

カンカケイニラ *Allium togashii* の保護のための研究

## —カンカケイニラ再導入個体の遺伝子解析—

Research on the Conservation of Kankakeinira, *Allium togashii*  
— Genetic Analysis prior to the reintroduction of Kankakeinira—

吉田 美紀                      池田 滋\*  
Miki YOSHIDA                Shigeru IKEDA

## 要 旨

カンカケイニラは、香川県小豆島の寒霞溪周辺の集塊岩地帯にのみ自生する多年生草本の固有種である。現在は自生個体が激減し、環境省レッドデータブックでは絶滅危惧 IA 類、香川県レッドデータブックでは絶滅危惧 I 類に指定されている。香川県は、「カンカケイニラ保護事業計画」を策定し、環境保健研究センターでは、自生個体を増殖し自生地へ再導入するため、2006 年よりカンカケイニラの栽培を行ってきた。しかし、個人から譲渡された個体や種子を栽培・増殖したため、自生地の移植に先立ち、自生個体と栽培個体の遺伝的同一性を明らかにした。

キーワード：カンカケイニラ 絶滅危惧種 遺伝子解析

## I はじめに

カンカケイニラ *Allium togashii*<sup>1)</sup> (図1) は、香川県小豆島の寒霞溪周辺の集塊岩地帯にのみ自生する多年生草本の固有種である<sup>2)</sup>。かつて花時には、一帯の急崖地が白く染まると言われるほどであったが、現在では数箇所ですらに生育するのみである<sup>3)</sup>。そのため、環境省レッドデータブックでは絶滅危惧 IA 類<sup>4)</sup>、香川県レッドデータブックでは絶滅危惧 I 類<sup>3)</sup>に指定されている。

2005 年 7 月、「香川県希少野生生物の保護に関する条例」<sup>5)</sup>が制定され、指定希少野生生物に指定(2006 年 5 月)された。カンカケイニラの生育する嶮岨山(けんそざん)一帯の地形や土壌環境と生育動植物の特殊性から、本県は小豆島の集塊岩地帯における多様な生物の保全を前提とした「カンカケイニラ保護事業計画」<sup>2)</sup>を策定(2008 年)し、保護に努めている。

当研究センターでは、カンカケイニラの自生個体が少数であることから、自生個体を増殖し、自生地へ再導入するため、2006 年よりカンカケイニラを栽培してきた。しかし、自生個体ではなく、小豆島で長期間栽培していた個人から譲渡された個体や種子を栽培・増殖したため、



図1 カンカケイニラの花

自生地への移植に先立ち、自生個体と栽培個体の遺伝的同一性を明らかにしておく必要がある。

そこで、カンカケイニラの自生個体と栽培個体の種レベルの遺伝的同一性を確認するために、Internal transcribed spacer 1 (ITS1)-5.8SrRNA 遺伝子-internal transcribed spacer 2 (ITS2) 領域<sup>6)</sup> の塩基配列を比較するとともに、RAPD 分析によりゲノム DNA の類似性を比較したので、その結果を報告する。

\* 香川大学総合生命科学研究センター

## II 方法

### 1 カンカケイニラ検体

ITS1-5. 8SrRNA 遺伝子-ITS2 の配列解析では、自生地で2009年11月2日に採取した8個体の葉(検体1~8)と当研究センター内の3個体の栽培個体から2009年11月27日に採取した葉(検体①~③)を検体とした。

RAPD 分析では、ITS1-5. 8SrRNA 遺伝子-ITS2 の配列解析のための検体(検体1~4, 7, 8, ①~③)に加え、5個体の自生個体の葉(検体9~13), 1個体の栽培個体の葉(④), それに同一個体から分球した5株から2010年4月16日に採取した葉(検体A~E)を検体とした。

なお、栽培個体は小豆島でカンカケイニラを栽培する個人から、①は2005年に株の状態、また②と④は2007年に、③は2008年に、いずれも種子で譲り受けたものである。

検体は、核酸の抽出まで冷凍保存した。核酸の抽出から遺伝子解析までの実験は、香川大学遺伝子実験施設で行った。

### 2 核酸の抽出

凍結保存したカンカケイニラの葉より、改変 SDS 法で核酸を抽出した。改変 SDS 法を図2に示す。抽出した核酸溶液は吸光光度計で濃度を測定、併せて純度を確認した。2本鎖 DNA 濃度は、核酸溶液に GelGreen (ナカライテスク) を混合した後、蛍光光度計で測定した。

### 3 ITS1-5. 8SrRNA 遺伝子-ITS2 の遺伝子配列

PCR プライマー ITS1-A (GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G) 及び ITS-B (CTT TTC CTC CGC TTA TTG ATA TG)<sup>7)</sup> を用い、ITS1-5. 8SrRNA-ITS2 領域の PCR を行った。0.2mPCR チューブに、10ng の鋳型 DNA, 0.2units の Taq DNA Polymerase (NEB) を含む PCR 反応液(各 250 μM の dNTP, 各 0.4 μM の PCR プライマー, 20mM Tris-HCl (pH8.8), 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100) を 6 μl 加え、PCR 反応を行った。PCR 温度条件を表1に示す。

PCR 産物は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (LKB-MULTIPHOR II) 後、銀染色を行い、確認した。

PCR 産物は、pGEM-T Easy Vector (プロメガ) に TA クローニングした後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いて塩基配列を決定した。

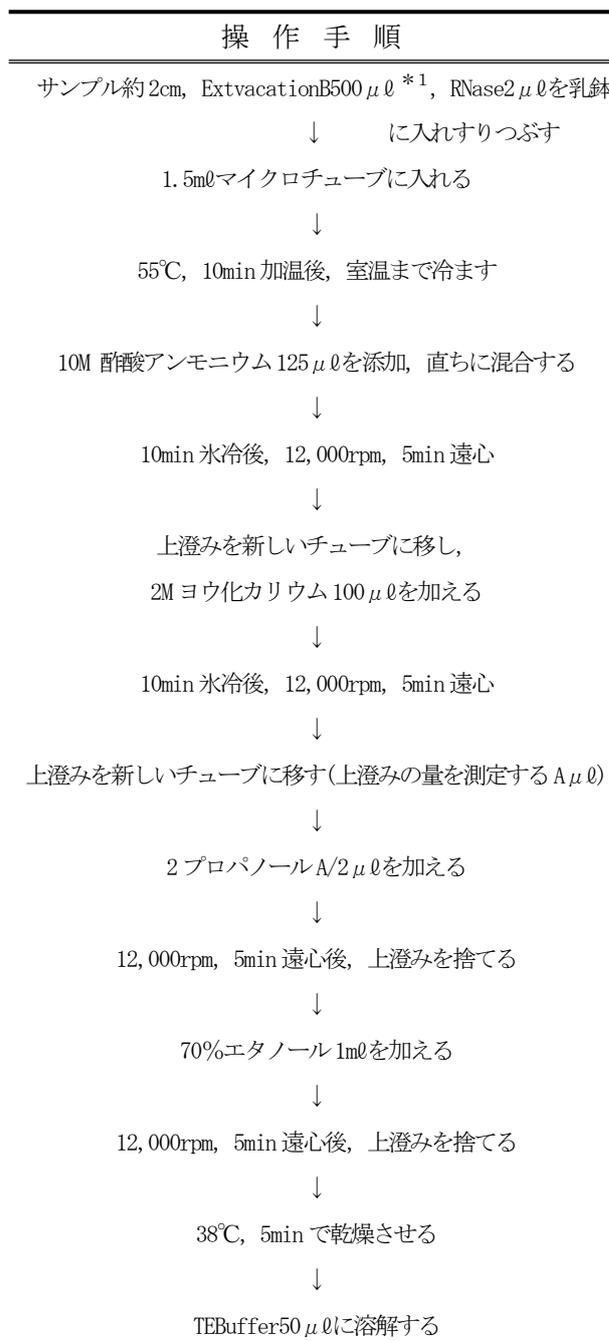


図2 改変 SDS 法による核酸の抽出

\* 1 500mM Tris-HCl (pH8.0), 8% SDS, 50mM EDTA

表1 ITS1-5. 8SrRNA-ITS2 の塩基配列の PCR

PCR 装置	Grandient Palm-Cycler CG1-96 型	
温度条件	94°C-3 分	} 35 サイクル
	94°C-10 秒	
	55°C-45 秒	
	72°C-60 秒	
	72°C-7 分	

#### 4 RAPD 分析

12 種類の RAPD プライマー (表 2) を用い、RAPD を行った。0.2mℓPCR チューブに、10ng の鋳型 DNA、0.2units の Taq DNA Polymerase (NEB) を含む PCR 反応液 (各 250 μM の dNTP、各 0.4 μM の PCR プライマー、20mM Tris-HCl (pH8.8)、10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、10mM KCl、2mM MgSO<sub>4</sub>、0.1% Triton X-100) を 6 μℓ 加え PCR 反応を行った。PCR 温度条件を表 3 に示す。

RAPD 産物は、DNA シーケンサー (島津製作所 DSQ-1000) を用い、4.5% ポリアクリルアミドゲル (GelGreen 含有) で電気泳動し、PCR 産物を蛍光検出した。

### III 結果及び考察

#### 1 ITS1-5.8SrRNA-ITS2 の塩基配列

カンカケイニラの自生個体と栽培個体の ITS1-5.8SrRNA-ITS2 の塩基配列を図 3 に示す。240 塩基から 401 塩基までが 5.8SrRNA 遺伝子で、その前後がそれぞれ ITS1 と ITS2 である。自生個体と栽培個体の ITS1-5.8SrRNA-ITS2 の塩基配列が一致していたことか

表 2 RAPD 用プライマーの塩基配列

塩基配列		塩基配列	
A03	CGACGACGACGA	B04	CAGGTGGGACCA
A04	ATCAGCGCACCA	B05	TCGGTGGGAATA
A05	AGCAGCGCCTCA	B22	GGTGACTGGTGG
A06	GCCAGCTGTACG	B23	GGTGCCGGAGCA
A07	TGCCTCGCACCA	B41	GGCGAGGGAGGA
A09	CCGCAGTTAGAT	B42	GAGAGACGATTA
A10	ACTGGCCGAGGG		

表 3 RAPD 分析の PCR 条件

PCR 装置	Grandient Palm-Cycler CG1-96 型	
温度条件	94°C-5 分	} 40 サイクル
	94°C-15 秒	
	36°C-1 分	
	72°C-30 秒	
	72°C-7 分	

ら、同一種であると考えられる。

また、EMBL-Bank<sup>®</sup> に登録されている *A. togashii* の ITS1-5.8SrRNA-ITS2 の塩基配列 (AJ411843) と比較した。

EMBL-Bank に登録された ITS1-5.8SrRNA-ITS2 の塩基配列は、ITS2 内の 531 番目がチミンであったが、本実験の自生個体と栽培個体はすべてグアニンであった。したがって、EMBL-Bank に登録配列が調査されたカンカケイニラは、本実験のカンカケイニラとは遺伝的に異なると考えられる。前者の属した栄養繁殖集団が絶滅した可能性が考えられる。

#### 2 RAPD 分析

自生個体と栽培個体の RAPD 産物のバンドパターンを図 4 に示す。RAPD 分析では個々の増幅産物が異なる RAPD 座に由来するとみなす。12 種類の RAPD プライマーにより得られた RAPD パターンはすべて異なっていたが、個体間では類似していた。しかし、同一栽培個体から分球した 5 個体の RAPD パターン (図 5) は、8 種類の RAPD プライマーのいずれについても、きわめてよく類似していた。したがって栄養繁殖体の中で遺伝的同一性は維持されたと考えられ、このことは当然自生個体でも成立つと考えられる。栽培個体の RAPD パターンは、すべて異なるので、4 個体の栽培個体は遺伝的に異なると考えられる。同様に、すべての自生個体の RAPD パターンも異なるので、11 個体の自生個体は遺伝的に異なると考えられる。さらに、栽培個体と自生個体の RAPD パターンも一致しなかったため、自生個体の属する栄養繁殖集団は、栽培個体が由来した親個体の属する栄養繁殖集団とは異なると考えられる。

カンカケイニラは、分球でも種子でも増殖する。分球個体は親個体と遺伝的に同一とみなせる。本実験でも同一栽培個体から分球した 5 個体の RAPD パターンがきわめて類似していた。種子については、ネギ科植物は他殖が一般的なので、自然条件で虫媒による他家受精によって種子が形成されると思われるので、遺伝子プールを共有する集団内の変異は大きい。本実験でもすべての自生個体の RAPD パターンが異なっていた。絶滅に瀕する前、現在よりも大きな遺伝的多様性が残っていた頃を想像すれば、分球で増殖したコロニー内の個体は遺伝的に同一であるが、各コロニーは遺伝的に異なり、多数のコロニーが集塊岩地帯一帯に分布していたであろう。それらのコロニーの中から個体を採取した個人が山麓の畑で増殖

し、その増殖個体や種子として分譲されたものが当研究センターで栽培増殖された。

そのため、4個体の栽培個体はすべて遺伝的に異なっていたと考えられる。

#### IV まとめ

ITS1-5. 8SrRNA-ITS2 の塩基配列の結果から、当研究センターで増殖されたカンカケイニラ個体は、自生のカンカケイニラ個体と同一種であることがわかった。

2箇所の自生地で、増殖個体の苗 50 個体の移植と種子 100 粒の播種を行った。今後も引き続き、種子や移植個体の定着繁殖を定期的に調査していく必要がある。

1	11	21	31	41	50
TAGAGTTCCT	TTTCGAACAA	TCGTGAAATT	GTACTTAAAC	CCGTCAAGAA	
51					100
CTAGGTATTT	GTGCGATTAG	CACTTGCGTT	GTTTAGATGG	GTCCCGTTTG	
61					150
CTGCCTTCAT	CTTGCTTCAA	ATGAAGTAAG	AAGGAGAGTA	GAAATAAGAA	
151					200
ACCGGCACGG	TTTGTGCCAA	GGACAGTTGT	TGTTGGAGCG	CAATGCCATC	
201					250
ATTTTGGTGT	GCTTTGTGTT	ATGTTACGGT	GAGCGTGTA	ATGACTCTTG	
251					300
GCAATGGATA	TCTTGGCTCT	CGTGTCGATG	AAGAACGTAG	CGAAATGCCA	
301					350
TACTTGGTGT	GAATTGCAGA	ATCCCGTGAA	CCATCGAGTC	TTTGAATGCA	
351					400
AGTTGCGCTC	GAGGCTATTA	GGTCGAGAGC	ACGTCTGTTT	GGGCGTCATG	
401					450
CCTTGCGTCA	TTCCAATCAC	CCATCCATGA	CGAAACGTCT	GTTTGGGACA	
451					500
TGGATGTGGA	AATTGACCCT	CCGTGATTTA	ACAGTGCGGT	TGGTTCAAGT	
501			531		550
GAATGTATTT	GCTAGGTCTA	CGCGCGGCTA	GTGGTGTATC	GAGTTACCTT	
551					600
CCAATGTCTC	TAACCGCGTT	TAGGATTCCT	AAGCATGATG	TAACATTAAC	
601					641
TGAAACCAAT	TCGATGTTTG	CCTTTGTTGC	AAGCTCGGAC	C	

図3 自生個体および栽培個体のカンカケイニラの ITS1-5. 8SrRNA-ITS2 塩基配列

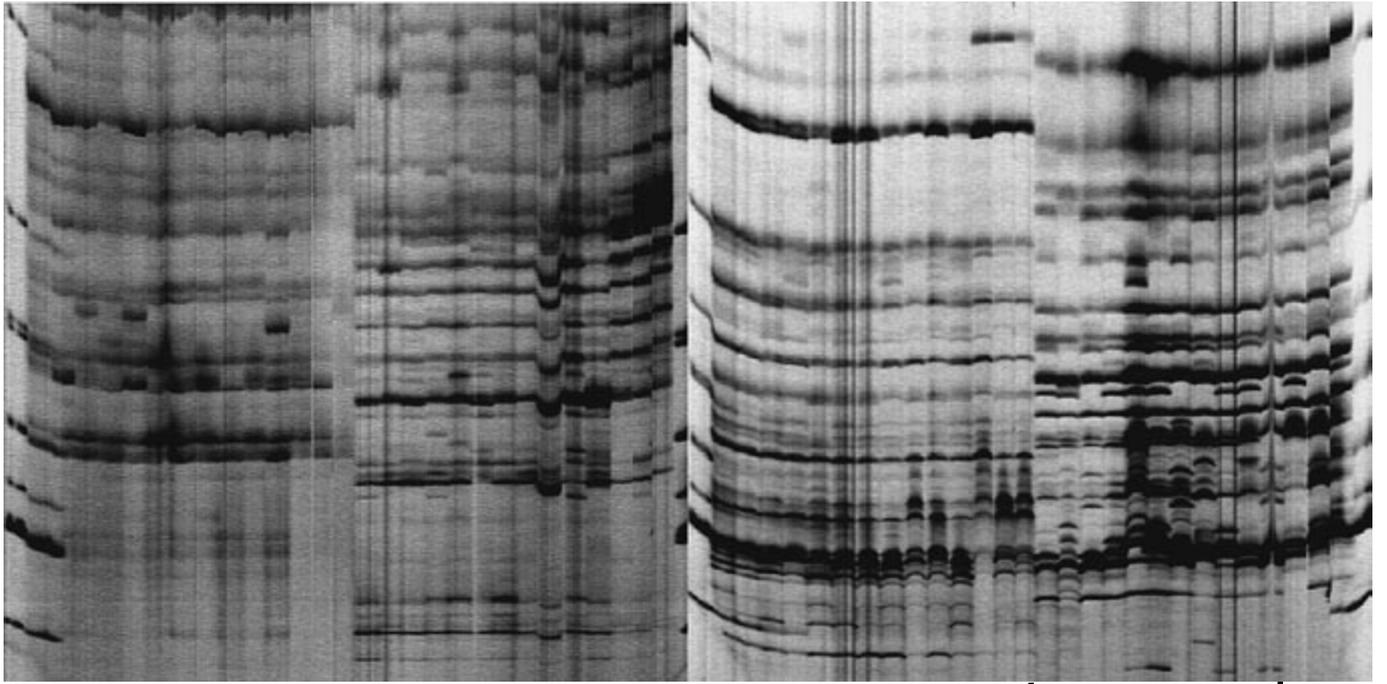
- 1) A はアデニン, C はシトシン, G はグアニン, T はチミンを示す
- 2) EMBL-Bank に登録されている *A. togashii* は、531 番目が T(チミン)
- 3) □部分は、5. 8SrRNA 遺伝子を示す

A03 プライマー

A04 プライマー

A05 プライマー

A06 プライマー



自生個体

栽培個体

自生個体

栽培個体

自生個体

栽培個体

自生個体

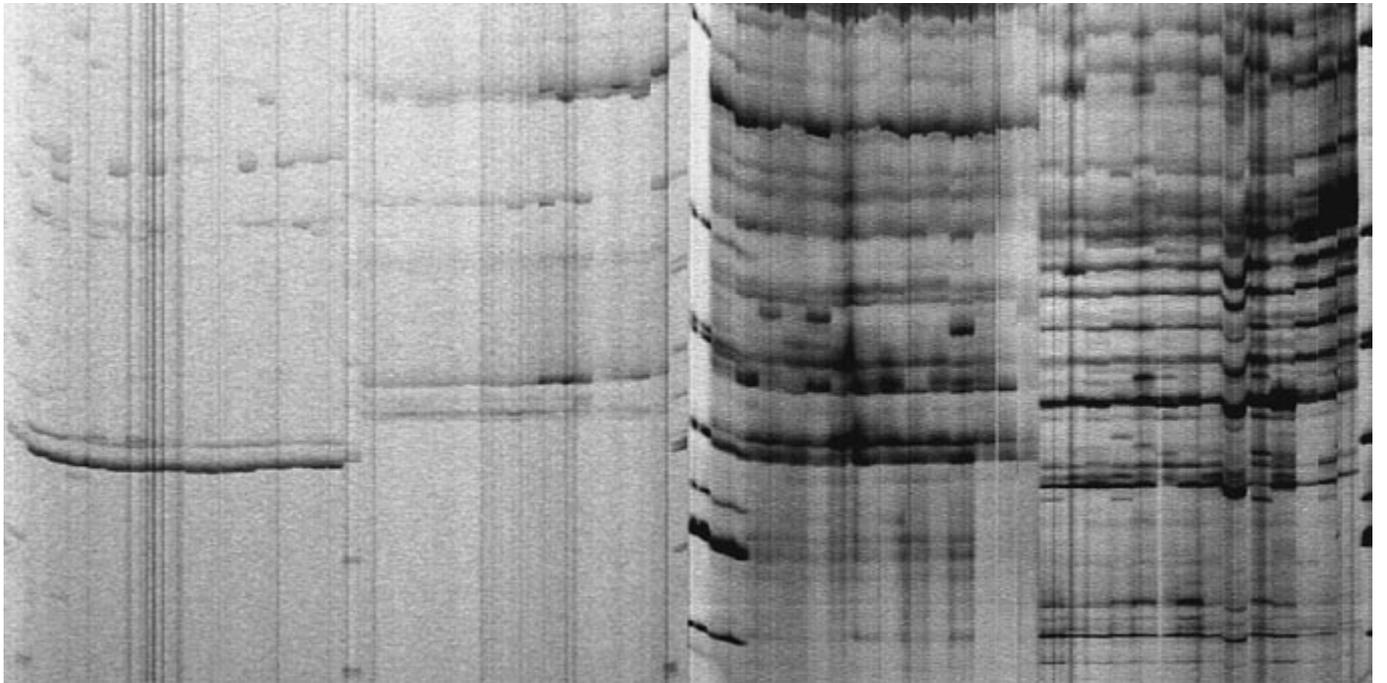
栽培個体

A09 プライマー

A07 プライマー

A10 プライマー

B04 プライマー



自生個体

栽培個体

自生個体

栽培個体

自生個体

栽培個体

自生個体

栽培個体

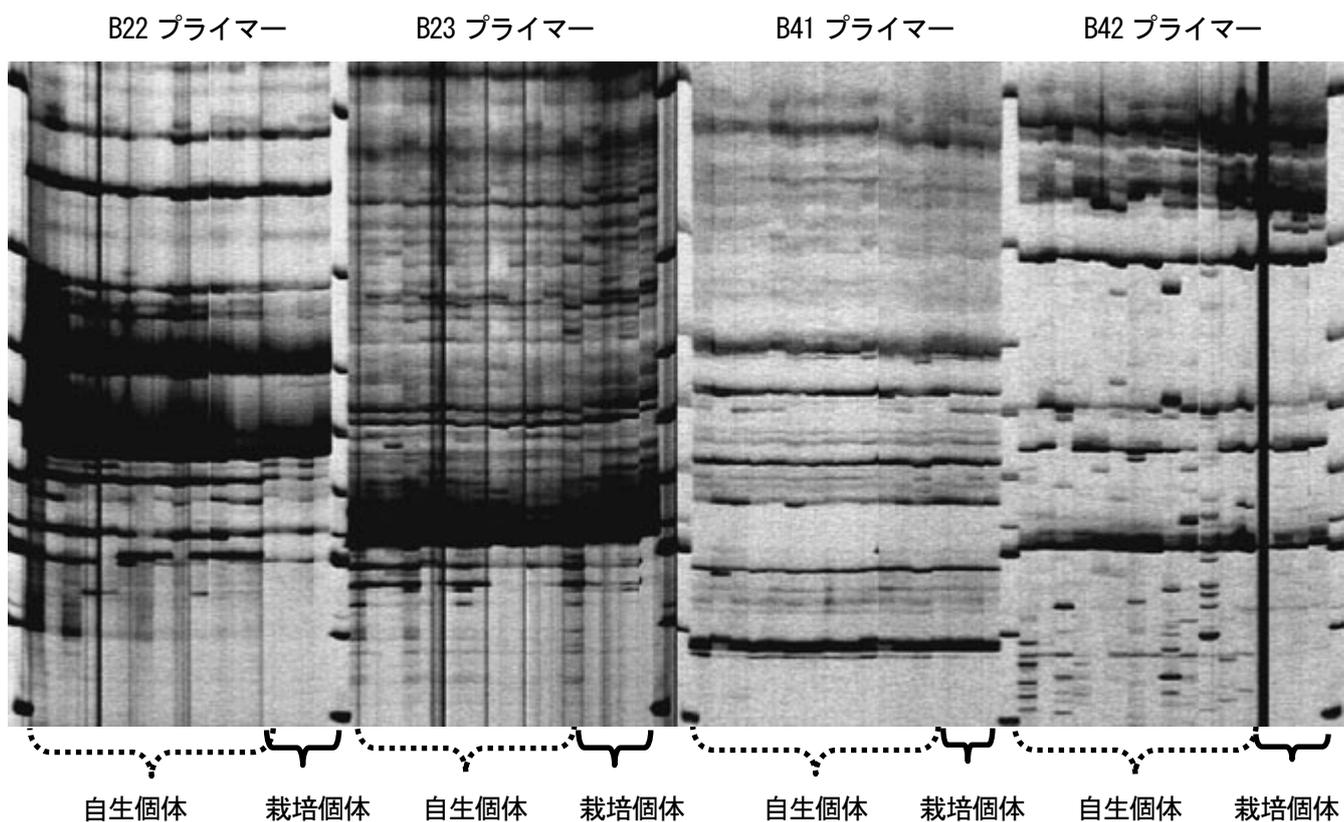
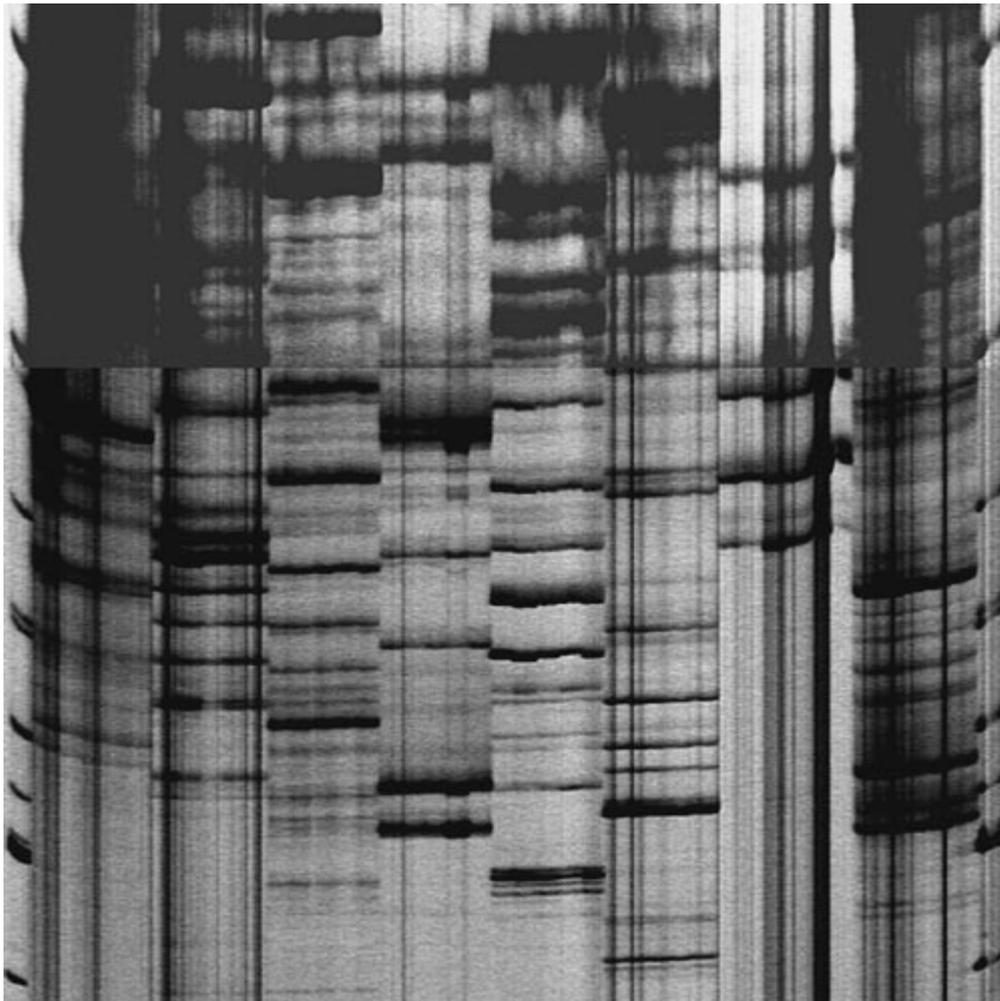


図4 カンカケイニラの RAPD 分析(4.5%ポリアクリアミドゲル)

自生個体は 1~4, 7~11

A03, A04, A05, A06, A10, B04 の栽培個体は①~③

A09, A07, B22, B23, B41, B42 の栽培個体は①~④



A03 プライマー      A05 プライマー      A06 プライマー      B05 プライマー  
A04 プライマー      A07 プライマー      A10 プライマー      B23 プライマー

図5 カンカケイニラの RAPD 分析(4.5%ポリアクリアミドゲル)  
各プライマーとも左から A, B, C, D, E

## 謝 辞

本研究の一部は、財団法人福武学術文化振興財団による「瀬戸内海文化研究・活動支援助成事業」による助成を受けた。ここに記して謝意を表す。

自生地のカンカケイニラは、香川大学教育学部末広喜代一教授に採取していただいた。深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 原寛：新種カンカケイニラ，植物研究雑誌，**28**(2)，62-63，(1953)
- 2) 香川県：“カンカケイニラ保護事業計画”，香川の環境，2006. 3. 1  
[http://www.pref.kagawa.jp/kankyo/shizen/hogo\\_jyore/kankakeinira.htm](http://www.pref.kagawa.jp/kankyo/shizen/hogo_jyore/kankakeinira.htm)(参照 2011-9-1)
- 3) 久米修：“カンカケイニラ”，香川県レッドデータブック，香川県希少野生生物保護対策検討会，133，香川県環境森林部環境・水政策課(香川)，(2004)
- 4) 環境省：“レッドデータブック/リスト” 生物多様性情報システム <http://www.biodic.go.jp/J-IBIS.html> (参照 2011-9-1)
- 5) 香川県：“香川県希少野生生物の保護に関する条例”，香川の環境 [http://www.pref.kagawa.jp/kankyo/shizen/hogo\\_jyore/zenbun.pdf](http://www.pref.kagawa.jp/kankyo/shizen/hogo_jyore/zenbun.pdf) (参照 2011-9-1)
- 6) David V. Jobs and Leonard B. Thien : A Conserved Motif in the 5.8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences, *Plant Molecular Biology Reporter* **15**, 326-334, (1997)
- 7) Blattner F. R. and Kadereit J.W. : Morphological evolution and ecological diversification of the forest-dwelling poppies (Papaveraceae:Chelidonioideae) as deduced from a molecular phylogeny of the ITS region, *Plant Syst. Evol.* **219**, 181-197, (1999)
- 8) EMBL-EBI : Databases, Database Browsing SRS <http://srsb.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz> (参照 2011-9-1)