様式Ｃ－１９

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 6 月 5 日現在

機関番号：11201
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2011
課題番号：19710197
研究課題名（和文）
近交弱勢はサクラソウ集団の絶滅リスクを高めるか
研究課題名（英文）
Does inbreeding depression affect the extinction risk of wild populations of *Primula sieboldii*?

研究代表者
北本 尚子（KITAMOTO NAOKO）
岩手大学・農学部・特任助教
研究者番号：70447241

研究成果の概要（和文）：
近交弱勢の遺伝的背景を明らかにするために、絶滅危惧植物であるサクラソウを用いて近交弱勢に関する QTL 解析を行った。その結果、第 3 連鎖群上にある ga0343 遺伝子座の周辺で同じ祖先に由来する対立遺伝子をホモ接合で持つ個体は、葉緑素が欠乏したアルビノになる確率が高まり、葉面積が小さく、翌年の出芽が遅くなり開花数も少なくなることが分かった。このことから、この遺伝子座の近傍には、近郊弱勢の発現に関与する有害遺伝子が座乗していることが推察された。

研究成果の概要（英文）：
To reveal the genetic architecture of inbreeding depression, the QTL analysis of inbreeding depression was conducted in a threatened plant, *Primula sieboldii*. The progeny which have the allele derived from a common ancestry around the locus ga0343, showed high probability of being albino, small leaf, late budding and small number of flowers. This result suggested that there is a deleterious recessive allele around the locus ga0343.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 22 年度	700,000	210,000	910,000
平成 23 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域
科研費の分科・細目：資源保全学
キーワード：保全、近交弱勢、サクラソウ、絶滅、有害遺伝子、連鎖地図

１．研究開始当初の背景
(1)生息地の分断･孤立化により近親交配が進む結果、劣性の有害遺伝子がホモ接合になることによって子孫の生存力や繁殖能力が低下する近交弱勢という現象が現れ、他殖性植物集団の絶滅確率が増加することが懸念されている。しかし、近親交配が進むと、有害遺伝子を持つ個体が自然選択で淘汰される結果、集団中の有害遺伝子の保有量が減少し、近交弱勢の程度も減少すると一般に考えられているため、<u>近交弱勢が実際にどの程度集団の絶滅に影響するかは研究者間で意見が分かれている</u>(Keller & Waller 2002)。一方、近親交配の最たるものである自殖性の進化と近交弱勢との関係に関する理論研究が進むにつれて、①突然変異率が高い場合(D. Charlesworth *et*

al. 1990)②複数の遺伝子座が関与する場合(Lande *et al.* 1994)③各遺伝子座の有害効果が相乗的に作用する場合(B. Charlesworth *et al.* 1990)には、自殖率が高くなっても近交弱勢の程度が大きく減少しない可能性が指摘されるようになった。このことは、生息地の孤立・分断化により近親交配が長期間くりかえされても、近交弱勢の程度が減少することなく集団の絶滅確率が累積的に上昇することを意味している。

近交弱勢の遺伝的背景を明らかにすることは、自殖性植物の進化の問題に加えて、保全生態学的にも重要であるが、実際にQTL解析によって有害遺伝子の遺伝子座数やその相乗効果を明らかにした研究は、トウモロコシやイネなどの作物に限られ、野生植物を対象としたものはない。作物は人為選抜により有害遺伝子がすでに淘汰されている可能性があるため、理論研究からの予測を検証するためには、**<u>野生種を対象として近交弱勢の遺伝的背景を解明することが求められている</u>**(Erickson *et al.* 2004)。

(2)申請者は、他殖性植物で絶滅危惧種でもあるサクラソウをモデル植物として、これまでに遺伝解析に必要な分子マーカーを開発し(北本ら 2005)、集団内の遺伝的多様性に大きく影響する遺伝子流動の実態を調査してきた(Kitamoto *et al.* 2005, 2006)。比較的本来の自然が残されている八ヶ岳山麓で調査した結果、サクラソウの遺伝子流動の範囲は従来考えられていたよりも広いことが分かり、それによって集団内の遺伝的多様性が高く維持されていることが示唆された。このように広範囲で遺伝子流動が生じている植物種では、有害遺伝子がヘテロ接合の状態で集団中に保有されやすいため、生息地の分断化により近親交配が進んだ場合には近交弱勢が現れると考えられる。実際に自生地で採取した自殖由来の種子は他殖由来の種子よりも生存率が低く、生き残った個体も成長が遅いことが分かった。

日本全国に分布するサクラソウ集団は、近年縮小を余儀なくされた**<u>100個体以下の集団が全体の約7割を占めている</u>**(本城ら 2006)。このような集団は、今後近交弱勢の発現により絶滅しやすくなると考えられるが、それを検証するためには有害遺伝子の遺伝子座数やその相乗効果、及び**<u>各集団内にどの程度有害遺伝子が蓄積されているのか</u>**を明らかする必要があると考える。

２．研究の目的

典型的な他殖性植物であり、絶滅危惧植物でもあるサクラソウを用いて、近交弱勢の遺伝的背景を明らかにし、生息地の分断・孤立化が集団の絶滅リスクに及ぼす影響を明らかにする。

３．研究の方法

<u>(1)近親交配による交配家系の作出</u>

全きょうだい交配を行い、近交弱勢の発現が期待される交配家系を作出するとともに、比較対象として、他殖も行い他殖由来の種子を得る。

<u>(2)QTL解析により有害遺伝子の遺伝子座数とその相乗効果の有無を明らかにする</u>

近親交配に由来する種子と他殖由来の種子に発芽処理し、各成長過程を記録するとともに、葉からDNAを抽出し、SSRとcDNAマーカーで遺伝子型を決定する。

他殖由来の個体の平均値と比較した際の、近親交配由来の各個体の①成長遅延の程度、②地下芽生産数とサイズの減少程度、③翌年の出芽率とその成長遅延の程度、④開花率の減少程度に関してQTL解析を行い、成育初期に発現する有害遺伝子座数とその相乗効果を推定する。

<u>(3)各集団内に保有されている有害遺伝子頻度の推定</u>

QTL解析によって明らかになった有害遺伝子座の近傍の分子マーカーを指標として、全国に分布するサクラソウ集団内にどの程度有害遺伝子が蓄積されているのかを推定する。

サクラソウ各集団の残存個体数と推定された有害遺伝子頻度から、それぞれの集団の絶滅リスクを評価する。

４．研究成果

(1)2008 年春に、連鎖地図の構築が進んでいる家系の中から開花の同調した 2 個体を選び、全きょうだい交配を行ったところ、38 花に人工授粉して 2524 種子（1 果実平均 66 種子）得られた。そこで、そこから 94 種子を任意に選び、種子から直接 DNA を抽出して SSR37 座の遺伝子型を決定した。

次に、各遺伝子座での分離比をカイ 2 乗検定し、歪みが有意であった SSR の連鎖群上の位置を確かめるとともに、連鎖している対立遺伝子の効果を推定した。その結果、5 つの遺伝子座で有意な歪みが認められた。このうち、第 1 連鎖群上の 2ca174（♀hk×♂hk）では同祖遺伝子 k をホモ接合で持つ結実種子の出現頻度が期待値より 29%少なかった。このことから、対立遺伝子 k と有害遺伝子が連鎖しており、この有害遺伝子は受粉から結実にいたる過程で発現することが示唆された。

(2)2009 年春に全きょうだい交配に由来する種子 367 粒を発芽処理したところ、88%の 324 粒が発芽し、葉緑素が欠乏しているアルビノ

個体が 60 個体（5%）観察された。アルビノ個体は葉数・葉面積がともに少なく、63%にあたる 38 個体が冬前までに死亡した。アルビノを示さなかった個体についても、葉数や葉面積に関して幅広い変異が認められたことから、アルビノ以外の有害遺伝子に関しても近親交配によって発現していると考えられた。一方、播種 2 か月後まで生き残っていた 228 個体から DNA を抽出し、65 の SSR で遺伝子型を特定した。

図１　発芽後 1 年目の春の様子
同じ全兄妹交配に由来する個体の中にも葉緑素が欠乏しているアルビノ個体(左)から、生育の旺盛な個体(中)や、開花する個体(右)まで生育に幅広い変異が観察された。

SSR での遺伝子型をもとに連鎖地図を作製したところ、55 の SSR が 11 本の連鎖群上に座乗した。各表現形質と SSR の遺伝子型との相関を解析したところ、第 3 連鎖群上にある ga0343 遺伝子座の周辺で同じ祖先に由来する対立遺伝子をホモ接合で持つと、葉緑素が欠乏したアルビノになる確率が高まり、葉面積が小さく、翌年の出芽が遅くなり開花数も少なくなることが分かった。このことから、この遺伝子座の近傍には、近郊弱勢の発現に関与する有害遺伝子が座乗していると推察された。

また、発芽 4 か月後の葉数の全個体平均が 14 枚であるのに対し、ga0343 と ga409-1 遺伝子座の両方で同祖的な対立遺伝子 k をホモ接合で持つ個体は、平均 8 枚と極端に葉数が減少する相乗効果も認められた。このことから、サクラソウにおける近交弱勢の発現に有害遺伝子座の相乗効果も存在していることが示唆された。

(3)各集団内に保有されている有害遺伝子頻度の推定

QTL 解析に用いた集団以外の野生集団においても ga0343 や ga409-1 遺伝子座と近交弱勢を引き起こす有害遺伝子座が連鎖しているかどうかを確かめるために、北海道に由来する集団から任意に選択した 2 個体を交配し、得られた全きょうだい間でさらに交配を行った。これら後代における近交弱勢の程度と ga0343 および ga409-1 遺伝子座での遺伝子型との相関を検証することにより、両遺伝子座を用いて全国の野生集団における有害遺伝子頻度の推定が可能かどうかについて指標が得られる予定である。

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８件）

① Yoshida, Y., S. Ueno, M. Honjo, N. Kitamoto, M. Nagai, I. Washitani, Y. Tsumura, Y. Yasui, R. Ohsawa (2011) QTL analysis of heterostyly in *Primula sieboldii* and its application for morph identification in wild populations. Annals of Botany 108: 133-142. 査読有
② Yoshida, Y., M. Honjo, N. Kitamoto and R. Ohsawa (2009) Reconsideration for conservation units of wild *Primula sieboldii* in Japan based on adaptive diversity and molecular genetic diversity. Genetics Research 91: 225-235. 査読有
③ Honjo, M., N. Kitamoto, S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani, R. Ohsawa (2009) Management units of the endangered herb *Primula sieboldii* based on microsatellite variation among and within populations throughout Japan. Conservation Genetics 10: 257-267. 査読有
④ Kitamoto, N., S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani and R. Ohsawa (2008) Effect of population density of compatible neighbours on inbreeding level within a *Primula sieboldii* population. Ecological Research 23: 307-315. 査読有

〔学会発表〕（計３件）

① 北本尚子，本城正憲，吉田康子，上野真義，津村義彦，鷲谷いづみ，大澤良（2009）サクラソウの受粉から結実までに働く近交弱勢の関与遺伝子座数とその効果の解析． 第 56 回日本生態学会.2009.3.19.　岩手県立大学（盛岡）
② 吉田康子，上野真義，北本尚子，小玉昌孝，本城正憲，田口由利子，永井美穂子，鷲谷いづみ，津村義彦，大澤良 （2009）適応に関連した QTL に基づく野生サクラソウ集団の遺伝的多様性評価.第 56 回日本生態学会.2009.3.19.　岩手県立大学（盛岡）

〔図書〕（計１件）

本城正憲，北本尚子 （2010）　第 3 章　植物の保全遺伝学的解析・評価法　（「保全生態学の手法～調査・研究・実践マニ

ュアル」鷲谷いづみ，宮下直，西廣淳，角谷拓　編）pp63-81.　東京大学出版会，東京

６．研究組織
(1)研究代表者
北本　尚子（KITAMOTO　NAOKO）
岩手大学・農学部・特任助教
研究者番号：70447241