

生物多様性とデオキシリボ核酸 (DNA)

朝倉 史明*

Biodiversity and Deoxyribonucleic acid (DNA)

Nobuaki ASAKURA*

1. 緒言

地球上には、きわめて多種多様な生物が様々な生態系を形成し、存在している。生態系を保全し、これを利用した人間の生活を保持するためには、生態系における多様な生物種を保全することが重要である。生物間にみられる多様さを生物多様性とよんでいる。生物多様性には、種の多様性の他にも、生態系の多様性と、各生物個体のもつ遺伝子レベルでの多様性という、異なる3つのとらえ方がある。生物多様性については高校生物の教科書にも記載されている^(1,2,3)。1992年にリオ・デ・ジャネイロにおいて環境と開発に関する国際連合会議が開催された。特にこれ以降、世界的に生物多様性の重要性が強く認識されるようになった。近年、生物の多様性の低下が危惧されており、生物種や生態系を保全しようとする取り組みが行われている。

遺伝的多様性の根本には DNA レベルでの多様性が存在する。しかしながら、この DNA レベルでの生物多様性は日常的には目視できるものではなく、多くの人にとって身近ではなく、イメージが湧きにくいものである。そこで DNA レベルでの遺伝的多様性を体感し、生物多様性についての理解を深めるための実験プログラムの開発を始めた。本報では、その教育を目的とした実験プログラムに関する内容の概要を紹介する。また、日本ではあまり馴染みのない果樹であるが、シーベリーというグミ科植物の品種群に見られる遺伝的多様性の研究の一端についても紹介する。

2. DNA レベルでの遺伝的多様性を体感する実験プログラム

生物多様性の理解が重要になっている今、専門とする人以外の一般の方にあまり知られていない DNA レベルでの生物多様性の概念を体感的に理解していただくために、特に各家庭の台所にある身近な野菜や果物などの植物や花瓶に生けるような身近にある観賞用植物を材料とした実験プログラムを開発している。

(1) キッチン PCR の開発

野菜と果物の全15種類(表1)を材料とし、トリス緩衝液中で破碎した各々の材料からの粗抽出物をポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) に用い、反応条件を検討した。PCR によって増幅する標的領域として、DNA 領域の長さの多様性が検出しやすいことから、染色体 DNA の *psbA-trnH* 遺伝子間領域を選

表1. キッチン PCR に用いた野菜と果物

| No. | 実験植物 | 切り出し部位 | 皮の有無 |
|-----|--------|--------|------|
| 1 | キャベツ | 葉 | × |
| 2 | ダイコン | 葉 | × |
| 3 | ナス | 果実 | なし |
| 4 | ジャガイモ | 茎 | なし |
| 5 | トマト | 果実 | なし |
| 6 | ピーマン | 果実 | なし |
| 7 | キュウリ | 果実 | あり |
| 8 | ハウレンソウ | 葉 | なし |
| 9 | ニンジン | 根 | なし |
| 10 | レタス | 葉 | × |
| 11 | ダイズ | 葉 | なし |
| 12 | ネギ | 葉 | なし |
| 13 | タマネギ | 茎 | なし |
| 14 | ニンニク | 球根 | なし |
| 15 | パイナップル | 果実 | なし |

んだ。実験の結果、各植物間において *psbA-trnH* 遺伝子間領域の長さの多様性を観察することが出来るようになった(図1)。台所にある身近な食材を植物材料として用いることから、この実験プログラムをキッチン PCR とよぶこととした。

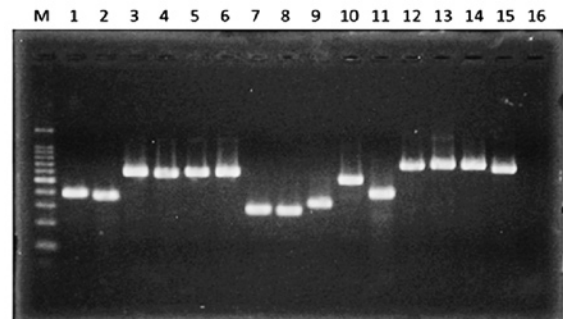


図1. キッチン PCR が示す *psbA-trnH* 遺伝子間領域の多様性16はネガティブコントロール

(2) ガーデン PCR の開発

キッチン PCR の開発ののちに、さらに違った植物を材料として用いることができるか検討した。やはり身近な植物が良いと考え、

*教授 生物学教室
Professor, Lab. of Biology

花屋で容易に入手できる15種類の観賞用植物（表2）を材料とすることとした。花卉を材料とするが、同種でも色の違う場合は異なる種類と数えている（表2、図2）。

表2. ガーデン PCR に用いた観賞用植物

| No. | 実験植物 | 花卉の色 |
|-----|---------|-----------|
| 1 | カーネーション | 赤 |
| 2 | カーネーション | ピンク |
| 3 | カーネーション | 緑 |
| 4 | ガーベラ | ピンク |
| 5 | ガーベラ | 黄 or オレンジ |
| 6 | スプレーギク | ピンク |
| 7 | スプレーギク | 黄 |
| 8 | バラ | 赤 |
| 9 | バラ | ピンク |
| 10 | バラ | 黄 or オレンジ |
| 11 | トルコギキョウ | 白 |
| 12 | トルコギキョウ | ピンク |
| 13 | ユリ | 白 |
| 14 | ユリ | ピンク |
| 15 | ドラセナ | -* |

* ドラセナのみ、葉を使用した。



図2. ガーデン PCR に用いた観賞用植物

1から15は表2の通り 16は抽出に用いた1.5mL チューブとペッスル

キッチン PCR の時と同じく色素体 DNA の *psbA-trnH* 遺伝子間領域を標的とした PCR を行った。実験の結果、各植物間において *psbA-trnH* 遺伝子間領域の長さの多様性を観察することが可能であることがわかった（図3）。身近な観賞用植物を材料として用いることから、この実験プログラムをガーデン PCR とよぶこととした。

(3) 今後の展望

キッチン PCR, ガーデン PCR とともに、研究室の学生のように日常的に実験を行っている者にはほぼ失敗のない実験プログラムまでは完成させることが出来た。今後は、高校生などの一般の方が実験を行っても失敗することのない実験プログラムへと成熟させていくことを目標に、失敗しやすい実験条件を検証していきたい。例えば、

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

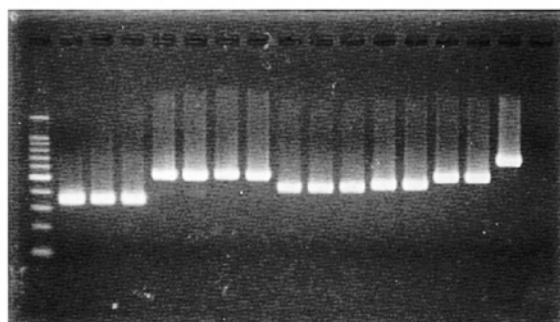


図3. ガーデン PCR が示す *psbA-trnH* 遺伝子間領域の多様性16はネガティブコントロール

材料とする植物の磨り潰し方、磨り潰して得た粗抽出物の保存方法、PCR の温度条件などを検討する予定である。さらに、安価な実験であった方がより一般的な実験プログラムになると考えられるため、本実験で使用する試薬の中で最も高価である DNA ポリメラーゼの量をどこまで減らすことが出来るか検討する予定である。そして、より充実した実験プログラムにするために、使用可能な植物材料を調査していきたい。

3. シーベリー品種群における遺伝的多様性の解析

グミ科植物のシーベリー *Hippophae rhamnoides* L. はユーラシア大陸に分布する雌雄異種の落葉底木果樹である。最近の分類では、*Hippophae* 属植物は7種に分けられており、そのうち *H. rhamnoides* (シーベリー) はさらに8亜種に分類されている⁽⁴⁾。シーベリーは防風や土壌保全の目的で利用される一方、果実にはビタミン、ミネラル、不飽和脂肪酸などの豊富な栄養素を含んでおり、健康食品としても利用されている。シーベリーは二倍体 ($2n=24$) の雌雄異株植物であり、風媒により種子を着ける。X/Y 性染色体が関与する機構によって性別が決定すると考えられているが、その詳細は明らかになっていない。

今後、様々な特性をもった新しい品種を育成していく上で、現在ある品種群の遺伝的多様性を明らかにすることは重要な意味を持つ。そこで RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分析および色素体 DNA の塩基配列分析によるシーベリー品種群の遺伝的多様性解析に着手している。

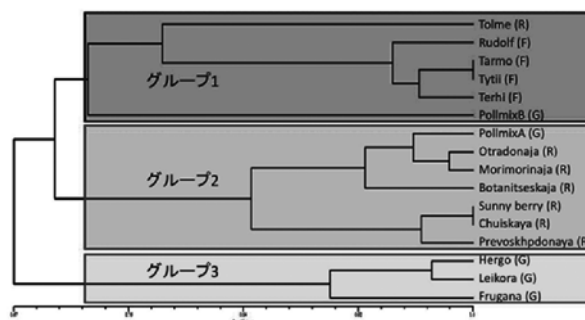


図4. RAPD 分析からみたシーベリー品種群の遺伝的多様性

(F) : フィンランド系品種, (R) : ロシア系品種, (G) : ドイツ系品種



図5. シーベリー品種群内における *psbA-trnH* 遺伝子間領域の塩基配列多型

*は全品種で一致していることを示す。

(1) RAPD 分析

RAPD 分析は任意の10塩基からなる単一のプライマーを用いた PCR により、比較したい系統や品種間の DNA レベルの差異を検出する分析手法である⁽⁵⁾。PCR の条件はシーベリーに前例に従った⁽⁶⁾。得られた DNA 断片の有無を品種間で比較して得られた結果をクラスター解析したところ15品種は三つのグループに大別された(図4)。

三つのグループの各々はだまかには同じ国で育成された品種から構成されていたが、それに合わない品種もあった。グループ1には主にはフィンランドの品種が含まれ、グループ2には主にはロシアの品種が含まれ、グループ3にはドイツの品種のみが含まれていた。

(2) 色素体 DNA の塩基配列分析

psbA-trnH 遺伝子間領域の塩基配列の解読を行って品種間で比較したところ、三つのタイプが存在するとの結果を得ることが出来た(図5)。タイプ A と分類された品種にはフィンランドで育成された品種とロシアで育成された品種とドイツで育成された品種が含まれていた。タイプ B と分類された品種にはドイツで育成された品種とロシアで育成された品種が含まれていた。タイプ C にはドイツの品種のみがあった。

(3) 今後の展望

RAPD 分析によるシーベリー品種群の分類と *psbA-trnH* 遺伝子間領域の塩基配列の解析による分類はともに三つに分けることが出来たという点では一致しているが、各グループに含まれる品種は異なっている。RAPD 分析では全 DNA を対象にして遺伝的多様性を解析しているが、その内容は主には核 DNA である。この点を考慮すると、核 DNA における分類と色素体 DNA の分類に不一致があるということを意味しているとも考えられる。今後は核 DNA と色素体 DNA、あるいはミトコンドリア DNA の解析をさらに行い、シーベリー品種群の遺伝的多様性、遺伝的分化の様相を明らかにし、今後のシーベリー育種のための基礎的知見を得ることに努める。

4. おわりに

ここで述べてきましたほとんどの内容は総合工学プログラムから卒業研究を行うために配属してくれました学生による成果です。まだまだ未完成ですが、将来大きく実を結ぶことを思い描き、今も研究室では学生と研究を続けています。指導が下手で、人間的にも至らない私は何度も学生を傷つけたことと思います。謝りたいと思

うと同時に、社会に出てからの大きな成長のためにも、恩師が私に与えてくださいました無形の財産を神奈川大学の学生にも引き継ぐことが出来ればと願う次第です。

謝辞

シーベリー品集群の遺伝的多様性の解析において、共同研究者として研究に関わる重要なご指導を頂くと共に、材料とした各品種をご提供くださいました東京農業大学農学部河合義隆教授に厚く御礼申し上げます。ガーデン PCR の開発において、毎週、材料とした観賞用植物を調達してくださいました横浜花日和さんに心より御礼申し上げます。研究室の整備に日頃から苦心頂いています神奈川大学工学部生物学教室の中川理絵准教授に深く御礼申し上げます。研究遂行に尽力してくれた学生であります、横田勇斗君、金古聡史君、浅野優人君、長谷川聖君の幸せを祈るとともに感謝申し上げます。

参考文献

- (1) 本川達雄, 渡辺守, 谷本英一, 飯島和重, 赤坂甲治, 池田博明, 石浦章一, 稲葉浩介, 片山豪, 木村進, 舘野正樹, 高橋和成, 西田治文, 平田泰紀, 増沢武弘, 牧野修司, 渡辺政隆, 生物, 啓林館 448-456. (2012)
- (2) 吉里勝利, 阿形清和, 筒井和義, 倉谷滋, 三村徹朗, 飯山浩二, 中井咲織, 木之上馨, 中島光博, 櫻井昭, 原紺勇一, 下村肇, 平岡さゆり, 白石直樹, 藤本英行, 関敏彦, 古本大, 生物, 第一学習社 344-350. (2014)
- (3) 嶋田正和, 久保田洋, 坂井建雄, 塩川光一郎, 鈴木孝仁, 鈴木誠, 園池公毅, 田村実, 仲田崇志, 湯本貴和, 板山裕, 大森茂樹, 久保田一暁, 中井一郎, 中道貞子, 中村厚彦, 中村哲也, 鍋田修身, 早崎博之, 林誉樹, 矢島正博, 生物数研出版 318-327. (2014)
- (4) U. Swenson and I. V. Bartish Taxonomic synopsis of *Hippophae* (Elaeagnaceae) Nord. J. Bot., 22: 369-374. (2002)
- (5) J. G. K. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535. (1990)
- (6) H. A. Persson and H. Nybom Genetic Sex Determination and RAPD Marker Segregation in the Dioecious Species Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) 129, 45-51. (1998)