

15. 遺伝子地図と個体ベースモデルにもとづく野生植物保全戦略の研究 サクラソウをモデル植物として

研究開発代表者 鷲谷いづみ（国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科）

技術分野 生物多様性の保全（自然環境）

研究期間 平成12年度～平成15年度

研究予算総額 242,148千円

研究の背景と目的

生物多様性条約は、種や生態系の多様性ととも「種内の多様性」を含むものとして「生物の多様性」を定義している。ゲノムには、適応的形質（自然選択を受ける）および中立的形質（自然選択を受けない）を支配する膨大な数の遺伝子が含まれるが、それらの変異の総体が種内（遺伝子）の多様性である。それは、階層別に、地理的変異、地域内の個体群間変異、および個体群内の変異として把握することができる。地理的変異は、遺伝的・進化的な意味での「保全単位」を決めるため、個体群内の変異は個体群の存続可能性（絶滅リスク）の予測をするためにその把握が欠かせない。今日では多くの絶滅危惧植物が遺伝的な劣化と個体群縮小が相伴う「絶滅の渦」に陥っていると考えられる。その有効な保全のためには、遺伝子流動を含む遺伝的動態に関する理解が必須である。サクラソウのエコゲノム研究の初期段階をなすともいえる本研究では、絶滅危惧種の保護増殖計画の策定や絶滅リスクの評価に必要な遺伝的情報を明確にし、遺伝子の多様性の保全と個体群の絶滅回避のための指針を得ることを目的とした。

研究の成果

この研究において絶滅危惧植物のモデルとして取り上げたサクラソウは、かつては北海道から九州までの火山周辺の明るく湿った草原や落葉樹林に広く分布する普通種であった。しかし、現在ではレッドリストに絶滅危惧類として掲載されるほど衰退している。今日、多くの種の絶滅リスクを増大させているのは、生育場所の分断・孤立化に伴う個体群の縮小や孤立化である。孤立した他殖性植物の個体群では、個体数の減少や花粉を運搬する送粉昆虫（サクラソウの場合はトラマルハナバチの女王）の喪失が遺伝的劣化、特に近交弱勢の発現を通じて、絶滅リスクをいっそう高めているものと推測されている。そのような絶滅に向けた個体群とその遺伝的特性の変化を理解し、遺伝子の多様性および絶滅危惧植物の保全戦略を策定するためには、個体群動態と遺伝的動態を結びつけて理解することが必要である。本研究では、サクラソウをモデル植物とし、遺伝マーカーの開発、異なる時間的・空間的スケールでの遺伝子流動と遺伝構造の把握、その生態学的背景の解明、遺伝子地図作成に向けたマッピング理論の開発と連鎖解析、保全のための計画や評価に資する汎用モデルの開発を通じて、そのような理解を深めるとともに絶滅危惧植物の保全に寄与する一般的な指針を得ることをめざした。その成果のうち主要なものは次の通りである。

1) 遺伝子流動の測定と連鎖地図の作製に利用するマイクロサテライトマーカーの開発を行った。

新たな濃縮法を開発し、13のライブラリーから2290クローンの塩基配列を決定し、298プライマー対を設計した。現在、68マーカーが分離分析に利用可能となっている。また、AFLPマーカーも23マーカーを開発した。

2) 近交弱勢により近交系の作出が困難な他殖性植物におけるQTLマッピングの手法として有効なものはこれまでなかったが、本研究における理論的検討により、遺伝子を高感度で検出する解析アルゴリズムとして遺伝アルゴリズムの有効性が示された。

3) QTLマッピングのための交配家系として個体群内交配3家系および自生地間交配家系12家系を育成した。また解析の対象とする量的形質として開花時期、クローン生長特性、および花の形態について標準的な測定法の検討を行い、QTLマッピングの準備を進めた。

4) AFLPマーカーとマイクロサテライトマーカーを用いて3つの家系について連鎖解析を進めた。B家系については10個の連鎖群からなる317cMの連鎖地図を得た。また、A家系、C家系(兄弟交配家系)では、それぞれ9連鎖群と4連鎖群を得たが、期待分離比からはずれたマーカーが0.7にも達し、サクラソウには多くの致死遺伝子が蓄積していることが示唆された。歪みのみられたマーカーは個体群の遺伝的健全性の指標として利用できる可能性がある。また、連鎖地図統合の際のアンカーマーカーとして利用可能なcDNAの部分塩基配列EST情報を5000クローンについて取得した。

5) 開発言語JAVAを使用し、サクラソウ様の生活史特性をもつ絶滅危惧植物の保全策の検討に資するシミュレーションツールとしての個体ベースモデルPrimuLatを構築し、遺伝子流動に伴う遺伝構造の形成のシミュレーション等への適用可能性を検討した。

6) 北海道から九州まで全国各地のサクラソウ自生地に残存する個体群の現状を踏査によりできるだけ詳細に把握した。調査ができた54個体群のうちジェネット(遺伝的な個体数)が5以下のもの、ジェネット数が100を越える比較的大きな個体群は、いずれも全体の30%程度であった。すなわち、絶滅リスクからみて多様な現状の個体群が存在することが明らかにされた。いくつかの地域においては、調査データにもとづいて保全のためのアドバイスを行い、鳥取県や岩手県の自生地では保全の取り組みが進展した。山形県や石川県にはかつて自生地が存在したとされるが、本研究では残存する個体群は見いだせなかった。

7) 全国の76個体群を対象とし、葉緑体DNA塩基配列変異およびマイクロサテライトマーカーの分析によりサクラソウの遺伝的変異を階層的に把握した。葉緑体DNAの5箇所の遺伝子間領域の塩基配列を決定したところ、サクラソウの種内には30のハプロタイプが認められ、それにもとづく系統解析からは3系統(クレード)が認められた。マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的分化の把握からは西日本、中部・関東、東北、北海道というように地理的に近い集団の類似性が認められた。また、個体群間の地理的距離が大きくなると遺伝的距離が大きくなる傾向が認められた。個体群サイズとヘテロ接合度の間には負の関係が認められ、厳しい条件におかれた個体群ほどヘテロ過剰となっていることが示された。

8) 遺伝子流動を担う生活史段階の生態、すなわち、トラマルハナバチ女王の送粉による花粉分散と、種子の時間的空間的分散に関する知見が飛躍的に拡大した。

9) マイクロサテライトマーカーおよび葉緑体 DNA 変異を用いて実験個体群や自生個体群における遺伝構造や父性解析等による遺伝子流動の測定がなされ、個体群の空間構造、遺伝構造(交配型の分布)、開花フェノロジーなどに依存した遺伝子流動の特徴やパターンが明らかとなった。沢に沿ってサクラソウが分布する自然の個体群では、花粉流動を反映するマイクロサテライトマーカー(核遺伝子)でみると沢内での多様性が高く、沢間での分化が認められないが、葉緑体 DNA 変異(母性遺伝)でみると沢間での有意な分化が認められた。実験個体群における遺伝子流動(花粉流動+種子流動)の測定からは、近傍の異型個体密度が花粉流動に大きな影響を及ぼすこと、その距離は数mであること、種子流動はきわめて限られており数 cm 程度であることが示された。また、水による種子分散などがない自生地では、近傍に遺伝的に近縁な個体が集中する空間的遺伝構造が認められた。

10) ヘテロ過剰から推測される近交弱勢を、自殖によって生産された種子の成熟、発芽、実生の定着、成長、開花にいたるまでの生活史段階について実測したところ、0.95 を越える大きな近交弱勢の値が得られた。

11) 開発したマイクロサテライトマーカーを用いてサクラソウにごく近縁な種で絶滅危惧 IB 類のカッコソウの保全計画の策定に必要な生態遺伝学的データ収集とそれにもとづく正確な現状把握を行った。その結果、カッコソウの唯一の自生地である鳴神山周辺には、わずか 14 のジェネット(クローン)しか残されていないこと、自生地においては種子による繁殖の可能性が残されていないことが示された。研究は、絶滅寸前ともいえるカッコソウを保全するための緊急的な保護増殖対策を兼ねて実施したが、人工授粉、制御環境下での育成後に自生地に再導入して成立させた個体群は 41 ジェネットを擁するものとなり、遺伝的なデータをもとにした計画的な保護増殖対策により絶滅を回避させうる可能性が確認された。

研究のまとめ

開発した多くの遺伝マーカーを用いた階層的な遺伝変異の解析および遺伝子流動や遺伝構造の詳細な把握により、遺伝的進化的な意味での保全の単位が明らかになり、また、個体群の縮小と相伴って進行する遺伝的劣化における近縁構造と近交弱勢の重要性が浮き彫りにされた。「遺伝子の多様性」に配慮した絶滅危惧植物の保全のための一般的指針が得られるとともに、全国のサクラソウ自生地の現状が把握され、それぞれの自生地における必要な保全策が明らかになった。QTL マッピングについては、連鎖解析の途上で研究期間が終了したが、その過程でマーカー分離比の異常が高頻度でみつき、他殖性のサクラソウでは多くの致死遺伝子や有害遺伝子が蓄積しており、保全においてはこの点への特段の配慮が必要なことが示唆された。小さな個体群で特に顕著なヘテロ過剰が見いだされたこともこの推論を支持する。本研究によって幸運なスタートを切ることのできたサクラソウの「エコゲノム研究」を今後さらに発展させる方途を探りたい。

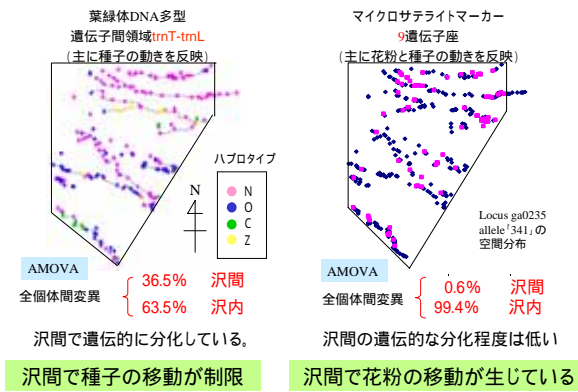


図 7: 沢沿いに分布する個体群における遺伝構造

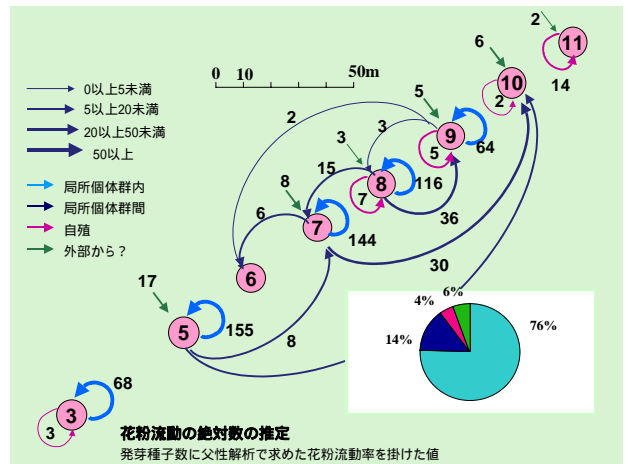


図 8: 密度の低い実験個体群の花粉流動パターン

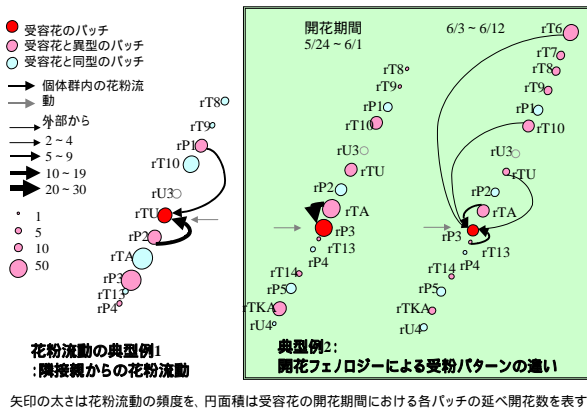


図 9: 密度の高い実験個体群の花粉流動パターン

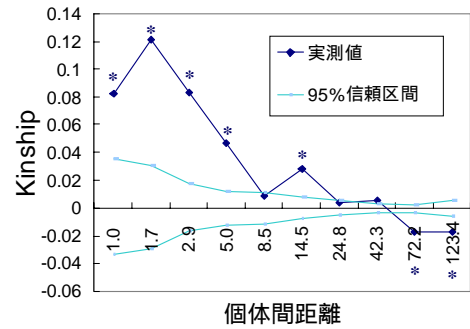


図 10: 攪乱の少ない安定した自生地でも認められた近縁構造

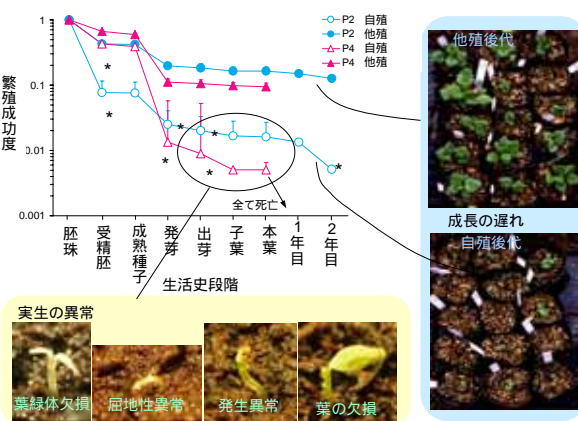


図 11: 自殖後代で発現した強い近交弱勢

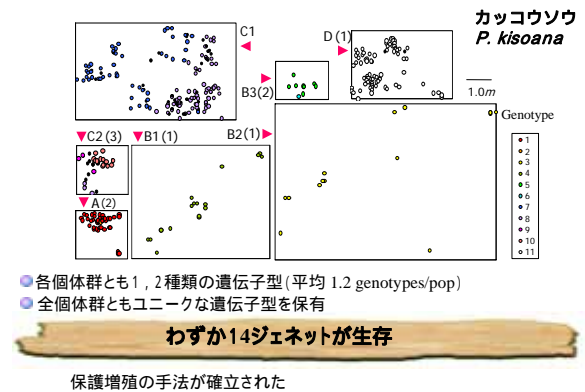


図 12: 開発されたマイクロサテライトマーカーの近縁種カッコソウへの応用

研究発表(主要なもののみ)

発表題名	掲載法 / 学会等	発表年月	発表者
(誌上発表)			
<ul style="list-style-type: none"> Resolving of closely linked quantitative trait loci with a genetic algorithm 	Genetics, 158: 463-475	2001.5	Nakamichi, R., Ukai, Y., & Kishino, H.
<ul style="list-style-type: none"> Heterostylous morph differences in pollen transfer and deposition patterns in <i>Primula sieboldii</i> on a visitation by a queen bumblebee, measured with a semi-natural experimental system 	Plant Species Biology, 17: 1-12	2002.4	Matsumura, C. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Testing the 'assortative mating' hypothesis on a variation maintenance mechanism for flowering time within a forest-floor population of <i>Primula sieboldii</i> 	Plant Species Biology, 18: 1-11	2003.4	Okayama, Y., Nagai, M. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Variability and specialization of plant-pollinator systems in a northern maritime grassland 	Ecological Research, 18: 221-246	2003.5	Nakano, C. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Cost-effective method to synthesize fluorescently labeled DNA size standards using cloned AFLP fragments 	BioTechniques, 34: 1146-1148	2003.6	Ueno, S., Tsumura, Y. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Seed set and gene flow patterns in an experimental population of an endangered heterostylous herb with controlled local opposite-morph density. 	Functional Ecology, 17: 680-689	2003.10	Ishihama, F., Nakano, C., Ueno, S., Ajima, M., Tsumura, Y. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Development of microsatellite markers in <i>Primula sieboldii</i> E. Morren, a threatened Japanese perennial herb 	Conservation Genetics, 4: 809-811	2003.12	Ueno, S., Tsumura, Y. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Effects of population spatial structure on the quantity and quality of seeds set by <i>Primula sieboldii</i> (Primulaceae). 	Plant Species Biology, 18: 107-121	2003.12	Watanabe, A., Goka, K. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Morphological and physiological acclimation responses to contrasting light and water regimes in <i>Primula sieboldii</i> 	Ecological Research, 19: 331-340	2004	Noda, H., Muraoka, H. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species <i>Primula sieboldii</i>. 	Biological Conservation, 120: 211-220	2004	Honjo, M., Ueno, S., Tsumura, Y., Washitani, I. & Ohsawa, R.
<ul style="list-style-type: none"> Seedling emergence patterns and dormancy/germination strategies of <i>Primula modesta</i> Bisset et Moore (Primulaceae) in two contrasting sub-alpine natural habitats 	Ecological Research, 19: 541-551	2004	Shimono, A. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Characterization of microsatellite loci in <i>Primula modesta</i> Bisset et Moore (Primulaceae) 	Molecular Ecology Notes (in press)	2004	Shimono, A. , Ueno, S., Tsumura, Y. & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Spatial genetic structure among and within populations of <i>Primula sieboldii</i> growing beside separate streams 	Molecular Ecology (in press)	2005	Kitamoto, N., Honjo, M., Ueno, S., Takenaka, A., Tsumura, Y., Washitani, I. & Ohsawa, R.
<ul style="list-style-type: none"> Gene flow and inbreeding depression inferred from fine-scale genetic structure in an endangered heterostylous perennial, <i>Primula sieboldii</i> 	Molecular Ecology	submitted	Ishihama, F., Ueno, S., Tsumura, Y., & Washitani, I.
<ul style="list-style-type: none"> Conservation ecology of <i>Primula sieboldii</i>: synthesis of information toward the prediction of genetic/demographic fate of a population 	Plant Species Biology	submitted	Washitani, I., Ishihama, F., Matsumura, C., Nagai, M., Nishihiro, J. & Ajima, M.
<ul style="list-style-type: none"> サクラソウの生態学：エコゲノム時代の黎明 	東京大学出版会	2005 出版予定	鷲谷いづみ (編)