

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890002

研究課題名(和文)サーキット理論を用いた希少植物クロビイタヤの景観遺伝学

研究課題名(英文)Landscape genetics of a rare maple *Acer miyabei* using circuit theory

研究代表者

佐伯 いく代(SAEKI, Ikuyo)

筑波大学・芸術系・准教授

研究者番号：70706837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、(1)絶滅危惧種クロビイタヤを対象として遺伝的多様性の空間パターンを明らかにし、(2)森林の分断化や生育地周辺の景観特性との関係を、サーキット理論を用いて定量化することを目的とする。サーキット理論は、土地利用のモザイク性が、野生生物の移動・分散にどのような影響を与えるかについて、遺伝子及び景観という二つのレベルの情報を統合し、解析するためのものである。この理論によって計算した抵抗距離と、クロビイタヤの遺伝距離とは有意な相関が見出され、生育地周辺の景観構造 - 特に森林の不連続性が本種の遺伝子流動に負の影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify spatial patterns of genetic diversity of a threatened maple, *Acer miyabei* and examine its relationships with a regional landscape structure using circuit theory. Leaf samples were collected from 580 individuals of *Acer miyabei* in northern and central Japan. Twelve SSR markers were developed to determine genetic variation among the individuals and populations. I found a significant correlation between genetic distances among populations and resistance distances calculated by the theory. The result suggests that landscape features, such as degree of fragmentation of forests, strongly affect gene flows among natural populations of the species.

研究分野：保全生態学

キーワード：クロビイタヤ カエデ 絶滅危惧種 保全 遺伝子流動 景観

1. 研究開始当初の背景

我が国は人口密度が高く、特に標高の低い平野部において都市化が急激に進んでいる。海岸および河川沿いの平地では、大面積の森林が少なく、むしろ道路や農地、市街地などによって、細切れの状態になっているものが多い。森林は多くの野生生物の生息環境として重要である。いくつかの例外はあるものの、森林面積の減少は、野生生物のハビタットの質を劣化させ、個体数の減少を引き起こすと考えられている(森本 2002)。

森林の分断化の影響については、国内外において多くの研究がなされている。これまでの成果を総合すると、孤立林の面積が小さいほど種の多様性が低下すること、重力散布の植物や飛翔能力の低い動物の移動・分散経路が限定されることなどが明らかになっている(日置 2002)。加えて近年では、遺伝子解析と空間解析を融合した景観遺伝学(landscape genetics)という学問分野が台頭し、遺伝的多様性の空間パターンが、個々の景観要素とどのような関係にあるのかについて明らかにする取組がはじまった(Manel et al. 2003)。こうした動きは、これまで別々に発展してきた景観生態学と、集団遺伝学を組み合わせ、新たな知見を得ようというものであり、生物多様性の保全に配慮した景観設計や自然修復技術の基盤となることが期待される。

2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では、森林の分断化や景観特性が野生生物に与える影響について、サーキット理論(McRae 2006)を用いて明らかにすることを目的とする。サーキットとは、直訳すると「電気回路」という意味である。この理論は、地域のランドスケープ全体に格子状の回路をはりめぐらし、その中での流れ - すなわち野生生物の移動・分散のおこりやすさ - を、ある種のアルゴリズムを用いて定量化するものである。

研究対象種は、絶滅が危惧されているカエデの一種、クロビイタヤ(*Acer miyabei* Maxim. 図1)を選定した。クロビイタヤは、河川の周辺や丘陵地の斜面下部の湿地に生育する樹木である。成木の樹高は15-20mに達し、北海道、東北、および本州の中部地方に隔離して分布する。クロビイタヤの種内分類群として、国内には、狭義のクロビイタヤ(*Acer miyabei* f. *miyabei*)と、シバタカエデ(*Acer miyabei* f. *shibatae* (Nakai) K. Ogata)が生育する。どちらも、開発などによってハビタットの分断化がすすんでおり(Nagamitsu 2014)環境省のレッドリストでは、クロビイタヤが絶滅危惧II類に、シバタカエデが絶滅危惧IAに指定されている(環境省 2012)。この研究では、シバタカエデを含む広義のクロビイタヤの遺伝的多様性の空間パターンを明らかにし、それらと生育地周辺の景観特性との関係とをサーキット

理論を用いて解明する。



図1 クロビイタヤ

3. 研究の方法

(1) サンプルの採集と遺伝子解析

クロビイタヤの遺伝構造を把握するため、分布のある北海道および本州において、43ヶ所の自生地から葉のサンプルを採集した。採集個体数は、1地点(=1集団)につき20個体を目標とし、20個体未満の小さな集団については、全ての個体からサンプルを採集した。さらに、森林総合研究所林木育種センターより岩手県松草地域由来の3個体のサンプルの提供を受けた。これらをあわせると、最終的な解析個体数は580となった。

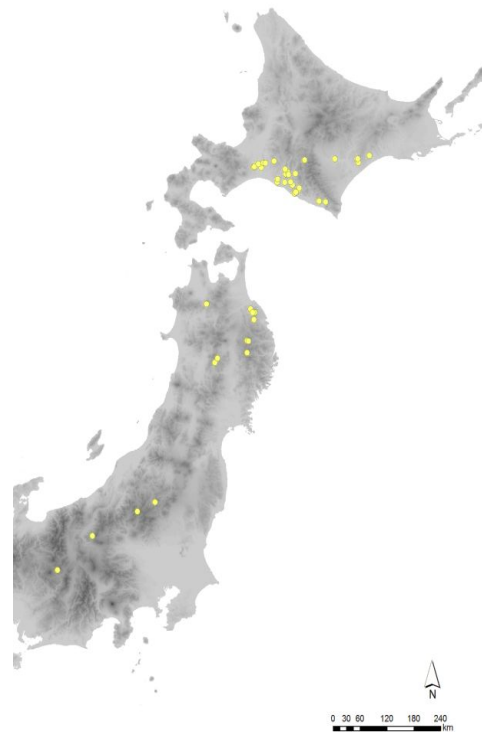


図2 クロビイタヤのサンプル採集地点

DNA解析をするため、QIAGEN社のDNA抽出キット(DNeasy Plant Mini Kit)を用い、それぞれのサンプルから全DNAを抽出した。植物の遺伝的変異をDNAレベルで解析する場

合、葉緑体、ミトコンドリア、核の3種類のゲノムを対象にできるが、本研究では、植物の遺伝変異を調べる際に広く用いられている核と葉緑体のゲノムを解析した。

核ゲノムについては、筑波大学菅平高原実験センターにて、次世代シーケンサーION PGMを用い、クロビイタヤに特異的な12座の核マイクロサテライトマーカーを開発して、ジェノタイピングを行った(Saeki et al. in press)。その情報をもとに、集団間の遺伝距離を、Neiの遺伝距離(1972)を用いて算出した。

葉緑体DNAの解析は、PCR法を用いて葉緑体DNAの特定の領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列の異同を調べた。これについては、580個体を全て解析するのではなく、分布域をできるだけ網羅するよう8個体を選び、変異の有無を探索する手法(スクリーニング)を用いた。この解析で対象とした葉緑体DNAの領域は、*trnH-psbA* (Sang et al., 1997; Tate and Simpson, 2003)、*rpl16*、*trnG* (Nishizawa and Watano 2000)、*trnL3 exon-trnF* (Taberlet et al., 1991)、*petL-psbE* (Popp et al. 2005)の5種類で、配列の総長は約2259塩基対であった。

(2) サーキットスケープによる抵抗距離の算出と遺伝子流動との関係の把握

サーキットスケープ(Circuitscape ver. 4.0; McRae et al. 2013)と地理情報システム(ArcGIS ver. 10.2.2)を用いて、各集団の採集地点間での抵抗距離(Resistance Distance)を算出した。抵抗距離の算出は、二つの空間スケールで行った。一つ目は、北海道南東部(千歳市から新ひだか町にかけて)を対象に、約80km × 100kmのスケールとした。この範囲には、市街地化などで面積の減少した森林とそうでない森林とが含まれるため、森林の分断化の状況と遺伝子流動との関係をみる上で効果的な地域と判断した。抵抗距離の算出のためには、レジスタンスサーフェスとよばれる抵抗値の空間分布図が必要である(McRae et al. 2013)。これについては、クロビイタヤの生育適地を河川近隣の森林とし、それ以外の場所を不適地として設定した。セルサイズは約1kmとし、適地のセルよりも不適地のセルのほうが、抵抗の値が大きくなるように設定した。

二つ目は、クロビイタヤの分布域全体を対象として、約1000km × 700kmのスケールで抵抗距離を計算した。これは、森林の分布との関係に加え、気候や大地形にもとづく障壁との関係を調べるために設定した。森林の分布については、国土数値情報ウェブサイトのデータ(国土交通省 <http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/index.html>)を利用し、森林地域(生育適地)と森林以外の地域(非生育適地)とで抵抗値をかえて算出した。解析の単位とするメッシュの大きさは、約1.5kmとした。

このスケールではさらに、エコロジカルニッチモデリング(ENM)を使って、クロビイタヤの分布確率を計算し、その逆数を抵抗値として用いる解析も行った。ENMには、Maximum Entropy法(Phillips et al. 2006)を用い、WorldClimという気象および標高のデータセット(Hijman et al. 2005)と、69のクロビイタヤの分布地点情報から分布確率を推定した。この手法では、ハビタットとして適した場所ほど分布確率が高くなるため、遺伝子流動の抵抗値は低くなるという前提を用いた。メッシュサイズは、森林地・非森林地の比較の場合と同じく約1.5kmとした。

4. 研究成果

(1) 遺伝子解析

12座の核マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子解析を行った結果、ほぼすべてのサンプルについて、全座のジェノタイプを決定することができた。ジェノタイプを決定できた座の割合は98.3%、1座あたりの平均アリル数は9.4であった。採集地点間の遺伝距離をNeiの遺伝距離(1972)を用いて算出した。これをもとに集団系統樹を作成したところ、6つのクラスターが検出された。それぞれのクラスターは強い地理的なまとまりを有していた。

葉緑体DNAにおいては、8個体を用いて5領域の塩基配列を決定した。比較の結果、これらの塩基配列には変異がみとめられなかった。同じ領域を調べたほかのカエデの事例では、多くの変異サイトが検出されていた(Saeki and Murakami 2009)。このことを考慮すると、クロビイタヤは過去に何らかの強いボトルネックを受け、葉緑体DNAの多型を失った可能性が考えられる。

(2) サーキット理論を用いた遺伝子流動との関係の把握

核マイクロサテライトマーカーを用いて計算した遺伝距離とサーキット理論を用いて計算した抵抗距離との相関関係を、マンテルテストおよび偏マンテルテストによって検定した。その結果、北海道南東部、分布域全体の両方において、有意な相関関係がみとめられた(表1;表2)。またこれらの関係は、単に地理的な距離との相関をみたときよりも、遺伝距離に対する説明力が高いことがわかった。分布域全体を対象とした場合には、森林・非森林地域で抵抗値を変えたレジスタンスサーフェスよりも、EMNによる推定値を用いたもののほうが、遺伝距離との相関が高かった。これは単に森林の連続性だけでなく、気候や標高といった要因も、遺伝子流動の強弱に影響を与えていることを示唆している。

これらの結果から、クロビイタヤの生育地周辺の森林の分布や景観特性は、本種の遺伝構造に影響を与えており、特にハビタット不適地の存在によって、遺伝子流動が妨げられている可能性が示唆された。

表 1 北海道南東部を対象とした場合の抵抗距離と遺伝距離との関係

距離の種類	マンテルテスト		偏マンテルテスト	
	相関係数 (R)	P値	相関係数 (R)	P値
地理的距離	0.071	0.5	-	-
サーキット理論によって計算した抵抗距離	0.394	0.001	0.409	0.001

表 2 分布域全体を対象とした場合の抵抗距離と遺伝距離との関係

距離の種類	マンテルテスト		偏マンテルテスト	
	相関係数 (R)	P値	相関係数 (R)	P値
地理的距離	0.312	0.001	-	-
サーキット理論によって計算した抵抗距離 (森林-非森林)	0.345	0.001	0.148	0.0013
サーキット理論によって計算した抵抗距離 (ENM)	0.408	0.001	0.321	0.001

<引用文献>

Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., Jarvis, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25, 2005, 1965-1978.

日置佳之. 生息地の消失、分断化、攪乱. 亀山章編. 生態工学. 朝倉書店, 2002, 86-90.

環境省. 植物 (維管束植物) 環境省第 4 次レッドリスト. 2012.

Manel, S., M. K. Schwartz, G. Luikart, and P. Taberlet. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 2003, 189-197.

McRae, B. H. and B. Nürnberger. Isolation by resistance. *Evolution* 60, 2006, 1551-1561.

McRae, B. H., V. B. Shah, and T. K. Mohapatra. *CircuitScape 4 User Guide*. 2013. The Nature Conservancy.

森本幸裕. 生息環境・生息地. 亀山章編. 生態工学. 朝倉書店, 2002, 45-54.

Nagamitsu, T., S. Kikuchi, M. Hotta, T. Kenta, and T. Hiura. Effects of Population Size, Forest Fragmentation, and Urbanization on Seed Production and Gene Flow in an Endangered Maple (*Acer miyabei*). *The American Midland Naturalist* 172, 2014, 303-316.

Nei, M. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* 106, 1972, 283-292.

Nishizawa, T. and Y. Watano. Primer pairs suitable for PCR-SSCP analysis of chloroplast DNA in angiosperms. *Journal of Phytogeography and Taxonomy* 48, 2000, 63-66.

Phillips, S. J., R. P. Anderson, and R. E. Schapire. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190, 2006, 231-259.

Popp, M., P. Erixon, F. Eggens, and B. Oxelman. Origin and evolution of a circumpolar polyploid species complex in *Silene* (Caryophyllaceae) inferred from low copy nuclear RNA polymerase introns, rDNA, and chloroplast DNA. *Systematic Botany* 30, 2005, 302-313.

Saeki, I. and N. Murakami. Chloroplast DNA phylogeography of the endangered Japanese red maple (*Acer pycnanthum*): the spatial configuration of wetlands shapes genetic diversity. *Diversity and Distributions* 15, 2009, 917-927.

Sang, T., D. J. Crawford, and T. F. Stuessy. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84, 1997, 1120-1136.

Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. Universal Primers for Amplification of 3 Noncoding Regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17, 1991, 1105-1109.

Tate, J. A. and B. B. Simpson. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28, 2003, 723-737.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Saeki, I., Hirao, A.S., Kenta, T. 2015.
Development and evaluation of
microsatellite markers for *Acer miyabei*
(Sapindaceae), a threatened maple
species in East Asia. Applications in
Plant Sciences, 査読有, 印刷中. 2015

〔学会発表〕(計 1 件)

佐伯いく代、平尾章、田中健太、永光輝義、
大谷雅人、日浦勉 .サーキット理論を用い
た遺伝子流動のモデル化 - 希少樹種ク
ロピイタヤを例として - . 日本生態学会 .
2015年3月19日 . 鹿児島大学 (鹿児島県
鹿児島市).

〔その他〕

ホームページ等

希少樹種クロピイタヤの自然史と保全

<http://nc.heritage.tsukuba.ac.jp/project/natural-heritage/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐伯 いく代 (SAEKI, Ikuyo)

筑波大学・芸術系・准教授

研究者番号 : 70706837