

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570107

研究課題名(和文)モデル植物ミヤコグサにおける生殖様式の進化生物学的研究

研究課題名(英文)Evolution and Phytogeography of model plant Lotus japonicus in Japan

研究代表者

上原 浩一 (UEHARA, Koichi)

千葉大学・園芸学研究科・准教授

研究者番号：20221799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ミヤコグサは日本に自生するマメ科植物で、ゲノム解析が行われており、様々な遺伝情報が公開されている。本研究は公開されたマイクロサテライトマーカーを用いて、各地のミヤコグサ野生集団の遺伝解析を行い、生殖様式や分子系統地理について検討した。解析の結果、北海道、本州、四国、九州の集団と、南西諸島の集団で遺伝的に異なっていることが明らかになった。本州型のミヤコグサは非常に自殖率が高いのに対し、南西諸島型は他種も行っていた。対馬で得られた集団も本州型であることから、日本のミヤコグサは南方から南西諸島を北上したグループと、朝鮮半島から対馬を経て本州各地に分布拡大したグループがあることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Lotus japonicus is a model plant which grows wild in Japan. It is considered the naturalized plant since prehistoric times. Whole genomic DNA of Lotus japonicus was analysed, and various genetic information are released widely. We use the exhibited microsatellite marker, and analysed wild populations of Lotus japonicus in Japan. Cluster analysis showed that Lotus japonicus of Japan was clearly divided into two geographically different groups. The first group, Honshu type consisted of wildness groups of Hokkaido, Honshu, Shikoku, and Kyushu. As for another group, Nansei type contained the populations of Nansei islands. It became clear that both types differ genetically. Since the population obtained from Tsushima Island was also the Honshu type, it was possible that Lotus japonicus of Japan has the group which went Nansei islands north from the south, and the group which carried out distribution expansion in various parts of Honshu through Tsushima from the Korean Peninsula.

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：ミヤコグサ 進化 系統地理 マイクロサテライト

1. 研究開始当初の背景

ミヤコグサ *Lotus japonicus* は、日本からインド以東の東アジア一帯に分布し、国内では北海道から南西諸島まで幅広く分布し、海岸線から標高 1000m を超える高地まで、様々な環境に適応している。様々な環境に適応するために幅広い遺伝的変異が存在すると考えられる。ミヤコグサは、ゲノムサイズが  $2n=12$  の 2 倍体、ゲノムサイズが比較的小さい、ライフサイクルが短い、形質転換が容易、自殖である<sup>1)</sup> といった特徴をもつことからマメ科のモデル植物として研究され始めた。しかし、自殖系統としてのミヤコグサはゲノム、分子遺伝学の分野で研究されているが、系統地理学的研究などにおける野生集団の実態は解明されてこなかった。

当研究室で行なった予備的研究において、本州のミヤコグサ野生集団は自殖率が高く、南西諸島のミヤコグサ集団は本州の集団よりも遺伝的多様性が高く、他種も行っていることが示唆された。

ミヤコグサはゲノム解析が行われ、6 つの染色体上の 782 個ものマイクロサテライト (SSR) マーカーが公開されており、そのすべてがゲノム上のどの位置にあるか明らかになっている。日本国内に自生する野生植物で、このようにゲノム情報が公開され、それを利用して研究できる野生植物はミヤコグサを除くと皆無であり、この遺伝情報資産を活用することにより、生物地理、系統分類、生態、進化など、野生植物の存在様式をこれまでにはない精度で明らかにできる可能性が高い。

2. 研究の目的

日本国内各地のミヤコグサ野生集団の遺伝的解析を行い、日本国内のミヤコグサ集団に生殖様式の分化が生じているか明らかにする。また、史前帰化植物であるミヤコグサがどのような経路で日本に分布したか、その経路を明らかにする。ミヤコグサについて SSR マーカーを用いた遺伝的解析による集団間・集団内の解析を行い、野生集団の遺伝的多様性と遺伝構造を調査し、ミヤコグサ野生集団の実態を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

日本国内に生育するミヤコグサを材料として用いた。日本国内のミヤコグサ 47 集団から採集した 583 個体を分析した。また、自殖系統の B-129 と MG-20 を野生集団との比較として公開されている SSR データを利用した。

採集した個体から DNA を抽出し、SSR マーカー 11 遺伝子座 (表 1) を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を、DNA シーケンサーを用いてフラグメント解析を行った。フラグメント解析で得られた断片長のデータをもとに、GenAlEx 6.5<sup>2)</sup> を用いて、SSR マー

ーごとに遺伝的多様性の指標となる対立遺伝子数、ヘテロ接合度、固定指数を計算した。さらに、集団ごとの対立遺伝子数とヘテロ接合度を算出した。また、各集団の遺伝的関係を明らかにするため、集団間の遺伝距離に基づいた近隣接合法による系統樹を Populations 1.2.30<sup>3)</sup> を用いて構築した。さらに STRUCTURE 2.3.3<sup>4)</sup> を用いてベイズ法によるクラスター解析を行った。STRUCTURE によるクラスター解析の結果について、R<sup>5)</sup> を用いて地図上にクラスターの分布および混合構造を図示した。

SSRマーカー	プライマー配列(5'-3')		反復領域	Tm値(°C)
	Forward	Reverse		
TM0295	ATGAGGGTGAACAACGAAGG	CCATGGAGGCAGAAATCGAG	(CT) <sup>14</sup>	58.3
TM0705	GCTCGTCAACACTGAAATGG	CTCATACCGCTTCTCATCAC	(CT) <sup>12</sup>	58.3
TM0349	AAACGAGTAGAAGGGAGGTC	TTCATTTTCACGCCGCTTC	(CT) <sup>22</sup>	58.3
TM1049	TCCCAACACACCTCATTCAC	ACGATTGGAGCTCTGTAGG	(AT) <sup>898</sup>	58.3
TM0231	GATTGTTACCGTAACCCCTG	AGAGTTTCAGTCAGTCTCC	(CT) <sup>32</sup>	58.3
TM0199	ACTCTGGAGGGAAGCAGTTG	CACCTCCAACCCATGTTTCG	(CT) <sup>28</sup>	58.3
TM0575	AGGGAAGTCGACAGATCCAC	AAACCGAACCAATCCAGACC	(AT) <sup>28</sup>	58.3
TM0002	AGCGATCTACATCAAGAG	AGCGTTCTCTCAGTGTG	(CT) <sup>15</sup>	54.3
TM0117	GGATATGCTCTGATACCATATTAG	TGGTCATACGTGTAACTGAATAAG	(CT) <sup>14</sup>	57.3
TM1207	CACATAAGCAATTTCTTAGGC	TCTGACATGGACATCCGAC	(AT) <sup>15</sup>	57.3
TM2181	CCTCTAAATCACAAGATACATCC	TGAAACATATGTTCTATCTCTTTG	(CT) <sup>88</sup>	58

表 1 使用した SSR マーカー

4. 研究成果

ミヤコグサの遺伝的多様性

SSR マーカー 11 遺伝子座を用いた結果、平均対立遺伝子数 (Na) は平均 3.6、ヘテロ接合度の観察値 (Ho) と期待値 (He) はそれぞれ平均 0.132、0.457 となった。固定指数 (F) は 0.726 となった (表 2)。ミヤコグサ国内野生集団ごとの対立遺伝子数 (Na) とヘテロ接合度 (He) の期待値を示した (図 1)。

SSR locus	Na	Ne	Ho	He	F
TM0295	3.551	2.343	0.127	0.439	0.717
TM0705	3.714	2.732	0.104	0.491	0.783
TM0349	2.959	2.009	0.109	0.367	0.688
TM1049	3.592	2.497	0.144	0.436	0.721
TM0231	3.122	2.230	0.196	0.428	0.572
TM0199	2.469	1.777	0.030	0.324	0.914
TM0575	4.531	3.035	0.167	0.536	0.702
TM0002	3.265	2.282	0.129	0.456	0.773
TM0117	2.939	2.062	0.184	0.400	0.590
TM1207	4.612	3.260	0.176	0.582	0.694
TM2181	4.796	3.559	0.089	0.569	0.869
Mean	3.596	2.526	0.132	0.457	0.726

表 2 SSR 遺伝子座ごとの遺伝的多様性 Na: 平均対立遺伝子数、Ne: 有効対立遺伝子数、Ho: ヘテロ接合度の観察値、He: ヘテロ接合度の期待値、F: 固定指数

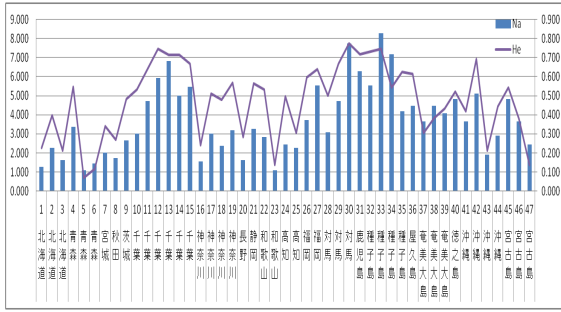


図1 集団ごとの遺伝的多様性  
Na：平均対立遺伝子数、He：ヘテロ接合度の期待値

ミヤコグサ集団間の遺伝的類縁関係  
近隣接合法による系統樹を構築した結果、大きく2つのグループに分かれた(図2)。

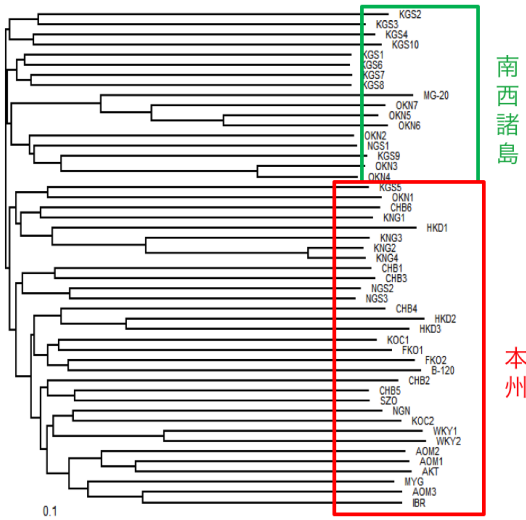


図2 近隣接合法による系統樹

ミヤコグサのクラスター解析  
STRUCTURE によるクラスター解析の結果、本研究でのミヤコグサ野生集団は2つのクラスター(K=2)を仮定する事が最も適切であることが明らかになり、主に本州の集団で構成されるクラスターと南西諸島の集団で構成されるクラスターに分けられた(図3, 図4) さらに、3つ以上のクラスターを仮定し、複数の結果(K=2~5)を並べることによって、ミヤコグサの国内野生集団においてどのような構造がみられるかを調べた(図5)

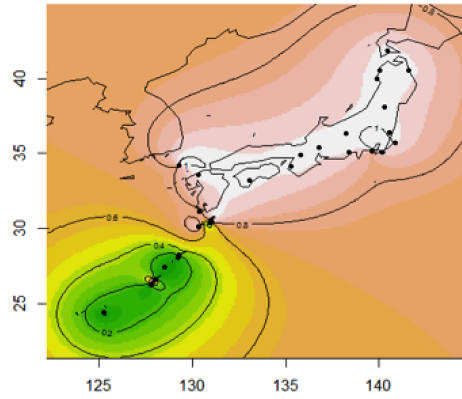


図3 K=2における空間補完

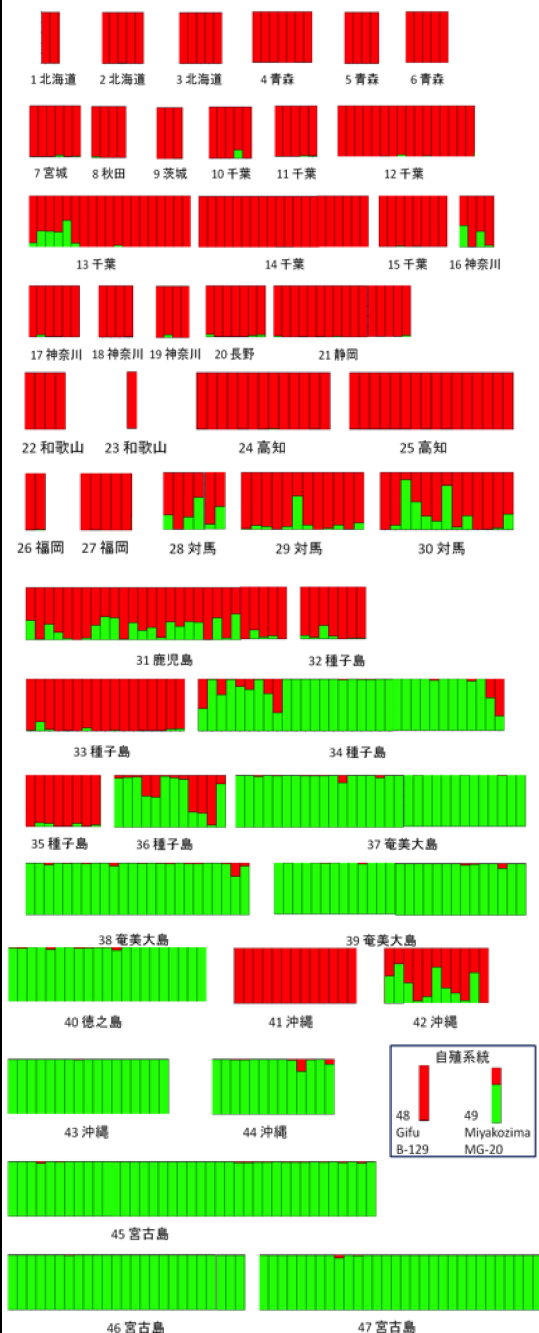


図4 クラスター解析結果(K=2)

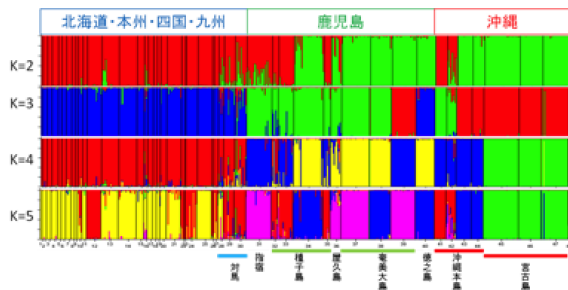


図5 クラスタ解析結果 (K=5)

#### 遺伝的多様性

今回の研究で解析されたミヤコグサは、集団内において遺伝的多様性は高くなかったことから、野生集団においても自殖性の植物であるといえる。しかし、集団間にはSSRマーカーにおける反復数による違いが数多く確認された。千葉の集団と鹿児島の種子島の集団は他の集団よりも比較的多くの平均対立遺伝子数 ( $N_a$ ) と高いヘテロ接合度の期待値 ( $H_e$ ) が確認でき、遺伝的分化が地域によって進んでいる可能性が示唆される。また、自殖性であるモデル植物シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* においても訪花昆虫による他殖がわずかながら確認されており<sup>6)</sup>、ミヤコグサにおいても地域ごとに訪花昆虫の違いなどの生態的要因によって遺伝的多様性に影響が生じた可能性が考えられる。

#### 集団構造

系統樹とクラスタ解析の両解析において、本州の集団と南西諸島の集団が明確に区別されていることから、ミヤコグサの野生集団は本州の集団と南西諸島の集団には明らかな遺伝的差異があると考えられる。この遺伝的差異の要因として、本州と南西諸島のミヤコグサの集団には、異なる導入の起源が存在する可能性が高い。ミヤコグサは史前帰化植物であり、麦などの栽培とともに中国大陸から移入してきたと考えられている<sup>7)</sup>。この移入の際に2つの進入経路があったと考えられる。本州の集団の場合、中国大陸から朝鮮半島を経由して渡来し、九州から本州、北海道へと北上していった。また南西諸島の集団の場合、南方から台湾を経由して渡来し、北上しながら南西諸島に広がった。それら2つの進入経路の境界線が種子島、屋久島周辺にあると推測される(図6)。また、クラスタ解析において仮定されるクラスターを3つに分けた場合には、本州の集団と沖縄本島周辺の島々、鹿児島県周辺の島々の集団に分けられ、さらにクラスターの数を増やすと、主に鹿児島の島々の集団が細分化されることから、他の集団よりも遺伝的分化が進んでいる可能性が考えられる。また、種子島 35 (KGS5) や沖縄 41 (OKN1) など南西諸島の集

団でも、系統樹やクラスタ解析の結果において、本州の集団と近い関係にある集団が見られた。これは、開発や造成などの人為的要因によって本州から南西諸島に持ち込まれた可能性がある。

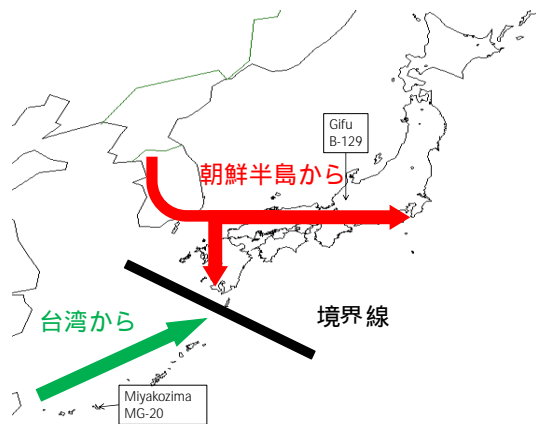


図6 ミヤコグサ導入起源の考察

本研究では、日本国内のミヤコグサについて遺伝的多様性の評価とミヤコグサの起源の歴史的推察を行うことができた。この結果は、分子系統地理学的研究において基礎的知見を得る上で有用と考えた。そこで、同様の歴史を辿っていると考えられる複数の種群において比較を行いたい。

今後は、中国、朝鮮半島、台湾のミヤコグサの野生集団を採集、解析し本研究における歴史的考察のさらなる解明を行う。また、国内野生集団においては解析個体が少ない地域を中心に詳細な解析を行う。さらに、他集団よりも鹿児島の島々のミヤコグサ集団は遺伝的分化が進んでいる可能性が示唆され、訪花昆虫などの生態的調査を行うなどミヤコグサの国内野生集団における更なる解明、研究が必要である。

#### 引用文献

- 1) Kawaguchi M. 2005. *Gamma Field Symp.* 44: 15-24.
- 2) Peakall R, Smouse PE. 2006. *Mol Ecol Note* 6: 288-295.
- 3) Langella O. 1999. CNRS UPR9034
- 4) Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. *Genetics*. 155: 945-959
- 5) R core team. 2006. ISBN 3-900051-07-0.
- 6) Hoffmann MH, Bremer M, Schneider K, Burger F, Stolle E, Moritz G. 2003. *Plant Biol.* 5: 491-494
- 7) 前川文夫. 1943. *植物分類・地理* 13: 274-279

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Tanaka, N., Uehara, K., Murata, J.

2013 Evolution of Floral traits in relation to pollination mechanisms in Hydrocharitaceae. Early Events in Monocot Evolution 165-184 査読有

Uehara K. Saiki, K., Ando, T. 2013 *Veronicastrum noguchii* (sect *Plagiostachys*, Plantaginaceae), a new species from Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 63: 63-69 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上原 浩一 (Uehara, Koichi)  
千葉大学・園芸学研究科・准教授  
研究者番号：20221799

### (2) 研究分担者

野村 昌史 (Nomura, Masashi)  
千葉大学・園芸学研究科・准教授  
研究者番号：50228368

伊藤 元己 (Ito, Motomi)  
東京大学・総合文化研究科・教授  
研究者番号：00193524