

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19370099  
研究課題名（和文） 対照的な集団構造を持つ樹種での遺伝子進化特性に関する集団遺伝学的研究  
研究課題名（英文） Population genetic studies on features of gene evolution in tree species with contrasting population structures  
研究代表者  
館田 英典（TACHIDA HIDENORI）  
九州大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：70216985

## 研究成果の概要（和文）：

生物種間には小集団への分割の有無（集団構造）や生活様式等に関する違いが見られる。本研究ではこのような違いがどのように遺伝子進化に影響を与えるかを、それぞれ特徴を持つ3樹木種（ヒノキ科、ミカン科）を材料とし遺伝的変異を調査することにより調べた。その結果、それぞれの種が集団構造や集団の歴史が反映された遺伝的構造を持つことが明らかになり、またその構造や生活様式を反映して特徴的に働く自然淘汰の例を見つけることが出来た。

## 研究成果の概要（英文）：

Species differ in their population structure and life history. In order to investigate effects of these differences on gene evolution, we investigated genetic variation in three characteristic tree species belonging to Cupressaceae and Rutaceae. We found that these four species have different genetic structures shaped by their attributes concerning population structure and life history. Also we found a few examples of action of selection reflecting those attributes.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：集団構造、適応進化、樹木進化、集団遺伝学、生活史

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の進化はその生物種が持つ集団構造や生活様式の影響を強く受けることが予想される。どのような集団構造が適応進化を

引き起こすかについては従来様々な議論があり、Fisher (1930) はサイズの大きな任意交配集団で進化が急速に進むと主張し、Wright (1948) は遺伝子間相互作用（エピス

タシス)がある場合は小集団が多く集まったメタ集団で進化が進むと考えた。また Ohta (1971)は弱い適応度効果を持つ遺伝子は小集団で急速に進化すると考えた。弱い効果を持つ遺伝子の進化では集団サイズの変化が大きな効果を持つことを研究代表者も理論的に示しており (Tachida 2000 等)、地理的構造の時間的変化も含めこの問題を究明することは遺伝子進化の重要な問題の一つである。また生活様式が種の進化に影響を与えることは十分予想されることである。しかしながら遺伝子進化の実体ははっきり見えず、また集団の地理的構造についての知見も少なかったため、これまで議論は概念的なものにとどまっていた。しかし近年の塩基配列解析技術の発展により、具体的にこの問題にアプローチすることが可能になってきた。

我々はこれまでの研究 (基盤研究 (B)「針葉樹進化の一般的特性及びその適応進化についての集団遺伝学的研究」) で風媒性のヒノキ科樹木、特にスギとその近縁種ヌマスギについて集団遺伝学的・分子進化学的解析を進め、スギでは種全体としてほぼ任意交配に近い集団構造を持つことや幾つかの遺伝子で適応淘汰が働いた可能性などを示してきた。しかしこれらの種と異なる生活史や集団構造を持つ種では、遺伝子進化の様相が異なることが予想される。樹木では毎木調査や化石花粉の分析等により集団の動態についての知見も蓄積しつつあり、遺伝学的データも加えると集団構造の動態について現在かなり詳しい情報を得ることができる。これにより集団構造や生活様式と遺伝子進化の関係を明らかにすることが可能となった。

## 2. 研究の目的

この研究では特徴的な集団構造や生活様式を持つと考えられる3樹種 (スギ: *Cryptomeria japonica*、ヌマスギ: *Taxodium distichum*、カラスザンショウ: *Zanthoxylum ailanthoides*) で、集団動態の情報を得るとともに遺伝的多様性を集団遺伝学的手法を使って解析し、これらの種間で遺伝子進化の様相を比較することによって集団構造と遺伝子適応進化の関係を明らかにする。集団動態については、世代の交代がどのように行われるか (世代交代動態) と長期的に集団構造がどのように変化したか (長期的集団構造) を、それぞれマイクロサテライトマーカーと中立多型データを用いて調べる。また遺伝子の適応進化については、アミノ酸進化 (非同義変異進化) と多重遺伝子族の進化に着目し、3種で共通の遺伝子セットについて調査する。

## 3. 研究の方法

### (1) スギ・ヌマスギの比較

### ①屋久島スギ集団のマイクロサテライトによる解析

屋久島の約300年前の択抜後に天然更新したスギ林4haのプロット中で、生育個体および切り株合計557サンプルについて、7個の核及び1個の葉緑体マイクロサテライトマーカーのタイピングを行った。得られたデータから、サイズクラス (胸高直径) や切り株によって遺伝的多様性の程度に違いがあるかどうかや、空間構造が存在するかどうかを調査した。

### ②スギ5核遺伝子の塩基配列多型の解析

日本各地の人工林 (天然林とほぼ同じ遺伝的多様性を持つことがわかっている) から得られた48個体の胚乳DNAを用い、核にコードされる5遺伝子座 (合計14kbp) での塩基配列多型を調べた。得られたデータから塩基多様度を計算し、また中立性のテスト統計量を使った検定を行った。さらに最尤法を用いて過去の集団構造・組換え率の推定や適応淘汰が働くコドンの検出を行った。

### ③スギ・ヌマスギ10遺伝子座での塩基配列多型比較

ヌマスギには生育場所が若干異なる bald-cypress (*Taxodium distichum* [L.] Rich. var. *distichum*) と pondcypress (var. *imbricatum*) の二変種が存在する。ミシシッピ川流域に生育する二変種の集団からサンプルされた胚乳由来のDNAを用い、核の10遺伝子座でDNA多型を調べ、スギでの同じ遺伝子座の多型との比較を行った。また過去の集団の構造を最尤法により推定し、二変種での遺伝的分化の程度の推定も行った。

## (2) カラスザンショウの解析

①九州大学伊都キャンパスに生育するカラスザンショウ集団の構造解析及び親子解析  
カラスザンショウは、土壤中にシードバンクを形成することにより森林のギャップにいち早く出現する先駆樹種として知られている。カラスザンショウの種子散布に伴う遺伝子流動を把握するとともに、ギャップ集団内・集団間、地域間における遺伝的構造を明らかにする事を目的とし、まず葉緑体1、核9遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを開発した。このマーカーを使い、九州大学伊都キャンパス多様性保全ゾーン内4地点のギャップ集団について、種子親・花粉親と集団構造の推定を行った。

### ②カラスザンショウ4核遺伝子の塩基配列多型解析

攪乱依存種であるカラスザンショウは、これまで調べられてきた樹種に較べて異なる集団構造を持つことが予想される。九州の複数集団から得られたカラスザンショウ44個体のサンプルからDNAを抽出し、デンブン合成系に関与する4遺伝子 (*agpSA*, *agpSB*,

*agpL*, *GBSSI*) について、塩基配列多型を調査した。得られたデータから集団間の分化の程度を  $F_{ST}$  によって推定するとともに、中立性テストを適用して個々の遺伝子座に自然淘汰が働いている可能性を検討した。

### ③日本の中でのカラスザンショウの集団構造の解析

カラスザンショウの日本での生育域をほぼカバーする10集団から、各集団15個体以上総計265個体をサンプルしてDNAを抽出し、①で開発した9遺伝子座のマイクロサテライトマーカ―を使って、集団の遺伝的構造を  $F_{ST}$  値の推定や Mantel テストにより調べた。また②で適応進化候補遺伝子として見つかった *agpL* 遺伝子が、九州以外の集団でも単型的になっているかどうかを調べた。集団構造の推定値をから中立遺伝子進化の集団遺伝学モデルを構築してシミュレーションを行うことにより、中立遺伝子で *agpL* で見られるような単型が観測される確率を推定した。

## 4. 研究成果

### (1) スギ・ヌマスギの比較

#### ①屋久島スギ集団のマイクロサテライトによる解析

マイクロサテライトマーカ―を使った解析から、択伐後(胸高直径小)、択伐前(胸高直径大)、切り株で遺伝的多様性量に違いは無く、遺伝的変異が択伐後の更新を経ても維持されていることが明らかになった。また葉緑体マーカ―では空間構造が見られなかったが、核マーカ―では近傍で正の空間自己相関が見られた。スギでは花粉により葉緑体が伝わるので、この結果は花粉の移動が種子の移動に比べて大きいことを示している。一代あたりの平均の種子拡散距離は8.6mで、34%の種子がプロット外から由来したと推定された。

#### ②スギ5核遺伝子の塩基配列多型の解析

これまでに得られていた7遺伝子座のデータと合わせて解析を行った。スギ集団の12遺伝子座での同義塩基多様度は0.00044で他の針葉樹と較べると低い値であった。最尤法(LAMARC)を使った過去の集団構造の解析から、集団が緩やかにサイズを減少させており、また集団組み換え率(集団サイズ×塩基あたりの組み換え率)は0.00046でこれも他種に較べて低い値となった。McDonald-Kreitman テストを使った解析により、*NCED* 遺伝子座では非同義多型が中立予想よりも多く、弱有害進化が起きていることが示唆された。一方花粉症アレルゲンをコードする遺伝子の一つである *Cryj2* 遺伝子座では、非同義置換が過剰に見られた。ヒノキ科の他種での配列と併せて最尤法(PAML)を使った解析を行ったところ、非同義/同義置換の比が4を超える

コドンサイトが複数見つかり、*Cryj2* では適応的置換が起きていることが示唆された。これらの結果から、スギでは遺伝的浮動、正負の淘汰、突然変異の全てが遺伝子進化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

#### ③スギ・ヌマスギ10遺伝子座での塩基配列多型比較

10遺伝子座での同義塩基多様度はヌマスギで0.00516、スギで0.00322で、ヌマスギが有意に多様性が高いことがわかった。最尤法およびBayes法を用いた解析(LAMARC)から、スギでは集団は緩やかに減少しているが、ヌマスギでは過去100万年間でサイズが3倍になっていることが推定された。*bald-cypress* と *pondcypress* 間では有意な遺伝的分化が見られたが、これは少数の遺伝子座での分化によるもので、特に *Acouli5*, *ammonium transporter* の二遺伝子座では  $F_{ST}$  値が0.4を超える値になっていることがわかった。この二遺伝子座には適応淘汰が働き分化が起こった可能性が示唆された。これらの遺伝子座を除くと分化の程度は低くなり、この二変種間では現在も遺伝子流動が続いていることが示唆された。

### (2) カラスザンショウの解析

#### ①九州大学伊都キャンパスに生育するカラスザンショウ集団構造及び親子解析

10遺伝子座のマイクロサテライトマーカ―による解析の結果、それぞれのギャップ集団では近傍の1もしくは2個体の種子親からの貢献度が高いことが示された。このためギャップ集団間には遺伝的分化がみられた。一方、花粉親に関してはギャップ集団間で分化は見られなかったため、花粉流動は種子散布よりも大きいと考えられる。また、伊都キャンパスの4ギャップ集団をプールした伊都地域集団と福岡市内の他の地域集団との間で遺伝的分化はみられず、地域間でも高い率で花粉流動が起きていることがわかった。

#### ②カラスザンショウ4核遺伝子の塩基配列多型解析

九州のカラスザンショウ集団では集団間分化の程度が高く、 $F_{ST}$  値は0.32-0.64であった。これはカラスザンショウが虫媒で攪乱依存種であるためにメタ集団構造を取ることによると考えられる。個々の集団内での多型のパターンも特徴的で、各遺伝子座で少数の分化したハプロタイプが高い頻度で存在することがわかった。これも攪乱依存種の特徴として、集団の分断・融合や瓶首効果の影響が強く現れたと考えられる。4遺伝子座の中で *agpL* は他の遺伝子座と異なり、一つのシングル変異を除き単型的であった。近縁のイヌザンショウの配列との比較を使ったHKAテストにより、セレクトィブ・スイープがこの

遺伝子またはその近傍で起こったことが示唆された。種子バンクを形成するカラスザンショウにおいて、種子の形成に関与するデンブン合成系遺伝子の一つで適応淘汰が示唆されたことは注目に値する。

### ③日本の中でのカラスザンショウの集団構造の解析

10 集団の中では鹿児島集団が一番多様性が高いことがわかった。これはカラスザンショウが生育する照葉樹林のレフュージアが、南九州に有ったためと考えられる。集団間の遺伝的分化は九州集団について②で示されたように全国的にも強く、平均の  $F_{ST}$  値は 0.318 であった。またソフトウェア STRUCTURE を使った解析から、このサンプルは 8 集団に由来する ( $K=8$ ) という結果を得た。更に Mantel テストからは、集団が距離に依存して分化 (isolation by distance) していることが明らかになった。最も遺伝的に分化した伊豆集団でも *agpl* 遺伝子座では鹿児島集団と同じハプロタイプがほぼ固定しており、セレクトイブスィープは日本全領域にわたっていることがわかった。推定された集団構造 (1 次元飛び石モデル) を仮定した中立遺伝子のシミュレーションを行って、鹿児島と伊豆で得られたような単型性が中立遺伝子座で現れる確率を推定したところ 5% 以下となり、*agpl* 遺伝子座が集団構造を考慮しても中立遺伝子では得られないような遺伝的変異パターンを示している、つまり遺伝子の適応的置換を起こしている可能性が高いことがわかった。

### (3) まとめと展望

三年間の成果をまとめると、風媒で競争種と言えるスギ・ヌマスギ、虫媒で攪乱依存種であるカラスザンショウの比較から、攪乱依存種では競争種に比べ集団間分化が進んでいること等が明らかになった。また競争種に属する近縁種間でも集団 (サイズの増減等) の歴史が異なっており、遺伝子進化に大きな影響を及ぼすことも明らかになった。更にスギの花粉抗原遺伝子 *Cryj2* や種子バンクを作るカラスザンショウのデンブン合成に関わる *agpl* 遺伝子等、それぞれの種で特徴的に適応したと考えられる遺伝子も見つかった。これまでの国内外の遺伝子多型に基づく遺伝子進化研究はモデル生物に関するものが多かったが、この研究により生態的条件が異なる生物でモデル生物とは異なる遺伝子進化の様相が見られることを示すことが出来た。配列解析技術の発展により、塩基配列による集団構造の推定や適応候補遺伝子の探索も、今後格段に大規模化することが予想される。このような新しい技術を使って様々な生態条件におかれた生物での遺伝子進化の全貌を明らかにして行くことがこれから必

要である。

### 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 6 件)

- ① T. Yoshida, H. Nagai, T. Yahara, and H. Tachida (2010) Genetic structure and putative selective sweep in pioneer tree, *Zanthoxylum ailanthoides*. J. Plant Res. (in press) (査読有り)
- ② H. Nagai, T. Yoshida, K. Kamiya, T. Yahara and H. Tachida (2009) Development and characterization of microsatellite markers in *Zanthoxylum ailanthoides* (Rutaceae). Mol. Ecol. Res. 9: 667–669. (査読有り)
- ③ A. Fujimoto, T. Kado, H. Yoshimaru, Y. Tsumura and H. Tachida (2008) Adaptive and slightly deleterious evolution in a conifer, *Cryptomeria japonica*. J Mol Evol 67(2):201–210. (査読有り)
- ④ K. Kamiya, E. Moritsuka, T. Yoshida, T. Yahara, and H. Tachida (2008) High population differentiation and unusual haplotype structure in a shade-intolerant pioneer tree species, *Zanthoxylum ailanthoides* (Rutaceae) revealed by analysis of DNA polymorphism at four nuclear loci. Mol. Ecol. 17: 2329–2338. (査読有り)
- ⑤ T. Takahashi, N. Tani, K. Niiyama, S. Yoshida, H. Taira, Y. Tsumura (2008) Genetic succession and spatial genetic structure in a natural old growth *Cryptomeria japonica* forest revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. Forest Ecology and Management 255: 2820–2828. (査読有り)
- ⑥ Y. Tsumura, T. Kado, T. Takahashi, N. Tani, T. Ujino-Ihara and H. Iwata (2007) Genome scan to detect genetic structure and adaptive genes of natural populations of *Cryptomeria japonica*. Genetics 176: 2393–2403 (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 為国愛・舘田英典 他 1 名 先駆樹種イヌザンショウと近縁種カラスザンショウの遺伝的構造の比較 日本遺伝学会第 81 回大会 2009 年 9 月 17 日 信州大学
- ② 田中絢子・舘田英典 他 4 名 ミシシッピ川流域及びフロリダ半島に生育するヌマスギ集団の遺伝的構造 日本遺伝学会第 81 回大会 2009 年 9 月 17 日 信

州大学

- ③ 田村美帆・舘田英典 植物耐病性遺伝子の LRR のリピート数の変化に対するモデル解析 日本遺伝学会大会第 80 回大会 2008 年 9 月 4 日 名古屋大学
- ④ 永居寿子・舘田英典 他 2 名 九州大学伊都キャンパスに生育する先駆樹種カラスザンショウ (*Zanthoxylum ailanthoides*) 集団のマイクロサテライトマーカー解析 日本進化学会第 9 回京都大会 2007 年 8 月 31 日 京都大学
- ⑤ 萬歳明香・舘田英典 他 6 名 スギの重複した耐病性遺伝子における集団遺伝学的解析 日本遺伝学会第 79 回大会 2007 年 9 月 21 日 岡山大学
- ⑥ 吉田貴徳・舘田英典 他 3 名 先駆樹種カラスザンショウ (*Zanthoxylum ailanthoides*) の塩基多型と遺伝的構造 日本遺伝学会第 79 回大会 2007 年 9 月 19 日 岡山大学

[その他]

ホームページ等

<http://cellbio.biology.kyushu-u.ac.jp/tachida/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

舘田 英典 (TACHIDA HIDENORI)  
九州大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：70216985

### (2) 研究分担者

陶山 佳久 (SUYAMA YOSHIHISA)  
東北大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：60282315  
津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)  
森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長  
研究者番号：20353774  
(H19→H20：連携研究者)  
矢原 徹一 (YAHARA TETSUKAZU)  
九州大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：90158048  
(H19→H20：連携研究者)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：