

北岳に生育するミヤマハナシノブ全4集団における遺伝的多様性と 遺伝構造

横川昌史¹, 長池卓男², 西川浩己², 井鷲裕司¹

(¹京都大学農学研究科, ²山梨県森林総合研究所)

要約 山梨県北岳に生育するミヤマハナシノブの遺伝的多様性および遺伝構造を評価した。北岳に分布するミヤマハナシノブの既存のすべての集団(大樺沢, 草すべり, 旧北岳山荘, 大樺沢下流)において遺伝解析用のサンプルを採取した。近縁種であるハナシノブで開発された10遺伝子座を用いて遺伝的多様性および遺伝構造を評価した。10遺伝子座のうち, 3遺伝子座は多型が検出されなかったため, 遺伝的多様性および遺伝構造の解析からは除外した。遺伝的多様性は草すべりで低い傾向にあったが, 全体として大きな違いはなかった。遺伝的分化の指標である F_{ST} , R_{ST} の値はともに小さかった。STRUCTURE解析を用いて, 遺伝構造の評価を行ったところ, 4つの集団間には遺伝的な分化は認められなかった。

Genetic diversity and genetic structure of all four populations of *Polemonium caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum* in Mount Kita

Masashi YOKOGAWA¹, Takuo NAGAIKE², Hiroki NISHIKAWA², Yuji ISAGI¹

(¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University, ²Yamanashi Forest Research Institute)

Abstract *Polemonium caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum* (Polemoniaceae) is a threatened perennial herb that occurs in Mount Kita, central Japan. We investigated genetic diversity and genetic structure of all known four populations (Okanbasawa, Kusasuberi, Old-Kitadakesanso and lower Okanbasawa) of *P. caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum* using ten microsatellite markers to inform future conservation management strategies for the species. Because three of these 10 loci were monomorphic, these three loci were excluded from analysis of genetic diversity and structure. Level of genetic diversity in Kusasuberi was much lower than that in other populations. F_{ST} value and R_{ST} values among the four populations were very low. STRUCTURE analysis indicated that there was no genetic divergence among the four populations.

1. 緒言

ミヤマハナシノブ *Polemonium caeruleum* L. subsp. *yezoense* Hara var. *nipponicum* Koji Ito (ハナシノブ科) は山梨県および富山県に分布する日本固有の多年草であり, 明るく湿った山地に生育する¹⁾。文献上の記録によると, 山梨県の北岳・櫛形山・鳳凰山御室・北荒川岳, 富山県の白馬岳に分布している^{2, 3)}。しかし, 近年は北岳以外では生育が確認されておらず, 北岳の集団がほぼ唯一の自生地となっている。園芸用の採取や登山客の踏み付けによって個体数が減少しており, 環境庁レッドデータブックでは絶滅危惧II類(VU)に指定されている⁴⁾。また, 近年, シカによるミヤマハナシノブへの被害も確認されており, 個体群動態への影響が懸念されている。

一般的に個体数の減少した集団では, 近親交配や遺伝的浮動の影響によって遺伝的多様性が失われやすい⁵⁾。また, 集団の縮小・分断化は集団間の遺伝子流動を低下させ, 近親交配や遺伝的浮動の効果を大きくする⁵⁾。遺伝的多様性の消失は, 環境変動に対する集団の適応可能性を低下させる可能性があるため, 絶滅危惧種の集団内の遺伝的多様性や近親交配の程度, 集団間の遺伝的分化や遺伝構造を詳細に把握したうえで保全策を立案・実施することが望ましい。野生生物の遺伝解析を行う際には, 共優性で高い多型性を持ち, 淘汰に対して中立なマイクロサテライトマーカーの使用が有効である⁶⁾。昨年度の報告によって, ミヤマハナシノブ3集団の間で遺伝的多様性に差がなく, 対立遺伝子の組成に違いがないことが示された

⁷⁾。本報告では, 北岳の高標高域に生育するミヤマハナシノブ集団のサンプルを加えて, 既存のサンプルと遺伝的多様性を比較し, 遺伝構造の評価を行った。

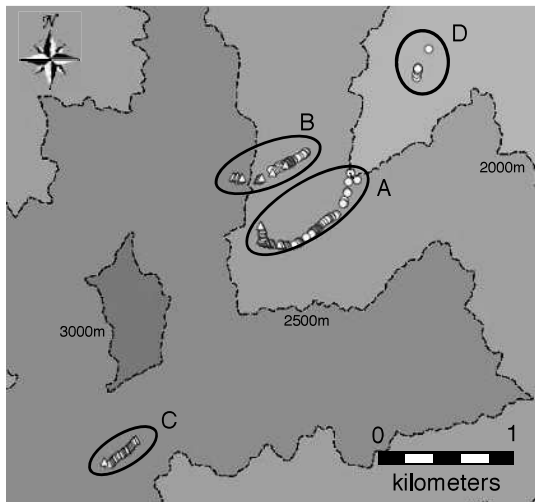
2. 方法

2-1 調査地とサンプリング

調査地は山梨県南アルプス市の北岳のミヤマハナシノブが生育する大樺沢, 草すべり, 旧北岳山荘, 大樺沢下流の4カ所である(図1)。2011年11月に登山道沿いを歩きながら大樺沢の一部, 草すべりの一部, 旧北岳山荘においてDNA解析用のサンプルを採取した。2010年に採取したサンプル⁸⁾と合わせて大樺沢から73個体, 草すべりから52個体, 旧北岳山荘から32個体, 大樺沢下流から8個体, 合計165個体を対象に個体の生存に影響のないようにごく少量の葉を採取した。採取した葉はDNA抽出まで-30°Cで保存した。

2-2 DNAの抽出およびマイクロサテライトマーカーによる遺伝子型の決定

改良CTAB法⁸⁾を用いて, ゲノムDNAの抽出を行った。近縁種であるハナシノブ *P. kiushianum* Kitam. (ハナシノブ科) で開発されたマイクロサテライト遺伝子座のうち, ミヤマハナシノブに転用可能な遺伝子座9座⁹⁾(Pkiu006, Pkiu129, Pkiu208, Pkiu227, Pkiu314⁸⁾; Pkiu853, Pkiu961, Pkiu965, Pkiu1052, Yokogawa et al. unpublished data)を用いて解析を行った。また, ハナシノブで開発されたマイクロサテライト遺伝子座を用い



○ 2010年採取 A: 大樺沢 B: 草すべり
△ 2011年採取 C: 旧北岳山荘 D: 大樺沢下流

図1 調査した集団の位置関係

それぞれの集団は樹林帯で分断されている。

たスクリーニングを新たに行い、1座(Pkiu135⁸⁾)においてミヤマハナシノブでも良好なピークパターンが得られることを確認した。この遺伝子座Pkiu135も用いて解析を行った。

Qiagen Multiplex PCR kit(Qiagen)を用いて、標準のプロトコルに従い、PCRによる各遺伝子座の増幅を行った(最終液量10 μ L中に5 ngの抽出DNA, 2 \times Multiplex PCR Master Mix 5 μ L, 各プライマーペア0.2 μ Mを含むように調整)。GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems) を用いてPCR反応を行い、初期熱変性95 $^{\circ}$ C15分の後、熱変性94 $^{\circ}$ C30秒、アニーリング 1分30秒(アニーリング温度は遺伝子座ごとに最適温度⁸⁾を用いた)、伸長反応72 $^{\circ}$ C 1分を28サイクル行った後、最終伸長を60 $^{\circ}$ C 30分を行った。ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) および GENESCANTM analysis software (Applied Biosystems) を用いてPCR産物の断片長の計測を行い、遺伝子型を決定した。

2-3 データ解析

集団内の遺伝的多様性を評価するために、遺伝子座あたりの対立遺伝子数(N_A : number of alleles per locus), 特定の集団にしか出現しない固有対立遺伝子(P_r : private allele), ヘテロ接合度の観察値(H_O : observed heterozygosity), ヘテロ接合度の期待値(H_E : expected heterozygosity)を算出した。対立遺伝子数はサンプル数に依存して増加するため、サンプル数で補正した対立遺伝子の期待値である対立遺伝子多様度(A_R : allelic richness)¹⁰⁾を算出した。また、FSTAT¹¹⁾を用いて固定指数 F_{IS} の算出および各遺伝子座におけるハーディ・ワインベルグ平衡からのずれを検定した。

個体群間の遺伝的分化を評価するため、GenAlEx¹²⁾を用いてペアワイズの F_{ST} 値および R_{ST} 値を算出し、それぞれの0からのずれの有意性を検定した。また、集団遺伝構造を評価するため、STRUCTURE¹³⁾(以後、STRUCTURE解析と呼ぶ)を用

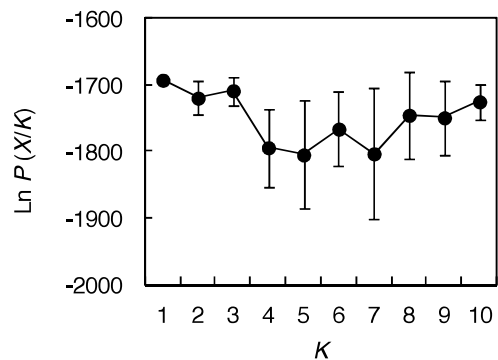


図2 STRUCTURE解析における $K = 1$ から $K = 5$ の場合の $\text{Ln } P(X/K)$ 。エラーバーは10回のランのそれぞれの $\text{Ln } P(X/K)$ の標準偏差を表す。

いた解析を行った。STRUCTURE ver.2.3を用いて、admixture model, allele frequencies model¹⁴⁾, LOCPRIOR model¹⁵⁾に基づき、 K 個のクラスターに各個体を配分した。10⁶のburn-inを行った後、MCMCによるシミュレーションを10⁶回行った。これらの設定を用いて $K = 1 \sim 10$ について10回の繰り返しで計算した。

3. 結果

10遺伝子座において全165個体のミヤマハナシノブの遺伝子型を決定したところ、3遺伝子座(Pkiu208; Pkiu314; Pkiu965)では多型が確認されなかった。以後の解析は多型が確認された7遺伝子座を用いて行った。ミヤマハナシノブの集団レベルの遺伝的多様性の指数は遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数(N_A)が2.29~4.00, 平均対立遺伝子多様度(A_R)が2.20~2.66, ヘテロ接合度の観察値(H_O)の平均値が0.23~0.33, ヘテロ接合度の期待値(H_E)の平均値が0.25~0.40であった(表1)。固有対立遺伝子は大樺沢, 草すべり, 旧北岳山荘においてのみ検出された(表1)。また、平均固定指数(F_{IS})は0.04~0.15で、遺伝子座別に見た場合、高い値を示す遺伝子座もあったが(表1)、各遺伝子座におけるハーディ・ワインベルグ平衡からの有意なずれは検出されなかった。

遺伝的分化の指標である集団間の F_{ST} および R_{ST} はいずれも大きな値は示さなかった(表2)。 F_{ST} に関してはそれぞれの集団間で有意に0よりも大きかったが、 R_{ST} では有意差はなかった(表2)。集団遺伝構造の解析であるSTRUCTURE解析では任意交配集団を1つと仮定した場合にもっとも対数尤度($\text{Ln } P(X/K)$)が大きく、シミュレーションごとの対数尤度のばらつきが小さかった(図2)。

4. 考察

4-1 ミヤマハナシノブの遺伝的多様性

本研究で解析した4集団で比較するとサンプル数の違いを補正した指標である対立遺伝子多様度(A_R)は、草すべりで低い傾向にあった(表1)。大樺沢, 草すべり, 旧北岳山荘は明るい高草草本群落の中にミヤマハナシノブが多数群生している

表1 ミヤマハナシノブの4集団における遺伝的多様性

| 遺伝子座 | 大樺沢 (n = 73) | | | | | | 草すべり (n = 52) | | | | | |
|----------|--------------|-------|------|-------|-------|----------|---------------|-------|------|-------|-------|----------|
| | N_A | A_R | Pr | H_O | H_E | F_{IS} | N_A | A_R | Pr | H_O | H_E | F_{IS} |
| Pkiu006 | 9 | 3.80 | 2 | 0.45 | 0.47 | 0.04 | 7 | 3.60 | 1 | 0.52 | 0.64 | 0.19 |
| Pkiu129 | 3 | 2.80 | 0 | 0.48 | 0.49 | 0.02 | 3 | 3.00 | 0 | 0.44 | 0.55 | 0.20 |
| Pkiu135 | 6 | 3.40 | 0 | 0.34 | 0.49 | 0.32 | 6 | 2.90 | 1 | 0.29 | 0.56 | 0.48 |
| Pkiu227 | 2 | 1.90 | 0 | 0.21 | 0.25 | 0.17 | 2 | 1.00 | 0 | 0.12 | 0.11 | -0.06 |
| Pkiu853 | 3 | 2.50 | 0 | 0.32 | 0.32 | 0.01 | 3 | 1.00 | 0 | 0.33 | 0.36 | 0.08 |
| Pkiu961 | 3 | 2.60 | 0 | 0.40 | 0.51 | 0.22 | 3 | 2.00 | 0 | 0.35 | 0.45 | 0.23 |
| Pkiu1052 | 2 | 1.60 | 0 | 0.11 | 0.13 | 0.14 | 2 | 1.90 | 0 | 0.12 | 0.11 | -0.06 |
| 平均 | 4.00 | 2.66 | 0.29 | 0.33 | 0.38 | 0.13 | 3.71 | 2.20 | 0.29 | 0.31 | 0.40 | 0.15 |

| 遺伝子座 | 旧北岳山荘 (n = 32) | | | | | | 大樺沢下流 (n = 8) | | | | | |
|----------|----------------|-------|------|-------|-------|----------|---------------|-------|------|-------|-------|----------|
| | N_A | A_R | Pr | H_O | H_E | F_{IS} | N_A | A_R | Pr | H_O | H_E | F_{IS} |
| Pkiu006 | 7 | 4.30 | 1 | 0.41 | 0.60 | 0.32 | 4 | 4.20 | 0 | 0.25 | 0.33 | 0.24 |
| Pkiu129 | 3 | 2.70 | 0 | 0.47 | 0.52 | 0.09 | 3 | 2.40 | 0 | 0.38 | 0.53 | 0.29 |
| Pkiu135 | 4 | 3.30 | 0 | 0.27 | 0.33 | 0.20 | 3 | 2.40 | 0 | 0.38 | 0.40 | 0.06 |
| Pkiu227 | 2 | 1.60 | 0 | 0.13 | 0.12 | -0.07 | 1 | 1.60 | 0 | 0.00 | 0.00 | - |
| Pkiu853 | 3 | 2.60 | 0 | 0.41 | 0.49 | 0.18 | 1 | 2.90 | 0 | 0.00 | 0.00 | - |
| Pkiu961 | 4 | 2.40 | 2 | 0.25 | 0.34 | 0.26 | 2 | 2.50 | 0 | 0.50 | 0.38 | -0.33 |
| Pkiu1052 | 2 | 1.60 | 0 | 0.13 | 0.12 | -0.07 | 2 | 1.60 | 0 | 0.13 | 0.12 | -0.07 |
| 平均 | 3.57 | 2.64 | 0.43 | 0.29 | 0.36 | 0.13 | 2.29 | 2.53 | 0.00 | 0.23 | 0.25 | 0.04 |

N_A , 対立遺伝子数; A_R , 対立遺伝子多様度; Pr , 固有対立遺伝子数

H_O , ヘテロ接合度の観察値; H_E , ヘテロ接合度の期待値

表2 ペアワイズ F_{ST} (左下)およびペアワイズ R_{ST} (右下)

| | 大樺沢 | 草すべり | 旧北岳山荘 | 大樺沢下流 |
|-------|--------|--------|--------|-------|
| 大樺沢 | 0 | 0.00 | 0.02 | 0.00 |
| 草すべり | 0.06 | 0 | 0.29 * | 0.00 |
| 旧北岳山荘 | 0.01 * | 0.03 * | 0 | 0.03 |
| 大樺沢下流 | 0.05 * | 0.02 | 0.02 * | 0 |

のに対して、大樺沢下流集団は樹林帯の中に位置し、ミヤマハナシノブの個体数は少なく生育状況が良好だとは言いがたい。生育環境が良好である草すべりにおいて遺伝的多様性が低い理由は現時点ではよくわからないが、過去の集団サイズの増減が関係しているかもしれない。今回新しく解析に加えた旧北岳山荘集団は、その他の集団に比べて特別高い遺伝的多様性は有していなかったが、最も多く固有対立遺伝子を持っていた。北岳全体のミヤマハナシノブの遺伝的多様性を維持するためには旧北岳山荘集団は重要であると考えられる。

4-2 ミヤマハナシノブの集団間の遺伝的分化および集団遺伝構造

本研究で解析した4集団間では、 F_{ST} および R_{ST} の値は一部の集団の組み合わせで有意に0より大きかったものの、値は極めて小さかった(表2)。また、STRCUTRE解析では、4つの集団を一つの遺伝子プールとして認識した場合に最も対数尤度が高くなった(図2)。これらの結果から、調査を行った4集団は

樹林帯で分断されているにも関わらず、遺伝的な分化は大きくないと言える。また、一般に、高標高の山岳は生物の移動を妨げ遺伝的な交流を阻害する障壁として機能することが知られている¹⁶⁾。実際に山岳の高い稜線が障壁となって遺伝子流動が制限されている例は、北米に生息するアライグマ *Procyon lotor*¹⁷⁾、北米に生息するアカガエル属の一種 *Rana luteiventris*¹⁸⁾、新熱帯に生育する木本であるセドロ *Cedrela odorata*¹⁹⁾、ウダイカンバ *Betula maximowicziana*²⁰⁾などで報告されている。今回新たに解析に加えた旧北岳山荘集団は、その他の集団とは標高2,500 m級の尾根で分断されている(図1)にもかかわらず、遺伝的組成は集団間で大きく異ならず遺伝的障壁が検出されなかった。このように調査を行った集団間で遺伝的分化が小さくない理由として比較的最近まで大きな一つの集団だった可能性、集団間で花粉や種子の移動がある可能性、調査していない樹林帯内に遺伝子流動の飛び石となるパッチ状の集団がある可能性の3つが考えられる。今後、北岳周辺の植生の変遷や送粉者の動態、登山道沿い以外でのミヤマハナシノブの分布が明らかになることで、これらの背景の特定が可能になるかもしれない。

4-3 保全上の留意点と今後の展望

今回の解析の結果では、草すべりで遺伝的多様性が低い傾向にあったものの、集団間の遺伝的な分化は認められなかった。これらの結果は今回調査したミヤマハナシノブの集団

は大きな一つの管理単位であることを示唆している。しかしながら、今回使用したマイクロサテライトマーカーはハナシノブで開発されたものであり、一般に他種のマーカーを転用した場合は多型性が低くなることが知られている^{21, 22)}。より高解像度の解析を行うならば、ミヤマハナシノブのマイクロサテライトマーカーを開発する必要がある。また、中立マーカーでは局所適応を検出できないが、局所適応を考慮せずに個体を移動させると、異系交配弱勢など集団の存続に悪影響が出る可能性がある。これらのことから安易に個体の移動などは行わず、現状を維持していくことが重要だと考えられる。

参考文献

- 1) Yamazaki T: Flora of Japan Vol. IIIa, Kodansha 242-243. (1993)
- 2) 植松春雄: 南アルプスの植物, 井上書店(1967)
- 3) 植松春雄: 山梨の植物誌, 井上書店(1981)
- 4) 環境庁: 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物8 [植物 I (維管束植物)], 自然環境研究センター(2000)
- 5) Flankham R, Ballou JD, Briscoe DA: Introduction to Conservation Genetics, Cambridge University Press (2010)
- 6) Schwartz MK, Luikart G, Waples RS: Trends in Ecology and Evolution, 22, 1, 25-33 (2007)
- 7) 横川昌史, 長池卓男, 西川浩己, 井鷲裕司: 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 6 (2011)
- 8) Milligan B: Molecular genetic analysis of populations: a practical approach, IRL Press, 59-88 (1992)
- 9) Yokogawa M, Kaneko S, Isagi Y: Conservation Genetics, 10, 5, 1445-1447 (2009)
- 10) El Mousadik A, Petit RJ: TAG Theoretical and Applied Genetics, 92, 7, 832-839 (1996)
- 11) Goudet J: Journal of Heredity, 86, 6, 485-486 (1995)
- 12) Peakall R, Smouse PE: Molecular Ecology Notes, 6, 1, 288-295 (2006)
- 13) Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P: Genetics, 155, 2, 945-959 (2000)
- 14) Falush D, Stephens M, Pritchard JK: Genetics, 164, 4, 1567-1587 (2003)
- 15) Hubisz M, Falush D, Stephens M, Pritchard JK: Molecular Ecology Resources, 9, 5, 1322-1332 (2009)
- 16) Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P: Trends in Ecology and Evolution, 18, 4, 189-197 (2003)
- 17) Root JJ, Puskas RB, Fisher JW, Swope CB, Neubaum MA, Reeder SA, Piaggio AJ: Vector-borne and Zoonotic Diseases, 9, 6, 583-588 (2009)
- 18) Funk WC, Blouin MS, Corn PS, Maxell BA, Pilliod DS, Amish S, Allendorf FW: Molecular Ecology, 14, 1, 483-496 (2005)
- 19) Cavers S, Navarro C, Lowe AJ: Conservation Genetics, 4, 5, 571-580 (2003)
- 20) Tsuda Y, Sawada H, Ohsawa T, Nakao K, Nishikawa H, Ide: Tree Genetics & Genomes, 6, 3, 377-387 (2010)
- 21) Wright TF, Johns PM, Walters JR, Lerner AP, Swallow JG, Wilkinson GS: Genetic Research, 84, 27-40 (2004)
- 22) Pashley CH, Ellis JR, McCauley DE, Burke JM: Journal of Heredity, 97, 4, 381-388 (2006)