

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17561

研究課題名(和文) 季節的な環境変動に対する植物の適応機構の解明

研究課題名(英文) Study on the adaptation of plants to seasonal environmental changes

研究代表者

甲山 哲生 (Kohyama, Tetsuo)

北海道大学・地球環境科学研究所・博士研究員

研究者番号：50793379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高山雪田環境の草本5種を対象とした比較研究により、種特異的な生活史特性の違いが、雪解け傾度に沿った形質変異や遺伝的集団構造に与える影響を調べた。野外調査および長期モニタリングデータの解析の結果、開花のための温度要求性が高い種ほど、雪解けの遅い場所では、開花フェノロジーが早くなり、開花個体のサイズや花数が減少する傾向が顕著であった。景観スケールでの遺伝的集団構造を明らかにするため、大面積調査区において高密度で採集したサンプルを用いて、次世代シーケンサーによるマイクロサテライト解析を行った。大規模ジェノタイピングのためのソフトウェア「massgenotyping」を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見は、高山帯の複雑な地形によって作られる空間的・時間的に多様な環境が、いかに生物多様性を生み出し、また、維持するかの理解に貢献するものである。高山生態系における気候変動影響の評価と保全に向けた取り組みにおいて、今後重要となる遺伝的多様性の継続的モニタリングの基盤となるデータを蓄積した。本研究で開発した大規模ジェノタイピング手法は、生態学研究のみならず幅広い分野での活用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：A comparative study of five plant species in an alpine snowmelt habit was conducted to examine how differences in species-specific life history characteristics affect phenotypic variations and population genetic structures along snowmelt gradient. Analysis using morphometric and long-term monitoring data showed that the species with higher temperature requirements for flowering showed a pronounced tendency for earlier flowering phenology and a decrease in the size and number of flowers of flowering individuals in the sites with delayed snowmelt. In order to elucidate genetic population structure at the landscape scale, microsatellite analysis using a next-generation sequencer was carried out using densely collected samples in a large survey plot. A new software "massgenotyping" for microsatellite genotyping from highly multiplexed amplicon sequencing data has been developed.

研究分野：進化生態学

キーワード：局所適応 種内変異 開花フェノロジー 景観遺伝学 高山生態系 マイクロサテライト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物を取り巻く環境は空間的・時間的に変化に富んでおり、異なる環境におかれた個体群間では、環境間の選択圧の差を反映して局所適応が生じる。同じ環境勾配にさらされていても、種によって個体群間の形質変異や遺伝的分化の程度は様々である。この理由として、個々の種のフェノロジーや繁殖戦略といった生活史特性の違いにより自然選択の強さや方向性、遺伝子流動の量が異なるため、あるいは、種によって個体群内に保持している潜在的な遺伝的変異の蓄積量が異なるためといったことが考えられる。従来の研究では、個別の種について、環境勾配に沿って変化する適応的形質の遺伝的基盤を明らかにすることに重きが置かれており、種間の生活史特性の違いが、環境勾配に沿った形質変異や遺伝的集団構造に及ぼす影響を解明することを目的とした研究事例はほとんどない。

種によって環境変化に対する進化的応答の違いが生じる原因の解明には、同一の環境勾配にさらされている複数種を対象とした比較研究を行う必要がある。多雪地域の高山帯では、冬季の強い季節風と複雑な地形を反映した雪分布の空間的不均一性によって、風衝地や雪田など多様な生育環境が形成される。従来の研究から、こうした多様な環境は、高山植物の形質進化と多様性の保持に貢献していることが明らかとなってきた。高山雪田では、雪解け時期が生育期間や土壌水分量の決定要因となる。雪解けが遅い場所ほど、植物はより短い期間で成長と繁殖を完了する必要がある。一方、雪解けが速い地点では、生育期初期の低温による凍害や送粉性昆虫の活性の低さなどが生存や繁殖成功を左右する。加えて、雪解け時期の違いに起因する開花時期にずれにより、花粉経由の遺伝子流動が制限されることで、空間的な遺伝的構造に偏りが生じやすい状況にある。このように、コンパクトな地理スケールで生育環境が劇的に変化する高山生態系は、局所適応の比較研究を行う上で理想的な系である。

### 2. 研究の目的

本研究では、個々の種の開花特性の違いを反映した選択圧の違いが、環境勾配に沿った形質変異や遺伝的集団構造および多様性に与える影響を明らかにし、季節的な環境変動に対する植物の適応機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

北海道大雪山系のヒサゴ沼・化雲平地域を調査地とし、雪田に広く分布する多年生草本5種(エゾコザクラ、ミヤマキンバイ、ハクサンボウフウ、ヨツバシオガマ、ミヤマリンドウ)を研究対象として、以下の研究を行った。

(1) 調査地において、研究協力者の工藤により、これまでに蓄積された14年にわたる高山植物群集の開花フェノロジーモニタリング調査のデータに基づき、対象植物種における開花のための温度要求性の種内変異を調べた。雪解け時期の異なる7地点に設置した永久調査区において、2005~2018年の毎年6月上旬~9月下旬にかけて、定期的に野外調査を行い、調査区内における各植物種の開花状況を4段階(1, 全体の30%以下の個体が開花; 2, 30~70%の個体が開花; 3, 70%以上が開花; 4, 咲き残った個体のみ)に分けて記録した。各調査区内に設置した温度ロガーによる地表面温度データに基づき、各調査区の雪解け日を推定した。また、調査地に設置した気象ステーションの気温データを用いて、雪解け日から調査日までの有効積算温度(日平均気温5°C以上の日の日平均気温の合計)を算出した。それぞれの種について、開花段階を応答変数、雪解け日および有効積算温度を説明変数とした順序回帰を行い、開花進行と雪解け傾度の関係を調べた。

(2) 雪解け傾度と形態形質の変異の関係を明らかにするため、2019年6月上旬~8月下旬にかけて計9回の野外調査を実施し、対象種の開花個体の形態形質(花茎高、株直径、基部直径、花数、花弁長、単位葉面積あたりの葉乾燥重量など)を計測し、雪解け時期との関係を調べた。また、雪解け時期の異なる地点において、対象種の種子を採取し、北海道大学構内の実験室および共通圃場を利用して同一環境下での栽培実験を試みた。

(3) 雪解け傾度と遺伝的集団構造および多様性の関係を明らかにするため、調査地において積雪分布の不均一性によって生じる多様な環境を網羅するように設定した大面積調査区(約225ha)において、50×50mグリッド単位で各種から採集した葉試料についてマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝分析を行った。これと並行して、大量サンプルから遺伝的多型情報を低コストかつ効率よく得るための実験手法、および、ジェノタイピング技術の開発を行った。

葉試料からCTAB法により抽出したゲノムDNAを鋳型として、2ステップPCRにより目的のマイクロサテライト領域(各種20遺伝子座)を含むDNA断片の増幅を行った。2ステップPCRでは、1ステップ目に各種の遺伝子座特異的プライマーによるマルチプレックスPCRを行い、2ステップ目に共通配列を持つプライマーを用いて個体識別のためのインデックス配列およびシーケンス用のアダプター配列を付加した。これらの2段階のPCR反応を1つのマイクロチューブ内で完了できるように反応条件を最適化した。PCR産物はSPRI磁性ビーズを用いて精製した後、各個体が当分子量になるよう混合し、次世代シーケンサー(Illumina MiSeq; V3試薬; 合計3ラン)を用いて塩基配列を解読した。得られたシーケンスデータについて、本研究で新たに開

発した Python ソフトウェア・パッケージ「massgenotyping」によるジェノタイピングを行い、集団遺伝学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 2005~2018 年にわたる開花フェノロジーモニタリング調査データの解析を行った結果、開花のための温度要求性の種内変異パターンには種間差が認められた(図1)。具体的には、開花までの温度要求性が高い「遅咲き種」のハクサンボウフウ、ヨツバシオガマ、ミヤマリンドウでは、開花進行と雪解け日の間には有意な正の相関関係がみられ、雪解けが遅い場所ほど開花フェノロジーが早まる傾向にあることが明らかとなった。一方、開花までの温度要求性が低い「早咲き種」のエゾコザクラおよびミヤマキンバイではこのような傾向は見られず、開花進行と雪解け日の間には有意ではないか弱い負の相関関係にあった。早咲き種と遅咲き種で異なる傾向が見られたことから、温度に対する感受性が種によって異なる可能性が考えられる。これらは、同一の環境勾配下にあっても、それぞれの種の生活史特性の違いを反映して選択圧の強さや方向性が異なり、これが種内変異に影響するという当初の予測に矛盾しない結果である。

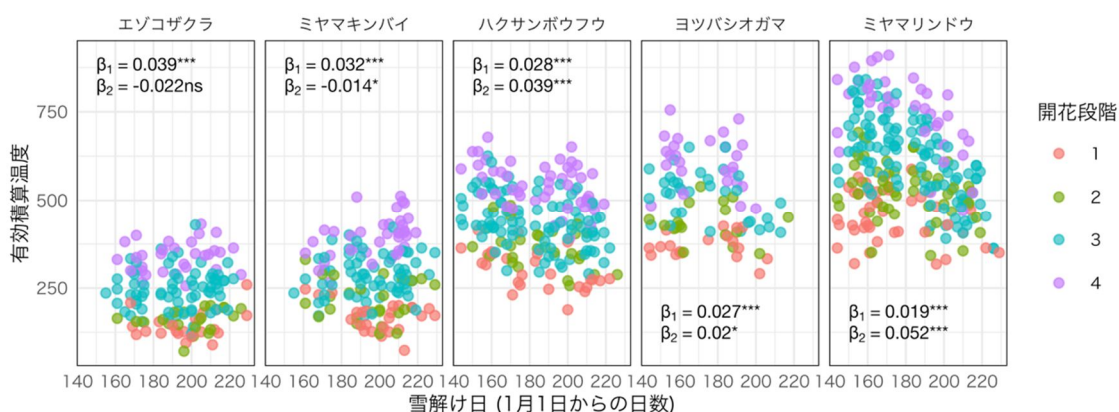


図1. 2005~2018年のモニタリング調査データに基づく、対象種の開花フェノロジーと有効積算温度および雪解け日の関係。開花段階: 1, 全体の30%以下の個体が開花; 2, 30~70%の個体が開花; 3, 70%以上が開花; 4, 咲き残った個体のみ。次の式を用いた順序回帰によって推定された回帰係数を図中に示す:  $\text{cloglog}(\text{開花段階}) = \alpha_i + \beta_1 \times \text{有効積算温度} + \beta_2 \times \text{雪解け日}$ 。 $\chi^2$ 検定による有意水準: ns,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ 。

(2) 雪解け傾度に沿って、対象種の開花個体の形態測定を行った結果、いずれの種においても、雪解け時期が極端に早い地点あるいは遅い地点では、開花個体が小型化し花数が減少する傾向にあった。雪解けの遅い場所での小型化および花数減少の傾向は、「遅咲き種」でより顕著であった。ミヤマリンドウでは、雪解け日の遅い場所で中絶花芽の割合が増加する一方、第一花の花サイズが大きくなる傾向にあることを明らかにした。これらの結果から、雪解けの遅い場所では、より短い期間で繁殖を完了する必要があるため、資源配分を変化させることで開花フェノロジーを早めていることが示唆された。今後、共通圃場での栽培実験の結果とあわせて解析を行うことで、野外個体群で観察された形質変異が、遺伝的変異を伴うものであるかどうかを解明できるだろう。

(3) 2017~2018年にかけて、5種合計2631個体から葉試料を採取し、ゲノムDNAを抽出した。マイクロサテライト20遺伝子座のPCR増幅産物について、次世代シーケンサーによる塩基配列の解読を完了した。得られたシーケンスデータについて、本研究で新たに開発した Python パッケージ・ソフトウェア「massgenotyping」によるジェノタイピングを進めている。本ソフトウェアは、次のような機能を実装している: 1) マイクロサテライト遺伝子座のシーケンスデータに最適化した半自動的ジェノタイピング; 2) インタラクティブ・プロットによる視覚的なジェノタイピングの補完(図2); 3) シーケンスデータ内の反復配列の高速検索; 4) 反復領域および非反復領域のそれぞれの多型情報に基づく対立遺伝子のグループ化と自動命名; 5) マルチコア・プロセッシングによる高速処理。また、本ソフトウェアによるジェノタイピングは以下の6工程から成る: i) プライマー配列に基づくシーケンスデータの振り分け; ii) ペアエンド・リードのマーキング; iii) シーケンスデータに含まれるエラーの削減; iv) 各サンプルにおけるユニーク配列のリード数・断片長情報に基づくフィルタリングと対立遺伝子の候補の抽出; v) マーカーごとの対立遺伝子データベースの作成(図3); vi) 各サンプルの遺伝子型の推定(ローカルBLAST検索を用いたアレールコール)。本研究で開発した Python パッケージのソースコードは、ウェブ上で公開しており(<https://github.com/kohyamat/massgenotyping>)、The Python Package Index に登録済みである(<https://pypi.org/project/massgenotyping>)。

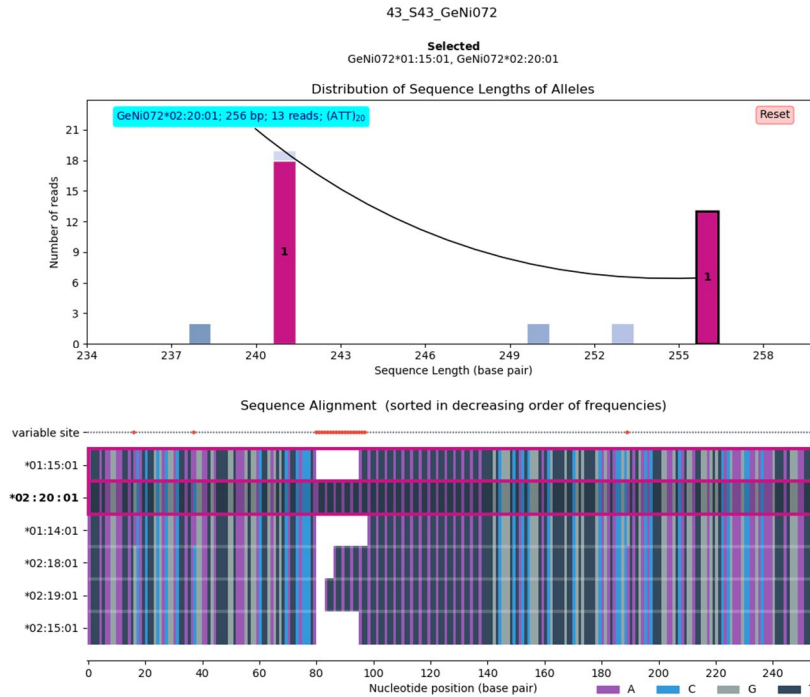


図2. 本研究で開発した Python パッケージ「massgenotyping」での、インタラクティブ・プロットを使った目視によるジェノタイピング。

これまでに、ミヤマリンドウ 192 個体についてはジェノタイピングを完了し、全体の 95% 以上について遺伝子型を決定することができた。非常に狭い地理的範囲から採集したサンプルにも関わらず、各遺伝子座における多型性は非常に高く、約半数の遺伝子座から 20 以上の対立遺伝子が検出された。また、反復領域における反復回数の多型以外に、非反復領域における変異も多く検出され（図 3）これらに基づいて対立遺伝子の系統推定とグループ化が可能であることが示された。これに加え、衛星画像を用いた調査区内の雪解け時期の数値化を進めており、本研究により得られた遺伝子型情報とあわせて解析することで、雪解け時期の不均一性が植物の遺伝的集団構造に与える影響を明らかにできるであろう。

本研究で新たに開発した、次世代シーケンサーによるマイクロサテライト遺伝子座のジェノタイピング手法は、従来の電気泳動を用いるジェノタイピング手法と比較して、複数種・数十遺伝子座・数千個体といった大規模サンプルについて、より高い精度で一括解析ができることに加え、異なる研究プロジェクト間での遺伝子型データを直接比較が可能であり、近縁集団を対象とした集団遺伝学的解析において今後有効なツールとなるであろう。また、本研究で開発した Python パッケージは、高性能なワークステーションや煩雑なプログラミングを必要とせず、マイクロサテライト解析やバイオインフォマティクスについての知識・経験が少ないユーザでも容易にジェノタイピングができるよう設計しており、幅広い分野での活用が期待できる。

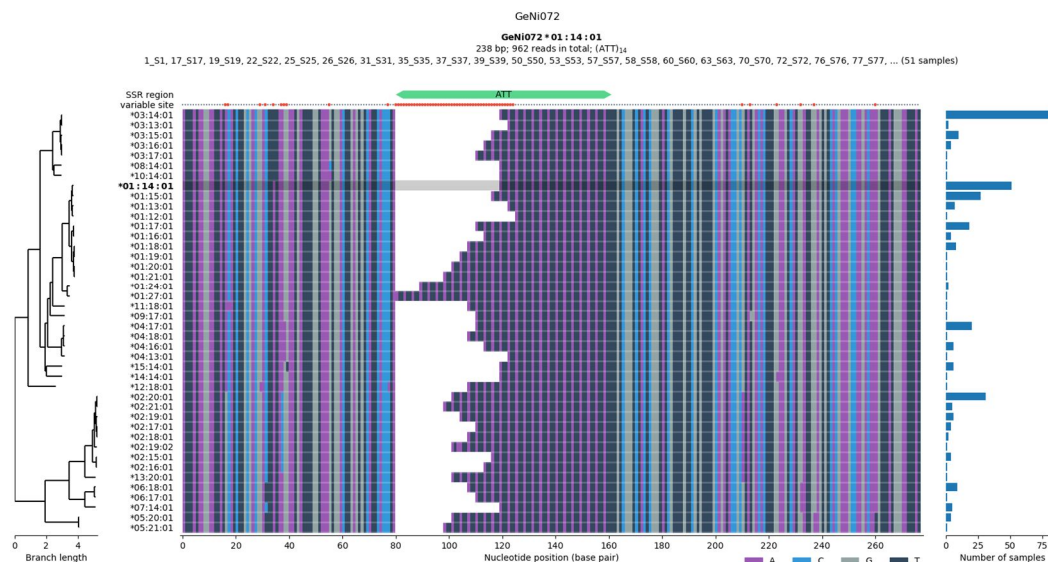


図3. ミヤマリンドウの1つのマイクロサテライト遺伝子座・192個体のシーケンズデータより得られた対立遺伝子の系統関係（左）、アライメント（中央）、頻度分布（右）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kohyama Takashi S., Kohyama Tetsuo I., Sheil Douglas	4. 巻 9
2. 論文標題 Definition and estimation of vital rates from repeated censuses: Choices, comparisons and bias corrections focusing on trees	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 809 ~ 821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1111/2041-210X.12929">https://doi.org/10.1111/2041-210X.12929</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohyama Takashi S., Kohyama Tetsuo I., Sheil Douglas	4. 巻 433
2. 論文標題 Estimating net biomass production and loss from repeated measurements of trees in forests and woodlands: Formulae, biases and recommendations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forest Ecology and Management	6. 最初と最後の頁 729 ~ 740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.11.010">https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.11.010</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 甲山隆司、甲山哲生、Douglas Sheil
2. 発表標題 観測間隔に影響されない材生産速度の推定方法
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲山哲生、亀山慶晃、雨谷教弘、工藤岳
2. 発表標題 マイクロサテライトも「読む」時代: アンプリコン解析による高効率ジェノタイピング (Cost-effective and accurate microsatellite genotyping by high-multiplex amplicon sequencing: Application to alpine plants)
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

massgenotyping: Python package for microsatellite genotyping from highly multiplexed amplicon sequencing data,  
<https://pypi.org/project/massgenotyping/>

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
研究協力者	工藤 岳  (KUDO Gaku)  (30221930)	北海道大学・地球環境科学研究院・准教授    (10101)	