

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657059

研究課題名(和文) 風穴植物の系統地理学 - 低地に氷河期の足跡を探る

研究課題名(英文) Phylogeography of "wind-hole plants": finding footprints of glacier era in lowland.

研究代表者

牧 雅之(Maki, Masayuki)

東北大学・学術資源研究公開センター・教授

研究者番号：60263985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 風穴は、冬の冷たい空気が夏でも吹き出す特殊な環境で、その周囲の環境に比べて1年を通して低い温度が保たれており、特異な植物種が見られる。それらの多くは本来、より高緯度または高標高に分布する。

このような風穴地特異な植物種の由来としては、最終氷期に現在より広く分布していた寒冷地の植物が、その後の温暖化に際して、風穴地の特異な環境に限って遺存的に生育していると一般的に考えられている。

本研究では、風穴地に特有な植物の集団遺伝分化を明らかにして、その由来を検討した。風穴地集団と高緯度・高標高集団では遺伝的分化が見られず、風穴地が寒冷地の植物のレフュージアになっているという仮説は支持されなかった。

研究成果の概要(英文)： Temperatures of areas around wind-holes are maintained to be very low even in summer. Therefore, plant species, which normally occurs in area at more high latitude or altitude, are uniquely found near wind-holes.

It is generally considered that such unique plants (hereafter, wind-hole plants) once widely spread in the Japanese Archipelago during past colder ages but retreated to high latitude or altitude area although some populations near wind-holes are maintained after climate warming after the last glacier era. Thus, wind-hole areas may be refugia for wind-hole plants.

In this study, the genetic differentiation between populations near wind-hole areas and in higher latitude/altitude areas in wind-hole plants were examined using molecular genetic markers to test the hypothesis above. There was no distinct difference in genetic constitution between wind-hole area populations and higher latitude/altitude ones, suggesting that wind-hole area may not be refugia for wind-hole plants.

研究分野：植物分類学

キーワード：系統地理学 遺伝的分化 風穴

## 1. 研究開始当初の背景

過去 20 年で、分子系統学と生物地理学を結び付けて、植物の過去の分布変遷を明らかにすることを目的とした分子地理系統学研究は急速に進んだ。申請者らは、国内の温帯域から冷温帯域に広く分布する草本植物を対象に分子系統地理学的解析を行って、これらの植物が最終氷期以前に朝鮮半島やサハリンとの間に生じた陸橋によって、ユーラシア大陸から移動してきたことを示した (e. g. Kikuchi et al., 2010, 2013)。これらの植物は、最終氷期をレフュージアで生き延びた後、その後の温暖化に伴って分布拡大を行ったものと考えられる。

一方、最終氷期あるいはそれ以前の寒冷期に国内に移住してきて、その後の温暖化によって分布を縮小したと考えられる植物群もある。その代表は、いわゆる高山植物であり、分子系統地理学的研究が国内でもっとも進んでいる (e. g. Ikeda and Setoguchi, 2007, 2008)。

我々は、国内を広くサンプリングする過程で、各地の低地の風穴地を訪れる機会があり、そこに生育する植物相が特異であることに関心を抱いた。これらの植物は風穴地から吹き出す風が摂氏 10 以下に保たれているために、維持されていると考えられている。したがって、最終氷期に国内に広く分布していた寒冷地植物が、その後の温暖化で北上した際に取り残されたと一般には考えられている。

五百川と石沢 (2003) は、風穴付近に生育する植物相を現地調査と文献調査により精査し、キタノミヤマシダ、ウサギシダ、オオタカネバラ、エゾヒョウタンボクの 4 種が、日本において中部地方以北に分布し本州では稀産とされているものの、風穴地においてはしばしば生育が見られることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

風穴地に特異的に見られる植物群の由来としては、先に述べたように最終氷期に広く分布していた寒冷地植物が風穴という特殊環境に遺存的に生育していると考えられる一方 (レフュージア仮説)、シダ植物や鳥散布植物のように長距離の散布が可能な植物も少なくない。したがって、現在は北海道や亜高山帯などの冷涼な地域に現在は分布が限定されている種の集団から、孢子や種子の長距離散布によって現在の風穴付近に到達し、その特殊環境によって集団が維持されている可能性もある (長距離散布仮説)。

そこで本研究では、風穴地に特有に見られ

る植物種について、より低緯度に存在する風穴周辺の集団とそれよりも高緯度もしくは亜高山以上の高標高にある、風穴に関係のない集団の遺伝的分化を遺伝子マーカーを用いて解析し、レフュージア仮説と長距離散布仮説のどちらが支持されるのかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、五百川・石沢 (2003) で特筆されている 4 種のうち、シダ植物よりも散布能力が低いと考えられるオオタカネバラとエゾヒョウタンボクの 2 種を対象として、本州北部の風穴地付近の集団を風穴集団、北海道の集団 (風穴地も含む) と亜高山帯の集団を冷涼集団として、実際に現地を踏査することによりサンプリングを行った。なお、エゾヒョウタンボクには、五百川・石沢 (2003) にしたがって、スルガヒョウタンボクとされる中部地方の集団も含めた。

集団から複数の個体を採取して、実験室に持ち帰り、葉片からトータル DNA を抽出した。

葉緑体 DNA の遺伝子間領域を PCR によって増幅し、DNA オートシーケンサーによって塩基配列を決定した。オオタカネバラについては、スクリーニングを行った結果、変異が見られた 2 領域の合計 1600bp を集団あたり 8 個体について決定した。また、エゾヒョウタンボクについては、同様に 2 つの遺伝子間領域、合計 1100bp を集団あたり 4 個体について決定した。

また、核 DNA による情報としては、リボゾーマル DNA の internal transcribed spacer (ITS) 領域を PCR 増幅し、DNA オートシーケンサーによって塩基配列を決定した。

これらのデータから得られた配列情報によって、ハプロタイプを決定して、風穴集団と冷涼集団の間での遺伝的分化および集団内の遺伝的多様性について比較して、レフュージア仮説と長距離散布仮説の点から考察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 葉緑体 DNA による解析

オオタカネバラのハプロタイプに関する TCS ネットワークと集団のハプロタイプ構成を図 1 に、エゾヒョウタンボクのハプロタイプに関する TCS ネットワークと集団のハプロタイプ構成を図 2 に示す。

オオタカネバラでは、4 つのハプロタイプが見られ、ハプロタイプ A が風穴集団と冷涼集団の両方で広く共通してみられた。また、ハプロタイプ B は山形の 1 集団で固定してみられた一方、北海道中部の 2 集団でも見られ

た．ハプロタイプ C と D は，それぞれ冷涼集団と風穴集団の 1 集団のみに見られた．ほとんどの集団では単一のハプロタイプから構成されていたが，北海道中部の 2 集団と青森県の 1 つの風穴集団では集団内多型が見られた．

エゾヒョウタンボクには 4 つのハプロタイプが見られ，ハプロタイプ A は風穴集団の全てで固定されていた．また，北海道中部の 3 集団でも同様にハプロタイプ A が固定されていた．一方，ハプロタイプ B, C, D については北海道の集団のみで観察された．エゾヒョウタンボクはどの集団でも単一のハプロタイプに固定されていた．

これらのデータを 2 つの仮説から検討する．今回の解析では，風穴集団と冷涼集団で共通してみられるハプロタイプ（オオタカネバラ，エゾヒョウタンボクともにハプロタイプ A）が全体の大部分を占めていたことから，本州に風穴付近に見られる集団は北海道の集団から長距離散布によって生じた可能性がある．また，どちらの種についても，北海道全体を見た場合にハプロタイプの多様性が高いことから，これらの 2 種の集団有効サイズは北海道の方が大きいものと推定される．

一方で長距離散布仮説では説明できないハプロタイプも観察された．オオタカネバラで見られたハプロタイプ D は青森県の 1 集団のみに観察されており，このハプロタイプが北海道の集団から由来しているかどうか不明である．北海道の集団にハプロタイプ D をもつ集団がある可能性と本州に長距離散布された後に突然変異によって生じた可能性の両方が考えられる．

一方，葉緑体 DNA の進化速度はあまり速くないため，最終氷期以降の遺伝的分化を検出できていない可能性もある．この点については，遺伝的多様性が高い領域を用いることと葉緑体 DNA のさらに多くの配列を決定することによって検証が可能であると考えられる．

## (2) 核 DNA を用いた解析

2 種の全集団にわたって，核 ITS 領域には変異が見られず，レフュージア仮説と長距離散布仮説のどちらが指示されるかについての情報が得られなかった．葉緑体 DNA による変異があまり見られなかったことから，進化速度の速い遺伝子マーカーを用いて検討する必要がある．サンプリングした全ての集団で複数個体を採取することができたので，Simple Short Repeats(SSR)マーカーを用いた集団遺伝学的解析が 2 つの仮説を検討するのに有効な集団であると考えられる．

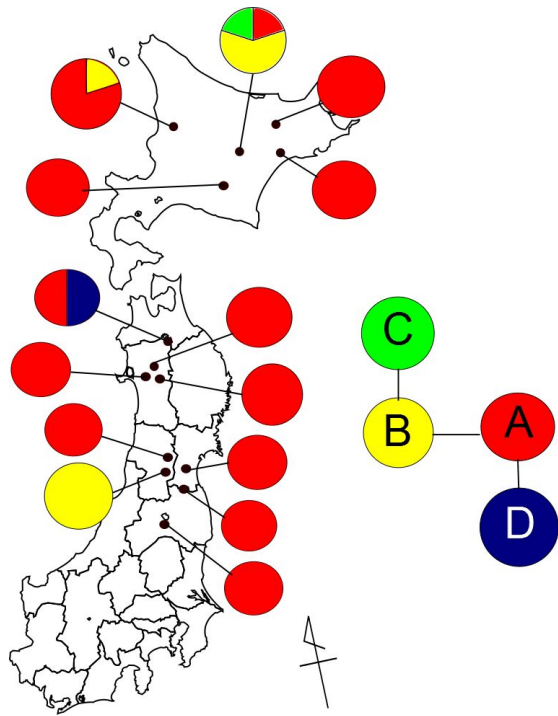


図 1. オオタカネバラのハプロタイプネットワークと各集団のハプロタイプの構成．

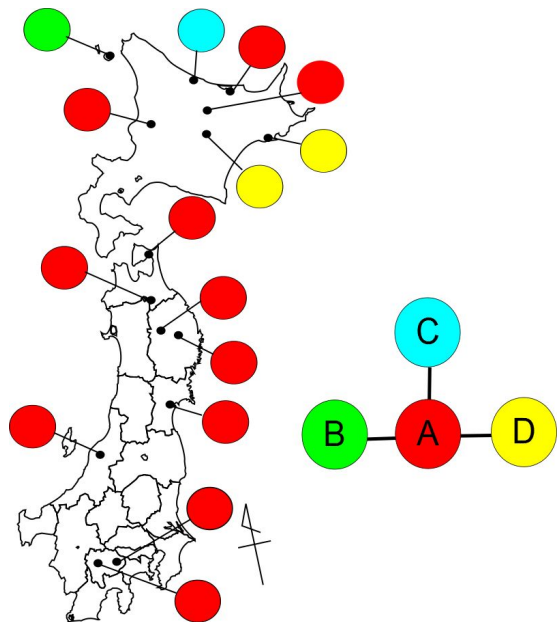


図 2. エゾヒョウタンボクのハプロタイプネットワークと各集団のハプロタイプの構成．

## (3) 本研究の成果から期待される今後の研究展開

本研究で対象とした 2 種は，鳥散布と考えられる被子植物であり，シダ植物と比較すると散布能力は大きくないと考えられる．もし，長距離散布仮説が正しいとすると，極めて範囲の狭い風穴地に別のやはり範囲の限定的な風穴から，あるいは，北海道や亜高山帯からの非常に長距離の散布者を想定しなければならない．今後はより変異性の高い遺伝子マーカーを用いた解析が必要であると考え

られる。

また、本研究では解析の対象としなかったシダ植物において、同様の解析を行うことによって、散布能力の違いと現在見られる遺伝的分化の相関を明らかにすることができる可能性がある。散布者に依存せず、より散布能力が高いと期待できるシダ植物では、長距離散布が現在の風穴集団の成立要因になっているかどうかを検討する必要があるものと考えられる。

#### (4) 引用文献

五百川裕・石沢進 (2003) 風穴地の維管束植物(1). 植物地理・分類研究 51: 13-26.

Kikuchi, R., Pak, J.-H., Takahashi, H. and Maki, M. (2010) Disjunct distribution of chloroplast DNA haplotypes in the understory perennial *Veratrum album* ssp. *oxysepalum* (Melanthiaceae) in Japan due to ancient introgression. *New Phytologist* 187: 879-891.

Kikuchi, R., Pak, J.-H., Takahashi, H. and Maki, M. 2013. Pattern of population genetic structure revealed by nuclear SSR markers in the understory perennial *Veratrum album* ssp. *oxysepalum* (Melanthiaceae) with a disjunct pattern of chloroplast DNA haplotypes. *Biological Journal of the Linnean Society* 108:278-293.

Ikeda, H. and Setoguchi, H. (2007) Phylogeography and refugia of the Japanese endemic alpine plant, *Phyllodoce nipponica* Makino (Ericaceae). *Journal of Biogeography* 34: 169-176.

Ikeda H. and Setoguchi, H. (2009) The homogenous genetic structure and inferred unique history of range shifts during the Pleistocene climatic oscillations of *Arctericia nana* (Maxim.) Makino (Ericaceae). *Journal of Plant Research* 122: 141-151.

#### 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4件)

Kizawa, A. and Maki, M. 2015. Phylogeography of *Arabis serrate* (Brassicaceae) in the Japanese Archipelago based on chloroplast DNA variations. *Plant Species Biology*. in press. 査読あり . DOI:

10.1111/1442-1984.12072

Lee, S.-R. and Maki, M. 2013.

Comparative phylogeographic study on *Hosta seiboldiana* and *H. albomarginata* (Liliaceae) in Japan. *Ecology and Evolution* 3: 4767-4785. 査読あり . DOI: 10.1002/ece3.838.

Li, Y. and Maki, M. 2015. Development and characterization of microsatellite markers for *Veratrum maackii* (Melanthiaceae). *Application in Plant Sciences*: in press. 査読あり

Yamashiro, T., Yamashiro, A., Dohzono, I. and Maki, M. 2013. Development of microsatellite markers for *Isodon longitubus* (Lamiaceae) *Application in Plant Sciences* 1: 1300018. 査読あり . DOI: 10.3732/apps.1300028.

[学会発表](計2件)

李尚龍・牧雅之.: オオバギボウシとコバギボウシの比較系統地理学的研究. 日本植物分類学会第12回大会: 2013年3月15日: 千葉大学.

木村拓真・牧雅之.: 異なる標高に生育するアキノキリンソウ(広義)の分子系統地理. 日本植物分類学会第13回大会: 2014年3月21, 22日: 熊本大学

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

牧 雅之 (MASAYUKI MAKI)

東北大学・学術資源研究公開センター・教授  
研究者番号: 60263985

##### (2)研究分担者

山城 考 (TADASHI YAMASHIRO)

徳島大学・総合科学部・准教授  
研究者番号: 50380126