

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26830147

研究課題名(和文) 絶滅が危惧される日本産ハナシノブ属植物の集団動態および局所適応メカニズムの解明

研究課題名(英文) Demographic history and local adaptation of Japanese Polemonium which all taxa are endangered

研究代表者

横川 昌史 (Yokogawa, Masashi)

大阪市立自然史博物館・学芸課・学芸員

研究者番号：30649794

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)：本研究では、すべての分類群が絶滅危惧種である日本産ハナシノブ属について、標本データに基づく詳細な分布図の作成、MIG-seq法による大量の一塩基多型データの取得を行い、その系統関係と集団構造を明らかにした。その結果、国内に大きく4つの遺伝的なクラスターが認識でき、その分布は地理的な構造と生育環境に対応した結果であった。これらの情報は属レベルで絶滅が危惧されている日本産ハナシノブ属植物の保全や管理単位の検討の基礎データになると同時に広域的な保全策の策定に役立つものと考えられる。一方で、局所適応に関連したマーカーの探索は十分なデータが得られなかったこともあり、詳細な検討はできなかった。

研究成果の概要(英文)：I made detailed distribution maps of Japanese Polemonium which all taxa are endangered species on the basis of specimen data. I also revealed phylogenetic relationship and demographic structure of them on the basis of a large amount of single nucleotide polymorphism data by MIG-seq method. As a result, four genetic clusters could be recognized and their distribution corresponded to geographical structure and habitat environment. These information are considered to be useful for conservation and management of Japanese Polemonium. On the other hand, searching for markers related to local adaptation could not be achieve because sufficient data could not be obtain.

研究分野：植物生態学・保全遺伝学

キーワード：ハナシノブ属 一塩基多型 MIG-seq 標本 絶滅危惧種 集団構造

1. 研究開始当初の背景

DNA 分析技術の進展に伴い、非モデル生物である野生生物でも大量の遺伝マーカーを用いた解析が可能になってきた。一般に遺伝的多様性が低いことが多い絶滅危惧種では、大量の遺伝マーカーを用いることで集団動態や局所適応を詳細に理解することができ、より効果的な保全策の検討が可能になると予想される。

日本のハナシノブ属植物は、*Polemonium caeruleum* 1 種が認められ、研究者によって見解は異なるもの、変種以上の種内分類群としてハナシノブ *P. ca.* subsp. *kiushianum*、カラフトハナシノブ *P. ca.* subsp. *laxiflorum* var. *laxiflorum*、クシロハナシノブ *P. ca.* *laxiflorum* var. *paludosum* ミヤマハナシノブ *P. ca.* subsp. *yezoense* var. *nipponicum*、エゾノハナシノブ *P. ca.* subsp. *yezoense* var. *yezoense* の 5 つ分類群が認識されている(図 1)。これらの分類群は、すべて環境省のレッドデータブックに掲載されている絶滅危惧種である。これらは生態的な分化が背景にある分類群であると考えられ、大量の遺伝マーカーを用いた絶滅危惧種の集団動態や局所適応の検討の好例になる可能性がある。



図 1. Flora of Japan (Yamazaki 1993)に基づく日本産ハナシノブ属植物の分布

2. 研究の目的

日本産ハナシノブ属植物について、ゲノムワイドな一塩基多型の探索を行い、詳細な集団構造の推定、系統関係の把握、適応的な遺伝子座の探索を目的とした。

また、対象とする分類群はすべて絶滅危惧種であり、詳細な生育地の情報が不足しているため、標本に基づく分布情報の整理も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 標本調査

研究対象種の野外調査を進めるにあたり、確実な生育地の情報が不足していたため、各地の標本庫(北海道大学総合博物館、北海道大学植物園、弘前大学白神自然環境研究センター、国立科学博物館、東京大学、京都大学、大阪市立自然史博物館、兵庫県立人と自然の博物館、倉敷市立自然史博物館、山口県立山口博物館)を訪ねて日本産ハナシノブ属の標

本記録を整理した。

(2) 野外調査

日本産ハナシノブ属の各地の自生地を訪れ、DNA 分析用に葉サンプルを採集した。採集したサンプルをシリカゲルで乾燥させ保存した。野外調査の際、地元の研究者等と連絡を取り、可能な限り現地協力者にサポートをお願いするよう心掛けた。なるべく近年の記録がある場所を優先したが、長らく記録がない場所についても生育の確認を兼ねて調査した。

(3) DNA 分析

供試したサンプルは日本国内各地から得たハナシノブ属植物と比較用にモンゴル産ハナシノブ属植物である。CTAB 法を用いて、DNA 分析用の 192 サンプルから DNA を抽出し、実験用のテンプレート DNA とした。MIG-seq 法 (Suyama and Matsuki 2015) を用いて、これらのサンプルを分析した。得られた約 80bp の配列 50,876,300 リードを用いて一塩基多型の探索を行い、欠損率 50% 以上のサンプルと遺伝座を排除して、集団構造や系統推定に用いた。

得られた遺伝子型データを元に、主成分分析や STRUCTURE 分析 (Hubisz 2009) によって集団遺伝構造等の推定を行った。

4. 研究成果

(1) 標本調査

467 点の日本産のハナシノブ属標本(重複標本を除く)を確認し、詳細な分布図を作成した(図 2)。分布の中心地である北海道で多くの標本が採集されている一方で、道内でも分布や密度に偏りがあることが明らかになった。国内産の標本を元にハナシノブ属の記載がはじめて行われた時代や分類の検討がなされた時代に標本採集数のピークがあり、研究史との関連性も見出すことができた。また、現在の生育が確認している地域であっても過去 30 年に標本が採られていない地域があった。これらの多くは国立公園などに指定されており、研究目的であっても標本採集のハードルが高いことが示唆される。

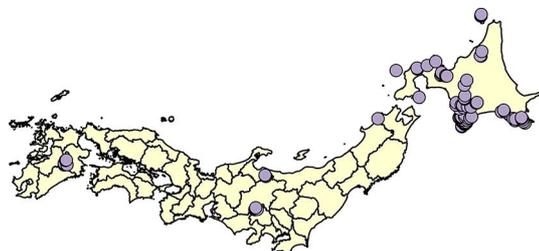


図 2. 標本に基づく日本産ハナシノブ属植物の分布図.

(2) 野外調査

上記の分布図の中から可能な限り多くの地点を周り、DNA サンプルの収集を行った。

標本記録がある多くの地点では今回の野外調査で生育を確認できた。一方で、奥尻島や札幌近郊などは過去 50 年以上標本の記録がなく、今回の調査では生育を確認できなかった。このような場所では局所絶滅した可能性が高い。

(3) DNA 分析

MIG-seq 法で得られた塩基配列からデータを精査した結果、171 サンプル 201 遺伝子座のデータを得ることができた。それらのデータを用いて、STRCUTRE 解析によるクラスタリングを行った結果、日本産ハナシノブ属の中に大きく 4 つの遺伝的クラスタを認識することができた(図 2)。クラスタ-1 は北海道の礼文島と根室・釧路に、クラスタ-2 は北海道の日高・十勝に、クラスタ-3 は北海道の石狩と後志および本州に、クラスタ-4 は熊本およびモンゴルに分布していた。また北海道の上川地域ではクラスタ-1 と 2 の混合構造が見られた。同様のサンプルセットで主成分分析を行ったところ、クラスタ-4 に属する熊本のサンプルが第二主成分で他の集団から明瞭に分かれた(図 3a)。加えて熊本のサンプルとほかの日本産のサンプルの間にモンゴルのサンプルがプロットされた。また、図 3a ではやや構造が不明瞭であった本州と北海道のサンプルについて、遺伝子座数を増やして再解析したところ、STRUCTURE 解析の結果に対応した明瞭な集団構造が確認された(図 3b)。第一主成分で、STRUCTURE 解析で得られたクラスタ-1、2、3 が明瞭に区別され、北海道の上川のサンプルはクラスタ-1 とクラスタ-2 の中間的な場所にプロットされた。

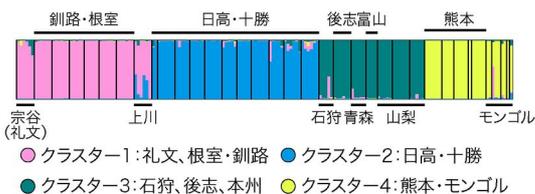


図 3. 171 サンプル 201 遺伝子座のデータを用いた STRUCTURE 解析による日本産ハナシノブ属の集団遺伝構造。

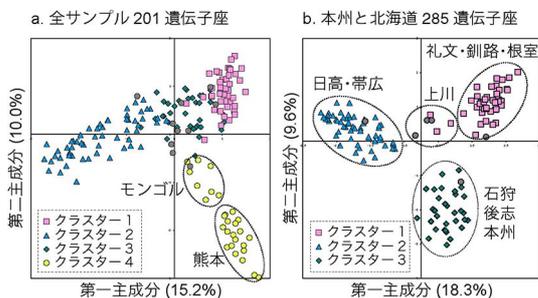


図 4. 主成分分析による日本産ハナシノブ属の遺伝的類縁関係。図中のクラスタは図 2 の結果に基づく。(a)供試した全サンプルを用いた解析。(b)本州と北海道のみで使える遺伝子座を増やして再解析。

(4) DNA 分析に関する考察

日本産ハナシノブ属は特に本州以南で明瞭な隔離分布が見られる。その由来についてはこれまでは掘り下げた議論は行われなかったが、本研究により熊本のサンプルは本州や北海道のサンプルよりもモンゴルのサンプルと遺伝的に近いことが明らかになった。これらのことは日本産ハナシノブ属の分布の成立に関して、朝鮮半島経由とサハリン・千島経由の 2 つのルートがあった可能性を示唆している。今後、海外のサンプルを加えて分析を進めることで、日本産ハナシノブ属植物の由来についてより詳細な検討が可能になると考えられる。

日本産ハナシノブ属の既存の分類学的取り扱いと本研究で得られた遺伝的類縁関係の比較をしてみると、九州だけに分布するとされるハナシノブ *P. ca. subsp. kiushianum* はクラスタ-4 として明瞭に区別された。一方で、カラフトハナシノブ *P. ca. subsp. laxiflorum* の系統は亜種レベルでクラスタ-1 と対応していたが、変種レベル、すなわちカラフトハナシノブとクシロハナシノブの遺伝的分化は見られなかった。また、エゾハナシノブ *P. ca. subsp. yezoense* の系統にはクラスタ-2 および 3 に含まれたものの、変種であるミヤマハナシノブとエゾノハナシノブの分布とこれらのクラスタは対応していなかった。日本産ハナシノブ属は、生育環境の違いなどによって生態的な分化は見られ、それらを反映したある程度の形態の差はあるものの、遺伝的な分化とは必ずしも一致しないことが示唆された。

本研究では、当初の予定では適応に関連した遺伝子座まで検討する予定であった。しかし、予定していたよりも得られた遺伝子座が少なく、非中立なマーカーを探索するには十分なデータを得ることができなかった。その背景として、日本産ハナシノブ属はいずれも絶滅危惧種であり集団サイズが小さいため、普通種に比べて遺伝的多様性が低い可能性がある。そのため、MIG-seq によって得られる遺伝子座の数が少なかった可能性がある。今後は、データのスクリーニングの段階で条件の検討を行うなどして、使えるマーカーを増やしていく必要がある。

日本産ハナシノブ属について、例えば、道東のクシロハナシノブは明らかに湿地に適応した小型のタイプであるし、本州のミヤマハナシノブは他の地域に比べて高標高域に分布しており、明らかに生態的な分化が見られる。しかしながら、生態分化に対応した遺伝的構造は見られなかった。このことから、これらの生態分化は比較的短い時間スケールで獲得された可能性が高いことが示唆される。今後は上記のように非中立なマーカーを探りながら、栽培実験などによってそれらの生態分化の基盤に迫っていく必要があると考えられる。

<引用文献>

Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K., Inferring weak population structure with the assistance of sample group information, *Molecular Ecology*, Vol.9, No.5, 2009, pp1322-32.

Suyama Y., Matsuki Y., MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform, *Scientific Reports*, No.5, 2015, 16963.

Yamazaki T., Polemoniaceae. In: Iwatsuki K., Yamazaki T., Boufford D.E., Ohba H. (eds), *Flora of Japan IIIa*, KODANSHA, Tokyo, 1993, pp242-243.

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2件)

日下部玄、横川昌史、安生浩太、野原七恵、小池幸雄、大野美涼、山岸洋貴、白神山地向白神岳北部稜線に生育する木本類について、*白神研究*、査読有、No.13、2018、pp54-59.

横川昌史、佐藤千芳、高橋佳孝、過去の草地改良が草原植生に与える影響:阿蘇地域での一例、*地域自然史と保全*、査読有、Vol.39、No.2、pp113-119.

横川昌史、クシロハナシノブ、*Nature Study*、査読無、Vol.62、No.7、pp1, 11.

横川昌史、氷期の遺存種、*Nature Study*、査読無、Vol.62、No.7、pp5.

[学会発表](計4件)

横川昌史「絶滅危惧植物を含む日本産ハナシノブ属のさく葉標本の収集状況」第65回日本生態学会大会(2018年3月16日 札幌市 ポスター発表)

横川昌史・綱本良啓・陶山佳久「Mig-seqを用いた日本産ハナシノブ属の遺伝的類縁関係の推定」第16回日本植物分類学会大会(2017年3月10日 京都 ポスター発表 P14)

Yokogawa M, Takahashi Y, Isagi Y. "Genetic status and demographic history of *Polemonium caeruleum* subsp. *kiushianum* recovered from soil seed banks" The 7th EAFES International Congress (April 2016, Daegu, Korea: Oral presentation in Symposium)

横川昌史「半自然草原の生物多様性保全

について注意すべきこと」2015年度日本草地学会信州大会(2015年3月25日 南箕輪村 口頭 企画シンポジウム1「草地生態系の多面的機能と環境保全」.)

[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]

ミニ展示「日本のハナシノブ」

大阪市立自然史博物館において、科研費の成果を展示し、広く普及を図った。

関連ホームページ

http://www.omnh.net/whatsnew/2017/06/post_283.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

横川昌史(YOKOGAWA, Masashi)

大阪市立自然史博物館

研究者番号: 30649794