

F-7 遺伝子組換え生物の開放系利用による遺伝子移行と生物多様性への影響評価に関する研究

(2) 遺伝子組換え植物の導入遺伝子の環境拡散リスクと植物多様性影響評価に関する研究

② 自生集団内および集団間における遺伝子移行の評価法の開発 - 2 自殖性植物について

独立行政法人農業生物資源研究所

遺伝資源研究グループ集団動態研究チーム

加賀 秋人・黒田 洋輔・

友岡 憲彦・Duncan Vaughan

平成 15～17 年度合計予算額 21,780 千円

(うち、平成 17 年度予算額 9,141 千円)

※上記の予算額には、間接経費 5,026 千円を含む

〔要旨〕日本国内において虫媒による自生集団への遺伝子移行が考えられる代表的作物であるダイズおよびアズキに関して、自生集団に組換え遺伝子が拡散する可能性を明らかにするため、ダイズからツルマメ集団およびアズキからヤブツルアズキ集団への遺伝子拡散のモニタリングに利用可能なマイクロサテライトマーカーを選抜し、野生種の集団遺伝構造、野生種間の自然交雑、栽培種－野生種間の自然交雑および栽培種から野生種への遺伝子浸透の実態を明らかにした。ダイズおよびアズキともに、栽培種から野生種への自然交雑率は、野生個体間よりも明らかに低かった。アズキでは、栽培種から野生種への遺伝子流動により生じた形態的中間体やその分離後代と考えられる雑草型が頻繁に認められた。その一方で、ダイズでは、近年のダイズとツルマメの自然交雑に由来する形態的中間体は非常に稀であり、しかも自生地環境において短期間のうちに消滅する傾向が認められた。しかしながら、ダイズでも、雑種や雑種後代が自生地環境で少なくとも数年間は自殖によって繁殖していることが明らかとなった。そのため虫媒の自殖性作物を代表するダイズやアズキでは栽培種－野生種間の自然交雑は稀であっても、自然交雑によって生じた雑種後代は自殖によって繁殖できることから、今後は組換え遺伝子が野生種へ拡散するという前提で研究を進めていく必要がある。組換え遺伝子が拡散する可能性を高める要因として、栽培種に雑種後代の適応度を高めるような遺伝子が存在する場合が想定される。組換え遺伝子の環境拡散リスクを定量的に評価するためには、本研究で明らかにした野生集団の遺伝構造や他殖率のデータに加え、今後そのような雑種後代の適応度を左右する遺伝子領域に関する情報と自生地における野生種の生活史戦略などの綿密かつ多様なパラメーターを統合し、組換え遺伝子の挙動を把握するためのシミュレーションモデルを構築していくことが欠かせない。

〔キーワード〕ダイズ、ツルマメ、アズキ、ヤブツルアズキ、遺伝子流動

1. はじめに

我が国には、遺伝子組換えダイズ (*Glycine max*) の近縁野生種であるツルマメ (*G. soja*) が、遺伝子組換えアズキ (*Vigna angularis* var. *angularis*) の近縁野生種であるヤブツルアズキ (*V. angularis* var. *nipponensis*) が広く分布しており、遺伝子組換え品種を作付けする場合、生物多様性へどのような影響を及ぼすのかについて把握しておく必要がある(Ellstrand 2003)。ツルマメおよびヤブツルアズキはダイズおよびアズキの祖先野生種として知られ、栽培種と祖先野生種間の交雑は可能で、かつその雑種後代は正常に生育できる。また、これらのマメ科植物は自殖性であるものの、栽培種と祖先野生種の形態的「中間体」が各地で発見されている (Tomooka et al. 2001、赤塚・吉山 1960)。今後遺伝子組換えダイズの環境影響をなくすまたは軽減する仕組みを構築するには、まずはダイズからツルマメへの遺伝子流動の実態と遺伝子拡散のメカニズムを把握し、次いで組換え遺伝子がツルマメ集団に移行した場合どのような影響を及ぼすのかを予想することが重要である。

2. 研究目的

(1) マイクロサテライト多型からみた日本各地のツルマメ集団の遺伝構造の把握

これまで葉緑体およびミトコンドリアの分子マーカーを用いた全国的なツルマメの集団構造に関する調査が行われているが、核ゲノムについては数種類のアイソザイムによる評価しか行われていない。本研究が目的とする遺伝子浸透個体の評価は表現形質からだけでは判断が難しいことから、マイクロサテライトマーカーを用いて、日本各地のツルマメ集団の遺伝構造と代表的なダイズ品種の遺伝構造を比較することにより、ダイズ遺伝子の検出評価手法の開発を試みた。

(2) 「中間体」とその周辺に自生するツルマメ集団の探索とその遺伝的構造

2003 年および 2004 年にかけて、ダイズおよびツルマメへの交雑後代によくみられる両者の形態的「中間体」を探索し、50 地点以上のツルマメ集団 (ダイズと隣接) のなかから、秋田県で 1 個体 (加賀ら 2005)、そして佐賀県で 11 個体 (黒田ら 2005) の中間体を発見した。そこで、中間体はダイズからツルマメへの遺伝子流動により生じた雑種であるかについて明らかにするためにマイクロサテライトマーカーによる解析を行った。また、仮に中間体がダイズとツルマメの雑種であった場合、中間体に含まれるダイズ遺伝子が周辺のツルマメに二次的に拡散している可能性がある。そのため、中間体後代の分布域の拡大や中間体とツルマメの雑種の形成などを明らかにすることを目的に、2005 年度も引き続き現地調査を行い、中間体が見つかったツルマメ集団の遺伝構造を解析した。

(3) 日本各地におけるダイズ-ツルマメおよびツルマメ個体間のお他殖率の推定

ダイズ-ツルマメ間のお他殖率に関する報告は模擬的環境下における研究 (Nakayama & Yamaguchi 2002) が一例だけで、自生地におけるツルマメ間のお他殖率に関する報告も限られている。これまで中間体を発見した場所はダイズ-ツルマメ間だけでなく中間体-ツルマメ間の自然交雑も期待されるので、そのような場所を中心に、国内のツルマメ自生地におけるお他殖率の推定を行った。

(4) 日本各地におけるツルマメの空間構造・種子散布

ツルマメは花粉だけでなく種子により移動することができる。そのため花粉流動によりダイズ

遺伝子がツルマメへ組み込まれた場合、ツルマメの種子の移動により、ダイズ遺伝子は自生地で拡散する可能性がある。成熟したツルマメの種子の多くは、親植物体から 4.5m 以内に散布される(Oka 1983)。しかしながら水の流れに乗ってツルマメの種子が長距離へ散布される可能性が指摘されている(Kiang et al. 1992, Choi et al. 1999)。種子の拡散は集団間の空間構造にも影響を及ぼす。そこで日本各地のツルマメ集団間の遺伝構造から、ツルマメがどの程度種子散布を行っているのかについて推定した。

(5) マイクロサテライト多型からみたヤブツルアズキ集団の遺伝構造および空間構造の把握

これまで AFLP マーカーや RAPD マーカーを用いて国内のヤブツルアズキの遺伝構造に関する調査が行われているが、本研究が目的とするヤブツルアズキ集団における遺伝子浸透個体の評価や空間構造の解析は行われていない。遺伝子浸透個体の判断は表現形質からだけでは難しいことから、マイクロサテライトマーカーを用いて、日本各地のヤブツルアズキ集団の遺伝構造と近辺の栽培アズキの遺伝構造を比較することにより、栽培アズキ遺伝子の検出評価手法の開発を試みた。

(6) アズキーヤブツルアズキ間およびヤブツルアズキ個体間他殖率の推定

アズキーヤブツルアズキ間およびヤブツルアズキ個体間他殖率に関する報告は全くないので、形態的中間体の多い自生地および模擬的試験から他殖率の推定を行った。

3. 研究方法

(1) マイクロサテライト多型からみた日本各地のツルマメ集団の遺伝構造の把握

日本各地(青森県～鹿児島県)から合計 77 のツルマメ集団を供試した(図 1)。これらは 1996 年から 2002 年にかけて我々の研究チームが独自に収集したものである。ツルマメ集団は、河岸、放棄水田、水路わきの溝などの年間を通して水分条件の比較的良好な場所に自生していた。各集団からは典型的なツルマメの種子サイズである 0.03g 以下の種子をそれぞれ 8 個体供試した。また最近 5 年間の栽培面積が 95%以上を占めるダイズ 53 品種についても野生ダイズの集団構造の比較対照として供試した。ツルマメ 616 個体とダイズ 53 個体について、ダイズの各染色体 ($n=20$) に座乗し、かつ北日本及び西日本のツルマメおよびダイズ数系統間で明瞭な多型を示した合計 20 座のマイクロサテライト遺伝子座を解析した。各遺伝子座の検出には蛍光標識したプライマーとシーケンサーを用いた。

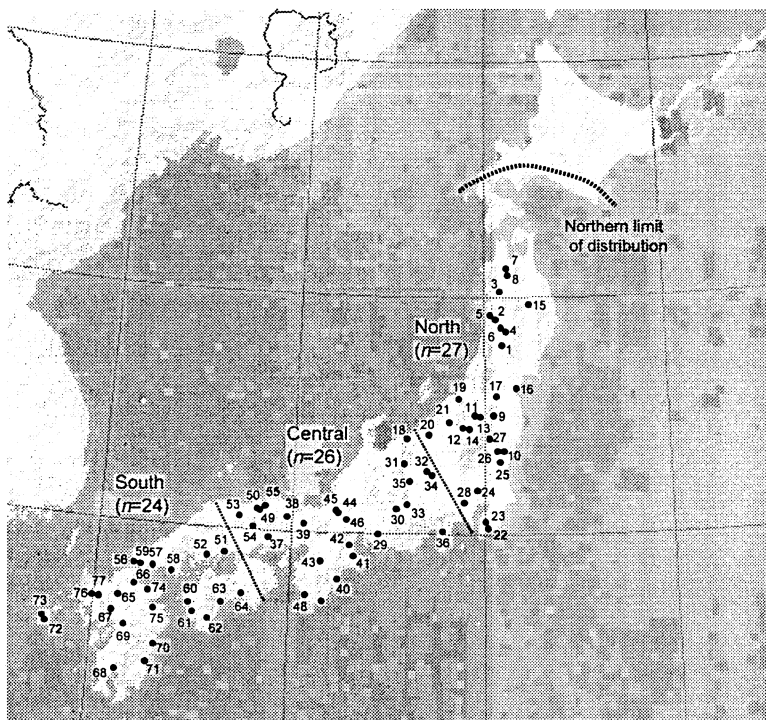


図 1. ツルマメの遺伝構造、空間構造、種子散布検出(ラージスケール)のために供試した日本各地のツルマメ集団の分布

決定した遺伝子型に基づき、以下の各種の集団統計遺伝学的解析プログラムで遺伝構造に関するパラメーターを推定した。集団内変異の種々のパラメーターは FSTAT(Goudet 2001)で算出し、得られた近交係数より自然交雑率(Weir 1996)を算出した。Genetic Admixture 解析は Structure (Pritchard et al. 2000)を用いた。個体間の類縁関係については遺伝距離 D_A を算出したのち、NTSYS (Rohlf 2000)を用いて主座標プロットを行った。

(2) 「中間体」とその周辺に自生するツルマメ集団の探索とその遺伝的構造

日本のツルマメ分布北限の北海道南部から南限の九州南部のなかで地理的分散性を考慮しつつ、ダイズ栽培面積の広い地域、比較的大きいサイズのツルマメ種子(100 粒重 5g 以上)が収集されている地域も含め、日本各地から 5 つの市(1. 秋田県大曲市、2. 茨城県下館市、3. 愛知県安城市、4. 広島県福山市、5. 佐賀県佐賀市)を中心に、2003 年から 2004 年にかけて中間体の探索を行った。中間体の発見された秋田県の 1 サイトおよび佐賀県の 3 サイトを 2004 年から 2005 年にかけて再訪し、中間体およびその周辺に自生するツルマメの葉や種子サンプルを 1m 間隔で収集した。2004 年に収集したサンプル合計 243 個体(中間体 12 サンプル、ツルマメ 231 サンプル、図 2)の遺伝子型を前述の 20 座のマイクロサテライトマーカーを用いて決定し、近辺のダイズの遺伝子型との比較を行った。国内のダイズとツルマメはこの 20 座において高度に遺伝的分化しており、国内の代表的なダイズ品種を識別可能なマーカーが含まれる(Kuroda et al. 2006)。このようなマーカーを中間体がダイズとツルマメの雑種であるかの判定や、中間体と周辺のツルマメが自然交雑した二次的な雑種個体の検出に利用した。

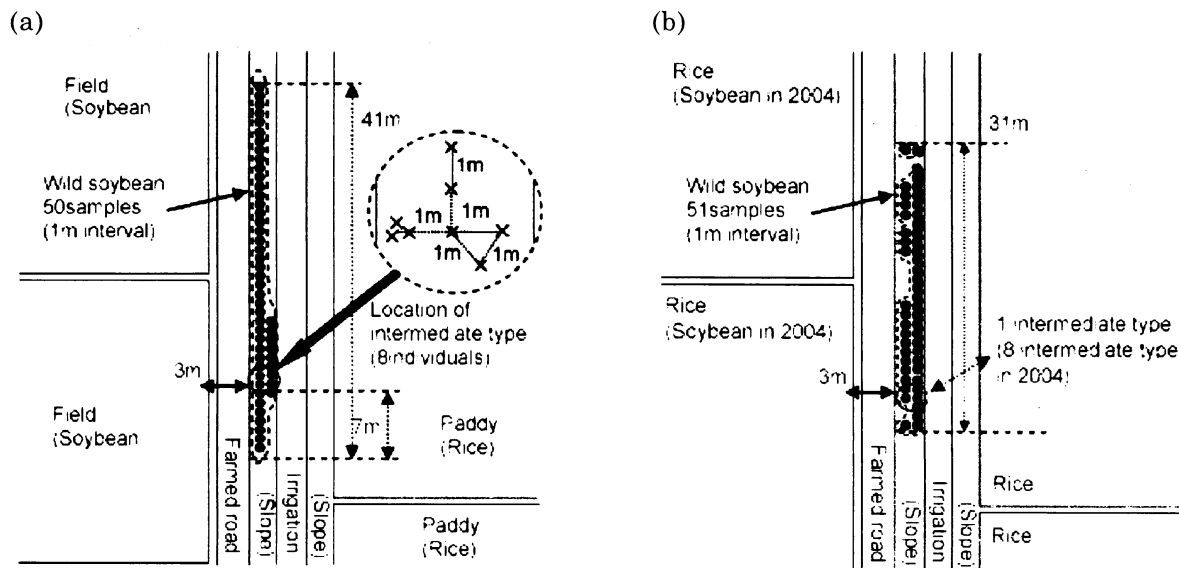


図 2. S1 サイトにおけるツルマメ集団のスケッチマップ。2004 年(a)には 8 個体の中間体が発見されたが、2005 年(b)には 1 個体となっていた。黒丸は、中間体から二次的に遺伝子流動しているかを検証するために収集したツルマメのサンプル地点(1m 間隔)

(3) 日本各地におけるダイズ-ツルマメおよびツルマメ個体間他殖率の推定

日本各地で探索し記録した、栽培ダイズと開花期が重複したツルマメ集団のなかから、様々な距離間隔となるよう構成した 7 サイト 14 集団を調査対象とした(図 3)。ツルマメと開花期が重

複した栽培ダイズからの花粉流動についても考慮するために、各サイトではダイズ畑と5m 以内に隣接 (○) している集団 (図 3, 図 4b) と、ダイズ畑から 50m 以上隔離

(●) されている集団 (図 3, 図 4a) を選定した。各集団内に自生する 12 個体 (各個体 5m 間隔) から合計 96 種子を収集した。前述の 20 座のマイクロサテライトマーカーのうち、集団内多型性の高い 7 マイクロサテライトマーカーを用いて野生ダイズ種子 1344 粒とその周辺で収集した栽培ダイズ種子 31 粒の遺伝子型

を決定し、統計学的解析ソフトウェア (MLTR, Ritland 2002) を用いて他殖率・花粉の拡散距離を推定した。

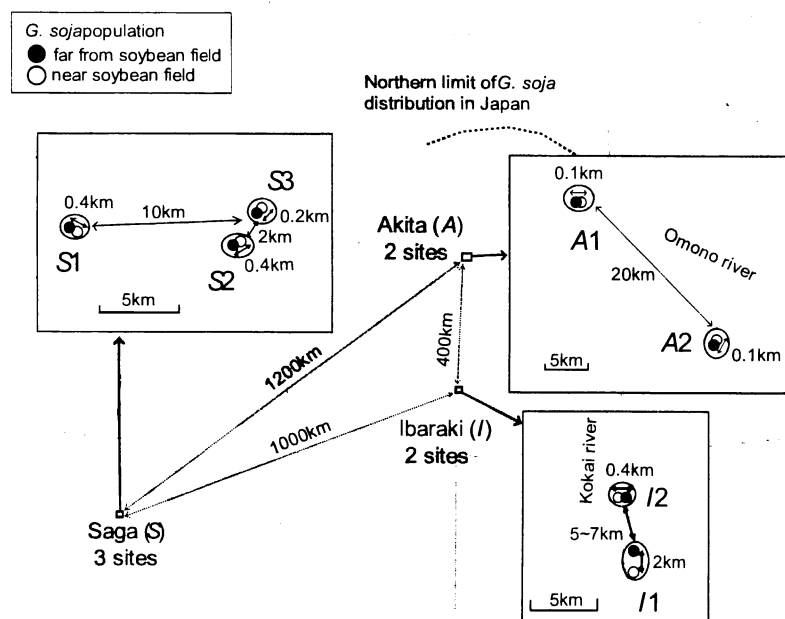


図 3. 花粉流動・空間構造・種子散布(スモールスケール)検出のために供試した日本各地のツルマメ集団の分布

(4) 日本各地におけるツルマメの空間構造・種子散布

ツルマメの空間構造・種子散布の推定は、ラージスケールでの評価と、スモールスケールでの評価に大別される。スモールスケールでの評価は、集団内(5m~55m、図 4)および地域内の集団間

(a)



(b)



図 4. ツルマメ集団のサンプリング風景 (2004 年 10 月 18 日撮影)。メジャーを用い 5m 間隔で個体を収集した。図(a)および図(b)はそれぞれ佐賀県の S3a および S3b 集団である。どちらのツルマメ集団も道路の右サイドに分布している。図(a)の周囲には水田が広がっておりダイズは近くで栽培されていない。その一方で、図(b)は道路の反対側にダイズが栽培されていた。

(100m~20km、図 3)に焦点を当てた 14 集団を用いた。ラージスケールでの評価は、日本国内におけるツルマメの分布を包括するように選抜した 77 集団 616 サンプル(図 1、0.2km~1330km)である。これらのサンプルを 7 座または 20 座の SSR マーカーより遺伝子型を決定し、空間自己相関解析 (GeneAlex, Peakall and Smouse 2001)を行い、ツルマメ集団間の種子散布を推定した。

(5) マイクロサテライト多型からみたヤブツルアズキ集団の遺伝構造および空間構造の把握
長期的なモニタリングを行っている鳥取県、栃木県、茨城県、岡山県計 4 ヶ所の自生集団 (Tomooka et al. 2001)、さらに鳥取県広域についてアズキとヤブツルアズキとの中間体を探索した。中間体が含まれる 11 集団とその近辺の 14 集団、合計 25 箇所の自生集団から収集したヤブツルアズキ 611 個体とアズキ 140 個体について、アズキの各染色体 ($n=11$) に座乗する合計 23 座のマイクロサテライト遺伝子座を解析した。各遺伝子座の検出には蛍光標識したプライマーとシーケンサーを用いた。決定した遺伝子型に基づき、(1) および (4) と同様の解析を行った。

(6) アズキーヤブツルアズキ間およびヤブツルアズキ個体間他殖率の推定

自生集団における他殖率は近交係数と父性分析から算出した。父性分析は 5 ヶ所の長期的モニタリング集団から直接サンプリングした葉およびその個体についた 10 粒の種子から抽出した DNA を合計 8 種類のマイクロサテライトマーカーで解析し、MLTR (Ritland 2002)を用いて自然交雑に関するパラメーターを算出した。また、模擬的栽培環境下においてアズキからヤブツルアズキ、ヤブツルアズキの他殖率の推定も行った。花粉のドナーをアズキ、レシピエントをヤブツルアズキとし、中心のドナーから 8 方向にレシピエントを 1m 間隔で農業生物資源研究所圃場に配置した。ドナー (栽培種) と開花が同調していたヤブツルアズキの花をラベルし、800 莢を個別に収穫した。各莢に含まれていた種子 1 粒を 8 種類のマイクロサテライトマーカーで解析し、自然交雑率を求めた。

4. 結果・考察

(1) マイクロサテライト多型からみた日本各地のツルマメ集団の遺伝構造の把握

国内のツルマメ集団間には明らかな遺伝的分化が存在し、遺伝変異を主座標平面軸へ投射すると、x 軸上にツルマメ集団の地理的クライン(図 5b:北部, c:中部, d:南部)が認められた。

一方、ダイズーツルマメ間にも明確な遺伝分化が y 軸上に認められた (図 5a)。ツルマメとダイズの対立遺伝子 (アレル) を各遺伝子座別に見ると、ツルマメとダイズの遺伝分化の明瞭な遺伝子座 (図 6a) と頻度分布が重なる傾向の遺伝子座 (図 6b) が存在した。本研究で用いた 20 種類のマイクロサテライトマーカーのなかから、合計 7 種類の遺伝子座においてこのような明瞭な遺伝分化が認められた。また Genetic Admixture 解析では見かけ上はツルマメであるが栽培ダイズとの交雑を経験し、ダイズ由来の遺伝子が残存している個体の存在が示唆された (図 5, 白・灰色の丸)。これらのことから、選抜したマイクロサテライトマーカーはダイズ(近年日本を代表する品種)とツルマメを識別したり、浸透交雑を評価したりするのに有効と考えられた。

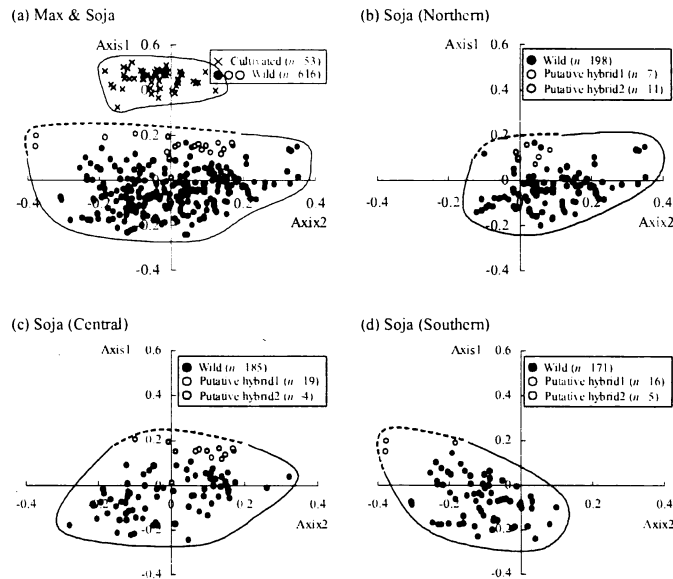


図 5. 遺伝距離(D_A)に基づく全サンプルの主座標プロット。(a)は野生ダイズ(*G. soja*)と栽培ダイズ(*G. max*)の比較、(b)、(c)、(d)はそれぞれ日本北部、中部、南部の野生ダイズに分類した表示。第一および第二主座標の寄与率はそれぞれ 7.4 %と 5.7 %。●で示した野生ダイズのうち、Genetic Admixture 解析により栽培ダイズのメンバーシップを保有していたものを白色(Putative hybrid1, $P > 0.25$)または灰色(Putative hybrid2, $0.25 > P > 0.01$)で示した。

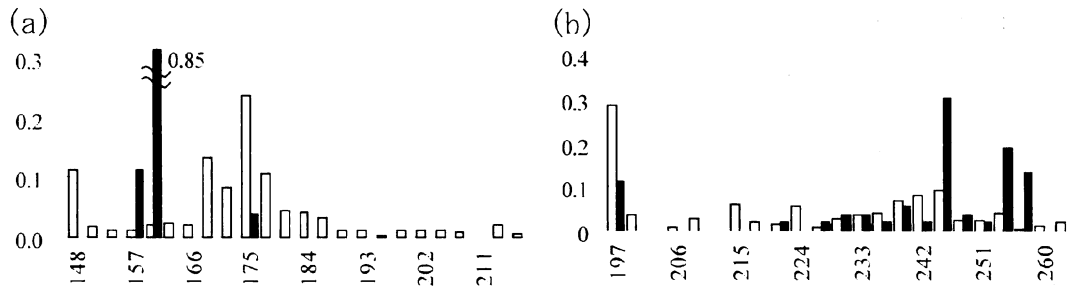


図 6. 栽培ダイズ($n = 53$, 黒色)と野生ダイズ($n = 616$, 白色)のアレルの頻度分布。(a)遺伝分化の明瞭 ($F_{ST} = 0.336$) な Satt076 座。(b)遺伝分化の不明瞭 ($F_{ST} = 0.066$) な Satt288 座。

(2) 「中間体」とその周辺に自生するツルマメ集団の探索とその遺伝的構造

探索とモニタリング：秋田県 8 サイト、茨城県 7 サイト、愛知県 4 サイト、広島県 6 サイト、佐賀県 33 サイトの合計 58 サイトを記録し、そのうち秋田県の 1 サイトおよび佐賀県の 3 サイトから、合計 11 個体の中間体を発見することができた。中間体の特徴は莢および種子が野生ダイズよりも 2 倍程度大きく (100 粒重 6~12g)、比較的茎が太く蔓の巻き方が弱いなど野生ダイズと栽培ダイズとの中間的特徴を示した。種皮色が緑や黄色のものも 4 個体得られた。このような形質に基づいて判断可能な中間体は集団内ではごく少数であり、直径 3m~5m 程の範囲に分散していた

(図 2)。2004 年度と 2005 年度のツルマメ集団のサイズには顕著な違いが認められなかったが、中間体の個体数は発見された翌年には消滅または減少していた (表 1)。例えば、1 個体の中間体

表 1. 自生地における中間体個体数の推移

Pref.	Site no.	No. intermediate individuals		
		2003	2004	2005
Akita	2004_01	1	0	0
Saga	S1(2004_13)	-	8	1
Saga	S2(2004_20)	-	1	0
Saga	S3(2004_39)	-	1	0



図 7. 佐賀市 S1 サイトで発見された中間体(下の莢)。周囲に自生する典型的なツルマメの莢(上)に比べて大

が発見された秋田県角館および佐賀県 (S2, S3) では、その翌年には中間体の自生を確認できなかった。また 8 個体発見された佐賀県の S1 サイトでも翌年には 1 個体の中間体しか確認できなかった (図 7)。このように、自生地で適応的に不利なサイズの遺伝子を持った中間体の後代は速やかに淘汰される傾向があるが、種子が休眠している可能性にも留意し、今後調査を継続する必要があると思われる。

遺伝的構造：前年度までの現地調査で見つかった中間体がダイズとツルマメとの雑種なのかどうかを検証するとともに、中間体から周囲のツルマメへの二次的な遺伝子流動の可能性について検討した。20 座のマイクロサテライトマーカーを用いて 2 年間にわたり収集した中間体およびツルマメ 243 個体の遺伝子型を決定・比較したところ、11 個体の形態的「中間体」は、すべてダイズとツルマメの自然交雑に由来することが明らかになった (表 2)。ツルマメとの交配親として推定されたダイズ (新丹波黒・フクユタカ・ムラユタカ・青入道) はすべて晩生の品種であったことから、雑種の形成にはダイズ品種の開花期が大きくかかわっていることが示唆された。一般にダイズの開花期はツルマメよりも早いと考えられているが、晩生品種は開花期が遅く、ツルマメの開花期と重複し、ツルマメとの自然交雑が高まったのではないかとと思われる。また、高いヘテロ接合度を示した中間体 (No.8~10) はダイズとツルマメが最近交雑した F1 雑種、中間体 (No.1~7) は「新丹波黒」とツルマメとの雑種後代が自生地環境下で数世代にわたり自殖によって繁殖した後代であることが明らかとなった。一方、2 年にわたりサンプリングした中間体周囲のツルマメ集団をマイクロサテライトマーカーで解析したが、雑種に含まれていた栽培ダイズの遺伝子が周辺のツルマメに拡散した証拠は得られなかった。種子が休眠していることや表現型とは無関係なゲノム領域にダイズ遺伝子が残存していることも考えられるが、上記のモニタリングでは自生地で見つかった雑種は消滅する傾向にあり、調査集団においては雑種後代が自生地を優占する可能性や雑種を介してダイズ遺伝子がツルマメ集団に急激に広まる可能性は低いと思われる。

表2. マイクロサテライト多型からみた形態的中間体の由来およびその世代の推定

サンプル No.	地点	種子の 大きさ*・色	栽培ダイズ遺伝子 の割合 (/20座)	親品種	ホモ接合度の 割合 (/20座)	推定 世代
1	佐賀S1	大粒・黒	50%	新丹波黒	100%	F3以降
2	佐賀S1	大粒・黒	42%	新丹波黒	95%	F3以降
3	佐賀S1	大粒・黒	47%	新丹波黒	85%	F3以降
4	佐賀S1	大粒・黒	50%	新丹波黒	88%	F3以降
5	佐賀S1	大粒・黒	44%	新丹波黒	80%	F3以降
6	佐賀S1	大粒・黒	58%	新丹波黒	90%	F3以降
7	佐賀S1	大粒・黒	50%	新丹波黒	100%	F3以降
8	佐賀S1	大粒・緑	50%	フクユタカ	0%	F1
9	佐賀S2	大粒・緑	50%	ムラユタカ	0%	F1
10	佐賀S3	大粒・緑	50%	フクユタカ	0%	F1
11	角館	大粒・緑	55%	青入道	45%	F1以降

* 典型的なツルマメの種子と比較した場合

(3) 日本各地におけるダイズ-ツルマメおよびツルマメ個体間のお他殖率の推定

自生地におけるお他殖率を推定するために、秋田県、茨城県、佐賀県のツルマメ 14 集団の種子 1344 サンプルを 7 座のマイクロサテライトマーカーで解析した。各マイクロサテライト座におけるダイズとツルマメの遺伝的分化は明確 ($F_{ST} = 0.185 \sim 0.389$, $p < 1.0 \times 10^{-5}$) であった。そのためこれらのマイクロサテライト多型はダイズとツルマメの花粉流動を検出することができる分子マーカーといえる。しかしながら、解析した 14 集団 1344 の種子の中にダイズとツルマメとの雑種種子は検出されなかった。そのうちの 7 集団 (672 種子) は栽培ダイズと隣接していたことを考慮するとダイズ-ツルマメ間のお他殖率は 0.15% 以下と推定される。ダイズからツルマメへの花粉流動が検出されなかった理由としては、ツルマメ集団とダイズ畑が道により分断されていたこと、ダイズはツルマメに比べて花の数が少なく、大きな葉で覆われていることでポリネーターに気づかれにくいこと、ダイズ畑の周りでは殺虫剤でポリネーターが少なくなったなどが考えられる。一方、ツルマメ集団内のお他殖率はダイズ-ツルマメ間のお他殖率よりも明らかに高いことがわかった (平均 2.3%、表 3)。そのなかでも雑種 (中間体) が見つかった S1a 集団のお他殖率は最も高い 6.3% を示したが、雑種からツルマメへの花粉流動は検出されなかった。これには雑種後代の開花時期のずれや花数の減少などダイズ遺伝子の効果による何らかの変化が関与していると思われる。以上のことから、ダイズ由来の遺伝子が一旦ツルマメ集団に移行すると、ダイズ-ツルマメ間のお他殖率よりもツルマメ間のお他殖率に従って集団に取り込まれていくと思われる。雑種や雑種後代が自生地環境で少なくとも数年間は繁殖でき

表 3. 各ツルマメ集団のお他殖率(t_m)

Population	t_m (S.D)
A1a	0.021 (0.024)
A1b	0.010 (0.007)
A2a	0.000 (0.000)
A2b	0.000 (0.000)
I1a	0.000 (0.000)
I1b	0.052 (0.042)
I2a	0.010 (0.010)
I2b	0.031 (0.022)
S1a	0.063 (0.021)
S1b	0.000 (0.000)
S2a	0.052 (0.026)
S2b	0.031 (0.023)
S3a	0.021 (0.023)
S3b	0.032 (0.021)
Mean	0.023

ることが明らかとなったことを考慮すると、栽培種－野生種間の自然交雑は稀であっても、今後は組換え遺伝子が野生種へ拡散するという前提で研究を進めていく必要がある。遺伝子拡散の過程にはダイズの遺伝子を持った雑種や雑種後代の開花特性等の適応度も大きく影響するので、遺伝子拡散のメカニズムを把握するにはそのような特性に焦点を絞った研究を進めていくことが重要と思われる。

(4) 日本各地におけるツルマメの空間構造・種子散布

スモールスケールでの評価： 各集団内では多くの個体(2~9 個体/12 個体)が同一遺伝子型をもっていた。また集団間でも、A2 サイトの 7 個体、S1 サイトの 5 個体、S2 サイトの 1 個体と S3 サイトの 1 個体が隣接した集団(100m~400m、図 3)の個体と同一遺伝子型を共有していた。空間自己相関解析では、集団内(5m~10m)で非常に高い相関がみられ、集団内から集団間(15m~400m)にかけて比較的高い相関が続き、2km 以降の集団間の相関は非常に弱くなった(図 8)。この結果より、多くのツルマメの種子は 10m 以内に散布されるものの、400m まで散布される種子もまれではないと考えられる。

ラージスケールでの評価： No.44 (図 1) の 2 個体と No.8 の 1 個体が、それぞれ No.45 集団 (No.44 から 200m 離れている)と No.7 の集団 (No.8 から 12.4km 離れている)と同一遺伝子型を共有していた。この結果より、種子散布は 12.4km ほどにまで到達する可能性が示唆された。空間自己相関解析では、250km の範囲内で正の相関が見られ、400km より離れると負の相関が見られた(図 9)。しかしながら相関係数は小さかったため、この正から負へのクラインは、短期間における種子移動による影響ではなく、交雑または突然変異などにより遺伝変異をもったツルマメ集団が長期間かけて移動や自然淘汰を繰り返し生じたものと考えられる。

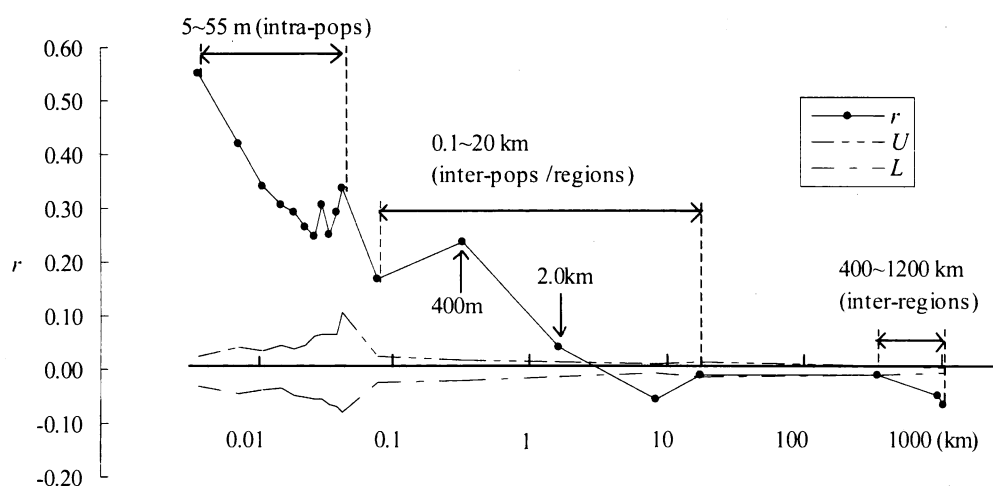


図 8. 日本各地のツルマメ集団内・集団間の空間相関図(スモールスケール)。横軸(距離)は対数変換した。強い相関は 400m までみられた。2km より離れると相関の値は非常に低くなった。

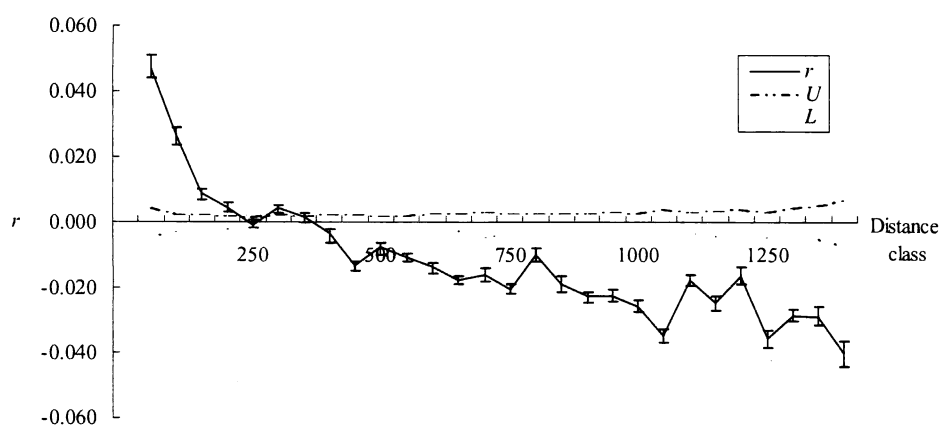


図 9. 日本各地のツルマメ集団間の空間相関図(ラージスケール)。相関の値は非常に弱いものの 350km より集団間の距離が離れると、正から負の相関に推移した。

(5) マイクロサテライト多型からみたヤブツルアズキ集団の遺伝構造および空間構造の把握

調査集団は大きく西日本と北関東に分けられ(図 10 左)、中間体が高頻度で分布する鳥取県については 22 箇所のヤブツルアズキ集団を解析した(図 10 右)。ヤブツルアズキ集団は畑や水田の周辺、水路など人為的攪乱の多い場所に分布するだけでなく、放棄水田や放棄畑などかつて雑草が生い茂っていなかったような場所に侵入・増殖した集団も多数認められた。

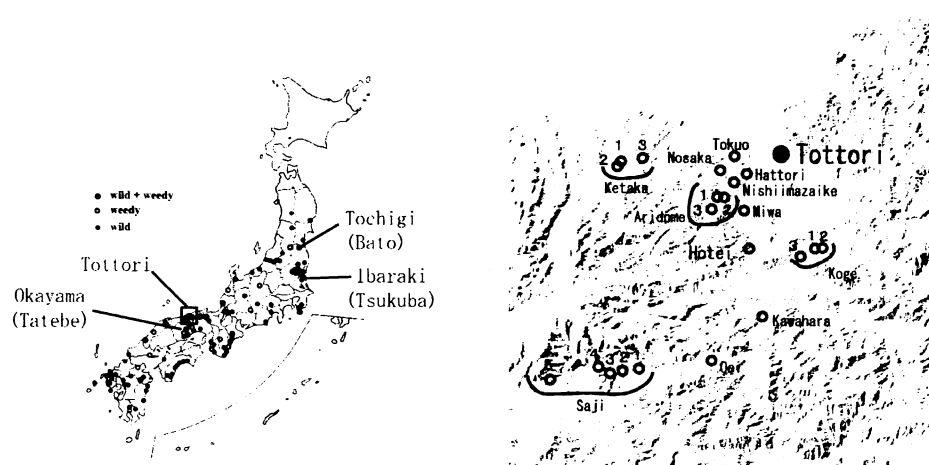


図 10. 日本国内における野生型(wild)、中間体(weedy)および複合型(wild+weedy)集団の分布と材料に用いた集団の収集地点(左)および鳥取県の自生集団の収集地点(右)

アズキからヤブツルアズキへの遺伝子拡散の実態を把握するために、まずアズキに特異的な形態形質に着目して集団内の中間体を判別した。ヤブツルアズキ集団内の形態的変異は連続的なので、全国のヤブツルアズキ種子の平均 100 粒重 2.6g よりも明らかに大きい 4.0g 以上の種子、種皮に黒斑がない、直立型か半直立型のどれかの特徴を持つ明らかな遺伝子浸透個体を中間体 H (Intermediate H) とした。さらにヤブツルアズキのように蔓性で、黒斑種子であるが、種子がや

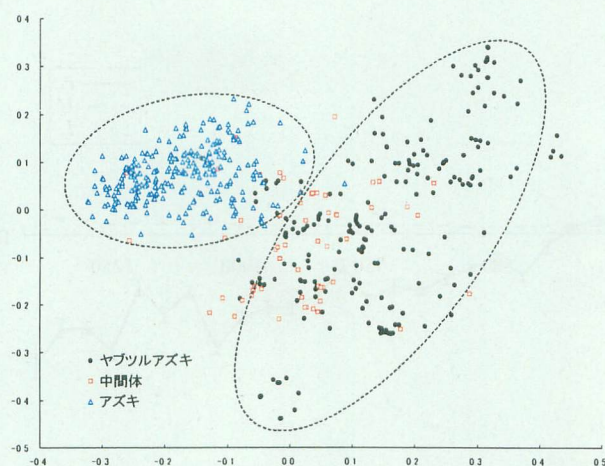


図 11. 遺伝距離(D_A) に基づく全サンプルの主座標プロット

や大きく、アズキに特徴的な緑色の茎を持つ個体を中間体 L (Intermediate L) とした。集団レベルでは中間体 H (Intermediate H) が含まれる集団を複合型 (Complex) 集団とした。アズキからヤブツルアズキ集団への遺伝子移行を明らかにするため、ヤブツルアズキ 611 個体とアズキ 140 個体を合計 23 種類のマイクロサテライトマーカーで解析し、遺伝子型を決定した。その遺伝変異を主座標平面軸へ投射すると、ヤブツルアズキとアズキの間に明らかな遺伝的分化が認められた (図 11)。中間体はヤブツルアズキとアズキの中間的なものから、ヤブツルアズキやアズキに偏ったものまで幅広い変異が認められた。

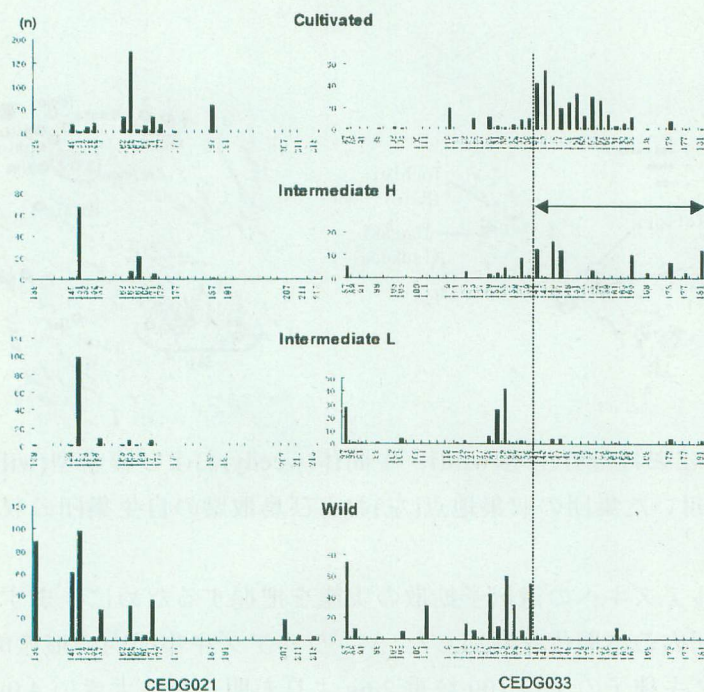


図 12. アズキ(Cultivated)、自生集団の中間体(Intermediate H, L)およびヤブツルアズキ(wild)から検出された CEDG021 座 (左)、CEDG033 座 (右) のマイクロサテライトアレルの頻度分布

また、ヤブツルアズキ、中間体、アズキそれぞれについて得られたアレルデータを比較すると、ほとんどの場合は CEDG021 座のように中間体のアレル分布は野生型の分布と類似し、一部の中間体が栽培種アレルを持つ傾向があった(図 12 左)。なかには、CEDG033 遺伝子座のように栽培種アレルが明らかな遺伝子浸透個体 (Intermediate H) 特異的に検出されるマーカーも認められた(図 12 右)。

全てのマイクロサテライトマーカーの情報を用いて遺伝子浸透個体を判別し、ヤブツルアズキ集団内の遺伝子浸透個体の分布を調査した。集団サイズの大きい鳥取県の集団は畦や水路脇に分布し、遺伝子浸透個体の割合は中程度であった。鳥取県の郡家集団ではヤブツルアズキと判別された個体は広範囲に分布し、その中に遺伝子浸透個体がパッチ状に認められた(図 13 左)。そのような場所では毎年生育期に複数回除草されており、個体あたりの種子生産数や休眠性に関する多様性においては遺伝子浸透個体よりもヤブツルアズキの適応度が高い可能性がある。一方、図中の遺伝子浸透個体が非常に多かった場所はアズキ栽培圃場の枠とヤブツルアズキがほとんど生息しない水路脇で、草刈りは行われていなかった。アズキとヤブツルアズキの雑種当代やその後代に対する草刈りのインパクトは大きく、遺伝子浸透個体の拡散は草刈りのタイミングと頻度によって決定されているかもしれない。さらに 10 年以上の長期にわたって放棄されている水田や畑のなかに分布する鳥取の集団や栃木県の馬頭集団では遺伝子浸透個体の頻度が高かった。栃木県の馬頭集団ではヤブツルアズキと判別された個体の分布域が畦や畦の外側であったのに対し、遺伝子浸透個体は畦だけでなく放棄水田のような加湿環境や放棄畑など初期成育において他雑草との競合が少ない環境に多数認められた(図 13 右)。このように過疎化によって放棄された耕地のような環境下に侵入・定着する能力においては遺伝子浸透個体のほうがヤブツルアズキよりも優れている可能性が考えられる。全サンプルの収集地点の情報を用いて、ヤブツルアズキ集団内および集団間の空間自己相関解析を行った。その結果、集団内の近距離(3m~14m)にある個体間で非常に高い相関($r=0.32$)がみられたが、集団内においても 15m 以上離れると有意な相関はなくなった。この結果から、ヤブツルアズキの種子は主に 15m 以内に散布されと考えられる。

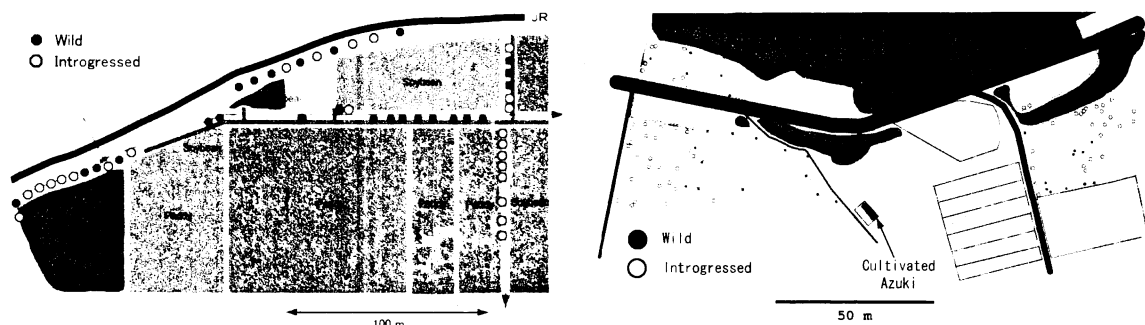


図 13.鳥取県郡家町（左）および栃木県馬頭町（右）のヤブツルアズキ集団内の遺伝子浸透個体の分布

(6) アズキーヤブツルアズキ間およびヤブツルアズキ個体間のお他殖率の推定

現地調査ではクマバチやハキリバチの訪花が頻繁に認められた。これらのハチが花の正面から蜜を吸う時に葯と柱頭が花器から押し出され、頭や脇腹に花粉が付着し、柱頭がこれに接するこ

とから、ヤブツルアズキの遺伝子流動に大きく関わっていると思われる。父性分析による単年度の自然交雑率と近交係数によって求めた自然交雑率は同程度で、ヤブツルアズキ個体間における平均他殖率は約 5%であった。自然交雑は主にヤブツルアズキ集団内の近傍のヤブツルアズキ個体間で生じていた。また、美和集団では 228 粒中 1 粒、群家集団では 303 粒中 1 粒、建部集団では 89 粒中 1 粒がアズキと他殖していること（他殖率 0.48%）が明らかとなった。聞き取り調査からアズキはイネからの転換作物として水田に一時的に栽培されており、連作障害を避けるためにアズキの栽培圃場を毎年移動させることから、アズキとヤブツルアズキとの距離は毎年一定とは考えられない。時には自生集団と栽培種が非常に密接し、栽培種からの遺伝子流動が局所的に増加し、多数の遺伝子浸透個体が発生することもあると考えられる。

そこで開花期が完全に同調した条件でアズキからヤブツルアズキへの距離が自然交雑に及ぼす影響について模擬的試験を行った。農業生物資源研究所圃場においても毎年多数のクマバチがアズキおよびヤブツルアズキに訪花しているのが観察された。事前にヤブツルアズキから得られた 100 粒の種子をマイクロサテライトマーカーで分析したところ、すでに 3% の種子が他の種子増殖用系統と自然交雑していることがわかった。次に、模擬的試験プロットからヤブツルアズキの莢をサンプリングし、800 莢に含まれていた種子をマイクロサテライトマーカーで解析した。しかし、花粉ドナーであったアズキから近傍のヤブツルアズキへの自然交雑は認められなかった。その理由の一つとして、猛暑少雨によって期待していたクマバチの訪花が全く認められなかったことが考えられる。しかし、野生ダイズ圃場に遮られた 25~30m 離れたヤブツルアズキ特性調査圃場の個体（全個体をマーカーで解析済み）との自然交雑（3 莢、0.4%）が認められた（図 14 点線矢印）。この結果は自生地における他殖率よりも低い、アズキからヤブツルアズキへの自然交雑はヤブツルアズキ個体間の自然交雑よりも少ないことが明らかとなった。

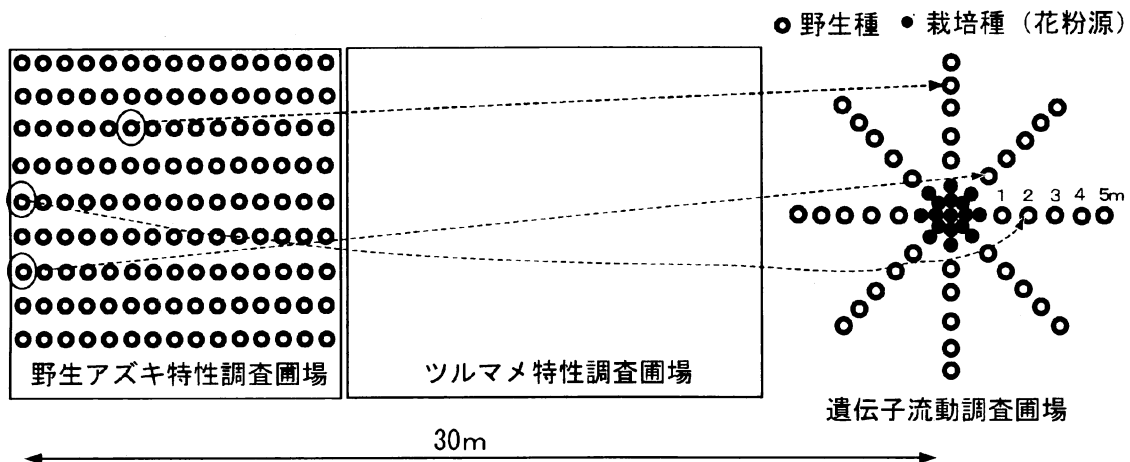


図 14. 遺伝子流動調査圃場の配置と観察された自然交雑（点線）

それらの莢は遺伝子流動調査圃場のアズキとヤブツルアズキの開花最盛期よりもやや遅い時期に開花したものであった。さらに自然交雑が認められた各莢に含まれていた残りの種子（8 粒程度）をマーカーで解析したところ、1 莢内には 2~4 種類の自然交雑種子が含まれ、その花粉源は野生アズキ特性調査圃場の開花期がほぼ同時期のヤブツルアズキであった。遺伝子型から花粉媒介昆虫は各々 3~5m ほど離れた複数の野生種個体を訪花した後、25~

30m飛び、遺伝子流動調査圃場に飛来したことが明らかとなった。送粉昆虫の候補としてはクマバチの代わりに頻繁に観察されたバラハキリバチモドキが考えられる。その訪花行動はクマバチのような連続訪花ではなく、中心にあったアズキを避けるようにヤブツルアズキのプロットをなぞりながら飛び、ほんの数個のヤブツルアズキの花に訪花した後、飛び去るもので、今回得られた自然交雑の形跡と良く一致していた。また、アズキを避けるように飛んでいたのはアズキの草姿がヤブツルアズキとは大きく異なり、花が葉に隠れて見えにくく、花数も少なく、ポリネーターにとっては魅力的でなかったのが原因と思われた。そのため、高頻度の自然交雑が期待できない自殖性植物において栽植間距離が自然交雑に及ぼす影響を調べるには、野生種を花粉源に用いるなど栽培種の草姿による影響を避けたコントロール試験も同時に行うことや、遠隔圃場に花粉源を設けるなどの工夫が必要と思われる。また、25～30m離れた場所からの送粉や花粉の持越しが認められたことから、訪花頻度の低い訪花昆虫ではその広い行動範囲に送粉される可能性が高い。

5. 本研究により得られた成果

1. 近年栽培されているダイズからツルマメへの遺伝子浸透評価が可能なマイクロサテライトマーカーを開発し、ダイズ由来の遺伝子が残存しているツルマメ個体を検出できるようになった。
2. ツルマメ集団内に見つかった中間体はダイズとツルマメの自然交雑によって生じたF₁雑種や交雑後代であった。経年調査から自生地では消滅する傾向にあり、雑種から周囲のツルマメにダイズ遺伝子が二次的に拡散した証拠は得られなかった。
3. 日本各地におけるツルマメ個体間のお他殖率はダイズーツルマメ間のお他殖率よりも明らかに高く、ダイズ遺伝子が一旦ツルマメ集団に移行すると、ダイズとツルマメの雑種が生じる確率よりも高い確率で、ツルマメ集団に取り込まれる可能性にも注意すべきことが示唆された。
4. 同一遺伝子型をもつツルマメの個体が100mから12.4km離れた集団間で見つかったことや、空間自己相関解析において強い相関が400mまで続いていたことから、ツルマメの種子は最大12.4km移動し、400m程度までの移動は稀ではないことが明らかとなった。
5. アズキからヤブツルアズキへの遺伝子浸透評価が可能なマイクロサテライトマーカーを開発し、アズキ由来の遺伝子が残存しているヤブツルアズキ個体の分布が明らかになった。
6. 自生集団にはアズキとヤブツルアズキとの形態的中间体が頻繁に認められた。中间体の一部は近年遺伝子浸透したもので、半耕地化した環境に優先的に拡散・繁殖する傾向が認められた。
7. アズキからヤブツルアズキへの他殖率はヤブツルアズキ個体間よりも低いことが明らかとなった。

6. 引用文献

- Choi IY, Kang JH, Song HS, Kim NS (1999) Genetic diversity measured by simple sequence repeat variations among the wild soybean, *Glycine soja*, collected along the riverside of five major rivers in Korea. *Genes and Genetic Systems* 74, 169-177.

- Ellstrand NC (2003) Dangerous Liaisons? When cultivated plants mate with their wild relatives. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Kiang YI, Chiang YC, Kaizuma N. (1992) Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate prefecture, Japan. The Journal of Heredity 83, 325-329.
- Nakayama Y, Yamaguchi H (2002) Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. soja) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. max) in a designed population. Weed Biology and Management 2, 25-30.
- Tomooka N, A. Kaga, D. A. Vaughan, N. Kobayashi, T. Yoshida, T. Nobori, T. Komatsuzaki, M. Akiba, T. Omizu, T. Taguchi, B. Pickersgill. (2001) Monitoring and collecting of the azuki bean complex (*Vigna angularis*) genepool in Tottori, Okayama, Ibaraki and Tochigi prefectures, Japan, 2000, Annual report on exploration and introduction of plant genetic resources, NIAR, 17, 17-32
- Oka HI (1983) Genetic control of regenerating success in semi-natural conditions observed among lines derived from a cultivated x wild soybean hybrid. Journal of Applied Ecology 20, 937-949.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Updated from Goudet (1995).
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945-959.
- Peakall R, Smouse PE (2001) GenAlEx V5; Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia.
- Ritland K (2002) Extension of models for the estimation of mating systems using in independent loci. Heredity, 88, 221-228
- Rohlf FJ (2000) NTSys pc, Version 2.02j, Exeter Software, Setauket, New York.
- Weir BS (1996) Methods for Discrete Population Genetic Data. In: Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- 赤塚清蔵・吉山武敏(1960) 飼料草としての在来野草に関する研究 第IV報 本邦産ツルマメの作物学的特性について. 関東東山農業試験場研究報告第15号, 57-73.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項は無い。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- ①X. X. Zong, A. Kaga, N. Tomooka, X. W. Wang, O. K. Han and D. Vaughan: Genome 46, 647-658 (2003)

- “The genetic diversity of the *Vigna angularis* complex in Asia”
- ②X. W. Wang, A. Kaga, N. Tomooka and D. A. Vaughan: Theor. Appl. Genet. 109, 352-360 (2004)
 “The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]”
- ③O. K. Han, A. Kaga, T. Isemura, X. W. Wang, N. Tomooka, D. A. Vaughan: Theor. Appl. Genet. 111, 1278-1287 (2005)
 “A genetic linkage map for azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi]”
- ④A. Kaga, D. A. Vaughan and N. Tomooka. In H. Lörz and G. Wenzel (eds.) Molecular markers in plant breeding and crop improvement. Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 55. Springer Verlag, Hiedelberg, Germany pp. 171-187 (2004)
 “Molecular markers in plant breeding and crop improvement of *Vigna*”
- ⑤D. A. Vaughan, N. Tomooka and A. Kaga. Chapter 11 in Singh, R. J. and Jauhar, P. P. (eds.) Genetic Resources, chromosome engineering, and crop improvement. Grain legumes. CRC Press, Boca Raton, FL page 341-353 (2005).
 “Azuki bean”.
- ⑥Y. Kuroda, A. Kaga, N. Tomooka, D. A. Vaughan: Molecular Ecology, 15, 959-974 (2006)
 “Population genetic structure of Japanese wild soybean (*Glycine soja*) based on microsatellite variation”

＜その他誌上発表（査読なし）＞

- ①A. Kaga, D. A. Vaughan and N. Tomooka: Conservation and use of wild relatives of crops. (Jayasuriya A. H. M. and D. A. Vaughan eds.), Perideniya, Sri Lanka, 111-120 (2003)
 “The *Vigna angularis* complex as a model for legume research, Conservation and use of wild relatives of crops”
- ②Weerasekrama, D., X. W. Wang, X. X. Zong, O. K. Han, T. Taguchi, H. Tomiyama, A. Kaga, N. Tomooka and D. A. Vaughan: Conservation and use of wild relatives of crops. (Jayasuriya A. H. M. and D. A. Vaughan eds.), Perideniya, Sri Lanka, 111-120 (2003)
 “Monitoring and analysis of *Vigna angularis* complex populations at Batou, Tochigi Prefecture, Conservation and use of wild relatives of crops.”
- ③A. Kaga, O. K. Han, S. Hirashima, P. Saravankumar, H. M. P. S. Kumari, G. Miranda - Jonson, N. Tomooka and D. A. Vaughan: 植物遺伝資源探索導入調査報告書, 20, 61-74 (2004)
 “Collecting and monitoring of the azuki bean (*Vigna angularis*) complex populations in Tottori prefecture, Japan”.
- ④加賀秋人、友岡憲彦、Ugen Phuntsho、黒田洋輔、小林伸哉、伊勢村武久、Miranda-Jonson Gilda、D. A. Vaughan: 植物遺伝資源探索導入調査報告書, 21, 59-71 (2005)
 “野生ダイズと栽培ダイズとの自然交雑集団の探索と収集－秋田県および広島県における調査－”、
- ⑤黒田洋輔、加賀秋人、Anna Apa、D. A. Vaughan、友岡憲彦、矢野博、松岡伸之: 植物遺伝

資源探索導入調査報告書, 21, 73-95 (2005)

“野生ダイズ、栽培ダイズおよび両種の自然交雑集団の探索、収集とモニタリングー秋田県、茨城県、愛知県、広島県、佐賀県における現地調査からー”.

(2) 口頭発表 (学会)

- ①加賀秋人, X. W. Wang, O. K. Han, G. J. Miranda, 柏葉晃一、友岡憲彦, D. Vaughan: 第 103 回日本育種学会 (2003)

「SSR マーカーを用いたアズキ栽培ー雑草ー野生複合の解析. 2. 栽培種から自生集団への遺伝子浸透」

- ②G. J. Miranda, A. Kaga, N. Tomooka and D. A. Vaughan: Plant and Animal Genomes XII Conference, San Diego, USA (2004)

“Gene introgression into a natural population of *Vigna angularis*” (アブストラクト提出済み)

- ③G. J. Miranda, 加賀秋人, O. K. Han, 伊勢村武久, N. S. Bautista, P. L. Sanchez, 友岡憲彦, D. A. Vaughan, 第 104 回日本育種学会 (2003)

「SSR マーカーを用いたアズキ栽培ー雑草ー野生複合の解析. 3. 自生集団の遺伝構造から見た遺伝子浸透」

- ④G. J. Miranda, 加賀秋人, O. K. Han, 伊勢村武久, N. S. Bautista, P. L. Sanchez, 友岡憲彦, D. A. Vaughan: 第 105 回日本育種学会 (2004)

「SSR マーカーを用いたアズキ栽培ー雑草ー野生複合の解析. 4. 鳥取県の自生集団における遺伝子浸透」

- ⑤G. Jonson-Miranda, A. Kaga, N. Tomooka, D. A. Vaughan: International Rice Genome meeting, Tsukuba, Japan 2005

“Gene introgression into natural populations of *Vigna angularis*.” (アブストラクト提出済み)

- ⑥加賀秋人, Gilda Miranda-Jonson, 伊勢村武久, 友岡憲彦, D. A. Vaughan: 日本育種学会第 106 回講演会 (2004)

「SSR マーカーを用いたアズキ栽培ー雑草ー野生複合の解析. 4. アズキ栽培種の遺伝的多様性」.

- ⑦伊勢村武久, 加賀秋人, 友岡憲彦, D. A. Vaughan: 日本育種学会第 106 回講演会 (2004)

「国内産アズキ栽培種と野生種との雑種集団を用いた SSR マーカー連鎖地図の作成」

- ⑧A. Kaga, Y. Kuroda, Y. Tabei, T. Isemura, N. Tomooka, D. A. Vaughan, H. Saji, R. Ohsawa, H. Yano, Y. Takada: 10th International Congress of SABRAO, Tsukuba, Japan, 2005

“Studies on the fitness of wild/cultivated soybean hybrids in Japan” (アブストラクト提出済み)

- ⑨T. Isemura, A. Kaga, N. Tomooka and D. A. Vaughan: 10th International Congress of SABRAO, Tsukuba, Japan, 2005

“Comparison of QTL for domestication related traits in two azuki bean populations” (アブストラクト提出済み)

⑩D. A. Vaughan, A. Kaga, N. Tomooka, Y. Kuroda and T. Isemura: 10th International Congress of SABRAO, Tsukuba, Japan, 2005

“Research and conservation on the Azuki bean and Soybean crop complexes” (アブストラクト提出済み)

⑪加賀秋人、黒田洋輔、友岡憲彦、Anna Apa、松岡伸之、矢野博、Duncan A. Vaughan: 日本育種学会第 107、108 回講演会 (2005)

「日本国内におけるツルマメとダイズの自然交雑集団の同定」

⑫黒田洋輔、加賀秋人、友岡憲彦、D. A. Vaughan、伊勢村武久、Paulino L. Sanchez、Bubpa Chaitieng: 日本育種学会第 107、108 回講演会 (2005)

「SSR 多型からみた日本における野性ダイズ (*Glycine soja*) の集団遺伝構造」

⑬伊勢村武久、加賀秋人、友岡憲彦、D. A. Vaughan: 日本育種学会第 107、108 回講演会 (2005)

「国内産アズキ栽培種と野生種との交雑集団を用いたアズキ栽培化関連形質の QTL 解析」

⑭黒田洋輔、加賀秋人、友岡憲彦、D. A. Vaughan: 日本熱帯農業学会第 98 回講演会 口頭発表 (2005)

「栽培ダイズから野性ダイズへの遺伝子流動」

⑮黒田洋輔、加賀秋人、友岡憲彦、D. A. Vaughan: 日本育種学会第 109 回 (2006)

「野生ダイズ (*G. soja*) の花粉、種子の拡散と空間遺伝構造」

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

これまで農林水産省の遺伝子組換えダイズの生物多様性影響評価検討会において本研究の進捗状況や今後の計画等の説明資料を提供した。本研究によって得られた自生地におけるダイズとツルマメの雑種形成に関する新しい情報は組換え遺伝子の定量的拡散リスク評価方法の開発に活用され、それを通じた遺伝子組換えダイズの安全性評価といった点で政策的な寄与ができると期待される。