

研究成果報告書（第28回学術研究助成）

2021年 4月 6日

公益財団法人 藤原ナチュラヒストリー振興財団
理事長 野村茂樹 殿

所属機関名 京都大学大学院理学研究科
職 名 准教授

氏 名 高山 浩司

1. 研究課題

海流散布植物ハマボウの潜在的近交弱勢と他殖促進機構の解明

2. 共同研究者

山崎 由理（京都大学大学院理学研究科修士課程、現在：日立製作所、野外調査と実験を担当）

3. 研究報告

I. 研究の目的

自家不和合性が不完全な植物は、自己の花粉と胚珠の交配で種子を作ることができる。こうした自家受粉（自殖）による繁殖は、交配相手や花粉媒介者がいない場所でも子孫を残せる点で有利であるが、自殖を繰り返すと遺伝的多様性が減少し、長期的視点からは生存に不利であるとも考えられている。

長距離種子散布植物では、繁殖相手のいない“新天地”への散布が頻繁に生じるため、高い自殖性を示すことが知られている。この傾向は、ベーカーの法則と呼ばれ、繁殖保証の視点からその適応的な意義が説明されてきた。一方、長距離種子散布は“既存集団”への新たな個体の移入の機会にもなるため、長距離種子散布により遺伝的に大きく異なる個体が混在した集団では、潜在的には他殖が有利になると予想される。しかし、長距離種子散布植物における他殖の有利性やそれに伴う他殖促進の機構を議論した研究はほとんどない。

本研究では、海流散布植物のハマボウを研究対象に（1）高自殖率集団における潜在的近交弱勢の検出と（2）花粉管競争による他家花粉の選択的受粉の可能性を検証することを目的とした。

II. 研究の方法

ハマボウ (*Hibiscus hamabo* Siebold et Zucc.) はアオイ科フヨウ属の木本植物で、日本の奄美諸島以北から三浦半島以西、および韓国の済州島に分布する海流散布植物である。これまでに全国各地から集団サンプリングを実施しており、花や花粉粒が大きいこと人工交配実験も容易であることから、本研究対象に選定した。

①自殖率の推定：全国から収集した16集団約150個体を対象に、MIG-seq法を用いたゲノムワイドな一塩基多型解析を行い、集団ごとの遺伝的多様性と近交係数を算出した。

②潜在的近交弱勢の検出：野外調査により、上記の16集団から新たにRNA試料を収集した。本助成金では鹿児島県での野外調査を実施した。野外で植物組織をRNA laterに保存し、実験室に持ち帰りRNAを抽出した。各集団3個体ずつのRNA-seqライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。①の結果をもとに9集団を選定し、塩基配列をアセンブル後、近縁種のムクゲのゲノムにマッピングし、一塩基多型を検出した。

③人工交配実験：兵庫県成ヶ島のハマボウ群落で交配実験を実施した。ナンバリングした3個体を用いて、自家受粉・他家受粉・自家花粉と他家花粉を混合した混合受粉の処理を施した。受粉後は柱頭をアルミホイルで覆い同花受粉を避けるとともに、さらに花全体をメッシュ袋で覆い、約1ヶ月後に果実を回収した。結実した種子は実験室に持ち帰り、一部はMIG-seq法による遺伝子型の決定に使用した。親個体および種子の遺伝子型から混合受粉処理における自家花粉と他家花粉の結実への貢献を算出した。

III. 研究結果

①自殖率の推定：MIG-seq法により取得した一塩基多型情報をもとに、遺伝的多様性 (Pi)、ヘテロ接合度の期待値 (He)、近交係数 (Fis) を算出した (表1)。いずれの値も集団の大きさ (個体クラス) とは有意な相関は見られなかった。

表1. ハマボウ16集団の遺伝的多様性と取得したRNA-seqの概要

採集値	個体数	MIG-seq			RNA-seq			
		個体数 クラス	遺伝的多様性 (Pi)	ヘテロ接合度 (He)	近交係数 (Fis)	平均取得 リード数	有効データ量 (>Q30)	非同義置換 /一塩基多型
鹿児島県奄美大島	<20	10-50	0.222	0.206	0.004	17,017,005	85.6	0.484
鹿児島県屋久島	20-30	10-50	0.078	0.072	0.002	19,049,839	87.3	0.416
鹿児島県種子島	20-30	10-50	0.163	0.142	0.105	14,407,547	87	0.465
鹿児島県南さつま市	20	10-50	0.170	0.159	0.140	17,643,871	87.2	-
宮崎県日南市	50-100	50-100	0.203	0.188	0.193	19,708,065	88.6	0.401
宮崎県延岡市	>100	100-500	0.154	0.139	0.046	16,182,483	88.2	-
大分県臼杵市	>100	100-500	0.091	0.079	-0.054	39,646,816	88	0.468
長崎県平戸市	100	100-500	0.177	0.164	0.021	24,221,523	88.5	0.434
高知県高知市	100	100-500	0.097	0.092	0.101	18,390,929	88.3	-
福岡県糸島市	>1000	>1000	0.089	0.080	0.018	15,970,782	87.4	0.399
兵庫県淡路市	<100	50-100	0.246	0.232	0.086	13,079,043	85.3	0.336
三重県南伊勢町	200-500	100-500	0.159	0.150	0.051	19,374,490	89.2	-
山口県長門市	50-100	50-100	0.145	0.137	0.085	10,924,799	80.9	-
静岡県下田市	400	100-500	0.176	0.166	0.133	18,180,126	87.6	0.476
静岡県磐田市	80	50-100	0.123	0.114	0.022	17,295,450	88.1	-
静岡県西伊豆町	100	100-500	0.184	0.170	0.015	17,095,232	87	-
平均			0.155	0.143	0.060	18,636,750	87.1	0.431

*-未解析

②潜在的近交弱勢の検出：16集団各3個体ずつ合計48個体のRNA-seqデータを取得した (表1)。1個体あたり約1000万-4000万リードの配列情報を取得し、データの精度を示すQ30スコアの平均は87%であった。9集団について一塩基多型全体に占める非同義置換の割合を算出した。この非同義置換の割合と遺伝的多様性や近交係数との有意な相関は見られなかった。

③人工交配実験：自家受粉・他家受粉・混合受粉、および受粉無しで袋掛けの処理をした80個の花のうち、昆虫の食害を受けなかった合計69個の花について、結実率および結実種子数をカウントした。結実率は自家・他家・混合受粉のいずれも70%以上で、処理間に有意な差は見られなかった (図1)。ハマボウは一つの花に約40-45の胚珠があるが、無受粉処理を除

く全ての処理で平均30個以上の種子を作り、処理間に有意な差は見られなかった。予備的に自家・他家受粉由来の種子の重さや発芽率を計測したが、両者に差は見られなかった。

交配実験により得られた種子の遺伝子型をMIG-seq法を用いて決定した。MIG-seq法では数百～千程度の一塩基多型情報を得ることができるが、今回は自家・他家受粉の組み合わせから期待される通りの遺伝子型を示し、かつ欠損データが少ない一塩基多型のみを用いて、混合受粉で得られた種子の花粉親を決定した(図2)。8つの果実の総計では、自家花粉に由来する種子がやや多かったが、統計的には有意な差は見られなかった。個体ごとで見ると、個体1と個体2の花粉の混合時は、胚珠親に関わらず個体2の花粉の結実寄与率が高いことが示された。一方、その他の組み合わせではこのような明確な偏りは見られなかった。

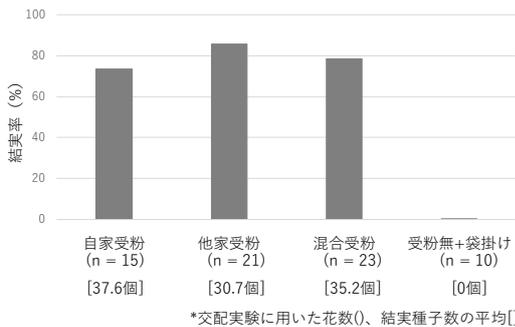


図1. 交配実験の結果

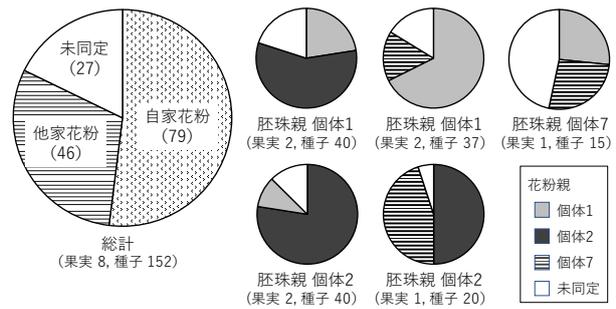


図2. 混合受粉における花粉親の割合

IV. 考察

ハマボウ16集団では近交係数がほぼ0の集団から0.2近い集団まで見られ、ほぼすべての集団が正の値を示した。近交係数が正に偏る要因としては、高い自殖率、分集団構造の内包、同型交配が一般的な要因として考えられるが、ハマボウが自家和合性を持ち、遺伝的多様性が極めて低い種であることから、自殖率が高いことが近交係数に影響していると考えられる。個体数が少ない集団ほど自殖率が高くなるという傾向が多くの植物で知られているが、そのような傾向はハマボウでは見いだすことはできなかった。また、個体数が非常に少なく有害遺伝子の蓄積が顕著な絶滅危惧植物では一塩基多型に占める非同義置換の割合が高いという報告もあるが、ハマボウでは集団サイズと非同義置換の割合には相関が見られなかった。ハマボウは寿命の比較的長い樹木であり、また、集団の個体数の減少が近年急速に生じた可能性が考えられるため、集団サイズと自殖率や非同義置換の割合の相関が見られなかったのではないかと推察している。

交配実験から、ハマボウでは少なくとも種子形成段階までは近交弱勢の影響は見られないことが示された。また、『他家花粉は自家花粉よりも花粉管伸長の速度が速く、そのことが他殖促進機構になっている』という研究当初に立てた仮説も今回の結果からは支持されなかった。一方で、交配数は限られてはいるものの、個体ごとに花粉管伸長の速度が異なる可能性が見えてきたことから、花粉親の組み合わせによっては、多個体の花粉が柱頭に着いた場合には、花粉管伸長速度の違いが自殖-他殖の結果に影響を与える可能性が示唆された。

V. 成果発表

山崎由理、Marina Cho、Ji Young Yang、高山 浩司、南方起源海流散布植物ハマボウの集団遺伝構造と種子散布能力、日本植物分類学会第20回大会オンライン口頭発表、2021年3月

VI. 今後の課題

交配実験の交配数を増やすとともに、花粉管伸長の速度を直接計測することで、個体ごとの花粉管伸長速度の違いについて検証する必要がある。また、理論的な側面から長距離種子散布植物における花粉管伸長の速度のばらつきの進化的意義を検討することも重要である。さらに、本研究により取得したRNA-seqのデータをもとに、有害遺伝子の蓄積に関する多面的な解析を実施し、潜在的近交弱勢の検出精度を高めることが直近の課題である。