

平成30年6月26日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14588

研究課題名(和文)地球上で最大スケールの輪状種を実証する

研究課題名(英文) Crossing ability in a Pantropical Plant with Sea-drifted Seeds, *Canavalia rosea*

研究代表者

梶田 忠 (KAJITA, Tadashi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：80301117

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)：汎熱帯海流散布植物のナガミハマナタマメについて、西表研究施設のガラス温室内で7地域19集団から得た植物を栽培し、人工交配実験を実施した。2015年から2017年までの3年間に実施した交配実験と観察実験により、(1) 観察できた全ての地域間の組み合わせで結実と種子形成は正常であること、(2) 種子の発芽も正常であること、(3) F1個体の花粉稔性に受粉後生殖隔離の影響が現れる可能性があること等が示された。F1個体に受粉後生殖隔離が見られた組み合わせのうち1つは、先行研究で遺伝子流動の無いことが示された新大陸東西の集団間であり、このことは、本種が輪状種としての性質を持つことを示すものであった。

研究成果の概要(英文)：We cultivated *Canavalia rosea*, which is one of the representative species of "Pantropical Plants with Sea-drifted Seeds," at a glasshouse of Irimote Station. Using plants from 19 populations collected in the seven geographical areas of the world, experiments to test the possibility of Ring Species was carried out. Crossing experiments conducted during the three years from 2015 to 2017 showed that (1) fruit and seed formation were observed in most of the regional populations, (2) seed germination was also normal for most of F1, and (3) pollen fertility of F1 individuals may show the influence of reproductive isolation. One of the cases of infertile pollen formations in F1 individuals was between the populations from the Pacific and Atlantic coasts of the American Continent, which may be consistent with the Ring Species hypothesis of the species.

研究分野：植物学

キーワード：種分化 汎熱帯海流散布植物 輪状種

1. 研究開始当初の背景

研究開始時における本研究の目的は、汎熱帯海流散布植物のナガミハマナタマメが地球上で最大スケールの輪状種であることを実証し、種分化研究に新たな展開をもたらすモデル実験系として提案することであった。研究対象とするナガミハマナタマメは、熱帯域で地球を一周するような、広大な分布域を持つ汎熱帯海流散布植物の一つである。葉緑体遺伝子および核遺伝子を用いた先行研究により、本種は全世界の隣り合う地域間では遺伝子流動を保持しているものの、新大陸の東西の集団間のみで遺伝子流動が無いことが示されていた。我々は、本種のこのような遺伝構造が輪状種（地理的障壁を輪状に囲むような集団構造を持ち、隣接集団間では十分な遺伝子流動が保たれているが、両端の集団間では生殖的隔離が成立して別種に分化した種）の特徴を、地球全体を地理的障壁として示すものであることに注目して、全球スケールの交配実験を核とする本研究計画を着想した。もし、本種が輪状種であるならば、地球上で最大スケールの新たな輪状種の報告となり得るし、また、連続する隣接集団との比較を行うことで、通常では観察の難しい、種が分化するプロセスを直接的に把握できる可能性もある。本研究で対象としたナガミハマナタマメは、交配実験も可能であることから、輪状種による種分化研究における実証実験可能なモデル実験系として、新たな展開を期待するものであった。

2. 研究の目的

本研究の申請時における第一の目的は、熱帯域で地球を一周するような広大な分布域を持つナガミハマナタマメが、特に隣接地域間では遺伝子流動の可能性は維持しつつ新大陸東西の集団で生殖的隔離を成立させているのか、あるいは、先行研究によって示された遺伝構造は、新大陸という地理的障壁によって遺伝子流動が妨げられているだけなのか（つまり、新大陸東西でも交配は可能）という仮説を、全球的実験スケールで検証することだった。そこで、申請時には、(1) 栽培・交配実験による生殖的隔離の程度の定量化、(2) 全世界の集団を対象とするゲノム網羅的解析による遺伝子流動・分化の定量化、(3) 標本調査・現地観察・栽培株観察による生殖隔離に関連する外部形態の変異の把握、によって、輪状種としての性質を検証することを目的とした。また、(2)では、次世代シーケンシングを用いた遺伝的変異の網羅的遺伝解析も計画していた。

3. 研究の方法

栽培実験：我々は、1990年代から世界各地で現地調査を実施し、ナガミハマナタマメの種子を採集して保存していた。これらの種子を播種し、発芽したものを琉球大学熱帯生物圏研究センター西表研究施設のガラス温

室において栽培した。栽培においては、ナガミハマナタマメの分布域を、アメリカ大陸太平洋側、アメリカ大陸大西洋側、西アフリカ、東アフリカ、北インド洋、東南アジア、オーストラリア・南太平洋の7地域に分け、それぞれの地域から少なくとも1つの集団の開花個体を得られるように、種子の播種と栽培を実施した。2015年から開始した播種・栽培実験により、19集団から開花個体を得ることができた。播種した種子のうち、発芽および開花に至り、交配実験に用いることができた最も古い種子は、20年前に採集されたものであった。

交配実験：上記の7地域・19集団の全ての組み合わせでの人工交配実験を、雌雄相互を入れ替えた両方の組み合わせで、1つの組み合わせについて10回以上実施することを目標に実施した。また、(1) 結実数、(2) 得られたF1種子の発芽数、(3) F1個体を栽培して得られた花の花粉稔性を定量することで、受粉後の生殖隔離の指標とした。このうち、結実数は交配実験を行った年度内に、種子の発芽数は年度内から翌年度にかけて、F1個体の花粉稔性はF1個体の発芽・栽培を経てからでないと計測できないため翌年度に得られた。2015年はガラス温室の老朽化と台風の襲来のため、栽培および交配実験が遅れがちであったが、2016年には温室が補修されたために、実験規模を拡大し、多くのデータが得られた。2017年には2015年から2年以上栽培してきた個体の多くが病気等のために枯死するなどの、不測の事態も生じたが、結実数と種子発芽についてのデータは取得できた。F1個体の花粉稔性は、研究期間の終了までには一部のデータしか得られておらず、終了後の2018年も継続して栽培実験と花粉稔性の計測実験を行っている。また、今後もこの実験系を維持して研究を続ける上では、健康な種子を保管して交配実験のタイミングを見計らって栽培を開始するなどの方法が必要だと思われる。

遺伝子解析実験：親個体の全てとF1個体の全て、および、発芽実験に用いた種子からDNAを抽出して保存している。このうち、親個体の全てとF1個体の全てについては、MIG-seq法を用いて、ゲノムワイドな遺伝子型の解析実験を実施した。得られたデータを用いることで、親個体間の遺伝的な差異の大きさを定量できる。また、F1個体が確実に実験に用いた親個体の組み合わせでできたF1であるかどうかを検証できる。

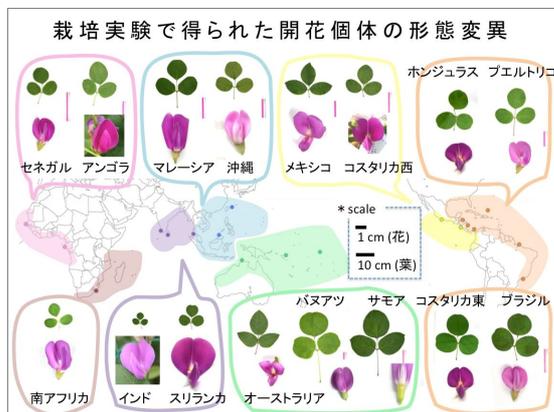
現地調査：研究期間内には、交配実験に使用するための生育個体を国内で得るために、沖縄（本島及び八重山）地域で現地調査を実施した。また、パナマでも現地調査を実施した。

研究協力者：本研究は大規模かつ長期の栽培および交配実験を含むものであり、複数の研究協力者の協力無しには実現できなかったものである。研究に協力して頂いた、梶

田結衣（琉球大）、山本崇（琉球大、鹿児島連大・農）、榮村奈緒子（京大生態研センター）、Alison K S Wee（広西大学）および、熱生研西表研究施設職員である井村信弥、石垣圭一、堤ひとみ（以上、研究協力者の敬称略）には、謹んで感謝申し上げます。

4. 研究成果

栽培実験：3年間の研究期間内に、ナガミハマナタマメを西表研究施設のガラス温室で栽培し、開花個体を用いた交配実験を可能にする、栽培実験系を確立できた。汎熱帯海流散布植物のような広大な分布域を持つ野生植物を、1カ所で栽培して実験に用いるような系は、これまでに例の無かったものである。また同一カ所・同一環境下で栽培実験の結果観察された各集団の葉や花の形態変異は非常に大きい（下図）、遺伝的に決まった形質であると考えられる。これら、形態変異の大きい集団間でも、稔性のある種子を形成できることが示された（後述）。また、本種を種分化研究の実験系として、継続して維持するためのノウハウも概ね確立することができた。



交配実験：7地域・19集団の組み合わせ総数380のうち169組み合わせで、人工交配実験を行うことができた。(1) 結実数、(2) F1種子の発芽数、(3) F1個体を栽培して得られた花の花粉稔性を定量することで、本種の生殖隔離等について、いくつかの新しい知見が得られた。

(1) 結実：実験に行うことができた7地域間および、ほとんどの集団間で、結実が観察された。このことは、結実の有無では明瞭な生殖隔離が示されないことを意味している。つまり、遺伝子流動が見られない新大陸の東西間の掛け合わせであっても、地球の裏側と言えるぐらい離れた2地点間の掛け合わせであっても、人工交配をすれば果実は得られるということである。また、各地域の集団では、自家受粉による果実形成・種子形成についても計測した。実験に用いた全ての集団において自家受粉による果実形成・種子形成が観察され、本種では自家不和合性は発達していないことが明らかになった。

(2) F1種子の発芽：ほとんどの地域間・地域内の掛け合わせで得られたF1種子は発芽し、明瞭な発芽能力の低下も観察されなかつ

た。このことは、F1個体の発芽能力にも明瞭な生殖隔離は現れないことを意味している。一方、自殖で得られた種子の発芽率は他より低い傾向を示した。このことは、近交弱勢の影響で発芽能力が低下するのだろうと考えている。

(3) F1個体の花粉稔性：親個体の花粉の90%近くは細胞質の詰まった正常な形状をしているが、F1株の花粉の40%程度は細胞質の抜けた異常な形状をしていた。また、コスタリカの太平洋側集団と大西洋側集団の掛け合わせで得られたF1個体では、正常な花粉が全く観察されなかった。F1個体の花粉稔性の確認実験は、まだ1年分しか行えておらず、データが不十分な点が否めないが、先行研究で遺伝子流動が示されなかったコスタリカの東西集団だけでなく、マレーシアとセネガルという地理的に離れた集団間の組み合わせでも正常花粉が観察されなかった。このことから、F1の花粉稔性は、本種の受粉後生殖隔離を反映する指標になると考えられる。ただ、新大陸の東西ではあっても、メキシコの太平洋側とコスタリカの大西洋側での掛け合わせで得られたF1個体1個体は、親株と同程度の花粉稔性を示していた。この集団については、今後、遺伝マーカーによる掛け合わせの検証が必要である。

研究発表：研究期間内に本研究の成果を論文として発表する予定であったが、2015年に生じた計画の遅れと、F1の花粉稔性のデータが十分に得られなかったことから、期間内の出版には至らなかった。2018年に必要としているデータが十分量得られれば、速やかに出版する予定である。期間内に、国内の4回の学会で研究発表を行った。

国内外における位置づけとインパクト・今後の展望：本研究は、被子植物の中でも有数の広い分布域を持つナガミハマナタマメを同一場所で栽培する実験系を確立し、交配実験を行うという、国内外で他に例を見ないような実験系を用いた研究である。足かけ20年近くにわたる現地調査で得られた種子から十分な数の開花個体が得られるか、世界各地から得られた植物が同一カ所で栽培できるか、など、多くの挑戦的な試みを含んでいたが、3年間の研究期間で、実験系を確立することができた。また、データはまだ不十分ではあるが、本種が輪状種であった場合に予想される、新大陸東西での受粉後生殖隔離も、F1個体の花粉稔性で観察された。今後もこの実験系を活用してF1個体の花粉稔性の研究や、同様に、F1個体の胚珠の稔性についても研究を継続することにより、これまでほとんど研究されていない植物の輪状種について、多くの新たな知見を提出できると考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 梶田結衣、山本崇、栄村奈緒子、井村信弥、石垣圭一、堤ひとみ、Wee Alison K S、高山浩司、梶田忠 . 全球規模の交配実験で示されたナガミハマナタマメの生殖隔離と近交弱勢. 日本植物分類学会第 17 回大会. 2018 年 3 月 8 日. 金沢歌劇座(石川県・金沢市).
- (2) 梶田結衣、山本崇、栄村奈緒子、井村信弥、石垣圭一、堤ひとみ、Wee Alison K S、高山浩司、梶田忠. 汎熱帯海流散布植物ナガミハマナタマメの全球スケールでの交配可能性. 日本植物学会第 81 回大会. 2017 年 9 月 8 日. 東京理科大学(千葉県・野田市).
- (3) 梶田結衣、山本崇、栄村奈緒子、井村信弥、石垣圭一、堤ひとみ、Wee Alison K S、高山浩司、梶田忠. 全世界のナガミハマナタマメ集団間の授粉後生殖隔離の検証. 沖縄生物学会第 54 回大会. 2017 年 5 月 20 日. 琉球大学(沖縄県・西原町).
- (4) 梶田結衣、山本崇、栄村奈緒子、井村信弥、石垣圭一、堤ひとみ、Wee Alison K S、高山浩司、梶田忠. 「汎熱帯海流散布植物ナガミハマナタマメの全球スケールでの交配実験」. 日本植物分類学会第 16 回大会. 2017 年 3 月 9-12 日. 京都大学(京都府・京都市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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：<http://nesseiken.info>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田 忠 (KAJITA, Tadashi)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授
研究者番号：80301117

(2) 研究分担者

高山 浩司 (TAKAYAMA, Koji)
京都大学・理学研究科・准教授
研究者番号：60647478

(4) 研究協力者

梶田 結衣 (KAJITA, Yui)
山本 崇 (YAMAMOTO, Takashi)
栄村 奈緒子 (EMURA, Naoko)
井村 信弥 (IMURA, Shinya)
石垣 圭一 (ISHIGAKI, Keiichi)
堤 ひとみ (TSUTSUMI, Hitomi)
Wee Alison Kim Shan (WEE, Alison Kim Shan)