

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：51501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06131

研究課題名(和文) クローナル植物の過去を解き明かすメチル化DNA遺伝子座プロファイリング法の開発

研究課題名(英文) Establishment of the methylated DNA loci profiling method that reveals the past of clonal plants.

研究代表者

南 淳 (Minami, Atsushi)

鶴岡工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：50270210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：クローナル植物の個体のDNAメチル化状態により群落の形成過程を推定する方法の開発をめざした。森林性クローナル低木ヤブコウジ *Ardisia japonica* のマイクロサテライトマーカーを開発しジェネット(遺伝的個体)を識別した。1.3 x 1.7 kmの調査区のサンプリング箇所の73%を3つのジェネットが占め、その範囲は半径1 km程度にもなった。高効率なMSAP(メチル化感受性増幅断片長)法によりラメット間のDNAメチル化遺伝子座の変異を解析した。地下茎でつながったラメットでは、当年葉より前年葉のDNAメチル化の違いが大きかった。しかし、ラメットの系譜とDNAメチル化との関係は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローナル植物は、森林の植物群集の重要な構成員であり、森林生態系の動態に重要な役割を持つ。しかしながら、個体識別に分子生物学的実験が必要になることから、その生態に関する研究は遅れている。本研究では様々な森林の林床において優勢な低木であるヤブコウジについて解析し、その遺伝学的個体が非クローナル植物に比べて遥かに巨大で高寿命であることを示した。これは身近な森林の見方を変える知見である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a method for estimating the process of community formation of clonal plants based on the DNA methylation status of individuals. Microsatellite markers for a forestry clonal shrub, *Ardisia japonica* were developed and used to identify genets (genetic individuals). Three genets occupy 73% of the sampling points in the 1.3 x 1.7 km survey area. The range of them is as large as 1 km in radius. Variation in DNA methylation loci between ramets were analyzed by the efficient MSAP (methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism) method. In the the five ramets connected by the rhizomes, the difference in DNA methylation between the previous year's leaf was larger than that of the current year's leaf. However, no relationship was found between ramet's genealogy and DNA methylation status.

研究分野：森林生態学

キーワード：クローナル植物 クローナル低木 林床 DNAメチル化 エピジェネティクス MSAP マイクロサテライトマーカー ヤブコウジ

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地下茎やストロンを伸ばし、葉や根を持つ機能上の個体(ラメット)を形成する、クローナル繁殖を行うことのできる植物種をクローナル植物種という。このクローナル植物種は、被子植物の多くの系統で進化し、様々な陸上生態系において優勢な生活型であり、生態系に重要な役割を果たしている。森林生態系においても、土壌の形成・安定性から生物群集の動態にいたるまでクローナル植物は大きな影響を及ぼしている。しかしながら、クローナル植物の生態研究は分子マーカーを用いるなど個体識別という作業が必要であり、非クローナル植物と比べると、生活史、生態がよく研究されている森林性のクローナル植物種は数少ない。さらに、寿命が長くクローン拡大が遅い多年生草本や樹木のクローン群落の動態の把握には長い期間の研究が必要であり、研究されているクローナル植物は一握りに過ぎない。

DNA のメチル化はエピジェネティクスの分子基盤と考えられ、最近では野外生物集団の生物個体のエピジェネティクスの分子基盤と考えられて MS-AFLP 法などに研究が行われるようになってきた。そして、野外での環境要因や形質とメチル化 DNA 遺伝子座の相関関係について報告されてきている。しかし、クローナル植物の単一ジェネットの中での DNA メチル化の違いについて解析した研究は報告されていない。

### 2. 研究の目的

長期間の追跡観察によらずにクローナル植物の群落形成過程を推定する方法として、DNA メチル化遺伝子座プロファイルを用いる方法を開発する(図1)。これは DNA のメチル化が体細胞分裂を経て継承されることを利用したものであり、個々のラメットの多数の多型性メチル化遺伝子座を MSAP 法などで調べ比較することにより、ラメットのクローナル繁殖の系譜を推定するものである。本研究では森林性クローナル植物ヤブコウジをモデルにして、分子マーカーの開発、分子マーカーによるジェネット分布の調査、そして DNA メチル化遺伝子座の解析を行った。

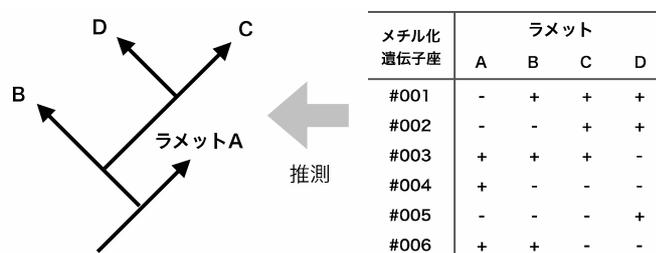


図1 メチル化遺伝子座プロファイリングによるラメットの系譜の推定

### 3. 研究の方法

(1) 研究材料と調査地 サクラソウ科の矮性低木ヤブコウジ *Ardisia japonica* を研究材料に用いた。この植物は東アジアに広く分布し、照葉樹林、夏緑樹林から温帯二次林、人工林にいたる様々な森林の林床に普通に見られる(小山と国府方 1998)。この常緑性植物はクローナル植物であり、地下茎を伸ばして先端に葉・不定根を持つラメットを形成する(図2)。



図2 掘り起こしたヤブコウジのラメット群

一部のラメットは自家和合性の花も作り、赤い鳥散布性の果実を作る(Cheon ら 2002)。山形県鶴岡市の金峰山麓(調査地 A: 38° 45' N, 139° 45' E)および高館山(調査地 B: 38° 42' N, 139° 47' E)において調査研究を行った。調査地 A はコナラ二次林、調査地 B はコナラなどの二次林、ブナ林とスギ植林などから構成されている。

(2) 分子マーカーの開発 迅速で精密な個体識別のため、マイクロサテライトマーカーを開発した。改良した CTAB 法により、ヤブコウジの葉からゲノム DNA を抽出した。精製した DNA の塩基配列のうち約 8 万リード x 300bp ペアエンドを次世代シーケンサーイルミナ社 Mi-Seq により解読した。この配列からマイクロサテライト(ACACAC...など単純な繰り返し配列)を検索し、プライマーを設計した。PCR は Tail 配列プライマーによる蛍光マルチプル PCR(Blacket ら 2012)により行った。調査地 A、調査地 B の個体を用いて、マイクロサテライトマーカーの集団の中での多様性、多型性をテストした。

(3) ジェネットの分布の解析 (2)により開発したマイクロサテライトマーカーを用いてジェネットの判別を行った。蛍光マルチプル PCR 産物の DNA シーケンサーでの電気泳動パターンを読み取り、各マーカーの遺伝子型を識別した。各マーカーでの遺伝子型を組み合わせた多遺伝子

座遺伝子型をソフトウェア Genodyve (Meirmans 2020) によって分析した。各ラメット間の遺伝的距離を計算し、ヒストグラムを作成し、遺伝的距離がごく小さいラメットを同一ジェネット(クローン)と判定した。同一ジェネットの遺伝子型のわずかな違いは遺伝子型判定のエラーまたは体細胞突然変異のためであると考えられる。

調査地 A において数 m レベルのミクروسケールの分析を行った。1 x 1 m の方形区を作り、全ラメットの MGG を解析してジェネット判別を行った。これに隣接して林内に 9 x 10 m のプロットを作り、1 m 格子の一番近くにあるラメットをサンプリングし、ジェネット判別を行った。調査地 B においてはマクロスケールの解析を行った。1.7 x 1.3 km の範囲において登山道沿いにサンプリングを行った。

(4) DNA メチル化遺伝子座の解析 DNA メチル化遺伝子座の解析は MSAP 法 (Reyna-Lopez ら 1997) により行った。各ラメットの当年葉または前年葉・前々年葉から抽出したゲノム DNA を *EcoRI* および CG メチル感受性酵素 *HpaII* で二重分解し、アダプター-DNA を連結した。両端アダプター配列+1 塩基のプライマーにより予備的に増幅し、両端アダプター配列+3 塩基のプライマーにより選択的な PCR を行った。*EcoRI* 側プライマー4 種に異なる色素を結合した蛍光プライマーを用いた。PCR 産物は平板ポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色、または DNA シーケンサーによるフラグメント解析により解析した。当該 *HpaII* 認識配列 (CCGG) の内側 C がメチル化されている時、DNA は切断されず、PCR により増幅されない。銀染色またはフラグメント解析の電気泳動像から CG メチル化増幅バンド (遺伝子座) の有無を判定し、有無が異なる個体がある場合、メチル化多型遺伝子座とした。各サンプルの各メチル化多型遺伝子座の有無のデータはソフトウェア Genodyve による主成分分析、MEGA7 による系統解析 (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average; UPGMA 法) にかけた。

#### 4. 研究成果

(1) マイクロサテライトマーカーの開発 ゲノム配列に基づき設計した 69 対のマイクロサテライトマーカーをスクリーニングした結果、安定した PCR 結果が得られる 12 対のマーカーが得られた。この 12 対のマーカーはそれぞれの調査地のヤブコウジ集団において全体として 3~8 のアリル (対立遺伝子) があり、0.47~0.88 のヘテロ接合度 (一個体中で異なるアリルが組み合わさっている程度) であり、これらを複数用いることによって精密なジェネット識別が可能になる。いつかのマーカーでの実験結果では、ひとつのマーカーに対して、一個体が 4 つのアリル (対立遺伝子) を持っていた。これはヤブコウジが四倍体であることを示しているが、これはヤブコウジや近縁種の染色体数の研究報告 (小山と国府方 1998) と一致している。

(2) ミクروسケールのジェネット分布 ヤブコウジはコナラ林である調査地 A の林床に優勢であった。いくつかのラメットを掘り起こしたところ、地下茎は枝分かれが少なく、ラメット間の地下茎は数 10 cm に及びことが多かった (図 2)。1 x 1 m の方形区内の全ラメットから DNA を抽出して、マイクロサテライトマーカー 5 つによる遺伝子型解析を行った。遺伝子型は明確に 4 つに分類でき、別ジェネットに相当すると考えられた。4 つのジェネット (ジェネット A, B, C, D) は互いに遺伝的に遠く有性生殖による親子姉妹関係にはないと考えられた。ジェネット A, B, C, D は 41, 20, 15, 3 個のラメットを持っており、実生によるラメット (1 ラメットのみからなるジェネット) は無かった。この 4 つのジェネットは区画内の一部では互いに入り組んでいたが、一部では単独のジェネットのみが位置していた (図 3)。掘り起こしでの観察結果よりも同一ジェネットのラメットの平均距離は小さいことから、接続地下茎が既に消失したジェネットの断片同士が複雑に入り組んでいる事が示唆された。

隣接する 9 x 10 m のプロットの 1 m 格子のラメットの遺伝子型を調べたところ、6 つのジェネットが存在することがわかった。そのうち、4 つは上記の 1 x 1 m の方形区にも含まれているジェネット A, B, C, D であり、他の 2 つは 1 x 1 m の方形区には含まれていないジェネット E, F であった。ジェネット A, B, C, D, E, F に属するラメットのあった格子はそれぞれ 8, 18, 30, 21, 19, 7 箇所であった (図 4)。各ジェネットの空間分布のパターンはジェネットごとに多様であった。どの

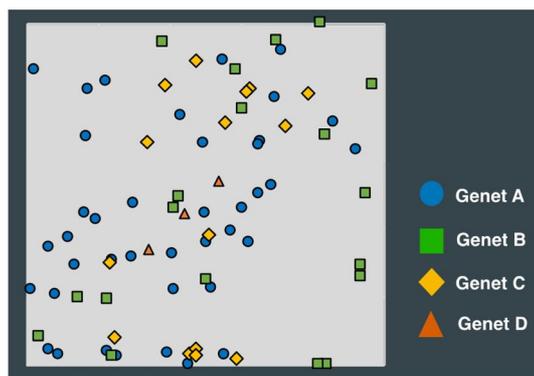


図3 1 x 1 m 方形区内のジェネット分布

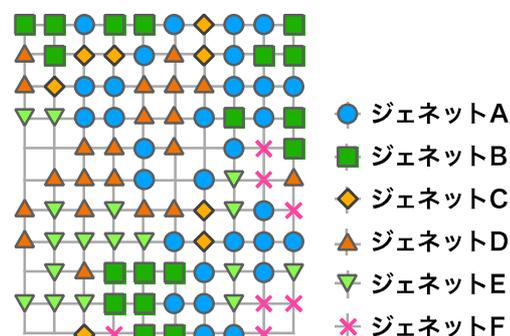


図4 9 x 10 m 調査区のジェネット分布

ジェネットもプロットの外縁付近にラメットを持っており、ジェネットの範囲はこのスケールより大きいことが考えられた。1 x 1 m から 9 x 10 m のスケールではジェネットの頻度の均等性が高く、またジェネット間の遺伝的距離が大きい。よって、送粉者による他家受粉が十分に行われれば、遺伝的に多様な種子が形成されるであろうと予想される。

(3) マクロスケールのジェネット分布 調査地 B において 1.7 x 1.3 km の範囲において登山道



図5 マクロスケールにおけるジェネットの分布

沿いにサンプリングを行った (図5)。158 箇所をラメットをサンプリングし 12 個のマイクロサテライトマーカーを用いてジェネット識別を行ったところ、いくつかの小さな遺伝子型の変異を内包する、32 個のジェネットにまとめられた。遺伝子型の変異の一部は体細胞突然変異と考えられた。32 個のジェネットのうち、1 箇所で見られなかったものは 20 ジェネット、2 箇所で見られたものは 6 ジェネットであり、他の 6 ジェネットは 3 箇所以上にラメットが存在した。このジェネット a,b,c,d,e はそれぞれ 57,33,26,6,4 箇所ラメットが存在した。73% のラメットが上位 3 つのジェネットに属していた。上位 3 つのジェネットは調査区の全域にわたって分布しており、最遠のラメット間距離としては 2 km にも及んでいた。野外での地下茎伸長速度 (ジェネット拡大速度) のデータは無いが、最大で 50 cm 程度と考えられる。仮にこの値を用いて計算すれば、創始者のラメットが発芽してから現在まで 2000 年経っていることになる。なお、現在、さらに範囲を広げた解析を行っている。

(4) ヤブコウジのクローン成長と DNA メチル化 2021 年 5 月に調査地 A の林床のラメットを掘り起こして、地下茎の接続が観察できるラメット群を採集した (図2)。地下茎とその分岐の形状から、ラメット 1 を持つ地下茎の側芽が成長し、ラメット 2 となっており、ラメット 2 を持つ地下茎の 2 つの側芽が成長してラメット 3 とラメット 4 ができ、ラメット 4 を持つ地下茎からラメット 5 ができるという系譜がわかる。各ラメットは先端部に 2~4 枚の形成されたばかりの葉 (当年葉) を持ち、その下の節に 2~4 枚の昨年形成され越冬した葉 (前年葉) があり、ラメット 2 と 4 は、さらに下の節にも葉 (前々年葉) が残っていた。ラメットの系譜、葉の齢と DNA メチル化プロファイルとの関係を明らかにするため、各ラメットの各節の葉から DNA を抽出し、MSAP 法により DNA メチル化の様子を調べた。

まず当年葉のサンプルで解析を行った。ひとつの選択的 PCR 実験では 10~30 本の明瞭なバンドが見られた。この一つ一つが DNA メチル化遺伝子座に相当する。このサンプルは DNA 塩基配列が同一であるクローンであるので、バンドの有無はその遺伝子座が CG メチル化していない・CG メチル化しているの違いを反映している。観察された明瞭のバンドのほとんどはサンプル間で一致しており、有無の違いはひとつの選択的 PCR あたり 0~2 本程度しか無かった。

次にラメット 1~5 の前年葉、ラメット 2,4 の前々年葉も含めた 12 サンプルで解析した。前年葉、前々年葉では、いずれかのサンプルにおいて有無が他のサンプルとは異なっている、すなわち多型性を持つ DNA メチル化遺伝子座が、ひとつの選択的 PCR あたり 3~10 本程度と高い割合で見られた。全ての選択的 PCR により 235 本の多型な DNA メチル化遺伝子座が得られた。12 サンプル x 235 DNA メチル化遺伝子座の有無の行列データを統計的に処理した。多変量解析のひとつである主成分分析を行うと、23% および 16% の変異を説明できた第 1 主成分と第 2 主成分を X 軸、Y 軸に取りプロットした (図

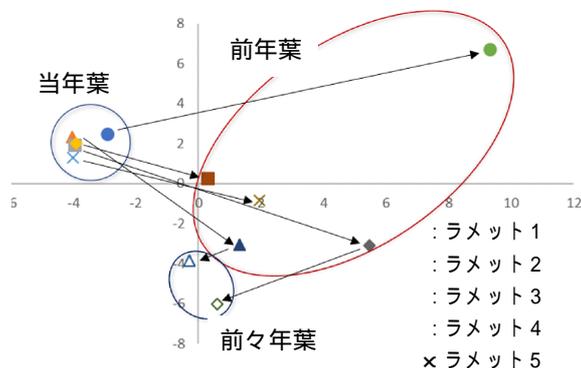


図6 DNAメチル化遺伝子座の主成分分析

6) 当年葉の5サンプルは狭い範囲にプロットされたが、前年葉の5サンプルは広い範囲に分散し、前々年葉の2サンプルの値は近かった。図中で、当年葉から前年葉に右方向へ移動し、前年葉から前々年葉へ移っている傾向が見られ、葉の齢に伴う共通したDNAメチル化状態の変化があることが示唆された。DNAメチル化遺伝子座データはUPGMA法による系統分析にかけると、当年葉の5サンプルは単系統にまとめられる一方、ラメット毎の系統は見られなかった(図7)。当年葉の5サンプルの間も前年・前々年葉でもラメット間の関係は実際のラメット間のクローン繁殖の系譜とは一致しなかった。

以上のように、ヤブコウジにおいてDNAメチル化遺伝子座のプロファイルは、側芽の成長による新しいラメットの形成時には高度に継承されるが、ラメット中の組織(葉)の加齢や経験に伴って、大きく変化することがわかった。これは、DNAメチル化遺伝子座プロファイルがラメットの系譜のみを反映するとして研究開始当初の予想に反するものである。現在、同一ジェネット内の離れたラメット間でのDNAメチル化遺伝子座の比較について解析を進めている。

当年葉

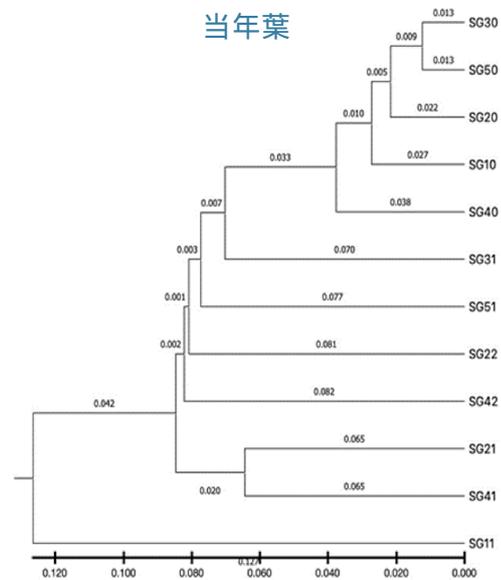


図7 UPGMA法によるメチル化遺伝子座プロファイルの分析。(SG21はラメット2の前年葉)

#### <引用文献>

Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD. 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour.* 12(3):456-463.

Cheon CP, Chung MY, Chung SG, Chung MG. 2002. Allozyme variation of a small subshrub *Ardisia japonica* (Myrsinaceae) in north eastern Asia. *Silvae Genet.* 51(1):1-6.

小山博滋, 国府方吾郎. 1998. オオツルコウジの分類学上の位置. *国立科学博物館専報.* 31:123-134.

Kumar S, Stecher G, Tamura K 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33(7): 1870-1874.

Meirmans PG. 2020. genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Mol Ecol Resour* 20(4):1126-1131.

Reyna-Lopez GE, Simpson J, Ruiz-Herrera J: Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol Gen Genet.* 1997, 253 (6): 703-710.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 南淳、菅原颯人、西村泰介
2. 発表標題 森林性クローナル低木ヤブコウジの巨大なジェネット
3. 学会等名 第86回日本植物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南淳、菅原颯人、西村泰介
2. 発表標題 クローナル低木ヤブコウジのSSRマーカーの開発とクローン構造の解析
3. 学会等名 第85回日本植物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南 淳、菅原 颯人、熊谷 一輝、西村 泰介
2. 発表標題 地下茎性クローナル植物ヤブコウジにおけるラメット間の DNA メチル化プロファイルの変化
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayato Sugawara , Atsushi Minami , Soichiro Goto , Kazuki Kumagai , Yuma Saito , Taiga Saito, Taisuke Nishimura
2. 発表標題 Deduction of the Developmental Process of Clonal Plant Populations by Comparing the Methylation Pattern of Genomic DNA of Each Functional Individuals.
3. 学会等名 The 4th International Conference on "Science of Technology Innovation" 2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------