

# 生物多様性保全に配慮した緑化計画手法について

—小笠原諸島に自生する植物種の遺伝子解析事例—

屋柝下 亮\*<sup>1</sup>・吉岡 俊哉\*<sup>2</sup>

**Keywords :** *biological diversity, conservation, vegetation, genetic analysis, zoysiagrass, Bonin Islands*  
生物多様性, 保全, 緑化, 遺伝子解析, シバ, 小笠原諸島

## 1. はじめに

生物多様性という言葉が広く知られるようになったのは、1992年にリオデジャネイロで開かれた「国連環境開発会議」において「生物多様性条約」が締結されてからである。この条約は、地球上の生物の多様性を包括的に保全することと、持続可能な利用を目的としており、各国に生物多様性保全に関する国家戦略の策定を求めた。それを受けて、日本は2002年に「新・生物多様性国家戦略」を定めた。これに合わせて、日本緑化工学会は、2002年に「生物多様性保全のための緑化植物の取り扱い方に関する提言<sup>1)</sup>」を發表し、その中で、計画地の植生及び地域性に合わせて保全レベルを設け、それに応じて緑化植物の取り扱いを検討するよう提案している。また、今春、日本在来の動植物を侵略する恐れがある外来種の取り扱いを規制する「外来生物種規制法案」が制定され、その附帯決議に「政府や自治体が行う緑化などの対策において、外来生物の使用は避けるよう努め、地域個体群の遺伝的攪乱にも十分配慮すること」が記された。したがって、今後、開発行為に伴う緑化事業において、遺伝子解析技術などを用いながら緑化材料を選定することが求められると思われる。

本報では、生物多様性保全に配慮して緑化事業を行った事例として小笠原南島の植生復元事業の内容を紹介するとともに、植物全般に適用できる遺伝子解析技術の開発に向けて、小笠原固有の植物について解析した結果を報告する。なお、南島の植生復元は共著者である吉岡らが実施し、筆者はシバ属植物の遺伝子解析を担当した。

## 2. 小笠原諸島に自生する植物の特性

小笠原諸島は日本列島南方の太平洋上に散在する大小

30ほどの海洋島で、そのうち小笠原群島は北緯26度30分から北緯28度25分の南北150 kmの間に点在する賀島、父島、母島の3つの列島からなる。小笠原諸島は一度も陸地に接したことがなく、小笠原の植物相は、固有種の割合が非常に高く、気候上あるべき植物種が欠落している、といった海洋島固有の特徴を示す。

また、小笠原群島の植生は19世紀以降に入植した人間の活動と、半野生化したヤギの影響を受けてきた<sup>2)</sup>。父島の南西に位置する無人島の南島においても、戦後まもなく放牧されたヤギの食害と1970年代に始まった島内観光によって多くの植生が破壊され、裸地化した部分から表土が流出している(写真-1)。そのため、南島では2001年より観光客の入島を規制するとともに、土壌浸食・流出防止を兼ねて植生復元事業が行われた。

## 3. 小笠原南島における植生復元事業

### 3.1 植生復元事業の概要

南島の植生復元事業にあたって、広域分布の普通種として南島も含めて小笠原諸島に自生しているシバ属植物(*Zoysia* spp.)の小型種を用いた。シバ属植物は強健なほふく茎によって増殖し、土壌保持力に優れ、粗放管理



写真-1 小笠原南島における土壌流防状況  
Soil erosion on Minami-sima of Bonin islands

\* 1 技術センター建築技術研究所環境研究室

\* 2 緑の風景計画

にも耐えることから、無人島での土壌浸食防止に適した植物種であると判断した。なお、前述した「生物多様性保全のための緑化植物の取り扱い方に関する提言」を参照すると、小笠原諸島は系統保全地域にあたり、外来種の持ち込みだけではなく、在来種を用いる場合でも新たな対立遺伝子座を持ち込まないよう配慮する必要がある。そこで、南島に植栽するシバ系統を選定するために、南島を含む小笠原群島に自生するシバ属植物を収集し、制限酵素断片長多型(RFLP)分析によって遺伝子解析を行った。

先に遺伝子解析の結果を述べるが、南島に自生するシバ系統は固有の対立遺伝子座を有していたため、植生復元を行うにあたって、南島より採取したシバ系統のほふく茎を父島に持ち帰り、栄養繁殖によって増殖した後、南島に植え戻すことで植生復元を進めた。

### 3.2 小笠原南島に自生するシバ属植物の遺伝子解析

#### 3.2.1 材料

東京都による「東京都の野生生物種目録」に火山列島を含む小笠原諸島に分布するシバ属植物として、ノシバ *Zoysia japonica*、コウシュンシバ *Z. matrella* Merrill、コウライシバ *Z. pacifica* (Goudswaard) M. Hotta et S. Kuroki の3種が記載されている<sup>3)</sup>。小笠原南島に自生するシバについては、1) 葉身が内折りになった細い円柱状の形状をしていることと、2) 穂の形態に関する計測結果(表-1)から、コウライシバであると分類した。

南島に自生するコウライシバを遺伝子解析するにあたって、小笠原群島の父島、媒島の異なる2地点、聳島から収集したコウライシバと、対照系統として与那国島に自生するコウライシバおよび石垣島より収集したコウシュンシバ2系統、の計8系統を材料として用いた(表-2)。なお、表-2にコウライシバの形態的特徴として記している type- I、II とは、堀田と黒木<sup>4)</sup> が述べている2種類の生態型、type- I : 10~20cm に直立する、type- II : 草高が10cm以下でマット状に生育する、をそれぞれ表している。

#### 3.2.2 遺伝子解析方法

各供試系統から新鮮重で0.5~1gの茎葉をサンプリングし、2×CTAB法によって全DNAを抽出した。抽出した

表-1 南島に自生するコウライシバの穂の形態  
Morphological characteristics of spike

供試番号	採取地	穂長 (mm)	小穂数 (個/穂)	小穂巾 (mm)	小穂長 (mm)
1	南島	11.0±1.3	7.2±1.0	0.86±0.1	2.35±0.1
7	石垣島-1	13.9±2.6	13.1±2.0	0.9±0.1	2.79±0.2
8	石垣島-2	24.1±2.2	20.8±2.5	0.64±0.1	3.41±0.3

DNAを制限酵素 *Hind* III、*Xba* I で処理し、切断したDNA断片をナイロンフィルターに写し取り、ノシバの核DNAおよびcDNAより作成した7種類のDNAプローブをハイブリダイズした。得られたRFLPプロファイルと比較することによって系統間の類縁関係を解析した。

### 3.3 結果および考察

7種類のプローブを用いることによって、供試8系統より36種類のDNA断片が検出された。そのうち13種類の断片は供試系統間で一致したが、それら以外については種間、系統間で変異が認められた。そのうち、ZG23プローブをハイブリダイズした際に得られたRFLPプロファイルを写真-2に示す。

7種類のプローブによって得られたRFLPプロファイルより系統間の類縁関係を推定するために、2系統間の総当り組み合わせでDNA断片の一致率を算出し、UPG法によって系統樹を作成した(図-3)。得られた系統樹において、供試した8系統は3つのグループに大別された。小笠原群島から収集したコウライシバ5系統が1つのグループを構成し、与那国島から収集されたコウライシバと細葉タイプのコウシュンシバの間でグループが形成され、中葉タイプのコウシュンシバが最も遠縁に位置した。小笠原から収集したコウライシバ5系統については島間で遺伝子型が異なっており、南島の系統においては1種類の固有なDNA断片が検出された。媒島で収集した系統は、同じ列島内に位置する聳島より採取した系統との間で高い類縁性を示したが、南島と近接する父島から採取したコウライシバは他の4系統から最も遠縁に位置した。父島の系統は小笠原貞頼神社前より収集したが、人為的に植えられたとされており、その由来を反映していると考えられる。

以上のことから、小笠原群島に分布するコウライシバは南西諸島に生育する系統と遺伝的に異なること、また、

表-2 コウライシバの系統診断に用いた供試材料  
Accessions used in the RFLP analysis of *Z. pacifica*

供試番号	採取地	種名	形態的特徴
1	南島	<i>Z. pacifica</i>	type- I *
2	父島	<i>Z. pacifica</i>	type- II
3	媒島-1	<i>Z. pacifica</i>	type- I *
4	媒島-2	<i>Z. pacifica</i>	type- I *
5	聳島	<i>Z. pacifica</i>	type- II
6	与那国島	<i>Z. pacifica</i>	type- II
7	石垣島-1	<i>Z. matrella</i>	中葉**
8	石垣島-2	<i>Z. matrella</i>	細葉

\*type- I : 10~20cmに直立する、type- II : 10cm以下でマット状

\*\*中葉: 葉幅2.0~2.5mm、細葉: 1.5~2.0mm

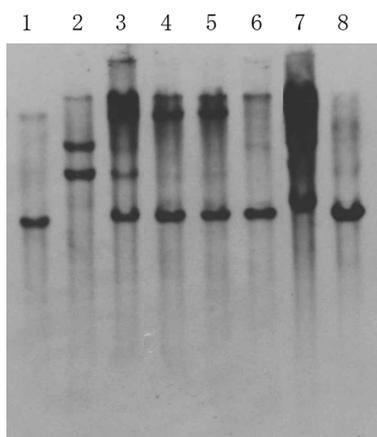


写真-2 ZG23プローブを用いた際に得られるRFLPプロファイル  
RFLP profile with ZG23 probe

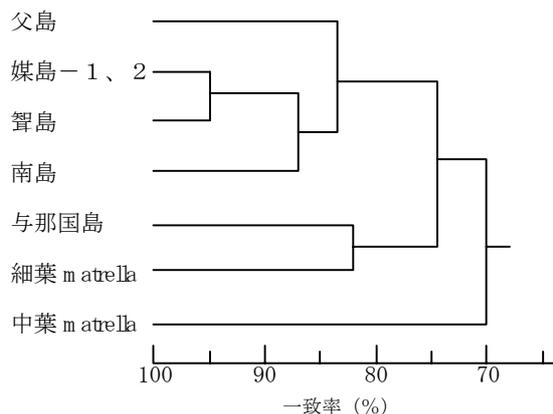


図-3 7種類のDNAプローブをハイブリダイズした際に得られたRFLPプロファイルより推定された供試材料の系統樹  
Phylogenetic tree of accessions by RFLP analysis

小笠原各島に自生するコウライシバは島間で遺伝子型が異なっており、南島に自生するシバも固有の対立遺伝子座を持っていること、が明らかとなった。

#### 4. 小笠原の固有種に関する遺伝子解析

##### 4.1 目的

これまでに述べてきたように、系統保全地域に定義される小笠原諸島において、遺伝子解析技術によって材料を選定し、生物多様性保全に配慮した緑化事業を行った。今後、「外来生物種規制法案」が浸透するにしたがって、同じように遺伝子の攪乱を引き起こさないよう配慮した緑化が求められると思われる。そこで、様々な植物に適用できる遺伝子解析技術を確立するために、まず、小笠原固有の植物種を材料に用いて、シバ属植物で確立した遺伝子解析技術が他植物に適用できるか検討した。

##### 4.2 材料および方法

表-3 RFLP分析に用いた小笠原固有の植物種  
Plant materials used in the RFLP analysis

供試番号	種名	系統番号 (採取地)	生態型	サンプル重 (mg)
1	ヒメフトモモ	7119	A	320
2	"	7159	"	190
3	"	7201	"	200
4	"	7546	B1	150
5	"	7850	"	130
6	"	8149	"	390
7	"	7087	B2	160
8	"	7367	"	200
9	"	7542	"	180
10	オオバシロテツ	ジョンビーチ	-	210
11	"	西崎	-	260
12	"	石門	-	140
13	"	西海	-	250

##### 4.2.1 供試材料

供試系統として、都立大学の加藤先生より提供していただいた小笠原固有の植物2種、ヒメフトモモ:9系統、オオバシロテツ:4系統、の合わせて13系統を用いた(表-3)。なお、供試したヒメフトモモ9系統、オオバシロテツ4系統とも父島内の異なる地点から採取されたもので、表-3にも示すように、ヒメフトモモ9系統は生育環境や葉の形態によって、便宜上、A、B1、B2の3タイプに分類されている。

##### 4.2.2 試験方法

各供試系統より葉部200~300mgを計り取り(表-3)、液体窒素存在下で粉状になるまで粉碎し、シバ属植物に適用している2×CTAB法にしたがって全DNAを抽出した。なお、DNA抽出に用いたサンプル量が少なかったため、シバからDNAを抽出する際には5mlの2×CTAB液を用いるが、今回は液量を2mlに変更した。

各系統より抽出したDNAについて、濃度と精製度をチェックするために260nmと280nmの吸光度を調べたのち、6塩基認識の制限酵素であるEcoRVと4塩基認識のTaq Iで切断した。切断したDNA断片をナイロンフィルターに写し取ったのち、性状の異なる5種類のDNAプローブ:rDNA、SSU、LHC、BP10、BP12をハイブリダイズした。rDNAは全植物に共通してゲノム中に多数のコピーが存在する遺伝子、LHCとSSUは光合成に関わる遺伝子、BP10とBP12はシバの葉緑体DNAに由来する断片である。

##### 4.3 結果および考察

ヒメフトモモ、オオバシロテツより抽出したDNAの濃度および精製度を調べた結果、データは示さないが、B2タイプのヒメフトモモ3系統(No. 7~9)を除いて、RFLP分析に適用できるDNAサンプルが得られたと判断され、シバに使われるDNA抽出方法が他の植物にも適用できるこ

表-4 ヒメフトモモとオオバシロテツに5種類のDNAプローブをハイブリダイズときに得られたRFLPプロファイル  
RFLP profiles obtained by five DNA probes

プローブ名	制限酵素	
	<i>Eco</i> RV	<i>Taq</i> I
rDNA	多型なし	多型検出
LHC	ハイブリせず	ハイブリせず
SSU	〃	〃
BP10	多型なし	多型なし
BP12	〃	〃

とが明らかとなった。B2タイプのヒメフトモモは葉が非常に小さく、抽出したDNAの濃度が低かった。

供試系統より抽出したDNAを2種類の制限酵素で切断し、それらに5種類のDNAプローブをハイブリダイズした結果を表-4にまとめる。供試系統のDNAを制限酵素*Taq* Iで切断し、rDNAをハイブリダイズした際に、目的とする系統間変異が検出された(写真-3)。しかし、光合成関連遺伝子であるLHC、SSUとハイブリダイズするDNA断片は検出されなかった。今回、プローブに用いたLHC、SSUはシバから単離した遺伝子で、双子葉植物である供試系統の遺伝子と相同性が低かったと考えられる。また、シバの葉緑体DNAに由来する断片をプローブに用いた場合、DNA断片は検出されたものの、系統間変異は認められなかった。一般的に、葉緑体DNAは系統間で保存性が高く、そのため、今回も遺伝子解析に有効な情報が得られなかったと考えられる。

次に、*Taq* Iで切断された供試系統のDNAにrDNAをハイブリダイズした際に得られたRFLPプロファイルを、系統間で比較する。ヒメフトモモ9系統のうち、十分量のDNAが得られなかったNo. 7~9では、マルチコピーであるrDNAをプローブに用いてもDNA断片は検出されなかった。No. 1~6については、写真-3に矢印で示すバンドの有無によって、Aタイプが含まれるNo. 1~4と、B1タイプに分類されるNo. 5、6、で構成される2つのグループが識別された。オオバシロテツについても、矢印に示す断片に変異が認められ、ジョンビーチと西崎より採取した2系統は同一のパターンを示したが、石門、西海から採取した系統はそれぞれ異なるパターンを示した。

以上のことから、シバ属植物において確立されたDNA抽出方法と遺伝子解析手法の一つであるRFLP分析法は、プローブDNAと制限酵素を選ぶことによって、他植物にも適用可能であることが明らかとなった。

## 5. まとめ

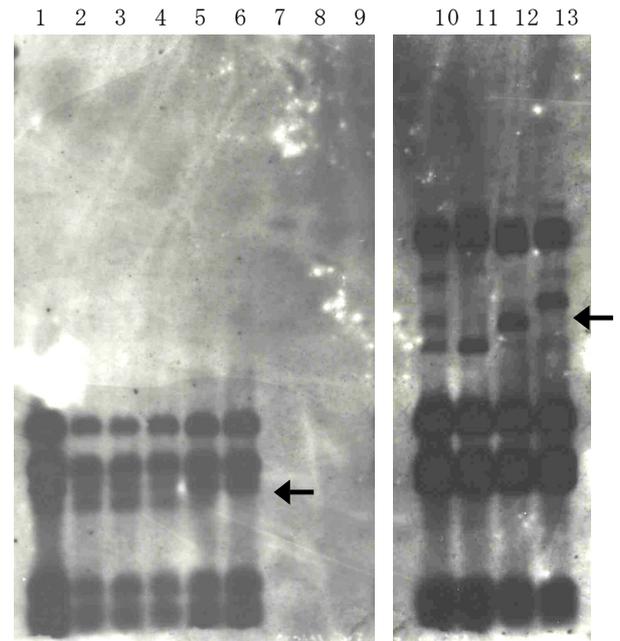


写真-3 制限酵素*Taq* Iで切断した供試系統のDNAにrDNAをハイブリダイズした際に得られるRFLPプロファイル  
RFLP profiles obtained by rDNA probes

生物多様性保全に配慮した緑化計画手法として、遺伝子解析技術を用いた緑化事業の概要を紹介するとともに、汎用性の高い遺伝子解析技術の確立に向けた実験を行い、以下のことが明らかとなった。

- 1) 小笠原に自生する植物種は、島間あるいは同じ島内の地域間でも遺伝的変異が生じており、生物多様性保全に配慮した緑化を行うためには、遺伝子解析を通して材料を選定する必要がある。
- 2) シバ属植物に適用してきたRFLP分析法は、プローブDNAと制限酵素を選ぶことによって、他の植物に適用することができる。
- 3) 葉緑体DNAは保存性が高いため、母系を判定するためには、新たな遺伝子解析手法を確立する必要がある。

なお、小笠原に自生する植物種を提供していただいた東京都立大学理学部牧野標本館加藤助手、与那国島の*Z. pacifica*を提供していただいた宇都宮大学野生植物化学技術センター倉持講師に感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 日本緑化工学会：生物多様性保全のための緑化植物の取り扱いに関する提言，日本緑化工学会誌，Vol.27，pp.481-491，2002。
- 2) 岩槻邦男：小笠原諸島の植物と人，プランタ，Vol.81，pp.4-8，2002。
- 3) 東京都環境保全局：東京都の野生生物種目録，1998。
- 4) 堀田満，黒木佐和子：南日本の植物雑記-1-コウライシバとコウシュンシバ，植物分類・地理，Vol.45，pp.67-74，1994。