

## 日本産樹木DNAバーコーディングの現状(2008)

吉村研介・大谷雅人（森林総研）・田中孝尚・鈴木三男（東北大）・神保宇嗣・伊藤元己（東大）・永居寿子・館田英典（九大）・津村義彦・藤井智之・能城修一・河原孝行・吉丸博志（森林総研）

**要旨：**DNA バーコーディングとは、特定の遺伝子領域の短い塩基配列(DNA バーコード)で生物種の同定を行う方法で、2003 年に動物分野でミトコンドリア DNA の遺伝子領域 COI を対象とすることが提唱された。植物では、葉緑体の rbcL 部分配列、trnH-psbA 遺伝子間領域などを使用することが 2005 年に提唱されているが、それだけでは情報量が不足する。日本産樹木を対象とする DNA バーコードの開発を 2008 年に開始した。rbcL は比較的保存性が高い、trnH-psbA 遺伝子間領域は、変異性は高いが非常に短い(200bp 弱)種が有る、そのため、この 2 領域のみでは同定できない種が有ることが解った。しかしながら樹木のいかなる部位（葉、材、根、花粉、標本など）からでも種同定が出来るようになると非常に有効な解析手段となることが期待される。2009 年に入り、rbcL と matK 部分配列を使おうという動きが出ている。将来的に「証拠標本」「DNA バーコード」の 2 つのデータベースの構築を進め、同定支援システムと併せて、公開する予定である。

**キーワード：**DNA バーコーディング、日本産樹木、葉緑体 DNA、rbcL、trnH-psbA 遺伝子間領域

### I はじめに

DNA バーコーディングとは、特定の遺伝子領域の短い塩基配列(DNA バーコード)で生物種の同定を行う方法である。2003 年に動物において、ミトコンドリア DNA のチトクローム c オキシダーゼサブユニット I 遺伝子(COI)の部分配列(648bp)を使うことが、Hebert らによって提唱された(2)。形態が似ていて同一種と同定されていた種が、遺伝学的には別種(隠れ種)であることが判明したり、種同定の特徴となる形態が、発現していない時期の個体、種同定不能な部分からでも、種同定が可能になる等の利点がある。全ての生物種のバーコーディングを行うことを目的に、2004 年に Consortium for the Barcode of Life (CBOL)が結成され各種のプロジェクトが世界的に進められている。

植物においては、2005 年に Kress らが、ミトコンドリア DNA の COI 領域は保存性が高く変異が少ないとから、葉緑体の rbcL の部分配列(約 700bp)、trnH-psbA 遺伝子間領域を使うことを提唱した(4)。

Hollingsworth(2008) によると 2007 年第 2 回国際 Barcode of Life (BOL)会議で、それだけでは情報量が不足でさらに複数の領域を使う必要があることが、複数報告されて、さらなる探索が進められている(3)。CBOL Plant Working Group1 (2009) は、植物では、rbcL 部分配列と matK 部分配列を、第一のターゲットとして使うことを提唱し、2009 年 11 月第 3 回国際 Barcode of Life (BOL) 会議で、合意されるものと予想されている(1)。一方、日本においては、組織だった DNA バーコーディングは行われておらず個々の研究グループが小規模に研究を行っている現状である。そのため、日本産樹木を対象に DNA バーコーディングを進めることとした。植物では、分類は生殖器官の形態を主として分類されていることが多い、葉の形態のみ、もしくは材の形質のみでは属レベルの同定しか行えないことも多く、樹木のいかなる部位（葉、材、根、花粉、標本塩基配列のみの解析しか行わないなど）からでも、種同定が出来れば非常に有効に活用できる。しかしながら DNA バーコーディン

---

Kensuke YOSHIMURA, Masato OHTANI(Forestry and Forest Products Research Institute, Ibaraki 305-8687), Takahisa TANAKA, Mitsuo SUZUKI(Tohoku University, Sendai 980-0862), Utsugi JINBO, Motomi ITO(University of Tokyo, Meguro-ku 153-8902), Hisako NAGAI, Hidenori TACHIDA(Kyushu University, Fukuoka 810-8560)・Yoshihiko TSUMURA, Tomoyuki FUJII, Shuichi NOSHIRO, Takayuki KAWAHARA, Hiroshi YOSHIMARU(Forestry and Forest Products Research Institute, Ibaraki 305-8687), DNA barcoding on Japanese woody plants(2008).

グでは、短い塩基配列のみの解析しか行わないため、全ての生物種の同定は不可能ではないかという主張もなされている。また植物の葉緑体DNAは、基本的に被子植物では母親、裸子植物では父親からしか遺伝せず、雑種や、浸透交雑が進んでいる種分類群では、葉緑体DNAバーコーディングによる種同定の手法は適当でないケースも考えられる。本研究では、DNAバーコーディングのシステム構築を開始するとともに、DNAバーコーディングの限界を明らかにすることを目的としている。

## II 材料と方法

過去に収集した物を含め国内樹種の試料を20か所で行っている(表-1)。これまでのところ3160個体強、748種・亜種・変種の資料を収集し、さく葉標本として保存し、DNA抽出を行っている。過去に収集された標本からDNA抽出を行っている最中で、全てのDNA抽出はまだ終わっていない。保存状況の良くない標本も含まれており、収集した資料すべてがDNA解析に使えるわけではない。DNA試料は、2007年の情報に基づきバーコードDNA領域の塩基配列をrbcL部分配列、trnH-psbA遺伝子間領域、解析を進めているが、先行研究に示されたプライマーの設計が悪く增幅しない種が多くみられた。そのため、ユニバーサルなプライマーを設計しながら解析を行っている。これらのデータは、「証拠標本」「DNAバーコード」の2つのデータベースの構築を進め、同定支援システムと併せて、公開する予定になっている。

## III 結果と考察

rbcL部分配列は、1579個体(494種)、trnH-psbA遺伝子間領域は、1002個体(385種)のシーケンスを明らかにした。

rbcL部分配列では、494種のうち、224種(45%弱)が、近縁種と同一シーケンスのものが含まれ同定不能であった。これは、rbcLは比較的保存性が高いことと対象とした塩基配列が632bpと短いことのためである。例としてモチノキ属のrbcL部分配列で書いた系統樹を示す(図-1)。リュウキュウモチ(*Ilex liukiuensis*)、オオシイバモチ(*Ilex warburgii*)、ヒメモチ(*Ilex leucoclada*)、タラヨウ(*Ilex latifolia*)、モチノキ(*Ilex integra*)、シイモチ(*Ilex buergeri*)の6種は、同一シーケンスを示した。他の種は、種ごとにまとまったクラスターを作った。rbcL部分配列のみでは属レベルの同定には使用できるが、種同定は不能な場合が多い。

trnH-psbA遺伝子間領域は、変異性は高いが、polyAやpolyTのSSRが含まれ、塩基配列の挿入・欠出が多く、長さが非常に短いもの(145bp)から、長いものは

700bp強と1回のシークエンス操作では読み取れない長さのものまで多岐にわたっている。385種のうち63種(16%)が、近縁種と同一シーケンスのものが含まれていた。また、変異性が高く、種内多型も数多く見受けられた。種内多型が多く含まれることは、DNAバーコーディングによる種同定にとって、誤同定の可能性が多くなる。一方、種内多型の情報を、地域情報とともにデータベース化しておけば、種同定の精度を高くすることができます。例としてモチノキ属のtrnH-psbA遺伝子間領域の系統樹を示す(図-2)。モチノキ属内でも塩基配列の挿入・欠損が多く359-424bpと長さが不統一で、種内多型がみられたが、リュウキュウモチ(*Ilex liukiuensis*)、モチノキ(*Ilex integra*)、シイモチ(*Ilex buergeri*)、オオシイバモチ(*Ilex warburgii*)の4種では、同一シーケンスのものが含まれていた。種内2つの領域を併せて解析した場合、383種のうち51種(14%)が同定不能であった。

2つの領域では、同定できない種があるので、さらなる領域の探索が必要であることが裏付けられた。今後、CBOL Plant Working Group1が提唱しているmatK領域を含めDNAバーコーディングを進めていくが、matK領域は変異性が高く、ユニバーサルなプライマーの設計が不可能であり、分類群ごとにプライマーを設計して解析を行う必要がある。

同定不能な種群のなかで、タニウツギ属(*Weigela*)のニシキウツギ(*Weigela deconia*)が、タニウツギ(*Weigela hortens*)タイプのものと、ツクシヤブウツギ(*Weigela japonica*)タイプのものがrbcLで見出された(図-3)。trnH-psbA遺伝子間領域では、ツクシヤブウツギタイプ個体は、ツクシヤブウツギと違う配列を示した。タニウツギタイプ個体は、trnH-psbAでもタニウツギと同じ配列を示した。調査した個体数が少ないので、確定的ではないが、タニウツギ属は、浸透交雫の可能性が示唆されており(5)、浸透交雫を起こしていたり、種分化の比較的新しい分類群などはDNAバーコーディングでの種同定が適当でない可能性がある。

## IV おわりに

証拠標本とDNA資料がセットとして保存され、データベース化されることにより、同定等に疑問が生じたときに、いつでも遡って検証しながらおさくことができる。DNA抽出が出来さえすれば、比較的簡単に種同定が可能になるため、種同定の一手法として有力な方法になることが期待される。

## 引用文献

- (1) CBOL PLANT WORKING GROUP1 (JANZEN, D.H.他) (2009) A DNA barcode for land plants. PNAS.106(31):12794-12797
- (2) HEBERT,P.D., CYWINSKA,A.,BALL,S.L., and DEWAARD,J.R.(2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 270(1512):313-321.
- (3) HOLLINGSWORTH,P.M.(2008) DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: Progress and outstanding questions. Heredity 101, 1-2
- (4) KRESS,W.J., ERICKSON,D.L.(2007) A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. PLoS ONE. 2007; 2(6): e508
- (5) 高橋睦美・石沢智子・横山摶(2008) ウツギの浸透性交雑がキバナウツギに与える影響：日本植物学会東北支部第21回福島大会講演要旨 p10

表-1. 採集地

年度	Coll.Name	場所
2000	2000 岡山	岡山県高梁市・川上郡・新見市・阿哲郡・御津郡
2001	2001 三重	三重県北牟婁郡・多気郡
2001	2001 国頭	沖縄県国頭郡・名護市
2002	2002 奄美	鹿児島県名瀬市・大島郡
2002	2002 対馬	長崎県下県郡・上県郡
2002	2002 東北	青森県青森市・岩手県宮古市・下閉伊郡・九戸郡
2003	2003 吾妻	群馬県吾妻郡
2004	2004 内之浦	鹿児島県肝属郡内之浦町
2004	2004 宮崎北部	宮崎県西臼杵郡・兒湯郡
2004	2004 富山	富山県上新川郡・中新川郡
2005	2005 島根	島根県飯石郡・江津市・邑智郡
2005	2005 岐阜	岐阜県郡上市
2006	2006 北薩	鹿児島県大口市・出水市・薩摩川内市・伊佐郡
2006	2006 芦生	京都府南丹市美山町
2007	2007 徳之島	鹿児島県大島郡天城町
2007	2007 四万十	高知県四万十市・高岡郡・土佐清水市・宿毛市
2007	2007 岐阜三重	岐阜県大垣市・三重県北牟婁郡
2008	2008 佐賀	佐賀県西松浦郡・唐津市・三養基郡・鳥栖市・神埼市
2008	2008 木曾	長野県木曾郡
2008	2008 滋賀	滋賀県高島市

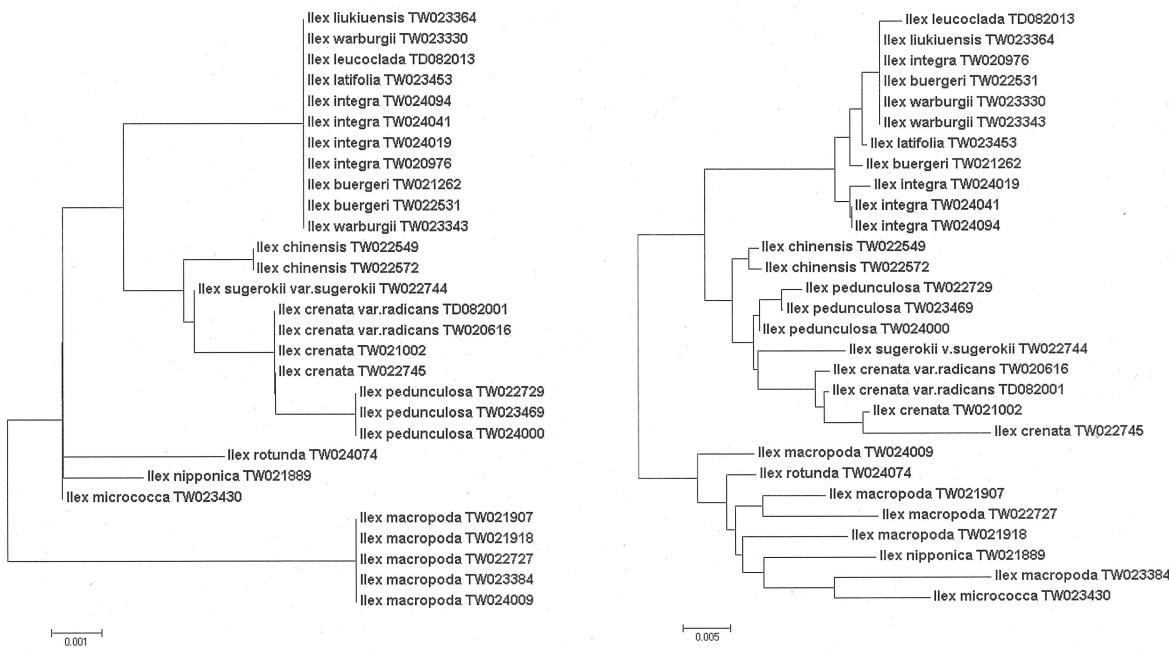


図-1. モチノキ属 (*Ilex*) の rbcL 部分塩基配列(632bp)の系統樹

図-1. 図-2 共通 種名の右側の記号は、資料番号  
シイモチ (*Ilex buergeri*), ナナミノキ (*Ilex chinensis*), ハイイ  
ヌツゲ (*Ilex crenata* var.*radicans*), イヌツゲ(*Ilex crenata*), モチ  
ノキ (*Ilex integra*), タラヨウ (*Ilex latifolia*), ヒメモチ (*Ilex*  
*leucoclada*) リュウキュウモチ(*Ilex liukiuensis*), オオシイバモチ

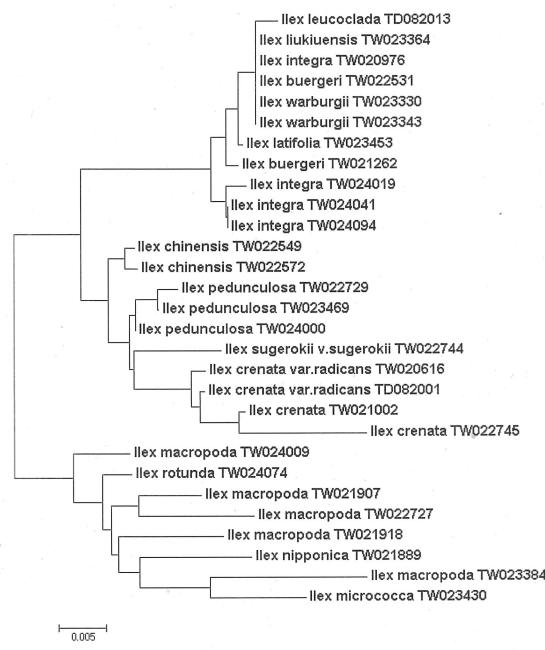


図-2. モチノキ属 (*Ilex*) の trnH-psbA 遺伝子領域間の系統樹

(*Ilex warburgii*), アオハダ (*Ilex macropoda*), タマミズキ (*Ilex micrococca*), ミヤマウメモドキ (*Ilex nipponica*) ソヨゴ (*Ilex pedunculosa*) アカミノイヌツゲ (*Ilex sugerokii*), オオシイバモチ (*Ilex warburgii*)

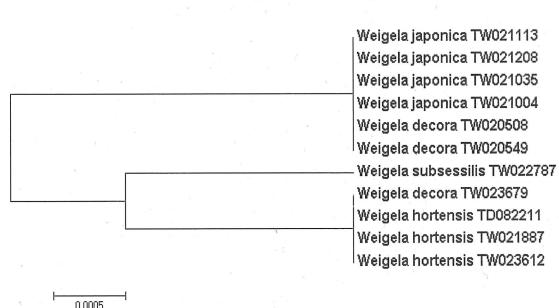


図-3. タニウツギ属(*Weigela*)の rbcL 部分塩基配列(632bp)の系統樹

図-3. 図-4.共通 種名の右側の記号は、資料番号  
ニシキウツギ(*Weigela decora*),タニウツギ(*Weigela hortensis*),ツク

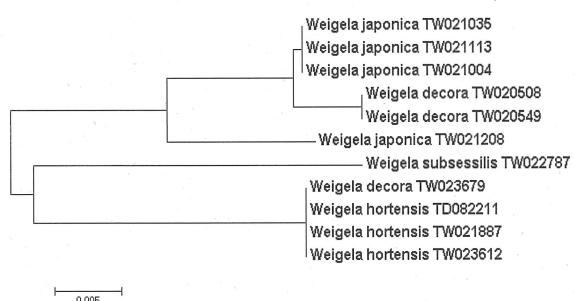


図-4. タニウツギ属(*Weigela*)の trnH-psbA 遺伝子領域間の系統樹

シャブウツギ(*Weigela japonica*), コウライウツギ(*Weigela subsessilis*)