

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871088

研究課題名(和文) 海流散布植物の歴史的な分布拡大規模の解明-環太平洋域を網羅したテリハボクの解析

研究課題名(英文) Estimation of historical gene flow in sea-drift seed dispersal plants: analysis of *Calophyllum inophyllum* which distribute to pacific rim

研究代表者

花岡 創 (HANAOKA, SO)

国立研究開発法人 森林総合研究所・林木育種センター・主任研究員

研究者番号：40598728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：海流散布植物における遺伝子流動の潜在的可能性を推定することを目的に、テリハボクの遺伝構造等の解析を行った。2つの手法(EST-SSR分析およびMIG-seq分析)を用いて解析した結果、南太平洋域(ソロモン諸島、バヌアツ共和国、フィジー共和国、トンガ王国)と台湾および日本の間には大きな遺伝的分化があり、両地域間では遺伝子流動が制限されてきたと考えられた。一方、南太平洋と台湾・日本のそれぞれの地域内では、経度に沿った遺伝構造が検出され、一定の遺伝子流動が成立してきたことを示唆していた。これらのことから、島嶼間であっても、海流散布による数百キロメートルレベルの遺伝子流動は成立し得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Genetic structure of *Calophyllum inophyllum* was analyzed to estimate the potential of gene flow in sea-drift seed dispersal plants. Two methods (EST-SSR and MIG-seq analysis) were used, and high levels of genetic differentiation between South Pacific (Solomon islands, Vanuatu, Fiji and Tonga) and Taiwan/Japan was detected. The results suggesting limitation of historical gene flow between two regions. On the Other hand, clear genetic structures along longitude was detected within South Pacific area or Taiwan/Japan. These results indicated the certain level of gene flow within each region has been occurred, and potential of gene flow for several hundreds kilometer by sea-drifted seed dispersal was suggested even among island populations.

研究分野：分子生態学

キーワード：テリハボク 海流散布 EST-SSR MIG-seq 遺伝構造 遺伝子流動

1. 研究開始当初の背景

種子が海へと流出し、海流によって広い海を渡り、新たな土地に定着して分布を拡大する「海流散布植物」には多くの種が知られる。しかし、広域においてこれらの種の分布拡大の潜在的な可能性を取り扱った研究は少なく(例えば、Takayama et al. 2006; 2008)。また、既存のいくつかの研究は、海洋間といった非常に長距離の遺伝子流動が成立してきた可能性を示唆する一方、島嶼間における遺伝子流動の範囲や規模を含めた分布拡大の過程までをも詳細を明らかにする研究デザインとはなっていない。集団(島嶼)間の遺伝子流動の規模および分布拡大ダイナミクスは集団分化や種分化に深く関わる問題であり、特に島嶼については、植物集団の固有性を形作る主要な要因となり得る。それゆえ、島嶼集団における海流散布植物の遺伝構造や遺伝子流動の規模を推定することは、島嶼への植物定着プロセスや大洋島における植物進化の理解に対しても有用な情報を提供することが期待される。

テリハボク(*Calophyllum inophyllum*)は、ケニアやタンザニアなど東アフリカの一部からインド、東南アジア、台湾、日本の沖縄、ポリネシア地域など広域にわたる熱帯・亜熱帯の海岸および海岸付近の低地に分布し(Prabakaran and Britto 2012)、それら地域の多くの島嶼にも存在している。日本の沖縄では防風林として活用されるほか、サモアやフィジー周辺の南太平洋地域では種子油を原料とした製品が製造されている。経済的にも重要な樹木であり、その遺伝資源の評価や保全にも関心が寄せられている。直径3~5cm程度の大きさを持つテリハボクの果実は90日以上にわたって塩水に浮かぶことができ、長期にわたって種子の発芽能力も維持されたことなどが報告されており、テリハボクが極めて高い海流散布能力を有すると考えられている(Nakanishi 1998)。それゆえ、広域に分布するテリハボクの遺伝構造等を解析することで、典型的な海流散布植物の遺伝子流動の範囲や規模を推定することができると期待され、また、テリハボクの歴史的な分布変遷パターンの推定も可能となるのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

環太平洋の広域に分布するテリハボクを供試材料として、解像度の異なる複数のDNAマーカーを用いて遺伝構造を明らかにすることで、海流散布による遺伝子流動(分布拡大の潜在的な可能性)を推定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)研究用試料の収集

南太平洋地域および台湾と日本の沖縄に分

布するテリハボクの島嶼集団を研究対象とした。ソロモン諸島の Guadalcanal 島と Makira 島、バヌアツ共和国の Espiritu Santo 島と Efate 島、フィジー共和国の Viti Levu 島、トンガ王国の Tongatapu 島と Vava'u 島、台湾島、日本の与那国島、波照間島、西表島、黒島、石垣島、多良間島、宮古島および南大東島に自然分布する個体を探索し、各島 24 個体(トンガ王国の Vava'u 島のみ 16 個体)から葉試料を採取した。採取した試料はシリカゲルを用いて乾燥させ、実験まで保存した。それら乾燥させた葉から改変 CTAB 法(Hanaoka et al. 2013)により DNA を抽出し、以降の解析に用いた。

(2)EST-SSR マーカーによる遺伝構造解析

EST-SSR11 遺伝子座(*Ci_0147*, *Ci_448*, *Ci_932*, *Ci_1542*, *Ci_2415*, *Ci_2791*, *Ci_3763*, *Ci_4038*, *Ci_4062*, *Ci_5283*, *Ci_5461*; Setsuko et al. 2012)を用いて遺伝子型を同定し、遺伝的多様性(ヘテロ接合度および対立遺伝子の豊富さ; El Mousadik and Petit 1996)および遺伝構造(STRUCTURE 解析; Pritchard et al. 2000)を実施した。STRUCTURE 解析は、全集団を用いて解析を行った上で、南太平洋地域と台湾・日本に分けた解析も行った。なお、STRUCTURE 解析における最適なクラスター(K)数は ΔK 値(Evanno et al. 2005)を参考に決定した。

(3)MIG-seq 法による遺伝構造解析

MIG-seq 法(Suyama and Matsuki 2015)を用いてゲノムワイドな一塩基多型(SNPs)を同定し、EST-SSR と同様に遺伝的多様性および遺伝構造(STRUCTURE 解析)を評価した。

(4)葉緑体 DNA(cpDNA)による遺伝変異解析

日本産の 2 個体、台湾産の 2 個体およびフィジー産の 2 個体について、cpDNA の変異を解析した。まず、公共のデータベース(NCBI)からテリハボクと同じキントラノオ目(Malpighiales)の *Populus trichocarpa*、*Jatropha curcas*、*Hevea brasiliensis* の cpDNA の塩基配列情報を取得して比較し、保存性の高い領域を探索してプライマーを設計した。設計したプライマーはすべて上述のサンプルに適用し、最終的に、Long-range PCR を行った際に増幅効率が良く安定的に単一バンドを示した 8 つの遺伝子間領域(*rpoB-rpoC2*、*rps4-ndhC*、*ndhC-rbcL*、*ycf2-rrn16*、*ndhH-rrn23*、*rrn23-rps7*、*rps7-ycf2*、*psbA-matK* の合計約 60 Kbp)について、次世代シーケンサ(ロシユ 454)を用いて塩基配列を取得し、de novo アセンブリを行って SNPs 変異を探索した。

4. 研究成果

(1)EST-SSR マーカーを用いた遺伝的多様性と遺伝構造評価

EST-SSR の 15 遺伝子座を用いて遺伝子型

を同定し、算出したヘテロ接合度および対立遺伝子の豊富さの結果をそれぞれ図 1 および図 2 に示す。

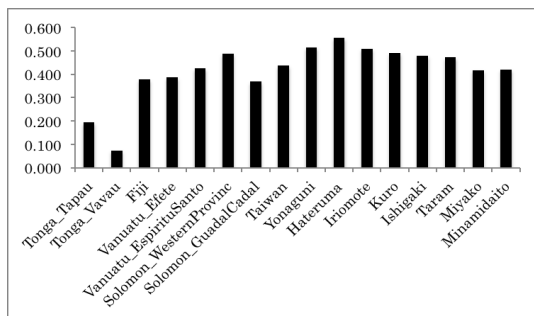


図 1. 各島のヘテロ接合度

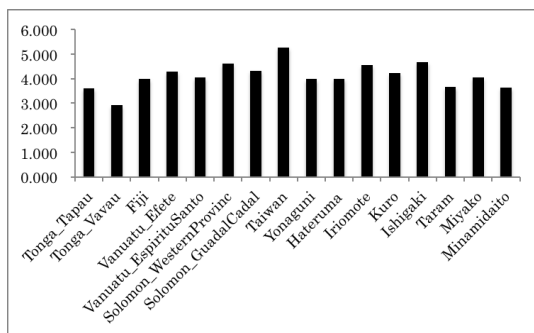


図 2. 各島の対立遺伝子の豊富さ

ヘテロ接合度および対立遺伝子の豊富さはいずれも遺伝的多様性の指標となるが、トンガ王国の 2 島および宮古諸島（多良間島と宮古島）と大東諸島（南大東島）といった分布域の北東および南東部に位置する島々においてやや低い値となった。

全集団を含めて STRUCTURE 解析を行った結果、2 つのクラスターに区部すること (K=2) が支持された。各島ごとにクラスターの割合をまとめた結果を図 3 に示す。トンガ王国からソロモン諸島までの南太平洋地域と台湾および日本が異なるクラスターに分かれる明瞭な遺伝構造が示され、両地域間は遺伝的に分化しており、歴史的に遺伝子流動が制限されてきた可能性が高いと考えられた。

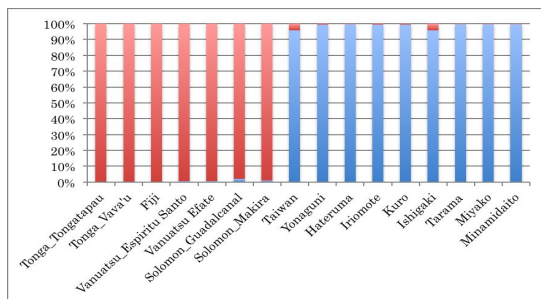


図 3. 全集団を含めた STRUCTURE 解析の結果

南太平洋地域および台湾・日本に分けて STRUCTURE 解析を行った場合の結果をそれぞれ図 4 および図 5 に示す。どちらの場合も K=2 が支持された。南太平洋地域では、

クラスター 1 (図 4: c1) がソロモン諸島およびバヌアツ共和国の島々で優先し、一方、トンガ王国の島々ではクラスター 2 (図 4: c2) が優先し、フィジー共和国において両方のクラスターが同程度となった。2 つのクラスター割合の経度に沿った傾向が検出された。台湾および日本の島々においては、クラスター 1 (図 5: c1) が日本の島々において優先し、クラスター 2 (図 5: c2) が台湾でやや優先する結果となり、台湾と日本の間での一定の遺伝的分化が検出され、日本の島々の間では遺伝子流動が成立してきたことを示唆する一方、台湾と日本の島々との間では遺伝子流動規模が小さかったことが示唆された。

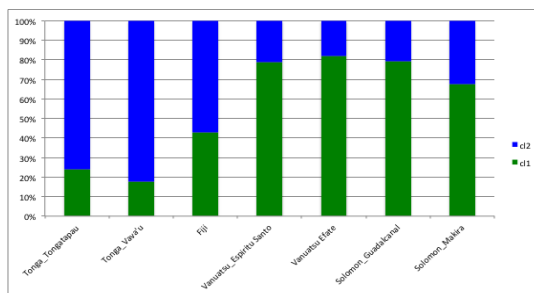


図 4. 南太平洋地域における STRUCTURE 解析の結果

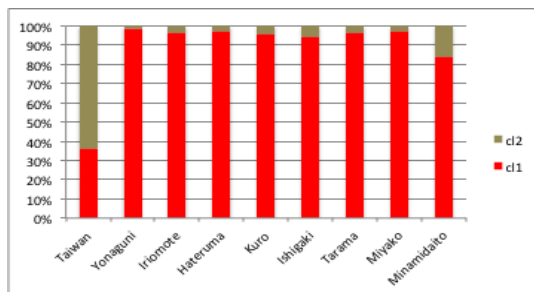


図 5. 台湾・日本における STRUCTURE 解析の結果

(2)MIG-seq 法による遺伝的多様性および遺伝構造解析

MIG-seq 法によりゲノムワイドな多数の塩基配列情報を取得し、depth が 5 以上、半数の集団 (8 集団) 以上かつ各集団の 50% 以上の個体でデータが得られた 77 遺伝子座のみについて解析を行った。各集団のヘテロ接合度の差は、数値は異なるものの傾向は EST-SSR と同様となった (図 6)。また、全集団を用いた STRUCTURE 解析についても、EST-SSR による解析と同様の結果となり、南太平洋地域と台湾・日本が明瞭に分かれる遺伝構造が検出された (図 7)。

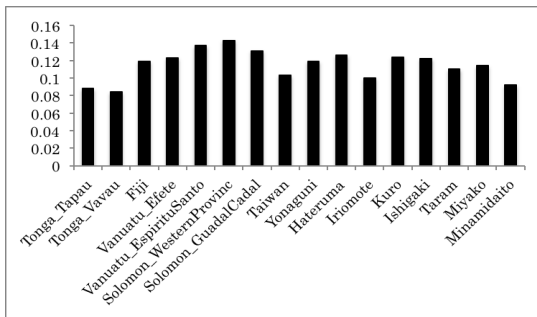


図 6. SNP データによるヘテロ接合度の観察値の結果

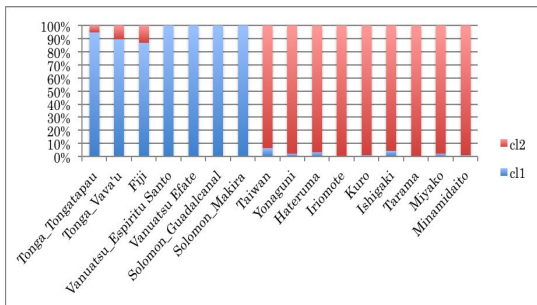


図 7. SNP データを用いた STRUCTURE 解析の結果

(3) 葉緑体 DNA の変異

フィジー、台湾、日本のそれぞれ 2 個体について、cpDNA の 8 つの遺伝子間領域、各個体合計約 60Kbp の塩基配列を取得して比較した。結果として、trnV-UAC と ndhC の遺伝子間領域に 2 つの SNPs、ndhJ と trnF-GAA の遺伝子間領域に 1 つの SNP、rps15 と ndhH の遺伝子間領域に 1 つの SNP、ycf1 遺伝子領域の近傍に 1 つの SNP と合計 5 個の SNPs が同定された。台湾と日本から収集されたサンプルのハプロタイプは全て同じであり、フィジーの 2 個体のみが異なるハプロタイプを有していた。cpDNA の解析からも南太平洋と台湾・日本の間の遺伝的分化が検出された。

(4) 総合考察

本研究では、EST-SSR 分析と MIG-seq 分析という異なる 2 つの手法を用いて遺伝的多様性および遺伝構造を解析した。MIG-seq 法の SNP 同定については、解析する遺伝子座の抽出の仕方等にまだ改善の余地があるものの、どちらの手法も同様の遺伝的多様性や遺伝構造の傾向を示し(図 2 と 6 および 3 と 7 の比較)第一に南太平洋地域と台湾・日本との間には大きな遺伝的分化が存在し、遺伝的交流が強く制限されてきたと考えられた。次に、東西約 2700km におよぶ南太平洋地域および約 1000km におよぶ台湾・日本のそれぞれの地域について見てみると、STRUCTURE 解析におけるクラスターの混合が見られ(図 4 および図 5)、また、各クラスターの割合には経度に沿った傾斜が見られた。これらのことから、南太平洋および台湾・日本それぞれの地域内においては歴史的な遺伝子流動が成立し

てきたことが示唆された。海流散布植物では、島嶼集団間であっても数百キロメートルという範囲での遺伝子流動(分布拡大)が成立し得ると考えられる。また、テリハボクにおいては、遺伝的多様性が東部で低い傾向が見られ、遺伝構造の結果と合わせて考えると、東南アジアやインドの方面が同種の起源であり、そこから南東(南太平洋地域)および北東(台湾および日本)へと分布を拡大してきたことに起因する遺伝的浮動(創始者効果)を反映した遺伝的多様性および遺伝構造となっていることも考えられる。残念ながら東南アジアからの試料を有しておらず、分布変遷についてのより詳細な検証はできないが、テリハボクの歴史的な分布拡大パターンに対する一つの可能性を提案できた。

<引用文献>

- El Mousadik A., Petit R.J., High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco., *Theoretical and Applied Genetics*, 7, 1996, 832-839
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J., Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study., *Molecular Ecology*, 14, 2005, 2611-2620
- Hanaoka S.(著)DNA extraction. In: Hanaoka S (編), *Basic molecular techniques for tree breeding -Experimental Protocol-*, 三恵社, 東京, 2013, pp.22-23
- Nakanishi H., Dispersal ecology of the maritime plants in the Ryukyu islands, Japan., *Ecological Research*, 3, 1988, 163-173
- Prabakaran K., Britto S.J., Biology, agroforestry and medicinal value of *Calophyllum inophyllum* L. (Clusiaceae): a review, *International Journal of Natural Products Research*, 1, 2012, 24-33
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155, 2000, 945-959
- Setsuko S., Uchiyama K., Sugai K., Hanaoka S., Yoshimaru H., Microsatellite markers derived from *Calophyllum inophyllum* L., (Clusiaceae) expression sequence tags., *American Journal of Botany*, 99, 2012, 28-32
- Takayama K., Kajita T., Murata J., Tateishi J., Phylogeography and genetic structure of *Hibiscus tiliaceus* speciation of a pantropical plant with sea-drifted seeds. *Molecular Ecology*, 15, 2006, 2871-2881
- Takayama K., Tateishi Y., Murata J, Kajita T., Gene flow and population subdivision in a pantropical plant with sea-drifted seeds

Hibiscus tiliaceus and its allied species: evidence from microsatellite analysis, *Molecular Ecology*, 17, 2008, 2730-2742

Cenon Padolina
Secretariat of the Pacific Community
Officer

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)

Hanaoka So, Ching-Te Chien, Shun-Ying Chen, Atsushi Watanabe, Suzuki Setsuko, Kazutaka Kato, Genetic structure of *Calophyllum inophyllum* L., a tree employing sea-drift seed dispersal in the northern extreme of its distribution, *Annals of Forest Science*, 71, 2014, pp.575-584, DOI 10.1007/s13595-014-0365-5

[学会発表](計3件)

Hanaoka So, Elina Young, Cenon Padolina, Genetic structure and differentiation of sea-drifted seed dispersal plant *Calophyllum inophyllum* in island populations of South Pacific area, 第63回日本生態学会大会、2016.3.20-24、仙台国際センター(宮城県仙台市)

花岡 創、加藤 一隆、尾坂 尚紀、テリハボクの事例から見た島嶼樹木集団の遺伝的多様性の脆弱性、平成26年度亜熱帯森林・林業研究会、2014.8.29、沖縄県庁(沖縄県那覇市)

花岡 創、平尾 知士、渡辺 敦史、Long-range PCR と次世代シーケンサを用いた葉緑体DNA一塩基多型の効率的な探索、第61回日本生態学会大会、2014.3.14-18、広島国際会議場(広島県広島市)

[図書](計1件)

花岡 創、加藤 一隆、松下 通也、板鼻 直榮、楠城 時彦、千吉良 治、林木育種センター発行、林木育種の最前線-2011年度～2015年度の主要成果-(防風・防潮効果に優れたテリハボクの育種研究)、2016年、総ページ数52(pp.13-14)

6. 研究組織

(1)研究代表者

花岡 創 (HANAOKA SO)

森林総合研究所・林木育種センター・主任
研究員

研究者番号：40598728

(2)研究協力者

Ching-Te Chien

Taiwan Forestry Research Institute

Researcher