

【解 説】

希少種マメナシの地理的遺伝構造の評価

加藤 珠理^{*1}・今井 淳²・西岡 理絵²・向井 譲²

はじめに

マメナシ [*Pyrus calleryana* Decne. var *dimorphophylla* (Makino) Koidz.] はバラ科の落葉小高木で、生育地は愛知県、三重県の湿地やため池の周辺にほぼ限定される(写真-1)。近年の都市開発が原因でマメナシの個体数は著しく減少しており、現在、環境省のレッドリスト(2012)では絶滅危惧IB類の指定を受けており、愛知県では絶滅危惧IA類(愛知県環境調査センター 2009)、三重県では絶滅危惧IB類(三重県環境森林部自然観教室 2006)とされている。マメナシは果樹として栽培されるナシと同じ属の植物であり、形態もよく似ている(写真-2)。しかし、その果実は1cm程度で豆粒のように小さいことから、「豆梨」という名前が付いている。また、花や葉の形態についても、栽培ナシや野生ナシのヤマナシやアオナシでは花柱が5本、葉の鋸歯は明瞭であるが、マメナシの花柱は2~3本、葉の鋸歯は目立たないのが特徴である。果実は強い渋味をもっており(熟すと渋味はなくなるようだが、酸味は強いままである)、栽培ナシのように食用としての利用には適さない。このため、マメナシはイヌナシ(犬梨)とも呼ばれている。マメナシは食用には適さないが、栽培ナシの台木として利用される他、盆栽用として愛好家の間ではとても人気がある。欧米では、観賞用の花木として庭木や街路樹にマメナシが利用されるため、侵略的外来種として、在来の野生ナシとの交雑が問題になっているようだ(Vincent 2005)。

東海地方の伊勢湾をとりまく地域には、固有・準固有または、著しく隔離分布する植物が存在する。特に、丘陵・台地の低湿地、およびその周辺に生育する植物は特徴的なものが多いため、東海丘陵要素として、マメナシの他、シデコブシ、ハナノキ、ヒトツバタゴなど13種がまとめられている(植田 1989)。これらの種は大都市近郊の湿地やその周辺に生育しているため、宅地造成など

の開発により個多数が減少している。

マメナシの自生地は天然記念物や公園として管理されるだけでなく、ボランティアによる熱心な活動によっても保護されている。開発に伴った他地域への個体の移植



写真-1 三重県桑名市のマメナシ自生地(撮影:今井淳)



写真-2 マメナシの果実、花、実生(撮影:今井淳)

*E-mail: shuri@affrc.go.jp

¹ かつう しゅり 首都大学東京都市環境科学研究科観光科学域

² いまい あつし、にしおかりえ、むかい ゆずる 岐阜大学応用生物科学部生産環境科学課程

や、種子や実生苗により個体を増殖し、植栽する活動や事業も積極的に行われている。しかし、これらの保護活動は種の遺伝的背景を考慮せずに行われることがしばしばあり、地域固有性の損失といった問題が生じつつある。実際に、植栽と思われる個体は各所で確認されるが、厳密に自生個体と区別できない場合が多い。また、マメナシと他の野生ナシ（あるいは栽培ナシ）との交雑種と考えられているアイナシ (*Pyrus × uyematsuana* Makino) が、各所でマメナシと同所的に生育しているので、浸透交雑の可能性も懸念される。今後、マメナシの保全を考慮するためには、地域個体群の遺伝的多様性や遺伝的分化の現状を把握することが重要である。本研究では現存するマメナシ全個体を対象として、葉緑体 DNA および核 SSR 領域の多型に基づいた地理的遺伝構造を評価し、保全管理の際に重要な単位となる集団について検討する。本稿では、Conservation Genetics 誌に掲載された論文 (Kato et al. 2013) を改変して紹介する。

マメナシの現存個体・個体群の分布状況

この研究では、現存するマメナシ（およびアイナシ）自生地を可能な限り全て調査した（図-1）。なお、ごく最

近、人為的に増殖・植栽されたことが明らかな個体は、調査対象から除外したが、その判別が困難な場合は調査個体に含めることにした。2007～2008年の調査において、マメナシの自生地は愛知県、三重県で92箇所見つかかり、407個体の生育が確認された。アイナシは17個体見つけた。マメナシの自生地の内訳は、多くは孤立木（50箇所）であり、2個体以上からなる自生地は47箇所であった。また、以下の分析を行うため、各調査個体からはDNAを抽出した。

葉緑体・核 DNA における地理的遺伝構造の評価

葉緑体 DNA の多型は PCR-RFLP 法により検出した。15領域を PCR 増幅して、27種類の制限酵素でそれぞれ処理することで多型のスクリーニングを行った結果、葉緑体 DNA の多型は、*trnT-trnL spacer / DdeI*、*trnG intron / HinfI*、*trnG intron / Sall* の3つの組合せで検出された。これらの多型に基づく、5つの葉緑体ハプロタイプ（タイプ A～E）に分けられた（図-2）。マメナシは、このうちの4つの葉緑体ハプロタイプ（タイプ A～D）を保有しており、タイプ A、タイプ B の出現頻度は9割以上であ

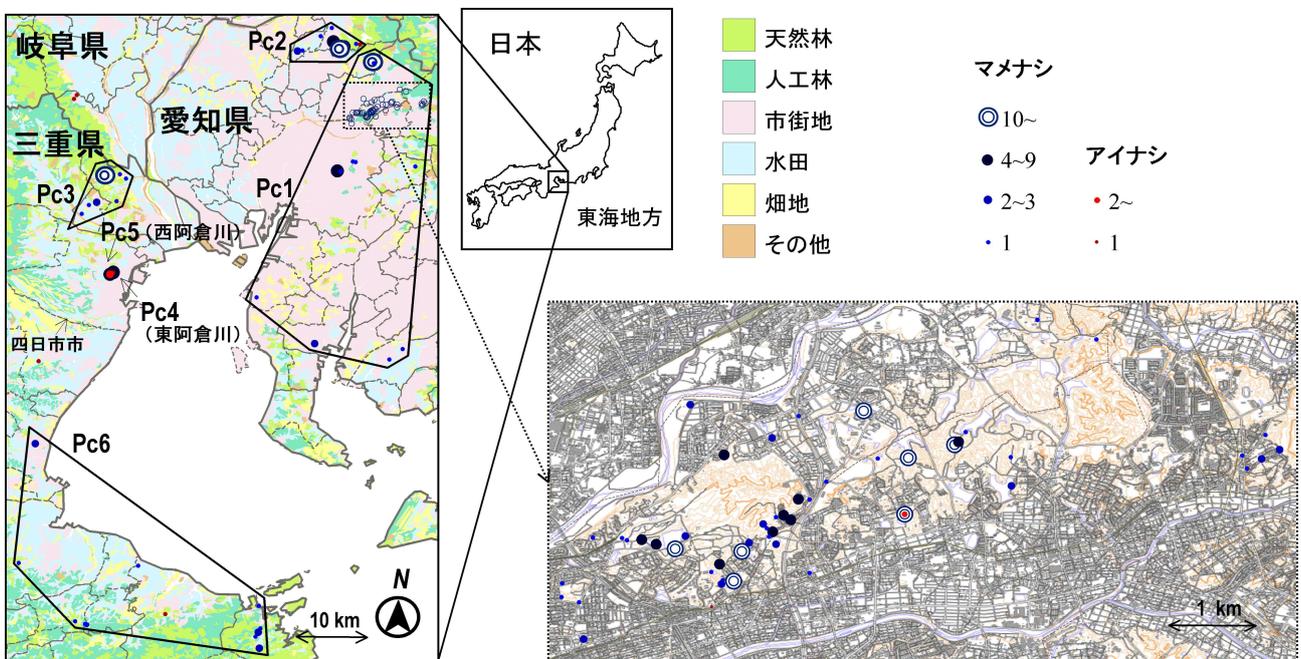


図-1 マメナシ（およびアイナシ）の現存個体・個体群の分布状況と葉緑体・核 DNA の多型解析の結果に基づいて区分した集団 (Pc1～6、アイナシについては Pu として区分する)。個体数や種の違いは、点の大きさ・色で表した。これらの図は、国土交通省国土政策局調査・編集の 20 万分の 1 土地保全図シームレスデータ、および国土地理院発行の 2 万 5 千分の 1 地形図の一部を使用して、作成したものである。

った。葉緑体DNAの遺伝子多様度は0.43であった。図-3aに示すように、タイプAは愛知県側と三重県四日市市の西阿倉川のマメナシで多く見られ、タイプBは三重県側と愛知県北部の犬山市、大口町周辺のマメナシで多く見られた。タイプCは四日市市の東阿倉川のマメナシで多く見られたが、隣接する西阿倉川のマメナシでは全く確認できなかった。タイプDは犬山市の植栽の可能性が疑われるマメナシ個体群(犬山南)のみで確認された。アイナシはタイプA~C、Eを保有していた。

核DNAの多型については、栽培ナシ・リングで開発されている11種類のSSRマーカーを用いて検出した。遺伝子型を決定したところ、各座で6~14個(平均10.9、合計120個)の対立遺伝子が検出され、ヘテロ接合度は0.53~0.80(平均0.68)であった。得られた核SSRの多型データを用いて、以下のように更に詳細な解析を行った。

マメナシの自生地では、図-1に示したように、複数個体がまとまって生育している箇所が少なく、孤立木が多数存在する。このため、便宜上の集団を設定した上で解析を行うことは困難であり、個体ベースの解析を行う必要がある。また、冒頭で述べたように、マメナシの現存個体は、自生と植栽の区別が困難なものを多く含んでいるので、遺伝子型データのみに基づいて、集団の区分を行うことが望ましい。こうした理由から、核SSRの多型データの解析には、STRUCTURE解析(Pritchard 2000)を採用した。STRUCTURE解析では、全ての個体が事前にどの集団に属するかという情報を与えずに、統計的な確率モデルによりK個の集まり(クラスター)に各個体を割り振ることで、集団を区分できる。最適なクラスター数は、Evanno et al. (2005)に従って決定して、個体が各クラスターに由来する確率(q値)を推定した。また、図-2に示すように、特定のクラスターが6割以上を占有する個体(つまり、最大q値が0.6以上の個体)を集めて、再度、STRUCTURE解析を行い、階層的な遺伝構造を評価した。こうした階層的なSTRUCTURE解析は、K=1(つまり、無構造)になるまで繰り返し行った。このように、STRUCTURE解析を行ったところ、マメナシ(およびアイナシ)の424個体は、4つの階層で17グループに分かれた(図-2)。最終的には、296個体(69.8%)が、この17グループのいずれかに割り当てられたが、残りの128個体(30.2%)は最大q値が0.6以下であったため、どのグループにも割り当てられなかった。

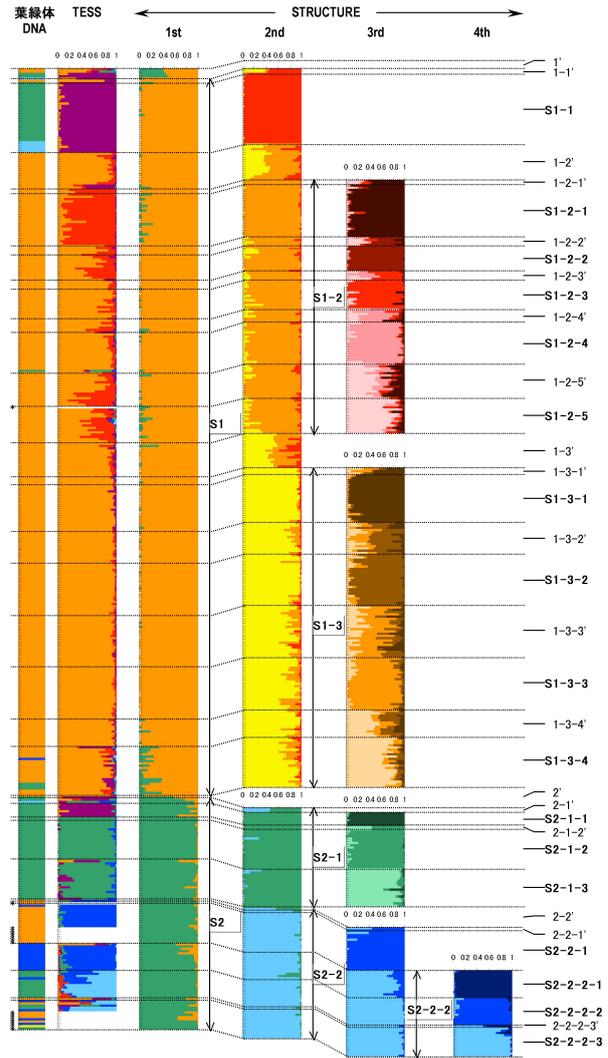


図-2 マメナシ(およびアイナシ)が保有する葉緑体ハプロタイプと核SSRの多型データを使って行ったSTRUCTUREおよびTESS解析の結果。棒グラフは各個体を表し、アイナシには「*」を付けて、区別している。1'、1-1'、1-2'のように「'」付きのグループに区分した個体は、STRUCTURE解析において、どのクラスターに由来するかはっきりとしない(最大q値が0.6以下である)個体である(図-3では「Unassigned」とした)。各色の凡例は図-3に対応している。

STRUCTURE解析の結果は地図上に図示した(図-3c~j)。1番目の階層では、最適なクラスター数はK=2であり、愛知県側(S1)と三重県側(S2)のマメナシで大きく分かれた(図-3c)。アイナシ17個体のうち16個体は、S2に区分された。愛知県北

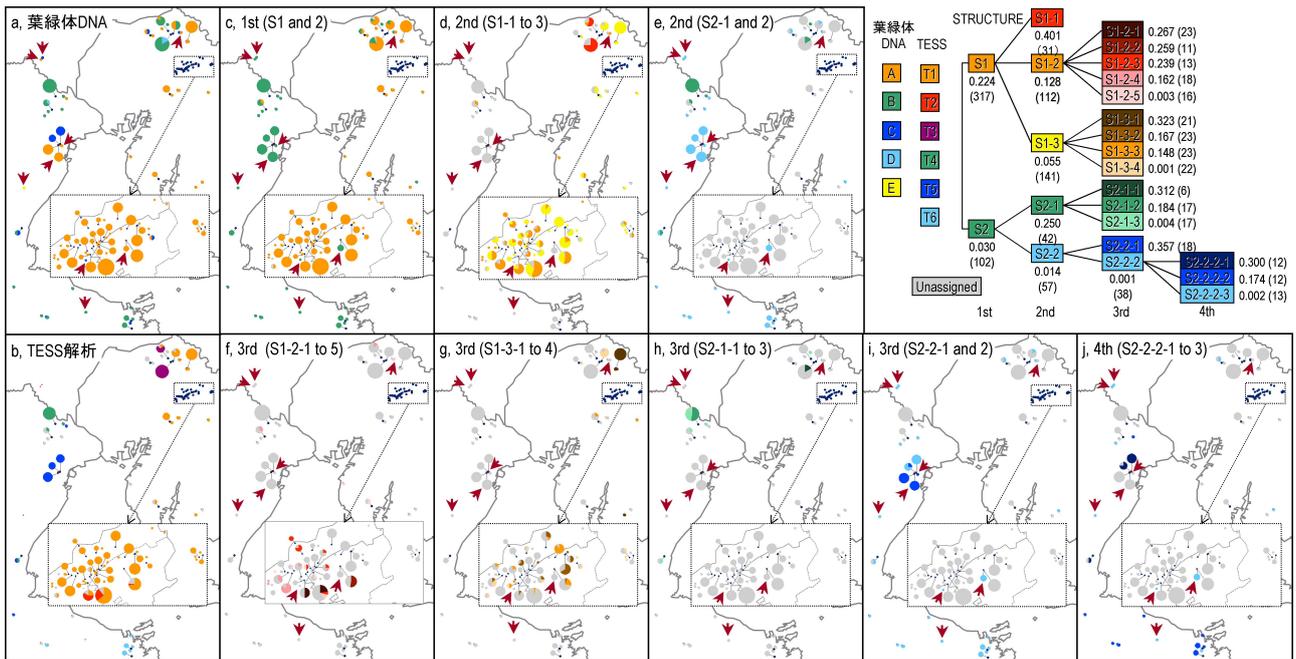


図-3 マメナシ（およびアイナシ）の現存個体・個体群における葉緑体ハプロタイプ (a) およびSTRUCTURE (c-j)、TESS (b) 解析で検出した各クラスターの保有状況。円グラフの大きさは個体数を反映しており、葉緑体ハプロタイプやSTRUCTURE、TESS 解析で推定した各クラスターの保有割合を示している。特定のクラスターに q 値が 0.6 以上で割り当てられた個体のみ表示して、 q 値が 0.6 以下の個体は「Unassigned」とした。STRUCTURE 解析で階層的に推定した各クラスターの関係は右上の凡例によって表示しており、共通祖先と各クラスターとの間の遺伝的分化を表す F 値とカッコ内に個体数を付記した。赤矢印はアイナシを示している。

部では S1 と S2 が混在していた。2 番目以降の階層では、愛知県側のマメナシを反映する S1 は 10 グループ (図-3d、f、g) に分かれた。特徴としては、2 番目の階層で検出された S1-1 は愛知県北部の 2 箇所のマメナシ個体群 (永泉寺、犬山南) で見られ (図-3d)、3 番目の階層で検出された S1-2-1 と S1-2-2 は、名古屋市守山区の 2 箇所のマメナシ個体群 (蛭池、雨池) と尾張旭市の 1 箇所のマメナシ個体群 (長池) で、それぞれ見られた (図-3f)。また、同じく 3 番目の階層で検出された S1-3-1 は、愛知県北部の 1 箇所のマメナシ個体群 (太良上池) で見られた (図-3g)。三重県側のマメナシを反映する S2 については、7 グループ (図-3e、h~j) に分かれた。2 番目の階層で検出された S2-1 は、三重県北部の 1 箇所のマメナシ個体群 (多度) と愛知県北部の 1 箇所のマメナシ個体群 (犬山南) で多く見られた (図-3e)。S2-1 は 3 番目の階層で更に分かれ、S2-1-1 は愛知県北部の 1 箇所のマメナシ個体群 (犬山南) で、S2-1-2 と S2-1-3 は三重県北部の 1 箇所のマメナシ個体群 (多度) で多く見られた (図-3h)。S2-2 についても、3、4 番目

の階層で細かく分かれ、S2-2-1 は四日市市の西阿倉川のマメナシ、アイナシの両方が混在して生育している個体群で多く見られ (図-3i)、S2-2-2-1~3 は四日市市の東阿倉川のマメナシ個体群 (2 箇所)、三重県南部のマメナシ、アイナシ (西阿倉川のアイナシ以外) で、それぞれ多く見られた (図-3j)。

STRUCTURE 解析と併せて、個体の位置データを考慮する解析も行った。マメナシの現存個体の多くが自生であって、過去に人為的な個体の移動が行われていない場合、個体の位置データは集団を区別する上で有用な情報として評価できるためである。こうした付加的なアプローチとして、TESS 解析 (Chen et al. 2007, tessellation...「きりばめ細工」になぞらえて、集団を区別する手法) を採用した。TESS 解析では、マメナシ 407 個体を対象として、位置データ (緯度・経度) を加味しながら、核 SSR の多型データを解析した。最適なクラスター数は Durand et al. (2009) に従って決定した。その結果、 $K=6$ が最適であり、370 個体 (90.9%) が 6 グループ (図-2、T1~T6) のいずれかに、 q 値 > 0.6 で割り当てられた。

図-3b に示すように、TESS 解析の結果においても、マメナシは愛知県側と三重県側の間で大きく異なっていた。愛知県側のマメナシについては、T3 は愛知県北部の2箇所のマメナシ個体群(永泉寺、犬山南)で見られ、T2 は名古屋市守山区の2箇所のマメナシ個体群(蛭池、雨池)における一部の個体のみで見られた。T1 は愛知県側のその他のマメナシ個体・個体群で見られた。三重県側のマメナシについては、T5 が四日市市の西阿倉川、東阿倉側のマメナシ個体群で見られ、四日市市を境にして、北部(T4)と南部(T6)のマメナシに分かれていた。

解析結果に基づいた集団の区分

以上の葉緑体・核 DNA の解析結果に基づいて、マメナシに対して、6 集団 (Pc1-Pc6) を設定して (図-1)、アイナシについては、1 つ (Pu) にまとめて評価した。集団を区分する際の根拠となった解析結果は表-1 にまとめ、区分した集団間の遺伝的分化の程度は表-2 に示した。また、この研究では、複数個体が密集している場合であっても、全ての個体を解析に含めたため、STRUCTURE 解析などでは、局所レベルで特異的なクラスターがいくつか検出された。これらは、図-4 に示すように、血縁構造を反映している可能性が考えられたため、集団区分の際には、各自生地状況を考慮しながら、注意して評価した。

現存するマメナシは、葉緑体・核 DNA の両方に関して、東西で大きく異なっていたので、愛知県側と三重県側で区分した。愛知県側のマメナシについては2 集団を設定した。Pc2 として区分した愛知県北部の犬山市、大口町のマメナシ (主に、永泉寺や犬山南の個体群、小牧市の太良上池の個体群は除く) では、葉緑体 DNA に関しては、この地域に特異的

なタイプ D や三重県側で多く見られたタイプ B が検出され、核 DNA に関しては、STRUCTURE、TESS 解析において、特異的なクラスター (S1-1、S2-1-1 および T3) が検出された。愛知県北部の小牧市のマメナシ (太良上池の個体群) を含め、その他は Pc1 とした。Pc1 については、全ての個体が葉緑体 DNA のタイプ A を保有しており、核 DNA では検出された細かい遺伝構造をそれぞれ集団として区分することが困難であると考え、大きく一つの集団として評価した。三重県側のマメナシについては、4 集団を設定した。四日市市を境に、それぞれ、南北で Pc3 と Pc6 を区分した。Pc3、Pc6 は、葉緑体 DNA における違いはなかったが、STRUCTURE、TESS 解析の結果では区別された。四日市市の東阿倉側と西阿倉川のマメナシ個体群については、互いに隣接するにも関わらず、遺伝的に大きく異なっているため、それぞれ、Pc4 と Pc5 として区分した。特に、Pc5 とし

表-1 マメナシの現存個体・個体群に対して設定した6 集団 (Pc1~6) とアイナシ (Pu) を特徴づける解析結果

集団	葉緑体 DNA	STRUCTURE 解析	TESS 解析
Pc1	A	S1-2-1~5, S1-3-1~4	T1, T2
Pc2	B, D	S1-1, S2-1-1	T3
Pc3	B	S2-1-2, 3	T4
Pc4	C	S2-2-2-1	T5
Pc5	A	S2-2-1	T5
Pc6	B	S2-2-2-2	T6
Pu	A, E	S2-2-1, S2-2-2-3	-

表-2. 解析結果から区分したマメナシ6 集団 (Pc1-Pc6) とアイナシ (Pu) の遺伝的分化の程度 (F_{ST} 値)

集団	Pc2	Pc3	Pc4	Pc5	Pc6	Pu
Pc1	0.113 ^{***}	0.167 ^{***}	0.094 ^{**}	0.145 ^{***}	0.151 ^{***}	0.124 ^{***}
Pc2		0.161 ^{***}	0.142 ^{***}	0.218 ^{***}	0.179 ^{***}	0.169 ^{***}
Pc3			0.117 ^{**}	0.136 ^{***}	0.086 ^{**}	0.128 ^{***}
Pc4				0.103 ^{***}	0.071 ^{***}	0.094 ^{***}
Pc5					0.121 ^{***}	0.026
Pc6						0.078 ^{***}

は $P < 0.01$ 、*は $P < 0.001$ で有意な F_{ST} 値を示す。

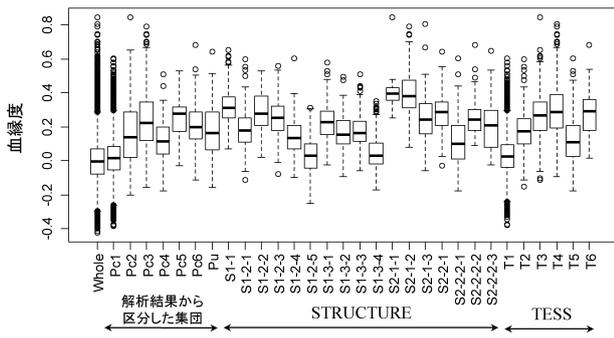


図4 解析結果から区分した集団と、STRUCTURE、TESS 解析により区分したグループの個体間血縁度。箱ひげ図は中央値、2.5、25、75、97.5 パーセントイルと外れ値を示している。

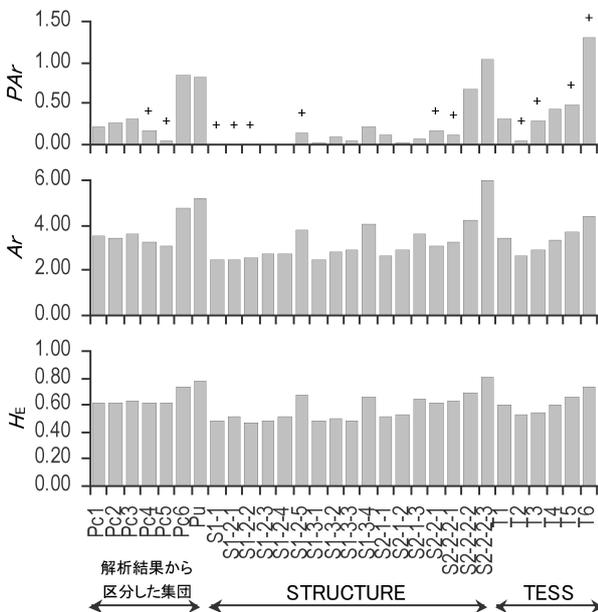


図5 解析結果から区分した集団と STRUCTURE、TESS 解析により区分したグループの遺伝的多様性。PAR は稀な対立遺伝子の多様度、Ar は対立遺伝子の多様度、 H_E はヘテロ接合度、+は有意な ($P < 0.05$) ボトルネックが検出されたことを示している。

て区分した西阿倉川のマメナシ個体群については、葉緑体 DNA に関しては、愛知県側で多く見られるタイプ A が検出されたが、核 DNA では、アイナシ (Pu) と遺伝的に近いことが示された (表-2)。このため、マメナシと近縁種 (他の野生ナシ、栽培ナシなど) との間で浸透交雑が起こっている可能性が考えられた。いずれにしても、四日市市のマメナシは他の地域のものとは区別すべきで

あると判断した。各集団における遺伝的多様性は Pc6 とアイナシ (Pu) で高い傾向が見られ (図-5)、こうした結果も近縁種との浸透交雑の影響を反映している可能性が考えられる。また、集団サイズの縮小 (ボトルネック) の痕跡がいくつかの集団、グループで認められた (図-5)。この研究で用いた材料は、植栽の可能性が疑われる個体を含んでいるが、こうした植栽個体では、遺伝的な均質化が起こっていることが懸念され、人為の影響を反映した結果であるものと考えられる。

おわりに

東海地方には、マメナシの他に、シデコブシ、ハナノキ、ヒトツバタゴなどの希少な植物が多数、生育しているが、マメナシの自生地は他の希少種と比べても、特に、市街地と近接している点が特徴のように思われる。図-1 を見ても明らかなように、マメナシの個体・個体群は道路や宅地によって著しく寸断されており、自然のまま放置したところで、種子や花粉を介した自生地間の遺伝子の交流は期待できないというのが現状だろう。こうした点を踏まえると、マメナシの遺伝的多様性の維持には、人為の介入は不可欠と云える。一方で、現在、取り組まれている実際の保全活動では、マメナシの地域固有性に対する配慮は不十分である。便宜的な集団の区分は行われているようだが、その区分は恣意的であるため、遺伝的多様性を故意に低めたり、歪めたりする危険性がある。この研究で明らかになったマメナシの地理的遺伝構造からは、近縁種との浸透交雑の可能性や個体の増殖・植栽活動といった人為の影響が示唆された。つまり、隣接する個体・個体群であっても遺伝的に異なったり、不均質であったりする場合があり、安易な集団区分に基づいた保全活動は、マメナシの遺伝的多様性を劣化させる可能性がある。最近では、マメナシの種子や実生苗を増殖して、植栽する活動が積極的に行われつつある。しかし、こうして増殖・植栽された個体のなかには、残念なことに、出所がわからないものがあり、近い将来、自生個体との区別がつかなくなる可能性は大きい。この研究で扱った材料も、そのようなものを含んでいたが、なかには遠方から持ち込まれたと思われる個体がいくつか含まれていた。

マメナシの保全管理をどのように進めるかは、今後、検討すべき重要な課題である。善意の保全活動を無駄にしないためには、この研究で得られた成果が有効に活用されることが望まれる。

謝辞

この研究では、マメナシ自生地調査を多くの方々に手伝っていただきました。また、マメナシの自生地に関する情報は、マメナシの保護・保全活動に従事する市民ボランティアの方々や文化財保護等に携わる市役所職員の方々が快く教えてくださいました。この場をお借りして、感謝の意を表したいと思います。なお、この研究の一部は、科研費(18580142)の助成を受けて行いました。

引用文献

- 愛知県環境調査センター (2009) 愛知県の絶滅のおそれのある野生生物 レッドデータブックあいち 2009 植物編. 愛知県環境部自然環境課, 名古屋
- Chen C, Durand E, Forbes F, François O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes* 7: 747–756
- Durand E, Jay F, Gaggiotti OE, François O (2009) Spatial inference of admixture proportions and secondary contact zones. *Molecular Biology and Evolution* 26: 1963–1973
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620
- 環境省自然環境局野生生物課 (2012) 環境省第4次レッドリスト 植物 I (維管束植物). 環境省, 東京
- Kato S, Imai A, Nishioka R, Mukai Y (2013) Population genetic structure in a threatened tree, *Pyrus calleryana* var. *dimorphophylla* revealed by chloroplast DNA and nuclear SSR locus polymorphisms. *Conservation Genetics* 14: 983–996
- 三重県環境森林部自然観教室 (2006) 三重県レッドデータブック 2005 植物・キノコ. 三重県環境保全事業団, 津
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- 植田邦彦 (1989) 東海丘陵要素の植物地理 I. 定義. *植物分類・地理* 40: 190–202
- Vincent MA (2005) On the spread and current distribution of *Pyrus calleryana* in the United States. *Castanea* 70: 20–31