

MIG-seq 法による絶滅危惧種（タチスミレ）の地域集団の遺伝的關係解析

(株) 奥村組 正会員 ○白石 祐彰
東北大学 陶山 佳久
大阪公立大学 廣田 峻
茨城県霞ケ浦環境科学センター 小幡 和男
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（生息域外保全）。

近年、次世代シーケンサーを用いた塩基配列解読技術の発展により、大容量のゲノム情報を得ることが可能となり、多数の個体のゲノム全体にわたる DNA 多型を比較的簡単に取得できるようになった。Multiplexed ISSRgenotyping by sequencing（MIG-seq）法は、次世代シーケンサーを用いた一塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）の検出およびその読み取り（遺伝子型特定）を、より迅速・簡便・安価に実現するために考案された方法である。本研究では、MIG-seq 法を用いた遺伝的多様性や遺伝構造などの情報から希少種の地域集団の保全価値を評価したので報告する。

2. 対象植物

2.1 タチスミレ（絶滅危惧種）

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）

平野や丘陵、山地のやや湿った草地や林内にふつうに見られる。高さは、5～20cm で茎は柔らかく、倒れやすい。

2.3 アギスミレ

ツボスミレの変種で、花期以前のロゼットは両者とも同じ形をしていて区別できない。

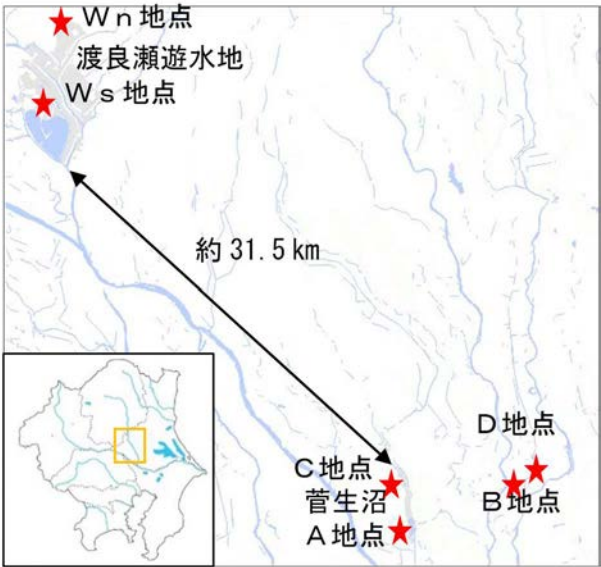


図1 菅生沼と渡良瀬遊水地との位置関係

表1 各地点におけるサンプル数と湿地

地点	タチスミレ	ツボスミレ	アギスミレ	湿地面積	備考
A	12	8	0	150m × 100m	
B	16	8	0	50～100m × 50m	
C	4	4	0	5m × 10m	タチスミレの群生地は2～3カ所
D	7	5	0	10m × 10m	タチスミレの群生地は4～5カ所
Ws	6	2	0		
Wn	6	0	4	9000m × 6000m	

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）、小貝川の河川敷（B 地点と D 地点）および渡良瀬遊水地（W 地点）で採取した。渡良瀬遊水地では、2 地点（Ws 地点と Wn 地点）で採取した。菅生沼および渡良瀬遊水地との位置関係を図1に示す。アギスミレは、Wn 地点で採取した。各地点（各集団）で採取したタチスミレとツボスミレとアギスミレの試料数および採取地点の湿地面積を表1に示す。A 地点と B 地点はタチスミレの大集団で、C 地点と D 地点は小集団であった。

3.2 MIG-seq 法および遺伝的關係解析

採取したサンプルは、DNeasy Plant MiniKit を用いて DNA を抽出した。DNA サンプルを用いた MIG-seq 法

キーワード 絶滅危惧種，MIG-seq 法，一塩基多型，遺伝的多様性，集団遺伝構造
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

によって、SNP の検出を行った^{1,2)}。韓国のキョンサン北道南西部の川沿いの湿地から採取したタチスミレ (10 個体) の遺伝情報を加え、最尤系統解析を SplitsTree ver.4.14.2 を用いて行い、タチスミレ、ツボスミレ、アギスミレの遺伝的関係を系統ネットワークとして図示した。また、IQ-TREE ver. 2.1.2 を用いてタチスミレの系統樹を作成した。地域的な集団遺伝構造を把握するための解析を STRUCTURE 2.3.4 を用いて行った。

4. 結果

タチスミレ、ツボスミレ、アギスミレの遺伝的関係の系統ネットワークを図 3 に示す。ツボスミレとアギスミレは遺伝的に区別できなかったが、タチスミレは明瞭に識別された。さらに、A、B、C、D、W 集団のタチスミレと韓国のタチスミレは、別の遺伝グループとして明瞭に識別された。韓国のタチスミレおよび A、B、C、D、W 集団のタチスミレの系統樹を図 4 に示す。系統樹から A、B、C、D、W 集団は、それぞれほぼ集団ごとにまとまった。STRUCTURE 解析の結果においても、A、B、C、D、W の集団ごとに異なるクラスターが示された (図 5)。W 地点においては、Ws 集団と Wn 集団で若干異なるクラスター組成であることが示された。

5. 考察

系統樹では W 集団と A 集団が近縁で、STRUCTURE 解析では A 集団を構成する 2 つのクラスターが W 集団の一部に現れた。このように A、B、C、D、W 集団の中では、A 集団と W 集団は地理的に比較的離れているにもかかわらず、遺伝的には近縁であった。要因として、タチスミレの種子が、過去に上流の渡良瀬遊水地から A 地点に流れて来るなどの遺伝子流動があった可能性が考えられる。一方、B 集団と D 集団は地理的距離が近く、系統樹においても近縁であることが示されたが、STRUCTURE 解析では、クラスター組成は明瞭に異なった。D 集団にわずかに存在した紫色のクラスターが B 集団で優占していたのは、両地点間での若干の遺伝子流動の存在によるものではないかと推察できる。C 集団は、系統樹においても STRUCTURE 解析においても A、B、D、W 集団とは明瞭に異なる構成であることが示された。A 地点と C 地点はともに菅生沼の湿地であり、地理的距離は近いが、遺伝的には異なるため、A 地点のタチスミレを C 地点へ移植することは、C 地点のタチスミレの遺伝的多様性を保持するためには好ましくないと考えられた。

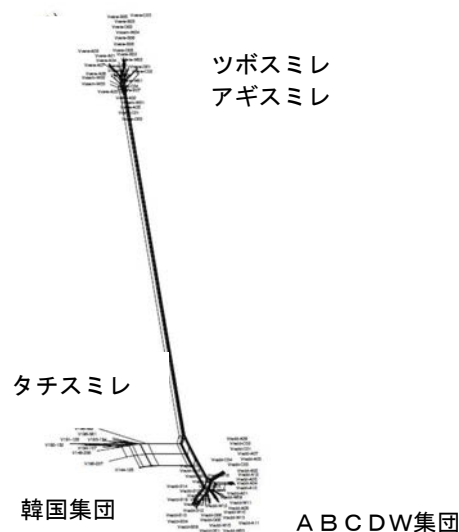


図 3. 系統ネットワーク

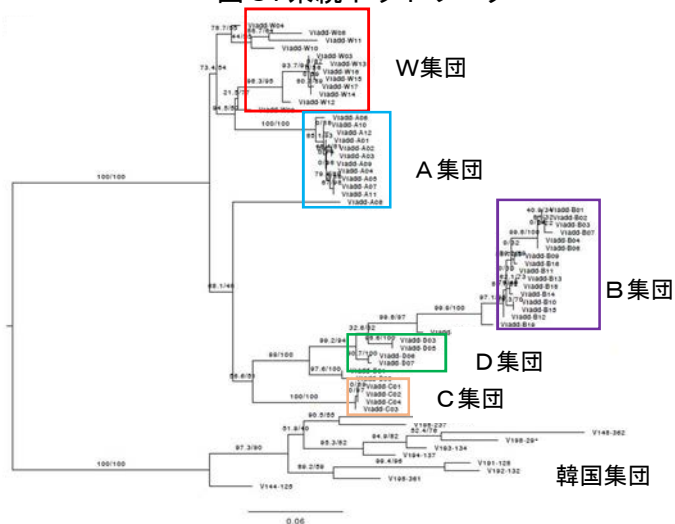


図 4. タチスミレの系統樹

かと推察できる。C 集団は、系統樹においても STRUCTURE 解析においても A、B、D、W 集団とは明瞭に異なる構成であることが示された。A 地点と C 地点はともに菅生沼の湿地であり、地理的距離は近いが、遺伝的には異なるため、A 地点のタチスミレを C 地点へ移植することは、C 地点のタチスミレの遺伝的多様性を保持するためには好ましくないと考えられた。

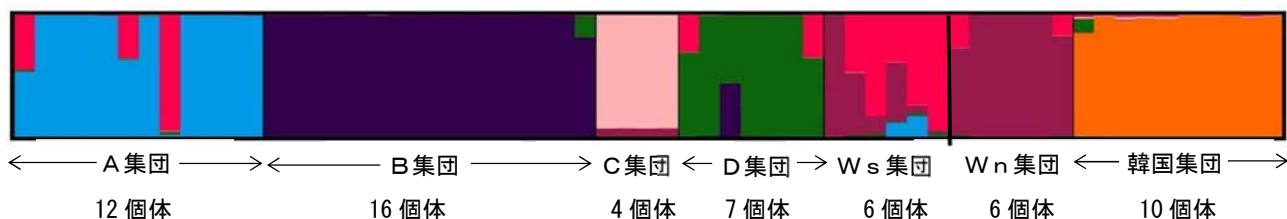


図 5. タチスミレの集団遺伝構造の解析結果 (STRUCTURE 解析)

参考文献

- 1) Yoshihisa Suyama, Yu Matsuki (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. Scientific Reports 5: 16963.
- 2) Yoshihisa Suyama, Shun K. Hirota, Ayumi Matsuo, Yoshihiro Tsunamoto, Chika Mitsuyuki, Atsuki Shimura, Kunihiro Okano (2022) Complementary combination of multiplex high-throughput DNA sequencing for molecular phylogeny. Ecological Research 37: 171-181.