

速報

マイクロサテライトマーカーを用いた立田山ヤエクチナシの遺伝解析の試み^{*1}

金谷整一^{*2}・上野真義^{*3}・江野優里子^{*4}・下村荘乃^{*4}・西田奈央^{*4}・福島裕基^{*4}・田嶋隆文^{*4}・
瀬上眞由美^{*4}・河原畑濃^{*5}・宮崎 寛^{*5}・長友安男^{*6}・松永道雄^{*2}

金谷整一・上野真義・江野優里子・下村荘乃・西田奈央・福島裕基・田嶋隆文・瀬上眞由美・河原畑濃・宮崎 寛・長友安男・松永道雄：マイクロサテライトマーカーを用いた立田山ヤエクチナシの遺伝解析の試み 九州森林研究 69：127 - 129, 2016 最近の開花調査から、1929年に国指定天然記念物に指定された自生地には、立田山ヤエクチナシは分布していないと考えられているが、森林総合研究所九州支所およびその周辺における自生地外には、「浅井系」、「拝聖院系」および「西岡系」の3系統が残っているとされる。これらの遺伝情報の収集と整理は、各系統の保全管理に不可欠であるとともに、自生地に残っているかもしれない個体の探索に有効である。そこで、クチナシで開発されたマイクロサテライトマーカー16座を用いて自生地内外にあるクチナシおよび立田山ヤエクチナシを用いた遺伝解析を実施した結果、全ての座で増幅が確認され、遺伝解析に利用可能であることが示唆された。立田山ヤエクチナシのヘテロ接合体の期待値 (H_E : 0.458) は、クチナシ (0.630) と比較して低かった。立田山ヤエクチナシのみに見られたプライベートアレルは、1つ (GJ 09: 250 bp) 確認された。また、今回供試した立田山ヤエクチナシは3つの複数遺伝子型に分かれた。今後、自生地内に分布するクチナシの遺伝解析を進めるとともに、自生地外で保全 (植栽) されている立田山ヤエクチナシの系統の特定ならびに遺伝的管理に活用していく必要性を指摘した。

キーワード：クチナシ, マイクロサテライトマーカー, 保全, 立田山

I. はじめに

1920年7月8日に第五高等学校(現:熊本大学)の浅井東一博士が立田山において発見した八重咲きのクチナシは、普通にみられるクチナシ (*Gardenia jasminoides*) と比較して葉がやや小型であるが、その他の形質に差異は見られないことから、「立田山ヤエクチナシ (*G. jasminoides* var. *ovalifolia* (中井・小泉, 1927))」として報告された (Asai, 1929; 吉岡ら, 2013)。自然状態で八重咲き個体が生じたことに加え、これらが集団として分布していたため高い学術的価値を有すると認められたことから、発見された自生地が1929年に「立田山ヤエクチナシ自生地 (面積: 0.54 ha)」として国指定天然記念物とされた (文部省, 1929)。なお学名については、後に *G. jasminoides* forma *ovalifolia* とされている (原, 1952)。

その後、戦中および戦後の全山伐採による森林植生の急激な変化や盗掘により、立田山ヤエクチナシは自生地では絶滅したとみられていた。ところが、1969年の調査で1株のみが再発見された。しかしながらこの株も、盗掘等で消失しており自生地では、再び絶滅したと考えられている (農林省林業試験場九州支場, 1977)。一方で、自生地に残っているかもしれないわずかな可能性を信じて探索作業も継続して行われている (金谷ほか, 2013)。

現在、聞き取り調査の結果から、自生地由来の立田山ヤエクチナシは、「浅井系」、「拝聖院系」および「西岡系」の3系統が保存されていると考えられている (宮崎ほか, 未発表)。「浅井系」は1920~1929年に浅井博士が発見したもので (Asai, 1929; 吉

岡ら, 2013)、「拝聖院系」は天然記念物指定の自生地から北西に900 m離れた拝聖院境内に自生と伝承されている株である (宮崎ほか, 未発表)。また「西岡系」は、戦後に捜索を行った熊本市立博物館の調査隊 (西岡鐵夫隊長) が再発見した1株由来とされる (宮崎ほか, 未発表)。

これらの系統の保全を進めていくうえで遺伝情報の収集と整理は、急務であるとともに、自生地に残っているかもしれない個体の探索、つまり一重咲きのクチナシとの判別および立田山ヤエクチナシの遺伝的多様性の評価にも不可欠であると考えられる。

遺伝情報の収集には多型性が高い遺伝マーカーを利用することが有効である。マイクロサテライトマーカーは、共有性で多型性が高く、多くの樹種で遺伝解析に用いられている。そこで本報告では、立田山の自生地内外で採取した立田山ヤエクチナシおよびクチナシに対し、既にクチナシで開発されたマイクロサテライトマーカー (Xu *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2015) を用いた解析が可能であるか検討した。

II. 材料および方法

1. 材料

遺伝解析に供する材料は、立田山 (32°49'37"N, 130°43'56"E, 標高: 151.7 m) の南斜面に位置する森林総合研究所九州支所の実験林内 (ここでは天然記念物指定されている自生地、以下「自生地」と表記) および敷地内、黒髪町内で採取した (表-1)。

^{*1} Kanetani, S., Ueno, S., Eno, Y., Shimomura, S., Nishida, N., Fukushima, Y., Tajima, T., Senoue, M., Kawarabata, A., Miyazaki, H., Nagatomo, Y. and Matsunaga, M.: Trial of genetic analysis for *Gardenia jasminoides* forma *ovalifolia* using microsatellite-makers.

^{*2} (研) 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. & Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862, Japan

^{*3} (研) 森林総合研究所 For. & Forest Prod. Res. Inst., Tsukuba 305-8687, Japan.

^{*4} 熊本県立第二高等学校 Kumamoto Prefectural Daini High School, Kumamoto 860-0901, Japan.

^{*5} 立田山ヤエクチナシ井戸端会議 Tatsudayama Yaekuchinashi Association, Kumamoto 860-0862, Japan.

^{*6} 元林業科学技術振興所九州事務所 Kyushu Br. For. Sci. & Tech. Inst., Kumamoto 860-0862, Japan.

表-1. 遺伝解析に供したサンプル数および確認された遺伝子型

採取場所	立田山ヤエクチナシ		クチナシ	
	八重咲き	一重咲き	一重咲き	未開花
森林総合研究所九州支所				
自生地	-	-	-	7
敷地内	8 ¹⁾	10	-	-
黒髪町内	2 ²⁾	-	-	-
計	10	10	7	7
遺伝子型数	3	3	3	7

1) 「西岡系」の挿し木

2) 「浅井系 K 株」および「拝聖院系」

解析に供した立田山ヤエクチナシは、「浅井系」は浅井博士が発見した株のうち (Asai, 1929; 吉岡ら, 2013), 同僚の河原畑氏に託された「浅井系 K 株」の 1 個体, および「拝聖院系」の 1 個体に加え、「西岡系」の挿し木とされる 8 個体の合計 10 個体とした (表-1)。これらは, いずれも毎年 6 月に実施している開花調査で, 八重咲きであることは確認されている。

クチナシについては, 敷地内で一重咲きと確認された 10 個体および自生地で無作為に採取した未開花の 7 個体を含めた計 17 個体を解析に供した (表-1)。なお, 自生地内ではこれまで八重咲きの個体は確認されていないことから (金谷ら, 2013), 自生地で未開花個体であった 7 個体については, クチナシとして取り扱った。

2. DNA 抽出

各調査対象個体より成葉を 2~3 枚採取し, チャック付きポリエチレン製袋 (ユニパック, 生産日本社) に入れ, DNA を抽出するまで -30℃ の冷凍庫に保管した。採取したサンプルからの DNA 抽出は, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。

3. 遺伝解析

遺伝解析には, クチナシで既に公表されているマイクロサテライトマーカー (Xu *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2015) のうち, 比較的多型性が高い計 16 プライマーを用いた (表-2)。

PCR 増幅では各プライマーの Forward (5'-) 側に Tail A ~ Tail D の Universal Primer でラベルし (Blackett *et al.*, 2012), 3 回のマルチプレックス (4~6 primers / reaction) を実施した。PCR の反応液は, DNA 1 μ l, Multiplex Mix 5 μ l, Primer Mix 1 μ l および滅菌水 3 μ l を混合し合計 10 μ l とした。PCR 増幅の条件は 95℃ で 15 分間の熱変性後, 94℃ 30 秒, 60℃ 90 秒, 72℃ 60 秒のサイクルを 30 回繰り返し, 60℃ で 30 分の伸長とした。増幅した PCR 産物の電気泳動は, ABI 3130 (Applied Biosystems 社) を用いて行った。遺伝子型の決定には GeneScan および Genotyper (Applied Biosystems 社) を用いて行った。

多様性の評価には, 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数 (N_A), プライベートアレル (P_A) およびヘテロ接合度の期待値 (H_E) を GeneAlix 6.2 (Peakall and Smouse, 2006) で算出した。

表-2. マイクロサテライトマーカーによる遺伝解析の結果

遺伝子座	クチナシ		クチナシ			立田山ヤエクチナシ		
	Original ^{1),2)}	H_E	N_A	P_A	H_E	(一重+未開花: 10)		
						(八重: 3)		
GJ02 ¹⁾	6	0.682	4	1	0.625	3	0	0.500
GJ03 ¹⁾	6	0.650	2	0	0.375	2	0	0.500
GJ04 ¹⁾	7	0.829	5	3	0.645	2	0	0.278
GJ08 ¹⁾	7	0.844	5	3	0.688	2	0	0.444
GJ09 ¹⁾	7	0.851	5	3	0.735	3	1	0.500
GJ14 ¹⁾	4	0.305	6	3	0.734	3	0	0.500
GJ17 ¹⁾	9	0.883	8	3	0.820	5	0	0.778
GJ20 ¹⁾	4	0.429	5	2	0.540	3	0	0.500
GJ21 ¹⁾	5	0.590	5	1	0.735	4	0	0.667
GJ22 ¹⁾	4	0.437	3	0	0.545	3	0	0.611
eGJ004 ²⁾	6	0.640	4	1	0.565	3	0	0.500
eGJ078 ²⁾	5	0.682	4	2	0.610	2	0	0.278
eGJ098 ²⁾	6	0.706	3	2	0.265	1	0	0.000
eGJ122 ²⁾	6	0.605	4	3	0.655	1	0	0.000
eGJ133 ²⁾	6	0.715	6	3	0.734	3	0	0.611
eGJ144 ²⁾	7	0.717	6	2	0.813	4	0	0.667
Total	95		75	32		44	1	
Mean	5.94	0.660	4.69	2.00	0.630	2.75	0.06	0.458

N_A : Number of alleles, P_A : Number of private alleles, H_E : Expected heterozygosity

1) Xu *et al.* (2014)2) Deng *et al.* (2015)

III. 結果および考察

解析に供した 16 座の遺伝子座で増幅が確認された。立田山ヤエクチナシについて, 森林総合研究所九州支所の敷地内で採取した全ての個体は, 同じ遺伝子型であったため, 挿し木で増殖されたものと遺伝的に確認できた。なおこれらは, 以後の解析には 1 個体 (1 クローン: 西岡系) として取り扱った (表-1)。また, クチナシについても同支所敷地内の 10 個体は, 3 つの遺伝子型に分かれた。これらは, それぞれ近隣に植栽されていたことから, 同一個体由来の挿し木クローンと判断した。クチナシは自生地で採取した未開花の 7 個体はすべて遺伝子型が異なった。したがってクチナシは, 10 個体として多様性の解析を実施した (表-1)。

各プライマーにおける立田山ヤエクチナシおよびクチナシの多型性を, Xu *et al.* (2014) および Deng *et al.* (2015) の値と比較した結果を表-2 に示した。今回解析した 2 種のクチナシで確認された対立遺伝子数 (N_A) は 76 であり, クチナシの 75 に対し, 立田山ヤエクチナシは 44 と, 6 割程度であった (表-2)。ヘテロ接合度の期待値 (H_E) において, クチナシは 0.630 と, Xu *et al.* (2014) および Deng *et al.* (2015) の 0.660 とそれほど差はなかったが, 立田山ヤエクチナシは 0.458 とこれらより極端に低かった。これらのことは, 立田山ヤエクチナシの解析サンプル数が少なかったことによるが, 現存する本種の遺伝的多様性は非常に低いと推察された。

表-3. 現存する立田山ヤエクチナシ3系統の各遺伝子座における対立遺伝子

遺伝子座	浅井系 K 株		拝聖院系		西岡系	
GJ02 ¹⁾	148	148	140	148	148	150
GJ03 ¹⁾	276	276	- ³⁾	- ³⁾	280	280
GJ04 ¹⁾	243	248	248	248	248	248
GJ08 ¹⁾	278	280	278	278	278	280
GJ09 ¹⁾	<u>250</u>	262	<u>250</u>	<u>250</u>	<u>250</u>	259
GJ14 ¹⁾	261	261	259	261	261	265
GJ17 ¹⁾	208	225	206	208	230	237
GJ20 ¹⁾	320	320	304	320	299	320
GJ21 ¹⁾	269	279	272	279	274	279
GJ22 ¹⁾	165	167	165	179	165	167
eGJ004 ²⁾	211	211	211	211	201	216
eGJ078 ²⁾	170	179	170	170	170	170
eGJ098 ²⁾	124	124	124	124	124	124
eGJ122 ²⁾	214	214	214	214	214	214
eGj133 ²⁾	284	292	292	296	284	292
eGj144 ²⁾	252	272	252	254	252	258

1) Xu *et al.* (2014)2) Deng *et al.* (2015)

3) Failed to amplify

今回の解析で観察された76の対立遺伝子のうち、立田山ヤエクチナシにのみ見られたプライベートアレルは1つ(GJ 09: 250 bp)であった(表-2, 表-3)。このアレルは、「浅井系 K 株」および「西岡系」がヘテロ、「拝聖院系」がホモで出現した(表-3, 下線部)。しかしながら、今回の報告ではサンプル数が少ないため、「GJ 09: 250 bp」の有無が立田山ヤエクチナシとクチナシとの判別に用いることへの可否は明らかではない。このことを明らかにするためには、解析に供試する個体数を増やして検討することが不可欠である。

「拝聖院系」におけるGJ 03については、PCR増幅がうまくいかなかったため、遺伝子型を決定できなかったが、現存する立田山ヤエクチナシは聞き取り調査(宮崎ほか, 未発表)の通り3系統に分かれた(表-3)。今後は、不足データの取得を急ぐとともに、得られたデータは自生地外で保全(植栽)されている立田山ヤエクチナシの系統の特定ならびに遺伝的管理に活用して予定である。

IV. おわりに

本報告では、クチナシで開発されたマイクロサテライトマーカーが立田山ヤエクチナシの遺伝解析に利用可能であることが示された。今後は、自生地内に分布する未開花状態のクチナシの開花調査を継続するとともに遺伝解析を進め、現存する3系統を含む「立田山ヤエクチナシ」系統の自生地ならびにその周辺の現存状況について明らかにしていきたいと考えている。

謝 辞

遺伝解析にあたり(研)森林総合研究所樹木遺伝研究室の松本麻子博士および内山憲太郎博士には便宜を図っていただいた。なお本報告は、熊本市による受託研究「立田山ヤエクチナシの保全に関する研究(平成25~27年度)」および熊本県立第二高等学校SSH学校指定(平成23~27年度)における課題研究「天然記念物ヤエクチナシを守る」の助成により実施された。ここに謝意を表する。

V. 引用文献

- Asai T. (1929) Jap. J. Botany 4: 335-344.
 Blacket *et al.* (2012) Mol. Ecol. Resources 12: 456-463.
 Deng *et al.* (2015) Biochem. Systematic and Ecol. 58: 149-155.
 原 寛 (1952) 日本種子植物集覧 第二冊 被子植物-雙子葉植物-後生花被植物 (2) (完) アカネ科→キク科. 310 pp, 岩波書店, 東京.
 金谷整一ほか (2013) 九州森林研究 66: 67-70.
 文部省 (1929) 天然記念物調査報告 第9輯 植物之部. 87 pp, 東京.
 中井猛之進・小泉源一 (1927) 大日本樹木誌 卷之一. 714 pp, 成美堂, 東京.
 農林省林業試験場九州支場 (1977) 三十年のあゆみ. 242 pp, 熊本市.
 Peakall and Smouse (2006) Mol. Ecol. Notes 4: 309-310.
 Xu *et al.* (2014) J. Genet. 93: e 22-e 24.
 吉岡理郎ほか (2013) 熊本記念植物採集會誌 BOTANY 63: 40-53.

(2015年10月23日受付; 2016年2月2日受理)