

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

石田 光¹⁾・我妻尚広^{*2)}・岡本吉弘²⁾

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: 本実験では復元の観点から遺伝的多様性に関する基礎的知見を得るため、爾志郡乙部町と厚岸郡浜中町霧多布湿原、霧多布岬に分布するゼンテイカの葉緑体ゲノム *trnH-psbA* 領域と *trnL(UAA) intron* 領域の塩基配列を決定し、遺伝変異の有無を調べた。その結果、葉緑体ゲノム *trnH-psbA* 領域の塩基配列、624塩基 (AB716413) を決定したが、この領域から多型は検出できなかった。一方、*trnL(UAA) intron* 領域の塩基配列、594塩基を決定した。この領域には4箇所が多型が検出でき、6種のハプロタイプが確認された (AB727660-AB727665)。これらハプロタイプは地域間で出現する種類やその出現割合に差が生じた。

キーワード: *Hemerocallis dumortieri*, 復元, 遺伝的多様性, 地理的変異, *trnH-psbA*, *trnL(UAA) intron*

1. はじめに

全国的なシカの急増に伴い、シカの食害は農林業に大きな被害をもたらしている。また、希少種や高山植物がシカに食害され、希少種の減少や群落の消失が報じられている²⁾。北海道でも、エゾシカの食害による影響で大きな被害が出ている⁴⁾。また、北海道洞爺湖中島では希少種の減少やエゾシカ不嗜好植物の増加が確認されている¹⁵⁾。

近年、北海道厚岸郡浜中町の霧多布湿原では、ゼンテイカ (*Hemerocallis dumortieri* C.Morren var. *esculenta* (Koidz.) Kitam. ex M.Matsuoka et M.Hotta) の花やつぼみがエゾシカに食害されるようになった (写真-1)。ゼンテイカは中部地方以北の本州および北海道全域に分布し、高山や低地の湿原や海岸の岩場や草地に群生するユリ科ワスレグサ属の多年生草本である¹⁴⁾。エゾシカの食害を受けてもゼンテイカは多年生草本であるため、現在のところ霧多布湿原ではゼンテイカの個体数の急激な減少は認められていない。しかし、このまま高い採食圧を受け続けられれば、個体数の減少や個体群の消失が危惧される¹⁶⁾。個体数の減少が起こった場合、その個体群の保全や復元を検討しなければ、いずれその個体群は消失する可能性が高い。個体群の復元は個体数が減少し

た個体群に別の個体群から種子や個体を移動させることが多い¹³⁾。しかし、遺伝的多様性の観点から、別の個体群からの個体の移動は遺伝子攪乱の危険性があり、わずかに残った個体群の価値まで失う可能性がある。また、それぞれの個体群にはその地域に適応した遺伝子やその組合せがあり、地域間での植物の移動が、その地域の個体群の存続に悪影響をおよぼすおそれがある⁸⁾。一方、長期的な生物多様性の保全にとって、地域間の隔離などの種が分化する条件を維持することが重要であり、地域間での移植は遺伝的な交流の機会が増え、多様性の減少に繋がる¹⁷⁾。そのため、復元するためには個体数が減少する前に、その個体群や周辺の個体群の遺伝的多様性を把握しておく必要がある。

近年、葉緑体ゲノムは母性遺伝であるため地理的変異の解明に適していると報じられている¹⁾。また、葉緑体ゲノムは遺伝子間領域に変異が多く見られることから、種内変異を把握する遺伝子マーカーとして有効であることが報告されている¹¹⁾。その中でも葉緑体ゲノムの *trnH-psbA* 領域は、変異に富んだ領域としてDNAバーコードの候補として提案されている⁷⁾。また、*trnL(UAA) intron* 領域はいくつかの植物で遺伝変異が報告されている^{3,5)}。これまで全国的にゼンテイカの遺伝的多様性を調べた例は見られるが^{9,10)}、霧多布湿原やその周辺での情報は十分とは言えない。

そこで、本実験では復元の観点から遺伝的多様性に関する基礎的知見を得るため、爾志郡乙部町と厚岸郡浜中町霧多布湿原、霧多布岬に分布するゼンテイカの葉緑体ゲノム *trnH-psbA* 領域および *trnL(UAA) intron* 領域の塩基配列をダイレクトシーケンシング法を用いて決定し、遺伝変異の有無を調べた。また、個体数の減少が危惧される霧多布湿原とその他の調査地を比較した。

2. 材料ならびに方法

材料は2011年6月16日に爾志郡乙部町から、7月13~14日に厚岸郡浜中町霧多布湿原と霧多布岬から、それぞれ9個体、14個体と14個体のゼンテイカを選び (図-1)、葉を2

* 連絡先著者: E-mail : wagatuma@rakuno.ac.jp 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地



写真-1 エゾシカによる食害の様子

～3枚採集し、 -80°C で保存した。保存した葉は SDS 0.3%, NaCl 400 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 20 mM で構成される SNET と Proteinase K を 50 : 1 の割合で混合した溶解液を用い、 55°C 1 時間の加熱抽出法で DNA を抽出した。抽出した DNA はフェノール抽出とエタノール沈殿で精製し、PCR 法で葉緑体ゲノム *trnH* と *psbA* の遺伝子間領域と *trnL* (UAA) intron 領域を増幅した (表-1)。PCR 反応は Amplitaq Gold PCR Master Mix を用い、反応条件は 95°C で 10 分間、DNA ポリメラーゼの活性化を行った後、熱変性を 94°C で 30 秒間、アニーリングを 60°C で 1 分間、伸長反応を 72°C で 1 分間行なうサイクルを 40 回繰り返した。その後、 72°C で 7 分間の伸張反応を行った。PCR 産物は 0.8% アガロースゲルを使用した電気泳動法で分離し、目的の DNA 断片を回収し、スピнкаラム法と Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 法で DNA を精製した。スピнкаラム法では、マイクロチューブの底に 18G の注射針で穴を開け、その中に切り出したゲルを入れ、穴を開けていないマイクロチューブの上に重ねた。その後、8,000 rpm、室温でゲルが完全に下のマイクロチューブに落ちるまで遠心を行った。等量の中性フェノールを添加して白濁色になるまで指で弾いてよく混合し、 -80°C で 30 分間凍結した。その後、室温で半解凍し、15,000 rpm、室温で 5 分間遠心して上清を他のマイクロチューブに移し、そこに等量の中性フェノール・クロを添加して混合し、チューブローターを用いて 1 時間ゆっくり混和した。その後、再び 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心した。上清をマイクロチューブに移し、1/10 容の pH 5.2 に調整した 3 M 酢酸ナトリウムと 1 容のイソプロパノールを添加して混合し、20 分間室温下に放置した。その後、15,000 rpm、 4°C で 20 分間遠心後、底の白い沈殿物を残して上清を完全に捨てた。マイクロチューブに 70% エタノール 200 μl を添加し、静かにマイクロチューブ内を洗浄した。15,000 rpm、 4°C で 10 分間遠心後、上清を完全に捨て沈殿を乾燥後、30 μl の



図-1 各調査地および個体数

TE Buffer で溶解した。一方、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 法では、切り出したゲルをマイクロチューブに入れ、Membrane Binding Solution をゲルスライス 10 mg に対して 10 μl 添加し、ボルテックスで混合した。その後、 55°C で 10 分間またはゲルスライスが完全に溶解するまでインキュベートした。Collection Tube に SV Minicolumn を挿入し、調製したゲル溶解液を添加後、室温で 1 分間インキュベートした。インキュベートした SV Minicolumn assembly を 13,000 rpm で 1 分間遠心した後、SV Minicolumn を取り外し、Collection Tube 内の液体を除去した。取り外した SV Minicolumn を再度 Collection Tube に挿入し、Membrane Wash Solution 700 μl を添加し、13,000 rpm で 1 分間遠心した。その後、SV Minicolumn を取り外し、Collection Tube 内の液体を除去し、取り外した SV Minicolumn を再度 Collection Tube に挿入した。その後、Membrane Wash Solution 500 μl を添加し、13,000 rpm で 5 分間遠心した。その後、SV Minicolumn を取り外し、新しいマイクロチューブに移し Nuclease-Free Water 30 μl を添加した。1 分間、室温でインキュベートした後、13,000 rpm で 1 分間遠心した。SV Minicolumn を廃棄し、マイクロチューブ内の溶出された DNA に 20 μl の TE Buffer を添加した。この精製 DNA をシーケンスのテンプレートとした。シーケンス反応には Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing KIT を用い、ABI PRISM310 Genetic Analyzer で塩基配列を決定し、遺伝変異の有無を調べた。

表-1 PCR に用いた葉緑体ゲノムプライマー

領域	プライマー配列
<i>trnH</i> (GUG)	ACGGGAATTGAACCCGCGCA
<i>psbA</i>	CGAAGCTCCATCTACAAATGG
<i>trnL</i> (UAA) intron F	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<i>trnL</i> (UAA) intron R	GGGGATAGAGGGACTTGAAC

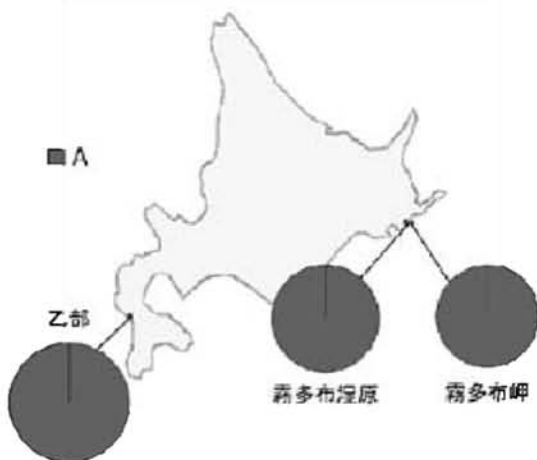


図-2 ゼンテイカの葉緑体ゲノム *trnH* - *psbA* 領域の塩基配列にもとづく調査地ごとのハプロタイプ出現割合

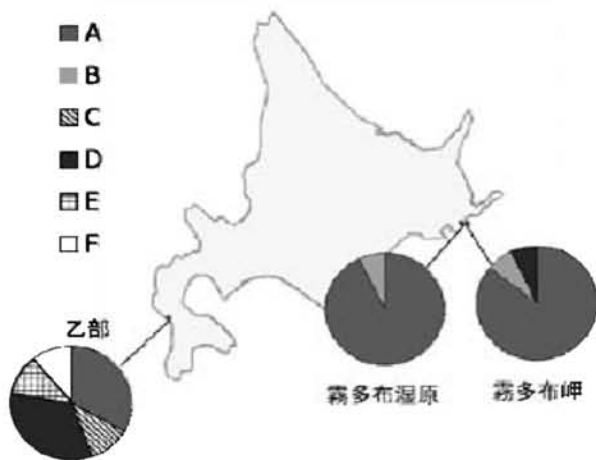


図-3 ゼンテイカの葉緑体ゲノム *trnL* (UAA) intron 領域の塩基配列にもとづく調査地ごとのハプロタイプ出現割合

3. 結果および考察

爾志郡乙部町と厚岸郡浜中町霧多布湿原、霧多布岬に分布するゼンテイカの葉緑体ゲノム *trnH* - *psbA* 領域の塩基配列を決定した結果、624塩基 (AB716413) を決定できた。しかし、この領域から多型は検出されなかった (図-2)。これまでの報告では、ウラルカンゾウでは3箇所の多型が検出され、4種のハプロタイプが⁶⁾、ミズナラでは10箇所の多型が検出され、11種のハプロタイプが見出され¹²⁾、多型が見られなかった本実験の結果とは異なった。

trnL (UAA) intron 領域の塩基配列を決定した結果、591塩基を決定でき、4箇所で多型が検出できた。*trnL* (UAA) intron 領域で検出されたハプロタイプとその塩基配列を表-2に示す。検出された4箇所の多型のうち3箇所は1塩基の挿入であり、1箇所は1塩基置換であった。これらの遺伝変異の組み合わせから、6つのハプロタイプ (A~F) の存在が確認された (AB727660 - AB727665)。道東・道南におけるゼンテイカの葉緑体ゲノム *trnL* (UAA) intron 領域の塩基配列にもとづく採取地ごとのハプロタイプ出現割合を図-3に示す。乙部町で採取した9個体のハプロタイプ割合は A : C : D : E : F

が 3 : 1 : 3 : 1 : 1 となった。霧多布湿原では、採取した14個体のハプロタイプ割合は、A : B が 13 : 1 となった。霧多布岬では、採取した14個体のハプロタイプ割合は、A : B : D が 12 : 1 : 1 となった。ハプロタイプ A はいずれの調査地でも確認できたが、ハプロタイプ B は浜中町でしか確認できなかった。また、ハプロタイプ D は霧多布岬と乙部町で確認できた。一方、ハプロタイプ C, E, F は乙部町でしか確認できず、地域間で出現するハプロタイプやその出現割合に差が生じた。さらに、乙部町のゼンテイカは浜中町に比べ、遺伝変異に富んでいることが明らかになった。これまでの報告ではゼンテイカの *trnL* (UAA) intron 領域に8箇所の多型が検出され、8種のハプロタイプが報告されている¹⁰⁾。また、北海道では3箇所の多型が検出され、3種のハプロタイプが報告されている。これらの多型は本実験で検出された多型とはいずれも一致せず、4箇所の多型が本実験で特異的に検出された。一方、本実験の調査地に近い釧路と江差は同じハプロタイプであったと報じられ、霧多布湿原や霧多布岬と乙部町では大きな違いの見られた本実験結果とは異なった。

以上の結果、個体数の減少や個体群の消失が危惧される霧多布湿原のゼンテイカの個体群を復元する場合、非常に近い

表-2 *trnL* (UAA) intron 領域で検出されたハプロタイプとその塩基配列

	170-176	201-207	429-435	503-509
ハプロタイプ A	A A A - G A T	G T T - C T A	T C C - A G G	T C T A C A T
ハプロタイプ B	. . . A
ハプロタイプ C T
ハプロタイプ D C
ハプロタイプ E C . . .
ハプロタイプ F C C . . .

表中の・はハプロタイプAと同一の配列であることを示し、-は欠失していることを示す

場所に自生する霧多布岬のゼンテイカであっても *trn L* (UAA) intron 領域に遺伝変異の差があるため、種子や個体の移動は遺伝子攪乱を引き起こす可能性がある。しかし、霧多布湿原と霧多布岬の個体群の遺伝的類似性は97%で、霧多布湿原と乙部町の個体群の遺伝的類似性は33%であることから、乙部町に比べ、霧多布岬から種子や個体の移動を行った方が遺伝子攪乱を引き起こす可能性が低いことが伺われる。

今後、調査地や対象植物を増やすことで基礎的知見を集積し、個体数の減少や個体群の消失が危惧される個体群を復元する場合の指針を検討できればと考えている。

引用文献

- 1) Amoatey, H. M. and R. A. E. Tilney-Bassett. (1994) A test of the complementary gene model for the control of iparental plastid inheritance in zonal pelargoniums. *Heredity* 72:69-77.
- 2) 藤木大介・岸本康誉・坂田宏志 (2011) 兵庫県氷ノ山山系におけるニホンジカ *Cervus nippon* の動向と植生の状況, 保全生態学研究16 (1) :55-67.
- 3) 平原友紀・矢原興一・星野卓二 (2007) 絶滅危惧種ビャッコイ (*Isolepis crassiuscula* Hook. f.) の染色体と葉緑体遺伝子の分析, 日本植物分類学会誌7 (1) :23-30.
- 4) 北海道 (2009) 「エゾシカの保護と管理」 <<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/ks/skn/sika/sikatop.htm>> (最終アクセス日2012年2月7日)
- 5) Kawase, D., Yumoto, T. and Sato, K. (2009) Phylogeography of a Rare Serpentine Plant, *Arenaria katoana* Makino (Caryophyllaceae). *Acta phytotaxonomica et geobotanica* : APG 60 (1) :19-25.
- 6) Kondo, K., Shiba, M., Yamaji, H., Morota, T., Zhengmin, C. Huixia., and Shoyama, Y. (2007) Species Identification of Licorice Using nrDNA and cpDNA Genetic Markers. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30 (8) :1497-1502.
- 7) Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt and D. H. Janzen (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8369-8374.
- 8) 松田裕之 (2002) 「保全と復元の生物学」野生生物を救う科学的思考, 種生物学会編, 野生生物を救う科学的思考とは何か?, 文一総合出版, pp. 19-36.
- 9) 野口順子 (1988) 異質染色質の変異よりみた日本列島におけるゼンテイカ群の変遷史と分化, 植物分類・地理39 (1~3) :25-36.
- 10) Noguchi, J, D. -Y. Hong, and W. F. Grant (2004) The historical evolutionary development of *Hemerocallis middendorffii* (Hemerocallidaceae) revealed by non-coding regions in chloroplast DNA. *Plant Systematics and Evolution* 247:1-22.
- 11) Okaura, T. and Harada, K. (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume), *Heredity* 88 :193-208.
- 12) Okaura, T., N. D. Quang, Ubukata, M. and Harada, K. (2007) Phylogeographic structure and late Quaternary population history of the Japanese oak *Quercus mongolica* var. *crispula* and related species revealed by chloroplast DNA variation. *Genes Genet. Syst.* 82:465-477.
- 13) 大澤雅彦 (2001) 生態学からみた身近な植物群落の保護, 日本自然保護協会編, 1.3 植物群落保護の考え方, 講談社, pp. 58-68.
- 14) 佐竹義輔 (1982) 日本の野生植物草本 I 単子葉類, 佐竹義輔・大井次郎・北村四郎・亙理俊次・富成忠夫編, ユリ科 LILIACEAE, 平凡社, pp. 30-31.
- 15) 助野実樹郎・宮木雅美 (2007) エゾシカの増加が洞爺湖中島の維管束植物相に与えた影響, *Wildlife Conservation Japan*, 11 (1) :43-66.
- 16) 田村淳 (2010) ニホンジカの採食により退行した丹沢山地冷温帯自然林における植生保護柵の設置年の差異が多年生草本の回復に及ぼす影響, 保全生態学研究, 15 (2) :255-264.
- 17) 矢原徹一 (2002) 「保全と復元の生物学」野生生物を救う科学的思考, 種生物学会編, 保全生物学における生物地理学の役割, 文一総合出版, pp. 199-201.

(2012.7.6 受理)