

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18770024

研究課題名（和文） ヤブツバキ・ユキツバキ交雑帯における遺伝的変異の解明

研究課題名（英文） Genetic structure in hybrid zones between *Camellia japonica* and *C. rusticana*

研究代表者

上野 真義 (UENO SANEYOSHI)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・研究員

研究者番号：40414479

研究成果の概要：富山県と新潟県におけるヤブツバキとユキツバキの交雑帯において遺伝的変異を解明した。まずヤブツバキの近縁種であるチャの EST 配列から EST マーカーを新規に開発した。葉緑体マーカーの開発も行った。35 個の EST マーカーを利用して約 300 個体を解析したところヤブツバキ型とユキツバキ型に対応するクラスターが得られた。葉緑体ハプロタイプは 10 個が見出された。3 個の遺伝子座については正の選択を受けた可能性があることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 800,000 | 0 | 800,000 |
| 2007年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2008年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,800,000 | 150,000 | 2,950,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態環境

キーワード：遺伝、ゲノム、植物、進化、分子、生態

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物の環境への適応を遺伝子レベルで研究することが可能となってきた。実験技術の進展によって mRNA として発現している遺伝子の塩基配列 (Expressed Sequence Tag: EST) を決定することが比較的容易になったためである。EST を遺伝マーカーとして利用することによって従来の中立マーカーでは解析が困難であった自然選択を把握できる可能性が高くなった。なぜならば EST は機能を持った DNA 領域だからである。さらに EST には大きな遺伝的変異を期待でき

るマイクロサテライト配列 (SSR) を含む場合がしばしばある。したがって EST-SSR マーカーは自然集団を対象とした進化的解析に有効であると期待される。

(2) 日本に分布するツバキにはヤブツバキとユキツバキがある。ヤブツバキは関東以西の照葉樹林に広く分布する。分布北限は青森県で関東以北では海岸沿いに分布し冬の乾燥した気候に適応している。一方、近縁のユキツバキは日本海側の豪雪地帯に分布する。分布の南西限は滋賀県北部で最深積雪 15

0 cm以上の多雪環境に適応している。ユキツバキは過去の気候変動において多雪地帯に取り残され、その後ヤブツバキが進出してきたといわれている。ヤブツバキとユキツバキとは花や葉の形態、さらには光合成や気孔の反応特性も異なっていることが示されているが、分布が接する場所では自然に交雑し交雑帯を形成する。交雑帯では遺伝子によって子孫に伝達される様式や程度が異なる場合があるなど進化的に面白い現象が観察される場合がある。したがってヤブツバキとユキツバキは環境適応と進化を考える上で興味深い研究材料であると言える。

2. 研究の目的

- (1) EST マーカーを開発すること。
- (2) 交雑帯の空間遺伝構造を解明すること。
- (3) ヤブツバキとユキツバキの遺伝的変異の比較により自然選択の寄与を推定すること。

3. 研究の方法

(1) マーカー開発

データベース (dbEST) に登録されている 2172 個のチャの EST 配列を取得し read2Marker ソフトウェア (Fukuoka et al, 2005) により EST-SSR に対して PCR プライマー配列を設計した。ヤブツバキの DNA を鋳型にして PCR を行い増幅を確認した後、16 個体の多型スクリーニング用のパネル DNA (ヤブツバキおよびユキツバキを含む) で多型をスクリーニングした。さらに野菜茶業研究所で開発されたチャの EST-SSR マーカーの 35 個を同じ 16 個体のパネル DNA でスクリーニングした。

データベースにあるチャの EST 配列から 189 個を選択し Primer3 ソフトウェア (Rozen & Skaletsky, 2000) を用いて PCR プライマーを設計した。ツバキ属の 3 種 (チャ、ヤブツバキおよびユキツバキ) の DNA を鋳型にして PCR を行い増幅を確認した後、16 個体の多型スクリーニング用のパネル DNA について PCR を行い PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行った。塩基配列をアラインメントしてによる断片長多型を探索した。これらの多型に対して PCR プライマーを設計した。

母性遺伝する葉緑体についてもマーカー開発を行った。既知の葉緑体用のプライマーを用いて 16 個体のパネル DNA を鋳型にして PCR を行ない産物をダイレクトシーケンシングして断片長多型を示す領域をスクリーニングした。

(2) DNA サンプル

ヤブツバキとユキツバキの交雑帯がみられる新潟県と富山県において 9 箇所からサン

プリングを行い 239 個体から改変 CTAB 法により DNA を抽出した。このうち富山県においては 1 カ所の交雑帯 (Z4) を含む。さらに富山市科学博物館の太田道人専門学芸員から譲り受けた乾燥標本から富山県および新潟県における 3 つの交雑帯 (Z1, Z2, Z3) の 12 箇所由来する 79 個体から DNA を抽出した。乾燥標本からの DNA 抽出に際しては HEPES バッファーで洗浄した葉の粉末から改変 CTAB 法により DNA を抽出した。

(3) 分子マーカーの解析

開発したマーカーについて PCR を行った後、産物をキャピラリーシーケンサー (Applied Biosystems 社製) で電気泳動し個体の遺伝子型および葉緑体ハプロタイプを決定した。STRUCTURE ソフトウェア (Pritchard et al, 2000) により admixture モデルのもとでベイズクラスタリングを行い Evanno ら (2005) の方法でメンバーシップ数 (K) を予測した。LOSITAN ソフトウェア (Antao et al, 2008) を用いて outlier 遺伝子座の検出を行った。無限対立遺伝子モデルおよびステップワイズ突然変異モデルのもとで 10000 回のシミュレーションを行い 99.5%信頼区間を求めた。

4. 研究成果

(1) マーカー開発

ソフトウェア read2Marker により PCR プライマーを 22 対決定した。ヤブツバキの DNA を鋳型にして PCR したところ 14 対のプライマーで増幅を確認し 1 対の多型的なプライマー対を得た。野菜茶業研究所で開発されたチャの EST-SSR マーカーの 35 個については 24 個のプライマー対が多型的であった。

189 個の EST 配列に対して設計したプライマーは 73 対がツバキ属の 3 種すべてで増幅を示した。このうち 61 個のプライマー対でシーケンシングを行い 29 個のプライマー対に由来する PCR 産物に挿入/欠失による多型を見出した。これらのうちから多型的なプライマーの 12 対を得た (表 1)。総計 37 個の多型的なマーカーが得られ、このうち 35 個を用いて以降の解析を行った。

表1 新規に開発されたESTマーカーの遺伝的多様性

| Accession No. | Size range (bp) | <i>N_a</i> | <i>H_o/H_e</i> | <i>F</i> |
|---------------|-----------------|----------------------|------------------------------------|----------|
| CV013583 | 266-279 | 5 | 0.74/0.67 | -0.10 |
| CV013617 | 450-470 | 4 | 0.61/0.61 | 0.00 |
| CV013670 | 386-392 | 3 | 0.39/0.41 | 0.05 |
| CV013840 | 413-424 | 5 | 0.70/0.69 | -0.01 |
| CV013841 | 194-203 | 2 | 0.04/0.04 | 0.00 |
| CV014520 | 292-320 | 7 | 0.78/0.80 | 0.02 |
| CV014553 | 202-208 | 2 | 0.13/0.20 | 0.34 |
| CV066969 | 120-124 | 2 | 0.52/0.51 | -0.02 |
| CV066981 | 180-201 | 12 | 0.91/0.88 | -0.04 |
| CV699843 | 475-481 | 3 | 0.22/0.20 | -0.07 |
| DN976177 | 354-357 | 2 | 0.35/0.35 | 0.00 |
| DN976212 | 308-317 | 8 | 0.52/0.67 | 0.22 |

$$F = 1 - H_o / H_e$$

葉緑体では8領域に存在する断片長多型についてプライマーを設計した。総計で11個のハプロタイプを検出した。欠損データの多かった1領域をのぞいて以降の解析を行った。

(2) 分子マーカーの解析

STRUCTURE ソフトウェアによるベイズクラスタリングと Evanno ら (2005) の方法より集団数は2個と推定された。これらはヤブツバキとユキツバキに対応すると考えられる。Z1 および Z3 ではヤブツバキ型からユキツバキ型への勾配が見られ交雑帯の形成が明らかになった (図1)。Z2 では典型的なユキツバキ型を示す集団とヤブツバキ型を示すもののユキツバキとの交雑が示唆される集団に別れた。Z4 においては1箇所で交雑が示唆されるものの、残りの集団では典型的なユキツバキ型に区別された。

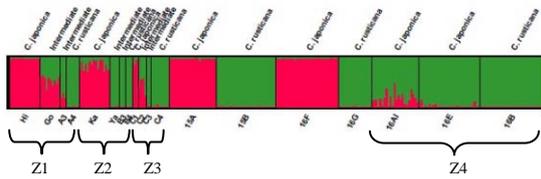


図1 メンバーシップ (K=2) の分布図
赤色：ヤブツバキ型、緑色：ユキツバキ型
横軸に各個体を取り、それぞれの個体についてヤブツバキ/ユキツバキの割合を表す。Z1 から Z4 は交雑帯を示す。

葉緑体ハプロタイプの交雑帯における分布 (図2) と核のメンバーシップの分布図 (図1) を比較すると Z1 においてヤブツバキ型の葉緑体ハプロタイプとユキツバキ型の核のメンバーシップを持つ個体が見られることがわかった。一方で、Z3 においては逆にユキツバキ型の葉緑体ハプロタイプとヤブツバキ型の核のメンバーシップを持つ個体が見られた。この結果は各交雑帯において異なる様式で浸透交雑が進行したことを示唆している。

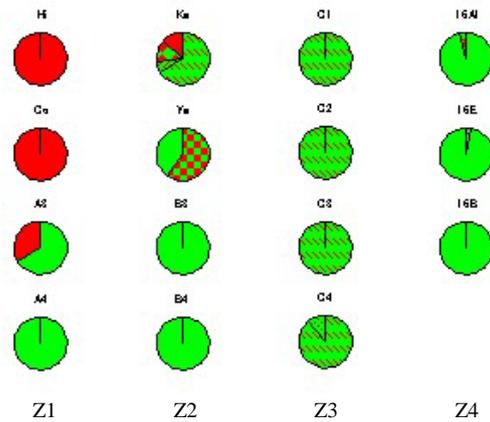


図2 葉緑体ハプロタイプの分布図
赤色：ヤブツバキ型、緑色：ユキツバキ型
Z1 から Z4 は交雑帯を示す

Outlier 遺伝子座の検出を無限対立遺伝子モデルおよびステップワイズ突然変異モデルのもとで LOSITAN ソフトウェアにより行ったところ、ともに3個の遺伝子座が潜在的に正の選択を受けたと示唆された (図3)。これらの遺伝子座の塩基配列を蛋白質データベース (nr) に対してホモロジーサーチを行ったところ類似した配列を見出すことができたがその機能は未知であった。

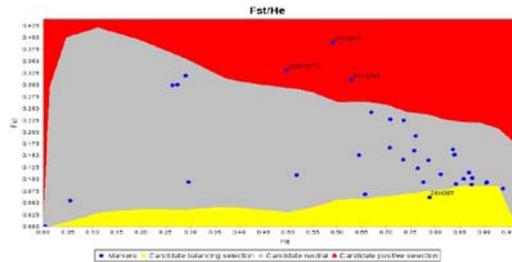


図3 F_{ST} と H_o のプロット
赤色の領域：潜在的に正の選択を受けたと考えられる領域、黄色の領域：潜在的に負の選択を受けたと考えられる領域、灰色の領域：潜在的に中立な領域、青色の丸印：マーカー
無限対立遺伝子モデルおよびステップワイズ突然変異モデルともに同様の傾向を示し3個のマーカーが赤色の領域に存在した。この図は無限対立遺伝子モデルによる。

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1件)

①Ueno S, Tsumura Y (2009) Development of microsatellite and ALP markers for Camellia japonica L. from tea plant (C. sinensis) expressed sequence tags. Molecular Ecology Resources 9: 814-816、
(査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

①上野真義, 谷口郁也, 津村義彦、ヤブツバキの遺伝的多様性と分化、第55回日本生態学会、2008年3月17日、福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 真義 (UENO SANAYOSHI)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・研究員

研究者番号: 40414479

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: