

# アロザイム分析による岐阜県内のホオノキ集団の遺伝的変異

中島美幸・横井秀一

Allozyme variation in *Magnolia obovata* populations in Gifu Prefecture

Miyuki NAKASHIMA and Shuichi YOKOI

岐阜県内に分布する9集団とそれらから遠く離れた鳥取県大山の1集団のホオノキを対象に、5酵素6遺伝子座を用いてアロザイム分析を行った。岐阜県の集団内に保有される遺伝的変異量は、 $H_e=0.027\sim 0.058$ であり、大山( $H_e=0.078$ )より小さかった。さらに、全集団の遺伝的変異量は、これまでに明らかにされてきた木本植物の平均値( $H_e=0.149$ )と比べて低かった。全集団間の遺伝分化は、 $F_{ST}=0.030$ であり、木本植物でまとめられている遺伝分化の程度( $G_{ST}=0.076$ )と比べて低かった。また、岐阜県の集団間の遺伝距離は $D=0.00001\sim 0.00046$ であったのに対し、岐阜県集団と大山集団との遺伝距離は $D=0.00014\sim 0.00024$ と小さく、ホオノキ集団間の遺伝距離は地理的距離の大きさを映していなかった。これらの結果から、岐阜県に分布するホオノキ集団の低い遺伝的多様性と遺伝分化が示された。

キーワード：ホオノキ，岐阜県，アロザイム分析，遺伝的変異

## I はじめに

ホオノキは、モクレン科に属する落葉広葉樹であり、日本の冷温帯から暖温帯にかけての山地に広く分布している。岐阜県では山地のほとんどで見られ、広葉樹林施業においては有用造林樹種の一つである。

アロザイムを用いて植物集団の遺伝的多様性を調べ

た研究は、数多く報告されている(Hamrick and Godt, 1989)。アロザイム解析は、酵素タンパク質のアミノ酸配列の違いを検出する方法である。ほとんどの酵素が共優性遺伝をし、各酵素の遺伝様式があきらかになっているため、自然集団の遺伝的多様性を評価することができる(津村, 2001)。

ホオノキでは、アロザイムを用いた近交弱勢に関する



図-1 調査集団の位置

表-1 各集団で検出された推定遺伝子座数

集団	酵素名									合計
	AAP	DIA	FDH	EST	GOT	MNR	6PG	PGM	SOD	
荘川	0	1	1	1	2	0	2	0	1	8
高鷲	1	1	0	1	2	1	1	1	1	9
清見	1	1	0	1	2	1	1	0	1	9
久々野	1	1	0	1	2	1	1	0	1	9
古川	0	1	1	1	2	0	2	0	1	8
白鳥	1	1	0	1	2	1	1	1	1	9
美濃	0	1	0	1	2	1	2	0	1	8
加子母	0	1	1	1	2	0	2	0	1	8
池田	0	1	1	1	2	0	2	0	1	8
大山	0	1	1	1	2	0	2	0	1	8
全集団相同	0	1	0	1	2	0	1	0	1	6

る研究や(石田, 2001), マイクロサテライトマーカーを用いて繁殖特性を調べた研究(Isagi et al. 2000)が報告されているが, ホオノキ集団の遺伝的多様性について調べた報告はない。

岐阜県では, ホオノキの植栽が行われているため, 自然集団の遺伝データの集積は, 遺伝的な攪乱の可能性を考える上でも重要である。そこで本研究では, 岐阜県内に分布するホオノキ集団を対象として, アロザイム分析法を用いた集団遺伝学的解析を行った。

## II 材料と方法

### 1. 調査集団および材料の収集

調査集団は, 岐阜県内のホオノキ9集団(荘川, 清見, 古川, 久々野, 白鳥, 高鷲, 美濃, 池田, 加子母)と, 岐阜県から遠く離れた集団(約500km)として, 鳥取県から1集団(大山)の計10集団を選定した(図-1)。2000年~2003年にかけて, 各集団からサンプル木30個体を選定し, 酵素抽出材料として冬芽を採集した。採取した冬芽は解析に用いるまで-80℃で保存した。

### 2. アロザイム分析

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(PVPP)を加えた後, 抽出バッファー(津村ら, 1990) 1ml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。

アロザイム分析には, ポリアクリルアミドゲルを支持体とした垂直電気泳動法を用いた。酵素抽出液は, ポリ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った。解析では, まず, 30酵素種についてスクリーニングを行い, 解析可能な遺伝子座を検出した。

### 3. データ解析

全集団において相同な遺伝子座から, POPGENE package version 1.31(Yeh et al., 1999)を用いて, 遺伝的変異の大きさを求めるため, 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( $A_e$ ), ヘテロ接合度観察値( $H_o$ ), ヘテロ接合度期待値( $H_e$ ))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, 集団の遺伝分化の程度を推定するために,  $F$ 統計量( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ )を算出した。 $F_{IS}$ と $F_{IT}$ はそれぞれ, 分集団内および全集団内で, 交配によって合

表-2 各集団に保有される遺伝的変異量

集団名	集団内の遺伝的変異				
	$A$	$A_e$	$P$	$H_o$	$H_e$
荘川	1.33	1.06	33.3	0.055	0.051
高鷲	1.50	1.08	50.0	0.067	0.058
清見	1.50	1.04	50.0	0.039	0.038
久々野	1.16	1.06	16.8	0.050	0.043
古川	1.33	1.03	33.3	0.028	0.027
白鳥	1.33	1.04	33.3	0.022	0.032
美濃	1.33	1.04	33.3	0.035	0.033
加子母	1.16	1.04	16.7	0.040	0.032
池田	1.50	1.08	33.3	0.034	0.033
大山	1.33	1.15	33.3	0.068	0.078
平均	1.35	1.06	33.3	0.044	0.043

$A$ :一遺伝子座あたりの対立遺伝子数、 $A_e$ :有効対立遺伝子数、 $P$ :多型的遺伝子座の割合、 $H_o$ :ヘテロ接合度観察値、 $H_e$ :ヘテロ接合度期待値

表-3 4多型的遺伝子座におけるF統計量

遺伝子座	F統計量		
	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
<i>Dia</i>	-0.084	-0.027	0.053
<i>Est</i>	-0.053	-0.005	0.045
<i>Got-1</i>	-0.017	-0.002	0.015
<i>6Pg</i>	-0.118	-0.095	0.021
平均	-0.105	-0.072	0.030

表-4 集団間の遺伝距離D

	荘川	清見	久々野	古川	高鷺	白鳥	池田	加子母	美濃
清見	0.0022								
久々野	0.0041	0.0022							
古川	0.0046	0.0029	0.0001						
高鷺	0.0023	0.0005	0.0011	0.0017					
白鳥	0.0013	0.0006	0.0021	0.0026	0.0004				
池田	0.0017	0.0005	0.0012	0.0017	0.0000	0.0002			
加子母	0.0025	0.0012	0.0002	0.0005	0.0004	0.0010	0.0004		
美濃	0.0017	0.0006	0.0008	0.0012	0.0001	0.0004	0.0000	0.0002	
大山	0.0023	0.0021	0.0024	0.0024	0.0016	0.0016	0.0014	0.0016	0.0014

体する2個の配偶子の相関である。また、 $F_{ST}$ は各集団から任意にとられた2個の配偶子の相関であり、集団間の遺伝分化の尺度となる。

さらに、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け離れていることを示す。

### III 結果と考察

#### 1. 集団内の遺伝的変異

スクリーニングした30酵素種のうち、集団全体で9酵素11遺伝子座において、鮮明なバンドが得られた(表-1)。しかし、解析可能な遺伝子座は集団によって異なり、全集団で相同な遺伝子座は5酵素6遺伝子座(*Dia*, *Est*, *Got-1*, *Got-2*, *6Pg*, *Sod*)であった。また、これらのうち4遺伝子座(*Dia*, *Est*, *Got-1*, *6Pg*)は、少なくとも1集団で多型が見られた。

5酵素6遺伝子座を用いて算出した集団内遺伝的変異を表-2に表した。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 $A_e$ の平均値はそれぞれ1.35(最小-最大, 以下同じ: 1.16-1.50)および1.06(1.03-1.15)であった。また、多型的遺伝子座の割合 $P$ は、平均で33.3(16.8-50.0)であった。さらに、ヘテロ接合度観察値 $H_o$ および期待値 $H_e$ の平均値はそれぞれ0.044(0.022-0.064)および0.043(0.027-0.078)であった。集団内変異の高さを集団間で比較すると、岐阜県内では、高鷺集団が最も高かった。また、大山集団は岐阜県内の集団に比べると、遺伝的変異が高かった。

一方、Hamrick and Godt (1989) によってまとめられている木本植物の遺伝的変異の平均値( $H_e=0.149$ )と比較すると、今回得られたホオノキ集団の遺伝的変異は非常に低かった。しかし、北米産ホオノキである *M. tripetala* の遺伝的変異( $H_e=0.062$ ; Qiu et al., 1994) とはほぼ同程度であった。

これらのことから、調査した10集団のホオノキ集団は木本植物としては低い遺伝的変異を有していることが考えられた。

#### 2. 集団間の遺伝的な関係

多型的遺伝子座(*Dia*, *Est*, *Got-1*, *6Pg*)における $F$ 統計量の平均値は、 $F_{IS}=-0.105$ ,  $F_{IT}=-0.072$ ,  $F_{ST}=0.030$ であった(表-3)。集団間の遺伝分化の程度を表す $F_{ST}$ は、Hamrick and Godt (1989) でまとめられている木本植物の遺伝分化の程度( $G_{ST}=0.076$ )と比べて低かった。

一方、集団間の遺伝距離 $D$ は最も離れたところで $D=0.00046$ (荘川-古川)であり、非常に小さかった(表-4)。また、岐阜県から地理的に大きく離れている大山集団とは、 $D=0.00014\sim 0.00024$ であり、岐阜県内の集団間の遺伝距離と大差なかった。このことから、ホオノキ集団間の遺伝距離は地理的距離の大きさをほとんど反映していないと思われた。

種レベルでの遺伝分化の程度を推定するには、分布域全体からのサンプリングが必要となる。ホオノキは日本全土に分布するが、今回は、岐阜県という限られた地域の集団の解析にとどまったため、正確な遺伝分化の程度を推定することはできなかった。しかし、岐阜県から約500km離れた大山集団との間に遺伝的な差異が見られなかったことは、ホオノキの低い遺伝分化を反映していると思われた。

### IV おわりに

本研究の結果、岐阜県に分布するホオノキ集団の低い遺伝的多様性と遺伝分化が示された。しかし、今回は解析遺伝子座数が少ないという問題点が残った。より高精度に遺伝的多様性を推定するためには、遺伝子座数を増やして解析を行う必要がある。

V 引用文献

- Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W. (1989) Allozyme diversity in plant species. In Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L., Weir, B. S. (ed.) Sinauer Associate Inc. Sunderland, Massachusetts, 43-63.
- Isagi, Y., Kanazashi, T., Suzuki, W., Tanaka, H., Abe, T. (2000) Microsatellite analysis of the regeneration process of *Magnolia obovata* Thunb. *Heredity* 84 : 143-151.
- 石田清 (2001) ホオノキが語る近交弱勢の謎. (森の分子生態学—遺伝子が語る森林のすがた. 種生物学会編. 319pp. 文一総合出版. 東京). 39-58.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89 : 583-590.
- Qiu, Y. L. and Parks C. R. (1994). Disparity of allozyme variation levels in three Magnolia (Magnoliaceae) species from the southwestern United States. *American Journal of Botany* 81: 1300-1308.
- 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) アインザイム実験法. 筑波大演習林報告 6 : 63-95.
- 津村義彦. 2001. アロザイム実験法. (森の分子生態学—遺伝子が語る森林のすがた. 種生物学会編. 319pp. 文一総合出版. 東京). 183-219.
- Yeh, F. C., Yang, R., Boyle, T. (1999). POPGENE version 1.31. A joint project development by University of Albarta and Centre for International Forestry Research.