

汎熱帯海流散布種から海洋島固有種への種分化
Speciation from "pantropical plants with sea-drifted seeds" into endemic
plants in oceanic islands.

(日本植物学会推薦)

代表研究者 千葉大学 梶田 忠 Chiba University Tadashi Kajita
協同研究者 JSPS 特別研究員 PD 高山浩司 JSPS Fellow (PD) Koji Takayama

Previous studies using chloroplast DNA (cpDNA) reported high level of genetic diversity of *Hibiscus glaber* that is an endemic species to the Bonin Islands. This unusual result for an endemic species of oceanic islands might be caused by repeated gene flow from its presumed mother species, *H. tiliaceus*, which is one of the "pantropical species with sea-drifted seeds." The ability of long distance seed dispersal of *H. tiliaceus* might contribute to repeated colonization into the Bonin Islands. To confirm this new insight into the speciation of an island species involving secondary contact through long distance seed dispersal, we examined the phylogeographic structure of *H. tiliaceus* and *H. glaber* by multiple nuclear genetic markers. A high level of genetic diversity of *H. glaber*, which is comparable to that of *H. tiliaceus*, was detected by both microsatellite analyses and a genealogical analysis by GBSSI (waxy) homologous gene. These nuclear markers also suggested gene flow between the two species. Frequent long distance seed dispersals of *H. tiliaceus* over the Pacific and Indian Ocean were also confirmed by microsatellite markers. The results obtained from nuclear markers confirmed the scenario of secondary contact with gene flow from *H. tiliaceus* in the speciation process of *H. glaber*.

研究目的

海洋島は海によって他の陸地から隔絶された環境にあることから、陸生生物の様々な固有種が分化する場となっている。例えば本州から約 1,000km 離れた小笠原諸島では、自生する植物の 40% 以上もの種が固有種であることが知られている。これら海洋島固有種の遺伝的多様性は、一般に、対応する大陸生の種よりも低く、推定母種と固有種との間の遺伝的距離は他の大陸生の植物の種内変異程度であることが多い。ところが、小笠原諸島固有のモンテンボク(*Hibiscus glaber*) とその推定母種であるオオハマボウ(*H. tiliaceus*) の遺伝的多様性を葉緑体 DNA を用いて比較したところ、モンテンボクの遺伝的多様性は非常に高く、オオハマボウに匹敵する程の多様性を保持していることが明らかになった(Takayama et al. 2005, 2006. *Molecular Ecology*)。オオハマボウは汎熱帯海流散布植物(Pantropical plants with sea-drifted seeds)の一つであり、西アフリカからインド洋を経て南太平洋までの熱帯・亜熱帯域に分布する植物である。東西約 2 万キロにも及ぶ分布域を

持つオオハマボウと、僅か数十 km²の海洋島（島嶼間の距離も数十 km）にしか分布しないモンテンボクが同レベルの遺伝的多様性を持つことは、これまでの島嶼生物学の常識からは想像しがたい結果であった。

葉緑体 DNA を用いてオオハマボウとその近縁種の系統地理学的パターンを解析した我々の研究によると、上記の結果の他にも、1 部の葉緑体ハプロタイプがモンテンボクとオオハマボウで共有されていること、新大陸のみに分布するアメリカハマボウ (*H. pernambucensis*) は大西洋側のほとんどの集団がオオハマボウと共通する葉緑体ハプロタイプをもっていること、オオハマボウはインド洋から太平洋にかけての広い分布域内で海流による種子散布を行っていることが分かってきた(Takayama et al. 2006. *Molecular Ecology*)。これらの事実から、我々は、モンテンボクの種分化過程では、オオハマボウが長距離種子散布によって何度も小笠原諸島に到達・定着することで、両種の二次的接触と種間の遺伝子流動が生じ、その結果、モンテンボクは高い遺伝的多様性を持っているのだろうという仮説を持つに至った。この仮説は、散布能力の高い母種との二次的接触により、広域分布種の遺伝的多様性が海洋島固有種に持ち込まれるという新たな視点に立ったものであるが、根拠となるデータは葉緑体遺伝子のみからしか得られていなかった。そこで本研究では、モンテンボクとオオハマボウの遺伝的分化の実態を、複数の核遺伝子マーカーを用いて系統地理学的に解析することを目的とした。

研究経過

1. 海外調査によるサンプル収集

本研究の実施に必要なモンテンボクとオオハマボウの集団サンプルの多くは、2000 年以降の 6 年間の野外調査によりほぼ収集できていたが、南太平洋域からは十分数のサンプルが得られていなかった。そこで、2007 年 9 月から 10 月にかけて海外調査を実施し、ニューカレドニア島、タヒチ島、ヌク・ヒバ島（マルケサス諸島）でオオハマボウの集団サンプルを採集した。いずれの島でも複数集団から十分な数のサンプルを採集することができた。

2. マイクロサテライトマーカーを用いた解析

オオハマボウを用いて開発した 6 つのマイクロサテライトマーカーを使って、オオハマボウ、モンテンボク、およびその他 3 つの近縁種の遺伝的多様性を解析した。その結果、モンテンボクはアレル多様度でもヘテロ接合体頻度でも、オオハマボウに匹敵する高い多様性を持っていることがわかった（アレル多様度 4.6, ヘテロ接合体頻度 0.602. Table 1）。その他、オオハマボウとアメリカハマボウで得られた結果を用いて、集団のクラスタ解析や **Assignment Test** などの解析を行ったところ、オオハマボウではインド洋と太平洋の地域集団間には大きな遺伝的分化が見られないが、大西洋の集団は種レベルに匹敵するほど分化していることなどが明らかになった。得られた結果は *Molecular Ecology* 誌に発表した。

3. GBSSI 相同遺伝子のジネアロジー解析

マイクロサテライトマーカーを用いて得られるデータは、個体間の遺伝的プロフィールの比較には適しているが、遺伝的分化の歴史的過程を解析することには適していない。そこで、シングルコピー（あるいはローコピー）遺伝子の塩基配列を用いてジネアロジー解析を行った。DNA データベースに登録されている近縁種の配列を用いて 10 数個の核遺伝子領域をスクリーニングし、ジネアロジー解析に適した遺伝子領域を探索した。その結果、GBSSI (waxy) 相同遺伝子がシングルコピーであり、イントロン部位にギャップを持たないなどの扱いやすい特徴を持つことが分かった。そこで、オオハマボウと近縁種について、分布域全体を広く網羅するような地域から得られた 64 集団 80 個体を用いて、GBSSI 相同遺伝子の部分配列 1,508bp によるジネアロジー解析を行った。

まずダイレクトシーケンシングで配列を決定し、波形データの比較から、ホモ接合体の塩基配列を得た。ヘテロ接合体と考えられるものはクローニングを行うことで2つのアリルを分離し、それぞれの塩基配列を決定した。この実験で得られたアリル数は、モンテンボクとオオハマボウの太平洋集団でそれぞれ 23 と 26、塩基多様度は 0.0068 と 0.0063 であり、葉緑体の結果と同じく遺伝的多様性のレベルは同程度であり、近縁他種よりも高い値を示した。また、ジネアロジー（遺伝子系統樹）を構築したところ(Fig. 1)、主要な5つのクレードが認識された。そのうち クレード I はハマボウのみからなるが、それ以外の3つでは主要な1種と他種が混在し、クレードIVではオオハマボウ、アメリカハマボウ、ヤママフウ(*H. elatus*)の3種が混在していることが分かった。オオハマボウとモンテンボクに注目すると、クレードIIがモンテンボク、クレードVがオオハマボウの主要クレードであるが、いずれのクレードにも他方の種が僅かに含まれ、いくつかのアリルは両種で共有されていることが明らかになった。

Table 1 Values of genetic diversity parameters in *Hibiscus tiliaceus* and its allied species based on six microsatellite loci. Abbreviations are as follows. N: number of individuals; A: allelic richness; FST: genetic differentiation; HE: expected heterozygosity; FIS: inbreeding coefficient; HWEP: P value for Hardy-Weinberg equilibrium, asterisk indicates $P < 0.01$. Allelic richness values are standardized for 10 individuals (by discarding all populations with less than 10 individuals).

Taxon	N	A	FST	HE	FIS	HWEP
<i>H. tiliaceus</i>	766	3.5	0.272	0.615	0.526	*
<i>H. glaber</i>	163	4.6	0.051	0.602	0.521	*
<i>H. pernambucensis</i>	528	2.2	0.417	0.359	0.635	*
<i>H. elatus</i>	15	2.0	-	0.603	0.447	*
<i>H. hamabo</i>	133	2.2	0.240	0.243	0.416	*

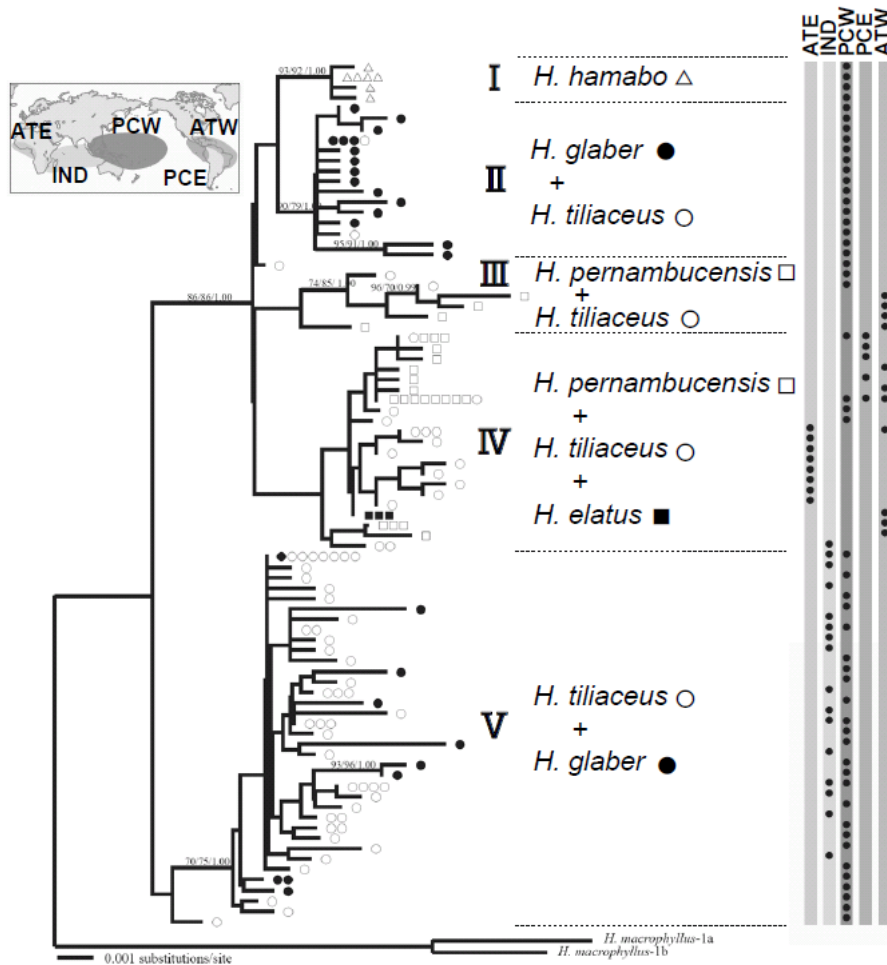


Fig. 1. Gene genealogy of GBSSI homologous gene of *Hibiscus tiliaceus* and its allied species. Allelic nucleotide sequences of 1,508bp obtained from in total 80 samples of *H. tiliaceus* (○), *H. glaber* (●), *H. pernambucensis* (□), *H. elatus* (■), and *H. hamabo* (△) are used to infer gene genealogy by NJ method. Symbols are used to designate the species from which the allele is obtained. Each symbol corresponds to a sequence obtained from an individual. Figures above branched are bootstrap values or posterior probabilities for NJ, MP and Bayes tree in this order (only shown when higher than 70%/70%/0.95). Sampling localities are shown by dots in the right columns for geographic regions: Atlantic East (ATE), Indian Ocean (IND), Pacific West (PCW), Pacific East (PCE) and Atlantic West (ATW).

考察

本研究の結果、マイクロサテライトと GBSSI 相同遺伝子という複数の核マーカーで、オオハマボウとモンテンボクの遺伝的分化の実態が示された。これまでに得られている葉緑体マーカーによる結果とあわせることで、以下のような考察を行った。

1. 長距離種子散布による分布域の維持

陸上植物は種子や果実などの散布体を様々な方法で分散させることで、分布域の維持と拡大を行

っている。しかし、散布体の分散には物理的・生理的要因による制限があるため、ほとんどの植物はごく限られた大きさの分布域しかもっていない。それに対して、オオハマボウのような汎熱帯海流散布植物の分布域は極めて広く、単一種が熱帯域を中心に地球を帯状に取り囲むように分布している。これほど広い分布域は、海流を用いた長距離種子散布によって獲得され維持されていると言われていたが、これまで実証はされてこなかった。

今回の研究の結果、オオハマボウのインドー太平洋域における極めて広い分布域内では、集団間の遺伝的分化が高く無いことが複数の遺伝マーカーによって示された。このことは、オオハマボウが海流を利用した長距離種子散布によって、集団間の遺伝子流動を維持していることを示している。

2. 長距離種子散布による分布域拡大を伴う種分化

汎熱帯海流散布植物のオオハマボウの分布域の端の方には、近縁な4種の分布域が存在している。葉緑体マーカーに系統解析によって、この4種がオオハマボウを母種として分化してきたことが示唆されていた。今回、マイクロサテライトマーカーによるクラスタ解析と、GBSSI相同遺伝子によるジネアロジー解析で得られた結果は、葉緑体マーカーの結果を支持するものだった。また、マイクロサテライトマーカーによる解析では、アフリカ大陸東岸にある集団が種レベルに匹敵するほど、遺伝的に分化していることが示された。

長距離種子散布が陸上植物の種の維持と分化において重要な働きをしていることは、これまでも理論的には指摘されていた。特に、長距離種子散布によって分布域が拡大される過程では、理論的には分布域が広くなればなるほど、分布の中心から遠く離れた集団への遺伝子流動が低下することが予想される。また、分布域が広大になると、分布域内の環境は一様では無くなるため、異なる選択圧の違いが集団の遺伝的分化や種分化の可能性を高めることが予想されていた。今回、オオハマボウで得られた結果は、これら理論的予測に合致する代表的な実例と言えるだろう。

3. 母種との二次的接触による海洋島固有種の高い遺伝的多様性

海洋島の固有種であるモンテンボクの遺伝的多様性は、葉緑体マーカーだけでなく、核マーカーでも非常に高いことが複数のマーカーで確かめられた。また、マイクロサテライトを用いたクラスタ解析と、GBSSI相同遺伝子によるジネアロジー解析(Fig. 1)は、いずれもモンテンボクとオオハマボウの間で遺伝子流動が起こっていたことを示唆した。ジネアロジー解析の結果、主要なクレードの基部にオオハマボウのみで見られるアリルが位置することから、共有アリルは祖先多型によるものではなく、種分化過程における遺伝子流動を表している可能性が高い。以上の結果は、オオハマボウが海流を利用して長距離種子散布を行うことにより、海洋島固有種のモンテンボクと何度も二次的に接触することで種間の遺伝子流動が生じたという、我々の仮説を裏付けるものである。今後、この仮説をより解析的に立証するために、複数の各遺伝子座を用いてIMモデル等を用いた解析を行い、種分化過程における遺伝子流動を検出したいと考えている。

島嶼における種分化は、進化生物学において最も興味をもたれている分野の一つである。我々

の研究データは、汎熱帯海流散布植物の持つ高い長距離種子散布が海洋島固有種の種分化をもたらしただけでなく、固有種の遺伝的多様性を高めるのにも貢献していたことを明らかにした。同様の現象は、西インド諸島の固有種であるヤママフウや、同じく汎熱帯海流散布種であるナガミハマナタマメ (*Canavalia rosea*) からハワイ諸島で分化した固有亜属のマウナロア亜属 (subgen. *Maunaloa*) でも生じている可能性がある。本研究の結果は、島嶼における種分化現象の新しいパターンを明らかにしたとすることができる。

研究発表

口頭発表

1. Koji Takayama. "Phylogeographical study of pantropical plants with sea-drift seed, *Hibiscus tiliaceus*." Seminarios Tecnico-Cienticos Dipeq, Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil, March 2007).

ポスター発表

1. 高山浩司・立石庸一・梶田忠. GBSSI (waxy) 相同遺伝子を用いた汎熱帯海流散布植物オオハマボウの分子系統地理. 日本植物分類学会第6大会. (新潟.2007年3月)。
2. 高山浩司・邑田仁・立石庸一・梶田忠. 「汎熱帯海流散布植物オオハマボウ(アオイ科)の分子系統地理～大洋を越えた種子散布と種分化～」. 日本生態学会第55回大会 (福岡. 2008年3月)。《日本生態学会全国大会賞・最優秀賞受賞》

誌上発表

1. Koji Takayama, Yoichi Tateishi, Jin Murata and Tadashi Kajita. Gene flow and population subdivision in a pantropical plant with sea-drifted seeds *Hibiscus tiliaceus* and its allied species: evidence from microsatellite analyses. *Molecular Ecology*. (in press).