

希少種の大切さ

- ミヤマスカシユリの保全を目指して -

自然環境担当 外国人特別研究員 アマウリ アルサテ

1 はじめに

現在地球上には、知られているだけでも 150 万種以上の生物が発見されており、未発見の種も含めると 1000 万種以上の生物が存在すると推測されている。このように、地球上には多様な生物種が存在している。しかしながら、これらの種は、日々驚異的なスピードで絶滅し続けており、生物多様性の危機が以前から指摘されている。この生物種の絶滅の原因として、人間活動に伴う開発、乱獲、環境汚染などの自然環境の破壊があげられる。

人間を含めた生物どうしの関係は、自然環境を含めて複雑に絡み合って成り立ち、自然界のバランスを保っている。したがって、突然の種の絶滅は、長い時間をかけて微妙なバランスを保ってきた自然界に悪影響を及ぼしかねない。すなわち、このような微妙な自然界のバランスを崩さないことが、人間を含めた生物の生存にとって必須の条件である。全世界的なレベルで絶滅の恐れのある動植物について調査・研究を行ってきた IUCN(International Union for Conservation of Nature; 国際自然保護連合)が作成したレッドデータブックによると、15000 種以上の動植物が絶滅の危機に瀕しているとされている。また、我々の気づかない所で、絶滅の危機に瀕している動植物がいるかもしれない。これらの種を絶滅の危機から救済し、生物多様性を保全することが、自然界の微妙なバランスを維持し、人間を含めた生物が健全に生存するために必要とされている。

希少な絶滅危惧種の保護を通して生物多様性を保全する計画は、全世界の様々なレベルで行われている。この講演では、講演者の母国であるメキシコに着目し、同国における自然環境の現況と生物多様性保全への取組みを紹介するとともに、日本および埼玉県における生物多様保全へ取組みを概説する。また、埼玉県における希少種保全に関する研究事例として、これまで我々が取り組んできた「武甲山に生育する絶滅危惧植物ミヤマスカシユリの保全に関する研究」についてその一部を紹介する。

2 生物多様性とは？

生物多様性は、遺伝子、種、そしてさらには生態系という広いスケールにまで及ぶ生命活動全般の多様性として定義されている。この定義の中で、生態系の多様性とは、温帯林や熱帯林、森林や湖沼など様々な生態系が存在することをいい、種の多様性とは、姿、形、生活が異なる様々な生物が存在することをいう。また、遺伝子の多様性とは、同じ生物の中でも、少しずつ異なった遺伝子をもつ個体が存在することをいう。これらの 3 つのレベルにおける多様性の概念は互いに関連しあっており、遺伝子の多様性が種の成り立ちを支え、種の多様性が生態系の多様性を構成する上での基礎となっている。したがって、3 つのレベルの多様性のうち、いずれの多様性が失われても、生物多様性が低下することになる。

3 生物多様性に富んだ国、メキシコ

世界には約 200 ヶ国が存在するが、極めて生物多様性に富んだ国とされているのはその内の 12 ヶ国(アメリカ、メキシコ、コロンビア、エクアドル、ペルー、ブラジル、コンゴ、インド、中国、インドネシア、マダガスカル、オーストラリア)のみで、地球上に存在する生物種の約 70%がそれらの国々に集中していると

いわれている。メキシコは、これらの 12 ヶ国のうちのひとつに含まれている。

メキシコは、約 200 万 km² の国土を持つ、人口約 1 億人の国である。標高は、最も低い所で海拔-10m (Laguna Salada)、最も高い所で海拔 5700m(Volcan Pico de Orizaba)であり、多様な地形が存在している。また、気候は、熱帯や砂漠などのいくつかの気候域が存在し、極めて変化に富んでいる。

メキシコでは、これまでに約 5 万種(植物: 26000 種、両生類および爬虫類: 989 種、鳥類: 1054 種、哺乳類: 491 種、昆虫類: 19011 種、魚類: 2122 種)の生物が発見されているが、未発見の生物を含めると、約 21 万種の生物が存在すると推定されている。この生物種数は、地球上の全生物種の少なくとも 10% がメキシコに存在していることを表している。また、メキシコには、900 種以上の脊椎動物が固有種として存在し、両生類と爬虫類については、世界で最も多くの種が発見されている。さらに、メキシコに生息する植物種数は、カナダとアメリカに生息する植物種数を合わせたものよりも多く、またヨーロッパに生息する植物種数の 2 倍を誇っている。これらのことは、メキシコにとって極めて名誉なことではあるが、メキシコは極めて重い責任を負っているということでもある。

メキシコには、極めて生物多様性に富んだ 4 つの州(Oaxaca、Chiapas、Guerrero、Veracruz の各州)がある。その中でも特に Oaxaca 州は、植物と動物の多様性に富んでおり、植物についてはメキシコに生息する全植物種の約 50% が生息している。また、鳥類も約 750 種が生息しており、その多くがメキシコの固有種である。なお、これはメキシコに生息する全鳥類種の約 70% に相当する。

4 メキシコにおける生物多様性保全への取組

メキシコでは、38 種の脊椎動物と 11 種の植物の絶滅が報告され、2000 種以上の動植物が、絶滅の恐れのある種として指摘されている。世界各国には、野生生物の保護・管理に責任を持ち、活動する多くの政府機関、研究所、財団、団体などがある。メキシコでは、CONABIO(Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad)が、生物資源の持続的利用について調査・研究し、科学的根拠に基づいた生物多様性の保全活動を進めており、2000 年に生物多様性国家戦略を発行した。

5 日本および埼玉県における生物多様性保全への取組

日本では、1993 年に生物多様性条約が発効し、それに対応して、1995 年に生物多様性国家戦略が策定された。その後、この戦略は根本的に見直され、2002 年には、新・生物多様性国家戦略が策定された。一方、埼玉県では、絶滅の恐れのある種について、その生息状況と絶滅の危険度がとりまとめられ、1996 年には「さいたまレッドデータブック 動物編」、1998 年には「さいたまレッドデータブック 植物編」が発行された。これらに続き、2000 年には、「埼玉県希少野生動植物の種の保護に関する条例」が公布された。この条例に基づき、「県内希少野生動植物種」として 22 種(動物 3 種、植物 19 種)が指定され、捕獲や採取の制限等により、これらの種の保全対策が実施されている。条例指定された 22 種の中には、埼玉県の「花」であるサクラソウや埼玉県の「魚」であるムサシトミヨ、そして我々が保全研究の対象としているミヤマスカシユリなどが含まれている。

6 希少な絶滅危惧植物ミヤマスカシユリの保全に関する研究

6.1 自然個体群の遺伝子解析 (Arzate-F. Amaury *et al.*, 2005)

ミヤマスカシユリ(*Lilium maculatum* var. *bukosanense*)は、埼玉県西部にある武甲山に自生する野生のユリで、標高 600m ~ 1000m の位置に生育している(図 1)。ミヤマスカシユリの自然個体群は、石灰石の採掘やシカやサルなどによる食害によって、その規模が極端に減少してきた。「さいたまレッドデータブッ

「植物編」によると、ミヤマスカシユリは、ごく近い将来における野生での絶滅の危険性が極めて高い種(絶滅危惧 A類)としてリストアップされており、早急に保全が必要な状況にきている。保全対策を効果的に行うためには、個体群内でのその種の繁殖様式や遺伝的多様性の状況等の科学的根拠に基づいて、それを実施する必要がある。従って、ミヤマスカシユリを保全する場合、その自然個体群における遺伝的多様性や繁殖様式についての情報が必要となるが、これまでに、ミヤマスカシユリのそれらについて調べた報告はほとんどない。そこで、本研究では、武甲山に生育する 2 つのミヤマスカシユリ個体群から 46 個体の葉を採取し、それらから DNA^{注1)}を抽出して遺伝子解析を行った。なお、遺伝子解析は、葉緑体 DNA^{注1)}と核 DNA^{注1)}をターゲットとして行った。



図1 ミヤマスカシユリが生息する武甲山(左上の写真)とその生息現場(真上の写真)、およびミヤマスカシユリの花(左の写真)。

葉緑体 DNA の解析には、PCR-RFLP 法^{注2)}を用い、これにより、採取した 46 個体の母親の由来を推定した。この方法は次のように行う。まず、葉緑体 DNA の特定領域を、既知の葉緑体 DNA 増幅プライマー対^{注3)}を用いて(表 1)、PCR^{注3)}で増幅する。次に、この PCR 産物を制限酵素^{注4)}で処理する。最後に、制限酵素で処理した PCR 産物をアガロースゲル電気泳動^{注5)}にかけ、個体間でバンドパターンを比較する。本研究では、葉緑体の特定領域を PCR で増幅するために、

16の葉緑体 DNA 増幅プライマー対を試験した。その結果、16のプライマー対のうち、4つのプライマー対を用いたときにだけ、電気泳動により鮮明なバンドが発現した。これらの4つのプライマー対に対して、6種類の制限酵素を組み合わせ、合計24通りの組み合わせについて、採取したミヤマスカシユリを検討した。その結果、46個体全てのミヤマスカシユリが、全ての組み合わせに対して、同一の電気泳動パターンを示した(図2)。これらの結果は、採取した46個体のミヤマスカシユリの母親の由来が遺伝的に極めて近いことを示唆している。

表1 本研究に用いた葉緑体 DNA 増幅プライマー対の塩基配列 (M, Haruki *et al.*, 1998; N, Demesure *et al.*, 1995).

プライマー対	塩基配列 (5' to 3')
SH020 ^M	CGC GGT GGA CTT GAT TTT ACC
SH021 ^M	GGC ATA TGC CAA ACA TGA ATA CC
SH019 ^M	GGT AAA ATC AAG TCC ACC GCG
SH022 ^M	GCA CTC ATA GCT ACA GCT CTA AC
<i>psbC</i> ^N	GGT CGT GAC CAA GAA ACC AC
<i>trnS</i> ^N	GGT TCG AAT CCC TCT CTC TC
<i>trnC</i> ^N	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC
<i>trnD</i> ^N	GGG ATT GTA GTT CAA TTG GT

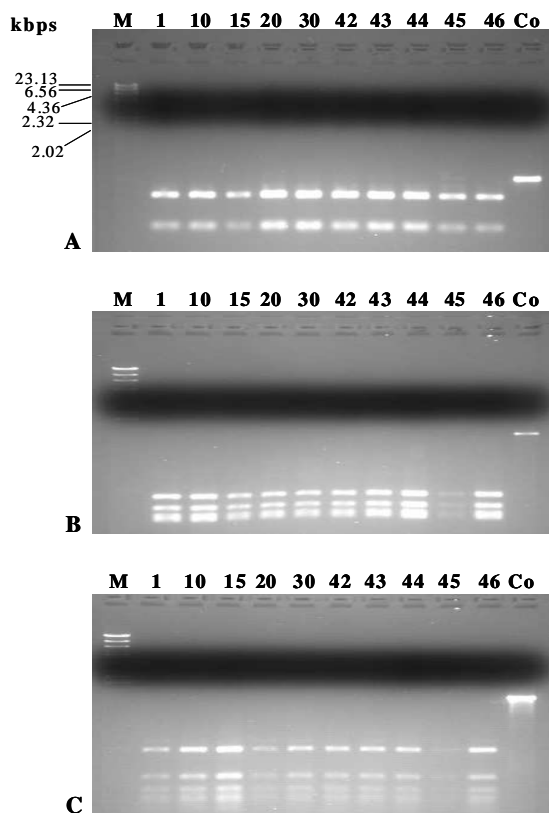


図2 増幅されたミヤマスカシユリの葉緑体DNAを制限酵素で処理したときの電気泳動パターンの例。

核 DNA の解析には、ISSR 法^{注6)}を用い、これにより、採取した46個体のミヤマスカシユリの両親から得た遺伝形質を調べた。この方法は次のように行う。まず、既知の ASSR プライマー^{注7)}を用いて(表2)、PCRで核DNAを増幅する。次に、そのPCR産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、個体間でバンドパターンを比較する。本研究では、5種類のASSRプライマーを用いて、採取された46個体のミヤマスカシユリの核DNAを増幅し、それらの電気泳動パターンを比較した。その結果、2個体を除く、44個体全てのミヤマスカシユリが異なる電気泳動パターンを示した(図3)。このことは、採取した46個体のミヤマスカシユリのうち、少なくとも44個体は種子により繁殖したことを示しており、武甲山のミヤマスカシユリ個体群では、主に種子繁殖が行われていることを示唆している。また、各個体の電気泳動パターンより、個体間の遺伝距離を算出した結果、個体群内および個体群間のいずれにおいても、遺伝的類似性が著しく高いことが分かった(図4)。

表2 核 DNA 増幅プライマーの塩基配列
(Abe *et al.*, 2002).

プライマー	塩基配列 (5' to 3')
ASSR02	(CT) ₇ ATC
ASSR15	(CT) ₇ ATG
ASSR20	(CT) ₇ GCA
ASSR29	(CT) ₇ GTA
ASSR35	(CT) ₇ TGA

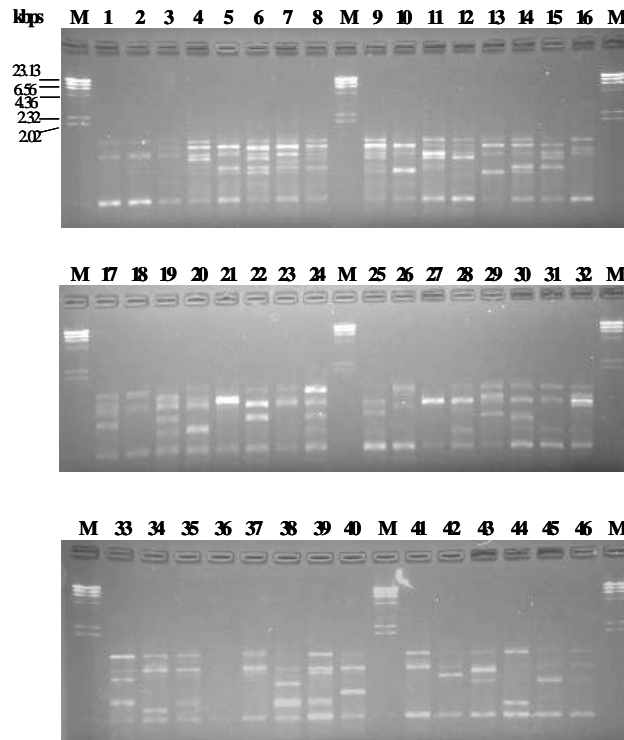
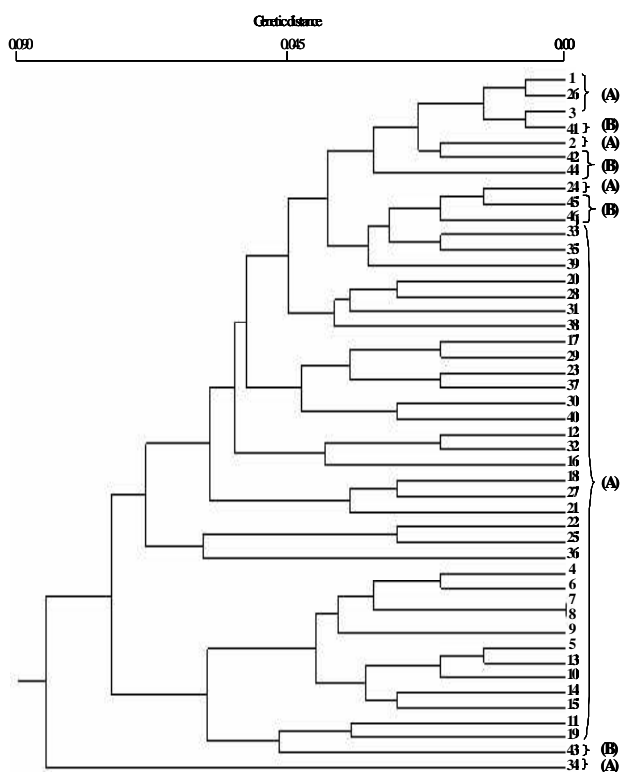


図3 増幅された核DNAの電気泳動
パターンの一例.

図4 採取した 46 個体のミヤマスカシユリ
間の遺伝距離から作成した樹形図.

6.2 人工増殖法の検討

希少な絶滅危惧植物の保全を考える場合、万が一野生において絶滅してしまった時のことを想定して保全対策をあらかじめ準備する必要がある。そのためには、対象とする絶滅危惧植物が絶滅してしまう前に、人工的に増殖する方法を検討し、万が一の時のためのバックアップ体制を整備しておかなければならない。そこで、本研究では、ミヤマスカシユリの球根鱗片から人工的に試験管内で効率よく植物体を再生するための方法を、培地内の2種類の植物ホルモン(α -naphthaleneacetic acid (NAA) と thidiazuron (TDZ))の濃度比および活性炭の有無、さらに育成条件としての光の有無について、それぞれの条件を

組み合わせて検討した(表 3)。なお、ミヤマスカシユリの球根鱗片の培養の様子を図 5 に示す。

ミヤマスカシユリの球根鱗片を 12 週間にわたって培地上で培養した結果、最も良好に植物体が再生されたのは、培地中に活性炭と植物ホルモンである NAA と TDZ をそれぞれ 2mg/L および 0.5mg/L の割合で添加し、光のある条件下で培養した場合であった(表 3)。しかしながら、この培地中に植物ホルモンを添加しなくても、ほぼ同程度の植物体再生が認められた(表 3)。培地中に植物ホルモンを添加すると、再生された植物体に突然変異が生じる可能性がある。このことを考慮すると、ミヤマスカシユリの人工増殖法としては、その鱗片を、植物ホルモンは添加せずに、活性炭のみを添加した培地上で、光条件下で培養する方法がより良いと考えられる。なお、この方法を用いて、現在、600 個体以上のミヤマスカシユリの再生に成功している。

表3 鱗片培養の条件と再生された個体数.

植物ホルモン NAA:TDZ (mg ^l)	再生された球根数			
	明		暗	
	活性炭			
	有	無	有	無
0.0:0.0	4 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.2
0.0:0.5	2.8 ± 0.1	0	1.9 ± 0.2	1.4 ± 0.1
1.0:0.5	3 ± 0.3	1.8 ± 0	1.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1
2.0:0.5	6 ± 0.8	0	2.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2



図5 ミヤマスカシユリの球根鱗片の培養の様子.

6.3 本研究のまとめと今後の課題

武甲山に生育するミヤマスカシユリ個体群では、母親の由来が遺伝的に極めて近いこと、主に種子繁殖が行われていること、個体間の遺伝的類似性が極めて高いことがわかった。また、ミヤマスカシユリの球根鱗片から植物体を効率よく再生する人工増殖法を確立した。今後は、これらの研究成果を踏まえて、具体的にミヤマスカシユリの保全策を検討していきたいと考えている。

7 謝辞

ミヤマスカシユリの保全に関する研究を進めるにあたり、能見三郎氏、福田政清氏、嶋田義久氏および秩父太平洋セメントの皆様方には、研究材料の確保にご協力を頂くとともに、多くの貴重なアドバイスを頂きました。ここに記して、お礼を申し上げます。また、この研究は、埼玉県、メキシコ州およびメキシコ州立自治大学の支援の下に実施することができました。ここに記して、関係各位に謝意を申し上げます。そして最後に、私の家族全員に感謝します。

用語解説

注1) DNA、核 DNA および葉緑体 DNA : DNA は、deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)の略称であり、遺伝子の本体を示す。二本のポリヌクレオチド鎖が二重らせん構造を形成しており、それぞれの鎖上の塩基配列が遺伝情報を表わしている。鎖上の塩基は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の4種類からなり、CとG、AとTがそれぞれ相補的に結合する。この相補的結合が二重らせん構造の成り立ちを支えている。植物の場合、DNA は核だけではなく、葉緑体にも存在し、核 DNA は両性遺伝(父親と母親の両者がかかわった遺伝)の解析に、葉緑体 DNA は母性遺伝(母親がか

かわった遺伝)の解析に用いられる。

注2) PCR-RFLP 法: PCR については、注3を参照されたい。RFLP は、restriction fragment length polymorphisn (制限酵素断片長多型)の略称である。この方法は、PCR で増幅した DNA を制限酵素(注4を参照)で処理し、そのとき生じた断片長の差異を個体間で比較する方法である。

注3) PCR およびプライマー(対): PCR は、polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)の略称である。PCR は、DNA ポリメラーゼ(DNA 合成酵素)がプライマーを利用しないと DNA 合成を開始できないという性質を利用して、DNA の離れた2点に結合するプライマーを用いて、その挟まれた2点間の DNA だけを大量に増幅させる反応方法である。また、ここでいうプライマーとは、DNA の塩基配列に相補的に結合する 20 塩基前後からなるポリヌクレオチド鎖の小断片である。DNA のある特定の領域を増幅したい場合、その領域を挟むようにプライマー(対)の塩基配列を設定し、人工的にそれらを合成する必要がある。

注4) 制限酵素: DNA の特定の塩基配列を認識して二本鎖を切断する酵素である。

注5) アガロースゲル電気泳動: DNA はマイナスに帯電しているため、電場をかけるとプラスの方向に移動する。この現象を電気泳動といい、これをアガロースゲル上で行う場合をアガロースゲル電気泳動という。アガロースゲルは分子篩としての効果を示すため、DNA をアガロースゲル電気泳動にかけると、DNA 断片の長さ毎に分離される。

注6) ISSR 法: ISSR は、inter-simple sequence repeat の略称である。ISSR 法は、PCR で DNA を増幅する際に、繰り返し配列をもつプライマーを用いる方法である。例えば、(CA)₁₀、(GTG)₅、(GACA)₄ など、様々な繰り返し配列をプライマーとして用いる。

注7) ASSR プライマー: ASSR は、anchored simple sequence repeat の略称である。ASSR プライマーは、(CA)₇ATC、(CA)₇TT、(CA)₇A のように、繰り返し配列の末端に、さらに任意の数塩基を付加したものをいう。

文 献

- 1) Abe H., Nakano M., Nakatsuka A., Nakayama M., Koshioka M. and Yamagishi M. (2002). Genetic analysis of floral anthocyanin pigmentation traits in asiatic hybrid lily using molecular linkage maps. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1175-1182.
- 2) Arzate-Fernández Amaury-M., Miwa M., Shimada T., Yonekura T., and Ogawa K. (2005). Genetic diversity of Miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*), an endemic and endangered species in Mt. Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biology.* 20(1): 43-51.
- 3) Demesure B, Sodzi N. and Petit R. J. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Eco.* 4: 129-131.
- 4) Haruki K., Hosoki T. and Nako Y. (1998). Tracing the parentages of some oriental hybrid lily cultivars by PCR-RFLP analysis. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67 (3): 352-359.

参考にしたホームページ

- 1) <http://www.iucnredlist.org/info/tables.html>
- 2) http://www.geocities.com/sergio_lara/mega.html
- 3) http://www.conevyt.org.mx/actividades/diversidad/lectura_biodiversidad.htm
- 4) <http://www.ciepac.org/biodiversity/Biodiversidad%20Estudio/CAP3.PDF#search='Mittermeier%20and%20Goettsch,%201992'>
- 5) <http://www.conabio.gob.mx/>
- 6) <http://www.cia.gov/cia/publications/factbook/geos/mx.html>

なお、上記の 1)は、IUCN レッドリストに関するホームページであり、2)から 6)は、メキシコの生物多様性に関するホームページである。

講師プロフィール

埼玉県環境科学国際センター 外国人特別研究員 アマウリ・アルサテ
(メキシコ州立自治大学農学部助教授)

<メキシコ州における経歴>

昭和60年 3月 メキシコ州立自治大学農学部卒業
同年 4月 メキシコ州立労働安全健康研究所教育研究企画室長
(～62年 3月)
62年 8月 メキシコ州立自治大学農学部助手
(～平成2年12月)
平成11年 1月 メキシコ州立自治大学農学部助教授
(現在に至る。)

<日本における経歴>

平成 元年 5月 埼玉県園芸試験場研修生
(～ 2年 3月)
5年 4月 京都大学大学院農学研究科修士課程
(～ 7年 3月)
同年 4月 京都大学大学院農学研究科博士課程
(～10年 3月) (農学博士：京都大学)
14年10月 埼玉県環境科学国際センター 外国人特別研究員
(現在に至る。)

[現在の研究分野]

分子生物学、育種学の専門を生かし、ミヤマスカシユリの遺伝子解析と人工育種に取り組んでいる。