

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04831

研究課題名(和文) 繁殖時期の多様化による広域分布種の種内分化機構

研究課題名(英文) Intraspecific differentiation reinforced by flowering time differentiation as local adaptation caused by the genotype polymorphisms

研究代表者

瀬戸口 浩彰 (Setoguchi, Hiroaki)

京都大学・地球環境学堂・教授

研究者番号：70206647

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)：同一種内における開花期の違いは、種内における生殖前隔離につながり、その蓄積は種分化の創始につながるものである。本年度の研究では、マメ科ミヤコグサ132系統の共通圃場栽培実験を行い、全ゲノム関連解析では、複数の形質データを用いる解析モデルにより、既知の開花遺伝子を含む有力な候補遺伝子を検出した。また、アブラナ科ハマダイコンでは、春化による開花制御の相違を南北系統間で定量PCRを行う事によって進めた。その結果、北方系統ではFLC-Aだけが、南方系統ではFLC-AとCOL-5の両方が拮抗的に発現しつつ、かつFLC-Aの発現量が極めて高いレベルにあることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本列島は北海道から沖縄まで、南北方向に長い島国です。北海道は亜寒帯、沖縄は亜熱帯の気候です。そのために、広い範囲に分布する植物は、地域の環境に適応して花を咲かせる時期を決めています。この研究では、ミヤコグサという植物が日長などを感じる様々な遺伝子の相互作用で、ハマダイコンという植物では冬の寒さを一定期間にわたって経験するか(春化)ということに関わる2つの遺伝子の相互作用で適応していることがわかりました。このように、1種の植物のなかでも、日本列島の地域ごとに適切な時期に開花を迎えるためのしくみがわかってきました。このような仕組みは、農作物の収量を最大にしたり、野生植物の保護に役立つものです。

研究成果の概要(英文)：Flowering time differentiation within a plant species can cause pre-zygotic isolation and sculpture the intraspecific differentiation. In this financial year 2018, we cultivated 132 wild lines of *Lotus japonicas* (Fabaceae) in Okinawa and conducted Genome Wide Association Analysis (GWAS) and identified plural candidate genes as "outlier loci" that would be associated with determining early or late flowering determination. In addition, we also investigated local differentiation of vernalization system using wild radish (*Raphanus sativus*: Brassicaceae). qRT-PCR revealed that floral initiation in the northern lineage was primarily controlled by FLC-A, while COL5-A initiated flowering in the southern accessions despite the presence of high FLC-A transcript levels.

研究分野：生物多様性

キーワード：開花 繁殖成長 栄養成長 生殖前隔離 生育環境 ミヤコグサ ハマダイコン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本列島は南北に長く沖縄県八重山諸島から北海道の稚内までの緯度差は20度以上にものなる。また、冬期には日本海側は多雪である一方で太平洋側は小雨乾燥である傾向がある。このように日本列島には様々な気候環境があり、日本列島に広域分布する植物は、このような日長や温度などの環境に適応して生育している。実際に発芽時期や開花時期には、南北の生育地の間で大きな違いが見られる植物が多くある。このような植物は、例えば京都にて共通圃場で栽培しても開花期がずれることから、実質的な種内分化と生殖隔離が進行していると言える。これは「種の進化の初めの一步」であると解釈できる。

(2) このような日本列島内で開花時期や生活史が大きく異なっている植物において、そのゲノム解析が完了している植物の場合には、遺伝的な背景を明らかにすることが可能であることが期待される。本研究を開始する時点において、マメ科のミヤコグサとアブラナ科のダイコンが、ゲノム解析が完了しており、特に前者ではバイオリソースセンターによる野生系統が整備されていた。これらのゲノム基盤とバイオリソースを利用することによって、研究を速やかに進めることが可能である状況があった。

2. 研究の目的

本研究は、3年間の期間内に、ゲノム基盤が整っているマメ科のミヤコグサとアブラナ科のダイコンの野生種であるハマダイコンの開花時期決定において、広範囲な分布(北海道最北部から沖縄県先島諸島まで)に伴う環境傾度(=日長、気温など)のなかで、

どのような遺伝子が関与し、

どのような遺伝子型で集団に維持されており、

どのようなタイミングで機能発現をするかを、主にRNAseqを利用して同定することを目的に設定した。本研究の遂行は、南北に長い日本列島で、広域に分布する植物種が生育地の環境に適合してどのように生殖時期を制御しているのかを解明する事になる。開花時期の「ずれ」は生殖的隔離をもたらすので、植物が「広く分布する」という一見当たり前の現象が、実は種内を分割して多様性を形成する原動力になっていることを検証する事になる。

3. 研究の方法

(1) ミヤコグサについては、愛知県岡崎市の基礎生物学研究所の野外温室、ならびに沖縄県糸満市の農地を圃場として借り受け、3年間にわたって116系統の国内野生系統を栽培した(各系統で3個体ずつ)。そして開花開始日と枯死日などの記録を取得した。また、自ら採取した4系統は新たに全ゲノムをリシーケンスすることによって、116系統の全ての全ゲノム情報を得た。そして全ゲノム関連解析を行い、開花時期との関連の高いゲノム領域の検出を行なった。

(2) ハマダイコンについては沖縄県西表島から最北端の北海道襟裳岬の野生集団、合計24集団を対象にして集団動態解析用のDNAサンプルを採取するとともに、種子を回収した。回収した種子は春化处理をしたものと春化处理をしないものに分けて、温室内で共通圃場実験を行い、発芽から開花開始日と枯死日などの記録を取得した。また、ダイコンで既知であった開花関連遺伝子として、RsFT、RsFLC-A、RsCOL-Bの発現パターンをRT-PCRで測定した。

4. 研究成果

(1) ミヤコグサ: 解析モデルにはAMMとLFMMの2つを用いた。まずそれぞれのモデルによる解析を行い、その結果をもとに2つのモデル間で共通して開花時期に高い関連を示した遺伝マーカーを抽出して候補遺伝子を絞り込んだ。その結果、43 SNPsが2つのモデル間で共通して高い関連を示した遺伝マーカーとして検出され、これらの近傍に存在した81遺伝子を候補遺伝子として挙げた(図1)。これらの遺伝子のアミノ酸配列を基に相同性検索を行い機能推定を行ったところ、候補遺伝子には4つの開花時期関連遺伝子の相同遺伝子が含まれており、Enrichment解析の結果、有意に開花時期関連遺伝子の相同遺伝子を検出したことが示された(Fisher's exact test, $p < 0.05$)。4つの開花時期関連遺伝子の相同遺伝子はそれぞれ *PLD alpha1-like*, *SUMO1-2*, *SUVR2*, *AKT2-3* に相同な遺伝子であった(図3にゲノム上の位置を示す)。これらの遺伝子はいずれも変異体の開花時期が野生株に比べて異なっていることが、シロイヌナズナなどの他種を用いた先行研究で実験的に示されている(例えば Lu *et al.*, 2013, Murtas *et al.*, 2003)。また、遺伝子の変異と開花時期との直接的な関連は明らかになっていないが、推定された機能を考慮すると開花時期制御に関連する可能性のある遺伝子が3つ含まれていた。それぞれ *CAX4*, *ADF7-like*, *Importin-4* 遺伝子の相同遺伝子で、*CAX1* と *ADF7-like* はパラログが開花時期制御に関わっていることが知られている(Cheng *et al.*, 2003, Dong *et al.*, 2001)。また、*Importin-4* については光受容体であるフィトクロムの核輸送に関わることが明らかになっており(Kevei *et al.*, 2007)、日長経路において開花時期決定に関連している可能性も考えられる。

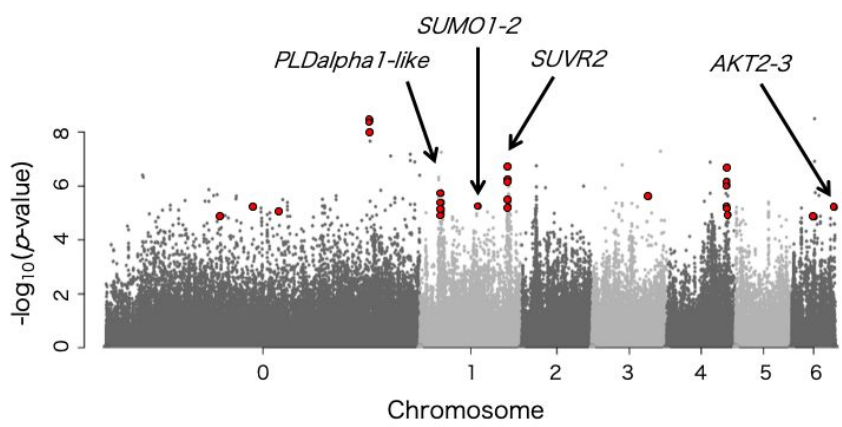


図 1. プロットは各 SNPs の染色体上の位置と開花時期との関連の高さを示す。横軸・縦軸はそれぞれゲノム上の位置と開花時期との関連の高さを示す。赤で示したプロットは 2 つのモデルで共通して上位に含まれた SNPs を示す。遺伝子名は、検出された SNPs の近傍に位置する遺伝子と同一性が高かった遺伝子を示す。

(2) ハマダイコン:

日本列島に自生するハマダイコンは、薩南諸島を境にして、南北に分化していることが明らかになった(南西諸島の系統と、九州以北の系統)。マイクロサテライトマーカー14 遺伝子座を用いた Isolation with Migration モデルでは、この南北分化は今から 1 万 8 千年前の最終氷期に生じたことが明らかになった。

またこの南北分化は、ハマダイコンの開花特性の相違にも関連していた。南系統では、春化処理をしなくても発芽から 55 日(平均値)で開花するのに対して、北系統では約 100 日を要した。これに対して、春化処理をした南系統では通常では有り得ない小さな個体サイズで 20 日程度で開花した。春化処理をした北系統は 50 日で開花した。このような知見を自生地環境と照らしあわせてみると、南西諸島の海岸では冬期にも 4 程度の低温を期待できないために、開花のシグナルに「春化を要求していない」ことが想定された。逆に九州以北では、4 以下の冬を経験してロゼットの形態を保ち、春の気温上昇とともに開花をする「春化要求性」があることが想定された。南の系統は更なる春化処理によって、開花が促進される機構を維持しているが、栄養成長期間が短いために、生育には著しく不利であることが想定された。

引き続き、花芽形成に関わる FT 遺伝子 (*RsFT*)、春化に関する FLC 遺伝子 (*RsFLC*)、時間を感じる概日時計遺伝子 *CO* の類似遺伝子 *COL* (*RsCOL5-A* と *COL5-B*) の 3 種類の遺伝子発現を、南系統と北系統を対象にして、春化処理あり、春化処理なしの二条件で RT-PCR による遺伝子発現を測定した。その結果、表 1 に示すように、南系統では *RsFLC* が開花の阻害機能を発揮しながらも開花に至っている一方で、北系統では春化によって *RsFLC* が機能しなくなっていることがわかった。南系統では、車に例えるとブレーキ (*RsFLC*) とアクセル (*RsFT*) の両方を踏みながら車が動いている(開花)している状態であり、北系統ではアクセルだけを踏んで動いている(開花している)状態であることがわかった。

表 1. ハマダイコンにおける開花関連遺伝子の発現状態と開花反応。

	春化処理	<i>RsFLC</i>	<i>RsCOL5-A</i>	<i>RsCOL5-B</i>	<i>RsFT</i>	開花反応
南系統	無し	○	×	×	○	→ 開花
北系統	無し	○	×	×	×	→ 開花遅延
南系統	有り	○	×	×	○	→ 開花促進
北系統	有り	×	×	×	○	→ 開花

引用文献

Lu S, Bahn SC, Qu G, Qin H, Hong Y, Xu Q, Zhou Y, Hong Y, Wang X. 2013. Increased expression of phospholipase D 1 in guard cells decreases water loss with improved seed production under drought in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal* 11: 380-389.

- Murtas G, Reeves PH, Fu Y-F, Bancroft I, Dean C, Couplan G. 2003. A Nuclear Protease Required for Flowering-Time Regulation in Arabidopsis Reduces the Abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER Conjugates. *the Plant Cell Online* 15: 2308-2319.
- Cheng N, Pittman JK, Barkla BJ, Shigaki T, Hirschi KD. 2003. The Arabidopsis *cax1* Mutant Exhibits Impaired Ion Homeostasis, Development, and Hormonal Responses and Reveals Interplay among Vacuolar Transporters. *The Plant cell* 15: 347-364.
- Dong C-H, Xia G-X, Hong Y, Ramachandran S, Kost B, Chua N-H. 2001. ADF Proteins Are Involved in the Control of Flowering and Regulate F-Actin Organization, Cell Expansion, and Organ Growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 1333-1346.
- Kevei E, Schafer E, Nagy F. 2007. Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* 58: 3113-3124.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

- Han, Q., Higashi, H., Mitsui, Y., Setoguchi, H. 2016. Distinct phylogeographical structures of wild radish (*Raphanus sativus* L. var. *raphanistroides* Makino) in Japan. *PLOS ONE* 10(8): e0135132. DOI: 10.1371/journal.pone.0135132
- Han, Q., Higashi, H., Mitsui, Y., Setoguchi, H. 2016. Lineage isolation in the face of active gene flow in the coastal plant wild radish is reinforced by differentiated vernalisation responses. *BMC Evolutionary Biology* 16: 84 DOI:10.1186/s12862-016-0655-7
- Han, Q., Sakaguchi, S., Setoguchi, H. 2016. Geographic variation in leaf trichome of wild radish (*Raphanus sativus* L. var. *raphanistroides* Makino) in Japan. *Journal of Biogeography and Taxonomy* 64: 17-23.

〔学会発表〕（計7件）

- 若林智美, Stig Andersen, 佐藤修正, 川口正代司, 瀬戸口浩彰
全ゲノム配列を用いた、ミヤコグサの開花所要日数の種内多型に関わる候補遺伝子の探索
日本植物分類学会第15回大会, 富山大学五福キャンパス, 富山市, 3月5日～8日. 2016年
- 若林智美, Andersen, SU, 佐藤修正, 川口正代司, 瀬戸口浩彰
ミヤコグサの開花時期の多型を生む遺伝的要因の探索 ～全ゲノム情報を利用して.
シンポジウム「技術革新が拓く植物の自然史」3aSF. 日本植物学会第80回大会, 沖縄県宜野湾市, 沖縄コンベンションセンター, 9月8日～11日. 2016年
- Tomomi Wakabayashi, Stig U. Andersen, Shusei Sato, Yoshihiro Handa, Masayoshi Kawaguchi, Setoguchi Hiroaki.
Genome-wide association study for flowering time in *Lotus japonicus*.
日本進化学会, 第18回大会, 東京工業大学, 8月25日～28日, 2016年
- 若林智美, 田中幸子, Stig U. Andersen, 佐藤修正, 川口正代司, 瀬戸口浩彰
Detecting loci contributing local adaptation through flowering time in *Lotus japonicus* in Japan.
日本植物分類学会第16回大会, 京都大学, 京都市, 3月9日～12日. 2017年

韓慶香，東広之，阪口翔太，三井裕樹，瀬戸口浩彰

Lineage isolation maintained by natural selection despite ongoing gene flow in Japanese wild radish.

日本植物分類学会第16回大会，京都大学，京都市，3月9日～12日，2017年
若林智美、Stig U. Andersen、佐藤修正、川口正代司、半田佳宏、瀬戸口浩彰。

全ゲノム関連解析によるミヤコグサの地域適応遺伝子の探索。日本生態学会 第64回大会
早稲田大学，東京，3月13日～18日，2017年

瀬戸口浩彰、若林智美

ミヤコグサ国内野生系統が示す開花時期の大きな違いとその遺伝基盤～全ゲノム関連解析
による責任遺伝子の検出～

日本植物学会第82回大会 シンポジウム「植物系 NBRP リソースとその活用研究最前線」
広島国際平和会議場，広島，9月13日～16日，2018年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：川口 正代司

ローマ字氏名：(KAWAGUCHI, masayoshi)

所属研究機関名：自然科学研究機構

部局名：基礎生物学研究所

職名：教授

研究者番号（8桁）：30260508

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：若林 智美

ローマ字氏名：(WAKABAYASHI, tomomi)

研究協力者氏名：韓 慶香
ローマ字氏名：(HAN,Chingxiang)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。