

ゲノム情報を活用した効率的な希少植物種の保全研究

2026 年 1 月

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
農学学位プログラム
博士（農学）学位論文

白石 祐彰

目次

第1章 序論	1
1.1 生物多様性とその保全	1
1.2 建設事業と生物多様性保全	2
1.3 生物多様性保全と社会資本整備との関連	2
1.4 湿地環境における土地利用改変と生物多様性保全の課題	3
1.5 植物の遺伝的多様性の保全	4
1.5.1 保全遺伝学的重要性	4
1.5.2 遺伝的多様性に基づく植物の保全遺伝学的研究	5
1.6 遺伝子解析の高度化	7
1.6.1 遺伝解析の変遷	7
1.6.2 次世代シーケンサーを用いた遺伝的多様性解析の方法	8
1.6.3 遺伝子発現解析と希少植物の環境適応	9
1.7 研究の目的	10
第2章 希少植物タチスミレの地域集団の遺伝的多様性および遺伝子発現情報	11
2.1 はじめに	11
2.2 材料	11
2.3 方法	12
2.4 結果	14
2.4.1 MIG-seq 解析	14
2.4.2 RNA-seq 解析	15
2.5 考察	15
第3章 希少植物ハナムグラの地域集団の遺伝的多様性	43
3.1 はじめに	43
3.2 材料	43
3.3 方法	44
3.4 結果	45
3.5 考察	45
第4章 つくば市における希少植物クロホシクサの地域集団の遺伝的多様性および遺伝子 発現情報	59
4.1 はじめに	59
4.2 材料	59
4.3 方法	60
4.4 結果	61
4.4.1 MIG-seq 解析	61
4.4.2 RNA-seq 解析	62

4.5 考察.....	63
第5章 総合考察.....	83
5.1 繁殖様式の違いが生物集団の遺伝的多様性に与える影響とその生態的意義	83
5.2 希少植物の有害遺伝子蓄積と環境適応能力の評価.....	84
5.3 保全管理単位の設定	85
5.4 希少植物の生息域内保全戦略	86
5.5 希少植物の生息域外保全戦略	86
5.5.1 消失する生息場の近隣に生息域外保全地を確保する場合	87
5.5.2 生息域外保全地を全く外部に作る場合	87
5.6 開発にともない消失のおそれのある希少植物の保全策の提案	88
5.7 対象種に関する今後の課題	89
5.7.1 サンプリング地点の増加	89
5.7.2 湿地植物以外の希少植物への応用.....	89
5.8 希少種を効率的に保全するための遺伝的アプローチ	89
5.8.1 効率的な解析手法について	89
5.8.2 効率的な評価について.....	90
引用文献.....	95
謝辞	106

第1章 序論

1.1 生物多様性とその保全

生物多様性とは、同じ種の遺伝的変異から、複数の種、属、科、さらに上位の分類群まで、あらゆるレベルで考慮される生物の多様性を指す (Wilson and Peter 1988)。また、特定の生息地における生物の群集とそれらが生息する物理的条件の両方から構成される生態系の多様性が含まれる (Wilson 1992)。生物多様性条約では、生物多様性は、生態系、種、遺伝子の三つのレベルの多様性からなるとしている (United Nations 1992)。条約の主たる目的は種の多様性を守ることにあるが、そのためには、生態系の多様性を維持していかなければならない。さらに、遺伝子の多様性が低下した種は、絶滅の可能性が高まるため、遺伝子の多様性の維持が極めて重要である。このように三つのレベルの多様性は、それぞれ独立して保全することはできないため、全ての多様性をセットで保全することが必要である (藤倉 2004)。

生物種は長い歴史の中で、氷期や間氷期といった気候変動や地殻変動などの地史的イベントを経験し、様々な分布変遷を経て、各地域の環境変動に適応することで現在の分布域を形成している。そのため、同じ種内でも分布地域ごとの集団は異なる歴史的背景を持つ種内系統に分化しており、これらは遺伝的多様性や集団遺伝学的研究として評価されてきた (Avice 2000)。遺伝子の多様性は、本研究が対象とする生物多様性のレベルであり、生物種が得た遺伝的多様性や地域性は一度消滅すると復元できないため (Moritz 2002)、これらの種内遺伝構造および地域系統の保全は種の進化的健全性を維持するために不可欠である (Franke 1974; Keith et al. 2000; Broadhurst et al. 2008)。

生物多様性の損失は、農地や草原の開発、湿原や自然湖沼の開拓、自然河岸や海岸の整備などに伴う土地利用・改変が主な原因のひとつとされている (環境省 2023)。健全な生態系は食料、水、医療などの資源を提供し、気候の安定や土壌の質を保つ役割を果たしている。多様な生物が存在することで、環境変化に対する適応力が高まり、持続可能な社会の実現に向けた基盤が形成される。このような生物多様性の重要性が広く認識されるようになり、国際社会はこの問題に対する取り組みを強化している (日本学術会議統合生物学委員会 2010)。2022 年の生物多様性条約第 15 回締約国会議 (COP15)では、世界目標である「昆明・モンリオール生物多様性枠組」が採択された (United Nations 2022)。自然と共生する世界を 2050 年までに実現するために、「自然を回復軌道に乗せるために、生物多様性の損失を止め反転させるための緊急の行動をとること」、いわゆるネイチャーポジティブが 2030 年までのミッションとして掲げられた (環境省自然環境局 2024)。福井 (2023) は、ネイチャーポジティブに向けた道筋を以下のように示した。(1) 生態系の健全性を回復させることで人類の存続基盤を確保される。(2) その基盤上で生じる社会課題を、健全な生態系が発揮する機能を活用し解決することで、自然の恵みが持続的に維持される。(3) 人々がこのような自然の恵みを享受し利用するなかで、生物多様性の重要性に対する理解が醸成される。さらに、(4) 自然や生態系への配慮が評価される経済の仕組みが構築されることで、人々の行動変

容を促される。こうした変革により、さらなる生態系の健全性に寄与する好循環が生まれるとしている（福井 2023）。

1.2 建設事業と生物多様性保全

市民生活の向上につながる社会資本整備は建設業界の最も重要な役割である。公共施設の建設を通じて、地域の発展や生活の質の向上に貢献している。しかし、建設業界においては、1960年代からの高度成長期には道路交通網などの社会資本の量的確保は重視されたものの、生物多様性をはじめとする環境保全は後回しされてきた。そのため、戦後の日本における建設業界による道路、河川、沿岸域などにおける社会資本整備は、むしろ生物多様性の損失をもたらしてきた。一方、社会資本整備は、人々の安全で快適な生活の実現を目的とするものであり、生物多様性の保全と究極的には共通する目的を持っている。従って、建設業界による社会資本整備と生物多様性保全の両者は、目的を実現するアプローチや、それぞれが満たし得る人間の福利の要素、時間スケールが異なるだけであり、適切にバランスをとることで相互に補完し合う関係になり得る（越川 2017）。現在、建設事業においても、社会資本整備として行われる土地利用や改変に際して、周辺生態系への影響低減や環境創造を同時に実施することが社会的責任の一部となっている（大澤・小山内 2016）。

大規模な土地改変を直接行う建設業は、マンション建設や造成、開発に伴う緑地や里山、生物、土壌の消失などにより生物多様性に多くの影響を与えている。しかし、絶滅危惧生物種の保護に対する法的な対応や環境マネジメントシステムの導入により、建設業は生物多様性に関連する環境への対策を講じるようになってきている。それでも、事業者や計画者の存在によって建設業が生物多様性の保護に果たす役割が不明確な部分が残っている（石井ら 2012）。

1.3 生物多様性保全と社会資本整備との関連

建設業が生物多様性の保護に果たす役割には不明確な部分があるものの（石井ら 2012）、日本においても社会資本整備と生物多様性保全の両立を目指した試みが、近年なされている。大規模な社会資本整備であるダム工事の例としては、工事区域内で動植物の持続的な生息を確保するために里山環境の復元整備が行われた結果、ニホンアカガエル (*Rana japonica*)、シュレーゲルアオガエル (*Rhacophorus schlegelii*)、トノサマガエル (*Rana nigromaculata*) など、カエル類の生育が継続的に確認できた事例がある（越川・高砂 2016）。砂防堰堤事業の例では、事業地内で生育が確認された天然記念物のヒメタイコウチ (*Nepa hoffmanni*) を保全するため、地盤の透水性を確保する設計変更を行うことでその生育環境である湿性環境を保全した。三重県桑名市における橋の下部の補強工事においては、現場の玉石を撤去する設計変更により絶滅危惧種のタコノアシ (*Penthorum chinense*) の繁茂エリアが拡大した（伴 2022）。

一方、緑化事業においては、希少生物の保全という観点ではなく、外来種問題を回避するという観点から、生物多様性保全との両立が図られるようになった。土木施設や建築物の建

設に伴って作られる人工的斜面である法面は、裸地状態のままだと風雨や凍結融解による侵食、表層崩壊の危険が増すため、また景観的にも周辺と調和しないことから、しばしば緑化が図られる。しかし、このような緑化に用いられる植物は外来種が多く、ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia*)、シナダレススメガヤ (*Eragrostis curvula*) などが自然生態系に侵入し、問題となっている (福永 2007)。一方、同じ種であっても、緑化法面に外国産在来種の種子を導入すると、外部から異なる遺伝子が持ち込まれ、地域の在来集団が有する環境に適応した遺伝子のセットが種内交雑によって失われるという遺伝的攪乱の問題が生じる。長期的には、このような遺伝的攪乱によって地域集団間の遺伝的分化や種の分化といった生物進化のプロセスが損なわれることが懸念される (今西 2018)。そのため、遺伝子解析によって適切な調達範囲を設定する方法が、遺伝子攪乱を防止するための優れた手段であるとされている (一般社団法人 生物多様性保全協会 2016)。緑化によく使用されるヤブラン (*Liriope muscari*) については、このような遺伝子攪乱を防止するための遺伝解析が行われている (Watanabe et al. 2022)。Watanabe et al. (2022) によると、大都市に近い関東地方においては、商用に生産された個体および関東地方周辺の自然分布域に生息する個体が同じ遺伝グループに属しているため、緑化による遺伝的攪乱の可能性は低い。一方、琉球諸島では、異なる遺伝集団に属する個体が同じ育種所で生産されており、緑化による遺伝的攪乱の可能性が示唆された (Watanabe et al. 2022)。さらに、樹木については、針葉樹や広葉樹など 43 種の樹種について、遺伝解析に基づき遺伝学的ガイドラインが提案されている (津村・陶山 2015)。また、コナラ (*Quercus serrata*) とミズナラ (*Quercus mongolica*) については、中部地方において詳細な遺伝構造の解析結果に基づいた遺伝的ガイドラインの必要性が示唆されている (Onosato et al. 2021)。さらに、建設事業においても、遺伝子攪乱を防ぐための取り組み例がある。埼玉県長瀬町および寄居町の送電鉄塔建設予定地において、工事に伴う伐採前に採種して育苗したコナラを植栽した結果、植栽集団が自生集団の遺伝的多様性および地域性を維持できたことが示された (白石ら 2015)。社会資本整備と生物多様性の保護は相反するものではなく、計画段階から生物多様性への配慮を組み込むことや、遺伝子解析を活用して地域の在来種を守る取り組みなどにより両立が可能である。今後、技術的知見が蓄積されることによって、生物多様性の保護と社会資本整備の調和がより一層図られることが期待できる。なお、遺伝子攪乱については、1.5.1 保全遺伝学的重要性で後述する。

1.4 湿地環境における土地利用改変と生物多様性保全の課題

本研究が対象とするであるタチスミレ (日本植物分類学会 2025a) などが生息する湿地は、古くから、治水などの安全対策や農業用水の確保のために、土地利用改変を受けてきた。伝統的には、湿地は資源採集の場であるとともに、干拓によって新たな活動の場として改変する生態系でもあった (鷲谷 2007)。このような改変傾向は時代とともに強まり、20 世紀の後半には最高潮に達した。湿地の減少や生態系の劣化は社会にさまざまな問題を引き起こしている。明治期以降の土地利用転換による自然の湿地の大規模な喪失は、近代的な土木工

学の進展に伴い、水田が開発された地域で特に著しく、圃場整備による乾田化や排水路のコンクリート化などにより、湿地としての機能が低下している。その結果、日本に生育する水草の 1/3 が絶滅危惧種となっている（鷲谷 2007）。湿地生態系の急激な減少は、各種の個体数を減少させ、遺伝的浮動による遺伝的多様性の喪失をもたらしたと考えられる（Saeki et al. 2015）。

本研究の調査地である渡良瀬遊水地と菅生沼においても、改変の影響を受けてきたと考えられる。渡良瀬遊水地は、足尾山地に源を発する渡良瀬川の河川区域にあり、遊水地内では巴波川と思川が渡良瀬川へ流れ込み、南下して利根川に合流している。利根川本川の流れに影響を与えないよう、これら 3 河川の洪水調節を行うための 3 つの調節池と、渇水時に生活用水を補給するための国内初の平地ダムである渡良瀬貯水池によって、利根川中・下流域の治水と利水に重要な役割を担っている。近年、渡良瀬遊水地では渡良瀬川の河道付け替えによる洪水土砂の堆積が進み、河川流量の人工的管理の強化により冠水頻度が低下している（小幡ら 2012）。最近では侵略的外来植物であるセイタカアワダチソウ (*Solidago altissima*) の侵入が著しく、現在広範囲にわたって分布するようになっている（澤田ら 2011）。菅生沼は茨城県の南西部に位置し、全長 50 km ほどの江川と飯沼川の合流部で形成された水域である。この位置は、両河川が本流の利根川に流入する直前にあり、洪水時には利根川の遊水池として機能している（原口 2000）。周囲にあった湖沼は次々と水田化されたが、菅生沼は飯沼の排水路および遊水地としての性格から、現在まで干拓を免れてきた。1940 年代には幅 600 m、長さ 5 km ほどの細長い沼であったが、年々陸化が進み、現在では 1940 年代の開水面の約 20 % にまで縮小している（小幡・飯田 1996）。特に渇水時には、菅生沼は南北の 2 水域に区分され、その間を細い流路が結んでいる状態となり、さらなる陸化が進行している（原口 2000）。

1.5 植物の遺伝的多様性の保全

1.5.1 保全遺伝学的重要性

生物種の分布変遷や適応の歴史を反映した遺伝的多様性は一度消滅すると復元できないため、遺伝的多様性の喪失のリスクがある種を保全することは、その種の進化的な健全性を維持するために必須であるといえる（Moritz 2002）。遺伝的多様性は、集団が環境の変化に応じて進化するために必要である（Frankham et al. 2002）。集団の遺伝的多様性が高くなることで、集団内に様々な環境応答を示す個体が存在することができ、また攪乱に対する許容範囲が広がるため、遺伝的多様性が高い集団は環境変異や物理的攪乱に強いと考えられている（Hughes et al. 2008）。

一方、従来の保全生態学では、生物の希少性を評価する上で最も重要な要素は、各種の個体数や生育面積の多寡や減少率であり、これらはレッドリスト掲載の主要な判断基準とされてきた（Gärdenfors et al. 2001）。したがって、遺伝情報を用いずに単に個体数を増加させることを目的とした生物保全が行われていることが少なくない（井鷲 2013 a）。一方、保全

遺伝学的には、希少植物の保全においては、ごく少数の家系の植物個体を増殖して植栽したり、集団間の遺伝的分化を考慮せずに移植を行ったり、血縁度を無視した人工交配を行ったり、近縁種を交雑させるなどの不適切な活動が見られることがある (Isagi and Kaneko 2014)。希少植物の保全活動における重要な目標の一つは、残存する個体群が保持している遺伝的多様性を明らかにするとともに、それを保全することである。一般的に、個体数が多いほど遺伝的多様性の保持が期待されるが、希少植物の遺伝的多様性は個体数だけでは正確に推定できず、集団や分類学の歴史に依存することが多い (Vane-Wright et al. 1991)。

異なる集団からの人工的な移植（増強）は、遺伝的多様性の維持に役立つものの、遺伝的に異なる集団を人為的に混合することは遺伝的攪乱のリスクを伴う (Nakahama et al. 2021; Tsumura 2022)。保全繁殖においては遺伝的攪乱を防ぎ、遺伝的要因による絶滅リスクを最小限に抑えるために、保全対象種の遺伝的構造を理解し、事前に保全単位を確立する必要がある (Nakahama and Isagi 2018)。

1.5.2 遺伝的多様性に基づく植物の保全遺伝学的研究

植物の遺伝的多様性の維持と保全の重要性に関して、以下の研究事例がある。

長野県戸隠神社奥社参道のスギ (*Cryptomeria japonica*) 並木について、遺伝子型から親子関係を推定した (木村ら 2013)。社叢林に生育するスギが限られた母樹からの苗木の挿し木による植林である可能性が指摘され、遺伝的多様性を維持するためには血縁関係にある母樹の重複を避けて苗木を生産することが有効であることを示した。松本ら (2013) は山梨県と新潟県におけるブナ (*Fagus crenata*) の遺伝構造を調べた結果、実生苗集団が地域の天然林と同様の遺伝的組成を保持するために、採種母樹数や採種箇所数の増加が必要であると指摘している。限られた母樹からの苗木生産が遺伝的多様性を損なうリスクが明らかとなった。

絶滅危惧種であるムニンフトモモ (*Metrosideros boninensis*) は、小笠原諸島の父島に3つの集団、兄島に1つの集団があるが、集団間で遺伝的分化していたため、花粉や種子を介した遺伝子流動が限られている可能性が示唆された (Kaneko et al. 2008)。半径 25km 以内に位置する秩父山脈の中央部に生息する 16 のウダイカンバ (*Betula maximowicziana*) 集団の遺伝的構造から、3つの集団が他の集団と区別されたが、その一因として山の尾根が遺伝的障壁として機能し、遺伝子の流れを制限していることが考えられた (Tsuda et al. 2010)。シモツケコウホネ (*Nuphar submersa*) の野生集団の研究例では、日光市の集団が那須烏山市や真岡市、佐倉市の集団と遺伝子流動することは許容されないこと、那須烏山市と真岡市の集団間の遺伝子流動および那須烏山市と佐倉市の集団間の遺伝子流動についても慎重に検討する必要があるとされている (Shiga et al. 201)。上杉 (2009) は、同一水系内のアサザの個体群を、空間的に連続したまとまり（パッチ）と比較的近距离のパッチの集合（局所個体群）という階層として捉え、霞ヶ浦内において種子や花粉、切れ藻の定着を通じた局所集団間の遺伝子流動が行われてきたことを示した。また、霞ヶ浦以外の局所個体群に明確な遺伝的まと

まが見られなかった理由として、地理的孤立を挙げた。局所個体群が密集していたと考えられる過去には、遺伝子流動による遺伝的構造が形成されていた可能性を推察した。これらの事例により、地理的要因が集団間の遺伝子流動に与える影響が明らかになった。集団間の遺伝的固有性の保全は長期的な種の保全のためには重要であり、それを破壊するおそれのある長距離の集団間あるいは流域を越えての移植には慎重であるべきである。

異なる集団間で遺伝子の交換が行われることで、遺伝的多様性を高めることができる。そのためには、管理単位を設定しなければならない。ヤマザクラ (*Cerasus jamasakura*) の 12 の自然集団の遺伝的構造から、九州と本州の 2 つのグループに分けられたので、それぞれ異なる保全単位として考えるべきであると提言された (Tsuda et al. 2009)。Honjo et al. (2009) は、サクラソウの保全・回復プログラムを推進するために、管理単位と認められる 4 つの遺伝子群（北海道、本州北部、本州中部、西日本）を検出した。また、太平洋沿岸のウバメガシ (*Quercus phillyraeoides*) の研究例では、遺伝的構造から 3 つのグループに分かれたことが確認された (Harada et al. 2018)。このことから、ウバメガシの移植や再植栽は、3 つのグループ管理単位として行うべきで、そうすることにより、沿岸保護のための生産林の育成が可能になることが示された (Harada et al. 201)。

絶滅危惧種であるサギソウ (*Habenaria radiata*) については、異なる集団間でサギソウを人為的に移植した結果、遺伝的に分化していない可能性が指摘されている (Tachibana et al. 2020)。遺伝的構造および系統解析から、姫路の西に生息するサギソウ集団と姫路の東に生息するサギソウ集団が 10 km 以上離れていて大都市で隔てられているにもかかわらず、分化していなかった。また、京都南部に生息するサギソウ集団と三重の上野森林公園に生息するサギソウ集団が約 10 km 離れているが、分化は認められなかった。

磯辺ら(2016)は、関東地方のヒメコマツ (*Pinus parviflora*) のヘテロ接合度の期待値および近交係数から、成木の遺伝的多様性が概ね保持されているものの、近交弱勢によって稚樹が減少している可能性を示唆した。北海道紋別市の開墾された場所に生息するサクラソウ (*Primula sieboldii*) の小規模に断片化された集団の近交係数から、近親交配の抑制が、種子繁殖の成功にかなりの影響を与える可能性があることが示された (Ishihama et al. 2005)。このように近交弱勢を解消するためには、遺伝的に多様な個体を導入することや、繁殖管理の見直しが必要さが指摘されてきた。

松本 (2021) は、ヒノキ (*Chamaecyparis obtuse*) 天然林における対立遺伝子の豊富さとヘテロ接合度の期待値を調べた。その結果、中部地方のヒノキ天然林の遺伝的多様性は高く保持されているが、天然更新が不十分で個体数の減少が進むと多様な遺伝的変異の喪失に繋がり、遺伝的多様性が低下する可能性を指摘した。ヒバ (*Thujopsis dolabrata*) は青森県、新潟県、石川県において、優良な実生苗を生産するためにそれぞれの県内から形質の優れた個体が選抜され、ヒバミニチュア採種園が造成されておき、遺伝学的研究もなされている。樋口ら (2012) は、ヒバの遺伝的構造および系統解析から、青森県、新潟県、石川県の選抜集団が各県の天然林集団と同等の遺伝的多様性を保持していることを明らかにした。天然

林集団間の遺伝構造の解明は、天然林資源を最大限に利用するためにも、天然林集団の保全においても重要である。貴重な遺伝資源であるヒノキ天然林やヒバ天然林にとって、選抜集団の育成が遺伝的多様性を維持する手段のひとつとなることが示された。

以上のような近年の研究事例から、遺伝情報から各集団の遺伝的構造を理解し、集団間での遺伝子流動を促進させるための生息環境の整備や育種、管理単位の設定などが、植物の遺伝的多様性の維持と保全のためには有効であることが示されてきた。

1.6 遺伝子解析の高度化

1.6.1 遺伝解析の変遷

DNA マーカーは多型を検出するよう設計された遺伝標識のことで、自然集団の多様性やその集団構造（隣接する集団との近縁の度合い）を把握するための強力なツールである（五十嵐 2022）。多型とは、DNA 塩基配列の個体差を指す。DNA 多型解析は、ゲノム全体について任意の配列を対象とするため、種内に存在するわずかな遺伝的変異を検出することが可能である。遺伝的多様性を理解するための重要な手法である。

DNA の分析手法が 1980 年代に開発され、遺伝的多型の検出方法としてサザンハイブリダイゼーション法を用いる RFLP (restriction fragment length polymorphism) 分析が行われるようになった。サザンハイブリダイゼーション法は、制限酵素で処理した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、目的の DNA 配列を検出する手法である。しかしながら、この手法は実験ステップが多く手間がかかる上、危険な放射性ラベルを使用することが一般的であったため、生態学的研究にはあまり利用されなかった（津村 2001）。1990 年代に入ると、PCR 法の発明により様相は大きく変わり、この手法を応用した様々な多型検出技術が開発された。RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法は、10 塩基のランダムな配列をもつプライマーを用いて PCR を行うことにより、ゲノム上の任意の領域を増幅できる。この手法によって、これまでの分析に比べ、簡便かつ迅速にきわめて多量のゲノム情報を得ることができるようになり、多くの生物種の遺伝的変異研究に利用された（磯田ら 2000）。AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; 増幅断片長多型) 法は、ゲノム DNA を 2 種類の制限酵素で断片化し、その断片を PCR 法により選択的に増幅して多型を検出する方法である。事前に塩基配列などの情報を必要とせずにゲノムワイドな解析が行え、基本的にどんな生物種にも適用できるといった特徴がある（朴ら 2003）。また、特にマイクロサテライト分析法は多型の検出感度が極めて高いため、親子鑑定や花粉流動、種子散布などの生態学的研究にも積極的に使われるようになった（津村 2001）。マイクロサテライトは、DNA の 4 種の塩基が 2~6 塩基単位で反復する構造を持ち、個体ごとに反復回数が異なるため、個体識別や遺伝解析に活用されている（井鷲 2013a）。しかし、新たな種に特化したマイクロサテライトマーカーを作成するには、多大な労力と時間が必要であるという課題が存在した（練・宝月 2004）。

1.6.2 次世代シーケンサーを用いた遺伝的多様性解析の方法

近年、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer : NGS) を用いた塩基配列解読技術の発展により、大容量のゲノム情報を得ることが可能となっている。ゲノムワイド領域から一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) をサンプリングし、NGS を使用してそれらの遺伝子型を決定するためのいくつかの方法が開発されている。具体的には、ゲノムを制限酵素で消化し、切断サイトの近傍の配列を決定することにより、一塩基多型 (SNP) を同定・比較する RAD-seq (Restriction Site Associated DNA Sequence)、ddRAD-seq (Double Digest RAD-seq)、および GBS (Genotyping By Sequencing) などが挙げられる。これらの方法は、分析対象サンプルから抽出した DNA を用いて PCR によりゲノム全体に散在する数万以上の領域を同時に増幅する作業から始まるが、抽出した DNA を制限酵素で切断するステップがあるため、比較的純度が高く多量の DNA 試料を必要とする。

一方、MIG-seq (Multiplexed ISSR Genotyping by Sequencing) 法は、一般的なゲノム DNA 中に多数存在するマイクロサテライトに挟まれた領域 (inter-simple sequence repeat, ISSR) を主な対象とし、NGS を用いた SNP の検出およびその読み取り (遺伝子型特定) を、より迅速・簡便・安価に実現する。PCR が可能な程度の量と純度の DNA 試料であれば分析が可能である (井鷲 2001; 陶山 2019; Suyama and Matsuki 2015)。ISSR を増幅するための複数の ISSR プライマーを、生物種を問わずに適用できる共通プライマーセットとして用いることで、シーケンシングの対象となるライブラリーを構築する。現在では、非モデル生物の SNP をマーカーとした分子系統解析や遺伝的集団構造解析を視野に入れることが可能な状況にある (五十嵐 2022)。参照ゲノムがなくても SNP を検出でき、遺伝マーカーを設計する必要がないことは、非モデル生物を対象とした研究にとって有利な特徴である (阪口 2019)。SNP はゲノム上に数百~千 bp (塩基対) に 1 個の割合で存在し、量および質 (感度) が圧倒的に高い解析が期待できる。また、NGS 解析への敷居が低くなることで、マイナーな生物を対象にした SNP を利用した解析が増え、これまで単一な集団であると考えられていた種でも集団構造についての新たな知見が見いだされる可能性がある (五十嵐 2022)。

SNP のデータセットを用いることで、例えば、それぞれの個体が互いにどのくらい近縁かを簡単に計算することができる。ある 2 つの系統を抽出し、SNP を数えてゲノムの全長で割ることで、ゲノムにおいて何%の塩基に置換が見られるかが求められる。この値はより近縁であれば小さく、より遠縁であれば大きくなる。すべての個体の組み合わせについてこの計算を行い平均した値は塩基多様度と呼ばれ、その種や集団の遺伝的な多様性の基本的な指標となる (土松 2017)。さらに、各個体の SNP 型から、明確に定義されていない集団構造を推定し、各個体を推定集団 (基礎集団) へ割り振り (グループ化) するストラクチャー解析なども行われる (穴田 2018)。このように、遺伝的解析技術の進展は、生物多様性保全における新たなアプローチを提供する。

1.6.3 遺伝子発現解析と希少植物の環境適応

NGS の性能向上に伴い、RNA シーケンシング (RNA-Seq) を用いた遺伝子発現解析が広く普及している (西田 2017)。この手法では、サンプル中の RNA 配列を NGS で解読し、得られた短鎖配列をつなぎ合わせることで、発現していた RNA の全長配列を得る。全遺伝子の配列を完全に把握することは難しいが、一定量発現している遺伝子の配列は特定できる (佐藤・小池 2018)。RNA 解析は、参照配列の有無に関わらずさまざまな情報を提供する (石毛 2016)。遺伝情報は生物個体の世代間で受け継がれるが、遺伝子発現の測定情報は、生物が現在生きている生活状態をスナップショットのように反映したものである (大羽 2006)。このように、機能遺伝子や有害変異の推定が進むことで、生物多様性保全に新たな潮流をもたらしている (Paez et al. 2022)。

メッセンジャーRNA (mRNA) の変異は希少植物に様々な影響を与える。mRNA の塩基配列はタンパク質のアミノ酸配列を決定し、3 つの塩基が 1 つのアミノ酸に対応する。この 3 つの塩基の単位をコドンと呼び、コドンは 64 種類存在し、それぞれ異なるアミノ酸に結びついている。非同義 SNV (Single Nucleotide Variant) は、コドンの 1 つの塩基置換によりアミノ酸の種類が変わるものを指し、同義 SNV は変わらない変異である。全 SNV に対する同義 SNV の割合は希少植物の遺伝的多様性を評価し、非同義 SNV の割合は有害なアミノ酸変異の蓄積を示す。さらに、1 つの遺伝子がコピーされて 2 つの遺伝子になることを遺伝子の重複といい、この重複遺伝子の割合には種間差がある。この差は環境の多様性が低い種で重複遺伝子が失われるためであり、多様性の低い環境に生息する種では遺伝子にかかる選択圧が変わり、重複遺伝子を維持できなくなることを示している。全 RNA に対する重複遺伝子の割合は希少植物の環境適応力を示す指標となる (Isagi et al. 2020; Hamabata et al. 2019; 牧野・河田 2015)。

研究例は少ないものの、近年では RNA 解析によって有害遺伝子の蓄積量や環境適応能力を直接的に観測することが可能となっている。Tsunenari et al. (2024) の研究では、タイワンホトトギス (*Tricyrtis formosana*) の台湾集団、西表島集団、沖縄本島集団の RNA 解析により、西表島集団が他の集団に比べてゲノム内に蓄積された有害変異の量が多く、本質的に脆弱であることが判明した。Hamabata et al. (2019) は、小笠原父島固有の 4 種類の植物について、遺伝的多様性や有害なアミノ酸変異、重複遺伝子の割合を算出した。ムニンノボタン (*Melastoma tetramerum*) の苗木が野生で長期生存できなかったのは、有害なアミノ酸変異の蓄積による可能性があると推測されている。

RNA 解析から得られるデータは膨大であり、その扱いや解析には特別な設備や専門知識が必要である。具体的には、データベースやサーバーの構築、プログラミング技術が求められる。このような背景の中、情報学やコンピュータ技術に基づいたデータ解析が行われる研究は、生命情報科学 (バイオインフォマティクス) として確立されており、専門家が存在する。そのため、すべての生物学者が各プロセスを一人で担う必要はない (佐藤ら 2012)。また、複数のソフトウェアを使用した試行錯誤や、高性能なコンピュータの使用が求められ

る。さらに、RNA は非常に不安定で分解されやすく、RNA 分解酵素により容易に分解される。この RNA 分解酵素は汗や唾液、皮膚などにも存在するため、RNA 抽出時には手袋を着用しなければならない。このように、RNA 解析は高い精度と情報量を提供する一方で、試薬や機器、専門的な技術、データ解析にかかるコストが DNA 解析に比べて高い。

1.7 研究の目的

建設工事などの開発行為において、希少動植物を保全するために、工事中や工事完了後の生物に対する影響を軽減する保全措置の計画を求められることがある。同一の希少種であっても、遺伝的に明確に分化した集団を区別しないで保全を行うことは、その種が長い期間にわたって経験してきた進化的な履歴を破壊することにつながる。一方で、同一の希少種を必要以上に細かいグループに分け、それぞれを個別に保全することは、より多くの労力と資金を要する。このため、生物保全に使用できる限られた資源（予算、労力、専門知識など）を浪費する恐れがある (Isagi and Kaneko 2014)。特に、予算上の制約がある場合には、保全対象とすべき希少植物の集団に優先順位を設定する必要がある。この場面において、遺伝情報は有用に活用できるとされている (井鷲 2013b)。

本研究が対象とするタチスミレ、ハナムグラ (*Galium tokyoense*)、クロホシクサ (*Eriocaulon parvum*) などの湿地性の希少植物は、関東平野北部における過去から現在に至る開発を通じて、本来広域的に生育していたものが、分断化されてきたと考えられる。分断化された湿地において遺伝的多様性を考慮しながら保全を進めることで、これらの希少植物の絶滅リスクを軽減することが期待される。さらに、関東地方北部には、本研究対象以外にも絶滅の危機にさらされている湿地性の希少植物も多く、これらの保全にも有効な知見を与えると考えられる。

本研究ではタチスミレ、ハナムグラ、クロホシクサを対象に、NGS を用いた大規模並列シーケンシングによって得られた DNA 塩基配列を解析し、希少種の集団間の遺伝的多様性や遺伝構造を明らかにする。さらに、RNA-seq 法を用いて解析した有害遺伝子の蓄積量や遺伝子重複量を基に、環境変化に対する脆弱性や環境ストレスに対する頑健性を評価する。この評価を通じて、希少植物の保全難易度を判断する。これら結果を用いて、それぞれの種における集団の遺伝的攪乱を抑制できる保全策の提案を行う。また、生態的特性や生息地の歴史の変遷による遺伝子流動の影響も考慮に入れることで、実用的な保全策を構築する。最後に、ゲノム情報を活用した効率的な希少植物種の保全について考察する。

第2章 希少植物タチスミレの地域集団の遺伝的多様性および遺伝子発現情報

2.1 はじめに

建設業は、インフラ整備や都市開発において大規模な土地改変を行うことで社会に貢献しているが、建設業の活動により湿地が破壊されると、希少植物が絶滅の危機にさらされる可能性がある。一般社団法人日本建設業連合会（2015）は、次のような取り組みを提言している。(1) 事業区域内にどのような植物が生息しているかを事前に調査して、保全の対象となる希少な植物を決定する。(2) 生息域への影響を回避・低減することができない場合、現在の生息場から他の場所に移動させ、生息・生育の継続をさせる保全措置を適切に行う。ただし、Isagi and Kaneko (2014) は、種内を必要以上に細かいグループに分け、それぞれを個別に保全・管理することは、より多くの労力と資金を要し、生物保全に使用できる限られた資源を浪費することになると指摘している。

湿地は多様な生物の生息地であり、本研究が対象とする湿生の希少植物にとって重要な生息環境である。渡良瀬遊水地、菅生沼および小貝川河川敷の湿地には、希少植物であるタチスミレ (*Viola raddeana*) が生息している。タチスミレは隔離遺存的な種であり（大橋ら 2018）、広域に分布する普通種と比べ、絶滅の危険性は高い（金指・吉丸 2013）。そこで、本章では、タチスミレを対象に、NGS を用いた大規模並列シーケンシングによって得られた DNA 塩基配列を解析し、集団間の遺伝的多様性や遺伝構造を明らかにする。さらに、RNA-seq 法を用いて解析した有害遺伝子の蓄積量や遺伝子重複量を基に、環境変化に対する脆弱性や環境ストレスに対する頑健性を評価する。また、これらの評価のために、近縁普通種との比較を行う。これら結果を用いて、本種の保全策を提言する。

2.2 材料

希少植物タチスミレとその近縁普通種であるツボスミレ (*Viola verecunda* var. *verecunda*) およびアギスミレ (*Viola verecunda* var. *semilunaris*) を対象とした。タチスミレは被子植物双子葉類スミレ科スミレ属で環境省のレッドリストで絶滅危惧Ⅱ類に指定されている多年生草本種である（日本植物分類学会 2025a）。絶滅危惧Ⅱ類に指定されるまで減少した要因は、生育地の管理放棄、自然遷移、河川開発とされる（澤田ら 2011）。本州（関東地方）、九州（大分県、鹿児島県）に分布。国外では、朝鮮半島、中国（東北部）、ロシア極東地方に分布し、低湿地のヨシ原や河畔林などに生育する（日本植物分類学会. 2025a）。ツボスミレは、タチスミレの近縁普通種で、平野や丘陵、山地のやや湿った草地や林内にふつうに見られる。高さは、5~20 cm で茎は柔らかく、倒れやすい。アギスミレはツボスミレの変種で、花期以前のロゼットは両者とも同じ形をしていて区別できない。タチスミレおよびツボスミレは、開放花を咲かせた後に晩秋まで閉鎖花によって種子を生産する（澤田ら 2010; 吉田・横山 2011）。開放花は潜在的には他殖と自殖の両方を行うことが可能性であるが、閉鎖花は開花することなく蕾の中で同花受粉による自殖のみを行う（Ammarellou et al.

2021)。

MIG-seq 解析用のタチスミレとツボスミレは、茨城県の菅生沼 (A 地点と C 地点)、小貝川の河川敷 (B 地点と D 地点) および渡良瀬遊水地 (W 地点) で採取した (図 2.1)。タチスミレの葉が三角披針形であることがはっきりわかる 7 月に採集を行った。採集されたタチスミレの個体数は 51、ツボスミレは 27 であった。渡良瀬遊水地では、ツボスミレが 2 個体しか採取できなかったため、ツボスミレの変種であるアギスミレを 4 個体採取した (表 2.1)。サンプリング場所、時期、個数は、希少植物の生態学的な特性や生息環境に詳しく、各地点を踏査している専門家とともに決定した。サンプリングを行う際、生息地域の関係者に対して専門家の指導のもとで行動していることを示すため、またサンプリングが生息地や周囲の生態系に与える影響を最小限に抑えるために、専門家に同行していただき実施した。RNA-seq 解析用のタチスミレとツボスミレは、茨城県の菅生沼 (A 地点と C 地点) および小貝川の河川敷 (B 地点と D 地点) でそれぞれ 2 個体を採取した。さらに MIG-seq 解析において、関東の集団の遺伝的分化程度を比較するために、遺伝的構造解析の外群的な位置付けとして、韓国慶尚南道の河川沿いの湿地帯で採集されたタチスミレ 10 個体の遺伝情報を加えた。

2.3 方法

サンプルは、DNeasy Plant MiniKi (Qiagen 社製) を用いて DNA を抽出した。DNA サンプルを用いて MIG-seq 法 (Suyama and Matsuki 2015) によるゲノムワイド SNP データを取得した。MIG-seq ライブラリーは 2 段階 PCR で調製した。Suyama and Matsuki (2015) で設計された multiplexed inter-simple sequence repeats (ISSRs) 増幅用のプライマーセット (MIG-seq primer set-1) を使用し、MultiplexPCR Assay Kit Ver.2 (タカラバイオ社製) で 1st PCR 反応を行った。1st PCR 産物は MultiNA (島津製作所社製) による増幅の確認を行い、Suyama et al.(2022) に従い 2nd PCR を行い、ライブラリーを作成した。ライブラリーは 1 フローセルを使用し MiSeq (Illumina 社製) によりシーケンスされた。

アダプターや末端配列、低品質リード、極端に短いリードは、Trimomatic 0.39 (Bolger et al. 2014) を用いて、Suyama et al.(2022) に従い除去した。次に、Stacks 2.41 pipeline を用いて塩基配列が全く同じリードを束ね (スタック)、スタックを比較して SNP を検出した (Catchen et al. 2013; Rochette et al. 2019)。スタック作成に必要な最小カバレッジ深度 (m) = 3、スタック間の最大距離 (M) = 2、カタログ作成時の遺伝子座間の最大ミスマッチ (n) = 2。SNP 検出は、韓国慶尚南道の河川沿いの湿地帯で採集されたタチスミレ 10 個体の遺伝情報を加えて、高分解能を得るために階層的に行われた。第一に、種間および種内の遺伝的分化を比較するために、全 88 サンプル (タチスミレ 61 サンプルおよびツボスミレ 27 サンプル) のうち 10 サンプル以上に存在する SNP を抽出した (「集団」パラメータ $R = 0.1$ 、「SNP データセット #1」)。次に、タチスミレ内の遺伝的多様性を調べるため、61 個のタチスミレサンプルのうち 7 個以上に存在する SNP を抽出した (「集団」パラメータ $R = 0.1$ 、「SNP データセッ

ト#2」)。SNP の共通性に基づくこの基準に加えて、さらに 2 つの基準を適用した。

第一に、2 つの対立遺伝子のうち 1 つが 3 カウント未満の SNP 部位はすべてフィルターで除外した。第二に、高いヘテロ接合性($H_o \geq 0.6$)を持つ SNP を取り除いた。次に、SNP データセット#1 および#2 に基づいて、RAxML-NG 0.9.0 を用いて (Kozlov et al. 2019) 、Lewis の確認バイアス補正を組み込んだ GTRG4 置換モデルを用いて、SNP ベースの最尤系統樹を構築し、並列木探索のブートストラッピングを 1000 回繰り返した。GTRG4 モデルは、データセットにヘテロ接合を表す対立遺伝子の遺伝子座に未確定の遺伝子型が含まれていたために使用された。遺伝的多様性は、Stacks の'population'プログラムを用いて (Catchen et al. 2011) 、SNP データセット#1 に基づいて評価し、塩基多様度 (π)、近交係数 (F_{IS})、ヘテロ接合度の期待値 (H_e)、タチスミレのペアワイズ集団 F_{ST} 値を算出した。

タチスミレの A、B、C、D、W、韓国集団 ('SNP データセット#3')、タチスミレの A、B、C、D、W 集団 (SNP データセット#4) の遺伝的構造を調べるため、各集団 (パラメータ $r = 0.5$ 、 $p = 5$) の 50%以上のサンプルで共有されている SNP をすべて同定した。連鎖 SNP を避けるため、遺伝子座ごとに最初の SNP のみを使用した。SNP データセット#3 と#4 に基づいて、STRUCTURE 2.3.4 を用いて、 $K = 1-10$ のクラスター数で 30 回の独立した実行を行い、クラスタリング解析を行った (Pritchard et al. 2010)。1 試行あたり 10 万回を burn-in period (初期値に依存する期間) として除き、10 万回のマルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) を行った。Structure Harvester を用いて ΔK および対数尤度 $\ln P(D)$ を算出し、最適なクラスター数を推定した。結果は CLUMPAK (Cluster Markov Packager Across K)を用いて可視化した (Earl and Vonholdt 2012)。

生息地において採取した植物試料の組織を RNA 保存液 (RNA later™ Stabilization Solution) に入れた。RNA の抽出は、Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Promega 社製) を使用した。抽出した RNA は、濃度、分解度、分子サイズ分布を測定した後、次世代シーケンサー (NovaSeq 6000) によるペアエンドの塩基配列解読を行った。Illumina HiSeq または Illumina NovaSeq により RNA をシーケンスしたショートリード配列をアセンブラー Trinity でアセンブルすることで転写産物配列を得た。これらの転写産物の配列を参照配列とし、Burrows-Wheeler Alignment (BWA) を用いてショートリードのマッピングを行った。NGS データ解析総合ツールである samtools を用いて一塩基変異 (SNV) の検出を行なった。各個体の SNVs を用いてバリエントコールした。このようにして 1 個体内で検出された SNVs を同義置換と非同義置換に分類した。

このようにして得た網羅的 SNV を用いて、以下の 3 つの指標 A)、B)、C) を解析した。各解析で得られたタチスミレとツボスミレの結果を比較することにより、希少植物の潜在的脆弱性などの評価を行った。

- A) 遺伝的多様性：種内の遺伝的多様性を評価するため、1 個体内でヘテロ接合として保持されている同義変異 SNVs の数を検出し転写産物 1kb あたりの数に換算して比較した。
- B) 有害変異の蓄積：タンパク質の配列変異がタンパク質の機能に影響を及ぼすかどうか

を予測するために開発された解析ツール PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) 1.1.5 により、タンパク質の構造を変化させて機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合を求めた (Choi et al. 2012)。また、非同義置換 SNVs において、終止コドンに変化し、タンパク質の機能消失が予想される変異 (ナンセンス変異) の割合を求めた。

- C) 重複遺伝子の割合：環境適応力の指標として用いることが期待されるゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合の推定を行った (Makino et al. 2012; Tamate et al. 2014)。アセンブルされた転写産物中の重複遺伝子を同定するために、そのアミノ酸配列の BLAST 検索を行った。同種ホモログ (blastp, E-value < 10^{-4}) を持つ遺伝子を重複遺伝子として同定した。

2.4 結果

2.4.1 MIG-seq 解析

SNP 検出のサンプルあたりの有効カバレッジの平均値は 27.0 ×、標準偏差は 5.1 ×、最小値は 16.5 ×、最大値は 41.2 ×であった。タチスミレの 61 サンプルとツボスミレの 27 サンプル (合計 88 サンプル、SNP データセット#1) において、2696 の多型遺伝子座から合計 4924 の SNP が同定された。タチスミレ、ツボスミレおよびアギスミレの塩基多様度(π)の平均値は、それぞれ 0.00083、0.00131 および 0.00166 であった (表 2.2)。ヘテロ接合度(H_e)の平均値はそれぞれ 0.09630、0.10805 および 0.13267 であり、近交係数 (F_{IS}) の平均値はそれぞれ 0.03140、0.08244 および 0.10672 であった。したがって、タチスミレの π と H_e の値はツボスミレとアギスミレの値よりも低く、タチスミレと近縁 2 種の F_{IS} はいずれも 0 に近かった。 F_{ST} の値は、1 に近いほど地域間の集団が遺伝的に分化していることを示し、0 に近いほど遺伝的な分化が見られず類似した集団構造であることを示す。すべてのタチスミレ集団間の F_{ST} を一対比較すると、A、B、C、D 集団間では比較的高い値を示した。一方、W 集団と A、B、C、D 集団の間の F_{ST} 値は比較的低かった (表 2.3)。韓国慶尚南道の河川沿いの湿地で採集されたタチスミレ 10 個体の遺伝情報を加え、タチスミレ、ツボスミレ、アギスミレの最尤系統樹を図 2.2、図 2.2.1、図 2.2.2 に示す。ツボスミレとアギスミレは同じ遺伝グループに属し、ツボスミレグループは 100 %のブートストラップ支持率でタチスミレから明らかに分岐していた。

タチスミレの系統樹を得るために、61 個のタチスミレサンプルからの 1346 の多型遺伝子座から 2344 の SNP を同定した (SNP データセット#2)。各集団は最尤系統樹において個別にクラスタリングされ、D 集団を除いて単系統のクレードを形成した (図 2.3、図 2.3.1、図 2.3.2)。韓国集団のタチスミレは、日本の 5 つの集団から大きく分化していた。日本の 5 つの集団は、韓国集団からの内部ノードによって 2 つの遺伝的グループに分けられた。A、C、W 集団はブートストラップ支持率 100%の単系統を形成し、D と B 集団もブートストラップ支持率 98 %の単系統を形成した。タチスミレの集団構造は、追加データセット (データセット#3 の 380 SNPs ; データセット#4 の 562 SNPs) を用いて調べた。

Structure Harvester を用いて、韓国集団を含む SNP データセット#3 に基づき、 ΔK および対数尤度 $\text{LnP}(D)$ の変化に着目し、タチスミレ集団の STRUCTURE 解析を行った。 $\Delta K=3$ で最高のピークが観察され (図 2.4)、 $\text{LnP}(D)$ は $K=2$ から 3 で増加が鈍化した (図 2.5)。最適なクラスター数(K)は 3 であることが示唆された。さらに、A、B、C、D、W 集団を用いて解析を行った (SNP データセット#4)。 $\Delta K=2$ で最高のピークが観察され (図 2.6)、 $\text{LnP}(D)$ は $K=2$ から 6 まで徐々に増加した (図 2.7)。韓国集団を含む SNP データセット#3 で最適 $K=3$ の場合、クラスターIは A、C、W 集団に含まれ、クラスターIIは B 集団に含まれた。D 集団はクラスターI と II に分かれ、クラスターIII は韓国集団に含まれた (図 2.8)。日本集団の A、B、C、D、W 集団を用いて解析を行ったとき、対数尤度 $\text{LnP}(D)$ の挙動から、最適なクラスター数(K)は 2 であると決定することができなかったため、 K 値が 2 ~6 の場合の A、B、C、D、W 集団の異なるクラスターの変化を図 2.9 に示した。 $K=2$ の場合、D 集団はクラスターI と II の遺伝的混合であった。 $K=2$ から $K=3$ になって追加された新しいクラスターは主に集団 A に含まれ、 $K=3$ から $K=4$ になって追加された新しいクラスターは主に W 集団に含まれた。 $K=4$ から $K=5$ になると、C 集団は新しいクラスターで構成された。D 集団は $K=4$ までは 2 つのクラスターの遺伝的混合であったが、 $K=5$ になると、ほとんど 1 つのクラスターで構成された。 $K=5$ から $K=6$ になると、新しいクラスターは主に W 集団に含まれた。

2.4.2 RNA-seq 解析

平均遺伝的多様性 (1 kb あたりの同義 SNV 数として定量化) は、タチスミレの平均値が 0.109 となり、ツボスミレの平均値 (0.158) よりも低かった (図 2.10、表 2.4)。生息数の多かった地点 A で採集された個体の遺伝的多様性は、他の地点で採集された個体よりも平均遺伝的多様性が高かった。A、B、C、D の各集団で 2 個体を採取し、合計 8 個体と少ないサンプル数だったので、マン・ホイットニーの U 検定を実施して、タチスミレとツボスミレの平均遺伝的多様性の中央値に有意な差があるかどうかを評価した結果、両者の中央値に有意な差があるとはいえなかった。タチスミレのタンパク質の構造を変化させて機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合の平均値(0.320)は、ツボスミレの平均値 (0.271) よりも高かった (図 2.11、表 2.5)。マン・ホイットニーの U 検定により、両者の中央値に有意な差が認められた。各サンプリング個体におけるナンセンス SNV の割合も測定したところ、タチスミレ個体の中にはナンセンス SNV の割合が高い個体があることが明らかになった (図 2.12)。図 2.13 および表 2.7 に示すように、各個体における重複遺伝子の割合 (P_D) は、タチスミレとツボスミレの間で有意な差は見られなかった。

2.5 考察

一般に、遺伝的多様性が高い集団は、環境の変化に適応する能力が高いとされてい (Guan et al. 2021; Teixeira and Huber 2021; Chung et al. 2023)。本研究では、関東地方に分布するタチスミレの遺伝的多様性を解析し、同じ地域に生息するツボスミレと比較した。 π および He

の解析からも、タチスミレの遺伝的多様性が低いことが確認され（表 2.2）、タチスミレの遺伝的多様性はツボスミレよりも低いことが示された。RNA-seq 解析を用いた比較においても、タチスミレは近縁種であるツボスミレよりも同義的 SNV の平均数が少なく（図 2.10、表 2.4）、遺伝的多様性が低いことが示された。RNA-seq 解析は次世代シーケンサーを用いてすべての転写産物の塩基配列を決定することにより、転写産物の存在量を包括的に推定することができるが、MIG-seq 法はマイクロサテライト多型近傍の塩基配列の解析に限定される。しかし今回のケースでは、どちらの手法もタチスミレは、ツボスミレよりも遺伝的多様性が低いことを示した。タチスミレは関東地方、大分県、鹿児島県にのみ分布しており、一般的なツボスミレは日本全国に広く分布している（大橋ら 2016）。同じ地域に生息する希少種と普通種を比較することは適切であり、今後新たなタチスミレの生息地が発見されることで、さらなるデータの蓄積が期待される。

各集団におけるタチスミレの F_{IS} は 0 に近く（表 2.2）、集団が任意交配であることが示唆された。多くのスミレ属の種は、同一個体内で形態（開花と閉鎖花）と機能の異なる二型花を咲かせる（Culley et al. 2007）。開花花は他家受粉し、閉鎖花は蕾の中で自家受粉して結実する。したがって、タチスミレの集団はすべて他家受粉していると推定でき、すべての場所に交配に十分な数のタチスミレ個体が存在すると考えられた。

韓国のタチスミレ集団と日本の 5 集団のデータを用いた系統樹と STRUCTURE 解析の結果、A、C、W 集団は 1 つの遺伝的グループに属することが示された（図 2.3、図 2.8）。渡良瀬遊水地（集団 W）と菅生沼（集団 A と C）は遺伝的に近いことが示された。逆に、小貝川河川敷のタチスミレの大集団（B 集団）は、渡良瀬遊水地（W 集団）や菅生沼（A および C 集団）とは遺伝的に分化しており、そのため F_{ST} 値が比較的高かった（表 2.3）。渡良瀬遊水地（W 地点）は利根川の上流に位置し、菅生沼（A および C 地点）は利根川の下流に位置する（図 2.1）。タチスミレはマルハナバチ (*Bombini* sp.) などの昆虫によって受粉されるため、送粉での遺伝子の移動範囲は制限され、W 地点と A および C 地点の間の遺伝子の移動が難しいことが予想される。しかし、その種子は水を介して移動することもできるため、渡良瀬遊水地と菅生沼のタチスミレ集団間の遺伝的近縁性は、前者から後者へのタチスミレの種子の水上移動によるものと考えられる。種子が主に水上輸送によってこの場所に散布されたことが示唆されたことは、米国ワシントン DC の潮汐のある淡水湿地での調査結果と一致する（Neff and Baldwin 2005）。また、ドイツ北部の小さな河川溪谷における氾濫時の水上種子輸送は、定期的に氾濫する生息地において、分断された個体群をつなぐ重要な役割を果たしていることが示唆された（Vogt et al. 2004）。サクラソウが典型的に生育する湿地帯では、水が長距離散布の重要な要因となる可能性があり、水による散布が稀に、おそらく季節的あるいは予測困難な洪水の際に行われることが示唆された（Washitani et al. 2005）。小貝川河川敷の大きなタチスミレ集団（B 集団）と渡良瀬遊水地（W 集団）および菅生沼（および C 集団）の集団との遺伝的分化がより顕著であるのは、渡良瀬遊水地以外の場所から B 地点への種子の移動が優勢であるためと考えられる。

タチスミレの A、B、C、D、W 集団の系統樹と STRUCTURE 解析の結果、D 集団は B 集団と近縁であり、2 つのクラスターに分かれており、そのうちの 1 つは主に B 集団を含んでいた (図 2.3、図 2.8)。D 集団と B 集団は小貝川河川敷にあり、地理的に近接していることから (図 2.1)、B 集団と D 集団の間で遺伝子の流れがあった可能性がある。したがって、それ以前から小貝川は頻繁に氾濫していたと推測できる。小貝川流域の地形は平野が 86%と圧倒的に多く、傾斜が緩やかなため洪水が長時間滞留し、水がすぐに引きにくいという特徴を有している (国土交通省ウェブサイト 2008)。

本研究が用いた MIG-seq 法は、集団遺伝学や分子系統地理学の研究に役立つとされている。MIG-seq 法が種内レベルの集団における遺伝的多様性や遺伝的分化に関する情報を得るために有効であることは、いくつかの先行研究によって実証されている。例えば、絶滅危惧種アマミツバボタン (*Portulaca akinawensis* var. *amamiansis*) の個体群間の系統関係を明らかにするために行われた MIG-seq 解析では、地理的に近接している奄美大島の西部と北部で、明らかな遺伝的分化が見られた (Kokubugata et al. 2023)。このような遺伝的分化について Kokubugata et al. (2023) は、奄美大島西部で冬季に卓越する強い北風などの環境要因によって引き起こされた可能性があるとした。MIG-seq 法は、また絶滅危惧種ランダイミズ (*Elatostema platyphyllum*) の個体および集団レベルでの系統、遺伝的構造、遺伝的多様性を分析することにより、その保全価値を決定するために使用された。その結果、地理的に近接した場所に生息する台湾の 2 つの個体群の間で、明らかな遺伝的分化が認められた (Shibabayashi et al. 2023)。ランダイミズは個体レベルで比較的高い遺伝的多様性を保持していると結論づけた。山本ら (2024) は、土地の造成工事などによって個体群が衰退傾向にあり、奄美群島の喜界島だけに生育するヒメタツナミソウ (*Scutellaria kikai-insularis*) について MIG-seq 法を用いて集団遺伝解析を行った。その結果、遺伝的多様性は近縁種であるアカボシタツナミソウ (*Scutellaria rubropunctata*) と比較して低かった。しかし、近交係数については両種で差異が見られず、0 に近い値であったことから、閉鎖花による自殖の影響は検出されなかった。このように本研究で用いた MIG-seq 法は希少種の遺伝的保全研究に適した手法であると言える。

PROVEAN によって同定された非同義 SNV の割合はタチスミレの方がツボスミレよりも多く (図 2.11、表 2.5)、自然選択の効率が低下したために有害な変異が蓄積したことが示唆された。小笠原諸島に生育する絶滅危惧種のシャクナゲ (*Rhododendron boninense*) でも、同様の有害変異の蓄積が観察された (Isagi et al. 2020)。しかし、タチスミレにおける非同義 SNV の割合は個体間で異なっており (図 2.12)、有害変異の蓄積には個体差があることが示唆された。有害変異の蓄積は、弱い純化選択に起因すると考えられ、純化選択の影響は個体群サイズに依存しないことが示唆されているが、重複遺伝子の割合が低い集団は有害変異の蓄積に対して脆弱であると予測される。この予測に従い、小笠原諸島の絶滅危惧種は近縁の普通種よりも重複遺伝子の割合が低かった (Hamabata et al. 2019)。しかし、タチスミレとツボスミレの間で重複遺伝子の割合に有意な差は見られなかったことから (図 2.13)、タ

チスミレは環境変化に対してある程度の頑健性を保持している可能性が示唆された。タチスミレは絶滅危惧種に指定されるほど減少しており、その要因としては、自然植生の遷移、河川の開発、管理の放棄などが挙げられている（澤田ら 2010）。しかし、その遺伝的変異の分析から、環境変化に対してある程度の強さを保っている可能性が示唆された。A、B、D 地点では、冬から早春にかけて年に 1 回枯れ草の野焼きが行われている。地上部の落葉と落葉枝の除去は、春の地表面の光環境を改善し、スミレの生育に適した温度環境に変化させる。したがって、野焼きで枯れ草を燃やすことは、スミレの更新と個体数の増加を促進するための効果的な植生管理であると考えられる（澤田ら 2010）。タチスミレは純化選択の効率の低下や、個体数の少なさからくる遺伝的浮動の影響により、有害な突然変異が蓄積されているようにも見える。したがって、生息地における枯れ草の野焼きや刈り取りなど、草原性草本種の保全に有効な生息環境管理を継続することによって、タチスミレの生存率と繁殖率を向上させることが望まれる。



図 2.1 菅生沼と小貝川河川敷と渡良瀬遊水地の位置

サンプルは、A、B、C、D、W 地点 で採取した。タチスミレとツボスミは、茨城県の菅生沼（A、C 地点）、小貝川河川敷（B、D 地点）、渡良瀬遊水地（W 地点）で採取した。アギスミレは W 地点で採取した。

図中の地図は、学習プリント.com（株式会社ディー・エフ・シー）より転載
https://xn--fdk3a7ctb5192box5b.com/other/map_japan_chiho_kanto_blankmap.htm

表 2.1 各地点におけるサンプル数と湿地面積

地点	MIG-seq 解析			RNA-seq 解析		湿地面積
	タチスミレ	ツボスミレ	アギスミレ	タチスミレ	ツボスミレ	
A	12	8	0	2	2	150 m × 100 m
B	16	8	0	2	2	50～100 m × 50 m
C	4	4	0	2	2	5 m × 10 m
D	7	5	0	2	2	10 m × 10 m
W	12	2	4	0	0	9000 m × 6000 m

表 2.2 各集団における塩基多様度 (π)、ヘテロ接合度の期待値 (He)、近交係数 (F_{IS})

集団	π			He			F_{IS}		
	タチ スミレ	ツボ スミレ	アギ スミレ	タチ スミレ	ツボ スミレ	アギ スミレ	タチ スミレ	ツボ スミレ	アギ スミレ
A	0.00083	0.00097	—	0.10119	0.08546	—	0.03068	0.02567	—
B	0.00084	0.00159	—	0.10353	0.14272	—	0.02540	0.14546	—
C	0.00072	0.00142	—	0.07124	0.11713	—	0.00640	0.11440	—
D	0.00086	0.00140	—	0.09795	0.11929	—	0.04532	0.09348	—
W	0.00089	0.00115	0.00166	0.10759	0.07564	0.13267	0.04042	0.03321	0.10672
Mean	0.00083	0.00131	0.00166	0.09630	0.10805	0.13267	0.03140	0.08244	0.10672

表 2.3 タチスミレ集団間のペアワイズ集団 F_{ST}

	A 集団	B 集団	C 集団	D 集団	W 集団
A 集団		0.378	0.313	0.293	0.198
B 集団			0.470	0.265	0.261
C 集団				0.367	0.256
D 集団					0.203
W 集団					

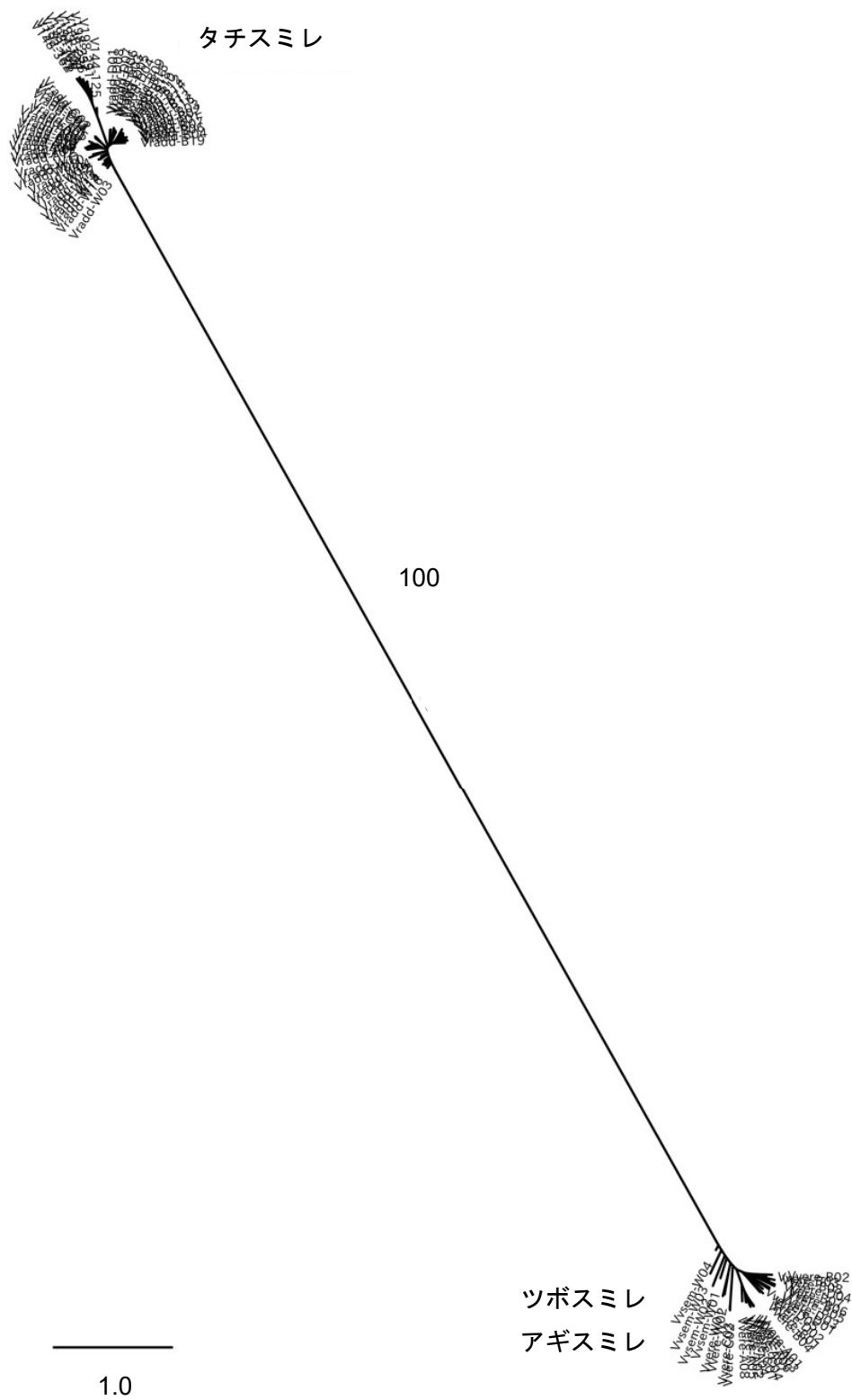


図 2.2 タチスミレ、ツボスミレ、アギスミレの最尤系統樹

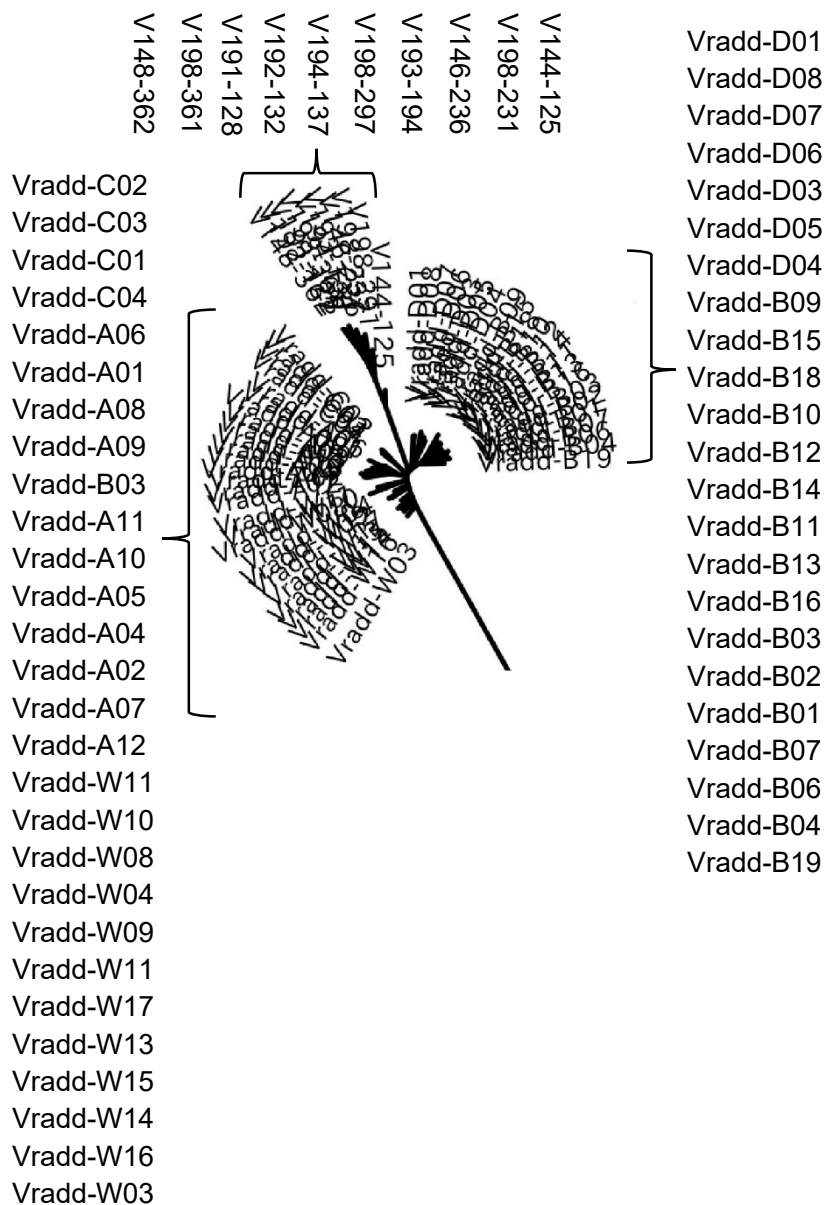


図 2.2.1 最尤系統樹の結果（図 2.2）のタチスミレ部分の拡大

Vradd-が日本のタチスミレ

Vradd-A、B、C、D、W が A、B、C、D、W 集団のタチスミレ

V144-、V146-、V148-、V191-～194-、V198-が韓国のタチスミレ

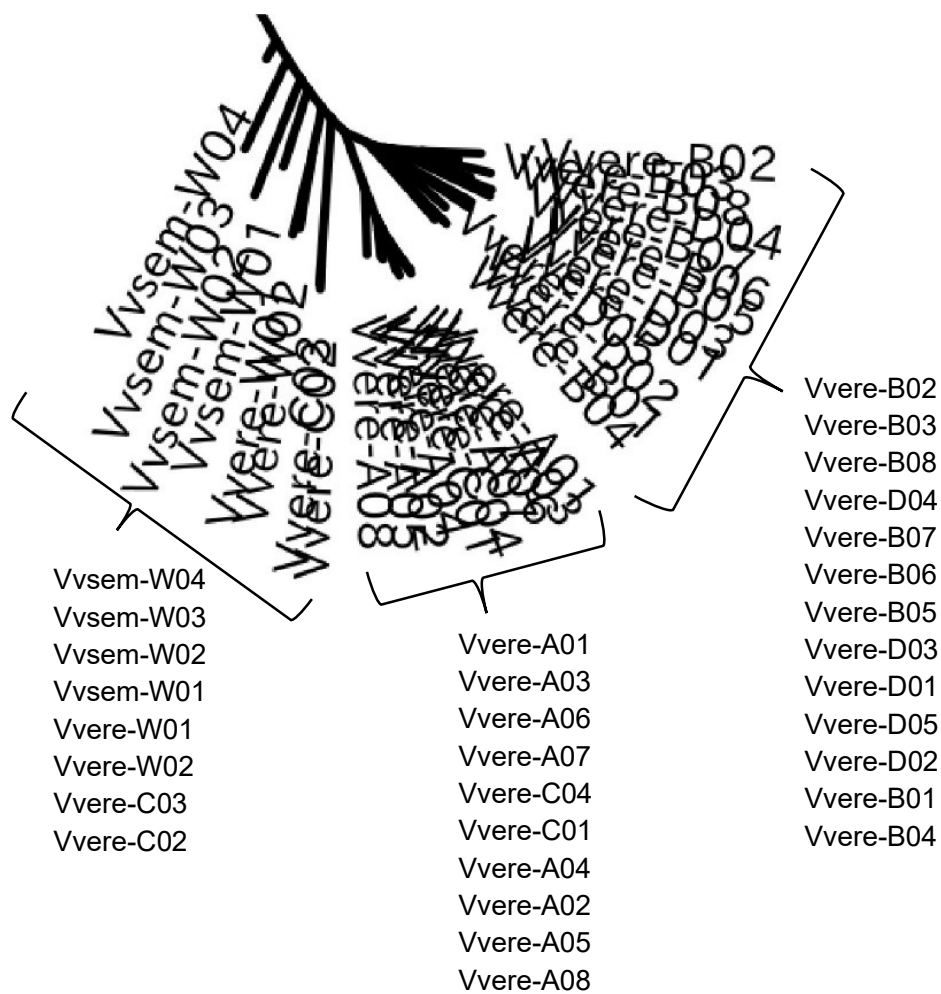


図 2.2.2 最尤系統樹の結果（図 2.2）のツボスミレ部分およびアギスミレ部分の拡大
 Vvere-A、B、C、D、W が A、B、C、D、W 集団のツボスミレ
 Vvsem-W が W 集団のアギスミレ

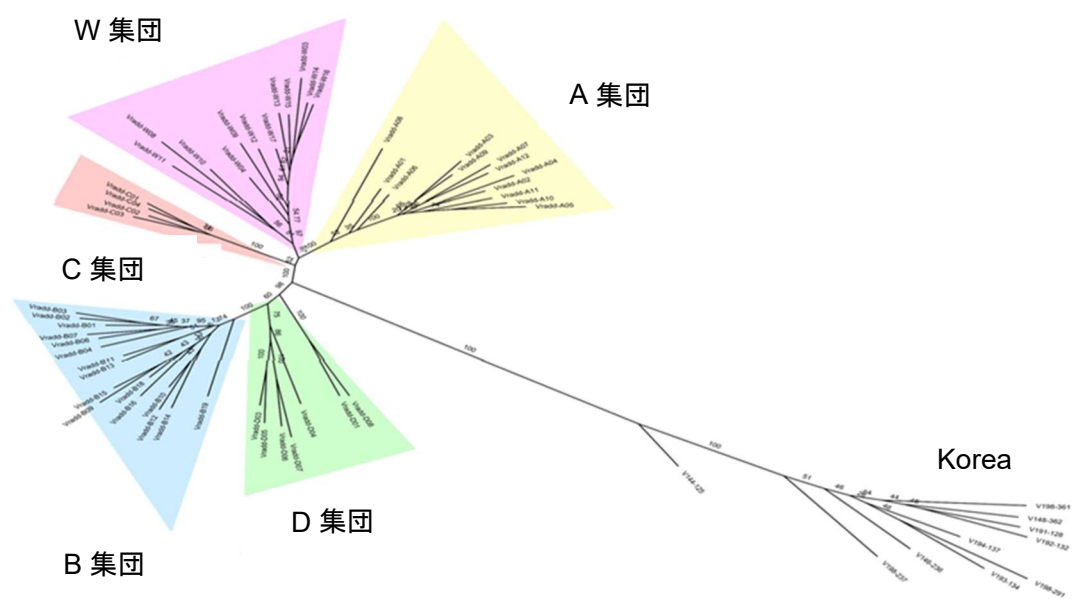


図 2.3 タチスミレ全個体の最尤系統樹

Vradd-A が A 集団
 Vradd-B が B 集団
 Vradd-C が C 集団
 Vradd-D が D 集団
 Vradd-W が W 集団

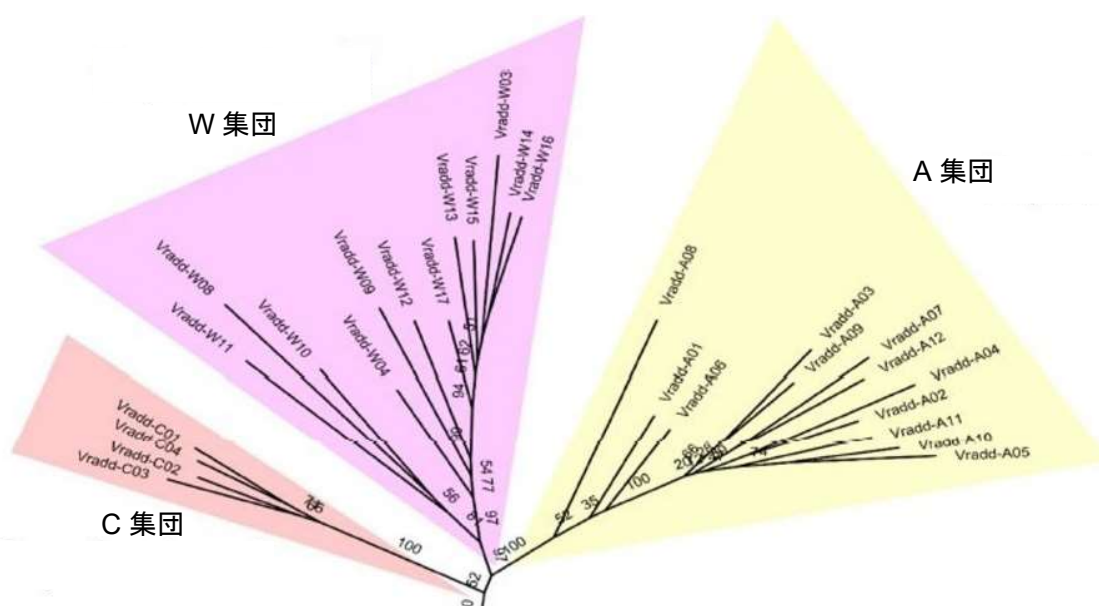


図 2.3.1 タチスミレ全個体の最尤系統樹(図 2.3)の A、C、W 集団の拡大

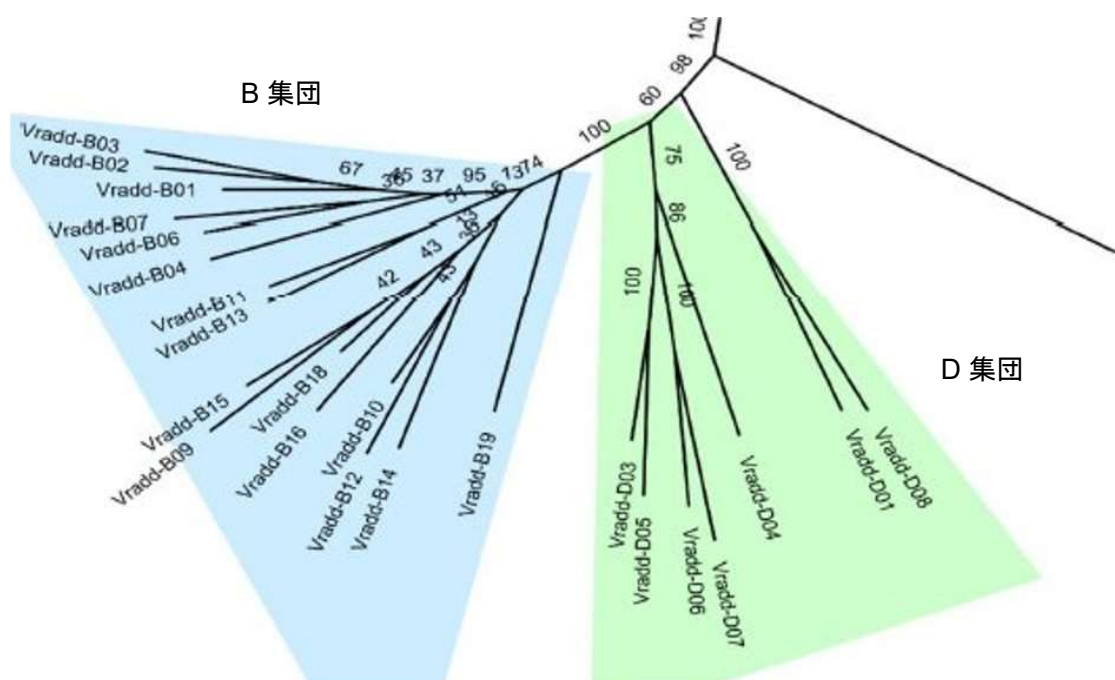


図 2.3.2 チスミレ全個体の最尤系統樹(図 2.3)の B、D 集団の拡大

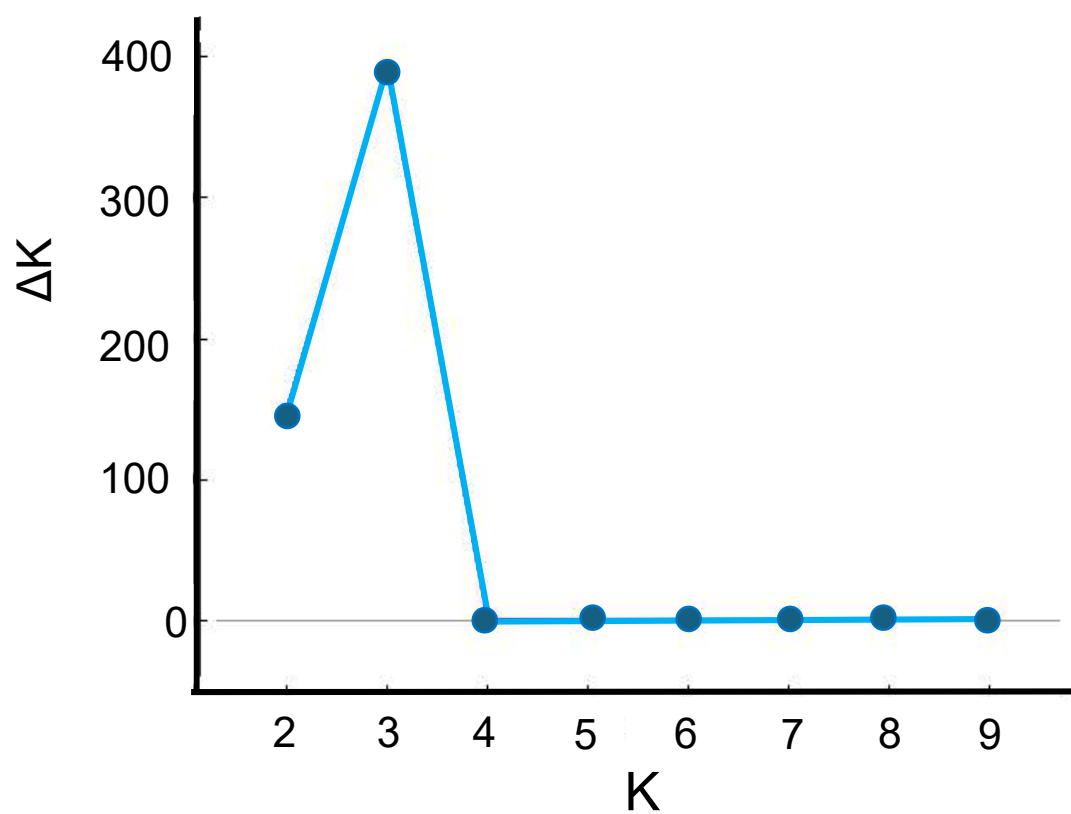


図 2.4 韓国集団を含む SNP データセットに基づく平均対数尤度確率からの ΔK

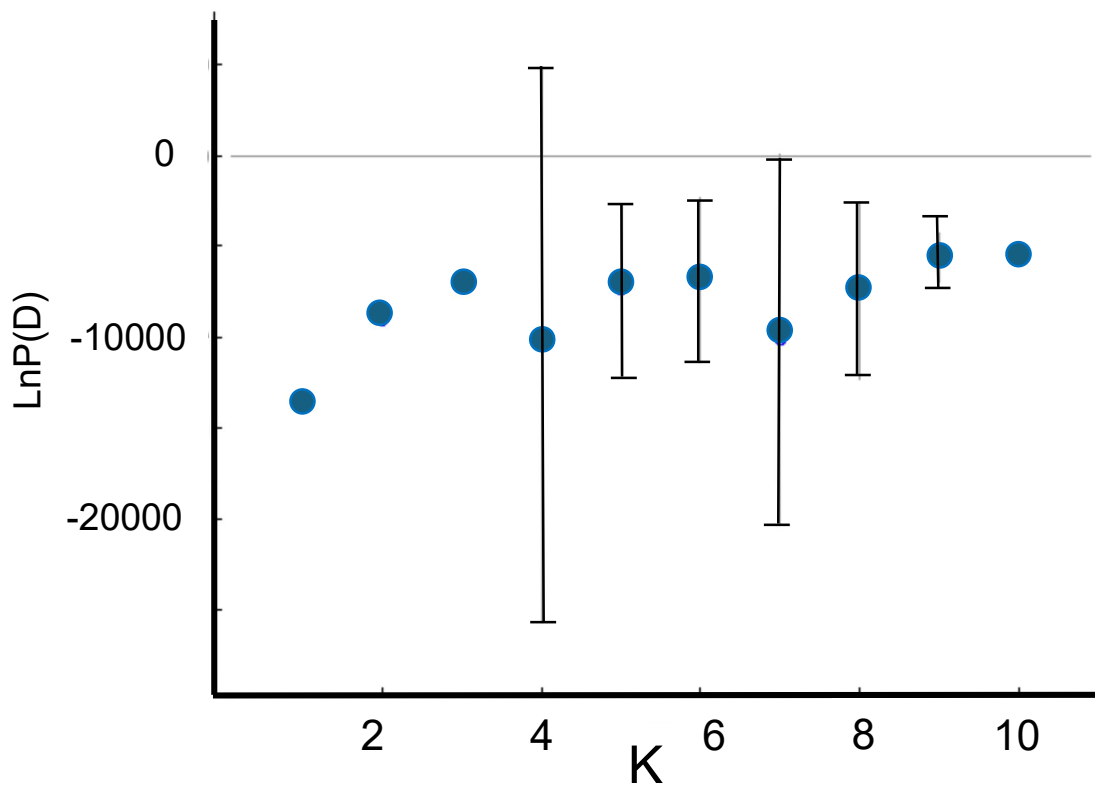


図 2.5 韓国集団を含む SNP データセットに基づくクラスター数に対するデータ $\text{LnP}(D)$ ($\pm\text{SD}$) の事後確率

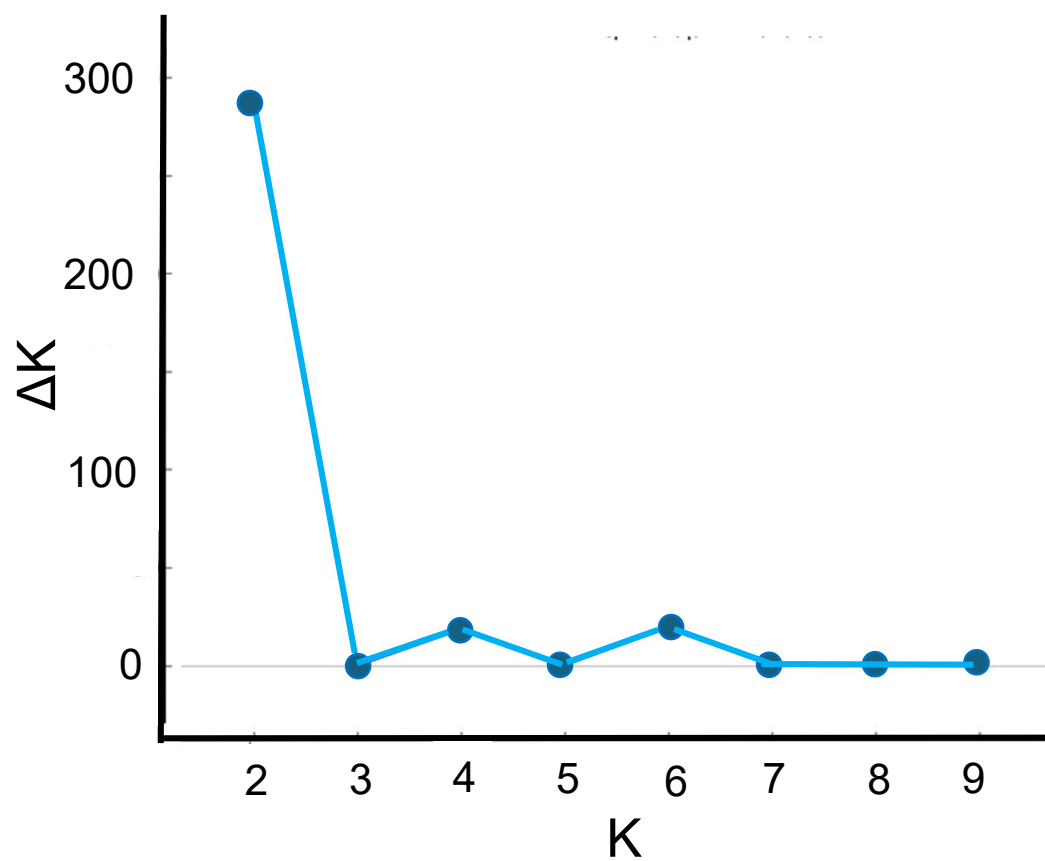


図 2.6 日本の A、B、C、D、W 集団のタチスミレの平均対数尤度確率からの ΔK

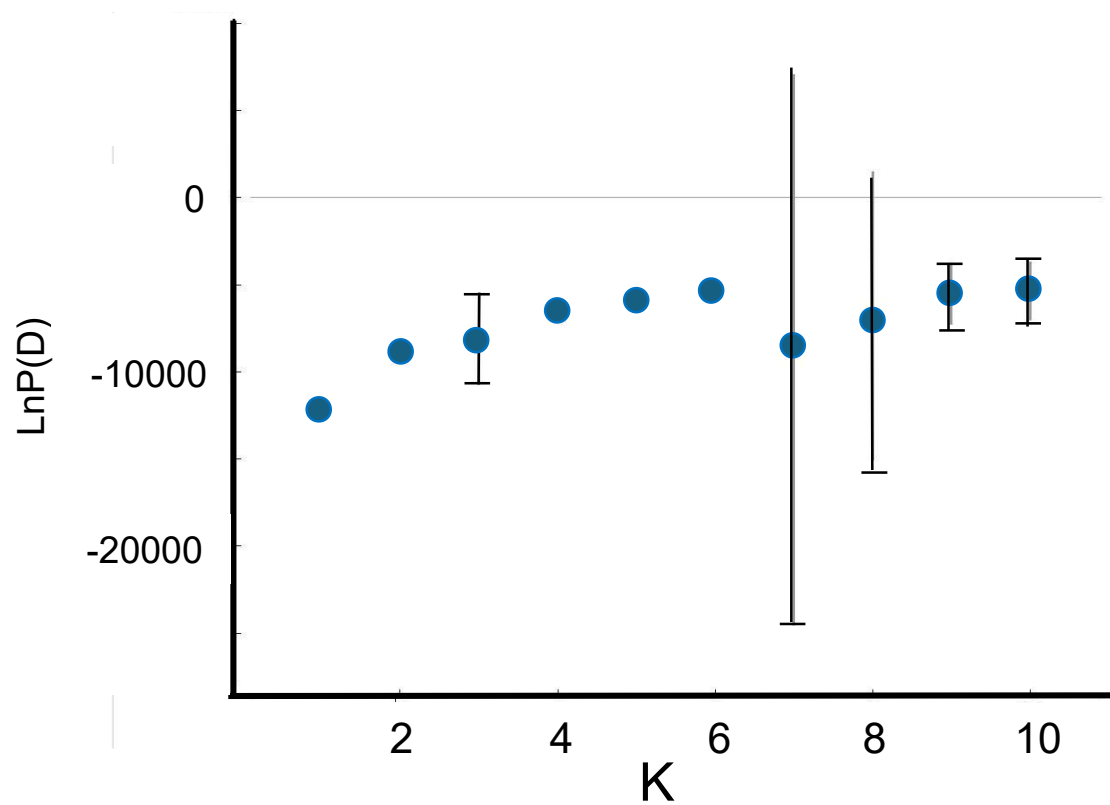


図 2.7 日本の A、B、C、D、W 集団のタチスミレのクラスター数に対するデータ $\text{LnP}(D)$ ($\pm\text{SD}$) の事後確率

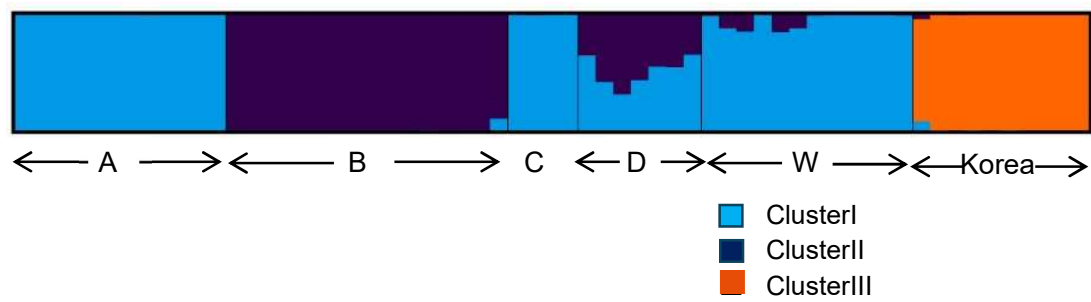


図 2.8 K = 3 における A、B、C、D、W、韓国集団のタチスミレの構造解析結果

K = 2



K = 3



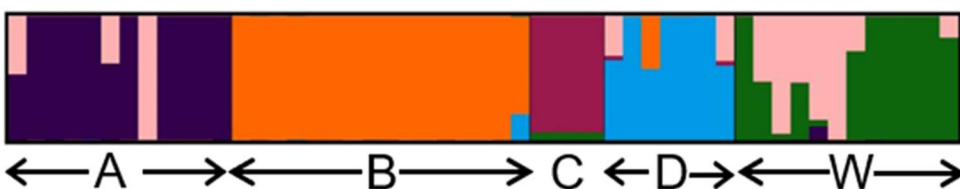
K = 4



K = 5



K = 6



← A → ← B → C ← D → ← W →

図 2.9 K = 2~6 における日本集団 A、B、C、D、W 集団のタチスミレの構造解析結果

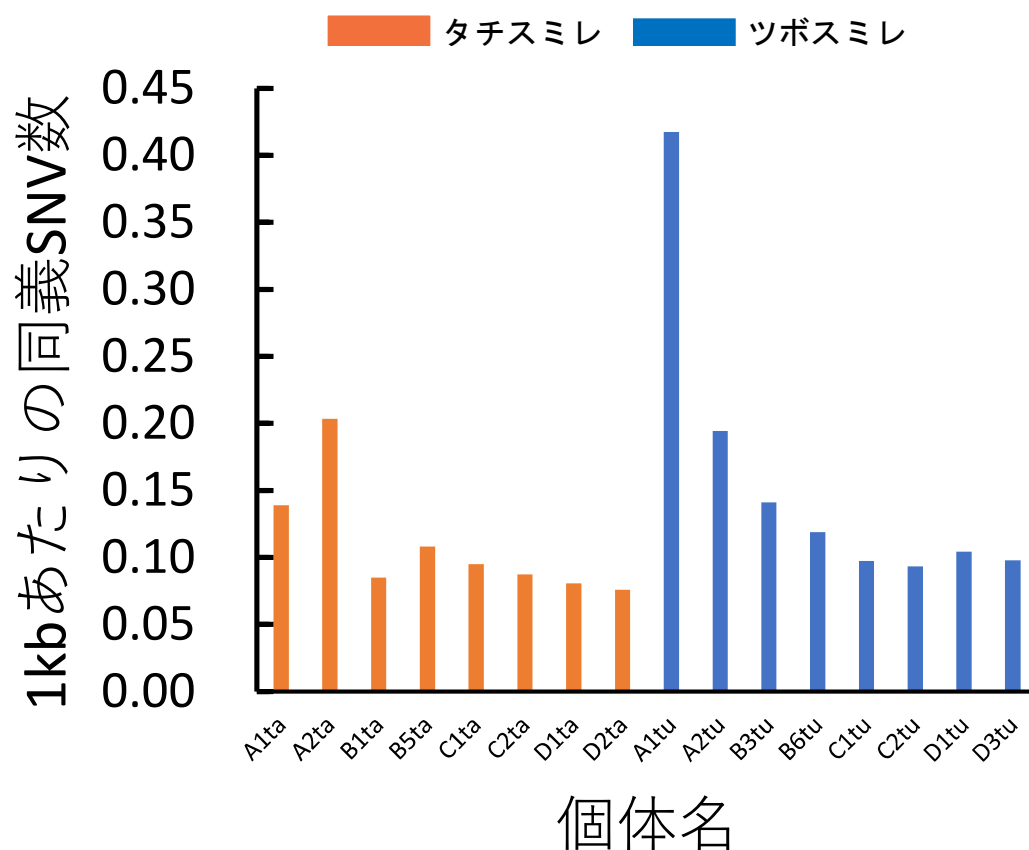


図 2.10 タチスミレおよびツボスミレの各個体における RNA-seq 情報に基づく遺伝的多様性（同義 SNV）

A1ta、A2ta は A 集団のタチスミレ
 B1ta、B2ta は B 集団のタチスミレ
 C1ta、C2ta は C 集団のタチスミレ
 D1ta、D2ta は D 集団のタチスミレ
 A1tu、A2tu は A 集団のツボスミレ
 B1tu、B2u は B 集団のツボスミレ
 C1tu、C2tu は C 集団のツボスミレ
 D1tu、D2tu は D 集団のツボスミレ

表 2.4 タチスミレおよびツボスミレの 1kb あたりの同義 SNV 数の平均値と標準誤差

	タチスミレ	ツボスミレ
平均	0.109	0.153
標準誤差	0.015	0.039

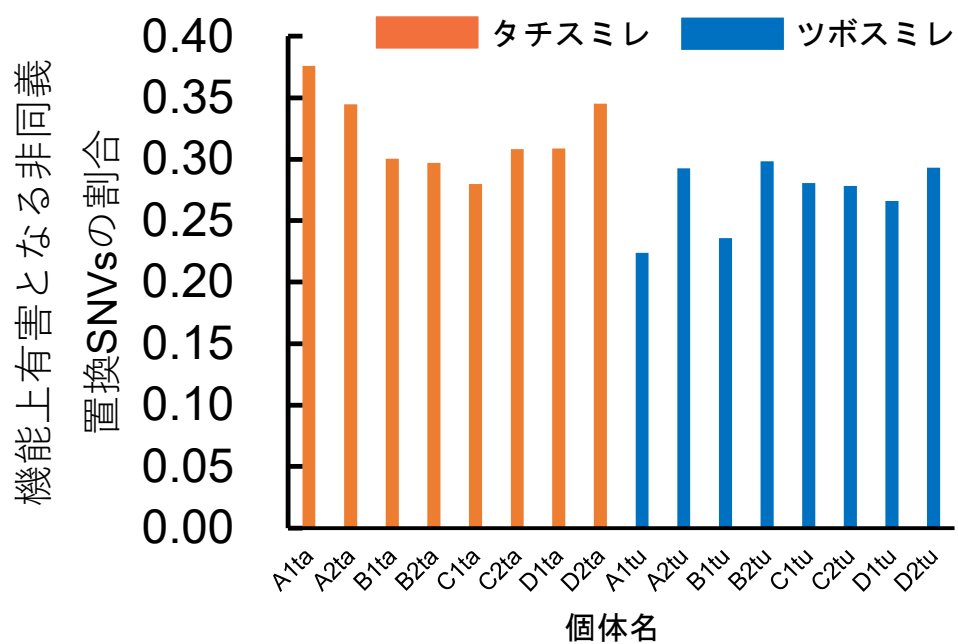


図 2.11 タチスミレおよびツボスミレの各個体における RNA-seq 情報に基づく機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合

A1ta、A2ta は A 集団のタチスミレ
 B1ta、B2ta は B 集団のタチスミレ
 C1ta、C2ta は C 集団のタチスミレ
 D1ta、D2ta は D 集団のタチスミレ
 A1tu、A2tu は A 集団のツボスミレ
 B1tu、B2tu は B 集団のツボスミレ
 C1tu、C2tu は C 集団のツボスミレ
 D1tu、D2tu は D 集団のツボスミレ

表 2.5 タチスミレおよびツボスミレの機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合の平均値
と標準誤差

	タチスミレ	ツボスミレ
平均	0.320	0.271
標準誤差	0.011	0.010

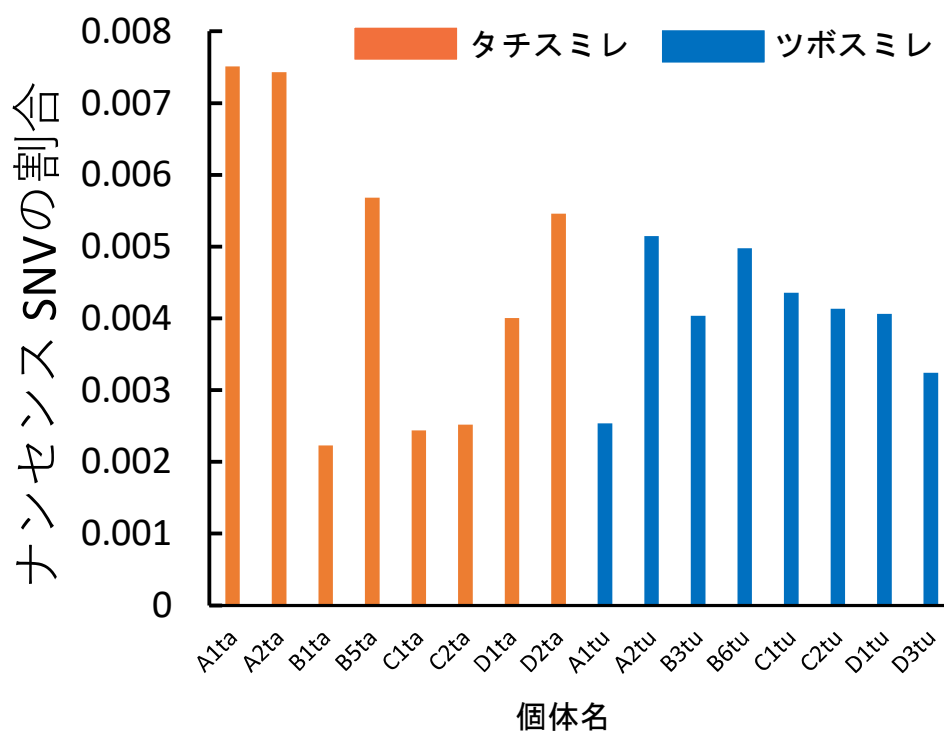


図 2.12 タチスミレおよびツボスミレの各個体における RNA-seq 情報に基づくナンセンス SNVs の割合

A1ta、A2ta は A 集団のタチスミレ
 B1ta、B2ta は B 集団のタチスミレ
 C1ta、C2ta は C 集団のタチスミレ
 D1ta、D2ta は D 集団のタチスミレ
 A1tu、A2tu は A 集団のツボスミレ
 B1tu、B2u は B 集団のツボスミレ
 C1tu、C2tu は C 集団のツボスミレ
 D1tu、D2tu は D 集団のツボスミレ

表 2.6 タチスミレおよびツボスミレのナンセンス SNVs の割合の平均値と標準誤差

	タチスミレ	ツボスミレ
平均	0.00466	0.00406
標準誤差	0.00077	0.00030

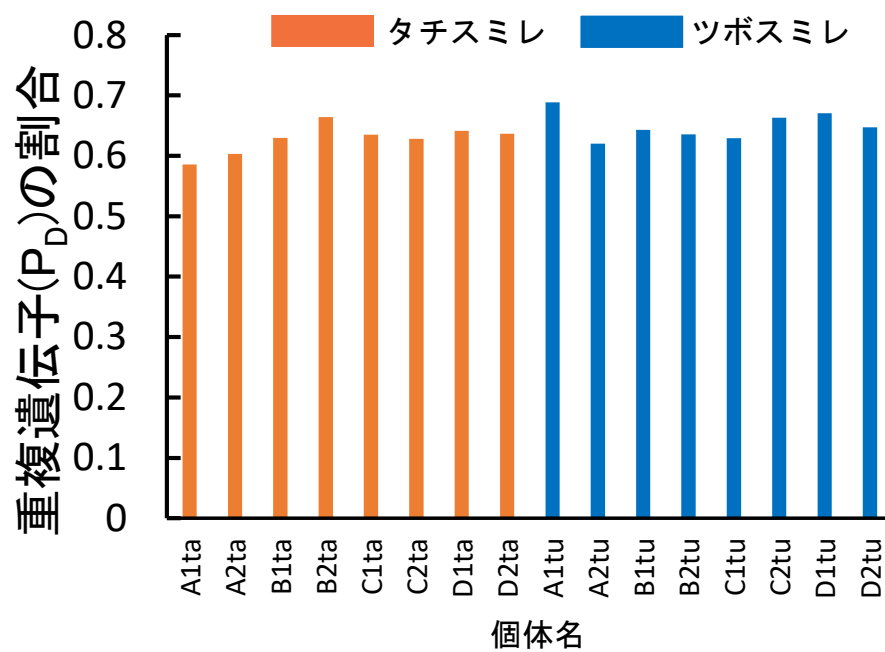


図 2.13 タチスミレおよびツボスミレの各個体における RNA-seq 情報に基づく重複遺伝子 (P_D)の割合

A1ta、A2ta は A 集団のタチスミレ
 B1ta、B2ta は B 集団のタチスミレ
 C1ta、C2ta は C 集団のタチスミレ
 D1ta、D2ta は D 集団のタチスミレ
 A1tu、A2tu は A 集団のツボスミレ
 B1tu、B2tu は B 集団のツボスミレ
 C1tu、C2tu は C 集団のツボスミレ
 D1tu、D2tu は D 集団のツボスミレ

表 2.7 タチスミレおよびツボスミレの重複遺伝子 (P_D) の割合の平均値と標準誤差

	タチスミレ	ツボスミレ
平均	0.6282	0.6497
標準誤差	0.0085	0.0081

第3章 希少植物ハナムグラの地域集団の遺伝的多様性

3.1 はじめに

湿地生態系を維持するうえで、人為的な管理と同様に冠水などの自然攪乱が重要とされる。氾濫原の攪乱はさまざまな原因によって引き起こされる。洪水は河川における攪乱の主要な要因である。洪水は、水による植生の物理的な剥離だけでなく、土砂の浸食あるいは堆積を通して植生を破壊する作用ももつ（西廣 2022）。このような環境では、地中の種子の状態で長期間過ごし、攪乱が生じるといち早く発芽する性質や、成長点（新しい芽を出せる組織）を地表面や地下にもち、攪乱によって地上部が破壊されても速やかに回復できる性質が重要となる（西廣 2022）。本章で対象とする希少種のハナムグラ (*Galium tokyoense*) は同様な性質を持つと考えられ、タチスミレとの性質の違いが、類似した環境に生育する両者の遺伝的特性に現れる可能性がある。タチスミレとハナムグラは両者とも環境省レッドリストでは絶滅危惧Ⅱ類(VU)に指定されている（日本植物分類学会 2025ab）。

本章では、タチスミレと同じく絶滅危惧Ⅱ類 (VU) に指定されているハナムグラを対象にして、MIG-seq 法を用いて分子系統解析や集団遺伝学的な解析を行う。さらに、類似した生息地に生育するが、する繁殖特性が異なるタチスミレとハナムグラの遺伝的特徴を比較する。以上をもとにして、ハナムグラの保全策を提案する。

3.2 材料

希少植物ハナムグラとその近縁普通種であるヤエムグラ (*Galium spurium* var. *echinospermon*) を対象とした。Jeong et al. (2016) が実施した葉緑体 DNA 配列に基づく系統解析では、両者は共通祖先を共有していることが示されている。ハナムグラは被子植物双子葉類アカネ科ヤエムグラ属の多年草であり、本州（中部地方・関東地方）にまれに見られ、川岸に湿った草地に生える多年草である。葉の先は円頭でしばしばわずかにへこみ、先端はごく短くとがる。5月～7月、枝先と葉腋から花序を伸ばし、多数の白色の花をつける（大橋ら 2017）。また、茎は横に広がって、他の植物に寄りかかりながら直立する形で成長する。ハナムグラは、東京都および神奈川県ではすでに絶滅したと考えられている（東京都環境局自然環境部 2021; 神奈川県環境農政局緑政部自然環境保全課 2022）。宮城県、山形県、福島県、埼玉県、長野県、静岡県、広島県、大分県では絶滅危惧Ⅰ類（絶滅の危機に瀕している種）と評価され、茨城県では絶滅危惧Ⅱ類（絶滅の危険が増大している種）と評価されている（NPO 法人 野生生物調査協会・NPO 法人 Envision 環境保全事務所 2007）。本調査地の一つである渡良瀬遊水地では、Ishii et al. (2009) によるハイパースペクトル画像を使用した調査によってハナムグラはオギ (*Micanthus sacchariflorus*) が優占する土地に生息することが示されている。一方、ヤエムグラは被子植物双子葉類アカネ科の一年草または越年草雑草で、人家近くのやぶや荒地によく見られる。茎はよく枝分かれし、長さ 60～90 cm なる。麦作では水田転換畑、畑地ともに強害草となっている（野田ら 1964; 植木 1965; 鶴内 1985;

鶴内 1988 ; 大段ら 2003)。

ハナムグラとヤエムグラの採取は、茨城県の菅生沼 (A 地点と C 地点)、小貝川の河川敷 (B 地点と D 地点) および渡良瀬遊水地 (W 地点) で行った。採取地点を図 3.1 に示す (図 2.1 と同じ)。ハナムグラの葉の先端がやや丸くやや凹頭または鈍頭であること、そしてヤエムグラの葉の先端の凸頭で刺状にとがった形状がはっきりわかる 5 月に採取を行った。採取したハナムグラの個体数は 47、ヤエムグラは 46 であった (表 3.1)。

3.3 方法

採取したサンプルは、DNeasy Plant MiniKit を用いて DNA を抽出した。DNA サンプルを用いた MIG-seq 法によって、SNP の検出を行った (Suyama and Matsuki 2015 ; Suyama et al. 2022)。配列データは Trimmomatic 0.39 を用いて低品質およびアダプター配列を含む短いリードを除去した (Bolger et al. 2014)。SNP の検出は Stacks2.56 を用いた (Rochette et al. 2019)。Stacks ではまずサンプル毎に同一の配列を持つリードをまとめた Stacks を作成し、一定のミスマッチを許して Stacks をまとめることにより候補遺伝子座を作成した。次に、サンプル間で候補遺伝子座を比較することにより、全サンプルでの候補遺伝子座のカatalogを作成した。本解析では、各 Stack の最低 Depth (m) = 6、サンプル内の遺伝子座内で許容するミスマッチ (M) = 2、サンプル間の遺伝子座内で許容するミスマッチ (n) = 2 のパラメータを用いた。

得られた SNP を用いて、最尤系統樹の構築とハナムグラの集団遺伝構造解析、遺伝的多様性および近交度を推定した。遺伝的多様性および近交度を評価するために、Stacks の populations プログラムにより、ハナムグラの遺伝的多様性の指標としてヘテロ接合度の期待値 (H_e) および塩基多様度 (π) を、近親交配の程度を示す指標として近交係数 (F_{IS}) を推定した (Catchen et al. 2011)。ハナムグラの集団間での遺伝的分化の程度を明らかにするため、GenAlEx6.5 を用いて、集団間の遺伝的分化係数 F_{ST} を算出した (Peakall and Smouse 2012)。最尤系統樹は RAxML 8.2.10 を用いて、Lewis による ascertainment bias を補正した GTR モデルにより推定した (Stamatakis 2014)。ハナムグラの集団遺伝構造解析として、ADMIXTURE1.3.0 による遺伝的クラスタリング解析を行った (Alexander et al. 2009)。ADMIXTURE 解析では、各個体が共通の祖先集団からいくつかの想定集団 (クラスター : K) に分化したことを仮定し、各個体がそれぞれの想定集団に由来する遺伝的要素をどのような割合で保有しているのかを 100% 積み上げ棒グラフによって可視化した。最適 K は CV error (交差検証) に基づいて推定した。

ヤエムグラは倍数体と考えられ、倍数体の場合、転写産物の量や種類が多様化する。そのため、2 倍体のハナムグラの転写産物と比較することは難しいと考えられたため、RNA-seq 解析を実施しなかった。

3.4 結果

A、B、C、D、W 集団のヘテロ接合度 (H_e)、塩基多様度 (π) および近交係数 (F_{IS}) の算出結果を表 3.3 に示す。 H_e は 0.0031~0.0040、 π は 0.0032~0.0046、 F_{IS} は 0.012~0.03 と低い値を示した。各集団のハナムグラの遺伝的多様性は低く、任意交配していることが示された。

集団間の F_{ST} を表 3.2 に示す。 F_{ST} は 0~1 の値をとり、数値が高いほど遺伝的分化が高いことを意味する。W 集団と A、B、C、D 集団の F_{ST} は、0.066、0.055、0.079、0.048 と 0 に近く、W 集団と A、B、C、D 集団のハナムグラはほとんど遺伝的に分化していなかった。

MIG-seq 解析で得られた SNP データを用いた希少植物種ハナムグラ 47 個体およびその近縁普通種ヤエムグラ 46 個体の最尤系統樹を図 3.2 示す。ハナムグラとヤエムグラは遺伝的に明瞭に識別された。ヤエムグラ 46 個体の最尤系統樹を図 3.3 に示す。A、D、W 集団のヤエムグラは 2 つに識別された。ヤエムグラは倍数体複合体である可能性が示された。ハナムグラ 47 個体の最尤系統樹を図 3.4 に示す。A、B、C、D、W 集団のハナムグラをそれぞれ黄色、緑、青、赤、灰色で重ねた。樹形図上では、各個体は遺伝距離が近いものほど近い位置に配置される。樹形図から、A 集団のまとまりに W 集団のハナムグ 3 個体が近い位置にあり、B 集団のハナムグラと D 集団のハナムグラが入り混じっていた。C 集団と W 集団のハナムグラ 3 個体が近い位置にあった。W 集団のハナムグラは明瞭な 1 つのまとまり（単系統）にはなっていない様子が見て取れた。また、A 集団のハナムグラ 3 個体が同一、C 集団のハナムグラ 5 個体が同一であった。

A、B、C、D、W 集団のハナムグラの遺伝的集団構造解析を図 3.5 に示す。想定集団数 (K) が 2 から 4 までの結果を描画した。 $K=2$ 、3 のときは、青色のクラスターがすべての集団に属していた。 $K=4$ のときは、薄青のクラスターがすべての集団に属していた。 $K=2$ 、3 のとき C 集団の 5 個体が薄青のクラスター 100% を示し、 $K=4$ のとき C 集団の 5 個体が緑色のクラスター 100% を示した。これらは、クローンである可能性が示された 5 個体であった。CV error と K の関係を図 3.6 に示す。CV error が最も低い値は $K=1$ であったことから、最適な想定集団数は 1 を示した。次いで CV error が低い値は $K=2$ であった。 $K=2$ の遺伝的集団構造解析では、C 集団の 5 個体が薄青のクラスター 100% を示し、そのほかの 42 個体は青色のクラスターが大部分を占めていた。薄青のクラスター 100% を示した C 集団の 5 個体はクローンなので、実質 1 個体である。したがって 1 個体を除いた全個体が青色のクラスターによって大部分を占められていたので、 $K=2$ の場合もハナムグラの最適な集団数は 1 を示した。

3.5 考察

H_e 、 π および F_{IS} の算出結果より (表 3.3)、各集団のハナムグラの遺伝的多様性は低い、任意交配していることが示されたことから、種子繁殖が行われていると推測された。また、ハナムグラの最尤系統樹を図 3.4 において、A 集団の 3 個体が同一、C 集団の 5 個体が同一

であった。地下茎がちぎれて流され、流された箇所では生育したクローンである可能性が示されたことから、ハナムグラは栄養繁殖も行われていると推測された。遺伝解析からハナムグラは集団内で任意交配により実生繁殖し、ある集団においては栄養繁殖をしていることが示された。北海道富良野市に隔離分布するハクサンシャクナゲ (*Rhododendron brachycarpum*) 4 集団は、有性繁殖と栄養繁殖で集団を維持している (犬飼ら 2013)。ハクサンシャクナゲ 4 集団を対象に、ジェネット (株分かれなどで独立しているが、遺伝的には同じ個体＝クローンの集まり) 数と遺伝的多様性を調べた結果、実生繁殖と伏条更新 (枝が地面につき発根して独立の林木に生長する) の両方を行っていた。ジェネット単位でみると、集団内の遺伝的多様性は低かったが、集団間の遺伝的分化は高かった。

ヤエムグラの A、B、C、D、W 集団の遺伝的関係の系統樹から (図 3.3)、B、D、W 集団のヤエムグラは倍数体複合体である可能性が示された。異なる倍数体が同じ生息地に存在する場合、これらの倍数体間で自然交配が行われることがある。これによって遺伝的流動が促進されるため、遺伝的多様性が向上すると考えられる。

ハナムグラの A、B、C、D、W 集団の遺伝的関係の系統樹では、集団ごとに同じクレードに属していなかった (図 3.4)。遺伝的集団構造解析では、最適な集団数は 1 を示した (図 3.6)。W 集団と A、B、C、D 集団の F_{ST} から (表 3.2)、それらはほとんど遺伝的に分化していなかった。したがって、A、B、C、D、W 集団間に明瞭な遺伝的分化は見られなかった。茨城県の菅生沼 (A 地点と C 地点) と小貝川の河川敷 (B 地点と D 地点) は渡良瀬遊水地 (W 地点) から 30 km 上離れているが、これらは一つの集団として取り扱っても問題なく、人為的移植による集団間の移動を行っても、遺伝的攪乱にはならないと考えられる。次に、河川などの攪乱により遺伝的分化が低下している例を示す。集団間の遺伝的分化について、横川ら (2011) は、山梨県北岳に分布するミヤマハナシノブ (*Polemonium caeruleum* ssp. *yezoense* var. *nipponicum*) のうち、大樺沢、草すべり、大樺沢下流でサンプルを採取し、マイクロサテライトマーカーで 6 遺伝子座を用いて F_{ST} 算出した。その結果、3 つの集団間の F_{ST} は 0.036～0.153 で、3 つの集団は樹林帯で分断されているにもかかわらず、集団間には遺伝的な分化は認められなかった。大樺沢、草すべり、大樺沢下流は、比較的最近まで大きな一つの集団だった可能性を示し、3 つの集団を大きな 1 つの管理単位と考えられることができるとしている。また Hu et al. (2010) は、ヤチダモ (*Fraxinus mandshurica*) のマイクロサテライト遺伝子座を調べ、日本の 15 の集団間の遺伝的変異を評価した。その結果、北海道と下北半島を含む北方の集団間の F_{ST} は 0.027 で、遺伝的な分化は見られなかった。北海道のヤチダモの集団間で遺伝的な分化は見られなかったのは、低標高に大きな河川が連続的に存在しており、河川間の地理的障壁は少なく、集団間の活発な遺伝子流動が促されたためと指摘されている。オオクグ (*Carex rugulosa*) は、準絶滅危惧種に指定されている、河川干潮域や汽水湖の砂州に生育する塩性湿地植物種である。種子繁殖と栄養繁殖の両方を行う。近年は護岸など人為的な沿岸環境の改変などによって砂州が消失、または陸地化しているが、陸地化すると勢力の強い陸上植物に負けてしまうために、生息数が減少している。しかし、

2011 年の東日本大震災および津波の影響により、東北地方太平洋沿岸及び河口域の地形や環境が大幅に改変された。Ohbayashi et al. (2017) は、太平洋沿いに生息していたオオクグ 6 集団について DNA 解析を行い、遺伝的多様性を津波前の 2008 年と津波後 2013 年、2014 年で比較し、大津波がオオクグの遺伝的多様性や遺伝的構造に及ぼした影響を調べた。その結果、津波後に集団間の遺伝子流動が増加（集団間の F_{st} が津波後に 0 方向に低下）していることを明らかにした。栄養繁殖と種子繁殖を同時に行うオオクグは、両方の繁殖様式を有効に活用することにより、自然かく乱が起きた場所で生息できたと推察した (Ohbayashi et al. 2017)。Kitamoto et al. (2005) は、長野県八ヶ岳の斜面に位置する筑波大学大学演習林の 7 つの小川沿いのサクラソウ (*Primula sieboldii*) 7 集団および非河川沿いのサクラソウ 1 集団の遺伝的構造を調べた結果、川岸に沿ったクローン性繁殖体の拡散がサクラソウの再定着に寄与する可能性があることを示した。また、シモツケコウホネ (*Nuphar submersa* 属) の植物は根茎がクローン繁殖を行い、根茎の断片が水流によって運ばれ、新たなラメット（新しい個体）を形成することがある (Shiga et al. 2017)。Kikuchi et al. (2009) は、日本の本州の 5 つの河川(利根川、只見川、鳴瀬川、和賀川、江合川) 流域のユビソヤナギ (*Salix hukaoana*) 5 集団の遺伝的構造から、水流による種子の拡散が下流への遺伝子流動に最も寄与していると考えられるが、栄養繁殖体の水流による拡散の可能性は排除できないとしている。

これらの事例を参考にして、渡良瀬遊水地に生息するハナムグラと菅生沼および小貝川河川敷に生息するハナムグラに遺伝的分化がなかった理由を以下のように考察した。江戸時代の初め、鬼怒川は下妻付近で小貝川とつながり、谷和原領一帯は広大な湿地であった (国土交通省ウェブサイト 2008)。過去において、菅生沼は、広大な湿地の一部だった可能性がある。小貝川は、流域の 86%が平野であり、河川の勾配が緩いため、洪水の継続時間が長く、氾濫時の出水が引きにくい (国土交通省ウェブサイト 2008)。菅生沼は、利根川の遊水池としての機能を果たしている (原口 2000)。ハナムグラは、地下茎がちぎれて流され、流された箇所でも生育できる。渡良瀬遊水地に生息していたハナムグラの地下茎が利根川を流れ、遊水地であった菅生沼に流れ着き、そこで生育した。小貝川の氾濫時の出水にともない、菅生沼のハナムグラの地下茎がちぎれて流され、小貝川河川敷に流れ着き、そこで生育した。利根川の洪水が菅生沼へ流入するときや小貝川が氾濫したときに、渡良瀬遊水地に生息するハナムグラと菅生沼および小貝川河川敷に生息するハナムグラが交雑したために、遺伝的分化がなかったと推測した。ハナムグラについては、河川流域が大きく異なるハナムグラ集団の遺伝情報が追加されると、A、B、C、D、W 集団の遺伝的分化の小ささがより明確になると考えられる。

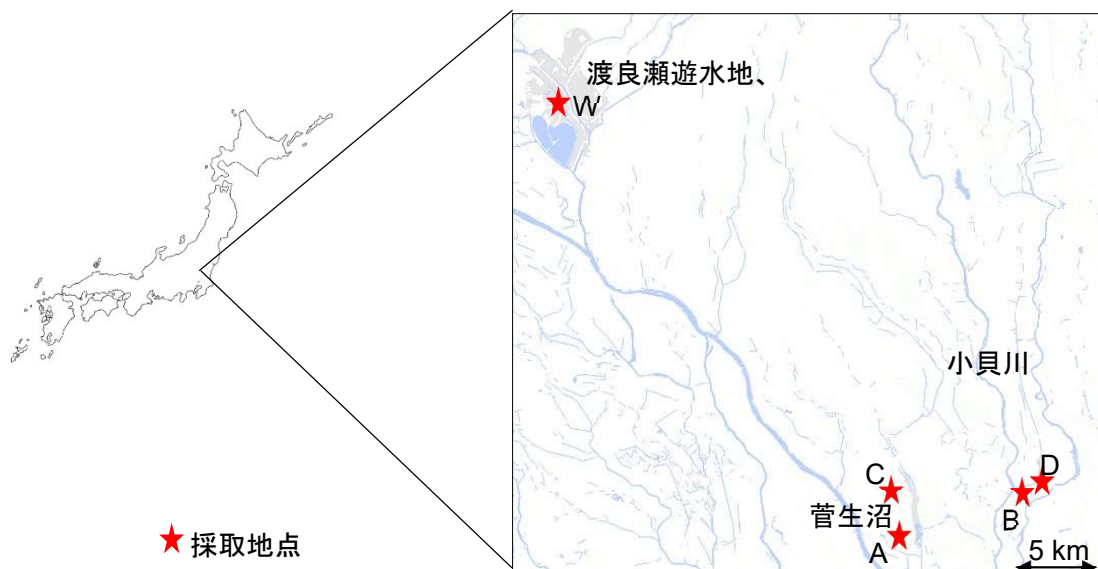


図 3.1 菅生沼と小貝川河川敷と渡良瀬遊水地の位置

サンプルは、茨城県の菅生沼（A、C 地点）、小貝川河川敷（B、D 地点）、渡良瀬遊水地（W 地点）で採取した。

図中の地図は、学習プリント.com（株式会社ディー・エフ・シー）より転載

https://xn--fdk3a7ctb5192box5b.com/other/map_japan_chiho_kanto_blankmap.htm

表 3.1 各地点におけるサンプル数

地点	ハナムグラ	ヤエムグラ
A	8	8
B	8	6
C	8	8
D	8	8
W	16	16

表 3.2 ハナムグラの各集団間の F_{st}

	A 集団	B 集団	C 集団	D 集団	W 集団
A 集団		0.100	0.126	0.090	0.066
B 集団			0.113	0.064	0.055
C 集団				0.103	0.079
D 集団					0.048
W 集団					

表 3.3 ハナムグラの各集団の H_e 、塩基多様度 (π)、 F_{IS}

地点	H_e	π	F_{IS}
A	0.0038	0.0042	0.0167
B	0.0036	0.0040	0.0149
C	0.0040	0.0046	0.0120
D	0.0035	0.0037	0.0178
W	0.0031	0.0032	0.0300

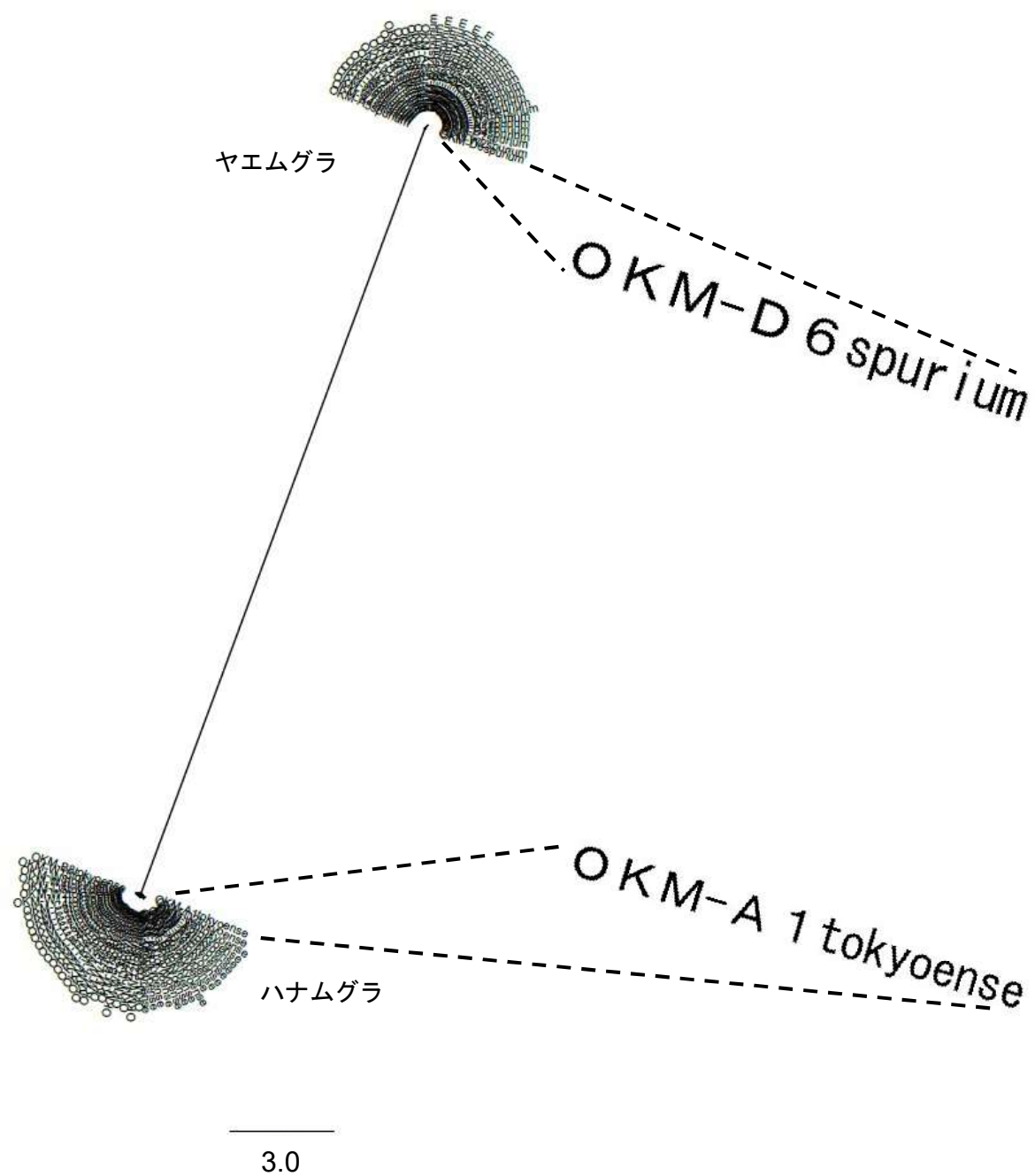
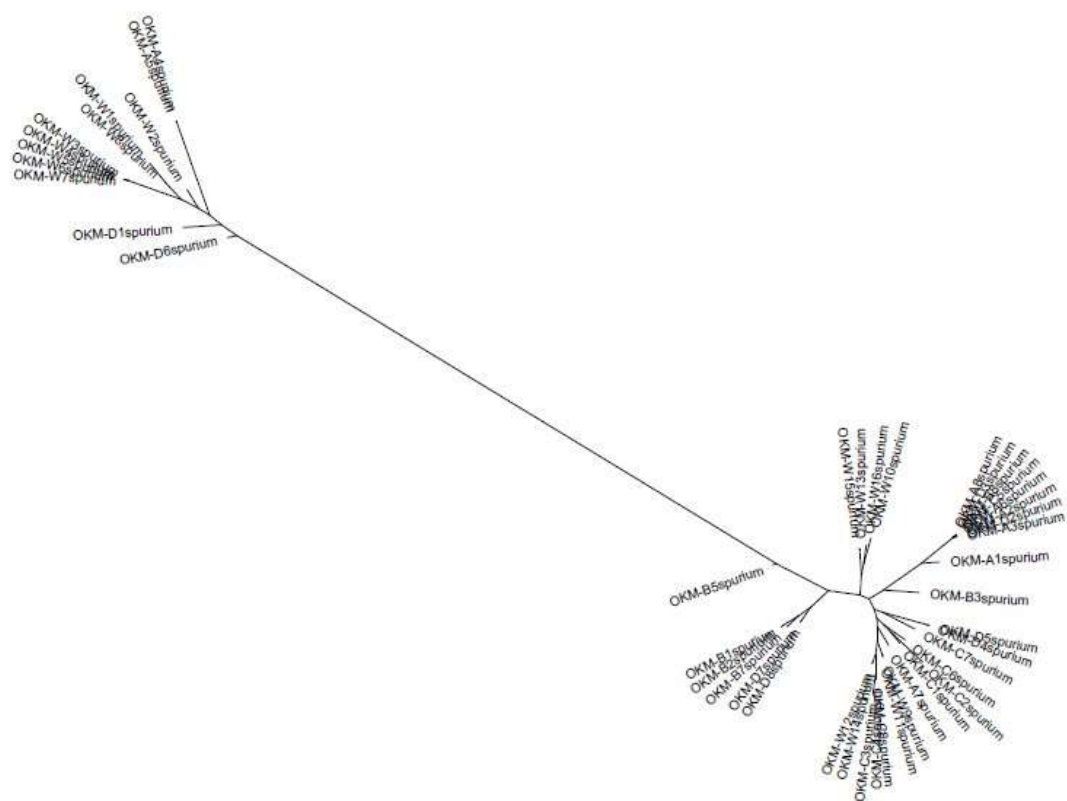


図 3.2 希少植物種ハナムグラおよびその近縁普通種ヤエムグラの最尤系統樹

OKM-試料名-tokyoense がハナムグラ

OKM-試料名-spurium がヤエムグラ



0.2

図 3.3 A、B、C、D、W 集団のヤエムグラの最尤系統樹

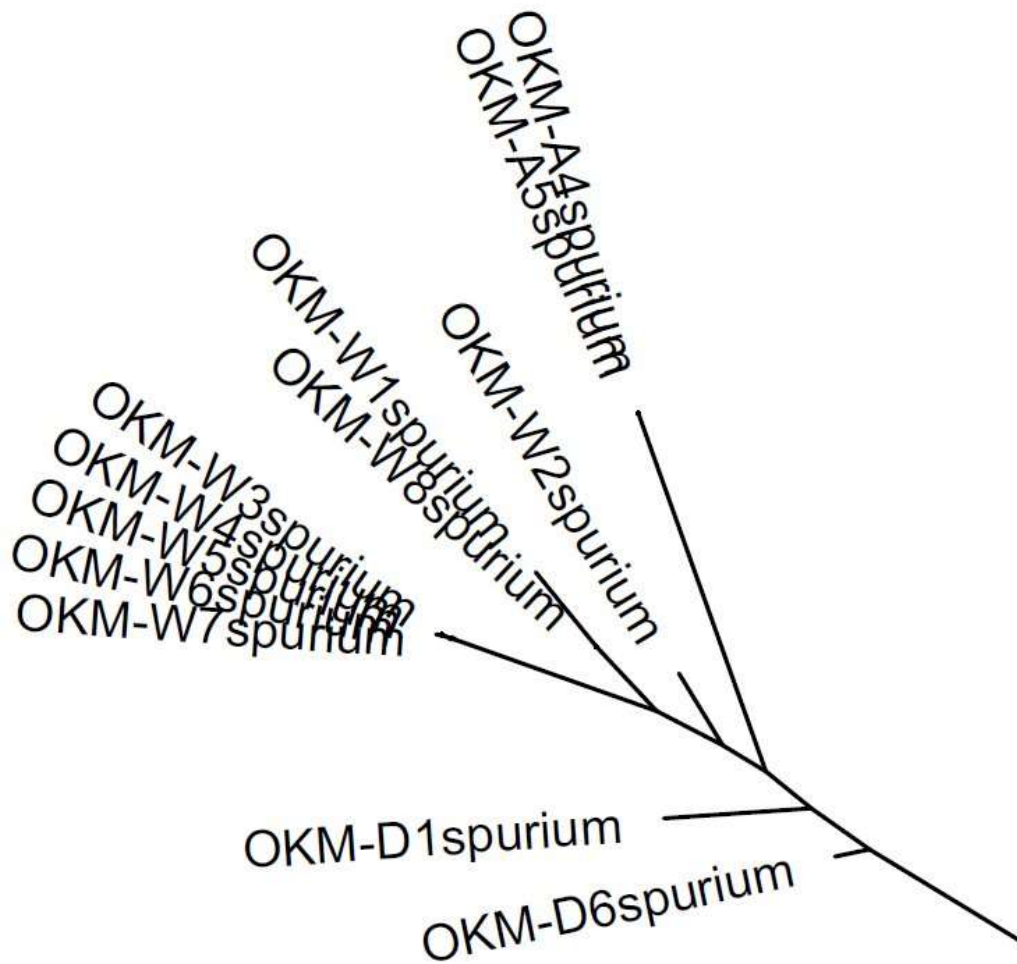


図 3.3.1 ヤエムグラの最尤系統樹 (図 3.3) の 2 つに識別されたうちの 1 つの遺伝的グループの拡大

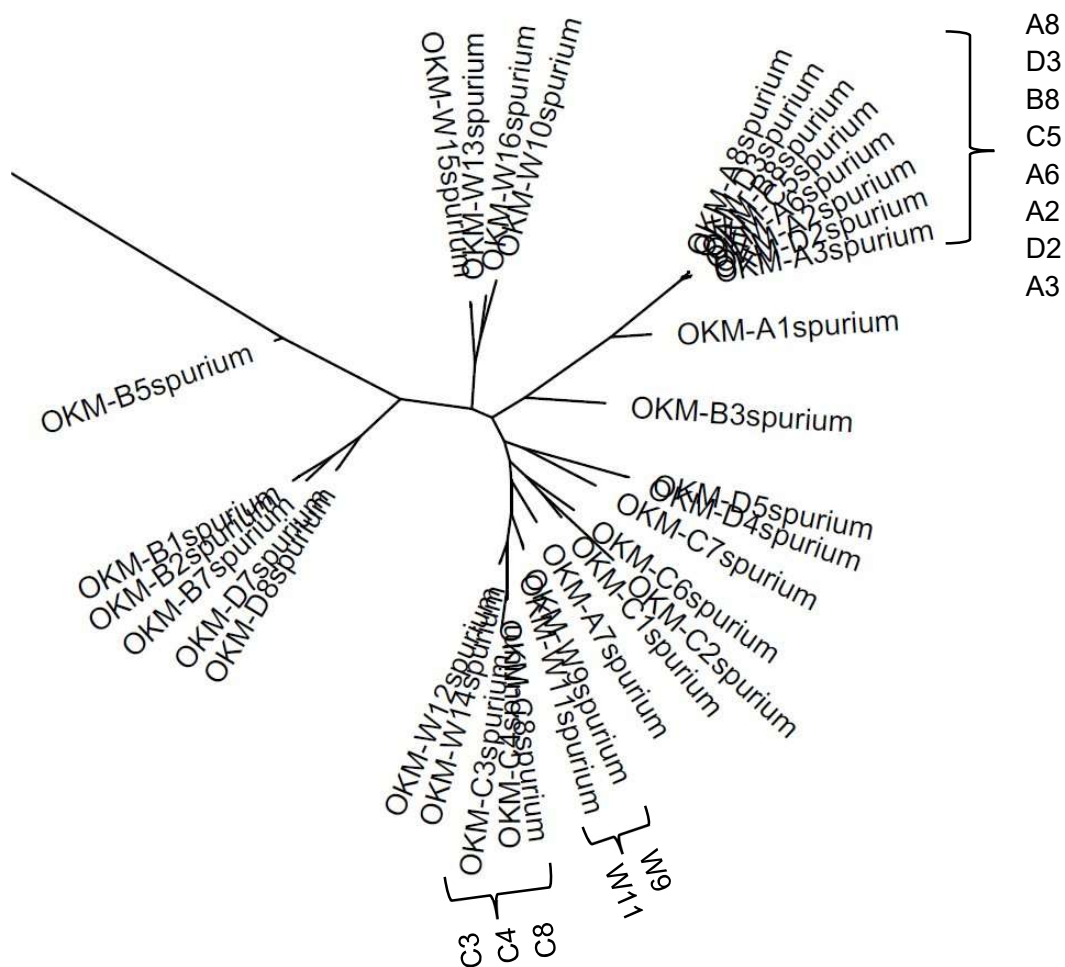


図 3.3.2 ヤエムグラの最尤系統樹 (図 3.3) の 2 つに識別されたうちのもう一方の遺伝的グループの拡大

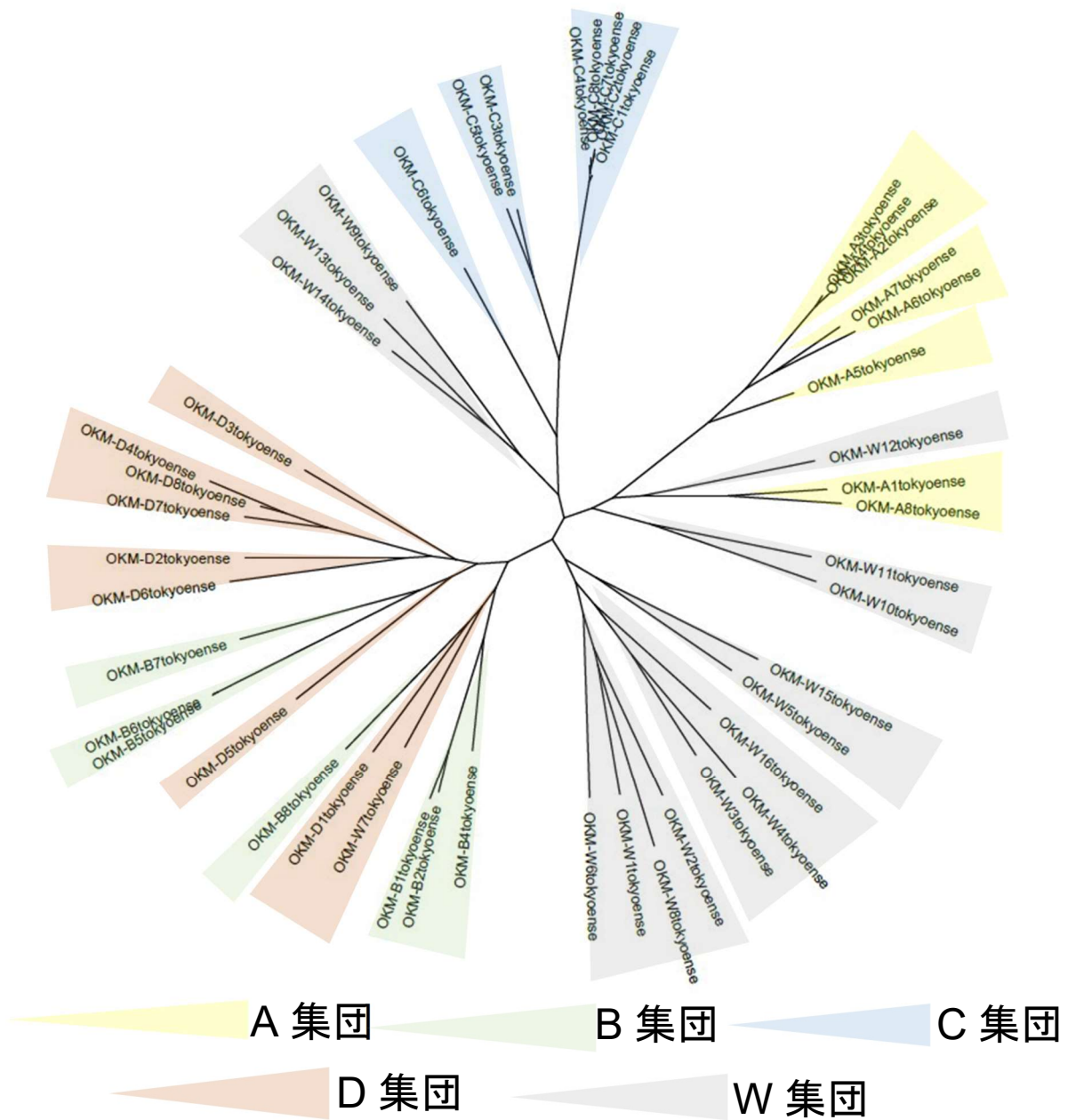


図 3.4 A、B、C、D、W 集団のハナムグラの最尤系統樹
各集団のハナムグラをそれぞれ黄色、緑色、青色、赤色、灰色で重ねた。

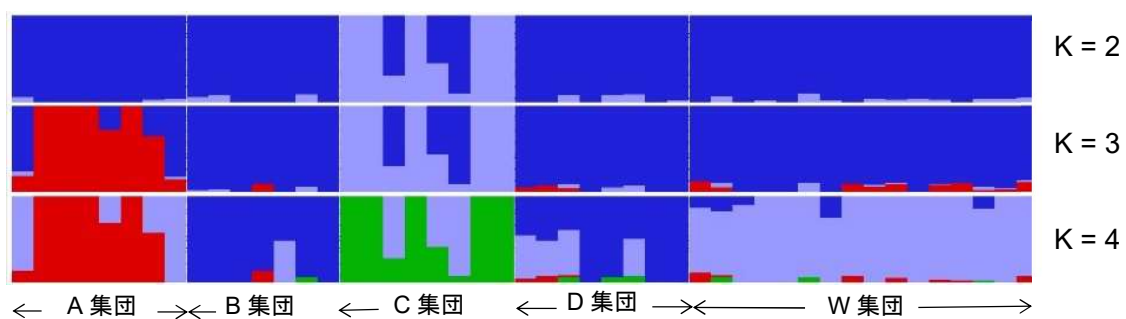


図 3.5 A、B、C、D、W 集団のハナムグラの遺伝的集団構造

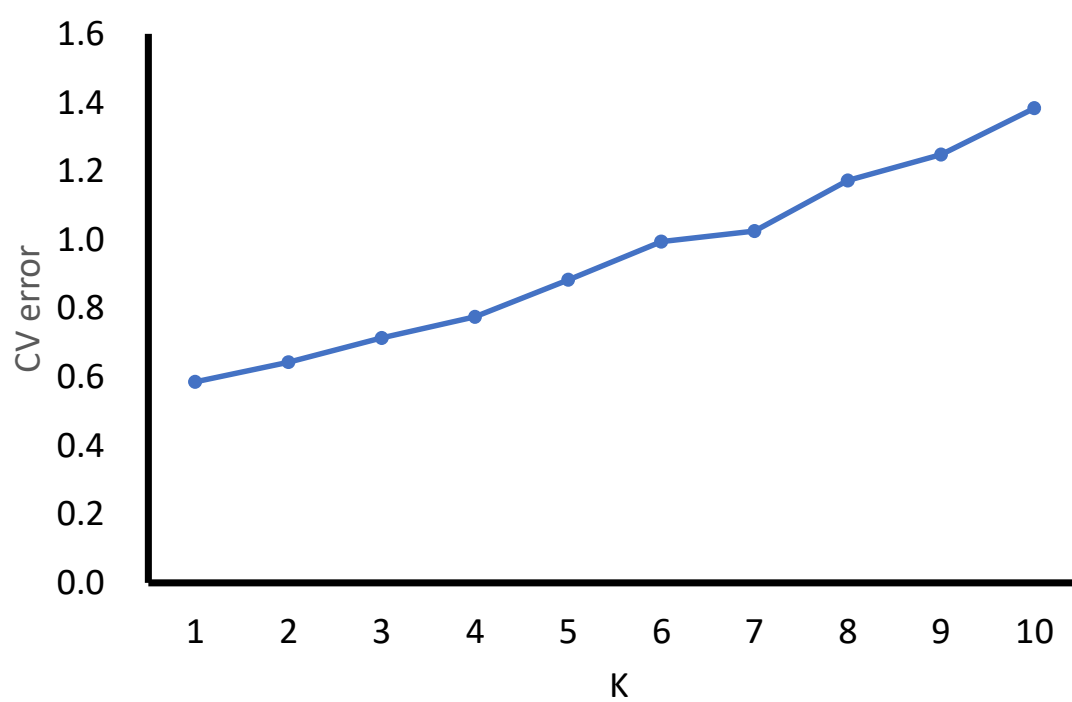


図 3.6 CV error と k の関係

第 4 章 つくば市における希少植物クロホシクサの地域集団の遺伝的多様性および遺伝子発現情報

4.1 はじめに

日本においては、2000 年度版植物レッドデータブック（以下、RDB）の作成時に、全国で維管束植物に関する個体数及び減少の程度が調査されている。渡邊ら（2014）は、2000 年度版の環境省 RDB 作成時の調査データから、日本の維管束植物について絶滅危惧 IA 類、絶滅危惧 IB 類、絶滅危惧 II 類に該当するものを抽出し、最終的に 407 種を解析対象種とした。減少要因の中で最も種数及び分布区域数が多かったのは、開発による影響で 343 種であった。本章で研究とする希少種のクロホシクサ (*Eriocaulon parvum*) は、つくば市内の開発予定地を生息地の一つとしており、同様の危機に瀕している存在である。

クロホシクサ是一年草で、実生繁殖によって世代を繰り返す。一方、南山ら（2003）が実施した実験により、クロホシクサの種子は暗条件ではほとんど発芽しないことが示されている。したがって、一年草であるが、種子が土壤中に深く潜る、または他の植物によって光が遮られると発芽できなくなる。さらに、増水などで種子が流されて移動すると、生息地に出現する個体数は減少する。これらの理由により、過去において個体数が一時的に減少したことがあると、集団内の遺伝的多様性が低下した可能性がある。

2 章および 3 章では、開発の予定がない渡良瀬遊水地、菅生沼、小貝川河川敷に生息する希少植物が、堤防や堰などの工事により湿地が消失するというシミュレーションで、遺伝的多様性を維持した希少植物の保全策を提案した。一方、本章では開発予定地に生息する希少植物クロホシクサの遺伝的多様性を維持した保全策を提案することを目的として、MIG-seq 法及び RNA-seq 法を用いた研究を実施した。

4.2 材料

希少植物クロホシクサとその近縁普通種であるイトイヌノヒゲ (*Eriocaulon decemflorum*) を対象とした。クロホシクサは被子植物単子葉類ホシクサ科ホシクサ属の湿地に生える 1 年草である、葉はロゼット状または茎にらせん状につく。花茎は高さ 5~20 cm、頭花は球形、黒色、径 4~5 mm、白色の短毛がある。本州から九州・沖縄に分布する（大橋ら 2015）。環境省レッドリストでは準絶滅危惧種 (NT) に指定されている（日本植物学会 2025c）。クロホシクサは、長野県および群馬県ではすでに絶滅したと考えられている（長野県環境部 自然保護課 2014；群馬県自然環境課 2022）。栃木県、千葉県、東京都、新潟県、静岡県、愛知県、滋賀県、兵庫県、広島県、山口県、徳島県、香川県、愛媛県、福岡県、佐賀県、長崎県、熊本県、大分県では絶滅危惧 I 類（絶滅の危機に瀕している種）と評価されている。茨城県では絶滅危惧 IB 類（近い将来における野生での絶滅の危険性が高いもの）と評価されている（NPO 法人野生生物調査協会・NPO 法人 Envision 環境保全事務所 2017）。

イトイヌノヒゲは被子植物単子葉類ホシクサ科ホシクサ属の湿った荒地や湿地に生え

る1年草である。葉は線形で長さ3~10 cm、格子状で、花茎は高さ3~30 cm、頭花は倒円錐形、白色、径3~7 mmである。北海道から九州に分布する(大橋ら2015)。環境省レッドリストに記載はない。イトイヌノヒゲは埼玉県、東京都、神奈川県、石川県、徳島県、徳島県、高知県では絶滅危惧I類(絶滅の危機に瀕している種)と評価されている。茨城県では絶滅危惧IB類と評価されている(NPO 法人 野生生物調査協会・NPO 法人 Envision 環境保全事務所 2017)。

MIG-seq 解析用のクロホシクサは、つくば市学園の森1丁目、2丁目および同市北部に位置する大学共同利用機関法人(KEK)内の湿地で採取した(図4.1)。つくば市学園の森2丁目とKEKは、約10 km離れている。つくば市学園の森2丁目が開発予定地である。学園の森1丁目の生息地は、2丁目から南西に約1 km離れた調整池内の湿地である。KEK内の湿地では、湛水域と陸域で採取した。イトイヌノヒゲは学園の森1丁目、2丁目で採取した(表4.1)。採取したクロホシクサの個体数は31、イトイヌノヒゲの個体数は15であった。RNA-seq 解析用のクロホシクサは、つくば市学園の森2丁目およびKEKで採取した。イトイヌノヒゲは学園の森1丁目、2丁目で採取した(表4.2)。クロホシクサの個体数は8、イトイヌノヒゲの個体数は3であった。クロホシクサの花径が最もよく伸びる9月~10月に採取を行った。

4.3 方法.

採取したサンプルは、CTAB法により、DNAを抽出し(Doyle et al. 1987)、Wizard® SV Genomic DNA Purification SystemによってDNAを精製した。DNAサンプルを用いたMIG-seq法によって、SNPの検出を行った(Suyama and Matsuki 2015; Suyama et al. 2022)。SNPの検出はStacks2.56を用いた(Rochette et al. 2019)。最尤系統解析をSplitsTree ver.4.14.2を用いて行い。(Huson and Bryant 2006)、クロホシクサ、イトイヌノヒゲの遺伝的関係を系統ネットワークとして図示した。クロホシクサ、イトイヌノヒゲの集団遺伝構造解析およびクロホシクサの集団遺伝構造解析として、ADMIXTURE1.3.0による遺伝的クラスタリング解析を行った。(Alexander et al. 2009)。ADMIXTURE解析では、各個体が共通の祖先集団からいくつかの想定集団(クラスター: K)に分化したことを仮定し、各個体がそれぞれの想定集団に由来する遺伝的要素をどのような割合で保有しているのかを100%積み上げ棒グラフによって可視化した。最適 K は CV error (交差検証)に基づいて推定した。遺伝的多様性および近交度を評価するために、Stacksのpopulationsプログラムにより、ハナムグラの遺伝的多様性の指標としてヘテロ接合度の期待値(H_e)および塩基多様度(π)を、近親交配の程度を示す指標として近交係数(F_{IS})を推定した(Catchen et al. 2011)。

生息地において採取した植物試料の組織をRNA保存液(RNA later™ Stabilization Solution)に入れた。RNAの抽出は、Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Promega社製)を使用した。抽出したRNAは、濃度、分解度、分子サイズ分布を測定した後、次世代シーケンサー(NovaSeq 6000)によるペアエンドの塩基配列解読を行った。Illumina HiSeqまたはIllumina

NovaSeq により RNA をシーケンスしたショートリード配列をアセンブラー Trinity でアセンブルすることで転写産物配列を得た。これらの転写産物の配列を参照配列とし、Burrows-Wheeler Alignment (BWA) を用いてショートリードのマッピングを行った。NGS データ解析総合ツールである samtools を用いて一塩基変異(SNV)の検出を行なった。各個体の SNVs を用いてバリエーションコールした。このようにして 1 個体内で検出された SNVs を同義置換と非同義置換に分類した。

このようにして得た網羅的 SNV を用いて、以下の 3 つの指標 A)、B)、C) を解析した。各解析で得られたクロホシクサとイトイヌノヒゲの結果を比較することにより、希少植物の潜在的脆弱性などの評価を行った。

- A) 遺伝的多様性：種内の遺伝的多様性を評価するため、1 個体内でヘテロ接合として保持されている同義変異 SNVs の数を検出し転写産物 1 kb あたりの数に換算して比較した。
- B) 有害変異の蓄積：タンパク質の配列変異がタンパク質の機能に影響を及ぼすかどうかを予測するために開発された解析ツール PROVEAN(Protein Variation Effect Analyzer) 1.1.5 により、タンパク質の構造を変化させて機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合を求めた (Choi et al. 2012)。また、非同義置換 SNVs において、終止コドンに変化し、タンパク質の機能消失が予想される変異 (ナンセンス変異) の割合を求めた。
- C) 重複遺伝子の割合：環境適応力の指標として用いることが期待されるゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合の推定を行った (Makino and Kawata 2012; Tamate et al. 2014)。

4.4 結果

4.4.1 MIG-seq 解析

学園の森 1 丁目、学園の森 2 丁目、KEK のクロホシクサ集団および学園の森 1 丁目、学園の森 2 丁目のイトイヌノヒゲ集団の塩基多様度(π)の平均値は、それぞれ 0.00018、0.00018、0.00025、0.00016、0.00016 で KEK のクロホシクサ集団が最も高かった (表 4.3)。ヘテロ接合度(H_e)の平均値はそれぞれ 0.16186、0.16999、0.23151、0.26055、0.26271 で、KEK のクロホシクサ集団はイトイヌノヒゲ集団と近い値を示した (表 4.3)。KEK のクロホシクサ集団は高い遺伝的多様性があることが分かった。また近交係数(F_{IS})の平均値は、それぞれ -0.00964、0.01455、0.02544、0.01759、-0.01390 と 0 に近かった (表 4.3)。

希少植物種クロホシクサ 31 個体およびその近縁普通種イトイヌノヒゲ 15 個体の遺伝的関係の系統ネットワークを図 4.2 に示す。クロホシクサとイトイヌノヒゲは遺伝的に明瞭に識別された。クロホシクサは、つくば市学園の森 1 丁目、2 丁目のグループと KEK のグループに明瞭に識別された。

クロホシクサ、イトイヌノヒゲの ADMIXTURE 解析の結果による CV error と K の関係を図 4.3 に示す。CV error が最も低い値は $K = 7$ で、次いで低い値は $K = 3$ あった。学園の森 1 丁目のイトイヌノヒゲ集団、学園の森 2 丁目のイトイヌノヒゲ集団、学園の森 1 丁目

のクロホシクサ集団、学園の森 2 丁目のクロホシクサ集団、KEK 内の湛水域と陸域のクロホシクサ集団の遺伝的集団構造解析を図 4.4 に示す。想定集団数 (K) が 3 および 7 の結果を描画した。 $K=3$ のとき、学園の森 1 丁目のイトイヌノヒゲ集団および学園の森 2 丁目のイトイヌノヒゲ集団では赤色のクラスターが優占し、学園の森 1 丁目のクロホシクサ集団および学園の森 2 丁目のクロホシクサ集団では青色のクラスターが優占し、KEK 内のクロホシクサ集団では薄青色のクラスターが優占した。KEK 内の陸域のクロホシクサには赤色のクラスターが存在した。 $K=7$ のとき、学園の森 1 丁目のイトイヌノヒゲ集団および学園の森 2 丁目のイトイヌノヒゲ集団では、青色、薄青色、紫色、黄色、緑色のクラスターが混在した。一方学園の森 1 丁目のクロホシクサ集団および学園の森 2 丁目のクロホシクサ集団では薄青色と赤色のクラスターが優占した。KEK 内のクロホシクサ集団では橙色のクラスターが優占したが、KEK 内の陸域のクロホシクサには黄色のクラスターが混在した。遺伝的集団構造解析の結果は、系統ネットワークの解析結果と同様にクロホシクサとイトイヌノヒゲは遺伝的に明瞭に識別されて、クロホシクサは、つくば市学園の森 1 丁目、2 丁目のグループと KEK のグループに明瞭に識別された。

クロホシクサの ADMIXTURE 解析の結果による CV error と K の関係を図 4.5 に示す。CV error が最も低い値は $K=2$ で、次いで低い値は $K=7$ あった。学園の森 1 丁目のクロホシクサ集団、学園の森 2 丁目のクロホシクサ集団、KEK 内の湛水域と陸域のクロホシクサ集団の遺伝的集団構造解析を図 4.6 に示す。想定集団数(K)が 2 および 7 の結果を描画した。 $K=2$ のとき、学園の森 1 丁目のクロホシクサ集団および学園の森 2 丁目のクロホシクサ集団は青色のクラスターのみであり、KEK 内のクロホシクサ集団では橙色のクラスターが優占した。この結果は、つくば市学園の森 1 丁目、2 丁目のグループと KEK のグループに明瞭に識別された系統ネットワークの解析結果と一致した。 $K=7$ のとき、学園の森 1 丁目のクロホシクサ集団および学園の森 2 丁目のクロホシクサ集団では、紺色、青色、紫色、黄緑色のクラスターが混在した。一方 KEK 内の湛水域のクロホシクサ集団では緑色と深緑色のクラスターが優占した、KEK 内の陸域のクロホシクサには橙色のクラスターが優占した。

4.4.2 RNA-seq 解析

平均遺伝的多様性 (1 kb あたりの同義 SNV 数として定量化) は、クロホシクサの平均値が 6.89 となり、イトイヌノヒゲの平均値 (2.06) よりも高かった (図 4.7、表 4.4)。クロホシクサのタンパク質の構造を変化させて機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合の平均値 (0.198) は、イトイヌノヒゲの平均値 (0.232) よりも低かった (図 4.8、表 4.5)。RNA-seq 解析用のクロホシクサの個体数は 8、イトイヌノヒゲの個体数は 3 と少ないサンプル数だったので、マン・ホイットニーの U 検定を実施して、クロホシクサとイトイヌノヒゲのタンパク質の構造を変化させて機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合の中央値に有意な差があるかどうかを評価した結果、両者の中央値に有意な差が認められた。また、クロホシクサのナンセンス SNV の割合の平均値 (0.00363) は、イトイヌノヒゲの平均値 (0.00393) よ

りも低かった（図 4.9、表 4.6）。マン・ホイットニーのU検定を実施して、クロホシクサとイトイヌノヒゲのナンセンス SNV の割合の中央値に有意な差があるかどうかを評価した結果、両者の中央値に有意な差があるとはいえなかった。クロホシクサの重複遺伝子の割合の平均値（0.668）は、イトイヌノヒゲの平均値(0.624)よりも高かった（図 4.10、表 4.7）。マン・ホイットニーの U 検定を実施して、クロホシクサとイトイヌノヒゲの重複遺伝子の割合の中央値に有意な差があるかどうかを評価した結果、両者の中央値に有意な差があるとはいえなかった。

4.5 考察

学園の森 1 丁目、学園の森 2 丁目、KEK のクロホシクサ集団および学園の森 1 丁目、学園の森 2 丁目のイトイヌノヒゲ集団の π および H_e から（表 4.3）、KEK のクロホシクサ集団は高い遺伝的多様性があった。過去において、KEK が造成される前に大きな湧水湿地があって、大きなクロホシクサ集団が成立していたことが推察された。全ての集団においてクロホシクサは任意交配していることが分かった。

茨城県の小貝川と桜川にはさまれた台地の湧水を起源とする谷田川にはいくつかの支流が存在する。つくば市学園の森 1 丁目の湿地、KEK 内の湿地はそれぞれ支流の源流付近にある。湧水湿地にはホシクサ属などを主な構成種とする特異な草本植物群落が成立しているという報告がある（富田 2008）。

遺伝的関係の系統ネットワーク（図 4.2）および遺伝的集団構造解析（図 4.4、図 4.6）から、つくば市学園の森 1 丁目に生息するクロホシクサとつくば市学園の 2 丁目に生息するクロホシクサが同じ遺伝グループに属した。現在は、開発にともない分断されているが、過去において、つくば市学園の森 1 丁目に生息するクロホシクサとつくば市学園の 2 丁目に生息するクロホシクサは、1 つの湧水湿地で生息していた可能性が示された。

また、同じく遺伝的関係の系統ネットワークおよび遺伝的集団構造解析から（図 4.2、図 4.4）、つくば市学園の森 1 丁目の湧水湿地のクロホシクサと KEK 内の湧水湿地のクロホシクサは遺伝的交流がなかったため分化したと推察した。佐伯（2011）によって、希少樹種ハナノキ (*Acer pycnanthum*) について、長野・岐阜・愛知の 3 県に分布する生育地 30 ヶ所から 400 個体の葉緑体 DNA の変異にもとづく遺伝構造を明らかにした結果、わずか数 km しかなかった集団間において、全く異なる遺伝構造で構成されていることが分かった。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。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。また勝木（2023）によって、ヤツガタケトウヒ (*Picea koyamae*) の八ヶ岳の 4 集団（天女山、カラマツ沢、フウキ沢、千枚岩）と南アルプスの 5 集団（大平、藪沢、上にごり沢、豊口山、天主岩）を対象に、SSR（マイクロサテライト）遺伝子座を用いた分析をした結果、集団間が最長でも 60 km にも満たない狭い分布範囲にも関わらず、集団間の分化が進んでいることが示された。これらの集団では分布地が分断化して近縁の個体間のみで交配し、近親交配

が進むとともに遺伝的な多様性が低下したと推定された。Shiga et al. (2017) は、日光市、那須烏山市、真岡市、佐倉市のシモツケコウホネ生息地の集団間の距離が 12 km から 35 km であるが、遺伝構造解析から日光市のシモツケコウホネ集団はほかの 3 集団との遺伝子流動は制限すべきと提案した。三重県北部に分布するシデコブシ (*Magnolia stellata*) は、20 km 四方という狭い範囲内にも関わらず、明確な 3 つの遺伝的グループが検出された (玉木 2017)。Honjo et al. (2004) のサクラソウの系統解析においても中央本州の軽井沢地域で 20 km の範囲内で 2 つの遺伝的グループが存在した。復元活動における隣接集団間の移植は、地域集団の遺伝子プールを大きく変えないように慎重に設計されるべきで、遺伝的構造に関する情報がない場合、無思慮に植物を集団から取り出さないことが望ましい (Honjo et al. 2004)。

KEK 内の湧水湿地のクロホシクサは厳格に保護されている。Masuda et al. (2017) は、愛知県と静岡県の水湿地に生息するシラタマホシクサの 12 集団について遺伝的構造を調査した結果、厳格に保全された 5 集団において遺伝的分化が認められ、残りの 7 集団には遺伝子攪乱が見られた。クロホシクサの遺伝的多様性を保全するためには、KEK 内のクロホシクサ生息地の厳格な保護を継続すべきと考えられる。

クロホシクサの ADMIXTURE 解析の $K=7$ の結果から (図 4.6)、KEK 内の湧水湿地の湛水域に生息するクロホシクサと陸域に生息するクロホシクサに遺伝的構造に違いがあった。陸域では乾燥に強い特性が求められ、湛水域では水分過多に耐える特性が求められる。それぞれの特性によって、異なる遺伝的組成を持つ集団が形成されたと推察した。

つくば市学園の森 2 丁目が開発予定地であり、近い将来には開発予定地にあるクロホシクサの生息地は消失する。遺伝解析により、学園の森 1 丁目に生息するクロホシクサと学園の森 2 丁目に生息するクロホシクサは 1 つの集団であることが示された (図 4.2、図 4.4、図 4.6)。学園の森 1 丁目の生息地は、2 丁目から南西に約 1 km 離れた調整池内の水湿地である。そこが学園の森 2 丁目に生息するクロホシクサを移植する候補地と考えられる。生息域内保全のひとつといえる。

学園の森 1 丁目の生息地へ移植が何らかの事情で難しい場合には、適地が見つかるまで生息域外保全によって対応すべきと考えられる。国立科学博物館筑波実験植物園や関連する官民の研究機関と連携して、管理された飼育施設へ学園の森 2 丁目のクロホシクサを移し、そこで増やすことが望ましい。

RNA 解析の結果、イトイヌノヒゲはクロホシクサよりも遺伝的多様性が小さく (図 4.7)、タンパク質の構造を変化させて機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合が高かった (図 4.8、表 4.5)。重複遺伝子の割合は、両者の中央値に有意な差があるとはいえなかったが (図 4.9)、平均値ではイトイヌノヒゲはクロホシクサよりも低かった (表 4.6)。小笠原諸島に生育する絶滅危惧種のシャクナゲ (*Rhododendron boninense*) で、有害変異の蓄積が観察され (Isagi et al. 2020)、小笠原諸島の絶滅危惧種は近縁の普通種よりも有害変異を多く蓄積していて、重複遺伝子の割合は低かった (Hamabata et al. 2019)。イトイヌノヒゲは、茨城県では

絶滅危惧IB 類に指定されているように、茨城県において近い将来に絶滅の危険性が高い影響が、遺伝的多様性が小さく、有害変異を多く蓄積していて、環境変化に対する頑健性が小さいことに表れたと考えられた。

クロホシクサは遺伝的多様性が高かったことから（図 4.7）、各集団において小規模で孤立した個体群を形成しておらず、特定の遺伝子型が固定されなかったことが示唆された。有害な変異が蓄積している傾向は観察されず（表 4.5、表 4.6）、遺伝的健全性は高く保持されていることから、自然選択効率の低下を引き起こす個体数減少に関連する遺伝的浮動は生じなかったと考えられた。



図 4.1 サンプルング地点

クロホシクサは、つくば市学園の森 1 丁目、2 丁目および同市北部に位置する大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構(KEK)内の湿地で採取。イトイヌノヒゲは学園の森 1 丁目、2 丁目で採取。採取地点を星印で示した。

図中の地図は、地理院発行 2.5 万分 1 地形図(地理院地図 電子国土 WEB)より転載
<https://maps.gsi.go.jp>

表 4.1 MIG-seq 解析用のサンプル数

	クロホシクサ	イトイヌノヒゲ
茨城県つくば市学園の森 1 丁目	7	7
茨城県つくば市学園の森 2 丁目	8	8
茨城県つくば市高エネルギー加速器 研究機構内の湿地【湛水域】	8	0
茨城県つくば市高エネルギー加速器 研究機構内の湿地【陸域】	8	0

表 4.2 RNA-seq 解析用のサンプル数

	クロホシクサ	イトイヌノヒゲ
茨城県つくば市学園の森 1 丁目	0	1
茨城県つくば市学園の森 2 丁目	2	2
茨城県つくば市高エネルギー加速器 研究機構内の湿地【湛水域】	3	0
茨城県つくば市高エネルギー加速器 研究機構内の湿地【陸域】	3	0

表 4.3 各集団の He 、 π 、 F_{IS}

地点	He	π	F_{IS}
学園の森 1 丁目に生息するクロホシクサ	0.1619	0.00018	-0.00964
学園の森 2 丁目に生息するクロホシクサ	0.1700	0.00018	0.01455
KEK に生息するクロホシクサ	0.2315	0.00025	0.02544
学園の森 1 丁目に生息するイトイヌノヒゲ	0.2606	0.00016	0.01759
学園の森 2 丁目に生息するイトイヌノヒゲ	0.2627	0.00016	-0.01390

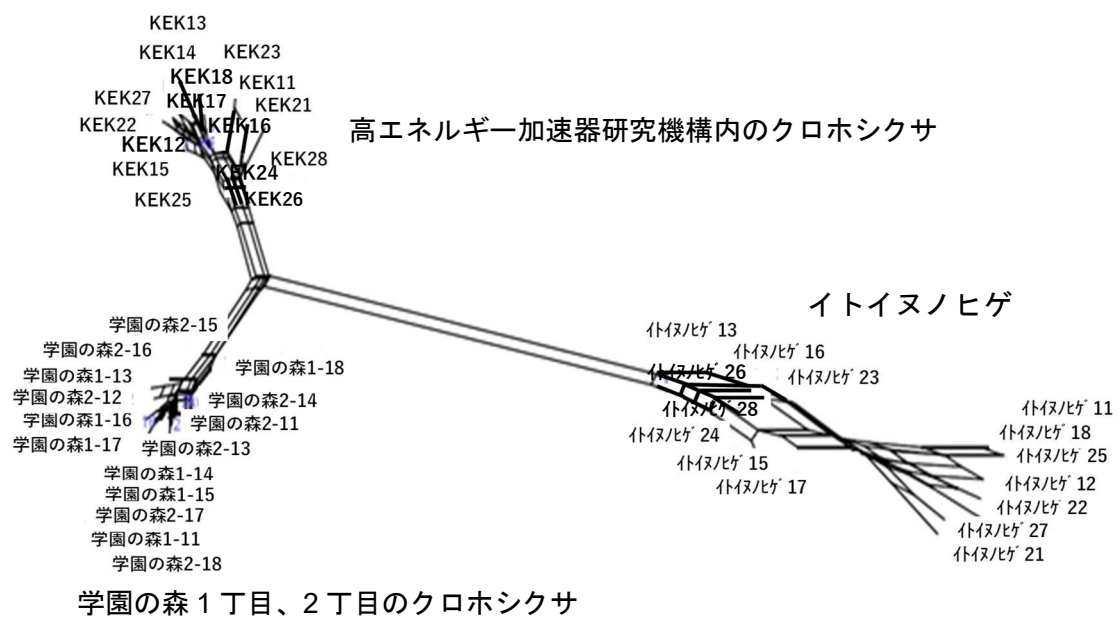


図 4.2 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲの遺伝的関係の系統ネットワーク

学園の森 1-11、1-13～1-18 は、つくば市学園の森 1 丁目に生息していたクロホシクサ

学園の森 2-11～2-18 は、つくば市学園の森 2 丁目に生息していたクロホシクサ

KEK11～18、KEK21～28 は、高エネルギー加速器研究機構内に生息していたクロホシクサ

イトイヌノヒゲ 11～13、15～18 は、つくば市学園の森 1 丁目に生息していたイトイヌノヒゲ

イトイヌノヒゲ 21～28 は、つくば市学園の森 2 丁目に生息していたイトイヌノヒゲ

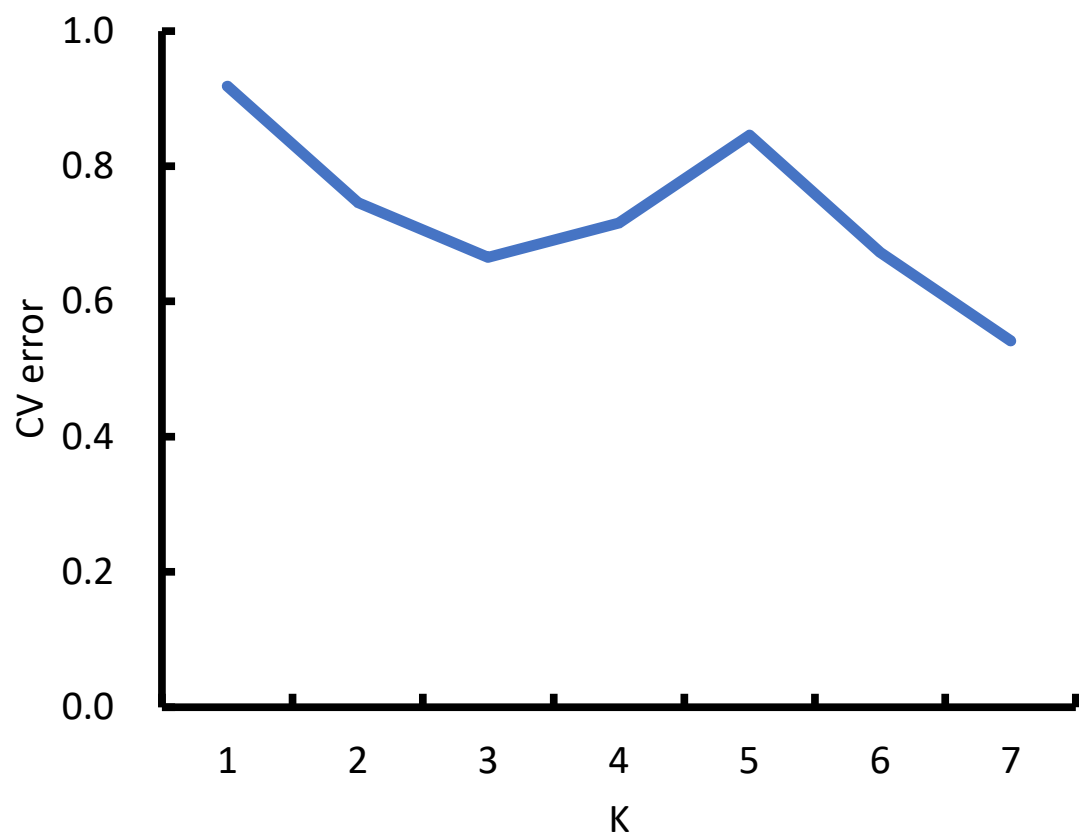


図 4.3 クロホシクサ、イトイヌノヒゲの ADMIXTURE 解析の結果による CV error と K との関係

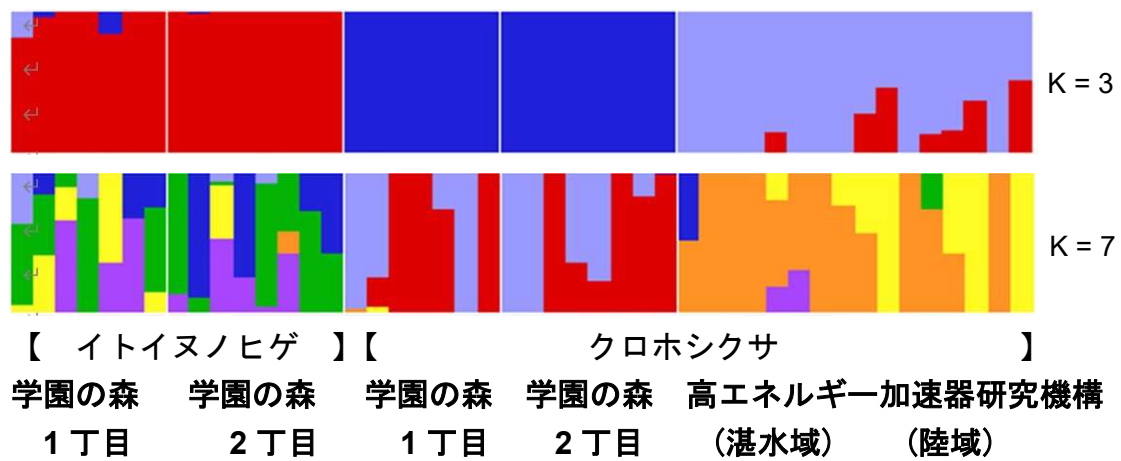


図 4.4 クロホシクサ、イトイヌノヒゲの ADMIXTURE 解析の結果による遺伝的集団構造解析

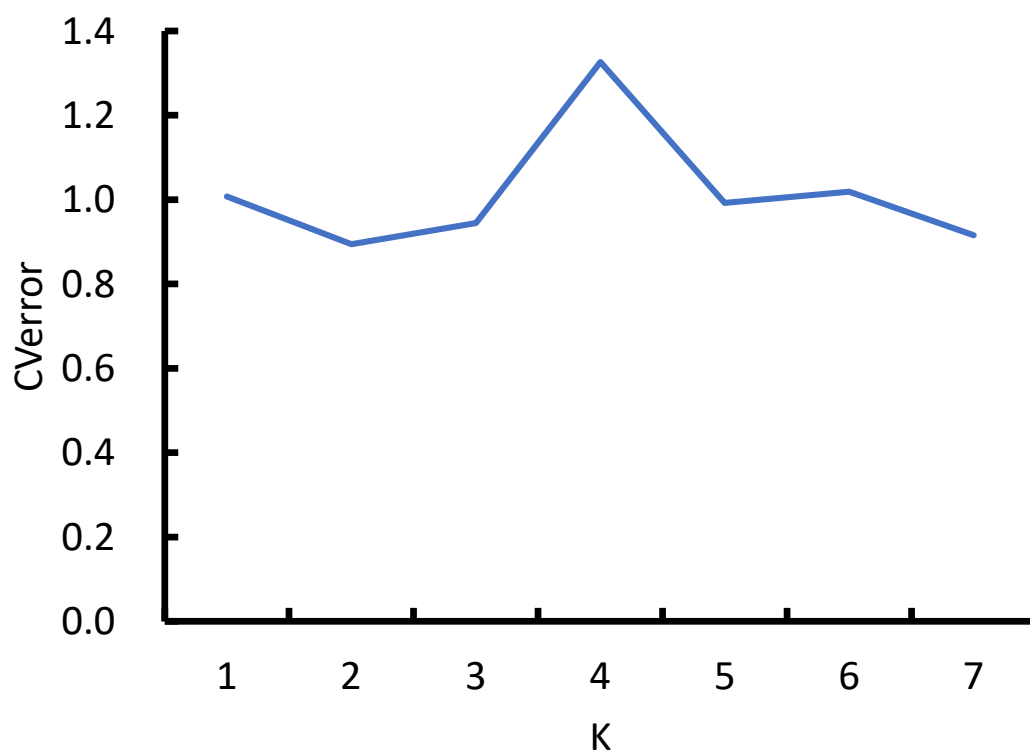


図 4.5 クロホシクサの ADMIXTURE 解析の結果による CV error と K の関係

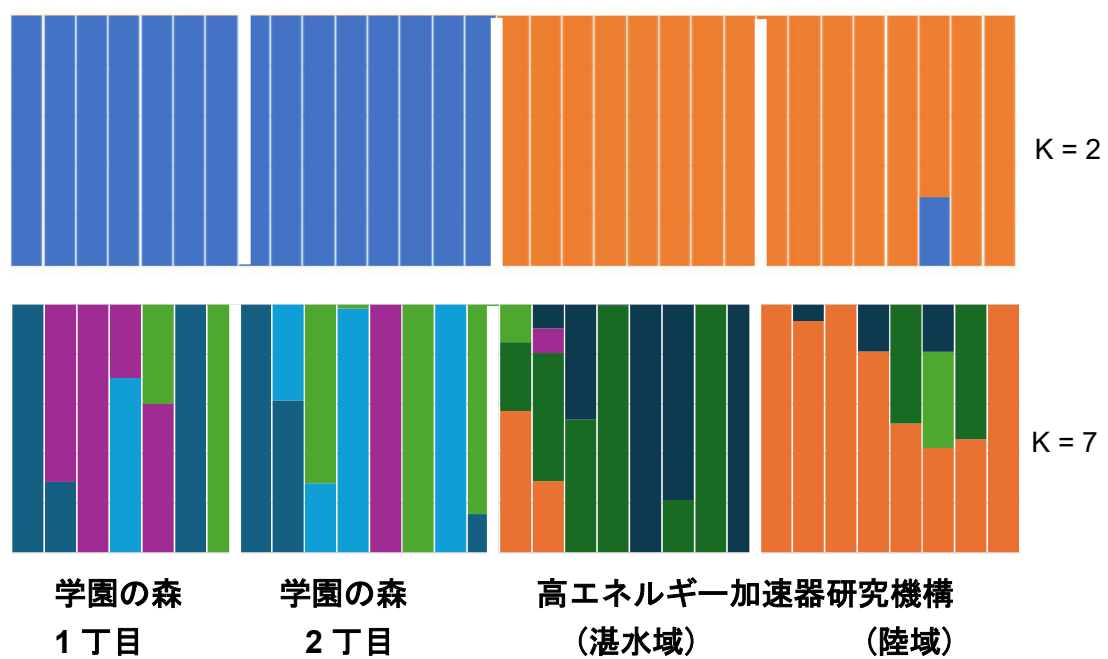


図 4.6 クロホシクサの ADMIXTURE 解析の結果による遺伝的集団構造解析

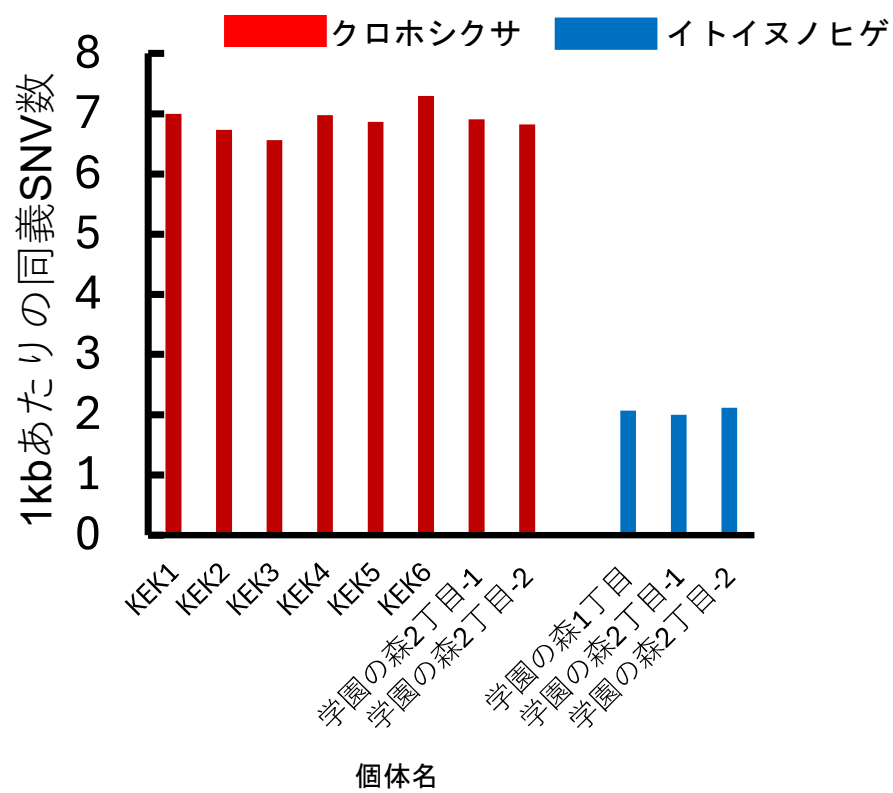


図 4.7 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲの各個体における RNA-seq 情報に基づく遺伝的多様性（同義 SNV）

表 4.4 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲの 1 kb あたりの同義 SNV 数の平均値

	クロホシクサ	イトイヌノヒゲ
平均	6.89	2.06

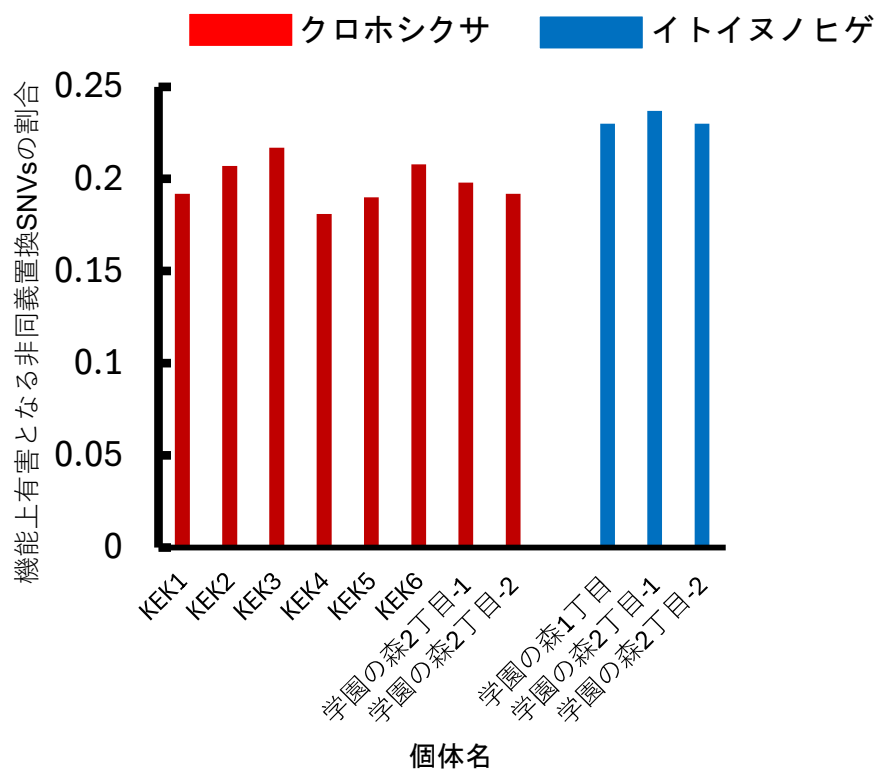


図 4.8 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲの各個体における RNA-seq 情報に基づく機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合

KEK1～6 は KEK 内の湿地のクロホシクサ

学園の森 2 丁目-1、-2 は学園の森 2 丁目のクロホシクサおよびイトイヌノヒゲ

学園の森 1 丁目は学園の森 1 丁目のイトイヌノヒゲ

表 4.5 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲの機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合の平均値と標準誤差

	クロホシクサ	イトイヌノヒゲ
平均	0.198	0.232
標準誤差	0.004	0.002

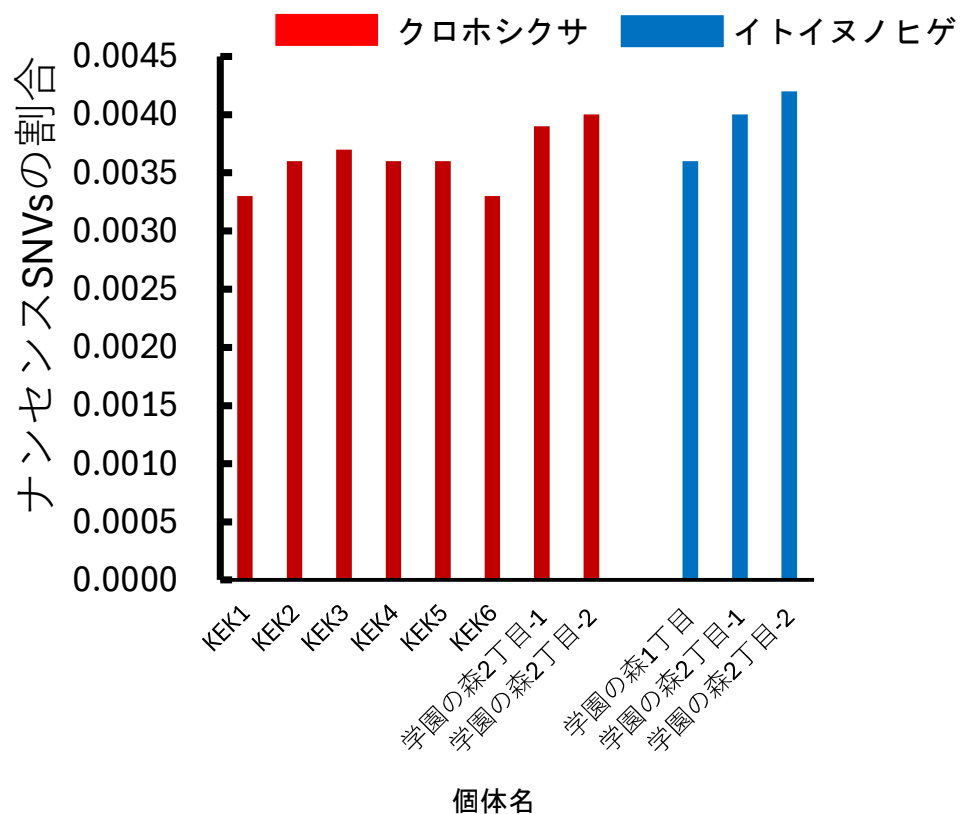


図 4.9 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲの各個体における RNA-seq 情報に基づくナンセンス SNVs の割合

KEK1～6 は KEK 内の湿地のクロホシクサ

学園の森 2 丁目-1、-2 は学園の森 2 丁目のクロホシクサおよびイトイヌノヒゲ

学園の森 1 丁目は学園の森 1 丁目のイトイヌノヒゲ

表 4.6 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲのナンセンス SNVs の割合の平均値と標準誤差

	クロホシクサ	イトイヌノヒゲ
平均	0.00363	0.00393
標準誤差	0.00009	0.00018

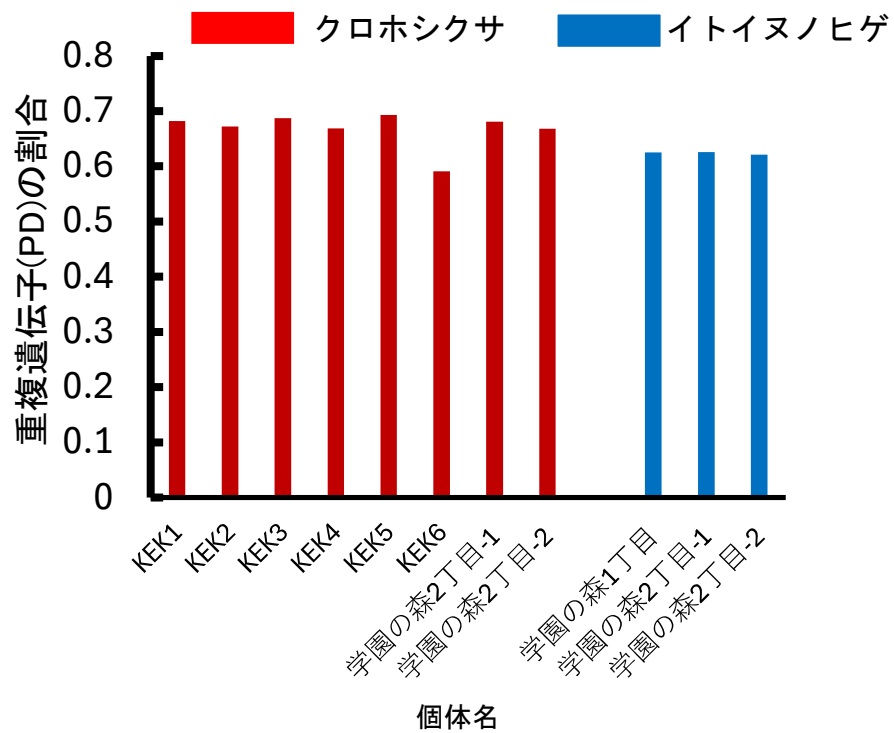


図 4.10 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲの各個体における RNA-seq 情報に基づく重複遺伝子(P_D)の割合

KEK1～6 は KEK 内の湿地のクロホシクサ

学園の森 2 丁目-1、-2 は学園の森 2 丁目のクロホシクサおよびイトイヌノヒゲ

学園の森 1 丁目は学園の森 1 丁目のイトイヌノヒゲ

表 4.7 クロホシクサおよびイトイヌノヒゲの重複遺伝子 (P_D) の割合の平均値と標準誤差

	クロホシクサ	イトイヌノヒゲ
平均	0.668	0.624
標準誤差	0.011	0.002

第 5 章 総合考察

5.1 繁殖様式の違いが生物集団の遺伝的多様性に与える影響とその生態的意義

本研究で対象とした 3 種の湿生植物の内、栄養繁殖が確認されたのは、ハナムグラのみだった（図 3.4）。別所-上原（2023）によると、多くの植物は栄養繁殖のみで全てのライフステージを乗り切ることではなく、ある一定のライフステージを栄養繁殖で過ごし、必要に応じて種子繁殖に切り替える巧みな生活環をもつとされる。また、栄養繁殖体は、より短時間で栄養繁殖器官を形成でき、環境条件の変化に迅速に対応できる可能性がある。この迅速な繁殖は競争を優位に進め、新たな生息地を占有することができる。富松ら（2007）は、栄養繁殖体が小規模攪乱の多い環境に適応したものである可能性を示唆している。栄養繁殖は、遺伝的多様性が低下しやすい傾向がある一方で、小規模攪乱の多い環境において短時間で個体数を増やす利点があると考えられる。ハナムグラの集団内における遺伝的多様性は低かった。また、集団内で任意交配していることが示されたので、各集団において交配に十分な数の個体が存在すると推定できた。ユビソヤナギは栄養繁殖するが、それが遺伝的構造に影響を与える可能性は低く、主に有性生殖に依存していることが示されている（Kikuchi et al. 2011）。さらに、チチブイワザクラ (*Primula reinii* var. *rhodotricha*) は、サクラソウ科サクラソウ属の多年生草本の絶滅危惧植物で、秩父地方の武甲山にのみ分布する固有変種であるが、2012 年ごろは、種子の結実率も実生の発芽率も低く、クローンによる個体増殖で集団が維持されている状態であった（倉田ら 2023）。このように栄養繁殖と実生繁殖は、遺伝的多様性や環境適応に深く関わっており、ハナムグラは生息環境に応じた巧妙な生存戦略を持っていることが示唆された。

遺伝的多様性について 3 種を近縁普通種と比較すると、タチスミレの集団内における遺伝的多様性は近縁普通種のツボスミレに比べ低かった（表 2.4、図 2.10）。一方、クロホシクサの *He* はイトイヌノヒゲより低かったが（表 4.3）、RNA 解析による転写産物 1 kb あたりの同義 SNV 数では、クロホシクサがイトイヌノヒゲより明らかに高かった（図 4.7）。なお、ハナムグラについては、近縁普通種のヤエムグラが倍数性のため（図 3.3）、直接比較できなかった。タチスミレが近縁種に比べ遺伝的多様性が低かったのは、各集団が小さかったためと考えられる。一方、交配様式については集団内で任意交配していることが示されたことから、交配に関しては、ある程度十分な数の個体が各集団に存在すると推定できた。したがって、タチスミレの実生繁殖を促進することで、遺伝的多様性を高めることができると考えられる。これらのことから、タチスミレの生存率を向上させて、個体数を増やすためには、生息地における枯れ草の野焼きや刈り取りなど、草原性草本種の保全に効果的な生息環境の管理が重要である。クロホシクサの *He* の低さは、個体数が少ないことによる可能性が高い。しかし、RNA 解析では逆の傾向が見られたことから、個体数が縮小する過程等に関する調査が必要と考えられる。一方、クロホシクサの各集団を比べると、KEK で遺伝的多様性が高かった（表 4.3）。クロホシクサは実生繁殖（1 年草）である。KEK 内の湿地は谷田川

の支流の源流付近に位置している。過去には、KEK が造成される前に大きな湧水湿地が存在し、大きなクロホシクサ集団が成立していたと推察される。したがって、花粉流動と種子散布によるクロホシクサの遺伝子流動を維持するためには、生息地の断片化や孤立化によって小集団化が進まないように湿地を保全する必要がある。さらに、KEK は入構管理が行われているため、人為的攪乱の影響が少なく、クロホシクサの遺伝的多様性保全が確保されることが期待できる。

5.2 希少植物の有害遺伝子蓄積と環境適応能力の評価

本研究で行った RNA 解析の研究例には、維管束植物では、小笠原のムニンノボタン (*Melastoma tetramerum*) など 4 種とタイワンホトトギス (*Tricyrtis formosana*) の例がある。Hamabata et al. (2019) は、国内希少野生動植物種に選定された小笠原諸島の植物と近縁普通種を対象に RNA 解析を行い、ゲノム内に蓄積されている有害変異と重複遺伝子の割合を比較解析することで、絶滅危惧種の脆弱性や環境適応能力を評価・推定している。中濱ら (2022) は、従来行われてきた中立変異を対象とした解析に加えて、このような有害遺伝子蓄積量や環境適応能力といった項目を評価することで、希少種の絶滅リスクをより正確に評価することができるとしている。Tsunenari et al. (2024)により、タイワンホトトギスの台湾集団、西表島集団、沖縄本島集団の RNA 解析の結果、西表島集団は、他の集団に比べてゲノム内に蓄積された有害変異の量が多く、本質的に脆弱であることを示した。

本研究で対象とした 3 種については、タチスミレの方がツボスミレよりも有害な変異が蓄積していたが (図 2.11)、タチスミレの有害変異の蓄積には個体差があることが示唆された (図 2.12)。一方、クロホシクサはイトイヌノヒゲより有害変異の蓄積は少なかった (図 4.8、図 4.9)。なお、ハナムグラは検討できなかった。タチスミレが有害な変異が蓄積していたことは、Hamabata et al. (2019)が指摘するように、有害遺伝子を持った個体を排除する選択圧が働いていない、すなわち、遺伝的に固定されていることを示していると考えられる。有害遺伝子の観点からは、遺伝的に脆弱であることが示された。一方、タチスミレとツボスミレの間で重複遺伝子の割合に有意な差は見られなかった (図 2.13)。このことは、タチスミレが普通種と同様に、環境変化に対してある程度の頑健性を保持している可能性を示唆する。現在、タチスミレは有害な変異が蓄積しているが、任意交配を促進することで、遺伝的に改善できる可能性があると考えられる。

有害な変異を持つ個体は、生存能力が低下するため、自然選択によって排除されるが、クロホシクサは有害な変異が蓄積している傾向は観察されず、遺伝的健全性は高く保持されている。遺伝的健全性が高いクロホシクサ集団は、病気や環境ストレスに対する抵抗力が強く、健全な遺伝子を持つ個体同士の交配は、次世代にもより健康で適応力のある遺伝子を引き継ぐことができる可能性が高い。クロホシクサの重複遺伝子の割合の平均値は、イトイヌノヒゲよりも大きかった。クロホシクサは、イトイヌノヒゲよりも環境変化に対して高い頑健性を保持していた。クロホシクサは、全体として任意交配に十分な数の個体が各集団で存

在すると推定できたので、仮定として開発のため生息地が消失のおそれが生じた場合、両者は環境変化に対して頑健性を保持しているため、消失する前にできるだけ多くの個体を採取し、人工的な生育環境に移して栽培することで、健全に生育させる可能性があると考えられた。

5.3 保全管理単位の設定

保護増殖における遺伝的攪乱を防ぐためには、あらかじめ遺伝構造を把握し、保全管理単位を設定しておく必要がある (Nakahama and Isagi 2018)。最も一般的に議論される 2 つの保全単位は、進化的に重要な単位 (Evolutionary significant unit; ESU) と管理単位 (Management unit; MU) である。ESU は一般に、遺伝的および生態学的特徴が高いため、個別の管理または保全の優先順位を保証する集団または集団のグループとして定義できる。ESU の特定と保存は、さまざまな ESU の維持が環境変化に直面して進化の可能性を最大化するため、保全の重要な焦点となっている。通常、MU は ESU よりも小さく、ESU 内には多数の MU が存在する可能性がある (Funk et al. 2012)。複数の MU を維持することは、種の長期的な持続性を確保するために重要である (Hanski and Gilpin 1997)。David et al. (2018) は、系統解析は ESU の独自性を考慮することを可能にし、進化的歴史を持つかに基づいて、保全のための地域を優先順位付けする際に有用であることを提唱している。中尾 (2016) は、メダカ属 (*Oryzias*) 野生集団の保全に取り組む際、ESU の区分は広大であり、ESU 内でのより遺伝的な地域性を考慮した詳細な区分が必要と考え、MU の設定を検討した。その結果、関西地方におけるメダカ野生集団を 3 つの MU に分けた。その一方で、関東地方においては MU の設定は控えた。これは、集団の地点数を増加させていくことで、関東地方の MU が設定できると判断したとされている (中尾 2016)。

タチスミレは、最尤系統解析では、茨城県の菅生沼 (A 地点と C 地点)、小貝川の河川敷 (B 地点と D 地点) および渡良瀬遊水地 (W 地点) の各集団で遺伝的に分化していた。また、集団遺伝構造解析では、タチスミレ (W 集団) と菅生沼のタチスミレ (A および C 集団) は 1 つのクレードに属した。保全のために十分な資金が得られない場合は、渡良瀬遊水地のタチスミレ (W 集団) と菅生沼のタチスミレ (A および C 集団) を一つの ESU として扱うことが考えられる (図 5.1(a))。各地域集団のもつ遺伝的固有性を保全して、タチスミレの長期的な持続性を確保するためには、各集団間の人為的移植による遺伝的攪乱は避けるように MU として集団ごとに管理すべきである。

ハナムグラは、最尤系統解析および集団遺伝構造解析で A、B、C、D、W 集団間に明瞭な遺伝的分化は見られなかったため、これらは一つの ESU として取り扱っても問題ないと考えられる (図 5.1(b))。タチスミレとハナムグラの ESU の広さの違いを以下のように推察した。タチスミレは種子繁殖だけであるが、ハナムグラは種子繁殖と栄養繁殖をする。タチスミレの種子に比べ、ハナムグラの栄養繁殖体である地下茎は大きいので、小貝川の氾濫時の出水に泥水とともに移動しやすい。それゆえ、小貝川の出水時に菅生沼のハナムグラのち

ぎれた地下茎が、小貝川河川敷に流れ着くことで、菅生沼（A 地点と C 地点）と小貝川の河川敷（B 地点と D 地点）のハナムグラに遺伝的交流が生じたと考えられる。

クロホシクサは、最尤系統解析と集団遺伝構造解析において、住宅地域（学園の森 1 丁目と 2 丁目が含まれる）のグループと高エネルギー加速器研究機構（KEK）のグループに遺伝的に明瞭に識別され、それぞれを ESU として扱うこととした（図 5.1(c)）。この住宅地域の一部が開発予定地であり、近い将来クロホシクサの生息地は消失する見込みである。住宅地域のグループは 1 つの ESU として扱われるので、異なる生息地へのクロホシクサの移植を検討することが必要である。

5.4 希少植物の生息域内保全戦略

タチスミレおよびハナムグラは、各集団において任意交配に十分な数の個体が存在すると推定された。生息域内保全を達成するための手段として、生息地の地上部の落葉や落葉枝を除去することで春の地表面の光環境を改善することや、枯れ草の野焼きをすることによって生育に適した温度環境を整えるなどの対策を講じ、任意交配を促進させることが考えられる。

クロホシクサは、学園の森 1 丁目の生息地 2 丁目の生息地が、1 つの遺伝グループであり、1 つの保全管理単位として設定した。また、KEK の生息地を 1 つの保全管理単位として設定した。それぞれの生息地の環境の維持および改善が妥当と考えられる。しかし、学園の森 2 丁目の生息地は開発により消失されるため、移植が必要と学識専門家により判断された。2025 年に生息地の表面の土壌が掘削・搬出され、保全管理単位内にある湿地へ土壌シードバンクとして散布された。この作業は茨城県、つくば市、筑波実験植物園、筑波大学および NPO 法人が連携して実施した。

5.5 希少植物の生息域外保全戦略

生息域外保全は、生息地での生存が困難な希少植物を生息地の外で人工的に繁殖させることによって回復を図り、希少植物の遺伝的多様性を確保するための手段として機能する。これは、生息地での保全を優先する「生息域内保全」を補完する措置であり、種や集団の保全に対する補償措置と位置づけられる（生物多様性条約 第 9 条）。「生息域外」は、多くの自然の生態学的プロセスから排除され、人間によってある程度管理されている状態として定義され、個体は自然の生息地や条件とは異なる選択圧の下で人工的に維持される（IUCN Species Survival Commission 2014）。生息域外保全は、個体が最終的に野生に戻ることを前提として行われる。生息域外保全において、個体を飼育環境に適応させることの難しさや、小集団での交配による近親交配の抑制、遺伝的多様性の喪失といった悪影響をできる限り排除することが重要である。Horiuchi et al. (2021) は、コシガヤホシクサ (*Eriocaulon heleocharioides*) の生息域外保全において繁殖を成功させるためには、異花受粉を促進する高い植物密度や花食虫からの逃避という複数の視点をもつことが重要であると指摘している。

5.5.1 消失する生息場の近隣に生息域外保全地を確保する場合

開発計画から開発が着手されるまでの間、生息地の環境条件（土壌、水分、日射など）を頻繁に調査することができる。希少植物を栽培する前に、調査結果を参考にして、灌水の頻度や用土、生育場所の検討を行える。石灰岩土壌に特異的にみられるチチブイワザクラは絶滅危惧植物であり、秩父地方の武甲山にのみ分布する固有変種である。鉱業的採掘による表層の攪乱から隔離して保護する取り組みとして、秩父太平洋セメント株式会社では、50 年ほど前に多くの自生個体を生育域外で鉢植えにし、一部を坑道の岩壁に試験的に植えるなどして保護を行ってきた（倉田ら 2023）。瀬戸口ら（2024）は、小笠原諸島母島固有種のタイヨウフウトウカズラ (*Piper postelsianum*) を野生絶滅から回避させるため、母島島内に全ての遺伝子型を網羅した生息域外保全集団を形成し、開花可能なサイズにまで生育させて開花結実をさせた。母島の南北を都道に面した国有林野の一角に生息域外保全地を設定した。タイヨウフウトウカズラの本来の自生地近くに設置されたため、苗の馴化に優れていた（瀬戸口ら 2024）。栽培によって希少植物の個体を維持・増殖できれば、消失する生息場と同じ管理単位にある生息地へ復帰させることで遺伝的攪乱は生じないこととなる。

地元のコミュニティや関係者との関わりが深まりやすく、地域の人々が保全活動に参加しやすい。しかし、同じ種の希少植物だからという理由で他の地域から持ち込まれないように、遺伝的多様性について啓発する必要がある。

開発予定地であるつくば市学園の 2 丁目に生息するクロホシクサを約 9 km 離れた株式会社奥村組の実験場で小型のプラスチック容器に移植して、筑波実験植物園の専門家の指導を仰ぎながら増殖を図っている。

本研究が対象としたタチスミレおよびハナムグラについては、土壌シードバンクを活用した生息域外保全が有効であると考えられる。米村・井原（2022）は、土壌中に残存したタコノアシ (*Penthorum chinense*) の種子から、再びタコノアシを生育させられることを確認している。また、栃木県にある最終処分場では、環境学習施設としての役割を考慮し、生物多様性保全のために既存湿地環境の整備やビオトープ型の雨水調整池の設置を行った事例において（高山 2022）、過去に良好な湿地環境が存在していたと考えられる敷地内の谷部の表面土壌を掘削し、造成した湿地ビオトープに土壌シードバンクとして活用した。定着した在来植物の調査の結果、湿性の多年生植物や一年生植物の割合が相対的に高いことが確認された。同様に、タチスミレやハナムグラの生息が見られなくなった場合には、過去にタチスミレやハナムグラの生息が存在していたと考えられる生息地の表面土壌を掘削し、湿地ビオトープを造成後に土壌シードバンクとして活用する。

5.5.2 生息域外保全地を全く外部に作る場合

希少植物の栽培を大学の理学部、農学部の附属植物園や国公立園、またはこれに準ずる施設に依頼することになる。環境省の希少植物の生息域外保全モデル事業として、コシガヤホシクサ (*Eriocaulon heleocharioides*) を国立科学博物館 筑波実験植物園が、キバナスゲユリ (*Lilium callosum* var. *flaviflorum*) を財団法人 海洋博覧会記念公園管理財団総合研究センター

が、ムカゴサイシン (*Nervilia nipponica*) を高知県立牧野植物園が技術開発を行っている(環境省自然環境局野生生物課 2013)。また、東本願寺の飛地境内地である渉成園にある池の浚渫工事により埋土種子が発芽した、絶滅寸前種ミズアオイ (*Monochoria korsakowii*) を京都府立植物園や京都市都市緑化協会で生息域外保全を実施している(後藤ら 2023)。

植物園が採集して維持できる樹木種の数と、採集の大きさとの間には兼ね合いがある。最小限の費用で最大限の遺伝的多様性を維持できる理想的な採集量がある(Cibrian-Jaramillo et al. 2013; Oldfield et al. 2015)。生息域外保全によって遺伝的多様性を維持した植物の栽培ができると考えられるが、遠方から生息地の環境条件の調査を行うことや増殖できた希少植物を遺伝的攪乱が生じないようにするため、消失する生息場と同じ管理単位にある生息地への運搬することなど、多くの労力と資金を要する保全策といえる。

5.6 開発にともない消失のおそれのある希少植物の保全策の提案

本研究において MIG-seq 解析および RNA-seq 解析の実施による、希少植物の集団(個体群)の維持、保管理単位(ESU)の設定、生息域内保全または生息域外保全に関する提案を表 5.1 に示す。

タチスミレおよびハナムグラは、実生繁殖を促すことで集団を維持できる。ハナムグラの生息環境を考慮すると、栄養繁殖は、遺伝的多様性が低下しやすい傾向があるが、小規模攪乱の多い環境において短時間で個体数を増やす利点がある。集団が維持されているクロホシクサについては、生息地の断片化や孤立化によって小集団化が進まないように湿地を保全すべきである。

ハナムグラは、菅生沼、小貝川河川敷、渡良瀬遊水地のハナムグラは一つの ESU として取り扱っても問題ない。タチスミレは、保全のために十分な資金が得られない場合において、渡良瀬遊水地と菅生沼のタチスミレをひとつの ESU として扱うことが考えられる。クロホシクサは、住宅地域(学園の森 1 丁目と 2 丁目が含まれる)と高エネルギー加速器研究機構(KEK)のそれぞれを ESU として扱う。

開発にともないタチスミレおよびハナムグラの生息地が消失すると仮定した場合、生息域外保全の一環として、生息地の表層土を掘削して土壌シードバンクとして移動することを提案する。クロホシクサは RNA 解析の結果、遺伝的健全性は高く保持されており、環境変化に対して高い頑健性を保持していたので、人工的な生育環境に移して栽培する生息域外保全により生育させることができる可能性が示された。

社会資本整備として行われる土地利用や改変に際して、動植物の遺伝的多様性保全の影響低減を図ることが建設業の社会的責任の一部となっている。遺伝情報の技術的知見を蓄積することによって、工事区域内で動植物の持続的な生息を確保するための保全策を工事の計画段階から提案できると考えられる。

5.7 対象種に関する今後の課題

5.7.1 サンプルング地点の増加

希少植物は生息場所や生存数が限られているため、サンプルリング数は少ない方が望ましい。一方で、サンプルリング地点は多い方が良い。例えば、ハナムグラのサンプルリング地点を増やすことで、保全管理の範囲を広げることができるかもしれない。また、クロホシクサについては、つくば市学園の森 1 丁目、2 丁目および KEK で見られる遺伝的分化が大きかったが、サンプルリング地点を増やすことで、両者の遺伝的分化の程度をより正確に把握できる可能性がある。Ueno et al. (2005) および Tamaki et al. (2008) の研究によると、東海三県の丘陵地に生息するシデコブシの遺伝的多様性が調査され、岐阜県南東部から愛知県中部、愛知県の渥美半島、三重県北部の集団において遺伝的に分化していることが明らかになった。さらに Tamaki et al. (2016) は、三重県北部に残る 6 つの集団と 7 つの孤立したシデコブシを対象に遺伝的多様性を調査した。その結果、6 つの集団が遺伝的に分化していることを確認し、現状を維持した場合、6 つの集団間の遺伝的分化は 30~40 世代以内に倍増すると予測することができた。また、小規模および中規模の集団における個体数の増加は、集団内および地域集団の遺伝的変異を保全する上で効果的であることを示した。

5.7.2 湿地植物以外の希少植物への応用

日本における希少樹種は、AI による電力需要の増加に伴う送変電線工事やリニア新幹線などのトンネル工事による森林伐採などの人為的要因により衰退することが危惧される。横川ら(2011)の研究では、山梨県北岳に分布するミヤマハナシノブの 5 集団（大樺沢、草すべり、大樺沢下流、旧北岳山荘、大仙丈沢）のうち、大仙丈沢を除く 4 集団の間では遺伝的多様性や対立遺伝子の組成に顕著な違いは見られなかった。このことは、大仙丈沢以外のミヤマハナシノブの集団が、ひとつの大きな管理単位として機能している可能性を示唆している。ただし、近縁種のハナシノブで開発されたマイクロサテライトマーカーを転用したため、より高解像度の解析を行うならば、ミヤマハナシノブのマイクロサテライトマーカーを開発する必要がある。ミヤマハナシノブに特異的なマイクロサテライトマーカーの作製には、多大な労力と時間がかかる。しかし、本研究で湿地植物を対象に用いた MIG-seq 法を活用することで、ミヤマハナシノブの遺伝的多様性と遺伝構造の評価をすることができると考えられる。

5.8 希少種を効率的に保全するための遺伝的アプローチ

5.8.1 効率的な解析手法について

MIG-seq 法は、分析対象種について事前にゲノム情報を必要とせず、植物・動物・菌類等、生物種を問わずに同一手法の適用が可能である。この手法では、分析対象種ごとのマーカー開発作業が不要である。さらに、迅速（3 日間）、簡便（2 回の PCR と NGS ラン）、安価（サンプルあたりの消耗品費は千円程度以下）で、膨大な量のゲノムワイド塩基配列情報を取得できる。従来の RAD-seq 法などでは、試料となるゲノム DNA を制限酵素処理する必要がある。

ったが、MIG-seq 法では PCR から開始できるため、より効率的である（陶山 2019）。

RNA-seq 法では、機能的遺伝子座を含むゲノムワイドな遺伝的変異の解析を通じて、自然選択を受けている非同義置換座位を取得できる。これにより、絶滅危惧種が普通種と比較して適応度の低下を示すようなゲノムの特徴を有するかどうかを直接調べることができる。RNA-seq は、対象種に参照ゲノム配列が存在するかどうかにかかわらず、任意の種で実施できる利点がある。

5.8.2 効率的な評価について

現存する希少植物の集団が保持している遺伝情報について、MIG-seq 解析により遺伝的多様性、近親交配の有無、各集団の遺伝構造を調査し、RNA-seq 解析を通じて遺伝的健全性や環境変化に対する頑健性を評価できる。これらの遺伝情報を基に、現存する希少植物の遺伝的攪乱が生じない保全管理単位を設定できる。生息域内保全が望ましいものの、域内保全が困難な場合には生息域外保全を検討する必要がある。また、現存する希少植物の保全の難易度を推測することもできる（図 5.2）。

塩基多様度(π)は、ゲノム全体の塩基置換頻度を反映する指標であるため、異なる種間での遺伝的多様性の比較に広く用いられている（Tsumura 2022）。そのため種間比較には適した遺伝的指標となる。本研究では 3 種の希少種とその近縁普通種の比較を行った。希少種と普通種で直接、遺伝的多様性の比較が可能になり、希少種の遺伝的状態の把握が可能である。希少種タチスミレでは普通種ツボスミレよりも π が有意に低く危機的であることが示された。一方、希少種クロホシクサと普通種イトイヌノヒゲの比較では大きな違いはなく、希少種クロホシクサもある程度の遺伝的多様性を保持していることが明らかとなった。このように個体数が少なくなった希少種の遺伝的多様性を定量的に評価するうえで、 π が有効に機能しうることを裏付けており、その後の保全方法を決定する重要な指標として使用できる。

ヘテロ接合度の期待値(H_e)は、アليل頻度の均等性に敏感なため、集団内遺伝構造の把握に適しており、とくに他殖性植物の解析において重要な役割を果たす（Wei and Jiang 2020）。ただし、本手法で使用した SNP データでは、稀な対立遺伝子や固有対立遺伝子などが少ないために感度の良い遺伝パラメータではない。しかし集団内の個体の遺伝的多様性を示すには有用な評価法と言える。 H_e と近交係数 F_{IS} は、集団の状態や交配様式を表現する良い遺伝統計量である。希少種タチスミレと普通種ツボスミレの比較では、 H_e はほぼ同程度で、 F_{IS} は普通種ツボスミレがやや高く、弱い近親交配が生じている結果であった。希少種クロホシクサと普通種イトイヌノヒゲの比較では、 H_e は普通種イトイヌノヒゲが高く、 F_{IS} はどちらも 0 に近く、任意交配を行っている結果であった。このように H_e と F_{IS} は、遺伝的多様性だけでなく、集団の状態を理解する有用な指標となる。

RNA-seq では、有害な変異の蓄積量や重複遺伝子の割合などの遺伝子発現情報を取得できるため、希少種がどの程度脆弱であるかの把握が可能である。希少種タチスミレでは普通種ツボスミレと比較して、非同義置換が多く、普通種に比較して脆弱であることが示された。一方、希少種クロホシクサと普通種イトイヌノヒゲの比較では大きな違いはなかった。RNA-

seq を用いると、このように希少種であっても、脆弱ではない状態で集団が維持されていることが把握できるので、その後の保全策の立案が容易になる。

遺伝的分化指数 F_{ST} などの遺伝的構造を示す解析では、保全する単位を決める有効な遺伝パラメータとなる。Weir and Cockerham (1984)によると、 $F_{ST} > 0.15$ は集団間遺伝的分化が大きいとみなし、別の保全単位として区別することができる。また遺伝的な違いを図示化するSTRUCTURE 解析 (Pritchard et al. 2000)、ADMIXTURE 解析 (Alexander et al. 2009)、主座標分析などを併用すると、集団間の違いが明確になる。それらを用いて進化的重要単位 (ESU) と管理単位 (MU) を決定することができる。

本研究ではこれら遺伝的解析手法を用いて、効率的に希少種が保全できるような方策を考案した。これらの成果は、将来的な希少種保全において実践的な貢献をもたらすことが期待される。

しかしながら、本研究は遺伝的データの解析に限定されている。Fasanella et al. (2024)がコモンガーデン実験により環境適応に関与する遺伝子機能の解明を試みた事例に示されるように、外部環境に対する表現型応答や適応能力を統合的に評価することも重要である。したがって今後は、遺伝的解析に加え、環境応答特性を考慮した実験的アプローチを組み合わせることで、希少種の適応潜在性を考慮した保全方針の構築に取り組む必要があると考えられる。



図 5.1 本研究で対象とした 3 種の湿生植物の保安全管理単位

- (a) タチスミレの保安全管理単位を青色で囲った。保全のために十分な資金が得られない場合は、渡良瀬遊水地のタチスミレ (W 集団) と菅生沼のタチスミレ (A および C 集団) を一つの ESU として扱うことが考えられる。
- (b) ハナムグラの保安全管理単位を青色で囲った。最尤系統解析および集団遺伝構造解析で A、B、C、D、W 集団間に明瞭な遺伝的分化は見られなかったため、これらは一つの ESU として取り扱った。
- (c) クロシクサの保安全管理単位を丸で囲った。最尤系統解析と集団遺伝構造解析において、住宅地域 (学園の森 1 丁目と 2 丁目が含まれる) のグループと高エネルギー加速器研究機構 (KEK) のグループに遺伝的に明瞭に識別され、それぞれを ESU として扱うこととした。

図中の地図は、地理院発行 2.5 万分 1 地形図(地理院地図 電子国土 WEB)より転載
<https://maps.gsi.go.jp>

表 5.1 MIG-seq 解析および RNA-seq 解析からの保全策の提案

対象植物	タチスミレ	ハナムグラ	クロホシクサ
分類	多年生草本	多年生草本	一年生草本
繁殖様式	実生繁殖	実生繁殖と栄養繁殖	実生繁殖
サンプリング地点	菅生沼、小貝川河川敷、渡良瀬遊水地	菅生沼、小貝川河川敷、渡良瀬遊水地	つくば市学園の森、KEK（つくば北部）
集団（個体群）の維持	・実生繁殖を促すことで、遺伝的多様性を高くすることができる	・実生繁殖を促すことで、遺伝的多様性を高くすることができる ・栄養繁殖は、遺伝的多様性が低下しやすい傾向がある一方で、小規模攪乱の多い環境において短時間で個体数を増やす利点もあると考えられる	・花粉流動と種子散布による遺伝子流動を維持するため、生息地の断片化や孤立化によって小集団化が進まないように湿地を保全する
ESU：個別の管理または保全の優先順位を保証する集団のグループとして定義	・保全のために十分な資金が得られない場合は、渡良瀬遊水地のタチスミと菅生沼のタチスミレを一つの ESU として扱うことが考えられる	・菅生沼、小貝川河川敷、渡良瀬遊水地のハナムグラは一つの ESU として取り扱っても問題ない	・住宅地域（学園の森 1 丁目と 2 丁目が含まれる）と高エネルギー加速器研究機構 (KEK) のそれぞれを ESU として扱う
生息域外保全	・表層土を生息地と同じ保全管理単位に土壌シードバンクとして移動する、または、過去に存在していたと考えられる生息地の表面土壌を掘削し、湿地ビオトープを造成後に土壌シードバンクとして活用する	同左	・消失する前にできるだけ多くの個体を採取し、人工的な生育環境に移して栽培することで、健全に生育させる可能性がある
RNA 解析結果	・環境変化に対してある程度の頑健性を保持している可能性がある	（近縁普通種のヤエムグラが倍数体のため、実施しなかった）	・遺伝的健全性は高く保持されている ・環境変化に対して高い頑健性を保持している→人工的な生育環境に移して栽培する生息域外保全により健全に生育させることができる可能性がある

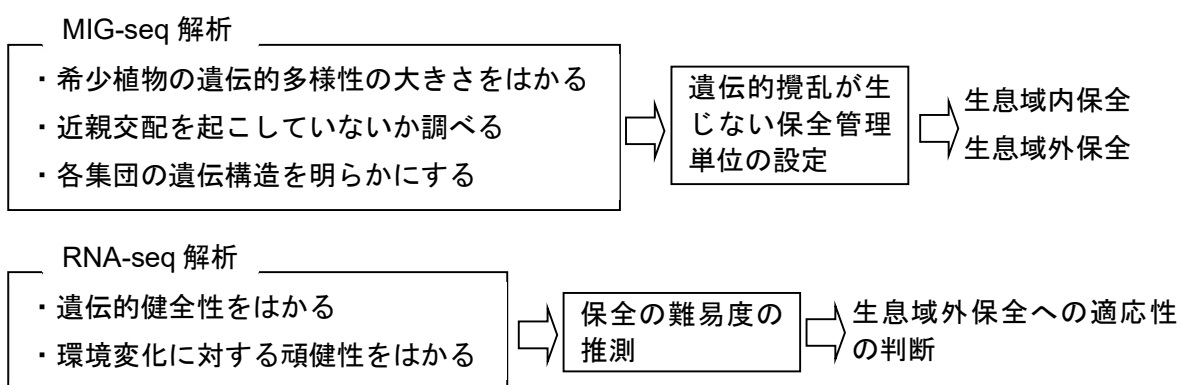


図 5.2 現存する希少植物の集団が保持している遺伝情報からの保全するためのアプローチ
遺伝情報から、保全管理単位の設定、生息域外保全の妥当性の検討、遺伝的にみた保全の難易度を評価する。

引用文献

- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*. 19 (9) pp.1655-1664
- Ammarellou A, Żabicka J, Słomka A, Bohdanowicz J, Marcussen T, Kuta E (2021) Seasonal and Simultaneous Cleistogamy in Rostrate Violets (*Viola*, subsect. *Rostratae*, Violaceae). *Plants* 10 (10) pp.1-13
- 穴田勝人 (2018) ストラクチャー解析について. 畜産技術 8 pp.46-47
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.
- 伴拓哉 (2022) エコミーティング〜建設業による生物多様性保全活動〜. なごやの生物多様性 9 pp.117-122
- 別所-上原奏子 (2023) 地下茎による栄養繁殖を支えるメカニズム. 植物科学の最前線 14 pp.50-64
- Bolger MA, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15) pp.2114-2120
- Broadhurst LM, Lowe A, Coates JD, Cunningham AS, McDonald M, Vesik AP, Yates C (2008) Seed supply for broadscale restoration maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications* 1 (4) pp.587-597
- Catchen MJ, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait HJ (2011) *Stacks* : Building and Genotyping Loci *De Novo* From Short-Read Sequences. *G3 GenesGenomesGenetics* 1 (3) pp.171-182
- Catchen MJ, Hohenlohe AP, Bassham S, Amores A, Cresko AW (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology* 22 (11) pp.3124-3140
- Choi Y, Sims E, Murphy S, Miller RJ, Chan PA (2012) Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 7 (10) e46688
- 練春蘭・宝月岱造 ((2004) 効率的マイクロサテライト (SSR) マーカー作製のためのプロトコル. 日本森林学会誌 86 (2) pp.191-198
- Chung MY, Merilä J, Li J, Mao K, López-PJ, Tsumura Y, Chung GM (2023) Neutral and adaptive genetic diversity in plants: An overview. *Frontiers in Ecology and Evolution* 11 pp.01-14
- Cibrian-Jaramillo A, Hird A, Oleas N, Ma H, Meerow AW, Francisco-Ortega J, Griffith MP (2013) What is the conservation value of a plant in a botanic garden? Using indicators to improve management of ex situ collections. *The Botanical Review* 79 pp.559-577
- Culley M, Klooster RM (2007) The Cleistogamous Breeding System: A Review of Its Frequency, Evolution, and Ecology in Angiosperms. *The Botanical Review* 73 (1) pp.1-30
- David J, Margaret B, Moritz C (2018) Genetic Diversity and Conservation Units: Dealing with the Species-Population Continuum in the Age of Genomics. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6 pp.1-

- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19 pp.11-15
- Earl DA, Vonholdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2) pp. 359-361
- Ellstrand N, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 24 pp.217-242
- Fasanella M, Souto CP, Kitzberger T, Premoli AC (2024) Common garden experiments and SNP genotyping at the extremes of a steep precipitation gradient suggest local adaptation in a Patagonian conifer. *Botanical Journal of the Linnean Society* 206 (1) pp.14-28
- Franke OH (1974) Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics* 78 (1) pp.53-65
- Frankham R, Briscoe AD, Ballou DJ (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, New York.
- 深津勝湿 (2019) 渡良瀬遊水地～これからの 100 年に向けて～. *湿地研究* 9 pp. 49-52
- 藤倉良 (2024) 生物多様性条約の成立過程をとおしてみた生物多様性保全の意義. *農林水産政策研究所 レビュー*. 14 pp.64-65
- 福井俊介 (2023) 生物多様性国家戦略 2023-2030 の概要～ネイチャーポジティブの実現に向けて～. 一般社団法人 日本環境アセスメント協会 JEAS NEWS 178 pp.2-8
- 福永健司 (2007) 四省庁による 緑化植物取扱方針の検討 について. *日本緑化工学会誌* 33 (3) pp.459-462
- Funk WC, McKay KJ, Hohenlohe AP, Allendorf WF (2012) Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology and Evolution* 27 (9) pp.489-496
- Gärdenfors U, Hilton-TC, Mace MG, Rodríguez JP (2001) The Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels. *Conservation Biology* 15 (5) pp. 1206-1212
- 後藤香奈・和田貴子・太田陽介・阪上富男・加藤友規 (2023) 名勝渉成園における京都府絶滅寸前種「ミズアオイ」確認の経緯と生息域外保全. *ランドスケープ技術報告集* 2 pp. 39-41
- Guan B, Gao J, Chen W, Gong X, Ge G (2021) The Effects of Climate Change on Landscape Connectivity and Genetic Clusters in a Small Subtropical and Warm-Temperate Tree. *Frontiers in Plant* 12 pp.1-13
- 群馬県環境森林部自然環境課 (2022) 群馬県の絶滅のおそれのある野生生物 植物編 (2022 年改訂版). 群馬県環境森林部自然環境課
- Hamabata T, Kinoshita G, Kurita K, Cao P-L, Ito M, Murata J, Komaki Y, Isagi Y, Makino T (2019) Endangered Island Endemic Plants Have Vulnerable Genomes. *Communications Biology* 2 (1) pp.1-10

- Hanski IA, Gilpin M (1997) Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution. Academic Press, San Diego.
- Harada K, Dwiyantri FG, Liu HZ, Takeichi Y, Nakatani N, Kamiya K (2018) Genetic variation and structure of Ubame oak, *Quercus phillyraeoides*, in Japan revealed by chloroplast DNA and nuclear micro satellite markers. *Genes and Genetic Systems* 93 pp.37-50
- 原口和夫 (2000) 菅生沼の珪藻類. *Diatom* 16 pp.63-74
- 樋口有未・松本麻子・森口喜成・三嶋賢太郎・田中功二・矢田豊・高田克彦・渡辺敦史・平尾知士・津村義彦 (2012) マイクロサテライトマーカーを使用したヒバ天然林および育種集団における遺伝的多様性と集団間の遺伝構造の評価. *日本森林学会誌* 94 (5) pp.247-251
- Honjo M, Kitamoto N, Ueno S, Tsumura Y, Washitani I, Ohsawa R (2009) Management units of the endangered herb *Primula sieboldii* based on microsatellite variation among and within populations throughout Japan. *Conservation Genetics* 10 pp.257-267
- Honjo M, Ueno S, Tsumura Y, Washitani I, Ohsawa R (2004) Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. *Biological Conservation* 120 pp. 211-220
- Horiuchi Y, Kamijo T, Tanaka N (2021) Floral and pollination characteristics of *Eriocaulon heleocharioides*, an extinct species in the wild, for evidence-based conservation management. *Plant biology* 23 (4) pp.546-555
- Hu L-J, Uchiyama K, Saito Y, Ide Y (2010) Contrasting patterns of nuclear microsatellite genetic structure of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* between northern and southern populations in Japan. *Journal of Biogeography* 37 pp.1131-1143
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N, Vellend M (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* 11 (6) pp.609-623
- Huson HD and Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23 (2) pp.254-267
- 五十嵐洋治 (2022) SNP を利用した水圏生物の遺伝的集団構造の解析. *化学と生物* 60 (8) pp.431-437
- IUCN Species Survival Commission (2014) Guidelines on the Use of Ex situ Management for Species Conservation. IUCN Species Survival Commission. Gland, Switzerland
- 犬飼慎也・木村徳志・石塚航・後藤晋 (2013) 北海道富良野市に隔離分布するハクサンシャクナゲ集団の遺伝的多様性と繁殖様式. *森林遺伝育種* 2 pp.122-127
- 今西純一 (2018) 遺伝的地域性に配慮した種苗供給の必要性和トレーサビリティの確保. *日本緑化工学会誌* 43 (3) pp.449-450
- 一般社団法人日本建設業連合会 環境委員会 生物多様性部会 (2015) 生物多様性リーフレット. 一般社団法人日本建設業連合会

- 一般社団法人 生物多様性保全協会 (2016) 地域性在来植物選定ガイドライン. 一般社団法人 生物多様性保全協会
- 井鷲裕司 (2001) 第 3 章 マイクロサテライトマーカーで探る樹木の更新過程. 種生物学会 (編). 森の分子生態学. 文一総合出版 pp.59-84
- 井鷲裕司 (2013a) 全個体遺伝子型解析による絶滅危惧植物の保全. 地球環境 18 (2) pp. 153-158
- 井鷲裕司 (2013b) 第 4 章 絶滅危惧種の分子保全遺伝学. 種生物学会 (編). 森の分子生態学. 文一総合出版 pp.137-158
- Isagi Y, Kaneko S (2014) Ubiquitous Genotyping for Conservation of Endangered Plant Species. In: Integrative Observations and Assessments, Nakano S, Yahara T, Nakashizuka T (eds.), Springer Japan.
- Isagi Y, Makino T, Hamabata T, Cao P-L, Narita S, Komaki Y, Kurita K, Naiki A, Kameyama Y, Kondo T, Shibabayashi M (2020) Significant loss of genetic diversity and accumulation of deleterious genetic variation in a critically endangered azalea species, *Rhododendron boninense*, growing on the Bonin Islands. Plant Species Biology 35 (3) pp.166-174
- 石毛太一郎 (2016) 次世代シーケンサー、畜産技術 735-Aug pp.41-46
- Ishihama F, Ueno S, Tsumura Y, Washitani I (2005) Gene flow and inbreeding depression inferred from fine-scale genetic structure in an endangered heterostylous perennial, *Primula sieboldii*. Molecular Ecology 14 pp.983-990
- Ishii J, Lu S, Funakoshi S, Shimizu Y, Omasa K, Washitani I (2009) Mapping potential habitats of threatened plant species in a moist tall grassland using hyperspectral imagery. Biodiversity and Conservation 18 pp. 2521-2535
- 石井雅章・漆崎昇・大竹利幸 (2012) 建設業の生物多様性対応 自己評価プログラム作成と成果. 環境システム研究論文発表会講演集 pp.133-138
- 磯辺山河・逢沢峰昭・久本洋子・軽込勉・齋藤央嗣・中山ちさ・遠藤良太・後藤晋・大久保達弘 (2016) 地域絶滅の危惧される関東地方のヒメコマツの遺伝的多様性と交配様式. 日本森林学会誌 98 (2) pp. 65-73
- 磯田圭哉・白石進・木佐貫博光 (2000) 葉緑体 DNA スペーサー領域の塩基配列分析および核 DNA の RAPD 分析による本邦産モミ属の系統分類学的位置の解明. 日本林学会誌 82 (4) pp.333-341
- Jeong KS, Shin JK, Maki M, Pak J-H (2016) Phylogeny of *Galium* L. (Rubiaceae) from Korea and Japan based on chloroplast DNA sequence. Bangladesh J. Plant Taxon 23(2) pp. 237-246
- 勝木俊雄 (2023) 日本の森林樹木の地理的遺伝構造 (42) ヤツガタケトウヒ (マツ科トウヒ属). 森林遺伝育種 12 (4) pp.169-173
- 神奈川県環境農政局緑政部自然環境保全課 (2022) 神奈川県レッドデータブック 2022 植物編. 神奈川県

- 金指あや子・吉丸博志 (2013) 日本における希少樹種の現状と保全. 地球環境 18 (2) pp.145-152
- Kaneko S, Isagi Y, Nobushima F (2008) Genetic differentiation among fragmented populations in an oceanic island: the case of *Metrosideros boninensis*, and endangered endemic tree species in the Bonin Islands. *Plant Species Biology* 23 (2) pp.119-128
- 環境省自然環境局 (2023) 生物多様性国家戦略 2023-2030. 環境省自然環境局
- 環境省自然環境局 (2024) 生物多様性国家戦略 2023-2030 概要版. (一財) 自然環境研究センター
- 環境省自然環境局野生生物課 (2013) 環境省 生息域外保全モデル事業成果集. 環境省自然環境局野生生物課
- Keith A, Olaf RPB-E, Georgina MM, Robert KW (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15 (7) pp.390-395
- Kikuchi S, Suzuki W, Sashimura N (2011) Gene flow in an endangered willow *Salix hukaoana* (Salicaceae) in natural and fragmented riparian landscapes. *Conservation Genetics* 12 pp.79-89
- 木村 恵・中村千賀・林部直樹・小山泰弘・津村義彦 (2013) 戸隠神社奥社社叢林に生育するスギの遺伝的多様性と遺伝的特性. 日本森林学会誌 95 (3) pp.173-181
- Kitamoto N, Honjo M, Ueno S, Takenaka A, Tsumura Y, Washitani I, Ohsawa R (2005) Spatial genetic structure among and within populations of *Primula sieboldii* growing separate streams. *Molecular Ecology* 14 pp.149-157
- Kokubugata G, Kakishima S, Abe, A, Nakamura K, Chung K-F, Yokota M (2023) Phylogenetic Relationships among Populations of *Portulaca okinawensis* (Portulacaceae) in the Ryukyu Archipelago of Japan Using MIG-seq SNP Data. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B (Botany)* 49 (1) pp.33-40
- 国土交通省ウェブサイト (2008) 小貝川
https://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/jiten/nihon_kawa/0307_kokai/0307_kokai_02.html 国土交通省 (国土交通省ウェブサイト 2008)。
- 越川義功・高砂裕之 (2016) 生物多様性保全・環境創造技術. 鹿島技術研究所年報 64 pp.28-33
- 越川義功 (2017) 建設工事における生物多様性保全および環境創造技術. 建設機械施工 69 (6) pp.50-55
- Kozlov MA, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A (2019) RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35 (21) pp. 4453-4455
- 倉田薫子・山本将也・宮本佳奈・矢部重樹・藤巻弘樹・吉田涼香・瀬戸口浩彰 (2023) 絶滅危惧植物チヂビワザクラ保全研究 10 年史. 横浜国立大学教育学部紀要 6 pp. 11-25
- Makino T, Kawata M (2012) Habitat Variability Correlates with Duplicate Content of *Drosophila*

- Genomes. *Molecular biology and evolution* 29 (10) pp.3169-3179
- 牧野能士・河田雅圭 (2015) ゲノム内の遺伝子重複の進化がもたらす生物の適応力. *化学と生物* 53 (11) pp.731-733
- Masuda M, Fukagawa T, Nishimura T (2017) Genetic diversity and genetic structure of an endangered species, *Eriocaulon Nudicuspe*, growing in artificial disturbing habitats. *International Journal of GEOMATE* 13 pp.136-143
- Mattila AL, Duploux A, Kirjokangas M, Lehtonen R, Rastas P, Hanski I (2012) High genetic load in an old isolated butterfly population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 E2496-E2505
- 松本麻子 (2021) ヒノキの生態と遺伝的変異. *森林遺伝育種* 10 (4) pp.166-170
- 松本麻子・金谷整一・塚原雅美・西川浩己・Pakkad G・吉丸博志 (2013) 山梨県と新潟県におけるブナの天然林と天然林産実生苗の遺伝的評価. *森林遺伝育種* 2 (2) pp. 43-51
- 南山典子・竹岳秀陽・服部保 (2003) 絶滅危惧植物クロホシクサの発芽特性. *人と自然* 14 pp. 93-97
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary process that sustain it. *Systematic Biology* 51 pp.238-254
- 長野県版レッドリスト改訂委員会 植物専門部会 (2014) 長野県版レッドリスト 植物編 2014. 長野県 環境部 自然保護課
- 中濱直之・安藤温子・吉川夏彦・井鷲裕司 (2022) 国内希少野生動植物種における保全遺伝学研究の基盤としての遺伝情報. *保全生態学研究* 27 (1) pp.21-29
- Nakahama N, Asai T, Matsumoto S, Suetsugu K, Kurashima O, Matsuo A, Suyama Y (2021) Detection and dispersal risk of genetically disturbed individuals in endangered wetland plant species *Pecteilis radiata* (Orchidaceae) in Japan. *Biodiversity and Conservation* 30 (6) pp.1913-1927
- Nakahama N and Isagi Y (2018) Recent transitions in genetic diversity and structure in the endangered semi-natural grassland butterfly, *Melitaea protomedia*, in Japan. *Insect Conservation and Diversity* 11 (4) pp.330-340
- 中尾遼平 (2016) 全国のメダカ種群におけるヒメダカによる遺伝的攪乱に関する研究. 近畿大学大学院 農学研究科 環境管理学専攻 博士学位論文
- Neff PK, Baldwin HA (2005) Seed dispersal into wetlands: Techniques and results for a restored tidal freshwater marsh. *Wetlands* 25 (2) pp.392-404
- 日本学術会議統合生物学委員会 (2010) 生物多様性の保全と持続可能な利用 ～学術分野からの提言～. 日本学術会議 統合生物学委員会
- 日本植物分類学会 (2025a) タチスミレ. 環境省 (編) 第5次レッドデータブック：絶滅のおそれのある日本の野生生物. 環境省
- 日本植物分類学会 (2025b) ハナムグラ. 環境省 (編) 第5次レッドデータブック：絶滅のおそれのある日本の野生生物. 環境省

- 日本植物分類学会 (2025c) クロホシクサ. 環境省 (編) 第5次レッドデータブック: 絶滅のおそれのある日本の野生生物. 環境省
- 西田翔 (2017) 次世代トランスクリプトーム解析による植物の新しい無機栄養応答機構の探索. 日本土壌肥科学雑誌 88 (3) pp. 242-247
- 西廣淳 (2022b) 氾濫原環境の利用と生物多様性保全. *River Front* 94 pp. 18-21
- 野田健児・江口未馬・茨木 和典 (1964) 裏作雑草ヤエムグラの生態とその防除に関する一考察. 雑草研究 3 pp.84-88
- NPO 法人野生生物調査協会・NPO 法人 Envision 環境保全事務所 (2007) 日本のレッドデータ検索システム. <http://jpnrdp.com/>, NPO 法人野生生物調査協会・NPO 法人 Envision 環境保全事務所 (2025 年 8 月 25 日参照)
- 大羽成征 (2006) 遺伝子発現データに基づく予測と推定: 言いたいことと言えること. 統計数理 54 (2) pp.405-423
- 小幡和男・飯田勝明 (1996) 菅生沼の植生とその変遷. 国際景観生態学会日本支部会報 3 (1) pp.10-12
- 小幡智子・石井潤・角谷拓・鷺谷いづみ (2012) 渡良瀬遊水地における過去の掘削履歴が絶滅危惧植物の現在の分布に及ぼす影響と影響評価地図. 保全生態学研究 17 (2) pp. 221-233
- Ohbayashi K, Hodoki K, Kondo N I, Kunii H, Shimada M (2017) A massive tsunami promoted gene flow and increased genetic diversity in a near threatened plant species. *Scientific Reports* 7 pp.1-9
- 大段秀記・住吉正・小荒井晃・児嶋清 (2003) 暖地の小麦早播き栽培におけるヤエムグラの発生の特徴. 雑草研究 48 pp.68-69
- Oldfield S, Gardner M, Rae D, McNamara W (2015) Strengthening the conservation value of ex situ tree collections. *Oryx* 49 pp.416-424
- Onosato K, Shitara T, Matsumoto A, Matsuo A, Suyama Y, Tsumura Y (2021) Contact zone of two different chloroplast lineages and genetic guidelines for seed transfer in *Quercus serrata* and *Quercus crispula*. *Plant Species Biology* 36(1) pp.72-83
- 大橋広好・門田裕一・邑田仁・米倉浩司・木原浩 (2016) 改訂新版 日本の野生植物 3. 平凡社
- 大橋広好・門田裕一・邑田仁・米倉浩司・木原浩 (2017) 改訂新版 日本の野生植物 4. 平凡社
- 大橋広好・門田裕一・邑田仁・米倉浩司・木原浩 (2018) 改訂新版 日本の野生植物 1. 平凡社
- 大澤隆文・小山内勇人 (2016) 生物多様性条約における民間参画への取り組みと期待. 建設機械施工 68 (2) pp.4-8
- Paez S, Kraus HSR, Shapiro B, Thomas M, Gilbert P, Jarvis DE, the Vertebrate Genomes Project Conservation Group (2022) Reference genomes for conservation. *Science* 377 (6604) pp.364-366
- 朴君・下桐猛・前田芳實・岡本悟 (2003) AFLP 法による日本ウズラ選抜系統の遺伝的特性

- の分析. 日本家禽学会誌 40 J13-J20
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28 pp.2537-2539
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 pp.945–959
- Pritchard JK, Wen X, Falush D (2010) Documentation for STRUCTURE Software: Version 2.3; University of Chicago: Available online: <https://docplayer.net/4695550-Documentation-for-structure-software-version-2-3.html>
- Rochette CN, Rivera-Colon GA, Catchen MJ (2019) Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology* 28 (21) pp.4737-4754
- 佐伯いく代 (2011) 希少樹種ハナノキを対象とした保全単位の設定. 林木の育種 238 pp.3-8
- Saeki I, Koike F, Murakami N (2015) Comparative phylogeography of wetland plants in central Honshu, Japan: Evolutionary legacy of ancient refugia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 179 pp.78-94
- 佐藤行人・八谷剛史・岩崎渉 (2012) 水圏生物学における次世代シーケンサー活用の現状と応用可能性への展望. 水産育種 41 pp.17-32
- 佐藤由也・小池英明 (2018) メタトランスクリプトーム解析：RNA-seq で環境を診る. 生物工学 96 (7) pp.403-407
- 澤田みつ子・小幡和夫・上條隆志・中村徹 (2010) 茨城県菅生沼における火入れがオギ二次草原のタチスミレに及ぼす影響. ランドスケープリサーチジャパン オンライン 3 pp.11-15
- 澤田みつ子・小幡和男・上條隆志・中村徹 (2011) 利根川水系における絶滅危惧種タチスミレの生育立地とその植生管理. 日本緑化工学会誌 37 (1) pp 44-49
- 瀬戸口浩彰・葉山佳代・茂木雄二 (2024) 母島固有の絶滅危惧植物種タイヨウフウトウカズラの生息域外保全. 東京都立大学 小笠原研究年報 47 pp.11-23
- Shibabayashi M, Shimizu T, Tokuhiko C, Suyama Y, Sakaguchi S, Ito T, Yu C-C, Chung K-F, Nagasawa J, Shiuchi T, Kokubugata G, Abe A, Naiki A, Nagano JA, Isagi Y (2023) The Contrary Conservation Situations of Two Local Critically Endangered Species, *Vaccinium Emarginatum* (Ericaceae) and *Elatostema Platyphyllum* (Urticaceae), Growing on the Eastern Edge of the Distribution. *Frontiers in Ecology and Evolution* 11 pp.01-08
- Shiga T, Yokogawa M, Kaneko S, Isagi Y (2017) Genetic diversity and population structure of *Nuphar submersa* (Nymphaeaceae), a critically endangered aquatic plant endemic to Japan, and implications for its conservation. *Journal of plant research* 130 (1) pp.83-93
- 白石祐彰・津田吉晃・高松進・津村義彦・松本麻子 (2015) 地域の遺伝資源保全に配慮した緑化工のための埼玉県コナラ集団の遺伝的多様性評価. 日本緑化工学会誌 41 (3) pp.402-

- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30 (9) pp. 1312-1313
- 陶山佳久 (2019) 森林遺伝育種学的研究における MIG-seq 法の利用. *森林遺伝育種* 8 (2) pp.85-89
- 陶山佳久 (2019) 森林遺伝育種学的研究における MIG-seq 法の利用. *森林遺伝育種* 8 (2) pp. 85-89
- Suyama Y, Hirota KS, Matsuo A, Tsunamoto Y, Mitsuyuki C, Shimura A, Okano K (2022) Complementary combination of multiplex high-throughput DNA sequencing for molecular phylogeny. *Ecological Research* 37 (1) pp.171-181
- Suyama Y, Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5: 16963.
- Tachibana T, Nishikawa, Kubo N, Takeda S (2020) Morphological and Genetic Diversities of *Habenaria radiata* (Orchidaceae) in the Kinki Area, Japan. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (1) pp.311-319
- 高山晴夫 (2023) 土木工事における在来植物を用いた緑化事例と課題. *ランドスケープ研究* 86 (4) pp.322-325
- 玉木一郎 (2017) 希少種シデコブシの保全遺伝学的研究. *森林遺伝育種* 6 (2) pp. 46-49
- Tamaki I, Setsuko S, Tomaru N (2008) Genetic variation and differentiation in populations of a threatened tree, *Magnolia stellata*: factors in population genetic variation. *Heredity* 100 pp.415-423
- Tamaki I, Setsuko S, Tomaru N (2016) Genetic diversity and structure of remnant *Magnolia stellata* populations affected by anthropogenic pressures and a conservation strategy for maintaining their current genetic diversity. *Conservation Genetics* 17 pp.715-725
- Tamate CS, Kawata M, Makino T (2014) Contribution of Nonohnologous Duplicated Genes to High Habitat Variability in Mammals. *Molecular Biology and Evolution* 31 (7) pp. 1779-1786
- Teixeira CJ, Huber DC (2021) The inflated significance of neutral genetic diversity in conservation genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (10) e2015096118
- 戸部真澄 (2015) 生物多様性保全と法. *大阪経大論集* 66 (1) pp. 69-86
- 東京都環境局自然環境部 (2021) 京都の保護上重要な野生生物種 (本土部) ～東京都レッドリスト (本土部) 2020 年版～ 環境資料第 32098 号. 東京都環境局自然環境部
- 富松裕・木村恵・井上みずき (2007) 栄養繁殖と有性繁殖: クローナル植物をめぐる問題. *日本生態学会誌* 57 pp.260-264
- 富田啓介 (2008) 尾張丘陵および知多丘陵の湧水湿地にみられる植生分布と地形・堆積物の

- 関係. 地理学評論 8 (6) pp.470-490
- 頭山昌郁・中越信和 (2004) 種多様性の評価における二, 三の問題点. 日本環境動物昆虫学会誌 15 (1) pp.31-48
- 土松隆志 (2017) 集団ゲノミクスからさぐる植物の進化. 大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 ライフサイエンス統合データベースセンター. 領域融合レビュー 6 e006
- Tsuda Y, Kimura M, Kato S, Katsuki T, Mukai Y, Tsumura Y (2009) Genetic structure of *Cerasus jamasakura*, a Japanese flowering cherry, revealed by nuclear SSRs-implications for conservation. Journal of Plant Research 122 pp.367-375
- Tsuda Y, Sawada H, Ohsawa T, Nishikawa H, Ide Y (2010) Landscape genetic structure of *Betula maximowicziana* in the Chichibu mountain range, central Japan. Tree Genetics and Genomes 6 pp.377-387
- 津村義彦 (2001) 遺伝的多様性研究ガイド. 種生物学会 (編). 森の分子生態学—遺伝子が語る森林のすがた—. 文一総合出版 pp.158-178
- Tsumura Y (2022) Genetic guidelines for tree species and perspectives on the conservation and sustainable use of forests. Journal of Forest Research 27 (2) pp.83-95
- 津村義彦・陶山佳久 (2015) 地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン. 文一総合出版
- Tsunenari K, Ito T, Yokota M, Shibabayashi M, Chung K-F, Suyama Y, Matsuo A, Abe A, Naiki A, Setoguchi H, Makino T, Isagi Y (2024) Double migration of the endangered *Tricyrtis formosana* (Liliaceae) in Japan. Scientific Reports 14 Article number: 957
- 鶴内孝之 (1985) 長崎県における畑麦作の雑草に関する研究 : IV. 冬作の野菜および飼料畑との比較. 日本作物学会九州支部会報 52 pp.88-91
- 鶴内孝之 (1988) 夏期湛水土中における冬雑草、とくに水田及び畑地産ヤエムグラ種子の生存期間. 雑草研究 4 pp.260-265
- 植木邦和 (1965) ヤエムグラの個生態. 雑草研究 4 pp.34-41
- Ueno S, Setsuko S, Kawahara T, Yoshimaru H (2005) Genetic diversity and differentiation of endangered Japanese endemic tree *Magnolia stellata* using nuclear and chloroplast microsatellite markers. Conservation Genetics 6 pp.563-574
- Uesugi R, Nishihiro J, Tsumura Y, Washitani I (2007) Restoration of genetic diversity from soil seed banks in a threatened aquatic plant, *Nymphoides peltata*. Conservation Genetics 8 pp.111-121
- 上杉龍士・西廣淳・鷺谷いづみ (2009) 日本における絶滅危惧水生植物アサザの個体群の現状と遺伝的多様性. 保全生態学研究 14 (1) pp.13-24
- United Nations (1992) Convention on Biological Diversity. United Nations. <https://www.cbd.int/convention/text/>
- Vane-W RL, Humphries CJ, Williams PH (1991) What to protect? - Systematics and the agony of choice. Biological Conservation 55 (3) pp.235-254
- Vogt K, Rasran L, Jensen K (2004) Water-borne seed transport and seed deposition during flooding

- in a small river-valley in Northern Germany. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 199 (5) pp.377-388
- 鷺谷いづみ (2007) 氾濫原湿地の喪失と再生:水田を湿地として活かす取り組み. *地球環境* 12 (1) pp.3-6
- Washitani I, Ishihama F, Shimono A, Nishihiro,MA (2005) Toward predicting gene flow in plant populations. *Plant Biotechnology* 22 pp.489-495
- 渡邊絵里子・斎藤昌幸・林直樹・松田裕之 (2014) 日本のレッドデータブックに掲載された維管束植物種の絶滅リスクに基づく生物多様性ホットスポット解析. *保全生態学研究* 19 (1) pp.53-66
- Watanabe K, Yaneshita M, Denda T, Yokota M, Hirota SK, Suyama Y, Tsumura Y (2022) Genetic structure of the *Liriope muscari* polyploid complex and the possibility of its genetic disturbance in Japan. *Plants* 11:3015
- Wei X, Jiang M (2020) Meta-analysis of genetic representativeness of plant populations under ex situ conservation in contrast to wild source populations. *Conservation Biology* 35 (1) pp.12-23
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 (6) pp.1358-1370
- Williamson PS, Werth CR (1999) Levels and pattern of genetic variation in the endangered species *Abronia macrocarpa* (*Nyctaginaceae*). *The American Journal of Botany* 86 pp.293-301
- Wilson EO (1992) *The Diversity of Life*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Wilson EO, Peter FM (eds.) (1988) *Biodiversity*. National Academy Press, Washington, D.C
- 山本将也・池上温人・川本晴希・福井萌花・松原信之 (2024) ゲノムワイド情報を用いた国内希少野生動植物種ヒメタツナミソウのクローン構造解析. *自然保護助成基金助成成果報告書* 33 pp.154-161
- 横川昌史・長池卓男・西川浩己・井鷺裕司 (2011) 北岳に生育するミヤマハナシノブの遺伝的多様性および遺伝構造の解析. *山梨県総合理工学研究機構研究報告書* 6 pp.69-75
- 米村惣太郎・井原寛人 (2008) 調整池の植生基盤に導入されたタコノアシ *Penthorum chinense Pursh* の経年的変化. *日本緑化工学会誌* 34 (1) pp.45-50
- 吉田政敬・横山潤 (2011) 東北地方南部におけるツボスミレ (*Viola vercunda* A. Gray) の形態的変異. *山形大学理学部裏磐梯湖沼実験所報* pp.21-27

謝辞

研究指導教員の筑波大学生命地球科学研究群生命環境系の上條隆志教授および津村義彦名誉教授には終始適切なご指導を賜りました。また、副査としてご指導いただきました廣田充教授、清野達之准教授、川田清和助教には、論文作成に関します貴重なご意見をいただきました。ここに深謝の意を表します。MIG-seq 解析につきましては、東北大学大学院農学研究科の陶山佳久教授、高橋大樹特任助教、福島大学共生システム理工学類の廣田峻准教授に、RNA-seq 解析につきましては、東北大学大学院生命科学研究科の牧野能士教授にご指導を賜りました。希少植物の生態につきましては、独立行政法人国立科学博物館植物研究部の田中法生先生、茨城県霞ヶ浦環境科学センターの小幡和男先生にご指導いただきました。また、希少植物の採取におきましては、ミュージアムパーク茨城県自然博物館の飯田勝明氏、伊藤彩乃氏、渡良瀬遊水地植物の会の大和田真澄氏、榎奥村組の高嶋則雄氏、富山陽子氏に協力頂きました。韓国のタチスミレの遺伝情報は、全南大学校の Jung-Hyun Lee 先生、昌原大学校の Hyeok Jae Choi 先生からご提供いただきました。ここに感謝の意を表します。