

# 絶滅危惧植物レブンコザクラの利尻島における保全単位の決定

吉田康子

〒 305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大学大学院

## Conservation Unit of Endangered Species *Primula modesta* var. *matsumurae* in Rishiri Island

Yasuko YOSHIDA

Institute of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8572 Japan

**Abstract.** In order to consider the conservation unit of endangered species *Primula modesta* var. *matsumurae*, I analyzed the genetic relationships among wild individuals growing in Rishiri and Rebun Islands by using three microsatellite markers, and sequence variation in two noncoding regions of chloroplast DNA. From the result of principal co-ordinate analysis, Rishiri B population was differentiated from Rebun C and D populations with wide variation, and Rishiri A and Rebun A and B populations were genetically similar to each other. Besides, two distinct haplotypes of chloroplast DNA were recognized between Islands. Based on these results, I considered Rishiri and Rebun Island as conservation units, respectively.

### はじめに

生物多様性の保全においては、種内の遺伝的多様性、種の多様性、生態系の多様性の3つの階層すべてを保全すべきであることが提唱されている (Frankham *et al.*, 2002). なかでも種内の遺伝的多様性は生物多様性の根本であり、種の適応進化の基盤として環境変動に対応していくために不可欠である。つまり、遺伝的に多様であるほど環境変動に対して適応できる可能性が高く、種の長期的な存続には十分な個体数はもちろんのこと、種内の遺伝的多様性も維持する必要がある。そのため、一見すると、多数の個体が存在する健全な集団にみえる場合にも、その遺伝的多様性を計ることは重要となる。

一般的に種内の遺伝的多様性は、地域集団ごとに維持されており、それらが集合したものが種の遺伝的多様性とされる。地域集団では、生育している環境において、不利な遺伝子は淘汰され、環境に適した遺伝子が選ばれるため、各地域の集団内にはそれ

ぞれの環境に適した遺伝的組成が保持されていることになる。特に、島などの隔離状態に自生する集団は他の地域集団との間での、個体の移動や種子の飛散や花粉の運搬などによる遺伝子の交流機会が少なく、それぞれの地域での環境による適応の様相も大きくことなることから、他地域の集団にはない「地域固有の遺伝的組成」を持つ場合が多い。また集団内の遺伝的多様性は、集団内の個体数(集団サイズ)に大きな影響を受ける。生育地の分断化や開発などによって集団サイズの縮小が引き起こされると遺伝的に近縁な個体同士の交配である近親交配が生じるため、繁殖能力や生存率の低下など絶滅の危険性が増大する。さらに集団サイズが小さい集団では偶然(遺伝的浮動)によっても遺伝的多様性が減少する。

近年では、個体数が減少した集団の再生が多く図られるようになった。しかし、その際に同種だからというだけの安易な他地域集団からの移植や導入は、導入個体と集団にもともと存在した自生個体と

の交配により遺伝的攪乱が生じさせ、その地域固有の、また適応的な遺伝的組成を壊してしまう可能性がある。したがって、集団が保有する遺伝的組成を考慮し、その遺伝的組成を維持していくための保全策を講じることが必要である。

保全策を講じる際には、「保全単位」という考え方が有効である。「保全単位」とは、Ryder (1986) が始めて提唱した概念である「歴史的また現在において適応的および遺伝的に分化した集団を保全する集団の単位」を示し、近年保全事業で重要視されている。この指標により、「単位が異なる」と判定された集団間の移植は不適切であり、反対に、地理的距離があっても集団の遺伝的組成が同一であり「同じ単位に属する」と判定された集団間での移植は考慮してもよいとされている。これまで筆者は、レブンコザクラと同属である絶滅危惧Ⅱ類とされてきた野生サクラソウ (*Primula sieboldii*) の保全方策を立てるために、DNA の多型や出芽日など適応関連形質の遺伝的な分化程度から保全単位を決定してきた (Honjo *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2009)。

冷涼な気候を好むレブンコザクラ (*Primula modesta* var. *matsumurae*) は、ユキワリソウ (*Primula modesta*) の変種であり、礼文島、夕張山地、知床半島、北見山地 (加藤・海老原, 2011)、さらに天塩山地 (山口, 2007) に分布が確認されているが、絶滅の危険が増大している種として絶滅危惧Ⅱ類に指定されている。利尻島における分布については、渡邊ら (1997) によって報告されている通り、現在確認されている個体群は二ヶ所だけである。レブンコザクラは北海道北東部の山地、および利尻島・礼文島と分布がそれぞれ地理的に隔離されており、集団間で遺伝的に分化している可能性がある。

同一の保全単位となる集団は、主に DNA の類似性で判断できる「現在までにおける共通の進化の歴史をもつ集団」と、適応関連形質で判断できる「共通の適応的な遺伝組成をもつ集団」という2つの特徴を持つ。一般的に、植物には母性遺伝するオルガネラ DNA (葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA) と両性遺伝する核 DNA が存在する。オルガネラ

DNA は種子を、核 DNA は花粉と種子を通して集団間での遺伝子流動が行われることから、流動しにくいオルガネラ DNA で判断した集団間の遺伝的分化程度は、花粉を通じて流動しやすい核 DNA で判断した分化程度の4から19倍になることが知られている (津村, 2006)。そのため、保全単位を決定する際には、誤った結論を防ぐためにも、両者による評価が必要である。一方、適応関連形質による適応的な遺伝組成の評価は、集団の存続性の評価には不可欠であり、保全に対して多くの情報を与えるが (Yoshida *et al.*, 2009)、対象とする全ての集団の個体を同一環境で栽培する必要があるため、個体の採取や持ち運びができないレブンコザクラでは難しい。

そこで本報告では、利尻島および礼文島におけるレブンコザクラの保全策構築のために、核 DNA と葉緑体 DNA 領域を用いて両島に現存する野生レブンコザクラ集団の遺伝的關係を評価し、その結果に基づいて利尻島と礼文島に自生するレブンコザクラの保全単位を決定した。

## 材料と方法

### 材料

2010年に利尻島に自生する野生1集団から40個体、また礼文島に自生する野生4集団から計39個体を、自生地の個体の分布からできる限り集団全体を網羅するように選び、葉を1枚ずつサンプリングした (表1)。利尻AとB集団は山の斜面に密集して生息しており、本来は同所のためひとつの集団とみなせるが、本報告では利尻島に自生する個体

表1. 採取個体数とSSR解析と塩基配列決定に供試したジェネット数

地域	集団	採取個体数	SSR解析*	塩基配列決定
利尻	利尻A	30	27	17
	利尻B	10	10	7
礼文	礼文A	9	8	6
	礼文B	30	29	6
	礼文C	30	27	6
	礼文D	30	27	6

\* 同じ遺伝子型を示した個体を除いた

をより詳細に評価するため、生育場所の斜面の方角が全く異なっていた個体を利尻 A 集団と B 集団に分けて解析を行った。また礼文 A 集団は、9 個体と集団サイズの小さい集団であった。葉緑体 DNA 領域の塩基配列の決定には、利尻集団から 24 個体、礼文島の 4 集団から各集団 6 個体を選抜し、各領域 48 個体を用いた。

## DNA 抽出

シリカゲルで乾燥させた葉から、改変 CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) を用いて DNA 抽出を行った。

## SSR マーカーを用いた遺伝子型の決定

核 DNA の遺伝的変異の評価には、マクロサテライト (SSR) マーカーを用いた。SSR マーカーは、ゲノム中に散在する、短い配列の繰り返し回数に基づく多型で、多型性が高いため、個体識別や集団の構成を解析する指標などに用いる。ユキワリソウで作成された SSR マーカー 11 対 (Shimono *et al.*, 2004) を、増幅断片長と蛍光色が重ならないようプライマーを組み合わせ、QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN 社) を使って PCR を行った。PCR 産物を ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて電気泳動を行い、Gene Scan software Gene Mapper (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて遺伝子型を決定した。

## SSR マーカーによる各個体の遺伝的な類似性

レブンコザクラは 4 倍体のため、各マーカー 1 から 4 のピークが検出される (図 1)。これらの異なるサイズのピークをそれぞれ対立遺伝子とみなした。個体ごとに各マーカーの対立遺伝子の有無を 1・0 データに変換し、ソフトウェア PAUP 4.0 Beta Version for Windows を用いて全個体間の遺伝的な類似度を算出した。この類似度に基づいた主座標分析によって各個体の遺伝的な関係を調査した。主座標分析には PCO2.0 (Iwata, 2005) を用いた。

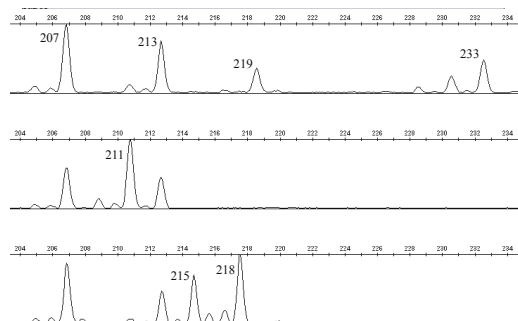


図 1. SSR マーカーによる増幅断片長の波形パターン。数字は PCR による増幅断片長を示し、長さの違うピークをそれぞれ対立遺伝子とした。

## 葉緑体 DNA 領域の塩基配列の決定

Gradient PCR により最適なアニーリング温度を決定後、Honjo *et al.* (2004) がサクラソウで行った方法に従い、PCR と ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いたキャピラリー電気泳動によって塩基配列の解読を行った。また、ソフトウェア phred/phrap/consed (University of Washington, USA; www.phred.org) を用いて、塩基配列を決定した。葉緑体 DNA は母系遺伝するため、同じ葉緑体 DNA タイプを示すジェネットは同一母系であると言える。

## 結果

### レブンコザクラの集団内変異と集団間変異

SSR プライマー 11 対のうち、解析可能なピークが得られた 3 マーカーを用いて解析を行った。さらに 3 マーカーで全く同じ遺伝子型を示した個体は同一ジェネットであるとし、各マーカーより 8 から 22 の対立遺伝子が検出された (表 2)。利尻 B と礼文 A 集団は個体数が少ないものの、他の集団に比べて顕著な対立遺伝子数の違いは認められなかった。

### 個体間の遺伝的な類似性

各マーカーの対立遺伝子の有無から算出した、全個体の総当りの遺伝的な類似性に基づく主座標分析の結果を図 2 に示した。利尻 B 集団は A 集団と同

所に生育しているにも関わらず、他の集団と重複することなく右上にプロットされており、他の集団に比べてやや遺伝的に分化していることが示された。利尻 A 集団と礼文 A と B 集団の多くの個体は、他の集団の個体と同じ場所にプロットされていることから、生育場所に関わらず遺伝的に近いことが示された。一方、礼文 C や D 集団は横に広くプロットされており、他の集団にはない遺伝組成を持っている個体が確認された。

### 利尻島と礼文島における葉緑体 DNA タイプ

葉緑体 5 領域の塩基配列を解読したところ、2 領域において利尻島と礼文島に自生する個体間で塩基配列が異なっていた (表 3)。領域 3' to rps2 では、利尻集団 24 個体では T が 12 回繰り返しているのに対し、礼文集団 24 個体は T が 11 回の繰り返してであり、挿入・欠失が認められた。一方、領域 matK では、領域の 171 塩基目において、利尻集団 24 個体では C が、礼文集団 24 個体では A であったことから、1 塩基の置換が認められた。2 領域の塩基配列より 2 つの葉緑体 DNA タイプが確認されたことから、利尻島と礼文島に自生する個体では母親の系譜が異なることが明らかになった。

## 考察

### レブンコザクラの遺伝的多様性

礼文 A 集団を除く全ての集団サイズは十分に大きく、長花柱花と短花柱花の花型比にも大きな偏りは認められなかった。また、9 個体が生育していた礼文 A 集団では、8 ジェネットが確認された。礼

文 A 集団は集団サイズが小さいものの、集団サイズの大きな他の集団との対立遺伝子数に顕著な違いが認められず、現時点では深刻な遺伝的多様性の低下や花型比の偏りは認められなかった。一般的に倍数体植物は、植物に多く見られる二倍体植物に比べ高い遺伝的変異を集団内に維持していることが多数報告されている。四倍体植物であるレブンコザクラも同様に、レブンコザクラの倍数性が集団サイズの小さな礼文 A 集団でも顕著な変異の縮小を防いでいる要因の一つである可能性が考えられる。

同所に生育していた利尻集団だが、3 マーカーでみると利尻 A と B 集団が異なる遺伝的組成を持っていることがわかった (図 2)。生育している斜面が違うことによる環境要因の差異が異なる選択圧になった可能性や、斜面ごとに遺伝子交流が行われるものの、尾根を越えた遺伝子交流は少ないため遺伝的に分化した可能性が考えられる。礼文島の 4 集団の中では、礼文 C と D 集団内に遺伝的に多様な個体が存在していることが示唆された (図 2)。礼文 A と B 集団には、礼文 C と D 集団の一部の個体と同じような遺伝組成を持つ個体が多いことが示された。図 2 で同じ場所にプロットされなかった礼文 C と D 集団は、利尻 B 集団と遺伝的に分化しているものと推察される。

### 利尻島と礼文島におけるレブンコザクラの保全単位

本報告では、3 つの SSR マーカーと葉緑体 2 領域を用いてレブンコザクラの遺伝的変異を評価した。SSR マーカーでは利尻 B 集団と礼文 C と D 集団が遺伝的に異なること、また葉緑体 DNA 領域から礼文島と利尻島のレブンコザクラは集団間で異なる母親由来であることが明らかになった。また、現時点では遺伝的に差異はないとされた集団も、マーカーや領域を増やすことで、遺伝的に異なるものをされる可能性も高いが、少なくとも現時点では、礼文島と利尻島は異なる保全単位にするべきであると言える。また、本報告では DNA だけによる評価であることから、可能であれば今後形質を評価し、適応的な集団間分化を評価する見る必要もある。

表 2. 各マーカーより検出された対立遺伝子数

集団	PM901	PM324	PM850
利尻 A	7	13	6
利尻 B	5	6	4
礼文 A	6	5	5
礼文 B	12	11	6
礼文 C	8	6	7
礼文 D	10	8	5
総対立遺伝子数	16	22	8

表 3. 利尻集団と礼文集団間で塩基多型が認められた 2 領域の塩基配列

3' to rps2	440	445	450	455	460
利尻集団 (24 個体)	C G C C C T T T T T T T T T T T T T T G A A A				
礼文集団 (24 個体)	C G C C C T T T T T T T T T T T T T - G A A A				

matK	160	165	170	175	180
利尻集団 (24 個体)	A T A T T C A T A T A C A T G A A A A T T				
礼文集団 (24 個体)	A T A T T C A T A T A A A T G A A A A T T				

レブンコザクラの保全において

クローン成長を行う種では、個体数が多い集団でも同じジェネットがクローン増殖している可能性もあることから、個体数が多い集団は必ずしも遺伝的に多様であるとは限らないことに注意しなければならない。しかし、調査した 5 つの自生地のうち 4 つの自生地では、個体数も多く、それに伴い遺伝的多様性も十分に維持されていた。また集団内の多様性維持に不可欠な種子生産には、集団内の花型比が重要であるが、調査した自生地では花型比の偏りは認められなかった。今後は花粉媒介昆虫の有無や種類を調査し、集団内で健全な種子生産が行われてい

るかを確かめたい。本報告では、核と葉緑体 DNA より保全単位が決められたが、現段階では各集団内の個体数とそれに応じた遺伝的多様性も維持されていると言える。そのため、基本的であるが、まずは個体数の減少を防ぐこと、自生地を維持することが重要だと言える。今から 25 年前に高橋氏 (1977) は、礼文島の野生種の保全について、礼文島内での増殖と移植、展示、自生地への立入り禁止、外来植物の駆除を一体とした積極的保全について提言しており、筆者は一見の価値があると考えている。高橋氏の提言を基に、本研究の成果がレブンコザクラの保全に利用されることを期待する。

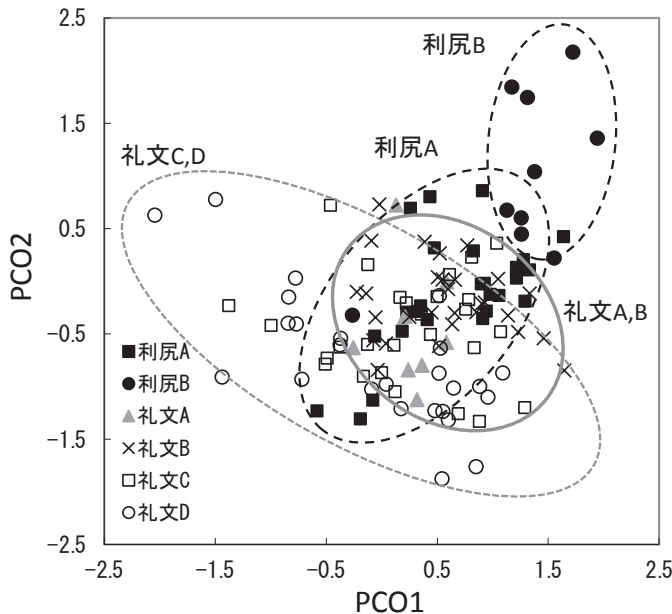


図 2. 主座標分析による全個体の遺伝的な関係。同じ場所にあるものは遺伝的に類似していることを示す。

近年は生物多様性の重要性が多くの人に認識されるようになったが、遺伝的多様性を保全することはどうということなのかを正しく認識している人はまだ多くはない。現存している集団がどの程度の遺伝的多様性を維持し、地域固有の遺伝組成を保持しているのか、また多様性を維持するための必要な要因が揃っているのかなど、最初に評価することが対策を講じる上でも重要となる。あくまでも移植は最終手段にすべきである。著者は近年、自生地以外で保存していたサクラソウ個体を、サクラソウ自生地に、または新たな自生地として野外に移植可能かどうかの調査を依頼される。保全対策は様々あるものの、何を旨とした保全なのか、何をもちて自生地復元なのかは、実際に保全を行う次第である。単に見た目の個体数の増殖や自生地の復元だけでなく、これまでの長い進化の歴史で培われてきたそれぞれの地域や集団の遺伝的固有性の重要性を忘れずに保全活動を行っていきたい。

## 謝辞

本研究の遂行に際しては、大澤良教授（筑波大学）、加藤淳太郎准教授（愛知教育大学）、佐藤雅彦氏（利尻町立博物館）に試料収集、解析、論文執筆にいたるまで多大なるご協力を賜りました。ここに感謝の意を表します。礼文島における試料収集に際しましては、村上賢治氏（環境 NPO 礼文島自然情報センター）にご協力いただきました。心より御礼申し上げます。本研究は平成 22 年度利尻島調査研究事業の助成を受けて実施された。

## 引用文献

- Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe, 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, New York.
- Honjo, M, S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani & R. Ohsawa, 2004. Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. *Biological Conservation*, 120: 215-224.
- Honjo, M., N. Kitamoto, S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani & R. Ohsawa, 2009. Management units of the endangered herb *Primula sieboldii* based on microsatellite variation among and within populations throughout Japan. *Conservation Genetics*, 10: 257-267.
- Iwata, H, 2005. PCO ver 2.0 (<http://lbm.ab.a.u-tokyo.ac.jp/~iwata/software/pco/>)
- 加藤雅啓・海老原淳, 2011. 日本の固有植物. 東海大学出版会. 東京. 503pp.
- Murray, M. G. & W. F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
- Ryder, O.A., 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of the subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, 1: 9-10.
- Shimono, A., S. Ueno, Y. Tsumura & I. Washitani, 2004. Characterization of microsatellite loci in *Primula modesta* Bisset et Moore (Primulaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 560-562.
- 高橋幹夫, 1977. 礼文島の思い出. ガーデンライフ東京山草会編, 野生のサクラソウ: 295-303. 誠文堂新光社. 東京.
- 津村義彦, 2006. 緑化ガイドライン検討のための解説—植物の地理的な遺伝変異と形態形質変異との関連. 小林達明・倉本宣編, 生物多様性緑化ハンドブック: 59-73. 地人書館. 東京.
- 山口聡, 2007. 日本産のサクラソウ属. 世界のプリムラ編集委員会編, 世界のプリムラ: 163-168. 誠文堂新光社. 東京.
- Yoshida Y, M. Honjo, N. Kitamoto & R. Ohsawa, 2009. Reconsideration for conservation units of wild *Primula sieboldii* in Japan based on adaptive diversity and molecular genetic diversity. *Genetics research*, 91: 225-235.
- 渡辺幹男・佐藤雅彦・芹沢俊介, 1997. 利尻・礼文島産レブンコザクラの遺伝的特性. 利尻研究, 16: 79-82.