

DNA塩基配列からみたアジア産五葉松類の分類

九州大学農学部 渡辺 敦史・白石 進

1. はじめに

マツ属は針葉樹最大の属であり、多くの研究者によって分類が試みられている^{2,3,4}。分類の指標としては針葉内維管束数、針葉数、球果、種子翼などの形態的特徴が基本であり²、種間交雑の結果¹も用いられている。これらを指標とした従来の分類に対し、近年のDNA分析技術の発展により、DNA塩基配列情報をもとにして生物の系統進化および分類を検討するDNA分類学・系統学が確立した。マツ属に関しても、RFLP分析 (restriction fragment length polymorphism) を用いることで系統進化を推定する試みがなされている⁵。

本研究ではアジアに分布する五葉松類の9種のうち、6種について葉緑体DNA上にある3カ所のスペーサー領域のDNA塩基配列を決定した。得られた塩基配列を樹種間で比較し、その分類について検討した。

2. 材料と方法

(a) 供試樹種及びDNA抽出

本研究で供試した樹種を表1に示した。DNA抽出は既に報告した白石・渡辺の方法に従った⁵。

(b) 塩基配列決定

DNA塩基配列を決定したスペーサー領域はすべてtRNAに関与する遺伝子、CS1 (*trnL-trnF*: 393bps)、CS2 (*trnD-trnY*: 345bps)、CS3 (*trnP-trnW*: 223bps) に挟まれた inter genic spacer である。塩基配列決定はこれらの領域をPCRした後、その産物を自動蛍光シーケンサー (A. L. F. DNA sequencer, Pharmacia Biotech Japan) によってダイレクトシーケンスした。

3. 結果と考察

スペーサー領域は非コード領域であるため、検出される塩基置換のほとんどが中立突然変異と考えられる。そのため、塩基置換数は種分岐後の経過時間に比例する。本研究で決定した3領域の塩基配列を図1に示した。このうち最も変異が多く検出されたのはCS1であ

った。5座位で塩基置換が観察され、1カ所で3塩基のギャップが存在していた。CS2では塩基置換が1座位と4塩基のギャップが1カ所で観察された。CS3はすべての樹種間で同一の塩基配列であった。ギャップはすべて、*P. griffithii* と他の樹種間で観察された。

3領域で観察された変異 (塩基置換数とギャップ数) について樹種間で比較し、その結果を表2に示した。樹種間で最も多くの差異が観察されたのは *P. griffithii* である。この結果から、*P. griffithii* はアジアに分布する他の樹種と系統的に異なっており、かなり早い時期にこれらの樹種と種分化したことが示唆された。*P. koraiensis* も同様に3~4座位で塩基置換が検出され (*P. griffithii* 以外の4種)、他の樹種と早い時期に種分化したと考えられる。また、わが国固有である *P. parviflora* およびその変種である var. *pentaphylla* についても1座位で他の樹種と異なることが明らかとなった。

LITTLE and CRITCHFIELD はアジアに分布する五葉松類を1節 (sect. *Strobus*)、2亜節 (subsect. *Cembrae*, subsect. *Strobi*) に分類した²。本研究で調査した樹種のうち、subsect. *Cembrae* には *P. koraiensis*, *P. pumila* の2種が属しており、残る4種は subsect. *Strobi* に分類されている。今回の結果から、亜節が異なる *P. pumila*, *P. armandi*, *P. fenzeliana* が全く同一の塩基配列であったこと、*P. griffithii* が同じ亜節内の樹種と系統的にかなり異なると考えられることから、この2亜節については分類を再考する必要がある。そのため、樹種を増やすとともに、塩基配列レベルだけでなく、RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法⁷ などのより変異性に富んだDNA分子マーカーについても検討する必要がある。

引用文献

- (1) DUFFIELD, J. W. : Z. Forstgenet., 1, 93-100, 1952
- (2) LITTLE, E. L., Jr., and CRITCHFIELD, W.B. : Subdivisions of the Genus *Pinus* U. S. Dept. Agric. Misc. Publ. No. 1144, Washington, D. C., 1969

表-1 供試樹種

種名	和名	分布域	莖節	採取場所*
<i>P. pumila</i> (Pallas) Regel	ハイマツ	東シベリア・中国東北部・朝鮮半島・日本	<i>Cembrae</i>	A
<i>P. koraiensis</i> Sieb. et Zucc.	チョウセンゴヨウ	朝鮮北部・中国東北部・シベリア東部・日本	<i>Cembrae</i>	A
<i>P. parviflora</i> Sieb. et Zucc.	ヒメコマツ	日本	<i>Strobi</i>	B
var. <i>pentaphylla</i> (Mayr.) Henry	キタゴヨウ	日本	<i>Strobi</i>	A
<i>P. armandi</i> Franch		中国	<i>Strobi</i>	B
var. <i>mastersiana</i> Hayata	タカネゴヨウ	台湾	<i>Strobi</i>	D
var. <i>amamiana</i> (Koidz.) Hatusima	ヤクタネゴヨウ	屋久島・種子島	<i>Strobi</i>	C
<i>P. fenzeliana</i> Handel.- Mazz.		海南島	<i>Strobi</i>	B
<i>P. griffithii</i> Mc Clelland	ヒマラヤゴヨウ	ヒマラヤ	<i>Strobi</i>	B

* : A 森林総合研究所 C 林木幾種センター九州育種場
 B 京大農学部付属演習林上賀茂試験地 D TAIWAN FORESTRY RESEARCH INSTITUTE

- (3) MIROV, N. T. : The Genus *Pinus* Ronald Press, N. Y., 1967
- (4) SHAW, G.R. : The Genus *Pinus*, Public. Arnold Arboret. No. 5, Riverside Press, Cambridge, MA., 1914
- (5) 白石 進・渡辺敦史 : 日林誌, 77, 429 - 436, 1995
- (6) STRAUSS, S. H. and DOERKSEN A. H. : Evolution, 44 (4), 1081 - 1096, 1990
- (7) WILLIAMS, J. G. K. ほか : Nucleic Acids Res., 18, 6531 - 6535, 1990

表-2 樹種間における配列上の差異

<i>P. pumila</i>					
<i>P. koraiensis</i>	3				
<i>P. parviflora</i>	1	4			
<i>P. armandi</i>	0	3	1		
<i>P. fenzeliana</i>	0	3	1	0	
<i>P. griffithii</i>	5(2)	7(2)	6(2)	5(2)	5(2)

() はギャップの数で内書き。
P. armandi および *P. parviflora* は変種を含む

CS1

A	CACCCAAGTT	CGTCCCGAA	CGGACTGATC	TATTTTCCTC	AATCCATTG	GTTCAAAATC	ATTCTAATTT	CTTCTCTTAG	AGAAGAAAT	AGAACATGAA	100
PK	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
PP	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
PG	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
A	TCTTTTCATC	CATCTTATGA	CAAGTTGAGT	TGATCCGTTA	ATCAGTTGAT	CATATGATCA	ATTCAATTTG	TGATATATGA	TCTACATAGA	TTAGATCGTT	200
PK	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
PP	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
PG	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
A	TGAAATTTAT	CAATTTGCA	CCATTTTTC	TCATATTAGT	GACTTCCAGA	TCGAAATAA	TAAAGATCAT	TGTAAAAC	GGGAAAATA	CTTTTTCCT	300
PK	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
PP	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
PG	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
A	ATTTTATAGT	GACATAAGTT	AAGAACCTGT	ACCAGGATGA	TCCACAGGGA	AGAGCCGGGA	TAGCTCAGTT	GGTAGAGCAG	AGGACTGAAA	ATC	393
PK	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
PP	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
PG	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

CS2

B	CAATTGAAC	ACAATCCAA	TACACTACAT	ACAGTTCACC	TACTATTGGA	TCATATTTAT	TCTATGATAG	GTGCTAGATA	GATCGTATAG	ATTATGCGAG	100
PG	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
B	TGCTAGGTCG	ATGAAATATC	TTATCCTTCT	CTTTCATTTT	TGAAATGAT	CCATTCATTT	CATTTGGAAT	TGGGCATCTA	CGATATGAAC	AGATATCGAT	200
PG	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
B	GTCGGGTTTC	AATAACCAAT	TATCTTTTCA	TTCATGATTT	GCATGAAGAT	AACCATACCG	ATGATTTGGT	ATTGATGATA	TTGGTTGGGT	CGAGCTGGAT	300
PG	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
B	TTGAACCAGC	GTAGGCATAT	TGCCAACGGA	TTTACAGTCC	GTCCT						345
PG	*****	*****	*****	*****	*****						

CS3

C	TACAAAATGT	CGCAGGTTCA	AATCCTGTCA	TCCCTACTTT	TCCCTTCTTT	TCTATGAAA	GAAAGGAACG	AAAGATCAT	TGATATCGAT	TCCAGCGGAA	100
C	CATCAAATAA	TTGAATCATA	TCAGATGCGA	AAGTATTTGA	CTCTAAGAGT	ATAAACAAA	GGTATTTTCC	TTTATCTACG	AATATGAAAG	AAAGCGCTCT	200
C	TAGTTCAGTT	CGGTAGAACG	TAG								223

図-1 スペーサー領域の塩基配列

PK *P. koraiensis* PP *P. parviflora* (変種を含む) PG *P. griffithii* A: Pk, PP, PG以外の樹種 B: PG以外の樹種 C: 全樹種