

加東市内に局所的に自生するササユリ(*Lilium japonicum* Thunb.)の 系譜的關係を解析するための STS マーカーの開発

教科・領域教育学専攻
自然系(理科)コース
M 0 8 1 9 2 E
山 本 博 史

1. 序論

ササユリ(*Lilium japonicum* Thunb.)はユリ属の日本固有種で、現在、全国的に自生個体数は減少している。そのため、各都道府県の内 7 県が、ササユリを絶滅危惧 I A 類、絶滅危惧 I B 類あるいは絶滅危惧 II 類に指定している。さらに 2 県は、準絶滅危惧類に指定している。加東市(社地区)でも、昔は自生のササユリが多くみられたが、現在ではほとんど見られない。兵庫県立「やしろの森公園」では、開園当時(2000 年)数個体しかササユリが確認されていなかった。ところが、7 年後に 436 個体も自生ササユリが確認されている。そこで、本研究室は加東市内に自生するササユリがどのようにして広がっていったのか、その分布の変動を調べることを目的とした。市川(2007)は、加東市内に自生するササユリと他府県産の個体合わせて 65 個体を対象に RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法(William ら、1990)を用いてどの程度遺伝子の交流があるのかなど系譜的關係の分析を試みた。その結果、採取した地域全体で遺伝子の交流が行われていると報告した。だが、RAPD 法は、再現性や信頼性が低いなど欠点がある。そこで、RAPD 法の結果をもとに本研究は、再現性が高く、より多くの遺伝情報を得るために RAPD 法で得られたバンドを同定標識(STS ; Sequence Tagged Sites)化し、遺伝的解析に有効なプライマーの開発を試みた。

2. 材料及び操作方法

研究室で保存されていた加東市内に自生するササユリの遺伝子をテンプレートにし、RAPD 法を行った。得られた 300 から 600bp のバンドのうち、特異的なバンドもしくは切り出しやすいようなバンドを抽出・精製した。精製した DNA を T-vector pMD 20 にライゲーションし、大腸菌(JM109 株)に形質転換した。そして、それをアンピシリン、IPTG、X-gal を含む LB 培地に播種後、37°Cで一晩培養した。得られたコロニーをブルー・ホワイトセレクションで選別し、候補のコロニーからプラスミドを抽出した。

シーケンスには、ダイターミネータ・サイクルシーケンス法で行った。精製したプラスミドをテンプレートとし Big Dye (v1. 1)を用いて PCR を行った。PCR 産物を 3130 ジェネティックアナライザー(Applied Biosystems 社)を用いてで配列を調べた。

3. 結果および考察

得られた配列から RAPD 法で用いたプライマーの配列を検出した。そして、そのプライマーから 3' 端側へ 8 塩基伸ばした 20 塩基をプライマーの候補とした。設計したプライマーが、PCR 反応で特異的に任意配列を増幅させることができるかは、使用するプライマーのアニーリング温度に依存する。今回、設計したプライマーは、組み合わせごとに GC と AT を含む割合が異なる。そこで、今回の組み合わせに合った温度設定をする必要があった。アニーリング温度の基準となる Tm 値の推定には、最近接塩基対法(Nearest Neighbor method), Wallace

法, GC%法の3つの方法がある. 今回設計したプライマーの組み合わせは, いずれの計算方法でも T_m 値に差が生じた. 一番大きな温度差は, 最近接塩基対法で 16°C であった. そこで, 比較的溫度差の小さい GC%法で計算したところ各プライマーの組み合わせのうち, 低い溫度を必要とするプライマーの T_m 値が 52.2 から 58.3°C と 55°C 前後の溫度を示していた. この結果から全てのプライマーに対してアニーリング溫度を 55°C と設定した.

設計したプライマーの有効性を確認するためにやしらの森公園, 上久米, 上鴨川6種類をテンプレートにして PCR と電気泳動を行った. その結果, 12種類のプライマーセットでバンドの有無が確認された. その結果, プライマー6セットでバンドが見られた. そこで, バンドの増幅が確認できなかったプライマー, テーリングが見られたプライマーをそれぞれプライマー設計を再度行った.

この結果, 本研究で作成した12セットのプライマーセットは加東市内で自生するササユリの遺伝的交流を知るツールとして有効であると判断した.

さらに, 今回設計したプライマーを用いてやしらの森公園, 上久米, 池之内, 上鴨川, 下鴨川, 馬瀬, 鴨川の郷のそれぞれ1個体以上を使い合計20個体の遺伝子の解析を行った結果, やしらの森公園という同地域内でも中央の谷, 西の谷, 東の谷でそれぞれ異なる結果を得た(図2). 中央の谷では, ほとんどホモ型の遺伝子しか確認できず閉鎖的に交配が行われていると推測された. 一方, 西の谷と東の谷では, 同じプライマーでヘテロ型を示す個体が検出された. このことから同じ地域から花粉や種子がそれぞれの地域へ侵入した可能性が考えられた.

また, 下鴨川と上鴨川は, どのプライマーセットを用いてもホモ型の遺伝子しか示さなかった. このことからこの2ヶ所は, 閉鎖的に交配

が行われていることが推測できた. さらに, 池之内と馬瀬は, ヘテロ型の遺伝子を示すプライマーセットは, 1つだけだった. この結果からこの2ヶ所は, 徐々に外部との交流が減少し閉鎖的な交配へと移行していると思われる.

一方, 鴨川の郷では, 多くのヘテロ型の遺伝子が検出され, 最も遺伝子の交流が盛んな地域と考えられた.

今回の研究で設計したプライマーを用いて PCR し, 電気泳動した結果バンドの濃淡や100bp付近でのバンドの増幅が検出された. この増幅産物は, 非特異的な増幅によるものと思われる. そこで, これらを解決するために各プライマーセットにおけるアニーリング溫度や反応時間の再検討が必要と思われる. さらに, より正確に遺伝子の交流を調査するために現在設計したプライマーの組み合わせを変えて多くの遺伝情報を得ることが, 有効と思われる. また, 別の視点から遺伝子の交流を調査するために SSR(Simple Sequence Repeats)マーカーの開発も有効と思われる.

今回実験で用いた個体数は20個体である. 地域的に見てみると各地域2個体でしか設計したプライマーを用いて PCR, 電気泳動を行っていない. そのため, 今回の結果が地域性を示しているということは言えない. そこで, これから, 本研究室で保存しているササユリのサンプル約100個体を調べる必要がある.

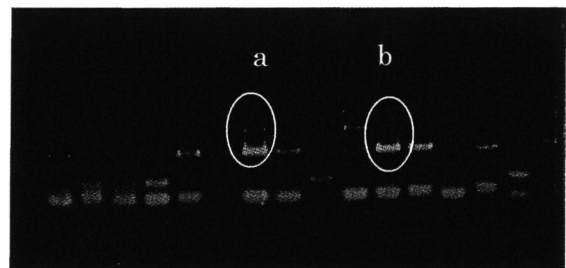


図 設計したプライマーで PCR を行ったサンプルの電気泳動像 a:ヘテロ型遺伝子 b:ホモ型

主任指導教員 渥 美 茂 明
指導教員 渥 美 茂 明