

氏名	藤井紀行
生年月日	
本籍	兵庫県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第224号
学位授与の日付	平成9年9月30日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	日本産高山植物の分子系統地理学的研究
論文審査委員	(主査) 植田 邦彦 (副査) 和田敬四郎, 山口 和男, 御影 雅幸, 長谷部光泰

学位論文要旨

Abstract

In order to clarify evolutionary patterns and processes of intraspecific diversification of the "Pacific element" in Japanese alpine plants, I have analyzed intraspecific variations of the nucleotide sequences of three non-coding regions of chloroplast DNA (cpDNA): the intergenic spacers between *trnT* (UGU) and *trnL* (UAA) 5'exon, *trnL* (UAA) 3'exon and *trnF* (GAA), and *atpB* and *rbcl*. Phylogenetic analyses of cpDNA haplotypes showed that *Pedicularis chamissonis* and *Primula cuneifolia* possessed two and three major clades, respectively. Furthermore, each clade of both species was found to be geographically structured. The cpDNA clades in northern region (the Northern or Hokkaido clades) had wider distribution areas from northern Honshu in Japan northward to Unalaska Island of the Aleutians. The cpDNA clades in southern region (the Southern clades) occurred in central Honshu, Japan. In both species, the Southern clades were genetically more differentiated than the Northern or Hokkaido clades. In other seven species of Pacific element, on the other hand, few molecular polymorphisms were observed in the intergenic spacer between *trnL* and *trnF*. From these results, I concluded that the plural clades of *Pe. chamissonis* and *Pr. cuneifolia* might have immigrated down to Japanese Archipelago from the north in not a single glacial period before last one, and other seven species, furthermore, might have come down to the Japanese Archipelago in the last glacial period.

(1) 序論

現在の日本産高山植物の分布パターンがどのように成立してきたかを考察する植物地理学的な研究は、20世紀初頭から多くの研究者によって行われてきた。これらの研究では各高山植物の分布域を検討し、同様な分布パターンを持った種群を1つの要素として区分した結果からそれらの持つ歴史を推定する、という手法が一般的に用いられる。これによると日本産高山植物は、主にアジア要素(アジア大陸に限って分布する植物)や周北極要素(北半球の北部地域に広く分布する植物)としてまとめられる種群が第四紀更新世の氷河時代に日本列島に侵入し、日本の高山に遺存的に残った種群であると考えられきた。しかしながら、このような議論は多くの仮定を含んだものであり、仮説検証することが不可能であることは否めない。

近年、分子情報が比較的容易に扱えるようになり、植物では葉緑体DNAを用いた系統解析がさかんに行われている。一般に葉緑体DNAは進化速度の遅い保存的なマーカーであると考えられているが、最近では葉緑体DNAの種内や近縁種間における変異が多く報告されるようになってきた。さらにこの情報を利用し、集団レベルの系統関係や遺伝的な地理的構造を明らかにした研究が行われつつある。

そこで本研究では、この分子情報を用いることによってこれまで曖昧な議論を余儀なくされてきた日本産高山植物の歴史的な側面をより客観的に議論することを目的としている。なお本研究では日本産高山植物の中から太平洋要素としてまとめられる種群を対象にした。この要素は日本産高山植物の中でアジア要素や周北極要素に次いで種類数の多い種群であり、日本を含めた北太平洋周辺地域に帯状に分布している。面的に分布しているアジア要素や周北極要素に比べて、帯状に分布している太平洋要素は、その分布の成立過程を推定するうえでの解釈が比較的容易になると考える。

(2) 材料と方法

太平洋要素の種群の中から、以下の9種群を対象とした：(1) ヨツバシオガマ (*Pedicularis chamissonis* Steven) 24集団, (2) エゾコザクラ (*Primula cuneifolia* Ledeb.) 18集団, (3) イワギキョウ (*Campanula lasiocarpa* Cham.) 6集団, (4) ハクサンチドリ (*Orchis aristata* Fisch.) 13集団, (5) クロユリ (*Fritillaria camtschaticensis* (L.) Ker Gawl.) 6集団, (6) サマニヨモギ (*Artemisia arctica* Less.) 2集団, (7) ヒメクワガタ群 (エゾヒメクワガタ; *Veronica stelleri* Pall. ex Link var. *longistyla* Kitag., シナノヒメクワガタ; *V. nipponica* Makino ex Matsum. var. *shinano-alpina* H. Hara) 2集団, (8) エゾノシシウド群 (エゾヤマゼンコ; *Coelopleurum trichocarpum* (H. Hara) Kitag., ミヤマゼンコ; *C. multisectum* (Maxim.) Kitag.) 2集団, (9) ミヤマダイコンソウ (*Geum calthifolium* Sm. var. *nipponicum* (F. Bolle) Ohwi) 2集団。その中で多型の多く検出されたヨツバシオガマとエゾコザクラを中心に解析を進めた。

ヨツバシオガマとエゾコザクラに関しては、葉緑体DNAの3遺伝子間領域の塩基配列を

決定した：(1) *trnT* (UGU)–*trnL* (UAA) 5'exon；(2) *trnL* (UAA) 3'exon–*trnF* (GAA)；(3) *atpB*–*rbcL*。一方、イワギキョウ他6種群は、*trnL*–*trnF*の遺伝子間領域のみ塩基配列決定した。遺伝子間領域は遺伝子領域に比べて進化速度が速く、近縁な分類群間の系統解析に有効であることが示されている。各種群において、決定した塩基配列データをアライメントし、塩基置換や挿入／欠失の形質をもとに葉緑体DNAハプロタイプを決定した。その後、最節約法、近隣結合法、最尤法の3つの方法でハプロタイプ間の系統解析をおこなった。

(3) 結果

ヨツバシオガマの24集団55個体を解析した結果、17種類の葉緑体DNAハプロタイプが検出された (Fig. 1)。それらの系統解析からは2つの大きな系統 (北方系統と南方系統) が認められ、両者は地理的にまとまっていることが明らかとなった。北方系統の葉緑体DNAは本州中北部の飯豊山以北の集団でみられ、南方系統のそれは本州北部の月山以南の集団で観察された。また北方系統内と南方系統内の遺伝的距離を比較した結果、前者の方が後者に比べて有意に小さいことが示された (Mann-WhitneyのU検定)。

エゾコザクラの18集団88個体を解析した結果、8種類の葉緑体DNAハプロタイプが検出された (Fig. 2)。それらの系統解析からは3つの大きな系統 (北方系統、北海道系統、南方系統) が認められ、各々は地理的にまとまっていることが明らかとなった。北方系統の葉緑体DNAは北海道の利尻島と斜里岳以北の集団で、北海道系統のそれは北海道の大雪山や日高山系、本州北部の岩木山の集団、南方系統のそれは本州中北部の飯豊山以南の集団において観察された。ただしそれら3つの系統間の関係は多分岐となり分からなかった。さらにヨツバシオガマと同様に、北方地域の系統 (北方系統や北海道系統) の葉緑体DNAは集団間の遺伝的な分化が小さく、本州中部の南方系統のそれは山岳ごとに細かく分化しており遺伝的な分化が大きいという結果が得られた。

一方、イワギキョウ他6種群では葉緑体DNAの種内および群内の変異は少なかった。イワギキョウ、クロユリ、エゾノシシウド群では多型は検出されたが、多型の量はヨツバシオガマやエゾコザクラに比べるとかなり少なかった。またハクサンチドリ、サマニヨモギ、ヒメクワガタ群、ミヤマダイコンソウではまったく変異がなかった。

(4) 考察

ヨツバシオガマとエゾコザクラでの解析結果をもとに、両種の複数系統の葉緑体ゲノムがどのような分布の変遷過程を経てきたのかについて以下の3つの仮説を立てた。第1は、日本における長期間の分断が原因となって複数の系統が分化したという仮説である (長期間分断説)。第2は、複数の系統が別々のルートを経て日本列島に侵入してきたという仮説である (別ルート侵入説)。この場合、北方系統や北海道系統がサハリンや千島列島を経て北から侵入し、南方系統が朝鮮半島を経て西方から侵入してきたと考える。第3は、複

数の系統が時間差をもって日本列島に侵入してきたという仮説である (時間差侵入説; Fig. 3)。

それぞれの仮説に対して、その妥当性を検討してみた。まず第1の長期間分断説は、過去の地史的情報からは日本において長期の分断をもたらすようなイベントは知られておらず考えにくい。また第2の別ルート侵入説も、現在の両種の分布状況から判断して考えにくい (両種とも本州西部や朝鮮半島、中国にはまったく分布していない)。一方、第3の時間差侵入説は、第4紀更新世における氷期と間氷期のくりかえしという地史的イベントが知られているので考えやすい。また北方系統や北海道系統のハプロタイプ間の遺伝的な分化が南方系統のそれよりも小さいという結果はこの仮説を支持していると思われる。以上のことから、第3の仮説が最も妥当性が高いと考える。つまりヨツバシオガマやエゾコザクラでは南方系統の葉緑体ゲノムが先に侵入し、後から北海道系統や北方系統が侵入してきたものと推察した。

イワギキョウ他6種群においては葉緑体DNAの種内変異が少なかった。このことはこれらの種群が最近になって分布を拡大したためと考える。分類群間の分子進化速度の違いによる影響とも考えられるが、本研究で解析した9種群はすべて多年性の草本植物である。したがってイワギキョウ他6種群の進化速度がヨツバシオガマやエゾコザクラのそれよりも特に遅いとは考えにくい。

第4紀更新世 (200–1万年前) には、氷期と間氷期のくりかえしが数万年のサイクルをもって複数回あったことが知られている。さらに最終氷期 (数万年–1万年前) には氷河や氷床におおわれていた地域は、全陸地の27%に達したことが知られている。そしてこの氷期に現在日本列島でみられる寒地性の動植物の多くが侵入してきたことが、化石の記録や花粉分析から明らかにされている。また更新世後期にかけて、日本列島における断層活動が活発化し、本州中部の山岳が高い標高を持つようになったことが知られている。これらのことから現在の日本に分布している高山植物の変遷過程には最終氷期が最も大きな影響を及ぼしたと考えられている。

以上のことをふまえて、日本産高山植物の太平洋要素の変遷過程をまとめたい。この種群の歴史に第4紀更新世の氷期と間氷期の複数回のくり返し関与していることは間違いないと思われる。ただし、いつ頃の氷期に侵入してきたのか、または古くに侵入した系統が残っているのかという点が種によって異なるために、種群によって葉緑体DNAの種内変異の多型の量や分布パターンに違いがあるものと思われる。ヨツバシオガマとエゾコザクラの分布の変遷には最終氷期より前の氷期が少なくとも2回関わったものと推察される。つまり両種は複数の氷期の影響を残している種群と言える。一方、イワギキョウ他6種群の葉緑体DNAには多型は少なく、最終氷期に日本列島に侵入したものと推察される。つまりこれらの種群は、単一の氷期の影響を残した種群と言える。このように日本産高山植物の太平洋要素には、古い氷期に日本列島に侵入した系統が現在まで遺存的に残っている種群と最近になって日本列島に侵入した種群が存在していることが明らかとなった。

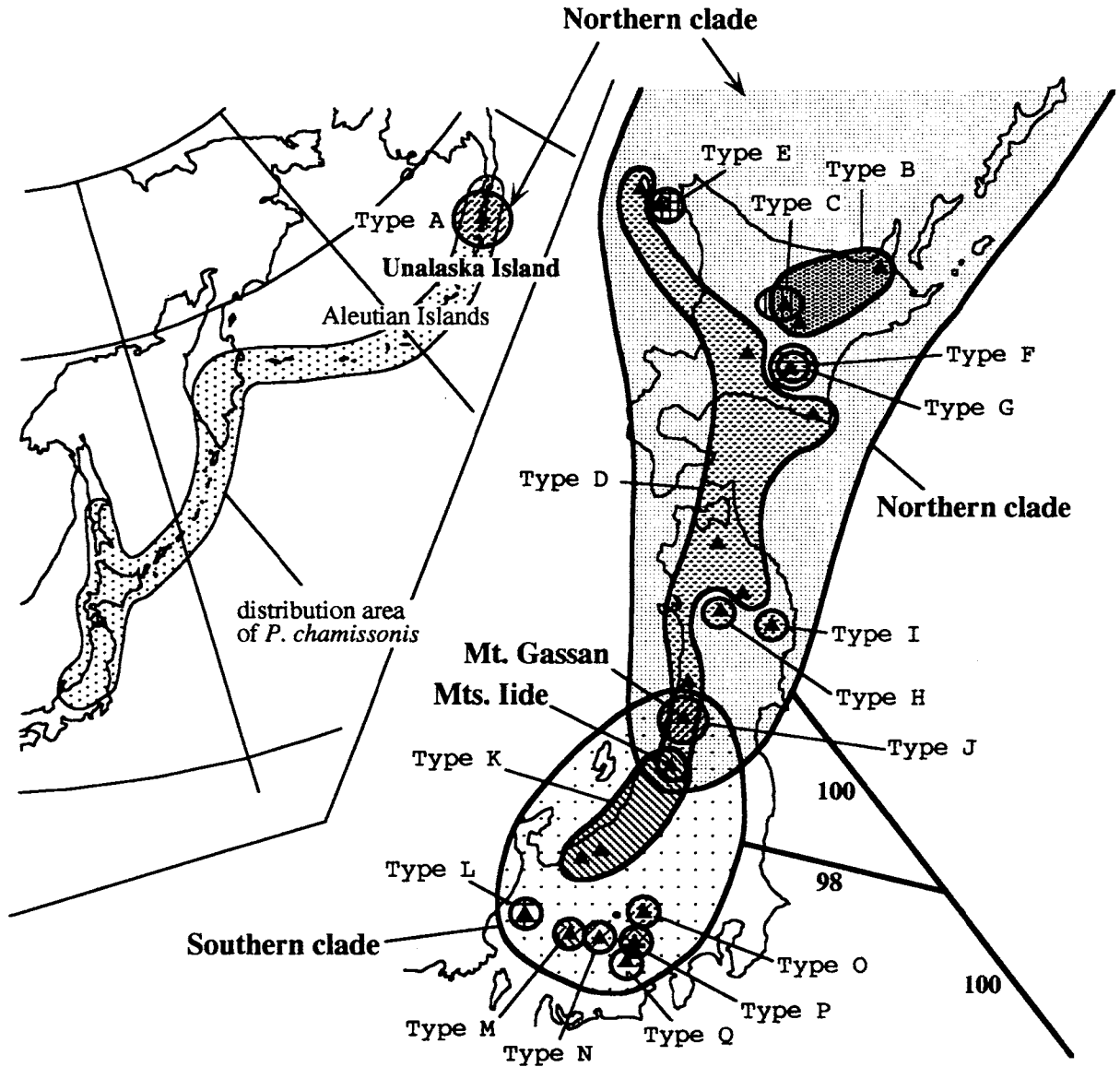


Fig. 1. The 17 distinct cpDNA haplotypes of *Pedicularis chamissonis* (Type A-Q). Two major clade (Northern and Southern clades) obtained from the most parsimony analysis are also indicated. Numbers below branches are bootstrap values in percentage based on 1,000 replicate analyses. In the populations of Mt. Gassan and Mts. Iide, the cpDNA haplotypes of both clades were observed.

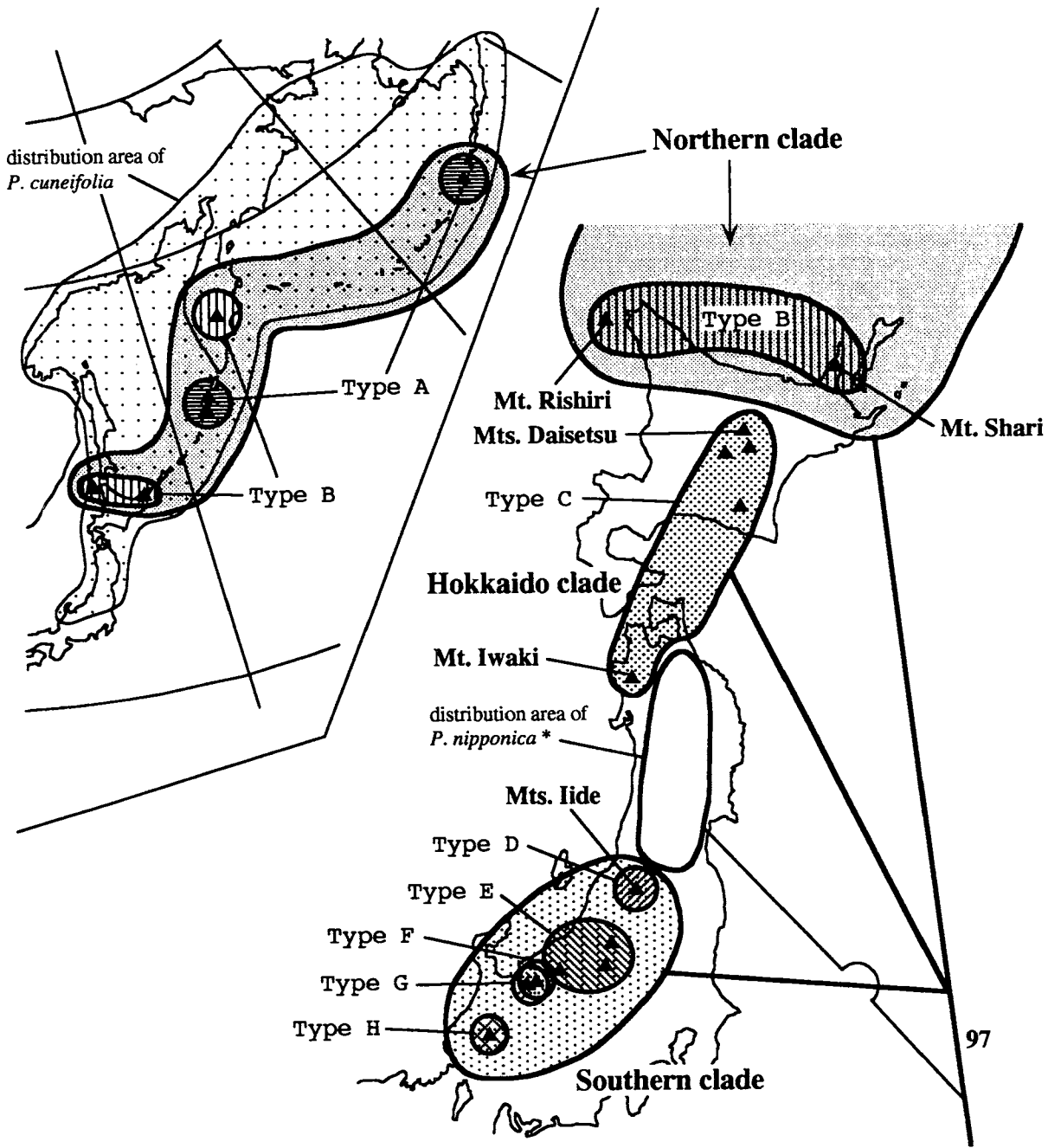


Fig. 2. The eight distinct cpDNA haplotypes of *Primula cuneifolia* (Type A-H). Three major clade (Northern, Hokkaido, and Southern clades) obtained from the most parsimony analysis are also indicated. Numbers along branch is bootstrap value in percentage based on 1,000 replicate analyses. Relationships among three clades were unresolved polytomies.

* *Primula nipponica* and *P. cuneifolia* belong to the same section (sect. *Cuneifolia*).

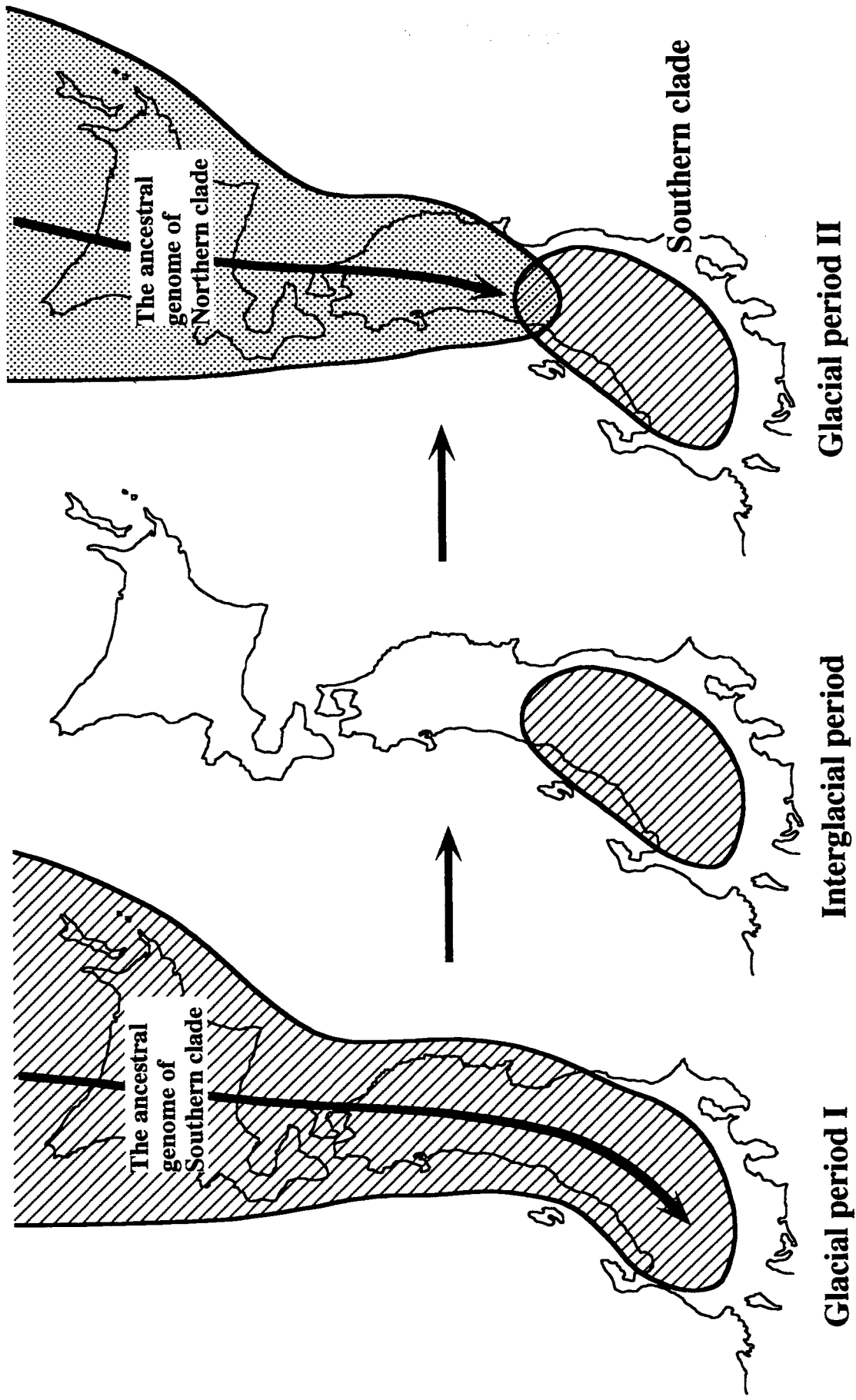


Fig. 3. A most probable scenario for the evolutionary processes of the two cpDNA clades in *Pedicularis chamissonis* (Hypothesis III). Two lineages had traveled southwards to the Japanese Archipelago during a different glacial period.

学位論文審査結果の要旨

各審査委員が提出学位論文に関して個別に審査を行うとともに、1997年7月24日の口頭試問の結果をふまえ、同日に論文審査委員会を開催し協議を行った。その結果、以下のように判定した。

日本の高山植物相の成立過程を歴史的に考察する研究は、従来は各種の分布を類型化した「要素区分」をもとに議論されてきた。しかし、この方法には科学的な根拠を見出すことが出来ない。そこで学位申請者は、葉緑体DNAの種内多型の把握と、それに基づく集団内・間の系統解析を行うことにより、日本の高山植物の植物地理学的理解を客観的で精度の高いものにするを試みた。解析対象としては従来太平洋要素としてまとめられた分布様式を示す種の中から9種群を取りあげた。その結果、(1)ヨツバシオガマとエゾコザクラの2種は、東西南部を境に南北に2系統に分かれ、さらにその中で地域集団を分化させた種であること、(2)イワギキョウ、ハクサンチドリ、クロユリ、サマニヨモギ、ヒメクワガタ群、エゾノシシウド群、ミヤマダイコンソウの7種群は比較的近年に日本列島に侵入してきた種群で遺伝的分化がほとんどないこと等を明らかにした。すなわち、太平洋要素とされていた種群には、異なる歴史を持った種が含まれていたことになる。また、葉緑体DNAの解析により種内レベルでの歴史的な変遷過程を解明できることを示した。

以上の研究成果は日本の高山植物相の成立過程についての初めての客観的な解析結果を示したものであり、生物学分野のみならず保全生物学分野にも大きく寄与するものである。したがって、本論文は博士（理学）の学位に値するものと判断する。