

論文

# 東濃地域に分布するシデコブシの遺伝的多様性

中島美幸・坂井至通

Genetic diversity of *Magnolia stellata* (Magnoliaceae), distributed in Tono region

Miyuki NAKASHIMA and Yoshimichi SAKAI

東濃地域のシデコブシ自生地は、多くの小集団が集まって巨大な分布面積を持つ貴重な自生地である。本研究では、東濃地域に分布するシデコブシの集団内および集団間の遺伝的多様性を明らかにするため、14集団を対象に、5酵素10遺伝子座を用いてアロザイム解析を行った。その結果、すべての集団において、集団内に保有される遺伝的変異量は、他の植物で算出されてきた地域固有種の平均よりも高かった。このことから東濃地域のシデコブシが高い集団内変異を保有していることが明らかとなった。さらに、集団間の遺伝距離に基づいてデンドログラムを作成したところ、3つのクラスターに分かれ、地理的に近い位置関係にある集団同士が同一クラスターに属する傾向が見られた。一方で、対立遺伝子の分布パターンは集団によって様々であり、独自の遺伝的多様性を保有していることがわかった。

キーワード：シデコブシ、東濃地域、遺伝的多様性、アロザイム分析、遺伝構造

## I はじめに

シデコブシ (*Magnolia stellata*) は落葉低木性のモクレン科植物で、伊勢湾を取り囲む東海丘陵地帯にのみ分布する地域固有種である。近年、道路建設や宅地造成、ゴルフ場開発により、多くのシデコブシが自生地の消滅とともに絶滅の危機にさらされていることから、シデコブシは絶滅危惧Ⅱ類に分類されている(環境庁 2000)。

シデコブシの分布が限られているのは、二つの地質学的特性と関係しているためと考えられている(日本シデコブシを守る会 1996; 菊池 2001)。このうち一つは、砂礫層の間にシルト層が挟まれた状態で重なった地層であり、もう一つは古生層や中生層でできている山裾の固結層上に、崩落した岩屑が堆積した地層である。いずれの地質条件も、透水層と不透水層を併せ持っているため、このような場所では貧栄養な水に涵養された小湿地が多く存在している。シデコブシは、

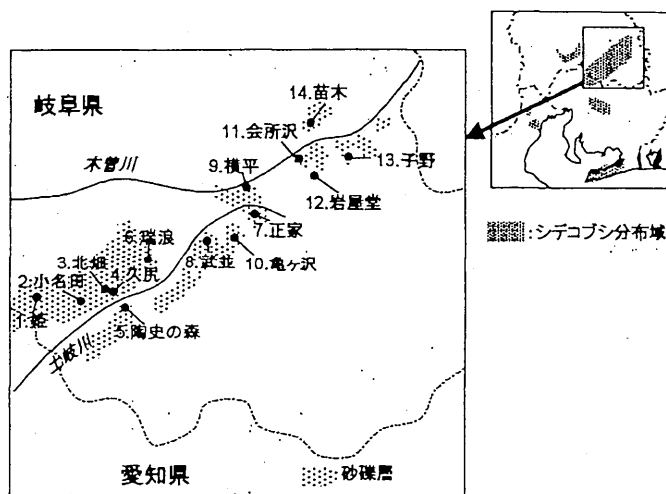


図-1 シデコブシ分布域と調査集団

このような地質に沿うようにして分布しているため、独特な分布となっている。このうち、渥美半島と三重県のシデコブシ分布域は、岐阜県東濃地域から地理的に大きく離れていて、集団数が少ないのに対し、東濃地域は砂礫層の小湿地群が連続的に分布し、これと重なるようにしてたくさんのシデコブシ集団が沢や小湿地の周囲を単位として分布している。このため、東濃地域には集団が連続的に分布した巨大なシデコブシ自生地が存在していると考えられる。

東濃地域のシデコブシ自生地は、多くの集団が集まって大きな分布面積を持つという点で、他の分布域では見られないような貴重な自生地となっている。また、集団内および集団間においては、個体どうしの交配や、送粉や種子散布を通じた遺伝子の交換によって、連続した集団を維持するための遺伝的構造が保たれていると考えられる。したがって、集団内および集団間の遺伝的多様性や遺伝的な関係を明らかにすることは、この地域のシデコブシを保全していくための重要な基礎資料となると思われる。

そこで本研究では、東濃地域に分布するシデコブシ14集団を対象にアロザイム解析を行い、東濃地域のシデコブシ集団の遺伝的多様性を調べた。

## II 材料および方法

### 1. 調査地および供試材料

調査地は、東濃地域に分布するシデコブシ14集団(“姫”, “小名田”, “北畑”, “久尻”, “陶史の森”, “瑞浪”, “正家”, “武並”, “横平”, “亀ヶ沢”, “会所

沢”, “岩屋堂”, “子野”, “苗木”)を選定した(図-1, 表-1)。2001年および2002年4月に、各集団においてシデコブシ5~27個体の開花個体, 合計214個体をサンプル木として選定し, これらの個体から冬芽を採集した。採取した冬芽は解析に用いるまで-80℃で保存した。

### 2. 実験方法

各個体から採取した冬芽約50mgを液体窒素で凍結後, 乳鉢を用いてパウダー状になるまでよくすりつぶした。これに同量のポリビニルピロリドンを加えた後, 抽出バッファー(組成: 0.1M トリス, 10mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.1mM NAD, 0.1mM NAD P, 0.4% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 2mM ジチオスレイトール, 30% (v/v) グリセリン, 5% (v/v) PVP40)を加えてよく攪拌した。これを12000rpm, 4℃で10分間遠心し, 上澄み液を酵素抽出液として回収した。

アロザイム解析には, アクリルアミドゲル垂直電気泳動法を用いた。酵素抽出液はアクリルアミドゲルに1レーンあたり10μlずつ注入し, 4℃, 15mA/cm<sup>2</sup>で120分間垂直電気泳動を行なった。解析には, アルコール脱水素酵素(ADH), ジアホラーゼ(DIA), エステラーゼ(EST), アスパラギン酸アミノ転移酵素(GOT), ロイシニンアミノペプチダーゼ(LAP)の5酵素を用いた。酵素染色法は津村ら(1990)の方法に従った。遺伝子座および対立遺伝子は早く泳動された順に, それぞれ1, 2, 3およびa, b, cと命名した。

表-1 各集団内に保有される遺伝的変異量

集団	N	n	P	A	A <sub>e</sub>	H <sub>e</sub>	H <sub>e</sub>
1 姫	300	27	60.0	1.7	1.25	0.115	0.146
2 小名田	300	13	60.0	2.0	1.34	0.179	0.223
3 北畑	6420	25	70.0	1.9	1.24	0.132	0.156
4 久尻	6340	20	60.0	1.9	1.31	0.145	0.187
5 陶史の森	600	19	60.0	1.7	1.26	0.174	0.166
6 瑞浪	215	19	70.0	1.8	1.23	0.153	0.166
7 正家	130	10	80.0	2.1	1.48	0.220	0.280
8 武並	135	10	60.0	1.9	1.48	0.270	0.262
9 横平	50	20	80.0	2.0	1.36	0.215	0.212
10 亀ヶ沢	215	9	50.0	1.5	1.45	0.222	0.248
11 会所沢	70	5	40.0	1.5	1.14	0.120	0.116
12 岩屋堂	150	10	50.0	1.6	1.29	0.157	0.176
13 子野	400	10	70.0	1.7	1.23	0.140	0.160
14 苗木	120	17	80.0	2.1	1.35	0.200	0.229
平均			63.6	1.8	1.32	0.174	0.195

N: 推定株数, n: 検体数, P: 多型的遺伝子座の割合, A: 一遺伝子座あたりの対立遺伝子数

A<sub>e</sub>: 有効対立遺伝子数, H<sub>e</sub>: ヘテロ接合度観察値, H<sub>e</sub>: ヘテロ接合度期待値

表-2 集団間の遺伝距離D

	姫	小名田	北畑	久尻	陶史の森	瑞浪	正家	武並	横平	亀ヶ沢	会所沢	岩屋堂	子野
姫													
小名田	0.006												
北畑	0.007	0.016											
久尻	0.010	0.014	0.002										
陶史の森	0.014	0.021	0.006	0.012									
瑞浪	0.019	0.030	0.006	0.008	0.004								
正家	0.025	0.021	0.015	0.019	0.013	0.019							
武並	0.040	0.029	0.035	0.046	0.027	0.044	0.007						
横平	0.065	0.073	0.044	0.045	0.029	0.026	0.042	0.066					
亀ヶ沢	0.049	0.043	0.031	0.037	0.024	0.028	0.005	0.006	0.048				
会所沢	0.038	0.056	0.026	0.026	0.023	0.012	0.065	0.101	0.047	0.078			
岩屋堂	0.031	0.050	0.022	0.033	0.027	0.033	0.048	0.066	0.062	0.070	0.032		
子野	0.054	0.070	0.029	0.029	0.026	0.015	0.052	0.084	0.010	0.052	0.019	0.047	
苗木	0.038	0.051	0.020	0.020	0.022	0.011	0.037	0.064	0.016	0.036	0.022	0.042	0.002

3. 統計解析

それぞれの集団において得られた遺伝子型から、POPGENE package version 1.31 (Yeh et al. 1999) を用いて、5つの遺伝的統計量(多型的遺伝子座の割合(P), 一遺伝子座あたりの対立遺伝子数(A), 有効対立遺伝子数(A<sub>v</sub>), ヘテロ接合度観察値(H<sub>o</sub>), ヘテロ接合度期待値(H<sub>e</sub>))を算出した。これらの値は、集団内に保有される遺伝的変異の大きさを表し、数値が高いほど遺伝的変異も大きいことを示す。

また、集団間の遺伝的な関係を推定するために、Nei (1978) の遺伝距離Dを算出した。この値は集団間の遺伝的差異の大きさを表し、値が大きいほど集団が遺伝的にかき離れていることを示す。この遺伝距離をもとに、UPGMA法を用いて作成した。

III 結果および考察

1. 集団内に保有される遺伝的変異量

解析に用いた5酵素からは、10遺伝子座(Adh-1, Adh-2, Dia-1, Dia-2, Est, Got-1, Got-2, Got-3, Lap-1, Lap-2)が検出され、すべての遺伝子座において少なくとも1集団で多型が認められた。表-1に、各集団内に保有される遺伝的変異量を表した。多型的遺伝子座の割合Pは、会所沢で40%であったがそれ以外の集団は50~80%で、平均は63.6%となった。一遺伝子座あたりの対立遺伝子数Aおよび有効対立遺伝子数A<sub>v</sub>は、平均がそれぞれ1.8(1.5~2.1), 1.32(1.14~1.48)であった。また、ヘテロ接合度観察値H<sub>o</sub>と期待値H<sub>e</sub>は、平均がそれぞれ0.174(0.115~0.270), 0.195(0.116~0.280)であった。集団ごとで遺伝的変異量を見ると、“会所沢”の集団は、ヘテロ接合度観察値以外は全集団の中で最も低い値を示し、“正家”、“武

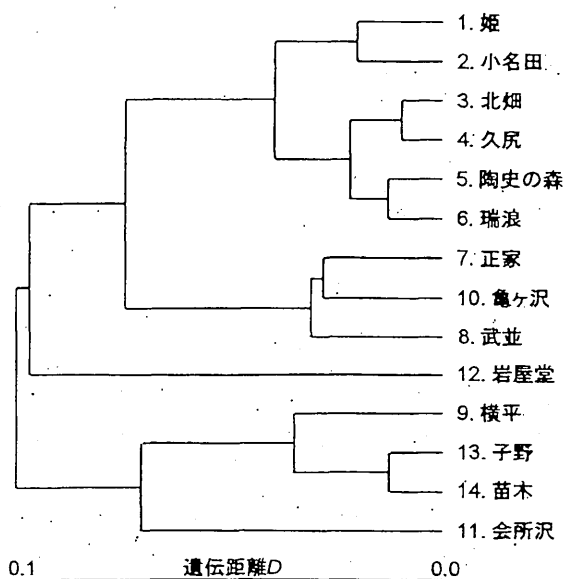
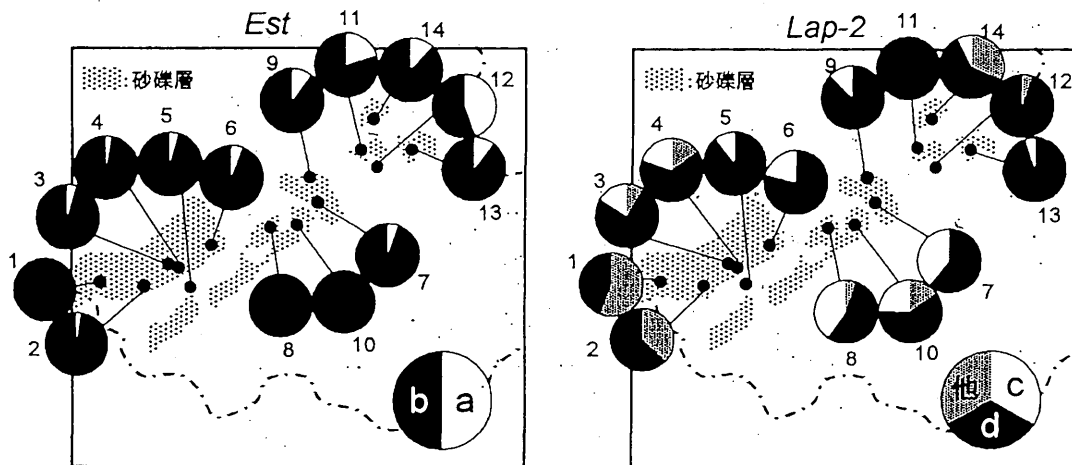


図-2 集団間の遺伝的な関係



図中の数字は集団Noを表す(1:“姫”, 2:“小名田”, 3:“北畑”, 4:“久尻”, 5:“陶史の森”, 6:“瑞浪”, 7:“正家”, 8:“武並”, 9:“横平”, 10:“亀ヶ沢”, 11:“会所沢”, 12:“岩屋堂”, 13:“子野”, 14:“苗木”)

図-3 2多型的遺伝子座 (Est, Lap-2) における対立遺伝子の分布

並”の集団は遺伝的統計量が他の集団よりも高い傾向にあった。

アロザイム分析による植物の集団遺伝解析は数多く行なわれてきている。Hamrick and Godt (1989)は、植物種を生態学的特性、生活史特性に分類して、遺伝的統計量の平均値を算出している。これによると、地域固有種の遺伝的統計量の平均値 ( $P=26.3$ ,  $A=1.39$ ,  $A_s=1.09$ ,  $H_s=0.063$ ) は、分布の広い種の平均値 ( $P=43.0$ ,  $A=1.72$ ,  $A_s=1.23$ ,  $H_s=0.159$ ) に比べて低いのが特徴であった。今回得られたシデコブシ集団の  $P$  および  $H_s$  は、すべての集団において地域固有種の平均値よりも高い値を示した。また、“姫”、“北畑”、“会所沢”の3集団を除くすべての集団において  $H_e$  は分布の広い種の平均値よりも高かった。これらの結果は、シデコブシは地域固有種であるにも拘わらず、地域固有種の平均値よりも非常に高い遺伝的統計量を示していた。このことから、東濃地域のシデコブシが高い集団内変異を保有していることが考えられた。

集団サイズ (集団内の個体数) は、集団内の遺伝的変異量を保つ上で重要であると考えられている (Templeton et al. 1990)。集団サイズと遺伝的変異量との間に見られる有意な正の相関は、集団サイズが小さければ小さいほど集団内の遺伝的変異が小さくなる傾向を示している (van Treuren et al. 1991; Rajmanna et al. 1994)。しかしながら、今回の調査では“北畑”や“久尻”のようなサイズの大きい集団は“武並”や“正家”などのサイズの小さい集団に比べて、遺伝的変異量が低いという結果が得られ、集団サイズと遺

伝的変異量との間に明瞭な傾向は見られなかった。このことから、東濃地域のシデコブシ集団内の遺伝的変異量が、集団サイズに依存していない可能性が考えられた。

## 2. 集団間の遺伝的な関係

集団間の遺伝距離  $D$  は、0.002~0.101までの値をとり、平均は0.032で、分化の程度は小さい傾向にあった (表-2)。遺伝距離が最も小さかったのは、“北畑”-“久尻”、“子野”-“苗木”で、最も大きかったのは、“武並”-“会所沢”であった。この遺伝距離をもとにデンドログラムを作成したところ、大きく3つのクラスターに分かれ、地理的に近い位置関係にある集団同士が同一クラスターに属する傾向が見られた (図-2)。特に、多治見市に位置する2集団 (“姫”、“小名田”)、土岐市に位置する3集団 (“北畑”、“久尻”、“陶史の森”) および恵那市に位置する3集団 (“正家”、“亀ヶ沢”、“武並”) は、非常に近い遺伝的関係にあることを示していた。一方、“横平”、“会所沢”、“岩屋堂”、“子野”、“苗木”の5集団は他の集団に比べて大きく分化している傾向を表していた。

解析に用いた5酵素10遺伝子座のうち、集団ごとでもっとも特徴的な傾向が見られた2遺伝子座 (Est, Lap-2) の対立遺伝子の分布を集団ごとで表したのが図-3である。Est遺伝子座ではaとbの二つの対立遺伝子が検出された。この対立遺伝子の集団ごとでの分布を見ると、“姫”、“武並”、“亀ヶ沢”の3集団では対立遺伝子aが検出されず、対立遺伝子bの固定が完

了していることを表していた。これら3集団の近隣に位置する集団では、対立遺伝子aの分布が認められたが、頻度は非常に低かった。一方、“横平”、“会所沢”、“岩屋堂”、“子野”、“苗木”の5集団は、他の9集団に比べて対立遺伝子aの割合が多い傾向にあった。このことが、これら5集団が他の集団から大きく分化していることを反映していることが考えられた。

一方、Lap-2遺伝子座では、a~eまでの五つの対立遺伝子が検出された。これらのうち、対立遺伝子cとdが他の3つの対立遺伝子に比べて高い割合で分布しているのが、多くの集団で共通して見られた。“姫”と“小名田”は、対立遺伝子cが検出されなかったという点において特異的であった。また、“北畑”と“久尻”、“陶史の森”と“瑞浪”は対立遺伝子の分布パターンが類似していた。これらのことから、Lap-2遺伝子座は、デンドログラム上での両者の関係を反映している可能性が考えられた(図-2)。一方、“正家”、“亀ヶ沢”、“武並”の3集団は、他の11集団に比べて対立遺伝子cの割合が大きい傾向にあった。このことが、これら3集団が遺伝的に近い関係を持って、他の集団とは別のクラスターを形成していることに反映していると考えられた。

これらのことから、Est遺伝子座の対立遺伝子aおよびLap-2遺伝子座の対立遺伝子cの分布パターンは、図-2で示された集団のクラスター構造に大きく反映していると考えられた。しかし、5つの対立遺伝子が検出されたLap-2遺伝子座では、対立遺伝子の分布パターンは様々であった。“苗木”は近隣に位置する“会所沢”、“子野”と比較すると、検出された対立遺伝子の数が多い点で際立っていた。また、“正家”と“武並”では、他の集団では検出されなかった集団特異的な対立遺伝子が検出されている(“正家”: Got-1a, Got-3a; “武並”: Lap-2e)。これらのことは、遺伝距離の大きさにはほとんど影響しないと思われる。しかし、集団によっては独自の遺伝的多様性を保有していることが考えられた。

#### IV まとめ

本研究により、東濃地域に分布するシデコブシ集団の遺伝的多様性を明らかにすることができた。今回の結果は、この地域のシデコブシ集団が非常に高い遺伝的変異を保有していることを示していた。また、集団間の遺伝的な関係は、地理的な位置関係に沿ったパターンを示した。しかし、遺伝子座によっては対立遺伝子の分布パターンが集団ごとで異なることから、集団が持つ遺伝的多様性の独自性は無視できないと思われる。

シデコブシは絶滅が危惧されている地域固有種であるが、東濃地域は他のシデコブシ分布域に比べて個体数や集団数が多いため、保全対策が遅れていた。本研究の結果は、今後のシデコブシ保全を図るための重要な示唆を与えている。また、シデコブシはその生育環境が独特であることから、生育地の地形的・地質的要因と絡めて遺伝的構造を考察し、適切な保全策を組み立てていく必要があると思われる。

#### V 謝辞

本研究での試料採集にご協力を頂いた、三戸憲和氏・小栗兼一氏(多治見市役所)、山口清重氏(日本シデコブシを守る会)、澤田與之氏(シデコブシと自然が好きな会)、市川廣利氏・光岡勝美氏(恵那シデコブシ保存会)、松川喜三氏・平井武二郎氏(中津川シデコブシの会)に感謝する。

#### 引用文献

- Hamrick, J., Godt, M. J. W. (1989) Allozyme diversity in plant species. In Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. Brown, A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler and B. S. Weir [eds.] Sinauer Associate Inc. Massachusetts.
- 環境庁(2000) レッドデータブック第2版. 維管束植物. 野生生物研究センター. 東京.
- 菊池多賀夫(2001) 地形植生誌. 216pp. 東京大学出版会. 東京.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- 日本シデコブシを守る会(1996) シデコブシの自生地. 217pp. 日本シデコブシを守る会. 瑞浪.
- Raijmann, L. L., van Leeuwen, N. C., Kersten, R., Oostermeijer, J. G. B., den Nijs, H. C. M., Menken, S. B. J. (1994). Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Genetiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology* 8: 1014-1026.
- Templeton, A. R., Shaw, K., Routman, E., Davis, S. K (1990) The genetic consequences of habitat fragmentation. *Annual of Missouri Botanical Garden* 77: 13-27.
- 津村義彦・戸丸信弘・陶山佳久・モハマド=ナイム・

大庭喜八郎 (1990). アイソザイム実験法. 筑波  
大学演習林報告6 : 63-90.

Van Treuren, R., Bijlsma, R., Delden, W. D.,  
Ouborg, N. J. (1991). The significance of  
genetic erosion in the process of extinction. I.  
Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and

*Scabiosa columbaria* in relation to population  
size. *Heredity* 66 : 181-189.

Yeh, F. C., Yang, R., Boyle, T. (1999). POPGENE  
version 1.31. A joint project development by  
University of Alberta and Centre for  
International Forestry Research.