

平成 22 年 3 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780111

研究課題名 (和文) 北東アジアにおける寒温帯性針葉樹種の系統地理学的研究

研究課題名 (英文) Phylogeography of cold temperate conifers across north-east Asia

研究代表者

逢沢 峰昭 (AIZAWA MINEAKI)

宇都宮大学・農学部・助教

研究者番号：70436294

研究成果の概要：

本研究は、化石情報が多く、日本を含めた北東アジアの寒温帯林の主要構成樹種であるマツ科樹種のチョウセンゴヨウおよびエゾマツ変種群 (*Picea jezoensis*) を対象として、北東アジアの数万年から数百万年という時空間スケールの中で、その分布域がどのように変化してきたかをオルガネラ DNA 解析を基に推論することを目的とした。現在チョウセンゴヨウは大陸部では広域的に優占分布するが、大陸部の本種のミトコンドリア DNA 型 (ハプロタイプ) は単一の型で占められていた。一方で、本種が散在的にしか分布していない日本で複数のハプロタイプがみられた。このような植物地理学的に極めて興味深いハプロタイプの地理的分布は、過去の大陸部での分布域の拡大・縮小に伴う遺伝的変異の減少、あるいは日本がかつて分布の中心となっていたことによって生じたと推論された。エゾマツ変種群のミトコンドリア DNA 解析の結果、ある DNA 領域上に極めて複雑な突然変異箇所があることが明らかになった。しかし、その系統地理学的解析については、今後の課題となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：チョウセンゴヨウ, エゾマツ変種群, 系統地理, 北東アジア, 寒温帯, ミトコンドリア DNA, 葉緑体 DNA

## 1. 研究開始当初の背景

第四紀の気候変動にともなって形成された陸橋の存在は、現在の日本列島の植物相を形成する上で、きわめて大きな影響を及ぼしたと考えられる。近年、分子系統地理学的研

究によって、姉妹種間や同一種内の集団・個体間の遺伝的な類縁関係が調べられ、植物がアジア大陸から陸橋を經由して日本列島に移住してきたという植物地理学的シナリオに対して、より実証的な推論を与えることが

可能となってきた。この際、日本と大陸に分布する植生帯の主要構成樹種を研究対象とすることによって、植生帯の地史的変遷のシナリオを再現することが可能になると期待される。このような研究を行う上で、日本において第四紀を通して化石情報が多く、日本を含めた北東アジアの寒温带林の主要構成樹種であるマツ科樹種が適していると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、大陸部の温带から寒温带にかけて広がるチョウセンゴヨウ落葉広葉樹林帯の最優占種であるチョウセンゴヨウ (*Pinus koraiensis*), およびエゾマツ変種群 (*Picea jezoensis*: エゾマツ, var. *jezoensis*; トウヒ, var. *hondoensis*; チョウセントウヒ, var. *koreana*) を対象とした。そして、両樹種の分布域を広く網羅するように集めた DNA 試料を用いて、マツ科では母性遺伝するミトコンドリア (mtDNA) の遺伝解析を行い、大陸ではその分布域がどのように変化し、日本の集団がどのように大陸から移住してきたのかを推論することを目的として研究を行った (以下、逢沢未発表データを示す)。

## 3. 研究の方法

### (1) チョウセンゴヨウ

遺伝解析試料として、本種の分布域を広く網羅するように、日本国内については5集団 (各集団3~25個体) で採取した針葉を、国外については Kim *et al.* (2005) で使用したロシア3集団、中国5集団、韓国3集団 (各集団10個体) の種子を用いた (図-1)。これらの試料から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて全DNAを抽出した。なお、種子については各個体1粒の種子の胚乳からDNAを抽出した。次いで、各集団から1個体を選び、マツ属で使用されている6つのmtDNA領域 (Demeasure *et al.* 1995; Duff and Nickrent 1999; Wang *et al.* 2000; Jaramillo-Correa *et al.* 2003, 2004) についてPCR増幅のスクリーニングを行った。そして、良好なPCR増幅の得た5つのDNA領域について、ダイレクトシーケンス法により、各集団4~5個体の塩基配列を決定した。この情報を基にmtDNA型 (ハプロタイプ) を決定し、ハプロタイプ間の系統的關係を推定した。系統推定の際には、塩基置換および挿入・欠失の重み付けは平等とし、NETWORK ver.4.5.1.6 (Bandelt *et al.* 1999) を用いて、Median-joining法によりハプロタイプ間のネットワーク図を作成した。

また、集団内多型のみられた御嶽山集団については、変異箇所に制限酵素サイトが見つかったことから、PCR-RFLP法により全20

個体の解析を行った。さらに、Aizawa *et al.* (2007) の研究から、本州内におけるmtDNAの遺伝的変異性が小さいことも予想されたことから、各集団2~3個体に対して、父性遺伝する葉緑体DNA (cpDNA) の1領域の一部分について、予備的解析を行った。

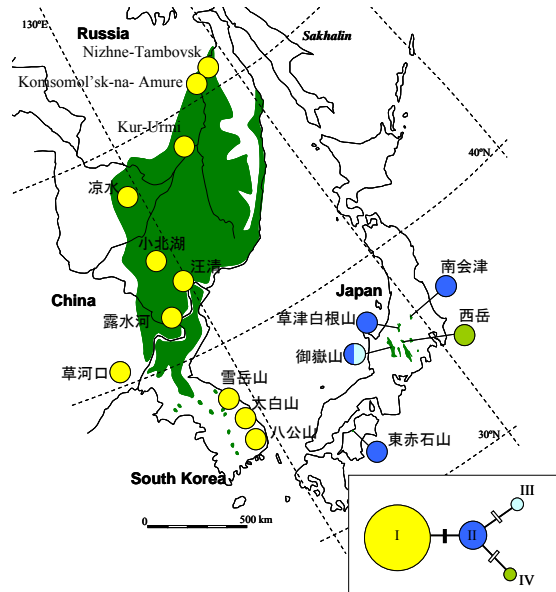


図-1 チョウセンゴヨウの分布域 (緑部分)、試料採取地、mtDNA ハプロタイプの地理的分布およびハプロタイプ間の系統的關係。ハプロタイプネットワークのノード上の黒ボックスは塩基置換を、白抜きボックスは挿入・欠失の存在を表す (逢沢、未発表)。

### (2) エゾマツ変種群

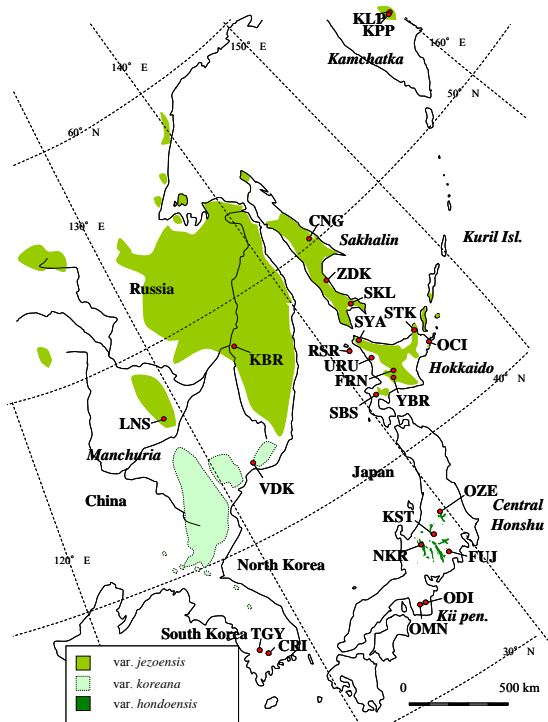


図-2 エゾマツ変種群 (エゾマツ, var. jezoensis ;

トウヒ, var. *hondoensis*; チョウセントウヒ, var. *koreana*) の分布域と試料採取地 (赤丸).

本種の分布域を広く網羅するように採取された Aizawa *et al.* (2007, 2009) の DNA 試料の一部に、ロシア・ウラジオストック、韓国・徳裕山、北海道・利尻島、落石の 4 集団を新たに加え、エゾマツ 15 集団、トウヒ 6 集団、チョウセントウヒ 3 集団を解析に用いた (図-2)。そして、各集団 4 個体に対して、Aizawa *et al.* (2007) において地理的変異の検出された mtDNA の 1 つの領域 (*nad1 intron b/c*; Demeasure *et al.* 1995) について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。この情報を基に mtDNA のハプロタイプを決定し、ハプロタイプ間の系統的關係を推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) チョウセンゴヨウ

本種に対する mtDNA のスクリーニングの結果、5 つの mtDNA 領域で良好な PCR 増幅が得られた。この領域について塩基配列を決定・比較したところ、2 つの領域で地理的変異が見られた。1 つの領域では日本国内 (本州・四国) と大陸 (ロシア・中国・韓国) の間で 1 塩基置換が見られ、もう 1 つの領域では本州の御嶽山集団の一部と西岳集団でそれぞれ 35bp と 3bp の挿入・欠失が見られた。これらの変異の組み合わせにより、4 つの mtDNA ハプロタイプが得られた (図-1)。すなわち、大陸の集団にみられる I 型、西岳を除く本州・四国の集団にみられる II 型、御嶽山集団の一部にみられる III 型、および西岳集団の IV 型である (図-1)。

集団内変異のみ見られた御嶽山集団では、PCR-RFLP 法によりその空間分布を調べたところ、2 つの mtDNA ハプロタイプが同所的に分布していた (図-3)。

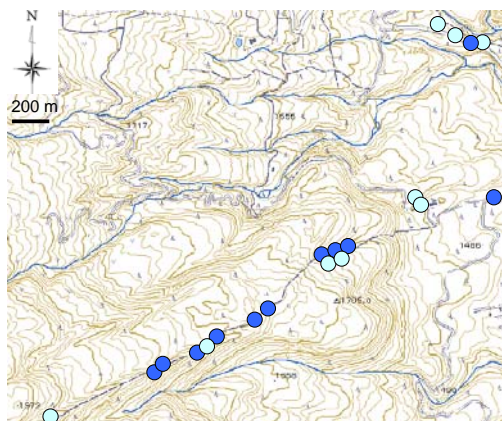


図-3 御嶽山集団における mtDNA ハプロタイプの空間分布 (各円は各個体を表す。ハプロタイプの凡例は図-1 を参照) (逢沢, 未発表)。

このように本研究では、日本と大陸間で大きく 2 つの系統に分かれた。この 2 つの系統は更新世後期 (10 万年前) の対馬海峡の形成によって生じたものと考えられる。興味深いことに、現在チョウセンゴヨウは大陸部に広く分布するにも拘らず、朝鮮半島から極東ロシアまで単一のハプロタイプで占められていた。このようなハプロタイプの分布パターンが形成されたシナリオとして、大きく分けて 2 つの仮説が考えられる。一つは、大陸部における花粉分析結果、第四紀を通してチョウセンゴヨウの分布域は大陸部に存在し、寒冷・温暖化の繰り返しの中で南北へ拡大・縮小していたとされることから、かつて大陸には複数の系統が存在したが、①氷期に分布域が一部の地域に縮小した際に、遺伝的浮動により特定のハプロタイプに固定された、あるいは、②分布域の拡大時に生じた“遺伝子の波乗り” (gene surfing; Hallatschek and Nelson, 2007) 効果などによって特定のハプロタイプの拡大・固定が生じた、という仮説である。もう一つは、日本ではチョウセンゴヨウの大型化石遺体は更新世を通して本州で多産すること、本州で複数のハプロタイプがみられたことから、①第四紀より古い時代に日本で種分化したチョウセンゴヨウの祖先が大陸に移住し、この系統が現在も維持されている、あるいは、②大陸の分布域が著しく縮小・消滅した際に、日本ではレフュージア的な安定した集団が維持されていて、この集団がその後大陸に移住し、この一つの系統を核として集団が広がった、の仮説が考えられる。

cpDNA の予備的結果をみると、2 つの系統 ( $\alpha$  および  $\beta$ ) が大陸・日本に広域的に分布していた (図-4)。

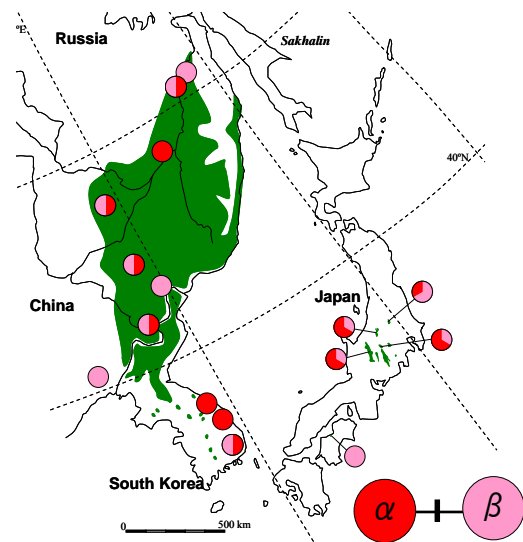


図-4 cpDNA ハプロタイプの地理的分布およびハプロタイプ間の系統的關係。ハプロタイプネットワークのノード上の黒ボックスは塩基置換を表す (逢沢, 未発表)。

この解釈として、①2つの系統は祖先多型に由来しており、古い時代に成立した系統が各集団内に維持されている、②cpDNAはマツ科では父性遺伝することから、花粉による高い遺伝子流動により、集団間、地域間、大陸間の分化程度を低くしている可能性が考えられる。これらの解釈は、mtDNA解析で得られた2つの仮説のどちらの下でも成り立つ。したがって、cpDNAについては地理的変異のあるDNA領域を探索する必要がある。

以上のような、北東アジアスケールで樹木の遺伝的変異を明らかにした研究は、エゾマツ変種群 (Aizawa *et al.* 2007, 2009)、カラマツ属 (Polezhaeva *et al.* 2010) を知るに過ぎない。したがって、アジア地域の広域的研究の推進が、温暖化に際する全球的な植生変化を予測する上で重要課題となっている (Pleines *et al.* 2008) 今日、その学術的価値は世界的に高いといえる。また、本研究では、遺伝的変異性の低さから移住ルートを推論できるような遺伝的な類縁関係は得られなかったが、現在チョウセンゴヨウは大陸部に広く分布するにも拘らず、大陸部では単一のハプロタイプで占められる一方で、日本において複数のハプロタイプが存在するという、植物地理学的に極めて興味深い結果が得られた。

今後の課題として、上述した cpDNA 解析の他に、日本および大陸部でのチョウセンゴヨウの大型化石遺体産出地や花粉分析地の位置データを基にして、本種の現在の気候的な分布域を再現し、これを基に時系的な分布域の変遷を推定し、今回得られた遺伝解析結果と比較するといった作業が必要である。

## (2) エゾマツ変種群

エゾマツ変種群の mtDNA について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した結果、Aizawa *et al.* (2007) と同様、7つの mtDNA ハプロタイプが得られた。各ハプロタイプ間の違いは、主として数 10 塩基以上の極めて複雑な挿入・欠失に由来していた。したがって、エゾマツ変種群については、塩基配列情報を基にした系統的関係の推定は今回できなかった。

今後の課題として、塩基置換情報だけでなく、挿入・欠失情報を考慮した系統推定方法の習得が必要である。また、エゾマツ変種群以外の同所的に生育するトウヒ属樹種を含めた解析が必要と考えられる。

## 引用文献

Aizawa *et al.* (2007) *Mol. Ecol.*, 16, 3393–3405.

Aizawa *et al.* (2009) *J. Biogeogr.*, 36, 996–1007.  
Bandelt *et al.* (1999) *Mol. Biol. Evol.*, 16, 37–48.  
Demeasure *et al.* (1995) *Mol. Ecol.*, 4, 129–131.  
Duff and Nickrent (1999) *Amer. J. Bot.*, 86, 372–386.  
Hallatschek and Nelson (2007) *Theor. Pop. Biol.*, 73, 158–170.  
Jaramillo-Correa *et al.* (2003) *Theor. Appl. Genet.*, 106, 1353–1367.  
Jaramillo-Correa *et al.* (2004) *Mol. Ecol.*, 13, 2735–2747.  
Kim *et al.* (2005) *Silvae Genet.*, 54, 235–246.  
Pleines *et al.* (2009) *Plant Syst. Evol.* 282, 281–294.  
Polezhaeva *et al.* (2010) *Mol. Ecol.*, 19, 1239–1252.  
Wang *et al.* (2000), *Mol. Biol. Evol.*, 17: 773–781.

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

逢沢峰昭・金子岳夫, 四国東赤石山におけるチョウセンゴヨウの生育状況, 植物地理・分類研究, 印刷中, 査読有.

[学会発表] (計 1 件)

逢沢峰昭・金 眞水・吉丸博志, 北東アジアにおけるチョウセンゴヨウの遺伝的変異, 日本森林学会, 2009年3月26日, 京都大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

逢沢 峰昭 (AIZAWA MINEAKI)  
宇都宮大学・農学部・助教  
研究者番号: 70436294

### (2) 研究協力者

吉丸 博志 (YOSHIMARU HIROSHI)  
森林総合研究所・森林遺伝研究領域  
・領域長