

【話 題】

第4回森林遺伝学若手勉強会の報告

玉木 一郎<sup>\*1</sup>・木村 恵<sup>2</sup>・加藤 珠理<sup>3</sup>・阪口 翔太<sup>4</sup>・渡辺 洋一<sup>5</sup>・小笠原 玄記<sup>6</sup>・九石 太樹<sup>6</sup>・  
岩崎 貴也<sup>4</sup>・内山 憲太郎<sup>2</sup>・鳥丸 猛<sup>7</sup>・近藤 俊明<sup>8</sup>・上野 真義<sup>2</sup>・村上 聡<sup>9</sup>

はじめに

2013年9月7-8日に千葉県の東京大学検見川セミナーハウスにおいて合宿形式で実施した森林遺伝学若手勉強会について報告する。森林遺伝学関連分野の若手で企画したこのような勉強会は、これまでに2008年10月(津田ら2009)と2009年9月(津田ら2010)、2010年11月の計3回開催されており、今回で4回目の開催となる。2年間のブランクを挟んでの久々の開催となったが、その発端は2013年3月の森林学会での「森の分子生態学」セッションの打ち上げの懇親会に遡る。ちょうどその場に居合わせていた本勉強会のスタッフである玉木と木村、阪口、渡辺、小笠原、九石の間で、最近の森林学会の当該分野では若手(特に学生)が発表する姿が少ないということ、また、ここ数年の実験機器や解析手法の発展は、これまでのなかでも特に目覚ましく、フォローするのが難しいということが話題に上った。さらにここ2年間、若手の勉強会が開催されていないこともあり、これらの問題を解決し、分野の底上げを計るためにも、是非とも勉強会を開催すべきだということ意見が一致した。その場で勉強会の内容について概要を決定し、それぞれの所属にもどった後はメールでの議論を重ねて調整を行った末、本勉強会の開催に至った(もう一人のメンバーの加藤はメールでの議論から加わ

った)。

今回の勉強会では7題の講演に加えて、初の試みとして



写真-1 勉強会の様子



写真-2 勉強会の参加者

\* E-mail: garageit@gmail.com

<sup>1</sup> たまき いろろう 岐阜県立森林文化アカデミー

<sup>2</sup> きむら めぐみ、うちやま けんたろう、うえの さねよし 森林総合研究所

<sup>3</sup> かとう しゅり 首都大学東京都市環境科学研究科

<sup>4</sup> さかぐち しょうた、いわさき たかや 東京大学大学院総合文化研究科

<sup>5</sup> わたなべ よういち 名古屋大学大学院生命農学研究科

<sup>6</sup> おがさわら げんき、くいし たいき 東北大学大学院農学研究科

<sup>7</sup> とりまる たけし 弘前大学農学生命科学部

<sup>8</sup> こんどう としあき 広島大学大学院国際協力研究科

<sup>9</sup> むらかみ さとし ライフテクノロジーズジャパン

データ解析演習を取り入れた(勉強会終了後、希望者のみに実施)。参加者は18大学と2研究機関、1教育機関から、学部生や大学院生が22名に加え、助教や研究員、ポストドクターなどの若手研究者が23名の合計45名であった。7題の講演に加え、自己紹介を兼ねた参加者のポスターセッションでは21題の発表があり、活気あふれる会となった(写真-1、2)。

### 発表内容

今回の勉強会では、次世代シーケンサーやアソシエーション解析、ジーンフローモデリング、系統地理、コアレセント解析、種分化などの現在、当該分野でホットなキーワードに関する研究を行っている若手研究者に講演を依頼した。それぞれの発表時間を50分程度と長めにとり、各自の題材や手法について、通常の学会での発表よりも丁寧に語ってもらうことにした。さらに、次世代シーケンサー Ion Torrent™ を取り扱っているライフテクノロジーズジャパンに Ion Torrent™ の原理と利用について解説してもらうことにした(図-1)。また、希望者に対し、上野真義氏による次世代シーケンサーのデータ解析演習をおこなった。7題の講演と演習の内容は以下のとおりである。

#### 方角を考慮に入れた採種園の花粉流動

鳥丸 猛

樹木集団における花粉親としての繁殖貢献度は母樹からの距離と負の相関関係にあることがこれまで知られているが、一方、繁殖木の雄性繁殖量(花粉生産量)が繁殖貢献度により影響を及ぼす要因として報告されるケースもある。本研究はヨーロッパアカマツの採種園の交配パターンの実態(Torimaru et al. 2009; Torimaru et al. 2012; Torimaru et al. 2013)を紹介するとともに仮想集団を用いたシミュレーションによって、繁殖個体の花粉生産量、集団内の空間構造、花粉散布パターンが種子の遺伝的多様性に及ぼす影響を検討した。その結果、繁殖個体の花粉生産量の空間分布がランダムである場合、花粉生産量の個体間のバラツキが大きくなるほど種子の遺伝的多様性は低下する傾向が認められた。一方、異なる花粉生産量を示す個体が集団中で偏って分布している場合、等方向性花粉散布パターンを示す集団では種子の遺伝的多様性は個体の空間構造の影響を受けないが、非等方向性花粉散布パター

ンを示す集団では異なる花粉生産量を示す個体の空間構造の偏りの程度によって種子の遺伝的多様性はばらつく傾向が認められた。

#### 半導体次世代シーケンサー Ion Torrent™ の概要とワークフロー

村上 聡

Ion Torrent™ (Ion PGM™, Ion Proton™) は、半導体チップ型のマイクロチップを利用しDNA伸長反応時の水素イオンを検出する、高速かつ高精度のベンチトップ型次世代シーケンサーである(図-1)。塩基置換エラーの少ないケミストリを採用し、高精度な変異検出能力と高品質データを算出する。半導体マイクロチップは1ラン毎に交換するディスポーザブルタイプであり、目的のアプリケーションに応じてスループットを容易に選択することができる拡張性の高い以下のような特徴を備えたシステムである。発表では本シーケンサーの原理、実施可能なアプリケーションを実施例等、交えて紹介した。

#### 次世代シーケンサーのデータを用いた *Quercus* の遺伝子探索

上野 真義

第2世代と言われる次世代シーケンサーは比較的短い配列(数十~数百bp)を多量に(Mb~Gb単位で)出力する。そのために塩基配列の決定だけでなくSNPのような変異分析の方法としても、さらには各遺伝子に由来するリードの数を遺伝子の発現量と見なすことで、発現解析の方法としても利用できる。本発表ではヨーロッパナラ(*Q. robur* および *Q. petraea*)を対象として様々な組織や時期に由来するESTを収集して、*Quercus* 属の遺伝子カタログ(Ueno et al. 2010)を作成し、遺伝子の探索を行った事例を紹介する。特に発現量の変動する遺伝子の探索では、秋(自発休眠期)と冬(他発休眠期)に採取した冬芽を対象とし、これらのサンプル間で発現量の変動をリード本数から予測した。約85%(11個)の遺伝子ではリード本数とqPCRの結果が一致し、リード本数のデータで発現解析ができる事が確かめられた(Ueno et al. 2013)。次世代シーケンサーを利用することで多くの遺伝子を対象として、発現量の時系列データを収集することが可能になってきていると考えられる。

## 林木のゲノム育種に向けた取り組み

内山 憲太郎

DNA チップや次世代シーケンサーなどの技術の汎用化は、ゲノム情報の乏しい生物種の遺伝解析に新たな道を開いた。大量のDNA マーカーを安価に短期間に作成できる技術は、高密度連鎖地図の作成 (Amores et al. 2011 ; Moriguchi et al. 2012)、ゲノムワイドアソシエーション研究 (Parchman et al. 2012)、集団遺伝学的解析 (Hohenlohe et al. 2010) などに急速に応用され始めている。林木の育種においても、従来の QTL 解析や候補遺伝子を対象にしたアソシエーション解析では捉えきれなかった、成長や材質といった多因子支配の量的形質の選抜への利用が始まっている。日本の主要な林業樹種であるスギにおいても、高密度のDNA マーカーを用いて表現型を支配する遺伝子を検出するゲノムワイドアソシエーション解析 (Uchiyama et al. 2013) ならびに遺伝子型情報から表現型を予測し選抜を行うゲノミックセレクションの適用が進められている。本発表ではそれらの最新の研究成果を交えて、林木育種の現在の動向と今後の方向性について紹介した。

## GIS を用いた歴史生物地理学的アプローチで復元する植物群集の分布変遷

岩崎 貴也

現在、日本の温帯林群集は北海道から九州までの広い範囲に分布する。しかし、氷期間氷期の気候変動が何度も訪れた第四紀には、この生物群集も分布を大きく変化させたと考えられている。そのような生物群集レベルでの分布変遷は、この群集に生育する様々な生物種内の地理的分化を生み出し、適応進化や種分化など生物多様性創出のきっかけとなり得る、従って、その解明は幅広い分類群にとって重要な意味を持つ。本研究では、この生物群集レベルでの分布変遷を解明することを目的とし、地理情報システム (GIS) 上で、温帯林樹種 8 種の葉緑体 DNA でみられた遺伝構造についての比較解析や、同じ 8 種についての生態ニッチモデリングによる生育適地予測とそれらの比較などを行い、この群集構成種における共通パターンを抽出した。発表ではこれらの手法を紹介し、得られた共通パターンに基づいて復元した日本の温帯林群集についての分布変遷シナリオについて解説した。最後に、今回の手法をベースとして次世代シーケンサーを用いて進めている研究の一部についても紹介し、議論を行った。

## コアレセント理論に基づくオーストラリア大陸中央部に局所分布するヤシ科植物 *Livistona mariae* の起源の解明

近藤 俊明

生物種や集団内に蓄積された遺伝的多型情報をもとに、現在から過去に遡って遺伝子の系譜を辿るコアレセント理論は、種や集団がいつ分岐したのか、また分岐に伴い個体群サイズがどのように変化してきたのか等、生物種がたどってきた歴史の理解に格段の進歩をもたらしている。本講演では、オーストラリア大陸中央部のオアシスに局所的かつ隔離的に分布し、これまでゴンドワナ大陸に広がっていた熱帯雨林起源の遺存種であると考えられてきたヤシ科植物 *Livistona mariae* を対象に、コアレセント理論に基づく分岐年代の推定からその起源の解明を行った研究例 (Kondo et al. 2012) を紹介し、フリーソフトとして入手可能なコアレセント理論ベースのプログラム Isolation with Migration (Hey and Nielsen 2004) 等を用いたデータの解析方法について解説を行った。

## ベイズ統計やMCMC、ABCの解説とそれらを用いた最近の関連分野の研究紹介

玉木 一郎

近年のコンピュータの進歩に伴い、ベイズ法に基づく解析が森林遺伝の研究分野においても普通に行われるようになってきている。ベイズ法に基づく解析は、これまでの最尤法では困難であった複雑なモデルのパラメータ推定や仮説の比較に用いられることが多く、集団構造や系統樹、血縁関係、遺伝子流動モデル、過去の集団動態の推定などに適用されている。今後、面白い研究を行うためには、これらのベイズ法に基づく解析を積極的に各自の研究に取り入れていく必要がある。これらの解析では個別の解析プログラムが存在することが多いが、パラメータ推定にはデータにあわせた個別の調整が必要とされる。従って、適切な調整を行うためには、ある程度ベイズ法やパラメータ推定の方法を理解しておく必要がある。本発表では、ベイズ統計の考え方やMCMC、ABCによるパラメータ推定の手順について簡単な例題を用いて解説した。そして、これらの解析を用いた関連分野の最近の研究を紹介した。

## 【演習】マイクロサテライトマーカー開発の情報処理

上野 真義

新型シーケンサーの出現により遺伝マーカーの開発は

分子生物学を利用した実験技術から計算機科学を利用した情報技術に焦点が移っている。このようなデータ処理需要の増大に対応して様々なソフトウェアやプログラムが発表されてきている。データ処理に際しては、数あるプログラムの中から研究目的に合わせて取捨選択し、活用することが重要となる。本発表ではマイクロサテライト (SSR) マーカー開発 (Ueno et al. 2012) を例にして、第二世代のシーケンサーから得られたデータを処理する過程を具体的に紹介した。膨大な配列データをまとめる (アセンブル) 過程では多くの計算資源 (メモリ) が必要であり、SSR を探索し PCR プライマーを設計する過程では複数のプログラムを組み合わせる必要がある。そこで前者には DDBJ パイプラインを、後者には BioLinux を使用する方法を提案した。いずれもインターネットに接続すれば利用できるため、携帯端末からでも SSR マーカー開発の情報処理は可能になってきていると考えられる。

### おわりに

今回の勉強会では「はじめに」に挙げたホットなキーワードの下で、先端の実験・解析手法を用いた研究を演者に紹介してもらった。講演者たちが試行錯誤を重ねながら先端の手法を取り入れて研究を進めていく様子は、話を聞く者に、自分も是非チャレンジしてみたいという思いを強く抱かせるものであったと思う。総合討論では、各手法の短所についての質問と説明がなされ、より実践的な議論となった。今回の勉強会が、学生や若手研究者に新たな実験・解析手法に取り組む第一歩を踏み出すきっかけになれば幸いである。さらに総合討論の場では「先端の実験・解析手法に挑もうとする今の時代だからこそ、元となる基本のデータがきちんと取得できているか注意すべきである」という意見がでた。いくら先端の実験や解析手法を用いようとも、元となる DNA サンプルの情報や遺伝子型のタイピングがしっかりしていなければ元も子もない。まずは足下をきっちりと固めた上で、望むようにしてもらいたいと思う。合宿形式で行う本勉強会は参加者同士の交流を促進する良い機会であると思う。ここで得たネットワークを各自の研究を深めるために活かしてもらいたい。

今回から取り入れた演習には参加者の約半数が参加した。次世代シーケンサーの普及とともに膨大な配列データを扱う機会は今後増加すると考えられるが、一から Unix

環境を構築して端末から配列データを扱う作業は、初心者には少し敷居が高い。今回の演習は Unix 環境に触れる良いきっかけになったと思う。後で寄せられた演習への要望に、コアレント解析や生態ニッチモデリングを扱ってほしいという意見があった。今後、取り入れていきたい。

また、発表資料の一部は森林遺伝若手の会のウェブサイト (<https://researchmap.jp/community/ForeGene2013>) からダウンロードすることができる。

最後に、質疑応答やポスター発表による話題提供を通して本勉強会を盛り上げてくれた参加者各位と、本勉強会の開催費の一部を援助していただいたライフテクノロジーズジャパン株式会社に心より感謝を申し上げる。

### 引用文献

- Amores A, Catchen J, Ferrara A, Fontenot Q, Postlethwait JH (2011) Genome evolution and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. *Genetics* 188: 799–808
- Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates, and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167: 747–760
- Hohenlohe PA, Bassham S, Etter PD, Stiffler N, Johnson EA, Cresko WA (2010) Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS Genetics* 6: e1000862
- Kondo T, Crisp MD, Linde C, Bowman DMJS, Kawamura K, Kaneko S, Isagi Y (2012) Not an ancient relic: the endemic *Livistona* palms of arid central Australia could have been introduced by humans. *Proceedings of the Royal Society B* 279: 2652–2661
- Parchman TL, Gompert Z, Mudge J, Schilkey FD, Benkman CW, Buerkle A (2012) Genome-wide association genetics of an adaptive trait in lodgepole pine. *Molecular Ecology* 21: 2991–3005
- Moriguchi Y, Ujino-Ihara T, Uchiyama K, Futamura N, Saito M, Ueno S, Matsumoto A, Tani N, Taira H, Shinohara K, Tsumura Y (2012) The construction of a high-density linkage map for identifying SNP markers that are tightly linked to a nuclear-recessive major gene for male sterility in *Cryptomeria*

*japonica* D. Don. BMC Genomics 13: 95

Torimaru T, Wang XR, Fries A, Andersson B, Lindgren D (2009) Evaluation of pollen contamination in an advanced Scots pine seed orchard in central Sweden. *Silvae Genetica* 58: 262–269

Torimaru T, Wennstrom U, Lindgren D, Wang X-R (2012) Effects of male fecundity, interindividual distance and anisotropic pollen dispersal on mating success in a Scots pine (*Pinus sylvestris*) seed orchard. *Heredity* 108: 312–321

Torimaru T, Wennstrom U, Andersson B, Almquist C, Wang XR (2013) Reduction of pollen contamination in Scots pine seed orchard crop by tent isolation. *Scandinavian Journal of Forest Research* 28: 715–723

津田吉晃・木村恵・井上みずき・内山憲太郎・三嶋賢太郎・富田基史・吉田貴徳・兼子伸吾・三村真紀子・亀山慶晃 (2009) 第一回森林遺伝学関連若手勉強会の報告. 林木の育種 231: 26–28

津田吉晃・三村真紀子・内山憲太郎・三嶋賢太郎・井上みずき・鈴木節子・木村恵・山道真人・池田啓・中村琢磨・中尾勝洋・玉木一郎・高山浩司・伊原徳子 (2010) 第二回森林遺伝学関連若手勉強会の報告. 林木の育種 234: 45–47

Uchiyama K, Iwata H, Moriguchi Y, Ujino-Ihara T, Ueno S, Taguchi Y, Tsubomura M, Mishima K, Iki T, Watanabe A, Futamura N, Shinohara K and Tsumura Y (2013) Demonstration of genome-wide association studies for identifying markers for wood property and male strobili traits in *Cryptomeria japonica*. *PLoS ONE* 8: e79866

Ueno S, Klopp C, Leplé JC, Derory J, Noirot C, Prince E, Léger V, Kremer A, Plomion C, Le Provost G (2013) Transcriptional profiling of bud dormancy induction and release in oak by next-generation sequencing. *BMC Genomics* 14: 236

Ueno S, Le Provost G, Leger V, Klopp C, Noirot C, Frigerio JM, Salin F, Salse J, Abrouk M, Murat F et al. (2010) Bioinformatic analysis of ESTs collected by Sanger and pyrosequencing methods for a keystone forest tree species: oak. *BMC Genomics* 11: 650

Ueno S, Moriguchi Y, Uchiyama K, Ujino-Ihara T, Futamura N, Sakurai T, Shinohara K, Tsumura Y (2012) A second generation framework for the analysis of microsatellites in expressed sequence tags and the development of EST-SSR markers for a conifer, *Cryptomeria japonica*. *BMC Genomics* 13: 136



PGM™ for genes. Proton™ for genomes.

## 新発見を、つぎつぎと。

Ion Torrent™ は、半導体チップ上でDNA 配列をデジタル情報に変換する高速ベンチトップシーケンサ。コンパクトながらパワフルな Ion Proton™ シーケンサが、わずか1,000 ドルのヒトゲノム解読を現実のものにしています。ライフテクノロジーズは、次世代シーケンスの裾野を拡大し、ゲノム情報のさらなる理解と新しい応用への扉を開きます。

詳細はこちら  
[www.lifetechnologies.com/ionsequencing](http://www.lifetechnologies.com/ionsequencing)

公式 Facebook ページ & Twitter もチェック!

 [facebook.com/LifeTechnologiesJapan](https://www.facebook.com/LifeTechnologiesJapan)
 [@LifetechJPN](https://twitter.com/LifetechJPN)

診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。販売条件はこちらをご覧ください。www.lifetechnologies.com/TC  
 ©2013 Life Technologies Japan Ltd., All rights reserved. Printed in Japan.

**ライフテクノロジーズジャパン株式会社**

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8 TEL.03 (6832) 9300 FAX.03 (6832) 9580  
[www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)





図-1 ライフテクノロジーズジャパンの次世代シーケンサー Ion Torrent™ (Ion PGM™ と Ion Proton™)