

Environment Research and Technology Development Fund

## 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

4-1902 ゲノム情報に基づくテーラメイド生物多様性保全策の構築と検証  
(JPMERF20194002)

令和元年度～令和3年度

Construction and Verification of Tailor-made Biological Conservation Strategy  
Based on Genome Information

<研究代表機関>  
京都大学

<研究分担機関>  
東北大学

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和4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. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	16
II-1 ゲノム縮約解読による希少種の保全価値評価および統合解析 （京都大学、東北大学）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-2 比較ゲノム解析による希少種の保全難易度評価 （東北大学）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	45
IV. 英文Abstract	48

## I. 成果の概要

課題名 4-1902 ゲノム情報に基づくテラメイド生物多様性保全策の構築と検証

課題代表者名 井鷲 裕司 (国立大学法人京都大学 教授)

重点課題 主：【重点課題⑫】生物多様性の保全とそれに資する科学的知見の充実に向けた研究・技術開発

副：【重点課題⑫】同上

行政要請研究テーマ (行政ニーズ) (4-7) 国内希少野生動植物種の生息個体数や生息適地の推定方法の確立に向けた研究

研究実施期間 令和元年度～令和3年度

研究経費

64,344千円 (合計額)

(各年度の内訳：令和元年度：24,024千円、令和2年度：20,160千円、令和3年度：20,160千円)

研究体制

(サブテーマ1) ゲノム縮約解読による希少種の保全価値評価および統合解析 (国立大学法人京都大学、国立大学法人東北大学)

(サブテーマ2) 比較ゲノム解析による希少種の保全難易度評価 (国立大学法人東北大学)

研究協力機関

研究協力機関はない。

本研究のキーワード 生物多様性保全、ゲノム解析、系統解析、保全難易度、保全価値評価、国内希少野生動植物種

### 1. はじめに (研究背景等)

生物多様性には多面的な価値があるが、その状況は年とともに厳しくなっている。わが国においては、1973年のワシントン条約、1992年の生物多様性条約などの国際条約を受けた国内法として、いわゆる「種の保存法」が1992年に制定され、生物多様性保全のための施策が行われてきた。「種の保存法」は2013年に意欲的な改正がなされ、「生物多様性の確保」を目的とすることや、「科学的知見の充実に資すること」が国の責務とされ、更に、2017年の改正時に付帯決議として、2030年までに、国内希少野生動植物種を700種指定する目標がかかげられた。国内希少野生動植物種は最大級の保全努力が払われることが求められているものであるが、現在、維管束植物だけでも120を超える種が指定されている。また、野生個体が概ね1,000個体未満と危機的状況にあり、環境省レッドリストにおいて絶滅危惧1類にランクされている維管束植物は1,045種にもものぼる。また、現在国内希少野生動植物種に指定されている維管束植物の約4割は日本だけでなく近隣諸国にも生育している。

これら多数の希少生物の保全状況に関しては、これまでもっぱら個体数の多寡や減少速度から評価されてきたが、それだけでは十分ではなく、限りある保全リソース（労力、経費、時間など）を活用して、適切かつ効率的に保全するためには、個々の希少種ごとに保全価値と保全難易度の評価を行う必要がある(図0.1)。

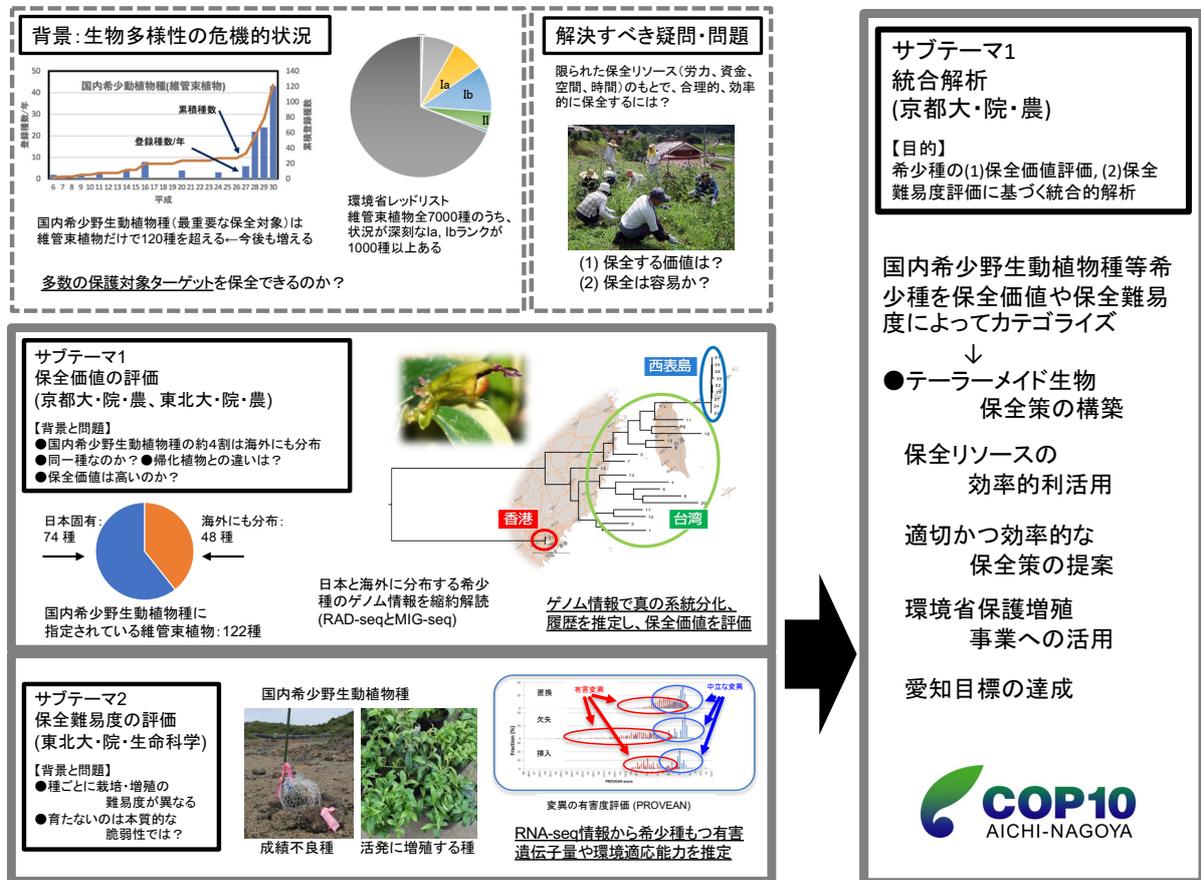


図0.1 本研究を構成するサブテーマ1、2の研究背景と研究内容

## 2. 研究開発目的

本研究では、限られた保全リソースを活用して保全対象となりうる多数の希少種を適切かつ効果的に保全するために、希少種の保全価値と保全難易度について、ゲノム情報を活用した新たな評価方法の確立を目的とする。対象とするのは国内希少野生動植物種や絶滅危惧I類等に指定されている維管束植物の希少種のうち、海外にも分布するものであり、1年間に2種、プロジェクト研究期間中に6種を解析することを目標とした。

サブテーマ1では、RAD-seqとMIG-seqによるゲノム縮約解読に基づき、種内系統関係、遺伝構造、デモグラフィックなどを明らかにし、希少種の保全価値を適切に評価する。サブテーマ2では、生物の形質として発現する遺伝情報をRNA-seqによって網羅的に解析し、ゲノムレベルの遺伝的多様性、有害突然変異の蓄積、環境適応性などを明らかにする事で、希少種の保全難易度を評価する(図0.1)。

そして、これらの結果をサブテーマ1で統合的に解析することによって、各々の希少種の状況に応じたテラメイドな保全策を構築し、限りある保全リソースを有効に希少種保全に活用できるようにすることを目的とする(図0.1)。

## 3. 研究目標

全体目標	現存する個体数が極めて少ない希少種6種のゲノムを解読し、地域個体群の独自性や履歴を解析するとともに、ゲノム内の有害遺伝子蓄積量と環境適応能力を解析することで、希少種の系統的独自性に基づく保全価値の評価と保全難易度を評価し、希少種の状況に応じたテーラーメイド生物多様性保全策を確立する。
------	--

サブテーマ1	ゲノム縮約解読による希少種の保全価値評価および統合解析
サブテーマリーダー/所属機関	井鷲裕司/京都大学
目標	希少種6種を対象に縮約ゲノム解読を行い、希少種地域個体群の独自性や履歴を解析する。また、mRNAの網羅的解読(RNA-seq)から得られた情報をサブテーマ2に提供する。さらに、統合的な解析を行い、サブテーマ2の結果を合わせて、希少種の状況に応じた適切かつ効率的な保全策(テーラーメイド生物多様性保全策)の構築を行う。

サブテーマ2	比較ゲノム解析による希少種の保全難易度評価
サブテーマリーダー/所属機関	牧野能士/東北大学
目標	サブテーマ1から提供された希少種6種のRNAの網羅的解読情報をもとに、ゲノム内の有害遺伝子蓄積量と環境適応能力を解析することで、希少種の保全難易度を評価する。

#### 4. 研究開発内容

国内希少野生動植物種に指定されている維管束植物の約4割は、近隣諸国にも生育しているが、日本に生育する個体群の独自性は必ずしも明らかにされていない。また、その履歴が不明なものもある。サブテーマ1では、国内希少野生動植物種や絶滅危惧I類の希少生物の保全価値を正しく評価し、限られた保全リソースを有効に活用するために、縮約ゲノム解読によって、日本産と海外産の希少種の同一性や、種内系統の独自性・履歴を解析する。

国内希少野生動植物種の中には環境省による集約的な保護増殖事業が行われているものがあるが、その成績は必ずしも良好ではない。サブテーマ2では国内希少野生動植物種に指定されている希少植物について、ゲノム内の有害遺伝子蓄積量や環境適応能力の観点から、個々の希少生物の保全難易度を評価する。

また、国内希少野生動植物種など、保全対象の分類群について、(I)保全価値の評価と(II)保全難易度の評価を統合的に解析することによって、ただ単に個体数の多寡に基づくだけでなく、より詳細な種の実態に応じた適切かつ効率的な保全策(テーラーメイド生物多様性保全策)を構築する。

#### 5. 研究成果

##### 5-1. 成果の概要

生物多様性保全を達成するためには希少種の保全が重要であるが、絶滅危惧種や国内希少野生動植物種など、保全対象とすべき分類群の数は多数にのぼる。適切かつ効果的な希少種の保全を達成するために、希少植物を、ただ単に個体数だけでなく、遺伝的多様性、系統的独自性、保全難易度などの評価軸でカテゴライズし、それぞれの種の状況に応じたテーラーメイドな生物保全策を提案・実行することを

目的として、毎年2種、3年間の合計で6種(ツルウリクサ、タイワンホトトギス、ユズノハカズラ、ランダイミズ、ハコベマンネングサ、マツムラソウ)を対象に解析を行なうという目標を達成した。

更に、サブテーマ1では上記6種に加えて縮約ゲノム解析を追加で4種(サガリラン、ヒメタニワタリ、ホシツラン、キリシマイワヘゴ、合計10種)、サブテーマ2ではRNAの網羅的解析を追加で1種(ナガミカズラ、合計7種)について行い、数値目標を上回る種数の解析を実行した。これらの種に関する解析結果をもとに、希少種の状況に応じた適切かつ効率的な保全策(テララーメイド生物多様性保全策)の構築を行ってきた。

以下にサブテーマ1で行った「ゲノム縮約解読による希少種の保全価値評価」、サブテーマ2で行った「比較ゲノム解析による希少種の保全難易度評価」、そして最後にサブテーマ1で行った「統合解析」の順に成果の概要を記述する。

### サブテーマ1「ゲノム縮約解読による希少種の保全価値評価」

サブテーマ1ではゲノム縮約解読によって、国内で少数のみが生育する10種の希少種について、系統的独自性や遺伝的多様性などの観点から保全価値を評価した。

#### 各解析対象種について明らかになった特筆すべき事項

■**ツルウリクサ**：日本では奄美大島に100個体未満が分布しているが、人為攪乱環境下に生育するため、園芸逸出品の可能性があり、保全価値が定まっていなかった。本研究の解析によって、奄美大島産のツルウリクサは中国大陸から台湾を経て自然分布した固有の系統であり、また、個体数が少ないにもかかわらず遺伝的多様性や健全性が維持されているために、保全価値は高く、また、保全努力が個体群の回復につながりやすい分類群であることが明らかになった。

■**タイワンホトトギス**：丈夫な園芸植物として親しまれていることもあり、西表島に古くから知られる集団の保全価値は定まっていなかった。本研究の解析によって、従来タイワンホトトギスとして知られている種が少なくとも2種以上の種によって構成されることが明らかになった。また、西表産タイワンホトトギスは自然分布による独自の系統であり、保全価値が認められた。更に、沖縄本島の農道沿いに生育する集団は生育地の状況から逸出したものと考えられてきたが、西表産タイワンホトトギスとは別系統のものが自然分布したことが明らかになった。すなわち広義のタイワンホトトギスは台湾から日本に2度分布拡大しており、どちらも系統的にユニークな保全価値の高いものであることが判明した。

■**ユズノハカズラ**：日本では大東島に生育しており、種の保存法による国内希少野生動物種に指定されているが、網羅的遺伝解析の結果、北大東島の野生クローン数は3程度であることが明らかになった。

■**ランダイミズ**：日本では唯一西表島の中心部の溪流沿いに数百メートルにわたって、一見多数の植物体が生育しているが、わずか1クローンのみで構成されることが明らかになった。台湾の集団と比べて系統的な独自性は低く、また、クローン数が少ないにもかかわらず、遺伝的多様性の明瞭な低下が認められないので、西表においてほとんど世代交代をしていない事がわかった。西表島集団は自然分布由来の可能性が高いが、その歴史は新しく系統の独自性は高くないものであった。

■**ハコベマンネングサ**：台湾に1ヶ所のみが知られる生育地は無融合生殖によって1クローンが増殖しているものであった。日本、中国大陸の集団は集団間に遺伝的分化が認められたが、クローンが卓越するものであった。日本の集団は倍数化に起因すると思われる高いヘテロ接合度が特徴的であった。中国大陸、台湾、日本ともにそれぞれ独自の由来と遺伝的特徴を持つ集団であることがわかった。

■**マツムラソウ**：台湾、日本の集団ともに殖芽による活発な無性生殖によって維持されており、各集

団はそれぞれ異なった1〜少数クローンによって構成されていた。西表島では3個の小サイズ集団が知られているが、集団を構成するクローン間には明瞭な遺伝的分化があった。これらのことから西表島の集団は自然分布によるものであり、また、西表島における歴史も長いため、すべての集団に保全価値が認められる。

■**サガリラン**：以前より生育が確認されていた個体に関しては、個体間にほとんど遺伝的変異が認められず、全体を一つの保全単位として扱うべきであると考えられていた。一方で、本研究の実施中にも環境省の事業の一環として新たな個体の発見が続いており、これらについても縮約ゲノム解読に基づく最尤系統解析を行った。その結果、新たに発見された個体は既存の個体とは異なった系統関係にあり、複数の保全単位を設定するのが適切であることがわかった。この知見は、今後の人工交配や移植を適切に行う上で有用な情報となるものである。

■**ヒメタニワタリ**：種の保存法に基づく保護増殖事業に協力して小笠原母島と大東島に生育するヒメタニワタリ野生集団についてはほぼ網羅的な系統解析を行い、小笠原と大東島の集団が明確に分化していることを見出した。島内における空間的遺伝構造に関しては、母島では第一石門洞より第二石門洞の方により多様な遺伝的変異が保持されており、また、第二石門は二つの遺伝的グループに分かれることなど、野生集団における個体レベルでの精密な保全管理に有用な情報を得ることができた。

■**ホシツルラン**：種の保存法に基づく保護増殖事業によって保護されているが、近年野生個体の状況が著しく悪化し野生絶滅寸前の状況であり、本種の保全のためには域外保全個体の重要性が高まっている。生息域外保全されているホシツルランについて網羅的に域外保全個体の解析試料を入手し、解析を行ったところ、現存するホシツルランは個体間の遺伝的差異が極めて小さいことがわかった。ホシツルランは人工交配させてもその後の成長が悪く、近交弱勢の弊害が懸念されているが、本研究で得られた個体間の遺伝的関係を参照し、なるべく遺伝的に離れた個体間で人工交配させることが本種の保全管理上有効と考えられる。

■**キリシマイワヘゴ**：現存する野生個体と栽培個体のほぼ全てを対象とした網羅的な解析によって、キリシマイワヘゴは種内の個体間変異が少ないものの、種内には地理的な遺伝構造があることが明らかになった。現存する野生個体群は3つのクラスターに別れ、そのうちの2つが宮崎県にあること、3つのクラスターともに栽培されている個体があることなどが判明した。今後、本種は野生個体と域外保全個体で維持せざるを得ない状況だが、より適切な保全を行うための基礎的な情報を得ることができた。

## 2つのゲノム縮約方法の活用

サブテーマ1ではゲノムの縮約解読方法としてRAD-seqとMIG-seqを用いたが、種内個体群の遺伝的分化・系統・遺伝構造などに関しては、両手法に結果の不一致は無く、信頼性の高い解析結果が得られた。行政的にも活用され、また、刑罰なども伴う国内希少野生動物種等希少種の保全管理にも用いられる情報として、その信頼性・再現性が高い解析結果が得られたことは意義がある。

RAD-seq、MIG-seqはゲノム情報の縮約解読方法が異なるため、その違いを活用して有用な保全情報を得ることができた(図1.23)。すなわち、RAD-seq解読情報には、核ゲノムに加えて葉緑体などのオルガネラゲノム情報も含まれているので、既に解読・公開されている近縁種的全葉緑体ゲノム情報と比較参照することで、希少種の葉緑体ゲノム情報だけを抽出し、国内外に共通して生育する希少種の集団間における系統的差異を解析できることがわかった。一般に葉緑体DNAによる系統解析では数百から数千塩基程度の情報が用いられるが、本手法では数万塩基オーダーの葉緑体ゲノム情報を利用でき、より信頼性が高い系統解析が可能であった。本研究ではこの方法を、ツルウリクサ、サガリラン、ホシツルランなどについて適用し、国内外集団間の分類学的な差異を客観的な基準で評価することができた。

一方、MIG-seqは解読できるのは核ゲノムに限定されるが、解読前にサンプルから抽出したDNAを

PCRによって増幅するため、微量や劣化した試料、例えば博物館等に保管されている植物腊葉標本でも解析可能である。この手法を活用することで、かつて保持されていた遺伝的多様性や人為によって失われた多様性などを定量的に評価できる。

この様に各手法の特長を活用することで、両者の共通部分からは、行政的な取扱いにも求められる解析の精度と信頼度を上げることができ、また、独自解析な部分においては、より多面的な見地からの希少種保全策の構築が可能と考えられる。

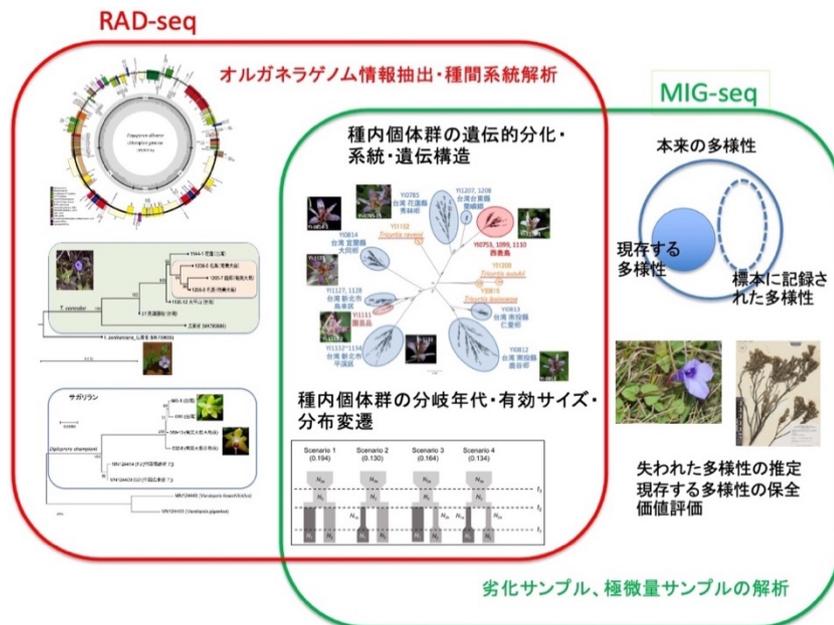


図1.23 ゲノム縮約解読方法RAD-seqとMIG-seqのテーラメイド生物多様性保全策への活用

多様な評価軸による希少種の状況評価

サブテーマ1では個体数が極めて少ない希少種を対象に縮約ゲノム解読による解析を行い、国内集団の独自性・ユニークさ・保全価値と、国内集団の遺伝的多様性という観点から、希少種ごとに特徴ある状況を個別に理解することができた (図1.24(a))。

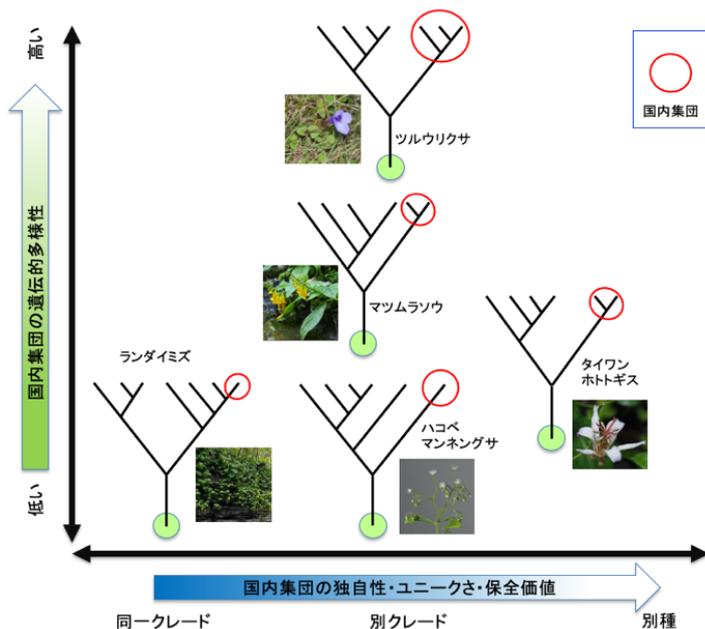


図1.24(a) 本研究の評価基準に基づく希少種の保全状況評価 国内集団の保全価値と遺伝的多様性による希少種の保全状況評価。各系統樹内において赤丸は国内集団の種全体に対する系統的位置を示す。

サブテーマ2 「比較ゲノム解析による希少種の保全難易度評価」

サブテーマ2では、RNA-seqによる発現遺伝子の網羅的解読情報をもとに、絶滅危惧種の遺伝的多様性、有害変異蓄積量、重複遺伝子含有率を解析し、国内集団と海外集団の間で希少種の保全難易度に関連する項目にどのような差異があるか解析を行った。具体的には、サブテーマ1から提供されたmRNA(メッセンジャーRNA)の網羅的塩基配列情報に図2.1に示したバイオインフォマティクス解析を施し、ゲノム全体で転写されている領域の情報をもとに、遺伝的多様性、有害変異蓄積量、重複遺伝子含有率を明らかにした。

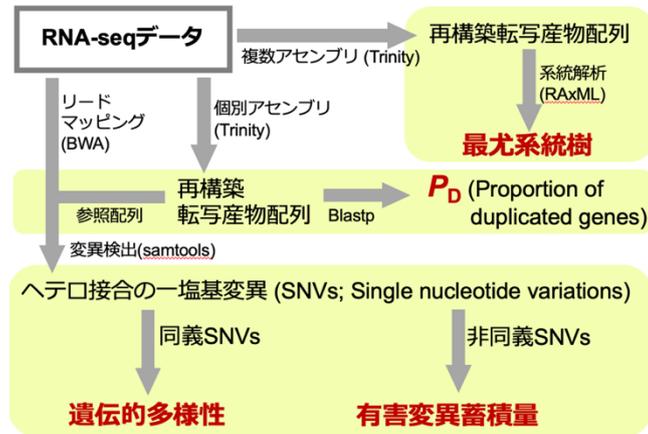


図2.1 RNA-seq解析パイプラインの概要

## 遺伝的多様性

集団遺伝学では集団を構成する複数個体について遺伝子型を解読し、その平均値で集団の遺伝的多様性を評価するが、本研究では、転写産物1 kb (kilo base、1,000塩基)あたりのSNVs (single nucleotide variations) を個体ごとに算出することで、より詳細な個体レベルの遺伝的多様性を評価した(図2.5a)。

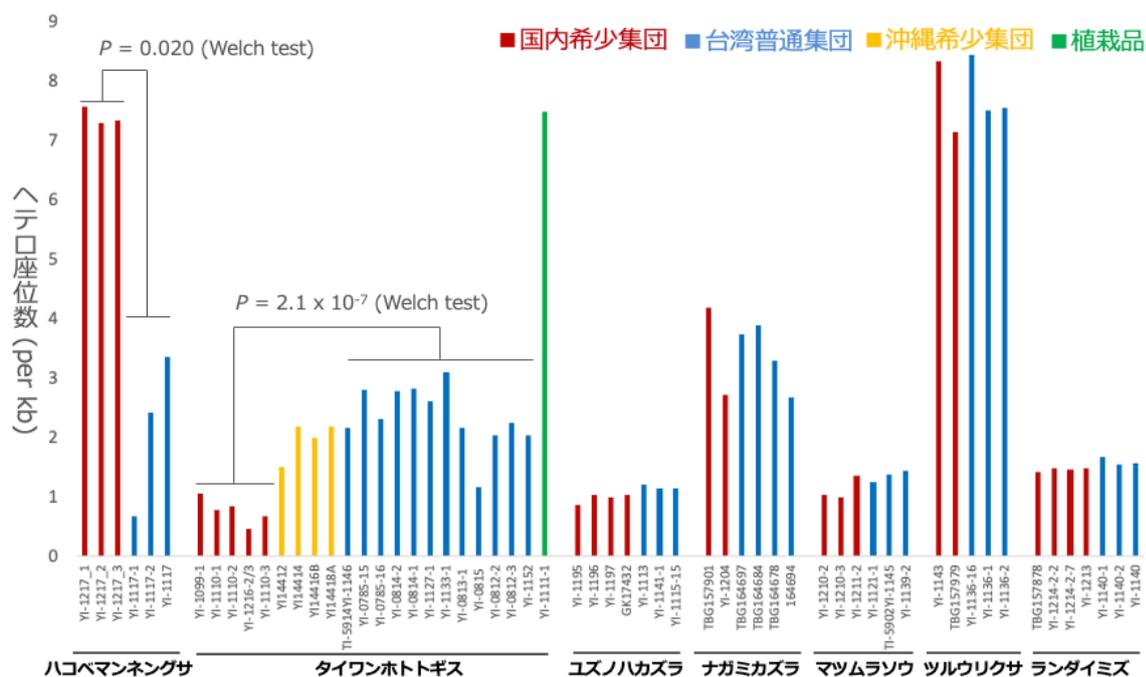


図2.5a ヘテロ座位数 / kb (個別アセンブリ)

解析を行った7種のうち5種(ユズノハカズラ、ナガミカズラ、マツムラソウ、ツルウリクサ、ランダイミズ)では国内外の集団において遺伝的多様性に優位な差は見いだされなかった。

一方で、タイワンホトトギス西表集団は、台湾普通集団に比べてSNV数が少ない傾向にあり、ゲノム

ワイドな遺伝的多様性の低さが観察された(図2.5a)。台湾産ホトトギスは台湾集団との共通祖先から分化してから比較的長い年月が経過しており、希少集団における遺伝的多様性の低さは、国内希少集団が長期間に渡り他集団から隔離されて小集団化したことを示唆している。一方、台湾産ホトトギス沖縄集団は遺伝的な多様性が高く維持されていた。西表島と沖縄本島の台湾産ホトトギスは台湾の別系統からそれぞれ独立に日本に渡来したものであることがサブテーマ1の解析で明らかになっているが、転写産物の解析からも両者の異質性が明らかになった。

また、ハコベマンネングサでは、国内集団の遺伝的多様性が海外集団に比べて著しく高いものとなっていた。ハコベマンネングサの転写産物内で見いだされた変異部位をサンプル間、種間で比較解析したところ、日本産ハコベマンネングサの変異部位においてはヘテロ接合座位の割合が極めて高いことが明らかになった(図2.3)。日本産ハコベマンネングサではゲノム全体にわたる重複の後に変異が蓄積され、相同な遺伝子座に複数の異なった対立遺伝子が座位していることを示唆している。転写産物による個体間、種間比較解析によって日本のハコベマンネングサの実態を明らかにすることができた。

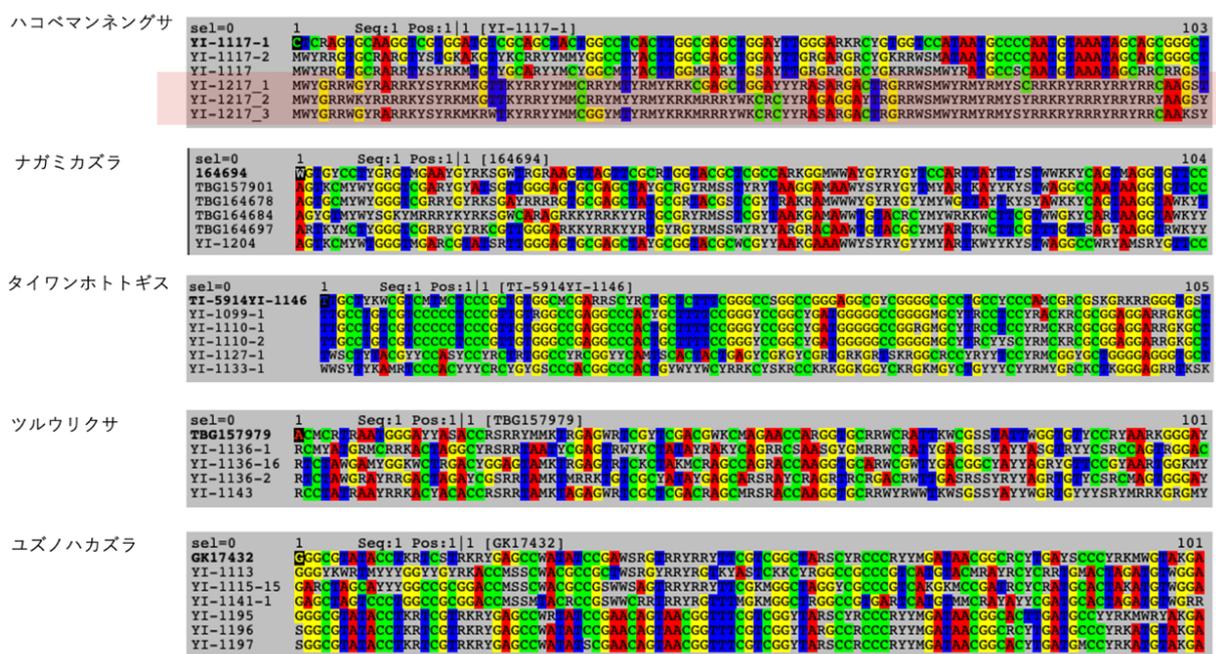


図2.3 個体間の配列比較で変異が検出された座位のみを抽出した塩基配列アライメント(一部) 日本集団のハコベマンネングサは領域全体にわたってヘテロ接合座位が存在 (赤色部分)。

### 有害突然変異

ゲノムに蓄積された有害突然変異の量に関しては、「全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合」と「全非同義SNVに占める有害SNVの割合」によって評価した。その結果、どちらの評価基準によっても西表産台湾産ホトトギスには台湾産や沖縄本島産の台湾産ホトトギスに比べて有害な変異が蓄積していることが明らかになった(図2.6)。この知見は、野生状態における生育状況、すなわち、西表産の台湾産ホトトギスが他の産地のものに比べて限定された環境条件下(常に滝飛沫がかかる場所)でのみ生育できることと対応している。

他種においては、国内希少集団と海外普通集団の間で有害突然変異の指標に大きな違いは見られなかった(図2.6)。このことは、これらの集団は希少であるものの、広く分布する台湾集団と同様に有害変異が蓄積していないことを示唆している。

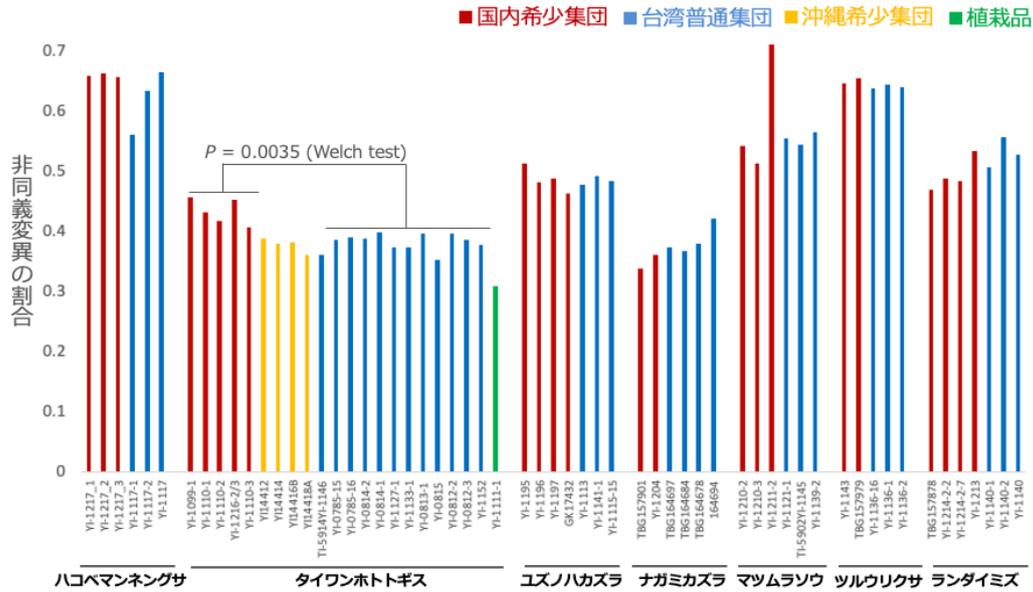


図2.6 全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合

### 重複遺伝子含有率

ゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合( $P_D$ )は環境適応力の指標となることが報告されている。網羅的なRNAseqにより得られた全転写産物のアミノ酸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、国内希少集団と台湾普通集団の環境適応能力の比較を行った。その結果、いずれの種においても、国内集団の個体が台湾集団の個体よりも $P_D$ が低い傾向は観察されなかった(図2.8)。この結果は、環境変化に対する頑健性は集団間で大きな差がない可能性を示している。環境研究総合推進費で実施した「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」では、小笠原諸島の希少種の $P_D$ は、本土の普通種と比較して有意に低いことが示されている。小笠原諸島のケースのように、分化して長い期間を経た種間比較では、明確な $P_D$ の違いが観察されうるが、同種の集団間の比較においては進化過程において $P_D$ が変化する十分な時間が経過しておらず、国内希少集団と台湾普通集団で $P_D$ の相違が観察されないと考えられる。

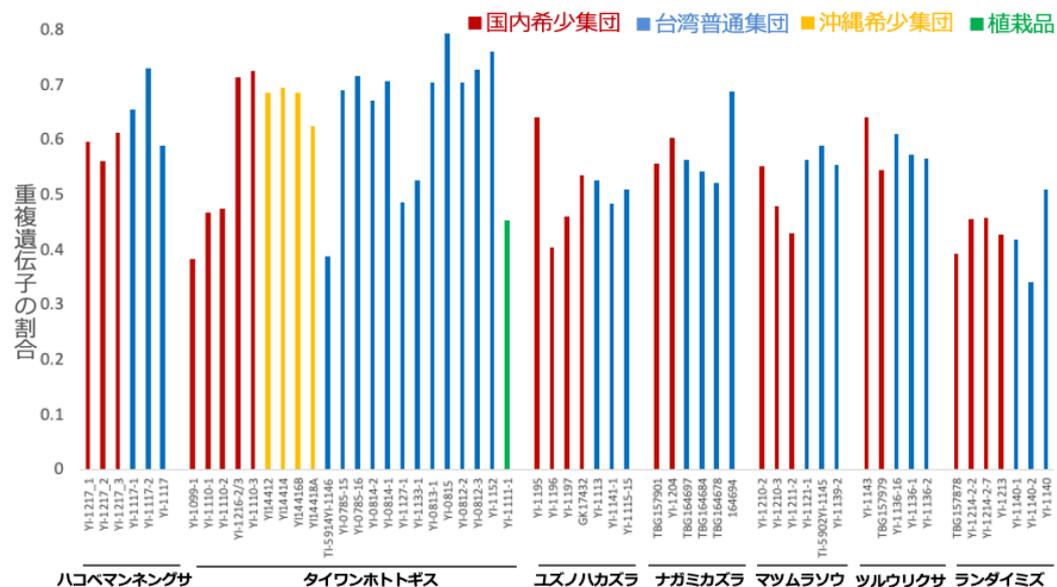


図2.8 重複遺伝子含有率 (全転写産物中の重複遺伝子の割合)

国内では希少であるが海外においては普通種として存在する国内希少種について、国内集団の固有性を遺伝的に評価し保全価値の高さを判断することは、従来困難であった。上記のようにサブテーマ2では、こうした国内希少種について当初目標の6種を超える7種を対象に、RNA-seqから得られた転写産物を網羅的に解析することで、ゲノムの状態から保全難易度の評価を行うことができた。

### サブテーマ1「統合解析」

上述の解析結果をもとに、サブテーマ1においてプロジェクト全体の結果を取りまとめた。まず、サブテーマ1では、ゲノムの縮約解読から得られた情報をもとに国内集団の独自性と遺伝的多様性から希少種をカテゴライズしたが(図1.24(a))、これにサブテーマ2による保全難易度という評価軸を加えることで(図1.24(b))、希少種の保全状況に関して更に詳細なカテゴリー分けが可能になった。本研究においては、mRNAの網羅的解読によって得られた転写産物を解析することによって、この軸を加えることが可能になった。従来の保全遺伝学的手法では、遺伝的変異を中立なものとして取り扱い、系統解析や遺伝構造の解析が行われてきたが、今後、希少種の生物保全状況の評価にはこのような転写された遺伝情報の評価も積極的に取り入れることが有効であることを、本研究は指し示すことができた。

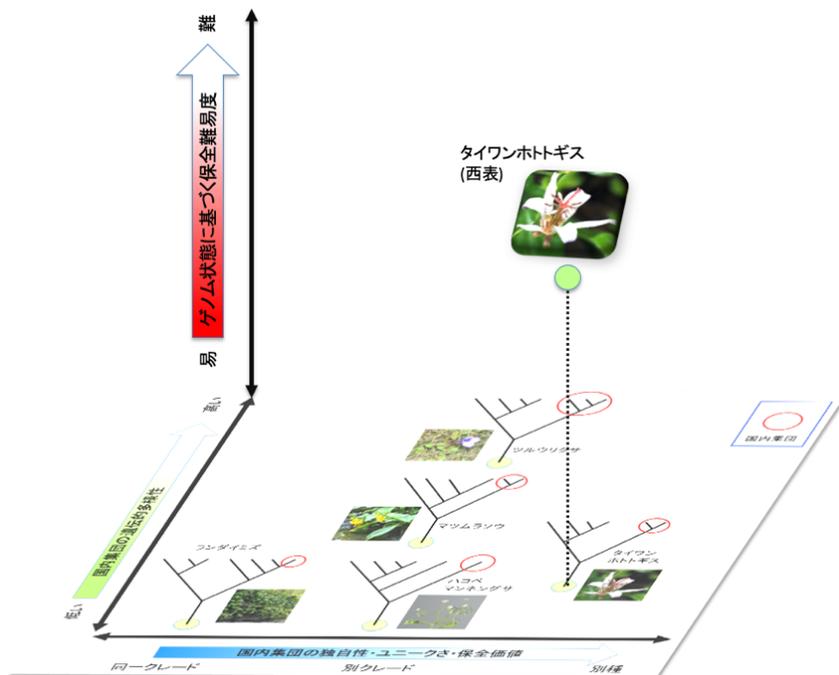


図1.24(b) 本研究の評価基準に基づく希少種の保全状況評価 保全難易度という第3の評価軸を加えた状況評価。

以上のように、本研究では個体数に加えて、遺伝的多様性、系統のユニークさ、保全難易度という3つの項目を解析したが、これらの3軸を、それぞれ高・低で分割するだけでも8個のカテゴリー空間が得られる(図1.25)。それぞれの空間には、例えば、系統的独自性と遺伝的多様性が高い上に、ゲノムの状態が良好で、保全努力の効果が期待されるもの(図1.25緑枠)、系統的な独自性は認められ保全価値はあるが保全難易度が高いもの(図1.25黒枠)、遺伝的多様性は低いにもかかわらずゲノム状態は良好で保全は容易だが系統的独自性の低いもの(図1.25赤枠)など、それぞれの特徴を持ったカテゴリー空間内に希少種を当てはめることで、より適切・効率的な保全策の提言が可能になった。

例えば、個体数が少ないが保全価値が定まっていなかった奄美大島のツルウリクサは、自然分布したものであり長い進化的歴史と遺伝的多様性を保持していることが判明した。保全価値が認められたうえに、ゲノムの状態も良好であり、比較的簡単な保全策を施すことで集団の回復が見込めることから、早急な保全事業を実行すべきであると考えられる(図1.25緑枠カテゴリーに該当)。西表島のタイワンホトギスは独自の系統であることが判明したが、本質的な脆弱性が懸念されるので、野生集団の保全に加えて域外保全も検討すべきであろう(図1.25黒枠カテゴリーに該当)。同じく西表島のランダイミズはわずか1クローンが栄養繁殖したものであることがわかったが、台湾集団に比べて系統的な独自性は大き

くなく、また、西表における歴史も浅いことが判明した。遠くない過去に偶発的に西表島に到来し、主に無性生殖で維持されてきたものであるため、生育地の現状維持で良いと考えられる(図1.25赤枠カテゴリーに該当)。

このように、本研究では、解析対象とした希少種について、国内系統の遺伝的固有性の多寡を明瞭に示しただけでなく、国内地域集団間の遺伝的地域性、集団内の遺伝的多様性、保全難易度などについてそれぞれ異なる特徴が明瞭に示されるなど、分類群ごとの状況に合わせたテーラメイドな生物多様性保全策が構築できることを提案した。

本研究で示した生物保全指標の総合的評価と種の生育情報を合わせることで、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が期待される。日本に生育する約7,000種の維管束植物のうち約3割が絶滅危惧種となっている。多数の絶滅危惧種を予算、時間、空間、人力などの限られた保全資源で適切かつ効率的に行うためには、ただ単に国内に残存する個体数の情報だけでは不十分である。本研究のアプローチ、すなわち、ゲノムの情報から保全価値や保全難易度を明らかにすることで、個々の希少種に適切な保全策を構築することが可能になると考えられる。

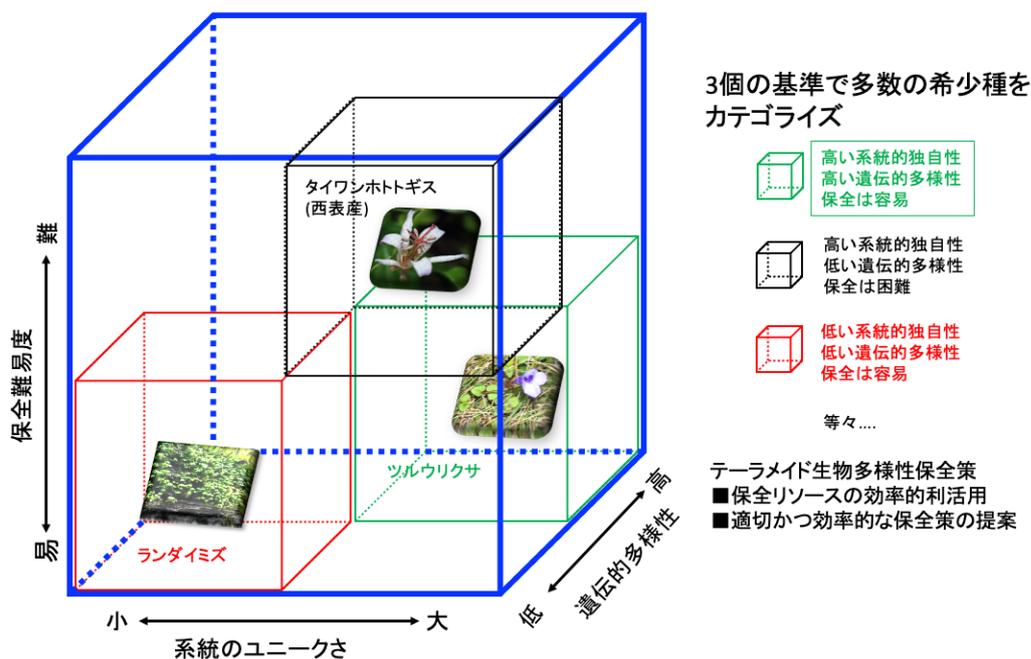


図1.25 本研究で用いた3軸の評価基準に基づく希少種のカテゴリ分け

## 5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

### (1) 「種の保存法」に基づく希少野生植物保護増殖事業への貢献

国内希少野生動植物種を保護増殖事業や生育域外保全等で保護・増殖する場面において、ゲノム情報に基づいて種の脆弱性や適応能力を明らかに本プロジェクトの成果を活用し、有用な情報を提供した。例えば、「種の保存法」に基づく「保護増殖事業計画」で保全対象となっている小笠原諸島の12固有種については、本プロジェクトの解析手法による解析成果にもとづいて、環境省が実施している小笠原希少野生植物保護増殖事業検討会に出席し、適切な保全策に関する助言を行っている。

### (2) 希少種の生育域外保全・野生復帰実施計画への貢献

環境省自然環境局野生生物課が主導しているサガリラン生育域外保全・野生復帰実施計画において、本プロジェクトで開発した解析に基づいて2020年2月16日、2021年2月22日、2022年3月8日に行われた野生復帰検討会等において保全策の提案を行っている。少数が野生で知られるサガリランの適切な人

工交配や生育域外保全個体の選定に必要な遺伝情報を提供した。また、台湾に生育するサガリランは花色や生育状況が異なるが、本研究で開発した解析で、台湾と奄美大島の集団は中国本土の集団から派生した同一種であることも明らかにした。

### (3) 希少種の生育地における地方行政への貢献

希少種の効果的かつ持続的な保全を達成するためには、生育地の自治体や保全団体との協力が不可欠である。国内希少野生動植物種であるカッコソウの保全に関して、群馬県、桐生市、みどり市や市民団体によって構成されるカッコソウ協議会に対して、本プロジェクトで開発している遺伝解析手法を活用して、遺伝解析や保全策の提言を行い、保全活動に貢献している。また、カッコソウの保全において問題となっている近縁種シコクカッコソウとの交雑に関しては、本研究で開発・改良を行った縮約ゲノム解析によって遺伝解析を行い、交雑の疑いのある個体除去に有用な情報を提供した。

### (4) 希少種を対象とした遺伝子解析手法の国際的な普及

環境省自然環境局が事務局を務めるアジア太平洋生物多様性観測ネットワーク第11回ワークショップ(2019年7月、クアラルンプール)において、本研究で用いているMIG-seq法による次世代生物多様性アセスメントの効率や重要性について招待講演を行い、生物多様性の減少が懸念されているアジア太平洋諸国の環境政策に活かせる知識と技術の普及に貢献した。

インドネシアのNational Research and Innovation Agencyとインドネシア産希少樹木5種を対象とした保全遺伝解析の共同研究を2021年度より開始した。遺伝解析には本研究で開発・改善を行ったMIG-seq法を用いている。

### (5) 生物保全に関わる地方自治体職員や環境省職員への研修

地方自治体職員を対象に行われた環境省野生生物研修(2019年12月11日)や、環境省職員のための自然保護官等研修特設(2020年1月8日)において、本研究で開発・採用した生物多様性保全のための解析方法や成果を講義し、ゲノム情報を用いた生物多様性保全が研究開発の進展により行政にも活かせる状況になっていることを紹介した。

2020年12月23日に環境省沖縄奄美自然環境事務所から、奄美・沖縄地域の希少種保全に係るヒアリングを受け、希少種の保全優先度評価に関する考え方、保全難易度評価に関する遺伝的手法、遺伝的手法の結果の解釈、遺伝解析実施体制について本研究の成果をもとに助言を行った。

#### <行政等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の適切な選定

国外では普通種として分布するが、国内ではごく限られた地域にしか分布しない国内希少種について、国内に分布する系統の遺伝的固有性を示すとともに海外集団に対する国内集団の独自性が種ごとに異なることを明らかにした。解析対象の中でツルウリクサや台湾ンホトトギスは逸出品の疑いもあるため国内希少動植物種に未指定であったが、既に指定されているユズノハカズラに劣らぬ独自性や保全価値があることが認められた。今後、本研究のアプローチによって、今後多数の指定が予定されている国内希少野生動植物種により適切な選定が可能になる。

##### (2) 希少種の保全状況のカテゴリ化による効果的・効率的な生物保全

希少種は個体数が少ないという共通した特徴を有するが、個体数のみから保全の優先順位をつけることは困難である。ゲノムレベル情報に基づいて、集団のユニークさ、保全価値、保全難易度の評価軸で希少種をカテゴリ化するという本研究のアプローチは、保護対象種の優先順位や保全コストの配分を決定するにあたって有用な情報を提供しうるものである。

### (3) 希少野生植物保護増殖事業への貢献

「種の保存法」に基づく国内希少野生動植物種の「保護増殖事業」について、本研究で明らかになった個体レベルのゲノム情報はより効果的で適切な保全の達成に利用できる。具体的には、小笠原諸島に生育する保護増殖事業対象種であるホシツルランとヒメタニワタリに関しては、野生個体と生息域外個体について、本研究で網羅的に縮約ゲノム解析を行った。得られた情報は、今後の安定的な種の保護・保全に必要な、保全ユニットの設定、人工交配、植え戻し、域外保全個体の選定、系統維持等に有効に活用されるものである。

### (4) 希少種の生育域外保全・野生復帰実施計画への貢献

環境省自然環境局野生生物課が主導している絶滅危惧種の保全技術に関わる業務に関して、本研究で行った奄美大島産サガリランと宮崎県および徳島県に生育するキリシマイワヘゴの縮約ゲノム解析は直接的に活用される予定である。サガリランに関しては、従来奄美大島集団を一つの保全単位として維持されようとしていたが、近年発見された集団が既知のものとは遺伝的に分化しており、複数の保全単位として管理すべきであることが本研究で明らかになった。キリシマイワヘゴについても個体ごとの遺伝的特徴を本研究で明らかにしたので、その情報は人工交配や域外保全、野生への植戻しが適切にできるよう活用される予定である。

#### 5-3. 研究目標の達成状況

2020年以降新型コロナウイルスcovid-19の感染拡大によって、国内外に生育する野生植物の試料採集に困難を生じるようになったが、関連諸機関、研究者の協力を得ることで、**3年間で予定の6種**を対象に、目標である「現存する個体数が極めて少ない希少種6種のゲノムを解読し、地域個体群の独自性や履歴を解析するとともに、ゲノム内の有害遺伝子蓄積量と環境適応能力を解析することで、希少種の系統的独自性に基づく保全価値の評価と保全難易度を評価し、希少種の状況に応じたテラメイド生物多様性保全策を確立する」を達成できた(表1.1)。

更にサブテーマ1では上記6種に加えて、縮約ゲノム解析による系統的独自性に基づく保全価値の評価を4種(サガリラン、ヒメタニワタリ、ホシツルラン、キリシマイワヘゴ、合計10種)、サブテーマ2では有害遺伝子蓄積量と環境適応能力に基づく保全難易度の評価を追加で1種(ナガミカズラ、合計7種)について行い、**数値目標を上回る種数の解析を実行した(表1.1)**。

表1.1 研究目標の達成状況

種名	サブテーマ1		サブテーマ2
	解析項目：縮約ゲノム解析	RNA-seq	比較ゲノム解析
	内容：独自性・履歴 保全価値評価	サブテーマ2へ トランスクリプトーム情報提供	有害遺伝子蓄積量・ 環境適応能力 保全難易度評価
1 ツルウリクサ	完了	完了	完了
2 タイワンホトトギス	完了	完了	完了
3 ユズノハカズラ	完了	完了	完了
4 ランダイミズ	完了	完了	完了
5 ハコベマンネングサ	完了	完了	完了
6 マツムラソウ	完了	完了	完了
7 ナガミカズラ		完了	完了
8 サガリラン	完了		
9 ヒメタニワタリ	完了		
10 ホシツルラン	完了		
11 キリシマイワヘゴ	完了		
数値目標	6種	6種	6種
完了種数	10種	7種	7種

当初数値目標  
2種 x 3年  
= 合計 6種

追加的解析

## 6. 研究成果の発表状況

### 6-1. 査読付き論文

10件

#### <主な査読付き論文>

- 1) T. Hamabata, G. Kinoshita, K. Kurita, P. Cao, M. Ito, J. Murata, Y. Komaki, Y. Isagi and T. Makino: *Commun. Biol.*, 2, 244 (2019) Endangered island endemic plants have vulnerable genomes (**IF: 6.268**)
- 2) Y. Isagi, T. Makino, T. Hamabata, P.-L. Cao, S. Narita, Y. Komaki, K. Kurita, A. Naiki, Y. Kameyama, T. Kondo and M. Shibabayashi: *Plant Species Biol.*, 35, 3, 166–174 (2020) Significant loss of genetic diversity and accumulation of deleterious genetic variation in a critically endangered azalea species, *Rhododendron boninense*, growing on the Bonin Islands (**IF: 2.077**)
- 3) M. Kato, N. Nakahama, S. Ueda and Y. Isagi: *Entomol. Sci.*, 23, 2, 204–207 (2020) Development of microsatellite markers for an extremely limited distributed rare diving beetle species, *Acilius kishii*, and a widely distributed species, *Acilius japonicus* (Coleoptera: Dytiscidae) (**IF: 1.073**)
- 4) T. Sakagami, S. Sakaguchi, Y. Isagi and H. Setoguchi: *J. For. Res.*, 25, 2, 120–123 (2020) Development and characterization of nuclear microsatellite markers in *Aphananthe aspera* (Thunb.) Planch. (Cannabaceae) (**IF: 1.093**)
- 5) A. Takano, S. Sakaguchi, P. Li, A. Matsuo, Y. Suyama, G.-H. Xia, X. Liu and Y. Isagi: *Plants*, 9, 9, 1159 (2020) A Narrow Endemic or a Species Showing Disjunct Distribution? Studies on *Meehania montis-koyae* Ohwi (Lamiaceae) (**IF: 2.870**)
- 6) S. Sakaguchi, Y.-X. Qiu, Y. Asaoka, D. Takahashi, Y. Isagi, P. Li, R. Lu and H. Setoguchi: *Heredity*, 126, 4, 615–629 (2021) Inferring historical survivals of climate relicts: the effects of climate changes, geography, and population-specific factors on herbaceous hydrangeas (**IF: 3.801**)
- 7) A. Narita, N. Nakahama, A. Izuno, K. Hayama, Y. Komaki, T. Tanaka, J. Murata and Y. Isagi: *Conserv. Genet.*, 22, 5, 717–727 (2021) Conservation genetics of critically endangered *Crepidiastrum grandicollum* (Asteraceae) and two closely related woody species of the Bonin Islands, Japan (**IF: 2.538**)
- 8) D. Takahashi, Y. Feng, S. Sakaguchi, Y. Isagi, Y.-X. Qiu, P. Li, R.-S. Lu, C.-T. Lu, S.-W. Chung, Y.-S. Lin, Y.-C. Chen, A.J. Nagano, L. Kawaguchi and H. Setoguchi: *J Biogeogr.*, 48, 8, 1917–1929 (2021) Geographic and subsequent biotic isolations led to a diversity anomaly of section *Heterotropa* (genus *Asarum*: Aristolochiaceae) in insular versus continental regions of the Sino-Japanese Floristic Region (**IF: 3.723**)
- 9) Y. Suyama, S. Hirota, A. Matsuo, Y. Matsuo, Y. Tsunamoto, C. Mitsuyuki, A. Shimura, K. Okano: *Ecological Research*, 37: 171-181 (2022) Complementary combination of multiplex high-throughputDNA sequencing for molecular phylogeny (**IF: 1.917**)
- 10) 中濱直之・安藤温子・吉川夏彦・井鷲裕司: 保全生態学研究, <https://doi.org/10.18960/hozen.2128> (2022) 印刷中 国内希少野生動植物種における保全遺伝学研究の基盤としての遺伝情報

#### <その他誌上発表（査読なし）>

- 1) あいち海上の森フォーラム実行委員会第4回あいち海上の森フォーラム報告書、43-56 (2021)  
「遺伝解析でまもる生物多様性（井鷲裕司）」

### 6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

### 6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	10件
その他誌上発表（査読なし）	1件
口頭発表（学会等）	15件
「国民との科学・技術対話」の実施	9件
マスコミ等への公表・報道等	10件
本研究に関連する受賞	0件

### 7. 国際共同研究等の状況

- 1) 国際共同研究計画名：ゲノムに残されたデモグラフィック情報の比較解析で探る生物多様性の環境変動応答、カウンターパート名：Gildas Gatable・New Caledonian Agronomic Institute・ニューカレドニア、希少植物を中心とした生物多様性創出機構を理解し生物多様性保全につなげるために、年に複数回現地を訪れカウンターパートの協力のもと試料採集、ゲノム解析を行っている。
- 2) 国際共同研究計画名：最隔離大洋島ハワイにおける生物多様性創出・維持機構の解明、カウンターパート名：Elizabeth Stacy・ネバダ大学・アメリカ合衆国; 清水健太郎・チューリヒ大学・スイス、種内の多型から種分化へと至る多様性創出過程をゲノム解読で明らかにしようとする共同研究であり、年に複数回ハワイ諸島を訪れて試料採集を行うとともに、チューリヒ大学の機器も利活用してゲノム解読を行っている。
- 3) 国際協力案件：インドネシアのNational Research and Innovation Agencyの研究者であるYayan Kusuma博士らと、インドネシア産希少樹木5種を対象とした保全遺伝解析の共同研究を2021年度より開始した。解析手法は本研究で開発・改善を行ったMIG-seq法を中心とするものである。

### 8. 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) 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教授

- 2) 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（理学）、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

## II. 成果の詳細

### II-1 ゲノム縮約解読による希少種の保全価値評価および統合解析

京都大学

井鷲 裕司

東北大学

陶山 佳久

<研究協力者>

京都大学

栗田 和紀・伊東 拓郎

#### [要旨]

希少生物の保全状況に関しては、これまでもつばら個体数の多寡や減少速度から評価されてきたが、それだけでは十分ではない。労力、経費、時間などに制約のある保全リソースを活用して、適切かつ効率的に保全するためには、個々の希少種ごとに保全価値の評価と保全難易度の評価を行う必要がある。サブテーマ1では希少種を対象に縮約ゲノム解読による解析を行い、対象集団の独自性・ユニークさ・保全価値と、国内集団の遺伝的多様性という観点から、希少種ごとに特徴ある状況を個別に理解することができた。いくつかの希少種については、これまで見過ごされていた保全価値があることを初めて見出したほか、個体レベルの保管理が必要となる絶滅危惧種について、人工交配、植戻し、生息域外保全などに活用できる遺伝情報を得た。最後に、従来行われてきた保全遺伝学的な評価基準に、サブテーマ1で行ったゲノム縮約解読に基づく希少種の保全価値評価とサブテーマ2の比較ゲノム解析による希少種の保全難易度評価を追加することで、個々の希少植物の状況に合致した合理的・効果的なテラメイト生物多様性保全策を提唱した。

#### 1. 研究開発目的

本研究では、限られた保全リソースを活用して保全対象となりうる多数の希少種を適切かつ効果的に保全するために、希少種の保全価値と保全難易度について、ゲノム情報を活用した新たな評価方法の確立を目的とする。サブテーマ1では、RAD-seqとMIG-seqによるゲノム縮約解読に基づき、種内系統関係、遺伝構造、デモグラフィなどを明らかにし、希少種の保全価値を適切に評価する。サブテーマ1および2で得られた結果をサブテーマ1で統合的に解析することによって、各々の希少種の状況に応じた、テラメイトな保全策を構築することで、限りある保全リソースを有効に希少種保全に活用できるようにすることを目的とする(図0.1)。解析対象とするのは国内希少野生動植物種や絶滅危惧I類等に指定されている維管束植物の希少種のうち、海外にも分布するものであり、1年間に2種、プロジェクト研究期間中に6種を解析する。

#### 2. 研究目標

【令和元年度】国内外に同一種が生育する希少種2種を対象に試料採集を国内と海外で行い、RAD-seqとMIG-seqによって縮約ゲノム解読を行い、希少種の保全価値を評価する。mRNAの網羅的解読をRNA-seqで行い、得られた情報をサブテーマ2に提供する。

【令和2年度】国内外に同一種が生育する希少種2種を対象に試料採集を国内と海外で行い、RAD-seqとMIG-seqによって縮約ゲノム解読を行い、希少種の保全価値を評価する。mRNAの網羅的解読をRNA-seqで行い、得られた情報をサブテーマ2に提供する。

【令和3年度】国内外に同一種が生育する希少種2種を対象に試料採集を国内と海外で行い、RAD-seqとMIG-seqによって縮約ゲノム解読を行い、希少種の保全価値を評価する。mRNAの網羅的解読をRNA-seqで行い、得られた情報をサブテーマ2に提供する。統合的解析を行い、希少種の状況に応じたテラメイト保全策の構築を行う。

#### 3. 研究開発内容

国内希少野生動植物種に指定されている維管束植物の約4割は、近隣諸国にも生育しているが、日本に生育する個体群の独自性は必ずしも明らかにされていない。また、その履歴が不明なものもある。サ

ブテーマ1では、国内希少野生動植物種や絶滅危惧I類の希少生物の保全価値を正しく評価し、限られた保全リソースを有効に活用するために、縮約ゲノム解読によって、日本産と海外産の希少種の同一性や、種内系統の独自性・履歴を解析した。更に、サブテーマ2から得られた情報とともに統合的解析を行うことで、保全対象の分類群について、(I) 保全価値の評価と (II) 保全難易度の評価を統合的に解析することによって、ただ単に個体数の多寡に基づくだけでなく、より詳細な種の実態に応じた適切かつ効率的な保全策（テラーメイド生物多様性保全策）を確立する。

### (1) 対象種と試料採集

本研究では日本国内外に生育する希少植物を毎年度2種、研究期間を通して合計6種解析対象とすることを目的とした。しかしながら、本研究が解析対象とするような希少種は、実際に生育地を訪れるまでは、分布や生育状況が不明である場合が多い。また、採集した植物試料から核酸を抽出するにあっても、大量塩基配列情報解読に求められる十分な量と質のRNAやDNAが得られるとは限らない。これらの点から、予定種数以上の解析を行う事を念頭におきつつ研究を進めた。2020年以降新型コロナウイルス covid-19の感染拡大によって、国内外に生育する野生植物の試料採集に困難が生じるようになったが、関連諸機関、研究者の協力を得ることで、3年間での予定の6種（タイワンホトトギス、ツルウリクサ、ユズノハカズラ、ランダイミズ、ハコバマンネングサ、マツムラソウ）について縮約ゲノム解析とトランスクリプトーム解析を完了したことに加えて、国内生育個体数が極めて少ないナガミカズラ、サガリラン、ヒメタニワタリ、キリシマイワヘゴに関しては、縮約ゲノム解析またはトランスクリプトーム解析を新たに行い、種の状況をより正確に理解することができた。

DNAの解析を行うゲノム縮約解読用には、集団レベルでの解析を行うために、日本と海外でそれぞれ数十サンプルの採集を行った。一方、RNA解析のためには生きた試料が必要であるので、栽培個体、あるいは、生育地において採集した植物試料をRNA保存試薬(RNA later, Thermo Fisher Scientific)に保管し、実験室に持ち帰ったサンプルから抽出し、RNAseqを行うことで発現している遺伝情報の網羅的解読を行った。これによって得られた情報はサブテーマ2に引き渡し、遺伝的多様性、有害突然変異蓄積量、環境適応能力などの評価を後述の通りサブテーマ2で行った。

#### (1-1) ツルウリクサ(*Torenia concolor*)

ツルウリクサは、湿った草地、林縁に生育する多年生草本であり、絶滅危惧IA類(CR)にランクされている。海外では、台湾、中国、ベトナムなど分布するが、日本では現在奄美大島のみで生育している。奄美大島の生育地は人里近くの路傍などであり(図1.1(a))、自然分布であることが疑問視されることもある。従って、奄美大島における本種の由来を知ることは、適切な保全価値の評価にきわめて重要である。本研究では奄美大島(図1.1(c))及び台湾に普通種として生育する個体(図1.1(d), (e))を解析試料として採集した(図1.1(f))。

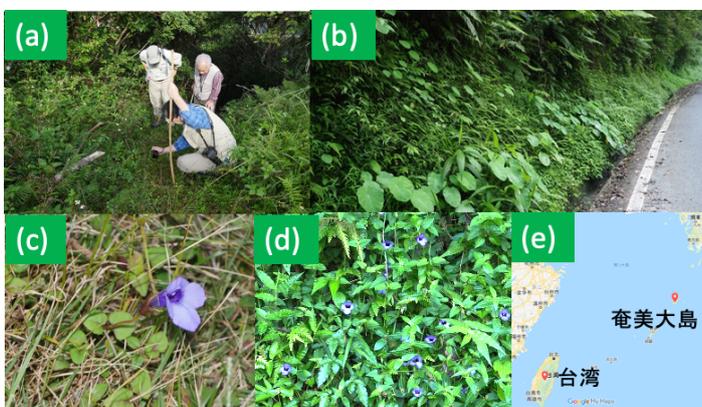


図1.1 ツルウリクサ (a)奄美大島の生育地。(b)台湾宜蘭県の生育地。(c)奄美大島のツルウリクサ。(d)台湾宜蘭県のツルウリクサ。(e)解析に用いたツルウリクサの採集地点。

#### (1-2) タイワンホトトギス(*Tricyrtis formosana*)

タイワンホトトギスは、湿った林縁に生育するユリ科の多年性草本である(図1.2)。レッドリストでは

絶滅危惧IA類(CR)にランクされている。日本では西表島の数ヶ所にそれぞれ少数個体が知られているが(図1.2 (a))、生育地は全て滝近くで常に水しぶきを受けているような場所である。一方、台湾では湿り気ある林縁に普通種として多数個体が生育している(図1.2 (b))。また、タイワンホトトギスは丈夫な園芸植物としても親しまれており、比較的乾いた庭に植栽しても良く育つが(図1.2 (d))、西表島産のタイワンホトトギスとは花色や植物体の形態が異なっている(図1.2 (c))。更に、沖縄本島中央部には農地の近くに生育していることが知られていたが、自然分布したものか不明であり、保全価値は定まっていない(図1.2 (e), (f))。本研究ではDNA解析用に、西表島の2地点、蘭嶼を含む台湾の8地点、沖縄本島1地点からサンプルを採集するとともに (図1.2 (g))、台湾産同属近縁種を系統解析の外群として用いた。

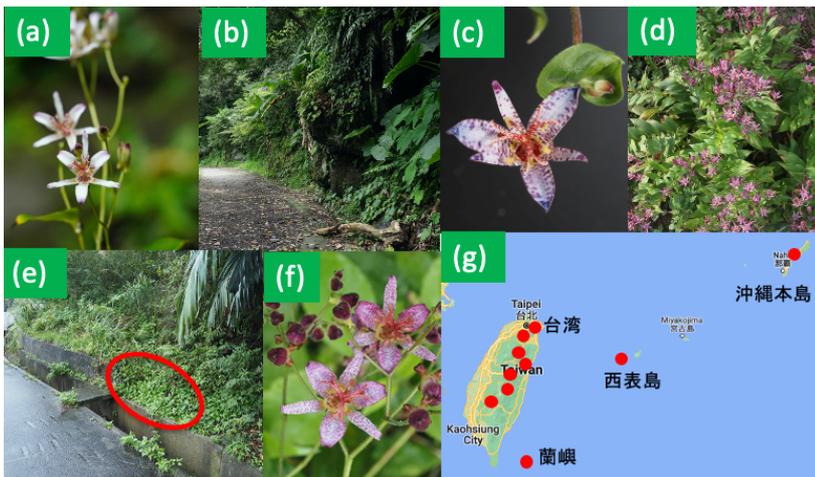


図1.2 タイワンホトトギス (a)西表産タイワンホトトギス。(b)台湾のタイワンホトトギス生育地。(c)台湾産タイワンホトトギスの花。(d)園芸植物として流通しているタイワンホトトギス。極めて頑強。(e)沖縄本島のタイワンホトトギス。西表産のものとは異なり、農道沿い(赤円内)で頑強に生育している。(f)沖縄本島産タイワンホトトギスの花。西表産のものとは明らかに異なる。(g)タイワンホトトギスの採集地点。

### (1)-3 ユズノハカズラ(*Pothos chinensis*)

ユズノハカズラは、樹木や岩に着生するサトイモ科の常緑つる性植物である(図1.3)。日本のほかに、インド、東南アジア、中国南部、台湾に広く分布するが、日本では南北大東島に少数個体のみが生育し(図1.3 (a), (b), (c))、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類(CR)、また国内希少野生動植物種にも指定されている。台湾では普通種であり、多くの個体が生育している(図1.3 (d), (e), (f))。本研究ではDNA解析用に、2015年に採集した北大東島の3集団と、2019年に採集した台湾の4集団の葉サンプルを解析に用いた(図1.3(g))。解析試料の一部は筑波実験植物園および沖縄美ら島財団から供与を受けた。

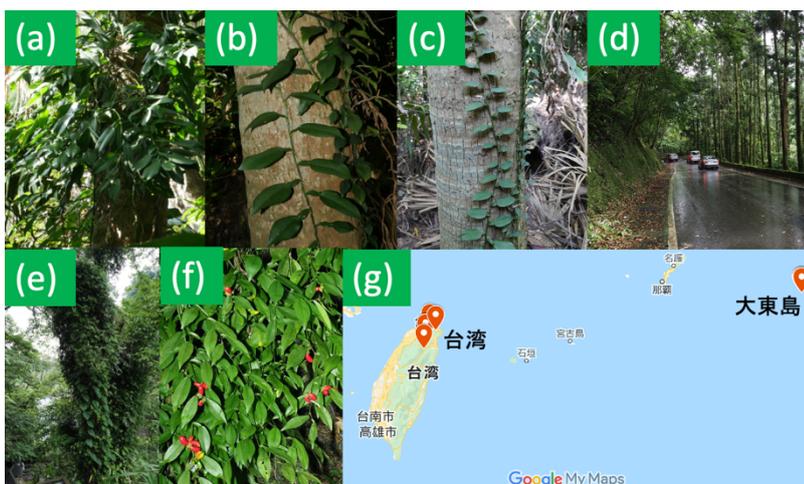


図1.3 ユズノハカズラ (a)~(c)北大東島に生育する個体。比較的乾燥した疎林の樹幹に着生する。(d)台湾北部の生育地。(e)台湾北部十分滝において高密度で生育する集団。(f)台湾の個体はよく結実しているが、大東島では結実はほとんど見られない。(g)解析に用いたユズノハカズラの採集地点。

### (1)-4 ランダイミズ (*Elatostema platyphyllum*)

ランダイミズは、溪流沿いや林床の湿地に生育するイラクサ科の多年生植物である(図1.4)。世界的には台湾、中国南部、ヒマラヤ山脈に分布するが、日本では沖縄県西表島にのみ生育する。環境省レッドリストでは絶滅危惧IB類(EN)にランクされている。西表島の集団は本種の分布最北東に位置し、島のほ

ほ中央部の溪流沿いの数百メートルのみに断続的に生育している(図1.4(a))。台湾では普通種であり、舗装道路や林道沿いの湿った場所で旺盛に生育している(図1.4(b), (c))。本研究ではDNA解析用に、西表島と台湾で採集したサンプルを用いた(図1.4(d))。

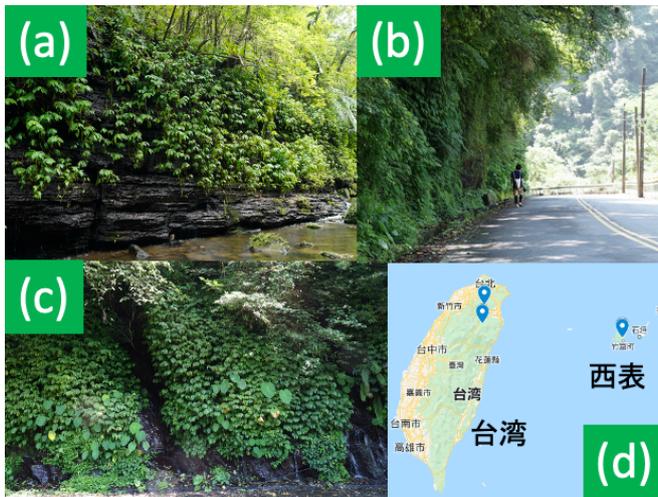


図1.4 ランダイミズ (a)西表島に生育する個体。島中央部の溪流沿いに数百メートルにわたって断続的に茎を密集させて生育している。(b)台湾北部では普通種として車道近辺にも生育している。(c)台湾北部において林道沿いの湿った崖に生育する集団。(d)解析に用いたランダイミズの採集地点。

#### (1)-5 ハコベマンネングサ(*Sedum drymarioides*)

ハコベマンネングサは湿り気のある岸壁などに生育するマンネングサ科の多年生草本である(図1.5)。マンネングサ科の植物は乾燥適応として多肉のものが多く、本種は水分の多い岩壁などに生育し(図1.5(a))、ハコベのような薄い葉を持つのが特徴である(図1.5(b), (c))。中国大陸に広く分布するが、日本では長崎県の石灰岩地域にのみ生育し、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類(CR)となっている。また、台湾北部にも1ヶ所のみ生育が知られている(図1.5(a))。日本のものは中国からの帰化植物であるという見解もある。本研究では台湾、日本、中国においてサンプリングを行った(図1.5(d))。

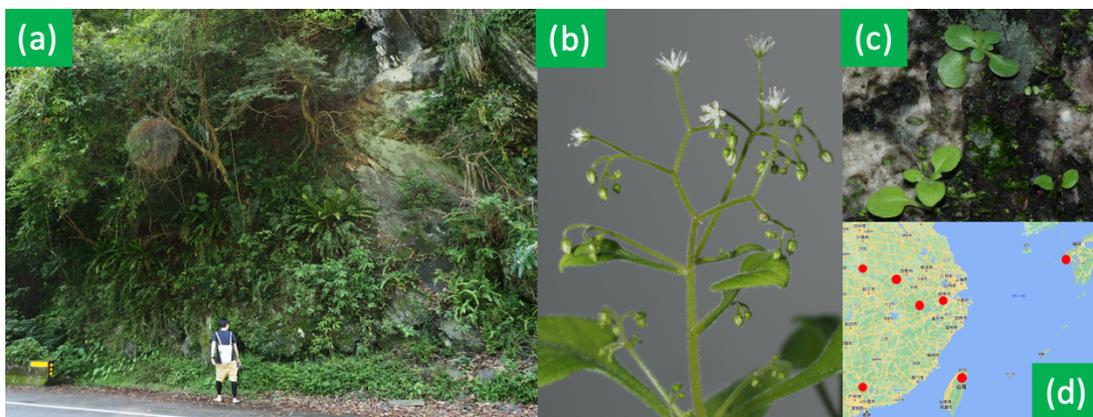


図1.5 ハコベマンネングサ (a)台湾における唯一の集団。(b)開花中の成熟個体。(c)生育地の岩上の幼個体。(d)解析に用いたハコベマンネングサの採集地点。

#### (1)-6 マツムラソウ(*Titanotrichum oldhamii*)

マツムラソウは、湿り気のある場所に生育するイワタバコ科の多年生草本である(図3.1.7)。世界的には中国大陸南部、台湾(図1.6(a))に分布するが、日本では西表島の数ヶ所の河川沿いの湿った岩上に少数個体が生育しており(図1.6(b), (c))、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類にランクされている。以前は石垣島にも生育していたが、ほぼ絶滅したと考えられている。日本では野生個体は少ないが栽培環境下では旺盛な成長を示す(図1.6(d)~(f))。台湾では普通種であり、舗装された車道沿いに多数の個体が生育している。本研究では西表島の3河川沿い及び台湾の4地域に生育する個体を採集し解析した(図1.(g))。西表産個体の一部サンプルについては美ら島財団からの供与を受けた。

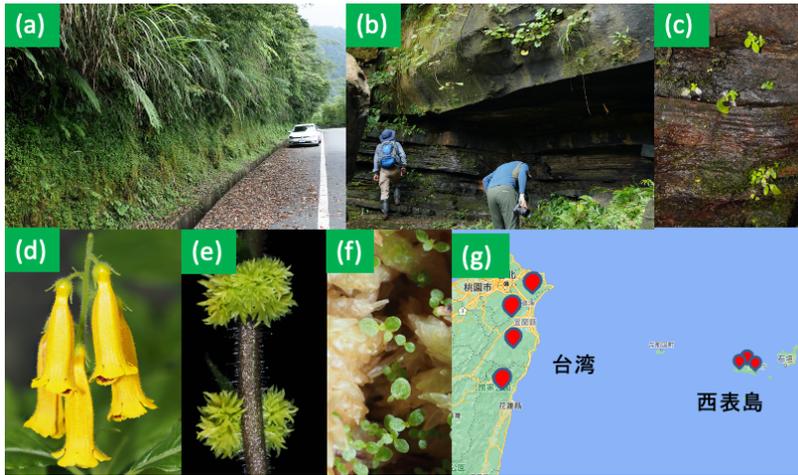


図1.6 マツムラソウ (a)台湾の生育地。湿った斜面に多数個体が生育している。(b)西表島の生育地。河川沿いの岩上に生育するが個体密度は低い。(c)岩上で生育する幼個体。(d)栽培環境下では成長がよく殖芽から1年以内に開花する。(e)開花後はほとんど結実せず花茎に微小な殖芽が多数形成される。(f)殖芽から再生した幼個体。(g)解析に用いたマツムラソウの採集地点。

上記6種については研究目標通り、サブテーマ1による縮約ゲノム解析とサブテーマ2による比較ゲノム解析を完了し、更に以下の5種について追加的解析を行なった。

#### (1)-7 ナガミカズラ (*Aeschynanthus acuminatus*)

ナガミカズラは、大木の幹や岩に着生するツル性のイワタバコ科植物である。国外では台湾、中国、インドネシアなど、広い範囲に分布している。日本では1973年に西表島で発見されたが、その後生育が確認されない状態が続いていたが、2004年に西表島山中の1ヶ所で再発見された(図1.7(a))。絶滅危惧IA類(CR)にランクされるだけでなく、国内希少野生動植物種にも指定されている。

#### (1)-8 サガリラン (*Diploprora championii*)

ナガミカズラは、大木の幹や岩に着生するラン科植物である(図1.7(b))。台湾、中国南部、ヒマラヤなどに広く分布するが、日本では奄美大島の限られた流域のみに100個体未満が生育し、環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類、国内希少野生動植物種であるが、近年、新たな集団も発見されている。本研究では、近年新たに発見された個体も含めた網羅的な遺伝解析を行い、日本産個体の遺伝的多様性を台湾の個体と比較した。また、奄美大島と台湾産のものには花色や生育環境に対する選好性について差異があることが知られていたため、奄美大島と台湾のサガリランの系統的差異を絶対的に評価するために、全葉緑体DNA塩基配列を活用して、中国産サガリラン及び近縁属 *Vandopsis* を含めた系統解析を行い、台湾産と奄美大島産個体の分類学的な差異を明らかにした。

#### (1)-9 ヒメタニワタリ (*Hymenasplenium cardiophyllum*)

ヒメタニワタリは、岩の隙間に生育するチャセンシダ科の草本である (図1.7(c))。中国海南島と日本の小笠原、大東島に生育する。環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類、国内希少野生動植物種、保護増殖対象種であり、個体レベルの識別管理・保護活動が行われている。本研究では、種の保存法に基づく保護増殖事業に協力して母島産及び北大東島産の個体について、詳細な解析を行った。

#### (1)-10 ホシツルラン (*Calanthe hoshii*)

ホシツルランは小笠原母島のみに生育するラン科の草本である(図1.7(d))。環境省レッドリストでは絶滅危惧IA類、国内希少野生動植物種、保護増殖対象種であり、野生個体群と生息域外個体群の保全が行われている。しかしながら、野生個体群の生育状況は極めて悪く、野生絶滅寸前の状態にある。本研究では、種の保存法に基づく保護増殖事業に協力して野生と生息域外個体についてほぼ全個体を対象に網羅的遺伝解析を行い、本種に残存する遺伝的多様性の実態を明らかにした。

### (1)-11 キリシマイワヘゴ(*Dryopteris hangchowensis*)

キリシマイワヘゴはオシダ科の草本で、日本では宮崎県と徳島県に分布が知られているが、主にシカ食害によって壊滅的なダメージを受けており、少数の野生個体と栽培個体が生育するのみである。国内希少野生動植物種である。本研究では現存個体の遺伝的特徴を縮約ゲノム解読で網羅的に解析した。



図1.7 追加的解析を行った希少種 (a)2004年に発見された日本で唯一西表島に生育が知られるナガミカズラ (b)日本では奄美大島にのみ分布するサガリラン (c)日本では小笠原母島と大東島に生育するヒメタニワタリ、(d)小笠原母島固有種のホシツルラン

## 4. 結果及び考察

### (1) 縮約ゲノム解読およびトランスクリプトーム解読

ゲノムの縮約解読は、比較的良好に保たれたサンプルについて大量の情報が得られるRAD-seq法<sup>1)</sup>と標本から抽出した劣化DNAにも対応でき、正確なクローン識別が可能なMIG-seq法<sup>2)</sup>を組み合わせで行った。その結果、十分な数のリード(read, 連続して解読した一連の塩基配列情報)を得ることができた。今回のRAD-seqでは1リードが150塩基長、MIG-seqでは76塩基長であった。RAD-seqによるゲノム縮約解読ではサンプルごとに300万~1,000万リード、MIG-seqでは300万リード程度の情報を得ることができた。

縮約ゲノム解読によって得られた情報は、Trimmomatic v. 0.39<sup>3)</sup>でプライマー配列情報の除去とリード長の均質化を行った。遺伝的変異に関してはStacks v. 2.2<sup>4)</sup>でSNPs (Single Nucleotide Polymorphismsの略。サンプル間で1塩基単位で配列が異なる座位)の検出を行いvcf (variant call format, ゲノムの塩基変異データ保管形式)ファイルを作成した。系統解析では、vcfファイルをPGDSpider<sup>5)</sup>を用いてphylip形式に変換し、RAxML v8.1.1<sup>6)</sup>によって最尤系統樹を探索した。空間的遺伝的構造は、STRUCTURE<sup>7)</sup>と主座標分析 (PCoA)によって解析した。空間的遺伝構造解析では中立的な遺伝子座で行うために、bayescan v. 2.1<sup>8)</sup>を用いて選択を受けている可能性のあるSNPsを除去した。遺伝的多様性、ヘテロ接合度、固有アレル数、塩基多様度等、一般的な集団遺伝解析はGenAlEx 6.5<sup>9)</sup>を用いて行った。国内集団に比較的多数のジェネットが保持されていたツルウリクサに関してはDIYABC<sup>10)</sup>とStairway plot 2<sup>11)</sup>によって過去数万年の個体群動態を推定した。

RNA-seqによるトランスクリプトームも良好に解読でき、各サンプルで150塩基長の3,000万リードについて塩基配列情報が得られた。本情報はサブテーマ2に提供し、保全難易度の評価を行った。

### (2) 縮約ゲノム解読による希少種の保全価値評価

希少種の保全価値は残存する個体数の多寡により評価されることが多い。今回解析対象とした7種の希少植物はいずれも国内では極めて生育個体数の少ないものであるが、ゲノム情報から評価した遺伝的特徴は種間で著しく異なっており、独自性や保全価値の評価についてよりの確な理解を得ることができた。今回の解析によって明らかになった各種の状況について、以下に個別に記述する。

#### (2)-1 ツルウリクサ

最尤法によって分子系統解析では奄美集団と台湾集団の間には明瞭な系統の違いが示された(図1.8)。また、奄美および台湾内においても集団間で遺伝的差異があった(図1.8)。STRUCTURE解析や主

成分分析によっても、奄美大島と台湾の集団間で明瞭な遺伝的分化が検出された(図1.9)。奄美大島では54サンプルのうち、クローンと識別されたサンプルをまとめると、全体で31ジェネットが識別された。台湾集団のサンプルでは、同一ジェネットに由来すると考えられるサンプルは存在しなかった。

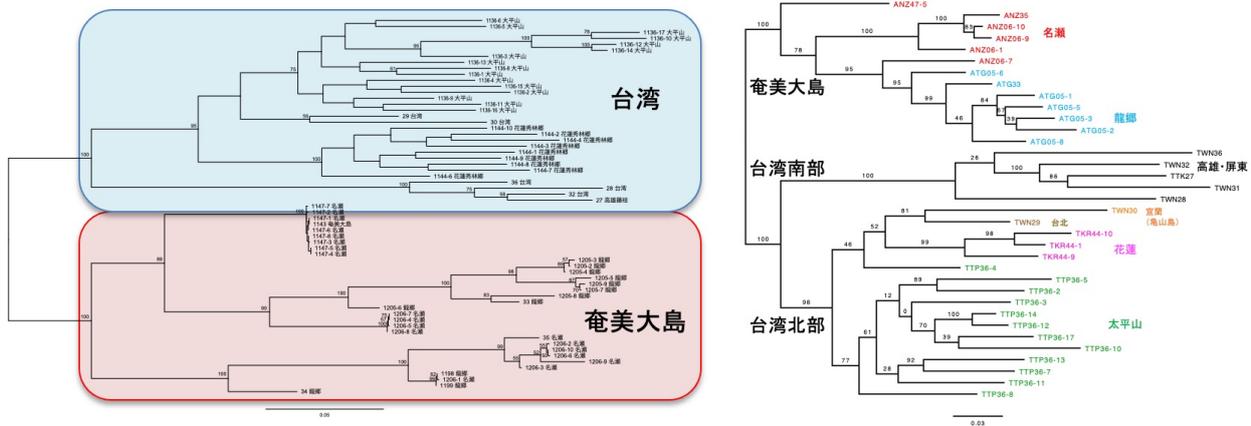


図1.8 RAD-seq法(左)とMIG-seq法(右)に基づくツルウリクサの最尤系統樹

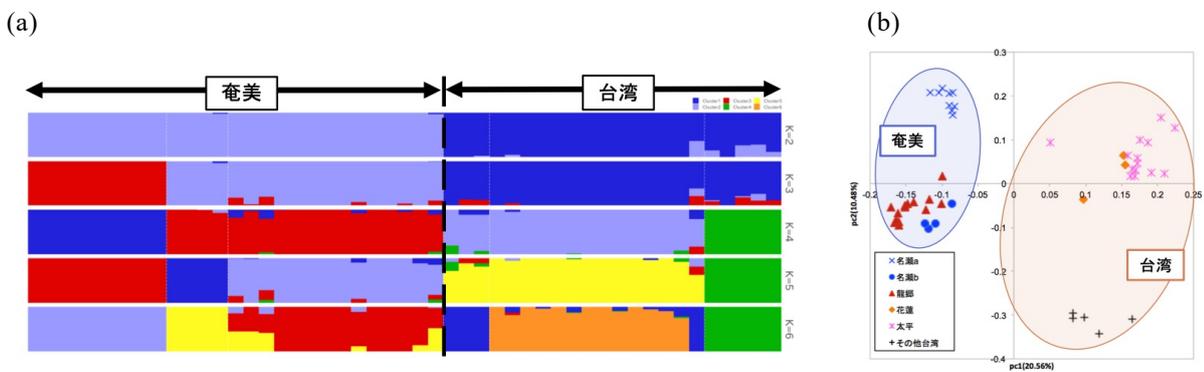


図1.9 奄美大島と台湾のツルウリクサの遺伝的集団構造解析 (a) STRUCTURE解析。(b)主座標解析。

DIYABCによる集団動態推定解析によって、奄美大島と台湾の集団が分岐したのはおよそ2,170世代前であり、それぞれの有効集団サイズは、奄美が3,040、台湾が4,400、共通の祖先集団が3,120,000であると推定された(図1.10(a))。また、奄美と台湾それぞれの集団の集団動態推定をStairway Plotにより推定した結果、奄美集団は3万年ほど前までの時代に個体数が半減し、その後回復したことが推定された(図1.10(b))。一方で、台湾集団は4万年ほど前までにかけて個体数が緩やかに増加した後に緩やかに減少しており、奄美集団とは明瞭に異なる集団動態が推定された。

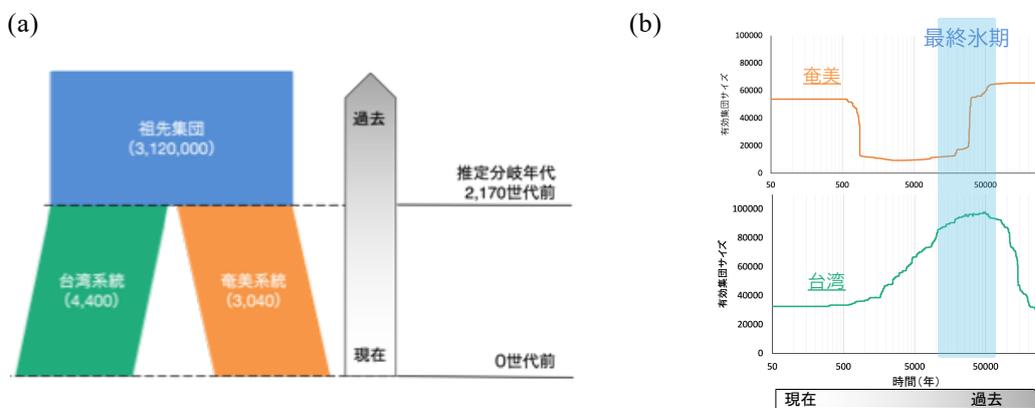


図1.10 ツルウリクサの個体群動態推定 (a)DIYABC解析による祖先集団から奄美大島と台湾集団への分岐年代と各集団サイズ推定。括弧内の数字は有効集団サイズ。(b) Stairway plot解析による奄美と台湾の集団動態推定

縮約ゲノム解析の結果、奄美集団と台湾集団の分化や奄美集団の種内における独自性が明らかになったが、これらの解析は種内の相対的な分化を示すものであるため、絶対的な分化レベルを明らかにするために、RAD-seqに含まれる葉緑体DNA塩基配列情報を近縁種の全葉緑体ゲノムと参照することで、約50,000塩基の葉緑体DNA情報を抽出して系統解析した(図1.11)。解析に用いた葉緑体参照ゲノムは中国広東省産の同属別種*Torenia benthamiana*及び、広東省産のツルウリクサである。解析の結果、今回の解析に由来するサンプルは一つのクレードにまとまっており(図1.11の高雄藤枝より上右)、更に広東省が基部で分岐していた。これらのことから、奄美大島の集団は中国大陆から台湾を経由して由来したものであることがわかった。また、葉緑体DNA塩基配列は比較的保守的で変異は少ないものであるが、個体数の少ない奄美大島個体群の中に比較的大きな葉緑体変異が保持されていることも注目値する。同属別種*T. benthamiana*との関係をみると、*T. benthamiana*がツルウリクサ*T. concolor*から分岐した後の枝長は広東省の*T. concolor*の枝長よりも短い。このことから、現在、ツルウリクサとして認識されている分類群は広東省のもの、台湾・奄美の系統に種レベルで分割される可能性も示唆された。

奄美大島に生育するツルウリクサは集団数が少なく、また、人為攪乱環境下にも存在する。このことから、奄美大島の集団が人為的に持ち込まれたものではないかとする懸念があった。しかしながら、奄美大島のツルウリクサは、(1)台湾の集団とは遺伝的に明瞭に分化していること、(2)国内には奄美大島北部の狭い範囲に数ヶ所生育しているに過ぎないが、そのような地域集団間にも明瞭な遺伝的地域性が認められること、(3)遺伝的多様性も台湾集団とほぼ同レベルのものが維持されていること、(4)台湾集団との分岐後、数千世代に及ぶ世代交代が進んでいること、(5)遺伝的特徴から推定された国内集団の有効集団サイズは数千個体と、現存する個体数(数十)よりも桁違いに多いことなどがわかった。これらの結果から、日本では奄美大島のみに残存するツルウリクサは、固有の遺伝的系統であり保全価値があるといえる。また、国内地域集団は遺伝的に分化しており、その地域性に配慮した保全を行う必要がある。個体数が少ないにもかかわらず、遺伝的多様性や健全性が維持されていると考えられているので、後述するゲノムの発現遺伝子に基づく解析と同様に、適切な管理による効果的な保全が達成できることも期待できる。

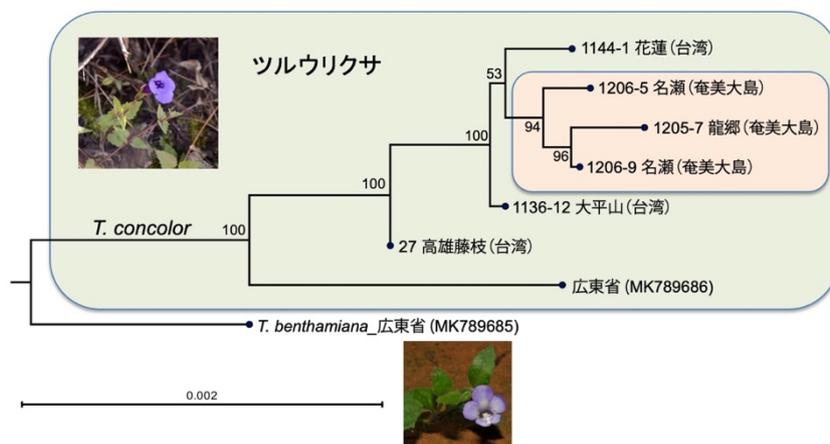


図1.11広東省産ツルウリクサ及び同属近縁種*Torenia benthamiana*の全葉緑体ゲノム情報との比較解析による奄美大島-台湾個体群の系統関係

## (2)-2 タイワンホトトギス

台湾、西表島、沖縄本島に分布するタイワンホトトギスと同属近縁2種(*T. revenii*と*T. lasiocarpa*)を対象に最尤法系統解析を行った結果、タイワンホトトギスは2つの大きなクレードに分割されることが明らかになった(図1.12(a))。このことは、現在タイワンホトトギスとされている種が複数の種から構成される可能性を示している。また、西表島と沖縄本島に生育するタイワンホトトギスはそれぞれが明瞭な単一系統であった。また興味深いことに、西表島、沖縄本島に生育するタイワンホトトギスはそれぞれが別のクレードのタイワンホトトギスに近縁なものであった(図1.12(a))。

今回の解析で検出されたタイワンホトトギス内の大きな系統の地理的分布には興味深い特徴が見られた(図1.12(b))。台湾北部と西部のクレードと、台湾東部、蘭嶼、西表島のクレードは重複することな

く分布していた。図1.12(b)において、赤色で示した沖縄本島集団は、黄色で示したものと同一のクレードであるが、国内の西表島からではなく、600 kmを超える台湾北部から移動していることは興味深い。また、西表集団に最も近縁な集団は最近隣の台湾北部集団ではなく、台湾南西部の島嶼である台東縣蘭嶼の集団であった(図1.12(b))。西表に生育する希少種の中には、ナガバコバンモチ、クサミズキ、クロボウモドキ、ヒメツルアダン、ヒメハブカズラ、ササキカズラのように、台湾本土ではなく蘭嶼に生育するという特徴ある奇妙な分布をするものが知られている。タイワンホトトギスは台湾本土にも生育するものであるが、最近縁のクレードが台湾本土ではなく蘭嶼であったことは、西表島における複数希少植物種の分布が単純に距離だけでなく、何らかの未知の共通要因によって規定されているという、生物地理上、興味深い可能性を示唆するものである。

沖縄本島のタイワンホトトギスは生育地の状況から自然分布であることが疑われていたが、集団内の枝の長さから個体間に遺伝的な変異も保たれており、また、台湾北部の集団からも長い枝で隔たっていることから、自然分布し沖縄本島内で長期間に渡って維持されてきた集団であると考えられる(図1.12(a))。系統解析の結果から、日本に生育するタイワンホトトギスは西表島と沖縄本島に独立に異なったクレードのものが2回移入しており、それぞれの独自性も認められることから、保全価値が高いと考えられる。

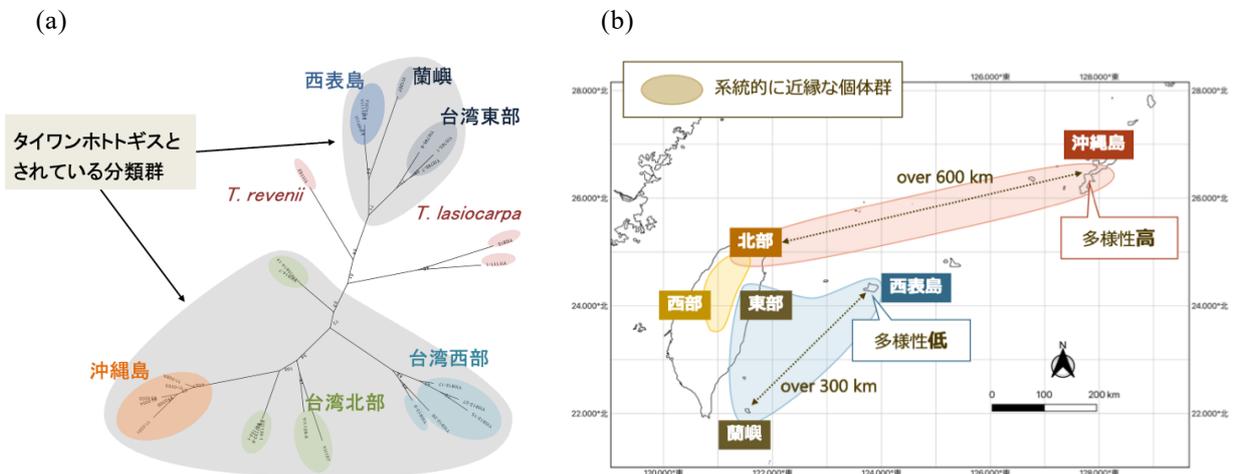


図1.12 タイワンホトトギスの最尤系統解析と系統地理分析 (a)タイワンホトトギスと同属別種の系統関係。(b)タイワンホトトギス種内クレードの地理的分布。

### (2)-3 ユズノハカズラ

国内の北大東島産(現地採集個体と栽培個体)と台湾産のサンプルを対象に縮約ゲノム解析を行い、得られたSNPからそれぞれ分子系統解析を行った結果、北大東島に分布する系統は台湾に分布する系統とは遺伝的に明瞭に異なることが明らかになった(図1.13)。また、北大東島に分布する個体はそれぞれ遺伝的差異が非常に小さいのに対して、台湾の個体間には大きな遺伝的差異があり、また、地域集団間レベルでも遺伝的な分化が認められた(図1.13)。

STRUCTUREによる遺伝構造解析では $K=2$ において、北大東島と台湾の集団が明確に分かれた。最適なクラスター数である $K=4$ の段階でも北大東島と台湾の分化が示されたが、この場合、北大東島が一つのクラスターで構成されるのに対して、台湾は遺伝的構成が異なる3つのクラスターにより構成されており、台湾に比べて北大東島の集団が遺伝的に単純であることが示された(図1.14(a))。

北大東島では網羅的な採集を行ったが、北大東集団はわずか3クローンのみで構成されていた(図1.14(b))。ユズノハカズラは国内希少野生動植物種に指定されているが、生息域外保全を行う場合は、本研究で明らかになったクローン情報を活用することで効果的な保全が可能になると考えられる。一方、台湾集団では各地点内・地点間で異なる複数クローンが集団を構成していた。

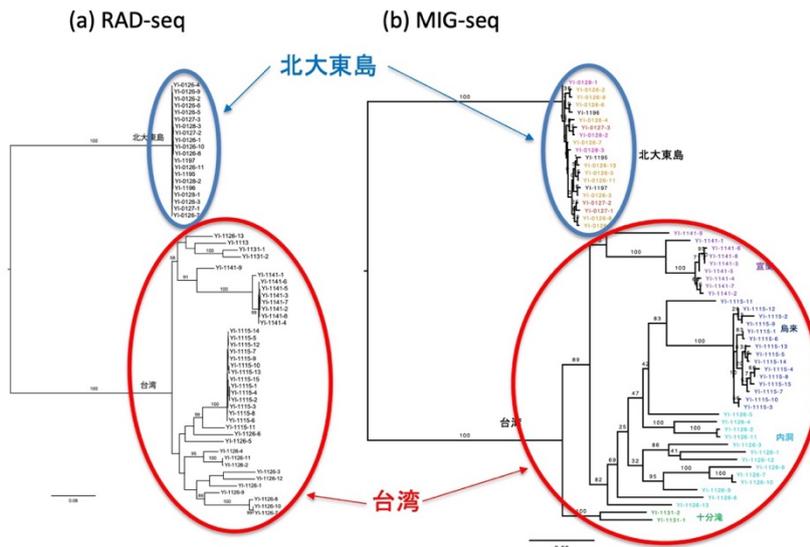


図1.13 北大東島と台湾に生育するユズノハカズラの最尤系統樹 (a) RAD-seqおよび(b) MIG-seqから得られたSNPsに基づくもの。

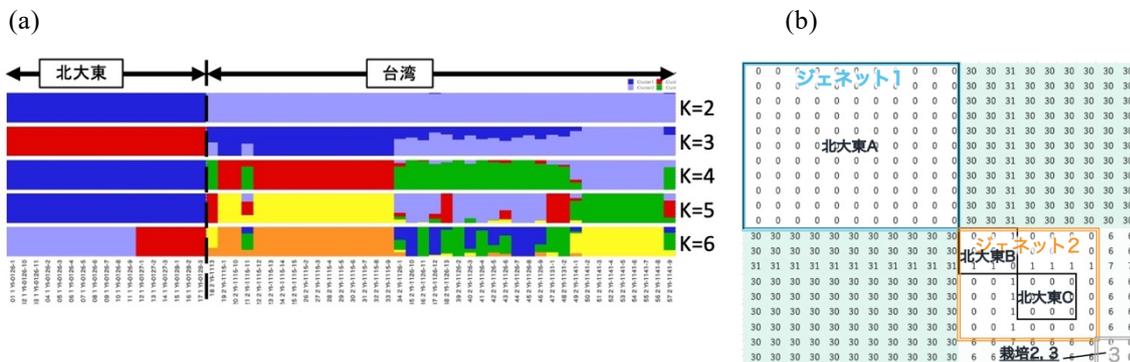


図1.14 北大東島と台湾に生育するユズノハカズラ遺伝構造解析 (a) STRUCTUREによるクラスター数はK=4が最適となった。(b)北大東島産ユズノハカズラ20サンプル間におけるSNPsの差異数を示した。異なったクローン間では30~31の個体間SNPsがあるが、同一クローン間では個体間SNPsは0~1である。

## (2)-4 ランダイミズ

縮約ゲノム解析に基づく種内最尤系統樹では、西表島と台湾産サンプルがそれぞれ別のクレードとして認識された(図1.15(a))。台湾産サンプルでは更に産地ごとに遺伝的分化が生じていることもわかった(図1.15(a))。西表島では数百メートルにわたる生育地を網羅するようにサンプリングを行ったが、それらに遺伝的差異はほとんど無く、1クローンで構成されていることが明らかになった(図1.15(a))。一方で台湾産サンプルでは、一部栄養繁殖に由来すると思われるクローンが認められたが、全体としてみると一つの生育地内にも多様な遺伝子型を保持している個体が存在していた。

図1.15(a)のような単一クローンを多く含むデータセットでは、系統間の差異が正しく評価されないことがある。そこで、西表島サンプルの系統的な位置づけをより正確に解析するために、同一クローンサンプルに関しては、そのうちのひとつを代表させて、SNPs検出と最尤系統樹の構築を行った(図1.15(b))。その結果、西表産サンプルの台湾産サンプルに対する遺伝的差異は、台湾の1地域内における個体間差異と大差無く、西表集団の遺伝的独自性は低いことが明らかになった(図1.15(b))。

ゲノム内に保持されている遺伝的多様性をヘテロ接合度の観察値( $H_o$ )で比較すると、個体数が多く個体間の系統的差異も大きい台湾産ランダイミズが0.27052であるのに対して、わずか1クローンで構成される西表島のランダイミズは0.22647であり、両者にほとんど違いが認められなかった。

少数個体が世代交代を繰り返すとヘテロ接合度の観察値 $H_o$ は著しく低下する。このことから、西表産の1クローンは、西表においてほとんど世代交代をしていないと考えられる。図1.15(b)で示された台湾個体との類似性も考慮に入れると、現在西表の奥地において生育しているランダイミズは、日本国内

において長い歴史を持ったものではなく、台湾北部から何らかの方法で西表島に移入・定着した後に、無性生殖でラメット数を増大させてきたものであると考えられる。

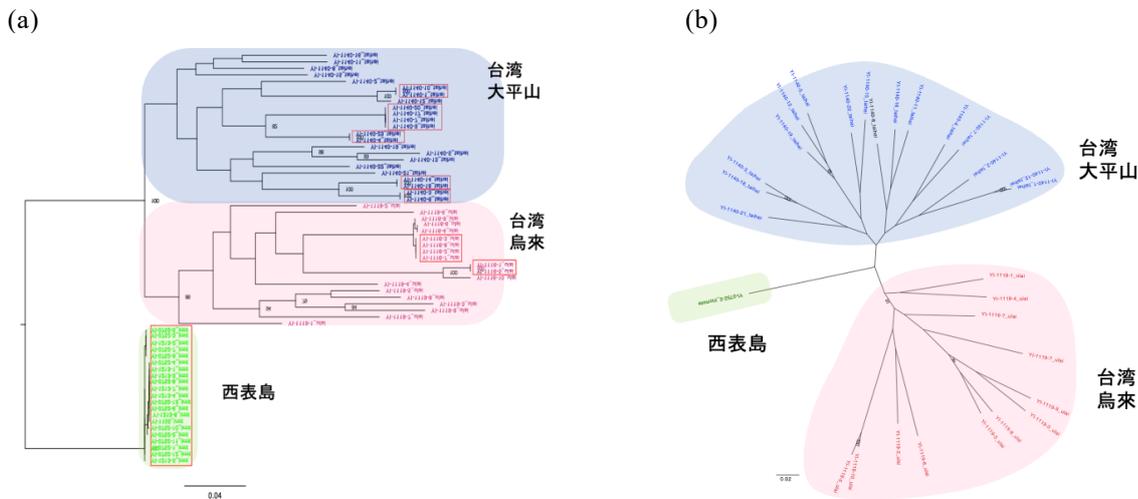


図1.15

西表島と台湾に生育するランダイミズの最尤系統樹 (a) すべてのサンプルを含む最尤系統樹。赤線で囲まれたサンプルはそれぞれ単一クローンである。(b) 同一クローンを1サンプルで代表させた場合の最尤系統樹。

#### (2)-5 ハコベマンネングサ

縮約ゲノム解析に基づく最尤系統解析の結果、中国大陸、台湾、日本(長崎県)のサンプルが明瞭に3つのグループに別れた。また、台湾集団はサンプル間で遺伝的差異がほとんど無く、系統樹上の末端枝がない構造となった。これは台湾サンプルが1クローンで構成されていることを意味する(図1.16(a))。台湾集団では開花個体があり一見実生と思われる個体も多数観察されたが(図1.5(c))、これらは無融合生殖によって生じた同一クローンと思われる。長崎では、採集を行った2集団に小さな遺伝的分化が認められたが、集団内においては同一クローンが卓越していた(図1.16(a))。中国大陸では地域間の遺伝的差異は大きく3つのクラスターが認識されたが、集団内の差異は小さかった(図1.16(a))。

STRUCTURE解析でも、中国大陸、台湾、日本の集団は明瞭に分化していた(図1.16(b))。また図1.17(b)において色の違いで表現されている遺伝的クラスターは、一つの個体内で互いに混合することがなく、集団間の交流が極めて少ないことを示していた。

各個体のゲノム内におけるSNPs(一塩基多型)頻度で個体ごとの遺伝的多様性を評価したところ、台湾、中国のものは個体内の遺伝的変異が極めて少なかったが、長崎のサンプルは1桁高い遺伝的多様性が保持されていた(図1.16(c))。この結果は極めて意外なものであったが、サブテーマ2で行われた解析では、日本産のハコベマンネングサはトランスクリプトーム内の一塩基多型座位においてヘテロ接合座位が卓越していたことから(図2.3)、倍数化によるゲノムの重複が起こったことが考えられる。

ハコベマンネングサの近縁種*Sedum stellarifolium*を外群として系統解析したところ、系統樹の根は台湾サンプルの近傍に位置したので、今回解析した集団の中では、台湾のものが最も祖先的であり、そこから日本と中国が派生してきたものと思われる。その後、そして、日本の集団においては倍数化によるゲノム全体の重複が起こり、また、中国大陸では遠く離れた集団間で変異が蓄積されたと考えられる。このように、ハコベマンネングサは集団ごとにそれぞれ特徴ある進化的イベントを経た集団が台湾、中国、日本に現存していることが明らかになった。

台湾集団、日本集団ともに分布は極めて限定的であり、生息域外保全を開始すべき時期にあると考えられるが、それぞれの集団においてクローンが卓越しているので、台湾集団では1個体、日本集団では同一クローンが重複しないように数個体を選定、保持すれば現存する野生集団の遺伝的多様性は保全できるだろう。域外保全集団構築の際の個体選別には今回の解析結果を活用することができるだろう。

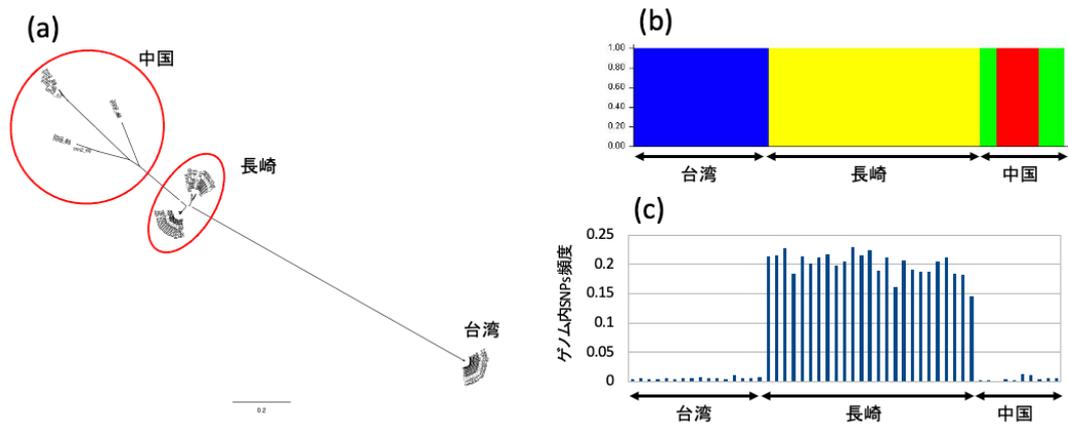


図1.16 台湾、日本、中国産ハコベマンネングサ縮約ゲノム解析 (a)最尤系統樹、(b) STRUCTURE解析、(c)各個体のゲノム内SNPs(一塩基多型)頻度

## (2)-6 マツムラソウ

縮約ゲノム解読から得られた一塩基多型情報から主座標分析PCoAを行ったところ、西表島と台湾の集団は大きく二分された(図1.17(a))。台湾で採集を行った4ヶ所の野生集団はそれぞれ数十メートルの範囲に及び、多数の個体によって構成されていたが、解析した4集団のうち3集団は、それぞれ平面上で同一点に位置し、単一クローンであることがわかった(図1.17(a))。西表島では3集団で採集を行ったが、それぞれの集団は優占する単一クローンと、それに類似した別クローンによって構成されていた(図1.17(a))。これは図1.6(e), (f)に示したように本種の繁殖が有性生殖によらず、無性的に多数形成される殖芽によって野生個体群が維持されていることを示唆するものである。

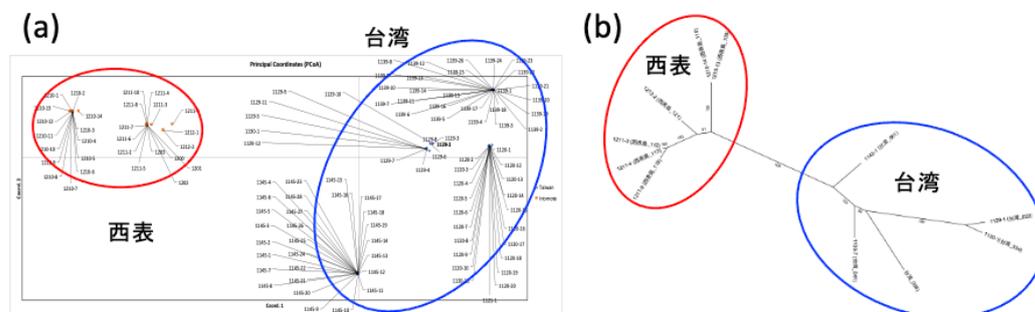


図1.17 台湾、西表産マツムラソウの縮約ゲノム解析 (a)主成分分析。多くのサンプルが同一点上に位置している。(b) クローンごとの最尤系統樹。

各クローンを1サンプルで代表させてクローン間の最尤系統解析を行った結果では、主座標分析と同様に西表島と台湾の集団が大きく二分された(図1.17(b))。更に、クローン間には明瞭な遺伝的分化があった。特に、西表島の集団サイズは台湾に比べると極めて小さく、また集団数も3ヶ所と少ないが、集団間の系統的差異が大きいことは注目値する。西表島の集団は長い歴史を持ち、既知の3集団はいずれも高い保全価値を持つと考えられる。域外保全においては、本研究で明らかになったクローン構造情報を活用することで、野生集団に残存する遺伝的多様性の効率的・効果的な保全が可能になるだろう。

## (2)-7 ナガミカズラ

日本では西表島に1集団のみが知られているが、縮約ゲノム解読によって西表の集団が1クローンで構築され、台湾からの到来後、数世代未満しか経ていないことが明らかになっている(芝林ほか未発表)。本種の持続的管理・保全には、サブテーマ2で行う発現遺伝子の解析が重要となるが、RNAが本種に関

しては抽出できていなかった。本研究ではRNA抽出条件の検討を行い、筑波実験植物園と美ら島財団の栽培個体からRNA抽出に成功し、RNAseqを行うことができた。得られた情報はサブテーマ2で解析し、有害突然変異量、重複遺伝子含有率などの比較解析により保全難易度の評価を行った。

## (2)-8 サガリラン

サガリランに関しては、以前より発見されていた個体に関しては、奄美大島の個体間にほとんど遺伝的変異が認められず、全体を一つの保全単位として扱うべきであると考えられていたが、本研究の実施中にも環境省の保全事業によって新たな集団の発見もされている。これらの個体も含めてについても縮約ゲノム解読に基づく最尤系統解析を行った(図1.18)。その結果、新たに発見された個体は既存の個体とは異なった系統関係にあり、複数の保全単位を設定するのが適切であることがわかった。この知見は、今後の人工交配や移植を適切に行う上で有用な情報となるものである。

図1.18では奄美大島内の個体間の系統的差異に比べると台湾と奄美大島の差異は大きい。これらの差異の絶対的な大きさを知るために、中国産サガリランと近縁種を加えて解析した結果、奄美大島と台湾産個体の相対的な差異は小さく、これらは同種として取り扱うのが妥当であることが明らかになった(図1.19)。もちろんこれによって、地域系統としての奄美大島集団の価値が減少するものではない。

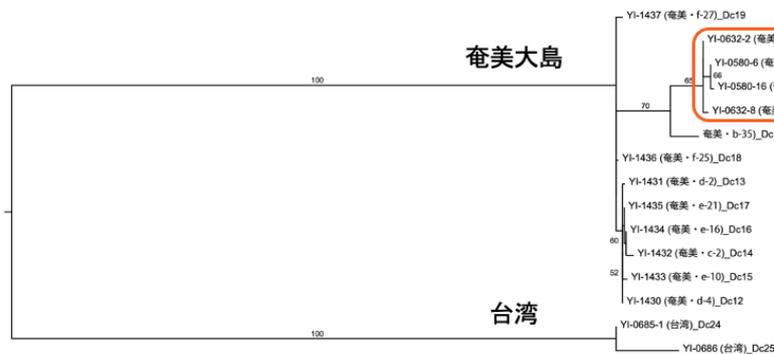


図1.18 台湾、奄美大島産サガリランの最尤系統樹 奄美大島のクレードにおいて赤枠で囲ったものは以前より生育が知られていた個体。それ以外は最近発見された個体。

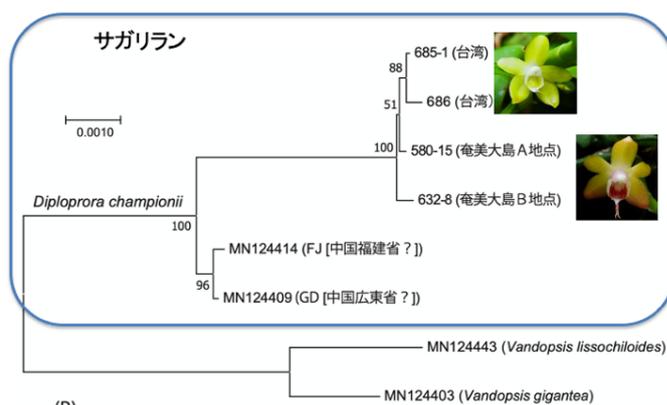


図1.19 中国産サガリランおよび近縁種を含めた最尤系統樹

## (2)-9 ヒメタニワタリ

種の保存法に基づく保護増殖事業に協力して小笠原母島と大東島に生育するヒメタニワタリ野生集団についてほぼ網羅的に系統解析を行い、小笠原と大東島の個体群が明確に分化していることを見出した(図1.20)。島内における空間的遺伝構造に関しては、母島では第一石門洞より第二石門洞の方により多様な遺伝的変異が保持されており、また、第二石門は二つの遺伝的グループに分かれることなど、野生集団における個体レベルでの精密な保全管理に有用な情報を得ることができた。

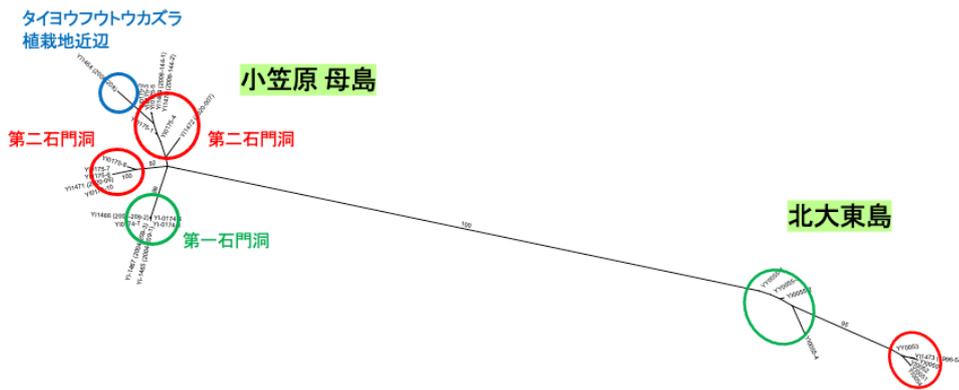


図1.20 小笠原母島と北大東島に生育するヒメタニワタリ個体の最尤系統樹

(2)-10 ホシツルラン

種の保存法に基づく保護増殖事業によって手厚く保護されているが、近年状況が著しく悪化し野生絶滅寸前である。従って、本種の保全のためには域外保全個体の評価・取扱いが重要である。本研究では生息域外保全個体について、網羅的に試料を入手し解析を行った。その結果、現存するホシツルランは個体間の遺伝的差異が極めて小さいことがわかった(図1.21)。ホシツルランは人工交配させてもその後の成長が悪く、近交弱勢の弊害が懸念されているが、本研究で得られた個体間の関係(図1.21)を参照し、なるべく遺伝的に離れた個体間で人工交配させることが本種の保安全管理上有効と考えられる。



の成長が悪く、近交弱勢の弊害が懸念されているが、本研究で得られた個体間の関係(図1.21)を参照し、なるべく遺伝的に離れた個体間で人工交配させることが本種の保安全管理上有効と考えられる。

図1.21 ホシツルランと同属近縁種ツルランの最尤系統樹

(2)-11 キリシマイワヘゴ

現存する野生個体と栽培個体のほぼ全てと、近縁普通種オシダの最尤系統解析を行ったところ、オシダに比べてキリシマイワヘゴの枝は著しく短く、種内の個体間変異が少ないことがわかった(図1.22(a))。キリシマイワヘゴおよび雑種のみで系統解析した結果(図1.22(b))、種内の遺伝構造が明瞭に示された。現存する野生個体群は3つのクラスターに別れ、そのうちの2つが宮崎県にあること、3つのクラスターともに栽培されている個体があることなどがわかった。今後、本種は野生個体と域外保全個体で維持せざるを得ない状況だが、より適切な保全を行うための基礎的な情報を得ることができた。

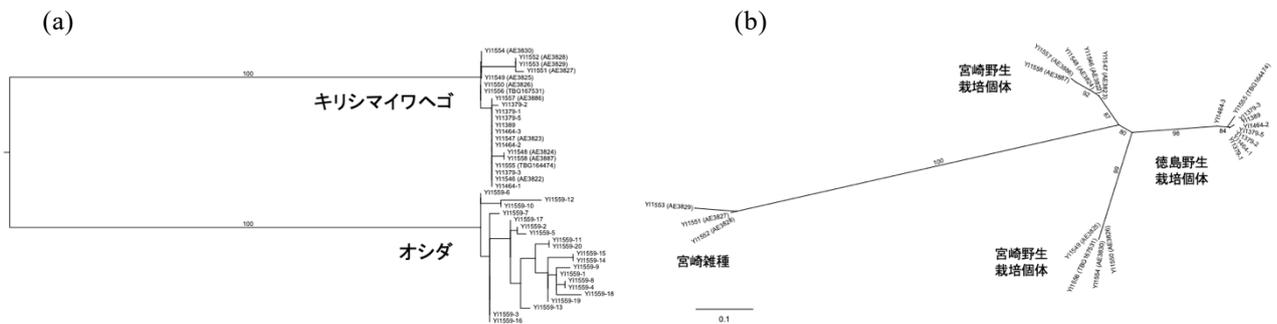
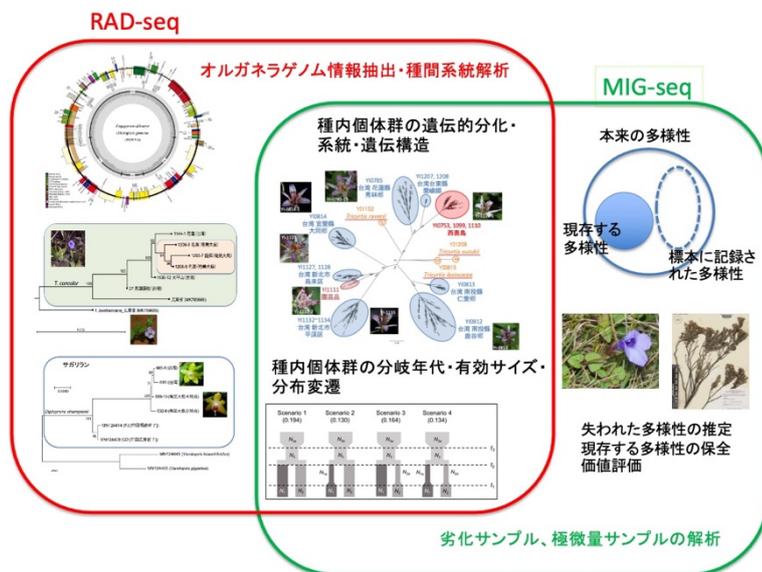


図1.22 キリシマイワヘゴおよび近縁種の最尤系統樹 (a)キリシマイワヘゴとオシダの最尤系統樹 (b)キリシマイワヘゴ及び雑種の最尤系統樹

### (3) 二つのゲノム縮約解読方法の活用

本研究ではゲノムの縮約解読方法としてRAD-seqとMIG-seqを採用したが、種内個体群の遺伝的分化・系統・遺伝構造・分岐年代・有効サイズなどに関しては、両手法で不一致は無く信頼性の高い解析結果が得られた。行政的にも活用され、また、刑罰なども伴う国内希少野生動植物種等希少種の保全管理にも用いられうる情報として、その信頼性・再現性が高い解析結果が得られたことは意義がある。

RAD-seq、MIG-seqはゲノム情報の縮約解読方法が異なるため、その違いを活用して有用な保全情報を得ることができた(図1.23)。すなわち、核ゲノムに加えて、葉緑体などのオルガネラゲノム情報も含むRAD-seq解読情報を、既に解読・公開されている近縁種の全葉緑体ゲノム情報と比較参照することで、希少種の葉緑体ゲノム情報だけを抽出し、国内外に共通して生育する希少種の集団間における系統的差異を客観的な基準によって評価することができた。一般に葉緑体DNAによる系統解析では数百から数千塩基程度の情報が用いられるが、本手法では数万塩基オーダーの葉緑体ゲノム情報を利用でき、より信頼性が高い系統解析が可能であった。一方MIG-seqは解読できるのは核ゲノムに限定されるが、解読前にサンプルから抽出したDNAをPCRによって増幅するため、微量や劣化した試料、例えば博物館等に保管されている植物腊葉標本でも解析可能である。この手法を活用することで、かつて保持されていた遺伝的多様性や人為によって失われた多様性などを定量的に評価できる。この様に2つの手法の



の特長を活用することで、両者の共通部分からは、行政的な取扱いにも求められる解析の精度と信頼度を上げ、また、独自の部分においては、より多面的な見地からの希少種保全策の構築が可能と考えられる。

図1.23 ゲノム縮約解読方法RAD-seqとMIG-seqのテラメイド生物多様性保全策への活用

### (4) ゲノム縮約解読および比較ゲノム解析に基づく希少種の統合的なテラメイド生物多様性保全策の構築

従来行われてきた保全遺伝学的な評価基準に、サブテーマ1で行ったゲノム縮約解読に基づく希少種の保全価値評価とサブテーマ2の比較ゲノム解析による希少種の保全難易度評価を追加することで、個々の希少植物の状況に合致した合理的・効果的なテラメイド生物多様性保全策を提唱した。

一般に生物の保全に際して、まず考察されるのが個体の多寡である。本研究の解析対象種は全て日本国内における野生個体数が100個体未満と希少である点で共通している。しかしながら、図1.24の縦軸に示した集団の安定性に関連する集団レベルの遺伝的多様性と横軸に示した国内集団の独自性やユニークさという観点から見ると、希少種種ごとに特徴ある状況が見いだされた(図1.24 (a))。

希少生物の中には、野生状態での個体群の存続が困難であるために、「種の保存法」に基づく保護増殖事業など積極的な保全管理や、あるいは、生育域外保全が必要な種も少なくない。ゲノムの状態を解析することで評価した保全難易度を更に軸に加えたのが図1.24(b)である。本研究の解析対象種の中では西表産タイワンホトトギスのゲノム状態が悪く、本質的に脆弱な性質を持つことがサブテーマ2の解析によって明らかになった。これまでの保全遺伝学ではほとんど考慮されてこなかった国内集団の保全価値と保全難易度という新たな評価軸を加えることで、ただ単に国内における生育数が少ないという観点

から評価されてきた希少生物を多面的にカテゴライズすることができた。

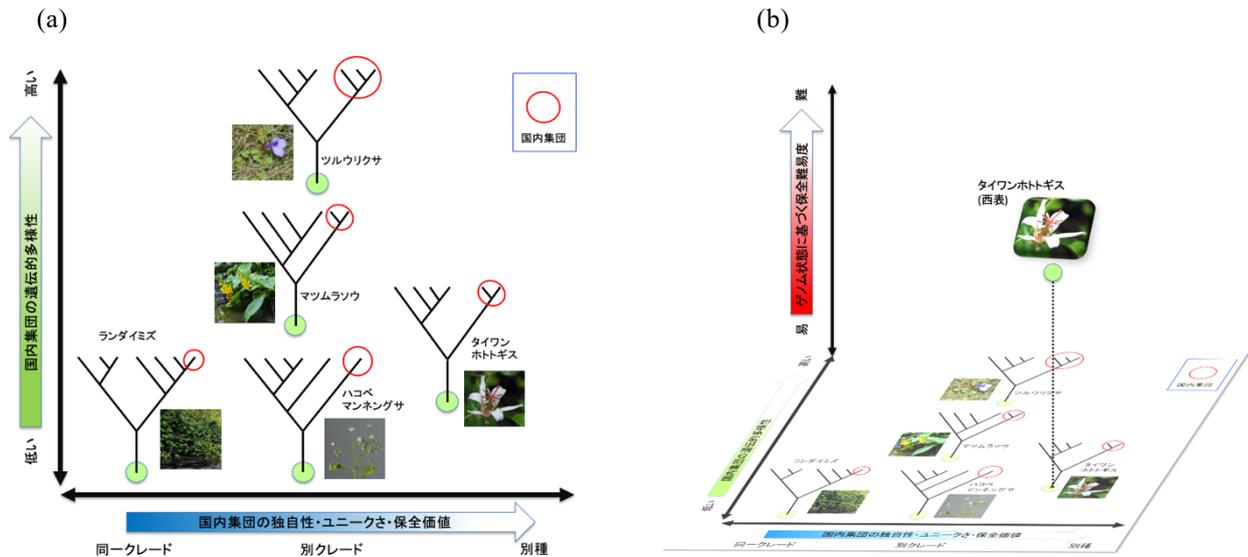


図1.24 本研究の評価基準に基づく希少種の状況評価 (a) 国内集団の独自性と遺伝的多様性による希少種の状況評価。各系統樹内において赤丸は国内集団の種全体に対する系統的位置を示す。(b) 保全難易度という第3の評価軸を加えた状況評価。

本研究では個体数に加えて、遺伝的多様性、系統のユニークさ、保全難易度という3つの項目を解析したが、これらの3軸を、それぞれ高・低で分割することで8個のカテゴリ空間が得られる(図1.25)。それぞれの空間には、系統的独自性と遺伝的多様性が高い上に、ゲノムの状態が良好で、保全努力の効果が期待されるもの(図1.25 緑枠、ツルウリクサ)、系統的な独自性は認められ保全価値はあるが保全難易度が高いもの(図1.25 黒枠、西表産タイワンホトトギス)、遺伝的多様性は低いにもかかわらずゲノム状態は良好で保全は容易だが系統的独自性の低いもの(図1.25 赤枠、ランダイミズなど)等々、希少種を当てはめることができる。

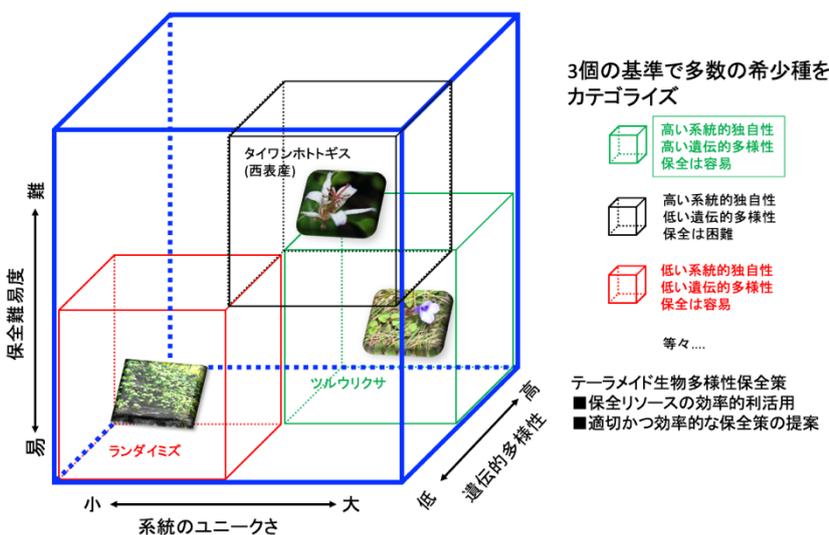


図1.25 本研究で用いた3軸の評価基準に基づく希少種のカテゴライズ

日本に生育する約7,000種の維管束植物のうち約3割が絶滅危惧種となっている。多数の絶滅危惧種を予算、時間、空間、人力などの限られた保全資源で適切かつ効率的に行うためには、ただ単に国内に残存する個体数の情報だけでは不十分である。本研究のアプローチ、すなわち、ゲノムの情報から保全価値や保全難易度を明らかにすることで、個々の希少種に適切な保全策を構築することが可能になる。本研究では3年間で6種について解析を行う目的を達成したが、それに加えて環境省などが行う保全事業対

象種にも積極的にゲノム解析を通して協力を行ってきた。今後も、本アプローチの実践を通して生物多様性の保全に貢献したいと考えている。

## 5. 研究目標の達成状況

研究期間中に、当初目標としていた6種についてゲノム縮約解析を行い、またmRNAの網羅的解読から得られた情報をサブテーマ2に提供することを達成できた(表1.1)。更にゲノム縮約解析については追加で4種(合計10種)、mRNAの網羅的解読については追加で1種(合計7種)について遂行するなど、数値目標を上回る種数の解析を実行できた(表1.1)。これらの種に関する解析結果をもとに、希少種の状況に応じた適切かつ効率的な保全策（テーラーメイド生物多様性保全策）の構築・提案を行った。

表1.1 研究目標の達成状況

種名	サブテーマ1		サブテーマ2
	解析項目： 縮約ゲノム解析	RNA-seq	比較ゲノム解析
	内容： 独自性・履歴 保全価値評価	サブテーマ2へ トランスクリプ トーム情報提供	有害遺伝子蓄積量・ 環境適応能力 保全難易度評価
1 ツルウリクサ	完了	完了	完了
2 タイワンホトトギス	完了	完了	完了
3 ユズノハカズラ	完了	完了	完了
4 ランダイミズ	完了	完了	完了
5 ハコベマンネングサ	完了	完了	完了
6 マツムラソウ	完了	完了	完了
7 ナガミカズラ		完了	完了
8 サガリラン	完了		
9 ヒメタニワタリ	完了		
10 ホシツルラン	完了		
11 キリシマイワヘゴ	完了		
数値目標	6種	6種	6種
完了種数	10種	7種	7種

} 当初数値目標  
 2種 x 3年  
 = 合計6種  
  
 } 追加的解析

## 6. 引用文献

- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012) Double digest RADseq: an inexpensive method for De Novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. PLoS ONE 7(5):e37135.
- Suyama, Y., & Matsuki, Y. (2015). MIG-seq: An effective PCR- based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. Scientific Reports, 5, 16963. <https://doi.org/10.1038/srep16963>
- Bolger, Anthony M., Marc Lohse, and Bjoern Usadel. "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data." Bioinformatics 30.15 (2014): 2114-2120.
- Catchen, Julian, et al. "Stacks: an analysis tool set for population genomics." Molecular ecology 22.11 (2013): 3124-3140.
- Lischer, Heidi EL, and Laurent Excoffier. "PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs." Bioinformatics 28.2 (2012): 298-299.
- Stamatakis, Alexandros. "RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies." Bioinformatics 30.9 (2014): 1312-1313.
- Pritchard, Jonathan K., Matthew Stephens, and Peter Donnelly. "Inference of population structure using multilocus genotype data." Genetics 155.2 (2000): 945-959.

- 8) Foll, Matthieu, and Oscar Gaggiotti. "A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective." *Genetics* 180.2 (2008): 977-993.
- 9) Smouse, R. Peakalland P., and R. Peakall. "GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update." *Bioinformatics* 28.19 (2012): 2537-2539.
- 10) Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, Dehne-Garcia A, Gautier M, Leblois R, Marin JM, Estoup A (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics* 30: 1187–1189.
- 11) Liu X, Fu YX (2020) Stairway Plot 2: demographic history inference with folded SNP frequency spectra. *Genome Biology* 21: 280.

## II. 成果の詳細

### II-2 比較ゲノム解析による希少種の保全難易度評価

東北大学

牧野 能士

#### 【要旨】

我々はこれまでに絶滅危惧種で発現している遺伝子の配列解析を通して、絶滅危惧種に特徴的な遺伝的指標(1. 遺伝的多様性が低い、2. 有害変異が蓄積している、3. 重複遺伝子含有率が低い)を見出し、種の絶滅危険度を推定する取り組みを行ってきた<sup>1,2)</sup>。日本国内の維管束植物は多くの種で絶滅が危惧されているが、国内で希少であっても、海外において同種が広く分布しているケースが多く知られている。サブテーマ2では、国内で希少、かつ、海外で広く分布する7種(タイワンホトトギス、ユズノハカズラ、ラインダイミズ、ツルウリクサ、マツムラソウ、ハコベマンネングサ、ナガミカズラ)についてRNA-seq解析を実施し、国内集団と海外集団の間で遺伝的指標にどのような差異があるか解析を行った。その結果、海外の集団から分岐してから長い年月が経過している国内希少種であるタイワンホトトギスは、海外集団よりも遺伝的多様性が低く、また、有害変異が蓄積しており、ゲノムの状態が悪い事が示された。国内固有性の観点からタイワンホトトギスは保全価値が高く、そして保全難易度が高い種と言える。一方で、海外集団と国内希少集団の間で遺伝的分化が進んでいない他の種では、国内集団と海外集団の間でゲノムの状態に大きな違いは観察されなかった。本研究により、海外で広く分布する種であっても保全価値の高い国内希少集団が存在する事が示された。保全活動を実施する際には個体数だけでなく、ゲノムの情報を参照して保全リソースの分配を考える必要が重要である。

#### 1. 研究開発目的

サブテーマ2では、生物の形質として発現する遺伝情報をRNA-seqによって網羅的に解析し、ゲノムレベルの遺伝的多様性、有害突然変異の蓄積、環境適応性などを明らかにする事で、希少種の保全難易度を評価する。

#### 2. 研究目標

【令和元年度】サブテーマ1から提供された国内外に同一種が生育する希少種2種のRNA-seq情報をもとに、ゲノム内の有害遺伝子蓄積量と環境適応能力を解析することで、希少種の保全難易度を評価する。

【令和2年度】サブテーマ1から提供された国内外に同一種が生育する希少種2種のRNA-seq情報をもとに、ゲノム内の有害遺伝子蓄積量と環境適応能力を解析することで、希少種の保全難易度を評価する。

【令和3年度】サブテーマ1から提供された国内外に同一種が生育する希少種2種のRNA-seq情報をもとに、ゲノム内の有害遺伝子蓄積量と環境適応能力を解析することで、希少種の保全難易度を評価する。

#### 3. 研究開発内容

国内で希少であっても海外において同種が広く分布しているケースが多く知られており、日本国内のみで希少な種に対して、限られた保全リソースを割くことが適切かどうか評価することが求められている。サブテーマ2では、海外では普通種として生育している一方で、国内では極めて個体数が少ない希少植物7種(タイワンホトトギス、ユズノハカズラ、ラインダイミズ、ツルウリクサ、マツムラソウ、ハコベマンネングサ、ナガミカズラ)について、遺伝的多様性、ゲノム内の有害遺伝子蓄積量、環境適応能力の観点から、個々の希少生物の保全難易度を評価した。これらの情報を得るために、サブテーマ1において日本希少集団と海外普通集団の個体のそれぞれからRNAを抽出してRNA-seqによるトランスクリプトームの網羅的解読を行い、ゲノムの塩基配列情報の中で実際に転写・翻訳された配列情報を用いた。

### (1) RNA-seq解析による網羅的な転写産物配列の取得

サブテーマ2におけるRNAシーケンス後のデータ解析の概要を図2.1に示す。RNA-seqによって得られたショートリード配列は、アセンブルツールTrinityでつなぎ合わせ転写産物の塩基配列を再構築した。アセンブルの際には、サンプル毎にショートリード配列をアセンブルする**個別アセンブル**と、同種全個体のショートリード配列を合わせてアセンブルする**複数アセンブル**を実施した。複数アセンブルは個体間で共通した座位を解析できるメリットがある一方で、全個体で転写産物が発現していない座位は調査ができないため、個別アセンブルと比較して利用可能な座位数が減少するデメリットがある(表2.1)。複数アセンブルで得た転写産物配列は、共通座位の利用が必須となる系統解析に用いた。

RNA-seq解析の特性上、発現量が高い領域ではreadが参照配列に多数マッピングされる一方で、発現量が低い、もしくは全く発現していない領域ではreadがマッピングされず、read深度が低くなる。read深度は一塩基変異の検出の精度に直結するため、本研究ではread深度が10以上の座位(領域)のみを対象として解析を行った。

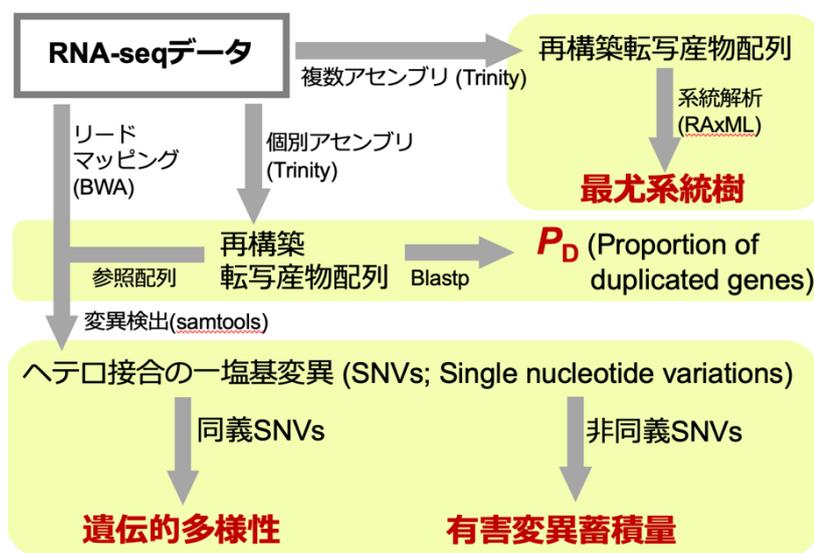


図2.1 RNA-seq解析パイプラインの概要

### (2) 系統解析による固有性の評価

同種複数個体のショートリード配列を用いてアセンブルを行い、その種における代表となる転写産物の参照配列を構築した。参照配列に対してサンプル毎にマッピングアプリケーションであるBWAによりreadのマッピングを行い、NGSデータ解析総合ツールであるsamtoolsを用いて一塩基変異(SNV)の検出を行なった。そして、参照配列と配列が同じ座位、異なる座位(ホモ/ヘテロ)に分類した。全ての個体で遺伝子が発現していた領域(read深度  $\geq 10$ )を共通座位として抽出し、個体間の配列の違いを解析することで系統解析を実施した。系統解析では、複数アセンブリにより得られた参照配列をベースとして、各サンプルの塩基配列を再構築し、RAxMLを用いて最尤系統樹を作成した。本解析により、国内希少集団が海外普通集団とどの程度遺伝的に分化しているかを掴むことが可能になる。

### (3) 配列解析による保全難易度の評価

個別アセンブルにより得られた塩基配列情報をもとに国内希少集団と海外普通集団のゲノムの特性を比較し、国内希少集団の潜在的脆弱性と保全難易度を評価するために、(3)-1 遺伝的多様性、(3)-2 有害突然変異蓄積量、(3)-3 環境適応能力の指標を下記の手順で算出した。

#### (3)-1. 遺伝的多様性

遺伝的多様性は、個体毎にヘテロ接合で保持されている座位数 / kb (read深度  $\geq 10$ )で計算した<sup>1)</sup>。各個体のヘテロ接合の座位を得るため、アセンブルした転写産物の塩基配列を参照配列とし、BWAによ

リショートリード配列を参照配列にマッピングした後に、samtoolsを用いてSNVの検出を行なった。

### (3)-2. 有害突然変異蓄積量

アミノ酸配列の変化を捉える本解析では、タンパク質をコードしている転写産物のSNVのみを対象とする必要がある(つまり、非コード遺伝子配列の除外)。そこで、転写産物の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、ゲノム配列既知植物の全アミノ酸配列をデータベースとして相同性検索を行った。以下の解析では、既知配列と相同な転写産物のみを用いた。有害突然変異を検出するために、まずタンパク質コード領域中のヘテロ座位SNVをアミノ酸配列を変化させる非同義SNVと変化させない同義SNVに分類した。非同義SNVは遺伝子の機能に影響を与える変異を含む可能性があるため、非同義SNVの有害度を、(a) 全SNV中の非同義SNVの割合、(b)非同義SNV中の有害SNVの割合をPROVEAN<sup>3)</sup>で評価した。

PROVEANは、進化学的に保存的されたアミノ酸配列の変化を検出するアプリケーションであり、保存度の高いアミノ酸の変異は、有害な影響を与える傾向にあることが分かっている。

### (3)-3. 環境適応能力

ゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合P<sub>D</sub> (Proportion of duplicated genes)は環境適応力の指標となることが報告されている<sup>4,5,6)</sup>ので、転写産物の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、all-to-all blastp相同性検索を行うことで、重複遺伝子を同定した。そして、全転写産物中の重複遺伝子数を遺伝子重複含有率P<sub>D</sub>と定義し、環境適応力の指標とした。

## 4. 結果及び考察

### (1) RNA-seq解析による網羅的な転写産物配列の取得

ショートリードをアセンブルして得られた転写産物数、総転写産物長、総ヘテロ座位数を表1に示す。個別アセンブルしたすべてのサンプルについて20,000以上の転写産物が得られており、RNAシーケンスとショートリードのアセンブルは良好であったことが示唆された。種毎に複数個体を合わせてアセンブルした転写産物数は、個別アセンブルの時よりも多くなるものの、解析に利用できる総転写産物長は、いずれの種も大幅に減少した(表1)。これは、すべての個体において、共通座位で遺伝子が深度10以上で発現している必要があるためである。

表2.1 RNA-seqアセンブリ結果

種名	学名/サンプルID	産地	アセンブル (個別/複数)	アセンブリ された転写 産物数	総転写産物 長(bp; read 深度 > 10)	総ヘテロ座 位数 (read 深度 > 10)
台湾ホトトギス	<i>Tricyrtis formosana</i>	-	複数	110,830	(共通座位) 444,231	-
	YI-1099-1	日本(西表)	個別	20,971	1,245,158	2,413
	YI-1110-1	日本(西表)	個別	40,575	3,724,311	5,309
	YI-1110-2	日本(西表)	個別	38,973	3,377,609	5,062
	YI-1216-2/3	日本(西表)	個別	87,105	26,502,143	28,396
	YI-1110-3	日本(西表)	個別	63,410	26,108,961	33,693
	YI14412	日本(沖縄)	個別	65,502	22,959,482	64,097
	YI14414	日本(沖縄)	個別	46,135	21,074,314	81,190
	YI14416B	日本(沖縄)	個別	51,133	20,264,567	73,651
	YI14418A	日本(沖縄)	個別	30,904	15,506,934	58,669
	TI-5914YI-1146	台湾(花蓮縣)	個別	25,349	1,163,576	2,988
	YI-0785-15	台湾(花蓮縣)	個別	40,191	21,345,309	107,312
	YI-0785-16	台湾(花蓮縣)	個別	71,437	25,944,766	111,554
	YI-0814-2	台湾(宜蘭縣)	個別	72,270	26,980,980	137,409
	YI-0814-1	台湾(宜蘭縣)	個別	61,153	23,722,690	121,057
	YI-1127-1	台湾(新北市)	個別	60,404	3,124,042	13,633
	YI-1133-1	台湾(新北市)	個別	70,108	7,107,482	36,870
	YI-0813-1	台湾(南投縣)	個別	51,850	25,810,649	102,592
	YI-0815	台湾(南投縣)	個別	75,434	34,869,045	71,442
	YI-0812-2	台湾(南投縣)	個別	56,687	25,945,763	98,286
	YI-0812-3	台湾(南投縣)	個別	59,498	26,137,981	106,613
	YI-1111-1	植栽品	個別	31,941	2,698,288	28,418
	YI-1152	台湾(近縁種)	個別	81,695	32,078,321	118,071
	( <i>Tricyrtis ravenii</i> )					

ユズノハカズラ	<i>Pothos seemanni</i>	-	複数	229,989	(共通座位)	-
	Schott.				1,589,851	
	YI-1195	日本	個別	68,076	4,598,256	6,330
	YI-1196	日本	個別	31,641	2,207,210	4,006
	YI-1197	日本	個別	44,421	3,644,945	6,595
	GK17432	日本	個別	118,126	9,077,680	18,689
	YI-1113	台湾	個別	77,552	5,618,026	13,778
	YI-1141-1	台湾	個別	59,414	4,839,114	9,790
ランダイミズ	YI-1115-15	台湾	個別	78,203	5,758,068	13,492
	<i>Elatostema</i>	-	複数	75,634	(共通座位)	-
	<i>platyphyllum</i>				507,254	
	TBG157878	日本	個別	23,591	1,699,646	3,838
	YI-1214-2-2	日本	個別	36,733	3,755,159	8,877
	YI-1214-2-7	日本	個別	35,231	3,148,981	7,486
	YI-1213	日本	個別	29,536	2,428,121	5,450
	YI-1140-1	台湾	個別	36,663	1,778,916	5,135
ナガミカズラ	YI-1140-2	台湾	個別	20,339	1,147,755	2,589
	YI-1140	台湾	個別	37,835	5,580,242	14,107
	<i>Aeschynanthus</i>	-	複数	105,572	(共通座位)	-
	<i>acuminatus</i>				903,808	
	TBG157901	日本	個別	50,972	3,605,853	17,319
	YI-1204	日本	個別	44,334	2,302,564	7,687
	TBG164697	台湾	個別	56,290	5,133,678	22,777
	TBG164684	台湾	個別	50,512	3,726,756	16,855
ハコベマンネングサ	TBG164678	台湾	個別	30,262	2,017,238	7,027
	164694	香港	個別	0		
	<i>Sedum</i>	-	複数	129,747	(共通座位)	-
	<i>drymarioide</i>				1,156,408	
	YI-1217_1	日本	個別	54,766	5,575,986	52,706
	YI-1217_2	日本	個別	49,145	3,309,816	30,387
	YI-1217_3	日本	個別	59,969	5,561,545	51,822
	YI-1117-1	台湾	個別	59,499	3,994,735	3,504
マツムラソウ	YI-1117-2	台湾	個別	95,965	11,236,732	25,630
	YI-1117	台湾	個別	46,213	4,594,074	14,072
	<i>Titanotrichum</i>	-	複数	98,678	(共通座位)	-
	<i>oldhamii</i>				1,711,903	
	YI-1210-2	日本	個別	48,963	6,082,744	9,769
	YI-1210-3	日本	個別	35,345	2,700,870	4,392
	YI-1211-2	日本	個別	23,400	167,613	333
	YI-1121-1	台湾	個別	52,408	6,168,206	12,117
ツルウリクサ	TI-5902YI-1145	台湾	個別	62,765	9,242,386	20,716
	YI-1139-2	台湾	個別	52,453	5,214,744	11,388
	<i>Torenia concolor</i>	-	複数	93,534	(共通座位)	-
	YI-1143	日本	個別	55,942	7,798,816	78,127
	TBG157979	日本	個別	34,947	1,864,492	14,358
	YI-1136-16	台湾	個別	60,627	6,163,050	62,004
	YI-1136-1	台湾	個別	39,419	3,292,440	28,032
	YI-1136-2	台湾	個別	42,835	4,436,020	38,834

## (2) 系統解析による固有性の評価

各種の最尤系統樹を図2.2に示す。図2.2中の枝長のスケールは揃えているため、枝長が長い種ほど、分化の程度が大きいことが分かる。タイワンホトトギスとハコベマンネングサは、日本希少集団と台湾普通集団の間の遺伝的分化の程度が非常に大きいことが分かった。ところが、塩基配列のアライメントを確認してみると、日本集団のハコベマンネングサは転写産物の配列全体に渡ってヘテロ接合座位が散在していることが分かった(図2.3)。このことは、日本集団ハコベマンネングサは、倍数化によってゲノム全体がヘテロ化した可能性を示唆している。一方で、ツルウリクサやランダイミズは日本希少集団と台湾普通集団が遺伝的に分化しておらず、固有性が低いことが明らかとなった。国内希少集団内の個体間の枝長に着目すると、国内集団個体間の遺伝的分化度はハコベマンネングサで非常に大きく、タイワンホトトギスとランダイミズで低かった。特にランダイミズは個体間の分化がほとんど観察されなかつ

た。

日本希少集団と台湾普通集団は遺伝的な分化の程度が大きかった台湾ホトトギスの国内集団には上記で用いた西表集団以外に、沖縄集団の存在が確認されている。そこで、国内および台湾のサンプルについて追加でRNA-seq解析を行い、国内サンプル9個体(西表5、沖縄4)、台湾サンプル11個体、近縁種 *Tricyrtis ravenii* 1個体、植栽品1個体、合計22個体を用いて最尤系統樹を作成した(図2.4)。その結果、西表集団と沖縄集団は遺伝的に大きく分化しており、それぞれ台湾の別集団のクレードに位置していることが明らかとなった。また、近縁種 *T. ravenii* が台湾ホトトギスの各個体と遺伝的に大きく離れた外群となっていなかったことから、本解析で用いたサンプルは分類上同一の台湾ホトトギスであるものの複数の種に分類できる可能性が示唆された。

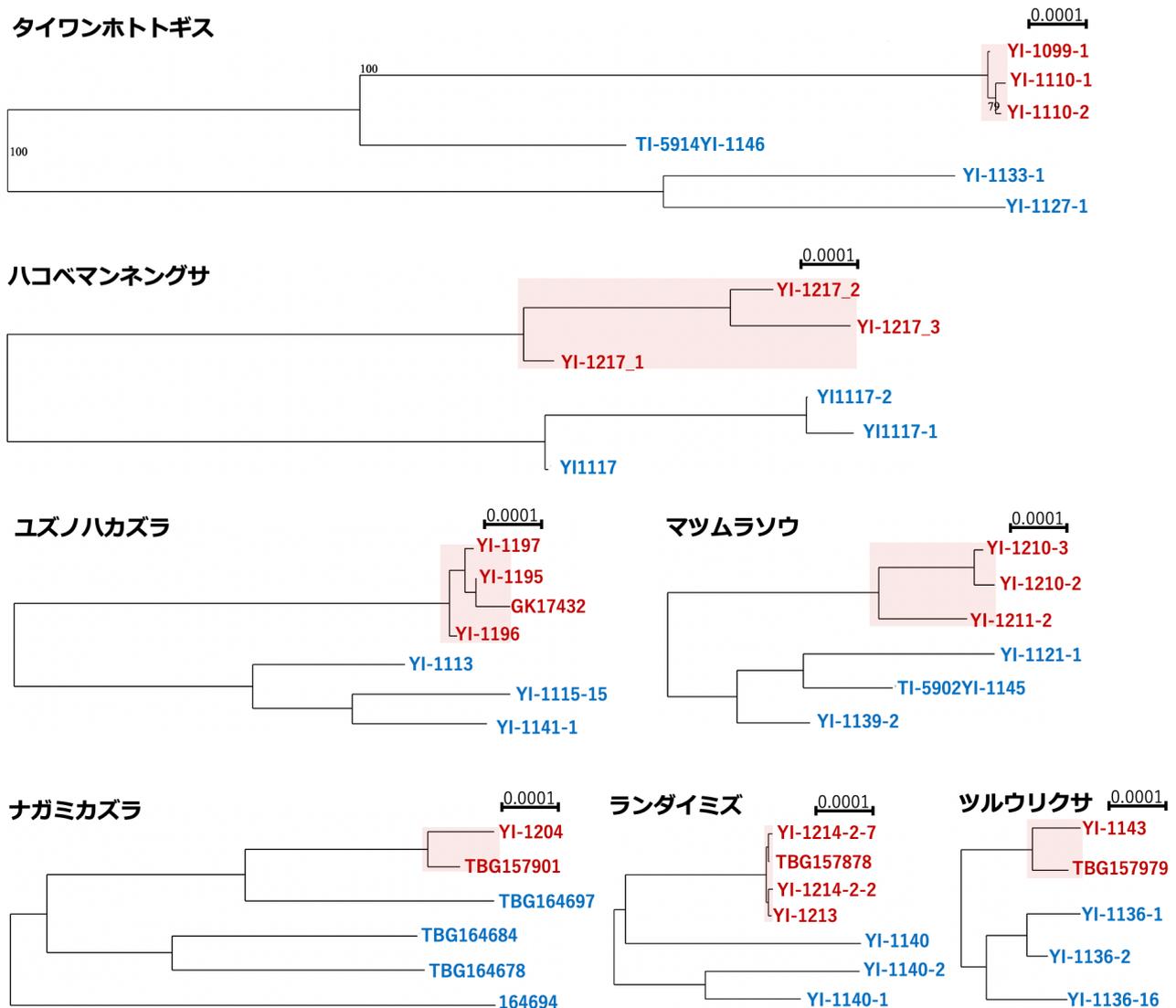


図2.2 転写された塩基配列情報に基づく最尤系統樹 赤色は国内希少集団、青色は海外普通集団を示す。赤色の囲いの大きさが国内希少集団の個体間の遺伝的相違の程度を表している。各種の系統樹の枝長スケールは同一。

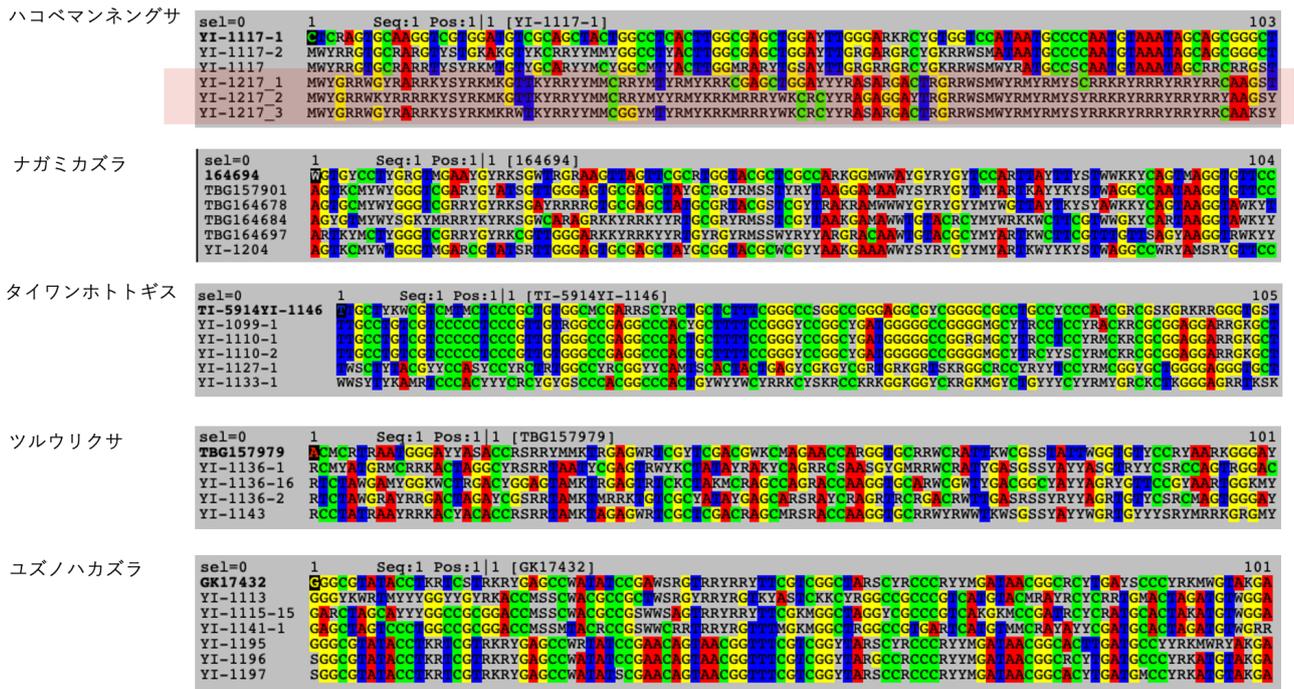


図2.3 個体間の配列比較で変異が検出された座位のみを抽出した塩基配列アライメント(一部) 日本集団のハコベマンネングサは領域全体にわたってヘテロ接合座位が存在 (赤色部分)。

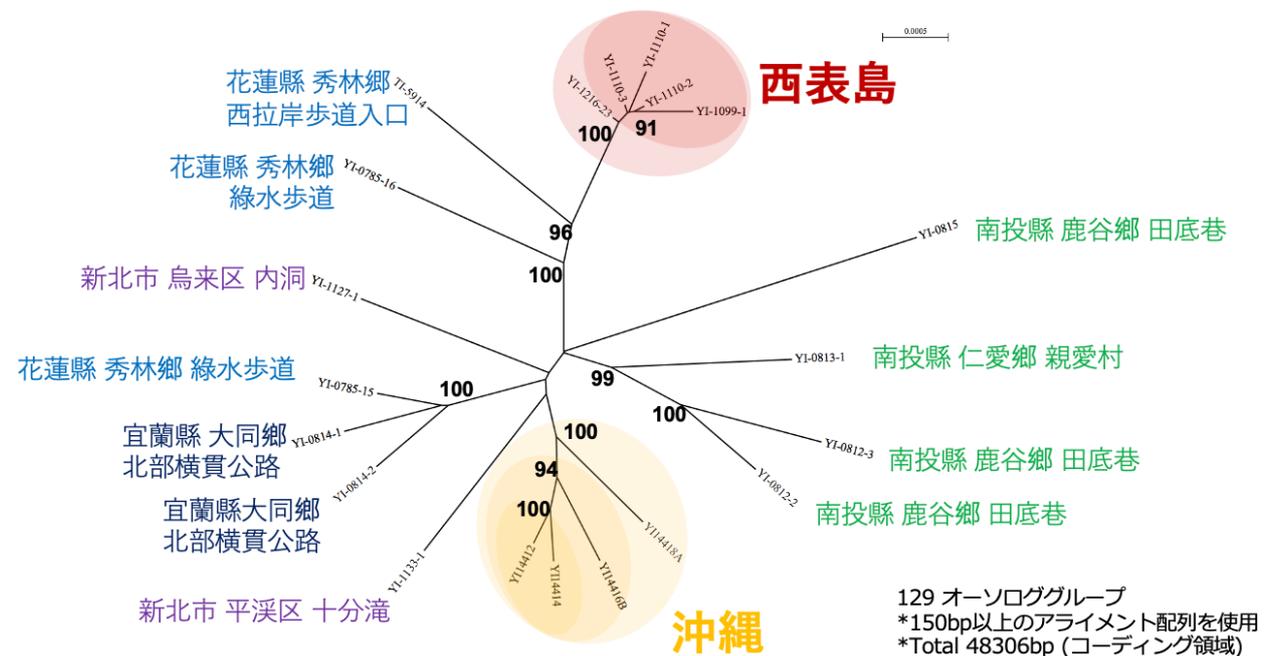


図2.4 タイワンホトトギスの最尤系統樹

(3) 配列解析による保全難易度の評価

(3)-1. 遺伝的多様性: ヘテロ接合で保有するSNV数 / kb

1個体内にヘテロ接合として存在する一塩基変異(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て、国内希少集団と台湾普通集団の遺伝的多様性の比較を行った。台湾ホトトギス西表集団は、台湾普通集団に比べてSNV数が少ない傾向にあり、ゲノムワイドな遺伝的多様性の低

さが観察された(図2.5a)。タイワンホトトギスは台湾集団との共通祖先から分化してから比較的長い年月が経過しており(図2.2)、希少集団における遺伝的多様性の低さは、国内希少集団が長期間に渡り他集団から隔離されて小集団化したことを示唆している。一方、タイワンホトトギス沖縄集団は遺伝的な多様性が高く維持されていた。流通しているタイワンホトトギスの園芸品種は、際立って高い遺伝的多様性を示した。この栽培品種は雑種であるとも考えられており、異なる種の交配により高い遺伝的多様性が創出された可能性が考えられる。以降の比較解析においては、タイワンホトトギスの園芸栽培個体が雑種であることに留意して評価する必要がある。

ハコベマンネングサでは、逆に国内希少集団の方が台湾普通集よりも遺伝的多様性が高かった。これは国内集団の個体が過去に倍数化を経験することにより、ゲノムの遺伝的多様性が高くなった可能性が考えられる(図2.3)。また、今回用いている海外集団のほとんどが旺盛に繁殖している集団からサンプリングを実施しているが、ハコベマンネングサは台湾で1集団しか見つかっておらず、その集団からサンプリングを実施した経緯がある。また、台湾ハコベマンネングサは絶滅危惧II類に分類されており、台湾集団の個体も優先的に保全しなければならない可能性がある。

国内集団個体間でほとんど分化していないランダイミズであったが(図2.2)、遺伝的多様性は台湾集団と比較して大きな違いはなかった。国内のランダイミズはクローン繁殖により個体数が増えていると言われており、本解析で得られた結果は、その知見と合致している。

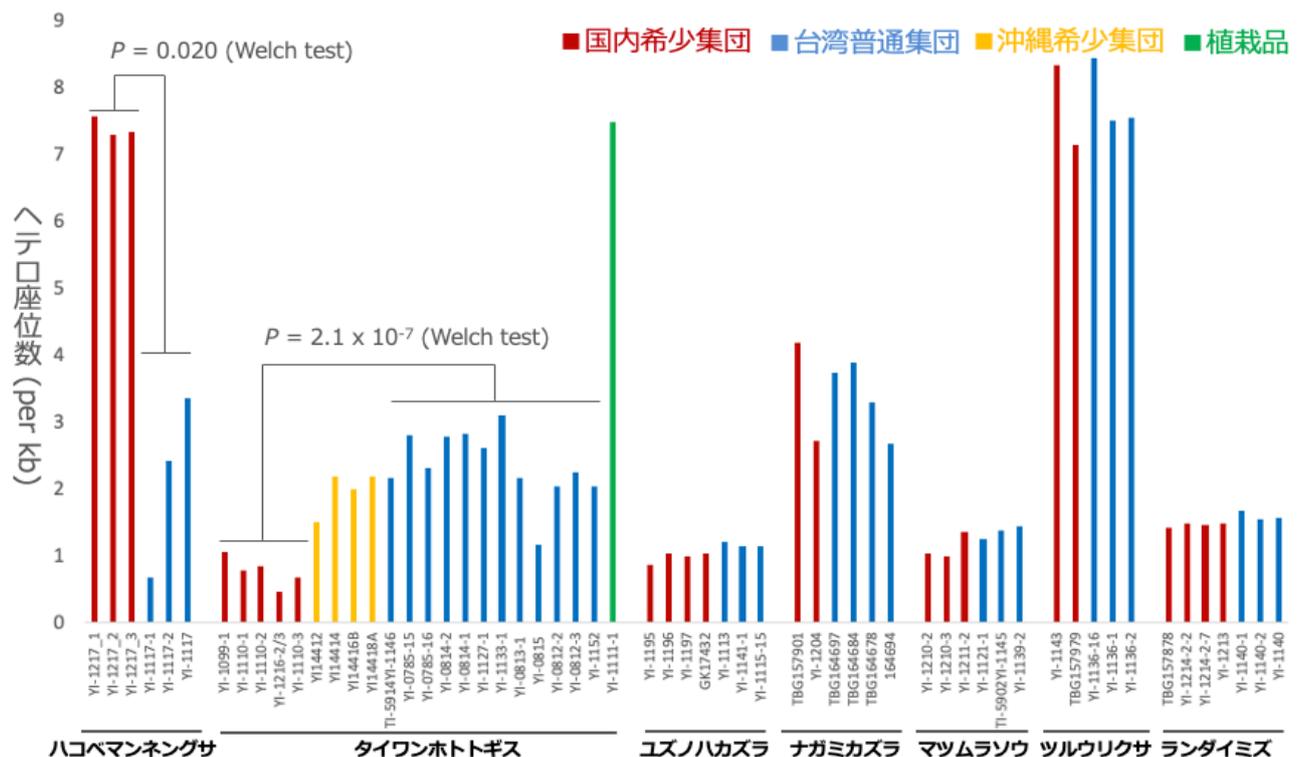


図2.5a ヘテロ座位数 / kb (個別アセンブリ)

個別アセンブリした配列を用いてコールしたSNVは必ずしも個体間で共通の座を観察しているとは限らない。そこで複数アセンブルで得た共通座位を用いて、転写産物1kbあたりのSNV数を推定し、個別アセンブリとの場合との違いを調査した。その結果、国内希少集団と海外普通集団の間の遺伝的多様性の違いについて、複数アセンブリでも個別アセンブリとほとんど同じ結果であることが分かった(図2.5b)。このことは必ずしも共通座位に着目しなくても、個々のトランスクリプトームの解析により遺伝的多様性の評価ができることを示唆している。そのため以降の解析では、個別アセンブリにより得られた転写産物の配列を用いて解析を行なった。

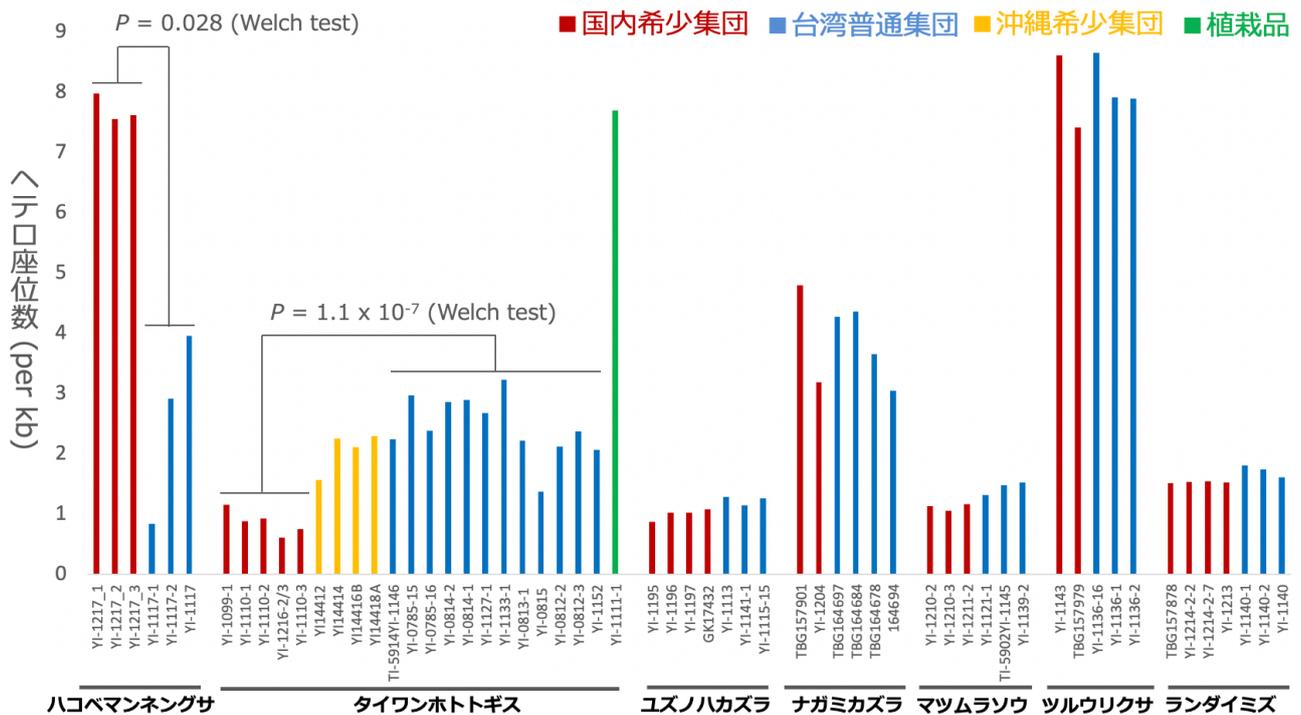


図2.5b ヘテロ座位数 / kb (複数アセンブリ)

(3)-2a.有害突然変異: 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。その結果、台湾ホトトギス西表集団は、台湾普通集団の個体に比べて全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合が高く、アミノ酸を変化させる変異が蓄積していることが分かった(図2.6)。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増加する状況下にあることが示唆された。一方で、他の種については、日本集団と海外集団で有意な差は観察されなかった。園芸品の台湾ホトトギスは、非同義SNVの割合が低く、丈夫で栽培しやすい特徴をよく反映している。

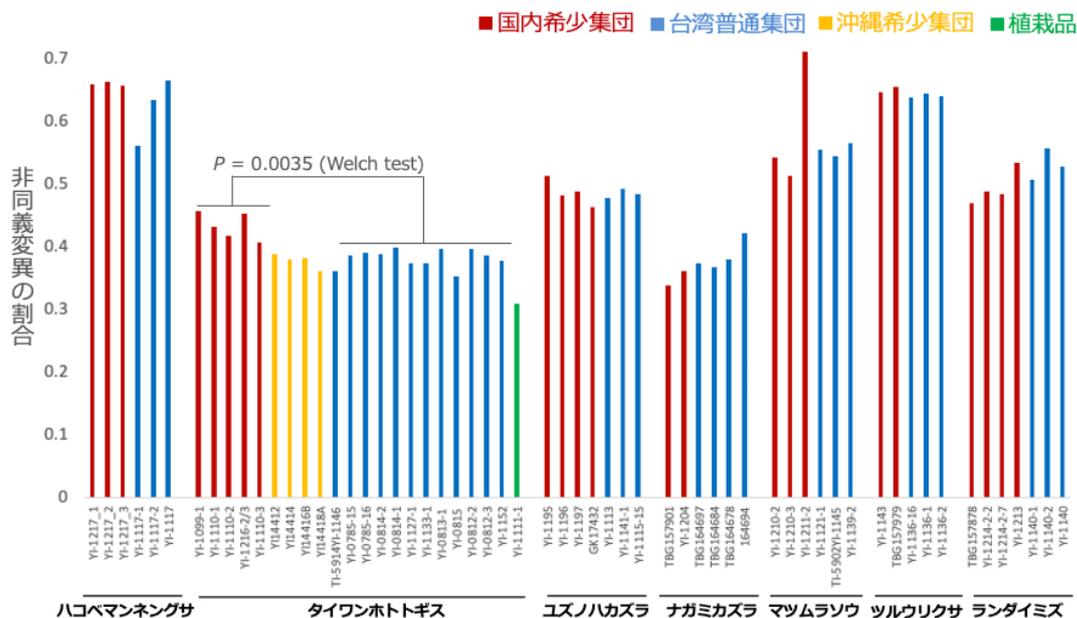


図2.6 全SNVsに対する非同義置換SNVsの割合

## (3)-2b.有害突然変異: 非同義SNV中の有害SNVの割合 (PROVEAN)

タンパク質の性質や構造を変化させて機能上有害となる可能性のある有害SNVをPROVEANを用いて検出し、全非同義SNVに占める有害SNVの割合を求めた。台湾ホトトギス西表集団は、台湾普通集団の個体に比べて非同義SNV中の有害SNVの割合が高く、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2.7a)。この結果は、小集団化した台湾ホトトギス西表集団が、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越していることを示唆している。

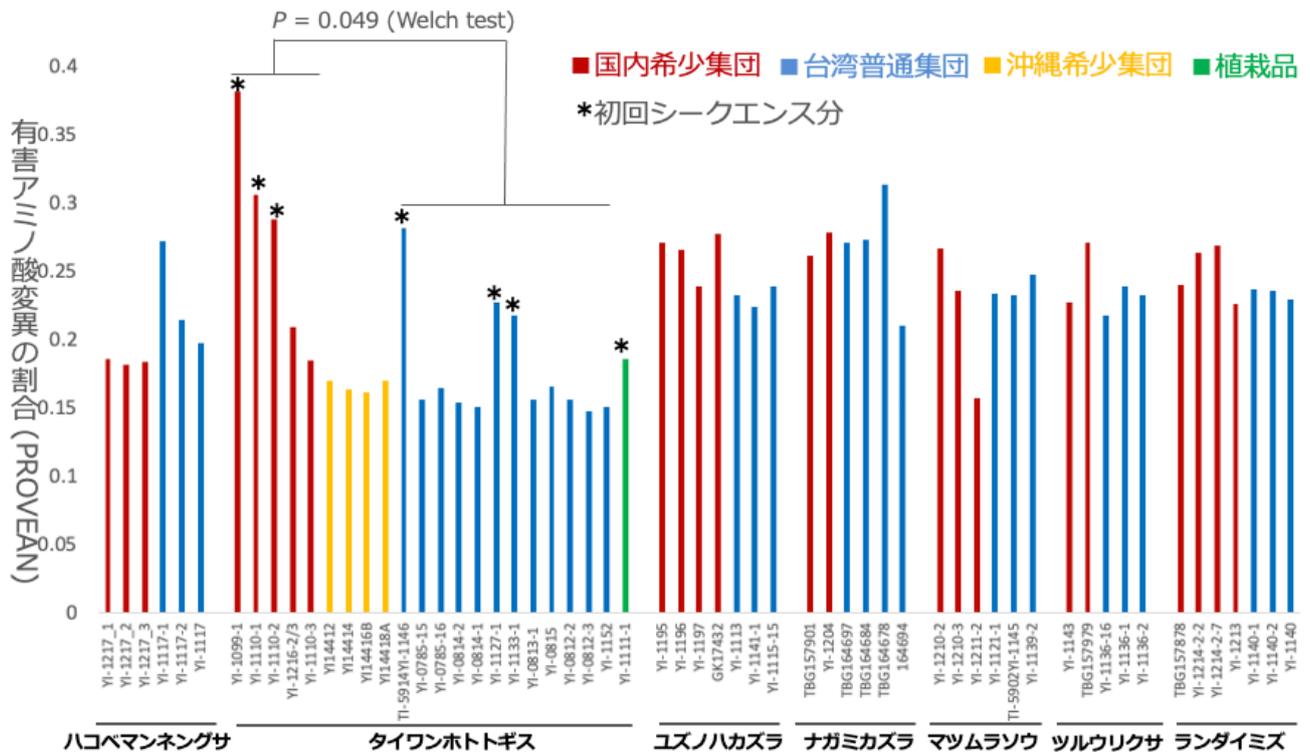


図2.7a. 非同義SNV中の有害SNVの割合 (PROVEAN)

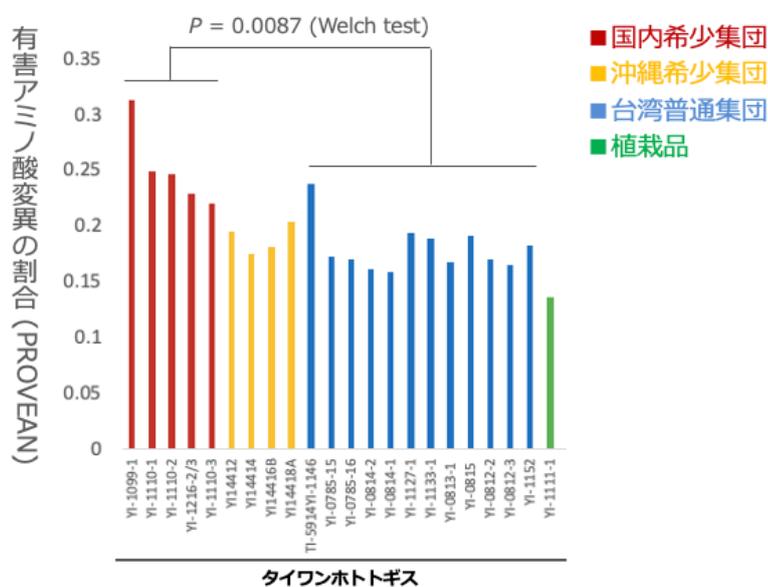


図2.7b. タイワンホトトギズ 非同義SNV中の有害SNVの割合 (PROVEAN) 22個体で同一read数(1,000万read)を用いてアセンブルとSNVコールを行い共通座のみを用いて有害アミノ酸変異を評価した。



国内では希少であっても海外で旺盛に繁殖する種について、国内集団の固有性を遺伝的に評価し保全価値の高さを判断することは、従来、困難であった。本サブテーマでは、こうした国内希少種の固有性をRNA-seq解析により調査し、さらにゲノムの状態から保全難易度の評価を行なった。サブテーマ2の解析結果を表2.2にまとめた。調査した7種の国内希少種のうち、台湾ホトトギス(西表)、ハコベマンネングサ、ユズノハカズラは海外集団と遺伝的に離れており、固有性、つまり保全価値の高い種であることが明らかとなった。特に台湾ホトトギス(西表)は、台湾集団と比較して遺伝的多様性が低く、有害変異が蓄積していることから保全の難易度が高いことが予想される。ただし、台湾ホトトギスの沖縄集団は遺伝的に多様で有害変異も蓄積しておらず、保全活動による効果が期待できる集団だと言える。ハコベマンネングサは台湾集団と比較して遺伝的多様性が高く、有害変異が蓄積していないことが明らかとなった。台湾ではハコベマンネングサが1集団しか見つかっておらず、日本国内集団と同様に希少性が高いことが分かっている(絶滅危惧II類)。これらのことから、国内ハコベマンネングサのゲノムの状態が良いというよりは、台湾集団のゲノムの状態が悪い可能性がある。今後、さらに調査の範囲を広げることで、台湾ホトトギスのように固有性が高く保全優先度の高い国内希少集団の発見がさらに進むと期待される。

表2.2 サブテーマ2結果まとめ

調査項目	国内固有性	国内集団遺伝的分化度	国内集団遺伝的多様性	保全難易度	環境適応力	備考
調査指標	日本-海外集団分化の程度	日本集団内分化の程度	ヘテロ座位数	有害変異蓄積	PD	
ハコベマンネングサ	大	大	多	-	-	日本集団倍数体の可能性
台湾ホトトギス(西表)	大	小	少	難	-	
台湾ホトトギス(沖縄)	大	-	-	-	-	
ユズノハカズラ	中	-	やや少	-	-	
ナガミカズラ	中	-	-	-	-	
マツムラソウ	小	-	-	-	-	
ツルウリクサ	小	-	-	-	-	
ランダイミズ	小	極小	やや少	-	-	国内クローン集団

## 5. 研究目標の達成状況

各年度2種ずつ、3年間の研究期間で当初目標の6種の他に追加的に1種、合計7種について比較ゲノム解析に基づく保全難易度の評価を行い、研究目標以上の成果をあげることができた(表1.1)。

## 6. 引用文献

- 1) T. Hamabata et al. *Commun. Biol.*, 2, 244 (2019) Endangered island endemic plants have vulnerable genomes
- 2) Y. Isagi et al. *Plant Species Biol.*, 35, 3, 166–174 (2020) Significant loss of genetic diversity and accumulation of deleterious genetic variation in a critically endangered azalea species, *Rhododendron boninense*, growing on the Bonin Islands
- 3) Choi et al. *PLOS One* (2012) Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels
- 4) Makino and Kawata. *Molecular Biology and Evolution* (2012) Habitat Variability Correlates with Duplicate Content of *Drosophila* Genomes
- 5) Tamate et al. *Molecular Biology and Evolution* (2014) Contribution of Nonohnologous Duplicated Genes to High Habitat Variability in Mammals
- 6) Makino and Kawata. *Molecular Ecology* (2019) Invasive invertebrates associated with highly duplicated gene content.

### Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

#### (1) 誌上発表

##### <査読付き論文>

##### 【サブテーマ1】

- 1) Y. Isagi, T. Makino, T. Hamabata, P.-L. Cao, S. Narita, Y. Komaki, K. Kurita, A. Naiki, Y. Kameyama, T. Kondo and M. Shibabayashi: *Plant Species Biol.*, 35, 3, 166–174 (2020) Significant loss of genetic diversity and accumulation of deleterious genetic variation in a critically endangered azalea species, *Rhododendron boninense*, growing on the Bonin Islands (IF: 2.077)
- 2) M. Kato, N. Nakahama, S. Ueda and Y. Isagi: *Entomol. Sci.*, 23, 2, 204–207 (2020) Development of microsatellite markers for an extremely limited distributed rare diving beetle species, *Acilius kishii*, and a widely distributed species, *Acilius japonicus* (Coleoptera: Dytiscidae) (IF: 1.073)
- 3) T. Sakagami, S. Sakaguchi, Y. Isagi and H. Setoguchi: *J. For. Res.*, 25, 2, 120–123 (2020) Development and characterization of nuclear microsatellite markers in *Aphananthe aspera* (Thunb.) Planch. (Cannabaceae) (IF: 1.093)
- 4) A. Takano, S. Sakaguchi, P. Li, A. Matsuo, Y. Suyama, G.-H. Xia, X. Liu and Y. Isagi: *Plants*, 9, 9, 1159 (2020) A Narrow Endemic or a Species Showing Disjunct Distribution? Studies on *Meehania montis-koyae* Ohwi (Lamiaceae) (IF: 2.870)
- 5) S. Sakaguchi, Y.-X. Qiu, Y. Asaoka, D. Takahashi, Y. Isagi, P. Li, R. Lu and H. Setoguchi: *Heredity*, 126, 4, 615–629 (2021) Inferring historical survivals of climate relicts: the effects of climate changes, geography, and population-specific factors on herbaceous hydrangeas (IF: 3.801)
- 6) A. Narita, N. Nakahama, A. Izuno, K. Hayama, Y. Komaki, T. Tanaka, J. Murata and Y. Isagi: *Conserv. Genet.*, 22, 5, 717–727 (2021) Conservation genetics of critically endangered *Crepidiastrum grandicollum* (Asteraceae) and two closely related woody species of the Bonin Islands, Japan (IF: 2.538)
- 7) D. Takahashi, Y. Feng, S. Sakaguchi, Y. Isagi, Y.-X. Qiu, P. Li, R.-S. Lu, C.-T. Lu, S.-W. Chung, Y.-S. Lin, Y.-C. Chen, A.J. Nagano, L. Kawaguchi and H. Setoguchi: *J Biogeogr.*, 48, 8, 1917–1929 (2021) Geographic and subsequent biotic isolations led to a diversity anomaly of section *Heterotropa* (genus *Asarum*: Aristolochiaceae) in insular versus continental regions of the Sino-Japanese Floristic Region (IF: 3.723)
- 8) Y. Suyama, S. Hirota, A. Matsuo, Y. Matsuo, Y. Tsunamoto, C. Mitsuyuki, A. Shimura, K. Okano: *Ecological Research*, 37: 171-181 (2022) Complementary combination of multiplex high-throughput DNA sequencing for molecular phylogeny (IF: 1.917)
- 9) 中濱直之・安藤温子・吉川夏彦・井鷲裕司: 保全生態学研究, <https://doi.org/10.18960/hozen.2128> (2022) 印刷中 国内希少野生動植物種における保全遺伝学研究の基盤としての遺伝情報

##### 【サブテーマ2】

- 1) T. Hamabata, G. Kinoshita, K. Kurita, P. Cao, M. Ito, J. Murata, Y. Komaki, Y. Isagi and T. Makino: *Commun. Biol.*, 2, 244 (2019) Endangered island endemic plants have vulnerable genomes (IF: 6.268)

##### <査読付論文に準ずる成果発表>

なし

##### <その他誌上発表(査読なし)>

##### 【サブテーマ1】

- 1) 井鷲裕司: あいち海上の森フォーラム実行委員会第4回あいち海上の森フォーラム報告書、43-56 (2021) 遺伝解析でまもる生物多様性

## (2) 口頭発表 (学会等)

### 【サブテーマ1】

- 1) Y. SUYAMA: The 11<sup>th</sup> APBON Workshop -Asia-Pacific Biodiversity Observation Network, 2019  
“Introduction of next-generation biodiversity assessment using MIG-seq(招待講演)”
- 2) 井鷲裕司: 第28回DNA多型学会大会 (2019)  
「ゲノム情報を活用した生物多様性保全 (招待講演)」
- 3) 芝林真友、國府方吾郎、阿部篤志、横田昌嗣、遊川知久、陶山佳久、内貴章世、栗田和紀、永野惇、本庄三恵、井鷲裕司: 日本生態学会第67回全国大会 (2020)  
「絶滅危惧種の分布フロント個体群を対象としたゲノムワイド解析」
- 4) 陶山佳久、松尾歩、佐藤光彦、廣田峻: 日本生態学会第67回全国大会 (2020)  
「改良されたMIG-seq法の概要」
- 5) 松尾歩、佐藤光彦、廣田峻、陶山佳久: 日本生態学会第67回全国大会 (2020)  
「MIG-seq法を用いた個体・品種・集団・種の遺伝的識別」
- 6) 徳弘千夏、井鷲裕司、伊東拓朗、國府方吾郎、阿部篤志、内貴章世、松尾歩、陶山佳久: 日本生態学会第67回全国大会 (2020)  
「琉球諸島における非固有性の国内希少植物を対象とした保全遺伝学的解析」
- 7) 恒成花織、伊東拓朗、阿部篤志、横田昌嗣、内貴章世、芝林真友、陶山佳久、松尾歩、瀬戸口浩彰、牧野能士、井鷲裕司: 日本植物学会第85回大会(2021)  
「日本に2度やってきた国内絶滅危惧種タイワンホトトギス個体群」
- 8) 陶山佳久: 第53回種生物学会 和文誌編集委員会企画シンポジウム (2021)  
「希少種保全に応用できるゲノム解析技術とその適用プロジェクトの概要」
- 9) 井鷲裕司: 第53回種生物学会 和文誌編集委員会企画シンポジウム (2021)  
「ゲノム情報に基づくテラメイド生物多様性保全」
- 10) Y Isagi: Kyoto-Zurich Workshop in Plant Science 2021: Recent developments in fundamental and applied plant molecular biology (2021)  
“Tailor-made biological conservation of endangered plant species with genomic information (招待講演)”
- 11) 陶山佳久: 第69回日本生態学会 自由集会「ゲノミクスで希少種を発見・保全・評価する」(2022)  
「MIG-seq法を用いたゲノムワイドSNPデータによる保全ゲノミクス研究」
- 12) 井鷲裕司: 第69回日本生態学会 自由集会「ゲノミクスで希少種を発見・保全・評価する」(2022)  
「国内外に生育する国内希少種の保全価値評価」

### 【サブテーマ2】

- 1) 牧野能士: 第67回日本生態学会 シンポジウム「先端オミクスで生態に迫る」(2020)  
「生態系が駆動するゲノム進化」
- 2) 牧野能士: 第53回種生物学会 和文誌編集委員会企画シンポジウム (2021)  
「RNA-seq解析による希少植物のゲノム診断」
- 3) 牧野能士: 第69回日本生態学会 自由集会「ゲノミクスで希少種を発見・保全・評価する」(2022)  
「希少植物の絶滅危険度はゲノムの情報から読み取ることができる」

### (3) 「国民との科学・技術対話」の実施

#### 【サブテーマ1】

- 1) カッコソウ協議会総会（主催：カッコソウ協議会、2019年6月2日、桐生自然観察の森、参加者約25名）にて、カッコソウなど国内希少野生動植物種をゲノム情報で保全する取り組みを紹介
- 2) FM仙台「Morning Brush」（2019年11月29日）、「数十万年の時を経てひっそりと生き続ける希少な生物を守る—西表島での調査から」と題して環境研究総合推進費の取り組みを紹介
- 3) プロフェッサービジット（主催：朝日新聞、2019年11月30日、東京都豊島学園高校、聴講者約70名）にて、プロジェクトの取り組みと成果を紹介
- 4) 環境省野生生物研修、井鷲裕司「ゲノム情報を活用した生物多様性保全」（2019年11月29日、環境省環境調査研修所、44名）
- 5) 環境省自然保護官等研修特設（野生生物）、井鷲裕司「ゲノム情報を活用した生物多様性保全」（2020年1月8日、環境省環境調査研修所、40名）
- 6) トークイベント「写真家・石川直樹 まだ見ぬ世界を探し求めて、トークセッションwith陶山佳久」（主催：FOLK GLOCALWORKS、2020年2月9日、THE6（仙台市）、観客約30名）にて、石川氏とのトークセッションにより本研究の取り組みを紹介
- 7) 第4回あいち海上の森フォーラム（主催：あいち海上の森フォーラム実行委員会、2020年11月1日、ウインクあいち、聴講者約100名）SDGsシンポジウムIIにて、プロジェクトの取り組みと成果を紹介
- 8) プロフェッサービジット（主催：朝日新聞、2020年11月20日、広島市立基町高等学校、聴講者66名）にて、プロジェクトの取り組みと成果を紹介
- 9) 社団法人近畿化学会第38回社員総会特別講演会（主催：近畿化学会、2021年5月28日、Web開催、聴講者約70名）にて、プロジェクトの取り組みと成果を紹介

### (4) マスコミ等への公表・報道等

#### 【サブテーマ1】

- 1) FM仙台「Morning Brush」（2019年11月29日）、「数十万年の時を経てひっそりと生き続ける希少な生物を守る—西表島での調査から」と題して10分ほど環境研究総合推進費の取り組みを紹介
- 2) 朝日新聞（2019年12月14日、東京版、朝刊27頁、「生物保全に活用 ゲノム解析講義」）
- 3) 朝日新聞（2020年1月27日、全国版、朝刊15頁、「ゲノム情報で希少植物を守る」）
- 4) 信濃毎日新聞（2020年11月12日、「釜無ホテイアツモリソウ」富士見で自生 希少性を証明—東北大准教授ら 地域固有 遺伝子分析で）
- 5) 長野日報（2020年11月12日、遺伝子解析で固有種立証 東北大の陶山准教授と4年生本宮さん「釜無ホテイアツモリソウ」富士見町の再生会議で報告）
- 6) 朝日新聞（2020年11月26日、広島版、朝刊23頁、「基町高生、大学の学び体験 京大院教授、ゲノム技術講義」）

#### 【サブテーマ2】

- 1) 東京大学プレスリリース（2019年6月27日、「絶滅危惧植物の弱さをゲノム情報で評価～生態系保全への応用に期待～」として研究成果を公表）
- 2) 東北大学プレスリリース（2019年6月28日、「絶滅危惧植物の弱さをゲノム情報で評価～生態系保全への応用に期待～」として研究成果を公表）
- 3) 京都大学プレスリリース（2019年7月5日、「絶滅危惧植物のみに見られるゲノムの脆弱性を発見」として研究成果を公表）
- 4) 国立環境研究所 環境情報メディア「環境展望台」（2019年6月26日、「東北大など、絶滅危惧種における3つの特徴的なゲノム情報を発見」）

- (5) 本研究費の研究成果による受賞  
特に記載すべき事項はない。

## IV. 英文Abstract

**Construction and Verification of Tailor-made Biological Conservation Strategy Based on Genome Information**

Principal Investigator: Yuji ISAGI

Institution: Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwake, Sakyo-ku, Kyoto, JAPAN

Tel: +81-75-753-6422 / Fax: +81-75-753-6123

E-mail: isagi.yuji.5n@kyoto-u.ac.jp

Cooperated by: Tohoku University

[Abstract]

Key Words: Biodiversity conservation, Genome analysis, Phylogenetic analysis, Conservation difficulty, Conservation value assessment, Domestic rare plant and animal species

Although the multi-level importance of biodiversity is becoming widely recognized, many species are threatened with extinction due to human impact. The limited resources available for biodiversity conservation, such as financial, time, space, and personnel resources, make it necessary to develop rational and effective methods of conserving a large number of endangered species. Until now, the conservation status of endangered species has been assessed primarily by the number of individuals surviving, but it is difficult to prioritize species for conservation based only on their population size. In this study, we evaluated the uniqueness of populations based on genetic diversity and phylogenetic perspectives through contracted genome sequencing such as RAD-seq and MIG-seq on individuals growing in Japan and overseas of rare species. Furthermore, by comprehensively analyzing the expressed genes by RNA-seq, we found genetic indicators characteristic of endangered species in terms of genetic diversity, deleterious mutation accumulation, and duplicated gene rate, thus estimating the vulnerability of species and local populations and their ability to adapt to the environment. By combining different types of genomic information (e.g., condensed genome information and transcriptome), we categorized the conservation status of endangered species and developed a tailor-made conservation strategy by which conservation resources can be allocated more effectively and rationally according to the species' unique conservation status.