

葉緑体遺伝子間領域のシーケンス分析による東日本産クズ

(Pueraria lobata) の遺伝的多様性保田謙太郎¹, 露崎浩²¹ 秋田県立大学生物資源科学部フィールド教育研究センター² 秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科

クズ (*Pueraria lobata*) を効率的に収集していくための基礎的知見を得る目的で、東日本の各地域から収集した 14 系統を対象に葉緑体ゲノム *rpoB-trnC* 遺伝子間領域の塩基配列を解析し、遺伝的多様性を調べた。また、対照として 6 系統の沖縄県産のタイワンクズ (*Pueraria montana*) を用いた。*rpoB-trnC* 遺伝子間領域の長さは 1092~1094bp であり、単一塩基のくり返し数の違いによって系統間でわずかに異なった。*rpoB-trnC* 遺伝子間領域の塩基配列には 6 ヶ所で変異があった。これら変異によって、14 系統は 5 種類のハプロタイプに分かれた。1 型がもっとも多く、9 系統で見つかった。4 型は 2 系統であり、2 型、3 型、5 型はそれぞれ 1 系統であった。タイワンクズはすべて 4 型であり、変異はなかった。東日本地域では 1 型のクズが優占的であったが、比較的高い遺伝的多様性を有しており、東日本地域は栽培に利用できる系統を探すのには適していると考えられた。

キーワード： 遺伝資源, 収集, 葉緑体 DNA, 遺伝的多様性, クズ, *Pueraria lobata*

クズ (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) は、つる性のマメ科多年生草本である (図 1)。植物体は非常に大型化し、イモ状に肥大した塊根を作る。日本を含む東アジアや東南アジア、ミクロネシア、ニューギニアに分布しており、アメリカ合衆国に帰化している。日本での分布は北海道から鹿児島県であるとされていたが、最近では沖縄本島や石垣島での分布も確認されている (立石ら, 2006)。クズの生育地は、路傍、空き地、法面、放棄畑などであり、旺盛な生育によって大群落を作る。アメリカ合衆国ではその旺盛な生育力に目をつけて、緑化植物などとして導入したが、逸出した個体が他の植物を覆い尽くようになり、生態系に悪影響を及ぼす状況になっている (伊藤, 2010)。

日本では、クズの塊根のデンプンは葛粉として、茎葉は家畜の飼料として古代より使われてきた (堀田・新田 1989)。現在では、山野に生えたクズの塊

根を専門の業者が掘り出して、葛粉や葛根の原料としてわずかに利用しているだけである。しかし、クズは日本では在来種であり、旺盛な生育能力は資源植物としての魅力的である。クズを栽培管理できれば、利用が広がると考えられる。

これまでもクズの栽培についての研究は行われてきた。しかし、栽培方法の確立や畑からの逸出防止が主であり、様々な工夫によって野生植物を畑で栽培できるようにするという研究であった。しかし、野生植物は畑に適応した植物ではないため、現代の農業技術を用いても栽培は難しい。一方で、野生植物を育種して、栽培植物にすることも考えられるが、育種法は、栽培植物を対象とした技術であり、野生植物は対象外である。

栽培植物は、採集段階→半栽培段階→栽培段階を経て誕生したと考えられている (中尾, 1977; 保田と山口, 2001; 中山と保田, 2016)。半栽培段階では、人



図1 空き地で繁茂するクズ（上）と花序（下）

間の活動の活発化によって、畑に類似した人為攪乱環境が生まれ、そこに一部の植物が雑草として適応したと考えられている。人間は、雑草としての特徴を持った植物の中から気に入ったものを積極的に保護し、さらに、それらを用いて栽培を開始したと考えられている。クズは採集段階の植物であり、畑で栽培するには、半栽培段階の再現、すなわち、クズのジーンプールの中から、畑に類似した環境で生育し、栽培環境に前適応した特徴を持つ原始的な栽培系統を見つけ出す一次的な選抜が必要であると考えられる。

原始的な栽培系統を見つけ出すためには、まずは多様性を多く含むようにクズをサンプリングしていく必要がある。クズの遺伝的多様性の評価はサンプリングを効率的に進める上で参考となる。クズの遺伝的変異についての研究は、アメリカ合衆国に侵入した個体について、葉緑体 DNA のシーケンス分析と核 DNA の SSR 分析によって行われてきた (Bentley and Mauricio, 2016)。特に、葉緑体 DNA のシーケンス分析についてはデータが公開されており、同領域を分析すれば、アメリカ合衆国に侵入し

表1 分析材料の収集地点とハプロタイプ

種	収集場所	系統番号	生育環境	ハプロタイプ	参考*
クズ (<i>Pueraria lobata</i>)					
	岩手県九戸郡軽米町	Ku-01	斜面	3型	H3
	岩手県一関	Ku-02	路傍	1型	H1
	岩手県奥羽市	Ku-03	フェンス	5型	-
	秋田県男鹿市	Ku-04	路傍	1型	H1
	秋田県横手市山内	Ku-05	植え込み	1型	H1
	宮城県栗原市	Ku-06	路傍	4型	H2
	宮城県刈田郡蔵王町	Ku-07	植え込み	2型	H9
	山形県鶴岡市	Ku-08	路傍	1型	H1
	山形県新庄市	Ku-09	路傍	1型	H1
	福島県耶麻郡西会津町	Ku-10	河川斜面	1型	H1
	新潟県胎内市	Ku-11	路傍	1型	H1
	新潟県十日町市	Ku-12	路傍	1型	H1
	長野県上水内郡信濃町	Ku-13	路傍	1型	H1
	栃木県足利市	Ku-14	駐車場横	4型	H2
タイワンクズ (<i>P. montana</i>)					
	沖縄県石垣市	Tku-01	路傍	4型	H2
	沖縄県石垣市	Tku-02	路傍	4型	H2
	沖縄県石垣市	Tku-03	路傍	4型	H2
	沖縄県宮古島市	Tku-04	路傍	4型	H2
	沖縄県宮古島市	Tku-05	路傍	4型	H2
	沖縄県宮古島市	Tku-06	路傍	4型	H2

*Bentley and Mauricio (2016) でのハプロタイプ。

たクズと比較して多様性が評価できる。そこで、本研究では、東日本から収集したクズについて、葉緑体 *rpoB-trnC* 遺伝子間領域をシーケンス分析した。

材料と方法

クズは東日本の 14 地点から収集した (表 1)。また、対照としてタイワンクズ (*Pueraria montana* (Lour.) Merr.) を沖縄県石垣島と宮古島の 6 地点から収集した。分析個体は、各系統 1 個体である。DNA は、収集した葉からすすい S DNA 抽出試薬 (株リゾ) を用いて抽出した。塩基配列の分析領域は葉緑体ゲノムの *rpoB-trnC* 遺伝子間領域であり、DNA 増幅用のプライマーは Egan と Crandall (2008) と Bentley と Mauricio (2016) の論文を参考に設計した (表 2)。

表2 *trnC-rpoB* の遺伝子間領域の DNA 増幅および塩基配列の解読に用いたプライマー

名前	塩基配列 (5'-3')
Kuzu-trnC	cacccggattgaactgggg
Kuzu-rpoB	ctacaaaaccctcaattg
Kuzu-trnC1	tgaattggaatatgtaatatcat
Kuzu-rpoB1	aagcaatattgattagttatg

PCR 反応液 (25 μ l) は、1 μ l のテンプレート DNA

(10ng/ μ l), 3.5 μ l の dH₂O (滅菌水), 5 μ l の 2mM dNTPs, 12.5 μ l の 2×PCR Buffer for KOD FX Neo, 1.25 μ l の 2 種類のプライマー (10 μ M), 0.5 μ l の KOD FX Neo (1U/ μ l, TOYOBO) を用いて調査した. PCR は, 98°C-3 分の初期変性, 35 サイクルの本反応(変性 98°C-10 秒, アニーリング 58°C-10 秒, 伸長 68°C-60 秒の繰り返し) の条件で行った. シーケンス分析は秋田県立大学生物資源科学部バイオテクノロジーセンターに依頼した. シーケンス分析には, kuzu-rpoB と Kuzu-trnC の 2 つのプライマーに加え, インターナルプライマー, kuzu-rpoB1 と Kuzu-trnC1 を新たに作成し, 用いた (表 2).

表 3 変異の種類とハプロタイプ

ハプロタイプ	129bp	448bp	645bp	646-647bp	996bp	1007bp
1型	T	T	T	AA	AAAAAA	G
2型	C	T	T	AA	AAAAAAA	G
3型	T	G	G	AA	AAAAAA	T
4型	T	T	T	TT	AAAAAA	T
5型	T	T	T	TT	AAAAA	T

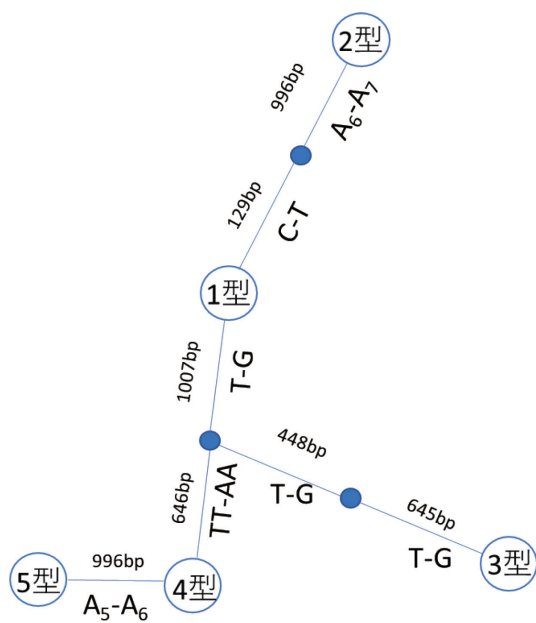


図 2 クズの cpDNA ハプロタイプ間のネットワーク図
枝の数値は変異ヶ所を、アルファベットは変異を表す (表 3 参照)。

結果と考察

rpo B-trn C 遺伝子間領域 (一部に遺伝子領域を含む) の長さは 1092~1094bp であり, 単一塩基のくり返し数の違いによって系統間でわずかに異なった. 変異は, 129bp, 448bp, 645bp, 646~647bp, 996pb,

1007bp 地点 (*kuzu-rpoB* プライマーの 3' 末端を 0bp として) の 6ヶ所にあった (表 3). 4ヶ所が 1塩基の置換, 1ヶ所が 2塩基の置換, 1ヶ所が単塩基の反復数の違いであった. これら変異によって, 東日本の 14 系統のクズは, 5 種類のハプロタイプに分かれた. 1 型がもっとも多く (9 系統), 次は 4 型であった (2 系統). 2 型, 3 型, 5 型はそれぞれ 1 系統であった. また, ハプロタイプのネットワーク図からは 2 型と 3 型間が 5ヶ所の変異で区別され, もっとも遠縁になったが, 極端にはなれていなかった (図 2). 一方で, 比較に用いたタイワンクズには変異はなく, すべて 4 型であった.

Bentley と Mauricio (2016) はアメリカ合衆国に侵入した 271 系統のクズについて *rpoB-trnC* 遺伝子間領域の塩基配列を分析し, 13 種類のハプロタイプを見つけている. 一般的に, 葉緑体ゲノムの進化速度は遅く, 非コード領域 (遺伝子間領域やイントロン) であっても種内変異は多くない. 本研究において分析に用いた系統数は 14 系統と少ないが, ハプロタイプの数は 5 種類であった. *rpoB-trnC* 遺伝子間領域は 1100bp の長さの領域であるが, 変異が多く, アメリカ合衆国だけでなく, 日本でもクズの種内変異や地理的傾向を分析するのに適した領域であると考えられる. また, タイワンクズは 4 型であったが, クズのなかにも 4 型は存在する. タイワンクズとクズとの遺伝的類縁性を考える上でも *rpoB-trnC* 遺伝子間領域は注目される.

クズはアメリカ合衆国内には 19 世紀後半に持ち込まれたとされており, 日本も侵入源の一つであると考えられている (Bailey, 1939; 伊藤, 2010). 本研究では 1 型の出現頻度は 71% であり, 残りの 2 型, 3 型, 4 型, 5 型よりも頻度が高く, 東日本は 1 型の優占している地域であった. 1 型は, Bentley と Mauricio (2016) の論文での H1 型に相当し, その出現頻度は約 63% であり, アメリカ合衆国でも同様に高い. また, 1 型以外にも, 本研究の 2 型, 3 型, 4 型のハプロタイプは, Bentley と Mauricio (2016) の H9 型, H3 型, H2 型に相当する. ハプロタイプが一致し, その頻度も類似していることから, 日本がクズの侵入源の一つであるとするこれまでの考え方を支持する結果であった.

本研究では、クズを効率的に収集するための基礎的知見を得る目的で、東日本に生育するクズの葉緑体 DNA の多様性を分析してきた。1 型のハプロタイプは優占的であったが、合計で 5 種類のハプロタイプが見つかり、東日本のクズは遺伝的に均一ではなく、比較的高い多様性を持っていることが示された。このことから、東日本は栽培に利用できる候補系統を探すのには適した地域であると考えられる。

段階における生活史特性の進化」山口裕文・島本義也（編著）『栽培植物の自然史』（pp.108-119）。北大図書刊行会。

2019 年 6 月 30 日受付
2019 年 7 月 9 日受理

引用文献

- Bailey, R. Y. (1939). Kudzu for erosion control in the Southeast. *USDA Farmers' Bulletin* no. 1840 (Government Printing Office, Washington, D.C., USA).
- Bentley, K. E. & Mauricio, R. (2016). High degree of clonal reproduction and lack of large-scale geographic patterning mark the introduced range of the invasive vine, kudzu (*Pueraria montana* var. *lobata*), in North America. *American Journal of Botany*. 103, 1499-1507.
- Egan, A. N. and Crandall, K. A. (2008). Incorporating gaps as phylogenetic characters across eight DNA regions: Ramifications for North American *Psoraleeae* (Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46, 532-546.
- 堀田満・新田あや（1989）．「クズ属」堀田満ら（編）『世界有用植物事典』（p.874）．平凡社．
- 伊藤操子（2010）．「クズ (*Pueraria lobata* Ohwi)」『草と緑』2, 36-41.
- 中尾佐助（1977）．「半栽培という段階について」『どるめん』13, 6-14.
- 中山祐一郎・保田謙太郎（2011）．「ヤナギタデの栽培利用：「葉タデ」と「芽タデ」と愛知県佐久島の半栽培タデ」山口裕文（編著）『栽培植物の自然史 2』（pp.231-252）．北海道大学図書出版会．
- 立石庸一・松村俊一・山城考・新城和治（2006）．「クズ（マメ科）の琉球列島における自然分布の空白域と沖縄・石垣両島への侵入」『沖縄生物学会誌』44, 65-73.
- 保田謙太郎・山口裕文（2001）．「アズキの半栽培

Genetic variations of Kudzu (*Pueraria lobata*) in East Japan inferred from the sequences of a cpDNA intergenic region

Kentaro Yasuda¹, Hiroshi Tsuyuzaki²

¹ Field Education and Research Center, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University

² Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University

To obtain the basic information required to promote the germplasm exploration of Kudzu (*Pueraria lobata*) efficiently, genetic variations of fourteen accessions from East Japan were analyzed based on cpDNA sequences using the intergenic spacer region between *rpo B-trn C*. The entire sequenced length of the all analyzed accessions were differentiated from 1092 to 1094 bp due to a mononucleotides repeat mutation. Six mutation sites were detected from all the accessions. Based on these mutations, five cpDNA haplotypes (1, 2, 3, 4, and 5) were recognized. Haplotype 1 was founded in nine accessions. Haplotype 4 was detected in two accessions. Only one accession was recognized in each of the haplotypes 2, 3, and 5. Our results indicated that Kudzu in East Japan has a relatively high genetic variation, although haplotype 1 predominated. Our results also indicated that East Japan might be an appropriate area for germplasm exploration to obtain candidate accessions for cultivation.

Keywords: germplasm, collection, cpDNA, genetic diversity, Kudzu, *Pueraria lobata*