

原著論文

藤沢市に生育するクゲヌマランの遺伝子解析

大井和之・岸しげみ・一ノ瀬友博

Kazuyuki Ooi, Shigemi Kishi and Tomohiro Ichinose: Genetic analysis of
Cephalanthera longifolia (L.) Fritsch in Fujisawa City,
Kanagawa, Japan

緒言

クゲヌマランは、樹林下に生育する地生ランで、ギンラン *Cephalanthera erecta* (Thunb.) Blume (1859) とよく似て白い花をつけるが、唇弁基部の距が浅くて突出しないことで区別できる。本種は、藤沢市鵠沼海岸産の標本に基づき 1936 年に前川文夫博士により *C. shizuoi* F. Maek. として記載された。その後、遊川 (2009) は、エゾギンラン *C. elegans* Schltr. (1919)、クゲヌマラン、台湾の *C. alpicola* Fukuyama (1938) は同一種で、ユーラシア大陸からアフリカ北部まで広く分布する *C. longifolia* (L.) Fritsch (1888) に相当すると整理した上で、和名についてはエゾギンランの方が早くに命名されているものの、クゲヌマランがより一般的に使われているので *C. longifolia* の和名としてはクゲヌマランを用いることが適切だろうとしている。

クゲヌマランは環境省レッドデータブックの 2000 年版では絶滅危惧 IA 類とされていたが、2007 年のレッドリストおよび 2014 年のレッドデータブックでは絶滅危惧 II 類になっており、「神奈川県においては、絶滅した自生地があるものの、最近の霊園や公園での発生状況は帰化植物的であるとされ（神奈川県レッドデータ生物調査報告書：植物篇 (2006)）、造成地などで新たに発生する例が報告されている」と記載されている（環境省, 2015）。神奈川県レッドデータブック 2006 でも絶滅危惧 II 類とされているが、最近発表された神奈川県レッドリスト〈植物編〉2020 では本種はランク外となり掲載されていない（勝山ほか, 2006；神奈川県環境農政局緑政部自然環境保全課, 2020）。

藤沢市内でも、公園や大学キャンパスなどで新たに本種の生育が確認されることが増えてきている。一方で、以前から生育が確認されている場所では、開花株数の減少など衰退傾向が見られている。万が一、最近新たに発生した生育地のものが帰化植物であれば、以前からの生育地の個体とは由来が異なるため、遺伝的な相違が見つ

かる可能性がある。

Hayakawa *et al.* (2014) では、核リボソーム DNA の ITS 領域と葉緑体の *rbcL*, *matK* 遺伝子によるキンラン属 *Cephalanthera* の系統樹が示されていて、ギンラン *C. erecta*, ササバギンラン *C. longibracteata* Blume (1859) はキンラン *C. falcata* (Thunb.) Blume (1859) に近く、クゲヌマランは別のグループになり、ITS または *matK* 領域の塩基配列で分子同定できるとされている。また、Micheneau *et al.* (2010) では葉緑体 DNA の塩基長が変異しやすい領域（葉緑体マイクロサテライト）を用いてヨーロッパからアジアに分布する *C. longifolia* のハプロタイプを報告している。本研究では、藤沢市内の元々から生育しているクゲヌマランと新しい生育地のクゲヌマランについて、これらの先行研究で分析された遺伝子領域の遺伝子解析を行って、論文やデータベースに登録された塩基配列との比較を実施した。

材料と方法

2016 年の 5 月と 6 月に、藤沢市内の 3 か所でクゲヌマランの葉を採取した（図 1）。1980 年代から本種の生育が確認されている個人宅敷地のクロマツ林下から得た個体を試料 H、近年の新規発生地である市街地の公園から得た個体を試料 O とした。この 2 か所では生育が確認できた個体が少数であったため、現地株の保全を優先して DNA サンプルの葉 1 枚のみを採取した。また、本種の新規発生地である慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス（以下 SFC）内でも標本採取を行なった。SFC 内には本種だけでなくギンランも生育しているが、調査時は結実期で、キンラン属の種判別に重要な花の形態が確認できなかったため、複数種が含まれる可能性を考慮しつつ、3 標本（SFC1–3）を採取し、DNA 解析に用いた。SFC のさく葉標本 3 点は神奈川県立生命の星・地球博物館に収めた（標本番号：KPM-NA0306608 ~ KPM-NA0306610）。

葉 1/2 枚（長さ約 2 cm 分）を液体窒素で凍結して乳鉢



図 1. 本研究に用いた試料の採取地での様子 (2016 年 6 月 12 日撮影). A: 従来からの生育地のクゲヌマラン (試料 H); B: 新規生育地のクゲヌマラン (試料 O); C: SFC 構内のクゲヌマラン (試料 SFC1, 標本番号: KPM-NA0306608); D: SFC 構内のキンラン属の 1 種 (ギンラン) (試料 SFC3, 標本番号: KPM-NA0306610).

表 1. PCR 分析に使用したプライマー

領域	名称	プライマー配列	出典
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>matK</i>	<i>matKAF</i>	CTATATCCACTTATCTTTCAGGAGT	Ooi <i>et al.</i> (1995)
	<i>matK8R</i>	AAAGTTCTAGCACAAAGAAAGTCGA	
<i>accD-psa1</i>	F	GGAAGTATAGCACTAGCTTC	Micheneau <i>et al.</i> (2010)
	R	ACTTATAACTGATGTCCCCA	
<i>trnK-matK</i>	F	ATCTTCCTCCAAAAATCCC	Micheneau <i>et al.</i> (2010)
	R	GAGCATTTTCAGAATACAAATTC	
<i>trnS-trnG</i>	F	GTTCAAGGCAAAGGACAAGT	Micheneau <i>et al.</i> (2010)
	R	AACACGTATTTTGTTCCTCC	

で粉碎し、ISOPLANT II（ニッポンジーン）を使用してマニュアルに従ってDNAを抽出した。全試料についてITS領域、試料Hと試料Oについて*matK*領域、試料Hと試料O、試料SFC1について葉緑体マイクロサテライト3領域（*accD-psa1*, *trnK-matK*, *trnS-trnG*）の塩基配列解析を行った。解析に用いたプライマーは表1に示す。PCR反応はEx Taq（タカラバイオ）を用い、温度サイクルはITS領域と*matK*領域は94℃2分－（94℃30秒－52℃30秒－72℃1分30秒）×35回－72℃7分、葉緑体マイクロサテライト3領域は94℃2分－（94℃30秒－55℃1分－72℃1分）×30回－72℃7分とした。PCR反応産物は、QIAquick PCR purification kit（QIAGEN）で未反応のプライマーとdNTPを除去した上で、PCRプライマーを片方ずつ使用してDNAシーケンサーで塩基配列を決定した。

塩基配列はBioEditで相補配列と照合してプライマーに挟まれた部分の全長を確定した。ITS領域（684 bp）と*matK*領域（1,170 bp）については、NCBI BLAST検索を行いDNAデータバンクに登録された類似度の高い配列データを取得し、CLUSTAL Wでアライメントを行った後、MEGA X (Kumar *et al.* 2018) によって分子系統樹を作成した。系統樹の推定には最尤法を用い、塩基置換モデルとして Tamura-Nei model を、塩基置換速度の分布モデルとして Gamma distribution with Invariant sites (G+I) を使用した。系統樹の各分岐の信頼性については500回のブートストラップ分析により評価した。

結 果

塩基配列の解析結果は、いずれの領域でも試料H、試料O、試料SFC1は同一の塩基配列であった。各領域の塩基配列の塩基配列長とアクセッション番号を表2に示す。DNAデータバンクに登録されている配列を加えて、ITS領域の塩基配列で作成した分子系統樹を図2、*matK*遺伝子領域の塩基配列で作成した分子系統樹を図3に示す。どちらの系統樹においても、本研究の試料は、試料SFC3を除きクゲヌマラン *C. longifolia* のクレードに含まれた。試料SFC3のITS領域の塩基配列（アクセッション番号 LC589968）はギンランに近く、分子系統樹でギンランとユウシュンラン *C. erecta* var. *subaphylla* (Miyabe

& Kudo) Ohwi のクレードに含まれた。

葉緑体マイクロサテライト3座位の塩基配列長を Micheneau *et al.* (2010) の Table 3 のハプロタイプ記号で示すと、*accD-psa1* (124 bp) が H, *trnK-matK* (169 bp) が M, *trnS-trnG* (216 bp) が Z となった。これは Micheneau *et al.* (2010) で解析されている中国雲南省で1981年に採取されたキュー植物園の標本（ハプロタイプ HNZ）と1塩基の相違で最も近い。Micheneau *et al.* (2010) の Figure 1 に藤沢市産クゲヌマランのハプロタイプを加えてハプロタイプの関係を示したものを図4に示す。

考 察

藤沢市内に生育しているクゲヌマランは、1980年代から発生が確認されている元々の自生地のものも、最近分布を拡げている新しい生育地のものも、葉緑体マイクロサテライトのハプロタイプは同一であり、ヨーロッパや中東産の *C. longifolia* のハプロタイプではなく、中国雲南省およびネパール産の標本で報告されているアジア型に属していた。このことから、ヨーロッパ産の外来個体が入り込んで分布を拡げているわけではなく、日本在来の遺伝子型の系統が分布を拡大していることが明らかとなった。しかしながら、今回分析した葉緑体マイクロサテライトは遺伝子型の多型がそれほど多く見られるものではなく、北海道から九州まで分布する本種の産地による遺伝子型の違いは知られていないため、国内外来の可能性については否定できない。

本種が最近急に増えてきたように見える理由として、今回分析したものと同一の遺伝子型の中に繁殖力強い系統が存在して、国内外来系統として最近各地に移入して分布を拡げているという仮説が考えられる。この仮説を検証するためには、葉緑体マイクロサテライトよりもはるかに詳細に、個体ごとの遺伝子型を区別できるような遺伝子マーカーの分析が必要となる。最近ではRAD-seq や MIG-seq という次世代シーケンサーを用いてゲノムワイドな遺伝子型解析を行う手法が開発されており、これを適用すれば発生場所による遺伝子型の集団構造が解析可能と期待される。

一方で、国内外来系統ではなく、地域在来の系統が分布を拡大していることも考えられる。SFC では、本種の

表2. 藤沢市に生育するクゲヌマラン *C. longifolia* の塩基配列分析結果

領域	塩基配列長	アクセッション番号
ITS	683 bp	LC589969
<i>matK</i>	1,170 bp	LC589970
<i>accD-psa1</i>	124 bp（プライマーを含む）	LC589971
<i>trnK-matK</i>	169 bp（プライマーを含む）	LC589972
<i>trnS-trnG</i>	216 bp（プライマーを含む）	LC589973

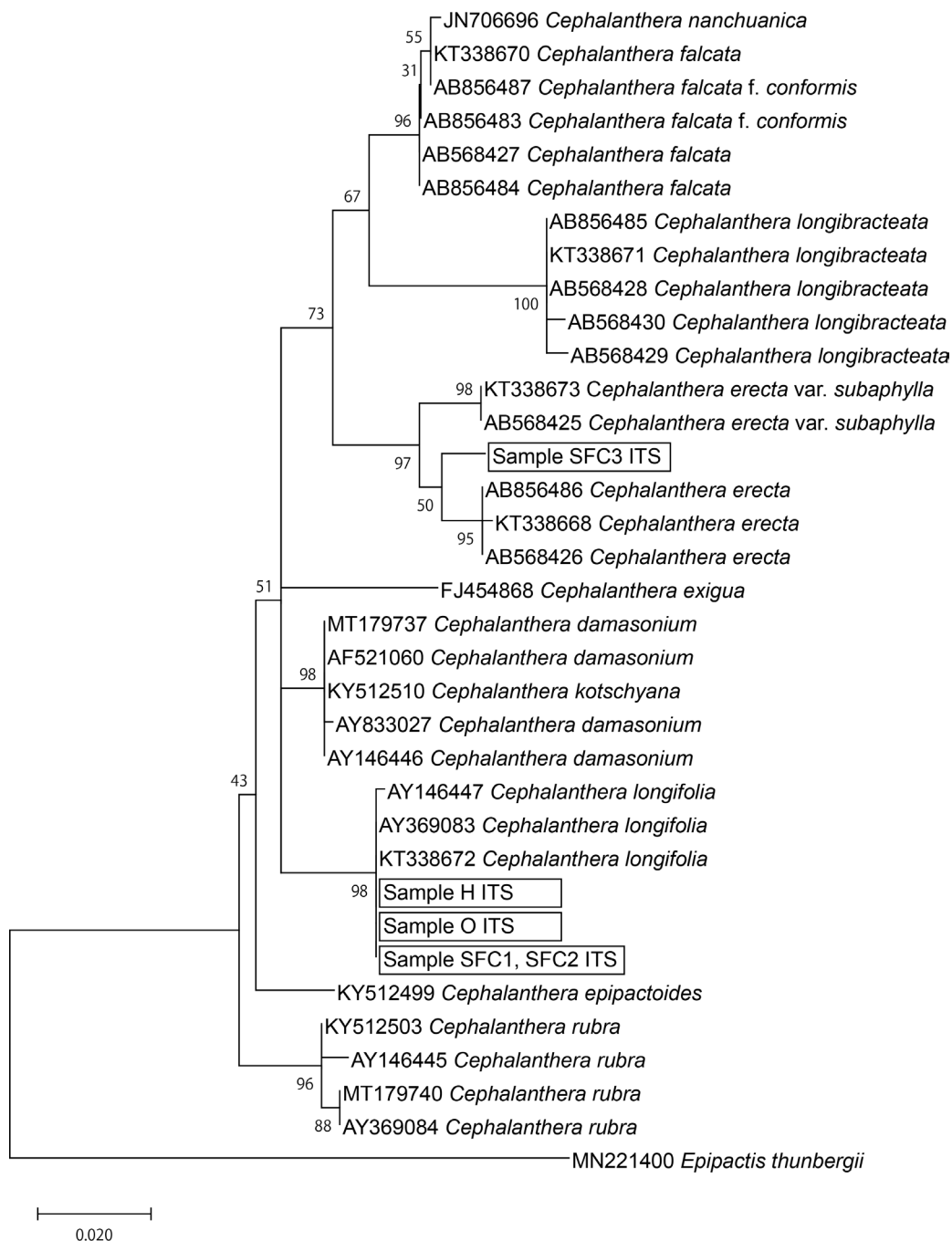


図 2. ITS 領域の最尤法による分子系統樹（各枝の数字はブートストラップ支持確率）。本研究の試料は枠囲みで示した。試料 H、試料 O、試料 SFC1、SFC2 の塩基配列は AY369083 の塩基配列と 100% 一致した。試料 SFC3 の塩基配列はギンラン *C. erecta* に最も近かった。

他にギンランとキンランが生育している。生育地は 30 年前に開校したキャンパスの周縁部のシラカシ等を主体とした常緑広葉樹林の林床である。ラン科植物は微小な種子が菌類と共生して発芽する。Sakamoto *et al.* (2017) では本種の菌根の ITS 領域の遺伝子解析からイボタケ科の複数の種類の塩基配列が得られており、共生菌の特異性は狭くはない。造成から 20 年程度経過して、樹林地の菌類相が発達しランの生育に適した状態になってから、周辺から飛散してきた種子が発芽できるようになった可能性が考えられる。東ほか (2020) では横浜市の埋立地の植栽林にある自生地において播種実験と共生菌類

の DNA 分析による同定によって、イボタケ科の 3 種の菌が本種の種子発芽とその後の実生の成長に関与していることを明らかにした。公園や緑地の植栽林の菌類相がキンラン属の種子発芽に適した状態になって、本種の実生が発生しやすくなった可能性は高いと考えられる。

今回の調査で、分布が拡大しているクゲヌマランは在来系統か国内外来系統のいずれかであることが明らかとなった。分布拡大には、①繁殖力が強い系統が増えた、②菌類相が発達し生育適地が拡大した、という要因が考えられ、これらの要因が実際にどの程度寄与しているのかを明らかにするためにはさらなる調査解析が必要である。

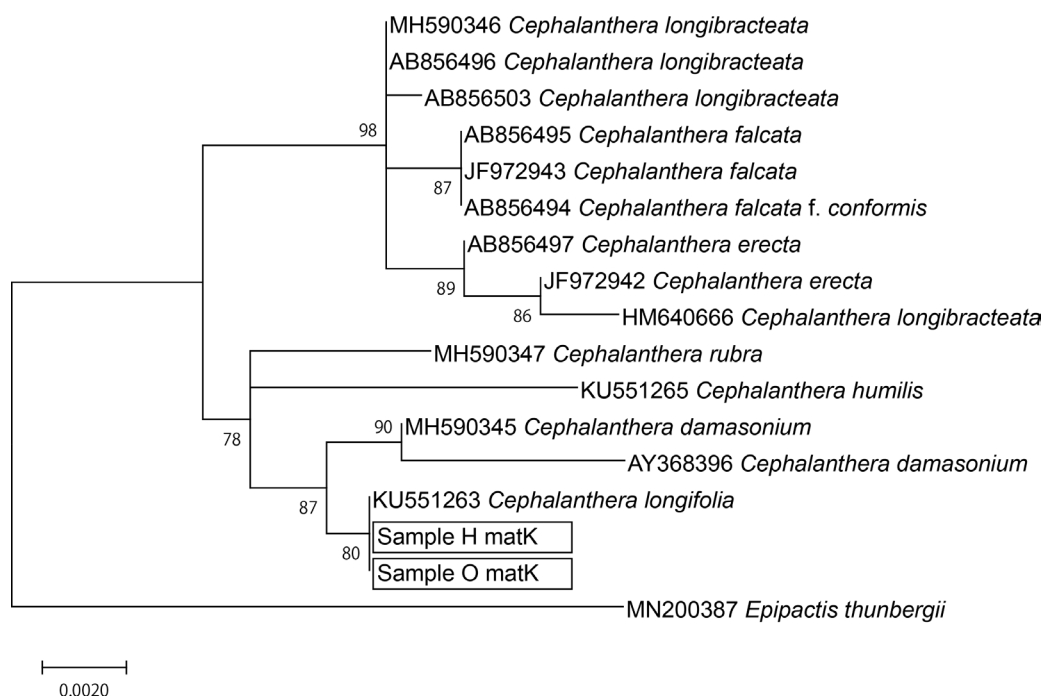


図 3. *matK* 遺伝子領域の最尤法による分子系統樹（各枝の数字はブートストラップ支持確率）。本研究の試料は枠囲みで示した。試料 H と試料 O の塩基配列は既知のクゲヌマラン *C. longifolia* の塩基配列と 100% 一致した。*matK* 領域は塩基配列の変異に乏しく、クゲヌマランの種内多型は認められなかった。

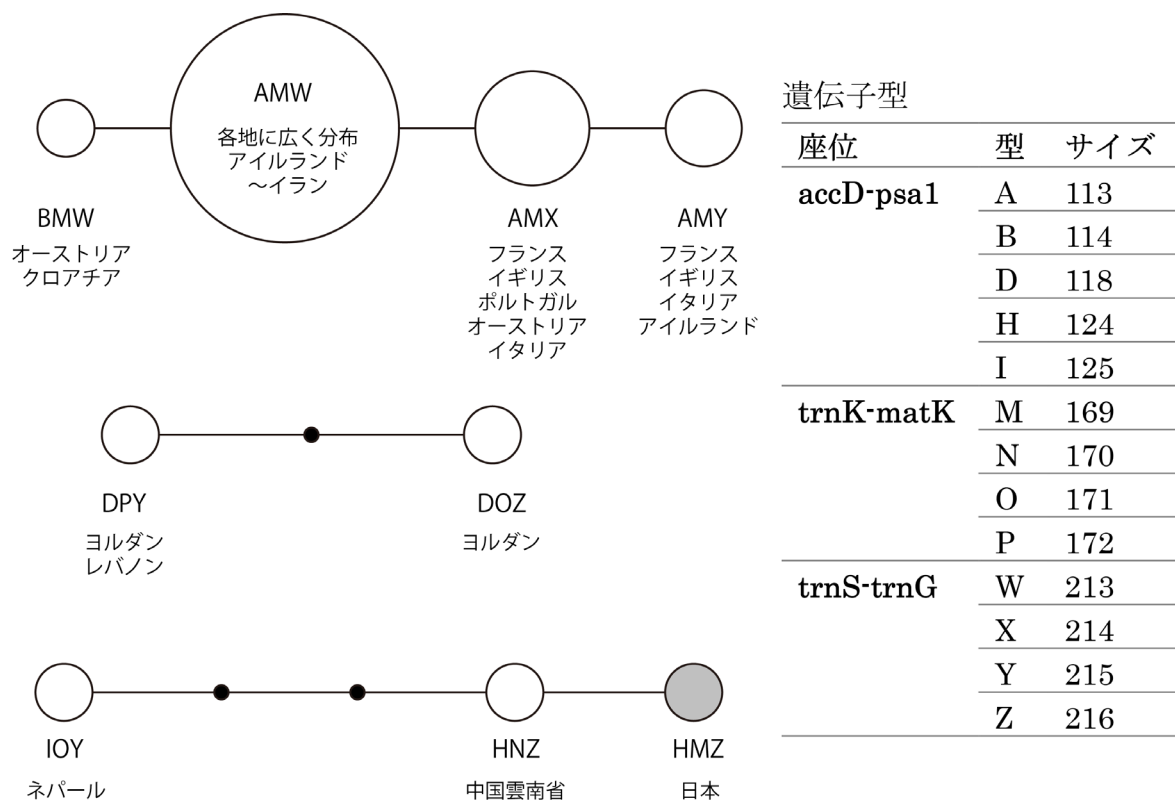


図 4. クゲヌマラン *C. longifolia* の葉緑体マイクロサテライトのハプロタイプネットワーク（Micheneau *et al.* 2010 の Fig. 1 を改変）。本研究で分析した試料 H、試料 O、試料 SFC1 は全て HMZ 型であった。

謝 辞

クゲヌマランの系統分類に関しては山形大学の横山 潤教授、東北大学の牧 雅之教授、国立科学博物館の遊川知久博士から多くの情報提供を受けた。佐賀大学の辻田有紀准教授には原稿に有益なコメントをいただいた。また調査にあたり、青木小四郎氏、岸 一弘氏、大谷房江氏、湯浅拓輝氏にご協力いただいた。ここに記して感謝する。

引用文献

- Hayakawa, H., C. Hayakawa, Y. Kusumoto, T. Nishida, H. Ikeda, T. Fukuda & J. Yokoyama, 2014. *Cephalanthera falcata* f. *conformis* (Orchidaceae) forma nov.: a new peloric orchid from Ibaraki Prefecture, Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, **65**(3): 127–139.
- 東 哲典・蘭光健人・庄司顕則・伊藤彩乃・赤崎洋哉・松前満宏・山崎 旬・遊川知久・辻田有紀, 2020. 埋立造成地に定着したクゲヌマラン (*Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch) の種子発芽に関与する共生菌相の解明. 日本緑化学会誌, **45**(4): 430–435.
- 神奈川県環境農政局緑政部自然環境保全課, 2020. 神奈川県レッドリスト〈植物編〉2020. <https://www.pref.kanagawa.jp/docs/t4i/cnt/f12655/p1196500.html> (accessed on 2020-December-25).
- 環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室 編, 2015. レッドデータブック 2014: 日本の絶滅のおそれのある野生生物: 8 植物I (維管束植物). 株式会社ぎょうせい, 東京.
- 勝山輝男・田中徳久・木庭英久・神奈川県植物誌調査会, 2006. 維管束植物. 高桑正敏・勝山輝男・木庭英久 編, 神奈川県レッドデータ生物調査報告書 2006, pp.37–130. 神奈川県立生命の星・地球博物館, 小田原.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz & K. Tamura, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547–1549.
- Micheneau, C., K. J. Duffy, R. J. Smith, L. J. Stevens, J. C. Stout, L. Civeyrel, R. S. Cowan & M. F. Fay, 2010. Plastid microsatellites for the study of genetic variability in the widespread *Cephalanthera longifolia*, *C. damasonium* and *C. rubra* (Neottieae, Orchidaceae), and cross-amplification in other *Cephalanthera* species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **163**(2): 181–193.
- Ooi, K., Y. Endo, J. Yokoyama & N. Murakami, 1995. Useful primer designs to amplify DNA fragments of the plastid gene matK from angiosperm plants. *Journal of Japanese Botany*, **70**: 328–331.
- Sakamoto, Y., J. Yamazaki, T. Yamada, J. Yokoyama, Y. Ogura-Tsujita & M. Maki, 2017. The diversity of mycorrhizal fungi in Japanese *Cephalanthera* species. *Plant Species Biology*, **32**(1): 81–86.
- 遊川知久, 2009. 北海道に分布するクゲヌマラン類似植物. 北方山草, (26): 13–20.
- White, T. J., T. D. Bruns, S. Lee & J. W. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*, pp. 315–322. Academic Press, New York.
- 大井和之：一般財団法人九州環境管理協会；岸 しげみ：日本ビオトープ管理士会；一ノ瀬友博：慶應義塾大学環境情報学部
- (受領 2020 年 10 月 26 日；受理 2021 年 1 月 28 日)