

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 6月 1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370031

研究課題名（和文） 適応放散的種分化の進化ゲノム遺伝学的研究：小笠原固有植物の進化解析

研究課題名（英文） Study for evolutionary genomics of adaptive radiation: an analysis of speciation in endemic species of Bonin Islands.

研究代表者

伊藤 元己 (ITO MOTOMI)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00193524

研究成果の概要（和文）：

本研究では、適応放散的種分化がおきている小笠原固有植物を最新ゲノム解析技術を使用することにより、従来の研究手法では困難であった適応放散的種分化をもたらした遺伝的変異の特定を試みた。

ヘラナレン、コヘナラレン、アゼトウナ、ヤクシソウについて RNAseq 法により解析を行った。その結果得られた遺伝子配列を対象にして、ヘラナレンとコヘナラレンで有意に発現量の異なる遺伝子の相互比較を行った結果、1つのフラボノイド合成系の遺伝子候補に挙げた。また、1年生草本のヤクシソウと比較して、発現が有意に異なる遺伝子を探索した結果、2個が維管束形成に関与する遺伝子であった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, endemic plant species of Bonin Islands with adaptive radiation t have been analysed using the genome technology.

Using RNAseq method, *Crepidiastrum linguifolium*, *C. grandicollum*, *C. keiskeanum*, and *Paraixeris denticulate* were analyzed with the next generation sequencer. As a result of detecting the genes with significantly differing expression levels between two endemic species of *Crepidiastrum*, *C. linguifolium* and *C. grandicollum*, we found one gene which were the candidate gene for flavonoid biosynthesis. Further, we compared with *Paraixeris denticulate*, an annual herb of closely related genus of *Crepidiastrum*, for detecting genes with different of expression level between them. As a result, we detected two genes involved in vascular differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：適応放散、種分化、アゼトウナ属、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

適応放散的種分化とは、祖先種が多様な環境に進出し、その後の適応などにより複数の種に種分化する現象である。そのため形態的・生態的に異なる近縁種が、比較的狭い地域に分布するという独特の生物相を作り上げる。このような種分化は大洋島でよく見られ、ガラパゴス諸島のダーウィフィンチやハワイ諸島の銀剣草類などは有名であり、昔から生物進化の研究対象として多くの生物学者の興味を引いてきた。

ダーウィン以来、適応放散的種分化については数多くの研究が行われてきたが、初期の研究は各種群の形態的変異や生態的・生理的特性などの記述がほとんどであった。近年、分子情報が使用できるようになって、種間や種内の遺伝的変異性や系統関係の解析が可能になり、多くの適応放散的種分化を遂げた生物群について進化的研究がされてきた。しかし、これまでの研究は分子情報を遺伝的マーカーとして用いたものがほとんどであり、実際にどのような遺伝的変化により種分化がもたらされたか（至近要因）や、その際に働いた進化的駆動力（正の自然選択、純化選択、遺伝的浮動など）は何か（究極要因）というような進化メカニズムにまで踏み込んだ実証研究はほとんど例がない。また、そもそも大洋島での「適応放散」が本当に適応現象を基にして起こっているかの検証も行われていない。

研究代表者らは小笠原諸島における植物の適応放散の研究に取り組んできており、固有植物の起源や島嶼内での分化についての研究を行ってきた。その結果、いくつもの固有種群の系統関係と遺伝的多様性の解析を通じて、小笠原諸島で適応放散した固有種間では遺伝的差異が非常に小さいにもかかわらず、大きな形態的・生態的な差異が生じてきていること、種内の遺伝的多様性は低いことなどを明らかにした (Ito and Ono, 1990, Ito and Pak, 1996, Ito, 1998, Ito et al., 1998)。しかし、種間の差異が実際にどのような遺伝的変化でもたらされたかや、適応放散の進化的駆動力については明確に出来ず今後の課題として残されていた。

2. 研究の目的

最近の遺伝子/ゲノム解析技術の発展により、モデル生物でなくてもゲノム全領域の遺伝情報にアクセス可能になった。特に次世代シーケンサーを使用することにより、短時間に多量の遺伝情報を得て詳細な比較解析をすることが可能になった。本研究では、このような最新ゲノム解析技術を

使用することにより、従来の研究手法では困難であった適応放散的種分化をもたらした遺伝的変異の特定を試みる。さらに現存の各種集団の遺伝的変異を抽出し、自然選択圧や遺伝的浮動などの進化的変化をもたらす作用がどのように働いて適応放散が起きたかを解析する。さらに、その結果と対象植物群の生態的特性の野外観察や野外実験の結果と統合して考察を行う。このように対象種群の種分化・適応進化の至近要因と究極要因の両面から切り込むことにより、適応放散的種分化という進化現象を総合的に理解しようとするのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 植物試料

研究に用いた植物のサンプルは、小笠原固有種のヘラナレンとコヘラナレンについては、東京大学大学院理学研究科附属植物園で系統保存用の栽培株を用いた (図 1)。アゼトウナおよびヤクシソウは野外の自生株より試料を得た (表 1)。全種について、開花前のつぼみを採取し、液体窒素で凍結後、RNA 抽出まで -80°C にて保存した (表 1)。また、ヘラナレンについては葉を同様に処理した。また、全種について DNA 抽出用の葉を採取した。

(2) DNA の抽出

系統関係を解析するため、DNA の抽出を CTAB 法により行い、配列決定用の DNA 精製を行った。

(3) mRNA の抽出と配列決定

RNA は -80°C で保存したサンプルを用いて、RNeasy (QIAGEN) により total RNA を抽出した。total RNA は BGI に委託し、mRNA を分離、cDNA ライブラリ作成後、Illumina HiSeq により配列を決定した。

(4) nrITS の塩基配列決定

本研究で使用する試料および他のアゼトウナ属とヤクシソウ属の植物から抽出した DNA を用いて、核リボゾームの **internal transcribed spacers** (ITS) 領域を対象にしたプライマーを使用して、PCR 法により対象領域を増幅した。増幅した DNA は CEQ8000 (ベックマン・コールター社) を使用して塩基配列を決定した。

(5) 系統樹の作製

核 rDNA の ITS 領域の DNA 塩基配列に基づいて系統樹を作製することにより、アゼトウナ属およびヤクシソウ属の系統関係を推定し

た。本研究の対象種において決定した ITS 領域の DNA 塩基配列について、ClustalW を用いてアライメントを行い、系統樹作製のデータとした。系統樹作製には近隣接合法、最節約法、最尤法 (PAUP* を使用)、ベイズ法 (Mr. Bayes) を用いて行った。



図 1. 小笠原産アゼトウナ植物のコヘラナレン (左) とヘラナレン (右) (キク科)。ヘラナレンは木本であるのに対し、コヘラナレンは草本植物である。

表 1. 研究に用いた試料

種名	産地
ヘラナレン	東京大学大学院理学系研究科 附属植物園栽培 (小笠原父島差)
コヘナラレン	東京大学大学院理学系研究科 附属植物園栽培 (小笠原父島差)
アゼトウナ	高知県足摺岬
ヤクシソウ	千葉県千葉市

4. 研究成果

(1) 結果

a. アゼトウナ属の系統

核ゲノムリボゾームの ITS 領域の DNA 塩基配列に基づいて、アゼトウナ属およびヤクシソウ属の分子系統樹を構築した。4 種の異なる系統樹作成法 (最節約法、最尤法、ベイズ法) を用いて得られた各系統樹のトポロジーはほぼ一致した。その中で近隣接合法による系統樹を図 1 に示す。

b. 次世代シーケンサーによる RNAseq 法により遺伝子配列および発現解析

小笠原固有種 of ヘラナレン、コヘナラレン および、アゼトウナ属 of 小笠原固有種 of 姉妹群にあたるアゼトウナと、アゼトウナ属に近縁であると推定されているヤクシソウ属 of ヤクシソウについて、花のつぼみから全 RNA を抽出し精製後に mRNA のみを分離し、cDNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーにより、配列決定を行った。また、ヘラナレンについては葉からの抽出 RNA からの解析も行った。それぞれについて塩基を読んだ結果、ヘラナレン、コヘナラレン、アゼトウナについて、それぞれ約 3600 万、4200 万、5400 万、6400 万の 100bp のリードができ、アライメントの結果、14, 532、15, 325、16, 687、

14, 547 本の異なる配列を得た。の配列が得られた。また、ヘラナレンの葉については、約 2530 万のリードで、12, 423 の配列を得た。それぞれの配列について、BLAST プログラムを用いて既知配列との相同性を検索し、それぞれの種についてそれらをデータベース化した。

c. アゼトウナ属の遺伝子配列の種間比較

ヘラナレン、コヘナラレン、アゼトウナで検出された。それぞれ 14, 532、15, 325、16, 687 の配列から、類似配列を検出し、種により発現が有意に異なる配列を抽出した。2 段階のスクリーニングの結果、ヘラナレン vs コヘナラレンで 5 個、ヘラナレン vs アゼトウナで 32 個、コヘナラレン vs アゼトウナで 23 個の候補遺伝子を得た。

アゼトウナ属の姉妹属にあたるヤクシソウ属 of ヤクシソウにおいて RNAseq で得られた 14, 547 個の有意に異なる配列をヘラナレン、コヘナラレンと比較し、発現量が異なる遺伝子を探索した結果、ヤクシソウ vs コヘナラレンで 35 個、ヤクシソウ vs ヘナラレンで 38 個の候補遺伝子を検出した。また、両者で共通していた遺伝子は 28 個であった。これらを対象にして、GeneBank に登録されている既知の遺伝子の DNA 配列データベースに対して相相同性検索 (Blast 検索) を実行した。その結果、対象遺伝子の中で 2 個の遺伝子は、植物の維管束形成に関与する遺伝子が最も近い配列のものであった。

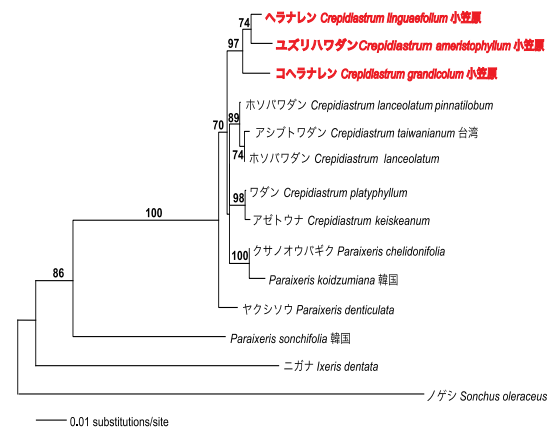


図 1. 核ゲノムリボゾームの ITS 領域の DNA 塩基配列に基づくアゼトウナ属およびヤクシソウ属の系統樹。

(2) 考察

RNAseq で得られた遺伝子配列を対象にして、ヘラナレンとコヘナラレンで有意に発現量の異なる遺伝子の相互比較を行って 5 個の遺伝

子が得られた。これらの有意に異なる遺伝子配列をリアルタイムPCR法により2次スクリーニングした結果、2つのポジティブな遺伝子の同定に成功した。そのうちの1つを既存の遺伝子とBlast検索により探索を行った結果、1つのフラボノイド合成系の遺伝子候補に挙げられた。この結果は、この遺伝子の発現の変化により、アゼトウナ属小笠原固有種の形質変化が引き起こされている可能性を示唆するものである。

木本であるヘラナレンと1年生草本のヤクシソウについて、発現が有意に異なる遺伝子が28個であり、これらをBlast検索した結果、この内の2個が維管束形成に関与する遺伝子であった。本研究ではこれらの遺伝子が、ヘラナレンでどのような部位で発現し、どのような機能を果たしているかは明らかにできていないが、小笠原諸島で独自に木本化がおきているアゼトウナ属の進化過程にこれらの遺伝子が関わっていることが示唆される結果である。

(3) 引用文献

- Ito, M. and Ono, M. 1990. Bot. Mag. Tokyo 103: 449-459.
- Ito, M., Pak, J-H. 1996. J. Plant Res. 109: 277-280.
- Ito, M., Soejima A. and Ono, M. 1997. J. Plant Res. 110: 455-462.
- Ito, M. 1998. Res. Pop. Ecol. 40: 205-212.
- Ito, M., Soejima A. and Ono, M. 1998. In Stuessy, T.F. and Ono, M. eds., Evolution and Speciation of Islands Plants, pp. 141-154, Cambridge Univ. Press.

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2件)

- Jinbo, U., Kato, T. and Ito, M. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. Entomological Science 14(2): 107-124
- Nitta, J., Ebihara, A., Ito, M. 2011. Reticulate evolution in the *Crepidomanes minutum* species complex (Hymenophyllaceae). Amer. J. Bot. 98: 1782-1800.

[図書] (計2件)

- Morinaga, S.-I., T. Iwasaki, and Y. Suyama. 2013. Eco-evolutionary genomic observation for local and global environmental changes. "The

biodiversity observation network in the Asia-Pacific Region: Integrative Observations and Assessments of Asian Biodiversity." Edited by S. Nakano, T. Yahara, T. Nakashizuka". Springer. in press.

- Kato, T., Jinbo, U., Ito, M. 2012. DNA Barcoding: A Novel Tool for Observation of Biodiversity. Nakano, S. et al. (eds.), The Biodiversity Observation Network in the Asia-Pacific Region: Toward Further Development of Monitoring, pp. 259-266.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 元己 (ITO MOTOMI)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：00193524

(2) 研究分担者

森長 真一 (MORINAGA SHINNICHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号：80568262

上原 浩一 (UEHARA KOICHI)

千葉大学・園芸学部・准教授
研究者番号：20221799