

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07526

研究課題名(和文) 海洋島木本種の進化に注目したシマザクラ属(アカネ科)の系統解析と分類学的再検討

研究課題名(英文) Molecular phylogeny and systematics of *Leptopetalum* (Rubiaceae) with special reference to evolution of shrubby species in oceanic island

研究代表者

邑田 仁 (Murata, Jin)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：90134452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アカネ科シマザクラ属は、広義フタバムグラ属の再編により、近縁とは考えられていなかった小笠原諸島固有種を含む太平洋諸島の木本4種と、アジア内陸・海岸～太平洋諸島に分布する草本3種を含む属として再認識されてきた。本研究では、シマザクラ属の分布域を網羅した系統解析に基づいて、木本種の起源と種分化を明らかにし、草本種の分類を刷新することを目的とした。属内の系統関係から木本種は単系統群であるが草本種に内包され、草本種の分布拡大に伴う太平洋諸島での木本化と種分化が示唆された。草本種は1種を除いて単系統群ではなく、形態・タイプ・文献の調査を踏まえて、東アジアに産するものを独立種とし、新組み合わせを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はシマザクラ属の系統分類・進化を明らかにしたもので、特に、古くから議論されてきた小笠原諸島など海洋島における植物の木本化と島嶼における種分化の一例を示した。また、問題が提起されてきた草本種の分類については、系統を踏まえた新たな分類を提示するとともに更なる解決すべき問題点を示した。本研究の成果は、植物多様性の認識に貢献するだけでなく、地域固有種や絶滅危惧種の保全に資するものである。

研究成果の概要(英文)：The phylogenetic relationships among the species of *Leptopetalum* (Rubiaceae) were updated by collecting new samples throughout their distributional range. The obtained phylogenetic tree indicated that four shrubby species were monophyletic but nested among herbaceous species, suggesting the evolution of the shrubby species as a result of the range expansion of herbaceous species. In the herbaceous species, several clades were detected and neither of *L. biflorum* and *L. strigulosum* was monophyletic. Based on a literature review and examination of type specimens, as well as morphological comparison, *L. strigulosum* was widely distributed in the Pacific islands but not in East Asia. In East Asia, a new combination, *L. coreanum* (H. L. & v.) Naiki & Ohi-Toma, was proposed. On the other hand, *L. biflorum* apparently contained a few entities from the morphological and phylogenetic views points, but several taxonomical problems remain to be solved in the revision of *L. biflorum*.

研究分野：植系統分類学

キーワード：系統分類 分子系統解析 シマザクラ属 小笠原 種分化 草本種の木本化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 広義フタバムグラ属の再編とシマザクラ属: アカネ科広義フタバムグラ属 *Hedyotis* s.l. は、亜熱帯～熱帯を中心に 500 種以上が認識されてきたが、分子系統解析と外部形態比較により、13 属に再編・細分化された (Neupane et al. 2015. *Taxon* 64: 299–322)。その結果、シマザクラ属 *Leptopetalum* が復活し、小笠原諸島に固有の 2 種と太平洋諸島に広域分布する 1 種の木本種 [*Hedyotis* subgen. *Leptopetalum* sensu Fosberg & Sachet (1991) の一部] に加えて、これまで近縁であるとは考えられてこなかったアジア内陸・海岸～太平洋諸島に広域分布する草本 3 種 [*Thecagonum* sensu Wikström et al. (2013)] が含まれることになった。このことを踏まえ、我々は、シマザクラ属への帰属が未検討であった小笠原諸島・硫黄列島固有のアツバシマザクラ (*H. pachyphylla*) について、先行研究を踏まえて葉緑体 DNA (*rps16* intron と *petB-petD*)、核 DNA (ITS 領域) による分子系統解析を行い、アツバシマザクラがシマザクラ属に含まれることを示し、新組み合わせ *L. pachyphyllum* を発表した (Naiki et al. 2016. *J. Jpn. Bot.* 91: 337–344)。しかし、その際に得られた草本種の系統関係を踏まえた予備的な標本・文献調査によると、草本種 *L. biflorum* については分類学的な再検討が必要であることが示唆された。また、木本種については、*Hedyotis* subgen. *Leptopetalum* のうち、マリアナ諸島の分類群については、*Leptopetalum* として記載された *L. kanehirae* の取り扱い、*H. leptopetaloides* と *H. marianensis* (= *H. foetida* var. *marianensis*) のシマザクラ属への帰属については保留とされていた。

(2) 海洋島における木本化、小笠原諸島固有種の種分化: 古くから海洋島における被子植物の木本化現象が知られており、生態的解放による適応進化の観点から議論がなされてきた。また、海洋島の固有植物の由来や、島嶼内での種分化 (適応放散) については、系統分類学的・集団遺伝学的な研究が行われてきた。しかし、シマザクラ属については、草本種から海洋島での木本化が単系統的に起こったのか、また小笠原諸島固有 3 種には花形態の相違 (花冠が深裂・反曲 vs. 中裂・筒状) がみられるが、太平洋諸島の *L. foetidum* などとの系統情報が不足しており、その種分化過程については、詳細な解析が必要な状況にあった。

2. 研究の目的

シマザクラ属 *Leptopetalum* には草本種・木本種が含まれるが、本研究では、シマザクラ属の構成種と分布域を網羅したサンプリングに基づく系統解析を行い、草本種と木本種の系統関係を明らかにすることで、(1) 木本種の海洋島における木本化および種分化」にアプローチし、また形態比較、染色体数・ゲノムサイズ比較、標本・文献調査も踏まえることで、(2) 木本種および草本種の分類学的問題点を再検討することを目的とした。

現在、本属の木本種には 4 種 (*L. foetidum*, *L. grayi*, *L. mexicanum*, *L. pachyphyllum*) が認識される。先行研究 (Neupane et al. 2015) では、父島・母島列島の固有種シマザクラ (*L. grayi*) と太平洋諸島の広域分布種 *L. foetidum* が姉妹関係にあり、草本種群に内包されることが示されているが、*L. foetidum* はタイプ産地ではなくマリアナ諸島産個体が用いられ、且つ他種では 4 つの DNA 領域 (*rps16* intron, *petB-petD*, ITS 領域, ETS 領域) を解析しているにも関わらず、*L. foetidum* は 2 領域の解析に留まっていた。一方、Naiki et al. (2016) の系統解析は ETS 領域を除く 3 領域によるもので、小笠原諸島固有 3 種 [シマザクラ、マルバシマザクラ (*L. mexicanum*)、アツバシマザクラ (*L. pachyphyllum*)] が単系統であることを新たに示したが、*L. foetidum* が含まれていなかった他、*L. pachyphyllum* は東京大学・小石川植物園に系統保存される北硫黄島産個体のみで、南硫黄島個体の解析が行われていなかった。本研究では、*L. foetidum* のタイプ産地であるトンガ、木本種が複数記載されるマリアナ諸島での現地調査に加えて、*L. pachyphyllum* 南硫黄島産個体入手することで、本属木本種の系統関係を明らかにし、海洋島における木本化と種分化にアプローチする他、また分類学的扱いが不明なマリアナ諸島産の木本種について検討することを目的とした。

本属の草本種には 3 種 (*L. biflorum*, *L. pteritum*, *L. strigulosum*) が認識されるが、*L. biflorum* には異なる型が含まれることが指摘されており (Fosberg & Sachet 1991. *Allertonia* 6: 191–278)、単系統群にはならないことも示されている (Neupane et al. 2015, Naiki et al. 2016)。その中で、宮古島・八重山諸島～台湾の南端と属島、フィリピン北部海岸域に分布するとされる「シマソナレムグラ」をどの学名に対応させるべきかが未解決である。また、台湾の南端と属島から記載されたタイワンソナレムグラ (*H. taiwanensis*) や、ミャンマーから記載され、標本が 1 枚採取されただけの *Thecagonum parishii* の分類学的な検討が必要である。本研究では、草本種の分布域を幅広く、タイプ産地を含む限り多くの地点からの試料を用いることで、草本種の系統関係を明らかにし、種分類を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料収集と形態比較: 研究期間内に、日本・韓国・台湾・中国・タイ・ベトナム・スリランカ・サイパン・グアム・パラオ・ソロモン・トンガ・インドネシア・フィリピンについて、野外調査あるいは現地研究協力者による試料提供により、草本種・木本種の試料を収集した。インドからの試料入手が不可能であった他、唯一の記録があるミャンマー・モーラマインで *Thecagonum parishii* を見つけることが出来なかった以外は、概ね、分布域と分類群を網

羅するような試料収集を行った。試料については、形態の比較観察を行った。

(2) 系統解析： 入手した試料については、先行研究を踏まえて、葉緑体 DNA (*rps16* intron, *petB-petD*) と核 DNA (ITS 領域, ETS 領域) の塩基配列を PCR・ダイレクトシーケンス (サンガー法) により決定した。一部のサンプルの核 DNA については、ダイレクトシーケンスであらわれた波形データに重なりがあったため、TA クローニング法を行うことで塩基配列を決定した。系統解析では、ILD test を踏まえて *rps16* intron、*petB-petD* と ITS 領域の結合配列に基づき最節約法 (塩基置換と Gap の binary coding をデータとして利用) および最尤法 (塩基置換のみ) を実施した

(3) 標本と文献調査： シマザクラ属の構成種および候補種について、タイプ標本を含む標本の調査を国内外の標本室へ訪問あるいは標本データベースを活用して実施した他、記載文・植物誌など関連文献についての文献データベース調査を実施した。

(4) ゲノムサイズ比較： シマザクラ属のうち、生きた試料を入手できたものについては、フローサイトメトリー法により、葉細胞のゲノムサイズ比較を実施した。

4. 研究成果

シマザクラ属 *Leptopetalum* として認識される全分類群の分布域 (南インド・スリランカ～東南アジア～東アジア～ミクロネシア～メラネシア～ポリネシア) を網羅した地点より採取・入手した試料の葉緑体 DNA (*rps16* intron, *petB-petD*) と核 DNA (ITS 領域) の塩基配列に基づいた系統解析を行うことで、先行研究 (Neupane et al. 2015, Naiki et al. 2016) に比べて格段に詳細な系統関係を明らかにした (図 1)。

本属では、まずインド・マレーシア地域に分布し翼の発達した花托で特徴づけられる草本種 *L. pteritum* が分岐した (図 1: クレード)。本種はこれまで特に分類学的な問題点が指摘されておらず、本属では形態的にも系統的にも明確に区別できる種である。

その他の草本種および木本種が、支持率が低いものの単系統群となり、スリランカ・ベトナム・中国からの *L. biflorum* (クレード) を除く試料が単系統群になることが強く支持された。この単系統群には、多分岐であるために系統関係は明確には出来なかったが、支持率の高い 4 つの単系統群 (クレード) が示された。

クレードには全ての木本種 (4 種) が含まれ、草本種に内包されることが示された。このことは、アジア大陸内陸にある草本種が、海岸域、さらには太平洋諸島に分布を拡大した際に、島嶼域で木本化が生じたことを示唆している。特に、小笠原諸島では現在では草本種は分布していないため、隔離と生態的解放が木本化を促進したと考えられる。またクレードは 2 つに系統分岐しており、花形態の分化に対応していることが明らかになった。サブクレード -1 は父島・母島・硫黄列島に固有で花冠が深裂・反曲する *L. grayi* と *L. mexicanum* から構成されるが、それぞれの種は単系統群にはならず入れ子状で、遺伝的分化の程度が低いことから、小笠原諸島内において比較的最近に種分化が生じたと考えられた。サブクレード -2 は花冠が中裂・筒状で特徴付けられ、硫黄列島に固有の *L. pachyphyllum* と太平洋諸島に広く分布する *L. foetidum* から構成されるが、両種は明確に系統分化しており、葉・花筒・花柱形態によっても区別できる。なお、本研究において新たに南硫黄島の *L. pachyphyllum* を栽培して開花させ花形態を確認したことで、真の *L. pachyphyllum* であると同定できた。一方、先行研究 (Naiki et al. 2016) で解析した北硫黄島由来の *L. pachyphyllum* 系統保存株は、葉形態で類似する *L. mexicanum* であることが明らかになった。小笠原諸島の木本 3 種の系統分化と分布域を踏まえると、小笠原諸島で木本化・種分化が生じた後、太平洋諸島に拡大したのち、*L. foetidum* が分化した可能性が考えられる。*L. foetidum* は単系統群で、タイプ産地のトンガとマリアナ諸島で系統的に分化していることが示されたが、外部形態では区別することができないことから、マリアナ諸島の *H. marianensis* (= *H. foetida* var. *marianensis*) は *L. foetidum* として扱うのが適当であると考えられる。マリアナ諸島での現地調査では、*L. kanehirae* あるいは *H. leptopetaloides* と考えられるものは採取できなかったが、九州大学および東京大学においてタイプ標本を確認した限りでは、両分類群も *L. foetidum* として扱うべきであ

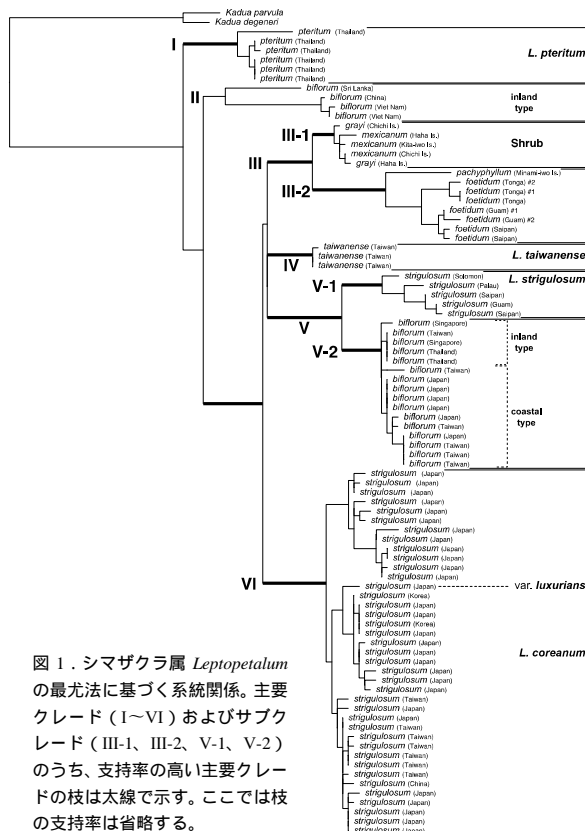


図 1. シマザクラ属 *Leptopetalum* の最尤法に基づく系統関係。主要クレード (I~VI) およびサブクレード (III-1、III-2、V-1、V-2) のうち、支持率の高い主要クレードの枝は太線で示す。ここでは枝の支持率は省略する。

ると考えられた。

草本種 *L. taiwanense* (*H. taiwanensis*) は、最近まで *H. strigulosa* あるいは *H. strigulosa* var. *parvifolia* とされてきたが、Chen & Wu (2019. J. Taiwan Mus. 71: 33–53)において、形態形質に基づいて *Leptopetalum* 属の独立種として扱われた。本種については、当初は、本研究において、形態と系統を踏まえて、新組み合わせとする予定であったが、先に発表されてしまった。しかし、本研究は初めてその系統的位置(クレード)を示し、他の草本種からの独立性を明確に示した。

シマザクラ属の残る草本性・広域分布種2種については、*L. biflorum* はクレード とサブクレード -2、*L. strigosum* はサブクレード -1とクレード に分割され、それぞれ単系統群ではないことが示された。まず後者について、先行研究(Naiki et al. 2016)においては東アジアのみに限られる単系統群とされていたが(本研究でのクレード)分布域を広く解析したところ、マリアナ諸島とソロモン諸島が別系統(サブクレード -1)であることが示された。*L. strigosum* は形態変異が大きいことが知られていたが、詳細な比較検討を行ったところ、サブクレード -1がタイプを含む系統であり、クレード は東アジアで記載された *H. coreanum* (*H. strigulosa* var. *coreana*)に相当することが明らかになった。そこで、*L. coreanum* を *Leptopetalum* 属の第5の草本種とした。またそれに併せて、大東諸島固有のオオソナレムグラを新組み合わせ *L. coreanum* var. *lukurians* とした。なお、*L. coreanum* のシノニムとした *H. strigulosa* var. *parvifolia* の学名について、記載とキュー植物園標本室の標本踏まえて、レクトタイプの選定を行った。

L. biflorum (*H. biflora*) は従来より、特に分類が混沌とした分類群であり、Biju et al. (1992. Rheedea 2: 11–18)がタイプ標本と記載を検討して南アジアに産するものを2種とした他、先行研究(Neupane et al. 2015, Naiki et al. 2016)では限られた試料であるが、単系統群ではないことも示されていた。さらに本研究期間内に、Chen & Wu (2019)が台湾に産するものを3種に分割して認識した。本研究では、南インド・東南アジア・東アジアに産する *L. biflorum* (広義)を採取・解析し、改めて本種が単系統群でないことを確認した。また生育場所により形態に2型(inland type と coastal type と定義)が見られたが、系統分化を反映しておらず、クレード とサブクレード -2の一部にみられる inland type は区別ができなかった。さらに、クレード とサブクレード -2に明確な地理的な区分を見出すことが出来なかった。系統と形態を踏まえると、*L. biflorum* には2つ以上の分類群が含まれると考えられるが、Chen & Wu (2019)の分類は支持されない。現時点では、シマソナレムグラについては *L. biflorum* (広義)とするが、Biju et al. (1992)が扱った南アジアを含めた系統解析を踏まえた分類学的再検討が必要である。

シマザクラ属の木本化、種分化に染色体レベルでの違いがないかを検討したが、解析が可能であった木本種および草本種はいずれも染色体数が $2n = 34$ であった。相対ゲノムサイズ(2C)の比較では、*L. coreanum* を基準とした場合、木本4種のゲノムサイズには違いがみられなかったが、宮古・八重山産の *L. biflorum* は約1.3–1.4倍、サイパン産の *L. strigosum* は約1.2倍のゲノムサイズを持つことが示唆された。宮古・八重山や台湾では複数の草本種が同所的に生育しているが、雑種の存在は確認できなかった。ゲノムサイズの違いが生殖的隔離となっている可能性もある。また、*L. taiwanense* については調べることができていないが、ゲノムサイズを考慮した場合、木本種は東アジアの *L. coreanum* に起源することも考えられたが、今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohi-Toma T., Naiki A., Waddell S., Kato H., Bang V-S & Murata J.	4. 巻 95
2. 論文標題 An updated phylogeny of Leptopetalum and taxonomic treatment of herbaceous species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Botany	6. 最初と最後の頁 141-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内貴章世、邑田仁、加藤詩邦、東馬哲雄
2. 発表標題 シマザクラ属（アカネ科）の系統分類（2）：草本種ソナレムグラ群の識別
3. 学会等名 日本植物分類学会第18回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naiki A., Akai K., Kato H., Komaki Y., Mizunashi K. & Ohi-Toma T.
2. 発表標題 Phylogeny and Taxonomy of Leptopetalum biflorum (Rubiaceae)
3. 学会等名 19th International Botanical Congress at Shenzhen Convention & Exhibition Center (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内貴章世、加藤英寿、邑田仁、東馬哲雄
2. 発表標題 シマザクラ属（アカネ科）の系統分類
3. 学会等名 日本植物分類学会第17回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	東馬 哲雄 (大井哲雄) (Toma Tetsuo) (10376527)	岡山理科大学・自然フィールドワークセンター・准教授 (35302)	
研究 分担者	内貴 章世 (Naiki Akiyo) (30393200)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授 (18001)	