

Multilocus phylogeography of the Japanese hare (*Lepus brachyurus*, Leporidae)

(複数遺伝子座を用いたニホンノウサギの系統地理学的研究)

学位論文内容の要旨

日本産哺乳類の中には、遺伝的、形態的、および生態的に異なる地域集団が、東西あるいは南北に分かれて分布しているものがある。その東西（南北）分布は日本産モグラ

(*Mogera*) 類、アカネズミ (*Apodemus speciosus*)、ニホンジカ (*Cervus nippon*)、ニホンノウサギ (*Lepus brachyurus*) などにみられ、その分布境界は本州中央部（中部地方）や本州西部（中国地方）の特定の地点に共通して位置している。日本産哺乳類に見られるこのような分布パターンの形成要因として、大陸からの複数回の移入による集団の分化、第四紀氷期に形成された複数の避寒地による集団の分化、および、日本列島の地形および環境の多様性による集団の分化などが挙げられている。前者二つの歴史的な要因の推定には、ミトコンドリア DNA (mtDNA) による分子系統学的解析が用いられている。しかし、mtDNA は母系遺伝するなど独自の遺伝様式を持つため、本来の集団史とは異なる歴史を示すことが知られている。よって本論文では、歴史的要因、環境要因と日本産哺乳類の集団構造の関連をより詳細に調べるため、mtDNA に加え、父系遺伝する Y 染色体 DNA および両性遺伝する常染色体 DNA を用いて、ニホンノウサギを対象に分子系統地理学的解析を行った。

ニホンノウサギは北海道を除く広い地域に生息する日本固有種であり、古くから日本列島に生息していたと考えられる。つまり、その集団史は第四紀の気候変動の影響を受けていると考えられる。また本種は通常茶色の毛をもつが、北方に生息する個体は冬季に毛色を白色へと変化させる。つまり、冬季毛色の異なる 2 集団が南北に分かれて分布している。この冬季白化は積雪地帯への適応によるものと考えられるため、ニホンノウサギは日本列島の環境の多様性にも影響を受けていると思われた。以上のことから、本種は、日本産哺乳類の遺伝的集団構造への歴史的要因および環境要因の影響を評価するうえで適当な種であると思われる。本論文の第一章では、mtDNA によるニホンノウサギの系統地理学的解析を用いてその集団史を推定し、他の哺乳類から得られている知見との比較を行った。第二章では Y 染色体および常染色体 DNA による遺伝的集団構造の解析を行い、mtDNA から推定された集団史および冬季毛色二型の分布を考慮して、ニホンノウサギの遺伝的集団構造と歴史的要因および環境要因との関係について検証した。

日本産哺乳類の集団史は主に mtDNA の分子系統樹を基に推定されてきた。それらの研究は、第四紀の避寒地や気候変動の影響を推定する目的で行われてはおらず、それらの影響を検証するためには適当な手法を用いたさらなる研究が必要である。そこでニホンノウサギの mtDNA からチトクローム b (*Cyt b*) 遺伝子を用いて、以下の三点を基に第四紀の避寒地と気候変動の影響について推定した。1) ニホンノウサギの *Cyt b* における地域集団の探索、2) 遺

伝的多様性の地理的勾配から、集団の地理的な起源（避寒地）の推定、3）*Cyt b*における系統数の時間的増減パターンから、第四紀気候変動の影響の推定を行った。その結果、ニホンノウサギの*Cyt b*は大きく二つの単系統群にわけられ、それらは中国地方の広島・岡山県を境に、東西に分かれて分布していた。この境界はニホンジカやニホンザル（*Macaca fuscata*）に見られるmtDNA二系統の境界とほぼ一致した。2系統群はさらに複数の小系統群に分けられた。それらは本州太平洋側（関東、中部、近畿地方）および四国と九州で高い遺伝的多様性を示し、これらの地域が避寒地であったことが示唆された。この地域は最終氷期に南方系の植生をより多く残していたことが推定されている。2系統群はおよそ120万年前に分かれた後、35万年前から小系統群の分岐が始まり、20万年前および10万年前にそれぞれの系統数が大きく増加していたことが推定された。この結果から、10万年周期で変動したとされる氷期-間氷期の影響が示唆される。以上のことから、ニホンノウサギは過去のなんらかの要因によって大きく南北二つの系統に分かれ、35万年前から第四紀の気候変動に伴って周期的に系統数を増加させたことが示唆された。また日本列島太平洋側に複数の避寒地をもち、最終氷期以降、二つの系統がそれらの地域から拡散した結果、現在のような分布パターンが形成されていると考えられた。しかし、その分布は冬季毛色二型の分布とは一致せず、核DNAを含めたさらなる遺伝的集団構造の解析が必要であると考えられた。

そこで、Y染色体上の性決定遺伝子*Sry*の5'端上流領域、および常染色体からの5遺伝子座、*Agouti signaling protein* (*Asip*)、*Tyrosinase* (*Tyr*)、*Apolipoprotein B 100* (*Apob*)、*beta spectrin* (*Sptbn1*)、*thyrotropin beta subunit* (*Tshb*)を解析し、遺伝的集団構造の推定を行った。*Asip*および*Tyr*遺伝子はカイウサギなどで毛色変異の原因遺伝子として報告されているため、ニホンノウサギの冬季毛色2型と遺伝的集団構造の関連を調べるために用いた。*Sry*における分子系統樹は*Cyt b*同様に大きく二つの単系統群を形成した。この結果は、ニホンノウサギが過去に二つの集団に分かれたことを示唆している。さらに、2系統は関東地方を境に北と南に分布していた。*Cyt b*と*Sry*の分布パターンの違いは、2系統の地理的分布が地理的な障壁ではなく、複数の避寒地における二系統群のランダムな固定によって決定されたことを示唆している。一方常染色体上の遺伝子座に*Cyt b*、*Sry*のような明瞭な系統の分化は見られなかった。*Asip*、*Tyr*に冬季毛色との関連を示すような地理的変異は見られなかった。5遺伝子座の遺伝的差異による集団間ネットワーク樹を構築したところ、北部・中央部・南部の大きく三つのグループが形成された。また対立遺伝子頻度の地理的分布を基にクラスタリング解析を行ったところ、ニホンノウサギ集団は三つの起源集団にクラスタリングされることが示唆された。起源集団は北方（東北-中部地方）、南方（中国-九州）、および中央部（関東-九州）に分布していたと推定された。これにより、常染色体上の遺伝子からも現在のニホンノウサギ集団が北部、中部、南部に位置した複数の避寒地に起源を持つことが示唆された。一方で、*Tshb*においては自然選択の影響を受けていることが、Tajimaの自然選択検定から示唆された。*Tshb*の遺伝的多様性は北方で低い傾向が見られ、これは自然選択の影響である可能性が考えられる。*Tshb*は光周期による繁殖状態などの季節的変化を制御する遺伝子であることが知られている。ニホンノウサギでも卵巣重量の変化と光周期との関連が報告されており、*Tshb*の遺伝的多様性の南北勾配は季節の光周期の南北勾配による可能性が考えられる。

以上のことから、本論文ではニホンノウサギを通して、日本産哺乳類の遺

伝的集団構造と歴史的要因および環境要因との関連について、重要な知見の一つを示すことができたと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 鈴 木 仁

副 査 教 授 木 村 正 人

副 査 教 授 東 正 剛

学 位 論 文 題 名

Multilocus phylogeography of the Japanese hare (*Lepus brachyurus*, Leporidae)

(複数遺伝子座を用いたニホンノウサギの系統地理学的研究)

日本産哺乳類の複数の種において、遺伝的、および生態的に異なる地域集団に分化していることが知られている。このような地域集団の形成要因として、大陸からの複数回の移入や、第四紀氷期に形成された複数の避寒地などの歴史的な要因と、日本列島の地形および生息環境の多様性などの環境的要因が挙げられている。本論文では、冬季毛色に二型を示すニホンノウサギの遺伝的集団構造を把握することで、上記の要因との関係について検証した。

ニホンノウサギ (*Lepus brachyurus*) は北海道を除く広い地域に生息する日本固有種である。また通常茶色の毛色を示すが、北方に生息する個体は冬季に毛色を白色へと変化させる。この冬季白化は積雪地帯への適応によるものと考えられる。よって本種は、その遺伝的集団構造に日本列島における第四紀の気候変動と生息環境の多様性の影響を受けていると思われる。本論文の第一章では、mtDNAによるニホンノウサギの系統地理学的解析を用いてその集団史を推定した。第二章ではY染色体および常染色体DNAによる遺伝的集団構造の解析を行い、ニホンノウサギの遺伝的集団構造における歴史的要因および環境的要因の影響を評価した。

まずニホンノウサギのmtDNAからcytochrome *b* (*Cyt b*) 遺伝子を用いて、集団史と第四紀の避寒地および気候変動の影響について推定した。ニホンノウサギの*Cyt b*は二つの単系統群にわけられ、それらは中国地方を境として東西に分布していた。それらは関東、中部および四国と九州で高い遺伝的多様性を示し、これらの地域が避寒地であったことが示唆された。2系統群はおおよそ120万年前に分かれ、35万年前からおおよそ10万年周期でそれぞれの系統数が増加していたことが推定された。この結果から、10万年周期で変動したとされる氷期-間氷期の影響が示唆された。以上のことから、ニホンノウサギの集団史は第四紀の氷期・間氷期の気候変動と複数の避寒地に影響を受けていることが示唆された。しかし、*Cyt b*の地理的分布には冬季毛色二型の影響はみられなかった。

次に、Y染色体上の性決定遺伝子*Sry*、および常染色体からの5遺伝子座、*Asip*、*Tyr*、*Apob*、*Sptbn1*、*Tshb*を解析し、遺伝的集団構造の詳細な検証を行った。*Sry*における分子系統樹は*Cyt b*同様に2つの単系統群を形成した。この結果は、ニホンノウサギが過去に2つの集団に分かれたことを示唆している。さらに、2系統は関東地方を境に東西に分布していた。*Cyt b*と*Sry*の分布境界の違いは、

複数の避寒地における2系統群の偶然による固定によって形成されたと考えられた。5遺伝子座における遺伝的変異の地域差を基に地域集団の推定を行ったところ、ニホンノウサギ集団は3つの地域集団に起源を持つことが示唆された。起源となった集団のうち2つは北部および南部に分布し、残り1つは中央部－南部に分布していたと推定された。これにより、常染色体上の遺伝子からも現在のニホンノウサギ集団が北部、中央部、南部に位置した複数の避寒地に起源を持つことが示唆された。今回得られたニホンノウサギの遺伝的集団構造からは冬季毛色二型の間に遺伝的分化は見られなかった。ニホンノウサギの毛色変化は遺伝的変異によって決められていることが示唆されている。よって、毛色の季節変化に関わる一部の遺伝子のみが、積雪など生息環境の違いに合わせて南北に分かれて分布している可能性が考えられた。また、*Tshb*において自然選択の影響を受けていることが示唆された。*Tshb*は光周期による繁殖状態などの季節的变化を制御する遺伝子であることが知られている。よって*Tshb*にみられた遺伝的多様性の南北勾配が季節的な日長変化の南北勾配による可能性が考えられた。これらの結果から、ニホンノウサギの遺伝的集団構造は部分的に環境的要因の影響を受けている可能性が示唆された。

以上のことから、ニホンノウサギの遺伝的集団構造は主に歴史的要因に起因することが明らかとなったが、一部の遺伝子においては環境要因がその地理的分化に影響している可能性が示唆された。本論文は、日本産哺乳類における遺伝的・形態的に異なる地域集団の形成に、日本列島の歴史的・環境的要因が複雑に絡み合っていることを示す、一つの重要な知見を与えたと思われる。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。