 ノート

[木材学会誌 Vol. 53, No. 3, p. 157-162 (2007)]

RAPD マーカーを利用したコナラ亜属コナラ節樹木の 識別に関する研究*¹

李 承珉*², 玉木恵理*², 加藤定信*², 古野 毅*²

Identification of *Quercus* Section *Prinus* Species using RAPD Markers*¹

Seungmin LEE*², Eri TAMAKI*²,
Sadanobu KATO*² and Takeshi FURUNO*²

Species-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers of *Quercus serrata* Thunb. (konara), *Quercus crispula* Blume (mizunara) and *Quercus alba* Linn. (white oak) were investigated to identify the species of Section *Prinus* in the subgenus *Quercus* by using molecular genetic information. Polymerase Chain Reaction was performed with a set of 10 mer or 12 mer primers and total DNA as template. A total of 144 (72 sets) primers were used in the RAPD analysis. We found that six RAPD markers were species-specific: one distinguishes konara from mizunara and white oak; four distinguish mizunara from konara and white oak; and one distinguishes white oak from konara and mizunara. All of the six RAPD markers were highly reproducible and resulted from distinct amplicons.

Keywords: *Quercus serrata*, *Quercus crispula*, *Quercus alba*, RAPD.

コナラ節のコナラ (*Quercus serrata* Thunb.), ミズナラ (*Quercus crispula* Blume), ホワイトオーク (*Quercus alba* Linn.) に対し RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法を利用して各樹種の特異的なマーカーを検出することを試みた。10 mer および 12 mer のプライマーセットを用いて DNA 断片の増幅を行った結果、コナラをミズナラ、ホワイトオークと識別するために有効なプライマー 1 セット、ミズナラをコナラ、ホワイトオークと識別するために有効なプライマー 4 セット、およびホワイトオークをコナラ、ミズナラと識別するために有効なプライマー 1 セットを得た。得られたプライマーセットはいずれも再現性が高く、かつ明瞭な増幅産物を産生した。

1. 緒 言

従来まで樹種識別は葉、樹皮、実の特徴やその組織的な特徴を目視及び顕微鏡を通して行ってきたが、特にコナラ亜属はその亜属間で雑種が生じやすいことから顕微鏡レベルでの識別も困難で、節の分類が研究者によって異なる¹⁾。このように、同一節

内の樹種で外観および組織的特徴が類似している点が多いと簡単に識別することが困難であるため、最近では random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法²⁾ を利用して、DNA の塩基配列的特徴を基に樹種識別を行う研究が盛んに行われている^{3,4)}。

木本植物の遺伝変異の解析には、アイソザイムや restricted fragment length polymorphisms (RFLP) 分析などが用いられてきた⁵⁾。近年では遺伝情報の本体であるゲノム DNA を鋳型にし、そこから直接変異を検出することができる分子マーカーが用いられるようになってきた⁶⁾。特に、任意の塩基配列を持つプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) 増幅を行う RAPD マーカーは、アイソザイ

*¹ Received April 19, 2006; accepted January 10, 2007. 本研究の一部は、第53回日本木材学会大会(2003年3月, 福岡)において発表した。

*² 島根大学総合理工学部 Faculty of Science and Engineering, Shimane University, Matsue 690-8504

ムや RFLP と比較して非常に簡便かつ低コストで分析が可能でありながら⁷⁾, 多量の DNA 情報を迅速かつ容易に得ることが可能である。また, ランダムプライマーの塩基配列を変化させることにより, マーカーとなる DNA 断片長も容易に増加させることが可能である。しかも RAPD マーカーは, 同一樹種内の個体間変異を容易に検出できるため, 多くの栽培植物において品種識別に用いられている⁸⁻¹⁰⁾。本方法を利用すると, より信頼性の高い植物系統の確立は勿論, 種レベル, 変種レベルでの識別, 遺跡から出土した木製出土品の樹種識別, ひいては古代の木材利用法と環境調査, 適切な出土木の保存方法の研究にも応用できると思われる。今までコナラとミズナラに関する RAPD 分析の研究論文を Lee ら¹¹⁾が発表しているが, 樹種特異的な増幅産物はまだ発見されていない。

本研究ではコナラ亜属コナラ節の中でもほぼ日本全国に分布しており, 薪炭や家具材, 建築材, 樽材, 器具材などに利用されている日本産のコナラ (*Quercus serrata* Thunb.) を中心に, 組織的に類似しており分布範囲も比較的広く, 国産の広葉樹材として一般的によく利用されているミズナラ (*Quercus crispula* Blume), また米国産のホワイトオーク (*Quercus alba* Linn.), イングリッシュオーク (*Quercus robur* Linn.) を選抜し, RAPD 法を利用して各樹種の樹種特異的なマーカーを検出し, 樹種識別の指標にすることを目的とした。また樹種の遺伝変異について多型増幅産物をもとに系統樹を作成し, その遺伝距離や分類形態を調査することで植物系統を確立させるための基礎資料とすることも目的とした。

2. 実験方法

2.1 供試材料

供試材料には, 日本産のコナラ, ミズナラ, 米国産のホワイトオーク, イングリッシュオークを用いた。コナラは島根県松江市島根大学付近の金崎古墳群, 島根県八束郡島根町の澄水山の 2 地域から各 4 個体 (S1~4 と S5~8), 合計 8 個体を供試した。ミズナラは鳥取県西伯郡大山町で 8 個体 (C1~8), ホワイトオークとイングリッシュオークはサントリー株式会社から各 8 個体 (A1~8 と R1~8) ずつ提供していただいたものを供試材料とした。

2.2 全 DNA の抽出・精製

上記の各供試個体から葉をそれぞれ 2~3 枚採取し, RAPD 分析に供試するまで -20℃ で冷凍保存した。全 DNA 抽出は, 採取した葉約 50 mg を乳鉢を

用いて液体窒素下で粉碎した後, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を単離, 精製したものを PCR の鋳型 DNA とした。

2.3 RAPD 分析

RAPD 分析は, Williams ら²⁾の方法に従った。精製した全 DNA を鋳型として RAPD 分析を行った。RAPD 分析には和光純薬工業株式会社と宝酒造株式会社のパライマーを用いた。PCR 反応液の組成は, 1×PCR Buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 200 μM 各 dNTP, 1 unit/μl Taq DNA polymerase (*TaKaRa Taq*TM, TaKaRa), 滅菌超純水, 各 1 μM のプライマー 2 種類, 100 ng/μl 鋳型 DNA である。

サーマルサイクラーは, Gradient 96 Robocycler PJ-480 (STRATAGENE) を使用し, まず 94℃ で 2 分間保持し変性処理を行った後, 変性 (94℃, 1 分)・アニーリング (35℃, 2 分)・伸長 (72℃, 2 分) を 1 サイクルとし 40 サイクル繰り返し, 最後に 72℃ で 3 分間保持し十分に伸長反応を行った。得られた PCR 増幅産物は 2.0% アガロースゲル (NuSieve 3:1 agarose, BMA) を用いて 50 V, 1 時間 45 分間電気泳動を行った。DNA サイズマーカーは 100 bp DNA Ladder (TaKaRa) を使用した。その後, エチジウムブロマイド (10 mg/ml), もしくは SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stains (BMA) で染色して 302 nm (SYBR Green I の場合は 254 nm) UV トランスイルミネーター上で DNA 多型を観察し, Kodak Digital Science DC40 camera でゲルを撮影し 1D Image Analysis (EASTMAN KODAK) を用いて解析を行った。

2.4 クラスター分析

クラスター分析には SPSS (SPSS 10.0J for Windows, SPSS Inc., 1999) ソフトウェアを利用した。分析方法は Ward 法 (設定は平方ユークリッド距離), 作図方法はデンドログラムという条件で行った。

3. 結果と考察

3.1 DNA の単離

採取したコナラ, ミズナラ, ホワイトオークとイングリッシュオークの葉から DNeasy Plant Mini Kit を利用して DNA を単離し, 1% アガロースゲルを用いて DNA の電気泳動を行い, 単離した各 DNA のサイズが 20 kbp 以上あることを確認した。

3.2 有用プライマーのスクリーニング

コナラ, ミズナラ, ホワイトオーク, イングリッシュオークの 4 樹種 (各 2 個体) を用いて, 識別に有効なマーカーのスクリーニングを行った。使用し

たプライマーは、10 mer のプライマー24種類と12 mer のプライマー120種類である。マーカーの増幅効率を高めるために1回のPCR反応に2種類のプライマーを用いた。1回目のPCR反応で明瞭かつ単型の増幅パターンを示すプライマーセットを選抜した。引き続き、それらのプライマーを用いて、4樹種の各4個体を対象にして二次スクリーニングを行った。二次スクリーニングの条件は、単型を示す明瞭な増幅産物の近くに誤認の原因となる増幅産物がなく、容易に増幅産物の有無が識別できることとした。

3.3 RAPD 解析

選抜したプライマーセットを用いて増幅産物の再現性を検討するために、全樹種に対して3回のPCR反応を行った。3回の反応で、一度でも増幅が不十分であったり、目的の増幅産物の近くにそれと混同しそうな増幅産物が認められた場合は、識別に不適当であるとして除外した。

RAPD マーカーについては、Penner ら¹²⁾ が提唱したように、その再現性に関する問題は今日に至るまで議論の対象となってきた。異なる複数回のPCR反応を行った際、増幅産物の出現パターンの再現性は、増幅産物の明瞭度やサイズによって異なることが報告されていることから¹³⁾、品種識別に用いる増幅産物は、複数回（できれば3回以上）の独立したPCR反応を行い、その再現性を充分に確認しておく必要がある¹⁴⁾。それ故、本研究でも増幅産物の再現性を確認するため同条件で3回のPCR反応を行い、明瞭かつ同一の断片長を持つ増幅産物が得られたプライマーセットのみを選択し比較した結果、コナラにおいて確実に識別できたものは、12 mer のプライマー A31・A32 (850 bp), A81・A82 (620 bp), B67・B68 (300 bp), B89・B90 (700 bp) の4セットであった (Fig. 1)。ミズナラでは10 mer のプライマー DT07・DT08 (1700 bp) と12 mer のプライマー A09・A10 (520 bp), A31・A32 (850 bp), A63・A64 (850 bp), B09・B10 (750 bp) の計5セットのプライマーを用いた際に再現性が認められた (Fig. 2)。ホワイトオークでは10 mer のプライマー DT01・DT02 (1400 bp) と12 mer のプライマー A81・A82 (2100 bp), B67・B68 (700 bp) の計3セットのプライマーから再現性のある増幅産物が認められた (Fig. 3)。しかしながら、イングリッシュオークでは10 mer のプライマー12セット (24種類) と12 mer のプライマー60セット (120種類) を用いても明瞭で再現性のある単型の増幅産物は認められなかった。

Fig. 1. Gel electrophoresis of *Quercus serrata* RAPD products amplified with B89 and B90 primers. Lane M : 100 bp molecular-weight ladder (TaKaRa), lanes 1-8 : individual numbers of *Quercus serrata*. The 700-bp bands of the RAPD marker are indicated by an arrow.

Fig. 2. Gel electrophoresis of *Quercus crispula* RAPD products amplified with A63 and A64 primers. Lane M : 100 bp molecular-weight ladder (TaKaRa), lanes 1-8 : individual numbers of *Quercus crispula*. The 850-bp bands of the RAPD marker are indicated by an arrow.

コナラの B89・B90 (700 bp), ミズナラの DT07・DT08 (1700 bp), A09・A10 (520 bp), A63・A64 (850 bp), B09・B10 (750 bp), ホワイトオークの DT01・DT02 (1400 bp) のプライマーセットでは、同一樹種の全ての個体から単型の増幅産物が得られ

Fig. 3. Gel electrophoresis of *Quercus alba* RAPD products amplified with DT01 and DT02 primers. Lane M: 100 bp molecular-weight ladder (TaKaRa), lanes 1-8: individual numbers of *Quercus alba*. The 1400-bp bands of the RAPD marker are indicated by an arrow.

た。

これらの結果から、コナラの B89・B90 (700 bp), ミズナラの DT07・DT08 (1700 bp), A09・A10 (520 bp), A63・A64 (850 bp), B09・B10 (750 bp), ホワイトオークの DT01・DT02 (1400 bp) は、樹種識別に有効なプライマーセットとして用いることが可能であると思われる (Table 1)。

RAPD 法は短いプライマーを使用する為にプライマーのアニーリングの温度を低く設定しているため、増幅される断片の再現性が低い場合がある。こ

のような際はこれらの増幅断片をクローニングして塩基配列を決定し、20塩基程度の長いプライマーのセットを作製することで、より高いアニーリング温度を設定した PCR により目的の断片が得られるようにする。このような操作を STS (sequence tagged sites) 化と呼んでいるが、STS 化を行えばマーカーの再現性は格段に高められる¹⁵⁾。今後、再現性が認められたマーカーに対して STS 化を行い、20塩基程度の特異的なプライマーを作製すれば、さらに精度の高いマーカーが得られるであろう。また、各樹種の個体数と採取範囲を広げ、それらに対する再現性をも確認することが望ましいと思われる^{16, 17)}。種内変異の調査のために、東日本の野生集団からも試料を採取し、再現性を確認する必要があると思われる。

プライマーセット A31・A32を用いた場合、コナラとミズナラで同一断片長 (850 bp) の増幅産物が出現した。これはコナラ節の中でも日本産樹木の遺伝的特徴である可能性があると思われるので、コナラ節の他の日本産樹種に対しても調査を進める必要があると思われる。また、他のプライマーを用いて同じ節として分類されるコナラ、ミズナラ、ホワイトオークに共通のマーカーがあるのかを調査し、その分類学的な証拠を裏付ける作業が必要であると思われる。イングリッシュオークの場合、今回用いたプライマーでは単型の増幅産物が得られなかったため、他のプライマーを用いて PCR を行い樹種特異的な増幅産物を調査する必要がある。

3.4 クラスター分析

4 樹種 (32個体) に対して RAPD 分析を行った結果、52個のマーカーが出現した。これを基に RAPD マーカーの出現パターンを調査した。マーカーが出現した個体には 1, 出現しなかった個体には 0 をスコアした。

RAPD マーカーの出現パターンを基に、SPSS を用いてクラスター分析を行った。Fig. 4 に示すように、各樹種の個体間の遺伝距離を表す相対遺伝距離はコナラが 3 で、ミズナラは 7, ホワイトオークは 5, イングリッシュオークは 8 であった。

コナラの相対遺伝距離は他の樹種に比べて大きな個体差はなく遺伝距離が 3 で、最も個体間で類似していた。ミズナラは個体番号 1, 2, 3, 4, 6 が一つのグループを、また 5, 7, 8 が別のグループを形成し、この二つのグループ間の相対遺伝距離は 7 でやや個体差が見られた。ホワイトオークの場合は各個体間の相対遺伝距離は 5 で、大きな個体差は見られなかった。イングリッシュオークは個体番号 1, 2,

Table 1. Sequences of primer-pairs for species-specific RAPD markers.

Primer	Sequence (5' to 3')
DT01	CGACGGTAGG
DT02	GGGCGGTGTA
DT07	CGTCACTGCG
DT08	CCGCGGAAC
A09	CCGCAGTTAGAT
A10	ACTGGCCGAGGG
A63	CCTATCCCAACA
A64	ACAAAGAGATAT
B09	CTTGAGCGTATT
B10	ACTGAGATAGCA
B89	ACTAACCTGGAC
B90	ATCTAAACCACG

Fig. 4. Hierarchical cluster analysis for *Quercus serrata*, *Quercus crispula*, *Quercus alba* and *Quercus robur*, based on similarity data from 52 RAPDs, indicating relationships among and within the species. R1-8: *Quercus robur*, S1-8: *Quercus serrata*, A1-8: *Quercus alba*, C1-8: *Quercus crispula*.

3, 4, 7, 8 が一つのグループを、また 5, 6 が別のグループを形成しこの二つのグループ間の相対遺伝距離は 8 であり、他の樹種に比べ最も大きな個体差が見られた。

また各樹種間の遺伝距離を表している平均遺伝距離を見てみると、イングリッシュオークとコナラとの平均遺伝距離は 14 で他の 2 樹種より最も近縁で、次にホワイトオーク (21)、ミズナラ (25) の順にクラスターされた。日本産のコナラ、ミズナラとアメリカ産のホワイトオーク、イングリッシュオークとの特別な変異を見出すことはできなかった。

樹木の形態や組織的な特徴による分類によると、コナラ、ミズナラ、ホワイトオークはコナラ節に、イングリッシュオークはロブール節に属している¹⁾。しかし今回のクラスター分析の結果によると、コナラ節の他の樹種よりもロブール節であるイング

リッシュオークが最もコナラと遺伝距離が近いことを示している。

イングリッシュオークにおける個体差が最も大きいことや異なる節でありながらミズナラやホワイトオークよりもコナラとの遺伝距離が近かったことは、個体共通の単型増幅産物がなく多型増幅産物だけが出現したこと、それに増幅産物の有無における個体差が大きかったことが要因であると思われる。しかし、ホワイトオークと同様に分布が広く雑種が多いイングリッシュオークの葉がホワイトオークのそれと類似していることや、その果実がコナラやミズナラに類似していること、またコナラ節とロブール節の分類が煩雑である部分が多いことから、他のプライマーを用いてより多くの増幅産物を使用し、さらに遺伝距離の調査をする必要があると思われる。

4. 結 論

本研究の結果, 以下のことが明らかとなった。

- 1) コナラをミズナラ, ホワイトオークと樹種識別するために有効なプライマー B89・B90 (700 bp) の1セットが得られた。
- 2) ミズナラをコナラ, ホワイトオークと樹種識別するために有効なプライマー DT07・DT08 (1700 bp), A09・A10 (520 bp), A63・A64 (850 bp), B09・B10 (750 bp) の4セットが得られた。
- 3) ホワイトオークをコナラ, ミズナラと樹種識別するために有効なプライマー DT01・DT02 (1400 bp) の1セットが得られた。
- 4) 得られたマーカーにより系統樹を作成したところ, 各樹種における個体間の相対遺伝距離はコナラ<ミズナラ<ホワイトオーク<イングリッシュオークの順であった。
- 5) 各樹種間の平均遺伝距離において, イングリッシュオークと他3種との平均遺伝距離は, コナラ<ホワイトオーク<ミズナラの順であった。

謝 辞

供試材料はサントリー株式会社生産第1部顧問加藤定彦氏に提供して頂いた。ここに記して厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 加藤定彦: “樽とオークに魅せられてー森の王の恵み, ウイスキー・ワイン・山海の幸”, 図書印刷株式会社, 株式会社ティービーエス・ブリタニカ, 2000, pp. 206-208.
- 2) Williams, J. G. K., Kuberik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V.: *Nucl. Acid Res.* **18**

(22), 6531-6535 (1990).

- 3) 家入龍二: *J. Jpn. For. Soc.* **85** (2), 142-146 (2003).
- 4) Nkongolo, K. K., Deverno, L., Michael, P.: *Plant Syst. Evol.* **236** (3-4), 151-163 (2003).
- 5) 金谷整一, 渡辺敦史, 白石 進, 玉泉幸一郎, 齊藤 明: 九州大学農学部演習林報告 No. 76, 1-9 (1997).
- 6) 後藤 晋, 家入龍二, 宮原文彦: 日林誌 **81** (3), 187-193 (1999).
- 7) Hedrick, P.: *Nature* **355**, 679-680 (1992).
- 8) 高田克彦, 白石 進: 九州大学農学部演習林報告 No. 75, 1-14 (1996).
- 9) 後藤 晋, 渡辺敦史, 池田浩一: 日林誌 **79** (4), 229-233 (1997).
- 10) Schnell, R. J., Ronning, C. M., Knight Jr, R. J.: *Theor. Appl. Genet.* **90** (2), 269-274 (1995).
- 11) Lee, J. H., Hashizume, H., Watanabe, A., Fukata, T., Shiraishi, S., Yamamoto, F.: *J. For. Res.* **2** (2), 121-123 (1997).
- 12) Penner, G. A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. J., Fedak, G.: *PCR Methods Appl.* **2** (4), 341-345 (1993).
- 13) Skroch, P., Nienhuis, J.: *Theor. Appl. Genet.* **91** (6-7), 1086-1091 (1995).
- 14) 後藤 晋, 宮原文彦, 家入龍二, 川内博文: 林木の育種 **197**, 6-7 (2000).
- 15) “新版 植物のPCRプロトコール”, 島本 功, 佐々木卓治監修, 秀潤社, 東京, 1997, pp. 164-165.
- 16) Kanno, M., Yokoyama, J., Suyama, Y., Ohyama, M., Itoh, T., Suzuki, M.: *J. Plant Res.* **117** (4), 311-317 (2004).
- 17) 菅野宗武: *Bunrui* **6** (1), 65-70 (2006).