

平成 20 年度 霧多布湿原学術研究助成報告書

霧多布湿原とその周辺における希少種エゾオオサクラソウ  
(*primula jesoana* var. *pubescens*) の遺伝的多様性の評価  
=葉緑体 DNA 配列を指標とした野生集団の系統分化の把握=

我妻尚広・佐藤由佳  
(酪農学園大学大学院酪農学研究科)

生物種の保全を考える場合、その生物種の生育環境や周辺の生物多様性を調査するとともに、種内の遺伝的多様性を認識する必要がある。併せて、その生物種の適応や集団分化を理解することが必要不可欠である。

霧多布湿原内には北海道レッドデータブックに希少種と位置づけられているエゾオオサクラソウ (*primula jesoana* var. *pubescens*) が自生している。サクラソウ属はその美しさから江戸時代より自然突然変異や偶発実生の選抜が行われ数多くの園芸品種が作り出されていて、栽培種として利用してきた。その陰では自生地からの盗掘が後を絶たず、絶滅の危機に瀕している自生地も少なくない。

そこで、本研究では霧多布湿原とその周辺に自生する希少種エゾオオサクラソウの遺伝的多様性を調査・評価し保全に関する基礎的な知見を得ることを目的とした。まず始めに、葉緑体 DNA 非コード領域 3 領域を用いて野生集団の系統分化の把握を試みた。

## 1. 材料および方法

材料：エゾオオサクラソウ

採取日：2008 年 5 月 30～31 日

採取地：霧多布湿原とその周辺、計 7ヶ所（図 1）。



図 1. 霧多布湿原とその周辺のエゾオオサクラソウの採取地

- |         |                            |
|---------|----------------------------|
| A 3番沢   | (N43°04'45.3 E145°02'47.9) |
| B 6番沢   | (N43°05'50.3 E145°03'09.2) |
| C 4番沢   | (N43°57'99.9 E145°34'34.4) |
| D 3番沢   | (N43°08'38.0 E145°08'13.8) |
| E 藻散布   | (N43°00'15.2 E145°01'04.2) |
| F 末広、厚岸 | (N42°59'57.7 E144°53'24.3) |
| G 昆布森   |                            |

## 採取方法：

各採種地に生育していたエゾオオサクラソウから 1 個体あたり 3 枚の葉を 4 個体から採取した。採取した葉は、1 枚ずつ茶袋に入れ、採取地ごとにシリカゲルを入れたポリエチレン製ジッパー付きの袋に入れて持ち帰り、-80°C の冷凍庫に入れ保存した。

## 実験方法の概要

- ① 葉から DNA の抽出
- ② PCR 法による DNA の増幅
- ③ アガロースゲル電気泳動にて DNA の分画
- ④ ゲルから DNA の抽出
- ⑤ シークエンサーにて DNA の塩基配列の決定

## 実験手順

### ① 葉から DNA の抽出

-85°C に保存したエゾオオサクラソウの葉を 1cm 角切り取り（図 2）0.5ml サンプルチューブに入れ、SNET (SDS 0.3%、NaCl 400mM、EDTA 5mM、Tris-HCl (pH8.0) 20mM) を 100 μl と Proteinase K を 2 μl 加え、ヒートブロック（図 3）を用いて 57°C で 1 時間加熱し DNA を抽出した。

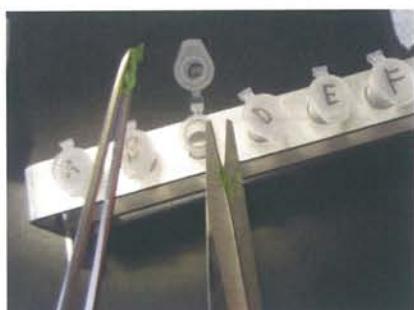


図 2. 葉を切り刻む様子



図 3. ヒートブロック

### ② PCR 法による DNA の増幅

抽出した DNA は表 1 に示す葉緑体 DNA プライマー 5 組（本城 2005）を用いて、PCR 法によりサーマルサイクラー（ABI Veriti : 図 4）で増幅した。Buffer には 2×Ampdirect Plus (SHIMADZU)、Taq には Nova taq (Novagen)（図 5）を使用し、表 2 に示す反応プログラムで増幅した。



図 4. サーマルサイクラー



図 5. 使用した試薬

表 1. DNA 増幅に用いた葉緑体 DNA プライマー

領域	プライマー配列	アニーリング温度
Trn(GUG) psbA	ACGGGAATTGAACCCGCGCA CGAAGCTCCATCTACAAATGG	63.4°C
TrnL(UAA) intronF	CGAAATCGGTAGACGCTACG	61.3°C
TrnL(UAA) intronR	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	
TrnL(UAA) 3'exon	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	60.2°C
TrnF(GAA)	ATTGAACTGGTGACACGAG	

表 2. PCR 反応プログラム

step	温度	時間
予備加熱	95°C	10min
熱変性	94°C	30s
アニーリング	50°C	60s
伸長反応	72°C	60s
反応停止	72°C	7min
冷却	10°C	∞

### ③ アガロースゲル電気泳動にて DNA の分画

増幅した DNA はアガロースゲル電気泳動により分離した。アガロースゲル板(以下ゲル板)はアガロース S(ニッポンジーン) 0.6g に TBE Buffer 30ml を加え、電子レンジで完全に溶解し、型枠に移しコームを差しこみ、2%ゲル板を作成した。作成したゲル板は TBE Buffer を貯めた電気泳動槽内(図 6)に入れた。PCR 産物 18μl と Ez vision (コスモ・バイオ) 1μl

を混合し、ゲル板のウェルに入れた。その後、100V の定電圧で 25 分間泳動し、増幅させた DNA を分離し、275nm の UV 照射により蛍光したバンド（図 7）の有無で DNA を確認した。



図 6. 電気泳動装置

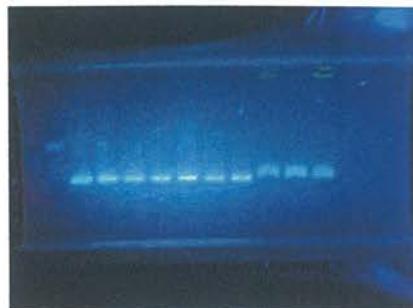


図 7. 抽出した DNA のアガロース  
ゲル電気泳動像

#### ④ ゲルから DNA の抽出

ゲルからの DNA 抽出は UV 照射によりバンドの有無を確認後、ゲル板の発光している DNA のバンドをゲル板と共に切り取った（図 8）。切り取ったゲル片は、穴を開けていない 1.5ml チューブと注射器で底に穴を開けた 1.5ml チューブを重ねたものの中に入れ、20°C、8,000 回転、5 分の条件でマイクロ冷却遠心機（KUBOTA 3700：図 9）にかけ DNA を含むゲル片を上の 1.5ml チューブから下の 1.5ml チューブに遠心力によって碎きながら移動させた。ゲル片が完全に落ちたら 1 容の中性フェノールを加え、白濁色になるまで指で弾いてよく混ぜた。その後、-80°C の冷凍庫に入れ、30 分以上凍らせた。凍らせた 1.5ml チューブを冷凍庫より取り出し半解凍させ、20°C、15,000 回転、5 分の条件でマイクロ冷却遠心機にかけ、上澄み液と沈殿液に分離させた。そこから上澄み液だけを違う 1.5ml チューブに取り出し、1 容の中性フェノクロを加え 10 分よく振り、その後 4°C、15,000 回転、5 分の条件でマイクロ冷却遠心機にかけ、再び上澄み液と沈殿液に分離させた。分離した上澄み液を違う 1.5ml チューブに取り出し、1 容の 2 - プロパノール（和光純薬）と上澄み液の 1/10 容の 3M 酢酸ナトリウム（関東化学）を加え、20 回上下に降り攪拌させた後常温で 10 分放置し、4°C、15,000 回転、30 分の条件でマイクロ冷却遠心機にかけた。その後、1.5ml チューブの底の白い沈殿物を残して溶液を全て捨て、70%エタノール 1ml を加え、沈殿物が動かないよう静かにエタノールを回し、4°C、15,000 回転、15 分の条件でマイクロ冷却遠心機にかけた。遠心分離後、沈殿物を残して 1.5ml チューブ内の溶液を取り除き乾燥させた。乾燥後、1.5ml チューブに TE50μl を入れ、沈殿物を溶かし、冷蔵庫で一晩置いて DNA テンプレートとした。

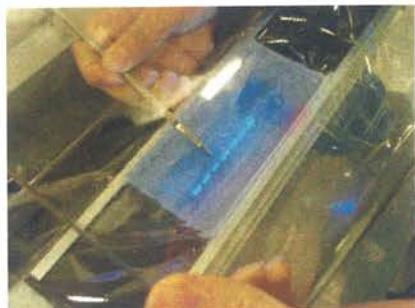


図 8. バンドの切り取り作業



図 9. 遠心分離機

##### ⑤ シークエンサーにて塩基配列の決定

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてシークエンス反応液を作成し、PCR 反応を行う。PCR 産物を 125mM EDTA を 95% エタノールを用いて遠心分離機にて遠心分離を行い DNA を沈殿させる。更に、70%エタノールを加え沈殿させる。沈殿した DNA にホルムアミドを加え 95°C、2 分の条件でヒートショックする。すぐに氷水で冷却し、ジェネティックアナライザー (ABI 310 : 図 10) を用いて塩基配列の解読 (図 11) を行った。各領域の塩基配列の決定は、PCR エラーやシークエンサーの解読をしないため、個体ごと同領域の塩基配列を 2 回以上解読し、同じ塩基配列が得られた場合とした。塩基配列決定後、ソフトウェア MEGA4 を用いて塩基配列の相同性を解析し、多型領域の有無を調べた。

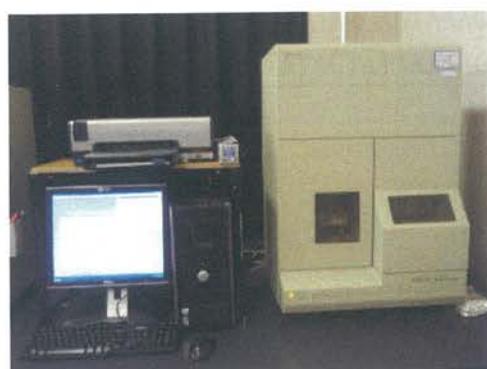


図 10. ジェネティックアナライザー



図 11. 塩基配列の波形

### 3. 結果

供試した 3 領域の各塩基配列を表 3 に示す。今回、葉を採取した地域に自生するエゾオオサクラソウの葉緑体 DNA は、解読に用いた 3 領域に多型が確認されず、同一のハプロタイプであることが示唆された。

今後、解読領域を増やすとともに、SSR マーカー等を用いたエゾオオサクラソウの構造解析を行っていきたい。

表 3.供試した 3 領域の各塩基配列

領 域	塩 基 配 列
Trn ( GUG ) ~ psbA	CATATACTTTCGTTAGTAAGAATAAGGATTCTTATGGAAAAATGAAAAGGGGGT TCTAAGTTAGTCATGATTGAGTATCGTTTTCATTTTATTCTGTATTAATTGA AATTTTATTCCGTGCCTTTTTGTTAATTGTTAGAATATGAAATAAAAAA CTTTTACATTTCTTAATATTGAATTGATAATTATTAAGATATGAACCAAAT AATGATGACTGGTTAAAAT
TrnL ( UAA ) intronF ~ TrnL ( UAA ) intronR	TAAAGCGTAATAAGGATTGAGCCTTAGATGGAAACCTACTAAGTGAGAACTTC ATTCAAGAGAAACCTGGAATTAAATAAAAATGGTAATCCTGAGCCAATCCTCTT TTCAAAAACAAGGTTAAAGGAAAATCAAACAAAAGGGGGATAGGTGCAGAGAC TCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTGGTCGCGTTGGTAGAGGAATCCTTCA TGAAAATTGCAGATAAGGATGAAAGAGAAATGTATATACATACGCATATGTACTGAA ATACTATATCATCAAATAAAATGTTATTTCTATAAAAAAAAGAGAAAAATA GAAGAATTGTTGCGAATCAATTCTACATTCCACATTGACTAAAGAATTTCATATT ATTGATCAAAGCATTACTCCATACCATAATAGTCTGATAGAT
TrnL ( UAA ) 3'exon ~ TrnF (GAA)	TATCCGACCACTCCGATGCATCATCCTCATTACTAGACGACTGGGTCTATGT CAATTAAAAACAAAAGGTATTATTAAAGTCTTATGCAAGCCCTGTAATTTTG ATTTCAAAAAAGGAAAATGTGTAAGTCGAATAATGATAGGGACCGTGAATCATT CACATGGAGATTCTGCTCAAAGATGTTCATTTGTACATGTATTAAATAGCATAAT ACATAATACCACAAAATTATAAGTAATAAGAGAAAGCATTCTGCTCGGATCC ATTGTCAAAGAGTAAAGTGAATCAGAAAAATACCGAATTAGAACTGCTAACGAAA AATATATAGTATAAATAGCATAATCAT