

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770016

研究課題名(和文) 標高傾度に沿って分布するシロイヌナズナ属野生種の温暖化適応形質の進化

研究課題名(英文) Evolution of adaptive traits to climate change in a wild relative of *Arabidopsis thaliana* distributed along wide altitudinal ranges.

研究代表者

平尾 章 (Hirao, Akira)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：20447048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：地球温暖化は、生物の進化にどのような影響を与えるのだろうか？モデル植物のシロイヌナズナに近縁な野生種であり、幅広い標高帯に渡って分布するミヤマハタザオ(*Arabidopsis kamchatica* subsp. *kamchatica*)を材料とし、標高適応の機構を遺伝子レベルから明らかにすることで、環境変化が生物に与える影響を進化的な視点から理解しようと試みた。次世代シーケンス技術を活用した遺伝子スクリーニングの結果、トライコーム形成制御遺伝子GL1および光受容体遺伝子PHYBにおいて、標高適応を強く示唆する塩基多型を検出し、自然淘汰圧の一端を進化生物学・集団遺伝学的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Genetic variation along environmental gradients such as altitude provides understanding to genetic basis of adaptive evolution. *Arabidopsis kamchatica* subsp. *kamchatica*, a wild relative of *A. thaliana*, occurs along wide altitudinal gradients. In this study, we took advantage of the wide altitudinal distribution of *A. kamchatica* to detect the genetic basis of local adaptation. The results of screening on eight candidate genes by next generation sequencing indicate that GL1, a trichome gene, and PHYB, a photoreceptor gene, are under natural selection and are associated with altitudinal adaptation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，生態・環境

キーワード：機能遺伝子 適応度 標高傾度 次世代シーケンス 異質倍数体 ホメオログ 共通圃場実験

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化は、生物の進化にどのような影響を与えるのだろうか？局所的な気候に応答した集団の適応進化の事例が知られている。この事実は、過去の分布変遷の歴史を背負った生物集団の環境応答が地域特異的であること、そして現在進行中の地球温暖化によっても集団の遺伝的变化が遅かれ早かれ確実に起こることを意味している。したがって温暖化にともなう生物相の変化とそのプロセス解明には、従来の生理学や生態学的アプローチに加えて、進化生物学的視点を学際的に統合する必要がある。

近年、モデル生物などで蓄積されたゲノム情報を利用することで、適応的形質の遺伝的基盤を突き止めることが可能となった。本研究では、モデル植物のシロイヌナズナに近縁な野生種であり、幅広い標高帯に分布するミヤマハタザオ (*Arabidopsis kamchatica* subsp. *kamchatica*) を材料とすることで、標高適応のメカニズムを遺伝子レベルから明らかにしようとする。ミヤマハタザオは標高 30m から 3000m までの極めて幅広い標高傾度に沿った分布パターンを示す。標高差 3000m の温度変化 (約 1.8 °C) を、緯度方向に換算すると、約 2400km (たとえば長野県からサハリン北端まで) の違いに相当するが、個別の山塊に相当する空間スケールの中で、急激な温度勾配が存在する対象システムを研究することができる。本州中部地方では、独立した複数の山塊に標高傾度に沿って集団が分布しており、標高への適応進化を検証するにあたって反復が可能な対象系である。

これまでの先行研究として、1) 野外個体群調査の結果から、自然集団では標高に応じて自然淘汰圧が異なること、2) 共通圃場実験の結果から、生活史特性 (開花タイミング・発芽タイミング・成長・個体サイズ) や防衛形質 (トライコーム、カラシ油配糖体、炭疽病抵抗性)、ストレス耐性 (耐寒性・耐熱性) といった様々な表現型が、標高に沿って遺伝的に分化していること、3) 相互移植実験系における適応度の測定から、ホームサイトアドバンテージの傾向があり適応進化が生じていること、が明らかになっている。

このように適応進化の研究対象として、モデル植物のリソースが援用できることに加えて、独自の研究成果が蓄積され、野外実験系が整備されているというアドバンテージを持つミヤマハタザオであるが、遺伝解析を実施する上で困難な生物学的特徴を持っている。それはミヤマハタザオが、ハクサンハタザオ (*A. halleri*) とオウシュウミヤマハタザオ (*A. lyrata*) の交雑に由来する異質倍数体ということである (図 1)。したがって、たとえ局所適応に関わる表現型の遺伝子が分かったとしても、異なる交雑親種に由来する相同遺伝子 (ホメオログス遺伝子またはホメオログ) を判別しなければ、塩基多型パターンを解析することができない。従来のクロ

ーニングに基づくホメオログス遺伝子の識別方法では、コストと手間が非常にかかる状況にあり、遺伝解析の対象として異質倍数体生物は避けられる傾向にあった。

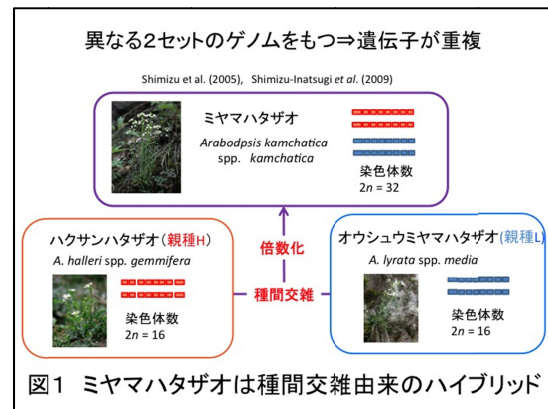


図1 ミヤマハタザオは種間交雑由来のハイブリッド

2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、本研究の課題を以下の通り設定した。

(1) 異質倍数体の集団を対象とした効率的な塩基多型検出法の開発

大量の塩基配列を並列的に一挙に解読するという特徴をもつ第二世代シーケンサーを活用して、異質倍数体生物のホメオログス遺伝子を生物情報科学的に識別する方法を確立する。あわせて複数の個体の DNA をまとめたプール試料を用いることで集団内・外の塩基多型を効率的に検出できるように試みる

(2) ミヤマハタザオの標高適応遺伝子のスクリーニング

標高間の遺伝的分化が明らかになっている表現型に着目し、その表現型に関与すると考えられる機能遺伝子について、遺伝子スクリーニングを実施する。

(3) 標高適応候補遺伝子が関与する表現型および適応度の検証

遺伝子スクリーニングで検出された候補遺伝子について、塩基多型サイトの遺伝子型と表現型の対応を検証する。また異なる標高に由来し、共通圃場で栽培されている個体を対象に適応度と候補遺伝子の遺伝子型との対応を検証する。

(4) 標高適応候補遺伝子の集団遺伝学的解析

遺伝子スクリーニングで検出された候補遺伝子について、塩基多型パターンを集団遺伝学的に解析し、自然選択の痕跡を検証する。

3. 研究の方法

本州中部山岳地域の標高 30m から 3000m までの幅広い標高帯に分布するミヤマハタザオ

オの野外集団を対象として、遺伝解析用の試料を収集した。また筑波大学菅平高原実験センターに設置した共通圃場において栽培されている個体も、本州中部野外集団で採取された種子に由来する。

(1) 標高適応の候補遺伝子スクリーニング

遺伝子スクリーニングとして、候補遺伝子アプローチと Pool-Seq 法 (Kofler et al. 2011) を組み合わせた方法を採用した。中部山岳地域の 24 野外集団を対象とし、集団あたり 20 個体からゲノム DNA を抽出した上で、集団毎にプール DNA 試料を調整した。候補遺伝子として、開花および被食防衛に関連する 8 つの候補遺伝子 (*GL1*, *HEN2*, *DFL2*, *GL1*, *MAM1*, *TTG1*, *CRY1*, *PHYB*) をターゲットとした。それぞれの遺伝子の約 400bp の塩基配列について、ホメオログ間で共通の塩基配列にプライマーを設計し、24 個のプール試料毎にアンプリコンを作成した。これらのアンプリコンはライブラリーとしてまとめた上で、第二世代型シーケンサーである GS Junior (Roche) を用いて一挙に解読した。

解読された塩基配列リード・データは、そのままの状態だとホメオログが混在するため塩基多型解析を実施することができない。そこでミヤマハタザオの 2 つの交雑親種の参照配列をあらかじめ準備し、各参照配列へのマッピング・クオリティー値を基準として、種間交雑に由来するホメオログス遺伝子の判別を行なった。それぞれのホメオログス遺伝子において塩基多型を検出するパイプラインを構築し、各塩基多型を示すリード数/全リード数を集団毎に対立遺伝子頻度として推定した。これらの対立遺伝子頻度に基づいてゲノムスキャン法を実施し、顕著な集団間分化を示す塩基多型サイトを検出した。更に、顕著な遺伝的分化が認められた塩基多型サイトについては、対立遺伝子頻度と標高の関係をロジスティック回帰によって検証した。

(2) *GL1* 遺伝子の遺伝子型・表現型・適応度

後述の遺伝子スクリーニングの結果によって、標高適応遺伝子であることが強く示唆された *GL1* 遺伝子については、検出された塩基多型サイトに SNP マーカーを作成した。筑波大学菅平高原実験センター内の共通圃場で栽培された個体について SNP ジェノタイピングを行い、表現型および適応度との関係を検証した。*GL1* はトライコーム (葉や茎の毛状突起 = 毛) の形成制御遺伝子であり、表現型としてトライコームの有無を肉眼およびルーペで記録した。繁殖成功度として果実生産数を計測し、適応度として評価した。

(3) *PHYB* 遺伝子の集団遺伝学的解析

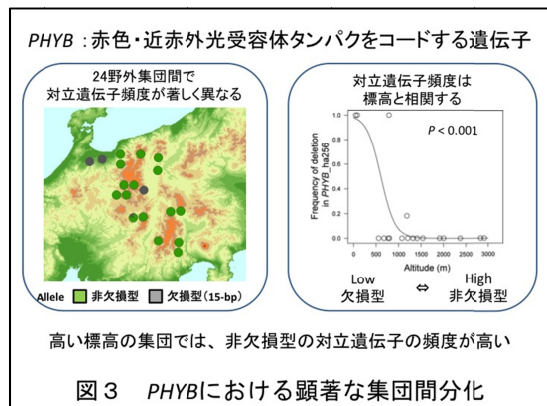
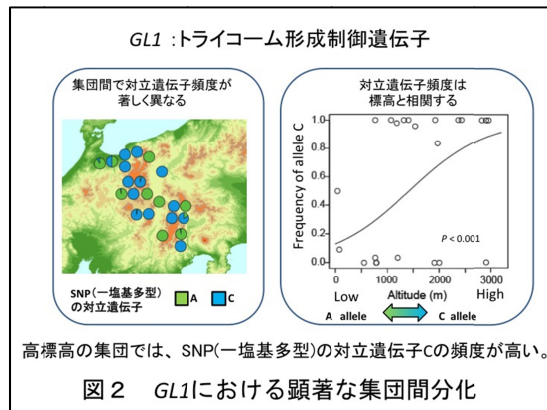
後述の遺伝子スクリーニングの結果によ

って、標高適応遺伝子であることが強く示唆された *PHYB* 遺伝子は、赤色・近赤外光受容体タンパクをコードする遺伝子群の 1 つであり、光情報のセンサーの役割を持つことから、花芽形成や発芽、避陰反応などのさまざまな生理反応に関わることが知られている。*PHYB* と表現型の関係を直接的に証明することは困難なため、遺伝子の塩基多型パターンを集団遺伝学的に検証することで、自然選択の影響を検出しようと試みた。中部山岳地域の 7 集団 20 個体を対象に、*PHYB* の各ホメオログのコード領域の全長をサンガー・シーケンスで決定した。塩基多様度はホメオログ毎に推定した。また McDonald-Kreitman の検定を用いて、ミヤマハタザオが種間交雑によって成立する前後のステージについて、正の自然淘汰の検討を行なった。

4. 研究成果

(1) 標高適応の候補遺伝子スクリーニング

8 つの候補遺伝子のスクリーニングの結果、トライコーム形成制御遺伝子 *GL1* および光受容体遺伝子 *PHYB* において、集団間で対立遺伝子頻度が著しく異なる塩基多型サイトを見出した。このサイトの対立遺伝子頻度は、標高と相関しており、標高適応を担っている遺伝子であることが強く示唆された (図 2, 図 3)。なお検出された塩基多型サイトは、*GL1* および *PHYB* のどちらとも *A. halleri* 側のホメオログに存在した。



(2) *GL1* 遺伝子の遺伝子型・表現型・適応度
 検出された *GL1* の塩基多型とトライコーム表現型の関係について、共通圃場で栽培された個体を用いて検証したところ、両者に強い相関が認められ、対立遺伝子 C をもつ場合はトライコーム形成率が高いことが明らかになった (図 4)。

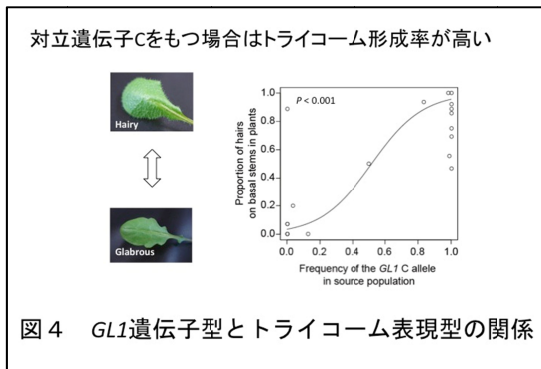


図 4 *GL1* 遺伝子型とトライコーム表現型の関係

同様に *GL1* の塩基多型と繁殖成功度を共通圃場の栽培株で調べたところ、対立遺伝子 C を持つ個体の方が対立遺伝子 A を持つ個体よりも結実数が少なかった (図 5)。対立遺伝子 C を持つ個体はトライコーム形成率が高い傾向があり、この実験圃場ではトライコームを持つことが繁殖上のコストとして働いていることが示唆された。一方で遺伝子型と生存率の間には有意な傾向は認められなかった。中部山岳地域において野外集団のトライコーム形成率は高標高ほど高くなる傾向を示す。高標高の野外集団では、トライコームを持つことで繁殖コストを上回るような自然淘汰上のアドバンテージ (被食者への防衛や乾燥耐性など) が存在するのかもしれない。

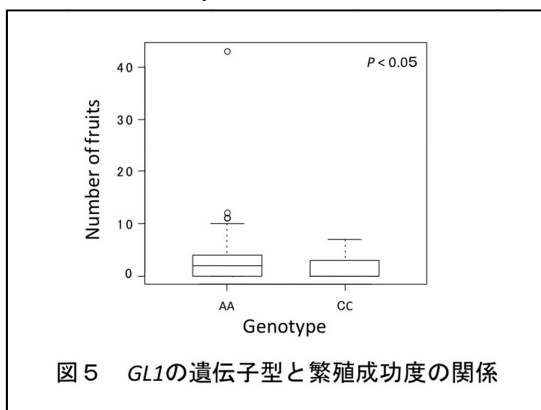


図 5 *GL1* の遺伝子型と繁殖成功度の関係

(3) *PHYB* 遺伝子の集団遺伝学的解析

PHYB の全長シーケンスの結果、それぞれのホメオログから 4 つずつのハプロタイプを検出した。塩基多様度 () をホメオログ間で比較すると、*A. halleri* 側のホメオログでは 0.0019 だったのに対し、*A. lyrata* 側のホメオログでは 0.0002 と多型性が非常に低く、*A. lyrata* ホメオログ側への強い安定化淘汰を示すパターンが得られた。一方で *A. halleri* ホメオログについては、第 3 イント

ロンに欠損が生じているハプロタイプが高標高集団に多く、非欠損型は低標高集団に存在するというパターンが得られ、標高間での分断化淘汰が示唆された。加えて、McDonald-Kreitman 検定の結果、*A. halleri* ホメオログでは、非同義置換が中立的な期待値よりも有意に多く、異質倍数体のミヤマハタザオが種間交雑によって生じる前後に、*A. halleri* に由来する *PHYB* 遺伝子が正の選択を受けたことが示された。

PHYB の重複遺伝子において、*A. lyrata* ホメオログでは機能を維持するような安定化淘汰が示唆され、*A. halleri* ホメオログでは正の自然淘汰が示された。「遺伝子重複による進化 (Ohno 1970)」は、重複した遺伝子では、機能的な余剰性によって単一の遺伝子よりも早く変異が蓄積されるという仮説であり、ミヤマハタザオが示す多様な適応現象の遺伝的基礎となってきた可能性がある。しかしながら重複遺伝子の進化パターンとしては、機能部位の変異などによる新機能の獲得や、遺伝子発現による機能分担のほか、機能が損なわれるような偽遺伝子化などが知られており、適応分化に貢献した重複遺伝子の割合をゲノム全体で評価することが今後の課題である。

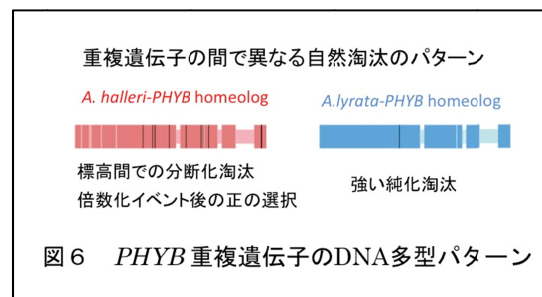


図 6 *PHYB* 重複遺伝子の DNA 多型パターン

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 3 件)

平尾章・わが国の高山植物の遺伝的多様性と脆弱性 - 温暖化条件下で氷期遺存種の南限集団が示すこと - . 地球環境 19(1), 63-70. (2014) (査読有り)

市野隆雄・栗谷さと子・楠目晴花・平尾章・長野祐介. 中部山岳地域における標高傾度に沿った草本植物の遺伝的・生態的分化. 地球環境 19(1), 71-78. (2014) (査読有り)

田中健太, 平尾章, 鈴木亮, 飯島慈裕, 浜田崇, 尾関雅章, 廣田充. (2013) 地球温暖化が山岳域と極域の生態系に与える影響: 人工温暖化実験によって何が分かってきたか? 地学雑誌 122(4), 628-637.

(査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2013) 標高傾度に沿ったミヤマハタザオの適応機構：生態から遺伝子へのアプローチ．日本進化学会第 15 回大会 つくば市 (2013 年 8 月 30 日)

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2013) 標高万能植物ミヤマハタザオのトライコームおよび光受容体の適応分化．2013 年日本地球惑星連合 セッション「中部山岳地域の自然環境変動」千葉市 (2013 年 5 月 22 日) .

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2013) 標高万能植物ミヤマハタザオにおけるトライコームおよび光受容体遺伝子の集団間分化．第 60 回日本生態学会 シンポジウム「標高傾度の中にある，隠れた遺伝的多様性」，静岡市(2013 年 3 月 7 日) .

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2012) 標高万能植物ミヤマハタザオの標高適応遺伝子：トライコームと光受容体．日本進化学会第 14 回大会 八王子市 (2012 年 8 月 23 日)

平尾章・恩田義彦・清水(稲継)理恵・瀬々潤・清水健太郎・田中健太 (2012) Pool-Seq 法を用いたシロイヌナズナ近縁野生種ミヤマハタザオの適応遺伝子のスクリーニング．NGS 現場の会・第二回研究会 大阪 (2012 年 5 月 24 日)

平尾章・市野隆雄 (2012) 山岳植物の適応的多様性，および標高傾度に沿った分化．第 59 回日本生態学会 企画集会「気候変動に対する高山・亜高山生態系の応答の将来予測：適伝子から景観レベルまで」，大津(2012 年 3 月 17-21 日) .

Hirao, AS, Y. Onda, R. Shimizu-Inatsugi, J. Sese, K. K. Shimizu and T. Kenta (2012) Screening for diversifying selection on six flowering and herbivory-defence genes among 19 natural populations of *Arabidopsis kamchatica*: from pooled-DNA analysis with parallel sequencing. The 5th EAFES International Congress, Otsu, Mar. 17-21, 2012.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平尾 章 (HIRAO, AKIRA)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：20447048

(2) 研究協力者

田中 健太 (TANAKA, KENTA)

筑波大学・生命環境系・准教授