

【解説】シリーズ

日本の森林樹木の地理的遺伝構造 (14)
コウヤマキ (コウヤマキ科コウヤマキ属)

James R. P. Worth^{*,1}

はじめに

コウヤマキ *Sciadopitys verticillata* (Thunb.) Sieb. et Zucc. は日本に固有の常緑針葉樹であり、世界的に貴重な植物である。この種は全ての他の針葉樹から形態的にも遺伝的にも異なっているため (Hayata 1931 ; Schlarbaum and Tsuchiya 1985 ; Crisp and Cook 2011)、コウヤマキ 1 種からなる独自のコウヤマキ科 (Sciadopityaceae) が認識されている。実際に分子系統学的解析では、コウヤマキはメタセコイアやウオレミマツのような「生きた化石」といわれている裸子植物よりも古い年代、およそ 2 億 2 千年前に分岐したことが示されており (Crisp and Cook 2011)、他の古い植物であるイチョウや基部被子植物のアンボレアに並んで世界に単一種として生き残っている、初期に分岐した植物系統の 1 つである。化石記録から、コウヤマキ属は白亜紀晩期から古第三紀初期 (6500 万年～ 4900 万年前) の間、北半球に広く分布していたが (Christophel 1973)、新第三紀鮮新世晩期には、第四紀更新世にみられた氷河がこの時期に形成され始めたために日本にだけ分布するようになったと考えられている (Tsukada 1963)。唯一生き残った現存種であるコウヤマキは、現在、福島県 (北緯 37.5 度) 以南の本州から九州 (北緯 32 度) にかけての山地の温帯多雨林に断片的に分布している (図-1)。

この種は、系統的な特殊性だけでなく、日本の文化的・宗教的な面からも重要である。庭園や寺社の境内に普通に植栽され、宗教儀礼としてその小枝が仏前に供えられることがある。日本列島に人が住むようになって以来、特に低標高ではその有用な材のために伐採され、分布域が縮小されてきた。コウヤマキ天然林集団の遺伝的多様性と遺伝的構造については、すでに Worth et al. (2013, 2014) で報告されているが、本稿では、高野山集団を加えて再解析した結果と新たな EST (expressed

sequence tag) の解析結果を用いてそれらを紹介する。また、寺院の境内等に植栽されているコウヤマキ個体の解析結果も紹介する。これらの植栽木は、天然林集団のほとんどの個体よりもサイズが大きいことから、過去の天然林の伐採によって失われたかもしれない貴重な遺伝的変異を保有している可能性がある。

核の遺伝的多様性と遺伝的構造

コウヤマキ天然林 31 集団から採取された個体を対象にして (図-1、表-1)、Kawase et al. (2009) が EST を用いて開発した核マイクロサテライト (SSR: single sequence repeat) の 8 遺伝子座およびコピー数の少ない EST の 6 配列における遺伝子型が決定された。SSR の 8 遺伝子座からは合計 50 対立遺伝子が検出された (表-2)。全遺伝子座で求められた *Fst* (遺伝的分化の指数) は 0.127 であり、遺伝的構造の強さは中程度であることが示された。STRUCTURE 解析 (Pritchard et al. 2000) によって 3 つの主要な遺伝的クラスターが検出され、九州集団にはそのうちのクラスター 1 が優占していた (図-2)。一方、九州以外ではクラスター 1 の頻度が低くなり、最も北方に位置する福島県の集団 (FUK) に近づくにつれてクラスター 2 の頻度が高くなった。Nei の遺伝距離 D_A (Nei et al. 1983) にもとづいて作成された近隣ネット (図-3) から遺伝的に強く分化している集団は九州の集団、島根県の集団 (SHI)、それから福島県の集団 (FUK) であることが示された。また、本州中央部の集団は遺伝的なクラスターを形成していたが、四国、紀伊半島、近畿の集団は遺伝的関係が強くなかった。

SSR の 8 遺伝子座における遺伝的多様性の空間分布には強いパターンが観察され、本州中央部と紀伊半島ではヘテロ接合度の期待値、アレリックリッチネス、コ

* E-mail: jrpw2326@affrc.go.jp

¹ 森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域

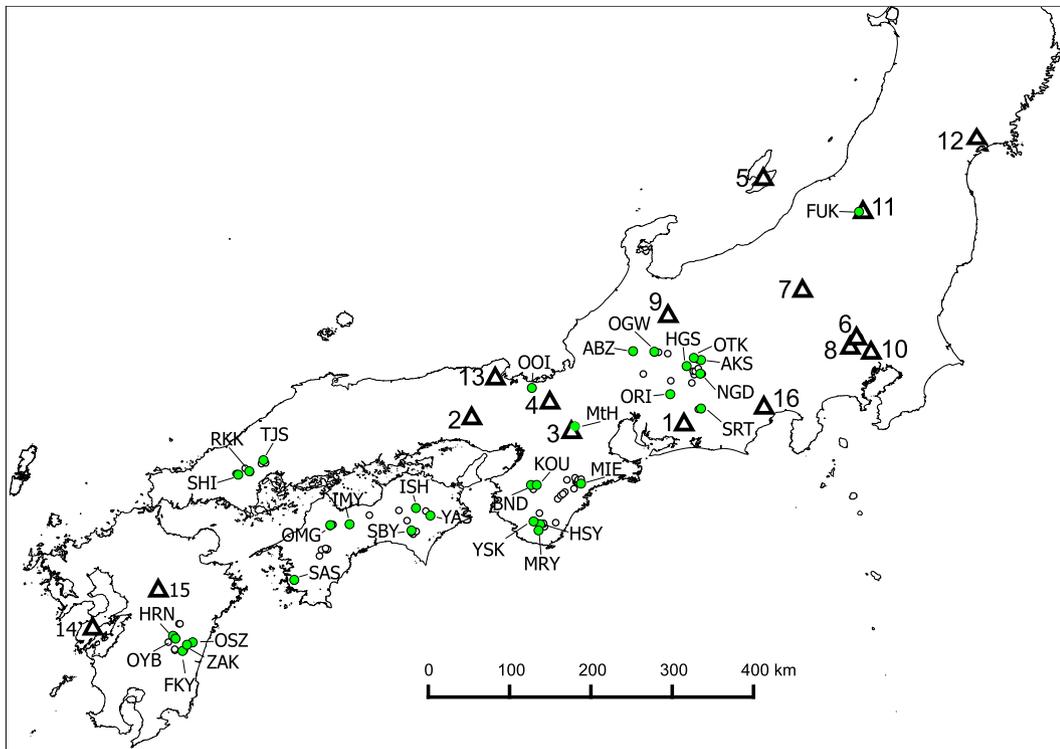


図-1 調査したコヤマキの天然林 31 集団 (緑色の丸) と植栽木のある寺院等 (白色の三角) の位置。小さな丸は既知のコヤマキの分布を示す。集団の略号と植栽木 No. はそれぞれ表-1 と表-4 のものに対応している。

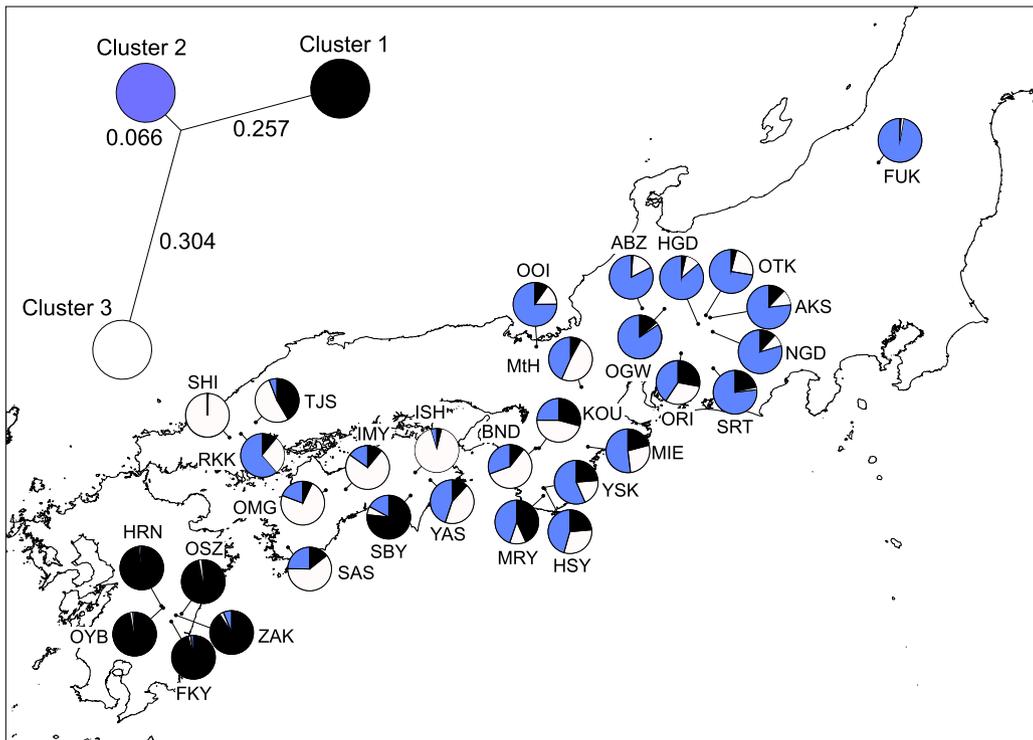


図-2 核マイクロサテライト 8 遺伝子座の遺伝子型にもとに STRUCTURE 解析によってベイズ推定されたコヤマキ 31 集団の集団構造。クラスター数 (K) は 3。各集団の円グラフは、集団位置を事前情報として 10 回のランで得られた 3 つの遺伝的クラスターの平均割合を示す。左上に、各クラスターと共通祖先集団間の F_{st} の値とともに遺伝的クラスターの近隣結合ネットワークを示す。

表-1 調査したコウヤマキ天然林 31 集団の情報

集団 (略号)	地域	緯度 (N)	経度 (E)	サンプル数		
				SSR	EST 配列	cpDNA
FUK	福島	37.575	139.592	36	12	12
ABZ	本州中央部	35.863	136.818	32	8	12
AKS	本州中央部	35.759	137.620	30	8	11
HGS	本州中央部	35.680	137.476	32	7	11
NGD	本州中央部	35.587	137.644	34	8	12
OGW	本州中央部	35.857	137.079	31	8	11
ORI	本州中央部	35.335	137.275	33	8	10
OTK	本州中央部	35.781	137.564	34	8	11
SRT	本州中央部	35.159	137.653	33	8	12
MtH	近畿	34.939	136.104	34	8	12
OOI	近畿	35.412	135.576	39	8	12
BND	紀伊半島	34.220	135.566	29	8	11
HSY	紀伊半島	33.738	135.679	34	8	12
KOU	紀伊半島	34.221	135.606	28	8	-
MIE	紀伊半島	34.238	136.180	24	12	12
MRY	紀伊半島	33.663	135.658	22	8	11
YSK	紀伊半島	33.754	135.657	33	8	12
IMY	四国	33.738	133.338	34	8	12
ISH	四国	33.937	134.153	28	8	12
OMG	四国	33.728	133.102	34	8	11
SAS	四国	33.056	132.659	34	8	12
SBY	四国	33.662	134.098	34	8	12
YAS	四国	33.845	134.330	12	8	11
RKK	中国	34.389	132.106	9	7	9
SHI	中国	34.347	131.971	36	11	11
TJS	中国	34.525	132.280	32	8	12
FKY	九州	32.183	131.287	31	8	10
HRN	九州	32.369	131.171	13	8	12
OSZ	九州	32.289	131.412	15	8	10
OYB	九州	32.345	131.194	31	8	12
ZAK	九州	32.259	131.342	35	12	12

サンプル数は、核マイクロサテライト (SSR)、EST 配列、葉緑体 DNA (cpDNA) の分析で用いられた個体数を示す。

表-2 コウヤマキ 31 集団における核マイクロサテライト 8 遺伝子座の遺伝的多様性の推定値

遺伝子座	Num	Eff_Num	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fst</i>	<i>Fis</i>
Sv01	3	1.10	0.090	0.094	0.084	0.047
Sv02	3	1.09	0.077	0.081	0.081	0.054
Sv04	7	1.31	0.225	0.241	0.145	0.066
Sv06	22	3.76	0.728	0.752	0.106	0.032
Sv03	5	2.08	0.521	0.528	0.112	0.014
Sv07	5	1.50	0.342	0.346	0.188	0.012
Sv08	2	1.38	0.274	0.28	0.095	0.019
Sv10	3	1.31	0.230	0.238	0.171	0.037
平均	6.25	1.691	0.311	0.320	0.127	0.029

Num : 対立遺伝子の観察数、Eff Num : 対立遺伝子の有効数、*Ho* : ヘテロ接合度の観察値、*He* : ヘテロ接合度の期待値、*Fst* : 遺伝的分化の指数、*Fis* : 近交係数。

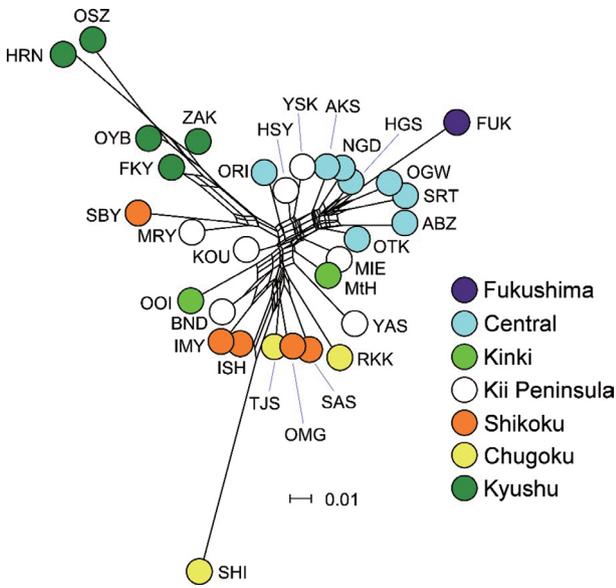


図-3 Nei の遺伝距離 D_A を用いて作成された 31 集団間の遺伝的関係を示す近隣ネット。遺伝距離 D_A は核マイクロサテライト 8 遺伝子座の遺伝子型をもとに計算された

モンアレル数の値が高かった (コモンアレル: 集団内の頻度が 5% 以上 25% 未満である対立遺伝子; 図-4a, b, c)。実際、アレリックリッチネスの最も高い 10 集団には、本州中央部や紀伊半島の集団以外に四国東部 (徳島県) の集団 (YAS) が 1 つ含まれるだけであった。遺伝的多様性は九州や中国で低い傾向にあり、特に島根県の集団 (SHI) で低かった。この傾向は、全体で検出された 50 対立遺伝子のうち、九州と中国ではそれぞれ 23 と 25 の対立遺伝子が検出されなかったのに対し、本州中央部では 10、紀伊半島では 9、四国では 14 の対立遺伝子だけが検出されなかったことからわかる。四国西部の集団 (SAS) と福井県の集団 (OOI) でプライベート・アレリックリッチネスが顕著に高かったが、本州中央部のいくつかの集団や徳島県の集団 (YAS) でも高かった (プライベートアレル: 単一の集団に固有の対立遺伝子; 図-4d)。

EST の 6 遺伝子座から合計 70 の一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) が検出され (遺伝子座あたり平均 11.7)、その多型から 65 のハプロタイプに分けられた (表-3)。全遺伝子座で求められた F_{st} の値は 0.156

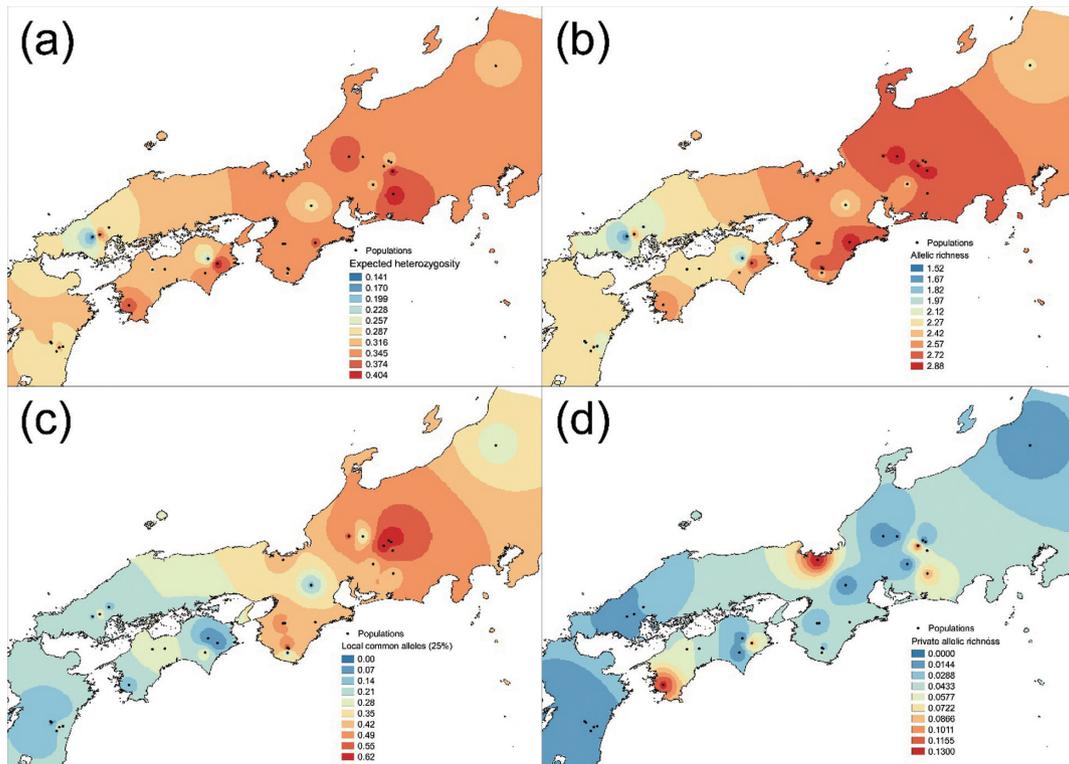


図-4 コウヤマキ集団における (a) ヘテロ接合度の期待値、(b) アレリックリッチネス、(c) 個体あたりのコモンアレル数 (コモンアレル: 集団内の頻度が 5% 以上 25% 未満である対立遺伝子)、(d) プライベート・アレリックリッチネスで示される遺伝的多様性の空間分布。31 集団における核マイクロサテライト 8 遺伝子座の遺伝子型をもとに 4 つの統計量が計算され、QGIS ver. 2.12 の IDW (inverse distance weighted) 補間法を用いて地図化された。

表-3 コウヤマキ 31 集団における EST 6 遺伝子座の遺伝的多様性の推定値

遺伝子座	配列の長さ (bp)	SNP 数	ハプロタイプ数	塩基多様度	ハプロタイプ多様度	<i>Fst</i>
c121	454	10	9	0.00163	0.42	0.153
c132	485	12	10	0.00182	0.40	0.191
c186	414	13	14	0.00508	0.80	0.160
c230	340	9	15	0.00519	0.77	0.175
c54	460	10	9	0.00454	0.70	0.140
rc35	414	16	8	0.00940	0.56	0.114
全体 / 平均	2567	70	65	0.00461	0.61	0.156

SNP 数：一塩基多型数、*Fst*：遺伝的分化の指数。

であり、遺伝的構造化の程度は SSR データで評価されたものと同様であった。全体の遺伝的分化のかなりの部分は、九州集団が大きく分化していることによるものであった (図-5)。九州以外では、本州中央部の集団

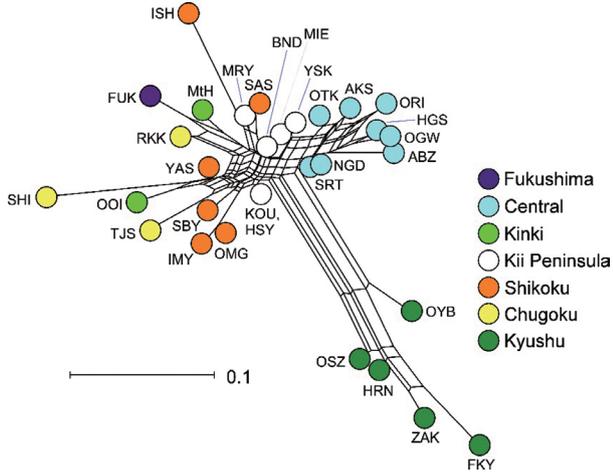


図-5 遺伝的分化の指数 *Fst* を用いて作成された 31 集団間の遺伝的関係を示す近隣ネット。*Fst* は EST の 6 配列データをもとに計算された。

が遺伝的なクラスターを形成したが (これは、SSR データで示されたものと同様であり、これらの集団が遺伝的に近縁であることを示唆する)、それ以外の地域では遺伝的構造化は不明瞭であった。ハプロタイプの多様性は、本州中央部、紀伊半島、近畿で高いが、西日本で低下していた (図-6a)。この傾向も SSR データから示されたものと同様であった。徳島県の集団 (YAS) と滋賀県の集団 (MtH) は顕著にユニークなハプロタイプを保有していた (図-6b)。

葉緑体 DNA の多様性

31 集団から集団あたり平均 11.4 個体 (合計 365 個体) を対象にして (表-1)、葉緑体 DNA の 6 領域 (*atp1-rpoC2*, *trnD-trnT*, *rpl16* イントロン, *petN-psbM*, *ndhA* イントロン, *trnT-trnL*) が増幅され、塩基配列が決定された。*trnT-trnL* の遺伝子間領域には、非常に多型的な 1 種類の一塩基繰り返し配列 (MNR : mononucleotide

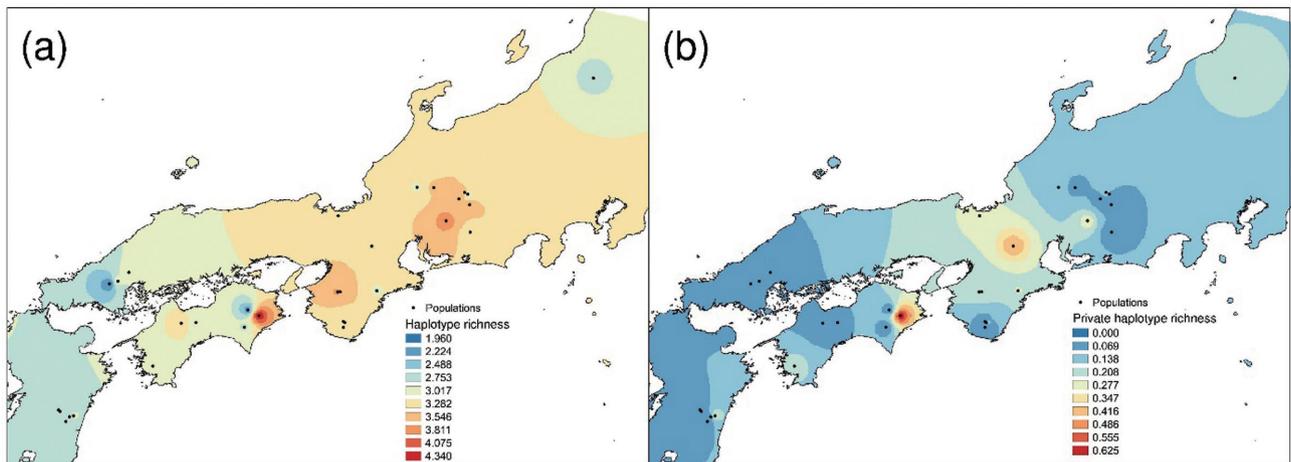


図-6 コウヤマキ集団における (a) ハプロタイプリッチネス、(b) プライベート・ハプロタイプリッチネスで示される遺伝的多様性の空間分布。31 集団における EST の 6 配列データをもとに 2 つの統計量が計算され、QGIS ver. 2.12 の IDW 補間法を用いて地図化された。

repeat) がみられたため、他の5領域とは別に解析した。*trnT-trnL*を除いた5領域の配列データから合計15ハプロタイプが識別され、遺伝的分化の指数である *Gst* は0.250であった。最も強く分化している集団は本州中央部の集団であり、それらはその地域に固有なハプロタイプを高い頻度で保有していた(図-7)。本州中央部以外では、祖先的なハプロタイプは共通して広く分布していた。九州集団、中国の集団(SHI)、四国西部の集団(SAS)にはまれでユニークな5つのハプロタイプがみられた。5領域のSNPとインデル、および *trnT-trnL* の1つのMNRにもとづくハプロタイプリッチネスは本州中央部で高かったが、外れ値として最も南の九州集団(FKY)でやや高かった(図-8a, b)。本州中央部における葉緑体DNAの高い多様性は、核の遺伝子座で示された多様性の傾向と一致し、このことは最終氷期最盛期から現在にかけてこの地域の集団サイズが大きかったことを示唆する。一方、核と葉緑体の多様性における不一致、たとえば四国東部のYAS集団にみられた不一致を説明することは困難であるが、葉緑体の多様性の調査が不十分であったこと、および葉緑体が半数体

であるためにボトルネックの影響を強く受けたことのもどちらか、あるいは両方が原因でありうるだろう。

寺院等の植栽木

寺院等の植栽木16個体(図-1、表-4)を対象に、天然林集団と同様に核SSRの8遺伝子座とESTの6配列、cpDNAの6領域の分析が行われた。SSRのアレリックリッチネスは2.7、プライベート・アレリックリッチネスは0.7であり、それらの値はそれぞれ31集団中24集団と26集団の値よりも高いことから遺伝的に多様であることが示された。このことは、植栽木が天然分布の種苗に由来すると考えられることに矛盾しない。群馬県の泉龍寺の植栽木が保有していた核マイクロサテライトSv03遺伝子座の1つの対立遺伝子および京都府の峰定寺の植栽木が保有していた1つのESTハプロタイプのみが、天然林集団にはみられなかった。したがって、植栽木が保有するユニークな遺伝的変異量は少ない。このことは、植栽木の遺伝的多様性は天然林集団のもの

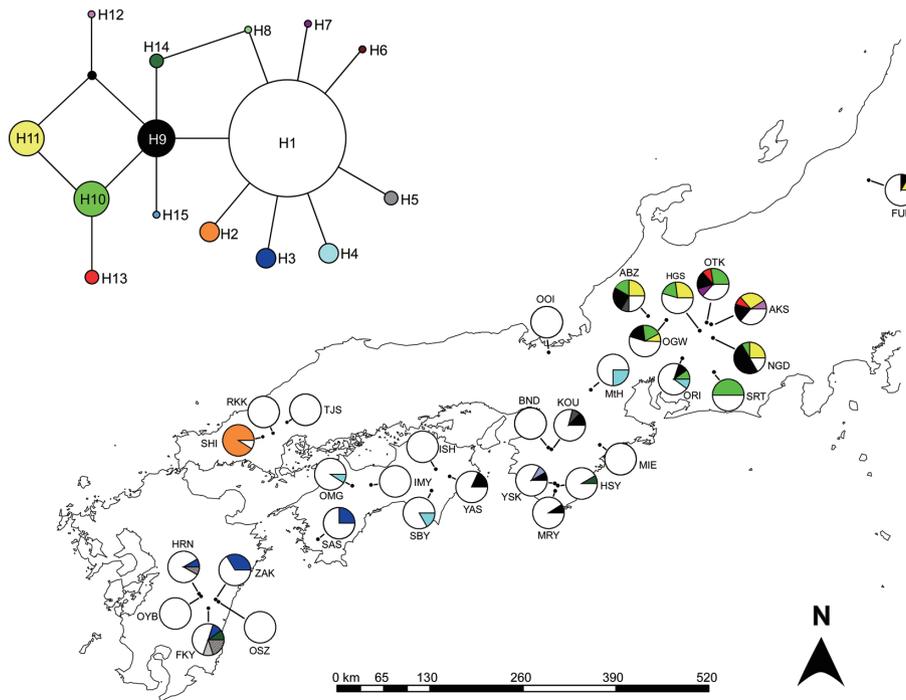


図-7 葉緑体DNAの *atpI-rpoC2*、*trnD-trnT*、*rpl16* イントロン、*petN-psbM*、*ndhA* イントロン (2213 bp) における一塩基多型とインデルにもとづくコヤマキ31集団における15の葉緑体ハプロタイプの分布。円グラフは各集団のハプロタイプ頻度を表す。左上の図は中央値結合法によって作成されたハプロタイプネットワークであり、円の大きさは各ハプロタイプの頻度に比例する。また、ハプロタイプを結ぶ直線は1回の突然変異を表し、ループ構造からホモプラシーが推定される。

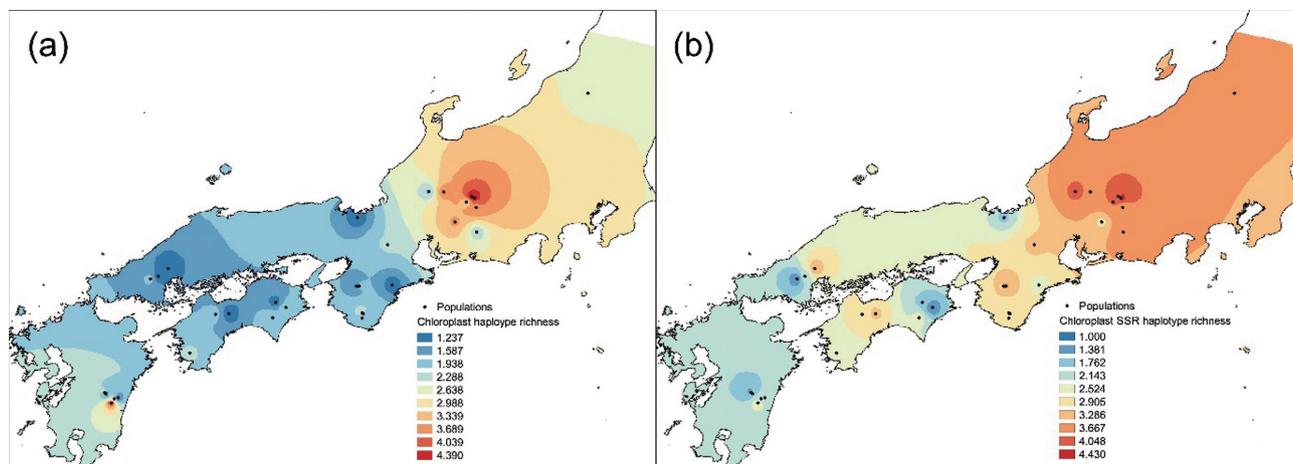


図-8 コウヤマキ集団における (a) *atpI-rpoC2*, *trnD-trnT*, *rpl16* イントロン, *petN-psbM*, *ndhA* イントロンにおける一塩基多型とインデルにもとづくハプロタイプリッチネス, (b) *trnT-trnL* における一塩基繰り返し配列にもとづくハプロタイプリッチネスで示される遺伝的多様性の空間分布。ハプロタイプリッチネスは31集団のデータをもとに計算され、QGIS ver. 2.12 の IDW) 補間法を用いて地図化された。

表-4 寺院等に生育しているコウヤマキ 16 植栽木における胸高直径、推定樹齢等の情報

植栽木 No.	寺院名	県名	胸高直径 (cm)	推定樹齢		EST ハプロタイプ数 ^c	対立遺伝子数 ^d	葉緑体ハプロタイプ
				A ^a	B ^b			
1	甘泉寺	愛知	201	600	836	0	0	H9
2	笠形寺	兵庫	145	500	606	0	0	H1
3	玉桂寺	滋賀	194	1200	809	0	0	H1
4	峰定寺	京都	121	—	504	0	0	H1
5	長谷寺	新潟	146	400	610	0	0	H1
6	光照寺	埼玉	121	500	504	0	0	H1
7	泉龍寺	群馬	204	800	849	1	0	H1
8	勝福寺	埼玉	156	—	650	0	0	H1
9	大国寺	岐阜	151	—	630	0	0	H1
10	真乗院	埼玉	143	800	597	0	0	H11
11	如法寺	福島	156	1180	650	0	0	H1
12	石雲寺	宮城	159	800	662	0	0	H1
13	神宮寺	京都	131	400	544	0	1	H1
14 ^e	明徳寺	熊本	—	—	—	0	0	H1
15	小糸家のコウヤマキ	熊本	99	300	411	0	0	H3
16	大平のコウヤマキ	静岡	180	—	750	0	0	H1

^a 現地で推定されている樹齢。

^b 胸高直径の成長率 (1.2mm/年) をもとに推定した樹齢。

^c 天然林集団では検出されなかった EST 配列のハプロタイプ数。

^d 天然林集団では検出されなかった核マイクロサテライトの対立遺伝子数。

^e 若齢木。

にほとんど含まれていることを意味する (図-9)。植栽木に固有な葉緑体ハプロタイプはみられず、16個体のうち13個体は天然林集団で最も広域に分布するハプロタイプを保有していた。核 SSR の変異では、福島と九

州の集団に地理的に近い植栽木はそれらの集団に遺伝的にも類似していたが、あまり分化していない地域では、植栽木が最寄りの集団と近縁であるかどうかは不明瞭であった (図-9)。

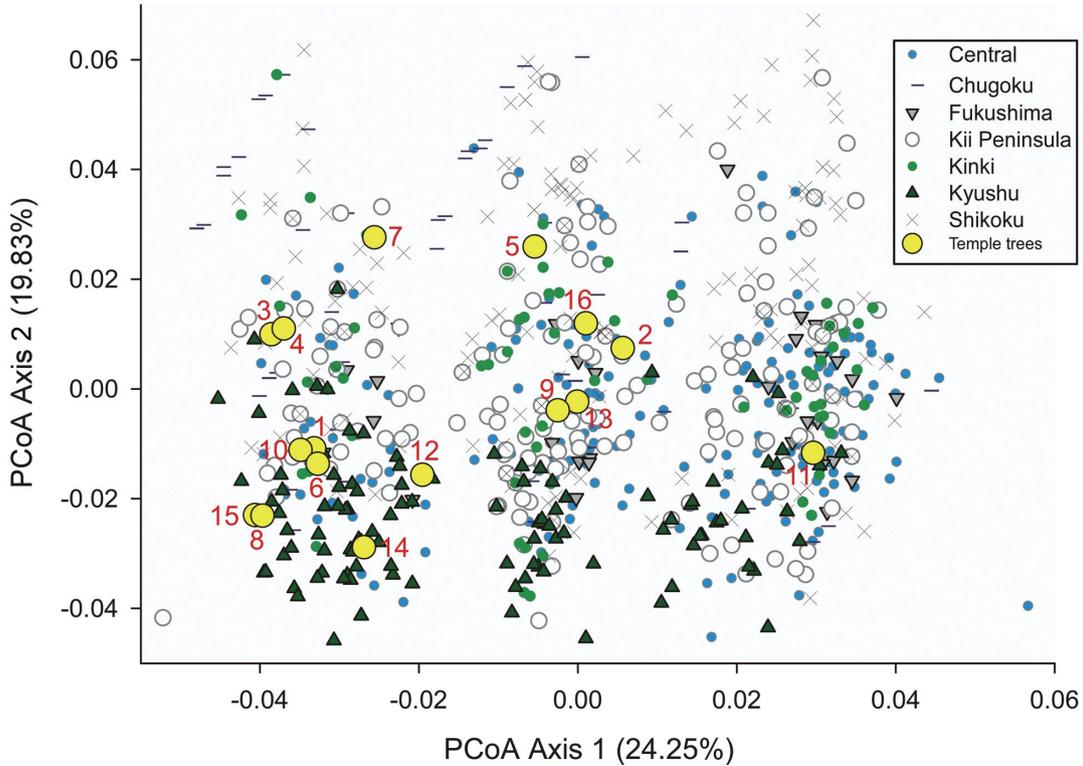


図-9 Nei の遺伝距離 D_A にもとづく主座標分析で示されるコウヤマキ 31 集団の 916 個体と寺院等の植栽木 16 個体の遺伝的關係。遺伝距離 D_A は核マイクロサテライト 8 遺伝子座の遺伝子型をもとに計算された。図中の数字は表-4 の植栽木 No. に対応する。

おわりに

これまでの研究から、コウヤマキの分布域には有意な遺伝的多様性の空間的構造化が起きていることが明らかとなった。分布域の東側の集団、特に本州中央部の集団が最も高い遺伝的多様性を保有していた。西日本の九州や中国の孤立集団、そして福島の最も北の集団では、調査した全ての遺伝マーカーで遺伝的多様性が低下しているとともに、他の地域の集団から遺伝的に強く分化していることが示された。この結果は、花粉が風で散布されるにもかかわらず、コウヤマキは遺伝的浮動の効果に対して脆弱であることを示唆している。全体としては、これまでの研究成果は、日本だけでなく世界的にも非常に重要なコウヤマキの将来の保全管理に

対して有用なガイドラインを示していると考えられる。

最後に、本稿をまとめるにあたり有益なご助言をいただいた京都大学の井鷲裕司教授と筑波大学の津村義彦教授に心から深く感謝を申し上げる。なお、本稿は、著者が執筆した英文原稿を森林遺伝育種編集委員会が翻訳したものである。

引用文献

Christophel DC (1973) *Sciadopitophyllum canadense* gen. et sp. nov.: A new conifer from western Alberta. American Journal of Botany 60: 61–66
 Crisp MD, Cook LG (2011) Cenozoic extinctions account for the low diversity of extant gymnosperms compared with angiosperms. New Phytologist 192: 997–1009

- Hayata B (1931) The *Sciadopityaceae* represented by *Sciadopitys verticillata* Sieb. et Zucc., an endemic species of Japan. *Botanical Magazine (Tokyo)* 45: 567–569
- Kawase D, Ueno S, Tsumura Y, Tomaru N, Seo A, Yumoto T (2009) Development and characterization of EST-SSR markers for *Sciadopitys verticillata* (*Sciadopityaceae*). *Conservation Genetics* 10: 1997–1999
- Nei M, Tajima F, Tatenos Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular-data 2. Gene-frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153–170
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- Schlarbaum SE, Tsuchiya T (1985) Karyological derivation of *Sciadopitys verticillata* Sieb. et Zucc. from a pro-Taxodiaceous ancestor. *Botanical Gazette* 146: 264–267
- Tsukada M (1963) Umbrella pine, *Sciadopitys verticillata*: Past and present distribution in Japan. *Science* 142: 1680–1681
- Worth JRP, Sakaguchi S, Tanaka N, Yamasaki M, Isagi Y (2013) Northern richness and southern poverty: contrasting genetic footprints of glacial refugia in the relictual tree *Sciadopitys verticillata* (*Coniferales: Sciadopityaceae*). *Biological Journal of Linnean Society* 108: 263–277
- Worth JRP, Yokogawa M, Pérez-Figueroa A, Tsumura Y, Tomaru N, Janes JK, Isagi Y (2014) Conflict in outcomes for conservation based on population genetic diversity and genetic divergence approaches: a case study in the Japanese relictual conifer *Sciadopitys verticillata* (*Sciadopityaceae*). *Conservation Genetics* 15: 1243–1257