

平成 21 年 5 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570081

研究課題名 (和文) 日本列島におけるニホンジカ 2 系統の成立過程—多重渡来仮説の再検討

研究課題名 (英文) Evolutionary process on the formation of two distinct lineages of sika deer in the Japanese archipelago—testing the multiple-colonization hypothesis.

研究代表者

玉手 英利 (TAMATE HIDETOSHI)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：90163675

研究成果の概要：

日本列島に生息するニホンジカは遺伝的には、九州、四国、本州西部に分布する南日本グループと、本州東部と北海道に分布する北日本グループに大きく分かれる。2 グループに分かれた原因を解明するために、ミトコンドリア DNA 調節領域の反復配列の変化を調べた。その結果、南日本のシカは九州西部地域で、北日本のシカは近畿地域で、それぞれ最も遺伝的多様性が高く、これらの地域から分布を拡大した可能性が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：ニホンジカ、ミトコンドリア DNA、分子系統、レフュージア

1. 研究開始当初の背景

日本の生物相の成り立ちを解明するために、90年代以降、さまざまな種を対象とした分子系統学的研究が行われてきた。その大きな成果として、ニホンジカ、ニホンザル、ツキノワグマなど多くの哺乳動物が、いずれも分子系統では南日本と北日本の 2 系統に分かれることが、申請者ら (Tamate et al., J. Mamm. 79, 1396-1403; Nagata et al., Mol. Phylogenet. Evol. 13, 511-519)、および他の研究者らによって明らかにされてきた。多くの場合、種内でみられる南北 2 系統群は、数十万年前に

分岐しているにもかかわらず、その分布境界は近畿から中国地方にかけての陸上にある。しかし、日本列島の哺乳動物が 2 系統に分かれた原因と、その境界が本州上にある理由については、解明されていない。

この問題を解明するためには、これまでのニホンジカおよび本州に分布する動植物の分子系統地理データを整理して共通パターンを確認する比較分子系統解析を行い、さらに特定の種 (本研究ではニホンジカ) について、より詳細な分子系統解析を行うことによって、分布拡大過程を推定する必要がある。加えて、

上記問題を解決するための分析手法の改善も必要と考えられる。申請者らは、アジア大陸における野生動物の分子系統地理に関する国際共同研究の実績があるが (Li et al., Mol. Phylogenet. Evol. 36, 78-89; Nagata et al., Conservation Genet. 6, 863-866, など)、そこでも同様の問題—系統地理は調査できるが、なぜそのような地理的分化が生じたのかを説明できない—に突き当たることを経験している。そのため、系統群の成立過程を再現する新たなマーカーとして、これまでは分子系統解析において除外されることが多かったミトコンドリアDNAの反復配列に注目し、その派生順序を手掛かりとして分布拡大パターンを解明する手法を検討することを考えた。

2. 研究の目的

課題1：多重渡來說と単一渡來說の検証

我が国のニホンジカの起源については、多重渡來說と単一渡來說の2説が考えられている。多重渡來說では、先に大陸で2系統にわかれたあとで、南集団は朝鮮半島経由で渡来し、北集団は樺太から北海道を経由して本州に南下したと考えている。

一方、単一渡來說では、ニホンジカの祖先集団が西日本に渡来したあとで、寒冷化した時期に異なるレフュージア (避難地) へ退避した際に2系統が分岐して、その後、別々に分布を再拡大したシナリオが想定されている。この場合、レフュージアは本州辺縁部や四国、九州に存在したと考えられる。

もし、多重渡来であれば北集団は南下したことになり、分布拡大の先端 (フロント) は本州の中部以西となる。一方、単一渡来の場合には、北集団は本州南部か辺縁部のレフュージアから北上するので、フロントは東北や北海道となる。

一般に、フロントでは、遺伝的多様性が減少し、新たに派生した固有の遺伝的変異がみられることが知られている。したがって、これらの特徴を手がかりとして、フロントの所在を明らかにすることで、いずれの仮説が支持されるのか、検証する。

課題2：新たな分子系統地理解析手法の開発

前述のように、現在、国内外で常法として用いられている分子系統地理解析手法では、系統群の分布拡大の過程を再現できないという問題がある。これを解決するために、本研究では、新たな解析ツールとして、モデル選択による分子系統地理解析手法を開発する。また、同手法の開発と関連して、これまで系統解析では使用されることが少なかった、ミトコンドリア調節領域の繰り返し配列 (DR) のパターン (reptype) を、遺伝マーカーとして用いる新たな方法論を確立する。DR reptype は、SINE や LINE のように、塩基配列の変異と比べて、派生形質がわかりやすい

という利点があり、フロントを探索するためのマーカーとしては特に有効と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 分子系統解析

本州の18地域で有害捕獲されたニホンジカ246個体の筋肉から抽出したDNAを使用した。また、分子系統地理解析では、データベースに登録されているニホンジカのミトコンドリアDNA調節領域の塩基配列を加えたメタデータを使用した。遺伝子増幅反応 (Polymerase chain reaction, PCR) では5種類のプライマー (Table 1, Nagata et al., 1998b, Nabata et al., 2004) を用いて部分配列を増幅し、ニホンジカ mtDNA 調節領域 (D-loop) 全長約1,100塩基の配列を決定した。ダイレクトシーケンス法により塩基配列を読みとることが困難なサンプルについては、TA-Cloning でクローンを分離して配列を決定した。アライメント解析には Clustal X 1.83 と MEGA 4 を使用し、既に報告されているニホンジカの D-loop (DNA Data Bank of Japan ABI186349 - 186352, AB279706 - AB279725, D50128-D50129, AB210267) (Nagata et al., 1999, 野原, 2007, Yamada et al., 2007) を参考に、全長塩基配列と tandem repeats のユニット配列を決定した。ハプロタイプに基づき TCS 1.21 (Clement et al., 2000) を用いて統計的最節約ネットワーク図を作成した。また PAUP* 4.0b10 を使用して系統樹を作成した。アウトグループとしてタイワンジカ (*C. n. taiouanus*) を用いた。

マイクロサテライト DNA 8 遺伝子座 (BOVIRBP, BM6438, BM4107, RME095, TGLA127, BL42, OARfcb193, BM203) を用いて解析を行った。BOVIRBP, BM6438, BM4107, RME095, TGLA127, BL42, BM203 の遺伝子座の PCR 反応は 94°C 2 分、94°C 30 秒・56°C 30 秒・72°C 30 秒の 30 サイクルで Cool Start による増幅反応を行った。また OARfcb193 遺伝子座の PCR 反応は、95°C 30 秒・65°C 1 分を 7 サイクル、90°C 30 秒・65°C 1 分を 20 サイクルの 2 ステップで Cold Start による増幅反応を行った。フラグメント解析には ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer を使用した。

(2) 集団構造解析

STRUCTURE2.2 (Falush et al., 2007, Pritchard et al., 2000, 2001) を使用して、分集団の数 (K) を推定した。モデル選択として、admixture model と no admixture model の両方を用いた。集団間の分化の程度を調べるために ARLEQUIN 3.11 を用いて、Fst を各地域集団間で算出した。また、集団の過去の個体数変遷を現在の mtDNA の遺伝的変異から推定するために、ARLEQUIN 3.11 を用いて Mismatch distribution 解析を行った。さらに Tajima's D と Fu's Fs をともに用いて

中立性を検定した。さらに、BOTTLENECK を用いて過去のボトルネックの可能性を検証した。

(3) DR repetype 分析手法の開発

reptype を調べるために、調節領域塩基配列のどの部分が反復配列なのかをモチーフ検索により調べた。まずステムループ構造を作る配列があることを確認するために、RNAstructure により二次構造を予測した。次に慶應義塾大学先端生命科学研究所の鶴野レイナ博士が作成したプログラムを使用してモチーフを検索した。最後に、reptype の派生順序を推定するために最節約ネットワークを作成した。

4. 研究成果

(1) 多重渡來說と単一渡來說の検証

レフュージア仮説を検証するために、ニホンジカと同様に日本の温帯林の動植物相を構成するツキノワグマ、ニホンザル、ニホンイノシシ、ブナ、コナラなどの分子系統地理パターンとの比較を行った。その結果、シカ、サル、クマの分子系統地理はほぼ同様のパターンを示していること(図1)、ブナ・ナラ類の分子系統地理とも類似性が高いことが明らかになった。

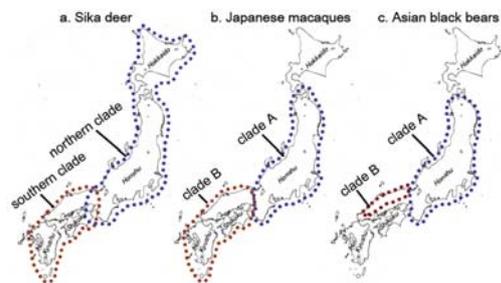


図1 ニホンジカ、ニホンザル、ツキノワグマのミトコンドリア DNA 調節領域で見られる2系統の地理的分布

比較分子系統地理解析の結果は、ニホンジカ2系統が本州に形成された複数のレフュージアから拡大した可能性(図2左)を示唆しており、北クレードが樺太経由でより最近渡来したと考える多重渡來說(図2右)を支持しない。(Tamate HB, in press.)

これまでの花粉分析の結果などから温帯林のレフュージアの一つと考えられる近畿地方について、集中的にシカサンプルを収集して、遺伝的多様性と集団構造を調査した。その結果、奈良および三重県のニホンジカ集団は、全国の各地域集団と比較して非常に高い多様性をもっていることが確認された。また、ミトコンドリア DNA から14ハプロタイプが検出された。更に、マイクロサテライト DNA データに基づく assignment test で

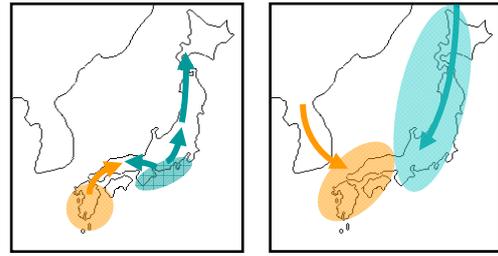


図2 ニホンジカ2系統の成立過程仮説

分集団の数を推定した結果、同地域では2つの分集団が存在する可能性が支持された(図3)。そのうち1集団は奈良公園個体で全て構成されていたが、残りの1集団は、さまざまな地域集団の個体で構成されていた。

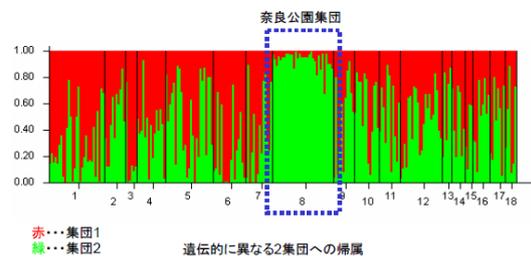


図3 近畿地方のニホンジカのStructureによる分集団の帰属テスト

以上の結果は他地域にはみられない独自のハプロタイプを奈良公園が有するというミトコンドリア DNA のデータと一致する。すなわち、同地域の集団構造は人為的要因によって大きく変化している可能性が示唆された。一方、ボトルネック解析、mismatch distribution 解析と、中立性検定などの結果から、同地域のニホンジカでは過去にボトルネックが生じた証拠は得られず、遺伝的多様性のレベルに対する人為的影響は少ないものと結論づけられた。(村上他、2007年日本哺乳類学会大会発表)

(2) 新たな分子系統地理解析手法の開発

reptype を最節約原理にもとづく遺伝子マーカーとして系統解析に利用するためには、まずその派生過程を明らかにする必要がある。そのため、先行研究(Mundy et al., 2004)で示された生成過程メカニズムが、ニホンジカの塩基配列においても当てはまるのかを最初に検証した。reptype の近傍には、ミトコンドリア DNA の複製時に生じるステムループを形成する特異的な配列があることが示されている。そのような二次構造を予測するソフトウェアである RNAstructure 4.4 により、ニホンジカにおいても反復配列の生成に関与する可能性がある塩基配列が確認された。さらに新たに開発したりポートモチーフ検索法により、ゲノムデータ検索をおこなった

ところ、ニホンジカの先行研究 (Nagata et al., 1999) で発見された反復配列のユニット 26 種類に加え、新たに 26 種類のユニットを見いだした(次頁、表 1)。二次構造の予測検索結果から、これまで 1 番目の repeat と考えられてきた反復配列は、実はステムループ形成に関わる配列で、実際には 2 番目の repeat がもたになって repeat が新しく増えていくことが示唆された。そのため、repetype の解析にあたっては、2 番目以降の反復配列の変化を調べることにした。

表 1 本研究で新たに見出されたニホンジカミトコンドリア DNA 調節領域の repetype (オレンジ色で表示)

sample site	ID	repeat unit									
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th	10th
北日本	北海道 AB118753	a1	d1	e1	u25	d8	f7	d8			
	岩手県 AB012371	a1	d1	e1	f3	d8	d8				
	東京(奥多摩) AB211429	a1	u3	u18	u8	u13	d8	d8	d8	u10	
	兵庫県 AB248238	a2	d1	e2	f3	u14	d8				
	徳島県・高知県 AB186344	a1	d1	e3	u7	u12	d8	u14	u14	u12	
	高知県 AB186345	a1	u4	u17	u6	u11	d8	u14	u15		
徳島県・高知県 AB186347	u2	d2	e3	u9	f4	d8					
南日本	山口県 AB012379	b2	d4	f1	f4						
	徳島県・高知県 AB186349	b2	d3	f1	f4						
	徳島県 AB186350	b2	d3	f1	u14						
	宮崎県 AB012375	b1	d3	f1	u14	u14					
	鹿児島 AB218689	u32	d5	u19	f4						
	鹿児島 AB012377	u31	d4	f1	u14	u14					

52 種類の repetype で作った最節約系統樹で 1 番目、2 番目のリピートはそれぞれ単系統となり、その中で南北が分岐するパターンを示した。一方、3 番目のリピートの分岐はより深く、南系統では側系統となった(図 4)。

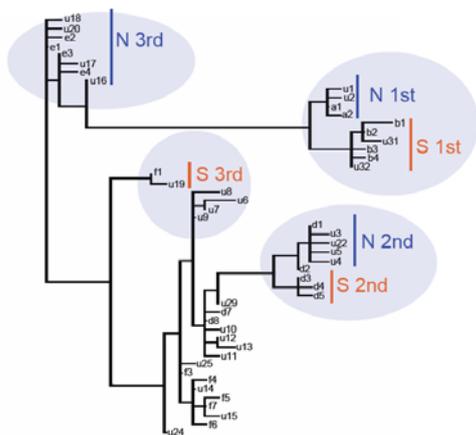


図 4 ニホンジカのミトコンドリア DNA 調節領域反復配列の最節約系統樹

南日本系統のハプロタイプで repetype の変化をネットワークで示すと、宮崎のハプロタイプが祖先型となり、多様性も最も高かった。九州および本州中国地方のハプロタイプはより末端に位置することから、南日本系統については少なくとも 1 箇所のレフュージアが現在の宮崎集団と関連する可能性が考えられた(図 5)。

一方、北日本系統では、祖先型が近畿地方

となり、遺伝的多様性も最も高いことから、この地域がレフュージアであった可能性が示唆された(図 6)。

以上の結果から、本研究の結論としては、①ニホンジカの起源に関して比較分子系統解析では単一渡来仮説(レフュージア仮説)が支持された、②反復配列をマーカーとした最節約的解析により祖先的形質を推定することが可能である、③同反復配列のネットワーク解析では、九州東部および近畿地方がそれぞれレフュージアであった可能性が示唆された。

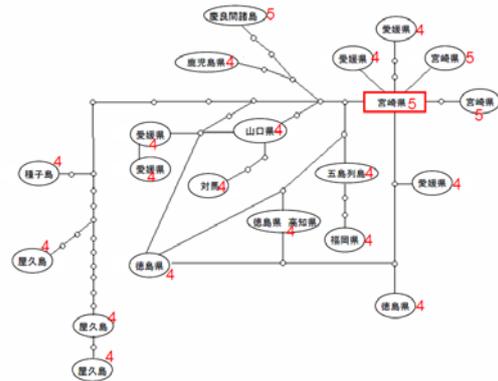


図 5 ニホンジカ南日本系統の repetype の最節約ネットワーク。数字は反復数を示す

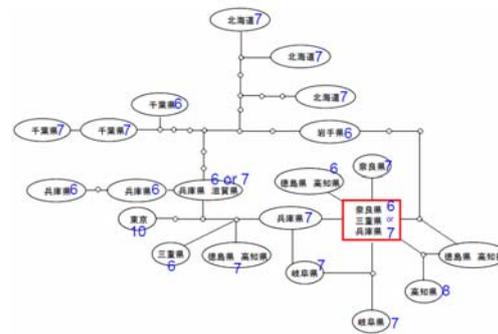


図 6 ニホンジカ北日本系統の repetype の最節約ネットワーク。数字は反復数を示す

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Yamada M, Hosoi E, Nagata J, Tamate HB, Tado H. Phylogenetic relationship of the southern Japan lineages of the sika deer (*Cervus nippon*) in Shikoku and Kyushu islands, Japan. *Mammal Study* 32: 135-138 (2007) 査読有

[学会発表] (計 1 件)

①村上綾子、玉手英利、鳥居春己、奈良公園のニホンジカに関する集団遺伝学的特異性 日本哺乳類学会 2007 年大会, 2007.9.14, 府

中市.

〔図書〕(計2件)

①Tamate HB. Springer, Tokyo. Evolutionary significance of admixture and fragmentation of sika deer populations in Japan. In “Sika Deer: Biology and Management of Native and Introduced populations” 2009年 43-59頁

②玉手英利、南正人 雑誌遺伝. 遺伝子からみたニホンジカの生態. 2007年, 第32巻 135-138頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉手 英利 (TAMATE HIDETOSHI)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：90163675

(2)研究分担者

廣田 忠雄 (HIROTA TADAO)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：00431635

(3)連携研究者

永田 純子 (NAGATA JUNCO)

独立行政法人森林総合研究所・野生動物研究

領域・主任研究員

研究者番号：10391179