

ゲノムの健全性に基づく小笠原産保護増殖事業 対象種の保全

井鷲 裕司（京都大学）
辻本 大地（京都大学）

要 約

保護増殖事業の対象種となっている小笠原産固有被子植物とアカガシラカラスバトについて、有害変異の蓄積量などのゲノムの特徴について概説した。両者はともに海洋島で長期にわたって小集団として維持されてきた点では共通しているが、ゲノム内の有害変異の蓄積量は異なった特徴を示した。すなわち、ホシツルラン、ムニンノボタン、ヒメカコソウ、コヘラナレン、ムニンツツジでは近縁普通種と比較してより多くの有害変異が蓄積していたのに対して、アカガシラカラスバトではカラスバトより有害変異は少なくなっていた。ゲノム内の有害変異の蓄積量に影響を与える要因や、ゲノム情報を用いた今後の絶滅危惧種の保全策について論じた。

I. はじめに

国内外の絶滅のおそれのある野生生物の種を保存するために、絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律（種の保存法）が施行されている。種の保存法では、個体の繁殖の促進や生息地等の整備等の事業の推進が必要と認められた場合、保護増殖事業計画を策定し、その計画に基づいて絶滅危惧種の保護増殖のための取り組みが行われている。現在、保護増殖事業は75種を対象としているが、そのうち小笠原諸島に生育・生息する生物は40種である。特に貝類では対象種20種のうち20種、植物では対象種16種中12種が小笠原の生物種となっており、小笠原の生物種に対して集約的な保全が行われていることがわかる。

一般に、個体数が著しく減少した絶滅危惧種の保全には、生息地の保護と復元のほかに、集団の遺伝的多様性の評価とモニタリング、保全単位の設定、近親交配を防ぐ人工交配など、遺伝的特徴を考慮した保全管理も必要とされているが、個体数の回復には至らないことが多い。保全策が効果をあげない原因は、マクロ的には生育地の破壊、外来種、環境変動、環境汚染などがあるが、遺伝的には、個体数の減少による遺伝的多様性の低下や近親

交配による近交弱勢などが考えられる。これらの遺伝的項目に関しては従来、比較的少数の遺伝子座における変異情報をもとに解析が行われてきたが、最近では、実験生物のみならず、野生生物においても、ゲノムレベルで大量の遺伝情報を解読することが可能になっており、いわゆる保全ゲノミクスという保全アプローチがとられるようになった。

ここでは、小笠原に生育・生息する保護増殖事業対象種のうち、被子植物とアカガシラカラスバトに関してゲノムレベルの解析を行ってきた事例を紹介し、今後の保全の方向について考察したい。

II. 被子植物

種の保存法に基づく保護増殖事業では現在 16 種の植物が保全対象となっているが、そのうちの 4 分の 3 にあたる 12 種が小笠原固有種である。このことから小笠原に生育する希少植物が危機的状況にあることが窺い知れる。

海洋島に生育する絶滅危惧種のように個体数が少ない状態が長期間継続すると、本来であれば負の選択によって集団から除去されるような有害変異が偶然に維持されることが起こりうる。ゲノムに蓄積された変異の有害性に関してはいくつかの推定方法がある。SIFT (Kumar *et al.*, 2009) や PROVEAN (Choi *et al.*, 2012) は、解析対象の生物において、DNA から転写・翻訳されたアミノ酸配列を、既知の配列と比較解析することで、タンパク質機能に対する変異の有害性を推定するものである。また、DNA 塩基配列からアミノ酸配列への翻訳の単位であるコドンが突然変異によって終止コドンになるナンセンス変異は、それ以降の翻訳が行われなくなるので有害性が高いと考えられる。Makino *et al.* (2018) は、家畜化した 5 種の脊椎動物と栽培化した 2 種の被子植物を対象に野生種との比較ゲノム解析を PROVEAN によって行い、家畜化あるいは栽培化がすすむとともに、ゲノム内の有害変異の割合が増加する傾向があることを見出している。多数個体で構成されている野生種の集団から、少数の個体を捕獲、飼育し、世代交代を重ねながら、人にとって好ましい形質を持った個体を選抜するのが家畜化のプロセスであるが、海洋島で小集団として長期間にわたって維持されてきた固有生物にも同様の過程が生じ、個体の脆弱性をもたらしている可能性が考えられる。そこで、小笠原に生育する保護増殖事業対象種であるホシツルラン、ムニンノボタン、ヒメカコソウ、コヘラナレン、ムニンツツジと、それぞれの同属近縁種、ツルラン、ノボタン、ツルカコソウ、ホソバワダン、サキシマツツジについて、転写されている RNA を網羅的に解読して、ゲノム内に蓄積されている有害変異を、上記の 3 つの手法 (SIFT、PROVEAN、ナンセンス変異) で比較解析したところ (Hamabata *et al.*, 2019; Isagi *et al.*, 2020)、小笠原産希少被子植物は同属の近縁種に比べて

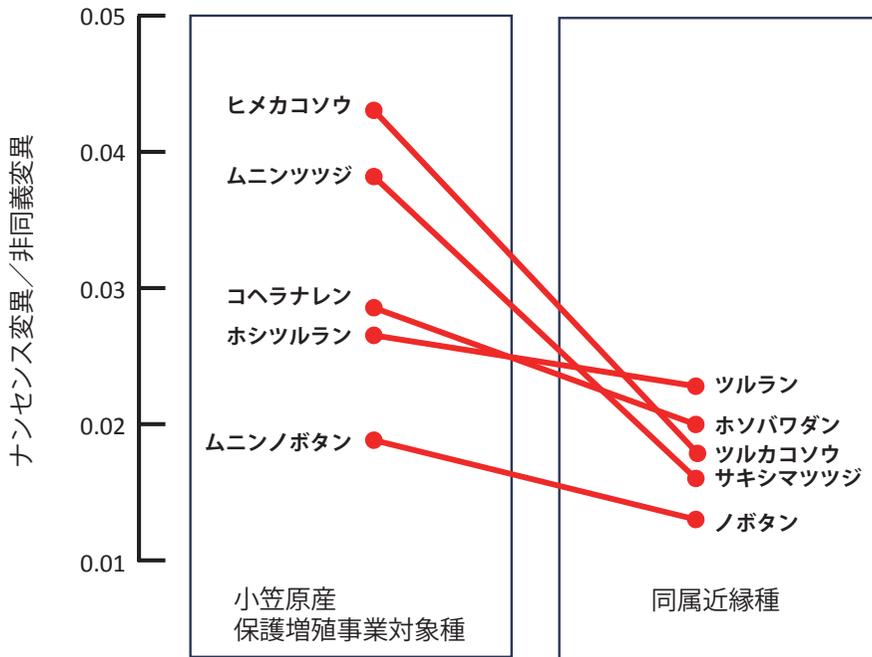


図1 小笠原に生育する保護増殖事業対象の植物と近縁普通種のゲノム内における有害変異率 (ナンセンス変異／非同義変異)

Hamabata *et al.* (2019) および Isagi *et al.* (2020) により作成。

より多くの有害変異が蓄積されている事が明らかになった (図1)。

生物種の脆弱性については、遺伝的要因以外にも、生育環境、生物間相互作用、生活史戦略などの要素について多面的に考慮する必要があるものの、この結果は、これら小笠原産希少植物種は本質的に脆弱であり、野生状態において集団を維持、あるいは増大させるためには慎重かつ入念な保全管理が必要である事を示唆している。Makino *et al.* (2018) が解析した、イヌ、ブタ、ニワトリ、カイコ、ダイズ、イネなどは、野生種と比べて遺伝的多様性が低く、より多くの有害変異を保持しているために、野生状態で集団を維持することは困難かもしれないが、人為管理下では問題なく成長し、世代交代している。ホシツルラン、ムニンノボタン、ヒメカコソウ、コヘラナレン、ムニンツツジについても同様に、野生状態では集団の維持や回復は困難であっても、適切な人為介入を行うことで集団の維持を行うことは可能かもしれない。たとえば、ムニンツツジは小笠原父島南部の躑躅山つづじに野生1個体が残り、この個体から増殖された個体が近辺に植栽されている状況である。野生状態では活発な個体数の増加はみられないものの、現地に植栽された個体は正常に生育している (図2 a)。また、父島の亜熱帯農業センターに植栽されている個体は、あたかも

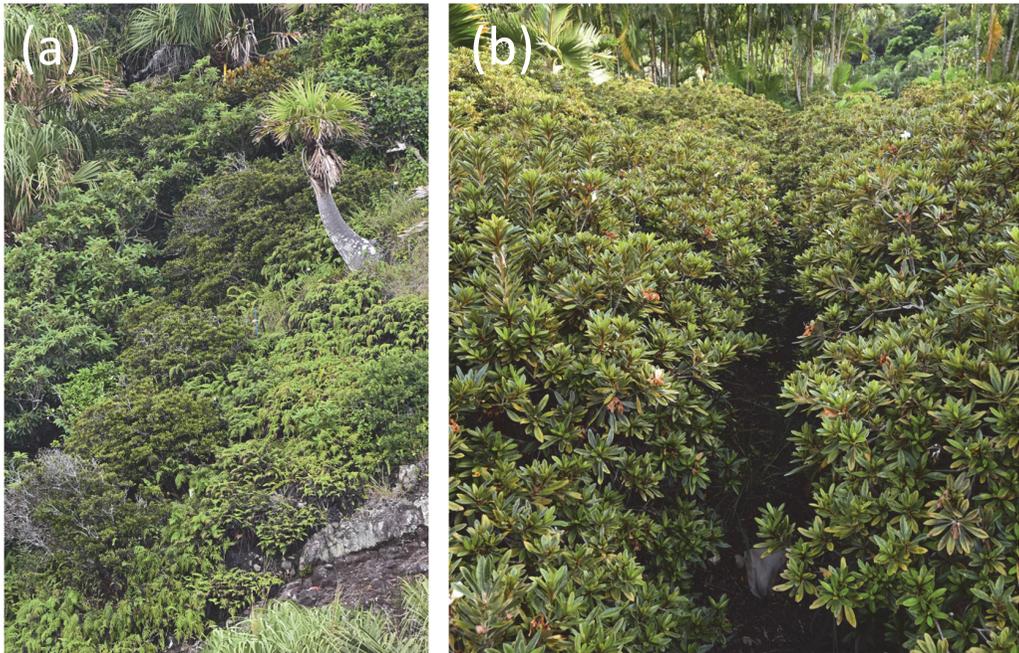


図 2 ムニンツツジの生育状況

(a) 躑躅山に生育する野生個体と近辺に植栽された個体、(b) 亜熱帯農業センターの植栽個体

園芸植物のヒラドツツジのように密生し、生垣状で旺盛に生育している（図 2 b）。園芸植物の多くは栽培条件下では活発に成長するが、その全てが野生に逸出し、増殖・分布拡大するわけではない。ムニンツツジもこれと同様な性質を示しているように見受けられる。

野生生物の集団は、自律的に集団サイズや遺伝的多様性が保持されながら世代交代し、また、生物間相互作用や物質循環を通して生態系機能を発揮しているのが理想的な状態であろう。しかしながら、絶滅危惧種の中には、ゲノム状態が劣化しているために、野生状態において自律的な集団の維持が困難なものもあるのかもしれない。その様な分類群に対しては、野生集団の保全に加えて、野生生育地における人為的な介入や域外保全によって系統を維持することも必要だろう。

Ⅲ. アカガシラカラスバト

アカガシラカラスバト *Columba janthina nitens* は、日本と朝鮮半島南部の海岸、濟州島、鬱陵島のみ分布するカラスバト *Columba janthina janthina* から分化した小笠原固有の亜種である（図 3 a）。カラスバトとカワラバト *C. livia* との分岐が 1000 万年以上であることと比べると、アカガシラカラスバトとカラスバトの分岐は浅く、Tsujiimoto *et al.* (2022)

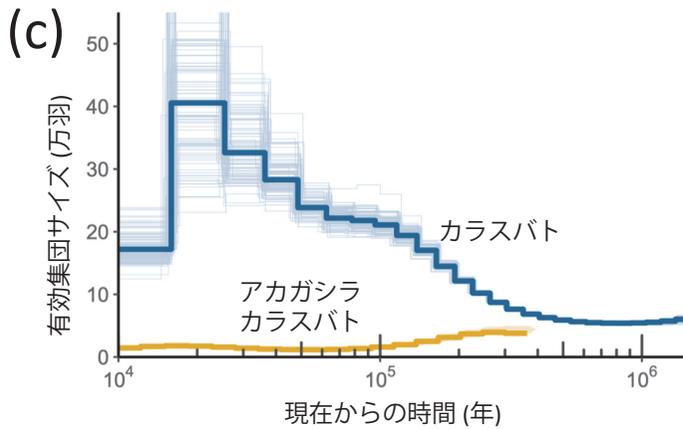
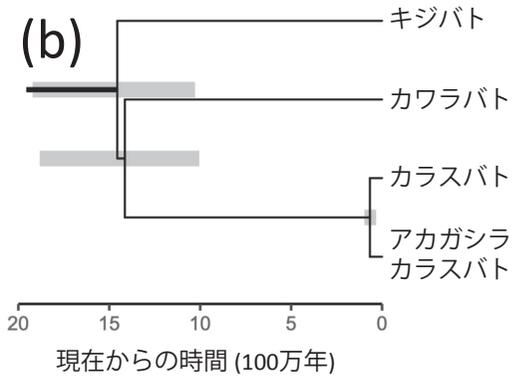


図3 小笠原固有亜種アカガシラカラスバト

(a) 大神山公園の個体、(b) アカガシラカラスバトと近縁種の系統関係、(c) PSMCによる過去の個体群動態推定。(b)、(c)は Tsujimoto *et al.* (2022) により作成。

による遺伝解析では、両者が分化したのは約 67 万年前と推定されている (図 3 b)。アカガシラカラスバトがカラスバトから分岐した後の集団動態を、ゲノム全体の変異情報に基づいて PSMC (Pairwise Sequentially Markovian Coalescent) 法 (Li & Durbin, 2011) で推定したところ (Tsujimoto *et al.*, 2022)、カラスバトが個体数を増減させつつも、概ね 10 万羽以上の有効集団サイズを維持してきたのに対して、アカガシラカラスバトは分岐以降、PSMC で解析可能な 1 万年前まで、小さな有効集団サイズで維持されてきたことが明らかになっている (図 3 c)。ヒトが小笠原へ入植を始めたのは 1830 年であるが、入植以前から、アカガシラカラスバトは海洋島の中で長期間にわたって小集団として維持されてきたようである。入植以降、アカガシラカラスバトの個体数は更に激減し、2008 年の時点で野生個体数は小笠原諸島全体で 60~80 羽程度と推定されていた (堀越ほか、2020)。

現在、アカガシラカラスバトは、環境省のレッドリストでは絶滅危惧 IA 類にランクされるとともに保護増殖事業対象種となっている。アカガシラカラスバト集団に最も重要な脅威となっているのは、ノネコによる捕食であり（堀越ほか、2020）、2010年より父島の山域全体で周年にわたってノネコ捕獲駆除が行われるようになった。その結果、驚くべきことに、3年程度を経た段階で、アカガシラカラスバトの個体数は大幅に増加し（堀越ほか、2020）、現在では父島市街地の大神山公園でも個体を観察できるようになっている（図3 a）。急速に増加したとはいえ、アカガシラカラスバトはヒトの入植前における個体数までは回復しておらず、今後も慎重な保全策の継続が必要であるが（堀越ほか、2020）、数十個体まで減少した陸鳥が、ネコの駆除によって個体数を回復させた例は極めて稀な事例である（堀越ほか、2020）。

一時は数十個体まで減少した希少生物が、天敵の捕獲によってこれほど順調に個体数を増加させたことはどのような要因に基づくのであろうか。小笠原に生育する被子植物の保護増殖事業対象種では、前述のようにゲノムに含まれる有害変異の割合が同属普通種に比べて有意に大きくなっており、このことが、保護増殖事業対象種の個体数の回復を阻んでいる要因の一つと考えられる。これに対して、捕食者の除去後に著しく個体数を増加させたアカガシラカラスバトに、小笠原固有被子植物と異なった特徴があるのか明らかにするために、同属普通種のカラスバトとアカガシラカラスバトの比較ゲノム解析を行った（Tsujimoto *et al.*, unpublished）。

アカガシラカラスバトに関しては、近縁種のカワラバトで詳細にゲノム解読が行われており、これを参照ゲノムとして利用することができる。野生カラスバトの9サンプルと、アカガシラカラスバトの野生個体および飼育個体について各々8サンプルのゲノム構造を比較解析してみたところ、二つの分類群の間に保全上注目すべき差異が見出された。

一つ目の差異はゲノム内の有害変異蓄積量の違いである。ゲノム内の塩基配列変異の有害性を評価する指標の一つにナンセンス変異がある。ナンセンス変異とは前述の様に、アミノ酸配列をコードするコドンが、タンパク質の合成を終了するストップコドンに変化する変異である。この変異が生じると、当該コドンよりも下流のアミノ酸が合成されなくなるので、正常なタンパク質が合成されなくなる。塩基レベルの突然変異の中では重大な影響をもたらすものである。第5番染色体におけるナンセンス変異部位の分布をみると、野生カラスバトでは、9個体にナンセンス変異が10遺伝子座で確認されたが、アカガシラカラスバトでは、野生8個体において3遺伝子座、飼育8個体において3遺伝子座であり、同属普通種であるカラスバトよりも有害変異数は少なかった（図4）。ここでは、第5番染色体の例を示したが、他の染色体でも同様の傾向があった（Tsujimoto *et al.*,

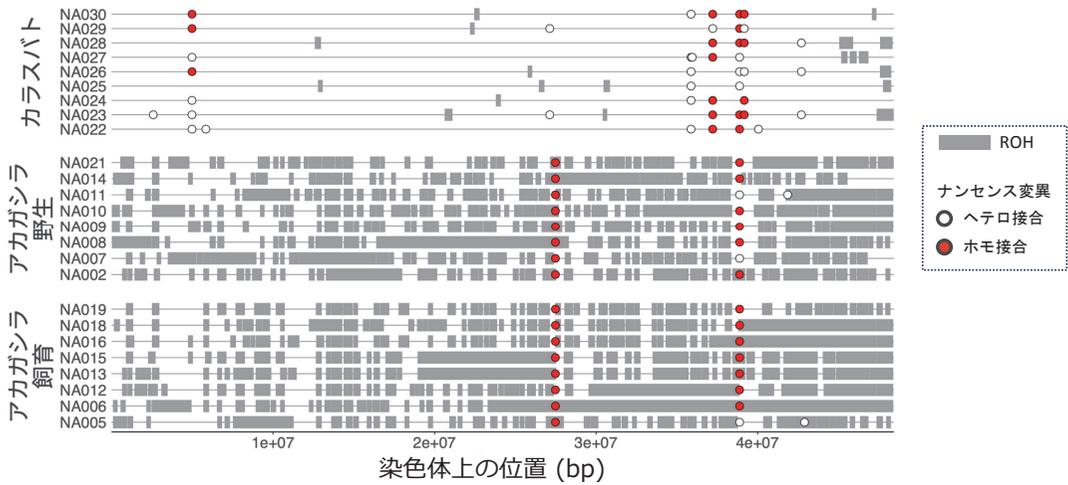


図4 カラスバトとアカガシラカラスバトの第5番染色体におけるROH (Runs of Homozygosity) およびナンセンス変異

unpublished)。

一般に小さな集団では、近親交配が起こりやすく、有害な対立遺伝子がホモ接合体となり有害形質が発現する。このプロセスを通して、自然選択により有害な対立遺伝子が集団から除去される。これがいわゆる遺伝的浄化である。アカガシラカラスバトでは狭い海洋島で分化以降、数十万年前にわたって小集団で維持されてきたが故に効率的な遺伝的浄化が起こったと考えられる。そして、それが数十羽まで個体数が減少しながらも、捕食者の除去に反応し個体数を増加させたような頑強性をもたらした要因の一つとなっている可能性がある。

ゲノム解析によって明らかになった二つ目の差異はROH (Runs of Homozygosity, ホモ接合連続領域) の数と長さの違いである。ROHはゲノム内でホモ接合状態が連続して存在する領域であり、その数と長さは、集団における近親交配の強さと歴史を反映している。多数の野生個体が生息し、個体間で任意交配が行われているカラスバトでは、ゲノム内にROH領域がほとんど存在しないのに対して、アカガシラカラスバトでは、多数のROHが存在し、また、ゲノムに占めるROHの割合も大きかった(図4)。また、アカガシラカラスバトにおいて野生個体と継代飼育されている個体とで、ROHの割合がほとんど変わらないのも注目に値する。一般に少数個体で創始された飼育集団では世代交代を繰り返すにつれてROH領域は増加するが、アカガシラカラスバトは野生個体においてもゲノム内に多数のROH領域が存在していた。これは、図3(c)に示したように、アカガシラカラスバ

トがカラスバトから分化した後に数十万年にわたって小集団として維持されてきたために、ゲノム全体の均質化とホモ接合化が進んだためと考えられる。また、アカガシラカラスバト集団の中でも個体間で ROH の割合や場所が異なっていることも興味深い。例えば、飼育集団の中の個体 NA006 は第 5 染色体のほぼ半分が ROH となっており、血縁度の高い個体間で近親交配が繰り返されてきた事を窺わせる。

飼育集団内で人工交配を行うにあたって、近交弱勢のリスクを低下させるために強い近親交配を避けることが試みられている。近親交配の強さは、従来、家系図などの情報に基づく血縁度によって評価されているが、図 4 に示したような、ゲノム情報を活用すれば、より適切な交配ペアの選定が行えるようになるだろう。

IV. 保護増殖事業対象種の保全とゲノム情報

以上の様に、小笠原に生育、生息する保護増殖事業対象種はいずれも個体数が少ないという点で共通しているものの、ゲノムの状態には種ごとに差異があり、その特徴を理解することがより効果的な保全策につながると考えられる。

ゲノム解読技術の発展により、実験生物だけでなく絶滅危惧種においても詳細なゲノム解析が行われるようになってきた結果、ここで紹介したアカガシラカラスバトの例の様に、少数の個体数で長期間にわたって維持されてきた絶滅危惧種の集団に遺伝的浄化が起きて、近親交配の弊害を免れているという報告がなされるようになった。その様な例の中で、アカガシラカラスバトの状況と類似しているのが、ニュージーランドの飛べないオウム、カカポである。カカポは 1995 年にはスチュワート島に生息していた 50 羽とニュージーランド本島の 1 羽、合計 51 羽までに減少していた。その後、これらの個体はすべてスチュワート島で保全されており、2021 年現在、その子孫の 201 羽が生存している。Dusseix *et al.* (2021) は、ニュージーランド本島から 1 万年前に隔離されたスチュワート島で生きのびてきた野生集団と、博物館に保管されている 130 年前の本土集団の標本を対象に比較ゲノム解析を行い、長期的な個体数の減少がもたらした遺伝的影響を明らかにしている。解析の結果、島に隔離されてきた集団は本土集団に比べると、近親交配によって遺伝的多様性は低下していたが、近親交配による浄化選択によって、有害な変異が除去されていた事を見出している。カカポでは、このようなゲノムに関わる知見に基づき、残存する集団の遺伝的多様性の維持、近交弱勢の影響を最小限に抑える交配相手の選定、有害な遺伝的変異の管理などを行い、効果的な保全策が行われようとしている。カカポの事例は、今後のアカガシラカラスバトの効果的な保全策構築に際しても良い参考となるだろう。

孤立した集団が世代交代を繰り返すことでアカガシラカラスバトのゲノムからは浄化選

択によって有害変異が取り除かれたのに対して、同じく小集団で維持されてきた小笠原固有の被子植物では、遺伝的浮動によって浄化選択が有効に働かず、有害変異が蓄積されてきたことが示唆された。アカガシラカラスバトと小笠原産固有被子植物で正反対の傾向が見出されたことになる。近年、さまざまな分類群の絶滅危惧種においてゲノム解析がなされ、小集団化が有害変異の蓄積量に及ぼした影響が明らかにされつつあるが、報告事例ごとに異なったインパクトを集団にもたらしている。小集団における有害突然変異の蓄積と浄化については、集団のサイズと構造、遺伝的浮動の強さ、近親交配の程度、変異の有害度など複数の要因が影響を与える。これらの要因の相互作用とゲノム内の有害変異の蓄積量との関係については、統合的な理解には至っていないのが現状であるが、少なくとも、保全対象とする絶滅危惧種について、ゲノム内での有害変異の位置、機能、蓄積量などを個体レベルで特定できるようになったことは、今後の保全活動の効率や効果を大きく向上させると考えられる。

謝辞

本研究で解析した希少生物の試料採集に関しては、環境省、東京都、東京動物園協会、東京大学小石川植物園の関係者の方にお世話になりました。本研究の一部は環境再生保全機構環境研究総合推進費（JPMEERF20194002, JPMEERF20204003, JPMEERF20224M02）の助成を受けて実施されました。

文 献

- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR & Chan AP (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* 7: e46688, DOI: 10.1371/journal.pone.0046688.
- Dussex N, van der Valk T, Morales HE, Wheat CW, Díez-del-Molino D, von Seth J, Foster Y, Kutschera VE, Guschanski K, Rhie A, Phillippy AM, Korlach J, Howe K, Chow W, Pelan S, Damas JDM, Lewin HA, Hasti AR, Formenti G, Fedrigo O, Guhlin J, Harro, TWR & Le Lec MF (2021) Population genomics of the critically endangered kakapo. *Cell Genomics* 1: 100002, DOI: 10.1016/j.xgen.2021.100002.
- 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: 244, DOI: 10.1038/s42003-019-0490-7.
- 堀越 和夫・鈴木 創・佐々木 哲朗・川上 和人 (2020) 小笠原諸島父島における外来ネコ対

策後のアカガシラカラスバトの個体数増加. 日本鳥学会誌 69: 3-18.

- 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: 166-174.
- Kumar P, Henikoff S & Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocol* 4: 1073-1082.
- Li H & Durbin R (2011) Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature* 475: 493-496.
- Makino T, Rubin CJ, Carneiro M, Axelsson E, Andersson L & Webster MT (2018) Elevated proportions of deleterious genetic variation in domestic animals and plants. *Genome Biology and Evolution* 10: 276-290.
- Tsujimoto D, Ando H, Suzuki H, Horikoshi K, Nakajima N, Suyama Y, Matsuo A, Fujii C & Isagi Y (2022) Has long-distance flight ability been maintained by pigeons in highly insular habitats? *Journal of Biogeography* 50: 235-246.