

蔵王山系馬ノ神岳に生存するカラマツのDNA分類学的解析

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者名	白石,進 磯田,圭哉 渡辺,敦史 河崎,久男
発行元	日本林學會
巻/号	78巻2号
掲載ページ	p. 175-182
発行年月	1996年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



論 文

蔵王山系馬ノ神岳に生存するカラマツの
DNA 分類学的解析*1

白石 進*2・磯田圭哉*2・渡辺敦史*2・河崎久男*3,4

白石 進・磯田圭哉・渡辺敦史・河崎久男：蔵王山系馬ノ神岳に生存するカラマツのDNA分類学的解析 日林誌 78: 175~182, 1996 カラマツ(ニホンカラマツ)の天然分布の北限は、福島県蔵王山系馬ノ神岳とされている。馬ノ神岳のカラマツは、外部形態的にはグイマツに類似しており、近年、ニホンカラマツとして分類することにに対し疑問が呈されてきた。本研究では、DNA分類・系統学的な観点から、馬ノ神岳のカラマツの分類上の位置付けと遺伝的多様性の評価を試みた。馬ノ神岳のカラマツと分布中心地域のニホンカラマツ、グイマツ、チョウセンカラマツの葉緑体DNA(*rbcL*遺伝子)の塩基配列を比較した結果、馬ノ神岳のカラマツはニホンカラマツと完全に一致し、進化系統的にグイマツよりもニホンカラマツに近いことが明らかとなった。また、RAPD分析による核ゲノム組成の比較においても、同様の結果が得られた。しかし、馬ノ神岳のカラマツとニホンカラマツの核ゲノム組成には大きな差異が認められた。馬ノ神岳のカラマツは、ニホンカラマツとの遺伝的分化がかなり進んでおり、形態的にも大きく異なることから、ニホンカラマツの変種として分類するのが妥当である。

キーワード：遺伝子多様性、カラマツ、RAPD、*rbcL*遺伝子、RFLP

SHIRAIISHI, S., ISODA, K., WATANABE, A., and KAWASAKI, H.: DNA systematical study on the *Larix* relict at Mt. Manokami, the Zao Mountains. J. Jpn. For. Soc. 78: 175~182, 1996 Mt. Manokami, the Zao Mountains has been defined as the northernmost natural distribution of Japanese larch (*Larix kaempferi*). The larch of Mt. Manokami is similar to Kurile larch (*L. gmelinii* var. *japonica*) in morphological and physiological characteristics rather than Japanese larch. This made quite a few researchers doubtful whether the larch was classified as Japanese larch recently. In this paper, DNA systematical study was carried out in order to reveal the phylogenetical relationship of this larch and to estimate its genetic diversity. The chloroplast genome and nuclear genome of Manokami larch were compared with Japanese larch in the Central Japan, Kurile larch and Korean larch (*L. gmelinii* var. *olgensis*). The *rbcL* gene sequence of Manokami larch was completely the same as Japanese larch, but it was different from the sequences of Kurile larch and Korean larch. This result made it clear that Manokami larch was closely related to Japanese larch phylogenetically. RAPD analysis of nuclear genome supported this result. The nuclear genome compositions between Manokami larch and Japanese larch, however, were different, and genetic differentiation was recognized. The genetic differentiation and morphological difference between them suggested that Manokami larch should be classified as a variety of *L. kaempferi*. Manokami larch that is small population size was poor of genetic diversity as a result of bottle neck effect.

Key words: gene diversity, *Larix*, RAPD, *rbcL* gene, RFLP

I. はじめに

カラマツ属(genus *Larix*)植物は北半球に広く分布しており、現在2節10~12種程度に分類されている(1, 4, 5, 12)。このうち、わが国には、カラマツ(ニホンカラマツ; *L. kaempferi* (LAMB.) CARR.)が中部山岳地域を中心として分布しており、その北限は宮城県蔵王山系馬ノ神岳(北緯38°05')とされている(6)。

1932年、蔵王山系の馬ノ神岳山頂付近(標高1,580m)に30個体の生存木が発見された(10)。その後の調査で、その個体数の減少が報告されており、現在では、わずかに12個体が生存するのみとなっている。この馬ノ神岳に生存するカラマツ(以下、馬ノ神系カラマツとする)は、カラマツの天然分布の中心地域から遠く(約300km)離れ、隔離分布している。馬ノ神系カラマツは、球果の形状、種鱗数、開葉期、葉色、葉の着生密度、当年枝の微毛の有無等

において、天然分布の中心地域のカラマツ(以下、ニホンカラマツとする)とは異なり、グイマツ(*L. gmelinii* (RUPR.) RUPR. var. *japonica* (REGEL) PILGER)に近い特性をもつとされている(7, 15, 19)。このため、馬ノ神系カラマツはグイマツの遺存集団ではないかとする研究者も多い(7, 8)。また、球果・種鱗の形状から、馬ノ神系カラマツは中国東北部の長白山産のカラマツ(*L. gmelinii* (RUPR.) RUPR. var. *olgensis* (HENRY) OSTENFELD et S. LARSEN)との共通性が高いとする報告もある(28)。このように、近年、馬ノ神系カラマツに対する分類学上の位置付けを再検討する必要性が指摘されている。

本研究では、1)DNA分類・系統学的な立場から、馬ノ神系カラマツの葉緑体DNAおよび核DNA情報を解析し、そのゲノム組成を、ニホンカラマツ、グイマツ、チョウセンカラマツ(*L. gmelinii* var. *olgensis*)と比較することにより、馬ノ神系カラマツの進化系統上の位置付けを試

*1 本研究の一部は第105回日本林学会大会および第1回林木遺伝育種セミナーで口頭発表した。

*2 九州大学農学部 Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-81

*3 林木育種センター東北育種場 Tohoku Breed. Stat. Nat. For. Tree Breed. Ctr., Iwate 020-01

*4 現勤務先: 林木育種センター Nat. For. Tree Breed. Ctr., Ibaraki 319-13

みた。また、2) きわめて小集団化している馬ノ神系カラマツの遺伝的多様性の評価もあわせて行った。

II. 材料と方法

1. 供試材料

供試個体を表-1, 図-1 に示した。馬ノ神系カラマツは、1976年に東北林木育種場(現:林木育種センター東北育種場)が現地外保存を目的として当時の全生存個体からつぎ

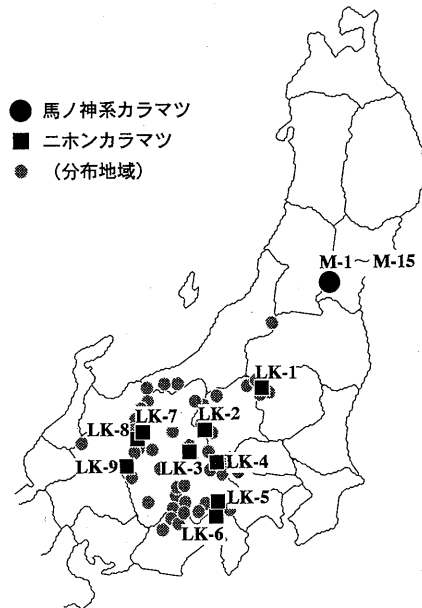


図-1. 馬ノ神系カラマツおよびニホンカラマツの供試個体(オルテットもしくは採種母樹)の生育地

Location of ortets/mother trees of Manokami larch and *L. kaempferi* used in this study.

図中の分布地域は倉田(11)によった。

表-1. 供試材料一覧

Clones/individuals used in the study.

馬ノ神系カラマツ (Manokami larch)	ニホンカラマツ (<i>L. kaempferi</i>)	グイマツ (<i>L. gmelinii</i> var. <i>japonica</i>)	チョウセンカラマツ (<i>L. gmelinii</i> var. <i>olgensis</i>)
M-1 馬ノ神 No. 1 ^{*1}	LK-1 日光 1 ^{*3}	LJ-1 豊岡 111 ^{*4}	LO-1 No. 2 ^{*3}
M-2 馬ノ神 No. 2 ^{*1}	LK-2 浅間 1 ^{*3}	LJ-2 豊岡 121 ^{*4}	LO-2 No. 3 ^{*3}
M-3 馬ノ神 No. 3 ^{*1}	LK-3 白田 110 ^{*2}	LJ-3 留辺蕊 5 ^{*4}	LO-3 No. 5 ^{*3}
M-4 馬ノ神 No. 5 ^{*1}	LK-4 塩山 104 ^{*2}		
M-5 馬ノ神 No. 6 ^{*1}	LK-5 吉田 103 ^{*2}		
M-6 馬ノ神 No. 7 ^{*1}	LK-6 静岡 112 ^{*2}		
M-7 馬ノ神 No. 8 ^{*1}	LK-7 上高地 1 ^{*3}		
M-8 馬ノ神 No. 9 ^{*1}	LK-8 松本 102 ^{*2}		
M-9 馬ノ神 No. 10 ^{*1}	LK-9 御岳 1 ^{*3}		
M-10 馬ノ神 No. 11 ^{*1}			
M-11 馬ノ神 No. 12 ^{*1}			
M-12 馬ノ神 No. 13 ^{*1}			
M-13 馬ノ神 No. 14 ^{*1}			
M-14 馬ノ神 No. 15 ^{*1}			
M-15 馬ノ神 No. 16 ^{*1}			

供試個体の保存機関: ^{*1} 林野庁林木育種センター東北育種場; ^{*2} 林野庁林木育種センター長野事業場; ^{*3} 信州大学農学部; ^{*4} 北海道立林業試験場。

穂を採取し、つぎ木によって造成したカラマツ遺伝子保存クローン集植所に植栽されている15クローン(M-1~15)(16)を使用した。また、ニホンカラマツとしては、林野庁の精英樹選抜育種事業によって各地のカラマツ天然林から選抜された5精英樹クローン(LK-3, LK-4, LK-5, LK-6, LK-8)と、信州大学農学部手良演習林のニホンカラマツ産地試験地内の4個体(LK-1, LK-2, LK-7, LK-9)を用いた。グイマツは、北海道立林業試験場のクローン集植所の3クローン(LJ-1, LJ-2, LJ-3)を供試した。このうち、LJ-1, LJ-2はチシマ系、LJ-3はカラフト系である。チョウセンカラマツは、信州大学農学部のカラマツ試験地の3個体(LO-1, LO-2, LO-3)を使用した。

2. 全DNAの単離・精製

上記30個体から針葉を採取し、DNA分析に供するまで-20°Cで冷凍保存した。針葉からの全DNAの単離およびDNAの精製は白石・渡辺(21)に従った。

3. *rbcL* 遺伝子の塩基配列分析およびRFLP分析

得られた全DNAを鋳型とし、表-2のプライマー組合せA(21)を用いてPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を行い、*rbcL* 遺伝子の一部(1,309 bps)を増幅した。PCR反応液の組成、PCR条件は、白石・渡辺(21)に準じた。

塩基配列分析は新たに設計・合成した3対のプライマー(表-2のSa, Sb, Sc)を用い、前述のPCR産物を鋳型として、nested PCR(9)を行い、*rbcL* 遺伝子(1,309 bps)を互いにオーバーラップする3領域に分けて鋳型DNAを調整し、サンガー法(20)により塩基配列を決定した。PCR反応液組成、PCR条件および塩基配列分析は、白石・渡辺(21)に従った。

RFLP(制限酵素断片長多型)分析(3, 24)は、PCR産物(1,309 bps)を鋳型として、新たに設計・合成したプライマー組合せB(表-2)を用いて、nested PCRを行い調整した。PCR産物(384 bps)は精製の後、*Tth*HB 8 Iを用い

表-2. *rbcL* 遺伝子の PCR に使用したプライマーの塩基配列
Primers used in PCR of *rbcL* and their respective oligonucleotide sequences.

プライマー組合せ Combinations	プライマー名 Primer	塩基配列 oligonucleotide sequences
A	PrL 1	5'-GTCTGGATTCAAAGCTGGTGT-3'
	PrL 2	5'-TCACAAGCAGCAGCTAGTTC-3'
B	PrL 5	5'-ATGGTATCCAAGTAGAAAGAGA-3'
	PrL 6	5'-CGGTGGATGTGAAGAAGTAG-3'
Sa	SrLa 1	5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTGTCTGGATTCAAAGCTGGTGT-3'
	SrLa 2	5'-CAGGAAAACAGCTATGACCTGATAGTACATCCCAATAAAGG-3'
Sb	SrLb 1	5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTATGGTATCCAAGTAGAAAGAGA-3'
	SrLb 2	5'-CAGGAAAACAGCTATGACCAATGCTTTAGCCAGTACACG-3'
Sc	SrLc 1	5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTTTGACAGACAGAGGAATCATGG-3'
	SrLc 2	5'-CAGGAAAACAGCTATGACCTCACAAAGCAGCAGCTAGTTC-3'

表-3. RAPD 分析に使用したプライマーと多型的遺伝子座数
Primers utilized in RAPD analysis and number of polymorphic loci for each primer.

RAPD 分析-1 Experience 1				RAPD 分析-2 Experience 2					
A-08	(3)	N-12	(2)	A-09	(2)	C-14	(1)	O-04	(2)
A-09	(2)	O-04	(2)	A-12	(1)	D-12	(3)	O-16	(3)
B-01	(4)	O-16	(2)	A-17	(1)	D-15	(2)	O-19	(3)
B-04	(2)	P-04	(1)	B-01	(3)	F-15	(2)	P-04	(1)
B-11	(4)	R-11	(4)	B-03	(7)	F-17	(4)	R-11	(2)
B-12	(3)	S-18	(2)	B-04	(2)	F-18	(2)	S-10	(1)
B-13	(4)	T-02	(2)	B-05	(1)	G-01	(3)	S-18	(3)
C-06	(4)	T-14	(1)	B-08	(2)	H-01	(2)	T-02	(1)
F-07	(1)	U-06	(2)	B-11	(2)	H-14	(1)	U-06	(1)
H-01	(2)	W-15	(5)	B-12	(4)	I-04	(1)	W-15	(5)
H-14	(1)	X-04	(3)	B-13	(6)	I-11	(1)	X-04	(3)
K-03	(2)	X-20	(4)	B-14	(3)	J-01	(1)	X-10	(5)
L-09	(1)	FB 5*3	(1)	B-16	(3)	J-04	(2)	X-20	(2)
M-04	(1)			C-03	(2)	K-19	(1)	FB 1*1	(1)
M-09	(9)			C-06	(2)	N-07	(2)	FB 2*2	(2)
N-07	(6)			C-09	(1)	N-12	(2)	FB 5*3	(2)
計 total		29	(80)	計 total		48	(109)		

() 内は多型的遺伝子座数。

Number of polymorphic loci showed in parenthesis.

*1 5'-CCACC GCCAG-3'; *2 5'-CAGTTCTGGC-3'; *3 5'-ACTCGTAGCC-3'.

て RFLP 分析を行った。なお、PCR 産物の精製、制限酵素による処理条件、アガロースゲル電気泳動等はすべて白石・渡辺 (21) に準じて行った。

4. RAPD 分析

精製した全 DNA を鋳型 DNA として RAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析 (25) を行った。分析に使用したプライマーは、表-3 に示すとおりである。A~X のプライマーは Operon Technologies 社の市販品である。また、FB シリーズの 3 種類 (FB 1, FB 2, FB 5) は、新たに設計・合成したプライマーであり、その塩基配列は表-3 の欄外に示すとおりである。

PCR 反応は、反応溶液組成の鋳型 DNA 濃度を 1 ng/μl とし、サーモサイクラーの変性 (93°C, 5 秒)・アニーリング (36°C, 5 秒)・伸長 (72°C, 15 秒) 条件およびサイクル

数 (60 サイクル) を変更した以外は、白石・渡辺 (21) に従った。得られた PCR 産物は、1%アガロースゲルを用いて電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、302 nmUV トランスイルミネーター上で観察した。

5. 遺伝距離の算出

RAPD 分析により得られたデータから、各供試個体間の遺伝的組成の違いの程度を表す遺伝距離を算出した。比較しようとする 2 個体の全多型的遺伝子座におけるバンドの保有データをもとに、Nei and Li (15) の F 値を用い、次式により、遺伝距離 (D) を求めた。

$$D=1-F=1-2n_{xy}/(n_x+n_y)$$

ここで、 n_{xy} は比較する 2 個体 (X,Y) が共有しているバンド数、 n_x は X 個体が保有しているバンド数、 n_y は Y 個体が保有しているバンド数である。

III. 結 果

1. *rbcL* 遺伝子の塩基配列分析および RFLP 分析

1) 馬ノ神系カラマツとニホンカラマツ, グイマツ, チョウセンカラマツの塩基配列

ニホンカラマツ, グイマツ, チョウセンカラマツの3樹種および馬ノ神系カラマツから各1個体 (LK-5, LJ-3, LO-5, M-1) を選び, 葉緑体 DNA 上に存在する *rbcL* 遺伝子の塩基配列をサンガー法により決定した。その配列の一部 (384 bps の領域) を図-2 に示す。3 樹種とも 1,309 bps からなり, 樹種間で DNA 長に違いはなかった。ダフリアカラマツ (*L. gmelinii* (RUPR.) RUPR.) の変種として分類されているグイマツとチョウセンカラマツ (4, 5) は, 全塩基配列が完全に一致した。しかし, この2樹種とニホンカラマツでは, 2カ所 (541番目, 713番目) で塩基置換のあることが明らかとなった。この2カ所の塩基置換は, それぞれ, ピリミジン塩基内, プリン塩基内の転位 (transition) であった。また, 541番目の塩基置換は, アミノ酸置換を伴わない同義置換であったが, 713番目の塩基置換は, イソロイシン (ニホンカラマツ) からバリン (グイマツ, チョウセンカラマツ) への非同義置換であった。

馬ノ神系カラマツの塩基配列は, ニホンカラマツのものと完全に一致し, グイマツ, チョウセンカラマツとは異なった塩基配列を示した。

2) 馬ノ神系カラマツ全個体の RFLP 分析

馬ノ神系カラマツのすべての個体がニホンカラマツ型の *rbcL* 遺伝子を保有しているのかを明らかにするために, 表-1の供試全個体 (30個体) の RFLP 分析を行った。

先に述べた2カ所の塩基置換のうち, 541番目の塩基置換によって, ニホンカラマツとグイマツ・チョウセンカラマツの *Tth*HB 8 I 制限酵素 (認識配列: TCGA) の認識部位 (540~543) に差異が生ずるため, これを利用することにより *rbcL* 遺伝子の塩基配列がニホンカラマツ型か, グイマツ・チョウセンカラマツ型かの判定を容易に行うことが可能である。すなわち, プライマー組合せ B によって増幅される 384 bps の PCR 産物 (図-2 に示した領域) は, グイマツとチョウセンカラマツではこの部位で切断されるため, 2本のバンド (約 110 bps, 約 270 bps) として検出される。一方, ニホンカラマツでは認識部位が存在しないため約 380 bps の1本のバンドとして検出される。

RFLP 分析の結果を図-3 に示した。ニホンカラマツ, グイマツ, チョウセンカラマツのすべての樹種で種内 (もし

430		489
TAAATTGAAC	AAATATGGCC	GTCCTTTATT
GGGATGTACT	ATCAAACCAA	AATTGGGCTC
.....
490		549
ATCGGCTAAG	AACTATGGTA	GAGCAGTTTA
CGAATGTCTC	CGTGGTGGAC	TTGATTTTAC
.....
550		609
CAAGGATGAT	GAGAACGTAA	ATTCCCAACC
ATTCATGCGC	TGGAGAGATC	GTTTTGTCTT
.....
610		669
TTGTGCGGAA	GCACTTTATA	AGGCTCAGGC
TGAGACGGGT	GAAATTAAGG	GACATTACTT
.....
670		729
GAATGCTACT	GCAGGTACAT	GTGAAGAAAT
GATGAAAAGG	GCAATATTTG	CAAGAGAATT
.....
730		789
GGGAGTTTCT	ATCGTTATGC	ATGACTATCT
GACGGGAGGT	TTTACTGCAA	ATACTTCTTT
.....
790		814
GGCTCATTAT	TGCCGAGACA	ACGGC
.....

図-2. 馬ノ神系カラマツとニホンカラマツ, グイマツ, チョウセンカラマツの *rbcL* 遺伝子 (一部分) の塩基配列の比較

A partial *rbcL* sequences of Manokami larch and related larches.

上段: 馬ノ神系カラマツ (Manokami larch), 中段: ニホンカラマツ (*L. kaempferi*), 下段: グイマツ (*L. gmelinii* var. *japonica*), チョウセンカラマツ (*L. gmelinii* var. *olgensis*)。

表-4. 馬ノ神系カラマツとニホンカラマツ, グイマツ間の遺伝距離
Genetic distances among Manokami larch, *L. kaempferi* and *L. gmelinii* var. *japonica*.

A) 馬ノ神系カラマツに対するニホンカラマツおよびグイマツ
Genetic distances of Manokami larch to *L. kaempferi* and *L. gmelinii* var. *japonica*.

	ニホンカラマツ				グイマツ			
	LK-1	LK-4	LK-6	平均	LJ-1	LJ-2	LJ-3	平均
馬ノ神系カラマツ								
M-2	0.29	0.28	0.28	0.285	0.65	0.71	0.73	0.695
M-4	0.23	0.22	0.22	0.224	0.64	0.70	0.72	0.687
M-6	0.31	0.28	0.25	0.281	0.66	0.73	0.79	0.725
M-9	0.28	0.30	0.24	0.273	0.67	0.74	0.79	0.734
平均				0.266				0.710

B) グイマツに対する馬ノ神系カラマツおよびニホンカラマツ
Genetic distances of *L. gmelinii* var. *japonica* to Manokami larch and *L. kaempferi*.

	馬ノ神系カラマツ					ニホンカラマツ			
	M-2	M-4	M-6	M-9	平均	LK-1	LK-4	LK-6	平均
グイマツ									
LJ-1	0.65	0.64	0.66	0.67	0.649	0.67	0.65	0.68	0.667
LJ-2	0.71	0.70	0.73	0.74	0.720	0.73	0.65	0.75	0.708
LJ-3	0.73	0.72	0.79	0.79	0.757	0.68	0.77	0.77	0.739
平均					0.710				0.705

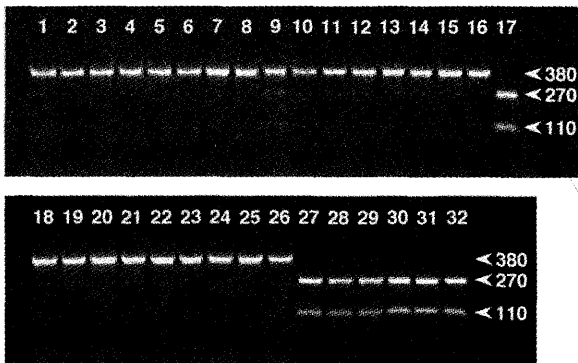


図-3. 馬ノ神系カラマツ, ニホンカラマツ, グイマツ, チョウセンカラマツの RFLP 分析
RFLP analysis with *Tth*HB8I of *rbcL* gene in Manokami larch and related larches.
1, LK-2; 2~16, M-1~15; 17, LJ-3; 18~26, LK-1~9; 27~29, LJ-1~3; 30~32, LO-1~3.

くは変種内) 変異は認められなかった。また, 馬ノ神系カラマツは, 全 15 個体がニホンカラマツと同一のバンドパターンを示し, ニホンカラマツ型の *rbcL* 遺伝子を保有していた。

2. 核ゲノムの RAPD 分析

1) 馬ノ神系カラマツ, ニホンカラマツ, グイマツ, チョウセンカラマツの RAPD 分析

馬ノ神系カラマツ(4 個体: M-2, M-4, M-6, M-9)と, ニホンカラマツ(3 個体: LK-1, LK-4, LK-6), グイマツ(3 個体: LJ-1, LJ-2, LJ-3), チョウセンカラマツ(3 個体: LO-1, LO-2, LO-3)を用いて, ゲノム組成の樹種間の比較を行った。

RAPD 分析に用いたプライマーは, 表-3 の RAPD 分析-1 に示した 29 種類である。これらのプライマーによる分析の結果, 80 個の推定遺伝子座(以下, 遺伝子座)で多型が認められた。多型の遺伝子座におけるバンド保有データから算出した各供試個体間の遺伝距離の一部を表-4 に示した。

馬ノ神系カラマツとニホンカラマツ間の遺伝距離は, 0.22~0.31 の範囲にあり, 平均 0.266 であった。一方, 馬ノ神系カラマツとグイマツとの遺伝距離は, 0.64~0.79(平均: 0.710)となり, 馬ノ神系カラマツは, グイマツよりも, ニホンカラマツとの間で小さな遺伝距離を示した。また, グイマツとニホンカラマツの遺伝距離は, 0.65~0.77 で平均値は 0.705 となり, 馬ノ神系カラマツとグイマツ間の遺伝距離とほぼ同一の値を示した。

全供試個体間の遺伝距離をもとに UPGMA 法(22)によりクラスター分析した結果を図-4 に示した。馬ノ神系カラマツ, ニホンカラマツ, グイマツ, チョウセンカラマツの各供試個体はそれぞれ樹種ごとにクラスターを形成した。また, グイマツはチョウセンカラマツと同じ系統に位置していた。一方, 馬ノ神系カラマツは, ニホンカラマツの系統に含まれた。

2) 馬ノ神系カラマツ全個体とニホンカラマツの RAPD 分析

ニホンカラマツは, これまでいくつかの産地系統に分類されている(2)。ニホンカラマツがもつ遺伝変異をより広く捉えるために, 分析個体数を増やして RAPD 分析した。ここでニホンカラマツとして供した個体は, 日光山系(LK-1), 浅間山系(LK-2), ハヶ岳系(LK-3), 川上・東山梨(秩父)系(LK-4), 富士山系(LK-5, LK-6), 北アルプ

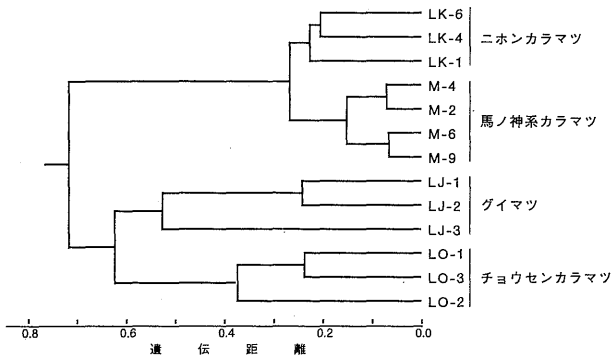


図-4. 馬ノ神系カラマツおよびニホンカラマツ, グイマツ, チョウセンカラマツのクラスター分析 UPGMA dendrogram based on genetic distances among Manokami larch and related larches.

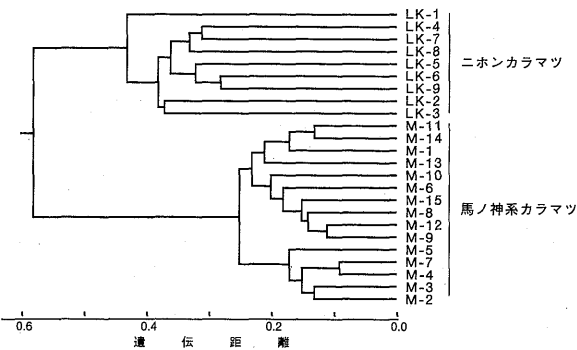


図-5. 馬ノ神系カラマツ全個体と産地系統を異にするニホンカラマツのクラスター分析 UPGMA dendrogram based on genetic distances among Manokami larches and *L. kaempferi*.

ス系 (LK-7, LK-8), 御岳系 (LK-9) である (図-1)。一方, 馬ノ神系カラマツは, 東北林木育種場と青森営林局が共同調査を行った 1976 年時点での全生存木である。

表-3 の RAPD 分析-2 に示した 48 プライマーを用いて分析した結果, 109 個の多型的遺伝子座が明らかとなった。供試した 24 個体間の遺伝距離を算出し, UPGMA 法でクラスター分析を行った結果を図-5 に示した。馬ノ神系カラマツの 15 個体とニホンカラマツの 9 個体は完全に別のクラスターを形成した。

109 個の多型的遺伝子座のうち, 馬ノ神系カラマツとニホンカラマツで異なる遺伝子が固定された遺伝子座について調査した結果, 7 遺伝子座で観察された。図-6 にその一部を示した。C-14 プライマーで検出される 620 bps のバンド (図中*印で示した) は, 馬ノ神系カラマツのすべての個体で出現しているが, ニホンカラマツでは全く現れていない。逆に, N-07 プライマーの 690 bps のバンド (図中*印で示した) はすべてのニホンカラマツで検出されるが, 馬ノ神系カラマツでは出現していない。

また, 馬ノ神系カラマツもしくはニホンカラマツで固定が認められる遺伝子座 (単型的遺伝子座) 数を表-5 に示した。馬ノ神系カラマツで固定がみられる遺伝子座数は 55

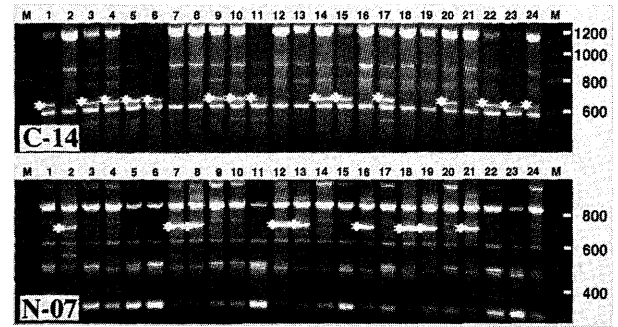


図-6. 馬ノ神系カラマツとニホンカラマツに特異的な遺伝子座

Specific RAPD locus in Manokami larch and *L. kaempferi*.

1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 20, 22, 23, 24 : 馬ノ神系カラマツ (Manokami larch). 2, 7, 8, 12, 13, 16, 18, 19, 21 : ニホンカラマツ (*L. kaempferi*). M : サイズマーカー (DNA size marker).

表-5. 馬ノ神系カラマツとニホンカラマツの遺伝的多様性の比較

Comparison of genetic diversity between Manokami larch and *L. kaempferi*.

	固定遺伝子座数 No. of fixed loci	平均遺伝距離 Ave. of genetic distances
馬ノ神系カラマツ	55	0.218
ニホンカラマツ	24	0.377

個あり, ニホンカラマツの固定遺伝子座数は 24 個であった。

IV. 考 察

馬ノ神岳のカラマツは, 1932 年に発見され, その後, 木村 (10), 村井・棟方 (13) によって天然分布の北限とされて以来, 馬ノ神岳をカラマツの北限とすることは定説となっている (6, 11, 17, 18)。しかし, 近年, この馬ノ神岳のカラマツは, 中部山岳地域のカラマツと同一種として分類することに疑問が呈されている (7, 8)。

長坂ら (14) は, 林木育種センター北海道育種場に現地外保存されている馬ノ神系カラマツ 6 クローン, ニホンカラマツ 39 クローン, グイマツ 16 クローンの球果長と種鱗数の調査を行い, 馬ノ神系カラマツの球果長はニホンカラマツよりも短く, グイマツに近いこと, また, 種鱗数はニホンカラマツの約半数であり, グイマツの種鱗数の範囲内にあることを報告している。また, 織田 (19), 長坂ら (14) によって, 開葉期の調査が行われ, 馬ノ神系カラマツは, グイマツ同様に開葉が早く始まり, ニホンカラマツとは明白な差異のあることが示された。さらに, 馬ノ神系カラマツの葉色は濃緑色であること, 当年枝が黒ずみ, 微毛が認められることなどからもグイマツとの共通点が多いとされている (7)。一方, 矢野 (28) は, 馬ノ神岳の現地において採取した球果標本を用いて, 球果の形状, 種鱗の形状について詳細な調査を行い, 本州中部のカラマツ (ニホンカ

ラマツ)とは異なった分類群である可能性を指摘した。さらに、極東地域に分布する樹種と比較し、中国東北部の長白山産のマンシュウカラマツの球果標本に近いことを報告している。このように、馬ノ神系カラマツは、形態的にニホンカラマツとは大きく異なっており、ウルム氷期最盛期(20,000 years BP)に北日本の湿原を中心に分布していたグイマツが、その後沖積世に入り日本列島の温暖化に伴い、北方に後退(27)して行く過程で取り残された遺存集団ではないかと一部で考えられている。

しかし、葉緑体 DNA 上に存在する *rbcL* 遺伝子の塩基配列において、馬ノ神系カラマツは、ニホンカラマツと同一の配列を示し、グイマツ、チョウセンカラマツとは2カ所で塩基置換のあることが明らかとなった(図-2, 3)。このことは、馬ノ神系カラマツは、グイマツやチョウセンカラマツの系統ではなく、ニホンカラマツに近いことを示している。グイマツとチョウセンカラマツの塩基配列は完全に一致しており、両樹種の母種であるダフリアカラマツの塩基配列(白石・渡辺・那須, 未発表)と同じであった。この配列は、ダフリ系カラマツにおいて普遍的である可能性があり、マンシュウカラマツもグイマツ、チョウセンカラマツと同一の配列をもっているものと考えられ、馬ノ神系カラマツがマンシュウカラマツの系統である可能性はきわめて低い。なお、極東地域のカラマツの分類は、ニホンカラマツを除いて、きわめて困難であるとされており(26)、チョウセンカラマツとマンシュウカラマツをともに *L. gmelinii* var. *olgensis* として分類している場合も多い(4, 5)。

また、このような結果は、馬ノ神系カラマツ、ニホンカラマツ、グイマツ、チョウセンカラマツの RAPD 分析において得られた核ゲノム組成からも明らかである。表-4(A)に示したように、馬ノ神系カラマツとニホンカラマツ間の平均遺伝距離は0.266であるのに対し、馬ノ神系カラマツとグイマツ間の平均遺伝距離は0.710ときわめて大きな値を示した。また、供試個体間の遺伝距離を用いたクラスター分析(UPGMA法)(図-4)においても、馬ノ神系カラマツはニホンカラマツに近縁であり、グイマツ、チョウセンカラマツの系統でないことが明らかとなった。このように、遺伝様式を異にする核ゲノムと葉緑体ゲノムの両方において、馬ノ神系カラマツはグイマツをはじめとするダフリ系カラマツの系統ではなく、ニホンカラマツの系統に属することが明確となった。

最近、馬ノ神岳に近い宮城県仙台市富沢遺跡(17,480~21,920 years BP)から産出した大量のグイマツ遺体の中に、馬ノ神岳のカラマツに近似した球果が含まれており、グイマツと馬ノ神系カラマツの祖先集団が混生していた可能性が指摘されている(23, 29)。このため、両樹種が種間交雑を行い、遺伝子流動が起こっていたことも考えられる。表-4(B)に示したグイマツと馬ノ神系カラマツ、ニホンカラマツ間との平均遺伝距離は、それぞれ、0.710, 0.705であり、非常に近い値である。もし、馬ノ神系カラマツに

グイマツからの遺伝子流動があった場合には、グイマツと馬ノ神系カラマツ間の遺伝距離は、グイマツとニホンカラマツ間よりも小さくなる。さらに、馬ノ神系カラマツ15個体の葉緑体ゲノム分析において、グイマツ型のものが全く観察されなかったことから、馬ノ神系カラマツにグイマツからの遺伝子流動があったとは考えにくい。

以上の結果、馬ノ神系カラマツは、ニホンカラマツの系統に属することが明らかとなった。そこで、両者間の遺伝的差異の程度を評価した。馬ノ神系カラマツとして、1976年時点での全生存木を、また、ニホンカラマツとして、7産地系統からなる9個体を用い、RAPD法により核ゲノム組成を比較した。馬ノ神系カラマツ内およびニホンカラマツ内の供試個体間の遺伝距離の平均値は、それぞれ0.218, 0.377であった(表-5)。これに対し、馬ノ神系カラマツとニホンカラマツ間の平均遺伝距離は0.578と大きな値を示し、両者の核ゲノム組成には大きな差異があり、遺伝的分化がかなり進んでいることが示された。このことは、クラスター分析の結果(図-5)からも明白である。また、今回調査した全遺伝子座の6.5%に当る7遺伝子座において、馬ノ神系カラマツとニホンカラマツで異なる遺伝子が固定されており、この点からも両者間での遺伝的分化が強く示唆された。

このように、馬ノ神系カラマツは、進化系統上は、ニホンカラマツの系統に属するが、両者間では遺伝的分化がかなり進んでいることが明らかとなった。外部形態的にもニホンカラマツとは大きく異なる馬ノ神系カラマツは、ニホンカラマツの変種として分類されるのが妥当であると思われる。

馬ノ神岳のカラマツは、発見当時(1932年)30個体、1976年の調査で15個体(16)、現在ではわずかに12個体と急速に減少している。このような集団サイズがきわめて小さな集団での遺伝的多様性について、固定(単型的)遺伝子座数と平均遺伝距離をもとに検討した(表-5)。馬ノ神系カラマツとニホンカラマツにおける固定遺伝子座数を調べた結果、馬ノ神系カラマツでは固定遺伝子座数は55個あり、調査した全遺伝子座の半数に及んでいることが判明した。この値はニホンカラマツの24個と比較して、2.3倍ときわめて高い値である。また、馬ノ神系カラマツの供試個体間の遺伝距離の平均値は0.218であり、ニホンカラマツの0.377に比べてかなり小さい。このことは、馬ノ神岳の生存個体間の核ゲノム組成が非常に類似しており、遺伝的多様性が小さいことを意味している。今回用いた個体数は、馬ノ神系カラマツが15個体であったのに対し、ニホンカラマツでは9個体と少なく、ニホンカラマツの遺伝的多様性は過小に評価されており、馬ノ神系カラマツとニホンカラマツの遺伝的多様性の差はさらに大きいものと思われる。このように馬ノ神系カラマツが遺伝的多様性に乏しいのは、きわめて強いBottle neck effectを受けてきた結果を反映しているものと思われる。

本研究で供試した材料の一部は北海道立林業試験場の黒丸 亮育種科長, 林木育種センターの栄花 茂育種部長, 信州大学農学部の川崎圭造助教授から提供していただきました。ここに厚く謝意を表します。本研究は平成4~6年度文部省科学研究費(No.04304018)の助成を受けて行われたものである。

引用文献

- (1) ABAIMOV, A. P. (1995) The larches of Siberian permafrost zone and their species peculiarities in progressive successions. *In Proc. Seminar Larch Genet. Breed.* 210 pp, Remningstorp and Siljansfors, Sweden, 11-15.
- (2) 浅田節夫 (1981) 天然林の概況. (カラマツ造林学. 浅田節夫・佐藤大七郎編著, 289 pp, 農林出版, 東京). 9-17.
- (3) ATCHISON, B. A., WHITEFELD, P. R., and BOTTOMLEY, W. (1976) Comparison of chloroplast DNAs by specific fragmentation with *EcoRI* endonuclease. *Mol. Gen. Genet.* 148: 263-269.
- (4) FARJON, A. (1990) Pinaceae. 330 pp, Koeltz Scientific Books, Königstein.
- (5) 濱谷稔夫 (1995) カラマツの分類と特性. 林木の育種 175: 4-8.
- (6) 林 弥栄 (1965) 有用樹木図説 (林木編). 472 pp, 誠文堂新光社, 東京.
- (7) 伊藤 敏 (1994) 蔵王・馬ノ神岳に幻のカラマツを見る. 山林 1326: 41-52.
- (8) 伊藤 敏 (1994) 幻のカラマツを見る—遺伝育種セミナーに参加して—. 林木の育種 173: 26-27.
- (9) JACKSON, D. P., HAYDEN, J. D., and QUIRKE, P. (1991) Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. *In PCR, A Practical Approach.* McPHERSON, M. J., QUIRKE, P., and TAYLOR, G. R. (eds.), 253 pp, Oxford University Press, New York, 29-50.
- (10) 木村武松 (1935) 当局管内に於ける針葉樹天然分布に就て. 青森林友 237: 12-20.
- (11) 倉田 悟 (1964) 原色日本林業樹木図鑑 (第1巻). 331 pp, 地球社, 東京.
- (12) MILYUTIN, L. I. (1995) Provenance trial of larch in Siberia. *In Proc. Seminar Larch Gene. Breed.* 210 pp, Remningstorp and Siljansfors, Sweden, 5-10.
- (13) 村井三郎・棟方啓爾 (1957) 北限カラマツ林の現状. 第67回日林講: 198-202.
- (14) 長坂寿俊・田中京子・中村和子・松崎智徳・河野耕蔵 (1995) 馬ノ神岳カラマツの球果および開葉期の変異について. 日林北支論 43: 172-174.
- (15) NEI, M. and LI, W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- (16) 野口常介 (1990) 林木遺伝資源の現況 (II) —東北東部地方(1). 林木の育種 157: 31-37.
- (17) 大井次三郎 (1972) 日本植物誌 (顕花篇). 1560 pp, 至文社, 東京.
- (18) 岡村省吾 (1959) 原色日本樹木図鑑. 306 pp, 保育社, 大阪.
- (19) 織田春紀 (1985) 馬ノ神山産カラマツの季節調査. 北海道林木育種場年報—1983—: 7-9.
- (20) SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- (21) 白石 進・渡辺敦史 (1995) *rbcl* 遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. 日林誌 77: 429-436.
- (22) SNEATH, P. H. and SOKAL, R. R. (1973) Numerical taxonomy. 573 pp, W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- (23) 鈴木敬治 (1992) 大型植物化石. (富沢遺跡第30次調査報告書第II分冊. 仙台市教育委員会編, 604 pp, 仙台市教育委員会, 仙台), 244-273.
- (24) VEDEL, F., QUETIER, F., and BAYEN, M. (1976) Specific cleavage of chloroplast DNA from higher plants by *EcoRI* restriction nuclease. *Nature* 263: 440-442.
- (25) WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., and TINGEY, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- (26) 柳沢聰雄 (1970) 極東のカラマツからみたニホンカラマツの形態, 生態上の特性. 北海道の林木育種 12(2): 2-13.
- (27) 柳沢聰雄 (1970) 極東のカラマツからみたニホンカラマツの形態, 生態上の特性—続報. 北海道の林木育種 13(1): 4-10.
- (28) 矢野牧夫 (1994) 日本列島北限「カラマツ」球果の変異とその古植物学的意味. 第四紀研究 33: 95-105.
- (29) 矢野牧夫 (1995) 北限のカラマツとその古植物学的意義. 林木の育種 175: 1-3.

(1996年3月2日受理)