

# 大雪山におけるエゾコザクラの葉緑体ゲノムの遺伝変異

澤田 円<sup>1)</sup>・我妻尚広<sup>\*2)</sup>・岡本吉弘<sup>2)</sup>・森 志郎<sup>2)</sup>

1) 酪農学園大学大学院酪農学研究科

2) 酪農学園大学大学院

**摘要:** 本調査では遺伝的多様性に配慮した個体群保全や植生復元に向けた地理的な遺伝変異の把握のため、大雪山の旭岳姿見の池と高原温泉に自生するエゾコザクラの葉緑体ゲノム *trn L* (UAA) 3' exon - *trn F* (GAA) 領域と *atp B* - *rbc L* 領域の遺伝変異の有無を調べた。その結果、旭岳姿見の池の 17 個体、高原温泉の 14 個体で塩基配列を決定できた。両領域で多型が検出され、その組み合わせから 4 種のハプロタイプが確認された。さらに、調査地で存在するハプロタイプやその出現割合に差があることが明らかになった。

**キーワード:** *Primula cuneifolia* var. *cuneifolia*, 個体群保全, 植生復元, 遺伝的多様性, 地理的変異

## 1. はじめに

エゾコザクラ (*Primula cuneifolia* var. *cuneifolia*) はサクラソウ科サクラソウ属の多年生草本である。エゾコザクラの分類には様々な見解があるが、エゾコザクラを母種、ハクサンコザクラ (*Primula cuneifolia* ssp. *hakusanensis*) とミチノコザクラ (*Primula cuneifolia* ssp. *heterodonta*) をエゾコザクラの亜種と一般的には位置付けられている<sup>9)</sup>。エゾコザクラは北海道における高山の雪田跡や湿った草地に群生しており、大雪山のお花畑では主役の花の一つである。一方、エゾコザクラは現在レッドデータブックに希少種として登録されている<sup>3)</sup>。希少種は絶滅の危険度はまだ低い、生育環境の変化などにより、絶滅の危険度が高まっていく可能性がある。希少種が地域的に減少した場合、景観や生物多様性を維持するため、個体群保全や植生復元が検討される。これまでの個体群保全や植生復元では種の多様性に力点が置かれてきた。しかし、種にはそれぞれの地域に適応した対立遺伝子またはその組み合わせがあるため、それが同種であっても別の場所から簡単に個体移動してよいとは限らず、他地域あるいは飼育系統個体の移動がその地域個体群の存続や生き方に悪影響を与える恐れがある<sup>5)</sup>。また、長期的に生物多様性を保全するためには、種が分化する条件を維持することが重要である。遺伝的な交流の機会が増えることは多様性の減少に

つながるとされている<sup>10)</sup>。これらのことから、個体群保全や植生復元を行う際には遺伝的多様性への配慮が求められ、個体数が減少し絶滅の危険度が高まる前に地理的な遺伝変異の差を把握しておく必要がある。エゾコザクラにおける葉緑体ゲノムの遺伝変異に関する研究には Fujii *et al.*<sup>1,2)</sup> の報告が見られる。しかし、この報告は系統地理学的視点で調査したため、各調査地での調査個体数が少なく、地理的な遺伝変異の差を把握するには至っていない。

そこで、本調査では Fujii *et al.*<sup>1,2)</sup> の行った調査地のうち大雪山に着目し、調査地を 2 ヶ所に、各調査地での調査個体数を 20 個体とし、大雪山におけるエゾコザクラの葉緑体ゲノムの遺伝変異の把握を試みた。

## 2. 材料ならびに方法

材料を 2015 年 7 月 24 日に北海道上川郡東川町の旭岳姿見の池で、2015 年 8 月 5 日に北海道上川郡川上町の高原温泉で採取した (図-1)。登山道周辺に群生しているエゾコザクラから 20 個体を選び、各個体から葉を 1 枚採取し、-80℃で保存した。



図-1 大雪山におけるエゾコザクラの遺伝変異の調査地

\* 連絡先著者 (Corresponding author) : 〒069-8501 北海道上川郡東川町 582 番地 E-mail : wagatuma@rakuno.ac.jp

表-1 PCR に用いた葉緑体ゲノム領域とプライマー配列

領域	プライマー配列 (5'→3')
<i>trn</i> L (UAA) 3' exon	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
<i>trn</i> F (GAA)	ATTTGAACTGGTGACACGAG
<i>atp</i> B	TAGTTTCTGTTTGTGGTGACAT
<i>atp</i> B w *	GCGCAACCCAATTCTTTT
<i>rbc</i> L	AAGTAGTAGGATTGGTTCTCAT

\* *atp* B - *rbc* L の間に設計したウォーキングプライマー

DNA 抽出, 精製, PCR 法による DNA の増幅およびダイレクトシーケンスによる塩基配列の決定は石田ら<sup>4)</sup>の報告に準じた。PCR 法による葉緑体ゲノム *trn* L (UAA) 3' exon - *trn* F (GAA) 領域と *atp* B - *rbc* L 領域の増幅には表 1 に示すプライマーを用いた。また, *atp* B - *rbc* L 領域は 700 塩基と 1 回のシーケンスではすべての塩基配列を決定できないため, 領域間にウォーキングプライマー (*atp* B w) を設計した。

塩基配列決定後, MEGA4 を用いて遺伝変異の有無を調べた。また, 遺伝的多様性を示す指標として DnaSP 5.10 を用い, ハプロタイプ多様度と塩基多様度を算出した。

### 3. 結果と考察

葉緑体ゲノム *trn* L (UAA) 3' exon - *trn* F (GAA) 領域と *atp* B - *rbc* L 領域において旭岳姿見の池で採取したエゾコザクラのうち 17 個体で, 高原温泉で採取したエゾコザクラのうち 14 個体で塩基配列を決定できた。それらの塩基配

表-4 調査地ごとのハプロタイプ出現割合

	ハプロタイプ				
	A	B	C	D	計
旭岳姿見の池	13	0	0	4	17
高原温泉	11	1	2	0	14

列を比較したところ, *trn* L (UAA) 3' exon - *trn* F (GAA) 領域では 1 ヶ所の多型が検出され, その多型は 2 塩基挿入であった (表-2)。また, *atp* B - *rbc* L 領域では 2 ヶ所の多型が検出され, それらの多型は 1 塩基欠失と 1 塩基挿入であった (表-3)。これらの塩基配列の組み合わせから 4 種のハプロタイプが存在することが明らかになった。そのうち, ハプロタイプ A は Fujii *et al.*<sup>2)</sup> で報告された type C の塩基配列と一致した。旭岳姿見の池で塩基配列を決定できた 17 個体のハプロタイプの出現割合は A : D が 13 : 4 となった。高原温泉で塩基配列を決定できた 14 個体のハプロタイプの出現割合は A : B : C が 11 : 1 : 2 となった。4 種のハプロタイプのうち, ハプロタイプ A は両調査地で検出されたが, ハプロタイプ B と C は高原温泉のみ, ハプロタイプ D は旭岳姿見の池のみで検出された。このことから, 隣接する大雪山の調査地間でも存在するハプロタイプの種類やその出現割合に差があることが明らかになった。

また, 本調査で決定した塩基配列を基に遺伝距離として Kimura の二変数法を用いた近隣結合 (NJ) 法により系統樹を作成した (図-2)。各ハプロタイプはかなり近く, Fujii *et al.*<sup>2)</sup> の塩基配列を加えて同様の解析を行った結果 (データ未掲載), 本調査で新たに検出されたハプロタイプ B, C

表-2 *trn* L (UAA) 3' exon - *trn* F (GAA) 領域で検出されたハプロタイプとその塩基配列

	259										270				
ハプロタイプ A*	A	C	A	G	G	G	-	-	C	C	C	T	C	A	
ハプロタイプ B	.	.	.	.	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.
ハプロタイプ C	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.
ハプロタイプ D	.	.	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.

\*Fujii *et al.* (1995) で報告された type B, Fujii *et al.* (1999) で報告された type C と同一

表-3 *atp* B - *rbc* L 領域で検出されたハプロタイプとその塩基配列

	213						219	620	625					
ハプロタイプ A*	C	C	C	C	T	T	T	C	C	C	-	G	A	T
ハプロタイプ B	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.
ハプロタイプ C	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.
ハプロタイプ D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.

\*Fujii *et al.* (1999) で報告された type C と同一

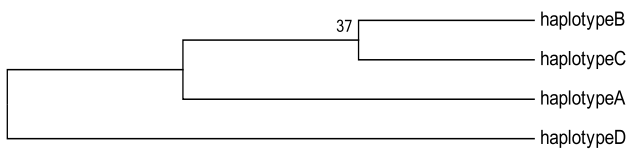


図-2 エゾコザクラの葉緑体ゲノム *trn* L (UAA) 3' exon - *trn* F (GAA) 領域と *atp* B - *rbc* L 領域の塩基配列に基づくハプロタイプを近隣結合法により構築した系統樹

と D はすでに報告されていた type C (ハプロタイプ A) と同じクレートに分けられ、ハプロタイプ B, C と D は A に近いことが分かった。

一方、旭岳姿見の池のハプロタイプ多様度は 0.382 で塩基多様度は 0.00048 であり (表-5) , 高原温泉のハプロタイプ多様度は 0.385 で塩基多様度は 0.00064 であった。調査地平均はハプロタイプ多様度が 0.391 で塩基多様度が 0.0006 であった。Fujii *et al.*<sup>2)</sup> の報告を基に全国に分布する亜種を含めたエゾコザクラのハプロタイプ多様度と塩基多様度を算出すると、ハプロタイプ多様度は 0.746 で塩基多様度は 0.00186 であった。また、北海道に分布するエゾコザクラのハプロタイプ多様度は 0.416 で塩基多様度は 0.00075 であった。本調査結果を基に算出された大雪山におけるエゾコザクラの遺伝的多様性は全国に分布する亜種を含めたエゾコザクラの値と比較すると低かったが、北海道に分布するエゾコザクラとは同等であった。このことから、Fujii *et al.*<sup>2)</sup> の報告では大雪山に分布するエゾコザクラには遺伝変異が見られなかったが、本調査結果では遺伝変異が見られ、北海道に分布するエゾコザクラと同等の遺伝的多様性を示すことが明らかになった。

また、本調査では 1 調査地から 20 個体のサンプルを採取して塩基配列を決定したところ、1 調査地から 1~5 個体のサンプルしか採取しなかった Fujii *et al.*<sup>1, 2)</sup> の報告では検出できなかった多型を得ることができた。これまでに葉緑体ゲノムの塩基配列から多型を検出しようとした報告では 1 調査地から 5 個体以下のサンプルしか採取しなかった場合、ほとんど多型が検出できず<sup>6, 8, 11)</sup>、10 個体以下でも多型が検出されることはまれであった<sup>7, 12)</sup>。以上の点から、地理的な遺伝変異を把握し比較する場合、調査地の環境に負荷をかけない範囲で多くの調査個体数を確保することが理想である。また、調査個体数が少なすぎると十分な遺伝変異の把握には至らないことから、20 個体程度のサンプルを採取して解析することが妥当ではないかと考えられた。

今後、調査地を増やしエゾコザクラの地理的な遺伝変異を把握することで、遺伝的多様性に配慮した個体群保全や植生復元に向けた基礎的知見を重ねていきたいと考えている。

表-5 各調査地における遺伝的多様性とその平均

	ハプロタイプ多様度	塩基多様度
旭岳姿見の池	0.382	0.00048
高原温泉	0.385	0.00064
調査地平均	0.391	0.0006

\**trn* L (UAA) 3' exon - *trn* F (GAA) 領域と *atp* B - *rbc* L 領域の塩基配列を基に算出した

引用文献

1) Fujii, N., Ueda, K., Watano, Y. and Shimizu, T. (1995) Intraspecific Sequence Variation in Chloroplast DNA of *Primula cuneifolia* Ledeb. (Primulaceae). J. Phytogeogr. & Taxon., 43: 15-24.

2) Fujii, N., Ueda, K., Watano, Y. and Shimizu, T. (1999) Further Analysis of Intraspecific Sequence Variation of Chloroplast DNA in *Primula cuneifolia* Ledeb. (Primulaceae): Implications for Biogeography of the Japanese Alpine Flora. J. Plant Res., 112: 87-95.

3) 北海道, “エゾコザクラ”, 北海道レッドデータブック. <http://rdb.hokkaido-ies.go.jp/page/detail1.asp?spc=00000000000000000000354> (参照: 2016 年 4 月 28 日)

4) 石田光・我妻尚広・岡本吉弘 (2012) 道東と道南に自生するゼンテイカの葉緑体ゲノムの遺伝変異. 日緑工誌, 38(1): 228-231.

5) 松田裕之 (2002) 野生生物を救う科学的思考とは何か?. 種生物学会編, 保全と復元の生物学: 野生生物を救う科学的思考. 文一総合出版, pp.19-36.

6) 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: 3-8.

7) 佐伯いく代・飯田晋也・小池文人・小林慶子・平塚和之 (2012) 里山の指標種ワレモコウの遺伝変異. 日緑工誌, 38(1): 115-120.

8) 津田その子・小林聡・富田基史・阿部聖哉・松木吏弓・河津かおり・花井隆晃・鈴木素弘・守谷栄樹・藤井義晴 (2014) 葉緑体 DNA ハプロタイプ分析による在来草本植物 10 種の地域性評価. 日緑工誌, 40(1): 72-77.

9) 植田邦彦 (1995) エゾコザクラ (広義) の亜種の命名者. J. Phytogeogr. & Taxon, 43: 50.

10) 矢原徹一 (2002) 保全生物学における生物地理学の役割. 種生物学会編, 保全と復元の生物学: 野生生物を救う科学的思考. 文一総合出版, pp.199-201.

11) 保田謙太郎・芝山秀次郎 (2003) 日本産チガヤ (*Imperata cylindrica*) の葉緑体 DNA 変異の地理的分布. Coastal bioenvironment, 2: 51-58.

12) 保田謙太郎 (2005) 東アジア地域におけるチガヤ (*Imperata cylindrica*) の葉緑体 DNA 変異. 雑草研究, 50(別): 118-119.

(2016 年 6 月 15 日受理)