

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：86401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14785

研究課題名(和文)大量SNPsデータを用いたシダの無配生殖種のゲノム構成の解析

研究課題名(英文)Analyzing genome constitution of apogamous ferns by much of SNPS data

研究代表者

堀 清鷹 (Hori, Kiyotaka)

公益財団法人高知県牧野記念財団・その他部局等・研究員

研究者番号：20806004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シダ植物の無配生殖種は外部形態の変異が連続的であり、種分類が難しいものを多く含むとされてきたが、個々の無配生殖種の定義DNA塩基配列情報に基づき客観的に行った研究は不十分である。本研究では複数のシングルコピー遺伝子の核DNAマーカーを用いて、オシダ科・メシダ科に知られている日本産シダ植物の無配生殖種群の雑種関係を明らかにした。また、次世代シーケンサーを用いて多量のSNPsデータを収集しゲノム構成の解析を試み、いくつかの解析条件のもとで核シングルコピー遺伝子と一致する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一連の研究により、日本産シダ植物の無配生殖種複合体の大まかなゲノム構成が明らかにされた。その多くは無配生殖種と有性生殖種の組み合わせなっており、ゲノム提供種として無配生殖種と有性生殖種が相互に関係したことが示唆された。さらに、従来外部形態に基づいて推定されていたゲノム提供種が、DNA塩基配列を用いたゲノム構成の推定によって、大きく見直されることにもなった。このため、これらの研究は、日本のシダ植物相の多様性の把握と保全に対して大きな影響をもつものであり、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Apogamous ferns are difficult to classify because of their continuous morphological variation. However, it is not still enough to define each apogamous species based on DNA information objectively. In Athyriaceae and Dryopteridaceae, several nuclear DNA markers showed there are reticulate relationships in apogamous species complex. Furthermore, next-generation sequencing can estimate similar genome constitution with single copied nuclear DNA markers depend on parameters of softwares.

研究分野：シダ植物のゲノム構成の解析

キーワード：無配生殖 シダ 倍数性 染色体 雑種

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

シダ植物における無配生殖とは、生活環から染色体の減数と受精の両方の過程が欠落することによって起こる無性生殖の一形態である。従来、シダの無配生殖種は無性的に胞子をつくることで子孫を残していると考えられてきた。そのため、1つの親個体から生じた子孫は遺伝的に同一で形態変異も小さいはずである。

しかし実際は、シダの無配生殖種は連続的で大きな形態変異をもち、種分類は難しいとされてきており、雑種起源の種も多いたらうと主張する研究者は多かった。ただし、このことについて議論し論文や著作などで正式な形として発表した研究者は少なく、ゲノム提供種に関する仮説も私見レベルにとどまっていた状況が長く続き、DNA マーカーを用いた検証が始まったのはつい最近の事である。そのため、無配生殖種の形態変異のなかから、単一の系統に由来する無配生殖種（いわゆる同質倍数体起源）と、複数種の雑種起源に由来するもの（異質倍数体起源）を区別することがまず必要であり、そのうえで各々の無配生殖種における形態変異の多寡が論じられるべきである。

関連して重要なのは、無配生殖種における網状関係を形成する要素になったと考えられる系統の識別である。近年の研究ではオシダ科オシダ属において、比較的ゲノム提供種の推定が可能であることが分かっている[1]。

ただし、ゲノム提供種のすべてが揃う例は少なく、いわゆる「未知種」がどうしても出てくるのが常である。さらには、使用する核遺伝子座によって DNA マーカーの精度は異なってくることもあり、本当に存在する系統がいくつあるのかを正確に推定することは難しい。そこで、次世代シーケンサーを用いて、大量の遺伝子座から DNA 塩基配列の情報を取得することも必要であると思われる。

<引用文献>

[1] Hori et al. (2014). J. Plant Res. 127: 661–684.

### 2. 研究の目的

本研究の目的はまず、分類が困難な無配生殖種を多く含むシダ植物複合体のゲノム構成を解析し、どのような網状進化が起きているかを明らかにすることである。申請者はまず無配生殖種における網状進化が明らかになりつつあるオシダ属の日本産の種について、網羅的にゲノム構成を解析し、次にメシダ科における無配生殖種のゲノム構成を解析することとした。これにより、日本国内のシダ植物において、論文発表の有無にかかわらず、ほぼすべての無配生殖種とその関連種のゲノム構成が解析されたことになる。

### 3. 研究の方法

<研究材料>

(1) オシダ属 *Dryopteris* (オシダ科)

本属はイタチシダ類・ベニシダ類 *D. erythrosora* complex・イワヘゴ類 *D. atrata* complex・コソギイタチシダ *D. yakusilvicola* と異なる系統群において無配生殖種群が知られている。

(2) メシダ属 *Athyrium* (メシダ科)

本属のうち、シケチシダ類では雑種起源の無配生殖種とされているハコネシケチシダ *Athyrium christensenianum* が知られている。本種はイッポンワラビ *A. crenuloserrulatum* とシケチシダ *A. decurrentialatum* の雑種起源とされてきたが[2]。

(3) オオシケシダ属 *Deparia* (メシダ科)

本属のうち、オオヒメワラビ類 *Deparia okuboana* complex は無配生殖種複合体を形成する。特にオオヒメワラビ *Deparia okuboana* はミドリワラビ *D. viridifrons* とオオヒメワラビモドキ *D. unifurcata* の中間的な形態をもち、また、コウライイヌワラビ *D. coreana* とコウライイヌワラビモドキ *D. henryi* と共にミドリワラビとほぼ相同な葉緑体 DNA 塩基配列をもつことが知られている[3]。そのため、二倍体ミドリワラビを一つのゲノム提供種とした複合体が存在すると考えられる。関連して、オオメシダ *D. pterorachis* とオオヒメワラビの雑種と推定されているオオメシダモドキ *Deparia x kikuchii* no.nud.の実体についても解析した。

(4) ノコギリシダ属 *Diplazium* (メシダ科)

本属のうち、シロヤマシダは形態変異が多く近縁種との区別にしばしば混乱をきたすもので

ある。近縁種のヒロハノコギリシダ、ヒュウガシダ、シマシロヤマシダ、アマミシダを含めたゲノム構成を解析することで、本種の起源が明らかになる可能性がある。

<ゲノム構成の解析方法>

・葉緑体と核シングルコピー遺伝子を用いたゲノム構成の解析

母性遺伝する葉緑体遺伝子のうち *rbcL*, *ndhF* の 2 遺伝子座と, *trnL-F* 遺伝子間領域の DNA 塩基配列を決定し, これにより母親由来の系統を推定した。さらに, 両性遺伝する複数の核 DNA マーカーを用いてゲノム構成を推定した。

・次世代シーケンサーを用いた大量 SNPs データの解析

次世代シーケンサーを用いて大量 SNPs データを取得することにより, より多くの情報に基づいてゲノム構成を推定して種間の遺伝的関係の把握を試みる。これにより, 特定の遺伝子座だけではなく「ゲノム全体の構成がどうなっているか」という問いに答えることができるであろう。

・MIG-seq [4]

本手法は, マルチプレックス PCR によって増幅された多数のマイクロサテライト間領域の PCR 産物から 150-200bp の長さの塩基配列情報を読み取り 1000 座程度の SNPs 情報を得るものである。イタチシダ類に行い, 得られた塩基配列を解析ソフト「Stacks」と「ipyrad」を用いて Structure 解析を行い, ゲノム構成を推定した。Raw データの取得は東北大学の陶山佳久教授の研究室に依頼した。

・GRASS-Di@解析[5]

トヨタ自動車株式会社によって開発されたもので, 基本的には MIG-seq と同様の手法であるが, ゲノム DNA を増幅するのに用いるプライマーが繰り返し配列ではなくランダムなプライマーである点で異なっている。個体変異の多いマイクロサテライト領域にプライマーを設計する MIG-seq に比べて, より均等にゲノムを増幅し欠失データも軽減すると期待できる。ベニシダ類の一部に用い, データ取得は Genebay (株) に依頼した。

<引用文献>

[2] Park CH, Kato M (2003). J. Plant Res. 116: 93–103.

[3] Kuo LY, Ebihara A, Kato M, Rouhan G, Ranker TA, Wang CN, Chiou WL (2017). Cladistics 34: 78–92.

[4] Suyama Y, Matsuki Y (2015). Scientific reports 5.

[5] 特開 2018-42548(P2018-42548A)

## 4. 研究成果

### (1) オシダ属 *Dryopteris* (オシダ科)

葉緑体 *rbcL* 領域と核 *G6PD* 遺伝子の解析から, 対馬でミサキカグマ *D. chinensis* の三倍体無配生殖型と二倍体有性生殖種のハチジョウベニシダ *D. caudipinna*, 三倍体無配生殖型ミサキカグマと二倍体有性生殖種アラゲベニシダ *D. tsoongii* の雑種起源の四倍体無配生殖種が以前から見られていたが, これらを新種として記載した。前者にはツシマミサキカグマ *D. tsushimensis*, 後者にはアラゲミサキカグマ *D. subtsumensis* の名を与えた。いずれも無配生殖種側が母親となった珍しい事例である。

イワヘゴ類 *D. atrata* complex のうち, 四倍体有性生殖種オクマワラビ *D. uniformis* はキリシマイワヘゴ *D. hanghowensis* とクマワラビ *D. lacera* (どちらも二倍体有性生殖種), 三倍体無配生殖種のイワヘゴ *D. atrata* とキヨスミオオクジャク *D. namegatae* はツツイイワヘゴ *D. tsutsuiana* とキリシマイワヘゴの雑種起源と判明した。この他の種についても, 二倍体有性・二倍体無配・三倍体無配・四倍体有性型における複雑な関係が明らかになった。両性遺伝をする核遺伝子で識別された祖先種の系統は不稔雑種も含めれば 10 を超えたが, 母性遺伝をする葉緑体遺伝子で識別できた系統についてはその半分程度にとどまった。これは, 特定の限られたゲノム提供者が母親として機能したことによると考えられた。

三倍体無配生殖種コスギイタチシダの起源は, オトメイタチシダ *D. melanocarpa* var. *elegans* (二倍体無配・三倍体無配両方) に近縁な未知の二倍体無配生殖種とミヤマイタチシダ *D. sabaiei* の雑種起源であるという結論になった。

### (2) メシダ属 *Athyrium* (メシダ科)

以下, メシダ科の分類群すべてにおいて, 使用した核マーカーは *AK1* 遺伝子のものである。

ハコネシケチシダには複数の実体があることが分かった。まず, イッポンワラビのゲノムとシケチシダに相似なゲノムをもつ異質四倍体の有性生殖種ヒメシケチシダ *A. bipinnatum* が西日本地域に少数生育していることが分かった。不稔雑種には複数の実体があり, ハコネシケチシダ狭義=ヒメシケチシダ×イッポンワラビ, 三倍体不稔; イッポンシケチシダ=シケチシダ×イッポンワラビ, 三倍体不稔; ニセヒメシケチシダ=シケチシダ×ヒメシケチシダ, 四倍体不稔; ナンゴクハコネシケチシダ=シケチシダ×イッポンワラビ×ナンゴクシケチシダ *A. opacum*, 三倍体不稔の 4 つであった。不稔雑種の胞子は異常か形成されず, 発芽能力はもたなかったため, 根茎が横走・分岐することによって集団が維持拡大されていることが推察された。

### (3) オオシケシダ属 *Deparia* (メシダ科)

*Deparia okuboana* complex (オオヒメワラビ類)のうち、片親としてオオヒメワラビモドキ(三倍体無配生殖種)が関係していたのは、オオヒメワラビとコウライイヌワラビモドキであった。また、ソーラスがソーセージ状になる形態をもち比較的近縁なものとして、ミヤマシケシダ類 *D. pycnosora* complex の関与が考えられ、コウライイヌワラビとコウライイヌワラビモドキについては、確かにその関係性が示唆された。

これまでオオメシダモドキはオオヒメワラビとオオメシダ(二倍体有性生殖種)の雑種と考えられてきたが、オオメシダモドキとされてきた集団から複数個体の遺伝子解析を実施したところ、ミドリワラビとオオメシダの組み合わせと判明し、染色体観察で二倍体であることも分かった。そのため、ミドリオオメシダに新たな雑種名 *D. ×nanakuraensis* を与えて記載した。ミドリオオメシダは生育地一帯に群落を作っていたが、胞子はできないか、異常であった。一方で根茎に不定芽ができることが確認されたので、胞子ではなく狭義のクローン生殖によって個体群が維持されているものとみられる。

#### (4) ノコギリシダ属 *Diplazium* (メシダ科)

シロヤマシダ類 *Diplazium hachijoense* complex も、オオヒメワラビ複合体と同様に、雑種起源の種が多数存在することが分かった。ゲノム提供種が両親ともに判明したのは、ニセシロヤマシダ *D. taiwanense*・モッコヨムシダ *D. kawabatae* (三倍体無配生殖種)、ヒロハノコギリシダ *D. dilatatum* (二倍体有性生殖型と三倍体無配生殖型)とヒュウガシダ *D. takii* (三倍体無配生殖種); シロヤマシダ(三倍体無配生殖種)、アマミシダ *D. amamianum* (二倍体有性生殖種)とヒュウガシダ(三倍体無配生殖種); 未記載種、アマミシダとシマシロヤマシダ *D. doederleinii* (三倍体無配生殖型または四倍体無配生殖型)の組み合わせである。片親だけが判明しているものとして、ヒュウガシダと未知種、ヒュウガシダとキノボリシダの片親(未知種)、ヒロハノコギリシダと未知種、アマミシダと未知種を挙げることが出来る。これらのうち、アマミシダと未知種の組み合わせについては、未知種が無配生殖種でなければ説明がつかないため、無配生殖種の未知種の存在までが示唆された。

#### (5) MIG-seq

得られたデータのうちリード長が80塩基のものだけをStacksによるトリミング機能を用いて抽出した。なおこのとき、系統的に近いナンカイイタチシダ、イワイタチシダ、モトイタチシダ、ムニンイタチシダとそれらの間の雑種起源と推定されていた種のみを比較した。次に ipyrad のツールキットを用いて Structure 解析を行った。このとき、ある相同遺伝子座において欠失データをもたない最低サンプル数の割合を0.1または0.4に設定し比較した。前者の場合、ナンカイ・イワ・モトの3つのゲノムが大まかに識別できたが、ムニンは雑種起源と判定されてしまった。先行研究において、核シングルコピー遺伝子によって推定されたゲノム提供種がナンカイ・イワ・モトのイワオオイタチシダ *D. subhikonensis*、ナンカイ・モトのオオイタチシダ *D. immixta*、モト・イワのヤマイタチシダ *D. bissetiana* は識別された3つのゲノムの組み合わせで説明することができた。一方で、ナンカイ・モト・ムニンの組み合わせのチチジマイタチシダ *D. chichisimensis* はナンカイイタチシダの同質倍数体と推定されてしまった。後者の場合、識別できたゲノムは2つにとどまった。これは、欠失データを過剰に除去したことによって、種の識別に必要な遺伝子座が欠失してしまったためであると思われる。

#### (6) GRASS-Di 解析

GRASS-Di 解析は一部ベニシダ類の種を対象として行った。リード長、ある相同遺伝子座において欠失データをもたない最低サンプル数の割合、同一の遺伝子座に含まれる塩基配列の相似性を複数設定したところ、その設定条件によって識別されるゲノムの数が変化した。核シングルコピー遺伝子で推定されたゲノム構成と一致した条件は限定され、大まかな傾向としては、リード長は80塩基以下をすべて含むか、100塩基に揃えた場合のみで、ある相同遺伝子座において欠失データをもたない最低サンプル数の割合は75~90%、同一の遺伝子座に含まれる塩基配列の相似性は85~90%に設定するのが適切であった。ヌカイタチシダマガイ *D. simasakii*、キノクニベニシダ *D. kinokuniensis*、ベニシダ *D. erythrosora*、マルバヌカイタチシダモドキ *D. tsugiwoi* のゲノム提供種の組み合わせは核シングルコピー遺伝子の解析結果と一致した。核シングルコピー遺伝子による解析で識別の困難であったナチクジャク・イヌナチクジャク・マルバベニシダとヌカイタチシダ・ヌカイタチシダモドキの関係は、GRASS-Di 解析においても識別されなかった。

以上の結果より、大量にSNPsデータを収集しても、核ゲノム構成の推定結果はシングルコピー遺伝子によるものと変わらないか、むしろ低下するのが現状と言える。これは、無差別に大量の遺伝子座の塩基配列情報を収集しても、種の識別に不必要な情報が適切なゲノム構成を阻害してしまうからであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kiyotaka Hori, Noriaki Murakami	4. 巻 124
2. 論文標題 Origin of the Diplazium hachijoense complex (Athyriaceae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phytokeys	6. 最初と最後の頁 57-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3897/phytokeys.124.35242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyotaka Hori, Masato Watanabe, Atsushi Ebihara, Ichiro Yamazumi, Masayuki Takamiya, Noriaki Murakami	4. 巻 84(2)
2. 論文標題 Genome Constitution of the Dryopteris atrata Complex (Dryopteridaceae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 135-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.84.135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyotaka Hori	4. 巻 61(2)
2. 論文標題 The origin of fern Athyrium christensenianum (Koidz.) Seriz. (Athyriaceae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biologica Cracoviensia series botanica	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24425/abcsb.2019.127742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyotaka Hori	4. 巻 85(1)
2. 論文標題 Allelic variation in the Athyrium christensenianum complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.85.9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyotaka Hori, Xile Zhou, Yue-Hong Yan, Yasuhiko Inoue and Noriaki Murakami	4. 巻 69
2. 論文標題 Evidence for Maternal Ability in Hybridization of Apogamous Fern Species: <i>Dryopteris tsushimense</i> K. Hori & N. Murak. and <i>D. subtsushimense</i> K. Hori & N. Murak. (Dryopteridaceae), New Tetraploid Apogamous Pteridophytes of Hybrid Origin from Tsushima, Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Phytotax. Geobot.	6. 最初と最後の頁 171-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18942/apg.201809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiyotaka Hori, Masato Watanabe, Atsushi Ebihara, Ichiro Yamazumi, Masayuki Takamiya and Noriaki Murakami	4. 巻 84
2. 論文標題 Genome Constitution of the <i>Dryopteris atrata</i> Complex (Dryopteridaceae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytologia	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyotaka Hori	4. 巻 17
2. 論文標題 Hybrid origin of some species in the <i>Deparia okuboana</i> complex (Athyraceae, Polypodiidae) verified with DNA analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hikobia	6. 最初と最後の頁 315-320
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 Kiyotaka Hori	4. 巻 165
2. 論文標題 <i>Deparia</i> $\times$ <i>nanakuraensis</i> K.Hori (Athyraceae), a new hybrid pteridophyte from Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytokeys	6. 最初と最後の頁 69-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3897/phytokeys.165.57837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kiyotaka Hori, Atsushi Ebihara, Noriaki Murakami	4. 巻 70
2. 論文標題 Origin of the apogamous Japanese fern <i>Dryopteris yakusilvicola</i> (Dryopteridaceae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 TAXON	6. 最初と最後の頁 16-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tax.12416	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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 堀清鷹
2. 発表標題 シダの無配生殖種における網状進化の解明と分類学的整理
3. 学会等名 日本植物分類学会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kiyotaka Hori
2. 発表標題 <i>Deparia</i> × <i>nanakuraensis</i> (Athyriaceae), new Japanese hybrid fern
3. 学会等名 Genetic and Species Diversity, Endemism and Relictness in Indo-China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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

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