

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650129

研究課題名(和文)非モデル生物を用いた異質倍数体形成を介した植物の種分化の分子機構解明

研究課題名(英文)Allopolyploid speciation in the non-model plant *Ficus iidaiana*: analysis of single-copy nuclear genes and RAD-seq markers

研究代表者

楠見 淳子 (Kusumi, Junko)

九州大学・比較社会文化研究院・准教授

研究者番号：20510522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：雑種形成や染色体倍化は植物の進化、種分化において重要な役割をもつことが知られている。本研究は異質倍数体の遺伝的多様性と種分化の遺伝的背景を明らかにすることを目的とし、小笠原固有イチジク属3種(オオヤマイチジク、トキワイヌビワ、オオトキワイヌビワ)とその近縁種の塩基配列多型解析を行った。得られた遺伝情報を解析した結果、異質倍数体であるオオヤマイチジクは古くに分岐した親系統に由来する遺伝子をもつことが示された。また、オオヤマイチジクと2倍体種(トキワイヌビワ、オオトキワイヌビワ)の間には強い生殖隔離があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Allopolyploid arise as a result of the hybridization between two related species and genome doubling, which has long been recognized as an important mode of plant speciation. In this project, we investigated genome-wide nucleotide polymorphisms of three endemic *Ficus* species in the Ogasawara Islands to reveal the genetic background of allopolyploid speciation of these species. The analyses based on single-copy nuclear genes and RAD-seq markers suggested that *F. iidaiana* (allotetraploid) has two divergent parental lineages. The divergence time between the parental lineages was estimated to be roughly 25-33 MYA. All of the endemic *Ficus* species have low levels of nucleotide diversity and there was a significant genetic differentiation between the diploid species (*F. boninshimae* and *F. nishimurae*) and *F. iidaiana*.

研究分野：生物学

キーワード：異質倍数体 種分化 RAD-seq イチジク属

1. 研究開始当初の背景

雑種形成と染色体倍化による異質倍数体の形成は植物一般にみられる現象である。このプロセスによりもたらされるゲノムの劇的な変化は、新しく生じた異質倍数体に新規形質を付与すると考えられる。さらに、異質倍数体と親系統の間には即座の生殖的隔離が生じることから、種分化の発端となりうる。最近では、被子植物の種分化の15%が染色体倍化に起因するという報告や、雑種個体に生じた多様な形質が新たな環境適応を可能になることで種分化が生じた例が報告されており、雑種形成や染色体倍化が植物の進化、種分化において重要な役割をもっていることが示唆されている。しかしながら、異質倍数体形成による遺伝子レベルの進化については未だに解明されていない点が多い。

先行研究において小笠原固有のイチジク属植物3種、トキワイヌビワ (*Ficus boninsimae*)、オオトキワイヌビワ (*F. nishimurae*)、オオヤマイチジク (*F. iidaiana*) の起源を明らかにすることを目的に、日本、台湾に分布するイチジク属植物の分子系統学的解析を行ったところ、小笠原イチジク属植物3種はイヌビワ (*F. erecta*) を母系とし、雑種形成と染色体倍化を経て現在の種に種分化したことが示唆された (Kusumi et al, 2012)。本研究では、小笠原固有イチジク属植物3種を材料に遺伝子レベルの進化に焦点を絞り、植物の種分化における雑種形成、染色体倍化の役割について集団遺伝学的手法を用いた解析を行う。

2. 研究の目的

(1) 小笠原固有イチジク属植物3種を材料に遺伝子レベルの進化に焦点を絞り、異質倍数体種の遺伝子喪失の頻度、異質倍数体種の遺伝的多様性、小笠原固有種3種の遺伝的分化の程度、分岐年代、進化速度の推定を行い、異質倍数体形成を伴った種分化の遺伝的背景を明らかにすることを目的とする。

(2) イチジク植物のポリネーターであるイチジクコバチ類についても分子系統学的手法を用い、その起源の解明を行う。イチジク植物とイチジクコバチ類はどちらが欠けてもお互いの繁殖は成立しないという互惠かつ種特異性の高い共生関係を有している。小笠原固有イチジク属植物も同様にイチジクコバチ類と共生しているが、その起源については明らかにされていない。小笠原諸島においてどのようにしてイチジク植物とイチジクコバチ類の共生系が再構築されたのかを明らかにすることは、小笠原イチジク属植物の種分化を考えるうえで非常に重要である。

3. 研究の方法

(1) 核遺伝子座の塩基配列を用いた、小笠原イチジク属3種の種分化過程の解析
小笠原固有種3種 (*F. boninsimae*, *F.*

nishimurae, *F. iidaiana*) とその近縁種7種 (イヌビワ、*F. erecta*: 日本, *F. formosana*: 台湾, *F. vaccinioides*: 台湾, *F. tannoensis*: 台湾, *F. pedunculosa*: 台湾, *F. ischnopoda*: 中国, *F. stenophylla*: 中国) を対象とした。これらの葉組織からDNAを抽出し、核コードの5遺伝子座の塩基配列を決定した。得られた配列データを元に、最尤法、ベイズ法による分子系統樹の作成、分岐年代の推定を行った。また、トキワイヌビワとオオヤマイチジクについては、塩基多様度の推定を行った。

(2) 核遺伝子の塩基配列を用いた、小笠原イチジクコバチ類の起源の解明

トキワイヌビワ及びその近縁種(日本、台湾、中国に分布)から採集された送粉コバチ類 (*Blastophaga* 属) のサンプルからDNAを抽出し、28rRNA 遺伝子及び3つの核遺伝子の塩基配列を決定した。得られた配列データをもとに、分子系統樹の作成を行った。

(3) 小笠原固有種3種のゲノムワイドな種内、種間変異解析 (RAD-seq 法)

小笠原固有種3種と日本在来のイヌビワ、計24個体からDNAを抽出し、RAD-seq 法により塩基配列多型の網羅的解析を行った。解析には、トキワイヌビワ8個体、オオトキワイヌビワ8個体、オオヤマイチジク7個体およびイヌビワ (伊豆) 1個体を用いた。Miseq による塩基配列の解析は、150cycle, 3000万リードの条件で計6回行った。得られたデータをもとに、異質倍数体種 (オオヤマイチジク) の遺伝子喪失の頻度の推定、2倍体種と異質倍数体種の遺伝的多様性の比較および種内の集団構造、種間の遺伝的分化の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 核遺伝子座の塩基配列を用いた、小笠原イチジク属3種の種分化過程の解析

5つの核遺伝子座の分子系統樹を最尤法、ベイズ法により作成したところ、小笠原固有種3種と近縁種イヌビワの分岐順序が異なる2種類のトポロジーをもつ分子系統樹が得られた。典型的なトポロジーを図1に示す。Type A は小笠原3種がクラスターを形成し、小笠原諸島内で固有種3種が種分化したことを強く示唆する。今回解析を行った核遺伝子のうち、典型的な TypeA のトポロジーが形成されたのは、*ACS1*, *Xdh*, *Lyc-beta-cyclase* の3遺伝子であった。一方、*-galactosidase* 遺伝子は TypeB のトポロジーを形成した。このトポロジーは異質倍数体種であるオオヤマイチジクにおいて、イヌビワと近縁なハプロタイプと小笠原2倍体種がもつハプロタイプがゲノム内に混在することを示している。得られた配列の変異サイトを比較したところ (図2)、古い分岐をもつハプロタイプ間で組換えが起こった形跡

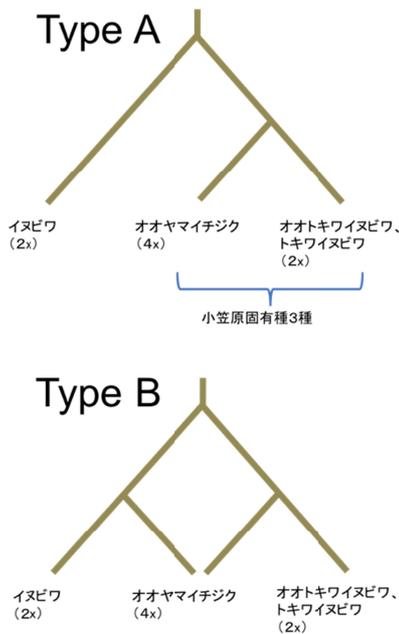


図1：2種類の分岐パターン

は認められなかったことから、これらは2つの親系統に由来するハプロタイプである可能性が高い。

次に、得られた塩基配列を用いてベイズ法により分岐年代の推定を行った。推定を行うにあたっては、トポロジーのタイプによって遺伝子を2つのグループに分けて推定を行った。先行研究で用いた核遺伝子(*Aco1*, *G3pdh*)もあわせて用いた(図3、図4)。

Type Aの遺伝子を用いた分岐年代の推定の結果、小笠原の固有種3種のクレードは、イヌビワと台湾の近縁種からなるクレードと約

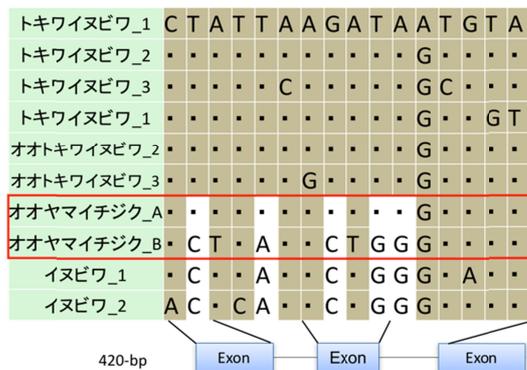


図2：Beta-galactosidase遺伝子のアラインメント

2,480 万年前 (95%HPD[最高事後密度区間]: 1,740 万年前 ~ 3,160 万年前) に分岐したと推定された。さらに、小笠原の固有種3種のMRCAは約560万年前(95%HPD: 240万年前 ~ 960万年前)に遡ることが推定された。また、Type Bの遺伝子を用いた分岐年代の推定の結果、トキワイヌビワ、オオトキワイヌビワとオオヤマイチジクの小笠原の固有種3種の配列を含むクレードは、イヌビワを含むクレードと約3,260万年前(95%HPD: 2,940万年前

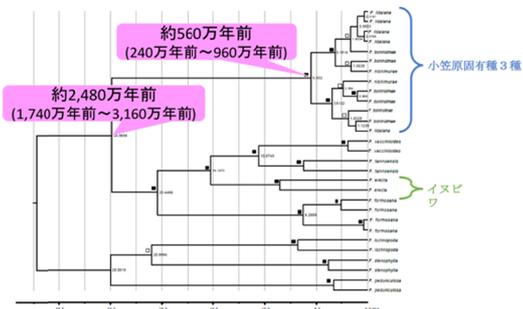


図3: TypeAの遺伝子から推定された分岐年代

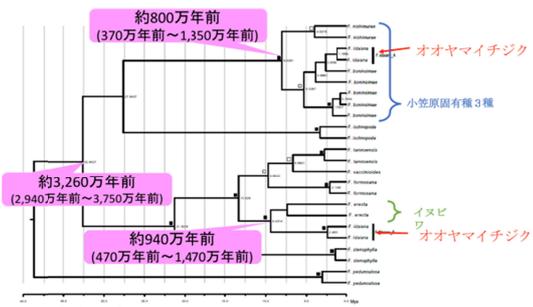


図4: TypeBの遺伝子から推定された分岐年代

~3,750 万年前) に分化したと推定され、イヌビワとオオヤマイチジクの配列の分岐年代は、約940万年前(95%HPD: 470万年前 ~ 1,470万年前)と推定された。

イヌビワとトキワイヌビワ、オオトキワイヌビワの分岐はどちらのタイプの系統樹も3000万年前後となり、これは先行研究で推定されている *Ficus* 節の分岐年代に相当する。オオヤマイチジクは、2つの系統のゲノムからなる異質倍数体だと考えられるが、得られた分岐年代が正しいとすると、かなり古い時代に分岐した親系統が雑種を形成し、倍数体化したことを示唆している。また、小笠原3種の起原は、約500~900万年前に遡ることが示唆された。Asami (1970)は、小笠原諸島が火山島として、現在の位置に定着して約400万年経っていると推定しており、植物が移入し始めたのもほぼ同時期であるとしている。一方、Ito (1998)によると、小笠原の固有種の多年草植物は、祖先種から約180万年前から320万年前に分岐したとしている。本研究の結果から、小笠原イチジク属植物の種分化はこれらの先行研究の推定よりも古い時期に遡る可能性もあることが示された。しかし、分岐年代の推定精度が低いことを考えると、さらに多くのデータを用いて検証する必要があると思われる。しかしながら、小笠原諸島にイチジク属植物が移入、定着したのは、諸島形成の初期であった可能性は高いと思われる。

オオヤマイチジクは4倍体植物であり、先行研究(Kusumi et al. 2012)より、異質倍数体である可能性が示され、雑種形成、染色体倍化を経て、種分化したことが示唆された。本研究でも、同様に異質倍数体であることを支持する証拠が得られた(-galactosidase 遺伝子)。ここで4倍体のオオヤマイチジク

が形成される過程を考えてみる。1つの仮説としてイヌビワと父系の祖先種が交雑して形成された小笠原の固有種の祖先種(2倍体)が固有種の種分化の際に倍數化し、オオヤマイチジクが形成された可能性が考えられる。この場合、小笠原の固有種3種は2つの系統由来の配列を持つことが予想される。葉緑体遺伝子座における分子系統学的解析では、小笠原の固有種3種がイヌビワに近い配列を持つことが報告されていること(Azuma et al. 2010; Kusumi et al. 2012)から、この仮説は支持されるが、各遺伝子座では、トキワイヌビワとオオトキワイヌビワとイヌビワが近縁となるトポロジーは発見できなかった。もう1つの仮説として、祖先系統での交雑は小笠原諸島内でおこり、同時に倍數化も起こりオオヤマイチジクが生じたということが考えられる。この場合、オオヤマイチジクだけが2つ系統由来の配列を持つことが予測される。今回、新たに増幅を行った *-galactosidase* 遺伝子座と *Aco1* 遺伝子座(Kusumi et al. 2012)のデータから得られたTypeBの分子系統樹の結果では、オオヤマイチジクは小笠原の固有種由来の遺伝子とイヌビワ由来の遺伝子の2つの分化した遺伝子を同一個体内に有していることが分かった。TypeBの分岐年代推定では、小笠原の固有種3種の種分化が始まったのが約800万年前(95%HPD: 370万年前~1,340万年前)、イヌビワとオオヤマイチジクの持つイヌビワに近い遺伝子が分岐したのは約940万年前(95%HPD: 470万年前~1,470万年前)であると推測されており、この結果は、雑種形成と固有種の種分化がほぼ同じ年代に起きていることを示唆している。これは、後者の仮説はより支持するものであり、葉緑体遺伝子座においてトキワイヌビワとオオトキワイヌビワがイヌビワに近い配列を持つていたのは、イントログレーションによるものと考えられる。また、オオヤマイチジクの同一個体内でTypeAやTypeBの系統樹を形成する遺伝子座が含まれている原因としては、交雑、倍數化後も両系統由来の配列が維持される遺伝子座と、欠失や相同組換えによって一方の系統由来の遺伝子が排除された遺伝子座が存在することによると考えられる。

(2) 核遺伝子の塩基配列を用いた、小笠原イチジクコバチ類の起源の解明

本研究で塩基配列を決定した28SrRNA遺伝子及び公開されているイチジクコバチ類の配列をもとに分子系統樹を作成した(図5)。他の3核遺伝子の配列からも分子系統樹を作成したが、ほぼ同じ系統関係を示していたため、28SrRNAの結果のみを示す。

イチジクコバチ類の分子系統樹の結果から、小笠原のトキワイヌビワから採集したコバチは、中国から東南アジアにかけて分布する *F. ischnopoda* から採集されたコバチとクレードを形成した(ブートストラップ59%)。ま

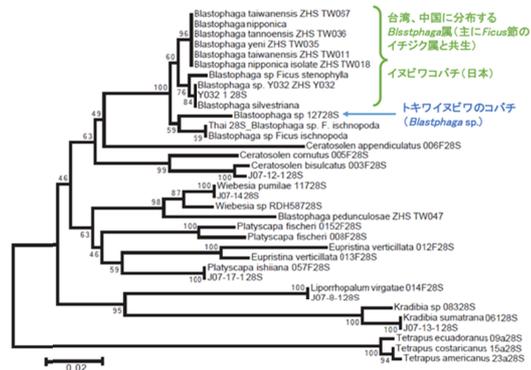


図5:28SrRNAから推定されたイチジクコバチ類の系統樹

た、このクレードは他の3核遺伝子を用いて作成した分子系統樹でも再現されている。一方、イヌビワコバチ(*B. nipponica*)は、台湾や中国に分布する他の *Blastophaga* 属のコバチ類とクレードを形成した(ブートストラップ60%)。さらに、上記のクレードが成立すると仮定した系統樹を用いて分岐年代の推定を行ったところ、トキワイヌビワのイチジクコバチとイヌビワコバチとの分岐年代は、約1,550万年前(95%HPD: 733万年前~2,480万年前)と推定された。このクレードの事後確率は、1.0であり高い値を示した。また、トキワイヌビワのイチジクコバチと *F. ischnopoda* のイチジクコバチは、約1,060万年前(95%HPD: 457万年前~1,750万年前)に分かれたことが推測されたが、このクレードの事後確率は低く、0.76となっていた。現在、日本に分布する *Blastophaga* 属はこのイヌビワコバチのみであることから考えると、小笠原に定着したイチジクコバチが日本から移入した可能性は低いと考えられる。一方で、*F. ischnopoda* から採集されたコバチとトキワイヌビワのコバチがクレードを形成したことは興味深い。*F. ischnopoda* のイチジクコバチは、未記載種であるため、詳細な分布地域は分からないが、共生するイチジク属植物(*F. ischnopoda*)の分布域は、中国南西部からマレー半島、インドの北東部であることが分かっている(Berg et al. 2011)。従って、*F. ischnopoda* のイチジクコバチも同じ分布域を持つとすれば、小笠原のイチジクコバチは中国南西部、東南アジアのイチジクコバチを起源とする可能性が示唆された。

(3) 小笠原固有種3種のゲノムワイドな種内、種間変異解析(RAD-seq法)

RAD-seq法による塩基配列多型解析
24個体のDNAからRAD-seqライブラリを作成し、Miseqにより塩基配列の解析を行った。有効なリードの数(クオリティ値の低いリードや重複等を除いたもの)は、個体あたり約5912850リードとなった。この有効リードをstacksプログラムによりdenovoアセンブルし、遺伝子座を決定した。depth(リード

の厚み)が3リード以上ある遺伝子座は個体あたりの平均で158482.4個得られた。また、サイト当りの平均 depth は32.64リードであった。得られた遺伝子座について多型サイトの検出を行ったところ、多型的な遺伝子座は個体あたり平均15885個、また各個体平均23449個のSNPが検出された。次に、種内種間で共有する座(243426個)を用いて、遺伝的多様性の比較、オオヤマイチジクの遺伝子喪失の頻度の推定、種内種間の集団構造、種間の遺伝的分化の評価を行った。

遺伝的多様性の比較

計4276882サイトを用いて、塩基多様度()、平均ヘテロ接合度観察値、期待値(Obs. Het., Exp. Het.) F_{IS} の推定を行った(表1)。

| | 平均 個体数 | Obs. Het. | Exp. Het. | π | F_{IS} |
|--------|-----------|--------------|--------------|--------|----------|
| FB(2x) | 7.5251 | 0.0014 | 0.0013 | 0.0014 | 0.0003 |
| FN(2x) | 7.7882 | 0.0015 | 0.0015 | 0.0017 | 0.0003 |
| FI(4x) | 6.8659 | 0.0008 | 0.0006 | 0.0007 | -0.0002 |

表1. 小笠原固有イチジク属植物の遺伝的多様性
FB:トキワイヌビワ, FN:オオトキワイヌビワ, FI:オオヤマイチジク
トキワイヌビワについては、(1)の解析から5遺伝子座の平均の値が得られている(0.0020)。一方、RAD-seq解析により得られた値は0.0014となり、2つの解析でほぼ同程度の値となった。次世代シーケンサーデータの解析では、変異とシーケンサーエラーの同定を適切に行う必要があるが、今回の解析結果の場合、シーケンサーエラーによる統計量の推定誤差は小さいと思われる。小笠原固有種3種を比較すると、異質倍数体であるオオヤマイチジクの値が最も低い値となり、この結果は(1)の核遺伝子から得られた結果と一致している。これはオオヤマイチジクの生息地が母島の狭い地域に限られており、本来、遺伝的多様性が非常に低い種であるためだと考えられる。また、近交係数(F_{IS})の値は3種ともほぼ0の値をとっており、近交度が極度に高まっている状況にはないことを示している。

種内種間の集団構造、種間の遺伝的分化各個体の遺伝子型データをもとに主成分分析(PCA)を行った。その結果を図6、図7に示す。第1主成分と第2主成分を軸とする場合(図6)オオヤマイチジク(FI)、イヌビワ(FE)、と小笠原2倍体種(トキワイヌビワ(FB)、オオトキワイヌビワ(FN))の3つのクラスターに分かれた。従って、小笠原イチジク属植物では、4倍体種と2倍体種間に強い遺伝的分化があることが示唆された。また、第3主成分と第4主成分を軸とする場合(図7)、トキワイヌビワがクラスターを形成する傾向が見られた一方で、オオトキワイヌビワは第3主成分と第4主成分ともに分散が大きく、はっきりとした傾向が示されなかった。次に、種間の固定指数(F_{ST})を推定したところ、表2の結果が得られた。やは

り、4倍体種と2倍体種の分化の程度が大きく、2倍体種間では分化が小さいことが示された。これらの結果から、4倍体種と2倍体種の間ではほぼ完全な生殖隔離が生じていることが明らかとなった。植物では近縁な4倍体種と2倍体種間で遺伝子流動が起こることが観察されており、染色体数の違いが必ずしも完全な生殖隔離を引き起こすとは限らない。小笠原のイチジク属植物の場合、遺伝的な要因(染色体数の違い)に加え、ポリネーターによる隔離も起こっている可能性

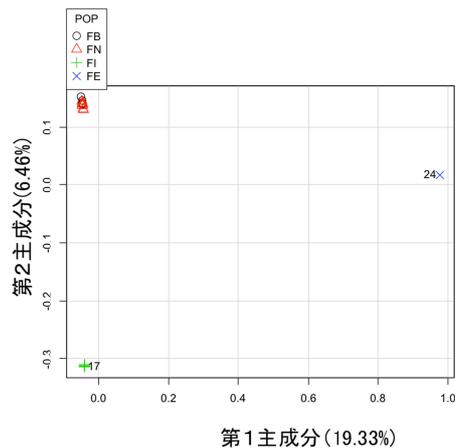


図6 PCAによる小笠原3種の遺伝的分化の解析-1

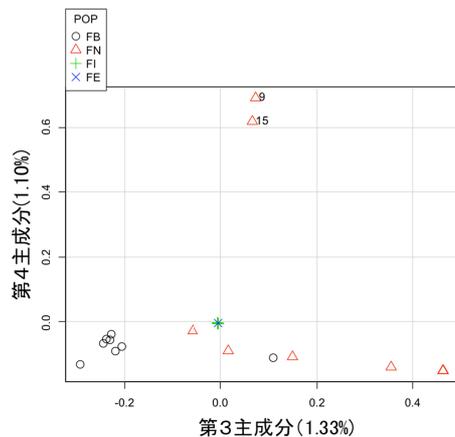


図7 PCAによる小笠原3種の遺伝的分化の解析-2

| F_{ST} | FB(2x) | FN(2x) |
|----------|--------|--------|
| FN(2x) | 0.028 | - |
| FI(4x) | 0.314 | 0.279 |

表2. 小笠原固有イチジク属3種の遺伝的分化
FB:トキワイヌビワ, FN:オオトキワイヌビワ, FI:オオヤマイチジク
が考えられることから、今後これらの固有種3種のイチジクコバチ類の遺伝的分化の程度を解析し、4倍体種と2倍体種生殖隔離の要因について明らかにしたい。また、2倍体種は、小笠原諸島の複数の島に分布しているが、今回は十分なサンプル数を用いてRAD-seq解析を行うことができなかったため、島間の遺伝的分化について詳細な解析を行うことができなかった。今後は、Mig-seq法等を用いて地理的な分化の有無についても解明したいと考えている。

オオヤマイチジクの遺伝子喪失の頻度の推定

オオヤマイチジクの各遺伝子座におけるハプロタイプは、小笠原固有2倍体種に由来する場合(図8B)、イヌビワに由来する場合(図8A)、両方の系統の配列もつ場合(図8C)に分けることができる。そこで、4種の多型のパターンからそれぞれのケースの頻度を推定した。推定には、イヌビワ及び小笠原固有

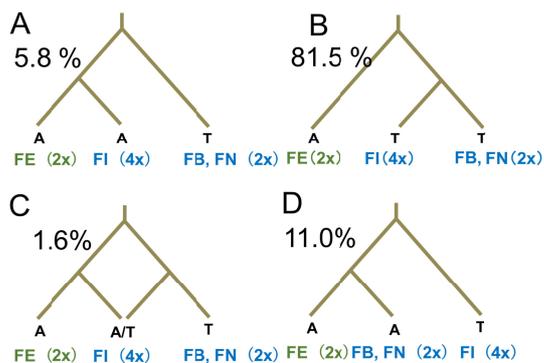


図8:オオヤマイチジク (FI, 4x)、小笠原固有2倍体種 (FB, FN)、イヌビワ(FE) の変異パターン

2倍体種の種内で固定しているサイトを用い、その塩基のパターンを比較した。(図8)。当初は、図8Cのパターン(オオヤマイチジクが両方の系統の配列もつ)が高い頻度で観察されるものと期待していたが、予想に反しその頻度は1.6%程度と低いものであった。しかし、(1)の解析では7つの遺伝子座のうち2つでこのCのパターンが観察されており、RAD-seqで解析した結果と矛盾が生じている。これは、古くに分化した2つの系統由来のハプロタイプが同一の祖先をもつ遺伝子座として検出されなかったことが一つの原因と考えられ、リードのアセンブル方法に検討が必要であると考えている。

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)

- Kusumi, J., Su, Z.-H., 2014. Isolation and characterization of 15 polymorphic microsatellite markers for the fig-pollinating wasp, *Blastophaga nipponica* (Hymenoptera: Agaonidae). *Appl Entomol Zool*, 査読あり 49, 487-491. DOI; 10.1007/s13355-014-0267-x
- Kusumi, J., Tsumura, Y., Tachida, H., 2015. Evolutionary rate variation in two conifer species, *Taxodium distichum* (L.) Rich. var. (baldcypress) and *Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L.f.) D. Don (Sugi, Japanese cedar). *Genes & Genetic Systems* 90, 査読あり 305-315. DOI; 10.1266/ggs.14-00079
- Kusumi, J., Ichinose, M., Takefu, M.,

Piskol, R., Stephan, W., Iizuka, M., 2016. A model of compensatory molecular evolution involving multiple sites in RNA molecules. *Journal of Theoretical Biology* 査読有 388, 96-107. DOI; 10.1016/j.jtbi.2015.10.008

〔学会発表〕(計 4 件)

- 蘇 智慧, 楠見 淳子, イチジク属植物とイチジクコバチの地域的分化, 昆虫DNA研究会, 2014.05. 東京、東京大学本郷キャンパス
- 浦志 知恵, 楠見 淳子, 蘇 智慧, 小笠原固有イチジク属植物の起源, 第16回日本進化学会年会, 2014.08.22. 大阪、高槻
- 楠見 淳子, 館田 英典, 針葉樹ヌマスギ、スギの進化速度, 日本遺伝学会第86回大会, 2014.09.18. 滋賀、長浜バイオ大学
- 森口夏季, 内山憲太郎, 宮城竜太郎, 高橋 文, 田村浩一郎, 津村義彦, 手島康介, 楠見 淳子, 館田 英典, アンブリコンシーケンス解析による塩基配列多型データに基づく針葉樹スギ (*Cryptomeria japonica*) の集団構造の推定, 日本遺伝学会第87回大会, 2015.09.26. 宮城、東北大学川内北キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠見 淳子 (KUSUMI, Junko)
九州大学・比較社会文化研究院・准教授
研究者番号: 20510522

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

蘇 智慧 (SU, Zhi-hui)
株式会社生命誌研究館・研究員
研究者番号: 40396221