

機関番号： 84402
 研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008 ~ 2010
 課題番号： 20770074
 研究課題名 (和文) 水生植物コウホネ属における生育形および異形葉形成の進化的背景
 研究課題名 (英文) Evolutionary process of life form and heterophylly in *Nuphar* Sm. (Nymphaeaceae)
 研究代表者
 志賀 隆 (SHIGA TAKASHI)
 大阪市立自然史博物館 学芸員
 研究者番号： 60435881

研究成果の概要 (和文) : 種間において交雑させることが可能である水生植物コウホネ属 (スイレン科) を用いて、葉形、生育形、異形葉形成に関する種間の形質差がどのような機構で進化してきたのかを明らかにすることを目的として、生育形が異なる3種間 (コウホネ、オグラコウホネ、シモツケコウホネ) の形態学的、生態的、遺伝的調査を行い、種間差を明らかにした。また、将来的な遺伝子解析を行うために、各組み合わせの雑種第一代を作出した。

研究成果の概要 (英文) : I investigated morphological, ecological, and genetical features of *Nuphar japonica* DC., *N. oguraensis* Miki, and *N. submersa* Shiga & Kadono to assess evolutionary process of leaf morphology, life form, and heterophylly in the genus *Nuphar* Sm. (Nymphaeaceae). In crossing experiment, these species were cross compatible, and I created artificial F1 hybrids with each species for the future ecogenomics study.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：進化、水生植物、生育形、異形葉

1. 研究開始当初の背景

水生植物は水環境に適応した特殊な種群であり、その生育形は大きく植物体が水面から抜き出て空気中にできる「抽水植物」、葉を水面に浮かせる「浮葉植物」、植物体が完全に水中に沈む「沈水植物」、水面上を浮遊する「浮遊植物」と4つに大別される。この中で、抽水植物は最も陸上植物に近く、沈水植物は水中生活に適応して最も特殊化が進んだ種群である。抽水植物から沈水植物へ進化

する中で、葉の気孔やクチクラ層の喪失、茎など支持器官の矮小化、異形葉性 (1個体の植物が2種類以上の異なった形や性質の葉をつけている状態や、同種の植物が生育環境の違いによって異なる葉形を示すこと) の喪失が起こったと考えられる。しかし、その進化をもたらした遺伝的基盤については明らかになっていない。

これまで種間差をもたらしている遺伝的背景を調べる方法はほとんど無かったが、近

年では EST (Expressed Sequence Tags) や QTL マッピングなどの分子生物学的な手法を活用して、交雑可能な 2 種を使って種間差を F2 で分離させ、種間差を決めている遺伝子を調べることが可能になった。多型が簡便に得られる分子マーカーも数多く開発され、非モデル植物においてもこのような手法を用いたエコゲノミクスの研究について取り組むことができる状況が整ってきている。

葉の形については、シロイヌナズナをはじめとしてモデル植物において関連する遺伝子についての研究が積極的に行われてきた (例えば Tsuge et al., 1996)。また、水生植物の異形葉形成に関してもデンジソウ属においてスクリーニング的に遺伝子が調べられているほか (Hu et al., 2001)、異形葉形成をもたらすシグナルについては様々な生理学的研究がなされてきた (Kuwabara and Nagata, 2002)。しかし、これらは種内の異形葉形成に関する研究であり、生育形や異形葉性獲得 (喪失) の進化に直接踏み込むまでには至っていない。

スイレン科コウホネ属 *Nuphar* (Nymphaeaceae) は浮遊植物を除く抽水植物、浮葉植物、沈水植物の 3 つの生育形が知られており、生育形や異形葉の進化を解明するための研究材料として適したグループである。また本研究を進める上での大きな特色はコウホネ属の各種が容易に交雑が可能であるということである。また、染色体数も属内の種は全て $2n=34$ で雑種後代を育成することができる。このため、生育形の違いを決定付けている遺伝子を F2 世代で分離させ、DNA レベルで調べることが可能である。種間の生育形の差を決めている遺伝子の配列がわかれば、生育形や異形葉形成の進化機構を解明するうえで重要な手がかりが得られる。本研究を進めることにより、研究対象種群が水生植物の進化研究のモデル植物となる可能性を秘めている。以上のことから、コウホネ属を研究対象にして、水生植物の生育形と異形葉形成の遺伝的背景を明らかにできる可能性があると考えに至った。

2. 研究の目的

種間において交雑させることが可能であるスイレン科コウホネ属を用いて、葉形、生育形、異形葉形成に関する種間の形質差がどのような機構で進化してきたのかを明らかにする。そのため、本申請期間内では、形態学的、生態学的な調査を進めると共に、将来的な遺伝子解析を行うための基礎的調査と雑種作出を行うことを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

主な課題と研究方法の概略は以下の通りである。

(1) 種間差の解明

①形態形質

コウホネ (2 集団)、オグラコウホネ (2 集団)、サイジョウコウホネ (コウホネ×オグラコウホネ) (1 集団)、シモツケコウホネ (3 集団)、ナガレコウホネ (コウホネ×シモツケコウホネ) (3 集団) について、集団ごとに 10-30 株をサンプリングし、コウホネ属の分類に重要とされている形質の他、葉や茎の形態学的な特徴、根茎の成長様式などを調査し、これらの種間の差を明らかにした。

②生態的特徴

形態形質の調査に用いた野外集団において、環境データと共に、葉長や根茎の伸長など、フェノロジー調査を定期的に行った。

③遺伝的変異

京都大学農学部の井鷲研と共同で、コウホネ属に使用可能なマイクロサテライトマーカーを 13 遺伝子座開発し、Ouborg ら (2000) が開発したマーカーと合わせて、シモツケコウホネとナガレコウホネの野外集団の遺伝的多様性および集団構造を調査した。また、交雑帯の調査においては葉緑体 DNA *trnL* イントロン領域の配列を調査した。

(2) 葉形、異形葉形成能力に対する淘汰圧の評価

野外集団における葉の形質、生育形の変異、葉形や異形葉形成能力に対する形質を調査するために、サンプリングしたコウホネ、オグラコウホネ、シモツケコウホネ、ナガレコウホネを圃場に移植し栽培実験を行った。通常条件、渇水条件における展葉数や開花数の計測など適応度にかかわる形質を調査した。今回の栽培試験では交配実験により作出した F1 個体が、実験期間内までに十分に成長しなかったため、実験には加えなかった。

淘汰圧は開花数と根茎伸長、分枝回数によって評価した。コウホネ属は地下を横走する根茎に葉茎痕や花茎跡が残るため、根茎を調べることでこのような評価をすることが可能である。この際、調査対象の個体の遺伝的な特徴をすでに開発されている種特異的なマーカーを用いて調査した。

(3) 人工雑種の作出

生育形の明らかに異なるコウホネ (抽水植物)、オグラコウホネ (浮葉植物)、シモツケコウホネ (沈水植物) の 3 種間で人工交配を行い、F1 を作出した。また、その際に結実率

を調査するとともに、得られた種子を用いて発芽試験を行った。発芽試験は、嫌気条件下で5週間以上の冷蔵処理を行った後、嫌気条件下25°C、明期16時間、暗期8時間の条件で行った。

これまでの研究から、コウホネ属植物は短くても開花に至るまで1年以上かかると予想されるため、F2世代の表現型を計測するためには少なくとも4年以上かかる。そこで本研究では、将来的な遺伝解析に用いるためのF2作出までを研究の一つの区切りとすることにした。

4. 研究成果

(1) 種間差の解明

①形態形質

これまで研究代表者が行ってきた近縁種との関係を含めて沈水葉の外部形態をまとめると(図1)、コウホネは大型で卵形~長楕円形、オグラコウホネは円形、シモツケコウホネでは小型で細長い形質を示した。その他、花形質などにおいても研究対象とした3種間の形質差を明確にすることができた。

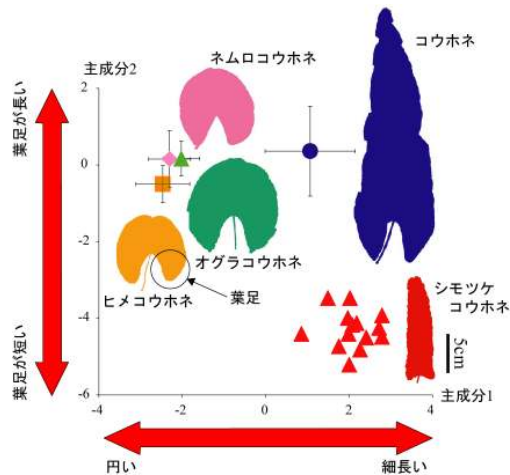


図1：沈水葉8形質に基づく主成分分析の結果。エラーバーは標準偏差を示す。シルエットは各分類群の沈水葉。▲：シモツケコウホネ、▲：オグラコウホネ、◆：ネムロコウホネ、●：コウホネ、■：ヒメコウホネ。ここでは種間雑種の形態は示していない。

また、実際にコウホネとシモツケコウホネの種間交雑が生じている栃木県において、形質を調べると、野外では雑種個体群(ナガレコウホネ)は2種間の中間的な形質値を示した(図2；遺伝的特徴については後述)。

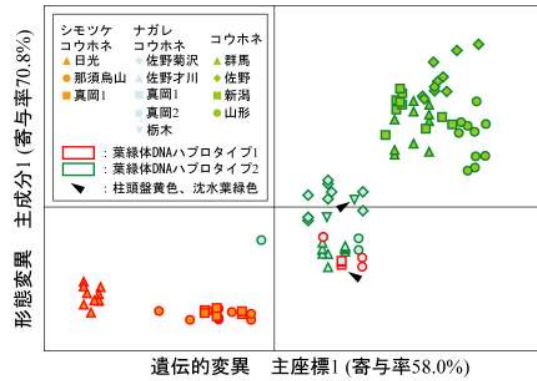


図2：形態変異と遺伝的変異の関係。ここではシモツケコウホネ、コウホネ、ナガレコウホネの3種間の例を示す。x軸にマイクロサテライトマーカーによる解析から得られたデータをもとに解析した主座標分析の結果を、y軸に形態11形質に基づく主成分分析の結果をそれぞれとった。

②生態的特徴

野外調査を進める中で、浮葉形成が雑種個体群の中でも個体ごとに大きな変異が見られることが確認された。

また、2009年~2010年にかけて、日光市と那須烏山市のシモツケコウホネの一部の個体において浮葉形成が確認された(図3)。同種はこれまで浮葉形成が野外条件下において確認されていなかった。生育地の水温データの観測より、例年よりも水温が高かったことがひとつの要因と考えられた。つまりこのことから、シモツケコウホネは浮葉形成に関わる遺伝子が完全に欠如している訳ではないことが明らかになった。



図3：浮葉を形成したシモツケコウホネ。沈水葉の一部が浮葉化しているものがほとんどである。2010年9月5日、栃木県日光市にて撮影。

③遺伝的変異

今回開発したマイクロサテライトマーカー

一は、コウホネ属の各種でも利用可能であった。また、種固有の対立遺伝子をもつ遺伝子座も確認され、種間の解析に対して有効なマーカーであることがわかった。

シモツケコウホネの残存集団を解析した結果は、遺伝的多様性が著しく低下しており（遺伝子多様度 1.39~1.56；ヘテロ接合度の観察値 0.12~0.33）、残存個体数は 51 個体であることが明らかになった。

シモツケコウホネ、ナガレコウホネ、コウホネの 3 種間の遺伝的関係を調べると、雑種であるナガレコウホネの中にはコウホネ特異的な葉緑体 DNA のハプロタイプを持つ個体と、シモツケコウホネに特異的なハプロタイプを持つ個体が確認され、双方向の雑種形成が生じたことが明らかになった（図 2、4）。また、マイクロサテライトマーカーによる解析から得られたデータを用いて、集団構造を解析すると、ナガレコウホネのほとんどの個体は F1 的な特徴を示さず、コウホネとの戻し交雑由来の個体である可能性が示唆された（図 5）。

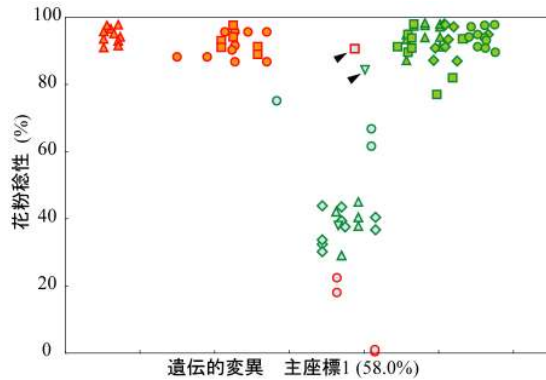


図 4：コウホネ、シモツケコウホネ、ナガレコウホネの遺伝的変異と花粉稔性の関係。凡例は図 2 と同じ。

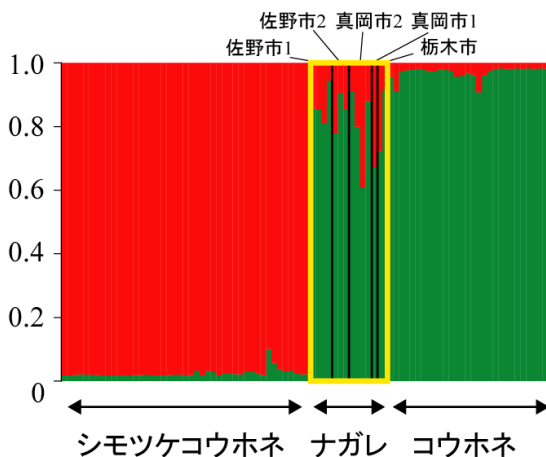


図 5：STRUCTURE での分析結果。1 本の棒グラフは 1 ジェネットを示し、色はそのジェネットのゲノムが推定される祖先集団 (k=2) からどの程度由来しているかを示す。

観察したナガレコウホネの中には花粉稔性がほとんど回復しているものや、形質が分離していると思われる個体が確認された（図 2、4）。戻し交雑や雑種個体同士での交配が進むことによって稔性回復や形質分離が生じたと考えられる。

(2) 葉形、異形葉形成能力に対する淘汰圧の評価

コウホネは渇水条件下において陸生形を形成し生育することができていたが、シモツケコウホネは陸生形を形成することができず、全て枯死した。オグラコウホネは浮葉をつけた状態のまま個体を維持するものがほとんどであったが、一部の個体では陸生葉を展開した。ナガレコウホネでは個体によって陸生形を形成して生存することができたものと陸生形を形成できずに枯死した個体が見られた。どの種においても渇水条件にした場合、根茎成長は抑制され、開花は観察されなかった。このことから、陸生形の形成能力の有無は乾燥ストレス条件下における生存に直接的に関わっていることが明らかになった。

(3) 人工雑種の作出

コウホネ、オグラコウホネ、シモツケコウホネの 3 種間における交配実験の結果、どの種間の組み合わせでも結実が確認された。また、発芽試験においてもどの雑種種子も発芽することが明らかになった。

発芽率については、同種間に比べて発芽率は低下するところがあるものの、異種間の組み合わせ間には発芽率に有意な差は見られなかった（表 1）。このことは雑種実生発芽までの間に種間の隔離機構はほとんど存在しないことを示し、野外で雑種形成が頻繁に確認されるコウホネ属の特徴をよくあらわしている。

表 1：掛け合わせ系統間の発芽率の比較。ここでは特にコウホネとシモツケコウホネの組み合わせの発芽試験結果を示した。

種子親	花粉親	
	コウホネ	シモツケコウホネ
コウホネ	71.4 (29.6) a	68.3 (11.9) a
シモツケコウホネ	62.9 (15.3) a	95.3 (2.3) b

標準偏差を括弧内に示す。

本研究で作出した各組み合わせの F1 は大阪市立自然史博物館の圃場において栽培したが、研究期間内には開花にいたらず、F2 作出までには至らなかった。

(4) 達成度と今後の課題

形態学的、生態的、遺伝的な種間差、野外雑種集団の葉形や異形葉形成能力に対する淘汰圧の評価、人工交配と F1 世代の作出については概ね予定通り計画を達成することができた。

しかしコウホネ、オグラコウホネ、シモツケコウホネの 3 種間の F2 世代を作出することはできなかった。これは、F1 世代の成長が予想以上にかかり、開花可能な個体サイズまで成長しなかったためである。

現在 F1 世代を栽培中であり、早い段階で F2 世代を作出したいと考えている。また、その後 F2 世代の表現形を計測し、F2 世代で分離させた各表現形と関連遺伝子の対応関係の解明と生育形、異形葉形成の進化機構について考察を試みたい。

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 1 件)

1. 志賀 隆, 2008. 絶滅危惧種シモツケコウホネ (スイレン科) の生活史-根茎成長と開花フェノロジーに注目して-. 環境科学総合研究所年報 27 : 1-11. (in Japanese with English abstract ; 査読なし)

[学会発表] (計 6 件)

1. Shiga T., M. Yokogawa, S. Kaneko, and Y. Isagi, Genetic diversity and population structure of *Nuphar submersa* (Nymphaeaceae), an endangered aquatic plant endemic to Japan, and its conservation implications. East Asian Botany, International Symposium 2011 and 10th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Systematics, Tsukuba. (2011 年 3 月 18 日~21 日 ; 東北地方の震災の影響により大会自体は中止になったが、Proceeding の発行により上記大会は成立し、研究発表が行われたことになった)
2. 志賀 隆・横川昌史・兼子伸吾・井鷲裕司. 地域固有絶滅危惧種シモツケコウホネを守る : コビキタスジェノタイプングから見えてきたこと. 日本生態学会第 58 回大会, 札幌. (シンポジウム・口頭発表) (2011 年 3 月 8 日~12 日)
3. 志賀 隆. シモツケコウホネはどのような水草なのか. シモツケコウホネを知る・守る (栃木県立博物館・京都大学農学研究科・環境省の三者による共催シンポジウム), 宇都宮. (招待講演) (2010 年 9 月 23 日)
4. 志賀 隆・横川昌史・兼子伸吾・井鷲裕

司. 遺伝子解析から見いだされたコウホネ属の絶滅危惧種~見逃されてきた絶滅危惧種とその保全~. 日本植物学会第 74 回大会, 春日井. (シンポジウム・口頭発表) (2010 年 9 月 9 日~11 日)

5. 志賀 隆・杉田勇治・横川昌史・兼子伸吾・井鷲裕司. 水生植物ナガレコウホネ (スイレン科) の形態変異と遺伝的変異. 日本植物分類学会第 9 回大会, 刈谷. (ポスター発表) (2010 年 3 月 26 日~28 日)
6. 志賀 隆. コウホネ属 (スイレン科) の自然史. 水草研究会全国集会第 31 回大会, 山形. (招待講演) (2009 年 8 月 22 日~23 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志賀 隆 (SHIGA TAKASHI)
大阪市立自然史博物館 学芸員
研究者番号 : 60435881