

課題名 D-0903 絶滅危惧植物の全個体ジェノタイピングに基づく生物多様性保全に関する研究

課題代表者名 井鷲裕司(京都大学大学院農学研究科森林科学専攻森林生物学研究室)

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 99,278千円(うち23年度 32,976千円)
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) 定常的な人為インパクト下にある絶滅危惧植物保全に関する研究(京都大学大学院農学研究科)
- (2) 地史的環境変動と近年の温暖化リスク下にある高山における絶滅危惧植物保全に関する研究(東北大学大学院農学研究科)
- (3) 絶滅危惧シダ植物保全に関する研究(熊本大学大学院自然科学研究科)
- (4) 全個体ジェノタイピングおよび位置情報に基づく絶滅危惧植物個体群の持続可能性評価に関する研究(北海道大学大学院地球環境科学研究院)

研究協力機関

神戸大学発達科学部、滋賀県立大学環境科学部、奈良教育大学教育学部、東京大学農学生命科学研究科、北九州市立自然史博物館、大阪市立自然史博物館、新潟大学農学部、山梨県森林総合研究所、屋久島生物多様性協議会、北海学園大学工学部、北海道立総合研究機構環境科学研究センター、高知大学大学院総合人間自然科学研究科

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

自然環境に対する人為インパクトの増大によって、多くの生態系で生物多様性が低下しつつある。日本列島は、世界に34ヶ所認識されている生物多様性ホットスポットのひとつであり、変種や亜種も含めると約7,000種の維管束植物が分布しているが、そのうち約4分の3が、何らかの形で絶滅の危機に面している。絶滅危惧種の保全活動によって、個体数が維持・回復している事例もあるが、詳細な遺伝解析に基づく保全活動が展開されている例は少なく、不適切な保全活動がかえって集団の健全性を損なう問題も懸念されている。



図1. 全個体ジェノタイピングによる絶滅危惧種保全

生物個体群における遺伝的多様性、遺伝構造、遺伝的分化等の遺伝的特徴は、絶滅危惧種の個体群動態、更新過程、適応度等に対して大きな影響を及ぼすため、これらの情報は、絶滅危惧種の保全のために必要不可欠である。適切な保全方法を確認し、生物学的多様性の減少を止めるためには、個体レベルの詳細な

遺伝情報が必要であるが、多くの絶滅危惧種においては、いまだにそのような情報を利用できる状態には至っていない。

本研究では、多様な絶滅危惧種を対象に、野生に生育する全個体をジェノタイピング（遺伝子型を決定すること）するという、野生生物の保全策としては、これまでほとんど行われた事のないアプローチを複数の絶滅危惧植物に適用し、詳細な遺伝情報を獲得する。得られた遺伝情報や生育地情報に基づいて、絶滅危惧種の状況のより正確な把握、適切な保全策の構築、そして数理モデルを活用した個体群持続可能性の評価を行うことで、生物多様性保全に寄与することを目的とする(図1)。

生物多様性保全の重要性は世界的に認知されつつあり、生物多様性条約の発効（1993年）以降、多くの社会的取り組みが行われている。これら各種の生物保全活動に対して、遺伝情報に基づく適切な管理指針を供与することにより、活動の意義やパフォーマンスを著しく上げることが期待される。

2. 研究開発目的

本課題は絶滅危惧植物の保全のために、残存するすべての個体について網羅的に、生育位置、繁殖状況、遺伝子型に関する調査を行い、その情報をもとに、遺伝解析と数理解析によって、合理的な生物多様性保全策を検討することを目的とする。

本研究では、ただ単一の絶滅危惧種を対象とするにとどまらず、異なった生育域、分類群の20種を解析対象にすることにより、生物多様性保全に関してより一般的な理解を得ることを目的とする。すなわち、定常的な人為インパクト下にある絶滅危惧植物、地史的環境変動および近年の温暖化リスク下にある高山における絶滅危惧植物、絶滅危惧シダ植物を対象とした遺伝解析を行う(図2)。異なった生育環境に生育する絶滅危惧植物、あるいは、多様な分類群を解析対象とすることで、より一般性・普遍性のある解析を目指す。得られたデータに基づき、空間構造と遺伝情報を組み込んだ数理モデルを作成し、メタ個体群の存続に関わる将来予測、個体群の脆弱性や持続可能性を解析する。また、種間あるいは個体群間の比較により、どのような生物学的特徴が絶滅リスクを高める要因になるか明らかにする(図2)。

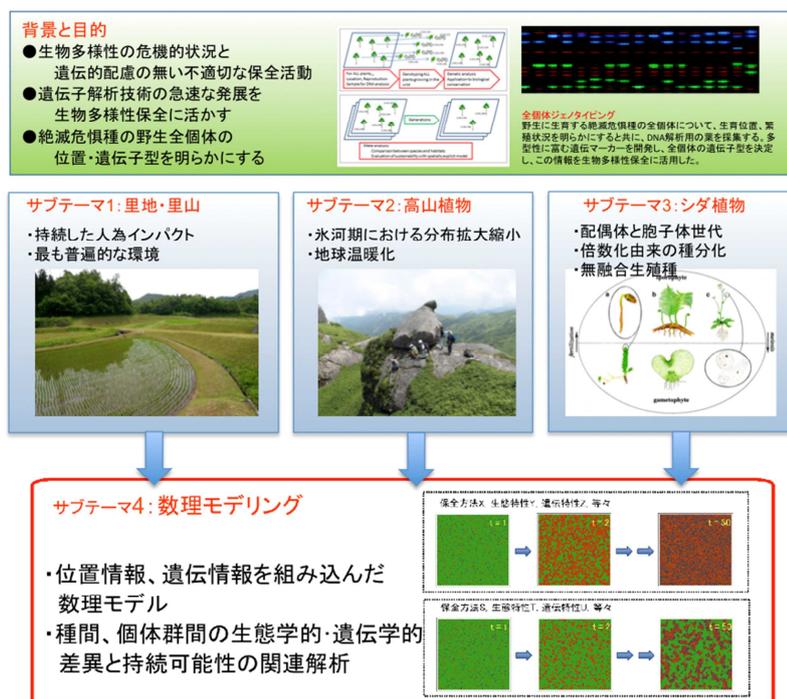


図2. 本研究の構成

この研究で集積されるデータは、遺伝的多様性や対立遺伝子頻度における経時変化のモニタリング、更新個体の遺伝的特徴の評価、人工繁殖における遺伝的に適切な交配相手の選定、違法盗掘の防止、集団の遺伝構造から判断した適切な移植場所の決定など、保全活動に直接的なメリットを提供する。本研究では、残存する全個体を網羅的に遺伝解析し、更に、異なった生活史特性を持つ種の情報をもとにメタ解析をおこなうことで絶滅危惧植物の保全を試みる。本研究のアプローチは世界的にも例がないものであり、生物多様性保全の新たな手法の確立を目指すものである。

3. 研究開発の方法

(1) 定常的な人為インパクト下にある絶滅危惧植物保全に関する研究

定常的な人為インパクト下で成立している生態系である、里地・里山に生育する絶滅危惧植物11種(スズカケソウ、トキワマンサク、ヤチシャジン、センリゴマ、シモツケコウホネ、ヒメコウホネ、ガシヤモク、ハリマサムシグサ、タデスミレ、ウスユキクテナシグサ、キバナスゲユリ)を対象に、マイクロサテライト遺伝マーカーの開発と生育地における個体の位置情報、繁殖状況調査、DNA解析のためのサンプル採集を行った。また、各対象種の状況に合わせた遺伝解析を行い、緊急の保全対策が求められる絶滅危惧種の適切な保全のための遺伝情報を得た。

(2) 地史的環境変動と近年の温暖化リスク下にある高山における絶滅危惧植物保全に関する研究

温暖化や盗掘の影響が大きいと考えられる絶滅危惧の高山植物6種(ゴヨウザンヨウラク、ヤクシマリンドウ、ヒダカソウ、キリギソウ、キタダケソウ、キバナアツモリソウ)を対象に、生育位置、繁殖状況を現地調査して正確な分布全容を把握するとともに、遺伝的解析用のサンプルを採集した。また、対象種の遺伝的解析用にマイクロサテライト遺伝マーカーを開発して、採取した個体の遺伝子型を決定し、集団遺伝学的な解析を行った。これらのデータをもとにして、遺伝的多様性や対立遺伝子頻度に関する現状把握、遺伝的特徴の評価、集団の遺伝的構造から判断した個体群間の遺伝的違いの把握など、保全活動計画策定に対して有効な情報を得た。

(3) 絶滅危惧シダ植物保全に関する研究

多様な繁殖様式を有するシダ植物の絶滅危惧植物5種(シビカナワラビ、フクレギシダ、アオグキイヌワラビ、タイワンアリサンイヌワラビ、キュウシュウイノデ)を対象にして、マイクロサテライトマーカーの開発、新たな生育地の調査、生育地における全個体の位置情報、繁殖状況調査およびDNA解析のための全個体サンプリング、集団の遺伝的特徴を把握し、これらをもとに適切な保全対策を提言した。さらに、開発したマイクロサテライト遺伝マーカーの、より多くの種に対する有効性の検証のため、近縁他種における汎用性の検討も行った。

(4) 全個体ジェノタイピングおよび位置情報に基づく絶滅危惧植物個体群の持続可能性評価に関する研究

個体レベルの詳細な位置情報と遺伝子型情報を活用することで、詳細な交配様式を表現した数理モデルを開発し、生物多様性の持続可能性や脆弱性を理論的に検討した。開発した数理モデルは、実生、成熟非繁殖、成熟繁殖、という3つの状態からなるステージ構造をもち、繁殖個体から生産される種子の生存率が親個体の血縁度によって決定されると仮定した。血縁度の推定には、ジェノタイピング情報を活用し、血縁度と種子の生存率の関係に関しては、線形減少関数、指数的減少関数、そして階段型減少関数の3通りの関数を用いた。本モデルのパフォーマンスを調べるために、絶滅危惧植物の遺伝子型に関する情報を基にして、持続可能性解析を行い将来の絶滅確率、将来残存する個体数、血縁度の推移を予測した。本数理モデルに、当プロジェクトで得られた全個体ジェノタイピングデータを適用して、複数種の絶滅危惧種の個体群存続性解析を行い、適切な保全管理に関する提言を行った。

4. 結果及び考察

(1) 定常的な人為インパクト下にある絶滅危惧植物保全に関する研究

本サブテーマから得られた成果により、今回対象とした絶滅危惧植物が、ただ単に野生に生育する個体数が少ないだけでなく、遺伝的に評価すると、著しく個体数が少ないことが明らかになった。また、スズカケソウにおいて、野生集団を構成するクローンと生育地外保全されているクローンが異なっていた事は、遺伝的多様性を保持しつつ適切な生育域外保全を行うにあたってきわめて重要な情報である。

里地・里山に生育する絶滅危惧植物の中でも特にランクの高い分類群には、過去において、人為に植栽・移植されたものがあることが明らかになった(図3)。現在、多くの地域で里地里山に生育する絶滅危惧植物の保全活動が行われているが、今回の結果は、これらの保全活動をより効果的に行うためには、網羅的な遺伝解析により状況を評価することが重要であることを改めて示している。

分子マーカーを用いることにより、採取や売買が禁止されている絶滅危惧種の識別がなされることはこれまで報告があるが、本課題の成果においては、更に、全個体の遺伝子型情報に基づいて、市場に流通している個体の採集場所を明らかにできた。このことは、市場に流通する希少植物の由来を正確に特定できることを意味しており、法生物学 (forensic biology) 的な観点からも意義ある成果であると考えられる。

植物園等において絶滅危惧植物の生育域外保全を行う際に、各個体に遺伝子型のタグを付け、それに基づいて適切に維持・管理することは、域外保全活動において先進的かつ有益な取り組みであるといえる。

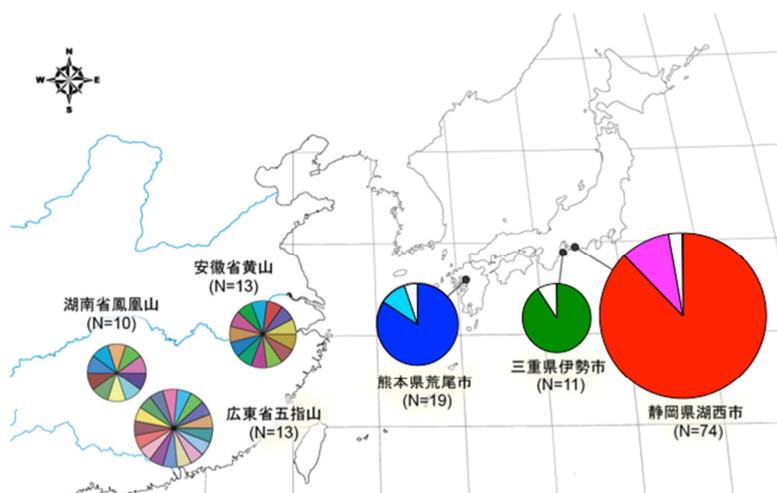


図3. トキワマンサク集団のクローン構成.

色の違いは異なったクローンを表す。中国のトキワマンサク野生集団は全てが異なったクローンから構成されるが、日本で野生として知られる3ヶ所の集団は、同一のクローンが卓越しており、人為植栽由来であることが判明した。N: 解析サンプル数。

日本に現存するスズカケソウについては、ユニークな対立遺伝子を持つすべてのクローンを、その遺伝子型とともに広島市植物公園で生育域外保全するという段階まで持ち込むことができたことは、大きな成果の一つとしてあげることができる(図4)。更に、スズカケソウ以外の絶滅危惧植物に関しても、域外保全が行われている、あるいは検討されている分類群について、現存する全個体について遺伝子型タグを付加したうえで個体管理することがほぼ可能となった。各個体の遺伝子型に基づいて種内の遺伝的多様性を保全する枠組みを実証したこと、そして、その基礎となる全残存個体の遺伝子型情報を、比較的短期間かつ低コストで複数の絶滅危惧植物について同時に整備できることを示したことは、絶滅危惧種の適切な域外保全を実行する上で、本プロジェクトの重要な成果である。

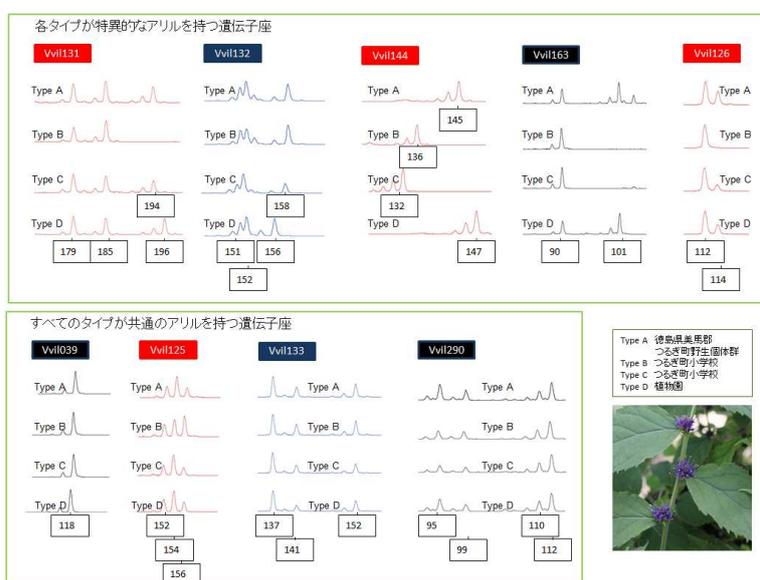


図4. 本研究の成果に基づいて生育域外保全しているスズカケソウの遺伝子型. Type A, B, C, Dの4クローンを保全することで現存する遺伝的多様性を保全できる。

(2) 地史的環境変動と近年の温暖化リスク下にある高山における絶滅危惧植物保全に関する研究

高山に分布する絶滅危惧種を対象として行った本研究の詳細な分布調査により、これまで不正確にしか明らかになっていなかった絶滅危惧種の分布の現状が判明した。例えば、岩手県五葉山のみ分布するゴヨウザンヨウラクは、本プロジェクトの解析を通して、これまで認識されていなかった多くの個体が分布することが判明した。しかしながら、それでも300株に満たない開花個体が数ヘクタールの範囲内に分布しているにすぎないことが明らか

かになり、その保全価値が改めて認識された。同時に行われた生育実態・開花状況・個体群動態調査などの情報を総合して、分布個体数以外のより広い視点でこれまで不明であった絶滅危惧種の現状を把握することができた。

また、遺伝マーカーを開発したことにより、対象種の遺伝的特徴を把握することが可能となった。これらのマーカーは近縁種にも利用可能であることから、近縁種に関する遺伝的解析が可能になっただけでなく、絶滅危惧種と近縁種との種間比較が可能になった。これらのマーカーを用いることによって、遺伝的な個体数、遺伝的多様性、個体群内の空間的遺伝構造、個体群間の遺伝的分化の程度、種間の遺伝的關係、集団サイズの急激な減少(ボトルネック)の有無等に関わる集団遺伝学的な解析を行うことができ、絶滅危惧種の状況を遺伝学的に適切に評価することが可能となった。例えば、ヒダカソウでは個体群動態調査によってだけでなく、集団遺伝学的にも近年に急激な集団サイズの減少があった可能性が示され、絶滅危惧植物としての保全の緊急度は極めて高いことが多角的に示された。

(3) 絶滅危惧シダ植物保全に関する研究

全個体ジェノタイピングを行うことで、保全生態学では、これまで世界的に見ても、ほとんど取り上げられることのなかったシダ植物に関する新たな情報が得られた。

二倍体有性生殖種シビカナワラビは、分布が限定するにもかかわらず、著しい遺伝的変異があり、現存する4集団は遺伝的に分化していた。二倍体有性生殖種フクレギシダは、4集団において全個体が遺伝的に全く同じ完全ホモ個体であること、集団間では遺伝的に異なることが分かり、シダ植物特有の自配自家受精による集団形成という事例を初めて発見できた(図5)。

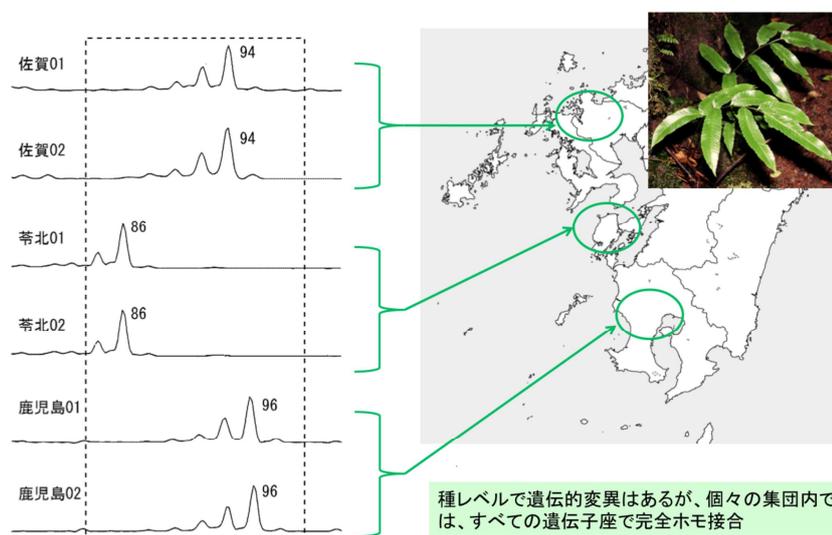


図5. フクレギシダの集団ごとに固定した遺伝子型. それぞれの集団は異なった単一胞子の自配自家受精由来する.

四倍体有性生殖種アオグキヌワラビは、遺伝的に変異は少なく複数生育地で優占するクローンが認められた(図6)。これに対して、比較解析に供試した普通種であるメシダ属3種は、高い遺伝的変異を示した。一方、同じく四倍体有性生殖種タイワンアリサンイヌワラビは、遺伝的に全て同一で固定異質接合体だった。四倍体種に関しては、通常遺伝的変異は少ないものと、これまで考えられてきたが、マイクロサテライトマーカーを用いた解析によって、多くの遺伝的変異が生じていることが明らかとなった。また、アオグキヌワラビは同質倍数体起源の、タイワンアリサンイヌワラビは異質倍数体起源の可能性があり、シダ植物に多く見られる四倍体種の保持する遺伝的多様性の実態について、新たな知見をもたらした。二倍体無融合生殖種キュウシュウイノデは、遺伝子座全てが同一のホモ接合体で、変異がまったく検出されず、全て同一クローンであった。

シダ植物においてマイクロサテライトマーカーを用いた解析は、これまで世界的に見ても、限られた数の報告がなされているだけである。また、すでに開発されているものも二倍体有性生殖種のみを対象としており、シダ類の多様な生殖様式をカバーするものではない。本プロジェクトでは、二倍体有性生殖種2種(カナワラビ属 *Arachniodes*とイワデンダ属 *Diplazium*)、四倍体有性生殖種(メシダ属 *Athyrium*)、二倍体無融合生殖種(イノデ属 *Polystichum*)のシダ植物に対してマイクロサテライトマーカーを開発した。このうちメシダ属以外のマイクロサテライトマーカーは、世界でも初めて開発されたものである。また、イワデンダ属以外のマーカーは同属植物に汎用可能であり、多くの絶滅危惧種を含むメシダ属やカナワラビ属にも応用可能となり、シダ植物の集団遺伝学的研究の発展への大きな貢献となった。

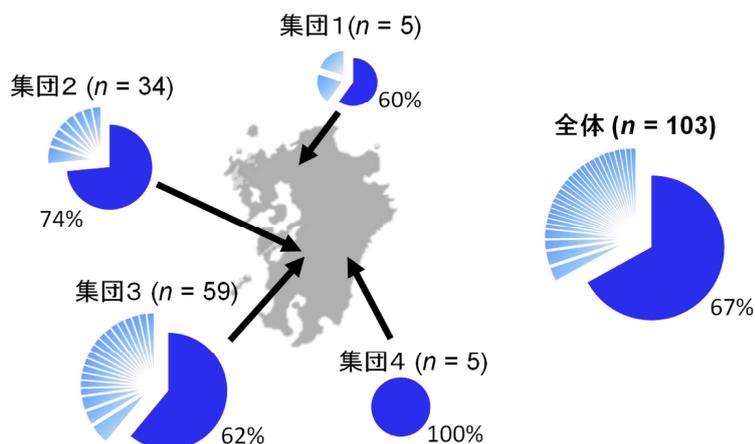


図6. アオグキヌワラビの全野生集団におけるクローン組成。
青色で示した最も頻度の高いクローンが全集団で優占している。

(4) 全個体ジェノタイプングおよび位置情報に基づく絶滅危惧植物個体群の持続可能性評価に関する研究

個体レベルの詳細な位置情報と遺伝子型情報を活用することで、遺伝的多様性の喪失が絶滅率に上昇に与える影響を量的に見積もることが可能となった(図7)。このことは、絶滅危惧種個体群の持続可能性について、種間や個体群間の違いに対応した科学的な予測を打ち立てることを可能にし、各種保全活動の効果予測の精度を高めることに繋がる。さらに、研究や保全活動へ割り当てることのできる資源をより効率的に利用できるようになる。

また、改良した数理モデルの解析によって、長距離花粉散布による遺伝子流動が、絶滅確率を減少させる主要な要因となる可能性が指摘された。また、個体数が減少した個体群においては、1年草の生活史を持つ植物種において、多年生植物種よりも絶滅確率が低く維持されることが明らかになった。

これまでの絶滅危惧種管理に関する研究はおもに残存個体数を軸になされてきた。本研究課題の成果として、個体数に加えて遺伝情報と位置情報が得られること、そして遺伝情報と位置情報を最大限生かした持続存続性解析モデルを活用すること、によって残存個体数だけではわからなかった遺伝的多様性を維持することの重要性が明らかになった。特に本研究によって、少数の個体からなる分集団も個体群維持に大きな貢献をしていることが明らかになった点には、大きな意義がある。

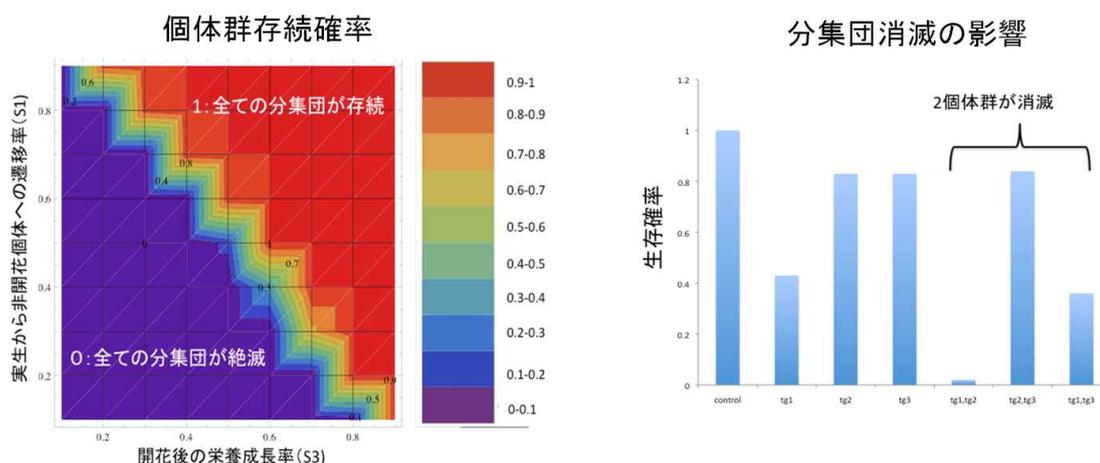


図7. シモツケコウホネにおける個体群持続確率の推定値および分集団消滅の影響

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

1) 本研究で対象とした多くの絶滅危惧種に関して、残存する絶滅危惧種のすべての個体に遺伝的なタグを付けた事になるので、各個体の遺伝的同一性、個体間の血縁度、集団の遺伝的多様性、集団間の遺伝的分化等に関して、詳細な情報を用いた合理的かつ効率的な保全を行うことが可能になった。絶滅危惧種存続上の大きな脅威となっている生育地縮小や劣化に対処するために保全活動を行うに当たって、残存した遺伝的多様性を最も高い費用対効果で保全するプランを立案できるようになった。

2)シモツケコウホネについては、全個体の遺伝子型決定に基づいて、市場に流通している個体の採集場所を明らかにできた。このことは、市場に流通する絶滅危惧種の由来を正確に特定できることを意味しており、法生物学 (forensic biology) 的な観点からも意義ある成果といえる。また、違法採集によって市場に流通した個体について、その由来を特定できるので盗掘防止への強い圧力となり得る。実際に盗掘由来と思われる個体の流通が行われなくなっており、遺伝子型情報を利用した新しい保全策として期待される。

3)スズカケソウに関しては、固有の対立遺伝子を保有するすべてのクローンに遺伝子型のタグを付け、それに基づいて植物園で生育域外管理を行うという、保全生物学上、先進的な取り組みをはじめた。

4)シダ植物においてマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝解析はこれまで世界的に見ても少なかったが、多様な繁殖システムを持つ複数のシダ植物を対象にマーカー開発を行った。カナワラビ属とイワデンダ属、イノデ属におけるマイクロサテライトマーカーは本研究により初めて開発されたものである。また、カナワラビ属とメシダ属、イノデ属のマーカーは同属植物にも汎用的に適用可能であり、多くの絶滅危惧種を含むこれら分類群の保全や集団遺伝学的解析が可能になった。

5)シダ植物特有の自配自家受精による集団形成の重要性が初めて明らかとなり、全ての集団において集団内の全個体の遺伝子型がホモ接合体で遺伝的に同一であるという非常に珍しい例が確認された。

6)遺伝的多様性の喪失や各残存個体群の消失が絶滅確率の上昇に与える影響を量的に評価することが可能になった。このことは、絶滅危惧種個体群の持続可能性について、種間や個体群間の違いに対応した科学的な予測を打ち立てることを可能にし、各種保全活動の効果予測の精度を高めることにつながるものである。

(2)環境政策への貢献

1)今回得られた成果は、全個体ジェノタイピングに基づく絶滅危惧植物の盗掘防止と適正管理に関するモデルケースを提供するものである。全個体ジェノタイピングが終了した絶滅危惧種については、残存するすべての個体に遺伝的タグを付けたことになるので、市場に流通している個体の由来を正確に特定でき、絶滅危惧種の違法な採取や販売を検知可能である。また、園芸的価値が高く、盗掘被害を受けやすい植物について、全個体についてジェノタイピングが終了していること、違法な採取によって市場に流通している個体の由来を特定できることを広く周知することによって、盗掘防止への強い圧力になることが期待できる。さらに、そのような絶滅危惧植物を、認定業者等が合法的に販売する場合にも、特定の遺伝子型を有する個体を販売することにより、販売されている個体が正規のルートを経たものである事を簡単に証明できるようになる。全個体ジェノタイピングに基づくこれらの対策を総合的に実施することにより、絶滅危惧植物の盗掘防止と有効利用について、より厳密かつ積極的な制度が構築できると考えられる。

2)本研究で対象としたシモツケコウホネは、絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律に基づく「国内希少野生動植物種」として指定される予定である。本研究で得られた知見や開発したマイクロサテライトマーカーや、今後の保全活動を実施する際に有効に利用できる。

3)本研究で対象とした高山植物3種(ヒダカソウ、キリギシソウ、キバナノアツモリソウ)は、北海道希少野生動植物の保護に関する条例の対象種であるため、本研究による遺伝的情報は包括的な保全対策の構築に寄与できる。またゴヨウザンヨウラクについては岩手県立博物館と、ヤクシマリンドウについては地元NPOの屋久島生物多様性保全協議会との連携を図り、研究成果を具体的な保全策に役立てていく予定である。なお、2010年10月21日には「COP10生物多様性交流フェア(名古屋大学)」において、屋久島生物多様性保全協議会によるヤクシマリンドウの保全活動の報告がなされている。

4)今回調査した4種のシダ植物は、全て平成22年度からの環境省のRDB調査対象種である。今回得られた結果から、個体数と遺伝的多様性の動態についてモニタリングが可能となり、正確でより持続性の高い保全部管理が期待される。フクレギシダについては、保全対策を含め、成果の広報・普及に努める予定である。また、アオグキイヌワラビに関しても、熊本県の自然保護課に情報提供し、保全対策に協力する予定である。また、宮崎県におけるシビカナワラビの新発見とアオグキイヌワラビの再発見は、現在作成中の宮崎県RDBに掲載される予定である。

5)本プロジェクトで得られた成果を、行政や市民の保全活動に速やかに反映させるため、市民向けシンポジウム(「シモツケコウホネを知る・守る」2010年9月23日栃木県立博物館講堂、「ふるさとの自然を守ろう～生物多様性を考える～」平成23年11月23日広島市植物園展示資料館)や新聞報道(「群落保全遺伝子型カギ」2011年9月25日朝日新聞)等で成果の普及に努めた。

6. 研究成果の主な発表状況

(1)主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) I. MASUMOTO, S. KANEKO, K. OHTAKE, and Y. ISAGI: Conservation Genetics Resources 3, 163-165 (2010)
“Development of microsatellite markers for *Adenophora palustris* (Campanulaceae), a critically endangered wetland plant species in Japan”
- 2) A. IZUNO, M. TAKAMIYA, S. KANEKO and Y. ISAGI: American Journal of Botany, 98, e339-341 (2011)
“Microsatellite loci in an endangered fern species *Athyrium viridescens* (Woodsiaceae) and cross-species amplification “
- 3) H. ABE, M. MAKI, S. HORIE and Y. SUYAMA: Conservation Genetics Resources, 3, 569-571 (2011)
“Isolation and characterization of microsatellite loci for *Menziesia goyozanensis*, an endangered shrub species endemic to Mt. Goyo in northern Japan”
- 4) M. YOKOGAWA, T. SHIGA, S. KANEKO and Y. ISAGI: Conservation Genetics Resources, (2012)
“Development of nuclear microsatellite markers for the critically endangered freshwater macrophyte, *Nuphar submersa* (Nymphaeaceae), and cross-species amplification in six additional *Nuphar* taxa ” (in press)
- 5) C. FUKADA, S. KANEKO, M. YOKOGAWA, and Y. ISAGI: Conservation Genetics Resources, (2012)
“Development of ten microsatellite markers for *Arisaema minus* (Araceae), a vulnerable Japanese herb species” (in press)
- 6) N. NAKAHAMA, S. KANEKO, A. HAYANO, Y. ISAGI, M. INOUE—MURAYAMA and T. TOMINAGA: Conservation Genetics Resources, (2012)
“Development of microsatellite markers for the endangered grassland species *Vincetoxicum pycnostelma* (Apocynaceae), using next generation sequencing technology.” (in press)
- 7) A. IZUNO, M. TAKAMIYA, S. KANEKO and Y. ISAGI: Journal of Plant Research, (2012)
“Genetic variation and structure of the endangered Lady Fern *Athyrium viridescens* based on ubiquitous genotyping.” (in press)
- 8) 津村義彦、陶山佳久編:森の分子生態学第二版、p137-158、文一総合出版、(2012)
「第4章 絶滅危惧種の分子保全遺伝学(執筆担当:井鷲裕司)」
- 9) 井鷲裕司、兼子伸吾、水谷未耶、加藤慶子、伊津野彩子、高宮正之、志賀隆、増本育子、大竹邦明:DNA多型(2012)
「全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全」(印刷中)

(2)主な口頭発表(学会等)

- 1) S. KANEKO, F. NOBUSHIMA and Y. ISAGI: East Asian Plant Diversity and Conservation 2nd Meeting, Beijin. China, (2009)
“Exhaustive genotyping for all remnant populations of endangered tree species revealed the significant genetic differentiation among populations in small geographical scale”
- 2) 橋本美幸、寺田(西田)泰子、藤井紀行、高宮正之:第73回日本植物学会大会(2009)
「ホソバインワラビ(広義)の種内分類群に関する研究」
- 3) 水谷未耶、兼子伸吾、井鷲裕司:第57回日本生態学会東京大会(2010)
「日本に生育する絶滅危惧種トキワマンサクの全野生個体解析による多様性評価」
- 4) 兼子伸吾、大庭俊司、井鷲裕司:第57回日本生態学会東京大会(2010)
「絶滅危惧植物センリゴマの全残存集団を対象とした網羅的遺伝解析」
- 5) 大竹邦暁、兼子伸吾、増本育子、井鷲裕司:第57回日本生態学会東京大会(2010)
「ユビキタスジェノタイピングによる絶滅危惧植物ヤチシャジンの保全」

- 6) 志賀隆、杉田勇治、横川昌史、兼子伸吾、井鷲裕司：第9回日本植物分類学会愛知大会(2010)
「水生植物ナガレコウホネ(スイレン科)の形態変異と遺伝的変異」
- 7) 志賀隆、横川昌史、兼子伸吾、井鷲裕司：日本植物学会第74回春日井大会 (2010)
「遺伝子解析から見いだされたコウホネ属の絶滅危惧種～見逃されてきた絶滅危惧種とその保全」
- 8) 阿部晴恵：秋田県立大学森林科学セミナー(2010)
「生物間相互作用系を通じた森林回復(三宅島)と遺伝的情報を用いた希少種の保全(高山植物)」
- 9) 屋久島生物多様性保全協議会(陶山佳久)：COP10生物多様性交流フェア(名古屋大学)(2010)
「世界自然遺産屋久島における生物多様性保全への取り組み」
- 10) 吉岡あゆみ、兼子伸吾、井鷲裕司、藤井紀行、高宮正之：第74回日本植物学会大会 (2010)
「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧シダ植物の遺伝的特徴の解明」
- 11) 加藤元海、佐竹暁子：第20回日本数理生物学会札幌大会 (2010)
「絶滅危惧植物における全個体遺伝子情報と個体群存続解析」
- 13) K. KATO, S. KANEKO, Y. ISAGI: East Asian Botany, International Symposium, Tsukuba, Japan, (2011)
“Conservation genetics of the endangered perennial herb, *Veronicastrum villosulum* (Plantaginaceae) analyzing all wild and cultivated individuals utilizing microsatellite markers.”
- 14) T. SHIGA, M. YOKOGAWA, S. KANEKO and Y. ISAGI: East Asian Botany, International Symposium, Tsukuba, Japan, (2011)
“Assessing genetic and genotypic diversities of *Nuphar submersa*, a critically endangered macrophyte, and its conservation implications”
- 15) Y. ISAGI, S. KANEKO, K. KATO, A. IZUNO, M. MIZUTANI, T. SHIGA, I. MASUMOTO and K. OHTAKE: 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, (2011)
“Conservation of critically endangered plant species based on information obtained by the ubiquitous genotyping.”
- 16) S. KANEKO, T. ABE, Y. ISAGI: 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, (2011)
“Conservation of a critically endangered shrub species *Stachyurus macrocarpus* var. *prunifolius* (Stachyuraceae) based on the ubiquitous genotyping approach.”
- 17) K. KATO, S. KANEKO, Y. ISAGI: 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, (2011)
“Conservation of a critically endangered perennial species, *Veronicastrum villosulum* (Plantaginaceae) by ubiquitous genotyping.”
- 18) A. IZUNO, M. TAKAMIYA, S. KANEKO, Y. ISAGI, 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, (2011)
“Conservation of a critically endangered tetraploid fern species *Athyrium viridescens* based on the ubiquitous genotyping approach.”
- 19) 井鷲裕司、兼子伸吾、加藤慶子、水谷未耶、増本育子、大竹邦暁：第58回日本生態学会札幌大会 (2011)
「二次的自然下に生育する絶滅危惧植物保全のためのユビキタスジェノタイピング」
- 20) 志賀隆、横川昌史、兼子伸吾、井鷲裕司：第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「地域固有絶滅危惧種シモツケコウホネを守る：ユビキタスジェノタイピングから見てきたこと」
- 21) 畑中佑紀、尾関雅章、平尾章、井鷲裕司：第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「AFLPとマイクロサテライト多型解析による絶滅危惧種タデスミレの残存個体群評価」
- 22) 兼子伸吾、西川恵子、井鷲裕司ほか7名：第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「全個体ジェノタイピングによる絶滅危惧植物ガシャモクの遺伝的多様性解析」
- 23) 深田ちひろ、小林禎樹、兼子伸吾、井鷲裕司、丑丸敦史：第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「全個体ジェノタイピングによるハリマサムシグサの遺伝的構造」
- 24) 高宮正之：第58回日本生態学会大会 (2011)
「様々な繁殖様式をもつシダ植物におけるユビキタスジェノタイピング」
- 25) 伊津野彩子、高宮正之、兼子伸吾、井鷲裕司：第58回日本生態学会大会 (2011)
「有性生殖をする絶滅危惧植物アオグキイヌワラビの遺伝構造—複数生育地にまたがる遺伝的固定」
- 26) 吉岡あゆみ、伊津野彩子、兼子伸吾、井鷲裕司、藤井紀行、高宮正之：第75回日本植物学会大会

(2011)

「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧シダ植物の解析」

27) 井鷲裕司、兼子伸吾、水谷未耶、加藤慶子、高宮正之、伊津野彩子、志賀隆、増本育子、大竹邦明：日本多型学会 第20回学術集会(2011)

「全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全」

28) 陶山佳久、阿部晴恵：第58回日本生態学会大会(2011)

「高山における絶滅危惧植物保全のための全個体ジェノタイピング」

29) 阿部晴恵、牧雅之、堀江佐知子、陶山佳久：第58回日本生態学会大会(2011)

「絶滅危惧植物ゴヨウザンヨウラクの遺伝的多様性の評価」

30) 小笠原玄記、阿部晴恵、牧雅之、堀江佐知子、陶山佳久：第43回種生物学シンポジウム(2011)

「絶滅危惧植物ゴヨウザンヨウラクとその近縁種の集団遺伝学的解析」

32) 加藤元海、佐竹暁子：第58回日本生態学会札幌大会(2011)

「絶滅危惧植物における全個体遺伝子情報と個体群存続解析」

33) S. KANEKO, Y. MATSUKI, X. Y. QIU and Y. ISAGI: The 5th EAFES International Congress, Otsu, Japan, (2012)

“Single clone remaining of *Rehmannia japonica*, critically endangered plant species in Japan, as revealed by exhaustive genotyping of all remnant populations.”

34) K. KATO, S. KANEKO and Y. ISAGI: The 5th EAFES International Congress, Otsu, Japan, (2012)

“Conservation genetics of the endangered clonal herb, *Veronicastrum villosulum*

(Plantaginaceae): analysis of all wild and cultivated populations with microsatellite markers.”

35) 内海知子、横川昌史、高宮正之、井鷲裕司：第59回日本生態学会大津大会(2012)

「マイクロサテライト遺伝マーカーによるウスユキクチャナシグサ(絶滅危惧IA類)の極めて低い遺伝的多様性」

36) 深田ちひろ、兼子伸吾、横川昌史、井鷲裕司、小林禧樹、丑丸敦史：第59回日本生態学会大津大会(2012)

「絶滅危惧種ハリマムシグサの保全遺伝学」

7. 研究者略歴

課題代表者：井鷲裕司 1960年生まれ、広島大学大学院理学研究科博士課程前期修了、博士(学術)、広島大学大学院総合科学研究科助教授、現在、京都大学大学院農学研究科教授

研究参画者

(1): 井鷲裕司 (同上)

(2): 陶山佳久 1964年生まれ、筑波大学大学院農学研究科修了、博士(農学)、筑波大学生物科学系助手、現在、東北大学大学院農学研究科准教授

(3) 1): 高宮正之 1954年生まれ、千葉大学大学院理学研究科生物学専攻修士課程修了、広島大学大学院理学研究科植物学専攻博士課程単位取得退学、理学博士、現在、熊本大学大学院自然科学研究科教授

2): 藤井紀行 1968年生まれ、金沢大学大学院理学研究科修了、博士(理学)、首都大学東京大学院理工学研究科助手、現在、熊本大学大学院自然科学研究科准教授

(4): 佐竹暁子 1974年生まれ、九州大学大学院理学研究院修了、博士(理学)、スイス連邦水圏科学技術研究所グループリーダー、北海道大学創成科学共同研究機構特任助教、現在、北海道大学大学院地球環境科学研究院准教授

D-0903 絶滅危惧植物の全個体ジェノタイピングに基づく生物多様性保全に関する研究

(1) 定常的な人為インパクト下にある絶滅危惧植物保全に関する研究

京都大学大学院農学研究科

井鷲 裕司

<研究協力者>

京都大学大学院農学研究科

兼子 伸吾

京都大学大学院農学研究科

横川 昌史

京都大学大学院農学研究科

畑中 祐希

京都大学大学院農学研究科

内海 知子

京都大学大学院農学研究科

加藤 慶子

京都大学大学院農学研究科

水谷 未耶

神戸大学発達科学部

丑丸 敦史

神戸大学発達科学部

深田 ちひろ

滋賀県立大学環境科学部

浜端 悦治

奈良教育大学教育学部

松井 淳

奈良教育大学教育学部

西川 恵子

東北大学大学院農学研究科

陶山 佳久

東京大学農学生命科学研究科

西廣 淳

北九州市立自然史博物館

真鍋 徹

大阪市立自然史博物館

志賀 隆

株式会社中電技術コンサルタント

大竹 邦暁

株式会社中電技術コンサルタント

増本 育子

平成21～23年度累計予算額:46,135千円

(うち、平成23年度予算額:16,239千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 定常的な人為インパクトの元で成立してきた里地里山は、多くの希少植物の生育地になっている。

この地域において適切な管理を行うことは、希少植物を直接的に保全するという意味に加えて、自然と人間の持続可能な共存を探るという点からも重要な意義がある。本年度は里地里山に生育する絶滅危惧植物7種を対象に、全残存個体の生育位置、繁殖状況を明らかにすると共に、解析対象種のマイクロサテライトマーカーを新たに開発し、全個体の遺伝子型を決定することによって、絶滅危惧植物を遺伝的観点から適切に評価・保全することを目的とした。その結果、以下の特記すべき情報を得た。

里山に生育する絶滅危惧植物においては、見た目の個体数は100個体以上であっても、遺伝的には1～数クローンで集団が構成されており、遺伝的な個体数は著しく少ない種が多かった。また、

集団内の遺伝的多様性は、見た目の個体数とは必ずしも一致せず、効果的に保全対策を実施するためには、それぞれの絶滅危惧種の遺伝的な状況にも配慮する必要があることが示唆された。さらに、遺伝解析の結果から、人為的な移植に由来すると考えられる植物種も認められた。

これらの一連の成果は、各絶滅危惧植物の遺伝的現状を詳細に明らかにしただけでなく、市場に流通している個体の採取場所の特定や域外保全を行う個体に遺伝子型タグを付ける等、生物多様性の保全政策に直接的に貢献できるものである。実際に、スズカケソウについては、ユニークな対立遺伝子を保持している現存するすべてのクローンについて遺伝子型のタグを付け上で植物園に生育域外保全を委託した。また、シモツケコウホネにおいては、現存するすべてのクローンの生育場所と遺伝子型を明らかにし、個体レベルのトレースが可能となったことをシンポジウム等で広く周知したことによって、盗掘由来と思われる個体の流通が行われなくなっており、極めて絶滅リスクの高いこれらの絶滅危惧植物の保全に大きな貢献をした。

[キーワード] 里地里山、遺伝的多様性、人為インパクト、マイクロサテライトマーカー、遺伝子型

1. はじめに

里地・里山は長期間にわたる継続的な人為インパクトによって成立した生態系であるが、高い生物多様性が持続可能な形で維持されている興味深い生態系である。しかしながら、近年、産業構造の変化とともに、その管理方法が変化し、里地・里山に生育する多くの植物が絶滅危惧種となっている。

里地・里山を構成する、都市近郊二次林、農地、ため池、草地などは国土の大部分を占めるものであり、この地域において適切な管理を行い、絶滅危惧種の個体群を維持することは日本の生物多様性保全にとって直接的な意味を持つと共に、人間と自然が持続可能な形で共存し、高い生物多様性を持続的に維持する方法を探るという観点からも重要である。特に、日本列島は世界に34ヶ所存在する生物多様性ホットスポットの一つとして認識されており、そのような場所で国土の大半を占める二次的自然環境の生物多様性を保全することは今日的な意義が大きい。これまで市民団体等によって保全活動がなされている絶滅危惧種も、この地域に生育しているものが多く、それらの活動の妥当性についても遺伝情報に基づいて評価することで、より適切な保全策につながることを期待される。

2. 研究開発目的

定常的な人為インパクト下で成立している生態系である、里地・里山に生育する絶滅危惧植物11種(スズカケソウ、トキワマンサク、ヤチシャジン、センリゴマ、シモツケコウホネ、ヒメコウホネ、ガシャモク、ハリマサムシグサ、タデスマレ、ウスユキクちなシグサ、キバナスゲユリ)を対象に、マイクロサテライト遺伝マーカーの開発と生育地における個体の位置情報、繁殖状況調査、DNA解析のためのサンプリングを行った。また、各対象種の状況に合わせた遺伝解析を行い、緊急の保全対策が求められる絶滅危惧種の適切な保全のための遺伝情報を得ることを目的とした。

3. 研究開発方法

(1) スズカケソウ

スズカケソウ *Veronicastrum villosulum* (オオバコ科) は、7月から8月にかけて濃紫色の穂状花序をつける多年生草本である(図(1)–1)。中国南東部および日本に分布するが、日本国内における野生集

団は徳島県美馬郡つるぎ町内の1ヶ所に確認されているのみであり、環境省レッドリストにおいて絶滅危惧種ⅠA類に指定されている。また、保全を目的としてつるぎ町内の小学校で同町内の野生集団に由来する個体が栽培されているほか、日本各地の植物園や公園においても栽培個体が維持されている。スズカケソウは野生にわずか1個体群が残存しているだけなので、今後の適切な保全策を構築するためには、これら生育地外保全されている個体群の遺伝特性を解析する事も重要である。

徳島県美馬郡つるぎ町内の自生地に生育する全個体(139個体)を対象に、個体の生育位置を記録すると共にDNA解析用の葉を採取した。また、栽培個体群として、つるぎ町内の小学校に生育している全個体(98個体)、京都府立植物園で1個体、潮見の森植物園で6個体、武蔵野森林公園で11個体についてDNA解析用の葉を採取した。

スズカケソウの遺伝的多様性を評価するために、Lian *et al.*のプロトコルに基づき^{1), 2)}、マイクロサテライトマーカーの開発を行った。開発したマイクロサテライトマーカー9座を用いて、採取したスズカケソウ254個体について遺伝子型を決定し、各集団の遺伝的多様性、繁殖状況を評価した。



図(1)－1. スズカケソウ(左)と地元小学校における栽培集団(右)

(2)トキワマンサク

トキワマンサク *Loropetalum chinense* (マンサク科) は常緑亜高木で、中国南部、台湾、インド北東部にかけて分布し、日本にも少数が自生するとされている(図(1)－2)。日本国内の自生地は、静岡県湖西市、三重県伊勢神宮林、熊本県荒尾市の3ヶ所に限られており、環境省のレッドリストでは絶滅危惧IB類に指定されている。

トキワマンサクは絶滅危惧種ではあるものの、庭園木として由来不明の個体が広く流通している。これら植栽個体と野生個体群との交雑による遺伝子汚染も懸念される。例えば、国内3生育地の一つである静岡県湖西市では生育地の保全と整備がなされているが(図(1)－2)、周辺には園芸業者から購入したトキワマンサクが植栽されている。このような保全行為の妥当性を評価するためにも、本プロジェクトの解析は有効な情報をもたらすことが期待される。

サンプルは、日本国内に生育する全個体(静岡県湖西市74個体、三重県伊勢市11個体、熊本県荒尾市19個体)からDNA解析用の葉を採取したほか、園芸的に流通している個体からも25サンプルの葉を採取した。また、日本と中国に生育する個体の遺伝的な差異を解析するために、中国安徽省黄山より13個体、広東省五指山より18個体、湖南省鳳凰山より10個体のサンプルを入手し解析に加えた。

トキワマンサクの遺伝的多様性を評価するためにLian *et al.*のプロトコルに基づき^{1), 2)}、マイクロサテライトマーカーの開発を行った。開発したマイクロサテライトマーカー6遺伝子座を用いて、採取したトキワマンサク165個体について遺伝子型を決定し、遺伝的多様性を評価した。



図(1)－2. トキワマンサク(左)と静岡県の自生地(右)

(3) ヤチシャジン

ヤチシャジン *Adenophora palustris* (キキョウ科) は、湿原に生育する多年生草本で、絶滅危惧IA類に指定されている(図(1)－3)。日本の本州西部及び中国北東部・朝鮮半島に分布するが、国内では過去20年間に自生地の半数が失われ、現在、生育地は、広島県に4箇所、岐阜県に1ヶ所が知られるのみである。個体数は総計で約1,000と推定されている。各集団の個体数については、栽培個体の再導入が行われている最大の集団には約800個体が生育しているが、他の集団は100個体未満が残存的に生育するのみであり、いずれも個体群消滅の危機にさらされている。サンプリングは、ヤチシャジンの全ての生育地で行い、全個体からDNA解析用の葉を採取した。採集したサンプル数は1,027である。

マイクロサテライトマーカーはLian *et al.*のプロトコルに基づき開発した^{1), 2)}。開発したマイクロサテライトマーカー7座を用いて、遺伝子型を決定し、各集団の遺伝的多様性やクローン構造を明らかにすると共に、STRUCTURE解析^{3), 4), 5)}により遺伝構造を評価した。



図(1)－3. ヤチシャジン(左)、広島県の生育地(中)および保存種子からの復元した岡山県の集団(右)

(4) センリゴマ

センリゴマ *Rehmannia japonica* (オオバコ科) は、中国から持ち込まれ⁶⁾、江戸時代には園芸品種として広く栽培されていたと考えられている多年生草本である⁷⁾(図(1)－4)。センリゴマは人為的に導入されたものではあるが、現在、日本では静岡県内の2ヶ所に生育するのみであり、また、原産地とされる中国においても、現在、生育地は報告されていない⁸⁾ために、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類に指定されている。このような状況のため、静岡県に残存するセンリゴマの起源や分類学上の位置付けも不明瞭である。



図(1)－4. センリゴマ(左)と静岡県の生育地(右)

また、静岡県に生育する集団では、毎年多くの個体が開花するが、結実を観察されていない⁸⁾。このことは、外見的には数百個体が存在するものの、遺伝的な問題から、有性生殖が有効に行われていないのかもしれない。この点に関しても本プロジェクトのアプローチによって解明が期待される。

センリゴマの生育が確認されている静岡県内浜松市天竜区内の2集団に生育する58個体から、DNA解析用の葉サンプルを採取した。開発したマイクロサテライトマーカーの有効性を近縁種で確認するために中国浙江省天目山に生育する *R. chingii* 15個体についても解析を行った。センリゴマの遺伝的多様性を評価するために Lian *et al.* のプロトコルに基づき^{1), 2)}、マイクロサテライトマーカーの開発を行った。開発したマイクロサテライトマーカー12遺伝子座を用いて、採取したセンリゴマについて遺伝子型を決定した。

センリゴマの系統上の位置づけと保全上の価値を明らかにするために系統解析もあわせて行った。葉緑体DNAの2領域 (*trnL-F*, *rps16*) における塩基配列を、静岡県に生育するセンリゴマと、センリゴマ以外のジオウ属植物6種全て⁹⁾ (*Rehmannia glutinosa*, *R. solanifolia*, *R. chingii*, *R. elata*, *R. piasezkii*, *R. henryi*) について比較・解析を行った。

静岡県立大学、岐阜大学、武田薬品植物園でセンリゴマとして栽培されている *Rehmannia* 属植物についても、葉緑体 *trnL-F* 領域の塩基配列の解析およびマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝子型の決定を行った。

(5) シモツケコウホネ

シモツケコウホネ *Nuphar submersa* (スイレン科) は2006年に新種として発表された栃木県固有の絶滅危惧水生植物であり¹⁰⁾、栃木県内の3集団が群落面積にして合計60㎡が残っているに過ぎない(図(1)－5)。環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類に指定されている。



図(1)－5. シモツケコウホネ(左)と栃木県の生育地

栃木県内の3集団に生育する計267個体を対象に、個体の生育位置を記録するとともにDNA解析用の葉を採取した。また、インターネット上でシモツケコウホネを販売している2社から個体を購入し、DNA解析用の葉を採取した。

Lian *et al.*のプロトコル^{11), 2)}で開発したマイクロサテライトマーカー¹¹⁾と近縁種の *Nuphar lutea* で開発されたマイクロサテライトマーカー¹²⁾計20座を用いて、採取および購入したシモツケコウホネ269個体について遺伝子型を決定し、各集団の遺伝的多様性を評価した。

(6) ヒメコウホネ

ヒメコウホネ *Nuphar subintegerrima* (スイレン科) は湖沼やため池、水路などに生育する多年生の水生植物で(図(1)－6)、これまで東海地方から西日本にかけて広く分布する分類群とされてきた。しかし、Makino (1910)¹²⁾ によって記載された狭義のヒメコウホネの分布は東海地方に限定されており、個体数は少ないことが近年明らかになっている¹³⁾。

東海地方の15集団に生育する計474個体を対象に、個体の生育位置を記録すると共にDNA解析用の葉を採取した。遺伝的多様性の評価には、本プロジェクトにおいてシモツケコウホネで開発したマイクロサテライトマーカー¹¹⁾と、近縁種の *Nuphar lutea* で開発されたマイクロサテライトマーカー¹²⁾ 計12座を用いた。



図(1)－6. ヒメコウホネ(左)と三重県の生育状況(中、右)

(7) ガシャモク

ガシャモク *Potamogeton dentatus* (ヒルムシロ科) は沈水性の多年生植物で(図(1)－7)、絶滅危惧IA類に指定されている。水質汚濁などにより、個体数が減少し、現在、安定的に存続している集団は北九州市に存在するのみである。



図(1)－7. ガシャモク(左)、福岡県の生育地(中)および千葉県手賀沼で過去に採取された標本(右)

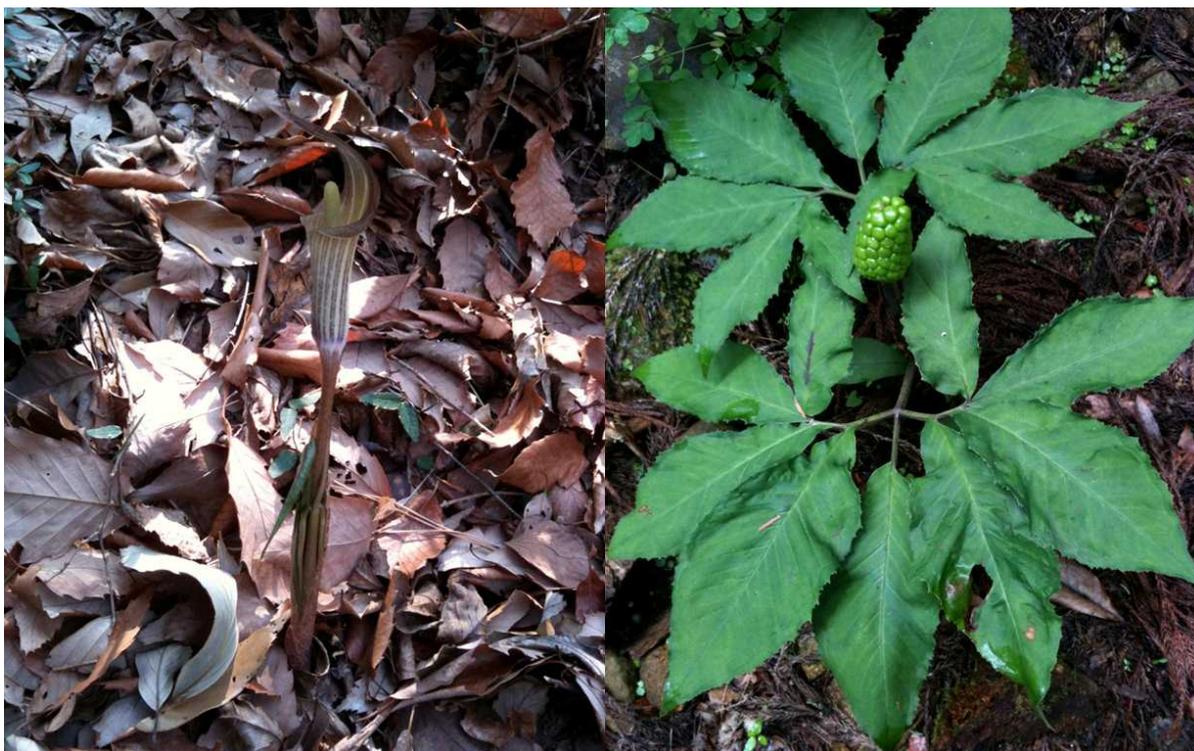
北九州市に生育する15個体、ガシャモク生育池の埋土種子からの再生個体1個体、北九州市標本3個体、手賀沼周辺で採取された栽培個体9個体、手賀沼周辺で採取された標本6個体から葉を採取した。また、過去に手賀沼周辺で採取され、草津市立水生植物公園みずの森で栽培されている個体から葉を採取したほか、ガシャモクを販売している2社から個体を購入し、DNA解析用の葉を採取した。更に、

モンゴルで採取されたガシャモクの近縁種である*Potamogeton lucens* についても同様に解析対象とした。マイクロサテライトマーカーはLian *et al.*のプロトコル^{1), 2)} によって11座開発し、遺伝解析を行った。

また、印旛沼において過去に埋土種子から再生した集団においても、*Potamogeton*属植物36サンプルを採取しマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝解析を行った。

(8)ハリマムシグサ

ハリマムシグサ*Arisaema minus* (サトイモ科) は、兵庫県内にのみ生育する多年草で(図(1)–8)、兵庫県西部の神戸市内および兵庫県西部の佐用町に、計800個体程度が確認されている。ハリマムシグサは、個体サイズの増加に伴い雄から雌に性転換する雌雄異株植物であり、環境省レッドリストでは絶滅危惧Ⅲ類に指定されている。確認されている全ての集団において、生育位置および繁殖個体数のカウント、性別の判定、地際直径の測定を行い、開花が確認された全個体からDNA解析用に葉のサンプルを採取した。Lian *et al.*のプロトコル^{1), 2)}で開発したマイクロサテライトマーカー8座¹⁴⁾を用いて、遺伝子型を決定し、各集団の遺伝的多様性を評価した。これらのデータに基づき、一般化線形モデルを用いて、雌雄等の繁殖に関するパラメータや遺伝的多様性や近親交配に関するパラメータと周囲の景観要素の相関について解析した。



図(1)–8. ハリマムシグサの開花個体(左)と結実個体(右)

(9)タデスマレ

タデスマレ*Viola thibaudieri* (スマレ科)は長野県にのみ生育する多年生草本で(図(1)–9)、環境省レッドリストでは絶滅危惧IB類にリストされている。

サンプルは現存する全7集団から採取した。個体群動態の追跡が行われている集団については開花個

体111個体、4年生以上の未開花個体152個体、1~3年生の実生個体55個体を含む全個体からサンプルを採取し、他の6集団からはそれぞれ17~31サンプル、計146サンプルを採取した。Lian *et al.*のプロトコル²⁾、³⁾で開発したマイクロサテライトマーカー14座を用いて、遺伝子型を決定し、成長段階ごとの遺伝的多様性、各集団の遺伝的多様性、集団間の遺伝的分化について評価した。



図(1)－9. タデスミレの開放花(左)と長野県の生育地(右)

(10)ウスユキクチナシグサ

ウスユキクチナシグサ *Monochasma savatieri* (ハマウツボ科)は、日本国内においては熊本県天草市内に1集団のみが確認されており、環境省レッドリストにおいて絶滅危惧種□A類に指定されている(図(1)－10)。サンプルは集団内から110個体を採取した。また、一部の個体からは種子も採取し、研究室に持ち帰り発芽させた。Lian *et al.*のプロトコル²⁾、³⁾で開発したマイクロサテライトマーカー22座を用いて、葉サンプルならびに種子から発芽させた個体について、遺伝子型を決定した。



図(1)－10. ウスユキクチナシグサ(左)と熊本県の生育地(右)

(11)キバナスゲユリ

キバナスゲユリ *Lilium callosum* var. *flaviflorum* (ユリ科)は沖縄県内にのみ生育する多年生草本で、環境省レッドリストでは、絶滅危惧IB類にリストされている。環境省の生息域外保全モデル事業の対象種ともなっており、熱帯・亜熱帯都市緑化植物園(沖縄県)で栽培技術が確立されている(図(1)－11)。現存する全5集団について(那覇、南城、恩納、渡名喜、久米)現地調査を行いDNA解析サンプル用の葉を採取した。Lian *et al.*のプロトコル^{1), 2)}で開発したマイクロサテライトマーカー5座を用いて遺伝解析を行った。

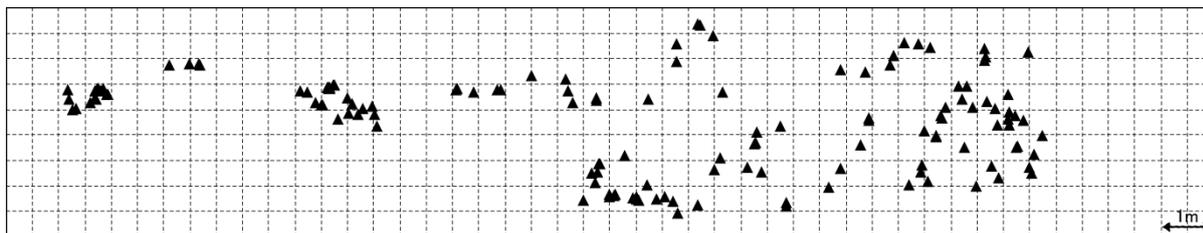


図(1)－11. 沖縄県のキバナスゲユリ生育地(左)と熱帯・亜熱帯都市緑化植物園の栽培個体(右)

4. 結果及び考察

(1)スズカケソウ

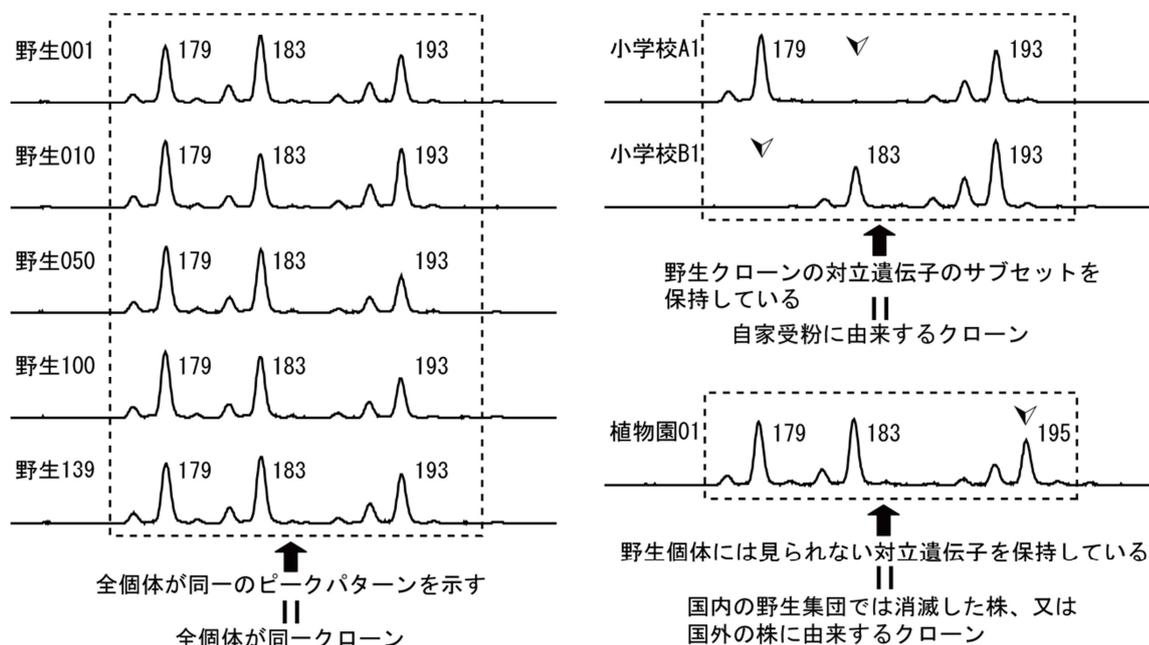
徳島県美馬郡つるぎ町に残存するスズカケソウの唯一の野生個体群について、個体レベルの詳細な調査を行ない、139個体の生育を確認した(図(1)－12)。



図(1)－12. スズカケソウ自生地における全個体(139個体)の分布. ▲は各個体の位置を示す.

マイクロサテライトマーカー9遺伝子座を用いた解析の結果、野生集団の139個体は約20mにわたって個体が散在しているにもかかわらず、全てが同一の遺伝子型を示し、単一のクローンによって集団が維持されていた(図(1)－12)。また、つるぎ町小学校の栽培個体は、半数以上が自生地の個体と同一の遺伝子型を示したがその一方、自生地と共通の対立遺伝子を持つものの遺伝子型が異なる個体もあった(図(1)－13)。これらの個体は、単一クローン間の自家受粉に由来するものであると考えられる。さらに、小学校におけ

る栽培個体には野生個体群では確認されなかった対立遺伝子を持つものもあった。野生集団がわずかに1クローンによって構成されているので、地元小学校で栽培されている集団は、本種の持続的保全のために、きわめて重要な意味を持っていることが明らかになった。

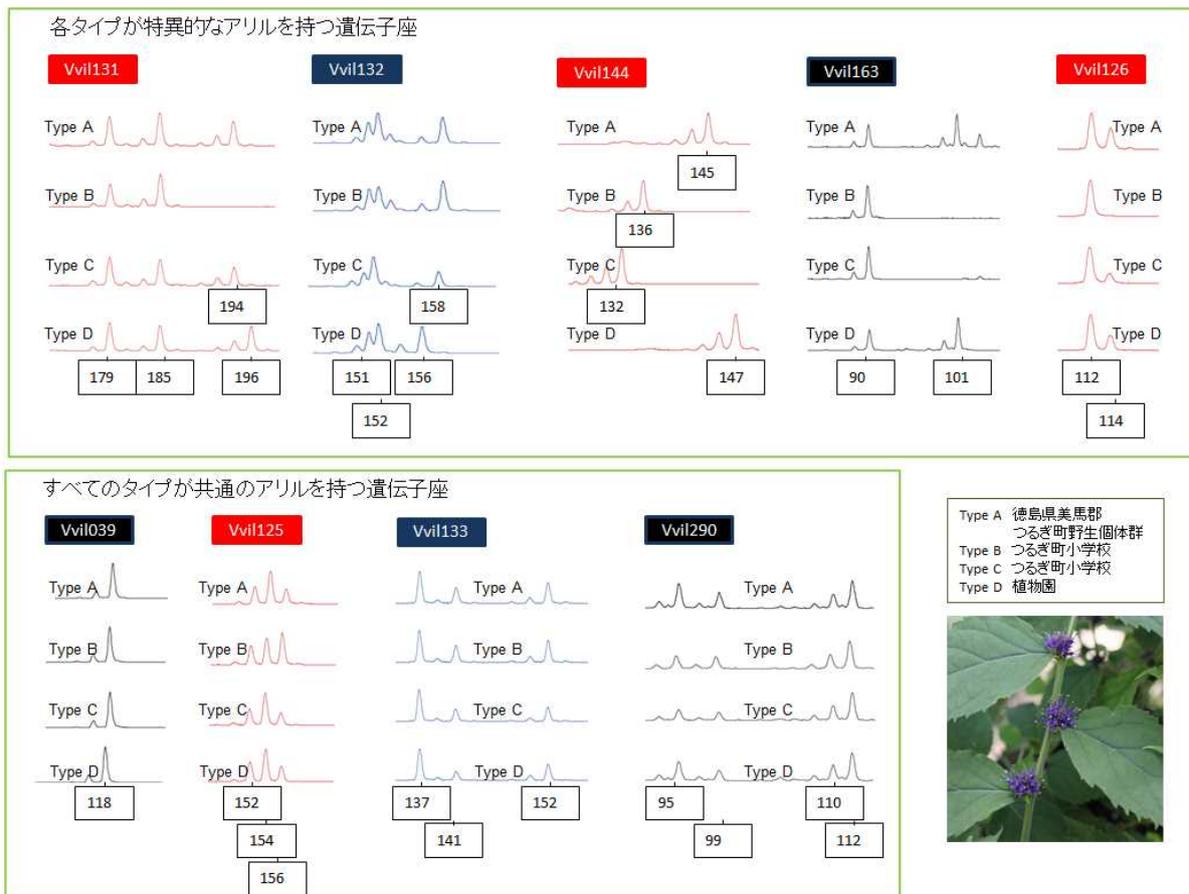


図(1)－13. スズカケソウのマイクロサテライト遺伝子座 *Vvill131* におけるピークパターン。ピーク横の数字は対立遺伝子の塩基サイズを示す。

日本各地の植物園で栽培されているスズカケソウは、全ての個体が同一の遺伝子型からなる単一クローンであったが、意外なことに、そのクローンは徳島県つるぎ町の野生集団を構成するクローンとは異なったものであった。日本の植物園で栽培されているスズカケソウのクローンは、既に野生で消滅した個体由来のもと考えられる。

絶滅危惧種の保全に際して、生育地の劣化という現状に対処するために、絶滅危惧種を他の場所で維持するという生育地外保全策がとられることがある。その場合、生育地外の個体群が保有する遺伝的多様性は、野生個体群に保持されている多様性の一部のみを代表することが多い。しかしながら、スズカケソウのケースでは、すでに野生集団は遺伝的には1個体であり、それとは遺伝的に異なった個体が生育地外保全されていることが判明した。この事実は本プロジェクトの全個体について遺伝子型を解読するというアプローチによって初めて明らかになったものであり、今後の保全活動にきわめて重要な意味をもつ情報である。

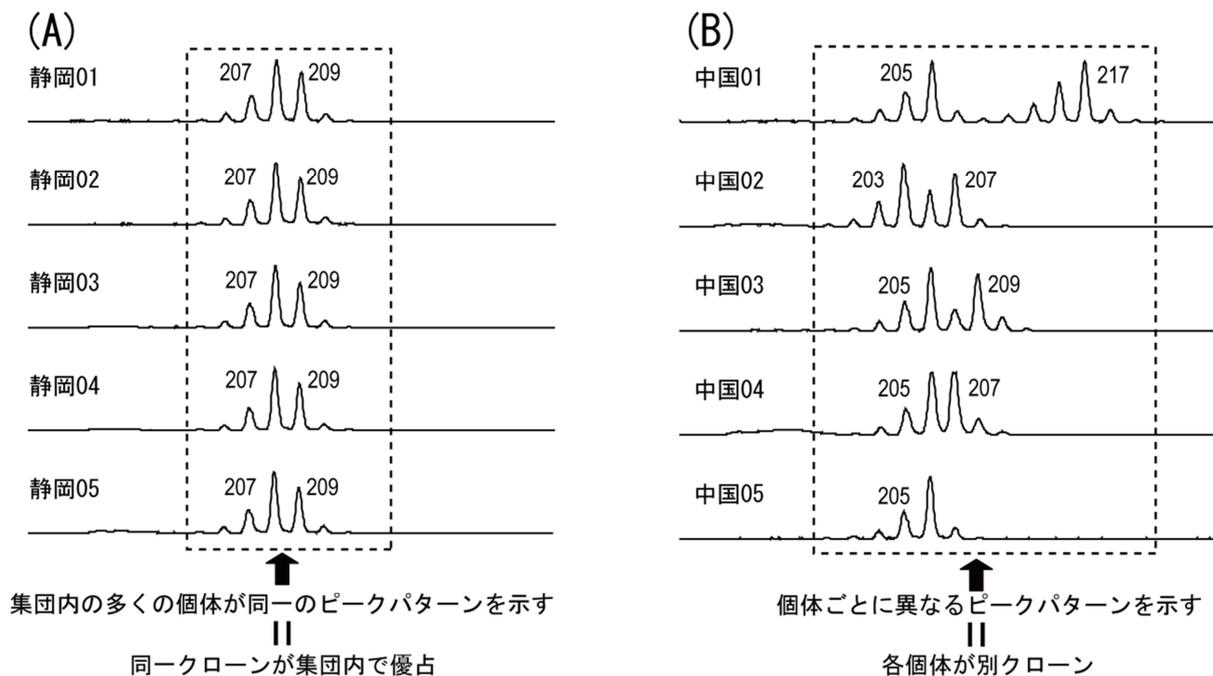
さらにこれらの希少な対立遺伝子を確実に維持するため、自生地には存在しない対立遺伝子を有する個体を栽培していた小学校から譲り受け、遺伝子型のタグを付けた上で(図(1)－14)、広島市植物園に生育域外保全を委託した。全個体ジェノタイプングの結果見いだされた、現存する対立遺伝子を全て保持できるように、保全対象クローンを選定し、遺伝子型タグを付加して生育域外保全を行うという取り組みは、世界でもこれまでほとんど行われていないものであり、本プロジェクトにおける大きな成果のひとつといえる。



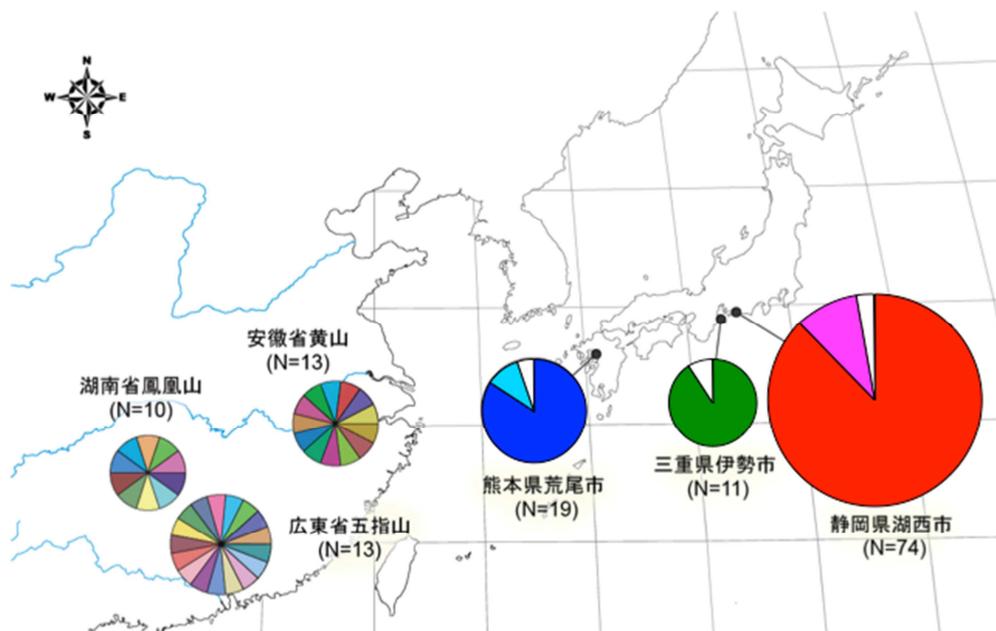
図(1)－14. 広島市植物公園に生育域外保全したスズカケソウの遺伝子型. 図中に示したType A, B, C, Dの4クローンを保全することで、現存するすべての遺伝的多様性を保全できる.

(2) トキワマンサク

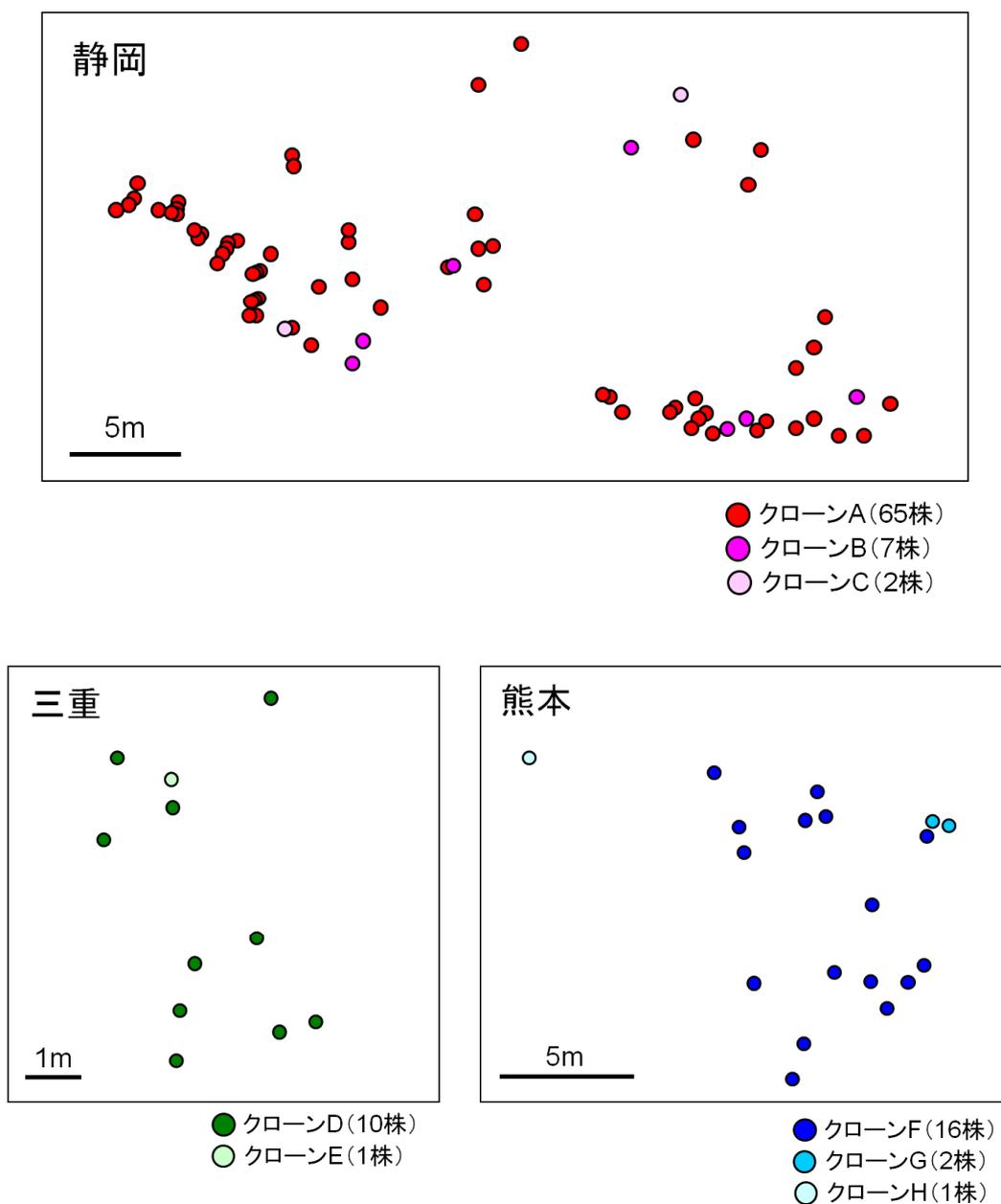
マイクロサテライトマーカー4遺伝子座を用いて、日本国内の3ヶ所の生育地に生育する全165個体について遺伝子型を決定した結果、生育地間で同一の遺伝子型を示す個体は無いものの、各集団内においては多数の個体が同一の遺伝子型を示した(図(1)－15 (A)、図(1)－16)。一方、中国で採取された36個体はすべて異なった遺伝子型であり、高い遺伝的多様性を示していた(図(1)－11 (B)、図(1)－12)。



図(1)–15. トキワマンサクのマイクロサテライト遺伝子座*Lchi068*におけるピークパターン. ピーク横の数字は対立遺伝子の塩基サイズを示す. (A) 静岡県の野生集団, (B) 中国湖南省の野生集団



図(1)–16. トキワマンサクの各集団に占める同一クローンの割合. 同じ色は同一のクローンが集団内に占める割合を示している. 中国の個体群はすべてのほとんどサンプルが異なったクローンであったが, 日本の個体群は特定のクローンが優占していた.



図(1)－17. 日本国内のトキワマンサクの各集団におけるクローンの分布. 同じ色の丸印は同一のクローンであることを示す. 3集団全てで集同一のクローンが数m以上離れて生育していた.

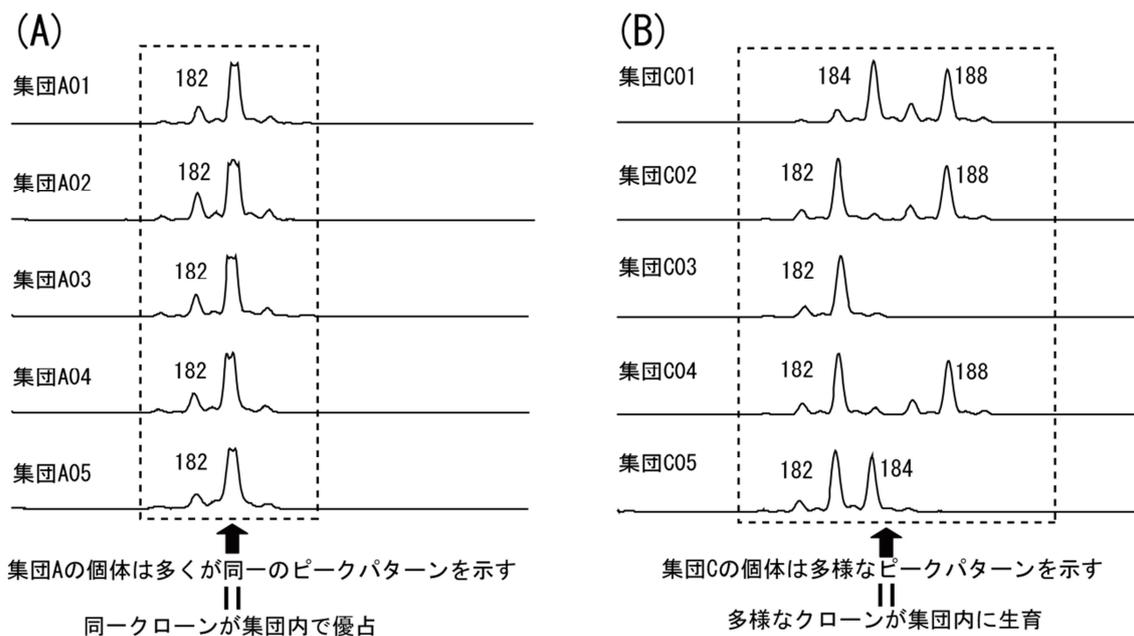
本プロジェクトで開発したマイクロサテライトマーカーはきわめて多型性に富むものであるので、日本国内の各自生地内で同一の遺伝子型を示した個体は同一のクローンであると考えられる。例えば、熊本県荒尾市の集団には19本の個体が生育しているがクローンが3あるに過ぎず、更にそのうちの1つクローンFが大部分を占めていた(図(1)－17、グラフ青色)。

これらの同一の遺伝子型を示した個体は互いに離れて生育しており(図(1)－17)、萌芽や伏上更新によって更新した個体ではない。従って、これらの個体は挿し木などの無性的方法によって人為的に増殖、植栽されたものと思われる。トキワマンサクは環境省のレッドリストにも掲載されている絶滅危惧種であるが、

その由来に関しては不明であり、かつて栽培されていたものが逸出した可能性も指摘されている⁷⁾。本研究の結果は、現在野生集団として保全されている3ヶ所のトキワマンサク個体群が、人為増殖や植栽に由来するものであることを強く示唆するものである。これらの個体群を構成している個体やクローンの由来については、更に、中国産のトキワマンサクも含めた系統解析が必要であるが、本プロジェクトの解析の結果は、日本国内に野生するとされるトキワマンサクの保全上の価値や取扱指針を見直す必要性を示している。日本の野生とされるトキワマンサク生育地には、熊本県の生育地のように中世に僧侶が中国に留学したとされる寺院の近くに成立しているものや、伊勢神宮内のものがある。従って、日本国内に3ヶ所存在する自生地は、ただ単に希少な絶滅危惧種としての扱いというよりも、文化財としての保全等を検討すべきなのかもしれない。

(3) ヤチシャジン

本プロジェクトではヤチシャジンの野生集団A~Dに生育する全個体から約1,000個のサンプルを得たが、遺伝的には229クローンが存在することが明らかになった。本プロジェクトで開発したマイクロサテライトマーカーはきわめて多型性に富み、個体識別や遺伝的多様性の評価に有効に使用できるものであったが、集団ごとに遺伝的多様性は著しく異なっていた(図(1)–18)。

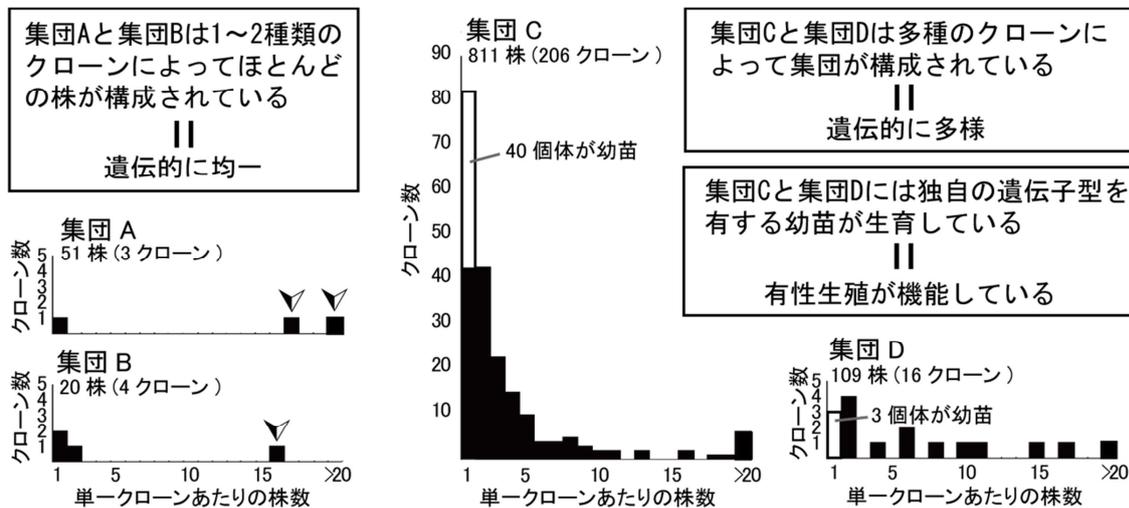


図(1)–18. ヤチシャジンのマイクロサテライト遺伝子座*Apal010*におけるピークパターン. ピーク横の数字は対立遺伝子の塩基サイズを示す. (A) 野生集団A, (B) 野生集団C

最大の野生集団Cにおいては、野生に現存するヤチシャジンのクローンの8割を占める206個のクローンが確認されたものの、他の野生集団では3~16クローンしか確認されず、集団ごとにクローン数がきわめて不均質であることがわかった。

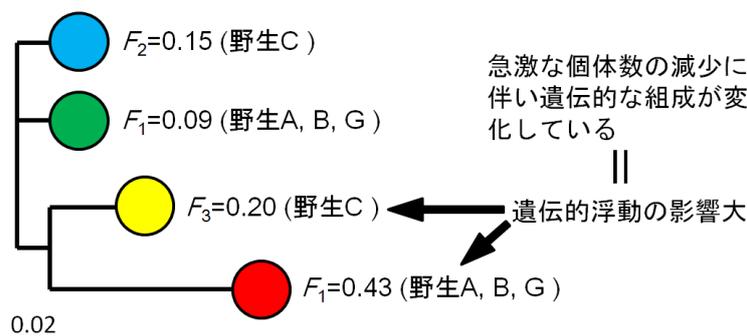
また、単一のクローンが占める株数の分布をみると、集団ごとに異なったパターンが見いだされた。たとえば、野生集団Cでは20株以上を占めるクローンが6個あったが、1株しか見いだせなかったクローンも80ほど有り、多様なクローンによって集団が構成されていた(図(1)–19)。これに対して、51株が生育していた野

生集団Aでは、その内の17株と33株がそれぞれ1つのクローンで占められており、集団のクローン構造がきわめて単純なものとなっていた。野生集団Aは、土地所有者によって熱心に保全活動が行われているが遺伝的には貧弱なものであることが判明した。



図(1)-19. ヤチシャジン各野生集団におけるクローンサイズ(単一クローンあたりの株数)

今回の解析の結果見いだされたヤチシャジンの全247クローンについてSTRUCTURE解析を行った結果、多数のクローン数により構成されている野生集団C,Dにおいて、集団が経験した遺伝的浮動の大きさを示すF値の高いクラスターが優占していた(図(1)-20)。このことから、野生集団C,Dはクローン数は多いものの、遺伝的浮動の影響を強く受けており、本来のものとは異なった遺伝的組成を有していることがわかった。また、保全活動の一環として、集団に個体の再導入が行われた生育地においては、再導入により遺伝構造が変化している可能性が示唆されたことから、人工繁殖を行う際には、各集団の遺伝的組成を反映するような個体を選抜する必要があり、個体の再導入を行う際には、既存の遺伝構造に配慮しなければならないことが明らかになった。



図(1)-20. STRUCTURE解析によるヤチシャジン野生集団における遺伝的浮動の評価

これらの成果について、広く一般に公表するために広島市植物園と共催でシンポジウムを実施した(平成23年10月23日、広島市植物園)。さらに、シンポジウムに先立って、これらの研究成果や各野生集団や栽培復元集団の保全に個人や団体間で、情報交換やより適切な保全方針について意見交換を行うための

研究会を実施した(図(1)－21)。



図(1)－21. ヤチシャジン保全に関する公開シンポジウム(左)と広島市植物公園で栽培されているヤチシャジンを見学する保全活動の関係者(右)

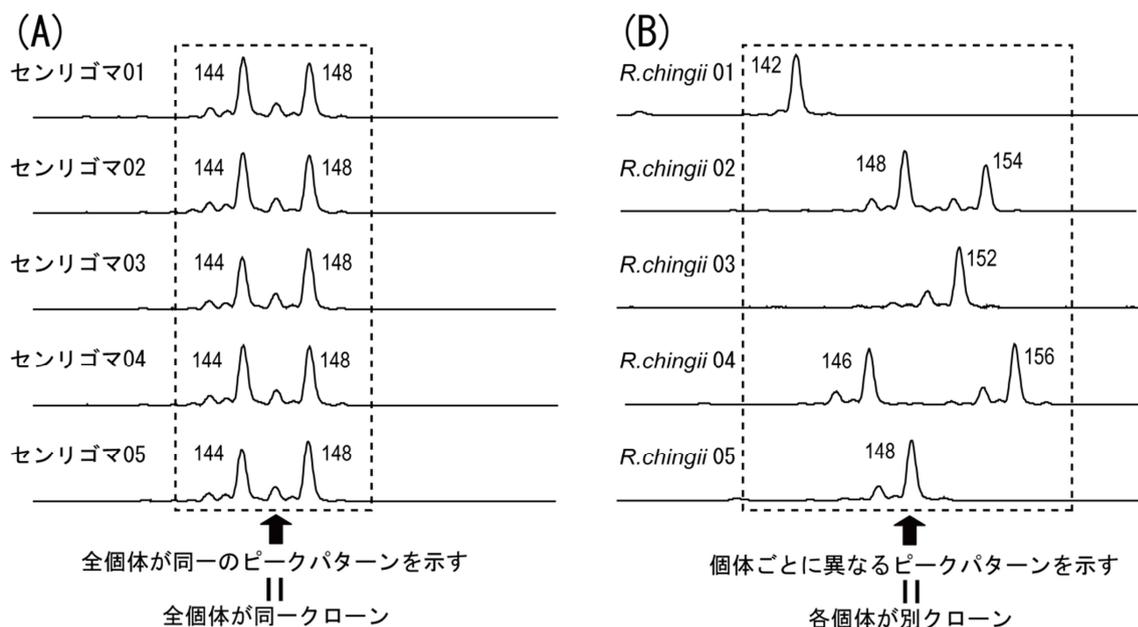
(4) センリゴマ

本プロジェクトで新たに開発したマイクロサテライトマーカー12遺伝子座を用いて、静岡県内の2集団から採取した58個体について遺伝子型を決定した結果、全ての個体が同一の遺伝子型を示した(図(1)－22(A))。

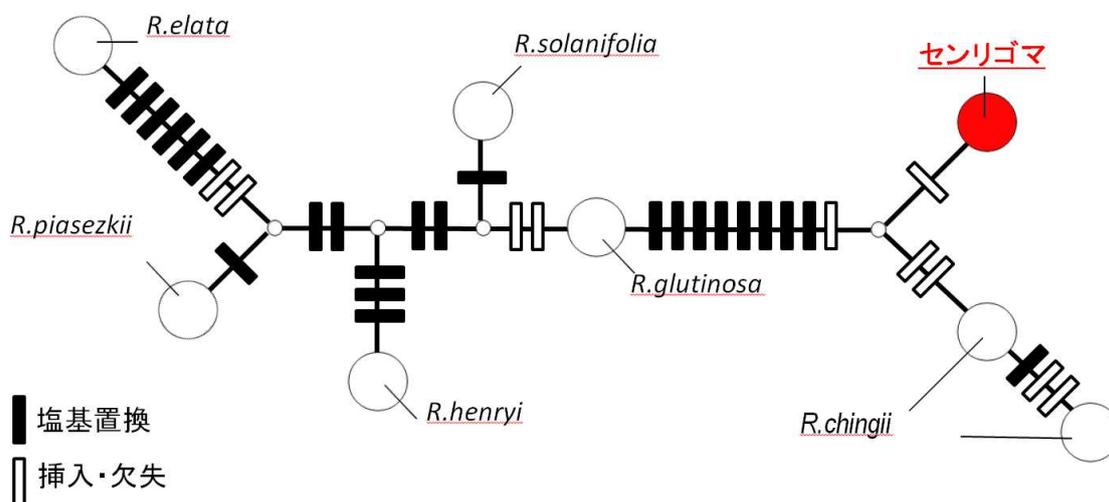
本来は高い多型性を示すマイクロサテライトマーカーにおいて多型性が低い時は、その原因として、(1)マイクロサテライトマーカーそのものに多型性が不足している場合と、(2)解析対象とするサンプルに遺伝的多様性が失われているという2つのケースが考えられる。この点を明らかにするために、センリゴマに対して最も近縁な種である*Rehmannia chingii*を対象にセンリゴマのマイクロサテライトマーカーで解析を行ったところ、高い多型性が見いだされた(図(1)－22(B))。このことは、今回解析に用いたマイクロサテライトマーカーが本来は十分な多型性を持つことを示すものである。

従って、静岡県に残存するセンリゴマ個体群から採集したサンプルにおいて全く多様性が検出できなかった事は、残存するセンリゴマ個体群が単一クローンから構成されている可能性が高いことを示している。静岡県の生育地では毎年多くの個体が開花するが、結実までに至る個体はない。すべての個体が単一クローンであると考えられること、近縁種のジオウ*R. glutinosa*においては自家不和合性が知られていること⁶⁾、から、自家不和合性や近交弱勢によって有性生殖が行えない状況になっていることが考えられる。

センリゴマは環境省のレッドリストにおいても絶滅危惧ⅡA類にランクされ、野生に生育するものとしてはもっとも危機的な状況にあると認識されている。しかしながら、その由来や他国における生育状況については不明な点が多い。センリゴマの保全的価値を再評価するために、静岡県内で採取したセンリゴマと他のジオウ属植物全6種(*Rehmannia glutinosa*、*R. solanifolia*、*R. chingii*、*R. elata*、*R. piasezkii*、*R. henryi*)について、葉緑体DNAの2領域(*trnL-F*、*rps16*)の塩基配列に基づいて系統解析を行った。その結果、センリゴマは*R. chingii*に最も近縁であることが明らかとなったが、センリゴマと*R. chingii*は両者の最近縁な系統においても、3箇所7塩基のインデルで区別された(図(1)－23)。これらの結果から、センリゴマは他のジオウ属植物6種とは系統的に明確に識別できる分類群であることが明らかになった。



図(1)ー22. マイクロサテライト遺伝子座 $Reja057$ におけるピークパターン. ピーク横の数字は対立遺伝子の塩基サイズを示す. (A) 静岡県に生育するセンリゴマ, (B) 中国省に生育するセンリゴマの近縁種 *R. chingii*



図(1)ー23. センリゴマと同属他種の葉緑体DNAの塩基配列に基づくハプロタイプネットワーク

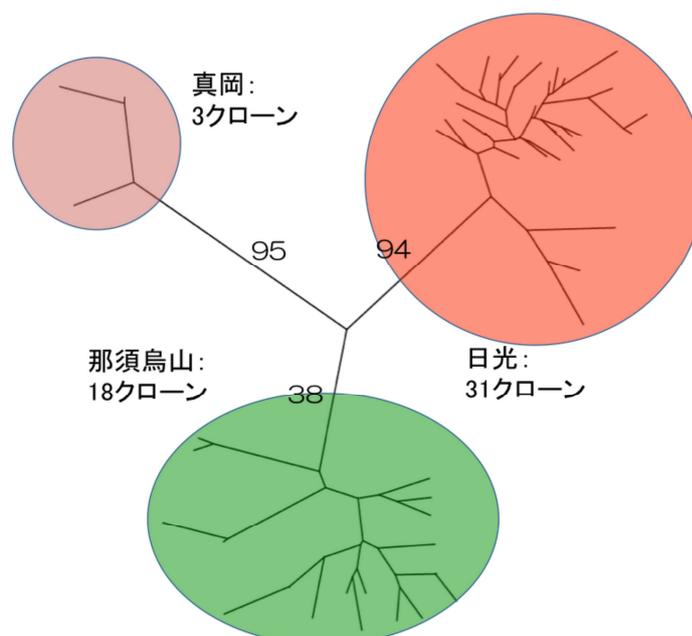
さらに 静岡県立大学、岐阜大学、武田薬品植物園でセンリゴマとして栽培されている *Rehmannia* 属植物を対象に、葉緑体 *trnL-F* 領域の塩基配列の解析およびマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝子型の決定を行った。葉緑体 *trnL-F* 領域の塩基配列の解析結果、武田薬品植物園の個体は野生のセンリゴマと同一の塩基配列を有していた。その一方で、静岡県立大学および岐阜大学の個体は、野生のセンリゴマとは異なる塩基配列を有しており、*R. henryi*, *R. solanifolia*, *R. glutinosa* 等に近い塩基配列を有していた。マ

マイクロサテライトマーカーによる解析の結果、武田薬品植物園の個体は、全ての遺伝子座において野生のセンリゴマと同一の対立遺伝子を有しており、同一のクローンであると考えられた。葉緑体DNAの塩基配列の結果から、センリゴマと別種と考えられる静岡県立大学および岐阜大学の個体は、センリゴマで開発されたマイクロサテライト遺伝子座、12座中8座において増幅が認められなかった。また、増幅が確認された遺伝子座においても、センリゴマとは異なる対立遺伝子を有していた。静岡県立大学および岐阜大学の個体は、trnL-F領域においては、互いに同一の塩基配列を有していたが、マイクロサテライト遺伝子座における対立遺伝子は異なっており、それぞれ異なるクローンであると考えられた。

以上の解析から、センリゴマは、現在のところ同一の分類群は中国には生育しておらず、確実な生育地が今回調査を行った静岡県の2ヶ所の生育地に局限されている希少植物であり、保全上の価値は高い。しかし、現在、生育地において保全活動は行われておらず、道路の拡幅工事等で生育地が縮小している。センリゴマの保全上の重要性を周知し、保全する必要があるが、静岡県の生育地の個体群はすべてが単一クローンで構成されている可能性が高いので、病虫害等による突発的な個体群消滅のリスクを避けるために生育地から一部の個体を採取し、生育地外における保全も検討する必要がある。

(5) シモツケコウホネ

マイクロサテライトマーカー15遺伝子座¹¹⁾を用いた解析の結果、集団を構成するクローンは日光市に31クローン、那須烏山市に18クローン、真岡市に3クローンが存在することが明らかになった。いずれも、見かけの個体数よりは著しく少ないクローンによって集団が構成されていることが判明した。これらのクローン間の遺伝的な関係を解析した結果、これらの集団は遺伝的に明確に分化していることが示された(図(1)－24)。各集団は地理的にも隔離しており、これまでも遺伝的交流がなかった可能性が高いことから、集団間の不用意な移植は避けるべきであると考えられた。



図(1)－24. 現存するシモツケコウホネ全クローン間の遺伝的關係

また、日光市では圃場整備に伴い移植された個体があるが、これらの個体はほとんど定着しておらず、圃

場整備前に生育していた上記31クローンのうち3クローンが失われていた。流通個体については、T社においてシモツケコウホネとして販売されていた個体は、日光市の生育地内の上流部に生育するクローンと同一の遺伝子型を示したことから、日光市生育地の上流部から採取された個体であるものと思われる。また、C社において、シモツケコウホネとして販売されていた個体は、シモツケコウホネとコウホネの雑種であるナガレコウホネであり、佐野市菊沢川に生育するクローンから採取されたことが判明した。

これらの成果について、広く一般に公表するために栃木県立博物館と共催でシンポジウムを実施した(平成22年9月23日、栃木県立博物館、図(1)－25)。同時に、これらの研究成果を保全活動に反映させるための意見交換を行うための研究会後に生育地において実施した。



図(1)－25. シモツケコウホネとその保全に関する公開シンポジウムの様子

さらにこれらの成果が、シンポジウム等において広く公表された後、C社、T社によるインターネット上でのシモツケコウホネの販売は行われておらず(2012年3月現在)、一定の盗掘抑制効果があったものと思われる。全個体の遺伝子型を把握することにより、シモツケコウホネは遺伝的には51個体しか存在しておらず、その遺伝的多様性を保全するためには、それぞれのクローンの維持が重要である。しかし、圃場整備により、それらのうち一割にあたる3クローンが失われていた。また、全ての個体の遺伝子型を明らかにすることにより、流通している株の採集地を推定することが可能になった。これらは全個体について遺伝子型を解読するという本プロジェクトのアプローチによって可能になったものであり、本種のように園芸的価値の高い絶滅危惧種において、実効的な保全策構築に活用できる成果といえる。

(6) ヒメコウホネ

岐阜県内、愛知県内、三重県内の計15ヶ所の自生地に生育する474個体について遺伝子型を決定した結果、計92クローンが検出された(表(1)－1)。

クローン数は、集団の大きさとは必ずしも一致しておらず、15集団の中で最も面積が広がった南伊勢市の集団では4クローンしか確認されなかったのに対し、それとほぼ同面積であった志摩市の集団では27クローンが検出された。ヒメコウホネにおいては、種内の遺伝的多様性の保全における重要性が集団ごとに著しく異なっており、包括的な保全を検討する際には、群落の規模に加えて遺伝的多様性についても配慮する必要があるだろう。また、現存するクローン数も92と少ないことから、各クローンを植物園等において生育域外保全することが望ましい。

表(1)－1. ヒメコウホネ集団におけるクローン数

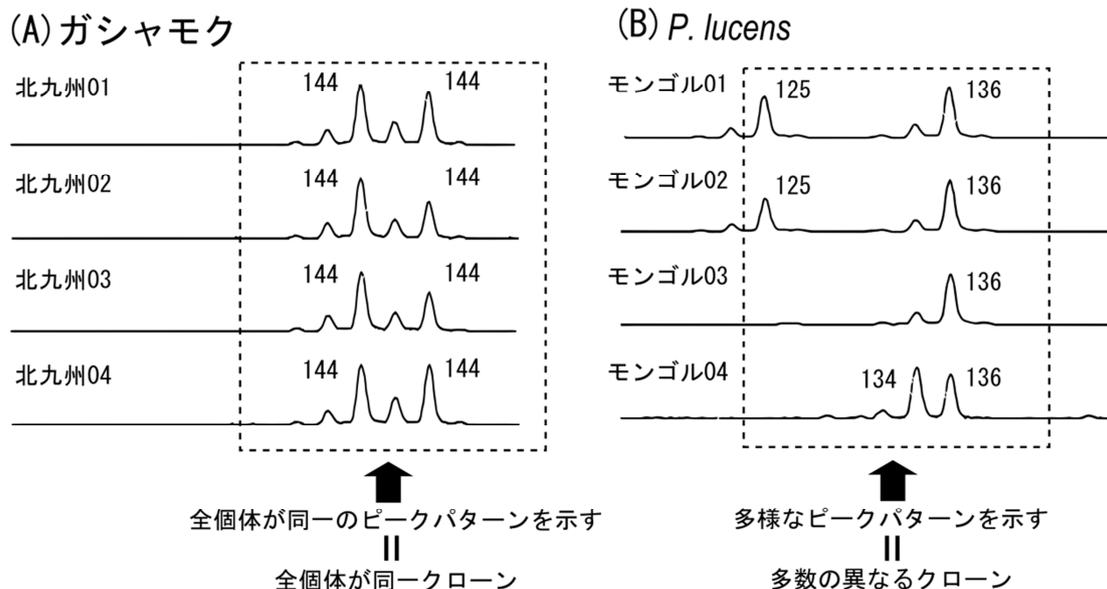
集団	生育環境	N	G	G/N
南伊勢市 2 (三重県)	流水・止水	65	4	0.06
志摩市 8 (三重県)	流水	62	6	0.10
志摩市 2 (三重県)	止水	60	27	0.45
志摩市 4 (三重県)	流水	60	10	0.17
犬山市 2 (愛知県)	止水	53	4	0.08
岐阜市 (岐阜県)	流水	46	8	0.17
志摩市 1 (三重県)	止水	37	11	0.30
志摩市 5 (三重県)	流水	28	4	0.14
志摩市 6 (三重県)	止水	12	9	0.75
みよし市 1 (愛知県)	止水	11	3	0.27
志摩市 7 (三重県)	止水	10	1	0.10
みよし市 2 (愛知県)	止水	9	3	0.33
南伊勢市 1 (三重県)	止水	9	1	0.11
犬山市 1 (愛知県)	止水	8	2	0.25
志摩市 3 (三重県)	止水	4	1	0.25
	合計	474	92	0.19

N:解析サンプル数(生育面積に比例)、G:クローン数

(7) ガシャモク

北九州市内の生育地全体にわたって採取した15サンプルは、全てが同一の遺伝子型を示した(図(1)－25A)。ガシャモクの近縁種である*Potamogeton lucens*を対象にガシャモクのマイクロサテライトマーカーで解析を行ったところ、高い多型性が見いだされたので(図(1)－25B)、北九州市内のガシャモク15サンプルが同一の遺伝子型を示したことは、集団が単一のクローンから構成されていることを示唆している。また、北九州の埋土種子に由来する個体は、現存するクローンとは異なる遺伝子型を示したものの、独自の対立遺伝子を持たず、ヘテロ接合度も低下していることから、現存する単一クロンの自殖に由来するものと考えられた。

手賀沼周辺で採取された個体からは、北九州の埋土種子、栽培個体等には存在しない対立遺伝子が検出されたことから、これらが本種の遺伝的多様性保全に活用しうるものであることが明らかになった(表(1)－2)。また、流通個体からは、手賀沼周辺で採取された個体に固有の対立遺伝子が検出されたことから、これらの流通個体は手賀沼周辺で採取された個体に由来する可能性がある。



図(1)－25. ガシャモクのマイクロサテライト遺伝子座*Pden040*におけるピークパターン. ピーク横の数字は対立遺伝子の塩基サイズを示す. (A) 北九州市に生育するガシャモク, (B)モンゴルダライヌール湖に生育するガシャモクの近縁種*P. lucens*.

表(1)－2. 各地から採取されたガシャモク個体の遺伝子型

個体の由来 (ジェネット ID)	遺伝子座									
	<i>Pden040</i>		<i>Pden041</i>		<i>Pden103</i>		<i>Pden210</i>		<i>Pden252</i>	
北九州野生 (A)	140	144	79	93	261	265	81	83	138	146
北九州埋土種子 (B)	144	144	79	93	261	265	81	81	138	146
北九州標本 (A?)	---	---	79	93	---	---	81	83	---	---
手賀沼 1 標本 (C)	139	140	93	101	---	---	81	83	---	---
手賀沼 1 標本 (D)	139	140	93	101	---	---	81	83	---	---
手賀沼 1 標本 (E)	139	139	101	101	---	---	81	83	---	---
手賀沼 1 標本 (F)	139	140	101	101	255	255	81	83	138	138
手賀沼 1 標本 (G)	140	140	93	101	---	---	81	83	145	145
手賀沼 2 標本 (H)	140	140	93	101	255	255	81	81	145	146
植物園 (I)	139	140	93	101	255	255	83	83	138	146
流通 1 (J)	139	140	93	93	255	267	81	83	138	146
流通 2 (K)	139	140	93	93	255	267	81	83	138	146

青字は北九州で採取された個体に固有の対立遺伝子、赤字は手賀沼で採取された個体に特異的な対立遺伝子を示す.

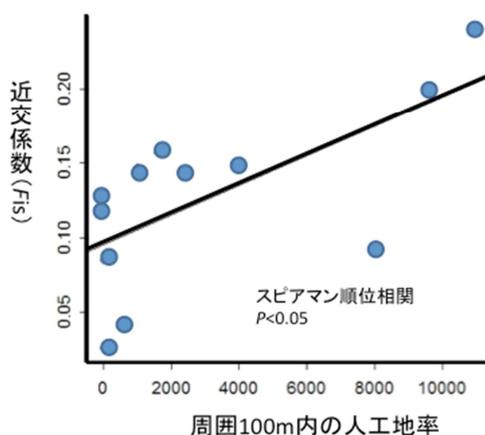
印旛沼において過去に埋土種子から再生した集団においても、生育地内で優占する*Potamogeton*属植物36サンプルを採取しマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝解析を行った結果、絶滅危惧種であるインバモ(ガシャモクとササバモの雑種)が1個検出されたものの、他の個体は全てササバモであった。

ガシャモクは、手賀沼や印旛沼周辺において埋土種子から集団が再生したことが報告されている。しかし、一部の栽培集団を除いて、ガシャモクが安定的に維持されている復元集団はなく、埋土種子から再生した後に適切に集団を維持させることが、本種の保全上重要であることが示唆されている。本種は、草津町立水生植物公園や手賀沼親水公園において栽培技術が確立されていることから、今後、埋土種子により集団が再生した場合には、すみやかに全個体ジェノタイプングを行い、遺伝的多様性の保全に重要な遺伝子型や対立遺伝子を有する個体は、生育域外においても維持することが望ましい。

(8)ハリマムシグサ

現存する成熟個体数は519個体であったが、性比はオスに著しく偏っており、有効集団サイズは257.4と成熟個体数のおよそ半分となった。開発したマイクロサテライトマーカー8遺伝子座を用いて519個体の遺伝子型を決定した結果、各遺伝子座において検出された平均対立遺伝子数は10.5であり、種内に比較的高い遺伝的多様性が保持されていた。

ハリマムシグサについて、一般化線形モデルを用いて、繁殖・近親交配に関するパラメータと周囲の景観要素の相関を解析した。その結果、繁殖個体密度は半径100mの森林率と正の相関が、半径100mの人工地率と負の相関があった。また、近交係数と半径100mの森林率には負の相関が、半径100mの人工地率とは正の相関(図(1)–27)があった。これらの結果は、土地改変によって小集団化した集団では繁殖個体数が減少し、近親交配の頻度が増加する事を示している。また、近交係数と集団内の雌比・個体サイズそれぞれには負の相関が見られた。このことから、近親交配が進んだ集団では近交弱勢の影響によって十分に成長できない個体が多く、その結果、雌個体が少ない可能性が示唆された。集団内の雌比の低下は、集団の種子繁殖を減少させるため、集団の存続性に影響を与えうると考えられる。



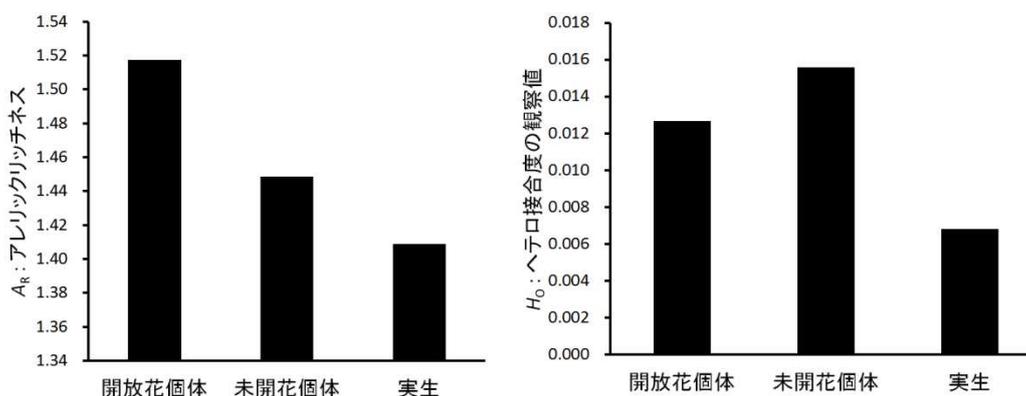
図(1)–26. ハリマムシグサの生育地周囲100m内の人工地率と近交係数の関係

(9)タデスマレ

サンプルを採取したタデスマレ計463個体の遺伝子多様性は極めて低いことが明らかになった。各集団の遺伝的多様性の指標である対立遺伝子多様度(アレリックリッチネス)は、1.45~1.62であった。タデスマレに近縁の普通種タチツボスマレの対立遺伝子多様性は、3.67~5.42であったことから、本種の遺伝的多様性は近縁種と比較し著しく低いと考えられる。また、タデスマレの各集団には集団毎に異なるレアアレルを持つ

個体が少数ずつ含まれていたこと、集団間に有意な遺伝的分化が認められたことから、タデスミレの遺伝的多様性を保全するためには全ての個体群を対象とした保全を行い、集団に固有な対立遺伝子を維持していくことが必要である。

個体群動態の追跡が行われている集団について、個体サイズ毎に遺伝的多様性(アレリックリッチネスとヘテロ接合)を比較した結果、個体サイズが小さくなるほど、アレリックリッチネスが減少している傾向が認められた(図(1)ー26)。このことは、現存する遺伝的多様性が失われつつあることを示している可能性がある。タデスミレは、本プロジェクトにおいて対象としている種のなかでは、比較的多くの個体数を維持している絶滅危惧種であるものの、遺伝的多様性の維持という点においては、脆弱な状況にあると考えられる。



図(1)ー27. タデスミレの個体サイズと遺伝的多様性(アレリックリッチネスとヘテロ接合度)

(10) ウスユキクチナシグサ

現地調査の結果、日本に生育するウスユキクチナシグサは、全株数は211、全茎数が1,190、うち開花茎数が925であった。開発した25遺伝子座のマイクロサテライト遺伝マーカーを用いて64株を遺伝解析したところ、すべての個体は全遺伝子座において同一の遺伝子型を示し、日本に現存するウスユキクチナシグサの遺伝的多様性は極めて低い事がわかった。

ウスユキクチナシグサは中国から持ち込まれて野生化した可能性が指摘されているが、最初の導入個体が少数で、遺伝的浮動により対立遺伝子が固定した可能性が考えられる。花あたりの種子数は平均56.8個であった。13株から採取した合計234個の種子を実験室で播種すると、105個(45%)が発芽した(図(1)ー28)。個体が数メートル以上離れて生育していることと、種子が発芽能力を有していることから、ウスユキクチナシグサにおける遺伝的多様性は極めて低いものの、地下茎等を介した栄養繁殖ではなく、種子を介した繁殖が行われている可能性が高い。

発芽した84の実生を対象に、親個体においてヘテロ接合を示した2遺伝子座で遺伝解析を行ったところ、すべて親個体と同じ遺伝子型であった。ウスユキクチナシグサの倍数性は不明だが、この結果は、ウスユキクチナシグサが二倍体で無配生殖をしている、あるいはウスユキクチナシグサが異質倍数性で2つの異なる遺伝子座において対立遺伝子が固定している事によって生じたと考えられる。現在の生育面積は約7,200m²と狭く、かつ遺伝的多様性が極めて低いため、ウスユキクチナシグサは環境変化に対して脆弱であると考えられる。現在の生育地において保全するとともに、一部の個体を植物園等の生育域外において保全することが望ましい。



図(1)－28. 採取したウスユキクチナシグサの種子と発芽した実生

(11)キバナスゲユリ

採集したキバナスゲユリ試料を対象に、マイクロサテライトマーカー5座のPCR増幅を行ったが、そのうち、良好な増幅が得られたのは80個体（那覇37個体、南城9個体、恩納4個体、渡名喜27個体、久米3個体）であった（表(1)－3）。マイクロサテライト遺伝子座5座の解析により、計18種類の対立遺伝子が検出され、3種類の対立遺伝子は、集団に固有の対立遺伝子であった。これらの3種の対立遺伝子は、南城、恩納、渡名喜の3集団からそれぞれ検出された(表(1)－3)。各集団の遺伝的多様性は、サンプル数の多い那覇および渡名喜で高く、サンプル数の少ない、南城、恩納、久米では低かった。これらの結果は、種内の遺伝的多様性を維持する上では、比較的個体数が多い那覇集団と渡名喜集団における個体数と遺伝的多様性の維持が重要であるだけでなく、個体数は少なくとも固有の遺伝子を有する南城集団や恩納集団の保全も重要であることを示している。

表(1)－3. マイクロサテライトマーカー5 遺伝子座の遺伝子型に基づくキバナスゲユリ 5 集団の遺伝的多様性

集団	N	A	R_S	H_O	H_E	F_{IS}	Pr (Locus)
那覇	37	3	2.1	0.55	0.54	0	
南城	9	2.4	1.7	0.29	0.33	0.19	73bp (<i>Lcaf357</i>)
恩納	4	1.6	1.5	0.2	0.24	0.43	150bp (<i>Lcaf441</i>)
渡名喜	27	3.2	2	0.41	0.51	0.22	* 115bp (<i>Lcaf450</i>)
久米	3	2	1.6	0.67	0.44	0.2	

N : 解析個体数, A : 平均対立遺伝子数, R_S : アレリックリッチネス, H_O : ヘテロ接合度の観察値, H_E : ヘテロ接合度の期待値, F_{IS} : 近交係数, Pr 各集団に固有の対立遺伝子.

また、5遺伝子座の遺伝子型に基づく近交係数 (F_{IS}) は、渡名喜集団で有意 ($P < 0.05$) に正の値となり（表(1)－3）、各遺伝子座に基づく数値も、1遺伝子座 (*Lcaf450*, -0.061) を除く4遺伝子座で、0.13－0.49という高い値となっていた。近交係数は、ヌル対立遺伝子の存在がすると、近親交配が行われていなくても正の値となることがある。しかしながら、渡名喜集団における近交係数は、4遺伝子座において、一貫し

て正の値となっていたことから、渡名喜集団においては任意交配ではなく、近親交配が行われていた可能性が高い。

集団間の遺伝的分化指数 (F_{ST}) は、全ての集団間で有意にゼロより大きく、 $0.106-0.542$ という高い値であった。集団間の対立遺伝子頻度には、比較的大きな違いが認められた。この対立遺伝子頻度の差異は、サンプル数の少ない南城、恩納、久米の3集団だけでなく、サンプル数の多い那覇集団と渡名喜集団間でも認められ、遺伝子座 *Lcaf441* や *Lcaf450* において大きかった。これらの結果は、各集団間が遺伝的に異なることを示唆している。各集団は、前述のように、基本的には類似の対立遺伝子を有しているものの、一部に集団固有の対立遺伝子を保持し、集団間での対立遺伝子頻度の違いも大きかった。キバナスゲユリは、個体数が急激に減少しているが、今回認められた対立遺伝子頻度における差異が、個体数の変動にともなう遺伝的浮動によるものか、長期間の集団の孤立や地域環境への適応等によるものかを判断することは難しい。しかし、南城や恩納といった個体数が極めて限られた集団が、集団固有の対立遺伝子を有することは、個体数の縮小が比較的最近に起こった事を示しており、集団間の個体の移動は行わないことが望ましいと考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本サブテーマから得られた成果により、今回対象とした絶滅危惧植物が、ただ単に個体数が少ないだけでなく、遺伝的に評価すると、より個体数は少ないという状況にあることが明らかになった。また、ズカケソウにおいて野生集団を構成するクローンと生育地外保全されているクローンが異なっていた事は、遺伝的多様性を保持しつつ適切な保全を今後行うにあたってきわめて重要な情報である。

一般に、野生植物には家系図が無いため、適切な交配相手を特定する事は困難であるが、全個体の遺伝子型解析に基づき個体間の血縁度を推定することで、残存する数少ない個体間で近交弱勢リスクを防ぐために、適切な花粉親、種子親の選定が可能となった。また、特定の家系の個体のみを増殖に用いる等の不適切な増殖プランを防止できる。

絶滅危惧種存続上の大きな脅威となっている生育地縮小や劣化に対処するために生育地外保全を行うに当たって、もっとも費用対効果が高く、残存した遺伝的多様性を保全するプランを立案できるようになった。

里地・里山に生育する絶滅危惧植物の中でも特にランクの高い分類群には、過去に行われた植栽や移植などの人為の影響を色濃く残している場合があることが明らかになった。このような絶滅危惧植物において保全対策を実施する際には、網羅的な解析により遺伝的状況を明らかにする必要がある。現在、多くの地域で里地里山に生育する絶滅危惧植物の保全活動が行われているが、今回の結果は、これらの保全活動をより効果的に行うためには、網羅的な解析による遺伝的評価が重要であることを改めて示している。

分子マーカーを用いることにより、採取や売買が禁止されている絶滅危惧種の識別がなされることはこれまで報告があるが、本課題の成果においては、更に、全個体の遺伝子型情報に基づいて、市場に流通している個体の採集場所を明らかにできた。このことは、市場に流通する希少植物の由来を正確に特定できることを意味しており、法生物学 (forensic biology) 的な観点からも意義ある成果が得られたと考えられる。

植物園等において絶滅危惧植物の生育域外保全を行う際に、各個体に遺伝子型のタグを付け、それに基づいて適切に維持・管理することは、域外保全活動において先進的かつ有益な取り組みであるといえる。日本に現存するスズカケソウについては、ユニークな対立遺伝子を持つすべてのクローンを、その遺伝子型とともに広島市植物公園で生育域外保全するという段階まで持ち込むことができたことは、大きな成果の一つとしてあげることができる。

更に、スズカケソウ以外の絶滅危惧植物に関しても、域外保全が行われている、あるいは検討されている分類群について、現存する全個体について遺伝子型タグを付加したうえで個体管理することがほぼ可能となった。各個体の遺伝子型に基づいて種内の遺伝的多様性を保全する枠組みを実証したこと、そして、その基礎となる全残存個体の遺伝子型情報を、比較的短期間かつ低コストで複数の絶滅危惧植物について同時に整備できることを示したことは、絶滅危惧種の適切な域外保全を実行する上で、本プロジェクトの重要な成果といえる。

(2) 環境政策への貢献

今回得られた成果は、全個体ジェノタイピングに基づく絶滅危惧植物の盗掘防止と適正管理に関するモデルケースを提供するものである。全個体ジェノタイピングが終了した絶滅危惧種については、残存するすべての個体に遺伝的にタグを付けたことになるので、市場に流通している個体の由来を正確に特定でき、絶滅危惧種の違法な採取や販売を検知可能である。また、園芸的価値が高く、盗掘被害を受けやすい希少植物について、全個体についてジェノタイピングが終了していること、違法な採取によって市場に流通している個体の由来を特定できることを広く周知することによって、盗掘防止への強い圧力になることが期待できる。さらに、そのような絶滅危惧植物を、認定業者等が合法的に販売する場合にも、特定の遺伝子型を有する個体を販売することにより、販売されている個体が正規のルートを経たものであることを簡単に証明できるようになる。全個体ジェノタイピングに基づくこれらの対策の総合的な実施により、絶滅危惧植物の盗掘防止と有効利用について、より厳密かつ積極的な制度が構築できると考えられる。

各絶滅危惧植物が生育する地域の自治体や市民団体に今回の研究成果を報告し、適切な保全方針の提案を行った。スズカケソウについては、つるぎ町教育委員会およびつるぎ町内の小学校に今回の研究成果を伝え、生育地における保全活動や環境教育に活用している。静岡県湖西市に生育するトキワマンサクについては、生育地の保護と地域の活性化を目的とした市民団体(トキワマンサク里作り推進会)と湖西市教育委員会に今回の研究成果を伝え、今後の保全指針に活用してもらう予定である。また、熊本県荒尾市教育委員会と地権者は、現在トキワマンサク生育地の管理方法について検討していることから、今回の研究成果を保全活動に活用する予定である。シモツケコウホネについては、絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律に基づく「国内希少野生動植物種」として指定される予定である。さらに生育地の保護を目的とした市民団体(シモツケコウホネと里を守る会)と栃木県上都賀農業振興事務所に、今後の保全活動に生かせるように、クローン数やその分布様式などに関する研究成果を伝えた。ガシャモクについてはこれまで自生地における調査研究や保全活動を主導してきた北九州市立自然史・歴史博物館やガシャモクの保護を目的とした市民団体(ガシャモク再生の会)、生育地外保全を行っている小学校などの関係者に今回の研究成果を伝え、より適切な自生地の保全方針や生育地外保全について共に検討する予定である。キバナスゲユリについては、環境省と国営沖縄記念公園熱帯・亜熱帯緑化植物園が実施している「キバナスゲユリ生息域外保全モデル事業」において本プロジェクトの遺伝解析結果が活用される予定である。

6. 国際共同研究等の状況

「特に記載すべき事項はない」

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

- 1) I. MASUMOTO, S. KANEKO, K. OHTAKE, and Y. ISAGI: Conservation Genetics Resources 3, 163-165 (2012)
 “Development of microsatellite markers for *Adenophora palustris* (Campanulaceae), a critically endangered wetland plant species in Japan”
- 2) M. YOKOGAWA, T. SHIGA, S. KANEKO and Y. ISAGI: Conservation Genetics Resources, (2012)
 “Development of nuclear microsatellite markers for the critically endangered freshwater macrophyte, *Nuphar submersa* (Nymphaeaceae), and cross-species amplification in six additional *Nuphar* taxa ”
 (in press)
- 3) C. FUKADA, S. KANEKO, M. YOKOGAWA, and Y. ISAGI: Conservation Genetics Resources, 4, 495-497 (2012)
 “Development of ten microsatellite markers for *Arisaema minus* (Araceae), a vulnerable Japanese herb species”
- 4) N. NAKAHAMA, S. KANEKO, A. HAYANO, Y. ISAGI, M. INOUE—MURAYAMA and T. TOMINAGA: Conservation Genetics Resources, (2012)
 “Development of microsatellite markers for the endangered grassland species *Vincetoxicum pycnostelma* (Apocynaceae), using next generation sequencing technology.” (in press)
- 5) 津村義彦、陶山佳久編: 森の分子生態学第二版、p137-158、文一総合出版、(2012)
 「第4章 絶滅危惧種の分子保全遺伝学 (執筆担当: 井鷲裕司)」
- 6) 井鷲裕司、兼子伸吾、水谷未耶、加藤慶子、伊津野彩子、高宮正之、志賀隆、増本育子、大竹邦明: DNA多型 20, 148-152 (2012)
 「全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全」

< その他誌上発表 (査読なし) >

- 1) 志賀隆、横川昌史、兼子伸吾、井鷲裕司: Nature Study, 58,2-4 (2012)
 「全個体遺伝子型解析で絶滅危惧種を護る: シモツケコウホネを例にして」
- 2) 井手雄二、戸丸信弘編: 森林遺伝育種学、文泳堂出版、(2012)
 「集団内の遺伝的動態 (執筆担当: 井鷲裕司)」(印刷中)

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) S. KANEKO, F. NOBUSHIMA and Y. ISAGI: East Asian Plant Diversity and Conservation 2nd

Meeting, Beijin. China, (2009)

“Exhaustive genotyping for all remnant populations of endangered tree species revealed the significant genetic differentiation among populations in small geographical scale”

- 2) 水谷未耶、兼子伸吾、井鷲裕司:第57回日本生態学会東京大会(2010)
「日本に生育する絶滅危惧種トキワマンサクの全野生個体解析による多様性評価」
- 3) 兼子伸吾、大庭俊司、井鷲裕司:第57回日本生態学会東京大会(2010)
「絶滅危惧植物センリゴマの全残存集団を対象とした網羅的遺伝解析」
- 4) 大竹邦暁、兼子伸吾、増本育子、井鷲裕司:第57回日本生態学会東京大会(2010)
「ユビキタスジェノタイピングによる絶滅危惧植物ヤチシャジンの保全」
- 5) 志賀隆、杉田勇治、横川昌史、兼子伸吾、井鷲裕司:第9回日本植物分類学会愛知大会(2010)
「水生植物ナガレコウホネ(スイレン科)の形態変異と遺伝的変異」
- 6) 志賀隆、横川昌史、兼子伸吾、井鷲裕司:日本植物学会第74回春日井大会 (2010)
「遺伝子解析から見いだされたコウホネ属の絶滅危惧種～見逃されてきた絶滅危惧種とその保全」
- 7) 井鷲裕司、兼子伸吾、加藤慶子、水谷未耶、増本育子、大竹邦暁:第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「二次的自然下に生育する絶滅危惧植物保全のためのユビキタスジェノタイピング」
- 8) 志賀隆、横川昌史、兼子伸吾、井鷲裕司:第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「地域固有絶滅危惧種シモツケコウホネを守る:ユビキタスジェノタイピングから見えてきたこと」
- 9) 畑中佑紀、尾関雅章、平尾章、井鷲裕司:第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「AFLPとマイクロサテライト多型解析による絶滅危惧種タデスミレの残存個体群評価」
- 10) 兼子伸吾、西川恵子、井鷲裕司ほか7名:第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「全個体ジェノタイピングによる絶滅危惧植物ガシャモクの遺伝的多様性解析」
- 11) 深田ちひろ、小林禧樹、兼子伸吾、井鷲裕司、丑丸敦史:第58回日本生態学会札幌大会(2011)
「全個体ジェノタイピングによるハリマムシグサの遺伝的構造」
- 12) T. SHIGA, M. YOKOGAWA, S. KANEKO and Y. ISAGI: East Asian Botany, International Symposium, Tsukuba, Japan, (2011)
“Assessing genetic and genotypic diversities of *Nuphar submersa*, a critically endangered macrophyte, and its conservation implications”
- 13) K. KATO, S. KANEKO, Y. ISAGI: East Asian Botany, International Symposium, Tsukuba, Japan, (2011)
“Conservation genetics of the endangered perennial herb, *Veronicastrum villosulum* (Plantaginaceae) analyzing all wild and cultivated individuals utilizing microsatellite markers.”
- 14) Y. ISAGI, S. KANEKO, K. KATO, A. IZUNO, M. MIZUTANI, T. SHIGA, I. MASUMOTO and K. OHTAKE: 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, (2011)
“Conservation of critically endangered plant species based on information obtained by the ubiquitous genotyping.”
- 15) S. KANEKO, T. ABE, Y. ISAGI: 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, (2011)
“Conservation of a critically endangered shrub species *Stachyurus macrocarpus* var. *prunifolius*

(Stachyuraceae) based on the ubiquitous genotyping approach.”

- 16) K. KATO, S. KANEKO, Y. ISAGI: 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, (2011)

“Conservation of a critically endangered perennial species, *Veronicastrum villosulum* (Plantaginaceae) by ubiquitous genotyping.”

- 17) 井鷲裕司、兼子伸吾、水谷未耶、加藤慶子、高宮正之、伊津野彩子、志賀隆、増本育子、大竹邦明: 日本多型学会 第20回学術集会 (2011)

「全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全」

- 18) S. KANEKO, Y. MATSUKI, X. Y. QIU and Y. ISAGI: The 5th EAFES International Congress, Otsu, Japan, (2012)

“Single clone remaining of *Rehmannia japonica*, critically endangered plant species in Japan, as revealed by exhaustive genotyping of all remnant populations.”

- 19) K. KATO, S. KANEKO and Y. ISAGI: The 5th EAFES International Congress, Otsu, Japan, (2012)

“Conservation genetics of the endangered clonal herb, *Veronicastrum villosulum* (Plantaginaceae): analysis of all wild and cultivated populations with microsatellite markers.”

- 20) 内海知子、横川昌史、高宮正之、井鷲裕司: 第59回日本生態学会大津大会(2012)

「マイクロサテライト遺伝マーカーによるウスユキクチャシグサ(絶滅危惧IA類)の極めて低い遺伝的多様性」

- 21) 深田ちひろ、兼子伸吾、横川昌史、井鷲裕司、小林禧樹、丑丸敦史: 第59回日本生態学会大津大会(2012)

「絶滅危惧種ハリマムシグサの保全遺伝学」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

- 1) シモツケコウホネを知る・守る (2010年9月23日 栃木県立博物館講堂 参加者126名)
- 2) ユビキタスジェノタイプングと数理モデリングによる絶滅危惧植物保全 (2011年3月10日 札幌コンベンションセンター 参加者10名)
- 3) 広島市植物園シンポジウム 「ふるさとの自然を守ろう～生物多様性を考える～」(平成23年11月23日、広島市植物園展示資料館、観客50名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 毎日新聞「シモツケコウホネ遺伝子解析 45個体に認識 宇都宮でシンポ 保存へ条例化検討を」(2010年9月24日)
- 2) 下野新聞「シモツケコウホネ守ろう 生物多様性の意義訴え 宇都宮でシンポ」(2010年9月24日)

- 3) 徳島新聞「スズカケソウ絶滅回避へ光 自生地と別遺伝子型 京大調査 太田小栽培4株で確認」
(2010年10月19日)
- 4) 徳島新聞「新型遺伝子のスズカケソウ 京大グループ解析へ つるぎ栽培の太田小が提供」(2010年10月21日)
- 5) 朝日新聞「群落保全 遺伝子型カギ 多様性の維持 適応力高める」(2011年9月25日)

(6)その他

- 1) 水谷未耶:「日本に生育する絶滅危惧種トキワマンサクの全野生個体解析による多様性評価」、第57回日本生態学会東京大会ポスター賞 保全分野 優秀賞
- 2) 第13回 日本DNA多型学会優秀研究賞 (全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全、井鷲裕司、兼子伸吾、水谷未耶、加藤慶子、高宮正之、伊津野彩子、志賀隆、増本育子、大竹邦明)

8. 引用文献

- 1) C. LIAN and T. HOGETSU: Molecular Ecology Notes, 2, 212- 213 (2002)
“Development of microsatellite markers in black locust (*Robinia pseudoacacia*) using a dual-suppression-PCR technique.”
- 2) C. LIAN, M. A. WADUD, Q. GENG, K. SHIMATANI and T. HOGETSU: Journal of Plant Research, 119, 415–417 (2006)
“An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers.”
- 3) J. K. PRITCHARD, M. STEPHENS and P. DONNELLY: Genetics, 115, 945–959 (2000)
“Inference of population structure using multilocus genotype data.”
- 4) D. FALUSH, M. STEPHENS and J. K. PRITCHARD: Genetics, 164, 1567–1587 (2003)
“Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies.”
- 5) M. HUBISZ, D. FALUSH, M. STEPHENS and J. K. PRITCHARD: Molecular Ecology Resources, 9, 1322–1332 (2009)
“Inferring weak population structure with the assistance of sample group information.”
- 6) 磯野直秀: Hiyoshi Review of Natural Science Keio University, 42, 27–58 (2007)
“明治前園芸植物渡来年表.”
- 7) T. YAMAZAKI: The Journal of Japanese Botany, 36, 351–352 (1961)
“Meeting with *Rehmannia japonica* Makino.”
- 8) K. IWATSUKI, T. YAMAZAKI, D. E. GOUFFORD and H. OHBA (eds): Flora of Japan IIIa. Kodansha, Tokyo, pp.343–344 (1993)
“Scrophulariaceae 17. *Rehmannia* (T. YAMAZAKI).”
- 9) Z. XIA, Y-Z. WANG and J. F. SMITH: American Journal of Botany, 96, 519–530 (2009)
“Familial placement and relations of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae s.l.) inferred from five gene regions.”

- 10) T. SHIGA, J. ISHII, Y. ISAGI and Y. KADONO: *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 57, 113–122 (2006)
“*Nuphar submersa* (Nymphaeaceae), a new species from central Japan.”
- 11) M. YOKOGAWA, T. SHIGA, S. KANEKO and Y. ISAGI: *Conservation Genetics Resources*, (2012)
“Development of nuclear microsatellite markers for the critically endangered freshwater macrophyte, *Nuphar submersa* (Nymphaeaceae), and cross-species amplification in six additional *Nuphar* taxa ”
(in press)
- 12) N. J. OUBORG, W. P. GOODALL-COPESTAKE, P. SAUMITOU-LAPRADE, I. BONNIN and J. T. EPPLER: *Molecular Ecology*, 9, 497–498 (2000)
“Novel polymorphic microsatellite loci isolated from the yellow waterlily, *Nuphar lutea*.”
- 12) T. MAKINO: *Botanical Magazine Tokyo* 24:137–147 (1910)
“Observations on the flora of Japan.”
- 13) T. SHIGA and Y. KADONO: *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 55, 107–117 (2004)
“Morphological variation and classification of *Nuphar* with special reference to the populations in central to western Japan.”
- 14) C. FUKADA, S. KANEKO, M. YOKOGAWA, T. KOBAYASHI, A. USHIMARU and Y. ISAGI: *Conservation Genetics Resources* (2012)
“Development of ten microsatellite markers for *Arisaema minus* (Araceae), a vulnerable herb species in Japan.” (in press)

(2) 地史的環境変動と近年の温暖化リスク下にある高山における絶滅危惧植物保全に関する研究

東北大学大学院農学研究科

陶山 佳久

<研究協力者>

新潟大学農学部

阿部 晴恵

東北大学農学部

小笠原 玄記

東北大学大学院生命科学研究所

牧 雅之

東北大学大学院生命科学研究所

堀江 佐知子

京都大学大学院農学研究科

横川 昌史

山梨県森林総合研究所

長池 卓男

屋久島生物多様性協議会

手塚 賢至

屋久島生物多様性協議会

荒田 洋一

屋久島生物多様性協議会

斎藤 俊浩

屋久島生物多様性協議会

手塚 田津子

屋久島生物多様性協議会

布施 健吾

北海学園大学工学部

佐藤 謙

北海道立総合研究機構環境科学研究センター

西川 洋子

平成21～22年度累計予算額:28,456千円

(うち、平成22年度予算額:9,535千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]高山における絶滅危惧植物保全に関する研究を行う本サブテーマでは、計6種を対象に研究を行った。このうち5種について、DNAマーカーの開発、分布調査、DNA抽出用試料採取、遺伝的解析を行った。他1種については1集団の全個体の分布調査およびDNA抽出試料の採取を行った。

ゴヨウザンヨウラクについては、300に満たない開花株しか存在しないことが認識され、その保全価値があらためて認められた。一方で、遺伝的データからは近年における明確な個体群サイズ縮小の証拠は検出されず、更新状況にも大きな問題は観察されなかった。従って、具体的な保全策としては、まずは現地保全を適切に遂行することが有効だと考えられた。ヤクシマリンドウについては、1,000に満たない株数しか現存しないことが明らかになり、山城間の遺伝的分化も認められたため、すべての分布域における保全の重要性を認めることができる。具体的な保全策として、本研究で行われた現存全個体の位置・写真・DNA記録が存在するという宣言による、盗掘抑止が考えられる。ヒダカソウについては、現状としてすでに生育保護区の設定や立入り制限等の保全対策が講じられているにも関わらず、個体群動態調査からも集団遺伝学的にも著しい個体数の減少傾向が認められた。個体群間は遺伝的に隔離している傾向があるとともに、ほぼ絶滅状態にある個体群も認められることから、全生育地を対象としたさらなる積極的な保全対策が必要であると考えられる。

キリギシソウとキバナノアツモリソウについては、現在当該地域の保全のために実施されている入山規制開始以降は個体群の著しい縮小傾向は認められず、対策に一定の効果が認められた。従って、今後も入山規制を継続し、保全効果を維持することが望まれる。キタダケソウについては、すでに特定国内希少野生動植物種に指定されて保全対策が施されているため、今後も適切な保全対策が継続されることが望まれる。

[キーワード]高山植物、地球温暖化リスク、遺伝的多様性、絶滅危惧種

1. はじめに

現在の日本列島の高標高域において島状に存在する高山帯には、氷河期の遺存種などが分布する興味深い生物相が維持されている。また、現在の冷涼な高山環境に適応して生存している種が多いと考えられるため、現在懸念されている温暖化の影響を最も受けやすい生態系のひとつであると考えられる。地球温暖化への危惧を背景として1988年に設立された「気候変動に関する政府間パネル(IPCC)」の報告書においても、地球温暖化に対して脆弱性が高い地域として高山地域が挙げられている。

また高山植物の多くは、人為としての盗掘や踏圧、シカなどによる食害の影響などを受け、気候変動以外の要因によっても絶滅リスクの高いグループである。さらに高山植物は、過去の氷河期-間氷期サイクルの影響を受けて、個体群の分布パターンやサイズに関する様々な変化を経ているため、過去の分布履歴が現在の遺伝的構造に大きく影響していると考えられる。このことは、現在の分布パターンからは認識困難な遺伝的多様性・空間的遺伝構造が存在する可能性が高いと考えられるだけでなく、今後に生じるかもしれない集団サイズや分布パターンの変化によって深刻な遺伝的劣化を受ける可能性があると考えられる。

これらの点から、高山植物の分布の現状と遺伝的状況を明らかにし、適切な保全策を講ずることの意義は大きい。

2. 研究開発目的

本研究では、高山に分布する絶滅危惧植物を対象に、個体群動態に大きな影響力を持つと考えられる遺伝的特徴を把握し、適切な保全対策の構築に寄与することを目的とする。そこで、温暖化や盗掘の影響が大きいと考えられる高山植物を対象に、生育位置、繁殖状況を現地調査して正確な分布全容を把握するとともに、遺伝的解析用のサンプルを採集する。また、対象種の遺伝的解析用にマイクロサテライトDNAマーカーを開発して、採取した個体の遺伝子型を決定し、集団遺伝学的な解析を行う。これらのデータをもとにして、遺伝的多様性や対立遺伝子頻度に関する現状把握、遺伝的特徴の評価、集団の遺伝的構造から判断した個体群間の遺伝的違いの把握など、保全活動計画策定に対して有効な情報を提供することを目的とする。

3. 研究開発方法

解析は、岩手県の五葉山のみに分布するゴヨウザンヨウラク(ツツジ科:絶滅危惧IA類)、屋久島の高標高域のみに分布するヤクシマリンドウ(リンドウ科:絶滅危惧IB類)、キタダケソウ属の3種として、北海道のアポイ岳周辺のみに分布するヒダカソウ(キンポウゲ科:絶滅危惧IA類)、北海道の峠山にのみ分布するキリギシソウ(キンポウゲ科:絶滅危惧IA類)、南アルプスの北岳のみに分布するキタダケソウ(キンポウ

ゲ科：絶滅危惧Ⅱ類)を、そして北海道の岨山・音別および本州中部以北の限られた地域に分布するキバナアツモリソウ(絶滅危惧ⅠB類)の合計6種を対象とした。

(1)ゴヨウザンヨウラク

ゴヨウザンヨウラク *Menziesia goyozanensis* (ツツジ科ヨウラクツツジ属)は高さ1~1.3mの落葉低木で、1962年に新種記載されたツツジ科の植物で、岩手県の五葉山のみ分布が知られている(図(2)-1)。環境省レッドリストでは絶滅危惧ⅠA類に指定されており、2002年の報告¹⁾によれば、「100 × 10m以下のきわめて限られた範囲に約60個体が生育する」と記載されている。

本研究においてすべての開花株の位置情報をGPSで記録し、サイズ(自然高・地際直径)と開花数の測定およびDNA抽出用サンプルの採取を行った。さらに、比較対象として同所的に生育する近縁種コヨウラクツツジについても、ゴヨウザンヨウラクの生育範囲内ですべての株のサンプル採取を行った。さらに同属の近縁種であるガクウラジロヨウラクを加え、3種間での遺伝的比較を行った。遺伝マーカーとして、Taniらのプロトコル²⁾によりマイクロサテライトマーカーを開発し、遺伝的解析を行った。



図(2)-1. ゴヨウザンヨウラクの花(左)と開花個体の枝(右)

(2)ヤクシマリンドウ

ヤクシマリンドウ *Gentiana yakushimensis* (リンドウ科リンドウ属)は、鹿児島県屋久島の高標高域における花崗岩上の割れ目に生育する多年生草本で、環境省レッドリストでは絶滅危惧ⅠB類に指定されている(図(2)-2)。本種は屋久島の山岳山頂部にのみ分布することから、地球温暖化に際してより標高の高い場所に移動することができず、温暖化による絶滅が懸念される。また盗掘による個体数の減少も危惧されている。

本研究では、分布地における全個体の分布情報を、GPSおよび目視による位置記録、写真記録によってとりまとめ、繁殖状況調査(開花株数・結実株数・分枝数)およびDNA解析のためのサンプリングを行った。

マイクロサテライトマーカーは、採取したヤクシマリンドウのサンプルを材料として、Taniらのプロトコル²⁾により開発した。また、近縁種である *Gentiana crassicaulis* ですでに開発されているマイクロサテライトマーカー³⁾ 及びエゾリンドウ *Gentiana triflora* で開発されたマーカー(西原ら、未発表)について、ヤクシマリンドウへの適用可能性を確認して使用した。



図(2)-2. ヤクシマリンドウの開花株(左)と分布調査地における調査風景(右)

(3)ヒダカソウ

ヒダカソウ *Callianthemum miyabeanum* (キンポウゲ科キタダケソウ属) は北海道様似町アポイ岳周辺のカンラン岩・蛇紋岩地帯のみに生育する固有種であり、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類に指定されている(図(2)-3)。本種はアポイ岳の代表的な高山植物として注目度が高いだけでなく、サハリンに生育するカラフトミヤマイチゲと、後述するキリギシソウ(絶滅危惧IA類)、およびキタダケソウ(絶滅危惧II類)等の近縁希少種があり、これらとの種間比較が可能である点で研究対象種としての利点がある。

本種については、全ての開花株の位置情報把握とサンプリングをアポイ岳とその近隣の吉田山、幌満岳の分布域で行った。また、株ごとに分枝数、花茎数のカウントも行った。また、狭い範囲内でのクローン構造を明らかにするために、6カ所の1m×1mモニタリングプロットにおいて、全株の位置情報記録およびサンプリングを行った。

遺伝マーカーについては、採取したヒダカソウのDNAサンプルを使用し、Taniらのプロトコル²⁾によりマイクロサテライトマーカーを開発し、遺伝的解析を行った。



図(2)-3. ヒダカソウの花(左)とヒダカソウ分布地であるアポイ岳(右)

(4)キリギシソウ

キリギシソウ *Callianthemum kirigishiense* (キンポウゲ科キタダケソウ属) は、北海道芦別市嵯山のみに分布する多年草で(図(2)-4)、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類に指定されている。分布調査は、北海道環境科学研究センターの資料に基づいて、全開花株と6つのモニタリング区内の全株の位置情報記録を行い、DNA分析用に株ごとのサンプリングを、他対象種と同様の方法で行った。

遺伝マーカーの開発は、前述したヒダカソウのサンプルを対象に、Taniらのプロトコル²⁾によりマイクロサテライト部位の濃縮を行い、ヒダカソウと同属である本種においても利用できるマーカーを選抜し、遺伝的解析を行った。



図(2)-4. キリギシソウの株(左:写真中央)とキリギシソウの分布地である嵯山の景観

(5)キタダケソウ

キタダケソウ *Callianthemum hondoense* (キンポウゲ科キタダケソウ属) は、南アルプスの北岳のみに分布する高山植物で(図(2)-5)、特定国内希少野生動物植物種に指定された絶滅危惧植物(□類)である。本研究では、本研究で対象とした同属のヒダカソウおよびキリギシソウの比較対象種として位置づけ、集団遺伝学的に比較可能なサンプルの採取を行い、ヒダカソウを対象として開発したマイクロサテライトマーカーのうちで本種でも利用可能なものを選抜し、集団遺伝学的解析を行った。



図(2)-5. キタダケソウの株(左)とキタダケソウの分布地である北岳の景観(右)

(6)キバナノアツモリソウ

キバナノアツモリソウ *Cypripedium yatabeanum* (ラン科アツモリソウ属) は落葉性の地生ランであり(図(2)–6)、環境省レッドリストでは絶滅危惧IB類に指定されている。本研究では、本種の北海道におけるすべての生育地である嵯山の個体群および、音別町の海岸沿いに生育する約1,000株の個体群を解析対象とした。調査は、嵯山の全株の位置情報把握及び株ごとのサンプリングを他対象種と同様の方法で行った。また音別町の個体群においては、約50株についてランダムサンプリングを行った。

Taniらのプロトコル²⁾によりマイクロサテライトマーカー開発を行うとともに、同属で開発された既存のマーカーの利用可能性を検討した。

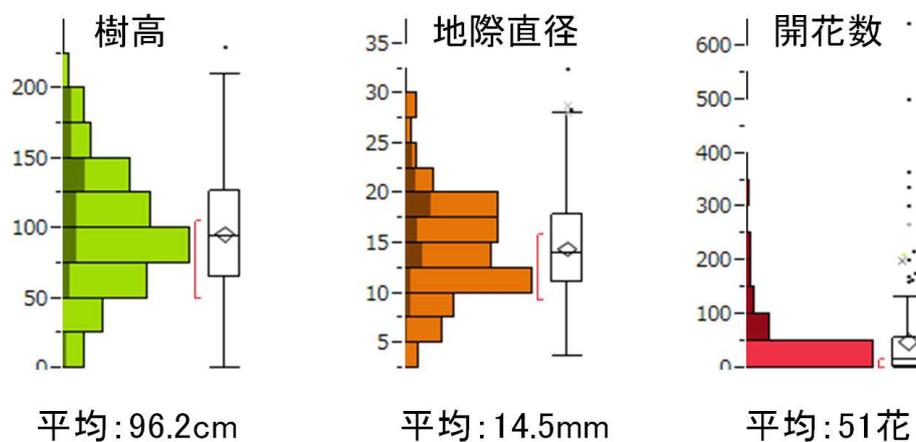


図(2)–6. キバナノアツモリソウの花(左)とキバナノアツモリソウ分布調査風景(右)

4. 結果及び考察

(1)ゴヨウザンヨウラク

岩手県の五葉山における分布地において全開花株の分布調査を行い、数ヘクタールの範囲内に241株が分布していることを確認し、それらの位置とサイズを記録した。また、生育状況調査によって明らかになった開花株の平均樹高(自然高)は96.2cm、平均地際直径は14.5mm、開花数(2009年)の平均値は51花、平均結果率は49%であった(図(2)–7)。



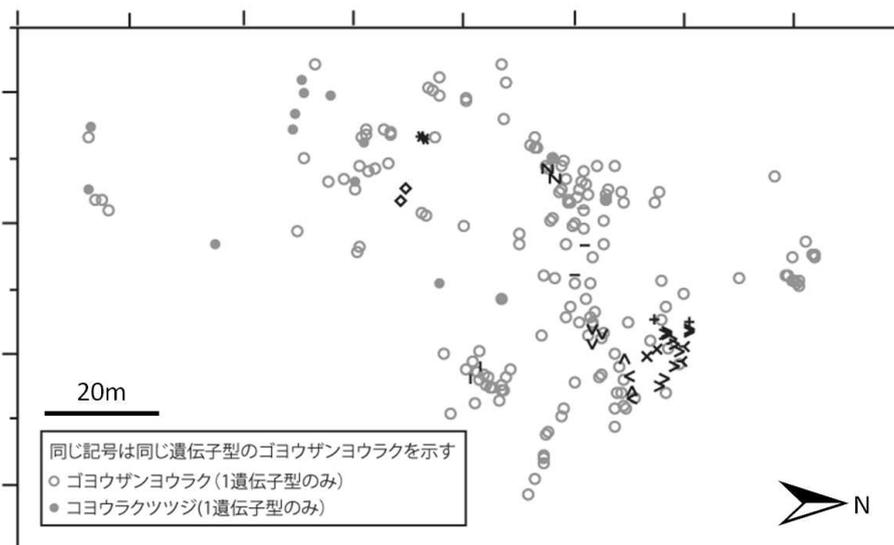
図(2)–7. ゴヨウザンヨウラク開花株の樹高、開花数、結果率の頻度分布。

本研究において新たに開発した16座のマイクロサテライトマーカーは(表(2)-1)³⁾、個体識別や遺伝的多様性、空間的遺伝構造等の解析に十分に使用できる多型性を示した。開発したマイクロサテライトマーカーのうち11座を用いてジェネット識別、遺伝的多様性、空間的遺伝構造等の解析を241株のサンプルを対象に行った。

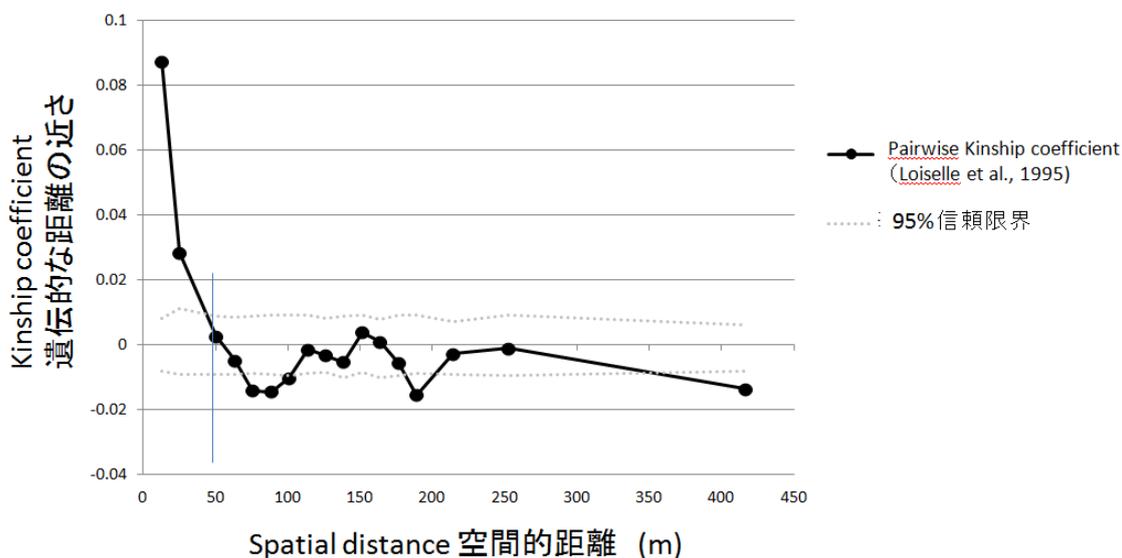
表(2)-1. ゴヨウザンヨウラクにおいて開発したマイクロサテライトマーカー

遺伝子座	プライマー塩基配列(5'-3')	繰り返し配列	Accession No.
<i>Mg15</i>	F: TCTCGAGGTGGGTGGTCTCT R: AGCAGTGATGTTGGCAGTAATG	(TC) ₁₅	AB597166
<i>Mg17</i>	F: ACTCCCAACTTCTCTCTAGCC R: CGGGTGGGAATGATCTGGTTGAG	(CT) ₄ CC(CT) ₁₅	AB597167
<i>Mg26</i>	F: TTCTCCAGCTGCGCACCA R: GAAAGCACAAGCCGAGCAAC	(CT) ₉	AB597168
<i>Mg59</i>	F: AACTTCCACTTCGACGTTTC R: TCAGCACCCGATCCAT	(TC) ₅ CC(TC) ₁₄ C(TC)	AB597169
<i>Mg125</i>	F: CCGCAAATCGATTAATCT R: ACAAATGGCGTCTTACCT	(CA) ₄ CTCG(CA) ₂ TG(CA) ₆	AB597170
<i>Mg140</i>	F: GTACCTTGGTTTTTACGG R: GTTTCCATTAACGAGGTG	(CT) ₈ AGAT(CT) ₃ ... (CT) ₂ CC(CT) ₃ CA(CT) ₉	AB597171
<i>Mg142</i>	F: CATGGGAGGGAGAGTACAAT R: AGTACACTCAGTGGGTCCAA	(GA) ₃ GG(GA) ₁₅	AB597172
<i>Mg205</i>	F: CCAAATAGCTAGACCACC R: AGGAGGAAATTCGTAGATTA	(GA) ₈	AB597173
<i>Mg213</i>	F: CCAAACCTTTCGCTACA R: ATTTCAAGCTAAGTTACCTCAAA	(TC) ₈ ...(TC) ₅ ...(TC) ₁₀	AB597174
<i>Mg214</i>	F: GGCAGCCCTGCAATAAG R: TAGGACGCTTCAGTTCCC	(GA) ₆ GG(GA) ₁₃	AB597175
<i>Mg218</i>	F: GGCTTCTTCGCTTCTATCCT R: CCTCCTGCTCACGATTAGTCC	(TC) ₁₈	AB597176
<i>Mg220</i>	F: ATTTTAAGGAGCGGAGTT R: AGTTCTATTACCTAGTCGCTTTG	(GT) ₉	AB597177
<i>Mg223</i>	F: GCTACAAACCCACTCAAGTAA R: TTTCTGGAAATCTCGC	(GA) ₁₃	AB597178
<i>Mg240</i>	F: TGAGGAAGGGAAAAACAGATCG R: CCCAGCAATGAATCCCAATAC	(TC) ₁₆ ...(TC) ₇	AB597179
<i>Mg247</i>	F: CGTGTC AATTATGCCTAAACA R: CTACCACTGTGCCAATCC	(GT) ₉ (GA) ₁₈	AB597179
<i>Mg286</i>	F: AGGGGAGTTAGGGTTTGG R: CGGGCATTGCTAGTAT	(GA) ₂₃	AB597180

遺伝解析の結果、ゴヨウザンヨウラクの全開花株241株は、遺伝的には192クローンによって構成されていることがわかった(図(2)-7)。同一クローンに属するラメットは数メートル程度以内の近距離に分布していた。また、個体間の遺伝的な距離⁴⁾と空間的な距離の関係を解析した結果、50m以下の近距離に近縁な個体が生育する空間的遺伝構造が検出された(図(2)-8)。



図(2)-7. 岩手県五葉山におけるゴヨウザンヨウラクの開花株の分布位置とクローンの分布、および同所的に分布するコヨウラクツツジの開花株の分布位置



図(2)-8. ゴヨウザンヨウラク個体ペア間の遺伝的な近さと空間的距離との関係

また、開発したマーカーのうち12座は近縁種のコヨウラクツツジについても遺伝的解析に使用できる多型性を示した。さらに、別の近縁種であるガクウラジロヨウラクについても7座が利用可能であったため、これら7座のマーカーを用いて集団遺伝学的な種間比較を行った。その結果、遺伝的多様性のレベルを示す尺度

である、検出されたアレル数 (k)、アレリックリッチネス (A)、ヘテロ接合度の観察値 (H_O)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E) のいずれにおいても、ゴヨウザンヨウラクは近縁種であるコヨウラクツツジおよびガクウラジロヨウラクよりも低い値を示した(表(2)-2)。

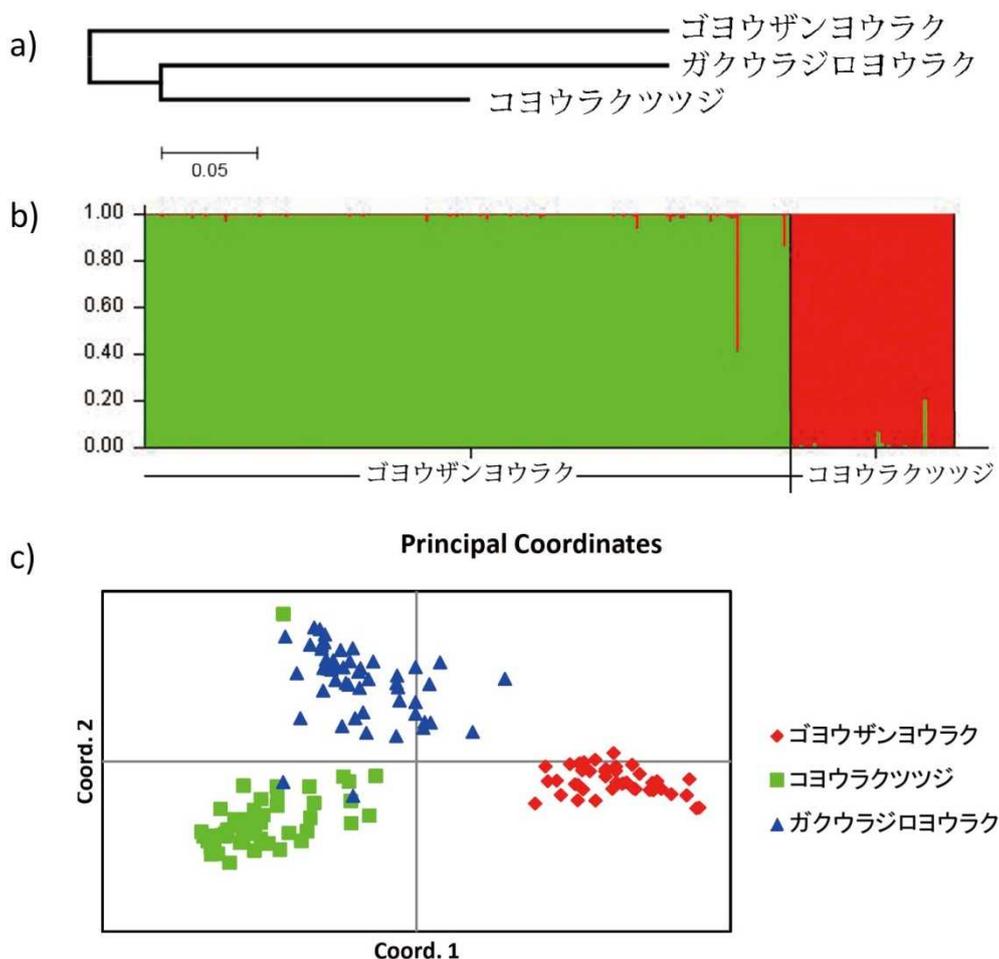
表(2)-2. ゴヨウザンヨウラクとその近縁種であるコヨウラクツツジおよびガクウラジロヨウラクとの遺伝的多様性比較

遺伝子座	N	K	R_S	H_O	H_E	F_{IS}
ゴヨウザンヨウラク						
Mg26	189	6	3.95	0.333	0.323	-0.031
Mg59	190	18	14.41	0.895	0.87	-0.028
Mg140	192	3	2.23	0.354	0.434	0.185
Mg218	192	17	13.41	0.891	0.872	-0.021
Mg233	192	8	6.65	0.719	0.804	0.106
Mg240	187	8	6.13	0.348	0.553	0.372
Mg247	183	23	18.53	0.803	0.9	0.108
平均	189.3	11.9	9.33	0.62	0.679	0.087
コヨウラクツツジ						
Mg26	49	23	22.48	0.816	0.939	0.132
Mg59	49	14	13.42	0.612	0.72	0.151
Mg140	49	6	5.83	0.327	0.552	0.411
Mg218	49	11	10.91	0.592	0.745	0.207
Mg233	49	16	15.98	0.878	0.921	0.048
Mg240	49	22	21.79	0.813	0.936	0.133
Mg247	49	23	22.64	0.837	0.937	0.108
平均	48.9	16.4	16.15	0.696	0.821	0.15
ガクウラジロヨウラク						
Mg26	50	18	17.66	0.86	0.905	0.051
Mg59	50	15	14.79	0.88	0.914	0.038
Mg140	49	17	16.48	0.653	0.69	0.055
Mg218	50	13	12	0.76	0.814	0.067
Mg233	50	10	9.96	0.76	0.829	0.084
Mg240	50	20	19.36	0.66	0.916	0.282
Mg247	49	23	22.56	0.898	0.943	0.048
平均	49.7	16.57	16.12	0.782	0.859	0.1

N :分析個体数、 k :対立遺伝子数、 R_S :アレリックリッチネス、 H_O :ヘテロ接合度の観察値、 H_E :ヘテロ接合度の期待値、 F_{IS} :近交係数

特に、ほぼ同所的に同様の集団サイズで分布するコヨウラクツツジは比較対象として条件がほぼ同一と言えるため、ゴヨウザンヨウラクが比較的低いレベルの遺伝的多様性を保持している可能性が高いと考えられる。一方、近交係数 (F_{IS}) についてはゴヨウザンヨウラクで特に高い傾向は認められなかった。

また、ゴヨウザンヨウラクの系統的な位置づけを明らかにするために、7座のマイクロサテライトマーカーの遺伝子頻度を元にした3種間の遺伝距離 (D_A) によって3種の遺伝的関係を近隣結合法によって図化した。また、同様にストラクチャー解析⁵⁾、⁶⁾ および主座標分析によって種間関係を解析した(図(2)-9)。その結果、いずれの解析によってもゴヨウザンヨウラクと他種とは遺伝的に明瞭に異なることが示され、系統的にもゴヨウザンヨウラクの保全価値が確認された。



図(2)-9. ゴヨウザンヨウラクとその近縁種であるコヨウラクツツジおよびガクウラジロヨウラクとの遺伝的関係を示すNJ法による分岐図(a)、ストラクチャー解析図($K = 2$ の場合)(b)(それぞれの縦バーが1個体を表し、色分けされた部分の割合が、それぞれ異なる遺伝的組成に由来すると推定されることを意味する)、および主座標分析図(c)(一つの点が1個体を示し、近い位置にプロットされるほど遺伝的に似通っていることを示す)。

さらに、ボトルネック解析によって、集団サイズの急激な減少があったのかを集団遺伝学的に解析⁷⁾したが、近縁種と比較して明確な強いボトルネックを受けた事は検出されなかった。

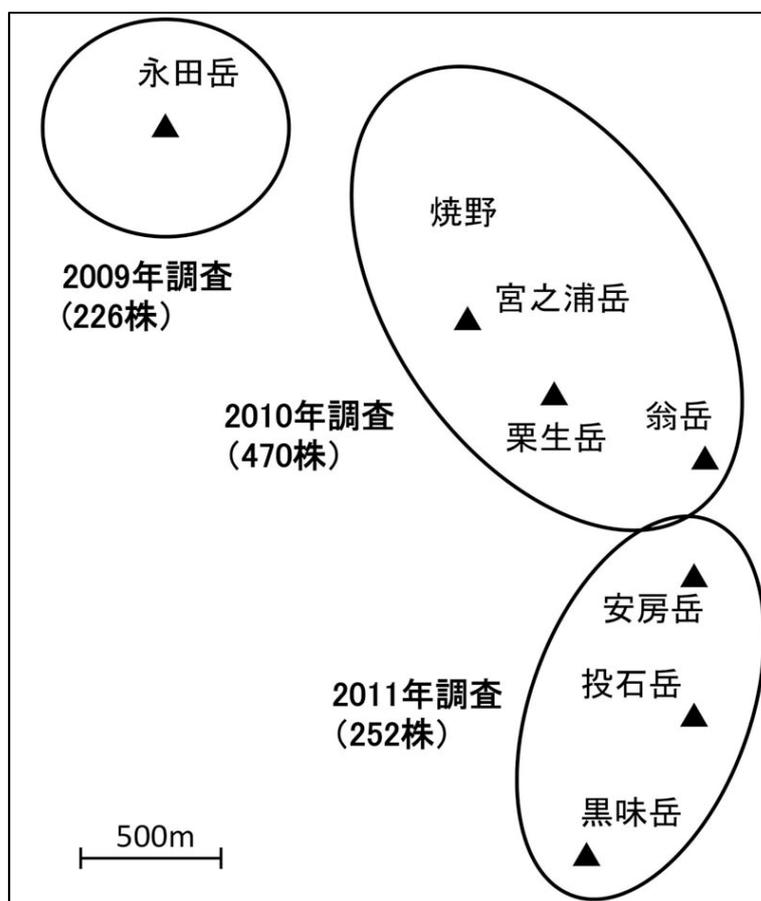
生育地においては多くの種子生産および幼稚樹の更新が観察され、個体群が危機的な衰退過程にある兆候は認められなかった。

以上の遺伝的な解析による成果と、個体群の良好な生育状況を勘案して総合的に考察すると、まず本種

が300に満たない開花株（開花個体数では200に満たない）しか存在しない希少種であることが、本プロジェクトの網羅的解析によって明確に認識され、その保全価値があらためて認められた。一方で、本種の分布域において、ボトルネックが発生した証拠は集団遺伝学的には検出されず、更新状況にも明確な問題は認められなかった。これらのことから、本種の具体的な保全策としては、まずは現地保全を適切に遂行することが有効である。ただし、その分布範囲はきわめて限られているため、分布地において山地崩壊などの大規模な自然災害があれば、個体群の存続に深刻な事態を招く危険性も想定され、現地外保存を行うことも考慮に入れる必要がある。また、開花個体のクローン数は188に過ぎないうえ、遺伝的多様性が近縁種と比較して低いことから、近交弱勢などによる個体群の遺伝的劣化については注意が必要である。

(2)ヤクシマリンドウ

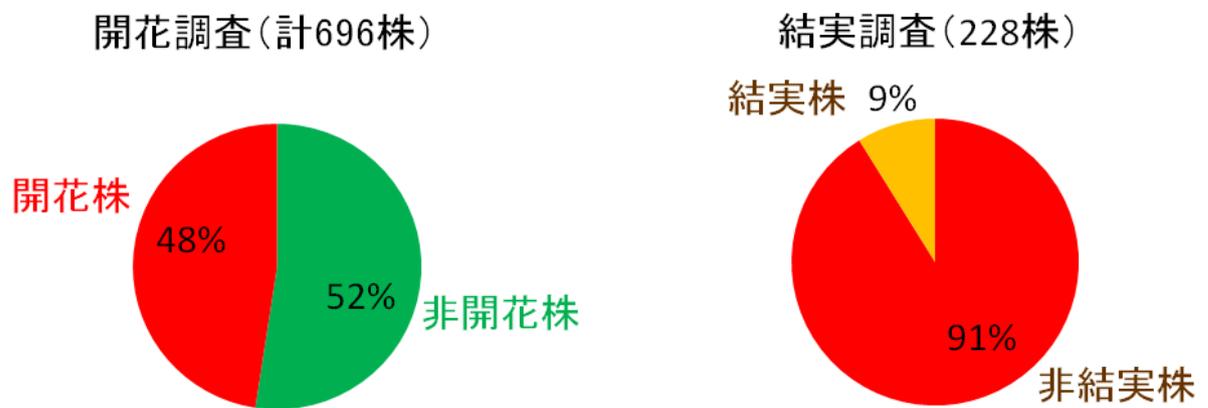
本研究での分布調査で、鹿児島県屋久島の永田岳周辺に226株、宮之浦岳から翁岳に至る山域に470株、さらに安房岳から黒味岳に至る山域に252株の分布を確認し、全分布域に948株が生育していることを確認した(図(2)-10)。



図(2)-10. 屋久島におけるヤクシマリンドウの分布域および分布数概略図(保全目的のため、詳細な位置は省略した模式図を示す)

これらの植物個体は、すべてその位置をGPSによって記録し、写真撮影するとともに、採取可能な株についてDNA分析用に微量サンプルを採取した。また、分枝数、開花の有無等の生育状況についても記録し

た。2010年に調査を行った宮之浦岳から翁岳に至る山城の全696個体のうち、開花個体は48%であり、そのうち9%の個体で結実が認められた(図(2)-11)。これらの調査により、本種の生育実態の全体像が初めて明らかになった。



図(2)-11. 屋久島におけるヤクシマリンドウの開花率と結実率

遺伝的解析は、本研究で開発した4座のマイクロサテライトマーカーと8座の一塩基多型(SNP)領域、同属の*Gentiana crassicaulis*で開発されたマイクロサテライトマーカー⁷⁾、西原ら(未発表)により開発されたエゾリンドウのマイクロサテライトマーカーのうち16座について、本研究で利用可能な多型性があるか調査した。その結果、13座で解析が可能であることがわかり、さらにそのうち6座のマイクロサテライトマーカーに多型が認められた(表(2)-3)。

これらのマーカーを用いて、永田岳周辺から採集した211サンプル及び宮之浦岳周辺から採集した97サンプルを対象として遺伝的解析を行った。また近縁普通種との比較のため、宮城県大崎市において採取したエゾリンドウ9個体についても、同様に遺伝的解析を行った。ある種で開発されたマイクロサテライトマーカーを他種に適応して遺伝的多様性を比較する場合には、マーカーの種特異性が影響するため注意が必要だが、ヤクシマリンドウで得られた遺伝的多様性の指標であるヘテロ接合度の観察値(H_0)は0.059、ヘテロ接合度の期待値(H_E)は0.082で、いずれもエゾリンドウで得られた値(0.368および0.444)よりも明らかに低い値を示した。

また、ヤクシマリンドウの種内の集団間比較では、遺伝的多様性の指標であるヘテロ接合度の期待値(H_E)は、永田岳で0.11、宮之浦岳周辺で0.18、アレリックリッチネス(R_S)は永田岳で1.6、宮之浦岳周辺で2.0であり、普通種であるエゾリンドウ9株のヘテロ接合度の期待値やアレリックリッチネスと比較して、明らかに低い値を示した(表(2)-4)。永田岳と宮之浦岳周辺の峰間の遺伝的分化程度(F_{st})は0.275であり、やや高い遺伝的分化が認められた。

表(2)-3. ヤクシマリンドウとその近縁種エゾリンドウにおけるマイクロサテライトマーカーの変異性

遺伝子座	N	k	H_O	H_E
ヤクシマリンドウ				
Gtm_10	152	1	0.000	0.000
Gtm_81	144	1	0.000	0.000
Gtm_84	133	2	0.008	0.008
Gtm_86	145	1	0.000	0.000
Gtm_94	148	2	0.034	0.166
Gcr_128	148	1	0.000	0.000
Gcr_169	139	3	0.115	0.391
Gyaku_002	151	1	0.000	0.000
Gyaku_003	153	1	0.000	0.000
Gcr_197	151	1	0.000	0.000
Gcr_59	177	2	0.006	0.028
Gcr_79	176	5	0.534	0.404
Gcr_138	171	5	0.070	0.069
平均	153	2	0.059	0.082
エゾリンドウ				
Gtm_10	9	6	0.889	0.850
Gtm_81	9	6	0.778	0.758
Gtm_84	9	3	0.333	0.392
Gtm_86	9	3	0.111	0.216
Gtm_94	9	7	0.667	0.843
Gcr_128	9	1	0.000	0.000
Gcr_169	4	4	0.250	0.750
Gyaku_002	9	2	0.444	0.366
Gyaku_003	9	1	0.000	0.000
Gcr_197	9	4	0.222	0.542
Gcr_59	-	-	-	-
Gcr_79	8	2	0.500	0.400
Gcr_138	9	3	0.222	0.216
平均	9	3.5	0.368	0.444

N は分析個体数、 k は対立遺伝子数、 H_O はヘテロ接合度の観察値、 H_E はヘテロ接合度の期待値

表(2)-4. マイクロサテライトマーカー6座を用いたヤクシマリンドウおよびエゾリンドウの遺伝的多様性

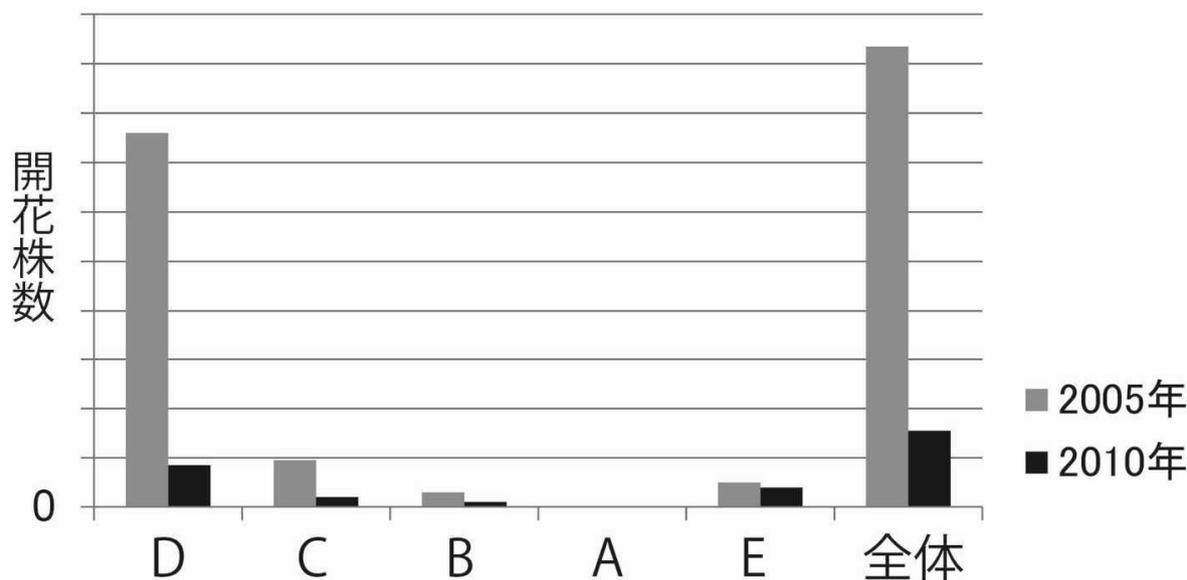
種名(集団)	N	G	G/N	A	R_S	H_E
ヤクシマリンドウ(永田岳)	211	14	0.07	2.3	1.6	0.11
ヤクシマリンドウ(宮之浦岳周辺)	97	6	0.06	2.7	2	0.18
エゾリンドウ	9	9	1	3.3	3.2	0.39

N : 解析個体数, G : クローン数, A : 遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数, R_S : アレリックリッチネス, H_E : ヘテロ接合度の期待値

以上の成果から、ヤクシマリンドウがわずか1,000に満たない株数しか現存しない絶滅危惧種であることが明らかになった。また、山城間で明瞭な遺伝的分化があることから、すべての個体群における保全の重要性を認めることができる。保全策としては、盗掘抑止を第一に考慮に入れなければならないが、本研究で網羅的に行われた全植物個体の位置・写真・DNA記録と照合すれば、万が一盗掘株が流通した場合にその由来の特定が可能であるという事実を一般に周知することにより、盗掘の抑制効果が期待できる。現段階では、このような対策には法的な拘束力は無いが、法生物学的な応用として前向きな検討が必要だろう。

(3)ヒダカソウ

これまでに分布が確認されている北海道アポイ岳周辺の5つの生育地（保全上の理由により、詳細な場所を伏せて生育地A～Eと標記する）において、2010年に全開花株の分布調査・サンプリングを行った。その結果、生育地Aでは開花株を確認できず、そのほかの生育地においてもごくわずかな開花株数しか観察されなかった(図(2)-12、保全上の理由によりここでは実数を伏せる)。



※A-Eは北海道環境科学研究センターのモニタリングプロット名に基づく

図(2)-12. ヒダカソウの生育地における2005年と2010年の開花株数の比較(保全上の理由により縦軸の実数を伏せる)

これまでに継続して行われて来た個体群動態調査の結果を用いて近年の個体数変化を見てみると、全生育地における開花株は、2005年から2010年の間に、約15%にまで減少し、急激な減少傾向にあることが明らかになった。このような減少をもたらした直接的な原因は不明であるが、花粉制限、乾燥化、ハイマツの侵入など、いくつかの生育環境の変化が指摘されている⁸⁾。

本研究で17座のマイクロサテライトマーカーを開発し、そのうち多型性のある15座を有効なマーカーとして集団遺伝学的解析を行った(表(2)-5)。有効であった15座のマーカーは、他の近縁種(後述するキリギシソウおよびキタダケソウ)においても良好なPCR増幅が見られ利用可能であった。

表(2)-5. ヒダカソウにおけるマイクロサテライト 15 遺伝子座の変異性

遺伝子座	N	K	H_E	H'
Cm_004	24	5	0.574	1.061
Cm_005	24	8	0.729	1.55
Cm_011	24	16	0.803	2.074
Cm_012	24	12	0.782	1.881
Cm_013	24	11	0.734	1.727
Cm_014	24	12	0.842	2.099
Cm_016	24	15	0.876	2.341
Cm_017	24	10	0.743	1.705
Cm_018	24	14	0.815	2.093
Cm_020	24	19	0.906	2.707
Cm_023	24	8	0.714	1.53
Cm_032	24	9	0.701	1.519
Cm_035	24	16	0.897	2.465
Cm_050	24	22	0.907	2.733
Cm_052	24	13	0.821	2.041
Average	24	12.67	0.789	1.968

N : 分析個体数, k : 対立遺伝子数、 H_E : ヘテロ接合度の期待値、 H' : Shannon-Weiner diversity index

開発したマイクロサテライトマーカーのうち多型性が高く、情報量の多い5座のマーカーを用いて遺伝的多様性と分集団間の分化に関する詳細な解析を行った。その結果、いずれの分集団(個体群)においても高い遺伝的多様性が検出され(表(2)-6)、分集団間の遺伝的分化も比較的高いレベル(遺伝子分化係数: $G_{ST}=0.16$)であることがわかった。また、個体群内に設置された1m×1mの全株調査方形区を対象として解析したジェネット(遺伝的に同一な個体:クローン)識別の結果では、ごく近傍ではクローン成長による株の形成が検出され、1つのジェネットは最大11ラメットによって構成されていることがわかった(表(2)-7)。また、近年に急激な集団サイズの減少があったのかを集団遺伝学的に検出する解析⁷⁾を試みたところ(ボトルネック解析)、近縁種と比較しても強いボトルネックを受けている可能性が示唆された。

表(2)-6. マイクロサテライト5遺伝子座の遺伝子型をもとにしたヒダカソウ個体群の遺伝的多様性(保全上の理由で、集団名は記号で標記する)

集団	N	R_S	H_E	F_{IS}
1	17	6.25	0.72	-0.04
2	55	6.40	0.66	-0.01
3	41	11.30	0.86	-0.03
4	98	8.20	0.79	0.10

N は分析個体数、 K は対立遺伝子数、 R_S はアレリックリッチネス、 H_O はヘテロ接合度の観察値、 H_E はヘテロ接合度の期待値、 F_{IS} は近交係数

表(2)-7. ヒダカソウの各個体群における1m×1m方形区内の株数およびクローン数(保全上の理由で、集団名は記号で標記する)

方形区	N	G	N/G
Y-E	17	12	1.4
A-D	47	18	2.6
H/H-B	22	4	5.5
H/H-C	20	12	1.7
H-C	72	34	2.1
H-D	24	12	2.0
平均	33.7	15.3	2.6

N : 分析個体数, G :クローン数

以上の成果と、昨年までに得られた個体群の明らかな縮小傾向から総合的に考察すると、絶滅危惧植物としてのヒダカソウ保全の緊急度は極めて高いと考えられる。つまり、現状としてすでに生育保護区の設定や立入り制限等の保全対策が講じられているにも関わらず、開花株数が著しく減少していることを重視する必要がある。個体群間では遺伝的に隔離している傾向があるとともに、個体群によってはほぼ絶滅状態にある場所が認められることを考慮すると、全生育地を対象としたさらなる積極的な保全対策が必要と考えられる。現状を考えると、現地の保全だけでは本種の保全にとって手遅れになる可能性が十分にあるため、現地外保全や積極的な復元・再生事業等も必要である。

(4)キリギシソウ

北海道芦別市嵯山における5つのモニタリング区内(A~Fプロット:合計約112m²)において全株の分布調査・サンプリングを行った(生育地情報は北海道環境科学研究センターの資料に基づく)。2010年度の調査により、確認された全株のうち、7分の1が開花株であると認められた(ここでは保全上の理由により実数を伏せる)。2000年から行われているモニタリングデータと比較すると、株数、開花株数ともに横ばいかやや減少傾向であった。また、Dプロットは2006年にがけ崩れのため生育地が崩壊したものの、2010年には株数が回復したことが確認された。

本種と同属であるヒダカソウ(前述)を対象として本研究で開発したマイクロサテライトマーカーについて、本種での利用可能性について検討を行った。その結果、すべてのマーカーでPCR増幅が見られ、そのうち13座で多型が認められた(表(2)-8)。

表(2)-8. キリギシソウにおけるマイクロサテライト15 遺伝子座の変異性

遺伝子座	N	K	H_O	H_E
Cm_004	24	1	-	-
Cm_005	24	5	0.708	0.707
Cm_011	24	1	-	-
Cm_012	24	6	0.542	0.71
Cm_013	24	9	0.792	0.75
Cm_014	24	3	0.458	0.483
Cm_016	24	5	0.542	0.445
Cm_017	24	2	0.458	0.439
Cm_018	24	2	0.333	0.284
Cm_020	24	2	0.083	0.082
Cm_023	24	3	0.333	0.624
Cm_032	24	5	0.625	0.653
Cm_035	24	4	0.417	0.637
Cm_050	24	2	0.000	0.082
Cm_052	24	13	0.542	0.826
平均	24	4.2	0.449	0.517

N :分析個体数、 k :対立遺伝子数、 H_O :ヘテロ接合度の観察値、 H_E :ヘテロ接合度の期待値

多型性を確認した13座のマーカーのうち、他の近縁種においても利用可能であり、十分な多型性の認められた5座のマーカーを用いて、詳しい遺伝的多様性の解析を行った(表(2)-9)。マイクロサテライトマーカーを用いた多様性の種間比較は、必ずしも正確な比較が可能なわけではないため注意が必要であるが、ヒダカソウやキタダケソウ(後述)と比較して低いレベルの遺伝的多様性が検出された。例えば、同じ遺伝子座で調べたヒダカソウのヘテロ接合度の期待値とアレリックリッチネスはそれぞれ0.922と14.22だったのに対し、キリギシソウではそれぞれ0.407および3.339であり、明らかに低い値を示した。また、近年に急激な集団サイズの減少があったのかを集団遺伝学的に検出する解析⁶⁾を試みたところ(ボトルネック解析)、前述のヒダカソウよりは弱いボトルネックを受けている可能性が示唆された。なお、近縁種との遺伝的関係の解析については、(6)のキタダケソウの項で解析結果を述べる。

以上の成果と、昨年までに得られた個体群動態のデータから総合的に考察すると、現在当該地域の保全のために実施されている入山規制に、一定の保全効果が認められる。つまり、入山規制以前に急激な個体群の縮小があったことが集団遺伝学的にも推測されるが、入山規制以降は個体群の著しい縮小は認められず、対策に一定の効果があったと言える。したがって、今後も入山規制を継続し、保全効果を維持することが必要である。

表(2)-9. マイクロサテライト 5 遺伝子座の遺伝子型をもとにしたキリギシソウ個体群の遺伝的多様性

遺伝子座	N	K	R_S	H_E	F_{IS}
Cm_020	45	2	1.645	0.065	-0.023
Cm_014	44	7	4.829	0.719	0.147
Cm_040	36	1	1.000	0.000	NA
Cm_018	45	2	2.000	0.465	0.235
Cm_013	46	11	7.223	0.787	0.282
平均	43.2	4.6	3.339	0.407	0.214

N :分析個体数、 K :対立遺伝子数、 R_S :アレリックリッチネス、 H_O :ヘテロ接合度の観察値、 H_E :ヘテロ接合度の期待値、 F_{IS} :近交係数

(5)キタダケソウ

本種と同属であるヒダカソウ(前述)を対象として本研究で開発したマイクロサテライトマーカーについて、本種での利用可能性について検討を行った。その結果、すべてのマーカーでPCR増幅が見られ、そのうち13座で多型が認められた(表(2)-10)。

表(2)-10. キタダケソウにおけるマイクロサテライト 15 遺伝子座の変異性

遺伝子座	N	K	H_O	H_E
Cm_004	24	1	-	-
Cm_005	24	2	0.000	0.082
Cm_011	24	9	0.708	0.616
Cm_012	24	10	0.417	0.886
Cm_013	24	11	0.583	0.851
Cm_014	24	5	0.708	0.602
Cm_016	24	9	0.375	0.784
Cm_017	24	2	0.375	0.467
Cm_018	24	2	0.292	0.439
Cm_020	24	3	0.333	0.462
Cm_023	24	3	0.042	0.566
Cm_032	24	4	0.167	0.691
Cm_035	24	3	0.167	0.649
Cm_050	24	1	-	-
Cm_052	24	7	0.458	0.800
平均	24	4.8	0.356	0.607

N :分析個体数、 K :対立遺伝子数、 H_O :ヘテロ接合度の観察値、 H_E :ヘテロ接合度の期待値

多型性を確認した13座のマーカーのうち、他の近縁種においても利用可能であり、十分な多型性の認め

られた5座のマーカを用いて、他種との比較を目的とした遺伝的多様性の解析を行った(表(2)-10)。前述のヒダカソウ、キリギシソウと合わせて、これによりわが国に分布するキタダケソウ属すべての種の解析が完了したことになる。前述のとおり、マイクロサテライトマーカを用いた多様性の種間比較は、必ずしも正確な比較が可能なのわけではないため注意が必要であるが、ヒダカソウと比較して低いレベルの遺伝的多様性が検出され、キリギシソウよりは高いレベルであった。また、急激な集団サイズ減少の有無を集団遺伝学的解析⁷⁾したところ(ボトルネック解析)、ヒダカソウのような強いボトルネックを受けている可能性は認められなかった。

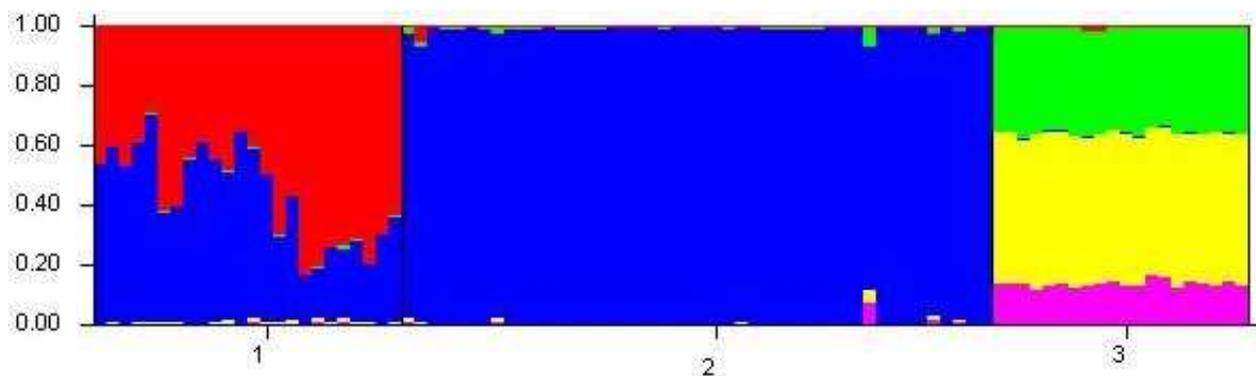
表(2)-11. マイクロサテライト5 遺伝子座の遺伝子型をもとにしたキリギシソウ個体群の遺伝的多様性

遺伝子座	N	K	RS	H_E	F_{IS}
Cm_020	13	2	2.000	0.365	-0.263
Cm_014	15	3	3.000	0.586	0.317
Cm_040	19	3	3.000	0.594	0.468
Cm_018	21	3	2.619	0.490	0.320
Cm_013	14	10	9.709	0.852	0.245
平均	24	4.2	4.066	0.577	0.254

N:分析個体数、K:対立遺伝子数、RS:アレリックリッチネス、 H_E :ヘテロ接合度の観察値、 H_E :ヘテロ接合度の期待値、 F_{IS} :近交係数

なお、キタダケソウ属3種の遺伝的種間関係を示すSTRUCTURE解析^{4), 5)}によれば、ヒダカソウに特に明瞭な遺伝的な固有性が認められ、独自系統としての保全価値が高いことが遺伝的にも裏付けられた(図(2)-13)。

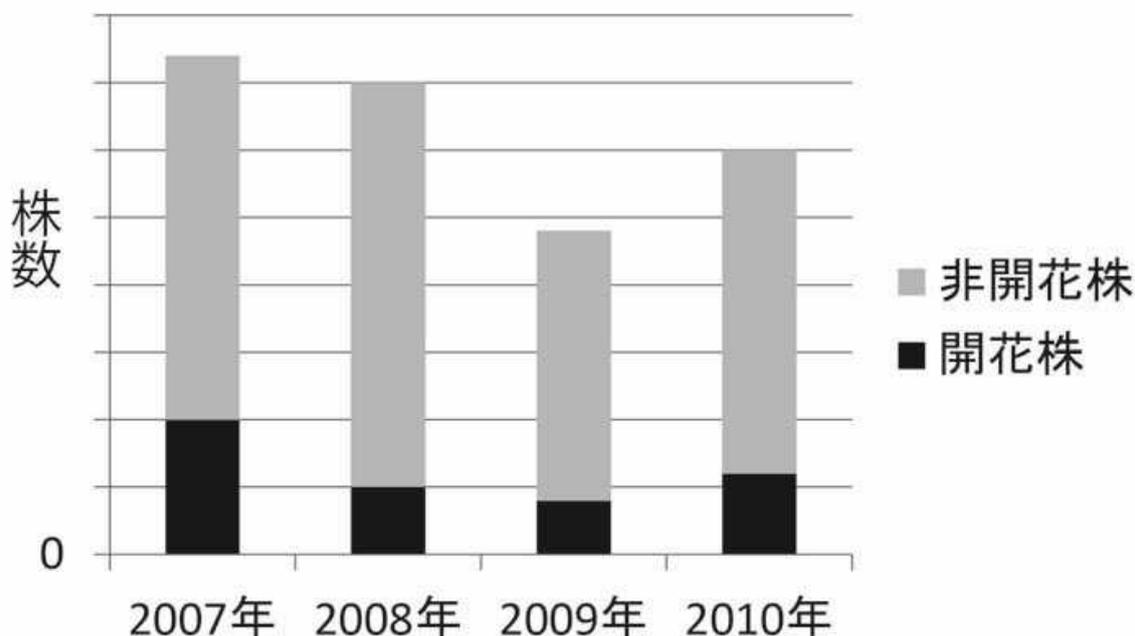
本研究ではキタダケソウについては前述のヒダカソウおよびキリギシソウの比較対象種としての位置づけで解析した。本種は、すでに特定国内希少野生動植物種に指定されて保全対策が施されているため、今後適切な保全対策が継続されることが望まれる。



図(2)-13. マイクロサテライト5遺伝子座の分析に基づくキタダケソウ(1)、キリギシソウ(2)、ヒダカソウ(3)の種間関係を示すストラクチャー解析($K = 5$ の場合)。それぞれの縦バーが1個体を表し、色分けされた部分の割合が、それぞれ異なる遺伝的組成に由来すると推定されることを意味する。

(6)キバナノアツモリソウ

北海道岨山における生育地において全開花株の調査を行った（生育地情報は北海道環境科学研究センターの資料に基づく）。また、2010年に北海道環境科学研究センターによって設置された2プロット内（計11m²）のすべての株数の調査を行った。その結果、プロット外を含めた全株を確認し、そのうち20%の株で開花が確認された（保全上の理由により、ここでは実数の記載を伏せる）。2007年からの4年間のプロット内における株数の増減幅は小さく、個体群サイズが極端に縮小・拡大する傾向は認められず、比較的安定していると考えられた（図(2)-14）。



図(2)-14. 北海道岨山のキバナノアツモリソウの生育地における2007年から2010年の株数の推移（保全上の理由により縦軸の実数を伏せる）

遺伝マーカーの開発については、アツモリソウ属には本種以外にも絶滅危惧植物があるため、すでに先行して研究を実施しているグループと協力して有効なマーカー開発を試みた。しかしながら、本種と共有して利用可能なマーカー数は著しく少ないことがわかった。昨年までに得られた個体群動態のデータから北海道芦別市の岨山における本種の保全について考察すると、現在当該地域の保全のために実施されている入山規制に、一定の保全効果が認められた。つまり、入山規制以降は個体群の著しい縮小は認められず、対策に一定の効果があつたと言える。したがって、今後も入山規制を継続し、保全効果を維持することが望まれる。

5. 本研究により得られた成果

(1)科学的意義

高山に分布する絶滅危惧種を対象として行った本研究の詳細な分布調査により、これまで不正確にしか明らかになっていなかった絶滅危惧種の分布の現状が、明確に把握された。例えば、岩手県五葉山のみ

に分布するゴヨウザンヨウラクは、これまで知られていたよりも多くの個体が野生に生育していることが明らかになった。しかしながら、全個体数は300に満たず、生育範囲も数ヘクタールの範囲内に限定されることが明確に把握され、その保全価値が改めて認識された。また、生育実態・開花状況・個体群動態調査などの情報も同時に把握したことにより、より広い視点でこれまで不明であった絶滅危惧種の現状を把握することができた。

また、多型性の高い遺伝マーカーを開発したことにより、対象種の遺伝的特徴を把握することが可能となった。これらのマーカーは近縁種にも利用可能であり、近縁種に関する遺伝的解析が可能になっただけでなく、絶滅危惧種と近縁種との種間比較が可能になった。これらのマーカーを用いた解析により、1) 遺伝的な個体数、2) 遺伝的多様性、3) 個体群内の空間的遺伝構造、4) 個体群間の遺伝的分化、5) 種間の遺伝的関係、6) 集団サイズのボトルネックの有無などを明らかにすることができ、対象種の正確な遺伝学的評価が可能となった。例えば、ヒダカソウでは個体群動態調査によってだけでなく、集団遺伝学的にも近年に急激な集団サイズの減少があった可能性が示され、絶滅危惧植物としての保全の緊急度は極めて高いことが生態データと遺伝解析により多角的に示された。

(2) 環境政策への貢献

本研究で対象としたヒダカソウ、キリギシソウ、キバナノアツモリソウは、北海道希少野生動植物の保護に関する条例の対象種であるため、本研究による遺伝的情報は包括的な保全対策の構築のために寄与できる。特にヒダカソウについては、集団遺伝学的にも保全の緊急度が極めて高いことが示されたため、本研究の成果を北海道立総合研究機構環境科学研究センター等に情報提供を行うことにより、具体的な保全対策推進の根拠として活かす予定である。またゴヨウザンヨウラクについては岩手県立博物館と、ヤクシマリンドウについては地元NPOの屋久島生物多様性保全協議会との連携を図り、本成果を保全対策推進の根拠として活かすとともに、具体的な保全策に役立てていく予定である。なお、2010年10月21日には「COP10 生物多様性交流フェア(名古屋大学)」において、屋久島生物多様性保全協議会によるヤクシマリンドウの保全活動の報告を行い、社会への啓蒙に本研究の成果を活用した。

そのほか、盗掘の恐れのある絶滅危惧種について、本研究で実施している全個体ジェノタイピングによって現存する全個体に遺伝子タグがついていることを公表することにより、盗掘の抑止に貢献できると考えられる。今後、保全策の一環として公表する方法を検討中である。特に、盗掘の危険性があるヤクシマリンドウについては、現在生育しているすべての株について位置・写真・DNAが記録されているため、盗掘抑止効果を目的としたこれらの情報の利用を検討している。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) H. ABE, M. MAKI, S. HORIE and Y. SUYAMA: Conservation Genetics Resources, 3, 569-571

(2011)

“Isolation and characterization of microsatellite loci for *Menziesia goyozanensis*, an endangered shrub species endemic to Mt. Goyo in northern Japan”

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 阿部晴恵: 秋田県立大学森林科学セミナー(2010)
「生物間相互作用系を通じた森林回復(三宅島)と遺伝的情報を用いた希少種の保全(高山植物)」
- 2) 屋久島生物多様性保全協議会: COP10生物多様性交流フェア(名古屋大学)(2010)
「世界自然遺産屋久島における生物多様性保全への取り組み」
- 3) 陶山佳久、阿部晴恵: 第58回日本生態学会大会(2011)
「高山における絶滅危惧植物保全のための全個体ジェノタイピング」
- 4) 阿部晴恵、牧雅之、堀江佐知子、陶山佳久: 第58回日本生態学会大会(2011)
「絶滅危惧植物ゴヨウザンヨウラクの遺伝的多様性の評価」
- 5) 小笠原玄記、阿部晴恵、牧雅之、堀江佐知子、陶山佳久: 第43回種生物学シンポジウム(2011)
「絶滅危惧植物ゴヨウザンヨウラクとその近縁種の集団遺伝学的解析」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

- 1) ユビキタスジェノタイピングと数理モデリングによる絶滅危惧植物保全 (2011年3月10日 札幌コンベンションセンター 参加者110名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 牧雅之、福田達哉、山口賢一、堀江佐知子、横山潤: 第11期プロ・ナトゥーラ・ファンド助成成果報告書、日本自然保護協会、47-56 (2002)
「岩手県五葉山のみ分布するゴヨウザンヨウラクの保全生物学的研究」

- 2) N. TANI, T. TAKAHASHI, T. UJINO-IHARA, H. IHARA, K. YOSHIMURA and Y. TSUMURA: *Annals of Forest Science*, 61, 569–575 (2004)
“Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries.”
- 3) H. ABE, M. MAKI, S. HORIE and Y. SUYAMA: *Conservation Genetics Resources*, 3, 569–571 (2011)
“Isolation and characterization of microsatellite loci for *Menziesia goyozanensis*, an endangered shrub species endemic to Mt. Goyo in northern Japan”
- 4) B. A. LOISELLE, V. L. SORK, J. NASON, and C. GRAHAM: *American Journal of Botany*, 82, 1420–1425 (1995)
“Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae).”
- 5) J. K. PRITCHARD, M. STEPHENS and P. DONNELLY: *Genetics*, 115, 945–959 (2000)
“Inference of population structure using multilocus genotype data.”
- 6) D. FALUSH, M. STEPHENS and J. K. PRITCHARD: *Genetics*, 164, 1567–1587 (2003)
“Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies.”
- 7) S. Piry, G. Luikart and J. M. Cornuet: *Journal of Heredity* 90, 502–503 (1999)
“BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data.”
- 8) Y. Li, L. F. Li, G. Q. Chen and X. J. Ge: *Conservation Genetics*, 8, 1499–1501 (2007)
“Development of ten microsatellite loci for *Gentiana crassicaulis* (Gentianaceae).”
- 9) 西川洋子、宮木雅美、大原雅、高田壯則: *日本本生態学会誌*, 55, 99–104 (2005)
ヒダカソウ (*Callianthemum miyabeanum*) の主要な生育地間のサイズクラス構成の比較と個体群動態からみた生育特性.

(3) 絶滅危惧シダ植物の保全に関する研究

熊本大学大学院自然科学研究科
熊本大学大学院自然科学研究科

高宮 正之
藤井 紀行

<研究協力者>

熊本大学大学院自然科学研究科
京都大学大学院農学研究科
京都大学大学院農学研究科

吉岡 あゆみ
伊津野 彩子
兼子 伸吾

平成21～23年度累計予算額:15,618千円

(うち、平成23年度予算額:5,006千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]近年個体数の減少が著しい日本産シダ植物の中から、倍数性や生殖様式が異なる、シビカナワラビ(環境省レッドリスト絶滅危惧IA類)、フクレギシダ(同IB類)、アオグキイヌワラビ、タイワンアリスンイヌワラビ(同IB類)、キュウシュウイノデ(同IA類)の5種を選定し、新たな生育地の調査、生育地における全個体の位置情報と繁殖状況調査、マイクロサテライトマーカーの開発、全個体サンプリングによるDNA解析を行った。

二倍体有性生殖種シビカナワラビは、分布が限定するにもかかわらず、著しい遺伝的変異があり、4集団は遺伝的に分化していた。二倍体有性生殖種フクレギシダは、集団内に遺伝的変異が全く無く、全ての遺伝子座がホモ接合で一つの対立遺伝子に固定されていること、対立遺伝子は集団間で異なっており、集団間では遺伝的分化があることがわかった。さらに現在の4集団は、それぞれが別々の1孢子由来の前葉体における自配自家受精により形成されたと推察された。四倍体有性生殖種アオグキイヌワラビは、遺伝的に変異は少ないものの28遺伝子型が検出でき、大半の個体が同じ遺伝子型で、集団間の遺伝的分化は認められなかった。四倍体有性生殖種タイワンアリスンイヌワラビは、遺伝的に全て同一で固定異質接合体だった。二倍体無融合生殖種キュウシュウイノデは、遺伝子座全てが同一のホモ接合体で、変異がまったく検出されなかった。シダ植物においてマイクロサテライトマーカーを用いた解析はこれまで世界的に見ても、限られた数の報告がなされているだけである。また、すでに開発されているものも二倍体有性生殖種のみを対象としており、シダ類の多様な生殖様式をカバーするものではない。

本プロジェクトでは、これまでの3年間で二倍体有性生殖種2種、四倍体有性生殖種、二倍体無融合生殖種のシダ植物に対してマイクロサテライトマーカーを開発した。このうちメシダ属以外のマイクロサテライトマーカーは、世界でも初めて開発されたものである。また、イワデンダ属以外のマーカーは同属植物に汎用可能であり、多くの絶滅危惧種を含むメシダ属やカナワラビ属にも応用可能となり、シダ植物の集団遺伝学的研究の発展への大きな貢献となった。

[キーワード]シダ植物、遺伝的変異、マイクロサテライトマーカー、倍数性、生殖様式

1. はじめに

シダ植物は他の陸上植物である種子植物やコケ植物と異なり、 n 世代の配偶体と $2n$ 世代の孢子体が別個に独立して生活できるというユニークな特徴を持つ¹⁾。配偶体世代と孢子体世代が交互に世代交代するのがシダ植物の生活環であるが、配偶体(前葉体)のみで維持されている個体群があることも知られている²⁾。さらに、倍数化由来の種分化や無融合生殖(受精を経ずに配偶体から直接孢子体が生ずる生殖方法)を行っている分類群が多いこともシダ植物の特徴であるが³⁾、これらの特徴は、ここ数万年の人為インパクトによる自然の改変と関連しているという見解もある⁴⁾。従って、人為インパクトが生物の進化に及ぼしてきた影響を解析する上でも、シダ植物はきわめて興味深い分類群である。

日本列島は全体に湿潤であり、南北に長く地形も複雑なため、シダ植物の種類数は750種と多い⁵⁾。たとえば面積が日本に比べ約7割のイギリスとニュージーランドではそれぞれ106種と193種であり⁶⁾、同じ面積に換算しても日本の種多様性は2から3倍に達する。しかしながら他の生物種と同様に、シダ植物は、現在多くの種が絶滅に瀕しており、環境庁のレッドデータブック⁷⁾では172種が、環境省のレッドリストでは186種が絶滅危惧種とされている。林床性のシダ植物は、最近ではシカの食害による急激な減少が各地から報告されている⁸⁾。シダ植物の絶滅危惧種に関する研究は分布調査以外これまでほとんど行われておらず、遺伝学的研究に基づく保全対策も立案されていなかった。

シダ植物は倍数体種が多く、日本のシダ植物のおよそ4割は倍数体種である³⁾。倍数体種のうち、四倍体有性生殖種は、ほとんどが異質倍数体で復二倍体起源とされる⁹⁾。アロザイム多型分析からは遺伝的変異がほとんど無いことが調査されていて、その原因は固定異型接合fixed heterozygosityにあると解釈されている¹⁰⁾。また、シダ植物には無融合生殖種が多く、日本のシダ植物はその15~17%が無融合生殖種である³⁾。無融合生殖種は有性生殖を行わないため、遺伝的変異は生じないと考えられてきた。アロザイム多型分析からは、遺伝的変異が無かった例の報告が多数あるが、多くの遺伝的変異が検出された種もある¹¹⁾。

近年、多くの生物種においてマイクロサテライト遺伝マーカーを用いた遺伝的多様性の調査と保全に関する研究がおこなわれてきた。シダ植物においては遺伝的調査のほとんどのものがアロザイム多型分析を用いたものであり¹²⁾、マイクロサテライトマーカーのような、より詳細な遺伝解析が可能なマーカーを用いた研究例は少ない^{13,14)}。個体数が著しく減少した絶滅危惧植物の保全策を構築する上で、マイクロサテライトマーカーのような、より詳細な遺伝解析が可能なマーカーの開発が、シダ植物においても望まれる状況にある。本プロジェクトは、二倍体と倍数体種、あるいは有性生殖種と無融合生殖種等、多様な特徴を持つ絶滅危惧シダ植物を選定し、マイクロサテライトマーカーの開発と全残存野生個体を対象とした遺伝解析を行い、遺伝学的研究に基づく保全対策を提言する。

2. 研究開発目的

多様な繁殖様式を有するシダ植物の絶滅危惧植物5種(シビカナワラビ、フクレギシダ、アオグキイヌワラビ、タイワンアリサンイヌワラビ、キュウシュウイノデ)を対象にして、1)マイクロサテライト遺伝マーカーの開発、2)新たな生育地の調査、3)生育地における全個体の位置情報、4)繁殖状況調査およびDNA解析のための全個体サンプリング、5)集団の遺伝的特徴を把握することを行い、これらをもとに適切な保全対策を提言することを目的とした。さらに、開発したマイクロサテライトマーカーの、より多くの種に対する有効性の

検証のため、近縁他種における汎用性も検討を行った。

3. 研究開発方法

(1) 対象種の選抜

環境省レッドリスト、各県のレッドデータブック、現在検討中の環境省レッドデータブックの未発表リストをもとに、対象種の絞り込みをおこなった。さらに、染色体数や生殖様式をもとに、二倍体種、倍数体種、無融合生殖種を選定し、以下の5種を最終的な対象種とした。

(2) シビカナワラビ

シビカナワラビ *Arachniodes hekiana* Sa.Kurata (オンダ科) は、国内では鹿児島県のみで生育するシダ植物で、絶滅危惧IA類に指定されている(図(3)-1)。本種は日本の固有種として記載されたが¹⁵⁾、中国南西部にも広く生育することが近年明らかになった¹⁶⁾。二倍体の有性生殖種 ($2n = 82$) であるが¹⁷⁾、これまで遺伝的変異について調査されたことはない。本研究における二倍体有性生殖種の代表種とした。

シビカナワラビについては、鹿児島県内に1ヶ所のみが知られていた自生地がシカの食害のため壊滅状態にあると伝えられていたが、近隣約700mの範囲に3集団約1,000個体が新たに見出された。また本プロジェクト進行中に、平成21年度宮崎県で新しい個体群が発見され¹⁸⁾、分析に加えることができ、最終的に鹿児島県3集団(集団1~3)と宮崎県1集団(集団4)を解析した。

集団内には、芽生えたばかりで孢子嚢を着けない若齢の個体も多数見られた(図(3)-1C)。これら4集団から集団内を網羅的にマークした上で、マイクロサテライトマーカー開発用のサンプルを集団1より採取した。Lian *et al.* のプロトコル^{19), 20)} でマイクロサテライトマーカーを開発し、集団1と集団4は全個体をサンプリングした。集団2と3は栄養繁殖による同一クローンのサンプリングを避けるため、およそ10m離れた個体をサンプリングし、分析した。これに加え、集団2では若齢個体が密集した地点に、1m²の方形区を設け、方形区内の全個体の正確な位置を記録し、サンプリングした。更に、同じカナワラビ属のカナワラビ *Arachniodes rhomboidea* (Wall. ex C.Presl) Ching とヒュウガカナワラビ *A. hiugana* Sa.Kurata を用いて、マイクロサテライトマーカーの汎用性を調べた。

各集団の遺伝的多様性を求めるため、GenAlEx ver. 6.2²¹⁾ を用いて、集団ごとの対立遺伝子数 (N_A)、有効な対立遺伝子数 (N_E)、ヘテロ接合度の観察値 (H_O)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E)、近交係数 (F_{IS}) を求めた。シビカナワラビでは、集団1において、同一の遺伝子型を示したラメット同士が根茎により増殖したかどうかを検証するため、全個体の遺伝子型の分布を個体の分布図に記入した。シビカナワラビでは全個体の遺伝子型をもとに集団ごとの多様性を評価するため、全体と集団ごとに、個体数 (= ラメット数 N) とジェネット数 (G) を求め、遺伝子型多様度 (R) とクローン多様度 Simpson's D を算出した。

それぞれ4集団間の遺伝的な関係を求めるため、解析した全個体の遺伝子型をもとに Population 1.2.30 beta²²⁾ を用いて集団間の遺伝的距離 D_A 、遺伝的同一度 I を算出した。集団間の分化の程度を求めるため FSTAT ver. 2.9.3.2²³⁾ を用いて、集団総当たりの固定指数 F_{ST} を算出し、 F_{ST} の0からのずれの有意性の検定を行った。



図(3)－1. シビカナワラビの生態写真. A、集団1、BとC、集団2、Cは若齢個体が密生する様子、D、集団4、宮崎県で生育が確認された集団.

(2) フクレギシダ

フクレギシダ *Diplazium pin-faense* Ching(イワデンダ科)は、国内では南九州の限られた地域にのみに生育するシダ植物で、絶滅危惧IB類に指定されている(図(3)－2)。

本種は中国南西部に知られ²⁴⁾、日本では熊本県(2集団)と鹿児島県(5集団)の計7集団が知られていたが^{25,26)}、近年では熊本県2集団、鹿児島県2集団が確認されているのみであった。二倍体の有性生殖種(2n = 82)で、アロザイム多型を用いた解析が報告されているが、集団内・集団間に遺伝的変異はこれまで検出されていない²⁷⁾。本研究における二倍体有性生殖種の代表種とした。フクレギシダは、既知の自生地として鹿児島県内2ヶ所、熊本県内2ヶ所、そして最近発見された佐賀県の1ヶ所²⁸⁾を調査した。



図(3)－2. フレギンダの生態写真. A～C、集団1、佐賀県で生育が確認された集団、Bは前葉体から生じたばかりの幼胞子体(矢印)、Cは幼胞子体に付けたタグ(長さ8mm)。D,E集団3、F、G、集団4、F、集団4の2000年の写真、大きな個体が100個体以上生育していた。G、2010年の写真、小さな個体ばかり。

鹿児島県の集団はシカの食害が著しかった。鹿児島県には2集団が知られているが、そのうちの1集団では1個体も発見できず、他方の1集団(集団4)ではシカの食害が激しく、ほぼ壊滅状態であり、生存個体も葉長10cm以下で、羽片の数も2対以下と少ない小さな個体しか見出されなかった。この集団は10年前には多数の大型個体が確認されていたので、近年、急激に個体数を減らしたものと思われる(図(3)-2, F, G)。熊本県と佐賀県の集団は、シカが生育しておらず食害による被害は無かった。熊本県の2集団(集団2と3)は、比較的生育状態は良く、葉長40cmに達し羽片数も5対の個体もあった(図(3)-2, D, E)。上述した3集団(集団2~4)では、葉長5cm以上の全個体をマークし、葉サンプルを採取した。佐賀県の集団(集団1)は、主に幼齢個体から成り立っているが、特に前葉体から初めて展開した胞子体の葉をもつ個体も見られた(図(3)-2, A-C)。前葉体から発生したばかりの幼齢個体を含めた全個体をマークしサンプルを採取した。集団4から採集したサンプルを用いて、Lian *et al.*のプロトコル^{19), 20)}によりマイクロサテライトマーカーを開発した。また、同属で近縁なノコギリシダ *Diplazium wichurae* (Mett.) Dielsを用いてマイクロサテライトマーカーの汎用性を調べた。

各集団の遺伝的多様性を求めるため、GenAlEx ver. 6.2²¹⁾を用いて、集団ごとの対立遺伝子数(N_A)、有効な対立遺伝子数(N_E)、ヘテロ接合度の観察値(H_O)、ヘテロ接合度の期待値(H_E)、近交係数(F_{IS})を求めた。また、集団間の遺伝的な関係を求めるため、解析した全個体の遺伝子型をもとにPopulation 1.2.30 beta²²⁾を用いて集団間の遺伝的距離 D_A 、遺伝的同一度 I を算出した。集団間の分化の程度を求めるためFSTAT ver. 2.9.3.2²³⁾を用いて、集団総当たりの固定指数 F_{ST} を算出し、 F_{ST} の0からのずれの有意性の検定を行った。

(3)アオグキイヌワラビ

アオグキイヌワラビ *Athyrium viridescens* Sa. Kurata (イワデンダ科)本種は、日本の固有種で、九州の一部のみ分布が知られている(図(3)-3)²⁹⁾。



図(3)-3. 2種のシダ植物の生態写真. A、B、アオグキイヌワラビ、A、集団2、B集団4、宮崎県で生育が確認された集団、C台湾アリサンイヌワラビ

環境省レッドリストには未記載だが、分布が知られる福岡県、熊本県、鹿児島県では極端に個体数が少ないことから県単位での絶滅危惧種として、宮崎県では絶滅種として扱われている。

平成22年度からの環境省のRDB調査では、調査対象種となっている。近年では福岡県1集団、熊本県1集団、鹿児島県1集団が確認されているのみである。本種はほとんどのメシダ属*Athyrium*が $x = 40$ を基本数に持つ二倍体 ($2n = 80$) や四倍体 ($2n = 160$) であるのに対し、低四倍体有性生殖種 ($2n = 156$) で、系統的には四倍体種群であるタニイヌワラビ類に近縁である³⁰⁾。四倍体有性生殖種の代表種とした。

アオグキイヌワラビについては、全野生集団にあたる福岡県1集団（集団1）、熊本県（集団2）、鹿児島県（集団3）、宮崎県（集団4）について分析した。宮崎県では絶滅扱いだが、本プロジェクト進行中の平成22年度に再発見されたため¹⁸⁾、分析対象とした（図(3)－2, A, B）。各集団の全個体から遺伝解析用に葉をサンプリングした。集団2から採集したサンプルを用いて、Lian *et al.*のプロトコル^{19), 20)}によりマイクロサテライトマーカーを開発した。また、集団2の1個体から胞子を集め、胞子1粒ずつを分析することで、対立遺伝子の分離を調べた。

マイクロサテライトマーカーの汎用性を確かめるため、同じ四倍体種 ($2n = 160$) で、系統関係が判明しているタニイヌワラビ*Athyrium otophorum* (Miq.) Koidz.を25個体、ツクシイヌワラビ*A. kuratae* Seriz.を16個体、ヤマイヌワラビ*A. vidalii* (Franch. et Sav.) Nakaiを21個体用い、合わせて分析した。

アオグキイヌワラビ及び、タニイヌワラビ、ツクシイヌワラビ、ヤマイヌワラビについて、集団ごとの対立遺伝子数 (N_A)、ヘテロ接合度の観察値 (H_O)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E)、遺伝子座の組み合わせによる遺伝子型 (MLAC: multi locus allele combination) の数 (C)、MLACが異なる率 (PD)、シャノン指数 (H') を求めた。また、アオグキイヌワラビの集団間の遺伝的分化を示すため、固定指数 (F_{ST}) 及び (R_{ST}) を求めた。ただし、四倍体では、 H_E が単純に求められないので、ATetra (Release 1.2)³¹⁾ を用いて、対立遺伝子頻度をシミュレーションにより推定することで算出した。

アオグキイヌワラビでは、次世代での分離を調べるため、胞子体で遺伝子座あたり2種の対立遺伝子が検出された4座を対象に、減数分裂後の半数体世代にあたる胞子の遺伝子型を調べた。胞子は集団2の1個体を用い、胞子採集は通常の方法³²⁾によった。

(4) タイワンアリスンイヌワラビ

タイワンアリスンイヌワラビ *Athyrium arisanense* (Hayata) Tagawa (イワデンダ科) は、台湾及び日本の屋久島のみ分布が知られていおり⁵⁾、絶滅危惧IA類に指定されている。屋久島では、もともと個体数が少なく、点々とししか知られていなかったが、シカの被害がひどく、現在は鹿の影響がほとんど見られない1集団のみに成育が確認されている（図(3)－3C）。

本種も低四倍体有性生殖種 ($2n = 158$) であり、系統的位置は不明である。今回の調査集団と同じ集団の個体をアロザイム多型実験法で比較していたが、多数の多型が検出されている³²⁾

1集団から、葉長5cm以上の全個体をマークし葉サンプルを採取した。マイクロサテライトマーカーは、アオグキイヌワラビで開発したものを用いた。また1個体から胞子を集め、前葉体を培養し分析することで、対立遺伝子の分離を調べた。四倍体有性生殖種の代表種とした。

タイワンアリスンイヌワラビでは、胞子を採集し前葉体を培養して、マイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子における次世代の分離を調べた。胞子体で2対立遺伝子が検出されたマイクロサテライト遺伝子座について、5座を対象に分析した。

前葉体の培養は通常の方法³³⁾によった。孢子播種後、十分に成長した前葉体を1個体ずつ分析した。

(5) キュウシュウイノデ

キュウシュウイノデ *Polystichum grandifrons* C.Chr. (オシダ科) は、日本、台湾、中国に知られ³⁴⁾、日本では熊本県と鹿児島県のみに分布するが³⁵⁾、近年ではほとんど確認されておらず、絶滅危惧IA類に指定されている。



図(3)－4. キュウシュウイノデの生態写真

本種は二倍体の無融合生殖種 ($2n = 82$) であるが¹⁷⁾、これまで遺伝的変異について調査されたことはない。キュウシュウイノデについて、これまで記録がある生育地を調査したが、シカによる食害が著しく、ほとんどの集団が絶滅していた。唯一残された鹿児島県の集団からマイクロサテライトマーカー開発用のサンプルを採集し、全個体サンプリングをおこなった(図(3)－4)。採取した葉を用いてLian *et al.*のプロトコル¹⁹⁾、²⁰⁾によりマイクロサテライトマーカーを開発した。この集団の個体に加え、他の国内集団からの採集品で、国立科学館筑波実験植物園ならびに個人宅で栽培管理されていた個体も解析に供試した。二倍体の無融合生殖種の代表種とした。

また、マイクロサテライトマーカーの変異と汎用性を確かめるため、系統が近く二倍体であることが判明しているコモチイノデ *Polystichum eximium* (Hook. et Arn.) J.Sm.、ナンピイノデ *P. otomasui* Sa.Kurata、サカゲイノデ *P. retrosopaleaceum* (Kodama) Tagawa についても分析した。

4. 結果及び考察

(1) シビカナワラビ

シビカナワラビにおいて開発したマイクロサテライトマーカーは、5遺伝子座(*Ahek021*、*Ahek028*、*Ahek032*、

Ahek146、*Ahek170*)において、PCR増幅により明瞭なピークパターンが得られ、集団内と集団間の対立遺伝子に多型性が認められた。よって、これら5遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いてその後の解析を行った。また今回開発したマーカーは、同属のカナワラビとヒュウガカナワラビにおいても全てPCR増幅により明瞭なピークパターンが得られた。

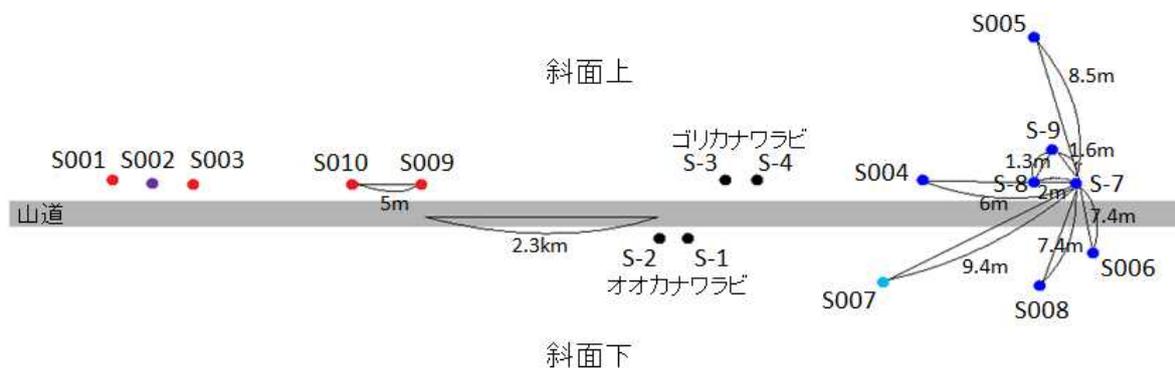
開発した5座のマイクロサテライトマーカーを用いて、集団1(16個体)、集団2(25個体)、集団3(31個体)、集団4(8個体)の計80個体を対象に分析した。解析した5遺伝子座における対立遺伝子数は、5~17個であった。集団ごとの5遺伝子座のヘテロ接合度の期待値(H_E)の平均は、集団1~3では、0.63から0.65であり、比較的遺伝的多様性が高かった(表(3)-1)。また、遺伝子型多様度(R)とクローン多様度Simpson's D を算出した結果、集団1と集団4では遺伝的多様度が低く、集団2と集団3では高いことが判明した。

表(3)-1. マイクロサテライトマーカー5 遺伝子座に基づくシビカナワラビの遺伝的多様性

	N	G	N_A	N_E	H_O	H_E	F_{IS}	R	D
集団1	15	4	3.2	2.78	0.50	0.63	0.15	0.21	60
集団2	23	22	6.4	3.90	0.33	0.63	0.33	0.95	100
集団3	30	28	6.4	3.74	0.33	0.65	0.46	0.93	100
集団4	8	5	1.8	1.42	0.20	0.26	0.31	0.57	79
全体平均	25.3	14.8	4.5	2.96	0.34	0.54	0.31	0.77	98

N : サンプル数、 G : クローン数、 N_A : 集団ごとの対立遺伝子数、 N_E : 有効な対立遺伝子数、 H_O : ヘテロ接合度の観察値、 H_E : ヘテロ接合度の期待値、 F_{IS} : 近交係数、 R : 遺伝子型多様度、 D : クローン多様度 Simpson's D

集団1では、サンプルの大半がヘテロ接合で、かつ5遺伝子座の組み合わせによる遺伝子型が同じであり、同一ジェネットすなわち、同一クローンが優占していると推定された。サンプリング15個体に対し、クローン数は4だった。同一遺伝子型のものは生育距離も近かった(図(3)-5)。本種は匍匐する根茎を持つため、特定のクローンの旺盛な栄養繁殖により、大きなクローンが個体群内で優占する可能性がある。

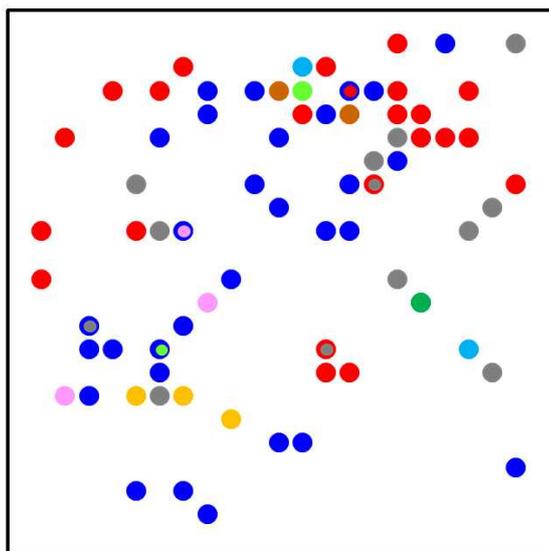


図(3)-5. シビカナワラビ集団1における各個体の位置. 黒以外の同色プロットは、同一のクローン個体であることを示す。

全個体サンプリングをおこなった集団4でも、サンプリング8個体に対し、ジェネットは5と、集団内に占める同一クローンの割合が高かった。集団4では集団1同様、根茎による栄養繁殖が頻繁に行われていると判断される。個体間を離して約10m間隔でサンプリングを行った集団2と3では、それぞれ23個体と30個体のうち22個体と28個体は異なるクローンであり、ほとんどが異なるクローンであった。

集団ごとの対立遺伝子数 5遺伝子座のヘテロ接合度の期待値(H_E)は、集団1~3では、0.63から0.65であり、遺伝的多様性が高かった(表(3)-1)。また、遺伝子型多様度(R)とクローン多様度Simson's D を算出した結果、集団1と集団4では遺伝的多様度が低く、集団2と集団3では比較的高かった。

集団2の方形区からサンプリングした全個体の中のうち、欠損データのある7個体を除外した80個体について、分布とクローンの種類を図示した(図(3)-6)。1m²の方形区中に21種類のジェネットが存在し、その中で複数のラメットを含むジェネットは8種類、独自の遺伝子型を持つ個体(灰色の点)は13個体であった。



図(3)-6. シビカナワラビ集団2における1m×1mの方形区とクローンの分布。独自の遺伝子型を持つ個体(灰色の点)を除き、同じ色の点は同一のクローンであることを示す。

複数のラメットを含むジェネットの中で、青色と赤色の点で表した2種類のジェネットが集団中の個体の大部分を占めていた(図(3)-6)。これら8種類のジェネットに含まれるラメット同士は、根茎により増殖した可能性が高い。一方独自の遺伝子型を持つ13個体は孢子による有性生殖により生じたと考えられるため、集団2では根茎による増殖以外に有性生殖による世代交代が行われていると推測できた。

集団間の遺伝的同一度 I を算出した結果(表(3)-2)、 I の値が0.482で最も遺伝的に離れていたのは集団1と集団4であり、それに次いで集団2と集団4、集団3と集団4だったことから、集団4が地理的に最も離れている関係を反映していた(表(3)-2)。また、 I の値が0.757で最も遺伝的に近かったのは集団2と集団3であった。

表(3)-2. シビカナワラビ集団間の遺伝距離(D_A 上右)と遺伝的類似度(I 下左)

	集団1	集団2	集団3	集団4
集団1 (n=4)	---	0.406	0.458	0.73
集団2 (n=22)	0.666	---	0.278	0.563
集団3 (n=28)	0.632	0.757	---	0.557
集団4 (n=5)	0.482	0.570	0.573	---

集団間の F_{ST} 値を算出した結果、最も集団間分化の程度が大きかったのは集団1と集団4の組み合わせで、 F_{ST} の値が0.411であった(表(3)-3)。それに次いで集団2と集団4、集団3と集団4と続いたことから、 I 同様集団4が最も遠いという地理的な関係を反映していた。 F_{ST} の値が0.096で最も集団間分化の程度が小さかったのは集団1と集団2であった。シビカナワラビの4集団における F_{ST} の値は0.096~0.411であったことから、中程度~非常に大きな遺伝的分化が生じていると考えられる³⁷⁾。また、集団1と集団4の組み合わせを除いた全ての集団の組み合わせが0から有意にずれており($P < 0.05$)、有意な遺伝的分化が起こっていることがわかった。集団1と集団4については、どちらの集団も個体数が5個体以下であったために有意差が検出できなかった。以上の結果より、集団4はその他の3集団とは遺伝的に異なり、集団間分化の程度が大きく、地理的な距離が集団間分化に影響すること、集団1~集団3は地理的に近かったが、中程度以上の遺伝的分化が起こっていることが示唆された。

表(3)-3. シビカナワラビ集団間の遺伝的分化 F_{ST}

	集団1	集団2	集団3	集団4
集団1 (n=4)	---			
集団2 (n=22)	0.096*	---		
集団3 (n=28)	0.143*	0.141*	---	
集団4 (n=5)	0.411*	0.301*	0.270*	---

*は F_{ST} 値が有意 ($p < 0.05$) にゼロより大きいことを示す。

本研究により、シビカナワラビにおいて調査した4集団の中で、集団1と集団4は個体数が少なく遺伝的

多様性が低い傾向が、集団2と集団3では個体数が多く遺伝的多様性が高い傾向が明らかになった。全ての集団において、集団間で全く同一の遺伝子型をもつ個体は無かったため、個体数の少ない集団1と集団4も遺伝子資源を保全するという意味で重要である。集団1と集団4の保全には個体数を増加させるとともに遺伝的多様性を高めることが重要である。そのために、他集団から異なる遺伝子型を持った個体を移植するという方法も考えられるが、近接した集団である集団1、集団2、集団3の間にも中程度以上の集団間の分化が認められた。そのため、集団1と集団4においては他集団から個体を移植するのではなく、それぞれの集団内で有性生殖による世代交代や根茎による増殖が正常に起こるように、シビカナワラビの生育に適した環境を整えることが最も有効であろう。

集団2の小サイズ個体が密集した地点においては、方形区中に独自の遺伝子型を持ち孢子による有性生殖で生じたと考えられる13個体が見られ、根茎による増殖以外に有性生殖による世代交代により遺伝的多様性が保たれていると推測できた。集団2と同様に小サイズ個体が密集する地点が存在する集団3に関しては、個体数が多いことに加え、遺伝的多様性が高く、有性生殖による世代交代と根茎による増殖の両方が起こっていると考えられる。これより、集団2と3は消滅する可能性は少なく、現状を維持することが重要である。

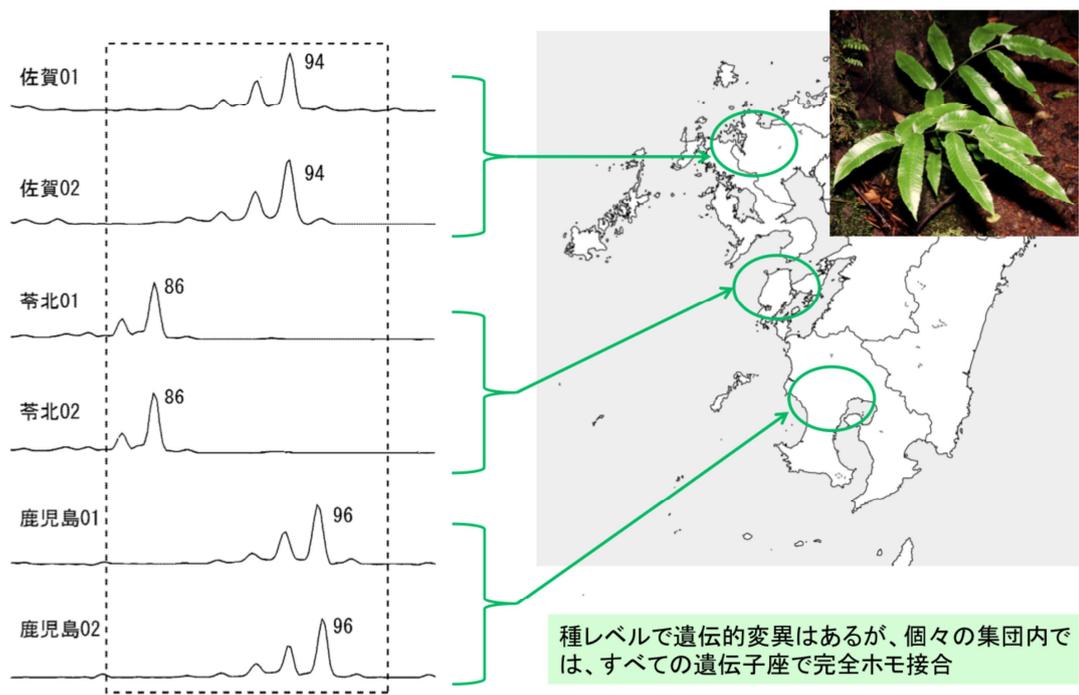
(2) フクレギンダ

フクレギンダにおいて開発したマイクロサテライトマーカーは、6遺伝子座 (*Dpin012*, *Dpin071*, *Dpin074*, *Dpin076*, *Dpin044*, *Dpin025*) において、PCR増幅により明瞭なピークパターンが得られ、集団間の対立遺伝子に多型性が認められた。そのため、これら6遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いてその後の解析を行った。

開発した6座のマイクロサテライトマーカーを用いて、集団1(47個体)、集団2(21個体)、集団3(69個体)、集団4(18個体)の計155個体を対象に分析した。分析の結果、全ての個体の遺伝子型はホモ接合体であり、ヘテロ接合体は全く見られなかった(図(3)-7)。また、集団内の全ての個体の遺伝子型は同一であったが、集団内の遺伝子型は異なっていた。

過去に集団3と集団4の個体をアロザイム実験法により解析した研究では、全く変異が無く、集団間の違いが検出されなかった²⁷⁾が、6遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを組み合わせることにより4集団間の差を検出することができた。そのため、これら6遺伝子座のマイクロサテライトマーカーは、アロザイム実験法で検出できなかった集団間の違いを区別できる点で有効であると言える。

集団間の遺伝距離 D_A と、その逆数である遺伝的同一度 I を算出した結果を表(3)-4に示した。決定した全個体の遺伝子型のデータのうち、欠損データのある個体を除いて計算し、集団1、集団2、集団3、集団4においてそれぞれ46、19、52、15個体を用いた。 D_A は0.500~1.000、 I は0.368~0.607の値をとった。集団1と集団3は全ての遺伝子座で対立遺伝子のピークの値が異なっていた。 I の値が0.368で最も遺伝的に離れていたのは集団1と集団3であり、0.607で最も近かったのは集団3と集団4であったため、地理的な距離を反映していなかった。



図(3)-7. フクレギシダのマイクロサテライト遺伝子座Dpin074におけるピークパターン. ピーク横の数字は対立遺伝子の塩基サイズを示す.

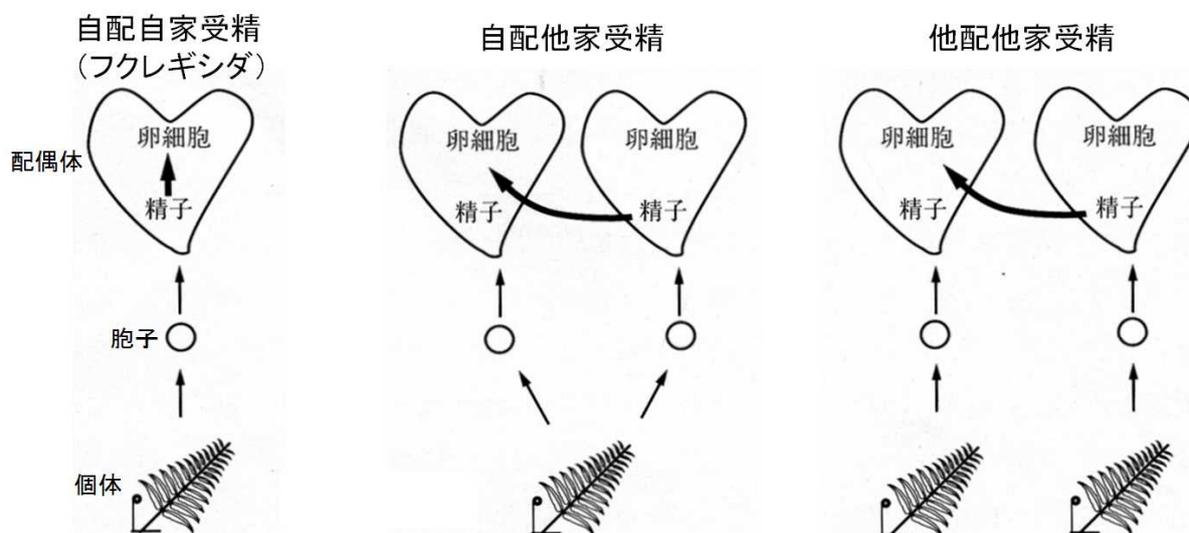
表(3)-4. フクレギシダ集団間の遺伝距離 (D_A 右上)と遺伝的類似度 (I 左下)

	集団1	集団2	集団3	集団4
集団1 (n=46)	---	0.667	1.000	0.833
集団2 (n=19)	0.513	---	0.667	0.833
集団3 (n=52)	0.368	0.513	---	0.500
集団4 (n=15)	0.435	0.435	0.607	---

以上まとめると、6遺伝子座の対立遺伝子数は2~3個であり、種が保有している遺伝的多様性が著しく低いこと、集団内に遺伝的変異が全く無く、すべての遺伝子座がホモ接合で一つの対立遺伝子に固定されていること、対立遺伝子は集団間で異なっており、集団間では遺伝的分化があること、が明らかとなった。特に集団3は渓谷に沿った約600mの大きな集団であるが、集団内に全く遺伝的変異の無い、全てがホモ接合体であることがわかった。フクレギシダの根茎は匍匐せずに立ち上がるため、ほとんど根茎による栄養繁殖をしないこと、解析した全ての集団で、芽生えたばかりの若齢個体が観察できたことから、これら4集団の各個体は有性生殖によって増殖した完全ホモ個体であると考えられる。フクレギシダは、種内には遺伝的変異が確認されたものの比較的大きな集団3でも全個体が遺伝的にまったく同一であることから、いずれの集団においても、複数の個体が元になって集団が成立したとは考えにくい。また、日本ではこれまで地理的に離れた7集団でのみ見つかっており、また現存する集団間では遺伝子型が異なるため、各集団が独立し

て別々に生じている可能性が高い。

同型孢子シダ植物は、減数分裂の結果生じた1個の孢子から前葉体が発達し、同一の前葉体上に造卵器と造精器を形成して受精することが可能となる。その場合、卵と精子はもともと1孢子由来なので、遺伝的にはまったく同一ものとなる。同じ前葉体上で受精が起こる場合を自配自家受精(intragametophytic selfing)と呼び⁴¹⁾同型孢子シダ植物特有の受精様式である。自配自家受精が起こると完全ホモの孢子体(ダブル・ハプロイド)が生じることになる(図(3)-8)。一般に集団内の個体数が少なくなると近交弱勢により絶滅のリスクが高くなることが知られている。ところがダブル・ハプロイドでは、孢子体維持に關与する致死遺伝子のような衰弱に関するものがあるれば、孢子体自身が枯死してしまうため、生存できない。そのため、致死遺伝子などを有しない個体のみが新しい集団を形成して定着でき、同一の前葉体上やホモ個体間での受精が繁殖力や生存力を低下することは無い。



自配自家受精を行う二倍体有性生殖種は珍しく、フクレギンダのように全ての集団内の全個体が遺伝的に同一な例は確認されていない。

図(3)-8. 同形孢子植物の3種類の生殖様式

フクレギンダの場合、例えば広範囲に分布する中国や、日本国内でまだ発見されていないかすでに消滅した別の集団などから孢子が飛来し、一つの孢子から成長した前葉体上で自配自家受精が起こることで孢子体ができ、各集団の起源になった可能性が考えられる。一般的に両性の前葉体では原則として自家受精が避けられている場合が多く³⁸⁾、フクレギンダのような二倍体の有性生殖種において自家自配受精が起こることが実際に確認された例は少ない^{39,40)}。また、これらの例においても、フクレギンダのように全ての集団において集団内の全個体の遺伝子型がホモ接合体で遺伝的に同一であるという例は現在のところ確認されていない。今回の結果は非常に稀なものである可能性がある。

今回調査地とした4集団は、集団内に遺伝的多型が全くなく、それぞれ別個の1孢子を起源として自配自家受精により別々に成立したと考えられる。集団の成立当初から遺伝的多様性が無いので、多くの絶滅危惧種において遺伝的多様性が低下することで生じる近交弱勢やボトルネック効果などの問題は、本種に關

して当てはまらない。ただし、各集団が別々の遺伝子型を有するため、集団間での移植等はせずに集団の維持を行う必要がある。今回調査地とした全4集団は、集団の中には集団2と集団4のように個体数が少なく、消滅のリスクが高い集団も存在するが、4集団全てにおいて集団内で有性生殖による世代交代が行われていることが確認された。そのため、各集団において実生を介した世代交代に適した環境を作ることで、集団の保持と個体数の増加に努めることが重要である。しかし、遺伝的多様性が無いため、病害や突発的な環境(物理的および生物的)の変化に対する適応度は著しく低いというリスクは避けられない。生育地外における遺伝子保全対策も必要と思われる。

(3) アオグキヌワラビ

アオグキヌワラビにおいて開発したマイクロサテライトマーカーは、15遺伝子座(*Avir029*, *Avir133*, *Avir193*, *Avir204*, *Avir211*, *Avir214*, *Avir235*, *Avir238*, *Avir249*, *Avir250*, *Avir255*, *Avir273*, *Avir064*, *Avir066*, *Avir155*)において、PCR増幅により明瞭なピークパターンが得られ、集団間の対立遺伝子に多型性が認められた(表(3)-5)。

開発した15座のマイクロサテライトマーカーの汎用性を同属種で確かめたところ、タニヌワラビでは14遺伝子座、ツクシヌワラビは15遺伝子座、ヤマヌワラビでは14遺伝子座において良好なピークパターンが得られ、遺伝的多様性の評価が可能になった(表(3)-6)。これまで、アオグキヌワラビを対象としたアロザイム分析では変異がまったく得られなかったが、マイクロサテライトマーカーでは多くの変異が検出でき、今回開発したマイクロサテライトマーカーの有効性が高いことがわかった。作成したマイクロサテライトマーカーが系統的に遠いヤマヌワラビにも適用できたことから、メシダ属の多数の種に使用できる有効なマーカーが得られたと考えられる。このうち、*Avir193*と*Avir064*の2座は4種とも変異が無かったので、今回の分析には13座を用いた。

開発した13座のマイクロサテライトマーカーを用いて、集団1(5個体)、集団2(34個体)、集団3(59個体)、集団4(5個体)の計103個体を対象に分析した。マイクロサテライト遺伝子座13座における遺伝子座あたりの対立遺伝子数(A)は、アオグキヌワラビでは1~5で平均2.08、一方、タニヌワラビでは2~9で平均4.38、ツクシヌワラビでは1~5で平均3.00、ヤマヌワラビでは0~8で平均4.67であった(表(3)-7)。アオグキヌワラビは、解析を行った4種の内、サンプルサイズが最も大きいにもかかわらず、1遺伝子座あたりのアレルの数が最も少なかった。 $H_E = 0.21$ と $H_0 = 0.21$ は、他3種から有意に($P < 0.001$ と $P < 0.05$)低く、アオグキヌワラビの遺伝的多様度が低いことが示唆された。

表(3)-5. アオグキイヌワラビにおいて開発したマイクロサテライトマーカー

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat	Accession No.
<i>Avir029</i>	F: CCTCTTGAGCCTAGCGATAC R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₈	AB623256
<i>Avir133</i>	F: GGGAGATTGTACCCAATACTGT R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₇	AB623257
<i>Avir193</i>	F: TACAGTAGTCCTAGCAGCCTCA R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₈	AB623258
<i>Avir204</i>	F: GTGAAGAATCCATAGGCTCAAT R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₇	AB623259
<i>Avir211</i>	F: AAGAGATCGATGCTTTATGCTA R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₁₂	AB623260
<i>Avir214</i>	F: CTGTGTGCCTGCTGTTAGTAAT R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₉	AB623261
<i>Avir235</i>	F: TTCTTGACATAACTTGCAATAAA R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₇	AB623262
<i>Avir238</i>	F: ATTGTCACACTAGAGCACTGGA R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₇	AB623263
<i>Avir249</i>	F: GCTCTCTCGTTTGATCTGGT R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₇	AB623264
<i>Avir250</i>	F: CGTGTGGGTTATAAGCTCTTG R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₇	AB623265
<i>Avir255</i>	F: CGCTACACCCTTAACTTTGAA R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₇	AB623266
<i>Avir273</i>	F: AGCTCTTTTAGCTCGCTCT R: ACACACACACACTCTCTCTCTC	(AC) ₆ (TC) ₁₁	AB623267
<i>Avir064</i>	F: GATCGTATCTACGTTACCAC R: AGAGAGAGAGAGAGAGACACAC	(AG) ₈ (AC) ₅	AB623268
<i>Avir066</i>	F: CAAAAGATAGTCGTTTAGGTCTT R: AGAGAGAGAGAGAGAGACACAC	(AG) ₈ (AC) ₆	AB623269
<i>Avir155</i>	F: TGGGAGAAAGTGAGTAAGTGTA R: AGAGAGAGAGAGAGAGACACAC	(AG) ₈ (AC) ₇	AB623270

表(3)-6. アオグキイヌワラビにおいて開発したマイクロサテライトマーカーの近縁種における汎用性

Locus	タニイヌワラビ (n = 25)		ツクシイヌワラビ (n = 16)		ヤマイヌワラビ (n = 21)	
	Na	H _E	Na	H _E	Na	H _E
<i>Avir029</i>	9	0.73	4	0.52	5	0.58
<i>Avir133</i>	4	0.62	5	0.62	6	0.74
<i>Avir193</i>	1	0	1	0	1	0
<i>Avir204</i>	5	0.6	2	0.49	3	0.52
<i>Avir211</i>	7	0.76	3	0.65	3	0.52
<i>Avir214</i>	3	0.55	3	0.61	2	0.48
<i>Avir235</i>	5	0.69	3	0.66	7	0.78
<i>Avir238</i>	3	0.5	1	0	4	0.54
<i>Avir249</i>	3	0.21	3	0.17	2	0.5
<i>Avir250</i>	3	0.51	3	0.26	6	0.64
<i>Avir255</i>	7	0.71	2	0.49	8	0.77
<i>Avir273</i>	3	0.25	5	0.57	7	0.7
<i>Avir064</i>	1	0	1	0	1	0
<i>Avir066</i>	2	0.56	2	0.49	_*	_*
<i>Avir155</i>	3	0.56	3	0.64	3	0.33
average	3.9	0.48	2.8	0.41	3.8	0.51

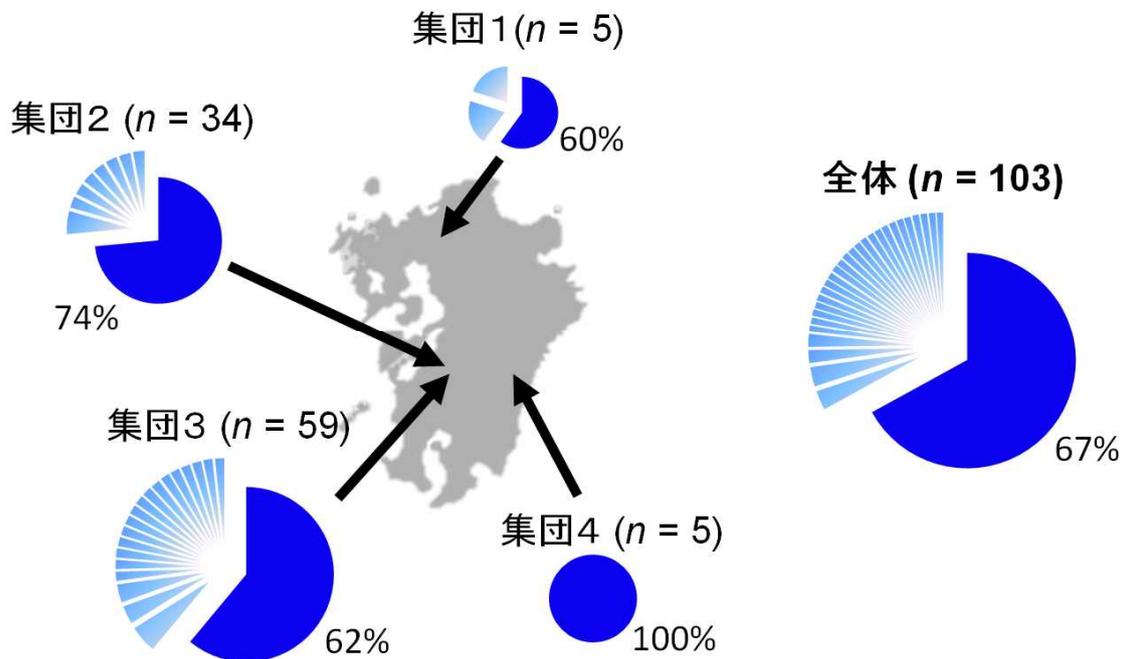
*は PCR 反応によって増幅しなかったことを示す。

表(3)-7. マイクロサテライトマーカー13 遺伝子座に基づくアオグキイヌワラビと近縁種の遺伝的多様性

	N	A	H _E	H _O	C	PD	H'
アオグキイヌワラビ	103	2.08	0.21	0.34	28	0.27	2.44
集団1	5	1.38	0.18	0.35	3	0.60	1.37
集団2	34	2.38	0.2	0.38	9	0.26	1.61
集団3	59	1.85	0.2	0.33	19	0.32	2.49
集団4	5	1.38	0.19	0.38	1	0.20	0
タニイヌワラビ	25	4.38	0.56	0.69	19	0.76	3.94
ツクシイヌワラビ	16	3	0.47	0.74	11	0.69	3.25
ヤマイヌワラビ	21	4.67	0.59	0.76	20	0.95	4.3

個体が保有する対立遺伝子の組み合わせ (MLAC: multi locus allele combination) は、現存するアオグキイヌワラビ全体で28種類 ($C = \text{MLAC数}$)、MLACが異なる割合 ($PD = C/\text{個体数}$) は0.27だった (表(3)-7)。各集団では、集団1が $C = 3$ 、 $PD = 0.6$ 、集団2が $C = 9$ 、 $PD = 0.26$ 、集団3が $C = 19$ 、 $PD = 0.32$ 、集団4が $C = 1$ 、 $PD = 0.2$ だった。集団3が最も変異に富み、集団4は全く変異が無かった。タニイヌワラビでは、 $C = 19$ 、 $PD = 0.76$ 、ツクシイヌワラビでは、 $C = 11$ 、 $PD = 0.69$ 、ヤマイヌワラビでは、 $C = 20$ 、 $PD = 0.95$ であり、アオグキイヌワラビが最も変異が少なかった。アオグキイヌワラビにおいては、同一のMLACが頻繁に見られ、このMLACを遺伝子型番号1とした。遺伝子番号1と分析された個体は、集団1で3個体 (60%)、集団2で25

個体(74%)、集団3で36個体(62%)、集団4で5個体(100%)、全体で69個体(67%)であった。また遺伝子番号1以外で2個体以上確認されたMLACは4種であり、他の23種のMLACは各1個体ずつであった。



図(3)-9.アオグキヌワラビ集団における優占する遺伝子型(遺伝子型1)の個体が各集団に占める割合。Nは分析個体数を示し、円グラフ青色および数値が遺伝子型1を示した個体が占める割合を示す。

集団間の遺伝的分化の程度を示す F_{ST} 及び R_{ST} の値は、集団1と集団4の間以外は低く、遺伝的分化はほぼ生じていないことが示された(表(3)－8)。集団1と集団4で値が大きくなったのは、双方の集団サイズが小さいためと思われる。個体数が多い集団2と集団3の間では、 F_{ST} が0.00、 R_{ST} が0.01であり、特に小さい値を示しているのは、両者が近接した2集団であり、遺伝子流動が他の集団間に比べて頻繁であるためと考えられる。

表(3)－8. アオグキヌワラビ集団間の遺伝的分化(R_{ST} 上右、 F_{ST} 下左)

	集団1	集団2	集団3	集団4
集団1 (n = 5)	---	0.04	0.04	0.11
集団2 (n = 34)	0.017	---	0.01	0.02
集団3 (n = 59)	0.017	0.00	---	0.02
集団4 (n = 5)	0.051	0.01	0.01	---

MLACの遺伝子番号1の胞子体(集団2、No.16)から得た60個の胞子を解析したうちで、27個の胞子において明瞭なフラグメントサイズが検出された(表(3)－9)。検出されたフラグメントサイズは、胞子体で検出されたものに一致したので、胞子一粒から抽出した微量のDNAサンプルでも、信頼に足る解析結果が得ら

れたと考えられる。今回のマイクロサテライトマーカー解析では、2個の対立遺伝子が検出された遺伝子座 (*Avir133*, *Avir214*, *Avir250*, *Avir255*) を分析した。

表(3)－9 アオグキイヌワラビの胞子の分析

	遺伝子座			
	<i>Avir133</i>	<i>Avir214</i>	<i>Avir250</i>	<i>Avir255</i>
親胞子体	158 / 197	94 / 100	231 / 249	157 / 177
胞子 01	158			
胞子 02	158			
胞子 03	158			
胞子 04	197			
胞子 05	158 / 197			
胞子 06		100		
胞子 07		94		
胞子 08		94		
胞子 09		100		
胞子 10		94		
胞子 11		94 / 100		
胞子 12		94 / 100		
胞子 13			249	
胞子 14			231	
胞子 15			249	
胞子 16			249	
胞子 17			231 / 249	
胞子 18			231	
胞子 19				177
胞子 20				157 / 177

本種は四倍体なので、対立遺伝子は実際には4個あり、例えば*Avir133*であれば、158と197の対立遺伝子は158/158/197/197、158/197/197/197、158/158/158/197として存在していることが想定される。胞子が全て2個の対立遺伝子158/197であれば、異質倍数体起源の四倍体で、染色体対合が限定され親の対立遺伝子が分離しない固定異質接合体¹⁰⁾であり、胞子に1個の対立遺伝子のみが検出されるなら、染色体対合がランダムに起こり、親の対立遺伝子が分離したことになる。胞子のジェノタイプングを行った結果、4座 (*Avir133*, *Avir214*, *Avir250*, *Avir255*) すべてにおいて1個の対立遺伝子のみが検出される胞子が認められた(表(3)－9)。これらのことから、アオグキイヌワラビは固定異質接合をしていないことが判明した。有性生殖で世代を更新する際に、胞子の遺伝子型を構成する対立遺伝子の組み合わせは、1つに限られていないことが明らかになった。

今回調査地とした4集団のうち、集団1と集団4は個体数が極端に少なく、消滅のリスクが高い集団である。集団1は公園内の川沿いの集団で、10年前には50個体程度確認できたが、その後台風等による川の氾濫やがけ崩れで、生育地が消滅し個体数が激減した。特定の遺伝子型(MLACの遺伝子番号27と28)もあるので、個体数を増やすよう保全が求められる。集団4は宮崎県で再発見された集団であり、周囲の鹿の食害がひどく、現地での保全は困難である。遺伝子型は最も頻度の高い遺伝子型番号1のみであるので、少なくとも1個体を移植して保護すれば復元は可能となる。集団2と3は個体数も多く、遺伝的変異に富んでい

る。特に集団3には固有な遺伝子型も多い。現状をできるだけ維持できるような保全対策が必要である。

本種の保全に際しては、集団間で遺伝的分化がほとんどないので、28パターンの遺伝子型を維持できるよう、個体識別をもとに管理する必要がある。その中で、MLACの2, 4, 7, 9(以上集団2)と、10, 11, 14(以上集団3)は、アオグキイヌワラビの全ての対立遺伝子を有しているので、現地での保護及び孢子等による保全対策が望まれる。

(4) タイワンアリサンイヌワラビ

タイワンアリサンイヌワラビの解析には、アオグキイヌワラビで開発した15座のマイクロサテライトマーカーを用いた(表(3)－5)。このうち、12遺伝子座はPCRにより良好な増幅結果が得られた。1集団全25個を対象に12遺伝子座で分析した結果、タイワンアリサンイヌワラビは全て同じ遺伝子型で、*Avir029*、*Avir214*、*Avir235*、*Avir238*、*Avir255*、*Avir155*の6遺伝子座では、2個の対立遺伝子がヘテロに固定され、変異は見られなかった(表(3)－10)。個体番号5番から孢子を採集し、前葉体を育て*Avir255*以外の5遺伝子座での分離を分析した結果、前葉体は全て親と同一の遺伝子型であり、本四倍体は分離の起こらない固定ヘテロ接合体だった。

表(3)－10. マイクロサテライト6遺伝子座に基づくタイワンアリサンイヌワラビの全個体の遺伝子型

個体ID	遺伝子座					
	<i>Avir029</i>	<i>Avir214</i>	<i>Avir235</i>	<i>Avir238</i>	<i>Avir255</i>	<i>Avir155</i>
1	159/175	91/98	83/109	172/190	163/177	184/186
2	159/175	91/98	83/109	172/190	163/177	184/186
3	159/175	91/98	83/109	172/190	163/177	184/186
⋮	全てのサンプルで同一の遺伝子型					
25	159/175	91/98	83/109	172/190	163/177	184/186

タイワンアリサンイヌワラビの同じ集団を対象に2002年に行われたアロザイム多型分析²⁷⁾では、21個体が分析され、解析できた7遺伝子座のうち、6遺伝子座がヘテロであり、そのうち1遺伝子座は変異に富み4対立遺伝子が見いだされている。今回の結果は、アロザイム多型分析よりも多型検出能が高いマイクロサテライトマーカーで変異が検出されず、前回の結果と矛盾した。可能性の一つとして、アロザイム多型分析が10年前のサンプリングであり、現地は人為的な影響やシカの食害はないものたびたび川が氾濫し、攪乱が生じ、集団の遺伝的多様性が失われてしまったことがあげられる。今回の調査では、遺伝解析が終わった段階で、葉が枯れており、アロザイム多型分析用の生葉を得ることはできなかったため、過去、10年間の遺伝的多様性の変化を明らかにするためには、同一個体でアロザイムとマイクロサテライト両者を分析する必要が残された。

タイワンアリサンイヌワラビは、四倍体で遺伝的に固定(固定異質接合体)していた。現在の個体からは、孢子での分離が無い場合、どのような受精様式をとっても集団に変異は生じない。同じメシダ属四倍体でも孢子で分離したアオグキイヌワラビとは遺伝的性質が異なっていた。

タイワンアリサンイヌワラビは、現在確実に確認できるのは1集団のみであり、生育域全体の保全が必要

である。また孢子嚢群を着けてない若齢個体が多いので、今後成長するにつれ自己間引き等で個体数が減少する可能性がある。本集団では遺伝的多様性が全く無いため、病害や突発的な環境(物理的および生物的)の変化に対する適応度は著しく低いというリスクは避けられない。生育地外における遺伝子保全対策も必要と思われる。

(5) キュウシュウイノデ

キュウシュウイノデにおいて開発したマイクロサテライトマーカーは、6遺伝子座(*Polk012*、*Polk023*、*Polk024*、*Polk030*、*Polk031*、*Polk093*)において、PCR増幅により明瞭なピークパターンが得られた。これらの6遺伝子座は、他のイノデ属種において多様な対立遺伝子が検出できたので、6遺伝子座のマイクロサテライトマーカー全てを用いて分析を行った。得られた6マーカーは、同属で系統的にも近縁なコモチイノデ、ナンピイノデ、サカゲイノデにおいても適用可能だった。

集団1の55個体と栽培株2集団2個体の計57個体の分析結果を表(3)－11に示した。その結果、6遺伝子座全てがホモ接合体で、変異がまったく検出されなかった。キュウシュウイノデは無融合生殖二倍体であり、孢子で増殖してもクローン増殖となる。少なくとも3集団の全個体は同一のクローンであった。

表(3)－11. マイクロサテライト6遺伝子座に基づくキュウシュウイノデの全個体の遺伝子型

個体ID	遺伝子座					
	<i>Polk012</i>	<i>Polk023</i>	<i>Polk024</i>	<i>Polk030</i>	<i>Polk031</i>	<i>Polk093</i>
1	87/87	121/121	198/198	111/111	154/154	194/194
2	87/87	121/121	198/198	111/111	154/154	194/194
3	87/87	121/121	198/198	111/111	154/154	194/194
⋮	全てのサンプルで同一の遺伝子型					
55	87/87	121/121	198/198	111/111	154/154	194/194
栽培1	87/87	121/121	198/198	111/111	154/154	194/194
栽培2	87/87	121/121	198/198	111/111	154/154	194/194

キュウシュウイノデは、現在、生育が確認できているのは1集団のみであり、生育域全体の保全が必要である。本集団周辺では現在シカの食害は観察されず、個体は旺盛に生育し、大株が多く安定した生育地である。ただし、シカが生育する地域の集団はことごとく絶滅してしまったので、シカの防御を考慮に入れて集団を保持する必要がある。また、本種の栽培は容易なため、植物園等への分散など、生育地外における遺伝子保全対策も必要である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

シダ植物においてマイクロサテライトマーカーを用いた解析はこれまで世界的に見ても、限られた数の報告がなされているだけである。また、すでに開発されているものも二倍体有性生殖種のみを対象としており、

シダ類の多様な生殖様式をカバーするものではない。

本プロジェクトでは、これまでの3年間で二倍体有性生殖種2種(カナワラビ属*Arachniodes*とイワデンダ属*Diplazium*)、四倍体有性生殖種(メシダ属*Athyrium*)、二倍体無融合生殖種(イノデ属*Polystichum*)のシダ植物に対してマイクロサテライトマーカーを開発した。このうちメシダ属以外のマイクロサテライトマーカーは、世界でも初めて開発されたものである。また、イワデンダ属以外のマーカーは同属植物に汎用可能であり、多くの絶滅危惧種を含むメシダ属やカナワラビ属にも応用可能となり、シダ植物の集団遺伝学的研究の発展への大きな貢献となった。

二倍体有性生殖種シビカナワラビは、分布が限定するにもかかわらず、著しい遺伝的変異が有り、現存する4集団は遺伝的に分化していることが明らかとなった。二倍体有性生殖種フクレギシダは、4集団において全個体が遺伝的に全く同じ完全ホモ個体であること、集団間では遺伝的に異なることが分かり、シダ植物特有の自配自家受精による集団形成の重要性が初めて明らかとなった。四倍体有性生殖種アオグキヌワラビは、遺伝的に変異は少ないものの28遺伝子型が検出できた。供試した普通種であるメシダ属3種は、高い遺伝的変異を示した。一方、同じく四倍体有性生殖種タイワンアリスンヌワラビは、遺伝的に全て同一で固定異質接合体だった。

四倍体種に関しては、通常遺伝的変異は少ないものと、これまで考えられてきたが、マイクロサテライトマーカーを用いた解析によって、多くの遺伝的変異が生じていることが明らかとなった。また、アオグキヌワラビは同質倍数体起源の、タイワンアリスンヌワラビは異質倍数体起源の可能性があり、シダ植物に多く見られる四倍体種の保持する遺伝的多様性の実態について、新たな知見をもたらした。二倍体無融合生殖種キュウシュウイノデは、遺伝子座全てが同一のホモ接合体で、変異がまったく検出されず、全て同一クローンであった。

全個体ジェノタイピングを行うことで、保全生態学ではこれまで取り上げられることの少なかったシダ植物に関する新たな情報が得られた。

(2)環境政策への貢献

今回調査した5種は、全て平成22年度からの環境省のRDB調査対象種である。今回得られた結果から、個体数と遺伝的多様性の動態についてモニタリングが可能となり、より正確な保全管理が可能となった。高宮は環境省の「平成24年度第3次絶滅のおそれのある野生生物の選定・評価検討会」「植物I分科会」検討委員であるため、委員会でも今回の成果を提示し、次期環境省レッドデータブックの編集に貢献する予定である。

今回の調査対象種は、福岡県・佐賀県・熊本県・宮崎県・鹿児島県でも県のレッドデータ(リスト)に含まれており、各県の自然保護課に情報提供し、保全対策に協力する予定である。また、保全対策を含め、成果の広報・普及に努める予定である。

6. 国際共同研究等の状況

現在、特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) A. IZUNO, M. TAKAMIYA, S. KANEKO and Y. ISAGI: American Journal of Botany, 98, e339-341 (2011)
 “Microsatellite loci in an endangered fern species *Athyrium viridescentipes* (Woodsiaceae) and cross-species amplification “
- 2) A. IZUNO, M. TAKAMIYA, S. KANEKO and Y. ISAGI: Journal of Plant Research, (2012)
 “Genetic variation and structure of the endangered Lady Fern *Athyrium viridescentipes* based on ubiquitous genotyping.” (in press)
- 3) 井鷲裕司、兼子伸吾、水谷未耶、加藤慶子、伊津野彩子、高宮正之、志賀隆、増本育子、大竹邦明:DNA多型 (2012)
 「全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全」(印刷中)

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 橋本美幸、寺田(西田)泰子、藤井紀行、高宮正之: 第73回日本植物学会大会 (2009)
 「ホソバイヌワラビ(広義)の種内分類群に関する研究」
- 2) 吉岡あゆみ、兼子伸吾、井鷲裕司、藤井紀行、高宮正之: 第74回日本植物学会大会 (2010)
 「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧シダ植物の遺伝的特徴の解明」
- 3) 高宮正之: 第58回日本生態学会大会 (2011)
 「様々な繁殖様式をもつシダ植物におけるユビキタスジェノタイピング」
- 4) 伊津野彩子、高宮正之、兼子伸吾、井鷲裕司: 第58回日本生態学会大会 (2011)
 「有性生殖をする絶滅危惧植物アオグキヌワラビの遺伝構造—複数生育地にまたがる遺伝的固定」
- 5) 吉岡あゆみ、伊津野彩子、兼子伸吾、井鷲裕司、藤井紀行、高宮正之: 第75回日本植物学会大会 (2011)
 「マイクロサテライトマーカーを用いた絶滅危惧シダ植物の解析」
- 6) A. IZUNO, M TAKAMIYA, S. KANEKO, Y. ISAGI, 18th International Botanical Congress, Melbourne, Australia, (2011)
 “Conservation of a critically endangered tetraploid fern species *Athyrium viridescentipes* based on the ubiquitous genotyping approach.”
- 7) 井鷲裕司、兼子伸吾、水谷未耶、加藤慶子、高宮正之、伊津野彩子、志賀隆、増本育子、大竹邦明: 第20回日本DNA多型学会 (2011)
 「全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

- 1) ユビキタスジェノタイピングと数理モデリングによる絶滅危惧植物保全 (2011年3月10日 札幌コンベンションセンター参加者110名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

- 1) 第13回 日本DNA多型学会優秀研究賞 (全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全, 井鷲裕司, 兼子伸吾, 水谷未耶, 加藤慶子, 高宮正之, 伊津野彩子, 志賀隆, 増本育子, 大竹邦明)

8. 引用文献

- 1) 岩槻邦男: 多様性からみた生物学、裳華房、(2002)
- 2) 岩槻邦男、加藤雅啓編: 多様性の植物学1、pp.109-147、東京大学出版会、(2000)
「植物地理と種分化—同形孢子シダ植物(益山樹生)」
- 3) 高宮正之: 日本シダ学会会報、70, 1-23, (1997)
「日本のシダ植物染色体研究の現状と問題点」
- 4) 岩槻邦男: シダ植物の自然史、東京大学出版会、(1996)
- 5) 岩槻邦男: 日本の野生植物 シダ、平凡社、(1992)
- 6) R. C. MORAN: A Natural History of Ferns. Tumber Press. (2004)
- 7) 環境庁編: 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 植物I(維管束植物)、自然環境研究センター、(2000)
- 8) 南谷忠志: 分類、5, 67-74 (2005)
「南九州の新分類群の植物とその保全」
- 9) T. A. RANKER and C. H. HAUFLER (eds): Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes, pp. 303-331, Cambridge University Press, Cambridge. (2008)
“Species and speciation. (C. H. HAUFLER)”
- 10) J. M. IDE, A. C. JERMY and M. P. ALISON (eds): Fern Horticulture: Past, Present and Future perspectives, pp. 167-181, Intercept, Andover. (1992)
“Origins of genetic variability in allopolyploid ferns. (C. R. WERTH)”
- 11) M. TAKAMIYA, N. OHTA, Y. YATABE and N. MURAKAMI: International Journal of Plant Sciences, 162, 625-636 (2001)
“Cytological, morphological, genetic, and molecular phylogenetic studies on intraspecific

- differentiations within *Diplazium doederleinii* (Woodsiaceae: Pteridophyta).”
- 12) T. A. RANKER and C. H. HAUFLER (eds): *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*, pp. 107-133, Cambridge University Press, Cambridge (2008)
“Population genetics. (T. A. Ranker and J. M. O. GEIGER)”
 - 13) A. KUMAR and M. A. REVILLA MA (eds): *Working with Ferns: Issues and Applications*, pp. 207-220, Springer, New York (2011)
“Microsatellites: a powerful genetic marker for fern research. (A. JIMENEZ)”
 - 14) H. FERNANDEZ, A. KUMAR and M. A. REVILLA (eds): *Working with Ferns: Issues and Applications*, pp. 221-234, Springer, New York. (2011)
“Diversity in natural fern populations: dominant markers as genetic tools. (E. L. PEREDO, M. A. REVILLA and H. FERNANDEZ)”
 - 15) 倉田悟: 北陸の植物、13, 98-101 (1965)
「シダ類ノート。」
 - 16) 中国科学院昆明植物研究所: 雲南植物誌第21卷、科学出版社 (2004)
 - 17) M. TAKAMIYA: *Index to Chromosomes of Japanese Pteridophyta (1910-1996)*. Japan Pteridological Society. (1996)
 - 18) 宮崎県版レッドデータブック作成検討委員会: 宮崎の保護上重要な野生生物: 改訂・宮崎県版レッドデータブック 2010年度版、宮崎県環境科学協会 (2011)
 - 19) C. LIAN and T. HOGETSU: *Molecular Ecology Notes*, 2, 212- 213 (2002)
“Development of microsatellite markers in black locust (*Robinia pseudoacacia*) using a dual-suppression-PCR technique.”
 - 20) C. LIAN, M. A. WADUD, Q. GENG, K. SHIMATANI and T. HOGETSU: *Journal of Plant Research*, 119, 415–417 (2006)
“An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers.”
 - 21) R. PEAKALL and P. E. SMOUSE: *Molecular Ecology* 6: 288-295 (2006)
“GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.”
 - 22) O. LANGELLA: <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/> (2007)
“Population 1.2.30: population genetic software.”
 - 23) J. GOUDET: *Journal of Heredity*, 86, 485-486 (1995)
“Fstat version 1.2: A computer program to calculate Fstatistics.”
 - 24) 中国科学院中国植物誌編集委員会: 中国植物誌第3卷第2分冊、科学出版社 (1999)
 - 25) 倉田悟、中池敏之: 日本のシダ植物図鑑 第3巻、東京大学出版会 (1983)
 - 26) 日置正臣: 日本シダの会会報、2, 18-19 (1974)
「南九州のシダ植物研究資料IX」
 - 27) M TAKAMIYA and N. OHTA: *Journal of Plant Research*, 114, 443-457 (2001)
“Cytological and reproductive studies of Japanese *Diplazium* (Woodsiaceae; Pteridophyta). III. The cytological complexity of species groups with simply pinnate to bipinnatifid leaves.”
 - 28) 佐賀県希少野生動植物調査検討会 植物分科会: レッドデータブックさが2010: 佐賀県の絶滅の

- おそれのある野生生物. 植物編、佐賀県くらし環境本部有明海再生・自然環境課 (2011)
- 29) 倉田悟: 北陸の植物、13, 73-163 (1965)
「シダ類ノート(35).」
- 30) B. ADJIE, M. TAKAMIYA, M OHTA, T. A. OHSAWA and Y. WATANO: Acta Phytotaxonomica et Geobotanica, 59, 79-95 (2008).
“Molecular phylogeny of the lady fern genus *Athyrium* in Japan. Based on chloroplast *rbcL* and *trnL-trnF* sequences.”
- 31) V. K. PUYVELDE, V. A. Geert and L. TRIEST: Molecular Ecology Resources, 10, 331-334. (2010)
“ATetra, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: comparison with Tetra and Tetrasat.”
- 32) Y. Terada and M. TAKAMIYA: Acta Phytotaxonomica et Geobotanica, 57, 95-106 (2006)
“Cytological and Genetic Study of Two Putative Hybrids and Their Parents of *Athyrium* (Woodsiaceae; Pteridophyta) in Yakushima Island, Southwestern Japan.”
- 33) 相馬研吾、安田啓祐: 植物の採集と観察、講談社 (1986)
- 34) 中国科学院中国植物誌編集委員会: 中国植物誌第3巻第2分冊、科学出版社 (1999)
- 35) 倉田悟、中池敏之: 日本のシダ植物図鑑 第1巻、東京大学出版会 (1979)
- 36) M. KANG, H. HUANG, M. JIANG and A. J. LOWE: Diversity and Distributions, 14, 799-807 (2008)
“Understanding population structure and historical demography in a conservation context: population genetics of an endangered fern.”
- 37) D. L. HARTL (ed): A Primer of Population Genetics 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland (1999)
- 38) R. M. LLOYD: Annals of the Missouri Botanical Garden, 61, 318-331 (1974)
“Reproductive biology and evolution in the Pteridophyta.”
- 39) K. M. FLINN: American Journal of Botany, 93, 1289-1294 (2006)
“Reproductive biology of three fern species may contribute to differential colonization success in post-agricultural forests.”
- 40) M.S. LOTT, J. C. VOLIN, R. W. PEMBERTON and D. F. AUSTIN: American Journal of Botany, 90, 1144-1152 (2003)
“The reproductive biology of the invasive ferns *Lygodium microphyllum* and *L. Japonicum* (Schizaeaceae) : implications for invasive potential.”

(4) 全個体ジェノタイピングおよび位置情報に基づく絶滅危惧植物個体群の持続可能性評価に関する研究

北海道大学大学院地球環境科学研究院

佐竹暁子

<研究協力者>

高知大学大学院総合人間自然科学研究科

加藤元海

平成21～23年度累計予算額 9,069千円

(平成23年度予算額 2,196千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 絶滅危惧種の個体レベルの生育場所と遺伝子型の情報を基にして、絶滅危惧植物個体群の持続可能性を予測する数理モデルの開発を行なった。数理モデルでは、実生、非繁殖成体、繁殖成体の3つの齢構成を考慮し、親個体の遺伝子型情報に基づく血縁度に応じた近交弱勢を仮定し、個体群存続可能性解析(PVA)を行なった。近交弱勢の影響に関しては、血縁度と近交弱勢の関係に複数の関数を仮定して解析を行なった。本プロジェクトにおいて開発した数理モデルは、花粉親になる確率と種子の定着確率を距離の関数として表現可能なものであり、ジェノタイピング情報をもとにした個体群であれば、様々なタイプの絶滅危惧種に応用できるものとした。数理モデルの解析から、一般的な傾向として、近交弱勢が強いほど100年後の絶滅確率が高まり、また絶滅までの時間が短いことが明らかになった。本年度の解析で想定した絶滅危惧種では、全個体数が100個体と少ないことから、時間とともに交雑を行なう個体間の血縁度が高くなり、それとともに集団全体におけるヘテロ接合度も時間とともに低下することが明らかになった。花粉が近距離にしか散布されない場合には、ヘテロ接合体の割合が低下し、絶滅確率が上昇することが示された。一方で、長距離花粉散布が行なわれると、絶滅確率は減少することが明らかになった。このことは、わずかな頻度でも長距離花粉散布が行なわれ、離れた個体群間で遺伝子流動があることが、絶滅確率の減少および生物多様性喪失の阻止に有効に働くことを意味している。

本プロジェクトで取得されたシモツケコウホネに関する遺伝/位置情報データを用いて、将来の変化を予測した結果、最も個体数の多い個体群が消失すると100年後に集団が生存する確率が6割も低下することが明らかになった。また、7個体しか残存していない個体群も、集団の生存確率の維持に貢献していることがわかった。しかし、対象種の生活史パラメーター値に結果は大きく依存するため、遺伝情報に加えて生存率や繁殖率などの基本的な生活史パラメーターに関する情報の取得が急がれる。

[キーワード] 血縁度、持続可能性、ヘテロ接合度、近交弱勢、絶滅確率

1. はじめに

これまで、絶滅の可能性のある動物や植物を対象に、個体群の絶滅確率や将来の個体群サイズを推定するために、個体群存続可能性解析が行われてきた。従来用いられてきた個体群存続性解析は、個

体の遺伝子型情報および個体が分布する位置情報を取り入れていないため、予測性に限界があった。しかし、本プロジェクトにおいて、対象種の全個体ジェノタイピングを行うことで、これまで欠けていた遺伝子型や位置情報に関わるデータを入手することが可能になる。絶滅危惧種には生活史、遺伝構造、履歴等に関して様々なタイプが認められる。従って、そのような多様な絶滅危惧種に対して適切な保全策を構築するためには、全個体についての遺伝子型・位置情報を総合的に活用することで、新しい個体群存続性解析の方法を確立することが必要である。

2. 研究目的

本研究では、個体レベルの詳細な位置情報と遺伝子型情報を活用することで、詳細な交配様式を表現した数理モデルを開発し、生物多様性の持続可能性や脆弱性を理論的に検討することを目的としている。まず、実生、成熟非繁殖、成熟繁殖、という3つの状態からなるステージ構造モデルをベースにして、繁殖個体から生産される種子の生存率が親個体の血縁度によって決定されると仮定した数理モデルを開発する。血縁度の推定には、ジェノタイピング情報を活用し、血縁度と種子の生存率の関係に関しては、線形減少関数、指数的減少関数、そして階段型減少関数の3通りの関数を比較する。

次に、当モデルのパフォーマンスを調べるために、本プロジェクトで得られた、絶滅危惧種全個体の位置情報と遺伝子型情報を基にして、持続可能性解析を行い、将来の絶滅確率、将来残存する個体数、血縁度の推移を予測する。さらに、実生、成熟非繁殖、成熟繁殖、という3つの状態からなるステージ構造モデルに、花粉散布と種子散布の空間距離依存性を導入することでモデルの改良を行う。

最後に、当プロジェクトで得られたジェノタイピングデータを活用し、複数種の絶滅危惧種の個体群存続性解析を行い、適切な保全管理に関する提言を行う。

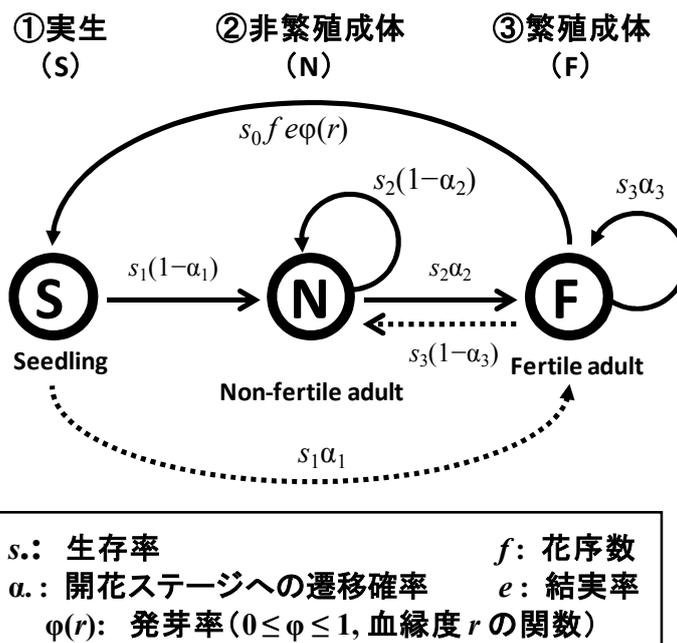
3. 研究方法

(1) ステージ構造モデルの開発

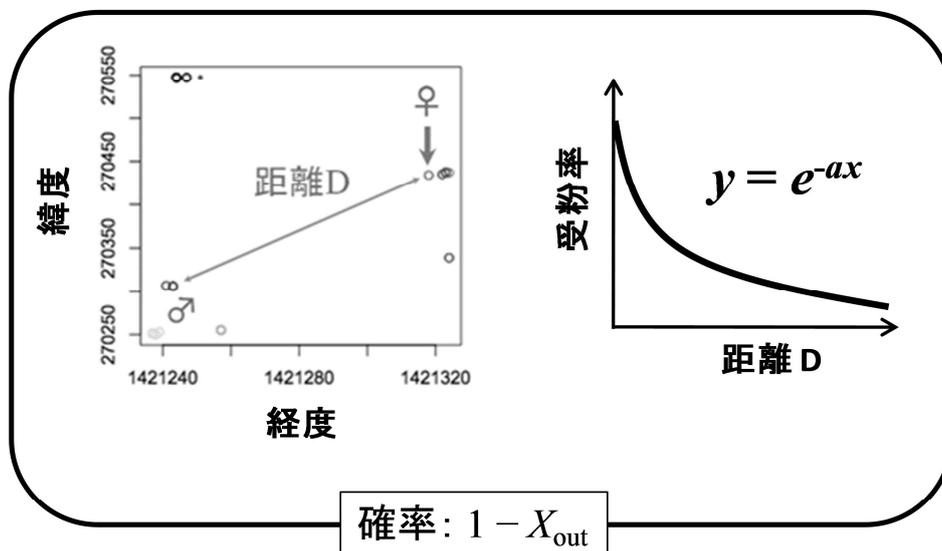
数理モデルでは、3つの齢構成(実生seedling stage、非繁殖成体non-fertile adult stage、繁殖成体fertile adult stage)を考慮し、それぞれのステージ間で図(4)–1に示すような遷移が生じると仮定した。

ここで、 s_1 、 s_2 、 s_3 はそれぞれ実生、成熟・非開花、成熟・開花状態の生存率を意味している。また、 α_1 、 α_2 、 α_3 は実生から成熟・開花状態への一年あたりの遷移率、成熟・非開花状態から成熟・開花状態への遷移率、そして成熟・開花状態が翌年もその状態を維持する確率に対応している。

繁殖個体どうしの交雑の際には花粉と胚珠を提供する親個体の遺伝子型情報を基に血縁度を求め、血縁度に応じた近交弱勢を仮定して個体群存続可能性解析を行なった。血縁度と近交弱勢の関係は1)線形減少関数、2)指数的減少関数、3)階段型減少関数の3つを仮定して解析を行なった(図(4)–2)。



図(4)－1. 数理モデル化した齢構成. S: 実生 (Seedling stage), N: 非繁殖成体 (Non-fertile adult stage), F: 繁殖成体 (Fertile adult).



確率: X_{out}

距離に無関係な(分集団外との)交配

図(4)－2. メタポピュレーションモデルの概要. 確率 $1 - X_{out}$ で胚珠(雌株)と花粉親(雄株)との距離に応じた受粉率が起こり、確率 X_{out} で距離に関係ない交配が行なわれる。確率 X_{out} が大きいほど、分集団間の交配が高頻度となる。

2 個体間の血縁度は、Lynch and Ritland¹⁾ を参考にして、以下のように遺伝子情報から推定を行なった。血縁度を r とすると、

$$r = \frac{1}{W} \sum^{\text{loci}} w \hat{r}$$

で表される。ただし、 \sum^{loci} は全ての遺伝子座に関して足し合わせることを表す。ここで、

$$W = \sum^{\text{loci}} w,$$

$$w = \frac{(1 + \delta_{ij})(p_i + p_j) - 4p_i p_j}{2p_i p_j},$$

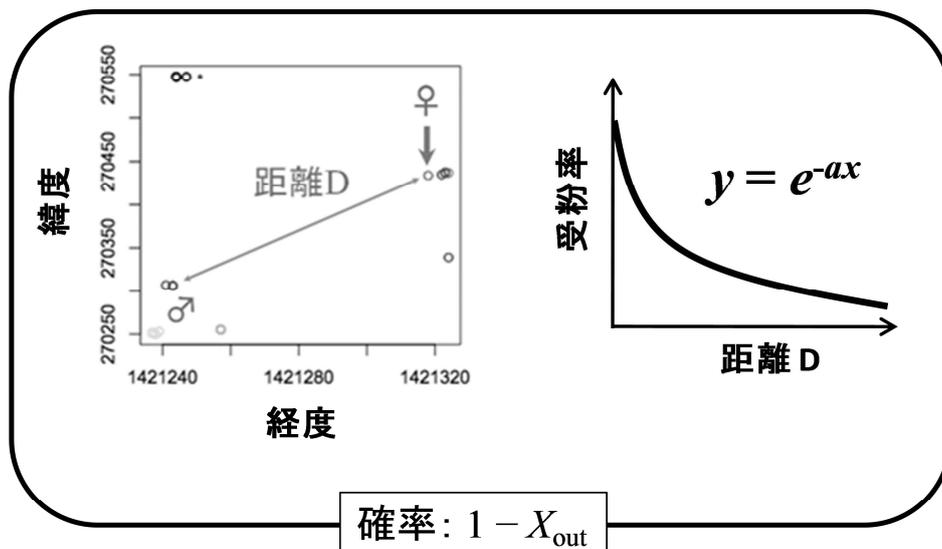
$$\hat{r} = \frac{p_i(\delta_{jk} + \delta_{jl}) + p_j(\delta_{ik} + \delta_{il}) - 4p_i p_j}{(1 + \delta_{ij})(p_i + p_j) - 4p_i p_j}$$

ただし、 p_i はある遺伝子座における遺伝子型 i の頻度を表し (j, k, l についても同様)、 δ_{ij} はクロネッカーのデルタ ($i = j$ の場合は $\delta_{ij} = 1$ 、 $i \neq j$ の場合は $\delta_{ij} = 0$) を表す。

(2) 空間動態をとりいれる: 花粉散布と種子散布

(1) において説明したモデルは、花粉散布や種子散布が距離に依存せず行われると仮定していたが、それに空間動態を考慮して、花粉親になる確率と種子の定着確率を距離の関数として表現可能なモデルを開発した。数キロメートルのスケールといった比較的短い距離の花粉散布については、距離とともに散布率が指数関数的に減少すると考えた。また、強風の際には数十キロメートルのスケールという長距離にわたり分散されることが報告されている。そのため今年度は、確率 $1 - X_{\text{out}}$ で短距離の分散が起こり、確率 X_{out} で距離に依存しない分散が生じると仮定したメタポピュレーションモデルへと改良を行なった(図(4)-3)。種子散布については、距離とともに分散率が指数関数的に減少すると仮定し、コンピューターシミュレーションを行なった。

植物の生活史が、絶滅確率にどのように影響するかをコンピューターシミュレーションによって検討した。検討した生活史は、1) 発芽から1年以内に成熟し、開花後には枯死する1年草; 成熟まで1年以上必要で、開花後も枯死せず繰り返し繁殖する多回繁殖型多年草のうち、2) 毎年開花を行なう多年草毎年開花と、3) 毎年開花しない多年草隔年開花、の3つの生活史を対象に絶滅率を比較した。



確率: X_{out} 距離に無関係な(分集団外との)交配

図(4) - 3. メタポピュレーションモデルの概要. 確率 $1 - X_{out}$ で胚珠(雌株)と花粉親(雄株)との距離に応じた受粉率が起こり、確率 X_{out} で距離に関係ない交配が行なわれる。確率 X_{out} が大きいほど、分集団間の交配が高頻度となる。

(3) 小笠原諸島に生息する絶滅危惧種のムニンフトモモの個体群持続存続性解析

この3ステージモデルを用いてまず、残存個体数が100程度の小笠原諸島に生息する絶滅危惧種のムニンフトモモを対象に、持続存続性解析を行った。生存率、各状態間の遷移率、花序数などのパラメーター値については、Kirchner et al. ²⁾を参考にした。

花粉の受粉に関しては、受粉率は2個体間の距離に依存するとした。つまり、受粉率は距離の減少関数として、具体的には次式で与えた。

$$D_p = e^{-ax}$$

ただし、 D_p は受粉率($0 \leq D_p \leq 1$)、 a は受粉パラメータ、 x は2個体間の距離(m)を表す。シミュレーションでは、受粉率が0.5となる半飽和距離を50 mとした(つまり、 $a = \log_e 0.5/50$ として与えられる)。

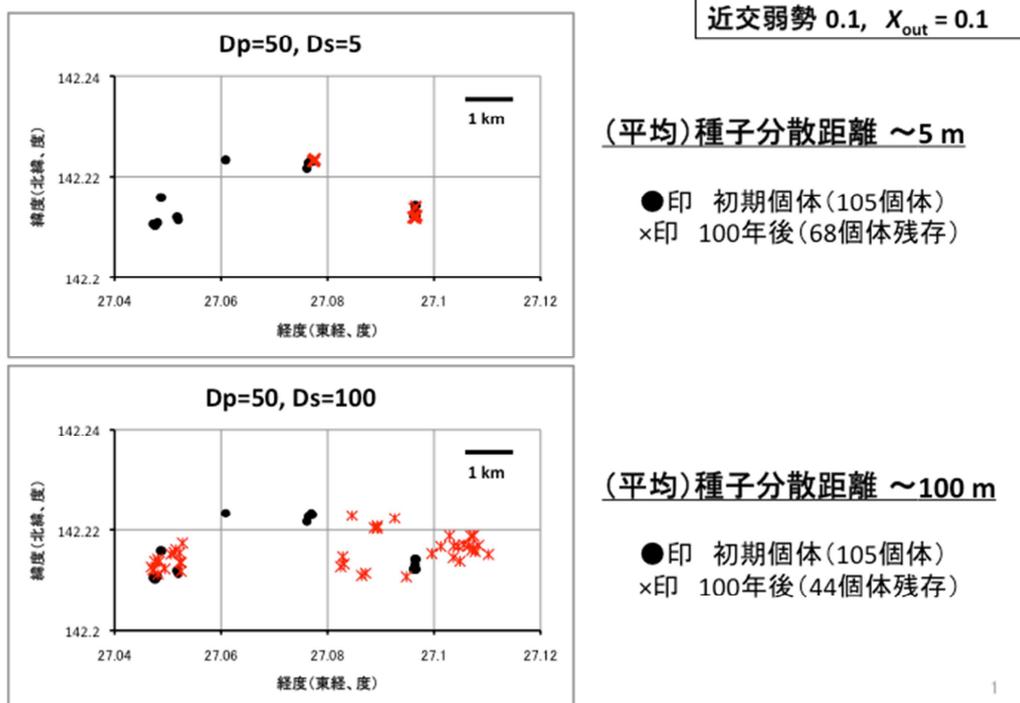
□ 種子の分散に関しては、分散距離 x への分散確率は距離の減少関数とした。具体的には次式で与えた。

$$D_s = e^{-bx}$$

ただし、 D_s は分散確率($0 \leq D_s \leq 1$)、 b は分散パラメーター、 x は分散距離(m)を表す。シミュレーションでは、分散確率が0.5となる半飽和距離を5 mとした(つまり、 $b = \log_e 0.5/5$ として与えられる、具体例を図(4)

□ - 4に示す)。

種子分散距離による空間的分散の一例



図(4)－4. 種子分散距離による空間分布パターンの変化. 種子分散距離が5mと100mの場合を比較した. D_p は受粉率、 D_s は分散確率を示す.

(4) 絶滅危惧種ヤチシャジンの個体群持続存続性解析

ヤチシャジン *Adenophora palustris* (キキョウ科)は、湿原に生育する多年生草本で、絶滅危惧IA類に指定されており、全1,009個体が6つの分集団を構成している。本プロジェクトで取得されたヤチシャジンに関する遺伝子型/位置情報データを用いて、現在の個体群の遺伝的多様性、個体数、絶滅可能性がどのように変化するかを予測した。特に、複数の分集団のうち、どれが個体群存続性維持に大きな貢献をしているかを検討することは、個体群管理の上で大変重要な課題である。そこで、一つずつ分集団を仮想的に消滅させた際、個体群存続性がどのように変化するかコンピューターシミュレーションによって検討した。なお近交弱勢は強く、分集団間での交流は頻繁に生じる、そして花粉分散の半減距離は50mであると仮定した上で、解析を進めた。

(5) 絶滅危惧種シモツケコウホネの個体群持続存続性解析

シモツケコウホネ *Nuphar submersa* (スイレン科)は、農業用水路等に生育する栃木県固有の絶滅危惧水生植物である。環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類に指定されており、全277個体が3つの分集団をなしている。(4)のヤチシャジンと同様に、本プロジェクトで取得されたシモツケコウホネに関する遺伝子型/位置情報データを用いて、個体群持続存続性解析を行った。

4. 結果及び考察

(1) 小笠原諸島に生育する絶滅危惧種のムニンフトモモの持続存続性解析

数理モデルの解析から、一般的な傾向として、近交弱勢が強いほど100年後の絶滅確率が高まり、また絶滅までの時間が短縮されることが明らかになった(図(4)–(5))。

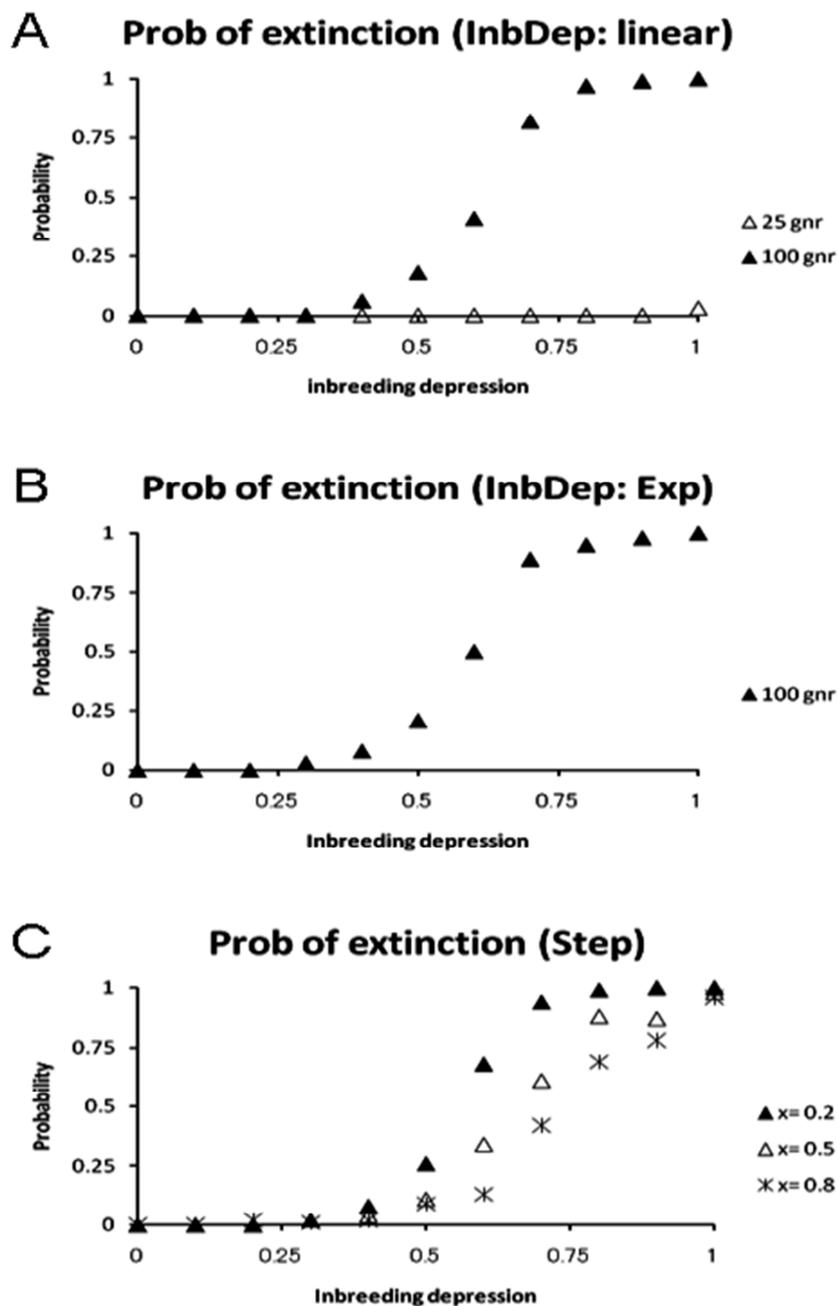


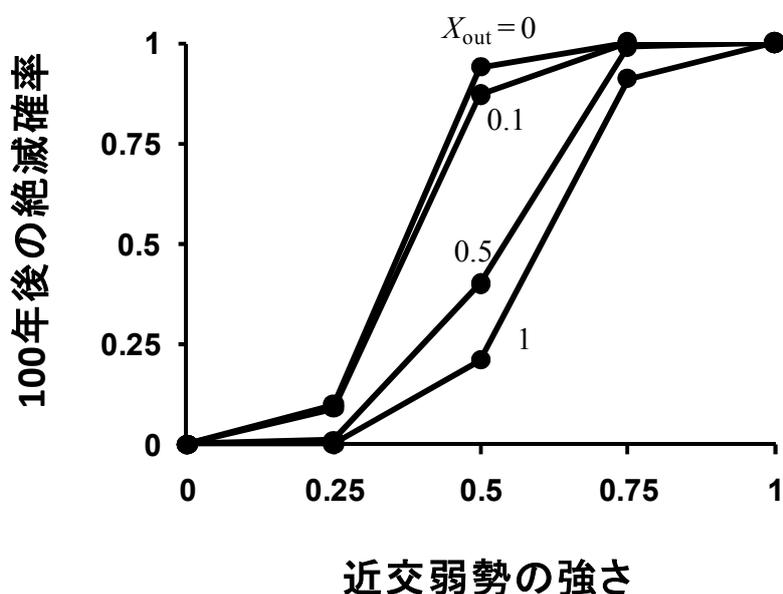
図4–(5). 3種類の減少関数に基づく100年後の絶滅確率. 線形減少関数(A), 指数的減少関数(B), 階段型減少関数(C).

特に、近交弱勢の強さが0.5を上回ると絶滅率の上昇が顕著になった。3つの関数間で結果を比較した

結果、絶滅率に関してはどの関数も同様な予測をもたらすことが示された。全個体数が100個体と少ない絶滅危惧種に関しては、時間とともに交配を行なう体間の血縁度が高くなり、それにもなって集団全体におけるヘテロ接合度も時間とともに低下することが明らかになった。以上の結果は、遺伝的多様性の低下による血縁度の上昇が、絶滅率の上昇に多大な寄与を与えることを示唆している。

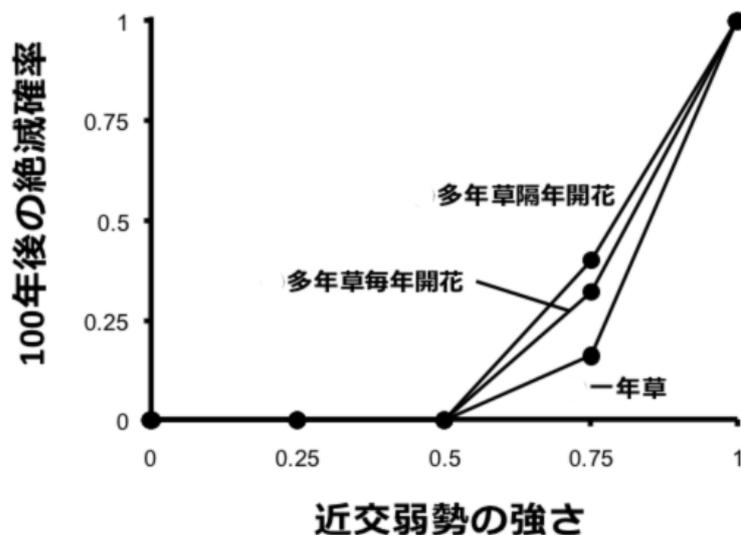
花粉が近距離にしか散布されない場合には(非メタポピュレーションモデル)、ヘテロ接合体の割合が低下し、絶滅確率が上昇することが示された。

一方で、長距離花粉散布が行なわれると(メタポピュレーションモデル)、絶滅確率は減少することが明らかになった(図(4)－6)。このことは、わずかな頻度でも長距離花粉散布が行なわれ、離れた個体群間で遺伝子流動があることが、絶滅確率の減少および生物多様性喪失の阻止に有効に働くことを意味している。



図(4)－6. 近交弱勢の強さ(横軸)と100年後の絶滅確率(縦軸)

また、近交弱性が中程度の場合に各生活史間で違い多年草毎年開花 < ⊗多年草隔年開花、という順番に絶滅率が上昇した(図(4)－7)。このことは、開花機会の少ない多年草隔年開花という生活史を持つ植物は、毎年開花する植物より脆弱であることを示唆している。



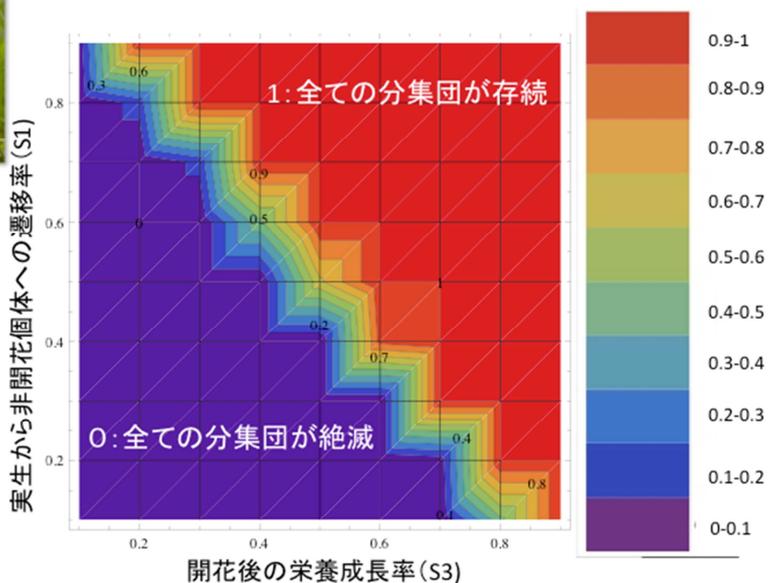
図(4)－7. 近交弱勢の強さ(横軸)と100年後の絶滅確率(縦軸)との関係に、3つの異なる植物の生活史が与える影響

(2) 絶滅危惧種ヤチシャジンの個体群持続存続性解析

生存率などのデモグラフィックパラメータ値が不明であるため、様々な値を用いて個体群存続確率を推定した(図(4)－8)。



ヤチシャジンにおける個体群存続確率

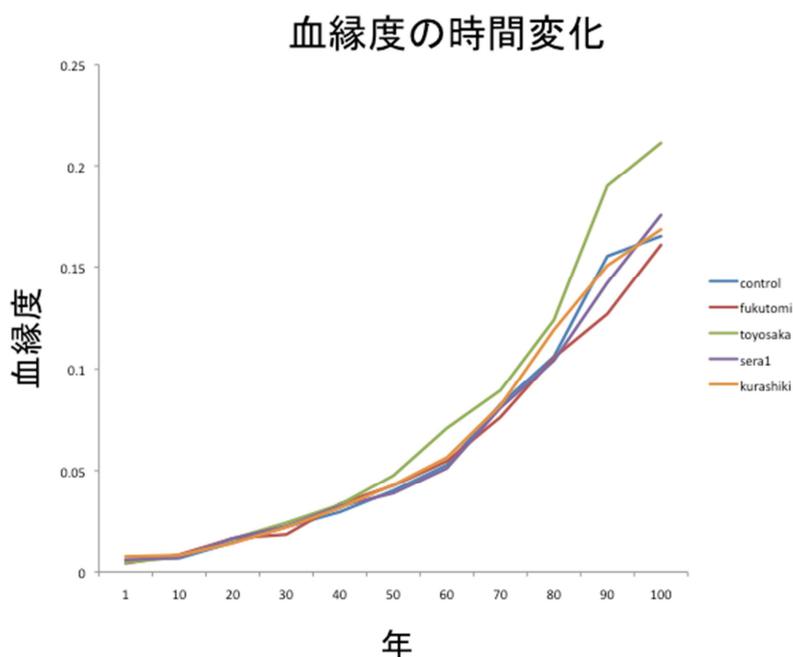


図(4)－8. ヤチシャジンにおける個体群存続確率の推定値. 実生から非繁殖個体への遷移率と開花後の栄養成長率に応じた変化を示す.

実生から非繁殖成体までの生存率(s_1)と繁殖後のクローン成長率(s_3)を変化させ100年後の生存確率を予測したところ、生存率、クローン成長率の増加に伴い全ての分集団が絶滅する状態から全ての分集団が生存する状態への推移が見られた。

どの分集団が消失すると最も生存率が低下するかを検討するためには、これらのデモグラフィックパラメータ値に依存した解析を行う必要がある。そこで、 $(s_1, s_3) = (0.8, 0.3)$, $(0.3, 0.7)$ という全ての分集団が絶滅する状態から全ての分集団が生存する状態への推移が生じる境界に位置するパラメーターセットに絞って検討した。

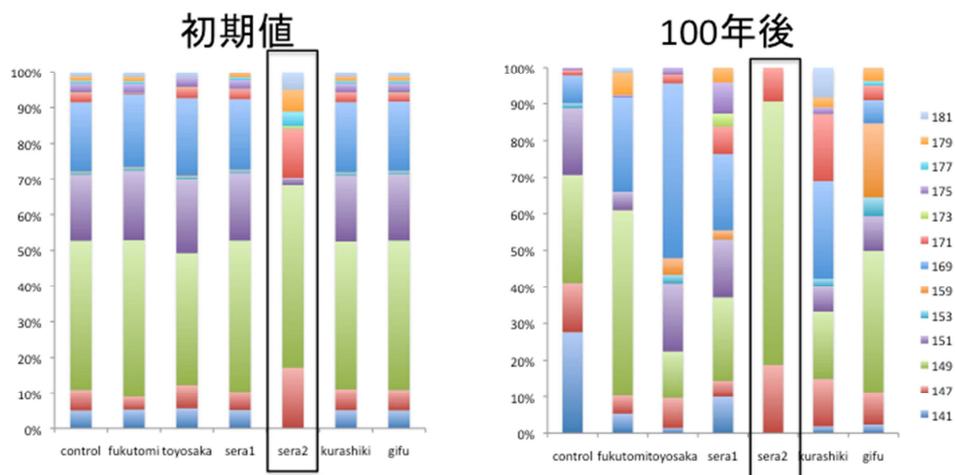
ヤチシャジン全1,009個体が6分集団を構成しているが、どの分集団が消失すると最も生存率が低下するかを検討したところ、最も個体数の多いSera2個体群の消失によって約1割($(s_1, s_3) = (0.8, 0.3)$ の場合)から3割($(s_1, s_3) = (0.3, 0.7)$ の場合)ほど生存率が低下することが示された。一方で、残り5つの分集団の消滅は、個体群存続確率の変化に全く影響を与えないという予想が得られた。血縁度の経時変化を予測したところ、分集団の消滅がない場合においても、100後には20%の血縁度の上昇が予測された(図(4)－9)。



図(4)－9. ヤチシャジン個体群における血縁度の時間変化. controlは分集団の消滅が生じない状況を指す。

各遺伝子座における対立遺伝子頻度の100年後の変化を予測したところ、Sera2の消失によって極端に対立遺伝子の多様性が低下することが明らかになった(図(4)－10)。これらの結果は、Sera2 分集団の重要性を示唆している。

対立遺伝子頻度の変化 遺伝子座: Apal02



図(4)－10. ヤチシャジン個体群における血縁度の時間変化. controlは分集団の消滅が生じない状況を指す.

(3) 絶滅危惧種シモツケコウホネの個体群持続存続性解析

シモツケコウホネについて実生から非繁殖成体までの生存率、繁殖後のクローン成長率を変化させ100年後の生存確率を予測した(図4－11)。



シモツケコウホネにおける個体群持続確率

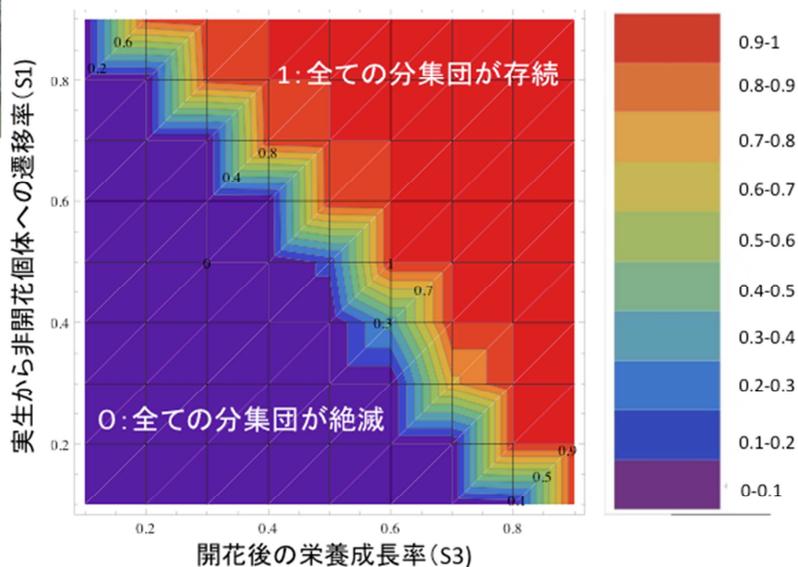
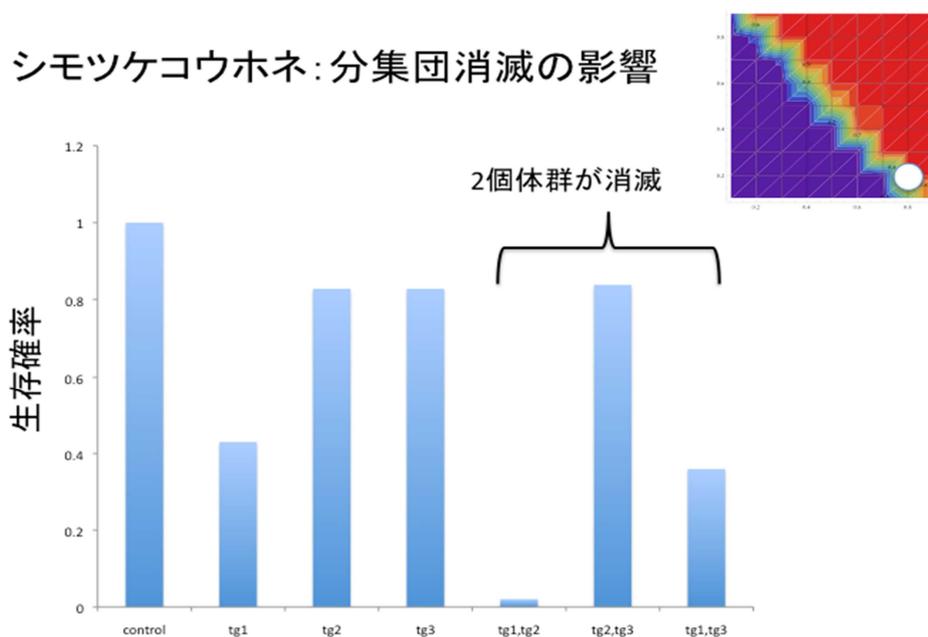


図4－11. シモツケコウホネにおける個体群持続確率の推定値. 実生から非繁殖個体への遷移率開花後の栄養成長率に応じた変化を示す.

その結果、生存率、クローン成長率の増加に伴い全ての分集団が絶滅する状態から全ての分集団が生存する状態への推移が見られたが、同じパラメータ値においてもヤチシャジンよりもやや低い生存率が予測された。

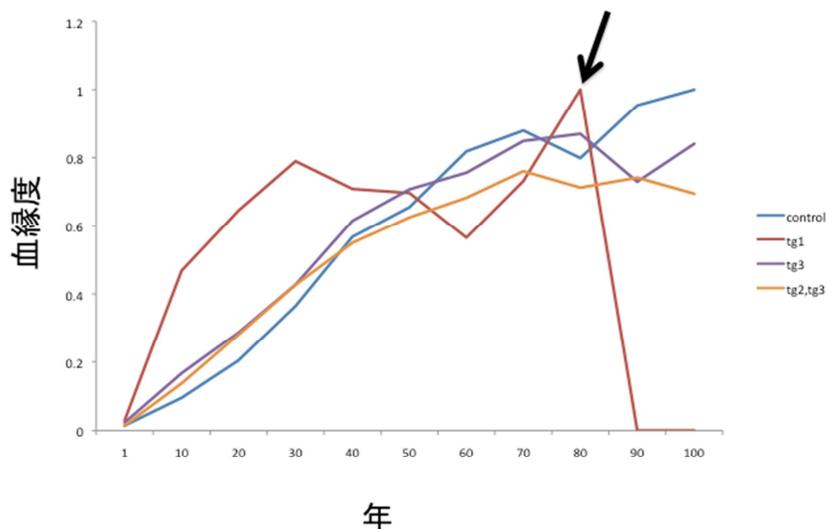
シモツケコウホネにおいては、 $(s_1, s_3) = (0.9, 0.1)$, $(0.2, 0.8)$ というパラメーターセットに絞ってさらなる解析を行った。どの分集団が消失すると最も生存率が低下するかを検討したところ、最も個体数の多いTg1分集団が消滅すると約6割($(s_1, s_3) = (0.2, 0.8)$ の場合)から9割($(s_1, s_3) = (0.9, 0.1)$ の場合)も生存率が低下することが示された。その他7個体のみ存在するTg3分集団が消滅したときさえ、1割以上の生存率低下が予測された(図(4)－12)。これはヤチシャジンよりもシモツケコウホネにおいて分集団消滅が個体群存続に与える影響が大きいことを示している。



図(4)－12. シモツケコウホネ個体群における分集団消滅の影響. $(s_1, s_3) = (0.2, 0.8)$ の場合の結果を示す.

血縁度の経時変化を予測したところ、急激な上昇が観察され、最終的にクローン個体ばかりからなる集団が形成されることが予測された(図(4)－13)。以上の結果より、シモツケコウホネについては現分集団における遺伝的多様性を維持し手厚く保全する必要があることが示唆される。

血縁度の時間変化



図(4)－13. シモツケコウホネ個体群における血縁度の時間変化。赤線は最も個体数の多いtg1分集団を消滅させた場合の結果を示す。↓の時点で、急激な血縁度の上昇がみられ、個体群の絶滅が予測された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本プロジェクトで行った解析の成果によって、遺伝的多様性の喪失が絶滅率に上昇に与える影響を量的に見積もることが可能になった。このことは、絶滅危惧種個体群の持続可能性について、種間や個体群間の違いに対応した科学的な予測を打ち立てることを可能にし、各種保全活動の効果予測の精度を高めることにつながる。さらに、研究や保全活動へ割り当てることができる資源をより効率的に利用できるようになる事が期待される。

また、改良した数理モデルの解析によって、長距離花粉散布による遺伝子流動が、絶滅確率を減少させる主要な要因となる可能性が考察された。また、個体数が減少した個体群においては、1年草の生活史を持つ植物種において、多年生植物種よりも絶滅確率が低く維持されることが明らかになった。

これまでの絶滅危惧種管理に関する研究においては、おもに残存個体数が重要な要因として扱われてきた。本研究課題の成果として、個体数に加えて遺伝情報と位置情報が得られること、そして遺伝情報と位置情報を最大限生かした持続存続性解析モデルを活用することによって、残存個体数だけではわからなかった遺伝的多様性を維持することの重要性が明らかになった。特に本研究によって、少数の個体からなる分集団も個体群維持に大きな貢献をしていることが明らかになった点には、生物多様性保全上、大きな意義がある。

(2) 環境政策への貢献

離れた個体群間での遺伝子流動を促進することが、絶滅危惧種の保全策として提案される。また複数種

の絶滅危惧種を対象とする場合には、一年生草本より多年生草本の管理により配慮を置く必要があることが提案された。残存個体数に関する情報に加えて遺伝情報を活用する本研究によって、多くの絶滅危惧種の100年後の状態を比較し、種毎の特徴に応じて適した保全政策を打ち出すことが可能となった。しかし、対象種の生活史パラメーター値に結果は大きく依存するため、遺伝情報に加えて生存率や繁殖率などの基本的な生活史パラメーターに関する情報の取得が急がれる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表

1) 加藤元海, 佐竹暁子: 第20回日本数理生物学会札幌大会 (2010)

「絶滅危惧植物における全個体遺伝子情報と個体群存続解析」

2) 加藤元海, 佐竹暁子: 第58回日本生態学会札幌大会 (2011)

「絶滅危惧植物における全個体遺伝子情報と個体群存続解析」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) F. A. KIRCHNER, B. ROBERT and B. COLAS: *Journal of Applied Ecology*, 43, 1011-1021 (2006)
“Modelling the dynamics of introduced populations in the narrow-endemic *Cantaurea corymbosa*: a demo-genetic integration.”
- 2) M. LYNCH and K. RITLAND: *Genetics*, 152, 1753-1766 (1999)
“Estimation of pairwise relatedness with molecular markers.”

Investigation of biodiversity conservation on the basis of ubiquitous genotyping of critically endangered plant species

Principal Investigator: Yuji ISAGI

Institution: Division of Forest and Biomaterials Science,
Graduate School of Agriculture,
Kyoto University
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku
Tel: +81-753-6422 Fax: +81-753-6129
E-mail:isagiy@kais.kyoto-u.ac.jp

Cooperated by: Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,
Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University
Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University

[Abstract]

Key Words: Genetic diversity, Microsatellite markers, Biodiversity, Genotyping, Sustainability

Because every individual of organisms have a finite lifespan, regeneration processes of populations must be considered in order to conserve threatened species in the long term. Genetic analyses can provide crucial information on biological conservation such as clonal structure, gene flow, inbreeding depression, relatedness, and genetic diversity. However, many problematic activities have been undertaken for the purpose of biological conservation due to the lack of genetic information. These problems, for example, include propagation and reintroductions that do not represent the full genetic diversity of species, transplantation without consideration of intraspecific genetic differentiation, breeding without consideration of relatedness, hybridizing with related species that causes genetic pollution, etc. These activities, though most of them have been done with good intentions, may in fact cause fatal effects on the endangered plant species.

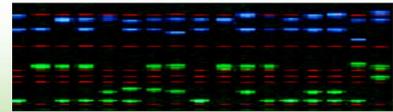
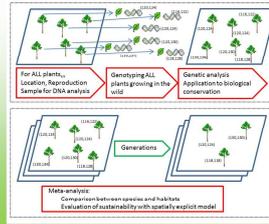
In this study, we selected 11 plant species growing in the rural area, 6 alpine plant species, and 5 fern species for extensive genetic analyses. In the wild populations of each target species, we determined the locations of all individuals and collected leaf samples for DNA extraction. We developed new microsatellite markers and determined the genotypes of all individuals. The genetic analyses revealed species-specific characteristics of genetic diversity, clonal structure, and number of genets. On the basis of the results of spatial distribution and genotypes of each plant individual, we developed new mathematical models to evaluate the sustainability of critically endangered species. The

models predicted the effects of loss in genetic diversity on the probability of extinction, which would enable us to estimate the effectiveness of conservation activities in a variety of endangered plant species with distinct life history characteristics. We obtained data that would be helpful to improve the conservation of each critically endangered target plant species. The field survey, extensive genetic analysis, and mathematical modeling conducted in this study have provided useful and essential information to direct the activities of biodiversity conservation of NPO and local/national government. For example, we have started a progressive ex situ conservation approach to manage the individuals based on the genotype data for *Veronicastrum villosulum*. In the case of *Nuphar submersa*, it is showed that the existence of ubiquitous genotyping database is able to serve as a deterrent for sale of the endangered species by illegal collections. Several collaborative actions for the conservation of critically endangered plant species will be promoted on the basis of the information obtained in this project.

D0903 全個体ジェノタイピングに基づく生物多様性保全に関する研究

背景と目的

- 生物多様性の危機的状況と 遺伝的配慮の無い不適切な保全活動
- 遺伝子解析技術の急速な発展を 生物多様性保全に活かす
- 絶滅危惧種の野生全個体の 位置・遺伝子型を明らかにする



全個体ジェノタイピング

野生に生育する絶滅危惧種の全個体について、生育位置、繁殖状況を明らかにすると共に、DNA解析用の葉を採集する。多型性に富む遺伝マーカーを開発し、全個体の遺伝子型を決定し、この情報を生物多様性保全に活用した。

サブテーマ1: 里地・里山

- ・持続した人為インパクト
- ・最も普遍的な環境



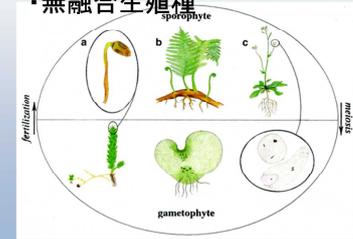
サブテーマ2: 高山植物

- ・氷河期における分布拡大縮小
- ・地球温暖化

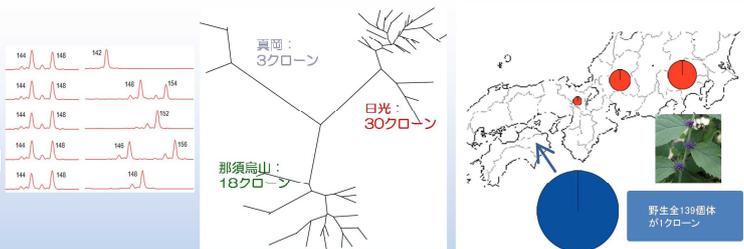


サブテーマ3: シダ植物

- ・配偶体と孢子体世代
- ・倍数化由来の種分化
- ・無融合生殖種



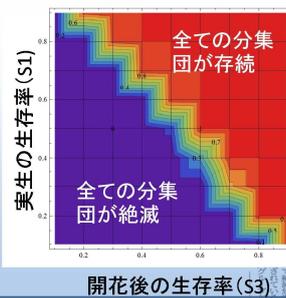
- 遺伝的評価に基づく真の個体数を解明 →種によっては1~数クローンのみが現存
- 種の保持する全遺伝的多様性を生育域外 保全集団として保持→世界的の試み
- 全個体の位置情報と遺伝子型情報から、 個体のトレースが可能→違法採集の抑制
- 人為植栽由来の絶滅危惧種を判明
- 単一孢子起源で形成・維持される 集団の発見→維管束植物で初の発見



これらの成果の多くは新聞でも報道

サブテーマ4: 数理モデル

- 全個体の位置情報、 遺伝情報を組み込んだ 数理モデルで絶滅危惧 種の存続可能性評価
- 局所集団の消滅と種 の絶滅の予測が可能に

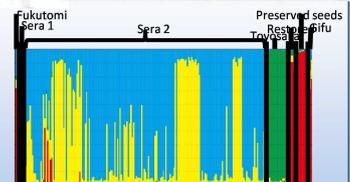


成果の利活用

- 環境省域外保全モデル事業への活用
- 市民団体がやっている多様性保全活動への活用
- 盗掘抑止策の構築
- 絶滅危惧種保全価値の適切な評価
- 開発等による集団消失が種の存続に及ぼす 影響の事前評価



環境省域外保全モデル事業で 栽培されるヒメスゲリ



全個体遺伝子型解析で、集団ごとの 保全価値を評価する