

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12255

研究課題名(和文) 外来種による遺伝的攪乱 - 侵入後の経過を植物標本DNAから探る

研究課題名(英文) Genetic disturbance of native plants by alien species examined by specimens in herbaria

研究代表者

牧 雅之 (Maki, Masayuki)

東北大学・学術資源研究公開センター・教授

研究者番号：60263985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：過去に行った生物現象の多くは、追跡・調査を行うことが困難である。しかし、植物標本庫には過去に採集された標本が保存されていて、それらからDNAを抽出することによって過去の現象を明らかにできる可能性がある。植物標本からDNAを抽出することによって、実際に野外で生じている外来種と在来種の交雑が、過去にどのように起きたのかを明らかにできるかどうかを検討した。また、交雑が起きている可能性があるが、これまで解析されてこなかったギンギン属植物2種間の交雑可能性を現地調査した。

研究成果の概要(英文)：In general, it is difficult to examine past ecological events, but specimens deposited in herbaria would be useful for such study because the specimens keep their DNA as when they were collected. These materials can be used to examine past hybridization between indigenous plant species and invasive alien species. We examined the possible values of the specimens in herbaria for study on past natural hybridization between native and invasive plants. In addition, field surveys and molecular genetic studies on on-going hybridization between two *Rumex* species, of which one is native and other is exotic, were conducted.

研究分野：植物分類学

キーワード：在来種保全

1. 研究開始当初の背景

人間の移動・運搬技術の発達とともに、本来はその場所に生育・生息していなかった生物が意図的・非意図的に持ち込まれ、外来生物問題として世界中で懸念されている。この状況は我が国においても例外ではない。これらの外来生物は、いくつかの要因から在来種に競争で勝つことが多く、生物多様性の維持における脅威となっている。

在来種と近縁な外来種が侵入すると、在来種間には確立されている生殖的隔離が外来種・在来種間には存在しない場合が多く、しばしば種間交雑を起きて、在来種の遺伝子プールの攪乱が引き起こされる。遺伝子の浸透は形態情報のみでは分からない場合が多く、保護対策を講じる前に取り返しがつかないほど進行してしまう場合が多い。

このような状況を、分子遺伝マーカーによって解析した研究例は近年増加しており、国内でもセイヨウタンポポの例がよく知られている。タデ科のギンギシ属植物においても、外来種と在来種の間での種間交雑は頻繁に起きており、在来種の遺伝子プールが外来種の遺伝子によって汚染されつつある。しかしながら、在来種と外来種の種間交雑がいつ頃から起きているのか、外来種が侵入してから在来種と種間交雑を行うようになるまでどの程度の時間がかかっているのか、遺伝子プールの汚染はどれくらいの速度で進行するのかについては今もって不明である。

ハーバリウムには、過去に採取された植物標本が多数保管されている。それは外来種についても例外ではない。外来種の標本が採取され始めた時期を調べれば、その種がその地域に侵入し始めた年代を推定することができる。一方、その外来種と交雑が可能なる在来種の標本には、明らかに雑種個体であるということが分かる個体が含まれるだけでなく、繰り返し交雑を行ったために遺伝子浸透が進んでいて、外部形態からは遺伝子汚染が起きたことがはっきりと認識できない個体も含まれる。しかし、標本の一部から DNA を抽出して、遺伝子マーカーを用いることにより遺伝子汚染の存在を確かめることができる。この方法を用いれば、外来種の侵入から在来種との種間交雑が起こるまでの期間や遺伝子汚染の速度・パターンを推定することができるはずである。

外来種による在来種の遺伝子プール汚染は、外見的には認識されにくく、気がついたときには対処の施しようがない場合が多い。しかし、遺伝子プール汚染が起きたのならば、ある時点から在来種の標本個体に外来種の遺伝子が見いだされることが予想される。過去のどの時点から遺伝子汚染が始まったかは、過去に採集された標本の DNA から追跡できるはずである。

外来種が侵入してから、遺伝的攪乱がどのようなパターン・速度で進むのかは現時点では全く不明である。一般的には、外来種と在来種の交雑は仮に起こりにくくても、いったん交雑個体が生じるとその個体がブリッジとなって交雑の進行を加速させる可能性があると考えられる。また、種間交雑は頻度依存的であり、交雑個体が増加することが、さらに新たな交雑を生じさせると予想される。その結果、ある時点から遺伝子汚染が加速度的に進むことになっているかも知れない。このような予測を検証するためには、過去から現在までの経時的な情報が必要となるが、現生の集団を用いたのでは必要な情報を得ることができない。しかし、ハーバリウムに蓄積されている植物標本の DNA を用いれば、そのような検証が可能となり得る。

2. 研究の目的

植物標本の DNA を用いて外来種の侵入過程を調べた研究は限られている。本研究では外来種による遺伝子汚染の過去から現在までの経過を、植物標本の DNA を用いて明らかにすることを目的に、標本から DNA を用いて、種間交雑が起きていることを確認する手法を確立して、実際に応用して、過去に起きた交雑現象の実態を明らかにすることを目指す。もし、この方法を確立することができれば、外来種と在来種の交雑がすぐに生じてしまうのか、あるいはある程度の時間がかかって（交雑個体の増加などに伴って）在来種の遺伝子プールの攪乱が起きるのかを推定できる。

また、実際に外来種と在来種で現時点で交雑が起きている可能性がある植物群のうち、これまでに実態が分かっていない種間交雑現象を解析し、植物標本に基づく形態的調査と比較して、野外において外来種による在来種の遺伝子プールの攪乱が検出できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 現状不明な在来種と交雑種の交雑の現状に関する解析

タデ科ギンギシ属のマダイオウ (*Rumex madaio* Makino) は日本固有種であり、もともと個体数が限られる種である。この種は現時点では、環境省によるレッドデータブックには掲載されていないものの、これまでこの種が確認された多くの都道府県で地域版レッドデータに掲載されている。実際、標本庫の調査によれば、近年は、全国的に見ても多くの産地からは採集されておらず、この種が減少して、危機的状況にあることが分かる。

マダイオウは主として山間の湿地に生育するが、そのような場所には、国内全域で同じタデ科ギンギシ属でヨーロッパ原産のエゾノギンギシが侵入しており、交雑している可能性がある。同属の在来種であるノダイオウでは、エゾノギンギシとの交雑が国内で広く観察されている。

これまでに標本庫に収められているマダイオウの生育地を踏査し、生育状況を把握するとともに、エゾノギンギシとの交雑の可能性を外部形態の点から観察した。

また、宮城県白石市には、マダイオウとエゾノギンギシが同所的に生育している場所があり、この場所において、葉緑体遺伝子マーカーとフローサイトメトリーを用いて、マダイオウとエゾノギンギシの間で交雑が起きているかどうかを検証した。

(2) 標本庫の標本から抽出した DNA を用いた在来種と外来侵入種の交雑の検定

研究対象としては、国内で広く、外来侵入種であるエゾノギンギシと交雑を起していることが分かっているノダイオウについて、ノダイオウとエゾノギンギシをそれぞれ特異的に識別できる遺伝的マーカーを用いて、植物標本庫に収蔵されている標本から DNA を抽出して、PCR 増幅を行い、交雑が起きているかどうかを検討することとした。

4. 研究成果

(1) マダイオウとエゾノギンギシの交雑に関する現象

中国地方から関東地方まで、マダイオウの標本記録のある地点を実際に訪れて、ノダイオウの生育現況ならびにエゾノギンギシとの交雑の可能性について検討した。

標本が採取された地点で、マダイオウが現在も生育している割合はあまり高くなく、シカ害によって消滅したと思われる地点やはっきりと原因が特定できないが消滅したと思われる地点があった。

いくつかの地点では、マダイオウの集団が現存していたが、多くの地点では同所的、もしくは近傍にエゾノギンギシが生育しており、外部形態から明らかにエゾノギンギシと交雑していると思われる個体も見出された。

白石市のマダイオウ生育地での調査では、フローサイトメトリー法によって、マダイオウとエゾノギンギシが交雑していることが確認されただけでなく、単なる第1世代の交雑個体だけでなく、戻し交雑によって生じたと考えられる個体の存在も確認された。

現時点では、マダイオウとエゾノギンギシの交雑は報告されたことがなく、マダイオウと外来侵入種との交雑は本研究によって新たに明らかになった現象である。

(2) 標本から抽出した DNA による交雑個体の解析

研究代表者らの先行研究により、ノダイオウとエゾノギンギシでは、すでに種特異的遺伝子マーカーが設計されている。これを用いて、標本庫に収蔵されている標本を用いて、交雑個体の判定を試みた。

DNA 抽出は通常的手法と同様の方法 (CTAB 法) を用い、葉組織から抽出を行った。

分光光度計で DNA 濃度ならびに純度を測定すると採取されてから長期間が経過した植物標本でも DNA の抽出に成功したと思われる指標が得られたが、十分な増幅が得られない場合が多かった。これは標本作製後、長期間が経過すると DNA は激しく断片化するためであると思われる。

比較的最近の標本から抽出した DNA の場合には、PCR の増幅も可能であり、解析に十分用いることができた。

外部形態からノダイオウとエゾノギンギシの交雑が疑われる個体で、比較的最近に採取されたものから抽出された DNA を用いて解析を行うと、2 種間の交雑を支持するデータが得られる。

これらのことから、ある程度近い過去の交雑現象を DNA 解析によって明らかにすることは可能であると思われる。一方、作成後、長時間が経過した標本から抽出した DNA は断片化が激しいため、ある程度長い断片を用いて、解析を行うことには困難が伴う。次世代型シーケンサーを用いた他の研究においても、古い標本から抽出した DNA による解析は困難であるとされている。断片化後のサイズ以下の増幅断片で種間特異的なマーカーが設計できるような遺伝子領域を探索して、マーカーを開発することによって、この問題を解決できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Yamashiro, T., Ogawa, M., Yamashiro, A. and Maki, M. 2018. Natural hybridization between endangered herb *Artemisia gilvescens* (Asteraceae) and common congener, *Artemisia indica* var. *maximowiczii* in Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 68: in press. (査読あり)

Kimura, T., Yamazaki, S., Uno, K., Yamada, T. and Maki, M. 2017. Isolation and characterization of microsatellite loci in the endangered perennial *Eleocharis pulvula* (Cyperaceae), emerging in the 2011 tsunami inundation areas. *Plant Species Biology* 32: 169-172. (査読あり)

Lee, W., Yang, J., Jung, K.-S., Pak, J.-H., Maki, M. and Kim, S.-C. 2017. Chloroplast DNA

assessment of anagenetic speciation in *Rubus takesimensis* (Rosaceae) on Ulleung Island, Korea. *Journal of Plant Biology* 60: 163-174. (査読あり)

藤井 伸二・勝山 輝男・狩山 俊悟・牧 雅之. 2017. コウガイセキショウモの野生化個体群を神奈川県と岡山県に記録する. 分類 17: 43-47. (査読あり)

藤井 伸二・牧 雅之. 2017. マダイオウと雑種ノダイオウの混乱. 長野県植物研究会誌 50:31-35. (査読なし)

Yamashiro, T., Yamashiro, A., Inoue, M. and Maki, M. 2016. Genetic diversity and divergence in populations of the threatened grassland perennial *Vincetoxicum atratum* (Apocynaceae-Asclepiadoideae) in Japan. *Journal of Heredity* 107: 455-462. (査読あり)

Li, Y., Tada, F., Yamashiro, T. and Maki, M. 2016. Long-term persisting hybrid swarm and geographic difference in hybridization pattern: genetic consequences of secondary contact between two *Vincetoxicum* species. *BMC Evolutionary Biology* 16: 20. (査読あり)
DOI: 10.1186/s12862-016-0587-2

藤井 伸二・牧 雅之・志賀 隆. 2016. 新外来水草コウガイセキショウモおよびオーストラリアセキショウモの同定. 水草研究会誌 103: 8-12. (査読なし)

Wasekura, H., Horie, S., Fujii, S. and Maki, M. 2016. Molecular identification of alien species of *Vallisneria* (Hydrocharitaceae) species in Japan with a special emphasis on the commercially traded accessions and the discovery of hybrid between nonindigenous *V. spiralis* and native *V. denseserrulata*. *Aquatic Botany* 128:1-6. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

荻嶋美帆・堂園いくみ・山城考・堀江佐知子・永野淳・牧雅之. 2016. 「日本産ヤマハッカ属の系統学的解析～葉緑体捕獲と不完全な系統ソーティングは見分けられるか～」日本植物分類学会第 16 回大会(京都大学)

荻嶋美帆・堂園いくみ・星野祐介・山城考・堀江佐知子・牧雅之. 2017. 「タカクマヒキオコシとサンインヒキオコシの交雑帯における遺伝的・形態的変異の解析」日本植物分類学会第 15 回大会(富山大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧 雅之 (MASAYUKI MAKI)
東北大学・学術資源研究公開センター・教授
研究者番号: 60263985

(2) 研究分担者

藤井 伸二 (SHINJI FUJII)
人間環境大学・人間環境学部・准教授
研究者番号: 40228945

(3) 研究分担者

森長 真一 (SHINICHI MORINAGA)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号: 80568162