

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ~ 2008  
 課題番号：19770020  
 研究課題名 (和文) チベット高原における高山植物の環境適応に関わる集団間の遺伝的分化の解明  
 研究課題名 (英文) Population differentiation related to environmental adaptation for alpine plants on the Qinghai-Tibetan Plateau  
 研究代表者  
 下野 綾子 (SHIMONO AYAKO)  
 独立行政法人国立環境研究所・生物圏環境研究領域・NIES ポスドクフェロー  
 研究者番号：30401194

## 研究成果の概要：

野生生物の集団の遺伝構造や過去の来歴とともに、集団間の遺伝的分化における選択圧の寄与を明らかにすることを目的とし、適応的遺伝子に関わるゲノム領域と、関わらない中立なゲノム領域の変異の遺伝変異を解析した。チベット高原において標高という環境勾配に着目し、幅広い標高に分布する *Potentilla fruticosa* L. (バラ科キジムシロ属) を対象とした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生態・環境

キーワード：適応的遺伝子、遺伝的分化、EST、チベット高原、高山植物、葉緑体 DNA

## 1. 研究開始当初の背景

チベット高原は広大な高山帯 (250 万 km<sup>2</sup>) を有し、その平均標高は 4000m を超え、隣接するヒマラヤとあわせて高山植物が多様化した地域の 1 つと考えられている。そこは植物の生育にとって環境条件の制約が最も大きい場所の 1 つといえ、極限環境での高山植物の適応進化を理解する上で重要な地域である。

高山植物は微少な環境変化に応じて異なった群集を構成しているが、中には環境傾度によって広い分布域をもつ種が存在する。こ

のような種の環境に応じた集団間の遺伝的分化については、古くから着目され研究されてきた。しかし、集団間の遺伝的分化における自然選択の寄与を明らかにするには、交配実験や移植実験、長期の野外データの取得など膨大な労力がかかるものであった。

一方、近年の DNA 解析技術の進展により、モデル生物や栽培植物を中心に発現している遺伝子の塩基配列 (Expressed Sequence Tag: EST) 情報が蓄積し、遺伝子レベルで生物の環境への適応を研究することが可能となってきた。適応的遺伝子に関わるゲノム領

域と、関わらない（中立な）ゲノム領域の変異を比較することで、選択圧の寄与を検討できる。しかし、いまだ EST を得るには時間とコストがかかるため、野生生物の EST の解析例はごくわずかである。一方、多種の EST 情報を利用して作成されたマーカーでも、保存性の高い領域であれば約 50% が分類群の異なる種群へ適用できる可能が示された。従って、すでに蓄積されているモデル生物や栽培種の EST 情報を野生生物へ適用していくことが、野生生物の進化的解析を行ううえで重要な課題である。

## 2. 研究の目的

野生生物の集団の遺伝構造や過去の来歴とともに、集団間の遺伝的分化における選択圧の寄与を明らかにすることを目的とし、適応的遺伝子に関わるゲノム領域と、関わらない中立なゲノム領域の変異の遺伝変異を解析する。

## 3. 研究の方法

チベット高原において標高という環境勾配に着目し、幅広い標高に分布するキンバイ *Potentilla fruticosa* L. (バラ科キジムシロ属) を対象種とした。標高の高い高原中央部から標高の低くなる北東部にわたる 23 集団よりサンプリングした。中立部位については葉緑体 DNA の *matK* 領域の塩基配列を決定し、遺伝的多様性および分子系統の解析を行った。それらの結果より集団の遺伝構造や過去の来歴について検討した。

適応的遺伝子に関わるゲノム領域を調べるマーカーの開発には、キジムシロ属に近縁なイチゴの発現遺伝子の塩基配列 (EST) 情報を利用した。データベースより情報を取得し、シロイヌナズナの塩基配列とアライメントし、相同性の高い領域に 192 対のプライマーを作成した。

## 4. 研究成果

チベット高原 23 集団を対象に、葉緑体 DNA の *matK* 領域の塩基配列を決定したところ、33 個の変異 (ハプロタイプ) を見出した。

高原北東部はハプロタイプ A が広く優先し遺伝的多様性が低いのに対し、標高が高い高原中央部では多様なハプロタイプが分布し、遺伝的多様性も高かった (図 1)。起源の古いハプロタイプは高原中央部のみに見られ (図 1, 2)、北東部に優先するタイプであった (図 1, 2)。従って高原中央部がキンバイ集団が長い間生存可能であり、北東部には新しく分布を拡大した集団が生育すると考えられた。この仮説は、集団が長い間生き延びてきた場所は遺伝的多様性が高いという一般的傾向からも支持される。

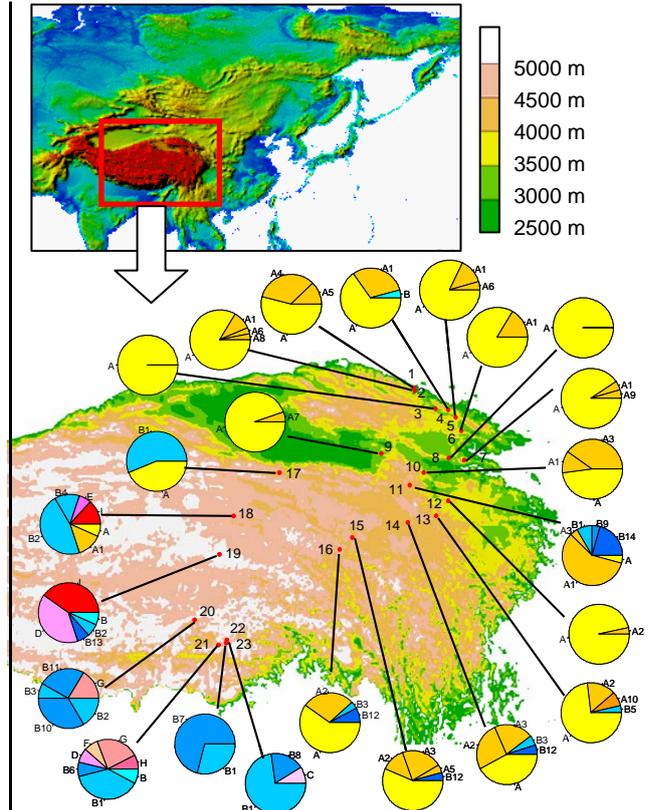


図 1. 葉緑体 DNA の *matK* 領域の塩基配列に基づくハプロタイプの地理的分布とその頻度。図中の数字は表 1 の集団番号に対応する。

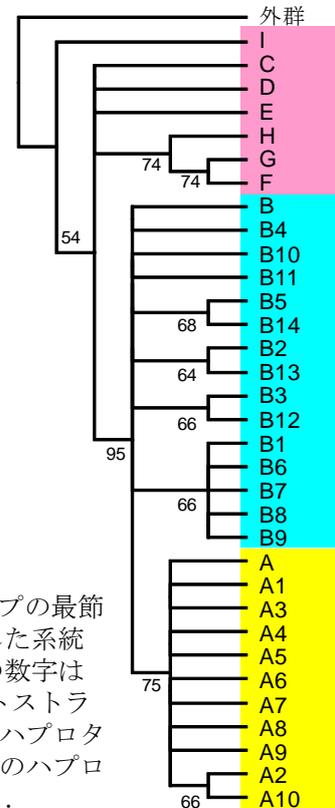


図 2. ハプロタイプの最節約法により構築した系統樹。系統樹枝上の数字は 10,000 反復ブートストラップ確率を示す。ハプロタイプの記号は図 1 のハプロタイプと対応する。

次に、北東部集団が分布拡大（集団サイズの拡大）を経験したかをミスマッチ分布分析によって検討した。任意の2個体間で塩基の異なる数（ミスマッチ数）を横軸にしたヒストグラムを描くと、集団サイズが急激に拡大した集団では一山分布となることが理論研究により示されている。チベット高原の集団を大きく東北部（1-17）と中央部（18-23）に分け分析した結果、北東部のミスマッチ分布は一山分布となり、モデルの理論値によく一致した（図3a）。一方、中央部のミスマッチ分布は二山分布となり、モデルの値との当てはまりは良くなかった（図3b）。

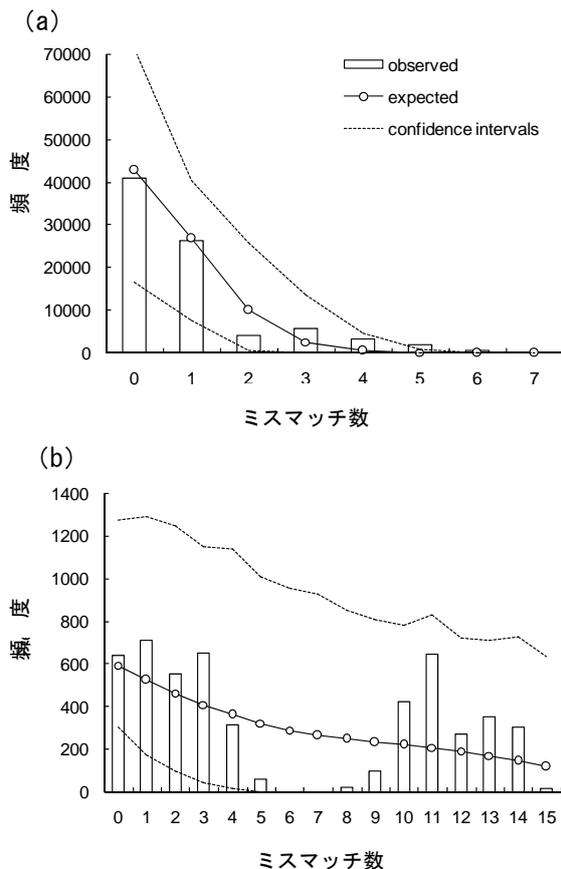


図3. チベット高原北東部集団 (a) および中央部集団 (b) のミスマッチ分布. 棒グラフは観測地を白丸はモデルの期待値を、点線は誤差の1,000反復ブートストラップ95%信頼区間を示す。

チベット高原の平均標高は4000mを超えるが、氷期にも氷床に広く覆われることはなく、高山草原が広がっていたとされている。一方、間氷期に森林が標高の低い東側から拡大してきたとされている。従って、高山植物の分布は氷期に高原広域に拡大し、間氷期に標高の高い地域に縮小したと考えられる。つまり高標高の中央地域は過去の気候変動期を通じてキンロバイ集団が存続可能であり、キン

ロバイの遺伝的多様性の維持に貢献してきたことを示唆している。

次にイチゴの発現遺伝子の塩基配列 (EST) 情報を利用し、192対のプライマーを作成した。そのうち約80% (154) でキンロバイのDNA断片の増幅が可能であった。そのうち単一断片のみ増幅され、ダイレクトシーケンスが可能であった57領域の塩基配列を決定した。次に、各集団の遺伝変異を中立部位であるとされている葉緑体の *matK* 領域の遺伝変異と比較した。その結果、*Gossypium hirsutum* *gaiacol peroxidase* (*pod1*) 領域のものは中立部位で見られたパターンと異なることが明らかとなった。本領域は17のSNPが存在したが、葉緑体の *matK* 領域で最も高い遺伝的多様性を示した高標高域の集団では1つの遺伝子型に固定していた。このことから、高標高域の集団では、この領域あるいは近傍の領域になんらかの淘汰圧が働いた可能性が考えられた。

モデル生物の塩基配列情報を利用することで、本来ESTを得るのに必要な作業 (mRNAを抽出し cDNA ライブラリーの構築を行う) にかかる時間とコストを大幅に節約できると考えられる。

## 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)

[学会発表] (計2件)

- ① Shimono, A., Ueno, S., Gu, G., Zhao, X., Tsumura, Y. & Tang, Y. Repeated range shifts of *Potentilla fruticosa* during glacial and interglacial periods on the Qinghai-Tibetan Plateau revealed by chloroplast DNA sequence variation. 10th Symposium of the International Organization of Plant Biosystematists, Vysoke Tatry, Slovakia, July 2008.
- ② 下野綾子・上野真義・津村義彦・古松・唐艶鴻 チベット高原の矮性低木キンロバイ (*Potentilla fruticosa*) の遺伝的多様性. 第55回日本生態学会 福岡国際会議場学 2008年3月

[図書] (計1件)

- ① 下野綾子、下野嘉子. (2008) 高山におけ土種子動態と発芽戦略. pp153-173. 遷移の自然史—「空き地」の植物生態学, 北海道大学出版会, 札幌

[その他]

ホームページ等

<http://www.tibetplant.com/>

#### アウトリーチ活動

NPO 法人山の自然学クラブ理事として、学術的に価値のある定量的データを取る指導を行っている。それは市民の意識醸成と知識・技術の習得にもつながっている。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

下野 綾子 (SHIMONO AYAKO)

独立行政法人国立環境研究所・生物圏環境  
研究領域・NIES ポスドクフェロー

研究者番号：19770020

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし