

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570116

研究課題名(和文) 花の匂い特性の異なる近縁種間の交雑集団における匂い特性の新規性の解析と種分化

研究課題名(英文) Analysis for novelty in floral scent chemistry of natural hybrid between closely related species.

研究代表者

東 浩司 (Azuma, Hiroshi)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50362439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：花の匂い特性の異なる近縁種の雑種個体が両親種とは異なる匂い特性(および花形態)を示すことにより、種分化が起こることが期待される。花の匂い特性が異なるアケビとミツバアケビ、およびそれらの雑種であるゴヨウアケビの匂い特性を調べた。ゴヨウアケビの匂い特性は両親種の間期的であったが、いくつかの個体は親種であるアケビ・ミツバアケビに見られない匂い物質を放出していることが分かった。セキショウは種内分類群として開花期が異なる二つの系統が知られている。両者の匂いを調べた結果、特に違いは無かったが、これまで天然物として知られていない匂い物質を放出していた。

研究成果の概要(英文)：Floral scent novelty in hybrid between closely related species which show different floral scent characteristics may drive speciation by hybridization. In this study I analyzed floral scent characteristics of *Akebia quinata* (strong odor), *A. trifoliata* (scentless) and their hybrid, *A. pentaphylla* by GC-MS technique. The scent profile of *A. pentaphylla* was intermediate between the parents species. But, it was found that several compounds which were not detected from the parents were emitted from *A. pentaphylla* with small amount. I also analyzed floral scents of *Acorus gramineus* var. *japonicus* and *A. gramineus* var. *pusillus*. There was no difference between them in quality. But, the main volatile was a new compound which was determined by NMR analysis.

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：花の匂い 多様性 雑種 種分化

1. 研究開始当初の背景

被子植物の系統進化・種分化を考える上で花の多様性がどのように成立・維持されてきたのかを明らかにすることは、重要な研究アプローチである。これまでの被子植物(特に花の)多様化・種分化についての多くの研究は花の「かたち」や「色・模様」の形態的特徴や変異幅などを調べることに重点を置いてきた。しかしながら、花の形や色と同等に重要な要素である花の「匂い」に関しては、あまり研究が行われていない。花形質の多様性は主に訪花昆虫との相互適応的な関係により成立維持されてきたと考えられ、実際、多くの研究はラン科やマメ科のように花の外部形態が非常に多様化(特殊化)した分類群やイチジク属やユッカのような種特異的な関係にある分類群で行われている。一方で、いわゆる原始的被子植物といわれる木本性多心皮群(モクレン科、スイレン科など)では、一般的に花の構成は単純で、花全体に形態的な多様性があまり見られない。このような分類群では、むしろ強い匂いを放出することにより、視覚の発達していない甲虫類を誘引することが知られている。実際、花の形態的多様性はあまり見られないにもかかわらず、花の匂い特性は種によって特徴的である場合が多い。このような分類群において花の匂いの多様性がどのように成立・維持されてきたのかはよく分かっていない。

これまでさまざまな分類群の花の匂いの化学的特性とそれらの訪花昆虫相を明らかにしてきた。その結果、個々の種の花の匂いの特徴や訪花昆虫相については明らかになってきたが、それは必ずしも花の匂い特性と訪花昆虫相との適応関係を意味しているわけではなく、花の匂い特性が種の維持または近縁種との隔離において具体的にどの程度の役割を担っているのかについてはほとんど答えられていない。しかし近年、ラン科における研究で、花の匂い特性の異なる近縁種の雑種個体が両親種とは異なる匂い特性(および花形態)を示し、送粉者シフトを起こしている例が報告され、その雑種集団は新たな種として確立していくと考えられることが示された(Stökl et al. 2008 Am J Bot, Vereecken et al. 2010 BMC Evol Biol)。そこで申請者は、近縁種間における花の匂い特性が異なるかどうか、異なるのであれば、それら近縁種間(または同種集団間)の交雑集団に着目し、花の匂い特性を親種と比較することで、交雑個体の花の匂い特性の新規性(両親種に見られない匂い物質の新たな放出など)を明らかにし、雑種形成を介した植物の種分化における花の匂いの役割を具体的に明らかにすることを目的とし、以下の研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、近縁種間で花の匂いが異なる系統の探索。それらの雑種集団(個体)の花

の匂い特性に新規性が見られるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) セキショウ(ショウブ属)は普通に見られる系統のほか、*Acorus gramineus* var. *japonicus*、やや小型で開花期が少し遅れる系統 var. *pusillus* が知られており、両者は異なる分類群とされている。そこで、普通系統と小型系統の花の匂いの化学的特性に違いがないかを野外の個体、または栽培個体を用いて、1花序から放出される花の匂いをヘッドスペース法により捕集し、ガスクロマトグラフィー質量分析器(GC-MS)で調べた。あわせて、ショウブ *Acorus calamus* の花の匂いの分析も行った。また、セキショウの花の匂いの主成分については、NMRを用いて同定した。

(2) 日本にはアケビ属3種が分布し、アケビ *Akebia quinata* の花は強い匂いを持ち、ミツバアケビ *Akebia trifoliata* はほとんど匂いを放出しない。また、ゴヨウアケビ *Akebia pentaphylla* はアケビとミツバアケビの雑種とされ、アケビ、ミツバアケビほどではないが、里山から山地にしばしば見られる。これら3種の花の匂いをヘッドスペース法により捕集し、GC-MS分析を行った。これらの花は比較的小さいので、同一個体から複数花序を集めて匂い捕集を行った。その際、一つの花序にオス花とメス花があるため、オス花とメス花は別々に匂い捕集を行った。ゴヨウアケビについては花序の形態がアケビとミツバアケビの中間的なもので、かつ葉の小葉が3-5枚のものとした。ゴヨウアケビの雑種性を明らかにするために、花粉稔性および葉緑体DNA配列を決定し、アケビ、ミツバアケビと比較した。

(3) ヒメタイサンボクは北アメリカ北東部から南東部および南部まで分布し、北方系集団と南方系集団で花の匂いが異なること、花が開き始める時間がずれていることが知られており、そのことから、生殖的隔離による北方系と南方系は異なる系統であることが示唆されてきた。そこで、両者の分布の境界があるかどうかを葉緑体DNAハプロタイプの分布により明らかにし、両者が混在する交雑帯が存在するかどうかを解析した。

4. 研究成果

(1) セキショウの二つの系統の花の匂いを捕集し、GC-MS分析した結果、両者とも花の匂いを放出していることが分かったが、花の匂いの化学的特性に特に違いは無かった。セキショウの花序、ショウブの花序、およびセキショウの葉から放出される匂いのクロマトグラムが図1である。

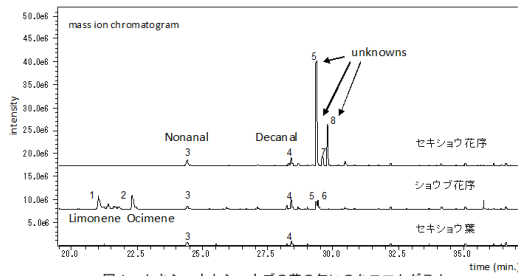


図1. セキショウとショウブの花の匂いのクロマトグラム。

ノナールとデカールがどのサンプルからも検出されているが、これはショウブ属特有の青臭い匂いの元であり、花からも検出されたが、花の匂いというよりは植物体から放出された匂いである。リモネンとオシメンがショウブ花序から検出されたが、両者とも花の匂い物質としてはごく普通のモノテルペン化合物である。一方、セキショウ花序の主成分(図の5, 7, 8)はクロマトグラム上の位置は異なるが、そのマススペクトルはほぼ同じで、異性体と考えられる。ショウブでも微量ながら検出された。この物質の構造を明らかにするために、NMR解析を行ったところ、これまで天然物としては報告されていない2-(1,3-hexadienyl)-tetrahydrofuranという物質であることが分かった。

(2) アケビの花の匂いの分析を行ったところ、アケビは強い匂いを放出しており、その組成から二つのタイプが認められた。一つはミルセンとリモネンがほぼ同量見られる個体、もう一方は、リモネンが見られず、ミルセンが花の匂いの主成分になっている個体である。訪花昆虫の観察を行ったが、どちらのタイプもハナバチやハナカミキリの仲間が訪花しており、特に違いは見られなかった。

表1. アケビの花の匂い

Scent type	Flower sex	Type 1		Type 2	
		Female	Male	Female	Male
Compounds (ID) ^a	RP	Avg (%) (#) ^b	Avg (%) (#)	Avg (%) (#)	Avg (%) (#)
MONOTERPENES					
α -Pinene (AU)	931	- ^c	<0.1 (0.1)[7]	1.8 (0.2)[3]	0.2 (0.1)[17]
Sabinene (MS)	967	-	0.2 (0.1)[4]	6.7 (0.6)[3]	0.5 (0.2)[17]
β -Pinene (AU)	969	-	<0.1 (0.0)[4]	0.1 (0.0)[3]	0.3 (0.2)[17]
Myrcene (AU)	988	679.5 (86.0)[3]	141.2 (75.9)[11]	603.9 (49.4)[3]	88.8 (44.4)[17]
1,8-Cineole (AU)	1017	-	1.5 (0.5)[5]	9.2 (0.8)[3]	1.9 (0.9)[17]
Limonene (AU)	1022	4.7 (0.6)[3]	2.0 (1.1)[11]	500.0 (40.9)[3]	79.7 (39.8)[17]
(Z)-Ocimene (AU)	1032	2.6 (0.3)[3]	0.9 (0.5)[11]	2.1 (0.2)[3]	0.3 (0.1)[17]
(E)-Ocimene (MS)	1043	31.6 (4.0)[3]	13.8 (7.4)[11]	27.9 (2.3)[3]	6.9 (3.4)[17]
MT-1	1054	-	0.2 (0.1)[3]	<0.1 (0.0)[1]	0.1 (0.1)[16]
Terpinolene (AU)	1079	-	0.4 (0.2)[4]	<0.1 (0.0)[1]	0.2 (0.1)[17]
Linalool (AU)	1087	8.3 (1.1)[3]	3.3 (1.8)[11]	9.2 (0.8)[3]	1.5 (0.7)[17]
Limonene oxide (AU)	1113	-	-	-	0.1 (0.1)[12]
allo-Ocimene (AU)	1121	<0.1 (0.1)[3]	0.2 (0.1)[10]	<0.1 (0.0)[1]	0.1 (0.1)[12]
MT-2	1160	-	<0.1 (0.1)[3]	-	0.1 (0.0)[11]
α -Terpinol (AU)	1171	-	5.7 (3.1)[4]	3.9 (0.3)[3]	0.9 (0.5)[17]
MT-3	1192	-	-	-	0.1 (0.0)[7]
<i>subtotal</i>		726.8 (92.0)	169.7 (91.2)	1165.1 (98.3)	181.7 (90.8)
SESQUITERPENES					
ST-1	1332	-	-	-	<0.1 (0.0)[2]
ST-2	1348	-	-	-	<0.1 (0.0)[1]
ST-3	1373	0.3 (0.0)[2]	<0.1 (0.0)[2]	0.1 (0.0)[2]	0.1 (0.1)[5]
ST-4	1378	-	-	-	<0.1 (0.0)[1]
ST-5	1379	-	-	-	<0.1 (0.0)[2]
ST-6	1384	1.9 (0.2)[2]	0.1 (0.1)[2]	-	<0.1 (0.0)[1]
ST-7	1385	0.4 (0.1)[2]	<0.1 (0.0)[4]	0.5 (0.0)[1]	0.6 (0.3)[6]
ST-8	1389	-	-	-	<0.1 (0.0)[1]
Carophyllene (AU)	1413	2.1 (0.3)[1]	0.1 (0.1)[3]	2.4 (0.2)[2]	0.5 (0.3)[9]
ST-9	1423	1.3 (0.2)[2]	<0.1 (0.0)[2]	0.1 (0.0)[2]	0.6 (0.3)[5]
ST-10	1437	-	-	-	0.1 (0.0)[2]
ST-11	1441	-	<0.1 (0.0)[3]	-	<0.1 (0.0)[7]
Humulene (AU)	1444	<0.1 (0.0)[1]	<0.1 (0.0)[1]	<0.1 (0.0)[1]	<0.1 (0.0)[7]
β -Farnesene (AU)	1449	-	0.1 (0.1)[3]	-	0.1 (0.1)[4]
ST-12	1454	24.3 (3.1)[1]	1.7 (0.9)[1]	38.1 (3.1)[2]	1.3 (0.6)[5]
ST-13	1469	-	-	-	<0.1 (0.0)[3]
ST-14	1474	-	-	-	2.2 (1.1)[2]
ST-15	1481	-	-	-	<0.1 (0.0)[3]
α -Farnesene (AU)	1484	-	-	-	<0.1 (0.0)[3]
ST-16	1488	0.5 (0.1)[1]	<0.1 (0.1)[3]	0.4 (0.0)[1]	0.1 (0.1)[5]
ST-17	1491	<0.1 (0.0)[1]	<0.1 (0.0)[1]	<0.1 (0.0)[1]	<0.1 (0.0)[1]
α -Farnesene (AU)	1497	17.5 (2.2)[3]	6.3 (3.4)[4]	8.2 (0.7)[2]	2.9 (1.5)[11]
ST-18	1502	-	-	-	<0.1 (0.0)[2]
ST-19	1506	-	-	-	0.1 (0.1)[3]
ST-20	1512	0.6 (0.1)[2]	<0.1 (0.0)[3]	0.1 (0.0)[2]	0.2 (0.1)[5]
ST-21	1528	-	-	-	<0.1 (0.0)[1]
ST-22	1561	3.3 (0.4)[1]	0.4 (0.2)[2]	2.1 (0.2)[2]	0.2 (0.1)[5]

<i>subtotal</i>	52.4 (6.6)	9.5 (4.9)	52.2 (4.3)	10.4 (4.7)
BENZENE OIDS				
Benzaldehyde (AU)	927	-	<0.1 (0.0)[6]	0.1 (0.0)[2]
Benzyl methyl ether (AU)	969	<0.1 (0.0)[1]	0.1 (0.1)[6]	1.6 (0.1)[1]
Phenylacetaldehyde (AU)	1004	-	3.9 (2.1)[11]	-
2-Phenylethyl methyl ether (AU)	1060	-	<0.1 (0.0)[1]	-
2-Phenylethanol (AU)	1082	-	0.6 (0.3)[6]	-
1,4-Dimethoxybenzene (AU)	1133	2.7 (0.3)[1]	0.4 (0.2)[7]	2.6 (0.2)[2]
4-Allylanisole (AU)	1174	-	0.1 (0.1)[7]	-
2-Phenylethyl acetate (AU)	1225	-	<0.1 (0.0)[1]	-
(Z)-Anethole (MS)	1225	-	<0.1 (0.0)[3]	-
(E)-Anethole (AU)	1259	6.0 (0.8)[1]	0.8 (0.5)[5]	-
4-Cumylphenol	1314	-	-	<0.1 (0.0)[6]
Methyl eugenol (AU)	1370	-	<0.1 (0.0)[2]	-
Isougenol (AU)	1415	-	-	<0.1 (0.0)[1]
Methyl isougenol (AU)	1462	-	<0.1 (0.0)[1]	-
Eugenin (MS)	1519	-	<0.1 (0.0)[1]	-
Benzyl benzoate (AU)	1720	-	-	-
<i>subtotal</i>	8.8 (1.1)	6.6 (3.4)	4.3 (0.4)	8.8 (4.0)
FATTY ACID DERIVATIVES				
(Z)-3-Hexenol (AU)	850	-	<0.1 (0.0)[3]	-
Hexanol (MS)	865	-	<0.1 (0.0)[2]	-
unidentified (alcohol) ^d	1099	-	<0.1 (0.0)[7]	-
unidentified (ester) ^e	1247	-	<0.1 (0.0)[3]	-
unidentified (ester) ^f	1335	-	0.1 (0.1)[4]	-
unidentified (ester) ^g	1758	-	<0.1 (0.0)[2]	-
<i>subtotal</i>	-	-	0.6 (0.3)	0.6 (0.1)
NITROGEN-CONTAINING COMPOUNDS				
2-Aminobenzaldehyde (AU)	1172	2.2 (0.3)[1]	0.2 (0.1)[4]	-
Indole (AU)	1251	-	<0.1 (0.0)[1]	-
<i>subtotal</i>	2.2 (0.3)	-	0.2 (0.1)	0.4 (0.2)

^a Identified based on mass spectrum and GC-retention time of authentic compound (AU) or by comparison with mass spectra in the NIST library and retention index (MS).

^b Retention Index (DB-1 column).

^c Number of samples being detected.

^d Not detected.

一方、ミツバアケビはほとんど匂い物質を放出していないことが分かった。雑種であるゴヨウアケビの花の匂い特性はアケビとミツバアケビの特性を中間的であったが、個体間の差異幅が大きかった。匂いの放出量はミツバアケビのようにほとんどないものから、アケビほどではないが、比較的多く放出する個体までさまざまであった。匂い物質もアケビ同様にミルセンおよびリモネンが主成分であったが、その割合はさまざまであった。興味深いことに、ゴヨウアケビのいくつかの個体から、アケビ、ミツバアケビからは検出されなかった匂い物質、例えば、リナロールオキド、ペリレン、ネロール、ゲラニオール、サリチル酸メチルなどが放出されていることが分かった。ただ、これらの匂い物質の放出量はごく微量であったが、親種からはまったく検出されなかった匂い物質であることから、雑種形成により新規にこれらの匂い物質が放出されるようになったことが示唆された。平行して、ゴヨウアケビ(7個体)の葉緑体 DNA (trnK intron) の塩基配列を決定した結果、アケビとまったく同じ配列を持つものが5個体、1塩基違うものが1個体、ミツバアケビとまったく同じものが1個体であった。このことからゴヨウアケビが雑種由来であることが分かった。雑種形成により新規に獲得された形質(新規匂い物質の放出)が種分化に生かされるにはその系統が次世代を作り続けなければならない。そこで、ゴヨウアケビの花粉稔性を調べたところ、平均43%であり、必ずしも稔性が高くない。ゴヨウアケビが果実をつけないかどうか、アケビまたはミツバアケビと戻し交雑を行うことがないかどうかは今後の検討課題である。

(3) ヒメタイサンボクは北方系と南方系の分布の境界を明らかにするために、アメリカ合衆国サウスカロライナ州において、サンプリングを行い、葉緑体 DNA の遺伝子間領域の配列(約5000塩基)を決定し、ハプロタイプ分布を明らかにした。19集団解析した結果、北方系と南方系は、近接する3集団で

のみ混生していることが明らかになった。比較的はっきりした分布の境界線が存在することが明らかになった。地形的にはサウスキャロライナ州では一番大きい Santee 川が両者の境界線と一致するように見えた。混生する 3 集団はこの川に近いところに位置する。形態的には、葉脈上の毛の有無によって北方系と南方系を区別することができるが、実際には毛の有無はその密度にばらつきがあり、葉緑体ハプロタイプの分布のように明確には区別できない。両系統の混生集団において、交雑が起こっているのかどうかは今後の検討課題である。

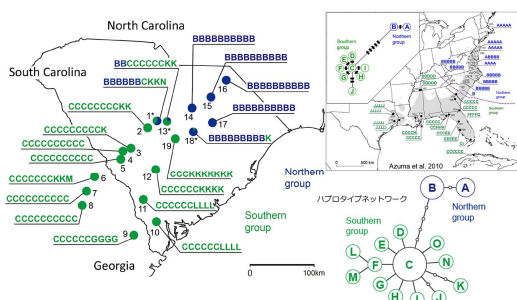


図 3. 葉緑体ハプロタイプの分布

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 3 件)

- (1) Azuma, H. 2013. Floral scent chemistry of *Nuphar japonica* (Nymphaeaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 48: 211-214. DOI: 10.1016/j.bse.2012.12.019
- (2) Azuma, H. and Richard B. Figlar. 2013. Progress report for the molecular study of *Magnolia virginiana*, toward a better understanding of the intraspecific taxonomy. *Magnolia* 48: 4-10. <http://www.castaneajournal.org/doi/abs/10.2179/10-018.1>
- (3) Azuma, H., and Toyota, M. 2012. Floral scent emission and new scent volatiles from *Acorus* (Acoraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 41: 55-61. DOI: 10.1016/j.bse.2011.12.018

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) 東 浩司, Richard B. Figlar. 北米産ヒメタイサンボクの種内分類について。日本植物学会第 77 回大会(北海道大学、札幌市) 2013 年 9 月 13 日 - 15 日(口頭)。

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 東 浩司。2012。モクレン科-ヒメタイサンボクの種内分類の解決に向けて-。戸部博・田村実 編著、新しい植物分類学、47-51 ページ。講談社、東京。

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 浩司 (HIROSHI AZUMA)
京都大学大学院・理学研究科・助教
研究者番号：50362439

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者