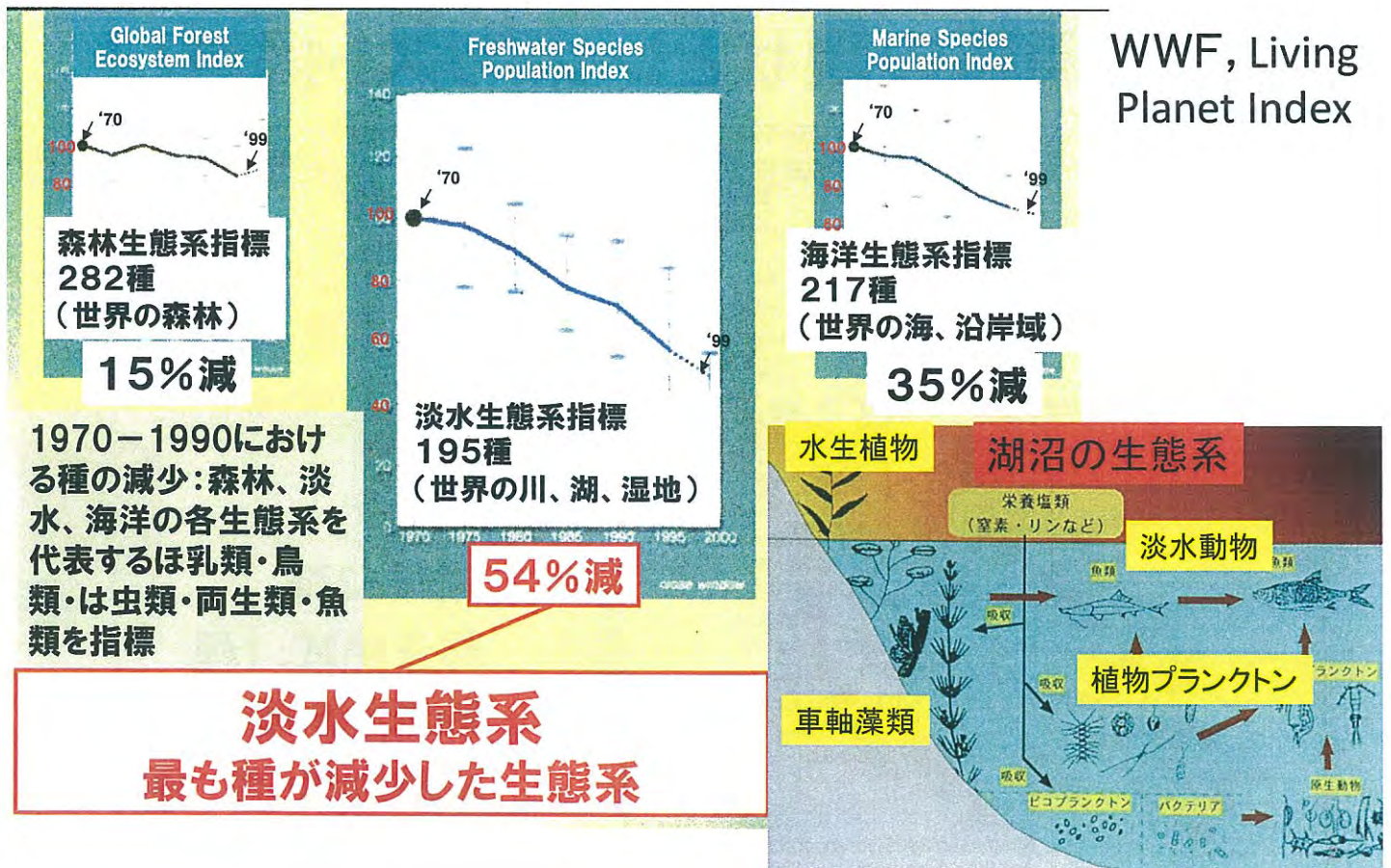


絶滅危惧種の多様性情報学と域外保全 技術開発:車軸藻類を例に

神戸大学・大学院理学研究科
 生物学専攻・生物多様性講座・講師
 坂山 英俊

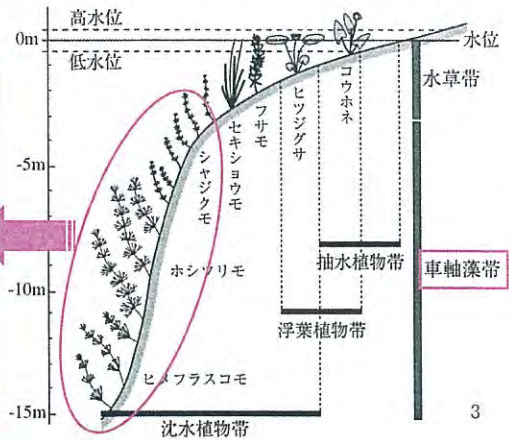
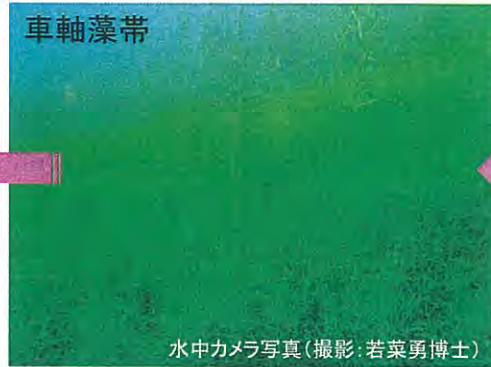
絶滅危惧藻類の多くをしめる車軸藻の様々な種



車軸藻類の生育場所と役割

- ①底泥に堆積した懸濁物を覆い、再懸濁を抑制
- ②多様な水生動物の生息場となり、植物プランクトンの捕食圧を高める
- ③カルシウムとともに栄養塩類を沈着し、植物プランクトンの増殖を抑制

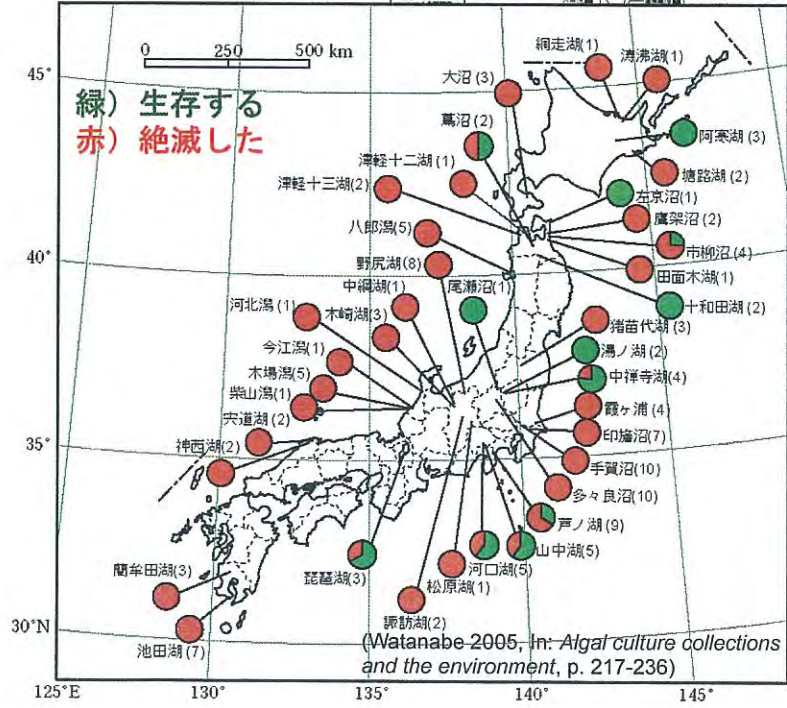
車軸藻



車軸藻類の現状とレッドリスト掲載種

環境 地域から地球へ

急速に姿消すシャジクモ類
湖沼の汚染を反映



全種数: 約80種

レッドリスト掲載種: 67種

(環境省版レッドリスト, 2012)

- 絶滅: 3種
- 野生絶滅: 1種
- 絶滅危惧I類: 58種
- 絶滅危惧II類: 1種
- 情報不足: 4種



絶滅危惧種、車軸藻類の保全へ

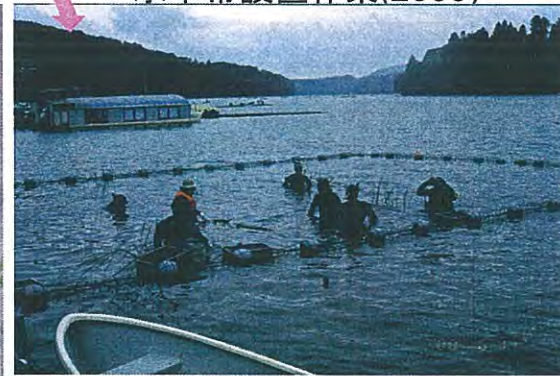
- 車軸藻類は湖沼の生態系を透明度が高く(きれいに)、生物多様性を高い状態(多種多様な生物が生育・生息)に保つために重要な生物(キーストン種)。
- 車軸藻の保全のためにどんな研究・施策が必要なのか。

5

保全策の実例①: 野尻湖のホシツリモ

大阪医科大学岩崎尚彦研究室

水草帯設置作業(2000)



住民による湖岸部移行帯の造成と植栽(2005)

ホシツリモと水草
復元のための活動
が始まる



保存株として域外保全することが有効

保全策の実例②: 室内培養保存

国立環境研究所

和名	学名	保存株数
オーストラリアシャジクモ	<i>Chara australis</i>	1
● シャジクモ	<i>C. braunii</i>	10
● イトシャジクモ類	<i>C. fibrosa</i> species complex	1
● カタシャジクモ	<i>C. globularis</i>	5
● ハダシシャジクモ	<i>C. zeylanica</i>	1
● シャジクモ属未定種	<i>Chara</i> spp	3
● シラタマモ	<i>Lamprothamnium succinctum</i>	1
● トガリフラスコモ類	<i>Nitella acuminata</i>	1
● ミルフラスコモ	<i>N. axilliformis</i>	2
● ジュズフサフラスコモ	<i>N. comptonii</i>	3
● ヒメフラスコモ	<i>N. flexilis</i>	4
● フタマタフラスコモ	<i>N. frucata</i>	5
● キヌフラスコモ	<i>N. gracilens</i>	4
● オトメフラスコモ	<i>N. hyalina</i>	1
● ニッポンフラスコモ	<i>N. japonica</i>	3
● セイロンフラスコモ	<i>N. megaspora</i>	2
● ミノリノフラスコモ	<i>N. mirabilis</i>	1
● モリオカフラスコモ	<i>N. moriokae</i>	2
● ハデフラスコモ	<i>N. pulchella</i>	1
● フラスコモ属未定種	<i>Nitella</i> spp	2
● ホシツリモ	<i>Nitelopsis obtusa</i>	2
合計	19種	55 株

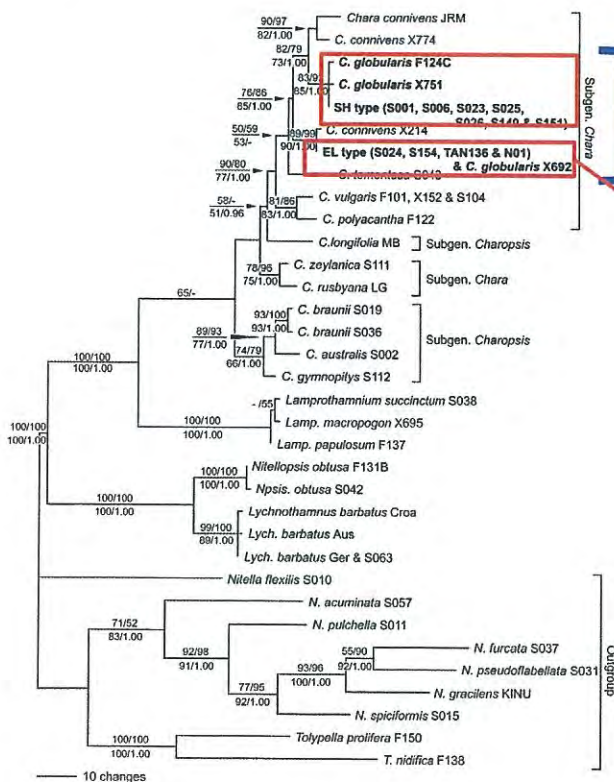


● 絶滅危惧種13分類群
● 日本固有種4分類分

保存株数が不十分。培養スペース、維持管理スタッフ数に限界。

参考：日本産車軸藻74分類群，今堀(1954)67分類群，Kasaki(1964)31分類群，環境庁絶滅危惧種(2000)30分類群

車軸藻類における分類学的問題の実例



Lumping = 複数の種を1種として誤ってひとまとめにしてしまうこと
(その逆はSplittingという)

Chara leptospora (新種)



分類体系はImahori (1954), Kasaki (1964), Wood (1965)に基づく

(Sakayama et al. 2009, J. Phycol. 45: 917-927)

本研究が目指すこと

- 保全単位の決定に必要な情報基盤作成
DNAバーコードを活用した種同定支援システムを構築
詳細な遺伝的多様性を把握できるDNAバーコード/
マーカーを新規開発
(DNAバーコーディング: マーカーを広範囲で標準化し、生物の同定と種の多様性管理を行うツール)
- 域外保全: 凍結保存技術を新規開発(経代培養より少スペース、低コスト)
- 将来: 保護管理の意思決定を支援
(長期的に情報基盤と凍結保存リソースの活用へ展開)

車軸藻類のDNAバーコーディング

73,388 EST, 3,285 Contig



新規開発

- 種レベルのDNAバーコード
葉緑体 *rbcl*, *matK*
(陸上植物で標準化されているマーカー;
Sakayama et al. 2005, 2008等で実証済み)
- 集団/個体(ジェネット)レベルのDNA
バーコード

核ITS領域は情報量不足(Sakayama et al. 2008)、葉緑体イントロン配列も情報量不足(Kato, Sakayama et al. 2009, 坂山 未発表)

進化速度が速いDNA領域を探索

EST-SSR¹マーカー開発
(or AFLP²法, RAPD³法)

(総説: Rajeev et al. 2005, Trends in Biotechnol. 23: 48-55; Bouck & Vision 2007, Mol. Ecol. 16: 907-924)

¹EST-SSR (Expressed sequence tag - simple sequence repeat) = EST配列上に存在する単純反復配列
²AFLP (Amplified fragment length polymorphism)
³RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)

琵琶湖で発見されたホシツリモの断片
(環境省希少動植物種保存推進員の須賀英文さん提供)



西日本で初
絶滅危惧種

日本では現在、山梨県の河口湖でしか自生が確認されていない絶滅危惧種の藻類「ホシツリモ」が琵琶湖で発見された。水資源機構琵琶湖開発総合管理所(大津市)が5日発表した。西日本で見つかったのは初めて。透明度が高い湖しか成長できず、研究者

ホシツリモ
琵琶湖で発見

水質改善を証明



は「琵琶湖の水質改善を証明している」と指摘している。ホシツリモはヨーロッパからアジアにかけて分布し、大型湖沼で生育。最大で数センチにもなる。日本では1950年代に河口湖や芦ノ湖(神奈川県)、山中湖(山梨県)、野尻湖(長野県)で分布を確認。その後水質悪化で絶滅したとみられていたが、2003年に河口湖で再び確認された。昨年7月に同管理所が沈水植物を調査した際、高島市新旭町沖の水深30センチでホシツリモとみられる藻類を発見し

きれいな湖沼でしか育たず、国内では山梨県の河口湖でしか自生していないとされた絶滅危惧種の藻の一種「ホシツリモ」が琵琶湖(滋賀県)の北湖西岸に、水草に交じって群生していることが神戸大学の研究チームの調査で分かった。南部の一部水域では水質悪化に悩む琵琶湖だが、北部では清らかな水環境が保たれていることを示している。9月に兵庫県内である日本植物学会で発表する。

琵琶湖に「清湖」の藻

絶滅危惧種
ホシツリモ
神戸大学大学院研究科の加藤博士(博士課程2年)と環境学博士の佐藤俊彦(博士課程1年)の研究チームが琵琶湖(滋賀県)の北湖西岸に、水草に交じって群生していることが神戸大学の研究チームの調査で分かった。南部の一部水域では水質悪化に悩む琵琶湖だが、北部では清らかな水環境が保たれていることを示している。9月に兵庫県内である日本植物学会で発表する。

神戸大 北湖西岸に群生確認

どの湖沼でしか見つからず、片が見つかり、研究チームは「琵琶湖は『清湖』であらう。いずれも一九九九年に琵琶湖の二日町、滋賀県高島市沖で調査し、水深二メートル、透明度が二・八メートル四方の好ホシツリモが群生する湖沼で確認された。二〇〇三年に河口湖で再び見つかった。琵琶湖では現在、ホシツリモとみられる断片が分譲されるシャシク湖に群生していることが確認された。昨年七月、琵琶湖で初めてホシツリモとみられる断片が分譲されるシャシク湖に群生していることが確認された。昨年七月、琵琶湖で初めてホシツリモとみられる断片が分譲されるシャシク湖に群生していることが確認された。

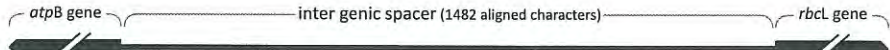
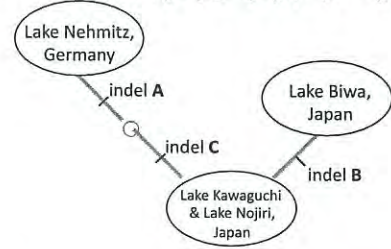
(Phycological Research投稿中)

野外調査結果

- H24年度: 総標本数715 records, 162集団
- H23年度: 総標本数501 records, 187集団

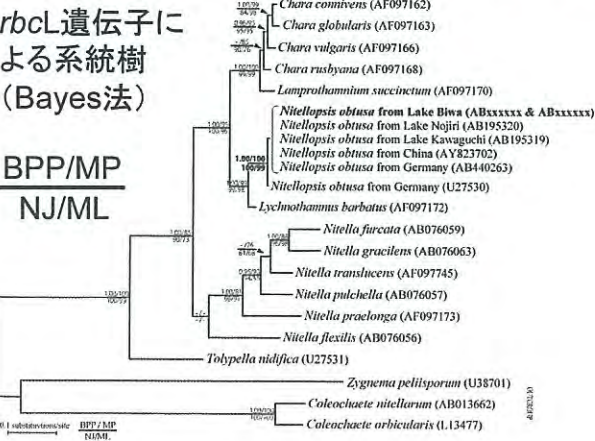
日本産ホシツリモのDNAバーコーディング

atpB-rbcL IGSによる
ハプロタイプネットワーク樹



Lake Biwa, Japan (Abxxxxxxx, ABxxxxxxx) TATCATATATATTATTATATATATATACACTATATAACATCTATATA
 Lake Kawaguchi, Japan (ABxxxxxxx) TATCATATATATTATTATATATATATACACTATATAACATCTATATA
 Lake Nojiri, Japan (ABxxxxxxx) TATCATATATATTATTATATATATATACACTATATAACATCTATATA
 Lake Nehmitz, Germany (Abxxxxxxx) TATCATATATATTATTATATATATA--CACTATATAACATCTATATA
 indel A

Lake Biwa, Japan (Abxxxxxxx, ABxxxxxxx) GAATATAATAATTATTGAATATAATAATTATTATTATTATTATTATTAT-----TATATTATTAAATATTATA
 Lake Kawaguchi, Japan (ABxxxxxxx) GAATATAATAATTATT-----TATATTATTAAATATTATA
 Lake Nojiri, Japan (ABxxxxxxx) GAATATAATAATTATT-----TATATTATTAAATATTATA
 Lake Nehmitz, Germany (Abxxxxxxx) GAATATAATAATTATT-----TATAATTATTATTATTATTAAATATTATA
 indel B indel C

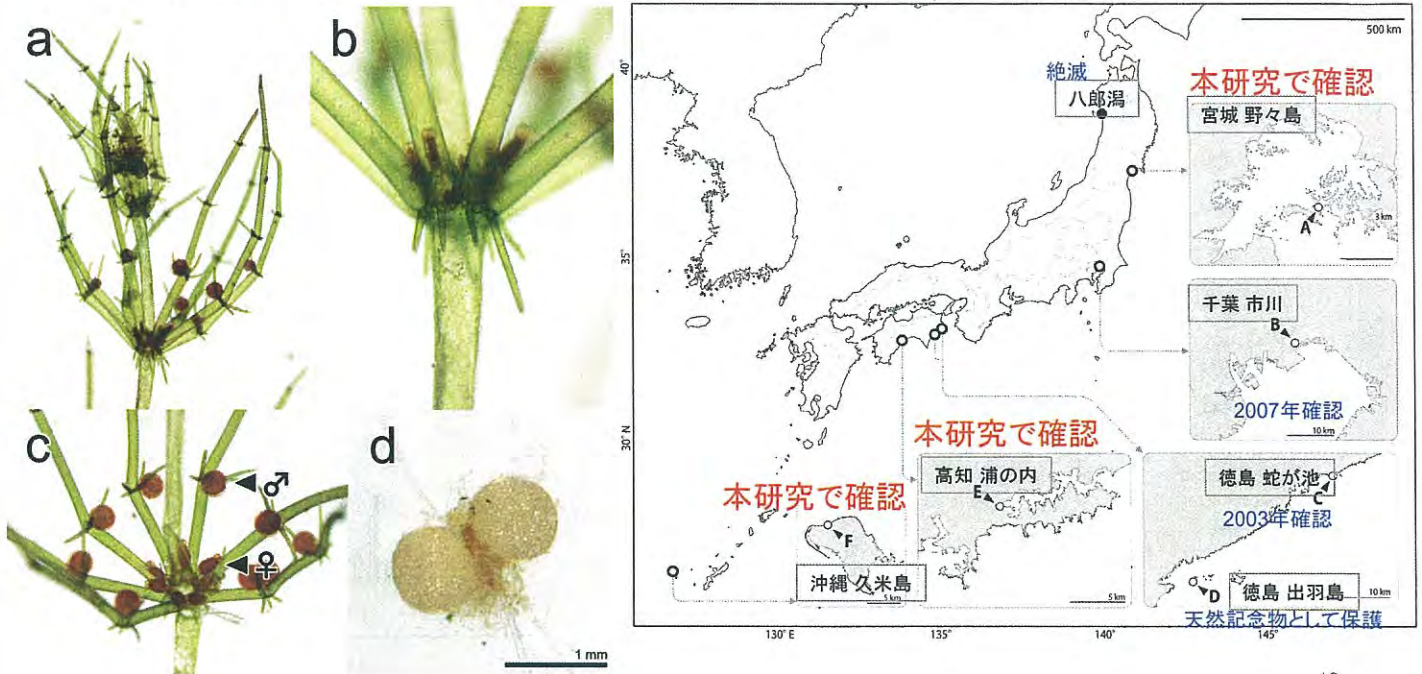


- 日本において、琵琶湖集団は、他の山岳湖沼集団とは別起源の可能性が示唆された
- 独立した保全単位である

日本における天然記念物シラタマモの分布

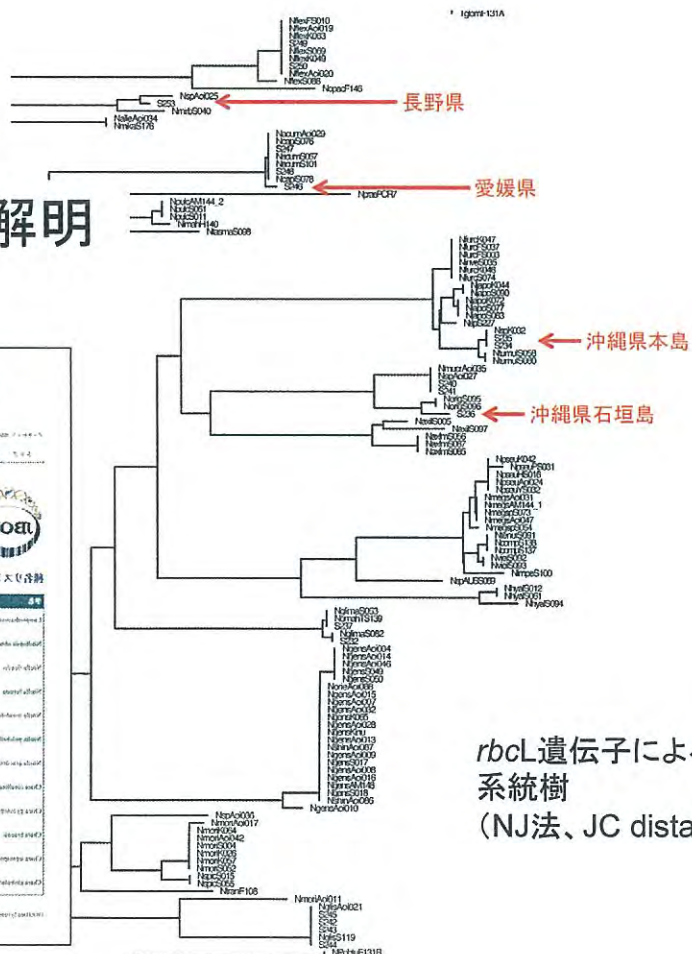
• *rbcl*, *matK*, *atpB-rbcl* IGSの配列は全て同一

(投稿準備中)



新規系統の発見

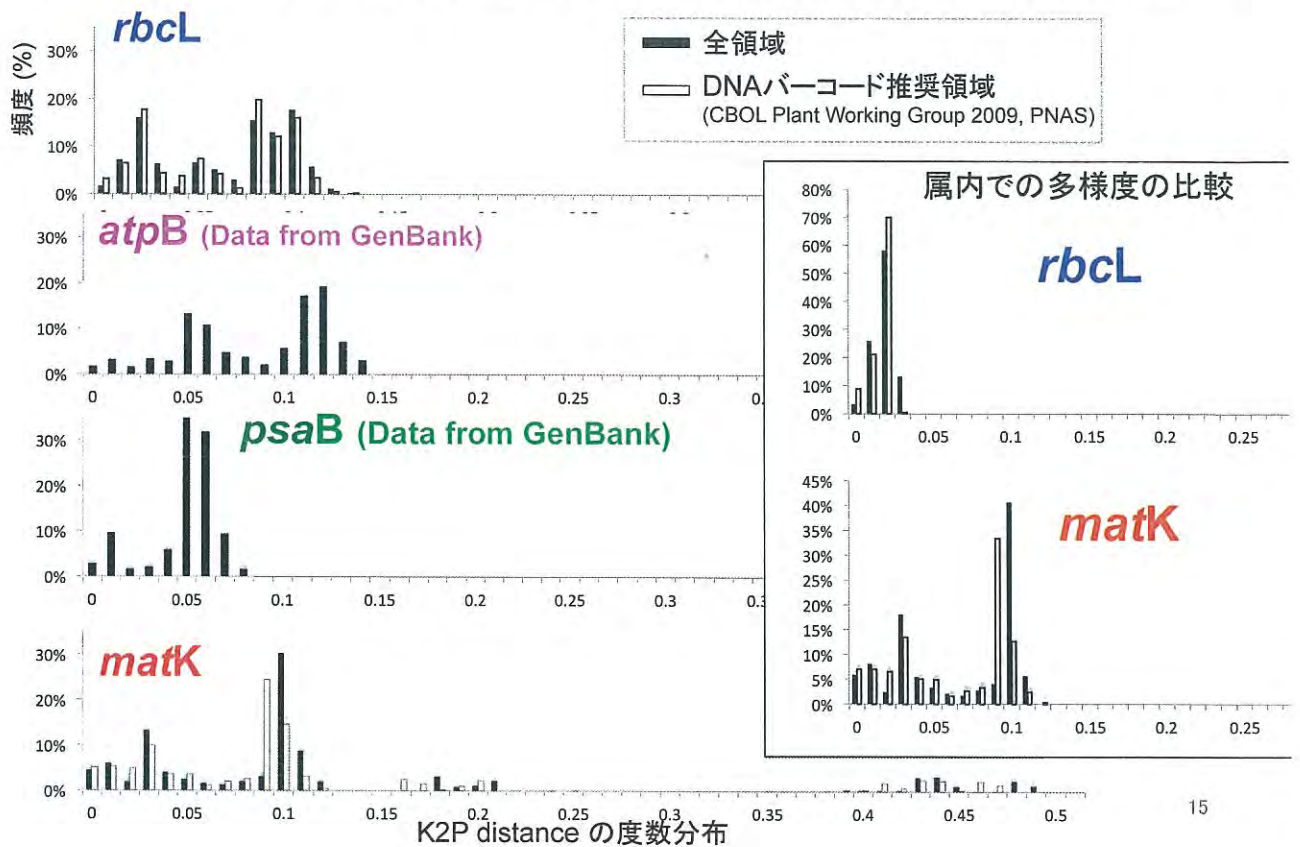
• 分類学的位置づけの解明が必要



rbcl 遺伝子による
系統樹
(NJ法、JC distance)

標本情報・種情報のデータベース入力

シャジクモ目内での*rbcl*遺伝子と他の遺伝子領域の多様度の比較



EST-SSRマーカー開発

- 使用データ: *Chara braunii* CH90株のEST
- SSR領域探索: MISA (MicroSatellite identification tool)
- EST 3,285 contig から2~3塩基モチーフのSSRを抽出
- 248領域を抽出
- 全てのプライマーを設計: Primer3
- 系統が異なる8サンプル(集団)でPCR増幅し、各SSR領域における多型を網羅的にスクリーニング
- 現時点で 248領域中71 領域スクリーニング済み

シーケンサーによるアリル決定と多型性の確認

系統が異なる8株(異なる地域集団)を用いてスクリーニングしたSSRマーカーと多型性

2塩基モチーフのSSR (12遺伝子座)				3塩基モチーフのSSR (20遺伝子座)			
Locus	Repeat motif	Allele size range (bp)	<i>N_a</i>	Locus	Repeat motif	Allele size range (bp)	<i>N_a</i>
Di002	(GA) _n	194-216	3	Tri002	(TCT) _n	155-176	5
Di003	(CT) _n	260-278	3	Tri003	(GAG) _n	199-211	2
Di011	(TC) _n	294-298	3	Tri004	(TGC) _n	270-297	5
Di015	(CT) _n	204-224	3	Tri006	(TCT) _n	155-188	6
Di017	(CT) _n	265-342	5	Tri007	(GAG) _n	199-211	4
Di021	(AG) _n	187-269	7	Tri008	(TCA) _n	209-218	3
Di022	(TC) _n	250-380	8	Tri009	(AGG) _n	261-270	4
Di023	(CT) _n	203-217	4	Tri010	(CTC) _n	266-272	2
Di027	(TC) _n	267-340	4	Tri012	(GGA) _n	289-298	4
Di029	(GA) _n	171-197	3	Tri013	(GAG) _n	262-271	2
Di031	(GA) _n	161-171	5	Tri014	(TCT) _n	143-156	5
Di033	(CA) _n	268-284	5	Tri015	(AAG) _n	146-166	5
mean			4.42	Tri016	(CTT) _n	188-217	5
SD			1.68	Tri017	(GAA) _n	193-198	2
<i>N_a</i> : number of observed allele (観測アリル数; 個)				Tri018	(AGA) _n	259-264	3
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> 系統が異なる8株を用いて、72遺伝子座の有用性を調査した結果、32遺伝子座が安定的にPCR増幅とアリル決定が可能であった(平均アリル数 4.0個) </div>				Tri020	(GAA) _n	290-300	4
				Tri027	(ATG) _n	203-219	4
				Tri031	(CTT) _n	219-235	4
				Tri033	(TCA) _n	250-259	4
				Tri036	(AGG) _n	285-288	2
				mean			3.75
				SD			1.25

17

集団レベルの多型性の確認

河口湖集団16個体を用いた13遺伝子座の多型性

Locus	Repeat motif	Allele size range (bp)	<i>N_a</i>
Di002	(GA) _n	194-216	8
Di003	(CT) _n	260-278	5
Di011	(TC) _n	294-298	2
Di015	(CT) _n	204-224	5
Tri002	(TCT) _n	155-176	6
Tri003	(GAG) _n	199-211	1
Tri004	(TGC) _n	270-297	1
Tri006	(TCT) _n	155-188	6
Tri007	(GAG) _n	199-211	3
Tri008	(TCA) _n	209-218	2
Tri009	(AGG) _n	261-270	1
Tri010	(CTC) _n	266-272	2
Tri012	(GGA) _n	289-298	3
mean			3.46
SD			2.30

集団内レベル(河口湖集団16個体)で、この13遺伝子座の多型性を確認した結果、10遺伝子座で多型性を示した(平均アリル数 3.6個)。

集団/個体レベルの識別に利用可能なレベル

18

凍結保存技術開発

•自然サンプル中の卵胞子

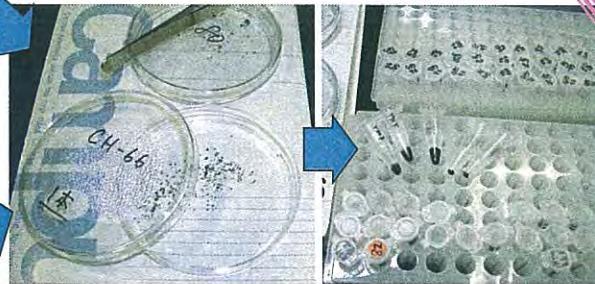


•栄養繁殖器官(ムカゴ)



保冷剤を加え、プログラムフリーザーを用いた2段階凍結法により凍結させる。

•培養株中の卵胞子



•シャーレに成熟卵胞子を回収

•エッペンチューブで次亜塩素酸ナトリウム処理

(Day et al. 2008, Molecular Biomethods Handbook, 2nd Ed., pp. 915-945; 笠井ら 2009, NIESコレクション保存株リスト 第8版. 国立環境研究所微生物系統保存株評価委員会)

凍結した接合子サンプル・ムカゴサンプルを、培地にまき、発芽率と生長率を計測する。



19

卵胞子凍結保存条件と発芽率



凍結処理後発芽サンプル

予備実験

	乾燥(常温)	滅菌処理	凍結	凍結防護剤 10%DMSO	ヒートショック処理	発芽率
条件A(control)	-	-	-	-	+	3% (n=600)
条件B	+	-	-	-	+	1.5% (n=600)
条件C	+	-	+	-	+	1% (n=600)
条件D	-	-	+	+	+	0% (n=600)
条件E	-	+	-	-	+	0% (n=300)
条件F	+	+	-	-	+	1.3% (n=300)
条件G	+	+	+	-	+	0.7% (n=300)
条件H	-	+	+	+	+	0.3% (n=300)

発芽条件を再検討(生育地の土を使用)

	乾燥(常温)	滅菌処理	凍結	凍結防護剤 10%DMSO	ヒートショック処理	発芽率
条件B (control)	+	-	-	-	+	25-52.5% (n=600)
条件C	+	-	+	-	+	21.5-23.5% (n=600)

+ は処理を行ったこと、- は未処理を示す。

研究のまとめ

- 種同定の実効性を検証(種同定支援システム)

データベースシステムに取得したすべての形態、遺伝子(DNAバーコード)、分布・生態、証拠標本情報を登録し、未同定サンプルのDNAバーコードおよび各種情報をqueryに用いデータベース検索

- 域外保全(凍結保存)技術を確立



- 種ごとの保全範囲の決定、絶滅リスク評価

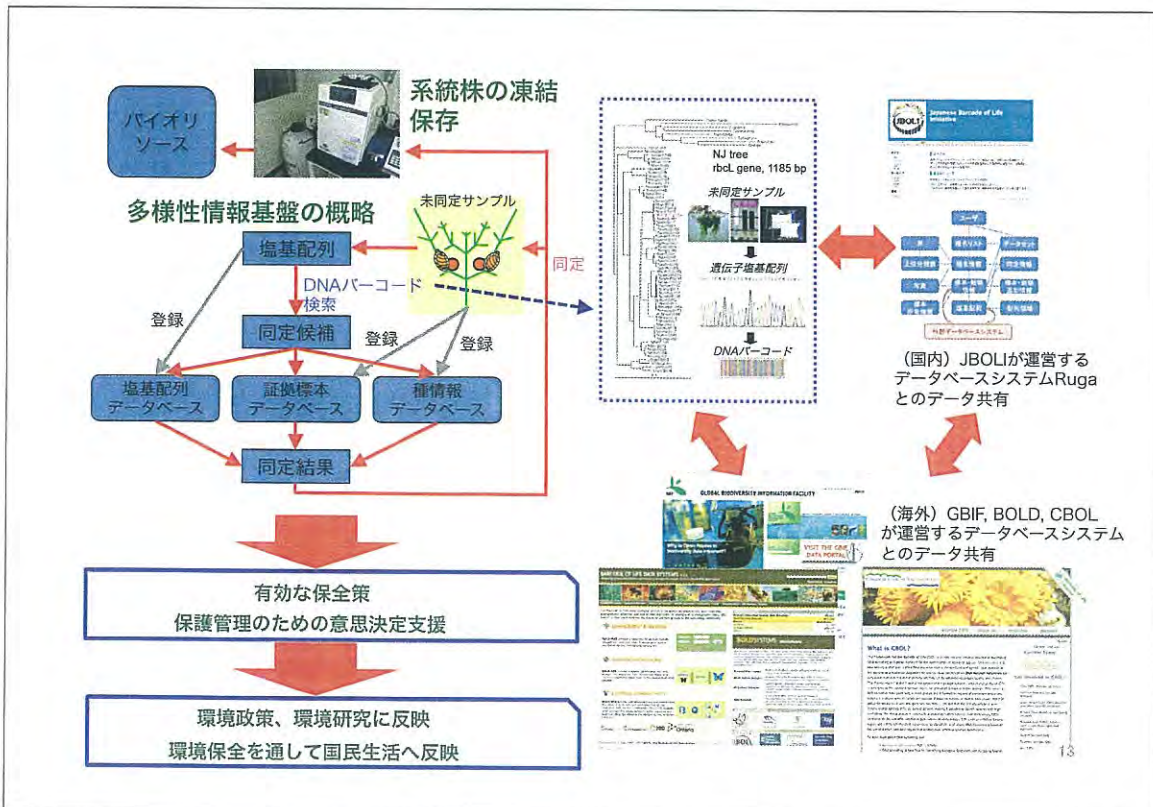
蓄積された遺伝的多様性、残存個体群数、個体群サイズ、環境要因、危機要因などの要素について統計的解析、モデル化

- 環境政策における「保護管理の意思決定」を支援する情報を供給(意思決定支援システム)

保全における優先順位の決定、凍結保存株の生息域内への補完の必要性、など

21

全体のイメージ図



22