

## DNA 材鑑データベースの構築

九州大学農学部 吉開 久代・渡辺 敦史  
白石 進

## 1. はじめに

近年の分子生物学的手法の発展はめざましく、特定の遺伝子領域を増幅させることが可能な PCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) 法と DNA 塩基配列決定技術は従来と比較して容易になってきており、多数の生物種において、塩基配列情報が飛躍的に増加した。これらの情報を基に、生物の系統進化および分類に関する多数の新知見が報告されている。

これまで、木部を対象とした樹種識別は、木材組織学的手法が利用されてきた。しかし、この手法はかなりの熟練が必要とされ、また種レベルでの識別は非常に困難とされている。そこで、これまで DNA 塩基配列を利用した新たな鑑定法の開発を進めてきた。すでに、PCR 法により木部に残存する微量 DNA からの増幅が可能であり、増幅 DNA を鋳型として塩基配列を決定できることが明らかにされた。

この手法を用いて樹種鑑定を行うためには、あらかじめ樹種の DNA 塩基配列情報が整備されている必要がある。本研究では、木材の樹種鑑定を行うために必要な塩基配列のデータベースを構築するための基礎的研究として、葉緑体 DNA 上に存在する *rbcL*、*atpA* 遺伝子を対象に、樹種識別能の高い DNA 領域の検索とその評価を行った。

## 2. 使用した DNA 塩基配列情報

DNA 材鑑に利用する DNA 領域を検討するに当たり、既に塩基配列が明らかにされている、マツ属 24 樹種の *rbcL* 遺伝子 (1309bps) と、ミズキ科およびその近縁種 (以下ミズキ科) 15 樹種の *atpA* 遺伝子 (1084bps) を用いた (未発表)。

さらに、データベース GENBANK から針葉樹 17 樹種と広葉樹 12 樹種の *rbcL* 遺伝子と、針葉樹 3 樹種と広葉樹 17 樹種の *atpA* 遺伝子を検索し、合わせて用いた。

## 3. 結果及び考察

木部に残存する DNA は微量であるが、PCR 法を用いることで特定領域の増幅が可能であることは既に報告している<sup>1)</sup>。しかし、低分子化が進んでいることから、長い配列の増幅は難しく、増幅が可能な領域としては約 400bps 程度と思われる。今回は、より確実な PCR 増幅を可能にするために、増幅 DNA 領域を 200~250bps 程度に設定し、高い樹種識別能を有する DNA 領域の検索を行った。同一のプライマーを用いて広範囲の樹種で PCR 増幅を可能にするためには、保存性の高い DNA 領域にプライマーを設定する必要があるため、この点についても考慮した。

まず、今回使用した塩基配列を用いて、樹種間の変異性 (塩基置換数) を *rbcL*、*atpA* 遺伝子それぞれについて検討した。*rbcL* 遺伝子では、1309bps のうち、31.9% にあたる 417 サイトで塩基置換が観察された。全長 1309bps を 20bps 毎に区切り、各ブロックにおける塩基置換数を図 1 に示した。*rbcL* 遺伝子は塩基置換が特定の領域に偏っておらず、いわゆるホットスポットは存在していなかった。前述した設定条件を満足させるいくつかの領域が存在し、その中から 3 領域 (図 1 の a, b, c) を選んだ。この 3 領域における変異性は 32.1% と全体で観察された値とほぼ同程度であった。*rbcL* 遺伝子と同様の検討を *atpA* 遺伝子についても行い、その結果を図 2 に示した。*atpA* 遺伝子は 1084bps のうち 303 サイトで置換が観察された。これは、全体の 28.0% にあたり、*rbcL* 遺伝子より若干低かった。*atpA* 遺伝子に関しても、*rbcL* 遺伝子と同じく 3 領域 (図 2 の a, b, c) が今回の設定条件に適合していた。特に c 領域における変異性は高く (44.2%)、この領域はホットスポットであると考えられる。

今回選んだこれらの領域が、実際にどの程度の樹種識別能を有しているかを評価するために、*rbcL* 遺伝子ではマツ属 24 樹種、*atpA* 遺伝子ではミズキ科 15 樹種を対象に検討を行った。

マツ属 24 樹種の *rbcL* 遺伝子は、a 領域で 8 グループに、b 領域で 13 グループに、c 領域で 7 グループに分類された。3 つの領域を合わせて用いると 16 グループに識別された (表 1)。ミズキ科 15 樹種の *atpA* 遺伝子では、a 領域で 11 グループに、b 領域で 10 グループに、c 領域で 10 グループに分類可能であり、3 つの領域を合わせて用いると 12 グループに識別できた (表 2)。*rbcL*, *atpA* 遺伝子の全塩基配列を利用した場合でも、マツ属は 17 グループに、ミズキ科は 12 グループにしか識別出来ない。このことから、今回設定した領域だけで、非常に高い識別能力が得られることが確認された。しかし、今回用いた *rbcL* と *atpA* 遺伝子の DNA 情報だけで、すべての樹種を完全に識別することはできなかった。今後、より多くの領域を設定し、情報量をふやすことによって、近縁な種間を識別できる可能性は高くなる。また、*rbcL*, *atpA* といった遺伝子コード領域よりさらに変異性の高い領域、例えばスペーサー領域などの利用も検討する必要がある。

引用文献

- 1) 白石 進: 日本木材学会ウッディエンス 第 24 号, 1993

表-1 *rbcL* の 3 領域で行った樹種識別の結果: マツ属植物 24 種

種 名	a	b	c	
<i>P. koraiensis</i>	I	I	I	↑ I
<i>P. a. var armandi</i>	I	I	I	
<i>P. armandi</i>	I	I	I	
<i>P. pentaphylla</i>	I	I	I	↓ I
<i>P. pvar parviflora</i>	I	I	I	
<i>P. pumila</i>	II	I	I	II
<i>P. fenzeliana</i>	III	I	I	III
<i>P. bungeana</i>	IV	II	II	IV
<i>P. gerardiana</i>	V	III	II	V
<i>P. luchuensis</i>	VI	IV	III	↑ VI
<i>P. tabulaeformis</i>	VI	IV	III	
<i>P. taiwanensis</i>	VI	IV	III	↓ VI
<i>P. hwangshanensis</i>	VI	IV	III	
<i>P. densiflora</i>	VI	V	IV	↓ VII
<i>P. funebris</i>	VI	V	IV	↓ VIII
<i>P. yunnanensis</i>	VI	VI	III	VII
<i>P. thunbergii</i>	VI	VII	III	IX
<i>P. roxburghii</i>	VII	VIII	IV	X
<i>P. pinea</i>	VII	VIII	V	XI
<i>P. massoniana</i>	VII	IX	VI	XII
<i>P. merkusii</i>	VII	X	IV	XIII
<i>P. palustris</i>	VIII	XI	VII	XIV
<i>P. radiata</i>	VIII	XII	VII	XV
<i>P. sylvestris</i>	VI	XIII	IV	XVI

表-2 *atpA* の 3 領域で行った樹種識別の結果: ミズキ科 15 種

種 名	a	b	c	
<i>Cornus kousa</i>	I	I	I	↑ I
<i>Cornus officinalis</i>	I	I	I	
<i>Cornus capitata</i>	I	I	I	
<i>Cornus brachypoda</i>	II	II	II	II
<i>Cornus controversa</i>	II	II	III	III
<i>Cornus alba</i>	III	II	IV	↑ IV
<i>Mastixia trichotoma</i>	III	II	IV	
<i>Nyssa siensis</i>	IV	III	V	V
<i>Davidia involucrata</i>	V	IV	V	VI
<i>Deutzia gracilis</i>	VI	V	VI	VII
<i>Hydrangea microphylla</i>	VII	VI	VII	VIII
<i>Cornus canadensis</i>	VIII	VII	IV	IX
<i>Itea chinensis</i>	IX	VIII	VIII	X
<i>Alangium platan</i>	X	IX	IX	XI
<i>Philadelphus nepalensis</i>	XI	X	X	XII

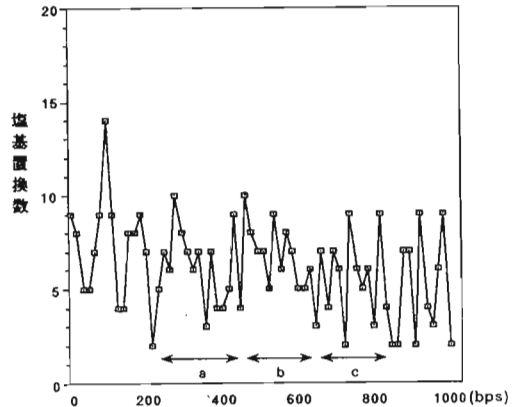


図-1 *rbcL* の各領域における塩基置換数

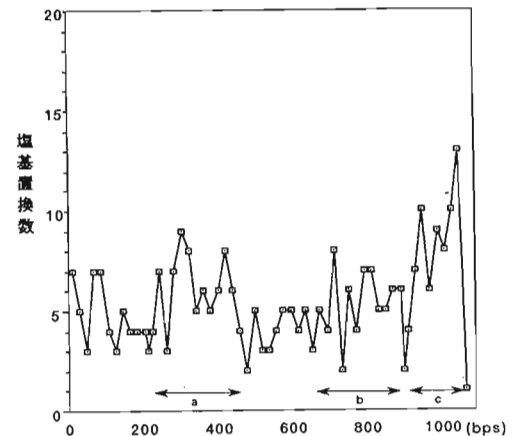


図-2 *atpA* の各領域における塩基置換数