

キレンゲシヨウマ (ユキノシタ科) の遺伝的多型と 遺伝的分化に関する解析

草食獣班 (徳島生物学会)

山城 考^{*1} 山城明日香^{*2}

要旨: キレンゲシヨウマ (*Kirengeshoma palmata*) のニホンジカの食害の保全対策を検討するために。アロザイム分析により遺伝的多様性および集団間の遺伝的分化について研究を行った。9 酵素群13遺伝子座について調査を行った結果、徳島県剣山の集団では3 遺伝子座、宮崎県諸塚村の集団では2 遺伝子座、高知県の町の集団では1 遺伝子座で多型が見られたが、島根県益田市の集団では変異が見られなかった。得られた結果を韓国の集団と比較すると、集団間の遺伝的分化程度 (G_{ST}) は0.756と韓国の集団 (0.373) に比べ非常に大きく、日本の集団では、集団間の遺伝的分化の程度が大きいことが明らかになった。4 集団間の遺伝的距離は0.139~0.453であり、集団間の対立遺伝子の分化が大きいことも明らかになった。

キーワード: キレンゲシヨウマ, アロザイム, 遺伝的多様性, 遺伝的分化, 食害

1. はじめに

キレンゲシヨウマ (*Kirengeshoma palmata*) は日本、韓国、中国に分布するユキノシタ科の多年草であり、国内では紀伊半島、四国、中国、九州の温帯林の林床に生育する (図1)。本種はもともと個体数が少ないことと、登山客の増加や森林伐採による環境の悪化、園芸目的の採集が減少の原因とされ、環境庁のレッドデータブックでは絶滅危惧Ⅱ類 (VU) に徳島県版レッドデータブックではⅠ類にリストされている (環境庁, 2000; 徳島県, 2001)。

近年、全国的にニホンジカの個体数が増加し、食害による絶滅危惧植物のさらなる減少が懸念されている (湯本・松田, 2006)。キレンゲシヨウマを含め、剣山系に生育する希少植物種の多くは、起源を中国大陸に持ち、西日本の亜高山帯や温帯域に隔離分布する固有種が多い (前川, 1977)。このような希少植物は、いったん、集団内の個体数が減少してしまうと近隣集団から隔離されているため、新しい

個体の移入が起こりにくく、個体数や遺伝的多様性の回復が望めない種が多い。そのため、今後、ニホ



図1 キレンゲシヨウマ

*1 徳島大学総合科学部自然システム学科

*2 徳島大学大学院先端技術科学教育部知的力学システム工学

ンジカの採食圧が高い状態で維持され続けると、絶滅する可能性がきわめて高い (e.g. 南谷, 2006)。

これらの希少及び絶滅危惧植物をニホンジカの採食から保全するため保護柵の作成による個体の保護対策が行われているが (森, 南谷私信), 希少植物を保全するには遺伝的多様性の保全も考慮されなければならない (Frankham *et al.*, 2004)。そのため, 本調査ではキレンゲショウマの遺伝的多様性と集団間の遺伝的分化について調査を行った。

2. 調査方法

1) サンプルング方法

徳島県剣山, 高知県のいの町, 島根県益田市, 宮崎県諸塚村の4集団から計100個体について調査を行った。集団の地理的位置とサンプル数は図2に示した。アロザイム分析に用いた葉サンプルは各個体から1枚採集した。群生し個体識別が困難な集団では1~2m間隔ごとにシュートから採集した。

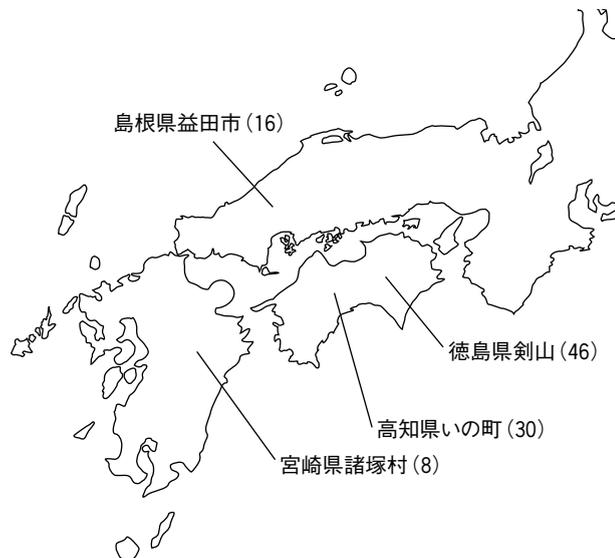


図2 キレンゲショウマのサンプルングサイト

2) 実験方法

植物の葉片100mgを1000 μ lの抽出緩衝液中 (Davis, 1964) ですりつぶした。抽出緩衝液は, Tris HCl pH 7.5 (93mmol/L), グリセロール (23.4%), Tween 80 (0.6% (v/v)), ジチオスレイトール (2.8mmol/L), 2-メルカプトエタノール (0.5%) の混合液を用いた (Uchida *et al.*, 1991)。葉片の破砕物は4 $^{\circ}$ C, 14000rpmで15分間遠心分離し, その上澄み10 μ lを取り出し酵素粗抽出液として電気泳

動に用いた。電気泳動は Davis (1964) と Ornstein (1964) の方法により平板ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動終了後, 活性染色を行いバンドを視覚化した。

遺伝的多様性の調査は次の9酵素群について行なった; アスパラギン酸アミノ転移酵素 (AAT), 非特異的エステラーゼ (EST), グルタミン酸脱水素酵素 (GDH), ロイシンアミノペプチターゼ (LAP), メナジオンレダクターゼ (MNR), ホスホグルコースイソメラーゼ (PGI), ホスホグルコムターゼ (PGM), パーオキシターゼ (POD), 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6 PGD)。

得られた遺伝子型のデータをもとに, 各集団の遺伝的変異量を表すパラメーター, 1遺伝子座当たりの対立遺伝子数 (A), 多型遺伝子座の割合 (P), ヘテロ接合体の期待値 (h) を計算した。集団間の遺伝的多様性と遺伝的分化については Nei の遺伝子分化係数 (G_{ST}) の値 (Nei, 1987) を計算し推定した。また, すべての集団間の遺伝的同一度 (I) と遺伝的距離 (D) (Nei, 1987) を求め, PHILIP 3.5c (Felsenstein, 1993) を用いて近隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) によりフェノグラムを作成した。

3. 結果と考察

1) キレンゲショウマの遺伝的多様性

調査を行った9酵素群について, 合計13の遺伝子座を検出した。このうち, Gdh, 6pgd, Mnr,

表1 キレンゲショウマ4集団の9酵素13遺伝子座から検出された対立遺伝子の頻度

遺伝子座	対立遺伝子	徳島県剣山	高知県のいの町	島根県益田市	宮崎県諸塚村
Gdh	a	1.00	1.00	1.00	1.00
	b	0.00	0.00	0.00	0.00
6pgd	a	1.00	1.00	1.00	1.00
	b	0.00	0.00	0.00	0.00
Mnr	a	1.00	1.00	1.00	1.00
	b	0.00	0.00	0.00	0.00
Pgi	a	0.97	1.00	1.00	1.00
	b	0.03	0.00	0.00	0.00
	c	0.00	0.00	0.00	0.00
Est	a	0.00	0.00	1.00	0.00
	b	0.54	1.00	0.00	1.00
	c	0.46	0.00	0.00	0.00
Aat-1	a	0.75	1.00	1.00	1.00
	b	0.25	0.00	0.00	0.00
	c	0.00	0.00	0.00	0.00
Aat-2	a	1.00	1.00	1.00	1.00
	b	0.60	0.22	1.00	0.75
	c	0.40	0.78	0.00	0.13
Lap	a	0.00	0.00	0.00	0.13
	b	1.00	1.00	1.00	0.00
	c	0.00	0.00	0.00	0.00
Pgm-1	a	1.00	1.00	1.00	0.00
	b	0.00	0.00	0.00	1.00
Pgm-2	a	0.00	1.00	0.00	0.00
	b	1.00	0.00	1.00	1.00
Pod-1	a	0.00	0.00	0.00	1.00
	b	1.00	1.00	1.00	0.00
Pod-2	a	1.00	1.00	1.00	1.00
	b	0.00	0.00	0.00	0.69
Pod-3	a	0.00	0.00	0.00	0.31
	c	1.00	1.00	1.00	0.00

Aat-2, Pod-2 の 5 遺伝子座については単型であったが, Pgi, Est, Aat-1, Lap, Pgm-1, Pgm-2, Pod-1, Pod-3 の 8 遺伝子座においては少なくとも一つの集団で複数の対立遺伝子が観察された。徳島県剣山の集団では 3 遺伝子座, 宮崎県諸塚村の集団では 2 遺伝子座, 高知県のいの町の集団では 1 遺伝子座で多型が見られたが, 島根県益田市の集団では 13 遺伝子座すべてにおいて単型であった (表 1)。集団の遺伝的変異量を表すパラメーター, 平均対立遺伝子数 (A), 多型遺伝子座の割合 (P), ヘテロ接合体の期待値 (h) は表 2 に示した。調査を行った 4 集団のうち, 徳島県剣山ですべてのパラメーターの値が最も高かった。キレンゲショウマの 4 集団のトータルの多型遺伝子座の割合 (P) は 38.4, 平均対立遺伝子数 (A) は 1.15, ヘテロ接合体の期待値 (h) は 0.049 であった。

表 2 キレンゲショウマの多型遺伝子座の割合 (P)、遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数 (A)、ヘテロ接合体の期待値 (h)。

集 団	P	A	h
徳島県 剣山	0.30	1.30	0.109
高知県のいの町	0.07	1.08	0.026
島根県益田市	0.00	1.00	0.000
宮崎県諸塚村	0.15	1.23	0.064
種 レ ベ ル	0.38	1.15	0.049

今回, キレンゲショウマで得られた値のうち, ヘテロ接合体の期待値以外は分布域の狭い固有植物で得られている平均値 ($P=30.6\%$, $A=1.45$, $h=0.105$, Hamrick & Godt, 1989) よりも高かった。韓国のキレンゲショウマでは, 動物媒の他殖植物とほぼ同程度の値が報告されているが ($P=36.8\%$, $A=1.47$, $h=0.220$, Chang *et al.*, 2007), ヘテロ接合体の期待値以外はその値よりもわずかに高い値を示した。

今回調査を行なった集団のうち, 剣山では比較的高い遺伝的多様性を保持していたが, 島根の集団のように比較的多型が全くない集団も見られた。韓国のキレンゲショウマは非常に高い値で外交配を行なっていることが明らかにされているが ($tm=0.991$, Chang *et al.*, 2007), 地下茎による栄養繁殖を行なっていることも知られている。そのため, 島根の集団のように多型の見られなかった集団では少数個体の個体が創始者となって栄養繁殖により集団を維持している可能性が高い。しかし, ISSR を用いた中

国のキレンゲショウマの遺伝的多様性に関する解析では酵素多型を用いた解析より高い遺伝的多様性が検出されているため (Zhang *et al.*, 2006), マイクロサテライトなどの, より多型の検出能力が高い遺伝子マーカーを用いた解析を行なうことが望まれる。

2) 集団の遺伝的構造と集団間の遺伝的分化

キレンゲショウマ 4 集団の全集団の遺伝子多様度 (H_T) は 0.204 で遺伝子分化係数 (G_{ST}) の値は 0.756 であった。このことは 24.4% の遺伝的変異が 4 つの集団で共有されており, 残りの 75.6% はそれぞれの集団に分割されているということである。4 集団の遺伝子多様度 (H_T) は狭い分布域を持つ植物で知られている平均値 ($H_T=0.215$, Hamrick & Godt, 1989) と同程度であったが, 韓国のキレンゲショウマに比べると低い値であった ($H_T=0.361$, Chang *et al.*, 2007)。

韓国の集団で得られている G_{ST} の値は 0.373 であるが (Chang *et al.*, 2007), 今回調査を行った 4 集団では 0.756 であり, 4 集団間の遺伝的分化が非常に大きいことが明らかになった。固有種の平均的な G_{ST} の値は 0.248 であり (Hamrick & Godt, 1989), この値に比べ, キレンゲショウマ 4 集団の遺伝子分化係数は非常に高く, 琉球列島などの島嶼の固有種から得られている値 (*Suzukia luchuensis* ($G_{ST}=0.863$), Maki *et al.*, 2003) に近い。他殖植物の集団間の遺伝的分化は一般的に低い傾向があるが, キレンゲショウマは標高の高い温帯域に小集団として隔離分布しているため, 集団間の地理的隔離が集団間の遺伝的分化を大きくしたと考えられる。

表 3 キレンゲショウマ 4 集団の遺伝同一度と遺伝的距離

	遺伝的距離	
	徳島県剣山	高知県のいの町
徳島県 剣山	—	0.884
高知県のいの町	0.194	—
島根県益田市	0.139	0.241
宮崎県諸塚村	0.394	0.453

キレンゲショウマ 4 集団の遺伝的同一度 (I) は 0.666~0.922 で遺伝的距離 (D) は 0.139~0.453 であった (表 3)。Nei (1987) の遺伝的距離による近隣結合法を用いて作成したフェノグラムは図 3 に示した。キレンゲショウマ 4 集団の遺伝的距離には地理

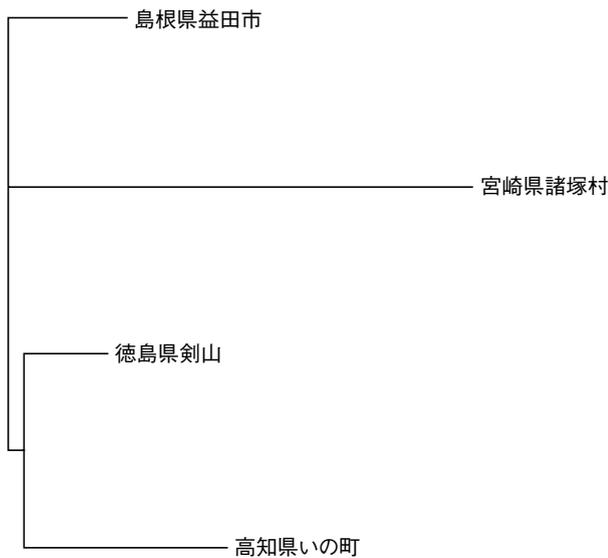


図3 集団間の遺伝的距離から近隣結合法を用いて作成した、キレンゲシヨウマ4集団のフェノグラム

的傾向が見られることが明らかになった。特に、宮崎の集団と他の3集団の遺伝的距離 (D) の値が大きく非常に遺伝的分化が大きいことが明らかになった。このことは、キレンゲシヨウマの日本への侵入経路や起源が異なっている可能性も示唆しているため、今後、韓国および中国の集団について共通の遺伝子マーカーを用いた研究を行う必要がある。

4. おわりに

剣山の集団は調査を行った集団のうち、最も遺伝的多型を保持していた。しかし、群生している所では同じ遺伝子型を示す個体が多く、そのような所では個体数が多く見えても栄養繁殖により増えている可能性が高い。キレンゲシヨウマは栄養繁殖でパッチ状に広がるので、パッチごとに個体を確保するような保全計画を立てる必要があると考えられる。特に、遺伝的多型の低い集団では、近交弱勢が起こっている可能性が高いと思われ、将来的には他の集団の多型を導入する必要があると考えられる。しかし、地域間での遺伝的分化が大きいため異なる地域間の個体を導入することは避けるべきである。今後、同じ山系の新しい集団の発見が望まれる。

謝辞

本調査を行うにあたって、多くの助言や資料の提供をして頂いた、徳島県立博物館の小川誠氏と徳島

県農林水産総合技術支援センター森林林業研究所の森一生氏に厚く感謝を申し上げます。また、宮崎県のサンプルを提供して下さった南谷忠志氏に心から感謝を申し上げます。

参考文献

- Chang, C. S., Choi, D. Y., Kim, H., Kim, Y. S. and T. Y. Park. (2007) : Genetic diversity and mating system of the threatened plant *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in Korea. *Journal of Plant Research* 120 : 149 - 156.
- Davis, B. J. (1964) : Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Science* 121 : 404 - 427.
- Felsenstein, J. (1993) : PHYLIP (Phylogeny Inference Program) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington.
- Frankham, R., Ballou, J. D. and D. A. Briscoe. (2004) : A primer of conservation genetics. Cambridge University Press. 220pp.
- Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. (1989) : Allozyme diversity in plant species. In : Brown A. H. D., Clegg M. T., Kahler A. L., Weir B. S. (eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, MA, pp.43 - 63.
- 樋口広芳 (1996) : 『保全生物学』東京大学出版会, 253総頁。
- 環境庁編 (2000) : 『改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物-レッドデータブック-8. 植物I (維管束植物)』自然環境センター, 660総頁。
- 前川文夫 (1977) : 『日本の植物区系』玉川大学出版部, 180総頁。
- Maki M., Yamashiro T. and S. Matsumura. (2003) : High levels of genetic diversity in island populations of the island endemic *Suzukia luchuensis* (Labiatae). *Heredity* 91 : 300 - 306.
- 南谷忠志 (2006) 宮崎の植物の現状~特に鹿の食害について, (社)日本植物学会『第70回 (熊本) 大会公開シンポジウム「九州の植物が危ない」』21 - 34頁。
- Nei M. (1987) : *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. 512pp.
- Ornstein N. L. (1964) : Disk electrophoresis. I. Background and theory. *Annals of the New York Academy of Science* 18 : 121 - 133.
- Saitou, N. and M. Nei. (1987) : The neighbor joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 : 406 - 425.
- 徳島県 (2001) : 『徳島県の絶滅のおそれのある野生生物 (徳島県版レッドデータブック)』徳島県環境生活部環境政策課, 438総頁。
- Uchida, K., Tsumura, Y. and K. Ohba. (1991) : Inheritance of isozyme variations in leaf tissues of Hinoki, *Chamaecyparis obtusa*, and allozyme diversity of two natural forests. *Japanese Journal of Breeding* 41 : 11 - 24.
- 湯本貴和・松田裕之編 (2006) : 『世界遺産をシカが喰う シカと森の生態学』文一総合出版, 212総頁。
- Zhang, X. P., Li, X. H. and Y. X. Qiu (2006) : Genetic diversity of endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. *Biochemical Systematics and Ecology* 34 : 38 - 47.