

平成21年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18770070

研究課題名（和文）マムシグサにおける父性繁殖成功度の集団間比較に関する研究

研究課題名（英文）Spatial genetic structure and male fitness variation among populations of *Arisaema serratum* (Araceae)

研究代表者

西沢 徹 (NISHIZAWA TORU)

独立行政法人国立環境研究所・生物圏環境研究領域・NIES ポスドクフェロー

研究者番号：80414382

研究成果の概要：性転換を行う植物として知られているサトイモ科のマムシグサ (*Arisaema serratum*) を対象に、性転換サイズを長野県安曇野市、石川県金沢市、茨城県つくば市の3集団で比較した。その結果、性転換が起こる臨界サイズには集団間で変異が認められ、長野集団が最も小さく、石川集団が最も大きかった。また、種子の父性解析によって繁殖成功度を推定するためのマイクロサテライトマーカーを新たに開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	270,000	3,970,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学

キーワード：マムシグサ、父性繁殖成功度、被子植物の性転換、植物集団遺伝学、
マイクロサテライトマーカー、送粉様式、花粉流動、テンナンショウ属

1. 研究開始当初の背景

(1) サイズ依存性の性型と進化モデル

マムシグサ (*Arisaema serratum*) はサトイモ科テンナンショウ属の多年生草本で、性型が個体のサイズ (= 球茎の大きさ) に依存して変化する「性転換」の現象が古くから知られてきた。個体の性型が生活史の過程で変化する現象は、さまざまな系統群の生物にみられ、その進化的安定性については理論的な側面から多くの議論が行われている (e.g. Charnov, 1982)。これらの理論的な研究では、個体のサイズと雌雄の繁殖成功度 (生涯繁殖

成功度: fitness) との関係から性転換の進化的安定条件を予想しており、その一つにサイズ有利性仮説 (Size-advantage hypothesis; Ghiselin, 1969) がある。一般に、サイズと繁殖能力の関係には雌雄間で差がないが、「雄と雌の繁殖上の有利さが個体のサイズによって異なる場合に性転換が進化する」というのがサイズ有利性仮説の骨子である。したがって、この理論モデルの検証を行うためには、雌雄の適応度と個体のサイズとの関係を明らかにする必要がある。しかし種子の花粉親を精度良く特定する技術は近年に

なって確立してきた段階であり、植物で雄の繁殖成功率を実測した研究例は少なく、このモデルの検証的研究には至っていない。

長野県南安曇郡堀金村（現安曇野市堀金）のmamシグサ集団に永久方形区を設置し、2001年度に生産された種子の父性解析をマイクロサテライトマーカー（以後 SSR と略記）で行った。その結果、雌の繁殖成功がサイズとともに増加するのに対して、雄の繁殖成功とサイズには相関が認められなかった。さらにサイズ有利性仮説では、各集団の生態的な特性の違いなどによって、集団間で性転換サイズが異なることも予想されている。そこで、石川県金沢市の集団で個体追跡を行って性転換サイズを測定したところ、長野県の集団よりも大きなサイズで性転換することが判明した。これらの結果は、いずれもサイズ有利性仮説の予想を支持するものであり、mamシグサの性転換がサイズ有利性仮説によって説明できることを示唆している（Nishizawa et al., 2005）。

テンナンショウ属植物では性転換の現象が20世紀初頭から知られ、性転換が個体のサイズと深く関係していることが明らかにされている。しかし、種子生産量や訪花昆虫の頻度から繁殖成功率を推定した研究例は僅かにあるが（e.g. Policansky, 1981; Kinoshita and Harada, 1990）、繁殖成功率を直接測定してサイズとの関係を明らかにし、性転換の進化モデルと関連づけて議論した論文は申請者が行った一集団での解析結果が最初である（Nishizawa et al., 2005）。今後は、複数年及び複数の集団でも解析を行い、長野県の集団での解析結果と比較検討する事が必要となっている。

(2) 当該研究の意義と位置付け

一般に、寿命が長く多回繁殖を行う生物の場合には、個体の適応度すなわち生涯繁殖成功率を実際に測定することは難しい。しかし、本研究の材料であるmamシグサでは個体群動態に関する研究が進んでおり、長野県堀金村の集団ではすでに動態を記述する推移行列が作られている。さらにこの推移行列に基づいて、年ごとの繁殖成功率（相対適応度）から個体の適応度を計算する方法が定式化されている（Kinoshita, 1986; 1987）。mamシグサでは生活史に関する様々なデータが蓄積されており、SSRによる父性解析によって雄個体の繁殖成功率が実測できれば、推移行列から個体の適応度を正確に予測できる点に特徴がある。

長野県堀金村の集団と同様に、石川県金沢市の集団でも個体追跡を行い、生活史に関する研究に着手している。今後数年間に渡って継続調査を行えば、金沢集団でも推移行列が作成できる予定である。本研究で目的とする、

実測した相対適応度の情報が得られれば、長野県集団と石川県金沢市の二つの集団での理論的な性転換サイズを予測できる。この理論値と野外で実測された性転換サイズを集団間で比較し、サイズ有利性仮説の検証を目指している。本研究の進展は、性転換の進化を説明する理論モデルの検証的研究へと発展が見込まれる。

2. 研究の目的

本研究はサイズ有利性仮説を検証するために必要な、サイズと適応度に関するデータを、複数集団で収集するための研究である。

長野県の集団の解析から得られた結果は、単年度分の解析結果に基づくものであることから、年次変動などを考慮して、さらに2年分の種子の父性解析を行うべきであると考えている。さらに、この長野県の集団の比較対象として、石川県金沢市、および茨城県つくば市の2集団でも、サイズと繁殖成功の関係を解析し、サイズ有利性仮説の検証に必要な基礎データを収集したいと考えている。

本研究は、テンナンショウ属植物における性転換の進化機構に関する研究の一環として、花粉親としての繁殖成功率が個体のサイズに依存して変化するかどうかを明らかにするために、3集団においてmamシグサの繁殖動態を比較検討することを目的に、継続的な野外調査と、SSRによる種子の父性解析によって繁殖成功率を実測するための解析系の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 野外調査

①長野県安曇野市堀金集団の解析

既に1980年代から設置してある永久方形区（10m×11m）内に生育する繁殖個体を対象に、各個体の性型、個体の空間分布、個体サイズ（偽茎直径）を5月の開花時期に継続調査した。偽茎直径は地表面での直径をノギスで測定した。その後、果実が成熟した10月に成熟果実数を計数した。

②石川県金沢市集団の解析

既に2000年から設置してある永久方形区（10m×16m）内に生育する繁殖個体を対象に、安曇野市堀金集団と同様の方法で、各個体の性型、個体の空間分布、個体サイズ（偽茎直径）を5月の開花時期に継続調査した。その後、果実が成熟した10月に成熟果実数を計数した。

③茨城県筑波山集団の解析

本研究の開始に当たって、筑波山頂御幸ヶ原付近の集団に新たに永久方形区を設置し、50個体の繁殖個体を識別し、各個体の性型、個体の空間分布、個体サイズ（偽茎直径）を

調査した。筑波山の野外調査は6月中に実施した。

(2) 繁殖個体および種子からの DNA 精製

①繁殖個体からの DNA 精製

新たに調査方形区を設置した筑波山集団では、方形区内に生育する繁殖個体から約30mm²の葉片を採取した。採取した葉片は封筒に入れて実験室に持ち帰り、シリカゲルで乾燥した後、常温で保存した。葉片からのDNA精製は、QIAGEN社製DNeasy Plant Kitを用いて次の方法で行った。

葉片を液体窒素を入れた乳鉢で粉砕した後、葉粉末を1.5mL チューブに移し、AP1 Buffer400μLとRNase A solution: 4μLを添加してから vortex でよく攪拌した。次に、65°Cで15分インキュベートしてから、AP2 Buffer130μLを添加し、混ぜてから氷中に5分間静置した後に、15,000rpmで5分間遠心した。遠心して得られた上清をQIAshredder spin columnに移し、15,000rpmで2分間遠心した。抽出液を1.5mL チューブに移し、1.5倍量のAP3/E Bufferを添加した。

静かに攪拌した後、沈殿物を含んだ650μL分をDNeasy spin column columnに移し、8,000rpmで1分間遠心した。濾液を捨てた後、残りの液も同様にカラムを通した。このDNeasy spin columnを新しい2mL チューブ(添付品)にセットし、AW Buffer500μLをカラムに添加してから8,000rpmで1分間遠心した。濾液を捨てた後、再びAW Buffer500μLをカラムに添加し、15,000rpmで2分間遠心した。このDNeasy spin columnを新しい1.5mL チューブにセットしてから、65°Cに加熱したAE Buffer100μLをカラム内の膜に直接かけ、5分間室温に放置してから8,000rpmで1分間遠心した。再び、このDNeasy spin columnに65°Cに加熱したAE Buffer100μLをカラム内の膜に直接かけ、5分間室温に放置してから8,000rpmで1分間遠心した。この1.5mL チューブに回収された溶出液を精製ゲノム DNA 試料とし、希釈せずに直接PCRのTemplateに使用した。試料は-20°Cで保管した。

②種子からの DNA 精製

秋季の調査で採取した果実は、個体ごとに封筒に入れ、果皮および果肉が完全に乾燥するまで風乾させた。乾燥させた果実はDNA抽出を行うまでデシケーター中で常温で保管した。

種子からのDNA抽出を行う段階になって、各果実の肉穂花序上での空間分布位置を記録した。記録方法はNishizawa et al. 2005に従った。位置を記録した果実から種子を取り出し、48穴のコレクションプレートのホールに種子を一粒ずつ入れた。この際に

ニッパーで種子に切れ込みを入れた。種子を入れたホールに滅菌水を適量加え、4°Cで一晩放置し、種子に吸水させた。

吸水させた種子からピンセットで胚を取り出し、DNA抽出用の試料とした。予め1.5mL チューブにAP1 Buffer400μLとRNase A solution: 4μLを加えて65°Cに加熱しておき、取り出した胚をこのAP1 Buffer中に入れた後、小型チューブ用のペレットミキサーで胚を破碎し、そのまま65°Cで15分間インキュベートした。以降の操作は葉片からのDNA精製法と同様におこなった。

(3) マイクロサテライトマーカーの作成

既に6遺伝子座においてマムシグサのマイクロサテライトマーカーを開発しているが、さらに父性解析の精度を上げるために、新たな遺伝子座でマーカーの開発を進めている。濃縮法によりマムシグサのゲノム中からマイクロサテライト領域を含むDNA断片を濃縮してゲノミックライブラリーを構築し、クローン化したDNA断片の塩基配列決定を行った。決定した塩基配列に基づき、マムシグサのマイクロサテライト領域を特異的に増幅するPCRプライマーの設計を行った。

設計したプライマーの実効性を確認するため、長野県安曇野市集団および石川県金沢市集団から採取した個体のDNAを鋳型としてPCRを行い、予想される分子量サイズに増幅が認められるかを確認した。PCR反応は15μLの反応系で行い、反応液の組成は20ng テンプレートDNA, 0.2μMの各プライマー, 0.2mMのdNTPs, 1×PCR buffer, 0.625UのExTaq DNA polymerase (Takara)である。増幅反応はThermal Cycler GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems)を使用し、94°Cで3分間熱変性させた後、94°C1分、(T_m+4)°C1分、72°C1分のサイクルを3回、次に94°C1分、(T_m+2)°C1分、72°C1分のサイクルを3回、そして94°C45秒、T_m°C45秒、72°C45秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72°Cで1分間伸長反応させるStep Down PCRで行った。

4. 研究成果

(1) 各集団の平均個体サイズと性型の関係

2006年度から2008年度までの3年間にわたって追跡した、性型と平均個体サイズを表1に示す。3集団共に従来までの報告(e.g., Kinoshita, 1986, 1987; Nishizawa, 2005)と同様に、雄の平均サイズよりも雌の平均サイズの方が大きかった。雄の平均個体サイズは長野県安曇野市の集団が最も小さく、茨城県筑波山頂の集団が最も大きかった。一方、雌の平均個体サイズは石川県金沢市の集団が最も小さく、茨城県筑波山頂の集団が最も大きかった。また、長野県安曇野市の集団と石

川県金沢市の集団では、性比が大きく雄に偏っていたが、茨城県筑波山頂の集団ではほぼ 1:1 であった。

表 1. 2006 年度から 2008 年度までの各集団における性型と平均サイズ、平均値と標準偏差を示し、括弧内に個体数を示した。

長野県安曇野市堀金集団		
年度	雄	雌
2006	5.1±1.8 (33)	17.6±5.1 (4)
2007	5.7±2.2 (32)	13.8±3.4 (3)
2008	6.3±2.3 (25)	18.0±3.0 (2)
3年間	5.6±2.3 (90)	16.4±4.5 (9)

石川県金沢市集団		
年度	雄	雌
2006	7.5±2.4 (33)	19.5 (1)
2007	7.9±2.8 (30)	16.5±3.6 (6)
2008	9.4±3.2 (21)	11.6 (1)
3年間	8.1±2.9 (84)	16.2±3.7 (8)

茨城県筑波山頂集団		
年度	雄	雌
2006	12.3±6.2 (27)	23.4±7.6 (23)
2007	17.8±7.4 (8)	24.9±9.0 (21)
2008	13.1±6.4 (21)	24.1±10.3 (22)
3年間	13.4±6.7 (56)	24.11±9.1 (66)

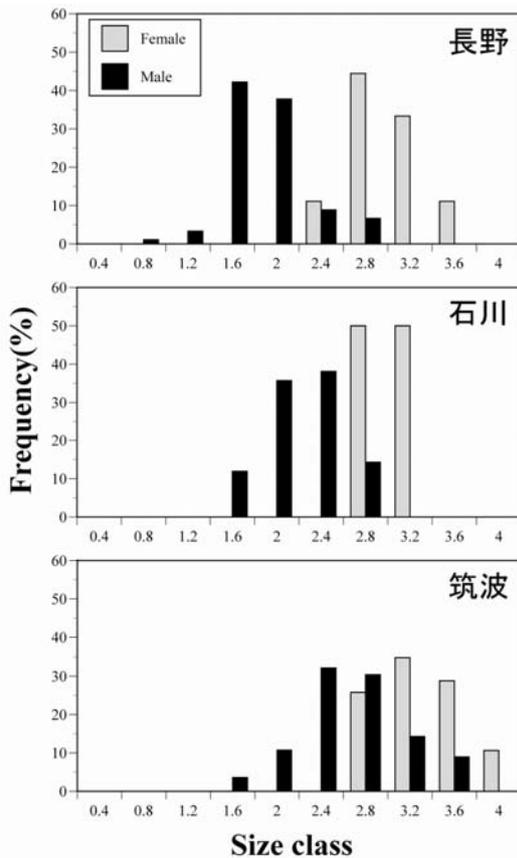


図 1. 2006 年度から 2008 年度までの各集団における雌雄のサイズクラス分布。個体のサイズクラス分けは Kinoshita (1987) による。地表面における偽茎直径に基づいて 10 段階のサイズクラスに分け、偽茎直径の値を自然対数に変換し、各クラスを 0.4 の増分で区切った。

(2) 雌雄のサイズクラス分布

2006 年度から 2008 年度までの 3 年間にわたって追跡した、各集団における雌雄のサイズクラス分布を図 1 に示す。個体のサイズクラス分けは Kinoshita (1987) に従った。それぞれの性型がもっとも多く存在するサイズクラスは、長野県安曇野市の集団では、雄はクラス 1.6 で、雌はクラス 2.8 で、雌雄両方の性型が存在するのはクラス 2.4 と 2.8 であった。石川県金沢市の集団では、雄はクラス 2.4 で、雌はクラス 2.4 と 2.8 に 50% ずつ存在していた。雌雄両方の性型が存在するのはクラス 2.8 であった。茨城県筑波山頂の集団では、雄はクラス 2.4 で、雌はクラス 3.2 で、雌雄両方の性型はクラス 2.8, 3.2 および 3.6 に存在していた。

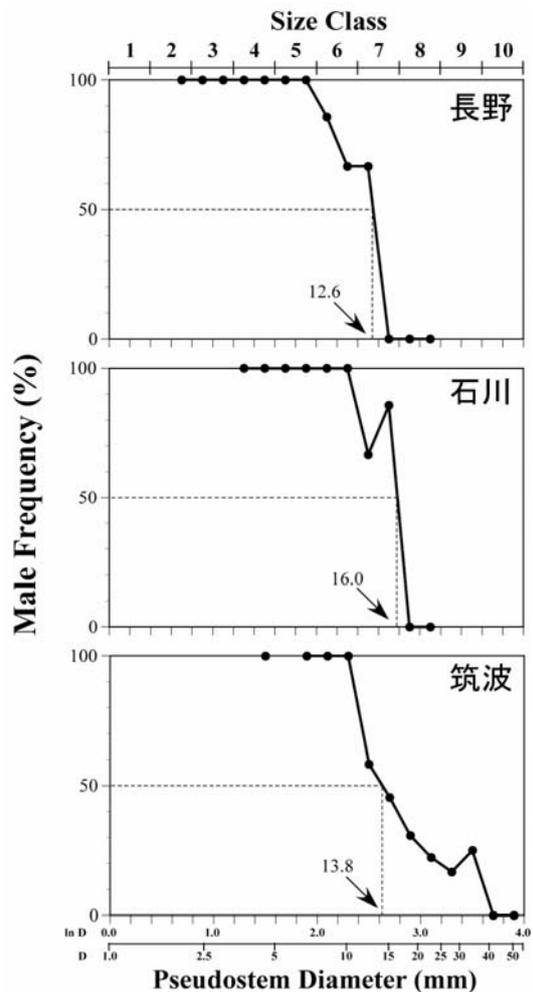


図 2. 各サイズクラスにおける雄の頻度。2006 年度から 2008 年度までの 3 年分の追跡結果をまとめて示す。性転換が起こる平均サイズと考えられる、雄の頻度が 50% になる偽茎直径を矢印で示してある。個体のサイズクラス分けは Kinoshita (1987) による。地表面における偽茎直径に基づいて 10 段階のサイズクラスに分け、偽茎直径の値を自然対数に変換し、各クラスを 0.4 の増分で区切った。頻度のプロットは 0.2 の増分で行った。

(3) 性転換サイズの集団間変異

それぞれの集団で2006年度から2008年度までの3年間にわたって追跡した、各サイズクラスにおける雄の頻度を図2に示す。個体のサイズクラス分けは Kinoshita (1987)に従った。その結果、雄の頻度はサイズが大きくなるにつれて減少した。長野県安曇野市および石川県金沢市の集団では、サイズクラス6および7の狭い範囲で急激に雄の頻度が減少していたが、茨城県筑波山頂の集団ではサイズクラス7から10にかけて徐々に減少していた。

長野県安曇野市の集団では、雄の偽茎直径(D)は2.2 (lnD=0.79) ~12.8 (lnD=2.55) mm, 雌の偽茎直径(D)は9.1 (lnD=2.21) ~25.0 (lnD=3.22) mmであった。石川県金沢市の集団では、雄の偽茎直径(D)は4.0 (lnD=1.39) ~15.7 (lnD=2.75) mm, 雌の偽茎直径(D)は11.2 (lnD=2.42) ~21.3 (lnD=3.10) mmであった。茨城県筑波山頂の集団では、雄の偽茎直径(D)は4.4 (lnD=1.48) ~34.9 (lnD=3.55) mm, 雌の偽茎直径(D)は11.6 (lnD=2.45) ~51.6 (lnD=3.94) mmであった。

雄の頻度はサイズが大きくなるにつれて減少してゆくの、雄の頻度が50%になるサイズクラスは性転換が起こる平均的な性転換サイズと考えられる。雄の頻度が50%になる偽茎直径は、長野県安曇野市の集団では12.6mm, 石川県金沢市の集団では16.0mm, 茨城県筑波山頂の集団では13.8mmであった。したがって、3つの集団間でマムシグサの性転換サイズには変異が認められた。

同種集団間で性転換サイズに変異が認められた事実は、サイズ有利性仮説の予想に一致するものである。雌雄それぞれの繁殖成功率とサイズとの関係が、集団間で異なるために性転換サイズが集団間で異なると解釈できる。

(4) マイクロサテライトマーカークの開発

マムシグサにおいては、既に6遺伝子座のマイクロサテライトマーカークの開発を行ってきたが、ヌル対立遺伝子の存在や変異が少ないなどの理由により、さらに詳細な父性解析を行うためには、新たなマーカークの開発が必要であった(Nishizawa et al., 2003, 2005)。そこで本研究では、マムシグサの新たなゲノミック DNA ライブラリーを構築し、マイクロサテライトマーカークの開発を行った。今回のマーカーク開発では、磁性ビーズを利用してマイクロサテライト領域を予め濃縮してから、SSRプローブを用いてゲノム中のSSR領域をスクリーニングした。スクリーニングに用いたプローブは、2塩基モチーフの(CT)nと(CA)n, 3塩基モチーフの(CGG)nと(GTT)nである。クローン化した濃縮DNA

断片の塩基配列を決定し、マムシグサのマイクロサテライト領域を特異的に増幅するPCRプライマーを設計した。2塩基モチーフの(CT)nと(CA)nのライブラリーから約500クローンの塩基配列を決定してプライマーを作成し、実際にマムシグサのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行って良好な増幅が認められる遺伝子座を選抜したところ、現在までに10遺伝子座で良好なPCR増幅が確認された(表2)。

表2. 新たに開発した父性解析用のマイクロサテライトマーカーク. Tmは至適アニーリング温度。

No.	Locus	Expected fragment size (bp)	Tm	Sequence
1	AsNI2A_B07F AsNI2A_B07R	228	58	CACACGAGAGCCTCTCAGTC TCCATGGCAGTACCGTACAG
2	AsNI2C_E06F AsNI2C_E06R	221	60	GTAGGTACAGCCTTGTGCT ACATAACGGTGGGACATCTC
3	AsNI2C_G02F AsNI2C_G02R	232	57	TAGTCGGGAAGCATCATGA TTGGACGGGAAGACATGGGA
4	AsNI2C_H11F AsNI2C_H11R	206	60	ACAGGAAGTGGGACTGAGGA GAGAGGTAAGCCGTGTGGA
5	AsNI3-1_Co26_B12MF AsNI3-1_Co26_B12MR	285	62	CAAACACAGATTGTGCAGAG TGCCGGAGTGTgTTGTGAGT
6	AsNI3-1_Co66_E10MF AsNI3-1_Co66_E10MR	203	62	TGGTCGGAGTACAGCACTTGTG CTTGAATTAATCTTGCAGAGT
7	AsNI3-1_Co71_F2MF AsNI3-1_Co71_F2MR	168	60	CCTTGAGTCTCTGTGAACTCG GCACACACACGATGCTCACTTG
8	AsNI3-2_Co4_H3MF AsNI3-2_Co4_H3MR	255	58	CAGGATCTTCACTGGCTCTACGT CTGAGTGTGTTGTCTCAGATTGAG
9	AsSSR_4(A)_D08F AsSSR_4(A)_D08R	189	58	GTGACCAAGTCCAGCACACAG ACGAGGAGAGCTCTGATCGAT
10	AsSSR_4(C)_G09F AsSSR_4(C)_G09R	174	58	GCCTCAAACTCTCTCACAC GGGGTCTCTGATCTGAAG

(5) 今後の課題と展望

本研究の開始に伴って、筑波山頂御幸ヶ原の集団に新たに調査方形区を設定し、既に行われていた長野県安曇野市集団や石川県金沢市集団と同様の方法で繁殖動態の追跡を行った。しかしながら筑波山頂の集団では、哺乳動物等による地下球茎部の捕食による追跡個体の損失、さらに鳥類等による果実の捕食が著しく、本研究期間中は2007年度を除き果実の採取を行うことが出来なかった。2007年度には13個体から果実の採取を行うことが出来たことから、これらの果実に含まれていた種子からはDNA精製を終え、新たに開発したマイクロサテライトマーカークによるPCR増幅作業を進めている。さらに、3年間にわたって追跡した筑波山頂集団の全繁殖個体、以前採取を行った石川県金沢市集団の種子サンプルからもDNA精製、マイクロサテライト多型解析を進めている段階である。

以前から個体追跡を行っている長野県安曇野市集団や石川県金沢市集団に加えて、本研究では新たに筑波山頂御幸ヶ原の集団を加えて3集団で性転換サイズを比較した。その結果、平均性転換サイズが3集団で異なり、マムシグサの性転換を理論的に説明するサイズ有利性仮説の予想と良く一致していた。従来までの2集団のみの比較に加えて、本研究で新たに筑波山頂の集団の解析を手掛けることが出来、複数集団での情報を比較出来る体制が整いつつある。従来までのマイクロ

サテライトマーカの解像度が不足しており、本研究において新たなマーカの開発から手掛けたことから、当初の研究実施期間内には全ての試料の父性解析を終えることが出来なかった。今後、マイクロサテライトマーカによる父性解析を進め、各集団の繁殖成功度に関する情報を蓄積することによって、テンナンショウ属の性転換の進化を説明する理論モデルの実証的研究が進展するものと期待される。

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西沢 徹 (NISHIZAWA TORU)

独立行政法人国立環境研究所・生物圏環境

研究領域・NIES ポスドクフェロー

研究者番号：80414382

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし