

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248028

研究課題名(和文)種内・属内レベルの集団ゲノミクスによる樹木の適応進化・種分化プロセスの解明

研究課題名(英文)Processes of adaptation and speciation of trees uncovered by population genomics

研究代表者

井鷲 裕司(Isagi, Yuji)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50325130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,500,000円

研究成果の概要(和文)：多様な環境に適応進化した樹木を対象に、複数集団のサンプルを数万遺伝子座オーダーで比較解読し、適応進化プロセスを解析した。共通圃場実験による形質の評価と遺伝子型の分析により環境適応に関わる形質多型には遺伝的背景があることを明らかにした。ゲノム情報を縮約して解読するRAD-seqや翻訳されたゲノム領域を解読するRNA-seqによって、適応進化に関与した可能性があるゲノム領域を探索し、いくつかの候補遺伝子を見いだした。また、胚乳が種子親の減数分裂に由来する半数体組織であることを利用して、1母樹と80個の胚乳の遺伝子型を次世代シーケンサーで解読することにより高密度連鎖地図を作成することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed adaptation and speciation processes of *Callitris* species, which had been growing in various environments, by means of comparative analysis on samples from distinct populations, genotyping at thousands of loci. By evaluating phenotypic characteristics and genotypes of *Callitris* plants in a common garden, it was found that several morphological and physiological traits that relate to adaptation had genetic background. Candidate genomic regions relating the adaptive evolution were found by combining analysis of the information obtained by RAD-seq and RNA seq. By taking the advantage of haploid endosperm of gymnosperms, a high-density linkage map for *Callitris* was successfully constructed by genotyping only 1 mother tree and ca. 80 endosperms using a next generation sequencer.

研究分野：保全遺伝学

キーワード：適応進化 次世代シーケンサー オーストラリア 連鎖地図 RAD-seq

1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な環境に対する生物の適応プロセスや、その履歴を明らかにすることは進化・生態学の重要なテーマである。多様な環境に対する適応により生物集団は遺伝的に分化し、進化と種分化がもたらされてきた。この過程は地球上の生物多様性を創出してきた重要な要因の一つであるが、多くの疑問もある。例えば、環境に対して適応している集団ではどの遺伝子に自然選択が作用しているのか？その遺伝子は種分化において、どのような役割をはたしたのか？進化適応、種分化の過程で、個々の集団はどのような歴史的プロセスを経験したのか？等の問いかけである。

これらの疑問に答えることは、進化・生態学的な意義に加え、地球規模での環境変動が懸念される中で、生物多様性の保全や、その持続可能性を評価する点からも重要である。

(2) 次世代シーケンサーの発展と普及は DNA 塩基配列解読法にブレークスルーをもたらし、非モデル生物でも、多量の遺伝情報を解読できるようになった。様々な環境への適応が起っている集団で、発現している遺伝子を一括して比較解読すれば、適応進化に関連した遺伝子座を特定することも可能になりつつある。生態学者は、野生生物の環境適応に重要な役割をはたす表現型形質についてよく理解しているが、その形質の遺伝的背景について解析するすべを持ち得なかった。しかしながら、適切な分類群を選択すれば、非モデル生物であっても、遺伝的データと生態学的データを統合し、適応をもたらした遺伝的背景を解析することも可能になってきた。

(3) この様な背景を基に、本申請課題では、オーストラリアおよびニューカレドニアにおいて多様な環境に適応し、種分化したヒノキ科樹種の種内変異と属内変異を解析対象とし、複数集団の遺伝子を数万個のスケールで比較解読することで、生物の適応や種分化の遺伝的基盤を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

(1) 次世代シーケンサーから得られる大量の塩基配列情報を用いて、環境適応と種分化に関わる解析を、種内と属内という二つのレベルで適応遺伝子座と中立遺伝子座について分析する。種内変異の解析から、多様な環境条件への適応に関与している遺伝子座を明らかにし、さらに、同一属内の種間比較を行うことで、種間における適応遺伝子の機能比較、対立遺伝子の歴史、種分化と適応遺伝子の関係などについて解析する。

(2) 中立遺伝子座の情報からは、集団有効

サイズの変遷、空間遺伝構造、系統地理、遺伝子流動などを明らかにする。大量の塩基配列情報を活用することで、比較的短期間でおこなう遺伝的分化から、環境適応、そして種分化に至るまでの広範な時間スケールにわたる生物多様性創出過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) オーストラリアおよびニューカレドニアに十数種が分布するヒノキ科針葉樹 *Callitris* 属樹木を対象として、次世代シーケンサーによる大量の塩基配列データを、多様な環境下に生育する広域分布種 *Callitris columellaris* と、同一属内の複数種を対象に収集し、種内と種間の遺伝的変異を解析する。

(2) 塩基配列解読から得られた多数の遺伝子座は、環境への適応に関与した遺伝子座と中立遺伝子座に識別し、集団ゲノミクス解析を行う。前者からは自然選択による環境適応過程を、後者からは集団有効サイズの変遷、空間遺伝構造、系統地理、遺伝子流動等を解析する。これらの遺伝解析に加えて、共通圃場実験による適応諸形質を支える遺伝的基盤の有無についても検証を行う。

(3) また、針葉樹の胚乳は種子親個体の卵が減数分裂した結果生じた半数体の組織であることを利用して、次世代シーケンサーによる大量遺伝情報解読によって、連鎖地図の作成も行う。

(4) これらの解析を通して、短期間で起こりうる集団の遺伝的分化から、環境に対する適応進化、そして種分化に至るまでの、広範な時間スケールにわたる生物多様性創出の過程を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 葉緑体 DNA 上の遺伝子座と核遺伝子座であるマイクロサテライトマーカーによる系統解析に基づいて、*Callitris* 種群内で起こったパイオームシフトを復元し、それに特に重要な影響を及ぼした環境傾度を解析した。その結果、最終氷期以降から現在に至る乾燥化が種内に保持されている遺伝的性質に大きな影響を及ぼしていることが明らかになった。

(2) *Callitris* 種群における地域環境への遺伝的適応を検証することを目的として、同一環境の共通圃場で稚樹段階における形質を測定した。オーストラリア大陸全域に分布する 28 集団〔年平均気温が 13.1-28.9 (15.8 の幅) 年平均降水量が 222-2,080mm (1,858mm)〕より採取した種子から 557 個体の稚樹を育成し、東京都に設定した共通圃場 (年平均気温 14.8 年平均降水量 1,610mm) で栽培を行った。その結果、測定を行った形質 (葉長・気孔密度・LMA・葉の窒素濃度・

樹形・相対成長速度)について系統分化に伴う形質進化を復元し、自生地環境といくつかの形質について関連見いだすことができた。

本研究で行った共通圃場実験から、種群内の形態・生理形質の変異に遺伝的基盤が存在していること、そしてその変異が自生地の気候要因と関係していることが明らかになった。

(3) *Callitris* 属を対象に種分化と環境適応に関連した遺伝的変異を明らかにすることを目的とし、*C. columellaris* 種群を含む5種(7個体)から発現遺伝子の配列(トランスクリプトーム)を次世代シーケンサーにより解読し、一塩基変異(Single Nucleotide Variant: SNV)に着目して解析を行った。

葉組織から個体あたり5千万本の塩基配列を収集し、類似した配列をまとめて再構築したところ、約13万本の「コンティグ配列」(平均581 bp)にまとめることができた。コンティグ配列のうち32,737本(24.9%)の配列はタンパク質データベースの中に類似した配列が見いだされ、機能やアミノ酸配列を推定することができた。さらに推定されたアミノ酸配列とSNVを利用して種分化と環境適応に関連する遺伝子の探索を行った。SNVによりアミノ酸配列が変わる非同義置換とアミノ酸配列が変わらない同義置換の数を調べ、それらの比(dN/dS)を遺伝子ごとに検討し、系統内でdN/dS<1かつ系統間でdN/dS>1、dNとdSの差が有意に大きい72遺伝子を候補遺伝子を定義した。これらの遺伝子について、大陸中から採取した96サンプルを対象に次世代シーケンサーを用いてリシーケンシングを行い、SNPデータを得た。これらの候補遺伝子におけるSNPの遺伝的分化と、RAD-seq由来のゲノムワイドSNPにおける遺伝的分化を比較することで、豪州ヒノキ複合種の適応と種分化に関わる遺伝的背景を解析した。

(4) オーストラリアには3系統のヒノキ科物(*Athrotaxis*属、*Callitris*属、*Diselma*属)が分布する。これらは生態遺伝学的に興味深い特性を持っているものの、これまで遺伝解析が十分に行われていない。本研究では各属についてEST-SSRマーカーを開発し、系統地理学・集団遺伝的解析を行った。

Athrotaxis 属では形態・生態的に分化した2分類群(*A. cupresoides*と*A. selaginoides*)、及びその交雑種とされる*A. laxifolia*について解析を行った結果、*A. laxifolia*は方向性のある交雑によって生じた雑種であることが示唆された。*Callitris* 属では、東部温帯域とタスマニア島に隔離分布する*C. rhomboides*と*C. oblonga*について解析を行ったところ、2種の*Callitris*共に隔離地域集団間で大きな分化が見られたが、最初に系統分化が起きたのは大陸側であり、その後タスマニア集団が約20-40万年前に分化したこ

とが明らかになった。タスマニアに固有の*Diselma* 属では各集団で高い多様性が維持され、遺伝的分化の程度は低いことが明らかになった。

(5) 裸子植物の多様性ホットスポットであるニューカレドニアでは、複数の針葉樹が放散的に種分化を遂げている。この中にはヒノキ科2属(*Callitris*属と*Libocedrus*属)が含まれており、それぞれの属内で3種に種分化している。ニューカレドニア産*Callitris*属と*Libocedrus*属は、オーストラリアとニュージーランドに分布する姉妹種と単系統を成すことから、1回の長距離分散によってニューカレドニアに侵入した後に種分化したと考えられる。2属がニューカレドニアで種分化を遂げる過程では、当地に特有の蛇紋岩土壌への適応に加えて、*Maquis*と呼ばれる乾性低木植生への進出が平行して起こったと想定される。

このヒノキ科2属をモデル系としてRNA-seq解析を行うことで、蛇紋岩土壌と島内の特殊環境への適応に重要な役割を果たした適応遺伝子座を*Callitris*属で54個、*Libocedrus*属で37個特定した。これらの適応候補遺伝子座の中には、蛇紋岩地帯の環境適応に関連するものがあった。2属で特定された候補遺伝子は多様であり、両属で共通する傾向は見られなかったことから、ニューカレドニアにおける蛇紋岩地帯への適応は系統特異的に起こったことが類推された。

(6) *Callitris glaucophylla*の1母樹から種子を採集し、母樹と74個の胚乳の遺伝子型データをRAD-seqとEST-SSR解析によって解読した。連鎖解析の結果、*Callitris*属の染色体数(2n = 22)に対応する11連鎖群が得られ、4280マーカーを含む高密度連鎖地図が得られた。本手法は、次世代シーケンサーによる大量遺伝情報解読と組換え後の半数体組織が種子内に維持されるという裸子植物の特性を活用したものであり、純系の交配実験を要する従来の連鎖解析と比べて、著しく短期間、低コストで高精度連鎖地図の作成を行うことができた。本研究で構築した連鎖地図は広域な生育地への適応進化を達成した*Callitris*属植物の系統分化や適応過程を解明する上での基盤的遺伝情報として活用が期待される。

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2件)

Sakaguchi S, Tsumura Y, Crisp MD, Bowman DMJS, Isagi Y, Genetic evidence for paternal inheritance of the chloroplast in four Australian *Callitris* species

(Cupressaceae), Journal of Forest Research, 査読有, 19 巻, 2014, 244-248
DOI: 10.1007/s10310-012-0384-8

Sakaguchi S, Bowman D, Prior L, Crisp M, Linde C, Tsumura Y, Isagi Y, Climate, not Aboriginal landscape burning, controlled the historical demography and distribution of fire-sensitive tree populations across Australia, Proceeding of the Royal Society B, 査読有, 280 巻: DOI: 10.1098/rspb.2013.2182

〔学会発表〕(計 12 件)

阪口翔太, Bowman D, Prior L, Crisp M, Linde C, 津村義彦, 井鷲裕司, 豪州ヒノキにおける集団デモグラフィの地理的変異はどのように形成されたのか?, 第 60 回日本生態学会大会, 2013.3.7, 静岡県コンベンションアーツセンター

阪口翔太, Bowman D, Prior L, Crisp M, Linde C, 津村義彦, 井鷲裕司, 針葉樹の集団デモグラフィから探るオーストラリアの最終氷期最盛期以降の景観変化, 第 124 回日本森林学会大会, 2013.3.27, 岩手大学

阪口翔太, David Bowman, Lynda Prior, Michael Crisp, 津村義彦, 上野真義, 伊藤元己, 井鷲裕司, バイオームを超えたヒノキ科針葉樹の環境適応 - 系統解析と共通圃場実験から見えてきた種分化の歴史, 日本進化学会第 15 回つくば大会, 2013.8.30, 筑波大学

上野真義, 阪口翔太, Mike Crisp, Lynda Prior, David Bowman, 津村義彦, 井鷲裕司, カリトリスのトランスクリプトーム解析, 森林遺伝育種学会第 2 回大会, 2013.11.08, 東京大学農学部

阪口翔太, 津村義彦, 上野真義, 伊藤元己, 永野惇, David Bowman, Lynda Prior, Michael Crisp, 井鷲裕司, 豪州ヒノキにおける適応形質の遺伝的変異, 日本生態学会第 61 回大会, 2014.3.15, 広島国際会議場

阪口翔太, 上野真義, 津村義彦, 永野惇, 伊藤元己, David MJS Bowman, Lynda Prior, Michael Crisp, 井鷲裕司, 生態ゲノミクスによる豪州ヒノキ種群の環境適応の検証, 第 125 回日本森林学会大会, 2014.3.28, 大宮ソニックシティ

阪口翔太, James Worth, Greg Jordan, David Bowman, Lynda Prior, Michael Crisp, Philip Thomas, 伊藤元己, 井鷲裕司, オーストラリア産ヒノキ科 3 属の EST-SSR マーカーの開発と系統地理学的評価, 森林遺

伝育種学会第 3 回大会, 2014.11.07, 東京大学農学部

Sakaguchi S, Qiu YX, Liu Y, Qi XS, Kim SH, Han J, Takeuchi Y, Worth JRP, Yamasaki M, Sakurai S, Isagi Y, What factors promoted lineage divergence of East Asian temperate tree? Testing respective roles of climate change, seaways barrier and topographic heterogeneity, Contribution of Genetics to Plant Conservation, FAPESP-JSPS Joint Research Workshop 2015, サンパウロ大学

阪口翔太, 杉野壮, Michael Crisp, 永野惇, 本庄三恵, 工藤洋, 津村義彦, 伊藤元己, 井鷲裕司, 高密度連鎖地図上でのヒノキ科 Callitris 属のゲノム分化推定, 日本植物分類学会第 14 回大会, 2015.3.7, 福島大学

阪口翔太, David Bowman, Lynda Prior, Michael Crisp, Linde Celeste, 津村義彦, 伊藤元己, 井鷲裕司, 歴史的な景観変化が地域集団の分布・デモグラフィに及ぼす影響, 第 62 回日本生態学会大会, 2015.3.19, 鹿児島大学

阪口翔太, 上野真義, 津村義彦, 伊藤元己, James Worth, Bruno Fogliani, 井鷲裕司, ニューカレドニア産ヒノキ科樹木の遺伝子における自然選択の痕跡, 第 62 回日本生態学会大会, 2015.3.19, 鹿児島大学

阪口翔太, 上野真義, 津村義彦, 伊藤元己, David Bowman, Lynda Prior, Michael Crisp, 井鷲裕司, 豪州ヒノキの候補遺伝子解析, 第 126 回日本森林学会, 2015.3.27, 北海道大学

〔図書〕(計 6 件)

井鷲裕司, 共立出版, 遺伝的変異と空間的遺伝構造, 「エコゲノミクス 遺伝子からみた適応」(共著), 2012, 302

井鷲裕司, 文永堂出版, 集団内の遺伝的動態, 「森林遺伝育種学」(共著), 2012, 296

井鷲裕司, 朝倉書店, 遺伝子の多様性, 「生物多様性と生態学-遺伝子・種・生態系」(共著), 2012, 176

井鷲裕司, 東京化学同人, 行動生物学辞典(上田ほか編)「遺伝子流動」「遺伝的組換え」「遺伝マーカー」「外交配」「近交係数」「近交弱勢」「近親交配」「限性遺伝」「交雑」「集団遺伝構造」「性連鎖」「対立遺伝子」「対立遺伝子頻度」「超優性」「二倍体」「瓶首効果」「マイクロサテライト解析」「ミトコンドリア DNA」「戻し交配」「優性遺伝」「量的形質遺

伝子座」「連鎖不平衡」, 2013、637

井鷲裕司・陶山佳久、文一総合出版、生態学者が書いた DNA の本、2013、200

井鷲裕司、文永堂出版、教養としての森林学(共著) 2014、253

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井鷲 裕司 (ISAGI, Yuji)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50325130

(2) 研究分担者

津村 義彦 (TSUMURA, Yoshihiko)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：20353774

上野 真義 (UENO, Saneyoshi)
独立行政法人森林総合研究所・研究員
研究者番号：40414479

瀬戸口 浩彰 (SETOGUCHI, Hiroaki)
京都大学・大学院人間・環境学研究科・教授
研究者番号：70206647

連携研究者

阪口 翔太 (SAKAGUCHI Shota)
東京大学・大学院総合文化研究科・研究員
研究者番号：50726809