

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04414

研究課題名(和文) ゲノム情報と生育域外保全集団を活用した生物多様性ホットスポットの保全研究

研究課題名(英文) Conservation of biodiversity hotspots by taking advantage of genomic information and ex situ populations

研究代表者

井鷲 裕司 (Isagi, Yuji)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：50325130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：小笠原諸島の固有希少植物を適切に保全するために、野生個体と域外保全個体を対象にゲノムレベル遺伝解析を行った。ゲノムの縮約解読はRAD-seqでおこない、集団の遺伝的多様性、分化、空間遺伝構造、系統関係の解析を行った。また、RNA-seqによって、翻訳されている塩基配列情報を網羅的に解読し、種分化に関与した遺伝子も推定した。本研究を通して、種内の遺伝的多様性がほとんど失われている分類群、近縁普通種に比べて有害遺伝子を多く蓄積している分類群、種分化が進行しており隠蔽種を含む分類群など、適切な保全活動に活用できる情報が分類群ごとに得られた。

研究成果の概要(英文)：We conducted analyses of conservation genomics on wild and ex situ individuals of critically endangered endemic plant species of the Bonin Islands. Using genomic information from RAD-seq and RNA-seq, genetic diversity, genetic differentiations, spatial genetic structure, intraspecies phylogeny and genes selected during radiative speciation for endangered endemics were inferred. We found species specific genetic traits for each taxon, such that, species without any genetic diversity in both wild and ex situ populations, one with significantly accumulated deteriorated genes and those under processes of speciation containing cryptic species. These findings are useful to achieve appropriate biological conservation activities.

研究分野：保全遺伝学

キーワード：保全ゲノミクス 絶滅危惧種 固有種 種分化 隠蔽種 小笠原諸島

1. 研究開始当初の背景

東洋のガラパゴスとも称される小笠原諸島は、大陸から隔絶された海洋プレートの上に誕生・存続している海洋性島弧であり、一度も大陸と陸続きになつたことがない海洋島である。小笠原諸島には、種分化や適応放散など進化の過程が保持されており、面積あたりの生物種・固有種の数が多いなど、きわだった特徴を示すことから、2011年には世界自然遺産に指定された。

しかしながら、小笠原諸島に生育する固有絶滅危惧植物には、野生個体数が100未満であるうえに、結実や実生がほとんど確認できないという、憂慮すべき状況にあるものが多い。これらの種については、もはや野生個体群だけでは存続は困難であり、適切な生育域外保全が必要である。東京大学小石川植物園では長らく小笠原諸島の植物調査と固有植物の収集が行われてきた。更に1983年以降は、生育域外保全に加え、増殖育成した個体を自生地に植え戻し、野生状態で維持・更新させることを試みている。これらの活動は、2004年に「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律」による希少種指定にもとづいた、環境省・農水省起案の保護増殖事業計画となり、両省と東京都小笠原支庁および東京大学植物園の共同事業として現在に至っている。これらの保全活動は、生育域外個体を保持と、それを活用した野生個体群の保全の実績として特筆すべきものであるが、活動に際しては、生物個体群の保全のために最も重要な項目の一つである、遺伝情報は活用されていない。そのため、例えば、近親交配を回避するための適切な交配相手の選定、野生個体群の遺伝構造を攪乱しない適切な植え戻し、隠蔽種の検出、といった生物保全上重要な項目については適切に対応できない状況にある。

遺伝情報の解読方法が著しく進んだ結果、いわゆるモデル生物のみで可能であったようなレベルの遺伝解析が絶滅危惧種においても可能になった。このような状況を活用すれば、生物保全を推し進める上で直面する上述の諸問題に対して適切に対処でき、有効かつ適切な生物保全を達成できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、著しく進展している遺伝情報解読技術を活用して、小笠原諸島に固有な絶滅危惧種を対象にゲノムレベルの遺伝子解析を行い、生物保全に関わる重要な知見、例えば、近親交配を回避するための適切な交配相手の選定、野生個体群の空間的遺伝構造の検出とそれを攪乱しない適切な植え戻し、隠蔽種の検出、などを得て、絶滅危惧種の保全を適切かつ効果的に行うことを目的とした。

また、独自の進化が進行する海洋島において、他の場所から到来した祖先種が種分化し

て固有種になるプロセスや、そのようなプロセスに関与した遺伝子の推定を行うことで、生物多様性を創出した進化・生態プロセスに関わる知見をゲノムレベルの情報から得ることも目的とした。

3. 研究の方法

3年間の研究期間を通して遺伝解析の対象とした小笠原固有希少種は、キク科アゼトウナ属のコレラナレンとその近縁普通種のホソバワダン、ツツジ科ツツジ属のムニンツツジとその近縁普通種の、シソ科キラソウ属のシマカコソウ、ラン科エビネ属のホシツルランとその近縁普通種のツルラン、シソ科ムラサキシキブ属3種(シمامラサキ、オオバシمامラサキ、ウラジロコムラサキとその近縁普通種のヤブムラサキ、小笠原固有分離群のムニンノボタン、ハハジマノボタン、硫黄のボタンとその近縁普通種のノボタンなどである。

それぞれの解析対象種について次世代シーケンサーによる大量遺伝情報解読によってSSRマーカーを開発し、小笠原に野生生育する希少植物について、網羅的な遺伝子型解読を行い、集団の空間的遺伝構造、遺伝的多様性の評価、系統解析などを行なった。

ゲノムレベルの縮約解読はRAD-seqによってをおこない、主に中立遺伝子座のSNPs(一塩基多型)情報に基づいて、種内系統解析や空間的遺伝構造の解析を行った。

また、小笠原諸島内で種分化が進行し、3種の固有種が生育するムラサキシキブ属や、ごくわずかの個体が野生状態で存続しているが生育状況の悪いホシツルランに関してはRNA-seqによって、発現している遺伝子を網羅的に解読した。ムラサキシキブ属ではRNA-seqから得られた網羅的な発現遺伝子情報から、小笠原諸島内で適応放散的な種分化に関与した遺伝子座の特定を試みた。ホシツルランは小笠原諸島に野生生育するものは数個体に過ぎないが、実生が生存率が低いなど、保全の困難さが指摘されている。小集団が世代交代を繰り返すと、有害遺伝子に対して負の選択が働きにくくなり、有害遺伝子が蓄積することが集団遺伝学的に予想されるが、ホシツルランの脆弱性が有害遺伝子の蓄積による可能性を近縁普通種のツルランとの比較解析によって明らかにした。

4. 研究成果

(1) コヘラナレンは残存個体数は少ないものの、集団内に遺伝的多様性が保持されていることが明らかになり、また、集団間の遺伝的分化も認められた。ムニンツツジに関しては野生個体と生育域外個体すべてが同一の遺伝子型を示した上に、すべての遺伝子座において一つの対立遺伝子に固定していることが明らかになった。このことは、ムニンツツジは少数個体のみで世代交代を繰り返してきたことを意味しており、人為

によって小笠原諸島の環境が変化する以前より個体数が少なかったものと思われる。シマカコソウは遺伝的多様性が低く、入手できた個体の多くがクローンであることが判明したが、ムニンツツジとは異なり、各遺伝子座には複数の対立遺伝子がヘテロ接合していた。個体数の減少が比較的近年に起こったことや、高い無性生殖能力がこの様な遺伝的特徴をもたらしたと考えられる。

(2) 小笠原に生育するムラサキシキブ属 (*Callicarpa*) 固有植物は、ごく少数個体のみが野生生育するウラジロコムラサキ *C. parvifolia* 及びシمامラサキ *C. glabra* と、比較的個体数の多いオオバシマムラサキ *C. subpubescens* がある。ウラジロコムラサキとシمامラサキは形態的に安定しているが、オオバシマムラサキは単独で生育している島では種内で環境に対する適応が生じており、生育地、形態共に変化が大きい。

小笠原諸島に生育するムラサキシキブ属植物を網羅的に採集し(図1)、RAD-seqによる多数の SNP 遺伝子座の多型情報から詳細な系統解析を行ったところ、ウラジロコムラサキとシمامラサキは遺伝的にもよくまとまった分類群であるのに対して、オオバシマムラサキは複数の分類群からなることが明らかになった(図2)。

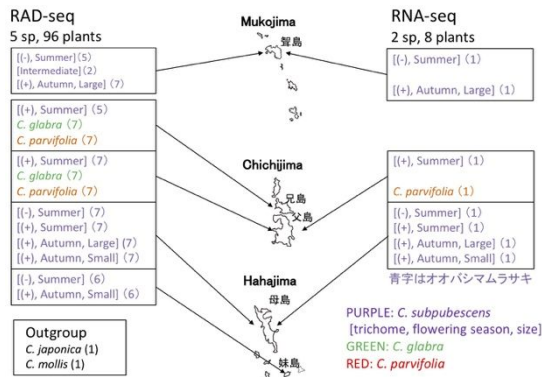


図1. 解析に用いたムラサキシキブ属植物 RAD-seq は5種96サンプル、RNA-seq は2種8サンプルを対象とした。オオバシマムラサキに関しては、トリコームの有無、開花時期、植物体のサイズの形質ごとにサンプリングを行った。

オオバシマムラサキを構成する複数の分類群は、それぞれ、生育場所や形態的な特徴でまとまっており、複数の種に分割することが望ましい。特に、植物体が小型で、トリコームを持ち、秋咲の分類群(図2の系統樹の右上に位置するクレード)については、ウラジロコムラサキやシمامラサキとの関係から判断しても、明らかにオオバシマムラサキとは別種とすべきものである。小笠原で種分化した3種のムラサキシキブ属植物のなかではオオバシマムラサキは個体数が多く、当面の保

全の必要性はないものと考えられてきたが、本研究の結果、オオバシマムラサキを遺伝的なサブ分類群単位でみるとそれぞれの個体数は多いわけではなく、今後、保全上の配慮が必要であることが明らかになった。

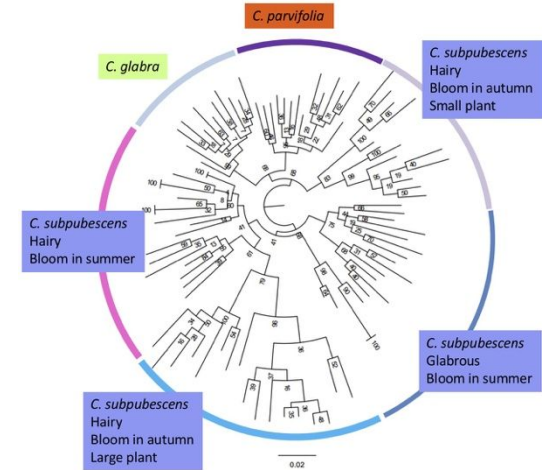


図2. RAD-seq から得られた SNPs 情報に基づく小笠原産ムラサキシキブ属3種の系統関係 ウラジロコムラサキ(*C. parvifolia*)とシمامラサキ(*C. glabra*)が単系統であるのに対して、オオバシマムラサキ(*C. subpubescens*)は複数の分類群から形成されている。

(3) RAD-seq から得られたトランスクリプトーム解析によって、最も乾燥した環境に適応放散したウラジロコムラサキの種分化に關与したと思われる候補遺伝子座も特定することができた(図3)。

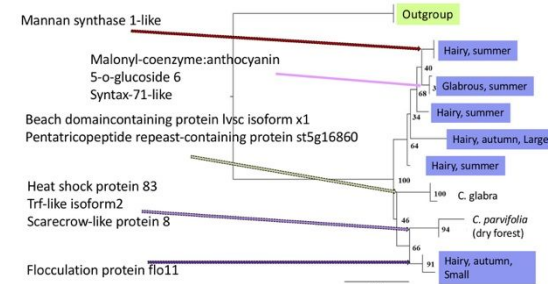


図3. 小笠原産ムラサキシキブ属3種の系統樹と系統樹の分岐過程で正の選択を受けた遺伝子座 outgroup は本州のヤブムラサキ、青紫はオオバシマムラサキ。最も乾燥して暑い場所に生育するウラジロコムラサキ *C. parvifolia* に分化する枝で熱ショックタンパク質遺伝子に正の選択が生じている。

(4) ホシツルランでは、小笠原諸島に生育する個体と、生育域外保全個体を網羅的に SSR マーカーを用いて遺伝的多様性を評価した。その結果、ホシツルランには中立遺伝子座における遺伝的多様性がほとんど維持

されていないことが明らかになった。更に、RNA-seqによる適応的遺伝子座における有害遺伝子の蓄積量を評価したところ、ホシツルランは近縁普通種のツルランに比べて有害遺伝子をゲノム内に多く蓄積していることも判明した。

(5) ムニンノボタンは長い保全の歴史があり、野生個体と植え戻された個体が父島に生育している。これらの個体を近縁種も含めて解析した結果、ムニンノボタンの空間的遺伝構造が明らかになるとともに、従来、ムニンノボタンの変種とされてきたハハジマノボタンが種レベルで異なった分類群であることがわかった。また、北硫黄島のみで生育するノボタンの変種イオウノボタンは、ノボタンのクレードに含まれており、遺传的差異は少なかった。これらの結果から、ハハジマノボタンに関しては保全価値の見直しをすることが必要であることが判明した。

(6) 野外踏査の結果、ムニンノボタンは個体数は減少傾向であるが、残存個体は開花・結実しており、一部の自生地では実生の成長が確認された。

ウラジロコムラサキは、2018年に兄島において42個体の生存を確認した。これらの個体の生育は良好で、多くの個体が結実していた。この結果、2017年と合わせて110個体の生育を確認できた。

ウチダシクロキは、わずか20個体が野生に生育していたが、2017年に1個体が枯死した。残存個体に開花はみられたが、結実は少なく、生育が悪い個体もあるため、更に個体数は減少する可能性が高い。

タイヨウフウトウカズラは、現在、ごく僅かの野生個体が母島の一部に生育しているほか、域外保全されている3系統から増殖した苗が石門地区に植栽されている。現存するほぼすべての個体(見かけ上の)より86サンプルを得て遺伝解析した結果、サンプルの約半数は同一クローンであり、6分の1も別クローンであるなど、遺传的な個体数は極めて少ないことがわかった。また、野生生育個体全体の空間的遺伝構造も明らかになった。

(7) 以上のように、本研究を通して、それぞれの小笠原固有分類群ごとに特徴的な遺伝的状况が明らかとなったが、その情報は、環境省の保護増殖事業計画にも取り入れられ、より効率的かつ効果的な保全活動に活用される予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

①Tsuda Y, Nakahama N, Izuno A, Kyogoku D, Arima K, Kato H, Isagi Y, Development of microsatellite markers for an endemic shrub, *Leptopetalum grayi* (Rubiaceae), on the Ogasawara Islands using Ion Torrent next-generation sequencing. Conservation Genetics Resources, 査読有, 8巻, 2016, 587-594. doi:10.1007/s12686-016-0635-7

②Narita A, Izuno A, Komaki Y, Tanaka T, Murata J, Isagi Y, Twenty novel microsatellite primers in critically endangered *Melastoma tetramerum* var. *tetramerum* (Melastomataceae). Applications in Plant Sciences, 査読有, 4巻, 2016, 1-4.
<http://dx.doi.org/10.3732/apps.1600053>

③Naiki A, Komaki Y, Mizunashi K, Ohi-Toma T, Two New Combinations of *Leptopetalum* (Rubiaceae) Based on Molecular Phylogenetic Evidence. Journal of Japanese Botany, 査読有, 91巻, 2016, 337-344.

[学会発表](計12件)

①成田智史、鈴木節子、加藤英寿、井鷺裕司、ゲノムワイド SNP を用いた小笠原諸島ムラサキシキブ属の種分化における遺伝的背景の解明、日本生態学会第63回大会、2016年3月22日、仙台国際センター(仙台市)

②津田優一、加藤英寿、井鷺裕司、小笠原諸島における送粉生態系攪乱が固有種シマザクラの繁殖成功と遺伝的特徴に与える影響-対照的な2島の比較解析-、日本生態学会第63回大会、2016年3月22日、仙台国際センター(仙台市)

③Yuji Isagi, Shingo Kaneko, Satoshi Narita, Ayu Narita, Haruko Ando, Taketo Komura, Conservation genetics with information from NGS in the Bonin Islands, a UNESCO World Heritage site, The 13th International Symposium on Integrated Field Science(招待講演)(国際学会), 2016年3月10日、東北大学大学院農学研究科(仙台市)。

Isagi Y, Kaneko S, Narita S, Narita A, Ando H, Komura T, Conservation genetics with information from NGS in the Bonin Islands, a UNESCO World Heritage site, The 7th EAFES (East Asian Federation of Ecological Societies) International Congress(国際学会), 2016年4月19日, Daegu, Korea.

⑤井鷺裕司、NGSによる大量塩基情報解読を活用した希少植物保全、日本植物学会第80回大会、2016年09月16日、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)。

井鷺裕司、遺伝的地域性の保全の必要性、

第 47 回日本緑化工学会大会(招待講演)、2016 年 10 月 1 日、稲盛記念会館(京都市)。

⑦ Isagi Y, Kaneko S, Narita A, Suzuki S, Ando H, Kato H, Conservation genetics with information from NGS in the Bonin Islands, a UNESCO World Heritage site. The 48th Annual Meeting for the Korean Society of Plant Taxonomists, International Symposium "Island Plants - Evolution and Conservation"(招待講演)(国際学会), 2017 年 2 月 8 日、Suwon, Korea.

⑧ 井鷺裕司、京極大助、田畑諒一、横田昌嗣、阿部篤志、網羅的遺伝解析に基づく種の保存法対象種の保全、日本植物分類学会第 16 回大会、2017 年 3 月 11 日、京都大学(京都市)。

⑨ 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、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、第 64 回日本生態学会大会、2017 年 3 月 16 日、早稲田大学(東京)。

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、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、第 64 回日本生態学会大会、2017 年 3 月 17 日、早稲田大学(東京)。

Isagi Y, Kaneko K, Narita A, Suzuki S, Ando H, Kato H, Conservation genetics/genomics on remote oceanic island ecosystems with information from NGS, International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity in East Asia and Conservation of Endangered Plants(招待講演)(国際学会), 2017 年 6 月 25 日、杭州市, 中国。

芝林真友、栗田和、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、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、日本植物分類学会第 17 回大会、2018 年 3 月 10 日、金沢

〔図書〕(計 1 件)

① 伊藤元己、井鷺裕司、文一総合出版、新しい植物分類体系、2018、144.

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/forestbiology2014/>

<http://www.forestbiology.kais.kyoto-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井鷺 裕司 (ISAGI, Yuji)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号:50325130

(2)研究分担者

邑田仁 (MURATA Jin)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号:90134452

(3)研究協力者

小牧義輝 (KOMAKI Yoshiteru)
東京大学・大学院理学系研究科