

マツ近縁種間における葉緑体 DNA スペース領域の シーケンス変異

— Virginia pine と Sand pine 間の変異 —

九州大学農学部 渡辺 敦史・白石 進

1. はじめに

Shiraishi and Watanabe は、葉緑体 DNA 上にコードされている遺伝子領域の塩基配列情報を用いて、マツ属における系統関係解明および分類体系の再構築を行ってきた(未発表)。その結果、従来の分類体系³⁾とは全く異なる新たな分類体系を構築した。しかし、最小の分類単位である亜節内の系統関係に関しては、必ずしも十分な信頼性を得ることはできなかった。4種で構成され、比較的多くの変異が確認された Subsection *Contortae* もまた、種間の分岐は必ずしも明確ではなく、特に、*P. clausa* (Chapm.) Vasey (Sand pine) と *P. virginiana* Mill. (Virginia pine) 間は全く同一の塩基配列となったことから、極めて近縁であるという以外に詳細な情報を得ることができなかった。Sand pine と Virginia pine だけでなく、他のいくつかのマツ近縁種間についても、遺伝子領域における情報量は必ずしも十分ではない。今後、マツ属の詳細な系統関係解明を行うためには、より進化速度の速い領域の探索を行うことが必要不可欠である。

本研究では、遺伝子領域に代わる遺伝子間スペース領域の開発を行った。マツ近縁種間の中でも特に近縁であると考えられる Sand pine と Virginia pine に関して、遺伝子間スペース領域の塩基配列を決定し、遺伝子領域と比較することによって、遺伝子間スペース領域の系統関係解明に対する有効性を検討した。また、得られた結果を基に、Sand pine と Virginia pine の種間関係について考察を行った。

2. 材料と方法

供試個体は、京都大学上賀茂試験地から採取した Sand pine および Virginia pine 各 1 個体を用いた。

全 DNA の抽出、PCR (polymerase chain reaction) 増幅、シーケンシングについては、全て既に報告している方法⁹⁾に従って行った。

本研究では、*matK* - *trnK* 間スペース領域 (792bps) の開発を行った (図 1)。この領域の PCR 増幅に用いたプライマーの塩基配列は、5'-TGTAACACGACGGCCAGTGGGTTGCTAACTCAATGGTAGAGTAC-3'、5'-CAGGAAACAGCTATGACCCGCATCTATGGAACTCACCAT-3' である。

3. 結果と考察

最近、系統関係解明において最も広く利用されてきた *rbcL* 遺伝子に代わる新たな領域の開発が盛んに行われている。中でも、*trnK* 遺伝子のイントロン領域で発見された *matK* 遺伝子は、進化速度が速いことから、近年最も注目されている領域の一つである³⁾。また、アミノ酸をコードしないスペース領域は、遺伝子領域と比較して塩基置換率が高く、Gielly and Taberlet (1994) や Small *et al.* (1998) によって、約 2 倍の塩基置換率となることが報告された。本研究では、進化速度が速いと推定される *matK* 遺伝子と *trnK* 間の遺伝子間スペース領域 (図 1) を新たに開発し、近縁種間での系統関係解明の利用に対する検証を行った。

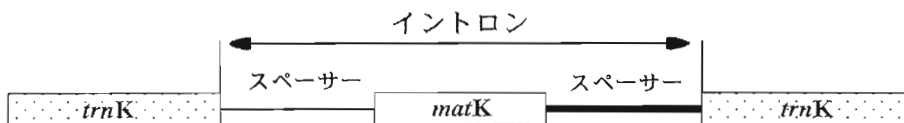


図-1 *matK* - *trnK* スペース領域の模式図
太線の部分が本研究で決定した領域

Sand pine と Virginia pine について、*matK-trnK* 間スペーサー領域の塩基配列を決定した結果、614番目に、Sand pine と Virginia pine 間で Sand pine が T、Virginia pine が G である転換型の塩基置換を検出した(図2)。これまで葉緑体 DNA 上にコードされている3遺伝子の塩基列(3,213bps)からは、両種間の差異を検出できなかった。しかし、本研究の結果、*matK-trnK* 間スペーサー領域762bpsの塩基配列を用いることによって、両種間の差異を確認することができた。

Wheeler *et al.* (1983) はアイソザイム分析の結果を基に Subsect. *Contortae* の系統関係解明を試みた結果、Sand pine と Virginia pine 間には明確な分岐が認められないことから、両種は別種ではなく、形態的、生態的に異なる亜種であると結論づけた。一方、Parker *et al.* (1997) は、アイソザイム分析をさらに詳細に行い、遺伝的差異は極めて小さいが、両種の間には明確な分岐があり、ごく最近になって、両種は分岐したと報告した。種内変異についても今後検討する必要性はあるが、他のマツと比較して、Sand pine と Virginia pine は遺伝的多様性が必ずしも高くはないことから⁶⁾、本研究で得られた塩基置換が種間の差異を反映している可能性は十分考えられる。

Sand pine と Virginia pine 間の変異は、遺伝子領域では全く認められなかったが、*matK-trnK* 間スペーサー領域では1塩基置換が存在した。本研究で新たに開発したスペーサー領域は、遺伝子領域と比較してより速い進化速

度を持つと推定される。このことは、Sand pine と Virginia pine 以外のマツ近縁種間でも、遺伝子間スペーサー領域を用いることにより、より多くの情報が得られる可能性を示している。既に、極めて近縁と考えられてきた五葉松類では、葉緑体 DNA 遺伝子間スペーサー領域の有効性が報告されており⁸⁾、今後、スペーサー領域塩基配列情報を蓄積することによって、マツ近縁種間および亜節内の系統関係を解明することができると考えられる。

引用文献

- (1) GIELLY, L. and P. TABERLET.: Mol. Biol. Evol., 11, 769~777, 1994
- (2) HILU, K. W. and H. LIANG: Amer. J. Bot., 84, 830~839, 1996
- (3) LITTLE, E. L., and W. B. CRITCHFIELD.: U. S. Dept. Agric. Misc. Publ. No. 1144, 1969
- (4) 西山和美・白石 進:日林九支研論, 51, 25~26, 1998
- (5) PARKER, K. C., *et al.*: Amer. J. Bot., 84, 1372~1382, 1997
- (6) PARKER, K. C., and J. L. HAMRICK: Can. J. For. Res., 26, 244~254, 1995
- (7) SMALL, R. L., *et al.*: Amer. J. Bot., 85, 1301~1315, 1998
- (8) 渡辺敦史・白石 進:日林九支研論, 49, 57~58
- (9) WHEELER, N. C., R. P. GURIED and D. M. O'MALLEY: Bio. Sys. Ecol., 11, 333~340, 1983

Sand pine	ACTCGGCTTT TAAGTGCAC TAAGATCTTT TACACATTTG AATGAAGTAG AAAACTCGTC	
Virginia pine	
	GATACCATCG GTAAAGTTCG GAAGACTACG ACTGATCCTC GAAGTATAAT GAACGGAAAA	120
	
	AAAAGCATGT CGTTCCAACA TATGATCTTT ATTATACCTG ATATTATTTC TCGGATACCT	
	
	GATTGTATTC GATCAGGACC GGATCTTATT TAAGGAATAA AATGGGTGGG AAATGTCTAT	240
	
	TATATACCTA GATGGATGTA TAATATGTTC ATCCTTTCGG ATCAAATGTG ATAATTTGTA	
	
	ATAGGATTGA ATCAATTCGC GGTTAAGTTCG AATGAGTCAA TGGAGAAAGC TATATGACTT	360
	
	GAATCATAAG TAGACCCAGA GAAACGAGCT TCTGTTCCCTC GTTCCAATTA AGTGAGCGAG	
	
	GAATTC CCTT TACTGATCAG AAGTTAAGAG CAGTTTAGTA CCCGATATCG GGAGGTTTTC	480
	
	CCTGAGTAGA TCAGGGATTT ATACACTCAC AATGAGTCCT AAATACTCGA GTACAGATGT	
	
	GTAAGATAAA TAGTGTACTG ACCAGGTTTA TTAATTCAT GAGTCAGGAG AGCGATTGGT	600
	
	TGCCAGGATA AAATATTTTC GTTCTTCCTC ATGACGAATG AGATCCCTTG GTAGTAAATC	
	
	TATAGAAGAT AGAATATTTA TATCCGGATA TATATCTTTT TTCCTATCTT GTTCCGACTA	720
	
	GATCGCACCA TGTATTTTAT CAAAAATGAA GAGGTTATTC TCATGAACGA GGGCCATAGC	
	
	TGAGGGTTTA AA	792
	

図-2 *matK-trnK* スペーサー領域の塩基配列