

全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全

Conservation of endangered plant species based on information from complete genotyping

井鷲 裕司*
Yuji ISAGI*

京都大学大学院農学研究科森林科学専攻
Division of Forest and Biomaterials Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

摘 要

個体レベルでは有限の寿命を持つ生物の種を保全するには、個体群を構成する個体間で正常に交配させ、世代交代をはかっていく必要がある。その場合個体数が数百オーダー以下にまで減少してしまった絶滅危惧植物を対象に、野生に生育する全個体の遺伝子型を解析することで、より適切かつ効果的な生物多様性保全が可能である。このようなアプローチの例として、ハザクラキブシとシモツケコウホネを対象とした解析を紹介する。小笠原諸島母島の灌木林に生育する固有種ハザクラキブシは十数本の野生個体と100本あまりの苗畑稚樹が現存するに過ぎないが、全個体遺伝子型解析を行うことで、未知の野生個体の存在が明らかになった。北関東に生育する国内希少野生動植物種シモツケコウホネは遺伝解析の結果、現存するクローン数が100に満たないことが判明した。すべてのクローンの生育場所が明らかになったことで、市場に流通している個体の由来を特定することが可能となった。

キーワード：生物多様性, 絶滅危惧種, 全個体遺伝子型解析, 保全遺伝学,
保全ゲノミクス

Key words : biodiversity, endangered species, complete genotyping,
conservation genetics, conservation genomics

1. はじめに：日本における絶滅危惧種の現状と 保全活動の問題

日本列島には亜種、変種も含めて約7,000種の維管束植物が分布しているが、そのうちの4分の1が絶滅が危惧される状況にある。生物多様性の重要性は広く認識されつつあるが、種の絶滅に関しては依然として状況は深刻である。日本産維管束植物を対象としたレッドリストによれば、野生に生育する植物種の中で、最も状況が厳しい絶滅危惧I類にランクされているものが1,000種を超えている。これらの種の多くは、野生に生育する個体数がおおむね数百以下になっている。

生物種はいわゆる「絶滅の渦」として知られているプロセスをたどって絶滅に至ると考えられている。すなわち、乱獲や生育地の破壊・汚染により個体数が減少することで、人口学的揺らぎや突発的事象の影響を受けやすくなり、また、個体数が減少することで近親交配による近交弱勢が発現する。これらのことが個体群に複合的に作用し、最終的にすべての個体群が存続できなくなる。絶滅の渦を構成するこれらの要素の中でも、遺伝的要因は、影響力の

大きなものである¹⁾。

個体レベルでは有限の寿命を持つ生物の種を保全するには、美術品や建築物を保管する場合と異なり、個体群を構成する個体間で正常に交配させ、世代交代をすることははからなければならない。さらに、生物種が保持している遺伝的多様性、遺伝子交流の量とパターン、個体群の遺伝的分化(個体群間で遺伝的特徴が異なっていること)、交配様式、遺伝的荷重(有害遺伝子を保持することによる個体の適応度の低下)、世代交代に伴う対立遺伝子頻度の変化、更新個体の遺伝的特徴、人工繁殖における遺伝的に適切な交配相手の選定、個体群レベルの遺伝構造から判断した適切な移植場所の決定、等々、多くの遺伝的情報が必要である¹⁾。

絶滅危惧種の保全に関しては、努力が実り個体数が維持・回復している事例もある。しかしながら、絶滅危惧種を対象にした多くの生物保全活動では、遺伝解析に余分にコストや手間がかかること、あるいは遺伝解析そのものの必要性に対する認識の欠如から、遺伝情報を用いないで、ただ単に個体数を増大させることを目的とした生物保全が行われていることが少なくない。もちろん、これらの保全活動は

受付：2013年4月4日、受理：2013年7月5日

* 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町, e-mail : isagi@kais.kyoto-u.ac.jp

善意で行われているが、特定系統の人工増殖と植え戻し、空間的遺伝構造を考慮しない移植、血縁度を考慮しない人工交配、近縁種との交雑による遺伝子汚染など、遺伝的情報を考慮しない保全活動は、投入したコストを無駄にするだけでなく、絶滅危惧種の集団維持にとって致命的なダメージを与えるものである。絶滅危惧種の遺伝子汚染に関しては、岐阜県と滋賀県の清流のみに生育する絶滅危惧種であるトゲウオ科の魚類ハリヨの例が挙げられる。ハリヨの滋賀県の生育地では、同じく絶滅危惧種である近縁種のイトヨが人為的に持ち込まれた結果、現存するほぼ全ての個体が交雑由来のものとなっている。滋賀県のハリヨは一見個体数は維持されているように見えても、遺伝的には絶滅しているといえる。

2. 全個体遺伝子型解析

近年著しく発展した遺伝子解析技術を用いれば、絶滅危惧植物の中でも個体数が数百オーダー以下に減少してしまった種を対象に、残存する全繁殖個体の位置情報と遺伝子型を明らかにすることはさほど困難なことではない。そして、そのような情報は、絶滅危惧植物の現状を正しく評価し、より合理的で適切な保全策を構築することに有効に活用することができる²⁾。

この方法では、まず、個体数が数百未満に減少した絶滅危惧種を対象に、生育位置と繁殖状況を明らかにするとともに、DNA解析用の葉サンプルを採集する(図1上)。DNA解析用のサンプルは1個体あたり1cm²未満の葉があればよく、希少な絶滅危惧種の個体にダメージを与えることはない。葉サンプルからDNAを抽出し、絶滅危惧種ごとにマイクロサテライト遺伝マーカーを開発した後に、全野生個体の遺伝子型解析を行う。マイクロサテライトとは、DNAを構成する4種の塩基が2~6塩基の長さを単位として反復して配列しているものであり(例えばAGを繰り返し単位としてAGAGAGAGAGAG...のように反復している)、ゲノム内に多数座位が存在するうえに、反復回数は個体ごと、座位ごとに変化に富んでいる。マイクロサテライト遺伝マーカーは、この反復回数の違いを個体識別や遺伝解析のためのマーカーとして利用するものであり、これを用いて得られた遺伝情報をもとに集団遺伝学的解析を行い、生物保全に活用する。また、生活史特性や個体群履歴の異なる多様な絶滅危惧種を対象にデータを蓄積し、メタ解析することで、種間や生育地間の比較や、種や個体群の持続可能性について評価・予測を行うことができる(図1下)。

本稿ではこのアプローチによる絶滅危惧植物保全の可能性について、小笠原諸島母島の森林のみに生育するハザクラキブシと、北関東の森林に囲まれた

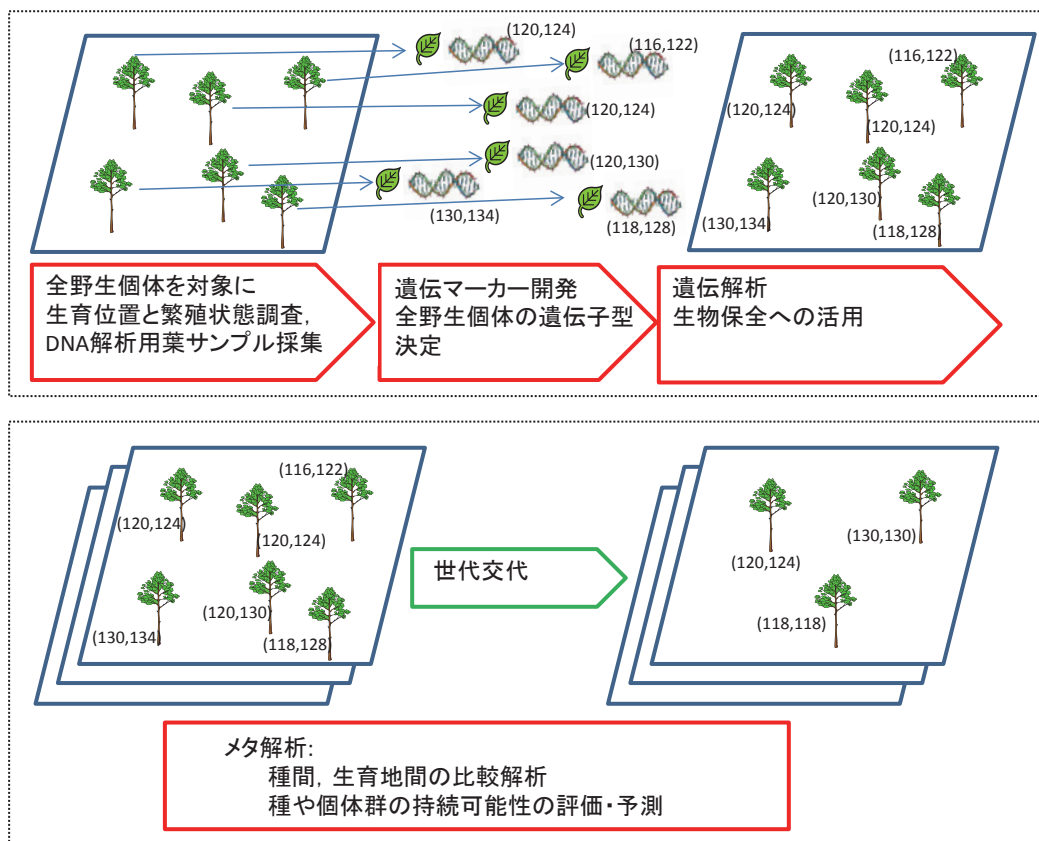


図1 全個体遺伝子型解析による絶滅危惧種の保全。
カッコ内の数字はマイクロサテライト遺伝マーカーの遺伝子型を示す。

田園地帯に生育するシモツケコウホネの事例をふまえて紹介する。

3. ハザクラキブシ

3.1 小笠原諸島に生育する絶滅危惧植物

ハザクラキブシ

近年世界遺産に登録された小笠原諸島は、本州から1,000 km 離れた典型的な海洋島、すなわち一度も他の島と地続きになったことのない島である。小笠原諸島では、これまで生物の移入に強い制約がかかってきたため、少数の個体に由来する個体群から種分化と適応放散が起こってきており³⁾⁻⁵⁾、維管束植物種の固有率は44.6%にも達する⁶⁾。残念なことに、現在、開発や移入種などの影響を受け、固有種の30%が絶滅危惧種となっている。また、小笠原諸島では絶滅危惧種の割合が高いだけでなく、絶滅危惧カテゴリーのより高度な、絶滅危惧I類の種が多いことも特徴として挙げられる。現存する個体が、わずか数十~数百個体にまで減少してしまった種も少なくない。

ハザクラキブシ(*Stachyurus macrocarpus* var. *prunifolius*)は、小笠原諸島の母島にのみ生育しているキブシ科の灌木である。1939年にTsuyamaにより記載されたが⁷⁾、第二次世界大戦後からごく最近まで母島乳房山の森林に1個体のみが生育することが知られていた。小笠原諸島の絶滅危惧植物の中でも特に危機的な状況にある植物である。

ハザクラキブシは雌雄同株であり、唯一の野生個体は毎年のように開花はするものの、発芽能力のある種子を結実しないことから、本種の保全状況は深刻なものであった。しかしながら、幸いなことに、

2007年に14個体が母島北部の石門地域において約50 m²の面積にわたって野生状態で新たに発見され⁸⁾、また2008年には、さらに1個体が石門で発見された⁹⁾。

これらの新たに発見された野生個体のうち、3個体において結実が認められたので、人工播種が行われた。その結果、約300個体の稚樹が母島内の個人所有の苗畑で育つに至った。これらの稚樹は3個体だけの繁殖個体に由来するため、野生に残存している遺伝的多様性や特徴を完全に網羅しているとは限らない。これらの稚樹をどのように生物多様性保全に活用すればよいのであろうか。

3.2 ハザクラキブシの全個体遺伝子型解析

この疑問に答えるために、野生状態で存在する全個体と、苗畑で生育する稚樹を対象に、マイクロサテライトマーカ-8 遺伝子座¹⁰⁾を用いて遺伝解析を行った。図2には解析したマイクロサテライト遺伝子座の1つ *Smap058* における遺伝子型を例示した。

この遺伝子座では、野生個体群に4種類の対立遺伝子(A, B, C, D)が保持されている。図2の例では苗畑稚樹の種子親である野生個体1は、遺伝子座 *Smap058* において、対立遺伝子Cをホモ接合の形で保持していたので、個体1に由来する苗木はすべてが対立遺伝子Cを保持している。また、既知の野生個体群が持っていた4種の対立遺伝子のうち、Aは苗畑の稚樹個体群には伝わっていない。苗畑稚樹個体群は少数の種子親に由来するものであるから、世代交代に伴う対立遺伝子数の減少は容易に起こりうることである。このことは、予想されていた結果であるといえるが、苗畑に維持されている稚樹を野生個体群の復元に用いる際には、野生個体群の

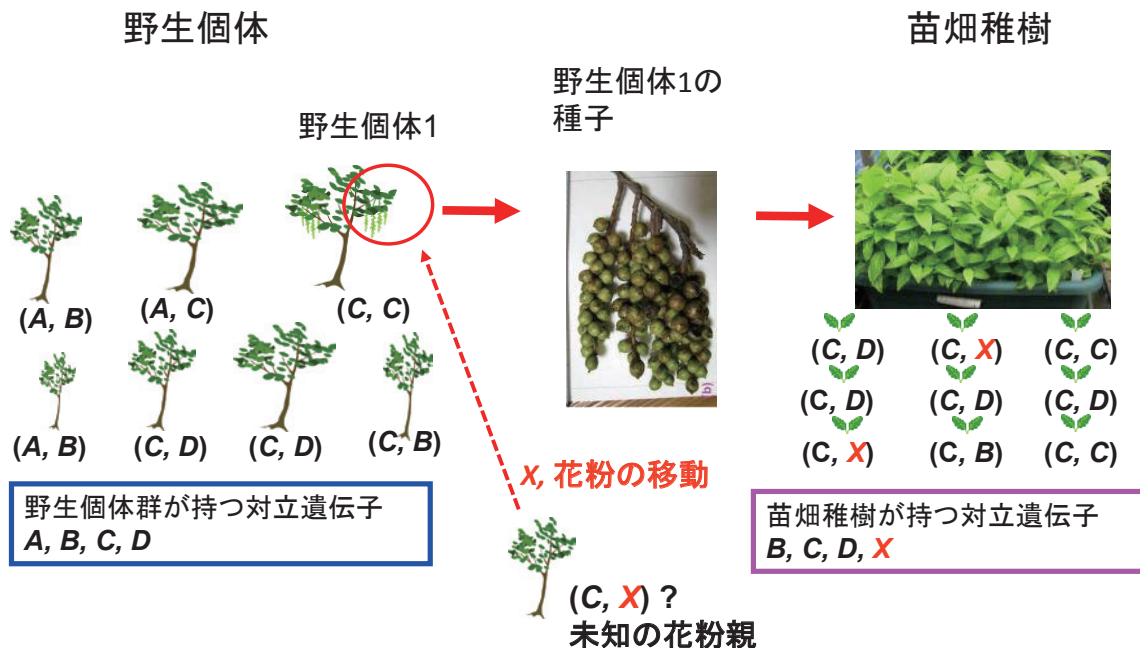


図2 ハザクラキブシ野生個体と苗畑稚樹の遺伝子座 *Smap058* における遺伝子型.

遺伝的多様性を十分には反映したものではないことに留意した取り扱いが必要であることを示している。

これとは逆に、苗畑稚樹の一部が保持していた対立遺伝子 X は既知の野生個体群には見られないものであった。この稚樹が保持していた対立遺伝子 X は、解析時には発見されていなかった未知の野生個体が生産した花粉によって、既知の野生種子親に運ばれて受精し、稚樹に遺伝したものと考えられる。これは、全個体の遺伝子型を明らかにしていたからこそ可能だったのである。

ハザクラキブシの生育地は、急勾配の斜面に成立した低灌木林であり、野生個体の網羅的探索には多大な労力を要するが、本解析アプローチによって、未知の野生個体の存在が明確に示された。このことは現地における探索のモチベーションを上げることにつながり、その結果、野生個体を新たに発見することにつながった⁹⁾。

絶滅危惧 IA 類にランクされる分類群は、野生個体数がきわめて少ないため、全残存個体を対象とした遺伝子型解読を比較的容易に行えるが、そのことによって、種レベルで保持されている遺伝的多様性を明らかにするだけでなく、未知の野生個体の存在を予測することもできるのである。そして、個体数が少ない絶滅危惧分類群の保全にとって、そのような未知の野生個体の存在が非常に重要であることは言うまでもない。

4. 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北関東地方固有の絶滅危惧水生植物である¹¹⁾ (図 3)。日本に生育

するコウホネ属植物が、主に止水状態にある池や、流れのきわめて緩やかな川の畔に生育するのに対して、シモツケコウホネは年間を通して清流が維持された比較的小規模の水田用水路を主要な生育地とする。したがって、本種の維持には、山地から安定した清流が供給されている田園地帯が保たれていることが重要である。

かつては、少なくとも栃木県の 16 カ所で生育していたが、現在では主要な生育地は、栃木県内の 4 カ所に限られており、群落面積は合計 60 m² 程度であるにすぎない。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。シモツケコウホネは、その希少性と外部形態の美しさから、園芸目的の盗掘も行われており、この点に対する対策も必要である。

シモツケコウホネは種子繁殖も行うが、主に地下茎で無性的に栄養繁殖し、遺伝的に同一の個体が繁茂する。そのため、群落に遺伝的に異なった個体が何個体あるのかを目視で判断するのは難しい。残存するシモツケコウホネは遺伝的に何個体あるのだろうか。それぞれの集団は遺伝的に分化しているのか。遺伝情報を用いた盗掘防止策を構築することはできないのか。これらの疑問に答えるために、志賀ら¹²⁾は、現存する個体群から網羅的なサンプリングを行うとともに、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、野生個体と同様の DNA 解析を行っている。解析に用いたマイクロサテライトマーカーは、*Nuphar lutea* 用にすでに開発されていたもの¹³⁾に加えて、シモツケコウホネ用に新たに開発されたもの¹⁴⁾をあわせて、20 遺伝子座である。

解析の結果、シモツケコウホネの野生個体群を構成するクローンは 53 と、見かけの個体数よりは著

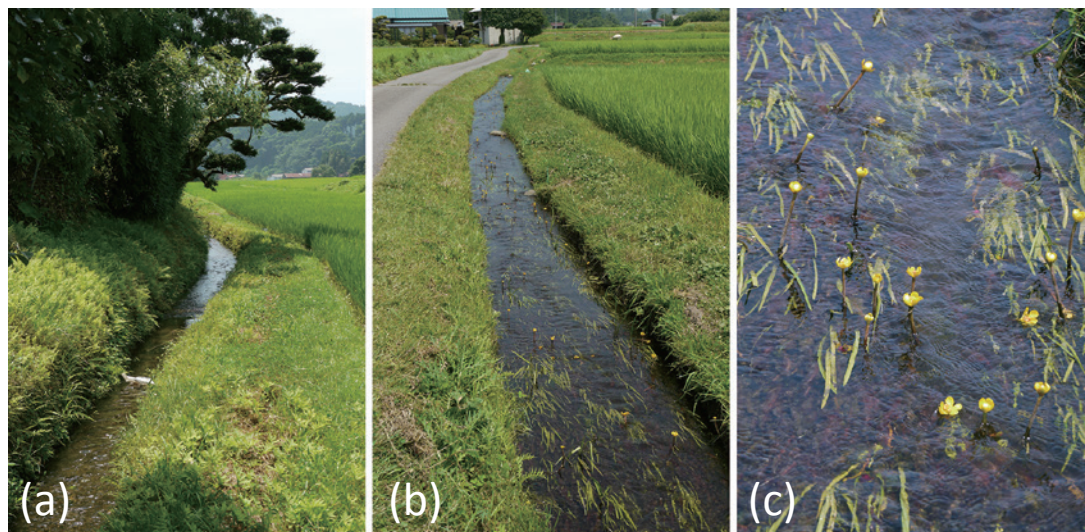


図 3 北関東に生育する絶滅危惧植物シモツケコウホネ。

- (a) 生育地は年間を通して透明度の高い水が流れる小規模の用水路である。
 (b) 現存する最大の個体群。新種として記載された後に、地元の熱心な団体によって保護管理されている。
 (c) 開花中のシモツケコウホネ。コウホネ属の他種と異なり、シモツケコウホネの葉は全てが沈水葉である。淡色の細葉はミクリ属植物である。

しく少ないことが明らかになった(Shiga *et al.*, unpublished)。また、現存する個体群は地理的に隔離しているだけでなく、遺伝的にも明確に分化していた。そのため、おのおのの個体群をそれぞれの地域で、独自の保全対象とすべきであり、個体群間の移植は行うべきでないといえる。

シモツケコウホネに関しては、野生生育個体が少ないにもかかわらず、インターネットでは盗掘由来と思われる個体が販売されている。シモツケコウホネは2012年4月20日より、環境省により国内希少野生動植物種に指定され、捕獲・採取、譲渡等が原則禁止となった。シモツケコウホネでは現存するすべての野生クローンについて、生育位置と遺伝子型が明らかになったので、その情報を活用して、流通個体の種同定や由来を識別することも可能である。インターネット上で流通していた個体について遺伝子型の解読を行ったところ、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ことが、強く示唆された¹²⁾。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¹⁵⁾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¹²⁾。

もちろん、全個体の遺伝子型が判明していることのメリットは盗掘防止だけにとどまるものではない。生育地で野生個体群の持続的存続が困難な場合には、生育域外保全が行われているが、その際には遺伝的に異なった複数個体を保全個体として適正に選定することや、生育域外における世代交代を通して遺伝的多様性が保持されているかどうか確認することなどに関しても、遺伝情報は有用である。

5. 全個体遺伝子型解析の生物保全への意義

以上のように、現存する全野生個体の遺伝子型を決定することで、絶滅危惧植物の現状に関して有用な情報を得ることができた。その情報は、絶滅危惧種の遺伝的状況に対する適切な評価、局所集団ごとの特徴や保全上の価値の評価、遺伝的汚染の検出と予防、盗掘の防止・検出、集団持続可能性の評価・予測等を通して絶滅危惧種の保全に活用できるものと期待される。

本稿で紹介した絶滅危惧種は、いずれも野生個体数が数百レベル以下となったものであるが、現在の技術を用いれば、そのような解析は比較的容易かつ低コストに行うことができる。そして、現存するすべての野生個体を対象に遺伝子型の決定を行うことで、次のような生物多様性保全に意義のある情報を得ることができ、より効果的な保全策を構築するこ

とが可能になる。

- (a) 残存するすべての個体に遺伝的なタグが付加された状況となり、個体の遺伝的同一性が明らかになる。これにより、野生に生育する個体数を遺伝的に評価できるし、違法盗掘によって市場に流通した個体についても、由来が特定でき、これが盗掘の抑制力として働くことも期待できる。
- (b) 個体数が減少した生物においては、近親交配による適応度の低下が大きな問題となる。一般に、野生植物には家系図がないが、全個体間で血縁度を推定すれば、残された数少ない個体間で、近交弱勢リスクを防ぐような適切な花粉親、種子親の選定を行うことができる。
- (c) 多くの生物種は同一種であっても、遺伝的に分化した局所個体群によって種全体の個体群が構成されている。そのような局所個体群の分布と遺伝的分化の程度は、これまでの種の進化と分布変遷を反映したものであり、同一種であっても、無配慮な移植は長い時間を経て形成された種の歴史を破壊することにつながる。また、血縁度が高い個体同士の交配は、近交弱勢という弊害をもたらすが、これとは逆に、遺伝的に大きく分化した個体間では、交配によって適応度の低い子供が生まれることがある。これが外交配弱勢であるが、種を構成する個体や個体群の空間的遺伝構造を明らかにすることで、保全のための適切な移植場所の決定、外交配弱勢を回避できる交配相手の選定が可能になる。
- (d) 全個体の遺伝子型情報をもとに継続調査を行うことで、世代交代による遺伝的多様性・対立遺伝子頻度の変化、個体ごとの適応度の差異、繁殖個体の交配範囲、小集団ごとの遺伝的分化の有無等を知ることができる。これらの項目は集団の持続可能性を評価する上できわめて重要な情報となる。

6. おわりに：大量遺伝情報時代の生物保全

遺伝子解析技術は絶え間なく発展してきたが、ここ数年来、いわゆる次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer, NGS)の開発と普及によって、爆発的ともいえる量の遺伝情報が実現可能なコストと手間で解読できるようになった。

従来、生物保全を目的とした集団遺伝学、すなわち、保全遺伝学においては、10～20程度の比較的少数の中立遺伝子座を対象とした解析が行われることが多かった。しかしながら、NGSを用いた解析では、野生生物を対象に1万を超える遺伝子座について一度に遺伝子型を解読することも可能である。この状況に対応して、ゲノムレベルの情報に基づいて生物保全を行う保全ゲノミクスという研究分野も

表1 保全遺伝学と保全ゲノミクスにより得られる生物保全のための情報。

	保全遺伝学	保全ゲノミクス
解析対象遺伝子座	比較的少数の中立遺伝子座	多数の中立および適応的遺伝子座
得られる情報	遺伝的多様性 遺伝的分化 遺伝子交流 親子判定 血縁度 など	環境適応メカニズム 環境応答予測 形質と遺伝子型の関連 進化プロセス 遺伝子発現 など

発展しつつある。ゲノムレベルの情報に基づくことで、中立遺伝子座の解析に基づく遺伝的多様性、遺伝的分化、遺伝子流動などの情報に加えて、環境への応答や進化に直接関連する適応的遺伝子座の解析も可能になる(表1)。本稿で紹介したような野生残存個体が数百未満の絶滅危惧種についても、すべての野生個体についてゲノムレベルで解析を行い、より適切な保全が行える時代が間近に迫っている。

引用文献

- Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe (2010) *Introduction to Conservation Genetics*. 2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge.
- 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 (2012) 全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全. *DNA 多型*, 20, 148-152.
- Soejima, A., H. Nagamasu, M. Ito and M. Ono (1994) Allozyme diversity and the evolution of *Symplocos* (Symplocaceae) on the Bonin (Ogasawara) Islands. *Journal of Plant Research*, 107, 221-227.
- Ito, M., A. Soejima and M. Ono (1997) Allozyme diversity of *Pittosporum* (Pittosporaceae) on the Bonin (Ogasawara) Islands. *Journal of Plant Research*, 110, 455-462.
- Takayama, K., T. Ohi-Toma, H. Kudoh and H. Kato (2005) Origin and diversification of *Hibiscus glaber*, species endemic to the oceanic Bonin Islands, revealed by chloroplast DNA polymorphism. *Molecular Ecology*, 14, 1059-1071.
- Abe, T. (2006) Threatened Pollination Systems in Native Flora of the Ogasawara (Bonin) Islands. *Annals of Botany*, 98, 317-334.
- Tuyama, T. (1939) *Plantae Boninensis Novæ vel Criticæ*. XII. *Botanical Magazine Tokyo*, 53, 1-7.
- Abe, T. and Y. Hoshi (2008) Ecological characteristics of the endangered shrub *Stachyurus macrocarpus* var. *prunifolius* Tuyama revealed by a population discovery in Haha-jima Island (Ogasawara). *Japanese Journal of Conservation Ecology*, 13, 219-223.
- Kaneko, S., T. Abe and Y. Isagi (2013) Complete genotyping in conservation genetics, a case study of a critically endangered shrub, *Stachyurus macrocarpus* var. *prunifolius* (Stachyuraceae) in the Ogasawara Islands, Japan. *Journal of Plant Research*, 126, 635-642.
- Kaneko, S., T. Abe and Y. Isagi (2009) Development of microsatellite markers for *Stachyurus macrocarpus* and *Stachyurus macrocarpus* var. *prunifolius* (Stachyuraceae), critically endangered shrub species endemic to the Bonin Islands. *Conservation Genetics*, 10, 1863-1865.
- Shiga, T., J. Ishii, Y. Isagi and Y. Kadono (2006) *Nuphar submersa* (Nymphaeaceae), a new species from central Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 57, 113-122.
- 志賀隆・横川昌史・兼子伸吾・井鷲裕司 (2013) 全個体遺伝子型解析データに基づく市場に流通する絶滅危惧水生植物シモツケコウホネ *Nuphar submersa* とナガレコウホネ *N. × fluminalis* (Nymphaeaceae) の種同定産地同定. 保全生態学研究 (印刷中).
- Ouborg, N. J., W. P. Goodall-Copestake, P. Saumitou-Laprade, I. Bonnin and J. T. Eppelen (2000) Novel polymorphic microsatellite loci isolated from the yellow waterlily, *Nuphar lutea*. *Molecular Ecology*, 9, 497-498.
- Yokogawa, M., T. Shiga, S. Kaneko and Y. Isagi (2012) Development of nuclear microsatellite markers for the critically endangered freshwater macrophyte, *Nuphar submersa* (Nymphaeaceae), and cross-species amplification in six additional *Nuphar* taxa. *Conservation Genetics Resources*, 4, 295-298.
- Shiga, T. and Y. Kadono (2007) *Nuphar xfluminalis*, a new hybrid from central Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 58: 43-50.



井鷲 裕司

Yuji ISAGI

京都大学大学院農学研究科教授。各種遺伝マーカーを用いて、森林に生育・生息する動植物の生態や保全に関わる研究を行っている。絶滅危惧種を対象に、野生に残存している全個体の遺伝子型を解析することや、花粉一粒遺伝分析、タケ群落の炭素循環、豊凶現象のモデリングなどを行ってきたが、現在、最も興味を引かれているのが、次世代シーケンサーから生み出される大量の遺伝情報を生物の進化研究や生物多様性保全に活用することである。