

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770074

研究課題名(和文) 屋久島の高山性ミニチュア植物の適応形質の自然選択圧特定と連鎖解析

研究課題名(英文) Natural selection pressure and linkage analysis of a dwarf plant in Yakushima

研究代表者

篠原 渉 (Shinohara, Wataru)

香川大学・教育学部・准教授

研究者番号：30467443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒメコナスビの小型化した形質が遺伝的バックグラウンドを有するかどうかを共通圃場実験から明らかにすることを目的とした。さらにヒメコナスビの小型化した形質が適応形質かどうかを共通圃場実験より導き出されるQst及び集団遺伝学的解析より算出されるFstの比較から明らかにした。共通圃場実験からヒメコナスビの葉はコナスビより小さく、その葉は細胞サイズと細胞数の両方が減少して小型化していた。FstとQstを比較した結果、ヒメコナスビの小型化した葉は適応形質であることが明らかとなった。さらに現地集団の調査から自ヒメコナスビにかかる自然選択圧が雨であることを特定した。

研究成果の概要(英文)：This study examined dwarf morphology in *Lysimachia japonica* var. *minutissima*, by comparing its lowland counterpart, *L. japonica* var. *japonica*. Measurements of morphological characters in a common garden experiment, and population genetic analysis were performed to investigate whether the dwarfed morphologies of this species are adaptive traits or not. The results of the common garden experiment revealed that the plants from the highland were significantly smaller in nine traits, which are mostly associated with plant size. This result indicates that the dwarf morphological characters in high-altitude populations are genetically controlled. The Qst values regarding both cell size and number measured in the common garden experiment were significantly higher than the Fst value (0.37) calculated using neutral genetic markers, suggesting that dwarf morphologies of *Lysimachia japonica* that occur in the alpine region in Yakushima have been evolved as adaptive traits.

研究分野：適応進化

キーワード：共通圃場実験 屋久島 高山性ミニチュア植物 ヒメコナスビ 集団遺伝解析

### 1. 研究開始当初の背景

自然界の適応進化を分子レベルで解明しようと試みた際、すべての必要条件を満たす研究系は非常に少ない。まず、対象生物の飼育が容易で世代交代が早い、比較のための(適応形質をもたない)近縁種が存在し、それらが交配可能である、という基本的な条件が必要である。また自然選択圧とそれに対する適応形質の証明には、自然選択圧の定量化と実験室内での再現、そして適応度の測定が必要となる。さらに適応形質を支配する分子メカニズムを解明するためには、適応形質に関する QTL マッピング(Quantitative trait loci mapping)、物理地図の作製、対象生物における遺伝子機能解析のための形質転換技術の確立が必要となる。本研究課題の代表者である篠原は屋久島の高山性ミニチュア植物のヒメコナスビコナスビ研究系(図1)が適応進化の分子メカニズムを解明する優れた材料であると考へ、研究を行っている。



図1. ヒメコナスビとコナスビ(祖先種)  
花は同大、ヒメコナスビの葉が著しく小型化する。

屋久島の山頂部では 82 の分類群で、祖先種と比較して植物体が 1/2 から 1/10 ほど小型化する現象が報告されている(初島,1991)。Kokubugata et al. (2010) は屋久島の高山性ミニチュア植物の一種であるヒメコナスビとその祖先種のコナスビの形態形質の比較と分子遺伝学的解析を行った。核の ITS 領域を用いた分子系統樹からヒメコナスビは近縁種の中でコナスビに最も近いことを明らかにした。さらに Shinohara et al. (2006) はアロザイムを用いた集団遺伝学的解析から、ヒメコナスビは屋久島低地のコナスビから進化したことを明らかにした。これらの結果は、ヒメコナスビとコナスビがお互いに比較対象種として妥当であることを示している。また Shinohara et al. (2006) は形態形質の比較から、ヒメコナスビは葉の大きさが他の器官と比較して特に小型化していること、そして細胞サイズと細胞数の両方の減少によりヒメコナスビの葉の小型化が起こることを明にした。

### 2. 研究の目的

本研究ではヒメコナスビの小型化した形質が遺伝的バックグラウンドを有するかどうかを共通圃場実験から明らかにすることを目的とした。さらにヒメコナスビの小型化した形質が適応形質かどうかを共通圃場実

験より導き出される  $Qst$  及び集団遺伝学的解析より算出される  $Fst$  の比較から明らかにすることを目的とした。また F2 集団の作製からヒメコナスビの小型化形質の分子メカニズムの解明のために F2 集団の作製を試みた。同時に屋久島高地での自然選択圧の観察を行い、ヒメコナスビの小型化した形質が適応的となる自然選択圧の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

コナスビとヒメコナスビそれぞれ 6 集団から計約 1000 個の種子を採集し(内訳:各集団から 6 個体、各個体から 12 個以上の種子)、ランダムブロックデザインとエッジ効果に配慮した共通圃場実験を行った。兄弟種子間、集団間、コナスビとヒメコナスビ間のうち、どの階層の差異が全体の変異を最も説明しているかの判別を行った。

集団遺伝学的解析では、すでに開発していた 10 個のコナスビ類に特異的なマイクロサテライトマーカーを使用し、屋久島におけるコナスビとヒメコナスビ集団の解析から、 $Fis$ 、 $Fst$  を算出した。また structure による遺伝的分化の有無、hybrid による自然雑種の有無を検証した。

コナスビとヒメコナスビの人工交配実験から F1、F2 を作製し、その DNA を採取すると共に形態形質の測定を行った。

またヒメコナスビの集団の年間を通じた観察から自然選択圧の候補の絞り込みをおこなった。

### 4. 研究成果

共通圃場実験の結果、ヒメコナスビの葉はコナスビより小さく(図2)、その葉の小型化は細胞サイズと細胞数の両方が減少することが原因であることがわかった。こ

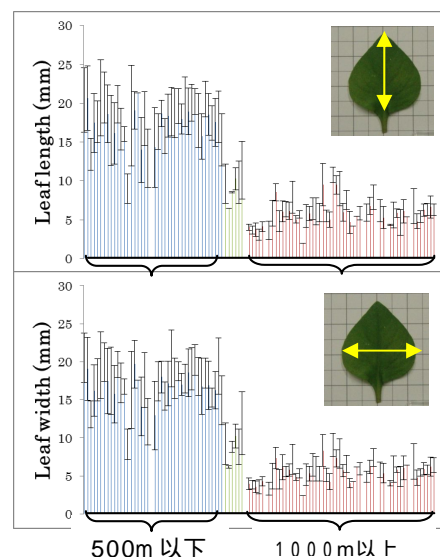


図2. 共通圃場実験による標高による葉の大きさの差異

のことはコナスビとヒメコナスビの葉の大きさ、細胞サイズ、そして細胞数の差異には遺伝的なバックグラウンドが存在することを意味する。さらにコナスビとヒメコナスビでは、茎の長さ、花芽の位置、胚珠数、バイオマスに差異がみられ、これらの形質における差異も同様に遺伝的バックグラウンドをもつことがわかった。形質間の遺伝相関を調べたところ、植物体の大きさに関する形質はお互いに強い相関を示した。葉の細胞レベルの形質に関しては、葉の細胞数と葉の細胞サイズだけは植物体の強い相関を示さなかった(図3)。このことから、葉の大きさを決定する細胞レベルの2つの要因、すなわち葉の細胞サイズと細胞数は、それぞれ異なる遺伝子座によって支配されていることを意味する。

Genetic correlation between morphological characters

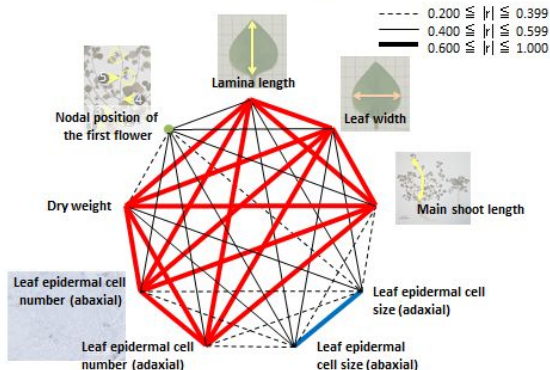


図3 形質間の遺伝相関

また集団遺伝学的解析から、コナスビとヒメコナスビは遺伝的にある程度分化していること、そして標高 500m 程度の場所では雑種と考えられる個体が生育していることが明らかとなった。

ある形質が適応形質であるかどうかは中立遺伝マーカーから算出された  $F_{st}$  と目的形質の集団間分化の適度の指数である  $Q_{st}$  を比較することで調べることができる。そこで  $F_{st}$  を計算し、共通圃場実験より算出された  $Q_{st}$  との比較を行った。その結果、いずれの測定したいずれの形質(葉の大きさ、葉の細胞サイズ、葉の細胞数、茎の長さ、花芽の位置など)においても  $Q_{st}$  の値は  $F_{st}$  (0.37) よりも有意に大きく、これらの形態形質の差異は低地と高地でのそれぞれ異なる自然選択圧に対する適応形質であることが明らかとなった(図4)。

コナスビとヒメコナスビの交配実験から、F1 を作製し、その F1 を自殖させることで F2 を作製した。F2 の葉のサイズを測定したところ、葉のサイズは小さいものから大きいものまで連続的に変化することがわかった。これは葉のサイズが2つ以上の遺伝子によって支配されていることを意味する。さらに F2 集団において細胞のサイズ、細胞の数をそれぞれ測定したところ、細胞の

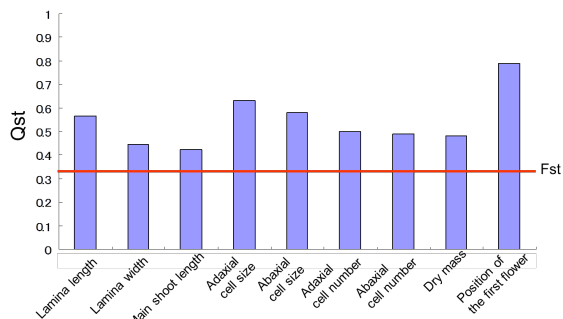


図4 屋久島のコナスビ類における  $Q_{st}$  と  $F_{st}$  の比較。

サイズ、数ともに測定値の小さいものから大きいものまで連続的に変化することがわかった。これらの結果から、葉の細胞サイズと数は共に2つ以上の遺伝子によって支配すると考えられた。作製された F2 集団からは DNA を採取し、連鎖地図の解析を行っている。

屋久島のヒメコナスビの生育地においてヒメコナスビの小型化した形質にかかる自然選択圧の特定を行った。最もありそうな自然選択圧として雨を第一候補とし、雨滴のサイズと雨量の測定機器をヒメコナスビの生育地に設置する準備を行った。

#### < 引用文献 >

初島,1991,『北琉球の植物』

Goro Kokubugata, Koh Nakamura, Wataru Shinohara, Yukiko Saito, Ching-I Peng and Masatsugu Yokota. Evidence of three parallel evolutions of leaf dwarfism and phytogeography in *Lysimachia* sect. Nummularia in Japan and Taiwan. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54. 657-663. 2010.

Wataru Shinohara and Noriaki Murakami. How have the alpine dwarf plants in Yakushima been miniaturized?: A comparative study of two alpine dwarf plants in Yakushima, *Blechnum niponicum* (Blechnaceae) and *Lysimachia japonica* (Primulaceae). *Journal of Plant Research*. 119. 571-580. 2006.

Wataru Shinohara, Akihiro Kakezawa, Eri Kawaguchi, and Kiyokazu Agata. Development of polymorphic microsatellite markers for genetic constitution comparison between *Lysimachia japonica* (Myrsinaceae) and its alpine dwarf variety, var. *minutissima*, endemic to Yakushima in Japan. (Summary in *Molecular Ecology Resources* 11. 586-589. 2011.

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 5件)

1. Shinohara, Wataru “Evidence for adaptive evolution of an alpine dwarf of *Lysimachia japonica* endemic to Yakushima, Japan” International Conference on the Water Crisis in the Asia-Pacific Region, Kagawa University, Kagawa University(香川県・高松市) 2015. 2. 12
2. 篠原 渉「屋久島の高山性ミニチュア植物の小型化形質は適応進化の結果か？ 共通圃場実験と集団遺伝解析に基づく Qst と Fst の比較」日本植物分類学会第 13 回大会、日本植物分類学会、熊本大学(熊本県・熊本市) 2014. 3. 21
3. 掛澤明弘、田村 実、工藤 洋、篠原 渉「屋久島の高山性ミニチュア植物ヒメコナスビの小型化形質には遺伝的バックグラウンドが存在する」日本植物分類学会第 13 回大会、日本植物分類学会、熊本大学(熊本県・熊本市) 2014. 3. 21
4. 篠原 渉「山の上で小さくなる植物—特殊な環境の植物を調べることで見えてくるもの—」, ナチュラルヒストリーの基礎講座、みんなでつくる自然史博物館・香川、高松シンボルタワー(香川県・高松市) 2014. 1. 25
5. 篠原 渉「フィールドとゲノムをつなぐ 適応進化研究系の確立を目指す」香川生物学会例会、香川生物学会、香川大学(香川県・高松市) 2012. 5. 27

〔図書〕(計 件)

〔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：  
出願年月日：  
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

篠原 渉 (SHINOHARA, Wataru)  
香川大学・教育学部・准教授  
研究者番号：30467443

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：