

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02496

研究課題名（和文）ゲノムに残されたデモグラフィック情報の比較解析で探る生物多様性の環境変動応答

研究課題名（英文）Response of biodiversity to environmental changes explored by comparative analysis of demographic information in genomes

研究代表者

井鷲 裕司（Isagi, Yuji）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：50325130

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,200,000 円

研究成果の概要（和文）：Oxera約30種のうち25分類群を対象にゲノムリシーケンスを行い、PSMC法によって過去数百万年間に及ぶ個体群動態の比較解析を行った。その結果、多くの種で適応放散的種分化に伴う新たなニッチの開拓により個体数が増大していた。その一方で、超塩基性土壌に適応した種は、個体数が小さく保たれてきたことがわかった。

さらに、low coverage genome sequencingとstairway plotで、詳細かつ高精度に個体群動態の推定や、新種候補11種を含む全38種1370サンプルを対象にMIG-seq法によるゲノム縮約解読で、各種・集団・個体の系統的位付けを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な生態系において人為活動により生物多様性は劣化しつつある。本研究は、生物多様性ホットスポットであるニューカレドニアにおいて、過去数百万年の間に種分化を繰り返してきたOxera属25種を対象に、適応的種分化によって生物多様性が創出されてきた過程を最新のゲノム解析技術によって明らかにしたものである。本成果は、生物多様性創出機構の解明という学術的意義に加えて、生物多様性に生態系機能、生物資源、文化的意義など多面的な価値があることが認識されつつある現在、社会的にも意義のある成果といえる。

研究成果の概要（英文）：We performed genome resequencing of 25 taxa among about 30 species of Oxera and compared their population dynamics over the past several million years using the PSMC method. As a result, we found that the populations of most species have increased due to the exploitation of new niches associated with adaptive and divergent speciation. On the other hand, species adapted to ultrabasic soils have maintained their small populations.

In addition, we estimated population dynamics in detail and accurately by low coverage genome sequencing and stairway plot, and clarified the phylogenetic position of each species, population, and individual by genome condensation decoding using MIG-seq method for 1370 samples of 38 species including 11 new species candidates.

研究分野：保全ゲノミクス

キーワード：生物多様性 適応放散 ゲノム解読 PSMC 種分化 隠蔽種 個体群動態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界中の様々な生態系で人為活動に起因して生物多様性が低下・劣化している。その中でも温暖化等、地球レベルの環境変動は、生物多様性を構成する個体群の動態に大きなインパクトを与えるものと懸念される。しかしながら、地球レベルの環境変動は今に始まったものではなく、現在まで続く氷期・間氷期サイクルにおける急激な環境変動に対して、何らかの形で対応し生残してきたのが現存する生物個体群である。そして、生物個体群が辿ってきた歴史はゲノム内の遺伝情報に記録されており、近年著しく発展してきたゲノム解読技術やバイオインフォマティクス解析によって、過去の個体群動態(デモグラフィ)の推定が可能になった。適応放散によって種分化してきた分類群を対象にゲノム情報を解読することで数百万年オーダーの個体群動態を詳細に明らかにすれば、生物多様性創出機構の解明につなげることができると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 人為インパクトの中でも温暖化のような地球レベルの環境変動は、生物多様性に多大な影響を与えるものと懸念されるが、そのような大規模な環境変動は、現在まで続く氷期・間氷期サイクルにおいても生じてきた。そして、これらの環境変動を生きのびてきた現生の植物個体のゲノムには、過去の個体群動態の情報が保持されている。本研究では、ニューカレドニアで多様な環境に適応して種分化してきた *Oxera* 属(シソ科)植物を解析対象とし、新規全ゲノム解読とリシーケンシングで得られたゲノムレベルの変異情報をコアレセント理論で解析し、生活史特性や現在の分布状況が異なった種を対象に、過去数百万年間の個体群動態を復元・比較解析することで、生物多様性の実態やその創出過程について理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、ニューカレドニアで多様な環境に適応して種分化してきた *Oxera* 属を解析対象とし、新規全ゲノム解読とリシーケンシングで得られたゲノムレベルの変異情報をコアレセント理論で解析し、生活史特性や現在の分布状況が異なった種を対象に、過去数百万年間の個体群動態を復元・比較解析する。解析対象種としては、ニューカレドニアで種分化を繰り返してきた *Oxera* 属のなかで、生活型(ツル、灌木、草本)、繁殖特性(送粉・種子散布)、分布状況(広域分布普通種、局所分布絶滅危惧種、低頻度広域散在種)の異なる種を当初の解析対象とした。

(2) *Oxera* 属植物のうち、まず1種 *O. balansae* について MinION (Oxford nanopore)を用いたロングリードゲノム解読とイルミナ HiSeq によるショートリード解読によって新規全ゲノム解読を行いレファレンスゲノムを構築した。

(3) 続いて、異なった生活史戦略と分布状況を示す種を対象にイルミナ HiSeq によるショートリードによるリシーケンシングを行い、レファレンスゲノムと比較解析することで、各種のゲノムに蓄積されてきた遺伝的変異を検出した。検出された変異にコアレセント理論を適応して PSMC 解析(Li & Durbin, 2011)を行い、過去数百万年の環境変動に対して、異なった形質をもつ個体群がどのように反応し、変動してきたか比較解析した。

(4) 広域分布し、種内で遺伝的分化が進行していると考えられる *O. baladica* については、種内の約 100 個体について low coverage genome sequencing を行い、Stairway plot (Liu & Fu, 2015)で主要 5 個体群の集団動態を詳細に解析した。

(5) 新種候補 11 種を含む全 38 分類群 1370 サンプルを対象に MIG-seq 法 (Suyama & Matsuki, 2015)によるゲノム縮約解読を行い、現存する個体群の遺伝的多様性、個体群間の遺伝的分化、分類群間の系統関係をこれまでになく規模で明らかにした。

4. 研究成果

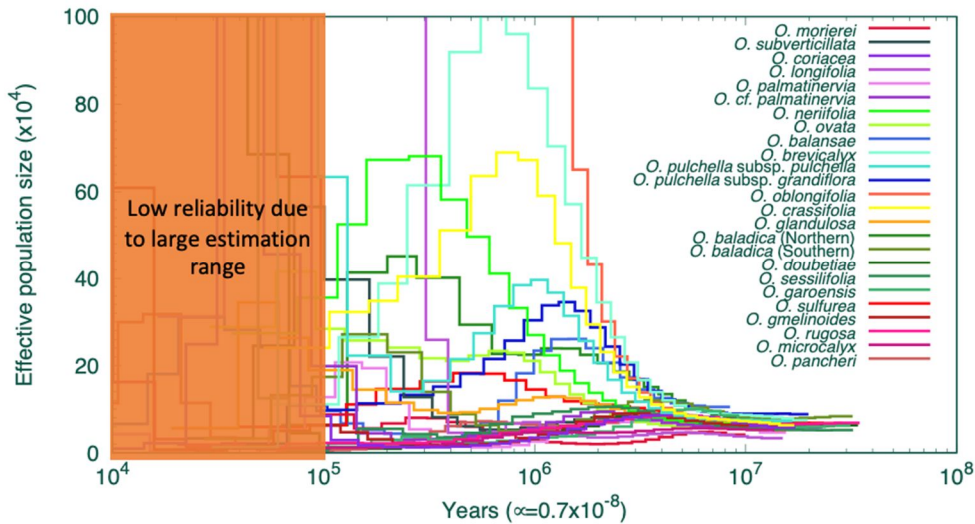
(1) *Oxera balansae* を対象に行なった新規全ゲノム解読はロングリードに MinION から得られた物を使用したものであったが、Canu v1.7, wtdbg2 v2.2.2, NECAT v0.0.1 などの複数のアセンブラの使用や、Racon v1.3.1 を用いたイルミナ HiSeq ショートリードを用いたエラー修正などの改善を続けた結果、コンティグ数 1000 程度、N50=1.4 Mbp のゲノム配列を得ることができた。k-mer 法によってゲノムサイズは 569 Mbp と推定されたが、NECAT でアセンブルしたゲノムの総塩基長が 515 Mbp であり、ゲノムのかなりの部分をカバーすることができたと考えられる。アセンブリ中に含まれる core genes の割合を示す BUSCO 値(Seppy et al. 2019)は 88.5 であった。

(2) 当初の研究計画では、ニューカレドニア産 *Oxera* 属植物のうち、特徴的な 10 種について比較個体群動態解析を行う予定であったが、現地の研究者の協力を得て順調に採集と遺伝解析が進捗した結果、年間で計画の 2.5 倍に当たる 25 分類群についてリシーケンスと PSMC による個体群動態解析をすることができた(図 1)。おおよそ 10 万年前から 1000 万年前までについて信頼

しうる結果が得られた。現存する *Oxera* 属植物が種分化を始める前の約 500 万年前より以前については各分類群の個体群動態は一致し、種分化前の状態を反映したのようになっていた(図 1)。興味深いことに種分化と同時に各分類群はそれぞれ異なった個体群動態を示すようになった。個体群動態に影響を与える要因について比較解析したところ、明るい疎林など生育する種は種分化後、有効集団サイズが増加しており、新たな環境への適応放散によって個体数が増加したことがわかった。一方で、ニューカレドニアに特徴的なモザイク状に分布する超塩基性土壌を生育地とする種は、種分化後も有効集団サイズが小さく維持されていた。

近縁種間の個体群動態を類似の方法で解析した例として、北半球に広く分布するクルミ属植物を対象とした Bai et al. (2017)の研究では、解析を行った 11 種が類似した個体群動態を示している。これに対して、本研究では、四国程度の面積に生育する 25 分類群が大きく異なった個体群動態を示したことは興味深い。クルミ属植物が類似したハビタットに生育するのに対して、多様なハビタット、生活史戦略に適応放散した *Oxera* 属植物の特徴を反映しているものと思われる。

図 1 ニューカレドニアに生育する *Oxera* 属 25 分類群の個体群動態。横軸は現在からの時間、縦



軸は有効集団サイズを示す。

(3) ニューカレドニア産 *Oxera* 属植物の中で、最も広範囲に分布種する *O. baladica* に関して、代表的な 5 集団から採集した各約 20 個体を対象に、それぞれ 0.5~1 程度の薄いカバレッジでゲノム解読を行う low coverage genome sequencing によって解読し、その結果を元に最尤法で集団レベルのゲノムの特徴を推定した。その情報をもとに個体群変動を Stairway plot で解析したところ、PSMC よりも、より近年に至るまで詳細かつ高精度に個体群動態を推定することができた(図 2)。また、南部集団において 100 万年前に個体群サイズの落ち込みが共通して認められた。ニューカレドニアに生育する現存する最も祖先的な被子植物である *Amborella trichopoda* では、その南部集団において、氷河期の環境変動に起因すると思われるボトルネックが検出されているが (Tournebize et al. 2017)、その点も含めて興味深い知見を得ることができた。

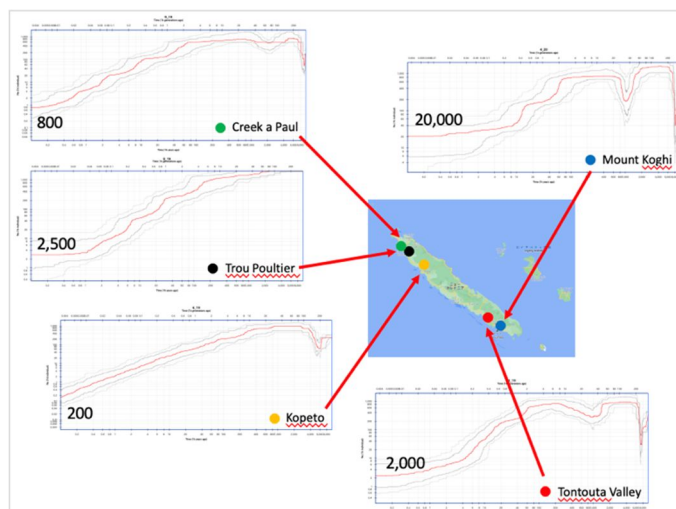


図 2 Stairway plot によって推定した *Oxera baladica* 5 集団の個体群動態

(4) *Oxera* 属全体の系統解析として、新種候補 11 種を含む全 38 種 1370 サンプルを対象に MIG-

seq 法によるゲノム縮約解読を行った。その結果、*Oxera* 属全体における各種・集団・個体の系統的位置付けを明らかにすることができただけでなく、外部形態では、分類学者ですら good species と認識していた分類群の中に隠蔽種があることも検出され、さらにはこれまで不明であった亜種レベルの系統関係も明らかにすることができた。

(5) 以上、本研究ではゲノム情報に基づく解析によって多くの興味深い新知見を得ることができた。個体群動態の比較解析や系統解析の結果は、ニューカレドニアの共同研究者とともに順次論文として発表する予定である。

< 引用文献 >

Bai WN, Yan PC, Zhang BW, Woeste KE, Lin K, Zhang DY (2018) Demographically idiosyncratic responses to climate change and rapid Pleistocene diversification of the walnut genus *Juglans* (Juglandaceae) revealed by whole-genome sequences. *New Phytologist*, 217: 1726–1736.

Li H, Durbin R. (2011) Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature*, 475, 493–496.

Liu XM, Fu YX (2015) Exploring population size changes using SNP frequency spectra. *Nature Genetics*, 47: 555–559.

Seppy M, Manni M, Zdobnov EM (2019) BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In: Kollmar M. (eds) *Gene Prediction. Methods in Molecular Biology*, 1962. Humana, New York, NY. 2019 doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14.

Suyama Y, Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports*, 16963.

Tournebize R, Manel S, Vigouroux Y, Munoz F, Kochko A, Poncet V (2017) Two disjunct Pleistocene populations and anisotropic postglacial expansion shaped the current genetic structure of the relict plant *Amborella trichopoda*. *PLoS One*: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183412>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 陶山佳久	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 森林遺伝育種学的研究におけるMIG-seq法の利用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 森林遺伝育種	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井鷲裕司・兼子伸吾・安倍哲人・伊津野彩子・牧野能士	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 島嶼性固有植物の保全ゲノミクス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 森林科学	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 6件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 河合良弥、伊津野 彩子、陶山 佳久、Gildas Gateble、井鷲 裕司
2. 発表標題 ニューカレドニア産準固有属Oxera（シソ科）の個体群動態推定のためのde novo全ゲノムアセンブル
3. 学会等名 第51回種生物学学会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡麟平、佐藤光彦、廣田峻、松尾歩、Gildas Gateble、井鷲裕司、陶山佳久
2. 発表標題 MIG-seq法によるゲノム情報により示されたニューカレドニア産シソ科Oxera palmatinerviaの近縁隠蔽種の可能性
3. 学会等名 第51回種生物学学会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井鷲裕司
2. 発表標題 ゲノム情報を活用した生物多様性保全
3. 学会等名 第28回DNA多型学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihisa Suyama
2. 発表標題 Introduction of next-generation biodiversity assessment using MIG-seq
3. 学会等名 The 11th APBON Workshop -Asia-Pacific Biodiversity Observation Network（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡麟平, 佐藤光彦, 廣田峻, 松尾歩, Gildas Gateble, 井鷲裕司, 陶山佳久
2. 発表標題 ゲノムワイドSNP分析によるニューカレドニア産シソ科Oxera属における隠蔽種の発見
3. 学会等名 日本生態学会東北地区会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合良弥, 伊津野 彩子, 陶山 佳久, Gildas Gateble, 井鷲 裕司
2. 発表標題 新規全ゲノム解読に基づくニューカレドニア産シソ科植物の比較デモグラフィ
3. 学会等名 第67回生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長岡麟平, Gildas Gateble, 井鷲裕司, 陶山佳久
2. 発表標題 MIG-seq分析によるニューカレドニア産シソ科Oxera属の隠蔽種の発見
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihisa Suyama, Ayumi Matsuo, Shun Hirota
2. 発表標題 MIG-seq and multiplexed DNA barcoding: efficient tool for phylogeography and conservation genetics
3. 学会等名 The 2nd International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity and Conservation of Endangered Plants in East Asia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陶山佳久
2. 発表標題 森林遺伝育種学的研究のためのMIG-seq (multiplexed ISSR genotyping by sequencing) 法の開発
3. 学会等名 森林遺伝育種学会第7回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陶山佳久
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた手軽な分子系統・集団遺伝解析
3. 学会等名 日本生態学会東北地区会第63回弘前大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陶山佳久
2. 発表標題 MIG-seqとマルチプレックスDNAバーコーディングによる分子系統・集団遺伝解析
3. 学会等名 第50回種生物学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陶山佳久
2. 発表標題 MIG-seq法を用いた絶滅危惧植物の保全遺伝学的解析
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陶山佳久
2. 発表標題 MIG-seq法：次世代シーケンサーを用いた手軽なゲノムワイド塩基配列分析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度東京大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Imai, Kohei Kamasaka, Dominique Fleurot, Gildas Gatable, Ayu Narita, Kentaro Uchiyama, Yoshihisa Suyama, Yoshiaki Tsuda, Yuji Isagi
2. 発表標題 Genetic diversity, population demography and adaptation of <i>Oxera baladica</i> (Lamiaceae) and an undescribed species in New Caledonia.
3. 学会等名 The 8th East Asian Federation of Ecological Societies (EAFES) International Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	陶山 佳久 (Suyama Yoshihisa) (60282315)	東北大学・農学研究科・准教授 (11301)	
研究 分担者	伊津野 彩子 (Izuno Ayako) (80816249)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・研究員 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------