

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850098

研究課題名(和文) ニューカレドニアにおけるヒノキ科2属の平行的な生態的種分化の解明

研究課題名(英文) Lineage diversification of two Cupressaceae conifer genera in New Caledonia

研究代表者

阪口 翔太 (Sakaguchi, Shota)

京都大学・人間・環境学研究科・助教

研究者番号：50726809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではニューカレドニア島に侵入した後に、蛇紋岩土壌と乾性低木林への適応進化が共通して起きたヒノキ科2属に着目し、RNA-seq解析に基づいてそれらの種分化に関わったと考えられる適応遺伝子を特定した。その結果、2属で共通して検出された遺伝子はなかったが、本島の貧栄養土壌への適応に係ると考えられる遺伝子がCallitris属で見つかった。また、Callitris sulcataについて集団遺伝解析を実施し、河川沿いの低地湿性林に分布する本種の集団分化には、複雑な山地地形が隔離要因として重要であったことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This project studied two conifer genera of Callitris and Libocedrus in Cupressaceae to detect the genes which would have played roles in environmental adaptation in New Caledonia. RNA-seq based phylogenetic analyses provided evidences for accelerated molecular evolution in the genes including macroelement transporter and stress-response functions. Population demographic analysis was particularly performed for one Callitris species to show complex river system and mountain barriers promoted significant population differentiation even for wind-pollinated conifers in a small geographic range.

研究分野：植物生態進化学

キーワード：針葉樹 ニューカレドニア 蛇紋岩 進化

1. 研究開始当初の背景

ニューカレドニア島は世界有数の針葉樹ホットスポットであり、進化的に長い歴史をもつ古固有種と比較的最近放散した系統の両方によってその多様性が構成されている (Jaffré et al. 2010, Biol. Cons.). とくに顕著な放散を遂げた系統は進化学者の注目を集め、系統学的な解析によって種分化の歴史が明らかにされてきた (Setoguchi et al. 1997; Gaudeul et al. 2012 Am. J. Bot.). しかし、ニューカレドニア島における針葉樹の種分化プロセスについては未解明の部分が多く、「遺伝的分化の起こりにくいはずの風媒性樹木が、なぜこのような小さな島で放散を遂げられたのか」、そして「種分化において遺伝的適応はどのような役割を果たしたのか」といった課題が残されている。

ニューカレドニア島で種分化を遂げた針葉樹には、全球分布するヒノキ科も含まれており、2 属 (*Callitris* 属と *Libocedrus* 属) がそれぞれ 3 種に種分化している。これらの種は、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しており、1 回の長距離放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ことが、申請者らの系統解析によって確かめられている (Crisp, M., Sakaguchi, S. et al. in preparation). これまで、ヒノキ科において放散が起こる要因として提案されてきたのは、「乾燥気候に対する適応の獲得」 (e.g. Mao et al. 2012 PNAS) であり、実際に北半球の *Juniperus* 属や南半球の *Callitris* 属などでは、乾燥気候への生理生態的適応が放散の引き金になったことが知られている (Pittermann et al. 2012 PNAS). しかし、ニューカレドニアに分布するヒノキ科 2 属は全て湿潤な環境に分布しているため、その種分化に乾燥適応が関係したとは考えにくい。

これら 6 種は島の中で飛び地状に分布している蛇紋岩地塊にのみ生育している。蛇紋岩は鉄やマグネシウム、さらにニッケル・クロムなどの植物にとって有害な重金属を高濃度で含んでいる。加えて、蛇紋岩には植物の生長に欠かすことのできない元素 (N, P, K, Ca, Al) が乏しく (Jaffré et al. 1987 Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.), 植物集団に対して選択要因として強く働くことが知られている (e.g. Turner et al. 2010, Nature Gen.). さらに、各属内での生態ニッチの分化に着目すると、標高傾度と植生型において共通した生態的分化が存在する。一つ目の標高傾度については、低標高地にのみ出現する種 (*C. sulcata* と *L. yateensis*) と高標高地に出現する種があり (*C. neocaledonica* と *C. pancheri*; *L. austrocaledonica* と *L. chevalieri*), 予備的な系統解析の結果からは低標高地に出現する種が最も初期に分岐したことが分かっている (Crisp, M., Sakaguchi, S. et al. in preparation). また、高標高地に分布する後者の種群の中には、樹高が 5m 程度の低木林

(Maquis) にのみ生育する種が含まれ、こうした種では葉が肥厚したり、植物体が小型化する傾向が共通して見られる。よってこうした観察から、ニューカレドニア島で蛇紋岩適応を遂げた *Callitris* 属と *Libocedrus* 属の祖先系統の一部が、後に高標高地の低木林という特殊環境へと生態ニッチをシフトさせることで、限られた地塊面積の中で種分化を遂げた可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ニューカレドニア島に侵入した後に、蛇紋岩土壌と乾性低木林への適応進化が共通して起きた、ヒノキ科 2 属 (*Callitris* 属と *Libocedrus* 属) に着目し、それらの生態的種分化に関わった適応遺伝子を生態ゲノミクスによって特定することを目的とした。また島内での種分化に関係する環境要因を特定するために、低地に集団が点在している *Callitris sulcata* について集団間の遺伝的分化に関連する要因を解析した。

3. 研究の方法

研究対象種の自生地および域外保全個体から得た RNA サンプルに基づいて、発現遺伝子データを取得し、ニューカレドニア島外の姉妹系統とアミノ酸配列を比較することで自然選択の痕跡を探索した。*Callitris* 属と *Libocedrus* 属では、ニューカレドニア産 3 種と近縁な姉妹系統がオーストラリアとニュージーランドに分布している。そこで、そうした姉妹系統と島内種を対象として (合計 8 種), 新規に RNA-seq 解析を行った。

また新規に開発した葉緑体エンリッチメント解析と RNA-seq データから、父性遺伝する葉緑体 SSR マーカーと両性遺伝する核 SSR マーカーを対象種について開発を行った。マーカーが確立できた *C. sulcata* について、現在確認されている全集団から集団遺伝試料を採取し、その集団分化過程を解析した。

4. 研究成果

ニューカレドニア島内の 3 種間では塩基置換数が限られており、第三紀以降の短い間に種分化が起こったことが明らかになった。その一方で、島外の姉妹系統との間ではある程度のアミノ酸置換が蓄積されたことから、姉妹系統と分化した後に島内で種分化するまでの系統樹における枝に着目し、この枝で非同義置換が集中して起きている遺伝子をスクリーニングすることとした。解析の結果、*Callitris* 属では 6,689 contig の中から 54 個の遺伝子が、*Libocedrus* 属では 5,072 contig から 37 遺伝子が抽出された。これらの中には無機リン酸トランスポーターなど、ニューカレドニアにおける特殊環境との関連が推察されるような機能をもつ遺伝子が含まれており、島内での種分化前に自然選択の影響を受けた候補遺伝子である可能性が考えられた。

Callitris 属で初期に分岐した *C. sulcata* について、現在確認されている全集団から集団遺伝試料を採取し、その集団分化過程を解析した。集団遺伝解析のために、新規に 14 座の核 SSR マーカーと 5 座の葉緑体 SSR マーカーを開発した。葉緑体 SSR の開発にあたっては、次世代シーケンサーを利用して本種の葉緑体ゲノム（コンティグ長 131,609bp）を決定し、そこから 59 の SSR 領域を単離、5 座の多型マーカーを得た。集団の遺伝的多様性は、核 SSR ヘテロ接合度が 0.679-0.755 と高いレベルが推定された一方で、3 つの河川沿いに隔離されている集団間では高い分化度を示した（核 SSR $G'st=0.509$, 葉緑体 SSR $Gst=0.148$ ）。さらに、河川からの距離・地形変量を考慮した分布予測モデルに基づいて集団間の抵抗距離を計算し、遺伝的分化との関係を調べたところ、単純な地理的距離よりも相関係数が高まった。また、隣接する河川間での遺伝的分化は約 3-5,000 世代前に起こり、祖先集団からの分化後に集団サイズが減少したことが、集団動態モデリングから示された。このことから、河川沿いの低地湿性林に分布する本種の集団分化には、ニューカレドニアの複雑な山地地形が隔離要因として重要であったことが示された。

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 11 件)

1. Sakaguchi, S., Worth, J., Jordan, G., Thomas, P. and Ito, M. (2014) Development of nuclear microsatellite markers for the Tasmanian endemic conifer *Diselma archeri* Hook. F. (Cupressaceae), Conservation Genetics Resources (doi: 10.1007/s12686-014-0368-4), 査読有り。
2. Sakaguchi, S., Worth, J., Jordan, G., Thomas, P. and Ito, M. (2014) Development of nuclear and mitochondrial microsatellite markers for the relictual conifer genus *Athrotaxis* (Cupressaceae), Conservation Genetics Resources (10.1007/s12686-014-0400-8), 査読有り。
3. Worth, J., Williamson, G., Sakaguchi, S., Nevill, P., Jordan, G. (2014) Environmental niche modelling fails to predict Last Glacial Maximum refugia: niche shifts, microrefugia or incorrect palaeoclimate estimates?, Global Ecology and Biogeography 23, 1186-1197, 査読有り。
4. 岩崎貴也・阪口翔太・横山良太・高見泰興・大澤剛士・池田紘士・陶山佳久 (2014) 地理情報システム技術を用いた歴史生物地理学的解析. 日本生態学会誌 64, 183-199, 査読有り。
5. Sakaguchi, S., Lannuzel, G., Fogliani, B., Wulff, A. S., L'Huillier, L., Kurata, S., Ueno, S., Isagi, Y., Tsumura, Y., Ito, M. (2015) Development of nuclear and chloroplast microsatellite markers for the endangered conifer *Callitris sulcata* (Cupressaceae) Applications in Plant Sciences 3(8) (<http://dx.doi.org/10.3732/apps.1500045>), 査読有り。
6. Sakaguchi, S., Sugino, T., Tsumura, Y., Ito, M., Crisp, M.D., Bowman, D.M.J.S., Nagano, A.J., Honjo, M.N., Yasugi, M., Kudoh, H., Matsuki, Y., Suyama, Y. and Isagi, Y. (2015) High-throughput linkage mapping of Australian white cypress pine (*Callitris glaucophylla*) and map transferability to related species. Tree Genetics & Genomes, 11: 1-12, 査読有り。
7. Worth, J.R.P., Larcombe, M.J., Sakaguchi, S., Marthick, J.R., Bowman, D.M.J.S., Ito, M. and Jordan, G.J. (2016) Transient hybridization, not homoploid hybrid speciation, between ancient and deeply divergent conifers, American Journal of Botany 103: 246-259, 査読有り。
8. 岩崎貴也, 阪口翔太, 津田吉晃 (2016) 分子系統地理学に生態ニッチモデリングがもたらす新展開と課題, 植物地理・分類研究, 査読有り。
9. James R. P. Worth, Sakaguchi, S., Karl D. Rann, Clarence J. W. Bowman, Motomi Ito, Gregory J. Jordan, David M. J. S. Bowman (2016) Gondwanan conifer clones imperilled by bushfire, Scientific Reports 6, (doi:10.1038/srep33930), 査読有り。
10. James R. P. Worth, Gregory J. Jordan, James R. Marthick, Sakaguchi, S., Eric A. Colhoun, Grant J. Williamson, Motomi Ito and David J.M.S Bowman (2016) Fire is a major driver of the genetic diversity of two co-occurring Tasmanian palaeo-endemic conifers, Journal of Biogeography; doi:10.1111/jbi.12919, 査読有り。
11. Sakaguchi, S., Ueno, S., Tsumura, Y., Setoguchi, H., Ito, M., Hattori, C., Nozoe, S., Takahashi, D., Nakamasu, R., Sakagami, T., Lannuzel, G., Fogliani, B., Wulff, A.S., L'Huillier, L. and Isagi, Y. (2017) Application of a simplified method of chloroplast enrichment to small amounts of tissue

for chloroplast genome sequencing, Applications in Plant Sciences, 査読有り.

〔学会発表〕(計6件)

1. Sakaguchi, S. Plant demographic responses to the past environmental changes: lessons to predict the future population consequences. Contribution of Genetics to Plant Conservation, FAPESP-JSPS Joint Research Workshop 2015, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil (2015年2月2日).
2. Sakaguchi, S. RAD-sequencing as a tool for unravelling the population dynamics of ecologically diverse plant lineages. Workshop of Young Scientists on Biodiversity and Conservation Biology in Southwest China: Advances in Conservation Genetics, Kunming, China (2015年7月12日).
3. 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. 福島 (2015年3月7日).
4. 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. 鹿児島 (2015年3月19日).
5. 阪口翔太, Guillaume Lannuzel, Bruno Fogliani, Adrien Wulff, L'Huillier Laurent, 上野真義, 津村義彦, 伊藤元己, 井鷲裕司 ニューカレドニア産希少針葉樹 *Callitris sulcata* の保全遺伝解析. 第127回日本森林学会. 神奈川, doi: http://doi.org/10.11519/jfsc.127.0_86 (2016年3月27日).
6. 阪口翔太 特殊土壌への適応が促した森林植物の系統分化, 日本森林学会, 鹿児島, doi: http://doi.org/10.11519/jfsc.128.0_700 (2017年3月27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〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
阪口 翔太 (SAKAGUCHI, Shota)
京都大学・大学院人間・環境学研究所・助教
研究者番号: 50726809