

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25年 5月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370083

研究課題名（和文） 最終氷期以降の分布拡大に伴う森林樹木の遺伝的適応に関する集団遺伝学的研究

研究課題名（英文） Population genetic studies of adaptation of forest trees during their expansion after the last glacial maximum

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）：

現在の西日本低地の主要な植生である照葉樹林は、最終氷期後にレフュージア（避難地）から分布を広げたと考えられている。本研究は照葉樹林構成樹種であるイスノキ、サカキ、カラスザンショウと北アメリカ湿地林のヌマスギが、この分布変化に伴ってどのように進化したかを明らかにするために、遺伝子情報を使った調査を行った。その結果、照葉樹林構成樹種の中でも種によって異なる進化の歴史を持っていることがわかった。また少数ながら適応への関与が示唆される遺伝子が同定された。

研究成果の概要（英文）：

Laurel forests dominating pristine lowlands in western Japan are considered to have expanded their distribution from one or more refugia after the last glacial maximum. In this project, we investigated their evolution during and after the expansion by studying genetic structure of their representative species, *Distylium racemosum*, *Cleyera japonica*, and *Zanthoxylum ailanthoides*, along with *Taxodium distichum* that grows in wetlands of North America. We obtained some indications that the three laurel forest species, although growing in the same forest at present, had different population histories. Also we found a small number of candidate genes that might have contributed to the adaptation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：集団遺伝学、適応進化、最終氷期、照葉樹林、集団構造、中立遺伝子、適応淘汰遺伝子

1. 研究開始当初の背景

| 約二万年前の最終氷期最盛期以降の温暖化

による分布拡大により、照葉樹林等を構成する森林植物では分布域の変化に伴う適応進化が起きたと考えられる。このような樹木適応進化の遺伝的基礎を探ることは、進化的にもあるいは現在の植生を考える上でも重要である。申請者はこれまで非モデル植物であるスギ、ヌマスギ、カラスザンショウ（照葉樹林種）で集団遺伝学的手法により適応淘汰候補遺伝子の探索を行い、数十万年のオーダーで種全体に適応的に広がったと考えられる遺伝子を複数同定した。しかしこれまでの我々の研究は、1. ヌマスギを除き氷河期以降の最近の分布域変化に伴う集団間分化による適応に着目していない、2. 調査した候補遺伝子数が少ない、3. 同じ森林の他樹種との関係を考慮していない、という点において不十分なものであった。しかし最近発展の著しい次世代シーケンサーを利用してゲノム情報が無い樹木で大量のEST配列を決定することができるようになり、上記の不十分な点を克服する大規模な多型調査が可能になった。

2. 研究の目的

本研究は照葉樹林を代表する3樹種イスノキ (*Distylium racemosum*)、サカキ (*Cleyera japonica*)、カラスザンショウ (*Zanthoxylum ailanthoides*) と、北米のヌマスギ (*Taxodium distichum*) を材料とし、最終氷期最盛期以降の温暖化に伴って起こったと考えられる樹木の分布拡大と適応進化を、遺伝子のレベルで明らかにすることを目的とする。このために「中立遺伝子」で過去の集団構造を推定し、更に予測される遺伝的変異パターンからずれた変異パターンを持つ遺伝子を調査することにより、「適応淘汰遺伝子」を探索する。これにより照葉樹林やヌマスギの最近2万年間の分布域拡大の様相と、それによって起こった適応進化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カラスザンショウの解析

氷期のレフュージアが存在したと考えられる鹿児島、屋久島、奄美及びその他日本の現分布域をカバーする伊豆、対馬、高知の6集団から、それぞれ10個体以上の葉片のサンプルを得た。これらのサンプルからDNAを抽出し、プライマーを設計してPCRを行い、核にコードされる26もしくは10遺伝子座で塩基配列を決定した。得られた配列データから、塩基多様度等の変異量、中立統計量を推定するとともに、ベイズ法に基づくIM法を用いて、集団の分岐年代や集団サイズ、移住率の推定を行った。

(2) ヌマスギの解析

①マイクロサテライトによる予備的解析

ヌマスギの広域な集団での遺伝的分化を明らかにするために、12の核マイクロサテライトマーカーを開発し、ミシシッピー川流域とフロリダ半島で二変種 pond cypress と bald cypress 集団をそれぞれ複数含む合計18集団444個体の遺伝子型の決定を行った。得られたデータからSTRUCTURE解析を使って全体集団が遺伝的に幾つの集団に分かれるかを推定するとともに、AMOVA解析により集団間の分化の程度を推定した。

②第1世代シーケンサーによる核遺伝子の解析

過去の研究で pond cypress と bald cypress で分化が見られた適応候補遺伝子 *AMT*, *Ac15* を含むタンパク質をコードする核5遺伝子座の塩基配列を、ミシシッピー川・フロリダ半島両地域の13集団で決定した。得られた配列データから、二地域間と二変種間での集団間分化の程度を推定した。またマイクロサテライトマーカーのデータからヌマスギの集団構造を推定し、集団構造を仮定した中立モデルが予測する以上の分化が変種間適応候補遺伝子座で見られるかどうかをシミュレーションにより調べた。

③次世代シーケンサー (NGS) を使った解析

葉片より抽出したRNAを精製し、NGSを使ってEST配列を得た。アノテーションを行った後、タンパク機能が推定された配列を用い、分子進化速度の推定を行った。近縁種スギの32167cDNA配列及びヒノキの5897EST配列の中からオーソログ遺伝子を抽出してアラインメントを行い、非同義置換速度 (dN)、同義置換速度 (dS) とその比 (ω) の推定を行った。また非同義置換速度の分散と平均の比 (dispersion index) を推定した。次にタンパク機能が推定されたEST配列から48遺伝子を選び、プライマーを設計した。テキサス、ミシシッピー川流域、フロリダの8集団から得られた総計96個体のサンプルで、これら48遺伝子の増幅を行い、NGSを使って配列を決定した。

(3) サカキの解析

サカキ葉片より抽出したRNAを精製し、NGSを使ってEST配列を得た。この中から96遺伝子を選びプライマーを設計した。鹿児島、宮崎、高知、対馬各集団から10個体以上合計48個体から得たサカキの葉片からDNAを抽出し、96遺伝子座での塩基配列をNGSを使って決定した。(5)の解析法を用いて解析し、塩基多様度、中立統計量、集団間分化の指標である固定指数を推定した。

(4) イスノキの解析

①第1世代シーケンサーによる葉緑体と核遺伝子の解析

鹿児島、宮崎、四国、対馬、福岡からサンプルした個体を使い、葉緑体3遺伝子座 (83

個体)と核4遺伝子座(45個体)で第一世代シーケンサーを使用して塩基配列を決定した。葉緑体遺伝子座についてはハプロタイプネットワーク推定を行った。また核遺伝子座については塩基多様度、Tajima' D、固定指数を推定した。

②NGSを使った核遺伝子の解析

イスノキ葉片より抽出したRNAを精製し、NGSを使ってEST配列を得た。この中から96遺伝子を選びプライマーを設計した。鹿児島、宮崎、高知、対馬、福岡各集団から8個体以上合計48個体のイスノキの葉片からDNAを抽出し、96遺伝子座での塩基配列をNGSを使って決定した。

(5) 集団サンプルNGSデータの解析法

各遺伝子座でPCRプライマーにより増幅された断片に各個体でタグ付けをし、得られたDNAの配列をNGSにより決定すると、多数の配列データ(リード)が得られる。配列データのQuality value及びリード長に基づいて質の高いリードを選別した後、一つのプライマーセットに対応したリードを各個体から集めてアセンブルし、その遺伝子の参照配列を作成する。次に各個体の対応するリードを参照配列に対してマッピングし、各個体の遺伝子型を決定する。この際可能であればリード間の変異サイトをもとにハプロタイプを構築する。以上により得られた各個体の遺伝子型データから、遺伝子座ごとにアライメントを行う。パラログ遺伝子を含む遺伝子座を除くために、アライメントデータが各集団内でHardy-Weinberg平衡になっているかどうかをカイ二乗検定によって調べる。また意図された遺伝子座配列かどうかを、EST配列を使ってチェックする。このようにして得た単一遺伝子座由来と考えられるアライメントから、塩基多様度や中立等計量、固定指数を計算する。これらの操作をスクリプト言語を使ってパイプライン化した。

(6) 理論的研究

①植物耐病性R-gene中のリピート進化

ゲノム配列がわかっている5種の植物の耐病性遺伝子族に属するR-gene遺伝子配列を、公開されているデータベースから得た。これらの配列データを使って、適応進化に関与していると考えられるロイシンリッチリピート(LRR)のリピート数変化率を各種で最尤法により推定した。

②氷期-間氷期サイクルが連鎖不平衡に及ぼす影響

過去数十万年の間、約10万年の周期で氷期-間氷期のサイクルが起こっている。このため多くの生物はどちらかの期間レフュージアに生息地を制限され、集団サイズの減少が周期的に起こってきたと考えられる。この状況をモデル化し、連鎖不平衡が集団サイズの周期的変化によってどのような値を取るか

を計算した。

4. 研究成果

(1) カラスザンショウの解析

10遺伝子座の塩基配列データに基づくIM法による解析から、鹿児島・伊豆集団が最も古くに分岐したことが示唆されたので、この二集団でより詳しい解析を行うために26遺伝子座で塩基配列を決定した。解析の結果、鹿児島、伊豆集団での平均サイレント塩基多様度はそれぞれ0.65%、0.28%、中立等計量Tajima' Dの平均は-0.030、-0.297で、有意に標準中立モデルの予測から逸脱する遺伝子座は見つからなかった。データからIM法によりこの二集団の分岐年代を推定したところ、最終氷期最盛期とほぼ一致する24000年前という推定値を得た(図1)。

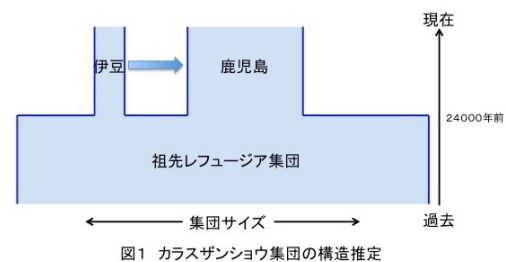


図1 カラスザンショウ集団の構造推定

このことから最終氷期に南九州に存在したレフュージア集団が分布域を拡大することにより、現在の日本のカラスザンショウ集団が形成されたことが推測された。またこの解析から鹿児島・伊豆集団の祖先集団の集団サイズは鹿児島集団の4倍程度で、また集団分岐後派生集団である伊豆から鹿児島への遺伝子移入が有ったことも推定された。必ずしも最終氷期レフュージア集団が現存集団よりも小集団ではない等、分岐後の複雑な集団構造が明らかになった。

(2) ヌマスギの解析

①マイクロサテライトによる予備的解析

STRUCTURE解析の結果から、ヌマスギ集団は大きくミシシッピー川流域集団(MAV)とフロリダ集団(Florida)の二地域に分かれていることが明らかになった。AMOVA解析から遺伝的変異は二地域間で9.23%、地域内集団間で15.36%、集団内個体間で1.67%、個体内で76.73%に分割されることがわかった。二変種bald cypressとpond cypressの間の遺伝的分化は殆ど見られなかった。MAVでは距離に依存した集団間分化が見られたが、Floridaでは分化は距離依存的ではなかった。

②第1世代シーケンサーによる核遺伝子の解析

二変種間の遺伝的分化は有意であったが、AMT遺伝子座(固定指数0.25)を除いてその程度は低かった(AMTを除いた平均固定指数0.051)。一方MAVとFloridaの両地域間でも程度は低い(平均固定指数0.046)有意な

分化が見られた。5核遺伝子座での分化の程度(固定指数 F_{ST})がマイクロサテライトデータから予測される集団構造を持つ中立モデルの予測から逸脱しているかどうかを調べた結果を図2に示す。

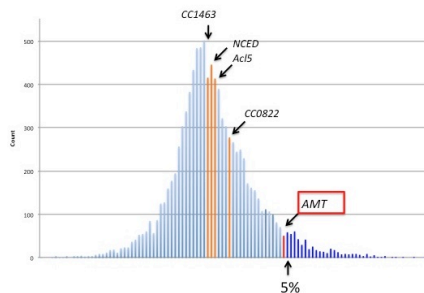


図2 中立モデルでの F_{ST} の分布

AMT 遺伝子の分化の程度は5% level で有意に近い値となり、この遺伝子(アンモニウムトランスポーター遺伝子)が変種間の分化に寄与している可能性が示唆された。

③ NGSを使った解析

cDNAのNGS解析から7549個(平均長465塩基)のEST配列を得た。この中からスギ、ヒノキ、ヌマスギでオーソログな遺伝子を186遺伝子座同定することが出来た。ヌマスギ、スギ、それぞれの平均 dS は0.0606と0.0534、平均 dN は0.0044と0.0037となり、共に有意差は無かった。同義置換をすべて中立と仮定し、化石記録から推定された2種の分岐年代(6550-7060万年前)を基にすると、ヌマスギとスギの突然変異率はそれぞれ、おおよそ $0.86 \times 10^{-9}/年$ と $0.76 \times 10^{-9}/年$ となる。3系統の同義置換数、非同義置換数から dispersion index を推定したところ、非同義サイトでは平均1.674、同義サイトでは平均2.813となり、先行研究の結果に比べ高い値を示した。一方で、ヌマスギ、スギ、ヒノキの ω ($=dN/dS$) の平均値はそれぞれ0.106、0.107、0.095となり、3系統で非常に近い値をとった。dispersion index の結果から示唆されるように、各遺伝子座において系統間に選択圧の多少のばらつきがある(中立モデルから外れる)にも関わらず、 ω の結果からは、平均的には系統によって遺伝子にかかる選択圧の違いがあまりないという結果が示された。さらに、PAMLプログラムを用いて正の淘汰を受けている遺伝子の検出を試みたところ、aquaporin 蛋白質と相同性の高い遺伝子で有意な結果を得た。乾燥地や湿地など、様々な水環境に適応している針葉樹において、植物の water channel である aquaporin で正の淘汰が見つかるということは非常に興味深い。8集団96個体の配列データの集団遺伝学的解析はまだ終わっていないので、終わり次第公表していく。

(3) サカキの解析

cDNAのNGS解析から5795個(平均長845塩基)のEST配列を得た。(5)の解析法を用いて解析したところ、34遺伝子座についてはハーディーワインバーク平衡となっており、またターゲットとした遺伝子配列が得られていた。そこでこの34遺伝子のデータから統計量を計算した。塩基配列の平均長は508塩基、集団内塩基多様度は0.97%、Tajima's Dの平均値は0.096、固定指数 F_{ST} は7.5%であった。 F_{ST} の分布を図3に示す。調べた遺伝子座には顕著な分化を示すものはなかった。サカキは虫媒だが、同じ虫媒のカラスザンショウと較べると固定指数は低い。しかし後述の風媒のイスノキよりは遺伝的分化の程度は高い。天然林での毎木調査によると、カラスザンショウに較べてサカキの集団内の実個体数は明らかに多いので、集団サイズが大きいことが遺伝的分化の程度を下げていると考えられる。

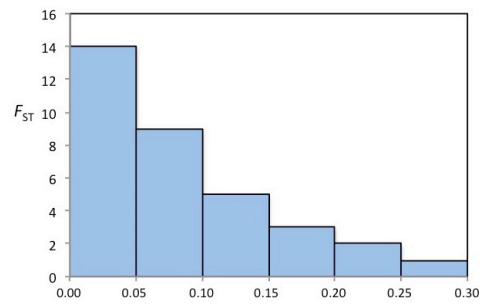


図3 サカキでの F_{ST} の分布

(4) イスノキの解析

①第1世代シークエンサーによる葉緑体と核遺伝子の解析

葉緑体3遺伝子座のデータから得たハプロタイプネットワークとその地理的分布を図4に示す。

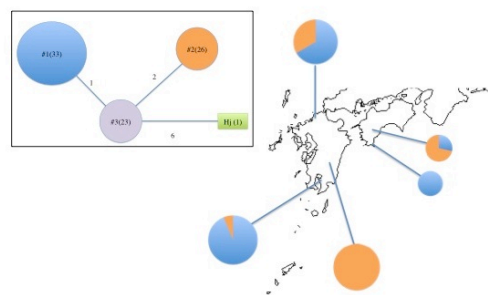


図4 イスノキ葉緑体ハプロタイプのネットワーク(左上)とその地理的分布ネットワークの#3はシマイスノキ、Hjはマンサクのハプロタイプを表す。

イスノキ集団には遺伝距離の離れた二つの葉緑体ハプロタイプ(1588塩基中3塩基置換)が存在し、しかも福岡・鹿児島集団では二タイプが多型的に存在している。このことから、過去に遺伝的に分化した集団の融合により現在のイスノキ集団が形成されたことが示唆された。一方4核遺伝子座のデータから、

集団内塩基多様度は0.50%、Tajima' Dの平均は-0.92、平均固定指数は0.5%と推定された。イスノキは風媒なので、スギ等他の風媒樹木と同じように固定指数値は低くなっていた。

②NGSを使った核遺伝子の解析

cDNAのNGS解析から6309個(平均長840塩基)のEST配列を得た。5集団48個体の配列データの集団遺伝学的解析はまだ終わっていないので、終わり次第公表していく。

(5) 集団サンプルNGSデータの解析法

実際にサカキの集団サンプルNGSデータに開発した解析法を適用したところ、96プライマーセットで増幅された断片のリードからオーソログスと考えられる34の遺伝子座でアラインメントを得て、変異統計量を計算することが出来た。解析法については更に次の二点を検討する必要がある。まず、除かれた遺伝子座の中には多くのパラログス遺伝子座のリードを含むものが有ったが、遺伝子座によってはリードを複数のオーソログス遺伝子座に振り分けることが出来るものも有った。今後この解析を行うプログラムの開発を行う。またより詳しい集団遺伝学的解析を行うためには精度の高い配列情報が必要とされるので、変異サイトの同定に関してはもう少しパラメーターの調整を検討する必要がある。

(6) 理論的研究

①植物耐病性R-gene中のリピート進化

種内のR-geneを系統樹を使ってグループ、更にサブグループと階層的に分け、サブグループ内でのLLRのリピート数変化率を推定した。LLRのリピート数の同義置換速度に対する相対的な変化率は、種間や種内の異なるグループのR-geneの間で異なっており、5種の植物で4.5から600の間の値を取ることがわかった。系統や世代時間等、各種の生活史形質の違いが変化率の違いに関与している可能性がある。また各種R-gene中の各グループ内でも他のサブグループと変化率の異なるサブグループが見つかり、このようなサブグループで何らかの適応的变化が起こっていることが示唆された。

②氷期-間氷期サイクルが連鎖不平衡に及ぼす影響

連鎖不平衡の指標である r^2 の期待値を、氷期・間氷期の集団サイズ、それぞれの期間の長さ、遺伝子座間の組換え率、レフュージア数の関数として求めた。 r^2 の期待値は2、3回の氷期・間氷期サイクルで平衡値に達する。またレフュージア数が増加すると減少する。レフュージア数が2以上で周期的変動を持ちレフュージア集団のサイズが小さい場合に r^2 の期待値は大きな値を取り、組換え率の変化に対する変動パターンも、任意交配・一

定サイズの集団の場合で較べると大きく異なることも明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6件)

- ① N. Wachi, Y. Abe, N. Inomata, A. E. Szmidt, H. Tachida (2012) Speciation history of three closely related oak gall wasps, *Andricus mukaigawae*, *A. kashiwaphilus*, and *A. pseudoflos* (Hymenoptera: Cynipidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Ecol.* 21: 4681-4694. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05727.x 査読有
- ② H. Tachida (2012) Linkage disequilibrium in a population undergoing periodic fragmentation and admixture. *Genes & Genetic Systems* 87: 125-135. https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/87/2/87_125/_html 査読有
- ③ A. Tanaka, M. Ohtani, Y. Suyama, N. Inomata, Y. Tsumura, B. A. Middleton, H. Tachida, J. Kusumi (2012) Population genetic structure of a widespread coniferous tree *Taxodium distichum* [L.] Rich. (Cupressaceae) in the Mississippi River Alluvial Valley and Florida. *Tree Genetics & Genomes* 8:1135-1147. DOI: 10.1007/s11295-012-0501-z 査読有
- ④ E. Moritsuka, Y. Hisataka, M. Tamura, K. Uchiyama, A. Watanabe, Y. Tsumura, and H. Tachida (2012) Extended linkage disequilibrium in non-coding regions in a conifer, *Cryptomeria japonica*. *Genetics* 190: 45-48. DOI:10.1534/genetics. 査読有
- ⑤ M. Tamura and H. Tachida (2011) Evolution of the number of LRRs in plant disease resistance genes. *Molecular Genetics and Genomics* 285:393-402. DOI: 10.1007/s00438-011-0615-2 査読有
- ⑥ J. Kusumi, L. Zidong, T. Kado, Y. Tsumura, B. A. Middleton, and H. Tachida (2010) Multilocus patterns of nucleotide polymorphism and demographic change in *Taxodium distichum* (Cupressaceae) in the lower Mississippi River Alluvial Valley. *American Journal of Botany* 97(11): 1-10. DOI:10.3732/ajb.1000082 査読有

[学会発表] (計 5件)

- ① 池崎由佳・舘田英典・陶山芳久・楠見淳子他2名 北米産針葉樹ヌマスギ2変種間の遺伝的分化に関する核遺伝子の塩基配列分析 日本遺伝学会第84回大会 2012年9月24日 九州大学
- ② 亀井敦哉・猪股伸幸・舘田英典他1名 照葉樹林高木層極相種イヌノキ (*Distylium racemosum*) の集団遺伝学的解析 日本遺伝学会第83回大会 2011年9月22日 京都大学
- ③ 久高洋介・津村義彦・舘田英典他3名 針葉樹スギの非遺伝子領域における連鎖不平衡の推定 日本遺伝学会第83回大会 2011年9月22日 京都大学
- ④ 田村美帆・津村義彦・舘田英典他3名 針葉樹スギより得られたBACクローンの塩基配列解析 日本遺伝学会第82回大会 2010年9月22日 北海道大学
- ⑤ 吉田貴徳・猪股伸幸・矢原徹一・舘田英典他1名 攪乱依存的樹木 *Zanthoxylum ailanthoides* の集団遺伝学 日本遺伝学会第82回大会 2010年9月20日 北海道大学

[その他]

ホームページ等

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

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 芳久 (SUYAMA YOSHIHISA)
東北大学・農学研究科・准教授
研究者番号：60282315

(3) 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

津村 義彦 (TSUMMURA YOSHIHIKO)
森林総合研究所・室長
研究者番号：20353774

猪股 伸幸 (INOMATA NOBUYUKI)
福岡女子大学・国際文理学部・准教授
研究者番号：20301335

楠見 淳子 (KUSUMI JUNKO)
九州大学・大学院比較社会文化研究院・講師

研究者番号：20510522

手島 康介 (TESHIMA KOSUKE)
九州大学・大学院理学研究院・助教