

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 人間・環境学 )	氏名	長澤 耕樹
論文題目	Plant adaptive evolution at a limit of life: phylogenetic, population genetic, and comparative genomic analyses of an extremophyte ( <i>Carex angustisquama</i> , Cyperaceae) in highly acidic solfatara fields (火山性強酸性土壌における極限植物ヤマタヌキランの適応進化過程の解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>植物は地球上の様々な環境に適応しながら生育範囲を拡げ、時に種分化を伴った進化を起こしている。とくに厳しい生育環境の場合には自然選択が植物に強く作用するために、進化研究の好例として塩湖や極地、高山、砂漠などの環境に生育する極限植物 (extremophytes) の事例が多く扱われてきた。本論文では、従来の研究では取り上げられてこなかった特殊な生育環境である火山ガスが噴出する硫気荒原を調査地とした。硫気荒原とは火山活動が沈静化した後も噴気孔から硫化水素ガスを噴出させ、土壌に高濃度のアルミニウムイオン (<math>Al^{3+}</math>) を蓄積して、pHが2~3の強酸性を示す場所であり、日本列島に多く存在する。この硫気荒原に特異的に生育するカヤツリグサ科スゲ属のヤマタヌキランを研究対象にして研究を行った。種形成過程や集団遺伝学的特性、硫気荒原において本種が克服しているストレス源の特定とその生理的な適応機構についてゲノムレベルにまで踏み込んで、総合的に研究した結果をまとめたものである。</p> <p>第1章では、硫気荒原だけに生育するヤマタヌキランが生じた系統進化過程について述べている。その近縁種を含めた世界のスゲ属の分布域を網羅する約40種77サンプルを対象にして、MIG-seq法とddRAD-seq法によるゲノムワイドなSNP (一塩基多型) 情報を解析したデータを統合して系統解析を行った。その結果、ヤマタヌキランが属するサブクレード内では、祖先種が日本列島の日本海側における多雪環境へ進出したのちに、高山適応などの頻繁な生育地変遷 (ハビタットシフト) を経て、ヤマタヌキランが進化したことが明らかになった。このように、北陸や東北地方日本海側における日本特有の多雪環境への前適応が、ヤマタヌキランの種形成に寄与した可能性が示唆された。</p> <p>第2章では集団遺伝学的解析に基づきヤマタヌキランのより詳細な進化過程の推定を試みた結果が述べられている。第1章で明らかになった近縁種をさらに詳細に調べた結果、本種の姉妹種は高山の砂礫地に生育して硫気荒原の土壌耐性は持ち合わせていないコタヌキランであることが明らかとなった。このことは、コタヌキランとの共通祖先からヤマタヌキランが種分化した段階で、新規に硫気荒原土壌へ適応したことを示唆している。さらに、これら2種の遺伝的多様性を比較したところ、ヤマタヌキランは遺伝的多様性が顕著に低いことが明らかになった。ヤマタヌキランの分布は青森から福島までの東北地方に限られているが、集団レベルでの遺伝的多様性は北のものほど高く、最南端の福島の集団ではアレル多様度 (<math>A_R</math>) やヘテロ接合度 (<math>H_O</math>, <math>H_E</math>) がほぼゼロに減</p>			

少していた。これらの知見は、ヤマタヌキランが北から南に向けて分布域拡大を繰り返す過程で複数回の創始者効果を経験したことに起因していると考えた。

第3章ではヤマタヌキランと近縁種の間での雑種形成と種の維持機構について述べている。従来からヤマタヌキランは近縁他種と交雑して3種類の雑種を形成すること、雑種は水辺などの多湿環境に生育することが知られていた。そこでこれらの雑種と母種を対象にして、EST-SSRマーカーによる集団遺伝解析を行った。その結果、雑種はほぼ全てがF1（雑種第一代）であり、ヤマタヌキランを含めた母種への戻し交配は生じていなかった。つまり系統的に近縁であることによって雑種形成能力があるものの、F1で留まったまま母種への遺伝子流動が抑制されている事が明らかになった。以上の結果は、ヤマタヌキランが硫気荒原土壌に適応している特性を維持することにおいて重要な役割を果たしたことを示唆するものと考察された。

第4章では生理生態学的手法を用いて、本種の硫気荒原環境への適応に関与した環境ストレスを解明した結果をまとめている。前述のように硫気荒原土壌は高濃度の $Al^{3+}$ の蓄積と酸性土壌に特徴づけられ、両要素ともに植物の成長を阻害する。ヤマタヌキランと姉妹種のコタヌキランの実生苗を培養装置のなかで水耕栽培する実験を行った結果、 $Al^{3+}$ に対しては両種ともに生育阻害を受けなかった。その一方で低pHでの水耕栽培ではヤマタヌキランだけが順調に育成したが、コタヌキランはすべて枯死した。この結果から、ヤマタヌキランは姉妹種コタヌキランとの種分化以前に $Al^{3+}$ 耐性を獲得しており、種分化後に低pH耐性を新たに獲得したことが明らかとなった。

第5章では低pH耐性に関わる遺伝的基盤を探索して、ヤマタヌキランの硫気荒原環境への適応進化過程の解明を目指している。その結果、ヤマタヌキランのゲノムでは、CIIIペルオキシダーゼ遺伝子の遺伝子重複が顕著に起きており、低pH耐性獲得に重要な役割を果たしたことが示唆された。この結果を検証するために、低pHの条件下でヤマタヌキランを水耕栽培して、根におけるペルオキシダーゼ発現量を確認したところ、強く発現していることが確認された。そしてその阻害剤を添加すると発現が消失するとともに個体が枯死した。以上の結果は、ヤマタヌキランの低pH耐性が、ゲノムにおけるCIIIペルオキシダーゼ遺伝子の遺伝子重複に拠るものであることを示唆している。

最後に総括として、本論文の結論をまとめ、今後の展望について述べている。

(論文審査の結果の要旨)

地球の陸地には様々な環境があり、その中には植物の生育に極めて不適と思われるものがある。そのような極限環境に特化して生育する植物は、極限植物：**extremophytes**と呼ばれ、進化研究の対象として、あるいは農業生産の観点から、その適応機構を明らかにしていく試みが多く行われてきた。特に近年のゲノム研究技術の急速な進歩は、このようなストレス応答の機構を農作物に応用して、環境問題や食糧生産に活用する試みが多く行われている。その様な状況のなかで、硫気荒原という高濃度のアルミニウムイオン ( $Al^{3+}$ ) と強酸性土壌に特徴づけられる極限環境は研究対象とされてこなかった。日本列島には火山が多く存在しており、火山活動が沈静化した後にも硫気荒原が多く残る。本研究はこの硫気荒原に特異的に生育するヤマタヌキランを研究対象にして、系統進化、集団の遺伝学的特性、純系種を維持している機構の解明、ストレス源の特定、ストレス耐性を支える生理的な適応機構をゲノムレベルで解析したものである。

第1章は系統解析の研究である。研究を始めるにあたってヤマタヌキランの系統的位置づけは不明であり、硫気荒原におけるストレス耐性の獲得が起こった機序を考察するためには姉妹種の特特定が不可欠であった。この系統解析においては国外のスゲ属構成種も含めた広範囲のサンプルを用いた綿密な研究計画のもとで、MIG-seq法とddRAD-seq法の二つの解析結果を組み合わせた大量のSNP情報を用いた緻密なデータセットを用意することも遂行しており、その結果として信頼性の高い系統樹を得ることに成功している。そして、日本国内の日本海側多雪地帯の湿潤環境が日本のスゲ属構成種の多様性形成に関わっており、ヤマタヌキランも同様であることを明らかにした。東北から北陸地方にかけての日本海側は、世界でも有数の多雪地帯であり、このような特殊環境から近接する硫気荒原にハビタットシフトしたという帰結を明らかにしたことは何らかの前適応を祖先種が持っていたことを予想させ、その予想が正しいことを第4章で示している。このようにこの章における知見は緻密な系統解析のデザインに基づく精巧な系統推定に成功しており、かつ前適応に関連した生育地シフトにまで考察が展開された、良質な研究成果として評価できる。

第2章ではヤマタヌキランの全ての自生地を網羅した集団遺伝解析の結果を示している。このなかでは、分布の北限である下北半島の恐山から分布南限の会津磐梯山までの11集団を研究対象として、北から南に向けて遺伝的多様性が徐々に低下していくことが有意に示されている。そして最南端の集団では遺伝的多様性がゼロにまで低下してクローン集団になっていることを明らかにした。これは集団遺伝学における「距離による隔離 Isolation-by-distance」がモデル通りに示された結果であり、ヤマタヌキランが集団内の一部の多様性を持ち出しながら分布域を拡大した

「創始者効果」が作用したことを証明することに成功している。

また第3章では、従来から知られていたヤマタヌキランが片親になっている近縁種との雑種を分析し、雑種の多くが第一代（F1）に留まっていることを明らかにした。すなわち、雑種は形成されてもその世代だけで留まっており、戻し交配などの遺伝子流動が起きていないために、ヤマタヌキランのゲノムが維持されており、このことが硫気荒原に生存し続ける背景になっていることを明らかにしている。このように、雑種崩壊がヤマタヌキランを独立種として維持している機構を明らかにした意義は大きい。

そしてヤマタヌキランが硫気荒原という極限環境に生き続ける機構を第4章と第5章で解明することに成功している。前述のように、硫気荒原における環境ストレスは高濃度の $Al^{3+}$ と強酸性土壌であると推定された。第4章では姉妹種のコタヌキランも獲得している $Al^{3+}$ 耐性が、ヤマタヌキランが硫気荒原に進出するうえで前適応として機能していると推定された。また、強酸性土壌への適応は、ヤマタヌキランにおけるCIIIペルオキシダーゼ遺伝子の遺伝子重複に起因することが明らかにされた。ペルオキシダーゼは植物体内の還元作用に使われる重要な酵素であり、これが根において強く発現することによって強酸性土壌に対する適応に貢献したことが明らかにされた。

このように本論文は高度なレベルの研究を多面的に行い、特殊環境に生育するヤマタヌキランの系統進化や分布域形成過程、種の維持機構、環境適応に関わる因子の特定とゲノムレベルでの説明に成功したものである。これらの成果の多くは、国際誌に掲載されている。本学位論文は、地球規模での多様な環境条件とそこに生存基盤を得ている生物の関わりを探究する相関環境学専攻 自然環境動態論講座にふさわしい内容を備えたものと言える。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年1月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 令和 年 月 日以降