

ゼンマイ類における適応的遺伝子を含むゲノム領域の解析による 種分化過程の解明

Genetic architecture of speciation in Subgenus *Osmunda*

(日本植物学会推薦)

代表研究者 東京大学 角川 洋子 the University of Tokyo Yoko KAKUGAWA_YATABE
共同研究者 国立科学博物館 堤 千絵 National Museum of Nature and Science Chie TSUTSUMI

Intra-gametophytic selfing is considered to be prevented by lethal or deleterious recessive genes in several diploid species of ferns. Doubled haploids obtained from intra-gametophytic selfing within isolated gametophytes of a putative F1 hybrid between *Osmunda japonica* and *O. lancea* were analyzed with EST-derived molecular markers, and the distribution pattern of transmission ratio distortion (TRD) along linkage map was clarified. The segregation of LG_11 was influenced by zygotic lethality or genotypic evaluation, and some deleterious recessive genes exist in LG_11 and reduce the viability of homozygotes with *O. japonica* alleles. It is very likely that a region of LG_11 were responsible for the low frequencies of intra-gametophytic selfing in *O. japonica*. *Osmunda lancea* is a rheophilous fern endemic to Japan, and a locus on LG_10 appeared to be associated with stenophylly in *O. lancea*. In order to clarify the other adaptive characters in subgenus *Osmunda*, the phenological analyses and more detailed morphological comparison were carried out. As the result, the sterile fronds of *O. lancea*, shorter in length and having thicker petiole, finished foliating earlier than those of *O. japonica*. Mapping of these characters are planned.

研究目的

種分化は生物多様性をうみだす原動力だと考えられる。多くの種分化研究がなされているが、陸上植物のモデル植物を用いる場合、近縁種間において繁殖様式や適応的な形質、野外での生育環境および自然選択圧などを比較するのが困難である場合が多い。シダ植物はモデル植物でなくとも、配偶体が独立栄養で単離培養が可能のため、Doubled Haploids 個体が作成できるという利点があり、遺伝学的な解析がしやすい。そこで、ゼンマイ科ゼンマイ属のゼンマイ (*Osmunda japonica*) とヤシャゼンマイ (*Osmunda lancea*) においては、遺伝地図を基にマップベースの研究を可能にすることを目的とした。

遺伝地図の作成方法としては、ヤシャゼンマイにおいて EST ライブラリーを作成し、CAPS マーカーなどの分子マーカーを設計した。解析した人工雑種集団は、自然 F1 雑種から採取した胞子から作製した。

作製したのは200個体程度のF2雑種および早熟性のF2雑種個体の胞子由来の10個体程度のF3雑種集団に加え、前葉体(配偶体)を単離し得た60個体程度のDoubled Haploids 個体である。

初期の陸上植物が多様化を遂げる上で主に働いた生殖隔離機構についての知見は限られているが、シダ植物は陸上植物の中でも原始的な繁殖様式をもつため、植物が陸上に上がる前から主に生殖的隔離として働いていたと考えられる交配後隔離、つまり、配偶体もしくは配偶子同士が互いに認識する際の接合前隔離や受精卵の遺伝子型によって異なる適応度をしめすなど、接合後隔離を調べるのに適した材料と考えられる。繁殖様式に関わる遺伝的背景の解析は、今後種分化研究を行う上で重要だと考えられる。ヤシャゼンマイには一つの前葉体上で受精し孢子体形成を行なう自配受精能があるが、姉妹種であるゼンマイではほとんどみられない。ヤシャゼンマイに

においては孢子一つから集団が形成できるため散布力が高いと考えられ、ゼンマイにおいては高い他殖性によって集団内の遺伝的多様性が維持されていることが考えられる。シダ植物においては劣性致死遺伝子が自配受精を妨げていると考えられてきた

(Klekowski 1969) ので、このような繁殖様式の違いに関わるゲノム領域を人工交配集団の解析によって明らかにし、ゼンマイにおいて劣性致死遺伝子の存在するゲノム領域を明らかにすることを目的とした。加えて、野外の雑種混生集団における遺伝子浸透の解析を行ない、劣性致死遺伝子を含む領域における種間の遺伝的分化にどのような影響を与えるかを解析した。

また、ゼンマイ類には日本固有の溪流沿い植物であるヤシャゼンマイが含まれる。溪流沿い植物とは、河川が増水すると冠水するところに生育する植物であり、系統的に離れた複数の分類群において葉が細くなる細葉形質がみられる。葉が細くなることで、水流抵抗が軽減され、冠水時の葉のダメージが少なくなる。陸上植物の近縁種間では、適応的な形態形質ははっきりしない場合がほとんどだが、溪流沿い植物であるヤシャゼンマイにおいては細葉形質が適応的な形質としてあげられる。細葉形質は他の分類群の溪流沿い植物にもみられることから、冠水時の水流抵抗という自然選択圧を受けることで平行進化する事が考えられる。そのため、形態観察などの研究もされ (Van Steenis 1981)、ヤシャゼンマイに関しても先行研究がある (Imaichi & Kato 1992, Imaichi & Kato 1993)。そこで、細葉形質に関する遺伝的背景の解析を行なった。

さらに、細葉形質以外に溪流沿いに生育する上で適応的な形質があるかどうか、フェノロジー調査および形態観察をおこない、将来のマッピング対象となる形質の探索を行なった。これらの総合的な解析結果を踏まえて、種分化研究における新しい実験系としてヤシャゼンマイとゼンマイの実験系を立ち上げることを目標とした。

経過

シダ植物では、配偶体を単離することによって自配受精が可能な場合、全ての遺伝子座がホモである Doubled Haploids を作成することができる。自然雑種オオバヤシャゼンマイの孢子から作成した Doubled Haploids においても形態形質を計測したが、

全体的に生存率が低かったので、十分に成長した幼個体を得ることが難しかった。しかし、Doubled Haploids から DNA を抽出し、EST ライブラリーに基づいて開発したマーカーを解析することは可能であり、この結果に基づいて遺伝地図を作成している。現在までに 120 のマーカーが遺伝地図上にマッピングされている。これらのマーカーの内、41 のマーカーについては、F₂ 雑種個体の解析も行なっている。構築された種間の遺伝地図上の分子マーカーの解析および人工交配集団と野外雑種集団の解析をおこなうことにより、自配受精能の遺伝的背景および細葉形質の遺伝的背景の解析を行なった。

さらに、小石川植物園植栽株および埼玉県飯能市入間川沿いの野生集団を用いたフェノロジー調査と形態観察を行なった。この調査において、適応的な形質と考えられた形質に関しては、今後遺伝地図上にマッピングする予定である。

遺伝地図の精緻化のため、ゼンマイ類のゲノムについて次世代シーケンス解析を行ない、新たな分子マーカーの開発も行っている。

考察

人工交配集団の解析により、ヤシャゼンマイとゼンマイの実験系における種間遺伝地図として、120 の分子マーカー (CAPS マーカー、SSR マーカー、SNP マーカー) がマッピングされ、23 連鎖群を含む遺伝地図が作成された (Yatabe-Kakugawa et al. 2013)。

この種間遺伝地図を基に、自配受精能に関わるゲノム領域の解析を行なった。Doubled Haploids 集団と F₂ 雑種集団、配偶体集団における対立遺伝子の頻度の比較により、連鎖群 11 にゼンマイの対立遺伝子がホモになると生存率が著しく低下する領域があることが明らかになった。この領域にゼンマイでは劣性致死遺伝子が存在すると考えられ、ヤシャゼンマイではこの劣性致死遺伝子が失われることにより、自配受精率が高くなっていることが考えられる (Yatabe-Kakugawa et al. 2013)。連鎖群 11 には 12 の分子マーカーがマッピングされている。しかし、これらの多くはゼンマイとヤシャゼンマイでは遺伝的分化がみられてもゼンマイの集団内には変異がない。そこで、次世代シーケンス解析をゼンマイについて行い、薄囊シダ全般で使えるマーカーの開発を試みた。その結果、葉緑体ゲノムに関しては変異探索が容易になった。但し、連鎖群 11 に関しては

L246 に相同性がある配列しかみつからず、次世代シーケンス解析によって得られた配列から開発したマーカーを改めてマッピングしなおす必要がある。

既存のマーカーを用いて京都と飯能のゼンマイとヤシャゼンマイの雑種混生集団および日光と飯能のゼンマイ純群において遺伝子頻度および遺伝子型の解析を行なった。その結果、雑種混生集団では、連鎖群 11 上の遺伝子座 L606 とその近傍の遺伝子座において、ゼンマイとヤシャゼンマイの対立遺伝子の共有の度合いが高く、ヤシャゼンマイの対立遺伝子の頻度が高く、かつ、ヘテロ接合度も有意に高いことが明らかになった。このことから、雑種混生集団では、劣性致死の効果がないヤシャゼンマイの対立遺伝子がゼンマイに浸透しやすいことが示唆された。また、日光と飯能のゼンマイ純群にも L606 とその近傍の遺伝子座において低頻度でヤシャゼンマイの対立遺伝子がみられた。しかし、有意にヘテロ接合度が高くなくゼンマイにおける自配受精率が 0 ~ 2% と非常に低いことと考えると、自配受精を妨げる効果のある対立遺伝子を含む複数の遺伝子座が近接して存在するか、ゼンマイの中に複数の劣性致死遺伝子として働く対立遺伝子が存在するか、のいずれかであることが考えられる。

以上のことから、繁殖様式に関わる劣性致死遺伝子は近傍の遺伝子座の遺伝子頻度と遺伝子型頻度に影響を与え、ヘテロ接合度を高く保つだけでなく、種間の遺伝子浸透を促進し遺伝的分化を小さくする効果もあることが明らかになった。つまり、劣性致死の効果はゼンマイ内で他殖性を維持する効果もあり、それぞれの相反する効果の結果として集団内の遺伝子頻度と遺伝子型頻度が決まるものと考えられる。シダ植物は様々な遺伝学的な解析における利点があるにもかかわらず、ゲノムワイドな解析はほとんどされてこなかった。他殖性は集団内の多様性を維持する機構として重要であり、生物多様性を理解する上で重要な知見を得ることができた。

また、人工交配集団における解析結果から、細葉形質は複数の遺伝子座に支配されていることが明らかになったが、特に大きな効果がある遺伝子座を含むゲノム領域が特定された。他の適応的な形態形質についても相関解析や QTL マッピングを試みている。

溪流沿い植物において一般的に適応的な形質だと考えられている細葉形質の遺伝学的な解析を行なった。まず、小羽片基部の角度と下側最下の支脈数な

どの形質の間にどの程度遺伝的な相関関係があるのかを明らかにするため、人工交配集団を作成し形態形質の解析を行なった。ゼンマイ類では、比較的簡単に配偶体（前葉体）を培養できるので、F1 雑種個体の胞子から配偶体を寒天培地上で育て、ランダム交配させれば、F2 雑種個体を得ることができる。幼個体は始め単葉だが、頂羽片と 1 対の側羽片が独立した段階で、側羽片の基部の角度と下側最下の側脈から分岐する支脈の数を含み、計 6 つの形態形質を計測した。60 個体について、1 から 3 枚の葉（計 106 枚）を解析した結果、側羽片の基部の角度と下側最下の側脈から分岐する支脈の数の 2 形質について大きな変異がみられ、両形質間の相関係数は 0.520 であり、かなりばらつきはあるものの無相関ではないことが明らかになった (Yatabe & Tsutsumi 2012)。また、上側最下の側脈から分岐する支脈の数も、側羽片の基部の角度との間の相関係数が 0.426 と小さいものの、無相関ではないことが示された。つまり、側羽片の上側最下の側脈や下側最下の側脈から分岐する支脈の数で、側羽片基部の角度が一義的に決まるわけではないが、これらの形質間にはある程度の相関があるということになる。一方で、側羽片の基部の角度と、葉形指数は葉ごとにみた場合は相関係数が -0.232、個体ごとに平均した場合は -0.286 というように、相関はあっても小さい (Yatabe & Tsutsumi 2012)。

L245 という遺伝子座では、F2 雑種個体 (60 個体) において、ゼンマイの対立遺伝子のホモ接合体は側羽片の基部の角度が大きく、反対にヤシャゼンマイの対立遺伝子のホモ接合体は、側羽片の基部の角度が小さくなっていた。Doubled Haploids (16 個体) でも、同じ遺伝子座において遺伝子型と側羽片の基部の角度の間に相関がみられた。但し、この遺伝子座における遺伝子型と、側羽片の下側最下の側脈から分岐する支脈の数などを含む他の計測した形質とは相関がなかった。つまり、側羽片の基部の角度に影響を与える遺伝子の 1 つは L245 と連鎖していて、現在までに L245 を含む 5 つのマーカーがマッピングされている連鎖群上にあると考えられる。しかし、この遺伝子を含むゲノム領域が側羽片の下側最下の側脈から分岐する支脈の数や葉形指数に影響を与えているという証拠は得られておらず、ヤシャゼンマイの細葉形質は複数の遺伝子によって決まるものだと考えられる。

さらに、ゼンマイ亜属には南北アメリカとヨーロッパ、アフリカに分布するレガリスゼンマイと、カラフトから北インドに分布するゼンマイ、日本固有種のヤシャゼンマイが含まれるので、3種を対象としたフェノロジー観察と形態観察を行なった。ゼンマイ属では孢子嚢をつける部分とつけない部分の羽片形態は完全に異なっている。レガリスゼンマイは一部の葉の先端部に孢子嚢群をつける（部分的に二形になる）のに対して、ゼンマイとヤシャゼンマイでは完全に二形になる。分子系統解析の結果と併せて考えると、レガリスゼンマイからゼンマイとヤシャゼンマイが分岐した時に完全二形が進化したと考えられる。ヤシャゼンマイは溪流沿い植物であり、溪流帯で冠水時に水流抵抗に耐えるために羽片や小羽片が細くなっている。しかし、その他にも溪流帯の生育環境に進出・適応する過程で獲得した形質や、ゼンマイの時点で前適応していた形質があると考えられる。そこで、本研究ではゼンマイ類の展葉フェノロジーや葉柄形態を調べた。

小石川植物園では、レガリスゼンマイ（北米産）とゼンマイ、ヤシャゼンマイの3種類が同じ場所に植えられている。この3株を使って展葉フェノロジーを調べた。その結果、レガリスゼンマイの孢子葉は3週間ほどかけて5月初旬に展葉が終わるが、展葉後1週間ほどしないと孢子が散り始めなかった。その後、2週間ほど時期をずらして栄養葉が展葉した。ゼンマイの孢子葉は4月中旬から4月末にかけて展葉し、展葉中に孢子が散布された。やはり、2週間ほど時期をずらして栄養葉が展葉した。ヤシャゼンマイの孢子葉は3月下旬には展葉が始まり、4月中旬に展葉が終わると、孢子が散布された。このころには、一部の栄養葉は展葉がおわり、すべての栄養葉の萌芽と展葉が4月末には終わった。レガリスゼンマイとゼンマイを比べると、孢子葉の展葉が始まる時期に大きな差はないが、ゼンマイの孢子葉は栄養葉の半分程度しかなく、孢子散布の始まるまでにかかる期間が3週間ほど短い。このことから、ゼンマイは、主に湿地に生育するレガリスゼンマイから、林床の攪乱環境で繁殖できるように適応して完全二形を獲得し種分化した可能性がある。一方で、ヤシャゼンマイでは、孢子葉の展葉や孢子の散布が終了する時期はゼンマイとほとんど変わらないが、孢子葉と栄養葉の長さにあまり差がなく、栄養葉の展葉も孢子葉とほぼ同時期に終わる。溪流帯に進出

する過程で、栄養葉が短くなり、栄養葉の早期に萌芽・展葉する性質が進化したのではないかと考えられる。ヤシャゼンマイとゼンマイの萌芽や展葉の性質は埼玉県飯能市入間川沿いでも比較観察され、ヤシャゼンマイに栄養葉の早期展葉の性質があることが支持された。晩秋に落葉した後の根茎の観察を行なったところ、同じ葉長の栄養葉で比較すると、ヤシャゼンマイの葉柄が一番太く、次いでゼンマイの葉柄が太いことが明らかになった。レガリスゼンマイの葉柄が一番細く、その分、株ごとの葉の数が多いたことが明らかになった。葉柄の太さは攪乱環境への適応と考えられ、この形質もレガリスゼンマイからゼンマイ、ゼンマイからヤシャゼンマイというように徐々に強い攪乱を受ける環境に侵出する過程で獲得したのではないかと考えられた。このように、ヤシャゼンマイの溪流帯への適応を考える上でも、葉柄形質や根茎形質、フェノロジー形質は細葉形質と同等に重要だと考えられ、今後さらに詳細な研究と遺伝地図上へのマッピングが必要である。

最後に、本研究では、今後の種分化研究のため、ゼンマイ類における遺伝地図の精緻化と野外集団を対象としても解析可能な分子マーカーの開発を試みた。ヤシャゼンマイとゼンマイのゲノムの次世代シーケンズ解析を行ない、混合アセンブルの結果、いままでのところ、10830配列についてマーカー作成が可能であることが明らかになった。

研究の発表

口頭発表

1. 角川洋子：溪流沿い植物ヤシャゼンマイにみられる適応的形質の遺伝的背景の解析、日本植物学会第76回大会 2012 9
2. 角川洋子：溪流沿い植物ヤシャゼンマイにおける細葉形質の遺伝学的解析、日本生態学会第60回大会 2012 3
3. 水谷有希、角川洋子、邑田仁：ゼンマイ類の野外集団における遺伝子型多型の解析、日本植物分類学会第12回大会 2012 3
4. 角川（谷田辺）洋子：溪流沿い植物ヤシャゼンマイにおける適応的形質の遺伝的背景、日本植物学会第75回大会 2011 9
5. 角川（谷田辺）洋子：シダ植物を材料とした種分化研究（奨励賞受賞講演）、日本植物学会第75回大会 2011 9

6. 角川（谷田辺）洋子、堤千絵、加藤雅啓：ゼンマイ類における展葉フェノロジーと種分化、日本植物分類学会第11回大会 2012 3

誌上発表

1. Y. Yatabe-Kakugawa, C. Tsutsumi, Y. Hirayama, S. Tsuneki, N. Murakami and M. Kato: Transmission ratio distortion of molecular markers in a doubled haploid population originated from a natural hybrid between *Osmunda japonica* and *O. lancea*. *J. Plant Res.* 126, 469-482, 2013
2. 角川洋子: シダ植物における種分化, 新しい植物分類学 II 94-105, 2012
3. 角川（谷田辺）洋子: 溪流沿い植物ヤシャゼンマイにおける適応的形質の遺伝的背景, *Plant Morphology* 24, 51-55, 2012
4. C. Tsutsumi, Y. Hirayama, M. Kato, Y. Yatabe-Kakugawa and S.-Z Shang: Molecular evidence on the origin of *Osmunda Xmildei* (Osmundaceae) *Amer. Fern J.* 102, 55-68, 2012
5. C. Tsutsumi, S. Matsumoto, Y. Yatabe-Kakugawa, Y. Hirayama and M. Kato: A new allotetraploid species of *Osmunda* (Osmundaceae). *Syst. Bot.* 36, 836-844, 2011