

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06805

研究課題名(和文)シカがもたらす葉サイズの進化と可塑性の変化—葉サイズ制御の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of plasticity evolution

研究代表者

石川 直子 (Ishikawa, Naoko)

東北大学・農学研究科・特任准教授

研究者番号：20771322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オオバコは湿り気のある路傍などに生える多年生草本であり、東アジアに広く分布する。また矮化オオバコは、奈良公園などで極端に高いシカの採食圧により進化したとされるエコタイプである。本研究では矮化オオバコ進化の機構を解明するための解析を行ない以下の成果を得た。(1)栽培実験により、矮化オオバコは短く倒伏した葉と花茎など、普通オオバコとは明瞭に異なる遺伝形質を持つことが分かった。(2)矮化に関わる遺伝子を単離するため核全ゲノム配列を決定した(全長約1.4Gb、遺伝子網羅率94.1%)、(3)QTL-seq解析により葉の倒伏に連鎖した約300kbの領域を単離し、少なくとも33遺伝子の存在を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生育地の様々な環境ストレスは、葉サイズなどの植物形態の表現型に可塑的な変化をもたらす一方、選択圧として働いて植物に形態進化をもたらす可能性を有する。表現型の可塑性は、変動が大きい環境下でその幅が広がり、安定した環境下では幅が狭まるよう選択されることが知られる。また先行研究では矮化オオバコの矮化形態が「可塑性の変化」により進化した可能性が指摘されている。そのため本研究により矮化オオバコの集団ゲノム解析の基盤が確立されたことで、今後、可塑性進化の機構を解明するためのより詳細な解析を行うことができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plantago asiatica (*P. asiatica*) is a perennial herb widely distributed in East Asia. The dwarf type of *P. asiatica* is an ecotype that is said to have evolved due to the extreme herbivory by deer in places such as Nara Park. In this study, we conducted an analysis to elucidate the molecular mechanism of the evolution of the dwarf, and obtained the following results.

(1) Cultivation experiments in a common environment revealed that the dwarf type of *P. asiatica* have genetic traits that are clearly different from normal plantains, such as short, lodging leaves and flower stems. (2) To isolate the genes involved in dwarfism, the entire nuclear genome sequence was determined (total length 1.4 Gb, gene coverage rate 92.6%), (3) Through QTL-seq analysis, I isolated an approximately 300kb region linked to leaf lodging, and found that it contained 33 genes. In summary, this study established the basis for population genomic studies of *P. asiatica*.

研究分野：分子遺伝学、植物形態学、植物分類学

キーワード：環境適応 ゲノム 葉形態

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉の大きさは、乾燥や傷害などの短期的な環境ストレスに随時応答して可塑的に調整される。この表現型の可塑性は、植物が変動し続ける野外環境の中で生き残るために重要な役割を果たしており、変動が大きい環境下ではその可塑性の幅が広がり、逆に安定した環境下ではその幅が狭まって形質進化が進むとされる。また植物の葉形態の可塑性を司る機構については、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて分子遺伝学的な研究の報告が多数ある。しかし野生植物の表現型可塑性の進化についての分子機構に関する知見は少なく、さらなる研究が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

オオバコは東アジアに広く分布する多年生草本であり、湿り気のある路傍や空地などに生育する。矮化オオバコは、京都の古い寺社における徹底的な除草あるいは奈良公園（奈良県）や宮島（広島県）などにおいて、極端に高いシカの採食圧を選択圧として平行的に矮化型に進化したと考えられるオオバコのエコタイプである（Nakayama et al. 1996; Ishikawa et al. 2006）。本研究の目的は、シカの採食圧が高い場所の矮化オオバコに注目し、（1）普通オオバコと矮化オオバコの遺伝形質の相違を明らかにすること、次に集団ゲノム解析を行うため（2）普通オオバコの核全ゲノム配列（参照配列）を決定すること。その後、得られた核全ゲノム配列を用いて（3）シカ過密地で選択された遺伝変異を特定するための解析（Pool-seq）を行うこと、さらに（4）矮化オオバコの葉サイズ、葉柄角度、早咲きに関わる遺伝子座を特定するための解析（QTL-seq）を行うことである。現時点において、葉柄角度、早咲きと可塑性との関係は不明であるが、矮化オオバコの進化を考える上で興味深い形質であるため合わせて解析を行った。

3. 研究の方法

（1）矮化オオバコと普通オオバコの栽培実験

奈良公園の矮化オオバコおよびそれと側所的に分布する普通オオバコの種子を野外より採取し、両者を人工気象機内で播種から同一期間・同一条件で栽培し、次の5形質についてそれぞれ30個体以上について測定を行った。①葉サイズ、②葉柄と地面がなす角度、③花茎の長さ、④花茎と地面がなす角度、⑤花成のタイミング（播種後、最初の花茎がついた葉位）。

（2）オオバコの核全ゲノム配列の決定

普通オオバコ（採集地：奈良教育大学）の葉からのゲノム DNA 抽出は NucleoBond® HMW DNA (TaKaRa) を用いて行い、さらに Short Read Eliminator Kit（日本ジェネティクス）で短いゲノム DNA 断片を取り除いた。長鎖 DNA 配列の決定は MinION (Oxford Nanopore Technologies) で行い、Flye v. 2.9 によりアセンブリ後、racon v. 1.5.0、medaka および pilon v. 1.24 でポリッシングを行った。またポリッシングには、普通オオバコから抽出したゲノム DNA 由来のショートリード (DNBSEQ) を合わせて使用した。その後、RepeatModeler v. 2.0.3 および RepeatMasker v. 4.1.2-p1 により反復配列の検索と反復配列のソフトマスクを行い、BRAKER2 により遺伝子予測・アノテーションを行った。また遺伝子予測には、普通オオバコの葉・花序・根由来の RNA-seq データを HISAT2 によりゲノム配列にマッピングしたデータを合わせて使用した。遺伝子予測により得られたアミノ酸配列の機能推定には、DIAMOND および InterProScan、eggNOG-mapper、SonicParanoid2 を用いた。本解析により得られた核全ゲノム配列およびそのアノテーション配列の品質評価には BUSCO v. 5.3.2 を使用した。

（3）Pool-seq 解析

奈良公園の矮化オオバコおよびそれと側所的に分布する普通オオバコ各 50 個体からゲノム DNA を抽出した。その後、矮化オオバコから得られた 50 個体のゲノム DNA を等量ずつミックスして作成したバルク DNA と、同様に作成した普通オオバコのバルク DNA の全ゲノム配列を決定し、PoPoolation2 によりデータ解析を行った。

（4）QTL-seq 解析

奈良公園の矮化オオバコおよびそれと側所的に分布する普通オオバコ（奈良教育大学）を両親とする F1 個体を作成し、F1 個体を自殖して得た F2 世代 500 個体を栽培室内で同一期間・同一条件で栽培し、下記 3 形質について計測を行った。①葉サイズ、②葉柄と地面がなす角度、③花成のタイミング（播種後、最初の花茎がついた葉位）。その後、QTL-seq 法では、分布の両極端を示すような個体を 20 個体ずつ選んで、高い値を示す個体のバルクと、低い値を示す個体のバルクの 2 種類のバルク DNA を作成して、それぞれ次世代シーケンサーで全ゲノム配列を決定し、QTL-seq v. 2 により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 矮化オオバコと普通オオバコの遺伝形質測定した5つ全ての遺伝形質(葉サイズ、葉柄と地面がなす角度、花茎の長さ、花茎と地面がなす角度、花成のタイミング)について、矮化オオバコと普通オオバコで統計的に有意な相違が見られた(図1. 参照)。本測定の結果より奈良公園の矮化オオバコは、普通オオバコと比較して、葉と花茎の両方が共に短く、かつ地面に倒伏し、極めて早咲きであることが明らかになった。

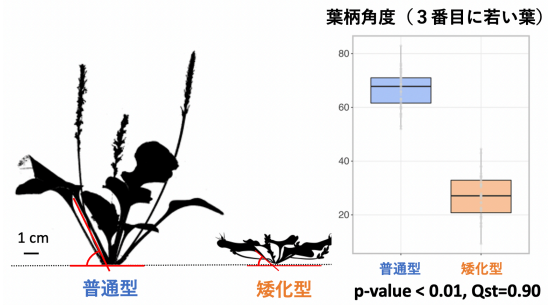


図1.普通型と矮化型のオオバコの形態(播種から同一環境で同一期間栽培)

(2) 普通オオバコの核全ゲノム配列の決定
本研究で得られた核ゲノムアセンブリのサイズは全長1.4Gb (Read depth of long read: 10-12, Read depth of short read: 25)、遺伝子網羅率94.1% (シングルコピー遺伝子: 12.3%、重複遺伝子: 81.8%)、コンティグ数5,569、平均コンティグ長254Kbであった。また本アセンブリにおいて、リピート配列としてソフトマスクされた領域はアセンブリ全長の75.51%、そのうち最も大きな割合を占めていたリピート配列は、レトロエレメントの一種であるLTR elements (49.43%)であった。

先行研究で報告されているオオバコのC値は $2C=3.298$ (Makowczynska et al., 2008)であり、これはゲノムサイズに換算すると約1.6Gbになる。また先行研究によりオオバコは異質4倍体で、その染色体は $2n=4x=24$ であることが分かっている。そのため本研究で得られたオオバコのアセンブリサイズは期待されるサイズよりも小さく、コンティグも分断された状態にある。しかしBUSCOの評価値である遺伝子の網羅度は十分に高く、高い遺伝子重複率も異質4倍体であるオオバコゲノムの特徴によく一致する。そのため本研究により得られた普通オオバコのアセンブリは、完全に読了した状態とはいえないが、集団ゲノム解析に耐えうる品質を持つと考えて以下の解析に使用した。

(3) Pool-seq 解析

奈良公園で選択を受けた可能性がある遺伝子領域として、約100 kbの領域が単離された。当該の領域には、ストレス応答、老化、ジベレリン分解に関わる遺伝子など13遺伝子が存在することが明らかになった。

(4) QTL-seq 解析

①葉サイズ、②葉柄と地面がなす角度、③花成のタイミングについてQTL-seq解析を行った。その結果、②葉柄と地面がなす角度の決定に関わる可能性のある領域として約300kbが単離された。当該の領域には少なくとも33遺伝子が存在し、WD40 repeatドメインを持つ機能未知の遺伝子などが含まれることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石川直子, 阪口翔太, 高橋大樹, 廣田峻, 陶山佳久, 伊藤元己
2. 発表標題 矮化オオバコの集団ゲノム解析
3. 学会等名 日本植物分類学会第21回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川直子
2. 発表標題 オオバコのかたちの進化 奈良公園における矮化現象について
3. 学会等名 2021年度日本植物分類学会講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoko Ishikawa, Takashi Shikata, Yuichiro Nakayama, Shota Sakaguchi, Chikako Hasekura, Alexey Shipunov, Shun K. Hirota, Ayumi Matsuo, Yoshihisa Suyama, Hirokazu Tsukaya, Hiroshi Ikeda, Motomi Ito
2. 発表標題 Genetic pollution and putative historical introgression in <i>Plantago hakusanensis</i> (Plantaginaceae) via hybridizations with <i>P. asiatica</i> var. <i>densiuscula</i> .
3. 学会等名 The 9th East Asian Plant Diversity and Conservation (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川直子, 四方貴士, 中山 祐一郎, 阪口翔太, 支倉千賀子, Shipunov Alexey, 塚谷裕一, 廣田 峻, 松尾歩, 陶山佳久, 池田博, 伊藤元己
2. 発表標題 ハクサンオオバコとオオバコの系統関係および遺伝的交流について
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川直子, 高橋大樹, 阪口翔太, 伊藤元己
2. 発表標題 奈良公園におけるオオバコ根生葉の倒伏形態の進化：形態および光・重力応答性について
3. 学会等名 第68回日本生態学会, 岡山
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川直子, 高橋大樹, 阪口翔太, 伊藤元己
2. 発表標題 奈良公園における矮化オオバコの分化とその環境応答性
3. 学会等名 日本植物分類学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川直子, 阪口翔太, 支倉千賀子, Shipunov Alexey, 塚谷裕一, 池田博, 伊藤元己
2. 発表標題 ハクサンオオバコとオオバコの遺伝的分化と交流について
3. 学会等名 日本植物分類学会第 19 回大会 (岐阜大学柳戸キャンパス)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川直子, 高橋大樹, 阪口翔太, 伊藤元己
2. 発表標題 奈良公園で進化したオオバコの葉の倒伏形態 - 光応答性および形態形成の特徴について
3. 学会等名 第67回日本生態学会 (名古屋)
4. 発表年 2020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	阪口 翔太 (Sakaguchi Shota) (50726809)	京都大学・地球環境学堂・助教 (14301)	

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