

ヒノキとサワラの rDNA 遺伝子 (一部) の塩基配列

九州大学農学部 深田 俊武・渡辺 敦史
白石 進

1. はじめに

rDNA は 3 つの rRNA 遺伝子 (18S, 5.8S, 26S) をコードする領域とその領域間にはさまれた 3 つのスペーサー領域 (ITS1, ITS2, IGS) を構成単位とする反復配列である¹⁾。rDNA は遺伝子領域での塩基配列は保存性が高く、一方、スペーサー領域では塩基配列や配列の長さに変異性があるとされている²⁾。このため、被子植物では農作物を中心に、rDNA の変異を利用した遺伝子分析が行われており、広葉樹においても同様に報告されている^{3, 4)}。しかし、裸子植物ではマツ科植物の RFLP 分析で報告されているが^{5, 6)}、塩基配列情報を利用した rDNA の構造解明研究は、被子植物に比べ、きわめて少ない⁷⁾。

近年の分子生物学手法の発達により迅速で簡便な PCR (polymerase chain reaction) 法が開発された。この手法は、既知の塩基配列の部位にプライマーを設定し、DNA ポリメラーゼの働きにより特定の DNA 領域を増幅するものである。この PCR 法を利用し、容易に塩基配列の決定を行うことも可能となり、多くの塩基配列情報が報告されている。

本研究では、ヒノキ属 2 種の遺伝子領域 (一部) を PCR 法により塩基配列決定し、ヒノキ属の rDNA の構造解明を試みたので報告する。

2. 材料と方法

(1) 供試材料

供試材料はヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.) 1 個体、サワラ (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.) 1 個体の計 2 個体を用いた。

(2) DNA 抽出及び PCR 反応

DNA 抽出は針葉から CTAB 法を改良⁸⁾ して行った。得られた DNA を鋳型として、2 種類のプライマー (PrU: 5' - TAACCAAGGTTTCCGTAGGTG - 3' PrL: 5' - CTCCGCTTATTGATATGC - 3') を用いて、PCR 反応を行った。PCR 反応溶液は 50mM Tris

- HCl, pH8.5, 5mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.5μg/μl BSA, 2% Ficoll, 4mM Tartrazine, 0.1ng/μl 鋳型 DNA, 0.25mM dNTP, 0.4units/μl TthDNA polymerase, 0.5mM primer である。反応条件は最初に、94℃で 60 秒間変性処理後、94℃10 秒 (変性)、55℃20 秒 (アニーリング)、72℃40 秒 (伸長) の 3 行程を 30 サイクル、最後に 72℃120 秒間伸長を行った。得られた PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで 100V, 1 時間電気泳動した後、QIAEX II (QIAGEN GmbH and QIAGEN inc.) で回収した。

(3) DNA 塩基配列の決定

塩基配列の分析は、回収した DNA 断片を鋳型として再び PCR 反応を行った。得られた PCR 産物はアガロースゲルで電気泳動し、QIAEX II を用いてゲルから回収後、Autosequencer 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を行った。

3. 結果及び考察

rDNA の模式図を図-1 に示す。18S と 26S の遺伝子領域にプライマーを設計し、遺伝子領域の塩基配列を決定するための PCR 増幅を行った。今回、ヒノキ及びサワラの 2 樹種について、18S の 3' 端の一部 (20 塩基)、5.8S 領域全体 (161 塩基)、26S の 5' 端の一部 (36 塩基) の塩基配列の決定を行った (図-2)。その結果、ヒノキ、サワラの 2 樹種間には、遺伝子領域で塩基配列上の差異は検出されなかった。このヒノキ属 2 種にイネ (GENBANK Accession No. M16845)、トマト (GENBANK Accession No. X52265, X07889)、広葉樹の *Populus deltoides*⁹⁾、同じ裸子植物のマオウ (*Ephedra kokanica*)¹⁰⁾ を加えて、塩基配列の比較を行った (図-2)。その結果、18S の 3' 端領域では、比較した 5 種間で塩基配列の長さには違いは検出されず、塩基配列上の差異はわずか 1 ヶ所であった (図-2A)。5.8S 領域全体ではイネ、ポプラで 164 塩基とヒノキ属 2 種より 3 塩基長く、トマトで 162 塩基とヒノキ属 2 種より 1 塩

基長かった。裸子植物であるマオウでは162塩基とヒノキ属2種と比較して1塩基の長さの違いがみられた。比較した6種間で塩基配列の差異は28座位確認された(図-2B)。同じ裸子植物であるマオウとヒノキ属2種の塩基配列を比較したところ、14座位(相同性90%)において塩基配列の差異が認められた。また、ヒノキ属2種とイネ、トマト、ポプラとの塩基配列の相同性は各組み合わせで約90%と高かった。26Sの5'端領域では、イネ、トマト、ポプラともに配列の長さは38塩基とヒノキ属2種に比べて2塩基長かった。また、塩基配列上の差異は6座位でみられた(図-2C)

今回、塩基配列を決定した結果、ヒノキ属2種のrDNA遺伝子領域は被子植物と比較してもかなり保存性の高いことが確認された。今後、この遺伝子領域の塩基配列情報をもとにして、スペーサー領域を増幅するためのプライマーの設計を行うことで、他の樹種においてもPCR法によりスペーサー領域の塩基配列を容易に決定することが可能となる。rDNAはスペーサー領域に高い変異性があるとされている⁹⁾ため、この領域の

PCR-SSCP分析⁹⁾を行うことにより、簡単に変異を検出できると思われる。

引用文献

- (1) DIDDHALLY, G., PAUL, L., CHRISTOPHER, C. : *Pl. Syst. Evol* 179 : 141 - 153, 1992
- (2) FAIVRE, R. P. et al.: *Genome* 35 : 733 - 740, 1992
- (3) MELEKHOVETS, Y., TROITSKY, AV. : *Biochim Biophys Acta* 1048 : 294 - 296, 1990
- (4) MICHAEL, S. B. et al. : *Mol. Biol. Evol* 9 : 125 - 137, 1992
- (5) ORITA, M. et al. : *Pro. Natl Acad. Sci. USA* 86 : 2766 - 2770, 1989
- (6) ROBIN, N. B., CURTIS, S. : *Plant Mol Biol* 22 : 887 - 892, 1993
- (7) RENATO, D.: *Plant Mol Biol* 19 : 1069 - 1072, 1992
- (8) 白石 進・渡辺敦史 : *日林誌*, 77 : 429 - 436, 1995
- (9) VENKATEAWARLU, K., NAZAR, R. : *Plant Mol Biol* 17 : 189 - 194, 1991

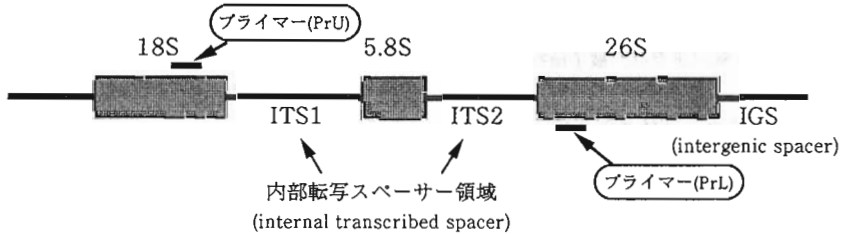


図-1 rDNAの模式図

A : 18Sの3'端部分

<i>C. obtusa</i>	AACCTGCGGTAGGATCATTG
<i>C. pisifera</i>	AACCTGCGGTAGGATCATTG
<i>E. deltooides</i>	AACCTGCGGAAGGATCATTG
rice	AACCTGCGGAAGGATCATTG
tomato	AACCTGCGGAAGGATCATTG

B : 5.8Sの遺伝子領域全体

<i>C. obtusa</i>	AACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCG-CTCTCGCCACGATGAAGAATGTAGCGAAATGCGATACTTAGTGTGAATTGCAGAAATCCCGT
<i>C. pisifera</i>	AACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCG-CTCTCGCCACGATGAAGAATGTAGCGAAATGCGATACTTAGTGTGAATTGCAGAAATCCCGT
<i>Ephedra kokonica</i>	CTTAGCACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATAATAGTGTGAATTGCAGAAATCCCGT
<i>E. deltooides</i>	TAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATAATAGTGTGAATTGCAGAAATCCCGT
rice	CACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTAGTGTGAATTGCAGAAATCCCGT
tomato	AA-ACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTAGTGTGAATTGCAGAAATCCCGT

<i>C. obtusa</i>	GAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCC-TC-GGCC-AAGGGCAGCTGCTTGGGCGTCGCAC
<i>C. pisifera</i>	GAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCC-TC-GGCC-AAGGGCAGCTGCTTGGGCGTCGCAC
<i>Ephedra kokonica</i>	GAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCC-TC-GGCC-AAGGGCAGCTGCTTGGGCGTCGCAC
<i>E. deltooides</i>	GAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCC-TCCTGGTTCGAGGGCAGCTGCTGGGTGTCAGCG
rice	GAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCC-TCGGCCCGAGGCCATCCGGCC-GAGGGCAGCTGCTGGGCGTCAGCG
tomato	GAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCATTTGGCC-GAGGGCAGCTGCTGGGCGTCAGCG

C : 26Sの5'端部分

<i>C. obtusa</i>	GT--CCCCAAGTCAGGCGTGAATACCCGCTGAGTTAA
<i>C. pisifera</i>	GT--CCCCAAGTCAGGCGTGAATACCCGCTGAGTTAA
<i>Ephedra kokonica</i>	GCGACCCAGGTCAGGCGGACTACCCGCTGAGTTAA
rice	GCGACCCAGGTCAGGCGGACTACCCGCTGAGTTAA
tomato	GCGACCCAGGTCAGGCGGACTACCCGCTGAGTTAA

図-2 rDNA 遺伝子領域の塩基配列
*は塩基配列に差異のみられた箇所