

## 小笠原諸島弟島で確認された絶滅危惧種オガサワラグワの実生の遺伝的評価

大谷雅人・那須仁弥・生方正俊（森林総研林育セ）・坂下智宏（東京都小笠原支庁）・福寿兼央・島田律子・熊本舞子・後藤雅文（東京都レンジャー）・脇山成二（自然環境研究セ）・板鼻直栄（森林総研林育セ西表）

**要旨：**オガサワラグワは小笠原諸島の固有樹種であるが、母樹の生育密度の低下や外来樹種であるシマグワとの交雑のため、父島と母島においては種子繁殖による更新が困難な状況に陥っている。しかし、弟島においては、近年、形態的特徴からオガサワラグワである可能性が高いと推測される実生が相次いで確認されている。これらの実生集団がもつ保全上の意義を評価するため、フローサイトメトリーによる倍数性の確認と SSR マーカーを用いた遺伝解析を行った。フローサイトメトリーの結果、2012 年度に確認された実生のうち 1 個体が 2 倍体のシマグワ、残る 14 個体が 4 倍体のオガサワラグワであると判断された。遺伝的特性としては、弟島のオガサワラグワ実生が保持する遺伝的変異のレベルは同島の成木に比べてやや低下しているものの、その差は有意ではないこと、STRUCTURE 解析により明らかにされた遺伝構造も世代間で似通っていることが明らかにされた。以上の知見から、弟島は今後オガサワラグワの更新が期待される貴重な自生地であると考えられる。

**キーワード：**遺伝的多様性、絶滅危惧種、倍数性分析、保全、マイクロサテライト

**Abstract:** *Morus boninensis* is an endemic tree species in Bonin (Ogasawara) Islands. Due to low density of remnant trees and frequent hybridization with an introduced species, *M. australis*, seedling recruitment of the species is very rare in Chichi-jima and Haha-jima Islands. The only exception is Ototo-jima Island, where a number of *Morus* seedlings have been identified as presumably *M. boninensis* based on their morphological traits. In order to assess their significance for the conservation of *M. boninensis*, we used the following two approaches. Firstly, ploidy levels of 15 seedlings were measured by flow cytometry. Fourteen seedlings were revealed to be tetraploid *M. boninensis*, while the other one was diploid *M. australis*. Secondly, genetic diversity and genetic structure were examined for six SSR loci in the seedlings and adult trees of *M. boninensis*. The seedlings exhibited slightly lower levels of genetic variation than the adult trees in Ototo-jima Island. The STRUCTURE analysis demonstrated that the seedlings and adult trees in the island were genetically similar to each other. Our findings may indicate a potential for successful, self-sustaining seed reproduction of *M. boninensis* in Ototo-jima Island.

**Keywords:** conservation, endangered species, genetic diversity, microsatellites, ploidy analysis

## I はじめに

オガサワラグワ (*Morus boninensis*) は小笠原諸島の弟島、父島、母島の限られた地域にのみ分布するクワ科の高木である。かつては同諸島の湿性高木林の主要構成樹種のひとつであったが、明治期以降の伐採により、個体数・生育密度の低下が著しい(8)。2003 年の推定残存個体数は、植栽も含めて約 170 個体、死亡率は 0.56～3.56%/年であった(10)。最大の自生地であった母島ではその後も衰退が進み、2012 年までに当時の残存個体の約 3 分の 1 が枯死した(6)。こうした危機的な現状から、本種は環境省の第 4 次レッドリストにおいて絶滅危惧 IA 類 (CR) に指定されている(3)。小笠原諸島の在来高木種の中では最も高い絶滅リスクに晒されている種の

ひとつであり、積極的な保全・再生戦略の構築がもてられている。

オガサワラグワの再生において最大の障壁となりうる要因のひとつが、外来樹種による負の影響である。小笠原諸島には戦前に養蚕のために導入された近縁種であるシマグワ (ヤマグワ, *M. australis*) が逸出・定着しており、とりわけ父島と母島には多数の個体が生育している。オガサワラグワとシマグワは容易に交雑可能であるため、両島に残存するオガサワラグワ成木が生産する種子の多くが雑種であることが分かっている(10)。また、本種の本来の生育地である湿性高木林では外来の高木種であるアカギ (*Bischofia javanica*) が他の在来樹種を差し置いて優占しており(8)、とりわけ母島では高密度の

Masato OHTANI, Jin'ya NASU, Masatoshi UBUKATA (Forest Tree Breeding Center (FTBC), Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), 3809-1 Ishi, Hitachi, Ibaraki 319-1301), Tomohiro SAKASHITA, Kaneo FUKUJU, Ritsuko SHIMADA, Maiko KUMAMOTO, Masafumi GOTO (Ogasawara Branch Office, Tokyo Metropolitan Islands Public Health Center, Nishi-machi, Chichi-jima, Ogasawara, Tokyo 100-2101), Seiji WAKIYAMA (Japan Wildlife Research Center, 3-3-7 Koutoubashi, Sumida-ku, Tokyo 130-8606), Naoei ITAHANA (Iriomote Tropical Tree Breeding Technical Garden, FTBC, FFPRI, Komi, Taketomi, Okinawa 907-1432), Conservation implications of *Morus boninensis* seedlings recently found in Ototo-jima, Ogasawara Islands

群落を形成している(7)。母島桑ノ木山における植栽試験により、オガサワラグワの幼苗の成長には良好な光環境条件が必要であることが示唆されているが(生方・板鼻私信)、アカギによる被陰のため、自然条件下での実生の定着はきわめて困難であると推測される。

以上のような要因により、父島と母島の残存個体の周辺で純粋なオガサワラグワの実生が観察されることは稀である。しかし、弟島ではシマグワの成木の生育は確認されており、アカギについてもほぼ根絶されていることから(9)、種子繁殖を通じたオガサワラグワの更新が期待できる条件が揃っている。実際、同島においては、特にノヤギの駆除事業が開始された2008年度以降、葉に欠刻がないことからオガサワラグワと推測される実生の発生が相次いで報告されている(図-1A)。その一方で、近年、鳥類等による散布によって他島から侵入したと推測されるシマグワの実生の出現も確認されている(図-1A, 1C)。後述のように形態的特徴のみにもとづくクワ属実生の種識別には限界があるため、オガサワラグワと判断された実生の中にシマグワや雑種が含まれている可能性は否定できない。

オガサワラグワは、シマグワの2倍のDNA量をもつ4倍体( $2n=56$ )である(4)。そこで本研究では、弟島のクワ属の実生集団に対する種同定の正確性を検証するため、フローサイトメトリーによる核DNAの相対量の推定を行った。さらに、SSRマーカーを用いた分析によって実生集団が保持する遺伝的変異を成木と比較することで、それらの保全上の意義の評価を試みた。

## II 方法

1. 調査地の概要 弟島のオガサワラグワ自生地は、北部の広根山(標高191m)山麓の西向き斜面(図-1A)と、その南方の尾根筋(図-1B)の2ヶ所である。前者の自生地においては2003年度に実施された網羅的な踏査によって35個体の成木が記録され、そのうち29個体は2012年度においても生存が確認されている(12)。後者の自生地では、近年になって成木1個体が孤立して生育していることが確認された。

2. 試料の採取 2012年12月および2013年2月に広根山西麓を踏査したところ、形態的特徴からオガサワラグワである可能性が高いと推測される実生21個体が確認された。そのうち15個体から葉1~2枚を採取した。残る7個体は植物体サイズが小さく、試料の採取によって個体の生存に負の影響が生じることが懸念されたため、分析対象から除外した。既往研究(10)で未解析の広根山南方のオガサワラグワ孤立木(図-1B)から

も同様の試料採取を行った。

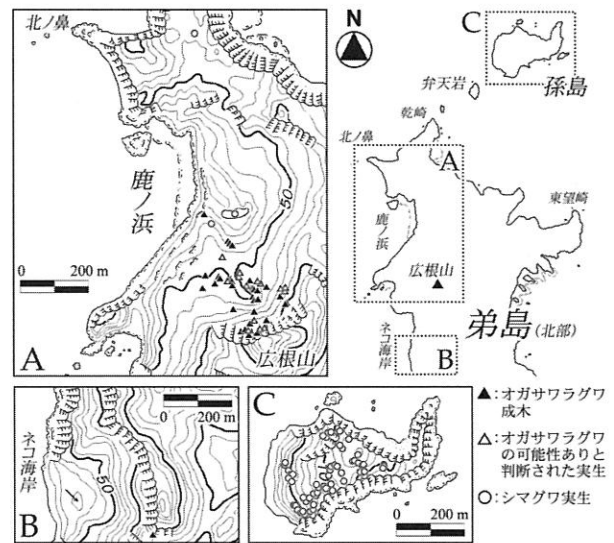


図-1. 弟島と孫島におけるクワ属植物の分布  
Fig. 1 Distribution of *Morus* spp. in Ooto-jima and Mago-jima Islands

3. フローサイトメトリーによる核DNAの相対量の推定 葉試料から長さ5mm程度の葉柄を切り出し、Nuclei Extraction Buffer (Partec) 200  $\mu$ Lを加えるとともにカミソリで細断した。ナイロンメッシュで夾雑物をろ過したのち、1,000  $\mu$ LのDAPI Staining Buffer (Partec)を加え、PA Ploidy Analyser (Partec)を用いて各試料の核内の相対的なDNA量を計測した。さらに、弟島産の実生と比較するために、林木育種センター(茨城県日立市)で系統保存されているオガサワラグワ成木(4倍体)と同構内に自生しているシマグワ成木(2倍体)についても、同様の計測を行った。

4. SSRマーカーによる遺伝子型の決定 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて、弟島の個体の葉柄からDNAを抽出した。オガサワラグワで開発済みのSSRマーカー(11)のうち6遺伝子座(Mos0008, Mos0031, Mos0050, Mos0157.1, Mos0288, Mos0340.2)を用いて、抽出DNAのPCRを行った。PCR増幅にはQIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN)を用い、forward側およびreverse側のプライマーの最終濃度はそれぞれ0.2  $\mu$ Mとした。PCRの反応条件は上記キットの推奨条件に従った。PCR産物をABI PRIZM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で電気泳動し、GeneScan (Applied Biosystems)を用いてそれぞれの対立遺伝子に対応するPCR産物の長さを推定し、各個体の遺伝子型を決定した。

5. SSRのデータ解析 各島の成木の遺伝子型は、共通のマーカーセットを用いた先行研究で決定済みである(10)。2003年度に弟島に生残していたと推測される成木36個体、

2012年度に生残が確認された成木30個体、本研究において純粋なオガサワラグワと判定された実生のそれぞれについて、サンプル数の違いによるバイアスを補正したAllelic richness( $I$ )を表計算ソフトにより算出した。同様に、ヘテロ接合度の期待値 ( $H_{E,C}$ ) をATetra Version 1.2.a(13)を用いて算出した。さらに、各島の成木個体と弟島のオガサワラグワ実生を対象として、STRUCTURE 2.3.3(5)を用いた個体のグループ分けを行った。対象個体が1~10のグループ(クラスター)に由来すると仮定し、それぞれの場合についてマルコフ連鎖モンテカルロシミュレーション (burn-in periodおよびその後の反復数はともに100,000回) を8回ずつ行った。 $\Delta K$ 統計量(2)にもとづき、遺伝構造を最もよく説明するクラスターの数 ( $K$ ) を推定した。

III 結果と考察

1. 実生の種同定の正確性 弟島産のクワ属実生のうち1個体 (No. 509) の核DNAの相対量はシマグワ成木と同程度であったが、No.509以外の実生の核DNAの相対量はオガサワラグワ成木と同程度であった (図-2)。したがって、No. 509はシマグワ、その他の実生14個体は純粋なオガサワラグワであると推測された。

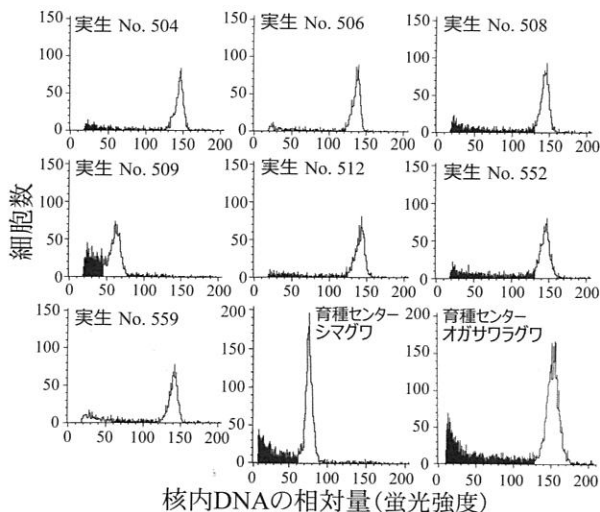


図-2. クワ属実生の倍数性識別のためのフローサイトメトリーの結果の一例

Fig. 2 Examples of the results of flow cytometry for ploidy identification of *Morus* seedlings

種同定の正解率は約93% (14/15) であり、外部形態によってもおおよその識別が可能であることが示された。しかし、サイズの小さな実生では識別形質が鮮明に現れていないことも多い。例えば、シマグワの葉身には通常、明瞭な欠刻が生じるが、No. 509の葉には切れ込みは認められなかった (図-3)。このような場合、本研

究のような倍数性分析が種識別において有効なツールになると考えられる。

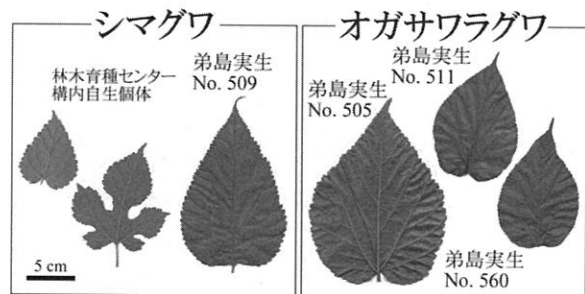


図-3. シマグワとオガサワラグワの実生の葉の形態  
Fig. 3 Leaf morphology of *M. australis* and *M. boninensis*

2. 実生の遺伝的特性 弟島のオガサワラグワについて、遺伝的多様性を示す統計量を算出した結果を表-1に示す。Allelic richness,  $H_{E,C}$ ともに、実生集団でより小さな値をとる傾向が認められたが、いずれもグループ間の差は有意ではなかった。

表-1. 弟島のオガサワラグワにおける遺伝的変異の指標の平均値と標準偏差

Table 1 Means and standard deviations (in parenthesis) of the estimates of genetic diversity for *M. boninensis* in Ototo-jima

	個体数	Allelic richness	$H_{E,C}^1$
成木 (2003年度生残)	36	6.621 (2.385)	0.684 (0.126)
成木 (2012年度生残)	30	6.169 (2.350)	0.678 (0.126)
実生 (2012年度確認)	14	5.143 (1.345)	0.654 (0.120)

<sup>1</sup> サンプル数のバイアスを補正したヘテロ接合度の期待値

STRUCTURE 解析による個体のグループ分けの結果を図-4に示す。一般に、 $\Delta K$ は遺伝構造を最も適切に説明するモデルにおいて最大になるとされるが、遺伝構造に明瞭な階層性が存在する場合、その挙動は最上位の階層に影響される(2)。階層構造が予想される際には、上記よりも細かいグループ分けを想定したモデルの結果にも注意する必要がある。オガサワラグワでは $K=2$ を仮定した際に $\Delta K$ が最大値 (22.30) を示し、弟島の成木と実生はともに特定のクラスターに高い確率で割り当てられた。 $K$ が増加するにつれ、父島と母島では複数のクラスターが関与する混合構造が顕著になっていったが、弟島では単一のクラスターが卓越する傾向が続き (図-4の $K=3, 4$ )、階層構造の存在が示唆された。これらの結果から、同島のオガサワラグワ集団は他島と比べると遺伝的に異質、かつ均一であり、実生の遺伝的組

成は成木のそれに似通っていることがうかがえる。したがって、弟島のオガサワラグワ実生は同島の成木間での種子繁殖に由来していると考えられる。

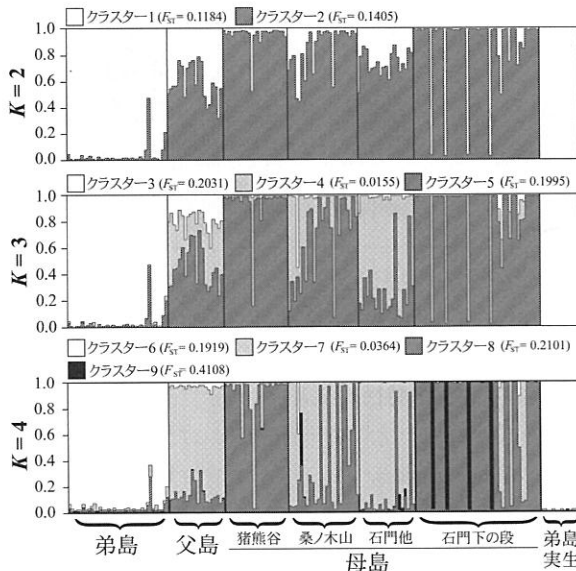


図-4. オガサワラグワの成木と実生を対象とした STRUCTURE 解析の結果

Fig. 4 Results of the STRUCTURE analysis for the seedlings and adult trees of *M. boninensis*

#### IV おわりに

弟島のクワ属実生に純粋なオガサワラグワが多く含まれていることが明らかにされた。実生が保持する遺伝的変異のレベルは同島に生残する成木に比べてやや低下していたが、その差は有意ではなく、遺伝的組成も世代間で似通っていた。したがって、同島においては今後、種子繁殖を通じたオガサワラグワの更新が進んでいくことが期待される。他地域での危機的状況を考慮すると、同島の实生集団がもつ保全上の意義はきわめて大きい。今後は、シマグワ実生を排除することで純粋なオガサワラグワ種子が生産される環境を維持しつつ、実生の定着状況や遺伝的変異の推移をモニタリングし、必要に応じて人為的補完を講じていくことが重要であろう。

なお、本論文は東京都小笠原支庁および自然環境研究センターによる事業(12)の成果であり、研究遂行に当たっては、両組織の方々に多大なるご協力をいただいた。また、国際農林水産業研究センターの谷尚樹氏には、オガサワラグワ成木の遺伝子型情報をご提供いただいた。査読者2名からは多くの有意義な指摘をいただいた。厚くお礼を申し上げます。

#### 引用文献

- (1) EL MOUSADIK, A. and PETIT, R.J. (1996) High levels of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco, *Theoretical Applied Genetics*: **92**, pp.832–839
- (2) EVANNO, G., REGNAUT, S. and GOUDET, J.(2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, *Molecular Ecology*: **14**, pp. 2611–2620
- (3) 環境省 (2012) 植物 I (維管束植物) レッドリスト, [http://www.env.go.jp/press/file\\_view.php?serial=20557&hou\\_id=15619](http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=20557&hou_id=15619), 2014年2月20日
- (4) 小山朗夫・山ノ内宏昭・町井博明 (1998) オガサワラグワ(*Morus boninensis* K.) の倍数性, *育種学雑誌*: **48**(別冊 2)
- (5) PRITCHARD, JK., STEPHENS, M. and DONNELLY, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*: **155**, pp.945–959
- (6) 林野庁 (2012) 平成 24 年度オガサワラグワ生育環境森林調査報告書, 関東森林管理局計画部, 前橋
- (7) SHIMIZU, Y. (1988) Vegetation of Mt. Kuwanoki in the Bonin (Ogasawara) Islands with reference to the invasion of an introduced tree species (*Bischofia javanica*), *Regional Views*: **1**, pp. 31–46
- (8) SHIMIZU, Y. (2003) The nature of Ogasawara and its conservation, *Global Environmental Research*: **7**, pp. 3–14
- (9) 田中信行・深澤圭太・大津佳代・野口絵美・小池文人 (2009) 小笠原におけるアカギの根絶と在来林の再生, *地球環境*: **14**, pp.73–84
- (10) TANI, N., YOSHIMARU, H., KAWAHARA, T., HOSHI, H., NOBUSHIMA, F. and YASUI, T. (2006) Determination of the genetic structure of remnant *Morus boninensis* Koidz. trees to establish a conservation program on the Bonin Islands, Japan, *BMC Ecology*: **6**, pp.14
- (11) TANI, N., KAWAHARA, T. and YOSHIMARU, H. (2005) Development and diversity of microsatellite markers for endangered species, *Morus boninensis* Koidz., to establish conservation program, *Molecular Ecology Notes*: **5**, pp. 398–400
- (12) 東京都小笠原支庁・自然環境研究センター (2013) 弟島植生回復調査委託報告書, 東京都小笠原村
- (13) van PUYVELDE, K., van GEERT, A. and TRIEST, L. (2010) ATETRA: a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT, *Molecular Ecology Resources*: **10**, pp. 331–334