

河川基金助成事業

「核SSRマーカーを用いたカワラハハコの 集団維持機構の推定」

助成番号：2023-5311-006

東北大学大学院生命科学研究科
保尊 大志

2023 年度

1. はじめに

河川沿いには多様な環境が存在し、それらの環境は河川系全般における豊かな生物多様性に大きく貢献している。礫河原は、丸石河原とも呼ばれる表層を円石などの砂礫で覆われた河原のことを指し、河川の中流域から下流域にかけてみられる河川沿い環境のひとつである(図1.1)¹⁾²⁾。礫河原は植被率が低く、周囲とは明確に異なる環境であるが、一定の期間がたつと、植物の侵入が増え溪畔林や草原などの環境へと変化する。こういった変化を抑制するのが河川氾濫であり、急峻な地形と豊富な降水量によって、氾濫が定期的に発生することで表層の砂礫層が更新されることが、礫河原環境の維持にとって重要である。そのため、礫河原環境は安定的に河川沿いに存在するのではなく、環境が消失したり、形成したりすることを繰り返しながら、河川沿いで存在してきたと考えられる。

そういった礫河原環境には、その環境でのみ見られる特殊な植生が広がっている³⁾。これは、礫河原環境では、強光ストレスなどの自然選択を受けるために、礫河原環境に適応した植物のみが生育できるからである。このような特殊な植生は多様な河川沿い環境の一つとして認知され、河川沿い環境の多様性を示す指標として用いられることもある⁴⁾。

近年の人間活動の高まりは、河川沿い環境にも大きな影響を与えている。礫河原環境においては、特に護岸工事によって直接的な影響を受け、礫河原環境は減少している²⁾。特に河川の中流域から下流域に多く存在する礫河原環境は、平野部や都市部といったより護岸工事等が行われやすい地域に存在するために、そういった影響を受けるリスクは高いと考えられる。また、厳密な出水管理による河川氾濫の減少や、河道工事や砂防ダム建設による下流に供給される砂礫の減少も礫河原環境の減少に間接的に影響していると考えられる。そのため、礫河原環境およびその特殊な植生を保全についての知見は非常に重要なものになると考えられる。

キク科ヤマハハコ属の多年草であるカワラハハコ(*Anaphalis margaritacea* var. *yedoensis*)は日本の北海道から九州にかけての礫河原でみられる(図1.1)。礫河原環境に生育する植物のなかで広い分布域を有し多くの河川で見られることから、全国の礫河原の特徴的な植生の標徴種とされている⁵⁾⁶⁾。礫河原におけるカワラハハコの集団は、大規模な河川氾濫による影響を受けると考えられる。一方で、長期にわたる河川氾濫の欠如によって、草原化などによる植被率の上昇によって生育地が失われる可能性もある。そのため、カワラハハコは、礫河原環境と同様に、常に河川の同じ場所に安定的に集団を維持しているのではなく、集団の形成と消失を繰り返しながら、河川においてメタ個体群的に集団を維持してきたものと推定できる。そこで、私は現時点での集団の遺伝的多様性の評価や、遺伝構造の推定、遺伝子流動の検証などによって、カワラハハコ集団の遺伝的特徴を明らかにすることで、カワラハハコがどのようにして集団を維持してきたのかについて考察することができると考えた。カワラハハコの集団維持機構を理解することは、減少傾向にある礫河原環境の保全策を考えるうえで重要な知見をもたらす可能性がある。また、一部の地域では、山地の草原などに好んで生育する変種のヤマハハコ(var. *margaritacea*)やホソバノヤマハハコ(var. *angustifolia*)が礫河原付近でもみられることから、これらの変種とカワラハハコ集団との関連性についても検証する必要があると考えた。

以上のことから、本研究では、全国各地の河川からカワラハハコ集団を河川ごとに複

数集団採取し、河川ごとに各集団の遺伝的多様性の評価、遺伝構造の推定、遺伝子流動の検証などを行うことで、カワラハハコの集団維持機構の検証を行った。具体的には①周囲より遺伝的多様性が低い集団はみられるのか、②同一河川内や近隣河川間で明確な遺伝構造を示すのか、また河川間の地理的障壁がどの程度遺伝構造に影響するのか、③集団間の遺伝子流動がどの程度存在するのかの大きく3点について解析を行った。これにより、近年の集団の形成が起きているのかを検証し、集団間や河川間における遺伝的交流の有無や具体的な遺伝子流動パターンについて考察した。また、④周囲の山地性の変種集団とカワラハハコ集団との遺伝的交流についても検証し、山地性変種がカワラハハコ集団に与える影響についても調査した。最後に研究結果を元に、カワラハハコおよび礪河原環境の保全にとって重要となることについて考察した。

(図1.1礪河原の風景写真およびカワラハハコの近影写真)

2. 植物試料サンプリング

本研究で使用するカワラハハコの試料サンプリングのために、分布域各地の礪河原を調査した。そのうち、礪河原環境が広く見られ、カワラハハコ集団を複数採取できた河川および地域を解析に用いた(表2.1)。また河川付近の山地性変種ヤマハハコ集団についても探索し採取を試みた。

北海道では、急峻な地形が少ないためか、カワラハハコの生育情報が少なく、安定的に集団が維持されていると思われる、渡島半島を中心とした道南地方を中心に採取を行った。そのなかで渡島半島中部を流れる見市川から4集団、鉛川から2集団採取した。この2河川は雲石峠を分水嶺としてそれぞれ日本海と太平洋に流れ出ていることから、2河川を隔てる分水嶺が2河川間の遺伝的交流に与える影響についても考察できる。また、山地性変種集団について雲石峠を始め3地点で採取を行った。

東北地方では、宮城県を中心に隣接県の河川において調査を行った。豪雨により十分な採取が出来なかった河川が存在した。宮城県北部の内陸部を流れる江合川から6集団採取することができたため解析に用いた。また、江合川上流付近の花立峠で採取を行った。

中部地方では、新潟県・長野県・富山県を中心に採取を行った。富山県では多くの河川でカワラハハコの生育が確認できたことから、河川間での遺伝的交流の検証に適した地域であると判断した。そこで富山平野に流れ出る早月川、常願寺川、神通川、庄川の4河川流域からそれぞれ、2集団、4集団、2集団、4集団採取し、解析に用いた。また、常願寺川上流付近において2地点で採取を行った。

近畿地方では、滋賀県・兵庫県の河川において採取を行った。兵庫県の河川はカワラハハコがほとんど生育しておらず、各河川につき1~2集団を発見するにとどまった。一方で、滋賀県の河川では多くのカワラハハコ集団が確認できた。そこで、滋賀県湖西地域の安曇川から3集団、湖東地域の犬上川、愛知川、野洲川からそれぞれ1集団、5集団、1集団について採取を行った。また、滋賀県近隣で山地性変種の分布情報が得られなかったことから、三重県と奈良県県境付近にある三峰山のホソバナヤマハハコ集団を山地性変種集団として使用した。

解析に用いたカワラハハコ集団は便宜上，河川ごとに上流の集団から1，2，...と定義した．

地域名	種名	集団名	緯度	経度	個体数 (核SSR)	個体数 (葉緑体DNA)
北海道	カワラハハコ	見市川1	42.167	140.053	14	10
北海道	カワラハハコ	見市川2	42.147	140.039	16	8
北海道	カワラハハコ	見市川3	42.137	140.028	15	8
北海道	カワラハハコ	見市川4	42.120	140.017	21	8
北海道	カワラハハコ	鉛川1	42.210	140.158	12	8
北海道	カワラハハコ	鉛川2	42.218	140.172	10	7
北海道	ヤマハハコ	赤岳橋	42.176	140.068	6	4
北海道	ヤマハハコ	鉛川沿い	42.212	140.160	10	5
北海道	ヤマハハコ	雲石峠	42.178	140.087	12	7
宮城	カワラハハコ	江合川1	38.749	140.737	10	10
宮城	カワラハハコ	江合川2	38.742	140.709	16	10
宮城	カワラハハコ	江合川3	38.714	140.822	16	11
宮城	カワラハハコ	江合川4	38.699	140.835	16	9
宮城	カワラハハコ	江合川5	38.652	140.883	16	11
宮城	カワラハハコ	江合川6	38.639	140.898	10	9
宮城	ヤマハハコ	花立峠	38.791	140.560	12	7
富山	カワラハハコ	早月川1	36.646	137.534	10	8
富山	カワラハハコ	早月川2	36.696	137.441	12	8
富山	カワラハハコ	常願寺川1	36.575	137.389	19	9
富山	カワラハハコ	常願寺川2	36.612	137.310	8	3
富山	カワラハハコ	常願寺川3	36.648	137.285	13	8
富山	カワラハハコ	常願寺川4	36.686	137.279	18	4
富山	カワラハハコ	神通川1	36.442	137.082	12	10
富山	カワラハハコ	神通川2	36.614	137.184	12	8
富山	カワラハハコ	庄川1	36.582	136.991	16	8
富山	カワラハハコ	庄川2	36.628	137.000	12	7
富山	カワラハハコ	庄川3	36.675	137.004	12	7
富山	カワラハハコ	庄川4	36.729	137.037	16	8
富山	ヤマハハコ	山麓スキー場	36.574	137.428	4	3
富山	ヤマハハコ	有峰湖	36.482	137.460	12	6
滋賀	カワラハハコ	安曇川1	35.268	135.875	14	7
滋賀	カワラハハコ	安曇川2	35.353	135.921	14	7
滋賀	カワラハハコ	安曇川3	35.363	135.972	16	10
滋賀	カワラハハコ	犬上川	35.240	136.245	10	8
滋賀	カワラハハコ	愛知川1	35.082	136.330	10	6
滋賀	カワラハハコ	愛知川2	35.078	136.307	16	6
滋賀	カワラハハコ	愛知川3	35.099	136.250	16	8
滋賀	カワラハハコ	愛知川4	35.128	136.213	16	8
滋賀	カワラハハコ	愛知川5	35.169	136.197	15	7
滋賀	カワラハハコ	野洲川	35.043	136.020	8	8
三重	ホソバノヤマハハコ	三峰山	34.444	136.201	8	8

(地点情報の表GPS，個体数)

3. 実験および解析手法

3.1 DNAの抽出

各地の試料サンプリングで採取したカワラハハコの葉については、シリカゲルを用いて乾燥させ保存した。カワラハハコはその高い乾燥耐性のため、シリカゲルによる乾燥のみでは破碎が容易なほど乾燥しないため、乾燥した葉を凍結乾燥機FDU-1200(東京理科器械株式会社)に入れて12時間以上乾燥させたのち、葉を破碎し、CTAB法⁷⁾を用いてDNAの抽出を行い、TE溶液に溶解させて冷蔵保存した。

3.2 核SSR配列を用いた集団遺伝学的解析

3.2.1 研究の背景

本研究では、隣接するようなカワラハハコ集団間の遺伝的変異を検出できる変異率の高い分子マーカーが必要である。SSR(Simple Sequence Repeat ; マイクロサテライト)は短い塩基の繰り返しからなる塩基配列のことであり、これらの繰り返しは、転写・翻訳の過程で繰り返し数が増減しやすく、その多型率は多くの塩基置換率より高いという特徴がある⁸⁾。また共優性であることから、精密な遺伝解析を行ううえで適している。したがって、本研究では、SSRマーカーを用いた核DNAにおける遺伝子型の決定に基づいて集団遺伝学的解析を実施した。

3.2.2 核SSRマーカーの選定

使用する核SSRマーカーについては、前年度開発したExpressed sequence tag (EST)-SSRマーカーを用いた。先行研究⁹⁾で開発した16座のSSRマーカーに加え、同研究にて最終的に除外された8座のマーカーを加えた24座のSSRマーカーについて改めて増幅を確認し安定した遺伝子型の決定が出来るかどうか試みた。その結果5つのマーカーについても本研究の解析に加えることとした(表3.1)。

Locus Name	Primer Sequence (5' - 3')	Repeat Motif
AnaSSR_7	F: TGTTCATGTTGTAAGGAGTAGC R: TGGTCTTAGATCCTCAATCAAGTGA	(TG) ₁₄
AnaSSR_27	F: AAGGCGAGAACGGGTCAAAT R: GTGCCAGATTGACACCCAGA	(CA) ₁₂
AnaSSR_32	F: TCGTTCATGCACTATACCACA R: AGTGAACAGACGATGAGAAAGGA	(TAT) ₁₂
AnaSSR_193	F: GCACGACATCAGCAAAGCTC R: AGGTGTTTCGGGTCAACCAA	(TG) ₁₀
AnaSSR_280	F: GCAGCTACTAACAACAGACACA R: TGACATCCACGTTTTACGATCG	(TG) ₁₀

表3.1 本研究で追加されたSSRマーカー5座の詳細

3.2.3 実験手法

抽出したDNA溶液について、選定したマーカーを用いてPCR反応により増幅を行った。

PCR反応における酵素は2× Type-it Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN)を使用した．あらかじめタグ配列をつけたマーカーとそのタグに特異的に結合する4種の蛍光プライマー (FAM, VIC, NED, PET [Applied Biosystems])を使用したマルチプレックスPCRにより実施した．PCR反応は，95℃で5分間の初期熱変性の後，95℃で30秒間の熱変性，55℃で90秒間のアニーリング，72℃で60秒間の伸長を1サイクルとする反応を35サイクル行った後，60℃で30分間の最終伸長を行い，得られた産物に校正用の蛍光酵素GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 (Thermo Fisher Scientific)を加えて3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem)を用いてフラグメント解析を行った．得られたフラグメント解析の結果はGeneMapper v4.0.1(Applied Biosystems)を用いてピークの判別および遺伝子型の判定を行った．

3.2.4 集団遺伝学的解析の手法

決定した各個体の遺伝子型をもとに，地域ごとに以下のように集団遺伝学的解析を行い，集団の遺伝的特徴の検証および集団間の遺伝的な関連性の検証を行った．

まず，各集団の集団遺伝学的特性を探るため，集団ごとにアリル数，有効アリル数，ヘテロ接合度の観察値，ヘテロ接合度の期待値をGenAlEx 6.51b2¹⁰⁾を用いて算出し，各集団の遺伝的特徴を検証した．また，集団サイズの影響を考慮した遺伝的多様性の指標であるアレリックリッチネス (Allelic Richness ; A_R)をFSTAT v2.9.3.2¹¹⁾を用いて算出した．

続いて，集団遺伝構造の推定のために，STRUCTURE v.2.3.4¹²⁾を用いてベイズクラスタリングを行った．解析は，まずカワラハハコ集団のみを用いて行い，カワラハハコ集団間の遺伝構造を推定した．その後，山地性集団を含めた解析を行い，カワラハハコと山地性変種間の遺伝的交流について検証を行った．

また，各地域における集団間の遺伝子流動を評価するためにBayesAss¹³⁾を使用した解析を行った．この解析は，ある集団が周囲の集団から近年どの程度の遺伝的な影響を受けているかを定量化するもので，各集団からの遺伝的な寄与の割合を推定することで，遺伝子流動のパターンを明らかにすることができるものである．

3.3 葉緑体DNA配列を用いた集団遺伝構造解析

3.3.1 研究の背景

本研究と平行して進行中の研究過程で，カワラハハコのいくつかの集団において，葉緑体全ゲノム配列の決定を行った¹⁴⁾．その結果，同じカワラハハコ集団内の葉緑体DNAに多くの遺伝変異を蓄積した複数のハプロタイプがみられることが示唆された．葉緑体DNAの遺伝子型は種子親の遺伝子型のみが受け継がれる母系遺伝であることから，両親の遺伝子型が受け継がれる核DNAの遺伝的組成と比較することで，遺伝的交流に関するさらなる考察ができると考え，核SSRマーカーの解析で用いた集団について葉緑体DNA配列に基づく集団遺伝構造解析を行った．

3.3.2 葉緑体DNAマーカーの選定

決定した葉緑体全ゲノム配列をもとに，カワラハハコでみられる複数のハプロタイプを区別することができる複数の葉緑体DNA遺伝子間領域を選定した．そのなかで，先行研

究で開発されているユニバーサルプライマーを用いても安定的に増幅できかつ遺伝的変異の多い, *trnK-rps16*¹⁵⁾, *petL-psaJ*¹⁶⁾の2つの遺伝子間領域を選定した.

3.3.3 実験手法および解析手法

上記の2領域について95℃で5分間の初期熱変性後, 95℃で30秒間の熱変性, 55℃で30秒間のアニーリング, 72℃で60秒間の伸長のサイクルを35回行った後, 72℃で10分間の最終伸長を行うPCR反応によって配列を増幅させたのち, サンガー法による配列決定を行った. 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて配列を決定し, Mafft Online Version¹⁷⁾を用いてアセンブルを行った.

集団遺伝構造の推定には, 各個体のハプロタイプを決定した後に, TCS法¹⁸⁾に基づいてハプロタイプネットワークを作成した.

4. 集団遺伝学的解析の結果

4.1 北海道の2河川の結果

4.1.1 核SSR配列を用いた集団遺伝学的解析の結果

各集団の集団遺伝学的パラメータについては表4.1の通りとなった. A_R の値を比較すると見市川集団の最下流部の集団において, 低い遺伝的多様性がみられたが, 他のすべての集団に対して有意に低いわけではなかった(図4.1).

集団名	Na	Ne	Ho	He
見市川1	4.238	2.628	0.660	0.577
見市川2	4.238	2.783	0.644	0.588
見市川3	4.619	2.622	0.576	0.564
見市川4	3.619	2.450	0.537	0.520
鉛川1	4.524	3.047	0.627	0.609
鉛川2	4.762	2.890	0.613	0.602

表4.1 北海道2河川の各集団の遺伝的多様性パラメータ

Na; アリル数, Ne; 有効アリル数, Ho; ヘテロ接合度の観察値, He; ヘテロ接合度の期待値

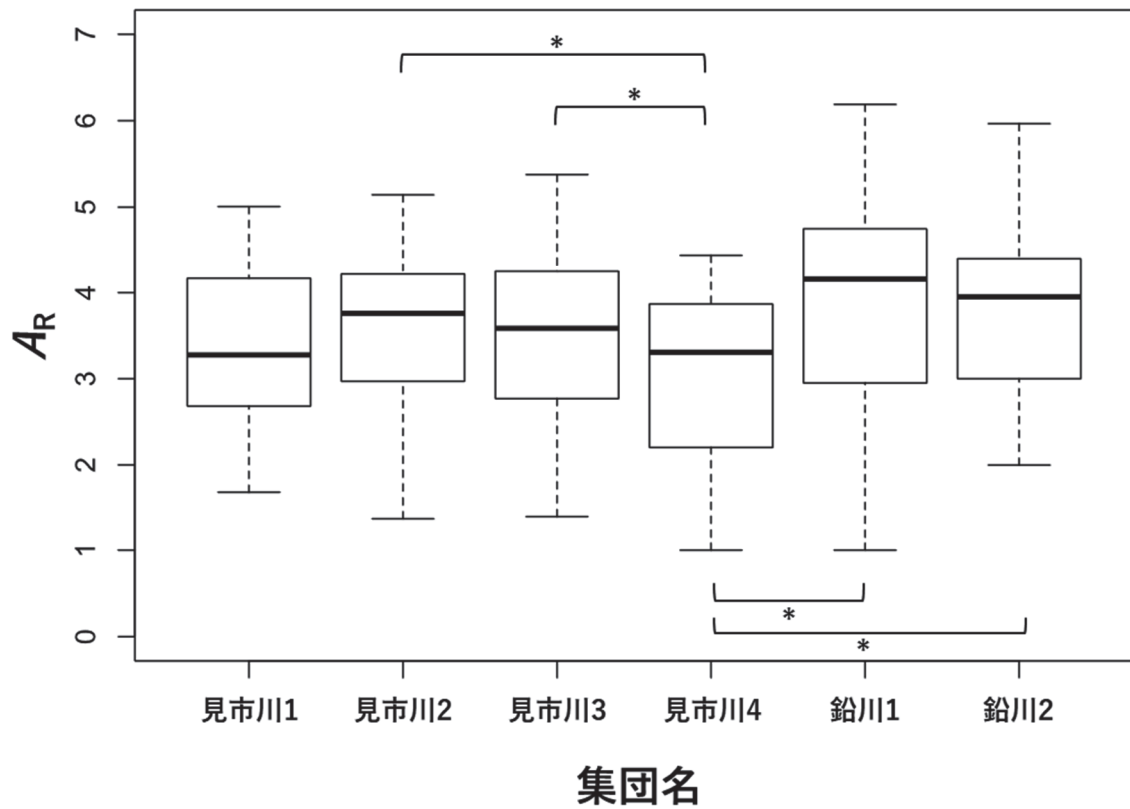


図4.1 北海道2河川の各集団の A_R を示した箱ひげ図

集団遺伝構造解析の結果では、2つの河川間ではっきりとした遺伝構造は見られなかったが、2河川間を区別する若干の傾向は見られた。山地性集団を含めた集団遺伝構造解析では、ヤマハハコ集団とカワラハハコ集団は明確に分化された。しかしながら、見市川付近の赤岳橋集団は、カワラハハコと同じクラスターが大半を占める結果となった。

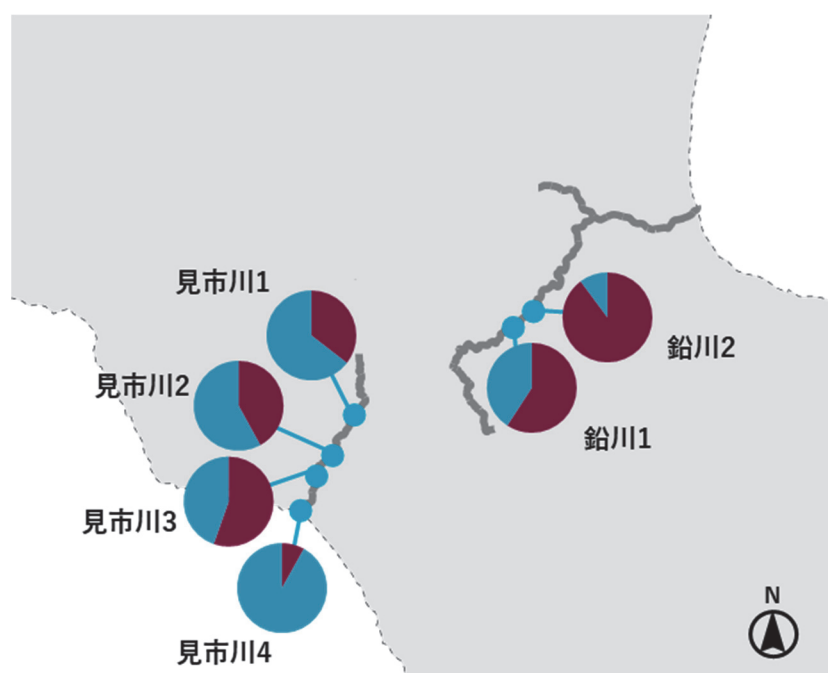


図4.2 北海道におけるカワラハハコ集団のみを用いた集団構造解析

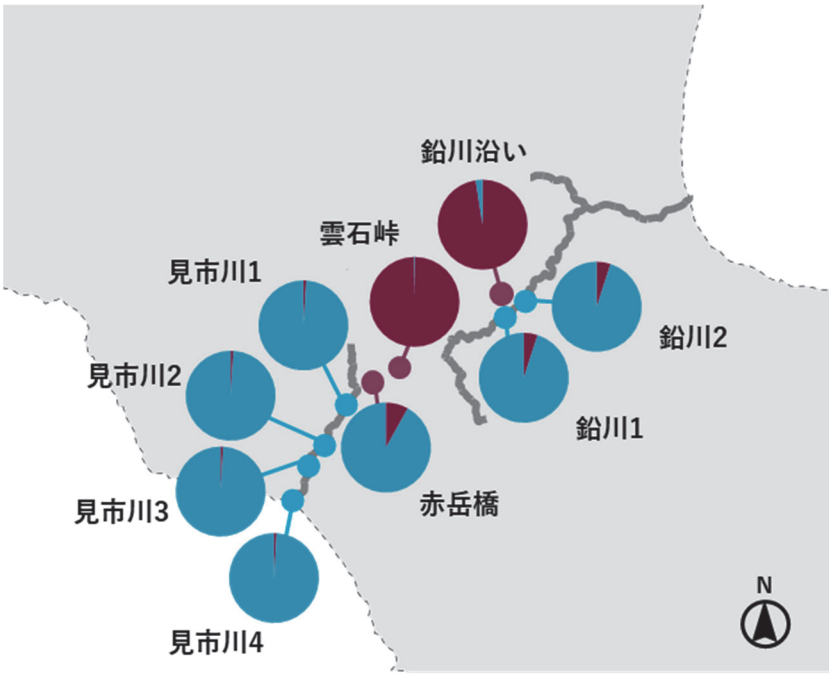


図4.3 北海道における全集団を用いた集団構造解析

集団間の遺伝子流動の推定では、見市川の最下流集団から上流集団への遺伝子流動が大きな影響を与えていることが示唆された。また、分水嶺を超えての遺伝子流動も影響を与えていることが示唆された。

流動先	流動元					
	見市川1	見市川2	見市川3	見市川4	鉛川1	鉛川2
見市川1	0.703	0.016	0.020	0.212	0.019	0.029
見市川2	0.016	0.699	0.025	0.214	0.021	0.025
見市川3	0.019	0.022	0.706	0.205	0.029	0.020
見市川4	0.044	0.017	0.045	0.696	0.186	0.013
鉛川1	0.025	0.023	0.032	0.160	0.730	0.031
鉛川2	0.025	0.019	0.060	0.052	0.039	0.804

表4.2 北海道2河川における遺伝子流動推定の結果に基づくヒートマップ

4.1.2 葉緑体DNA配列を用いた集団遺伝構造解析の結果

各個体の葉緑体DNA配列を決定した結果、2つのハプロタイプが観察された。見市川と鉛川それぞれで優占するハプロタイプが異なる結果が得られた。また、周囲のヤマハハコ集団の葉緑体DNA配列を決定したところ、鉛川のカワラハハコ集団で優占されるハプロタイプと同じもしくは、1塩基のみの違いがあるハプロタイプであることがわかった。

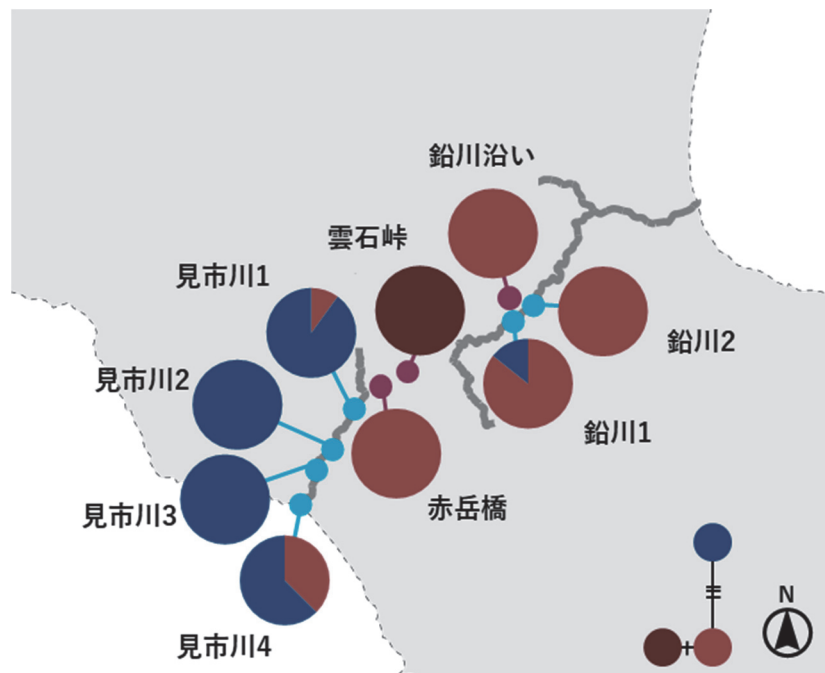


図4.4 北海道における全集団の葉緑体ハプロタイプの結果
右下のネットワーク図における横棒は塩基置換を示す

4.2 宮城県の1河川の結果

4.2.1 核SSR配列を用いた集団遺伝学的解析の結果

各集団の集団遺伝学的パラメータについては表に示した。 A_R の値を比較すると、上流から2番目の集団がほかの集団に比べ有意に低い結果が得られ(ウィルコクソンの符号順位検定, $p < 0.01$), この集団の遺伝的多様性が著しく低いことが明らかになった。したがって、この集団は、近年形成された比較的新しい集団であると考えられる。江合川のこの集団は、他集団と比べて、通常水位に近い場合、より頻繁に河川氾濫の影響を受ける可能性があるほか、周囲に礫河原環境が少ない部分であり、より孤立しやすかった可能性がある。

集団名	Na	Ne	Ho	He
江合川1	4.190	3.007	0.694	0.633
江合川2	3.048	2.269	0.597	0.508
江合川3	5.667	3.344	0.626	0.681
江合川4	5.333	3.211	0.668	0.648
江合川5	5.714	3.727	0.693	0.699
江合川6	5.238	3.722	0.643	0.705

表4.3 宮城県江合川の各集団の遺伝的多様性パラメータ

Na; アリル数, Ne; 有効アリル数, Ho; ヘテロ接合度の観察値, He; ヘテロ接合度の期待値

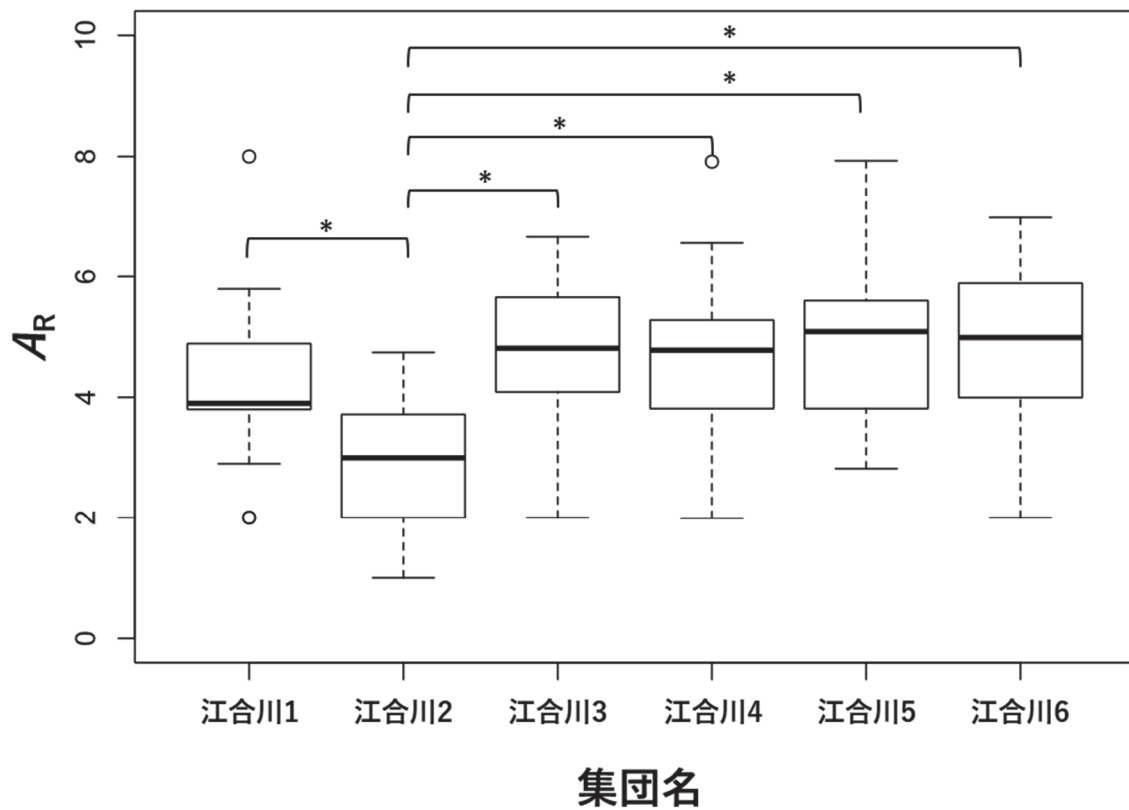


図4.5 宮城県江合川の各集団の A_R を示した箱ひげ図

集団遺伝構造解析の結果では、遺伝的多様性が著しく低かった集団のみが、固有のクラスターを形成する結果となった。したがって、比較的新しい集団は他の集団とは異なる遺伝構造を有していることが分かった。山地性集団を含めた集団遺伝構造解析では、ヤマハハコ集団とカワラハハコ集団は明確に分化された。

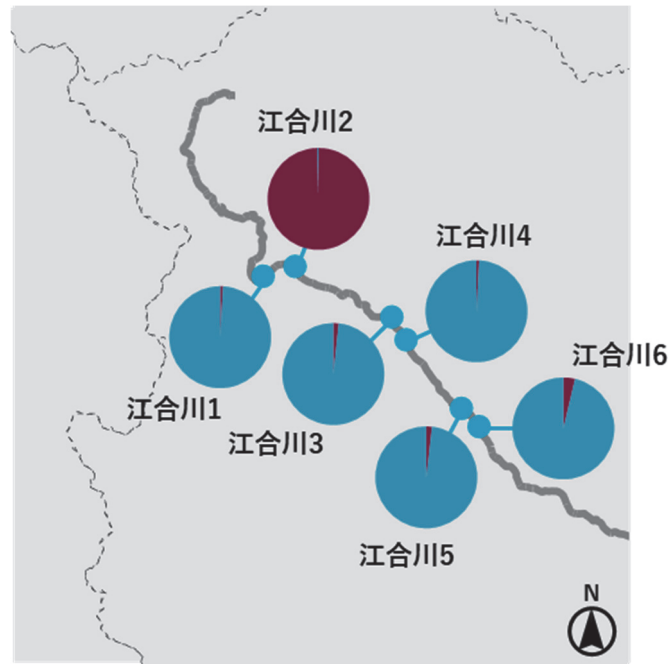


図4.6 宮城県におけるカワラハコ集団のみを用いた集団構造解析

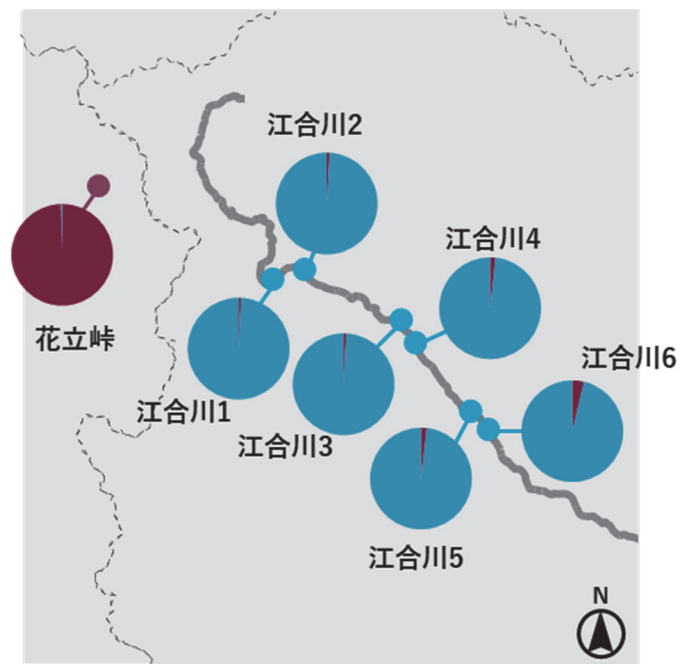


図4.7 宮城県における全集団を用いた集団構造解析

集団間の遺伝子流動の推定では、下流から2番目の集団からの遺伝子流動の影響が大きいことが示唆された。

流動元	流動先					
	江合川1	江合川2	江合川3	江合川4	江合川5	江合川6
江合川1	0.687	0.023	0.023	0.021	0.224	0.022
江合川2	0.015	0.903	0.018	0.023	0.025	0.017
江合川3	0.015	0.062	0.689	0.169	0.030	0.035
江合川4	0.015	0.029	0.042	0.800	0.086	0.028
江合川5	0.015	0.021	0.037	0.160	0.739	0.029
江合川6	0.021	0.036	0.026	0.077	0.152	0.689

表4.6 宮城県江合川における遺伝子流動推定の結果に基づくヒートマップ

4.2.2 葉緑体DNA配列を用いた集団遺伝構造解析の結果

各個体の葉緑体DNA配列を決定した結果、複数のハプロタイプが観察された。上流域では一つのハプロタイプのみにより優勢されていたが、下流域にかけて、別のハプロタイプの割合が増加する傾向がみられた。江合川の上流にあたる花立峠のヤマハハコ集団の葉緑体DNA配列を決定すると、下流域にかけてカワラハハコ集団で増加するハプロタイプとヤマハハコ集団のハプロタイプが同じであった。

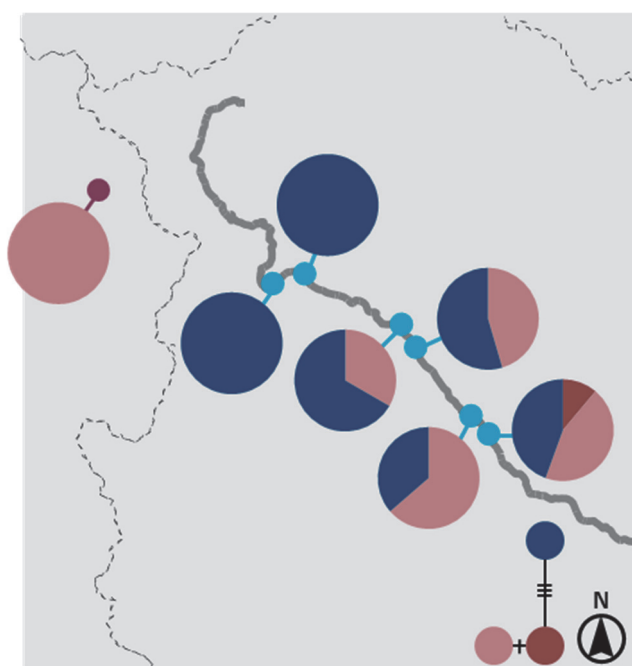


図4.8 宮城県における全集団の葉緑体ハプロタイプの結果
右下のネットワーク図における横棒は塩基置換を示す

4.3 富山県の4河川の結果

4.3.1 核SSR配列を用いた集団遺伝学的解析の結果

各集団の集団遺伝学的パラメータについては表の通りとなった。 A_R の値は、集団間で一定の差異がみられたが、有意な差は見られなかった。

集団名	Na	Ne	Ho	He
早月川1	5.095	3.348	0.577	0.666
早月川2	5.952	4.058	0.613	0.681
常願寺川1	6.286	3.932	0.623	0.665
常願寺川2	4.857	3.435	0.658	0.627
常願寺川3	6.048	3.732	0.661	0.688
常願寺川4	6.810	4.092	0.652	0.681
神通川1	5.095	3.256	0.642	0.623
神通川2	5.667	3.641	0.685	0.664
庄川1	5.762	3.307	0.661	0.653
庄川2	6.571	3.873	0.646	0.684
庄川3	5.429	3.416	0.704	0.659
庄川4	5.762	3.617	0.699	0.660

表4.5 富山県4河川の各集団の遺伝的多様性パラメータ

Na; アリル数, Ne; 有効アリル数, Ho; ヘテロ接合度の観察値, He; ヘテロ接合度の期待値

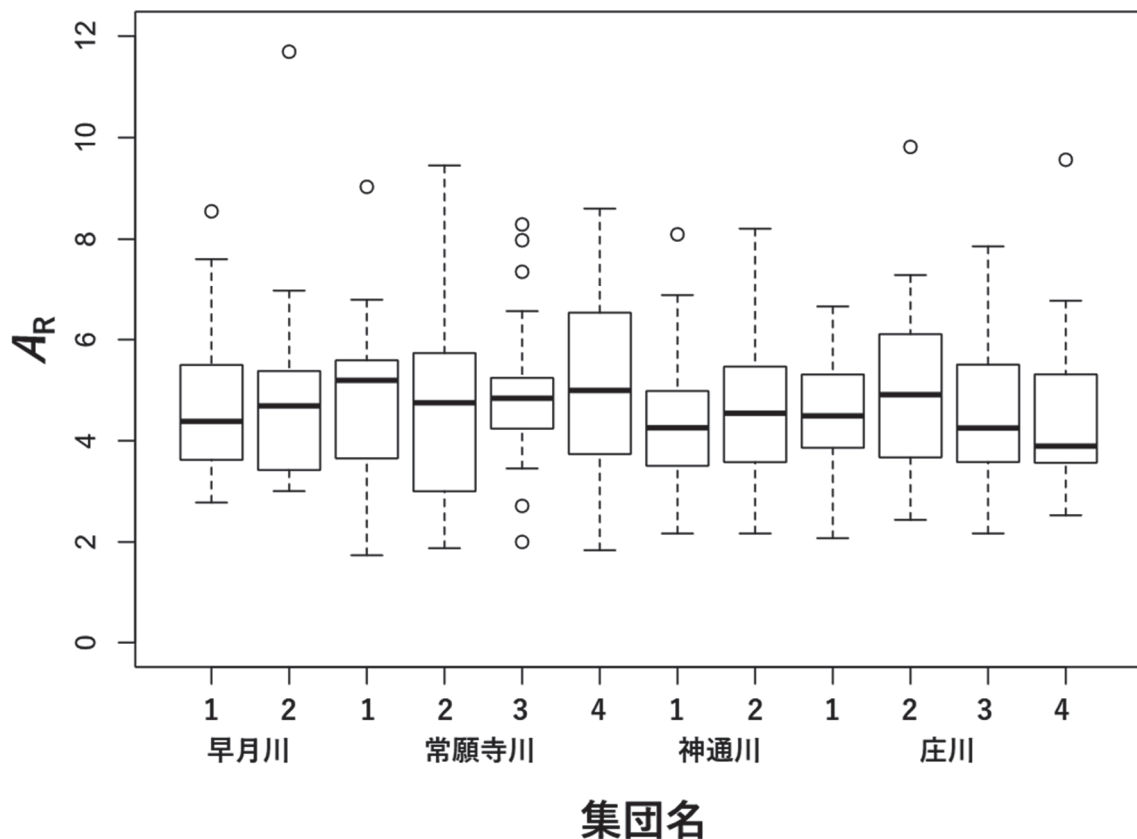


図4.9 富山県4河川の各集団の A_R を示した箱ひげ図

集団遺伝構造解析の結果から、東西で若干の分化がみられたが、明確なクラスター化はみられなかった。常願寺川上流の山地性集団を含めた集団遺伝構造解析では、ヤマハハコ

集団とカワラハハコ集団は明確に分化された。

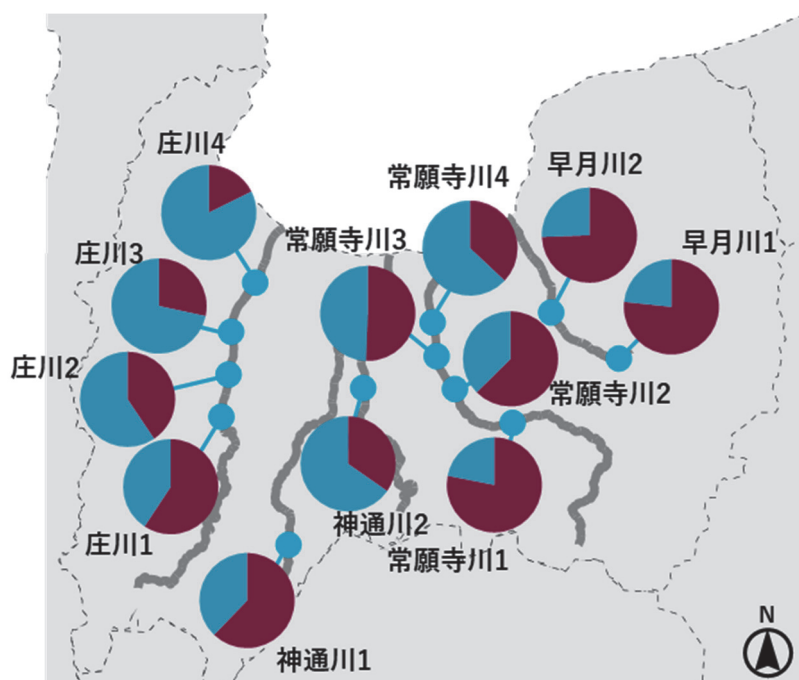


図4.10 富山県におけるカワラハハコ集団のみを用いた集団構造解析

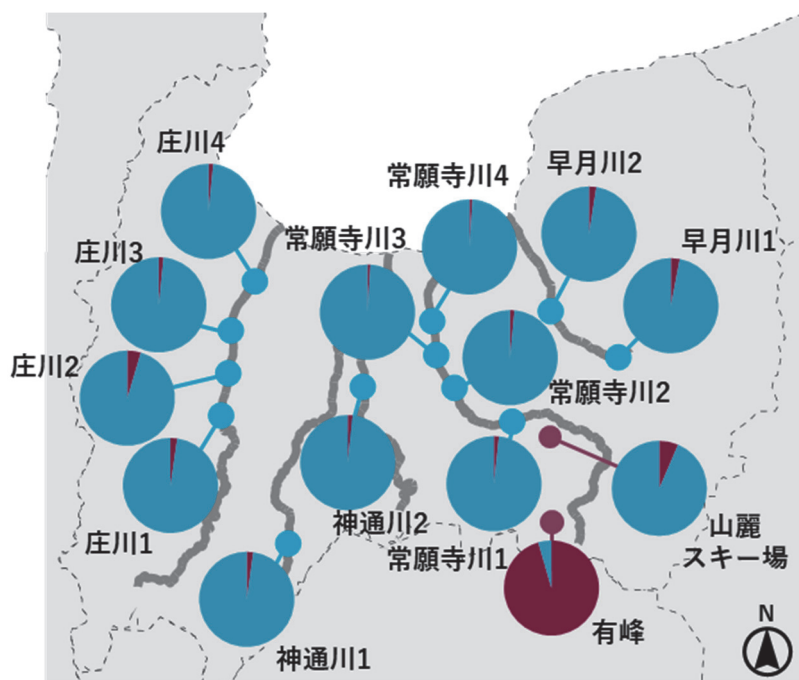


図4.11 富山県における全集団を用いた集団構造解析

集団間の遺伝子流動の推定では、河川内だけでなく河川間でも遺伝子流動の影響がみられた。特に、庄川の各集団に対して、神通川のカワラハハコ集団からの遺伝子流動が大きく影響することが示唆された。

流動元	流動先											
	早月川1	早月川2	常願寺川1	常願寺川2	常願寺川3	常願寺川4	神通川1	神通川2	庄川1	庄川2	庄川3	庄川4
早月川1	0.6958	0.108	0.0278	0.0148	0.0166	0.0349	0.0145	0.0292	0.0144	0.0146	0.0145	0.0149
早月川2	0.0137	0.6975	0.0915	0.0136	0.0224	0.0357	0.0133	0.0554	0.0138	0.0142	0.0133	0.0154
常願寺川1	0.0104	0.0153	0.8499	0.0105	0.0181	0.0213	0.0106	0.0192	0.0106	0.0112	0.0105	0.0123
常願寺川2	0.016	0.0179	0.0828	0.6981	0.0176	0.0613	0.0161	0.0258	0.016	0.0159	0.0158	0.0167
常願寺川3	0.0128	0.0244	0.0834	0.0128	0.6945	0.0634	0.013	0.0434	0.013	0.013	0.0129	0.0134
常願寺川4	0.011	0.0252	0.0459	0.0107	0.0326	0.754	0.012	0.0431	0.0112	0.0118	0.0111	0.0315
神通川1	0.0131	0.024	0.0151	0.0134	0.0138	0.1426	0.6952	0.0289	0.0137	0.0132	0.0136	0.0134
神通川2	0.0132	0.0449	0.047	0.0135	0.0155	0.0827	0.0141	0.7131	0.014	0.014	0.0134	0.0145
庄川1	0.0105	0.0111	0.0146	0.0107	0.011	0.0131	0.0109	0.1966	0.6888	0.0108	0.0108	0.011
庄川2	0.0116	0.0127	0.0163	0.0116	0.0152	0.0527	0.012	0.1434	0.0117	0.6896	0.0115	0.0119
庄川3	0.0133	0.0134	0.0289	0.0133	0.0145	0.0822	0.014	0.0874	0.0132	0.0133	0.6921	0.0134
庄川4	0.0115	0.0176	0.0217	0.0116	0.0147	0.0423	0.0117	0.1438	0.0116	0.0116	0.0115	0.6904

表4.10 富山県4河川における遺伝子流動推定の結果に基づくヒートマップ

4.3.2 葉緑体DNA配列を用いた集団遺伝構造解析の結果

各個体の葉緑体DNA配列を決定した結果、河川間でハプロタイプの組成が異なることが示唆された。また、同じ河川系内であっても、隣接する集団間で大きくハプロタイプが異なることが示唆された。ヤマハハコ集団の葉緑体DNA配列を決定すると、近隣の早月川や常願寺川では多く同じハプロタイプをもつカワラハハコがみられたが、庄川ではこのハプロタイプは観察されなかった。

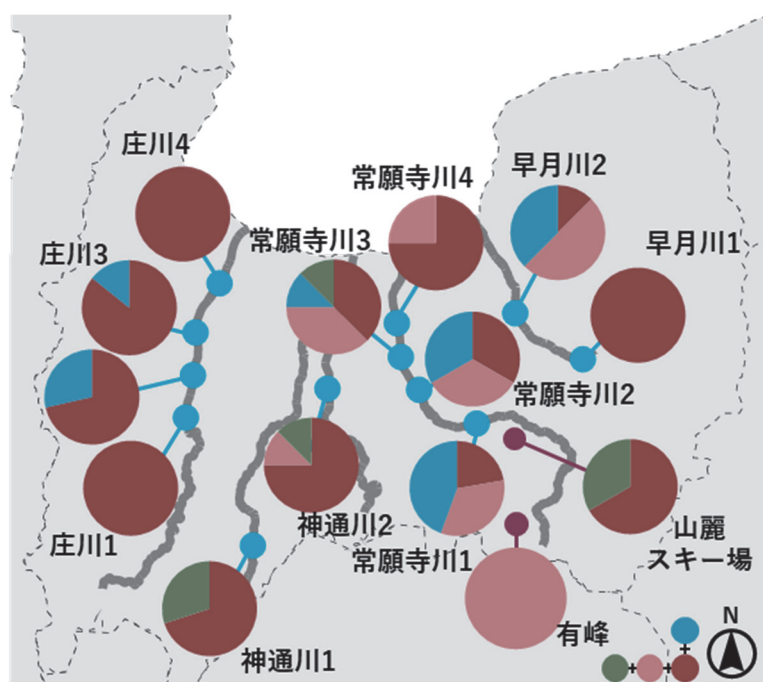


図4.12 富山県における全集団の葉緑体ハプロタイプの結果
右下のネットワーク図における横棒は塩基置換を示す

4.4 滋賀県の4河川の結果

4.4.1 核SSR配列を用いた集団遺伝学的解析の結果

各集団の集団遺伝学的パラメータについては表に示した。 A_R の値は、愛知川の上流か

ら3番目の集団が低い値を示したが、他集団と比べて有意な差異ではなかった。

集団名	Na	Ne	Ho	He
安曇川1	4.333	2.946	0.667	0.608
安曇川2	5.000	3.251	0.675	0.633
安曇川3	4.429	2.906	0.681	0.624
犬上川	4.571	3.080	0.717	0.628
愛知川1	4.476	2.947	0.640	0.600
愛知川2	5.429	3.358	0.625	0.625
愛知川3	4.524	2.638	0.635	0.564
愛知川4	5.476	3.181	0.698	0.628
愛知川5	5.143	3.432	0.659	0.646
野洲川	4.238	3.010	0.692	0.617

表4.7 滋賀県4河川の各集団の遺伝的多様性パラメータ

Na; アリル数, Ne; 有効アリル数, Ho; ヘテロ接合度の観察値, He; ヘテロ接合度の期待値

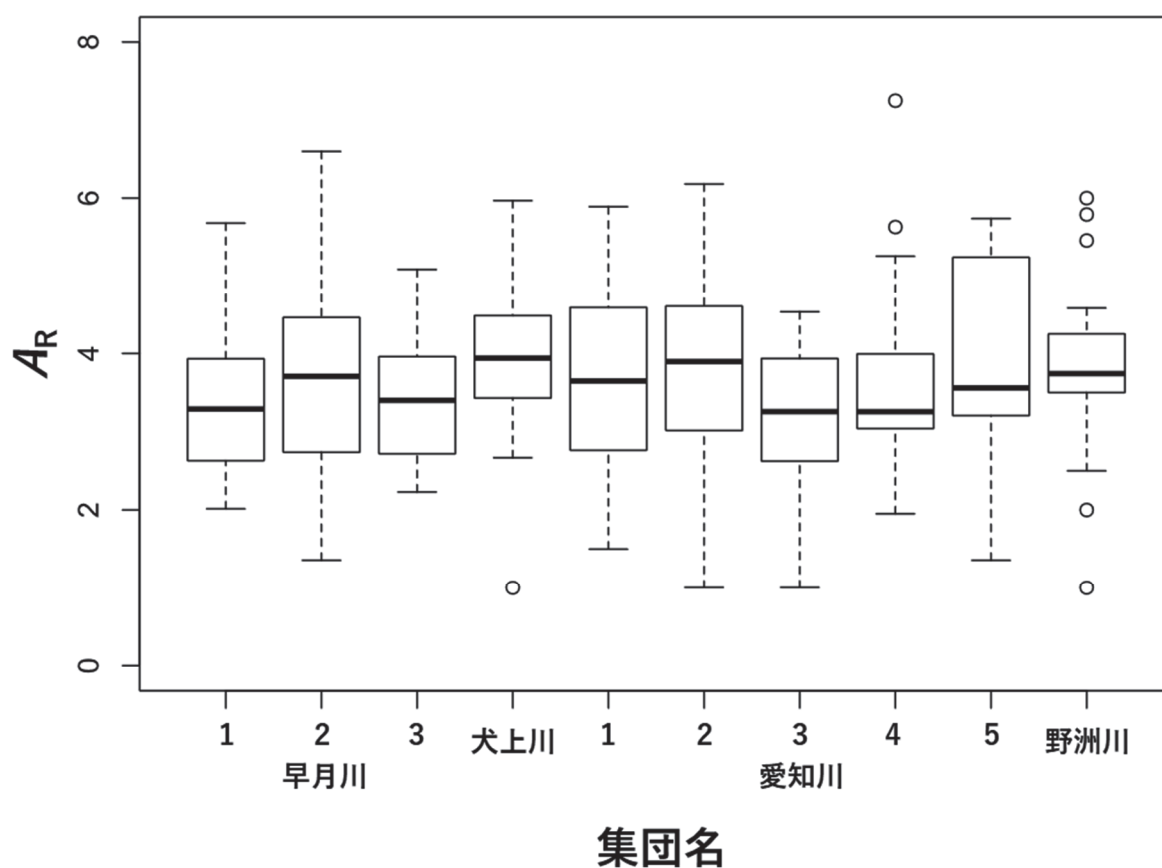


図4.1 滋賀県4河川の各集団の A_R を示した箱ひげ図

集団遺伝構造解析の結果から、湖西地域と湖東地域で異なるクラスターを形成する結果が得られた。山地性集団を含めた集団遺伝構造解析では、ホソバナヤマハコ集団と湖西カワラハハコ集団、湖東カワラハハコ集団の3つのクラスターに分化していることが示唆された。

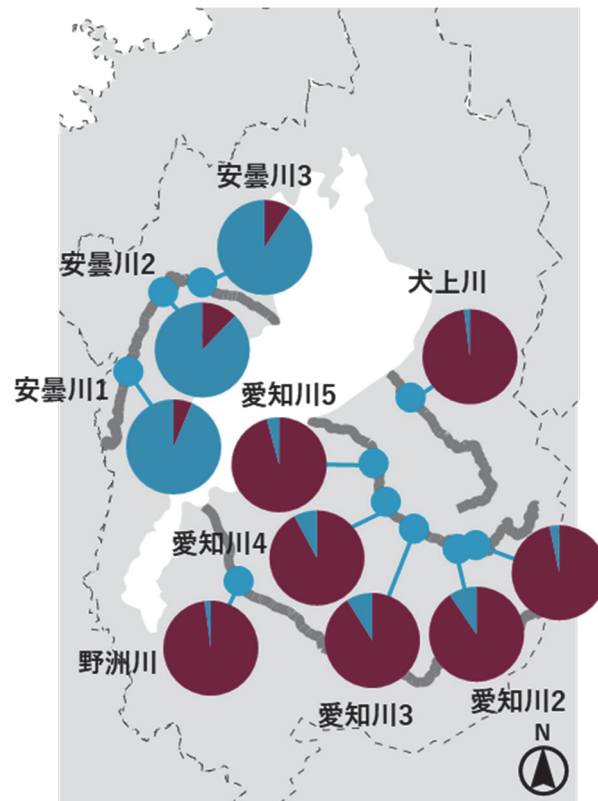


図4.14 滋賀県におけるカワラハコ集団のみを用いた集団構造解析

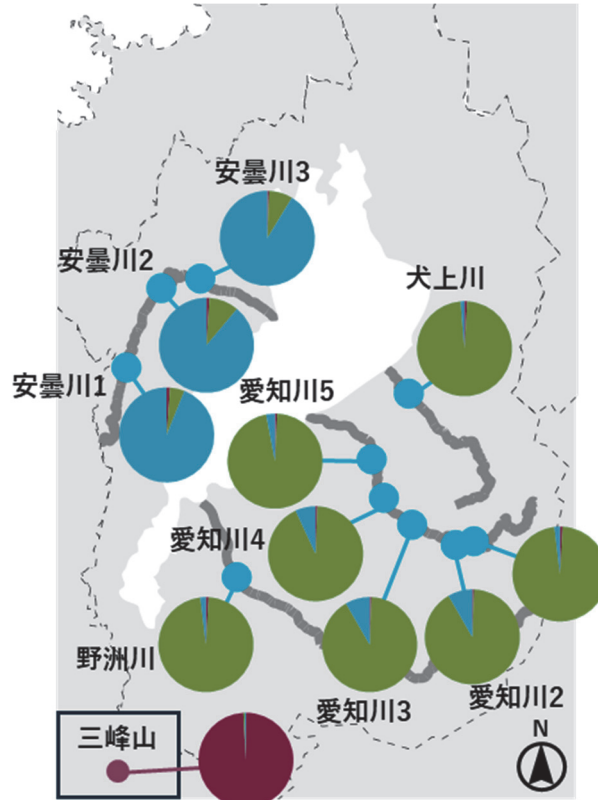


図4.15 滋賀県における全集団を用いた集団構造解析

集団遺伝構造が湖西と湖東で明確に分化したことから、集団間の遺伝子流動の推定では、湖東地域に限定して解析を行った。その結果、愛知川の下流から2番目の集団からの遺伝子流動が、愛知川の集団および、周囲の犬上川、野洲川の集団へも強く影響していることが示唆された。

流動元	流動元						
	犬上川	愛知川1	愛知川2	愛知川3	愛知川4	愛知川5	野洲川
犬上川	0.7541	0.018	0.0327	0.0235	0.1338	0.0183	0.0196
知川1	0.0168	0.7466	0.0217	0.0235	0.1543	0.0181	0.019
知川2	0.0138	0.0133	0.7635	0.0151	0.1656	0.0145	0.0141
知川3	0.0143	0.0162	0.0201	0.7879	0.1293	0.016	0.0162
知川4	0.0138	0.0135	0.0203	0.0197	0.9034	0.015	0.0142
知川5	0.0135	0.014	0.0172	0.0361	0.1756	0.7281	0.0155
野洲川	0.0225	0.0207	0.0502	0.0212	0.1153	0.0203	0.7497

表4.14 滋賀県3河川における遺伝子流動推定の結果に基づくヒートマップ

4.4.2 葉緑体DNA配列を用いた集団遺伝構造解析の結果

各個体の葉緑体DNA配列を決定した結果、全体で3つのハプロタイプが観察された。その中で、それぞれ1つのハプロタイプが湖西地域・湖東地域それぞれで固有であった。三峰山のホソバノヤマハコ集団の葉緑体DNA配列を決定すると、湖西地域と湖東地域で共通していたハプロタイプと同じハプロタイプであった。

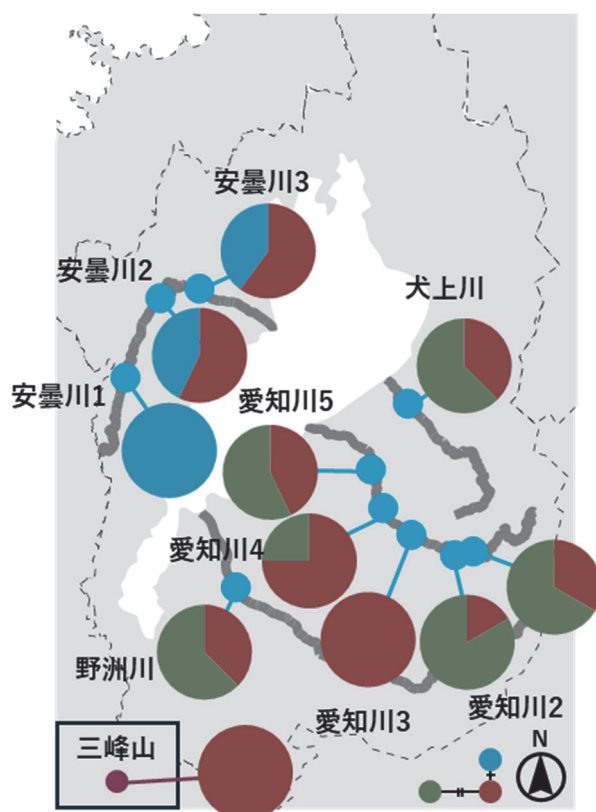


図4.16 滋賀県における全集団の葉緑体ハプロタイプの結果

右下のネットワーク図における横棒は塩基置換を示す

5. 各地域の結果に基づくカワラハハコの集団維持機構の推察

5.1 カワラハハコの集団維持機構

各地域でカワラハハコ集団の集団遺伝学的パラメータを算出したところ、宮城県・江合川で見られたように、他集団と比べて遺伝的多様性が著しく低い集団が存在することが明らかになった。したがって、カワラハハコにおける集団の急速な形成が実際に起きていることが示された。江合川の遺伝的多様性が低い集団が固有のクラスターの形成を示したように、集団の急速な形成は、他集団と遺伝的組成が大きく異なる集団の形成につながっている可能性がある。これは、集団の再形成当初の少ない個体数の状態では偶然性の影響を強く受けやすいために、頻度の高くなかった遺伝子型が集団内に急速に拡大したことによるものであると考えられる。カワラハハコ集団の形成過程ではこのような創始者効果と呼ばれる影響を受けることで、遺伝的な多型性を維持している可能性が考えられる。礪河原の消失と形成が繰り返されることで、カワラハハコにとって創始者効果の影響を受ける機会は増加すると考えられる。そのことから、カワラハハコ集団は偶然性の影響がより強くある可能性がある。

集団遺伝構造解析の結果を見ると、同一河川内の集団間や、物理的障壁の少ない平野の河川間では遺伝的交流が存在し、遺伝的分化は小さいことが示唆された。したがって、カワラハハコのメタ個体群は、各河川全体や隣接する河川を含んだ複数の河川で形成されるものであると考えられる。また、北海道の2河川間での遺伝的交流が存在することが示唆されたように、分水嶺となりうる山地も遺伝的分化をもたらすような物理的障壁としては機能しにくいのかかもしれない。一方で、琵琶湖に隔てられた湖西地域と湖東地域においては、異なるクラスターを形成することから、琵琶湖のように大規模な物理的障壁は河川間の隔離機構として強く機能しているものと考えられる。

また、集団間の遺伝子流動の検証の結果、遺伝子流動は隣接する集団にとどまらず、一定の距離の集団間にも影響していることがわかった。さらに、異なる河川の集団間であっても遺伝子流動が強く影響することがあることがわかった。今回対象とした河川では、特定の集団が、周囲の集団に大きく影響を与えるという共通した遺伝子流動パターンを示した。さらに、周囲に大きく影響する流動元となる集団が下流域に多い傾向が見られた。これは、下流域のほうが、川幅が広がり礪河原となりうる河床や河岸が大きくなるため、より大規模な集団が形成されやすいことや、河川氾濫の規模や頻度が少なく、影響を受けにくいことによるものであると考えられる。ただし、多くの地域で流動元となっていた集団は、最下流部の集団ではなく下流部から2番目の集団であった。これは、河川の河口域に近づくと、流れが穏やかになるため砂礫の供給が少なくなり、礪河原が発達しづらいことが原因であると考えられる。唯一、最下流部の集団が流動元となっている北海道・見市川は、礪河原が河口付近まで存在しており最下流部まで砂礫の供給が十分にあるために、最下流部の集団であっても安定的であるため、最下流部の集団が流動元として機能することができた可能性がある。

また、いくつかの地域では、山地性集団のなかにカワラハハコと同じクラスターに分類される集団が存在した。これらは、北海道における河川沿いの道路沿いの斜面や、富山県における河川上流のスキー場といった本来山地性変種が生育する環境の集団であった。このような例は本研究におけるサンプリングの過程で今回解析に含めなかった他河川周辺でも観察され、周辺道路のアスファルトの隙間や、砂利敷の駐車場のような環境でもカワラハハコは生存できることが示唆された。

5.2 山地性変種との関係や葉緑体DNAにおける遺伝的多型

山地性の変種であるヤマハハコおよびホソバノヤマハハコを含めた集団遺伝構造解析では、いずれの地域においても、カワラハハコは山地性変種集団と明確に異なるクラスターを形成した。このことから、カワラハハコと山地性変種との間における、近年の遺伝的交流は非常に限定的であると考えられる。

すべての地域のカワラハハコ集団においても複数の葉緑体DNAハプロタイプがみられた。これらのハプロタイプ間には複数の塩基置換が見られたが、各ハプロタイプの中間的なタイプは見られなかった。また、いずれの地域においても、カワラハハコで見られた複数のハプロタイプのうちのいずれかが、近隣の山地性変種集団のハプロタイプと同じものであった。

このような葉緑体DNAの遺伝的組成をもたらした要因として、一方向性の遺伝子流動によってもたらされる葉緑体捕獲とよばれる現象の可能性がある。具体的には、山地性変種の種子が礫河原環境へと分散し、その後周囲のカワラハハコとの交雑を繰り返しながら山地性変種種子由来の個体数が増えた結果、母性遺伝する葉緑体DNAのハプロタイプはヤマハハコと同じハプロタイプを維持しながらも、核DNAの遺伝子型は徐々にカワラハハコと同様の遺伝子型へと変化した可能性が考えられる。ただし、カワラハハコにおいて山地性変種の葉緑体捕獲が起こっている場合であっても、これらの間の遺伝的交流は限定的であり、葉緑体捕獲は頻繁に起こっていないものと考えられる。そのため、山地性変種の種子は、礫河原環境が新たに形成された際に偶発的に分散したもので、創始者効果の影響で山地性変種由来のハプロタイプが集団内に一斉に広がったことで、カワラハハコ集団において維持されていると考えられる。

カワラハハコの葉緑体DNAにおける遺伝的多型も創始者効果によって維持されてきた可能性がある。そのことから、その効果を受ける機会が多いと考えられるカワラハハコでは、多型性の高い特殊な葉緑体DNA組成が維持されているものと考えられる。

5.3 今後の課題やカワラハハコおよび礫河原環境の保全に対する知見

カワラハハコ集団において、近年消失後に形成されたとされる集団が見いだされたことから、礫河原環境は安定的な環境ではないことを本研究では遺伝的アプローチから証明することができた。このような新形成集団の遺伝的多様性は著しく低く、これらの集団が安定的に維持されるには周囲の集団からの遺伝子流動が重要であると考えられる。そのため、河川の一部のみではなく水系全体の礫河原集団の保全が非常に重要である。特に、遺伝子流動に大きく貢献するのは下流部の集団であるが、砂礫の供給が不十分になれば、本来安定的であるはずの下流部集団が不安定な環境となってしまう可能性がある。そのた

め、砂礫の供給に関連する河道工事などは下流の礫河原環境に与える影響について深く検証し理解したうえで実施されるべきであると考えられる。

本研究からは下流域の集団が周辺集団への流動元として機能するという集団維持機構において重要な役割を負っている可能性を示唆した。周辺集団に流動元として機能する集団のパターンについてより詳細に理解するにはさらなる検証が必要であると考えられる。本研究で唯一、最下流部の集団が流動元となっていた見市川のように河口付近まで礫河原環境が存在する河川は、北海道ではしばしば見られるが、本州以南においては、新潟県姫川などの例外を除きほとんど見られない。そのため、今後は姫川のカワラハハコ集団についても追加研究を行い、カワラハハコの集団維持機構において多くの周辺集団へと影響を与える流動元集団のパターンについて詳しく検証する必要がある。

また、礫河原環境に縛られないカワラハハコの保全というプロセスについても考慮する必要があるかもしれない。本研究では、一部の地域で礫河原環境以外の環境に生育するカワラハハコ集団が見られたように、カワラハハコの生育環境は礫河原環境のみに限定されていない。これまでも礫河原環境に生育する植物の一部は礫河原環境以外の環境にも生育することが知られていた¹⁾。今回カワラハハコ集団が観察された環境は従来知られていたものを超越し、カワラハハコは植被率の低い人工的な環境へと進出していることが示唆された。礫河原環境が人間活動の高まりとともに脆弱になるなかで、周辺の人工的環境は礫河原の植物が集団を維持するうえで重要であった可能性がある。そのため、時として、礫河原環境以外の退避地についても考慮しておくことも保全策の一つとなる可能性が考えられる。ただし、礫河原環境に生育する植物にはカワラノギクやカワラニガナのようにあくまで、礫河原環境のみに生育する植物も存在する¹⁾。そのため、優先されるべきは礫河原環境をどのようにして維持していくのかであることを忘れてはならない。

礫河原環境を保全するうえで、集団が一度消失し再形成される過程で生じる影響についても理解をしておく必要がある。本研究の結果から、カワラハハコ集団の形成時における創始者効果が、周囲と異なる遺伝構造を持つ集団の形成や、複数のハプロタイプの維持に貢献したりしている可能性が示唆された。そのため、礫河原環境に生育する植物を保全するうえでは、礫河原環境を完全に保全するのではなく、時として集団が消失したりすることを許容することが必要になるかもしれない。そのため、必要最低限の集団のみが維持されればよいのではなく、集団の減少や消失が起きてもメタ個体群として機能できるだけの集団が維持されていることが重要である。人間活動が礫河原環境を必要数以上に減少させることが、これらの遺伝的な多型性の喪失につながることを念頭においた保全策を講じることが重要である。

頻繁な環境の消失と形成が、創始者効果によって遺伝的多型の維持に貢献している可能性を示したことは、集団遺伝学的にも非常に価値のある結果であると考えられる。この結果により、礫河原環境がより着目されることになれば礫河原環境に対する理解は急速に高まるものと期待される。今後は、創始者効果の影響をより詳細に検証するために、長期のモニタリングやより高密度のサンプリング、より高解像度の遺伝解析を行っていくことが重要になると考えられる。

6. まとめ

本研究では、礫河原環境に生育するカワラハハコを対象とした集団遺伝学的解析を行い、カワラハハコがどのようにして集団を維持しているのかについて検証し、礫河原環境の保全策を考えるうえで重要な知見を得ることを目的とした。北海道、宮城、富山、滋賀の4地域を対象に行った解析の結果、遺伝的多様性が著しく低い新しく形成された集団の存在が示され、それらの集団が創始者効果によって、周囲とは異なる遺伝的組成を有していることが示唆された。また、集団間の遺伝子流動は、隣接する河川間でも存在し、下流域の集団が周囲の集団の流動元として機能するという遺伝子流動パターンを見いだした。礫河原環境近くの山地性変種は、カワラハハコと近年遺伝的交流はほとんどなかったと推定されるが、種子分散による葉緑体捕獲という形で、カワラハハコの葉緑体DNAの遺伝的多型に貢献している可能性がある。以上の結果から、カワラハハコは礫河原環境の消失と形成とともに、集団の消失と形成を繰り返しており、河川内もしくは隣接する河川からの遺伝子流動が発生していると考えられる。

これらの成果は、礫河原環境に生育する植物が頻繁に集団の形成を起こしていることを遺伝学的アプローチから示した数少ない研究例の一つであると考えられる。また、本研究で明らかになったカワラハハコの遺伝的多型は頻繁な集団の消失と形成が植物集団に与える影響について新たな知見をもたらすものである。これらの成果が近年減少傾向にある礫河原環境に対する注目度を上昇させ、さらなる研究の発展とそれに伴う保全活動の高まりが期待される。

7. 謝辞

本研究は河川基金の支援によって実施できたものであり、助成を決定してくださった公益財団法人河川財団様には深く感謝申し上げます。また、本研究全般にわたり、東北大学学術センターの牧雅之教授には、多大なご協力をいただきました。また、本研究の実施にあたり、東北大学植物園の皆様には、多くのご助力をいただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

8. 参考文献

- 1) 倉本宣, 本田裕紀郎, & 八木正徳. (2000). 丸石河原固有植物と多摩川におけるその生育状況.
- 2) 倉本宣. (2019). 礫河原固有植物の生育地としての多摩川. 日本緑化工学会誌, 44(3), 502-506.
- 3) 村中孝司・鷺谷いづみ(2001)鬼怒川砂れき質河原の植生と外来植物の侵入. 応用生態工学, 4(2), 121-132.
- 4) 浅見佳世, 中山昭彦, 川谷健, & 藤田一郎. (2013). 揖保川中流カワラハハコ群落成立地の植生学および水理学的考察. 土木学会論文集 B1 (水工学), 69(4), I_1339-I_1344.
- 5) 赤松弘治, 浅見佳世, 田村和也, & 福井聡. (2007). 円山川浅倉地区におけるカワラハハコ個体群の生育立地.

- 6) 浅見佳世, 赤松弘治, & 菅村定昌. (2011). 円山川におけるカワラハハコ群落の 19 年間の動態. 人と自然, 22, 33-41.
- 7) Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin.
- 8) Hardy, O. J. (2003). Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation - by - distance processes using dominant genetic markers. Molecular Ecology, 12(6), 1577-1588.
- 9) Hoson, T., Murakami, S., Ito, T., & Maki, M. (2023). Development and characterization of expressed sequence tag-simple sequence repeat markers for *Anaphalis margaritacea* var. *yedoensis* (Asteraceae). Genes & Genetic Systems, 98(5), 259-265.
- 10) Peakall, R., and Smouse, P. E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes 6, 288–295.
- 11) Goudet, J. (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. J. Hered. 86, 485–486.
- 12) Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.
- 13) Wilson, G. A., & Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. Genetics, 163(3), 1177-1191.
- 14) Hoson, T., Ito, T., & Maki, M. (2022). The complete chloroplast genome sequence of *Anaphalis margaritacea* var. *yedoensis* (Asteraceae) and phylogenetic relationships within Gnaphalieae. Mitochondrial DNA Part B, 7(3), 563-565.
- 15) Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. American journal of botany, 94(3), 275-288.
- 16) Prince, L. M. (2015). Plastid primers for angiosperm phylogenetics and phylogeography. Applications in Plant Sciences, 3(6), 1400085.
- 17) Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Briefings in bioinformatics, 20(4), 1160-1166.
- 18) Clement, M., Posada, D. C. K. A., & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular ecology, 9(10), 1657-1659.

- 助成事業者紹介

氏名：保尊 大志

現所属：東北大学大学院生命科学研究科