

研究目的

①研究の全体構想及びその中で本研究課題の具体的な目的について、科学研究費の交付を希望する期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか、
 ②当該分野におけるこの研究(計画)の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義、
 ③国内外の関連する研究動向や自らのこれまでの研究実施状況を踏まえ、当該研究の独創性・特色などに関する位置付け(適宜、文献を引用しつつ説明する。文献の引用形式については研究業績欄に準ずること。)、
 ④について焦点を絞り、具体的かつ明確に記入してください。

① 研究の全体構想・具体的な目的・何をどこまで明らかにしようとするのか?

動物媒の花の著しい多様性は、送粉動物への適応を通じて進化したと考えられている。しかし、送粉動物による花形質への淘汰を実測しようとした研究は、必ずしも成功していない。その理由として、花形質の集団内変異が小さいことが指摘されている。本研究では、種間雑種を作り、さまざまな花形質を分離させることによってこの障害を克服し、異なる送粉動物への適応進化の過程を実証的に調べる。



研究材料として、ユウスゲ属の2種をとりあげる。2種は、大型の花を持ち、測定・交配・操作実験が容易である。ハマカンゾウ(図:左側)は朝に開花し、夕方に閉花する昼咲き種であり、匂いのない赤い花をつけ、アゲハチョウ類やハナバチ類に送粉される。ユウスゲ(図:右側)は、夕方に開花し朝に閉花する夜咲き種であり、匂いのある黄色の花をつけ、スズメガ類に送粉される。このよう

な、送粉昆虫に適応した一連の花形質は、送粉シンドロームと呼ばれている。近縁種との比較から、昼咲き種から夜咲き種が進化したと考えられる。しかし、昼咲き種の集団中に、夜咲き・黄花などの突然変異体が単独であらわれても、一般的には不利であり、対照的な送粉シンドロームの分化がどのような機構で実現したかは、大きな謎である。

2種は送粉シンドロームにおいて対照的な分化を遂げているが、雑種には稔性があり、雑種第2世代を作ることができる。平成18年度の夏には、過去4年間をかけて育成を進めてきた雑種第2世代が開花する。雑種第2世代では、開花時間、花色、匂い、花形態など、送粉シンドロームを構成する諸形質が分離する。本研究は、この雑種第2世代を用いて、次の問題に答えることを目的とする。

(1)送粉昆虫(ハナバチ、アゲハチョウ、スズメガ)の訪花は、個々の誘引形質(花色、匂い、花サイズ)、およびその組み合わせに対するどのような選好性を通じて実現するか?このような選好性は、昼咲き集団中にあらわれたユウスゲ型の形質(夜咲き、匂いの生産など)を持つ突然変異に対して、どのような淘汰圧をもたらすか?

(2)送粉シンドロームの対照的な分化は、どのような遺伝子の変化によって生じたか?効果の大きな少数の遺伝子の変化か、それとも効果の小さな多くの量的遺伝子の変化か?形質間の遺伝的相関や、遺伝子間の連鎖は、送粉シンドロームの分化においてどの程度重要だったか?

(1)に答えるために、昼咲き種から夜咲き種への進化の初期過程を、実験的に再現する。具体的には、雑種第2世代の植物を使い、昼咲き種の集団の中に、一部の形質のみユウスゲ型になった変異体が少数混生する実験集団を作る。このような実験集団を野外試験地に置き、送粉昆虫(ハナバチ、アゲハチョウ、スズメガ)がどのような形質に誘引され、結果としてどのような形質を持つ個体の繁殖成功が高いかを調べる。さらにこれらの種子から育った後代の子孫集団中の遺伝子頻度を調べることで、淘汰が実際にどの遺伝子を増やしたかを実測する。

(2)に答えるために、送粉シンドロームの種差の遺伝的背景を、雑種第2世代(F2)における分離、QTLマッピング、候補遺伝子解析という3つの方法で調べる。開花時間・花色・花の匂いの有無が少数の遺伝子座に支配されていることをF2の分離から明らかにする。また、送粉シンドロームを構成する形質についてQTLマッピングを進め、開花時間・花色・花の匂いに加え、花弁長・花筒長・おしべ長などの送粉関連形質がどのようなQTLで支配されているかを明らかにする。さらに、花色・花の匂いを支配する候補遺伝子(R2R3 Myb 遺伝子)の多型解析を行い、マッピングされたQTLとの関係を調べる。

(1)の実験において、(2)で開発したQTLマーカーを用い、送粉昆虫によって花形質が淘汰される過程で、QTLに連鎖したマーカーの頻度も変化することを実証する。

基盤研究(A)B・C)	研究機関名	九州大学大学院	研究代表者氏名	矢原徹一
-------------	-------	---------	---------	------

研究目的(つづき)

②当該分野におけるこの研究の特色・独創的な点及び予想される結果と意義、

本研究計画には、花の多様性や送粉戦略に関する研究を発展させるだけでなく、進化生態学の第四段階を切り開く意義があり、生態学全体への方法論的インパクトが期待できる。

進化生態学は、(1) 最適戦略・ESSモデルにもとづく仮説検証と新たな現象の発見、(2) 量的遺伝学的アプローチによる自然淘汰の実測、(3) 系統樹を活用した種間比較、という3つの段階を経て発展してきた。(1)の仮説検証において、戦略モデルの予測と生物の形質状態が一致したとしても、その一致が淘汰によってもたらされたとは限らない。そこで(2)が発展したが、種差は一般に、集団内の遺伝的変異の幅をこえているので、現在の種内集団に生じている自然淘汰への反応(短期的反応)は、種分化過程で過去の集団に生じた反応(長期的反応)とはおそらく異なるだろう。この弱点を補う方法論として歴史の推定にもとづく(3)が発展したが、この方法は統計的推論にとどまっている。このように、進化生態学は今なお、実証科学という点で大きな弱点を持っている。

本研究計画では、種間雑種の第2世代を活用することで、この弱点を克服する。種間雑種の第2世代では、種において固定している形質(たとえば開花時間・花色・匂いの有無など)が分離するために、種差をもたらした遺伝子への淘汰を実験的に研究できる。この方法は、(2)(3)よりもはるかに高い実証力を持つ。

この方法を始めて採用したのは、Bradshaw et al (1995, Nature: 762-765)である。ハナバチ媒とハチドリ媒の *Mimulus* 属2種を交配し、QTL マッピングを行なった研究は、方法論的な革新をもたらした。しかし、進化生態学分野におけるこの方法の活用は、いまなお限定的なものに留まっている。その理由は、雑種第2代を育成し、QTL マッピングを行なうには時間がかかること、およびこの方法に適した材料(対照的な分化をとげ、なおかつ交配可能な2種)が限られていること、などにある。

本研究では、*Mimulus* 属の研究で用いられた方法が、より一般的な有効性を持つことを示すとともに、次の点で、新しい展開を進める。

(1) 進化生態学のモデルが想定している初期状態、すなわち、野生型の集団中に新たな変異型が少数進入した状態を実験的に再現し、送粉昆虫がもたらす淘汰圧を実測する。

(2) 分離解析・QTL マッピング・候補遺伝解析によって、送粉シンドロームの種差の遺伝的背景を明らかにし、(1)の実験において、特定の遺伝子が淘汰を受けて増えていく過程を実証する。

雑種第一世代(F1)についての研究結果から、開花時間・花色・匂いの変化は、少数の突然変異で生じた可能性が高い。雑種第二世代(F2)の分離解析やQTL マッピングにより、この仮説を検証する。この研究により、送粉シンドロームの種差の遺伝的背景を特定したうえで、昼咲きから夜咲きへの突然変異と、花色・匂いなどの誘引形質の突然変異が組み合わせたり、「適応度の谷」(5ページ参照)を越えて対照的な送粉シンドロームを持つ種が分化していく過程について、実証的な研究を行う。このような研究の成果は、進化生態学を新しい段階に進めるものになるだろう。

③国内外の研究動向・研究実施状況・位置付け

国内では、進化生態学にQTL マッピングや他のゲノム科学の方法論を適用しようとしているラボは、ごく少数である。世界的に見れば、植物だけでも10程度のラボで、進化生態学やその関連分野の研究にQTL マッピングの方法論が活用されている。しかし、cDNA・ESTライブラリーの作成、候補遺伝子解析など、ゲノム科学の方法論を生態学的テーマに本格的に導入しているラボは、まだ少数である。

本研究はこれらのラボと競合するが、とくにDoug Schemskeらによる *Mimulus* 属のプロジェクトは、送粉と関係する花形質をとりあげており、本研究の強力なライバルである。彼らは、ハナバチ媒種とハチドリ媒種の花形質の違いが表現型効果の大きな少数のQTLで説明できること(Nature 376: 762-765, 1995)、花色に関する単一の突然変異が、ハナバチ・ハチドリの訪花頻度を大きく変化させること(Nature 426, 176-178, 2003)を示し、進化生物学全体に大きなインパクトを与えた。しかし、2種は送粉様式と花形質以外に、垂直分布が異なり、生理的な性質においても顕著な分化を遂げている(Angert & Schemske, Evolution 59:1671-1684, 2005)。したがって、花形質が種分化の引き金になったかどうかは疑わしい。一方、ハマカンゾウとキスゲは、開花時間という隔離に直結する形質で異なっている。

本研究は、昼咲き種から夜咲き種への進化の初期過程を、実験的に再現することによって、花形質の変化が種分化を導くことを実証しようとする点に、とくにオリジナリティがある。

従来の研究経過・研究成果 (I 及び II を区別するため、I を記入後は点線を引いて分けてください。)

- I. この研究課題又はこれに密接に関連した研究課題で、研究代表者が従来受けた科学研究費補助金の研究種目、期間(年度)、研究課題名、研究経費を記入のうえ、それぞれの当初の研究計画、研究経過及び研究成果等について、具体的かつ明確に記入してください。
- II. I 以外で、この研究課題又はこれに密接に関連した研究課題で受けた、科学研究費補助金以外の研究費(所属研究機関より措置された研究費、府省・地方公共団体・研究助成法人・民間企業等からの研究費を含む。)におけるそれぞれの研究経過・研究成果等について、名称、期間(年度)、研究課題名、研究者(研究代表者又は研究分担者)氏名、研究経費を記入のうえ、具体的かつ明確に記入してください。
- なお、従来受けた研究費には現在遂行中の研究も含まれます(ただし、4 頁目の研究計画最終年度前年度の応募に記載のものは除く)。

I. 基盤研究(A)、平成 14-17 年度、QTL マッピング法を利用した送粉・生殖システムの実験進化生態学的研究、平成 14 年度：1090 万円、15 年度：1080 万円、16 年度：1040 万円、17 年度：1010 万円
 当初の研究計画：上記の基盤研究(A)は、本研究計画の前段階にあたるものであり、ユウスゲ属を研究材料とする最初の研究プロジェクトである。申請書には、次のように書かれている。

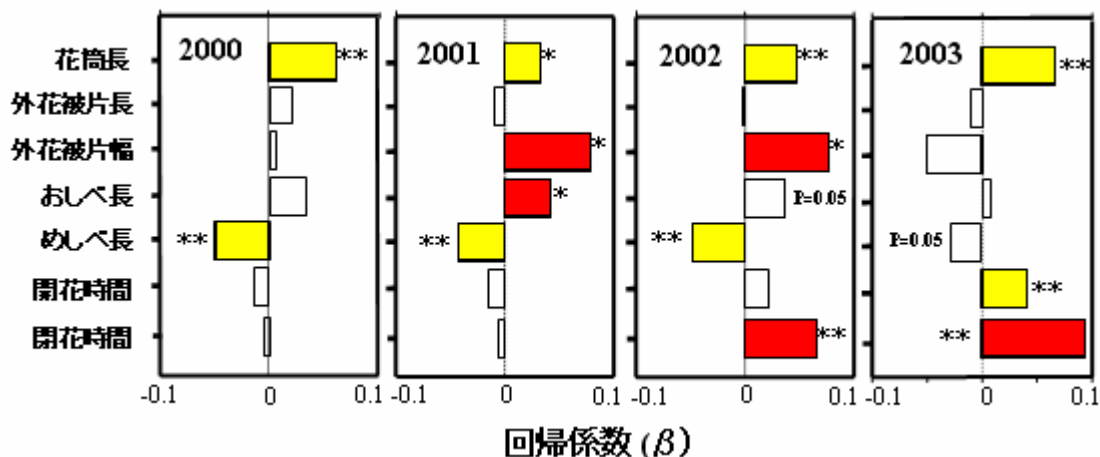
F2 世代を育成することによって、開花時間、芳香、花色の諸形質を遺伝的に分離させ、夜咲きだがオレンジ色の花をつける個体や、昼咲きだがレモン色の花をつける個体などを得る。これらを混生させた野外実験集団を九大の圃場に作り、種子生産と花粉による繁殖成功を調査し、諸形質への自然淘汰の作用を実測する。この集団について 10 年以上の継続調査を計画している。本研究課題の 4 年間では、野外実験集団を確立する。

研究経過及び研究成果：

上記のように、この研究プロジェクトは 4 年前の開始時点から長期的な研究計画を持ち、最初の 4 年間は F2 世代を育成し、より本格的な研究の準備を行なうことを目標にしていた。

この 4 年間に行なった研究とその主要な成果は以下のとおりである。

- (1) F1 世代、F2 世代の育成：ハマカンゾウ・ユウスゲはともに多年草であり、播種から開花までに 2 年を要する。平成 14 年度に交配した種子からの F1 世代が 16 年度に開花した。これらを交配した F2 世代が現在順調に生育しており、来夏には開花する。F 1 世代の観察から、昼咲きは主要には単一の遺伝子に支配される優性形質であること、ただし、一部の個体に昼夜咲き(24 時間開花)や、夜咲きが見られることから、主要遺伝子の下流にあり、これと相互作用する第二の遺伝子があることが示唆された(Hasegawa & al, in press)。匂いは優性形質、アントシアニン合成は劣性形質であることがわかった。
- (2) ハマカンゾウ・ユウスゲの自然雑種集団(花形質が分離した集団)を発見し、4 年間にわたり、花茎ごとに花形質・送粉昆虫の訪花頻度・種子生産を観察し、個々の花形質への淘汰をロジック回帰によって評価した。下図のように、形質によって、ユウスゲ的な状態が有利な場合(黄色)とハマカンゾウ的な状態が有利な場合(赤色)があった(Hasegawa & al, in prep.)。



- (3) F1 のつぼみから cDNA ライブラリーを作成し、1916 個について部分配列を決定し、フィルタリング・クラスタリング解析・Blast 検索を行い、EST ライブラリーを作成した。
- (4) 44 個のマイクロサテライトを単離し、約半数で多型を確認した(Miyake & al, in prep.)。
- (5) 交配実験を通じて、自然雑種集団の近傍では生殖隔離の崩壊が起きていることを明らかにした(Yasumoto & al, in prep.)。

II. 該当なし

基盤研究 (A)・B・C	研究機関名	九州大学大学院	研究代表者氏名	矢原徹一
--------------	-------	---------	---------	------

「研究計画最終年度前年度の応募」(公募要領13頁を参照)として新規応募する場合のみ記入

研究計画最終年度前年度の応募の概要

〔 研究代表者として行っている特別推進研究及び基盤研究のうち研究期間が4年以上で、かつ、平成18年度が最終年度に当たる研究課題の当初研究計画及びこの研究によって得られた新たな知見等の研究成果について具体的かつ明確に記入してください。 〕

研究種目名	審査区分	課題番号	研究課題名	研究期間
			平成 年度～ 平成18年度

特別推進研究又は基盤研究による研究計画及び研究成果

研究計画最終年度前年度の応募をする理由

準備状況等 (I～IIIを区別するため、点線を引いて分けてください。)

- I. この研究課題の準備状況等について、焦点を絞り、具体的かつ明確に記入してください。
 なお、この研究課題に密接に関連した研究課題の成果を発展させる場合は、そのことについて記入しても差し支えありません。
- II. 研究を実施するために使用する研究施設・設備等、現在の研究環境の状況について記入してください。
- III. 海外共同研究者がいる場合の相手国研究者との連絡調整の状況など、研究着手に向けての状況について記入してください。

I. 準備状況

基盤研究(A)による準備状況については「**従来の研究経過・研究成果**」で述べたとおりである。ここでは、基盤研究(A)の研究成果などから得られた新たなアイデアについて記す。

「送粉シンドローム」のような、一連の形質が協調してはたらくシステム(他に、擬態・異型花柱性などがある)の進化は、大きな謎とされている。進化生態学のモデルが通常仮定しているように、効果の小さな突然変異が繰り返しあらわれ、漸進的に改良進化が進むという考えでは、シンドロームの進化を説明することは容易ではない。なぜなら、最適状態の間に「適応度の谷」(適応度の低い中間状態)があるからである。しかし、シンドロームの変化が、効果の大きな少数の突然変異によって実現されるなら、「適応度の谷」を経ずにシステム間の大きなシフトが可能になる。

これまでに得られた結果は、開花時間・匂い・花色の違いがいずれも、効果の大きな少数の突然変異によって生じたことを示している。またF1は、昼咲き・黄花(アントシアニンの欠如)で、匂いを出すので、これらの形質が優性である。

ハマカンゾウ・ユウスゲの自然雑種集団(花形質が分離した集団)で、4年間にわたって花形質への淘汰を調べた結果によれば、送粉昆虫の利用度が低く、なおかつ年変動があれば、ハマカンゾウの状態とユウスゲ的状态の双方が有利になる場合が生じ、多型が維持される。

これらの事実から、ユウスゲ的なシンドロームの進化機構について、次の仮説が導かれる。

- (1) 昼咲き集団中に1回の優性突然変異で黄花、または匂いを出す個体が生じた。
- (2) この集団が、昼行性送粉昆虫の利用度が低く、相対的にスズメガの利用度が高い環境にあれば、黄花、または匂いを出す変異個体は有利となり得る。
- (3) 夜咲きの劣性対立遺伝子は、ヘテロ接合の状態では昼咲き集団中に低頻度で維持され得る。(2)の集団において、遺伝的浮動や近親交配により、夜咲きのホモ接合体があらわれれば、淘汰上有利となり、夜咲きの対立遺伝子が集団中に広がる。

花色・匂いのいずれか一方が、夜咲きと結びついて進化すれば、他方の変異体も有利になりえる。この、花色・匂いが独立に進化した可能性のほかに、両者が何らかの遺伝的相関によって進化した可能性が考えられる。具体的には、連鎖した調節遺伝子ファミリーが色と匂いの両方の制御に関与している可能性を考え、このアイデアを検証する計画である。

II. 研究環境

ゲノム科学の方法を使ってDNA・RNAを調べる研究環境は整っている。また、多くのF1, F2個体を維持する圃場も整っている。花の匂い・色素の定量分析に必要な機器が不足しているので、購入する。

III. 海外共同研究者：なし

研究分担者に分担金を配分する必要性 (公募要領8頁を参照)

(応募情報(Web入力項目)の「分担金の配分」欄で「有」に該当する場合は、必ずその理由を記入してください。)

研究計画・方法

〈平成18年度の計画と19年度以降の計画に分けて記入してください。また、以下の事項について、焦点を絞り、具体的かつ明確に記入してください。その際、I及びIIを区別するため、Iを記入後は点線を引いて分けてください。〉

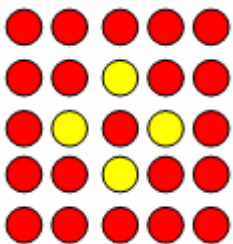
- I. 研究目的を達成するための研究計画・方法について、経費と研究計画との関連性及び研究代表者、研究分担者の役割が明らかとなるように記入してください。なお、研究計画を遂行する上で、予期される問題点に対する配慮、問題が生じたときの対応策を含めて記入してください。
- また、①研究計画のいずれかの年度において、「設備用品費」、「旅費」又は「謝金等」のいずれかの経費が90%を超える場合には、当該経費の研究遂行上の必要性について記入してください。②海外共同研究者や科学研究費への応募資格を有しない企業の研究者等（公募要領7頁を参照）との共同研究を含む場合には、その必要性及びこれらの者とのどのように共同して研究を実施していくのかについて記入してください。
- II. 社会的コンセンサスが必要とされている研究、生命倫理・安全対策に対する取組が必要とされている研究など関連する法令等を遵守しなければ行うことができない研究を含む場合には、対策としてどのような措置を講じようとしているのか具体的に記入してください。（該当者のみ）

研究計画・方法（平成18年度）

(1) 実験集団を用いた送粉昆虫の訪花行動の観察（大学院生との共同研究）

ハマカンゾウ集団中にF1個体が少数あらわれた状態を実験的に設定し、この実験集団を用いて、ポリネータの訪花行動を観察する。この結果をもとに、次年度のF2を用いた実験を計画する。

野外実験は、九大理学部圃場で行う。この圃場では、ハマカンゾウの主要な送粉昆虫であるアゲハチョウ類とクマバチが昼に、およびユウスゲの主要な送粉昆虫であるスズメガ類が夕方以後に訪花する。ハマカンゾウ・F1はともに昼咲きだが、開花が19-24時なので、スズメガ類にも訪花されることがある。



21個体のハマカンゾウ（●）集団の中央にF1（●）を4個体置き（左図）、どの個体の花にどの送粉昆虫が何回訪問したか、どの花からどの花へ移動したかをウェブカメラにより記録する。摘花、または実験個体の入れ替えにより、個体あたりの花数をそろえる。左図の実験集団を3つ設定し、隣接した場所に置く。

20時に各花の葯を採集し、残存花粉数を粒子計数機で数える。摘花した花の花粉生産数との差をとって花粉持ち去り数を推定する。

結実後に果実を採集し、種子数を数える。周囲と中央を除く8個体（ハマカンゾウとF1各4個体）について、DNAマーカーをもちいて種子の花粉親を判定する。

これらの場所には、固有のマーカー遺伝子を持つ個体を配置する。

なお、実験に用いるF1個体には、これまでの交配によって、ハマカンゾウと戻し交配をしても種子稔性が低下しないことが確認された系統を用いる。

アゲハチョウ類とクマバチはハマカンゾウに、スズメガ類はF1に訪花する頻度が高いと予想される。この選好性の程度をウェブカメラの記録から量的に評価する。

上記の実験とは別に、それぞれの送粉昆虫が1回の訪花で持ち出す花粉の比率を推定しておく。この比率をもとに、各花の残存花粉数の期待値を求め、観察値と比較し、送粉昆虫に固有の比率で花粉が持ち出されるというモデルの妥当性を検証する。

上記の結果から、昼行性・夜行性送粉昆虫の相対的利用度に応じて、ハマカンゾウとF1の繁殖成功率がどのように変化するかを評価する。Miyake & Yahara (OIKOS 86: 233-240, 1999)が示したように、夜行性送粉昆虫の送粉効率は高いが、昼行性送粉昆虫の訪花は、夜行性送粉昆虫が持ち出せる花粉数を減らす。したがって、昼行性送粉昆虫の訪花頻度が高い状況では、F1の繁殖成功は低いと予想される。しかし、昼行性送粉昆虫の訪花頻度が低く、かつ夜行性送粉昆虫の訪花頻度が高い場合には、F1の繁殖成功がハマカンゾウのそれを上回る条件があると予想される。この予想を検証し、論文にまとめる。

(2) F2における分離にもとづく花色・匂い・開花時間の遺伝的基礎の解析（大学院生との共同研究）

F1と自然雑種集団の観察から、花色は表現型効果の大きな1個の遺伝子によって制御されていることが強く示唆される。F2世代での分離データをもとにこの点を立証する。

ユウスゲとF1の花はオシメン・リナロールなどのテルペン類を放出するが、ハマカンゾウの花はごく微量のオシメンを放出するだけである。この結果から、テルペン類の有無は、テルペノイド合成系のスイッチを入れる調節遺伝子に生じた単一の変異だと考えている。18年度には、F2が開花するので、F2の花が放出する芳香成分をガスクロマトグラフィで分析し、形質の分離を調べ、この仮説を検証する。

F1個体のほとんどは昼咲きだが、一部に昼夜咲き（24時間開花）個体が出現する（Hasegawa & al, in press）。この事実から、開花時間の違い（昼咲き・夜咲き）には、大きな効果を持つ1個の遺伝子座と、それに相互作用する第二の遺伝子座が関与していると考えている。第二の遺伝子座に、24時間開花を促す劣性対立遺伝子が低頻度であると考えれば、F1での表現型が説明できる。この2遺伝子座仮説を、F2世代での分離の観察によって検証する。

以上の結果について論文をまとめ、送粉シンドロームを構成する花色・匂い・開花時間の違いがいずれも少数の遺伝子の変化で説明できることを報告する。

研究計画・方法(平成18年度(つづき))

(3) 花形質のQTLマッピング(実験補助員を雇用して進める)

F2世代の植物について、花色・匂い・開花時間だけでなく、花弁長・花筒長・おしべ長・めしべ長など、さまざまな花形質を測定する。また、マイクロサテライト・AFLPマーカー・ESTライブラリーから得られたマーカーを用いて、これらのDNA多型と、花形質の相関を調べる。相関が見つかれば、花形質に関与する遺伝子座(QTL)の近傍に位置するマーカーが得られたことになる(相関マッピング法)。この方法は、区間マッピング法(下記)よりもQTLの検出率は低い、全体のマッピングが不十分な段階でも有効な方法である。

さらに、マイクロサテライト多型とAFLPの連鎖関係を網羅的に調査し、これらのマーカーによる連鎖地図の作成を進める。ハマカンゾウ・ユウスゲはゲノムサイズがかなり大きな植物なので、この連鎖地図作成には、少なくとも3年間を必要とする。

ある程度のマーカー数が得られた連鎖群を用いて、区間マッピング法にもとづくQTLマッピングを進める。区間マッピング法とは、隣接マーカー座で挟まれた区間にあるQTLを検出する方法である。QTLを検出する統計的方法は、日進月歩である。汎用統計ソフトRへのadd-onパッケージであるR/qt1を用い、新しい進歩を取り入れながら、解析を進める。

この研究の成果を公表できるのは早くとも3年後であるが、種分化に関わる花形質の遺伝的背景をQTLマッピングで調べた研究はまだごく少数である。研究が先行しているMimulus属では、花色という誘引形質に焦点が当てられているが、本研究では誘引形質に加え、開花時間という生殖隔離に直接的な効果を持つ形質を扱っている。QTLマッピングによって(2)の結果を補強し、開花時間の違いが2つの遺伝子で制御されていることを明快に立証できれば、その研究成果は高い評価を受けるはずである。

(4) 花の色素・芳香物質の生産を制御する候補遺伝子の解析(ポスドクを雇用して進める)

キンギョソウなどを使った研究から、花のアントシアニン合成は、R2R3型Myb遺伝子ファミリーに属す転写因子(合成系酵素遺伝子の転写のON/OFFを決める調節遺伝子)によって制御されていることが明らかにされた。また、ペチュニアの研究から、花の匂いの生産を制御している転写因子も、R2R3型Myb遺伝子ファミリーの一員であることが明らかにされた。このような研究から、R2R3型Myb遺伝子重複をおこし、重複したコピーが変異することで、特定の器官に、特定の物質を生産するシステムが進化した可能性が高まっている。

ユウスゲが持つ黄色の花は、アントシアニンが合成されず、カロテノイドだけが生産されている状態である。黄花は優性形質なので、ユウスゲやF1は、アントシアニン合成を抑制する転写因子を持つものと考えられる。また、F1の花が匂いを持つことから、ユウスゲやF1は、匂い物質の合成を促す転写制御因子を持つものと考えられる。これらの転写因子の候補遺伝子として、花特異的に発現するR2R3型Myb遺伝子を単離する計画を進める。

ハマカンゾウ・ユウスゲの花弁から得たmRNAを用いて、R3領域を増幅するように設計された混合プライマー(Rabinowicz & al, 1999)を使って、RT-PCR(mRNAからcDNAを合成させ、これを鋳型として行うPCR)を行う。PCR産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、期待されるサイズ(約180bp)の断片を切り出し、クローニングし、配列を決定する。既知の植物R2R3型Myb遺伝子の配列と比較し、相同性から植物R2R3型Myb遺伝子と判断されるクローンを決定する。

すでに作成しているcDNAライブラリーから、上記のクローンをプローブとして、植物R2R3型Myb遺伝子のcDNAを単離し、配列を決定する。

(5) 昼咲き種から夜咲き種への進化に関するモデル

(1)~(3)の研究で得られた結果にもとづいて、昼行性送粉昆虫の利用度が低い環境下で、夜行性送粉昆虫への適応が進み、昼咲き種から夜咲き種が分化する条件を、数理モデルを使って検討する。

ここで検討するのは、進化生態学の第一段階のモデル(最適化・ESSモデル)や第二段階のモデル(量的遺伝モデル)とは異なり、開花時間、誘引形質(花色、匂い、花サイズ)に対して送粉昆虫が与える淘汰圧の性質(たとえば複数の誘引形質の相乗効果)と、これらの花形質の遺伝的背景(強い効果を持つ少数の遺伝子と、より弱い効果を持つQTLの組み合わせ)とを考慮に入れたモデルである。

候補遺伝子研究から、遺伝子重複による進化の介在が明らかになれば、この点もモデルに組み入れる。

これらの情報を取り入れることによって、より現実的で、予測力の高いモデルを作り、研究成果全体の総合化をはかる。

研究計画・方法（平成19年度以降）

(1) 実験集団を用いた送粉昆虫の訪花行動の観察と送粉昆虫による淘汰の実測（大学院生と共同）

平成18年度と同じ実験配置による、F2個体を利用した実験を行なう。平成18年度の実験では、F1を用いるために、花色と匂いの効果を分離できない。平成19年度には、18年度において花形質を測定し、QTLマッピングのためにマーカー遺伝子型を決定したF2個体が利用できるため、各花形質の単独効果を調べることができる。

平成18年度の実験でF1を置いた位置に、①黄花＋匂い無し＋昼咲き、②赤花＋匂い有り＋昼咲き、③赤花＋匂い無し＋夜咲き、という形質状態を持つF2個体を置いた3つの実験区を作り、ハマカンゾウが持つ形質状態から、花色・匂い・開花時間だけが単独でユウスゲ型に変化した場合に、アゲハチョウ類・クマバチ・スズメガ類がこれらの形質にどのような選好性を示すかを調べる。

さらに、平成20年度には、F1を置いた位置に、赤花＋夜咲き＋黄花、赤花＋夜咲き＋匂い、という形質状態を持つF2個体を置いた実験区を作り、夜咲きと誘引形質の相互作用の効果を調べる。

これらの実験から、アゲハチョウ類・クマバチ・スズメガ類の形質選好性を量的に評価し、これらの昆虫の選好性が、昼咲き種から夜咲き種への進化の初期過程で、各花形質の変異にどのような淘汰圧をもたらしたかを評価する。

実験に用いたハマカンゾウ・F2個体の種子を播き、芽生えを用いてマーカー遺伝子型を決定し、送粉昆虫がもたらす淘汰圧によって、黄花、匂い有り、夜咲きの各QTLマーカーの頻度が、予測どおりに増えていることを確認する。

(2) 花形質のQTLマッピング（実験補助員を雇用して進める）

平成18年度に引き続き、マイクロサテライトとAFLPマーカーによる連鎖地図の作成を進め、区間マッピング法にもとづくQTLマッピング作業を継続する。

論文公表は最終年度以後になるが、ある程度の結果が得られた段階で、国内外の学会で発表し、進捗状況についての評価を受けながら研究を進める。

ハマカンゾウ型の昼咲き種から、夜咲き種ユウスゲが分化する初期過程では、開花時間と誘引形質（花色・匂い）の遺伝子座における、表現型効果の大きな少数の突然変異が、重要な役割を果たしたと考えられるが、これに続く過程では、スズメガによる送粉効率を高めるような形質が選択されただろう。具体的には、ユウスゲではハマカンゾウに比べ、花卉が小型化し、おしべやめしべが短くなる一方で、花筒長は長くなっている。花卉サイズ・おしべ長・めしべ長は、花全体のサイズを大きくするQTLの変化であり、一方、花筒長はプロポーションを変化させる別のQTLの変化だと考えられる。このような予測を、マッピングの結果にもとづいて検証する。

(3) 花の色素・芳香物質の生産を制御する候補遺伝子の解析（ポスドクを雇用して進める）

単離されたR2R3型Myb遺伝子について、アンチセンスRNAを作成し、これをプローブとして、花卉と葉から得たmRNAに対してハイブリダイゼーション（ノーザンブロット解析）を行い、花卉に特異的に発現されているR2R3型Myb遺伝子を特定する。これらのR2R3型Myb遺伝子について、ハマカンゾウとユウスゲの間でcDNAの配列を比較し、アミノ酸置換が生じているR2R3型Myb遺伝子をしばりこむ。アミノ酸置換が生じているR2R3型Myb遺伝子が見つかれば、これらは花色や匂いの制御に関与している転写因子の有効な候補となる。これらの置換をSNP（単一ヌクレオチド多型）として検出できるように、プライマーを設計し、連鎖地図上にマッピングする。QTLマッピングにおいて同定された、花色・匂いに関するQTLの近傍にマップされれば、候補遺伝子の変異によって花色（または匂い）が変化したことが、強く支持される。

(4) ユウスゲ属の分子系統（大学院生と共同）

ユウスゲ属は東アジア固有で、日本と朝鮮半島に大部分の種が分布する。夜咲き種のユウスゲは、分類学的には単一の種とされているが、昼咲き種から並行進化した可能性も示唆されている。本研究が実証を試みる昼咲きから夜咲きへの進化過程が、並行的に繰り返されたかどうかは、興味深い問題である。この可能性を検証するために、複数の遺伝子の配列を用いて、ユウスゲ属の分子系統学的研究を行う。

(5) 総説の執筆

上記の研究から得られた結果を総合し、昼咲き種から夜咲き種への進化に関するモデルを完成させ、対照的な送粉シンドロームの分化に関する総説を執筆する。

設備備品費の明細			消耗品費の明細	
[記入に当たっては、基盤研究(A・B・C)(一般)研究計画調書作成・記入要領を参照してください。]			[記入に当たっては、基盤研究(A・B・C)(一般)研究計画調書作成・記入要領を参照してください。]	
年度	品名・仕様 (数量×単価) (設置機関)	金額	品名	金額
18	ガスクロマトグラフィー・島津GC-2014AF/SP L (1×1,800千円) (九州大学)	1,800	マイクロサテライトプライマー	1,040
	高速液体クロマトグラフィー・島津HPLCシステム (1×2,750千円) (九州大学)	2,750	BigDye Terminatorシーケンシングキット	2,300
	ウェブカメラ・AXIS 211 (4×80千円) (九州大学)	320	AFLPプライマー	390
	Genotyping ソフト・アプライド GeneMapper v. 3.0 (1×1,200千円) (九州大学)	1,200	AFLP ligationキット	1,600
			DNeasy	214
			Ex Taq	176
			cDNAライブラリー分析	250
			その他試薬	1,000
	小計	6,070	小計	6,970
19	該当なし		DNA分析用プライマー・試薬 (18年度と同じ7品目)	5,970
			その他試薬	1,000
	小計	0	小計	6,970
20	該当なし		DNA分析用プライマー・試薬 (18年度と同じ7品目)	5,970
			その他試薬	1,000
	小計	0		
基盤研究(A) B・C) 研究機関名 九州大学大学院 研究代表者氏名 矢原徹一				

研究業績

最近5年間に学術誌等に発表した論文、著書のうち本計画に関連する重要なものを選定し、現在から順に発表年次を過去にさかのぼり、発表年(暦年)ごとに点線で区切り、かつ、研究組織欄に記入された研究者ごとに記入してください。なお、この頁で記入できない場合は、裏面を使用してください。また、学術誌へ投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。

発表年	研究代表者・ 分担者氏名	発表論文名・著書名 (論文名、著書名、著者名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)について記入してください。) (以上の各項目が記載されていれば、項目の順序を入れ替えても可。著者名が多数にわたる場合は、主な著者を数名記入し以下を省略(省略する場合、その員数と、掲載されている順番を○番目と記入)しても可。なお、研究代表者及び研究分担者にはアンダーラインを付すこと。)			
2005以降	矢原徹一	<p>●Hasegawa, M. & <u>Yahara T.</u> 2005. Bimodal distribution of flowering time in a natural hybridizing population of daylily (<i>Hemerocallis fulva</i>) and nightlily (<i>H. citrina</i>). Journal of Plant Research, in press.</p> <p>●Ohtsuka, A., Watanabe, M., <u>Yahara, T.</u> 2005. Inbreeding coefficients in six species of <i>Ainsliaea</i> and two species of <i>Pertya</i> (Asteraceae). Plant Systematics and Evolution 251: 143-151.</p>			
2004	矢原徹一	<p>●Masuda M, <u>Yahara T.</u>, Maki M. 2004. Evolution of floral dimorphism in a cleistogamous annual, <i>Impatiens noli-tangere</i> L. occurring under different environmental conditions. Ecological Research 19 (6): 571-580.</p> <p>●Murayama K, <u>Yahara T.</u>, Terachi T. 2004. Variation of female frequency and cytoplasmic male-sterility gene frequency among natural gynodioecious populations of wild radish. Molecular Ecology 13 (8): 2459-2464.</p> <p>●Yamaguchi N, Kawano KK, Eguchi K, <u>Yahara T.</u> 2004. Facultative sex ratio adjustment in response to male tarsus length in the Varied Tit <i>Parus varius</i>. Ibis 146 (1): 108-113.</p>			
2003	矢原徹一	<p>●Saunders, K., Bedford, I. D., <u>Yahara, T.</u>, and Stanley, J. 2003. The earliest recorded plant virus disease. Nature 422: 831.</p> <p>●Matsuda, H., Serizawa, S., Ueda, K., Kato, T. and <u>Yahara, T.</u> 2003.. Assessment of the impact of the Japanese 2005 World Exposition project on the extinction risk of vascular plants. Chemosphere 53: 325-336.</p>			
2002	矢原徹一	<p>●Ohashi, K. and <u>Yahara, T.</u> 2002. Visit larger displays but probe proportionally fewer flowers: counterintuitive behaviour of nectar-collecting bumblebees achieves an ideal free distribution. Functional Ecology 16: 492-503.</p> <p>●Kinoshita M, Kasuya E, <u>Yahara T.</u> 2002. Effects of time-dependent competition for oviposition sites on clutch sizes and offspring sex ratios in a fig wasp. Oikos 96 (1): 31-35.</p> <p>●Yamaguchi N, <u>Yahara T.</u> 2002. Factors causing variation in flock size: Decision making to join a foraging flock. Ecological Research 17 (3): 361-371.</p> <p>●Mishima, M., Ohmido, N., Fukui, K. and <u>Yahara, T.</u> 2002. Trends in site-number change of rDNA loci during polyploid evolution in <i>Sanguisorba</i> (Rosaceae). Chromosoma 110: 550-558.</p>			
基盤研究(A・B・C)		研究機関名	九州大学大学院	研究代表者氏名	矢原徹一

研究業績 (つづき)		
発表年	研究代表者・ 分担者氏名	発表論文名・著書名 (論文名、著書名、著者名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)について 記入してください。)
2001	矢原徹一	<p>●Funayama, S., Terashima I., and <u>Yahara T.</u> 2001. Effects of virus infection and light environment on population dynamics of <i>Eupatorium makinoi</i> (Asteraceae). <i>American Journal of Botany</i> 88(4): 616-622.</p> <p>●Masuda, M., <u>Yahara, T.</u> and Maki, M. 2001. The ESS model for the mixed production of cleistogamous and chasmogamous flowers in a facultative cleistogamous plant. <i>Evolutionary Ecology Research</i> 3: (4) 429-439.</p> <p>●Ohashi, K. and <u>Yahara, T.</u> 2001. Behavioral responses of pollinators to variation in floral display size and their influences on the evolution of floral traits. In: Chittka, L. & Thomson J. D. eds., <i>Cognitive Ecology of Pollination</i>. Cambridge University Press, New York, pp. 274-296.</p> <p>●Watanabe, K., Soejima A., <u>Yahara, T.</u>, and Ito M. 2001. Mexican species of the genus <i>Stevia</i> (Eupatorieae, Asteraceae). Chromosome numbers and geographical distribution. <i>Plant Species Biology</i> 16, 49-68.</p> <p>●Soejima, A., <u>Yahara, T.</u> and Watanabe, K. 2001. Distribution and variation of sexual and agamosperous populations of <i>Stevia</i> (Compositae: Eupatorieae) from Mexico. <i>Plant Species Biology</i> 16, 91-105.</p> <p>●Soejima, A., <u>Yahara, T.</u> and Watanabe, K. 2001. Thirteen new species and two new combinations of <i>Stevia</i> (Asteraceae : Eupatorieae) from Mexico. <i>Brittonia</i> 53: 377-395.</p> <p>●Ishida, Y., Kasuya, E. and <u>Yahara, T.</u> 2001. Female control of paternity during copulation: inbreeding avoidance in feral cats. <i>Behaviour</i> 138: 235-250.</p>

本応募研究課題及び他の研究課題の受入・応募等の状況・エフォート

- ※1 所属研究機関内で支給される研究費（基盤的経費を除く。）についても記入してください。
 ※2 他の研究費への応募等があるにもかかわらず記入していないこと及び事実に反する記入のないようにしてください。

研究代表者のみ作成・添付

区分（採択・応募中の別）	資金制度・研究費名（配分機関等名）	研究課題名（研究代表者氏名）	役割（代表・分担の別）	研究期間（年度）	18年度研究費（期間全体の額）（千円）	エフォート（%）	本応募研究課題と他の研究課題における研究内容の相違点及び当該他の課題に加えて本課題へ応募する理由
—	基盤研究（A）（一般）	蝶・ハナバチ媒花から蛾媒花への進化に関する実験的・分子生態学的研究（矢原徹一）	代表	H18～	20,540	50	—
採択	環境技術開発等推進費補助金（環境省）	地域生態系の保全・再生に関する合意形成とそれを支えるモニタリング技術の開発（矢原徹一）	代表	H16～H18	37,915 （5機関総額）	20	本研究は保全・自然再生事業に役立つ技術開発を目標とする応用研究である。また、5機関の研究者による共同研究である。申請者はこのような社会的要請に応えることにも時間を割いているが、研究の主要なエフォートは、基礎研究に向けており、基礎研究の業績で評価されている。本応募課題は、4年間の準備期間を経て、大きく発展する段階にあり、大学院生やポストドクとの共同研究によって、インパクトのある成果を確実にあげることができるので、応募する。
採択	九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト	生物多様性の保全と進化に関する研究拠点形成（矢原徹一）	代表	H16～H18	14,200 （17名総額）	20	このプロジェクトは、「九州大学生物多様性研究センター」設立を準備するためのものであり、九州大学教官17名によるパイロット研究が実施されている。申請者は代表者として農学部・理学部・工学部などの間での調整を行なっている。このプロジェクトは、保全の研究に重点があり、本課題は含まれていない。
採択	21世紀COEプログラム	統合生命科学（藤木幸夫）	分担	H14～H18	5,000	10	大学院教育を充実させ、国際的に活躍できる若手研究者を養成することに力点がある。

※ 本応募研究課題、他の研究課題で採択されているもの、他の研究課題で応募中のものの順にそれぞれ点線で区切って記入してください。