様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２年　７月　６日現在

機関番号：８２６１７
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2019
課題番号：１６Ｋ０７４９５

研究課題名（和文）ゼンマイ科の系統と系統的遺存種ヤマドリゼンマイの進化

研究課題名（英文）Phylogeny of Osmundaceae and evolution of phylogenetic relict species, Osmundastrum cinnamomeum

研究代表者
堤　千絵（Tsutsumi, Chie）

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号：３０４５５４２２

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）：系統的依存種ヤマドリゼンマイを含むゼンマイ科の系統と進化を明らかにするため、主要な種の若い胞子体を用いてRNA-Seq解析を行った。得られた8万を超える塩基データをもとに系統解析を行った結果、既存の研究とは異なり、ヤマドリゼンマイはTodeaやLeptopterisと単系統になる樹形が得られ、葉緑体や形態による推定を支持しなかったが、サポートは不十分であった。しかしながらヤマドリゼンマイとオニゼンマイは異なる遺伝的背景を持つことはサポートされた。またヤマドリゼンマイとオニゼンマイの集団遺伝学的解析から、両種とも日本とアメリカの集団間では遺伝的に分化していることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ゼンマイ科はシダ植物の初期進化を知る上で非常に重要で、ヤマドリゼンマイなど系統的遺存種を含み、ゲノムの安定性が系統的遺存種を生み出した可能性がある。本研究は初めてゼンマイ科の主要な種を網羅した大規模遺伝子解析を行った。系統解析結果から、問題であったヤマドリゼンマイの系統が不明瞭なのは、遺伝子座により結果が異なるためと考えられた。また系統樹では科内の枝の長さが短いことから、塩基置換速度が遅くゲノムが安定的であることが類推され、さらなる検証に向けて、他の群との塩基置換速度、同義置換や非同義置換率などを比較解析することを継続して行なっている。

研究成果の概要（英文）：To clarify the phylogeny and evolution of Osmundaceae, which includes phylogenetically relic species, Osmundastrum cinnamomeum, we performed a RNA-Seq technique using young sporophytes of representative species in the family. The phylogenetic tree deduced from the data of over 80,000 nucleotide bases, O. cinnamomeum formed a clade with Todea and Leptopteris, although the support was insufficient. Our study supported that O. cinnamomeum has different evolutionary backgrounds from those of Claytosmunda claytoniana. MIG-Seq analysis of O. cinnamomeum and C. claytoniana suggested that both species were genetically differentitated between Japanese and American populations.

研究分野：生物多様性・分類

キーワード：系統　RNA-Seq　系統的遺存種

※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。

様　式　Ｆ－１９－２

１．研究開始当初の背景

ゼンマイ科は最も原始的な薄嚢シダで、その歴史は極めて古く、分岐年代推定からその起源はおよそ３億年前にさかのぼると考えられている。化石を用いた研究から、ヤマドリゼンマイは１億 8000 万年前の化石から核サイズが変化していないことや、形態がおよそ 7000 万年前からほとんど変化していないことが知られ、ヤマドリゼンマイはゲノムも形態も極めて安定した系統的遺存種である。ヤマドリゼンマイは、同じゼンマイ科のオニゼンマイと胞子葉の位置が異なるものの、栄養葉ではよく似ており、オニゼンマイも２億年以上前から類似種の化石が知られる。しかし葉緑体遺伝子 *rbcL* による分子系統解析結果では、ヤマドリゼンマイは、オニゼンマイやゼンマイ属と単系統にならず、ゼンマイ科の中で最も古くに分岐する。しかし別の葉緑体遺伝子や化石を用いた研究では、ヤマドリゼンマイがゼンマイ属と単系統となる可能性も示唆され、系統は未だはっきりしていない。

ヤマドリゼンマイのように古代から生き延びてきた種では、ゲノムが安定的で、ゲノムの安定性と形態の安定性が相関している可能性が指摘されている。しかしこれまでの研究は、染色体や核レベルでの解析、あるいは一部の葉緑体遺伝子の解析のみで、ゲノムワイドな遺伝子の安定性を明らかにするには、ゼンマイ科複数種の大規模な遺伝子解析が必要である。さらに、ヤマドリゼンマイとオニゼンマイは、生育場所や分布パターンも似ており、両種はアメリカと東アジアに隔離分布する。しかしながら、葉緑体遺伝子では明らかに異なる。そのため両種の遺伝的分化はどれほどか、類似性は祖先形質か収斂か、類似性はどれほど長く類似性維持されてきたかは興味深い。

２．研究の目的

本研究では、ゼンマイ科の大規模な遺伝子解析を行い、ゼンマイ科の系統進化を推定するとともに、ゼンマイ科における形質進化（葉の二型性、生育場所、分布の変遷等）や分岐年代を推定する。同データから算出した塩基置換率や塩基の変化パターンを他分類群と比較することで、ゼンマイ科のゲノムワイドな遺伝子の安定性を推定し、本科におけるゲノムの安定性が系統的遺存種を生み出したという可能性を検証する。

同時に、形態や分布が類似するヤマドリゼンマイとオニゼンマイにおける類似性と相違性を詳細に明らかにするため、集団遺伝学的解析を行い、集団間の遺伝的多様性や遺伝的分化を調査した。

３．研究の方法

大規模な遺伝子解析には、ゼンマイ科の各グループから少なくとも１種ずつ解析することとし、ヤマドリゼンマイ、オニゼンマイのほか、レプトプテリス属の１種、トデア・バーバラ、シロヤマゼンマイ、レガリスゼンマイ、ゼンマイを用いた。各種の胞子から培養し、作出した若い胞子体から RNA を抽出した。抽出方法は、GuSCN and CTAB method （T. Fujita, T. Kurata & M . Hasebe, http://www.nibb.ac.jp/evodevo/PHYSCOmanual/4.4.htm）をもとに行い、ゲノム除去には TURBO DNA-free™ Kit（ThermoFisher）を用いた。シーケンシングはフィルジェン株式会社の真核生物用 RNA-Seq 受託解析サービス(3 Gb raw datasample)に委託した。サンプルごとに trinity2.5.0 によりアッセンブルを行ったのち、Sonicparanoid や SCaFoS v.1.2.5 を用いて、1 種 1 配列を含む 1 対１オーソログ遺伝子の組合せを探索した。Hmmcleaner 3.0 で相同性の低い配列は除去した。系統解析には 261 領域、81255bp の塩基配列を利用した。jModeltest2.1.10 を行い、最も尤度が高かった GTR+G+I モデルを用いた。最尤法は RAxML、ベイズ法は MrBayes 3.2、NeighborNet は SplitsTree4.14.8 にて構築した。これらの解析は主に遺伝研と基生研のスーパーコンピューターを用いた。

ヤマドリゼンマイとオニゼンマイの集団遺伝学的解析では、アジアとアメリカのヤマドリゼンマイ、ならびにオニゼンマイを用いて、葉緑体と核マーカーの遺伝子解析、ならびに MIG-Seq 法の解析を行った。MIG-Seq 法により得られたデータは、stacks2.0 を用いて解析し、集団間の遺伝的分化の程度を示す Fst や、集団内の塩基多様度を調査した。

４．研究成果

(1) 大規模遺伝子解析の結果

解析対象種すべてから相同配列が得られた８万を超える塩基を用いて系統樹を構築した結果、既存の研究とは異なり、ヤマドリゼンマイは、*Todea* や *Leptopteris* と単系統になる樹形が得られたが、サポートは不十分だった（図１）。NeighborNet も同様の結果となった（図２）。遺伝子座ごとに解析すると、葉緑体遺伝子の結果と同様、ヤマドリゼンマイがゼンマイ科の基部に位置する結果や、ヤマドリゼンマイがオニゼンマイやゼンマイのクレードの基部に位置する結果が得られるなど、遺伝子座により異なっていた。しかしヤマドリゼンマイとオニゼンマイが単系統となる樹形はほとんど見られず、ヤマドリゼンマイとオニゼンマイは異なる遺伝的背景を持つことが本解析でもサポートされた。

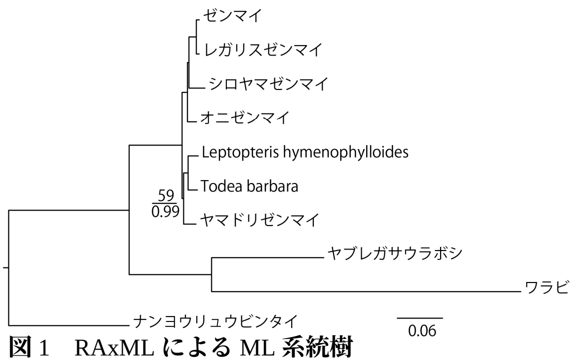

図１ RAxML による ML 系統樹

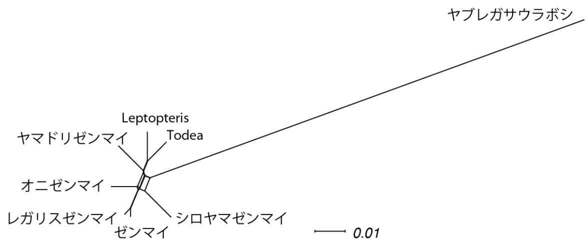

図２ SplitsTree による NeighborNet

また、系統解析結果から、ゼンマイ科内は枝の長さが短かかった。そのため、塩基置換速度が遅く、ゲノムが安定的である可能性があることも示唆された。他の群との塩基置換速度、同義置換や非同義置換率などを比較解析することを継続して行なっている。

(2) ヤマドリゼンマイとオニゼンマイの遺伝的分化

野外調査では、日本においてもアメリカにおいても、両種が同所的に混生して生育する様子も見られた。MIG-Seq 法による集団遺伝解析の結果から、2 種ともアメリカとアジアでは遺伝的に集団が分化していることが推定された。各集団で 70%以上のサンプルからデータが得られた遺伝子座に限定して解析した結果、アメリカ集団と日本集団の間における Fst の値は、ヤマドリゼンマイ、オニゼンマイとも 0.2~0.5 程度であった。一方で同国内の集団間の Fst は 0.1 以下であった。オニゼンマイについては日本とアジア集団間でも比較した結果、両者で分化はほとんど見られなかった。このことから、現在ではアメリカ集団とアジア集団では、遺伝的に分化している一方、アジア集団でははほとんど分化していない可能性が示唆された。日本とアメリカの集団内の塩基多様度を比較すると、ヤマドリゼンマイはアメリカでも日本でも同程度であったが、オニゼンマイでは日本における集団内の遺伝的多様性が低い傾向が見られた。日本のオニゼンマイは、ヤマドリゼンマイと比べて分布範囲が狭く、遺伝的な多様性が低くなっている可能性がある。

葉緑体遺伝子マーカーの比較では、ヤマドリゼンマイは一貫して、アメリカ集団と日本の集団で明確に分化がみられたが、オニゼンマイでは、日本とアメリカの集団間で変異が全く見られない領域が一部みられた。葉緑体マーカーと核マーカーの矛盾は、これまでレガリスゼンマイとゼンマイの系統間でも知られ、これらは葉緑体の浸透性交雑の可能性が指摘されている。オニゼンマイにおいても、同様の傾向があるかどうか、今後、詳細に調べる必要があると考えられた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 堤千絵、片山なつ、平山裕美子、加藤雅啓
２．発表標題 ゼンマイ科の分子系統
３．学会等名 日本植物分類学会第18回大会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	矢部　淳 (YABE ATSUSHI) (20634124)	独立行政法人国立科学博物館・地学研究部・研究主幹 (82617)	
研究分担者	角川　洋子 (KAKUGAWA YOKO) (70575141)	首都大学東京・理学研究科・准教授 (22604)	