様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 ２６ 日現在

機関番号：３２６３９
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2015
課題番号：２５８４０１６１

研究課題名（和文）迅速な適応を可能にする遺伝子変異の由来の判定

研究課題名（英文）Sources of genetic variation for contemporary adaptation to changing environments

研究代表者
三村　真紀子（MIMURA, Makiko）

玉川大学・農学部・准教授

研究者番号：６０４５１６８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、東北から屋久島（南九州）まで分布し、すでにドラフトゲノムが決定しているモミジイチゴを対象として、ゲノム変異解析と相互移植実験から分布域の維持に貢献する遺伝的変異の由来を検証した。相互移植実験では、明瞭な形態的・形質的な地域間変異が検出されている。また、RADseqによるゲノムワイド変異解析では、初期解析において複数の適応関連候補SNPsが検出された。形質的には同地域間で類似しているものの、選択下にあると推定されたSNPsは同一地域内集団間で異なるものもあり、環境へ対する類似の形質変化への既存の遺伝的変異の寄与が示唆された。今後、形質との関連を精査する。

研究成果の概要（英文）：What makes a species robust to changing environments? In this study, we aimed to identify the sources of genetic variation for contemporary adaptation to past climate changes using common garden experiments and genome-wide RAD-seq analysis in Rubus palmatus. R. palmatus is a wild raspberry species that has a wide species range within Japan and displays a range of phenotypic variations. Its draft genome is available from previous research. In common garden experiments, we found the phonological (bud flush) variation among populations along latitudes at the sampling origins. Genome scan analyses based on genomic SNP data have revealed several SNPs deviated from the neutral expectation, suggesting that they were under natural selection. Some of these SNPs were shared among populations within regions; however, others were unique to only one of two populations studied within regions. These findings imply that standing variation has contributed to rapid adaptation to past climate changes.

研究分野：Molecular Ecology

キーワード：local adaptation　common garden experiment　RADseq

１．研究開始当初の背景

生物は常に変化する地球環境への応答を迫られている。新たな環境への短期的な応答には、可塑的な反応や移住が考えられるが、長期的な応答には、遺伝的な適応が求められる。今日の変動する環境に対して、迅速な適応進化が確認されている生物は少なくない。適応による形質進化はわずか 20 世代程度あるいはそれ以下の時間軸でも起こりうることが分かっている。このような生物において、迅速な適応を可能にする遺伝的変異は、どこから供給されたのだろうか。

種が新しい環境に適応するメカニズムとして、新規の突然変異が挙げられる。しかし、新しい環境に対する迅速な応答には、新規の突然変異よりも高い頻度で集団内に維持されている既存の遺伝子変異の寄与も高いと考えられる。多くの形質は、多遺伝子によって制御されており、既存の変異の組み合わせで新たな形質が形成されるケースが考えられる。さらに、新たな環境に適応するための遺伝資源を提供するのは、種内の遺伝子変異だけではない。異なる環境に適応した”交雑可能な近縁種”からの遺伝子変異の供給は、膨大な遺伝資源になりうる。

これまで、ゲノム情報の少ない野生種において、ゲノム全域にわたる大量の遺伝的変異を検出し、その頻度や特性を複数の集団で比較するのは困難であった。しかし現在では、次世代シーケンサー等の台頭により、ゲノムワイドな解析が非モデル生物でも比較的安価で可能になり、網羅的な変異解析から迅速な適応に関連する遺伝子の探索と追跡が可能になった。

２．研究の目的

本研究では、変動する環境への生物の迅速な適応における、既存の遺伝子変異の寄与とその程度の検証を目的とした。この目的のために、相互移植実験による形質変異の検出とゲノムワイドな遺伝子変異解析を行う。ここでは、変動する環境要因として、とくに最終氷期以降の気候変動への適応に着目している。材料は、日本に広く分布するモミジイチゴ（*Rubus palmatus*）とした。この種には、３つの変種があり、それぞれ東日本地域、西日本地域、屋久島を中心に、モミジイチゴ（*R. Palmatus var. coptophyllus*）、ナガバモミジイチゴ（*R. palmatus var. palmatus*）、ヤクシマキイチゴ（*R. palmatus var. yakumontanus*）が自生する。これらの変種は、葉形態など形態的に分化する傾向がある。また、これまでの研究により、変種ヤクシマキイチゴのドラフトゲノムが構築されつつある。このため、ゲノムワイドな解析を有効に行うことができると期待される。

３．研究の方法

（１）相互移植実験

異なる環境に生育するモミジイチゴが、それぞれの地域に局所適応しているか検証するために、相互移植実験を行った。東北（秋田県大曲市および五城目町）、関東（神奈川県箱根町および千葉県君津市）、南九州（宮崎県宮崎市および鹿児島県霧島市）においてそれぞれ２集団から 10 株ずつ採集し、株分けによるクローン株を玉川大学（東京都町田市）において作成した。クローン株は、平成27 年度に秋田県立大学（秋田県五城目町）、玉川大学、および宮崎大学（宮崎県宮崎市）に不織布ポットを用いて移植し、その形質を観測した。

（２）ドラフトゲノムの精度向上

① アセンブリの向上

すでにドラフトゲノムは作成しているが、ヘテロ接合性（変異性）がかなり高いことが分かったため、とくに heterogeneous genome に特化したアセンブラーである Platanus を用いて、再度アセンブリをやり直した。得られた scaffold に対してアノテーションを行った。

② Scaffolds の連鎖

ドラフトゲノムとして得られた Scaffolds の連鎖（どの scaffold がどの染色体上にあるのか）を明らかにするために、モミジイチゴ（2n=14）とその近縁種であるリュウキュウイチゴ（2n=14）の雑種第一代（F1）の作出を行った。開花期に、リュウキュウイチゴの雌ずいにモミジイチゴの花粉を受粉させ、交配を行った。遺伝子間の連鎖は、自然選択が起こるうえで、重要な痕跡を残すため、今後の解析精度を飛躍的に増すと期待される。

（３）モミジイチゴゲノムの変異解析

① RADseq によるゲノムワイド SNP の検出

RADseq は、制限酵素を利用したゲノムワイドの変異解析で、ゲノムを特定の制限酵素で切断し、その切断された場所から、次世代シーケンサーで塩基配列を決定する手法である。この研究では、ddRADseq とよばれる２種類の制限酵素を用いて読み取り開始位置を制限する手法を用いた。Illumina 社の HighSeq 2000 を用いた。得られた配列は、トリミングとリードのクオリティ・チェック

を行い、研究の方法（1）で再アセンブリしたドラフトゲノムをリファレンスとしてマッピングを行った。マッピング情報から SNP（一塩基変異）を抽出した。マッピングには Bowtie2、SNP 抽出には stacks を利用した。抽出された SNP のうち、少なくとも 10 リードある SNP だけを解析対象とした。

② 遺伝的集団構造
　集団の履歴は対立遺伝子頻度に影響を与えるので、モミジイチゴがもつ国内の集団遺伝構造を理解することはゲノムスキャンを進める上でも、重要な情報になる。移植実験のために採集した集団のほかに、新たに葉サンプルから DNA を調整した 4 集団を加え、計 10 集団で RADseq 解析を行った。得られた変異のうち、各遺伝子座につき１つの SNP をランダムに抽出し、モミジイチゴの集団構造について STRUCTURE を用いて解析した。

③ ゲノムスキャン
　移植実験を行っている計６集団を対象として、RADseq によるゲノム SNP データから、選択下にある SNP を推定した。ゲノムスキャンには、ベイズ推定に基づく BayeScan および環境要因などと対立遺伝子頻度の関連性に基づく回帰解析を行った。初期解析として、環境要因は、サンプル採集地の緯度勾配を用いた。

④ 他種との変異の共有
　モミジイチゴにおいて環境適応に関与した形質および遺伝子が、近縁野生種で共有されているか検証するために、日本各地からキイチゴ属 *Ideobatus* 亜属に属する計 20 種を収集し、準備を行った。それぞれの分布域情報と形態を調査した。

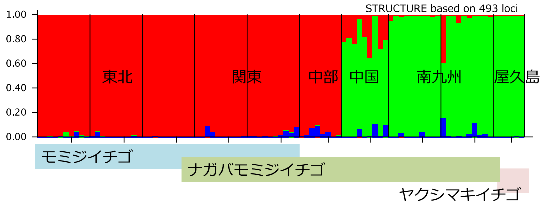
４．研究成果
（1）集団間の形質的変異
　東北・関東・南九州の３地域・６集団から採集したモミジイチゴの個体は、玉川大学にて株分けし、計 56 系統のクローン株の作成に成功した。これらの系統は、平成 27 年度に、モミジイチゴの分布域のなかでも局地的環境である東北環境（秋田県）と南九州環境（宮崎県）に移植した。残りの株は、関東環境（東京都）で同時に移植した。

*Rubus palmatus*の地域間変異

　モミジイチゴの葉形態では明瞭な地域性変異が観測された（上図）。また、樹高および展葉期を測定したところ、南九州集団から緯度に沿って、展葉が開始される傾向が、南九州環境と関東環境において確認された。樹木では、寒い地域に自生する個体は、温度上昇に対する感受性が高く、春先の温度に（北半球の場合）南集団よりも早く応答し、展葉するケースもある。しかし、モミジイチゴでは、北集団において冬期の低温欲求性が深く、ある一定の寒さを経験してからでないと、温度上昇に対する感受性が発現しないのかもしれない。東北環境では、展葉の時期は、地域間でほとんど変わらなかったことを考えると、東北環境では東北集団も十分な寒さを経験したと考えられる。

　クローン株の作成と安定化にやや時間がかかったことから、予定より相互移植実験の開始が遅れた。このため、今後２年間かけて集中的にデータ収集を行う。計測予定項目は、フェノロジー（展葉期、開花期、落葉期）、葉面積、比葉面積、総フェノール含有量、縮合タンニン含有量である。

（2）モミジイチゴ・ドラフトゲノム
　モミジイチゴのゲノムを heterogeneous genome に特化したアセンブラーである Platanus を用いて、アセンブリしたところ、N50 が 415kbp、全長 212Mbp、最長 scaffold 長 3.8Mbp のアセンブリ結果となった。また、共同研究先である基礎生物学研究所においてバラ科近縁種である *Fragaria vesca* のゲノム情報から遺伝子機能のアノテーションを行った。得られた scaffold の連鎖を検証するために、モミジイチゴとそのリュウキュウイチゴの F１個体を玉川大学および宮崎大学で作成した。異なる親の組み合わせで計２家系の F１世代が 100 個体以上作成できた。F１個体のデータから scaffold の連鎖の検証（染色体ごとの並び替え）が終わり次第、結果を公表する。

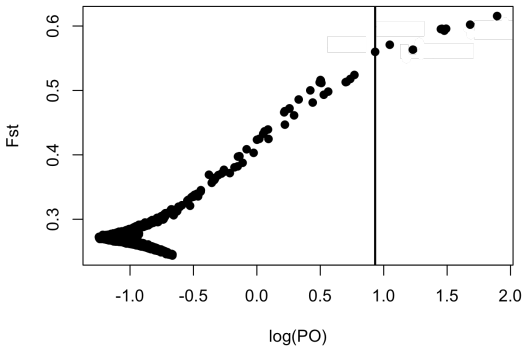
（3）モミジイチゴの集団遺伝構造


　日本各地の 10 集団（移植実験集団を含む：東北地方３集団、関東地方２集団、中部地方１集団、中国地方１集団、九州地方３集団）から採集した計 94 個体において RADseq を行った。10 リード以上ある SNP をもつ遺伝子座を抽出したところ、493 座あった。これらの遺伝子座からランダムに１つの SNP を抽出し、STRUCTURE 解析を行ったところ、中部地方と中国地方の間に遺伝的障壁があることが明らかとなった。これは、２つの変種モミジイチゴとナガバモミジイチゴの分布域に概ね一致する。東北集団と関東集団は、南九州集団に比べて、遺伝的構成が類似している傾向がみられた（上図）。この傾向は、

サンガー法によるフィトクロム A 遺伝子（*PhyA*）の配列に基づく解析でも検出された。

（４） 適応関連遺伝子の探索

東北・関東・南九州の６集団の RADseq によるゲノム SNP データ（約 11,000SNPs）を用いて、選択下にあると想定される SNP の検出を試みた。初期解析として以下の２つの手法を用いた：１）集団に共有する効果から逸脱する遺伝子座を対立遺伝子頻度から BayeScan（ベイズ法）により抽出、２）環境要因との回帰解析から緯度勾配に応答して遺伝子頻度が変化する遺伝子座の抽出。結果、前者では、計 9SNP（下図、log(PO) > 1.0）、後者の手法では、計 31SNP が検出された。２つで共通して検出された SNP は、5SNP あり、これらは、強光下での細胞修復に関連すると考えられる *ftsH* 遺伝子などであった。



上記の SNP は地域間で共通してみられたものであれが、集団レベルでみると、１つの集団に固有に検出される候補遺伝子も多くあった。今後、相互移植実験から得られた形質データをもとに、これらの遺伝子が関連する形質を解析し、近縁野生種との共有性から遺伝的変異の由来について検討し、終了次第、結果を公表する。

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）

<u>三村 真紀子</u>（2015）キイチゴたちが屋久島で出会うとき：気候変動と遺伝的交流　屋久島学 2:97-99 査読無

<u>Mimura M</u>, Mishima M, Lascoux M, Yahara T. (2014) Range shift and introgression of the rear and leading populations in two ecologically distinct Rubus species. BMC Evolutionary Biology 14:209　査読有 DOI:10.1186/S12862-014-0209-9

〔学会発表〕（計２件）

<u>三村真紀子</u>・重信秀治・山口勝司・矢原徹一　異なる気候帯に適応分布する野生キイチゴの RADseq 解析、NGS 現場の会第四回研究会、2015 年 7 月、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

<u>三村真紀子</u>　標高帯における適応的浸透交雑、生態学会第 62 回全国大会、2015 年 3 月、鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）

６．研究組織

(1)研究代表者

三村 真紀子（MIMURA, Makiko）
玉川大学・農学部・准教授
研究者番号： 60451689

(2)研究協力者

國武 久登（KUNITAKE, Hisato）
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号： 80289628

今西 弘幸（IMANISHI, Hiroyuki）
秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号： 10320607