

ヒマラヤカラマツ球果からの単離 DNA を用いた *rbcL* 遺伝子のシーケンシング

九州大学農学部 檜崎 康二・白石 進
信州大学農学部 川崎 圭造

1. はじめに

カラマツ属植物は北半球に広く分布する落葉性針葉樹であり、主に球果の形態的特徴よりカラマツ節 (Sect. *Larix*)、トウカラマツ節 (Sect. *Multiseriales*) の2節に分類されている²⁾。しかし、種を特徴づける形態的指標が少ないため、種間の系統関係の解明が困難であった³⁾。近年の DNA 分析技術の急速な進展により、DNA 情報から系統関係を明らかにすることが可能となってきた。

本研究では、カラマツ属の一種であるヒマラヤカラマツ (*Larix griffithiana*) の球果より DNA 抽出し、葉緑体 DNA 上にコードされている *rbcL* 遺伝子の一部 (883bps) の DNA 塩基配列を決定した。さらに、得られた DNA 塩基配列をすでに報告されているセイブカラマツ (*L. occidentalis*) の配列と比較した。

2. 材料と方法

(1) DNA 抽出

ヒマラヤカラマツ球果1個より DNA を抽出した。抽出は、CTAB 法を改良して行った⁴⁾。最初に球果をミキサーで粉碎し、その粉末約 2g に抽出用緩衝液 20ml (100mM Tris - HCl, pH9.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 2% CTAB, 0.1% 2-メルカプトエタノール) を加え、65℃で60分間インキュベートした。これにクロロホルム 20ml を加え、20分間穏やかに混和し、遠心分離 (3,200rpm, 20分) 後、上清を回収した。この溶液に再度クロロホルムを加え、上記操作を繰り返した。得られた溶液 (6ml) に 3M 酢酸ナトリウム (200 μ l) とインソプロパノール (6ml) を加え、穏やかに混和した後、-20℃で一晩静置し、遠心後、上清を除去した。DNA は 70% エタノールで洗浄し、減圧乾燥後、滅菌水 150 μ l に溶解させた。DNA 溶液は Bio Mag (PerSeptive Diagnostics 社) を用いて精製した。

(2) *rbcL* 遺伝子の増幅及び塩基配列の決定

得られた DNA を鋳型とし、4種類のプライマー (5' - GTCGGATTCAAAGCTGGTGT - 3', 5' - CTTTCTACTTGGAT ACCATGAG - 3', 5' - CATGGTATCCAAGTAGAAAGAGA - 3', 5' - CGGTGGATGTGAAGAAGTAG - 3') を用いて *rbcL* 遺伝子の2領域を PCR 増幅した。PCR 反応液の組成は、1ng/ μ l 鋳型 DNA, 1mM Tris - HCl, pH8.3, 5mM KCl, 1mM dNTP, 0.35mM MgCl₂, 0.05unit/10 μ l *AmpliTaq* DNA polymerase (Stoffel Fragment: PERKIN ELMER 社), 0.2 μ M primer である。反応処理は、Gene Amp PCR System9600 (PERKIN ELMER 社) を用い、最初に 94℃で60秒間変性処理を行った後、94℃10秒 (変性)、45℃20秒 (アニーリング)、72℃40秒 (伸長) の3行程を30サイクル行った。最後に72℃で120秒間伸長反応を行った。PCR 増幅産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、DNA 断片を切り出し、QIAEX II (QIAGEN GmbH and QIAGEN inc.) を用いて回収し、これを鋳型 DNA として PCR 増幅を行った。

PCR 産物は Auto Sequencer Core Kit (TOYOBO) を用いて、自動蛍光シーケンサー (Pharmacia Biotech Japan) でダイレクトシーケンスした。

3. 結果と考察

針葉から抽出した DNA は、通常1回の PCR 反応 (アニーリング 55℃) で、分析に十分な PCR 産物 (バンド) を得ることができる。しかし、球果の DNA ではほとんど PCR 産物を得ることができなかった。そこで、アニーリング温度を 45℃ に設定して行ったところ、微量の PCR 産物を検出することができた。しかし、分析に必要な量の DNA を得ることができなかったため、この PCR 産物を鋳型として再度 PCR 反応を行った。その結果、DNA 塩基配列を決定するのに十分な量の PCR 産物を得ることができた。また、球果から抽出した DNA を鋳型として、*rbcL* 遺伝子の長い領域 (883bps) を一度に増幅することはできなかったが、これを2領域に分割

Koji NARAZAKI, Susumu SHIRAIISHI (Fac. of Agric., Kyushu Univ. Fukuoka 812) and Keizo KAWASAKI (Fac. of Agric., Shinshu Univ. Minamiminowa, Nagano 399-45)

Partial sequencing of *rbcL* gene using DNA extracted from the cone of *Larix griffithiana*

し、PCR することで増幅産物を得ることが可能となった。このことより球果から抽出したDNAはかなり低分子化していることが予想される。低分子化したDNAは、RAPD法⁹⁾などの全ゲノムを対象とした分析に用いることができないという短所もあるが、球果標本を用いることによる利点もある。まず、カラマツ属の分類が、主に球果の形態をもとに行われていることから、分析を行う前に球果の形態から樹種を確認することができる。また、カラマツ属は落葉性針葉樹であるため、針葉が落葉している時期でも球果を採取して分析を行うことができる。

今回決定したヒマラヤカラマツの *rbcL* 遺伝子の一部の塩基配列 (883bps) を GENBANK のデータベースより検索したセイブカラマツ (Accession No. X63663) の配列と比較した。その結果、図-1に示すように、232番目と623番目のサイトで塩基置換が確認された。カラマツ属は、トウカラマツ節5種、カラマツ節5種の計10種からなっており、ヒマラヤカラマツとセイブカラマツはともにトウカラマツ節に属している²⁾。同じトウカラマツ節に属するこれらの2樹種間の遺伝子領域で塩基置換が確認されたことより、今後、他の樹種、他のDNA領域の塩基配列についても分析を行

い、利用可能なDNA情報を増やすことで、カラマツ属全体の系統関係の解明が可能となることが示唆された。

本研究から、このように、球果より抽出したDNAからも塩基配列を決定できることが明らかとなった。このことは、針葉、材⁹⁾、球果いずれかの標本が入手できれば、DNA塩基配列を決定できることを意味しており、今後研究を進めていくうえで利用できる標本 (供試組織) の幅を広げることが可能となった。

引用文献

- (1) MURRAY, M. G., THOMPSON, W. F.: *Nucleic Acids Res.*, 8 : 4321 - 4325, 1980
- (2) OSTENFELD, C. H., SYRACH LARSEN, C.: *Selskab. Biol. Meddel*, 9(2), 3 - 8, 1930
- (3) 白石 進・渡辺敦史: *日林誌*, 77, 429~436, 1995
- (4) ————・—————: 第45回日本木材学会大会発表要旨集, pp.38, 1995
- (5) WILLIAMS, J. G. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531 - 6535, 1990
- (6) 柳沢聡雄・中田 功: *北海道の林木育種*, 9(2), 8 - 10, 1966

```

TAAAGATTAC AGATTAACCT ATTATACTCC TGAATATCAG ACCAAAGATA CGGATATCTT GGCAGCATTC
*****
CGAGTAACTC CTCAACCTGG GGTGCCGCC GAGGAAGCGG GAGCAGCAGT AGCTGCTGAA TCTTCCACCG
*****
GTACATGGAC CACTGTTTGG ACCGATGGAC TTACTAGTCT TGATCGTTAC AAGGGACGAT GCTATGACAT
*****
CGAGGCCGTT CCTGGAGAGG AGAGTCAATT TATTGCCTAT GTAGCTFACC CCTTAGACCT TTTCGAAGAA
*****
GGTTCGTGTTA CTAACCTGTT CACTTCCATT GTAGGTAATG TATTGGGATT CAAGGCCCTA CGGGCTCTAC
*****
GTTTGGAAGA TTTGCGGATC CCCCTGCTT ATTCAAAAC TTTCAAGGT CCACCTCATG GTATCCAAGT
*****
CGAAAGGGAT AAATGAACA AATATGGCCG TCCTTTATG GGATGTACTA TCAAACCAA ATTGGGTCTA
*****
TCGGCTAAGA ACTATGGTAG AGCAGTTTAC GAATGCTCC GTGGTGGACT CGATTTTACC AAGGATGATG
*****
AGAACGTAAA TTCCAACCA TTCATGCGCT GGAGAGATCG TTTTGTCTTT TGTGCGGAAG CAATTTATAA
*****
GGCTCAGGCT GAGACGGGTG AAATAAGGG ACATTACTTG AATGCTACTG CAGGTACATG TGAAGAAATG
*****
ATGAAAAGGG CAGTATTGTC AAGAGAATG GGAGTTCCTA TCGTTATGCA TGACTATCTG ACGGGAGGTT
*****
TFACTGCAA TACTTCTTTG GCTCATTAT GCCGAGACAA CGGCCTACTT CTTCACATTC ACCGCGCGAT
*****
GCATNCAGTT ATTGACAGC AAAGAAATCA TGGCATGCAT TTC
*****

```

図-1 ヒマラヤカラマツ (上段) とセイブカラマツ (下段) における塩基配列の比較
 セイブカラマツの塩基配列 (下段) についてはヒマラヤカラマツ (上段) と同一の箇所は*印で示し、異なる箇所のみ
 の塩基配列を示した。