

スゲ属シバスゲ節における葉緑体DNAを用いた 分子系統学的研究

宮村 由美*・沖垣 達*・星野 卓二**

*重井医学研究所分子細胞生物学部門

**岡山理科大学理学部基礎理学科

(1995年9月30日 受理)

要 旨

カヤツリグサ科スゲ属植物は、種類が非常に多く、しかも形態がよく似ており分類が困難なグループである。本研究では、スゲ属の RFLPs 分析による系統分類を目的として葉緑体 DNA の単離を試みた。しかし、葉の組織がケイ素の集積で硬く繊維質が多いため純度の高い葉緑体が得られず DNA の収量が悪かった。そこで、スゲ属シバスゲ節の種内異数体を含む4種の全 DNA を CTAB 法によって単離し、イネの葉緑体 DNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、4種間および種内異数体間で異なる断片パターンが認められ、この RELPs 分析が本属の系統の解析に有効であることが明らかになった。

1. はじめに

葉緑体は高等植物や下等藻類などの真核生物細胞に含まれる光合成器官で、形態的にも機能的にも独立したオルガネラである。1960年代初期、葉緑体に固有の DNA の存在が見出され、1976年にトウモロコシの葉緑体 DNA の制限酵素物理地図が発表された¹⁾。今までにタバコ、イネ、ゼニゴケ葉緑体 DNA の全塩基配列が決定されている²⁾³⁾⁴⁾。葉緑体 DNA の構造の特徴は、環状型 (130~160 kbp) で大単一配列 (large single copy region ; LSC) と小単一配列 (small single copy region ; SSC) に挟まれた逆位反復配列 (inverted repeat ; IR) の存在である。陸上植物の葉緑体 DNA は、コピー数の多い自己増殖性でゲノムサイズ、構造遺伝子配列などが核 DNA に比べて系統発生的に安定していることが明らかになり、これらの特徴を生かした葉緑体 DNA の RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) 分析による分子系統学研究が数多く行われている。RFLPs 分析は制限酵素を利用して DNA の多型を解析し、遺伝子の塩基配列の違いを比較する方法で、同時に多種類の種間、近縁属間の比較に有効である。葉緑体 DNA の RFLPs 分析による陸上植物の分子系統学研究には、*Triticum*、*Aegilopus* 属の葉緑体ゲノムの多様性とその系統関係、*Prunus* 属11種の栽培種の起源、*Prunus* 属9種の系統関係などの報告がある⁵⁾⁶⁾⁷⁾。ま

た、既に塩基配列が明らかになりクローン化されている葉緑体 DNA をプローブとして、核 DNA、葉緑体 DNA、ミトコンドリア DNA を含む全 DNA に、サザンハイブリダイゼーションを行う研究方法が報告されている。

スゲ属植物は日本に約300種が報告されているが、他の植物種に比べて種類が非常に多く、しかも形態がよく似ているため分類が困難なグループである。形態学的分類からは異なる分類体系がいくつか報告されており⁸⁾⁹⁾、スゲ属植物の分類体系の確立が待たれている。また、本属は被子植物に希な連続した種内異数体があり、遺伝的分化の研究に有用である¹⁰⁾¹¹⁾。今回、スゲ属シバスゲ節4種の葉緑体の分離法の検討、CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) 法による葉緑体 DNA の抽出、および全 DNA の抽出を試み RFLPs 分析を行ったので報告する。

2. 実験材料及び実験方法

2.1 実験材料

葉緑体 DNA の抽出には鳥取県日野郡江府町で採取したミヤマカンスゲ (*Carex multifolia* Ohwi, $2n=70$) を用い、全 DNA の抽出には形態分類学的に近縁なグループであるシバスゲ節4種を用いた。本研究で用いたシバスゲ節の5種類は、いずれも岡山県周辺で採集したもので分類学的に近縁な種である。ケスゲ (*Carex duvaliana* Franch. et Savat., $2n=75, 76, 77, 78$)、オクノカンスゲ (*Carex foliosissima* Fr. Schm., $2n=30$) の2種は広島県神石郡油木町、ヒメカンスゲ (*Carex conica* Boott) の $2n=32$ は岡山県岡山市笠井山、 $2n=34$ は栃木県今市市、 $2n=36$ は広島県神石郡加茂町遠鳴峡、カンスゲ (*Carex morrowii* Boott, $2n=38$) は岡山県御津郡加茂川町鼓山でそれぞれ採集した。

2.2 Percoll 密度勾配法による葉緑体の分離

50 g の新鮮な葉を 5 mm 四方に刻み、4°C の ct-A buffer (0.44M Mannitol, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 3mM Na₂EDTA, 1mM 2-Mercaptoethanol, 0.1% BSA) 500ml が入ったミキサーで3秒間の攪拌を3回行った。または、液体窒素中で凍結後、乳鉢中で磨砕し ct-A buffer に溶解させた。溶解液を4重のガーゼで濾過したのち、2重のミラークロスで濾過して細胞残渣を取り除いた。葉緑体、ミトコンドリア、細胞核、デンプン粒を含む濾過溶液を1,000rpm, 4°C, 5分間遠心(日立 RPR 10-2 ローター)をして細胞核、デンプン粒の除去を行った。上澄み液を新しいチューブに移し3,500rpm, 4°C, 10分間遠心して沈澱を得た。沈澱は ct-A buffer に穏やかに溶解して葉緑体抽出液とした。葉緑体抽出液を15%-40%-60%の Percoll 密度勾配 (0.44M Mannitol, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 3mM Na₂EDTA, 15%-40%-60% Percoll solution, 0.1% 2-Mercaptoethanol, 1mM BSA) にゆっくり分注して7,500rpm, 4°C, 15分間遠心分離した。15%-40%の境界に得られた葉緑体抽出液を静かにピペットで吸い取り、2倍量の CIB-buffer (1.25M NaCl,

50mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM Na₂EDTA, 0.1% 2-Mercaptoethanol, 0.1% BSA) に懸濁し3,500rpm, 4℃, 10分間遠心を行った。

2.3 ショ糖密度勾配法による葉緑体の分離

50gの新鮮な葉を5mm四方に刻み、4℃のC buffer (0.3M Mannitol, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM Na₂EDTA, 2-Mercaptoethanol, 0.1% BSA, 0.6% ポリビニルピロリドン) 500mlが入ったミキサーで3秒間の攪拌を3回行った。または、液体窒素中で凍結後、乳鉢中で磨砕しC buffer に溶解させた。溶解度を4重のガーゼで濾過したのち、さらに2重のミラークロスで濾過して細胞残渣を取り除いた。葉緑体、ミトコンドリア、細胞核、デンプン粒を含む濾過溶液を1,000 rpm, 4℃, 5分間遠心 (日立 RPR 10-2 ローター) をして細胞核、デンプン粒の除去を行った。上澄み液を新しいチューブに移し3,500 rpm, 4℃, 10分間遠心して沈澱を得た。沈澱をC buffer から0.6%ポリビニルピロリドンを除いた液4mlで穏やかに懸濁後、ショ糖密度勾配 (0.3M Mannitol, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM Na₂EDTA, 60%8ml-45% 9ml-20% 9ml の Saccharose, 2-Mercaptoethanol, 0.1% BSA) にゆっくり分注して、25,000 rpm, 4℃, 30分間遠心分離した。緑色の2本の断片が得られたらピペットで回収し緩衝液 (0.32M Mannitol, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM Na₂EDTA) にゆっくり混合した後、3,500 rpm, 4℃, 10分間遠心を行った。

2.4 CTAB 法による葉緑体 DNA の単離方法

Percoll およびショ糖密度勾配法により得られた沈澱を10ml TE buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM Na₂EDTA) と10%CTAB 1mlに静かに懸濁して60℃, 60分間保温した後、10mlのクロロホルム-イソアミルアルコールを加えて15分間振とう処理して2,500 rpm, 5分間遠心した。上澄み液に2倍量のイソプロパノールを加え-20℃に一晩置いた。これを7,500 rpm, 4℃, 5分間遠心して得た沈澱を70%エタノールで洗浄し風乾した。その後、TE buffer に溶解しR Nase を加えて37℃, 50分間反応を行い、クロロホルム抽出して99.5%エタノールを加え-20℃に一晩置いた。その後、70%エタノールで洗浄し、12,000 rpm, 4℃, 10分間遠心して風乾した。これをTE buffer に溶解して4℃に保存した。

2.5 CATB 法による全 DNA の単離方法

新鮮葉2gを液体窒素中で凍結後、乳鉢中で粉末状になるまで磨砕した。あらかじめ60℃に保温しておいたCATB isolation buffer (0.1M Tris-HCl pH 0.8, 20mM Na₂EDTA, 1.4M NaCl, 2% CATB, 0.2% 2-Mercaptoethanol)に懸濁し30分間反応させた。その後、等量のクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)を加えて15分間穏やかに振とうして、5,000 rpm, 10分間遠心 (日立 RT15A 6 ローター) した。上澄みに2倍量イソプロパノールを加え穏やかに混合して7,000 rpm, 10分間遠心して得られた沈澱を風乾した。これにTE

buffer 2.5倍量の99.5%エタノール, 1/10倍の3 M NaOAc を加えて -20°C に一晩置いた。遠心後, 沈殿を70%エタノールで数回洗浄して風乾し, TE buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM Na_2EDTA), RNase を添加して 37°C , 60分間反応し, 4°C に保存した。

2.6 アガロースゲル電気泳動

泳動緩衝液として TAE buffer (0.04M Tris-Glacial acetic acid pH 8.0, 1mM Na_2EDTA) を用いて同緩衝液に0.8%の Agaroseを溶かし Ethidium bromide solution 10mg/mlを $0.5\mu\text{l}/\text{ml}$ の割合で加え, ゲル化したサブマリン型スラブゲル電気泳動装置にて70Vで約4時間泳動を行った。試料には Tracking-dye-solution (50% Glycerin, 0.25% Xylen cyanol, 0.25% Bromophenol) を10%の割合で加えサイズマーカーとして λ -DNA (*Hind* III 消化) を試料と同時に泳動した。

2.7 サザントランスファー

電気泳動後のゲルを2.5N HCl に15分間浸して DNA 試料を変性させ, 蒸留水で洗浄した後, Denaturation solution (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) で15分間振とう変性した。蒸留水で洗浄した後 Neutralization solution (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH 7.5) で30分間中和した。Hybond nylon blotting membrane (Amersham Co. Ltd) ゲルの上に置き重石を載せて $20\times\text{SSC}$ (3M NaCl, 0.3M $\text{Na}_3\text{citrate}$) を Transfer bufferとして一晩トランスファーした。

2.8 プローブ DNA・ラベリング反応

プローブ DNA は, 名古屋大学遺伝子施設より分譲していただいたイネの葉緑体 DNA を用い, 物理地図を図1に示した。プローブ DNA・ラベリング反応およびサザンハイブリダイゼーションは, ECL 法に従った (Amersham Co. Ltd)。 $0.2\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ に調整したプローブ DNA を 95°C , 10分間熱変性を行い水中で急冷し, 等量の標識試薬とグルタルアルデヒド溶液を添加して 37°C , 10分間反応を行った。

2.9 サザンハイブリダイゼーション

トランスファーしたメンブランは, 0.4M NaOH で DNA 固定し, $5\times\text{SSC}$ で軽く洗浄した後 Hybridization solution (Hybridization buffer 500ml, 0.5M NaCl, 5% Blocking agent) に浸して 42°C , 15分間プレハイブリダイゼーションした。その後, ラベル済み DNA を添加して 42°C , 一晩反応を行った。メンブランを Primary wash buffer (6M Urea, 0.4% SDS, $0.5\times\text{SSC}$) により 42°C , 20分間2回洗浄し, さらに $20\times\text{SSC}$ で室温, 5分間2回洗浄を行った。メンブランの水気を切り, Detection solution I, Detection solution II を等量混ぜた液をメンブラン上にかけてサランラップに包み, X-ray film で検出した。

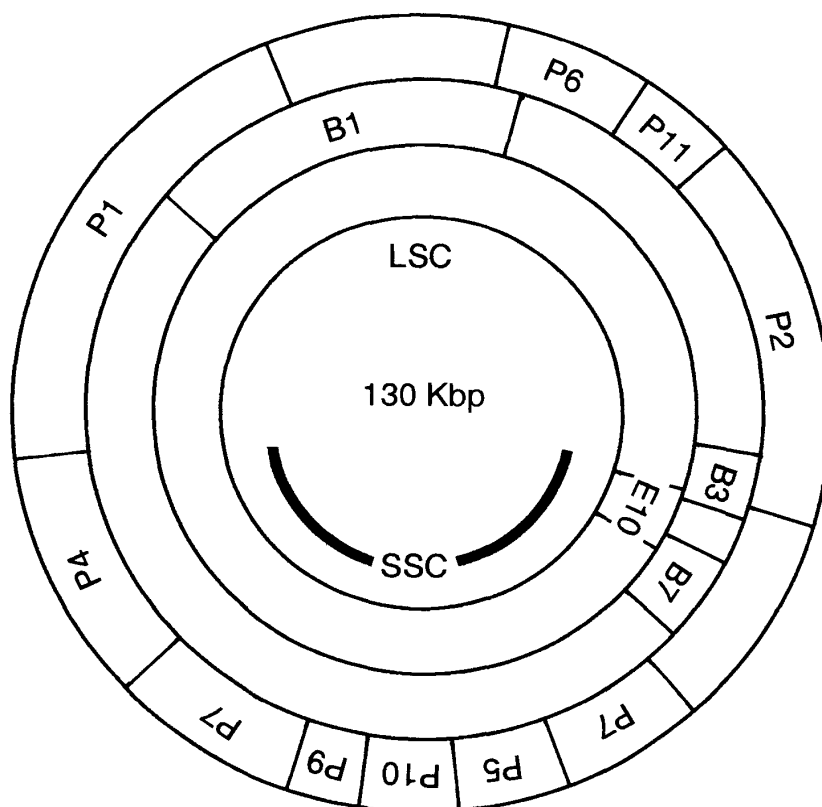


図1 イネ葉緑体 DNA の物理地図

P ; *Pst*I 認識部位 P1 (19.2Kbp), P2 (15.1Kbp), P4 (14.3Kbp), P5 (10.9Kbp), P6 (10.0Kbp), P7 (8.3Kbp), P9 (5.5Kbp), P10 (5.0Kbp), P11 (4.6Kbp)
 B ; *Bam*HI 認識部位 B1 (19.2Kbp), B3 (9.0Kbp), B7 (4.9Kbp)
 E ; *Eco*RI 認識部位 E10 (2.3Kbp)
 太線は逆位反復配列 (inverted repeat ; IR) の位置を示す。

3. 結果と考察

スゲ属植物の葉片はミキサーによる破碎はできなかったが、液体窒素による凍結後は粉末状の破碎が容易にできた。本属のようにケイ素の集積で硬く繊維質が多い材料は、液体窒素により凍結後、乳鉢中で磨砕する方法が適していると思われる。葉緑体抽出液から葉緑体のみを分離するために、Percoll 密度勾配法とショ糖密度勾配法による遠心分離を試みたが、Percoll 密度勾配法による遠心分離の方が適していた。ショ糖密度勾配法は、浸透圧が高くなり葉緑体の包膜が破壊されていた。Percoll 密度勾配法は、浸透圧が緩和であり葉緑体の包膜の破壊が少なかった。ミヤマカンスゲの葉緑体抽出液を Percoll 密度勾配法により分離し、15%-30%層に分離した葉緑体を DAPI 蛍光顕微鏡法により観察した。葉緑体中に点在する葉緑体 DNA と混在するミトコンドリア DNA は確認できたが、単離された葉緑体 DNA 量は少なく、アガロース電気泳動による確認はできなかった。今後、収量を高めるための検討が必要である。

シバスゲ節4種の全 DNA の単離は CATB 法により行った。単離された全 DNA にイネの葉緑体 DNA をプローブとしてハイブリダイズし、RFLPs 分析による解析を行った。

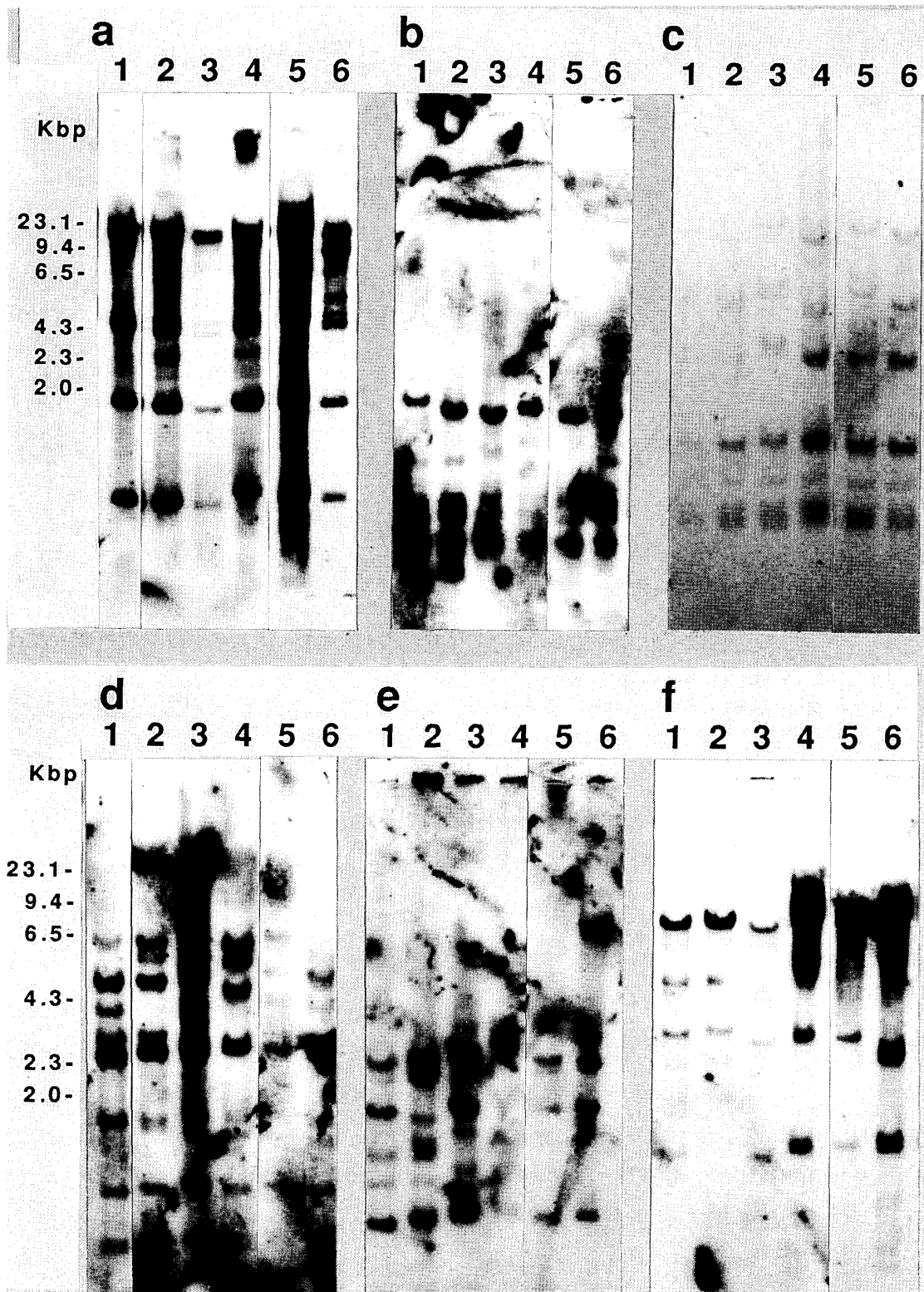


図2 シバスゲ節4種のサザンハイブリダイゼーションの結果

a: 全 DNA を *Xho*I で消化後, P4, P5, P7, P9, P10, B7 をプローブとした。b: 全 DNA を *Bbl*II で消化後, P4, P7, P9, P10 をプローブとした。c: 全 DNA を *Hind*III で消化後, P10 をプローブとした。d: 全 DNA を *Hind*III で消化後, P1 をプローブとした。e: 全 DNA を *Bbl*II で消化後, P1 をプローブとした。f: 全 DNA を *Bam*HI で消化後, P1 をプローブとした。

1. *Carex duvaliana* 2. *Carex conica* (2n=32) 3. *Carex conica* (2n=34) 4. *Carex conica* (2n=36)
5. *Carex foliosissima* 6. *Carex morrowii*

使用した4種類の制限酵素 (*Xho* I, *Bgl* II, *Hind* III, *Bam* H I) で複数の断片を検出することができた。全 DNA を *Xho* I により消化後, IR 部位を含むプローブ DNA (P4, P7, P9, P10, P5, B7) をハイブリダイズし X-ray film で検出した結果, 複数の異なる断片が得られた (図 2-a)。全てにおよそ分子量 1.9 Kbp, 4.3 Kbp, 20 Kbp の共通断片が認められた。ヒメカンスゲの種内異数体 $2n=32$, $2n=34$ で認められる 9 個の断片全てが共通であるが, $2n=36$ はおよそ 1 Kbp の断片が消失し, $2n=32$, $2n=34$ と異なる分子量の大きい断片が認められた。IR 部位を含む塩基配列の *Xho* I 認識部位に塩基置換が起きていると考えられる。一般に近縁種における IR 部位の配列は保存的であることが報告されているが, ヒメカンスゲの種内異数体には多型が認められた。全 DNA を *Bgl* II により消化後イネの葉緑体 DNA の IR 部位を含むプローブ DNA (P4, P7, P9, B7) をハイブリダイズしたところ, ヒメカンスゲ $2n=34$, $2n=36$, オクノカンスゲ, カンスゲに 5 個の共通の断片が認められた (図 2-b)。また, 全 DNA を *Hind* III により消化後, プローブ DNA (P10) をハイブリダイズした結果, 他の 5 種に認められるおよそ 3 Kbp の断片がヒメカンスゲ $2n=34$ では消失し, 分子量の大きい断片が認められた (図 2-c)。全 DNA をそれぞれ *Hind* III, *Bgl* II, *Bam* H I により消化後, プローブ DNA (P1) をハイブリダイズした結果, ヒメカンスゲの種内異数体に断片パターンの違いが認められ, ヒメカンスゲ $2n=32$ とケスゲに共通の断片パターンが認められた。特に *Hind* III 消化後のハイブリダイズした結果は, ヒメカンスゲ $2n=32$ とケスゲに 2 Kbp よりも小さい分子量を示す断片パターンが共通しており他の 4 種と異なっていた。また, *Bgl* II 消化後にハイブリダイズした結果では, オクノカンスゲとカンスゲに共通の断片パターンが認められた (図 2-d, e, f)。

ヒメカンスゲは秋山, 小山らによる形態からの分類体系では, オクノカンスゲに近縁とされているが今回の断片パターンの比較から, ヒメカンスゲはケスゲに近縁である傾向を示した。しかし, 本研究では分析した種類が少なく, シバスゲ節の類縁関係を推定することは困難であった。また, ヒメカンスゲの種内異数体間で認められた断片パターンの違いは, 他の 3 種オクノカンスゲ, カンスゲ, ケスゲの違いと同レベルと考えられた。このことからスゲ属植物は, 種内レベルですでに葉緑体 DNA の分化が生じていると推定される。

謝 辞

本研究の遂行にあたりご助言をいただいた, 横浜市立大学木原生物学研究所の荻原保成氏, 片山寛則氏, 東京大学附属植物園の長谷部光泰氏, 国立科学博物館の遊川知久氏および, 貴重な実験試薬の提供をして下さったニッポンジーンの荘司和明氏に感謝する。

参考文献

- 1) K. Shinozaki, *et al.*: EMBO. J. 5, 2043-2049 (1986).

- 2) J. Hiratsuka, *et al.* : Mol. Gen. Genet. **217**, 185—194 (1989).
- 3) K. Ohyama *et al.* : Nature **322**, 572—574 (1986).
- 4) K. Sinozaki and M. Sugiura : Adv. Bioshys. **21**, 57—58 (1986).
- 5) Y. Ogihara and K. Tsunewaki : Jpn. J. Genet. **57**, 371—396 (1982).
- 6) T. Kaneko, T. Terauch and K. Tsunewaki : Jpn. J. Genet. **61**, 157—168 (1986).
- 7) C. Uematsu, T. Sasakuma and Y. Ogihara : Jpn. J. Genet, **66**, 59—69 (1991).
- 8) 吉川純幹 : 日本スゲ属植物図譜, 北陸の植物の会 (1957).
- 9) T. Koyama : J. Fac. Sci. Univ. Tokyo (1962).
- 10) T. Hoshino and K. Okamura : J. Plant Res. **107**, 1—8 (1994).
- 11) T. Hoshino and M. J. Waterway : J. Plant Res. **107**, 131—138 (1994).

Phylogenetic studies of *Carex* section *Praecoces* (Cyperaceae) by restriction fragment analysis of chloroplast DNA

Yumi MIYAMURA*, Tohru OKIGAKI* and Takuji HOSHINO**

*Shigei Medical Research Institute,
Division of Molecular and Cell Biology,
Yamada 2117, Okayama 701-02, Japan

**Biological Laboratory,
Department of Applied Science,
Faculty of Science,
Okayama University of Science,
Ridai-cho 1-1, Okayama 700, Japan

(Received September 30, 1995)

The species *Carex* are difficult to distinguish because the morphological features are very similar. In order to clarify the phylogenetic relationships among the species of this genus, restriction fragment analysis of cpDNA was applied to four species of section *Praecoces*. Total DNA was isolated from fresh leaves by the CTAB procedure and digested with four restriction enzymes. The probes for Southern hybridization were prepared from the clone bank of *Oryza sativa* cpDNA. Different restriction sites were recognized among four species and intraspecific aneuploids of *Carex conica*. This result shows the restriction fragment analysis of cpDNA is an effectual method of phylogenetic analysis in the genus *Carex*.