

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380102

研究課題名（和文） 核およびオルガネラDNA情報に基づくスギの系統地理学的研究

研究課題名（英文） Phylogeographical study of *Cryptomeria japonica* using nuclear and organelle DNAs information

研究代表者

近藤 禎二 (KONDO TEIJI)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター育種部・部長

研究者番号：20370827

研究成果の概要（和文）：

核 DNA マーカーに加えてオルガネラ DNA マーカーを用いてスギの系統地理学的分化の解明に取り組んだ。核 DNA マーカーでは、ウラスギとオモテスギとの分化に関連していることが示唆される 2 マーカーを検出した。オルガネラのうち、葉緑体 DNA マーカーでは、多くの SNP (Single Nucleotide Polymorphism) が見出され、ハプロタイプネットワークを構築した結果、大きく二つのハプロタイプに区分され、過去に大きく二つの集団に分化したと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Phylogeographical study of *Cryptomeria japonica* was conducted using nuclear and organelle DNA markers. There were two nuclear DNA markers which suggested to be linked to the differentiation between Pacific Oceanside line and Sea of Japan side line. Many SNP (Single Nucleotide Polymorphism) were found in chloroplast DNA. This polymorphism indicated that two large populations differentiated in the past.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：スギ、系統地理学、核 DNA、オルガネラ DNA、葉緑体、オモテスギ、ウラスギ

1. 研究開始当初の背景

スギは通直性や材としての加工の容易さに優れ、古来より木材加工に適した樹木と認識された結果、現在まで人工造林が積極的に行われており、森林構成種の中でも人工造林の面積がほとんどを占めるといった意味で、生態的位置づけは極めて特異的であると言える。一方で、人工造林による分布拡大の結

果、固有種であるスギが実際にはどのような分布拡大を遂げたかについては曖昧な点も多い。花粉分析からは最終氷期に数カ所のレフュージアが存在し、それらのレフュージアから分布拡大が行われてことが示唆されてきた。DNA マーカー等の利用による集団遺伝学的解析の結果では、南限や北限での多様性の喪失が指摘されたものの、明確な集団構

造が存在しない可能性が示唆されており、これは長大な花粉飛散等による遺伝子交流の結果であると考えられている。しかし、スギは太平洋側のオモテスギと日本海側のウラスギで形態的や生態的に異なっているとする指摘もあり、スギの系統地理学的分化において、オモテスギとウラスギの二つに分けるのか（二元論）、あるいはそれらを区別せず一つとするのか（一元論）について決め手がない状況にあった。最近の研究成果ではオモテスギとウラスギの明瞭な分化を示す核 DNA マーカーが検出されており、分子遺伝学的・生態学的研究の発展と併により多くのゲノム情報が利用できるようになった結果、論争に終止符が打てる可能性が出てきた。

2. 研究の目的

最近、スギの EST 情報の集積が進み、特に SNP（一塩基多型）マーカーは数千にも及ぶ情報が活用できることから、これまで開発されてきたいずれの DNA マーカーよりも大量な情報を得ることを可能としている。特に、EST 情報は遺伝子情報そのものであり、EST-SNP マーカーから得られる情報は適応性とも関連する可能性がある。さらに、スギの葉緑体全塩基配列が 2008 年に決定された。葉緑体 DNA は、針葉樹では花粉親から遺伝するため、遺伝子交流の程度によっては集団解析に適さないものの、進化速度が遅く、その突然変異はゲノムの組換えなしに保存される傾向があることから、特に一元論・二元論について何らかの知見が得られる可能性がある。本研究では、核大規模 EST-SNP マーカーと葉緑体 DNA マーカーを用いることでこれまで以上に完成度の高いスギの系統地理学的研究を行う。さらに、本研究によって、これまで長い間結論が出なかったスギの起源についての一元論、二元論あるいはオモテスギ、ウラスギの存在について決着をつける。

3. 研究の方法

核 EST-SNP については、実生等から発現する EST を集積し、重複する EST を除いた上で SNP 探索を行い、1536 EST-SNP をマーカーとした。これらの分析にはオリゴレイシステムが利用された。得られた情報については地域環境適応的遺伝子の検出のために中立性の検定を Tajima' D 検定、Fu & Li 検定、Fay and Wu 検定を用いて行うとともに、オモテスギとウラスギの集団での遺伝的分化が有意かどうかの検定を Ks 検定、Z 検定、Snn 検定を用いて行った。

スギ葉緑体 DNA はすでに完全解読が行われており、全長は約 130kbp に相当する。これら全ゲノムを PCR によって解読出来るように 400 断片に分割できるプライマーを設計し、天然林由来と考えられるスギ 6 個体の葉緑

体全ゲノムを解読することで、SNP を探索した。得られた SNP については、コード領域・非コード領域に分けた上で、ハプロタイプネットワークを構築し解析した。

4. 研究成果

核 EST-SNP1536 マーカーを利用し、地域環境適応的遺伝子の検出のために中立性の検定を行ったところ、4 つの候補遺伝子が検出された。これらの遺伝子が真に非中立であるかどうかの検定を行うためにスギの天然分布から広く環境の異なるスギ 20 個体について 4 遺伝子の塩基配列を解読し中立性の検定（Tajima' D 検定、Fu & Li 検定、Fay and Wu 検定）を行った。その結果、4 遺伝子が Tajima' D 検定、Fu & Li 検定ともに有意な結果となった。またオモテスギとウラスギの集団での遺伝的分化が有意かどうかの検定（Ks 検定、Z 検定、Snn 検定）を行ったところ、中立性の検定で有意となった 1 遺伝子を含む 2 遺伝子が有意となった。これらの遺伝子はウラスギとオモテスギとの分化に関連していることが示唆された。これらの結果から、ウラスギとオモテスギ間では、適応性に何らかの違いがあることが示唆された。一元論は、環境的相違がスギ集団の成立に影響しないことを前提としていと考えられる。実際には、遺伝的組成に相違があることから、一元論で全てを説明することは困難である。一方で、最終氷期のレフュージアは、日本海側では現若狭湾周辺地域、太平洋側では伊豆半島を初めとしていくつかの地域があることが花粉分析から示唆されてきた。集団の成立を考慮する上で、レフュージアの存在を無視することは困難であり、これらレフュージアを中心として最終氷期以降にスギ集団が成立したと考えられる。スギの長寿命性と世代交代サイクルを考慮すれば、数千年単位でこれら適応性を獲得したと考えることは困難であり、これら適応性の相違は最終氷期以前に獲得された可能性を考慮する必要がある。ウラスギとオモテスギの相違はすでに最終氷期以前に獲得された形質であり、レフュージアを中心として日本の中心部に位置する山脈に沿って拡大し、その後の遺伝子交流は非常に希な世代交代数を考慮すれば集団動態レベルではほぼ無視できると考えることも可能である。この仮説に則れば、一元論・二元論についてはより詳細な分析と共に検討する必要がある。

葉緑体ゲノムは進化速度が非常に遅く、同一塩基サイトで複数の突然変異が生じるいわゆる“マルチプルヒット”が生じることは希である。従って、その変異は単純に加算的に評価できるため、その変異数を明らかにすることが出来れば、スギの進化的動態をより明らかに出来ると考えられる。しかし、突然変異数が少なく、一つの変異が大きな情報量を

持つのに対し、変異を探索するためには多大な労力が必要であり、これまで葉緑体ゲノムを扱った多くの植物種の研究では特定領域に認められる突然変異の探索に終始してきた。既に全ゲノムの完全解読が終了したスギでは、①これまで一部領域で評価されてきた進化速度を全ゲノムへと拡大し、葉緑体ゲノムの進化速度を明らかにすること、②得られた突然変異についてはその変異を整理した上で、特にSNPに焦点を絞ること、③これらSNPをマーカーとしてより多くの個体数を評価し、各ハプロタイプ間の関係性からスギの進化的動態について明らかにすることを目的として天然林由来のスギ6個体の葉緑体全ゲノムを解読した。最も短い立山スギの131,329bpを初めとして、概ね131kbpがスギ葉緑体ゲノムサイズであった。ゲノムサイズの相違は、一塩基繰り返し数の違いやycf遺伝子に認められたindel(挿入・欠失)に由来する。SNPは6クローン間で33認められた。このうち、コード領域では5SNPが認められた。北限のスギであるアジガサワスギは全SNPの65%である22SNPで特異的であった。葉緑体全ゲノムで進化速度を算出した結果、 2.31×10^{-9} /site/yearであり、これは以前一部領域で算出されていた数値と差はなく、スギ葉緑体ゲノムもまた極めて遅い進化速度であることが明らかとなった。次に、アジガサワスギ特異的SNPを除き、残る5クローンでランダムに変異が認められた11SNPをマーカー化し、全国28集団551個体に適用することでハプロタイプの出現頻度を明らかにした。11SNPマーカーのうち、4SNPはコード領域由来である。この結果、スギは少なくとも20ハプロタイプを保有することが明らかとなった。さらに、ハプロタイプ間の関係を明らかにするため、ハプロタイプネットワークを構築した(図1)。図1の円の大きさはそのハプロタイプを保有する個体数を表しており、ハプロタイプH04・H06・H09は多くの個体で認められた主要なハプロタイプである。クラスター1はH04とH06の主要ハプロタイプで構成されたクラスターであり、両ハプロタイプは一塩基で異なっているだけであった。同様に、H03・H05・H07・H08もまた、H04またはH06と一塩基だけで異なっており、

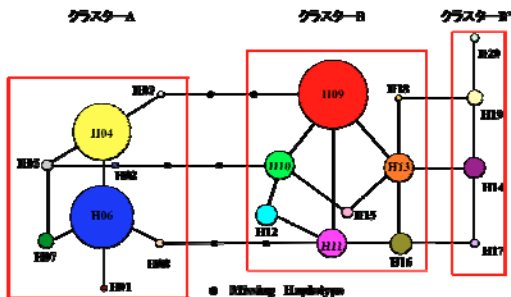


図1_スギ葉緑体ゲノムハプロタイプネットワーク

H01とH02はH04と二塩基で異なっていた。もう一つのクラスターであるH09を中心としたクラスターについても1もしくは2塩基の違いで構成されている一方で、H14・H17・H19・H20についてはrp123コード領域でこのクラスターの他のハプロタイプとは異なっていた。コード領域は遺伝子本体であり、突然変異が生じにくいと考えられている。実際、葉緑体ゲノムでのコード領域種内変異は極めて少ない。従って、これら4ハプロタイプは異なるサブクラスターと考えることが妥当である。

大きく異なるクラスター間の変異は極めて大きく、これらは最終氷期以後に分布拡大と縮小を繰り返して成立したとは考えにくい。実際、H04とH06の含まれるクラスターとH09のクラスター間にはmissing haplotypeを仮定する必要性があった。スギ葉緑体ゲノムの進化速度が 2.31×10^{-9} /site/yearであることを考慮すれば、これらmissing haplotypeを仮定せざるを得ないほどの差異は少なくともこれらの分岐が数百万年以前であると推定することが可能である。一塩基で異なるハプロタイプは氷河期に伴う分布変遷に伴って生じた可能性が高い。

葉緑体ゲノムから想定されるシナリオは以下である。

かつて、日本列島が成立する以前、スギの原集団が存在し、何らかの地理的隔離によって二つの大きな集団に分岐した。それぞれの集団はその後独自の進化を遂げた。約600万年前に始まる氷河期と間氷期が繰り返す中で、分布は拡大と縮小を繰り返した。現生の集団に最も影響したと考えられる最終氷期では複数の集団に隔離し、それぞれがマイナーな変異を獲得し、氷期以後急速に分布を拡大した可能性がある。分布変遷を伴う過程で各集団は混合を繰り返したと考えられる。実際、葉緑体ゲノムが花粉親から遺伝するとは言え、天然林集団には葉緑体ゲノムに集団単位での相違は認められなかった。ここに核ゲノムでの結果を加味すれば、最終氷期によるレフュージアが形成された時点で適応性に関連する遺伝子に変異が生じ、固定したまま最終氷期以後の分布拡大の中で北上し、現在に至っていると考えられる。

本研究目的である一元論と二元論で論じれば、一元論ではこれらの説明をすることは困難であり、二元論が妥当であると考えられる。missing haplotypeで大きく二つに分かれたクラスターのうち、一方のクラスターはさらにコード領域の変異でもう一つのクラスターの存在を仮定することが可能であるとすれば、日本列島が成立する以前に二つ以上の原集団が存在していたと考えることが出来る。本課題ではアジガサワスギ特異的SNPについて本格的な検討をしなかった。アジガサワスギ

はスギ葉緑体全ゲノムを決定する際に用いた個体であり、これらの特異性が全ゲノム解読中に生じたエラーであると判断したためである。しかし、アジガサワスギの特異性が本当であるとすれば、さらに北限集団は地理的隔離

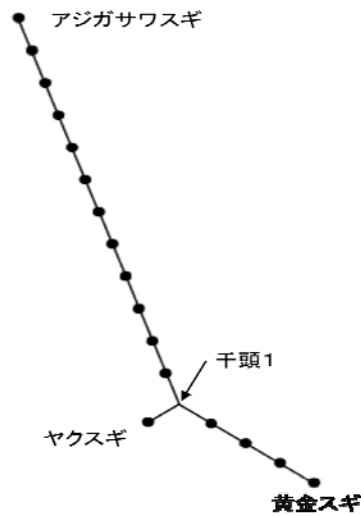


図2 アジガサワスギの特異性を示すハプロタイプネットワーク

により独自に進化した可能性が高い(図2)

。本課題ではもう一つのオルガネラゲノムであるミトコンドリアゲノムの解読を進めた。いくつかのミトコンドリアゲノムの解読には成功し、その遺伝性を検証した結果、父性遺伝であることが明らかとなった。ミトコンドリアゲノムと葉緑体ゲノムの遺伝性が同一であることから、それぞれのゲノム情報を駆使すればその共通性も含めて、より詳細な知見を得ることが出来ると考えられる。本課題では、核と葉緑体双方のゲノム解析を利用することで、スギの二元論を証明することが出来た。さらに、二元論では説明できない結果が得られたことから、むしろスギ現世集団起源の多元論が仮説として妥当と考えられる。最終氷期以前にすでにスギは分布変遷に伴って分岐を繰り返しており、分布変遷の過程で適応性に関する変異を獲得した。最終氷期以後は急速な分布拡大に伴ってそれ以前の集団の混合などの歴史的経緯を包含したまま現在に至った結果、複雑なゲノムパターンを示していると考えられる。古地理学やミトコンドリアゲノムの情報が今後加われば、この仮説をさらに強固に出来ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Ujino-Ihara, T., Y. Taguchi, Y. Moriguchi and Y. Tsumura, An efficient method for developing SNP markers based on EST data combined with high resolution melting (HRM) analysis, BMC

Research Notes、査読有、3:51、2011、1-5

〔学会発表〕(計4件)

- ① 近藤禎二、「杉のきた道」のこれまで、森林遺伝育種学会第1回シンポジウム、2012年3月29日、宇都宮大学(宇都宮市)
- ② 平尾知士、他、オルガネラゲノムを利用したスギの遺伝変異、森林遺伝育種学会第1回シンポジウム、2012年3月29日、宇都宮大学(宇都宮市)
- ③ 津村義彦、核遺伝子から明らかになったスギの遺伝構造と地域環境適応、森林遺伝育種学会第1回シンポジウム、2012年3月29日、宇都宮大学(宇都宮市)
- ④ 津村義彦、他、スギ天然林を利用した環境適応的遺伝子の検出、第122回日本森林学会、2011年3月27日、静岡大学(静岡市)

〔図書〕(計1件)

- ① 平尾知士、他、秋田文化出版株式会社、コンサイス木材百科、2011年、12-13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 禎二 (KONDO TEIJI)
独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター育種部・部長
研究者番号：20370827

(2) 研究分担者

渡邊 敦史 (WATANABE ATSUSHI)
独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター育種部・室長
研究者番号：10360471
宮本 尚子 (MIYAMOTO NAOKO)
独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター遺伝資源部・主任研究員
研究者番号：30370844
平尾 知士 (HIRAO TOMONORI)
独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・研究員
研究者番号：90457763
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・領域長
研究者番号：20353774
伊原 徳子 (IHARA TOKUKO)
独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・主任研究員
高田 克彦 (TAKATA KATSUHIKO)
秋田県立大学・木材高度加工研究所・教授
研究者番号：50264099