

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 遺伝構造の解析

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集団のうち、大樺沢、草すべり、大樺沢下流で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21遺伝子座の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したところ、6遺伝子座で多型が確認されたため、この6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。遺伝的多様性は大樺沢下流で低い傾向にあったが、大樺沢と草すべりでは大きな違いはなかった。遺伝的分化の指標であるFST, RSTの値はともに小さかったが、FSTはそれぞれの個体群間で有意に0より大きかった。主座標分析およびSTRUCTURE解析を用いて、遺伝構造の評価を行ったところ、3つの集団間には遺伝的な分化は認められなかった。今後はまだサンプルを採取していない個体群でも同様の調査を行い、北岳全体のミヤマハナシノブの遺伝的多様性および遺伝構造の評価を行う必要がある。

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

Masashi YOKOGAWA¹, Takuo NAGAIKE², Hiroki NISHIKAWA², and Yuji ISAGI¹ (¹Kyoto University, ²Yamanashi Forest Research Institute).

Abstract *Polemonium caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum* (Polemoniaceae) is an endangered perennial herb that occurs in Mount Kita, central Japan. We investigated genetic diversity and genetic structure of three populations (Okanbasawa, Kusasuberi, and lower Okanbasawa) of *P. caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum* using six microsatellite markers to inform future conservation management strategies for the species. For initial marker screening, we used a total of 21 microsatellite loci isolated from *Polemonium kiushianum*. Six of these 21 loci were used in subsequent analysis because they showed polymorphism. Levels of genetic diversity between Okanbasawa and Kusasuberi were similar to each other. However, genetic diversity in lower Okanbasawa was much lower than that in Okanbasawa and Kusasuberi. F_{ST} value and R_{ST} values among the three populations were very low. The results of principal coordinate analysis and STRUCTURE analysis indicated that there was no genetic divergence among the three populations. From now, exhaustive genetic analysis of distribution range of *P. caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum* will be required.

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・楡形山・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⁾。

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ことが知られている⁵⁾。遺伝的多様性の消失は、環境変動に対する適応可能性を低下させる可能性がある。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⁾。よって、絶滅危惧種のより効果的な保全を行うためには、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⁾。ミヤマハナシノブの遺伝的多様性の現状を理解した上で保全策を構築するため、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。

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、大樺沢下流の3カ所である(図1)。2010年10月に登山道沿いを歩きながらDNA解析用のサンプルを採取した。大樺沢から41個体、草すべりから38個体、大樺沢下流から8個体、合計87個体を対象に少量の葉を採取した。採取した葉は、DNA抽出まで-30℃で保存した。採取場所は南アルプス国立公園内の保護地域内であり、山梨県みどり自然課による採取許可を得た。

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⁷⁾を用いて、ゲノムDNAの抽出を行った。抽出後、近縁種であるハナシノブ *P. kiushianum* Kitam. (ハナシノブ科)のマイクロサテライト遺伝子座、

21座 (Pkiu006, Pkiu059, Pkiu129, Pkiu135, Pkiu208, Pkiu212, Pkiu227, Pkiu239⁸⁾; Pkiu228, Pkiu237, Pkiu314, Pkiu577, Pkiu627, Pkiu765_3, Pkiu776_3, Pkiu853_3, Pkiu953_3, Pkiu961, Pkiu963_3, Pkiu965_3, Pkiu1052_3, Yokogawa et al. unpublished data) のスクリーニングを行い、ミヤマハナシノブの解析に使用できるマーカーを検討した (表1)。その結果、多型が確認された遺伝子座を用いて遺伝的多様性および遺伝構造の解析を行った。

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 $^{\circ}$ 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を用いた, Table 1 参照), 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 (M_n : 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_n : allelic richness)⁹⁾ を算出した。また、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、および連鎖不平衡をFSTAT¹⁰⁾ を用いて検定した。

個体群間の遺伝的分化を評価するため、GenAlEx¹¹⁾ 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、個体の遺伝子型間の距離を調べるために、すべての組み合わせについて共有対立遺伝子距離 D_{AS} ¹²⁾ を算出した。この遺伝距離 D_{AS} に基づきGenAlExを用いて主座標分析 (PCo: Principal coordinate analysis) を行った。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。10⁵ 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

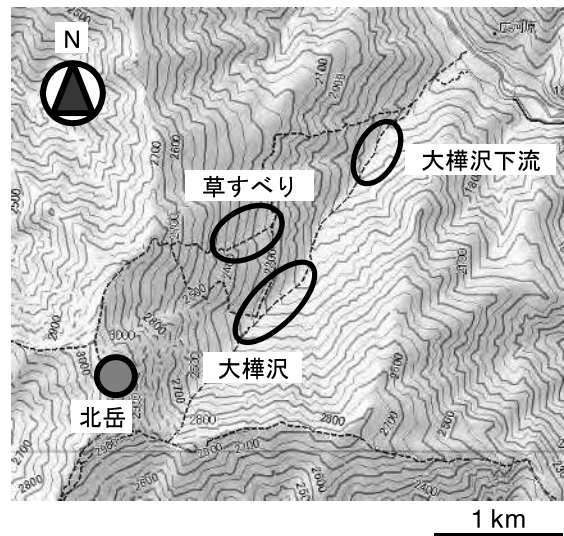


図1 調査した集団の位置関係。
それぞれの集団は樹林帯で分断されている。

= 1~5 について20回の繰り返しで計算した。

3. 結果

ハナシノブで開発された21遺伝子座の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したところ、9遺伝子座で増幅が確認された。増幅が確認された9遺伝子座について、全87個体の遺伝子型を決定した (表2) ところ6遺伝子座で多型が確認された (表1)。以後の解析は多型が確認された6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対立遺伝子数 (NA) が2.17~3.33, 対立遺伝子多様度 (AR) が2.08~2.52, ヘテロ接合度の観察値 (H_o) が0.21~0.30, ヘテロ接合度の期待値 (HE) が0.23~0.38であった (表3)。固有対立遺伝子は大樺沢においてのみ検出された (表3)。また、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および遺伝子座間の連鎖不平衡は検出されなかった。

遺伝的分化の指標である集団間のFSTおよびRST はいずれも大きな値は示さなかった (表4)。FST 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、RST では有意差はなかった (表4)。個体の遺伝子型間の遺伝距離に基づく主座標分析では、各個体が拡散してプロットされ、明瞭な構造は認められなかった (図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 ($\ln P(X/K)$) 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3)。

4. 考察

4-1 マイクロサテライトマーカーの有効性

表1 解析に用いたプライマーとハナシノブおよびミヤマハナシノブで検出された対立遺伝子数.

遺伝子座	プライマーの配列 (5'-3')	T_a (°C)	対立遺伝子数	
			<i>P. kiu.</i>	<i>P. cae.</i>
Pkiu006	TCTCTCTCTCACACACACAC AACAGTAACACCAAGTCCTCCT	57	4	8
Pkiu059	AGAGAGAGAGAGACACACACAC GAATCTAGTTGTGCTTGAATGG	57	5	_ ^a
Pkiu129	TCTCTCTCTCACACACACAC TGAACTCAAGTTCAGGTTG	57	2	3
Pkiu135	AGAGAGAGAGAGACACACACAC GAATATGCTCGTAGGCTCGT	57	10	_ ^a
Pkiu208	AGAGAGAGAGAGACACACACAC GGTACTGTTTACACAGCCAAA	57	2	1
Pkiu212	AGAGAGAGAGAGACACACACAC GTCTTGTCCACTTTCCAACAC	57	12	_ ^b
Pkiu227	AGAGAGAGAGAGACACACACAC TCCACTCTGTTGTTAGGACAAA	57	2	2
Pkiu228	AGAGAGAGAGAGACACACACAC GGACCTTTAGTCACGAACCTTG	57	1	_ ^a
Pkiu237	AGAGAGAGAGAGACACACACAC AACTTCCGATAAGTTTCTGCAT	57	1	_ ^a
Pkiu239	AGAGAGAGAGAGACACACACAC ATTGCCAATCACATGTAACGTA	57	4	_ ^a
Pkiu314	AGAGAGAGAGAGACACACACAC CTAGAATTGGACATGTTTGAA	57	2	1
Pkiu577	AGAGAGAGAGAGACACACACAC ATAATTAGCCCTTCAAATACGC	57	1	_ ^a
Pkiu627	ACACACACACACTCTCTCTCTC GAGGGACAGAGAGATCAAGAAC	57	4	_ ^a
Pkiu765_3	AGAGAGAGAGAGACACAC GGATTTAATTCAAGAGTGTA	45	1	_ ^a
Pkiu776_3	AGAGAGAGAGAGACACAC ATAGGATAAAGTTGTCATAGTA	45	_ ^a	_ ^a
Pkiu853_3	AGAGAGAGAGAGACACAC TACAAATCATATAAAACCTACT	45	1	3
Pkiu953_3	AGAGAGAGAGAGACACAC GATTATAAGAATTGCATTAGT	45	1	_ ^a
Pkiu961	AGAGAGAGAGAGACACACACAC TTTATTTGGGTTGATTTGGACT	57	1	3
Pkiu963_3	AGAGAGAGAGAGACACAC ATACAATATGTTCAAAATTC	45	1	_ ^b
Pkiu965_3	AGAGAGAGAGAGACACAC TAATAGTCATAAAATAAGAGGT	45	8	1
Pkiu1052_3	AGAGAGAGAGAGACACAC GTCTCGATAGGATACATCT	45	1	2

T_a , アニーリング温度; *P. kiu.*, ハナシノブ; *P. cae.*, ミヤマハナシノブ

^a クリアーなピークが検出されなかった遺伝子座

^b 3つ以上のピークが検出されたため、解析から除外した遺伝子座

ミヤマハナシノブのマイクロサテライトマーカーは開発されてないため、本研究ではハナシノブで開発されたマイクロサテライトマーカー⁸⁾を用いた。他種で開発されたマイクロサテライトマーカーを用いた場合、多型性が低くなることが知られている¹⁶⁾が、今回は21遺伝子座のうち6遺伝子座で多型が得られた。多型が確認された遺

伝子座のうち、近縁種であるハナシノブの遺伝的多様性が報告されている3遺伝子座 (Pkiu006, Pkiu129, Pkiu227)⁸⁾について対立遺伝子数を種間比較してみると、Pkiu006ではミヤマハナシノブで対立遺伝子数が多く、Pkiu129とPkiu227では同じであった。このことから、ハナシノブのマイクロサテライトマーカーを転用し

表2 ミヤマハナシノブの個体の位置情報と遺伝子型.

サンプル ID	集団	遺伝子型																	
		Pkiu006		Pkiu129		Pkiu227		Pkiu853		Pkiu961		Pkiu1052		Pkiu208		Pkiu314		Pkiu965	
1	大権沢	89	103	100	100	196	196	300	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
2	大権沢	103	103	100	100	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
3	大権沢	89	103	98	100	196	196	300	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
4	大権沢	103	103	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
5	大権沢	103	103	102	102	196	196	302	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
6	大権沢	103	103	98	100	196	196	300	302	88	90	130	130	97	97	217	217	146	146
7	大権沢	103	103	98	98	196	196	300	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
8	大権沢	103	103	98	100	196	196	302	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
9	大権沢	103	103	100	102	196	196	302	302	86	88	130	132	97	97	217	217	146	146
10	大権沢	103	103	98	100	196	196	302	310	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
11	大権沢	103	105	100	100	196	196	300	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
12	大権沢	103	103	102	102	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
13	大権沢	103	103	100	100	196	196	300	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
14	大権沢	103	103	100	100	194	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
15	大権沢	103	105	100	100	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
16	大権沢	103	103	98	100	196	196	302	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
17	大権沢	103	103	100	100	194	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
18	大権沢	99	103	100	102	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
19	大権沢	99	103	100	102	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
20	大権沢	103	105	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
21	大権沢	99	103	98	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
22	大権沢	101	103	100	100	194	196	302	310	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
23	大権沢	103	105	100	100	196	196	300	302	88	88	130	130	97	97	217	217	---	---
24	大権沢	103	107	98	100	196	196	302	302	88	90	130	130	97	97	217	217	146	146
25	大権沢	103	103	100	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
26	大権沢	103	103	100	100	196	196	300	302	88	90	130	130	97	97	217	217	146	146
27	大権沢	103	103	100	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
28	大権沢	103	107	98	100	196	196	300	300	88	90	130	130	97	97	217	217	146	146
29	大権沢	103	107	98	100	194	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
30	大権沢	103	103	100	100	196	196	302	302	88	88	130	132	97	97	217	217	146	146
31	大権沢	101	101	100	100	196	196	302	310	88	88	130	132	97	97	217	217	146	146
32	大権沢	103	103	100	100	196	196	302	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
33	大権沢	101	103	98	100	194	196	300	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
34	大権沢	103	103	98	100	194	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
35	大権沢	101	103	100	100	194	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
36	大権沢	99	101	100	100	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
37	大権沢	103	105	100	100	196	196	302	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
38	大権沢	103	103	100	100	196	196	302	310	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
39	大権沢	103	107	100	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
40	大権沢	93	93	100	100	194	196	302	302	88	88	130	132	97	97	217	217	146	146
41	大権沢	103	103	100	100	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	---	---
42	草すべり	101	103	100	102	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
43	草すべり	101	103	100	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
44	草すべり	101	103	98	100	196	196	302	302	88	90	130	130	97	97	217	217	146	146
45	草すべり	99	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
46	草すべり	103	103	98	100	194	196	300	300	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
47	草すべり	101	103	100	100	194	196	302	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
48	草すべり	99	101	98	100	194	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
49	草すべり	103	103	100	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
50	草すべり	103	103	100	100	196	196	300	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
51	草すべり	103	103	100	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
52	草すべり	103	103	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
53	草すべり	99	103	98	100	194	196	302	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
54	草すべり	103	105	100	100	196	196	302	302	88	90	130	130	97	97	217	217	146	146

--- は欠測データを表す

表2(続き). ミヤマハナシノブの個体の位置情報と遺伝子型.

サンプル ID	集団	遺伝子型																	
		Pkiu006		Pkiu129		Pkiu227		Pkiu853		Pkiu961		Pkiu1052		Pkiu208		Pkiu314		Pkiu965	
55	草すべり	103	103	100	100	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
56	草すべり	103	103	98	100	196	196	302	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
57	草すべり	103	105	98	100	196	196	300	310	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
58	草すべり	103	103	100	100	196	196	302	310	88	88	130	132	97	97	217	217	146	146
59	草すべり	105	105	98	98	196	196	300	302	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
60	草すべり	99	105	98	102	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
61	草すべり	103	103	98	100	196	196	302	310	88	88	130	132	97	97	217	217	146	146
62	草すべり	103	103	100	100	196	196	300	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
63	草すべり	101	103	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
64	草すべり	101	101	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
65	草すべり	103	103	100	100	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
66	草すべり	103	105	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
67	草すべり	101	103	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
68	草すべり	105	105	98	100	196	196	302	302	86	88	130	132	97	97	217	217	146	146
69	草すべり	103	103	100	100	194	196	302	310	86	86	130	130	97	97	217	217	146	146
77	草すべり	105	105	98	100	196	196	302	302	86	88	130	132	97	97	217	217	146	146
78	草すべり	103	105	100	100	196	196	302	310	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
79	草すべり	101	103	102	102	196	196	300	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
80	大樺沢下流	103	105	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
81	大樺沢下流	91	107	98	100	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
82	大樺沢下流	103	103	98	102	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
83	大樺沢下流	103	103	98	98	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
84	大樺沢下流	103	103	100	102	196	196	302	302	86	88	130	130	97	97	217	217	146	146
85	大樺沢下流	103	103	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
86	大樺沢下流	103	103	98	98	196	196	302	302	88	88	130	130	97	97	217	217	146	146
87	大樺沢下流	103	103	100	100	196	196	302	302	88	88	130	132	97	97	217	217	---	---

--- は欠測データを表す

表3. ミヤマハナシノブの遺伝的多様性.

遺伝子座	大樺沢 (n = 41)					草すべり (n = 38)					大樺沢下流 (n = 8)				
	N_A	A_R	Pr	H_O	H_E	N_A	A_R	Pr	H_O	H_E	N_A	A_R	Pr	H_O	H_E
Pkiu006	7	4.0	2	0.44	0.47	5	4.1	0	0.45	0.62	4	3.6	0	0.25	0.33
Pkiu129	3	2.7	0	0.39	0.42	3	2.6	0	0.34	0.54	3	3.0	0	0.38	0.53
Pkiu227	2	1.8	0	0.20	0.18	2	1.7	0	0.13	0.12	1	1.0	0	0.00	0.00
Pkiu853	3	2.4	0	0.32	0.31	3	2.7	0	0.30	0.36	1	1.0	0	0.00	0.00
Pkiu961	3	2.5	0	0.37	0.50	3	2.5	0	0.39	0.50	2	2.0	0	0.50	0.38
Pkiu1052	2	1.5	0	0.10	0.09	2	1.7	0	0.16	0.15	2	1.9	0	0.13	0.12
平均	3.33	2.50	0.33	0.30	0.33	3.00	2.52	0.00	0.30	0.38	2.17	2.08	0.00	0.21	0.23

 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

たことによる遺伝的多様性の過小評価の影響は小さかったと考えられる. また, すべての遺伝子座においてハーディ・ワインベルグ平衡からのずれや連鎖不平衡は検出されなかった. これらのことから, 今回用いた6遺伝子座のマイクロサテライトマーカーはミヤマハナシノブの遺伝解析において有用だと考えられる.

4-2 ミヤマハナシノブの遺伝的多様性

本研究で解析した3集団で比較すると遺伝子座あたりの対立遺伝子数(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), 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)のいずれの値も, 大樺沢と草すべりよりも大樺沢下流で低い傾向にあった(表3). 大樺沢および草すべりは明るい高茎草本群落の中にミヤマハ

表4 ペアワイズ F_{ST} (左下) およびペアワイズ R_{ST} (右上)

	大樺沢	草すべり	大樺沢下流
大樺沢	0	0.000	0.000
草すべり	0.036 *	0	0.000
大樺沢下	0.153 **	0.053 *	0

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

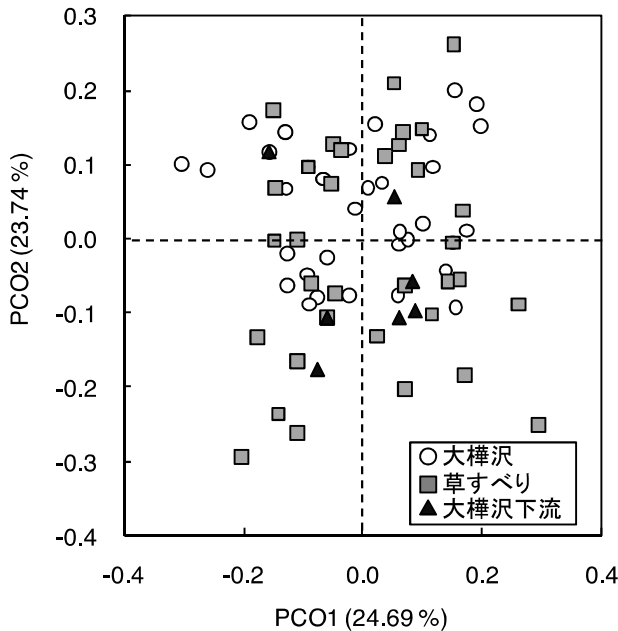


図2 ミヤマハナシノブの個体の遺伝子型の距離にもとづくPCOプロット

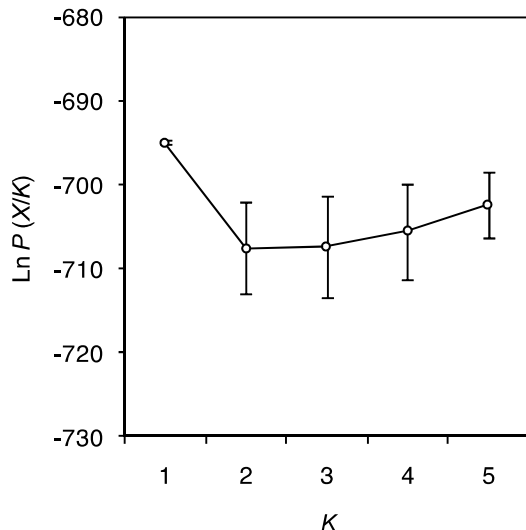


図3 STRUCTURE解析における $K=1$ から $K=5$ の場合の $\text{Ln}P(X/K)$. エラーバーは20回のランのそれぞれの $\text{Ln}P(X/K)$ の標準偏差を示す.

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、開花個体はほとんど生育していなかった。このように大樺沢下流では個体数が少ないため、遺伝的多様性が低かった可能性がある。一方、大樺沢と草すべりで

は遺伝的多様性に明瞭な違いはなかった。これら2つの集団は大樺沢の方が開花個体数は多いものの、それぞれ良く似た環境で大きな集団が維持されているため遺伝的多様性に差がでなかったと考えられる。

4-3 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3集団間では、 F_{ST} の値は有意に0より大きかったものの、値は極めて小さく、 R_{ST} は有意に0と異ならなかった(表4)。また、主座標分析の結果では解析した個体は各個体が拡散してプロットされ、集団ごとにクラスターを形成するようなことはなかった(図2)。STRUCTURE解析では、3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3)。このように、調査を行った3集団は樹林帯で分断されているにも関わらず、遺伝的な分化がなかった理由としては、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つが考えられた。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。

4-4 保全上の留意点と今後の展望

今回の解析の結果では、大樺沢と草すべりで遺伝的多様性に明瞭な違いはなく、集団間の遺伝的な分化は認められなかった。これらの結果から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と考えることができる。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、6遺伝子座のうち5遺伝子座は対立遺伝子数が2~3と少なく(表3)、情報量が十分でない可能性がある。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、集団間で遺伝子流動を起こしつつも標高傾度によって表現型が異なり集団ごとに局所適応している例も知られている¹⁷⁾。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、生育地外保全を行う場合は、なるべく多くの個体から種子を採取し、由来する集団ごとに分けて管理することが望ましい。

本研究では、現在知られているミヤマハナシノブの自生地のうち特に集団サイズが大きい大樺沢と草すべりについて調査を行った。しかし、今回のサンプルセットはミヤマハナシノブの分布範囲を網羅できていない。左俣沢方面や大仙丈沢方面など高い稜線を挟んだ別の集水域

でも生育情報が得られている。これらの集団からもサンプルを採取し、大樺沢や草すべりと遺伝的多様性を比較する必要がある。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*¹⁸⁾、北米に生息するアカガエル属の一種 *Rana luteiventris*¹⁹⁾、新熱帯に生育する木本であるセドロ *Cedrela odorata*²⁰⁾、ウダイカンバ *Betula maximowicziana*²¹⁾ などで報告されている。ミヤマハナシノブの生育する北岳は、日本でも有数の高標高の山岳地帯であり、高い稜線が遺伝子流動の障壁として機能している可能性がある。今後は別の集水域のミヤマハナシノブを採取し、遺伝子流動の有無を検証する必要がある。また、現在は生育情報が得られていない山梨県の蘆山・鳳凰山御室・北荒川岳、富山県の白馬岳などの情報も収集し、生育が確認できれば解析に加えることでより広域スケールでのミヤマハナシノブの遺伝構造が明らかになると考えられる。

5. 結 言

マイクロサテライトマーカーによる解析の結果から、ミヤマハナシノブの主な自生地である大樺沢と草すべりの間では遺伝的多様性の大きさは同程度で遺伝的な分化は生じていないことが明らかになった。これらのことからこの二つの集団は大きな一つの管理単位と考えられた。一方で、マーカーの情報量が不足している可能性があること、表現型の違いや適応的な遺伝子の違いは今回の調査ではわからなかったことから、今後さらなる研究の余地がある。

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) Milligan B : Molecular genetic analysis of populations: a practical approach, IRL Press, 59-88. (1992)
- 8) Yokogawa M, Kaneko S, Isagi Y : Conservation Genetics, 10, 5, 1445-1447. (2009)
- 9) El Mousadik A, Petit RJ : TAG Theoretical and Applied Genetics, 92, 7, 832-839. (1996)
- 10) Goudet J : Journal of Heredity, 86, 6, 485-486. (1995)
- 11) Peakall ROD, Smouse PE : Molecular Ecology Notes, 6, 1, 288-295. (2006)
- 12) Bowcock AM, Rulz-Linares A, Tomfohrde J, Mich E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL : Nature, 368, 455-457. (1994)
- 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) Wright TF, Johns PM, Walters JR, Lerner AP, Swallow JG, Wilkinson GS : Genetic Research, 84, 27-40. (2004)
- 17) Ikeda H, Setoguchi H, Morinaga SI : Acta phytotaxonomica et geobotanica, 61, 1, 21-26. (2010)
- 18) Root JJ, Puskas RB, Fisher JW, Swope CB, Neubaum MA, Reeder SA, Piaggio AJ : Vector-borne and Zoonotic Diseases, 9, 6, 583-588. (2009)
- 19) Funk WC, Blouin MS, Corn PS, Maxell BA, Pilliod DS, Amish S, Allendorf FW : Molecular Ecology, 14, 1, 483-496. (2005)
- 20) Cavers S, Navarro C, Lowe AJ : Conservation Genetics, 4, 5, 571-580. (2003)
- 21) Tsuda Y, Sawada H, Ohsawa T, Nakao K, Nishikawa H, Ide : Tree Genetics & Genomes, 6, 3, 377-387. (2010)