

北岳に生育するミヤマハナシノブにおける 野生集団の遺伝構造と組織培養サンプルの遺伝子型

横川 昌史¹, 長池 卓男², 西川 浩己², 井鷲 裕司³

(¹大阪市立自然史博物館, ²山梨県森林総合研究所, ³京都大学農学研究科)

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と遺伝構造の評価および組織培養による域外保全集団の遺伝子型の決定を行った。北岳に分布するミヤマハナシノブの5集団（大樺沢、草すべり、旧北岳山荘、大仙丈沢、大樺沢下流）および組織培養サンプルから遺伝解析用のサンプルを採取し、近縁種であるハナシノブで開発された10遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いて解析した。大仙丈沢では遺伝的多様性が低く、ほかの集団に比べて対立遺伝子の組成が異なっており、遺伝的浮動の影響が示唆された。そのほかの4集団の間では遺伝的多様性や対立遺伝子の組成に大きな違いはなかった。組織培養サンプルの遺伝子型を決定したところ、同じ培養系のサンプルはすべて同じ遺伝子型、異なる培養系のサンプルは異なる遺伝子型であった。これらのことから組織培養に伴う体細胞突然変異は起こっておらず、組織培養による域外保全集団において遺伝子型タグを使った管理が可能であると考えられる。

Genetic structure of wild populations and genotype of tissue culturing samples of *Polemonium caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum* in Mount Kita

Masashi Yokogawa¹, Takuo Nagaike², Hiroki Nishikawa², Yuji Isagi³

(¹Osaka Museum of Natural History ²Yamanashi Forest Research Institute ³Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Abstract *Polemonium caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum* (Polemoniaceae) is a threatened perennial herb that occurs in Mount Kita, central Japan. We analyzed five populations (Okanbasawa, Kusasuberi, Old-Kitadakesanso, Osenjosawa and lower Okanbasawa) and ex situ population by tissue culturing of this species using ten microsatellite markers to inform future conservation management strategies for the species. Level of genetic diversity in Osenjosawa was much lower than that in other four populations, and the allele composition in this population differ from other four populations. Level of genetic diversity and allele composition in other four populations were similar to each other. These results indicated that Osenjosawa population was affected by genetic drift. In respect of tissue culturing samples, the samples from same culturing line were same genotype and the samples from different culturing line were different genotypes. These results indicated that no somatic mutation associated with tissue culturing was occurred on analyzed microsatellite loci. Thus, genetic tagging using these loci was useful for management of this species in ex situ conservation with tissue culturing.

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・榎形山・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食害が確認されており⁵⁾、個体群動態への影響が懸念されている。このようにミヤマハナシノブは北岳の植物の中で

も早急な保全策の構築が必要とされている種の一つである。

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⁶⁾。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⁶⁾。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⁷⁾。昨年度の報告によって、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

ロサテライトマーカーをミヤマハナシノブに転用が可能であることが確かめられており⁸⁾、これらのマーカーを用いての解析が有効であると考えられる。

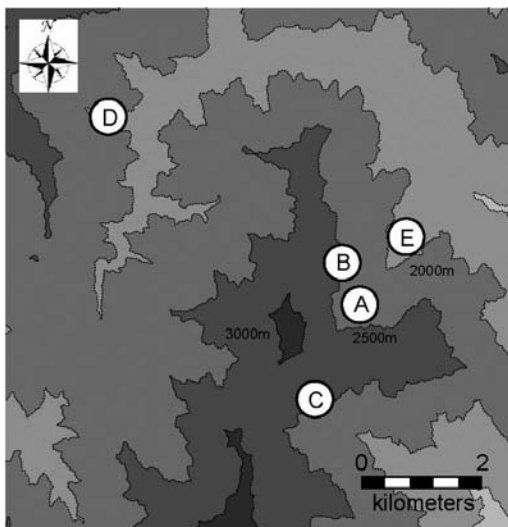
また、ミヤマハナシノブにおいて組織培養による域外保全が行われている⁹⁾。域外保全においてはマイクロサテライトマーカーなどを用いて遺伝的なタグ付をして管理をすることでサンプルの由来などを明確にして管理することができる⁷⁾。また、クローン成長する植物では体細胞突然変異により同一クローンでもマイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型が異なる場合があることが知られており¹⁰⁾、組織培養による増殖でも体細胞突然変異が起こる可能性も捨てきれない。

本報告では、今年度新たに発見された大仙丈沢のミヤマハナシノブ集団のサンプルを加えて、野生集団の遺伝的多様性と遺伝構造の評価を行い、組織培養サンプルの遺伝子型を決定することで培養による体細胞突然変異がないかどうかを確かめた。

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、大仙丈沢の5カ所である(図1)。2012年10月に、大仙丈沢に生育するミヤマハナシノブ21個体から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、多量のシリカゲルと一緒に保存し急速乾燥した。これらのサンプルに、2010年¹¹⁾ および2011年⁸⁾ に採取したサンプルを加えて、全部で5集団189個体のサンプルを用意した。



A : 大樺沢, B : 草すべり, C : 旧北岳山荘
D : 大仙丈沢, E : 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。

2-2 組織培養サンプルの採取

長池ほか(2012)⁹⁾によって報告されている組織培養サンプルを遺伝子型解析に用いた。培養方法の違いによる影響を調べるため、添加するBAP(6-Benzylaminopurine)の濃度が異なる培養サンプルを用いた。0, 0.1, 1.0mg/lの三段階のBAP濃度で継代培養して増殖を行い、培養元サンプルとBAP濃度が異なる3つの培養系で増殖した培養サンプルから葉を採取した。採取した葉は、多量のシリカゲルと一緒に保存し急速乾燥した。

2-3 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¹²⁾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10座⁸⁾(Pkiu006, Pkiu129, Pkiu135 Pkiu208, Pkiu227, Pkiu314¹³⁾; Pkiu965¹⁴⁾; Pkiu853, Pkiu965, Pkiu1052, Yokogawa et al. unpublished data)を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5ng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 $^{\circ}$ C 15分の後、熱変性94 $^{\circ}$ C 30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 3130 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。

2-4 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(A: number of alleles per locus)、ヘテロ接合度の観察値(H_0 : observed heterozygosity)、ヘテロ接合度の期待値(H_E : expected heterozygosity)、近交係数(F_{IS} : Fixation index)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(AR: allelic richness)¹⁵⁾と固有対立遺伝子多様度(PAR: private allelic richness)¹⁶⁾を算出した。加えて、今回のデータセットの個体識別率(P_1 : Probability of identification)および片親が同じ場合の個体識別率(P_{SIB} : Probability of identification of sibling)をGenAlEx¹⁷⁾を用いて算出した。また、集団遺伝構造を評価するた

め、STRUCTURE¹⁸⁾ (以後、STRUCTURE解析と呼ぶ) を用いた解析を行った。STRUCTURE ver. 2.3を用いて、admixture model, allele frequencies model¹⁹⁾, LOCPRIOR model²⁰⁾ 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 $K=1\sim 5$ について20回の繰り返しで計算した。

3. 結果

10遺伝子座において全189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 (A) が1.8~2.9, 平均対立遺伝子多様度 (AR) が1.61~2.15, 平均固有対立遺伝子多様度 (PAR) が0.01~0.13, ヘテロ接合度の観察値 (H_0) の平均値が0.29~0.42, ヘテロ接合

表1. マイクロサテライトマーカー7遺伝子座によるミヤマハナシノブの野生集団における遺伝的多様性

	N	A	AR	PAR	H_0	H_E	F_{IS}
大樺沢	73	2.9	2.15	0.13	0.33	0.38	0.14
草すべり	52	2.9	2.15	0.10	0.31	0.40	0.14
旧北岳山荘	35	2.7	2.04	0.10	0.29	0.36	-0.11
大仙丈沢	21	1.8	1.61	0.01	0.32	0.29	0.13
大樺沢下流	8	1.9	1.85	0.08	0.42	0.26	0.20

N , サンプル数; A , 対立遺伝子数; AR , 対立遺伝子多様度; PAR , 固有対立遺伝子数; H_0 , 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

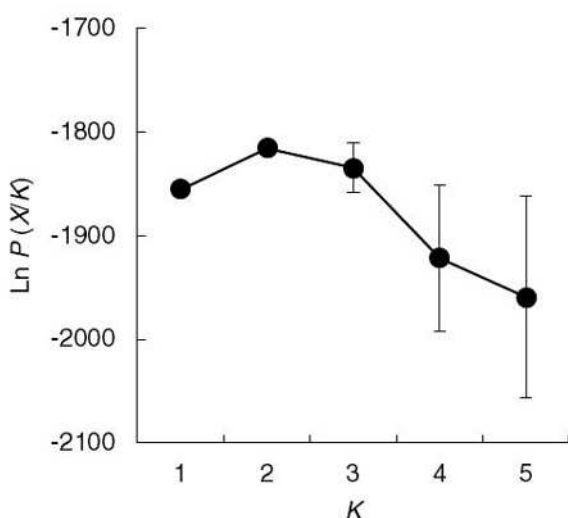


図2. STRUCTURE解析における $K=1$ から $K=5$ の場合の $\ln P(X/K)$ 。エラーバーは20回のランから得られた $\ln P(X/K)$ の標準偏差を表す。

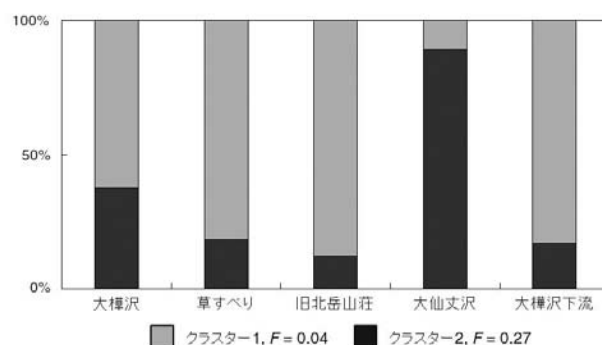


図3. STRUCTUREによって推定された2つのクラスター (遺伝子プール) への各集団の配分確率。Fは共通祖先集団と各クラスターとの遺伝的距離を示し、各クラスターが受けた遺伝的浮動の大きさの指標となる。

度の期待値 (H_E) の平均値が0.29~0.40, 平均近交係数 (F_{IS}) は-0.11~0.20であった (表1)。解析に用いた7遺伝子座トータルの個体識別率 (PI) は0.002, 片親が同じ場合の個体識別率 (PI_{SIB}) は0.054であった。

集団遺伝構造の解析であるSTRUCTURE解析では任意交配集団を2つと仮定した場合にもっとも対数尤度 ($\ln P(X/K)$) 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)。大樺沢, 草すべり, 旧北岳山荘, 大樺沢下流ではクラスター1が優占し, 大仙丈沢ではクラスター2が優占していた (図3)。遺伝的浮動の影響の指標であるFはクラスター1が0.04, クラスター2が0.27であった。組織培養サンプルの遺伝子型については、同じ培養系のサンプルはすべて同じ遺伝子型, 異なる培養系のサンプルは異なる遺伝子型であった (表2)。また, BAP濃度の違いによる遺伝子型の違いは確認されなかった。

4. 考察

4-1 野生集団の遺伝的多様性および遺伝構造

本研究で解析した5集団と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 (AR) や固有対立遺伝子多様度 (PAR) は, 大仙丈沢で低い傾向にあった (表1)。加えて, STRUCTURE解析の結果から, 大仙丈沢だけ他の集団と遺伝的組成が異なり, 優占するクラスターのFの値が大きいことから (図3) 強い遺伝的浮動の影響が示唆された。大仙丈沢は他の集団と比べて, 地理的に離れた場所に位置しており大きな谷を挟んで位置している (図1)。大仙丈沢全域のミヤマハナシノブの調査は行われていないため集団サイズや生育環境の詳細はまだわからないが, 遺伝的多様性と遺伝構造のデータから判断すると, 大仙丈沢集団はボトルネックなどの有効集団サイズが小さくなるイベントを経験した可能性が考えられる。

表2. 組織培養サンプルの遺伝子型

サンプルID	サンプルの由来	BAP添加量 mg/l	Pkiu006		Pkiu129		Pkiu227		Pkiu853		Pkiu961		Pkiu1052		Pkiu135	
培養系1																
TC_C32	増殖元	-	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-1a	継代培養	0	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-1b	継代培養	0	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-1c	継代培養	0	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-2a	継代培養	0.1	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-2b	継代培養	0.1	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-2c	継代培養	0.1	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-3a	継代培養	1	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-3b	継代培養	1	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
TC_C32-3c	継代培養	1	101	103	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	129	129
培養系2																
TC_C33	増殖元	-	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-1a	継代培養	0	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-1b	継代培養	0	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-1c	継代培養	0	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-2a	継代培養	0.1	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-2b	継代培養	0.1	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-2c	継代培養	0.1	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-3a	継代培養	1	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-3b	継代培養	1	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
TC_C33-3c	継代培養	1	99	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	129	131
培養系3																
TC_C34	増殖元	-	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-1a	継代培養	0	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-1b	継代培養	0	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-1c	継代培養	0	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-2a	継代培養	0.1	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-2b	継代培養	0.1	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-2c	継代培養	0.1	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-3a	継代培養	1	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-3b	継代培養	1	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129
TC_C34-3c	継代培養	1	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	129	129

一方で、大樺沢、草すべり、旧北岳山荘、大樺沢下流は遺伝的多様性や遺伝構造について今回解析した遺伝子座については明瞭な違いはなかった。大樺沢、草すべり、旧北岳山荘は明るい高茎草本群落の中にミヤマハナシノブが多数群生しているのに対して、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。生育環境が樹林で集団サイズが小さい大樺沢下流が他の集団サイズが大きい集団と遺伝的多様性が同程度である理由は現時点ではよくわからないが、過去の個体群動態が関係しているかもしれない。また、これらの集団の対立遺伝子の組成は似ていたものの、現在は樹林帯で隔離されている。今回はミヤマハナシノブの主な自生地である高茎草本群落の登山道沿いでサンプリングを行ったが、調査した場所にまだ知られていない自生地があれば、それらが飛び石の役割を果たして遺伝的分化を妨げている可能性が考えられる。

4-2 組織培養サンプルの遺伝子型

今回解析した組織培養サンプルの遺伝子型は培養系ごとすべて同じであった(表2)。クローナル植物では体細胞突然変異によって同じクローンであっても遺伝子型が異なる場合があることが知られている¹⁰⁾が、今回の培養過程では体細胞突然変異は確認されず、また培養方法によって体細胞突然変異が起こるといこともなかった。当面は今回使用した遺伝子座を用いて遺伝的にタグ付された組織培養サンプルの個体識別を行うことが可能である。しかし、長期間の培養過程で体細胞突然変異が起こる可能性は残されており、今後も遺伝子型のモニタリングが必要だと思われる。また、個体識別率(PI)は0.002、片親が同じ場合の個体識別率(PI_{SIB})は0.054であった。全く由来の異なる株については偶然同じ遺伝子型になる確率は1%以下であるが、片親が同じ場合は5%程度の確率で偶然同じ遺伝子型が検出されてしまう。組織培養による域外保全では種子を採取して行うため、種子親が同じ株を多数管理することが想定され、大規模に培養を行う場合は個体識別ができないケースが出てくる可能性がある。本格的に遺伝的なタグ付を行うのであれば利用可能な遺伝子座を増やして片親が同じ場合の個体識別の精度を上げる必要があると考えられる。

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、大仙丈沢のみ遺伝的組成が異なり遺伝的浮動の影響が示唆された。また、大仙丈沢以外の集団は互いに遺伝的組成が似ており、明瞭な遺伝的な分化は認められなかった。これらの結果は大仙丈沢以外の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のかもしれない。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。また、組織培養の域外保全個体についてマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝的タグ付ができることが示された。域外保全個体を自生地に植え戻す場合は遺伝的多様性や由来する集団に配慮する必要がある⁶⁾、これらの遺伝子型タグは域外保全集団の管理に有用である。現状では、ミヤマハナシノブの自生地への植え戻しを行う必要はないと考えられるが、将来に渡って再導入ソースとして域外保全集団を位置づけるためには、今回使用した遺伝マーカーを用いた管理が必須だと考えられる。

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II (維管束植物)], 自然環境研究センター (2000)
- 5) 長池卓男, 西川浩己, 飯島勇人, 北原正彦, 杉田幹夫, 中野隆志, 伊藤和彦, 亀井忠文, 横川昌史, 井鷲裕司, 中村健一, 田村哲生, 竹田謙一 : 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 6, 61-64. (2011)
- 6) Flankham R, Ballou JD, Briscoe DA : Introduction to Conservation Genetics, Cambridge University Press (2010)
- 7) Schwartz MK, Luikart G, Waples RS : Trends in Ecology and Evolution, 22, 1, 25-33. (2007)
- 8) 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, 7, 59-62. (2012)
- 9) 長池卓男, 西川浩己, 飯島勇人, 北原正彦, 杉田幹夫, 中野隆志, 伊藤和彦, 亀井忠文, 横川昌史, 井鷲裕司, 中村健一, 田村哲生, 竹田謙一 : 山梨県総合理工学研究機構研究報告書, 7, 59-62. (2012)
- 10) Gitzendanner MA, Weekley CW, Germain-Aubrey CC, Soltis DE, Soltis PS : Conservation Genetics 13, 1, 223-234. (2012)
- 11) 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, 69-75. (2011)
- 12) Milligan B : Molecular genetic analysis of

- populations : apractical approach, IRL Press, 59-88. (1992)
- 13) Yokogawa M, Kaneko S, Isagi Y : Conservation Genetics, 10, 5, 1445-1447. (2009)
 - 14) Yokogawa M, Kaneko S, Takahashi Y, Isagi Y : Biological Conservation 157 : 401-408. (2013)
 - 15) El Mousadik A, Petit RJ : TAG Theoretical and Applied Genetics, 92, 7, 832-839. (1996)
 - 16) Kalinowski ST : Conservation Genetics, 5, 539-543. (2004)
 - 17) Peakall R, Smouse PE : Molecular Ecology Notes, 6, 1, 288-295. (2006)
 - 18) Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P : Genetics, 155, 2, 945-959. (2000)
 - 19) Falush D, Stephens M, Pritchard JK : Genetics, 164, 4, 1567-1587. (2003)
 - 20) Hubisz M, Falush D, Stephens M, Pritchard JK : Molecular Ecology Resources, 9, 5, 1322-1332. (2009)
 - 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)

成果発表状況

学会発表

なし

学会誌等掲載

なし