

# 森林生態系の保全を遺伝子レベルで考える

愛媛大学農学部教授 原 田 光

## 1. 地球の森林資源の現状

地球上の森林面積は約35億ヘクタールで、全地表面積の三分の一をしめている。現在温帯林では面積は増加傾向にあるが、それ以外は熱帯林を中心に、減少傾向にあり、1981年から1990年までに1億6千万ヘクタールが減少したとされている。なお森林の1億5千万ヘクタールは植林地であり、さらに5億ヘクタールは水源涵養林や保養林、あるいは食糧品その他の商品生産といった人為的な利用が行われている。その他、焼き畑や、アグロフォレストリーといった形での潜在的な利用も、広大な面積に及ぶと考えられる。人口の増加と、人類の活動範囲の拡大によって、地球環境に対する人為的な影響はますます大きくなっており、いまやあらゆる生態系において、人為的支配の影響を無視することはできなくなっている (Noble and Dirzo, 1997)。

最も古い人類の直接の祖先の化石は東アフリカのオルドバイ峡谷で見つかっているが、これは約600～500万年前のもので推定されている。100万年前には彼らはユーラシア大陸の熱帯および亜熱帯地域に拡散してゆき、さらに、50万年前には温帯地方にも現れるようになった。オーストラリア大陸に海を渡って人類が現れたのはそれよりずっと後のことで約5万年前のこととされている。また新大陸に人類が現れたのは現生人類に進化してからのことで、今から約3万年前のことである。人類は

長い間、農耕を知らず、おそらく森林をすみかとした森の民として暮らしていた。農耕を始めたのは今から約1万年前であり、この当時の人口から推定して、狩猟、採集、漁労生活の方が遙かに効率がよく、農耕は補助的な手段として行われたであろう。しかしながら、農耕生活は人口の集積を促し、さらに食料の備蓄が進むと、これの利用をめぐって貧富の差に特徴づけられる構造的な人類の社会が形成され、文明が芽生えた。農耕の起源とともに、森林の取奪が始まったと考えることができるが、それ以来、現在までに地球上の森林は約3分の2に減少したと考えられている。現在、木材や燃料として伐採される森林の体積は年間50億立方メートルに達し、毎年1.5%ずつ増加している。また世界中で増加しつつある人口を維持するために毎年1000万ヘクタールの土地が必要であり、それらの多くは森林を伐採することによって供給されている。1980年から1995年までの間に毎年1300万ヘクタールの森林が失われているが、植林によって補われているのは年間その10分の1にすぎない (FAO, 1997)。

## 2. 森林生態系の生物多様性

森林は多様な生物を包含した生態系として重要であり、全体として地球の生物圏の環境を維持するために、かけがえのないものであることは明らかである。とりわけ熱帯林には地

地球上の全植物種の3分の2、すなわち170,000種が存在すると推定されているが (Wilson and Peters, 1988), この地域が最も急速な取奪を受けていることもまた事実である。東南アジアの熱帯林の破壊が最も目立った形で行われているのはマレーシアのサラワク州の熱帯雨林である。ミリ市近郊のランビル国立公園では日本の研究グループを中心にして、様々な研究が行われているが、52ヘクタールの大規模生態学調査プロットでの毎木調査では、直径1cm以上の樹木が358,900本、1,175の樹種がカウントされた (山倉ら, 1996)。表1に同様に調査されたマレー半島部のパソー、およびパナマのバロ・コロラド島 (BCI) の大面積調査区のプロラの比較を示す。

表1. 熱帯雨林における大面積調査区のプロラの概要 (山倉ら, 1996より)

地域	面積	個体数	種数	属数	科数
ランビル	52 ha	358905	1175	276	75
パソー	50 ha	239000	820	290	78
BCI	50 ha	238000	306	190	61

種の多様度を示す指数として Fisher の  $\alpha$  (Fisher et al., 1943) が用いられるが、ランビル、パソー、BCIでのそれぞれの値は、151、106、および35となる。伊藤 (1977) によって報告された暖温带林での値 (3.6~8.7) および、冷温带林での値 (0.5~3.9) に比べて、熱帯雨林における種の多様性がいかに大きいかわかる。森林は様々な植物と動物および微生物を含む生態系であることは前にも述べたが、これらは互いに依存しあった連鎖、共生関係を形成している。従って、多様な植物種を包含することは多様な動物、微生物をも包含していることと同義であると考え

てよい。生物種の多様性は人間の生活にも大きな関わりを持っている。例えば現在使用されている医薬品のうち、3分の1以上が熱帯雨林に生育している植物、動物、および微生物を原料として作り出されたものである (宇沢, 1995)。これからもますます積極的に、この地域の生物種から、人間の生活に役立つ物質を探索する作業が行われるであろう。このような生物資源はしばしば遺伝子資源という言葉で表現される。これは生物の種が様々であることと、種が様々な特徴を持つことを同時に意味している。種および種の持つ特徴の多様さは基本的にはDNA上の遺伝子の多様性に帰属する。従って遺伝子資源の重要さはそれが進化の長大な時間を経て、より適応的なものに形作られていることであり、それゆえにかけがえがないものである。

### 3. 遺伝的変異に基づく生物多様性の評価

1992年6月の「地球サミット」で地球生態系の保全を目指した「生物多様性条約」が採択された。生物多様性 (バイオダイバーシティー) とは特定の生息環境 (ハビタット) や地理学的地域に生息する生物の多様性を指すが、地球温暖化とともに、現在我々が地球の環境問題を論じるとき重要なキーワードとなっている。生物多様性は種、生態的ニッチェ、遺伝子、およびランドスケープの多様性を含む広範な概念であり、それらを階層的に配置すれば理解しやすい。しかしながらこれらは時間的、空間的に影響しあっているものであり、実態の把握は困難である。これを研究する主要な方法として生態学および遺伝学的アプローチがあるが、これまでこの二つのアプローチの間での有効な橋渡しはなされて

こなかったように思われる。最近の分子生物学の発達により遺伝子の発現調節に関する知見が急速に集積され始めた。それとともに、生態学研究にも分子生物学の手法と、集団遺伝学的方法論が積極的に取り入れられるようになった。しかし、これは必ずしも両方のアプローチの相互の理解が進んだことを意味していない。生物の基本的な体制は遺伝子によって規定されるが、その発現は環境によって大きく影響を受ける。遺伝的な変異が、生態的な環境要因とどのように相互作用するかを空間的、時間的に研究する分野の発展が必要であるように思われる。このような研究の基盤として、生物集団にはどれくらいの遺伝的な変異が蓄積されているのかを生息環境の違いに基づいて調べ、データを蓄積することが必要であると考えている。以下に遺伝的な変異を評価するための基礎的理論を解説し、これが実際の森林資源にどのように適用されるかを見てみたい。

#### 4. 集団内の遺伝子

遺伝的多様性を考える時の基本的な単位は集団である。一般に集団とは遺伝子の交換が自由にできる、交配可能な同一生物種個体の地理的なまとまり（個体群）を指しており、メンデル集団あるいはデーム（deme）ともよばれる。メンデル集団の極大が種であると定義してもよい。現実の集団では、集団間の個体の移動や、分集団化がダイナミックに起こっていると考えられる。そこで極限的モデルを設定し、そこからの帰結を現実の集団に当てはめることにする。このモデルでは集団の個体数は無限大であり、個体間の交配は自由に（無作為に）起こる。また突然変異や移住による遺伝的な変異の導入はなく、また自然選

択も働かないと考える。ここで特定の遺伝子座の対立遺伝子をAとaとする。従って個体の遺伝子型はAA, Aaもしくはaaのいずれかである。ある世代でAAを持つ個体の数が $n_1$ , Aa個体が $n_2$ , aa個体が $n_3$ 存在したとする。A遺伝子の頻度を $p$ とすると、 $p = (2n_1 + n_2) / 2(n_1 + n_2 + n_3)$ となる。またa遺伝子の頻度を $q$ とすると、 $q = (n_2 + 2n_3) / 2(n_1 + n_2 + n_3)$ となる。従って $p + q = 1$ である。次世代の個体を作るに当たって、交配が無作為に起こるから、父親がA遺伝子を子孫に伝える確率は $p$ であり、またa遺伝子は確率 $q$ で子供に伝えられる。母親からも同様の割合で遺伝子が伝えられる。従って、AA個体は $p^2$ , Aa個体は $2pq$ , そしてaa個体は $q^2$ だけ生じることになる。子孫の世代でのA遺伝子の頻度を $p'$ , a遺伝子の頻度を $q'$ とすると、 $p' = p^2 + pq = p(p + q) = p$ ,  $q' = pq + q^2 = q(p + q) = q$ となり、Aおよびa遺伝子の頻度は親世代と等しくなる。従って以下の世代ではAA, Aaおよびaa遺伝子型の頻度はそれぞれ $p^2$ ,  $2pq$ および $q^2$ となって安定する。この状態を「ハーディー・ワインバーグの平衡」という。実際の集団では個体をすべて採集して遺伝子型を調べるのは不可能なので、ランダムサンプリングを行うことになる。現実的には数十個体をサンプルする。これから計算した遺伝子頻度は母集団の遺伝子頻度の推定値となる。すなわち、

$$p = \frac{(2n_1 + n_2)}{2(n_1 + n_2 + n_3)} \pm \sqrt{\frac{(2n_1 + n_2)(n_2 + n_3)}{8(n_1 + n_2 + n_3)^3}} \dots\dots(1)$$

現実の集団は多かれ少なかれこのモデルの仮定を満たさない要因が含まれている。ハーディー・ワインバーグの平衡からのずれは固定指数,  $F$  (Wright, 1951, 1965) によって

測ることができる。すなわちAAの遺伝子型頻度をX, Aaの遺伝子型頻度をY, そしてaaの遺伝子型頻度をZとすると, それぞれの頻度は以下ようになる。

$$X = (1 - F)p^2 + Fp \dots\dots\dots(2)$$

$$Y = 2(1 - F)pq \dots\dots\dots(3)$$

$$Z = (1 - F)q^2 + Fq \dots\dots\dots(4)$$

F = 0のとき, 集団はハーディー・ワインバーグの平衡にある。Fが0からずれる要因として考慮されねばならないのは近親交配, 同類交配, 集団の分集団化, および, 自然選択である。近親交配および同類交配が起こると, ホモ接合の割合が増える。自家受精では毎代ヘテロ接合の割合は半分に減少し究極的にF = 1となる。近親交配ではゲノム全体の遺伝子でホモ接合の割合が高くなるのに対し, 同類交配は似たもの同士の交配であり, 対象となった遺伝子のみ限定される。集団が細分され, いくつかの分集団構造をとるとき, 分集団内ではハーディー・ワインバーグの平衡が成立するときには, 集団全体でホモ接合の割合がハーディー・ワインバーグの平衡で期待されるものより大きくなることが知られている。これは「Wahlundの原理」とよばれる。近親交配と同類交配, および集団の細分化はランダム交配からのずれであるのに対して, 遺伝子座に自然選択が働いている場合にもF = 0からのずれが認められる。自然選択がヘテロ接合に有利に働く場合には当然Fは負となって, ヘテロ接合の割合が増加する。逆の場合はFは正となってホモ接合の割合が増加する。自然選択が一方のホモ接合に有利に働く場合は, それ以外の遺伝子型に働く自然選択の強さによってFの値は負にも正にもなりうる。集団がハーディー・ワインバーグの

平衡にないときFの期待値はLiとHorvitz (1953) によって次の式で示されている。

$$\hat{F} = \frac{4n_1n_3 - n_2^2}{(2n_1 + n_2)(n_2 + 2n_3)} \dots\dots\dots(5)$$

また, F = 0からのずれは, 自由度1の $\chi^2_{(1)} = n\hat{F}^2$ で検定される。

## 5. 遺伝的変異量の測定

遺伝的変異の量は最も一般的に「平均ヘテロ接合度」(average heterozygosity)を用いて測定される。任意交配を行っている集団を考え, ある遺伝子座のi番目の対立遺伝子の頻度を $x_i$ とすると, ヘテロ接合度hは,

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2 \dots\dots\dots(6)$$

で定義される。ここでmは対立遺伝子の数である。平均ヘテロ接合度, Hはすべての遺伝子座にわたってhを平均したものである。この量は二倍体の生物において定義される量であるが, Nei (1973) はこれが半数性および倍数性の生物にも普遍的に適用しうる量であることを指摘し, Hのより一般的な呼称として「遺伝子多様度」(genetic diversity)を用いている。実際のHの推定にはr個の遺伝子座を抽出しそのヘテロ接合度の平均値をとる。従って以下ようになる。

$$\hat{H} = \sum_{j=1}^r \hat{h}_j / r \dots\dots\dots(7)$$

ここで $\hat{h}_j$ はj番目の遺伝子座のhの値である。実際にHを推定する場合, これまで, 最も一般的に用いられてきたのは電気泳動法を用いたアイソザイム変異である。アイソザイムとは酵素タンパク質のアミノ酸が置換したために電荷が変化し, スターチやポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行うことによっ

て、異なる移動度を持つバンドとして検出されるものである。様々な生物種を用いた解析から、集団中にはこのような変異が豊富に存在することが示されてきた。表2に様々な生物のアイソザイム変異にもとづく平均ヘテロ接合度 (H) および、多型的な遺伝子座の割合 (P) を示す。

表2. アイソザイム変異にもとづく様々な生物の遺伝的多様度 (Selander, 1976より)

	P(%)	H(%)
他殖植物 (8,8)	46.4	17.0
海生巻き貝 (5,17)	17.5	8.3
陸生巻き貝 (5,18)	43.7	15.0
海生無脊椎動物 (9,26)	58.7	14.7
シオウジョウバエ (28,24)	52.9	15.0
シオウジョウバエ以外の昆虫(4,18)	53.1	15.1
魚類 (14,21)	30.6	7.8
両生類 (11,22)	33.6	8.2
は虫類 (9,21)	23.1	4.7
鳥類 (4,19)	14.5	4.2
齧歯類 (26,26)	20.2	5.4
大型ほ乳類 (4,40)	23.3	3.7

生物種に付随したかっこ内の数値は種の数(左)と調べられた遺伝子座の数(右)を示す。

主にシオウジョウバエを用いた実験で、多くのアイソザイムマーカーは選択的に中立である事が示されている。またアイソザイムは酵素タンパク質の変異であり、遺伝子のコード領域に限定される。従って、アイソザイムデータだけからは、ゲノム遺伝子全体の多様度を見ることはできない。

## 6. 集団の遺伝的構造

第4節でハーディ・ワインバーグ平衡からのずれの量が、固定指数、Fで示されることをみたが、Fは一方で近交係数として定義される量である。近交係数とは個体の二つの対立遺伝子が同じ祖先に由来する(同祖的である)確率である。集団が細分化され、個々の集団のサイズが小さくなると、分集団内でランダムな交配が起こっても配偶子のサンプリングエラーが生じ、同祖的な遺伝子をとる組み合

わせが増えてくる。集団が細分化してt世代後の近交係数 $F_t$ は、分集団のサイズをNとすると、

$$F_t = 1 - \left(1 - \frac{1}{2N}\right)^t \dots\dots\dots(8)$$

となり、Nが小さいほど近親交配の効果が強くなる。また世代tにおける遺伝子頻度の分散 $\sigma^2$ は、遺伝子頻度の平均値をpとすると、

$$\sigma^2 = p(1-p)\left\{1 - \left(1 - \frac{1}{2N}\right)^t\right\} \dots\dots\dots(9)$$

となり、世代が進むにしたがって大きくなる。このことは分集団の遺伝子頻度の違いが世代ごとに大きくなることを示し、究極的に $F=1$ となり、いずれかの遺伝子が集団中に固定することになる。このような現象を「遺伝的浮動」(genetic drift)とよぶ。集団が細分化したために生じた、ハーディー・ワインバーグの平衡からのずれを示す固定指数を、ここで新たに $F_{ST}$ と定義し直す。このとき式3で示したヘテロ接合頻度(Y)は分集団のヘテロ接合頻度の平均値を示すことになり、これを $H_S$ (分集団のヘテロ接合頻度)とする。ハーディー・ワインバーグの平衡から期待されるヘテロ接合頻度は集団が分化する前の状態を示しており、これを $H_T$ (集団全体のヘテロ接合頻度)とする。すなわち $H_T = 2pq$ である。ここで、

$$\frac{H_T - H_S}{H_T} = \frac{2pq - 2pq(1 - F_{ST})}{2pq} = 1 - 1 + F_{ST} = F_{ST} \dots\dots(10)$$

となる。また $F_{ST}$ は各分集団で推定された遺伝子頻度の平均値pとその分散 $\sigma^2$ を用いて以下の式で推定することが出来る。

$$F_{ST} = \frac{\sigma^2}{p(1-p)} \dots\dots\dots (11)$$

ところで、実際に分集団内では近親交配や、自然選択が働くので、必ずしもハーディー・ワインバーグの平衡が成り立っているとは限らない。そこで分集団内での固定指数を  $F_{IS}$  と定義する。実際の  $F_{IS}$  は分集団の固定指数の加重平均から求められる (Nei, 1986)。集団全体の固定指数は集団間の固定指数  $F_{ST}$  と集団内の固定指数  $F_{IS}$  に分割されることになり、これを  $F_{IT}$  とおく。ある個体が同祖接合にならない確率、 $1 - F_{IT}$  は分集団内で同祖的にならず、さらに集団が細分されることによって同祖的にならない確率であるから、 $F_{IT}$  と  $F_{ST}$  および  $F_{IS}$  との間に次の関係式が成立する。

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS}) \dots\dots\dots (12)$$

これらの固定指数は集団の繁殖構造と自然選択の働きを知るために有用である。大庭ら (1996) は落葉性ナラ類 2 種 (コナラ、ミズナラ) について、関東周辺の 5 集団 (日山、小川、仏頂山、筑波山、伊豆) の遺伝的変異を 6 つの酵素遺伝子座 (Shd, Gdh, Dia, Px, Got, Asp-1) のアイソザイムを用いて調べた。彼らの結果を表 3 に示す。

表 3. 落葉性ナラ類 2 種の遺伝的変異と固定指数 (大庭ら, 1996 より)

	$H_e$	$H_o$	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
コナラ	0.156 ± 0.07	0.142 ± 0.06	0.090	0.024*	0.111
ミズナラ	0.194 ± 0.08	0.174 ± 0.07	0.112	0.013**	0.124

\*および \*\* はそれぞれ 5% および 1% レベルで統計的に有為であることを示す。また ± で示した数値は標準誤差である。

ここで  $H_e$  および  $H_o$  は平均ヘテロ接合度の期待値および観察値であるが、ミズナラの変異がコナラの変異より大きいことがわかる。固定指数はコナラおよびミズナラで大きな違

いは見られない。分集団内の固定指数  $F_{IS}$  が大きいことから、集団内では自家受精が行われているか、あるいはヘテロ接合体が不利になるような自然選択が働いている可能性がある。一般に分布域が広く、花粉が広く散布される樹木集団では集団間の遺伝子交換が頻繁に行われるので集団分化が顕著ではない。ここでは  $F_{ST}$  の値は小さいが、有意に 0 より大きいことに注意したい。大庭らは同時に常緑性のカシ類、4 樹種 (ウバメガシ、アカガシ、アラカシ、シラカシ) についても西日本のいくつかの集団についてアイソザイムの解析を行った。彼らの結果を表 4 に示す。

表 4. 常緑性カシ類 4 種の遺伝的変異と固定指数 (大庭ら, 1996 より)

	$H_e$	$H_o$	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
ウバメガシ (4)	0.365 ± 0.07	0.345 ± 0.07	0.057	0.104**	0.155
アカガシ (6)	0.142 ± 0.05	0.136 ± 0.05	0.041	0.032**	0.072
アラカシ (6)	0.315 ± 0.09	0.286 ± 0.08	0.096	0.017	0.112
シラカシ (2)	0.169 ± 0.07	0.154 ± 0.06	0.095	0.010**	0.105

\*\* は 1% レベルで統計的に有為であることを示す。また ± で示した数値は標準誤差である。樹種に付随したカッコ内の数字は調べた集団の数を示す。ウバメガシでは 9 遺伝子座、アカガシでは 11 遺伝子座、アラカシでは 8 遺伝子座、シラカシでは 7 遺伝子座の対立遺伝子頻度を用いて各統計量を求めた。

各樹種の平均ヘテロ接合度はウバメガシ、アラカシで大きく、アカガシ、シラカシで小さいことが示される。また集団の分化の程度は、ウバメガシで最大となっている。シラカシでは  $F_{ST}$  の値そのものは小さいが、有意に 0 と異なることに注意すべきである。アラカシは西日本では低地を中心にきわめて広い分布を持つことから、種内に比較的大きな遺伝的変異を有する。反面、集団間の分化は進んでいないことがわかる。ウバメガシはその天然分布域の多くが海岸地域に限られており、集団間の分化が進んだものと見られる。しかしながら種全体として大きな遺伝的変異を保有することは、かつては海岸地域を中心に大集団を作っていたことをうかがわせる。アカガシ、シラカシは比較的標高の高いところに生

育し、分布もさほど広くない。集団が西日本に分布するときには何らかの瓶首効果を受けたのかも知れない。

## 7. 遺伝的変異の解析に用いられる分子マーカー

最近の分子生物学の進展により、生物の遺伝的変異を遺伝子レベルで調べることが可能になった。究極的なデータは遺伝子のDNA塩基配列から得られるが、大量のサンプルの遺伝的変異を調べるために、簡便でコストのかからない様々な方法が開発されている。以下にそれらの方法の概略を述べる。

### (a) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

10mer程度のランダムな配列を持つプライマーを用いて、PCRを行い、同一プライマーに挟まれるゲノム上の無作為な部分を増幅する。これをアガーロスゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色の後、UV照射下で写真に撮る。増幅DNAのバンドの有無によって変異を調べる。あるDNA領域が増幅されるかどうかはプライマーと相補的な部位の塩基配列の変異に依存し、変異がホモ接合の時にはバンドは検出されない。従ってこのマーカーは優性マーカーである。この方法は作物の品種鑑定などに広く用いられている。また増幅したDNAをゲルから切り出してサブクローニングし塩基配列を決定してSTS (sequence tagged sites) 化したものは連鎖解析の遺伝子マーカーとして用いられ、また量的形質を解析するQTLマッピングにも利用される。RAPDを用いてフタバガキの遺伝的変異を調べた例を図1に示す。

RAPDは再現性に問題のある場合がある

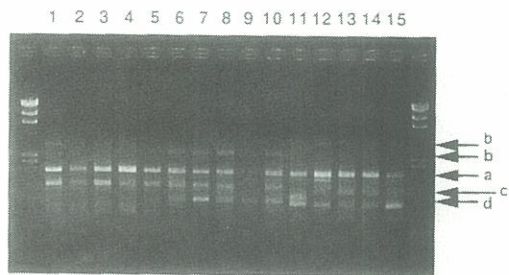


図1. プライマー OP01 (Operon) を用いて行った RAPD

レーン1~5は *Shorea curtisii*, レーン6~10は *S. accuminata*, レーン11~15は *S. leprosula*。バンド (a) はすべての種で見られるのに対し、バンド (b) は種特異的である。バンド (c) は多型的になっており、バンド (d) は1系統のみに出現している。(Harada et al. 1994)

が、ゲノム全体からランダムにDNA領域をサンプリングできる利点がある。また非常に多数の多型的変異を検出できるので種内変異を調べるのに適している。

### (b) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

集団のサンプルを解析するためには、PCRを用いたRFLP (PCR-RFLP) が簡便な方法として用いられる。すでに塩基配列の決定されている特定の遺伝子を選び、適当な位置にプライマーを設定する。このプライマーを用いてPCRで増幅し、これを制限酵素で切断して、電気泳動を行う。RAPDと同様な方法で写真撮影し、バンドの有無と位置の変化を調べる。増幅できる遺伝子領域は数100~4000bpである。2000bpのPCR産物について、10種類の4塩基認識の制限酵素を用いて解析する場合、4塩基認識では平均して256bpに1回切断部位が現れるので、 $4 \times 10 \times 2000 / 256 = 312$ bpの塩基の変異を調べることになる。この方法ではごく少量の植物材料からで

もRFLPを検出することができ、RIも使わないので、比較的簡単な設備で実験を行うことができる。この方法は主に種間の遺伝的変異の比較に用いられ、系統樹の作成などに有効である。津村らはフタバガキ科の10属、30種の樹種についてRFLPを用いた系統樹を作成している (Tsumura et al., 1996)。

#### (c) SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)

一本鎖に変性させたDNAは非変性条件下でヘアピンループなどの高次構造をとる。この部位に塩基の欠失や置換があると、ヘアピンループが解消されるなどして、全体的な高次構造が変化する。この状態で非変性ポリアクリルアミド電気泳動を行うと、高次構造の変化によってゲル中の移動度が変わり、異なるバンドとして検出される。バンドの検出は銀染色によって行う。ゲルの温度およびゲル中のグリセロールの濃度によって移動度が変化するのので、多型を検出できる適当な条件を設定する必要がある。PCRを行って適当な遺伝子部位を増幅し、これに対してSSCPを行って多型を検出する。SSCPでは一塩基の変化でも検出できるとされている。塩基の変化は調べるDNA領域の長さが増すほど大きくなるが、それに伴って複数の高次構造が生じることがあり、バンドの数が多くなり、解析が困難になる。SSCPの検出限界は最大1000bp程度とされている。SSCPでは種内変異の解析が可能であるため、作物の連鎖解析などに用いられる。遺伝子地図上の位置が決定された変異はSTS化して、YACやコスミドクローンのコンティグ作成のためのスクリーニングに用いられる。

#### (d) マイクロサテライトを用いたフィンガープリント法

ゲノムDNA上には1~6塩基の短いモチーフの繰返し (...GTGTGTGTGT...など) からなるマイクロサテライトとよばれる領域が散在している。繰返し配列を持つ領域では複製に際してスリッページが生じやすいために繰返し数に大きな変異がある。このような領域は何ら生物学的機能を持たない、いわゆる利己的 (selfish) DNAであると考えられている。マイクロサテライトを含む領域をクローニングし、その両端にプライマーを設定してゲノムDNAからこの領域をPCRを行って増幅する。これを変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、変異を検出する。フィンガープリント法は作物における連鎖地図の作製や動物の親子鑑定など、種内変異の解析に用いられるが、森林資源では花粉を介した遺伝子流動の解析に有効であることが示唆されている (Terauchi, 1994)。マイクロサテライトの変異率は非常に高いので、樹木のような長寿命の生物体では個体内の変異を調べることも可能だと思われる。

#### (e) AFLP (Amplified Restriction Fragment Polymorphism)

AFLPはRFLPを用いたフィンガープリント法の変法であり、原理的にはRAPDと同等と考えてよい。ゲノムDNAを制限酵素で切断し、これに制限酵素特異的なアダプターを結合させる。アダプター配列と制限酵素部位を含んで+1塩基を付加した選択プライマーを用いてPCRを行い、この領域を増幅する。このDNAを鋳型にして、さらに+3塩基を付加した選択プライマーでPCRを行い、これを変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を



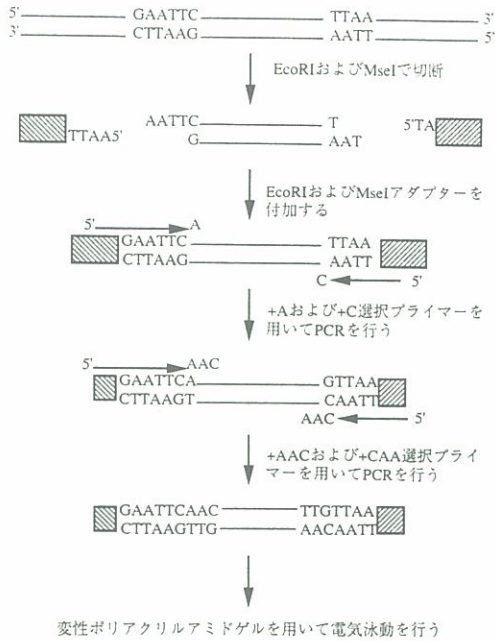


図2. AFLPの概要  
(Gibco BRL '97-'98 カタログより)

行う (図2)。

2回目のPCR増幅の際にRI標識したヌクレオチドを取り込ませ、X線フィルムに感光させてバンドを検出する。このようにして検出された領域はゲノム上のランダムな部位であり、通常のRFLPやRAPDより多くの多型を検出できる。従って種内変異を調べるのに有望な遺伝子マーカーといえる。

## 8. 塩基配列に基づく遺伝的変異の解析

DNA塩基配列は現在ほとんどの場合、PCRを組み合わせたジデオキシ法によって決定される。これはPCRにおいて配列を決定したいDNAを鋳型として、ポリメラーゼ反応を行う際に、通常の基質である2'デオキシリボヌクレオシド3リン酸と、ある一定の割合で2', 3'ジデオキシリボヌクレオシド3リン酸を混合して反応させる。2', 3'ジデオキシリボヌクレオシド3リン酸を取り込むとリボースの3'位置

に水酸基がないために、反応がそれ以上進展しない。これを変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行って分離する。塩基配列の決定には自動塩基配列決定装置 (オートシーケンサー) が普及してきており、一度に数100bpから1kb程度の配列の決定が可能である。鋳型DNAにはPCRで増幅したDNAを直接、配列決定に用いる場合と、いったん適当なベクターにサブクローニングして用いる場合がある。直接法ではポリメラーゼによる複製のエラーが含まれないので、変異を定量的に解析するのに適している。直接法ではヘテロ接合のサンプルの場合に、塩基の判別が困難な場合がある。この場合はサブクローニングによる方法を用いるべきであるが、かなりの頻度で複製のエラーが生じ得るので、複数個のクローンの配列を決定する必要がある。

配列データを用いて集団内の遺伝的多様性を解析するときの基本的な尺度は「塩基多様度」(nucleotide diversity) であり、集団から二つの配列をランダムにサンプリングしたときの異なる塩基の割合として定義される。この量は

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij} \dots\dots\dots (13)$$

によって示され、任意交配を行っている集団の塩基レベルの平均ヘテロ接合度に相当する。 $x_i$ はDNAの配列タイプ*i*の頻度、 $x_j$ は配列タイプ*j*の頻度であり、 $\pi_{ij}$ はタイプ*i*とタイプ*j*の間で異なる塩基の割合である。実際のデータからは $\pi$ の不偏推定値は、 $n$ をサンプル数としたときに

$$\hat{\pi} = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} x_i x_j \hat{\pi}_{ij} \dots\dots\dots (14)$$

によって与えられる。集団や種などの二つの系統間での配列の比較を行う場合の変異量の

基本的な尺度は、サイトあたりの塩基置換数、 $d$ で与えられる。二つの系統から抽出した二つの配列の異なる塩基の割合を $p$ とすると、 $p = n_d/n$ である。ここで $n$ は調べた塩基の総数、 $n_d$ は異なる塩基の数である。長い進化時間を考慮すると、サイトで複数回置換が起こりうるので $p$ は $d$ の過小推定値となる。これを補正するためにいくつかの方法が考案されているが、もっとも簡単な Jukes と Cantor の 1 パラメーター法では  $d$  は

$$\hat{d} = -\frac{3}{4} \ln\left(1 - \frac{4}{3} p\right) \dots\dots\dots (15)$$

によって推定される。集団の塩基置換数の平均値は、配列の数を  $n$ 、配列タイプ  $i$  と配列タイプ  $j$  の集団中の頻度をそれぞれ  $x_i$  と  $x_j$ 、 $i$  と  $j$  の間の塩基置換数を  $d_{ij}$  とすると

$$\hat{d} = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} x_i x_j d_{ij} \dots\dots\dots (16)$$

で推定される。二つの集団、 $X$  と  $Y$  の集団間の塩基置換数の平均、 $d_{xy}$  は

$$\hat{d}_{xy} = \sum_{ij} x_i y_j d_{ij} \dots\dots\dots (17)$$

となる。ここで  $x_i$ 、 $y_j$  はそれぞれ集団  $X$  および  $Y$  の配列タイプ  $i$  と  $j$  の頻度である。二つの集団の比較における塩基の純置換数は集団が分化する前にすでに多型的に存在したことによる置換数を差し引かねばならない。従って純置換数を  $d_A$ 、集団  $X$  の塩基の平均置換数を  $d_x$ 、 $Y$  のそれを  $d_y$  とすると

$$\hat{d}_A = \hat{d}_{xy} - \frac{1}{2} (\hat{d}_x + \hat{d}_y) \dots\dots\dots (18)$$

で推定される。 $d$  は集団間の遺伝的距離を示しており、これを用いて集団間の系統関係を調べることができる。

表5にトドマツ (*Abies sachalinensis*) の北海道の3集団 (足寄、富良野、名寄) につい

て調べたクロロプラストDNAのtRNA遺伝子スペーサー領域の塩基置換数を示す。

表5. トドマツの集団内および集団間の平均塩基置換数 (Kinosita et al., 1995)

	足 寄	富良野	名 寄
足寄	0.0267		
富良野	0.0172	0.0102	
名寄	0.0213	0.0131	0.0122

各集団2個体のサンプルについてtrnLとtrnF間のスペーサー、413bpの塩基配列を決定した。

式18から集団間の純塩基置換数は足寄と富良野の間で-0.0013、足寄と名寄の間で0.0019、富良野と名寄の間で0.0019となる。これらの値は0からは有意に違わず、集団間の分化がほとんど起こっていないことを示している。

## 10. クロロプラスト、ミトコンドリアおよび核ゲノムの遺伝的変異

遺伝的変異の対象となる遺伝子マーカーとして、核ゲノムのDNAのほかに、葉緑体 (クロロプラスト) DNA (cpDNA) やミトコンドリアDNA (mtDNA) などのオルガネラDNAも用いられる。ゼニゴケ、タバコ、クロマツなどでクロロプラストDNAの全塩基配列が決定されているが、その全長は120~180kbp程度である。一方、植物のミトコンドリアゲノムは動物や菌類などと比べて一般に大型で、全長200~2400kbpである。高等植物では一つのミトコンドリアの中に様々な大きさの環状DNA分子が存在し、分散型のゲノム構造になっている。高等植物の核のゲノムサイズは $10^9 \sim 10^{11}$  bpと推定されており、ヒトやその他のほ乳類のゲノムサイズ ( $3 \times 10^9$  bp) より大きい。遺伝子マーカーとして、クロロプラストではrbcLやmatK遺伝子が用いられる。またミトコンドリアではnad1やnad4遺伝子などが用いられる。これらは非常によく保存

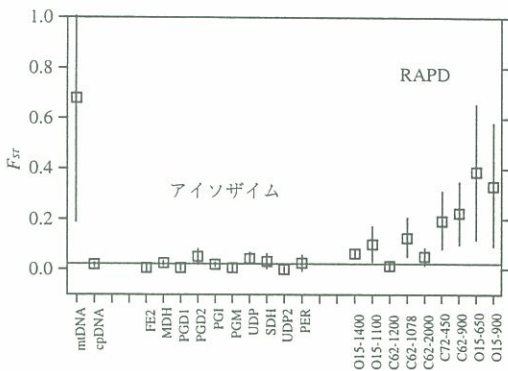


図3. 各遺伝子座での  $F_{ST}$  の推定値

垂直の直線は95%信頼限界を示す。水平の直線はmtDNAおよびcpDNAの分化から推定された核の中立遺伝子座の  $F_{ST}$  を示す (Latta and Mitton, 1997)。

された遺伝子であるので、属や科の間の関係を調べるのに適している。同じ科に属する種の間関係を調べるためにはクロロプラストのtRNA遺伝子のイントロンやスペーサーなどの非コード領域が用いられる。核遺伝子として用いられるのはgapC遺伝子などであるが、エキソンとイントロンで異なる進化速度を持つので、これらの違いを利用して、適応進化的な、より詳しい解析が可能である。核ゲノムとオルガネラゲノムでは異なる遺伝様式を持つために、集団の遺伝的構造がそれぞれ異なる。LattaとMitton (1997) はコロラド州、デンバー近郊のロッキーマツ (*Pinus flexilis*) の7集団について、ミトコンドリアおよびクロロプラストのRFLP解析、およびアイソザイムとRAPD解析を行って、各マーカーごとの固定指数を比較した (図3)。

ミトコンドリアでは  $F_{ST} = 0.679$  であり、クロロプラストでは  $F_{ST} = 0.013$  となり、ミトコンドリアで有意に大きい値が得られた。針葉樹ではミトコンドリアは母性遺伝をし、クロロプラストは父性遺伝をすることが知られている。ミトコンドリアの  $F_{ST}$  が有意に大きいのは、ミトコンドリア遺伝子の移動が種子を介

して行われるのに対し、クロロプラストでは種子と花粉を介して行われるので、より大きな移住率を持つからだと考えられる。中立遺伝子に関して島状の分集団構造を持つ島モデルを考え、遺伝子の移住率を  $m$ 、突然変異率を  $\mu$ 、集団の有効な大きさを  $N_e$  とすると、二倍体および、半数体の集団の固定指数はそれぞれ以下のように示される (Wright, 1951)。

$$F_{ST} = \frac{1}{4N_e(m+\mu)+1} \dots\dots\dots (19)$$

$$F_{ST} = \frac{1}{2N_e(m+\mu)+1} \dots\dots\dots (20)$$

$\mu$  は  $m$  に比して非常に小さいので無視すると、固定指数は集団のサイズと移住率の積によって決まることがわかる。式20からミトコンドリアおよびクロロプラストの  $N_e m$  はそれぞれ、0.26と38になり、クロロプラストの移住率が非常に高いことがわかる。Ennos (1994) は両親性の遺伝子座の固定指数 ( $F_{ST(b)}$ ) と、父性 ( $F_{ST(p)}$ ) および母性 ( $F_{ST(m)}$ ) の遺伝子座の固定指数との間に、次の関係が成り立つことを示した。

$$\left(\frac{1}{F_{ST(b)}} - 1\right) = \left(\frac{1}{F_{ST(m)}} - 1\right) \left(\frac{1}{F_{ST(p)}} - 1\right) \dots (21)$$

ここで、上記の値を代入して、 $F_{ST(b)} = 0.013$  (95%信頼限界, 0.006~0.020) と推定される。アイソザイムの  $F_{ST}$  は0.001から0.0048までの値をとり、中央値は0.016になった。この値は上記の推定値と有意に変わらない。一方RAPDの  $F_{ST}$  は0.1から0.4までの値をとり、いくつかの  $F_{ST}$  は中立遺伝子の推定値より有意に大きくなり、アイソザイムの結果と大きく異なることになった。アイソザイムマーカーとRAPDマーカーのほとんどは核ゲノムに存在するので、これらが異なる伝達様式をとることは考えられない。アイソザイム

の  $F_{ST}$  の分布は分集団の遺伝的変異が移住と遺伝的浮動との間で平衡に達していると仮定すればよく説明できる。RAPD マーカーで見られた  $F_{ST}$  の大きな値は、このマーカーに何らかの自然選択が働いていることを示しているのかもしれない。前節で示したトドマツの集団に分化が見られなかったのは、クロロプラストの遺伝子をマーカーを用いたためであろう。

## 11. おわりに

核とオルガネラ、および中立マーカーと適応的マーカーで集団の遺伝的構造が異なる様相を持っていることを見てきた。このことは森林の生態系の保全のためにどの程度の大きさの集団を維持したらよいのかという問題に対して、答えは一律ではないことを示唆している。生態系の多様性に遺伝的変異がどのように対応しているのか、より端的な実験系の開発が望まれる。このためには適応的な変異の探索や、環境変動に応答する遺伝子の調節領域の変異を調べることが必要になると思われる。

## 参考文献

- 1) Fisher, R. A., Corbet, A. S. and Williams, C. B., 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *J. Anim. Ecol.* 12 : 42 - 58.
- 2) Food and Agriculture Organization (FAO), 1997. *State of the World's Forests* (FAO, United Nations, Rome, Italy.)
- 3) Harada, K., Kinoshita, A., Ab Shukor, N. A., Tachida, H. and Yamazaki, T., 1994. Genetic variation estimated in three *Shorea* species by the RAPD analysis. *Jpn. J. Genet.* 69 : 713 - 718.
- 4) Kinoshita, A., Harada, K. and Yamazaki, T., 1995. A study of phylogenetic relationship and diversity within species of Japanese conifer species at the molecular level. *Jpn. J. Genet.* 70 : 722.
- 5) Latta, R. G. and Mitton, J. B., 1997. A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* 146 : 1153 - 1163.
- 6) Li, C. C. and Horvitz, D. G., 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Amer. J. Hum. Genet.* 5 : 107 - 117.
- 7) Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70 : 3321 - 3323.
- 8) Nei, M., 1986. Definition and estimation of fixation indices. *Evolution* 40 : 643 - 645.
- 9) Noble, I. R. and Dirzo, R., 1997. Forests as human dominated ecosystems. *Science* 277 : 522 - 525.
- 10) Selander, R. K. 1976. Genic variation in natural populations. In Ayala, F. J. ed. *Molecular Evolution*, 21 - 45pp. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- 11) Terauchi, R., 1994. A polymorphic microsatellite marker from the tropical tree *Dryobalanops lanceolata*

- (Dipterocarpaceae). Jpn. J. Genet. 65 : 567 - 576.
- 12) Tsumura, Y., Kawahara, T., Wickneswari, R. and Yoshimura, K., 1996. Molecular phylogeny of dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR - amplified chloroplast genes. Theor. Appl. Genet. 93 : 22 - 29.
- 13) Wilson, E. O. and Peters, F. M., 1988. *Biodiversity*. National Academic Press.
- 14) Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. Ann. Eugen. 15 : 323 - 354.
- 15) Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F - statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19 : 395 - 420.
- 16) 伊東秀三, 1977. 「群落の組成と構造」 332pp, 朝倉書店, 東京.
- 17) 宇沢弘文, 1955. 岩波新書「地球温暖化を考える」127pp, 岩波書店, 東京.
- 18) 山倉拓夫, 神崎護, 大久保達弘, 伊東明, 萩野和彦, Sylvester Tan, Lee Hua Seng, James LaFrankie, Peter Shaw Ashton, 1996. 大面積調査区における種の多様性の階層性. 第6回日本熱帯生態学会講演要旨35.
- 19) 大庭喜八郎, 1996. コナラ属7樹種の遺伝資源の in situ 保存に関する分子遺伝・生態学的研究. 平成7年度科学研究費補助金成果報告書.