

## 論文内容の要旨

論文題目    Geographic structure as evidenced by ploidy level and DNA variations  
                  of *Aucuba japonica* (Aucubaceae) in the Japanese archipelago

(染色体倍数性とDNA多型からみた日本列島におけるアオキの地理的分化)

氏名    大井 哲雄

### 序論

植物の分布域の形成には、地史的要因が極めて大きな影響力を持っている。日本列島の植物は、第四紀に繰り返し起きた気候変動に伴い、分布域の縮小と拡大による変遷を遂げてきた。特に、最終氷期（約 10 万年～1 万年前）の寒冷化とその後の温暖化が、現在の分布域の成立に大きな影響を与え、種内レベルの地理的な分化が形成されたと考えられる。このような地理的分化の形成を明らかにする上で、系統推定の可能な分子情報に基づく解析が非常に有効である。被子植物では、半数性・母性遺伝で、種子散布で遺伝子流動が起きるオルガネラゲノムに分布変遷の歴史が反映されており、その遺伝的多型の地理的分布と系統関係から、分布域の動向、地理的分化のプロセスを捉えることができるようになってきた。日本列島の植物では、まだ解析例が限られているが、様々な植物での地理的分化のパターンを捉えることにより、日本の植物相の形成過程が明らかになると期待できる。また、オルガネラゲノムの情報に加えて、両性遺伝で、種子散布と花粉散布による遺伝子流動が起きる核ゲノムの情報も用いることにより、地理的分化と遺伝子交流の面から総合的に種内分化の全貌を明らかにできると期待できる。

本研究では、日本列島の温帯林に連続的に広い分布域をもち、種内に染色体倍数性が存在する常緑低木種アオキ *Aucuba japonica* (アオキ科) における地理的分化について明らかにすることを目的とした。アオキは、外部形態と染色体倍数レベルの違いから、異なる分布域をもつ種内分類群 (3 変種) が区別され、日本海側と太平洋側の間での地理的分化を示す代表的な植物と考えられている。概ね、太平洋側では植物体が直立するのに対し、日本海側では植物体が小型で匍匐する傾向があり、後者は日本海側の気候環境への適応によ

り形成されたと考えられている。しかし、その区別は厳密に捉えられてはいない。また、染色体倍数性は、2 倍体 ( $2n = 16$ ) が西日本に分布するのに対し、東・北日本には 4 倍体 ( $2n = 32$ ) が分布していることが示唆されているが、分布域内を通しての染色体倍数性は調べられていない。このような現状を踏まえ、まず、アオキ種内における種内倍数性と葉緑体DNA多型から地理的分化を明らかにし、種内倍数体の起源を明らかにした。また、明らかになった地理的分化を考慮し、種内レベルでの遺伝マーカーとして注目されはじめている核DNA low-copy遺伝子の多型解析を用いて、種内における遺伝子交流について明らかにした。これらの結果をまとめ、アオキ種内の地理的分化の過程について考察した。

## 結果と考察

### 染色体倍数レベルと葉緑体DNA多型からみたアオキの地理的分化

アオキ種内の 2 倍体と 4 倍体の地理的分布を明確に捉えるため、フローサイトメトリー法を用いて、分布域全体を網羅した個体のサイトタイプを調べた。根端細胞の染色体数を顕微鏡観察により計数した 2 倍体個体と 4 倍体個体を各サイトタイプのサイズマーカーにし解析した結果、調べた 151 個体のうち、58 個体が 2 倍体、93 個体が 4 倍体として区別できた。サイトタイプの地理的分布は、中国・四国地方の東経 134 度付近を境にして、西日本・台湾北部・鬱陵島に 2 倍体、東日本に 4 倍体が分布していることが明らかになった (図 1)。

アオキ種内の遺伝的多型における地理的構造を捉えるため、分布域全体を網羅した葉緑体DNA多型の地理的分布を調べた。3 種類の遺伝子間領域 *atpB - rbcL*; *psbA - trnH* (GUG); *trnT* (UGU) - *trnL* (UAA)5'exon の塩基配列 (約 1,900 bp) を 234 個体について決定し、塩基置換とlength polymorphismにより、9 個のハプロタイプが区別できた。アオキ種内の葉緑体DNA多型は、塩基多様度 ( $\pi = 0.00303$ ) で、平均的な植物種内レベルにある。ハプロタイプについての系統解析の結果からは、アオキは、台湾中南部の *Aucuba chinensis* と単系統群となり、そのクレードは 2 つのサブクレード (系統 1, 系統 2) からなること、系統 1 に *A. chinensis* が含まれ、アオキが側系統群であることが示された (図 2)。葉緑体DNAの塩基置換速度 (Richardson 2001) と、アオキと *A. chinensis* の塩基多様度に基づく、系統 1 と系統 2 の推定分岐年代は 320 万年~19 万年前であった。それら 2 つの系統の地理的分布は、非常に明確な地理的構造をもち、系統 1 が西日本・台湾北部・韓国鬱陵島と、関東・東海に、系統 2 が四国東部・紀伊半島・日本海側・東北にかけて分布しており、さらに各ハプロタイプには地域的な偏りがみられた (図 1)。また、染色体倍数性も考慮した地理的分布では、西日本の系統 1 の分布域の東端に 4 倍体が存在し、中国・四国地方にみられるサイトタイプの分布境界に近接して東側に、葉緑体の系統の分布境界がみられた (図 1)。

葉緑体ゲノムは種子散布で遺伝子流動が生じるため分布域の変遷を反映しており、さらにアオキは他の暖温帯植物同様に、最終氷期に太平洋沿岸に縮小していた分布域が温暖化により拡大したことを踏まえると、アオキの地理的分化のパターンは、最終氷期に異なる集団に別れていた系統の分布域が、その後の温暖化に伴い独立に拡大したことにより形成されたと想定される。その過程において、系統 2 と Ja-4x (系統 1) の間では、脊梁山脈が地理的障壁となったが、障壁のみられない地域では、異なる集団から拡大してきた系統 1 と系統 2 の分布域が接触したことが考えられる。

染色体倍数体の起源は、系統関係に基づく、少なくとも系統 1 の Ja1-4x と Ov-4x のそれぞれで 1 回、系統 2 の基部で 1 回の、計 3 回の倍数化が生じたことが明らかになった (図 2 の矢印)。系統 2 の推定分岐年代から、系統 2 における倍数化は 3 万年以前に生じたと推定され、最終氷期後の分布拡大時には 4 倍体が存在していたと考えられる。現在、系統 2 には祖先 2 倍体が存在せず、既に 6 種類のハプロ・サイトタイプに分化しているのに対し、系統 1 の 2 つの 4 倍体それぞれに、同じハプロタイプをもつ祖先 2 倍体が存在することは、系統 1 における 2 回の倍数化が、系統 2 における倍数化に比べて、最近に生じた可能性を示唆している。系統 1 には、同じハプロタイプを持つ 2 倍体と 4 倍体の群が 2 組 (Ja1-2x と Ja1-4x 群, Ov-2x と Ov-4x 群) 含まれ、その地理的分布は、Ja 群では 2 倍体と 4 倍体が九州と関東・東海に隔離しているが、Ov 群では 2 倍体の分布域の東端に側所的に 4 倍体が分布している (図 1)。この 2 群の地理的分布の違いは、倍数化

と地理的分化の成立過程に違いがあることを示しており、Ja 群では最終氷期の分布域の縮小に伴い、九州に 2 倍体、関東・東海に 4 倍体の隔離が生じ、各々が独立に分布を拡大した一方で、Ov 群では 2 倍体の分布拡大した後、最近に 4 倍体が生じたと考えられる。

#### 核DNA多型からみた葉緑体の系統間における遺伝子交流

アオキ種内の葉緑体の 2 つの系統の間での核DNAの遺伝子交流について、*GapC* 遺伝子の多型解析を行った。アオキのサイトタイプを調べた 151 個体と、葉緑体の系統関係でアオキとの単系統性が示された *A. chinensis* 7 個体について、PCR・ダイレクトシーケンスによりヘテロ個体とホモ個体を区別し、ヘテロ個体はクローニング法により、各個体内の対立遺伝子の分離を行った。その結果、塩基置換と length polymorphism により、アオキには 24 個、*A. chinensis* に 8 個の計 32 個の対立遺伝子が区別でき、塩基多様度 ( $\pi$ ) は、0.01185 であった。対立遺伝子の遺伝子系統樹は、基部での 2 分岐がみられたが、葉緑体の系統関係とは一致せず、また *A. chinensis* は単系統にはならなかった (図 4)。32 個の対立遺伝子のうち、6 個が葉緑体の異なる系統間で共有されており、そのうち 3 個は 4 倍体間のみで共有され、残りの 3 個は 2 倍体と 4 倍体で共有されていた。対立遺伝子の地理的分布には、染色体倍数性および葉緑体DNA多型にみられたような明確な地理的構造がみられなかったが、葉緑体の系統間および 2 倍体と 4 倍体で共有される 2 個の対立遺伝子で地域的な偏りがみられ、対立遺伝子 k が分布域全体にみられ、且つ特に東・北日本の 4 倍体に偏り、対立遺伝子 f が西日本の 2 倍体に偏っていた (図 3)。

核DNAと葉緑体DNAの系統関係の不一致、及び葉緑体の系統間での対立遺伝子の共有からは、葉緑体の系統間における遺伝子交流が生じている可能性、または葉緑体の系統が分岐する以前の祖先多型を反映している可能性が考えられる。しかし、自然集団では 4 倍体から 2 倍体への遺伝子流動が知られていないこと、また一般的に核DNAの進化速度が葉緑体DNAより速いことを考慮すると、対立遺伝子の共有は、系統が分岐した後生じたと考えられ、葉緑体の 2 つの系統間に遺伝子交流が生じていることを示唆している。特に、2 倍体と 4 倍体で共有される対立遺伝子 k は、分布域全体を通してみられ (図 3)、系統 1 における 2 倍体から 4 倍体への遺伝子流動と、その後の異なる起源の 4 倍体間での遺伝子交流が生じていることを示していると考えられる。

アオキ種内では、染色体倍数化が、異なる系統で異なるタイミングで生じ、2 倍体から 4 倍体へ遺伝子流動が繰り返し生じ、さらに異なる起源の 4 倍体間での遺伝子交流が生じることにより、分布域全体における核遺伝子の移動があることが示唆された。

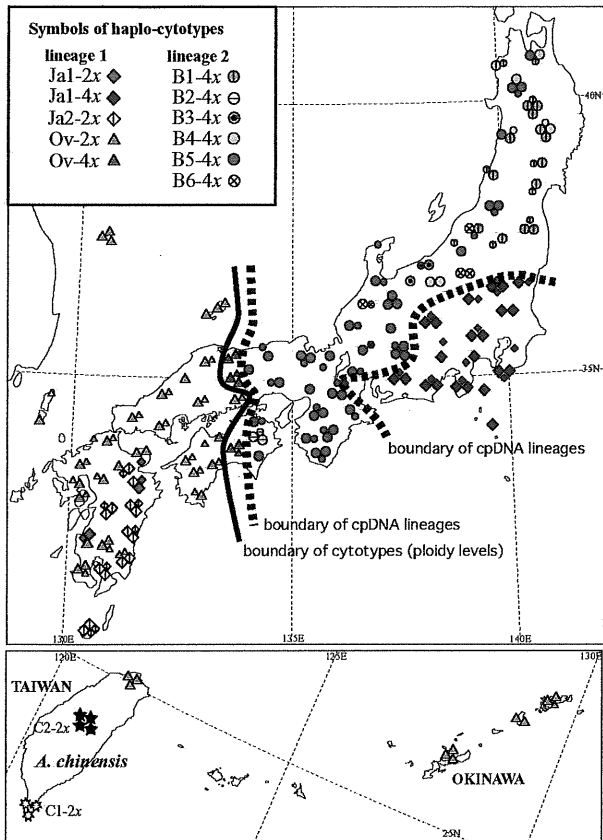


図1. 葉緑体DNAハプロタイプとサイトタイプにより区別されるハプロ・サイトタイプの地理的分布。シンボル一つが1個体のハプロ・サイトタイプを示す。小さなシンボルで示す個体の倍数レベルは、同じ集団もしくは近接集団の倍数レベルから推定した。東経134度付近を境界(太線)にして、西側に2倍体、東側に4倍体が分布する。また、西日本・台湾・韓国と関東・東海に系統1が分布し、四国東部・近畿・日本海側・東北にかけて系統2が分布する。系統間の分布境界は点線で示す。

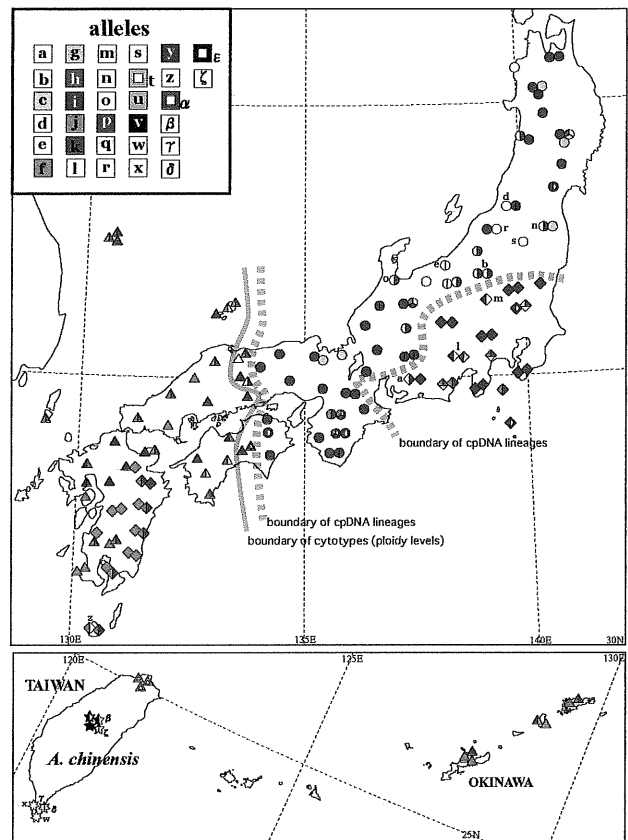


図3. GapC 遺伝子の対立遺伝子の地理的分布。2倍体、及び4倍体ホモ個体は遺伝子型 (genotype) を示すが、4倍体ヘテロ個体は、個体内のアリル頻度が明らかでないため表現型 (phenotype) を示す。個体内の対立遺伝子の保持数が、2倍体ヘテロ個体では最大2種類、4倍体ヘテロ個体では最大3種類である。対立遺伝子 k が分布域内に広く分布し、特に東日本の4倍体に偏って見られ、対立遺伝子 f が、西日本の2倍体に偏って見られる。

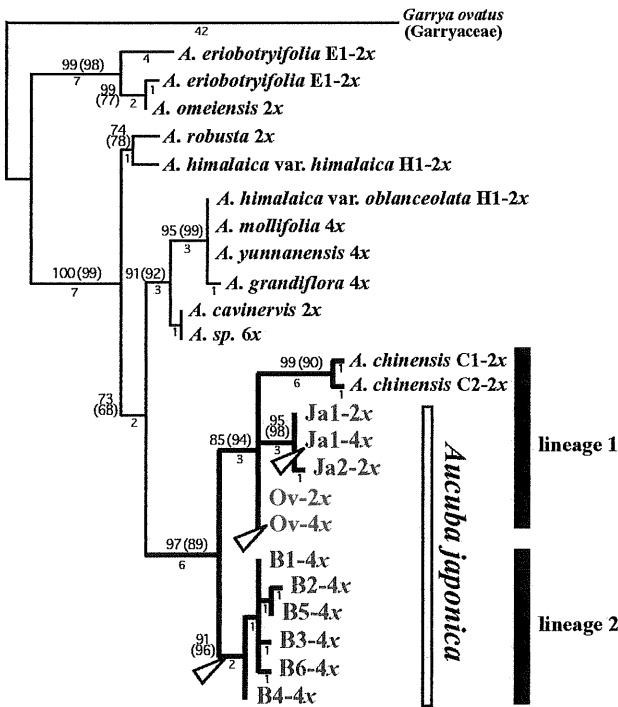


図2. 葉緑体DNAの遺伝子間領域の塩基配列に基づくアオキ属の系統関係。葉緑体DNAの3遺伝子間領域 *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*, *trnT-trnL* の塩基配列計約1,900bpに基づき、系統解析ソフト PAUP\* (Swofford, 2002) の最節約法 (Branch-and-bound search) により得られた2本の最節約系統樹 (105steps, CI=0.9333, RI=0.9613, RC=0.8972) の厳密合意樹 (ACCTRAN Optimization)。葉緑体DNAハプロタイプとサイトタイプの組合せにより区別したハプロ・サイトタイプをOTUとした。枝下値は枝長、枝上値は最節約法による1,000回試行のブーストラップ確率、括弧内の値は、Jukes-Cantorモデルを用いた近隣結合法によるブーストラップ確率を示す。アオキは、*A. chinensis* と単系統群になり、大きく2系統からなる個系統群である。また、アオキ種内では、系統1で2回、系統2で1回の、計3回の倍数化 (矢印) が生じている。

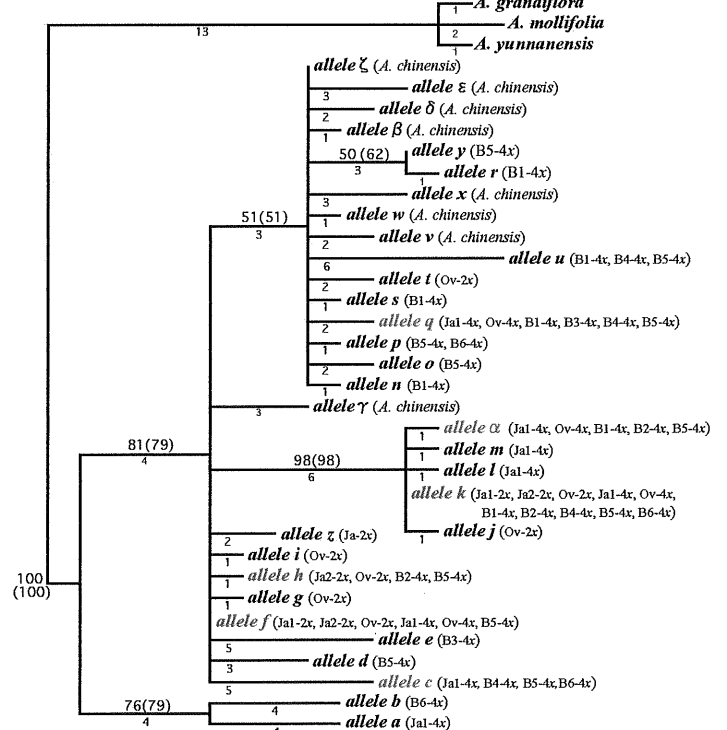


図4. GapC 遺伝子の対立遺伝子の遺伝子系統樹。GapC 遺伝子の対立遺伝子の塩基配列約580-bpに基づき、系統解析ソフト PAUP\* (Swofford, 2002) の最節約法 (heuristic search) により得られた7,380本の最節約系統樹 (82steps, CI=0.8293, RI=0.8923, RC=0.7400) の厳密合意樹 (ACCTRAN Optimization)。枝下値は枝長、枝上値は最節約法による1,000回試行のブーストラップ確率、括弧内の値は、Jukes-Cantorモデルを用いた近隣結合法によるブーストラップ確率を示す。葉緑体の系統間における対立遺伝子の共有を色で示した (青: 異なる系統の4倍体間で共有、赤: 異なる系統間及び倍数レベル間で共有)。また、OTUには、ハプロ・サイトタイプを示した。