

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06381

研究課題名(和文) RADseq比較ゲノム解析による照葉樹林の生物間ネットワークの変遷過程の解明

研究課題名(英文) Phylogeography of evergreen Fagaceae trees in the warm temperate zone in Japan using genomic approach

研究代表者

青木 京子 (Aoki, Kyoko)

大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・寄附講座助教

研究者番号：70378537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本の照葉樹林の優占樹種であるシイ類とカシ類を対象とし、マイクロサテライトマーカーあるいは次世代シーケンサーのRADseq法による系統解析および遺伝子多型解析から集団変遷の歴史を推定した。シイ類は、遺伝的に異なる4グループ(琉球、太平洋岸の西側、東側、日本海側)に分けられた。これら4グループは最終氷期最寒冷期前には既に成立しており、それぞれの地域で独自に最寒冷期を生きのび、氷期後に暖かくなるにつれて個体数を増やしたと考えられる。このように照葉樹林構成種の氷期のレフュジアの位置や規模、その後の変遷過程を推定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本列島に分布する照葉樹林を構成する植物種について、種内多型量が多く得られる解析方法を用いて集団動態の解析を行うことによって照葉樹林構成種の氷期のレフュジアの位置や規模、その後の変遷過程を推定できた。照葉樹林を構成する複数種の地理的変異パターンを明らかにすることで森林生態系の変遷過程を考察することができ、生物地理学的发展へ貢献できる。また、多数の生物種群について地域ごとの遺伝的多様性のあり方が明らかになることで遺伝的多様性の保全や野生生物の移植に対して指針を与えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the demographic history of the broadleaved evergreen trees *Castanopsis* and *Quercus* (Fagaceae) during the last glacial period in Japan using EST-associated microsatellites or restriction site associated DNA sequence. In *C. sieboldii*, we used approximate Bayesian computation for model comparison and parameter estimation for the demographic modeling. The results strongly support a demographic scenario that the Ryukyu Islands and the western parts in the main islands were derived from separate refugia and the eastern parts in the main islands and the Japan Sea groups were diverged from the western parts prior to the coldest stage of the Last Glacial Maximum (LGM). Our data indicate that multiple refugia survived at least one in the Ryukyu Islands, and the other three regions of the western and eastern parts and around the Japan Sea of the main islands of Japan during the LGM.

研究分野：分子植物地理学

キーワード：照葉樹林 レフュジア 遺伝的多様性 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

日本の生物相は、氷河期から比較的温暖な現在までの数百万年間に大きな気候変動をうけ、それともなつて分布域を大きく変化させてきた。そのため現在の生物の地理的分布は、過去の環境や地史の影響を強く受けている。個々の種における遺伝構造は様々な要因によって形成されるため、森林の歴史変遷を考察するためには、複数の構成種の地理的変異パターンを解析する必要がある。

少数遺伝子座を対象にした植物の DNA の塩基配列多型だけではその分子進化速度が遅いため種内多型量が少なく、集団動態の解析を用いて最近の分布変遷を追跡するには限界があった。しかし近年の遺伝子解析技術の発展により、核ゲノム上のマイクロサテライト多型にコアレセントシミュレーションを適用する、または次世代シーケンサーの Restriction Site Associated DNA Sequence (RADseq) 手法により数十万～数百万オーダーの遺伝子座の塩基配列情報を得る等を用いることにより、植物の歴史の変遷をさらに最近まで追跡することが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、日本の暖温帯に分布する照葉樹林に生育する植物群において、種内のゲノム解析を行い、それらの種群間で遺伝構造や遺伝的多様性を比較することによって、照葉樹林生態系の歴史的成立過程を解明する計画である。日本の照葉樹林の優占樹種であるシイ類とカシ類を対象とした。マイクロサテライト多型解析および RADseq 解析データに集団サイズの変遷解析を行うことにより、過去数万単位の分布変遷を含む最終氷期前後の分布変遷を詳細に推定する。

3. 研究の方法

(1) シイ類のマイクロサテライト解析

シイ林の優占種であるスダジイ・オキナワジイについて、コジイとの交雑の影響をできるだけ無視できるように、葉の表皮組織が1層である個体(コジイと考えられる)が混在しないスダジイ集団27集団とオキナワジイ6集団、合計33集団のデータを Aoki et al. (2014) から選んだ。このデータセットに対し、Expressed Sequence Tag に由来するマイクロサテライトマーカー32座 (Aoki et al. 2014) のうち、ヌルアレル頻度やアウトライヤー座を再チェックし、解析に適した27座を用いた。氷期から現在までの集団動態(例えばレフュージアの位置や規模、遺伝子流動の有無など)について、複数のモデルを構築して比較検討した。モデルの比較検討は、Approximate Bayesian computation analysis (ABC 解析: 近似ベイズ計算) を用いて行った。

(2) カシ類の RADseq 解析

カシ林の主要構成樹種のうち、まとまった森林を形成するイチイガシ・ウラジロガシ・アカガシを選択し、これらのタイプの林が生育する山系において1地点1種につき5~6個体を目標にして葉サンプルを採集した。アラカシ、シラカシ、ツクバネガシ、ハナガガシ、オキナワウラジロガシについても葉サンプルを採集した。採集した葉サンプルのうち、イチイガシ30個体、アカガシ79個体、ウラジロガシ69個体、アラカシ64個体、シラカシ7個体、ツクバネガシ12個体、ハナガガシ11個体、オキナワウラジロガシ6個体について RADseq 法により解析を行った。DNeasy Plant Mini Kit を用いて葉サンプルから DNA を抽出し、濃度を 20ng/μL にそろえ、RADseq 解析 (Paired end 100bp+100bp) を行った。種間の系統関係および種内の遺伝構造については解析ソフト PEAR を用いてアセンブルを行い、解析ソフト pyRAD と RAXML を用いて系統樹を作成した。

4. 研究成果

(1) モデル解析によって推定されたスダジイの歴史の変遷

ベイズ法を基本とするクラスター解析プログラムである TESS 解析を行った結果、4つの遺伝的に特徴的なまとまりを認識できた (Aoki et al. 2019)。琉球グループ、西グループ(太平洋岸の西側)、東グループ(太平洋岸の東側)、日本海グループの4グループである。この4グループに着目して過去から現在までの集団動態を推定した。これまでの推定気温、植生、出現花粉化石、遺伝子解析等の知見をもとに十分に成立し得るモデルを4つ設定し、コアレセントシミュレーションによってどのモデルが実際に観察されたデータに当てはまりがよいかを推定した。琉球地域については、最も寒冷であった最終氷期最盛期の地層からシイ属の花粉化石が検出されている (黒田 1998; 松岡・三好 1998) ため、すべてのモデルに共通して琉球グループは最も古くから存在したものとした。モデルの詳細については Aoki et al. (2019)、青木(2022)を参照。

モデル1: 九州以北地域の中で西グループが最も古くから存在し、その後、西グループから東グループや日本海グループへ分布拡大したもの(九州南部から最終氷期最盛期に照葉樹林構成種の花粉化石が出ることに基づく)

モデル2: 九州以北地域の中で太平洋沿岸のグループ(西グループおよび東グループ)が最も

古くから存在し、その後、日本海側へ分布拡大したものの（現在のフロラ・地理的分布や現在と最終氷期間の気温比較等の間接的データに基づく）

モデル3：琉球グループから九州以北地域へ分布拡大し、東グループから西グループおよび日本海グループへ分布拡大したものの（スタジイの堅果を種特異的に食するシイシギゾウムシのミトコンドリア DNA の遺伝的分化の地理的パターンに基づく）

モデル4：西グループおよび日本海グループは、琉球グループと東グループの遺伝子が混合したことによって生じたと仮定したもの（TESS 解析の結果に基づく）

現在の集団サイズはすべて同じと仮定し、移住は最近のものだけを考慮した。マイクロサテライト座の突然変異モデルには generalized stepwise mutation model を用いた。解析は、各集団からランダムに 100 個体を取り出して行った。コアレセントシミュレーションについては fastsimcoal2 を使い、モデル選択は R の abcrf パッケージを用いて行った（ABC 解析の詳細については Aoki et al. 2019 参照）。4 モデルのうち、モデル1が圧倒的に高い事後確率（0.906）で選択された。したがって、スタジイのマイクロサテライト多型で実際に観察されたデータに当てはまりがよいのは、琉球グループと西グループが最も古くから存在し、その後、西グループから東グループと日本海グループが生じた（図1）というシナリオであることがわかった。

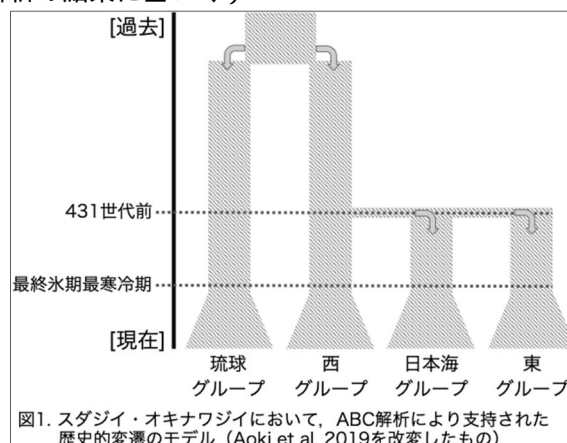


図1. スタジイ・オキナワジイにおいて、ABC解析により支持された歴史の変遷のモデル（Aoki et al. 2019を改変したもの）

西グループから日本海グループと東グループが分岐した年代は 431 世代前と推定された。樹木の世代時間を仮定するのは難しいが、世代時間は繁殖開始年齢と最長寿命の中間と仮定するのが適当であり（Petit and Hampe 2006 ; van Valen 1975）、樹木の世代時間は比較的長いようである。そこでスタジイの1世代を100年と仮定すると、日本海グループと東グループは43,100年前に西グループから分岐したことになる。したがって、これら4つのグループは最終氷期最寒冷期である1.8~2.1万年前には既に成立しており、最終氷期最盛期のレフュージアは、琉球および太平洋岸の西側に加えて、太平洋岸の東側、日本海側にも存在していたことがわかった。各グループの集団サイズの変遷をみると、それぞれ最終氷期から現在までに4倍ほど拡大している。このことからスタジイは、琉球、太平洋岸の西側、東側、日本海側で独自に最終氷期最寒冷期を生き延び、氷期後に暖くなるにつれて個体数を増やしたと考えられる。

(2) カシ類8種の系統関係

日本に生育するカシ類8種（イチイガシ、アカガシ、ウラジロガシ、アラカシ、シラカシ、ツクバネガシ、ハナガガシ、オキナワウラジロガシ）の系統関係を解析した。その結果、日本のカシ類8種は、種ごとに明確に遺伝的分化していた。イチイガシは他のカシ類と遺伝的にかなり離れており、アカガシ、ツクバネガシ、ハナガガシ、オキナワウラジロガシのクレードとウラジロガシ、アラカシ、シラカシのクレードに大きく分かれた。

カシ類は、東アジアに広く分布する主要樹種であるにもかかわらず種の境界があいまいな分類群の一つであり、複数の種間において葉緑体ハプロタイプの共有や核ゲノムの混合が報告されている。RADseq法を用いてゲノムワイドなSNPデータを得ることにより、これまで不明瞭だったカシ類の系統関係を明らかにすることができた。今後、それぞれのカシ種内の遺伝構造を解析し、集団サイズの変動を地域間で比較する予定である。

<引用文献>

- Aoki K, Tamaki I, Nakao K, et al. (2019) Approximate Bayesian computation analysis of EST-associated microsatellites indicates that the broadleaved evergreen tree *Castanopsis sieboldii* survived the Last Glacial Maximum in multiple refugia in Japan. *Heredity*, 122, 326-340.
- 青木京子(2022)シイ類（ブナ科シイ属）. 戸丸信弘・内山憲太郎・玉木一郎・阪口翔太編，日本における森林樹木の遺伝的多様性と地理的遺伝構造，164-172. 森林遺伝育種学会
- Aoki K, Ueno S, Kamijo T, et al. (2014) Genetic differentiation and genetic diversity of *Castanopsis* (Fagaceae), the dominant tree species in Japanese broadleaved evergreen forests, revealed by analysis of EST associated microsatellites. *PLOS ONE*, 9, e87429.
- 黒田登美雄(1998)南西諸島の植生史. 安田喜憲・三好教夫編，図説日本列島植生史，162-175. 朝倉書店，東京
- 松岡数充・三好教夫(1998)最終氷期最盛期以降の照葉樹林の変遷 - 東シナ海東部から日本海沿岸を中心として. 安田喜憲・三好教夫編，図説日本列島植生史，224-236. 朝倉書店，東京
- Petit RJ, Hampe A (2006) Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 187-214.
- van Valen L (1975) Life, death, and energy of a tree. *Biotropica*, 7, 259-269.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 青木京子	4. 巻 -
2. 論文標題 【第4章】各樹種の遺伝的多様性と地理的遺伝構造27 シイ類(ブナ科シイ属)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本における森林樹木の遺伝的多様性と地理的遺伝構造	6. 最初と最後の頁 164-172
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 -

1. 著者名 服部保・南山典子・浅見佳世・青木京子	4. 巻 5
2. 論文標題 照葉樹林の基礎情報と歴史	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 兵庫自然研究会報告	6. 最初と最後の頁 1-44
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 -

1. 著者名 Kyoko AOKI, Ichiro Tamaki, Katsuhiko Nakao, Saneyoshi Ueno, Takashi Kamijo, Hiroaki Setoguchi, Noriaki Murakami, Makoto Kato, Yoshihiko Tsumura	4. 巻 122
2. 論文標題 Approximate Bayesian computation analysis of EST associated microsatellites indicates that the broadleaved evergreen tree <i>Castanopsis sieboldii</i> survived the Last Glacial Maximum in multiple refugia in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heredity	6. 最初と最後の頁 326-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41437-018-0123-9	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kyoko AOKI, Noriaki Murakami, Makoto Kato
2. 発表標題 Phylogeography of broadleaved evergreen forests in Japan: parallel histories of <i>Castanopsis</i> and its seed-parasitic insect populations
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 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本の常緑広葉樹は最終氷期をどこで生き延びたのか-遺伝的多様性の保全のための新しい根拠-
https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2018/20180928_1

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------