さく葉標本から読み解く野生植物における 外来系統の侵入・分布拡大過程の解明

東 浩司 京都府

1. はじめに

明治期以降、日本の社会が海外に開かれ、外国との人や物の移動が盛んになるにつれ、本来日本には自生しない植物が国内に入ってくるようになった。園芸・観賞用に意図的に持ち込まれた植物もあれば、人や物に付着して、意図せず国内に侵入してしまった植物もある。人間・社会活動のグローバル化に伴い、外国産植物種が国内に侵入するのはある程度仕方が無いことだが、問題はそれらの外来植物が日本古来からある生態系に破壊的影響を与える場合があることである。空き地や河原では、帰化植物であるセイタカアワダチソウが大群落を形成し、他の在来雑草は細々と生育している。また、セイヨウタンポポは約100年前に日本に侵入したと考えられているが、いまでは日本中どこでも普通に見ることができる。セイヨウタンポポはこれまで日本の在来タンポポを駆逐していると考えられていたが、実際にはセイヨウタンポポと在来タンポポ(カンサイタンポポなど)は雑種を形成し、普段見られるセイヨウタンポポの6割程度が雑種であるという(タンポポ調査・西日本実行委員会 2014)。このように、外来植物は単に国内に侵入し、分布を拡大するだけではなく、国内に自生する近縁在来種と交雑を起こし、いわゆる遺伝子汚染を引き起こしていることが近年明らかになってきた。

タンポポの場合、外部形態に違いのあるセイョウタンポポと在来タンポポを対象としているので追跡しやすいが、もし外部形態に明瞭な違いが見られない場合、外来種(または外来系統)が侵入していることすら気が付かないかもしれない。つまり、知らないうちに、外来系統が侵入し、在来種(在来系統)との雑種形成による遺伝子汚染が広がり、日本固有の遺伝的特徴が失われてしまうかもしれない。例えば、ヒメフウロは日本国内では限られた石灰岩地でしか見られないが、最近、それ以外の場所でもヒメフウロが見られるようになった(Nishida 2013)。それらの分子系統解析をしてみると、従来の生育地に見られるヒメフウロと最近見られるようになったヒメフウロは異なる系統であり、おそらく、最近見られるようになった系統は近年国外から侵入したものでないかと考えられている(Nishida 2013)。幸い、在来のヒメフウロの生育地付近にはまだこの別系統のヒメフウロは分布を広げておらず、両者の交雑が起こっていることは考えにくいが、分布範囲が拡大すれば、いずれは従来のヒメフウロとの交雑、遺伝子汚染が起こることが予想される(Nishida 2013)。

つまり、日本を含む世界的に分布するような種においては、国内の系統とは遺伝的に異なる国外の系統が存在し、その外来系統が日本国内に侵入していることは十分考えられる。 しかし、同じ種であるために形態的に区別することが難しく、そうした外来系統の侵入の 実態についてはよく分かっていない。

カタバミは日本国内に広く分布し、市街地から里山・山地まで見られる(図1)。これまでの予備調査の結果、カタバミの葉緑体 DNA ハプロタイプには2 タイプがあり、一つはおもに山地に生育するカタバミに見られるが、もう片方はおもに市街地に生育するカタバ

ミでのみ見られることが分かった。このことから、筆者はおもに市街地で見られるハプロタイプはもしかしたら外来系統で、近年国外から侵入した系統ではないかと考えた。これを検証するために、本研究では、京都市を中心に、市街地とその周辺の里山・山地でカタバミを採集し、その葉緑体ハプロタイプを決定し、二つのタイプがどのように分布しているのか詳細に明らかにすることを試みた。また、大学博物館等に収められているさく葉標本から DNA を抽出し、同じくハプロタイプを決定することで、過去数十年におけるハプロタイプの分布を明らかにすることも試みた。

2. 材料と方法

2-1. 材料の採集

京都市を中心として、15ヵ所の調査地を設定した(表 1)。それぞれの場所で約1km四 方の区画を設定し、その中を歩きながらカタバミ Oxalis corniculata を採集した。それぞれ の区画で 20~30 個体を採集した。山の中では道路沿いにカタバミが生育するが、林内また は登山道に入るとほぼ見られなくなるので、その場合、1km を超えて採集した。それでも、 山地の調査地では10個体を集めるのが精一杯であった(数メートルの範囲で複数個体見ら れるが、その場合は同一パッチとして、その場所からは1個体しか採集していない)。カタ バミの近縁種として帰化植物であるオッタチカタバミが知られている。市街地ではむしろ カタバミより繁茂している印象であった。両者は基本的に形態形質で区別することができ る(図1)。各区画において、基本的には葉のみを採集したが、各区画5~10個体について はさく葉標本も作製した。これは後に二つのハプロタイプ間で形態的差異がないかどうか を詳しく検討するためであるが、本研究では行っていない。さらに、カタバミの二つのタ イプの生育場所に違いが見られるかどうかを明らかにするために、京都市左京区岩倉地区 おいて、上記15ヶ所の採集とは別に、市街地と公園、畑や水田などの場所で、カタバミの 採集を行い、一個体ずつ地図上にプロットすることで、より詳細なハプロタイプの分布図 を作成した。さく葉標本からの DNA サンプルについては京都大学総合博物館標本庫で、 近畿(京都、大阪、兵庫、滋賀、奈良、和歌山)地方で採集されたカタバミのさく葉標本 を閲覧し、採集地の記録および DNA 解析用の葉断片を採取した。

2-2. DNA 抽出

野外で採集したカタバミの葉はシリカゲル入りの小袋に密閉し、乾燥させた。乾燥させた葉断片を 2.0mL のチューブに入れ、ジルコニアボール(直径 4mm)2 個と共にキアゲン TissueLyser で破砕した。2xCTAB 液を 700μL 入れ、よく撹拌し、55°C30 分間放置した。次にクロロホルムーイソアミルアルコール(25:1)を 700μL 入れ、よく混和した。13000rpm で 30 分間遠心分離した。上部の CTAB 層を新しい 1.5mL チューブに移した。400μL のイソプロパノールを加え、ゆっくり撹拌した後、-20°Cで一晩放置した。次に 13000rpm で遠心し、DNA を沈殿させた。液を捨て、70%エタノール 1000μL を加え、洗浄し、最後に液を捨て、55°Cのヒートブロックにおいて、エタノールを完全に除去した。乾燥させた DNAに対して TE 液 50μL を加え、一晩放置して溶解させ、DNA サンプルとした。

2-3. PCR・塩基配列決定

予備調査のおいて、山地と市街地で採集したカタバミ数個体について、葉緑体 DNA の

psbA-trnH 遺伝子間領域、trnT-trnL 遺伝子間領域、trnL イントロン、trnL-trnF 遺伝子間領域の4 領域について塩基配列を決定し、比較したところ、trnT-trnL 領域に両者を区別する塩基置換が見られた(表2)。そこで本研究ではこの領域について解析を行った。また、同じ領域にオッタチカタバミにのみ見られる塩基置換もあり、もし間違ってオッタチカタバミを採集してしまった場合でも、塩基配列により区別することができる。

カタバミでは trnT-trnL 遺伝子間領域は約 800 塩基あったが、表 2 で示された塩基置換を知るには約 400 塩基を決定すればよいので、今後はこの約 400 塩基のみを増幅するようなプライマーを新たに設計し、PCR を行った。さく葉標本の場合は、DNA は断片化されており、古い標本ほど PCR の成功度が低くなる。そこで、表 2 の 157 番目、181 番目、254 番目の塩基置換のみを対象とし、その部分約 250 塩基を増幅させるようなプライマーを設計し、PCR を行なった。PCR は TaKaRa Ex taq 酵素を用い、10μL スケールで行なった。PCR 反応液は滅菌水 6.5μL、dNTP with MgCl₂を 1μL、10x バッファーを 1μL、フォワードプライマー(10μM) 0.5μL、リバースプライマー(10μM) 0.5μL、Ex taq 0.05μL、DNA テンプレート 0.5μL である。PCR プログラムは次の通りである;94℃(5min)→[94℃(30sec)→50℃(30sec)→72℃(30sec)]×35 cycles→72℃(7min)→10℃、PCR は GeneAmp PCR System 2700 を用いた。

PCR 産物はエキソヌクレアーゼ I (Exo I, TaKaRa 2650) アルカリフォスファターゼ (CIAP, TOYOBO CAP-101) により、精製した。具体的には滅菌水 1.84μ L、Exo I を 0.06μ L、CIAP を 0.1μ L (合計 2.0μ L) を混ぜあわせ、各 PCR 反応液のチューブに加え、撹拌した後、 37° C (30分) で酵素反応させた。その後、 80° C15分間の処理をすることで酵素を失活させた。 精製した PCR 産物のシーケンス反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた。シーケンサーは ABI3130 を用いた。

3. 結果と考察

3-1. カタバミ野外集団について

京都市内 15 地点からカタバミを合計 330 個体採集した (表 3)。各個体の葉緑体 DNAtmT-tmL 領域約 400 塩基の決定を行い、表 2 にしたがって、それぞれの個体が山地タイプか市街地タイプかを決定した。330 個体のうち、各地点における山地タイプと市街地タイプの頻度を図 2 にまとめた。この図から、山地タイプは山地のみならず、市街地にもある程度の頻度で分布していることが示された。山地に多いタイプというよりは分布域全体にまんべんなく分布している状態である。一方、市街地タイプは明らかに市街地に多く分布しており、山地ではいずれも場所も 1 割以下である。山地の採集地点(No. 11-15)は山間部の車道または林道沿いで、集落ではないところで採集を行った。道路を外れるとカタバミはほとんど見られなくなる。そのため、他の地点に比べて個体数が少ない。山間の集落内でも市街地タイプが見られないのかについては、今後検討したい。

市街地タイプは明らかに市街地にのみ偏って分布していることが明らかになった。山地でも市街地タイプが低頻度で見られたが、それはたまたま人や車の移動により市街地から移動してきたものと思われる。山地に侵入した市街地タイプが、分布を拡大するのか、それとも市街地タイプは何らかの理由で山地では生育しづらいのか(つまりやがて消滅するのか)、市街地タイプと山地タイプで生育条件に何らかの違いがあるのかどうか今後検討したい。それにより、市街地タイプの分布が今後山地に広がっていくのかどうかが明らかに

なるだろう。

カタバミの二つのタイプの分布頻度は山地と市街地で明らかに異なっていた。これは、山地タイプと市街地タイプで最適な生育場所が異なっているかもしれない。例えば、市街地タイプはコンクリートやアスファルトのようなかなり高温になる場所でも生育できるが、山地タイプはそのような場所では生育しづらいといった違いがあるかもしれない。そこで、上記 15 地点の解析とは別に、京都市の市街地の端にあたる京都市左京区岩倉地区において、住宅街、公園、水田地帯といったさまざまな生育環境に生育するカタバミを採集し、DNA解析を行なった。岩倉地区で合計 217 個体を採集し、葉緑体ハプロタイプを決定し、市街地タイプか山地タイプかを決定した。その結果を図 3 に示した。

図3から岩倉地区において、カタバミの二つのタイプはほとんどランダムに分布していることが明らかになった。特に、図中の上のほうの「岩倉村松町」という文字から北側は水田地帯であり、田のあぜ道や用水路の斜面から採集したものである。山地タイプが多いのではないかという予想に反して、これら水田地帯のカタバミは二つのタイプが同程度に見られ、特に山地タイプが多いという結果にはならなかった。また、図中の左下に宝ヶ池公園があるが、公園内や池の周りでもどちらかといえば市街地タイプが多かった。このことからカタバミの二つのタイプの生育環境に特に違いは見られないといえるだろう。

3-2. さく葉標本のカタバミについて

大学博物館標本庫に保管されているカタバミの DNA 解析を行った。サンプル数は合計 122 個体だが、古い標本ほど DNA は断片化され、PCR がうまくいかなくなる。詳細は省くが、野外で採集した生材料よりも時間とコストがかかり、実際にはもっと多くのサンプルを入手したが、時間の都合で解析が終了しなかった。122 個体のうち、PCR が成功し、塩基配列(さく葉標本の場合は約 250 塩基)を決定できたものは 90 個体であった。さく葉標本の葉緑体 DNA ハプロタイプを表 4 にまとめた。カタバミ標本 90 サンプルのうち、山地タイプは 71 サンプル、市街地タイプは 19 サンプルであった。山地タイプが全体の約 8 割であった。市街地タイプはすでに 1967 年の標本(滋賀県大津市)に見られた。表 5 に府県ごとの葉緑体ハプロタイプの数を示した。サンプル数は少ないが、兵庫県、奈良県、和歌山県、大阪府では市街地タイプは見られなかった。これについてはサンプル数を増やす必要がある。

表 6 に標本の採集年代ごとの葉緑体ハプロタイプの頻度を示した。1960 年から 1979 年までに採集されたカタバミ標本のうちハプロタイプを決定できたのは 7 標本だけだったが、そのうち 2 標本は市街地タイプであった。その採集地は滋賀県大津市坂本と京都府久美浜町神崎であった。前者は琵琶湖岸、後者は日本海に面した集落で、水際かつ標高が低い場所である。本研究を行うにあたり、市街地タイプはもしかしたら国外から侵入した系統かもしれないという仮説を立てたが、その場合、大きな港がある大阪や兵庫ではなく、大津市や久美浜町のような特に大きな港があるわけでもない場所で見つかるのは不自然であり、本研究のこれまでの結果は、むしろ、市街地タイプは標高の低い地域にもともと分布していることを示唆している。もちろん、本研究で解析したサンプル数は不十分で、今後の追加調査が必要である。いずれにせよ、市街地タイプは外来系統で侵入後に分布を拡大しているかもしれないという仮説は支持されなさそうである。その後の、1980 年から 2000 年および 2000 年以降のデータを見ても、市街地タイプの割合はどちらも約 20%で、とくに

増加傾向があるわけではない。このことも、もともとカタバミには市街地タイプと山地タイプが存在しており、市街地タイプが分布を拡大しているというわけではなさそうである。

4. まとめ

カタバミの葉緑体 DNA ハプロタイプには 2 型があり、山地タイプは市街地から山地まで広く分布している。一方、市街地タイプはおもに市街地にのみ分布し、山地にはまれに見られる程度である。つまり、市街地では山地タイプと市街地タイプの両方が見られる。市街地において、両ハプロタイプはランダムに見られ、アスファルトや土といった生育環境の違いは特に見られなかった。カタバミさく葉標本の DNA ハプロタイプを調べたところ、1967 年には滋賀県大津市で、1979 年は京都府久美浜町で市街地タイプが採集されており、このことから、市街地タイプは外来系統というよりはもともとカタバミの葉緑体 DNAは二つのタイプがあり、低地と山地にすみ分けているようである。今後は更なる追加データを取ると共に、市街地タイプがなぜ山地に分布を広げないのか、海外ではこれらタイプがどのように分布しているのかなどを調査する予定である。

参考文献

タンポポ調査・西日本実行委員会. 2014. http://gonhana.sakura.ne.jp/tanpopo2015/index.html.

Nishida, S., H. Azuma, A. Naiki, M. Ogawa. 2012. Molecular phylogenetic analyses of *Geranium robertianum* populations recently found in Japan. Acta Phytot. Geobot. 62: 79-87.

表 1. 京都市内におけるカタバミ調査地

番号	場所	
No. 1	京都市左京区京都大学周辺	市街地
No. 2	京都市南区京都駅南側	市街地
No. 3	京都市山科区山科駅南側	市街地
No. 4	京都市伏見区六地蔵駅北東側	市街地
No. 5	京都市伏見区丹波橋駅西側	市街地
No. 6	京都市西京区桂駅南側	市街地
No. 7	京都市右京区太秦駅北側	市街地
No. 8	京都市西京区京都大学桂キャンパス北西側	市街地
No. 9	京都市北区上賀茂	市街地
No. 10	京都市左京区静原	里山
No. 11	京都市左京区大原小出石~百井	山地
No. 12	京都市左京区花背	山地
No. 13	京都市右京区京北小野町	山地
No. 14	京都市右京区京北弓槻町	山地
No. 15	京都市右京区嵯峨越	山地

表 2. 葉緑体 trnT-trnL 遺伝子間領域で見られたカタバミ 2 タイプおよびオッタチカタバミ の塩基配列の違い.

	56-61	157	181	254	321
カタバミ山地タイプ-1*	CATTTT	С	T	T	T
カタバミ山地タイプ-2*		C	T	T	T
カタバミ市街地タイプ		A	T	T	T
オッタチカタバミ		C	A	T	G

^{*} 本研究では区別していない。

表 3. 京都市内採集地ごとの葉緑体ハプロタイプ

番号	場所	個体数	山地/市街地タイプ	市街地タイプ の割合
No. 1	京都市左京区京都大学周辺	30	15/15	50%
No. 2	京都市南区京都駅南側	25	8/17	76%
No. 3	京都市山科区山科駅南側	25	16/9	36%
No. 4	京都市伏見区六地蔵駅北東側	25	12/13	52%
No. 5	京都市伏見区丹波橋駅西側	25	8/17	68%
No. 6	京都市西京区桂駅南側	25	9/16	64%
No. 7	京都市右京区太秦駅北側	25	7/18	72%
No. 8	京都市西京区御陵	25	13/12	48%
No. 9	京都市北区上賀茂	25	15/10	40%
No. 10	京都市左京区静原	30	16/14	47%
No. 11	京都市左京区大原小出石~百井	25	24/1	4%
No. 12	京都市左京区花背	15	14/1	7%
No. 13	京都市右京区京北小野町	10	10/0	0%
No. 14	京都市右京区京北弓槻町	10	10/0	0%
No. 15	京都市右京区嵯峨越	10	9/1	10%
	슴計	330	184/146	44%

表 4. カタバミさく葉標本の葉緑体 DNA ハプロタイプ

採集年	採集地	葉緑体ハプロタイプ	サンプル番号
1960	和歌山県串本町	山地タイプ	H196
1961	大阪府高槻市	山地タイプ	H166
1963	京都府舞鶴市	山地タイプ	H195
1965	京都府京都市	山地タイプ	H204
1967	滋賀県大津市	市街地タイプ	H170
1968	兵庫県三木市	山地タイプ	H175
1979	京都府久美浜町	市街地タイプ	H173
1983	京都府京都市	山地タイプ	H158
1983	京都府京都市	山地タイプ	H172
1983	京都府京都市	市街地タイプ	H190
1983	京都府京都市	山地タイプ	H194
1984	兵庫県南淡町	山地タイプ	H183
1987	京都府京都市	山地タイプ	H160
1987	京都府舞鶴市	山地タイプ	H176
1987	京都府亀岡市	山地タイプ	H181
1987	京都府久美浜町	山地タイプ	H207
1988	京都府大山崎町	山地タイプ	H164
1988	兵庫県南淡町	山地タイプ	H167
1988	京都府舞鶴市	山地タイプ	H205
1990	京都府亀岡市	市街地タイプ	H028
1990	京都府舞鶴市	山地タイプ	H061
1991	京都府亀岡市	山地タイプ	H023
1991	京都府亀岡市	山地タイプ	H036
1991	京都府亀岡市	市街地タイプ	H111
1991	京都府亀岡市	山地タイプ	H129
1991	京都府亀岡市	市街地タイプ	H130
1991	京都府亀岡市	市街地タイプ	H140
1991	京都府三和町	市街地タイプ	H179
1992	京都府美山町	山地タイプ	H044
1992	兵庫県神戸市	山地タイプ	H115
1993	京都府綾部市	山地タイプ	H046
1993	奈良県川上村	山地タイプ	H052
1993	京都府田辺町	市街地タイプ	H053
1993	京都府舞鶴市	山地タイプ	H208
1993	奈良県川上村	山地タイプ	H213

表 4. 続き

採集年	採集地	葉緑体ハプロタイプ	サンプル番号
1994	兵庫県家島町	山地タイプ	H064
1994	兵庫県家島町	山地タイプ	H065
1994	京都府久美浜町	山地タイプ	H169
1996	京都府亀岡市	市街地タイプ	H047
1996	京都府舞鶴市	山地タイプ	H206
1996	兵庫県洲本市	山地タイプ	H214
1997	京都府加悦町	山地タイプ	H055
1997	兵庫県家島町	山地タイプ	H157
1998	京都府網野町	山地タイプ	H018
1998	京都府京都市	山地タイプ	H039
1999	京都府舞鶴市	山地タイプ	H118
1999	兵庫県洲本市	山地タイプ	H156
1999	京都府城陽市市	山地タイプ	H200
2000	京都府長岡京	市街地タイプ	H049
2000	京都府長岡京	市街地タイプ	H050
2000	京都府舞鶴市	山地タイプ	H062
2000	京都府舞鶴市	山地タイプ	H063
2000	京都府城陽市	市街地タイプ	H119
2000	兵庫県加古川市	山地タイプ	H212
2000	京都府京田辺市	山地タイプ	H221
2001	京都府亀岡市	山地タイプ	H051
2001	京都府網野町	山地タイプ	H057
2001	奈良県天理市	山地タイプ	H066
2001	京都府長岡京	山地タイプ	H067
2001	京都府亀岡市	山地タイプ	H209
2001	京都府亀岡市	山地タイプ	H210
2001	京都府亀岡市	山地タイプ	H211
2002	京都府夜久野町	市街地タイプ	H068
2003	兵庫県神戸市	山地タイプ	H093
2003	和歌山県本宮町	山地タイプ	H096
2003	京都府亀岡市	市街地タイプ	H101
2004	京都府亀岡市	山地タイプ	H092
2004	京都府亀岡市	山地タイプ	H097
2004	京都府亀岡市	山地タイプ	H217

表 4. 続き

採集年	採集地	葉緑体ハプロタイプ	サンプル番号
2005	奈良県奈良市	山地タイプ	H012
2005	京都府亀岡市	山地タイプ	H088
2005	京都府亀岡市	山地タイプ	H089
2005	京都府亀岡市	山地タイプ	H091
2005	京都府亀岡市	市街地タイプ	H201
2006	京都府八幡市	山地タイプ	H198
2007	京都府亀岡市	山地タイプ	H014
2007	京都府亀岡市	市街地タイプ	H016
2007	京都府亀岡市	山地タイプ	H102
2007	京都府亀岡市	山地タイプ	H142
2007	京都府南山城村	山地タイプ	H219
2008	京都府亀岡市	山地タイプ	H009
2008	京都府亀岡市	山地タイプ	H011
2008	京都府亀岡市	山地タイプ	H013
2008	京都府亀岡市	市街地タイプ	H015
2009	京都府亀岡市	山地タイプ	H004
2009	京都府亀岡市	山地タイプ	H003
2009	京都府亀岡市	山地タイプ	H002
2009	京都府亀岡市	山地タイプ	H001
2012	京都府亀岡市	山地タイプ	H008
2012	京都府亀岡市	市街地タイプ	H007

表 5. 各府県別のカタバミさく葉標本の葉緑体 DNA ハプロタイプ

	山地タイプ	市街地タイプ
京都府	53	18
兵庫県	11	0
奈良県	4	0
和歌山県	2	0
大阪府	1	0
滋賀県	0	1

表 6. 標本採集年ごとのカタバミさく葉標本の葉緑体ハプロタイプ

	山地タイプ	市街地タイプ	市街地タイプの割合
1960年~1979年	5	2	29%
1980年~1999年	33	8	20%
2000年~2014年	33	9	21%



図 1. カタバミとオッタチカタバミ. カタバミの花 (左上)、カタバミの群落 (右上)、畑の畔に生えるカタバミ (左中)、コンクリートの隙間から生えるカタバミ (右中). オッタチカタバミ (左下、右下)

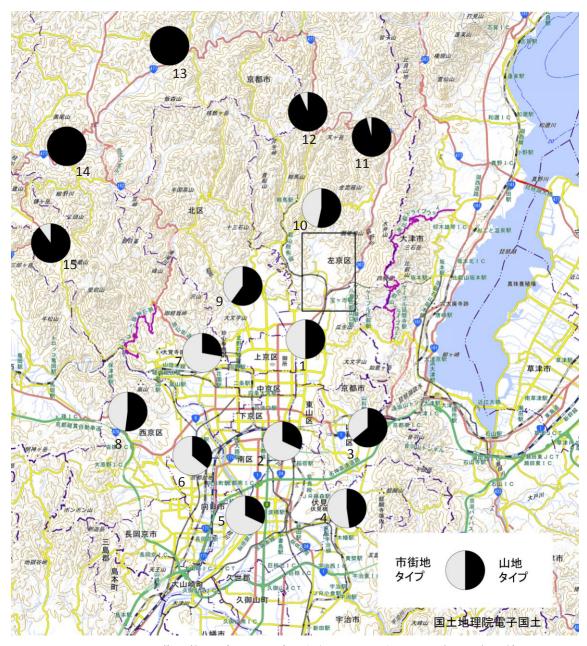


図 2. カタバミにおける葉緑体ハプロタイプの分布. 番号は表 1 に対応。四角の枠は図 3.

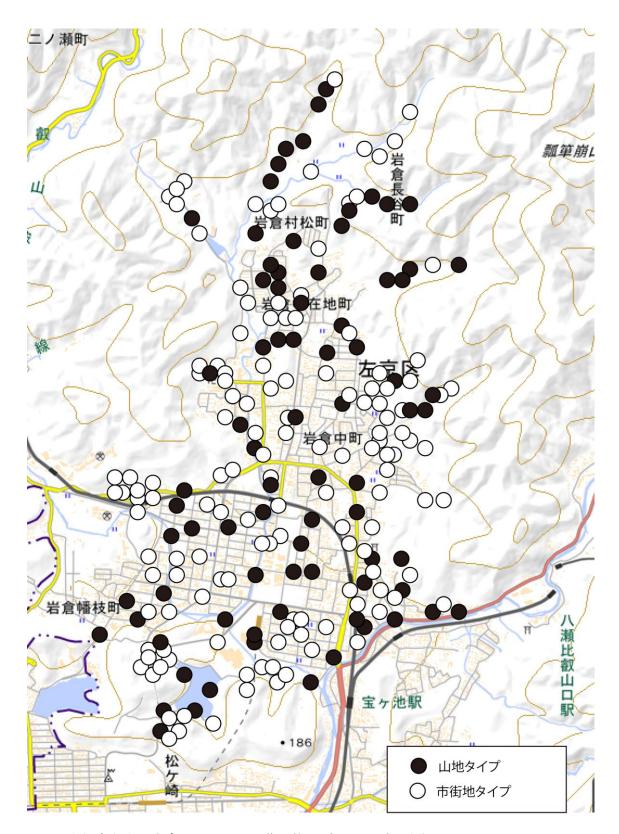


図3. 京都市左京区岩倉地区における葉緑体ハプロタイプの分布.

補遺

山地タイプ-1の配列

山地タイプ-2の配列

市街地タイプの配列