

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 6月 6日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770080
 研究課題名（和文）QTL マッピングによる溪流沿い植物ヤシャゼンマイにおける適応と種分化過程の解析
 研究課題名（英文）Analyses of adaptive evolution and speciation in rheophilous fern, *Osmunda lancea*
 研究代表者
 角川 洋子（KAKUGAWA YOKO）
 東京大学・大学院理学系研究科・助教
 研究者番号：70575141

研究成果の概要（和文）：ヤシャゼンマイの細葉形質に関しては相関が強くみられる遺伝子座がみつき、この適応的形質を支配する遺伝子が含まれるゲノム領域が明らかになった。また、ヤシャゼンマイに自配受精能があるのは、ゼンマイにみられる劣性有害遺伝子が失われていることに起因することが示された。この遺伝子座は連鎖群11上に存在し、野外雑種集団ではヘテロ接合度が高く、このゲノム領域では遺伝子浸透しやすいことなどが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A locus on linkage group 10 appeared to be associated with stenophylly in *Osmunda lancea*. The genomic region associated with intra-gametophytic selfing rate was also found on linkage group 11 in subgenus *Osmunda*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：種分化、適応的形質、溪流沿い植物、細葉形質、相関解析、QTL マッピング

1. 研究開始当初の背景

植物では、種間で生殖的隔離が完全ではなく、雑種や雑種後代を形成する例が多く知られている。それらの生殖的隔離が不完全な近縁種の間でも、それぞれの生育環境において、適応的な遺伝子は種内に拮がり、適応的でない対立遺伝子は種間で自然選択（分断性選択）によって浸透が妨げられていると考えられる。一方、中立的なゲノム領域は異種間で比較的頻繁に浸透していることが考えられる。したがって、近縁種間でどのように種としてのまとまりが保たれているのかを明らかにするためには、適応的な遺伝子、もしくは適応的な遺伝子に強く連鎖している遺伝

子座を調べる必要があると考えられた。これらを調べるのに有効な方法としては、適応的な形態形質のQTL (Quantitative Trait Loci) マッピングやEST (Expressed Sequence tags) 配列の解析などが挙げられる。

適応的な形態形質やその形質を支配する遺伝子座に注目した野生植物の遺伝学的解析は、国外では *Mimulus* や申請者が留学中に研究材料とした野生ヒマワリ（いずれも被子植物）を使った研究が進められているが、国内ではまだ例がなかった。シダ植物では、国内外のいずれにおいても適応的な形態形質に注目した遺伝学的な解析はほとんど行なわれてこなかった。しかし、シダ植物では、配偶体を容易に単離培養できるので、全ての遺伝子座においてホモである Doubled

haploid を作成することができる。これは遺伝学的な解析をする上での大きな利点であり、リチャードミズワラビでは実際に遺伝地図が作成されている (Nakazato *et al.* 2006. *Genetics* 173:1585-1597)。溪流沿い植物は川の増水による冠水時に、水流抵抗に耐えるためにいろいろな適応的な形態形質をもつと考えられているが、中でも葉形が細くなるという形質が多く例でみられ、適応的であることが明らかである。溪流沿いに生育するシダ植物であるヤシャゼンマイは姉妹種ゼンマイとの間に遺伝子浸透がみられる。本研究ではヤシャゼンマイを用いて適応的であることが明らかな細葉等の形態形質に対して遺伝学的な解析をすることを計画した。

2. 研究の目的

河川が増水すると冠水する溪流帯に生育する“溪流沿い植物”であるヤシャゼンマイを材料として、溪流沿いに生育する上で適応的だと考えられる細葉とその他の形態形質を支配する遺伝子座を QTL マッピングすることによって、姉妹種であるゼンマイからの溪流帯への進出と適応進化がどのように起きたのか、その種分化過程を明らかにすることを目的とした。また、集団遺伝学的に野生集団を解析することにより、現在どのようにして種としてのまとまりが保たれているのかを明らかにすることを試みた。

種分化研究においては生殖的隔離の進化機構の解明に重点が置かれてきた (e. g. Coyne & Orr 1989: *Evolution* 43: 362-381) が、近年、種分化における生態的隔離や自然選択の役割の重要性も注目されるようになった (e. g. Colosimo *et al.* 2005: *Science* 307: 1928-1933)。しかし、ゲノムレベルで研究した例は非常に限られている。特に植物の場合、生育環境が異なり、種間で異なる自然選択圧を受けていると考えられる場合でも、実際に適応的な形態形質が何なのかについては事前に明らかではないことが多い。しかし、溪流沿い植物における細葉という形態形質は複数の分類群で並行的に進化していることから適応的であることが明らかである。本研究で材料として用いるゼンマイ科においても、ヤシャゼンマイとシロヤマゼンマイ類で細葉の形質をもつ溪流型が独立に複数回進化している。本研究の特色は、適応的な形態形質が明らかな溪流沿い植物とその姉妹種を材料として用いて、自然選択圧がどのように働いて種分化したか、ゲノムレベルで明らかにすることを目的としていることである。

3. 研究の方法

溪流沿い植物であるヤシャゼンマイとその姉妹種であるゼンマイの間の自然推定 F1 雑種から採取した孢子から Doubled Haploid 集団と F2 集団を作成した。いずれの集団でも細葉の形質に関して非常に大きな変異がみられる。細葉形質とそれ以外の適応的な形態形質について相関解析を行い、それぞれの形質を支配する遺伝子座を遺伝地図上にマッピングした。また、ヤシャゼンマイとゼンマイの野外集団について集団遺伝学的な解析を行い、種間での遺伝子浸透が起りやすいゲノム領域と起りにくいゲノム領域を明らかにした。これらのことにより、ヤシャゼンマイが溪流沿いに進出する上で重要な役割を果たしたと考えられる領域を特定し、その領域がどのように自然選択を受けているのかを議論した。

4. 研究成果

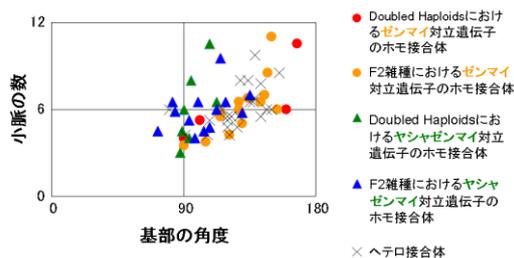
溪流沿い植物において一般的に適応的な形質だと考えられている細葉形質の遺伝学的な解析を行なった。まず、小羽片基部の角度と下側最下の支脈数などの形質の間にどの程度遺伝的な相関関係があるのかを明らかにするため、人工交配集団を作成し形態形質の解析を行なった。ゼンマイ類では、比較的簡単に配偶体 (前葉体) を培養できるので、F1 雑種個体の孢子から配偶体を寒天培地上で育て、ランダム交配させれば、F2 雑種個体を得ることができる。幼個体は始め単葉だが、頂羽片と1対の側羽片が独立した段階で、側羽片の基部の角度と下側最下の側脈から分岐する支脈の数を含み、計6つの形態形質を計測した。60個体について、1から3枚の葉 (計106枚) を解析した結果、側羽片の基部の角度と下側最下の側脈から分岐する支脈の数の2形質について大きな変異がみられ、両形質間の相関係数は0.520であり、かなりばらつきはあるものの無相関ではないことが明らかになった (Yatabe & Tsutsumi 2012)。また、上側最下の側脈から分岐する支脈の数も、側羽片の基部の角度との間の相関係数が0.426と小さいものの、無相関ではないことが示された。つまり、側羽片の上側最下の側脈や下側最下の側脈から分岐する支脈の数で、側羽片基部の角度が一義的に決まるわけではないが、これらの形質間にはある程度の相関があるということになる。一方で、側羽片の基部の角度と、葉形指数は葉ごとにみた場合は相関係数が-0.232、個体ごとに平均した場合は-0.286というように、相関はあっても小さい (Yatabe & Tsutsumi 2012)。

シダ植物では、配偶体を単離することによって自配受精が可能な場合、全ての遺伝子座がホモである Doubled Haploids を作成する

ことができる。オオバヤシャゼンマイの胞子から作成した Doubled Haploids においても形態形質を計測したが、全体的に生存率が低かったので、十分に成長した幼個体を得ることが難しかった。しかし、Doubled Haploids から DNA を抽出し、EST ライブラリーに基づいて開発したマーカーを解析することは可能であり、この結果に基づいて遺伝地図を作成している。現在までに 120 のマーカーが遺伝地図上にマッピングされている。これらのマーカーの内、41 のマーカーについては、F2 雑種個体の解析も行なっている。

その結果、L245 という遺伝子座では、F2 雑種個体 (60 個体) において、ゼンマイの対立遺伝子のホモ接合体は側羽片の基部の角度が大きく、反対にヤシャゼンマイの対立遺伝子のホモ接合体は、側羽片の基部の角度が小さくなっていった。Doubled Haploids (16 個体) でも、同じ遺伝子座において遺伝子型と側羽片の基部の角度の間に相関がみられた (図 1)。但し、この遺伝子座における遺伝子型と、側羽片の下側最下の側脈から分岐する支脈の数などを含む他の計測した形質とは相関がなかった。つまり、側羽片の基部の角度に影響を与える遺伝子の 1 つは L245 と連鎖していて、現在までに L245 を含む 5 つのマーカーがマッピングされている連鎖群上にあると考えられる。しかし、この遺伝子座を含むゲノム領域が側羽片の下側最下の側脈から分岐する支脈の数や葉形指数に影響を与えているという証拠は得られておらず、ヤシャゼンマイの細葉形質は複数の遺伝子によって決まるものだと考えられる。

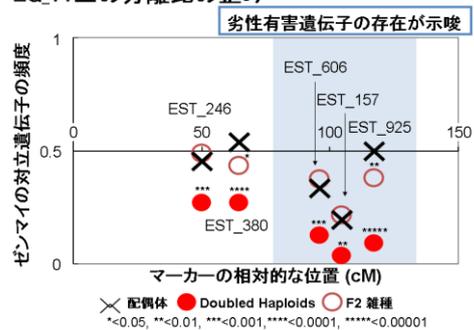
図 1 EST_245 における遺伝子型と形態形質



また、自配受精能に関わるゲノム領域の解析を行なった。Doubled Haploids 集団と F2 雑種集団、配偶体集団における対立遺伝子の頻度の比較により、連鎖群 11 にゼンマイの対立遺伝子がホモになると生存率が著しく低下する領域があることが明らかになった (図 2)。この領域にゼンマイでは劣性致死遺伝子が存在すると考えられ、ヤシャゼンマイではこの劣性致死遺伝子が失われることに

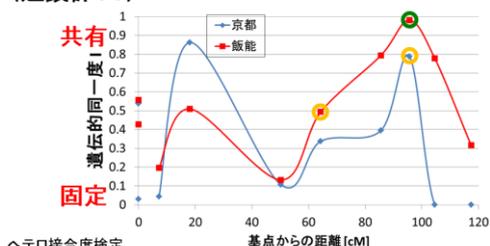
より、自配受精率が高くなっていることが考えられる。連鎖群 11 には 12 の分子マーカーがマッピングされている。しかし、これらの多くはゼンマイとヤシャゼンマイでは遺伝的分化がみられてもゼンマイの集団内には変異がない。そこで、次世代シーケンス解析をゼンマイについて行い、薄囊シダ全般で使えるマーカーの開発を試みた。その結果、葉緑体ゲノムに関しては変異探索が容易になった。但し、連鎖群 11 に関しては L246 に相同性がある配列しかみつからず、次世代シーケンス解析によって得られた配列から開発したマーカーを改めてマッピングしなおす必要がある。

図 2 LG_11 上の分離比の歪み



既存のマーカーを用いて京都と飯能のゼンマイとヤシャゼンマイの雑種混生集団および日光と飯能のゼンマイ純群において遺伝子頻度および遺伝子型の解析を行なった。その結果、雑種混生集団では、連鎖群 11 上の遺伝子座 L606 とその近傍の遺伝子座において、ゼンマイとヤシャゼンマイの対立遺伝子の共有の度合いが高く、ヤシャゼンマイの対立遺伝子の頻度が高く、かつ、ヘテロ接合体も有意に高いことが明らかになった (図 3)。

図 3 野外雑種集団における対立遺伝子の共有の度合い (連鎖群 11)



このことから、雑種混生集団では、劣性致死の効果がないヤシャゼンマイの対立遺伝子がゼンマイに浸透しやすいことが示唆された。また、日光と飯能のゼンマイ純群にも L606 とその近傍の遺伝子座において低頻度でヤシャゼンマイの対立遺伝子がみられた。

しかし、有意にヘテロ接合度が高くないこととゼンマイにおける自配受精率が0～2%と非常に低いことと考え合わせると、ゼンマイの中に複数の劣性致死遺伝子として働く対立遺伝子が存在することが考えられる。

以上のことから、繁殖様式に関わる劣性致死遺伝子は近傍の遺伝子座の遺伝子頻度と遺伝子型頻度に影響を与え、ヘテロ接合度を高く保つだけでなく、種間の遺伝子浸透を促進し遺伝的分化を小さくする効果もあることが明らかになった。つまり、劣性致死の効果はゼンマイ内で他殖性を維持する効果もあり、それぞれの相反する効果の結果として集団内の遺伝子頻度と遺伝子型頻度が決まるものと考えられる。シダ植物は様々な遺伝学的な解析における利点があるにもかかわらず、ゲノムワイドな解析はほとんどされてこなかった。他殖性は集団内の多様性を維持する機構として重要であり、生物多様性を理解する上で重要な知見が得ることができた。

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) Yoko Yatabe-Kakugawa, Chie Tsutsumi, Yumiko Hirayama, Shizuka Tsuneki, Noriaki Murakami and Masahiro Kato. Transmission ratio distortion of molecular markers in a doubled haploid population originated from a natural hybrid between *Osmunda japonica* and *O. lancea*. Journal of Plant Research (in press) 査読有

DOI 10.1007/s10265-012-0540-4

(2) 角川(谷田辺) 洋子, 堤千絵 2012 「溪流沿い植物ヤシャゼンマイにおける適応的形質の遺伝的背景」 Plant Morphology 24: 51-55. 査読有

[学会発表] (計6件)

①角川洋子 日本植物分類学会第12回大会「ゼンマイとヤシャゼンマイの共有派生形質の適応進化」 2013年3月15日 千葉大学西千葉キャンパス

②角川洋子 日本生態学会第60回大会「溪流沿い植物ヤシャゼンマイにおける細葉形質の遺伝学的解析」 2013年3月5日 静岡県コンベンションアーツセンター

③角川洋子 日本植物学会第76回大会関連集会シダ学会「溪流沿い植物ヤシャゼンマイにみられる適応的形質の遺伝的背景の解析」 2012年9月15日 兵庫県立大学姫路書写キャンパス

④角川(谷田辺) 洋子, 堤千絵, 加藤雅啓 日

本植物分類学会第10回大会「ゼンマイ類における展葉フェノロジーと種分化」 2012年3月24日 大阪学院大学

⑤角川洋子 日本植物学会第75回大会2011年度日本植物学会奨励賞受賞講演「シダ植物を材料とした種分化研究」 2011年9月18日 東京大学駒場キャンパス

⑥角川洋子 日本植物学会第75回大会「溪流沿い植物ヤシャゼンマイにおける適応的形質の遺伝的背景」シンポジウム「おかしな形はかしこい形？」 2011年9月18日 東京大学駒場キャンパス

[図書] (計1件)

角川洋子 2012 講談社「シダ植物における種分化」新しい植物分類学 II : 94-105

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角川 洋子 (KAKUGAWA YOKO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 70575141