

MIG-seq 法を用いた希少植物（タチスミレ）の 地域集団の遺伝的関係による保全策の検討

Study on Conservation Measures Based on Genetic Relationships Among Local Populations of Endangered *Viola raddeana* Plant Using MIG-seq

白石祐彰*

要 旨

土地の開発・改変に際して、その事業地域で希少植物種が確認された場合、対象となる植物を人間の管理下で保全する「域外保全」という方法がある。域外保全では、限られた個体での近親交配による遺伝的多様性の低下などの弊害をできるだけ排除することが重要である。保護増殖における遺伝的攪乱を防ぐためには、あらかじめ遺伝構造を把握し、保全単位を設定しておく必要がある。本研究では、MIG-seq 法による SNP（DNA の塩基配列が 1 つ分だけ他の塩基に置き換わっていること）を用いて、渡良瀬遊水地、菅生沼および小貝川河川敷に生息する希少植物タチスミレの遺伝的多様性と遺伝構造を評価した。その結果、タチスミレはそれぞれの場所で任意交配が可能な個体数が存在すること、地理的に近い 2 つの集団の間で遺伝的分化が見られることなどが示された。そこで、保全策として、生息域外保全に十分な予算が確保できない場合は、渡良瀬遊水地のタチスミレと菅生沼のタチスミレを 1 つの大きな管理単位として扱うことを提案した。

キーワード：MIG-seq 法、一塩基多型、遺伝的多様性、集団遺伝構造、遺伝的分化

1. まえがき

建設工事により土地の開発・改変を行う際に、事業区域内に希少動植物の生息が確認されることが多々ある。生息域への影響を回避・低減することができない場合、現在の生息場から他の場所に移動させ、生息を継続させる措置を求められることがある（生息域外保全）。

希少植物の保全に際して、ごく少数の家系の植物個体を増殖して植栽すること、血縁度を考慮しないで人工交配を行うこと、近縁種を交雑させること等、さまざまな不適切な活動が行われることがある¹⁾。人間による意図的・非意図的な生物の移動により、その生育地本来のものとは全く異なる遺伝的な構造に変化してしまう遺伝的攪乱が生じると、種が長い期間にわたって経験してきた進化的な履歴を破壊することにつながる。逆に、種内を必要以上に細かいグループに分け、それぞれを個別に保全・管理することは、より多くの労力と資金を要し、生物保全に使用できる限られた資源を浪費することになる。

保護増殖における遺伝的攪乱を防ぐためには、あらかじめ遺伝構造を把握し、保全単位を設定しておく必要が

ある²⁾。こうしたアプローチにより、遺伝的要因による絶滅のリスクを最小にすることを目的としているのが保全遺伝学であり、国内希少野生動物植物種をはじめ生物多様性の保全に必要不可欠な学問分野といえる³⁾。

従来の保全遺伝学では、生物の希少性を評価するうえで最も重要なものは、個体数や生育面積の多寡や減少率であり、これらの項目が、例えばレッドリスト掲載の主要な判断基準とされてきた⁴⁾。さらに、個体数と遺伝的多様性は相関関係を示すことが多いが、個体数が減少したことにより遺伝的多様性が低下して近交弱勢をもたらす、希少種の存続性を低下させるという前提で解析がなされてきた⁵⁾。

近年、次世代シーケンサーを用いた塩基配列解読技術の発展により、大容量のゲノム（生物のもつ遺伝情報の総体を指す言葉）の解読が可能となっている。多数の個体のゲノム全体にわたる DNA 多型（DNA の微細な構造の差異）を比較的簡単に取得できるようになり、遺伝的多様性、遺伝構造、遺伝子発現の研究が正確に迅速に行えるようになった。

Multiplexed ISSR genotyping by sequencing (MIG-seq)

*技術本部技術研究所環境研究グループ

法は、次世代シーケンサーを用いた一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) の検出、およびその読み取り (遺伝子型特定) を、より迅速・簡便・安価に実現するために考案された方法である⁶⁾。SNP は、遺伝情報を保つ DNA 配列を構成する 1 つの塩基 (ヌクレオチド) が別の塩基に置き換わる現象である。DNA は、アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) という 4 種類の塩基から成り立っているが、SNP は、例えば C が T に 1 か所だけ置き換わることをいう。MIG-seq 法は、遺伝的に固定された作物等の品種識別、同一種内の集団間を対象としたいわゆる集団遺伝・分子系統地理学等の研究、近縁種間を対象とした雑種判定等の研究、属内レベル程度の種間関係を対象とした系統解析等、個体レベルから属レベルまで、広い階層の生物群を対象として適用できるのが大きな特徴である⁷⁾。

本研究では、茨城県の県南などに生息する希少植物のタチスミレを対象にして、MIG-seq 法により SNP を用いてタチスミレの遺伝的多様性や遺伝構造などを評価し、今後の保全策について検討した。

2. 材料および方法

2.1 対象植物

タチスミレは、環境省のレッドリストでは絶滅危惧種 II 類に指定されている多年生草本種である (写真-1)。絶滅危惧種に指定されるまで減少した要因は、生育地の管理放棄、自然遷移、河川開発とされ、関東地方の生育地は利根川水系に属している。

低湿地の草原や河畔林などに生息している。茎の高さは 30~100cm で、根出葉の葉身は両面とも深緑色で三角状披針形 (平たくて細長く、先のほうがとがり、基部のほうがやや広い形)、長さは 4~8cm である。淡紅紫色ま

たは白色の花は葉の付け根から生じ、花期は 5~6 月である。

2.2 実験方法

a. 植物試料の採取

タチスミレは、茨城県の菅生沼 (A 地点と C 地点)、小貝川の河川敷 (B 地点と D 地点) および渡良瀬遊水地 (W 地点) で採取した。菅生沼、小貝川の河川敷および渡良瀬遊水地との位置関係を図-1 に示す。採取した試料数および採取地点の湿地規模を表-1 に示す。A 地点と B 地点はタチスミレの大集団で、C 地点と D 地点は小集団であった。タチスミレの群生地は C 地点で 2~3 か所、D 地点で 4~5 か所であった。

b. MIG-seq 法および遺伝的関係解析

採取したサンプルから、DNeasy Plant MiniKit を用いて DNA を抽出した。一般的なゲノム DNA 中に多数存在する単純反復配列に挟まれた領域 (inter-simple



写真-1 タチスミレ

表-1 試料数および採取地点の湿地規模

地点(集団)	試料数	湿地規模
A	12	150m × 100m
B	16	50~100m × 50m
C	4	5m × 10m
D	7	10m × 10m
W	12	9000m × 6000m



図-1 渡良瀬遊水地と菅生沼と小貝川の位置関係

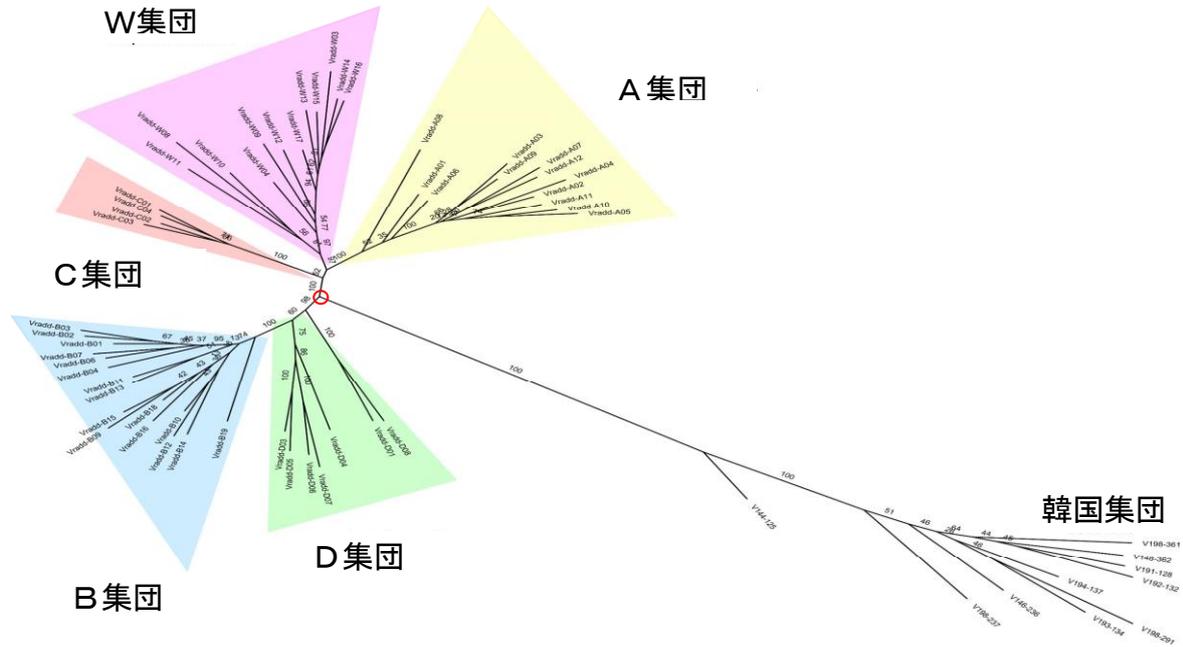


図-2 韓国集団、A、B、C、DおよびW集団のタチスミレ 61 個体の系統樹

sequence repeat, ISSR) を対象とし、抽出した DNA から MIG-seq 法によって、SNP の検出を行った^{8),9)}。単純反復配列とは、数塩基の単純な塩基配列（例えば AG や TCC 等）が繰り返す、例えば TCCTCCTCCTCC のような配列である。MIG-seq 法は、DNA 中に多数存在する単純反復配列を利用することにより、生物種を問わずに次世代シーケンサーを適用することができる利点がある。

A、B、C、D、W 集団のタチスミレに、韓国のキョンサン北道南西部の川沿いの湿地から採取したタチスミレ（10 個体）の遺伝情報を加え、IQ-TREE ver. 2.1.2 を用いて最尤系統樹を作成した。A、B、C、D、W 集団のタチスミレの地域的な集団遺伝構造を把握するため、STRUCTURE Version 2.3.4 を用いてクラスター解析を行った。クラスター解析とは、異なる性質のものが混ざり合った標本の中から、互いに似たものを集めて集落（クラスター）を作り、対象を分類するという方法である。STRUCTURE 解析では共通祖先を持つ遺伝的クラスターを仮定して、各個体がそれぞれのクラスターに割り振られる確率が計算される。しかし、最適なクラスター（K）を選ぶことは難しく、複数の手法による結果を見比べることが推奨されている¹⁰⁾。そこで、対数尤度に基づく基準 LnP(D)の二階差分に基づく基準 ΔK の変動を見比べる方法および LnP(D)の K の変化における変動を見比べる方法の 2 種類を行った^{11),12)}。ΔK や LnP(D)は、値が高いほどその K が最適であると認容した。各集団内の近親交配の程度を表す近交係数 F_{IS} 、および集団間の遺伝的分化度 F_{ST} を Stacks v. 1.48 を用いて求めた。 F_{ST} は、集団間の塩基配列の違いの相対的指標の一つで、2 集団間の遺伝的分化の程度を各集団の遺伝的多様性を考慮して定量化している。 F_{ST} は、0~1 の値

をとり、遺伝的分化の程度が大きいくほど、大きな値をとる¹³⁾。

3. 結果

韓国集団、A 集団、B 集団、C 集団、D 集団および W 集団のタチスミレ 61 個体の系統樹を図-2 に示す。系統樹上に小さく書かれている数字は、その系統樹の形の信頼性を表した数値で、ブートストラップ（Bootstrap）値という。0~100 の値で示し、100 に近いほど信頼性が高いことを示す。系統樹の末端には、各集団の個体がそれぞれ近い位置に集まり、ひと塊となった。したがって、A、B、C、D、W 集団のタチスミレは、遺伝的に明瞭に分かれた。また、韓国集団の枝の先にある節（図中の赤丸）を境にして、A 集団、C 集団および W 集団のグループと B 集団および D 集団のグループに分かれた。

A、B、C、D、W 集団の STRUCTURE 解析の結果、ΔK は K = 2 で最大値を示した（図-3）。LnP(D)は K = 3, 7, 8, 9, 10 でばらつきが大きく、K = 2, 4, 5, 6 で比較的大きな値を示した（図-4）。K = 2~6 の個体毎のクラスター配分を図-5 に示す。このグラフは、横方向にタチスミレ 51 個体の祖先性の推定値が並べてある。1 本の棒グラフの中に異なる色のクラスターが混ざっている場合には、その個体が複数のクラスターにそれぞれの確率で帰属することを意味する。すなわち、各個体内の遺伝的組成を、各想定集団に由来する要素の割合として 100%積み上げ棒グラフで色分けして表している。K=2 のとき、一つのクラスターは A 集団と C 集団と W 集団が優占し、もう一つのクラスターは B 集団が優占し、D 集団は二つのクラスターが混合していた。

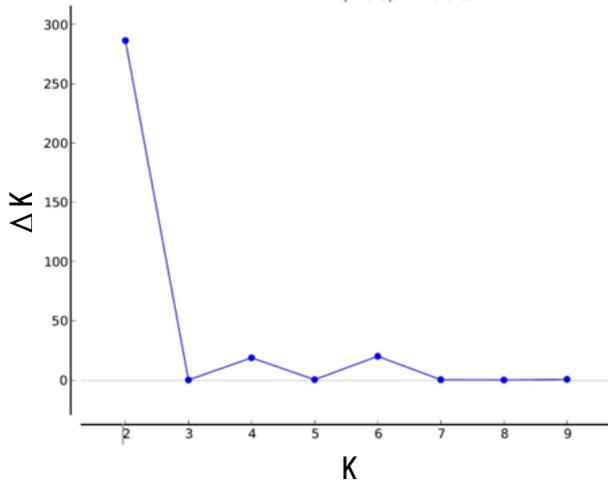


図-3 ΔKとクラスター数 (K) の関係

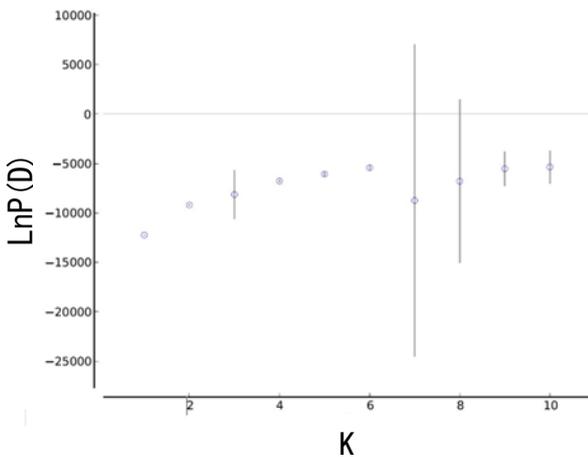


図-4 LnP(D)のKの変化における変動

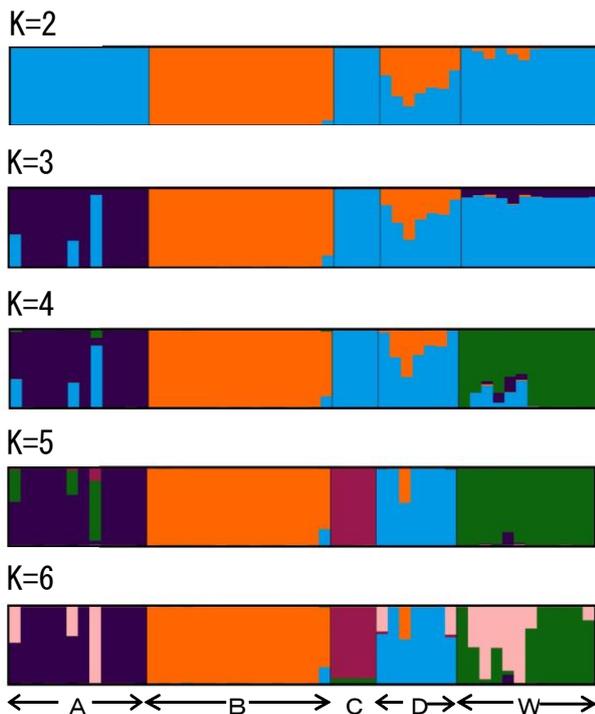


図-5 STRUCTURE解析の結果

K=2 から K=3 へと一つクラスターが増えたとき、そのクラスターはA集団が優占し、K=4へと一つクラスターが増えたとき、そのクラスターは W 集団が優占し、K=5へと一つクラスターが増えたとき、そのクラスターはC集団が優占した。またD集団はK=2からK=4のときは、二つのクラスターが混合していたが、K=5のときは一つのクラスターが優占した。K=5からK=6へと一つクラスターが増えたとき、そのクラスターは主に W 集団に含まれていた。

集団間の遺伝的分化度 F_{st} を表-2に示す。A、B、C、Dの4集団間では0.265~0.470と比較的高い値を示したが、W集団と他のA、B、C、D集団との間では0.198~0.261と比較的低い値を示した。最も高い F_{st} 値は、B集団とC集団の0.470であった。

各集団内の近交係数 F_{IS} の算出結果を表-3に示す。 F_{IS} が1に近い集団は近親交配、0に近い集団は任意交配であることを示し、すべての集団のタチスミレは0に近かった。

4. 考察

韓国集団と日本の5集団を用いた系統解析の結果、A、B、C、D、W 集団のタチスミレは、遺伝的に明瞭に分かれた。日本の5集団のSTRUCTURE解析においても、K=5のとき、A、B、C、D、W 集団はそれぞれ紫色、橙色、えんじ色、青色、緑色のクラスターが優占し、祖先が異なることが示された。

また、系統樹では、A集団、C集団、W 集団は一つの遺伝的グループに属することが示された。STRUCTURE解析ではK=2のとき、A集団とC集団とW 集団は一つのクラスターが優占した。渡良瀬遊水地 (W 集団) と菅生沼 (A 集団とC 集団) は遺伝的に近いことが示された。渡良瀬遊水地 (W 地点) は利根川の上流に位置し、菅生沼 (A 地点およびC 地点) はその下流に位置する。渡良瀬遊水地と菅生沼のタチスミレが遺伝的に近かった理由として、渡良瀬遊水地から菅生沼にタチスミレの種子が移動し、定着した可能性が考えられる。種子の水流

表-2 集団間の遺伝的分化度 F_{st}

	A	B	C	D	W
A		0.378	0.313	0.293	0.198
B			0.470	0.265	0.261
C				0.367	0.256
D					0.203

表-3 各集団内の近交係数 F_{IS}

地点(集団)	F_{IS}
A	0.00022
B	0.00018
C	-0.00004
D	0.00032
W	0.00029

散布に関して、米国ワシントン DC の復元された潮汐のある淡水湿地において、水と風を通して飛散する種子を収集し、その構成と種子の飛散を測定した結果、この場所に飛散した種子の主な供給源は水であることが示された¹⁴⁾。また、ドイツ北部の小さな河谷では、河道沿いの周期的に氾濫する生息地において、氾濫時の水上種子輸送が、分断された個体群をつなぐ重要な役割を果たしている可能性が示された¹⁵⁾。タチスミレの受粉媒介者はマルハナバチなどの昆虫であるため、遺伝子流動の範囲は非常に限られている。一方、種子は河川を移動することができるため、種子は渡良瀬遊水地（集団 W）から菅生沼の大集団（集団 A）へ頻繁に移動することが示唆された。

系統樹では、B 集団と D 集団は一つの遺伝的グループに属することが示された。STRUCTRE 解析では $K=2\sim 4$ のとき、B 集団は、D 集団が占めた二つのクラスターのうちの一つのクラスターが優占した。D 地点は、B 地点の小貝川上流にあり、D 地点のタチスミレが B 地点へ移動したと考えられる。個体の生存や繁殖に有利であるか不利であるかにかかわらず、ある遺伝子の頻度が集団内で確率的に減少する現象を遺伝的浮動という。B 地点でタチスミレの遺伝的浮動が生じたことで、B 集団は、D 集団が占めた二つのクラスターのうちの一つのクラスターが減少したと推察した。

W 地点と A、B、C、D 地点は地理的に離れているが W 集団と他の A、B、C、D 集団との遺伝的分化度 F_{st} 値は、 $0.198\sim 0.261$ と比較的低い値を示し、遺伝的分化の程度は小さかった。一方、A、B、C、D 地点は地理的に近いが、4 集団間では $0.265\sim 0.470$ と比較的高い値を示し、遺伝的分化の程度は大きかった。W 集団と他の A、B、C、D 集団よりも A、B、C、D 集団のタチスミレのほうが遺伝的に分化していた。最も遺伝的に分化していたのは B 集団と C 集団のタチスミレであった。このように地理的に近いにもかかわらず遺伝的に分化していた事例として、絶滅危惧種のアマミマツバボタンおよびランダイミズがある。アマミマツバボタンの個体群間の系統関係を明らかにするため、MIG-seq を用いた系統解析を行ったところ、地理的に近い奄美大島西部と北部で遺伝的分化が見られた¹⁶⁾。奄美大島西部では冬季に強い北風が吹くなどの環境的な選別によって系統的な分離が起こった可能性があると考えたが、本種の植物間の形態学的・生理学的な比較についてはさらなる研究が必要である。また、ランダイミズの保全価値を決定するために、MIG-seq を用いて個体および集団レベルでの系統、遺伝的構造、遺伝的多様性を解析した結果、地理的に近い台湾の 2 つの集団間で遺伝的分化があることが示された¹⁷⁾。

各集団のタチスミレの近交係数 F_{IS} は 0 に近かったので、任意交配を行っているかと推察できた。したがって、タチスミレは、A、B、C、D、W のすべての地点におい

て任意交配を行える程度の個体数が維持されていることが推定できた。

5. 結論

タチスミレは絶滅危惧種に指定されるほど個体数が減少している。その要因として植生の自然遷移、河川の開発、管理の放棄などが挙げられているが、タチスミレの各集団の F_{IS} は 0 に近く、任意交配を行っているかと推測された。スミレは蜜を出し、多くの花粉媒介昆虫を惹きつける。花粉媒介昆虫は花蜜や花粉などを求めて花を訪れ、その際、偶然体に付着した花粉が雌しべに運ばれることで、受粉が成立し、任意交配が行われる。

工事等の開発行為により生息環境が著しく悪化し、生息域での生存が困難となり、生息域外での保全が必要となった場合を想定し、遺伝的多様性を維持するために以下のことを実施すべきと考える。

- i. A、B、C、D および W 地点は地理的に近くても遺伝的に分化しているため、人為的な移植による遺伝的攪乱が起こらないように各集団間の移動を管理する
- ii. 生息域外保全に十分な予算が確保できない場合は、渡良瀬遊水地のタチスミレ（W 集団）と菅生沼のタチスミレ（A 集団と C 集団）を 1 つの大きな管理単位として扱う
- iii. A 集団と C 集団のタチスミレは渡良瀬遊水地に移植することができるが、B 集団と D 集団のタチスミレを移植して保存するためには、別々の場所に生育環境を準備する必要がある

6. あとがき

生物多様性保全に向けて企業などが策定した計画を国が認定する「生物多様性増進活動促進法」が 2024 年 4 月に国会で可決された。本法では、「在来生物の生息地・生育地の保護・整備」が掲げられている。希少植物の地域集団の遺伝的関係解析により、生息地の保護や整備が効率的に行われるように技術を確認していきたいと考えている。

MIG-seq 法を用いたタチスミレの地域集団の遺伝的関係解析について研究を行うにあたって、筑波大学生命環境学群生命地球科学研究群生命環境系の津村義彦教授、東北大学大学院農学研究科の陶山佳久教授、大阪公立大学附属植物園の廣田峻特任助教並びに、茨城県霞ヶ浦環境科学センターの小幡和男氏に技術指導を頂いた。また、タチスミレ採取においては、ミュージアムパーク茨城県自然博物館の飯田勝明氏、伊藤彩乃氏、渡良瀬遊水地植物の会の大和田真澄氏、当社の高嶋則雄氏、富山陽子氏に協力頂いた。ここに記して感謝の意を表す。

【参考文献】

- 1) Yuji Isagi, Shingo Kaneko, 「Ubiquitous Genotyping for Conservation of Endangered Plant Species. Shinichi Nakano, Tetsukazu Yahara and Tohru Nakashizuka T (Eds.)」,In Integrative Observations and Assessments; Springer Japan, pp. 311–326,2014
- 2) Naoyuki Nakahama, Yuji Isagi, 「Recent Transitions in Genetic Diversity and Structure in the Endangered Semi-Natural Grassland Butterfly, *Melitaea Protomedia*, in Japan.」,Insect Conservation and Diversity, Vol. 11, pp. 330–340,2018
- 3) Richard Frankham, Jonathan D. Ballou, David A. Briscoe, 「Introduction to Conservation Genetics, 2nd Ed.」,Cambridge University Press,2010
- 4) Ulf Gärdenfors, Craig Hilton-Taylor, Georgina M. Mace, Jon Paul Rodríguez, 「The Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels」,Conservation Biology, Vol. 15, No. 5, pp. 1206–1212,2001
- 5) Richard Frankham, 「Genetics and Extinction」,Biological Conservation, Vol. 126, No.2, pp.131-140,2005
- 6) Yoshihisa Suyama, Yu Matsuki, 「MIG-seq: an effective PCR based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the nextgeneration sequencing platform」,Scientific Reports, Vol.5, 2015
- 7) Yoshihisa Suyama, Shun K. Hirota, Ayumi Matsuo, Yoshihiro Tsunamoto, Chika Mitsuyuki, Atsuki Shimura, Kunihiko Okano, 「Complementary combination of multiplex high-throughput DNA sequencing for molecular phylogeny」,Ecological Research, Vol.37, No. 1, pp. 171-181,2022
- 8) Yoshihisa Suyama, Yu Matsuki, 「MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform.」,Scientific Reports 5,2015
- 9) Yoshihisa Suyama, Shun K. Hirota, Ayumi Matsuo, Yoshihiro Tsunamoto, Chika Mitsuyuki, Atsuki Shimura, Kunihiko Okano, Complementary combination of multiplex high-throughput DNA sequencing for molecular phylogeny.」, Ecological Research Vol.37, pp. 171–181,2022
- 10) 玉木一郎、「森林遺伝育種のデータ解析方法（実践編 1）集団構造解析」森林遺伝育種、Vol.9、No.3、pp.110-112、2020
- 11) Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 「Inference of population structure using multilocus genotype data.Genetics」,Vol.155, pp.945–959,2000
- 12) Evanno G, Regnaut S, Goudet J 「Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study」,Molecular Ecology Vol.14 pp.2611–2620,2005
- 13) 東京工業大学、情報・システム研究機構、国立遺伝学研究所、北里大学、「シクリッドゲノム中に適応進化の痕跡を発見 祖先から受け継いだゲノム多様性が急速な進化の鍵」、プレスリリース、用語解説、2021.4
- 14) Neff, K.P, Baldwin, A.H. 「Seed Dispersal into Wetlands: Techniques and Results for a Restored Tidal Freshwater Marsh.」,WETLANDS, Vol.25, pp. 393–403, 2005
- 15) Vogt, K., Rasran, L, Jensen, K., 「Water-borne seed transport and seed deposition during flooding in a small river-valley in Northern Germany.」 Flora, Vol.199, pp.377-388,2004
- 16) Goro Kokubugata, Satoshi Kakishima, Atsushi Abe, Koh Nakamura, Kuo-Fang Chung, Masatsugu Yokota. 「Phylogenetic Relationships among Populations of *Portulaca Okinawensis* (Portulacaceae) in the Ryukyu Archipelago of Japan Using MIG-Seq SNP Data.」,Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B, Vol. 49, No.1, pp. 33–40,2023
- 17) Mayu Shibabayashi, Taiga Shimizu, Chinatsu Tokuhiko, Yoshihisa Suyama, Shota Sakaguchi, Takuro Ito, Chih-Chieh Yu,Kuo-Fang Chung, Jun'ichi Nagasawa, Toshiaki Shiuchi, Goro Kokubugata, Atsushi Abe, Akiyo Naiki, Atsushi J. Nagano, Yuji Isagi, 「The Contrary Conservation Situations of Two Local Critically Endangered Species, *Vaccinium Emarginatum* (Ericaceae) and *Elatostema Platyphyllum* (Urticaceae), Growing on the Eastern Edge of the Distribution.」,Front. Ecol. E, Vol.11,2023