

温暖化が山岳地におけるナラ林に及ぼす影響に関する保全遺伝学的研究

大澤隆文 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

I 研究の背景

山岳地には貴重な森林生態系が数多く残されている。しかし、温暖化は、これらの森林を構成する様々な生物種に対して低標高域集団を高標高域へ移動させる、高標高域集団を絶滅へ追いやるなどの、影響をもたらすと考えられている。こうした生物種の移動や存続の可能性は、その種が持つ遺伝子プールの多様性および遺伝子の流動性に強く影響を受ける。例えば、種子が低標高域から高標高域へ頻繁に流れるのであれば、その生物種は高標高域へ移住が進み温暖化から逃れることができ得るが、そうでない場合は、移住が進まず種が絶滅の危険に曝される。また低標高域から近縁種の遺伝子が高標高域に流入することで、高標高域の遺伝子プールが変質化する危険性もある。そこで、生物種の遺伝的変異に関する情報は、温暖化が山岳の森林植物に及ぼす影響を予測し、これらの生物保全を考える上で重要となる。

さらに、森林遺伝子資源を保全管理する上で、近年では種苗流通が遺伝子攪乱を招き得るという問題が重視されており、遺伝的な保全区の設定も不可欠となっている。

II 研究の概要

上に述べた背景を踏まえ、本研究では、第一に山岳地におけるナラ林の遺伝的多様性および遺伝構造を把握することによって、温暖化が山岳ナラ林に及ぼす影響を推察することにした。第二に東日本広域スケールでミズナラの遺伝構造を把握し、広域スケールでの保全区設定への提言も併せて行うことにした。この際、ミズナラからコナラへの浸透交雑の度合いを評価し、遺伝子プールの変質化が起こる可能性についても検討することとした。

研究材料としたコナラ属 2 種 (*Quercus*) は、日本およびその周辺の温帯に広く分布する主要樹種であり、花粉は風散布、種子は大型かつ重く、重力散布および一部は動物散布によって分散する。そのため、森林に生息する鳥獣類の貴重な食料資源を提供し、森林生態系を担う極めて重要な種である。また、木材資源としての価値も高い。

III 個別の研究目的および方法

本研究では大きく分けて 2 つのトピックを以下の通り、扱った。

(1) 日光・南会津山系におけるミズナラ、コナラ、(ミヤマナラ) の遺伝構造および類縁関係の解明

[目的] 日光・南会津山系は、太平洋側気候と日本海側気候の接点に位置することから、少雪・多雪環境が混在し、多様な遺伝子資源が潜在していると期待される。さらに、偽高山地帯に局在するミヤマナラという変種も分布するが (図 1)、こうした高山性希少樹種は温暖化による影響で最も絶滅の可能性が高い生物種である。そこで、これらの貴重な遺伝子資源を抱えるナラ林の遺伝構造を、様々な箇所調査し、遺伝子資源の評価および温暖化が及ぼしうる影響について解明する。

[方法] コナラ 8 集団、ミズナラ 25 集団 (変種ミヤマナラ 4 集団を含む) より成木の葉をランダム採取し、DNA を改変 CTAB 法 (Zhou et al. 1999; Lian et al. 2003) により抽出、核マイクロサテライト

(nSSR) 10 座 (QpZAG1/5, QpZAG9, QpZAG15, QpZAG16, QpZAG36, QpZAG110 (Steinkellner et al. 1997), MSQ13 (Dow et al. 1995), bcqm31, bcqm42 and bcqm 325 (Mishima et al. 2006)) および葉緑体マイクロサテライト (cpSSR) 6 座 (μ cd4, μ cd5, μ dt1, μ dt3, μ dt4 and μ kk4 (Deguilloux et al. 2003)) による遺伝解析を行った。プログラム FSTAT (Goudet 2001) を利用して集団内変異および集団間変異の把握を行った。集団間の遺伝的関係を把握するべくプログラム STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) による Bayesian clustering、およびプログラム TFPGA (Miller 1997) を利用した UPGMA 樹形図の作成も実施した。

さらに Porth et al. (2005) が EST 解析によって同定した水ストレス耐性 candidate gene2 領域について、塩基配列の比較を行った。具体的には 1T57 (Dc3 プロモーター結合因子 2) および 2T13 (オキシラーゼ様蛋白) である。供試した試料は日本海側産コナラ (新田原)、太平洋側産コナラ (椎坂峠)、日本海側産ミズナラ (枝折峠)、太平洋側産ミズナラ (椎坂峠)、2 産地のミヤマナラ (荒海山および至仏山)、それぞれ 7~8 サンプルずつとしたので、各系統で約 14~16 本ずつの配列データを解析にかけたことになった。但し、各試料において、対合している 2 ヌクレオチド鎖を同時にシーケンスした (ヘテロも分離せずヘテロのまま解読した) ため、同一領域に複数の一塩基多型 (SNP) が検出された場合、その SNP 間での組み合わせを特定することができなかった。そのため、遺伝子型に基づいた解析はできず、全て対立遺伝子頻度に基づいた解析法のみをプログラム DnaSP ver4.0 および MEGA ver3.1 で実施した。

(2) 東日本全域におけるミズナラ (およびコナラ) の遺伝構造の解明と保全区設定への提案

[目的] 関東から北海道までの東日本全域においてミズナラの遺伝構造がどう形成されているかを把握し、具体的な保全区をどう設定すれば良いのかについて検討を行う。それと同時にコナラの間にもどの程度の遺伝的交流 (分化) があるのかおよび、交雑によって両種の遺伝子プールが既に変質していないかを解明する。

[方法] 関東から北海道にかけての広域ミズナラ 6 集団および関東のコナラ 1 集団より成木の葉をランダム採取し、DNA を改変 CTAB 法 (Zhou et al. 1999; Lian et al. 2003) により抽出、核マイクロサテライト (nSSR) 10 座 (QpZAG1/5, QpZAG9, QpZAG15, QpZAG16, QpZAG36, QpZAG110 (Steinkellner et al. 1997), MSQ13 (Dow et al. 1995), bcqm31, bcqm42 and bcqm 325 (Mishima et al. 2006)) および葉緑体マイクロサテライト (cpSSR) 6 座 (μ cd4, μ cd5, μ dt1, μ dt3, μ dt4 and μ kk4 (Deguilloux et al. 2003)) による遺伝解析を行った。プログラム FSTAT (Goudet 2001) を利用して集団内変異および集団間変異の把握を行った。集団間の遺伝的分化度と集団間の地理的距離に相関 (Isolation By Distance; Wright 1943) があるかを確認するために、両変数間での線形回帰を行った。ミズナラおよびコナラ間で浸透交雑がどの程度あるかを把握するべくプログラム STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) による Bayesian clustering、およびプログラム TFPGA (Miller 1997) を利用した UPGMA 樹形図の作成も実施した。また Monmonier アルゴリズムを利用したプログラム Barrier (Manni and Guérard 2004; Manni et al. 2004) を利用して、地図上のどこに大きな遺伝的障壁があるかについて検討した。

IV 結果および考察

(1) 日光・南会津山系におけるミズナラ、コナラ、(ミヤマナラ) の遺伝構造および類縁関係の解明

葉緑体 SSR 分析では、ナラ両種が同一ハプロタイプを共有し、類似した遺伝構造を形成していた (図

2)。一方、太平洋側と日本海側では異なるタイプが優占し、両地域を隔てる尾根による「地理的隔離」が認められた。さらにその境界域に位置する栃木県北部では稀なタイプが複数検出された。コナラ属の過去の分布変遷に関しては、西南日本から少しずつ北上してきたが、最終氷期の間は関東地方以北には分布を拡大できなかったという先行研究が既に発表されている(Kanno et al. 2004)。そのため、この地域が最終氷期の間にコナラ属の一時的な逃避地(refugia)となっていた可能性が示唆された。偽高山に分布する変種のミヤマナラは、いずれの集団も日光山系の南側(太平洋側)のミズナラ・コナラ集団に卓越するハプロタイプ、もしくはそれに近縁なタイプを持っていたことから(図3)、少なくとも日光・南会津に分布するミヤマナラは南方由来であることが示唆された。

他方、核 SSR のヘテロ接合度期待値 H_e はコナラで日本海岸気候区の集団 \leq 太平洋岸気候区の集団、ミズナラで太平洋岸気候区の集団 $>$ 日本海岸気候区の集団という結果を示した。両気候区間での H_e の大小関係が両種で逆転しているのは、積雪が両種に及ぼす影響の仕方が異なったためと推察された。集団間の分化度を示す F_{ST} はコナラで 0.012、ミズナラで 0.030 だった。Hardy-Wienberg 不平衡および連鎖不平衡を最小にする様に個体を振り分ける STRUCTURE 解析では、供試したコナラ個体は 1 群に纏められた一方、ミズナラ個体は 2 群に分けられ、特にミヤマナラ集団および日本海岸気候区の中でも多雪かつ傾斜地に位置するミズナラ集団は、他のミズナラ集団と優占する群が異なっていた(図4)。即ち局所的な環境の相違がミズナラの集団間に生殖隔離を招き、種内分化、さらにミズナラからミヤマナラへの分化を促した可能性が示唆された。但し、群馬県で調査したミヤマナラ集団は周囲のミズナラ集団と同程度の遺伝的多様性を保持していたのに対し、栃木県および福島県の県境尾根に見られたミヤマナラの小集団では、周囲の集団に比べ著しく低い集団内の多様性が観察された。従って後者の集団では、周囲の集団との遺伝的な交流は殆ど成されずに、孤立化したまま今に至っているものと思われる。

最後に Porth et al. (2005) の EST 領域のシーケンス結果では、2 種 1 変種間に大きな分化は認められなかったが、ミヤマナラ 2 集団では特に塩基多様度が高く、かつ他の種に比べ相対的に分化していた。この結果は、ミヤマナラ集団で突然変異が特に(高標高域における強紫外線などにより)頻発し、かつその変異が(Wright 効果によって)集団に蓄積し易くなっている可能性を示唆している。こうした突然変異の蓄積がミズナラからミヤマナラへの矮性進化を進めた原動力となっている可能性が考えられ、更なる研究が必要である。

(2) 東日本全域におけるミズナラ(およびコナラ)の遺伝構造の解明と保全区設定への提案

葉緑体 SSR 分析では(1)の日光・南会津山系における調査で見られた2つの主要なハプロタイプが、東日本広域でも見られた(図2)。日光山系の南側で優占していたタイプは東日本広域では、太平洋側に多く、もう一方のタイプは日本海側および北海道で多く見られた。

他方、核 SSR の対立遺伝子多様度は南方から北方に向かって、緩やかに減少していく傾向があったが、有意な傾向は認められなかった。集団間の遺伝的分化度と集団間の地理的距離には強い正の相関が認められ($r^2 = 0.41$, $P < 0.05$)、回帰直線を外挿すると、およそ 40km の距離範囲内では集団間の分化(pairwise F_{ST}) がゼロになることが判明した(図5)。即ち、40km の距離範囲内では花粉や種子による遺伝的な交流が盛んに行われ、殆ど分化が起きていないことが推察された。その一方で、北海道と本州の間では比較的大きな遺伝的障壁(遺伝的分化)があることが判明した(図6)。最後にコナラとの浸透交雑については、その程度が今回のデータでは限られていた(図7)。

V 保全への提言

東日本広域で見た場合、葉緑体ハプロタイプによる保全区の区分けは難しいが、少なくとも北海道と本州との間に大きな遺伝的境界があったことから、両者間での種苗の交換などは避けるべきと考えられる。併せて日光・南会津山系に見られた様な尾根による隔離があった場合は、その隔離を維持する様にして、尾根を越えた種苗流通は避けるべきである。また、40km を一つの目安として保全区 (Management Unit) を設定し、その中では種苗の交換をある程度許容できる可能性が考えられた。

一方山岳地域では仮に水平な地理的距離が近くても標高による隔離や、局所的な環境の相違によって、栃木県と福島県の県境尾根で見られた様な、遺伝的に特殊なナラ集団も存在する。全てのミヤマナラ集団を同じ様に扱うのではなく、今回の研究で明らかになった様に特に遺伝的に孤立しているミヤマナラ集団を優先して、温暖化による集団の絶滅から救うための保全をする必要がある。

VI 謝辞

本研究は公益信託エスベック地球環境研究・技術基金（平成 18 年度）の助成の下に行われた。ここに厚くお礼申し上げる。また本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科の井出雄二教授、齊藤陽子助手、および一部の研究については森林総合研究所の津田吉晃博士との共同研究として遂行された。

VII 引用文献

- Deguilloux M-F, Dumolin-Lapègue S, Gielly L, Grivet D, Petit RJ. (2003) A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. Mol Ecol Notes 3:24-27.
- Dow BD, Ashley MV, Howe HF (1995) Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. Theor Appl Genet 91:137-141.
- Goudet J (2001) FSTAT (version 2.9.3): A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. www.unil.ch/izea/software/fstat.html.
- Kanno M, Yokoyama J, Suyama Y, Ohyama M, Itoh T, Suzuki M (2004) Geographical distribution of two haplotypes of chloroplast DNA in four oak species (*Quercus*) in Japan. J Plant Res 117:311-317.
- Lian C, Oishi R, Miyashita N, Nara K, Nakata H, Wu B, Zhou, Z, Hogetsu T (2003) Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. Mol Ecol 12:609-618.
- Manni F, Guérard E (2004) Barrier vs. 2.2 Manual of the user. Population genetics team, Museum of mankind (Musée de l' Homme), Paris [Publication distributed by the authors].
- Manni F, Guérard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by "Monmonier's algorithm". Hum Biol 76: 173-190.
- Miller MP. 1997. TFGPA (version 1.3): A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm
- Mishima K, Watanabe A, Isoda K, Ubukata M, Takata K (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Quercus mongolica* var. *crispula*. Mol Ecol Notes 6:695-697.
- Porth I, Scotti-Saintagne C, Barreneche T, Kremer A, Burg K. 2005. Linkage mapping of osmotic stress induced genes of oak. Tree Genet & Genomes 1:31-40.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959.
- Rogers JS (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. In: Studies in Genetics VII. Austin: University of Texas Publication 7213, 145-154.
- Steinkellner H, Fluch S, Turetschek E, Lexer C, Streiff R, Kremer A, Burg K, Glössl J (1997) Identification and characterization of (GA/CT)_n microsatellite loci from *Quercus petraea*. Plant Mol Biol 33:1093-1096.
- Wright S (1943) Isolation by distance. Genetics 28:114-138.
- Zhou Z, Miwa M, Kogetsu T (1999) Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytol 144:55-63.

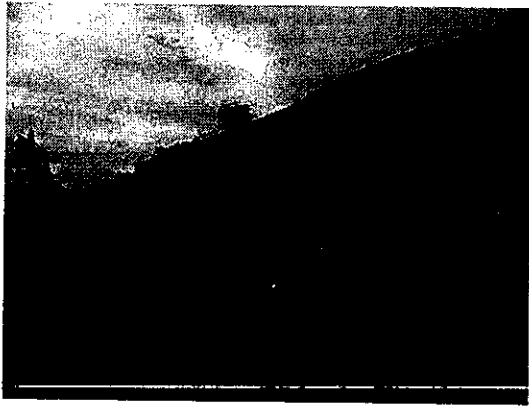


図1 ミヤマナラ (偽高山帯に分布するミズナラの矮性変種).

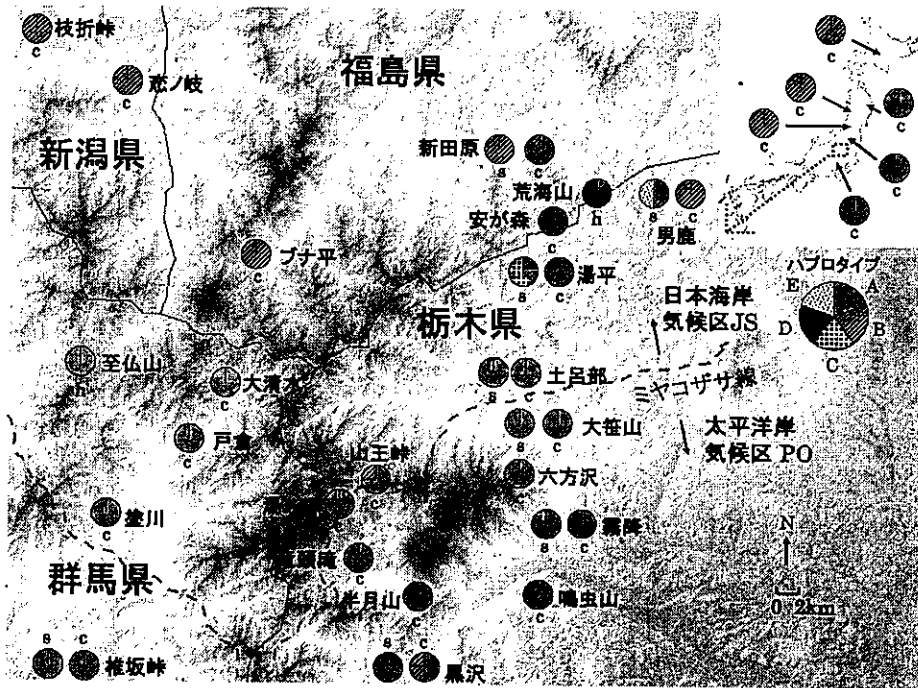


図2 日光・南会津山系におけるコナラ(s)、ミズナラ(c)、ミヤマナラ(h)の葉緑体 SSR のハプロタイプの地理的分布。

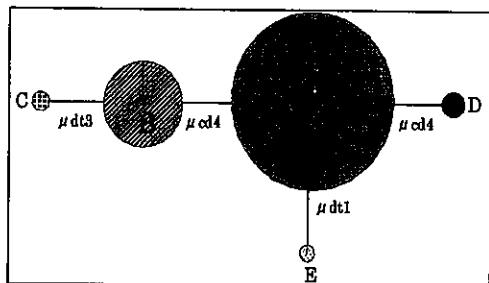


図3 葉緑体 SSR のハプロタイプ間の系統関係. それぞれの円のサイズはおおまかなハプロタイプの相対出現頻度を示している。

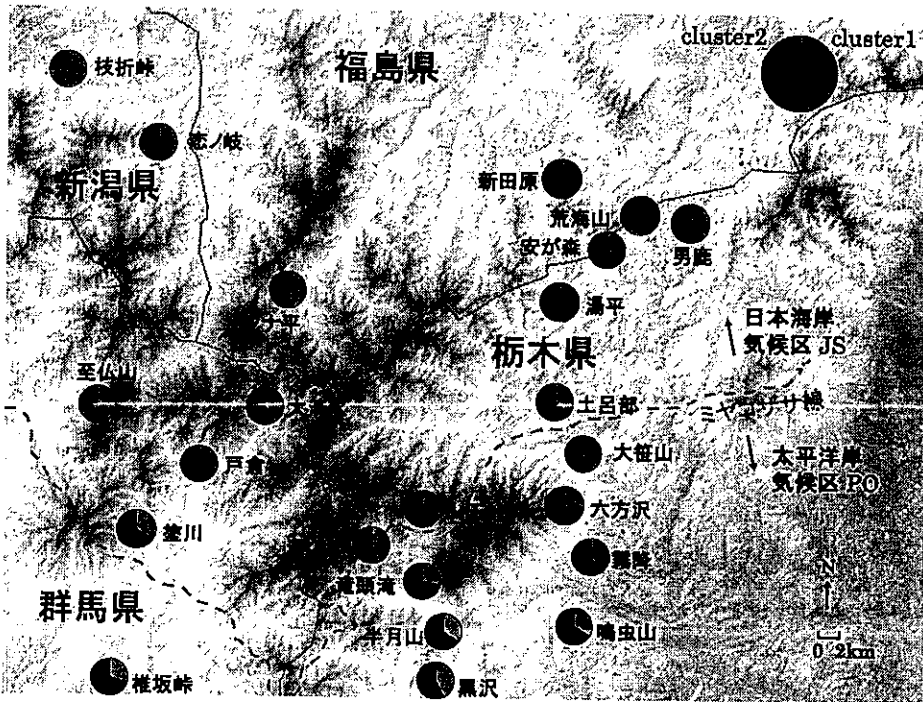


図4 日光・南会津山系におけるミズナラ（ミヤマナラ集団も含む）の Bayesian clustering による 2 つのクラスターの地理的分布.

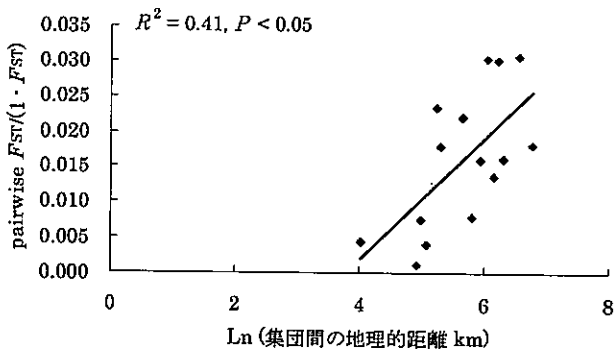


図5 東日本全域ミズナラ 6 集団の核 SSR10 座の遺伝子型に基づいた、地理的距離と集団間分化度の相関。外挿すると地理的距離が約 40km 付近で集団間分化度が 0 になる。

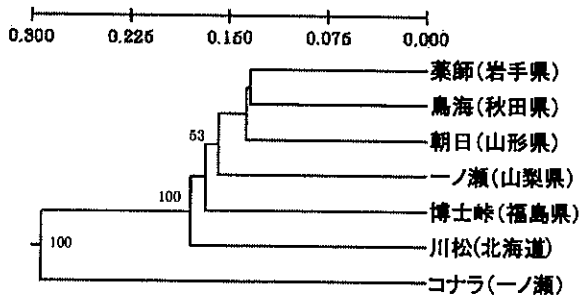


図6 東日本全域ミズナラ 6 集団およびコナラ 1 集団の核 SSR10 座の遺伝子型に基づいた UPGMA 樹形図。Roger's Original (1972) distance を尺度として使用した。

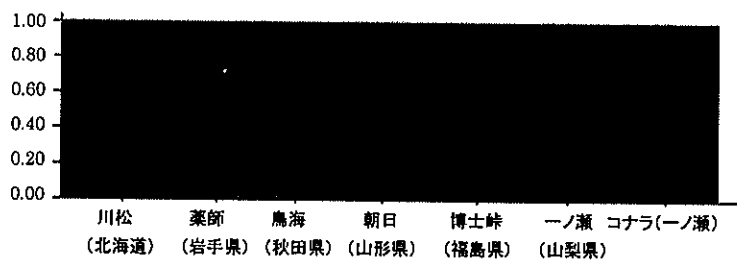


図 7 東日本全域ミズナラ 6 集団およびコナラ 1 集団の核 SSR10 座の遺伝子型に基づいた Bayesian clustering のバープロット図. 2つのクラスターに分ける場合が最もらしい (最大尤度) ため、2つのクラスターに分けた場合の各集団の組成を示した.