

マツ科植物の制限断片長多型 (RFLP) 分析

九州大学農学部 渡辺 敦史・白石 進

1. はじめに

従来, 系統進化の研究を行う上で, 形態学的形質や生理学的形質が指標として用いられたきた。近年, DNAを直接解析する方法が進歩し, 生物進化にDNA情報が適用される例も多くなっている^{1, 11)}。植物の系統進化の解明を行うにあたっては, 一般に植物特有のオルガネラゲノムである葉緑体DNAが用いられている^{5, 13)}。

本研究では, マツ科に属する9属17種について葉緑体DNA上にある *rbcL* 遺伝子 (リブロース二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ・大サブユニットをコード) を制限断片長多型 (RFLP) 分析により系統進化の解明を試みた。

2. 材料と方法

(1) 供試樹種

RFLP分析にはマツ科9属16種を用いた (表1)。

表-1 系統進化の分析に用いた樹種

No.	属名	学名	和名
1	モミ属	<i>Abies sachalinensis</i> F. Sshn.	トドマツ
2	モミ属	<i>Abies veitchii</i> Lindl.	シラベ
3	ヒマラヤスギ属	<i>Cedrus deodara</i> Loud.	ヒマラヤスギ
4	カラマツ属	<i>Larix leptolepis</i> Gord.	カラマツ
5	ウサン属	<i>Keteleeria davidiaha</i> Beisn.	ユサン
6	トウヒ属	<i>Picea jezoensis</i> Carr.	エゾマツ
7	トウヒ属	<i>Picea Kayamaki</i> Shirasawa.	ヤツガクテウヒ
8	マツ属	<i>Pinus densiflora</i> Seib. et Zucc.	アカマツ
9	マツ属	<i>Pinus Koraiensis</i> Seib. et Zucc.	チョウセンゴヨウ
10	マツ属	<i>Pinus luchuesis</i> Mayr	リュウキョウマツ
11	マツ属	<i>Pinus parviflora</i>	キタゴヨウ
12	マツ属	<i>Pinus thunbergii</i> Parlatores	クロマツ
13	マツ属	<i>Pinus palustris</i> Mill.	ダイオウシヨウ
14	マツ属	<i>Pinus rigida</i> Mill.	リギダマツ
15	ツガ属	<i>Tsuga diversiflora</i>	コメツガ
16	イヌカラマツ属	<i>Pseudolarix kaempferi</i>	イヌカラマツ
17	トガサワラ属	<i>Pseudotsuga japonica</i> Peissn.	トガサワラ
18	ヌマスギ属	<i>Taxodium distichum</i> Rich.	ラクウシヨウ

(2) 抽出およびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

DNA抽出は成葉100mgからCTAB法を改良して行った⁹⁾。抽出した全DNAから *rbcL* 遺伝子のみをとりだ

すためにPCRを行った。PURは全DNAを鋳型DNA (ing/10 μ l) として反応溶液 (10mM Tris-HCl (pH8.4), 1.5mM MgCl₂, 50mM kcl, 10 μ g/mlゼラチン, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 各200mM, DNA polymerase 0.25units/10 μ l, プライマー各0.5 μ M) 中で, 94 $^{\circ}$ Cで1分変性した後, 94 $^{\circ}$ C30秒, 55 $^{\circ}$ C30秒, 72 $^{\circ}$ C1分を1サイクルとして30回繰り返した²⁾。プライマーはタバコ⁹⁾ とイネ⁹⁾ の塩基配列をもとに設計したものである。

(3) RFLP分析

増幅したDNA (1309bp) を The GENE CLEAN Kit II (BIO 101 Inc.) により精製し, 11種類の制限酵素 (表2) で切断した。制限酵素は全て4塩基認識のものを用い, DNA1 μ gに対して10unitsを加え2時間インキューベートした後, さらに10unitsを加えDNAを完全に切断した。電気泳動は2.2%アガロースゲルと12%または15%ポリアクリルアミドゲルを併用して行った¹⁰⁾。電気泳動によって得られた泳動像から断片 (バンド) のサイズを決定し, 既に *rbcL* 遺伝子のDNA塩基配列が報告されているクロマツ⁷⁾, ダグラスファー⁸⁾, およびスギ科ヌマスギ属ラクウシヨウ¹⁰⁾ の塩基配列を参考にすることで物理地図の作成を行った。

(4) 系統樹作成

物理地図から制限酵素認識部位 (サイト) が全樹種に共通してみられたものと樹種間に差異があったものに分け, 類似度を算出した。類似度は $F = 2M_w / (M_x + M_y)$ (M_w ; 2個体共通のサイト数, M_x および M_y : それぞれの個体のサイト数) を用いて算出し⁹⁾, これをもとにUPGMA法で系統樹の作成を行った。

3. 結果と考察

今回のRFLP分析によって得られたマツ科植物9属16種と既存の塩基配列から求められたクロマツの各制限酵素による物理地図を図1に示した。11制限酵素で計63サイトが確認され, このうち多型サイトは31であった (表2, 図1太線)。また, outgroupとして既に

報告された塩基配列からラクウショウの物理地図を作成した。ラクウショウを含めるとサイトの総数は75で、多型サイトは52であった。一塩基置換が複数の制限酵素での切断に関係していると思われる箇所が延5サイト認められた。しかし、これを断定するためには各樹種における塩基配列の解明が必要であるためこれらのサイトのデータは以後の解析から除外した。そのため、最終的に類似度を算出するのに用いたサイト数は70である。

これらのサイト数から遺伝距離(1-F)を算出し、作成した系統樹を図2に示す。今回作成した系統樹から、①マツ属では、二葉松類、三葉松類、五葉松類は早い時期に分岐したこと。②マツ属と対照的に属内における各樹種の分岐を示すことの出来なかったトウヒ属とモミ属内の種分化の時期は比較的新しいこと、が示唆された。

引用文献

(1) BRANDON S. GAUT et al. : J. Mol. Evol., 35, 292 ~303, 1992
 (2) ERLICH H. A. : PCR TECHNOLOGY, pp. 246, Stockton Press, NY, 1989

(3) HIPKINS V. D. et al. : Plant. Mol. Biol., 15, 505 ~507, 1990
 (4) HIRATUKA J. et al. : Mol. Gen. Genet., 217, 185 ~194, 1989
 (5) LISTON A. : Am. J. Bot., 79, 953~961, 1992
 (6) MURRAY M. G., THOMPSON W. F. : Nucleic. Acids. Res., 8, 4321~4325
 (7) MUKAI Y. et al. : Plant Cell Physiol., 32, 273 ~282, 1991
 (8) NEI M., LI W. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5269~5273, 1979
 (9) SHINOZAKI K. et al. : EMBO J., 5, 2043~2049, 1986
 (10) SOLTIS P. S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 449~451, 1992
 (11) STRAUSS S. H. DOERKSEN, A. H. : Evolution, 44, 1081~1096, 1990
 (12) 渡辺格, 杉浦昌弘 : クローニングとシーケンシング, pp. 314, 農村文化社, 東京, 1989
 (13) WHITE E. E., WATINMS R. F. : Can. J. For. Res, 23, 427~435, 1993

表2 11制限酵素によるRFLP分析の結果

制限酵素	認識配列	全サイト数	多型サイト	単型サイト
Hae III	GGCC	6	5	1
Rsa I	GATC	7	1	6
Msp I	CCGG	6	4	2
Dde I	CTNAG	4	2	2
Acc II	CGCG	1	0	1
Alu I	AGCT	7	3	4
ScrF I	CCGG	7	4	3
Nde II	GATC	9	2	7
Cfr113 I	GNCC	5	2	3
TthHB8 I	TCGA	8	6	2
Hha I	GCGC	3	2	1
計		63	31	32
(ラクウショウを含めたとき)		75	52	23

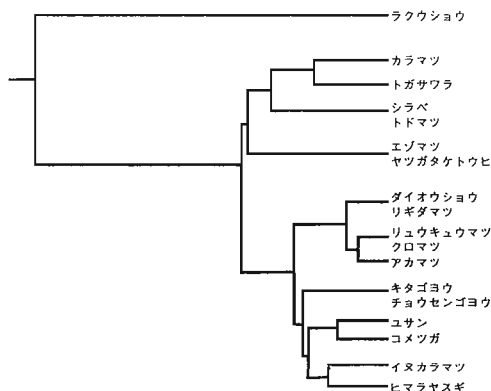


図2 マツ科植物9属17種の系統樹

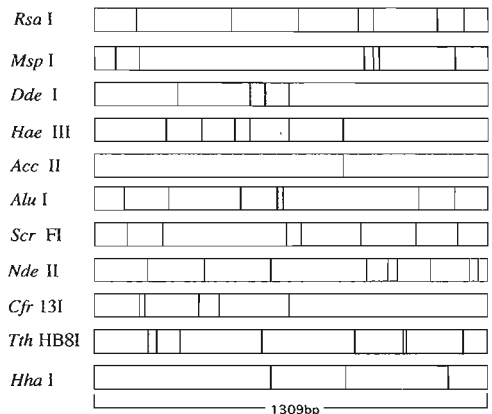


図1 11制限酵素によるrbcL遺伝子の物理地図