

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

遺伝情報解読ブレークスルーを活用した
「種の保存法」指定種の最適保全管理
(4-1605)

平成28年度～平成30年度

Optimum Conservation of Species Designated by the Endangered Species Preservation Act
Using Information Obtained from Sequencing Breakthrough

<研究代表機関>
京都大学

<研究分担機関>
東北大学
筑波大学

2019年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに (研究背景等)	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 ゲノム情報を活用した絶滅危惧種の最適保全管理 (京都大学)	13
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-2 絶滅危惧種保全のためのバイオインフォマティクス解析 (東北大学)	38
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-3 絶滅危惧種を構成する残存集団のデモグラフィー解析 (筑波大学)	58
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	

3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

II-4 絶滅危惧種のゲノム情報の縮約解読技術開発 76

(東北大学)

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

III. 英文Abstract 97

1. 成果の概要

課題名 4-1605 遺伝情報解読ブレークスルーを活用した「種の保存法」指定種の最適保全管理
 課題代表者名 井鷲 裕司（京都大学大学院農学研究科教授）
 研究実施期間 平成28～30年度
 累計予算額 74,204千円
 （うち平成28年度：25,154千円、平成29年度：25,154千円、平成30年度：23,896千円）
 累計予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 生物多様性保全、生物多様性条約、有害遺伝子、空間的遺伝構造

研究体制

- (1)ゲノム情報を活用した絶滅危惧種の最適保全管理(京都大学)
- (2)絶滅危惧種保全のためのバイオインフォマティクス解析(東北大学)
- (3)絶滅危惧種を構成する残存集団のデモグラフィック解析(筑波大学)
- (4)絶滅危惧種のゲノム情報の縮約解読技術開発(東北大学)

1. はじめに(研究背景等)

絶滅の恐れのある野生動植物の種の保存に関する法律、いわゆる「種の保存法」は2013年6月に改正され、「生物の多様性の確保」が目的として明記されるとともに、「科学的知見の充実を図る」ことが国の責務とされた。国内希少野生動植物種は同法の施行以来20年で90種が指定されてきたにすぎなかったが、2020年までに300種を新規指定するという意欲的な目標が設定された。

しかしながら、国内希少動植物種に指定すれば、種の保全が適切に行えるというわけではない。指定によって盗掘圧が上昇し絶滅に拍車がかかるという懸念や、域外保全、有害遺伝子、適応能力、遺伝子汚染、保全単位など、適切な保全のために必要な遺伝情報が不足しているという問題がある。日本の生物多様性保全において中心的役割を担う「種の保存法」を有効に実施するためには、絶滅危惧種の保全に関して、より厳密かつ効率的な保全管理策の構築が強く求められている。

従来、生物保全のための遺伝解析では、少数の中立遺伝子座について遺伝子型解読がなされてきたが、現在、DNA塩基配列解読技術は著しい速度で発展しており、ブレークスルーが起こっている。この状況を活用して、絶滅の危機にある種の保存法対象種(国内希少野生動植物種)を対象にゲノムレベルの遺伝情報を得ることで、これまでにないレベルの的確で効率的な保全の達成が可能になることが期待できる。

2. 研究開発目的

本課題では、遺伝子解読技術におけるブレークスルーを活用し、社会的かつ行政的に保全の必要性が高い国内希少野生動植物種について、ゲノム情報を活用した、組織的、合理的、効果的な生物保全策を構築することで、「種の保存法」の有効実施を強力にサポートする手法を確立することを目的とした。この目的の達成のために、「種の保存法」の保全対象種(国内希少動野生植物種)とその近縁普通種を対象にゲノムレベルの解読を行い(サブテーマ1)、その情報を解析することで、有害遺伝子の蓄積量や適応進化能力から希少種の存続可能性の評価(サブテーマ2)、希少種の歴史的集団サイズの変動履歴解析(サブテーマ3)を行う。また、微量サンプルや劣化サンプルでもゲノムレベルの遺伝情報を解読できる手法の開発・改善を行う(サブテーマ4)。

この研究アプローチを通して、COP10愛知ターゲットの目標12「2020年までに、既知の絶滅危惧種の絶滅及び減少が防止され、また 特に減少している種に対する保全状況の維持や改善が達成される」及び、目標19「2020年までに、生物多様性、その価値や機能、その現状や傾向、その損失の結果に関連する知識、科学的基礎及び技術が改善され、広く共有され、適用される」の達成に貢献する。野生生物保全をめざした法律において、保護対象種にゲノムレベルの遺伝解析を行い、適切な保全を図ることは世界的に見てもきわめて先進的な試みであり、ゲノム解読時代における新たな生物保全策のスタンダードを構築する。

3. 研究開発の方法

(1) ゲノム情報を活用した絶滅危惧種の最適保全管理(京都大学)

■絶滅危惧種の保全状況の確認と解析試料採集

本研究では、国内希少野生動植物種6種を対象に、保全状況の確認と解析試料の採集を行い、そして、ゲノム情報の解読および統合的な保全策の構築を行うことを目標とした。

しかしながら、本研究が解析対象とする国内希少野生動植物種は、実際に生育地を訪れるまでは生育状況が不明な場合が多い。また、核酸の抽出においても、大量塩基配列情報を解読できる十分な量と質のRNAやDNAが得られるとは限らない。また、大量塩基配列情報の解析に関しても、DNAの質やゲノム構造に由来する種特異的な状況によって解析が困難になる場合もある。

これらの点を考慮して、本研究では余裕を持った数の分類群について、試料採集と大量塩基配列情報の解読を行った。対象とした国内希少野生動植物種と絶滅危惧植物は、日本国内(本州や小笠原諸島、琉球列島など)のみに生育する固有植物や国内に加えて海外にも生育する広域分布種を中心に選定した。

■ゲノム情報の解読

各植物について、RNA-seq (RNA sequencing) によるRNAの塩基配列変異の解読とRAD-seq (Restriction Site Associated DNA sequence)によるDNAの塩基配列変異の縮約解読を行った。

トランスクリプトーム解析に用いたRNAは、生育地において採集した植物試料の組織をRNA保存液(RNA later, QIAGEN)に入れて研究室に持ち帰り、抽出を行なった。RNA laterによるRNAの保存が不良な種もあり、そのようなものに関しては生個体を持ち帰り、鉢植えで状態を良好に保った個体から、あるいは、域外保全されている栽培個体からRNAの抽出を行なった。RNAの抽出は、Plant RNA Isolation Mini キット(Agilent)を使用した。抽出したRNAは濃度、分解度、分子サイズ分布を測定し、十分なクオリティ(濃度19-737 ng/ μ l、全量0.8 μ g以上、RIN値3.5以上)を持つサンプルについて次世代シーケンサー(HiSeq 2500、HiSeq 4000、NovaSeq 6000、HiSeq X、全てIllumina社)によるペアエンド塩基配列解読を行った。

RAD-seqによるゲノム情報の縮約解読に関しては、国内希少野生動植物種については可能な限り網羅的に、比較対象となる普通種からは集団レベルの遺伝的特性が明らかになるように、それぞれ12-72個体の試料からCTAB法によりDNAを葉組織から抽出した。適切に濃度調整したDNA(13-16 ng/ μ l)を制限酵素(EcoRIとBglII)で消化処理することで、多数のDNA断片を含むライブラリーを作成し、これを次世代シーケンサー(HiSeq 2500, Illumina)によってペアエンド解読し、各DNA断片について150 bps X 2の塩基配列解読を行った。

RNA-seqおよびRAD-seqによって得られた塩基配列情報は、それぞれ、サブテーマ2及びサブテーマ3に提供した。また、一部の対象植物については、DNA抽出物をサブテーマ4におけるMIG-seq解析にも使用した。

■大量塩基配列情報を活用した希少種の保全状況評価と新たな管理指針の構築

多数の遺伝解析試料を必要とする従来の集団遺伝学的解析では保全状況を適切に評価できなかったような少数の試料を対象に、ゲノム情報から個体の保全状況や保全価値の評価する手法を考察した。RAD-seqから得られた塩基配列情報からSNPs(1塩基多型)を検出し、各サンプルの種内系統関係や空間的遺伝構造を解析し、種内の保全単位の検出や生育地間の遺伝的分化を明らかにした。また、ゲノム内に存在するSNPs頻度によって個体レベルの遺伝的多様性を評価した。RAD-seqから得られた塩基配列情報はstacksで処理し、SNPs(1塩基多型)を検出した。SNPs情報をもとに、各サンプルの種内系統関係は、RAxML v8を使用して最尤法によって作成した。塩基置換モデルはGTR+Gを用いた。種内の遺伝構造はSTRUCTUREによってを解析し、種内の保全単位の検出や生育地間の遺伝的分化を明らかにした。個体レベルの遺伝的多様性は、ゲノム内に存在するSNPs頻度で評価した。

最後に、各種希少植物の大量塩基配列情報を適切かつ効果的な生物保全策につなげるために、希少植物の保全状況を一貫して各サブテーマから得られた結果を統合し、希少種の保全状況評価と新たな管理指針の構築を行った。

(2) 絶滅危惧種保全のためのバイオインフォマティクス解析(東北大学)

■絶滅リスクに関するゲノム指標

ゲノムの状態から種の絶滅リスクを評価する手法を確立するため、サブテーマ1でRNA-seqにより得られた対象種(国内希少動植物種や絶滅危惧種、および近縁普通種)のRNA配列情報を用いて、(i)集団サイズを反映している遺伝的多様性、(ii)自然選択効率の低下を示す有害変異の蓄積、(iii)環境適応能力の高さと相関のある重複遺伝子の割合、の3つの指標に着目して絶滅リスク評価を行った。

■希少種の比較対象カテゴリー

本研究において対象とした希少種や絶滅危惧種は個体数が極めて少なく、また種の保存法によって厳格に管理されているため、解析個体数の確保は容易ではない。そのため、ここでは対象種の地理的分布や種内個体群の生育状況に応じて、小笠原諸島固有の絶滅危惧植物と同属普通種(4属12種)、本土または離島に生息する絶滅危惧植物とその同属普通種(4属9種)、隔離地域個体群と近縁種普通種または同種他集団(6属12種)の組み合わせで比較した。

■バイオインフォマティクス解析手法

サブテーマ1より提供されたRNA-seq解読情報に含まれる短いRNA塩基配列をアセンブルして転写産物配列を得た。これらの転写産物の配列を参照配列とし、BWAを用いてショートリードのマッピングを行った。各個体の塩基変異(SNVs)はSamtoolsを用いてコールした。このようにして1個体内で検出されたSNVsを、アミノ酸配列には変化のない同義置換とアミノ酸配列を変異させる非同義置換に分類した。

得られた網羅的SNVsを用いて、(i)遺伝的多様性については、種内の遺伝的多様性を評価するために、1個体内でヘテロ接合として保持されている同義変異の数を検出し、転写産物1kbあたりの数に換算した比較解析した。(ii)有害変異蓄積の指標としては、全SNVs中の非同義置換SNVsの割合、非同義置換SNVs中の保存性の高いアミノ酸配列の置換の割合、非同義置換SNVs中のナンセンスSNVsの割合を算出した。(iii)環境適応力の指標としては、ゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合を推定した。(i)~(iii)を行うために、各種解析ソフトウェアを組み合わせてパイプラインを構築した。

これらの指標の解析結果を、上記に示した比較対象カテゴリーごとに絶滅危惧種と普通種の間で比較することにより、絶滅危惧種の潜在的脆弱性の評価を行った。

(3) 絶滅危惧種を構成する残存集団のデモグラフィ解析(筑波大学)

■データのフィルタリングと遺伝子座の中立性の検定

生物種を構成する集団の歴史的な動態(デモグラフィ)は、絶滅危惧種の保全上、きわめて有用な情報である。次世代シーケンサーによる塩基配列解読技術が発展し、大量の遺伝情報が得られるようになったことや、解析技術の発展により、遺伝データから種内あるいは近縁種間での集団分化、二次的混合の時期や有効な集団サイズなどの進化学的な集団動態のパラメーターが推定可能となった。

本サブテーマでは、サブテーマ1でRAD-seqによって得られた対象種(国内希少動植物種や絶滅危惧種)のゲノム縮約解読情報を用いて、種間の遺伝的關係、種内の地域系統間の評価およびこれらの分化時期や分化してからの有効な集団サイズの変動など集団動態の推定を行った。解析対象とした国内希少野生動植物種は、キク科アゼトウナ属のコヘラナレン、サクラソウ科サクラソウ属のカッコソウ、トウダイグサ科ニシキソウ属のポロジニシキソウ、シソ科キランソウ属のシマカコソウ、ラン科セッコク属のオキナワセッコク、ツツジ科スノキ属のヤドリコケモモである。

RAD-seqから得られるデータには極めて多数の遺伝子座に関する情報が含まれている半面、データの欠損率が高い。欠損率が高く、低頻度でしか検出しない多型を持っている遺伝子座は、遺伝構造およびデモグラフィ推定にバイアスになるため、RAD-seqデータからは欠損率(2割まで許容)、低頻度で検出される対立遺伝子の頻度(5%以上のみ許容)も考慮して、データをフィルタリングした。フィルタリングをパスした遺伝子座については中立性の検定を行った。当初はヘテロ接合度期待値および集団分化度から中立な遺伝子座の分布を推定するLOSITAN、あるいは、モデルベースで集団に特異的な中立の変異による動態から、座特異的な適応的遺伝変異による効果を分けるBayeScanを用いていたが、これら方法ではデモグラフィなどの影響で選択の影響を誤判断する可能性が高いため、これら方法に加え個体ベースの主座標分析による遺伝構造評価から中立遺伝子座を検出するPCADAPTも用いて、中立性の検討を行った。これらの検討によって選別された遺伝子座の変異情報をもとに、遺伝的多様性や遺伝構造、およびデモグラフィを推定した。

■ 遺伝的多様性と遺伝構造

遺伝的多様性はヘテロ接合度の期待値、多型的遺伝子座の割合、アレリックリッチネスを用いて評価した。集団あたりの個体数がある程度ある場合は固定指数 F_{IS} も算出し、任意交配からの偏りについても評価した。集団分化程度は F_{ST} を用いて評価し、種間、種内集団間および集団内個体間の分子分散分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)も用いた。いずれの場合も用いたマーカーの多型性の影響を考慮した F_{ST} などの補正値を用いた。これら解析などには主にGenAlEx6.5を用いた。また遺伝構造評価は主にSTRUCTURE解析および個体間の遺伝距離に基づく主座標分析を用いた。またカツコソウについては個体位置データも取得できたため、個体間血縁度を用いて集団内の空間遺伝構造も評価した。

■ デモグラフィ推定

種間、種内集団間のデモグラフィは集団動態シナリオを近似ベイズ計算(Approximate Bayesian Computation, ABC)を用いたDIYABC2.0により推定した。さらに時間スケールにおける有効な集団サイズ変動は拡張ベイズスカイラインプロット(Extended Bayesian Skyline Plot)およびStairway plotを用いて評価した。前者ではRAD-seqデータからSNPが検出された元の塩基配列データを用いて、1遺伝子座あたり4SNP以上を含む多型の遺伝子座のみ供試した。後者はsite frequency spectrum (SFS)を用いた。さらに集団分化、遺伝子流動については日々内容が更新されているDadiを用いて評価した。また集団間の方向性のある遺伝子流動についてはdivMigrateも用いて評価した。

(4) 絶滅危惧種のゲノム情報の縮約解読技術開発(東北大学)

■ 簡易縮約ゲノム法MIG-seqの技術的改善

絶滅危惧種を適切に保全管理するためには、ゲノム情報解読技術を活用した遺伝的情報の利用が有効であるが、絶滅危惧種では必ずしも十分な量と質の解析試料が得られるとは限らない。また、多数のサンプルを低コストかつ簡便に解析する手法も求められている。

より実効性のあるゲノム情報縮約解読技術を開発することを第一の目的とし、本サブテーマでは、次世代シーケンサーを用いたDNA分析方法であるMIG-seq (Multiplexed ISSR Genotyping by sequencing)法の改善・改良を行った。MIG-seqでは、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 sequence repeat, ISSR)をユニバーサルなマルチプレックスPCRプライマーセットによって数千以上のゲノムDNA断片として同時に増幅することでライブラリーとして構築する。そして構築されたライブラリーを次世代シーケンサーで分析することにより、ゲノムワイドな一塩基多型(SNP)の検出およびサンプルごとの遺伝子型の解読を行うものである。本手法は分析対象種について事前にゲノム情報を必要とせず、植物・動物・菌類等、生物種を問わずに同一手法の適用が可能であるため、分析対象種ごとのマーカー開発作業を必要としない。また、迅速(3日間)、簡便(2回のPCRとNGSラン)、安価(サンプルあたりの消耗品費は千円程度以下)に、膨大な量のゲノムワイド塩基配列情報を取得することができる。

本サブテーマでは、DNA抽出サンプルの採集に制約の多い絶滅危惧動植物の迅速・簡便・安価な保全遺伝学的解析手法の確立を目指して、MIG-seq法の分析手順・反応条件等の設定・データ解析方法等、手法全体にわたる技術的改良を行った。具体的には、多様な分類群(脊椎動物・無脊椎動物・草本・プランクトン・貝・菌類・ササ)の生物を用いて、さまざまな実験反応条件(PCRキット、プライマー濃度、アニーリング温度、サイクル数、インデックス構成)についてウェット系プロトコルの改善を行った。また、解読情報のドライ系プロトコルに関して各種解析プログラムのパラメータの設定を最適化し、得られる一塩基変異の検出効率の向上を目指した。

■ 国内希少野生動植物種の集団遺伝学的解析

改善された手法を用いて検出したゲノムレベルの遺伝的変異情報を本に、「種の保存法」指定植物種10種(シマカコソウ、コヘラナレン、タイヨウフウトウカズラ、ハナシノブ、キタダケソウ、キリギシソウ、チョウセンキバナアツモリソウ、レブンアツモリソウ、アツモリソウ、ヤクシマリンドウ)の遺伝的情報を取得し、集団遺伝学的解析を行った。解析には、PCA、系統樹構築、STRUCTUREを用いた。

4. 結果及び考察

(1) ゲノム情報を活用した絶滅危惧種の最適保全管理(京都大学)

■絶滅危惧種の保全状況の確認と解析試料採集

国内希少野生動植物種(コヘラナレン、ユズリハワダン、シマカコスウ、ナガミカズラ、ヤドリコケモモ、ムニンツツジ、カッコソウ、ムニンノボタン、ボロジノニキソウ、ホシツルラン、アツモリソウ、レブンアツモリソウ、オキナワセッコク、ヤブミョウガラン、タイヨウフウトウカズラの15種)、絶滅危惧植物(ツルカコスウ、シコクカッコソウ、ツルラン、サガリラン、イシガキスミレ、オキナワスミレ、ナンバンキンギンソウの7種)、およびそれらの近縁普通種(ホソバワダン、ヒメキランソウ、サキシマツツジ、オオサクラソウ、ノボタン、ハマタイゲキ、ヤエヤマスミレ、セッコクの8種)、合計11科30種の維管束植物について、生育・保全状況の確認と解析試料採集を行うことができた。本プロジェクトで解析対象とした国内希少野生動植物種に関しては、それぞれの分類群で現存するほぼすべての野生個体について位置情報や生育状態、繁殖状況の確認を行うことができ、今後の保全活動にも活用が期待される。

■ゲノム情報の解読

RNA-seqによるトランスクリプトームの網羅的塩基配列解読では、解析試料ごとに平均4,600万リード(read)のデータ量が得られた。ゲノム情報の縮約解読であるRAD-seqでは、解析試料ごとに約200万~800万リードのデータ量を得た。RNA-seqとRAD-seqのデータは、トランスクリプトーム解析と集団ゲノム解析をおこなうサブテーマ2とサブテーマ3にそれぞれ提供した。

目標を大きく上回る数の多様な分類群について試料採集と遺伝情報の解読ができたことにより、データを供与したサブテーマ2と3において、より深く普遍性の高い解析が可能となった。

■大量塩基配列情報を活用した希少種の保全状況評価

日本国内ではごくわずかししか生育していないために集団遺伝学的解析が困難であった希少種でも、ゲノムレベルの情報を活用することで、その遺伝的独自性や履歴の評価が可能となった。

例えば、西表島のみには生育が知られていた国内希少野生動植物種ナガミカズラは、わずか1クローンのみが国内に生育しているにすぎず、また、遺伝的には台湾産の個体と同一クレードにあることが判明した。また、ゲノム内に保持されている遺伝的変異量をもとに解析することで、日本産のナガミカズラは台湾からごく少数個体が来訪して数世代しか経緯していない、いわば帰化植物に近い実態であることも明らかになった。

このように、従来の保全遺伝学的観点では、国内希少野生動植物種はいずれも個体数が極めて少ないという点で共通しているが、ゲノムレベルの情報で解析を行うことで、遺伝的分化、履歴、保全価値などの点で、分類群ごとに異なった状況にあることが明らかになった。この解析アプローチは、今後、数百種類という多数の指定が予定されている国内希少野生動植物種の合理的かつ効率的な管理・状況評価において有用な情報を与えるものと期待される。

■大量塩基配列情報を活用した希少種の新たな管理指針の構築

これまで個体数が少ないという点で共通して希少種として扱われてきた種を、種の脆弱性、環境適応能力、系統的独自性、履歴などの観点に基づいて、複数のカテゴリーに分けることで、より合理的・効果的な保全策を構築した。

例えば、ゲノム内における有害突然変異量が少ない種は、脆弱性は低いと期待される。更にゲノム内の遺伝子重複量が多ければ、環境適応能力も高く、現在は盗掘や生育地の物理的破壊などで個体数は少なくはなっているものの、適切な保全策のもとで野生個体数の回復が見込まれる。反対に、ゲノム内に有害突然変異が多く蓄積されており、更に遺伝子重複量の少ない種は、現在生育している野生条件下では長期的保全が困難である可能性が高い。生物保全は本来的に野生条件下での個体群の維持や更新が望ましいものであるが、このようなタイプの希少種は域外保全も重要な保全策として考慮すべきであると考えられる。希少種の独自性、履歴、脆弱性といった観点を取り入れたアプローチは、希少種保全のための解析では世界的にもこれまでなされてこなかったものであり、「種の保存法」による保全対象種などを対象に、絶滅リスクや存続可能性をより直接的に評価できる新たな評価基準となり得るものである。

(2) 絶滅危惧種保全のためのバイオインフォマティクス解析(東北大学)

■絶滅リスクに関与するゲノム指標の解析パイプライン

次世代シーケンサーによるゲノムワイドな情報とバイオインフォマティクスを用いた網羅的解析により、各指標を得るための大規模ゲノム解析について手法の改善を重ね、(i)集団サイズを反映している遺伝的多様性、(ii)自

然選択効率の低下を示す有害変異の蓄積、(iii)環境適応能力の高さと相関のある重複遺伝子の割合に関する解析が可能なパイプラインを構築することができた。

■希少種の比較対象カテゴリーごとのゲノム指標の特徴

対象種の地理的分布や種内個体群の生息状況に応じて、小笠原諸島固有の絶滅危惧植物と同属普通種(4属12種)、本土または離島に生息する絶滅危惧植物とその同属普通種(4属9種)、隔離地域個体群と近縁種普通種または同種他集団(6属12種)の組み合わせでゲノムの状況を比較解析した。

その結果、特に小笠原固有希少種で環境省の保護増殖事業の対象種となっている分類群の多くは、本土や琉球諸島に生育する近縁普通種に比べて、ゲノム内の遺伝的多様性が低く、より多くの有害遺伝子が蓄積されており、また、重複遺伝子の割合が低いことが明らかになった。これらの特徴は、小笠原諸島に生育する国内希少野生動植物種の脆弱性を示唆するものであり、生物多様性保全上、極めて注目すべき結果が得られた。環境省が行っている、保護増殖事業において成果の出にくい分類群はゲノムの状態が悪いことが、その原因の一つと考えられる。

小笠原産固有希少種において見出された特徴が、ほかのタイプの絶滅危惧種にも共通するものか明らかにするために、本土または離島に生息する絶滅危惧植物とその同属普通種(4属9種)と、隔離地域個体群と近縁種普通種または同種他集団(6属12種)における比較解析を行った結果、前述の3要因、すなわち、遺伝的多様性、有害変異の蓄積、重複遺伝子の割合は分類群の組み合わせごとに異なった結果となっており、小笠原産固有希少種と近縁普通種の組み合わせにおいて見出されたような、希少種におけるゲノムの状態の劣化のような、一貫した傾向は見いだせなかった。

小笠原産固有希少種であるコヘラナレン、ユズリハワダン、ヘラナレン、ホシツルラン、ムニンノボタン、ムニンツツジ、本州に生育するカッコソウ、四国に生育するシコクカッコソウ、奄美大島に生育するヤドリコケモモ、沖縄本島に生育するヤブミョウガランはゲノムの状態が極めて悪いのに対して、北海道に生育するレブンアツモリソウ、琉球諸島に生育するナガミカズラ、オキナワセッコク、イシガキスミレ、ボロジノニシキソウ等の希少種に関しては、それぞれの近縁普通種とゲノムの状態は差が認められなかった。

このように、本サブテーマの解析結果から、国内希少野生動植物種に指定されている分類群は、いずれも分布域が狭く、野生個体数が極めて少ないという点で共通しているが、遺伝的多様性、有害変異の蓄積、重複遺伝子の割合という、種の脆弱性に関与しているゲノムの特徴は分類群ごとに大きく異なっていることが明らかになった。本サブテーマで行ったゲノムの状態を評価する項目を解析・評価することで、今後も多数が指定される予定の国内希少野生動植物種を、それぞれの脆弱性を考慮に入れてより適切かつ効果的に保全できることが期待される。

(3) 絶滅危惧種を構成する残存集団のデモグラフィ解析(筑波大学)

■解析条件の検討

解読されたゲノム縮約情報の質と量は、解析対象分類群ごとに異なっていたので、それぞれについて最適なデータのフィルタリング、遺伝子座の中立性の検討などを詳細に行い、得られた一塩基多型情報をもとに、遺伝的多様性、遺伝構造、デモグラフィに関する解析結果を得た。

■各解析分類群の遺伝的特性とデモグラフィ

キク科アゼトウナ属の小笠原産国内希少野生動植物種コヘラナレンと近縁普通種のホソバワダンについて、連鎖不平衡の影響を考慮した解析を行った。両種間で遺伝構造の差異が認められたが、遺伝的多様性には大きな違いはなかった。両種の分岐は約1万年前であり、更に小笠原の父島と兄島に生育するコヘラナレン集団は500年前に別れたことが推定された。Stairway Plotによる分析では、両種ともに集団減少パターンがみられたが、有効な集団サイズは、ホソバワダンの方がコヘラナレンよりも、やや大きな値であった。

サクラソウ科サクラソウ属の国内希少野生動植物種カッコソウと、近縁種シコクカッコソウおよびオオサクラソウの解析では、カッコソウ集団は遺伝的多様性が減少し、近親交配もシコクカッコソウよりも進んでいることが示唆された。デモグラフィをStairway Plotで推定したところ、両種ともに約1000世代前に集団サイズの減少が検出され、さらにカッコソウについては約200世代に再度減少と、2度のボトルネックが検出された。2種で共通したボトルネックは、1世代を数年とすると数千年前程度、長く見ても1万年程度だと思われるため、おそらく最終氷期最盛期

以降の冷温な気候から温暖な気候になった時期に分布を縮小したためだと思われる。これらの結果より、カッコソウおよびシコクカッコソウはいずれも集団サイズの減少を同時期に経験しているという共通点はみられたが、種の保存法対象種のカッコソウはさらに最近のボトルネックを経験していることがわかり、改めて、保全優先度が高いことがわかった。

トウダイグサ科トウダイグサ属の国内希少野生動植物種ボロジノニシキソウと近縁普通種ハマタイゲキに関しては、ハマタイゲキとボロジノニシキソウ2集団は遺伝的に非常に大きく分化していることがわかった。またボロジノニシキソウの2集団は10 kmも離れていないにも関わらず、大きな遺伝的分化がみられ、これらは個別の保全単位として取り扱うべきと考えられる。Stairway plotからは、ハマタイゲキは約8万年前と4万年前に2回集団サイズが減少した後に、サイズは一定である一方、ボロジノニシキソウは約20万年前から2万年前にかけて徐々に集団サイズを減少させ、最近2,000年程度で更に集団サイズが減少したことがわかった。また有効な集団サイズをみても、ボロジノニシキソウのそれはハマタイゲキよりも明らかに小さいものであった。

シソ科キランソウ属では国内希少野生動植物種のシマカコソウと近縁種のツルカコソウおよびヒメキランソウは、種間で明瞭な遺伝的差異が認められた。シマカコソウ4集団については、本課題で用いた他の希少種に比べ、遺伝的分化はそれほど進んでいなかった。

沖縄本島北部の固有種オキナワセッコクは、生育域をほぼカバーする6集団間において遺伝的分化はみられなかった。集団分化がないのは、かつてはより連続的に分布していたこと、また現在の分布域は沖縄本島北部と限られた地域であり、その中で十分な遺伝子流動がおこっているためと考えられる。またStairway plotからは約80万年に一度大きな集団減少を経験した後、集団サイズは再度回復し、約6万年前に集団を再度減少し、それ以降、集団サイズは安定していることがわかった。特に最近6万年の有効集団サイズは20万個体以上と十分に大きな値が維持されていた。

ツツジ科スノキ属の国内希少野生動植物種ヤドリコケモモについては、台湾に生育する野生株、奄美大島の野生株および日本各地で域外保全されている個体を最尤系統解析したところ、日本と台湾の集団は大きく遺伝的に分化していることがわかった。デモグラフィー解析では、日本の集団は約5500世代前に台湾から分岐した後に小さな集団として維持されてきたことが判明した。そして、その間に日本の集団は遺伝的浮動の影響で遺伝的多様性が減少したと考えられる。

以上のように、コヘラナレン、カッコソウ、ボロジノニシキソウのようにゲノムレベルで有効集団サイズが減少している希少種として予測されるデモグラフィーを示した分類群があるとともに、オキナワセッコクのように国内希少野生動植物種でありながら比較的健全な遺伝的多様性を維持している種もあることが判明した事は興味深い。これは、遺伝的多様性と種の現在の分布パターンが必ずしも、直接的に関係しているわけではなく、分類群が辿ってきた時空間スケールでの集団デモグラフィーの変動が現在の種の分布パターンに影響していることを示唆しており、希少種の保全・管理のためには、種ごとのデモグラフィー評価が重要である事を示している。

(4) 絶滅危惧種のゲノム情報の縮約解読技術開発(東北大学)

■簡易縮約ゲノム法MIG-seqの技術的改善

MIG-seq法の分析技術を改良するために、手法全体の諸条件を再検討した結果、MIG-seq分析用ライブラリー構築時に2回行うPCRのうち、1回目のPCRの反応条件のアニーリング温度を38°Cに設定することで、最終的に得られるデータ中においてリード数に対する共有座数の割合がほぼ2倍以上になることを見出した。この変更によって通常の集団遺伝学的解析の最終段階で、おおまかに数百から千座以上のSNP遺伝子座が得られるようになり、一般的な絶滅危惧種の保全遺伝学的情報取得のために過不足のない解析が可能になった。

また、MIG-seq法プロトコルにおける2回目のPCRにおいて使用する多数サンプル同時解析用の識別インデックス構成を両方のPCRプライマーにインデックスを組み込むデュアル・インデックス方式に変更した。その結果、インデックスの読み取りエラー率が0.5%から0.01%程度に大幅に改善された。さらに、1回目のPCR後にPCR産物を精製・均一化する作業を加えるなど、各ステップにおける細かな改良により、手法全体として再現性が向上した。

データ解読後に行う解析においては、各種解析プログラムのパラメータの設定を最適化することなどにより、得られる一塩基変異の検出効率が大幅に改善できることが確認できた。

これらwet(ライブラリー作製工程)およびdry(データ解析方法)双方における改良によって、改良前の方法に比

べて平均7倍以上の情報量が得られる大幅な改善に成功した。これらの改変については、改良版MIG-seq法プロトコルとしてまとめて学会等で発表するとともに、論文中やWeb上で公開する作業を進めている。

■国内希少野生動植物種の集団遺伝学的解析

本研究によって改良したMIG-seq法を用いて、「種の保存法」指定種(国内希少動植物種)10種とそれらの近縁種を対象に集団遺伝学的解析を行い、それぞれの対象種で次のような生物保全上極めて有用な具体的成果を得ることができた。

小笠原産固有希少種シマカコスウ、コヘラナレン、タイヨウフウトウカズラについては、近縁種との間に明瞭な遺伝的違いが検出され、国内希少動植物種の遺伝学的な独自性を検出した。複数の集団が維持されている希少種、シマカコスウ、コヘラナレン、ハナシノブ、キリギシソウ、チョウセンキバナノアツモリソウ、レブンアツモリソウなどに関しては、種内で地域による遺伝的違い(遺伝的地域性)が存在することを明らかにした。この情報は、適切な保全単位の設定に活用できる。小笠原の母島のみで生育するタイヨウフウトウカズラでは近縁の普通種と比べて遺伝的多様性が低いことが判明した。種レベルの識別が困難なキタダケソウ属植物3種、キタダケソウ、キリギシソウ、ヒダカソウが混在した盗掘株をゲノム情報から明瞭に識別することで、押収株の保全上の価値を評価することができた。また、野生集団の遺伝構造と比較することによって、それぞれの盗掘株の本来の生育地を推定することもできた。北海道の礼文島のみで知られるレブンアツモリソウでは、既知の自生地以外で発見された個体に人為的な移植の疑いがあることがわかった。屋久島のみで生育するヤクシマリンドウでは、地域集団間に遺伝的多様性の差があり、保全上重要な集団を特定することができた。

これらの成果は、本研究で開発したゲノム情報縮約解読技術が、絶滅危惧種の保全を目的とした遺伝情報取得のために実効性のある手法であることを示すとともに、個々の「種の保存法」指定植物種の適切な保全管理のための具体的な有用情報として提供できたことを示している。

■本ゲノム縮約解読技術の意義

絶滅危惧種の保全遺伝学的な応用に加えて、分子系統分類・分子系統地理・集団遺伝学・分子生態学、さらには農作物等の品種識別技術に至るまで、様々な対象を目的としたゲノム情報取得がより現実的に可能になった。また、本解析手法は国内外で広く用いられる新技術として注目されつつある点も特筆すべき点であり、国内希少野生動植物種を対象に本解析手法で、ゲノム情報を取得することにより、各対象種に関する分子系統分類・集団遺伝学的情報を集積でき、また、保全管理等に活用できる情報を提供することができたという点において、基礎および応用科学的意義は大きい。また、本サブテーマで縮約ゲノム解読を行った「種の保存法」指定種である10種(シマカコスウ、コヘラナレン、タイヨウフウトウカズラ、ハナシノブ、キタダケソウ、キリギシソウ、チョウセンキバナノアツモリソウ、レブンアツモリソウ、ヤアツモリソウ、クシマリンドウ)に関しては、遺伝的地域性等の情報が各種の保全実施計画に活用されることが見込まれる。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

- 1) 機能遺伝子の網羅的解読によって、国内希少野生動植物種等希少種の脆弱性や環境適応性を評価することが可能になり、ゲノム情報に基づく絶滅危惧種の新たな評価基準を提言することができた。このことは世界的に見ても全く新たな生物保全のアプローチである。
- 2) 日本国内では極めて個体数が少ないために国内希少野生動植物種とされているが、海外には相当数が生育している分類群について、解析サンプルは少数であっても、ゲノムレベルの解析を行うことで、国内希少野生動植物種の遺伝的独自性や国内における履歴・歴史を正確に知ることができた。希少種の保全価値評価などに活用が期待される。
- 3) これまで、時間・労力・経済性・分析対象試料の質・量の問題等により実施が困難であった保全遺伝学的情報取得法に関して、本研究により実効性のあるゲノム情報の縮約解読技術を開発した。希少種の保全状況や履歴などに関して科学的客観性に基づいた評価が可能になった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

- 1) 環境省は、国内希少野生動植物種に指定されている小笠原産固有希少植物について、個体の繁殖の促進、生息地等の整備等の事業の推進の必要性を認め、保護増殖事業を行っている。本研究で行われた国内希少野生動植物種に指定されている小笠原産固有希少植物の遺伝解析の結果は、実施計画の策定に活用されている。
- 2) 環境省と日本植物園協会の間で締結された「生物多様性保全の推進に関する基本協定書」に基づいて設立されたサガリラン野生復帰検討会において、今後の保全方法、域外保全集団の確立方法、人工交配の好適な組み合わせ方法などについて、本研究の遺伝解析結果が活用された。
- 3) 環境省東北地方環境事務所が行うチョウセンキバナアツモリソウ生育域外保全実施計画検討会準備会合等において、本研究成果であるゲノム縮約解読技術を用いたチョウセンキバナアツモリソウの分析結果を提示し、保全実施計画の検討に貢献した。
- 4) 桐生市によって国内希少野生動植物種カッコソウ保全のために設立されたカッコソウ協議会に対して、カッコソウの遺伝構造、遺伝子汚染の有無等情報を提供し、その保全活動に貢献した。
- 5) 環境研究総合推進費による他プロジェクト4-1702「希少植物の自生地復元に向けた問題解決と基盤整備での活用」が行っている小笠原産希少種の遺伝解析にも本プロジェクトの解析結果を提供した。
- 6) 本プロジェクトで著しく解析能力の向上した縮約ゲノム解読技術MIG-seqは、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」において、簡易品種判定、効率的育種、税関での水際取締などを目指した、国内食用きのこ全登録品種のDNA情報データベース構築と、他農産物にも応用できる汎用品種鑑定システムの開発に活用されている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- 1) 本プロジェクトで解析対象とした国内希少野生動植物種や希少植物に関して、それぞれの分類群で現存するほぼすべての野生個体について位置情報や生育状態、繁殖状況の確認、個体レベルの遺伝子型解読を行うことができた。野生個体数や域外保全個体数が極めて少ない希少種について遺伝的な個体数を明らかにすることで、より効果的な保全策の構築が可能になった。
- 2) 本プロジェクトで開発・改善を行ったゲノムの縮約解読法は少量の劣化試料にも適用可能であり、国内希少野生動植物の遺伝的個体識別や産地判定を行うことで、盗掘・違法売買を低コストで効果的に防止することや、近縁種との交雑による遺伝子汚染を検出することなど、行政による国内希少野生動植物種の効果的な保全策の実施に活用できる。
- 3) すでに多数が指定され、また、今後も多数が指定される予定である国内希少野生動植物種について、その絶滅リスクや存続可能性を事前に評価できる。また、ただ単に、個体数の少なさだけでなく、機能遺伝子の網羅的解読によって、国内希少野生動植物種等希少種の脆弱性や環境適応性を評価することが可能になり、ゲノム情報に基づく絶滅危惧種の新たな評価基準に基づいて、世界的に見ても先進的かつ合理的・効果的な保全策の構築が可能になる。
- 4) 愛知ターゲットに関して、その目標12(2020年までに、絶滅危惧種の絶滅・減少が防止され、特に減少している種に対する保全状況の維持・改善が達成される)と目標19(2020年までに、生物多様性などに関連する知識、科学的基礎及び技術が改善され、共有適用される)について、生物多様性条約第10回締約国会議(GOP10)開催国としての責務遂行に貢献できる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) T. HAMABATA, G. KINOSHITA, K. KURITA, P.-L. CAO, M. ITO, J. MURATA, Y. KOMAKI, Y. ISAGI and T. MAKINO: Commun. Biol., 2, 244 (2019)
Endangered island endemic plants have vulnerable genomes.

- 2) Y. YAMAURA, A. NARITA, Y. KUSUMOTO, A.J. NAGANO, A. TEZUKA, T. OKAMOTO, H. TAKAHARA, F. NAKAMURA, Y. ISAGI and D. LINDENMAYER: *Biol. Lett.*, 15, 5, 20180577 (2019)
Genomic reconstruction of 100,000-year grassland history in a forested country: population dynamics of specialist forbs.
- 3) L. MIZUSAWA, N. ISHIKAWA, O. YANO, S. FUJII and Y. ISAGI: *Acta Phytotaxon. Geobot.*, 70, 2, 87–102 (2019)
Geographic distribution of ploidy levels and chloroplast haplotypes in Japanese *Clerodendrum trichotomum s.lat.* (Lamiaceae).
- 4) K. KURITA, D. KYOGOKU, A. ABE, M. YOKOTA, and Y. ISAGI: *Genes Genet. Syst.*, 94, 2, 99–102 (2019)
Development of microsatellite markers for an endangered fern in the Ryukyus, *Plagiogyria koidzumii* (Palgiogyriaceae).
- 5) K. KISHIKAWA, K. SUETSUGU, D. KYOGOKU, K. OGAKI, D. IGA, K. SHUTOH, Y. ISAGI, and S. KANEKO: *Genes Genet. Syst.*, 94, 2, 95–98 (2019)
Development of microsatellite markers for complete cleistogamous species *Gastrodia takeshimensis* (Orchidaceae), with transferability for its chasmogamous sister *G. nipponica*.
- 6) 芝林真友、栗田和紀、井鷲裕司、横田昌嗣、阿部篤志、赤井賢成、國府方吾郎、遊川知久、長澤淳一、志内利明、市河三英、橋本季正、阪口翔太、寺峰孜: DNA多型、27, 62–65 (2019)
分布フロントにおける希少植物のゲノムワイドな遺伝解析
- 7) Y.W.C. KUSUMA, S.R. ARIATI, R.A. RISNA, C. MITSUYUKI, Y. SUYAMA and Y. ISAGI: *Trop. Conserv. Sci.*, 12, 1–12 (2019)
Seedling selection using molecular approach for ex situ conservation of critically endangered tree species (*Vatica bantamensis* (Hassk.) Benth. & Hook. ex Miq.) in Java, Indonesia.
- 8) T. MAKINO and M. KAWATA: *Mol. Ecol.*, 28, 7, 1652–1663 (2019)
Invasive invertebrates associated with highly duplicated gene content.
- 9) K. ARIMA, D. KYOGOKU, N. NAKAHAMA, K. SUETSUGU, M. OHTANI, C. ISHII, H. TERAUCHI, Y. TERAUCHI and Y. ISAGI: *Evol. Ecol.*, 33, 1, 55–69 (2019)
Mating pattern of a distylous primrose in a natural population: unilateral outcrossing and asymmetric selfing between sexual morphs.
- 10) T. MAKINO, C.J. RUBIN, M. CARNEIRO, E. AXELSSON, L. ANDERSSON and M.T. WEBSTER: *Genome Biol. Evol.*, 10, 1, 276–326 (2018)
Elevated proportions of deleterious genetic variation in domestic animals and plants.
- 11) S. SUZUKI, K. SUGAI, K. UCHIYAMA, S. KATOH, H. KATO, S. NARITA and Y. ISAGI: *J. Forest Res.*, 23, 6, 393–397 (2018)
Development of microsatellite markers for *Gallicarpa subpubescens* (Lamiaceae), an endemic species of the Bonin Islands.

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 井鷲裕司: 第66回日本生態学会大会 (2019)
「分布フロントに成育する国内希少野生動植物種の保全価値評価」
- 2) 牧野能士: 日本生態学会第66回全国大会 (2019)
「絶滅危惧植物ゲノムの脆弱性評価」
- 3) Y. ISAGI, S. KANEKO, S. NARITA, A. NARITA, H. ANDO and H. KATO: International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity in East Asia and Conservation of Endangered Plants (Zhejiang, China) (2018)
“Conservation genetics/genomics on remote oceanic island ecosystems with information from NGS.”
- 4) 芝林真友、栗田和紀、横田昌嗣、阿部篤志、赤井賢成、國府方吾郎、長澤淳一、志内利明、市河三英、橋本

- 季正、遊川知久、阪口翔太、寺峰孜、井鷺裕司：日本植物分類学会第17回大会（2018）
「海外に多個体が生育する国内希少野生動植物種の保全ゲノミクス」
- 5) Y. SUYAMA, A. MATSUO and S. HIROTA: The 2nd International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity and Conservation of Endangered Plants in East Asia (2018)
“MIG-seq and multiplexed DNA barcoding: efficient tool for phylogeography and conservation genetics.”
- 6) Y. ISAGI, S. KANEKO, A. NARITA, S. SUZUKI, H. ANDO and H. KATO: The 48th Annual Meeting for the Korean Society of Plant Taxonomists, International Symposium “Island Plants – Evolution and Conservation”, Suwon, Korea (2017)
“Conservation genetics with information from NGS in the Bonin Islands, a UNESCO World Heritage site.”
(招待講演)
- 7) 井鷺裕司、京極大助、田畑諒一、横田昌嗣、阿部篤志：植物分類学会第16回大会（2017）
「網羅的遺伝解析に基づく種の保存法対象種の保全」
- 8) 成田あゆ、山浦 悠一、楠本良延、手塚あゆみ、川口利奈、永野淳、井鷺裕司：日本生態学会第64回大会（2017）
「日本の草地性植物は過去にどのような変遷をたどってきたのか？ 全国規模のゲノム解析で推定した草本 4種の集団サイズ動態」
- 9) 成田あゆ、兼子伸吾、陶山佳久、綱本良啓、小牧義輝、葉山佳代、坂入祐子、井鷺裕司：日本生態学会第64回大会（2017）
「小笠原諸島の希少植物タイヨウフウトウカズラの実生の遺伝的多様性：SSR/MIG-seqによる解析と比較」
- 10) 井鷺裕司、兼子伸吾、成田智史、木下豪太、成田あゆ、永野淳、手塚あゆみ、八杉公基、鈴木節子、加藤英寿、加藤朗子、須貝杏子：日本生態学会第64回大会（2017）
「小笠原諸島に生育する絶滅危惧固有植物の保全ゲノミクス」
- 11) Y. SUYAMA: IUFRO 2017 Genetics & Genomics of Fagaceae (2017)
“MIG-seq: an efficient PCR-based method for genome-wide genotyping.”
- 12) Y. SUYAMA, C. MITSUYUKI and Y. TSUNAMOTO: Evolution 2017 (2017)
“MIG-seq: efficient PCR-based method for genome-wide sequencing.”
- 13) Y. SUYAMA, G.M. MORI, C. MITSUYUKI and Y. TSUNAMOTO: XIX International Botanical Congress (2017)
“MIG-seq: efficient PCR-based method for genome-wide sequencing using NGS.”
- 14) Y. SUYAMA, C. MITSUYUKI, M. ITO and T. YAHARA: 7th International Barcode of Life Conference (2017)
“Genome-wide DNA barcoding: new concept of species identification tool using next-generation sequencing.”
- 15) 浜端朋子、牧野能士：日本生態学会第64回全国大会（2017）
「絶滅危惧植物における遺伝的多様性の低下と有害変異の蓄積」
- 16) 津田吉晃：第128回日本森林学会大会（2017）
「保全遺伝学から保全ゲノミクスへ：変わること、変わらないこと」
- 17) 津田吉晃：日本地理学会2017年春季学術大会（2017）
「最終氷期における気候変動と山岳生物の集団動態の歴史」
- 18) Y. ISAGI: JASTIP Symposium: Collaborative Bioresources and Biodiversity Studies for the ASEAN Region, Jakarta, Indonesia (2016)
“Conservation of Biodiversity in Asia using Genetic Information from NGS.”
- 19) T. SHIGA, M. YOKOGAWA, S. KANEKO and Y. ISAGI: East Asian Plant Diversity and Conservation, Tokyo, Japan (2016)
“Conservation and management of critically endangered species, *Nuphar submerse*, based on genotype data of all remnant individuals growing in the wild.”
- 20) 井鷺裕司：日本植物学会第80回大会（2016）

「NGSによる大量塩基情報解読を活用した希少植物保全」

21) 成田あゆ、山浦悠一、手塚あゆみ、永野惇、井鷲裕司: 日本植物学会第80回大会 (2016)

「草地性草本植物の有効集団サイズ動態」

22) 井鷲裕司: 第47回日本緑化工学会シンポジウム (2016)

「遺伝的地域性の保全の必要性」(招待講演)

23) Y. Tsuda: The 3rd International Workshop for Conservation Genetics of Mangroves: Toward the Conservation Genetics of Mangroves on a Global Scale. Iriomote Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan (2016)

“Genetic structure and population demography of species: Its applications to ecosystem conservation from mountains to ocean.”

7. 研究者略歴

研究代表者

井鷲 裕司

広島大学大学院理学研究科博士課程前期修了、博士(学術)、森林総合研究所主任研究官、
現在、京都大学大学院農学研究科教授

研究分担者

1) 牧野 能士

総合研究大学院大学生命科学研究科博士課程修了、博士(学術)、トリニティカレッジ研究員、
現在、東北大学大学院生命科学研究科教授

2) 津田 吉晃

東京大学大学院農学研究科博士課程修了、博士(農学)、ウプサラ大学進化生物学センター研究員、
現在、筑波大学生命環境系菅平高原実験センター准教授

3) 陶山 佳久

筑波大学大学院生命科学研究科博士課程修了、博士(農学)、筑波大学生物科学系助手、
現在、東北大学大学院農学研究科准教授

II. 成果の詳細

II-1 ゲノム情報を活用した絶滅危惧種の最適保全管理

京都大学

井鷲 裕司

平成28～30年度累計予算額：32,075千円

(うち平成28年度：10,873千円、平成29年度：10,873千円、平成30年度：10,329千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

国内希少野生動植物種など多くの希少分類群は危機的な状況にある。その一方で、遺伝子解読技術におけるブレークスルーを活用し、社会的かつ行政的に保全の必要性が高い国内希少動植物種について、ゲノム情報を活用した組織的、合理的、効果的な生物保全策を構築することで、「種の保存法」の有効実施を強力にサポートすることを目的として、国内希少野生動植物種など希少種やその近縁種の生育・保全状況の確認と遺伝解析試料の採集を行った。

採集した試料から抽出したRNAやDNAは、RNA-seqによるトランスクリプトーム解読と、RAD-seqによるゲノム情報の縮約解読を行い、その情報は、国内希少野生動植物種の脆弱性やデモグラフィ変遷を明らかにするために、サブテーマ2及び3に引き渡した。また、簡便ゲノム縮約解読であるMIG-seq法の改良と解析を行うサブテーマ4に解析用のDNAサンプルの提供を行った。

本研究が解析対象とする国内希少野生動植物種は、採集や核酸抽出に不確実性が生じうるために、本来の目標以上に多くの分類群において試料採集と大量塩基配列情報の解読を行った。その結果、本研究では常に目標を大きく上回る11科30種の維管束植物について解析を行うことができた。目標を大きく上回る多様な分類群について試料採集と解析ができたこと、そしてプロジェクト実施期間中における解析技術の発展などによって、他のサブテーマの報告書にも記述されているように、想定していた以上に多面的で有益な解析が可能となった。

また、多数の遺伝解析試料を必要とする従来の集団遺伝学的解析では保全状況を適切に評価できなかったような少数の試料を対象に、ゲノム情報から個体の保全状況や保全価値の評価する手法を考察した。国内には極めて少数の個体のみが生育するにすぎないが、海外には相当数の野生個体が生育している分類群を対象に、ゲノムレベルの解析を行い、国内外に同一種が生育する国内希少野生動植物種の保全状況・価値評価を行った。

最後に、各種希少植物の大量塩基配列情報を適切かつ効果的な生物保全策につなげるために、希少植物の保全的状況を各サブテーマから得られた結果を統合し、希少種の保全状況評価と新たな管理指針の構築を行った。これまで個体数が少ないという点で共通して希少種として扱われてきた種を、ゲノム情報をもとにして、いくつかのカテゴリーに分けることで、より合理的・効果的な保全策を構築することが期待される。野生生物保全をめざした法律において、保護対象種の選定と同時にゲノムレベルの遺伝解析を行い、適切な保全を図ることは世界的に見てもきわめて先進的な試みといえる。

[キーワード]

絶滅危惧種、保全ゲノミクス、生物多様性保全、ゲノム縮約解読、トランスクリプトーム解読

1. はじめに

絶滅の恐れのある野生動植物の種の保存に関する法律、いわゆる「種の保存法」は2013年6月に改正され、「生物の多様性の確保」が目的として明記されるとともに、「科学的知見の充実を図る」ことが国の責務とされた。国内希少野生動植物種は同法の施行以来20年で90種が指定されてきたにすぎなかったが、2020年までに300種を新規指定するという意欲的な目標が設定されたが、その反面、指定によって盗掘圧が上昇し絶滅に拍車がかかるという懸念や、域外保全、有害遺伝子、適応能力、遺伝子汚染、保全単位など、適切な保全のための遺伝情報が不足しているという問題がある。日本の生物多様性保全において中心的役割を担う「種の保存法」を有効に実施するためには、絶滅危惧種の保全に関して、より多くの対象種について、より厳密かつ効率的な保全管理策の構築が強く求められている。

従来、生物保全のための遺伝解析では、少数の中立遺伝子座について遺伝子型解読がなされてきたが、数十億塩基にもものぼる遺伝情報解読を数日で可能にしたDNA塩基配列解読技術のブレークスルーによって、状況は大きく変化しつつある。この状況を活用すれば、個体数が著しく減少している種の保存対象種において、これまでにないレベルの的確で効率的な保全が可能になってきた。

2. 研究開発目的

本サブテーマでは、上記の状況、すなわち、多くの分類群における危機的な保全状況に対して、遺伝子解読技術におけるブレークスルーを活用し、社会的かつ行政的に保全の必要性が高い国内希少動植物種について、ゲノム情報を活用した組織的、合理的、効果的な生物保全策を構築することで、「種の保存法」の有効実施を強力にサポートすることを目的とした。

4個のサブテーマから構成される本研究の中で、本サブテーマ1では、まず、(1)「種の保存法」で保全対象となっている国内希少野生動植物種など希少種やその近縁種からの遺伝解析試料の採集と、RNAおよびDNAの抽出を行う。RNAに関してはトランスクリプトーム解読(RNA-seq)、DNAに関してはゲノム情報の縮約解読(RAD-seq)を行うことで、大量塩基配列情報を得る。こうして得られた塩基配列情報から国内希少野生動植物種の脆弱性やデモグラフィ変遷を明らかにするために、RNA-seqから得られた情報はサブテーマ2に、RAD-seqから得られた情報はサブテーマ3に引き渡し、それぞれ異なった手法に基づくバイオインフォマティクス解析を行う。また、簡便ゲノム縮約解読であるMIG-seq法の改良と解析を行うサブテーマ4に解析用のDNAサンプルの提供を行う。

次に、(2)統合的解析として、サブテーマ2~4の解析結果をもとに国内希少野生動植物種など希少絶滅危惧種のより合理的、効果的な保全策を構築する。

野生生物保全をめざした法律において、保護対象種の選定と同時にゲノムレベルの遺伝解析を行い、適切な保全を図ることは世界的に見てもきわめて先進的な試みであり、ゲノム解読時代における新たな生物保全策のスタンダードの構築を目的とする。

3. 研究開発方法

(1) 解析対象分類群と生物保全状況の調査

本研究では、当初目的として、国内希少野生動植物種3種について解析することを目的・目標とした。しかしながら、本研究が解析対象とする国内希少野生動植物種は、実際に生育地を訪れるまでは生育状況が不明な場合が多い。また、核酸の抽出においても、大量塩基配列情報を解読できる十分な量と質のRNAやDNAが得られるとは限らない。これらの点を考慮して、本研究では余裕を持った数の分類群(表(1)-1)について、試料採集と大量塩基配列情報の解読を行った。

(2) ゲノム情報の解読

生育地や域外保全集団から得た植物試料について、RNA-seq (RNA sequencing)によるトランスクリプトーム解析と、RAD-seq (Restriction Site Associated DNA sequence)^{1, 2)}による縮約解読を行った。

表(1)-1 解析した植物

対象植物	分布	レッドリスト*	RNA-seq	RAD-seq
キク科				
コヘラナレン (<i>Crepidiastrum grandicollum</i>)	小笠原	IA	○	○
ユズリハワダン (<i>Crepidiastrum ameristophyllum</i>)	小笠原	IB	○	
ホソバワダン (<i>Crepidiastrum lanceolatum</i> var. <i>lanceolatum</i>)	本州、琉球、朝鮮、中国		○	○
シソ科				
シマカコソウ (<i>Ajuga boninsimae</i>)	小笠原	IB	○	○
ヒメキランソウ (<i>Ajuga pygmaea</i>)	九州、琉球、台湾、中国		○	○
ツルカコソウ (<i>Ajuga shikotanensis</i>)	本州	II	○	○
イワタバコ科				
ナガミカズラ (<i>Aeschynanthus acuminatus</i>)	琉球、台湾、中国、東南～南アジア	IA	○	○
ツツジ科				
ヤドリコケモモ (<i>Vaccinium amamanum</i>)	琉球、台湾	IA	○	○
ムニンツツジ (<i>Rhododendron boninense</i>)	小笠原	IA	○	
サキシマツツジ (<i>Rhododendron amanoi</i>)	琉球		○	
サクランソウ科				
カッコソウ (<i>Primula kisoana</i> var. <i>kisoana</i>)	本州	IA	○	○
シコクカッコソウ (<i>Primula kisoana</i> var. <i>shikokiana</i>)	四国	II	○	○
オオサクランソウ (<i>Primula jesoana</i> var. <i>jesoana</i>)	北海道、本州		○	○
ノボタン科				
ムニンノボタン (<i>Melastoma tetramerum</i> var. <i>tetramerum</i>)	小笠原	IA	○	
ノボタン (<i>Melastoma candidum</i> var. <i>candidum</i>)	小笠原、琉球、台湾、中国、東南アジア		○	
トウダイグサ科				
ボロジノニシキソウ (<i>Euphorbia sparrmannii</i>)	琉球、オセアニア	II	○	○
ハマタイゲキ (<i>Euphorbia atoto</i>)	琉球、台湾、中国、東南アジア～オセアニア		○	○
スミレ科				
ヤエヤマスミレ (<i>Viora tashiroi</i> var. <i>tashiroi</i>)	琉球		○	
イシガキスミレ (<i>Viora tashiroi</i> var. <i>tairae</i>)	琉球	IA	○	
オキナワスミレ (<i>Viola utchinensis</i>)	琉球	IB	○	
ラン科				
ホシツルラン (<i>Calanthe hoshii</i>)	小笠原	IA	○	
ツルラン (<i>Calanthe triplicata</i>)	九州、琉球、台湾、中国、熱帯アジア～オセアニア	II	○	
サガリラン (<i>Diploprora championi</i>)	琉球、台湾、中国、東南・南アジア	IA		○
アツモリソウ (<i>Cypripedium macranthos</i> var. <i>speciosum</i>)	北海道、本州、台湾、朝鮮～ヨーロッパ東部	II	○	
レブンアツモリソウ (<i>Cypripedium macranthos</i> var. <i>rebunense</i>)	礼文島	IB	○	
オキナワセッコク (<i>Dendrobium okinawense</i>)	琉球、台湾	IB	○	○
セッコク (<i>Dendrobium moniliforme</i>)	本州、琉球、台湾、朝鮮～ヒマラヤ		○	○
ヤブミョウガラン (<i>Goodyera fumata</i>)	琉球、台湾、中国、南・東南アジア	IA	○	
ナンバンキンギンソウ (<i>Goodyera grandis</i>)	琉球、台湾、ヒマラヤ	II	○	
コショウ科				
タイヨウフウトウカズラ (<i>Piper postelsianum</i>)	小笠原	IA		

網掛け：国内希少野生動物植物種

*環境省レッドリスト2019における絶滅危惧種のカテゴリー。IA, IB, IIはそれぞれ、絶滅危惧IA類(CR)、絶滅危惧IB類(EN)、絶滅危惧II類を示す。

トランスクリプトーム解析に用いたRNAは、生育地において採集した植物試料の組織をRNA保存液(RNA later, QIAGEN)に入れて研究室に持ち帰り、抽出を行なった。RNA laterによるRNAの保存が不良な種もあり、そのようなものに関しては生個体を持ち帰り、鉢植えで状態を良好に保った個体から、あるいは、域外保全されている栽培個体からRNAの抽出を行なった。RNAの抽出は、Plant RNA Isolation Mini キット(Agilent社)を使用した。抽出したRNAは濃度、分解度、分子サイズ分布を測定し、十分な

クオリティ(濃度19-737 ng/μl、全量0.8 μg以上、RIN値3.5以上)を持つサンプルについて次世代シーケンサー(HiSeq 2500、HiSeq 4000、NovaSeq 6000、HiSeq X、全てIllumina社)によるペアエンドの塩基配列解読を行った。

RAD-seqによるゲノム情報の縮約解読に関しては、国内希少野生動植物種については可能な限り網羅的に、比較対象となる普通種からは集団レベルの遺伝的特性が明らかになるように、それぞれ12-72個体の試料からCTAB法によりDNAを葉組織から抽出した。適切に濃度調整したDNA(13-16 ng/μl)を制限酵素(EcoRIとBglII)で消化処理することで、多数のDNA断片を含むライブラリーを作成し、これを次世代シーケンサー(HiSeq 2500, Illumina)によってペアエンド解読し、各DNA断片について150 bps X 2の塩基配列解読を行った。一部の対象植物については、抽出したDNAをサブテーマ4におけるMIG-seq解析にも使用した。

(3) 大量塩基配列情報を活用した希少種の保全状況評価と新たな管理指針の構築

1) 少数サンプルを対象とした希少種の独自性および保全状況の解析

従来の保全遺伝学的手法では、もっぱら集団遺伝学的手法に基づき、1集団から比較的多数(20~30個体)の解析試料を採集し、10遺伝子座程度の塩基配列情報を解読し、集団内の遺伝的多様性や集団間の遺伝的分化などが解析されてきた。つまり従来の手法は、「多数のサンプルにおける少数の遺伝子座」を対象に遺伝解析を行うことで、生物保全上の情報を得てきたのであるが、本プロジェクトが解析対象とする国内希少野生動植物等の希少種では、保全上の理由から、あるいは、そもそも野生個体数が極めて少ないといった理由から、集団遺伝学的手法で必要とされる解析試料数が確保できないことも多い。

このような状況に対して、従来の集団遺伝学的手法では保全状況を適切に評価できなかったような少数の試料を対象に、ゲノム情報から個体の保全状況や保全価値を評価する手法を考察した。国内には極めて少数の個体のみが生育するにすぎないが、海外には相当数の野生個体が生育している種としてサガリランとナガミカズラを対象にゲノム情報から個体レベルの解析を行った。

RAD-seqから得られた塩基配列情報はstacks³⁾で処理し、SNPs(1塩基多型)を検出した。SNPs情報をもとに、各サンプルの種内系統関係は、RAxML v8⁴⁾を使用して最尤法によって作成した。塩基置換モデルはGTR+Gを用いた。STRUCTURE解析⁵⁾によって種内の遺伝構造を解析し、種内の保全単位の検出や生育地間の遺伝的分化を明らかにした。個体レベルの遺伝的多様性は、ゲノム内に存在するSNPs頻度で評価した。

2) 大量塩基配列情報を活用した希少種の新たな管理指針

各種希少植物の大量塩基配列情報を適切かつ効果的な生物保全策につなげるために、希少植物の保全的状況を各サブテーマから得られた結果を統合し、希少種の保全状況評価と新たな管理指針の構築を行った。

4. 結果及び考察

(1) 解析対象分類群と生物保全状況の調査

方法の項でも記述したように、本研究が解析対象とする国内希少野生動植物種は、採集や核酸抽出に不確実性が生じうるために、本来の目標以上に多くの分類群において試料採集と大量塩基配列情報の解読を行った。その結果、本研究では常に目標を大きく上回る11科30種の維管束植物について解析を行うことができた(表(1)-1)。これらは、国内希少野生動植物種(15種)、絶滅危惧植物(7種)、およびそれらの近縁普通種(8種)を含むものである。対象とした国内希少野生動植物種と絶滅危惧植物は、日本国内

(本州や小笠原諸島、琉球列島など)のみに生育する固有植物や国内に加えて海外にも生育する広域分布種を中心に選定した。

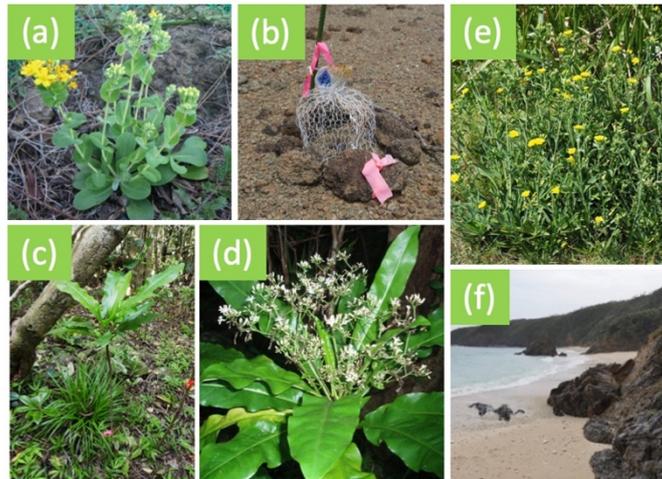
このように目標を大きく上回る多様な分類群について試料採集と解析ができたこと、そしてプロジェクト実施期間中における解析技術の発展などによって、他のサブテーマの報告書にも記述されているよ

うに、想定していた以上に多面的で有益な解析が可能となった。

試料採集と遺伝解析を行った分類群の状況は次に記述する通りである。いずれも、生物多様性保全上、注目に値するものであり、本研究で明らかになった情報は、各種団体が行っている保全活動にもすでに活用されており、今後も有用に活用されることが期待される。

1) キク科アゼトウナ属

キク科アゼトウナ属では、希少種として小笠原に生育するコヘラナレン(*Crepidiastrum grandicollum*)とユズリハワダン(*C. ameristophyllum*)を、近縁種としてホソバワダン(*C. lanceolatum* var. *lanceolatum*)を解析対象とした。小笠原諸島の固有種コヘラナレン(図(1)-1a)は、平成20年に国内希少動植物種に指定され、平成21年から保護増殖事業対象種として手厚い保護下にあるが(図(1)-1b)、増殖成績は良好ではなく、現在、小笠原諸島に数十個体のみが生育している。ユズリハワダン(図(1)-1c, d)も小笠原諸島の固有種であり、小笠原諸島内でコヘラナレン等とともに種分化したものであり、環境省のレッドリストでは絶滅危惧ⅠBに指定されている。本研究の解析結果は、毎年開催されている小笠原希少植物保護増殖事業検討会において、遺伝的特性の見地からコヘラナレンの保全状況の評価や保全策への提言を行っており、環境省の保護増殖事業にも活かされている。ホソバワダン(図(1)-1e, f)は本州、琉球、朝鮮、中国の海岸に広く生育する普通種である。本研究では沖縄本島と奄美大島に生育する個体を試料とした。



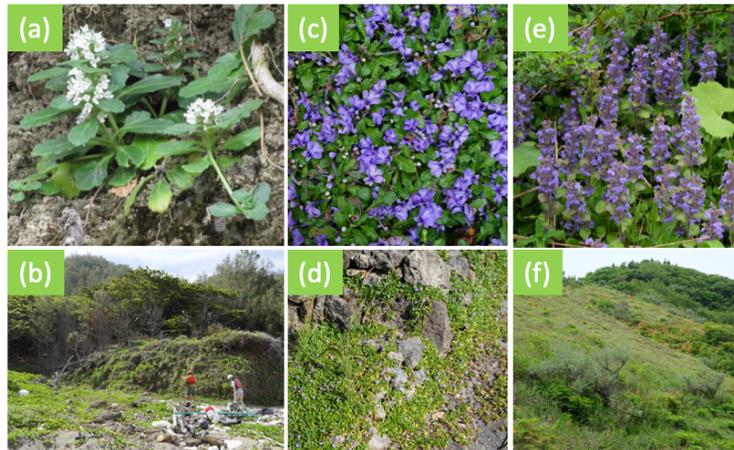
図(1)-1 アゼトウナ属の解析対象種

(a)小笠原固有植物の国内希少動植物種コヘラナレン。(b)コヘラナレンは数十個体が野生生育するのみであり、保護増殖事業が試みられており、現地では厳重に保全管理されている。(c, d)小笠原固有絶滅危惧種ユズリハワダン。ユズリハワダンは小笠原諸島の林内に生育する。小笠原での種分化と草本から木本への進化が進行している興味深い分類群である。(e)同属普通種のホソバワダン。(f) 本州以南から琉球列島の海岸に広く分布するホソバワダンの生育地。

2) シソ科キランソウ属

シソ科キランソウ属では、希少種として小笠原諸島固有種のシマカコソウ(*Ajuga boninsimae*)を、近縁種として、ヒメキランソウ(*A. pygmaea*)とツルカコソウ(*A. shikotanensis*)を解析対象とした。シマカコソウ(図(1)-2a, b)は、平成20年に国内希少動植物種に指定され、平成21年から保護増殖事業対象種として手厚い保護下にある。現在、小笠原諸島の海岸岩場に100個体未満のみが生育している。本研究の解析結果は、毎年開催されている小笠原希少植物保護増殖事業検討会において遺伝的特性の見地から、シマカコソウの保全状況の評価や保全策への提言を行っており、環境省の保護増殖事業にも活かされている。ヒメキランソウは、本州、琉球、台湾、中国の海岸に広く生育する普通種である(図(1)-2c, d)。本研究では沖縄本島に生育する個体を試料として用いた。ツルカコソウは南千島と本州に生育するが個体数はやや少なく、環境省レッドリストでは絶滅危惧Ⅱ類に指定されている(図(1)-2e)。本研究では、佐

渡島に生育する個体を試料として用いた(図(1)-2f)。



図(1)-2 キランソウ属の解析対象種

(a)小笠原固有植物の国内希少動植物種シマカコソウ。(b)シマカコソウの生育地の一つである兄島の海岸。本種は数十個体のみが小笠原の海岸斜面に野生生育する。(c)同属普通種のヒメキランソウ。(d)沖縄本島におけるヒメキランソウ生育地。(e)同属普通種のツルカコソウ。個体数はやや少ないが、南千島～本州の山地に広く分布する。(f)佐渡島のツルカコソウ生育地。

3) イワタバコ科ナガミカズラ属

ナガミカズラ属は世界に175~185種が知られるが、日本にはナガミカズラ(*Aeschynanthus acuminatus*)1種のみが西表島の1ヶ所に生育している(図(1)-3)。環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類にリストされているほか、国内希少野生動植物種にも指定されている。本種は西表島で1974年に初めて自生が確認され、その後、しばらく不明であったが、2004年にほぼ同じ場所で再確認された(図(1)-3c)。本種に関しては国内に近縁普通種がないため、西表島に生育する個体のほか、国立科学博物館筑波実験植物園で栽培保管されている、台湾と香港産の個体について比較解析を行った。



図(1)-3 ナガミカズラ属の解析対象種

(a)西表島に生育する国内希少野生動植物種ナガミカズラ。(b)ナガミカズラの花。海外の近縁種は送粉者の鳥類を惹きつける赤色の花弁を持つものが多いが、本種は地味な緑色である。本種の送粉者は不明である。(c)2004年に発見された西表島のナガミカズラ生育地。写真の場所が日本における唯一の生育地である。本プロジェクト開始年に撮影したものであるが、現在は周辺の植生が繁茂し、ナガミカズラが圧迫されている。植生管理や生育域外保全が必要である。

4) ツツジ科スノキ属

スノキ属植物は世界に450~500種が知られている。本研究では、国内では奄美大島のみにごく少数が生育するヤドリコケモモ(オオバコケモモ)(*Vaccinium amamanum*)を解析対象とした(図(1)-4)。本種は環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類にランクされており、また、国内希少野生動植物種でもある。

国内に生育するスノキ属植物としては唯一樹木に着生して生育している。国内では分布は極めて限定されており、個体数も少ないが、台湾では普通種として相当数が生育している。本研究では日本国内の個体の系統的位置付けや保全状況を評価するために、日本における野生個体と域外保全個体のほぼ全てと、台湾の野生個体を対象にゲノムレベルの解析を行った。



図(1)-4 スノキ属の解析対象種

(a)奄美大島に生育する国内希少野生動植物種ヤドリコケモモの結実個体。(b)以前より知られていた数少ない野生個体の一つ。樹幹に着生している。(c) 2018年の大型台風で林冠が攪乱され見通しが良くなることで、新たに発見された大型の個体。樹幹に着生し、1メートルほど垂れ下がっている。(d)奄美大島でヤドリコケモモが生育する森林。

5) ツツジ科ツツジ属

ツツジ属は北半球を中心に約1000種が知られる大きな分類群である。日本には約60種が分布している。本研究では、希少種としてムニンツツジ(*Rhododendron boninense*)を、近縁普通種として、サキシマツツジ(*R. amanoi*)を解析対象とした。ムニンツツジは、小笠原父島の躑躅山に本来の野生個体1個体が生育しているが、域外保全によって増殖された個体(図(1)-5a)も植え戻されている。ムニンツツジは多くの絶滅危惧種の中でも、最も野生絶滅に近い危機的状況にあるものである。環境省レッドリストにおいて絶滅危惧IA類、国内希少野生動植物種にリストされており、保護増殖事業も行われている。本研究の解析結果は、毎年開催されている小笠原希少植物保護増殖事業検討会において遺伝的特性の見地から保全状況の評価や保全策への提言を行っており、環境省の保護増殖事業にも活かされている。ムニンツツジに最も近縁と考えられるサキシマツツジは石垣島と西表島に分布しており、近年盗掘などによって個体数は減少傾向にあるものの、未だ相当数が野生生育している普通種である(図(1)-5b)。本研究では西表に生育する個体を解析に用いた。



図(1)-5 ツツジ属の解析対象種

(a)東京大学小石川植物園で域外保全されている国内希少野生動植物種ムニンツツジ。最後に残った野生1個体に由来するものである。(b)西表島の溪流沿いに生育する近縁種サキシマツツジ。

6) サクラソウ科サクラソウ属

サクラソウ属は北半球の温帯～寒帯を中心に400~500種が知られている。日本には約15種が分布している。日本に生育するサクラソウ属植物の多くは個体数が減少しており、絶滅危惧植物となっている。本研究では、分布が群馬県鳴神山のみに限定されており、国内希少野生動植物種に指定されているカッコソウ(*Primula kisoana* var. *kisoana*)を希少種の解析対象種とした(図(1)-6a)。比較解析対象としては、シコクカッコソウ(*P. kisoana* var. *shikokiana*)とオオサクラソウ(*P. jesoana* var. *jesoana*)を選定した。カッコソウと変種関係にあるシコクカッコソウは、環境省のレッドリストでは絶滅危惧II類であるが、四国の各地に相当数の個体が生育している。オオサクラソウは北海道と本州に分布しており、レッドリストには掲載されていない。日本のサクラソウ属植物の中では例外的に比較的良好な保全状況にある分類群である。本研究では、シコクカッコソウは愛媛県(図(1)-6e)、オオサクラソウは新潟県佐渡島(図(1)-6f)に生育する個体を分析対象とした。カッコソウの唯一の生育地である群馬県桐生市では、桐生市役所、桐生自然観察の森、地元金融機関、市民、などによるカッコソウ協議会が組織され、保全活動を継続している(図(1)-6b, c)。本研究の解析結果は、毎年開催されている協議会において、遺伝的特性の見地から保全状況の評価や保全策を提案している。また、国内近縁種であるシコクカッコソウとの遺伝子汚染個体の識別においても、本プロジェクトで開発された分析手法が活用されている。

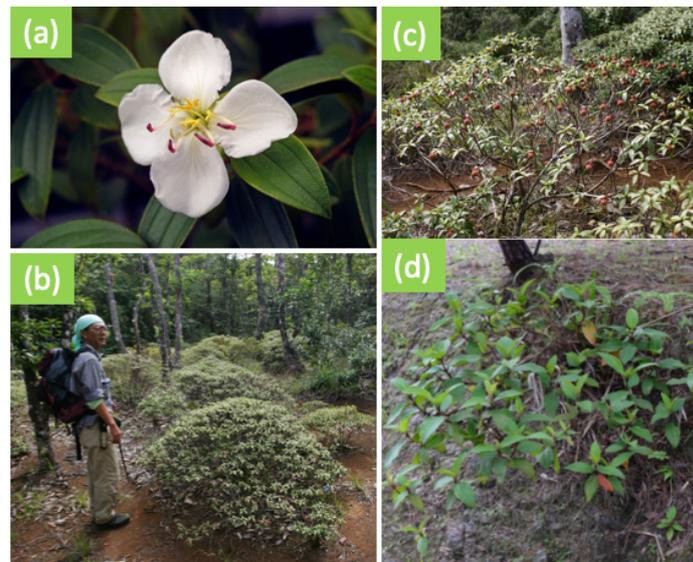


図(1)-6 サクラソウ属の解析対象種

(a)唯一の生育地である群馬県鳴神山で開花する国内希少野生動植物種カッコソウ。(b)鳴神山麓の桐生市自然観察の森で域外保全されているカッコソウ。(c)桐生市自然観察の森で行われているカッコソウ協議会による市民学習会。(d)近縁種シコクカッコソウの保全地。(e)愛媛県に生育する近縁種シコクカッコソウ。(f)佐渡島に生育する近縁種オオサクラソウ。

7) ノボタン科ノボタン属

ノボタン属は東南アジアに約20種が知られているが、日本には3種が分布する。本研究ではムニンノボタン(*Melastoma tetramerum* var. *tetramerum*)とノボタン(*M. candidum* var. *candidum*)を解析対象種とした。ムニンノボタンは、小笠原父島にごく少数の個体が生育するのみであり、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類にリストされており、また、国内希少野生動植物種として指定されるとともに保護増殖事業も行われている(図(1)-7a)。東京大学小石川植物園では人工増殖した個体を自生地に植え戻している(図(1)-7b, c)。本研究では小石川植物園で域外保全されている個体を解析に用いた。また、本研究の解析結果は、毎年開催されている小笠原希少植物保護増殖事業検討会において遺伝的特性の見地から保全状況の評価や保全策への提言を行っており、環境省の保護増殖事業にも活かされている。ノボタンは琉球、台湾、中国、東南アジアに広く分布する普通種である。本研究では沖縄本島に生育していた個体を解析に用いた(図(1)-7d)。

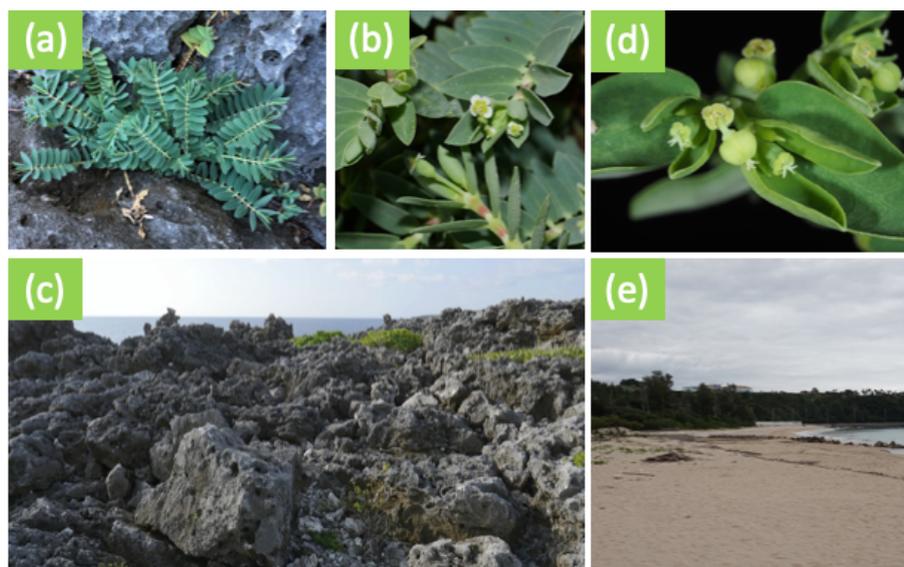


図(1)-7 ノボタン属の解析対象種

(a)小笠原父島にのみ生育する国内希少野生動植物種ムニンノボタン。(b, c)父島のムニンノボタン生育地。東京大学小石川植物園で増殖し植え戻された個体が生育している。(d)沖縄本島に生育する近縁普通種のノボタン。

8) トウダイグサ科トウダイグサ属

トウダイグサ属は全世界に約2000種が知られる大きな分類群である。本属は日本に約30種が生育している。本研究では、希少種としてボロジノニシキソウ(*Euphorbia sparrmannii*)を、近縁普通種としてハマタイゲキ(*E. atoto*)を解析対象とした。ボロジノニシキソウ(図(1)-8a, b)はポリネシア、ミクロネシアに分布するが、日本国内では南北大東島の隆起石灰岩の磯のみに生育する(図(1)-8c)が、生育地、個体数ともに極めて少ない。ハマタイゲキは、太平洋諸島、オーストラリア、東南アジア、中国など広く分布し、日本国内では琉球諸島に分布する(図(1)-8d, e)。名前の通り浜の砂地に深く根を下ろし生育する。本研究では、ボロジノニシキソウは南大東島に生育するものを、ハマタイゲキは沖縄本島に生育するものを解析に用いた。

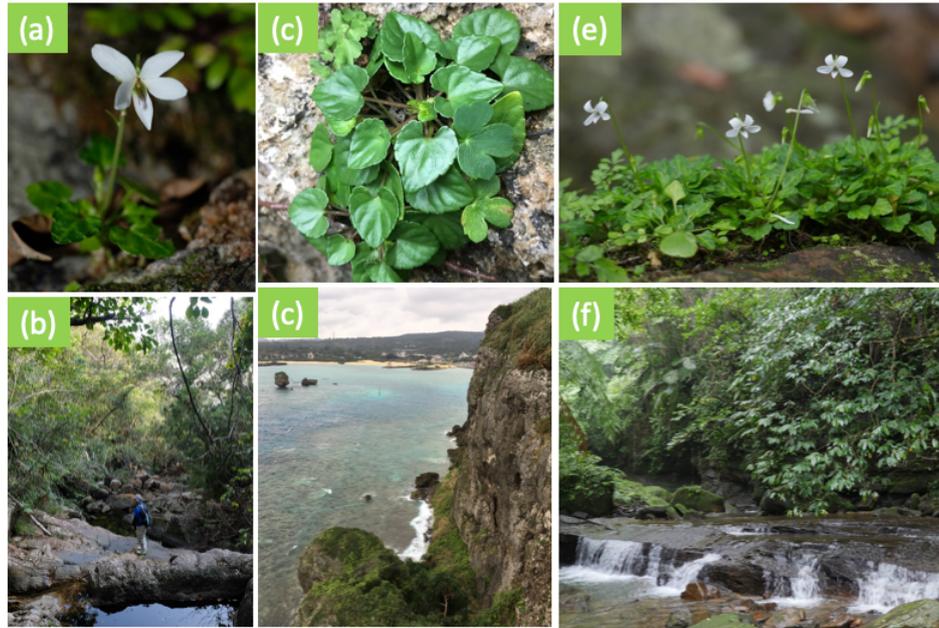


図(1)-8 トウダイグサ属の解析対象種

(a)日本国内では南北大東島にのみ生育するボロジノニシキソウ。(b)ボロジノニシキソウの開花個体。(c)南大東島のボロジノニシキソウの生育地。(d)近縁普通種のハマタイゲキ。(e)沖縄本島のハマタイゲキの生育地。

9) スミレ科スミレ属

スミレ属は世界の御大を中心に約600種が知られている。日本には約50種が分布している。本研究では、琉球列島に生育する3種、オキナワスミレ(*Viola utchinensis*)、イシガキスミレ(*V. tashiroi* var. *tairae*)、ヤエヤマスミレ(*V. tashiroi* var. *tashiroi*)を解析対象とした。これらの分類群のうち、イシガキスミレは石垣島の1河川ぞいにのみ知られるもので、数百メートルの範囲にわたって生育しており(図(1)-9a, b)、環境省レッドリストでは絶滅危惧IB類にランクされている。また、オキナワスミレは、沖縄本島万座毛近辺の切り立った岩場に数百メートルの範囲にのみ生育し、環境省レッドリストでは絶滅危惧IB類にランクされている(図(1)-9c, d)。イシガキスミレと変種関係にあるヤエヤマスミレは琉球列島に相当数が生育している普通種であり、本研究では、西表島に生育する個体を解析対象とした(図(1)-9e, f)。

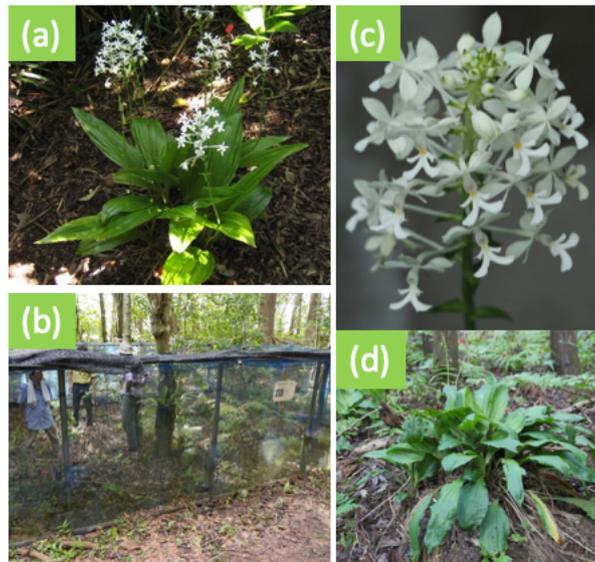


図(1)-9 スミレ属の解析対象種

(a)石垣島の限られた河川ぞいに生育するイシガキスミレ。(b)イシガキスミレの生育地。川沿いの岩間に生育する。(c)沖縄本島万座毛近辺の磯に生育するオキナワスミレ。(d)オキナワスミレの生育地。(e)普通種のヤエヤマスミレ。(f)ヤエヤマスミレの生育地。本種は西表島の溪流沿いの岩上に生育する。

10) ラン科エビネ属

ラン科エビネ属では希少種として、小笠原諸島固有のホシツルラン(*Calanthe hoshii*)を、近縁種としてツルラン(*C. triplicata*)を解析対象とした(図(1)-10a)。ホシツルランは、平成16年に国内希少動植物種に指定され、同年より保護増殖事業対象種として保護されている(図(1)-10b)。現在、小笠原母島の森林に数十個体のみが生育する多年生草本である。野生状態における本種の生育は近縁種であるツルランと比較すると良好ではない。少数個体が開花し、少数の芽生えも観察されているが、繁殖個体まで成長する次世代の個体はほとんど見出されていない。本研究では東京大学小石川植物園に域外保全されている個体を解析試料として用いた。小笠原希少植物保護増殖事業検討会では、本研究の解析結果に基づいて遺伝的特性の見地からホシツルラン保全状況の評価や保全策への提言を行っており、環境省の保護増殖事業にも活用されている。ツルラン(図(1)-10c, d)は、九州以南、琉球、台湾からオーストラリアまで広く分布する。森林内に生育するが、盗掘によって個体数が減少しつつあり、環境省のレッドリストでは絶滅危惧II類となっている。本研究では、奄美大島に生育する個体を解析試料として用いた。

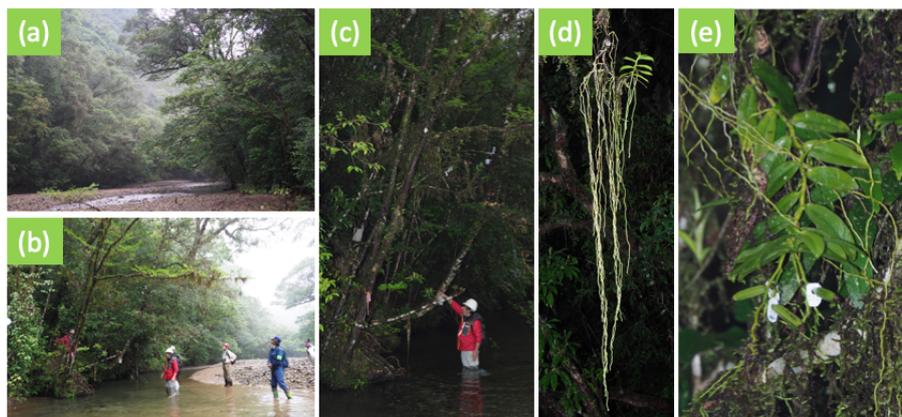


図(1)-10 エビネ属の解析対象種

(a)小笠原固有植物の国内希少動植物種ホシツルラン。(b)希少野生植物保護増殖事業対象種として小笠原母島の柵内で保護されているホシツルラン。(c)同属普通種のツルラン。九州、沖縄に広く分布する。開花結実後生じた幼個体の生育も良好である。(d)琉球諸島の湿った森林内で旺盛に生育するツルラン。

11) ラン科サガリラン属

サガリラン(*Diploprora championi*)は、台湾、中国、東南・南アジアに広く分布する着生ランであるが、日本では奄美大島のみで生育が知られている(図(1)-11)。サガリランは、今のところ、国内希少野生動植物種には指定されていないが、野生個体数は極めて少なく、一つの河川沿いの樹木に数十個体が確認されているにすぎない。また、盗掘などによって個体数は減少を続けている。本研究では、海外では多数が生育しているのに対して、国内では極めて生育個体数が少なく、希少種として扱われているサガリランの遺伝的状況を評価するために、国内外の個体について、ゲノム解析を行った。本プロジェクトの解析結果は、平成27年度に環境省と日本植物園協会の間で締結された「生物多様性保全の推進に関する基本協定書」に基づいて、両者間で野生復帰実施計画検討を進める種について調整し、設置されたサガリラン野生復帰検討会において報告され、実施計画の策定に活用された。



図(1)-11 サガリラン

(a)~(c) 奄美大島のサガリラン生育地。(d) 長い気根を伸ばした個体。この後、この個体は盗掘された。盗掘防止のために、本研究で得られた個体レベルのDNA barcodingによる管理など今後の対応が必要である。(e)白ラベルは人工交配で結実した果実。美ら島財団により、増殖が図られている。

12) ラン科アツモリソウ属

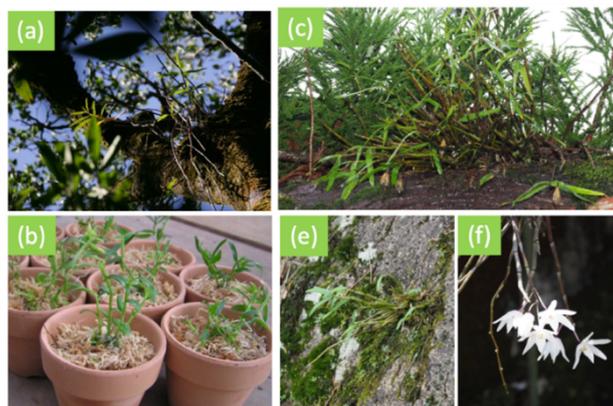
アツモリソウ属植物は北半球の温帯に約50~60種が生育しているが、その多くが絶滅危惧種である。日本に生育するものもすべてが絶滅危惧にあり、チョウセンキバナアツモリソウ(*Cypripedium guttatum*)、ホテИАツモリソウ(*C. marcanthos* var. *marcanthos*)、レブンアツモリソウ(*C. marcanthos* var. *rebunense*)、アツモリソウ(*C. marcanthos* var. *speciosum*)は国内希少野生動植物種に指定されている。本研究では北海道大学植物園に域外保全されているアツモリソウとレブンアツモリソウを解析対象とした(図(1)-12)。アツモリソウは北海道、本州、台湾、朝鮮~ヨーロッパ東部に広く分布する。日本国内では盗掘により近年著しく個体数が減少している。レブンアツモリソウはアツモリソウの変種であり、礼文島にのみ生育している。盗掘によって減少したものの、個体数は比較的安定している。礼文島において分化し、長期間小集団で維持されてきた集団と考えられる。



図(1)-12 北大植物園で域外保全されているアツモリソウ属植物

13) ラン科セッコク属

セッコク属植物は世界に約1100種が知られる大きな分類群であるが、日本には、セッコク(*Dendrobium moniliforme*)、オキナワセッコク(*D. okinawense*)、キバナノセッコク(*D. tosaense*)が知られている。いずれも盗掘や生育環境の変化によって減少しているが、オキナワセッコクとキバナノセッコクは特に深刻であり、いずれも、絶滅危惧 I B類にランクされている。また、オキナワセッコク(図(1)-13a)は特定国内希少野生動植物種であり、「種の保存法」で保護対象となるとともに、人工的に増殖された個体が指定業者によって売買されている(図(1)-13b)。本研究では希少種としてオキナワセッコクを、近縁普通種として、近年個体数は減少しているもののレッドリストには未掲載のセッコク(図(1)-13c, d, e)を解析対象とした。オキナワセッコクは沖縄本島やんばる地方の森林に生育するものを、セッコクは高知県と広島県に生育するものを解析対象とした。

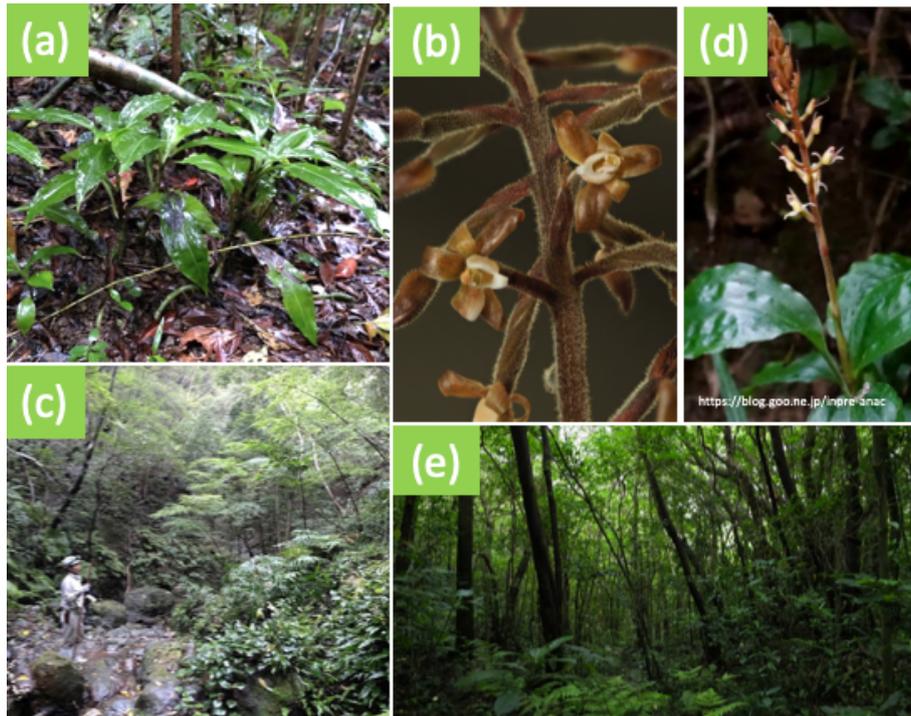


図(1)-13 セッコク属の解析対象種

(a)沖縄本島やんばる地方の山林に生育する国内希少野生動植物種オキナワセッコク。大木の幹に着生する。近縁種のセッコクよりもバルブが長く垂れ下がる。(b)オキナワセッコクは特定国内希少野生動植物種であるため、人工増殖された個体が認可を得た業者によって販売されている。栽培条件下における繁殖・生育は良好である。(c)高知県のスギ樹上に着生する近縁種のセッコク。(d)広島県の岩上に着生する近縁種のセッコク。(e)セッコクの開花個体。

14) ラン科シュスラン属

シュスラン属植物は世界に約100種が知られているが、日本には10種程度が分布している。本研究では、希少種としてヤブミョウガラン(*Goodyera fumata*)を、近縁普通種として、同属で生育地および形態が類似しているナンバンキンギンソウ(*G. grandis*)を解析対象とした。ヤブミョウガラン(図(1)-14a, b, c)は、琉球、台湾、中国、南・東南アジアに分布しているが、国内では沖縄本島北部のごく限られた地域に100個体程度が生育しているに過ぎない。環境省レッドリストでは絶滅危惧ⅠA類にリストされ、また、国内希少野生動植物種にも指定されている。本研究では、沖縄本島に生育する個体を解析対象試料とした。ナンバンキンギンソウ(図(1)-14d, e)は琉球、台湾、ヒマラヤに分布している。国内に生育する個体数は少なくないが、環境省レッドリストでは絶滅危惧Ⅱ類にリストされている。本研究では、沖縄本島のヤブミョウガランの生育地内で採集したナンバンキンギンソウを解析対象試料とした。



図(1)-14 シュスラン属の解析対象種

(a)沖縄本島の石灰岩地域の湿った森林に生育するヤブミョウガラン。(b)ヤブミョウガランの生育地。(c)ヤブミョウガランの花。(d)近縁普通種ナンバンキンギンソウの花。(e)沖縄本島北部のナンバンキンギンソウの生育地。

15) コシヨウ科コシヨウ属

コシヨウ属は世界の熱帯を中心に1000種を超える種が知られているが、日本にはフウトウカズラ(*Piper kadsura*)とタイヨウフウトウカズラ(*P. postelsianum*)の2種が野生種として分布している。フウトウカズラは本州関東南部から琉球、朝鮮半島南部、台湾、中国南部に生育する普通種であるが、タイヨウフウトウカズラは小笠原母島にごく少数のみが生育する希少種である(図(1)-15)。環境省レッドリストでは絶滅危惧ⅠA類であり、また、国内希少野生動植物種にも指定され、環境省によって保護増殖事業が行われている。本研究では、小笠原にわずか残された個体の空間的遺伝構造をMIG-seqで明らかにするために、小笠原母島の個体からDNAを抽出し、サブテーマ4に供与した。本研究の解析結果は、毎年開催されている小笠原希少植物保護増殖事業検討会において遺伝的特性の見地から保全状況の評価や保全策への提言を行っており、環境省の保護増殖事業にも活かされている。



図(1)-15 コシヨウ属の解析対象種

(a)小笠原母島の山中のみに生育する国内希少野生動植物種のタイヨウフウトウカズラ。(b, c)ネズミの食害を防ぐ柵によって嚴重に現地保全されている個体。

表(1)-2 RNA-seqの結果

科名	種名	サンプリング地域 (個体数)	リード数*
キク科	コヘラナレン	父島(3)	50,259,697
	ユズリハワダン	妹島(1)	44,295,838
	ホソバワダン	沖縄本島(2)、奄美大島(1)	45,637,926
シソ科	シマカコソウ	兄島(1)	20,340,666
	ヒメキランソウ	沖縄本島(3)	37,326,991
	ツルカコソウ	佐渡島(3)	40,890,375
イワタバコ科	ナガミカズラ	西表島(1)、台湾(1)、香港(1)	55,700,997
ツツジ科	ヤドリコケモモ	栽培株(2)、台湾(1)	48,817,367
	ムニンツツジ	父島(1)	45,284,446
	サキシマツツジ	西表島(1)	43,431,410
サクラソウ科	カッコソウ	群馬(3)	63,395,233
	シコクカッコソウ	愛媛(2)	45,839,199
	オオサクラソウ	佐渡島(1)	54,344,896
ノボタン科	ムニンノボタン	父島(2)	40,306,664
	ノボタン	沖縄本島(2)	33,794,728
トウダイグサ科	ボロジノニシキソウ	南大東島(2)	42,659,735
	ハマタイゲキ	沖縄本島(2)	48,642,815
スミレ科	ヤエヤマスミレ	西表島(2)	66,835,765
	イシガキスミレ	石垣島(1)	55,824,762
	オキナワスミレ	沖縄島(1)	46,739,014
ラン科	ホシツルラン	母島(3)	33,585,947
	ツルラン	沖縄本島(1)、石垣島(1)、奄美大島(1)	33,853,139
	アツモリソウ	北海道(1)	69,189,462
	レブナツモリソウ	北海道(1)	52,362,754
	オキナワセッコク	沖縄本島(1)	46,167,962
	セッコク	広島(1)、高知(1)	48,634,221
	ヤブミョウガラン	沖縄本島(2)	44,490,025
	ナンバンキンギンソウ	沖縄本島(2)	47,185,825

網掛け：国内希少野生動植物種。

*複数サンプルを解読したものは平均値

(2) ゲノム情報の解読

「種の保存法」で指定されている国内希少野生動植物種とその近縁普通種から抽出したRNAとDNAについて、次世代シーケンサーを用いて、トランスクリプトーム解読であるRNA-seqとゲノム縮約解読であるRAD-seqを行なった。それぞれの解読パフォーマンスは以下の通りである。

RNA-seqによるトランスクリプトーム解読の結果、各解析試料において数千万リード(read)の塩基配列が得られた(表(1)-2)。リードとは、連続した連記配列データのことであり、今回の解読では1リードは100個または150個の塩基配列で構成されている。表(1)-2に示したように、各分類群ごとに20,340,666~69,189,462個のリード数が得られており(塩基数では2,034,066,600~6,988,135,662)、詳細なトランスクリプトーム解析を行うための十分なデータ量をサブテーマ2に提供することができた。

RAD-seq解析でDNA塩基配列情報の縮約ゲノム解読を行った結果、いずれの対象植物でも、100個の塩基配列からなるリードを1,980,274~8,256,645個得ることができた(表(1)-3)。これらの情報はサブテーマ3に提供し、デモグラフィの推定など詳細な解析を行った。

表(1)-3 RAD-seqの結果

科名	種名	解析 個体数	サンプリング地域 (サンプル数)	平均リード数
キク科	コヘラナレン	43	父島本島(12)、兄島(31)	2,914,102
	ホソバワダン	36	沖縄(24)、奄美(12)	2,047,475
シソ科	シマカコソウ	69	父島(13)、兄島(11)、 母島(33)、妹島(12)	1,980,274
	ヒメキランソウ	12	沖縄本島(12)	3,286,239
	ツルカコソウ	12	佐渡島(12)	3,396,082
イワタバコ科	ナガミカズラ	31	西表島(10)、台湾(18)、香港(3)	7,519,845
ツツジ科	ヤドリコケモモ	19	奄美大島(8)、台湾(5)、栽培株(6)	3,746,646
サクラソウ科	カッコソウ	30	群馬(30)	4,831,789
	シコクカッコソウ	40	愛媛(40)	4,611,708
	オオサクラソウ	20	佐渡島(20)	4,673,341
トウダイグサ科	ボロジノニシキソウ	33	北大東島(9)、南大東島(24)	7,829,959
	ハマタイゲキ	19	沖縄本島(19)	5,362,462
ラン科	サガリラン	48	奄美大島(25)、台湾(2)、栽培株(21)	2,984,370
	オキナワセッコク	72	沖縄本島(66)、栽培株(6)	5,365,543
	セッコク	26	広島(6)、高知(20)	8,256,645

網掛け：国内希少野生動植物種

(3) 大量塩基配列情報を活用した希少種の保全状況評価と新たな管理指針の構築

1) 少数サンプルを対象とした希少種の独自性および保全状況の解析

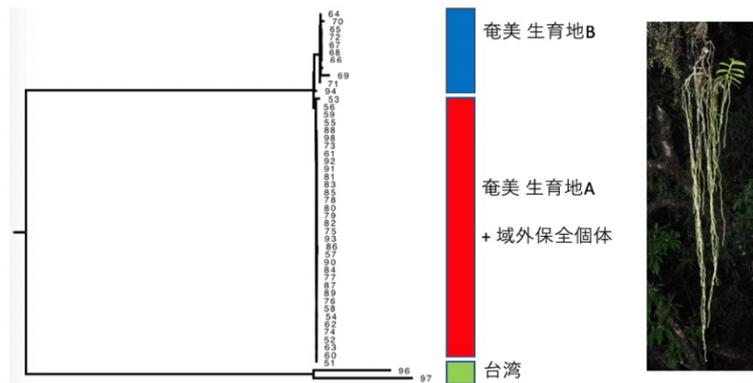
■サガリラン：大量のSNP（1塩基多型）情報に基づいてサガリランの種内最尤系統を構築した結果(図(1)-16)、台湾と奄美大島の個体は遺伝的に明瞭に分化していた。また、台湾の試料は個体間で遺伝的変異が大きい（系統樹の枝が長い）のに対して、奄美大島のサンプルは個々の個体の枝が極めて短く、これらの個体は有性生殖をしているにもかかわらず、ほとんどクローンに近いほど遺伝的に類似していることが明らかになった。ただし、同じ河川流域で数km離れた場所に位置する生育地Aと生育地Bとは、少ないながらも遺伝的な分化が生じており、それぞれが別のクレードにまとまった。

個体レベルの遺伝的類似性をクラスターの組成によって表示するSTRUCTURE分析(図(1)-17)では、台湾、奄美生育地A、奄美生育地Bがそれぞれ別の色で表現されるクラスターに属することがわかった。また、東京で栽培されていた個体は台湾や奄美大島の個体とは異なったクラスター配分となっていた。

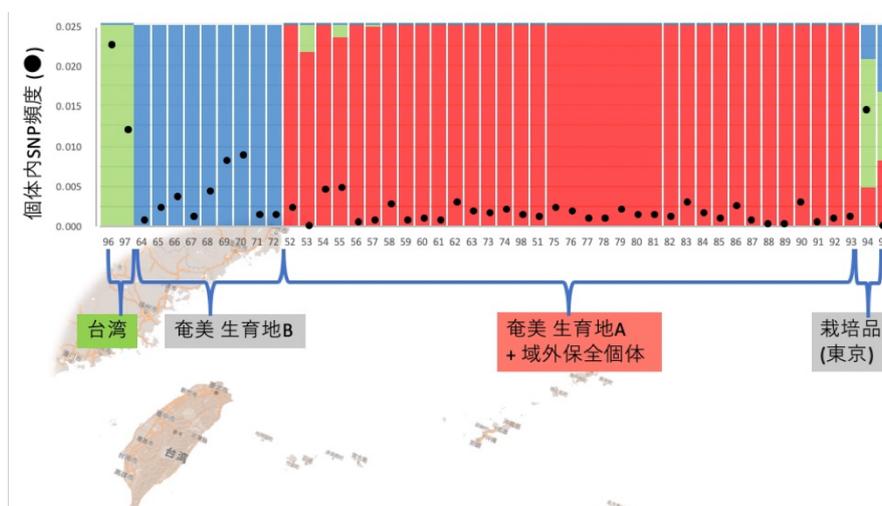
環境省事業として行われている「サガリラン野生復帰検討会」では、沖縄県美ら島財団の植物園で野生復帰のためにサガリランの人工増殖が行われているが、域外保全や人工増殖に用いられている個体はすべて生育地Aのものである。本プロジェクトの解析で、生育地Bにはより多くの遺伝的多様性が保

持されていることが明らかになった。域外保全個体として生育地Bの個体も用いるべきであることを、本プロジェクトの解析結果をもとにサガリラン野生復帰検討会で提言し、より適切な保全策の実行に貢献している。

集団遺伝学における従来の解析では、多数の個体で特定の遺伝子座について遺伝子型を解読して遺伝的多様性を評価する。これに対して、本研究では個体ごとにゲノム内の多数の遺伝子座においてヘテロ接合塩基座頻度（個体内SNP頻度）を求め、この値で1個体の遺伝的多様性を評価した(図(1)-17)。解析の結果、ゲノムレベルの遺伝的多様性は、奄美大島生育地Aの個体は台湾産のものに比べて著しく低いことが明らかになった。奄美大島生育地Bの個体は台湾の個体に比べるとゲノム内の遺伝的多様性は低い、生育地Aのものよりは遺伝的多様性が保持されていることも明らかになった。



図(1)-16 奄美産および台湾産サガリラン試料のSNPにもとづく系統関係



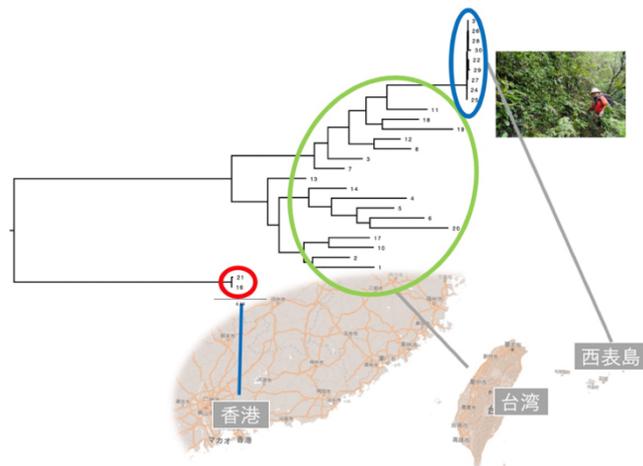
図(1)-17 STRUCTURE解析による各サンプルの遺伝的クラスター構成と個体内SNP頻度
1個のサンプルが一つの縦長方形として表され、遺伝的クラスターの組成が色で塗り分けられている。個体内SNP頻度はそれぞれの個体を表す長方形の中に●で示されている。

■**ナガミカズラ**: ナガミカズラは日本では西表島の1ヶ所のみ、数平方メートルの範囲で生育している国内希少野生動植物種であるが(図(1)-3c)、ゲノムレベルのSNP情報に基づく系統解析(図(1)-18)では、西表産群落から採集した9サンプルは遺伝的にほぼ同一であり、単一のクローン、すなわち、遺伝的には1個体であることがわかった。西表島の唯一の集団は、現在周辺の植生に圧迫されているが、1個体の域外保全によって、日本に現存する本種の多様性は保全できることになる。また、台湾と香港のナガミカズラは遺伝的には明瞭に分化しているが、西表産のナガミカズラは台湾のクレードに入っていた(図(1)-18)。

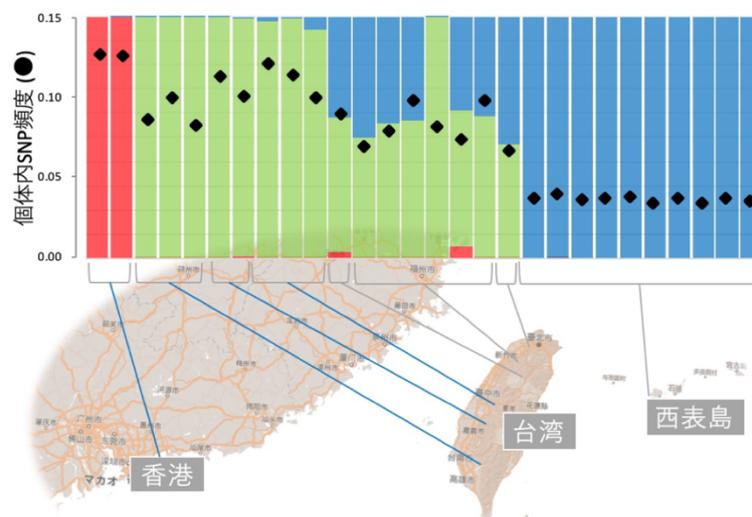
STRUCTURE解析の結果(図(1)-19)も同様の傾向を示しており、香港（赤いクラスター）と台湾

(緑・青のクラスター)は異なった遺伝的クラスターに属するが、台湾のサンプルは、南から北へ向かうにつれて、徐々に青のクラスターが増加し、さらにその先に青のクラスターのみをもつ西表のサンプルへとつながっており、西表の個体が台湾北部からの自然な移入個体であることを示唆する遺伝構造となっていた。

個体ごとのゲノム内SNP頻度は香港のものが最も高く、台湾がやや低くなっていた。1クローンのみが生育する西表の個体は台湾よりも更に低くなっていたが、興味深いことに台湾の1/2~1/3程度のSNP、すなわち遺伝的多様性が保持されていた(図(1)-19)。このことは、西表に少数個体で渡来したナガミカズラがごく少数回の世代交代しか経ていないことを意味する。すなわち、日本国内における存続時間という点では、ある意味帰化植物に近い実態であることが明らかになった。



図(1)-18 西表産および香港・台湾産ナガミカズラ試料のSNPにもとづく系統関係



図(1)-19 STRUCTURE解析による各サンプルの遺伝的クラスター構成と個体内SNP頻度

表示方法は図(1)-17と同様。台湾産のサンプルのクラスター組成は、南部から北部にラインが認められ、その傾向は西表島と連続している。

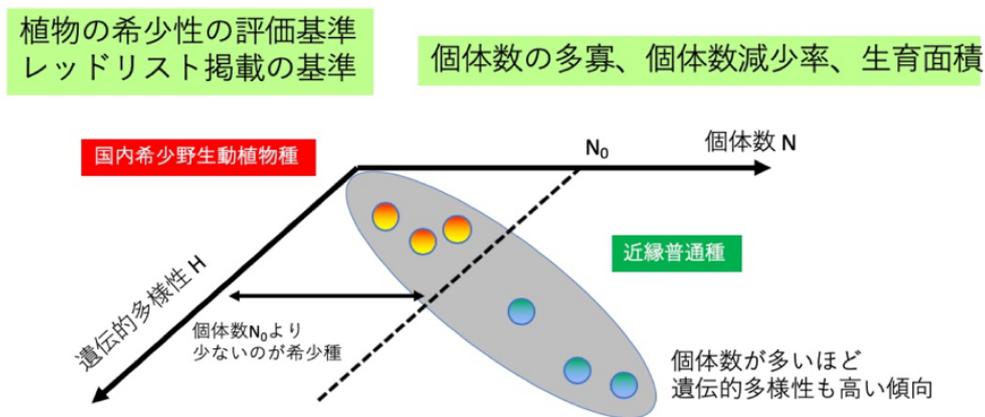
この様に、日本国内ではごくわずかししか生育していないために、集団遺伝学的解析が困難であった希少種でも、ゲノムレベルの情報を活用することで、保全上、極めて有益な示唆が得られた。従来の保全遺伝学的観点では、ここにあげた2種、サガリランとナガミカズラのように、いずれも個体数が極めて少ないという点で共通している分類群においても、ゲノムレベルの情報で解析を行うことで、両者が遺伝的分化、履歴、保全価値などの点で極めて異なった状況にあることを明らかにすることができた。ここで示した解析アプローチは、今後、数百種類という多数の指定が予定されている国内希少野生動植物

種の合理的かつ効率的な管理・状況評価において有用な情報を与えるものと期待される。

なお、大量塩基配列情報を活用した希少種の保全状況評価と新たな管理指針の構築として行った、少数サンプルを対象とした希少種の独自性および保全状況の解析に関しては2018年12月に日本DNA多型学会より優秀研究賞が授与された。

2) 大量塩基配列情報を活用した希少種の新たな管理指針

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。更に、個体数と遺伝的多様性は相関関係を示すことが多いが、個体数が減少して遺伝的多様性が低下することが近交弱勢をもたらし、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(図(1)-20)。

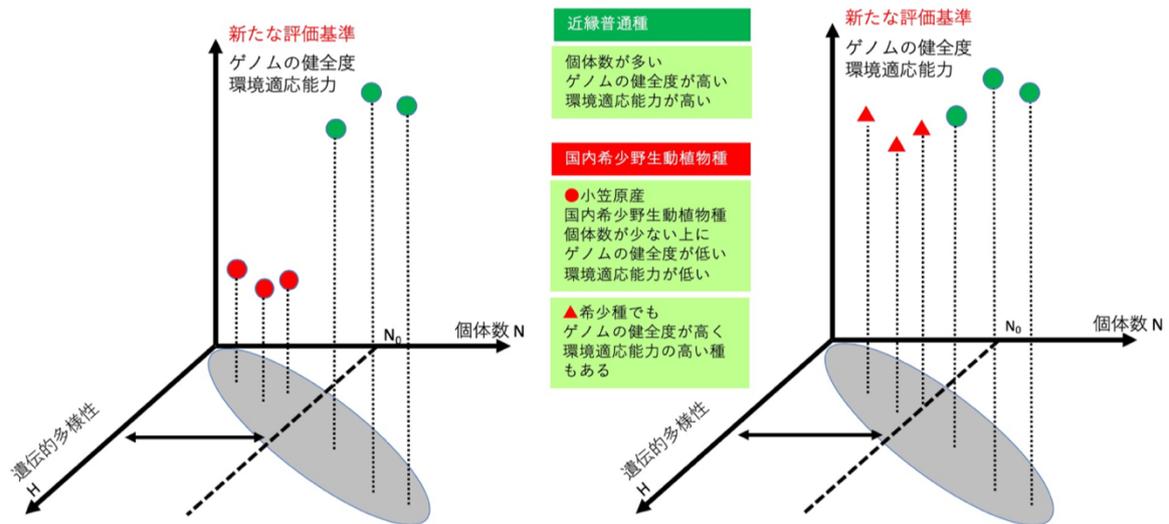


図(1)-20 希少生物に対する従来の主要な評価基準と存続性の評価

本研究では、全く新しい希少種の評価基準として、ゲノムの健全度・環境適応能力を取り入れた(図(1)-21)。すなわち、国内希少動植物種とその近縁普通種において、実際に遺伝子に翻訳された塩基配列を網羅的に解読し、両者の塩基配列の変異を遺伝子の機能や、生物の適応進化能力・環境適応能力といった、より直接的に生物保全にかかわる内容まで踏み込んで解析をした。

その結果、これまで解析が終了した小笠原産の国内希少動植物種は、近縁普通種に比べると、(1)ゲノム内に蓄積されている有害遺伝子の量が多いこと、(2)生物の進化能力や環境適応能力に関与するゲノム内の遺伝子重複度が少ないことがわかった。実際、国内希少野生動植物種に指定されている小笠原産固有植物は、環境省の長年の保護増殖事業にもかかわらず、繁殖状況の成績は向上していない。本プロジェクトの結果は、今回解析した小笠原産固有種が、ただ単に個体数が少ないという事に加えて、ゲノムレベルでも脆弱であり、その存続のためにはより細心の保全管理が必要であることを意味するものである(図(1)-21左)。

また、本研究では小笠原に生育する希少種だけでなく、多様な場所に生育する希少種も解析した。その結果、興味深いことに野生個体数は極めて少ないにもかかわらず、ゲノムの状況が健全な分類群も認めることが出来た(図(1)-21右、図(1)-22)。



図(1)-21 新たな評価基準（ゲノムの健全度と環境適応能力）を加えた希少生物の状況評価
個体数が極めて少なく、国内希少野生動植物種等、希少種に指定されているものの中には、ゲノム状態が極めて悪く、保安全管理が困難なもの(左図●)、ゲノムの状態がよく、適切な管理で個体数増加や持続的管理が期待できるもの(右図▲)があることがわかった。



図(1)-22 解析対象種のゲノムの状態
希少種は個体数が極めて少ないという点では共通するが、ゲノムの状況は種間で大きく異なっていた。

上述の解析結果をもとに、少数サンプルを対象とした希少種の独自性および保全状況の解析や、ゲノムレベルの情報に基づく希少種の脆弱性という新たな観点を取り込んだ、国内希少野生動植物種等の希少種の管理指針を構築した(表(1)-4)。

希少種の保全状況の評価は様々な方法でなされているが、生物学的な観点からは、もっぱら、個体数の多寡・増減が重要であり、更に遺伝的な情報を取り入れる場合でも、比較的少数（多くは10遺伝子座未満）の中立遺伝子座における遺伝的多様性を考慮するにとどまっていた。

表(1)-4 プロジェクト成果を取り込んだ国内希少野生動植物種等の希少種の新たな管理指針

	普通種	国内希少野生動植物種など希少種								
従来法	個体数	多い	少ない							
	中立遺伝子座の 遺伝的多様性	高い傾向 (低いものもある)	低い傾向 (高いものもある)							
新たな評価基準	ゲノム内の 有害突然変異量 → 脆弱性	少ない	少ない				多い			
	ゲノム内の 遺伝子重複量 → 環境適応能力	高い	高い	低い	高い	低い	高い	低い	高い	低い
	保護管理コスト	無	小		中～大		中～大		高	
	希少性の歴史	-	長期	短期	長期	短期	長期	短期	長期	短期
	管理指針		●個体の生育は良好 ●環境変動にも耐性がある ●生育地の環境を整えれば個体群回復の可能性は高い		●個体の生育は良好だが、環境変動への耐性は低い ●現在の環境条件下で生育地環境を整えれば個体群回復の可能性は高い		●個体は脆弱性を示す ●生育可能な環境範囲は狭くない		●野生では脆弱で長期的保全は困難 ●生育域外保全を中心とした維持	

本プロジェクトでは、「ゲノム内の有害突然変異量」から希少種の脆弱性を、そして「ゲノム内の遺伝子重複量」から希少種の環境適応能力を評価するという、これまでにない新しい観点を取り入れることができた。興味深いことに、国内希少野生動植物種に指定されるほどに個体数が極めて少ない希少種においてもすべての種が同様なゲノムの健全度を示すわけではなく、分類群ごとに異なった状態があり、そのことが希少種の保全難易度にも関連している可能性が示唆された。新たな管理指針ではこの点も考慮に入れて、希少種のカテゴライズを行っている。

また、国内外に分布が認められる国内希少野生動植物種に関しては、国内において極めて個体数が少ないために、従来の集団遺伝学的解析が困難であったが、その保全状況や希少性、国内における歴史という点についてもゲノム情報から評価を行った。例えば、西表島の1ヶ所のみで生育するナガミカズラが1クローンで形成されていること、同じ遺伝的集団に属する台湾の個体が西表島に渡来して数世代しか経緯しておらず、ある意味で帰化植物に近い実態であることなどがわかった。国内では極めて希少であるが、同じ分類群が海外にも生育しているケースは少なくない。実際、2019年の段階で、維管束植物は約120種が国内希少野生動植物種に指定されているが、そのうちの約4割が海外にも生育している。これらの中には、ナガミカズラと類似した状況にある分類群も少なくないと考えられ、今後の解析・検討が必要である。表(1)-4ではこうした状況も考慮して、新たな評価基準として日本国内における希少性の歴史も追加している。

これまで個体数が少ないという点で共通して希少種として扱われてきた種を表(1)-4に示したように、更にいくつかのカテゴリーに分けることで、より合理的・効果的な保全策を構築することが期待される。例えば、ゲノム内における有害突然変異量が少ない種は、脆弱性は低いと期待されるが、更にゲノム内の遺伝子重複量が多ければ、現在は盗掘や生育地の物理的破壊などで個体数は少なくはなっているが、増殖能力や環境への適応能力は高いため、適切な保全策のもとで個体数が回復する可能性は高いものと見込まれる。反対に、ゲノム内に有害突然変異が多く蓄積されており、更に遺伝子重複量の少ない種は、現在生育している野生条件下では長期的保全が困難である可能性が高い。生物保全は、本来的に野生条件下での個体群の維持や更新が望ましいものであるが、このようなタイプの希少種は域外保全も重要な保全策として考慮すべきであろう。

生物の保全は遺伝的な特性だけでなく、生態的要因や社会的要因も広く考慮に入れて行うべきであるが、ここで示した解析アプローチは、少なくとも希少種保全のための遺伝解析では世界的にもこれまで

なされてこなかったものであり、国内希少野生動植物種など希少種を対象に、絶滅リスクや存続可能性をより直接的に評価し、保全資源（資金、時間、労力）をより合理的・効果的に分配し、保全策を講じる上で新たな評価基準となり得るものである。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

- 1) ゲノム情報解読のための試料採集と解析を通して、国内希少野生動植物種等、多くの希少種の保全状況が明らかになった。野生個体数や域外保全個体数が極めて少ない希少種について遺伝的な個体数を明らかにすることで、より効果的な保全策の構築が可能になった。
- 2) 日本国内では極めて個体数が少ないために国内希少野生動植物種とされているが、海外には相当数が生育している分類群についてゲノムレベルの解析を行うことで、国内希少野生動植物種の遺伝的独自性や国内における履歴・歴史を正確に知ることができた。
- 3) 機能遺伝子の網羅的解読によって、国内希少野生動植物種等希少種の脆弱性や環境適応性を評価することが可能になり、ゲノム情報に基づく絶滅危惧種の新たな評価基準を低減することができた。このことは世界的に見ても全く新たなアプローチである。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

- 1) 国内希少野生動植物種の個体の繁殖の促進、生息地等の整備等の事業の推進をする必要がある場合は、保護増殖事業計画を策定して、保護増殖事業が実施されているが、環境省によって実施されている。本サブテーマでは、保護増殖事業の対象となっている小笠原産固有植物について、解析を行い、その成果については小笠原希少野生植物保護増殖検討会において報告し、中期実施計画の策定に活用された。
- 2) 環境省と日本植物園協会の間で締結された「生物多様性保全の推進に関する基本協定書」に基づいて、両者の間で野生復帰実施計画検討を進める種について調整し、設置されたサガリラン野生復帰検討会において、今後の保全方法、域外保全集団の確立方法、人工交配の好適な組み合わせ方法などについて、本サブテーマの遺伝解析結果が活用された。
- 3) 桐生市によって国内希少野生動植物種カッコソウの保全のために設立されたカッコソウ協議会に対して、カッコソウの遺伝構造、遺伝子汚染の有無などについて、本プロジェクトの解析内容をもとに、その保全活動に貢献した。
- 4) 環境研究総合推進費による他プロジェクト4-1702「希少植物の自生地復元に向けた問題解決と基盤整備での活用」が行っている小笠原産希少種の遺伝解析にも本プロジェクトの解析結果を提供した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- 1) 国内希少野生動植物種等の希少種の新たな管理指針は、今後、継続的に多数種が指定される予定の国内希少野生動植物種をカテゴライズし、限られた保全資源（予算、時間、人力）のもとで行政が合理的・効果的に保全策を実行するに際して活用できる。
- 2) 本研究で解析した国内希少野生動植物種に関しては、野生個体の大部分について個体レベル、あるいは集団レベルでの遺伝的特徴を解読したので、ゲノムレベルの遺伝子型を違法採集や違法売買の防止のための遺伝的タグとして活用できる。
- 3) COP10愛知ターゲットのうち、目標12「2020年までに、絶滅危惧種の絶滅・減少が防止され、特に減少している種に対する保全状況の維持・改善が達成される」と目標19「2020年までに、生物多様性などに関連する知識、科学的基礎及び技術が改善され、共有適用される」は、本プロジェクトで直接的に達成できるものであり、COP10開催国としての責務遂行に貢献が見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

- 1) 国際共同研究名：ニューカレドニアにおける生物多様性創出メカニズムの解析とその保全に関する共同研究、カウンターパート氏名・所属・国名：Gildas Gâteblé・Institut Agronomique néo-Calédonien・ニューカレドニア、連携状況：世界でも有数の生物多様性ホットスポットであるニューカレドニアには多くの固有種が生育しているが、ニッケル鉱業等開発によってその生物多様性は危機的状況にある。ニューカレドニアで著しく種分化を繰り返している分類群を対象に、本研究によって開発された遺伝解析手法を活用して、ニューカレドニアの生物多様性保全研究を行っている。
- 2) 日本学術振興会二国間交流事業共同研究、「日華植物区系における主要植物の系統・種分化をもたらす時空メカニズムの解明」、Yingxiong Qiu教授・浙江大学・中華人民共和国、本研究で開発したゲノム情報解読手法を活用して、日中の生物多様性創出メカニズムについて、共同研究を行ってきた。
- 3) JST国際科学技術共同研究推進事業（戦略的国際共同研究プログラム）、「日華植物区系区の暖温帯林におけるキーストーン植物の系統多様化と遺伝的変異分布パターンの時空間解析」、Yingxiong Qiu教授・浙江大学・中華人民共和国、日本の生物多様性の起源や特性を理解するには大陸の植物相との比較解析が不可欠である。本共同研究では、中国に生育している同種あるいは近縁種との遺伝的関連性について、共同研究を行っている本環境研究総合推進費プロジェクトで使用した遺伝情報解読手法を活用している。
- 4) Yayab Wahyu研究員・ボゴール植物園・インドネシア：国費留学生としてボゴール植物園の研究員を博士課程後期学生として受け入れ、東南アジアの生物多様性保全についてゲノムレベルの情報を生かした解析を行っている。手法は本プロジェクトで使用した遺伝情報解読手法を活用している。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) T. HAMABATA, G. KINOSHITA, K. KURITA, P.-L. CAO, M. ITO, J. MURATA, Y. KOMAKI, Y. ISAGI and T. MAKINO: Commun. Biol., 2, 244 (2019), Endangered island endemic plants have vulnerable genomes.
- 2) Y. YAMAURA, A. NARITA, Y. KUSUMOTO, A.J. NAGANO, A. TEZUKA, T. OKAMOTO, H. TAKAHARA, F. NAKAMURA, Y. ISAGI and D. LINDENMAYER: Biol. Lett., 15, 5, 20180577 (2019), Genomic reconstruction of 100,000-year grassland history in a forested country: population dynamics of specialist forbs.
- 3) L. MIZUSAWA, N. ISHIKAWA, O. YANO, S. FUJII and Y. ISAGI: Acta Phytotaxon. Geobot., 70, 2, 87–102 (2019), Geographic distribution of ploidy levels and chloroplast haplotypes in Japanese *Clerodendrum trichotomum* s.lat. (Lamiaceae).
- 4) K. KURITA, D. KYOGOKU, A. ABE, M. YOKOTA, and Y. ISAGI: Genes Genet. Syst., 94, 2, 99–102 (2019), Development of microsatellite markers for an endangered fern in the Ryukyus, *Plagiogyria koidzumii* (Palgiogyriaceae).
- 5) K. KISHIKAWA, K. SUETSUGU, D. KYOGOKU, K. OGAKI, D. IGA, K. SHUTOH, Y. ISAGI, and S. KANEKO: Genes Genet. Syst., 94, 2, 95–98 (2019), Development of microsatellite markers for complete cleistogamous species *Gastrodia takeshimensis* (Orchidaceae), with transferability for its chasmogamous sister *G. nipponica*.
- 6) 芝林真友、栗田和紀、井鷲裕司、横田昌嗣、阿部篤志、赤井賢成、國府方吾郎、遊川知久、長澤淳一、志内利明、市河三英、橋本季正、阪口翔太、寺峰孜：DNA多型、27, 62–65 (2019), 分布フロントにおける希少植物のゲノムワイドな遺伝解析
- 7) Y.W.C. KUSUMA, S.R. ARIATI, R.A. RISNA, C. MITSUYUKI, Y. SUYAMA and Y. ISAGI: Trop.

- Conserv. Sci., 12, 1–12 (2019), Seedling selection using molecular approach for *ex situ* conservation of critically endangered tree species (*Vatica bantamensis* (Hassk.) Benth. & Hook. ex Miq.) in Java, Indonesia.
- 8) K. ARIMA, D KYOGOKU, N. NAKAHAMA, K. SUETSUGU, M. OHTANI, C. ISHII, H. TERAUCHI, Y. TERAUCHI and Y. ISAGI: *Evol. Ecol.*, 33, 1, 55–69 (2019), Mating pattern of a distylous primrose in a natural population: unilateral outcrossing and asymmetric selfing between sexual morphs.
- 9) S. SUZUKI, K. SUGAI, K. UCHIYAMA, S. KATOH, H. KATO, S. NARITA and Y. ISAGI: *J. Forest Res.*, 23, 6, 393–397 (2018), Development of microsatellite markers for *Callicarpa subpubescens* (Lamiaceae), an endemic species of the Bonin Islands.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 井鷲裕司、兼子伸吾、安倍哲人、伊津野彩子、牧野能士：森林科学、86, 19–22 (2019), 島嶼性固有植物の保全ゲノミクス

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 井鷲裕司：第66回日本生態学会大会（2019）
「分布フロントに成育する国内希少野生動植物種の保全価値評価」
- 2) Y. ISAGI, S. KANEKO, S. NARITA, A. NARITA, H. ANDO and H. KATO: International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity in East Asia and Conservation of Endangered Plants (Zhejiang, China) (2018)
“Conservation genetics/genomics on remote oceanic island ecosystems with information from NGS.”
- 3) 芝林真友、栗田和紀、横田昌嗣、阿部篤志、赤井賢成、國府方吾郎、長澤淳一、志内利明、市河三英、橋本季正、遊川知久、阪口翔太、寺峰孜、井鷲裕司：、日本植物分類学会第17回大会（2018）
「海外に多個体が生育する国内希少野生動植物種の保全ゲノミクス」
- 4) Y. ISAGI, S. KANEKO, A. NARITA, S. SUZUKI, H. ANDO and H. KATO: The 48th Annual Meeting for the Korean Society of Plant Taxonomists, International Symposium "Island Plants - Evolution and Conservation", Suwon, Korea (2017)
“Conservation genetics with information from NGS in the Bonin Islands, a UNESCO World Heritage site.”
(招待講演)
- 5) 井鷲裕司、京極大助、田畑諒一、横田昌嗣、阿部篤志：植物分類学会第16回大会（2017）
「網羅的遺伝解析に基づく種の保存法対象種の保全」
- 6) 成田あゆ、山浦 悠一、楠本良延、手塚あゆみ、川口利奈、永野惇、井鷲裕司：日本生態学会第64回大会（2017）
「日本の草地性植物は過去にどのような変遷をたどってきたのか？ 全国規模のゲノム解析で推定した草本 4 種の集団サイズ動態」
- 7) 成田あゆ、兼子伸吾、陶山佳久、綱本良啓、小牧義輝、葉山佳代、坂入祐子、井鷲裕司：日本生態学会第64回大会（2017）
「小笠原諸島の希少植物タイヨウフウトウカズラの実生の遺伝的多様性：SSR/MIG-seqによる解析と比較」
- 8) 井鷲裕司、兼子伸吾、成田智史、木下豪太、成田あゆ、永野惇、手塚あゆみ、八杉公基、鈴木節子、加藤英寿、加藤朗子、須貝杏子：日本生態学会第64回大会（2017）
「小笠原諸島に生育する絶滅危惧固有植物の保全ゲノミクス」
- 9) Y. ISAGI: JASTIP Symposium: Collaborative Bioresources and Biodiversity Studies for the ASEAN Region, Jakarta, Indonesia (2016)
“Conservation of Biodiversity in Asia using Genetic Information from NGS.”
- 10) T. SHIGA, M. YOKOGAWA, S. KANEKO and Y. ISAGI: East Asian Plant Diversity and Conservation, Tokyo, Japan (2016)

“Conservation and management of critically endangered species, *Nuphar submerse*, based on genotype data of all remnant individuals growing in the wild.”

- 11) 井鷲裕司：日本植物学会第80回大会（2016）
「NGSによる大量塩基情報解読を活用した希少植物保全」
- 12) 成田あゆ、山浦悠一、手塚あゆみ、永野惇、井鷲裕司：日本植物学会第80回大会（2016）
「草地性草本植物の有効集団サイズ動態」
- 13) 井鷲裕司：第47回日本緑化工学会シンポジウム（2016）
「遺伝的地域性の保全の必要性」（招待講演）

（3）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（4）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第5回絶滅危惧植物講演会（京都府立植物園、京都市）で講演「遺伝子を調べて希少植物をまもる」（2019年3月30日、聴講者30名）
- 2) 朝日新聞プロフェッサービジット（広島皆実高校、広島市）で講演「ゲノム情報で希少生物（生物多様性）を保全する」（2018年9月25日、聴講者500名）
- 3) カッコソウ協議会総会（桐生自然観察の森、桐生市）で講演「国内希少野生動植物種カッコソウ生態と遺伝の特徴」（2018年4月8日、聴講者25名）
- 4) 第58回野楽マッチ勉強会（大阪市立総合生涯学習センター、大阪市）で講演「森林生態系と生物多様性について学ぼう」（2017年11月19日、聴講者25名）
- 5) 朝日新聞プロフェッサービジット（開智高校、さいたま市）で講演「ゲノム情報で希少生物（生物多様性）を保全する」（2017年10月24日、聴講者250名）
- 6) カッコソウ協議会総会で講演「網羅的遺伝解析に基づく種の保存法対象種の保全」（2017年4月9日、聴講者30名）
- 7) 平成28年度京都大学森林科学公開講座で講演「遺伝解析でまもる森林の生物多様性」（2016年11月15日、聴講者60名）
- 8) 京都大学オープンキャンパス2016農学部で講演「遺伝子を調べて森林の生物多様性をまもる」（2016年8月8日、聴講者100名）

（5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞（2019年1月9日、朝刊、19頁、「生物多様性 ゲノムで守る」）
- 2) 桐生たいむす（2018年4月26日、12頁、「知っておきたい、カッコソウのいま 京都大学・井鷲裕司教授が講話」）
- 3) 朝日新聞（2017年12月22日、朝刊、22頁、「ゲノム解読 絶滅危惧種救え」）
- 4) 朝日新聞（2017年10月31日、埼玉全県版、32頁、「希少生物の保全 開智高生学ぶ」）
- 5) 産経新聞および産経ニュース（2017年4月30日、愛媛版、18頁、「絶滅危惧種シコクカッコソウを守れ「かわいらしいお姫様」京大初調査」）

（6）その他

- 1) DNA多型学会優秀研究賞、芝林真友ほか、分布フロントにおける希少植物のゲノムワイドな遺伝解析、2018年11月

8. 引用文献

- 1) N.A. BAIRD, P.D. ETTER, T.S. ATWOOD, M.C. CURREY, A.L. SHIVER, Z.A. LEWIS, E.U. SELKER, W.A. CRESKO and E.A. JOHNSON: PLoS ONE, 3, 10, e3376 (2008)
Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers

- 2) B.K. PETERSON, J.N. WEBER, E.H. KAY, H.S. FISHER and H.E. HOEKSTRA: PLoS ONE, 7, 5, e37135 (2012)
Double Digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species
- 3) J. CATCHEN, P.A. HOHENLOHE, S. BASSHAM, A. AMORES and W.A. CRESKO: Mol. Ecol., 22, 11, 3124–3140 (2013)
Stacks: an analysis tool set for population genomics
- 4) A. STAMATAKIS: Bioinformatics, 30, 9, 1312–1313 (2014)
RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies
- 5) J.K. PRITCHARD, M. STEPHENS and P. DONNELLY: Genetics, 155, 2, 945–959 (2000)
Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data

II-2 絶滅危惧種保全のためのバイオインフォマティクス解析

東北大学大学院生命科学研究科

牧野 能士

平成28～30年度累計予算額：10,425千円

(うち平成28年度：3,534千円、平成29年度：3,534千円、平成30年度：3,357千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

遺伝的多様性の喪失は種の適応度を低下させ、絶滅の危険性を増大させる重要な要因となりうる。しかし、絶滅の危機に瀕している種と広域に分布する普通種とのゲノムの特徴の違いから、絶滅の危険性と高い脆弱性を示した研究はほとんどない。本サブテーマでは、ゲノムの状態から種の絶滅リスクを評価する手法を確立するため、絶滅危惧植物とその近縁普通種におけるゲノムワイドな(i)遺伝的多様性、(ii)有害な変異の蓄積、(iii)重複遺伝子の割合を比較し、絶滅危惧植物のゲノム脆弱性を評価可能か検証した。絶滅危惧種とその近縁種から抽出されたRNAをRNA-seqでトランスクリプトーム解読して得られた配列をアセンブルし、多型座位を網羅的に取得した。得られた変異情報をもとに、上記の3指標を推定し、同属内の絶滅危惧種と近縁普通種の比較を行った。小笠原諸島固有植物と本州または沖縄列島の近縁普通種の比較において、集団サイズの指標となる塩基あたりの同義置換SNVs(single nucleotide variations)は、絶滅危惧種で有意に低いことが示された。また、全ての絶滅危惧種において、それらの近縁種よりも有害突然変異が有意に蓄積していることが示された。重複遺伝子の割合においても統計的に有意に絶滅危惧種で低いことが示されたが、有意差がない種も観察された。次に、日本本土や沖縄の絶滅危惧種について同様の評価を行なった。その結果、遺伝的多様性の低さ、有害変異の蓄積が観察されたものの、重複遺伝子の割合の低下はみられなかった。さらに、広い分布域を持つものの特定の集団が孤立した地域個体群である絶滅危惧種のゲノム評価を行なったが、絶滅危惧種で共通して観察される指標はなかった。ごく最近に種分化した種や隔離集団においては、本評価方法においてゲノムが脆弱ではないことを示唆している。本研究の結果は、小集団化した絶滅危惧種がゲノムワイドな遺伝的多様性の減少を経験しているだけでなく、自然選択効率の低下により機能的遺伝子座において有害変異の蓄積を引き起していることを示唆している。こうしたゲノム内の有害突然変異の蓄積や重複遺伝子含有率の低下は、絶滅危惧種の脆弱性に寄与している可能性があり、我々の調査結果は、絶滅危惧植物保全に向けた、全く新しいアプローチによる種の脆弱性評価を提供するものである。

[キーワード]

絶滅危惧種、有害変異、自然選択、ボトルネック、重複遺伝子

1. はじめに

急激な種の消失が世界的に進行している。そのような消失を最小限に抑え、保全効率を最大限に高めることを目的とした生態学的および生物学的研究が求められている。

絶滅危惧種は、小規模で孤立した個体群を形成していることが多いため、遺伝的浮動の影響を受けやすく、また、遺伝的多様性の消失に繋がる近親交配が起こりやすい。さらに、絶滅危惧種の個体数減少に関連するボトルネック効果は、自然選択効率の低下を引き起こし、有害な対立遺伝子の蓄積を促進すると考えられる。多くの遺伝子座において有害な突然変異が固定すると累積的な悪影響により近交弱勢を引き起こす。さらに、遺伝的多様性の喪失は、環境変化に応じて進化する能力を低下させている可能性がある。絶滅の危機に瀕している種や個体群の絶滅リスクを遺伝的多様性の消失や有害変異の蓄積といったゲノムの変化によって評価する取り組みはなされておらず、その効果は不明である。

保存遺伝学では、遺伝的多様性を評価するため、塩基の多様性、対立遺伝子の数、および中立遺伝的マーカーのヘテロ接合性が広く調べられてきた。これは、中立遺伝子座の多様性が有効集団サイズを反

映するという前提に基づいており、それが集団の適応度と相関すると予想されている。しかしながら、適応度に直接影響する遺伝子機能に影響を与えるような変異については、保全生物学の分野においてこれまで調べられていない。どのような遺伝的要因が絶滅危惧種の脆弱性に寄与しているかを明らかにするために、機能に関わるゲノムワイドな遺伝的変化を評価する必要がある。

次世代シーケンシング(NGS)により、ゲノムワイドなハイスループットデータを生成することが可能になり、バイオインフォマティクスツールを使用してこれらのデータを網羅的に解析できる時代となってきた。機能的遺伝子座を含むゲノムワイドな遺伝的変異の解析により、絶滅危惧種が普通種と比較して適応度の低下を示唆するゲノムの特徴を有するかどうかを直接調べることができる。これは中立遺伝子座を用いてきた従来の手法とは大きく異なるものである。特に、トランスクリプトームを調べるために使用されるハイスループットシーケンシング法であるRNAシーケンシング(RNA-seq)により、自然選択を受けている非同義置換座位を網羅的に取得できる。この手法の長所として、RNA-seqは対象種に参照ゲノム配列が存在するかどうかにかかわらず、任意の種で実施することができることが挙げられる。こうしたRNA-seqの特徴は、機能的な遺伝子座に焦点を当てながら、網羅的な遺伝的多様性の推定も同時に可能にするため、保全ゲノミクスの分野において極めて有益であると考えられる。

絶滅リスクのゲノム評価手法の確立のため、我々は様々な多面的な視点で解析を行う絶滅危惧種とそれらの近縁普通種の選定を行った。これは絶滅危惧種と近縁普通種の生息場所の違い、または、絶滅危惧種と近縁普通種の遺伝的な近縁度によって得られる結果が異なると予想されるためである。選定した種と比較の分類は、3. 研究開発方法で詳しく述べる。

2. 研究開発目的

本研究の目的は、絶滅の危機に瀕している種（絶滅危惧種）と広い分布域を持つ近縁種（同属普通種）のRNA-seqを行い、転写産物配列中に多型のある座位を網羅的に取得し、ゲノムの状態から種の絶滅リスクを評価する指標を開発することである。

本研究では、(i)集団サイズを反映している**遺伝的多様性**¹⁾、(ii)自然選択効率の低下を示す**有害変異の蓄積**¹⁾、(iii)環境適応能力の高さと相関のある**重複遺伝子の割合**²⁾⁻⁴⁾、の3つの指標に着目し絶滅リスク評価を行った。

3. 研究開発方法

サブテーマ1において、絶滅危惧種、及び、それらの種と同属の普通種のRNA配列を次世代シーケンサーにより決定した(表(2)-1)。本研究において対象とした絶滅危惧種は個体数が極めて少なく、また種の保存法によって厳格に管理されているため、個体数の確保は容易ではない。そのため、本研究に用いた個体数は種によって異なる(1~5個体)。対象となる絶滅危惧種と比較する普通種との関係によって、比較の組み合わせを次の(1)~(3)に分類した。

(1) 小笠原諸島固有の絶滅危惧植物と同属普通種の比較(4属12種)

キランソウ属：絶滅危惧IB類に指定されているシマカコソウは、小笠原諸島の希少種の中では最も状態が良く、小石川植物園において域外保全がなされている。比較対象の普通種として九州に分布するツルカコソウと九州・沖縄に分布するヒメキランソウを用いた。なお、今回用いたキランソウ属3種は倍数体であることが分かっており、解析には注意を要する分類群である。

アゼトウナ属：ユズリハワダン¹⁾は絶滅危惧IB類、ヘラナレンは絶滅危惧IA類に指定されている。絶滅危惧IA類に指定されているコヘラナレンは、小石川植物園で増殖した個体を生育地に植え戻す保全活動が行われている。コヘラナレンの一部は開花するが、継代は困難な状況である。比較対象の普通種として西日本から朝鮮半島、中国にかけて生息するホソバワダンと西日本に生息するアゼトウナを用いた。

エビネ属：絶滅危惧IA類に指定されているホシツルランは、ごく少数が母島に生息するのみであり、生育状況、繁殖状況が非常に悪い。アジアから日本にかけて広く分布するツランを比較する

普通種として用いた。

ノボタン属：絶滅危惧IA類に指定されているムニンノボタンの個体数は極めて少なく、小笠原産希少固有植物保全活動の象徴的分類群である。保全活動として、ごく少数の個体を域外で増殖し、植え戻しが行われている。沖縄以南のアジアに広く分布するノボタンを比較する普通種として用いた。

(2) 本土または離島に生息する絶滅危惧植物とその同属普通種の比較(4属9種)

ツツジ属：絶滅危惧IA類にしてされているムニンツツジは父島のみで自生する小笠原諸島固有種である。比較する普通種のサキシマツツジは、石垣、西表に分布している。普通種として扱っているが個体数減少の傾向があり、絶滅危惧II類に指定されている。

サクラソウ属：群馬県のみで生息するカッコソウは、特定国内希少野生動植物種および絶滅危惧IA類に指定されている。絶滅危惧II類に指定されているシコクカッコソウは、愛媛、香川、徳島の四国3県に分布している。北日本に分布する普通種のオオサクラソウについては、今回の試料が佐渡の隔離集団の個体からサンプリングされており、この点を留意の上で結果を解釈する必要がある。

セッコク属：オキナワセッコクは沖縄北部にのみ生息し、絶滅危惧IB類に指定されている。近縁普通種のセッコクは、東北以南の本州に広く分布している。

スマイレ属：島嶼性植物間の比較として、絶滅危惧IB類に指定されているオキナワスマイレと西表島に生育するヤエヤマスマイレを普通種を用いた。ヤエヤマスマイレの染色体数は $2n = 22$ であるのに対し、オキナワスマイレは $2n = 44$ の倍数体であることが報告されている⁵⁾。

(3) 隔離地域個体群と近縁種普通種または同種他集団との比較(6属12種)

1) 隔離地域個体群と近縁普通種との比較(3属6種)

スマイレ属：台湾から東南アジアにかけて広く分布するイシガキスマイレだが、国内では石垣島の1河川のみでしか生息しておらず生育絶滅危惧IA類に指定されている。西表島に生育するヤエヤマスマイレを普通種として比較した。

ニシキソウ属：ボロジノニシキソウはマイクロネシアからオーストラリアまで広く分布しているが、国内では大東島にのみ生息しており、絶滅危惧IA類に指定されている。比較に用いた普通種のハマタイゲキは、沖縄、台湾、マレーシアに分布し、海岸の砂地に生息している。

シュスラン属：ヤブミョウガランは、沖縄、台湾、中国、東南アジアに分布している。国内では沖縄北部にのみ生息しており絶滅危惧IA類に指定されている。普通種として使用した八重山に生息するナンバンキンギンソウは絶滅危惧II類に指定されているが個体数は少なくない。

2) 隔離地域個体群と同種他集団との比較(3属6種)

アツモリソウ属：北海道の礼文島にのみ生育するレブンアツモリソウについて、同属で国内の複数箇所に分布するアツモリソウを普通種として比較した。レブンアツモリソウは、アツモリソウの変種とされ、両種は独立に種の保存法の特定国内希少野生動植物種および絶滅危惧種に指定されている。しかし、系統的に種としては分岐が非常に浅いことが系統樹から明らかになった。

ナガミカズラ属：ナガミカズラは中国から東南アジアにかけて広く分布しているが、国内では西表島に数個体が生息するのみで、絶滅危惧IA類に指定されている。西表島産のナガミカズラは、隣接する台湾の個体と系統的に近いことが系統樹から明らかとなっている。この地域集団の位置づけについて詳細に調べるため、香港および台湾個体と比較した。

スノキ属：ヤドリコケモモは、国内では奄美大島に数個体が自生する希少種で、保存法の国内希少野生動植物種、絶滅危惧IA類に指定されている。本種は、台湾に生育する普通種のオオバコケモモと近縁であることが核および葉緑体DNAによる系統解析から推定されていたが、サブテーマ1の系統推定により両種が明確に分化していることが示された。

表(2)-1 RNA-seqを実施した植物種

分類*	属名	絶滅危惧種 (生息地)	同属普通種 (生息地)
(1)	キランソウ <i>Ajuga</i>	シマカコソウ (小笠原諸島)	ツルカコソウ (本州) ヒメキランソウ (九州、沖縄)
(1)	アゼトウナ <i>Crepidiastrum</i>	コヘラナレン (小笠原諸島) ユズリハワダン (小笠原諸島) ヘラナレン** (小笠原諸島)	ホソバワダン (本州、東アジア) アゼトウナ** (本州、四国、九州)
(1)	エビネ <i>Calanthe</i>	ホシツルラン (小笠原諸島)	ツルラン (九州、沖縄、台湾、中国)
(1)	ノボタン <i>Melastoma</i>	ムニンノボタン (小笠原諸島)	ノボタン (沖縄、台湾、朝鮮半島、中国)
(2)	サクラソウ <i>Primula</i>	カッコソウ (群馬県鳴神山) シコクカッコソウ (四国)	オオサクラソウ (北日本)
(2)	スミレ <i>Viola</i>	オキナワスミレ (沖縄中部)	ヤエヤマスミレ (八重山)
(2)	セッコク <i>Dendrobium</i>	オキナワセッコク (沖縄北部)	セッコク (東北以南の本州)
(2)	ツツジ <i>Rhododendron</i>	ムニンツツジ (小笠原諸島)	サキシマツツジ (石垣、西表)
(3-1)	スミレ <i>Viola</i>	イシガキスミレ (石垣、台湾、東南アジア)	ヤエヤマスミレ (八重山)
(3-1)	トウダイグサ <i>Euphorbia</i>	ボロジノニシキソウ (大東島、ミクロネシア、オーストラリア)	ハマタイゲキ (沖縄、台湾、マレーシア)
(3-1)	シュスラン <i>Goodyera</i>	ヤブミョウガラン (沖縄北部、台湾、中国、東南アジア)	ナンバンキンギンソウ (八重山)
(3-2)	アツモリソウ <i>Cypripedium</i>	レブンアツモリソウ (礼文島)	アツモリソウ (北海道、本州)
(3-2)	ナガミカズラ <i>Aeschynanthus</i>	ナガミカズラ (西表)	ナガミカズラ (中国、東南アジア)
(3-2)	スノキ <i>Vaccinium</i>	ヤドリコケモモ (奄美)	オオバコケモモ (台湾)

* (1)小笠原諸島希少種、(2)本土・離島希少種、(3-1)地域個体群、(3-2)地域個体群の集団間比較

**東京大学伊藤元己教授よりRNA-seq情報を得た

Illumina HiseqまたはIllumina NovaSeqによりRNAをシークエンスしたショートリード配列をアセンブラーTrinityでアセンブルすることで転写産物配列を得た。これらの転写産物の配列を参照配列とし、BWAを用いてショートリードのマッピングを行った。各個体の一塩基変異(SNVs)はSamtoolsを用いてコールした。このようにして1個体内で検出されたSNVsを、アミノ酸配列には変化のない同義置換とアミノ酸配列を変異させる非同義置換に分類した。

このようにした得た網羅的SNVを用いて、以下の3つの指標i), ii), iii)を解析するパイプラインを構築した。各解析で得られた絶滅危惧種と同属普通種の結果を比較することにより、絶滅危惧種の潜在的脆弱性の評価に有効な指標の開発を行った。

i) 遺伝的多様性：種内の遺伝的多様性を評価するため、1個体内でヘテロ接合として保持されている同義変異の数を検出し転写産物1kbあたりの数に換算して比較した。

ii) 有害変異の蓄積：有害変異蓄積の指標として、全SNVs中の非同義置換SNVsの割合、非同義置換SNVs中の保存性の高いアミノ酸配列の置換の割合(Provean及びSIFT)、非同義置換SNVs中のナンセンスSNVsの割合を求めた。

iii) 重複遺伝子の割合：環境適応力の指標として用いることが期待されるゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合の推定も行った。

4. 結果及び考察

(1) 小笠原諸島固有の絶滅危惧植物と日本列島・琉球列島に広く生育する同属普通種の比較(4属12種)

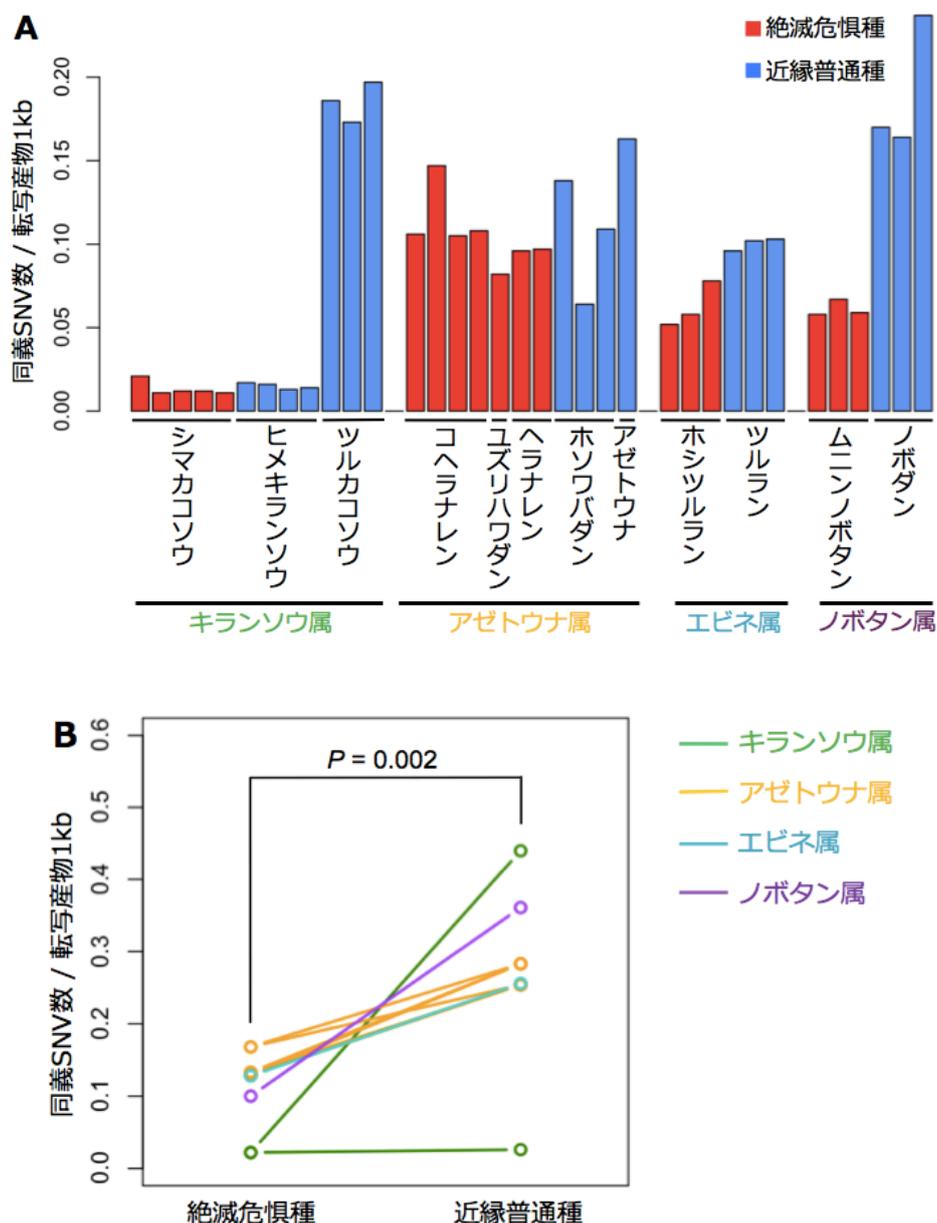
小笠原諸島固有の絶滅危惧植物4属6種と同属普通種4属6種についてRNA-seqデータを解析した。以下

にそれぞれの解析ごとに結果を示す。

1) 遺伝的多様性

種内の遺伝的多様性を評価するため、1個体内にヘテロ接合として保持されている一塩基変異 (SNVs)を検出し、転写産物1kbあたりのSNVsを遺伝的多様性の指標とし、絶滅危惧植物と同属普通種の比較を行った。

絶滅危惧種は同属普通種に比べてその座位数が少ない傾向にあり、ゲノムレベルで遺伝的多様性の低下が観察された(図(2)-1A)。複数個体いる種では平均値を用い、4属12種全体を用いて統計検定を行った結果、絶滅危惧植物と同属普通種は遺伝的多様性が有意に異なることが示された(図(2)-1B; $P = 0.0020$, 二項検定)。こうした遺伝的多様性の低下は、絶滅危惧種が孤立・小集団化した結果だと考えられる。ツルカコソウでは同属他種と比較して極端に高い値が得られたが、染色体数の観察⁶⁾から、本種は国内に生育する同属他種に対して倍数化している可能性が報告されており、本結果はツルカコソウの倍数化を反映したものと考えられる。以降の種間比較において、倍数性に留意して評価基準種の選択を行う必要があることが明らかになった。



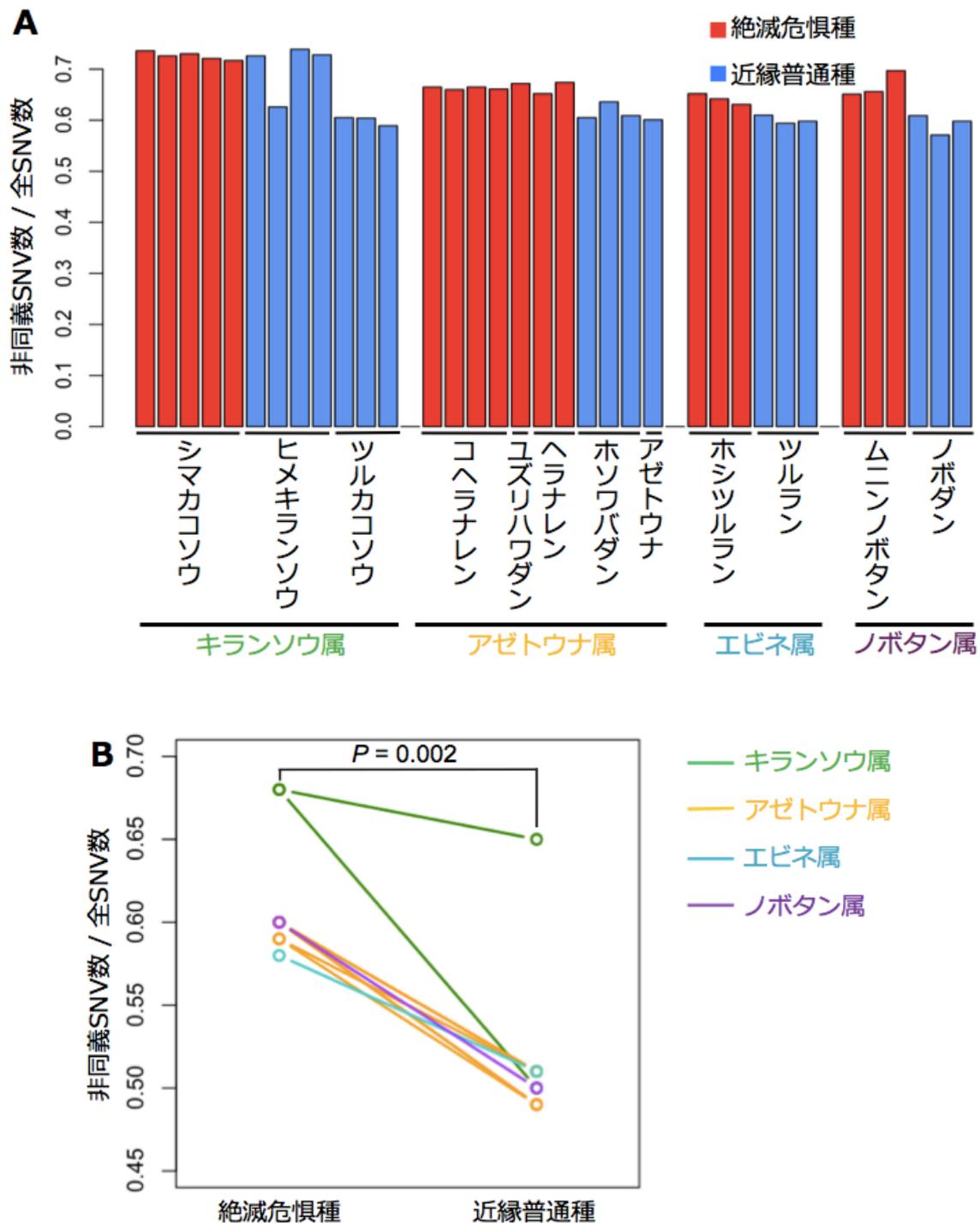
図(2)-1 ヘテロ接合座位数 (SNVs数)

2) 有害変異の蓄積

2-1) 全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合

上記で検出されたSNVsを、アミノ酸配列には変化のない同義置換SNVsとアミノ酸配列を変異させる非同義置換SNVsに分類し、全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合を求めた結果、絶滅危惧種では、同属の普通種と比べて非同義置換SNVsが高かった(図(2)-2A)。また、この違いが統計的に有意であることも示された(図(2)-2B; $P = 0.0020$ 、二項検定)。

今回対象とした絶滅危惧種は野生状態で残存する個体数が極めて少なく、各個体に生じた遺伝子機能に変化をもたらす可能性のある突然変異が、集団中に固定されやすい状況下にあることが示唆された。



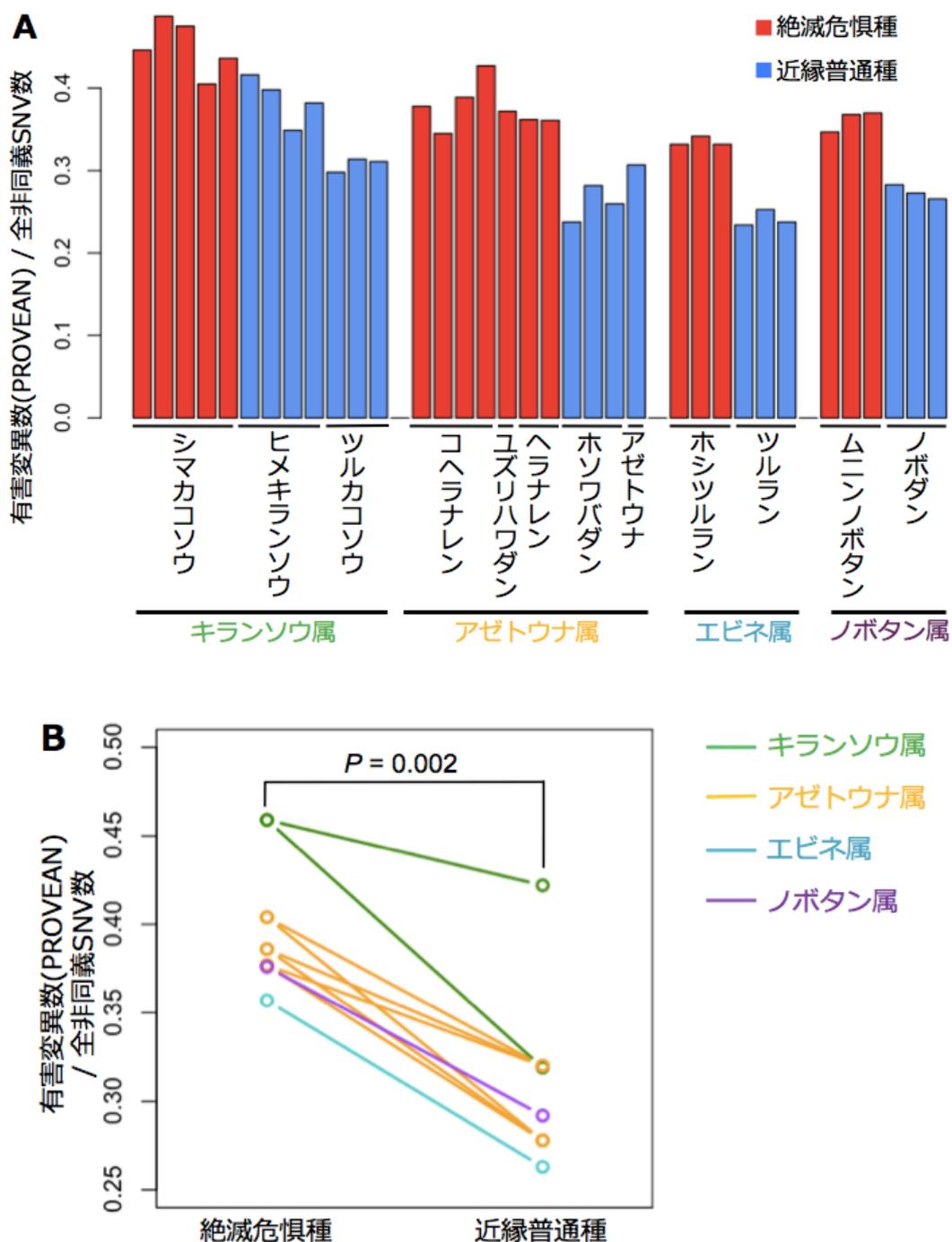
図(2)-2 全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合

2-2) 有害アミノ酸変異を引き起こす非同義置換のSNVsの割合

上記で検出されたアミノ酸変化を伴う非同義SNVsにおいて、進化的によく保存されたアミノ酸をコードしており、タンパク質の構造を変化させて機能上有害となる非同義SNVsの検出を行った。解析ツールとしてPROVEANを用い、検出した非同義置換について網羅的に有害非同義置換を推定し、全非同義置換に占める有害変異の割合を求めた。

その結果、絶滅危惧種は同属の普通種に比べて有害変異が占める割合が高く、ゲノムに生じた有害変異を除去する機能の低下が示唆された(図(2)-3; $P = 0.0020$ 、二項検定)。また、有害変異を推定する別の解析ツールとしてSIFTを用いて解析を行なったが、同様の結果を得た($P = 0.0020$ 、二項検定)。

この結果は、小集団化した絶滅危惧種がゲノムワイドな遺伝的多様性の減少を経験しているだけでなく、自然選択効率の低下により機能的遺伝子座において有害変異の蓄積を引き起こしていることを示唆している。



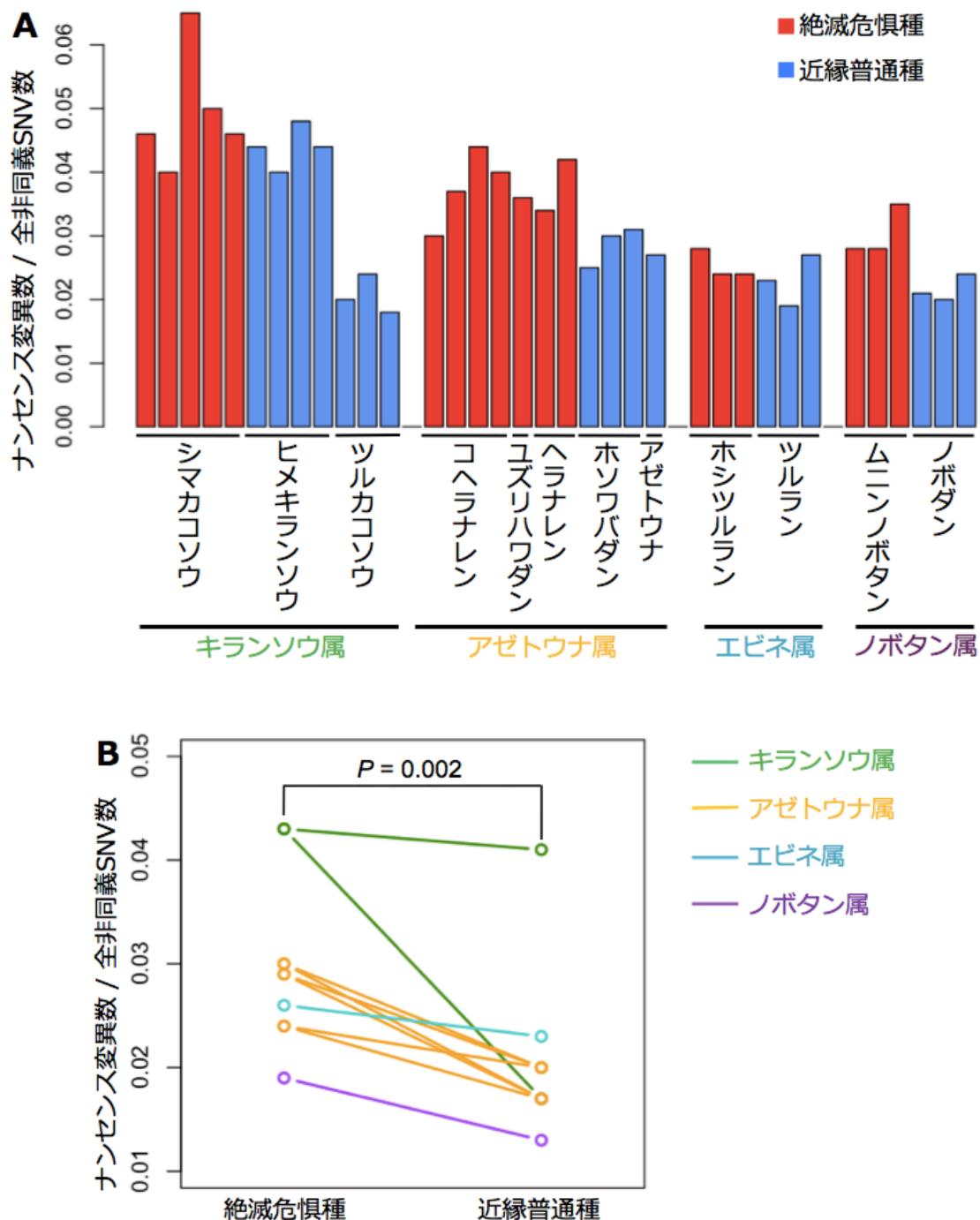
図(2)-3 有害突然変異の割合

2-3) 非同義置換SNVs中のナンセンスSNVsの割合

上記で検出されたアミノ酸変化を伴う非同義SNVsにおいて、終止コドンに変化し、タンパク質の機能消失を伴うことが予想される変異（ナンセンス変異）の割合を種間で比較した。絶滅危惧種、近縁普通種それぞれにおいて、全非同義置換に占めるナンセンス変異の割合を求めた。

その結果、全ての組み合わせにおいて絶滅危惧種の方が近縁普通種よりもナンセンス変異の割合が高いことが示された(図(2)-4; $P = 0.0020$ 、二項検定)。

上記において絶滅危惧種ゲノム中の非同義置換の蓄積、有害変異の蓄積について示したが、少なからず適応的なアミノ酸変化を含む可能性があった。しかし、ナンセンス変異はタンパク質機能が消失すると考えられるため、絶滅危惧種における有害変異の蓄積を強く裏付ける結果である。

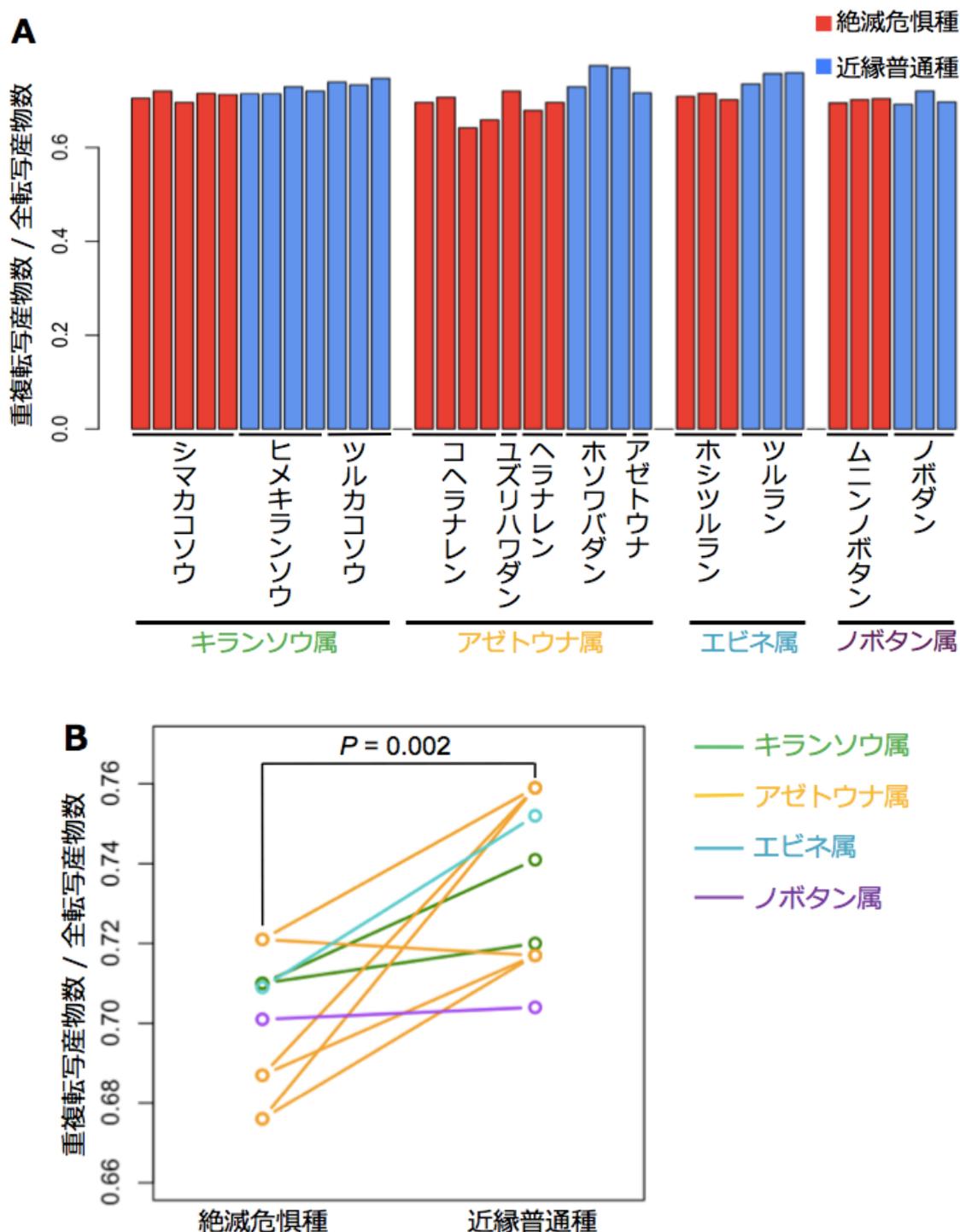


図(2)-4 全非同義置換に対するナンセンス変異の割合

3) ゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合

ゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合(P_D)は生息環境多様性の指標となることが報告されている²⁾。全転写産物の配列を用いて相同性検索により重複遺伝子を同定し、全転写産物数に対する重複遺伝子の割合を P_D と定義した。

ユズリハワダンとアゼトウナの比較を除いた他の全ての組み合わせにおいて絶滅危惧種は同属普通種よりも P_D が低く、統計的な有意差が認められた(図(2)-5; $P = 0.021$ 、二項検定)。絶滅危惧種は、進化過程において多くの重複遺伝子を消失しており、多様な環境へ適応することが難しく、生育地に生じる環境変化に脆弱である可能性を示唆する結果となった。



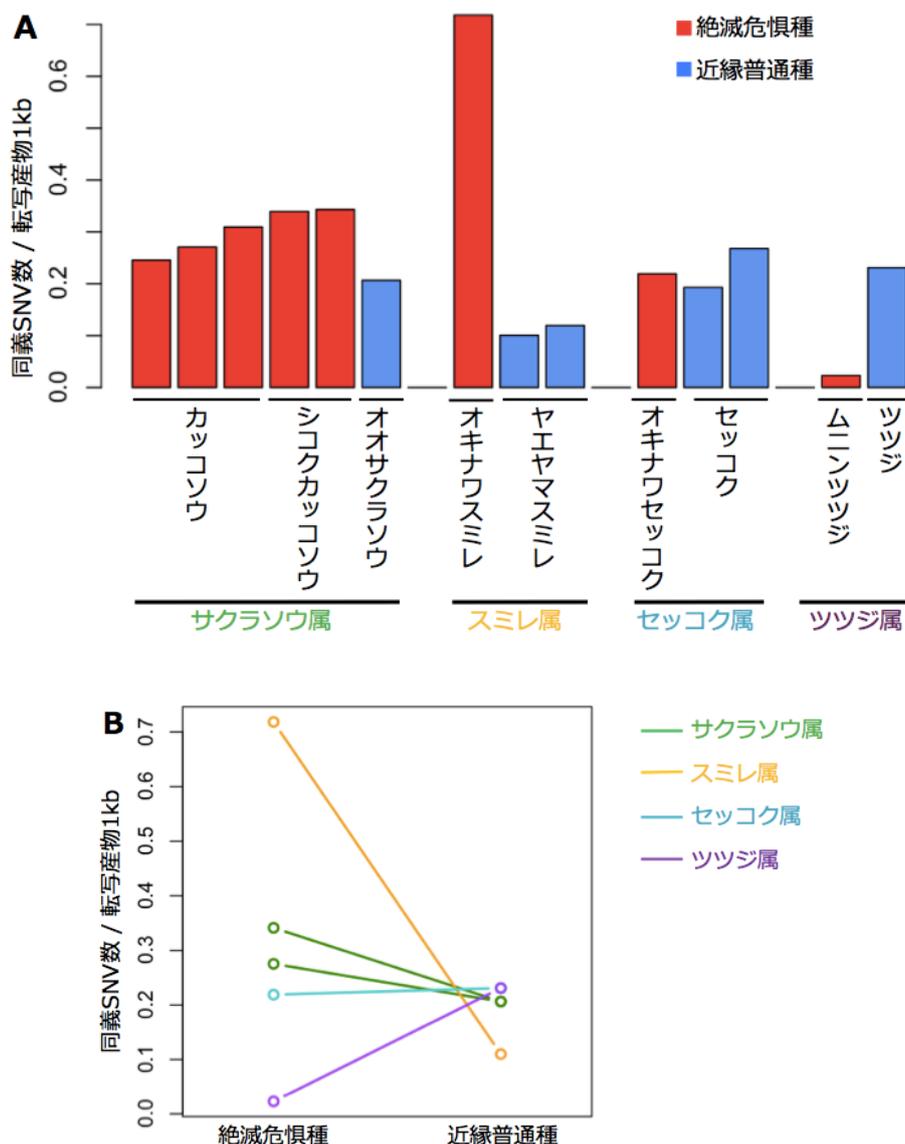
図(2)-5 重複遺伝子の割合

(2) 本土または離島に生息する絶滅危惧植物とその同属普通種の比較(4属9種)

小笠原諸島固有の絶滅危惧種と本土または沖縄の広範囲に分布する近縁普通種を対象とした解析において、絶滅危惧種のゲノムは遺伝的多様性が乏しく、有害変異が蓄積し、重複遺伝子の割合が低いことが示された。しかし、こうして観察された特徴が、絶滅危惧種に共通するものか、あるいは島嶼性植物に見られるものか不明である。そこで、本土または離島に生息する絶滅危惧種と近縁普通種を用いた比較を実施した。島嶼性植物間比較にあたる小笠原諸島に生息するムニンツツジと石垣島に生息する近縁普通種サキシマツツジとの比較も本分類に含めた。解析は上述の小笠原諸島の絶滅危惧種のゲノム評価で用いた手法に従った。なお、以降の解析は用いた個体数が少なく検定力が低いため、統計解析は実施していない。

1) 遺伝的多様性

絶滅危惧種ムニンツツジのみ広域分布種のツツジより同義SNVs数が少ないことが示された(図(2)-6)。オキナワスミレは絶滅危惧種であるものの極端に高い値であった。オキナワスミレは4倍体であることが報告されている⁵⁾。同じく4倍体のツルカコソウでも同義SNVs数が同属他種より異常に高かったことから、RNA-seqによる倍数体の遺伝的多様性評価は困難であることが示された。また、普通種オオサクラソウは佐渡の隔離集団からサンプリングしたために同義SNVs数少なかった可能性が考えられる。

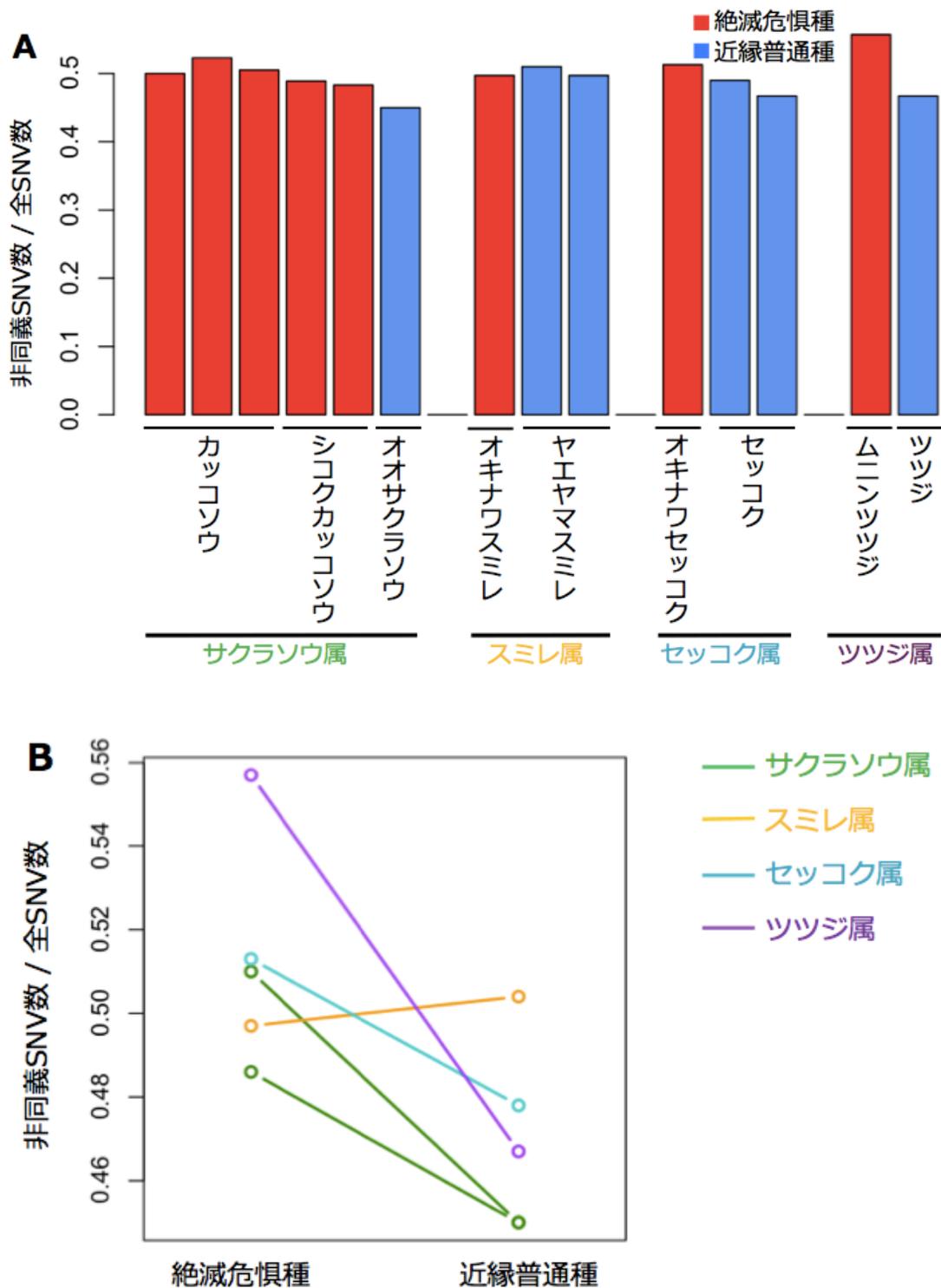


図(2)-6 ヘテロ接合座位数(SNVs数)

2) 有害変異の蓄積

2-1) 全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合

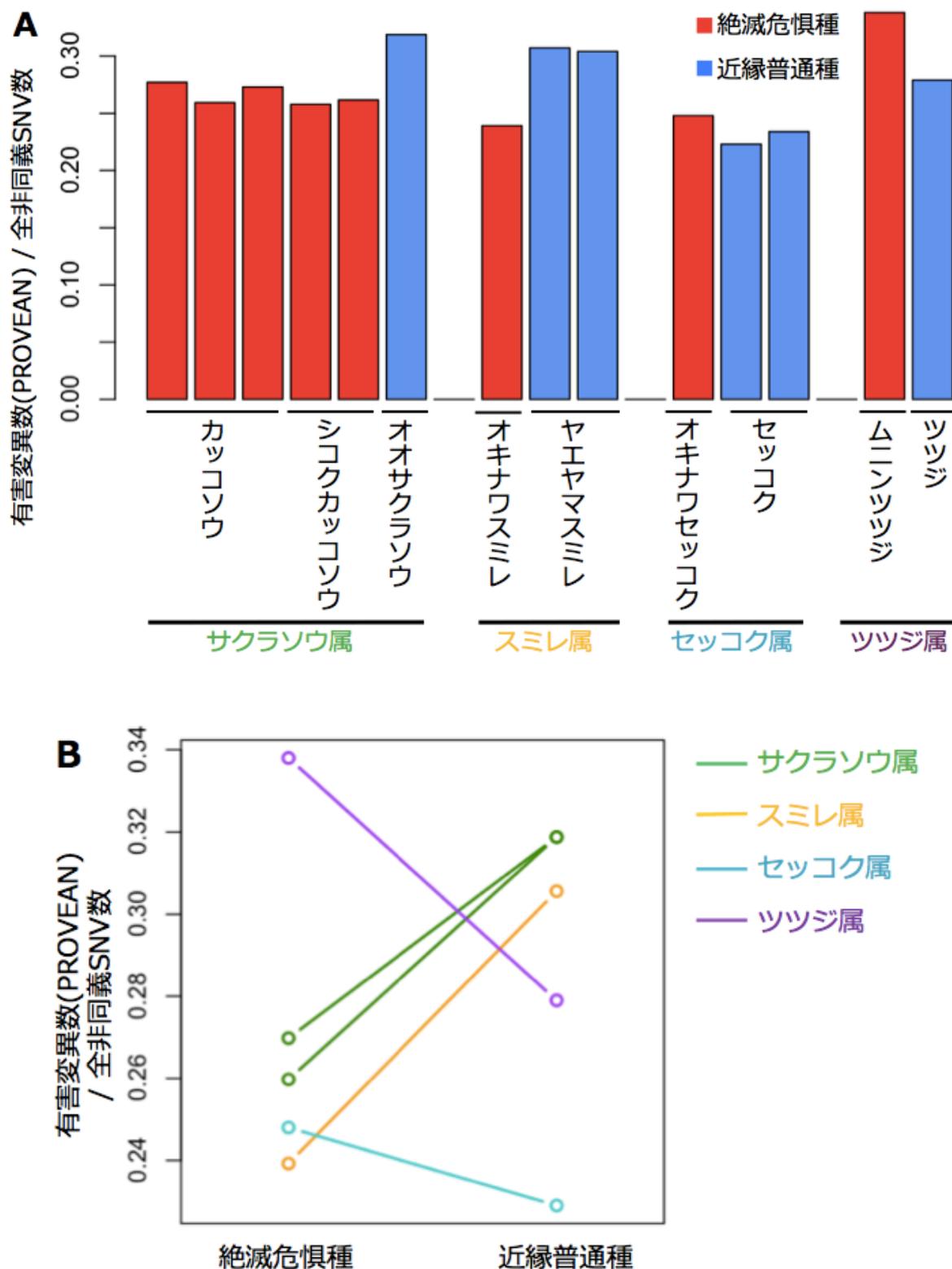
1個体内で検出されたSNVsを、アミノ酸配列には変化のない同義置換とアミノ酸配列を変異させる非同義置換に分類し、全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合を求めた結果、倍数体のオキナワスミレ以外の絶滅危惧種において、同属の広域分布種と比べて非同義置換SNVsの割合が高かった(図(2)-7)。



図(2)-7 全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合

2-2) 有害アミノ酸変異を引き起こす非同義置換のSNVsの割合

PROVEANを用いて有害な非同義SNVsを同定し、全非同義SNVsに対する有害変異の割合を求めた。隔離集団の普通種オオサクラソウで有害変異が多かった(図(2)-8)。また、倍数体絶滅危惧種のオキナワスマレは普通種と比較して有害変異が蓄積した傾向は観察されなかった。

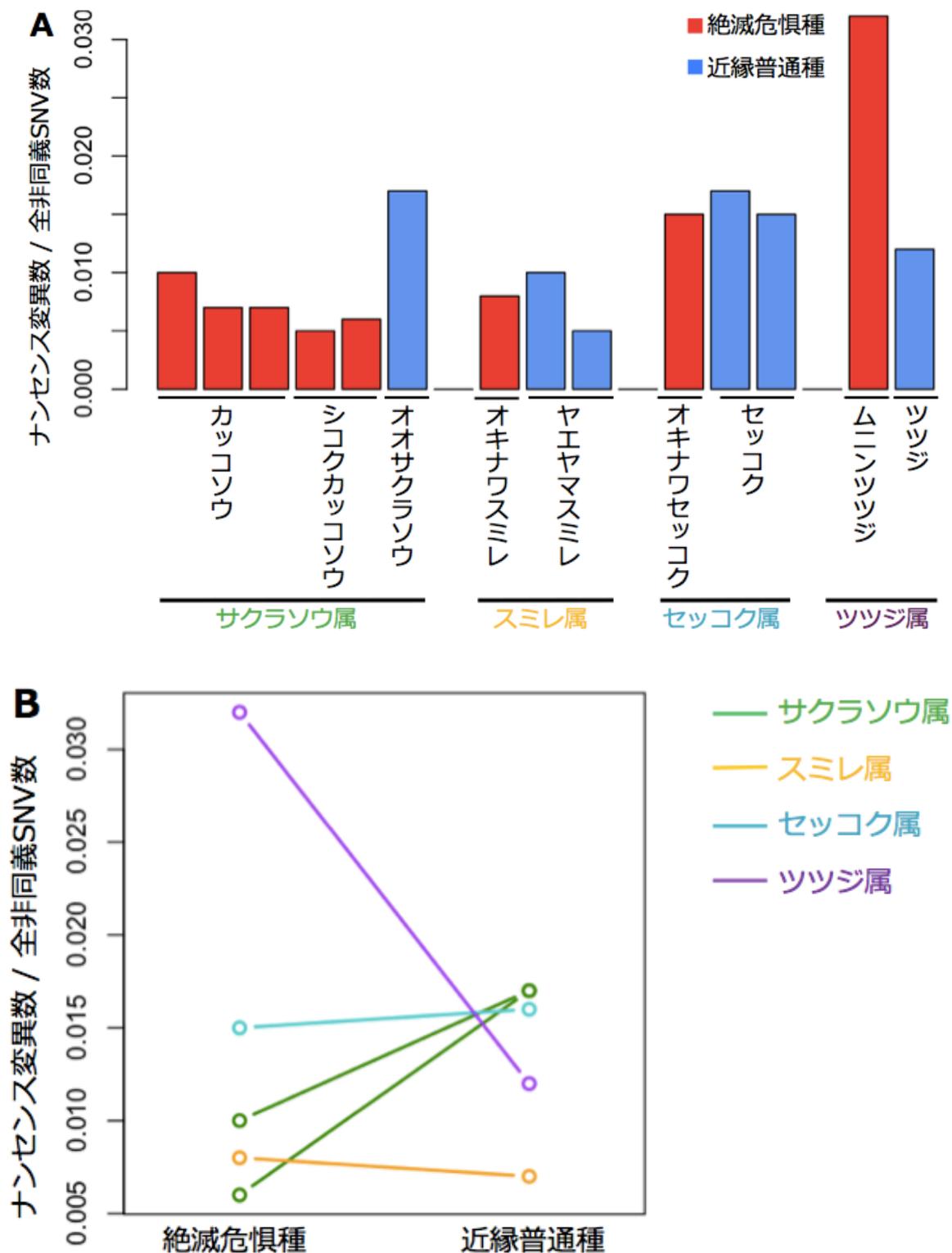


図(2)-8 有害突然変異の割合

2-3) 非同義置換SNVs中のナンセンスSNVsの割合

タンパク質機能に影響するアミノ酸変異のうち、終止コドンに変化し、タンパク質の機能消失となる変異（ナンセンスSNVs）の割合を種間で比較した。

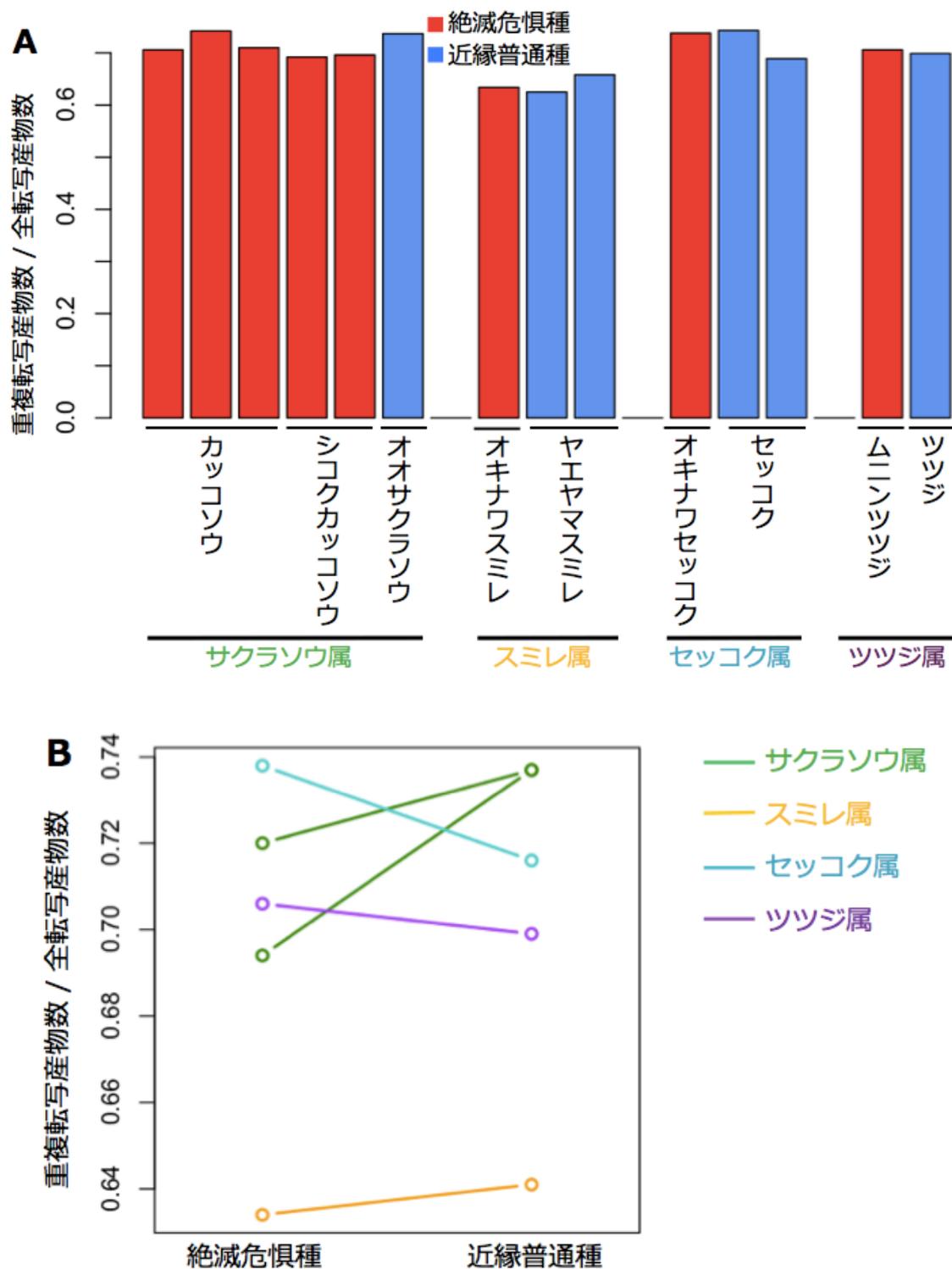
ツツジ属では絶滅危惧種でナンセンスSNVsの蓄積が観察されたが、他の属ではその傾向は観察されなかった(図(2)-9)。



図(2)-9 全非同義置換に対するナンセンス変異の割合

3) ゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合

サクラソウ属以外では、明確に絶滅危惧種で P_b が高い傾向は観察されなかった。この結果は、本分類群の絶滅危惧種は普通種に比べて環境変化に対する頑健性に大きな差がない可能性を示唆している(図(2)-10)。



図(2)-10 重複遺伝子の割合

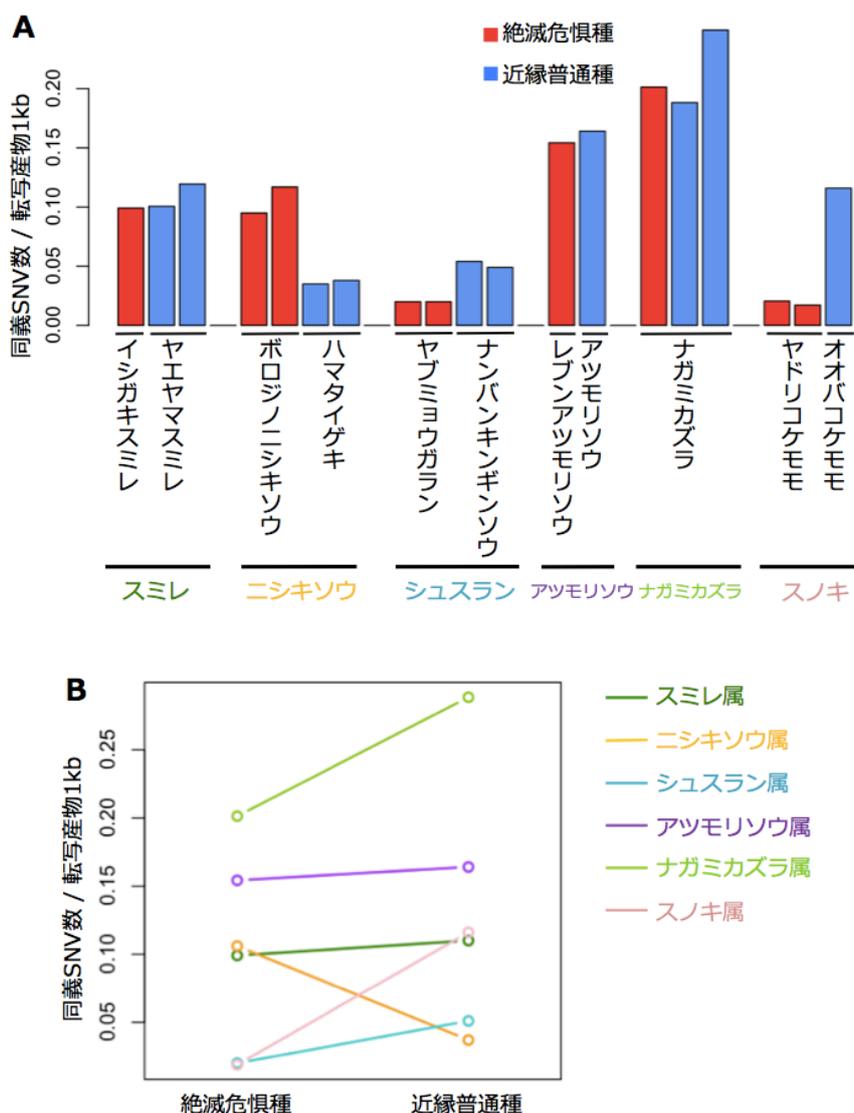
(3) 隔離地域個体群と近縁種普通種または同種他集団との比較(6属12種)

広域に分布している種においても、一部の集団が孤立し、隔離地域個体群として存在しているケースが少なくない。日本国内において隔離された地域個体群6属6種のRNA-seqデータを解析し、(C-1)同属近縁普通種、または、(C-2)同種他集団と比較を行い、ゲノム評価を行なった。

1) 遺伝的多様性

ヤブミョウガランは近縁普通種のナンバンキンギンソウより遺伝的多様性が低く、ヤドリコケモモは台湾集団のオオバコケモモより遺伝的多様性が低い傾向にあった(図(2)-11)。一方で、他の隔離個体群は比較種・比較集団と大きな差は観察されなかった。ごく最近に種分化した種や隔離集団においては、ゲノムの脆弱性は低下していない結果を反映しているものと考えられる。なお、隔離個体群のレブニアツモリソウの比較集団であるアツモリソウも分布域が減少しており、比較対象とする同属普通種としては必ずしも適切ではないが、アツモリソウ以外に適切な同属普通種がなく、属によっては種の選定が困難な場合がある。

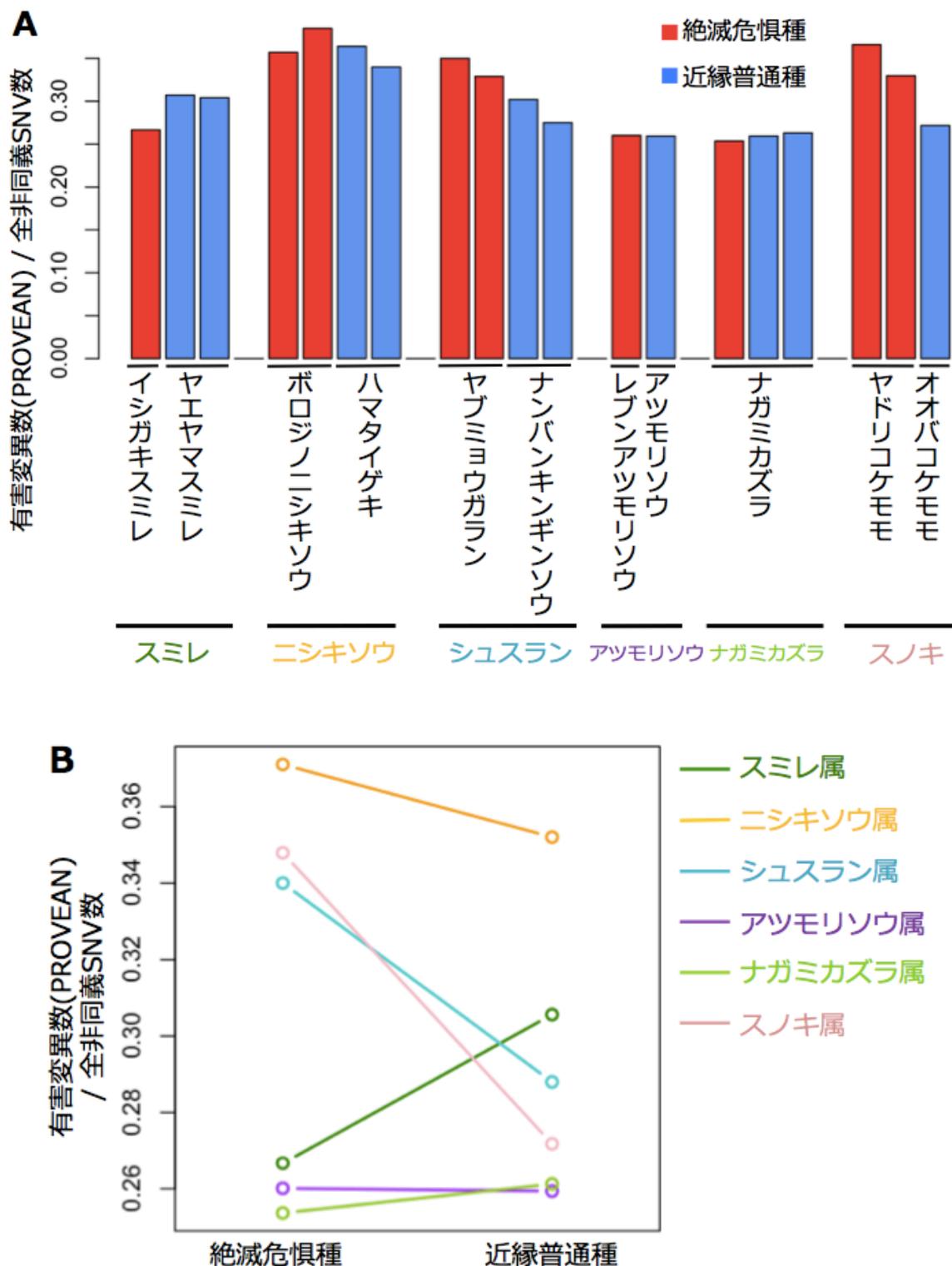
ナガミカズラは国内では西表島に1クローンのみ存在しており、遺伝的多様性の低下が予想されたが、比較集団との大きな差は観察されなかった。サブテーマ1の系統解析により、西表島のナガミカズラは台湾の集団と近く、遺伝的分化は浅いことが分かっている。1クローンのみであるものの、ごく最近の移入であるため、遺伝的多様性が低下していないと考えられる。



図(2)-11 ヘテロ接合座位数(SNVs数)

2) 有害変異の蓄積

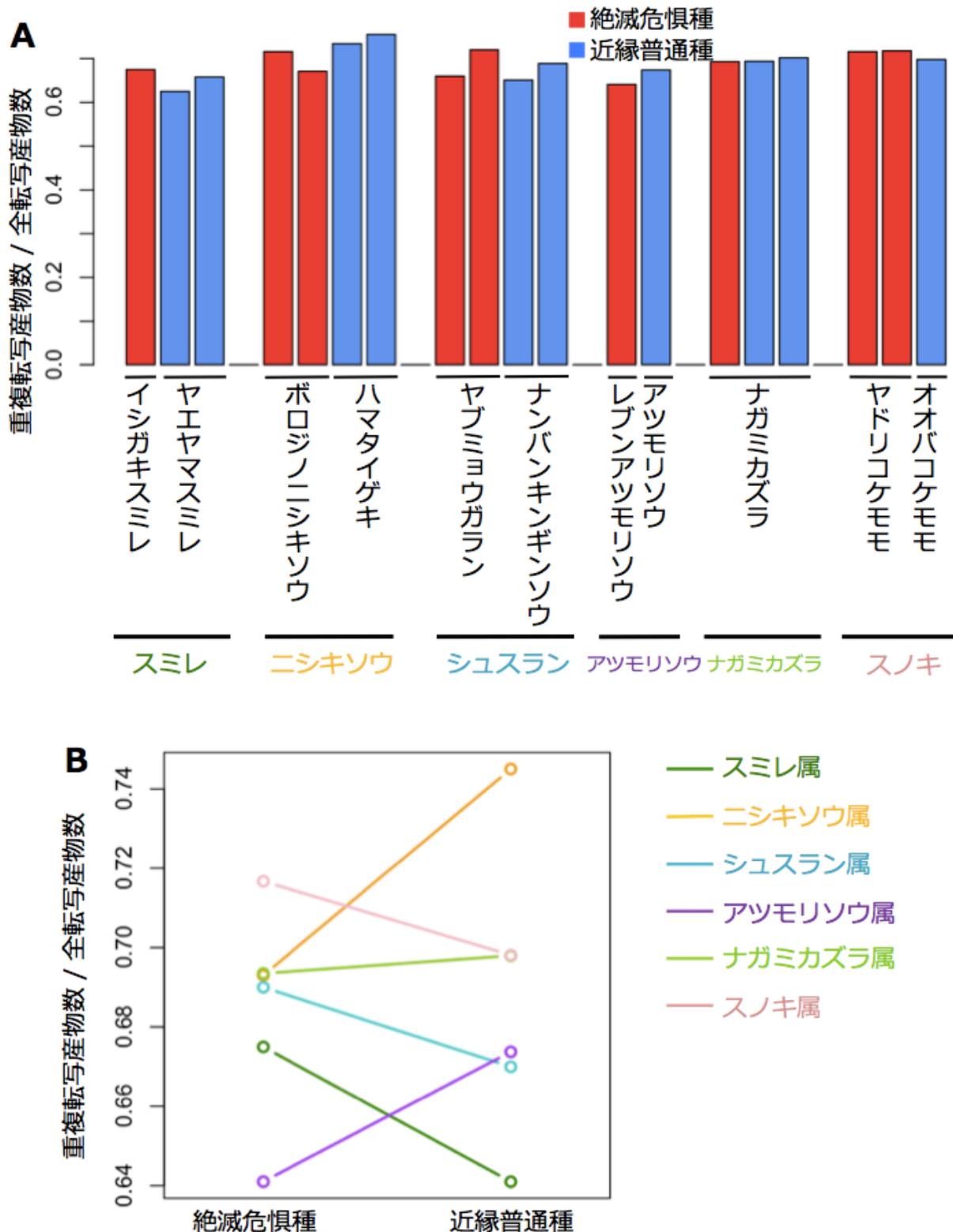
遺伝的多様性の低下が観察されたヤブミョウガランとヤドリコケモモでは有害変異の蓄積が観察されたが、隔離個体群で一貫した有害変異の蓄積は観察されなかった(図(2)-12)。また、全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合、全非同義置換に対するナンセンス変異の割合についても同様の傾向が観察された。



図(2)-12 有害突然変異の割合

3) ゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合

それぞれの種について P_D を求めた結果、ボロジノニシキソウ、レブンアツモリソウ以外では、絶滅危惧種で P_D が高い傾向は観察されなかった(図(2)-13)。ボロジノニシキソウ、レブンアツモリソウは遺伝的多様性の低下が観察されていないため(図(2)-11)、 P_D 値が低いということのみで、これらの種の環境適応能力が低下していると言及するのは難しい。その他の隔離集団においては比較種、比較集団と P_D に大きな差がなく、隔離集団の多くは環境変化に対する頑健性が低下していないことが示された。



図(2)-13 重複遺伝子の割合

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

次世代シーケンサーによるゲノムワイドな情報とバイオインフォマティクスを用いた網羅的解析により、各指標を得るための大規模ゲノム解析について改善を重ね、順次新たな対象種を追加して解析可能なパイプラインを構築した。さらに、解析した結果から、絶滅危惧種が同属普通種と比べて狭い分布域において、少数個体で集団維持を続けていることによる影響と、すでに個体数の回復が難しい状況を反映した結果が各指標に表れており、ヘテロ接合座位数、有害変異蓄積、重複遺伝子の割合による、絶滅危惧種における遺伝的多様性の低下と環境変化への脆弱性の評価指標としての有効性が示された。一方で、広い分布を持つ種の中で孤立した集団が絶滅危惧種の指定を受けているケースでは、必ずしもゲノムの脆弱性が観察されず、個体数回復の可能性が示された。

今後これらの指標の総合的評価と種の生育情報を合わせ、保護対象種の選定において優先度を付与するなど基準の構築にも活用できる。絶滅危惧植物のゲノム評価のまとめを表(2)-2に示す。

表(2)-2 絶滅危惧植物のゲノム評価まとめ

分類*	属名	絶滅危惧種	遺伝的多様性	有害突然変異	重複遺伝子
(1)	キラソウ	シマカコソウ (倍数体)	低	蓄積	少
(1)	アゼトウナ	コヘラナレン ユズリハワダン ヘラナレン	低 低 低	蓄積 蓄積 蓄積	少 一部少 少
(1)	エビネ	ホシツルラン	低	蓄積	少
(1)	ノボタン	ムニンノボタン	低	蓄積	少
(2)	サクラソウ	カッコソウ シコクカッコソウ	高 高	一部蓄積 一部蓄積	少 少
(2)	スマレ	オキナワスマレ (倍数体)	高	差なし	差なし
(2)	セッコク	オキナワセッコク	低	蓄積	差なし
(2)	ツツジ	ムニンツツジ	低	蓄積	差なし
(3-1)	シュスラン	ヤブミョウガラン	低	蓄積	差なし
(3-1)	ニシキソウ	ボロジノニシキソウ	高	一部蓄積	少
(3-1)	スマレ	イシガキスマレ	差なし	差なし	差なし
(3-2)	アツモリソウ	レブンアツモリソウ	差なし	差なし	少
(3-2)	ナガミカズラ	ナガミカズラ	差なし	差なし	差なし
(3-2)	スノキ	ヤドリコケモモ	低	蓄積	差なし

* (1)小笠原諸島希少種、(2)本土・沖縄列島希少種、(3-1)地域個体群、(3-2)地域個体群の集団間比較

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

日本に生育する絶滅危惧種または隔離個体群について、同属近縁普通種とのゲノムワイドな遺伝的多様性、有害変異蓄積、および、重複遺伝子含有量 P_D を比較し、種の保存法指定種および絶滅危惧種としての位置づけの評価検討に資する情報の収集を行った。

小笠原諸島の絶滅危惧種は、すべての指標（遺伝的多様性、有害変異蓄積、 P_D ）においてゲノム脆弱性が示されており、これらの種を対象とした保護活動の促進が急務であることが分かった。小笠原諸島固有の絶滅危惧植物の保全活動について、現在、域外保全が行われているのはホシツルラン、ムニンノボタン、ムニンツツジのみである。ゲノム脆弱性評価から、域外保全などの保全管理を促進する小笠原諸島絶滅危惧種の対象を広げる検討が必要だと考えられる。域外保全が行われているムニンツツジは遺伝的多様性と有害突然変異の蓄積が観察された一方で、環境適応力の指標である P_D は低下していなかった。このことは、ムニンツツジの個体数回復は、ホシツルランやムニンノボタンよりも難易度が低い可能性が考えられる。こうした結果を踏まえて絶滅危惧種の保護活動の優先順位を決めることで効率

的な保全活動の実現が期待される。

小笠原諸島以外の絶滅危惧種では普通種と比較して必ずしも遺伝的多様性が低い傾向になかった。遺伝的多様性は、個体数の減少や他集団からの隔離により急速に減少しうることに関与していると考えられる。また、小笠原諸島以外の絶滅危惧種は有害変異が蓄積している傾向が観察されたが、低 P_D が観察されることは稀であった。小笠原諸島のような海洋島では、種の生存競争がマイルドであるため適応力の低い種でも長期間に渡り種の存続が可能である一方で、大陸では生物種の生存競争が激しく、より厳しい自然選択に晒されていると考えられる。そのため、小笠原諸島以外の絶滅危惧種種では、小集団化していく過程において、 P_D が低下する前に絶滅に至るケースが多く、普通種と絶滅危惧種との比較の際に P_D の相違が検出されにくいと考えられる。以上のことから、環境政策判断を行うにあたり、まず、有害突然変異の蓄積に注視することで、保全対象とすべき種の候補を選定することが重要である。さらに、遺伝的多様性や P_D の低下が観察された絶滅危惧種においては、すでに域内保全による個体数回復が困難となっている可能性が考えられ、早急に域外保全や現地替え保全など他の保全策と合わせて運用し、保全管理を推進する必要がある。

近縁普通種からの分岐が浅い希少種や広域に生息する集団から隔離された個体群の多くは、ゲノム脆弱性の低下が観察されなかった。多くの隔離個体群では、生息地の環境を整える域内保全を行うことで十分に個体数を増やすことが期待できる。

6. 国際共同研究等の状況

- 1) ウプサラ大学（スウェーデン）のMatthew Webster博士らとの共同研究で、栽培化の過程で小集団化した植物において有害変異が蓄積していることを示した。本国際共同研究により、絶滅危惧植物で有害変異が蓄積していることを検証する重要な根拠となる成果を得た。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) T. HAMABATA, G. KINOSHITA, K. KURITA, P.-L. CAO, M. ITO, J. MURATA, Y. KOMAKI, Y. ISAGI and T. MAKINO: *Commun. Biol.*, 2, 244 (2019), Endangered island endemic plants have vulnerable genomes.
- 2) T. MAKINO and M. KAWATA: *Mol. Ecol.*, 28, 7, 1652–1663 (2019), Invasive invertebrates associated with highly duplicated gene content.
- 3) T. MAKINO, C.J. RUBIN, M. CARNEIRO, E. AXELSSON, L. ANDERSSON and M.T. WEBSTER: *Genome Biol. Evol.*, 10, 1, 276–290 (2018), Elevated proportions of deleterious genetic variation in domestic animals and plants.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 牧野能士：日本生態学会第66回全国大会（2019）
「絶滅危惧植物ゲノムの脆弱性評価」
- 2) 牧野能士：ワークショップ「NGSデータの多彩な活用」（2017）
「家畜種・栽培種・絶滅危惧種のゲノムに蓄積する有害突然変異」
- 3) 浜端朋子、牧野能士：日本生態学会第64回全国大会（2017）

「絶滅危惧植物における遺伝的多様性の低下と有害変異の蓄積」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 宮城県仙台第二高等学校における特別授業で講演「遺伝子重複による生物の進化」(2017年12月14日、聴講者約60名)
- 2) 栃木県國學院栃木高校における特別授業で講演「遺伝子重複による生物の進化と適応」(2016年6月18日、聴講者約30名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 東北大学プレスリリース(2019年2月27日、「ゲノム情報から侵略的外来種を予測 ～生態系被害防止への応用に期待～」)

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) T. MAKINO, C.J. RUBIN, M. CARNEIRO, E. AXELSSON, L. ANDERSSON and M.T. WEBSTER: *Genome Biol. Evol.*, 10, 1, 276–290 (2018)
Genome Biology and Evolution. Elevated proportions of deleterious genetic variation in domestic animals and plants
- 2) T. Makino and M. Kawata: *Mol. Biol. Evol.*, 29, 10, 3169–3179 (2012)
Habitat variability correlates with duplicate content of *Drosophila* genomes
- 3) C.S. Tamate, M. Kawata and T. Makino: *Mol. Biol. Evol.*, 31, 7, 1779–1786 (2014)
Contribution of non-ohnologous duplicated genes to high habitat variability in mammals
- 4) T. Makino and M. Kawata: *Mol. Ecol.*, 28, 7, 1652–1663 (2019)
Invasive invertebrates associated with highly duplicated gene content
- 5) M. YOKOTA, S. HIGA, H. YOSHIOKA and K. SHIMABUKU: *Bot. Mag. Tokyo*, 101, 1, 1–8 (1988)
Viola stoloniflora (Violaceae), a new species from the Ryukyus
- 6) T. FUNAMOTO and D. ISHII: *Chromosome Sci.* 7, 3, 91–98 (2003)
Comparative karyological studies in ten *Ajuga* species in Japan, Lamiaceae (Labiatae)

II-3 絶滅危惧種を構成する残存集団のデモグラフィー解析

筑波大学生命環境系

津田 吉晃

平成28～30年度累計予算額：10,756千円

(うち平成28年度：3,646千円、平成29年度：3,646千円、平成30年度：3,464千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

集団遺伝学的解析の発展により、遺伝データから種内あるいは近縁種間での集団分化、二次的混合の時期や有効な集団サイズなどの進化的な集団動態（デモグラフィー）のパラメーターが推定可能となった。また、デモグラフィー推定は対象種の歴史を含めて評価できるため、保全遺伝学的においても対象種の保全を講じる上で非常に重要な情報となる。次世代シーケンサー技術などの発展により、1塩基多型(SNP, single nucleotide polymorphism)の大量取得も可能となり、従来の保全遺伝学が保全ゲノミクスとも呼ばれるようになった昨今、保全対象種の遺伝情報を用いた研究はさらに発展している。そこで本サブテーマでは絶滅の危機に瀕している種の保存法の対象種6種および各対象種の近縁の普通種を対象に種間の遺伝的關係、種内の地域系統間の評価およびこれらの分化時期や分化してからの有効な集団サイズの変動など集団動態（デモグラフィー）の推定をおこなった。特に1) 中立な遺伝子座の選抜、2) 遺伝構造の評価、3) デモグラフィー推定の3ステップを中心に各種で解析を行った。またRAD-seqなどのデータ解析は未だに確立されていない部分が多いため、データ解析の確立もあわせて行った。大きな成果としては、各対象種について集団分化時期などだけでなく、各種の地域集団の時間軸に沿った有効集団サイズの減少傾向を明らかにしたことである。特にカッコソウではこの傾向が顕著であった。但し、この有効集団サイズの減少は種の保存法対象種以外でも見られたパターンであり、種の保存法対象種がもつ隔離分布などだけが有効集団サイズの減少の要因でないことも示され、種のもつ遺伝構造は進化的複雑さにより形成されていることも考慮する必要があることも示された。

[キーワード]

中立・非中立な変異、SNP、デモグラフィー、有効な集団サイズ

1. はじめに

生物種はこれまでの長い歴史の中で、山岳や河川・島嶼形成などの数々の地史的イベントや氷期～間氷期などの気候変動により、分布を移動し、また環境に適応することで現在の分布を形成している¹⁾。これらの歴史の中で新たな種が形成された一方、絶滅した種もある²⁾。ここで、絶滅の危機に瀕しているような種の保存法の対象種が現在、有効な集団サイズの時空間的変動などを含めて、どのような進化生物学的な状況にあるのかを評価することは、生物多様性保全の観点から重要である。

遺伝的変異には環境選択の影響をうける適応的な変異と、選択の影響をうけず、遺伝構造は突然変異、遺伝的浮動、移住などのより形成される中立な変異の2つに大別できる³⁻⁶⁾。一般的に遺伝構造やデモグラフィー推定は中立な遺伝子座を用いて集団の歴史を評価するため⁶⁾、これら2つの種類のデータが混在しているデータで遺伝構造や集団デモグラフィーを推定すると、結果に大きくバイアスを受けることが予想される。そこで、まずはRAD-seq (restriction-based short-read sequencing)から得られるSNP遺伝子座から遺伝構造、デモグラフィー推定に適した遺伝子座を慎重に選抜する必要がある。RAD-seqはじめゲノム上のSNPをランダムに検出する方法では、中立性を仮定できないSNPも検出される。これが適応的な遺伝的変異の評価に発展できるというRAD-seqなどの長所である一方、中立性を仮定した遺伝解析を行う場合には、非中立な遺伝子座が結果に大きなバイアスとなり、誤った考察、保全策の提案をする恐れがある⁴⁻⁸⁾。さらには遺伝構造や集団デモグラフィーの影響を受けて、本来は中立で説明でき

る遺伝子頻度の挙動を“選択の影響”と誤判断してしまうこともわかってきた⁹⁾。さらにRAD-seqなどの縮約されたゲノム情報由来の遺伝子型情報を用いる場合の欠損データの取り扱いについても系統的視点、集団遺伝学的視点から昨今広く議論されている¹⁰⁻¹⁵⁾。本サブテーマではこのようなRAD-seqに関連したデータ解析についても検証したうえで、種の保存法対象種の集団デモグラフィーを推定した。

2. 研究開発目的

本研究の目的は種の保存法対象種の過去の地域系統への分化、二次的混合、遺伝子流動、有効な集団サイズの時間的変動などのデモグラフィーを推定することである。但し、この推定のためには複数のデータ解析のステップがあり、具体的には1) 中立な遺伝子座の選抜、2) 遺伝構造の評価、3) デモグラフィー推定の3ステップを中心に各種で解析を行った。

3. 研究開発方法

(1) 対象種

本研究では毎年、種の保存法対象種6種およびこれら各種について、属内近縁種も1-2種供試し、種の保存法対象種およびそうでない種での遺伝的多様性、遺伝構造、デモグラフィーを推定し、比較した。対象とした属・種は下記の通りである。

キク科アゼトウナ属

コヘラナレン：*Crepidiastrum grandicollum*（種の保存法対象種）

ホソバワダン：*C. lanceolatum*

サクラソウ科サクラソウ属

カッコソウ：*Primula kisoana* var. *kisoana*（種の保存法対象種）

シコクカッコソウ：*P. kisoana* var. *shikokiana*

オオサクラソウ：*P. jesoana* var. *jesoana*

トウダイグサ科トウダイグサ属

ボロジノニシキソウ：*Euphorbia sparrmannii*（種の保存法対象種）

ハマタイゲキ：*E. atoto*

シソ科キランソウ属

シマカコソウ：*Ajuga boninsimae*（種の保存法対象種）

ツルカコソウ：*A. shikotanensis*

ヒメキランソウ：*A. pygmaea*

ラン科セッコク属

オキナワセッコク：*Dendrobium okinawense*（種の保存法対象種）

ツツジ科スノキ属

ヤドリコケモモ：*Vaccinium amamianum*（種の保存法対象種）

(2) データ解析

対象種により異なる部分もあるが、本研究では、下記のデータ解析を各対象種で共通して用いた。

1) データフィルタリングおよび選択の影響の評価

まず欠損率が高く、低頻度でしか検出しない多型を持っている遺伝子座は、遺伝構造およびデモグ

ラフィー推定にバイアスになるため、RAD-seqデータからは欠損率（2割まで許容）、低頻度で検出される対立遺伝子の頻度（5%以上のみ許容）も考慮して、データをフィルタリングした。これらについて中立性の検定を行った。当初はヘテロ接合度期待値(H_E) および集団分化度 F_{ST} 値から中立な遺伝子座の分布を推定する方法¹⁶⁾を改変したLOSITAN¹⁷⁾、モデルベースで集団に特異的な中立的変異による動態から、座特異的な適応的遺伝変異による効果を分けるBayeScan¹⁸⁾を用いていたが、これら方法ではデモグラフィなどの影響で選択の影響を誤判断する可能性が高いため⁹⁾、これら方法に加え個体ベースの主座標分析による遺伝構造評価から中立遺伝子座を検出するPCADAPT⁹⁾も用いることにした。

2) 遺伝的多様性および遺伝構造の評価

遺伝的多様性はヘテロ接合度期待、多型的遺伝子座割合、アレリックリッチネス¹⁹⁾を用いて評価した。集団あたりの個体数がある程度ある場合は固定指数(F_{IS})も算出し、任意交配からの偏りについても評価した。集団分化程度は F_{ST} ²⁰⁾を用いて評価し、種間、種内集団間および集団内個体間の分子分散分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)²¹⁾も用いた。いずれの場合も用いたマーカーの多型性の影響を考慮した F'_{ST} ²²⁾などの補正值を用いた。これら解析などには主にGenAlEx6.5²³⁾を用いた。また遺伝構造評価は主にSTRUCTURE解析²⁴⁾および個体間の遺伝距離に基づく主座標分析²³⁾を用いた。またカッソウについては個体位置データも取得できたため、個体間血縁度を用いて集団内の空間遺伝構造も評価した。

3) デモグラフィの推定

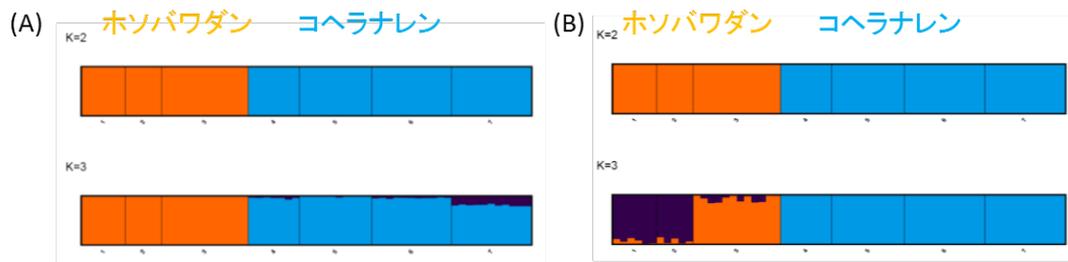
種間、種内集団間のデモグラフィは集団動態シナリオを近似ベイズ計算(Approximate Bayesian Computation, ABC)を用いたDIYABC2.0^{25, 26)}により推定した。さらに時間スケールにおける有効な集団サイズ変動は拡張ベイズスカイランプロット(Extended Bayesian Skyline Plot)およびStairway plot²⁷⁾を用いて評価した。前者では先行研究²⁸⁾を参考にRAD-seqデータからSNPが検出された元の塩基配列データを用いて、1遺伝子座あたり4SNP以上を含む多型的な遺伝子座のみ供試した。後者はsite frequency spectrum (SFS)を用いた。さらに集団分化、遺伝子流動については日々内容が更新されているDadi²⁹⁾を用いて評価した。また集団間の方向性のある遺伝子流動についてはdivMigrate³⁰⁾も用いて評価した。

4. 結果及び考察

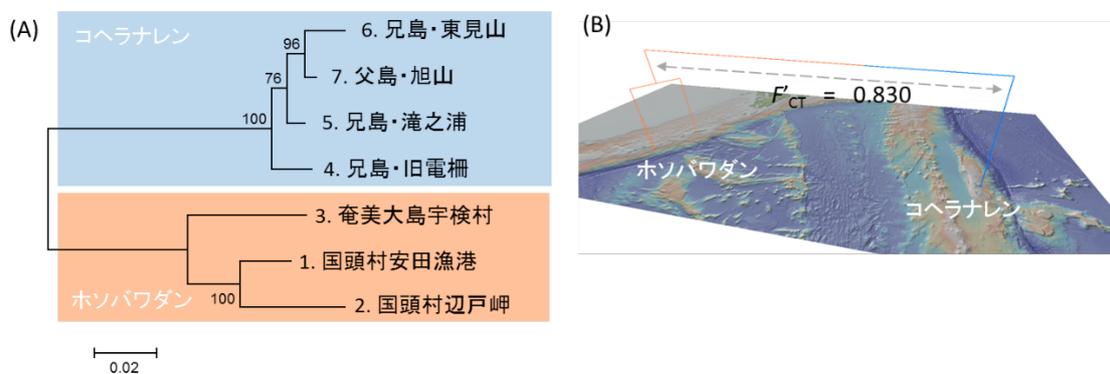
(1) コヘラナレン・ホソバワダン

欠損率（2割まで許容）、低頻度で検出される対立遺伝子の頻度（5%以上のみ許容）も考慮して、データをフィルタリングした。その結果、3120 SNP遺伝子座を検出でき、これらについて中立性の検定を行った。ここでは選択の影響を検出する3つの方法で1回でも非中立となった693 SNP遺伝子座については誤ったデータ解釈を避けるためにデータから外し、残りの2427 SNP遺伝子座を中立な遺伝子座と仮定した。

試験的に行った2427 SNP遺伝子座を用いたデータ解析では多くの遺伝子座がコヘラナレンとホソバワダンの種間の多型であり、種内多型は多くなく、このために遺伝子座間の“みかけ上”の連鎖不平衡が非常に強くなってしまうことがわかった。特に遺伝構造推定で最もよく使われているSTRUCTURE解析では連鎖不平衡下にある遺伝子座の供試は大きなバイアスとなる。実際に本2427 SNP遺伝子座でも $K=2$ のときには種間で異なるクラスターが検出されたが、 $K=3$ では3つ目のクラスターが検出されなかった。これは遺伝的に分化した種間の連鎖不平衡および種内多型不足によると考えられた(図(3)-1A)。そこで連鎖不平衡下にある遺伝子座はデータから外すことにした。その結果、666 SNP遺伝子座が残り、 $K=3$ で3つ目のクラスターは検出でき、集団系統樹でも各種各集団の地理的位置を反映した集団構造が検出されたが(図(3)-1B)、種内多型が少なくなってしまうため、 $K=4$ 以降でのクラスタリングはうまくできなかった。



図(3)-1 ホソバワダン3集団およびコヘラナレン4集団のSTRUCTURE解析の結果。2427 SNP遺伝子座によるかいせきでは連鎖不平衡と種内多型不足で $K = 3$ で遺伝構造が検出されない(A)。一方、連鎖不平衡を考慮した666 SNP遺伝子座では $K = 3$ でもホソバワダン沖縄本島に対応するクラスターが検出された(B)。



図(3)-2 2種7集団の集団系統樹(A)および集団系統樹を地図上に示した図(B)

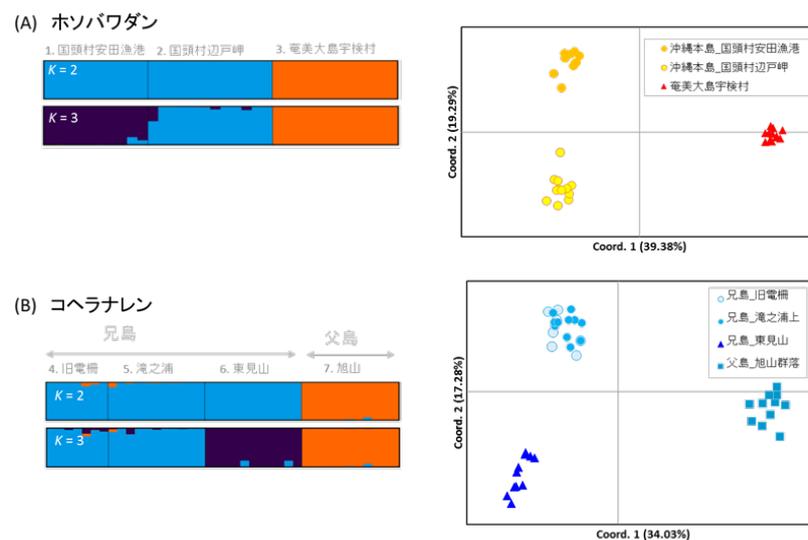
種間、種内集団間および集団内個体間のAMOVAの結果、666遺伝子座では種間の遺伝的変異および種内集団間の遺伝的変異は全変異のそれぞれ26%および10%であり、残りの64%は集団内個体間にあることがわかった。一方、2427遺伝子座を用いた場合のAMOVAでは、種間の遺伝的変異および種内集団間の遺伝的変異は全変異のそれぞれ62%および8%であり、残りの30%が集団内個体間にみられた。特にAMOVAの種間変異について多型性を考慮した F_{CT} (0から1の値をとり1に近いほど遺伝的分化が高い) で評価すると2427遺伝子座、666遺伝子座ではそれぞれ0.830および0.363であり、特に2427 SNP遺伝子座の場合は種間変異が非常に大きいことがわかった(図(3)-2)。種間でみられた連鎖不平衡は実際には独立した遺伝子座がいずれも種間でのみ多型を示したために検出された見かけ上の連鎖不平衡と考えられるため、実際の中立的な種間変異は2427 SNP遺伝子座の方がより真の値に近いと思われる。一方、このように遺伝的に分化した2種を対象にRAD-seqを行う場合は、殆どの多型が種間で検出されてしまい、片方の種内で多型があるがもう一方の種ではRAD-seqの制限酵素処理の都合でそもそも遺伝データが得られず欠損となってしまう遺伝子座が多く含まれるため、種間で多型を共有している大量SNP遺伝子座の検出は難しいことがわかった。そのため、種内の遺伝構造を詳細に評価するために、それぞれの種ごとにRAD-seqデータを分けて、再度SNP遺伝子座の検出、中立性、連鎖不平衡の評価を行いデータのフィルタリングを行った。その結果、ホソバワダンでは1650 SNP遺伝子座、コヘラナレンでは1319 SNP遺伝子座の遺伝構造評価およびデモグラフィック推定に適したSNP遺伝子座を獲得することができた。

ホソバワダン3集団 (1650 SNP遺伝子座) およびコヘラナレン4集団の (1319 SNP遺伝子座) で遺伝的多様性を評価したところ、種間で遺伝的多様性に明確な差異は見られなかった(表(3)-1)。ただしホソバワダンの奄美大島宇検村、コヘラナレンの兄島・東見山および父島・旭山の3集団は他よりも低い遺伝的多様性が検出された。両種内の遺伝構造について主座標分析およびSTRUCTURE解析を行ったとこ

る、両種ともに島ごと、さらに集団ごとに明確な遺伝構造が検出された(図(3)-3)。但し、コヘラナレン兄島の旧電柵と滝ノ上は実際には地理的にかなり近い集団であることもあり、これら2集団は明確には分化していなかった。種内集団間の多型性を考慮したホソバワダンおよびコヘラナレンの集団分化指数である F_{ST} (0から1の値をとり1に近いほど遺伝的分化が高い)は0.323および0.267であり、両種ともに比較的高い集団分化がみられた。普通種のホソバワダン(沖縄本島~奄美大島)でコヘラナレン(兄島~父島)よりも高い集団分化がみられたのは対象集団間の地理的距離も関係していると考えられる。国内で広域に分布するカバノキ科のウダイカンバ(*Betula maximowicziana*)⁷⁾では全国集団でも F_{ST} は0.069であることから、特にコヘラナレンも兄島一父島含めても10kmに満たない地域内集団で F_{ST} が0.267という値は集団分化が強く、遺伝的浮動の影響が大きいといえる。

表(3)-1 RAD-seq解析に用いた各集団の個体数および遺伝的多様性

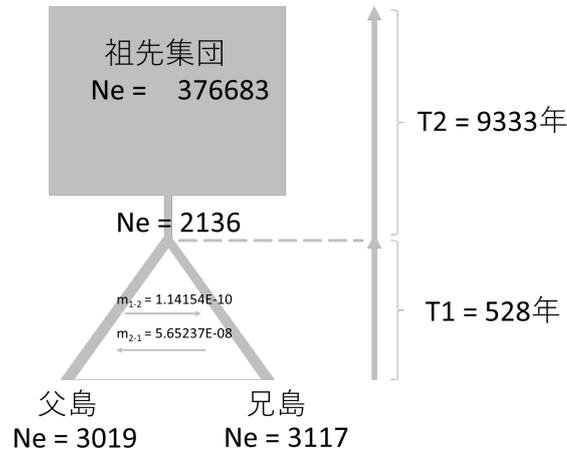
集団名	個体数	多型的遺伝子座の割合 (%)	ヘテロ接合期待値 (H_E)
ホソバワダン (1650 SNP遺伝子座)			
1. 国頭村安田漁港	10	72.18	0.257
2. 国頭村辺戸岬	12	74.97	0.260
3. 奄美大島宇検村	12	59.94	0.206
コヘラナレン (1319 SNP遺伝子座)			
4. 兄島・旧電柵	7	76.57	0.270
5. 兄島・滝之浦	11	82.34	0.267
6. 兄島・東見山	11	53.75	0.201
7. 父島・旭山	11	63.15	0.229



図(3)-3 ホソバワダン (A : 1650SNP遺伝子座) およびコヘラナレン (B : 1319SNP遺伝子座) のSTRUSTRUCTURE解析 (左) および主座標分析 (右) で評価した遺伝構造。

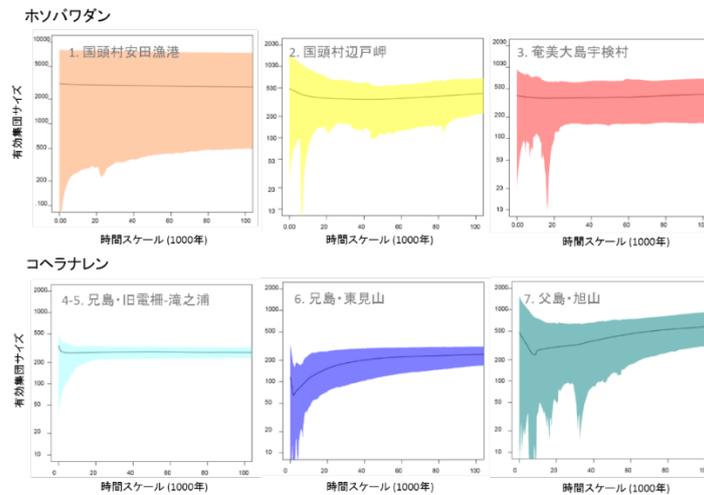
ホソバワダン—コヘラナレンの種間のデモグラフィック推定については、中立とされた2427SNP遺伝子座を用いて2種間の分化時期を推定した。推定には近似ベイズ計算(ABC, Approximate Bayesian computation)をベースとしたDIYABC2.0を用いた。その結果、2種間の分化時期は1770世代前と推定された。DIYABCでは集団分化以降の種間遺伝子流動は考慮していないが、2種間の F_{CT} は0.830と非常に高いため、実際に種間遺伝子流動は低く、分化時期が多少過小評価となっている可能性はあるが実質的にその影響は少ないと考えられる。実際にdivMigrateでは種間での遺伝子流動は検出されなかった。さらにコヘラナレン内の父島および兄島のデモグラフィック推定したところ、約1万年程度まで遡る共通祖先集団の有効集団サイズ(N_e)は、現在の父島、兄島のそれに比べ、かなり大きかったことがわか

った(図(3)-4)。またこれら2集団は約500年前に分化し、現在島間での遺伝子流動は方向性に関係なくほぼ0であり、これは集団間で遺伝子流動が検出されなかったdivMigrateの結果とも一致した。



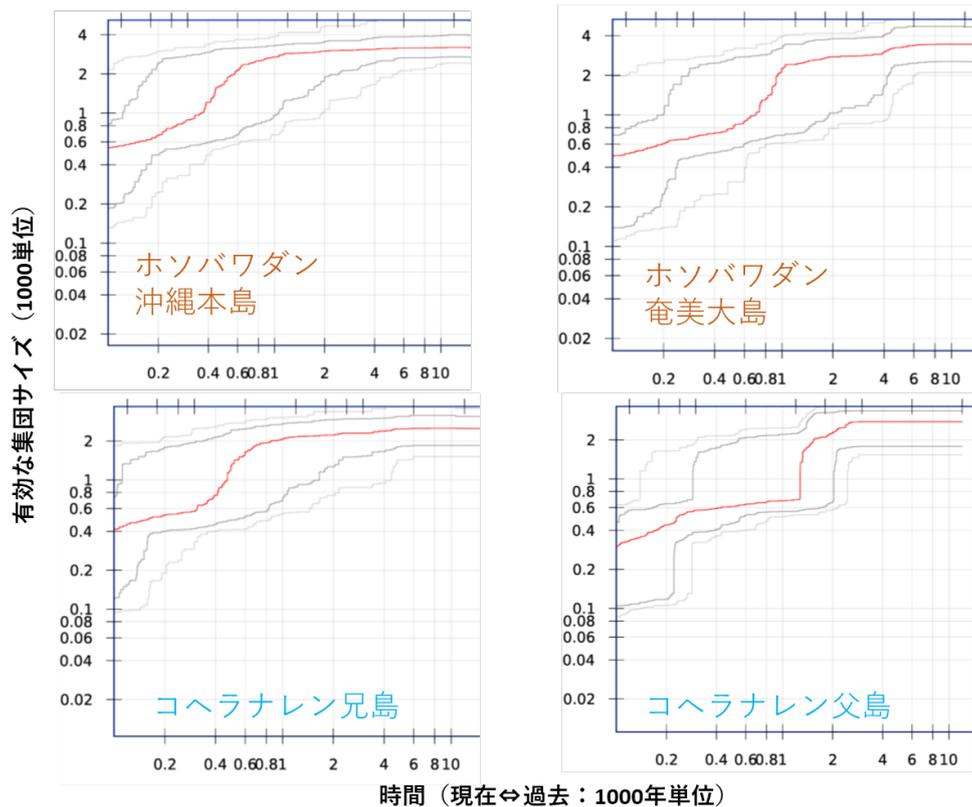
図(3)-4 Dadiで推定したコヘラナレン2島集団のデモグラフィの歴史

各集団の詳細な歴史については、時間軸上に有効集団サイズの変動を示すスカイラインプロット³¹⁾を改変した拡張ベイズスカイラインプロット(Extended Bayesian Skyline Plot, EBSP)³²⁾をRAD-seqデータに応用して行った。しかし、明確なパターンは推定できなかった(図(3)-5)。



図(3)-5 ホソバワダンおよびコヘラナレン各集団の拡張ベイズスカイラインプロット(EBSP)の結果。色付の範囲は95%中央事後確率密度(信頼区間に相当)を示す。

そこでStairway Plotを用いて評価したところ、より明確なパターンが推定された(図(3)-6)。ここでは種、集団に関わらず、集団減少のパターンがみられた。これは本解析法の原著論文で推定されている最近の有効な集団サイズがみられるヒトのパターンとは対照的であった。さらに両種ともに集団減少パターンがみられたが、有効な集団サイズに着目すると、ホソバワダンはコヘラナレンに比べ、やや大きな値であった。



図(3)-6 ホソバワダン、コヘラナレンのStairway Plotのパターン

(2) カッコソウ・シコクカッコソウ・オオサクラソウ

群馬県鳴神山のみに分布する種の保存法対象種のカッコソウを対象に、比較対象としてシコクカッコソウ2集団(愛媛県)、オオサクラソウ(新潟県佐渡島)も供試した。カッコソウについてはすでに核DNAマイクロサテライトマーカーを用いた先行研究で把握している27ジェネットを対象とした。SNP検出の結果、これら計4集団で共通して遺伝的変異性を評価できる1338 SNP遺伝子座を検出できた。遺伝的多様性についてはカッコソウの多型的遺伝子座割合、ヘテロ接合度期待値は近縁種であるシコクカッコソウよりやや低く、固定指数は逆にやや高い傾向を示し、カッコソウ集団は遺伝的多様性が減少し、近親交配もシコクカッコソウよりも進んでいることが示唆された(表(3)-2)。但し、オオサクラソウの遺伝的多様性はこれら3集団よりも明らかに低い一方、固定指数は任意交配を示唆した。この結果についてはオオサクラソウの佐渡島集団の歴史に加え、後述のように遺伝的分化が高い集団間でSNP検出を行ったため、オオサクラと他種他集団との間で多型のあるSNPを多く研究し、総じて、オオサクラソウ集団内の多型を検出できなかった可能性もある。

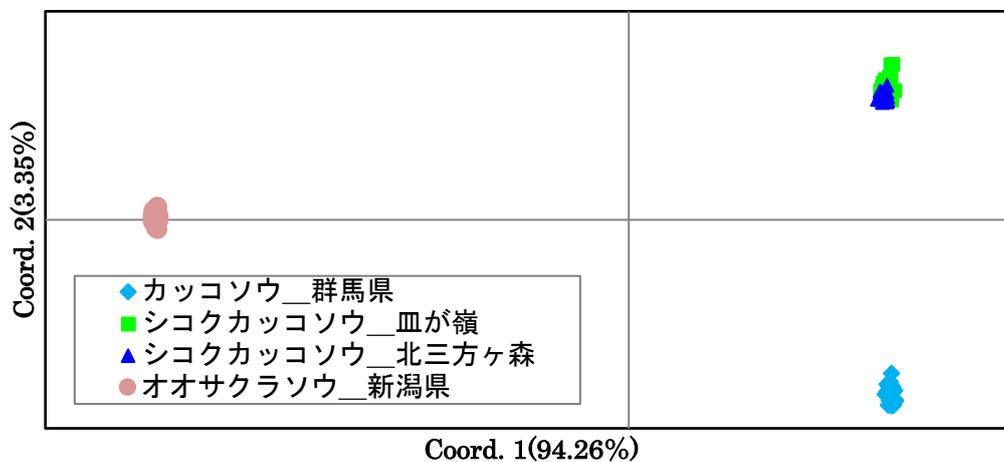
表(3)-2 サクラソウ属4集団の遺伝的多様性

	多型的遺伝子座の割合(%)	ヘテロ接合度期待値(H_E)	固定指数(F_{IS})
カッコソウ (27 個体)	22.50	0.073	0.142
シコクカッコソウ 皿が嶺 (18 個体)	24.89	0.083	0.130
シコクカッコソウ 北三方ヶ森 (19 個体)	25.19	0.084	0.122
オオサクラソウ (20 個体)	8.89	0.035	0.027

これらサクラソウ属4集団の F'_{ST} は0.799であり、総当たりでみるとオオサクラソウはカッコソウおよびシコクカッコソウから非常に大きく分化しており($F'_{ST} < 0.9$)、シコクカッコソウとカッコソウのペアも F'_{ST} が0.4台とある程度遺伝的に分化していることがわかった(表(3)-3)。これらに比べ、シコクカッコソウの2集団間の遺伝的分化は小さかった。これらパターンは主座標分析でもみられた(図(3)-7)。

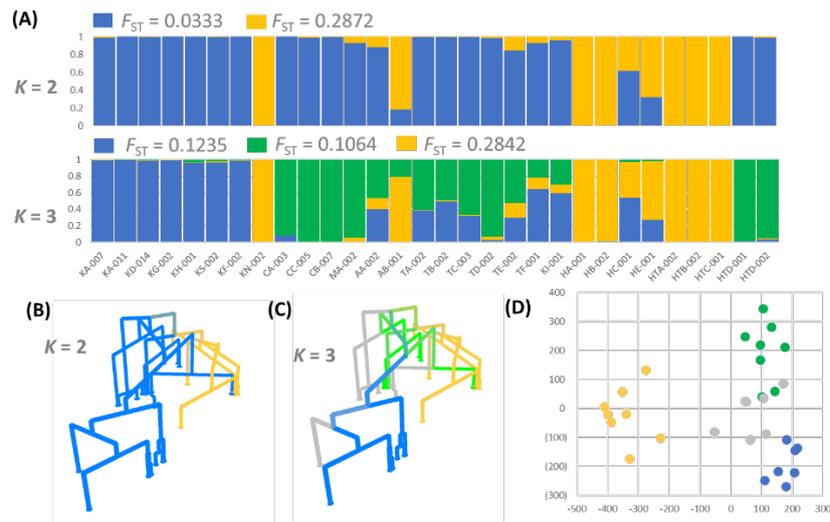
表(3)-3 カッコソウ属 4集団の総当たり F'_{ST}

	1. カッコソウ	2. シコクカッコソウ (皿が嶺)	3. シコクカッコソウ (北三方ヶ森)	4. オオサクラソウ
1. カッコソウ	0.000			
2. シコクカッコソウ (皿が嶺)	0.413	0.000		
3. シコクカッコソウ (北三方ヶ森)	0.403	0.082	0.000	
4. オオサクラソウ	0.930	0.931	0.930	0.000



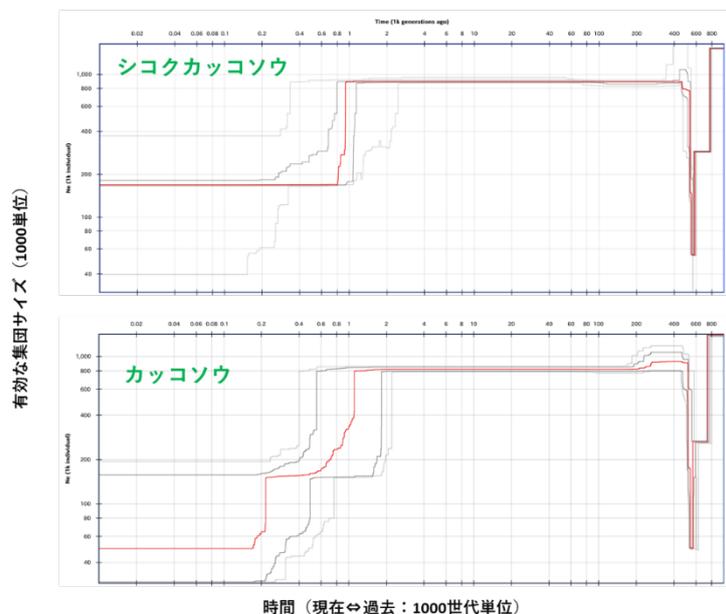
図(3)-7 サクラソウ属4集団の主座標分析

さらにカッコソウ27個体について、STRUCTURE解析でその遺伝構造について詳細に調べたところ、全個体を2つもしくは3つのクラスターに分けたときに、生物学的意味のある明確なクラスタリングがみられた(図(3)-8A)。特にクラスター数を3つにした $K=3$ の場合では、ゲノム組成が青、黄、緑色で示した各クラスターのいずれかに80%以上優占されている個体が大半である一方、これら複数クラスターの混合がみられる個体も6個体みられた。さらにこれらに各個体の位置、個体間血縁度も考慮すると、青、黄、緑色のクラスターはそれぞれ地理的に集中して分布しており、遺伝的に混合がみられた個体はこれら個体の中間的な位置に分布していることもわかった(図(3)-8B-D)。また、これら検出された3つの遺伝グループは3つの沢沿いの分布ともよく一致していた。



図(3)-8 カッコソウ27個体のSTRUCTURE解析の結果(A)、27個体の血縁度遺伝距離および各個体の空間的位置を考慮して作成した系統樹。STRUCTURE解析での $K=2$ および $K=3$ のクラスタリングの色を反映させたものをそれぞれ(B)および(C)に示す。灰色は2クラスター以上の混合がみられた個体を示す。これら27個体の主座標分析の結果を(D)に示す。

カッコソウおよびシコクカッコソウで時間スケールに沿ったデモグラフィーをStairway Plotで推定したところ、両種ともに約1000世代前に集団サイズ減少が検出され、さらにカッコソウについては約200世代にさらに集団サイズ減少がみられ、カッコソウでは2度のボトルネックが検出された(図(3)-9)。2種で共通したボトルネックは1世代を数年とすると数千年前程度、長く見ても1万年程度だと思われるため、おそらく最終氷期最盛期以降の冷温な気候から温暖な気候になった時期に分布を縮小したためと思われる。このような冷温帯に分布する植物のデモグラフィーのパターンは樹木でも議論されており⁷⁾、カッコソウ、シコクカッコソウでも同様のことがいえると考えられる。



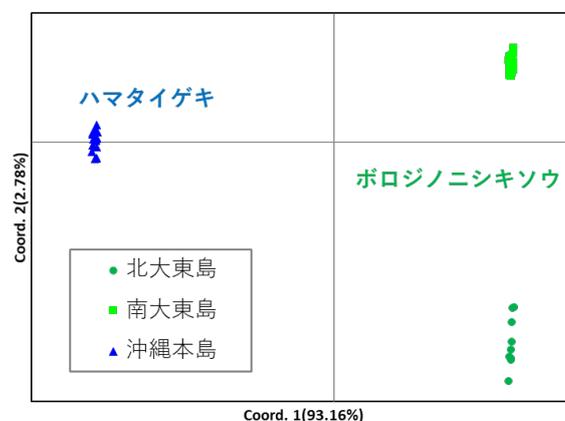
図(3)-9 シコクカッコソウおよびカッコソウのStairway Plotのパターン

これらの結果より、カッコソウおよびシコクカッコソウはいずれも集団サイズの減少を同時期に経験しているという共通点はみられたが、種の保存法対象種のカッコソウはさらに最近のボトルネックを経験していることがわかり、改めて、保全優先度が高いことがわかった。特に本研究で示された3つの

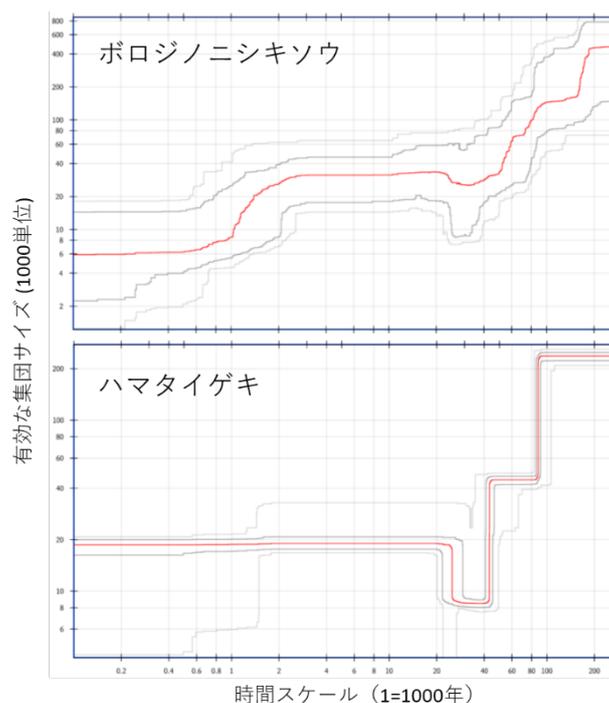
遺伝グループについてはその場所での現地保全が重要であると考えられる。

(3) ボロジノニシキソウ・ハマタイゲキ

ボロジノニシキソウ（北大東島・南大東島の2集団）およびハマタイゲキ（沖縄本島1集団）の計52個体からは4152 SNPが検出され、ハマタイゲキとボロジノニシキソウ2集団の F_{ST} はいずれも0.97以上であり、ほぼ完璧に分化していることがわかった。またボロジノニシキソウ2集団間の F_{ST} は0.527と2集団は10 kmも離れていないにも関わらず2集団間で大きな遺伝的分化がみられた。そのためこれら3集団のデータセットでは明確な遺伝構造がみられ(図(3)-10)、集団間の有効な遺伝子流動も検出されなかった。またStairway plotからは、ハマタイゲキは約8万年前と4万年前に2回の集団減少を経験してから集団サイズは一定である一方、ボロジノニシキソウは約20万年前から2万年前にかけて徐々に集団サイズを減少させ、最近2000年程度でさらに集団サイズが減少していることがわかった(図(3)-11)。また有効な集団サイズをみても、ボロジノニシキソウのそれはハマタイゲキよりも明らかに小さいことがわかった。



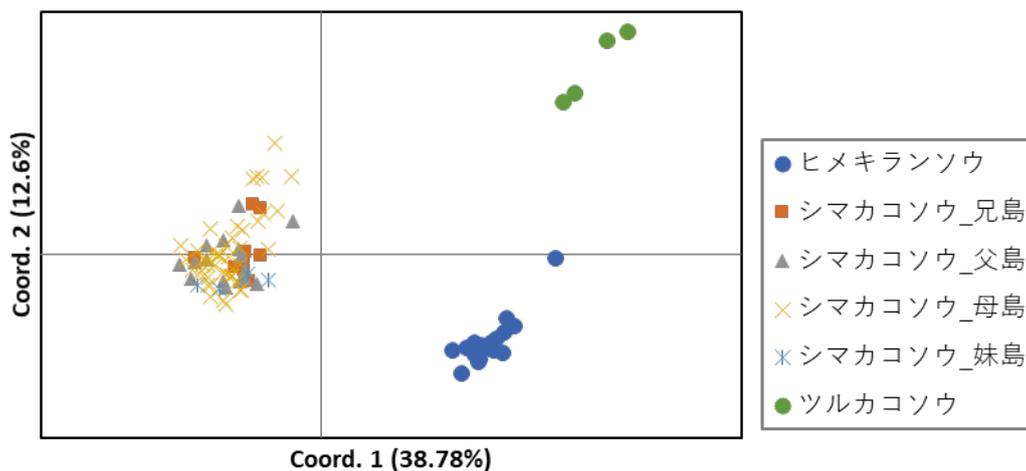
図(3)-10 ボロジノニシキソウ2集団およびハマタイゲキ1集団の主座標分析



図(3)-11 ボロジノニシキソウおよびハマタイゲキのStairway plotのパターン

(4) シマカコソウ・ツルカコソウ・ヒメキランソウ

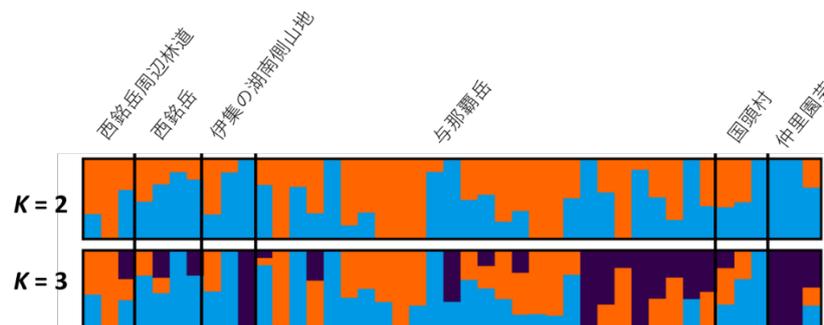
これら3種からは107 SNPが検出され、3種間の F_{ST} は0.7以上あり、明確な遺伝構造が検出された(図(3)-12)。しかし、シマカコソウ4集団については $F_{ST} = 0.065$ (父島-兄島) ~0.204 (妹島-父島) の値をとり、本課題で用いた他種に比べ、遺伝分化はそれほど進んでいないことがわかった。また主座標分析から母島集団は他3集団の遺伝的組成をほぼカバーしていることが示唆された。これについては母島集団からは47個体を供試し、他集団 (4-17個体) よりも倍以上のサンプルを供試したことによるバイアスも考慮する必要があるが、遺伝的多様性保全のためには、母島集団の保全優先度は高いことが分かった。またこれら集団間の遺伝子流動やDIYABCを用いた集団分化時期、有効集団サイズ変動などについて推定を行ったが、要約統計量の観察値と事後分布からの値が一致せず、精度の高い推定はできなかった。



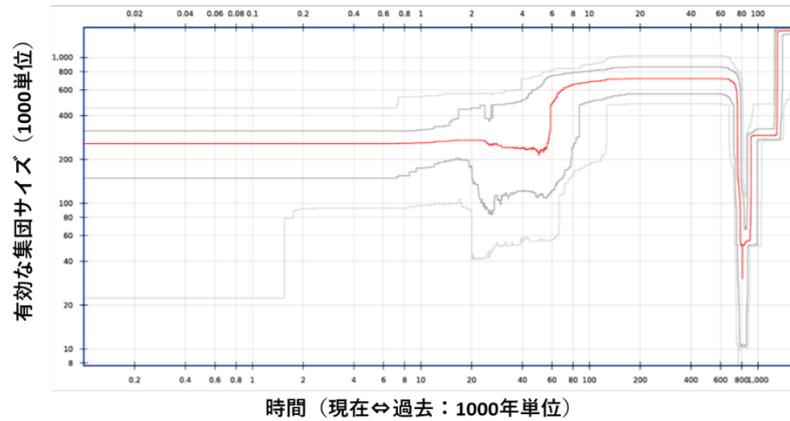
図(3)-12 シマカコソウ、ヒメキランソウおよびツルカコソウの主座標分析からみた遺伝構造

(5) オキナワセッコク

沖縄本島北部の固有種オキナワセッコクは、6集団43個体から2343 SNPが検出された。但し、6集団間に集団分化はみられなかったが($F_{ST} = 0$)、STRUCTURE解析では2つもしくは3つのクラスターは検出された(図(3)-13)。但し、これらクラスターの分布に明確な地理的パターンはみられず、やはり遺伝構造はほとんどないことが示唆された。遺伝構造がないのは、かつてはより連続的に分布していたこと、また現在の分布域は沖縄本島北部と限られた地域であり、その中で十分な遺伝子流動がおこっているためと考えられる。またStairway plotからは約80万年に一度大きな集団減少を経験した後、集団サイズは再度回復し、約6万年前に集団を再度減少して以降の集団サイズは安定していることがわかった(図(3)-14)。特に最近6万年の有効集団サイズは20万個体以上と大きな値が推定された。Stairway plotの有効集団サイズの解釈は難しいが、遺伝構造パターンからもオキナワセッコクは集団間の遺伝子流動も十分にあるため、集団サイズも十分に維持できていると考えられる。



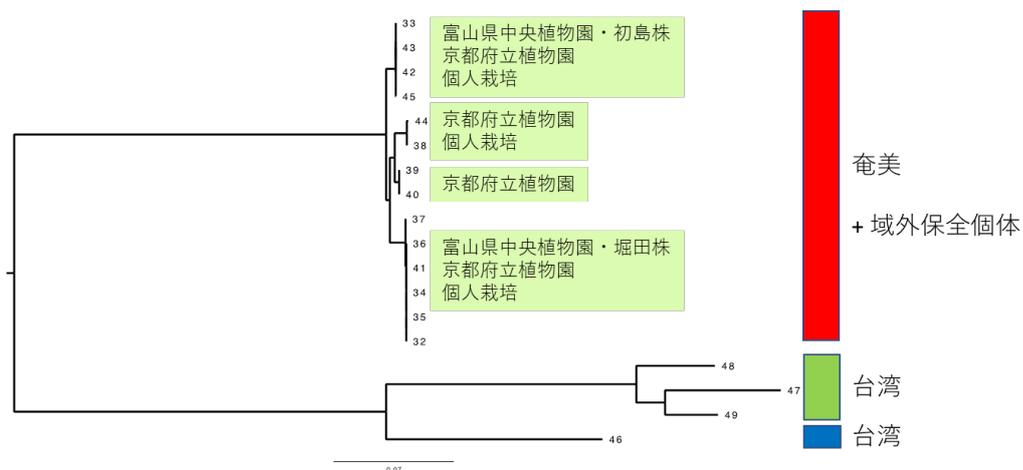
図(3)-13 オキナワセッコク43個体のSTRUCTURE解析の結果



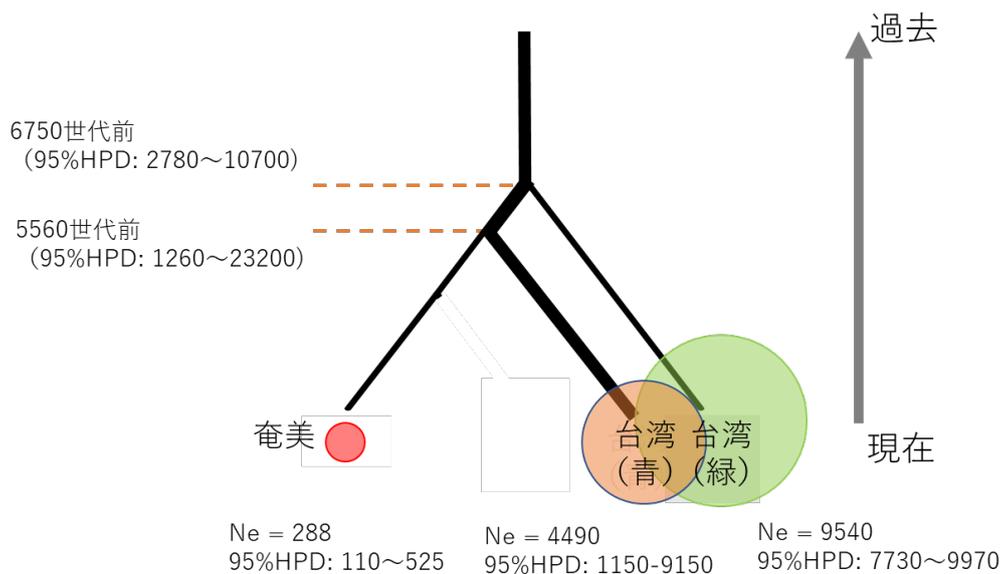
図(3)-14 オキナワセッコクのStairway plotのパターン

(6) ヤドリコケモモ

ヒマラヤ、マレーシア、中国南西部、台湾、日本に分布しているヤドリコケモモについて、台湾に生育する野生株、奄美大島の野生株および日本各地で域外保全されている個体を対象とし、4975 SNP 遺伝子座を得た。RAxML³³⁾を用いた最尤系統樹により遺伝構造を評価したところ、日本と台湾の集団は大きく遺伝的に分化していることがわかった(図(3)-15)。また台湾の個体同士は互いに遺伝的に分化しているのに対して、日本の個体同士は遺伝的に近く、日本集団は遺伝的多様性が低いことも示唆された。DIYABCを用いた集団デモグラフィ推定の結果、まず台湾2集団が分化した後に、台湾集団から日本集団が分化したモデルが支持された(図(3)-16)。台湾2集団間の分化時期が6750世代前、日本集団と台湾集団の分化時期は5560世代前と推定された。ここで1世代を10年とすると、日本集団はおよそ数万年前に分化したと考えられるが、95%最高確立密度(HPD)も考慮すると20万年以上前だった可能性もある。有効集団サイズ(N_e)は台湾2集団が4490と9540、日本集団が288と推定され、最尤系統樹から示唆されたように日本集団の遺伝的多様性は低いことが明らかとなった。これらの結果から、日本集団は台湾集団から分化して以降、隔離された小さな集団で世代交代を重ねたことにより遺伝的浮動の影響も受け、遺伝的多様性が減少したと考えられる。



図(3)-15 ヤドリコケモモの台湾および日本集団の最尤系統樹



図(3)-16 ヤドリコケモモの集団デモグラフィーのパターンおよび推定されたパラメーター値

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

生物多様性ホットスポットである日本において、カッコソウに代表されるような1種1集団のような種の保存法対象種複数種の集団デモグラフィーを最新の手法を用いてゲノムレベルで評価できたことの科学的意義は大きい。特にコヘラナレン、カッコソウ、ボロジノニシキソウのようにゲノムレベルで有効集団サイズが減少している教科書的な結果を得られたと同時に、オキナワセッコクのように種の保存法対象種でありながら比較的健全な遺伝的多様性を維持している種もあることがわかったことも興味深い。これは必ずしも遺伝的多様性と種の現在の分布パターンが直接的に関係しているわけではなく、場合により、種が辿ってきた時空間スケールでの集団デモグラフィーの変動が現在の種の分布パターンに影響していることも示された。これは進化の偶然性⁴⁾とも一致すると考えられる。これらの結果から、種の保存法対象種の保全、管理のためには、種ごとのデモグラフィー評価が重要であるがわかった。加えて、種の保存法対象種以外の種でも強い集団減少パターンがみられる種があることも本研究ではわかり、進化生物学的には種の保存法対象種だけが保全優先度が高いというわけでは必ずしもないことも示唆された。これら結果は世界的にみても新規制の高いものであり、目下、これら成果の国際誌への発表を準備している。

(2) 環境政策への貢献

本研究の成果から、種の保存法対象種の地理的な遺伝構造だけでなく、ゲノムベースのデータから時間軸に沿った集団デモグラフィーも評価することができた。このような各対象種が辿ってきた時空間スケールでの動態情報は今後、環境政策にも大きく貢献できると期待される。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究成果により、種の保存法対象種、特にコヘラナレン、カッコソウ、ボロジノニシキソウは遺伝的分化も進み、有効集団サイズも過去のボトルネックの影響などで減少傾向にあることがわかり、保全優先度が高いこともわかった。またことにより各地点の局所集団の保全が重要であることが示唆された。また長期的には現地外保全の必要があることも意味している。一方、種の保存法対象種でありなが

らオキナワセッコクは他の種の保存法対象種に比べ、集団間の遺伝的分化もなく、比較的健全な遺伝的多様性が維持されていることがわかり、おおよそ現状維持ができていれば種の保全はできると考えられる。これら情報は行政が種の保存法対象種の保全、管理をする上で活用が期待される情報である。

6. 国際共同研究等の状況

本研究で検討したゲノム情報解析手法は下記の国際共同研究にも活用した。

- 1) ユーラシア大陸冷温帯の主要樹種であるカバノキ属およびトウヒ属複数種を対象にした遺伝構造および集団デモグラフィ推定をスウェーデン、イタリア、ノルウェー、ロシア、スイスなどの研究者らと行った^{1,2)}。
- 2) 地中海地域に広く分布するトルコガシの遺伝構造および集団デモグラフィについて遺伝データだけでなく、大型遺体、花粉化石などの古生態学的データも用いて、イタリア、スペイン、スロバキアの研究者らと解析を行った³⁴⁾。
- 3) 森林伐採および分断化が進む世界有数の生物多様性ホットスポットであるインド西ガーツ山脈において希少有用樹種の保全遺伝学的研究をインド、スウェーデン、イタリア、オーストリアなどの研究者らと行った³⁵⁾。
- 4) 気候変動に伴う砂漠化が懸念されているメキシコにおいてソテツ植物のゲノム由来データの保全遺伝学的研究をメキシコの研究者らと行った³⁶⁾。
- 5) 日本温帯地域の里山に広く分布するクヌギの遺伝構造を中国の研究者らと調べ、クヌギは日本自生種ではない可能性もあることを議論した³⁷⁾。
- 6) 気候変動にともなう海流変動、海面上昇あるいは海洋酸性化は海岸域に分布し、種子が海流散布されるマングローブに代表される植物にとって、重要な環境問題である。そこで太平洋を中心に海流散布植物の遺伝構造および集団デモグラフィを推定した^{38,39)}。またマングローブ保全における保全ゲノミクスの重要性についても議論した⁴⁰⁾。これら研究は中国、マレーシア、ベトナム、インドネシア、タイ、シンガポール、メキシコ、ブラジルなどの研究者らと行った。
- 7) ススキを宿主とする社会性ハダニにおける雄同士の攻撃性の地理的変異および系統地理的構造を調べ、さらに集団デモグラフィを中国、台湾の研究者らと推定した。これらデータからススキとの分布変遷の関係性、攻撃性の形成過程について議論した⁴¹⁾。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 津田吉晃：第128回日本森林学会大会（2017）
「保全遺伝学から保全ゲノミクスへ：変わること、変わらないこと」
- 2) 津田吉晃：日本地理学会2017年春季学術大会（2017）
「最終氷期における気候変動と山岳生物の集団動態の歴史」
- 3) Y. Tsuda: The 3rd International Workshop for Conservation Genetics of Mangroves: Toward the Conservation Genetics of Mangroves on a Global Scale, Okinawa, Japan (2016)

“Genetic structure and population demography of species: Its applications to ecosystem conservation from mountains to ocean.”

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 国際植物の日イベント「高原の植物観察観察～植物と多様性を考えよう～」(筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所)にて講演「絶滅危惧種が辿っている歴史と種の保存法」(2018年5月19日、聴講者約40名)
- 2) 安曇野市レッドデータ展II自然講座2(安曇野市豊科郷土博物館)にて講演「生きものたちが歩んできたはるかなる道を探る～生物系統地理という世界～, 植物編」(2017年3月18日、聴講者約40名)
- 3) NPO法人からだところの発見塾主催第15回「からだところのサイエンスカフェ」(東京都文京区根津みのりcafé)にて講演「人は森とどう関わってきたのか ー生物多様性からみた森と人の歴史ー」(2016年11月30日、聴講者約20名)
- 4) 生物群横断系統地理ワークショップ(京都大学理学部セミナーハウス)にて講演「世界に飛び立て! phylogeographers! ～東アジアにおける植物系統地理学的研究の魅力と限界～」(2016年10月29日、聴講者約150名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 週間うえだ(2018年6月12日、「高原の植物観察観察～植物と多様性を考えよう～」)

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Y. TSUDA, J. CHEN, M. STOCKS, T. KÄLLMAN, J.H. SØNSTEBØ, L. PARDUCCI, V. SEMERIKOV, C. SPERISEN, D. POLITOV, T. RONKAINEN, M. VÄLIRANTA, G.G. VENDRAMIN, M.M. TOLLEFSRUD and M. LASCoux: *Mol. Ecol.*, 25, 12, 2773–2789 (2016)
The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*P. abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west?
- 2) Y. TSUDA, V. SEMERIKOV, F. SEBASTIANI, G.G. VENDRAMIN and M. LASCoux: *Mol. Ecol.*, 26, 2, 589–605 (2017)
Multispecies genetic structure and hybridization in the *Betula* genus across Eurasia
- 3) L.M. BENESTAN, A. FERCHAUD, P.A. HOHENLOHE, B.A. GARNER, G.J. NAYLOR, I.B. BAUMS, M.K. SCHWARTZ, J.L. KELLEY, and G. LUIKART: *Mol. Ecol.*, 25, 13, 2967–2977 (2016)
Conservation genomics of natural and managed populations: building a conceptual and practical framework
- 4) J. DUMINIL, S. FINESCHI, A. HAMPE, P. JORDANO, D. SALVINI, G.G. VENDRAMIN, and R.J. PETIT: *Ame. Nat.*, 169, 5, 662–672 (2007)
Can population genetic structure be predicted from life-history traits?
- 5) G. LUIKART, P.R. ENGLAND, D. TALLMON, S. JORDAN P. and TABERLET: *Nat. Rev. Genet.*, 4, 12, 981–994 (2003)
The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing
- 6) 津田吉晃: 日本生態学会誌、60, 3, 349–359 (2010)
森林樹木の遺伝的多様性保全と生態リスク
- 7) Y. TSUDA, K. NAKAO, Y. IDE and Y. TSUMURA: *Mol. Ecol.*, 24, 7, 1403–1418 (2015)

The population demography of *Betula maximowicziana*, a cool-temperate tree species in Japan, in relation to the last glacial period: its admixture-like genetic structure is the result of simple population splitting not admixing.

- 8) F.W. ALLENDORF, R.A. HOHENLOHE and G. LUIKART: *Nat. Rev. Genet.*, 11, 10, 697–709 (2010)
Genomics and the future of conservation genetics
- 9) K. LUU, E. BAZIN, and M.G. BLUM: *Mol. Ecol. Resour.*, 17, 1, 67–77 (2017)
pcadapt: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis
- 10) B. ARNOLD, R.B. CORBETT-DETIG, D. HARTL and K. BOMBLIES: *Mol. Ecol.*, 22, 11, 3179–3190 (2013)
RADseq underestimates diversity and introduces genealogical biases due to nonrandom haplotype sampling
- 11) D.A. EATON and R.H. REE: *Syst. Biol.*, 62, 5, 689–706 (2013)
Inferring phylogeny and introgression using RADseq data: an example from flowering plants (*Pedicularis: Orobanchaceae*)
- 12) R.G.J. HODEL, S. CHEN, A.C. PAYTON, S.F. MCDANIEL, P. SOLTIS and D.E. SOLTIS: *Sci. Rep.*, 7, 1, 17598 (2017)
Adding loci improves phylogeographic resolution in red mangroves despite increased missing data: comparing microsatellites and RAD-Seq and investigating loci filtering
- 13) S. HOTALING, C.C. MUHLFELD, J.J. GIERSCH, O.A. ALI, S. JORDAN, M.R. MILLER, G. LUIKART and D.W. WEISROCK: *J. Biogeogr.*, 45, 2, 304–317 (2018)
Demographic modelling reveals a history of divergence with gene flow for a glacially tied stonefly in a changing post-Pleistocene landscape
- 14) E.A. TRIPP, Y.H.E. TSAI, Y. ZHUANG and K.G. DEXTER: *Ecol. Evol.*, 7, 19, 7920–7936 (2017)
RADseq dataset with 90% missing data fully resolves recent radiation of *Petalidium* (Acanthaceae) in the ultra-arid deserts of Namibia
- 15) M. CROTTI, C.D. BARRATT, S.P. LOADER, D.J. GOWER and J.W. STREICHER: *Zool. Scr.*, 48, 2, 157–167 (2019)
Causes and analytical impacts of missing data in RADseq phylogenetics: Insights from an African frog (*Afrivalus*)
- 16) M.A. BEAUMONT and R.A. NICHOLS: *P. Roy. Soc. B Biol. Sci.*, 263, 1377, 1619–1626 (1996)
Evaluating Loci for Use in the Genetic Analysis of Population Structure
- 17) T. ANTAO, A. LOPES, R.J. LOPES, A. BEJA-PEREIRA and G. LUIKART: *BMC Bioinformatics*, 9, 323 (2008)
LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method
- 18) M. FOLL and O.E. GAGGIOTTI: *Genetics*, 180, 2, 977–993 (2008)
A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective
- 19) A.E. MOUSADIK and R. PETIT: *Theor. Appl. Genet.*, 92, 7, 832839 (1996)
High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic of Morocco
- 20) B. WEIR and C. COCKERHAM: *Evolution*, 38, 6, 1358–1370 (1984)
Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure
- 21) L. EXCOFFIER, P.E. SMOUSE and J.M. QUATTRO: *Genetics*, 131, 2, 479–491 (1992)
Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data
- 22) P.G. MEIRMANS and P.W. HEDRICK: *Mol. Ecol. Resour.*, 11, 1, 5–18 (2011)
Assessing population structure: F_{ST} and related measures

- 23) P. PEAKALL and R. SMOUSE: *Bioinformatics*, 28, 19, 2537–2539 (2012)
GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update
- 24) J.K. PRITCHARD, M. STEPHENS and P. DONNELLY: *Genetics*, 155, 2, 945–959 (2000)
Inference of population structure using multilocus genotype data
- 25) J.M. CORNUET, F. SANTOS, M.A. BEAUMONT, C.P. ROBERT, J.M. MARIN, D.J. BALDING, T. GUILLEMAUD and A. ESTOUP: *Bioinformatics*, 24, 23, 2713–2719 (2008)
Inferring population history with DIYABC: a user-friendly approach to Approximate Bayesian Computations
- 26) J.M. CORNUET, P. PUDLO, J. VEYSSIER, A. DEHNE-GARCIA, M. GAUTIER, R. LEBLOIS, J.M. MARIN and A. ESTOUP: *Bioinformatics*, 30, 8, 1187–1189 (2014):
DIYABC v2.0: a software to make Approximate Bayesian Computation inferences about population history using Single Nucleotide Polymorphism, DNA sequence and microsatellite data
- 27) X. LIU and Y.X. FU: *Nat. Genet.*, 47, 5, 555–559 (2015)
Exploring population size changes using SNP frequency spectra
- 28) E. TRUCCHI, P. GRATTON, J.D. WHITTINGTON, R. CRISTOFARI, Y.L. MAHO, N.C. STENSETH and C.L. BOHEC: *P. Roy. Soc. B. Biol. Sci.*, 281, 1787, 20140528 (2014)
King penguin demography since the last glaciation inferred from genome-wide data
- 29) R.N. GUTENKUNST, R.D. HERNANDEZ, S.H. WILLIAMSON and C.D. BUSTAMANTE: *PloS Genetics*, 5, 10, e1000695 (2009)
Inferring the Joint Demographic History of Multiple Populations from Multidimensional SNP Frequency Data
- 30) L. SUNDQVIST, K. KEENAN, M. ZACKRISSON, P. PRODÖHL and D. KLEINHANS: *Ecol. Evol.*, 6, 11, 3461–3475 (2016)
Directional genetic differentiation and relative migration
- 31) O.G. PYBUS, A. RAMBAUT and P.H. HARVEY: *Genetics*, 155, 3, 1429–1437 (2000)
An Integrated Framework for the Inference of Viral Population History From Reconstructed Genealogies
- 32) J. HELED and A.J. DRUMMOND: *BMC Evol. Biol.*, 8, 289 (2008)
Bayesian inference of population size history from multiple loci
- 33) A. Stamatakis: *Bioinformatics*, 30, 9, 1312–1313 (2014)
RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies
- 34) F. BAGNOLI, Y. TSUDA, S. FINESCHI, P. BRUSCHI, D. MAGRI, P. ZHELEV, L. PAULE, M.C. SIMEONE, S.C. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ and G.G. VENDRAMIN: *J. Biogeogr.*, 43, 4, 679–690 (2016)
Combining molecular and fossil data to infer demographic history of *Quercus cerris*: insights on European eastern glacial refugia
- 35) S. BODARE, G. RAVIKANTH, S.A. ISMAIL, M.K. PATEL, I. SPANU, R. VASUDEVA, R.U. SHAANKER, G.G. VENDRAMIN, M. LASCOUX and Y. TSUDA: *Conserv. Genet.*, 18, 1, 1–15 (2017)
Fine- and local- scale genetic structure of *Dysoxylum malabaricum*, a late successional canopy tree species in disturbed forest patches in the Western Ghats, India
- 36) J.S. GUTIÉRREZ-ORTEGAR, K. JIMÉNEZ-CEDILLO, M.A. PÉREZ-FARRERA, A.P. VOVIDES, A.P. MARTÍNEZ, F. MOLINA-FREANER, R. IMAI, Y. TSUDA, Y. MATSUKI, Y. SUYAMA, Y. WATANO and T. KAJITA: *Conserv. Genet.*, 19, 5, 1069–1081 (2018)
Considering evolutionary processes in cycad conservation: identification of evolutionarily significant units within *Dioon sonorensis* (Zamiaceae) in northwestern Mexico
- 37) Y. SAITO, Y. TSUDA, K. UCHIYAMA, T. FUKUDA, Y. SETO, P.G. KIM, H.L. SHEN and Y. IDE: *Forests*, 8, 11, 451 (2018)
Genetic variation in *Quercus acutissima* Carruth., in Traditional Japanese rural forests and agricultural landscapes, revealed by chloroplast microsatellite markers

- 38) Y. TOMIZAWA, Y. TSUDA, M.N. SALEH, A.K.S. WEE, K. TAKAYAMA, T. YAMAMOTO, O.B. YLLANO, S.G. SALMO III, S. SUNGKAEW, B. ADJIE, E. ARDLI, M. SULEIMAN, N.X. TUNG, K.K. SOE, K. KANDASAMY, T. ASAKAWA, Y. WATANO, S. BABA and T. KAJITA: *Forests* 8, 12, 480 (2017)
Genetic structure and population demographic history of a widespread mangrove plant *Xylocarpus granatum* J. Koenig across the Indo-West Pacific region
- 39) A.K.S. WEE, J.X.H. TEO, J.L. CHUA, K. TAKAYAMA, T. ASAKAWA, S.H. MEENAKSHISUNDARAM, A.B. ONRIZAL, E.R. ARDLI, S. SUNGKAEW, M. SULEIMAN, N.K. TUNG, S.G. SALMO III, O.B. YLLANO, M.N. SALEH, K.K. SOE, Y. TATEISHI, Y. WATANO, Y. TSUDA, T. KAJITA and E.L. WEBB: *Forests* 8, 12, 483 (2017)
Vicariance and oceanic barriers drive contemporary genetic structure of widespread mangrove species *Sonneratia alba* J. Sm. in the Indo-West Pacific
- 40) A.K.S. WEE, G.M. MORI, C.F. LIRE-MEDEIROS, J. NÚÑEZ-FARFÁN, K. TAKAYAMA, L. FAULKS, S. SHI, Y. TSUDA, Y. SUYAMA, T. YAMAMOTO, T. IWASAKI, Y. NAGANO, Z. WANG, S. WATANABE and T. KAJITA: *Conserv. Biol.*, 33, a, 206–209 (2019)
The integration and application of genomic information in mangrove conservation.
- 41) Y. SATO, Y. TSUDA, H. SAKAMOTO, M. EGAS, T. GOTOH, Y. SAITO, Y.X. ZHANG, L.Z. LIN, J.T. CHAO and A. MOCHIZUKI: *Ecol. Evol.*, 9, 4, 1590–1602 (2019)
Phylogeography of lethal male fighting in a social spider mite

II-4 絶滅危惧種のゲノム情報の縮約解読技術開発

国立大学法人東北大学

陶山佳久

平成28～30年度累計予算額：20,948千円

(うち平成28年度：7,101千円、平成29年度：7,101千円、平成30年度：6,746千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

絶滅危惧種を適切に保全管理するためには、ゲノム情報解読技術を活用した遺伝的情報の利用が有効である。しかし従来の技術では、時間・労力・経済性・試料の質・量の問題等により、保全対策として利用するための実際上の適用が困難であった。そこで本研究では、より実効性のあるゲノム情報縮約解読技術を開発することを第一の目的とした。第二に、本研究で開発した技術を用いて「種の保存法」指定植物種のゲノム情報を実際に取得し、その保全管理等に活用できる情報を提供することを目的とした。まず、本研究の担当者が開発したゲノム情報縮約解読技術であるMIG-seq法を改良することとして、手法全体を対象として技術的改良を検討し、分析用ライブラリー作製工程の改良を行ったほか、解析用プログラムのパラメータ設定について最適条件を探索した。これらの改良の結果、従前の方法に比べて平均7.3倍の遺伝的情報（SNP数）が得られるまでに分析効率が改善し、絶滅危惧種の保全現場において実効性のある技術として完成させることができた。次に、改良したゲノム情報縮約解読技術を用いて、「種の保存法」指定植物種である10種を対象として遺伝的情報を取得し、集団遺伝学的解析を行った。その結果、1)近縁種との間の明瞭な遺伝的違いを検出したこと、2)種内において地域による遺伝的違い（遺伝的地域性）を明らかにしたこと、3)絶滅危惧種が近縁の普通種と比べて低い遺伝的多様性を示したこと、4)外部形態による種同定が困難な盗掘株の種を識別したこと、5)盗掘された株がどの自生集団由来なのかを特定したこと、6)域外保全株の由来等を遺伝的に位置付けたこと、7)既知の自生地以外で新規に発見された個体に人為的な移植の疑いがあることを示したこと、8)地域集団間に遺伝的多様性の差があり、保全上重要な集団を特定したことなど、多くの有用な情報を示した。これらの成果は、本研究で開発したゲノム情報縮約解読技術が、絶滅危惧種の保全を目的とした遺伝情報取得のために実効性のある手法であることを示すとともに、個々の「種の保存法」指定植物種の適切な保全管理のための具体的な有用情報として提供できたことを示している。

[キーワード]

絶滅危惧種のDNA種識別、遺伝的多様性・地域性検出、盗掘元集団の特定、域外保全株の遺伝的位置付け、遺伝的保全優先度

1. はじめに

絶滅危惧種に対して適切な保全管理を実施するためには、対象生物（集団）の遺伝的多様性・遺伝的集団構造・個体間の類縁関係等のさまざまな遺伝的情報を有用な情報として活用することができる。しかしながら、これまでに保全遺伝学的な情報取得のために主に用いられてきた分子生物学的分析手法では、絶滅危惧種の保全管理への導入に多くの障害があった。例えば、集団遺伝学的な情報取得のための主要な手法として用いられて来たマイクロサテライト分析法では、対象種ごとに遺伝マーカー（ゲノムDNA内のマイクロサテライト領域を検出するために用いられるPCRプライマー組）を開発する必要があるため、時間・労力や経済的な面が大きな障害であった。逆に、種ごとのマーカー開発が必ずしも必要ではないオルガネラDNAの塩基配列分析では、一般に変異情報が限られているために、必要十分な情報を取得できないことが大きな問題であった。

上記の問題を解決できる手法として、近年に次世代シーケンサー(next generation sequencer, NGS)を用いた開発手法が開発されてきた。その代表的なものであり、「遺伝情報解読のブレイクスルー」の一つ

として位置付けられるRAD-seq法およびその類似手法では、種ごとにマーカーを開発する必要がなく、膨大な量の変異情報を入手することが可能である。しかしながら、この手法を用いるための分析対象材料としては、相当量の高品質DNAが必要であり、絶滅危惧種を材料とする場合にはこの点が大きな障害となるケースが多い。つまり、特に国内希少野生動植物種等の絶滅危惧種からは、試料としてわずかな量のDNAしか得られないことも多く、しかも野外環境下で劣化した試料しか得られないことも珍しくない。これらのことが、現実的には同様の分析にとって深刻な障害となることが多く、ひいては絶滅危惧種の保全遺伝学的なデータ取得を実施困難なものにまでしている。

そこで本研究では、これらの問題点を解決すべく、1)種ごとのマーカー開発を必要とせず、2)十分な量の変異情報を取得することができ、3)微量・劣化試料に対しても対応可能な、新たなゲノム情報縮約解読技術を開発することを目的とした。また、開発した技術を利用して、実際に「種の保存法」指定植物種のゲノム情報を取得し、保全管理のための具体的な有用情報として提供することを目的とした。

2. 研究開発目的

絶滅危惧種を対象とした保全遺伝学的な情報取得のために、実用的なゲノム情報の縮約解読技術を開発する。また、その技術を利用して「種の保存法」指定植物種のゲノム情報を取得し、集団遺伝学的な解析を行うことにより、その保全管理等に活用できる情報を提供する。

3. 研究開発方法

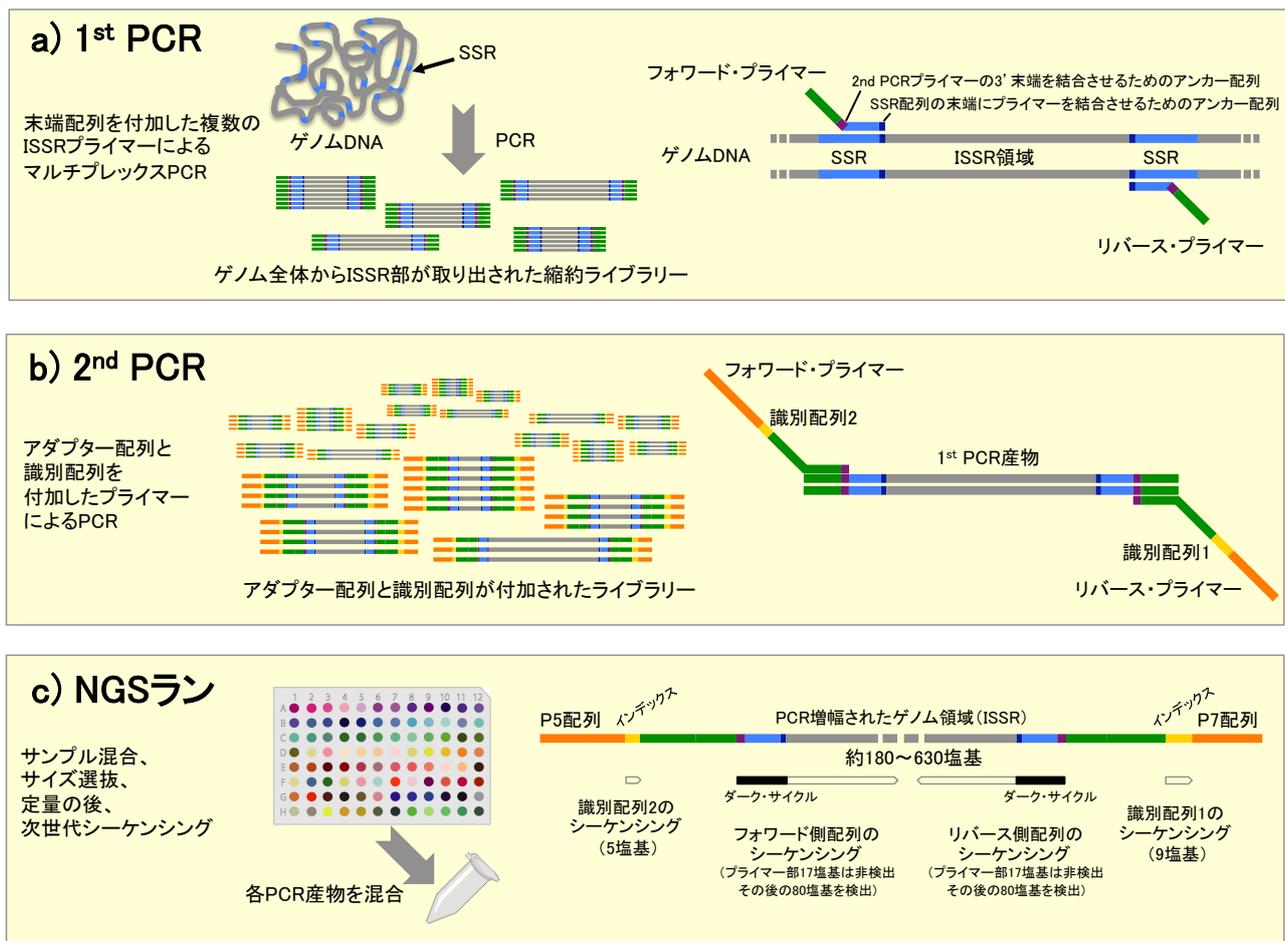
絶滅危惧種を対象とした保全遺伝学的な情報取得法に用いることのできる実効性ある技術として、本研究では次世代シーケンサーを用いたDNA分析方法であるMIG-seq (Multiplexed ISSR Genotyping by sequencing)法¹⁾を改良することとした。

MIG-seq法とは、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 sequence repeat, ISSR)を主な対象とし、ユニバーサルなマルチプレックスPCRプライマーセットによって数千以上のゲノムDNA断片を同時に増幅し、DNA塩基配列情報取得の対象となるDNA断片のまとまり(ライブラリー)を構築する手法である。これを次世代シーケンサーで分析することによって膨大な塩基配列情報を取得し、ゲノムワイドな塩基多型(SNP)の検出およびサンプルごとの遺伝子型特定(ジェノタイピング)を行うというのがMIG-seq法の仕組みである(図(4)-1)。

この手法では、分析対象種について事前にゲノム情報を必要とせず、植物・動物・菌類等、生物種を問わずに同一手法の適用が可能であるため、分析対象種ごとのマーカー開発作業を必要としない。また、迅速(3日間)、簡便(2回のPCRとNGSラン)、安価(サンプルあたりの消耗品費は千円程度以下)に、膨大な量のゲノムワイド塩基配列情報を取得することができる。さらに、従来のRAD-seq法等では試料となるゲノムDNAを制限酵素処理する必要があったのに対し、この手法ではPCRからスタートすることができるため、従来は分析が難しかった微量・低品質のDNAサンプル等についても対応可能である。特に、DNA抽出用試料としては必ずしも適していない条件下で採取・保存された絶滅危惧種の野外採取試料等や、DNA精製時に障害となる夾雑物の多く含まれた組織の試料などにおいても、本手法の幅広い応用が可能なのは、本研究の目的に合致している。

本研究では、MIG-seq法の分析手順・反応条件等の設定・データ解析方法等、手法全体にわたる技術的改良を行った。具体的には、多様な分類群(脊椎動物・無脊椎動物・草本・プランクトン・貝・菌類・ササ)の生物を対象として、さまざまな実験反応条件(異なるPCRキット、プライマー濃度、アニーリング温度、サイクル数、インデックス構成)についてプロトコルの改善を行った。

また、本研究で改善した手法を用いて、「種の保存法」指定植物種10種を対象として遺伝的情報を取得し、集団遺伝学的解析を行った。その結果をもとに、対象種の適切な保全管理のための具体的な提案について考察した。



図(4)-1 MIG-seq法によるDNA塩基配列情報取得法の概念図(既報^{1), 2)}の図を改変)

a) 1回目のPCRでは、末端配列を付加した複数のISSR (inter-simple-sequence repeat)プライマーによるマルチプレックスPCRによって数千ヶ所以上のISSR領域を増幅する。b) 2回目のPCRでは、1回目のPCR産物の両端に付加された配列に結合するプライマーを用い、さらにその末端にNGSランに必要な配列と識別配列(インデックス)を付加する。c) 各サンプルのPCR産物をミックスして精製し、分析可能なサイズのPCR産物を抽出した後にqPCRで定量する。それをNGSによって同時に数千万以上のフラグメントの両端から塩基配列を解読する。

4. 結果及び考察

(1) ゲノム情報の縮約解読技術の改良

MIG-seq法の分析技術を改良するために、手法全体の諸条件を再検討した。その結果、MIG-seq分析用ライブラリー構築時に2回行うPCRのうち、1回目のPCRの反応条件(アニーリング温度)を変更することによって、データの生産性(検出SNP座数)が著しく改善されることを見出した。具体的には、原法¹⁾では48°Cに設定していたアニーリング温度(PCRステップにおいて、PCRプライマーがゲノムDNAの配列に結合するステップの温度)を38°Cに下げることによって、最終的に得られるデータ中においてリード数に対する共有座数の割合がほぼ2倍以上になることを見出した。

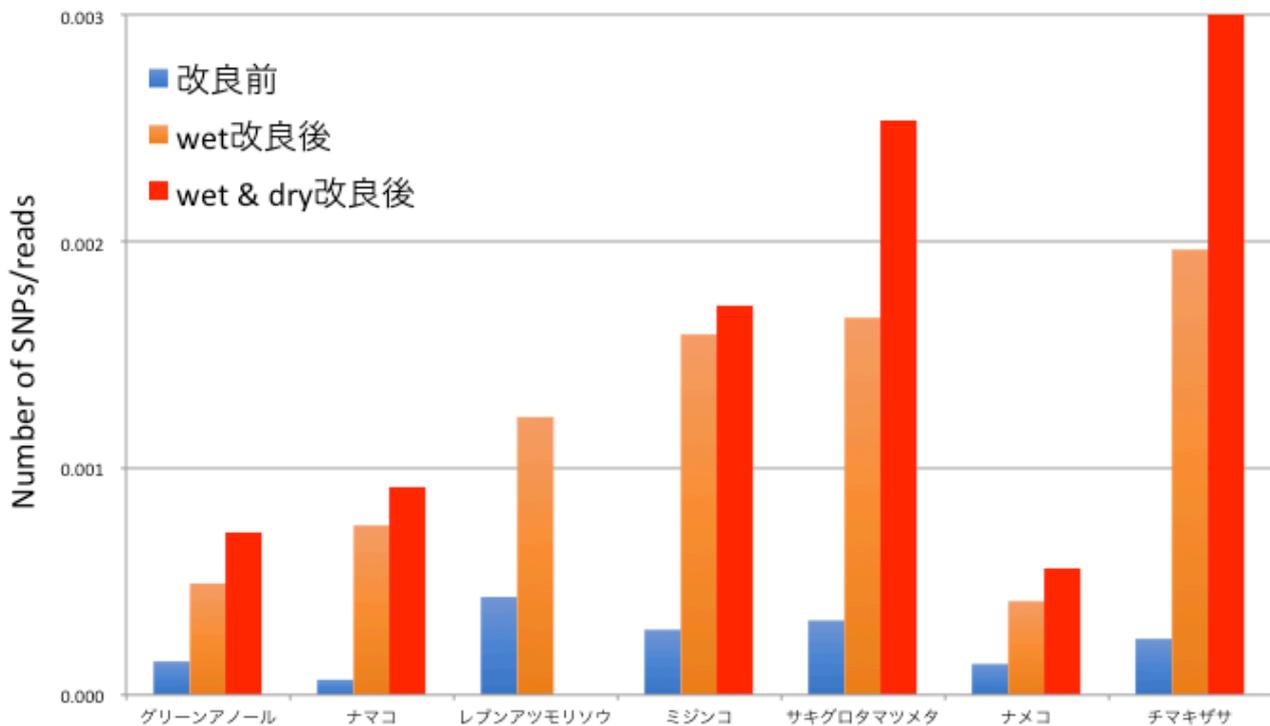
これまでの原法のMIG-seq法では、得られる情報量(SNP座数)が比較的少ないことが欠点として挙げられていたが、この改変によって通常の集団遺伝学的解析の最終段階で、おおまかに数百から千座以上のSNP遺伝子座が得られるようになり、一般的な絶滅危惧種の保全遺伝学的情報取得のために過不足のない解析が可能になった。

そのほかの特筆すべき改善点として、2回目のPCRにおいて使用する多数サンプル同時解析用の識別インデックス構成を見直し、原法¹⁾で採用していた一方のPCRプライマーのみにインデックスを組み込むシングル・インデックスインデックス方式から、両方のPCRプライマーにインデックスを組み込むデ

ュアル・インデックス方式に変更したことが挙げられる。その結果、インデックスの読み取りエラー率が0.5%から0.01%程度に大幅に改善された（データ省略）。また、1回目PCR後にPCR産物を精製・均一化する作業を加えるなど、各ステップにおける細かな改良により、手法全体として再現性の向上に効果を上げた。

さらに、データ解読後に行う解析において、各種解析プログラムのパラメータの設定を最適化することなどにより、得られる一塩基変異の検出効率が大幅に改善できることを確認した。

これらwet（ライブラリー作製工程）およびdry（データ解析方法）の改良を合わせると、改良前の方法に比べて平均7倍以上の情報量が得られる大幅な改善に成功した(図(4)-2)。これらの改良については、改良版MIG-seq法プロトコルとしてまとめて学会等で発表するとともに、論文中やWeb上で公開する作業を進めている。



図(4)-2 MIG-seq法による分析によって得られた一塩基変異の検出効率の比較

次世代シーケンシング用ライブラリー作製工程(wet)およびデータ解析方法(dry)を改良する前（手法発表論文¹⁾の条件）と後により検出したデータ量（一塩基変異数／リード数）を異なる生物7種で示した。この値が大きいほどデータ取得効率が良いことを示し、改良により平均7倍以上のデータが得られたことを示している。

(2) 「種の保存法」指定種を対象とした集団遺伝学的解析

本研究によって改良されたMIG-seq法を用いて、「種の保存法」指定種（国内希少植物種）である10種（シマカコソウ、コヘラナレン、タイヨウフウトウカズラ、ハナシノブ、キタダケソウ、キリギシソウ、チョウセンキバナアツモリソウ、レブンアツモリソウ、アツモリソウ、ヤクシマリンドウ）と、それらの近縁種を対象に集団遺伝学的解析を行った。

その結果、希少種の合理的かつ効果的な保安全管理に活用できる、以下のような有用な情報を取得することができた。

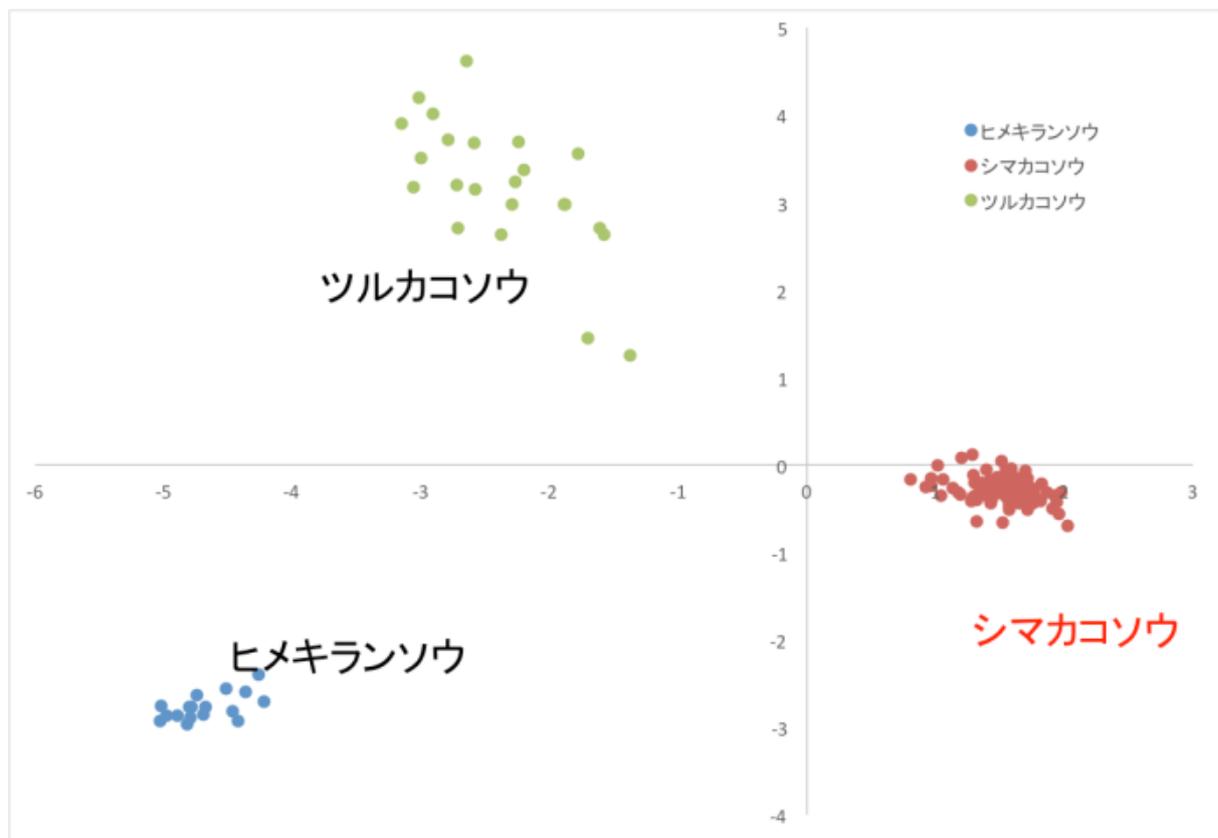
1. 近縁種との間に明瞭な遺伝的違いが検出され、国内希少動植物種の遺伝学的な独自性を示した
2. 種内で地域による遺伝的違い（遺伝的地域性）を明らかにした
3. 対象の希少種が近縁の普通種と比べて遺伝的多様性が低いことを示した

4. 外部形態による種同定が困難な盗掘株の種を識別した
5. 盗掘された株がどの自生集団由来なのか特定した
6. 域外保全株の遺伝的位置付け（由来）を示した
7. 既知の自生地以外で発見された個体に人為的な移植の疑いがあることを示した
8. 地域集団間に遺伝的多様性の差があり、保全上重要な集団を示した

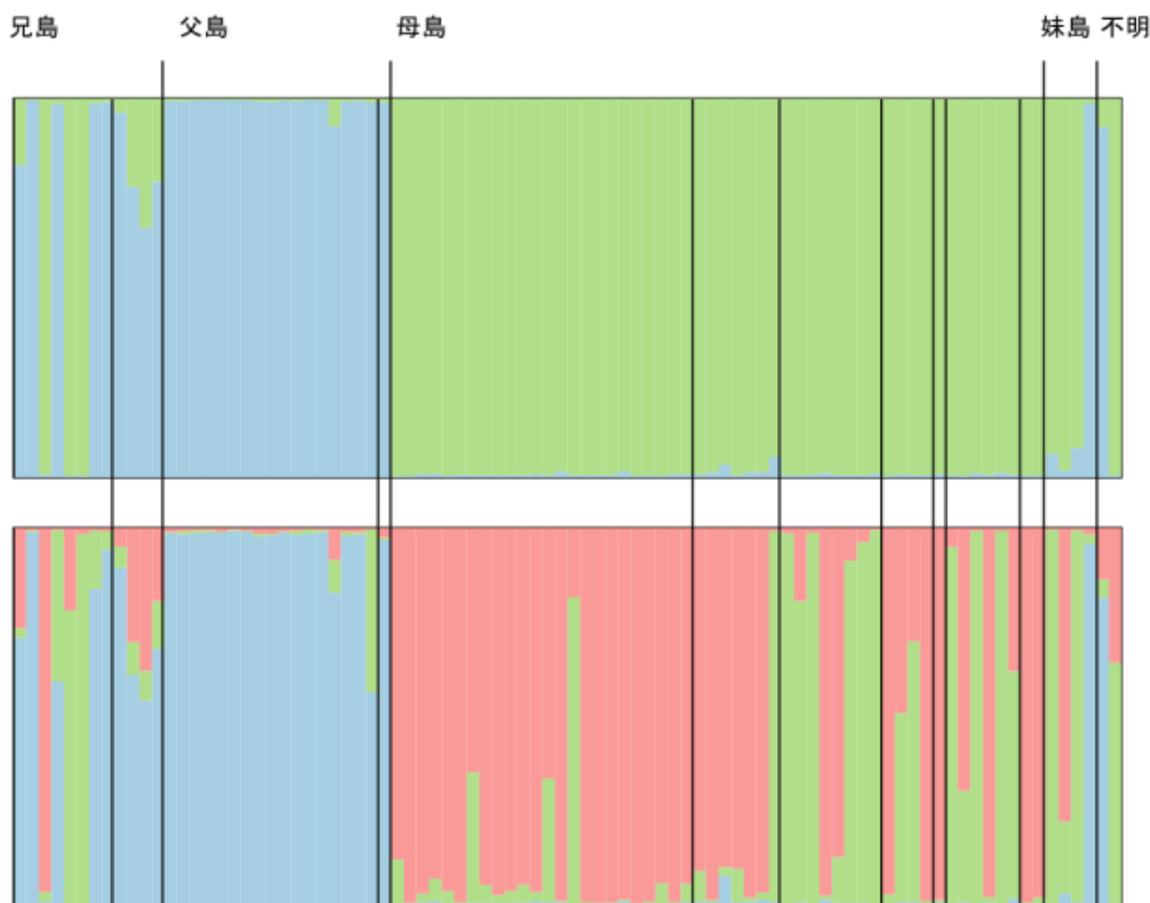
このように、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術は、広い分類群の絶滅危惧種等について、対象種の分子系統学的位置付け（遺伝的固有性評価）、種内の遺伝的集団構造（遺伝的地域性）や近縁普通種との遺伝的多様性の比較解析、域外保全個体の評価等を簡便・低コストに行うのに適した有効な手法として活用できる実例を示すことができた。以下に、種ごとに主な結果を示す。

1) シマカコソウとその近縁種

小笠原諸島に分布するシマカコソウはその近縁種（ツルカコソウやヒメキランソウ）とは遺伝的に明瞭に異なることが示され、国内希少植物種としての遺伝学的な固有性を確認することができた(図(4)-3)。また、種内地域変異の存在が示され、基本的には各島の集団、さらには各島内の異なる地域集団は、それぞれ異なる単位として保全管理を行う必要性が示唆された(図(4)-4)。



図(4)-3 シマカコソウとその近縁種（ツルカコソウとヒメキランソウ）の遺伝的関係を示す主成分分析図



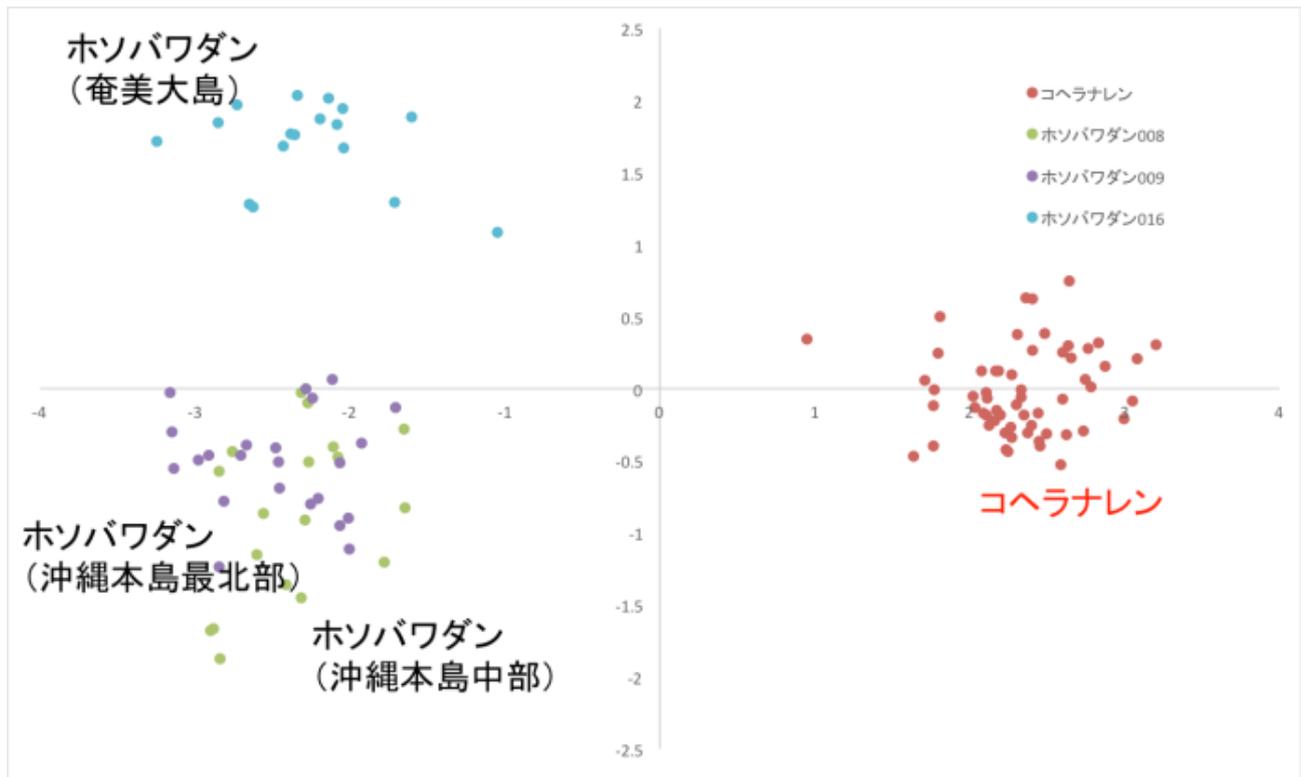
図(4)-4 シマカコソウの遺伝的地域性を示す遺伝的集団構造解析図

2) コヘラナレンとその近縁種

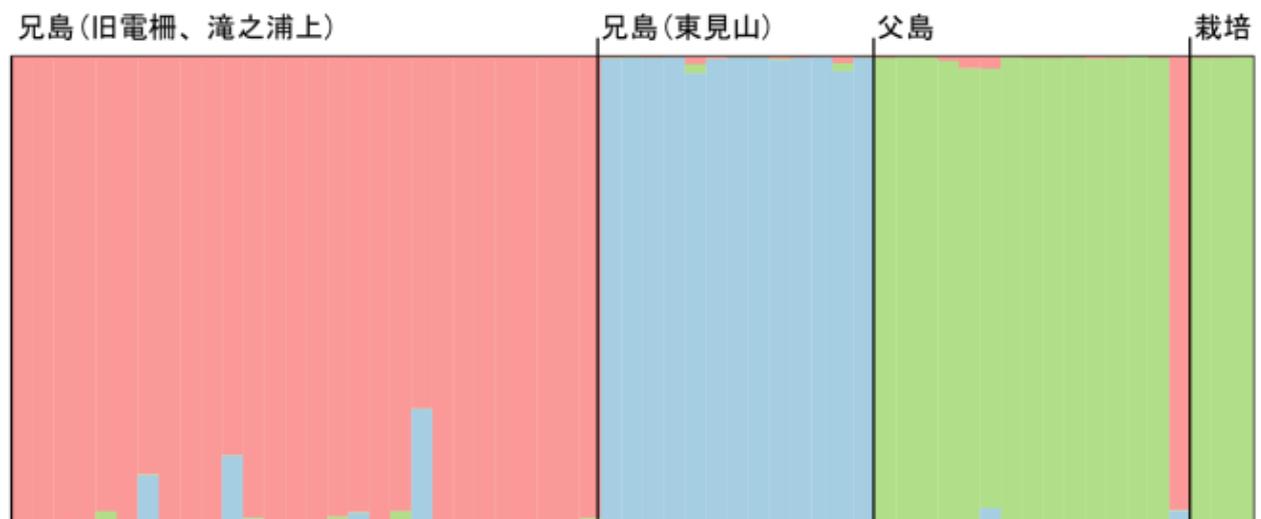
コヘラナレンとその近縁種であるホソバワダンには遺伝的に明瞭に異なることが示され、国内希少植物種としての遺伝学的な固有性を確認することができた(図(4)-5)。

また、コヘラナレン種内では、島間および兄島内の地域間で遺伝的に明瞭に異なることが示され、少なくとも兄島の2地域と父島の集団は、それぞれ異なる単位として保全管理を行う必要があることが示された。なお、分析に供試された栽培株は、遺伝的には父島の集団由来であることが明確に示され、それらの域外保全株としての取り扱いについても、父島の遺伝的組成を持つ株としての位置付けを考慮する必要があることが示された(図(4)-6：右端の個体)。

このように、本研究で用いた技術によって、仮にその出所が不明な域外保全株を対象とした場合でも、遺伝的な位置付けによって域外保全株の適切な取り扱いのために活用できる情報取得が可能であることを示した。なお、近縁種として比較用に用いたホソバワダンについても、奄美大島と沖縄本島の集団間で明瞭な遺伝的地域性が検出された(図(4)-5)。



図(4)-5 コヘラナレンと近縁種（ホソバワダン：奄美大島および沖縄本島の北部・中部の計2集団）の遺伝的関係を示す主成分分析図



図(4)-6 コヘラナレンの遺伝的地域性を示す遺伝的集団構造解析図

3) タイヨウフウトウカズラとその近縁種

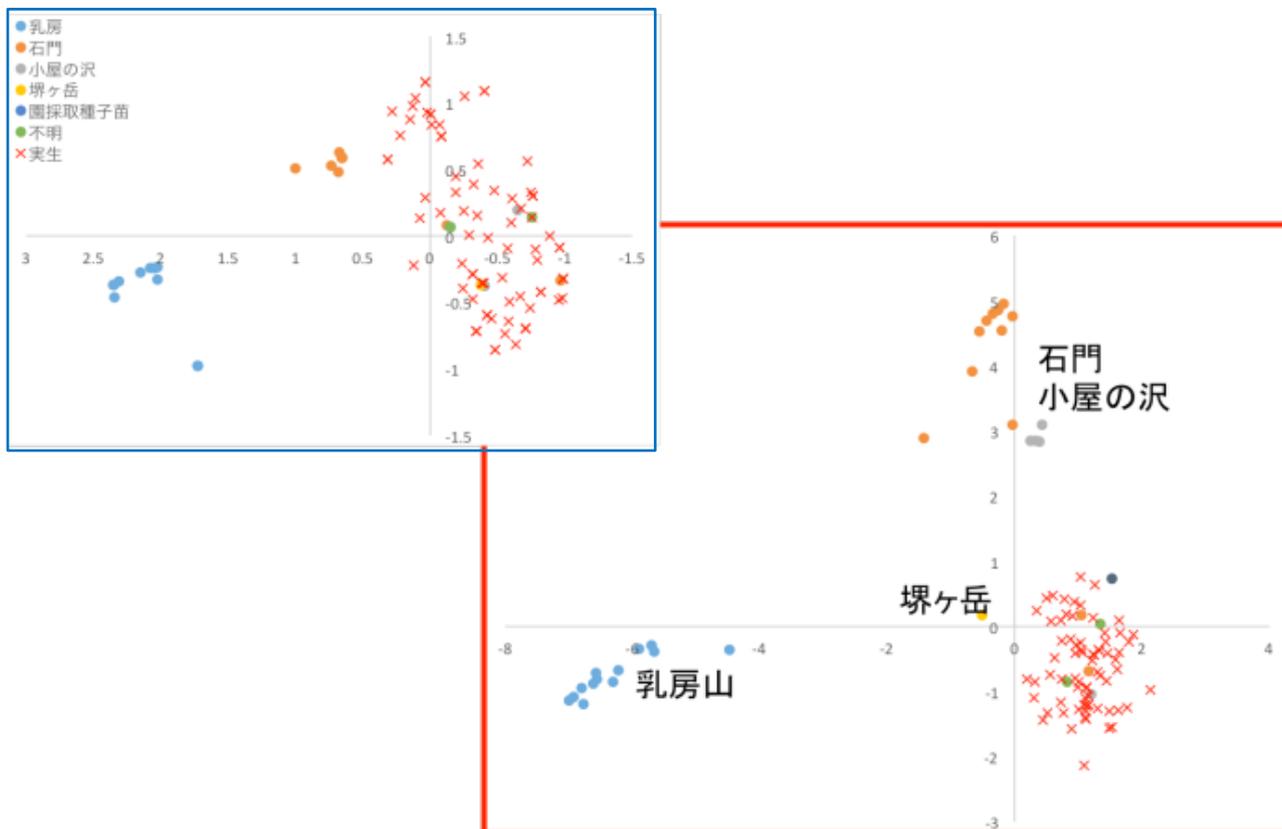
タイヨウフウトウカズラの種内変異（遺伝的地域性）について、従来のマイクロサテライト分析による結果(図(4)-7：左上青長方形内)と比較すると、本研究で開発した手法を用いて解析することによってより多くの情報が取得され(図(4)-7：右下赤長方形内)、地域集団間の遺伝的違いが明瞭に示された。

この結果により、特に乳房山とそれ以外の集団の違いなど、限られた現存個体数の中での遺伝的違いを考慮した保全管理を行う必要があることが示された。また、域外保全個体の種子に由来する栽培実生集団は、その種子親個体およびそのごく近隣に生育していた推定花粉親個体とともにクラスタリングされ(図(4)-7図：右下赤長方形内の右下の塊)、増殖用域外保全個体群の遺伝的位置付け・花粉親の特定

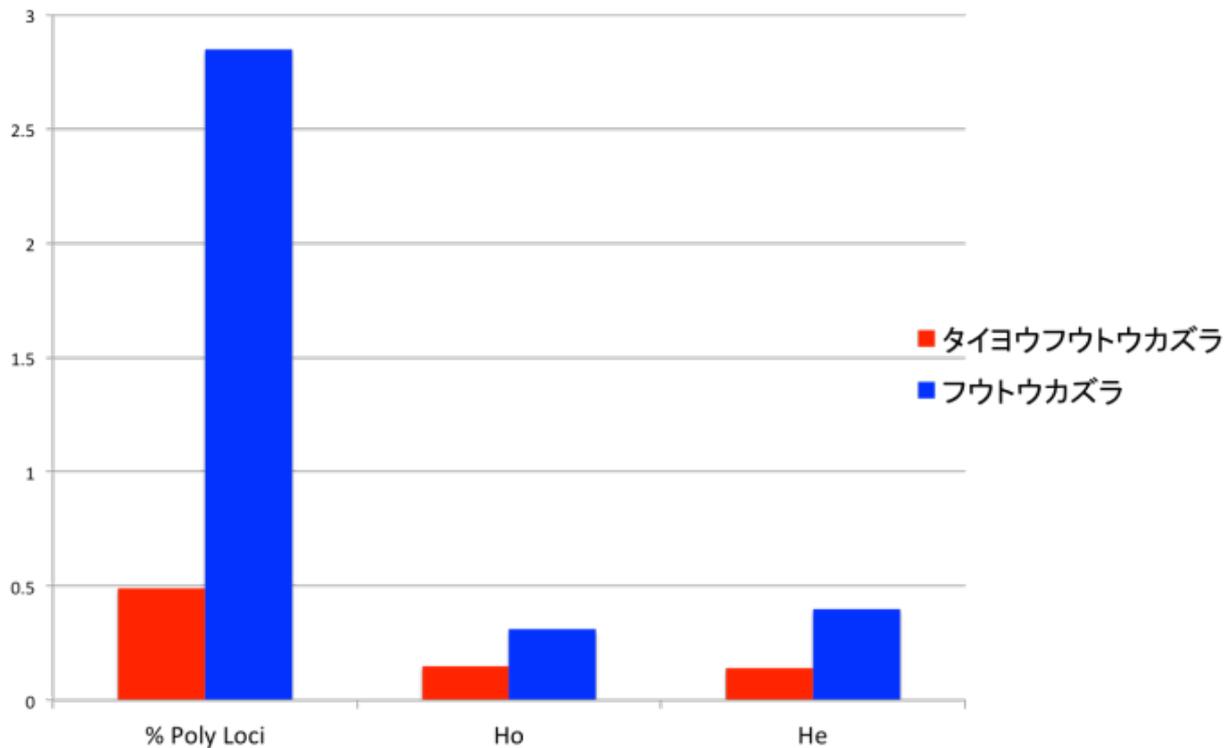
が可能であった（詳細データ省略）。

なお、種子親が不明な種子由来個体（図中に「不明」として緑丸で表示）は、前述の実生集団と同じグループとしてクラスタリングされたため、その由来が同一の遺伝的集団であると推定され、遺伝学的位置付けとして評価できる。

近縁普通種のフトウカズラと遺伝的多様性を比較すると、希少種のタイヨウフトウカズラの遺伝的多様性が、いずれの尺度（多型的遺伝子座の割合[% Poly Loci]、ヘテロ接合度の観察値[H_o]、ヘテロ接合度の期待値[H_e])でも低いことが示された(図(4)-8)。



図(4)-7 タイヨウフトウカズラの遺伝的地域性を示す主成分分析図

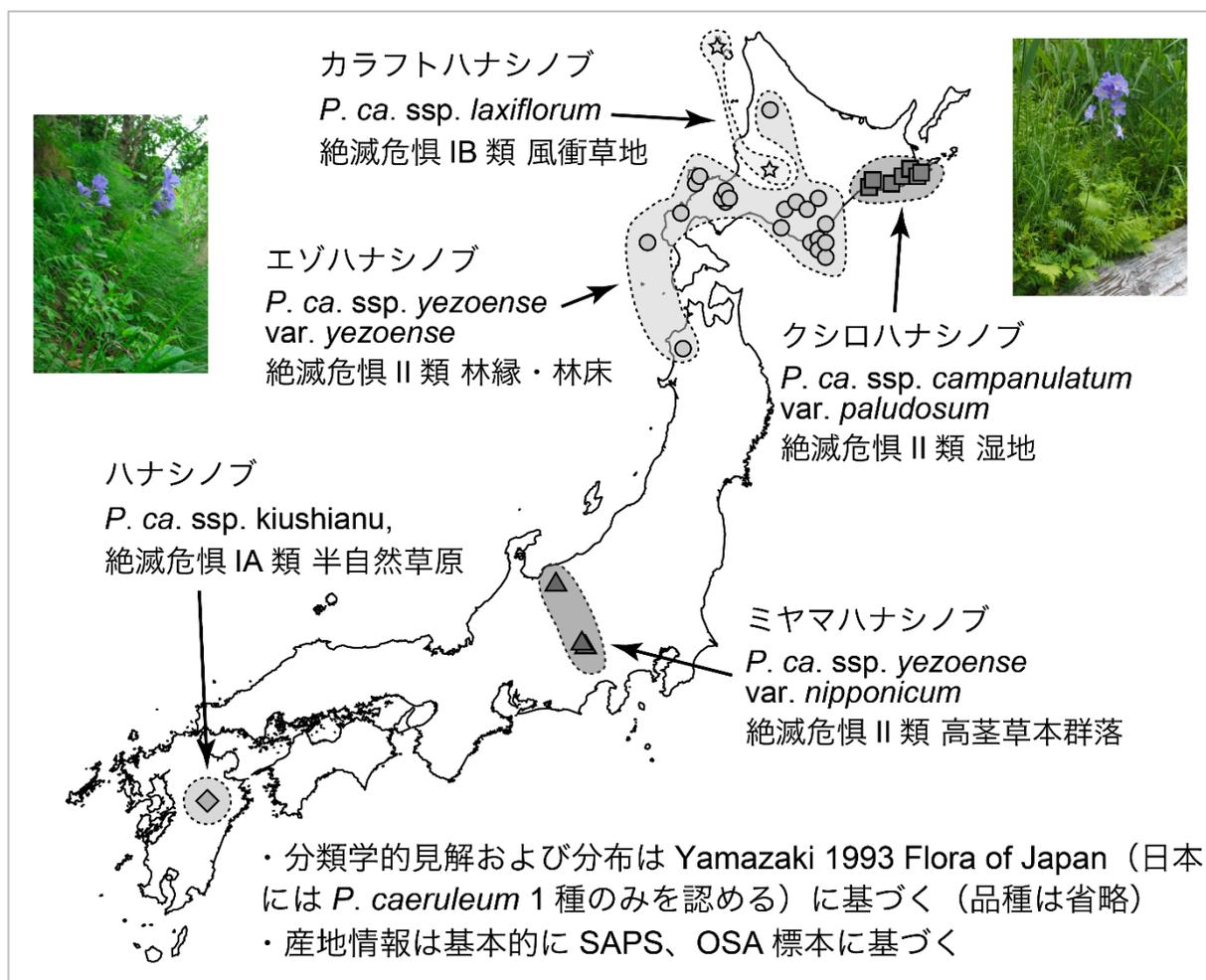


図(4)-8 タイヨウフウトウカズラと近縁普通種との遺伝的多様性比較

4) ハナシノブとその近縁種

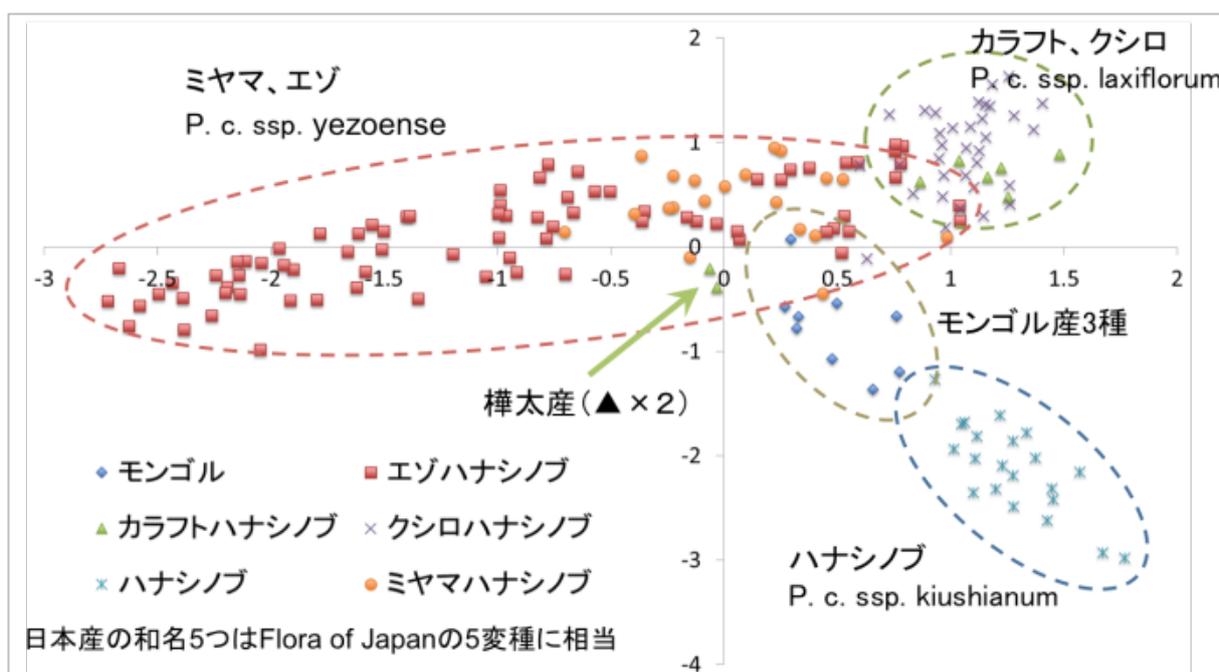
国内希少植物種であるハナシノブは、その他の日本産亜種・変種であるミヤマハナシノブ・エゾハナシノブ・カラフトハナシノブ・クシロハナシノブ(図(4)-9)とは遺伝的に明瞭に異なるが、モンゴルの種とは比較的近縁であることが示された(図(4)-10, 11)。今後、特にモンゴル産の関連種についてはさらに分類学的な検討が必要であるものの、少なくとも国内産のハナシノブ関連種の中では、希少種であるハナシノブの遺伝的固有性を確認することができた。

なお、今回の解析ではハナシノブ種内での集団間変異については示されていないが、これは今回の解析では種内レベルの解析を詳しく実施していないためであり、今後種内のサンプルに絞った解析を行うことで集団間変異が検出される可能性がある。



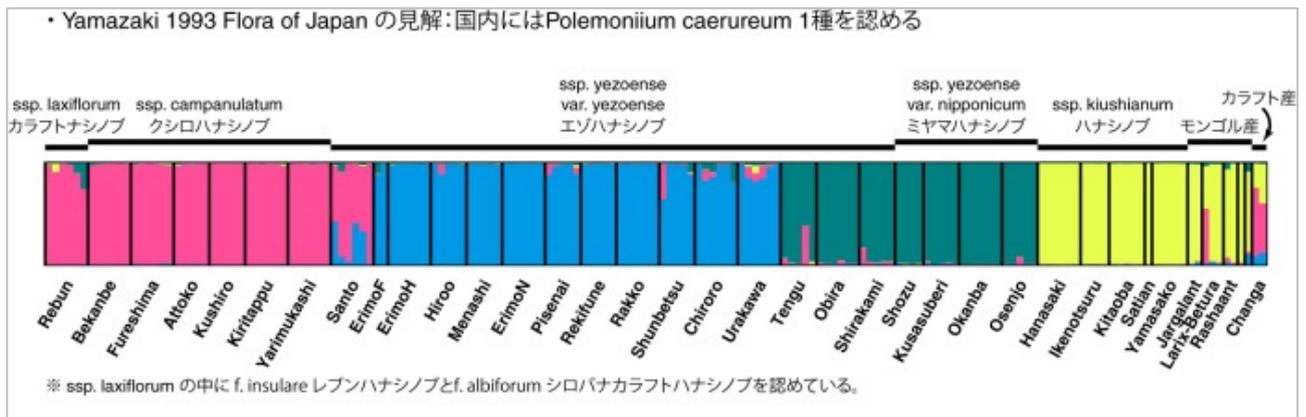
図(4-9) ハナシノブとその近縁種分類群の分布域

(研究協力者である大阪市立自然史博物館の横川昌史氏の作成した図を利用)



図(4-10) ハナシノブとその近縁種分類群の遺伝的関係を示す主成分分析図

(研究協力者である大阪市立自然史博物館の横川昌史氏の作成した図を利用)

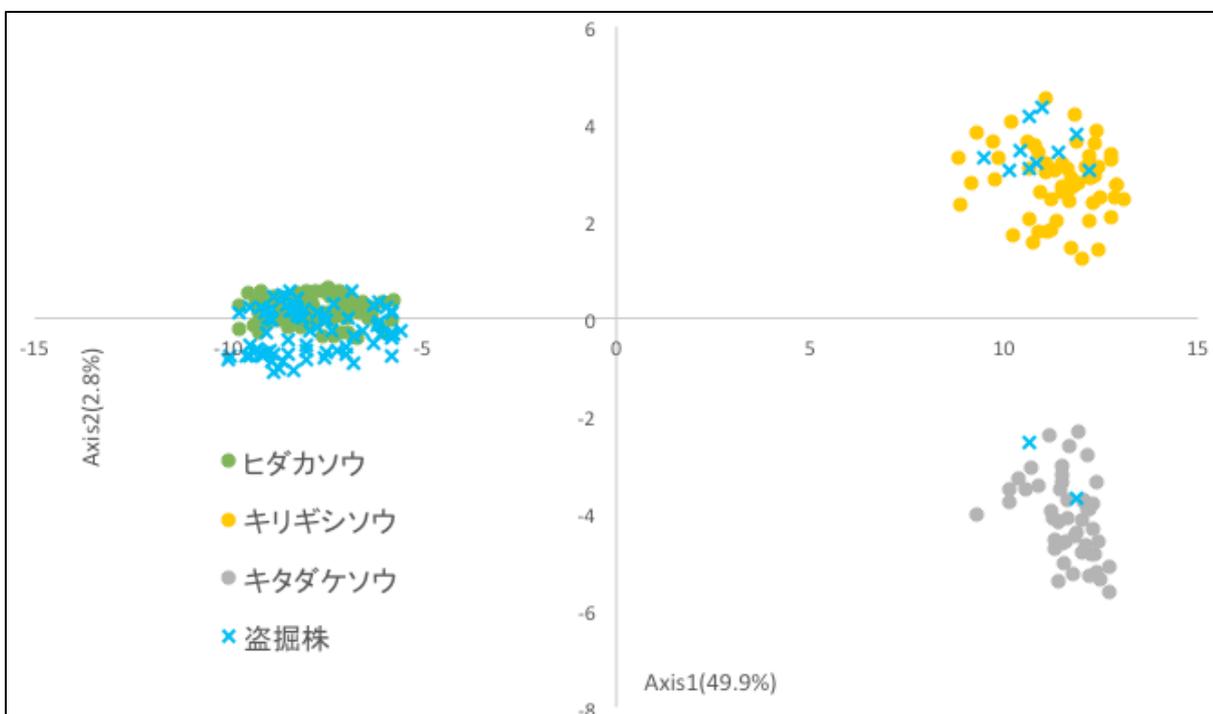


図(4-11) ハナシノブとその近縁種分類群の遺伝的集団構造解析図
(研究協力者である大阪市立自然史博物館の横川昌史氏の作成した図を利用)

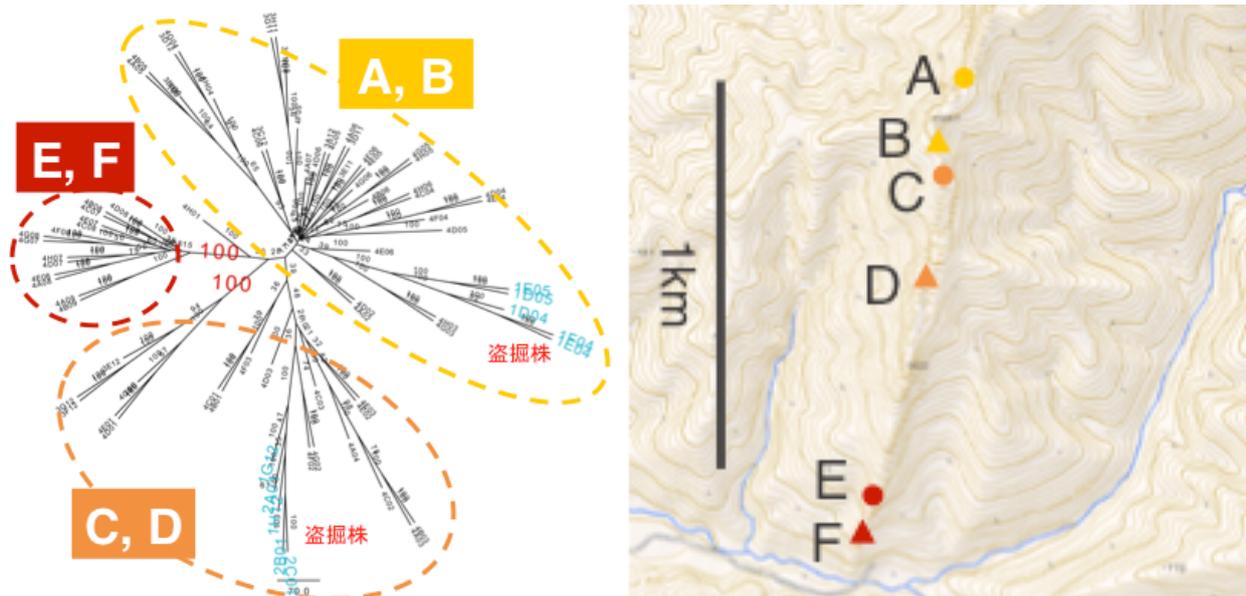
5) キタダケソウ・キリギシソウとその近縁種

キタダケソウとキリギシソウについては、国内の同属希少種であるヒダカソウとともに、警察により押収された盗掘株が北海道大学植物園で管理されている。しかし、外部形態ではこれら3種の識別が困難なままであり、域外保全株としての保全管理上の扱いに支障をきたす状態であった。そこで、これらの株とともに、各種の自生地から採取した試料を対象として、本研究で開発した手法により分析した。

その結果、3種は明瞭に判別され、盗掘株についても明確に種識別を行うことができた(図(4-12))。さらに、キリギシソウについて自生地集団と盗掘株の遺伝的関係を解析したところ、盗掘された元集団の推定も行うことができた(図(4-13))。これらの成果は、域外保全株の遺伝的位置付け(種同定)が可能であることを示すだけでなく、盗掘株の盗掘元集団の特定が可能であることを示しており、これらの情報による盗掘抑止への活用が期待される。



図(4-12) キタダケソウ・キリギシソウ・ヒダカソウの遺伝的関係を示す主成分分析図
自生地株と盗掘株の合計254サンプルを対象にしたMIG-seq分析により252個のSNPが得られ、キタダケソウ属3種の識別や盗掘株の種判別についての有効性が示された。



図(4)-13 キリギシソウの自生地株（黒字）および盗掘株（青字）の合計80サンプルを対象としたMIG-seq分析により検出された1535個のSNPをもとにした各サンプル間の遺伝的関係（左：近隣結合図）と、自生地集団の地理的位置（右）

6) チョウセンキバナアツモリソウ

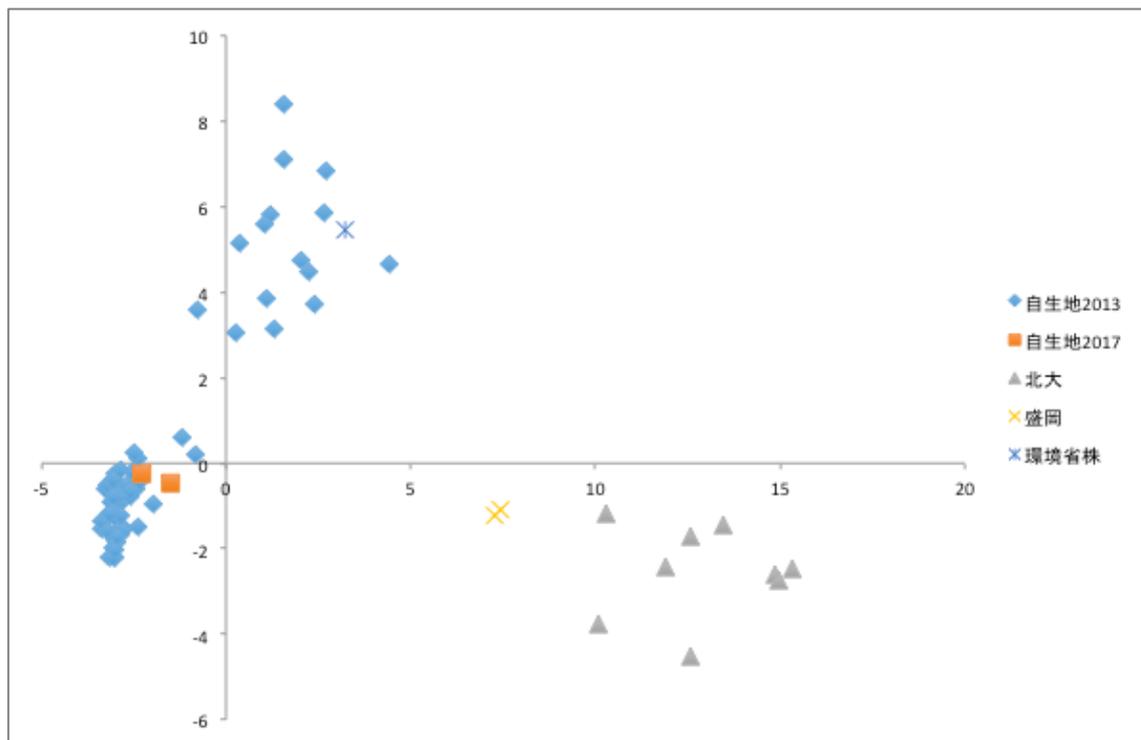
チョウセンキバナアツモリソウは、我が国では秋田県の1箇所にのみ自生するが、過去にこの自生地から採取された株から人工交配により作出されたとされる域外保全株が北海道大学植物園等において維持管理されている。

そこで、1)自生地に生育しているサンプルを2013年（「自生地2013」として図中の表示）および、2)2017年（同様に「自生地2017」）に採取した。また、3)北大の域外保全株（同様に「北大」）および、4)過去に自生地から採取されたと言われている株（同様に「盛岡」）、5)北大の域外保全株の種子親株として民間会社で栽培されていた株（同様に「環境省株」）、さらに比較用としてアラスカ自生地由来の種子から育成された栽培株（図中には含まれない）を対象として、本研究で開発した手法により遺伝的情報を取得した。

その結果、国内産の1~5)の株は遺伝的多様性が極めて低く、アラスカ由来のサンプルとは遺伝的に明確に異なることが示された（データは省略）。また、極めて重要な知見として、域外保全株には現在の自生地株に存在しない遺伝子が存在し、遺伝的に異なる組成を持つことが明らかになった(図(4)-14)。このことは2つの可能性として解釈可能であり、域外保全株がすでに自生地で失われた個体の系統を受け継ぐものである可能性と、民間会社での栽培時に国外株等の別系統との交雑によって生じた子孫である可能性が考えられた。

これらの結果、少なくともアラスカに自生する同種に対しては、国内希少植物種としての遺伝学的な固有性を確認することができたが、その遺伝的位置付けをより明らかにするためには、中国等の近隣地域に自生する同種を含めた解析を行う必要がある。また、域外保全株が自生地株と異なる遺伝子を持つことが示された点については、慎重な判断が必要である。すなわち、域外保全株がすでに自生地で失われた個体の系統を受け継ぐものであれば、域外保全株の遺伝的重要性を示すことになるが、一方で国外株との交雑による子孫である場合には、国内系統と区別した慎重な管理が必要となる。これらの可能性について判断できるデータを得るためには、前記同様に中国等の近隣地域に自生する株を含めた解析を行う必要がある。

なおこの成果は、環境省東北地方環境事務所が行うチョウセンキバナアツモリソウ生育域外保全実施計画検討会準備会合等において報告し、今後の保全実施計画に活用される予定であるとともに、今後も継続してデータ解析を実施する予定である。



図(4)-14 チョウセンキバナアツモリソウの自生地株（2013年および2017年に採取）および域外保全株（北大、盛岡、環境省株）の遺伝的違いを示す主成分分析図

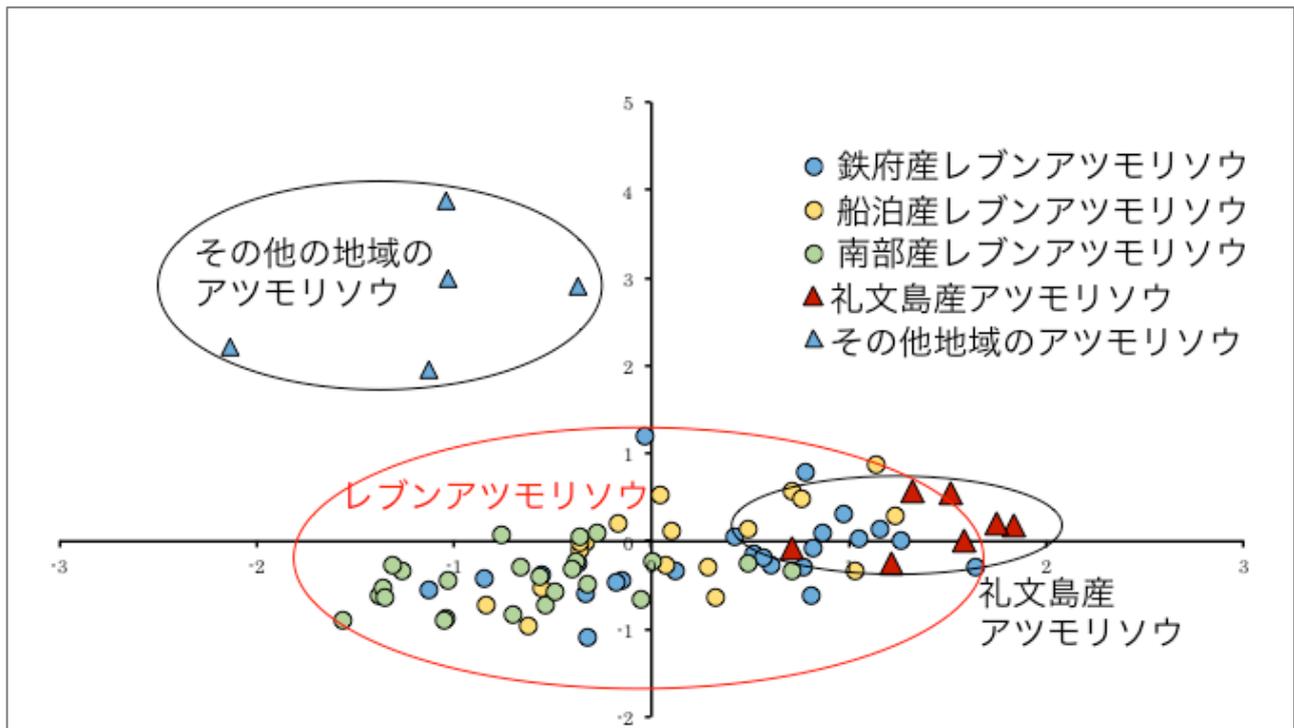
自生地および環境省株に対し、域外保全株の北大と盛岡株は異なる遺伝的組成をもっていることが分かる。

7) レブンアツモリソウ・アツモリソウ

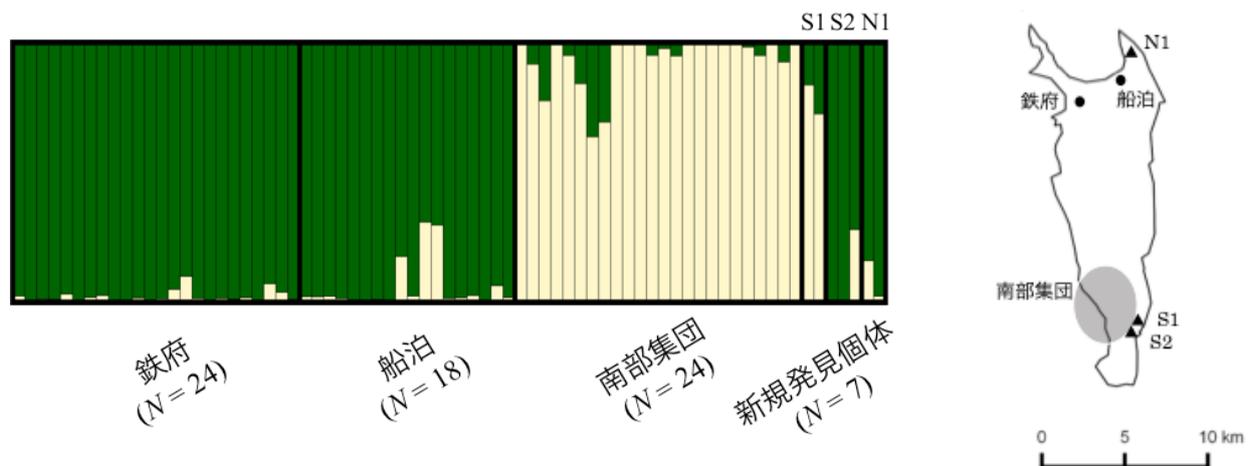
レブンアツモリソウは、その近縁種である他地域産のアツモリソウとは遺伝的に明瞭に異なるが、礼文島産のアツモリソウとはより近縁であることが示された(図(4)-15)。

レブンアツモリソウの遺伝学的な固有性を評価する上でさらに慎重な検討が必要ではあるが、このことは少なくとも礼文島におけるレブンアツモリソウおよびアツモリソウの遺伝的固有性を支持している。一方、レブンアツモリソウ種内では島内に明瞭な遺伝的地域性があることが示された(図(4)-15)。すなわち、礼文島北部に位置する「鉄府」および「船泊」の集団は、島南部の集団とは明瞭に異なる遺伝的組成を示すことがわかった。

なお、これらの自生地以外の島南部(S1およびS2)および北部(N1)で近年発見された個体には、自生地集団の遺伝的地域性との不整合が認められる個体が検出された。すなわち、S2の3個体は島南部で発見されたにも関わらず、明らかに北部の遺伝的組成を持っていた(図(4)-16：北部集団の組成と同じ緑色で示された遺伝子組成を持つ右端から3～5番目の個体)。これらの個体は教育施設の敷地で発見されたこともあり、移植等による人為的な背景を持つ個体である可能性が疑われるため、域外保全株として位置付けるなどの慎重な取り扱いが必要であることを示唆した(図(4)-16)。



図(4)-15 レブンアツモリソウと近縁種（アツモリソウ）の遺伝的関係を示す主成分分析図

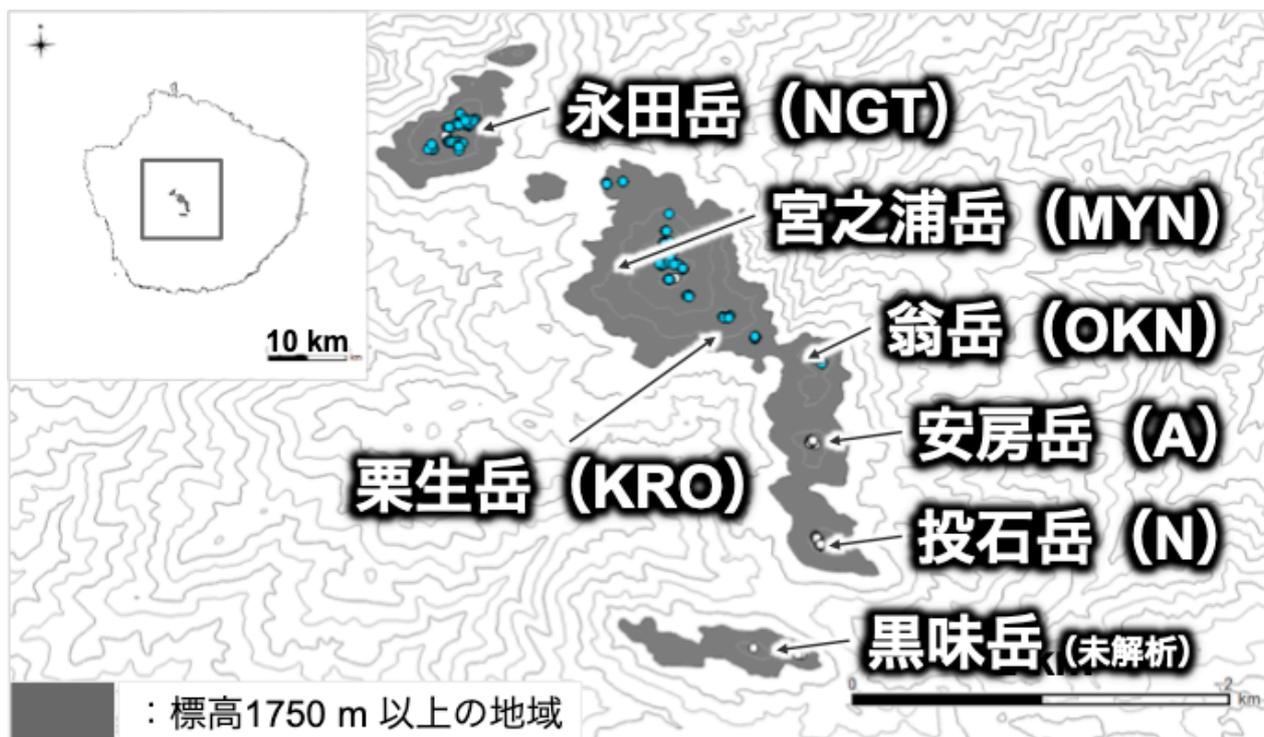


図(4)-16レブンアツモリソウの遺伝的地域性を示す遺伝的集団構造解析図（左）、およびその試料採取地（右）

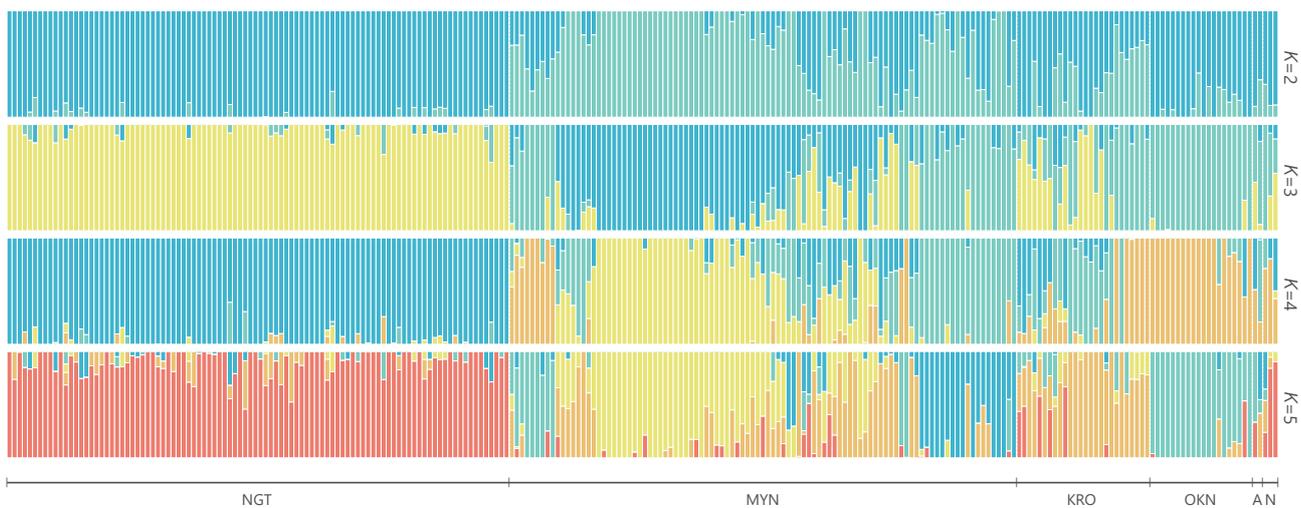
8) ヤクシマリンドウ

ヤクシマリンドウは、種内の遺伝的多様性が低いレベルであるものの、分布域内(図(4)-17)の山岳分集団間に緩やかな遺伝的違いが存在することが示された(図(4)-18)。特に、永田岳とそれ以外では比較的明瞭な遺伝的違いが検出された。また、それぞれの山岳分集団ごとに分集団内の遺伝的多様性レベルを比較したところ、分布のほぼ中央に位置する宮之浦岳で最も高いレベルの遺伝的多様性が検出された(図(4)-19)。

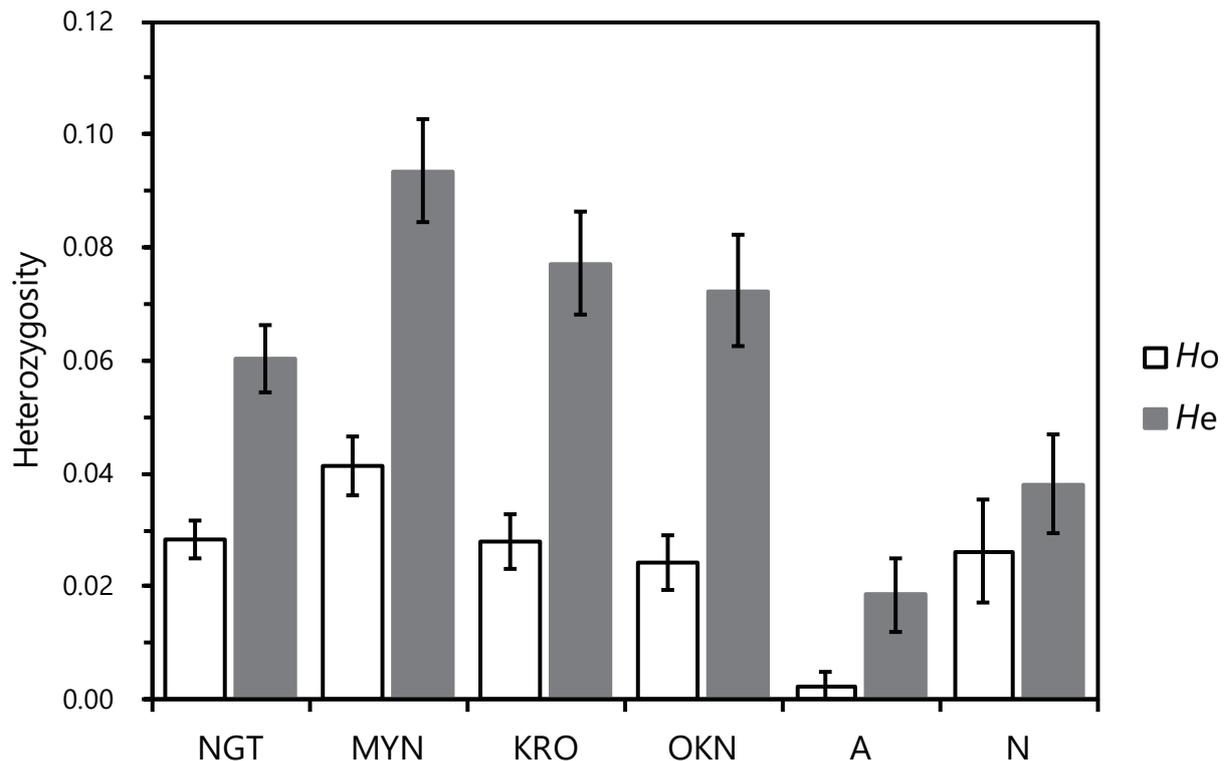
これらのことは、効率的な保全対策が必要な場合には宮之浦岳の保全優先度が高いものとして位置付けられることを支持するが、各山岳分集団間に緩やかな遺伝的違いが存在するため、分布全域の一体的な保全管理の必要性を考慮する必要がある。



図(4)-17 ヤクシマリンドウの試料採取地



図(4)-18 ヤクシマリンドウの遺伝的地域性を示す遺伝的集団構造解析図



図(4)-19 ヤクシマリンドウの各山岳分集団における遺伝的多様性（ヘテロ接合度の観察値[H_o]、ヘテロ接合度の期待値[H_e]）の比較

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで、時間・労力・経済性・分析対象試料の質・量の問題等により実施が困難であった保全遺伝学的情報取得法に関して、本研究により実効性のあるゲノム情報の縮約解読技術を開発した。

本プロジェクトの成果として、絶滅危惧種の保全遺伝学的な応用を始めとして、分子系統分類・分子系統地理・集団遺伝学・分子生態学、さらには農作物等の品種識別技術に至るまで、様々な対象を目的としたゲノム情報取得がより現実的に可能になり、国内外で広く用いられる新技術として注目されつつある点は特筆すべき成果である（「国際共同研究等の状況」および「口頭発表」を参照）。

また、この技術を用いて実際に「種の保存法」指定植物種のゲノム情報を取得することにより、各対象種に関する分子系統分類・集団遺伝学的情報を集積できた点で基礎科学的意義がある。さらに、その保全管理等に活用できる情報を提供することができたという点で、応用科学的意義は大きい。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省東北地方環境事務所が行うチョウセンキバナアツモリソウ生育域外保全実施計画検討会準備会合等において、本研究成果であるゲノム縮約解読技術を用いたチョウセンキバナアツモリソウの分析結果を提示し、保全実施計画の検討に貢献した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

「種の保存法」指定種である10種（シマカコソウ、コヘラナレン、タイヨウフウトウカズラ、ハナシノブ、キタダケソウ、キリギシソウ、チョウセンキバナアツモリソウ、レブンアツモリソウ、ヤアツモリソウ、クシマリンドウ）において得られた遺伝的地域性等の情報が、各種の保全実施計画に活用されることが見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

- 1) 東南アジアの森林植物を対象とした種および遺伝子多様性の包括的解析 (Hoang Thi Binh、Nguyen Van Ngoc・ダラット大学・ベトナム) :ベトナムに分布する熱帯林植物の種多様性調査で連携し、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して、当地に分布する希少な植物群を対象に新種・新産地記載、系統関係解析等の共同研究を行なった。これらの成果は2報の国際共著論文^{3),4)}として発表したほか、ダラット大学で開催された国際ワークショップにおいて開発技術を紹介した。
- 2) マングローブ林保全のためのグローバルゲノミクス解析 (Juan Núñez-Farfán、メキシコ国立自治大学、メキシコ) :マングローブの保全を目的とした遺伝学的研究において連携し、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して、メキシコ等に分布するマングローブ植物の集団遺伝学的研究を行なった。また、ゲノム情報を用いたマングローブの保全方法について、国際共著論文として総説⁵⁾を発表したほか、メキシコ国立自治大学で開催されたセミナーにおいて、本研究で開発した技術を紹介した。
- 3) ヨーロッパ南部におけるエゴノキ属植物の隔離小集団を対象とした保全遺伝学的研究 (Laura Parducci、Alessandro Nobile、ウプサラ大学、スウェーデン) :ヨーロッパ南部に分布する貴重な隔離遺存植物群落を構成する植物を対象とした保全遺伝学的研究において連携し、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して、イタリア・ギリシャ等に分布するエゴノキ属植物の集団遺伝学的研究を開始した。また、ウプサラ大学で開催されたセミナーに招聘され、本研究で開発した技術を紹介した。
- 4) 中国におけるコナラ属植物の分子系統地理学的研究 (Min Deng、Shanghai Chenshan Plant Research Center、中国) :中国南部に分布するコナラ属植物を対象とした保全遺伝学的研究において連携し、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して*Quercus cocciferoides*の集団遺伝学的研究を実施した。また、Shanghai Chenshan Botanical Gardenで開催された国際学会に招聘され、本研究で開発した技術を紹介した。
- 5) 希少種を含む*Dalbergia*属植物の保全のための分子系統分類学的研究 (Mohammad Vatanparast、コペンハーゲン大学、デンマーク) :ローズウッド等の貴重な植物を含む*Dalbergia*属植物の保全のための分子系統解析のため、当該研究者が当研究室を訪問し、意見交換をするとともに、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して分子系統解析を行った。
- 6) 希少樹木を含むジンコウ属植物の分子系統解析 (Marlina Ardiyani、ボゴール植物標本館、インドネシア) :香木として高額で取引されるために保全が急務となっているジンコウ属植物の分子系統解析のため、当該研究者が当研究室に滞在して、意見交換をするとともに、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して研究を実施した。
- 7) 東南アジア産樹木の種多様性・系統多様性・形質多様性の地理的パターン (Phetlasy Souladth、ラオス国立大学、ラオス) :ラオス南部に残された熱帯林植物の種多様性解析のため、カウンターパートと連携して現地での植物相調査を実施するとともに、DNA分析用試料を採取した。今後、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して分子系統解析を実施予定。すでにラオス初記載および新記載種の発見を確認しており、今後論文発表の予定である。
- 8) ゲノムに残されたデモグラフィ情報の比較解析で探る生物多様性の環境変動応答 (Gildas Gâteblé、ニューカレドニア農業研究所・フランス領ニューカレドニア) :ニューカレドニアに分布する固有希少種を含む*Oxera*属植物を対象として、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して分子系統・集団遺伝学的解析を実施している。
- 9) オーストラリア南部に分布する*Olearia*属希少植物の保全遺伝学的研究 (Elizabeth James、Royal Botanic Gardens Victoria、オーストラリア) :オーストラリア南部のごく限られた場所に孤立集団として分布する*Olearia*属植物を対象として、本研究で開発したゲノム情報の縮約解読技術を利用して集団遺伝学的解析を実施した。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 岩崎貴也、小玉あすか、松尾歩、陶山佳久、大西亘、尾関雅章、中浜直之、山本薫：Sic. J. Kanagawa Univ., 30, 89–96（2019）
「腊葉標本DNAのMIG-seq法による利用可能性・解析手法の検討」
- 2) 陶山佳久：森林遺伝育種、8, 2, 85–89（2019）
「森林遺伝育種学的研究におけるMIG-seq法の利用」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) Y. SUYAMA：西南大学生命科学院セミナー（2019）
“MIG-seq: an efficient tool for the study of genetic differentiation among individuals, populations and species.”
- 2) 陶山佳久：日本農芸化学会2019年年度東京大会（2019）
「MIG-seq法：次世代シーケンサーを用いた手軽なゲノムワイド塩基配列分析」
- 3) 陶山佳久：第66回日本生態学会（2019）
「MIG-seq法を用いた絶滅危惧植物の保全遺伝学的解析」
- 4) 陶山佳久：第129回日本森林学会大会（2018）
「森林生態・遺伝育種学的研究のための分子生物学的分析手法の開発と普及」
- 5) Y. SUYAMA: The IEG Seminar series ‘Frontiers in Ecology and Evolution’(2018)
“MIG-seq: a simple method for genome-wide sequencing.”
- 6) 陶山佳久：森林遺伝育種学会第7回大会（2018）
「森林遺伝育種学的研究のためのMIG-seq（multiplexed ISSR genotyping by sequencing）法の開発」
- 7) 陶山佳久:日本生態学会東北地区会第63回弘前大会（2018）
「次世代シーケンサーを用いた手軽な分子系統・集団遺伝解析」
- 8) 陶山佳久：第50回種生物学シンポジウム（2018）
「MIG-seqとマルチプレックスDNAバーコーディングによる分子系統・集団遺伝解析」
- 9) 陶山佳久、綱本良啓、満行知花：第65回日本生態学会大会（2018）
「改良MIG-seq法の概要」
- 10) 綱本良啓、廣田峻、石井直浩、小沼拓矢、陶山佳久：第65回日本生態学会大会（2018）
「MIG-seqで加速する絶滅危惧植物の保全遺伝学的データ取得」
- 11) 綱本良啓、満行知花、陶山佳久：第65回日本生態学会大会（2018）
「MIG-seq：NGSを用いた迅速で簡単な多型解析法」
- 12) Y. SUYAMA：Instituto de Ecología Seminar, Universidad Nacional Autonoma de Mexico（2018）
“MIG-seq: a simple method for genome-wide sequencing.”
- 13) 陶山佳久、松尾歩、廣田峻：日本DNA多型学会第27回学術集会（2018）
「MIG-seq法：次世代シーケンサーを用いた手軽なゲノムワイド塩基配列分析」
- 14) N. ISHII, Y. TSUNAMOTO, S. HIROTA, A. MATSUO, H. ABE, Y. SUYAMA: The 8th East Asian Federation of Ecological Societies International Congress（2018）
“Spatial genetic structure in alpine populations of an endangered gentian, *Gentiana yakushimensis*.”
- 15) Y. SUYAMA, A. MATSUO, S. HIROTA, C. MITSUYUKI, T. YAHARA: 7th International Legume Conference（2018）
“MIG-seq and multiplexed DNA barcoding: an efficient combination for molecular phylogenetic analysis.”

- 16) Y. SUYAMA, A. MATSUO, S. HIROTA: The 2nd International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity and Conservation of Endangered Plants in East Asia (2018)
“MIG-seq and multiplexed DNA barcoding: efficient tool for phylogeography and conservation Genetics.”
- 17) Y. SUYAMA: Workshop on the ecological research of plant diversity and forest ecosystem in Bidoup - Nui Ba National Park and surrounding areas (2018)
“Advanced approaches to the study of genetic and phylogenetic diversity in tropical forests.”
- 18) 横川昌史、綱本良啓、陶山佳久：日本植物分類学会第16回大会（2017）
「MIG-seqを用いた日本産ハナシノブ属の遺伝的類縁関係の推定」
- 19) 成田あゆ、兼子伸吾、陶山佳久、綱本良啓、小牧義輝、葉山佳代、坂入祐子、井鷲裕司：日本生態学会第64回大会（2017）
「小笠原諸島の希少植物タイヨウフウトウカズラの実生の遺伝的多様性：SSR/MIG-seqによる解析と比較」（サブテーマ1の業績と重複）
- 20) 陶山佳久：日本生態学会第64回大会（2017）
「MIG-seqの原理と概要」
- 21) 綱本良啓、丹野たかね、斎藤遥花、陶山佳久：日本生態学会第64回大会（2017）
「MIG-seqの特徴を生かした研究と、今後の可能性」
- 22) 綱本良啓、満行知花、陶山佳久：日本生態学会第64回大会（2017）
「MIG-seq法のバージョンアップ：複数種を用いた検討によるライブラリー構築方法の改良」
- 23) 小沼拓矢、綱本良啓、阿部晴恵、中村 剛、陶山佳久：第49回種生物学シンポジウム（2017）
「MIG-seq分析によるキタダケソウ属3種の種識別と遺伝的集団構造解析」
- 24) Y. SUYAMA, G.M. MORI, C. MITSUYUKI, Y. TSUNAMOTO: Workshop for Mangrove Conservation Genetics 2017 (2017)
“MIG-seq: an efficient genome-wide sequencing method for conservation genetics of mangroves.”
- 25) Y. SUYAMA: IUFRO 2017 Genetics & Genomics of Fagaceae (2017)
“MIG-seq: an efficient PCR-based method for genome-wide genotyping.”
- 26) Y. SUYAMA, C. MITSUYUKI, Y. TSUNAMOTO: Evolution 2017 (2017)
“MIG-seq: efficient PCR-based method for genome-wide sequencing.”
- 27) Y. SUYAMA, G.M. MORI, C. MITSUYUKI, Y. TSUNAMOTO: XIX International Botanical Congress (2017)
“MIG-seq: efficient PCR-based method for genome-wide sequencing using NGS.”
- 28) Y. SUYAMA, C. MITSUYUKI, M. ITO, T. YAHARA: 7th International Barcode of Life Conference (2017)
“Genome-wide DNA barcoding: new concept of species identification tool using next-generation sequencing.”
- 29) 満行知花、綱本良啓、陶山佳久：第48回種生物学シンポジウム（2016）
「MIG-seqライブラリー構築法の改良」
- 30) 陶山佳久：第3回ゲノム多様性解析ワークショップ（2016）
「MIG-seq法：NGSによる簡便な遺伝的多型解析」

（3）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（4）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 大学公開セミナー「首都大学東京『系統進化特別講義』兼セミナー」において講演「生物の個体・集団・種を識別できる新しいDNA分析技術：MIG-seq法の原理からその研究事例まで」（2018年11月22日、聴講者約30名）

- 2) 大学公開セミナー「熊本大学生命科学講座公開セミナー」において講演「生物の個体・集団・種を識別できる新しいDNA分析技術：MIG-seq法の原理からその研究事例まで」（2018年10月24日、聴講者約70名）
- 3) インターネット上公開セミナー「イルミナ iSchoolプロフェッショナル・ウェビナー」において講演「MIG-seq法：次世代シーケンサーを用いた手軽なゲノムワイド塩基配列分析」（2018年9月5日、登録聴視者約80名）
- 4) 一般公開シンポジウム「未来の暮らし方を育む泉の創造シンポジウムin志摩—地域の自然とライフスタイル—」において講演「生物の地域性を活かした豊かな未来を目指して」（2018年7月21日、聴講者約80名）
- 5) 「ネイチャーテクノロジー研究会」において講演「生物の個体・集団・種を識別できる新しいDNA分析技術—その応用による豊かな社会の創造—」（2018年2月20日、聴講者約20名）
- 6) 一般公開シンポジウム「未来の暮らし方を育む泉の創造シンポジウムin北上」において講演「生物の地域性を活かした豊かな未来を目指して」（2017年12月16日、聴講者約100名）
- 7) 大学公開セミナー「東京大学大学院総合文化研究科広域システム科学特別セミナー」において講演「MIG-seq法の概要とその多様性生物学研究への応用」（2017年12月14日、聴講者約60名）
- 8) 大学公開セミナー「第26回Qecoセミナー（九州大学理学研究院）」において講演「生物の個体・集団・種を識別できる新しいDNA分析技術：MIG-seq法の原理からその研究事例まで」（2017年11月16日、聴講者約50名）
- 9) 大学公開セミナー「宮崎大学テニユアトラック推進セミナー」において講演「生物の個体・集団・種を識別できる新しいDNA分析技術：MIG-seq法の開発秘話からその研究事例まで」（2017年10月6日、聴講者約60名）
- 10) 一般公開「エフエム仙台 forever green project仙台北山輪王寺の森体験ツアー講演会」において講演「森の命の多様性を次世代に残す」（2017年9月24日、聴講者約80名）
- 11) 秋田市「自然共生社会ワークショップ」において講演「地域産の遺伝子資源を活かした農林水産業と自然再生」（2017年3月22日、聴講者約20名）
- 12) 一般公開「南三陸町ワークショップ」において講演「地域に残る『生物の伝統』を『売り』にする」（2017年2月23日、聴講者約40名）
- 13) 地域の科学講座「仙台ツリーケアワークショップ」において講演「地域による遺伝子の違いを生かした植樹の重要性」（2016年11月19日、聴講者約20名）

（5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) イルミナ社webサイト（2019年4月2日掲載、お客様インタビュー、「MiSeqシステムを用いて開発したMIG-seqにより、生物種を超えて集団遺伝学や分類学に貢献」）
- 2) エフエム仙台（2019年2月24日、Forever Green Radio、「自然を守る研究の中での思いがけない発見の興奮」）
- 3) エフエム仙台（2017年7月30日、Forever Green Radio、種の保存法や推進費による希少植物保全研究について紹介）

（6）その他

- 1) 森林遺伝育種学会賞受賞、陶山佳久、2018年11月
- 2) 日本森林学会賞受賞、陶山佳久、2018年3月

8. 引用文献

- 1) Y. SUYAMA and Y. MATSUKI: Sci. Rep., 5, 16963 (2019)
MIG-seq: an effective PCR based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next generation sequencing platform

- 2) 陶山佳久：森林遺伝育種、8, 2, 85–89 (2019)
森林遺伝育種学的研究におけるMIG-seq法の利用
- 3) H.T. BINH, N.V. NGOC, T.N.C BON, S. TAGANE, Y. SUYAMA and T. YAHARA: *PhytoKeys*, 92, 1–15 (2018)
A new species and two new records of *Quercus* (Fagaceae) from northern Vietnam
- 4) H.T. BINH, N.V. NGOC, S. TAGANE, H. TOYAMA, K. MASE, C. MITSUYUKI, J.S. STRIJK, Y. SUYAMA and T. YAHARA: *PhytoKeys*, 95, 37–70 (2018)
A taxonomic study of *Quercus langbianensis* complex based on morphology and DNA barcodes of classic and next generation sequences
- 5) A.K.S. WEE, G.M. MORI, C.F. LIRA-MEDEIROS, J.N. FARFÁN, K. TAKAYAMA, L. FAULKES, S. SHI, Y. TSUDA, Y. SUYAMA, T. YAMAMOTO, T. IWASAKI, Y. NAGANO, Z. WANG, S. WATANABE and T. KAJITA: *Conserv. Biol.*, 33, 1, 206–209 (2019)
The integration and application of genomic information in mangrove conservation

III. 英文Abstract

Optimum Conservation of Species Designated by the Endangered Species Preservation Act Using Information Obtained from Sequencing Breakthrough

Principal Investigator: Yuji ISAGI

Institution: Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwake, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8501, JAPAN
Tel: +81-75-753-6422 / Fax: +81-75-753-6123
E-mail: isagiy@kais.kyoto-u.ac.jp

Cooperated by: Tohoku University, University of Tsukuba

[Abstract]

Key Words: Biodiversity conservation, Convention on biological diversity, Deleterious gene, Spatial genetic structure

In Japan, many plant species are threatened by extinction. However, the Act on Conservation of Endangered Species of Wild Fauna and Flora was revised in 2013 to describe the importance of conservation of endangered plant species. The revision set a target of 300 newly designated domestic rare species of wild fauna and flora in Japan. We aimed to construct effective and rational conservation guidelines for critically endangered species on the basis of DNA sequencing breakthroughs established over the last 2 decades.

This project achieved four objectives: (1) to contract genome and transcriptome sequencing, (2) to evaluate the vulnerability and sustainability of the species, (3) to estimate demographic changes, and (4) to develop a cost-effective method of genome sequencing using small and degraded DNA samples.

We found that some endangered species have accumulated more deleterious variations in their genome and fewer gene duplications as compared with those in non-threatened congeners. These traits in endangered species can result in vulnerability and less adaptability to diverse environments. Conservational conditions of endangered species have been conventionally evaluated on the basis of their number of wild individuals and reduction rate. The present finding is an epoch-making for biodiversity conservation in that some genomic traits, including the amount of accumulated deleterious genetic variations and gene duplications, can be used to evaluate the sustainability of endangered species.

Demographic changes of critically endangered species were successfully inferred and compared with those of less threatened congeners. Most endangered species exhibited smaller effective population numbers and more frequent population decline.

MIG-seq (Multiplexed ISSR Genotyping by sequencing) analysis, a simple and cost-effective contracted genome sequencing method, was greatly improved during this project. Now, the method outputs larger amounts (several times more) and more accurate sequencing information. Genetic analyses of spatial genetic structure, phylogeny, detection of genetic pollution, and construction of appropriate management units for many critically endangered species were successfully performed using small amount of degraded DNA samples.

Finally, findings of each objective were integrated into a new scheme for biological conservation of domestic rare species of wild fauna and flora in Japan using large amount of genetic information obtained from DNA sequencing breakthroughs. The outcome of this project will aid in achieving the Aichi Biodiversity Targets 12 and 19.