

機関番号：82617

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657065

研究課題名(和文)次世代型分子系統解析の標準手法の開発：急速な適応放散史の可視化に向けて

研究課題名(英文)Toward the standard methodologies for next-generation molecular phylogenetics

研究代表者

奥山 雄大 (OKUYAMA, YUDAI)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究員

研究者番号：40522529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、急速に種分化を遂げているため従来法では系統解析が困難な種群で、系統推定を可能とする標準手法を確立することを目標とし、RAD法の応用による巨大データ取得の手法と、RNA-seq法の応用による種分化関連遺伝子の探索の両方を試みた。RAD法の応用については、当初利用を試みた次世代シーケンサーGS Juniorでは出力データ量が不足することが明らかになった。そこでよりデータ出力量の大きいシーケンサーHiSeq2000を用いる手法に切り替え、現在は解析結果待ちである。また、RNA-seqにより花の発現遺伝子を網羅的に読むことで、種分化に関係する少数の遺伝子を絞り込むことにも成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish the standard methodologies for phylogenetic inferences on the plant groups that underwent rapid species radiation. To this end, two next-generation-sequencer-based methodologies were examined, i.e., RAD-seq and RNA-seq. In the earlier trial of the RAD-seq, we found that the amount of the data output by GS Junior is far from that necessary for consistent phylogenetic study, so we switched to the use of HiSeq 2000. Now we have finished the library preparation and the data processing is underway. As for the RNA-seq, we analyzed the flower-expressed genes and succeeded to find some genes with unusual mode of molecular evolution, possibly because of their association with the plant speciation process. The gene regions were found to have much more information than the standard genes used for the routine phylogenetic studies.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：分子系統樹 次世代シーケンサー RAD-seq

1. 研究開始当初の背景

サンガー法による DNA 塩基配列決定法が普及し、標準化された手法で簡便に分子系統樹が得られるようになったことで、生物多様性の記述やその進化史の可視化は劇的に進んだ。一方で従来の分子系統学的手法の限界も明らかになって来た。例えばアフリカ大陸で急速に適応放散し、驚くべき種多様性を誇るカワズメ科魚類の系統進化のパターンを通常分子系統学的手法でたどるのは困難であり、また通常 DNA バーコード領域として用いられているミトコンドリア COXI 領域などを用いても多くの種の識別には成功しないことが分かっている (Seehausen 2006)。同様の例は、動物ほど進化速度の大きい汎用遺伝子領域を持たない植物ではより深刻であり、これまでに提唱されている限りにおいては種レベルでの DNA バーコーディングの成功率は高くない (Fazekas et al. 2006)。また比較的種分化の歴史が浅い種群においてその系統関係を少数の遺伝子領域から推定することはほぼ絶望的である (Meudt et al. 2009)。このように、生物多様性の研究がより汎用性を獲得し核心に迫るためにも、方法論的ブレークスルーが求められていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、急速に種分化を遂げており、それゆえ従来法では系統解析が困難であったような種群において大量データセットを用いた系統推定を可能とするため、次世代シーケンサーを活用した標準手法を探索することを目的とした。特に、RAD 法を応用し、従来の手法の 100-1000 倍の塩基配列量のデータを用いる系統解析の標準的手法 (図 1) を確立することを第 1 の目的とする。

(2) これに加え、急速に多様化を遂げた分類群において (例えばアフリカのカワズメ科魚類においてほぼ唯一種間で分化が見られるオプシン遺伝子のように) 種を識別したり高い解像度の系統樹が得られる数少ない DNA 領域を探索し、検出することを第 2 の目的とする。

上記の研究により、本研究では、自然史研究、特に集団や種の系統関係を解明する手段としての分子系統学に必要なデータを大量かつ少コスト、少労力で得るための標準的方法論を確立する、また次世代シーケンサーを自然史研究分野に広く利用するためのモデルとなる研究を提案することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 材料としては、すでに系統解析の実績が十分にあり、結果を評価しやすいユキノシタ科チャルメルソウ属チャルメルソウ節および、日本列島で 50 種以上という顕著な種分化を遂げているウマノスズクサ科カンアオイ属を用いた。チャルメルソウ類については 14 種 140 個体、カンアオイ類については 58

種 96 個体について DNA サンプルを調整し、RAD-seq 法の手法に従ってペアドエンド法による両端各 100 塩基対の配列決定を試みた。(2) また、これとは別に、種分化に直接関与し、それゆえ急速な種分化プロセスを可視化するのに有用と考えられる遺伝子領域を探索することを目指した。チャルメルソウ類やカンアオイ類では、送粉者が認識する花の匂いを介在した種分化メカニズムが存在すると考えられる。そこで、花の匂いに関連する遺伝子を探索する目的で、チャルメルソウの花で発現している遺伝子の網羅的シーケンシングを GS Junior を用いて行った。チャルメルソウ類ではテルペン類が花の匂いとして重要な構成要素であるため、得られた配列情報に対して tblastx を用い、シロイヌナズナのテルペン合成酵素に近縁な配列を網羅的に探索した。また本研究とは別に行っていた SuperSAGE 法 (Matsumura et al. 2003) によって得られたデータを参考にし、これらの遺伝子の花組織での発現の程度についても検討した。

4. 研究成果

(1) 当初 RAD タグ法を出発点として検討したが、異なるシーケンス反復の間で得られる配列 (遺伝子座) の再現性が乏しく、結果として従来法の精度を大きく上回るような系統解析に必要なデータ量を得ることができなかった。いくつかの条件検討を試みたが、これは次世代シーケンサー GS Junior の能力の限界によるところが大きいと判断した。

そこでこの研究は、よりデータ出力量の大きい Illumina 社のシーケンサー HiSeq2000 を用いる手法に切り替えることとした。このため、京大大学生態学研究センター・さきがけ研究員 永野淳氏との共同研究を行った。平成 25 年 12 月にサンプルを送付し、ライブラリの調整は完了したが、他の機器共同利用者のサンプルが揃うまでシーケンス解析を発注できないため、2014 年 6 月 1 日現在は解析結果待ちの状況にある。(2014 年 7 月データ取得予定)。

(2) 一方で、これとは別に GS Junior の能力でも可能な手法をあらためて探索することとした。その結果、花の発現遺伝子を網羅的に読む RNA-seq の手法により、種分化に関係する少数の遺伝子を絞り込むことに成功した。すなわち、発現上位の遺伝子の中で、花の匂いに関連するテルペン合成酵素遺伝子を探索した結果、Linalool/nerolidol synthase に相同な遺伝子 Mit-LIS を同定することができた。この遺伝子配列をもとにチャルメルソウ属の系統解析を行ったところ、従来の遺伝子領域では種間の系統関係を明らかにすることができなかった極めて近縁な 4 種について、種の境界を正確に反映した系統関係が得られた (図 1)。これは本種群が花の匂いが介在する種分化を遂げているためと考えられる。したがって、同様の進化メ

カニズムをもち急速に種分化を遂げているカンアオイ属やカンコノキ属、テンナンショウ属といった植物群にも同様の手法が応用できると期待される。

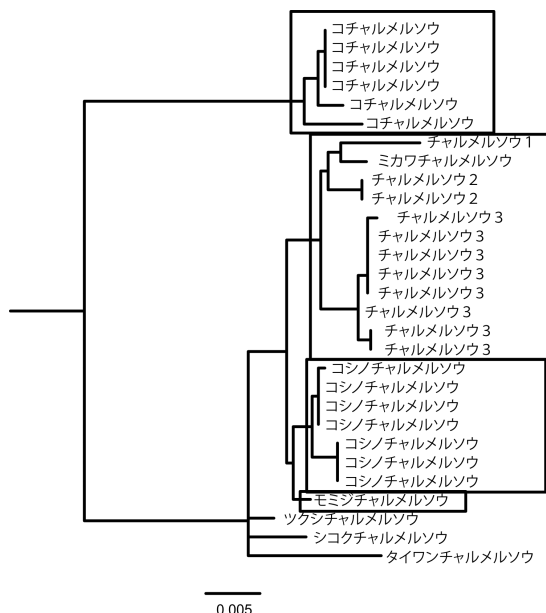


図1: Mit-LIS を用いた日本産チャルメルソウ属の部分系統樹。通常の遺伝子では枠で囲った4種を明確に区別することはできなかった。

このように、当初の研究計画とは異なる手法となったが、本プロジェクトによって2つの方向から次世代シーケンサーを用いた進化系統解析の手法が考案、実行でき、大きな成果が得られた。

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 1件)

Yudai Okuyama, Mio Akashi. 2013. The genetic basis of flower-related phenotypic differences between closely related species of Asian *Mitella* (Saxifragaceae). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany* 39: 131-136. (査読有)

[学会発表](計 4件)

奥山雄大 遺伝子から迫るチャルメルソウ属の生態的種分化 日本進化学会第15回つくば大会シンポジウム「種分化を伴う進化と伴わない進化 - 環境傾度に対する植物の適応進化とその生態・遺伝的背景」筑波大学筑波キャンパス 2013年8月
奥山雄大 チャルメルソウ属雑種 F2

集団を用いた生殖隔離形質および生活史形質遺伝子群のマッピング 日本植物学会第77回大会シンポジウム「RAD-Seqが切り拓く植物研究 栽培種から野生種まで」北海道大学札幌キャンパス 2013年9月

奥山雄大 チャルメルソウ属の生態的種分化の謎に迫る - フィールドからゲノムまで - 第249回生態研セミナー 京大大学生態学研究センター 2013年9月

Yudai Okuyama. The speciation gene complex underlying recurrent pollinator shifts in Asian *Mitella*. Memorial Symposium for the 29th International Prize for Biology Kyushu University Ito Campus, Fukuoka, Japan, 2013年11月21日

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ
<http://www.kahaku.go.jp/research/researcher/researcher.php?d=yokuyama>
<https://sites.google.com/site/okuyamanokenkyuupeji/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山雄大 (OKUYAMA YUDAI)

国立科学博物館植物研究部・研究員

研究者番号: 40522529

(2) 研究分担者

田辺晶史 (AKIFUMI TANABE)

研究者番号: 40549044

(3) 連携研究者

()

研究者番号：