

Brassica 属作物における葉緑体の塩基配列の種間および種内変異

山 岸 博

京都産業大学工学部生物工学科

石 橋 篤 志

京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻

川 口 晋 吾

京都産業大学工学部生物工学科

Abstract

In order to analyse the inter- and intraspecific variations of chloroplast genome in *Brassica* crops, DNA sequences of about 2000bp in the region ranging from *trnL* to *psbG* of chloroplast were determined. Twenty varieties or lines belonging to *B. rapa*, *B. nigra* and *B. oleracea* were used, and total DNA was isolated from young leaves of the individual seedlings. The DNA sequences were determined directly with the CEQ2000XL Auto-sequencer. Sequence variations including nucleotide substitutions and insertion/deletions were observed and the degree of differentiations were evaluated among the plants.

Compared with the regions within the genes (*trnL*, *trnF* and *ndhJ*), much larger variations were found in inter-genic sites, such as *trnL/trnF* and *trnF/ndhJ*. Especially, the latter site contained not only interspecific but also intraspecific nucleotide sequence variations. While the variation between *B. rapa* and *B. oleracea* was rather small, *B. nigra* possessed far larger differences with both of *B. rapa* and *B. oleracea*. In *B. rapa*, which shows large morphological variations in the species, being used as vegetables, oil seed rape and fodders, differentiations among the varieties were found. It is considered that the variations in *B. rapa* would be useful for the detailed phylogenetic studies of this species and the amphidiploid ones, *B. juncea* and *B. napus*, originated from the hybridization between *B. rapa* and *B. nigra* or *B. oleracea*.

1. はじめに

アブラナ科の植物とりわけ*Brassica*属植物には、世界的に広く栽培されて人類の食生活上重要な役割を果たしている作物が多数含まれている。*Brassica*属の作物は2倍体種とそれらの間で生じた種間雑種に由来する複2倍体種とからなっているが、そのうち2倍体種には、表1に

示す3種が存在する．さらに、これら3種の間のすべての組合せによって複2倍体種が生じ、そのいずれもが作物として利用されている．また2倍体作物種とりわけA、C両ゲノム種においては、種内で多様な特性と用途を持つ作物が分化している（表1）．

表1．*Brassica* 属に含まれる作物種およびそれらの種内における分化

種	ゲノム	2n	作物（用途）
<i>B. rapa</i>	A	10	Toria（油料）、Sarson（油料）、ハクサイ（野菜）、ツケナ（野菜）、カブ（野菜、飼料）、ナタネ（油料）
<i>B. nigra</i>	B	8	クロガラシ（香辛料、油料）
<i>B. oleracea</i>	C	9	キャベツ（野菜）、ブロッコリー（野菜）、カリフラワー（野菜）、コールラビー（野菜）、メキャベツ（野菜）、ケール（野菜）、カイラン（野菜）
<i>B. juncea</i>	AB	36	カラシナ（油料、野菜）、タカナ（野菜）
<i>B. napus</i>	AC	38	西洋ナタネ（油料）、ルタバガ（野菜、飼料）
<i>B. carinata</i>	BC	34	アビシニアガラシ（油料、香辛料、野菜）

このような*Brassica* 属内の種分化と種内変異ならびに複2倍体種の存在は、古くからこれらの作物間の系統分化に関する興味を呼んでいた．今日までの様々な方向からの研究によって、複2倍体種のうち*B. juncea*（ABゲノム）はAゲノムを細胞質提供親として、また*B. carinata*（BCゲノム）はBゲノム種を細胞質提供親として成立したことが明らかになっている．さらに、3種の2倍体種のうち、*B. rapa*と*B. oleracea*は互いに類似した細胞質ゲノム（葉緑体およびミトコンドリアゲノム）を持つものに対して、*B. nigra*はこれら両種とは異なる細胞質ゲノムを持つことが明らかになっている¹⁻³⁾．一方、*B. rapa*および*B. oleracea*の種内には上記のように多様な形態的変異が存在しているが、これら両種における細胞質ゲノムの種内分化については現在まで全く解析がなされていない．したがって、たとえばABゲノムの*B. juncea*がAゲノム種のうちどのような植物を母本として成立したか等、複2倍体種の起源についての詳細な解明は不可能な状態にある．このような細胞質ゲノムの種内変異の分析には、葉緑体ゲノムの塩基配列を調査することが有効である⁴⁻⁶⁾．

そこで、本研究においては*Brassica* 属の2倍体種3種における葉緑体ゲノムの分化を明らかにすることを目的として、3種に属する多数の品種・系統を用いて、葉緑体のBrassica 属作物の細胞質の分化を総合的かつ詳細に解明するための足がかりが得られた．

2. 材料及び方法

2. 1 植物材料

表2に示した*Brassica*属の2倍体種3種に属する20品種・系統を用いた。これらのうち表中にTで示した‘Toria’, ‘Sarson’ および*B. nigra*の3系統は東北大学より、またSで示した‘温海カブ’などの5品種は生物資源研（農業研究機構）より分譲を受けたものであり、その他は著者らが独自に収集したか、または市販種子を購入したものである。

これらの品種・系統の種子を温室内で播種し、生育した幼苗の本葉からTotal DNAを単離した。得られたDNAを用いて、各個体の葉緑体における塩基配列を決定した。

表2. *Brassica*属葉緑体の塩基配列の解析に用いた材料

種	系統・品種 ^a
<i>B. rapa</i> (A)	Toria-504 (T)、Sarson C-665 (T) 温海カブ (S)、金町小カブ (S)、切葉天王寺カブ (S)、 山カブ (S)、野生カブ (S) 丸葉壬生菜、ハクサイ ‘野崎2号’、開田カブ、スグキナ
<i>B. nigra</i> (B)	Ni-108 (T)、Ni-110 (T)、Ni-135 (T)
<i>B. oleracea</i> (C)	キャベツ ‘富士早生’、カリフラワー ‘野崎早生’、カイラン、ブロッコリー ‘ドシコ’、ケール ‘青汁用ケール’、野生ケール ‘O-169’

a (T) は東北大学より、(S) は生物資源研より導入したことを示す。

2. 2 葉緑体の塩基配列の解析

各個体について得られたDNAを鋳型として、図1に示した葉緑体のArabidopsis thalianaで明らかにされている葉緑体の塩基配列⁷⁾を参考にした。各個体について得られた塩基配列に基づき、調査領域における塩基配列変異の数を、塩基置換と挿入／欠失に分類していくつかの領域ごとにまとめるとともに、塩基配列変異の種間および種内変異の存在とその大きさを評価した。

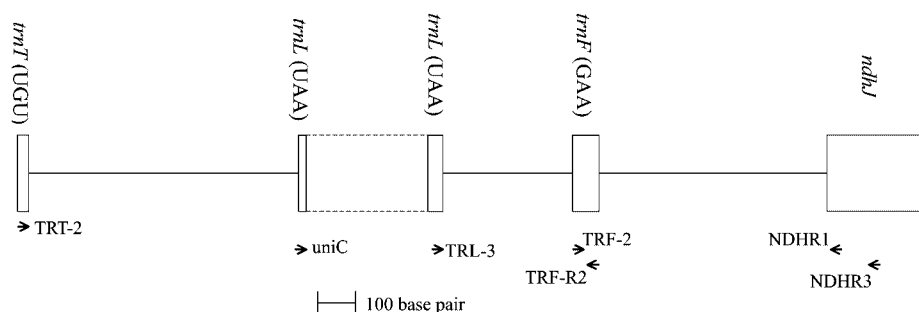


図 1. *Brassica* 属作物における葉緑体の塩基配列変異の解析に用いた領域

3. 結果および考察

3. 1 調査領域における構造の変異

調査領域のうち、*trnF* (GAA) と *ndhJ* の遺伝子間領域においては、両遺伝子内のプライマーを用いた PCR によって、供試品種・系統間で PCR 産物のサイズの差が検出された (図 2)。検出されたサイズの差には種間変異のみでなく種内変異も観察された。すなわち、*B. rapa* (A ゲノム種) においては、‘Torja-504’、‘丸葉壬生菜’ および ‘野崎 2 号’ が同一のサイズを示すのに対して、‘Sarson C-665’ は、これらより大きい増幅断片を有していた。また *B. oleracea* (C ゲノム種) においては多くの品種で *B. rapa* より小さいサイズの PCR 産物が認められた中で、‘青汁用ケール’ のみが *B. rapa* と同様のサイズの DNA 増幅を示した。さらに *B. nigra* (B ゲノム種) の 2 系統のうち、‘Ni-110’ が *B. oleracea* よりさらに小さいサイズの増幅断片を生じる一方で、‘Ni-135’ は *B. rapa* と同様の大きさの PCR 産物を持っていた。なお、図 2 の結果より、これら *Brassica* 属植物のこの領域における塩基配列は、いずれも *Arabidopsis* より大きいサイズであることが認められた。

このように、*Brassica* 属作物において PCR レベルで検出される DNA サイズの差が存在することは、これら植物の葉緑体における *trnF* と *ndhJ* の遺伝子間領域に、数 10bp 以上の挿入／欠失によると考えられる構造変異が存在することを示していると推定された。しかも、その変異が種間で観察されたのみでなく、3 種のいずれにおいても種内の個体間で観察されたことは、この領域に豊富な塩基配列変異が蓄積されている可能性があることを示唆しているものと判断された。一方これに対して、*trnL* から *trnF* に至る領域においては、このような PCR で検出できる顕著な塩基配列数の差は存在しなかった。

そこで、3 種のうち供試個体数の少なかった *B. nigra* について、調査系統と系統内の個体数をふやして同領域の PCR を行った。その結果 (図 3)、‘Ni-112’、‘Ni-108’ および ‘Ni-138’ はいずれも全個体が ‘Ni-110’ と同一のサイズの PCR 産物を持っていたのに対して、‘Ni-135’

は調査した4個体すべてがこれより大きいサイズのDNAの増幅を示した。このことから*B. nigra*は種の特徴としては、*trnF/ndhJ*領域において*B. oleracea*よりもさらに塩基配列数が少ないものの、その中で‘Ni-135’のみが何らかの理由で*B. rapa*と同様のサイズのPCR産物を生じたものと考えられた。

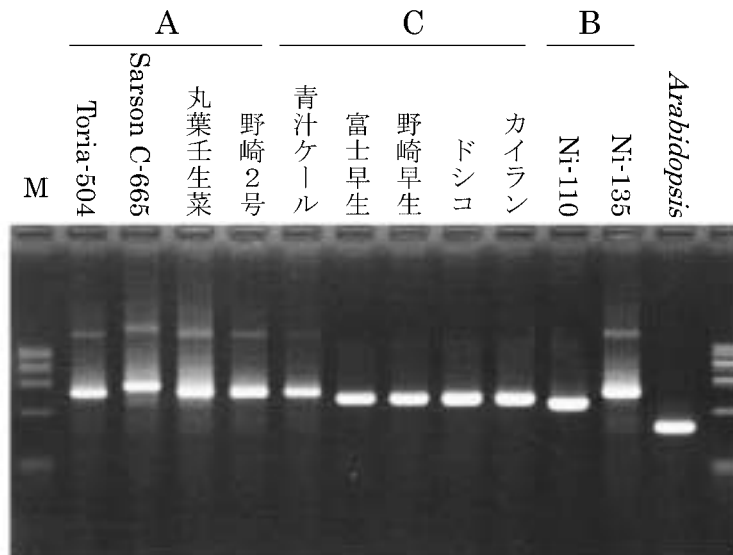


図2. 葉緑体の*trnF*と*ndhJ*の遺伝子間領域におけるPCR産物のサイズの差

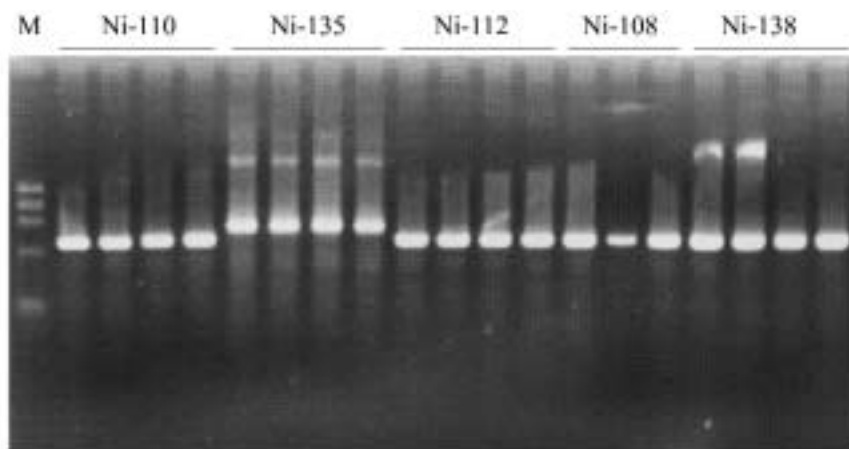


図3. *B. nigra*における*trnF/ndhJ*遺伝子間領域のサイズの系統間差

3. 2 葉緑体の遺伝子内および遺伝子間領域における塩基配列変異

本研究において塩基配列を調査した葉緑体ゲノムには、3 個の遺伝子 (*trnL*, *trnF*, *ndhJ*) および 3 か所の遺伝子間領域 (*trnL/trnF*, *trnF/ndhJ*, *ndhJ/psbG*) が含まれている。さらに *trnL* においては、遺伝子内にエキソンとイントロンが存在することが知られている。そこで供試した個体間における塩基配列変異の分布をこれらの領域に分けて調査し、各領域における変異の大きさを比較した。

その結果 (表 3), それぞれ 35bp および 50bp からなる *trnL* のエキソンおよび *trnF* (74bp) の遺伝子内領域においては、個体間の変異は観察されず、すべての個体の塩基配列が完全に一致した。一方, *ndhJ* の遺伝子内では, *B. nigra* の 2 個体 ('Ni-108', 'Ni-110') と他のすべての個体との間で, 1 塩基の置換が観察された以外は, 塩基配列変異が存在しなかった。これと比較して, 遺伝子間領域および *trnL* のイントロンでは塩基配列変異の存在が示された。しかしながらそれらの変異の程度は領域によって異なっていた。すなわち, *ndhJ/psbG* 間では 2 個の塩基置換が観察されたのみであったのに対して, *trnL/trnF* 間および *trnF/ndhJ* 間では, 塩基置換および挿入／欠失の変異が共に存在した。とりわけ後者の領域では, 調査個体間に 22 か所の塩基置換と 12 か所の挿入／欠失が認められ, *Brassica* 属植物においてこの領域が特に塩基配列変異に富むことが示された。このように遺伝子間領域における塩基配列変異の大きさには, 領域間で差が認められたが, 全体として明らかに遺伝子内に比較して大きい変異が観察された。こうした傾向は従来他の植物種で知られている結果と一致した⁸⁻⁹⁾。

表 3. 葉緑体の *trnL* から *psbG* に至る領域における塩基配列変異の数

領域	サイズ (bp)	塩基置換	挿入/欠失	合計
<i>trnL</i> 5' エキソン	35	0	0	0
<i>trnL</i> イントロン	312,313	7	1	8
<i>trnL</i> 3' エキソン	50	0	0	0
<i>trnL/trnF</i>	343,344	13	1	14
<i>trnF</i>	74	0	0	0
<i>trnF/ndhJ</i>	588 ~ 729	22	12	33
<i>ndhJ</i>	477	1	0	1
<i>ndhJ/psbG</i>	103	2	0	2

3. 3 葉緑体における塩基配列の種間および種内変異

各個体について決定した *trnL* から *psbG* に至る領域の塩基配列から, 調査個体は 5 つのハプロタイプに分類された (表 4)。また表 5 には, これらハプロタイプ間の変異の数を示した。

表 4. 葉緑体の塩基配列に基づく供試個体の分類

タイプ	代表品種・系統 (ゲノム)	品種・系統 (ゲノム)
1	Ni-108 (B)	Ni-110 (B)
2	開田カブ (A)	Toria-504 (A)、金町小カブ (A)、山カブ (A)、 切葉天王寺カブ (A)、野生カブ (A)、丸葉壬生菜 (A)、 野崎 2 号 (A)、スグキナ (A)、Ni-135 (B)、 青汁用ケール (C)
3	温海カブ (A)	
4	Sarson C-665 (A)	
5	富士早生 (C)	野崎早生 (C)、カイラン (C)、ドシコ (C)、O-169 (C)

表 5. 葉緑体の *trnL*/*psbG* 領域におけるタイプ間の塩基置換 (左) と挿入/欠失 (右)

	開田カブ	温海カブ	Sarson	富士早生
Ni-108	40-13	40-14	43-13	40-13
開田カブ		0 - 1	3 - 3	2 - 3
温海カブ			3 - 3	2 - 3
Sarson C-665				5 - 4

このうちタイプ 1 には *B. nigra* の 2 系統が含まれ、タイプ 2 には *B. rapa* の多くの品種・系統に加えて、‘Ni-135’ (*B. nigra*) と ‘青汁用ケール’ (*B. oleracea*) が含まれていた。さらにタイプ 3 および 4 は、それぞれ *B. rapa* の ‘温海カブ’ および ‘Sarson C-665’ のみで構成されていた。残りのもう 1 つのタイプ 5 には ‘青汁用ケール’ を除くすべての *B. oleracea* の品種・系統が含まれた。このように、基本的には *B. nigra* がタイプ 1、*B. rapa* がタイプ 2、また *B. oleracea* がタイプ 5 に分類され、*Brassica* 属の 3 種の 2 倍体作物種間で葉緑体塩基配列の種間変異が明瞭に存在した。このうち、*B. nigra* の属するタイプは、他のタイプとの間で極めて多くの変異を有しており、同種が *Brassica* 属の他の 2 種とは大きく異なる細胞質を持つことが裏づけられた (表 5)。

しかしながら、このような種間変異に合致しない品種・系統が、*B. nigra* と *B. oleracea* にそれぞれ 1 つ存在した。表 4 から明らかなようにこれら 2 品種・系統の塩基配列は、*B. rapa* の大部分の品種が含まれるタイプ 2 の塩基配列と完全に一致した。このうち *B. nigra* の ‘Ni-135’ は東北大学で保存されている系統である。また ‘青汁用ケール’ はタキイ種苗から市販されているケールの 1 品種である。前述のように *B. nigra* と *B. rapa* の間では、後者を細胞質親とする複 2 倍体種の *B. juncea* が成立している。このことから推定すると、‘Ni-135’ は *B. nigra* ではな

く、*B. rapa*に由来する葉緑体を持つ*B. juncea*の1系統ではないかという可能性が生じる。この点については同系統の収集の経緯にまでさかのぼって調査する必要があると考えられる。同様に‘青汁用ケール’は*B. oleracea*に属するケールの1品種でありながら、*B. rapa*の細胞質を持つと判断される。これが事実であれば、同品種は*B. rapa*と*B. oleracea*の間の種間雑種に由来しながらも、育種によって形態的にはケールと同様の特性を示すに至ったものと考えられる。この品種がどのような育種的操作によって成立したものかについては興味を持たれる。

以上のように種間変異が認められる一方で、*B. rapa*においては‘Sarson C-665’と‘温海カブ’が、‘開田カブ’を代表とする他の多くの品種・系統とは異なる独自の塩基配列を有していた。表5には、塩基配列の5つのタイプ間の変異数を塩基置換と挿入／欠失に分けて示したが、‘Sarson C-665’は‘開田カブ’などとは3つの塩基置換と3つの挿入／欠失の計6か所の変異を有するのに対して、‘温海カブ’と‘開田カブ’など多数の品種・系統との間には1か所の挿入／欠失変異が認められるのみであった。この変異が存在するのは、表6に示したように*trnF*と*ndhJ*の遺伝子間領域のうち、シトシン（C）が繰り返して存在するSimple Sequence Repeat（SSR）領域である。この領域において‘温海カブ’は他のタイプに比べて1つ多くのCを有していた。このようなSSR領域における塩基配列の種内変異は他の植物でも観察され、種内分化の解析に利用されており^{10,11)}、今後*B. rapa*における種内変異の調査に活用することができるかもしれない。

表6. *trnF/ndhJ*遺伝子間領域におけるSSR変異

系統・品種	塩基配列
Ni-108	T T - A C C C T C C C C C C - A T
開田カブ	T T A A C C C - C C C C C C - A T
温海カブ	T T A A C C C - C C C C C C C A T
Sarson C-665	T T A A C C C - C C C C C - - A T
富士早生	T T A A C C C - C C C C - - - A T

他方、‘Sarson C-665’が他の*B. rapa*の品種・系統との間で示す変異のうち、図4に示す*trnF*遺伝子とその3’領域における繰り返し配列の数に関する変異が注目された。すなわち、この領域に存在する54bpの塩基配列が、‘Sarson C-665’では3回反復されるのに対して、他の*B. rapa*での繰り返しは2回であり、さらに*B. nigra*および*B. oleracea*においては、1個しか存在しない。このような遺伝子内と遺伝子間にまたがる比較的長い塩基配列の繰り返し数に関する変異の原因は現在のところ不明である。しかし、塩基配列の決定によって、図2に示されたようなPCRレベルで検出される遺伝子内領域の構造変異の主な原因が明らかにされたことは、このような変異の成因を探る上で有効になるものと考えられる。

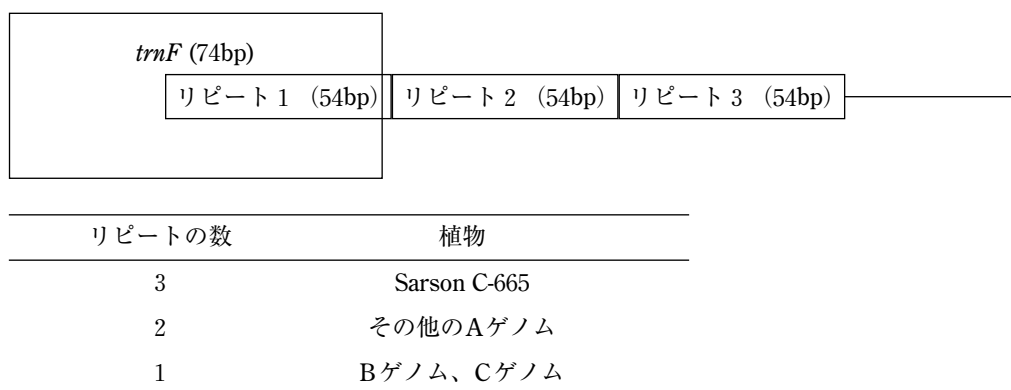


図4. *trnF*とその3'領域における繰り返し配列の数に関する変異

*B. rapa*のうち‘Sarson’は主として南アジアで栽培される油料用の作物であり、他の*B. rapa*との間で必ずしも交雑和合性が高くないとされている。また‘温海カブ’は山形県の温海町の山間で焼畑によって栽培されるカブで、非常に古い栽培の歴史を持っていると考えられている。この点で我国で栽培されている他のカブやツケナ類と比較して、我国への伝来の時期や経路が大きく異なる可能性が指摘されている¹²⁾。今回明らかにされた*B. rapa*の種内でのSSR変異の存在は、こうした我国のカブ、ツケナ類における系統分化を探るための指標となり得る。また、今回の結果を含めて、さらに*B. rapa*における葉緑体ゲノムの種内変異が明らかになれば、*B. rapa*を細胞質親として成立し、アジアの広い地域で野菜および油料作物として栽培されている*B. juncea*の起源を、今までよりはるかに詳細に明らかにする可能性が生じる。これらの点については今後さらに検討したい。

4. まとめ

1. *Brassica*属のA, B, C 3ゲノム種の植物20個体について、葉緑体の*trnL*から*psbG*に至る約2kbpの領域の塩基配列を決定した。
2. 調査領域には、豊富な塩基配列変異が存在したが、その多くは*B. nigra* (Bゲノム) に特有なもので、A・Cゲノム間の変異は小さく、*Brassica*属植物の細胞質の種間変異に関する従来の説が裏づけられた。
3. Bゲノム及びCゲノムとして導入・供試した各1品種・系統(‘Ni-135’, ‘青汁用ケール’)が、Aゲノムの大多数の個体と同一の配列を示し、それらの来歴に興味を持たれた。
4. Aゲノム内ではSarsonが他と異なる塩基配列を示し、また‘温海カブ’に特有なSSR変異が検出された。一方Cゲノムでは、上記の1品種を除き、塩基配列変異は観察されなかった。

引用文献

- 1) Uchimiya, H. and Wildman, S. G. (1978) J. Heredity 69 : 299-303.
- 2) Warwick, S. I. and Black, L. D. (1991) Theor. Appl. Genet. 82 : 81-92.
- 3) Yanagino, T., Takahata, Y. and Hinata, K. (1987) Japan. J. Genet. 62 : 119-125.
- 4) Ennos, R. A. (1994) Heredity 72 : 250-259.
- 5) Kanno, A and Hirai, A. (1993) Curr. Genet. 23 : 166-174.
- 6) Ohsako, T. and Ohnishi, O. (2000) J. Botany 87 : 573-582.
- 7) Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamitu, E. and Tabata, S. (1999) DNA Res. 6 : 283-290.
- 8) Curtis, S. E. and Clegg, M. T. (1984) Mol. Biol. Evol. 1 : 291-301.
- 9) Xu, D. H., Abe, J., Kanazawa, A. and Gai, J. Y. (2001) Theor. Appl. Genet. 102 : 683-688.
- 10) Bryan, G. J., McNicoll, J., Ramsay, G., Meyer, R. C. and De Jong, W. S. (1999) Theor. Appl. Genet. 99 : 859-867.
- 11) Provan, J., Powell, W. and Hollingsworth, P. M. (2001) Trends in Ecology & Evolution 16 : 142-147.
- 12) 青葉 高 (1981) 野菜—在来品種の系譜—. 法政大学出版局. PP.332.