

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07181

研究課題名(和文) ゲノム情報から探るアオキ属の適応分化と系統進化

研究課題名(英文) Approach to adaptive and phylogenetic evolution of Aucuba from genome information

研究代表者

東馬 哲雄(大井哲雄)(TOMA, Tetsuo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：10376527

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)：アオキ属の分類の再検討、系統進化・適応進化の理解を目指し、分類学的・地理的に属を網羅したサンプリングを踏まえて、葉緑体DNA(複数の遺伝子領域と非遺伝子領域)と核DNA(ITS領域、gapC遺伝子、rpb2遺伝子)による系統解析を実施した。その結果、新亜属を認識すべきであることが強く示された。またアオキは殆どの葉緑体DNAと核DNAのITSでは単系統だが、rbcL、gapC、rpb2では多系統群で、大陸産種との交雑で異質4倍体系統が生じ、同質4倍体系統との二次的交雑を経験したことが示唆された。さらに前者は大陸産種と同一のrbcL配列をもち、その要因について葉緑体DNA完全長解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：In order to revise the infrageneric classification of Aucuba and to elucidate its phylogenetic and adaptive evolution, phylogenetic analyses of chloroplast and nuclear DNAs were conducted based on samples that taxonomically and geographically covered the genus. The phylogenetic relationship suggested that the new subgenus should be recognized. In addition, *A. japonica* is monophyletic in the phylogenetic trees of most chloroplast regions and nuclear ribosomal ITS region but polyphyletic in the phylogenetic trees of chloroplast rbcL, and nuclear encoded gapC and rpb2 genes. It is suggested that the allotetraploid lineage might be originated via a past crossing with continental species and subsequent gene flow was occurred with the autotetraploid lineage in Japan. Moreover, the former lineage shared the identical sequence of rbcL with a continental species, so we continue to examine its evolutionary factors, cf. selection of rbcL gene, by a comparison of complete chloroplast DNA sequences.

研究分野：植物系統分類

キーワード：アオキ属 系統分類 進化 日華植物区系

1. 研究開始当初の背景

申請者は日華植物区系に固有な植物群であるアオキ属 *Aucuba* (ガリア科) について、属内分類と系統に加えて、属内で唯一倍数体の報告のある日本産種 *A. japonica* における倍数化の起源について、DNA 情報による系統推定を踏まえることで明らかにするべく研究を進めてきた。属内分類については、中国産種 *A. chinensis* の形態的特徴が正確に把握されておらず、誤認識されてきたことに起因して種分類が混乱していること、アオキ属は2つの系統に区別でき亜属レベルでの分化があること、従来 *A. japonica* のみに4倍体が知られていたが大陸産種にも複数の倍数体が存在することなどが明らかになった他、*A. japonica* の4倍体には同質倍数体と異質倍数体がある可能性が示唆された。さらに *A. japonica* には、種内で地理的に分化する2つの系統に対応した葉緑体 DNA *rbcl* 遺伝子に2種類の配列タイプがみられ、その配列タイプの違いは5つの非同義置換 (アミノ酸置換) によるもので、かつ単系統群にはならないことから、種内でのカルビン・ベンソン回路で炭酸固定反応に参与する酵素 Rubisco に、適応的な分化が生じている、あるいは種間交雑により他種から *rbcl* 遺伝子のみが水平移動した可能性も考えられた。しかし属内分類や属内の系統進化を理解するには、アオキ属の特に大陸産種が十分に網羅できていなかった。

2. 研究の目的

本研究計画では、これまでの研究により得られている結果を踏まえて、分類学的・地理的にもアオキ属を網羅したサンプルを対象にして、葉緑体 DNA のほぼ全域および複数核 DNA 遺伝子のゲノム情報を駆使することで、属内の系統分類の再検討および倍数化や種間交雑による系統進化、さらに *A. japonica* 種内における Rubisco の適応分化または多種からの遺伝子水平移動の検証についてアプローチすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) これまでの解析には、所属する東京大学大学院理学系研究科附属植物園で栽培されている日本・韓国・台湾・中国からのアオ

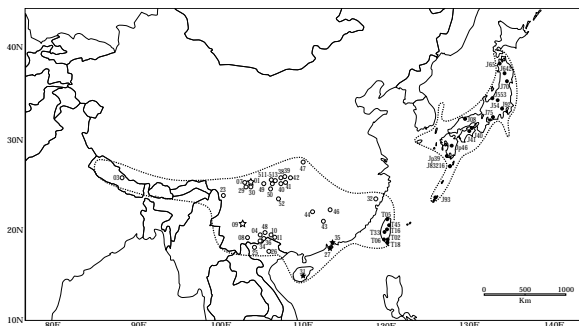


図1: 属の分布域とサンプリング地点

キ属植物を利用してきた。しかし、アオキ属を網羅しきれてはいなかったため、ここ数年の間に、中国の共同研究者の協力により広東省・湖南省・江西省・湖北省・云南省・重慶市・貴州省・台湾から新たにサンプルを入手ができ、概ね分類学的・地理的にアオキ属を網羅できたことから (図1)、これらを新たに解析に利用することにした。また外群に利用するガリア属 *Garrya* については、新たに1種を追加した。

(2) これまでの解析を踏まえて、新たなサンプルについては、フローサイトメーターを用い生葉の細胞核から倍数性を推定した他、HEPES-CTAB 法により抽出した全 DNA から葉緑体 DNA 遺伝子領域 (*rbcl*, *ndhF*, *psbA*, *matK*) と非遺伝子領域 (*atpB-rbcl*, *trnH-psbA*, *trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *accD-psaI*, *trnK* intron, *psbA-trnK*) および核 DNA リボosomal ITS 領域の配列決定を行い、さらに生葉から抽出した RNA から核 DNA *gapC* 遺伝子エキソンの配列決定を行った。また、単一または少数コピー核 DNA 遺伝子を探索した上で、他の被子植物の系統解析に用いられている *rpb2* 遺伝子のエキソン部分に、ガリア科に特異的な PCR 増幅プライマーを設計し、既存および追加の全サンプルについて全 DNA からの配列決定を行った。なお、核 DNA の1領域、2遺伝子については、殆どのサンプルの PCR または RT-PCR 増幅産物に複数種類の配列が含まれるため、クローニングによる配列分離を行った後、複製エラーや増幅時の人工キメラを取り除いた上で、配列を決定した。決定配列については、葉緑体 DNA では系統解析、核 DNA では系統解析の他、外群を除いたネットワーク (Neighbor-net) 解析を行った。

(3) 葉緑体 DNA および核 DNA による系統関係、葉緑体 DNA の4つの遺伝子領域の配列比較を踏まえて代表サンプルを選抜して、葉緑体 DNA ほぼ完全長解析を試みた。従来の HEPES・CTAB 法で抽出した DNA は、断片化が多く Long PCR による増幅に不適であるため、抽出キットを用いて生葉から長鎖の全 DNA を抽出した。PCR 増幅は、葉緑体 DNA (ガリア目トチュウ科で約 16 万 bp) を8分割 (約 1.2 万 bp~2.4 万 bp: IR 領域は1区分として) して増幅するように設計されたプライマーセットを用いて Long PCR による増幅を行い、次世代シーケンサー用のライブラリー作成を行った。なお、最終的なランについては期間内には完了しておらず、引き続き解析を継続している。

4. 研究成果

(1) 葉緑体 DNA と核 DNA の系統と属内分類
葉緑体 DNA 非遺伝子領域のみの結合配列 (計約 5,000bp) の系統解析 (図2) では、サンプルの追加により属内を網羅しても、黄色花・高木種 (系統1) と、紫色花・低木種

(系統 2) に分化していることが確認できた。また、新たに追加した湖南省南部の 4 倍体が日本・台湾・韓国の *A. japonica* に近縁であることが示された。

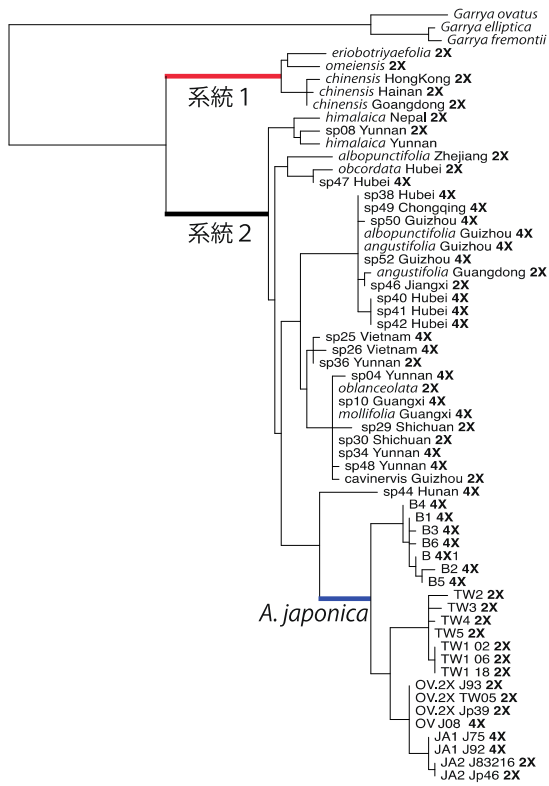


図 2 : 葉緑体 DNA 非遺伝子領域による系統

核 DNA リボソーム ITS 領域 (約 680bp) のネットワーク解析 (図 3) では、黄色花・高木種 (系統 1) と紫色花・低木種 (系統 2) が遺伝的に分化していた。また系統 2 では、*A. japonica* は大陸産種から遺伝的に分化しており、近縁種は不明であった。他種については、多系統の関係にある複数配列 (最大 5 種類の配列タイプ) を持つ個体が複数存在しており、系統関係は明確にはならなかった。

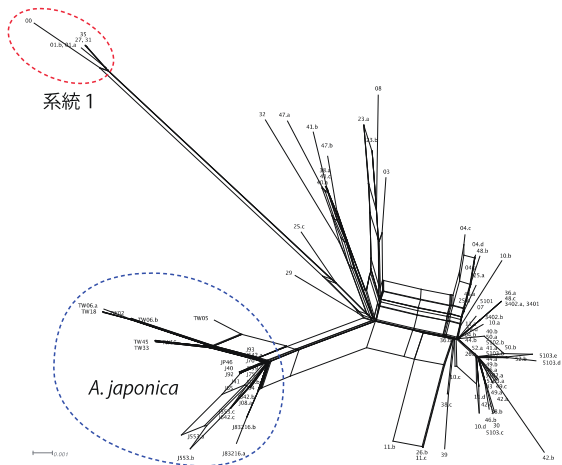


図 3 : 核 DNA ITS 領域のネットワーク

核 DNA *gapC* 遺伝子 (約 620bp) のネットワーク解析 (図 4) では、黄色花・高木種 (系統 1) と紫色花・低木種 (系統 2) が遺伝的に大きく分化していた。*A. japonica* には系統的に離れた 2 つの系統 (*A. japonica*-1、*A. japonica*-2) が含まれたが、葉緑体 DNA 系統に見られた 2 つの種内系統には対応してはいなかった。*A. japonica*-1 系統は、日本・台湾からのサンプルの配列がまとまり、大陸産種からは遺伝的に分化していた。他方、*A. japonica*-2 は、2 つの葉緑体 DNA 種内系統を含むが、東日本にある 4 倍体からの配列に限定されており、大陸産種 *A. himalaica* などに比較的近縁であった。他種については、多系統の関係にある複数配列 (最大 4 種類の配列タイプ) を持つものが複数存在しており、系統関係は明確にはならなかった。

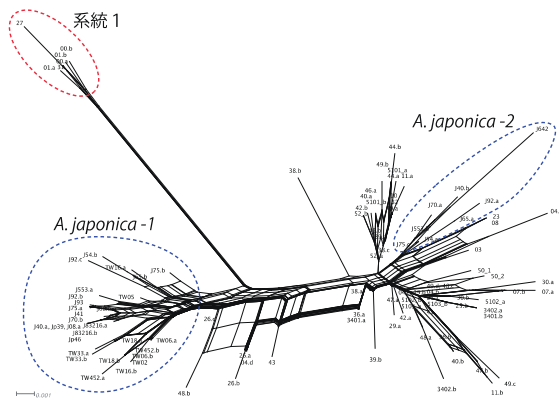


図 4 : 核 DNA *gapC* 遺伝子のネットワーク

核 DNA *rpb2* 遺伝子 (約 760bp) のネットワーク解析 (図 5) では、黄色花・高木種 (系統 1) は遺伝的にまとまったが、紫色花・低木種 (系統 2) との分化の程度は小さかった。*A. japonica* は複数の系統からなる多系統群で (図の青点線) 各系統は葉緑体 DNA 種内系統・分布域・倍数性などによるまとまりは見られず、それぞれに大陸産種の近縁配列がみられた。多系統の関係にある複数配列 (最大 4 種類の配列タイプ) を持つものが複数存在しており、他種の系統関係は全く明確にはならなかった。

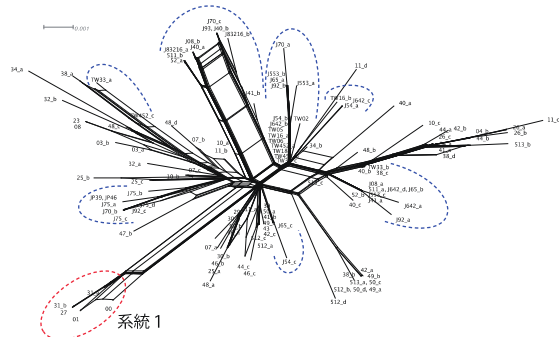


図 5 : 核 DNA *gapC* 遺伝子のネットワーク

属を網羅した葉緑体 DNA・核 DNA の系統解析を踏まえると、アオキ属は2つの系統に分化しており、それらは黄色花・高木種(系統1)と紫色花・低木種(系統2)に相当する。属のタイプが *A. japonica* であることから系統2を subgenus *Aucuba* とし、系統1を新亜属とすることを提案し、そのタイプは記載年が古い *A. chinensis* とする。*A. chinensis* は黄色花で、かつ長い花糸をもつ雄花などにより明確に区別される種で、その分布域は中国南部の局所に限定される。従来の属内分類では、*A. chinensis* は中国に広域分布する紫色花または黄色花の種として認識されてきたが、大半のものは未記載種を含む別種に相当すると考えられ、種分類の再検討を行う必要がある。その中で少なくとも、台湾産 *A. chinensis* として認識されてきたものは *A. japonica* としてすべきである。

他種の系統関係は、期待に反して核 DNA の情報からは有用な系統情報を得ることができず、核 DNA の系統を踏まえた種分類の再検討は難しく、倍数体の起源推定もほとんど不可能である。アオキ属では、倍数体種が多く存在することが明らかになり、交雑による異質倍数化が繰り返されている、さらに異なる倍数体間での交雑が生じていることにより核 DNA の分子進化が網状的になっていると考えられた。特に新規解析領域の *rpb2* 遺伝子は、被子植物の系統推定にも利用されるが、遺伝子重複や欠損などが指摘されており、アオキ属でも同様のことが原因かもしれない。

A. japonica に限って言えば、ITS 領域と *gapC* 遺伝子の系統情報は有益であり、ITS 領域では協調進化のため *A. japonica* の範囲を明確に示すが、*gapC* 遺伝子では *A. japonica* の東日本の2つの種内系統の4倍体に祖先多型がみられることから、過去の交雑による異質倍数化、さらに種内系統間での倍数化後の交雑を示唆している。

(2) *A. japonica* 種内の *rbcl* 分化
 葉緑体 DNA の4つの遺伝子(*rbcl*, *ndhF*, *psbA*, *matK*)の配列比較を行い、特に *A. japonica* に着目した(図6の赤字)。*A. japonica* の *rbcl* 遺伝子には種内系統に対応した5つの非同義置換の違いによる2種類の配列タイプがわかっていたが、一方は *A. japonica* (台湾産を含む)のみに見られ、他方は葉緑体 DNA 非遺伝子領域の系統で単系統群になる中国産複数サンプルと同じ配列を持っていることが明らかになった。*psbA* 遺伝子では、*A. japonica* の日本産と台湾産の間に1つの非同義置換がみられ、日本産は大陸産種と配列を共有していたが、*rbcl* 遺伝子とは異なるパターンである。*ndhF* 遺伝子では、*A. japonica* 種内に9種類の配列タイプがあるが、単系統群で他種との共有はない。*matK* 遺伝子では種内系統に対応した3種類の配列が見られるが、3つの塩基置換のうち1つは非同義置換で、他種との配列共有はみられない。

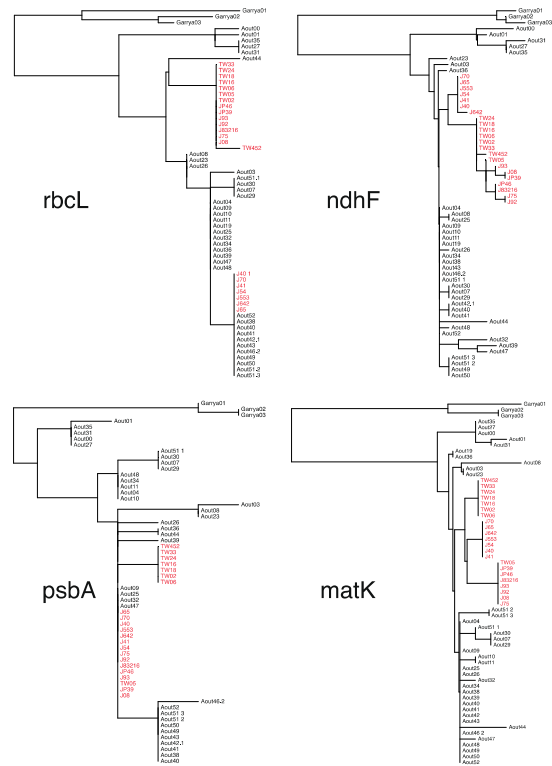


図6：葉緑体 DNA の4つの遺伝子の系統

rbcl 遺伝子に加えて *psbA* 遺伝子に見られた *A. japonica* と他種との配列共有については、*gapC* 遺伝子から推測された過去の交雑とは関係がないと考えられる。光合成に関わる *rbcl* 遺伝子に加えて光化学系 II の *psbA* 遺伝子での日本・台湾での分化は、光反応への適応分化の可能性を示唆している。そこで葉緑体 DNA の他の遺伝子について網羅的に配列比較を行うため、葉緑体 DNA 完全長配列の決定と各遺伝子の多型について解析を進めた。葉緑体 DNA を8分割した Long PCR では、全てを増幅できないサンプルがあり最終的にはアオキ属 23 サンプルと外群 1 サンプルについてライブラリー作成を行った。この後、次世代シーケンサーにより配列データを取得する予定であったが、ライブラリー作成に時間が要したこと、機器の不調で現段階で取得には至っていない。引き続き、配列決定と各遺伝子の配列比較を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔図書〕(計 1 件)

東馬哲雄、平凡社、アオキ科、大橋・門田・邑田・米倉(監修)改訂新版日本の野生植物、2017、4巻、p.265.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東馬 哲雄(大井哲雄)(TOMA, Tetsuo)
 東京大学・大学院理学系研究科・助教
 研究者番号：10376527