

(学位第9号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	山本 崇
審査委員	主査 琉球大学 教授 梶田 忠
	副査 琉球大学 准教授 渡辺 信
	副査 佐賀大学 准教授 永野 幸生
	副査 佐賀大学 准教授 辻田 有紀
	副査 佐賀大学 准教授 徳田 誠
審査協力者	
実施年月日	平成 31年 1月 13日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査及び副査は、平成31年1月13日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。また、学位論文の内容を慎重に検討した結果、本研究は農学、理学、環境学に関連した学際的な研究内容になっていることから、審査委員会は申請者が博士(学術)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

山本 崇

[質問1] 核と葉緑体で、パターンが違う。これをどう考えるか？

[回答1] これに関しては、いくつか考えていることがある。葉緑体と核のマーカーでは、見ている遺伝子の歴史性が違う。葉緑体は進化速度の違い等により、核よりも古い歴史を反映する。また、このようなマーカーの性質の差に加え、SSRでは、集団が南から北に分布拡大してきたことに加え、母性遺伝する葉緑体では偶発的に北から南へ種子散布による遺伝子流動も起きているのではないかと考えている。

[質問2] そうとは言えると思うが、歴史が違うというだけ説明がつくのだろうか？こういうことはよくある。このような説明だけで済むのだろうか？また、バッククロスが起きて、葉緑体のキャプチャーが起きたということか？

[回答2] この植物に限らず木本でもよく知られている現象で、オルガネラは種子で移動、核は種子と花粉で移動するということの説明されている。また、来たから南への偶発的な移動の説明については、種子で移動し葉緑体のキャプチャーが起きたと説明できる。

[質問3] ハマアズキではにインド洋が分かれる。ただ、ハプロタイプでは多様性が低い。これは集団が縮小した結果か？

[回答3] そう考えている。ベイズ推定のシナリオ分析では、インド洋が先に分かれるシナリオも検証したが、いずれも棄却された。インド洋は先に分かれるというシナリオが支持された。こういうパターンは、ご指摘の通り、最近ボトルネックがかかって多様性が減少した時に見られる。あるいは、もしかすると、太平洋で多様性創出を促進する何らかのイベントが起きたということも考え得る。

[質問4] インド洋が分布が狭いなら、比較的最近の分布拡大ということがあってもいいかと思うが、これだけ広いインド洋域でこのような結果になるのは不思議な感じがした。

[回答4] ホウガンヒルギでも同様のパターンが得られている。この事例でも、もしかすると、ボトルネックをうけて小集団化し、変異が固定したものが、分布拡大によって定着したのかもしれない。

[質問5] ハマアズキは大きく3つに分かれているが、生殖的な隔離はあるのか？

[回答5] 交配実験は行っていない。少なくとも、形態の分化はおこっていない。もしかすると、急速な生殖隔離がおきるようなことは否定はできない。

[質問6] 外部形態に違いが無いということならば、生育環境の違いは無いか？

[回答6] 生育環境にも違いは無い。沖縄でも、タヒチ等の南太平洋の島でも、同様な環境に生育する。近縁種の海岸植物では、内陸の山地に生育する場合も知られている。

[質問7] ハマアズキのハプロタイプについては、祖先的なものが多様性が高いような気がするが、それらが分布する北太平洋が祖先的ということでは無いのか？

[回答7] 葉緑体でも、核でも同様に、インド洋が先に分かれることが示唆された。

[質問8] 最終氷期のレフュジアはどこにあったと考えているか？

[回答8] その点は、私自身も非常に気にしている。陸域に分布する生物の例では、残存集団や花粉化石などから、レフュジアの位置を推定できる。しかし、熱帯域の海流散布植物では難しい。マレー半島域の研究で推定されたマングローブ林のレフュジアとされる場所は、今は海の底になっている。当時の環境のデータを今、見ることはできないし、ニッチモデリングで当時の環境を再現するにしても、これらの植物は、海岸域という限られた場所に限る植物なので、難しい。このようなこともあり、集団動態の研究に使える方法として、遺伝子を用いた。

[質問9] [注:Cannon et al. 2009. PNAS 106(27) 11188-11193の図について] 図の見方がよくわからない。図中の緑の部分は何を示しているか？

[回答9] マレー半島域・スマトラ・ボルネオなどの陸域と、モデリングで示された森林の分布が緑色で示されている。オレンジはマングローブ。色のついているところは全て陸域を示している。

[質問10] [注 上の質問と同じ図について] この図のレフュジア推定は、現在陸地であるこ

- とを使って推定しているが、この方法は、経済学でいう重心をもとめるようなことをやっているのか？
- [回答10] 経済学でいうところの重心を求める手法については分からない。ここでは、ある程度、ここに陸地があったというデータを年代にあてはめてできる。また、過去の気候を推定して植物の分布を推定している。
- [質問11] 遺伝構造の分断の原因の一つとして、この図のマレー半島域を考えているのだろうかと思う。また、レフュジアの一方所はここ〔注マレー半島域東側〕と考えているか？
- [回答11] 確実にここかどうかは分からないが、本博士論文の研究で示された、南と北での分化を考えると、一つはここ（マレー）で、もう一つはオーストラリア等の大きな陸域が残っていた場所にあった可能性はある。ただ、すごく極端な話をすると、隣接していた逃避地から、2つのクラスタが生まれた可能性もある。逃避地がどこにあるかについては、もっと研究する必要がある。
- [質問12] 分布を拡大する過程で、北太平洋で二次的接触が起きたという議論があった。ここでは、ABCの結果とあわせた考察をしていて、シナリオ分析で二次的接触がおきた時期と、skyline plotでの分布拡大のイベントが同じ時期だとしていたが、根拠はあるのか？2つの解析が同じ時間軸を表していると考えても構わないのか？
- [回答12] いずれもベイズ推定をもとにしたもの。二次的接触はシナリオ分析だと世代時間で推定された。いずれも同じベイズ推定を用いており、同じデータに基づいて行ったものであるので、時間軸の推定としてはこのような比較をして構わないと考えている。
- [質問13] シナリオ分析では、1000年前に起きたイベントを推定している。どういうことが、こんな最近におきたと考えているか？
- [回答13] 世代時間から推定したものであり、シナリオ分析では、推定の手法上、1度のイベントとして扱っている。ただ、実際には、断続的に起きた可能性もあり、その場合は、この時期よりはもっと前から起きたと考えられる。年代の分岐と、ベイズ推定での中央値の分岐があって、中央値の方はかなりシャープに出ている。
- [質問14] 最近この図をよく見るが、結局のところ推定であって、根拠は無いではないか？こうやって作ったモデルが、化石と一致すれば正しいと言えるかと思う。別の生物でいいので、化石でも検証されたという研究はあるか？
- [回答14] ご指摘の通り、こういった方法は多くの生物で行われている。ベイズ推定でも尤度を用いる方法でも、化石記録にあわせてcalibrationをしている研究が多々ある。また、新たな化石記録が出たら、それにあわせて推定方法を更新するなどしている。また、スカイラインの解析では、実測データで集団の縮小過程がわかっているサメに用いたら、解析からも集団動態が示された。そういう意味で、手法が原因になる不確実性はある程度抑えられると考えている。
- [質問15] この研究は、海外遺伝資源を用いた研究となっている。名古屋議定書以前に採集されたものなので問題は無いかと思うが、相手からの許可は得ているのか？
- [回答15] 少なく共、今回の研究は現地の共同研究者の許可を得ているし、論文執筆も共同研究として出版しているので、問題は無い。
- [質問16] 海流散布型の植物は、生育場所から種子を海流で散布する。その場合、生育値で留まるのが有利か、移動するのが有利か、トレードオフの関係があると思う。どれくらい留まって、どのくらい定着するのがわかっているのか？
- [回答16] どれくらいという値はわかっていない。ただ、ちょうどこの審査会に出席されている方が、ハマアズキの種子がどの程度の数浮かんで、どの程度の数沈むのかというのを、時間の変化と共に解析した。数ヶ月たっても発芽能力を保ったまま浮かんでいるので、ハマアズキに関しては、長距離散布に多く投資していると言える。
- [質問17] 海流散布型の植物は基本的には、長距離散布するのか、それとも、そこに留まるのか？
- [回答17] 他の海流散布植物の例では、長距離散布で海洋島に到達すると、そこに留まる戦略にシフトするものが知られており、場合によっては、そういった方向の進化がおきる可能性はある。またこの研究と関連づけるなら、オガサワラや、ハワイやタヒチの集団では、Fisが他のものよりも大きくでている。つまり、自殖を中心におこなっている集団であることを意味しており、このまま自殖が続くと、特定の形質が固定しやすいかも。また、将来的には内陸への適応や、集団分化・種分化がおきるかもしれない。
- [質問18] StructureでKを用いているが、正しいKは実際には推定が難しいんじゃないかと思う。

[回答18] 仰るとおりだと思います。ΔKを使うのは問題なのじゃないかという論文もある。ある程度の幅でみるのが推奨されてもいる。これについては、EMSという解析もしている。[発表には含まれていなかったEMS解析のスライドを示しながら、]この図のようにして、距離による隔離と、分散をみている。この結果からも、Kに対応したStructureの結果が示すように、genetic barrierがあるのは示されている。

[質問19] この研究ではStructureを使ったかと思う。Structureはデータが多いと動かないから、自分はAdmixtureを使う。ソフトウェア間の違いは無いかな？

[回答19] 今回、他の遺伝的パラメータを見たかったので、Structureを使った。データ量の多い他の解析では、Admixtureも使っている。ベイズ振り分けをしているので基本的に結果は同じになる。

[質問20] 今は次世代シーケンシングの時代であるが、論文中にはそのようなアプローチは示されていない。そういうこともやっているか？

[回答20] やっている。[発表には含まれていなかったスライドを示しながら、]次世代シーケンシングをつかって、AdmixtureでKをふって、遺伝構造をみるとこうなる。次世代シーケンシングのデータを使うと、データがたくさんあるので、多くの意味はある。ただ、遺伝構造としては、この図のように、本研究で用いたSSRが示すものと同じものが見えてくる。ただ、次世代シーケンシングデータとの比較で、特に面白いのは、PSMCというSkylineのような方法をつかったもの。この方法では、クラスターごとの集団動態や過去の動態も検出できる一方で、ごく最近のイベントの検出には適していない。つまり、よりリアルが多いSSRによるSkyline解析は、より最近イベントの解析に適しており、一方のNGSを用いたPSMCは、より古いイベントの解析に適している。両方をつかうことで、集団動態を古い方から、新しい方まで推定できる。もっとも、どのみち、NGSがもっと安くなれば、NGSデータに含まれるSSR領域のデータも手に入るだろうから、将来的には、NGSのみで、どちらの解析も出来るだろうとは考えている。

[質問21] 最初のコンセプトの説明で、この研究のアピールポイントは、地球温暖化にあると言っていた。しかし、レフュジアの解析を地球温暖化に関して行うというアイデアはもはや普通で、この研究のオリジナリティがわからなかった。この研究のオリジナリティを一言でいうと何か？

[回答21] 熱帯域の広域分布種については、温帯・寒帯の植物と違って、化石などのデータが無いことから、気候変動による分布拡大や逃避地については、よくわからなかった。この研究では、分子データを用いた解析を行うことで、それを示せたところがオリジナリティだと考えている。

[質問22] 前の質疑で花粉の移動についての議論があったが、マングローブのレフュジアがあった頃は、陸地が非常に広がったようで、そうなると、島の間をハマアズキで、飛べないからというのがよくわからない。陸伝いでも移動できるのではと思う。

[回答22] ハマアズキでの南から北へ遺伝子流動は、陸域が非常に広がったと考えられる最終氷期よりもさらに最近のことである示されている。そのため、虫が直接移動できたということにはならないと思う。

[質問23] そうすると、むしろ、花粉の寿命を解析して示した方が、花粉の移動についても説得力があったかと思う。また、この研究を、フィールドワーク、デスクワーク・実験にわけると、博士課程の3年間は割割ずつにわけられるか？

[回答23] フィールド2割、実験解析が8割だった。解析は、かなりいろいろとやったので時間を要した。

[質問24] 博士課程最初で計画していた交配実験はどうなったか？

[回答24] 生殖隔離をそれぞれのクラスタ間の交配実験で検証しようとしたが、花粉が出なかったり、花期がそろわなかったりし、また、使うことのできる集団がかぎられているなどで、博士課程の期間内に行くことは断念した。

[質問25] 倍数性は二倍体を仮定しているが、大丈夫かな？

[回答25] 二倍体で正しい。また属内のほぼ全てが二倍体であると報告されている。