

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30日現在

機関番号：82617

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657015

研究課題名（和文）モデル生物を利用した野生集団に保持される遺伝的変異の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of natural genetic variation of non-model species using model species

研究代表者

池田 啓 (IKEDA HAJIME)

国立科学博物館・植物研究部・研究員

研究者番号：70580405

研究成果の概要（和文）：

野生集団が持つ遺伝的変異の機能を解析するために、ミヤマタネツケバナ(*Cardamine nipponica*)の野生集団に複数のアミノ酸置換を伴った対立遺伝子を持つ *PHYE* に着目した。まず、大腸菌でタンパク質を発現させるためのベクターに *PHYE* を挿入することに成功した。特に、特定のアミノ酸置換の影響を評価するために、対立遺伝子の間で異なるアミノ酸残基を入れ替えたキメラ配列のコンストラクトを構築することができた。また、植物（シロイヌナズナ）に遺伝子導入し、強発現するためのベクターに *PHYE* を挿入することに成功した。当初の目的であるタンパク質や植物体における機能解析を終えることができなかったが、これらの成果は今後の研究で野生集団が持つ変異の機能を明らかにするために有効な進展である。

研究成果の概要（英文）：

I have focused *PHYE* in *Cardamine nipponica* that have two alleles distinguished by several amino acid replacements in wild populations. At first, I succeed cloning *PHYE* into a vector to induce protein synthesis in *E. coli*. In particular, I made chimeric constructions that exchanged some amino acid replacements between alleles. In addition, I made construct of *PHYE* to apply transformation of *Arabidopsis thaliana*. Because *PHYE* is a large gene (ca. 3600 bp in protein coding region), I took much time for cloning and failed to obtain sufficient data about functional differences of alleles of *PHYE*. Nevertheless, my progress could contribute future work to unravel functional differences of alleles found in wild populations.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：分子生態

1. 研究開始当初の背景

生物の野生集団に見られる遺伝的変異は、多様な生物を生み出す進化の根源である。これまでの生物多様性の研究では、遺伝的変異を定量的に明らかにすることに主眼が置かれており、変異が生み出す生理的な機能の差を明らかにする研究は十分に行われていない。

これまでに2種の高山植物（ミヤマタネツケバナ：アブラナ科、コメバツガザクラ：ツツジ科）の野生集団が持つ、植物の赤色光受容体であるフィトクロム遺伝子の変異を解析してきた。その結果、植物が複数持つフィトクロム遺伝子（シロイヌナズナでは5種類：PHYA-PHYE）のうち、PHYEは自然選択を受け、地域適応に関わっていることが明らかになった。その一方で、このPHYEには数多くのアミノ酸置換を伴う変異が保持されており、進化的な制約が弱いことも示されてきた。このような“進化的な制約の弱い遺伝子が地域適応に関わる”と言う逆説的な発見から、野生集団に保持される遺伝的変異は、生理的な差を生み出すことで、より適応的な変異が自然選択され、適応進化に寄与する、という仮説が考えられた。

フィトクロムは、植物に普遍的に見られ、生育地における光環境をモニターし、発芽や開花のタイミングといった植物の生活史を制御する中枢としての働きを持つ。そのため、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、変異株を用いた研究が盛んに行われている。こうした背景から、PHYEにおける変異は、野生集団に保持される遺伝的変異の意義を明らかにする上で、優れたモデル系となることが期待される。

2. 研究の目的

生物の野生集団に保持される遺伝的変異

は、生物の多様性を生み出す根源である。本研究では、植物の環境適応において重要な役割を果たす、赤色光受容体であるフィトクロムに着目することで、植物の野生集団に保持される遺伝的変異が、生理的な差を生み出すものであるか否かを検証する。特に、シロイヌナズナを用いたトランスクリプトームという汎用性のある手法を実践的に構築することで、野生集団に保持された遺伝的変異が持つ機能的な意義を解明するための礎を築くことを目指す。

3. 研究の方法

野生集団が持つPHYE遺伝子の変異をそれぞれクローニングする。その上で、この遺伝子、シロイヌナズナの変異株（PHYE欠損変異株）に形質転換した上で、その機能への影響をトランスクリプトーム解析によって検出する。

（1）コンストラクトの作成

形質転換に用いるコンストラクトの作成には、市販のキット（Invitrogen社・Gatewayシステム）を用いることで、35Sプロモーターにより植物内でPHYEを強発現させるためのコンストラクトを作成する（P35S::PHYE）。ミヤマタネツケバナにはアミノ酸置換を伴い大きく配列の異なる対立遺伝子が2種類ある。これらの対立遺伝子をクローニングすることに加えて、機能的に重要な役目を担うと考えられるアミノ酸置換のみを対立遺伝子間で入れ替えたキメラ状のPHYE（2種類）をクローニングしコンストラクトを作成する。これらのコンストラクトを用いてシロイヌナズナのphyE欠損変異株に遺伝子導入する。

（2）トランスクリプトーム解析

マイクロアレイ（GeneChip® *Arabidopsis*

ATH1 Genomes Array, Affymetrix 社) を用い、シロイヌナズナの野生株・*phyE* 欠損株・4つの形質転換株の6者の間における遺伝子発現パターン之差を明らかにする。発現パターンの比較をすることにより、*PHYE* の野生集団に保持される変異が、生理的な影響をもたらすか否かを検証する。

遺伝子発現量は個体間の微環境における違いによるバラツキが見られる可能性もある。そこで、本研究では、10個体を1セットとして、4セット分のRNAをまとめることで、1サンプル(10個体×4セット⇒40個体分)として扱い、個体間のばらつきを少なくするための工夫をする。また、1解析あたり2サンプル用いることで、反復した解析を行う。

シロイヌナズナにおいて、*PHYE* は、種子で強く発現していることが知られている(Winter et al. 2007. *PLoS One*) ため、発芽形質に関わる可能性が高い。また、*phyE* 欠損株を用いた発芽実験からも、*PHYE* が低温条件下における発芽に対して、大きな役割を果たしていることが知られている(Heschel et al. 2007. *New Phytologist*)。このような理由から、本研究では、発芽時における遺伝子発現パターンに着目したトランスクリプトームを行う。特に、*phyE* 欠損株は10℃における発芽形質に対して顕著な影響を持つので、10℃に播種した種子を解析に用いる。

遺伝子発現パターンが、発芽のステージと共に変化する可能性の影響を回避するため、播種3日目と発芽直後の2つの異なるタイミングでRNAを抽出し、それぞれを別個にトランスクリプトームにより解析する。

4. 研究成果

(1) 植物を形質転換するための *PHYE* のク

ローニング

ミヤマタネツケバナ(アブラナ科)が持つ *PHYE* の全長を植物に形質転換し、35Sプロモーターで発現させるためのベクターにクローニングすることに成功した。クローニングが当初の予定よりも難航し、GateWay システムなどの様々なシステムを試した結果、InFusion システムを使用したことで、ベクターに組込むことができた。

(2) タンパク質を合成するための *PHYE* 遺伝子のクローニング

トランスクリプトーム解析で結果を出すことまでは時間的に難航することが予想されたため、タンパク質レベルで野生集団における変異がもつ機能の差を分析することを目指した。フィトクロムのタンパク質における生化学的性質を明らかにする研究は既に報告(Oka et al. 2004, 2008)があるため、これらの論文の代表者である京都大学・長谷あきら教授の指導のもとで、実験を進めた。ミヤマタネツケバナの *PHYE* 遺伝子を大腸菌に導入することで *PHYE* を合成するためのベクターに組込むことに成功した。

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)

(1) Ikeda Hajime, Setoguchi Hiroaki. A multilocus sequencing approach reveals the cryptic phylogeographic history of *Phyllodoce nipponica* Makino (Ericaceae). *Biological Journal of Linnean Society*, 査読有. 出版中.

[学会発表] (計 3 件)

(1) Ohtsuki Tatsuo, Ikeda Hajime, Setoguchi Hiroaki. Recent colonization of a coastal plant into inland habitats at an ancient freshwater lake, Lake Biwa: multilocus sequencing and a demographic history of *Lathyrus japonicus* (Fabaceae). 1st Joint Congress on Evolutionary Biology, 2012/07/06-07/10, Ottawa, Canada.

(2) Ikeda Hajime, Gustafsson Lovisa, Brochmann Christian, Setoguchi Hiroaki. Molecular evolution of photoreceptor genes between sister species. 1st Joint Congress on Evolutionary Biology, 2012/07/06-07/10, Ottawa, Canada.

(3) 池田啓, 岡義人, Lovisa Gustafsson, Christian Brochmann, 長谷あきら, 瀬戸口浩彰. 周極－高山植物における種分化と光受容体の分子進化. 日本植物学会第 76 回大会, 2012 年 9 月 15 日～9 月 17 日. 兵庫県立大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 啓 (IKEDA AJIME)

国立科学博物館・植物研究部・研究員

研究者番号 : 70580405