

RNA解析による絶滅危惧種（タチスミレ）の潜在的脆弱性の評価

(株) 奥村組 正会員 ○白石 祐彰
 ミュージアムパーク茨城県自然博物館 小幡 和男
 東北大学 牧野 能士
 筑波大学 津村 義彦

1. 目的

建設工事により土地の開発・改変を行う際に事業区域内に希少動植物の生息が確認されることが多々ある。生息域への影響を回避・低減することができない場合、現在の生息場から他の場所に移動させ、生息を継続させる措置を求められることがある。

生物集団中の個体数が少ない場合では、病気を引き起こすような有害な変異を効率良く除去できないため、植物の遺伝子の中には有害変異が蓄積している可能性がある。有害遺伝子の総量や環境適応能力について遺伝情報解読手法を用いて直接的に測定することで、希少植物の存続可能性を評価できる。河川の氾濫原の低湿地に生育する多年生草本種である絶滅危惧種タチスミレの脆弱性や環境適応性を評価するために、機能遺伝子の網羅的解読を行ったので報告する。

2. 対象植物

2.1 タチスミレ（絶滅危惧種）

タチスミレは、環境省のレッドリストでは絶滅危惧種Ⅱ類に指定されている多年生草本種である。絶滅危惧種に指定されるまで減少した要因は、生育地の管理放棄、自然遷移、河川開発とされ、関東地方の生育地は利根川水系に属している。

2.2 ツボスミレ（タチスミレの近縁普通種）

ツボスミレは、平野や丘陵、山地のやや湿った草地や林内にふさは柔らかく、倒れやすい。

3. 実験方法

3.1 植物試料の採取

タチスミレとツボスミレは、茨城県の菅生沼（A地点とC地点）で2個体を採取した。採取地点を図1に示す。タチスミレの試料名をA1tu、A2tu…とした。採取地点の湿地の大き



図1. タチスミレとツボスミレの採取地点
 つまに採取地点の湿地の大きさを20cmで

地点	面積	備考
A	150m × 100m	
B	50~100m × 50m	
C	5m × 10m	タチスミレの群生地は2~3カ所
D	10m × 10m	タチスミレの群生地は4~5カ所

および小貝川の河川敷（B地点とD地点）の試料名をA1ta、A2ta、…とし、ツ

3.2 RNAの解析

生息地において採取した植物試料の組織をRNA保存液（RNA later™ Stabilization Solution）に入れ

（Promega社）を使用した。抽出したRNAは、濃度、分解度、分子サイズ分布を測定した後、次世代シーケンサー（NovaSeq 6000）によるペア

エンズの塩基配列解読を行った。
 Illumina HiSeq または Illumina NovaSeq により RNA をシーケンシングしたショートリード配列をアセンブラー Trinity でアセンブルすることで転写産物配列を得た。これらの転写産物の配列を参照配列とし、Burrows-Wheeler Alignment (BWA) を用いてショートリードのマッピングを行った。各個体の一塩基変異 (SNVs: Single

キーワード 絶滅危惧種, RNA解析, SNVs, 遺伝的多様性, 重複遺伝子, 環境適応力

連絡先 〒300-2612 茨城県つくば市大砂 387 (株) 奥村組 技術研究所 TEL 029-865-1521

Nucleotide Variants)は Samtools を用いてバリエントコールした。このようにして1個体内で検出された SNVs を、アミノ酸配列には変化のない同義置換とアミノ酸配列を変異させる非同義置換に分類した。

このようにして得た網羅的 SNV を用いて、以下の3つの指標 i), ii), iii) を解析した。各解析で得られたタチスミレとツボスミレの結果を比較することにより、絶滅危惧種の潜在的脆弱性の評価を行った。

i) 遺伝的多様性：種内の遺伝的多様性を評価するため、1個体内でヘテロ接合として保持されている同義変異 SNVs の数を検出し転写産物 1kb あたりの数に換算して比較した。

ii) 有害変異の蓄積：解析ツール PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) により、タンパク質の構造を変化させて機能上有害となる非同義置換 SNVs の割合を求めた。また、非同義置換 SNVs 中のナンセンス SNVs の割合を求めた。

iii) 重複遺伝子の割合：環境適応力の指標として用いることが期待されるゲノム中に維持されている重複遺伝子の割合の推定を行った。

4. 結果

各個体の遺伝的多様性を図2に示す。タチスミレよりツボスミレの方が遺伝的多様性が高かった。大集団であるA地点で採取した個体は、他の地点よりも遺伝的多様性が高かった。各個体の PROVEAN による非同義置換 SNVs の割合を図3に示す。ツボスミレよりタチスミレの方が割合が高かった。非同義置換 SNVs において、終止コドンに変化し、タンパク質の機能消失が予想される変異(ナンセンス変異)の各個体の割合を図4に示す。タチスミレは個体ごとに割合の大きさに差が見られた。各個体の重複遺伝子の割合を図5に示す。両者に大きな差はみられなかった。

5. 考察

タチスミレはツボスミレに比べ、遺伝的多様性が低く、PROVEAN による非同義置換 SNVs の割合が大きかったことから、個体数の少ないタチスミレが遺伝的多様性の減少を引き起こしているとともに、自然選択効率の低下により有害変異が蓄積されていると考えられた。しかし、タチスミレのナンセンス変異は個体ごとに割合の大きさが違っていたので、有害変異の蓄積には個体差があると推察された。重複遺伝子の割合は、タチスミレとツボスミレで大きな差はなかったため、タチスミレには環境変化に対する頑健性(ロバスト性)がある可能性が示唆された。

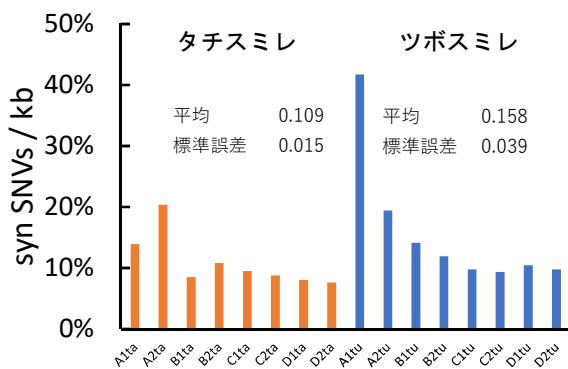


図2. 各個体の遺伝的多様性

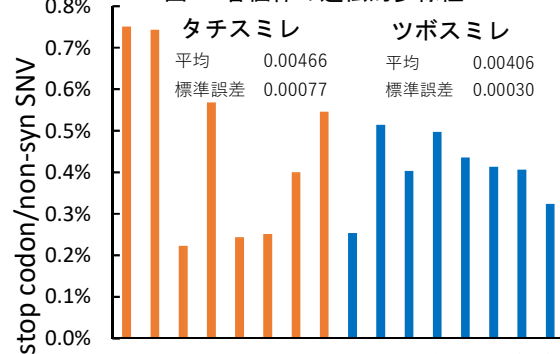


図4. ナンセンス変異の割合

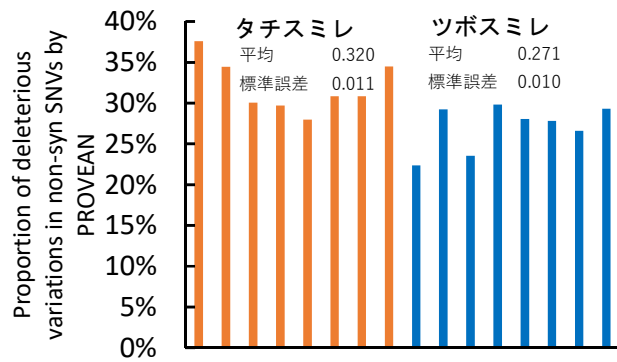


図3. 機能上有害となる非同義 SNVs の割合

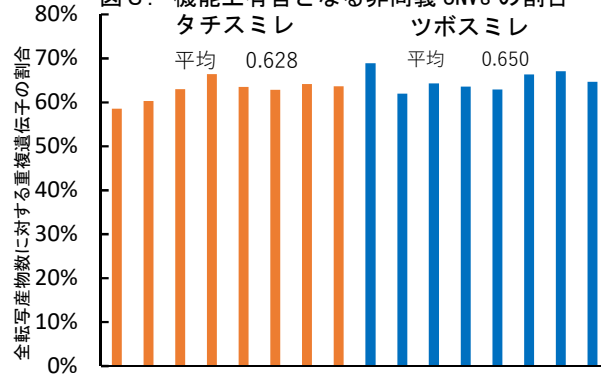


図5. 重複遺伝子の割合