

## 異なったランドスケープ構成要素をカバーする大個体群解析のための DNA 解析ツールの整備・開発

井鷲裕司 (広島大学総合科学部)

人為インパクトにさらされている森林生態系の動態、繁殖過程、遺伝構造等を評価する為には、解析対象種の個体群をメタ個体群レベルでとらえるというアプローチに加えて、そのような個体群が異なったランドスケープ構成要素をカバーする形で存在しているという観点が必要である。そして、そのようなレベルの調査を目指す、必然的に、調査プロットは大きく、個体数は多くならざるを得ない。この様な調査地域から得られたサンプルセットの解析に対応するために、以下の DNA 解析の整備・開発を行った。

### (1) 多数のサンプルから効率よく DNA を抽出する

従来遺伝マーカーを用いた集団解析では、サンプル数の上限は DNA で数百、酵素多型で数千といったところであったが、最近では DNA に関しては解析対象サンプル数が一桁上がりつつある。実際、阿武隈においてホオノキで目指している解析でも、繁殖個体だけで 600 程度、稚樹を含めると 1000 を超えるサンプル数となりそうである。このような状況に対処する為、簡便な DNA 抽出プロトコルを工夫した結果、一人で 1 日 (6 時間程度)、100 サンプルの処理ができるようになった。

### (2) 遺伝マーカーの情報量を上げる

マイクロサテライトマーカーを利用すると、繁殖個体集団の中で親でない個体を高い排除確率で除く事ができる。一般に生態学的な研究事例では 5 座程度のマイクロサテライトを解析し、排除確率  $p = 0.999$  程度の情報で親子解析が行われることが多い (実際にはこれより低い排除確率で解析が行われることも少なくない)。ここで注意すべきは、排除確率とは任意の 1 個体を正しく排除する確率であるということである。親候補が 100 個体の場合、その集団全体で正しく解析が行われる確率は  $0.999^{100} = 0.90$  となる。今回のホオノキ個体群のように候補個体数が多いと、 $p = 0.999$  という値であっても集団全体にわたって正しく排除できる確率は  $0.999^{600} = 0.55$  程度にまで低下する。

この様な問題に対処する為、野生植物個体群における親子解析としては最多級のマイクロサテライト 11 遺伝子座に関する多型の評価を行い、より高い排除確率を得た。

### (3) 種子親の直接的解析のため、種皮の遺伝子型決定を行う

ホオノキの種子散布は鳥に依存するため、きわめて広範囲に散布されていると考えられる。稚樹を対象とした親子解析では、親候補を絞り込むことはできても、母親と父親を特定できない。シードトラップ等で採取した種子の種皮から DNA を抽出し、遺伝解析できれば母親を直接的に特定できる。また、この方法では、減数分裂や受精を経ていないため、稚樹を対象とした解析に比べて、より少ない遺伝子座でより確実な判定が可能となる。ホオノキ個体群の断片化を評価する為には鳥散布の実態を知ることが重要である。

ホオノキの種皮から DNA 抽出を試み、マイクロサテライト遺伝子座を PCR で増幅したところ、正常なバンドを確認することができ、種子サンプルからの母親特定が可能であることが明らかになった。

#### (4)花粉 1 粒を対象に複数のマイクロサテライト遺伝子座の解析を行う(世界初！)

ホオノキは、主要なポリネーターとして考えられてきた送粉効率の悪い甲虫以外にも、ハチやアブ等の多様な昆虫によって、送粉がなされていることが明らかになってきた。しかし、これらの昆虫が運ぶ花粉の質の違い、すなわち、花粉移動距離や花粉親の多様性に関しては全く明らかにされていない。花粉の質が送粉者タイプによる花粉の質の違いを明らかにするためには、昆虫の体表面に付着している花粉粒を個々に遺伝解析し、その由来を明らかにすることが有効である。花粉に含まれる DNA を対象とした解析としては、葉緑体 DNA の塩基配列を解読し、系統解析を行った例がある。しかしながら、マイクロサテライトが含まれる核 DNA は花粉粒内に 1 コピーしかないため、そのままでは複数のマイクロサテライト遺伝子座を解析できず、花粉の由来を推定することは困難である。

この問題に対処するため、マイクロチューブ内で花粉 1 粒を破碎した後に、そのゲノム全体を増幅し、その水溶液を PCR のテンプレートとして複数のチューブに分注し、マイクロサテライト遺伝子座の増幅を行ったところ、花粉親と共通する対立遺伝子の増幅が認められ、花粉粒ごとの解析が可能となった。