂発達段階別の発現様式から、*ZmMADS1* および *ZmMADS2* 遺伝子は花穂の形成、*ZmMADS3* および *ZmMADS4* 遺伝子は雌蕊・雄蕊の成熟・開花、*ZmMADS5* 遺伝子は種子の形成、*ZmMADS6* および *ZmMADS7* 遺伝子は生殖株の形成・生長に重要な役割を果たしていることが考えられる。今後、一年生アマモについても同様の解析を進め、アマモの形態形成や繁殖特性と MADS ボックス遺伝子の発現特性との関連性を明らかにする必要がある。

(4) 環境水温に適応した一年生アマモの繁殖戦略に関わる遺伝子群の単離・同定

春化处理・高温発芽体、春化处理・低温発芽体および未処理・低温発芽体からそれぞれ、*ZmBH*, *ZmBL* および *ZmNL* cDNA ライブラリーを作製し、計 2 試験区で cDNA サブトラクション処理を行った。*ZmBH* および *ZmBL* cDNA サブトラクションにより春化处理・高温発芽体および低温発芽体の高発現遺伝子 cDNA プール（*ZmBH/BL-FS* および *ZmBH/BL-RS*）、*ZmBL* および *ZmNL* cDNA サブトラクションにより春化处理および未処理・低温発芽体の高発現遺伝子 cDNA プール（*ZmBL/NL-FS* および *ZmBL/NL-RS*）を調製した。計 4 種類の cDNA プールを各々プラスミドベクターにサブクローニング後、大腸菌を形質転換させた。*ZmBH/BL-FS* および *ZmBL/NL-FS* については 864 個ずつ、

ZmBH/BL-RS および ZmBL/NL-RS については 576 個ずつ、cDNA が挿入されたプラスミドを含む大腸菌コロニーを選抜した。各 cDNA のドットプロット解析により、サブトラクション区に用いた cDNA ライブラリー間で蓄積差のある遺伝子 cDNA、すなわち一年生アマモの繁殖戦略に関わる候補遺伝子 cDNA (FS cDNA については約 680~700 個、RS cDNA については約 390~430 個) を特定した。

特定した cDNA の塩基配列を決定し、CAP3 プログラムによるアセンブルを行ったところ、FS cDNA から約 270~340 種類、RS cDNA から約 190~210 種類の配列データが得られた。各配列データについて Blast2GO プログラムによる配列解析を行ったところ、ZmBH/BL-FS では 281 種類、ZmBH/BL-RS では 158 種類、ZmBL/NL-FS では 228 種類、ZmBL/NL-RS では 166 種類の配列データで既知遺伝子との類似性が認められた。

サブトラクション cDNA のドットプロット解析データと配列解析データから、春化处理・高温発芽体および春化处理・低温発芽体の間では転写制御系、シグナル伝達系、分子シャペロン系、膜輸送系遺伝子等に、春化处理・低温発芽体および未処理・低温発芽体の間では転写制御系、シグナル伝達系、ホルモン合成系遺伝子等に発現差のあることが分かった。これら候補遺伝子は、環境水温に適応した一年生アマモの繁殖戦略、すなわち生殖株の花穂形成数や栄養株の分枝数等の形態的特性の決定機構において重要な役割を果たしていることが考えられる。一方、今回の cDNA サブトラクションで得られた配列データの中には、既知遺伝子との類似性が認められないものがあった (FS cDNA で約 50~60 種類、RS cDNA で約 30~40 種類)。アマモの繁殖戦略に関わる一連の分子機構を明らかにするためには、本研究で単離・同定された候補遺伝子ならびに未知候補遺伝子の機能解析を進めていく必要がある。

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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

DDBJ/EMBL/GenBank アクセス番号

ZmMADS1 cDNA : AB661632

ZmMADS2 cDNA : AB661633

ZmMADS3 cDNA : AB661634

ZmMADS4 cDNA : AB661635

ZmMADS5 cDNA : AB661636

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿沼 誠 (KAKINUMA, Makoto)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号 : 60303757

(2)研究分担者

森田晃央 (MORITA, Teruwo)

三重大学・生物資源学研究科・リサーチフ

エロー

研究者番号 : 20500804

(3)連携研究者

なし