

絶滅危惧植物ミヤマスカシユリのマイクロサテライトマーカーの開発とそれを用いた遺伝子解析

Development of microsatellite markers of an endangered plant, *Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*, and gene analysis using them.

環境総合評価研究室

06ME227

渡辺 好美 (Yoshimi Watanabe)

指導教員: 三輪 誠 客員准教授

Abstract

Lilium maculatum Thunb. var. *bukosanense*, Miyamasukashi-yuri in Japanese, is a kind of wild lily grown in Mount Buko in Chichibu, Saitama, Japan, and is listed in the Red Data Books of Saitama Prefecture and the Ministry of Environment as a critically endangered plant species. To gather the fundamental information for conservation of this plant species, we have studied about genetic diversity in the habitat until now. As a result of this study, it turned out that the population in the habitat consists of individuals similar genetically. However, more studies are needed to investigate whether the loss of the genetic diversity happened in this population. So, in this study, we developed microsatellite markers of *L. maculatum* Thunb. var. *bukosanense*, and analyzed the genetic diversity in the population using them.

We succeeded in development of 7 microsatellite markers, and analyzed DNAs extracted from leaves of 46 *L. maculatum* Thunb. var. *bukosanense* individuals using them. As a result of analysis, it turned out that the level of inbreeding in the population is not so high in the present condition. However, the inbreeding tended to gradually advance. We should suggest the conservation plan to maintain the present genetic diversity in the population.

Keywords : *Lilium maculatum*, microsatellite markers, genetic diversity, DNA, inbreeding

1. はじめに

ミヤマスカシユリ (*Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*) は埼玉県秩父地方にある武甲山で発見された野生のユリである(本田, 1942)。その特徴は茎が弓なりになり、スカシユリ (*Lilium maculatum*) に酷似した上向きの花をつけるところにある(図1)。これらの特徴などから、ミヤマスカシユリは、スカシユリが武甲山の石灰岩壁に適応した形として評され、その変種として分類されている(原, 1963)。現在、野生のミヤマスカシユリは、全国でも埼玉県の武甲山と茨城県の一部でのみ確認されているにすぎない。

武甲山のミヤマスカシユリは、石灰石の採掘、シカやサルなどの動物の食害でその数が大幅に減少し、現在では人や動物が立ち入ることが困難な場所ではしか確認できない状況にある。このような現状をうけて、国および埼玉県は、レッドデータブックにおいて、ミヤマスカシユリを「ごく近い将来における絶滅



図1 ミヤマスカシユリの形状

の危険性が極めて高い種」(絶滅危惧 I A 類) に指定した。また、埼玉県では、ミヤマスカシユリを「埼玉県希少野性動植物の種の保護に関する条例」において、県内希少野性動植物種のひとつとして指定し、重点的に保護する方針を示している。これらのことからミヤマスカシユリは早急に保全策が必要な種であ

ると考えられる。しかしながら、現在のところ、その保全策として生育地における採取制限が実施されているにすぎない。

絶滅危惧植物であるミヤマスカシユリを保全するためには、人工的に個体を増殖し絶滅を回避すると共に、生育地の更なる保全策を考える必要がある。これまでに、埼玉県では、ミヤマスカシユリの球根の鱗片培養により個体を増殖する手法を確立した (Arzate et al, 2007)。また、更なる保全策を考えるための基礎的情報として、生育地における遺伝的な状況を把握する研究も進めてきた (Arzate et al, 2004)。その結果、武甲山に自生するミヤマスカシユリの個体群では母系統の由来はひとつであり、個体間の遺伝的類似性が高いことがわかった。これらの結果から、この個体群が近親交配を重ねた、遺伝的多様性に乏しい個体群である可能性も考えられたが、この点に関しては、更なる研究が必要である。

そこで、本研究では、核 DNA のマイクロサテライト (simple sequence repeat, SSR) 領域を用いたマーカー (以降、SSR マーカーと記す。) を開発し、それを用いてこのミヤマスカシユリの個体群が、近親交配を繰り返して確立されたものかどうかを解析することを目的とした。

2. 方法

2.1 SSR マーカーの開発

ミヤマスカシユリの葉から、改良 CTAB 法 (Zhou et al., 1999) により、SSR マーカーの開発に必要な DNA を抽出した。

SSR とは、DNA の塩基配列中にある (CA)_n や (GA)_n といった繰り返し配列のことであり、この領域は個体間での変異が大きいと考えられている。そのため、この領域を PCR (Polymerase Chain Reaction) で増幅することにより、単一遺伝子座の極めて高い多型を示す共優性マーカーとして利用できることが知られている。

ミヤマスカシユリの SSR マーカーを開発するためには、DNA の塩基配列中から SSR 領域を抽出し、その領域を PCR で増幅するためのプライマー対を設計する必要がある。本研究では、練・宝月 (2004) の方法を適用し、ミヤマスカシユリの DNA 塩基配列中から SSR 領域を抽出するとともに、その前後の塩基配列に従って 20 塩基前後からなるプライマー対を設計した。

2.2 SSR マーカーによる解析

先述した方法 (練・宝月, 2004) により、武甲山で採取したミヤマスカシユリ (46 個体) の葉から DNA を抽出し、解析の試料とした。抽出したミヤマスカシユリの DNA を鋳型とし、設計したプライマー対を用いて、SSR 領域を PCR で増幅した。その PCR 産物をシーケンサーを用いたポリアクリルアミド電気泳動にかけ、断片長を解析した。

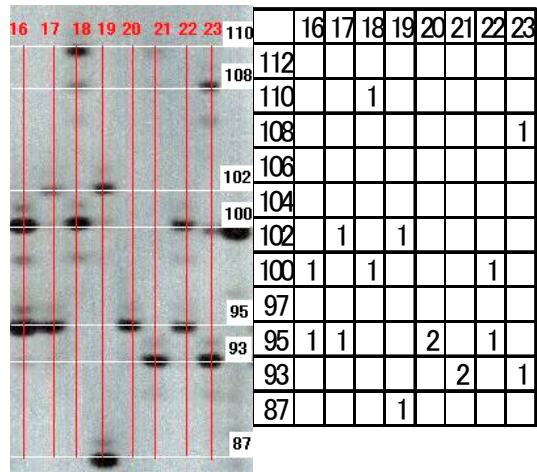


図2 SSRマーカーの実際の電気泳動パターン(左)とその集計表(右)

16 から 23 までの数字は個体番号を表す。中央の数字は断片長 (塩基数) を表す。'1' はヘテロ接合体、'2' はホモ接合体を表す。

SSR マーカーの電気泳動パターンは、通常 2 本のバンドとして現れる (図 2)。これらの 2 本のバンドは対立遺伝子を表し、それぞれいずれかが父親または母親から由来する対立遺伝子である。なお、二つの対立遺伝子が異なる場合をヘテロ接合体、同じ場合をホモ接合体という。

各 SSR マーカーの電気泳動パターン (表 1) から、ヘテロ接合度の観察値 (Ho) と期待値 (He) を以下の式 (1) と (2) より算出した (津村・戸丸, 2001)。

表 1 SSRマーカーの電気泳動パターン集計表 (一例)

IP3-40(Afa1/CA)																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
144																								
156				1	1	1	1	1	1	2		1	1	2					1					1
165	1	1	1								1							1	1				1	1
167	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1		1	1
171																								
175																								1
177																								
178												1							1					

IP3-40(Afa1/CA)																								
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	
144																								
156																	1							
165	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1				1	1	2	1
167				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					1	2				1
171																								2
175	1		2																			1	1	
177																								
178		2																						

左端の数字はマーカーの断片長 (塩基数)、上段の数字は個体番号を表す。'1' はヘテロ接合体、'2' はホモ接合体を表す。

$$H_o = A/N \quad (1)$$

A : ヘテロ接合体として検出された個体数

N : 全個体数

$$H_e = 1 - \sum (X^2) \quad (2)$$

X : 対立遺伝子頻度

なお、 H_o は、実際に観察されたヘテロ接合体の割合を表し、 H_e は、ハーディ・ワインベルグの平衡から期待されるヘテロ接合体の割合を表す(津村・戸丸,2001)。また、算出された H_o と H_e から以下の式(3)より各マーカーにおける近交係数 (F_{is}) を算出した。

$$F_{is} = 1 - H_o / H_e \quad (3)$$

なお、 F_{is} は集団内における近親交配によるヘテロ接合体の減少の程度を表す値である。 F_{is} が 0 または 0 に近い値をとるときは、遺伝子型の分布が、ハーディ・ワインベルグの法則にしたがっていることを意味し、自由交配が行われていることを表す(津村・戸丸, 2001)。

3. 結果

3.1 開発した SSR マーカーの特性

本研究では、練・宝月(2004)の方法により SSR 領域が含まれると予想される約 500 の DNA 断片を抽出し、その中の 7 つの SSR 領域につ

いて、PCR で増幅するためのプライマー対が設定できた(表 2)。これらの 7 つの SSR 領域は、PCR で増幅すると、単一遺伝子座の共優性マーカーとしての特性を示した。これらのマーカーは、7 から 16 の対立遺伝子を持ち、ほぼ 100 から 200 塩基程度の断片長としてあらわれた(表 2)。また、各マーカーのヘテロ接合体の期待値(H_e)は 0.68 から 0.91、観察値(H_o)は 0.50 から 1.00 の範囲にあった(表 2)。なお、各マーカーを PCR 増幅する際のアニリング温度は、52℃から 60℃の範囲で設定され、増幅された SSR 領域には、主に(AG) $_n$ や (AC) $_n$ といった繰り返し配列が含まれた(表 2)。

一方、開発した 7 つの SSR マーカーの組み合わせにより個体の識別を行った結果、46 個体中、42 個体の識別が可能であった。

3.2 近交係数 (F_{is})

表 3 に、式(3)より算出した各マーカーにおける近交係数を示す。各マーカーの近交係数について、0 からの偏差を χ^2 乗検定で調べた結果、4 つのマーカーにおいて 0 からの偏差に有意な差が認められた($p < 0.05$)。また、各マーカーの近交係数の平均値を、このミヤマスカシユリ個体群の近交係数とし、同様の検定を行った結果、0 からの偏差に有意な差は認められなかった。

表2 開発に成功した SSR マーカーの特性

遺伝子座	SSR領域	アニリング温度(℃)	対立遺伝子数	塩基数 (bp)	ヘテロ接合体 観察値(H_o)	期待値(H_e)
IP3-9(Ssp I /CA)	(TA) $_6$ (CA) $_6$	60℃	7	229-256	0.74	0.77
IP3-4(EcoRV /CA)	(AT) $_{40}$ (AC) $_{17}$	56℃	16	133-201	0.63	0.91
IP3-9(EcoRV /GA)	(AG) $_{10}$	54℃	11	87-112	0.78	0.84
IP3-2(Hae III /GA)	(AG) $_{21}$	53℃	10	163-189	0.50	0.86
IP3-49(Hae III /GA)	(AG) $_n$	57℃	9	80-112	1.00	0.68
IP3-29(Afa I /CA)	(AT) $_{24}$ (CA) $_{16}$	52℃	13	152-214	0.24	0.87
IP3-40(Afa I /CA)	(AC) $_4$ (AC) $_9$ (AT) $_7$	54℃	8	144-178	0.76	0.76

表3 近交係数(Fis)

マーカー	Fis
IP3-9(Ssp1/GA)	0.042
IP3-4(Ecor5/CA)	0.304*
IP3-9(ecor5/GA)	0.063
IP3-2(Hae3/GA)	0.416*
IP3-49(Hae3/GA)	-0.473*
IP3-29(Afa1/CA)	0.726*
IP3-40(Afa1/CA)	-0.001
平均値	0.154

*がついているFisは0からの偏差に有意な差があることを示す。

4. 考察

本研究では、SSR 領域が含まれていると予想される約 500 の DNA 断片から、7つの SSR マーカーが開発できた。このマーカー開発の成功率は、同様の方法で実施された他の植物のそれに比べて低かった(練・宝月, 2004)。このことは、ミヤマスカシユリの SSR マーカーの開発が他の植物と比べて困難であることを意味している。

また、開発された SSR マーカーにより 46 個体中 42 個体の個体識別が可能であった。このことは、このミヤマスカシユリ個体群では主に種子繁殖が行われていることをあらわしている。また、識別ができなかった個体は、栄養繁殖により生じた可能性が考えられる。

本研究により得られたミヤマスカシユリ個体群の近交係数は、0からの偏差に有意な差は認められなかった(表3)。このことは、この個体群がハーディ・ワインベルグ平衡に従った自由交配を前提とした理想状態にあることを意味し(津村・戸丸, 2001)、近親交配によって近交度が極度に高まっている状況にはないことを示している。

しかしながら、このミヤマスカシユリ個体群の近交係数は正の値を示した(表3)。近交係数が正の値に傾くことは、ハーディ・ワインベルグ平衡の理想状態よりもホモ接合体が多い傾向にあることを示している(津村・戸丸, 2001)。また、近親交配が繰り返されるとホモ接合体の割合が増加することが知られている(根井, 1990)。さらに、Arzate et. al (2004)は、このミヤマスカシユリ個体群を構成する個体間では、遺伝的類似性が高いことを示した。これらのことから、このミヤマスカシユリ個体群では、現段階においては、近親交配により近交度が極度に高まっている状況ではないものの、それにより、ホモ接合体の割合が徐々に増加し、近交度が高まりつつある状況にあることが推測された。

このように、自然状態において、個体群内での近親交配が繰り返されれば、将来的には個体群における遺伝的多様性が失われていくことが予想される。このことから、ミヤマスカシユリの現状を考慮し、現在残されている遺伝的多様性を保持するための保全対策が必要であると考えられる。

現在、3000 種ほどが環境省の絶滅危惧種として指定されている。しかしながら、遺伝的状況が把握されている種は極めて少ない。本研究において、ミヤマスカシユリの個体群は近親交配によって極度に近交度が高まっている状況ではないことが確認できたが、既に近親交配が進み遺伝的多様性に乏しい個体群になっている種が存在する可能性もある。

平成 19 年に新多様性国家戦略が見直された。その中でも、遺伝的多様性は引き続き重要視され、絶滅危惧種の遺伝的状況の把握が必要だとされている。しかしながら、遺伝的状況の把握に関する具体的な案は提示されていない。ミヤマスカシユリを含む絶滅危惧種の保全のためには、今後、より容易に遺伝的多様性の解析ができる手法の確立やデータの蓄積が必要である。

<参考文献>

- Arzate A., Miwa M., Shimada T., Yonekura T., 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
- Arzate A., Miwa M., Shimada T., Yonekura T., Ogawa K. (2007) Propagation of Miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*), an endangered plant species. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(4): 373-379
- 原寛 (1963) ヤマスカシユリ. 植物研究雑誌 38(8):248-249
- 本田正次 (1942) Plate CXXVIII. *Lilium bukosanense*
Honda みやますかしゆり. 東亜植物図説 4(3):403-404, t. 128
- 根井正利 (1990) 分子進化遺伝学, 倍風館 p134
- 練春蘭, 宝月岱造 (2004) 効率的マイクロサテライト (SSR) マーカー作製のためのプロトコル. 日林誌 86(2):191-198
- 津村義彦・戸丸信弘 (2001) 遺伝的多様性をはかるパラメータ. 森の分子生態学 遺伝子が語る森林のすがた, 種生物学会編, 文一総合出版 pp179-182
- Zhou Z., Miwa M., and Hogetsu T. (1999) Analysis of genetic structure of a *suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytol.* 144 : 55-63