

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14955

研究課題名(和文) 雑種の単一遺伝子型の蔓延は進化上のノイズなのか？ チガヤを用いた実証

研究課題名(英文) Is the spread of single genotypes in hybrids evolutionary noise? -Test using *I. cylindrica*-.

研究代表者

野村 康之 (Nomura, Yasuyuki)

龍谷大学・公私立大学の部局等・研究員

研究者番号：70847722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：チガヤは根茎による栄養繁殖を行う多年草であり、世界的に有害な雑草である。日本には本種の生態の異なる2型(生態型)とそれらの雑種が生育している。生育地において両親の2生態型は結実率が高いが、それらの雑種の結実率は低い。チガヤが自分の花粉では結実できない性質(自家不和合性)を有することから、本研究では雑種の結実率が低い原因は雑種集団ではクローン多様性が低いためであると考えて、調査を行った。その結果、雑種集団は2生態型の集団よりもクローン多様性が低く、これが雑種集団での結実率が低い原因の1つであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、チガヤの2生態型間の雑種が生育地において集団内のクローン多様性が低いことが明らかになった。この結果は、雑種の結実率が低い結果とも整合する。雑種は両親とは異なり、主に栄養繁殖で増殖し、クローン多様度の低い集団を形成していると考えられる。これは、雑種が野外環境において単一のクローンで蔓延しやすいことを示しているのかもしれない。チガヤは日本において緑化資材として利用される植物でもあるため、生態と遺伝的多様性の解明は、今後の本種の生態系への負荷の少ない利用において基盤となる情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Imperata cylindrica (cogongrass) is a perennial weed reproducing clones by rhizomes and is a noxious worldwide. Two ecotypes and their hybrids grow in Japan. The two ecotypes have high seed-setting percentages in the natural habitats, whereas the hybrids have low ones. I am. cylindrical cannot fertilize their ovules with their own pollens (self-incompatibility). This study investigated the clonal diversity of hybrid populations because the low seed setting percentage was thought to be due to low clonal diversity. The results showed that hybrid populations had lower clonal diversity than the two ecotype populations, which could be one of the reasons for the low seed-setting percentage in hybrid populations.

研究分野：雑草学

キーワード：集団クローン構造 集団遺伝構造 雑種形成 結実率 チガヤ ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

雑種形成が生物の多様化をもたらす鍵となるイベントであることが長年の研究で明らかになってきた (Lamichhaney et al. 2018, *Science*)。その中で着目されてきたのは、雑種形成によって表現型や遺伝子型の多様性が増大することで、種々の環境での適応を促し、種分化を促進するという効果である。逆に、雑種形成由来であっても多様性が極端に低い集団は、絶滅していくと考えられている (Hamilton et al. 1990, *PNAS*)。ところが、クローン生長などにより同一の遺伝子型を生み出す雑種がしばしば繁栄していることがある (Maebara et al. 2020, *Front. Plant Sci.*)。このような生育旺盛な単一遺伝子型の存在は、時に生態系を改変してしまうインパクトをもたらすこともある (Ainouche et al. 2009, *Biol. Invasions*)。しかし、この単一遺伝子型の蔓延の進化生態学における役割は、ほとんど研究が進んでいない。

チガヤ *Imperata cylindrica* はイネ科の自家不和合性、多年生草本であり、根茎によって旺盛に栄養繁殖する。そして、適応する土壌水分環境が全く異なる2つの生態型 (C型およびE型) が存在する。東北地方の広範な地域、滋賀県、三重県、和歌山県および兵庫県の複数の地域でこれらの2生態型は雑種形成しており、さらにその雑種集団は F<sub>1</sub> だけで構成されている (Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*)。特に東北地方では2生態型を上回る数の F<sub>1</sub> が発見された (図1)。これらの F<sub>1</sub> は異なる遺伝子型同士を交配すれば種子を生産するが、野外では結実率が 0.12% で、2生態型の 1/10 程度と低い。これは、野外の F<sub>1</sub> 集団がほとんど単一遺伝子型で構成されていることを示唆している。しかし、これらは示唆にとどまっており、実際の集団構造については明らかではない。

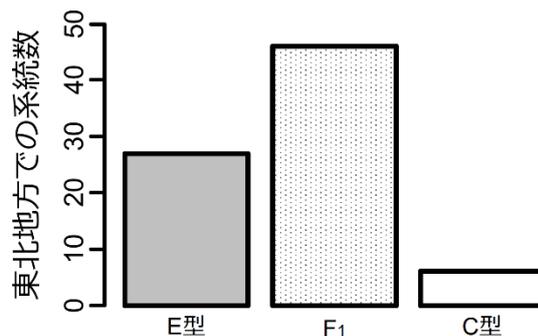


図1 東北地方における2生態型およびF<sub>1</sub>の系統数

これは、野外の F<sub>1</sub> 集団がほとんど単一遺伝子型で構成されていることを示唆している。しかし、これらは示唆にとどまっており、実際の集団構造については明らかではない。

### 2. 研究の目的

各地で発生している生態型間の F<sub>1</sub> は遺伝子型が異なっているため (Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*)

(図2)、各地で雑種形成が起こり F<sub>1</sub> の単一遺伝子型集団が形成されていると考えられる。そこで本研究では F<sub>1</sub> の親である2生態型の日本全国の集団遺伝構造の解明を行い、各地域における2生態型の遺伝的特徴を抽出する。続いて、日本各地の2生態型および F<sub>1</sub> 集団内におけるクローン多様性の程度を明らかにする。本研究で得られた各集団のクローン多様性と先行研究 (Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*) で得られている結実率との関係を明らかにする。これまでの解析では利用できる分子マーカーが少なく (Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*)、より詳細な集団遺伝構造を調査することは困難であった。そこで本研究では RAD-Seq 解析によって、多数の分子マーカーを得ることでこれを解決する。

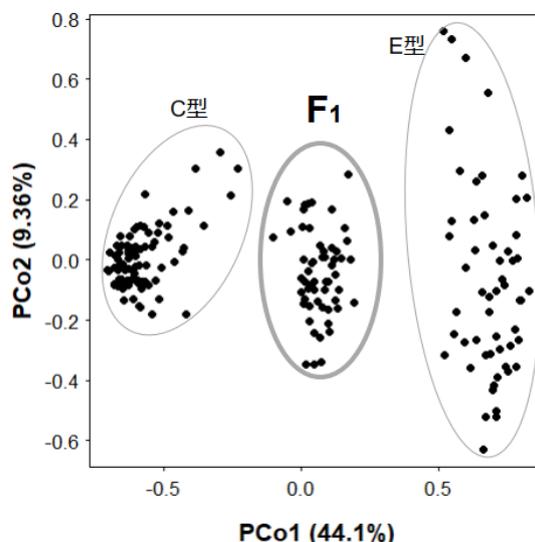


図2 12 遺伝子座を用いた2生態型および F<sub>1</sub> の主座標分析。日本各地から採集された F<sub>1</sub> には多様な遺伝子型が含まれる。

### 3. 研究の方法

#### (1) チガヤ2生態型のリファレンス配列の作成

全ゲノムシーケンズを行い、得られた塩基配列 (リード) による元配列の再構築 (*de novo* アセンブリ) を行う。C型とE型は独立に進化しており (Nomura et al. 2015, *Weed Res.*)、さらにゲノムサイズが異なることから (野村ら, 2022, 第54回種生物学シンポジウム)、ゲノム構造が大きく異なっている可能性が高い。マッピング精度を上げるために、両生態型のリファレンス配列を用意することを目指した。

#### (2) チガヤ2生態型の日本全国における遺伝的分化の解明

日本各地から採集したチガヤの2生態型について、RAD-Seq 解析により遺伝的多型を検出し、2生態型の遺伝的分化、日本各地の集団間分化を明らかにした。このとき得られたリードは Stacks によってマッピングした。以上の解析では、龍谷大学永野研究室のグループで開発

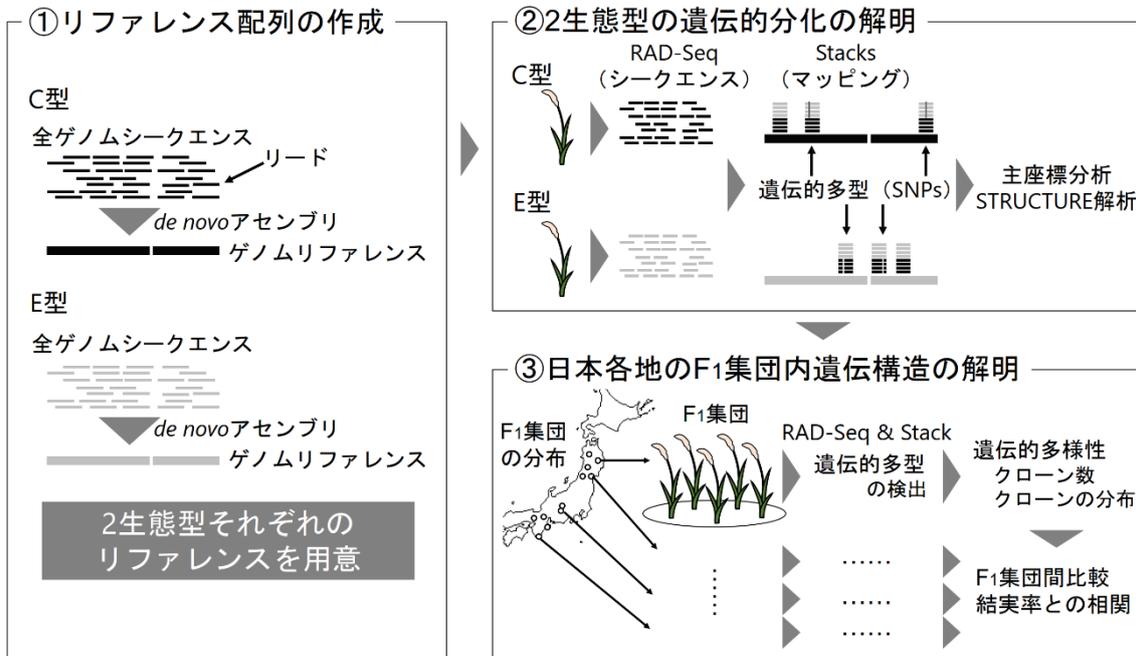


図3 本研究の概要

した超多検体を安価に次世代シーケンスできる技術を用いた。得られた塩基多型情報は、主座標分析や STRUCTURE によって解析を行った。

### (3) チガヤの集団内クローン多様性の解明

日本各地から採集した2生態型およびF<sub>1</sub>を、RAD-Seq解析およびStack解析によって遺伝的多型を検出し、集団内におけるクローン多様度を明らかにした。また、各集団の結実率 (Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*) とクローン多様度の関係性を明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

チガヤのゲノムリファレンスの整備を目指し、2生態型に関して Pacbio SequelII および HiSeq X を用いて、ロングリードおよびショートリードのゲノムの塩基配列を取得した。特に、ロングリードデータに関して、ソフトウェア NECAT などを用いてアセンブリを行ったが、リファレンスの完成までには至っていない。また、当初の予定にはなかったが、リファレンスの整備にあたり、遺伝子情報の必要性があると考え、HiSeq Xを用いてショートリードのトランスクリプトームの塩基配列も取得した。現在、共同研究者の協力も得て、リファレンスの整備を進めている。

日本各地の系統から RAD-Seq によって塩基配列を取得した。その後、Stacks 解析に最適なパラメータ設定を模索し、塩基多型の検出を行った。当初の予定ではリファレンス配列を用いることを想定していたが、リファレンスがない状態でも集団構造解析に耐える数の遺伝的変異を取得できた。2生態型およびF<sub>1</sub>を含む全系統を用いた解析では、1,042 座位の SNPs (一塩基多型) を解析に利用することができ、これは先行研究 (Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*) の約 100 倍の座位を用いた解析精度となる。解析の結果、2生態型およびF<sub>1</sub>はそれぞれ独立のクラスターを形成し、先行研究 (Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*) を支持した (図4)。また、2生態型をそれぞれ用いて、Stacks 解析を行った (図5)。C型からは9,137 SNPs 取得でき、このデータを用いるとC型は奄美大島以南、奄美大島以北のクラスターに分かれることが示唆された。この結果は、おおむね生物の分布境界線の1つである渡瀬線と一致している。E型からは9,758 SNPs 取得でき、このデータを用いると大阪に由来する系統、和歌山に由来する系統、およびそれ以外の系統の3つのクラスターに分かれること

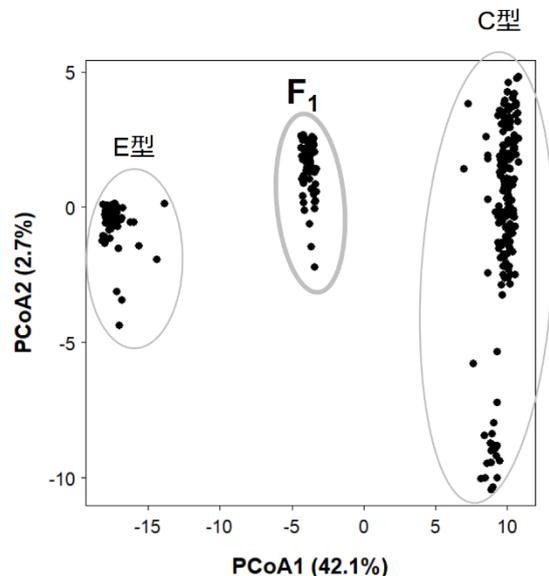


図4 本研究で得られた1,042 SNPsを用いて行った2生態型およびF<sub>1</sub>の主座標分析。

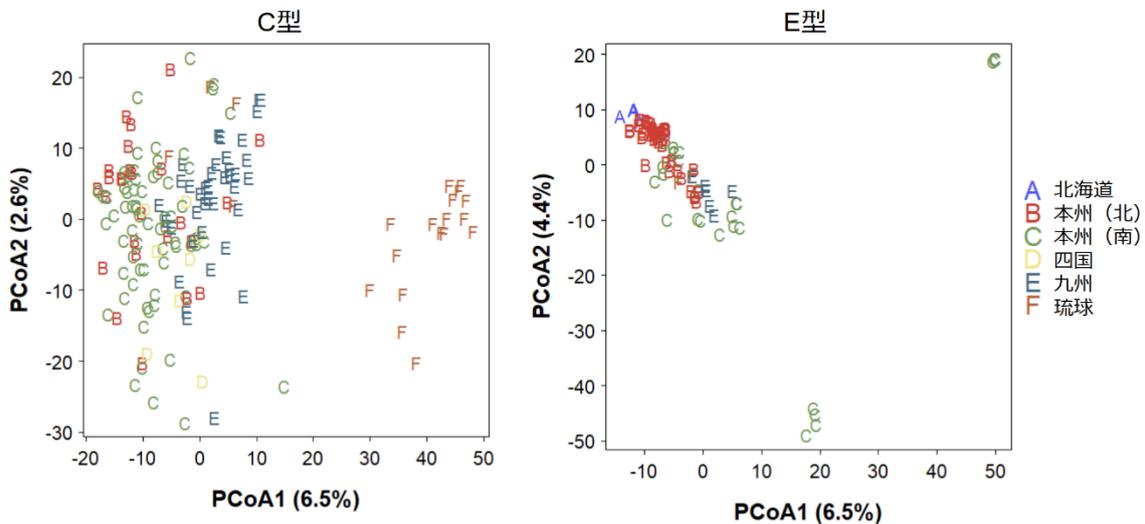


図5 各生態型内における遺伝的分化。

が示唆された。さらに大阪および和歌山の系統を除いた系統は、地方ごとの遺伝的分化が顕著であった。これらの結果は、2生態型が全く異なる集団分化の歴史を有していることを示唆している。

F<sub>1</sub>は集団によって異なるクローンが存在していた(図4)。この結果から、F<sub>1</sub>は各集団で独立に生じてきたと考えられる。RAD-Seqによって塩基配列を取得したのち、2生態型とF<sub>1</sub>の集団ごとにStacks解析を行ってクローン多様性を明らかにした。まず、C型、E型およびF<sub>1</sub>のそれぞれ平均で、5,035.5、5,246.8および2134.4 SNPs取得できた。このデータを用いて、クローンを識別し、クローン多様度の指標としてSimpsonの多様度指数を計算した結果、C型、E型およびF<sub>1</sub>はそれぞれ平均で0.69、0.60および0.50であり、F<sub>1</sub>は2生態型よりもクローン多様度が低い傾向にあった(図6)。また、クローン多様度を結実率の関係性を明らかにした結果、予想通り、2生態型はクローン多様性が高いほど結実率が高くなる傾向が得られたが、結実率のばらつきは大きかった(図7)。また、F<sub>1</sub>に関しては結実率が低いため、すべての集団でクローン多様度が低いと予想されたが、これに反してクローン多様度が高い集団も観察された。以上の結果から、クローン多様度以外の要因も強く結実率を規定する可能性があると考えられ、今後も調査を行う必要がある。

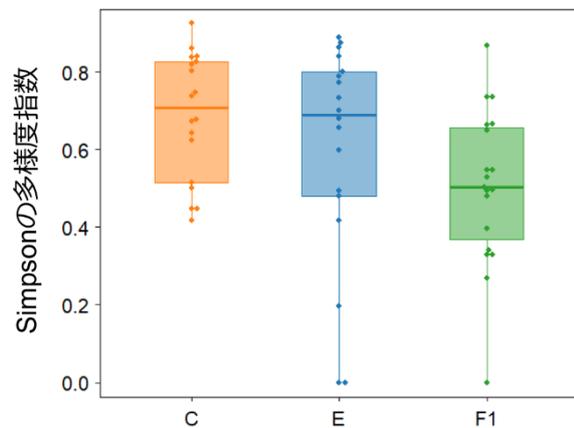


図6 2生態型およびF<sub>1</sub>のクローン多様度。

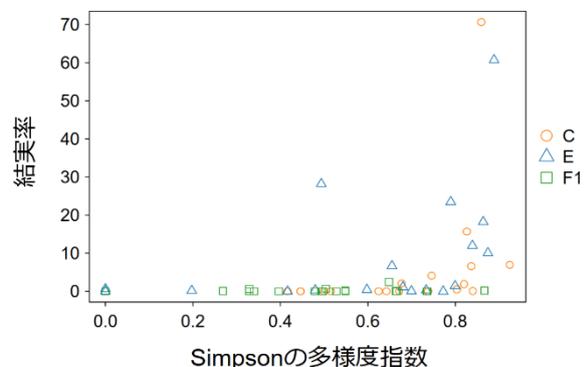


図7 2生態型およびF<sub>1</sub>のクローン多様度と結実率の関係。

## (2) 国内外における位置づけとインパクト

雑種に由来する遺伝的多様性の低い種が蔓延している事例があるにもかかわらず(Maebara et al. 2020, *Front. Plant Sci.*)、進化生態学的観点から多様性の低い雑種集団の研究は進んでこなかった。しかし、遺伝的多様性が低い場合でも、進化上重要な役割を有する可能性が高い。多年生F<sub>1</sub>の生残は、すぐに次世代を生み出すことができなくても、次世代を生み出すまでの猶予をもたらすと考えられる。長期にわたってF<sub>1</sub>が生残し続けることで、新たな雑種形成を通じてF<sub>1</sub>の遺伝的多様性が増加し(Roman and Darling 2007, *TREE*)、それにより自家不和合性による低い結実率が解消される可能性がある。このような多年生によって次世代を生み出すまでの猶予が生まれるという考え方は、異質倍数性種分化の議論と共通である(Rice et al., 2019, *Nat. Ecol. Evol.*)。本研究では、集団によって異なる遺伝子型のF<sub>1</sub>が存在していることを明らかにし、さらにF<sub>1</sub>だけで構成されていながらもクローン多様性が高い集団も存在した。先行研究(Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*)の結果から、現在も2生態型間の雑種形成が起こっていることが示唆されており、将来はF<sub>1</sub>雑種の集団内でのクローン多様性は増加していく可

能性が高い。クローン多様度が増加すれば、 $F_1$ における低い結実率を乗り越える可能性が高くなり、進化的袋小路ではなくなるだろう。このように、本研究は主に異質倍数性種分化の文脈で議論されてきたことを、同質倍数性種分化に拡張する研究となりうる。また、 $F_1$ が日本各地に独立に生じている証拠があり、この系を利用することで前述した進化的影響を複数反復について行うことができる。本研究は、このように多様性の低い雑種集団に焦点を当て、その進化的意義について解明する基盤をなすと考えられる。

また、チガヤは日本の景観を構成する主要構成種である（服部ら 1994, 人と自然; 岩切ら 2010, 人と自然）。さらには法面の土壌流亡を防止、半自然草原の復元のための緑化被覆資材をしても利用される（服部ら 1994, 人と自然; 岩切ら 2010, 人と自然; Yamada and Nemoto 2016, *Open J. Ecol.*）。一方で世界的には有害な雑草として認知されている（Holm et al., 1977, *World's Worst Weeds, Dist. Biol.*）。このように、人間生活、自然景観とも密接に関連し、利用上注意を要する植物でありながら、チガヤの進化生態学的研究は進んでいない。現在、チガヤの 2 生態型は同一種として扱われているが、別種レベルまで遺伝的に分化しており（Nomura et al. 2015, *Weed Res.*; 2022, *J. Ecol.*）、生態的にも高度に分化している（松村・行村 1980, 岐阜大農研報）。本研究によって 2 生態型は異なる集団分化のパターンを示すことが明らかになった。 $F_1$  は集団によって遺伝子型が異なっており、さらに生態的特性およびクローン多様度が 2 生態型と異なるにもかかわらず、2 生態型と  $F_1$  は区別されていない。本研究の結果は、チガヤの導入や利用するにあたって、由来する遺伝子型などの配慮が必要であることを示している。

### (3) 今後の展望

本研究の結果、クローン多様度が高い集団であっても結実率は低いことがあった。それゆえ、クローン多様度以外にも結実率に強く影響する要因があると考えられる。また、先行研究（Nomura et al. 2022, *J. Ecol.*）で明らかになっている  $F_1$  だけが有する形質の遺伝的基盤を、人為的な  $F_2$  を作出やトランスクリプトーム解析を通じて明らかにすることで、実際に雑種後代が生じたときの応答を予測することが可能になる。これらを生態学および分子遺伝学の両面から解明することで、チガヤの  $F_1$  の進化可能性についてより正確に議論することが可能となるだろう。

チガヤに起因する世界的な雑草問題の解決や緑化等の利用において、チガヤのゲノムおよびトランスクリプトームのリファレンス整備は、急務であると考えられる。リファレンスの整備が進めば、チガヤの分子生物学的解析が容易になるだろう。近年開発された、多検体を安価に RNA-Seq を行う方法（Kamitani et al., 2019, *Sci. Rep.*; Kashima et al., 2022, *Plant Methods*）などを活用すれば、チガヤの生態に関するより多くの情報を取得することが可能になる。

緑化等においては、遺伝的な攪乱を避けるために、遺伝的多様性の地域性を考慮した利用が求められている。本研究で得られた結果は、2 生態型および  $F_1$  を識別して取り扱うことの重要性を示している。これらの結果は、チガヤの利用に関するガイドラインの制定の基盤づくりに役立つであろう。また、本研究では E 型において、大阪および和歌山の系統が日本各地に由来する E 型と比較して遺伝的に離れていることが明らかになった。このような系統は、外来系統である可能性が高く、今後も注視していく必要があるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nomura Yasuyuki, Shimono Yoshiko, Mizuno Nobuyuki, Miyoshi Ikuya, Iwakami Satoshi, Sato Kazuhiro, Tominaga Tohru	4. 巻 110
2. 論文標題 Drastic shift in flowering phenology of F1 hybrids causing rapid reproductive isolation in <i>Imperata cylindrica</i> in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Ecology	6. 最初と最後の頁 1548-1560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1365-2745.13890	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村康之, 永野惇, 富永達
2. 発表標題 チガヤ2生態型およびそのF1雑種のクローン多様度の比較
3. 学会等名 第54回種生物学シンポジウム
4. 発表年 2022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
---------	---------