

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20241055

研究課題名（和文）サクラソウの適応的遺伝子に関するエコゲノム研究

研究課題名（英文）Eco-genome study of adaptive genes in *Primula sieboldii*

研究代表者

大澤 良（OHSAWA RYO）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80211788

研究成果の概要（和文）：野生サクラソウ集団の保全方法を構築するために、サクラソウの持つ適応関連遺伝子を QTL 解析および発現遺伝子情報に基づくマーカーによるゲノムワイドな探索によって同定することを試みた。集団の存続に影響を与える異型花柱性について関連する遺伝子領域を高い精度で把握することが可能になった。園芸品種と野生種の遺伝的多様性の比較を行い、園芸化の過程ではびん首効果が働いたことを明らかにした。また、EST マーカーなどを用いて北海道から関東の国内 7 集団による出芽期や開花期など適応関連形質についての遺伝的解析を行い、サクラソウの適応に強く関連する出芽日に関して多数の遺伝子座を検出した。本研究の成果は、今後のサクラソウの保全方策構築に貢献するだけでなく、他の野生植物の保全にゲノム研究がどのように貢献しえるのかのモデルになる。

研究成果の概要（英文）：To develop the conservation strategy of endangered wild primroses, we tried to identify the adaptive genes by QTL analysis and the genome-wide gene analysis based on the expression genetic information. Several associated gene regions about hetero style which affected the continuation of the group were detected with high precision. We clarified that a bottle neck effect committed the process of domestication by a comparison between genetic diversity of wild primrose and cultivars. Using EST markers, genetic analysis about the adaptive characters including the budding date and the flowering time were performed for 7 populations from Hokkaido to Kanto region. We could detect a lot of loci about budding in conjunction with the adaptation of the primrose. The results of our study will contribute not only the development of the conservation strategy, but also will become the model which show how to use genome information for conservation strategy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成 20 年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
平成 21 年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
平成 22 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
年度			
年度			
総 計	38,500,000	11,550,000	50,050,000

研究分野：植物育種学

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：生物多様性保全、サクラソウ、適応的遺伝子、QTL 解析、EST マーカー、異型花柱性

1. 研究開始当初の背景

種あるいは集団が進化の過程で保持してきた遺伝的多様性を適切に保存することを目的としてこれまでに多くの研究が進められてきた。特に RFLP や AFLP など自然選択に対して中立的な遺伝子マーカーを利用した遺伝的変異の解析の成果は、対象とする種の生活史や保全ユニットの理解を助けるなど保全戦略に大きな貢献をしてきた。しかし、中立マーカー遺伝子は基本的に遺伝的浮動や突然変異の影響を反映するものであるため、集団の絶滅確率に大きく影響する個体の適応に関わる種子生産性や開花期などの適応的遺伝子の多様性は把握できない。今後、地球規模でおこるとされている環境変動に抗して種を保全するには、種もしくは集団内に適応に関わる遺伝的変異がどの程度存在しているのかを把握する必要がある。

多様なゲノム情報を利用できるようになった今、種内の遺伝的多様性の保全研究には①できるだけ多数の中立マーカー遺伝子によって、集団が保有する適応的な遺伝変異量にも影響を与える集団の人口学的な歴史の推定精度を高めること、②集団の存続に大きな影響を与える環境に対して反応する適応的な変異を量的に把握すること、③中立的変異と適応的変異の情報によって、保全ユニットの策定など集団の遺伝的多様性の保全策を構築することが求められている。ここ数年、野生集団において多くの適応関連形質に関与する量的形質遺伝子座の解析手法が開発され、さらにはゲノム科学の急速な進展により適応的遺伝子の直接的な解析が可能になってきた。野生集団における QTL 解析は年々増えている。また、近年の遺伝子情報の膨大な蓄積はゲノムワイドな適応的遺伝子の探索を可能にした。発現遺伝子を DNA マーカーとして、直接的に適応に係る遺伝子を探索する試みは様々な植物において報告がなされている。しかし、いずれも実験植物や栽培化や進化過程の解明を目的にした解析であり、野生集団の保全を念頭に置いたものではない。世界的には、保全ユニットの設定に関して、中立マーカー遺伝子に加えて、適応的遺伝子の組成を重視するべきとし、保全遺伝学の新行動計画として中立的な変異、有害な変異、適応的な変異の関係を明確にする研究プログラムの構築をただちに進めるべきとされている。

筆者らはこれまでに絶滅の危機にあり、虫媒他殖性で種子繁殖と栄養繁殖の生殖様式という野生植物に典型的に見られる生殖様式を持つサクラソウを対象として「サクラソウ・エコゲノム・プロジェクト」を推進し、①量的形質遺伝子座解析に供する SSR マーカーの開発およびそれを利用したサクラソウ自生集団の遺伝構造の解析と保全単位の提

唱、②他殖性植物におけるマッピング理論の構築、③QTL 解析に供する形質データの生態学的解析や野生個体群の遺伝子動態に寄与する生活史特性と個体群動態パラメータの測定手法の開発などの成果を挙げてきた。しかしながら、中立的マーカー遺伝子、ならびに発現遺伝子に基づくマーカーの開発が不十分であったこともあり、集団の存続に大きな影響を及ぼす適応に関係するような機能を持ったゲノム領域あるいは遺伝子そのものの変異の把握には至らずにいた。そこで、野生植物であるサクラソウの適応的遺伝子の探索とこれまでの蓄積を合わせることで、より精度の高い保全戦略の構築の基盤を整えることを目的として、中立遺伝子による変異の把握とともに集団の存続に強く関わる適応的遺伝子の変異の把握、すなわちエコゲノム研究を推進することとした。

2. 研究の目的

野生サクラソウ保全方策を確立するために、野生サクラソウを対象として、量的形質による多様性解析の有効性の検証、量的形質遺伝子座解析および発現遺伝子情報である EST 情報に基づくマーカーによるゲノム上の広範な領域を対象とした探索による適応関連遺伝子領域の同定、および既存の中立的遺伝子により同定した適応的遺伝子を加えた集団の多様性解析を行う。

3. 研究の方法

研究は以下の 6 項目で構成されている。

(1) サクラソウの量的形質および DNA マーカーによる多様性解析と保全単位の再考

- ① サクラソウの多様性解析における花卉形状変異の有効性を検討する。
- ② QTL は栽培環境の影響を受けるため、日本各地の集団をつくばにおいて同一環境栽培試験を行い、分子マーカーによる集団分化程度と量的形質の遺伝的分化程度を比較し、従来の分子マーカーに基づく保全単位の有効性を再考する。

(2) サクラソウ連鎖地図作成と QTL 解析および E アソシエーション解析による適応関連遺伝子の同定

- ① EST マーカーおよび SSR マーカーの開発。
- ② 北海道由来個体と八ヶ岳由来個体の 4 系交雑家系を用いた連鎖地図の作成。
- ③ 出芽日、開花数、種子生産性などの適応関連形質、さらには、サクラソウの繁殖生態と近親交配に重要な役割を果たしている異型花柱性とそれに関わる形質の QTL の探索。
- ④ 現存する野生集団を用いた表現型と遺伝子型とのアソシエーション解析。

4. 研究成果

(1) サクラソウの多様性評価の指標とされてきた花卉形状と花卉面積の集団内・間の遺伝的変異を同一圃場実験によって評価し、DNA マーカーによる集団間分化程度と比較したところ、花卉の切れ込みと最大幅と面積は有意な集団間差が認められたものの、花卉形質の遺伝的変異は主に集団内に維持されていた。さらに花卉形質は自然選択に中立な形質であり、花卉形状変異の大部分を占める切れ込みと最大幅、長幅比に加え花卉面積が集団内の遺伝的多様性の目視評価の指標となりうることを示された。

(2) 適応関連形質である出芽に着目し、量的形質の集団間分化程度である QST と分子マーカーによる分化程度である FST を日本各地の集団で比較したところ、従来 FST によって支持された保全単位とは異なる保全単位が見出された。これは野生集団の保全事業において DNA マーカーのみに依存するべきではないことを示唆するものである。

(3) QTL 解析を進めるため、EST マーカーおよび SSR マーカー数を増やし、連鎖地図の充実を図った。2960 の unigene element を同定した。近縁種である *Primula vulgaris* の S 遺伝子座との同一性が認められる element を見出すことができた。これらにより異型花柱性関連 QTL を高い精度で把握することが可能になった。また、開発した 20 個の SSR マーカーと 40 個の SNPs マーカーが国内野生集団の多様性解析に使用可能であることを明らかにし、EST-SSR マーカーによる多様性程度は SSR マーカーより低くなることを示した。さらに、56 種の園芸品種の多型解析を行い、対立遺伝子多様度が野生集団より低く、園芸化の過程ではびん首効果が働いたことを明らかにした。

(4) 開発した SSR マーカーおよび EST マーカーにより北海道由来個体と長野由来個体の分離家系を用いて連鎖地図を作成し、128 座、14 個の連鎖群からなる連鎖地図が作成できた。サクラソウは $2n=24$ であるため今後さらに地図を充実させる必要がある。

(5) 同一家系による適応関連形質の QTL 解析を行い、出芽日、開花まで日数、花型および異型花柱性に関わる QTL 座を検出した。集団の存続に影響を与える異型花柱性について QTL 解析を進め、関連する染色体領域を特定した。その結果、質的遺伝をする主要遺伝子領域の他に、柱頭高、葯高などに関与する複数の QTL を同定することができた。これらの結果は、従来明らかにされていた異型花柱性の遺伝様式に新たな解釈を与えるものである。また、これらの QTL に連鎖する DNA マーカーにより未開花個体の異型花柱性判別が可能となった。

(6) 出芽日が適応関連形質であることが示唆

され、適応関連形質の遺伝的多様性の評価は長期的な存続を考えるうえで重要であるが、絶滅危惧植物でサクラソウは自生地からの個体のサンプリングが難しく、同一環境栽培による評価は難しい。当初は、出芽日に関連する遺伝子座に連鎖するマーカーを用いて、出芽日の遺伝的多様性評価を行うために QTL 解析を行ったが、家系に用いた両親が出芽日に大きな差がなく、出芽日に関連する QTL が検出されなかった。そこで、アソシエーション解析を行い、出芽日に関連する遺伝子座の特定を試みた。材料には北海道、埼玉、長野の 3 地域由来 8 集団から総計 142 ジェネットを用いた。SSR プライマー 140 対、EST-SSR プライマー 23 対、SNP プライマー 40 個によって遺伝子型を決定した。測定形質は出芽日とした。集団構造の解析には、ソフトウェア structure ver. 2.3.3 を使い、最適な K 値を決定した。さらに、R を用いたアソシエーション解析を遺伝子座を考慮しないモデルと遺伝子座を考慮したモデルを比較することで、各遺伝子座の効果の検証を試みた。ソフトウェア R ver. 2.7.1 を使い、各モデルの回帰式を分散分析することにより 1%水準で有意差が認められた遺伝子座を、測定形質に関与している遺伝子座とみなした。解析の結果、203 プライマーのうち、増幅が認められた 112 マーカーの遺伝子型を決定した。structure 解析の結果から最適な K 値は 7 とした。そのうち、北海道 2 集団、および長野 2 集団はそれぞれ同じクラスターに分類されたが、他の集団はそれぞれ異なるクラスターに分類され、長野の 1 集団のジェネットは 4 つのクラスターに分類され、他の集団に比べ集団内に遺伝的に多様なジェネットが存在していることが明らかになった。アソシエーション解析の結果、1%水準で出芽日に関連する 17 遺伝子座が検出された。これらの遺伝子座は 9 つの連鎖群で検出された。このモデルでは個体間の近縁関係を示す K マトリックスを考慮できなかったことから、過大に評価されている可能性が考えられるものの、出芽日は複数の連鎖群に存在する多くの遺伝子座に支配されている形質であることが示唆された。

本研究の成果は、今後のサクラソウの保全方策構築に貢献するだけでなく、他の野生植物の保全にゲノム研究がどのように貢献し得るのかというモデルになる。

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 18 件)

① Yoshida, Y., S. Ueno, M. Honjo, N. Kitamoto,

- M. Nagai, I. Washitani, Y. Tsumura and R. Ohsawa. QTL analysis of heterostyly in *Primula sieboldii* and its application for morph identification in wild populations. *Annals of Botany* 108:133-142. 2011. 査読有
- ② Ueno, S., Y. Yoshida, Y. Taguchi, T. Ujino-Ihara, N. Kitamoto, M. Honjo, R. Ohsawa, I. Washitani and Y. Tsumura. Generation of expressed sequence tags, -development of microsatellite and single nucleotide polymorphism markers in *Primula sieboldii* E. Morren (Primulaceae) and its effectiveness for analysis of genetic diversity in natural and horticultural populations, *Breeding Science* 61 : 234-243. 2011 査読有
- ③ Nishihiro, J. and Washitani, I. Post-pollination process in a partially self-compatible distylous plant, *Primula sieboldii* (Primulaceae). *Plant species Biology* 26 : 213-220, 2011 査読有
- ④ Kadoya, T. and Washitani, I. Predicting the rate of range expansion of an invasive alien bumblebee (*Bombus terrestris*) using a stochastic spatio-temporal model. *Biological conservation* 143:1228-1235, 2010 査読有
- ⑤ 鷺谷いづみ 人間中心世の変動環境と生物多様性 科学 10月号 2010 査読無
- ⑥ 鷺谷いづみ 気候変動対策と生物多様性保全 学術の動向 3月号 76-81 2010 査読無
- ⑦ 鷺谷いづみ 生物多様性の危機とその克服に向けて 前衛 862:209-231, 2010 査読無
- ⑧ 大谷雅人・西廣淳・寺内浩・寺内優美子・鷺谷いづみ 群馬県鳴神山における絶滅危惧植物カッソウの個体群再生に向けた取り組みとそれにより明らかになった種特性及び生育環境 保全生態学研究 14:91-99, 2009 査読有
- ⑨ Yoshida, Y., M. Honjo, N. Kitamoto, R. Ohsawa Reconsideration for conservation units of wild *Primula sieboldii* in Japan based on adaptive diversity and molecular genetic diversity. *Genetics Research*, 91: 225-235. 2009 査読有
- ⑩ Nishihiro, J., Uesugi, R., Takagawa, S., and Washitani, I. Toward the restoration of a sustainable population of a threatened aquatic plant, *Nymphoides peltata*: integrated genetic/demographic studies and practices. *Biological Conservation* 142:1906-1912, 2009 査読有
- ⑪ Inoue, M.N., Ishikawa, S., Inoue, T. and Washitani, I. Conservation ecological study of invasion of *Bombus terrestris* (Hymenoptera:Apidae) into a preserved area of the Notsuke Peninsula of eastern Hokkaido, Japan. *Applied Entomology and Zoology* 44:337-342, 2009 査読有
- ⑫ Ueno, S., Y. Yoshida, Y. Taguchi, M. Honjo, N. Kitamoto, I. Washitani, R. Ohsawa, Y. Tsumura Development of 120 microsatellite markers for *Primula sieboldii* E. Morren for linkage mapping. *Conservation genetics*.10:1945-1952. 2009. 査読有
- ⑬ Honjo, M., N. Kitamoto, S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani, R. Ohsawa Management units of the endangered herb *Primula sieboldii* based on microsatellite variation among and within populations throughout Japan. *Conservation Genetics* 10: 257-267. 2008 査読有
- ⑭ Honjo, M., T. Handa, Y. Tsumura, I. Washitani, R. Ohsawa Origins of traditional cultivars of *Primula sieboldii* revealed by nuclear microsatellite and chloroplast DNA variations. *Breeding Science* 58: 347-354. 2008 査読有
- ⑮ Honjo, M., S. Ueno, Y. Tsumura, T. Handa, I. Washitani, R. Ohsawa Tracing the origins of stocks of the endangered species *Primula sieboldii* using nuclear microsatellites and chloroplast DNA. *Conservation Genetics*.9: 1139-1177. 2008 査読有
- ⑯ Yoshida, Y., M. Honjo, N. Kitamoto, R. Ohsawa Genetic variation and differentiation of floral morphology in wild *Primula Sieboldii* evaluated by image analysis data and SSR markers. *Breeding Science* 58: 301-307. 2008 査読有
- ⑰ Ohtani, M., Terauchi, H., Nishihiro, J., Ueno, S., Tsumura, Y., and Washitani, I. Towards a legal framework for systematic conservation: identification and development of allele-specific PCR markers for conspecific varieties of an endangered perennial herb *Primula kisoana* Miquel based on sequence variation of chloroplast DNA. *conservation genetics* 9:1173-1181.2008 査読有
- ⑱ Shen, H., Tang, Y., Muraoka, H. and Washitani, I. Characteristics of leaf photosynthesis and simulated individual carbon budget in *Primula nutans* under contrasting light and temperature conditions. *Journal of Plant Research* 121 : 191-200. 2008 査読有
- [学会発表] (計 8 件)
- ① Yoshida, Y., S. Ueno, Y. Tsumura and R. Ohsawa QTL analysis of floral morphology

related heterostyly in *Primula sieboldii*,
28th International Horticultural Congress
2010 年 8 月 24 日 リスボン、ポルトガル

- ② Ohsawa, R., Yoshida, Y., S. Ueno, Y. Tsumura QTL analysis of petal form variation in *Primula sieboldii*, 28th International Horticultural Congress 2010 年 8 月 26 日 リスボン、ポルトガル
- ③ 吉田康子, 上野真義, 本城正憲, 北本尚子, 永井美穂子, 鷺谷いづみ, 津村義彦, 大澤良 サクラソウの異型花柱性に関するQTL解析 日本育種学会 2009 年 9 月 26 日 北海道大学
- ④ 吉田康子, 上野真義, 北本尚子, 小玉昌孝, 本城正憲, 田口由利子, 永井美穂子, 鷺谷いづみ, 津村義彦, 大澤良 適応に関連したQTL に基づく野生サクラソウ集団の遺伝的多様性評価 日本生態学会第 56 回大会 2009 年 3 月 19 日 岩手県立大学
- ⑤ 北本尚子, 本城正憲, 吉田康子, 上野真義, 津村義彦, 鷺谷いづみ, 大澤良 サクラソウの受粉から結実までに働く近交弱勢の関与と遺伝子座数とその効果の解析 日本生態学会第 56 回大会 2009 年 3 月 19 日 岩手県立大学
- ⑥ 田中良典・鷺谷いづみ サクラソウの個体群構造と種子生産の空間的不均一性 日本生態学会第 56 回大会 2009 年 3 月 19 日 岩手県立大学
- ⑦ Kato, J., M. Nimura, Y. Futagami, M. Ikeda, M. Hayashi, Y. Murata, Y. Yoshida, R. Ohsawa, S. Ichihashi, M. Mii Unreduced gamete formation and its utilization for ornamental plant breeding The 3rd Asian Chromosome Colloquium. Abstract: 31 2008 年 12 月 3 日
- ⑧ 加藤淳太郎, 村田有紀, 鈴木幹奈, 池田真由子, 吉田康子, 上野真義, 大澤良, 三位正洋 SSRマーカーによる 3 倍体サクラソウ (*Primula Sieboldii*) 種間雑種形成に寄与する 非還元雌性配偶子タイプの推定 育種学研究 10 (別 2) : 249 2008 年 10 月 11 日

〔図書〕(計 2 件)

- ① 鷺谷いづみ・宮下直・西廣淳・角谷拓 保全性多額の技法、東京大学出版会 2010
- ② 幸田シャーミン (作)・大島節子 (絵)・鷺谷いづみ (監修) サクラソウのひみつ 社団法人ユネスコ協会連盟 2008

〔その他〕ホームページ等

大澤 良

<http://www.sakura.cc.tsukuba.ac.jp/~pbr/eed/>

津村義彦

<http://www.ffpri.affrc.go.jp/research/dept/09f-genetics/index.html>

鷺谷いづみ

<http://www.coneco.es.a.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 良 (OHSAWA RYO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号 : 80211788

(2) 研究分担者

津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)

独立行政法人 森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長
研究者番号 : 20353774

鷺谷 いづみ (WASHITANI IZUMI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号 : 40191738

(3) 連携研究者

上野 真義 (UENO MASAYOSHI)

独立行政法人 森林総合研究所・研究員
研究者番号 : 40414479

北本 尚子 (KITAMOTO NAOKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員 (現 岩手大学農学部 研究員)
研究者番号 : 70447241