

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840148

研究課題名(和文)クローナル植物の繁殖戦略におけるエピジェネティクス機構の解明

研究課題名(英文)Understanding roles of epigenetics in reproductive strategies of clonal plants

研究代表者

荒木 希和子(Araki, Kiwako)

立命館大学・生命科学部・任期制講師

研究者番号：30580930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的変異を生じないクローン繁殖を行う植物におけるエピジェネティクス機構を明らかにするため、クローナル植物3種のクローン株を光強度もしくは水環境の異なる環境下で栽培し、形態変化とDNAメチル化変異を調べた。その結果、異なる条件間では開花数や葉数、葉の質感などに差異が見られたが、その子孫株には継承されなかった。パイサルファイトシーケンス解析では、条件間でのメチル化差は平均2%(最大40%)であり、DNAメチル化状態が大きく変化しないことがわかった。したがって、実験での継承世代では、子孫株はその経験した環境に迅速に応答する一方、DNAメチル化変異は安定的で変化はほとんど生じないことが確認された。

研究成果の概要(英文)：To reveal epigenetic roles in plants reproduced by clonal reproduction without genetic changes, clonal individuals of three clonal species were cultivated in different conditions to investigate their phenotypic and DNA methylation changes. As a result, such phenotypes as flowering number, leaf number and leaf shapes varied between clonal ramets of different treatments, which was however not inherited. In the result of bisulfite sequencing, methylation differences between ramets with different treatments were 2% on average (maximum 40%), which indicated that few changes of DNA methylation status might be caused between clonal individuals during the generation. Therefore, it is suggested that clonal offspring respond to the environment they experience, but DNA methylations of them are stable for the experimental periods.

研究分野：植物生態学

キーワード：クローナル植物 エピジェネティック変異 野生植物 DNAメチル化 生育環境 環境応答 クローン繁殖

## 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティック変異は、遺伝的変異や環境の影響を受けて遺伝子発現に作用し、表現型形質にも変化をもたらす。また遺伝的変異とは独立に生じることが知られている。特にクローナル植物では、クローン繁殖により生産された遺伝的同一個体が野外の不均一環境に生育することから、クローン株間の遺伝的変異とともに、遺伝的変異を伴わないエピジェネティック変異が、野外での変動環境への迅速な応答メカニズムとして、生物の適応に関わり、さらに進化を速める役割を果たしていることが考えられる。しかし、野外環境では様々な要因が複合的に作用するため、それらの寄与を明確にすることは容易ではない。

エピジェネティック状態には、細胞分裂の前後で継承されるものと、変化するものがある。また細胞分裂には、その前後で遺伝的組成が変化しない体細胞分裂と、生殖細胞の対合に伴い遺伝的変異が生じる減数分裂がある。そして、エピジェネティック状態の継承は、体細胞と生殖細胞で異なることが知られている。したがって、減数分裂を伴う種子繁殖と体細胞分裂により生じるクローン繁殖由来の個体間では遺伝的変異のみならず、エピジェネティックな状態の変化も生じると考えられる。さらに連結しているクローン株間での可塑的な生理的性質の変化が生じることが知られており、環境応答においてもエピジェネティック変異が関わっている可能性がある。

## 2. 研究の目的

体細胞分裂によって増殖するクローン繁殖を行うクローナル植物の野外での変動環境への迅速な応答メカニズムとして、繁殖戦略におけるエピジェネティック変異の役割を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

### (1)栽培実験 1

花茎の先端よりクローン繁殖を行うアブラナ科 *Arabidopsis halleri* (ハクサンハタザオ) の 6 株 (6 遺伝子型, 自然集団より採取) より 12 クローン株を分け、6 区画に移植し、実験を開始した。3 区画は白ネット (明条件)、3 区画は黒ネット (暗条件) で覆いをし、野外で生育させた。

開花期に、和合株の花粉を強制受粉させ、結実した種子を採取した。

開花後に形成されたクローン株を採取した。

種子とクローン株を親株と同一もしくは異なる明・暗条件に移植した。

### (2)形態計測 1

各株の葉数・葉長・花数・開花開始時期などを測定した。

1 週間 (開始 1 ヶ月) もしくは 1 カ月おきに葉を採取し、-20 で保存した。

### (3)DNA メチル化解析 1

親株 1 遺伝子型 (遺伝子型 2) の明・暗条件で生育させたクローン株の葉から、PBAT バイサルファイト処理を行った。またこの株の種子とクローン子株についてもバイサルファイト処理を行った。

Illumina Hi-Seq 2000 (もしくは Hi-Seq X) によりシーケンス解析を行った。

この種におけるデータの解析パイプラインの構築を行った。(a)得られたリードの前処理 (アダプターとメチル化バイアス領域の除去) (b)Bismark によるマッピングおよび参照配列の構築、(c)リード集計 (遺伝子領域, 上流, 下流ごと) (d)リスト作成のフローで解析を進めた。遺伝子領域からの距離による比較検討も併せて行った。

### (4)栽培実験 2

匍匐枝もしくは分けつによりクローン繁殖を行うアブラナ科 *Cardamine flexuosa* (異質 4 倍体) と *C. amara* (2 倍体) のクローン株 (各 1 遺伝子型) を土壌水分 15% (乾燥) もしくは 80% (湿潤) に維持し、植物育成室 (22 /18 , 12h 明/12h 暗) で生育させた。

各株のクローン株 (茎の先端) を移植し、親株と同一の環境条件下でそのクローン株の継代を行った。

### (5)形態計測 2

葉長・葉数・葉の形態について計測を行った。

複葉の一部を酢酸エタノールに浸し、気孔の形態変化観察のサンプルを作製した。

### (6)メチル化解析 3

湿潤環境で生育させた *C. flexuosa* および *C. amara* の 10 世代目のクローン株、乾燥環境で生育させた 2 種の 6 世代目のクローン株について、バイサルファイト処理を行い、Illumina Hi-Seq X によりシーケンス解析を行った。

データ解析のパイプライン作成を行った。

## 4. 研究成果

*Arabidopsis halleri* を異なる光環境 (明・暗) 条件で生育させたところ、2 条件間では同一クローンに由来する株同士であっても、葉の形態・葉数・開花数に差異が見られた。特に被陰環境下では、複葉の葉柄が長く伸び、花茎の花数が少なくなる傾向が見られた。葉数は明条件下で多くなる傾向があった。環境による変化は遺伝子型によっても違いが認められた。クローン子孫株および種子株は、いずれも生育環境に応答した形態を示したことから、1 世代では形態変化は親から継承されず、形態はその株が経験した環境に規定されることが示唆された。

2 つの光環境下で生育させた同一株由来のクローン株 (親株) の DNA メチル化解析を行った結果、各株での gene body メチル化は平

均 30%であり、その上流と下流のメチル化は 2% - 15%程度であった。そして、条件間でのメチル化の差異は平均 2%(最大 40%)であった。このことから、野外の光環境においてクローン繁殖一代のクローン株間では、環境を変化させても DNA メチル化状態が大きく変化しないことがわかった。変異の見られた領域に特徴的な遺伝子は認められず、機能的に重要な遺伝子には変異が生じていないことが示唆された。種子とクローン株による繁殖様式における違いについても解析を進めている。

より長い世代を経ることでエピジェネティックな状態が変化し、維持される可能性を検証するため、クローン繁殖が旺盛な *C. flexuosa* と *C. amara* のクローン株を用いて継代栽培を行った。異なる水分環境(乾燥・湿潤)でクローン株を栽培したところ、いずれの種も湿潤環境では複葉が大きくなり、葉柄が長くなった。特に *C. flexuosa* は湿潤環境に分布する親株である *C. amara* と似た形態に変化した。

さらに、このクローン株を親株の経験した環境と異なる環境下で栽培し、表現型の変化を調べた。その結果、生育条件に合わせた形態に変化したことから、10 世代では変異が固定されない可能性が示唆された。近年の研究により、エピジェネティック変異の中でも DNA メチル化は安定的であり変化しないことが明らかになりつつあるため、今後はヒストン修飾や遺伝子発現レベルでの変化についても併せて調べることで、クローナル植物の繁殖を介したエピジェネティックな変化やその機構について検証する必要があると考えられる。

#### 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 5 件)

- (1) Araki KS, Kubo T, Kudoh H (2017) Genet-specific DNA methylation probabilities detected in a spatial epigenetic analysis of a clonal plant population. PLoS ONE 12(5): e0178145. 査読あり <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178145>
- (2) 荒木希和子, 福井眞 (2017) 特集にあたって. 特集: 生物のクローン性: クローン増殖による分散と局所環境変化への応答からその有効性を考える. Clonality: effectiveness of clonal multiplication for disperse and response to fine scale environmental change 日本生態学会誌 .67: 119-122. 査読あり [https://doi.org/10.18960/seitai.67.2\\_119](https://doi.org/10.18960/seitai.67.2_119)
- (3) 福井眞, 荒木希和子 (2017) クローン植物の繁殖戦略と遺伝構造 - 固着性生活を

おくる上での空間不均一性への適応 - . Reproductive ways (clonal vs seed) and spatial genetic structure in clonal plants: Adaptation to environmental heterogeneity in sessile life histories 日本生態学会誌 . 67: 147-159. 査読あり [https://doi.org/10.18960/seitai.67.2\\_147](https://doi.org/10.18960/seitai.67.2_147)

- (4) 荒木希和子, 福井眞, 杉原洋行 (2017) ガン細胞に見るクローン増殖と適応進化 - 細胞の特殊性とクローン生物との共通性を考える - . Features of clonal proliferation and adaptive evolution in neoplastic cells: similarities between cancer cells and clonal organisms 日本生態学会誌 . 67: 169-180. 査読あり [https://doi.org/10.18960/seitai.67.2\\_169](https://doi.org/10.18960/seitai.67.2_169)
- (5) Fukui S, Araki KS (2014) Spatial niche facilitates clonal reproduction in seed plants under temporal disturbance. PLoS ONE 9 (12): ppe116111. 査読あり DOI:10.1371/journal.pone.0116111

[学会発表](計 8 件)

- (1) 荒木希和子, 島谷健一郎, 大原雅 “ 地下茎伸長のダイナミクス - クローン成長の推移行列モデル構築 - ” 第 48 回種生物学シンポジウム, 2016 年
- (2) 荒木希和子, 島谷健一郎, 大原雅 “ クローン成長の推移行列モデル - 地下茎伸長のダイナミクス - ” 第 63 回日本生態学会, 2016 年
- (3) 辻本典顯, 荒木希和子, 工藤洋 “ 疑似一年生クローン植物のラメット生産におけるジェネット間差異: 自然集団と移植実験による解析 ” 第 63 回日本生態学会, 2016 年
- (4) 辻本典顯, 荒木希和子, 工藤洋 “ 疑似一年生クローン植物集団におけるジェネットの分布に依存したラメットサイズの変異 ” 第 46 回種生物学シンポジウム, 2015 年
- (5) 福井眞, 荒木希和子 “ 空間自己相関をもつ攪乱条件下でのクローン繁殖戦略 - ” 第 31 回個体群生態学会大会, 2015 年
- (6) 荒木希和子, 工藤洋 “ Roles of epigenetic and genetic variations in wild plant populations 野生植物集団におけるエピジェネティック・ジェネティック変異の役割 ” 第 9 回日本エピジェネティクス研究会, 2015 年
- (7) 岩崎貴也, 荒木希和子, 永野惇, Sabirov RN, Marhold K, Yakubov VV, Pak J-H, 伊藤元己, 工藤洋. “ 網羅的サンプリングと RAD-seq 法を活用した分子系統地理 - 東アジアに広域分布するコンロンソウを例に ” 第 62 回日本生態学会, 2015 年
- (8) 辻本典顯, 荒木希和子, 八杉公基, 本庄三恵, 永野惇, 工藤洋 “ クローン植物の優

占ジェネットにおけるラメット生産様式：自然集団と移植実験による解析”第62回日本生態学会，2015年

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 荒木希和子，種生物学会(編)(2017)“エピジェネティクスの生態学 環境にตอบสนองして遺伝子を調節するしくみ”，文一総合出版．pp. 245.
- (2) 荒木希和子 (2017) “野生クローン植物集団に見られるエピジェネティック空間構造” 荒木希和子・種生物学会(編)エピジェネティクスの生態学，文一総合出版．133-153.

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

荒木 希和子 (ARAKI, Kiwako)  
立命館大学・生命科学部・任期制講師  
研究者番号：30580930