

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14779

研究課題名(和文)種子散布に関する果実形態の進化プロセスの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the evolutionary process of fruit morphology related to seed dispersal

研究代表者

榮村 奈緒子 (Emura, Naoko)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・助教

研究者番号：10762114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：海岸植物のクサトベラには、海流散布能力をもつ果実(コルク型)ともたない果実(果肉型)をもつ個体が存在する。本研究では、この二型の分子レベルの違いを明らかにすることを目的とした。比較トランスクリプトーム解析の結果、開花15日以降の果実において、リグニン生合成に関わる遺伝子の発現量に二型間で違いがみられた。また、西表島産の自殖第一世代のコルク型1個体について、全ゲノム配列を決定した。これを基準配列として、全ゲノム連鎖解析の一つであるQTL-seq法による解析を行い、二型間の配列比較を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

散布形質の果実形態の変異について、個体間変異はクサトベラを除いて、ほとんどの例が果実色多型である。しかし、多く知られている果実色多型は果実食動物の嗜好性に違いをもたらすものが、その違いは餌資源や季節で変動するため、分散能力に明瞭な違いが生じない場合が多い。一方で、クサトベラの二型は海流散布の有無という散布能力と環境嗜好性に明瞭な違いがあるため、選択圧の違いが検出されやすいと期待される。ハビタットシフトにともなう種子散布形質の分子レベルの進化過程を明らかにした研究はほとんどない。本研究はクサトベラを用いてこの過程を明らかにすることで、果実形態の多様性について新たな理解を深める。

研究成果の概要(英文)：Coastal shrub *Scaevola taccada* has the inter-individual fruit dimorphism of a dispersal-related two fruit morphs. Namely, the individuals either produce fruits with a corky mesocarp, or with a pulpy mesocarp, referred to as cork and pulp morphs, respectively. In this study, we aimed to clarify the molecular differences between the two morphs. Comparative transcriptome analysis revealed differences in the expression levels of genes involved in lignin biosynthesis between the two morphs in fruits after 15 days of flowering. In addition, we have determined the whole genome sequence of one type of the first generation of self-built cork in Iriomote Island. Using this sequence as a reference sequence, we are analyzing it using the QTL-seq method, one of the whole genome linkage analysis methods, and comparing the sequences between the two types.

研究分野：生態学

キーワード：種子散布 海岸植物 環境適応 多型

1. 研究開始当初の背景

生物はいかに多様化するのか？進化論の提唱以降、様々な議論が行われてきたが、分子レベルで多様化プロセスを理解できた例は少ない。種子植物の果実形態が多様である理由の一つとして、果実が種子散布の器官であり、特定の散布媒体に適応した形態に進化した結果であると考えられる。また、植物では新たな環境に侵入した場合、果実が本来の散布媒体に適応した形態を失い、新たな散布媒体に適応した形態の獲得とともに種分化したと考えられるハビタットシフトの例が広い分類群で観察される。

この現象は、海洋島にたどり着いた長距離散布能力をもつ生物がその後、新たな環境への適応とともにこの能力を失うというアイランド・シンドロームにも当てはまる (Carlquist 1974)。多くの海岸植物は果実が海流による長距離散布能力をもち、海岸域に広く分布しているが、これらの姉妹種が島の内陸で固有種として種分化している例が見られる。これらの固有種の果実は長距離散布能力を失い、新たな環境である内陸へ適応するために散布媒体のシフトが見られる (例：モンテンボク、*Canavalia* など)。本研究材料である海岸植物のクサトベラでも同様の現象が見られ、南半球のニューカレドニアやフィジーなどの各島に海流散布能力を失い、海流散布から鳥散布にシフトした内陸の固有種が姉妹種として存在する (Howarth *et al.* 2003)。

申請者はこれまでの研究において、海岸低木クサトベラ *Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb. (キク目クサトベラ科) の果実 (図1) に海流散布能力を持つ型 (コルク型) と持たない型 (果肉型) の二型が同一集団内で存在することを発見した (図2, Emura *et al.* 2013)。この二型は海岸タイプによって出現頻度が異なる。すなわち、波による攪乱の大きい砂浜ではコルク型、小さい海崖 (内陸に近い環境) では果肉型の出現頻度が高い。そのため、本種の二型は海岸から内陸へのハビタットシフトの進化過程を理解できるよい材料であると考えられる。



図1. クサトベラの果実

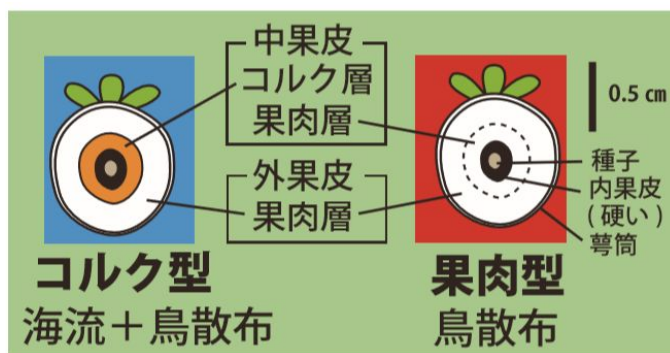


図2. コルク型と果肉型

2. 研究の目的

本研究では、クサトベラの海岸から内陸へのハビタットシフトにともなう果実形態の進化過程の理解を深めるために、二型の原因遺伝子を同定し、この遺伝子の野外での振る舞いを分子レベルで明らかにすること、および異なる環境における種子散布に関わる果実形態の違いを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

・ de novo トランスクリプトーム解析

RNA-seq に使用したサンプルは、西表島北部にある海崖のうなり崎と砂浜の船浦海岸の二つの野生集団で採集した。解析した組織は、開花から 0、5、10、15、20、25、30、35 日目の果実、成熟果実、根、茎、および葉であり、コルク型と果肉型の各 3 個体から採集した。これらの果実は全体をサンプリングした。さらに、開花から 5、10、15 日後の果実については、中果皮 (成熟するとコルク型はコルク層、果肉型は果肉層になる部位) と外果皮を分けてサンプリングした。各サンプルは採集後、ただちに組織用 RNA 安定化溶液 (RNA later) に入れて、調査地に滞在中は冷蔵庫、実験室に戻ってからは実験で使用するまで冷凍庫に保存した。

RNA-seq ライブラリーの作成は、京大大学生態学研究センターの工藤洋教授の下で、RNA 抽出からライブラリー作成まで従来の方法よりも簡便で超低価格で行える Breath Adapter Directional sequencing (BrAD-seq) 法 (Townsend *et al.* 2015) を用いて行った。HiSeq2000 を用いてシーケンシングを行った。リファレンス配列はシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* を使用し、検出されたホモログ遺伝子を解析に使用した。

・全ゲノム連関解析

原因遺伝子を同定するために、全ゲノム連関解析法の一つである QTL-seq 法 (Takagi et al. 2013) を用いた。この手法は、従来の手法と比べて表現型の分離のための F2 個体を作成する必要がないため、本種のような交配後代を得るのに長い年月が必要な木本種に有効である。

まず、基準配列を得るために、全ゲノム配列の決定を行った。全ゲノム配列を決定した個体は、自殖可能な西表島産のコルク型から作成した自殖第一世代を用いた(本種は普通、自家不和合であるが、申請者がこの個体を野外で発見した)。Sequel2 と HiSeq2500 を用いてシーケンサーデータを取得した。この全ゲノム配列の決定は、2019 年度に先進ゲノム支援の助成を受けた。つぎに、石垣島と西表島で採集した「コルク型」と「果肉型」それぞれの 25 個体の葉からゲノム DNA を抽出して、各型のサンプルごとにすべてを均等に混合してバルク DNA を作成した。これを次世代シーケンサーで全ゲノムシーケンスを行い、得られた配列を基準配列と比較して、二型間に存在する SNP の解析を進めているところである。QTL-seq の解析は、2020 年度の先進ゲノム支援の助成を受けた。

・果実形態比較

計測する果実はコルク型 1472 個 (147 個体)、果肉型 778 個 (76 個体) を対象とした。サンプリングは 2013 年から行い、南西諸島の 7 島 (徳之島、沖繩本島、宮古島、石垣島、西表島、南大東島) および小笠原諸島の 1 島 (母島) の 3 つの海岸タイプ (海崖、岩場、砂浜) の合計 18 サイトで行った。各サイトでは各型 10 個体、各個体につき 10 個程度の果実を対象とした。砂浜では果肉型の個体数が少ないため、十分にサンプリングできなかった。採集した果実について、果実サイズ (縦、横、高さ)、核果サイズ、果肉糖度、コルク重量、果実あたりの果肉量などを形質を計測した。

4. 研究成果

・二型間の果実で発現量の異なる遺伝子

de novo トランスクリプトーム解析で成熟段階ごとの果実全体の遺伝子発現量を二型間で比較した結果、開花後 15 日以降の果実において、木化形成関連の遺伝子群でコルク型が果肉型よりも発現量が高い傾向がみられた。これらの遺伝子には、二次細胞壁の形成を制御することが知られている転写因子の NST3 も含まれた。また、開花 5、10、15 日後の中果皮の比較では、二型間の発現量が大きく異なる遺伝子が 10 個程度見つかり、細胞伸長に関わる遺伝子も含まれた。これらの遺伝子のどれかが二型間に違いをもたらしている可能性がある。今後は全ゲノム連関解析の結果をもとに、解析を進める予定である。

・全ゲノム連関解析

基準配列として使用する個体のゲノムアセンブルおよび遺伝子アノテーションまでの解析を、先進ゲノム支援により進められた。アセンブルの結果より、本種のゲノムサイズは 1.25Gb であると推定され、対象個体のヘテロ接合度は 0.225% であった。QTL-seq については、現在も先進ゲノム支援の助成を受けて、解析を進めている段階である。

二型間および海岸タイプ間で違いのある果実形質

いくつかの計測した形質において、海岸タイプ間または型間に違いがみられた。例えば、砂浜のコルク型果実はコルク層重量と核果重量が他の海岸タイプのものよりも大きかった。つまり、砂浜のコルク型は他の海岸タイプのものよりも海流散布に適した形質をもつと考えられた。また、海崖ではコルク型と果肉型は果実サイズが他の海岸タイプよりも小さくなる傾向がみられたが、核果サイズが果肉型でより大きい傾向がみられた。また、果実あたりの果肉量は、果肉型の方がコルク型よりも多かった。これらのことから、果肉型はコルク型よりも鳥被食散布に適した形質をもつことが示された。

引用文献

- Emura N *et al.* (2014) Dimorphism of the seed-dispersing organ in a pantropical coastal plant, *Scaevola taccada*: Heterogeneous population structure across islands. *Ecological Research* 29, 733-740.
- Takagi H *et al.* (2013) QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *The Plant Journal* 74, 174-183.
- Townsley BT *et al.* (2015) BrAD-seq: Breath Adapter Directional sequencing: a streamlined, ultra-simple and fast library preparation protocol for strand specific mRNA library construction. *Frontiers in plant science* 6:366.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榮村奈緒子・古本 良・内貴章世・梶田 忠・工藤 洋
2. 発表標題 海岸植物クサトベラの果実二型 - 鳥による種子散布能力の評価 -
3. 学会等名 九州森林学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榮村奈緒子
2. 発表標題 海岸植物クサトベラの種子散布に関わる果実二型の研究
3. 学会等名 生態学会九州地区会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榮村奈緒子・古本良・内貴章世・梶田忠・工藤洋
2. 発表標題 クサトベラの二型間および環境間で果実形態に違いが生じる要因
3. 学会等名 生態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榮村奈緒子、内貴章世、梶田忠、吉永新、高部圭司、本庄三恵、工藤洋
2. 発表標題 クサトベラの種子散布に関わる果実二型をもたらす形態的差異と遺伝基盤
3. 学会等名 種生物学シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://sites.google.com/site/emuranaokoweb/home>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------