

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770231

研究課題名(和文) エピジェネティクスは適応進化の素材となりうるか? - シロイヌナズナ属野生種を材料に

研究課題名(英文) Can epigenetics be the material of adaptive evolution? -Focusing wild Arabidopsis-

研究代表者

田中 健太 (TANAKA, Kenta)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：80512467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：標高30～3000mに分布するミヤマハタザオを材料に、(1)野外移植実験によって、標高に応じて既に適応進化が起きていることを示した。(2)室内栽培実験によって、開花や発芽のタイミングの標高クラインを示した。(3)栽培条件によって開花タイミングが異なる表現型可塑性を定量した。(4)母親が経験した環境によって、開花タイミングが異なることを示した。(5)標高によって対立遺伝子頻度が大きく異なる「標高適応遺伝子」を3つ同定した。(6)環境によるゲノム修飾変異を調べられるDNAサンプリングを行い、バイサルフェイト処理後の次世代シーケンサー実験によるエピジェネティクス解析系を立ち上げた。

研究成果の概要(英文)：Focusing *Arabidopsis kamchatica* that is distributed over 30 - 3000 m altitude; we (1) clarified adaptive evolution had already occurred in the field transplant experiment, (2) clarified altitudinal cline in flowering and germination timing in the laboratory growth experiment, (3) quantified phenotypic plasticity in flowering timing in the laboratory growth experiment, (4) indicated the change in flowering timing depending on environment that maternal individuals experienced, (5) identified three "altitude adaptation genes" whose allele frequencies were drastically differentiated along altitude, and (6) sampled DNA and initiated epigenetics analytical system utilizing bisulphate treatment and next-generation sequencing, for investigating epigenetic variation across different environments.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：適応進化

## 1. 研究開始当初の背景

生育環境に応じて表現型可塑性によって形質が変わり、それが子に遺伝する現象が、これまでに様々な生物で報告されていた。これらの現象の多くは母親経由で遺伝し、母性効果という名前で以前から知られていた。しかし近年、その主要メカニズムのひとつがおそらくエピジェネティクスであること、この効果が時に数世代に及ぶことが分かってきた。これらは、ラマルクが提唱しダーウィニズムによって否定されてきた獲得形質遺伝そのものではない。しかし、環境に対する世代内の適応が次世代以降に伝わるという広い意味で「獲得形質遺伝」とも捉えることができ、しかも、新しい環境に対する生物の適応に重要な役割を果たすことから、進化学の新しい枠組みとして注目を集めていた。また、これらの適応が最終的にゲノムの変化をもたらす可能性も指摘されていたことから、従来の定義による狭義の進化の原動力にもなりうる。しかしながら、これらの現象のメカニズムや、環境適応に対する相対的な役割はよく分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

標高 30m から 3000m まで分布する植物ミヤマハタザオの適応進化における、ゲノム塩基配列の分化と、エピジェネティクスを含む母性効果の重要性を、室内実験や野外移植実験によって明らかにすること。

## 3. 研究の方法

- (1) 野外移植実験で、進化的な標高適応は既に起きているのかを明らかにする。
- (2) 室内栽培実験で、標高適応形質は何かを明らかにする。
- (3) 室内栽培実験で、標高適応形質にどのくらい表現型可塑性があるかを明らかにする。
- (4) 室内栽培実験で、母親が経験した環境によって標高適応形質の表現型が変わるかを明らかにする。
- (5) 遺伝子解析で、標高適応の原因遺伝子は何かを明らかにする。
- (6) 野外移植実験で、母親が経験した環境によって原因遺伝子のメチル化修飾状態が変わるかを明らかにする。

## 4. 研究成果

- (1) ミヤマハタザオ 28 集団・タチスズシロソウ 8 集団を、低・中・高標高の圃場に移植する実験を行った。高標高圃場では移植植物が全滅してしましたが、低標高圃場では低標高集団の適応度が、中標高圃場では高標高集団の適応度が高いことが分かった。特に夏の生存率において

ホームサイトアドバンテージが見られている。

- (2) 耐寒性に関しては、低温馴化なしの条件でミヤマハタザオ 2 集団・タチスズシロソウ 1 集団を用いて予備実験を行い、高標高ミヤマハタザオとタチスズシロソウの凍結耐性が低標高ミヤマハタザオよりも著しく高いことが分かった。開花タイミングについて、ミヤマハタザオ 28 集団、タチスズシロソウ 9 集団を共通の実験室で栽培実験し、長日・20 度 C 条件では標高が高い集団ほど発芽も開花が早いという明瞭な結果がえられた。また同様の実験によって、発芽タイミング、被食防衛能力などに標高クラインがあることが分かった。
- (3) 開花タイミングと発芽タイミングの表現型可塑性を定量解析した。高標高の集団では夏に開花するので短日条件化の表現型変異も興味深い。そこで同様の実験を短日条件下で行い、結果を解析中である。
- (4) 母親が異なる環境を経験している実験室第一世代と、母親が共通の実験室環境を経験している実験室第二世代の間で、開花タイミングに世代がどのように効果を与えているかを長日条件の実験室で栽培して解析した。その結果、低標高に由来する集団ほど開花タイミングが早く、高標高集団ほど春化处理（発芽後の低温処理）が開花を促進する効果が大きかった。世代の効果としては、低標高の集団では、第二世代の方が第一世代より、春化处理が開花を促進する効果が大きかった。このような母性効果が発芽タイミングなどの他の形質でも見られるのか、検討中である。
- (5) アジレント社のシロイヌナズナ用マイクロアレイを用いて、高標高ミヤマハタザオ・低標高ミヤマハタザオ・タチスズシロソウ各 8 集団のゲノム塩基多型を調べ、開花関連遺伝子のいくつかにゲノム多型があることが分かった。そこで、開花関連遺伝子 *CRY1* (クリプトーム遺伝子)・*GI* (概日時計遺伝子) を対象に、塩基多型と自然淘汰を詳細に検討するために、次世代シーケンサー (454 GS Junior) によってミヤマハタザオ 20 集団の各 20 個体の塩基配列を決定した。その結果、これらの遺伝子に塩基多型があることが確認され、中立の下で期待されている水準を超えて対立遺伝子頻度が集団間で著しく異なっていることが分かり、分断化淘汰を受けている可能性が示唆された。*GI* については、遺伝子型と表現型の関係も明らかになった。
- (6) 移植実験豊穢において、異なる標高で異なるゲノム修飾を獲得しているかどうかを確かめる DNA 実験のための葉のサンプリングと、その修飾が次世代に受け継

がれるかを調べる種子のサンプリングを行った。当初計画していたマイクロ・アレイと免疫沈降を組み合わせたエピジェネティクス解析多量の DNA を要し、齢の異なる葉などを全て混ぜて DNA 抽出しなければならず、環境応答性の検出に不利であることが分かった。一方、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな解析のコストが大幅に下がったため、共同研究者とともにバイサルフェイト処理後の次世代シーケンサー実験によるエピジェネティクス解析系の確立のため、ミヤマハタザオ 20 系統のリシーケンスを行ってリファレンス配列を得ることに成功し、解析系を立ち上げられるところまで来た。

#### 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)

T. Kenta, A. Yamada & Y. Onda. 2011. Clinal variation in flowering time and vernalisation requirement across a 3000-m altitudinal range in perennial *Arabidopsis kamchatica* ssp. *kamchatica* and annual lowland subspecies *kawasakiana*. **Journal of Ecosystem and Ecography** S6:1-10. doi:10.4172/2157-7625.S6-001 査読あり

[学会発表](計 15 件)

T. Kenta & Y. Onda (2014) Cline in germination traits along 30-3000m altitude in *Arabidopsis kamchatica*. 61th Annual Meeting of Ecological Society of Japan, 2014 March 15, International Conference Center Hiroshima, Hiroshima

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2013) 標高傾度に沿ったミヤマハタザオの適応機構：生態から遺伝子へのアプローチ．日本進化学会第 15 回大会，2013 年 8 月 30 日，筑波大学（茨城県つくば市）。

平尾章，恩田義彦，清水（稲継）理恵，瀬々潤，清水健太郎，田中健太。2013. 標高万能植物ミヤマハタザオのトライ

コームおよび光受容体の適応分化．日本地球惑星科学連合 2013 年大会，千葉市幕張メッセ，2013 年 5 月 22 日

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2013)：標高万能植物ミヤマハタザオにおけるトライコームおよび光受容体遺伝子の集団間分化．第 60 回日本生態学会シンポジウム「標高傾度の中にある、隠れた遺伝的多様性」，2013 年 3 月 7 日，静岡市，静岡県コンベンションアーツ センター．

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太「標高万能植物ミヤマハタザオの標高適応遺伝子：トライコームと光受容体」中部山岳地域環境変動研究機構 2012 年度年次研究報告会，高山市、2012 年 12 月 13 日

田中健太・平尾章・恩田義彦・山田歩・永野 惇・瀬々潤・清水理恵・清水健太郎・岡村 悠・村上正志・澤田有司・平井優美 (2012)「標高万能植物ミヤマハタザオの適応機構：デモグラフィ・形質・遺伝子」第 44 回種生物学シンポジウム，12 月，高島市，マキノパークホテル 2012/12/8

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2012)：標高万能植物ミヤマハタザオの標高適応遺伝子：トライコームと光受容体．日本進化学会第 14 回大会，2012 年 8 月 23 日，八王子市，首都大学東京．

田中健太・恩田義彦・平尾章・山田歩・永野惇・山口正樹・工藤洋・小林元 2012「標高万能植物ミヤマハタザオの適応機構：生態・生理・遺伝子」，日本地球惑星科学連合 2012 年度連合大会，千葉市幕張，2012/5/23

T. Kenta, Y. Onda, A. Hirao, M. Yamaguchi, A. Yamada, A.J. Nagano, Y. Kawamura, Y. Sawada, H. Kobayashi, J. Sugisaka, M. Kohno, M. Hirai R. Shimizu-Inatsugi, J. Sese, K.K. Shimizu & H. Kudoh (2012) Altitudinal adaptation of *Arabidopsis kamchatica*: demography, physiology and genes. 8th Okazaki Biology Symposium. Okazaki. 2012年3月20日

Hirao, A., Onda, Y., Shimizu-Inatsugi, R., Sese, J., Shimizu, K. K., & Kenta, T. (2012) Screening for diversifying selection on six flowering and herbivory-defence genes among 19 natural populations of *Arabidopsis kamchatica*: from pooled-DNA analysis with parallel sequencing. 第59回日本生態学会. 大津. 2012年3月20日

Kenta, T., Sawada, Y., Yamada, A., Onda, Y., Hirao, A., Bacigalupe, L.D., & Hirai, M.Y. (2012) Altitudinal cline in life-history and herbivory-defence traits in *Arabidopsis kamchatica* that inhabits 30 - 3000 m altitudinal range. 第59回日本生態学会. 大津. 2012年3月19日

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2011) ミヤマハタザオの環境適応を担う遺伝子のスクリーニング. 中部山岳地域環境変動研究機構 2011年度年次研究報告会, 松本, 2011年12月16日

早川恵里奈, 宮村新一, 恩田義彦, 田中健太, 富松元, 唐艶鴻, 廣田充, (2011) (ポスター発表) 低圧環境下で

の形態変化による光合成特性の解明. 中部山岳地域大学間連携事業 2011年度年次研究報告会. (2011/12/16-17, 松本)

山田歩・瀧本岳・恩田義彦・田中健太 (2011) 生態的分化と生殖隔離: 標高適域の広いミヤマハタザオについて, 第58回日本生態学会, 札幌, 2011年3月10日

田中健太・山口正樹・恩田義彦・小林元・杉坂次郎・河野真澄・工藤洋 (2011) 標高30~3000mに生えるミヤマハタザオの局所適応: 相互移植実験による検証, 第58回日本生態学会, 札幌, 2011年3月10日

〔図書〕(計1件)

田中健太 2011. 野外生態系を舞台にオミクスをどう活かすか?: オウシュウミヤマハタザオの分布と適応. In: ゲノムが拓く生態学 遺伝子の網羅的解析で迫る植物の生きざま(種生物学会編). pp 25-50. 文一総合出版.(総ページ376、7月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 健太 (TANAKA, Kenta)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号: 80512467