

【論説・報文】

希少樹種ハナノキを対象とした保全単位の設定

佐 伯 いく代\*

IKUYO SAEKI. Establishment of Conservation Units of a rare maple, *Acer pycnanthum*.  
For. Tree Breed., 238, 3-8, 2011

Abstract: Japanese red maple (*Acer pycnanthum* K. Koch) is an endangered species which grows in discrete wetland ecosystems within a limited geographic range of central Honshu, Japan. It is an important relic of geologic time and an endemic of unique wetland ecosystems. However, information on its genetic characteristics across its range is lacking. The aim was to determine the genetic structure and diversity of the species and establish Conservation Units. Leaf samples were collected from 400 individuals of *A. pycnanthum* in 30 populations. Total DNA was extracted from each, and three non-coding regions of chloroplast DNA were sequenced. As a result, nine haplotypes were identified based on six polymorphic sites (one nucleotide substitution and five cpSSRs). High haplotype diversity (0.81) of the species and the occurrence of rare haplotypes in eight distant populations suggest that wetlands provided multiple, adequate-size refuges during the last glacial maximum. One to four haplotypes were found within a given population. The high degree of differentiation ( $G_{st} = 0.83$ ) implies that gene flow by seeds among populations is restricted. There were significant spatial clusters of populations which were characterized by similar haplotype composition. Using the BARRIER and SAMOVA, we detected nearly identical genetic boundaries. Six Conservation Units were proposed, which can be used for introduction of new individuals for on-site conservation projects and seed collection for *ex-situ* conservation.

Keywords: chloroplast DNA, conservation unit, genetic diversity, maple, phylogeography, spatial analyses

1. はじめに

ハナノキ (*Acer pycnanthum* K. Koch写真-1) は日本固有のカエデの一種で、本州中部地方の特異な低湿地に自生する絶滅危惧種 (VU) である<sup>1)</sup>。「花の木」という名は、春に深紅の花を咲かせ、秋には鮮やかに紅葉する卓越した華やかさに由来する。本種は希少か



写真-1 ハナノキ (長野県飯田市)

\* 国立大学法人横浜国立大学大学院 環境・情報研究院生態学研究室: Laboratory of Ecology, Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, 79-7 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501, Japan



図-1 ハナノキの主な生育地の分布



写真-2 ハナノキの生育地（岐阜県瑞浪市）

つ美しい樹木であることから本地域における湿地保全の象徴種であり、地域住民による自生地の保護や個体の増殖・植栽が行われている。しかし、本種について分布域を網羅した遺伝的な情報は把握されておらず、地理的変異の程度やそれをふまえた保全・植栽活動のあり方について議論されることはなかった。そこでわたしは、首都大学東京の村上哲明博士とともに、葉緑体DNAの情報を用いてハナノキの地理的な遺伝構造を明らかにし、地域系統に配慮した保全・植栽活動を行うための空間的ユニット（以下保全単位と呼ぶ）<sup>2)</sup>の設定を試みた。

## 2. ハナノキの分布と生態

ハナノキは、第三紀の地層から化石が産出される起源の古い植物である<sup>3,4)</sup>。ハナノキの祖先系統は、北アメリカで始新世中期に出現し、中新世中期には、ユーラシアと北アメリカ大陸の中緯度地域に広く繁栄したことが知られている<sup>5)</sup>。その後、気候変動などで分布域が縮小するなかで、アジアでは、本州中部地方にある低湿地群に遺存的にのこることができた。自生地が特に集中しているのは、岐阜県の東濃地方と長野県の

下伊那地方である（図-1）。ここには、土岐砂礫層に代表される特殊な砂礫層が堆積し、ハナノキの生育に適した湿地（写真-2）が高密度に形成され続けた<sup>6)</sup>。ハナノキのように、伊勢湾周辺の低湿地に特異的にみられる固有植物群を東海丘陵要素という<sup>7)</sup>。

湿地の開発による生育地の減少により、ハナノキの個体数は急速に減少している。わたしは以前、セスナ機による航空探査<sup>8)</sup>などによって本種の全生育地の調査を試みたが、開花サイズに達した個体の数は1500に満たないと考えている。現存する自生地は多く見積もっても100前後で、その大部分が0.5ha以下の小規模なものである。また、多くの生育地が水田、宅地、道路などに囲まれ、生育地の孤立化・分断化がすすんでいる。ハナノキは、各個体が雄花だけをつける雄木（おぎ）と雌花だけをつける雌木（めぎ）にわかれている雌雄異株（しゆういしゆ）植物である。従って、受粉可能なエリア内に雄木と雌木とがバランスよく存在しないと効率的に種子を生産することができない<sup>9)</sup>。送粉は、花の構造や花粉の形態から風媒と推定されているが<sup>10)</sup>、虫媒を示唆する報告もある<sup>11)</sup>。体サイズの小さい時期から開花を始め、成長するに従って、安定した種子生産を行う<sup>9)</sup>。成熟したハナノキ林から得られる種子の発芽率が高い。しかし、種子生産量の大きな個体群であっても、次世代を担う幼木がみられることは少ない。この理由として、ハナノキの幼木は地すべりや河川の氾濫の後にできる光環境の良い湿地でなければ生育が難しいこと、一方、都市化によって新たな湿地が形成されにくくなり、更新適地が大幅に減少していることなどがあげられる。

### 3. 葉緑体DNAハプロタイプの地理的分布と多様性

遺伝的多様性の保全の考え方の一つに、進化の過程で構築された遺伝的変異をなるべく攪乱せずに保護していこうとするものがある<sup>12,13,14,15</sup>。一般に、野生生物の遺伝的多様性には地理的な偏りが存在し、同じ種であっても、地域ごとに異なる遺伝子型をもっている場合が多い<sup>16</sup>。そこで、遺伝子型の地理的分布の偏り具合を事前に調べておき、近縁の遺伝子型をもつグループを一つのユニットと認識して保全に用いる手法が知られている。このアプローチにならない、本研究では、まず現存するハナノキの遺伝的多様性の地理的パターンを調査し、その結果に基づいて保全単位を検討することとした<sup>17</sup>。

ハナノキの遺伝的多様性の地理的パターンを知るため、長野・岐阜・愛知の3県に分布する生育地30ヶ所から400個体の葉のサンプルを採集し、葉緑体DNAの遺伝子間領域の塩基配列(約1600bp)を解析した。高等植物のDNAは、核、葉緑体、ミトコンドリアの3か所に存在する。うち葉緑体DNAは、突然変異が起こりにくいため分子進化速度が遅く、十～百万年のオーダーでの種の歴史を反映しているとさえいわれている<sup>18,19</sup>。またハナノキのような高次倍数体植物(2n=78, x=13)<sup>10</sup>からでも容易に塩基配列を読み取れること、主に母系遺伝し種子による遺伝子流動の流れを明らかにできること、花粉よりも種子のほうが散布距離が小さいために見出された遺伝子型が地理的まとまりをつくりやすいこと、などの特徴がある<sup>20,21</sup>。解析の結果、塩基置換(1サイト)とcpSSR(1塩基の繰り返し数の違い:5サイト)によって9種類の遺伝子型が検出された。半数体の葉緑体DNAにおいて認識される遺伝子型はハプロタイプとよばれる。ハナノキのハプロタイプを地図上に落としてみると、地理的なまとまりをもつことが明らかにされた(図-2)。

葉緑体DNAの分子進化速度を考慮すると、分布域が狭く個体数の少ない種に9種類ものハプロタイプが検出されたのは少々意外であった。日本産の他のカエデとハプロタイプの共有はみられず、姉妹種とされるアメリカハナノキ<sup>10</sup>とも大きく分化をしていた。一般に、絶滅が危惧される種のほとんどは、集団サイズの大きな絶滅のおそれのない種と比べると遺伝的多様性が低い<sup>22</sup>。近年、急激に個体数が少なくなってしまったハナノキではあるが、すこし前までは相当規模の個体群を維持し続けてきたのではないだろうか。日本列

島は2.5万～1.5万年前に最終氷期最盛期を経験した<sup>23</sup>。このとき、ほとんどの植物は分布を南下させなければならず、移動の際の創始者効果や生育適地の減少から遺伝的多様性を失った種も多い<sup>19</sup>。しかしハナノキの種全体のハプロタイプ多様度は0.81と高く、頻度の低いレアハプロタイプが地理的に離れた集団に分布している。これは、氷期の避難地となるレフュージアが一定規模で存在し、分布域や個体群サイズが極度に変動することなくハナノキが生育し続けられたことを示唆している。特に、主たる生育地である周伊勢湾地域の低湿地群が優れたレフュージアとして機能し、ハナノキの遺伝的多様性を支え続けていた可能性が高い。

ハナノキの分布域は、恵那山(2190m)に連なる木曾山脈によって、長野県側の天竜川流域と岐阜県側の木曾・土岐川流域の二つに分断されている。にもかかわらず、両地域に共通するハプロタイプが3種類検出された(図-2)。木曾山脈は60万～80万年前に隆起をはじめた歴史の浅い山脈である<sup>24</sup>。山脈の東西で同じハプロタイプが検出されたのは、隆起をはじめ以前に両地域で遺伝子交流があり、そのなごりが、地史的スケールでの情報を保つ葉緑体DNAの中に残されていた可能性も考えられる。

サンプルサイズの大きい19の集団を対象に $G_{ST}$ (遺伝子分化係数)を求めたところ、0.83と高い値を示した。これは、集団ごとにハプロタイプの構成が大きく偏っていることを意味している。最も傾向が顕著なのは分布域の南西部である(図-2, サンプル集団の番号では15-26)。ここでは、18と19のように、わずかに数kmしか離れていないのに全く異なるハプロタイプで構成されている集団のペアがみられる。さらに、ほとんどの集団が単一のハプロタイプで固定されているため、一見するとモザイクのようなパターンが形成されている。ハナノキは、更新適地となる光環境のよい湿地が創出されると、たまたまその近くにあった少数の雌木から種子が散布され、次世代の個体群が成立する場合が多い。モザイクのようなパターンは、更新時に強い創始者効果をもつハナノキの生態をよく反映した特徴と考えられる。さらに、ハナノキが生育する湿地は普通、急斜面を含む尾根部に隣接する。果実は風で散布されるが、大部分の種子は、樹高よりもはるかに高い尾根を越えることができず、近距離に散布されている可能性がある。

### 4. 境界の探索と保全単位の設定

ハナノキのハプロタイプの分布には明瞭な地理的ま

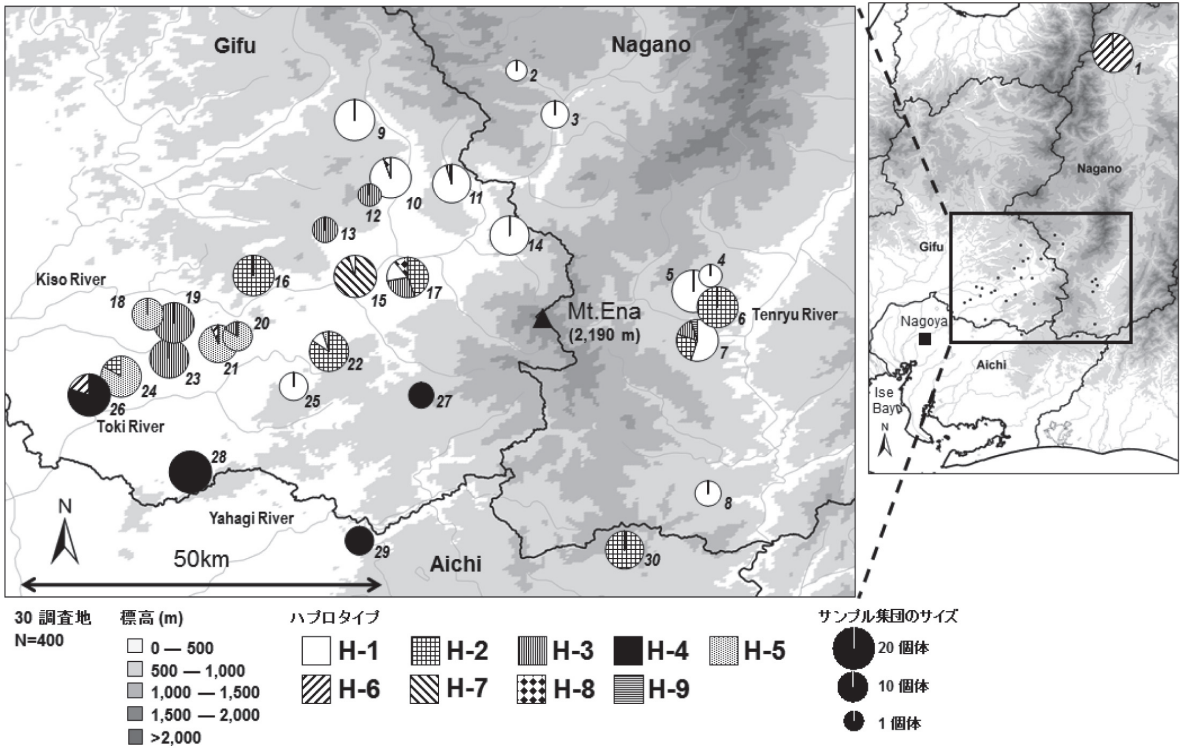


図-2 ハナノキの葉緑体DNAハプロタイプの分布。図中の円グラフがサンプル集団のハプロタイプの割合を示す。円グラフに付随する番号は、サンプル集団の番号。Saeki & Murakami (2009)<sup>17)</sup>を改変。

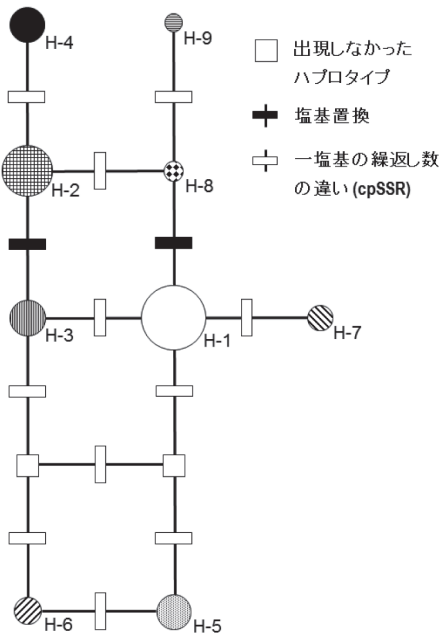


図-3 ハナノキの葉緑体DNAハプロタイプネットワーク。Saeki & Murakami (2009)<sup>17)</sup>を改変。

とまりがみられた。そこで、主たる分布域である周伊勢湾地域の集団を対象に、ハプロタイプのまとまりを示す遺伝的境界線を引き、保全単位を設定することにした。

遺伝的境界の探索には、BARRIER<sup>25,26)</sup>とSAMOVA<sup>27)</sup>という二つの手法を用いることにした。BARRIERは、①サンプル地点を基点にしてボロノイ図を描き、②ボロノイで隣りあう集団間の遺伝的距離が最も大きくなる辺を選択し、③以後、それにつながるように遺伝的距離の大きい辺をなぞって境界を探索する手法である。遺伝的距離の計算には、ハプロタイプ間の系統的な距離を考慮せずに距離を求める手法(パーセンテージ類似度指数を遺伝子データに拡張した手法)を用いた<sup>28)</sup>。これはデータにcpSSRという、ホモプラシーを強く示す変異が多かったため、ハプロタイプ間の真の系統的距離をはかることが難しかったからである。しかし、cpSSRの変異が少ない場合には、系統的な距離を反映させて集団間の距離を求めることも可能である。

SAMOVAは、ボロノイ図を描いた後、集団全体を

ランダムにいくつかのグループに分けるよう指定し、これをグループ間の遺伝的組成の違いが最大になるまで繰り返して境界を探索するという手法である。たとえば、2から30までのサンプル集団をグループ数 (K) = 2として二つに分けるよう指定すると、SAMOVAのプログラムが無作為にいろいろな組み合わせを試行し、グループ間の変異が最大となるような組み合わせを解として提示する。これを、K=3, K=4, とグループ数を変えて試行し、分かれ具合の良さを示すFct値が最大になるまで境界を探索する。SAMOVAは、BARRIERに比べて地理的に隣接していない集団を同じ遺伝的グループに選択できること、遺伝的距離の大きい境界に引きずられることなく柔軟にグループ構造を認識できることなどのメリットがある。一方BARRIERは、アルゴリズムがシンプルで手計算でも境界を探索できることという利点がある。BARRIERとSAMOVAの詳しい解説については、それぞれの手法を記述した論文<sup>25,26,27)</sup>および立田ほか (2008)<sup>29)</sup>を参照されたい。

BARRIERとSAMOVAを用いた結果、類似した境界のパターンが検出された (図-4)。そこで、二つの結果を統合して6つのユニットからなる保全単位案を作成した (図-5)。6つの保全単位間でハプロタイプの類似度を計算したところ、平均で0.03, 最大で0.13という低い値が得られた。これは、各ユニットの特異性が高いことをあらわしている。また塩基置換はcpSSRに比べて分子進化速度が遅いという特性を考慮し、塩基置換のみで検出された境界も提示した。塩基置換で検出された境界も木曾川流域と天竜川流域の系統の類似性を支持していた。cpSSRによって検出される遺伝構造の解釈については注意が必要だが、ほかの変異と同様の構造を検出する場合もあり<sup>30)</sup>、ユニットの検討に有用な情報の一つと思われる。

### 5. 終わりに

本研究では、希少樹種ハナノキについて、葉緑体DNAの変異にもとづく遺伝構造を明らかにした。さらに空間解析を用いて遺伝的境界を探索し、保全単位として地図化した。これらの結果は、生育地復元の際に導入される個体ソースの決定、地域系統の生育地外保存、および地域性苗木の生産などに応用できると考えられる。今後の課題としては、葉緑体DNAだけでなく、他の遺伝情報も組み合わせて総合的なユニットを検討することがあげられる。葉緑体DNAは核ゲノムとオルガネラゲノムの有効な集団サイズの違いから

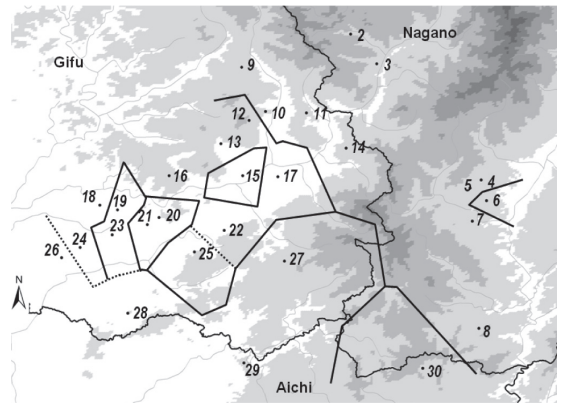


図-4 ハナノキの葉緑体DNAの変異にもとづく境界探索の結果。BARRIERとSAMOVAの両方で検出された境界 (実線) およびSAMOVAのみで検出された境界 (破線) を示す。図中の黒点は、境界探索の基点となったサンプル集団の位置を示す。黒点に付随する数字はサンプル集団の番号である。Saeki & Murakami (2009)<sup>17)</sup>を改変。

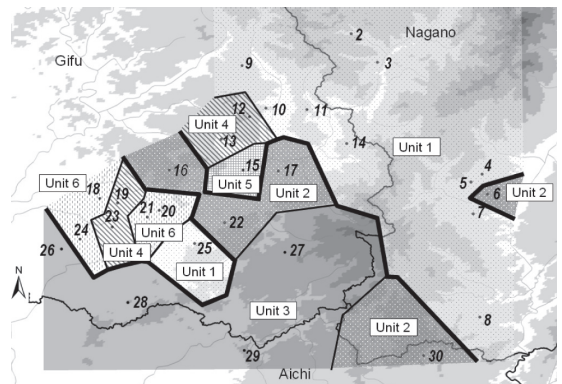


図-5 ハナノキの保全単位案。太線は塩基置換情報のみで検出された境界を示す。図中の黒点は、境界探索の基点となったサンプル集団の位置を示す。黒点に付随する数字はサンプル集団の番号である。Saeki & Murakami (2009)<sup>17)</sup>を改変。

共通の祖先までさかのぼれる時間が短いという特異性を持つ。また、単一の遺伝子系図を示しており、形態など自然選択の影響を受ける形質の分化と必ずしも相関が高いわけではない。したがって、まだ検出しきれていない遺伝構造が存在する可能性があり、研究を進めているところである。

### 謝辞

執筆の機会をくださった戸丸信弘博士、初期原稿に貴重なご意見をくださった村上哲明博士と亀山章博士に心より感謝いたします。また、査読者の方には有益

なコメントをいただきました。本研究は、ハナノキの遺伝的変異を報告したSaeki & Murakami (2009)<sup>17)</sup>の概略をまとめたものです。研究にご協力いただいたすべての皆様に感謝申し上げます。

#### 引用文献

- 1) 環境省：日本の維管束植物のレッドリスト [http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb\\_f.html](http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html). [Accessed 1 Feb. 2009]
- 2) Moritz, C. : Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51, 238-254, 2002
- 3) Miki, S. : On the change of flora in Eastern Asia since Tertiary Period. I. The clay or lignite beds flora in Japan with special reference to the *Pinus trifolia* beds in Central Hondo. *Japanese Journal of Botany* 11, 237-303, 1941
- 4) Wolfe, J.A., Tanai, T. : Systematics, phylogeny, and distribution of *Acer* (maples) in the Cenozoic of western North America. *Journal of Faculty of Science, Hokkaido University, Ser. IV*, 22, 1-246, 1987
- 5) 棚井敏雅：カエデ属の進化—そのたどった道, (植物の世界樹木編, 河野昭一監修), 136~143, ニュートンプレス, 2001
- 6) 植田邦彦：東海丘陵要素の起源と進化, (植物の自然史, 岡田博・植田邦彦・角野康郎編), 3~18, 北海道大学図書刊行会, 1994
- 7) 植田邦彦：東海丘陵要素の植物地理 I. 定義, 植物分類・地理40, 190~202, 1989
- 8) Saeki, I. : Application of aerial survey for detecting a rare maple species and endangered wetland ecosystems. *Forest Ecology and Management* 216, 283-294, 2005
- 9) Saeki, I. : Sexual reproductive biology of the endangered Japanese red maple (*Acer pycnanthum*). *Ecological Research* 23, 719-727, 2008
- 10) van Gelderen, D.M., de Jong, P.C., Oterdoom, H.J. : *Maples of the World*, 458 pp., Timber Press, 1994
- 11) 井上健：ハナノキ (カエデ科) の繁殖生態, 長野県植物研究会誌29, 29~32, 1996
- 12) Ryder, O. A. : Species conservation and systematic: the dilemma of subspecies. *TREE* 1, 9-10, 1986
- 13) Avise, J. C., Nelson, W. S. : Molecular genetic relationships of the extinct dusky seaside sparrow. *Science* 243, 646-648, 1989
- 14) Moritz, C. : Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *TREE* 9, 373-375, 1994
- 15) Newton, A. C., Allnutt, T. R., Gillies, A. C. M., Lowe, A. J., Ennos, R. A. : Molecular Phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *TREE* 14, 140-145, 1999
- 16) Avise, J.C. : *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 2000
- 17) Saeki, I., Murakami, N. : Chloroplast DNA phylogeography of the endangered maple, *Acer pycnanthum*: the spatial configuration of wetlands shapes genetic diversity. *Diversity and Distributions* 15, 917-927, 2009
- 18) Wolfe, K. H., Li, W. H. : Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear Dnas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9054-9058, 1987.
- 19) Aoki, K., Suzuki T., Hsu, T.W., Murakami, N. : Phylogeography of the component species of broad-leaved evergreen forests in Japan, based on chloroplast DNA variation. *Journal of Plant Research* 117, 77-94, 2004
- 20) Petit, R.J., Aguinalgalde, I. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300, 1563-1565, 2003
- 21) McLachlan, J.S., Clark, J.S., Manos, P.S. : Molecular indicators of tree migration capacity under rapid climate change. *Ecology* 86, 2088-2098, 2005
- 22) Frankham, R. Ballou, J.D., Briscoe, D.A. : 保全遺伝学入門, 751pp, 文一総合出版, 2007
- 23) 塚田松雄：古生態学II—応用論一, 231pp, 共立出版, 1974
- 24) 松島信幸：伊那谷の造地形史, 145pp, 飯田市美術博物館, 1995
- 25) Monmonier, M. : Maximum-difference barriers—alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis* 5, 245-261, 1973
- 26) Manni, F., Guérard, E., Heyer, E. : Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* 76, 173-190, 2004
- 27) Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. : Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotype—Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. *Genetics* 131, 479-491, 1992
- 28) McCune, B., Grace, J.B., Urban, D.L. : *Analysis of Ecological Communities*. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, USA. 2002
- 29) 立田晴記・吉尾政信・浅田正彦・落合啓二・宮下直：景観遺伝学的解析に基づく野生生物集団における遺伝的不連続性の検出手法, *生物科学*59, 174~181, 2008
- 30) Saeki, I., Dick, C.W., Barnes, B.V., Murakami, N. : Comparative phylogeography of red maple (*Acer rubrum* L.) and silver maple (*A. saccharinum* L.): impacts of habitat specialization, hybridization and glacial history. *Journal of Biogeography* (in press)

(2010年12月2日受理)