

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650165

研究課題名(和文)モクセイ科における二対立遺伝子型自家不和合性と、それがもたらす性表現の多様化

研究課題名(英文)Diallelic self-incompatibility and diversification of sexual expression in Oleaceae

研究代表者

川北 篤(Kwakita, Atsushi)

京都大学・生態学研究センター・准教授

研究者番号：80467399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物の自家不和合性は、アブラナ科やナス科のように、花に多型がない植物で見られる同形花型自家不和合性と、異花柱性をもつサクラソウ科やアカネ科のように、花に多型が存在する植物で見られる異形花型自家不和合性に大別される。分子生物学的な研究から、前者については分子生物学的な理解が大きく進んでいるが、両者が進化的にどのような関係にあるのかは全く分かっていなかった。本研究ではモクセイ科において、花に多型のない植物における二対立遺伝子型自家不和合性という、これまで知られていなかった新しい自家不和合性を発見し、同形花型自家不和合性と異形花型自家不和合性を統一的に理解するための新しい枠組みを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Self-incompatibility of angiosperm can be largely divided into homomorphic self-incompatibility, as found in Brassicaceae and Solanaceae, and heteromorphic self-incompatibility, as found in Primulaceae and Rubiaceae species with heterostyly. Whereas the molecular mechanism of the former has intensively been studied previously, little is known on how these two self-incompatibility systems relate to each other. In this study, I found that diallelic self-incompatibility, formerly only known from heterostylous plants, is widespread in Oleaceae and propose a new framework by which to understand the relationship between homomorphic and heteromorphic self-incompatibility

研究分野：植物生態学

キーワード：モクセイ科 二対立遺伝子型自家不和合性 S遺伝子 ハシドイ ネズミモチ 同形花型自家不和合性 異形花型自家不和合性

1. 研究開始当初の背景

被子植物の多くは一つの花に雄しべと雌しべをもつ両性花をつけるが、同一の花(または同一個体の花同士)での受粉を避けるために、さまざまな機構を発達させている。その一つが自家不和合性であり、これは自己の花粉を柱頭で認識し、それを拒絶する仕組みである。

被子植物の自家不和合性はこれまでアブラナ科、ナス科、バラ科、ケシ科などでよく研究されており、これらの植物では自己・非自己の認識はS遺伝子という遺伝子が関わっている。S遺伝子には通常、個体ごとに異なる対立遺伝子が存在するため、異なる個体間での受粉では受精が起こるのに対し、同じ個体由来の花粉は柱頭で拒絶反応が起こる。アブラナ科、ナス科、ケシ科ではそれぞれ由来の異なる遺伝子がS遺伝子として機能していることが分かっているため、自家不和合性は被子植物の進化の過程で何度か独立に獲得された類似のメカニズムの総称である。

一方、同じ自家不和合性でありながら、これまで分子進化学的な研究がほとんどされてこなかったものに、異花柱性植物がもつ自家不和合性がある。異花柱性は、同一種内に雄しべが長く雌しべが短い「短花柱花」をつける個体と、逆に雄しべが短く雌しべが長い「長花柱花」をつける個体が半数ずつ存在する性質で、こうした花の二型が実に29もの科で独立に進化している。興味深いことに、ほとんどの異花柱性植物は「同型内不和合」という性質をもっており、これは同じ型の花同士の受粉では、たとえ他個体同士であっても受精が起こらない性質である。同型内不和合性は、自己・非自己の認識に関わるS遺伝子の対立遺伝子が2つのみからなる自家不和合性(二対立遺伝子型自家不和合性)であり、短花柱花、長花柱花それぞれで遺伝子型が異なっていると考えられている。

アブラナ科、ナス科、ケシ科などで見られる自家不和合性と、異花柱性植物で見られる同型内不和合は、同じ自家不和合性でありながら、なぜ前者では種内に多数の対立遺伝子が存在するのに対し、後者ではそれが2つしかないのだろうか?もし異花柱性をもつ植物の集団内に、3つめのS対立遺伝子をもつ変異体が現れた場合、他の個体はそれぞれ集団中の半数の個体としか交配できないのに対して、変異体は集団のすべての個体と交配ができるため有利なはずであるが、なぜそのような変異が広まらないのだろうか?

これらの問いは被子植物における自家不和合性の進化を考える上で極めて重要であるにもかかわらず、これまで真剣に議論されることはなかった。自家不和合性は分子生物学者の研究領域であり、異花柱性植物は生態学者の研究材料という、目に見えない壁が存在していたためだろう。いまこそこの壁を打ち破り、被子植物の自家不和合性を統一的に

理解する必要がある。

2. 研究の目的

我々は、被子植物にはもともとS対立遺伝子が多数からなるタイプの自家不和合性と、S対立遺伝子が2つ以上増え得ないタイプの自家不和合性(二対立遺伝子型自家不和合性)があり、後者のタイプの自家不和合性をもった植物のなかで、不和合な受粉を避けるように雄しべと雌しべの位置を相補的にずらしたのが異花柱性植物だと考えた。もしこれが正しいとすると、二対立遺伝子型自家不和合性でありながらも、花に二型がない植物があってもおかしくない。

モクセイ科は一つの科内で異花柱性がおそらく4度独立に進化しているため、上記の考えを確かめるのに最適な分類群である。もし二対立遺伝子型自家不和合性が、異花柱性の進化に先んじて生じたのであれば、モクセイ科のなかで花に二型のない植物でも二対立遺伝子型自家不和合性が見られるはずである。そこで本研究は、モクセイ科のさまざまな属の植物で受粉実験を行い、二対立遺伝子型自家不和合性がモクセイ科で祖先的かどうかを確かめることを目的とした。また、もし二対立遺伝子型自家不和合性が確かめられた場合、S遺伝子の特定を目指し、祖先的な二対立遺伝子型自家不和合性が異花柱性の進化を促したことを遺伝的に裏付けることを目的とした。

3. 研究の方法

平成26年度と平成27年度の2年間にわたり、以下の調査地でモクセイ科植物計12種を用いて受粉実験を行い、二対立遺伝子型自家不和合性が科内で広く見られるかどうかを検証した(カッコ内は調査対象植物種、印は異花柱性植物)。

京都市(ネズミモチ)
兵庫県長坂山(ネズミモチ)
和歌山県友が島(ネズミモチ)
北海道標茶研究林(ハシドイ)
大津市田上山(ヒイラギ)
大津市田上山(マルバアオダモ)
奄美大島(シマタゴ)
沖縄本島(オキナワソケイ)
対馬(ヒトツバタゴ)
小豆島(ショウドシマレンギョウ)
中国浙江省天目山(コバタゴ)
日本各地の植物園(コバタゴ)
中国海南島(*Myxopyrum pierrei*)

受粉実験には、野外でつぼみをつけた枝を採集し、室内で咲かせた花を用いることにより、虫などが運んだ花粉の影響を除去した。花粉親には5-6個体を用い、それぞれの個体の花粉を15-20個体の別の個体の雌しべに受

粉した。24 時間後、受粉した雌しべを FAA で固定し、70%エタノールで保存した。和合・不和合の判定は、雌しべの組織をアニリンブルーで染色し、蛍光顕微鏡下で観察して花粉管が伸長したかどうか確認することで行った。

以上の受粉実験の結果、ハシドイおよびネズミモチで二対立遺伝子型自家不和合性が確かめられたため（研究成果の項を参照）、これらの植物の花に二型が存在しないことを確認するため、和歌山県友が島のネズミモチ 19 個体を用いて花の 11 項目を計測し、主成分分析を行った。

さらに、S 遺伝子の特定を目指し、まずは S 遺伝子と強く連鎖する一遺伝子多型を見つけることを目的として、和歌山県友が島のネズミモチ 75 個体を用いて RAD-Seq 解析を行った。RAD-Seq 解析は、ゲノム DNA から制限酵素によって切断された DNA 断片をランダムに多く読む手法で、もし受粉実験で見られた不和合性のタイプと一致する一遺伝子多型が見つければ、それは S 遺伝子と強く連鎖していると考えられる。

4. 研究成果

調査対象とした植物のうちのいくつかは開花期を逃してしまったり、室内で花を咲かせることが難しかったなどの理由で十分なデータが取れなかったが、ハシドイ、ネズミモチ、コバタゴで十分な個体数にもとづく実験結果が得られた。

ハシドイ、ネズミモチでは、調査した集団のすべてにおいて、二対立遺伝子型自家不和合性から予想されるように、互いに交配ができない個体からなるグループが 2 つのみ見つかった。同じグループに属する個体同士では、たとえ他個体同士でも交配ができず、これはまさにこれまで異花柱性植物のみで知られていた二対立遺伝子型自家不和合性である。

一方のコバタゴは、興味深いことに自己の花粉では花粉管が伸長しないが、他個体の花粉であればどのような組み合わせでも花粉管伸長が起こった。水差しの枝を用いているため、結実までは確認できていないが、自家花粉で起こった不和合性反応は花粉の発芽時点で拒絶が起こっているため、異なる個体同士で花粉管が伸長したことは、これらの受粉では不和合性反応は起こっていないと推測される。このように解釈すると、コバタゴで見られた自家不和合性は、アブラナ科やナス科で見られる、S 対立遺伝子が多数あるタイプの自家不和合性であり、モクセイ科ではこれと二対立遺伝子型自家不和合性が同居していることになる。

モクセイ科の系統樹上で、ハシドイが属するハシドイ属とネズミモチが属するイボタノキ属は姉妹群をなす。つまり、両属で二対立遺伝子型自家不和合性が見られたことは、モクセイ科では、これらの属の分化が起こる

時間スケールにおいてさえ、S 対立遺伝子の数は増えることなく維持され続けていることを示している。花の形態計測の結果、ネズミモチの集団内で不和合性反応と一致するような花の二型は見出されなかった。

ネズミモチを用いた RAD-Seq の結果、S 遺伝子と連鎖していると考えられる一遺伝子多型は見つからなかったが、これはモクセイ科植物のゲノムサイズがダイズの 2 倍以上と大きいことが原因だと考えられる。今後はリード数を増やす工夫をして、二対立遺伝子型自家不和合性の遺伝的実態に迫る必要がある。

本研究は、被子植物で初めて、花に多型のない種で二対立遺伝子型自家不和合性の存在を明らかにした。これまで二対立遺伝子型自家不和合性は異花柱性植物の専売特許と考えられてきたが、そうではないこと、さらに S 対立遺伝子は負の頻度依存選択によって増え続けると理論的に予測されてきたが、その予測に当てはまらない例があることを示したことが、本研究の重要な成果である。本研究で当初予測したように、被子植物にはもしかしたら本質的に異なるタイプの自家不和合性があり、一方では S 対立遺伝子が多数存在するが、他方では S 対立遺伝子は 2 つ以上増え得ないのではないだろうか。後者のタイプの自家不和合性をもった植物のなかで、不和合な受粉を避けるように雄しべと雌しべの位置を相補的にずらしたのが異花柱性植物だとすると、今後も花に多型のない植物で二対立遺伝子型自家不和合性が次々と見つかる可能性がある。今後はさまざまな科の植物で二対立遺伝子型自家不和合性の存在を検証していくとともに、その遺伝的実態を明らかにし、なぜ S 対立遺伝子が 2 つのまま維持されるのかを明らかにしていく必要がある。

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 9 件)

Toki, W., Kawakita, A. & K. Togashi (2016) Presence of weed fungus in a non-social beetle-fungus cultivation mutualism. *Ecological Entomology* 41: 253-262. DOI: 10.1111/een.12293

Kawakita, A. & M. Kato (2016) Revision of the Japanese species of *Epicephala* Meyrick with descriptions of seven new species (Lepidoptera, Gracillariidae). *ZooKeys* 568: 87-118. DOI: 10.3897/zookeys.568.6721

Kawakita, A., K. Mochizuki & M. Kato (2015) Reversal of mutualism in a leafhopper-

leafflower moth association: The possible driving role of a third-party partner. *Biological Journal of the Linnean Society* 116: 507-518. DOI: 10.1111/bij.12633

Suetsugu, K., R. S. Naito, S. Fukushima, A. Kawakita & M. Kato (2015) Pollination system and the effect of inflorescence size on fruit set in the deceptive orchid *Cephalanthera falcata*. *Journal of Plant Research* 128: 585-594. DOI: 10.1007/s10265-015-0716-9

Suetsugu, K., A. Kawakita & M. Kato (2015) Avian seed dispersal in a mycoheterotrophic orchid *Cyrtosia septentrionalis*. *Nature Plants* 1: 15052. DOI: 10.1038/nplants.2015.52

Yamasaki, E., A. Kawakita & S. Sakai (2015) Diversity and evolution of pollinator rewards and protection by *Macaranga* (Euphorbiaceae) bracteoles. *Evolutionary Ecology* 29: 379-390. DOI: 10.1007/s10682-014-9750-7

Mochizuki, K., A. J. Nagano, H. Kudoh & A. Kawakita (2014) Isolation and characterization of 11 microsatellite markers for *Glochidion acuminatum* (Phyllanthaceae). *Applications in Plant Sciences* 2: apps.1400045. DOI: 10.3732/apps.1400045

Lees D. C., A. Y. Kawahara, R. Rougerie, I. Ohshima, A. Kawakita, O. Bouteleux, J. De Prins & C. Lopez-Vaamonde (2014) DNA barcoding reveals a largely unknown fauna of Gracillariidae leaf-mining moths in the Neotropics. *Molecular Ecology Resources* 14: 286-296. DOI: 10.1111/1755-0998.12178

Suetsugu, K., A. Kawakita & M. Kato (2014) Evidence for specificity to *Glomus* group Ab in two Asian mycoheterotrophic *Burmanna* species. *Plant Species Biology* 29: 57-64. DOI: 10.1111/j.1442-1984.2012.00387.x

〔学会発表〕(計3件)

平野友幹、Shixiao Luo、川北篤「モクセイ科における二対立遺伝子型自家不和合性と異花柱性への進化」第63回日本生態学会、平成28年3月22日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

Tomoki Hirano, Luo Shixiao, Atsushi Kawakita "Diallelic self-incompatibility and the evolution of heterostyly. Kyoto-Bristol-Heidelberg

Plant Sciences Workshop, 平成28年3月3日、京都大学理学部セミナーハウス(京都市)

平野友幹、Shixiao Luo、川北篤「モクセイ科における祖先的な二対立遺伝子型自家不和合性と異花柱性への進化」第62回日本生態学会、平成27年3月19日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

〔図書〕(計2件)

川北篤(2014)奄美大島で発見されたカンコノキとハナホソガの絶対送粉共生. 水田拓編『奄美群島の自然史』東海大学出版部. Pp. 77-92.

有村源一郎、矢崎一史、高林純示、川北篤(2014)『植物アロマサイエンスの最前線』フレグランスジャーナル社. Pp. 51-67.

〔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0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://www.ecology.kyoto-u.ac.jp/~kawakita/kawakita/homu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
川北 篤 (KAWAKITA, Atsushi)
京都大学・生態学研究センター・准教授
研究者番号: 80467399

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号：