北海道に自生するミズゴケ属の遺伝子解析と種同定結果の比較（事例報告）

日本湿地学会2016年度大会発表

＊新庄 久尚（株式会社エコテック） 佐藤 桐子（東海大学農学部応用植物科学科） 星 良和（東海大学農学部応用植物科学科）

背景と目的

北海道の石狩川下流域にはかつて総面積55,000haとなる日本最大の湿原が拡がっていた。石狩湿原は美唄、幌向、当別篠津、対雁など複数地域の泥炭地の集合体であり、湿原生のスゲ類やミズゴケ類などが優占する広大なボッグを形成していた。

明治以降の開発や、1950～1960年代の農地開発や治水事業に伴い、石狩川流域は日本最大の穀倉地帯へと変貌したが、その一方でかつて存在していた広大な湿原はほぼ消滅し、1983年には石狩平野に残存する湿原植生は119 haとかつての0.2%にまで激減した。現在では美唄湿原や月ヶ湖湿原などに孤立したわずかな湿原植生が残るのみとなっており、これらの残存する湿原も地下水位の低下等による乾燥化が進行するなど、今後の存続が危ぶまれている。

国土交通省北海道開発局札幌開発建設部では、流域住民や泥炭採取業者、有識者などとの連携のもと、かつて石狩川下流域に成立していたボッグの再生を目指した自然再生事業を進めている。新たなボッグの再生のためには、現在の石狩川下流域に僅かに残存する湿原植物やミズゴケ属を保全するだけでなく、既にボッグが消失した地域においてボッグの成立条件を確保すると共に、ボッグの優占種となる湿原生のスゲ類やミズゴケ属などの増殖、再導入を進める必要がある。

自然再生などにおいて消失した生物の再導入を行う際、導入元と導入先での個体群間の遺伝的な構成の違いは個体群の適応性に影響するため、遺伝子汚染などが生じないよう、導入元となる個体群の遺伝的な位置付けについて考慮する必要がある。しかし、ミズゴケ属については2016年現在において生育箇所や種毎での遺伝子解析の事例が乏しく、石狩川下流域においても十分な知見が得られていない。

そこで現状の石狩川下流域に残存する湿原箇所から採取したミズゴケ属について、PCR法を用い、葉緑体のDNA領域である*rbc*L遺伝子の増幅と配列の決定、解析を行った。さらに、採取したミズゴケ属について光学顕微鏡を用いた種同定を実施し、今後、採取地や種による違いと遺伝子の差異について比較検討を進めるための事例の蓄積を行った。

北海道における湿原の変遷図※1

湿地面積：337.39km² 約33%の湿地が消失 湿地面積：226.56km²

■石狩平野には、総面積55,000ha となる北海道最大のボッグが形成されていた※2
■1983 年石狩平野に残存する湿原植生は119ha（かつての0.2%）のみ
現在は美唄湿原や月ヶ湖湿原などにわずかなボッグが残るのみとなっている

※1：国土地理院 湖沼湿原調査結果HP 2000
※2：北海道未開発泥炭地調査報告 北海道開発庁 1963

材料と方法

●サンプル採取箇所位置図

20万分の1土壌図 国土交通省（1967年～1978年）

●遺伝子解析

【サンプル採取】
・石狩川下流域に残存するミズゴケ属自生箇所において、30箇所より32個体のミズゴケ属サンプルを採取
・北海道美唄湿原No.1サンプルに関しては同一集団内での遺伝子差異を確認するため同一集団から3個体を選出し解析を実施
・サンプルを洗浄、乾燥した後、1個体ずつにラベルをつけて個体番号を設定し、1個体から1つの頭状体だけをDNA抽出に使用
・解析に使用しなかったサンプルは標本とし、同定作業に利用

【DNAの抽出】
・乾燥した頭状体を液体窒素で破砕し、CTAB法を用いて32サンプルのDNA抽出を実施
・得られたDNAをTEに溶かし、濃度を調節した後PCRに使用
・PCR法を用いて*rbc*L遺伝子の増幅を実施（図1参照）
・*rbc*L領域は約1400bpと配列長が長いため、領域を3分割（a, b, cに分割）してPCRを実施

【PCR産物の精製】
・PCR産物内に含まれる塩、DNTp、残ったプライマーの除去を行うためキアゲンの QIAquick PCR Purification Kit(250)を使いPCR産物の精製を行った後、電気泳動にてサンプルの濃度を確認し濃度を調整したサンプルを配列決定に使用
・精製後のPCR産物とプライマーを混合しタカラバイオ株式会社にて配列の決定を実施
・BioEditを用い、aF, aR, bF, bR, cF, cR それぞれの配列をアセンブリング、a, b, c, 3領域の配列をつなぎ合わせた後、その配列を用いてアライメントを行い、それぞれのサンプルの配列の差異を比較した

写真1 ミズゴケ属サンプル

用いたプライマー
aF：ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
aR：CTTCTGCTAGAAATAAGAATCGATCTCTCCA
bF：TATCCCCTGGATTTATTTGAGGAAGGTTC
bR：CGTTCGCCTTCCAATTTGCCCACTACAGT
cF：TGAAAACGTGAATTCCCAACCGTTTATGCG
cR：GCAGCAGCTAGTTCCGGGCTCCA

PCR反応組成
Recipe for 1 reaction (50 μl)

10 x reaction buf	5 μl
2.5 mM dNTP mix	4 μl
Primer F (10 pmol/ μl)	1.25 μl
Primer R(10 pmol/ μl)	1.25 μl
EX-Taq (5U/ μl)	0.25 μl
Template DNA (10ng/ μl)	5 μl
H_2O	up to 50 μl (32.5 μl)

PCRサイクル
94℃ 120 s
94℃ 10 s
58℃ 30 s
68℃ 30 s
x 35 cycles
70℃ 3 min
4℃ ∞

1. ラダー
2. *rbc*L a
3. *rbc*L b
4. *rbc*L c

図1 PCR法を用いた*rbc*L遺伝子の増幅

●種同定作業

・サンプルの標本を再度蒸留水に浸して吸水させ、実体顕微鏡を用いて確認しながら精密ピンセット等を用いてサンプルの茎葉、枝葉、表皮細胞などを採取しプレパラートを作成
・実体顕微鏡を用いて確認しながら、カミソリ等を用いて枝葉の切片を作成し、枝葉の横断面を確認するためのプレパラートを作成
・光学顕微鏡を用いて茎の表皮細胞や枝葉、茎葉の細胞、枝葉断面などを確認し同定を実施

写真2 ミズゴケ節（ムラサキミズゴケ）の茎表皮細胞

写真3 キダチミズゴケ節（キダチミズゴケ）の茎表皮細胞

写真4 枝葉断面での葉緑細胞の形状の違い（例）

結果

・サンプル採取箇所が異なる集団間で遺伝子の差異を確認した
・同一箇所でサンプルを採取した集団内（美唄湿原）においても遺伝子の差異を確認した
・種同定結果でも同一箇所より採取したサンプルに異なる種が混在することが判明した（複数の種がごく近接して混在し群落を形成している）

■遺伝子配列の差異を確認
■同一箇所サンプル内でも遺伝子の差異を確認

図2 本解析で配列を決定したサンプルをアライメントもの（約1400bp内の100bp程度、一部表記）

図3 本解析で得られた配列情報とDDBJに登録済のミズゴケ属*rbc*L配列を元に作成した分子系統樹

図4 遺伝的距離を考慮した系統樹

●同定結果との比較 Point.1

■赤枠内に入った24サンプル：
オオミズゴケ（L13485）と塩基配列が完全に一致

同定結果：表1に示す2節4種が混在

表1 塩基配列が一致したグループ内サンプルの同定結果

採取場所	節	種名
美原地区	ミズゴケ節	イボミズゴケ
		オオミズゴケ
美唄湿原	ミズゴケ節	イボミズゴケ
	キダチミズゴケ節	キダチミズゴケ
東野幌湿原	ミズゴケ節	イボミズゴケ
夕張川左岸	ミズゴケ節	イボミズゴケ
江別太遊水地	ミズゴケ節	ムラサキミズゴケ
	ミズゴケ節	オオミズゴケ

→種・節が異なるサンプル間でも塩基配列が一致する場合がある（今後、種・節間の遺伝的距離などを評価するうえで基礎知見となる）

●同定結果との比較 Point.2

■チャミズゴケ（AY309697）のクレードに入ったサンプル

同定結果：スギバミズゴケ節 チャミズゴケ
クレードと同定結果が一致
→今回の配列を比較することで節や種の判別ができる可能性がある

今後の課題

『石狩川下流域に自生するミズゴケ属の種同定』と『種毎の遺伝子情報の蓄積』のふたつを連携して進め、今後の保全・再生計画に活用するためのデータベースの構築が必要

自生するミズゴケ属の種同定
現在石狩川下流域に残存しているミズゴケ属群落の種類や生育箇所毎での構成の違いなどを把握する

相互連携・補完

種毎の遺伝子情報の蓄積

種同定面での応用
・各種の特徴となる遺伝子配列を見つけることで遺伝子情報からの節や種の同定が可能となる
・種間の遺伝的距離を把握することで、形態以外によるより詳細な分類系統の把握が可能となる

湿原再生に向けた応用
・同一種内や同一個体群内での遺伝的な多様性、生育地間での遺伝的な距離、類似性などの把握、評価に役立つ
・失われた湿原を再生する際などに、導入するミズゴケ属の採取場所や導入種の選定などに活用できる