

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440214

研究課題名(和文)大規模比較ゲノム解析からカシ林の生物間ネットワークの成立・変遷の歴史を復元する

研究課題名(英文) Phylogeny and phylogeography of evergreen oaks (*Quercus*) in the warm temperate zone in Japan using genomic approach

研究代表者

青木 京子 (Aoki, Kyoko)

大阪大学・連合小児発達学研究所・寄附講座助教

研究者番号：70378537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：日本の暖温帯に生育する照葉樹林の中で比較的耐寒性のあるカシ類について遺伝的分化のパターンを解析した。日本のカシ類8種(イチイガシ, アカガシ, ウラジロガシ, アラカシ, シラカシ, ツクバネガシ, ハナガガシ, オキナワウラジロガシ)の系統関係を解析した結果, 日本のカシ類は種ごとに明確に遺伝的分化していた。ゲノムワイドな遺伝子配列データを得ることにより, これまで不明瞭だったカシ類の系統関係を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Phylogeny and phylogeography of evergreen oaks (*Quercus*) in the warm temperate zone in Japan were analyzed using a genomic approach (restriction site associated DNA sequence). Eight evergreen *Quercus* species (*Q. gilva*, *Q. acuta*, *Q. salicina*, *Q. miyagii*, *Q. glauca*, *Q. myrsinifolia*, *Q. sessilifolia*, *Q. hondae*) in Japan were clearly genetically differentiated.

研究分野：分子生物地理学

キーワード：分子植物地理学 照葉樹林 レフュジア 遺伝的多様性 植食性昆虫 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

日本の生物相は、氷河期から比較的温暖な現在までの数百万年間に大きな気候変動を受け、それとともなって分布域を大きく変化させてきた。そのため現在の生物の地理的分布は、過去の環境や地史の影響を強く受けている。これまで日本の暖温帯に生育する照葉樹林を構成する様々な植物種群について遺伝的分化の地理的パターンを比較することにより、照葉樹林の歴史的成立過程を考察してきた。個々の種における遺伝構造は様々な要因によって形成されるため、森林自体の歴史変遷を考察するためには、複数の構成種の地理的変異パターンに共通する点をさがし出す必要があるからである。

これまでは日本の暖温帯に生育する照葉樹林を構成する林のうち、比較的暖かい低地に生育するシイ林の分布変遷の解明を目指し、シイ林に生育する複数の植物種群について遺伝的分化の地理的パターンを比較してきた。その結果、シイ林における氷期中のレフュジアの候補地に関する知見は得られた。しかし、植物で使える DNA 多型（例えば葉緑体 DNA）は分子進化速度が遅すぎて種内多型量が少なく、集団動態など最近の分布変遷を追跡するには限界があった。

このように植物で使える DNA の塩基配列多型だけからは十分な情報が得られなかったのであるが、近年の遺伝子解析技術の発展によって低コストで使えるようになった次世代シーケンサーを活用すれば、植物および森林の歴史の変遷をさらに最近まで追跡することが可能である。最近開発された Restriction Site Associated DNA Sequence (RADseq) という手法を用いると、多数の試料を対象に数十万～数百万オーダーの遺伝子座の塩基配列情報を容易に得ることができる。この技術を新しく生物地理学の研究に取り入れると、数千～数万遺伝子座の一塩基多型 (SNP) データが得られ、これまで行われてきた少数遺伝子座を対象にした DNA 多型解析からは推定できなかったような過去数千年単位の分布変遷や集団動態の変遷まで読み取れる。

2. 研究の目的

本研究では、日本の暖温帯に生育する照葉樹林を構成する樹種のうち、シイ類（これまでの研究対象）よりも耐寒性のあるカシ類を対象とする。カシ類は、東アジアに広く分布する照葉樹林の主要樹種であり、シイ類よりも内陸部の、さらに標高の高い山地にまで分布する。カシ林は、シイ林とは現在の分布や生態特性が異なるため、両樹林は分布変遷も異なると考えられるからである。次世代シーケンサーを活用してカシ型照葉樹林に生活する生物種内のゲノム解析を行い、それらの

種群間で遺伝構造や遺伝的多様性を包括的に比較することによって、照葉樹林生態系の歴史的成立過程を総合的に解明する計画である。

3. 研究の方法

(1) カシ類の RADseq 解析

カシ林の主要構成樹種のうち、まとまった森林を形成するイチイガシ・ウラジロガシ・アカガシを選択し、これらのタイプの林が生育する山系 15～20 地点を日本列島から広く選び出した。1 地点 1 種につき 5～6 個体を目標にして葉サンプルを採集した。周辺にアラカシやシラカシ、ツクバネガシ、ハナガガシなどの種が分布する場合には、同時にサンプリングした。オキナワウラジロガシについては、琉球列島で葉サンプルを採集した。比較のために台湾でもサンプリングを行った。

次世代シーケンサーの RADseq 法により、それぞれの種内で数千～数万遺伝子座の SNPs を検出し、カシ類の系統解析およびそれぞれの種内における多型の地理的分布パターンを調べた。

(2) カシ類に種特異的に寄生する植食性昆虫の遺伝解析

カシ林の優占樹種には、新葉にウスモンノミゾウムシ、フトノミゾウムシ、ハイマダラノミゾウムシ、ツヤコガ、モグリチビガ等が大量に産卵・潜葉する。4-6 月の新葉の時期に潜葉している昆虫を新葉および落葉ごと採集した。

4. 研究成果

(1) 現地調査

本研究の調査を通して、日本の本州から琉球にかけてのカシ林から、日本に生育するカシ類 8 種（イチイガシ、アカガシ、ウラジロガシ、アラカシ、シラカシ、ツクバネガシ、ハナガガシ、オキナワウラジロガシ）すべてのサンプルを収集することができた。種多様性の高い林においては、同所的に数種のカシのサンプルを採集することができた（写真）。



写真. 種多様性の高いカシ林（宮崎県）

カシ類の新葉に産卵・潜葉する植食性昆虫については、新葉の落葉に潜葉していたツヤコガを複数地点で採集することができた。

(2) 遺伝子解析

日本に生育するカシ類 8 種 (イチイガシ, アカガシ, ウラジロガシ, アラカシ, シラカシ, ツクバネガシ, ハナガガシ, オキナワウラジロガシ) の系統関係を解析した。カシ類は、東アジアに広く分布する主要樹種であるにもかかわらず種の境界があいまいな分類群の一つであり、複数の種間において葉緑体ハプロタイプの共有や核ゲノムの混合が報告されている。

採集したカシ類の葉サンプルのうち、イチイガシ 30 個体, アカガシ 79 個体, ウラジロガシ 69 個体, アラカシ 64 個体, シラカシ 7 個体, ツクバネガシ 12 個体, ハナガガシ 11 個体, オキナワウラジロガシ 6 個体について RADseq 法により解析を行った。DNeasy Plant Mini Kit を用いて葉サンプルから DNA を抽出し、濃度を 20ng/uL にそろえ、RADseq 解析 (Paired end 100bp+100bp) を行った。種間の系統関係および種内の遺伝構造については解析ソフト PEAR を用いてアセンブルを行い、解析ソフト pyRAD と RAXML を用いて系統樹を作成した。

その結果、日本のカシ類 8 種は、種ごとに明確に遺伝的分化していた。イチイガシは他のカシ類と遺伝的にかなり離れており、アカガシ, ツクバネガシ, ハナガガシ, オキナワウラジロガシのクレードとウラジロガシ, アラカシ, シラカシのクレードに大きく分かれた。

これらの結果から、RADseq 法を用いてゲノムワイドな SNP データを得ることにより、これまで不明瞭だったカシ類の系統関係を明らかにすることができた。今後、それぞれのカシ種内の遺伝構造を解析し、集団サイズの変動を地域間で比較し、論文を執筆する予定である。

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 4 件)

Kyoko Aoki, Saneyoshi Ueno, Takashi Kamijo, Hiroaki Setoguchi, Noriaki Murakami, Makoto Kato, Yoshihiko Tsumura (2016) Detecting east-west genetic differentiation in *Castanopsis* (Fagaceae) on the main islands of Japan and north-south on the Ryukyu Islands, based on

chloroplast haplotypes. *Plant Systematics and Evolution*, 302:1093-1107, 査読あり, doi: 10.1007/s00606-016-1319-1

青木京子 (2015) 「解説シリーズ: 日本の森林樹木の地理的遺伝構造(11) シイ類 (ブナ科シイ属)」。森林遺伝育種 4, 173-179, 査読なし

青木京子 (2015) 「フィールド便り: 照葉樹林の分布変遷を調べる-植物を食べる昆虫の情報も用いて」。人環フォーラム (京都大学人間環境学研究所) 34, 48-49, 査読なし

Kyoko AOKI, Saneyoshi UENO, Takashi KAMIJO, Hiroaki SETOGUCHI, Noriaki MURAKAMI, Makoto KATO, Yoshihiko TSUMURA (2014) Genetic differentiation and genetic diversity of *Castanopsis* (Fagaceae), the dominant tree species in Japanese broadleaved evergreen forests, revealed by analysis of EST-associated microsatellites. *PLOS ONE*, 9 (1), e87429, 査読あり, doi:10.1371/journal.pone.0087429

[学会発表] (計 4 件)

青木京子・瀬尾明弘・川口 利奈・手塚あゆみ・永野惇・井鷲裕司 (ポスター発表), 「RADseq 法を用いた日本のカシ類の系統解析および種内の遺伝構造」, 日本植物分類学会第 16 回大会, 京都大学, 2017 年 3 月 10 日

青木京子・瀬尾明弘・手塚あゆみ・永野惇・井鷲裕司 (ポスター発表), 「RADseq 法を用いた日本のカシ類の系統解析」, 日本植物分類学会第 15 回大会, 富山大学, 2016 年 3 月 6 日

青木京子 (シンポジウム招待講演), 最新の森林系統地理学と将来展望 (コーディネータ 戸丸信弘・津村義彦・井鷲裕司・陶山佳久), 「照葉樹林の分布変遷過程-スダジイと種子食昆虫の集団動態から」, 日本森林学会第 126 回大会, 北海道大学, 2015 年 3 月 27 日

青木京子 (日本植物学会第 78 回奨励賞受賞招待講演), 「植食性昆虫の DNA 多型情報を利用した照葉樹林の植物地理学的研究」, 日本植物学会第 78 回大会, 明治大学, 2014 年 9 月 13 日

[図書] (計 5 件)

青木京子・村上哲明 (2015) 「ホルトノキ」, 津村義彦・陶山佳久 (編) 「地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン」, pp.96-97, 文一総合出版

青木京子・村上哲明 (2015) 「バクチノキ」, 津村義彦・陶山佳久 (編) 「地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン」, pp.98-99, 文一総合出版

青木京子・村上哲明 (2015) 「カナメモチ」, 津村義彦・陶山佳久 (編) 「地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン」, pp.108-109, 文一総合出版
青木京子・村上哲明 (2015) 「コショウノキ」, 津村義彦・陶山佳久 (編) 「地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン」, pp.147-148, 文一総合出版
上野真義・青木京子 (2015) 「スタジイ」, 津村義彦・陶山佳久 (編) 「地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン」, pp.114-116, 文一総合出版

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 京子 (Aoki, Kyoko)
大阪大学・連合小児発達学研究所・寄附講座助教
研究者番号: 70378537

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし