

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291085

研究課題名(和文)植物の超塩基性土壌への適応進化：シュンジュギクの比較ゲノム解析

研究課題名(英文) Adaptive Evolution of Plants to Ultra-basic Soil: Comparative Genomic Analysis in *Aster savatieri*

研究代表者

伊藤 元己 (ITO, Motomi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00193524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛇紋岩植物であるシュンジュギクについて、その進化の遺伝的背景および土壌適応の分子機構を明らかにするための解析を行った。

ミヤマヨメナとシュンジュギクを含む38集団について、核SSRによる集団構造解析を行った。解析の結果、全体は地理的なまとまりを持つ3つのグループに分かれることが明らかになった。またシュンジュギクは、少なくとも愛知と三重・高知で2回独立に平行進化したことが示唆された。また、RNA-seqによるリファレンス作成と多型検出、遺伝子発現プロファイルの比較を行った結果、重金属耐性に関わると思われるG0を持つ遺伝子を探索した所FRD3が候補に上がった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the genetic background of evolution and the molecular mechanism for serpentine soil adaptation of *Aster savatieri*.

Population structure analysis by SSR was performed on 38 populations including *Aster savatieri* and var. *pygmaeus*. As a result, it became clear that the whole is divided into three groups with geographical cohesion. Moreover, it was suggested that var. *pygmaeus* evolved independently at least twice in Aichi and Mie / Kochi. In addition, as a result of reference preparation with RNA-seq, polymorphism detection, and comparison of gene expression profiles, FRD 3 was searched for as a result of searching for genes with G0 related to heavy metal tolerance.

研究分野：多様性生物学

キーワード：適応進化 比較ゲノム ミヤマヨメナ シュンジュギク 蛇紋岩

## 1. 研究開始当初の背景

種分化において、適応進化は重要な働きをされると考えられる。しかし、野生植物の適応進化による種分化プロセス研究において、生理的特性の適応進化に関する詳細な研究例はきわめて少ない。このような研究は、強い選択圧を受ける環境下に生育し、近縁種、可能なら同種内で比較可能な研究対象を選択してゲノム全体を比較することで可能と考える。本研究では、このような条件を満たすシオン属（キク科）のミヤマヨメナとその蛇紋岩地帯に分布する変種であるシュンジュギクを対象とする。従来の形態や遺伝変異の解析に加え、最近急速に発展したゲノム解析技術を用いて超塩基性土壌への適応に関与した遺伝的变化を特定し、どのような選択圧によりどのようにして高ストレス環境への適応が起きているかについて、自然選択や遺伝的浮動などの進化的駆動力の役割の解析をゲノム全領域について行うことにより、新たな環境への適応進化について総合的に考察する。

## 2. 研究の目的

キク科に属するミヤマヨメナ (*Aster savatieri*,  $2n=2x=18$ ) は、本州から九州までの湿潤な林床に生育する日本固有の多年草である。またシュンジュギク (var. *pygmaeus*,  $2n=2x=18$ ) は愛知・三重・高知県の蛇紋岩地に隔離分布する矮性変種である。本研究では、蛇紋岩植物であるシュンジュギクについて、その進化の遺伝的背景および土壌適応の分子機構を明らかにするための解析を行った。

## 3. 研究の方法

### 遺伝構造の解析

SSR (マイクロサテライト) プライマーを作成するため、ミヤマヨメナについて RNA-seq 解析を行い、平均 134bp 長の約 40 万配列を得た。この配列をアセンブルした結果、約 4 万の contig を得た。この配列に対し、SSR 部位の検索を行って、100 個のプライマーセットを作成した。ミヤマヨメナとその蛇紋岩地帯の変種のシュンジュギクについて、このプライマーセットを試した結果、4 遺伝子座について使用可能であった。この 4 遺伝子座について集団サンプリングした試料について解析を行った。

### 遺伝子発現プロファイルの比較.

ミヤマヨメナとシュンジュギク、クの各 1 個体の根から RNA を抽出した後、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 法により、遺伝子の発現遺伝子解析を行った。

## 比較栽培実験

栽培実験蛇紋岩土が生育に与える影響を知るため、培養土あるいは蛇紋岩土 (三重・朝熊山) で、ミヤマヨメナを栽培した。

## 4. 研究成果

### 系統解析と遺伝構造

ミヤマヨメナについては近畿地方と中国地方で 4 カ所、シュンジュギクについては四国の高知県錦山にてサンプリングを行った。従来のサンプルと合計すると、シュンジュギクについては現在知られているすべての産地の 3 カ所 (高知、伊勢、三河)、ミヤマヨメナは、8 カ所となる。これらの集団サンプルについて以下のような調査・研究を行った。形態観察：各サンプルで、葉や頭花のサイズ・形など、の形態的特徴について計測を行い、種内の形態変異を調査した。その結果、蛇紋岩地域の植物では、葉のサイズ、頭花サイズ、小花数が有意に小さいという結果が得られた。

ミヤマヨメナとシュンジュギクを含む 38 集団について、核マイクロサテライトマーカーによる集団構造解析を行った。解析の結果、全体は地理的なまとまりを持つ 3 つのグループに分かれることが明らかになった (1、日本海側、2、愛知県、3、紀伊半島・四国・中国地方)。またシュンジュギクは、非蛇紋岩地のミヤマヨメナが蛇紋岩地帯に侵入して分化したものであり、少なくとも愛知と三重・高知で 2 回独立に平行進化したことが示唆された。(図 1~3)。

cpDNA (*trnLF-TabCF*, *rpS16*, ca. 1.4 kb)

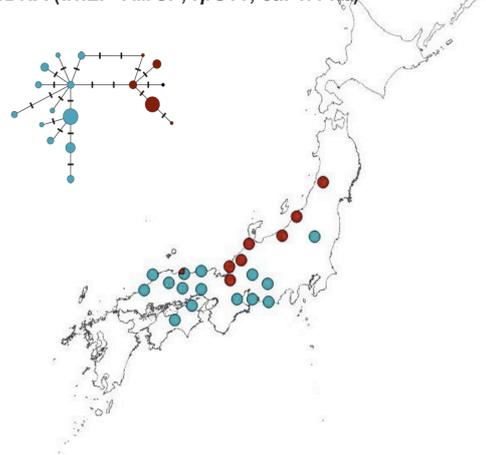


図 1. 葉緑体 DNA による集団間分化

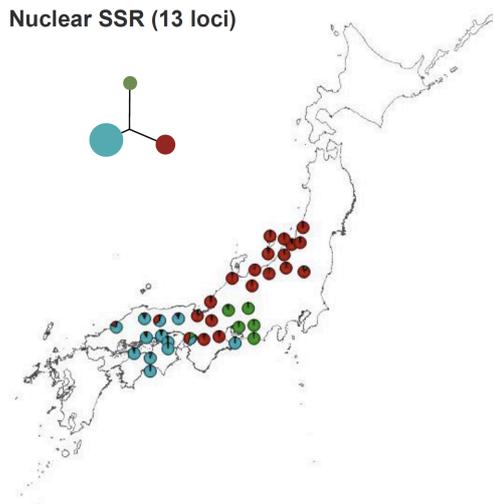


図 2. 核 SSR による集団間分化 (日本全体)

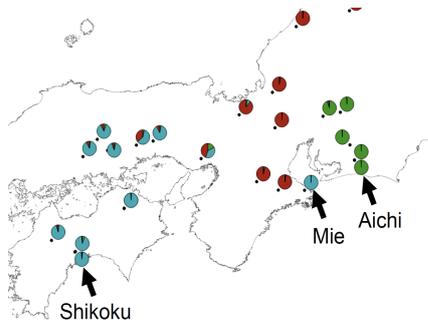


図 3. 核 SSR による集団間分化 (拡大) . 蛇紋岩土壌に生育する集団を矢印で示す。

### RNA-seq によるリファレンス作成と多型検出、遺伝子発現プロファイルの比較

次世代シーケンサーによる発現定量解析・多型解析のため、ミヤマヨメナとシュンジュギクについて、RNA シークエンシング (RNA-seq) リファレンス配列を作成した。また蛇紋岩適応に関わることが示唆されている遺伝子がシュンジュギクでの蛇紋岩適応に関わるかを検討するため、リファレンス配列からミヤマヨメナホモログを選び、そこにシュンジュギクのリードをマップすることで多型の検出を行なった。ミヤマヨメナ MRS2-4 と CAX13 ではシュンジュギクとの間に非同義多型が検出された。

次に蛇紋岩植物シュンジュギクの土壌適応に重要な役割を果たしたと考えられる遺伝子候補を同定するため、RNA-seq 法を用いたミヤマヨメナとシュンジュギクの根由来の転写産物の網羅的比較解析を行った。ミヤマヨメナの根から mRNA を抽出して cDNA ライブラリを作成後、Illumina 社の次世代シーケンサーで 100 bp ペアエンドで配列を読む

だ所 37 M のリードが得られた。これをアセンブルして 74,818 contigs が得られ、プラストサーチの結果 42,022 contigs が、GO mapping で、は 36,142 contigs がアノテーションされた。この結果に対し、ミヤマヨメナとシュンジュギクを、それぞれニッケルを含まない培養土と 50 μm 含む培養土で、育てた根からの mRNA 配列をマッピングした。その上で、ミヤマヨメナとシュンジュギクで発現量が 5 倍以上異なる転写ユニット (遺伝子) を抽出した所、Ni: 0 μm 特有は 169 個、Ni: 50 μm 特有が 62 個、両者で異なるものが 23 個となった。この中から重金属耐性に関わると思われる GO を持つ遺伝子を探した所 The MATE efflux family protein (ferric reductase defective3: FRD3) が候補に上がった。この遺伝子は、重金属をキレートすることで、重金属耐性に関わる可能性がある (表 1, 2)

表 1. 発現頻度の差異が大きな遺伝子の Gene Ontology (GO) 解析結果

GO term (Ni: 0)	P-value	GO term (Ni: 50 mM)	P-value
Trichoblast differentiation	3.1E-06	Photosynthesis, light harvesting	1.2E-04
Catabolic process	9.9E-05	Cellular aldehyde metabolic process	2.8E-04
Xyloglucan metabolic process	1.4E-04	Protein-chromophore linkage	4.3E-04
<b>Proton transport</b>	<b>2.4E-04</b>	proline catabolic process	6.5E-04
<b>Response to oxidative stress</b>	<b>2.6E-04</b>	Oxidation-reduction process	2.2E-03
Cell wall biogenesis	6.7E-04	<b>Proton transport</b>	<b>4.6E-03</b>
Protein metabolic process	1.2E-03	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catabolic process</b>	<b>5.3E-03</b>
Cellular process	2.9E-03	Nitrate transport	9.9E-03
Citrate transport	6.0E-03	Nitrogen fixation	1.0E-02
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catabolic process</b>	<b>8.5E-03</b>	<b>Response to oxidative stress</b>	<b>1.2E-02</b>

Common in Ni: 0 and Ni: 50

表 2. シュンジュギクにおける高発現転写因子 (上位 11 遺伝子)

No.	Fold change (Ni: 0)	Fold change (Ni: 50)	Annotation	GO biological process
1	35.4	11.7	late embryogenesis abundant protein Lea5-like	Response to stress
2	15.7	12.9	subtilisin inhibitor-like	Response to stress
3	13.4	13.8	salutaridin reductase-like	Oxidation-reduction process
4	13.4	8.9	UDP-glycosyltransferase 73C3-like	Metabolic process
5	12.7	11.3	Not annotated	Not annotated
6	8.7	6.9	Not annotated	Not annotated
7	8.2	5.5	peroxidase 60	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catabolic process, Response to oxidative stress</b>
8	8.0	6.6	Not annotated	Not annotated
9	7.8	8.5	<b>Vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase</b>	<b>Proton transport</b>
10	6.7	9.4	Not annotated	Not annotated
11	6.3	5.3	MATE efflux family protein FRD3	Citrate transport

### 比較栽培実験

栽培実験により、蛇紋岩土がミヤマヨメナおよびの生育に与える影響を知るため、通常の培養土あるいは三重・朝熊山で採取した蛇紋岩土を用いて植物を栽培した。その結果、(1) 蛇紋岩土で栽培した植物は、常の培養土で栽培した植物よりも成熟葉が早く枯れる、(2) 蛇紋岩土でも、新たな葉形成は播種後 4 ヶ月以降も止まらず、全体が枯死することも少ない、(3) 播種後 1 ヶ月後の本葉第一葉の葉サイズおよび根の長さには差がなかった。蛇紋岩土が、根や葉の形態形成に直接与える影響は小さい可能性があることが明らかになった。そのため、蛇紋岩土自体が、ミ

ヤマヨメナの生育を阻害する可能性が示唆された。

次にシュンジュギクの蛇紋岩土壌適応の仕組みを解明するための解析を行った。まずミヤマヨメナとシュンジュギクの自生地土壌の含水率・窒素および重金属含有量を調べたところ、シュンジュギク自生地土壌には重金属(Ni, Co, Cr, Mn)が多く含まれていた。重金属は、植物体内に過剰に取り込まれると、酸化ストレスや栄養障害を起こし有害であることが知られる。さらに異なる濃度のニッケル溶液を用いた栽培実験で、シュンジュギクは、ミヤマヨメナと比較して高いニッケル耐性を持つことが示唆されたことから、シュンジュギクの蛇紋岩適応には重金属(少なくともニッケル)に対する耐性の獲得が重要であったと考えられる。

#### 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 3件)

- ① Ishikawa, N., Sakaguchi, S., Worth, J.R.P., Jordan, G.J., Thomas, P., Ito, M. 2016. Development and characterization of SSR markers for *Aster savatieri* (Asteraceae). *Appl Plant Sci.* 2016 Jun; 4(6): apps.1500143. DOI: 10.3732/apps.1500143
- ② Nakagawa, S. and Ito, M. 2014. Variation in floral morphology within a population of *Aster hispidus* var. *tubulosus* (Asteraceae, Astereae). *Plant Species Biol.* 29: 287-293, DOI: 10.1111/1442-1984.12027
- ③ Sakaguchi, S., Worth, J. R. P., Jordan, G. J., Thomas, P., Ito, M. 2014. Development of nuclear and mitochondrial microsatellite markers for the relictual conifer genus *Athrotaxis* (Cupressaceae). *Conservation Genetics Resources* 12: DOI:10.1007/s12686-014-0400-8

[学会発表](計 4件)

- ① 石川直子、阪口翔太、横山正昭、福島慶太郎、伊藤元己. 日本生態学会第64回大会、2017年3月14~18日、早稲田大学(東京都新宿区)
- ② 伊藤元己、加藤俊英、森重剛志、海老原淳、綱本良啓、満行知花、陶山圭久. 日本植物学会第16回大会、2017年3月10~12日、京都大学(京都府京都市左京区)
- ③ 石川直子、森下洋子、阪口翔太、伊藤元己. 蛇紋岩シュンジュギクの遺伝構造解析—蛇紋岩土壌適応形質の進化について. 日本生態学会第62回大会、2015年3月18~22日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
- ④ 石川直子、森下洋子、阪口翔太、伊藤元己. 蛇紋岩植物の進化—シュンジュギクとミヤマヨメナの遺伝構造解析. 日本植物学会第14回大会、2015年3月6~8日、福島大学(福島県福島市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

特になし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 元己(ITO, Motomi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授  
研究者番号:00193524

(2)研究分担者

森長 真一(MORINAGA, Shin-ichi)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教  
研究者番号:80568262

土松 隆志(TSUCHIMATSU, Takashi)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号:60740107

阪口 翔太(SAKAGUCHI, Shota)

京都大学・大学院人間・環境学研究科・助教  
研究者番号:50726809

青木 誠志郎(AOKI, Seishiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教  
研究者番号:10334301

(4)研究協力者

石川 直子(ISHIKAWA, Naoko)