

令和元年5月30日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05604

研究課題名(和文)送粉共生が駆動した花香多様化の分子基盤：迅速アッセイ系を用いた実験的解明

研究課題名(英文)Elucidating the molecular basis of floral scent diversification driven by plant-pollinator mutualisms.

研究代表者

奥山 雄大 (Okuyama, Yudai)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号：40522529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウマノスズクサ科カンアオイ属、コミカンソウ科、ユキノシタ科チャルメルソウ類のそれぞれについて網羅的な花香成分プロファイルのデータを得た。特にカンアオイ属の花香成分は極めて複雑かつ多様なものであることを明らかにし、またそのプロファイルは近縁種間でも大きく異なることを見出した。著しい花香成分の多様性が見出されたカンアオイ属の11種について送粉調査を行い、その送粉様式の一部を解明した。またカンアオイ類、コミカンソウ類、チャルメルソウ類からそれぞれ複数の花香関連遺伝子のクローニングに成功した。チャルメルソウ類では少なくとも3つの花香生合成遺伝子に種分化の際分断化淘汰が働いた証拠を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の種の多様性が生じた背景には花粉を運ぶ昆虫(送粉者)との多様かつ特異的な関係が存在すると考えられる。本研究では日本で著しい多様化を遂げた植物の種群としてユキノシタ科チャルメルソウ属やウマノスズクサ科カンアオイ属を研究材料とすることで、送粉者との多様な関係を形作り、ひいては植物の種分化を促した重要な要素の一つとして花の香りの進化があった、という仮説を提唱し、それを部分的に実証することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We obtained the comprehensive datasets of floral scent profiles for the genus *Asarum* (Aristolochiaceae), *Phyllanthus* (Phyllanthaceae), and *Mitella* (Saxifragaceae). Especially we found that the species of the genus *Asarum* have complex and diverse floral scent profiles; even closely related species had strikingly dissimilar scent profiles. We surveyed the pollination systems for some *Asarum* species that have diverse floral scent profiles, and found that the pollinators were different among species. We successfully cloned some floral scent-associated genes from these plants. We further obtained the signature of expected divergent selection during ecological speciation in at least three floral scent-associated genes in the genus *Mitella*.

研究分野：植物進化学

キーワード：花香分析 送粉 比較ゲノム解析 遺伝子発現解析 生態的種分化 二次代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

30万種を超える多様性を誇り、陸上生態系の基盤をなす被子植物は、さまざまな生物同士の密接な関わり合いの中で進化を遂げてきた。特に送粉者との関係は花の多様性をもたらし、同時に近縁植物種間での生殖隔離メカニズムとしても働くため、かねてより被子植物の適応放散のカギを握ると考えられてきた (Fenster et al., 2004; van der Niet & Johnson, 2012)。

近年の研究から、匂いを含めた送粉者に対する信号こそが被子植物の種分化の引き金として注目されつつある。しかし、これらの形質を支配する遺伝基盤については、まだほとんど分かっていないため、実際にこれらに分断化淘汰が働いた証拠は得られていない。

一方動物では、信号とそれを受容する感覚器に分断化淘汰が働き、種分化、多様化を促進するとする「感覚駆動(sensory drive)仮説」が約20年前に提唱されており (Endler, 1992, 1993)、近年このうち視覚について節足動物、脊椎動物を材料として大量の研究が成され、実証的に理解が深まっている。このブレイクスルーを後押ししたのが色覚受容体オプシン遺伝子のクローニングと試験管内でのタンパク質再構築による吸収波長帯の簡易アッセイ法である (Terai et al., 2006 など多数)。この手法により近縁種間で異なる遺伝子配列を、実際に野外で働く表現形質の種間差と結びつけることが可能になった。すなわち、着目している表現形質(この場合視覚)が実際に近縁種間で分化していることを定量的に示すことができ、しかも同時にその分化の原因遺伝子が分断淘汰の標的となっていることを遺伝学的に解析できるのである。これは、野外生態学的知見と分子遺伝学的知見の双方が必要不可欠な種分化メカニズムの研究において、数少ない画期的な統合的研究が達成されている例である。

日本列島で劇的な種分化、多様化を遂げたチャルメルソウ属を材料として研究を続けてきた。本群はキノコバエの数種と特異的な送粉共生の関係にあるが、繰り返し起こった生態的種分化の原因として、送粉者を特異的に誘引する花香成分ライラックアルデヒドの生合成能の獲得/喪失によることを示した (Okamoto et al. 2015)。さらに、この生合成を支配しているのがモノテルペン合成酵素およびシトクロムP450ファミリータンパク質をコードする遺伝子群であることを明らかにしつつあった。この過程で、花香生合成遺伝子は匂いの元である花で大量に発現しており、比較的簡便なトランスクリプトーム解析で容易にクローニングできること、さらに、少なくともテルペン合成酵素に関しては大腸菌を用いることで組換えタンパク質を大量合成し、その代謝産物を直接明らかにすることも容易であることを発見した。

2. 研究の目的

上記の発見を受け、本研究では花の匂い、中でもテルペノイドが送粉者の特異性を規定していると考えられ、かつ、送粉様式の多様性が多様化に関与している可能性が高い3つの系統群(ウマノスズクサ科カンアオイ属、コミカンソウ科、ユキノシタ科チャルメルソウ属)を主たる材料とし、以下の目的で研究を行った。

1) 花のトランスクリプトーム解析により網羅的に花香関連遺伝子を単離、同定する。そこから発現させた組換えタンパク質のアッセイによって、植物種特異的な花香成分の多様性を、その基盤となる花香生合成遺伝子配列の多様性と結びつけ、理解する。

2) それぞれの系統群で花香成分と送粉者の網羅的な調査を行い、花香生合成遺伝子と生態形質との対応関係を明らかにする。

3) 調査した植物群のそれぞれで花香生合成遺伝子に多様化選択/分断淘汰が働いたかどうかを、分子系統学的手法、遺伝学的手法を駆使して明らかにする。これによって、本研究が提示する「被子植物においては送粉者に対する信号を支配する遺伝子(特に花香遺伝子)に分断淘汰が働き、多様化を促進した」という仮説に一般性があるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) ウマノスズクサ科カンアオイ属、コミカンソウ科、ユキノシタ科チャルメルソウ類のそれぞれについて、その花香成分の多様性を網羅できるように遺伝子クローニング対象種を選定し、RNA-seq解析を行った。

(2) 各系統群ごとに可能な限り網羅的な花香分析を行い、花香成分が顕著に異なる種間での発現遺伝子比較が可能ないようにした。花香のサンプリングには主としてSPME (PDMS ないしDVB/CAR/PDMS 複層ファイバー利用)を用いたヘッドスペース法により、GCMS-QP2010 SEで成分分析を行った。特に日本固有種の多様性が顕著なカンアオイ属について重点的に花香分析を行い50種100個体を超える株から花香プロファイルのデータを得た。

(3) 送粉者と花の匂いとの対応が未知な種が多い、ウマノスズクサ科カンアオイ属を中心に、国内外の自生地で調査を行い、送粉者との関係を調べた。

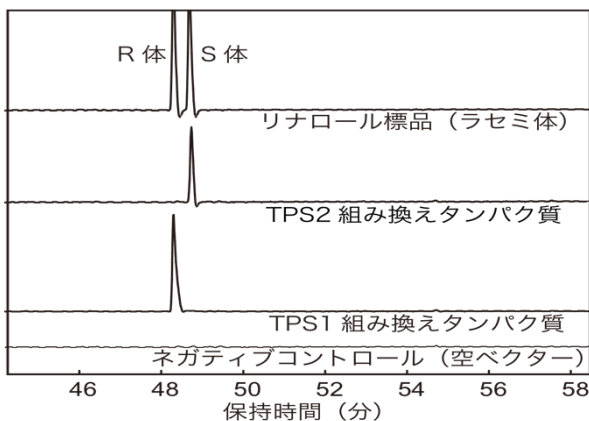
(4) (1)で得られた花香関連遺伝子について、予測されるアミノ酸配列情報から機能が異なると考えられるものごとに分類した。機能の重複が無いと考えられる遺伝子について、逐次大腸菌に遺伝子導入を行い、組み換えタンパク質を発現させアッセイを行った。

(5) 上記の解析で得られた花香関連遺伝子の塩基配列情報を元に、対象植物群の近縁種で花のRNAあるいはゲノムDNAを鋳型として関連遺伝子塩基配列を決定した。特にチャルメルソウ類については、単離した花香関連遺伝子が生態的種分化の引き金となったいわゆる「種分化遺伝子」である可能性を検証するため、相同遺伝子配列を網羅的に単離したほか、特に顕

著に送粉者／花香成分が異なる姉妹種ペアであるコチャルメルソウ・チャルメルソウについて、ドラフトゲノム配列の取得(Illumina HiSeqX ショートリード他による)および、各種約 20 個体群からの ddRAD-seq 法による集団遺伝学的解析を行った。

4. 研究成果

- (1) ウマノスズクサ科カンアオイ属、コミカンソウ科、ユキノシタ科チャルメルソウ類のそれぞれについて網羅的な花香成分プロファイルのデータを得た。特にカンアオイ属の花香成分は主としてジメチルジスルフィド、短鎖のエステル類、ヘミテルペン、モノテルペン、セスキテルペンから成る極めて複雑かつ多様なものであることを明らかにし、またそのプロファイルは近縁種間でも大きく異なることを見出した (Kakishima and Okuyama, 2018 にその一部を発表)。このことは、カンアオイ属の花香がその多様な送粉様式への適応であることを示唆している。
- (2) カンアオイ属 4 種、コミカンソウ科 4 種、チャルメルソウ類 2 種について RNA-seq を行い、特に花で発現しているテルペン合成酵素遺伝子のカタログを得た。このデータをもとに大腸菌 (*BL21* 株) で組み換えタンパク質を発現させアッセイを行い、コミカンソウ科から β エレメン合成酵素遺伝子、 β オシメン合成酵素遺伝子を、チャルメルソウ類からは *S* リナロール合成酵素遺伝子、*R* リナロール合成酵素遺伝子、 β カリオフィレン合成酵素遺伝子などをそれぞれ特定することに成功した (図)。一方でカンアオイ属のテルペン合成酵素ファミリーに属する複数の遺伝子配列をもとに同様の手法で得た組み換えタンパク質では活性が微小であり、その明確な機能を解明することができなかった。



図：キラル GC 分析による花香生成遺伝子の機能確認

チャルメルソウ由来のモノテルペン合成酵素 TPS1 と TPS2 を大腸菌 *BL21* 株で発現させることで、それぞれチャルメルソウの花香成分である *R*-リナロール、*S*-リナロールを特異的に生合成する機能を持つことが確認できた。基質にはゲラニルピロリン酸 (GPP) を使用。

- (3) 著しい花香成分の多様性が見出されたカンアオイ属の 11 種について送粉調査を行った。このうち 6 種は奄美諸島で共通の祖先から顕著な多様化を遂げた種群であり、それぞれ異なるハエ類によって送粉されていることを突き止めた。
- (4) カンアオイ類では、腐肉擬態花を特徴づける悪臭成分ジメチルジスルフィドを放出する花が繰り返し進化していることを明らかにした。東アジア固有の単系統群カンアオイ節全 61 種のうち 50 種を網羅した花香成分プロファイルの情報を、ddRAD-seq 法による分子系統樹にマッピングした結果、ジメチルジスルフィドを放出する形質が系統内で 10 回以上進化していることが分かった。
- (5) (4) の結果を受け、ジメチルジスルフィドを放出する種の代表としてフジノカンアオイの RNA-seq データを遺伝子アノテーションして解析し、ジメチルジスルフィド生合成に関与すると考えられる遺伝子の探索を行った結果、少なくとも 1 つのジメチルジスルフィド生合成関連遺伝子の特定に成功した。この遺伝子についても大腸菌 (*BL21* 株) で組み換えタンパク質を発現させアッセイを行い、実際にジメチルジスルフィド生合成能を持つタンパク質をコードしていることを確認できた。またジメチルジスルフィド整合性の基質となる物質の特定にも成功した。
- (6) これまでの研究から花香プロファイルの変化が種分化に大きな役割を果たしたと考えられるチャルメルソウ類については、合わせて 4 つの花香生成遺伝子かを特定し、これらが実際に種分化に関与した可能性を進化遺伝学的に検証した。具体的には、特にこの種分化モデルがよく当てはまる姉妹種コチャルメルソウとチャルメルソウの 2 種間について、これらの遺伝子に分断化淘汰が働いた痕跡を、ゲノム平均からの 4 遺伝子の分化係数 (F_{st}) のずれから検証した。この結果、少なくとも 3 つの花香生成遺伝子に種分化の際分断化淘汰が働いた証拠を得て、両種の種分化の際には花香の分化が引き金となったという仮説の検証に成功した。
- (7) チャルメルソウ類の特異的な送粉者であるキノコバエ類が幼虫期にチョウチンゴケ類やジャゴケ類を餌としていることを発見した。このことは、両者の特異的な関係に、必ずチャルメルソウ類の生育環境である溪畔林に随伴する第 3 の生物が重要な役割を果たしていることを示している。また、花香成分の変化によるチャルメルソウ類の生態的種分化を引き起こした環境要因として、対応するキノコバエ類の食草となるコケ類 (チョウチンゴケ類とジャゴケ類) の生育環境の違いが関係している可能性を示唆している (Okuyama et al. 2018)。

(8) 野外調査の過程でサトイモ科テンナンショウ属においても顕著な花香成分の変化による種分化が起きている可能性があることを発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- ① 岩崎貴也、奥山雄大 2019 DNA シーケンス「革命」がもたらす日本列島における植物系統地理・系統進化研究の新展開 生物科学 70 巻 pp. 112-123.
- ② Kakishima, S., Okuyama, Y. 2018. Pollinator assemblages of *Arisaema heterocephalum* subsp. *majus* (Araceae), a critically endangered species endemic to Tokunoshima Island, Central Ryukyus. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 44: 173-179.
- ③ Okuyama, Y. Okamoto, T., Kjærandsen, J., Kato, M. 2018. Bryophytes facilitate outcrossing of *Mitella* by functioning as larval food for pollinating fungus gnats. *Ecology* 99: 1890-1893.
- ④ Kakishima, S., Okuyama, Y. 2018. Floral scent profiles and flower visitors in species of *Asarum* series *Sakawanum* (Aristolochiaceae). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 44: 41-51.
- ⑤ Okuyama, Y. 2016. Compartmentalized floral scent emission in two species of *Mitella* (Saxifragaceae). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 42: 1-6.
- ⑥ Okuyama, Y. 2016. *Mitella amamiana* sp. nov., the first discovery of the genus *Mitella* (Saxifragaceae) in the central Ryukyus. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 67: 17-27.
- ⑦ Okuyama, Y. 2015. A consistent phenotyping of floral scent in *Mitella* (Saxifragaceae) using solid-phase microextraction. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 41: 125-129.
- ⑧ Okamoto, T., Okuyama, Y., Goto, R., Tokoro, M., Kato, M. 2015. Parallel chemical switches underlying pollinator isolation in Asian *Mitella*. *Journal of Evolutionary Biology*, 28: 590-600.

〔学会発表〕(計 23 件)

- ① 奥山雄大 花香遺伝子に刻まれた植物種分化の痕跡を探る 第 10 回茨城大学遺伝子実験施設シンポジウム「進化がもたらす生物の多様性と適応力」 茨城大学図書館 2018 年 11 月 20 日
- ② 奥山雄大 花の進化の裏側にある昆虫とのふしぎな関係 日本植物学会第 81 回大会公開講演会 東京理科大学野田キャンパス 2017 年 9 月 10 日
- ③ Okuyama, Y. Ecological speciation through floral scent/pollinator divergence in Asian *Mitella*. 2017. Symposium T2-53: Role of plant-pollinator interactions in generating and maintaining biodiversity. The XIX International Botanical Congress Shenzhen, China. 2017 年 7 月 29 日
- ④ 奥山雄大 ゲノム情報から花の匂いの多様化メカニズムを探る 2016 年度国立遺伝学研究所研究集会「次世代モデル生物におけるゲノム情報利用ワークショップ」国立遺伝学研究所 2016 年 12 月 16 日
- ⑤ Okuyama, Y. *Mitella*-fungus gnat system as the model for plant ecological speciation through floral scent/pollinator divergence. 2015. Invited Seminar. UiT The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway 2015 年 9 月 14 日
- ⑥ 奥山雄大 植物種分化の鍵となる花の香りの進化遺伝学 第 32 回インターゲノミクスセミナー 神戸大学農学部 2015 年 7 月 28 日
- ⑦ 奥山雄大 チャルメルソウに秘められた生態的種分化の謎に迫る 第 323 回昆虫学土曜セミナー 岡山大学農学部 2015 年 6 月 20 日

〔図書〕(計 6 件)

- ① 奥山雄大 2018 多様な花が生まれる瞬間 斎藤成也ら監修、シリーズ・遺伝子から探る生物進化 6 慶應義塾大学出版会
- ② 奥山雄大 2016 ユキノシタ科 大橋広好ら(編)、改訂新版 日本の野生植物 2 平凡社 pp. 413-428.

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：柿嶋 聡
ローマ字氏名：Satoshi Kakishima
研究協力者氏名：岡本 朋子
ローマ字氏名：Tomoko Okamoto
研究協力者氏名：仲里 猛留
ローマ字氏名：Takeru Nakazato
研究協力者氏名：永野 惇
ローマ字氏名：Atsushi Nagano
研究協力者氏名：加藤 真
ローマ字氏名：Makoto Kato

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。