

機関番号：64303

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 年度 ~ 2010 年度

課題番号：21770092

研究課題名 (和文) 繁殖様式の違いが遺伝構造に与える影響を分子植物地理学的に解明する

研究課題名 (英文) Comparison of population genetic structure between plant species of different sexual systems

研究代表者

瀬尾 明弘 (SEO AKIHIRO)

総合地球環境学研究所・研究部・プロジェクト研究員

研究者番号：30378567

研究成果の概要 (和文)：

繁殖様式の異なる複数の植物近縁種間の遺伝構造を明らかにするために、ウラボミソウ（雌雄異株）およびヤマトキホコリ（雌雄同株）の葉緑体 DNA ハプロタイプ多型解析、ベニシダ類（有性生殖型および無配生殖型）のアロザイム多型解析を行った。その結果、雌雄異株・有性生殖型が雌雄同株・無配生殖型に比べて集団間の遺伝的分化が大きいということはない。これらの結果は、異なる繁殖様式間で分散効率が異なるわけではないことを示唆した。

研究成果の概要 (英文)：

Spatial pattern of genetic structure between plant species of different sexual systems, *Elatostema umbellatum* var. *majus* (dioecy) VS *E. laetevirens* (monoecy) and *Dryopteris erythrosora* (asexual) VS *D. caudipinna* (sexual), were analysed using molecular analysis. Genetic differentiation of dioecious species was not higher than those of monoecious species. *D. caudipinna* on Izu Island was dispersed to disturbed area. These results suggest that difference of sexual system of plant species might not effect the genetic structure of these species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：分子植物地理・繁殖様式・遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

一つの学問分野として長い歴史をもつ生物地理学は形態形質にもとづいて認識されてきた種や属などの分類群を単位として地域間の比較を行い、生物相の変遷などを議論してきた。しかし、形態形質にもとづいた種の中には形態形質では容易に識別困難であ

り、かつ遺伝子交流がない、いわゆる隠蔽種を多数含んでいるものも少なくないことがシダ植物や哺乳類など様々な分類群で明らかになってきている。このような遺伝的に隔離された群を複数含む分類群を単位として、その分布の変遷を議論することが間違った結論を導く恐れがあることは明白である。

同地域に分布している生物はその地域の歴史的出来事の影響を等しく受けていることが考えられる。そして、島の分断や連結など地史的出来事は地域内の集団間の遺伝子交流の程度にも大きく影響を与えるだろう。その場合には、同地域に分布している系統的に独立な複数の分類群で類似した遺伝的分化の地理的パターンがみられることが期待できる（たとえば、Hewitt 2000 ; Seo et al. 2004）。

琉球列島は、九州と台湾の間にあり、更新世の氷期-間氷期サイクルによる気候変動にともなう海面の上下により、諸島の島々同士、あるいは近接地域と接続と分断を繰り返してきた地域である。この過程において、琉球列島地域に分布している植物および動物もその分布域を変遷させてきたはずである。本地域における分子植物地理学的解析実際に行うにあたって、琉球列島およびその周辺地域に広く分布する木本種（タブノキ、クサギなど）、草本種（ツワブキ、ボタンボウフウなど）の両方を含む19植物種群について、種内の遺伝的変異量のスクリーニングを行った。そして、分子植物地理学的議論を行うために十分な量の遺伝的変異のみられたツワブキ、ボタンボウフウ、ハマウド（ナンゴクハマウドを含む）の3種についてより詳細なサンプルの採集と解析（アロザイム多型解析および葉緑体 DNA 塩基配列多型解析）を行った。

その結果、これら3種に共通してみられる遺伝的分化の地理的パターンを3つ見出すことができた（瀬尾 2006）。1つは八重山諸島の集団が周囲の集団から大きく遺伝的に分化していること。このことは八重山諸島集団の長期間の地理的隔離が要因として考えられる。2つめは、台湾東部およびランユウ島の集団は地理的に近い八重山集団や台湾北部集団よりも地理的に離れた奄美・沖縄集団と遺伝的類似性が高かった。このことは北から南への遺伝子流動を示唆していて興味深い。3つめは集団内の遺伝的変異量の地理的クラインが3種に共通してみられ、奄美・沖縄諸島地域が最終氷期中のレフュジアであったことが示された。このように、系統的に独立した複数の植物種の遺伝的分化の地理的パターンを比較し、共通な地理的パターンに着目することによって琉球列島地域の植物集団の分布変遷を考察することができた。

ところで、気候変動により氷河に覆われるなどした地域では、氷期後に速やかな集団形成が行われたと考えられている。このような速やかな集団形成の際には繁殖様式の影響が大きく、長距離散布をして広がる場合、自殖も行える植物種のほうが他殖しか行えない植物種よりも有利だという Baker's Law が提唱されている（Baker 1955）。実際、こ

れまでの国内外の研究によって雌雄性の進化などが、気候の変動下における生存と分布域拡大に大きく関与したことが示唆されている（例えば、Dorken and Barrett 2004）

2. 研究の目的

本研究では、異なる繁殖様式をもつ近縁種間の遺伝構造がどのようになっているかを明らかにし、これらの遺伝構造の地理的分布パターンを比較することで、繁殖様式と遺伝構造の関係を議論することである。

3. 研究の方法

(1) ウワバミソウならびにヤマトキホコリの葉緑体 DNA 塩基配列多型解析

『日本の野生植物』（平凡社）に記載されている繁殖様式の情報にもとづいて、同じような地理的分布域をもつ異なる繁殖様式（雌雄異株 vs 雌雄同株、無性生殖 vs 有性生殖）をもつ日本列島の広域分布種の組み合わせを属ごとに探索した。それらの種ペアのうち Nishizawa & Watano (2000) の13種類のプライマーでPCR増幅でき、十分な多型が見られたウワバミソウならびにヤマトキホコリの解析を行った。

青森県から兵庫県まで広くサンプルを収集し、実験室へ持ち帰り、葉を1-2枚をシリカゲルで乾燥させDNA抽出まで保管した。残りは証拠標本にした。シリカゲルで乾燥させた葉をDNA抽出キット（Qiagen, Hilden, Germany）を用いてDNAを抽出した。

前述のプライマーのうち、psbC-trnS 遺伝子間領域ならびにrp116イントロンに多型があることがわかっているので、これらの領域をPCR増幅した。増幅したサンプルはExo-Sapによる処理後、BigDye Terminator (Life Technology) によってラベリングし、3100 Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。決定した塩基配列はPhred/Phrap/Consed (Gordon *et al.* 1998) およびSeaview (Galtier *et al.* 1996) を用いて比較し、葉緑体 DNA ハプロタイプを決定した。

ウワバミソウとヤマトキホコリは葉の形態など外部形態が非常に似ており、もっとも明瞭な識別形質は雌雄異株であるか雌雄同株であるかである。しかし、開花時期にサンプル収集を行うことができなかったものもある。そのようなサンプルはDNA情報を用いて識別を行った。識別には京都大学植物標本庫（KYO）に収蔵されているウワバミソウならびにヤマトキホコリの標本からDNAを抽出し両者を識別できるマーカーを探索した。その結果、rp116イントロンに使用可能な多型があり、これを用いて種を同定した。

(2) ベニシダ類のアロザイム多型解析

また、伊豆大島において、ベニシダの無配

生殖型および有性生殖型のアロザイム多型解析を行った。伊豆大島には3倍体無配生殖型ベニシダ類と2倍体有性生殖型ハチジョウベニシダの混生集団が形成されていることが知られている。伊豆大島におけるベニシダ類の生育地をおおまかに網羅するように34集団851個体を収集し、実験室へ持ち帰り、アロザイム多型解析および生殖様式の推定を行った。

約2cm四方の新鮮な葉に1mlの抽出液(2ml 2-メルカプトエタノール, 20mg PVP, 0.1mM Tris-HCL, 1ml EDTA (4Na), 10mM KCl, 10mM MgCl₂, pH=7.5)を加え, Qiagen Tissue Lyser を用いて破碎した。抽出液を10,000回転, 10度C, 10分間遠心した。得られた上澄み液20マイクロリットルずつを一酵素あたりの電気泳動に用いた。6連式スラブ電気泳動槽(日本エイドウ)を用いて泳動し, 各サンプルの遺伝子型を決定した。解析にはホスホグルコースイソメラーゼ(Pgi)およびロイシニアミノペプチダーゼ(Lap)について活性染色を行った(秋山・鈴木, 1998; Richardson et al. 1986; Shiraishi 1988)。

電気泳動距離の大きい遺伝子座から順に1, 2, …, 泳動度のより大きい酵素バンドをコードする対立遺伝子から順にa, b, …と呼び, 各個体の遺伝子型を決定した。

複数遺伝子座にもとづく遺伝子型の空間構造を検討するためにQGIS (Quantum GIS Development Team 2010), R (R Development Core Team 2011) およびspdep (Bivand et al. 2011)

4. 研究成果

(1) ウワバミソウならびにヤマトキホコリの葉緑体DNA塩基配列多型解析

青森県から兵庫県にかけての7集団29個体の葉緑体DNAハプロタイプを決定した。psbC-trnS 遺伝子間領域(223bp)をもちいて8つのハプロタイプが検出された。これらは8カ所の変異(塩基置換が6カ所, 挿入欠失が2カ所)でお互いを識別することができた。これらの出現頻度が高い順番にA, B, …とつけた。rp116イントロンによってハプロタイプGおよびハプロタイプHがヤマトキホコリでそれ以外がウワバミソウと同定された。ウワバミソウでは6つのハプロタイプが, ヤマトキホコリでは2つのハプロタイプが検出されたことになる。

表1 検出された葉緑体DNAハプロタイプの頻度

集団名	ハプロタイプ							
	A	B	C	D	E	F	G	H
青森		1		2	2			
石川1		2				1		
石川2	3					1		
京都1			2					
京都2	3						2	1
兵庫1	5							
兵庫2	1						3	

ウワバミソウでは石川以北の集団では集団内に複数のハプロタイプが観察された(表1)。一方, 京都および兵庫の集団ではそれぞれの集団内に一つのハプロタイプしか観察されなかった(京都ではハプロタイプAとC, 兵庫ではAだけ)。

ヤマトキホコリは京都2および兵庫2集団で観察された。京都2集団では2ハプロタイプが分布しており, 兵庫2集団では1ハプロタイプであった。

ウワバミソウおよびヤマトキホコリが同所的に生育していた集団は京都2集団ならびに兵庫2集団であった。これらの集団のハプロタイプはウワバミソウではハプロタイプAのみであり, 一方, ヤマトキホコリではハプロタイプGとHの二つのハプロタイプが分布していた。京都2集団および兵庫2集団は地理的に離れているけれども, ほぼ同じハプロタイプが分布しており, ウワバミソウおよびヤマトキホコリともに明瞭な遺伝的分化はみられなかった。

(2) ベニシダ類の生殖様式の推定およびアロザイム多型解析

生殖様式を推定するために孢子囊あたりの孢子数を計数したところ無配生殖型は723個体, 有性生殖型は78個体であった。これらのうち後述するように遺伝子型を決定できたのは無配生殖型が561個体, 有性生殖型が61個体である。今回調べた伊豆大島の34集団のうち, 23集団は無配生殖型のみがみられた集団であり, ベニシダ類の無配生殖型と有性生殖型の混生集団は11集団であった。有性生殖型のみ集団は見出されなかった。混生集団のうち5集団が島の北東部, 6集団が島の南西部や北西部と偏った分布をしていた(図1)。

有性生殖型が多く分布していた地域は近年の火山活動の結果に攪乱を受けた地域である。有性生殖型は, このような地域へ速やかに侵入をしたと考えられる。

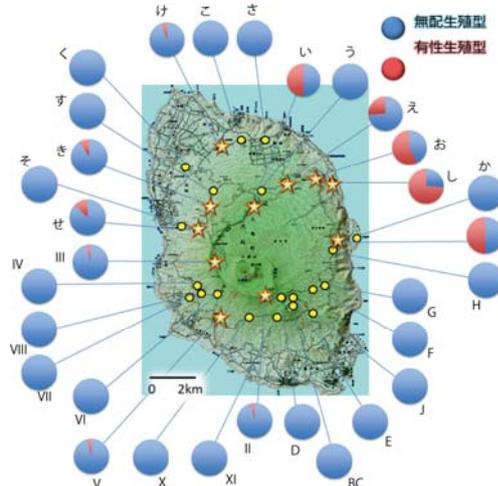


図1 伊豆大島におけるベニシダ類の無配生殖型および有性生殖型の地理的分布

M. Reder, M. Tiefelsdorf, D. Yu. 2011. spdep: Spatial dependence: weighting schemes, statistics and models. R package version 0.5-35.
<http://CRAN.R-project.org/package=spdep>

Dorken, M. E. and Barrett, S. C. H. 2004. Chloroplast haplotype variation among monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae) in eastern North America. *Molecular Ecology*. 13: 2699-2707.

Gordon, D., C. Abajian, and P. Green. 1998. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research*. 8:195-202

Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 543-548

Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907-913.

Nishizawa, T., and Watano, Y. 2000. Primer pairs suitable for PCR-SSCP analysis of chloroplast DNA in angiosperms. *J. Phytogeogr. Taxon.* 48: 63-66.

Quantum GIS Development Team. 2010. Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project.
<http://qgis.osgeo.org>

R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Richardson, B. J., Baverstock, P. R. and Adams, M. 1986. Allozyme electrophoresis. Academic press. New York.

瀬尾明弘・村上哲明. 2011. DNA 情報からみた植物の分布変遷. 湯本貴和 編. 高原光・村上哲明責任編集. 「環境史をみる技術」. pp. 45-58. 文一総合出版, 東京.

Seo, A., Watanabe, M., Hotta, M., Murakami, N. 2004. Geographical patterns of allozyme variation in *Angelica japonica*

(Umbelliferae) and *Farfugium japonicum* (Compositae) on the Ryukyu Islands, Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 55: 29-44.

Shiraishi, S. 1988. Inheritance of isozyme variations in Japanese black pine, *Pinus thunbergii* Parl. *Silvae Genet.* 37: 93-100.

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 山本薫, 瀬尾明弘, 角川(谷田辺)洋子, 村上哲明「伊豆大島におけるベニシダ類の無配生殖型と有性生殖型の生育値と火山活動との関係」第42回種生物学シンポジウム(P1)(京都)(12月10日-12日 2010年)

② Yamamoto, K., Yatabe-Kakugawa, Y., Seo, A. and N. Murakami. "Do apogamous ferns obtain genetic variation through hybridization with sexual relatives?" The 5th Symposium on Asian Pteridology and Fern Show (Shenzhen, China) (11月15日-21日 2010年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 明弘 (SEO AKIHIRO)

総合地球環境学研究所・研究部・プロジェクト研究員

研究者番号 : 30378567

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :