

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：18370033

研究課題名（和文） 連鎖地図ベースでのハイマツ・キタゴヨウ交雑帯の解析

研究課題名（英文） Genetic map-based analysis of the hybrid zone between *Pinus pumila* and *Pinus parviflora* var. *pentaphylla*

研究代表者

綿野 泰行 (WATANO YASUYUKI)

千葉大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：70192820

研究成果の概要（和文）： 連鎖地図ベースで、ハイマツとキタゴヨウの交雑帯における遺伝子浸透パターンを解析することを目的に、連鎖地図作成を行った。ハイマツとキタゴヨウの推定 F1 雑種個体から採集した種子 96 個を利用して、大配偶子法によって連鎖地図を作製した。分子マーカーとして EST、SSR、AFLP マーカーを用い、LOD4.2、 $\theta < 0.40$ の基準で 13 個の連鎖群に 64 個の EST マーカーを含む 438 個のマーカーを配置できた。

研究成果の概要（英文）： Genetic linkage map of a hybrid between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* was constructed in order to examine the pattern of introgressive hybridization between the two pine species. Haploid megagametophytes from 96 seeds of a putative F1 parent were analyzed with EST, SSR and AFLP markers. The analysis resulted in 483 loci (64 ESTs, 2 SSRs and 417 AFLPs) mapping to 13 linkage groups under the criteria of LOD4.2 and $\theta < 0.4$.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2007 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：植物分類学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：ゲノム、連鎖地図、浸透性交雑、ハイマツ、キタゴヨウ、グラフィカル・ジェノタイプ、EST、AFLP

1. 研究開始当初の背景

浸透性交雑とは、種間での交雑が雑種第一代 (F1) で留まることなく、F1 がさらに両親種と戻し交雑を繰り返すことで、種の壁を越えた遺伝子の交流がおこるような交雑の様式のことである。このような交雑が盛んに行われている場所（交雑帯）は、異なった種間での遺伝的・生態的な相互作用を観察する

ことが出来る“自然の実験室”として、古くから進化生物学者の興味を引いてきた。

研究代表者は、1993 年以来、高山帯に生育する匍匐性低木であるハイマツと、より標高の低い山地帯から亜高山帯にかけて生育する高木のキタゴヨウの間の浸透性交雑現象の解析に取り組んでいる。植物細胞は、核・葉緑体・ミトコンドリアの 3 種類のゲノ

ムから構成されているが、マツ科植物においては、核は両性遺伝、葉緑体は父性遺伝、ミトコンドリアは母性遺伝を行う。このように3種類のゲノムが異なる遺伝様式を持つため、交雑帯における遺伝子浸透のパターンについても異なった挙動を示す。今迄に、この3つのゲノム全てについてマツ・キタゴヨウそれぞれの種特異的遺伝子マーカーを開発し、日本各地の交雑帯についてその遺伝的構造を詳細に記述し、樹木の浸透性交雑現象の研究のモデル系として育てることを目指してきた。

2. 研究の目的

本研究は核遺伝子による交雑帯の遺伝的構造の解析 (Watano et al. 2004) の発展版といえるものである。交雑帯における遺伝的交流は、個々の遺伝子単独でおきているのではなく、多くの連鎖した遺伝子群の単位でおきている。従って、両種間での遺伝的交流のパターンを正しく把握するためには、連鎖地図をベースに解析することが必要だと考えられる。

連鎖地図とは、染色体上における遺伝マーカーの位置を、地図として示したものである。同じ染色体上のマーカーは連鎖群として認識される。またマーカー間の距離は組換えの頻度から計算された地図距離 (単位センチモルガン) によって示される。

本研究では、AFLP法によって大量の分子マーカーを開発し、ハイマツ・キタゴヨウ・その両者の雑種を材料にして、連鎖地図を作成する。次にテダマツ由来のESTデータベースを活用し、共優性分子マーカーを作成し、これを連鎖地図に載せることで、マツ属マツ亜属 *Pinus subgenus Pinus* のテダマツとハイマツやキタゴヨウが属するスロトープス亜属 *subgenus Strobus* の連鎖群の対応付けを行う。

連鎖地図をベースに遺伝子浸透のパターンを解析するためには、個体ごとの核ゲノム全体における、ハイマツ由来とキタゴヨウ由来の部位を識別する必要がある。最も単純な手法としては、交雑の影響を受けていないと推定されるハイマツやキタゴヨウ個体をコントロールとして、連鎖地図に載った遺伝子座の解析を行い、種特異的な対立遺伝子を特定する方法である。しかし、ハイマツとキタゴヨウ間における遺伝的分化は、遺伝子座によって大きく異なるため、種特異的な対立遺伝子が無い遺伝子座も多く存在する。そこで本研究では、STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) というソフトウェアの Linkage Model を援用することで、ハイマツ由来とキタゴヨウ由来の部位をベイジ法で推定するを試みる。この解析により、染色体のブロック単位での遺伝子浸透のパターンを解析するこ

とが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 材料

先行研究 (Ito et al. 2008) に用いられた北海道アポイ岳産の推定 F1 雑種個体から得られた種子 96 個の胚乳組織を連鎖地図作成に用いた。また、アポイ岳産のハイマツ 12 個体とキタゴヨウ 10 個体の種子胚乳それぞれ 24 個をコントロールとして解析した。

(2) DNA の抽出

種子の殻をペンチで軽く押さえて割り、ピンセットで胚と胚乳に分け、胚乳のみから DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA の抽出を行った。

(3) EST および SSR マーカーの開発

96 個の種子胚乳サンプルのうち、16 個を用いて、1:1 で分離するマーカーのスクリーニングを行った。一部は PCR 増幅断片長多型 (3 個)、CAPS (3 個)、残りの 58 遺伝子座は SSCP によって分離を検出した。SSR マーカーは、2 遺伝子座を解析した。

(4) AFLP マーカーの開発

① AFLP 解析: DNA サンプルの制限酵素処理 (MseI と EcoRI) とアダプターライゲーションは AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen) を用いた。予備増幅は MseI(+CC) と EcoRI(+AC) プライマーを用い、AFLP Amplification Core Mix (Applied Biosystems) で行った。選択増幅は、Remington et al. (1999) で用いられた 21 プライマーセットで行った。MseI は 4 塩基付加、EcoRI は 3 塩基付加である。反応は AFLP Amplification Core Mix を用いて行った。泳動は ABI 377 シーケンサーを用いた。

② データ処理: 泳動データから、GeneScan 3.1.2 によって 50-500bp の大きさのフラグメントの検出を行った。さらに GeneMapper ver. 4.1 によって 1 と 0 のバイナリデータに変換した。

③ 再現性のテスト: AFLP バンドの再現性を確認するために、ハーフサイズ (48 サンプル) で再実験を行った。バンドの有無について 100% マッチする遺伝子座のみを連鎖地図作成に用いた。

(5) 連鎖地図作成

連鎖地図は JoinMap3.0 を用いた。LOD4.2、 $\theta < 0.40$ の基準で最適な結果が得られた。

(6) データ解析

ハイマツ由来とキタゴヨウ由来のゲノム部位を識別するために、STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) というソフトウェア

の Linkage Model を用いて解析した。この解析には、アボイ岳のハイマツとキタゴヨウのコントロールサンプルも加えた。結果は、GGT2.0 (van Berloo 2008)によってグラフィカルジェノタイプで表示を行った。

4. 研究成果

(1) EST および SSR マーカーの選定

合計で 268 個のプライマーセットで、PCR における増幅の有無を確かめたところ、162 組でシングルバンドで安定な増幅が見られた。このうち 3 個は増幅断片長多型を示した。残りの 159 組について SSCP 解析を行い、最終的に 58 個のプライマーセットで、解釈可能な分離パターンを示した。この内、4 プライマーでは 2 つの遺伝子座がスコアされた。SSCP において変異が無かったプライマーセットの一部についてはシーケンス決定によって CAPS マーカーとして利用できた。

最終的に、EST は、断片長多型 3 プライマーセット 3 遺伝子座、SSCP は、55 プライマーセット 59 遺伝子座、CAPS は、3 プライマーセット 3 遺伝子座となった。SSR は解析した 2 遺伝子座共に分離を示した。

(2) AFLP マーカーの予備選定

96 スケールおよび 48 スケールの 2 回の解析で、完全に再現性が確かめられた AFLP 遺伝子座は 20 プライマーセットで 936 個であった。10%水準で 1 : 1 の分離比から外れるマーカーを取り除くと 538 遺伝子座となった。予備的に連鎖地図を作製したところ、LOD6.6, $\theta < 0.4$ の基準で 14 個の連鎖群にマッピングできた。

(3) AFLP ミスタイプの除外

LOD 値の設定が既報のマツの連鎖地図に比べて高いため、96 個の分離データについて STRUCTURE の Linkage Model を援用して、母由来と父由来のゲノム部位の区別を行い、その結果をグラフィカル・ジェノタイプで解析した。その結果、5cM 以内の小さな組換え部位が存在した。これらはミスタイプと想定し、ミスタイプが 96 個体中 4 個体以上の場合には除外し、4 個体以下の場合には unknown とコードした。また、まったく同じ分離パターンを示すものの一方は除外した。

(4) 連鎖地図

上記の 65 個の EST、2 個の SSR、そして選定を行った AFLP 遺伝子座を用いて、連鎖地図の作成を行った。その結果 LOD4.2, $\theta < 0.4$ の基準で、13 個の連鎖群に、64 個の EST、2 個の SSR、374 個の AFLP、合計で 440 遺伝子座を配置することができた。結果を図 1 に示す。

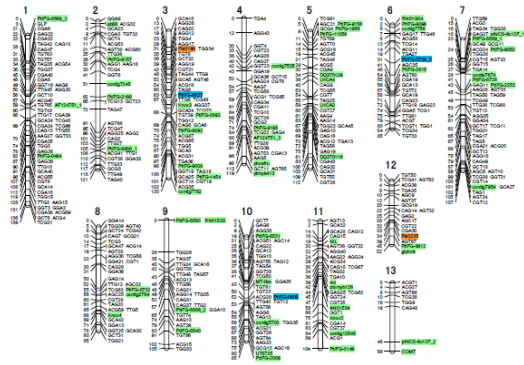


図 1. ハイマツとキタゴヨウの推定 F1 雑種の連鎖地図。緑と青が EST、オレンジが SSR、その他が AFLP マーカーである。

マーカー間の平均距離は 3.05cM、連鎖群の全長は 1368.5cM である。マツ属の染色体基本数は 12 であるため、ほぼ、同じ数の連鎖群が得られたことになる。

(5) テーダマツ連鎖地図との対応

テーダマツの連鎖地図作成に用いられた EST 遺伝子座と相同な遺伝子座の連鎖地図上での配置を確認した (表 1)。その結果、テ

表 1. EST および SSR マーカーの連鎖群上での位置。

Locus	<i>P.taeda</i>	本研究	Locus	<i>P.taeda</i>	本研究
PtiFG-0464	L02	LG1	ptNCS-6c12F_1		LG7
AF124751_1			PtiFG-8569_1	L02	
GLP			PtiFG-9053	L01	
PtiFG-8569_2	L02		contig7674		
sb68		LG2	PtiFG-8728		LG8
PtiFG-9157	L04		PtiFG-2253	L01	
contig7245			contig7954		
PtiFG-2166	L04		Knox4		
PtiFG-8886_1	L07		contig2764		LG9
Pis0198		PtiFG-8732	L08		
PtiFG-8837	L05_1	PtiFG-8580	L10		
Knox3		RN01D02			
PtiFG-0893	L05_2	LG3	PtiFG-8886_2	L07	LG10
PtiFG-9092	L05_3		PtiFG-8540	L10	
PtiFG-9008	L05_4		PtiFG-2009	L06_4	
PtiFG-1454	L05_5		U76725		
contig7782			contig5703		LG11
contig7535		PtiFG-0606	L06_3		
PtiFG-9198	L01	MT-like	L06_2		
AF124751_2		PtiFG-8531	L06_1		
phosfru		LG4	NIL		LG12
ptmyb413			4cl	L07	
DQ370116	L09_?		ptxmyb126		
LHCA2			AN01E04		
LHCA4		LG5	Knox1		LG13
DQ370129	L09_1		Knox2		
PtiFG-11056			contig12646		
PtiFG-1956	L09_3		PtiFG-0149	L07	
PtiFG-9156	L09_2	LG6	Pis0235		
PtiFG-2615	L11		PtiFG-8612	L03	
PtiFG-0739N	L06		glyhmt	L03	
contig7756			COMT		
PtiFG-9098			ptNCS-6c12F_2	L03	
RN01G04					

ーダマツで同じ連鎖群にまとまるものは、本研究でも同じ連鎖群に配置された。また、ならび順もほぼ一致した (表 1)。

一部で、矛盾が見られたが、その全てが、一つのプライマーセットで複数の遺伝子座がコードされたもの、もしくは、テーダマツのオリジナルなプライマーセットでなく、cDNA 配列から再設計されたものであった。それゆえ、これらはテーダマツのものパラログであろうと考えられる。

表 1 から本研究の連鎖群 LG1, LG2, LG3, LG5, LG7, LG9, LG10, LG11, LG12&13 はテーダマツの L02, L04, L05, L09, L01, L10, L06, L07, L03 にそれぞれ対応すると考えられる。LG04, LG06, LG8 については、対応するテーダマツのマーカーが 1 個のみなので、さらなる検証が必要である。

(6) ハイマツとキタゴヨウ由来のゲノム部位の特定

連鎖地図作成に用いた 96 個の種子胚乳データおよび、同じアポイ岳のハイマツとキタゴヨウの種子胚乳の AFLP データを合わせ、STRUCTURE による解析を行った。ここでハイマツとキタゴヨウとしたものは、Watano et al. (2004)において、両種の種特異的マーカーとされた EST8 遺伝子での STRUCTURE によって、純粋なハイマツとキタゴヨウと判定されたものである (Ito et al. 2008)。

マーカー遺伝子座間の連鎖を考慮しない、admixture model と連鎖情報を加味する linkage model の両方の解析による、各サンプルの Q 値 (ゲノムの混ざり程度) の推定結果を図 2 に示す。

admixture model の場合、コントロールのハイマツ (pum) とキタゴヨウ (par) は明確に区別でき、ハイマツで >0.95 、キタゴヨウで <0.05 となった。一方、96 個の分離集団では Q 値は大きくばらつき、平均値は 0.152 となり、かなりハイマツ寄りに推定された。この 96 個のデータは 1 個体の親から得られたものなので、Q 値がばらつく結果は信頼できない。連鎖した多くのデータが Q 値のバイアス

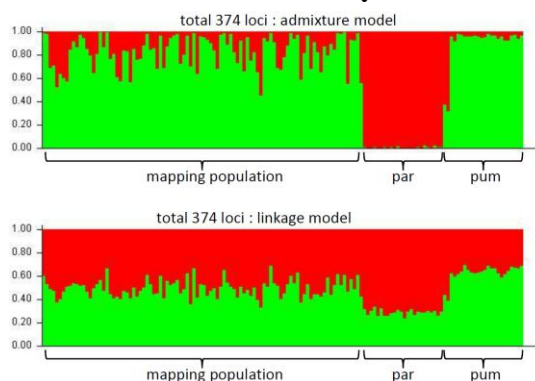


図 2. アポイ岳サンプルの Q 値プロット

をもたらしている可能性がある。

linkage model の場合は、コントロールのハイマツの Q 値は平均 0.35, キタゴヨウは平均 0.71 となり、ゲノムの混合が示唆された。96 個の分離集団の Q 値はよくまとまり、平均で 0.50 であった。

ここで用いたアポイ岳のハイマツとキタゴヨウの間では、歴史的に浸透性交雑が継続的に行われていると考えられ、実際に、キタゴヨウ個体の全てが、ハイマツ由来の mtDNA をもっている (Ito et al. 2008)。従って、linkage model で示唆されたゲノムの混合は、実際に生じている可能性がある。

次に、このようなゲノムの混合が、連鎖地図上で平均的に起きているのか、それとも、ゲノムの特定部位に集中しているのかを解析するため、linkage model の site by site オプションによって、各個体の遺伝子座ごとにキタゴヨウ由来である事後確率を求めた (図 3)。その結果、ゲノムの特定の部位に集中して他種のゲノムの混合が起きている可能性が示唆された。例えばキタゴヨウの LG1 の 0-50cM の範囲は、高い確率でハイマツ由来と推定された。興味深い事に、ハイマツのこの部位では浸透は示唆されない。つまり、ハイマツからキタゴヨウへ一方向的に核ゲノムの浸透が起きている可能性がある。逆のパターンは、LG3 の 40-60cM の範囲にみられる。

要点は、両種のゲノムの遺伝的分化をゲノム全体で見てみた場合、明確に分化している

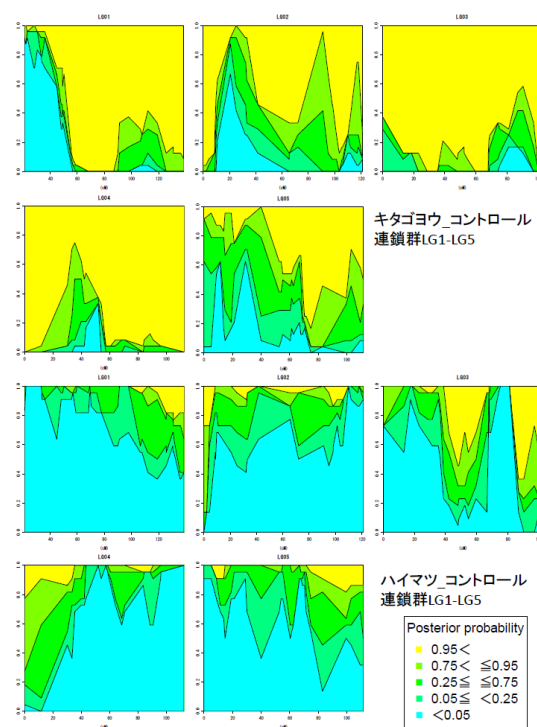


図 3. アポイ岳のコントロールサンプルにおける、ゲノムの由来推定。連鎖群 1 から 5 の結果を例としてしめた。

部位と分化していない部位がブロックとして存在しているという事実である。明確に分化していない部位が存在する理由が、アポイ岳における歴史的な遺伝子浸透なのかどうかは、他山系のハイマツとキタゴヨウを加えた解析によって、精査する必要がある。

(7) 派生的研究

本研究で開発された核 EST マーカーを、ロシアのバイカル湖の Upper Angara 地域で生じている、ハイマツとシベリアマツとの交雑現象の解析に用いた。その結果、雑種個体は全てハイマツが母方となって生じた F1 雑種であることが判明した。キタゴヨウとの交雑におけるような浸透性交雑は検出できなかった。

Petrova et al.(2008) は、バイカル湖の異なる地域 Barguzin Biosphere Natural Reserve において、同様にハイマツとシベリアマツの交雑をアロザイム多型をつかって解析した。Petrova et al.(2008) は、ハイマツ・シベリアマツ・雑種の種子の遺伝子型を解析し、本研究と同様に、ハイマツが母方となって雑種が形成されるが、逆は起こっていない事を示した。

Petrova et al.(2008) の解析した場所では、シベリアマツが優占し、ハイマツは稀である。一方、我々の解析した場所では逆にハイマツが優占する。密度非依存で、常にハイマツが母親となった一方向性の交雑が起きていることから、環境要因ではなく、遺伝的な一方向性の交雑不和合性が関与している可能性が高い。

キタゴヨウとの交雑のケースもまた、交雑が一方向性であり、さらにハイマツが母親となって交雑が起きている点は極めて興味深い。

(8) 今後の展開

①EST 遺伝子座の SNP によるタイピング：STRUCTURE による解析は、AFLP データでしか行っていない。EST の多くは SSCP によって分離パターンを調べているが、多くの個体を解析に加えた場合、対立遺伝子の特定が困難である。そこで、SNP ベースで遺伝子型をタイピングする予定である。

②他山系の交雑帯の解析：交雑帯の細胞質ゲノムの遺伝子浸透のパターンについては、アポイ岳の他に、谷川山系、東吾妻山、蔵王、八甲田山（綿野 2004）のデータがある。図 4 に示した通り、これら 4 つの交雑帯は、それぞれユニークな浸透パターンを示す。AFLP および EST マーカーによってゲノム全体での遺伝子浸透のパターンを解析し、山系間で比較を行う事を計画している。もし、各山系で“浸透しやすい”または“浸透しにくい”ゲノム部位が共通しているならば、遺伝子

浸透に働く自然選択の影響を評価出来る可能性がある。

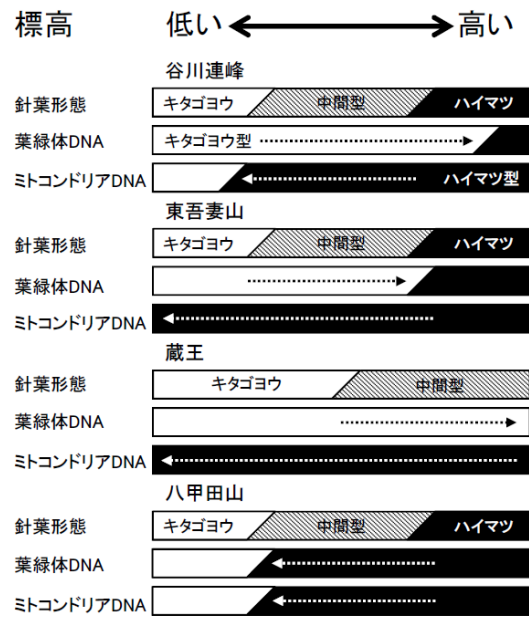


図 4. 4 つの山系における、ハイマツとキタゴヨウ間の葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA の遺伝子浸透のパターン。

(8) 引用文献

- ITO, M., Y. SUYAMA, T. A. OHSAWA, AND Y. WATANO. 2008. Airborne-pollen pool and mating pattern in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla*. *Mol. Ecol.* 17: 5092-5103.
- PETROVA, E., S. GOROSHKVICH, M. BELOKON, Y. BELOKON, AND D. POLITOV. 2008. Population genetic structure and mating system in the hybrid zone between *Pinus sibirica* Du Tour and *P. pumila* (Pall.) Regel at the Eastern Baikal Lake shore. *Ann. For. Res.* 51: 19-30.
- PRITCHARD, J., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-959
- REMINGTON, L., R. WHETTEN, B. LIU, AND D. O'MALLEY. 1999. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *TAG* 98: 1279-1292.
- VAN BERLOO, R. 2008. GGT 2.0: versatile software for visualization and analysis of genetic data. *J. Hered.* 99: 232-236.
- WATANO, Y., A. KANAI, AND N. TANI. 2004. Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) revealed by

molecular hybrid index analysis. *Am. J. Bot.* 91: 65-72.

綿野泰行. 2004. ハイマツとキタゴヨウ, 交雑する樹木のはなし. *プランタ* 96: 49-55.

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 2 件)

- ① Tsutsui, K., A. Suwa, K. Sawada, T. Kato, T.A. Ohsawa, and Y. Watano. 2009. Incongruence among mitochondrial, chloroplast and nuclear gene trees in *Pinus* subgenus *Strobus* (Pinaceae). *Journal of Plant Research* 122: 509-521. (査読有)
- ② Ito, M., Y. Suyama, T.A. Ohsawa, and Y. Watano. 2008. Airborne-pollen pool and mating pattern in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla*. *Molecular Ecology* 17: 5092-5103. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Watano, Y. Hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla*, a model system for studying introgressive hybridization of tree species. *Syposium on East Asian Plant Diversity and Conservation 2009*, 22-23 Oct., 2009; Beijing, China.
- ② 江夏知美・谷尚樹・津村義彦・朝川毅守・梶田忠・綿野泰行. ハイマツとキタゴヨウの雑種を用いた連鎖地図作成とグラフィカル・ジェノタイプ解析. 日本植物分類学会, 2009年3/13-15, 宮城県民会館.
- ③ 江夏知美・谷尚樹・津村義彦・朝川毅守・梶田忠・綿野泰行. ハイマツ・キタゴヨウ間の自然雑種の AFLP と EST マーカーを用いた連鎖地図作成. 日本植物学会, 2008年9/25-27, 高知大学.

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿野 泰行 (WATANO YASUYUKI)

千葉大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 70192820

(2) 研究分担者

梶田 忠 (KAJITA TADASHI)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 80301117

(H20→H21: 連携研究者)

朝川 毅守 (ASAKAWA TAKESHI)

千葉大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 50213682

(H20→H21: 連携研究者)

津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長

研究者番号: 20353774

(H20→H21: 連携研究者)