

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770067
 研究課題名（和文） AFLP 解析を用いた東北地方高山帯フロラにおけるボトルネック効果の検証

研究課題名（英文） Verification of bottleneck effect in the alpine flora of the Tohoku region using AFLP analysis

研究代表者

藤井 紀行（FUJII NORIYUKI）
 熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授
 研究者番号：40305412

研究成果の概要：

日本列島の東北地方高山帯におけるボトルネック効果や創始者効果といった過去の集団サイズの縮小・拡大を推定するために、エゾシオガマ（*Pedicularis yezoensis*, ゴマノハグサ科）のマイクロサテライトマーカーの開発を行い、集団間の遺伝的多様性の比較を行った。また予備的な結果ではあるが、東北集団が北海道集団、本州中部集団に比べて低い傾向が見られた。この結果は、東北地方の集団において過去に創始者効果、もしくはボトルネック効果が働いたことを支持するものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	210,000	3,910,000

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：マイクロサテライト解析、日本産高山植物、集団遺伝学的解析、遺伝的多様性評価

1. 研究開始当初の背景

日本の高山帯フロラの成立過程を推定するために、分子マーカーである葉緑体 DNA を用いて解析した結果、東北地方の高山帯は比較的最近になって分布を拡大させたか、もしくはボトルネック効果を強く受けた可能性が高いことが示された。しかし、これまで解析していた葉緑体 DNA では解像度が低く、その検証までには至っていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、東北地方高山帯におけるボトルネック効果や創始者効果といった過去の集団サイズの縮小・拡大を推定するために、エゾシオガマのマイクロサテライトマーカー（以降、SSR マーカーと呼ぶ）の開発を行った。研究の当初 AFLP 解析を進めることで計画していたが、共優性マーカーである SSR マーカーが比較的容易に作れるようになってきたことから解析手法を変更した。

3. 研究の方法

対象種はエゾシオガマ (*Pedicularis yezoensis*, ゴマノハグサ科)である。本種は、日本の準固有の高山植物であり、比較的個体数も多いことから集団解析を行ううえで有利な種である。

SSR マーカーの開発は、Lian *et al.* (2006) の手法に沿って行い、プラスミドに組み込まれた SSR 部位を含んだ配列を計 96 個作成した。その後、それらの配列を精査し、適当なプライマーを計 18 個設計した (Primer3 使用)。エゾシオガマの複数サンプルを用いて、それらのプライマーで実際に PCR 反応で増幅が認められるか、またヘテロやホモアリルを区別できるかどうかを検討した。

完成した SSR マーカーを用いて、予備的な集団遺伝的な解析を行った。GenAlEx や FSTAT 等の解析アプリケーションを用いて、アリル数やヘテロ接合度を計算し、ハーディー・ワインベルグ平衡からのずれがあるかどうかを検定した。

4. 研究成果

エゾシオガマのマーカー開発において計 18 組の候補マーカーを作成した。そのプライマーセットを用いて、マーカーとして利用できるかどうかの検証を行った結果、最終的には 6 つのマーカーが絞り込まれた (AC01, AC08, AC12, AC41, TC13, TC45)。それぞれのマーカーにおけるアリル数 (A) は 3~16、ヘテロ接合度の観察値 (H_o) は 0.000~0.667、ヘテロ接合度期待値 (H_e) は 0.652~0.912 に範囲しており、多様性の程度はマーカーによって大きく異なっていた。

上記の 6 つのマーカーを用いて、3 集団 (暑寒別岳 (北海道)、八甲田山 (東北)、赤石岳 (本州中部)) の 24 個体のエゾシオガマを用いて予備的な集団解析を行ったところ、八甲田山の集団が暑寒別岳、赤石岳の集団に比べて低い傾向が見られた (暑寒別岳 ($A=2.5$, $H_o=0.438$, $H_e=0.382$), 八甲田山 ($A=2.5$, $H_o=0.292$, $H_e=0.267$), 赤石岳 ($A=3.2$, $H_o=0.313$, $H_e=0.383$))。現時点での結果は解析個体数がまだ少ないので予備的であるが、この結果は、東北地方の集団において過去に創始者効果、もしくはボトルネック効果が働いたことを支持する結果である。今後は新規マーカーを開発すること、集団数・個体数を増やすことを目指す予定である。

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 10 件)

Ikeda, H., K. Senni, N. Fujii, H.

Setoguchi. 2008. Survival and genetic divergence of an arctic-alpine plant, *Diapensia lapponica* subsp. *obovata* (Fr. Schm.) Hult en (Diapensiaceae), in the high mountains of central Japan during climatic oscillations. *Plant Systematics and Evolution* 272: 197-210.

(査読有)

Ikeda, H., K. Senni, N. Fujii, H.

Setoguchi. 2008. Consistent geographic structure among multiple nuclear sequences and cpDNA polymorphisms of *Cardamine nipponica* Franch. et Savat. (Brassicaceae). *Molecular Ecology* 17: 3178-3188. (査読有)

Ikeda, H., K. Senni, N. Fujii, and H. Setoguchi. 2008. Post-glacial range fragmentation is responsible for the current distribution of *Potentilla matsumurae* Th. Wolf (Rosaceae) in the Japanese archipelago. *Journal of Biogeography*. 35: 791-800. (査読有)

藤井紀行. 2008. 日本産高山植物における本州中部地域の系統地理学的重要性. *Bunrui* 8: 5-14. (第一回日本植物分類学会奨励賞 受賞記念論文) (査読無)

Fujii, N. 2007. Chloroplast DNA phylogeography of *Pedicularis* ser. *Gloriosae* (Orobanchaceae) in Japan. *J. Plant Res.* 120: 491-500. (査読有)

Ikeda, H., K. Senni, N. Fujii, and H. Setoguchi. 2006. Refugia of *Potentilla matsumurae* (Rosaceae) located at high mountains in the Japanese archipelago.

Molecular Ecology 15: 3731-3740. (査読有)

Kobashi, S., N. Fujii, A. Nojima, N. Hori. 2006. Distribution of chloroplast DNA haplotypes in the contact zone of *Fagus crenata* in the southwest of Kanto District, Japan. Journal of Plant Research 119: 265-269. (査読無)

Fujii, N. and K. Senni. 2006. Phylogeography of Japanese alpine plants: biogeographic importance of alpine region of central Honshu in Japan. Taxon 55: 43-52. (査読有)

藤井紀行, 2006. サハリン植物紀行. 分類 6: 151-155. (査読無)

小橋寿美子・藤井紀行・岡秀一, 2006. ブナの地理的変異研究と今後の展望 (A review of studies on geographical variation in *Fagus crenata* and future prospects). 長野県植物研究会誌 40: 207-213. (査読無)

[学会発表](計 15件)

藤井紀行・瀬井純雄. 阿蘇山系における絶滅危惧植物の現状と保全活動. 第56回日本生態学会大会. 岩手県立大学. 2009年3月19日. (シンポジウム: ユビキタスジェノタイプングによる生物多様性ホットスポットの包括的生物保全、企画者、井鷲裕司(京大院農)).

藤井紀行. 分子データからみた東北地方の高山フロラの成立過程. 日本植物分類学会第8回大会公開シンポジウム. 東京エレクトロンホール宮城, 2009年3月15日.

池田啓・藤井紀行・瀬戸口浩彰. ミヤマタネツケバナ (*Cardamine nipponica*) の PHYE 光センサードメインにおける南北間

での適応分化. 日本植物学会第72回大会. 高知大学. 2008年9月25日~27日.

Fujii, N., Chloroplast DNA phylogeography of *Pedicularis resupinata* (Scrophulariaceae) around the Japanese Islands. International symposium on East Asian plant diversity and conservation. Hokkaido University, Sapporo, Japan, August 2, 2008.

高橋誠・原正利・藤井紀行、以下24名省略. 葉緑体SNPによるブナの系統地理学的な研究 - 分布域全体をほぼ網羅したハプロタイプ地図の作成. 日本生態学会第55回大会. 福岡国際会議場. 2008年3月14-17日.

藤井紀行. 葉緑体DNAを用いたハンカイシオガマ列植物(ゴマノハグサ科)の分子系統地理学的解析. 日本植物分類学会第7回大会. 首都大学東京. 2008年3月20-23日.

宮なろう・藤井紀行・桜澤裕樹・村上哲明. イワタバコ類の種分類学的研究. 日本植物分類学会第7回大会. 首都大学東京. 2008年3月20-23日.

池田啓・仙仁径・藤井紀行・瀬戸口浩彰. 複数遺伝子座からみたミヤマタネツケバナ (*Cardamine nipponica*) の分断分布と進化史. 日本植物分類学会第7回大会. 首都大学東京. 2008年3月20-23日.

高橋誠・平岡宏一・後藤晋・原正利・藤井紀行、以下4名省略. ブナの地理的変異と広葉樹種苗. 第120回日本森林学会大会. 京都大学. 2008年3月25日~27日.

池田啓・仙仁径・藤井紀行・瀬戸口浩彰. アブラナ科ミヤマタネツケバナの遺伝構

造と地理的構造 .日本植物学会第71回大会 .
東京理科大学、2007年9月6日～9日 .

池田啓・仙仁径・藤井紀行・清水健太郎・
瀬戸口浩彰 .日本産高山植物の比較系統地
理 . 日本生態学会大54回大会 . 愛媛大
学、2007年3月19日～23日 .

藤井紀行・植田邦彦・綿野泰行 . 本州中
部産ヨツバシオガマの分類学的再検討 .
日本植物分類学会第6回大会 . 新潟大学、
2007年3月14～17日 .

藤井紀行 .日本産高山植物における本州中
部地域の系統地理学的重要性(奨励賞受賞
講演) . 日本植物分類学会第6回大会 .
新潟大学、2007年3月14～17日 .

池田啓・仙仁径・藤井紀行・瀬戸口浩彰 .
高山植物ミヤマキンバイ(バラ科)の系統
地理 . 日本植物学会第70回大会 . 熊本
大学、2006年9月13日～16日 .

藤井紀行・仙仁径・菅原敬・若林三千男 .
日本産高山植物エゾシオガマの葉緑体DNA
の地理的変異 . 日本植物学会第70回大
会 . 熊本大学、2006年9月13日～16日 .

〔図書〕(計 1件)

藤井紀行 .2008 . 日本の高山植物を見つめて .
進化し続ける植物たち (葛西奈津子著・日本
植物生理学会監修) のトピックとして . 化学
同人 , pp. 133-135 .

〔その他〕

ホームページ等

http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/bio/staff/fujii/Fujii_HP/index.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 紀行 (FUJII NORIYUKI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号 : 40305412