

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14745

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた種間共有SNP解析による雑種起源ササ類の遺伝学的検証

研究課題名(英文) Population genetic analysis for identifying hybrid origin of dwarf bamboo species using next-generation sequencing

研究代表者

陶山 佳久 (Suyama, Yoshihisa)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60282315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物種間の雑種の起源について遺伝学的に検証するためには、親種間で共有する核ゲノムDNAマーカーが必須である。しかし、種間共有できるマーカーを多数得るのは、これまでの技術では一般に困難であった。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた新たなDNA分析手法(MIG-seq法)により、簡便に共有マーカーを得て、これまで容易には解決できなかったササ類における雑種起源の一例を明らかにした。さらに別の生物種(ツツジ属)における雑種起源の推定も実施し、本研究の手法が雑種起源の検証法として有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Studies of the genetic origin of hybrids are required to clarify systematic relationships in many species groups. However, it is generally difficult to develop common DNA markers among different species for the genetic analysis. Here, we conducted a new approach, multiplexed ISSR genotyping by sequencing (MIG-seq) method, for identifying the parental species of two putative hybrid species (groups) of dwarf bamboo and Rhododendron. Our population genetic analysis strongly suggested hybrid origin of the species. This approach can be applied to investigating a wide range of hybrid species, and will be able to contribute to systematic studies of many species.

研究分野：森林分子生態学

キーワード：雑種識別 MIG-seq法 集団遺伝学 NGS ササ ホンシャクナゲ

1. 研究開始当初の背景

(1) ササ類における雑種問題と、雑種起源の遺伝学的検証に立ちはだかる技術的障壁

通常の葉緑体 DNA 塩基配列分析では、種間雑種が含まれる種群の系統解析は複雑な結果を示し、系統関係が明確に把握できない場合がある。ササ類にはこのような雑種の存在が多数推定されているが、それらの親種を遺伝学的に検証するためには、核ゲノムの種間共有マーカーが必要である。しかし、異なる推定両親種間で共有する多型マーカーを相当数開発するのは通常困難であり、このような技術的問題が雑種解析の障壁となっている。

(2) 次世代シーケンサーを用いた雑種ササ類とその推定親種の集団遺伝学的解析

研究代表者らは、近年急速に発達した次世代シーケンサーを駆使し、独自に新しい SNP 解析手法を開発した。この手法では、ゲノム情報が事前に全く得られていない種であっても、通常は短期間に数百程度程度の SNP (一塩基多型) マーカーを得ることができる。ただし、この手法を用いても種間関係が遠縁な場合には種間共有マーカー数は限られることになるが、もともとの種あたりの座数が多いため、最終的に利用できる座数が相当数確保される可能性が高くなる。つまりこの手法を用いれば、これまで困難だった種間共有マーカーによる集団遺伝学的な雑種起源の解析が可能になる。そこでその解析実例として、森林研究分野では古くからその存在が指摘されているササ類の推定雑種を対象として、その起源の検証を目指した。また、この手法を新しい雑種研究手法として提案するため、そのほかの種を対象とした解析も行うこととした。

2. 研究の目的

ササ類には、種間雑種だけでなく属間雑種も存在すると考えられており、身近に分布するササ類であっても簡便な種同定の障害となることが多い。このような雑種の起源について遺伝学的に検証するために必要な、親種間で共有する核ゲノムマーカーを得るのは一般に困難で、このことが技術的障壁となっている。これに対し、研究代表者らが独自開発した新手法である Multiplexed ISSR Genotyping by sequencing (MIG-seq) 法 (Suyama & Matsuki 2015) では、次世代シーケンサーを利用して簡便に数百程度程度の SNP マーカーが得られる。そこで本研究では、この新手法によりササ種間の共有 SNP 解析を行い、これまで解決できなかった複数のササ類の雑種起源を明らかにすることを目的とした。さらに、このような研究アプローチを、新たな雑種起源検証法として提唱することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料

解析対象の雑種をアズマザサ属のウゴザサ (*Sasaella masamuneana* f. *hashimotoi*) として、その推定親種であるメダケ属のアズマネザサ (*Pleiolobus chino*) とササ属のチマキザサ (*Sasa palmata*; 同節の近縁種を含む)、さらに同一地域内に自生するササ類であるオクヤマザサ (*Sasa spiculosa*) およびスズタケ (*Sasamorpha borealis*) を含めた近縁種群を分析対象とした。これら 5 種について、東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター (川渡フィールドセンター) 内に自生する個体から採取した合計 68 サンプルを分析対象試料とした (図 1)。またこれらのサンプルの中に、同センター内に自生するアズマネザサを種子親、チマキザサを花粉親として 1987 年に人工交配して得られた雑種個体も含めた。

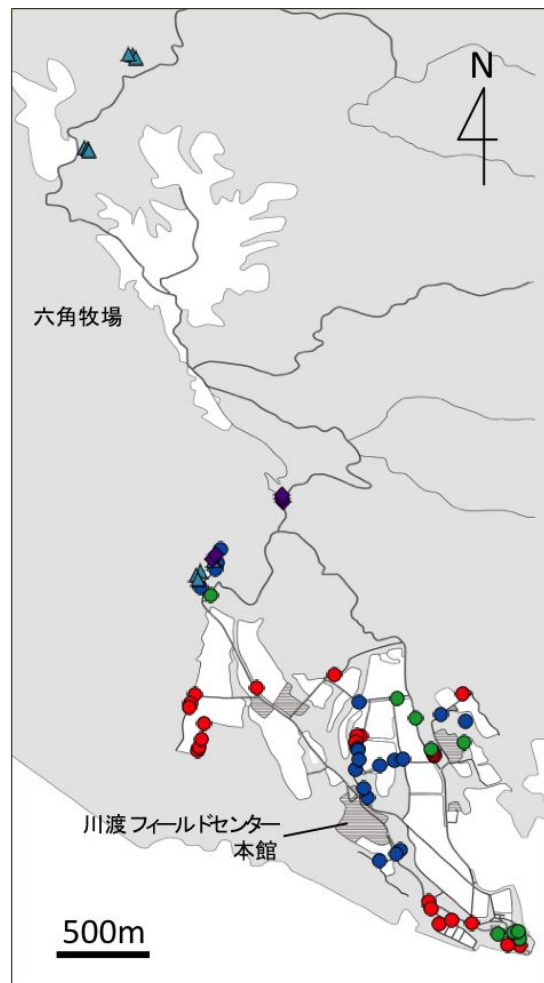


図 1 本研究で分析対象試料とした各サンプルの採取位置図 (アズマネザサ、ウゴザサ、チマキザサ、オクヤマザサ、スズタケ)。図に示したのは宮城県大崎市鳴子温泉に位置する東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター (川渡フィールドセンター) の敷地。

(2) 方法

これらの対象サンプルの葉から DNA を抽出

し、次世代シーケンサーを利用した新規分析手法である MIG-seq 法を用いて(図2) 対象種間で共有する SNP マーカーに基づいた集団遺伝学的な解析を行った。得られたデータから、各種の遺伝的組成を明らかにし、雑種起源(親種)の遺伝学的特定を試みた。さらに、遺伝的多様性の評価、遺伝的関係の解析および近似ベイズ計算(ABC)法による集団動態の推定を行った。

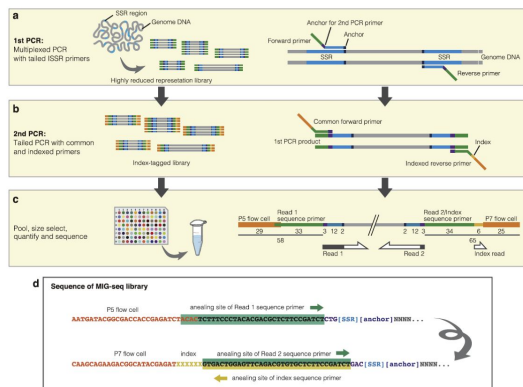


図2 本研究で用いた MIG-seq 法の概要 (Suyama and Matsuki 2015 より引用)。a) まず 1st PCR として、特定の Tail 配列を付加した複数の ISSR (inter-simple sequence repeat) プライマーによってマルチプレックス PCR を行う。b) 次に Tailed PCR である 2nd PCR によって、1st PCR 産物にシーケンシングに必要な配列とインデックス配列を付加したライブラリーを作成する。c) 出来上がったサンプル別ライブラリーを混合・精製・サイズ選択・定量する。d) 完成したライブラリーを次世代シーケンサーで読み取り、数千領域程度の塩基配列データを取得する。これらの配列データからサンプル間で共有する座にある SNP を検出し、遺伝マーカーとして用いた解析を行う。

(3) 他の分類群への応用

次世代シーケンサーを用いた新手法による雑種起源の遺伝学的検証法として、一連の研究手法を完成させ、他の分類群の植物における雑種起源の検証を試みた。材料として、ツツジ科ツツジ属のホンシャクナゲ (*Rhododendron japonoheptamerum* var. *hondoense*) とキョウマルシャクナゲ (*R. japonoheptamerum* var. *kyomaruense*) およびこれらの中間的な形態を示す集団を対象として、ササを対象として行った研究と同様に次世代シーケンサーを用いた種間共有 SNP 解析、すなわち MIG-seq 法によって遺伝的情報を取得した。

4. 研究成果

(1) ウゴザサの両親種特定

対象としたササ類の各種間で共有する 36 座の SNP を用いて、各種の遺伝的多様性を算出した。その結果、ヘテロ接合度の観察値 (H_0)

は推定雑種であるウゴザサが最も高い値を示した(図3)。このことは、ウゴザサが遺伝的に異なる両親種の交配によって生じた交雑由来のグループであることを強く支持している。

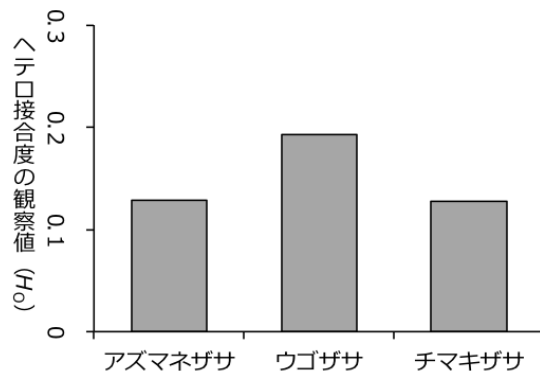


図3 推定雑種であるウゴザサと、その推定両親種であるアズマネザサとチマキザサで共通して得られた SNP36 座における各種のヘテロ接合度の観察値 (H_0)

次に、各個体間で得られた 94 座の SNP の遺伝子型を基に、それぞれ算出した遺伝的な距離を 2 次元散布図にする主座標 (PCoA) 分析を行った結果、各種ごとにまとまりが見られ、推定雑種は推定両親 2 種の中間的な配置関係にあることがわかった(図4)。

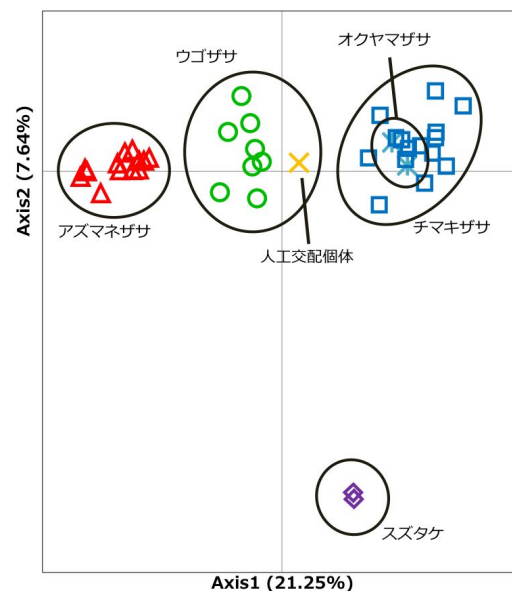


図4 推定雑種であるウゴザサと、その推定両親種であるアズマネザサとチマキザサ、さらに同一地域内に分布するササ類であるオクヤマザサおよびスズタケで共通して得られた SNP94 座の遺伝子型データを基に算出した 41 個体間の遺伝距離に基づく主座標分析 (PCoA)。

遺伝的集団構造 (STRUCTURE) 解析においては、全集団内の想定分集団数 (K) は 2 が

最適値であることが示され、推定両親2種はそれぞれ別の遺伝的要素にほぼ固定し、推定雑種は推定両親種の遺伝的要素をほぼ半分ずつ持っていることが示された。さらに人工交配個体についても推定雑種と同様の遺伝的組成をもつことが示された(図5)。

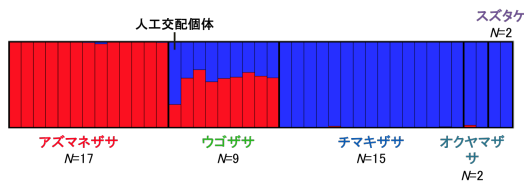


図5 推定雑種であるウゴザサと、その推定両親種であるアズマネザサとチマキザサ、さらに同一地域内に分布するササ類であるオクヤマザサおよびスズタケの合計41個体で共通して得られたSNP94座の遺伝子型データを基にした遺伝的集団構造(STRUCTURE)解析図。最尤であった想定分集団数 $K=2$ の遺伝的集団構造のみを示した(20回の独立した試行結果の平均を結果として表した。縦軸は事後確率を表し、それぞれ異なる想定分集団に分けられた確率を個体ごとに100%の積み上げ棒グラフに表している)。

また、ABC法による集団動態推定を行った結果、祖先集団から推定両親種がまず分化し、その後2種間の交雑によってウゴザサが形成されたとするシナリオが支持された(図6)。

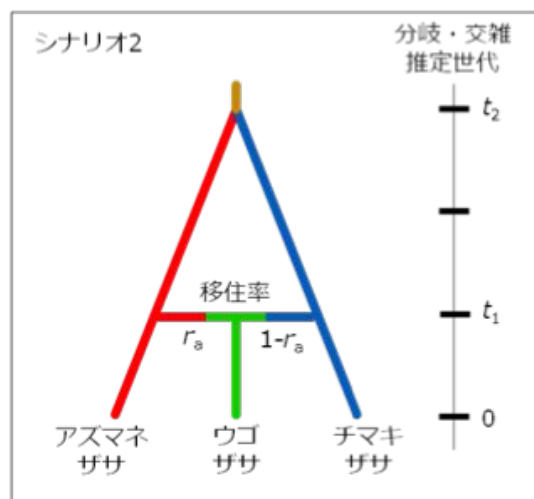


図6 近似ベイズ計算(ABC)法によるコアレントシミュレーションで仮定した6つのシナリオのうち、最尤であったシナリオ(ここではシナリオ2)が示す3種(推定雑種であるウゴザサと、その推定両親種であるアズマネザサとチマキザサ)の分岐パターン。現在から遡って交雑が起きた世代を t_1 、集団の分化が起きた世代を t_2 、交雑の際の移住率を r_a として表示した。

以上の結果から、本研究で対象とした推定雑種アズマザサ属ウゴザサは、メダケ属とサ

サ属の属間雑種由来であるという仮説が強く支持された。本研究の手法は、その他の同様な雑種関係の解明にも応用できると考えられ、本研究ではそのモデル的成果が得られたと言える。そこで同様の研究アプローチによって、ツツジ属における推定雑種集団を対象とした解析を行った。

(2) ホンシャクナゲおよびキョウマルシャクナゲ間の推定雑種集団の解析

推定両親種集団は遺伝的に明確に区別され、推定雑種集団の個体は両親種集団の中間的な形態および遺伝的クラスター組成を示した。集団動態推定解析の結果を合わせて総合的に考察すると、対象とした推定雑種集団は、過去の種間交雑によって成立した集団が長い期間維持されて現在に至った集団であると考えられた。この成果は、研究協力者を筆頭著者として *Tree Genetics & Genomes* 誌に発表した(Tamaki et al. 2017)。

(3) まとめ

以上のように、本研究によるMIG-seq法を用いた集団遺伝学的な解析が、雑種起源の検証法として有効であることが示された。今後、本手法によってササ類等に代表される複雑な種間雑種を含む分類群において、詳しい系統関係の解明が進むことが期待される。

<引用文献>

Yoshihisa Suyama, Yu Matsuki (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5: 16963 DOI: 10.1038/srep16963

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Ichiro Tamaki, Watanabe Yoichi, Yu Matsuki, Yoshihisa Suyama, Mizuo Mizuno, Inconsistency between morphological traits and ancestry of individuals in the hybrid zone between two *Rhododendron japonoheptamerum* varieties revealed by a genotyping-by-sequencing approach. *Tree Genetics & Genomes*, 査読有、13巻、2017年、4 DOI: 10.1007/s11295-016-1084-x

[学会発表](計3件)

Yoshihisa Suyama, Yoshihiro Tsunamoto, Chika Mitsuyuki, Improvement of MIG-seq: as an effective method for conservation genetics of Mangroves. The 3rd International Workshop for Conservation Genetics of Mangroves. 2016年10月18日、琉球大学熱帯生物学研究センター西表研究施設(沖縄県八重山郡竹富町)

Yoshihisa Suyama, MIG-seq: rapid SNP genotyping for conservation genetics using NGS. The 7th EAFES International Congress、2016年4月20日、Daegu (韓国)

Takamasa Kanno, Yoshihisa Suyama, Population genetic analysis for identifying hybrid origin of a dwarf bamboo species in *Sasaella*. 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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

蒔田 明史 (MAKITA, AKIFUMI)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60315596

(3) 研究協力者

米倉 浩司 (YONEKURA, KOJI)

東北大学・植物園・助教

菅野 敬雅 (KANNO, TAKAMASA)

東北大学・大学院農学研究科・大学院生