

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24247005

研究課題名(和文)植物の対照的適応戦略に関する次世代分子生態学

研究課題名(英文)Next generation molecular ecology of contrasting adaptive strategies in flowering plants

研究代表者

矢原 徹一 (Yahara, Tetsukazu)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90158048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,600,000円

研究成果の概要(和文)：対照的な適応戦略を持つ姉妹種の間で、どのような遺伝的变化が生じているかを、次世代シーケンサーを活用して解析した。キスゲ属の姉妹種(アゲハチョウ媒の昼咲き赤花種ハマカンゾウとススメガ媒の夜咲き黄花種キスゲ)では、赤い色素であるアントシアニンの量と発現量が相関する遺伝子群を同定した。これらのうち、調節遺伝子の変化によって赤花から黄花への進化が起きたことが支持された。キイチゴ属の姉妹種(落葉性・温帯性のヤクシマキイチゴと常緑性・暖帯性のリュウキュウイチゴ)では、赤色光受容体の抑制遺伝子が2種間で大きく分化していることが判明し、光受容体の抑制が落葉性・温帯性の違いに関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using Next Generation Sequencer, we analyzed genetic backgrounds of evolutionary changes between two pairs of sister species with contrasting adaptive strategies: *Hemerocallis fulva* and *H. citrina* having swallowtail-pollinated red flowers and hawkmoth-pollinated yellow flowers, and *Rubus palmaus* and *R. grayanus* having deciduous and evergreen leaves. In the *Hemerocallis* pair, we identified a group of genes of Anthocyanin color-pigments biosynthesis in which expression levels are correlated with the amounts of Anthocyanin color-pigments. This finding supported that changes in a regulatory system of Anthocyanin biosynthesis caused the evolution of flower color. In the *Rubus* pair, we found that a gene suppressing the receptor of red light (phytochrome) is highly differentiated between species. This finding suggests that divergence of evergreen/deciduous leaves were driven by regulatory changes of a light receptor.

研究分野：生態学

キーワード：分子生態学 次世代シーケンサー ゲノム 花色 葉の寿命 *Hemerocallis* *Rubus* *Taraxacum*

1. 研究開始当初の背景

研究開始当時には、次世代シーケンサーの登場により、特定少数の遺伝子やマーカーではなく、多数の遺伝子を対象とする比較研究が可能になり、分子生態学への応用が始まるようになっていた。申請者は、生態学におけるこの技術の革新性をレビューし、「遺伝子多様性アセスメント」への活用を国際的に提案した (Yahara, T., Donoghue M, Zardoya R, Faith D, and Cracraft J. 2010. Genetic diversity assessments in the century of genome science. *Current Opinion in Environment Sustainability* 2: 43-49)。このレビューを執筆した 2010 年当時は、次世代シーケンサーはまだきわめて高価な (7500 万円 ~) 装置であり、ランニングコストも高かった (1 ランあたり約 100 万円)。しかしその後、より廉価な機種が発売され、ランニングコストも下がり (1 ランあたり 5 - 10 万円)、次世代シーケンサーを生態学的な研究に活用できる時代が到来した。本研究は、この次世代シーケンサーを生態学的に興味深い適応現象の解明に適用し、「次世代分子生態学」を開拓することを意図して計画された。

2. 研究の目的

本研究は、次世代シーケンサーを生態学に活用するために、以下の 3 つの目的を持って実施した。

対照的な適応戦略を持つ姉妹種の間で、どのような遺伝的変化が生じているかを、次世代シーケンサーを活用して解明する。

外来種が侵入地において、どのような遺伝子変化 (進化) を遂げているかを次世代シーケンサーを活用して解明する。以上の研究に活用できる迅速な遺伝的解析法を開発する。

目的の研究対象として、キスゲ属の姉妹種 (アゲハチョウ媒の昼咲き種ハマカンゾウとスズメガ媒の夜咲き種キスゲ)、およびキイチゴ属の姉妹種 (落葉性・温帯性のヤクシマキイチゴと常緑性・暖帯性のリュウキュウイチゴ) をとりあげ、次世代シーケンサーを活用して、姉妹種間の適応戦略の違いの遺伝的背景を調べた。

目的の研究対象として、セイヨウタンポポをとりあげた。ヨーロッパから日本に侵入・定着したセイヨウタンポポは 3 倍体であり、無融合生殖により種子を形成するが、稀に 2 倍体や 3 倍体の機能的な花粉を生産し、ニホンタンポポと交雑する。この交雑によって、無融合種子形成能力を持つ 3 倍体や 4 倍体の雑種タンポポが形成されることがわかっている。これは、外来種と在来種の交雑による進化の例である。この進化の過程でどのような遺伝的変化が生じているかを明らか

にすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) キスゲ属の姉妹種に関する研究

ハマカンゾウとキスゲを材料に、発達段階初期・中期・後期のつぼみの花弁について、次世代シーケンサー HiSeq2000 (Illumina) を用いた大量 mRNA シーケンス (RNA-seq 解析) を行った。得られた read について、De novo Assembly を行った。得られたライブラリーに対して、各サンプルの read をマップした後、得られたカウントデータについて、ハマカンゾウとキスゲの発現量の比較を行った。さらに、花形質が分離し、アントシアニン色素量が様々な F2 雑種個体において、リアルタイム定量 RT-PCR を行い、発現量の解析を行った。これらの発現解析によって、花色の種差に関与していると考えられるアントシアニン色素合成経路の候補遺伝子を探索した。

アゲハチョウやスズメガの選好性が花形質に与える淘汰を実測するために、ハマカンゾウとキスゲの雑種第二世代において、花色などの形質が分離した 12 個体とハマカンゾウ 24 個体をランダムに配置した実験個体群の花にアゲハチョウやスズメガを訪問させ、めしべ上についた花粉を採取し、一粒つづ DNA を PCR で増幅し、遺伝子型を決定した。

(2) キイチゴ属の姉妹種に関する研究

温帯性キイチゴであるヤクシマキイチゴ (*Rubus palmatus*) の屋久島由来個体 Pal01 を対象とし、次世代シーケンサーを活用してゲノム配列の決定を進めた。抽出した DNA から 180bp のペアエンドライブラリー、3kbp のメイトペアライブラリーを作成し、Illumina HiSeq 2000 で網羅的に解析した。

ゲノムワイドな多型解析を行うために、ヤクシマキイチゴおよびリュウキュウイチゴ (*Rubus grayanus*) から RADseq 用ライブラリーの作成を試み、MiSeq および HiSeq にて解析した。RADseq は、ゲノムを制限酵素で断片化し、網羅的に配列解析する方法である。

(3) 外来・在来・雑種タンポポに関する研究

セイヨウタンポポ・ニホンタンポポ・雑種タンポポの葉から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて cDNA 配列を決定した。得られた cDNA 配列から BLAST 検索によって R-gene を探索した。また、レタスで開発された R-gene マーカーを用いた PCR、クローニングによって、ニホンタンポポ、セイヨウタンポポ、そして雑種の耐病性の耐病性遺伝子を配列決定した。得られた配列について、MAFFT によるアライメント、MEGA5 による遺伝子の系統樹作成を行った。ニホンタンポポの地域 (東京、愛知、京都、福岡) 間で耐病性遺伝子の変異があるかを調べた。その後、ニホンタ

ンポポ・セイヨウタンポポの種間で変異があるかを調べ、ニホンタンポポ特有の配列を雑種が取り込んでいるかを検討した。

(4) 次世代シーケンサーを用いたゲノム網羅的多型解析のための手法開発

マルチプレックス PCR によってゲノム内の数千以上の領域を同時に増幅して、それらをライブラリーとして次世代シーケンサーで同時に読み取る手法を検討した。また、ハマカンゾウとキスゲを交配した F1 個体の葯から花粉を単離し、花粉一粒ずつから DNA を抽出した後、新手法による網羅的塩基配列分析を行った。

4. 研究成果

(1) キスゲ属の姉妹種に関する研究

RNA-seq 解析の結果、ハマカンゾウにおいて発現が高く、キスゲで低い遺伝子群の中に、アントシアニン色素合成経路の酵素遺伝子 *Chs*, *F3'5'h* (又は *F3'5'h*), *Dfr*, *Ans*, *3gt*, *Rt*, *Gst* と、R2R3MYB family の転写因子である *Anthocyanin 2* 様遺伝子を同定した。この *Anthocyanin 2* 様遺伝子について、ゲノム DNA 上の塩基配列を決定した結果、キスゲでは配列長が約 4.7kb で、ハマカンゾウの約 2.2kb に比べて 2 倍以上になっており、イントロン領域の 2 ヶ所に長い挿入があることが明らかになった。

さらに、F2 雑種個体において、リアルタイム定量 RT-PCR を行い、発現量の解析を行ったところ、*Chs*, *F3'5'h* (又は *F3'5'h*), *Dfr*, *3gt* と *Anthocyanin 2* 遺伝子はアントシアニン色素量と相関があった。また、発現量について、遺伝子間の総当たりの相関を解析すると、*Chs*, *F3'5'h* (又は *F3'5'h*), *Dfr*, *3gt* と *Anthocyanin 2* 様遺伝子の相関が高かった。よって、合成経路上の酵素遺伝子の発現が、転写因子である *Anthocyanin 2* 様遺伝子によって制御されることが示唆された。昼咲き種から夜咲き種キスゲへの進化過程では、この転写因子の進化によって、赤色の花から黄色の花へ進化したと考えられる。

実験個体群において、アゲハチョウやスズメガによって運ばれた花粉 1736 個について生産株を特定し、送受粉数から実験使用株の適応度を評価した。その結果、アゲハチョウはハマカンゾウ的な弱い花香へと淘汰圧をかけていることが明らかになった。一方、薄暮性スズメガは花蜜さえあればハマカンゾウ的な花にもキスゲ的な花にも柔軟に訪問するため、花形質に有意な選択圧をかけていないという意外な結果が得られた。これまで、キスゲに代表される夜咲きの花の進化には、薄暮性スズメガが大きな役割を果たしていると考えられてきたが、本研究結果によれば薄暮性スズメガは非常に日和見的な送粉者であり、花色や花香の進化の主要な駆動因として十分に機能しないこと

が示唆された。

(2) キイチゴ属の姉妹種に関する研究

ヤクシマキイチゴ個体 Pal01 から、総コンテグ塩基長 231.0Mbp、総 scaffold 塩基数 253.1Mbp のゲノム配列の解読に成功した。ナガバモミジイチゴのゲノムサイズは 253Mbp 程度と推定されているため、これは推定ゲノムサイズのそれぞれ 91.6%、100% にあたる。また、トランスクリプトーム解析から、おおよそ 5 万個の遺伝子がコードされていることが確認された。

常緑性リュウキュウイチゴと落葉性ヤクシマキイチゴにおいて、RADtag による多体ゲノム変異解析から、合計 25,224 個の SNPs (一塩基多型) を得た。これらの SNPs をヤクシマキイチゴ Pal01 のドラフトシーケンスにマッピングし、ヤクシマキイチゴとリュウキュウイチゴの F_{ST} (集団間分化) を推定した。グローバル F_{ST} は、0.54 であった。ドラフトゲノム上で各 SNPs の上流下流 50kbp の F_{ST} 値を平滑化したところ、ゲノム上で高い F_{ST} 値をもつゲノム領域がいくつか得られた。特に高い F_{ST} 値 ($F_{ST}=0.81$) をもつ領域の直下には、光受容体である PhyA のサブレッサー遺伝子がコードされていた。こうした遺伝子が、リュウキュウイチゴとヤクシマキイチゴの亜熱帯と温帯という異なる環境に適応分化するプロセスに関わったと推測される。

さらに、リュウキュウイチゴとヤクシマキイチゴの交雑帯から採取した 51 個体について RADtag 法により 3.4 億リードを得ており、異なる環境に異所適応した種が二次接触によって遺伝的変異が浸透していくプロセスについて明らかにしていく。

(3) 外来・在来・雑種タンポポに関する研究

次世代シーケンサーを用いて得られた cDNA ライブラリーと PCR、クローニングによって、合計 840 のタンポポ耐病性遺伝子が得られた。これらの配列について、近縁種レタスと比較したところ、得られた全ての RGC サブファミリーで、タンポポとレタスでは異なるクラスターを形成し、配列が大きく異なっていた。また、タンポポ特有のサブファミリーと考えられるクラスターも存在した。次に、ニホンタンポポの地域間での配列を比較したところ、地域特有の配列は見られなかった。最後に、ニホンタンポポとセイヨウタンポポの間で異なる耐病性遺伝子を持つか比較したところ、両種間では多くの場合、アリルと考えられる程度の塩基の変異が見られた。それらの種特異的な R-gene 26 個のうち 15 個は非同義置換/同義置換の比 (Ka/Ks 値) < 0.3 となっており、アミノ酸配列は強く保存されていた。しかし、RGC1 サブファミリーの一部では、 $Ka/Ks = 3.13$ という非常に高い値を示す R-gene もみられた (図 1)。これらの R-gene は、強い正の自然選択によって各生育

地の病原体に適應してきた可能性が高い。そ

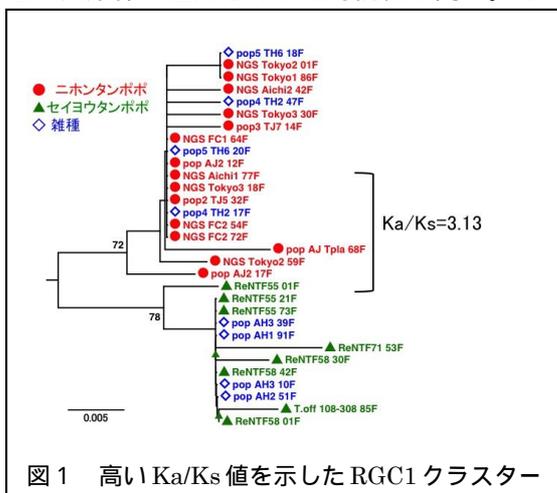


図1 高い Ka/Ks 値を示した RGC1 クラスター

して、雑種では、どちらのアリルも見られた。これらの結果から、タンポポでもタンポポに感染する病原体との共進化によって耐病性遺伝子が多様化した可能性が高い。ニホンタンポポは地域間で耐病性遺伝子を共有しており、それらはセイヨウタンポポとは配列が異なる。その配列の中には生育地に適應進化した可能性の高い配列も存在した。雑種は、このような R-gene についても、ニホンタンポポ特有の配列を取り込んでおり、耐病性の面で有利になる可能性がある。

(4) 次世代シーケンサーを用いたゲノム網羅的多型解析のための手法開発

新手法による網羅的塩基配列分析を行った結果、226 座で 1 : 1 の期待分離比に従う SNP 座を得ることが出来た。これにより、高密度連鎖地図を構築するための基礎データを得ることができた。また、この新手法は簡便かつ低コストで、広い範囲の生物種・サンプルに対して迅速な遺伝的解析が可能のため、「次世代分子生態学」のための有効なツールとして今後の幅広い利用が期待できる。

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 9 件)

- (1) Fukano Y, Yahara T. 2012. Changes in defense of an alien plant *Ambrosia artemisiifolia* before and after the invasion of a native specialist enemy *Ophraella communa*. PLoS ONE 7: e49114
- (2) Hirota SK, Nitta K, Kim Y, Kato A, Kawakubo N, Yasumoto AA, and Yahara T. 2012. Relative role of flower color and scent on pollinator attraction: experimental tests using F1 and F2 hybrids of daylily and nightlily. PLoS ONE 7(6): e39010.
- (3) Hirota SK, Nitta K, Suyama Y, Kawakubo N, Yasumoto AA, Yahara T.

2013. Pollinator-mediated selection on flower color, flower scent and flower morphology of *Hemerocallis*: evidence from genotyping individual pollen grains on the stigma. PLoS ONE 8(12): e85601.

- (4) Matsumoto T, Yasumoto AA, Nitta, K, Yahara T and Tachida H. 2013. Difference in flowering time as an isolating barrier. Journal of Theoretical Biology 317: 161–167
- (5) Fukano Y, Tanaka K, Yahara T. 2013. Directional selection for early flowering is imposed by a re-associated herbivore - but no evidence of directional evolution. Basic and Applied Ecology 14: 387–395.
- (6) Fukano Y, Tachiki Y, Yahara T, Iwasa Y. 2013. Soil disturbances can suppress the invasion of alien plants under plant–soil feedback. Ecological Modelling 260: 42–49.
- (7) Mitsuyuki C, Hoya A, Shibaie H, Watanabe M, Yahara T. 2014. Formation of a hybrid triploid agamosperm on a sexual diploid plant: evidence from progeny tests in *Taraxacum platycarpum* Dahlst. Plant Systematics & Evolution 300: 863–870.
- (8) Mimura M, Mishima M, Lascoux M, Yahara T. 2014. Range shift and introgression of the rear and leading populations in two ecologically distinct *Rubus* species. BMC Evolutionary Biology 14: 209.
- (9) Matsumoto T, Yasumoto AA, Nitta K, Hirota SK, Yahara T, Tachida H. 2015. Difference in flowering time can initiate speciation of nocturnally flowering species. Journal of Theoretical Biology 370: 61-71.

[学会発表](計 6 件)

廣田峻・新田梢・安元暁子・矢原徹一：スズメガの花選好性及ばす蜜報酬の影響 第 44 回種生物学シンポジウム、P1、滋賀、2012 年 12 月 8 日
 廣田峻・新田梢・安元暁子・矢原徹一：蜜報酬の偏在がスズメガの花選好性に及ぼす影響 第 60 回日本生態学会大会、P1-153、静岡、2013 年 3 月 6 日
 廣田峻・新田梢・陶山佳久・安元暁子・矢原徹一：アゲハチョウによる花粉授受効率および花粉輸送パターンの実測 第 45 回種生物学シンポジウム、P6、別府、2013 年 11 月 30 日
 廣田峻・新田梢・陶山佳久・安元暁子・矢原徹一：受粉花粉の直接遺伝解析に基づくアゲハチョウを介した送粉パターンの解明 第 61 回日本生態学会大会、PA1-115、

広島、2014年3月15日
満行 知花：タンポポの有性・無性混在システム～3倍体雑種の有性生殖と無性生殖～ 第62回日本生態学会 自由集会
「complex life cycleの進化生態学2：有性・無性生殖混在システムの進化と適応」 2015年3月18日 鹿児島 口頭発表
廣田峻・矢原徹一：薄暮性および夜行性スズメガによる花形質への選好性 第62回日本生態学会大会、PA2-157、鹿児島、2015年3月21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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢原徹一 (YAHARA, Tetsukazu)
九州大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：90158048

(2) 研究分担者

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

舘田英典 (TACHIDA, Hidenori)
九州大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：70216985

手島康介 (TESHIMA, Kosuke)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：20447593

三村真紀子 (MIMURA, Makiko)

玉川大学・農学部・准教授・
研究者番号：60451689

(3) 連携研究者
なし