

ユウゲシヨウの分布拡大について part III

静岡県立磐田南高等学校
生物部 1 年 平松楓佳

1 動機・目的

Part I の研究で先輩方は、外来種のユウゲシヨウ (*Oenothera rosea*: 図 1) が日本国内で分布を北へと拡大していること、その原因として、雨水散布であるユウゲシヨウの種子の特徴と強雨の頻度との関係を示唆した。Part II では、ユウゲシヨウは明治以降、何度かにわたって日本に移入されている可能性があったため、「現在分布を広げているのは明治に入ったものとは遺伝的に異なる集団なのではないか」という仮説を立て、それを検証するために DNA 解析を行った。しかし、調べた標本（現在、学校周辺に生育している個体、及び 1984 年に清水港で採集された個体）については、塩基の差は見られなかった。今年度の研究の目的は、昨年度調べられなかった別の標本について DNA の解析を行い、遺伝的な違いの有無をはっきりさせることだった。



図 1 ユウゲシヨウ

2 材料と方法

(1) 材料

ユウゲシヨウは、原産地を北アメリカ大陸南部とする、アカバナ科マツヨイグサ属の多年生草本であり、日本には明治時代に園芸用として移入された(斎田・佐藤 1917)。夏から秋にかけて、直径 15mm くらいの 4 弁の淡紅色の花を咲かせる。茎は基部でよく分岐する。根出葉は冬でも残り、倒披針形で不規則に浅～中裂し、茎生葉は披針形で波状の鋸歯があり、短い柄で互生する。Part I の研究の時の調査結果では、日本での分布の北限は岩手県であった。

また、昨年度 part II の DNA 分析のために、静岡県内の 5ヶ所（沼津市、静岡市、掛川市、磐田市、浜松市）及び東京都文京区本郷で採集した生標本と、杉野孝雄氏が採集したユウゲシヨウの乾燥標本（ふじのくに地球環境史ミュージアム所蔵）3 点の計 8 標本を用意した。昨年度は、磐田の生標本と 1984 年に清水港で採集された乾燥標本についてのみ分析をした。そのため、今年度は昨年度解析に至らなかった残りの沼津、掛川、浜松、東京の生標本と 2005 年に掛川で、1982 年に清水港町で採集された乾燥標本について分析を試みた。

(2) 方法

今年度の実験は、昨年度ユウゲシヨウの 8 つのサンプルから抽出して冷凍保存してあった DNA を用いた。昨年度は前述のように、この内の 2 サンプルの解析を行っているため、残りの 6 サンプルを用いた。しかし、参考として昨年度どのような方法で DNA を抽出したかということから述べることにする。

① DNA 抽出

QIAGEN 社の DNeasy PLant Mini Kit を用いて、各サンプルの葉からの DNA 抽出を行った。乾燥標本の場合は、できるだけ緑が濃く若い部分を用いた。実験手

順はこのキットの「植物組織からのトータル DNA 生成(Mini プロトコール)」にしたがった。ただし、乾燥標本の場合は、プロトコールに記されていた最大乾燥重量の2倍、すなわち40mgとし、また、65°Cでのインキュベーション時間も2倍、すなわち20分間とした。

② DNA 増幅

PCRには、TaKaRa社のPrimeSTAR Max DNA Polymeraseを用いた。プライマーは葉緑体DNAの増幅には、TaberLetら(1991)に従い、*trnL(UAA)*3'エキソンと*trnF(GAA)*間のスペーサーの配列を増幅するためのユニバーサルプライマーを用いた。また、核DNAの増幅にはMiikedaら(2006)に示されていた、nrITS-AB101、nrITS-AB102のユニバーサルプライマーを用いた。

PCR条件は、次のように50 μ L系で行った。

PrimeSTAR Max	25 μ L
Primer (50 μ mL)	各5 μ L
Temprate	5 μ L
dH ₂ O	10 μ L

98°Cで10秒、55°Cで5秒、72°Cで10秒を30サイクル行なった。

③ 電気泳動

アガロースゲルの作成には、TAEバッファーを用いた。各サンプル5 μ Lにローディングダイ5 μ Lを加えて電気泳動した後、Gel Greenで染色した。

④ DNA の精製

増幅したDNAのバンドをゲルから切り出して(図2)定量し、3倍量のQGバッファーに溶解した後50°Cで10分間インキュベートした。QIA quick spin カラムで遠心、PEバッファーで洗い、MiLLi QにDNAを溶かし出した。

⑤ ライゲーションとプレーティング

TaKaRa社Mighty Cloning Reagent Set <BLunt End>を用いて、ライゲーションを行なった。目的のDNAを導入するベクターはpUC118である。実験手順は、この説明書のなかの「V. 操作」にしたがった。④で精製したDNA溶液を37°Cで10分間インキュベート後、70°Cで5分間の熱処理し、Ligation Mighty Mixを加えて16°Cで1時間インキュベートした。50 μ Lのコンピテントセルに、クローニングを終えたこのベクター溶液全量を加え、42°Cで50秒のヒートショックの後、SOC培地を加えて37°Cで振とうしながら再び1時間インキュベートした。



図2 ゲルの切り出し



図3 青白選択の例

⑥ 青白選択（図3）とインサートチェック

形質転換を終えた大腸菌溶液を 50 μ L、100 μ L、残り全部というように分けて3枚のアンピシリンを含む LB プレートにまいた。それを 37 $^{\circ}$ C で 17 時間インキュベートした。生じた白コロニーを 20 個、青コロニーを 5 個選び、マスタープレート用の LB 培地に植え継いだ。

同時に選んだ大腸菌を MiLLi Q に溶かし、90 $^{\circ}$ C で 10 分のヒートショックを与えたのち氷で冷やした。このコロニー懸濁液 2 μ L と以下の PCR mixture 8 μ L を合わせてインサートチェックのために PCR にかけた。なお、mixture および条件は下記のように設定した。

Ex Taq	0.05 μ L
10 \times Ex Taq buffer	1 μ L
dNTP mixture	0.8 μ L
M13 M4(Primer I)	0.2 μ L
M13 RV(Primer II)	0.2 μ L
MiLLi Q	5.75 μ L

98 $^{\circ}$ C で 30 秒、52 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 30 秒を 30 サイクル行った。

⑦ 電気泳動と液体培養、シーケンス解析

⑥の PCR 産物を電気泳動にかけ、目的のバンドの有無を確認した（図4）。バンドを確認できたコロニーを各サンプル4つ選び、アンピシリン入りの LB 培地で液体培養した。培養は、37 $^{\circ}$ C で1日振とうしながら行った。これをシーケンス解析にかけた。

⑧ シーケンス結果解析

解析結果の処理にはまず、フォワード、リバースそれぞれの鎖についてプライマー以降の目的配列を獲得する。その後、リバース側を相補鎖変換し、前半部分にフォワードのデータ、後半部分に変換したリバースのデータを繋ぐ。このようにして完成させた全長 DNA の全てを ClustalW にかけ分析した。

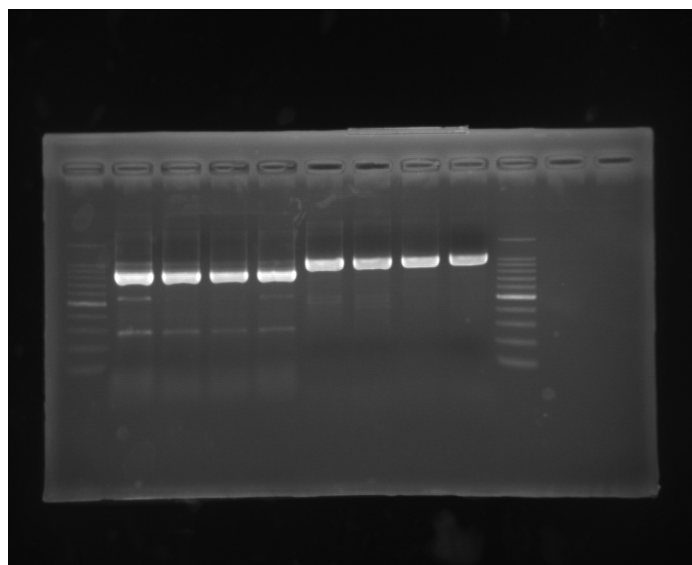


図4 インサートチェック後のバンド
左端のレーンから、1レーン；マーカー、
2～5レーン；核DNA（約850塩基）、
6～9レーン；葉緑体DNA（1021塩基）

3 結果

(1) DNA の増幅と DNA の結果

凍結保存してあった DNA の 6 サンプルを PCR で増幅したところ生標本 4 サンプルは核と葉緑体いずれの領域も増幅できた。乾燥標本は清水港町（1982 年）については核、葉緑体どちらも増幅できず、掛川（2005 年）は葉緑体 DNA のみ増幅できた。

(2) ライゲーションから青白選択まで

この操作は一度失敗し、もう一回行わなければならないようになった。失敗の原因は使用したベクターが適当でなかったためである。そのため、時間的制約から 2 回目のライゲーションは 2 つのサンプルだけ行

うことにした。選んだのは東京と浜松で採集した生標本から抽出した DNA である。その2つを選んだ理由は、距離的な差が最も大きいサンプルだからである。part II の研究でも時間的制約から2サンプルに絞り込んだが、その時は時間的な差があるものとして磐田の生標本と1984年に清水港で採集した乾燥標本を選んだ。今回は空間的な差を確かめることにしたわけである。ところが、青白選択について葉緑体領域の DNA が導入された白コロニーは十分な数が得られたが、核の領域を導入したものについては、コロニーの数が足りなかった。

(3) インサートチェック

インサートチェックの結果、20個のホワイトコロニーの中で東京では6つ、浜松では5つ目的の領域が導入されたことが確認できた(図5と図6)。この内それぞれ4つを任意に選び、解析を依頼した。

(4) シークエンス解析の結果

解析を依頼したサンプルのうち浜松の2サンプルと東京の3サンプルについて、塩基配列の読み取りができた。それをパソコンで分析したところ、東京と浜松のユウゲシヨウの間で、葉緑体DNAの調べた領域では、異なる塩基は1個も無いことがわかった。

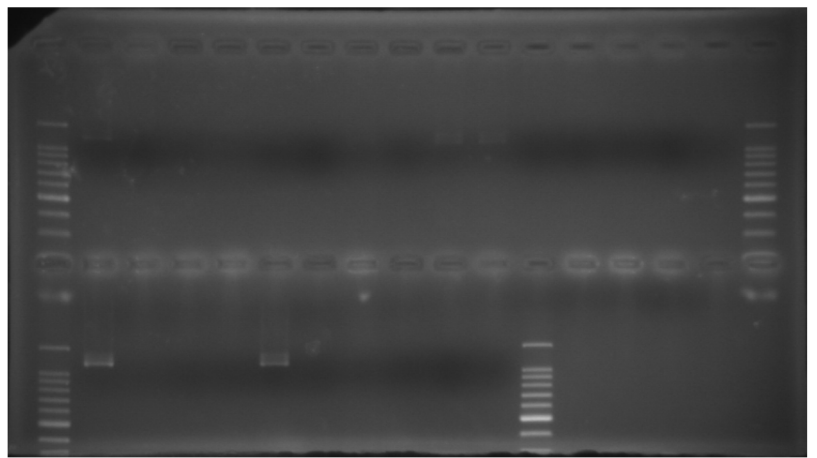


図5 葉緑体 DNA 浜松 (明瞭なバンドが見えるのは2レーン)

4 考察

Saltonstall(2002)は、北アメリカ大陸のアシ (*Phragmites australis*) が、過去150年の間に分布を拡大している原因を探求した。その結果、それまでに言われてきた人為的な影響ではなく、遺伝的な原因、すなわち、見た目にはわからないが DNA レベルで、北アメリカ大陸の固有の系統が、ヨーロッパなどに広く分布している系統に置き換わっていることを、各地で採取した生標本及び博物館に保管されていたアシの標本から抽出した葉緑体 DNA の非コード領域の比較することにより明らかにした。このような例があるため、私たちが調べているユウゲシヨウも、外見は同じユウゲシヨウでも遺伝的には異なる集団が急速に分布を拡大している可能性を検討する必要がある。

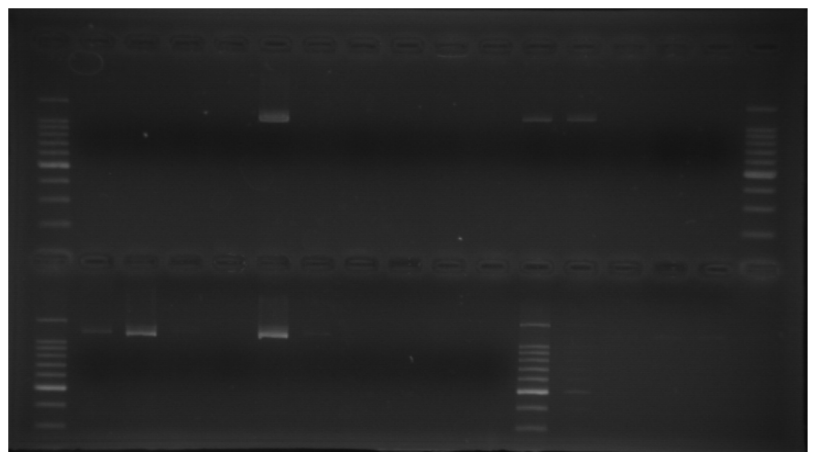


図6 葉緑体 DNA 東京 (明瞭なバンドが見えるのは3レーン)

しかしながら、昨年得られた結果は、約30年前に清水で採集されたユウゲシヨウと、現在、磐田の学校付近に生育しているユウゲシヨウは、分子系統的には差がないことを明らかにするものだった。

そして、今回得られた結果も、現在、東京と浜松に生育しているユウゲシヨウは、分

子系統的には差がないことを示すものだった。

2年間の研究結果からは、近年に起こっているユウゲショウの分布拡大の原因は、遺伝的な要因によるものではないことが示唆され、仮説は否定される。しかし、もっと古いユウゲショウ標本、あるいはもっと離れた地域のユウゲショウ標本と比較してみないと、結論は出せない。今後の課題の一つである。

<謝 辞>

この研究を進めるに当たり、御指導、御支援をいただいた、静岡大学大学院農学領域総合科学技術研究科助教、一家崇志先生、静岡大学大学院農学研究科博士課程1年の田中靖乃さん、同修士1年の山下寛人さん、ふじのくに地球環境史ミュージアムの准教授高山浩司先生、杉野孝雄先生に感謝いたします。

<引用・参考文献・引用 Web サイト>

○小野 芙子、他3名

『ユウゲショウの分布拡大について part II 』

第63回鈴木賞準賞受賞論文(2016)

○小野田愛梨、他4名

『ユウゲショウの分布拡大について』

第62回鈴木賞正賞受賞論文(2015)

○近田文弘・清水建美・濱崎恭美(2006)

『帰化植物を楽しむ』p52-p53:トンボ出版

○齋田功太郎・佐藤禮介編(1917)

『内外植物誌最新図説』p464:大日本図書

○清水矩宏・森田弘彦・廣田伸七(2002)

『日本帰化植物写真図鑑』p212-p213:全国農産教育協会

○岩手県環境生活部(2001):『岩手県野生生物目録』p31

○Pierre Taberlet *et al.*(1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA: *Plant Molecular Biology* 17:p1105-1109

○Osamu Miikeda *et al.*(2006) Phylogenetic relationships of *Clematis* (Ranunculaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences :*Botanical J.Linnean Soc.*Vol.152(2):p153-168

○ClustalW(URL:clustalw.ddbj.nig.ac.jp)

○Kristin Saltonstall(2002) Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America :*PNAS* 99(4),p2445-244