

2011 年度

霧多布湿原学術研究助成報告書

北海道浜中町におけるゼンテイカの
葉緑体ゲノムの遺伝変異

酪農学園大学 短期大学部

資源植物学研究室 我妻 尚広

目 次

緒 言	1
材料および方法	2
結果および考察	7
摘 要	9
謝 辞	9
引用文献	10
図 表	12

緒 言

ゼンテイカ (*Hemerocallis dumortieri* C.Morren var. *esculenta* (Koidz.) Kitam. ex M.Matsuoka et M.Hotta) はユリ科ワスレグサ属の多年生草本であり，中部地方以北の本州および北海道全域に分布しており，高山や低地の湿原や湿地草原，また海岸の岩場や草地に群生する（鮫島ら 1993，佐竹 1982）．近年，エゾシカの急増に伴い，農林業や高山植物にエゾシカの食害による影響が見られる（北海道 2009）．特に，北海道厚岸郡浜中町では多くのゼンテイカの花やつぼみを食べるため（図 1），種子繁殖が厳しい状態が続き，世代交代が進まない状況にある．ゼンテイカは多年生であるため，現在のところ，個体数の急激な減少は認められていない．しかし，エゾシカによる食害が続くと，個体数の著しい減少や個体群の消失が危惧される．矢原（2002 a）は個体数の減少が，遺伝的変異の消失と，それにとまなう近親交配の増大が，絶滅のリスクをさらに高める可能性がある」と述べている．また，松田（2002）はそれぞれの地域には適応した対立遺伝子または組合せがあり，地域間での植物の移動が，同種であってもその地域の個体群の存続に悪影響を及ぼすおそれがあることを指摘している．一方，矢原（2002 b）は，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，地域間での移植を行い，遺伝的な交流の

機会が増えることは、多様性の減少に繋がると指摘している。これらのことから、個体群を復元する際に闇雲に同種の個体を移動させるだけでは復元したとは言えない。そのため、復元するためには個体数の減少の前にその個体群の遺伝的多様性を把握しておく必要がある。しかし、霧多布湿原のゼンテイカの遺伝的多様性を調べた例は少なく、葉緑体ゲノムを用いた調査はみられない。

そこで、本実験では保全と復元の観点から基礎的知見を得るため、北海道厚岸郡浜中町に分布するゼンテイカの葉緑体ゲノム *trnH-psbA* 領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法を用いて決定し、遺伝変異の有無を検討した。

材料および方法

本実験には、北海道厚岸郡浜中町の霧多布湿原の仲の浜と琵琶瀬の木道沿い（図 2）、および霧多布岬の海岸段丘の上部の草原（図 3）から、それぞれ 28 個体、3 個体および 13 個体のゼンテイカを選び（図 4）、葉を 1 個体につき 2 から 3 枚ずつ採取した。採取した葉は 1 枚ずつ茶袋に入れ、採取場所ごとにポリエチレン製ジッパー付きの袋に入れて -80℃ で保存した。

DNA 抽出には保存した葉を用いた。保存した葉は表 1 に示す組成の溶解液を用いて DNA を抽出した。DNA は溶解液に 10×2 mm 程

度の大きさに刻んだ葉を浸漬し、アルミブロック恒温槽（EYELA MG-2300 型）を用いて 55℃、60 分で DNA を加熱抽出した。本研究では Kress *et al.* (2005) が葉緑体ゲノムの中でも変異に富み、DNA バーコードの候補として提案している *trnH-psbA* 領域を調べることとし、表 2 に示す葉緑体プライマーを用いた。抽出した DNA は PCR 法によりサーマルサイクラー（ABI Veriti）で目的とした DNA 領域を増幅した。PCR 反応液の組成は表 3 とし、PCR 反応にはサーマルサイクラー（ABI Veriti）を用いて、反応液を 95℃10 分間で予備加熱を 1 サイクル、熱変性を 94℃30 秒間、アニーリングを 60℃1 分間、伸長反応を 72℃1 分間で 40 サイクル行い、72℃7 分間で反応を停止した。反応後は 4℃で保存した。増幅した DNA はアガロースゲル電気泳動法により分離した。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）0.6 g に TBE Buffer 30 ml を加え電子レンジで完全に溶解して型枠に移し、コームを差し込み、2.0%ゲル板を作成した。作成したゲル板は TBE Buffer を入れた電気泳動槽内に沈めた。PCR 産物 6 μ l と EZ Vision (aMResco) 1 μ l を混合し、ゲル板のウェルにアプライした。その後、定電圧 100V、25 分間の通電により分離し、ゲル板に 272 nm の UV を照射してバンドの有無を確認することで DNA の増幅の可否を確認した。

DNA 増幅が見られたものを用い、再び PCR 反応させた。PCR 産

物はアガロースゲルを支持体として、電気泳動法により分離した。ゲル板は、アガロース S 0.6 g にオートクレーブ (アルプ KT2322) で滅菌した TBE Buffer 75 ml 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込み、0.8%ゲル板を作成した。ゲル板は電気泳動槽内にオートクレーブで滅菌した TBE Buffer を入れ、その中に沈めた。PCR 産物 20 μ l と EZ Vision 2 μ l を混合し、ゲル板のウェルにアプライした。その後、定電圧 100V で 25 分間の通電により分離した。ゲル板に 272 nm の UV を照射して目的の PCR で増幅した DNA 断片を確認し、メスで切り出した。

アガロースゲルからの DNA 断片の回収には、カラム抽出法とゲル抽出法の 2 通りを用いた。カラム抽出法では、Promega 社の Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて抽出した。まず切り出したゲルを 1.5 ml 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 μ l 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 16,000 \times g 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 (95%エタノール添加済み) 700 μ l を添加し、16,000 \times g 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 (95%エタノール添加済み) 500 μ l を添加し、16,000 \times g で5分間遠心した。その後、SV Minicolumn を取り外し、新しい 1.5 ml マイクロチューブに移し Nuclease-Free Water 30 μ l を添加した。1分間、室温でインキュベートした後、16,000 \times g で1分間遠心した。SV Minicolumn を廃棄し、1.5 ml マイクロチューブ内の溶出された DNA に 20 μ l の TE Buffer を添加した。

一方、ゲル抽出法では、まず 1.5 ml 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落ちるまで遠心を行い、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 $^{\circ}$ 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チューブに移し、そこに等量の中性フェノール・クロ (中性フェノール 1:クロロホルム 1) を添加して混合し、チューブローテーター (AS ONE TR-350) 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 0.6 ml マイクロチュ

ューブに移し、1/10 容の pH5.2 に調整した 3M 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。チューブに 70% エタノール 200 μ l を添加し、静かに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 μ l の TE Buffer で溶解した。

シーケンス反応には Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems) を用いた。シーケンス反応液は表 4 のように調整し、PCR 産物を精製して DNA テンプレートとした。シーケンス反応にはサーマルサイクラーを用いて、反応液を 95°C 1 分間で 1 サイクル、96°C 30 秒間、50°C 15 秒間、60°C 4 分間の反応条件で 25 サイクル行った。その後、シーケンス反応液に 125 mM EDTA を 2.5 μ l、100% エタノールを 30 μ l 添加して混合し、室温遮光条件下に 20 分間放置した後、12,000 rpm で 20 分間遠心を行った。遠沈後、直ちに上清を取り除き、70% エタノール 200 μ l を添加しチューブ内を洗浄し、12,000 rpm で 10 分間遠心を行った。直ちに上清を完全に取り除き、沈殿を完全に乾燥するまで遮光条件下で風乾を行いサンプルとした。遮光風乾を行ったサンプルに Hi-Di formamide (Applied Biosystems) を 20 μ l 添加してボルテックスで混合した後、95°C で 2 分間加熱後、氷水中で急冷し、ABI PRISM 310 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。その後、ソフトウェア MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) を用いて塩基配列を解析し、個体間の塩基配列を比較、多型領域の有無を調べた。

結果および考察

ゼンテイカにおける葉緑体ゲノム *trn H - psb A* 領域の塩基配列を表 5 に示す。本実験では葉緑体ゲノム *trn H - psb A* 領域の 565 の塩基配列を決定した。また、調査をした 44 個体を比較したところ、遺伝変異は確認できなかった。

これまで、遺伝変異の解析は C-バンド法などの分染法が利用されることが多かった (野口 1988, 稲田・遠藤 1995)。野口 (1988) によると、ゼンテイカ群での C-バンド法による核型解析で、霧多布では 4 つの変異パターンがあったと報告している。しかし、今回の調査では葉緑体ゲノム上での遺伝変異は確認できず、C-バンド法により核型を調べた結果と葉緑体ゲノムを調べた結果が異なった。近年の研究において、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 (Okuhara and Harada 2002)。また、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も適していると言われている (Amoatey and Tilney - Bassett 1994)。これらのことから、

本実験のような種内変異や地理的変異を検討する場合、葉緑体ゲノムを用いたほうが、より適していると考えられる。本実験の結果からは、霧多布湿原と霧多布岬の間では両地域の遺伝的多様性に影響を与えずに移動することが可能であるといえる。しかし、本実験では1領域での遺伝変異の検討しか行っておらず、このような判断することは結果を過大に解釈することになる。今後、別領域での遺伝変異の有無を明らかにしたうえで、北海道内の地域間においてゼンテイカの移動が遺伝的多様性に影響を与えるかどうかを検討する必要がある。また、野口（1988）はC-バンド法では介在部C-バンドを持つ個体が北海道、東北・関東、中部地方の3地域に独立して生じ明瞭な地域性があったと報告している。そのため、東北・関東や中部地方のゼンテイカの葉緑体ゲノムの遺伝変異を探索することで地域性を検討したいと考えている。

摘 要

本実験では保全と復元から基礎的知見を得る目的で、北海道厚岸郡浜中町に分布するゼンテイカの遺伝変異を調べた。その結果、葉緑体ゲノム *trn H-psb A* 領域において 565 の塩基配列を決定したが、比較した 44 個体には遺伝変異が見られなかった。

謝 辞

本実験を遂行するにあたり、ご協力して頂きました霧多布湿原センターの皆様、大変ありがとうございました。

なお、本研究の一部は平成 23 年度、霧多布湿原学術研究助成をうけて実施しました。

引用文献

- Amoatey, H. M. and R. A. E. Tilney-Bassett (1994) A test of the complementary gene model for the control of biparental plastid inheritance in zonal pelargoniums. *Heredity* 72:69- 77.
- 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)
- 稲田委久子・遠藤元庸 (1995) アサツキの系統間変異に関する細胞遺伝学的研究, 園芸学会雑誌 64 (2) : 339-349.
- 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.
- 松田裕之 (2002) 野生生物を救う科学的思考とは何か?, “「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, 文一総合出版, 東京. 19-36.
- 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.
- Okuhara, T. and K. Harada (2002) phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) . *Heredity* 88 :193-208.
- 鮫島惇一郎・辻井達一・梅沢俊 (1993) 黄やオレンジの花, “新版 北

海道の花 <増補版>”，北海道大学図書刊行会，北海道．62．

佐竹義輔（1982）ユリ科 LILIACEAE，“日本の野生植物 草本 I
単子葉類”，佐竹義輔・大井次三郎・北村四郎・亘理俊次・富成
忠夫編，株式会社 平凡社，東京．30-31．

矢原徹一（2002 a）植物集団の保全遺伝学—最近の進歩，“「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，文
一総合出版，東京．129-134．

矢原徹一（2002 b）保全生物学における生物地理学の役割，“「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，
文一総合出版，東京．199-201．

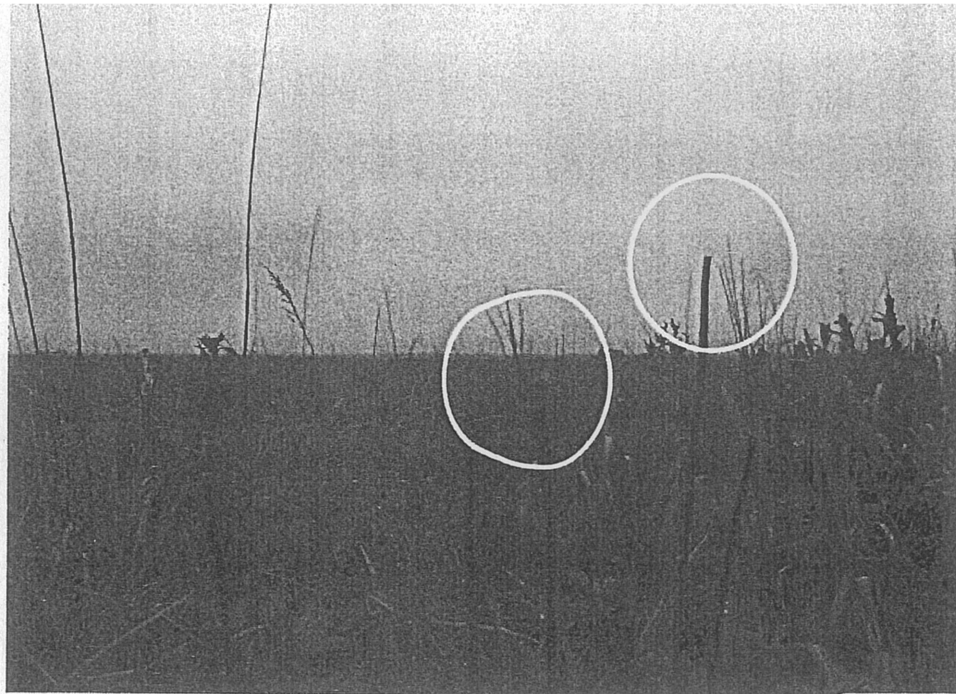


図 1. 厚岸郡浜中町におけるゼンテイカのエゾシカによる食害の様子。



図 2. 霧多布湿原の採取地の様子。

表 1. ゼンテイカの DNA 抽出に用いた
溶解液の組成

SNET	150 μ l
SDS	0.30%
NaCl	400mM
EDTA	5mM
Tris-HCl(pH8.0)	20mM
Proteinase K	3 μ l
計	153 μ l

表 2. 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>trn</i> H(GUG)	ACGGGAATTGAACCCGCGCA
<i>psb</i> A	CGAAGCTCCATCTACAAATGG

表 3. PCR 反応液の調整

PCR Master Mix	10 μ l
F-Primer	0.5 μ l
R-Primer	0.5 μ l
DNA template	0.5 μ l
滅菌水	8.5 μ l
計	20 μ l

表 4. シークエンス反応液の調整

Reaction Mix(Big Dye ver1.1)	1.0 μ l
5 \times Sequence Buffer	1.5 μ l
Primer(5 倍希釈)	0.5 μ l
DNA template	0.5 μ l
滅菌水	6.5 μ l
計	10 μ l

表 5. ゼンテイカ葉緑体ゲノム *trn H - psb A* 領域の塩基配列
(565bp)

1	TCCGCCCTT	ATCTAGCTAA	AGGATTTTCT	CTTTTTTCCA	TTCATCATT
51	TTGTATATTC	ATCATTATTG	TAATTGTATT	TATTCTTACT	TTCATAGTTA
101	GATCGAGATA	TTCTATTAGA	CGTAGAATGC	CAATCTTTAA	AAGAAAATGT
151	AAAAAAAAGG	AGTAATCAGC	TGTGACACGT	TACTAAAAA	AAAATCCTTT
201	TGTAGCTAAT	CATTTAGCAG	GAAAAATGGA	AAAACCTAAC	ATGAGGGAGG
251	AGAAAGAAAT	AAAGTAACTT	GGTCTCGGGC	ATCTACCATT	ATACCCACAA
301	TGATTGGCCA	TACAATCGCT	ATTCATAATG	GAAAAGAACA	TTTACCTATT
351	TATATAACGG	ATGTATGGTA	GGTCACAAAT	TGGGAGAATT	CGCGCCTACT
401	CTGACTTTTCG	CGAGACATGC	GAGAAACGAT	AATAAATCTC	GTCGTTAAGT
451	CGTTAATTTG	GCGGAATCAA	AAAAGAATAG	AATAAATCAT	TCAAAGCAAA
501	GAAGGGGATA	TGCCCATACA	TATCTTTCTA	AAGGAAGATA	CATATGGGTA
551	TAGCCCCTTT	ACCCA			