

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370030

研究課題名（和文）ハイマツ・キタゴヨウ交雑帯に働く自然淘汰の連鎖地図ベースでの解析

研究課題名（英文）Linkage-map based study of natural selection acting on the hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora*

研究代表者

綿野 泰行（YASUYUKI WATANO）

千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70192820

研究成果の概要（和文）：

交雑帯に働く自然選択を検出する目的で、ハイマツとキタゴヨウ間の 3 山系の交雑帯（八甲田山・蔵王・谷川岳）の詳細な遺伝的構造を、連鎖地図上に載った 34 遺伝子座（11 連鎖群）を用いて解析した。その結果、中立下での期待値から有意に頻度が偏っており、かつ 3 山系で共通したパターンを示した遺伝子座が 4 個件検出された。これらの遺伝子座には、自然選択が働いている事が示唆される。また、連鎖不平衡の低下レベルは、蔵王で最も低く、この山系で両母種の融合が進行していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Genetic structures of three hybrid zones (Mt. Hakkoda, Mt. Zao and Mt. Tanigawa) were analyzed by using 34 marker loci mapped on a linkage-map in order to detect natural selection acting on the hybrid zones. Statistically significant deviations of allele frequencies were detected at 4 marker loci consistently across all hybrid zones. It is suggested that natural selection would act on the 4 loci. Additionally, we found that the hybrid population in Mt. Zao showed the least level of linkage disequilibrium, suggesting that genetic fusion between the two parental species is highly developed in Mt. Zao.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 ・ 生物多様性・分類

キーワード：系統・遺伝子浸透

1. 研究開始当初の背景

浸透性交雑とは、種間での交雑が雑種第一代 (F1) で留まることなく、F1 がさらに両親種と戻し交雑を繰り返すことで、種の壁を越えた遺伝子の交流がおこるような交雑の様式のことである。このような交雑が盛んに行われている場所(交雑帯)は、異なった種間での遺伝的・生態的な相互作用を観察することが出来る“natural laboratories”として、古くから進化生物学者の興味を引いてきた。

研究代表者は、長年、高山帯に生育する匍匐性低木であるハイマツと、より標高の低い山地帯から亜高山帯にかけて生育する高木のキタゴヨウの間の浸透性交雑現象の解析に取り組んでいる。植物細胞は、核・葉緑体・ミトコンドリアの3種類のゲノムから構成されているが、マツ科植物においては、核は両性遺伝、葉緑体は父性遺伝、ミトコンドリアは母性遺伝を行う。このように3種類のゲノムが異なる遺伝様式を持つため、交雑帯における遺伝子浸透のパターンについても異なった挙動を示す。今迄に、この3つのゲノム全てについてマツ・キタゴヨウそれぞれの種特異的遺伝子マーカーを開発し、日本各地の交雑帯についてその遺伝的構造を詳細に記述し、樹木の浸透性交雑現象の研究のモデル系として育てることを目指してきた (Watano et al. 1995, 1996, 2004; Senjo et al. 1999; Ito et al. 2008)。

申請者がハイマツ・キタゴヨウ交雑帯の解析をすすめるのと並行して、世界的にも浸透性交雑の研究は大いに進歩した。特に、AFLP 法など大量の分子マーカーを簡便に作出する手法が発達した事にもない、ゲノムワイドでの遺伝子浸透パターンの解析が可能になった。その結果、ゲノムの部位によって、異種の対立遺伝子の遺伝子浸透の程度が大きく異なるという例が明らかとなってきた (Baack & Rieseberg 2007)。連鎖地図と対比させた研究ではさらに、浸透しにくいゲノム部位が、ある特定の連鎖群のある部位に集中する例も存在する (Scotti-Saintagne et al. 2004)。このような浸透しにくいゲノム部位は、

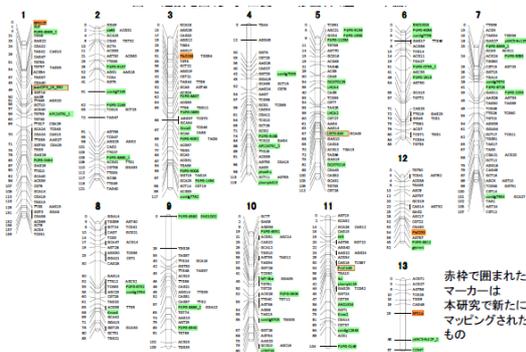


図 1 ハイマツとキタゴヨウの雑種個体から作られた連鎖地図

交雑帯に働く分断性淘汰や、隔離機構に係る遺伝子座と関連していると考えられている。単なる遺伝的構造の記述ではなく、自然選択や種の維持機構にまで踏み込むためには、連鎖地図ベースでの解析は必須であると考えられる。

申請者もまた、ゲノムワイドでの解析を目指し、科研費(基盤 B 2006-9)による助成によって、AFLP および EST マーカーを使用することで、ハイマツとキタゴヨウの自然雑種の高密度な連鎖地図(マーカー間平均距離が 2.9cM)を作成することに成功した(図 1)。

2. 研究の目的

(1) 交雑帯では、遺伝子によって浸透しやすい、または浸透しにくいものがあることが知られている。これは、交雑帯に働く自然選択の作用によるものである。本研究では、ハイマツとキタゴヨウの交雑帯において、このような自然選択の影響を受けている遺伝子座を特定する事を目的とした。独立に形成されたと想定される3山系での結果を比較し、3山系で同じ挙動を示す遺伝子座を検出することで、確度の高い結果を求める事を試みる。

(2) 自然選択の関与が期待される遺伝子として、ゴヨウマツ類発疹さび病菌耐性遺伝子がある。ハイマツには発疹さび病が生じるが、キタゴヨウには知られておらず、耐性が異なると予想される。北米産の *Pinus monticola* の主要耐性遺伝子 Cr2、*P. lambertiana* の主要耐性遺伝子 Cr1、さらに *P. monticola* で発見された耐病性関連キチナーゼ遺伝子 PmCh4B をハイマツ・キタゴヨウの連鎖地図にマッピングすることを試みる。

(3) さらに、連鎖地図上で強く連鎖した (<5cM) 遺伝子のペアについて連鎖不平衡係数を求め、母種間の融合の程度を解析した3山系の交雑帯で比較を行う。

3. 研究の方法

(1) 材料の採集

青森県八甲田山で 100 個体、群馬県谷川岳で 59 個体、宮城県蔵王山で 92 個体について球果のサンプリングを行い、1 個体につき 1 種子の胚乳の DNA 抽出を行った。

(2) 分子マーカーの選択

図 1 の連鎖地図のマーカーのうち、EST マーカー 34 個 (11 個の連鎖群) を用いた。LHCA4 を除く全てのマーカーは、PCR-SSCP 法で変異を検出し遺伝子型の決定を行った。なお、次の 5 つのマーカー群は 5cM 以下の距離で強く連鎖している。LG3 (PtIFG0893, KNOX3, PtIFG9092); LG3 (PtIFG9008, PtIFG1454); LG5 (PtIFG9156, PtIFG1956, PtIFG11056); LG5 (DQ370129, LHCA4);

LG6 (RN01G04, PtIFG9098)。これらは、連鎖不平衡解析のため、強く連鎖したマーカーを必要としたため、解析対象とした。

(3) 分子交雑指数の推定

個体（種子胚乳）ごとの分子交雑指数 MHI（ハイマツ由来のゲノムの割合）を推定する目的で、ソフトウェア STRUCTURE ver. 2.3.3 を用い、個体ごとのゲノムの混ざり具合（admixture proportion）を決定した (Pritchard et al. 2000)。STRUCTURE による解析のデータセットとしては、各 3 山系のサンプルの遺伝子型データに加えて、江夏 (2009 修論) で用いられた北海道アポイ岳の純粋なハイマツとキタゴヨウの種子胚乳サンプルを、コントロールとしてそれぞれ 16 個用いた。マーカーには強く連鎖したものも含まれているため、マーカーの位置情報を含む Linkage model を用いて解析を行った。(Falush et al. 2003)。

(4) 自然選択の検出

分子交雑指数を基に、交雑帯の中心となっている地域を特定した。これらの集団での対立遺伝子頻度を計算し、中立と仮定した場合の頻度からどれだけずれているかを以下の方法で推測した。中立な場合の交雑帯における、ある allele x が観察される確率は次の式から求められる。

$$Pr_i(x) = MHI_i \times U_x + (1 - MHI_i) \times A_x$$

ここで、 U_x および A_x は交雑親種であるハイマツ (pumila) とキタゴヨウ (parviflora) における allele_x の頻度であり、 MHI_i は交雑帯の i 番目の個体の分子交雑指数 (STRUCTURE 解析による admixture proportion) である。 $Pr_i(x)$ は、i 番目の個体が、allele_x を持つ確率となる。各個体の $Pr(x)$ に基づき、乱数を用いて allele x をランダムサンプリングした (allele x が現れる回数を集計する)。これを 100 万回繰り返して、allele x の交雑帯での頻度のバラツキを求めた。この計算にはエクセルを用いた。5% を有意水準とし、実際のアリル頻度が累積分布確率 0.025 以下に当てはまる場合過少方向に、累積分布確率 0.975 以上に当てはまる場合過剰方向に、有意に中立頻度から逸れているものと見なした。

(5) 耐病性遺伝子マーカー

Cr1 および Cr2 に強く連鎖した STS マーカーの既報の PCR プライマーセット (Jermsted et al. 2011, Liu & Ekramoddoullah 2008) をマップ集団で試して、安定して単一バンドで増幅されるものを探した。また PCR 産物の塩基配列を決定し、元の STS マーカーと相同であることを確かめた。EST マーカー PmCh4B は、既報の PCR プライマー (Liu et al. 2011) を用いて、マップ集団での分離を確かめた。Cr1, Cr2, PmCh4B 全て、SSCP 法で検出を行った。

(6) 連鎖不平衡のレベルの比較

研究方法②で述べた 5 つのマーカー群の遺伝座対について連鎖不平衡係数 R を計算した。また地図距離から遺伝子座間の組換え価 C をホルデンの地図関数を基に計算した。t 世代目の雑種集団の遺伝子座ペア i の連鎖不平衡係数 R_t^i は、母種からの遺伝子流動が無い場合、以下の式の通り、減衰する。

$$R_t^i = R_0^i (1 - C^i)^t$$

ここで、 R_0^i は交雑開始時 t=0 における値であり、分子交雑指数を基に推定を行うことが出来る。各交雑帯について t 値の平均を以下の式で求め、比較を行った。

$$t = \frac{\sum \log R^i - \sum \log R_0^i}{\sum \log(1 - C^i)}$$

4. 研究成果

(1) 交雑帯の遺伝的構造

各交雑帯の個体の分子交雑指数をプロットした結果を図 2 に示す。青はキタゴヨウ、赤はハイマツのゲノムの割合、黄緑の線はサンプルの標高を示す。

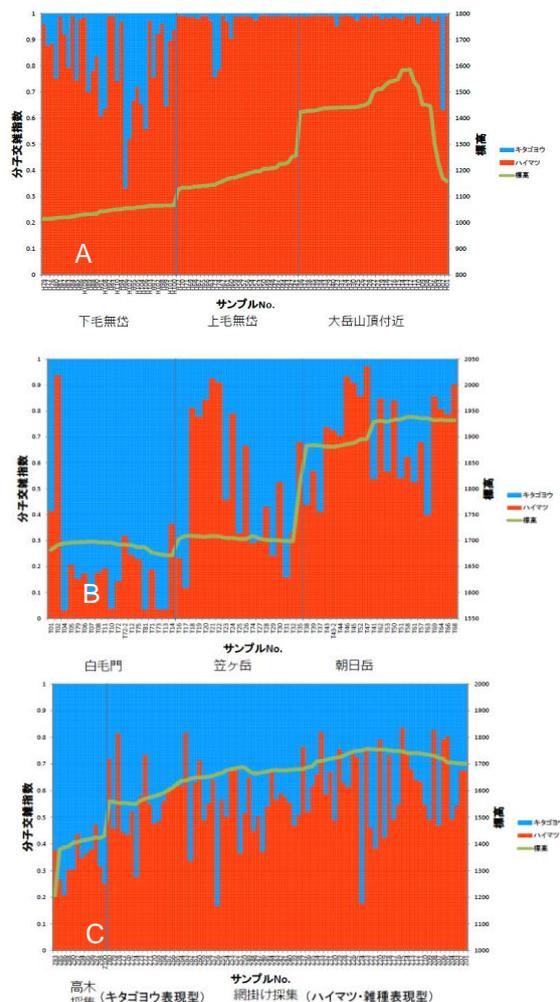


図 2 A 八甲田山 ; B 谷川岳 ; C 蔵王

(2) 自然選択の関与の検出

図 2~4 の結果から、八甲田山では下毛無岱 (33 個体 MHI=0.808) のみ、谷川岳では笠ヶ岳と朝日岳(42 個体 MHI=0.619)、蔵王では全サンプル(91 個体 MHI=0.553)を用いて、自然選択の検出の対象とした。また、ハイマツのコントロール(Ux)としては、八甲田山大岳山頂付近及び上毛無岱集団中の MHI0.95 以上の 63 個体とアポイ岳の 16 種子 (MHI 推定時に用いたもの)、キタゴヨウのコントロール(Ax)には、谷川岳白毛門集団中の MHI0.05 以下のもの 5 個体とアポイ岳の 16 種子 (MHI 推定時に用いたもの) を用いた。

全 34 遺伝子座 148 対立遺伝子の内、5% レベルで、有意に遺伝子頻度の偏りが見られた遺伝子座数を表 1 に示す。また、3 山系を通して同じ方向 (+ または -) に偏った対立遺伝子を持つ遺伝子座が 4 個検出された (表 2)。このような対立遺伝子が検出される確率は $p=0.025^3=1.6 \times 10^{-5}$ であり、148 対立遺伝子での期待値は 0.002 であり、十分に小さい。

表 1 中立からの偏りが検出された遺伝子座数 (対立遺伝子数)

	八甲田	谷川	蔵王
Total	21 (15)	52 (27)	64 (27)
+	16 (15)	27 (24)	27 (24)
-	5 (5)	25 (19)	37 (26)

表 2 自然選択の関与が示唆される遺伝子。

E は期待値、O は観察値。

遺伝子座	連鎖群	対立遺伝子	遺伝子頻度					
			ハイマツ	キタゴヨウ	八甲田	谷川	蔵王	
PtIFG9092	LG3	#1	0.21	0	E 0.58 O 0.82**	E 0.45 O 0.78***	E 0.40 O 0.74***	
PtIFG9198	LG4	#4	0.05	0.71	E 0.18 O 0.47***	E 0.30 O 0.53***	E 0.35 O 0.58***	
PtIFG8569_1	LG7	#1	0.66	0.62	E 0.65 O 0.41**	E 0.65 O 0.44**	E 0.64 O 0.36***	
PtIFG8886_2	LG9	#2	0	0.62	E 0.12 O 0.39***	E 0.24 O 0.53***	E 0.28 O 0.36**	

* 5%, ** 1%, *** 0.1%

BLASTN 検索での類似性の高いものは、PtIFG9092 は non-specific lipid transfer protein、PtIFG9198 はスコアは低い translation elongation factor-1 alpha、PtIFG8569 は alpha-tubulin、PtIFG8886 は、nucleoside diphosphate (NDP) kinase であった。

(3) 耐病性遺伝子のマッピング

Cr1 に連鎖する scarOPG_116_950 は LG1 の 48.521cM、Cr2 に連鎖する U570-843 は LG5 の 66.827cM、PmCh4B は LG11 の 33.727cM に位置することが分かった (図 1)。Cr1 と Cr2 は、共に過敏感細胞死 hypersensitive response によるゴヨウマツ類発疹及び病耐病性遺伝子座であるが、異なる種で同定されたため、同一遺伝子であるか不明であった。今回の結果では、別の連鎖群に位置したので、別遺伝子であると考えられる。ただ

し、scarOPG_116_950 については断片長の異なる 2 種類の PCR 産物が増幅した。塩基配列決定の結果、共に *P. lambertiana* の元配列と類似していたが長い断片には、挿入が起きている事がわかった。今回マッピングしたのは元配列と同じく挿入の無い短い配列の方である。ハイマツとキタゴヨウで、類似配列が複数存在する事から、今回の結果の解釈には注意が必要である。

(4) 連鎖不平衡解析

強く連鎖した 5 つのマーカー群のうち、LG5 のマーカーはハイマツ・キタゴヨウ間での対立遺伝子頻度の分化が少なく R_0 値が低かったため、それ以外の 5 マーカーペアについて解析を行った。例として蔵王の結果を表 3 に示す。

表 3 蔵王における強く連鎖したマーカー間の連鎖不平衡係数

マーカー-1	マーカー-2	cM	R	R_0	C
PtIFG-0893	Knox3	1.15	0.168	0.764	0.011
PtIFG-0893	PtIFG-9092	3.25	0.573	0.696	0.031
Knox3	PtIFG-9092	2.10	0.360	0.852	0.021
PtIFG-9008	PtIFG-1454	2.16	0.267	0.438	0.021
RN01G04	PtIFG-9098	2.09	0.402	0.657	0.020

交雑帯形成後の世代数 t は、八甲田山で 0.09、谷川岳で 8.9、蔵王で 33.4 となった。八甲田山交雑帯 (下毛無岱) では図 2A に示したように、純粋なハイマツが生育している。さらに、隣接していないが、近隣の城ヶ倉溪谷にはキタゴヨウが生育している。両親種からの移入によって、連鎖不平衡が維持されている状況がうかがわれる。興味深いのは、蔵王で、図 2C の通り、頂上の匍匐型から低標高の高木個体まで、雑種しか存在しない。この交雑帯では、両親種の遺伝的融合が進行して、純粋な親種からの移入が無くなった事が原因で、連鎖不平衡の解消が相対的に進行している可能性がある。雑種の世代時間を 50 ~ 100 年とすると、現在のような純粋な親種が無くなった状況は、1670 ~ 3340 年前から継続していると推定できる。

(5) 総合考察

交雑帯での自然選択の関与が示唆された 4 遺伝子のうち、PtIFG-9092 と最も塩基配列の類似性が高い lipid transfer protein は、in vivo では細胞壁上に存在し、植物の表面をおおうクチクラ層物質であるクチンの生合成、表面ろう状の形成、病原体防御反応や環境変化に対する植物の適応への関係が示唆されており (Kader 1997)、環境変化への適応という点で興味深い。ただし、この 4 遺伝子自身ではなく、連鎖した他遺伝子への自然選択のヒッチハイク効果である可能性もある。少なくとも今後、塩基配列の種内変異を調べ、自然選択の検出を行う試みが必要であろう。

テーダマツ *P. taeda* では現在ゲノムプロジ

エクトが進行中である。リファレンス配列が公表されれば、4 遺伝子の近傍遺伝子の探索も可能になるので、さらなる進展が期待できる。

中立からの偏りが検出された遺伝子座は、蔵王と谷川岳で最も多く、約 79%である。この結果は、連鎖不平衡解析の結果と相補的である。谷川岳では純粋なハイマツが無く (Watano et al. 2004, 図 2B)、蔵王では融合によって両親種が存在しない (図 2C)。親種からの移入が減少することで、遺伝的浮動と自然選択の両要因によって交雑帯での独自の進化が進行するのかもしれない。

(6) 引用文献

Baack EJ, Rieseberg LH (2007) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 513-518.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) *Genetics* 164, 1567-1587.

Ito M, Suyama Y, Ohsawa TA, Watano Y (2008) *Mol. Ecol.* 17, 5092-5103.

Jermstad K, Eckert A, Wegrzyn J, et al. (2011) *Tree Genet. Genomes* 7, 457-468.

Kader J-C (1997) *Trends Plant Sci.* 2, 66-70.

Liu J-J, Ekramoddoullah A (2008) *Tree Genet. Genomes* 4, 601-610.

Liu J-J, Snieszko R, Ekramoddoullah AKM (2011) *Phytopathology* 101, 904-911.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) *Genetics* 155, 945-959.

Scotti-Saintagne C, Mariette S, Porth I, et al. (2004) *Genetics* 168, 1615-1626.

Senjo M, Kimura K, Watano Y, Ueda K, Shimizu T (1999) *J. Plant Res.* 112, 97-105.

Watano Y, Imazu M, Shimizu T (1995) *J. Plant Res.* 108, 493-499.

Watano Y, Imazu M, Shimizu T (1996) *J. Plant Res.* 109, 403-408.

Watano Y, Kanai A, Tani N (2004) *Am. J. Bot.* 91, 65-72.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Iwasaki T, Sase T, Takeda S, Ohsawa TA, Ozaki K, Tani N, Ikeda H, Suzuki M, Endo R, Tohei K, Watano Y. (2013) Extensive selfing in an endangered population of *Pinus parviflora* var. *parviflora* (Pinaceae) in the Boso Hills, Japan. *Tree Genetics & Genomes* (査読有) 9: 693-705.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 富士本和人、綿野泰行. (2012) 複数山系のハイマツ・キタゴヨウ交雑帯の遺伝的構造の比較解析. 日本植物分類学会 大阪学院大学 (2012 年 3 月 23 日)

[図書] (計 1 件)

- ① 綿野泰行. (2012) ハイマツとキタゴヨウの交雑帯, 現在起こっている進化のプロセス p131-141. 戸部・田村編著 日本植物分類学会監修「新しい植物分類学 II」講談社

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿野 泰行 (YASUYUKI WATANO)

千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号 : 70192820

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

津村 義彦 (YOSHIHIKO TSUMURA)

森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長

研究者番号 : 20353774

梶田 忠 (TADASHI KAJITA)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号 : 80301117