

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710244

研究課題名（和文） 外来樹木の逸出による在来種への生態遺伝学的影響

研究課題名（英文） The molecular ecological effects of exotic trees on native tree populations

研究代表者

亀山 慶晃（KAMEYAMA YOSHIAKI）

東京農業大学・地域環境科学部・助教

研究者番号：10447047

研究成果の概要（和文）：外来樹木トウネズミモチと在来樹木ネズミモチでは、果実（種子）形成に至るまでの遺伝的隔離機構は完全ではなく、野外環境下での雑種の定着は、開花時期の差異または種子の発芽、生育阻害によって制限されていることが明らかになった。また、クスノキを対象とした研究では、22 のマイクロサテライト遺伝マーカーの開発に成功し、H-W 平衡からのずれや連鎖不平衡の程度が、集団によって異なる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Natural hybridization between exotic *L. lucidum* and native *L. japonicum* Thunb. has been a long-term concern in Japan. To reveal the interspecific crossability and the possibility of natural hybridization, we conducted (1) the observation of flowering phenology, (2) the experimental crosses and (3) an AFLP analysis. The hybrids between *L. japonicum* and *L. lucidum* do not establish at present, at least in a Kanto region, in Japan. The natural hybridization between these species might be prevented by the difference of flowering time and/or the negative endogenous selection on hybrid seeds or seedlings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：外来樹木、自然交雑、遺伝子汚染、遺伝マーカー、分子生態学

1. 研究開始当初の背景

外来生物の逸出は様々な過程を通じて在来生物に多大な影響を及ぼしている。外来樹木の多くは緑化や観賞を目的として導入されたものであるが、都市域の森林群落ではシュロ、アオキ、エンジュなどが異常繁殖し、河川ではトウネズミモチ、ハリエンジュ、ナンキンハゼ、イタチハギなどの侵入が確認さ

れている。しかし、このような「目に見える侵入」だけでなく、外来樹木の逸出は種間交雑を介して近縁な在来樹木の遺伝的組成を変化させ（遺伝子浸透）、形成された種間雑種が多様な環境に侵入、定着することによって、更に多くの影響を引き起こすと予測される。ここで重要なのは、種間の交配障壁を決定している要因とその強さ、それらを反映し

た遺伝子浸透の可能性、形成された種間雑種の特性といった分子生態学的な視点である。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、中国原産の外来生物トウネズミモチと、トウネズミモチに近縁な在来生物ネズミモチに着目し、両者の交配親和性と野外における雑種形成の可能性を検証することである。また、第二の目的として、様々な地域から持ち込まれ、在来生物かどうかの議論が続いているクスノキに着目し、分子生態学的研究を進めるための基盤となるマイクロサテライト遺伝マーカー (SSR マーカー) の開発をおこなった。

3. 研究の方法

(1) ネズミモチとトウネズミモチの交配親和性と雑種形成の可能性

①調査地の選定

調査地として、東京都渋谷区の「明治神宮内苑」(60.9 ha)、神奈川県大和市の「泉の森」(41.0 ha)、東京都世田谷区の東京農業大学「世田谷キャンパス」(14.5 ha)、神奈川県川崎市の東京電力「東扇島火力発電所」(12.7ha)、計4カ所を選定した。

②開花フェノロジーの観察

世田谷キャンパスに植栽されたネズミモチ8個体、トウネズミモチ5個体の開花フェノロジーを観察し、集団全体の開花ピークを100%とする相対値(開花率)として開花の状態を記録した。

③交配実験

ネズミモチとトウネズミモチの交配親和性を確かめるため、世田谷キャンパスに植栽されたネズミモチ6個体、トウネズミモチ8個体を用いて、4~6組の交配ペアを作成し、ペアあたり1花序、平均10個の花(合計41~54花)の受粉処理をおこなった。ネズミモチはトウネズミモチより早く開花したため、ネズミモチ(種子親)×トウネズミモチ(花粉親)の交配には、前年に採取したトウネズミモチの花粉を使用した。トウネズミモチ(種子親)×ネズミモチ(花粉親)の交配には、前年及び当年に採取したネズミモチの花粉を使用した。花粉は葉包紙に包み、プラスチックバイアルの中でシリカゲルと共に4℃で保存した。

④AFLP 遺伝分析

世田谷キャンパスのネズミモチ8個体、トウネズミモチ8個体に加えて、無作為に選定した349個体(明治神宮内苑:218個体、泉の森107個体、世田谷キャンパス6個体、東扇島火力発電所18個体)、計365個体から試料(葉)を採取し、AFLP 遺伝分析をおこなった。選択的増幅には、片側に *MseI*-CAG、もう片側に *EcoRI*-ACT (FAM)、*EcoRI*-ACG (VIC)、*EcoRI*-AGC (NED) のいずれかのプライマーを

使用した。

得られた遺伝子型情報を用いて、主座標分析、雑種クラスの判定、AMOVA 分析、をおこなった。主座標分析には NTSYSpc (アプライドバイオスタティスティクス社) を使用し、Dice (1945) の遺伝的類似度 (S) を算出した後、非類似度に変換 ($D = 1 - S$) した。雑種クラスの判定には NewHybrids v1.1 を使用し、対立遺伝子の頻度及び混合割合として一様分布を仮定した上で、10,000 回のバーインと、30,000 回のサンプリングをおこなった。想定したクラスは、純粋な両親種(2つ)、雑種第一代、雑種第二代、両親種への戻し交配種(2つ)の計6クラスである。AMOVA 分析には GenAlEx v6.4 を使用し、全365個体、ネズミモチのみ(173個体)、トウネズミモチのみ(192個体)の3通りについて、種または集団を階層とする999回のパーミュテーションを実施した。

(2) クスノキの SSR マーカー開発

新鮮なクスノキの葉から DNA を抽出し、Lian and Hogetsu (2002) 及び Lian et al. (2006) の手法に基づいて SSR マーカーの開発を実施した。設計したプライマーの有効性については、3集団から採取した102個体(明治神宮内苑:54個体、神奈川県鍛冶屋:24個体、神奈川県真鶴半島:24個体)を対象にジェノタイピングをおこない、ヘテロ接合度を算出し、ハーディ・ワインバーグ平衡からのずれと連鎖不平衡の検証を実施した。

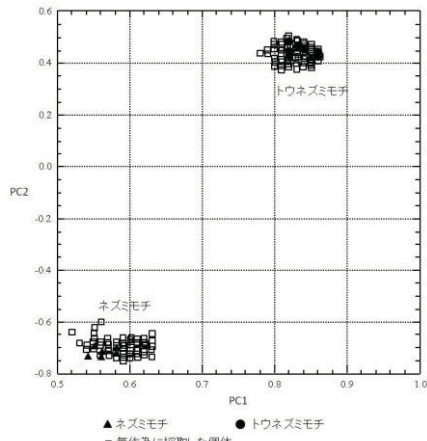
4. 研究成果

(1) ネズミモチとトウネズミモチの交配親和性と雑種形成の可能性

①遺伝的攪乱の有無

AFLP 遺伝分析によって得られた多型バンドの割合は、*MseI*-CAG と *EcoRI*-ACT (FAM) の組み合わせで 93.1% (67/72 本)、*MseI*-CAG と *EcoRI*-ACG (VIC) の組み合わせで 100% (57/57 本)、*MseI*-CAG と *EcoRI*-AGC (NED) の組み合わせで 92.3% (48/52 本)、全体で 95.0% (172/181 本) であった。

遺伝的類似性に基づく主座標分析の結果、第一軸で 52%、第二軸で 33% の分散が説明され、世田谷キャンパスで採取したネズミモチ(8個体)とトウネズミモチ(8個体)は2つのグループに明確に区分された(下図)。また、各調査地から無作為に採取した349個体は、ネズミモチもしくはトウネズミモチ、いずれかのグループに属していた(下図)。



さらに、ベイズ理論に基づく雑種クラスの判定でも、全ての個体が99.9%以上の確率で純粋な親種であると判断された。以上の結果から、遺伝分析をおこなった365個体のうち、ネズミモチは173個体、トウネズミモチは192個体であり、両種の雑種は存在しないことが示された。

全365個体を対象としたAMOVA分析の結果、全分散に占める割合は種間、集団間、集団内でそれぞれ82.6%、1.3%、16.1%であり、8割以上の分散が種間に存在していた。種ごとにAMOVA分析をおこなった場合、集団内及び集団間に存在する分散は、ネズミモチでそれぞれ11.1%と88.9%、トウネズミモチでそれぞれ2.9%と97.1%であった。ネズミモチはトウネズミモチに近縁な在来種であるが、両種の遺伝的差異は明確であり、少なくとも、今回採取した試料の中に雑種は存在しないと断言できる。

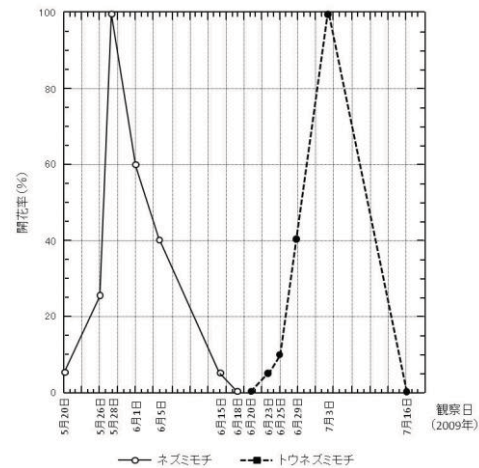
②種間の交配隔離機構

本研究の結果は、ネズミモチとトウネズミモチの間に、雑種形成を抑制する交配隔離機構が存在することを示唆している。考えられる要因について、交配前と交配後の2つの段階に分けて、考察をおこなう。

交配前隔離機構としては、「両種の生育地（ハビタット）の違い」や、「開花時期の違い」が挙げられる。ハビタットについてみると、兵庫県西宮神社の社叢に生育するネズミモチの個体群密度は、林内93本/ha、林縁91本/haで同程度だったのに対し、トウネズミモチの個体群密度は林内52本/ha、林縁174本/haで、林縁部の方が大きかった（大杉・石井 2009）。神奈川県でおこなわれた調査でも、トウネズミモチの出現頻度は明るい環境ほど高くなり、相対光量子束密度6.3%以上で50%を越えることが示されている（伊藤・藤原 2007）。しかし、トウネズミモチは林内でも多数生育しており（大杉・石井 2009）、光量が少ない場所で出現頻度が0になるわけではない（伊藤・藤原 2007）。本研究の調査

地である明治神宮内苑や泉の森、東扇島火力発電所でも両種は混在して生育しており、ハビタットの違いが両種の交配隔離機構として機能しているとは考えにくい。

開花時期の違いについては、ネズミモチとトウネズミモチの開花ピークはおよそ1ヶ月ずれており（下図）、一定の交配隔離機構として機能していると考えられる。しかし、それぞれの種の開花期間もおよそ1ヶ月であり、ネズミモチの開花終了からトウネズミモチの開花開始までは、わずか数日であった（下図）。従って、日照、温度、降雨等の環境変化によって開花期が重なる可能性もある。



交配後隔離機構としては、両種の遺伝的差異を反映した「種子形成や発芽、生育の抑制」と、生育環境の違いを反映した「雑種の定着の抑制」が考えられる。種子形成や発芽、生長の抑制については、トウネズミモチを種子親、ネズミモチを花粉親とした場合、当年採取した花粉であれば平均21%、前年採取した花粉であっても平均7%の結果率が認められた（下表）。ネズミモチが種子親、トウネズミモチが花粉親（花粉は前年に採取）の場合、形成された果実は1個で、平均結果率は2%であった（下表）。交配の組み合わせや花粉の採取時期によって結果率が有意に異なるのかどうかは検証できなかったが、交配実験によって得られた種子は見かけ上、健全であり、少なくとも果実（種子）形成に至るまでの遺伝的な隔離機構は完全ではないことが示された。

種子親	花粉親	花粉採取年	交配ペア数	処理花数 (合計)	果実数 (合計)	結果率 (平均±標準偏差)
ネズミモチ	トウネズミモチ	前年(2009年)	6	54	1	0.019 ± 0.045
トウネズミモチ	ネズミモチ	前年(2009年)	4	41	3	0.068 ± 0.136
トウネズミモチ	ネズミモチ	当年(2010年)	4	48	10	0.208 ± 0.160

生育環境の違いを反映した雑種の定着の抑制については、（雑種が未確認であるため）現段階で確定的な議論をすることは出来ない。しかし、親種の生理、生態的な特性を比較すると、ネズミモチ、トウネズミモチ共に、種子発芽における光条件への依存性は低い

ことが知られている (Aragón and Groom 2003; 飯島・佐合 2006; 伊藤・藤原 2007)。また、実生の生存率については、林内のトウネズミモチで低くなるものの (伊藤・藤原 2007)、林縁ではネズミモチ、トウネズミモチ共に高い値を示す (伊藤・藤原 2007)。さらに、トウネズミモチの幼樹は林内でも生存、生長することができ (Aragón and Groom 2003)、林内におけるネズミモチとトウネズミモチの最大光合成速度は同程度である (大杉・石井 2009)。このように、ネズミモチとトウネズミモチの生理、生態的特性は類似しており、雑種の定着が生育環境の違いによって妨げられているとは考えにくい。

以上の結果から、ネズミモチとトウネズミモチの雑種形成を抑制している要因としては、開花時期の差異 (交配前隔離機構) と、種子の発芽、生育阻害 (交配後隔離機構) が考えられる。仮に、雑種の形成・定着が開花時期の差異によって抑制されているとすれば、今後の環境変化によって交雑が生じる可能性は否定できない。各々の要因が、どの程度、種間の交配障壁として機能しているのかを解明することは、トウネズミモチによる遺伝的攪乱の可能性を評価する上で不可欠である。

(2) クスノキの SSR マーカー開発

計 46 のマイクロサテライト部位について PCR プライマーを設計し、予備実験をおこなった結果、22 部位で明瞭かつ有効な多型性が認められた (下表)。

Locus	Primer sequences (5'-3')	DDBJ Accession No.
Cc-A4	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616689
	R: TAACCAAAAAGATCAC	
Cc-A13	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616690
	R: GGAATTTCTGGGAGGTTGTT	
Cc-A46	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616691
	R: GGAJAATCTTTACATCTCAG	
Cc-A50	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616692
	R: ACTGCGTATTCTCCTCCAT	
Cc-A54	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616693
	R: TTCAGGAAAATAAGTAAACAAAT	
Cc-A71	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616694
	R: CCTTACACCCCTTCCAAAT	
Cc-A75	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616695
	R: TTTGCGCAGTATGAGATTT	
Cc-A81	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616696
	R: AAGAAAGAAAACAGAGAGATG	
Cc-B25	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616697
	R: ATCTACTATCTGGGTTCAATGG	
Cc-B29	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616698
	R: ATCCGACAGGCAAGTTGAAAT	
Cc-B89	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616699
	R: AGCTGACAAATGCTTAGGAA	
Cc-B90	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616700
	R: ATGTACTGAGTTTGTGATGC	
Cc-B91	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG	AB616701
	R: TTTATTGGGTTTGAATTT	
Cc-C1	F: ACACACACACACTCTCTCTCTC	AB616702
	R: AAGACTAAAACCAAGGACAAAAG	
Cc-C9	F: ACACACACACACTCTCTCTCTC	AB616703
	R: TAGGATAAGTGCAGGTAAGTG	
Cc-C87	F: ACACACACACACTCTCTCTCTC	AB616704
	R: TAACCAAAAACCAAAATCTTA	
Cc-C90	F: ACACACACACACTCTCTCTCTC	AB616705
	R: ATTCTTGACTTCAGAAAAC	
Cc-D30	F: TCTCTCTCTCACACACACAC	AB616706
	R: CACTTCAAAAATCCAAACTAA	
Cc-D88	F: TCTCTCTCTCACACACACAC	AB616707
	R: TGCTGCAACCAATCATCTTT	
Cc-E42	F: TCTCTCTCTCACACACACAC	AB616708
	R: AATTATTATGATGGAAGCA	
Cc-F11	F: TCTCTCTCTCACACACACAC	AB616709
	R: ACAAAACAGGGTCTTTATGCT	
Cc-F58	F: TCTCTCTCTCACACACACAC	AB616710
	R: AGCTCTATATCTTTGTTCTT	

開発した 22 の SSR マーカーを用いて、明治神宮、鍛冶屋、真鶴半島の集団について対立遺伝子数、ヘテロ接合度、H-W 平衡からのずれを検証した結果、明治神宮の多数の遺伝子座で H-W 平衡からのずれが検出された。また、明治神宮、鍛冶屋、真鶴半島の集団では、それぞれ 6 ペア、3 ペア、2 ペアの連鎖不平衡が認められた。人工的に造成された明治神宮の森には、複数の祖先集団が混在すると推察され、開発した SSR マーカーがこのような集団の歴史を検出するのに有効であることが示唆された。

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)

- (1) Kameyama Y., Development of microsatellite markers for *Cinnamomum camphora* (Lauraceae). *American Journal of Botany (Primer Notes & Protocols)* 99:e1-e3 (2012) (査読有り)
DOI:10.3732/ajb.1100231
- (2) Kameyama Y., Kudo G. Clarification of genetic component of hybrids between *Phyllodoce caerulea* and *Phyllodoce aleutica* (Ericaceae) in Hokkaido, northern Japan. *Plant Species Biology* 26:93-98 (2011) (査読有り)
DOI:10.1111/j.1442-1984.2010.00301.x
- (3) 津田吉晃, 木村恵, 井上みずき, 内山憲太郎, 三嶋賢太郎, 富田基史, 吉田貴徳, 兼子伸吾, 三村真紀子, 亀山慶晃. 第一回森林遺伝学関連若手勉強会の報告. *林木の育種* 231:26-28 (2009) (査読無し)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 清田陽助, 亀山慶晃, 濱野周泰, 鈴木貢次郎. トウネズミモチ (*Ligustrum lucidum* Ait.) とネズミモチ (*Ligustrum japonicum* Thunb.) の雑種形成に関する研究. 日本植物学会 (東京) 2011 年 9 月.

[図書] (計 2 件)

- ① 東京農業大学造園科学科 (編), 造園用語辞典. 彰国社. 全 627 頁 (2011) (査読無し) (新規用語の解説として)
- ② 亀山慶晃. 造園と遺伝子. In: 東京農業大学造園科学科 (編), 「造園力」で地球を庭に. 東京農業大学出版会. pp103-104 (2009) (査読無し)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀山 慶晃 (KAMEYAMA YOSHIKI)

東京農業大学・地域環境科学部・助教
研究者番号：10447047

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
鈴木 貢次郎 (SUZUKI Kojiro)
東京農業大学・地域環境科学部・教授
研究者番号：80256643

濱野 周泰 (HAMANO Chikayasu)
東京農業大学・地域環境科学部・教授
研究者番号：80109561