

---

ハイマツ・キタゴヨウ間の交雑帯の遺伝的構造  
—樹木の浸透性交雑現象のモデル系—

---

(課題番号: 12640679)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(1))  
研究成果報告書

平成14年3月

千葉大学附属図書館



20002816085

研究代表者 綿野 泰行

(千葉大学理学部生物学科)



## はしがき

平成12年度から平成13年度にかけての2年間、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究(C)(1))を受けて「ハイマツ・キタゴヨウ交雑帯の遺伝的構造—樹木の浸透性交雑現象のモデル系—」の解析を行った。これは、その研究成果報告書である。

植物では種間交雑が一般的な現象であるのだが、雑種または交雑起源種の両親種の特定といった分類学的な問題のみがクローズアップされ、動物の交雑帯の研究のように、交雑現象自体に観点を持った研究が少ない。本研究を含め、最近の分子マーカーを用いた交雑現象の解析は、生殖的に隔離されている“はず”の種の間でのダイナミックな遺伝子の動きを明らかにしつつある。交雑帯は、この種間での遺伝子流動の進化的な意味や、種という単位を維持している進化的力について改めて考えを深めるために重要な研究材料である。

本研究では、ハイマツ・キタゴヨウ交雑帯の解析の道具として、複数の EST マーカーやマイクロサテライトマーカーの開発を行った。今までの解析(Watano et al., 1995, 1996; Senjo et al., 1999)で用いたミトコンドリアと葉緑体のマーカーも合わせれば、遺伝様式の異なった3つのゲノム全てについて遺伝マーカーを整備したことになる。樹木での浸透性交雑研究のモデルとして今後、多くの研究がこの系を利用してなされることを期待する。

核ゲノムの遺伝マーカーとしてはアロザイム多型が昔から広く用いられている。ただアロザイムでは、使用できる酵素遺伝子座の数が限られてしまうこと、酵素タンパクを用いるので生の材料を必要とするなど、欠点が存在する。DNA マーカーは、利用できる遺伝子座に原理上の制限が無く、アロザイムより定量的な解析が可能となる。ただ RAPD や AFLP など簡便に多くのマーカーを開発できる方法は、優性遺伝マーカーのため個体の遺伝子型推定ができなかったり、機器依存の実験再現性のために、研究者間での情報の結合性(connectibility of information)が弱かったりという問題を含む。本研究で開発したマーカーは共優性マーカーであり、情報の結合性も持つ。ハイマツとキタゴヨウだけでなく、マツ属全般でアロザイムと同様な解析を行うことが出来る分子マーカーである。さらに、EST を利用したマーカー作成の方法は、どのような材料にも利用できる。シダ植物で同じ手法を用いた仕事を第4章に加えた。参考にしてもらいたい。

### 研究組織

研究代表者 綿野 泰行 (千葉大学・理学部・助教授)

研究分担者 谷 尚樹 (独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・技官)

### 研究経費

平成12年度	2,100 千円
平成13年度	1,600 千円
計	3,700 千円

千葉大学附属図書館



20002816085

## 研究発表

### (1) 学会誌等

綿野 泰行. 2001. 種を越えた遺伝子の流れ: ハイマツ—キタゴヨウ間におけるオルガネラ DNA の遺伝子浸透. 種生物学研究 No.23: 112-138.

綿野 泰行. 2001. SSCP分析法. 種生物学研究 No.23: 263-274.

Ishikawa, H., Watano, Y., Kano, K., Ito, M. and Kurita, S. 2002. Development of primer sets for PCR amplification of the *PgiC* gene in ferns. Journal of Plant Research 115: 65-70.

### (2) 口頭発表

綿野 泰行. 「ハイマツとキタゴヨウにおける浸透性交雑現象の解析」 日本植物学会(静岡大学 2000年9月)

石川寛・綿野泰行・伊藤元巳・栗田子郎. 「シダ類の核遺伝子 *PgiC* の PCR プライマーの汎用性」 日本植物学会(静岡大学 2000年9月)

綿野 泰行. 「ハイマツ・キタゴヨウ交雑帯における核 DNA マーカーによる分子ハイブリッドインデックスの推定」 日本植物分類学会(岐阜大学 2001年3月)

## 目次

1. ハイマツとキタゴヨウの交雑帯の遺伝的構造の分子ハイブリッド指数による解析 綿野泰行-----	4
2. 核遺伝子を用いたマツ属ストロブス亜属の種間系統解析 加藤俊英・綿野泰行-----	32
3. Development of primer sets for PCR amplification of the <i>PgiC</i> gene in ferns Hiroshi Ishikawa, Yasuyuki Watano, Kenji Kano, Motomi Ito and Siro Kurita -----	43
4. ゴヨウマツ類のマイクロサテライトマーカーの開発 谷尚樹-----	49

# ハイマツとキタゴヨウの交雑帯の遺伝的構造の 分子ハイブリッド指数による解析

綿野 泰行(千葉大学理学部生物学科)

## はじめに

植物における浸透性交雑現象の研究は、近年、分子マーカーを用いて直接的に種間での遺伝子浸透を記述することが可能となったため、大きく発展しつつある(Rieseberg 1995)。特に、細胞質捕獲 cytoplasmic capture という現象の発見は、種間での細胞質ゲノムのダイナミックな遺伝子流動が存在することを示し、進化生物学者に大きなインパクトをもたらした(Rieseberg and Soltis 1991)。これは、種間交雑を通じて一方の種の細胞質ゲノムが他方の種に取りこまれる現象で、葉緑体系統樹の種系統樹からの歪みから発見された。また、細胞質捕獲が起こっている多くのケースで、形態の変化や核遺伝子の浸透はほとんど検出されず、このことから核遺伝子よりも細胞質遺伝子の方が浸透しやすい傾向があるのではと考えられている(Rieseberg and Wendel 1993)。この理由については、核ゲノムへの自然淘汰や、細胞質雄性不稔の影響など様々な可能性が考えられているが、いまだ統一的な見解は得られていない。

本研究では、ハイマツとキタゴヨウの交雑帯の遺伝学的解析の道具として、両種の種特異的な核のマーカー遺伝子座を複数開発し、交雑帯の各個体の雑種性(ハイマツとキタゴヨウの遺伝子の組成比)を定量推定することを試みた。後に述べるように、マツ科植物では2つの細胞質ゲノム(葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA)が、それぞれ父性と母性という別の遺伝様式を持つ。そのため、遺伝子浸透においても独自の浸透パターンを示しうる。実際のところ、ハイマツとキタゴヨウの交雑帯では、葉緑体 DNA はキタゴヨウ由来のものがハイマツへ、一方、ミトコンドリア DNA では反対にハイマツ由来のものがキタゴヨウへと、逆の一方方向性の浸透を起こしていることが明らかとなっている(Watano et al. 1995, 1996; Senjo et al. 1999)。今までの研究では、浸透の方向性や程度を推定するために、針葉の解剖学的形質を基準として用いてきた。しかし、この針葉形態の遺伝的背景は不明であり、したがって、雑種性の程度を推定することが不可能であった。一方、複数の核分子マーカーを用いれば、より客観的に雑種性を推定することが可能であり、それを基準に葉緑体 DNA やミトコンドリア DNA の浸透の程度を比較することが可能となる。

## ハイマツとキタゴヨウ

ハイマツ *Pinus pumila* (Pallas) Regel は日本では高山帯に生育する匍匐性の低木である。分布はかなり広く、中国東北部、東シベリアから朝鮮半島、カムチャッカ、千島列島そして日本の南アルプス丸盆山が南限とされている(Mirov 1967, 清水 1996)。一方、キタゴヨウ *P. parviflora* Sieb. et Zucc. var. *pentaphylla* (Mayr) Henry は亜高山帯から山地帯に分布する低木で、日本固有である。両種ともマツ属ストロブス亜属 *Pinus* subgenus *Strobilus* に属している(Price et al. 1998)。この2種は日本の本州中部から北海道東部にかけて広く分布域が重なっているが、生育する標高域の違いにより隔離されている。一般に本州中部の山岳ではオオシラビソやコメツガなどから構成される亜高山帯性針葉樹帯がよ

く発達しており、このゾーンによってハイマツとキタゴヨウの隔離がおこっていることが多い。しかし東北南部以北では亜高山帯性針葉樹帯が形成されないか、未発達な場合が多く、そのため両者が接触し、交雑帯を形成している。

この両種の雑種はハッコウダゴヨウ *P. hakkodensis* Makino として牧野・根本(1931)によって「ゴエフマツ ト ハヒマツノ間種ニシテ樹幹斜上ス」という日本語の短い記載文をつけて発表された。石井(1941)は、ハイマツ、キタゴヨウとの詳細な形態の比較を行い、“ハッコウダゴヨウ型”ゴヨウマツの記載を行っている。しかし、交雑帯には様々な形質を示す中間型個体が存在し、当然のことに石井(1941)の記載から外れる中間型が多く存在する。そこで、本研究では混乱を防ぐためハッコウダゴヨウという名を使用せず、単に中間型と呼ぶことにする。

#### ハイマツとキタゴヨウの交雑帯の研究上の利点

ハイマツとキタゴヨウの交雑帯は、樹木の浸透性交雑現象の解析を行う上で幾つかの利点を持っている。

まず第一に、マツ科植物の細胞質ゲノムの遺伝様式の特異性である。多くの植物では、葉緑体 DNA (cpDNA)もミトコンドリア DNA (mtDNA)も基本的に母性遺伝であるのに対し(Mogensen 1996)、マツ科植物ではcpDNA が父性遺伝、mtDNA が母性である(Neale and Sederoff 1989, Sutton et al. 1991)。つまり、子供の葉緑体は父親の花粉からもたらされ、ミトコンドリアは母親の胚嚢由来となる。このように2つの細胞質ゲノムが遺伝的に独立であり、浸透性交雑における父系の流れと母系の流れを、区別して観察することが可能である。遺伝子の移動媒体に関しても、父性である葉緑体 DNA は種子でも花粉でも移動できるが、母性であるミトコンドリア DNA は種子でしか移動できない。このように、移動媒体の違いが浸透に及ぼす効果も解析対象となりうる。

第二に、複数の独立した交雑帯が存在することも利点となる。ハイマツの分布は、高山の頂上部に限られるので、日本では島状の分布を示す。したがって交雑帯も各山ごとに独立に存在している。もし、これらの交雑帯が独立に形成されたのだとすれば、各交雑帯の遺伝的構造の比較により、ハイマツとキタゴヨウが浸透性交雑を行った場合の、一般的事象と個別的事象の区別を行うことができる。一般的事象からは、ハイマツとキタゴヨウの間の生殖的隔離の性質などの生物学的要因を探ることができる。また、個別的事象からは、地理的要因や地史的要因が、どの程度交雑帯の構造に影響を与えているかを探ることができる。

最後に、マツ属は林業上の有用樹種であり、アメリカの IFG(Institute of Forest Genetics)などで、ゲノムマッピングなどのゲノム解析プロジェクトが進行中であり、その成果をマーカー作成に利用することができる。本研究では Temesgen et al. (2001)の ESTP (expressed sequence tag polymorphism) primers をハイマツとキタゴヨウの核遺伝子マーカーとして利用するために用いた。これら PCR プライマーは論文として発表される前から、Dendrome という樹木ゲノムデータベースの WEB (<http://dendrome.ucdavis.edu/>) で公開されていた。詳細な遺伝学的研究にはゲノム情報は不可欠であり、近縁種群でゲノム解析プロジェクトが行われていることは非常に有益である。

## 材料と方法

### 解析に用いた集団

核遺伝子マーカーを用いて遺伝的構造を解析した交雑帯は新潟県と群馬県の県境の谷川山系と福島県の東吾妻山の2箇所である。谷川山系のサンプル No. の W1 から W25 までは Watano et al. (1995, 1996) で使用されたサンプルと同一である。低標高のサンプル、TN1 から TN45 は、1998 年に採集を行った。TN ナンバーの個体の葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA の結果は、先生(1999)のものを用いた。東吾妻山のサンプルは Senjo et al. (1999) で用いたものと同一である。

核遺伝子マーカーの対立遺伝子の、母種での遺伝子頻度を算定するため、交雑帯に接しておらず浸透の影響を受けていないと考えられる幾つかのハイマツとキタゴヨウ集団の解析を行った。キタゴヨウは石川県白峰村 (Semjo et al. (1999) の Shiramine と同一) と秋田県北秋田郡森吉町 (Semjo et al. (1999) の Moriyoshi と同一) の2集団。ハイマツは白山と乗鞍岳の集団を用いた。このハイマツのサンプルは Tani et al. (1998) で用いられたものと同一である。

### 核マーカーのスクリーニング

ハイマツとキタゴヨウの種特異的マーカーを開発するため、Temesgen et al. (2001) により設計されたテーダマツの ESTP プライマーセットを用いた。

全部で93種類のプライマーセットを作成し、ハイマツとキタゴヨウそれぞれ2サンプルずつをテンプレートとして、増幅の有無を調べた。PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで泳動し、テーダマツの PCR 産物とほぼ同じ大きさで、きれいな1本バンドパターンが得られるプライマーセットを選んだ。PCR の条件は、最初に 95°C 3min、次ぎに 94°C 1min30sec・58°C 1min30sec・72°C 2min のサイクルを3回、さらに 94°C 1min30sec・55°C 1min30sec・72°C 2min のサイクルを3回、さらに 94°C 1min30sec・52°C 1min30sec・72°C 2min のサイクルを34回、最後に 72°C 8min である。

PCR で目的のサイズの物がきれいに増幅された場合、さらにハイマツとキタゴヨウそれぞれを4サンプルずつをテンプレートとして PCR を行い、合計でハイマツとキタゴヨウそれぞれ6サンプルの PCR 産物を用いて、SSCP (single-strand conformation polymorphism) 解析を行った。SSCP は、アト—の AE6290 というスラブゲル電気泳動装置と、循環冷却恒温装置を組合せて行った。綿野 (2001) の方法 (本報告書の添付資料) に従い、グリセリン濃度 2%、泳動温度 20°C の条件で行った。この解析で、ハイマツとキタゴヨウで共有している対立遺伝子が無いものを種特異的なマーカー遺伝子座として選んだ。

種特異的マーカーの候補となった遺伝子座については、種内変異も含め、各個体の遺伝子型の推定にふさわしいように、より解像度の良い泳動条件を求めて、5%と10%のグリセリン濃度でも泳動を行った。最終的な泳動条件を表1に示した。

### 分子交雑指数 molecular hybrid index の最尤推定

交雑帯の個体の雑種性を定量化するため、ハイマツが1、キタゴヨウが0となる分子交雑指数を求めた。この分子交雑指数は、調べた遺伝子の数 (調べた遺伝子座の数の2倍) あ



たりのハイマツ由来の対立遺伝子の数で求めることができる。本研究で最終的に使用したマーカー遺伝子座は8つであるが、交雑の影響を受けていないと考えられるハイマツとキタゴヨウ集団の解析の結果、そのうち6つで、若干の対立遺伝子の共有がみられた。この場合、母種においても分子交雑指数が完全に1か0にならない。そこで、Rieseberg et al. (1998)が用いた交雑指数の最尤推定法を用いた。この方法では使用するマーカーが、完全に種特異的ある必要がない。

この最尤法の説明を行う。ある個体の交雑指数をHIとすると種1からHIの割合で遺伝子を、そして種2から(1-HI)の割合で遺伝子をもっていることになる。Locus1に2つの対立遺伝子があり、それぞれの種の遺伝子頻度をベクトルで以下のようにあらわしてみる。

$$\text{Taxon1Frequency} = \{a_1, b_1\};$$

$$\text{Taxon2Frequency} = \{a_2, b_2\};$$

この場合、HIの割合で種1と種2のジーンプールを混ぜたものを考えると

$$\begin{aligned} \text{IndividualExpectation[HI]} = \\ & \text{Taxon1Frequency} * \text{HI} + \text{Taxon2Frequency} * (1 - \text{HI}) = \\ & \{a_1 * \text{HI} + a_2 * (1 - \text{HI}), b_1 * \text{HI} + b_2 * (1 - \text{HI})\}; \end{aligned}$$

という関数になる。

さて、ある雑種個体の遺伝子型が観察された場合、ある仮説(交雑指数=HI)が正しいと考えた場合の尤度は、上のミックスジーンプールの元でのその遺伝子型の確率となる。したがってAA、AB、BBそれぞれの遺伝子型が観察された場合の尤度は

$$\begin{aligned} \text{Pr[AA, HI]} &= \{a_1 * \text{HI} + a_2 * (1 - \text{HI})\}^2; \\ \text{Pr[AB, HI]} &= 2 * (a_1 * \text{HI} + a_2 * (1 - \text{HI})) * (b_1 * \text{HI} + b_2 * (1 - \text{HI})); \\ \text{Pr[BB, HI]} &= (b_1 * \text{HI} + b_2 * (1 - \text{HI}))^2; \end{aligned}$$

で与えられる。

交雑指数の最尤推定は、この尤度を最大にするHIを求めればよい。複数の遺伝子座の場合には、各遺伝子座での尤度の積の関数をつくれればよい。最尤推定では一般に、尤度の計算を単純にするために、上記の関数の対数をとった対数尤度関数というものを使用する。

$$\begin{aligned} \text{LogPr[AA, HI]} &= 2 * \text{Log} \{a_1 * \text{HI} + a_2 * (1 - \text{HI})\}; \\ \text{LogPr[AB, HI]} &= \text{Log} (a_1 * \text{HI} + a_2 * (1 - \text{HI})) + \text{Log} (b_1 * \text{HI} + b_2 * (1 - \text{HI})) + \text{Log} 2; \\ \text{LogPr[BB, HI]} &= 2 * \text{Log} (b_1 * \text{HI} + b_2 * (1 - \text{HI})); \end{aligned}$$

ヘテロの遺伝子型の場合にLog2という定数が生じるが、これは最尤推定には関係ないので無視して良い。したがって、最終的に複数の遺伝子座での対数尤度関数は、雑種が持っている個々の遺伝子のミックスジーンプールでの頻度の対数の和となる。

$$\text{LogLikelihoodHI[HI]} = \sum_{\text{Locus}=1}^n \{ \text{Log} (p_{\text{Locus},1}) + \text{Log} (p_{\text{Locus},2}) \}$$

ここで $p_{\text{Locus},1}$ と $p_{\text{Locus},2}$ はLocusという遺伝子座の1番目または2番目の遺伝子のミックスジーンプールでの頻度である。最尤値を求める計算にはMathematica4.1(Wolfram Reserch)を用いた。

## 結果

### テーダマツ EST(expressed sequence tag)ライブラリーのスクリーニング

テーダマツでは大規模な cDNA ライブラリーが構築されつつあり、EST も現在では何千と利用可能である。これらマーカーを用いてゲノムマップを作成する際には、幾つかの方法がある。古典的なのは RFLP を行って cDNA プロブを用いて検出する方法である (Sewell et al. 1999)。この方法の弱点は、用いた遺伝子がファミリーを作っている場合、複数の遺伝子座が検出されてしまう点にある。より洗練された方法として、最近では PCR 法に基づいたマーカー作成が行われている。Temesgen et al. (2001) は、cDNA から PCR プライマーセットを作成する場合に、3'UTR 部位に片方のプライマーを設計したり、PCR 増幅条件を厳密にするなど工夫を行い、シングルコピーの PCR 産物を得ることを可能とした。

本研究では、Temesgen et al. (2001) のプライマーセットのうち、93 種類を用いてハイマツとキタゴヨウでの PCR 増幅の有無を調べた。その結果、36 個 (39%) のプライマーセットで綺麗な増幅を確認した。これらの PCR 産物を SSCP 解析にかけた結果、25 個について、解釈可能な綺麗なバンドパターンを示した。残りの 11 個については、複雑な SSCP バンドパターンが現われた。恐らく複数の遺伝子座が増幅されたためと考えられる。ハイマツとキタゴヨウで利用可能な 25 個のうち、同じ対立遺伝子を共有していない (または、ほとんどしていない) ため、種特異的マーカーとして用いることができるものは 10 個みつけた (表 2)。このうち、PtIFG\_2009 と 9157 はどちらの種でも種内での対立遺伝子の数が 5 個以上と多く、遺伝子型の判定が煩雑であった。そこで、遺伝子型の判断が容易な残りの 8 個の遺伝子座 (PtIFG\_0464, 0893, 1454, 2615, 8728, 9008, 9076, 9098) を最終的に用いて交雑指数の推定を行った。この 8 つの遺伝子マーカーの SSCP でのバンドパターンを図 1~8 に示した。

Brown et al. (2001) らは、マツ科の異なった種のゲノム連鎖マップの対応付けのためのアンカー遺伝子座を探す目的で、本研究と同様に、Temesgen et al. (2001) のプライマーセットおよび新しく作った 38 種類、合計で 90 種類について、テーダマツのほか、4 種のマツ属ピヌス亜属の種 (*P. elliotii*, *P. pinaster*, *P. sylvestris*, *P. radiata*)、マツ属ストロブス亜属の *P. lambertiana* そしてトウヒ属の *Picea menziesii* について使用可能性をスクリーニングした。その結果、75-89 個がピヌス亜属内で、そして 44 個 (49%) が *P. lambertiana* でも PCR 増幅された。ストロブス亜属でも使用可能なプライマーの割合は、本研究の方が若干低いが、だいたい 40-50% 程度の割合で汎用性があることが推定される。

Brown et al. (2001) において、マツ属の両方の亜属で使用可能だとされた 44 個のプライマーセットと本研究の結果を照らし合わせたのが表 3 である。ほぼ半分の 20 個は Brown et al. (2001) により新たに設計されたプライマーセットで、本研究では解析していない。残りの 22 個のうち、17 個は表 3 に示したハイマツとキタゴヨウでも使用可能なことが判明したものである。最後の 5 個のプライマーセットは、複雑な SSCP バンドパターンを示すなど、ハイマツとキタゴヨウでは使えないことが判明している。

表 2 に示したマーカーのうち、実際にハイマツとキタゴヨウの種特異的マーカーとして使用

できた 8 遺伝子座は、連鎖群 2 が 1 個、連鎖群 5 が 3 個、連鎖群 11 が 2 個、不明が 2 個である。テーダマツの染色体数は  $n=12$  で、連鎖地図では主要な連鎖群が 12 個検出されている (Sewell et al. 1999)。本研究でマーカーの連鎖群には偏りが存在するといえる。今後、表 2 に示した未調査のプライマーセットを調査することにより、主要な連鎖群全てについて種特異的マーカーを見つけることが必要と考えられる。

#### 種特異的核マーカーのコントロール集団での解析

種特異的マーカー遺伝子座のスクリーニングは、キタゴヨウ 6 個体、ハイマツ 6 個体を用いて行った。その後、実際に共有している対立遺伝子が存在しないかどうかを、コントロール集団を用いて行った。ここでコントロール集団と呼んでいるのは交雑帯が存在しない地域のキタゴヨウおよびハイマツ集団のことである。結果を表 4 に示した。各遺伝子座の対立遺伝子の名前は、主にキタゴヨウ集団に見られるものは a (parviflora) とし、主要なものから a1, a2 とした。ハイマツ集団に主に見られるものは u (pumila) とし、キタゴヨウと同様に主要なものから u1, u2 と名づけた。PtIFG\_0464\_a2, PtIFG\_1454\_a3, PtIFG\_9098\_a2 の 3 つの対立遺伝子は、交雑帯でのみ見つかった対立遺伝子である。交雑帯の中でも、キタゴヨウに遺伝的に近い個体にみつかったので便宜上“a”と名づけた。交雑指数を最尤推定する場合、これら“みなしご遺伝子 orphan allele”が存在すると遺伝子型の確率が 0 となる (母種に存在しないから) ため、その遺伝子座を解析に組み入れることができなくなる。そこで、Rieseberg et al. (1998) に従い、2 つの母種の両方が、これらの遺伝子を共有しているものとして、組み入れた。遺伝子頻度は、 $n$  個体のサンプル数があるならば、 $1/(2n+1)$  とした。すなわち、最低頻度である。

8 遺伝子座のうち、コントロール集団で完全に種特異的なものは、PtIFG\_0464, 2615, 8728, 9098 の 4 つである。しかし、PtIFG\_0464, 1454 についてはみなしご遺伝子を組み入れたので、遺伝子の共有が生じた。

#### 交雑帯の遺伝的構造

東吾妻山の解析結果を図 9 に示した。東吾妻でのサンプル採集域は大きく 3 つに分けることができる。一つは AZ1~22 までで、磐梯吾妻スカイライン上で、高湯温泉側から浄土平にかけて、車道沿いに生育する個体を採取したものである。もう一つは AZ23~44 までで、浄土平レストハウスから登山道沿いに姥ヶ原経由で東吾妻山山頂への道沿いである。東吾妻山の標高 1800-1900m 域にはオオシラビソとコメツガが優先する亜高山帯針葉樹林が発達しており、登山道沿いからゴヨウマツ類は姿を消す。最後は AZ45~69 で、針葉樹林を抜けた頂上部に相当する。徒歩で採集した AZ23~69 のサンプル採集位置を図 10 に示した。この 3 つの領域を更に 2 つに分割し、合計で 6 つの領域ごとに、平均標高、葉緑体とミトコンドリアゲノムの組成、核の交雑指数をまとめたのが表 5 である。図 9 から、東吾妻の交雑帯の核ゲノムの組成は、亜高山帯針葉樹林帯を境界として大きく変化することがわかる。針葉樹林帯より標高の低い領域では、針葉樹林帯に接した AZ44 (交雑指数 0.874) を除いて、核の交雑指数は 0 から 0.192、平均で 0.054 となり、キタゴヨウゲノムが優占している。一方、針葉樹林帯より上部では 0.163 から 1、平均で 0.949 となり、ハイマツゲノムが優占する。この領域で、1 個体だけ低い交雑指数を示す個体 (AZ58) がある。この頂上

域ではほぼ全ての個体がハイマツ的な匍匐性の樹形を示したが、この個体だけは直立していた。

谷川山系の解析結果を図 11 に示した。谷川山系でのサンプルの採集位置を図 12 に示した。TN45 と 47 の間には標高で 300m 強ほどのギャップが存在する。これは、この領域だけ登山道沿いからゴヨウマツ類の姿が消え、採集できなかったことを示している。この交雑帯では東吾妻のような、交雑指数のギャップは存在せず、ほぼ標高に応じて交雑指数がクライナルに変化していた。交雑指数が 1 の個体が 1 個体だけ存在するが (W18)、この個体は葉緑体がキタゴヨウ型である。従って純粋なハイマツは見つからなかった。

#### オルガネラゲノムの遺伝子浸透の程度

核の交雑指数とオルガネラゲノムの浸透の程度の比較を表 5 にまとめた。東吾妻山では、低標高域でのハイマツ mtDNA の浸透が顕著であることが判明した。針葉樹林帯より低い 4 つの領域では核の交雑指数の平均は 0.034 から 0.142 と、15% 以下しかハイマツゲノムを含んでいないが、ミトコンドリアでは 0.273 から 0.833 がハイマツ由来のハプロタイプを持つ。一方、キタゴヨウ cpDNA のハイマツへの浸透は、核の浸透の程度とほぼ同じ程度であった。

谷川山系では、ハイマツ mtDNA のキタゴヨウへの浸透は、標高 1300-1600m の採集の空白域でストップしていて、それより下部には入りこんでいない (図 11)。いっぽう、キタゴヨウ cpDNA のハイマツへの遺伝子浸透は顕著である。頂上域 (W16-7) では核の浸透は 25% 程度であるが、キタゴヨウ cpDNA の頻度は 80% である (表 5)。

#### 針葉形態による同定と核の交雑指数の比較

Watano et al. (1995, 1996) および Senjo et al. (1999) では、針葉の解剖学的形質を用いてハイマツ、キタゴヨウ、どちらにも当てはまらない中間型という分類を行い。この結果と、細胞質ゲノムの遺伝子型から、葉緑体やミトコンドリア DNA の浸透パターンを議論していた。用いられた形態形質は 1) 針葉横断面の樹脂道の数と位置、2) 厚壁細胞の有無、3) 異型細胞の有無である。

東吾妻山ではキタゴヨウと同定された個体の交雑指数の平均は 0.050、中間型が 0.351、ハイマツが 0.982 であった。東吾妻山では針葉樹林帯 (1800-1900m) の上下で大きく交雑指数が変化するが、針葉樹林帯下部の中間型の交雑指数の平均は 0.141、上部は 0.813 であった。東吾妻の中間型の針葉形態には、2 種類ある。全てキタゴヨウと同様に厚壁細胞を持つが、樹脂道が中間型のものと、ハイマツ型のものである。この針葉形態タイプと分子交雑指数の関係を表 6 にまとめた。この交雑帯では樹脂道が中間型かハイマツ型かで分子交雑指数が大きく異なる。針葉樹林帯より下部の樹脂道が中間型の個体は、キタゴヨウと分類されたものとほぼ同じ交雑指数を示した。また、針葉樹林帯より上部で樹脂道がハイマツ型のもものはハイマツと分類されたものほぼ同じであった。

谷川岳では、W ナンバーの個体では形態観察のために採集されたものが少ない (18 個体, Watano et al. 1995)。そのため、形態的中間型は 5 個体、ハイマツは 7 個体しかない。形態が判明しているもののうち、キタゴヨウと同定された個体の平均交雑指数は 0.098、中間型は 0.636、ハイマツは 0.594 となり、中間型とハイマツで交雑指数に差が無かった。谷

川の間中型には、東吾妻に無かった様々な形態タイプが存在する(表7)。

## 考察

### 亜高山帯針葉樹林帯の有無と交雑帯の遺伝的構造

東吾妻山の分子交雑指数による解析は、この交雑帯の個体の核遺伝子組成が、標高1800-1900mに存在する主にオオシラビソとコメツガで構成される亜高山帯針葉樹林帯を境に大きく二極化していることを明確に示した。この境界より下部にも形態的中間型が存在するが、これらはキタゴヨウに近い核組成を示す。それに対し境界より上部は、交雑指数が0.9を越える個体が多い。このことは、針葉樹林帯がハイマツとキタゴヨウの分布を分断し、これが有効な核遺伝子の障壁として機能していることを示唆する。

いっぽう、谷川山系では核組成の二極化は存在せず、0から1まで連続的な標高に応じた交雑指数の変化がみられた。谷川山系には、東吾妻山で核組成のギャップになっていた亜高山帯針葉樹林帯が存在しない。

谷川山系のように、亜高山帯針葉樹林が発達しうる標高を持ちながら、針葉樹林帯を欠く、またはその発達の不十分な山系は東北に多い(梶 1982; 杉田 1990)。例えば、岩木山、鳥海山、月山、朝日岳、飯豊山、秋田駒ヶ岳、和賀岳、焼石岳、栗駒山、船形山ではオオシラビソが全くないか、小林分がみられるのみで、偽高山帯と呼ばれる低木群落に被われた景観がブナ林を抜けた山頂付近に広がっている。八甲田山や蔵王にはオオシラビソ林が存在するが、パッチ状の林分で、本州中部のような密な針葉樹林帯にはなっていない。吾妻山系は東北の山では最も密生した針葉樹林帯を持つ。守田(2000)は、最終氷期以降の亜高山植生の変遷を花粉分析によって解析した。最終氷期に東北地方ではグイマツ、アカエゾマツ、チョウセンゴヨウなど現在は存在しない針葉樹が優占していたが、後氷期の気候変動で、これらの樹種は衰退・絶滅する。空白となった亜高山帯に新しくオオシラビソなど針葉樹が進出するのは東北地方では約2500-3000年前以降の最近のできごとであると推定されている。このシナリオは、アロザイムを用いたオオシラビソ集団の遺伝的多様性解析でも支持されている(Suyama et al. 1998)。集団の遺伝的多様性は低緯度から高緯度にクライナルに減少しており、近年の北方への分布拡大による遺伝的浮動が生じたことを示唆している。もし、最終氷期以降、東北地方では亜高山帯針葉樹林帯が未発達のままであれば、ハイマツとキタゴヨウが接触し、遺伝子浸透を起こす機会を多く提供したに違いない。Senjo et al. (1999)は、日本各地のキタゴヨウ集団のmtDNAのハプロタイプ頻度を決定し、福島県の東吾妻山や安達太良山から宮城・岩手県境の栗駒山山麓の鬼首にかけて、ハイマツmtDNAのキタゴヨウ集団への遺伝子浸透が起こっていることを発見した。特に宮城・山形県境の蔵王から宮城・岩手県境の栗駒山にかけての地域のキタゴヨウ集団は、ほぼ完全にハイマツmtDNAに置換されてしまっている。このミトコンドリアの細胞質捕獲は、この地域で特に浸透性交雑が激しいことを示唆している。この地域でmtDNAの浸透が激しい理由として、両種間の遺伝的隔離として機能する亜高山帯針葉樹林の欠如または未発達をあげることができる。

ただ、谷川山系では核の交雑指数が連続的に変異する典型的な交雑帯が存在するにも

かかわらず、ハイマツ mtDNA のキタゴヨウへの浸透は、標高 1500m 以下へは届いていない。ただ、谷川では、TA45 の 1279m から TA47 の 1664m までサンプルのギャップがある。今回、核の組成を調べていない個体で TA46 というサンプルが存在するが、標高 1484m で cpDNA, mtDNA 共にキタゴヨウ型である。ゴヨウマツ類の分布については、登山道沿いのみで、二次元的に調べていないが、mtDNA の浸透がこのギャップで途絶えていることを考慮すると、この標高域はゴヨウマツ類の分布の空白地になっていて、これが遺伝子流動の障壁となっている可能性がある。なぜ、この標高域が分布の空白になっているのかは不明である。

#### 核で基準化したオルガネラ DNA の遺伝子浸透

東吾妻山については、核の浸透が 1800-1900m の亜高山帯針葉樹林によって有効に遮られているのに対し、ハイマツ mtDNA が最も低標高の場所まで達している。一方、キタゴヨウ cpDNA のハイマツへの浸透は、1800-1900m の亜高山帯針葉樹林帯によってほぼ遮られている(図 9, 表 5)。谷川岳では、標高 1300-1600m の分布のギャップに遮られ、ハイマツ mtDNA の下部への浸透がストップしている。一方、キタゴヨウ cpDNA のハイマツへの浸透は著しく、核の浸透を上回っている(図 10, 表 5)。

このように、mtDNA と cpDNA の浸透の程度は、東吾妻では mtDNA の浸透が顕著、谷川では cpDNA の浸透が顕著と、山系によって異なることが判明した。東吾妻と谷川で異なる点は、分布のギャップの位置である。東吾妻では 1800-1900m と高い位置に、谷川では 1300-1600m と低い位置にギャップが存在する。個々の交雑帯のギャップの位置が遺伝子浸透のパターンに大きく影響を与える可能性がある。

父性遺伝の cpDNA と母性遺伝の mtDNA のどちらの方が浸透を起こしやすいかという問題は、東吾妻と谷川で結果が異なり、一般的な結論を導くことが困難な結果となった。

#### 形態と交雑指数

東吾妻山で針葉樹林帯より下部で厚膜細胞が有り(キタゴヨウ型)、樹脂道が中間型の個体の交雑指数の平均は 0.067 となり(表 7)、キタゴヨウと同定されたもの(0.05)との差がなかった。また、谷川岳でも形態的中間型とハイマツと同定された個体の交雑指数に差がなかった。これらのことは、針葉形態のみでは交雑帯の核の遺伝的構造を推し量ることが困難であることを意味している。ただ、東吾妻山の中間型個体のうち、樹脂道の中間型のものとハイマツ型のもので交雑指数に大きな違いがあったように、形質の組合せがキタゴヨウに近いのか、ハイマツに近いかで、大雑把に核の組成を推定することが可能かもしれない。谷川岳では、針葉形態を調べた 5 個体全てが異なった形質組合せを持っていた。このうちで、厚膜細胞が有り、樹脂道が中間型のものが、東吾妻と同様に低い交雑指数を示した。しかし、他の 4 個体には形質組合せがハイマツ・キタゴヨウどちらに近い点と交雑指数との間には明確な関係が見出せない。もっと多くのサンプルで傾向を調べる必要がある。

Carney et al. (2000) は、ヒマワリ属の *Helianthus annuus* と *H. bolanderi* の雑種群落の遺伝的構造を、AFLP マーカーを用いて分子雑種指数を推定して解析を行っている。その結果、*H. bolanderi* が *H. annuus* に遺伝的に同化 (genetic assimilation) されつつあること、

形態的にほとんど純粋な *H. annuus* 個体にも相当、*H. bolanderi* の核遺伝子が浸透していることなどを発見した。Carney et al. (2000) は、元の種の形態形質組合せを保存するように自然選択が働いている可能性を指摘している。本研究でも谷川山系の針葉形態からハイマツと同定された個体の交雑指数は 0.594 と、4 割はキタゴヨウの浸透が起こっているという結果になった。本研究では針葉形態のみと少数の形質しか用いていないが、*Helianthus* と同様に、形態が変わらないまま中立的な核の浸透が進行している可能性もある。詳細な形態観察と分子交雑指数の解析を同時に行う必要性が明らかとなる問題点である。

#### 今後の課題

本研究で用いた 8 つの核マーカーは、連鎖群が片寄っている(表 2)。今後、表 3 に示した未調査の遺伝子座(Brown et al. 2001) のスクリーニングを行い、各連鎖群にばらけたマーカーを使用することが望ましいと考える。

交雑帯の遺伝的構造のパターンについても、さらに解析を行う必要がある。特に、ハッコウダゴヨウが最初に記載された八甲田山の交雑帯には興味がある。谷川(Watano et al. 1995, 1996)、東吾妻、蔵王(Senjo et al. 1999) といった山岳では交雑帯にキタゴヨウ cpDNA とハイマツ mtDNA を持つ細胞質キメラが優占するが、八甲田山の形態的中間型は両細胞質ゲノム共にハイマツ由来のものが多い(未発表)。細胞質キメラについては、いままで調べた限り、キタゴヨウ cpDNA とハイマツ mtDNA を持つタイプしか見つかっていないので、八甲田の交雑帯にも初期的にはこの組合せの細胞質キメラ個体が存在したと考えられる。この細胞質キメラが両方ともハイマツ型に変化するためには、ハイマツから雑種集団への cpDNA の遺伝子流動が起こる必要がある。雑種が雌としてハイマツと戻し交雑を行う過程で、核の遺伝的組成がどのように変化したか知る必要がある。

#### 今後の展望

細胞質ゲノムの遺伝子浸透に方向性がなぜ存在するのかという問題は、ハイマツ・キタゴヨウ交雑帯の遺伝的構造を理解する上で極めて重要であるが、この論文では追求を行っていない。Senjo et al. (1999) では、ハイマツが雌、キタゴヨウが雄の組合せでしか雑種が出来ないのでという一方向性の交雑不和合性の仮説を提唱した。交雑指数を用いた解析で、この仮説を検証することが可能かもしれない。北海道のアポイ岳では、超塩基性土壌(かんらん岩)のため、350m という低標高からハイマツが生育し、キタゴヨウや雑種と混生した群落を形成している。この場所で、母樹と種子の胚や胚乳(雌性配偶体)の遺伝子型の比較を行えば、母樹の交雑指数と花粉の選別のプロセスの関係を明らかにできる可能性がある。

#### 引用文献

- Brown, G.R., Kadel, E.E. III, Bassoni, D.L., Kiehne, K.L., Temesgen, B., van Buijtenen, J.P., Sewell, M.M., Marshall, K.A. and Neale, D.B., 2001. Anchored reference loci in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics. *Genetics*, 159:799-809.
- Carney, S.E., Gardner, K.A. and Rieseberg, L.H. 2000. Evolutionary changes over the fifty-year

- history of a hybrid population of sunflowers (*Helianthus*). *Evolution* 54: 462-474.
- 石井盛次. 1941. ハヒマツ並びに北日本産五葉松類の諸型と其の分布(IV) 4. 北日本に分布する *Strobilus* 節と *Cembra* 節との中間的性質を有すると考へらるる五葉松の諸型. *日本林学会誌* Vol.23: 47-55.
- 梶幹男. 1982. 亜高山性針葉樹の生態地理学的研究 —オオシラビソの分布パターンと温暖期気候の影響—. *東京大学農学部演習林報告* 72:31-120.
- 牧野富太郎・根本莞爾. 訂正増補日本植物総覧. 春陽堂, 東京, p148.
- Mirov, N.T. 1967. The genus *Pinus*. The Ronald Press, New York.
- Mogensen, H.L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Amer. J. Bot.* 83: 383-404.
- 守田益宗. 2000. 最終氷期以降における亜高山帯植生の変遷—気候温暖期に森林帯は現在より上昇したか?—. *植生史研究* 9: 3-20.
- Neale, D.B. and Sederoff, R.R. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical Applied Genetics* 77: 212-216.
- Price, R.A., Liston, A. and Strauss, S.H. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. In D.M. Richardson (ed) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp49-68.
- Rieseberg, L.H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82: 944-953.
- Rieseberg, L.H., Baird, S.J.E. and Desrocher, A.M. 1998. Patterns of mating in wild sunflower hybrid zones. *Evolution* 52: 713-726.
- Rieseberg, L.H. and Soltis, D.E. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 5: 65-84.
- Rieseberg, L.H. and Wendel, J.F. 1993. Introgression and its consequences of cytoplasmic gene flow in plants. In R.G. Harrison (ed) *Hybrid Zone and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Oxford, pp70-109.
- 先生真弓. 1999. ハイマツとキタゴヨウ間の浸透性交雑現象の解析. 金沢大学自然科学研究科修士論文.
- Senjo, M., Kimura, Y. Watano, K. Ueda and T. Shimizu. 1999. Extensive mitochondrial introgression from *Pinus pumila* to *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae). *Journal of Plant Research* 112: 97-105.
- Sewell, M.M., Sherman, B.K. and Neale, D.B. 1999. A consensus map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. construction and integration of individual linkage maps from two outbreed three-generation pedigree. *Genetics* 151: 321-330.
- 清水建美. 1996. ハイマツ. 「週刊朝日百科 植物の世界 Vol.11」朝日新聞社, 東京, p237.
- 杉田久志. 1990. 後氷期のオオシラビソ林の発達史-分布特性にもとづいて. *植生史研究* No.6:31-37.
- Sutton, B.C.S., Flanagan, D.J., Gawley, J.R. Newton, C.H. Lester, D.T. and El-Kassaby, Y.A. 1991. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in *Picea* and composition of hybrids from



introgression zones. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 242-248.

Suyama, Y., Tsumura, Y. and Ohba, K. 1997. A cline of allozyme variation in *Abies mariesii*. *Journal of Plant Research* 110: 219-226.

Tani, N., Tomaru, N. and Ohba, K. 1998. Genetic structure within a Japanese stone pine (*Pinus pumila* Regel) population on Mt. Aino-dake in central honshu, Japan. *Journal of Plant Research* 111:7.

Temesgen, B., Brown, G.R., Harry, D.E., Kinlaw C.S., Sewell, M.M. and Neale, D.B. 2001. Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Theor. Appl. Genet.* 102:664-675.

綿野泰行. 2001. SSCP 分析法. 種生物学会編「森の分子生態学」文一総合出版, 東京, pp263-274.

Watano, Y., M. Imazu and T. Shimizu. 1995. Chloroplast DNA typing by PCR-SSCP in the *Pinus pumila* - *P. parviflora* var. *pentaphylla* complex (Pinaceae). *Journal of Plant Research* 108: 493-499.

Watano, Y., M. Imazu and T. Shimizu. 1996. Spatial distribution of cpDNA and mtDNA haplotypes in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae). *Journal of Plant Research* 109: 403-408.

表1. ハイマツ・キタゴヨウ種特異的遺伝子座の PCR 産物の SSCP 泳動条件

遺伝子座	グリセリン濃度	泳動温度	電圧	時間
PtIFG_0464*	2%	20°C	300V	7hr
PtIFG_0893	2%	20°C	350V	8hr
PtIFG_1454	2%	20°C	300V	8hr
PtIFG_2615	10%	20°C	300V	10hr
PtIFG_8728	2%	20°C	300V	6hr
PtIFG_9008	2%	20°C	300V	8hr
PtIFG_9076	10%	20°C	300V	7hr
PtIFG_9098	2%	20°C	300V	5hr

\*, PCR産物が730bpと長いため、HinfIで2つに切断してからSSCPを行った。

表2. ハイマツとキタゴヨウで使用可能なテーダマツの EST プライマーセット (Temesgen et al. 2001)

LOCUS	EST SEQUENCE ACCESSION NO.	PRIMER SEQUENCES	LINKAGE GROUP/cM	LENGTH OF cDNA	LENGTH OF PCR PRODUCTS
Diagnostic marker loci between <i>Pinus pumila</i> and <i>P. parviflora</i> var. <i>pentaphylla</i>					
PtIFG_0464#	H75150	TGTCAGTCCCAGAGCTATTC ATCACAGCCGCTCCAAAAC	L02/58	450	730
PtIFG_0893#	H75118	GGACTGAAGGGATCTAGCTGG CASGCCCAAATCCATCGTC	L05/41.3	450	620
PtIFG_1454#	H75120	ACATCAATCAAGTTGGCCTTG ACGACCATCTCCAACCACTC	L05/75.9	350	350
PtIFG_2009#	no info.	CACAGTCCCACAGCAAC ACAAGCGGTTCACTGGCTC	L06/107.7	400	600
PtIFG_2615#	H75223	CACTCTTATTCTGGCCCTTG TCGGTTAGGTAACGACTGGAC	L11/49.5	320	400
PtIFG_8728	AA739676	CCAAAGCCCAAATCCATG CCAATTTGCACCTTTGCC	no info.*	370	370
PtIFG_9008#	AA739854	GGTAAACTGGGATGGATTGC TCTCGGATAGGCAATATGC	L05/71.5	290	290
PtIFG_9076#	AA739897	CTCTATTGCAAAATGTGCCAC AGAATTTACTGGCCGCTCG	L11/39.1	250	250
PtIFG_9098	AA739911	GTGGCTTGTATAAATGC AGTGCATCGTTCACAATTCTC	no info.*	280	280
PtIFG_9157#	AA739961	TTCCAGTTCCCTGAGCATC AATACGCTGCTAATCGTGTC	L04/8.2	275	275
Marker loci at which alleles are largely shared between <i>P. pumila</i> and <i>P. parviflora</i> var. <i>pentaphylla</i>					
PtIFG_0149	H75140	GGTGACGCAATCACCTTTG CCAATCCAACCGATACTTGG	L21/0	410	550
PtIFG_0606#	no info.	TCATGAGGGGAGAAAGTTGG GGGCAGTCACTTGAACCTCG	L06/98.6	360	550
PtIFG_0674	no info.	ATAATTGGGAGATCGCGAG AGCAGAAGGAAGACAGAGTGG	L14/0	300	300
PtIFG_0739#	H75167	TACAAAGGCTCGGGTATTGG GTCATGCCTAACAAGCCCTG	L06/67.6	350	350
PtIFG_1956#	H75039	GAAGCTAGCGAAGGCTTTGG GGGTGTGACCATATAACACCG	L09/7.1	410	500
PtIFG_2053#	no info.	TGAAACTGCGGATGGCTC CCGGAATCGAACCCATAATC	L01	310	360
PtIFG_2253	H75063	CCAATTTGCACCTTTGCC CCAAAGCCCAAATCCATG	L01/59.9	370	370
PtIFG_8564	AA739580	GCAGTTATAGGTTTCTGGCC CACCAGGGCAAAAAGTTGG	L06/55	230	230
PtIFG_8758	AA739696	GAGTTCGCATCACAGTTACC AATTGCCCATGATTCTGG	no info.*	350	350
PtIFG_8939#	AA739822	AACCACGAGCTTGGCATG ACGTGGACGAGCAGTCAAAG	L02/84.3	300	300
PtIFG_9022#	AA739862	GGATTTGCATTTTGCATGCC CGGTGTGTTTCATGTGCTG	L02/36.7	210	210
PtIFG_9053#	AA739883	CCACCGAAATATATGCCTGTG TGCATGATGACGGCTCTATG	L01/38.1	280	280
PtIFG_9064	AA739890	GAGGGGAACACTAATCAAGCG TGCCTCAAATGCTTGCTTTC	no info.*	270	270

表2. つづき

LOCUS	EST SEQUENCE ACCESSION NO.	PRIMER SEQUENCES	LINKAGE GROUP/cM	LENGTH OF cDNA	LENGTH OF PCR PRODUCTS
PtIFG_9092#	AA739907	AGCTAAAGTTGGCTGGCATC GTCAGTACCTTAACGTCCC	L05/43	270	400
PtIFG_9156#	AA739959	TAAGCTTCGTGCAACAGGAG GACAATCCCTCTAACCTCGC	L09/13	280	400

#, Brown et al. (2001)によって、anchored reference loci として選ばれているもの。

\*, DGGE で複雑なバンドパターンを示すなどの理由により、Temesgen et al (2001)では、マップ上の位置を決めていない。本研究ではきれいな SSCP バンドパターンを示した。テーダマツでは複数遺伝子座が増幅されるのかもしれない。

表3. Brown et al. (2001)でマツ属全体での汎用性が示された 44 プライマーセットと本研究の結果の比較

Locus	Subgenus Pinus	Subgenus Strobilus	<i>Picea menziesii</i>	Present Study
LG1				
<i>PtIFG_9053</i>	+	+	+	+
PtIFG_8843	+	+	-	NE
<i>PtIFG_2253</i>	+	+	+	+
PtIFG_9198	+	+	-	NE
LG2				
PtIFG_8569	+	+	+	smear
<i>PtIFG_9022</i>	+	+	+	+
PtIFG_0464	+	+	+	+
PtIFG_0048#	+	+	+	complex SSCP
<i>PtIFG_8939</i>	+	+	+	+
PtIFG_0066	+	+	+	-
LG3				
PtNCS_6C12F	+	+	+	NE
PtIFG_8612	+	+	-	NE
LG4				
PtIFG_9157	+	+	-	+
PtIFG_8898	+	+	-	NE
LG5				
PtIFG_8837	+	+	-	NE
PtIFG_8596	+	+	+	NE
PtIFG_0893	+	-	-	+
<i>PtIFG_9092</i>	+	+	-	+
PtIFG_9008	+	+	+	+
PtIFG_1454	+	+	-	+
LG6				
PtIFG_8531	+	+	-	NE
PtIFG_8647#	+	+	-	NE
PtIFG_8972	+	+	+	no amp.
PtIFG_1165	+	+	-	multiple bands
PtIFG_1764	+	+	-	NE
<i>PtIFG_0739</i>	+	+	+	+
PtIFG_8473#	+	+	-	NE
<i>PtIFG_0606</i>	+	+	+	+
PtIFG_2009	+	+	+	+
LG8				
PtIFG_8732	+	+	+	NE
PtIFG_9036	+	+	+	complex SSCP
PtIFG_2781	+	+	+	NE
LG9				
<i>PtIFG_1956</i>	+	+	+	+
<i>PtIFG_9156</i>	+	+	-	+
PtIFG_0624	+	+	-	NE
PtIFG_2290	+	+	-	NE

表3. つづき

Locus	Subgenus Pinus	Subgenus Strobilus	<i>Picea menziesii</i>	Present study
LG10				
PtIFG_8580	+	+	+	NE
PtIFG_8436	+	+	-	NE
PtIFG_1643	+	+	-	complex SSCP
PtIFG_8540	+	+	-	NE
LG11				
PtIFG_9076*	+	+	-	+
PtIFG_2615	+	+	-	+
other LGs				
PtIFG_2889	+	+	-	NE
PtIFG_8542	+	+	-	NE

ボードで示した遺伝子座は、表 2 のハイマツとキタゴヨウで種特異的マーカーとして使用できるもの。

イタリックで示した遺伝子座は、表 2 のハイマツとキタゴヨウで対立遺伝子を共有するもの。

\*, Temesgen et al. (2001)では LG11 だが、Brown et al. (2001)では other LGs に分類。

#, Brown et al. (2001)では、DGGE で複雑なバンドパターンが検出されている。

+, PCR による増幅あり。

-, PCR による増幅なし。

NE, 本研究では解析していない。

smear, PCR 産物のアガロースゲル泳動での増幅バンドがスメア。

multiple bands, PCR 産物のアガロースゲル泳動で複数バンド。

complex SSCP, SSCP で複雑なバンドパターン。

表4. ハイマツとキタゴヨウ母集団における、マーカー遺伝子座の対立遺伝子頻度

Locus	Allele	<i>Pinus pumila</i>			<i>P. parviflora</i> var. <i>pentaphylla</i>		
		Hakusan	Norikura	Total	Shira- mine	Moriyoshi	Total
PtIFG_0893		10	7	17	12	7	19
	<i>a1</i>		0.071	0.029	0.625	0.929	0.737
	<i>a2</i>				0.375	0.071	0.263
	<i>u1</i>	0.900	0.929	0.912			
	<i>u2</i>	0.100		0.059			
PtIFG_1454		10	10	20	12	10	22
	<i>a1</i>	0.050		0.024	0.792	0.950	0.844
	<i>a2</i>				0.208	0.050	0.133
	<i>a3</i>			0.024			0.022
	<i>u1</i>	0.850	1.000	0.902			
	<i>u2</i>	0.100		0.049			
PtIFG_2615		10	8	18	12	13	25
	<i>a1</i>				0.875	0.692	0.780
	<i>a2</i>				0.083	0.308	0.200
	<i>a3</i>				0.042		0.020
	<i>u1</i>	1.000	1.000	1.000			
PtIFG_9008		10	10	20	12	9	21
	<i>a1</i>	0.150		0.075	0.917	1.000	0.952
	<i>a2</i>				0.083		0.048
	<i>u1</i>	0.850	0.950	0.900			
	<i>u2</i>		0.050	0.025			
PtIFG_0464		10	9	19	12	10	22
	<i>a1</i>				0.917	0.850	0.867
	<i>a2</i>					0.050	0.022
	<i>a3</i>			0.026			0.022
	<i>a4</i>					0.050	0.022
	<i>u1</i>	1.000	0.944	0.949	0.083	0.050	0.067
	<i>u2</i>		0.056	0.026			
PtIFG_9076		10	9	19	12	12	24
	<i>a1</i>	0.050	0.333	0.184	0.750	0.667	0.708
	<i>a2</i>				0.250	0.333	0.292
	<i>u1</i>	0.950	0.667	0.816			
PtIFG_8728		10	10	20	12	11	23
	<i>a1</i>				0.958	1.000	0.957
	<i>a2</i>			0.024			0.021
	<i>a3</i>				0.042		0.021
	<i>u1</i>	1.000	0.900	0.927			
	<i>u2</i>		0.100	0.049			

表4. つづき

		9	5	14	9	12	21
PtIFG_9098	<i>a1</i>				<i>0.889</i>	<i>0.625</i>	<i>0.738</i>
	<i>a2</i>				<i>0.111</i>	<i>0.333</i>	<i>0.238</i>
	<u>u1</u>	0.111	0.400	0.214		0.042	0.024
	<u>u2</u>	0.889	0.600	0.786			

イタリックで示した対立遺伝子は、キタゴヨウのマーカー。

ボールドで示した対立遺伝子は、ハイマツのマーカー。

アンダーラインで示した対立遺伝子は交雑帯のみでみつかった orphan allele。



表5. 東吾妻山および谷川山系における、核ゲノムの分子交雑指数と、ハイマツ由来のミトコンドリア DNA およびキタゴヨウ由来の葉緑体 DNA のハプロタイプ頻度の比較

Samples	Altitude (m)	Pumila index	Pumila mtDNA	Parv. Index	Parv. cpDNA
Mt. Higashiazuma					
AZ1-11(11)	1223	3.4%	27.3%	96.6%	100.0%
AZ12-22(11)	1324	3.8%	72.7%	96.2%	100.0%
AZ23-32(10)	1560	6.9%	80.0%	93.1%	100.0%
AZ33-44(12)	1713	14.2%	83.3%	85.8%	100.0%
AZ45-55(11)	1954	98.2%	100.0%	1.8%	18.2%
AZ56-69(14)	1974	92.1%	100.0%	7.9%	7.7%
Mt. Tanigawa					
TA1-15(8)	935	0.8%	0.0%	99.2%	100.0%
TA17-45(15)	1122	7.6%	0.0%	92.4%	100.0%
TA47-W17(10)	1740	50.2%	77.8%	49.8%	100.0%
W16-7(10)	1932	74.4%	100.0%	25.6%	80.0%
W7-1(7)	1756	48.3%	100.0%	51.7%	100.0%

Pumila Index, 核のゲノム中でのハイマツ遺伝子の割合。

Pumila mtDNA, ハイマツ mtDNA のハプロタイプ頻度。

Parv. Index, 核のゲノム中でのキタゴヨウ遺伝子の割合。

Parv. cpDNA, キタゴヨウ cpDNA のハプロタイプ頻度

表 6. 東吾妻山交雑帯の形態的中間型のタイプ分類と分子交雑指数

個体数 (番号)	厚壁細胞	樹脂道	異型細胞	分子交雑指数
亜高山針葉樹林帯より下部				
10 (AZ16, 23, 29, 32, 35, 36, 38, 39, 41, 43)	キタ	中間型	無	0.067
1 (AZ44)	キタ	ハイ	無	0.874
亜高山針葉樹林帯より上部				
1 (AZ58)	キタ	中間型	無	0.163
4 (AZ45, 59, 64, 65)	キタ	ハイ	無	0.975

表 7. 谷川山系交雑帯の形態的中間型のタイプ分類と分子交雑指数

個体数 (番号)	厚壁細胞	樹脂道	異型細胞	分子交雑指数
1 (W2)	キタ	中間型	有	0.370
1 (W4)	キタ	ハイ	無	0.647
1 (W15)	ハイ	キタ	有	0.581
1 (W16)	ハイ	中間型	無	0.884
1 (W7)	ハイ	ハイ	有	0.688

図 1-8. ハイマツ・キタゴヨウ交雑帯の分子交雑指数推定に用いた 8 つの核マーカーとその SSCP バンドパターン

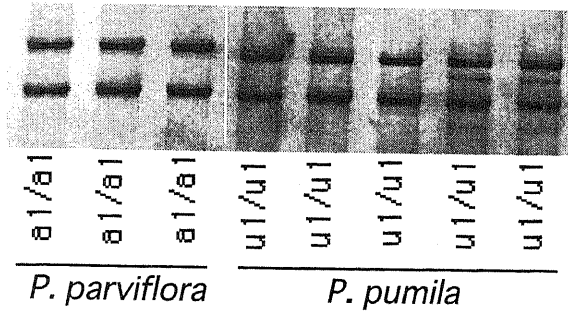
図 9. 東吾妻山の交雑帯の遺伝的構造。サンプルは採集した順番で、左から右へ並べてある。各サンプルの採集標高を白丸で示した。軸は右である。サンプルナンバーの上の棒グラフは核の分子交雑指数で、軸は左である。キタゴヨウの成分を青、ハイマツの成分を赤で示した。サンプルナンバーの下の図は、葉緑体とミトコンドリアの DNA ハプロタイプである。上の棒グラフと同様に、キタゴヨウのハプロタイプを青、ハイマツのハプロタイプを赤で示した。

図 10. 東吾妻山の俯瞰図とサンプル採集地点。徒歩で採集した AZ23-69 を示した。車道沿いに採集した AZ1-22 は示していない。緑の標高域が 1800-1900m の範囲で、亜高山帯針葉樹林帯となっている。

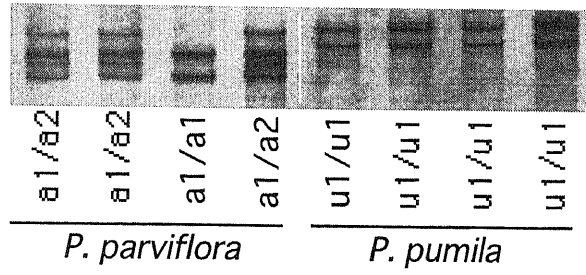
図 11. 谷川山系の交雑帯の遺伝的構造。サンプルは採集した順番で、左から右へ並べてある。各サンプルの採集標高を白丸で示した。軸は右である。サンプルナンバーの上の棒グラフは核の分子交雑指数で、軸は左である。キタゴヨウの成分を青、ハイマツの成分を赤で示した。サンプルナンバーの下の図は、葉緑体とミトコンドリアの DNA ハプロタイプである。上の棒グラフと同様に、キタゴヨウのハプロタイプを青、ハイマツのハプロタイプを赤で示した。

図 12. 谷川山系の俯瞰図と採集地点。各個体の細胞質ゲノムの組合せ型を色で示した。青は葉緑体・ミトコンドリアともにキタゴヨウ由来。緑は葉緑体がキタゴヨウでミトコンドリアはハイマツ由来。赤は葉緑体・ミトコンドリアともにハイマツ由来。

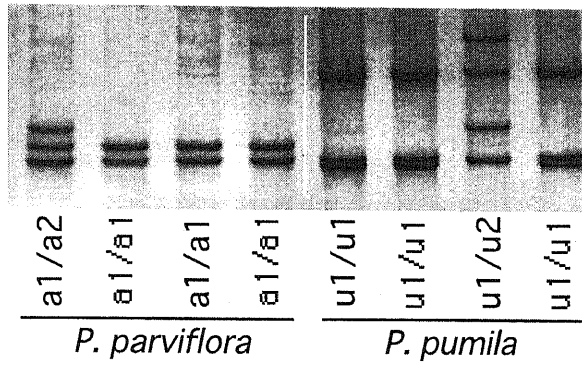
1. PtIFG\_0464



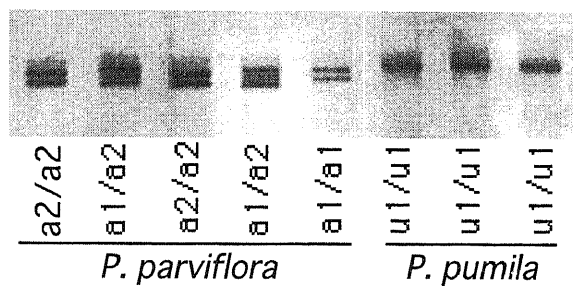
2. PtIFG\_0893



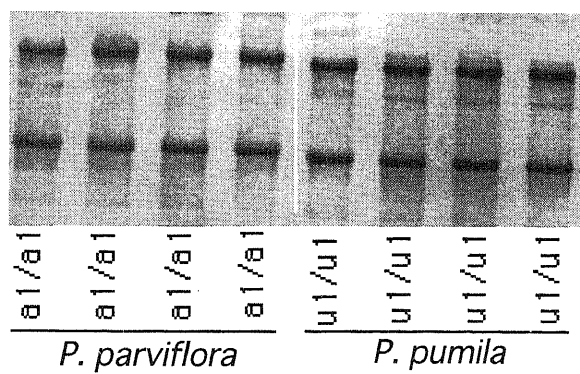
3. PtIFG\_1454



4. PtIFG\_2615



5. PtIFG\_8728



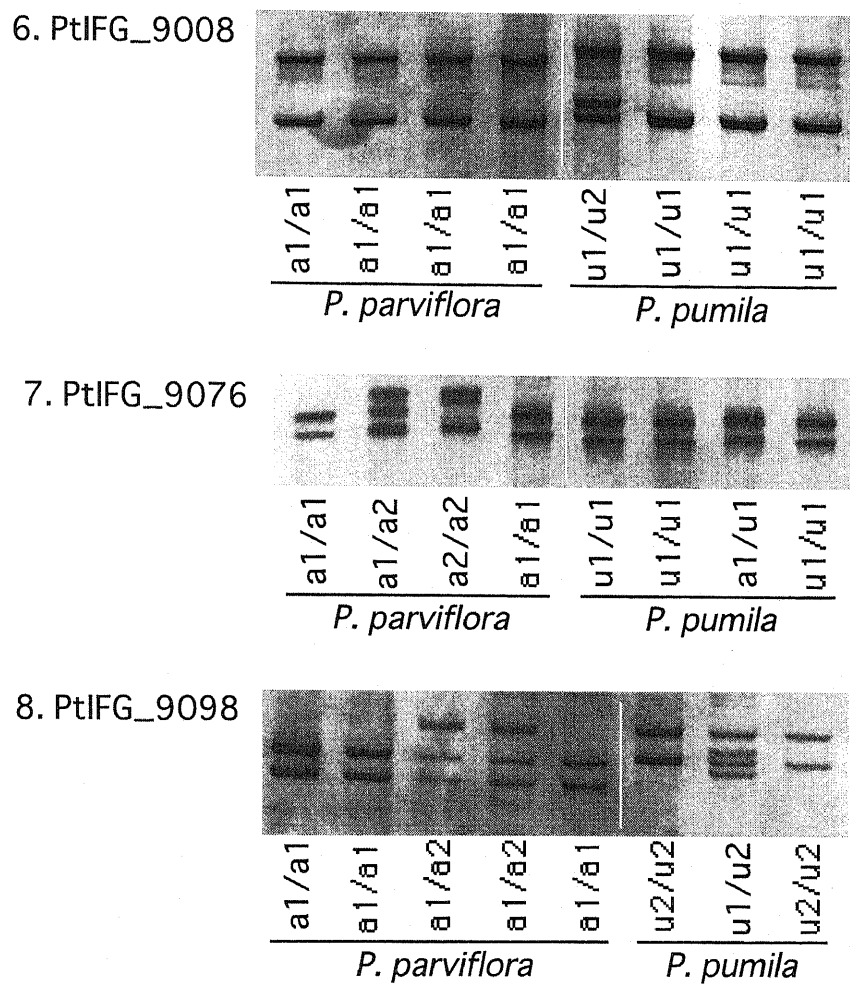
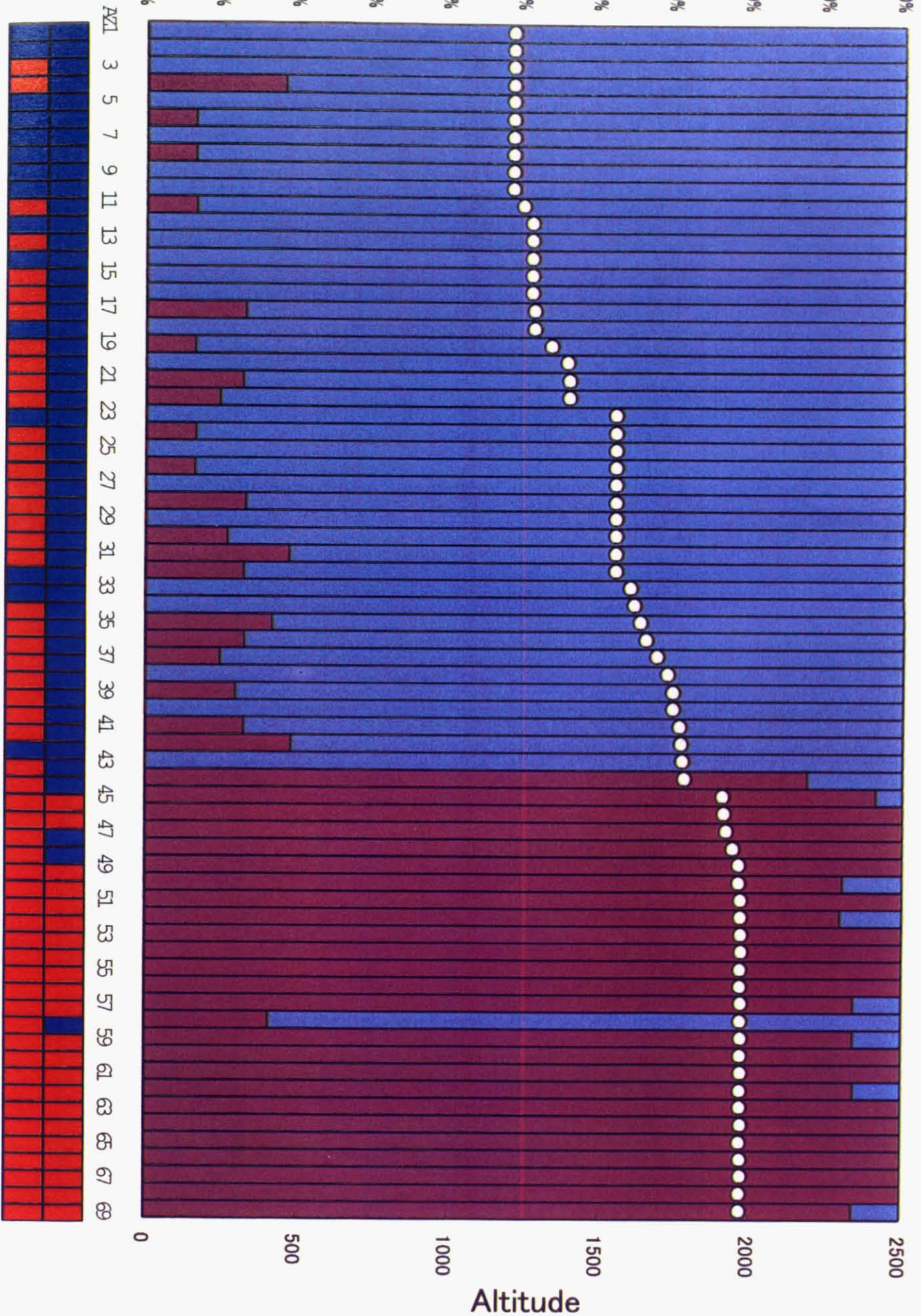


図1-8. ハイマツ・キタゴヨウ交雑帯の分子交雑指数推定に用いた8つの核マーカーとそのSSCPバンドパターン

# Hybrid Index (percent of *pumila* markers)

CpDNA  
MtDNA



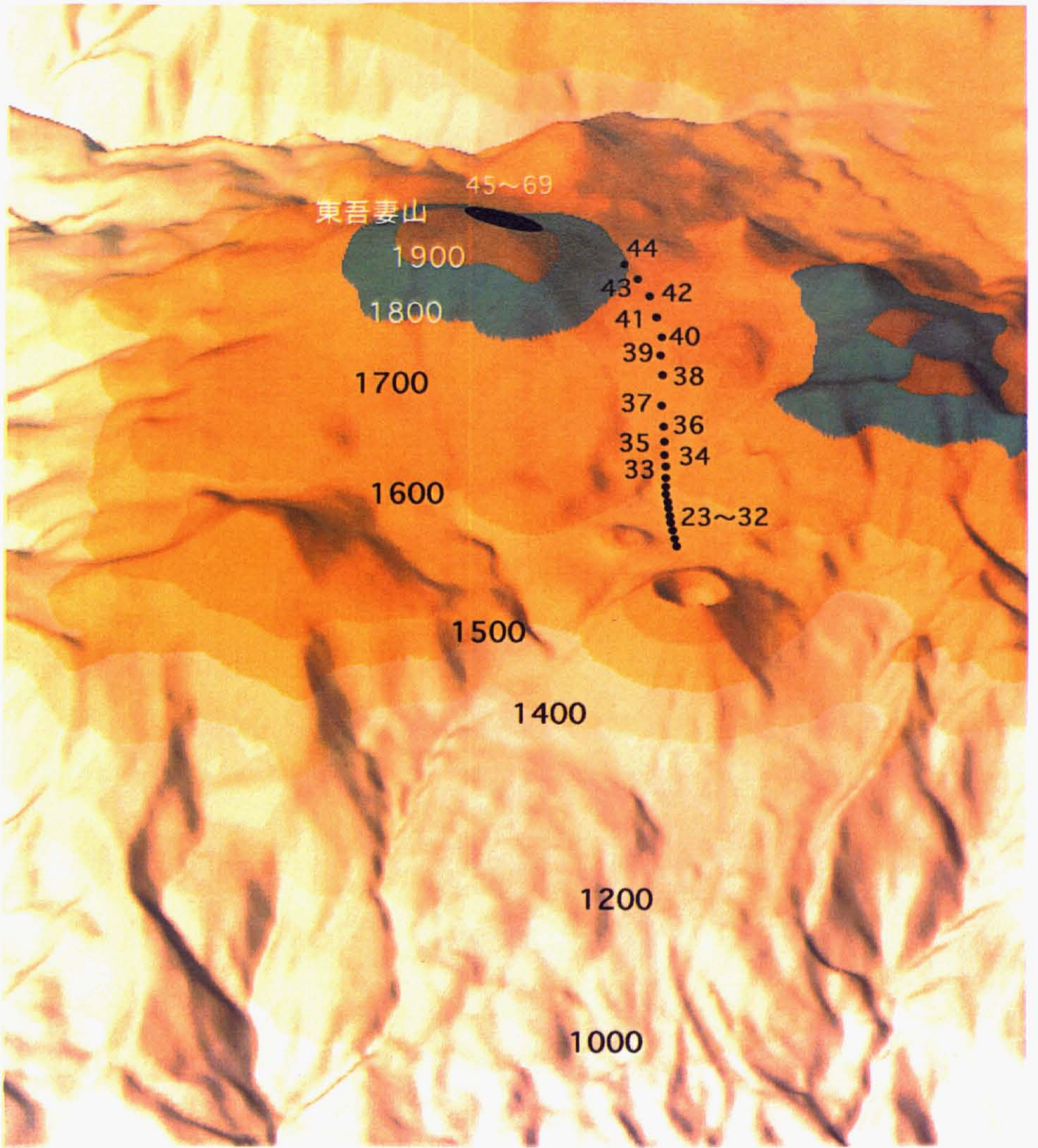
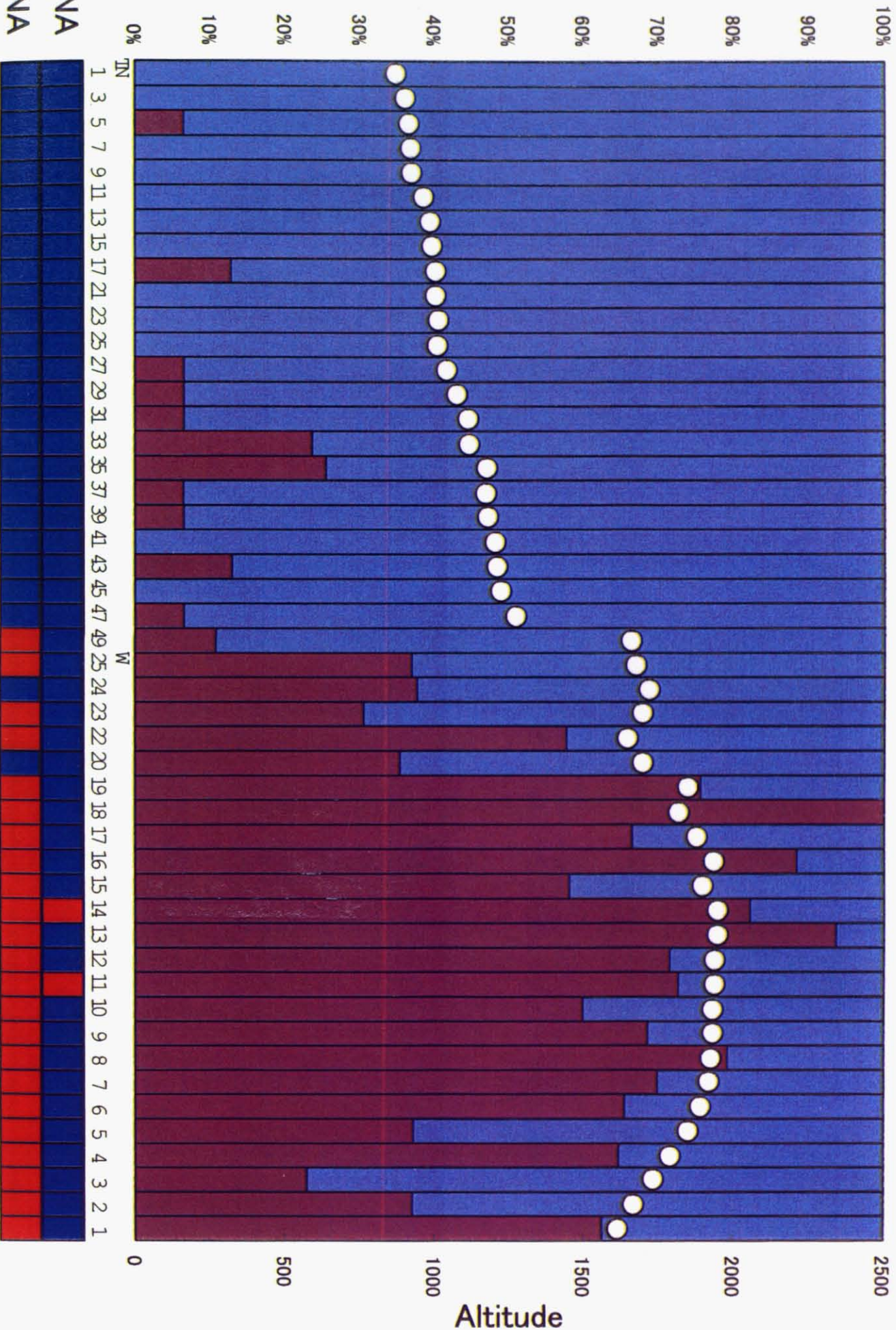


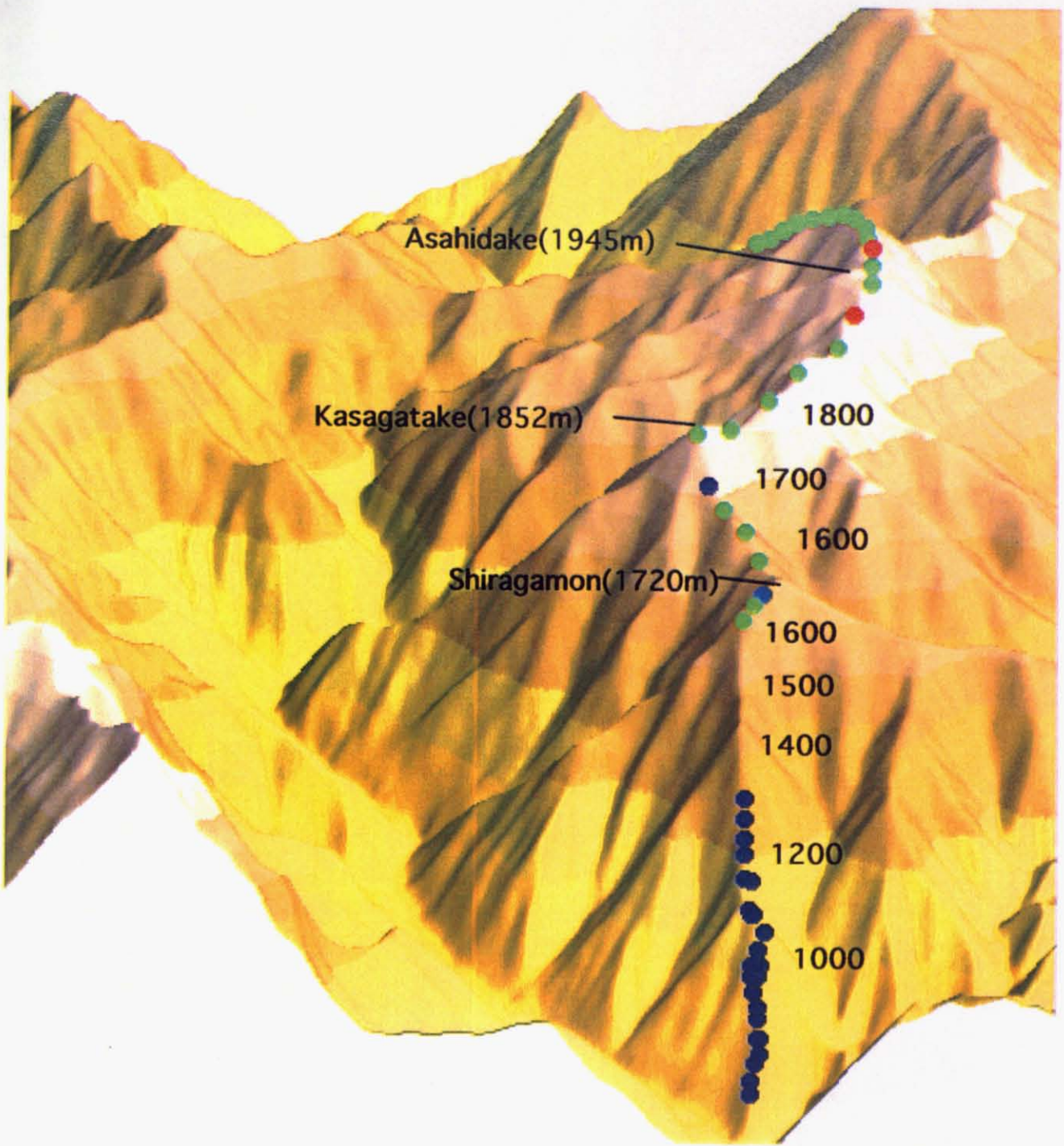
图 10

# Hybrid Index (percent of *pumila* markers)

CpDNA  
MtDNA







## 核遺伝子を用いたマツ属ストロブス亜属の種間系統解析

加藤俊英・綿野泰行(千葉大学理学部生物学科)

植物の系統学的解析には、葉緑体 DNA(cpDNA)がひろく利用されている(Soltis and Soltis 1998)。cpDNA は、多くの分類群で使用可能な汎用プライマーが多く開発されていること、シングルコピーであることから、PCR産物のダイレクトシーケンスが可能であること、系統解析の階層に応じて遺伝子間領域からコード領域まで、様々な DNA 領域を使用可能なことなど、多くの利点を持っている。一方、浸透性交雑がおこった場合、細胞質ゲノムは核よりも浸透を起こしやすいことが経験的に知られており(Riseseberg and Soltis 1991)、同属内の種間系統といった階層の場合には、細胞質捕獲の影響を考慮する必要が生じる。

マツ属では、頻繁に浸透性交雑を起こすことが知られており(Wagner et al. 1987)、特に細胞質捕獲による系統推定のバイアスを受けやすい可能性がある。マツ属の分子系統解析については、Wang et al. (1999)が4種類の cpDNA 領域に基づいた解析、および Liston et al. (1999)による核リボソーマル DNA の ITS 領域に基づいた解析がある。両者の結果には、得られた系統関係に無視できない異なった点があるが、これが情報不足のせいなのか、cpDNA もしくは ITS の遺伝子浸透のせいなのかは定かでない。

ハイマツとキタゴヨウの核マーカーの開発の過程で、マツ属全体で使用できる核遺伝子領域が数多くみつかった。本研究では、そのうちの PtIFG\_9008 という領域を用いて、ハイマツとキタゴヨウが属するマツ属ストロブス亜属の系統関係の解析を行った。また、Wang et al. (1999)で得られた cpDNA 系統樹とのトポロジーの比較も行った。

### 材料と方法

マツ属ストロブス亜属 21 種 1 変種、外群としてピナス亜属 3 種、合計で 25 分類群を用いた。材料のリストを表 1 に示した。

PtIFG\_9008 の塩基配列の決定の手順は以下の通りである。まずトータル DNA をテンプレートとして PCR を行い(図 1)、その産物を SSCP 解析にかけた。ホモ接合の表現型を示すものはそのままダイレクトシーケンスを行った。ヘテロ接合のものは、pGEM-T Vector System (Promega)をベクターとして TA クローニングを行い、対立遺伝子を分離した。

塩基配列は、ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンスサイクル反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて解析した。得られた塩基配列は、PAUP4.0 を用いて NJ 法と最節約法で解析した。解析した 25 分類群のうち、Wang et al. (1999)と共通する 15 分類群については、改めて最節約法で系統解析し、トポロジーの相違を、PAUP4.0 の Partition Homogeneity Test で検定した。

### 結果と考察

解析した 25 分類群のうち、*Pinus fenzeliana* のみが SSCP でヘテロ表現型を示した。

PtIFG\_9008 の最節約法の厳密合意樹を図 2 に示した。ストロース亜属のうち、ストロース節が 91% のブートストラップ確率で単系統となった。ストロース節のうち、アジア産のストロビ亜節 6 分類群のうち、*P. morrisonicola* を除く 5 分類群 (*P. arandii* var. *arandii*, *P. arandii* var. *amamiana*, *P. fenzeliana*, *P. wallichiana*, *P. parviflora* var. *pentaphylla*) が 59% で単系統となった。この姉妹群の位置にヨーロッパ産の *P. peuce* がついた。また、センブラエ亜節の 3 種 (*P. sibirica*, *P. cembra*, *P. koraiensis*) はストロビ亜節の *P. morrisonicola* と 85% で単系統となった。センブラエ亜節の *P. pumila* はストロース節のクレードの根本から分岐し、他種との関係は不明であった。

Wang et al. (1999) と共有するデータセット (15 分類群) での葉緑体と PtIFG\_9008 の最節約法の厳密合意樹を図 3、4 に示した。葉緑体系統樹 (図 3) では、ストロース節のうち、ストロビ亜節の *P. arandii*, *P. wallichiana*, *P. fenzeliana*, *P. parviflora* とセンブラエ亜節の *P. cembra*, *P. pumila*, *P. koraiensis* が 100% で単系統になる。これらは全てアジア産の種である。PtIFG\_9008 系統樹では、先に述べたように、これらストロビ亜節の種は、センブラエ亜節の種とは別のクレードとなる。葉緑体 DNA のデータセットと PtIFG\_9008 データセットを組合せて Partition Homogeneity Test を行った結果では、 $P=0.008$  となり、この二つのデータセットが有意に異質なものであることが示された。

この PtIFG\_9008 核遺伝子系統樹 (図 4) と Wang et al. (1999) の葉緑体系統樹の不一致については、葉緑体 DNA でアジア産のストロビ亜節とセンブラエ亜節が単系統となることから、アジアにおける両亜節間での葉緑体の細胞質捕獲が起こった可能性が考えられる。ただ、用いた核遺伝子が一つであること、配列が 400bp ほどと短いことから、核遺伝子系統樹が間違っている可能性も残っている。今後、数多くの核遺伝子を解析することで、蓋然性を高めることが必要である。

## 引用文献

- Liston, A., Robinson, W.A., Pinero, D. and Alvarez-Buylla, E.R. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Mol Phylogenet Evol* 11: 95-109.
- Soltis, D.E. and Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. Soltis et al. (eds.) *Molecular Systematics of Plants II DNA Sequencing*. Kluwer Academic Publishers, London, pp.1-42.
- Rieseberg, L.H. and Soltis, D.E. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 5: 65-84.
- Wagner, D.B., Furnier, G.R., Saghai-Marooof, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P. and Allard, R.W. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole pines and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 2097-2100.
- Wang, X.R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K. and Szmidt, A.E. 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *MatK*, *Rpl20-Rps18* spacer, and *TrnV* intron sequences. *Amer. J. Bot.* 86:1742-1753

表1. サンプル一覧

種名及び分類群	分 布	標本番号
<b>subgenus Strobos</b>		
<b>section Strobos</b>		
<b>subsection Cembrae</b>		
<i>P.koraiensis</i> Sleb et Zucc	本州、四国、朝鮮半島、中国東北部	K-016
<i>P.cembra</i> L	ヨーロッパアルプス	K-008
<i>P.sibirica</i> Mayr	シベリア、モンゴル	
<i>P.pumila</i>	日本、ユーラシア東北部	
<b>subsection Strobi</b>		
<i>P.fenzeliana</i> Hand Maz	中国（海南島）	K-012
<i>P.strobiformis</i> Engelm	メキシコ、北米西南部	K-028
<i>P.flexilis</i> James	北米西部	K-013
<i>P.armandii</i> Franch	中国中西部、台湾	K-002
<i>P.armandii</i> Franch v. <i>amamiana</i> Hatus	日本（屋久島、種子島）	K-003
<i>P.ayacahuite</i> Ebran	メキシコ、グアテマラ	K-004
<i>P.lambertiana</i> Dougl	北米西部	K-017
<i>P.strobos</i> L	北米東部	K-029
<i>P.peuce</i> Griseb	バルカン地方	K-022
<i>P.wallichiana</i> A B Jacka	ヒマラヤ、アフガニスタン	K-032
<i>P.morrisonicola</i> Hayata	台湾	K-021
<i>P.parviflora</i>	日本	
<b>section Parrya</b>		
<b>subsection Gerardianae</b>		
<i>P.bungeana</i> Zucc	中国中部	K-006
<i>P.gerardiana</i> Wall	ヒマラヤ、アフガニスタン	K-014
<b>subsection Balfourianae</b>		
<i>P.aristata</i> Engelm	北米西部	K-001
<b>subsection Cembroides</b>		
<i>P.cembroides</i> Zucc	メキシコ、北米西南部	K-008
<i>P.maximartinezii</i> Rzedowski	メキシコ	K-018
<i>P.monophylla</i> Torr	北米西部	K-020
<b>subgenus Pinus</b>		
<b>section Pinus</b>		
<b>subsection Pinus</b>		
<i>P.sylvestris</i>	ユーラシア	K-030
<b>subsection Canariensis</b>		
<i>P.canariensis</i> Smith	カナリー諸島	K-007
<b>subsection Pineae</b>		
<i>P.pinea</i> L	地中海沿岸	K-023

各サンプルの標本は千葉大学理学部に保存されている。

*P.pumila*、*P.parviflora*、*P.koraiensis*、*P.cembra*、*P.sibirica* については抽出済みTotalDNAをサンプルとした。

図1-1

PtIFG9008F 5' TCTCGGATAGGGCAATATGC 3'  
PtIFG9008R 5' GGTAAGCTGGGATGGATTGC 3'

図1-2

1 GGACCTTTGGGGATNTCGGAGTTTTGGGGAATGGAAAGAAACANTGAAGAGTTGGTGATG 60  
61 TTCTTTACAAAGGCCTGAGTATTTNTTAAAGGACAATTAACAAANCCTTGCAAGGTATCC 120  
121 TTCTGTTTGTTCCTCCAGGAACNGGGAAAACAATGNTAGCCAAAGCTGTTGCAACGGAAG 180  
181 CCGGTGCCAATTTTATAAATATTTCAATGTCAAGCATAACATCAAAGTGGTTTGGTGAAG 240  
241 GTGAAAAGTATGTCAAAGCGGTATTTTCATTGGCGAGTAAAATTTACNTAGTGTCATAT 300  
301 TTGTTGACGAGGTTGACAGTATGTTGGGTCTGAAGGGAGAGTCCTGGAGAACATGAGGCCA 360  
361 TGCCTAAGATGAAAAATGAGTTTATGGTAAGCTGGGATGGATTGCGCACTAAGGACAAGG 420  
421 AACGAGTACTAGTTCTTGCTGCAACCAATAGACCCTTTGATCTTGATGAAGCTGTCATCC 480  
481 GAAGACTTCCCCGGAGGTTAATGGTGAATTTGCCAGATAACAACAACAGGGCAAAAATCT 540  
541 TGAAGGTGATACTTGCAAAAGAGGAATTGGCACCAGACGTGGATTTGGATGCAATTGCAA 600  
601 GTATGACAGAGGGATATTCTGGGAGTGACCTCAAGAAGCTGTGTGTTACAGCTGCATATT 660  
661 GCCCTATCCGAGAAATTCTGG 681

## 図1.プライマーPtIFG9008F、PtIFG9008Rの塩基配列

図1-1に本実験で使用したプライマーPtIFG9008F、PtIFG9008Rの塩基配列を示す。

図1-2はPinus taedaのcDNAの配列とプライマーPtIFG9008F、PtIFG9008Rのアライメントの結果を示した図である

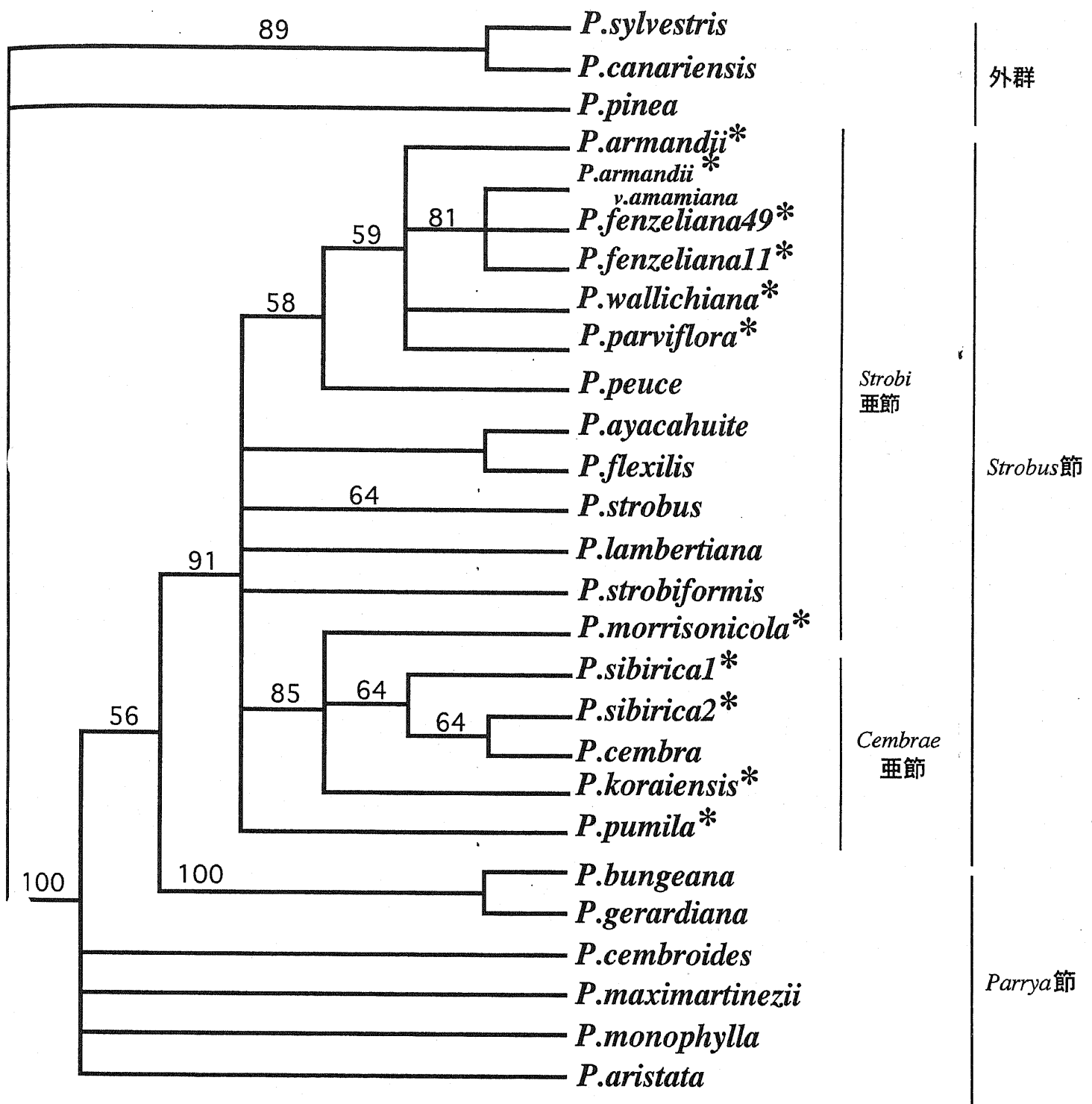


図2.核遺伝子による *Pinus* 属25種の系統樹

*Strobis* 亜属22種、*Pinus* 亜属3種のPtIFG9008由来のPCR産物の配列から最節約法で得られた5つの最節約系統樹の厳密一致樹。

枝上の数字は100回のブートストラップに基づいた各枝のブートストラップ確率を示す。

種名に\*がついている種はアジアに分布する種である。

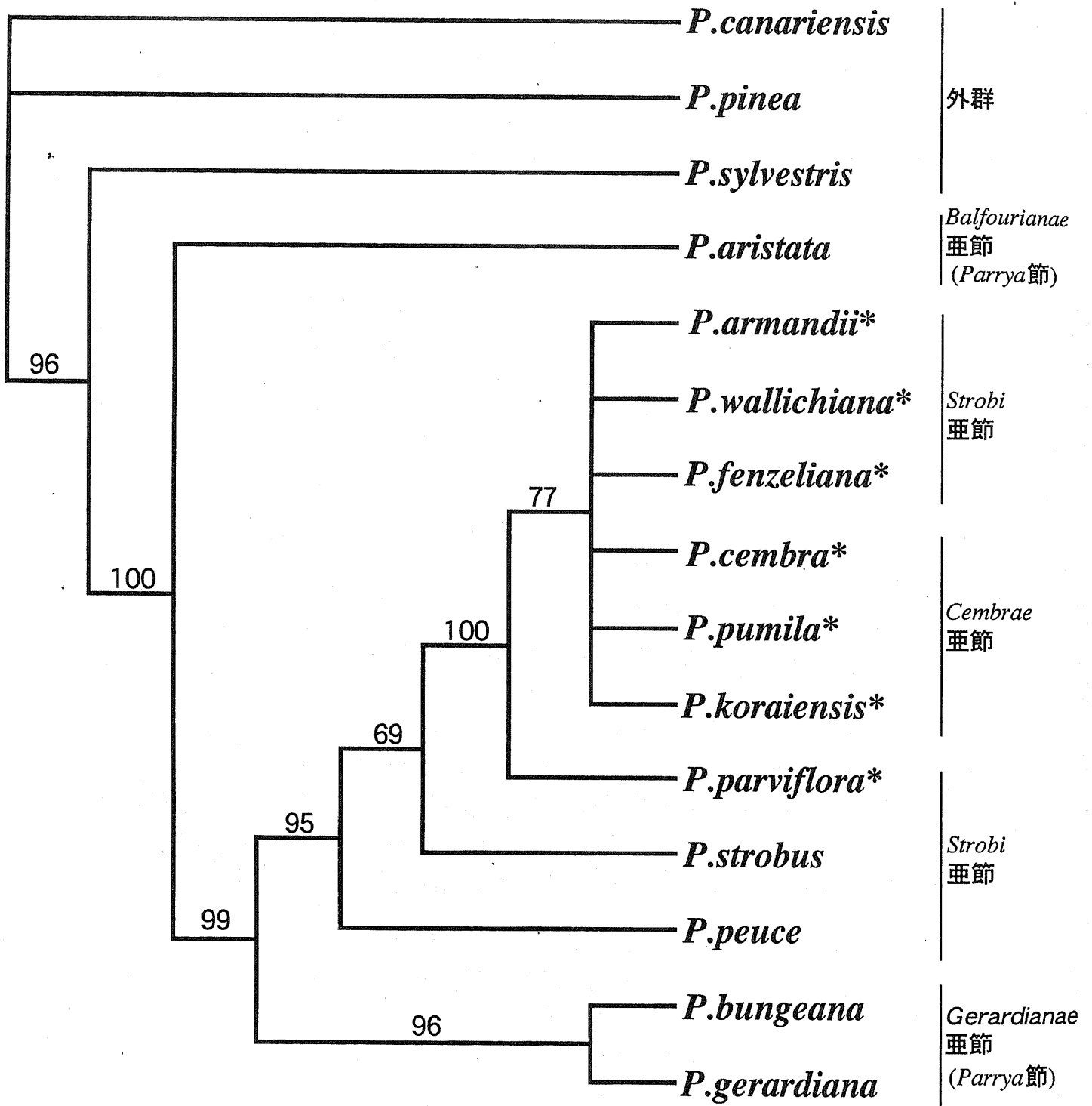


図3. 葉緑体DNAによる *Strobus* 亜属12種の系統樹 (Wang et al 1999のデータによる)

Wang et al (1999) の葉緑体 *rbcL*、*matK*、*trnV*、*rp120* の配列データを用いて最節約法によって得られた系統樹。

枝上の数字は100回のブートストラップに基づいた各枝のブートストラップ確率を示す。

*Balfourianae* 亜節及び *Gerardiana* 亜節は *Parrya* 節、外群を除くその他の種は *Strobus* 節に属する。

種名に\*がついている種はアジアに分布する種である。

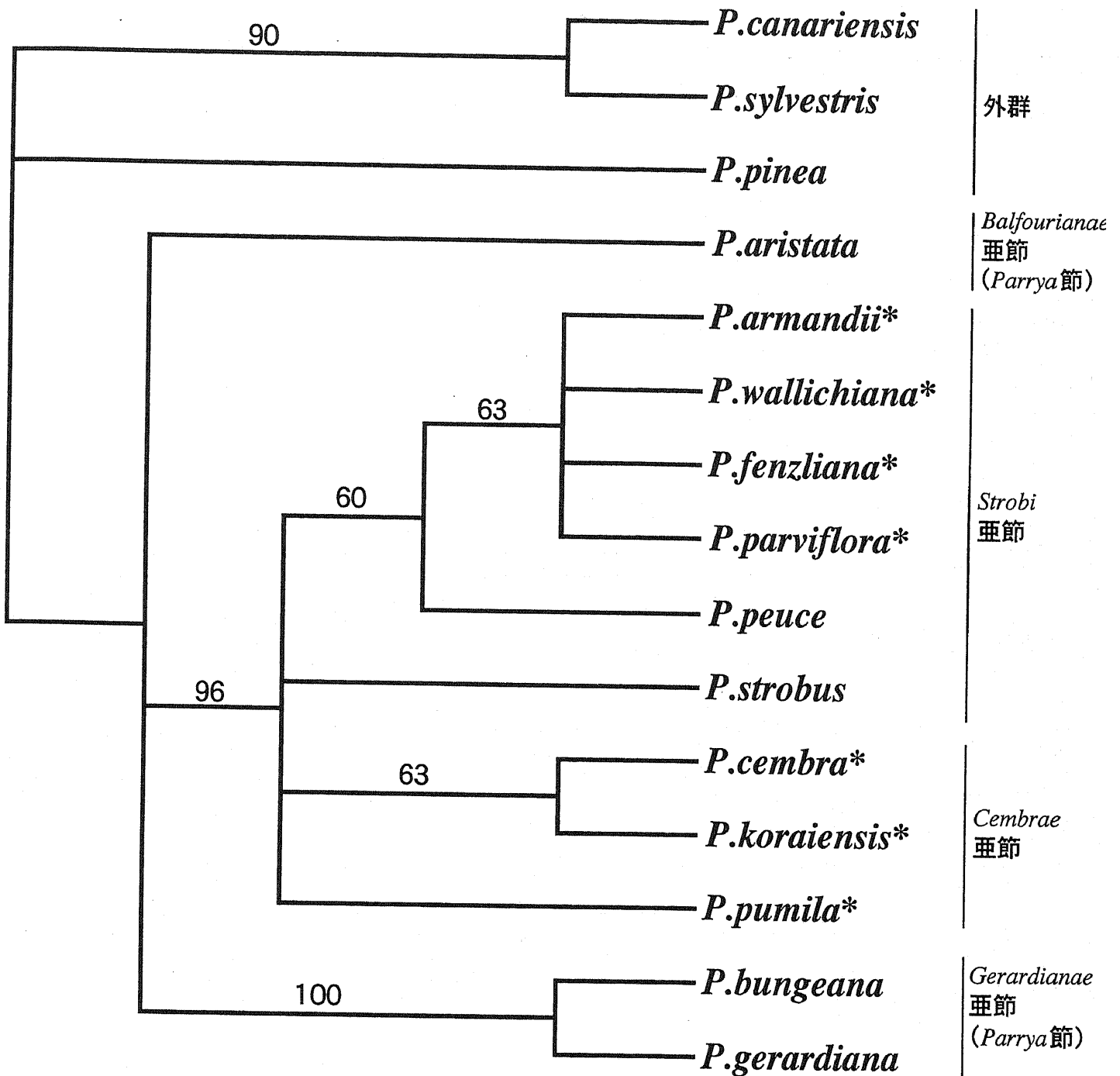


図4.核遺伝子による *Strobos* 亜属12種の系統樹

シーケンスを行った *Strobos* 亜属22種及び外群の *Pinus* 亜属3種のうち、Wang et al (1999) によって葉緑体遺伝子による系統解析が行われている12種について、PtIFG9008由来のPCR産物の配列データを用いて、最節約法により得られた2つの系統樹の厳密一致樹。枝上の数字は100回のブートストラップに基づいた各枝のブートストラップ確率を示す。種名に\*がついている種はアジアに分布する種。





<i>P. cembra</i>	121	CTTGCAATTGCATCCAAATCCACGTCTGGTGCCAATTCCTCTTTTGCAAGTATCACCTTC	180
<i>P. koraiensis</i>	121	.....	180
<i>P. pumila</i>	121	.....	180
<i>P. sibirica1</i>	121	.....	180
<i>P. sibirica2</i>	121	.....	180
<i>P. armandii</i>	121	.....C.....	180
<i>P. armandii</i>	121	.....C.....	180
<i>ver. amamiana</i>			
<i>P. ayacahuite</i>	121	.....	180
<i>P. fenzeliana11</i>	121	.....A.....C.....	180
<i>P. fenzeliana49</i>	121	.....C.....	180
<i>P. fiexilis</i>	121	.....G.....	180
<i>P. lambertiana</i>	121	.....	180
<i>P. morrisonicola</i>	121	.....	180
<i>P. parviflora</i>	121	.....C.....	180
<i>P. peuce</i>	121	.....C.....	180
<i>P. strobiformis</i>	121	.....	180
<i>P. strobus</i>	121	.....	180
<i>P. wallichiana</i>	121	.....C.....	180
<i>P. bungeana</i>	121	.....	180
<i>gerardiana</i>	121	.....	180
<i>aristata</i>	121	.....	180
<i>P. cembroides</i>	121	.....	180
<i>P. maximartinezii</i>	121	.....	180
<i>P. monophylla</i>	121	.....N.....	180
<i>P. sylvestris</i>	121	.....	180
<i>P. canariensis</i>	121	.....	180
<i>P. pinea</i>	121	.....	180
		*****	

<i>P. cembra</i>	181	AAGATTTTTGCCCTGTTTGTGTATCTGGCAAATTCACCATTAACCTGCAAAACCATTGC	240
<i>P. koraiensis</i>	181	.....	240
<i>P. pumila</i>	181	.....	240
<i>P. sibirica1</i>	181	.....	240
<i>P. sibirica2</i>	181	.....	240
<i>P. armandii</i>	181	.....A.....	240
<i>P. armandii</i>	181	.....A.....	240
<i>ver. amamiana</i>			
<i>P. ayacahuite</i>	181	.....	240
<i>P. fenzeliana11</i>	181	.....A.....	240
<i>P. fenzeliana49</i>	181	.....A.....	240
<i>fiexilis</i>	181	.....	240
<i>P. lambertiana</i>	181	.....	240
<i>P. morrisonicola</i>	181	.....	240
<i>P. parviflora</i>	181	.....A.....	240
<i>P. peuce</i>	181	.....	240
<i>P. strobiformis</i>	181	.....	240
<i>P. strobus</i>	181	.....	240
<i>P. wallichiana</i>	181	.....A.....	240
<i>P. bungeana</i>	181	.....T.....	240
<i>P. gerardiana</i>	181	.....	240
<i>P. aristata</i>	181	.....	240
<i>P. cembroides</i>	181	.....	240
<i>P. maximartinezii</i>	181	.....	240
<i>P. monophylla</i>	181	.....	240
<i>P. sylvestris</i>	181	.....	240
<i>P. canariensis</i>	181	.....	240
<i>P. pinea</i>	181	.....	240
		*****	

<i>P. cembra</i>	241	AATG--TGTACATCAGTAACAAAAACAATCACGTACATACTCGTGTTCTATTTCAGA	298
<i>P. koraiensis</i>	241	.....--.....TG.....	298
<i>P. pumila</i>	241	.....--.....G.....T.....A.....	298
<i>P. sibirica1</i>	241	.....--.....	298
<i>P. sibirica2</i>	241	.....--.....	298
<i>P. armandii</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. armandii</i>	241	.....--.....G.....A.....T...	298
<i>ver. amamiana</i>			
<i>P. ayacahuite</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. fenzeliana11</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. fenzeliana49</i>	241	.....--.....T.....G.....	298
<i>P. fiexilis</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. lambertiana</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. morrisonicola</i>	241	.....--.....G.....G.....	298
<i>P. parviflora</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. peuce</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. strobiformis</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. strobilus</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. wallichiana</i>	241	.....--.....G.....	298
<i>P. bungeana</i>	241	.....--.....T.....TG..C.....A.....	298
<i>gerardiana</i>	241	.....--.....T.....G..C.....A.....	298
<i>aristata</i>	241	.....--.....C.....G.....A.....	298
<i>P. cembroides</i>	241	.....--.....C.....G.....A.....A.....	298
<i>P. maximartinezii</i>	241	.....--.....C.....A.....	298
<i>P. monophylla</i>	241	.....--.....C.....G.....A.....	298
<i>P. sylvestris</i>	241	.....AA-CAT.....G.....A.....A.....AA.....C.G.....A.....	298
<i>P. canariensis</i>	241	.....AA----.....G.....A.....A.....A.....C.G.....	298
<i>P. pinea</i>	241	.....AA----.....G.....A.....A.....C.G.....	298
		**** .....	

<i>P. cembra</i>	299	GAGGAACTGCCAATTAACAAAAATAATACACTGAACCAGAACTGATCAAGCACACCTCCG	358
<i>P. koraiensis</i>	299	.....	358
<i>P. pumila</i>	299	.....	358
<i>P. sibirica1</i>	299	.....	358
<i>P. sibirica2</i>	299	.....	358
<i>P. armandii</i>	299	.....	358
<i>P. armandii</i>	299	.....T.....	358
<i>ver. amamiana</i>			
<i>P. ayacahuite</i>	299	.....	358
<i>P. fenzeliana11</i>	299	.....	358
<i>P. fenzeliana49</i>	299	.....	358
<i>fiexilis</i>	299	.....	358
<i>P. lambertiana</i>	299	.....	358
<i>P. morrisonicola</i>	299	.....G.....T.....	358
<i>P. parviflora</i>	299	.....	358
<i>P. peuce</i>	299	.....	358
<i>P. strobiformis</i>	299	.....	358
<i>P. strobilus</i>	299	.....	358
<i>P. wallichiana</i>	299	.....	358
<i>P. bungeana</i>	299	.....G.....	358
<i>P. gerardiana</i>	299	.....G.....T.....G.....	358
<i>P. aristata</i>	299	.....C.....	358
<i>P. cembroides</i>	299	.....	358
<i>P. maximartinezii</i>	299	.....	358
<i>P. monophylla</i>	299	.....	358
<i>P. sylvestris</i>	299	.....	358
<i>P. canariensis</i>	299	.....	358
<i>P. pinea</i>	299	.....T.....	358
		**** .....	



# ゴヨウマツ類におけるマイクロサテライトマーカークの開発 と得られたマイクロサテライトシーケンスの特徴

森林総合研究所森林遺伝研究領域ゲノム解析研究室

谷 尚樹

## はじめに

本課題において、まず効率のよいマイクロサテライトマーカークの開発法の開発に取り組んだ。採用した方法はビオチンラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを用いてマイクロサテライトを含む DNA 断片を選択し、濃縮化ゲノミックライブラリーを構築する方法で Armour et al. (1994)、Fleischer and Lowe (1995)、Fischer and Bachmann (1998)、Iwata et al. (2000)を改変して開発した。この結果、ビオチンラベルされたマイクロサテライト配列のオリゴヌクレオチドプローブ ((CT)<sub>15</sub>) を用いて効率の良い開発法を開発することが出来た。本方法を用いることによってゴヨウマツ以外の樹種、スギ (*Cryptomeria japonica*)、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、オガサワラグワ (*Morus boninensis*) においてもマイクロサテライト配列を持つ DNA フラグメントを高い確率で選抜することに成功した。本方法はゴヨウマツだけでなく他の種へ普遍的に応用可能である。ここでは、まず今回開発したマイクロサテライトマーカークの開発法を述べ、次に、ゴヨウマツから得られたゲノミックライブラリー中のマイクロサテライトを持つ DNA フラグメントの濃縮率、さらにマイクロサテライト配列の特徴について考察する。

## 開発したマイクロサテライトマーカー開発法

### セシウムクロライド密度勾配遠心による DNA 精製

マイクロサテライト遺伝マーカー開発に必要なライブラリの構築にはより良質の DNA が 5ug 以上必要なため、ラージスケールで CTAB 法を用いて植物細胞より未精製の DNA を回収する。その後、DNA 溶液 3mL に対し、セシウムクロライドを 3.12g、エチジウムブロマイドを 120uL 加えセシウムクロライドの密度が  $\rho=1.55$  になるように調整し、8 時間以上 100000 回転で遠心を行う。遠心終了後、UV 下で DNA はエチジウムブロマイドによって視覚化されるので、その層を注射針で抜き取り、SSC で飽和されたイソパノールによってエチジウムブロマイドを除去する。エタノール沈殿後、塩を除去するため 70%エタノールによって洗浄を繰り返し、インタクトなゲノミック DNA を回収する。

### 制限酵素処理と DNA 断片のサイズ分画

制限酵素処理によって DNA を断片化し、その DNA 断片をアガロースゲル電気泳動する。この電気泳動では 1.6%アガロースゲルを用い、300bp から 1000bp の DNA 断片をアガロースゲルから切り出した。切り出したゲルは QIAGEN 社の QIAGEN™ QIAquick Gel Extraction Kit を用いてゲルから DNA 断片を回収した。回収した DNA 溶液はエタノール沈殿後、滅菌水に溶かし、蛍光光度計を用いて濃度を測定した。

### カセットの結合と PCR 増幅

制限酵素処理した DNA 断片はオリゴヌクレオチドプローブによってマイクロサテライトを含む DNA 断片を選抜した後、クローニングのため二本鎖にする必要がある。そこでクローニング直前に PCR を利用し一本鎖の DNA 断片を二本鎖にする。そこで PCR を可能にするため DNA 断片の両端に Sau3AI カセットを結合する。

回収した DNA 約 500ng に対して Sau3AI カセットおよびライゲースを加え、16°Cで一晩反応を行う。反応後、エタノール沈殿によって DNA 断片を回収し、減圧乾燥後、滅菌水 15uL に DNA 断片を溶かす。この後、ニックの修復を行う。この DNA 溶液に dNTP と DNA ポリメラーゼを加え 16 度で 2 時間反応させる。これによってニックが修復されるので、この後エタノール沈殿を行い、TE バッファーを 20uL 加えて、これ以降の作業に用いるカセット付の DNA 断片を完成させる。カセットが結合したかどうかは PCR によって簡単に確認できる。カセットが結合しているはずの DNA を鋳型にしてカセットプライマー (Primer C1) を用いて PCR を行う。これを 2%アガロースゲルで電気泳動し、増幅が 300bp から 1000bp にスメアーなバンドが増幅していればカセットは結合している。

### ハイブリダイゼーション

マイクロサテライト配列を持ったオリゴヌクレオチドプローブを作成し、あらかじめビオチンでラベルしておく。今回は植物ゲノムの中で最も多く分布しているといわれているマイクロサテライト配列(CT)15 と 3 塩基繰り返しのマイクロサテライトの一つである(ATG)10 を作成した。これを 12XSSC, 0.1%SDS 中でハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの条件は(CT)15 では 95 度で 15 分インキュベーターとした後、70 度で一晩インキュベーターとした。(ATG)10 の場合は、95 度で 15 分インキュベーターとした後、60 度で一晩インキュベーターとした。その後、調整した Streptavidin が表面についたマグネットビーズをハイブリダイゼーション溶液に混和させ、43 度で 2 時間混和しながらインキュベーターし、ビオチンと Streptavidin を結合させた。

次にマグネットビーズの洗浄を行い、非特異的にハイブリダイズした DNA 断片を除去した。洗浄液は 2XSSC, 0.1%SDS と 1XSSC, 0.1%SDS を使用した。(CT)15 の場合、最初、室温で洗浄し、その後、45 度、60 度の条件で洗浄を行った。一方で(ATG)10 の場合、最初、室温で洗浄し、45 度、50 度の条件で洗浄を行った。プローブの T<sub>m</sub> 値の関係から(ATG)10 の最後の洗浄温度を(CT)15 に比べて低く設定した。

洗浄終了後、洗浄液を破棄し、マグネットだけを回収した。そこにあらかじめ 95 度に暖めておいた TE バッファーを加え 15 分間 95 度でインキュベートし、オリゴヌクレオチドプローブとマイクロサテライト配列を含んだ DNA 断片を乖離させた。次にマグネットビーズだけをチューブの底に磁石で集め、上澄みをピペットで回収した。この溶液にエタノールを加え、DNA を沈殿させた。その後、20 $\mu$ L の滅菌水に溶解した。

DNA 断片を二本鎖にするためにカセットプライマーを用いて PCR を行った。PCR 後、この PCR 溶液の 5 $\mu$ L だけを用いて 2%アガロースゲルで電気泳動を行い、増幅の有無のチェックを行った。増幅していれば残りの溶液をエタノール沈殿させ、次のクローニングに使用する DNA 断片とした。

### カセットの切断

制限酵素 *ndeII* で DNA 断片を切断し、カセットを切り離す。その後、1.6%アガロースゲルを用いて電気泳動すると DNA 断片のスメアーなバンドと低分子の領域にカセットプライマーによるバンドが確認できる。ターゲット DNA 断片であるスメアーなバンドをゲルから切り出し、QIAGEN<sup>TM</sup> QIAquick Gel Extraction Kit を用いて切り出したゲルから DNA を抽出、精製する。このキットで精製した後、エタノール沈殿によって DNA を回収し、減圧乾燥後、15 $\mu$ L の TE 溶液に溶解する。

### ベクターへの連結（ライゲーション）及び大腸菌の形質転換

市販のプラスミドベクター pUC118BamHI/BAP を、DNA 溶液、ライゲースとともにエッペンチューブ内で混和し、16 度で 2 時間インキュベートし、ベクターに DNA 断片を連結させる。その後、大腸菌 (DH5 $\alpha$ ) にプラスミド溶液を混和し、氷上で 2 時間インキュベートした後、42 度で 45 秒間ヒートショックを行う。SOC 培地で 2 時間大腸菌を培養した後、LB 培地に大腸菌を撒き、37 度で一晩培養しコロニーを得た。

得られたコロニーは 1mL の Terrific Broth 液中で 37 度 24 時間浸透培養し、浸透培養後、



集菌し、プロメガ社の Wizard 96SV miniprep kit でプラスミド DNA を回収した。

## シーケンス反応とオートマチックシーケンサーによるシーケンスの決定

シーケンス反応は Applied Biosystems 社の BigDye ver. 3 プロトコルにしたがって行った。また、シーケンス反応後のシーケンス反応物の精製もこのプロトコルに示されたエタノール沈殿を用いて行った。この後、シーケンス反応物を Applied Biosystems 社の ABI3100 オートマチックシーケンサーにセットし、それぞれのプラスミドクローンのインサート部のシーケンスを決定した。pUC 系のベクターを使用したのでプライマーには M13 を使用した。

## 得られたシーケンスの解析

得られたシーケンスはコンピュータソフトウェア Factura でプラスミド配列を除去した後、クローンの重複を確認するためホモロジーサーチプログラム Blast で処理し、ユニークな配列だけを抽出した。また同時に、マイクロサテライト配列の存在するクローンをピックアップした。(CT)15 プローブで濃縮されたライブラリからは 119 個のクローンのシーケンスが得られた。この中でマイクロサテライト配列を含んでいたクローンは 64 個であり、濃縮率は 57%であった。この 64 クローンの中でマイクロサテライト配列は AC, CA, TG, GT のモチーフのものが 18 個、AG, GA, CT, TC のモチーフが 141 個、AT, TA のモチーフが 7 個、CCG, CGC, GCC, CGG, GCG, GGC のモチーフが 2 個それぞれ存在した。合計で 64 クローンのシーケンスの中に 168 個のマイクロサテライト配列を検出した。平均で 2.65 個のマイクロサテライト配列が一つのクローンのシーケンス中に含まれていた。(ATG)10 プローブでは 64 クローンのシーケンスを決定した結果、22 のクローン中にマイクロサテライト配列を検出し、濃縮率は 34%であった。しかし、ターゲットである ATC, TCA, CAT, GAT, TGA, ATG モチーフのマイクロサテライトを検出することは出来なかった。検出したマイクロサテライト配列は AC, CA, TG, GT のモチーフのものが 6 個、AG, GA,

CT, TC のモチーフが 19 個、AT, TA のモチーフが 2 個、AGG, GGA, GAG, CCT, TCC, CTC のモチーフを 1 個であった。

以上のように、(CT)<sub>10</sub> オリゴヌクレオチドプローブを使ったときには、安定してマイクロサテライト配列を含んだ DNA 断片を濃縮できる条件を決定することができた。しかしながら(ATG)<sub>10</sub> オリゴヌクレオチドプローブではターゲットモチーフの濃縮は確認できなかった。今後、(CT)<sub>10</sub> プローブによって濃縮されたライブラリは 1000 クローン程度のシーケンスを決定し、プライマーを作成しマイクロサテライトマーカを開発する。また、3 塩基反復のモチーフの濃縮は困難であった。プローブのモチーフの長さを調節し、T<sub>m</sub> 値をコントロールし、ハイブリダイゼーション、その後の洗いの条件を再考する必要がある。それに加えて、別の 3 塩基反復のモチーフを試すなどの条件設定を変更する必要があるであろう。

#### 引用文献

- Armour JAL, Neumann R, Gobert S, and Jeffreys AJ. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3: 599-605.
- Fischer D, and Bachmann K. 1998. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *Biotechniques* 24: 796-802.
- Fleischer RC, and Loew S. 1995. Construction and screening of microsatellite-enriched genomic libraries. Page 459-468 in J. Ferraris and S. Palumbi (eds.), *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*. Wiley-Liss, New York.
- Iwata H, Konuma A, and Tsumura Y. 2000. Development of microsatellite markers in the tropical tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). *Molecular Ecology* 9: 1661-1686.

表-1. 決定されたシーケンス中に存在したマイクロサテライト、及びその開始位置と繰り返し数

クローン	開始位置およびモチーフとその繰り返し数						
Pis195F	125 AG(24)	236 GA(6)	251 AG(6)				
Pis198F	291 TG(16)						
Pis199F	36 GA(8)	151 GA(14)					
Pis201F	85 GA(7)	127 GA(13)					
Pis205F	27 TG(16)						
Pis206F	31 GA(21)						
Pis208F	99 AG(51)						
Pis216F	326 AC(12)	350 AT(6)	372 AT(8)	388 AC(27)	443 AC(6)		
Pis217F	33 GA(8)	71 GA(61)					
Pis219F	71 AC(14)						
Pis222F	16 AG(58)	225 AG(6)					
Pis224F	181 GA(40)						
Pis229F	82 GA(6)	95 AG(6)	235 GA(20)	370 GA(9)	391 GA(9)		
Pis232F	10 GA(16)	44 GA(79)					
Pis233F	121 TC(52)						
Pis234F	6 AG(17)	121 GA(10)	190 GA(23)	280 GA(6)	342 GA(6)		
Pis235F	106 TG(24)	230 GA(9)	251 AG(23)				
Pis237F	6 AG(29)	124 GA(17)	156 GAGG(4)	313 GA(6)			
Pis239F	108 AG(14)	147 AG(6)					
Pis240F	36 AG(41)	163 AG(24)	363 GA(17)				
Pis241F	186 AG(13)	222 AG(23)					
Pis243F	36 AG(25)	87 AG(35)					
Pis248F	90 GA(6)	122 GA(9)	166 GA(9)	212 GA(7)	300 GA(16)		
Pis249F	192 AG(15)						
Pis253F	26 AG(6)	112 GA(35)	225 GT(6)	237 GA(11)			
Pis254F	39 AG(25)	110 GA(25)	175 AG(9)	219 GA(13)	260 AG(11)	292 AG(8)	322 AG(9)
Pis257F	13 TC(9)	65 TC(25)					
Pis259F	33 TG(14)						
Pis261F	18 AT(16)	50 AG(47)	225 GA(18)	310 GA(21)	392 GA(6)		
Pis262F	495 CT(26)						
Pis266F	69 GA(14)	104 GA(30)	267 GA(16)	346 GA(25)			
Pis273F	6 AT(14)	34 AG(14)					
Pis281F	11 AG(51)						
Pis283F	10 AG(14)	39 AG(12)	66 AG(9)				
Pis285F	7 GA(7)	41 GA(33)					
Pis286F	22 AG(14)	100 GA(21)	182 GA(6)	256 GG(6)			
Pis288F	12 AC(15)						
Pis289F	42 GA(6)	81 AG(7)	99 GA(7)	177 GA(13)	285 GA(8)	303 GA(12)	482 GA(12)
Pis290F	191 TC(35)						
Pis295F	402 CT(22)						
Pis298F	225 CA(17)						
Pis299F	48 CGG(4)	120 GGC(5)	152 AG(6)	288 GA(7)			
Pis301F	24 GA(12)	68 GA(6)	136 GA(9)	166 GA(6)	188 GA(9)	233 GA(6)	283 GA(25)
Pis303F	52 AG(7)	117 GA(37)	341 GA(6)				
Pis307F	132 AG(7)	261 GA(15)					
Pis310F	91 CA(23)	136 AT(6)					
Pis311F	6 AG(6)	19 AG(11)	108 GA(6)	122 GA(20)	216 GA(6)		
Pis316F	77 TA(14)	104 AG(40)	191 GA(8)	208 AG(11)			
Pis317F	27 GA(68)						
Pis319F	66 GA(20)	108 GA(21)					
Pis320F	42 GA(8)	81 AG(6)	97 GA(6)	139 GA(6)	161 GA(8)	255 GA(8)	273 GA(8)
Pis326F	111 TC(48)						
Pis327F	42 TC(19)						
Pis339F	63 TC(19)						
Pis342F	70 GA(12)	95 AG(8)	161 GA(23)				
Pis344F	275 TG(16)						
Pis346F	115 TG(6)						
Pis347F	221 GA(37)						
Pis349F	49 AT(9)	69 AG(27)	202 GA(8)	220 GA(18)	262 GA(6)	331 GA(9)	397 GA(18)
Pis352F	197 GT(10)						
Pis369F	67 AG(9)	127 GT(6)	146 AG(17)				

つづき

クローン	開始位置およびモチーフとその繰り返し数		
Pis372F	94 TG(15)		
Pis381F	142 AG(31)		
Pis383F	258 CA(18)		
PisATG0008	283 AG(19)		
PisATG0012	153 AC(13)		
PisATG0019	268 TA(14)	295 AG(33)	
PisATG0024	22 AG(10)		
PisATG0050	27 TC(9)	47 TC(14)	
PisATG0051	340 CT(15)		
PisATG0052	27 TC(24)		
PisATG0057	108 GA(20)		
PisATG0058	10 AG(8)	28 AG(22)	
PisATG0059	10 GA(19)		
PisATG0062	64 GGA(6)		
PisATG0064	77 TC(30)		
PisATG0065	348 TG(9)		
PisATG0069	34 AT(7)	47 TG(10)	69 TG(7)
PisATG0073	449 TC(12)		
PisATG0076	25 TG(17)		
PisATG0077	230 GA(19)		
PisATG0082	334 AG(12)		
PisATG0085	50 TC(29)		
PisATG0087	156 AG(21)		
PisATG0089	365 CT(18)	506 CT(6)	
PisATG0096	114 TG(19)		