

# 羅臼湖と富良野岳におけるエゾコザクラの葉緑体ゲノム *trnL* (UAA) 3' exon - *trnF* (GAA) 領域および *atpB* - *rbcL* 領域の遺伝変異

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:** エゾコザクラは北海道の高山帯の雪田跡に群生するが、どの自生地でも密度が低く、北海道レッドデータブックで希少種と扱われている。生物多様性を保護するには遺伝子の多様性を把握し、それらに配慮した保全や復元が必要である。そこで、本調査ではこれまでに調査されていないエゾコザクラの自生地である羅臼湖と富良野岳で葉緑体ゲノム *trnL* (UAA) 3' exon - *trnF* (GAA) 領域と *atpB* - *rbcL* 領域の遺伝変異の有無を調べた。その結果、両地域個体群を比較すると違いが見られた。しかし、各地域個体群内では遺伝変異が見られなかった。このことは各地域個体群が環境変化の影響を受けやすい状態であることを示唆した。

**キーワード:** エゾコザクラ, 保全, 復元, 遺伝子の多様性

SAWADA, Madoka, WAGATSUMA, Takahiro, OKAMOTO, Yoshihiro and MORI, Shiro: Genetic diversity of the chloroplast genome region from *trnL* (UAA) 3' exon - *trnF* (GAA) and *atpB* - *rbcL* of *Primula cuneifolia* Ledeb. var. *cuneifolia* in Rausuko and Furanodake.

**Abstract:** *Primula cuneifolia* Ledeb. var. *cuneifolia* occurs in alpine regions of Hokkaido. It is described as rare species in the Red Data Book of Hokkaido because the individuals density is low anywhere. In this study, we attempted to determine the genetic variation of the species as useful information for conservation and restoration. Two natural populations of the species in Rausuko and Furanodake, were investigated to sequence two chloroplast DNA regions of *trnL-trnF* and *atpB-rbcL*. Consequently, some genetic variations were detected between the studied populations, not within the populations. This result suggests that the both populations are in a state sensitive to environmental changes.

**Key words:** *Primula cuneifolia* Ledeb. var. *cuneifolia*, conservation, restoration, genetic diversity

## 1. はじめに

世界規模で進む生物多様性の減少を食い止めるため、1993年に生物多様性条約が締結され、生態系の多様性、種の多様性、遺伝子の多様性という三つの視点での保護活動が進められている<sup>1)</sup>。一般に把握しやすい生態系の多様性や種の多様性はカワラノギク (*Aster kantoensis* Kiamura) 保全活動に関する事例<sup>18)</sup>やセイヨウオオマルハナバチ (*Bombus terrestris* L.) 対策に関する事例<sup>9)</sup> など市民を巻き込んだ数多くの保護活動が見られ、生態系や種の多様性の重要性は広く浸透している。一方、遺伝子の多様性は魚類や樹木では多々報告がある<sup>23,25)</sup>。しかし、草本の遺伝子の多様性については絶滅危惧植物のミヤマスカシユリ (*Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*) における調査<sup>1)</sup> など一部の研究者が報告しているが、遺伝子の多様性に配慮した保護活動は少なく、その重要性は一般に浸透していない。一方、生物多様性の保護における遺伝子の多様性は変化する環境へ適応するために重要であり、遺伝子の多様性の低下は繁殖力の低下

や生存率の低下を引き起こす可能性がある<sup>2)</sup>。そのため、集団を保全管理する場合には遺伝子の多様性が消失しないよう注意を払う必要があり、種が分化する条件の維持が長期的な生物多様性の保全に重要であると考えられている<sup>27)</sup>。これらのことから、遺伝子の多様性に関する基礎的知見を重ねるとともに、遺伝子の多様性に配慮した保護活動を行い、その重要性の啓発活動が必要である。

生物多様性は開発や攪乱といった人間活動や地球環境の変化により減少傾向にある。地域個体群の消失は直接的にその地域の生物多様性の低下につながる。消失しそうな地域個体群はその保全や復元を検討しなければ、いずれ消失する。消失しそうな地域個体群の保全や復元には他地域からの個体の移動やわずかに残った個体からの人為増殖が行われる<sup>26)</sup>。しかし、地域個体群には地域に適応した遺伝子の多様性があるため、他地域からの個体移動や特定の個体の人為増殖はその地域個体群の遺伝子の多様性のバランスを崩し、その地域個体群の存続に悪影響を与える危険性がある<sup>15)</sup>。遺伝子の多様性に配慮した保全や復元をするためには個体数が減少する前

\* 連絡先著者 (Corresponding author): 〒069-0834 北海道江別市文京台緑町 582 番地 E-mail: wagatuma@rakuno.ac.jp

に、その地域個体群や周辺の地域個体群の遺伝子の多様性を把握しておく必要がある。

葉緑体ゲノムは被子植物のほとんどで母性遺伝し、母系の遺伝情報が子へと受け継がれている。そのため、植物の種内変異を検出する遺伝マーカーとして地理的構造の解明<sup>19)</sup>や遺伝変異の把握<sup>20)</sup>等、遺伝解析研究に広く用いられている。その中でも葉緑体ゲノム *trn L* (UAA) 3' exon - *trn F* (GAA) 領域はイチビ (*Abutilon theophrasti* Medic.)<sup>14)</sup> やフタバガキ科 (Dipterocarpaceae)<sup>5)</sup> など多くの植物で遺伝変異が調査されている。また、*atp B* - *rbc L* 領域もスイカズラ属の分子系統解析<sup>16)</sup>などに用いられている。

本調査で注目したエゾコザクラ (*Primula cuneifolia* Ledeb. var. *cuneifolia*) はサクラソウ科サクラソウ属の多年生草本である。長花柱花と短花柱花の花型を持つ異型花柱性で自家不和合性を示し、特定の昆虫により送粉される。種子は重力散布と考えられている。主な分布は大雪山系で、他に日高山系、知床山系や利尻岳などに点在している<sup>20)</sup>。いずれも森林限界より上部の雪田草地や湿性草地中に見られるが、分布地域は限定され、どの分布地域でも密度が低く、北海道

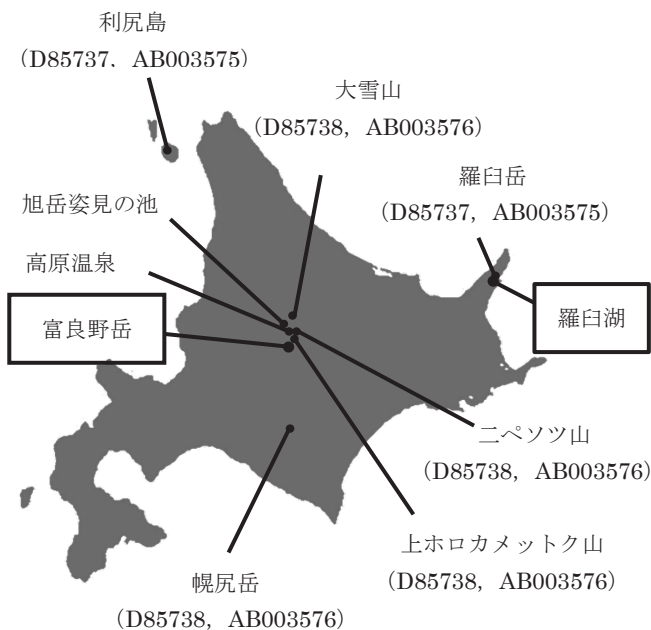


図-1 本調査地域とこれまでの調査地域<sup>3,4,22)</sup> 四角で囲んだ地域が本調査地域を示す。( )内は DNA Data Bank of Japan (DDBJ)<sup>12)</sup>のアクセッションナンバーを示す。

Fig.1 This studied populations and past studied populations<sup>3,4,22)</sup> This studied populations are portion surrounded by square. Numbers in parentheses are accession number of DNA Data Bank of Japan (DDBJ)<sup>12)</sup>.

表-1 PCRに用いた葉緑体ゲノムプライマー配列

Table 1 The chloroplast primer arrays that were used PCR

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

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

\* It is a walking primer region from *atp B* - *rbc L*.

レッドデータブックでは希少種として扱われている<sup>7)</sup>。希少種は今後の環境の変化次第で絶滅の危険度が増す種である。これまでに Fujii *et al.* がエゾコザクラの塩基配列の変異を基に系統地理学的な研究<sup>3,4)</sup>を行っているが、各調査地域での調査個体数が少ないため、希少種の保全や復元を行う場合に必要となる地域個体群の遺伝子の多様性の把握には至っていない。一方、地域個体群の遺伝子の多様性の把握を念頭に置き、大雪山系の隣接する旭岳姿見の池と高原温泉で調査を行った澤田ら<sup>22)</sup>の調査では Fujii *et al.* の報告<sup>3,4)</sup>には見られないハプロタイプが検出され、隣接する地域であっても遺伝子の多様性が異なることを明らかにした。この調査は大雪山系中央部で行ったので、より詳細な地域個体群の遺伝子の多様性を把握するためにはこれまで行った調査の隣接地域や未調査地域での調査が必要とされる。

そこで、本調査ではエゾコザクラの分布の東端である知床山系の羅臼湖と大雪山系の南部に位置する十勝岳連峰の富良野岳に注目し、エゾコザクラの葉緑体ゲノムの遺伝変異の有無を調べた。

## 2. 材料ならびに方法

材料は2016年7月29日に北海道目梨郡羅臼町の羅臼湖二の沼周辺の湿地に点在するいくつかのパッチと2016年8月7日に北海道空知郡上富良野町の富良野岳山頂へ向かう途中の上ホロ分岐過ぎの登山道周辺に点在するいくつかのパッチから採取した(図-1)。各パッチから数個体、各地域個体群で20個体を選び、各個体から葉を1枚採取、-80℃で保存した。保存した葉は SDS 0.3%, NaCl 400 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 20 mM で構成した SNET 100 μl と Proteinase K 2 μl を混合した溶液に浸漬し、DNAを55℃1時間で加温抽出した。抽出したDNAはDNA精製キット(Wizard SV Gel and PCR Clean Up System: Promega)を用いて精製した。抽出液から葉を取り除き、Membrane Binding Solution 100 μlを加えた混合液をCollection Tubeに挿入したSV Minicolumnに添加し、室温で1分間インキュベートした。その後、16,000 gで1分間遠心し、Membrane



表-4 各調査地域個体群等における遺伝的多様性

Table 4 Genetic diversity in each studied population

	サンプル数	ハプロタイプ多様度	塩基多様度
羅臼湖	16	0	0
富良野岳	15	0	0
大雪山系 (大雪山, ニペソツ山, 上ホロカメツク山, 旭岳姿見の池, 高原温泉, 富良野岳)	57	0.228	0.00034
知床山系 (羅臼岳, 羅臼湖)	21	0.381	0.0004
日高山系 (幌尻岳)	5	0	0
エゾコザクラ (全道)	83	0.573	0.00091

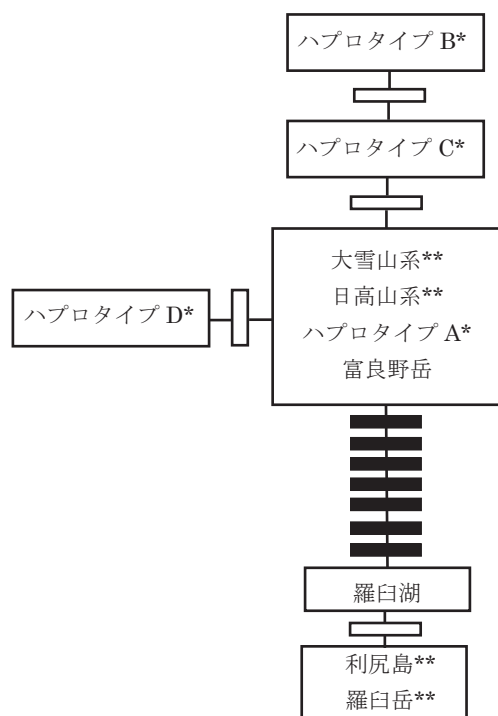


図-2 エゾコザクラの塩基配列を基に構築したハプロタイプ間のネットワーク樹

\*澤田ら<sup>22)</sup>, \*\*Fujii *et al.*<sup>3,4)</sup>

黒い四角は置換, 白い四角は挿入欠失を示す。

Fig.2 Haplotype network tree constructed that based on base sequences

\*Sawada *et al.*<sup>22)</sup>, \*\*Fujii *et al.*<sup>3,4)</sup>

Black squares show replacement and white squares show indel.

前述のデータを基に, 今回調査した羅臼湖と富良野岳に加え, 大雪山系 (大雪山, ニペソツ山, 上ホロカメツク山, 旭岳姿見の池, 高原温泉, 富良野岳), 知床山系 (羅臼岳,

羅臼湖), 日高山系 (幌尻岳) およびエゾコザクラ (全道) で, それぞれハプロタイプ多様度と塩基多様度を算出した。その結果, 羅臼湖および富良野岳ではハプロタイプ多様度が 0, 塩基多様度が 0 であった (表-4)。また, エゾコザクラ (全道) ではハプロタイプ多様度が 0.573, 塩基多様度が 0.00091 であった。エゾコザクラ (全道) のハプロタイプ多様度と塩基多様度は津田らの報告<sup>24)</sup> で示された在来植物 10 種のハプロタイプ多様度 0~0.815 (平均 0.421), 塩基多様度 0~0.00422 (平均 0.00149) と比較し同程度であった。しかし, 羅臼湖, 富良野岳, 日高山系のハプロタイプ多様度と塩基多様度は 0 で著しく低く, 遺伝子の多様性はみられなかった。遺伝子の多様性が低いということは地域個体群の繁殖力や生存率が低下しているものと推測される。これらのことから, これらの地域個体群は環境変化の影響を受けやすく, 存続が危ぶまれる状態になることも考えられ, 効果的な保全計画の立案が必要と考えられる。

前述のデータを基にハプロタイプネットワーク樹を作成した (図-2)。その結果, 大雪山系および日高山系のエゾコザクラと知床山系および利尻島のエゾコザクラとの間で分化が進んでいることが明らかになった。希少種や絶滅危惧種の個体群の個体数が減少した場合, 保全や復元が必要とされ, 自生地間での種子や個体の移動が検討される。種子や個体の移動は遺伝子の多様性に攪乱を起こす可能性があるため, 配慮が必要である<sup>17)</sup>。これらのことから本調査結果はエゾコザクラの保全や復元を考える場合, 大雪山系および日高山系と知床山系および利尻島との間での種子や個体の移動は避けるべきであることを示唆した。

これまでに行われたサクラソウ (*Primula sieboldii* E. Morren) の復元計画策定ではすでに個体数が減少した個体群で調査を行ったため, 遺伝子の多様性に配慮した保全や復元に重要な地理的構造の情報が十分得られなかった可能性があることが報告されている<sup>8)</sup>。そのため, 地域個体群が減少する前に遺伝変異を知ることが意味があり, 本調査のような研究の積み重ねが重要と言える。また, エゾオオサクラソウ (*Primula jesoana* Miq var. *pubescens* Takeda et Hara) で

釧路の沿岸と内陸を比較した報告<sup>21)</sup>やゼンテイカ (*Hemerocallis dumortieri* C. Morren var. *esculenta* (Hoidz.) Kitam. ex M. Matsuoka et M. Hotta) で霧多布湿原と霧多布岬を比較した報告<sup>10)</sup>は近隣地域でも出現するハプロタイプやその出現割合に差が生じることを示唆している。さらに、エゾコザクラの生育する雪田環境は環境変動が大きく、そのことが昆虫との相互作用、繁殖や種子発芽特性等に影響を及ぼしている。例えば、雪田の雪解け時期の違いは開花時期の違いや地域個体群間で花粉媒介を通じた遺伝子交流を妨げるため、近隣地域や同一地域内でも遺伝子交流が行われず、隔離が生じることが知られている<sup>13)</sup>。これらの報告は地域個体群の遺伝子の多様性を把握する場合、1 調査地域個体群の範囲をどのように設定するのが重要であり、雪田環境ではその設定がより難しいことを示唆している。

今後、保全や復元に向けた遺伝子の多様性の基礎的知見を集積するなかで1 調査地域個体群の範囲の指標を示したい。また、前報<sup>22)</sup>で地域個体群の遺伝子の多様性を把握する場合、1 調査地域個体群あたりの調査個体数は20 個体程度必要であることを示唆したが、地域個体群の遺伝子の多様性は地域個体群サイズと関係があるため<sup>6)</sup>、地域個体群サイズにあった調査個体数をより明確にしていきたい。

#### 引用文献

- Arzate-fernandez, A., Miwa, M., Shimada, T., Yonekura, T. and Ogawa, K. (2005) Genetic diversity of Miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*), an endemic and endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biology*, 20: 57-65.
- Frankham, R., Ballou J. D. and Briscoe, D. A. (2007) 遺伝的多様性. 西田睦監訳, 保全遺伝学入門. 文一総合出版, pp.71-103.
- Fujii, N., Ueda, K., Watano, Y. and Shimizu, T. (1995) Intraspecific sequence variation in chloroplast DNA of *Primula cuneifolia* Ledeb. (Primulaceae). *Journal of Phytogeography and Taxonomy*, 43: 15-24.
- Fujii, N., Ueda, K., Watano, Y. and Shimizu, T. (1999) Further analysis of intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Primula cuneifolia* Ledeb. (Primulaceae): Implication for biogeography of the Japanese alpine flora. *Journal of Phytogeography and Taxonomy*, 112: 87-95.
- 原田光 (2012) 熱帯林の遺伝子研究—環境省地球環境研究総合推進費によるプロジェクトを終えて—. *森林遺伝育種*, 1: 28-34.
- Hirao, A. S., Watanabe, M., Liu, Q., Li, X., Masuzawa, T., Ohara, M. and Wada, N. (2015) Low genetic diversity and high genetic divergence in southern rear edge populations of *Dryas octopetala* in the high mountains of far East Asia. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 66(1): 11-22.
- 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/> (参照: 2017年2月20日).
- Honjo, M., Ueno, S., Tsumura, Y., Washitani, I. and Ohsawa, R. (2004) Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. *Biological Conservation*, 120: 211-220.
- 堀本理華・北野紀子・鷲谷いづみ (2013) 参加型モニタリングプログラムを活用したセイヨウオオマルハナバチ対策—継続参加者の役割と運営者からの情報発信の意義—. *保全生態学研究*, 18: 213-224.
- 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. *日本緑化工学会誌*, 38(1): 228-231.
- 環境省. “生物多様性とは”. 環境省生物多様性ウェブサイト. <http://www.biodic.go.jp/biodiversity/> (参照: 2017年2月20日).
- 国立遺伝学研究所. “DNA Data Bank of Japan”. <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html> (参照: 2017年3月2日).
- 工藤岳 (2000) 大雪山のお花畑が語ること. 京都大学学術出版会, pp.3-143.
- 黒川俊二 (2006) 分子生物学的手法によるイチビの種内変異および日本への侵入経路の解明. *雑草研究*, 51(3): 165-171.
- 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. 文一総合出版, pp.19-36.
- Nakaji, M., Tanaka, N. and Sugawara, T. (2015) A molecular phylogenetic study of *Lonicera* L. (Caprifoliaceae) in Japan based on chloroplast DNA sequence. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 66(3): 137-151.
- 日本緑化工学会 (2002) 生物多様性保全のための緑化植物の取り扱い方に関する提言. *日本緑化工学会誌*, 27(3): 481-491.
- 岡田久子・倉本宣 (2009) 市民・行政・研究者の協働による絶滅危惧種カワラノギク保全活動の取り組み—多摩川における保全の実施とその評価—. *保全生態学研究*, 14: 101-108.
- Okaur, T. and Harada, K (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese Beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity*, 88: 322-329.
- 佐藤謙 (2007) 北海道高山植生誌. 北海道大学出版会, pp.175-252.
- 佐藤由佳・我妻尚広・岡本吉弘 (2010) 北海道におけるオオサクラソウ (*Primula jesoana*) の葉緑体ゲノムの遺伝的変異. *酪農学園大学紀要*, 35(1): 77-83.
- 澤田円・我妻尚広・岡本吉弘・森志郎 (2016) 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. *日本緑化工学会誌*, 42(1): 160-162.
- 鈴木重則 (2006) 希少種マツカワの遺伝的多様性の維

- 持に向けた交配技術. 日本水産学会誌, 72(2): 254-258.
- 24) 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. 日本緑化工学会誌, 40(1): 72-77.
- 25) 津田吉晃 (2010) 森林樹木の遺伝的多様性保全と生態リスク. 日本生態学会誌, 60: 349-359.
- 26) 鷺谷いづみ (1999) 生物保全の生態学. 共立出版株式会社, pp.162-169.
- 27) 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. 文一総合出版, pp.199-201.
- 28) 横田仁美・我妻尚広・岡本吉弘 (2011) ミゾソバ (*Persicaria thunbergii* (Siebold et Zucc.) H. Gross.) における葉緑体ゲノムの遺伝変異. 酪農学園大学紀要, 36(1): 17-24.

(2017年5月31日受理)