

令和元年5月8日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07180

研究課題名(和文) オニヤブソテツ有性生殖型における高自殖性進化の集団ゲノミクス解析

研究課題名(英文) Population genomics on the evolution of inbreeding in sexual subspecies of *Cyrtomium falcatum*

研究代表者

綿野 泰行 (Watano, Yasuyuki)

千葉大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：70192820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：オニヤブソテツの二倍体有性生殖型には、配偶体の性表現(造精器と造卵器の形成の仕方)に多型がある。ゲノムワイドSNPを用いた解析によって、他殖型亜種であるムニンオニヤブソテツ(以下ムニン)から、中間的自殖率を示す混合交配型亜種であるヒメオニヤブソテツ(以下ヒメ)が派生的に生じた事がわかった。またヒメ集団では、最終氷期に明確なボトルネックイベントが検出され、これが自殖性の進化と関連する可能性が示唆された。ヒメとムニンの人工F1雑種を用いて連鎖地図を作成したが、性表現型のQTLマッピングでは有意なピークが検出できなかった。両者の性表現型は比較的多くの遺伝子によって支配されていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他殖から自殖への進化は、被子植物では経験的にも理論的にも多くの研究がなされている。同形孢子シダ植物の配偶体もまた雌雄同株であり、様々な交配様式を示す点でも被子植物と同じであるが、自殖の進化に関わる機構については大きく研究が遅れている。本研究ではオニヤブソテツの二倍体有性生殖型の亜種間での交配様式の変異について解析し、自殖型亜種が他殖型亜種から派生して生じた事、また自殖型亜種は、最終氷期に明確なボトルネックを経験した事を示した。シダ植物において自殖の進化と歴史的ボトルネックの相関が検出されたのは初めての事例であり、自殖の進化において基本的に被子植物と同じ機構が働いている可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Diploid sexual races of *Cyrtomium falcatum* exhibit mating system variation: two different types of sexual expression (gametangia formation) in gametophytes. Inference of population splitting using SNPs data suggested that mixed mating-subspecies *littorale* had been derived from obligate outcrossing-subspecies *australe*. Furthermore, both EBSP and Stairway plot detected a severe population bottleneck event during the Last Glacial Period in the subspecies *littorale*, indicating a clear association between evolution of selfing and population bottleneck. In order to map genetic loci responsible for sexual expression in gametophytes, we constructed a linkage map by using RAD-seq data of a gametophyte population from an artificial F1 hybrid between the two subspecies. Unfortunately, however, no significant QTL were detected for the two different types of sexual expression. This suggests that the difference of the sexual expression between two subspecies are governed by relatively many loci.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：自殖 交配様式 シダ植物 SNP 遺伝的多様性 ボトルネック RAD-seq 連鎖地図

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シダ植物の生活史においては、孢子体と配偶体が独立生活を行い、受精は配偶体世代において行われる。配偶体上には造精器と造卵器の両性の配偶子嚢が形成されるので、被子植物と同様に、自殖から他殖まで様々な交配様式が存在する事が分かっている。特に、シダ植物においては、gametophytic selfing と呼ばれる一つの配偶体内での自家受精という究極の自殖が可能であり、その生物学的意義や役割について強い関心もたれているにも関わらず、他殖から自殖への推移を起こす、進化的メカニズムの理解については大きく遅れていた。

オニヤブソテツの二倍体有性生殖型には二亜種が認識されている。他殖型の配偶体性表現 (S-type) のみを持つムニンオニヤブソテツ *Cyrtomium falcatum* subsp. *australe* と、他殖型の配偶体性表現 (S-type) と、自殖型の配偶体性表現 (M-type) の多型を示すヒメオニヤブソテツ *C. f.* subsp. *littorale* である。種内に交配様式が分化しているこの種が、自殖の進化の研究に最適と考え、集団ゲノミクス手法で解析を行った。

2. 研究の目的

研究 (1): ヒメオニヤブソテツの S-type 集団と M-type 集団の遺伝的構造を、マイクロサテライトマーカーによって解析し、性表現から予期される通り、M-type 集団の方 S-type 集団より自殖率が高いかどうかを確かめる。

研究 (2): ヒメオニヤブソテツの S-type 集団と M-type 集団およびムニンオニヤブソテツの各地集団の間の遺伝的関係についてゲノムワイド SNP を用いて解析する。また、被子植物でよく観察されるように、自殖性の系統において、ボトルネックに伴う遺伝的多様性の減少が観察されるかを確かめる。

研究 (3): M-type のヒメオニヤブソテツ個体と S-type のムニンオニヤブソテツ個体の人工 F1 雑種の配偶体では、M-type と S-type の分離が観察される。これを分離集団として用い、この人工 F1 雑種の連鎖地図を作成し、M-type と S-type を支配する遺伝子座 (QTL) の連鎖地図へのマッピングをおこなう。

3. 研究の方法

研究 (1): ヒメオニヤブソテツの S-type 集団を2地点3集団、M-type 集団を3地点4集団、全体で233個体採取した。8遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いて解析し、近交係数や各種の遺伝的多様性指標を求めた。

研究 (2): ヒメオニヤブソテツ (集団 1 ~ 11) に加え、ムニンオニヤブソテツ (集団 12 ~ 21) も採集し、21 集団 83 個体について2種類の制限酵素 (*EcoRI* と *BglIII*) を用いた ddRAD-seq¹ を行い、ゲノムワイドな SNPs を得た。まず得られたリードをオニヤブソテツの葉緑体 DNA ゲノム配列² にマッピングして葉緑体 DNA を除いた。次に pyRAD³ を用いて、contig を作成した他、各種のフィルターリングを行った。また、pcadapt⁴ を用いて外れ値と見做しうる遺伝子座を除いた。残った SNP を用いて集団間・亜種間の関係を STRUCTURE⁵ と Treemix⁶ で解析した。また、過去の集団サイズの時間的変動を、Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP)⁷ と Stairway plot⁸ を用いて推定した。

研究 (3): Matsumoto (2003) が作成したヒメオニヤブソテツとムニンオニヤブソテツの人工 F1 雑種個体 (A1-55 × A2-2) から孢子を採取し、寒天培地プレート (1 % Agar, 0.1 % ハイポネックス) に播いた。幅が 1 ~ 2 mm となった配偶体を 24 穴マルチディッシュに単離して同培地にて培養し、配偶体の幅が 7 mm ~ 10 mm になったら光学顕微鏡下で性表現型の観察を行った。観察後の配偶体から DNA を抽出した。2種類の制限酵素 (*EcoRI* と *BglIII*) を用いた ddRAD-seq と MIG-seq⁹ によって SNP マーカーを作出した。次に R/qtl¹⁰ を用いて SNP 連鎖地図を作成し、性表現型決定遺伝子座の QTL マッピングを試みた。

¹Peterson et al. (2012) PLoS ONE 7, e37135; ²Raman et al. (2016) Genes 7, 115; ³Eaton (2014) Bioinformatics 30, 1844–1849; ⁴Luu et al. (2017) Mol. Ecol. Resour. 17, 67–77; ⁵Pritchard et al. (2000) Genetics 155, 945–959; ⁶Pickrell & Pritchard (2012) PLoS Genet. 8(11), e1002967; ⁷Heled & Drummond (2008) BMC Evol. Biol. 8, 289; ⁸Liu & Fu (2015) Nat. Genet. 47, 555–559; ⁹Suyama & Matsuki (2015) Sci. Rep. 5, 16963; ¹⁰Broman et al. (2003) Bioinformatics 19, 889–890

4. 研究成果

研究 (1): 全 7 集団の内、佐渡 (Sado) を除く 6 集団において、自殖のレベルの指標となる近交係数 F_{IS} は、有意に 0 よりも大きかった。配偶体の性表現型で整理すると、自殖型と推定された M-type 集団は、他殖型と推定された S-type 集団より高い近交係数を示した (M-type, $F_{IS} = 0.626$; S-type, $F_{IS} = 0.208$)。これは、配偶体の生殖器官の形成パターンの多型が、実際に野外集団の自殖レベルに影響を与えている事を示した最初の事例となる。また共に中間的な近交係数を示すことから、ヒメオニヤブソテツは性表現型によらず基本的に混合交配様式 (Mixed

Mating; 自殖と他殖の混合の交配様式)を持つことが示唆される。

興味深い事に、M-type 集団は S-type 集団よりも低い遺伝的多様性 h と小さな有効集団サイズ N_e を示した (M-type, $h = 0.152$, $N_e = 252$; S-type, $h = 0.367$, $N_e = 675$)。一般に近交係数と有効な集団サイズの関係は $N_e = N / (1 + F_{IS})$ の式で表される¹。M-type 集団の有効集団サイズは、S-type 集団の半分より小さく、この式によって両者の近交係数の差から期待されるより低下のレベルが大きい。シダ植物の配偶体が雌雄両全性であることは、単一胞子による遠隔地への移入を可能にする有利性を持つと古くから議論されてきた²。ヒメオニヤブソテツは、海沿いの海食崖という不安定な立地に生育する。自殖を容易にする M-type は、地域的絶滅と再移入という攪乱が多い集団において選択的に有利となると考えられる。一方、頻繁な攪乱の際に働くボトルネックが、M-type 集団における低い遺伝的多様性と小さな有効集団サイズの原因であると考えられる。

研究 (2): ddRAD-seq により非葉緑体ゲノム由来の 9,350 遺伝子座が得られた。フィルターリングと外れ値遺伝子座の除外により、最終的に 2,281 遺伝子座が残った。

STRUCTURE を用いたクラスター解析の結果 (Fig. 1) では $K=2$ が最適となり、この際、Sado (集団 8) の全 7 個体と Sandan (三段; 集団 11) の全 10 個体の内の 2 個体を除くヒメオニヤブソテツが一つのクラスター (青いクラスター) を形成した。Treemix の結果 (Fig. 2) でも Sado を除くヒメオニヤブソテツの集団がクラスターを形成した他、ヒメオニヤブソテツの太平洋側分布の西限にあたる紀伊半島の集団 9~11 が、ヒメオニヤブソテツの基部に位置するという西から東への集団分岐パターンが得られた。

Sado は研究 (1) においても、近交係数が -0.100 となりヒメオニヤブソテツとして採集された集団の中で唯一他殖性を示した。本研究によって Sado が遺伝的には μ ニオニヤブソテツに属することが示唆された。Sado を除くヒメオニヤブソテツは研究 (1) で示された通り混合交配様式を持つ。Fig. 2 に示された通り、この形質は他殖性の μ ニオニヤブソテツから派生的に生じたことが示唆される。

ヒメオニヤブソテツ内には配偶体の性表現に関して自殖型の M-type と他殖型の S-type という多型が存在する。本研究で解析したヒメオニヤブソテツ集団では、Sado を除けば、Izu (伊豆; 集団 6) のみが S-type で、それ以外は全て M-type である。S-type の Izu は、同じく S-type である μ ニオニヤブソテツに近縁という訳でなく、Fig. 2 のヒメオニヤブソテツクラスター内では派生的な位置で分岐している。この結果は、ヒメオニヤブソテツ内において S-type の性表現が二次的に進化した可能性を示している。自殖レベルが減少する方向への進化は、種子植物でも事例が無く、極めて興味深い。

EBSP による集団サイズの歴史的変動の解析 (Fig. 3) では、ヒメオニヤブソテツにおいて約 10 万年前から 2 万年前にかけて個体数が減少し、その後回復するというボトルネックが検出された。一方、 μ ニオニヤブソテツではボトルネックは見えず、ほぼ一定の集団サイズであったと推定された。stairway plot による解析でも同様に、ヒメオニヤブソテツにおいてのみ、ボトルネックが検

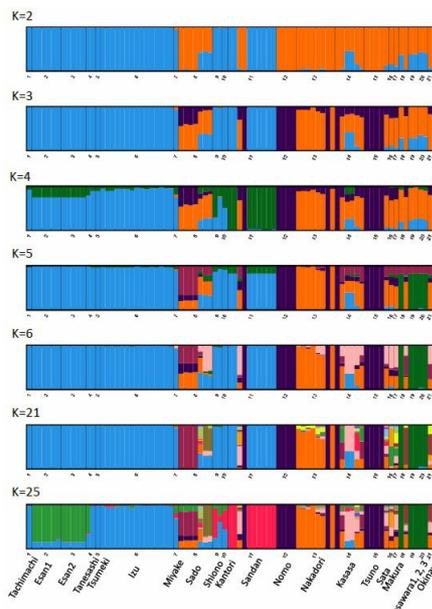


Fig. 1. STRUCTUREによるクラスター解析

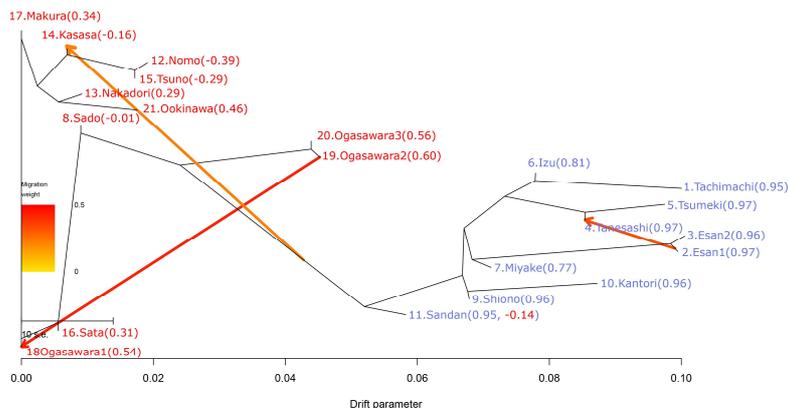


Fig. 2. Treemixによる集団間の系統的關係

出している。この結果は、ヒメオニヤブソテツ内において S-type の性表現が二次的に進化した可能性を示している。自殖レベルが減少する方向への進化は、種子植物でも事例が無く、極めて興味深い。

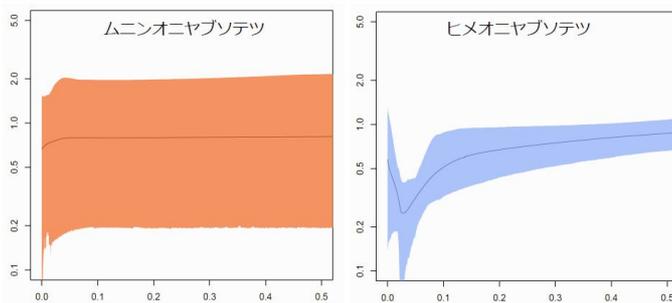


Fig. 3. EBSP解析による有効な集団サイズの時間的推移。横軸は現在からの時間 (100万年単位)、縦軸は有効な集団サイズ (100万個体単位)、95%の信頼区間がオレンジと青で示されている。

出された。stairway plot の場合、最も個体数が減少した時期は 4 万年前である。

両解析によってボトルネックが検出された時期は最終氷期（約 1~7 年前）に相当する。従ってヒメオニヤブソテツの祖先集団がムニンオニヤブソテツと分岐した後、より北方に位置していたヒメオニヤブソテツでは最終氷期の寒冷化の影響を大きく受けて個体数が縮小したが、その後、最終氷期最大期（LGM, 約 2 万年前）以降の温暖化に伴い分布域を拡大させたというシナリオが考えられる。Matsumoto (2003)³ は、ヒメオニヤブソテツでは S-type の Izu 集団の個体でも配偶体の単離培養下でほぼ 100% 孢子体を形成することを示しており、遺伝的荷重が小さい可能性が高い。ヒメオニヤブソテツで検出されたボトルネックが、この遺伝的荷重のパーシに貢献した可能性は考慮に値するだろう。少なくとも LGM 後の分布拡大においてヒメオニヤブソテツの M-type 型性表現が有利に働いたであろう事は間違いない。

研究(3): Matsumoto (2003)³ は、M-type のヒメオニヤブソテツ孢子体と S-type のムニンオニヤブソテツ孢子体の人工雑種を作成し、この雑種の配偶体集団では M 型と S 型が 1:1 の分離比を示すことから、この性表現型が 1 遺伝子座によって決定されていることを示唆した。本研究では、Matsumoto (2003)³ で作成された人工雑種の孢子体を用いて追試を行い、クッション部に造卵器のみの配偶体 (S-type) が 39 個体、そして造卵器と造精器を混生する配偶体 (M-type) が 53 個体観察された。これは、Matsumoto (2003)³ で示唆された 1:1 の分離とは有意に異なる (Fisher's Exact Test, $p=0.3750$)。

MIG-seq では MiSeq での解析により 50.8M リードが得られ、フィルタリング後に 5,354SNPs が残った。更に欠損の多い個体や遺伝子座、そして 1:1 の分離比からずれる遺伝子座等を除去した結果、674SNPs が残った。ddRAD-seq では Hiseq での解析により 232.9M リードが得られ、同様なフィルタリングの結果、1,203 SNPs が残った。

両者の結合データを用いた連鎖地図作製では、LOD スコア 10・組換え率 0.2 をグルーピング閾値とした場合、520SNPs (334 RAD-seq SNPs & 186 MIG-seq SNPs) が 42 の連鎖群に分けられた。これはヤブソテツ属の基本染色体である $x=41$ とほぼ一致する。また、地図の全長は 1778.5 cM で SNPs 間の平均距離は 3.7 cM、連鎖地図のゲノムカバー率(c)は 88.5%、そして任意の遺伝子と近傍マーカー間の距離の期待値 $E(m)$ は 1.7cM であった。

QTL マッピングの結果では、残念ながら有意な相関を検出することが出来なかった (Fig. 4)。最大のピーク (LOD=2.36) は連鎖群 10、次に大きなピーク (LOD=2.10) は連鎖群 42 に観察されたが、共に 5% 有意水準である LOD=4.64 よりも相関が低い。一般に QTL マッピングで表現型に関連する領域のピークが検出されない場合の可能性として、着目している形質が他遺伝子座 (単一または少数ではない) により支配されている場合、形質が環境に支配される割合が大きく遺伝効果小さい場合、単一または少数の遺伝子座に支配されているが使用した分子マーカーでは関連領域をカバーできていない場合、マーカー密度が低い場合などが考えられる。本研究では、SNPs 間の平均距離は 3.7 cM であり、これは 3.7% の確率でしか組換えが起こらない距離である事を意味する。もし Matsumoto (2003)³ が示唆したように単一の遺伝子座支配であれば、検出が困難だとは考えにくい。また本研究のカバー率も他研究に比べて低くない。目的としている配偶体の性表現という形質は、親個体では固定しており環境の影響を受けない。従って遺伝率の低い形質であるとも考えにくい。最後に残った可能性として、比較的多くの遺伝子座の影響を受けていて、個々の遺伝子座の効果が相対的に小さくなってしまったのではないかと考えられる。QTL ピーク最近傍の SNP のアリルと表現型との相関を見てみると、最大ピーク最近傍の RAD-524111 では、ムニンオニヤブソテツ親由来のアリルを持つ配偶体で、M-type の頻度が高いという、期待と逆の相関が見られる。二番目のピーク最近傍の RAD-173309 では、順相関が見られる。

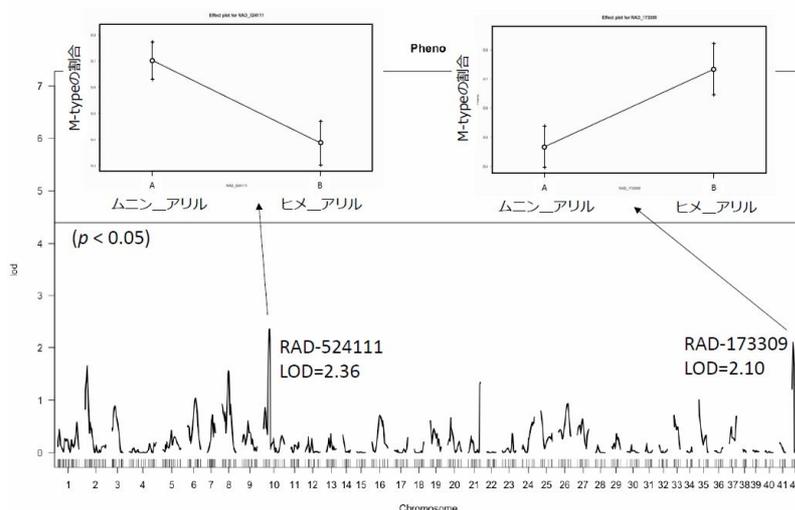


Fig. 4. MIG-seq と ddRAD-seq の SNP の結合データにより得られた連鎖地図

本研究では、亜種間の F1 雑種における表現型分離を解析したが、みかけの 1:1 の表現型分離から推測されるように少数の遺伝子座が関与しているのではないと結論できる。比較的多くの遺伝子座が関与しており、遺伝子座間の関係も Fig. 4 の例のように、時にはムニンオニヤブソテツ側の遺伝子が M-type の表現型に寄与するなど複雑であり、結果として明確なピークとしての検出ができなかったと考えるのが妥当である。性表現型の QTL マッピングを成功させるためには、親個体の遺伝的背景を近付けるため、ヒメオニヤブソテツの M-type と S-type の雑種を用いるのが良いであろう。

¹ Pollak (1987) *Genetics* 117, 353-360; ² Baker (1955) *Evolution* 9, 347-349; ³Matsumoto (2003) *Ann. Tsukuba Bot. Gard.* 22, 1-141.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Imai, R., Tsuda, Y., Matsumoto, S., Ebihara, A., Watano, Y. (2016). The Relationship between Mating System and Genetic Diversity in Diploid Sexual Populations of *Cyrtomium falcatum* in Japan. 査読有. *PLoS One*. 11(10): e0163683. doi: 10.1371/journal.pone.0163683.

〔学会発表〕(計 2 件)

今井亮介・津田吉晃・松本定・海老原淳・手塚あゆみ・永野惇・綿野泰行 (2017). 2倍体オニヤブソテツの交配様式の進化について. 日本森林学会@鹿児島大学

今井亮介・松本定・海老原淳・津田吉晃・手塚あゆみ・永野惇・綿野泰行 (2016). ヒメオニヤブソテツとムニンオニヤブソテツの RAD シーケンスを用いた系統学的研究. 日本植物分類学会@富山大学.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

海老原 淳 (Ebihara, Atsushi)

今井 亮介 (Imai, Ryosuke)

松本 定 (Matsumoto, Sadamu)

永野 惇 (Nagano, Atsushi)

高山 浩司 (Takayama, Koji)

手塚 あゆみ (Tezuka, Ayumi)

津田 吉晃 (Tsuda, Yoshiaki)

陶山 佳久 (Suyama, Yoshihisa)

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。