

# 葉緑体DNAの制限酵素断片からみた 日本産キク属(広義)植物数種の類縁関係

高 橋 伸 二

## I はじめに

日本産のキク属*Chrysanthemum* (広義) 植物としては約20種が記載されているが (cf. 大井, 1983)、これらには  $X=9$  を基本数として、2倍体 ( $2n=18$ ) から10倍体 ( $2n=90$ ) までの整然とした倍数性があることが知られている (cf. Shimotomai, 1933)。また、細胞遺伝学的見地からみた類縁関係については田中・下斗米 (1978)、中田他 (1987) 等によって検討され、田中・下斗米 (1978) は外部形態、生態、地理的分布、交雑親和性、核型、ゲノムの特性を総合した日本産キク属 (広義) 植物の系統樹を示した。一方、北村 (1978) は日本産キク属 (広義) をその特性からハマギク属*Nipponanthemum*、ミコシギク属*Leucanthemella*、ヨモギギク属*Tanacetum*、キク属 (狭義) *Dendranthema*に分ける見解を示しているが、これは田中・下斗米 (1978) の見解とほぼ一致している。

近年、分子生物学の発展により、制限酵素によるDNAの切断やDNA塩基配列の決定などが比較的容易に行われるようになり、系統学においてもその手法が広く用いられるようになってきた。植物では、そのゲノムの大きさが約15万塩基対 (150kbp) と小さい葉緑体DNAの分析が広く行われており (cf. Palmer et al., 1988), Jansen et al. (1990, 1991) はキク科57属の葉緑体DNAの制限酵素による切断部位についての分析を行い、属間の系統関係を明らかにした。

本研究は、分類学的研究や細胞遺伝学的研究が十分に行われていながら、いまだ分子生物学的手法による分析が行われていない日本産キク属 (広義) 植物数種について、葉緑体DNAの制限酵素断片分析法を用いて、葉緑体DNAの特徴と、その類縁関係を明らかにしようとするものである。

## II 材 料

研究に用いた材料は表1に示す通りである。なお、学名は北村 (1978) に従った。

表1. 葉緑体DNAの制限酵素断片を分析した植物

No.	種 名	染色体数 (2n)	産 地	入手先*
1.	ハマギク <i>Nipponanthemum nipponicum</i> (Franch. ex Maxim.) Kitam.	18	茨城県日立市	(1)
2.	ワカサハマギク <i>Dendranthema japonicum</i> (Makino) Kitam. var. <i>wakasaense</i> (Shimotomai) Kitam.	36	京都府舞鶴市	(2)
3.	シマカンギク <i>Dendranthema indicum</i> (L.) Des Moulins	36	広島県東城町	(2)
4.	コハマギク <i>Dendranthema arcticum</i> (L.) Tzvelev subsp. <i>maekawanum</i> Kitam.	90	北海道余市町	(1)

\* (1) 広島大学理学部附属植物遺伝子保管実験施設  
(2) 著者採集

### Ⅲ 方 法

#### 1. 試 薬

本実験に使用した主な試薬は次の通りである。

洗浄緩衝液	2 mM EDTAと0.3Mマンニトールを含んだ50mMトリス塩酸緩液 (pH 8.0)
分離緩衝液①	洗浄緩衝液に0.1%ウシ血清アルブミン (W/V)、5 mM 2-メルカプトエタノールを添加したもの
分離緩衝液②	分離緩衝液①に0.6%ポリビニルピロリドンk-30 (W/V) を加えたもの
シヨ糖重層液	60%, 45%, 20% シヨ糖 (W/V) をそれぞれ含んだ分離緩衝液①10mlづつを順に50ml遠心管に重層したもの
TE緩衝液	20mMEDTAを含んだ50mMトリス塩酸緩液 (pH 8.0)
飽和フェノール	融解したフェノールを1Mトリス塩酸緩液 (pH 7.0) で2回飽和したもの
フェノール混液	飽和フェノール、クロロホルム及びイソアミルアルコールをそれぞれ25:24:1 (体積比) の割合で混合したもの
TBE緩衝液	トリス塩基10.8g、ホウ酸5.5g、EDTA0.93gを蒸留水に溶して1000mlにしたもの
泳動用色素液	30% (W/V) グリセリン、0.25% (W/V) ブロモフェノールブルー、0.2% (W/V) キシレンシアノールの混合水溶液

#### 2. 実験操作

##### (1) 植物体の栽培

植物体の栽培は、Palmer (1986) を参考にして、次のように行った。

貸与された植物および採集してきた植物は、それぞれ株分けをして鉢植えにし、温室内で栽培した。葉緑体単離前の2日間は、細胞内のデンプンを減らすために、20℃に調節した人工気象室(暗室)に置いた。

##### (2) 葉緑体の単離

葉緑体の単離は、杉田 (1991) の方法を一部改変して次のように行った。操作はすべて低温室 (4℃) で行い、また遠心分離はスイングローター (Beckman JS13 または TOMYJS7) を用いた。植物体から葉50gを切りとり(約5鉢分の植物体)、水道水で水洗した後、包丁で5mm角に切り刻んだ。500mlのブレンダーボトルに切り刻んだ葉と分離緩衝液②250mlを加え、ワーリングブレンダーで10000rpm、10~30秒間粉碎して1~2mm角になるようにした。四重のガーゼ、ついで二重の20μmナイロンメッシュで濾過し、濾液を50ml遠心管に分注し、2500×g、10分間遠心して葉緑体を沈澱させた。各遠心管の沈澱に分離緩衝液①を2mlづつを加え、柔らかい絵筆で懸濁した。葉緑体を精製するために50ml遠心管に作成したシヨ糖重層液4本に懸濁液を重層し、BeckmanJS13ローターで27000×g、30分間遠心した。シヨ糖液の境界面にできた葉緑体層をピペットで50ml遠心管4本に取り、それぞれ40mlの洗浄緩衝液を加え、2500×g、10分間遠心した。上澄みを捨て、沈澱に40mlの洗浄緩衝液を加え、2500×g、10分間遠心した。この操作は2回繰り返した。

##### (3) 葉緑体DNAの抽出

葉緑体DNAの抽出は、杉田 (1991) の方法を一部改変して次のように行った。遠心分離はすべてスイングローター (TOMYJS7) で行った。

(2)で単離した葉緑体の沈澱にTE緩衝液を少量加え懸濁し、15ml遠心管1本にすべて移して総量を6mlにした後、葉緑体を可溶化させるために20%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム溶液1.5mlと10mg/mlプロテイナーゼK溶液60μlを加え、37℃で3時間インキュベートした。DNAからタンパク質を取り除くために飽和フェノール7mlを加え10分間混和した後、室温で2500×g、5分間遠心し、水層を回収し、これにフェノール混液7mlを加え10分間静かに混和して、室温で2500×g、10分間遠心した。再び水層を回収し、DNAを沈澱させるために3M酢酸ナト

リウム0.4ml、氷冷したエタノール10mlを加え、-20℃で一晩置いた。その後4℃で2500×g、20分間遠心した。そして沈澱に氷冷した70%エタノールを加えよく攪拌した後、4℃で2500×g、20分間遠心した。沈澱を1.5mlマイクロチューブに移し、真空遠心乾燥機を用いて3時間乾燥した後、滅菌水100μlに溶かし、-20℃で保存した。

#### (4) 制限酵素処理

制限酵素処理は、制限酵素に添付されていたデータシートを参考にして、次のように行った。

0.5mlマイクロチューブに10×緩衝液(ニッポンジーン社製)1.5μl、1回分の泳動に要するDNA溶液5μl、制限酵素6ユニット、総量が15μlになるように蒸留水を加え混合し、37℃で2時間インキュベートした。DNA溶液の濃度は、電気泳動後のバンドの濃さが適当になるように滅菌水であらかじめ希釈した。制限酵素はOgihara and Tsunewaki (1982, 1988)、Palmer (1986)を参考にして、葉緑体DNAの切断される部位が比較的少ない酵素として、*Sal* I、*Pvu* II、*Pst* I、*Xho* I、*Kpn* Iの5種類、比較的多い酵素として、*Eco* R I、*Hind* III、*Dra* I、*Bgl* II、*Bam* H Iの5種類(すべてニッポンジーン社製)を使用した。

#### (5) 電気泳動

電気泳動は、池村(1991)の方法を参考にして、Pharmacia社GNA-200型電気泳動装置、0.8%および0.4%アガロースゲル、TBE緩衝液を使って2回以上行った。

制限酵素処理したDNA溶液に泳動用色素液1μlを加えた後、注入溝へ注入し40Vで14時間通電した。サイズマーカーとしては*Hind* IIIで処理したλDNA(23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.5kbp)を用いた。泳動後、ゲルは0.5μg/mlのエチジウムブロマイド水溶液で1時間染色し、30分間水洗した後、紫外線照射装置上にゲルを載せ、ニコンF3にオレンジフィルター(OA-3)を装着して、写真撮影をした。フィルムはミニコピーHR(FUJI)を用い、現像はコピナル現像液(FUJI)で20℃、5分間行った。

#### (6) 制限酵素断片の分析

制限酵素断片の大きさはOgihara and Tsunewaki (1982)、池村(1991)を参考にして、次のような方法で決定した。

写真撮影をした泳動像を印画紙に焼き付けた後、注入溝から各断片のバンドまでの距離を測定した。次に片対数グラフの通常軸にサイズマーカーまでの距離を、対数軸にサイズマーカーの大きさをプロットし、検量線を引いた。次に各断片の移動距離をこの検量線上にプロットし、グラフから断片の大きさを読みとった。なお、6.6kbpより大きい断片は0.4%ゲル、これより小さい断片は0.8%ゲルを中心として断片の大きさを決定した。各バンドのなかで、他のバンドに比べて明るいバンドは、一般的な明るさのバンドを1コピーとして、相対的にコピー数を決定した。この方法によって求めた各断片の大きさを合計して、葉緑体DNAの大きさを求めた。

## IV 結果と考察

### 1. 各制限酵素による断片の特徴

図1~10に各制限酵素処理による断片の電気泳動パターンの写真とその模式図を示した。

#### (1) *Pst* Iによる断片(図1)

4種とも10本のバンドが見られ、同じ泳動パターンを示した。18.0kbpと4.6kbpのバンドは他のバンドよりも明るいので、他のバンドのDNA量を1コピーとすると、その倍の2コピーのDNAを含んでいるものと判断した。各断片の大きさを合計すると143.3kbpであった。

#### (2) *Pvu* IIによる断片(図1)

4種とも10本のバンドが見られ、同じ泳動パターンを示した。各断片の大きさを合計すると133.3kbpであった。

#### (3) *Sal* Iによる断片(図1)

4種とも8本のバンドが見られ、同じ泳動パターンを示した。各断片の大きさを合計すると123.0kbpであった。

(4) *Xho* I による断片 (図1)

4種とも12本のバンドが見られ、同じ泳動パターンを示した。14.5kbpと10.0kbpと3.2kbpのバンドは他のバンドよりも明るいので、2コピーのDNAを含んでいるものと判断した。各断片の大きさを合計すると127.2kbpであった。

(5) *Kpn* I による断片 (図2)

ハマギクと他の3種は9本のバンドは同じであったが、4.9kbpのバンドを持つという点で区別できた。10.0kbpのバンドを2コピーと判断した。各断片の大きさを合計するとハマギクが129.2kbp、他の3種は124.3kbpであった。

(6) *Bgl* II による断片 (図2)

ハマギクと他の3種は22本のバンドは同じであったが、ハマギクは9.2kbpと4.15kbpのバンドを、他の3種は10.5kbpと4.10kbpのバンドを持つという点で区別できた。4.9kbp、3.2kbp、3.0kbpのバンドを2コピーと判断した。各断片の大きさを合計するとハマギクが111.45kbp、他の3種は112.7kbpであった。

(7) *Eco* R I による断片 (図2)

ハマギクと他の3種は18本のバンドは同じであったが、ハマギクは6.6kbpと2.8kbpのバンドを、他の3種は5.9kbpと3.5kbpのバンドを持つという点で区別できた。8.9kbpのバンドを2コピーと判断した。各断片の大きさを合計すると84.1kbpであった。

(8) *Bam* H I による断片 (図3)

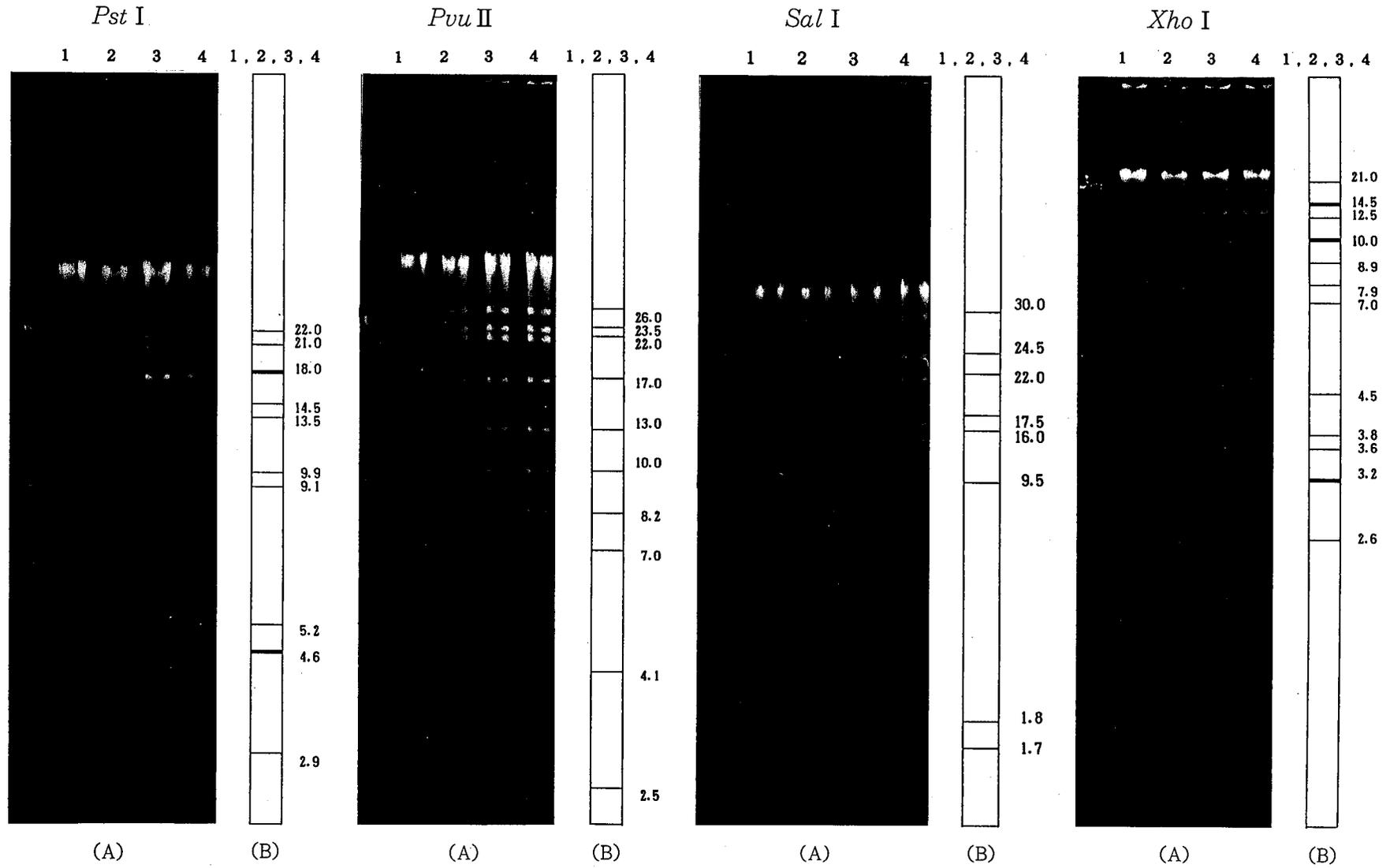
ハマギクと他の3種の材料は22本のバンドは同じであったが、ハマギクは2.5kbpのバンドと5.6kbpの2コピーと思われるバンドを、他の3種は5.5kbpと3.2kbpのバンドおよび5.6kbpの1コピーと思われるバンドを持つという点で区別できた。各断片の大きさを合計するとハマギクが128.3kbp、他の3種は128.9kbpであった。

(9) *Hind* III による断片 (図3)

ハマギクと他の3種は18本のバンドは同じであったが、ハマギクは4.25kbpと4.20kbpのバンドを、他の3種は4.30kbpと4.15kbpのバンドを持つという点で区別できた。11.0kbpのバンドを3コピー、9.0kbpと2.3kbpのバンドを2コピーと判断した。各断片の大きさを合計すると141.85kbpであった。

(10) *Dra* I による断片 (図3)

ハマギクと他の3種は5本のバンドは同じであったが、ハマギクは7本の1コピーと思われるバンドと4本の2コピーと思われるバンドを、他の3種は9本の1コピーと思われるバンドと1本の2コピーと思われるバンドと1本の3コピー (9.6kbp) と思われるバンドを持つという点で区別できた。各断片の大きさを合計するとハマギクが104.35kbp、他の3種は104.85kbpであった。



葉緑体DNAの制限酵素断片からみた日本産キク属(広義)植物数種の類縁関係

図1. *Pst* I、*Pvu* II、*Sal* I、*Xho* Iで処理した後、0.4%ゲル (*Pst* I、*Pvu* II、*Sal* I)、0.8%ゲル (*Xho* I) で電気泳動をした葉緑体DNAの制限酵素断片パターンの写真 (A) とその模式図 (B)。材料は1:ハマギク、2:ワカサハマギク、3:シマカンギク、4:コハマギクである。写真の左端のレーンはサイズマーカーを示す。模式図の横の数字は各バンドのDNAの大きさ (kbp) を示す。

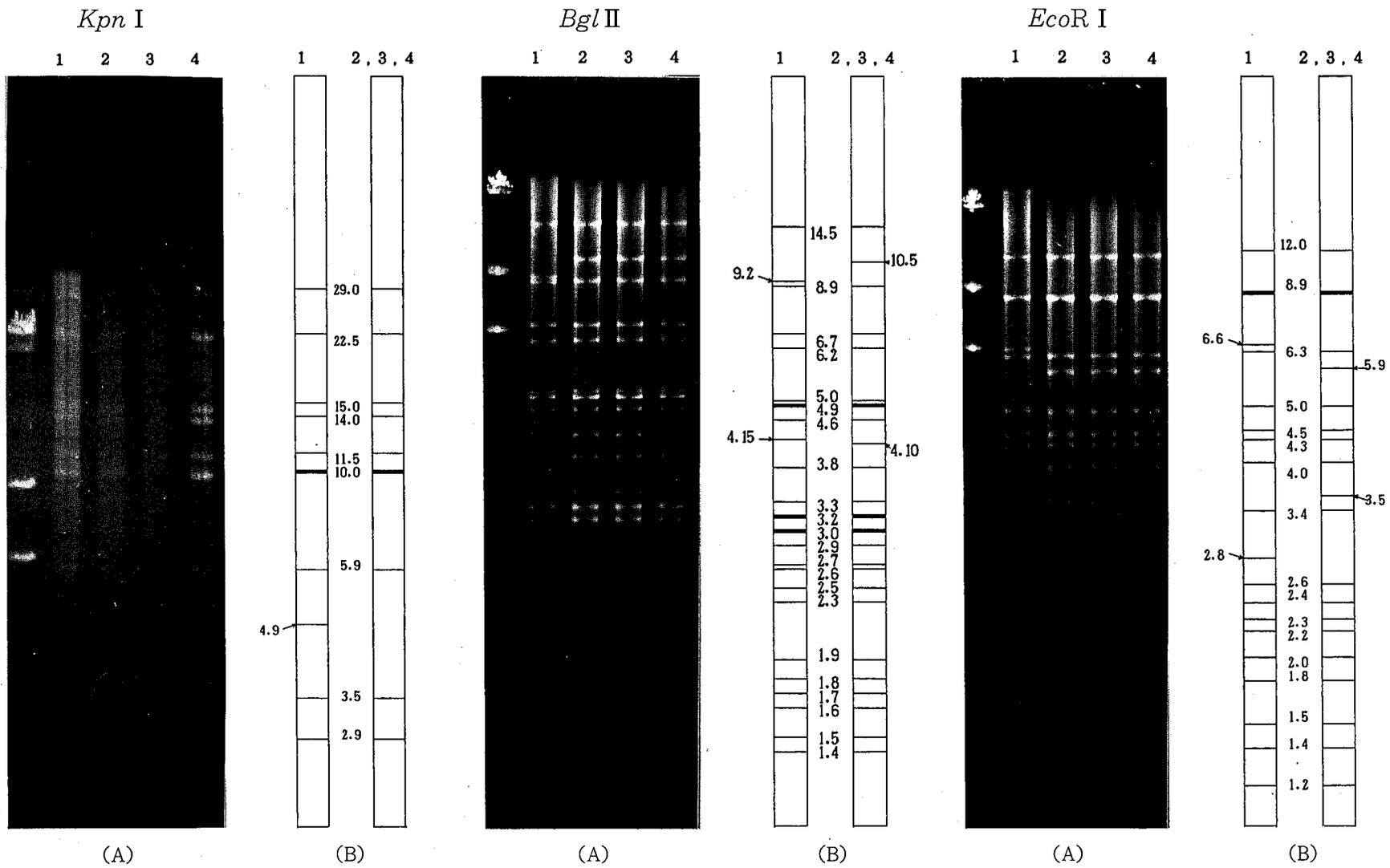


図2. *Kpn* I、*Bgl* II、*Eco* R Iで処理した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動をした葉緑体DNAの制限酵素断片パターンの写真(A)とその模式図(B)。材料は1:ハマギク、2:ワカサハマギク、3:シマカンギク、4:コハマギクである。写真の左端のレーンはサイズマーカーを示す。模式図の太線は明るいバンドを、模式図中のレーンの間の数字は共通のバンド、レーンの両端の数字は各レーンに特徴的なバンドのDNAの大きさ(kbp)を示す。

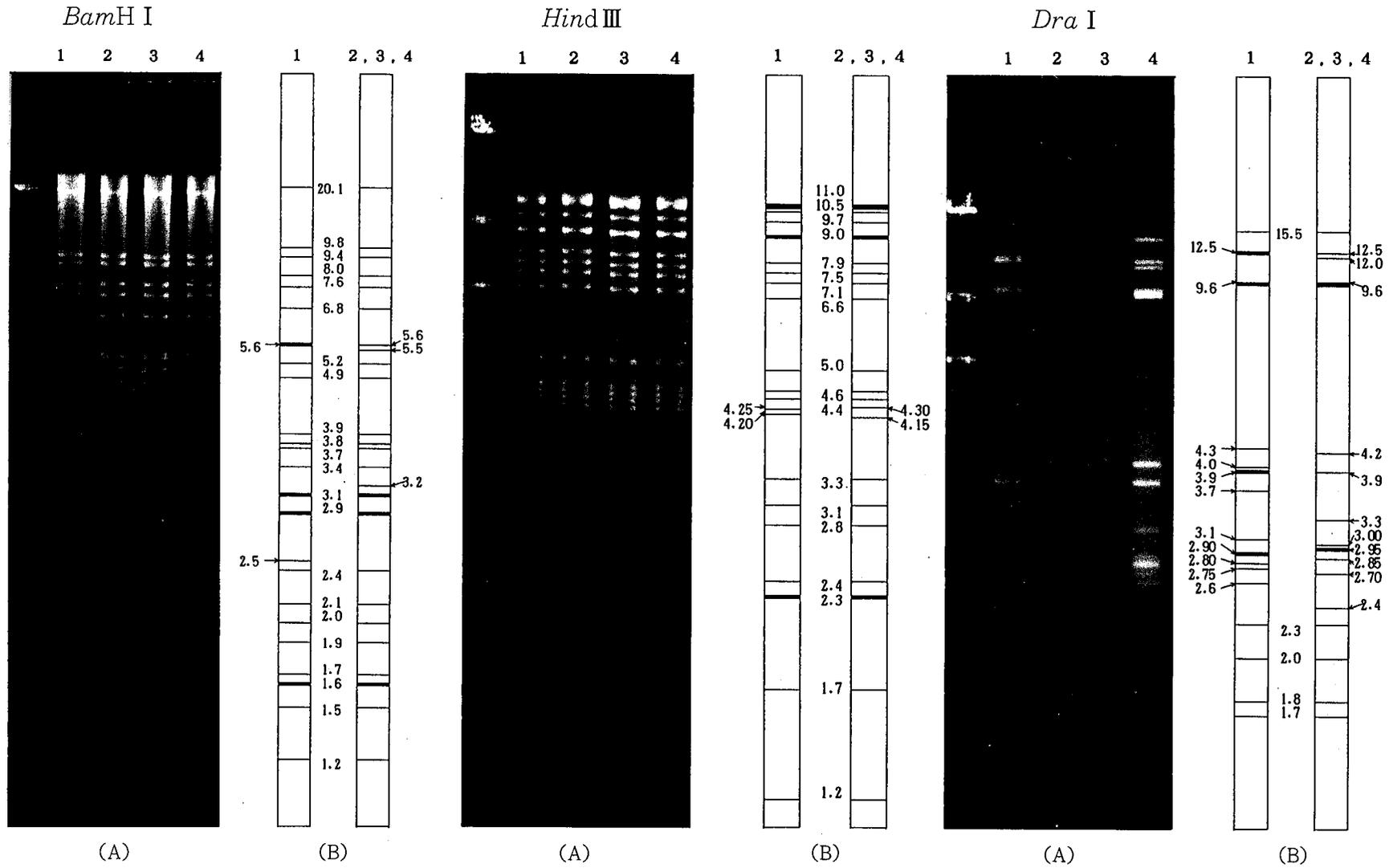


図3. *Bam*H I、*Hind* III、*Dra* Iで処理した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動をした葉緑体DNAの制限酵素断片パターンの写真(A)とその模式図(B)。材料は1:ハマギク、2:ワカサハマギク、3:シマカンギク、4:コハマギクである。写真の左端のレーンはサイズマーカーを示す。模式図の太線は明るいバンドを、模式図中のレーンの間の数字は共通のバンド、レーンの両端の数字は各レーンに特徴的なバンドのDNAの大きさ(kbp)を示す。

## 2. 葉緑体DNAの大きさ

表2はそれぞれの制限酵素断片の大きさを合計して、葉緑体DNAの大きさを推定したものである。

表2 制限酵素断片の大きさから推定した葉緑体DNAの大きさ (kbp)

制限酵素	ハマギク	ワカサハマギク シマカンギク コハマギク
<i>Sal</i> I	123.0	123.0
<i>Xho</i> I	127.2	127.2
<i>Pvu</i> II	133.3	133.3
<i>Pst</i> I	143.3	143.3
<i>Hind</i> III	141.9	142.0
<i>Kpn</i> I	129.2	124.3
<i>Bam</i> H I	128.3	128.9
<i>Bgl</i> II	111.5	112.7
<i>Dra</i> I	104.4	104.9
<i>Eco</i> R I	84.1	84.1
平均	122.6	122.4

今回用いた10種類の制限酵素によって推定された葉緑体DNAの大きさは、84.1~143.3kbpであった。このように、用いた制限酵素によってDNAの大きさが異なる原因としては、長分子長のDNAが検量線から予想されるよりも大きな移動度を持つため、長分子側の断片は過小に評価されるためと考えられる(池村, 1991)。すなわち、*Pvu*II、*Sal*I、*Kpn*Iでは一番大きいサイズマーカーの23.1kbpよりかなり大きい断片を持つために、DNAの大きさが実際よりも小さく推定されていると考えられる。また、約1kbp以下の断片はこの方法では検出できないので、約1kbp以下の断片が存在すれば、同様にDNAの大きさを小さく推定することになる。このように用いた制限酵素の種類によってDNAの大きさが異なることは、Ishii et al. (1988) がイネ属*Oryza*で、11種類の制限酵素を用いて調べた断片の大きさの合計は95kbp~140kbpと報告している。

一方、Jansen et al. (1990) は、本研究で用いた断片分析法よりも分析能が高いとされているプローブを使ったサザンハイブリダイゼーション法によってキク科57属において葉緑体DNAの大きさを測定し、148~151kbpと報告している。したがって、より正確なDNAの大きさはサザンハイブリダイゼーション法で決定する必要があると考えられる。

## 3. 葉緑体DNAの制限酵素断片からみた類縁関係

本研究に用いた4種のキク属(広義)植物では、葉緑体DNAの制限酵素断片パターンにおいて、ハマギクと他の3種(ワカサハマギク、シマカンギク、コハマギク)は10種類中6種類の制限酵素で明瞭に区別された。このことはワカサハマギク、シマカンギク、コハマギクが属するキク属(狭義)の中では種間での交雑が可能な場合が多いが、この属とハマギクの間で交雑ができたという報告がないことや、体細胞分裂中期染色体でのCバンドが、ハマギクでは全ての染色体の端部に出現するのに対してワカサハマギク、シマカンギクでは一部の染色体にのみ見られるという

細胞遺伝学的研究の結果(中田他、1987)とよく一致している。

また、キク属(狭義)に属する3種のうち、コハマギクは、草丈が低いこと、葉が肉質であることなど外部形態が他の2種とは大きく異なるが(cf. 大井、1983)、葉緑体DNAの制限酵素断片パターンは同一であった。このことから、キク属(狭義)での葉緑体DNAの変異は外部形態の変異に比べて、小さいことが予想される。

したがって、葉緑体DNAの分析によるキク属(広義)の類縁関係の分析はキク属(狭義)、ハマギク属、ミコシギク属、エゾノヨモギギク属の属間の関係を解析するには有効であるが、キク属(狭義)内の種間関係を解析するには不適當であると考えられる。したがって、キク属(狭義)内の解析には酵素多型(アイソザイム)の分析や、制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)を使った核DNAの分析が必要であると考えられる。

## V 要 約

日本産キク属(広義)植物4種について、制限酵素断片法によって葉緑体DNAの特徴とその類縁関係を調べた。

葉緑体DNAの大きさは、種間での違いはほとんどみられなかったが、使用した制限酵素の種類によって、84.1~143.3kbpと変異し、平均の大きさは約122kbpであった。

葉緑体DNAの制限酵素による切断パターンは、用いた10種類の制限酵素のうち、4種類では種間で違いはみられなかったが、6種類でハマギクとワカサハマギク、シマカンギク、コハマギクの3種の2群に区別できた。このことからワカサハマギク、シマカンギク、コハマギクの3種が属するキク属(狭義)内では葉緑体DNAの変異はごく小さいと推定された。したがって、葉緑体DNAを用いたキク属(広義)の類縁関係の分析は、キク属(狭義)内の分析には適さないが、ハマギク属、ミコシギク属、ヨモギギク属、キク属(狭義)の属間関係の分析には適していると考えられた。

## VI 謝 辞

本研究は平成3年度附属学校内地研修員として鳴門教育大学大学院で行ったものの一部です。研修の機会を与えていただいた文部省、島根大学の関係各位に感謝します。

また、本研究を行うにあたり、材料の一部を貸与していただいた広島大学理学部附属植物遺伝子保管実験施設、研究全般にわたり指導助言をしていただいた鳴門教育大学清水宏次教授、米澤義彦助教授に深く感謝します。

## 引 用 文 献

- 池村淑道(1991)『電気泳動による核酸の分離』日本生化学会編: 新生化学実験講座2, 東京化学同人, pp.81-102.
- Ishii, T., T. Terachi and K. Tsunewaki (1988), Restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA from A-genome diploid species of rice. *Jpn. J. Genet.*, 63:523-536.
- Jansen, R. K., K. E. Holsinger, H. J. Michaels and J. D. Palmer (1990), Phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site data at higher taxonomic levels: an example from the Asteraceae. *Evolution*, 44:2089-2105.
- Jansen, R. K., H. J. Michaels and J. D. Palmer (1991), Phylogeny and character evolution in the Asteraceae based on chloroplast DNA restriction site mapping. *Systematic Botany*, 16:98-115.
- 北村四郎(1978)『キク属とハマギク属』植物分類地理, 34:165-170.
- 中田政司・田中隆荘・谷口研至・下斗米直昌(1987), 『日本産キク属の種: 細胞学および細胞遺伝学からみたその実体』植物分類地理, 38:241-259.

- Ogihara, Y. and K. Tsunewaki (1982), Molecular basis of the genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. I. Diversity of the chloroplast genome and its lineage revealed by the restriction pattern of ct-DNAs. *Jpn. J. Genet.*, 57:371-396.
- Ogihara, Y., and K. Tsunewaki (1988), Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 76:321-332.
- 大井次三郎 (1983), 『新日本植物誌. 顕花編』 至文堂, pp.1494-1501。
- Palmer, J. D. (1986), Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Methods in Enzymology*, 118: 167-186.
- Palmer, J. D., R. K. Jansen, H. J. Michaels, M. W. Chase and J. R. Manhart (1988), Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75:1180-1206.
- Shimotomai, N. (1933), Zur Karyogenetik der Gattung *Chrysanthemum*. *Jour. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B*, div. 2:1-100.
- 杉田護 (1991), 『植物およびオルガネラからのDNA抽出法』 日本生化学会編: 新生化学実験講座 2, 東京化学同人, pp.29-32。
- 田中隆荘・下斗米直昌 (1978), 『日本産野生菊の種類』 植物と自然, 12(9):6-11。

(たかはし しんじ・理科)