

古い植物標本を用いた絶滅個体群の系統解析方法の開発 —磐梯朝日地域の「絶滅種」イワキアブラガヤの標本を用いた系統解析—

兼子伸吾・首藤光太郎（福島大学大学院・共生システム理工学研究科）・
黒沢高秀（福島大学・共生システム理工学類）

要 旨

イワキアブラガヤ *Scirpus hattorianus* Makino (カヤツリグサ科) は福島県耶麻群磐梯町で 1925 年に採集され、1933 年に新種として記載された植物である。しかし、1939 年に北会津郡戸ノ口で採集された標本を最後に現在まで確認されておらず、27 枚の標本が現存するに過ぎない。日本の固有種であるという考え方がある一方で、イワキアブラガヤに形態のよく似た植物が北米に分布することから、北米と日本の隔離分布種であるという説や北米からの帰化植物であるという説もあり、その実体は明らかになっていない。そこで本研究では、磐梯朝日地域に関わりの深い植物であり、「絶滅種」とされているイワキアブラガヤの由来について明らかにするために、1930 年代に採取されたイワキアブラガヤの標本から採取したサンプルを用いて系統解析を行った。その結果、1930 年代に採取されたイワキアブラガヤのサンプルからも良好な増幅結果が得られ、125 bp の塩基配列を決定することができた。既にデータベースに登録されている東アジアと北米の *Scirpus* 属植物の塩基配列を比較した結果、イワキアブラガヤは、北米産の *S. hattorianus*, *S. flaccidifolius*, *S. georgianus* と同一の塩基配列を有していた。この結果は、イワキアブラガヤは、東アジアに分布する *Scirpus* 属とは遺伝的に異なっており、東アジアに生育する *Scirpus* 属から種分化したのではないこと、福島県産のイワキアブラガヤと形態の類似性が指摘され、同一種として扱われている北米産の *S. hattorianus* は形態だけでなく、遺伝的にも極めて近いことを示している。また、これらの結果から、福島県のイワキアブラガヤは、磐梯朝日地域の植物多様性を特徴付ける重要な種というよりは、北米からの人為的な移入種である可能性が高いと考えられる。

I. はじめに

現在は、第 6 の大量絶滅が進行中とされているように、記録が残っているだけでも、既に多くの動植物が絶滅し、現在も多くの生物が絶滅危惧種に指定されている。そのような現状において、急速に失われつつある生物多様性を理解し、効果的に保全していくためには、現存する生物や近年絶滅した生物について、その由来や近縁種との系統関係、生態等を正確に把握することが重要である。

生物の由来や系統関係について明らかにする際には、対象となる生物が生残しており、新鮮なサンプルを得ることができるかどうかは、研究の難易度を大きく左右する。研究対象となる生物が

生育していれば、新鮮なサンプルを得ることができ、DNA 解析等によってその生物の由来や近縁種との系統関係について明らかにすることは、比較的容易である。しかし、絶滅種のように、生体から分析に適した試料が得られない場合には、分析を行うことが難しくなることも多い。結果的に、比較的近年絶滅した生物については、標本等の記録により、過去のある時点まではその場所に生育・生息していたことが確実であるにも関わらず、その由来や系統関係について明らかにされていない生物も多い。

このような標本等の記録はあるものの、個体群が絶滅してしまったために、その由来や系統関係が明らかになっていない生物のひとつで、磐梯朝

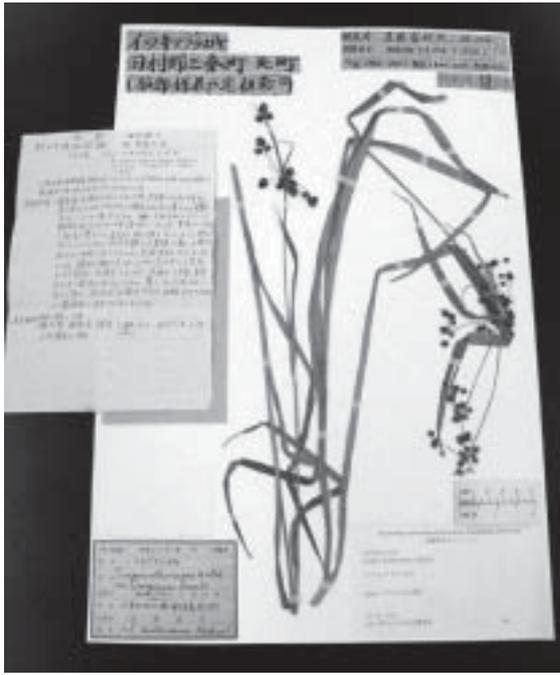


図 1. 福島大学標本庫に保存されているイワキアブラガヤの標本(FKSE4193)

日地域にかかわりの深い植物に、イワキアブラガヤ *Scirpus hattorianus* Makino (カヤツリグサ科) がある (図 1)。イワキアブラガヤ *Scirpus hattorianus* Makino (カヤツリグサ科) は福島県耶麻郡磐梯町で 1925 年に採集され、1933 年に新種として記載された植物である (Makino, 1933)。しかし、1939 年に北会津郡戸ノ口で採集された標本を最後に現在まで確認されておらず、27 枚の標本が現存するに過ぎない (黒沢ら、投稿準備中)。イワキアブラガヤに形態のよく似た植物が北米に分布することから (Schuyler, 1967a, 1967b)、北米と日本の隔離分布種であり、絶滅種もしくは絶滅危惧種という説 (環境庁自然保護局野生生物課, 2000) や北米からの帰化植物であるという説 (大井, 1965, 1982) があり、その実体は明らかになっていない。なお、福島県のレッドデータブック (福島県生活環境部環境政策課, 2002) では、イワキアブラガヤは絶滅種として扱われている。この植物が北米と日本の隔離分布種であれば、磐梯朝日地域の植物多様性を特徴付ける最も重要な種類のひとつとすることになる。一方、この植

物が北米からの帰化植物であれば、この磐梯朝日地域の歴史において、大正から昭和初期における北米との関係を示す象徴的な植物であることになる。

イワキアブラガヤの標本のように、標本室に残存する植物標本は、現在は生育していない生物が生きていた明確な証拠となるだけでなく、現存しない種や個体群の遺伝的特徴を知るうえで、重要なサンプルである。しかし、外来種の移入の歴史を明らかにするための事例や、歴史的な遺伝的多様性の変異についての研究はいくつか報告されているものの (Saltonstall, 2002; Cozzolino, et al., 2007)、あまり一般的ではない。これは古い標本の場合、組織中の DNA が劣化、断片化しており (Savolainen et al., 1995)、通常の DNA 分析に用いられるような比較的長い数百 bp 程度の PCR 増幅が成功しないことに起因すると考えられる。実際に、イワキアブラガヤの標本についても、通常の系統解析に用いられる遺伝子座 (数百 bp 程度) の PCR 増幅を試みたものの、PCR 増幅はうまく行っていない (兼子ら、未発表)。

そこで、劣化したテンプレート DNA から PCR 増幅できるように、葉緑体の *rbcL* 遺伝子において、東アジアと北米の *Scirpus* 属植物を識別可能な短い領域を増幅するプライマーを新たに設計した。新に設計したプライマーを用いて、1930 年代に採集されたイワキアブラガヤの標本から採取したサンプルについて系統解析を行った。これにより、イワキアブラガヤの由来について一定の結果を得ることができた。本報告では、これらの未発表の成果 (Kaneko et al., unpublished) のうち、磐梯朝日地域に関連が深い部分について紹介する。

II. 方法

サンプルは、福島大学共生システム理工学類生物標本室に収蔵されている標本 (FKSE4193) から、10 mm² 未満の葉を採取した。ゲノム DNA の

抽出は、DNeasy Plant Kits (QIAGEN, Maryland, USA) を用いて行った。葉緑体 DNA の *rbcL* 遺伝子において、東アジアに分布する *Scirpus* 属植物と北米の *Scirpus* 属植物を識別できる箇所を含む短い領域を特異的に増幅することのできるプライマー (*rbcL2F*: 5'-GCC GAA ACA GGT GAA ATC AA-3', *rbcL2R* (CCC GGT TAA GTA GTC ATG CA-3', Kaneko et al., unpublished) を設計し、PCR を行った。PCR による増幅は、Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen) を用い、標準のプロトコルに従って行った (最終液量 8 μ L 中に約 5 ng の抽出 DNA, 2 \times Multiplex PCR Master Mix 5 μ L, 各プライマーペア 0.2 μ M を含むように調整)。PCR 反応は、T100 thermal cycler (BioRad) を用いて行い、温度条件は、初期熱変性 95°C15 分の後、熱変性 94°C30 秒、アニーリング 50°C1 分 30 秒、伸長反応 72°C1 分を 35 サイクル行った後、最終伸長を 60°C30 分とした。反応終了後、1.5%アガロースゲル (Agarose L03 「TAKARA」、タカラバイオ社製) を用いて電気泳動を行い、増幅を確認した。想定されたサイズが増幅した PCR 産物については、illustra ExoStar (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, UK) を用いて精製した。精製産物は、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems) でシーケンス反応を行った後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。得られた波形データは Finch TV (<http://www.geospiza.com/finchtv/>) を用いてアセンブルを行い、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) に登録されている北米の *Scirpus hattorianus* や近縁種 (Muasya et al. 2009) および、東アジアの近縁種の配列 (Jung et al., 2010) を CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) を用いて比較した。

III. 結果および考察

葉緑体 DNA は *rbcL* 遺伝子において 125 bp の塩基配列データが得られた。イワキアブラガヤで

得られた配列と北米に分布する *Scirpus* 属植物 9 種 (*S. hattorianus*, *S. flaccidifolius*, *S. georgianus*, *S. ancistrochaetus*, *S. atrocinctus*, *S. cyperinus*, *S. expansus*, *S. pendulus*, *S. sylvaticus*)、東アジアに分布する *Scirpus* 属植物 6 種 (*S. ternatanus*, *S. karuisawensis*, *S. mitsukurianus*, *S. radicans*, *S. orientalis*, *S. wichurae*) について配列を比較した (表 1)。配列が得られた 125bp のうち 16 分類群の間で多型が認められた箇所は計 6 箇所であった。また、イワキアブラガヤは、北米で採取された *S. hattorianus*, *S. flaccidifolius*, *S. georgianus* と同一の塩基配列を有していた。

この結果は、イワキアブラガヤが東アジアに分布する *Scirpus* 属とは遺伝的に異なっており、東アジアに生育する *Scirpus* 属から種分化したのではなく、北米に分布する *Scirpus* 属植物に近縁であることを示している。また、Schuyler (1967a, 1967b) によって、福島県産のイワキアブラガヤと形態の類似性が指摘され、同一種として扱われている北米産の *S. hattorianus* は形態だけでなく、遺伝的にも極めて近いと言える。

福島のイワキアブラガヤと北米の *S. hattorianus* 間において、形態の上でも遺伝的にも変異が認められなかったということは、これらの分類群が隔離してから、あまり長い時間が経過していない可能性が高いことを示している。今回の結果のみでは、ベーリング陸橋等、北米と東アジアが地続きになった時代に分布を拡大してきた可能性を完全には否定できない。しかし、福島のイワキアブラガヤと北米の *S. hattorianus* 個体群が隔離してから長い時間は経過していない可能性が高く、福島のイワキアブラガヤは北米からの人為的な移入種である可能性が高い。今回の結果は、この植物が磐梯朝日地域の植物多様性を特徴付ける最も重要な種類のひとつではなく、大正から昭和初期に、この地域が北米と物資の輸送を含む関係があったことを示す、地域の歴史で象徴的な植物であることを示しているようである (以上、

表 1. イワキアブラガヤおよび近縁種間の *rbcL* 遺伝子の塩基配列 125bp における多型部位

種名	多型部位						分布	DDBJ Accession No.
	36	44	50	51	63	103		
イワキアブラガヤ	C	C	C	C	G	A	東アジア(福島)	未登録
<i>S. hattorianus</i>	C	C	C	C	G	A	北米	EF178584
<i>S. flaccidifolius</i>	C	C	C	C	G	A	北米	EF178582
<i>S. georgianus</i>	C	C	C	C	G	A	北米	EF178583
<i>S. ancistrochaetus</i>	C	G	C	C	C	A	北米	EF178578
<i>S. atrocinctus</i>	T	G	C	T	G	A	北米	EF178579
<i>S. cyperinus</i>	T	G	C	T	G	A	北米	EF178580
<i>S. expansus</i>	T	G	C	T	C	A	北米	EF178581
<i>S. pendulus</i>	T	G	C	T	C	A	北米	EF178585
<i>S. sylvaticus</i>	T	G	G	T	C	A	北米・シベリア	EF178586
<i>S. ternatanus</i>	T	G	C	T	C	G	東アジア	EF178587
<i>S. karuisawensis</i>	T	C	C	T	C	A	東アジア	GQ130369
<i>S. mitsukurianus</i>	T	G	C	T	C	A	東アジア	GQ130370
<i>S. radicans</i>	T	G	C	T	C	A	東アジアほか	GQ130372
<i>S. orientalis</i>	T	G	C	T	T	A	東アジア	GQ130371
<i>S. wichurae</i>	T	G	C	T	C	A	東アジアほか	GQ130373

Kaneko et al., unpublished).

今回の分析の結果は、塩基配列データベースの利用と短断片 DNA 配列の PCR 増幅を目的とした種特異的なプライマーの利用により、これまでのような通常の解析ではデータが得られなかった標本についても、DNA データが得られる可能性があることを示している。標本庫に収蔵されている標本のなかには、イワキアブラガヤのように、固有種か外来種かの由来がわからないものがある。また、絶滅種等の近縁種と推定されるものの、分類形質が残されていないために、同定ができない標本もある。これらの標本についても、なんらかの遺伝的なデータが得られれば、絶滅した生物や個体群について、重要な新発見が得られる可能性が高い。これまでにデータが得られなかった標

本についても、再解析を検討する価値があると考えられる。

引用文献

- Cozzolino, S., Cafasso, D., Pellegrino, G., Musacchio, A., and Widmer, A. (2007) Genetic variation in time and space: the use of herbarium specimens to reconstruct patterns of genetic variation in the endangered orchid *Anacamptis palustris*. *Conserv. Genet.*, 8, 629–639.
- 福島県生活環境部環境政策課(編) (2002) レッドデータブックふくしま -福島県の絶滅のおそれのある野生生物-(植物・昆虫類・鳥類). 25p, 福島県生活環境部環境政策課.
- Jung, J. and Choi, H.-K. (2010) Systematic

- rearrangement of Korean *Scirpus* L. s.l. (Cyperaceae) as inferred from nuclear ITS and chloroplast *rbcL* sequences. *J. Plant Biol.*, 53, 222–232.
- 環境庁自然保護局野生生物課(編) (2000) 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 レッドデータブック 8 植物 I (維管束植物). 660p, 自然環境研究センター.
- Makino, T. (1933) A contribution to the knowledge of the flora of Nippon. *J. Jap. Bot.*, 8, 43–46.
- Muasya, A. M., Simpson, D. A., Verboom, G. A., Goetgheber, P., Naczi, R. F. C., Chase, M. W. and Smets, E. (2009) Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data: Current progress and future prospects. *Bot. Rev.*, 75, 2–21.
- 大井次三郎 (1965) 改訂新版 日本植物誌 顕花編. 205p, 至文堂.
- 大井次三郎 (1982) カヤツリグサ科. 佐竹義輔他 (編), 日本の野生植物草本 I, pp. 145–184.
- Schuyler, A. E. (1967a) *Scirpus hattorianus* in north America. *Notulae Naturae of the Acad. of Natur. Sci. of Phil.*, 398, 1–5.
- Schuyler, A. E. (1967b) A taxonomic revision of north American leafy species of *Scirpus*. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.*, 119, 295–323.
- Saltonstall, K. (2002) Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2445–2449.
- Savolainen, V., Cue´noud, P., Spichiger, R., Martinez, M. D. P., Cre`vecoeur, M. and Manen, J. F. (1995) The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics: evaluation and improvement. *Plant Syst. Evol.*, 197, 87–98.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876–4882.