

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26304012

研究課題名(和文)比較保全ゲノミクスに基づくニューカレドニアの生物多様性創出機構解析と保全

研究課題名(英文) Analysis and conservation of the biodiversity of New Caledonia based on comparative conservation 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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニューカレドニアにおける生物多様性の実態と創出メカニズムを明らかにするために、ニューカレドニアにおいて、多様な形質を示す30種程度に種分化しているOxera属(シソ科)を解析対象分類群として、保全ゲノミクスの解析を行った。RNA-seqによって翻訳されている塩基配列情報を解読・解析することで、種分化や環境適応に關与している可能性のある遺伝子座を推定した。Oxera属のほぼ全種について網羅的なサンプリングを行い、縮約ゲノム情報を元に、有効な保全策につなげるために、種間関係、種内の遺伝的分化、種内個体群の分岐時期と有効サイズなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the current situation of biodiversity in New Caledonia, we carried out conservation genomics analysis for semi-endemic genus Oxera (Lamiaceae) which consists of ca. 30 species with distinct traits in their morphology and ecology. By analyzing transcriptomes obtained from RNA-seq, we inferred several candidate loci that may be involved in speciation and environmental adaptation. In order to construct effective conservation measures, phylogeny of species, genetic differentiation between intraspecies populations, effective population sizes, demographic histories were inferred based on constructed genomic information for exhaustively collected samples of Oxera species and populations.

研究分野：保全遺伝学

キーワード：生物多様性保全 トランスクリプトーム 遺伝的分化 保全単位

### 1. 研究開始当初の背景

オーストラリア東方 1,500km の太平洋に位置する仏領ニューカレドニアは、四国程度の面積にもかかわらず、3,000 種を超える維管束植物が生存しており、そのうち 77% が固有種、属レベルで見ても 15% が固有属という、驚くべき独自性を保持しており、生物多様性の博物館とも呼ばれている。

ニューカレドニアは、急峻な地形が多いうえに、降雨も島の東西で不均一である。また、ニッケル等金属に富む超塩基性土壌が南部を中心に分布している。これら複数の要因の組合せによって、異なった微環境がモザイク状に配置している。その微環境に適応して、極端な例では一つの山地や斜面など、きわめて狭いエリアで種分化が起こり、固有種が成立している。

生物多様性が高く、特徴的な固有種が多い事に加え、その多くが比較的近年に種分化し、更に、微環境に適応した局所固有種も多数存在することから、ニューカレドニアは種分化や生物多様性創出機構を解析する上で理想的な場所といえる。しかし、その生物多様性は、鉱業採掘等の人為インパクトによって危機的状況にあり、遺伝解析に基づく合理的な保全が早急に必要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、ニューカレドニアにおいて種分化が進み、20 種もの多様な固有種が属内に含まれるシソ科の *Oxera* 属を対象に、次世代シーケンサーを用いて、(1) RNA-seq で種間のトランスクリプトーム比較を行い種分化プロセスの解析を行うとともに、(2) 集団レベルでは RAD-seq や MIG-seq による縮約されたゲノム情報をもとに、保全ゲノミクス解析を行うことで、種間と種内の個体群における遺伝的關係、遺伝的空間構造を把握し、適切な保全単位を明らかにする。これらのアプローチを通して、ニューカレドニアにおける生物多様性創出機構の解析と、適切な保全対策に生かすことのできる遺伝的情報を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) RNA-seq のトランスクリプトーム解析による解析では、*Oxera* 属 14 種を対象に成葉および花組織を現地に採取し、RNA の抽出を行った。シーケンサーには HiSeq2000 (イリミナ社) を用い、100bp ペアエンドでデータを取得した。得られた発現遺伝子の塩基配列情報は、クリーニングとトリミングを行ったのち、種毎に de novo アセンブルを行った。その後 CD-HIT を用いてクラスタリングを行い *Oxera* 属の代表配列を作成した。代表配列のうち、アミノ酸配列の長さが 100 (300bp) 以下のものおよび nr データベースへの blast 解析で緑色植物に相同性の認められない配列は除外した。

得られた代表配列を元に、種間の多型サイ

トを検出し、以降の解析に用いた。種間の変異については、同義置換、非同義置換の比を計算し、遺伝子系統樹のある枝で正の自然選択が働いたかどうかを検定する枝モデルによって解析を行った (PAML (Yang, Z 1997))。自然選択が検出された遺伝子に関しては、TAIR10 データベースに対する相同性検索により機能を推定した。

(2) ゲノムの縮約解読は RAD-seq および、研究分担者らが開発した MIG-seq (Suyama & Matsuki 2015) を用いて行った。

RAD-seq はゲノム情報のない生物を対象に、制限酵素処理したゲノム断片を解読することで、ゲノム全体を縮約解読するものであり、数千~数万遺伝子座の情報を得ることができるが、解析には高品質の試料が必要である。これに対して、MIG-seq は解析遺伝子座数は数百~数千と少ないものの、短期間で安価・簡便に数百座程度以上の SNP (一塩基多型) マーカーを得ることができるものである。

そこで、本研究における比較保全ゲノミクス解析として、少数サンプルを対象として多数の座を対象とした解析を行うためには RAD-seq 法を用い、多数のサンプルを対象とする解析には MIG-seq 法を用いることとして手法を使い分けた。

ゲノム縮約情報解読のために、ニューカレドニア (一部バヌアツを含む) に生育する *Oxera* 属 28 種 (6 種の推定新種を含む) の 139 集団から計 1050 個体の葉サンプルを採取した。なお、このうち *O. balladica* (34 集団 467 個体)、*O. pancheri* (12 集団 132 個体)、*O. rugosa* (4 集団 60 個体) については、既知の全集団からほぼ全個体を対象として葉サンプルを採取し、種全体の遺伝的情報を解析可能なサンプルとした。

### 4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析に関しては、RNA 解読の結果、1 種あたり平均 86.2 Mbp の情報が得られ、アセンブルを行った結果、平均 73,000 のコンティグにまとめ、平均配列長は 821.5 bp となった (表 1)。

このうち、系統関係の明らかになっている 4 種 (*O. robusta*, *O. inodora*, *O. pancheri* *N'go*, *O. microcalyx*) の情報を用いてクラスタリングおよび読み枠予測を行った結果、約 76,000 の代表配列を得た。4 種揃ってデータが得られ、種間で多型の見つかった約 30000 の遺伝子に関して dN/dS 解析を行った。

遺伝子系統樹のある枝で正の自然選択が働いたかどうかを検定する枝モデルの元で解析した結果、それぞれの種を分ける枝において、計 70 遺伝子で有意な正の自然選択が検出された (図 1)。

TAIR10 データベースに対する相同性検索の結果、これらの遺伝子には金属や硫酸塩などの輸送に関わると予想される遺伝子が複数含まれていた (表 2)。

NC はニッケルの貫入によって生じた超塩基性土壌が島内全域に複雑に分布しており、本属の種分化に土壌環境に対する適応が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

表1. *Oxera* 属の発現遺伝子のアセンブルの結果 (Trinity assembler (Grabherr et al., 2011))

Species name	Number of Genes	Av. contig length
<i>O. robusta</i>	67,918	890.1
<i>O. inodora</i>	63,927	818.4
<i>O. pancheri N'go</i>	71,512	869.1
<i>O. pancheri kuebini</i>	74,367	877.7
<i>O. microcalyx</i>	62,255	796.7
<i>O. gohapi1</i>	73,956	1017.4
<i>O. gohapi2</i>	72,919	804.4
<i>O. puruchella</i>	62,872	720.2
<i>O. geroensis</i>	72,922	723.2
<i>O. baladica</i>	100,451	785.7
<i>O. macrocalyx</i>	79,475	733.1

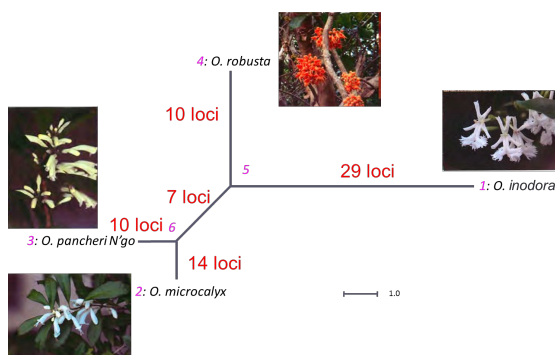


図1. PAML 解析により各枝で検出された正の自然選択が働いた遺伝子座の数

表2. *O. inodora* の枝において検出された上位4つの遺伝子のTAIR10 へのblastの結果および推定された機能

gene id	ω	Description	e-Value	GO Names list
o202_c289_85_g2_j2	7.9	cyclic nucleotide gated channel 5	0.00E+00	P:pollen tube growth; F:calcium channel activity; F:inward rectifier potassium channel activity; P:response to cadmium ion; P:cellular calcium ion homeostasis; P:potassium ion transport; C:integral component of plasma membrane
o202_c165_91_g1_j1	4.3	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily	2.14E-157	P:multicellular organism development; C:intracellular membrane-bounded organelle; C:cytoplasmic part
o202_c294_42_g3_j2	2.9	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family	1.03E-50	P:sulfate transport; F:inositol heptakisphosphate kinase activity; F:inositol hexakisphosphate kinase activity; P:cellular response to sulfate starvation; P:osmosensory signaling pathway; P:pollen development
o204_c319_44_g2_j2	2.9	RNA-binding KH domain-containing	1.46E-135	P:mRNA transcription; P:negative regulation of long-day photoperiodism, flowering; P:regulation of nitrogen compound metabolic process; P:positive regulation of flower development; P:negative regulation of short-day photoperiodism, flowering;

(2)ゲノム縮約解読による比較保全ゲノミクスに関して、まず、*Oxera* 属 28 種の種間関係を明らかにした。全 1,010 サンプルを対象としてゲノムワイドな塩基配列情報を取得し、得られた 2,655 の SNP 座をもとにクラスター解析したところ、これまでに推定されていた情報によく合致した種間関係情報が得られた。ここでは、そのうちごく一部のデータである 14 種 186 サンプルから得られた 1685 の SNP 座を用い、サンプル間の遺伝的関係を二次元平面上に配置した主座標分析図を示す (図2)。異なるシンボルで示された各種のサンプルが、それぞれ種ごとに明瞭なクラスターを形成し、近縁な種間は近い位置に配置された (例えば図左端では、近縁とされている新種と *O. coronata* がごく近い位置に配置されている)。これらの情報を用いれば分岐図による系統関係の推定も可能であり、現在は得られた結果の詳細な検討を行っている。

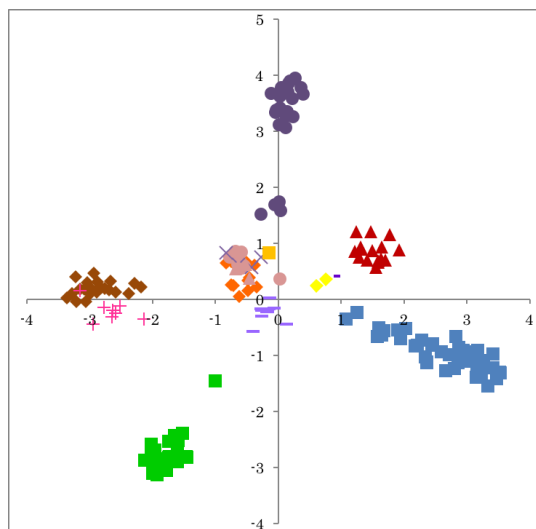


図2 *Oxera* 属 14 種 (推定新種 3 種を含む) 186 サンプルを対象とした MIG-seq 分析によって得られた 1685 の SNP に基づく主座標分析図。異なるシンボルは異なる種を表す。

(3) *O. baladica* は、ニューカレドニアの広範囲に分布する種であるが、地域ごとに局所的な小集団として存在し、また、それぞれの小集団には外部形態や環境適応において分化したと考えられる個体が生育している。これらの個体について、適切な保全単位を明らかにするために、ゲノム縮約解読情報を用いて集団遺伝学的解析を行った。その結果、大きく分けて島の北部・中部・南部で遺伝的に明瞭な違いが認められた (図3)。

また、島の北部・中部・南部それぞれの地域内においても、ほとんどの分集団ごとに異なる遺伝的組成が存在していた。ここでは、一例として南部地域における遺伝的地域性を示す遺伝的集団構造解析 (ストラクチャー解析) の結果を示す (図4)。

*O. baladica* と同様にして、既知の全分布

集団を対象とした解析を行った *O. pancheri* および *O. rugosa* についても、同様に明瞭な遺伝的地域集団分化が認められた。これらの結果により、各地域集団を異なる単位として保全する必要性が裏付けられた。

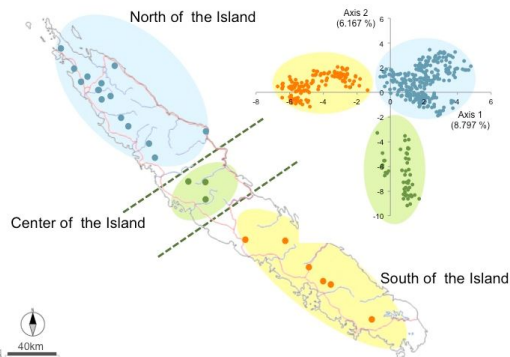


図3 ニューカレドニアの各所に分布する *O. baladica* の全既知集団（地図上に丸で表示）から採取した467個体の1,685個のSNP座の情報に基づく主座標分析図（右上）。点および背景の楕円の色は、地図上の点および楕円の色に対応し、島の北部・中部・南部で遺伝的に異なることが示された。

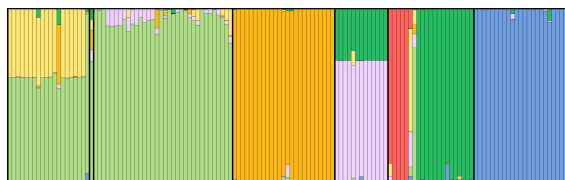
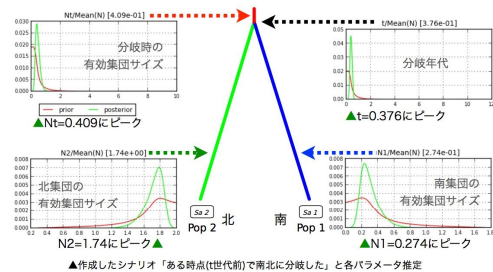


図4 ニューカレドニア南部に分布する *O. baladica* の7集団（図内に太線の縦棒で境界を表示）の個体のSNP座の情報に基づく遺伝的集団構造解析（ストラクチャー解析）。各個体内の遺伝的組成を、個体ごとに細い縦長の100%積上縦棒グラフで色分けして表している。ここでは、7つの遺伝的要素の割合を表示しており、色の違いが遺伝的違いを示している。

(4) ニューカレドニア全域に分布する *O. baladica* は、MIG-seq や RAD-seq の縮約ゲノム情報に基づいた解析で、大きく南北集団に分断されることが明らかになった。これら2集団について、RAD-seq から得られた情報をもとにコアセメント解析を行い、集団サイズの変遷、南北集団の分岐時期と分岐時の集団サイズなどを推定した。

その結果、分岐時期は113世代前であり、北部集団の方が南部集団よりも有効サイズが10倍近く高いことが明らかになった（図5）。



▲作成したシナリオ「ある時点(世代前)で南北に分岐した」と各パラメータ推定

○結果より2集団合計で  $N_e=450-600-3100$  とすると  $\text{mean}(N)=225-300-1550$  各パラメータはそれぞれ、

$N1(\text{南}N_e)$	$=300 \times 0.274 = 82.2$	(61.7-82.2-424.7)
$N2(\text{北}N_e)$	$=300 \times 1.74 = 522$	(391.5-522.0-2697)
$t(\text{分岐年代})$	$=300 \times 0.376 = 112.8$ 世代前	(84.6-112.8-582.8)
$Nt(\text{分岐時}N_e)$	$=300 \times 0.409 = 122.7$	(92.0-122.7-634.0) と推定された

図5 DIYABC (2.1.0, Cornuet et al. 2014) による *O. baladica* 南北集団の分岐時期、有効集団サイズの推定

## 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）

〔学会発表〕(計10件)

満行知花、網本良啓、陶山佳久、MIG-seq 法による熱帯林樹木の保全遺伝学的研究、第128回日本森林学会大会、2017年3月26-29日、鹿児島大学農学部（鹿児島県鹿児島市）

藤田琴実、満行知花、網本良啓、井鷲裕司、Gildas Gâteblé、陶山佳久、ニューカレドニア産希少植物 *Oxera* 属樹種間・種内の遺伝的關係解析、第64回日本生態学会大会、2017年3月14-17日、早稲田大学早稲田キャンパス（東京都新宿区）

内山憲太郎、上野真義、成田あゆ、Gildas Gâteblé、陶山佳久、永野惇、井鷲裕司、著しい適応放散を示すニューカレドニア産 *Oxera* 属植物（シソ科）の保全ゲノミクス、第64回日本生態学会大会、2017年3月14-17日、早稲田大学

藤田琴実、満行知花、網本良啓、井鷲裕司、Gildas Gâteblé、陶山佳久、ニューカレドニア産希少植物 *Oxera* 属樹種の保全遺伝学的研究、日本生態学会東北地区会第61回大会、2016年10月29-30日、ZAO センタープラザ（山形県山形市）

Kotomi Fujita, Yuji Isagi, Gildas Gâteblé, Manato Fushimi, Yoshihisa Suyama, Conservation genetics of three endangered species of the genus *Oxera* in the south of New Caledonia. The 13th International Symposium on Integrated Field Science, 2016年3月10日、東北大学大学院農学研究科（宮城県仙台市）

成田あゆ、Gildas Gâteblé、伊津野彩子、

永野惇、手塚あゆみ、井鷲裕司、ニューカレドニア産希少シソ科木本 *Oxera baladica* の集団遺伝構造、第 47 回種生物学会シンポジウム、2015 年 12 月 4 日～6 日、かんぼの宿 岐阜羽島（岐阜県羽島市）

内山憲太郎、上野真義、Gildas Gâteblé、陶山佳久、井鷲裕司、トランスクリプトームデータから探る種分化の歴史 - 島嶼生態系での適応放散の事例から、森林遺伝育種学会第 5 回大会、2015 年 11 月 16 日、東京大学農学部キャンパス 弥生講堂アネックス・セイホクギャラリー

Yuji Isagi, Biological conservation by using genetic information, la Fontaine d'or de Nouvelle-Calédonie. 2015 年 11 月 12 日、Mairie de Koumac (ニューカレドニア)

Yoshihisa Suyama, Genetic differentiation among local populations of *Oxera baladica*. *Oxera baladica*, la Fontaine d'or de Nouvelle-Calédonie. 2015 年 11 月 12 日、Mairie de Koumac (ニューカレドニア)

Yuji Isagi, Demographic history of *Oxera baladica*, la Fontaine d'or de Nouvelle-Calédonie. 2015 年 11 月 12 日、Mairie de Koumac (ニューカレドニア)

[図書] (計 1 件)

Isagi Y, Kaneko S (2014) Ubiquitous genotyping for conservation of endangered plant species. In Nakano S, Yahara T and Nakashizuka T (Eds.) Integrative Observations and Assessments. Springer, pp. 311-325.

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

陶山 佳久 (SUYAMA, YOSHIHISA)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：60282315

内山 憲太郎 (UCHIYAMA, KENTARO)  
森林総合研究所・森林遺伝研究領域・研究員  
研究者番号：40501937