

# 植物分子系統学の現状と展望

## — *rbcL* 遺伝子の系統解析における有効性と問題点 —

村 上 哲 明

(東京大学理学部附属植物園)

### はじめに

生物の進化を科学的に解明しようとする進化生物学の研究方法は、(1) 進化の歴史を明らかにしようとする系統学的アプローチと(2) 進化過程とそのメカニズムを明らかにしようとする生態学的アプローチの2つに大別することができる。これら2つの研究アプローチはこれまで独立に進められてきた。しかし、進化生物学も近年飛躍的に進歩した結果、論理的な厳密さが要求されるようになり、これら2つのアプローチは独立ではいられなくなってきた。たとえば、生態学的アプローチによってある進化プロセスに関して数学的モデルを立て、その妥当性を実際の生物の観察データに基づいてテストしようと考えた時、テストに用いる生物の歴史(=系統樹)まで考慮しなければいけない時代になったのである。このことは、比較法の問題として話題を呼んでいる(Harvey & Pagel, 1991)。

さて、地球上の生命は一回起源だと考えられている。とすれば、すべての生物には必ず親となった生物がいることになる。このことは進化においても当てはまり、すべての種には、やはりそのもとになった祖先種が存在したはずである。数ある生物種のなかには、ヒトとチンパンジーのように比較的最近分化した近縁なものもあれば、ヒトとタバコのように大昔に分化した遠縁なものもある。生物種間の類縁関係、別の言い方をすると種分化の歴史的順序を図1のように樹状図にして表現したものを系統樹という。系統学的アプローチにとっては、このような系統樹を得ることが長い間、最終目標であった。また、生物の歴史を考慮するとは、とりもなおさず系統樹を考慮することなので、生態学的アプローチにとって最近必要になったものも系統樹と言えよう。すなわち、この系統樹が系統と生態の2つのアプローチを結びつけているのである。

とは言え、科学的に信頼できる系統樹が容易に得られないのでは、これがいくら必要であってもどうしようもない。実際、ほんの15年前には分類学者にとっても信頼性の高い系統樹を得ることはほとんど不可能と思えるほど困難だったのである。しかし、近年、切片を作って顕微鏡で覗くのと大して変わらない手間と労力で分子レ

ベルの情報を野生生物からも得られるようになり、事態は一変した。分子系統学的手法は瞬く間に進歩・成熟し、ヒト、チンパンジー、ゴリラといった近縁種間からヒトとタバコのような遠縁な群間まで、信頼性の高い系統樹が得られるようになったのである。

本稿では、まず分子系統学の利点や一般的な方法などを紹介し、次いで *rbcL* 遺伝子の塩基配列決定と比較に基づく系統解析(主としてわれわれの研究)を実例として紹介する。*rbcL* 遺伝子は、植物分子系統学では標準的なツールとして使われており、その解析方法もほぼ完成している。*rbcL* 遺伝子を用いた系統解析法の有効性と限界を知ることは、そのまま植物分子系統学の現状と問題点を把握することにつながる。そのうえで、その問題点をどのように克服すればよいかを考察したい。

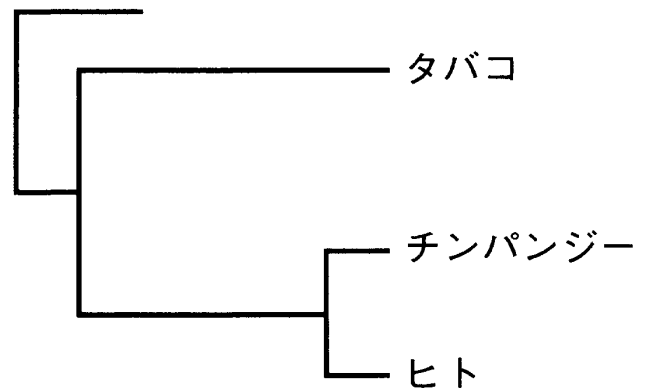


図1. 系統樹。

この樹状図はヒトとチンパンジーがタバコとよりも最近まで祖先種を共有していたことを示している。

### 系統解析にどのような情報を使うか

従来、分類学者は外部形態や染色体数、化学成分といった表現形質を用いて系統解析を行ってきた。しかし、分子情報が容易に得られるようになった現在、とくに植物のように形態の単純な生物では、取り扱える形質の数においても、また相同性や独立性など質においても表現形質は分子形質に及ばない(村上 1993)。さらに同じ分子形質と言っても、葉緑体DNAの制限酵素断片長多

型（RFLP）解析のように、DNAの塩基配列の違いを間接的に調べる方法は、塩基配列そのものが容易に短時間で決定できるようになった現在、その役割を終えつつある。間接的方法の利点は塩基配列の情報をより簡便に取り出せることだけなので、塩基配列の決定がRFLP解析などと同等の手間で行えるようになれば、これら間接法は絶滅する運命にあるというわけである。DNAの塩基配列を決定する技術（たとえばDNAシーケンサー）は、日々進歩しているので、数年後には役割を終えると私は予想している。

塩基配列データを系統解析に用いるメリットとしては、以下のようなものがある。

（１）塩基配列は生物の遺伝子の一次情報であり、環境の影響も全く受けず、質的には最高の形質である。

（２）最も基本的なところで比較するのだから情報量も最大になるはずである（遺伝子の発現、ほかの遺伝子や環境などの影響による情報の損失がない）。

（３）RFLP解析などの間接法は近縁種間の系統解析では塩基配列の直接比較法と比べて遜色のない結果が得られるものの、たとえば科間のような高次分類群間の系統解析にはそもそも適用できない。制限酵素による断片のパターンが違いすぎると比較できないからである。塩基配列の直接比較による系統解析法なら、近縁種間から高次分類群間まで、どのレベルの系統解析にも適用可能である。

（４）さらに、RFLP解析では系統解析したい分類群を外群まで含めて、すべて同時に比較解析しなければいけない。それに対して、塩基配列の決定・比較法では、データを一種ずつ追加できる。したがって、ほかの研究者が決定した分子データも容易に取り込むことができる。

これらの利点を考えると、現在では系統解析には特定の遺伝子の塩基配列を決定し、比較するのが最も近道である。

### 特定の遺伝子の塩基配列の決定方法

つぎに植物を材料とした特定の遺伝子の塩基配列決定方法を順を追って紹介したい。

#### （１）植物材料からのDNAの抽出

CTABと呼ばれる強力な界面活性剤を含む溶液を用いると、野生植物からでも通常1g程度の葉から十分量の全DNA（核、ミトコンドリア、葉緑体由来のDNAの混合物）が半日で得られる。通常のCTAB法では全DNAが得られない多糖類などを多く含む植物についても、いくつかの抽出法が開発されている（村上ら1995）。

#### （２）PCR法による特定の遺伝子断片を増幅

特定の遺伝子断片を増幅する方法は、PCR（Polymerase Chain Reaction）法の開発によって大幅に省力化された。PCR法とはプライマーと呼ばれる一対の短い（30塩基対程度）DNA断片と同じ配列をもつ部分に挟まれた遺伝子の一部分を高熱菌由来の耐熱性DNA合成酵素を用いて試験管内で複製・増幅する方法のことをいう。通常、遺伝子には構造的に重要な部位があり、進化の過程であまり変化しない。このような保存的な部位を使ってプライマーを設計しておけば、同じプライマーで幅広い生物群の特定の遺伝子を増幅することもできる。PCR法はいわばDNAの高速コピー機であり、4－6時間程度で特定の遺伝子断片を $10^5$ から $10^6$ 倍に増幅することができる。これにより従来クローニングしてバクテリアなどの生物によって増幅させていた煩わしいステップが大幅に簡便化された。

（３）増幅断片の精製とダイレクトシーケンス法による塩基配列決定

増幅断片は、塩基配列決定の反应用到にジーンクリーンII（フナコシ）を用い、ガラス粒子にDNAを吸着させる方法により精製する。この方法により、プラスチックチューブ（エッペンドルフチューブ）用の簡単な遠心機だけで超遠心機を用いたのと同程度の精製が2時間程度で行える。

さらにサンガー法とPCR反応を合体させたダイレクトシーケンス法を塩基配列自動決定装置（DNAシーケンサー）と組み合わせて行うことで、塩基配列決定も容易に行えるようになった。また、ラジオアイソトープも不要になって、これらの研究が通常の実験室で行えるようになった。われわれの研究室では一人の実験助手が1日7時間労働で2.5日間かければ、一つの野生植物の1200塩基対程度の遺伝子を増幅して、その配列を決定することができるまでになっている。

#### （４）アラインメント

自分が系統解析をおこないたい分類群について一通り特定の遺伝子の塩基配列が決定できたら、それらの配列を相同になるように並べる。この操作をアラインメントと呼ぶ。この作業は、比較するDNAの中でその長さを変えるような突然変異が多数回起こっているときには困難になる。

#### （５）系統樹作成

アラインメントの後、PAUP（Swofford, 1993）などの系統解析用コンピューターソフトを使って分子系統樹が得られる。最近では、最大節約法と呼ばれる塩基の置換数を系統樹全体で最小にするように分類群を配置する系統樹作成法がよく用いられている。さらに、これらのコンピューターソフトにはブートストラップ法など、得られた系統樹の信頼性を統計学的に調べる機能も付いている。

## 植物分子系統学的解析の道具としての *rbcL* 遺伝子

植物の分子系統学的解析では、*rbcL* と呼ばれる遺伝子が最もよく用いられている。藻類から被子植物まで、すでに1000種を超える植物種についてこの遺伝子の塩基配列が決定されている。本章ではわれわれの*rbcL*の塩基配列比較に基づくシダ植物の分子系統学的研究を中心に紹介したいと思う。

さて、*rbcL* 遺伝子は（１）リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼという光合成における炭酸固定の最初のステップをつかさどる酵素の大サブユニットをコードする遺伝子で、（２）葉緑体 DNA 上にある。したがって、通常、母性遺伝をし、１個体には１種類のゲノムしか存在しない。（３）長さは約1500塩基対で、構造遺伝子としては平均的な長さである。（４）光合成をつかさどる重要な遺伝子で、きわめて保存的であり、被子植物とシダ植物間で比較してもアミノ酸レベルで92%、塩基レベルでも80%は同じである。

*rbcL* が系統解析にこれ程までよく用いられているのは、以下のような利点があるからである。

（１）*rbcL* は、すべての緑色植物に通常１コピーだけ存在している（実際細胞あたりには何万コピーも存在しているが、これらは元の１コピーが発生の過程で増幅したものにすぎない）。したがって、ナンバンギセルのような光合成能を失った全寄生の植物以外ならどんな植物でもこの遺伝子を調べることができる（全寄生の植物では*rbcL* が欠失していることが多い）。また、比較する際に相同性の問題も起きない。一方、重要な機能を持つ核遺伝子では多重遺伝子族を形成しており、一つの個体に特定の遺伝子が複数コピー存在することが多い。それゆえ、比較の際にはどのコピーを比較しているかが問題になる。

（２）藻類から被子植物まで1000種以上の幅広いデータの蓄積がある。したがって、外群などとして比較する塩基配列も容易に得られる。

（３）*rbcL* は挿入・欠失などの DNA の長さを変えるような変化がほとんどない。実際、シダ植物と種子植物を比べても両端の部位以外は全く同じ長さである。このことは当然ながらアラインメントが容易かつ確実におこなえることにつながる。また、ダイレクトシーケンス法では AAAAAA のように同じ塩基が多数つながっているような部位においてその数を正確に知ることは困難であることが多い。DNA の長さを変える突然変異が少ないことは塩基配列決定がより容易となるのである。

（４）*rbcL* ではとくに保存性の高い部位が散在している。実際、シダ植物から被子植物まで幅広い分類群につ

いて共通のプライマーを用いて PCR 増幅が可能である。しかも、ダイレクトシーケンスしやすいように 500-600塩基対程度の長さの断片を増幅することも容易である。

（５）*rbcL* は進化速度のかなり遅い遺伝子ではあるが、同属内の比較的近縁な種間の比較をする際にも、それなりには変異がみられる。これは、コードするタンパク質のアミノ酸配列にほとんど影響を与えないコドンの３番目の塩基の置換がどのような遺伝子でも同じように、ほぼ最高の速度（偽遺伝子と同じ速度）で起こっていること（Li *et al.*, 1985）を考えると容易に納得できる。したがって、*rbcL* は近縁な種間から大系統群（たとえば科）間まで、もちろん得られる解像度は場合によって異なるが、幅広いレベルの系統解析に使うことが可能である。

## *rbcL* の塩基配列比較に基づく植物の 系統解析の実例

この章では、科間から種複合体の内部までさまざまなレベルの系統解析に *rbcL* を適用した実例を紹介することによって、*rbcL* の有用性を示したい。

### （１）被子植物の科の間の系統関係

一般的に、被子植物はひとつの科の中では形態学的に互いに似ており、多くの科は識別可能である。しかし、科の間の系統関係の解析は、従来の比較形態学的方法では広い範囲の植物で共通して比較できる形質が少ないため、手のつけようがない大問題であった。また、従来用いられていたアロザイム多型や葉緑体 DNA の RFLP 解析などの分子系統学的手法も科レベルの解析には、得られるバンドのパターンが違いすぎて適用できなかった。

Chase *et al.* (1993) は、被子植物の科をおおよそ一通り網羅する約500種について *rbcL* の塩基配列を決定・比較して、最大節約法により分子系統樹を作成した。これにより、被子植物の科レベルの大まかな系統関係が解明された。同時に、系統的にまとまりのない（単系統群でない）科も少なからず見出された。いずれにしても、被子植物を研究材料とする多くの進化生物学者にとって Chase *et al.* (1993) の系統樹は参考になるはずである。植物を材料とする進化生物学者は一度この系統樹を用いて自分の材料の系統学的位置を確認してみることをお薦めする。

### （２）チャセンシダ科（*Aspleniaceae*）内種間の系統関係

次に、一つの科の中の解析例としてチャセンシダ科に関するわれわれの研究を紹介したい。チャセンシダ科は700種以上を含むシダ植物の中では最も大きな科の一つ

*rbcL* の塩基配列比較により最大節約法を用いて描いたもの。枝の上の数字は10,000回のブートストラップ検定を行った際の各枝の再現率(%表示)。図の右側：模式的な葉の切れ込みの程度(単葉, 1回羽状複葉, 2回以上の羽状複葉の3段階)。四角の囲み：自然雑種が知られている種群。矢印：従来オニヒノキシダの両親種と考えられていたもの。

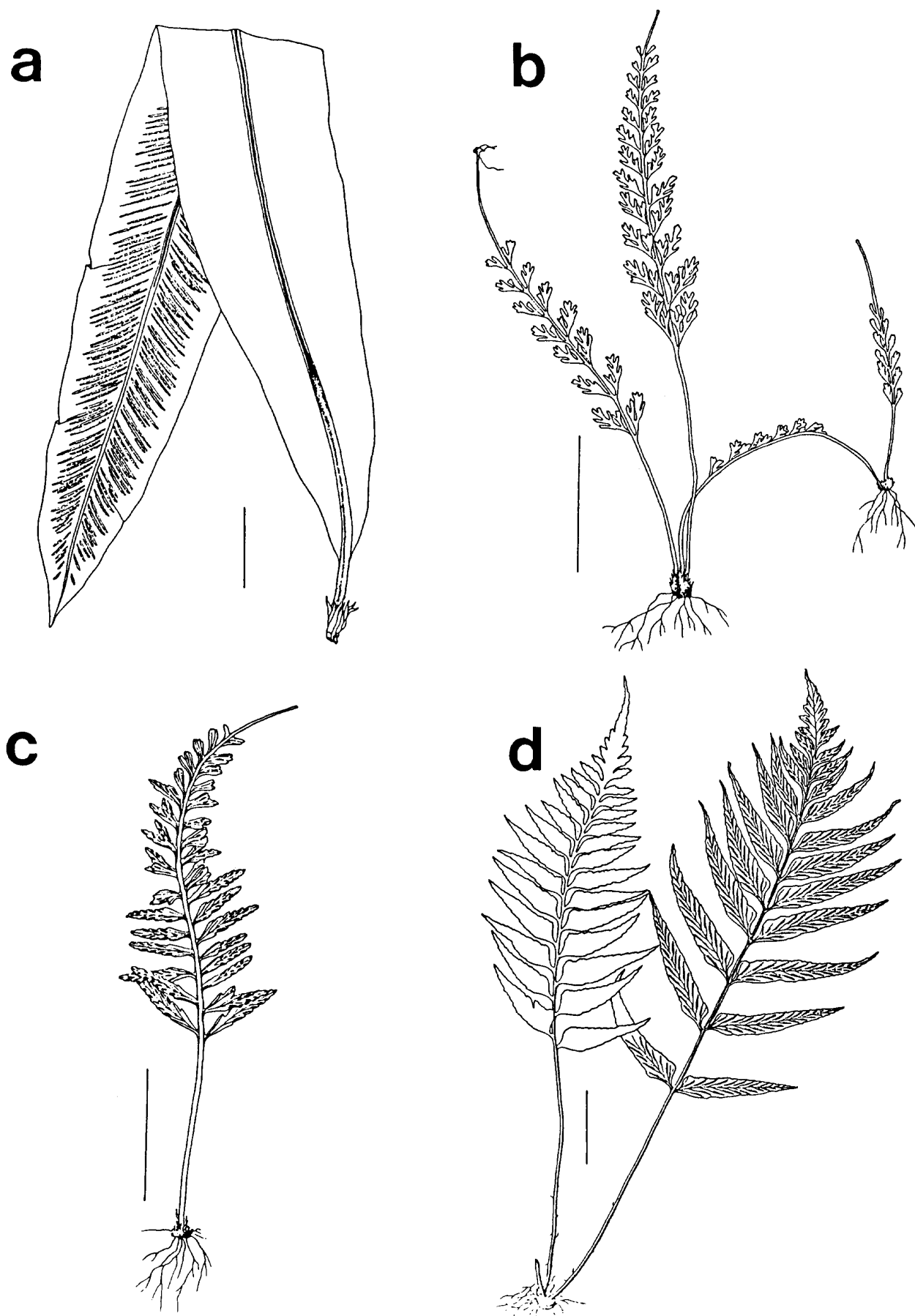


図3. オオタニワタリ (a), ヒノキシダ (b), オニヒノキシダ (c), クルマシダ (d) の外部形態.  
棒の長さ: 5 cm.

である。形態学的にもチャセンシダ科はよくまとまっており、科全体として単系統群であることはほぼ疑いがなかった。しかし、科内の系統関係となるとさっぱり分かっておらず、したがって、どのように属を設定するかに定説がない状態であった。われわれは、チャセンシダ科の中で形態の大きく異なる種群をできる限り網羅するように日本産の種を中心に、27種を選んで、その *rbcL* の塩基配列を決定し、最大節約法で分子系統樹を作成した。得られた系統樹が図2である。枝の上の数字は10,000回のブートストラップ検定を行った際の各枝の再現度を%表示したものである。かなりの割合で、その値は100%に近くを示しており、解像度と信頼度の高い系統樹が得られたと言ってよいであろう。

チャセンシダ科では、葉の切れ込みの程度に多様性が見られる。そこで、図2の右側には、単葉、1回羽状複葉、2回以上の羽状複葉の3段階でそれぞれの種の葉の切れ込みの程度を模式的に示した。これを見ると、たとえば単葉は独立に少なくとも5回は進化しており、葉形は系統を反映していないことがわかる。さらに、たとえばオオタニワタリ (*Asplenium antiquum* Makino) とヒノキシダ (*A. prolongatum* Hook.) は図3のaとbのように外見上は大きく異なっている。しかし、*rbcL* の分子系統樹では、ごく近縁であることが示されている。この類縁関係などは形態からでは想像だにできなかった結果である。

この、系統関係をよく反映した現象として、自然雑種の存在がある。図2では、そのあいだで自然雑種が知られている種群を四角で囲ってある。これを見ると、近縁な種群内でのみ自然雑種が形成されている。先に述べたオオタニワタリとヒノキシダがオニヒノキシダ (*A. kenzoi* Kurata, 図3c) という種間雑種を作っていることもわれわれは見出した。これまでの研究者は似てもつかないオオタニワタリとヒノキシダが雑種を作るとは考えてもみなかったもので、以前から知られていたオニヒノキシダをヒノキシダとクルマシダ (図3d) の雑種とできてしまったのである (Kurata, 1962)。以上のように *rbcL* による分子系統学的解析は、科以下のレベルの解析にもきわめて有効である。

### (3) ホウビシダ属 (*Hymenasplenium*) 内種間の系統関係

ホウビシダ属は、チャセンシダ科にあって背腹性のある長くはう根茎をもつことで特徴づけられる一群である。その単系統性はほぼ疑いがなかったものの、ほかのチャセンシダ科の種との関係は不明であった。ホウビシダ属はチャセンシダ科の多様化の初期に他の種群と分化した、いわば原始的な単系統群であることが分子系統樹により示された (図2)。そこで、さらにホウビシダ属に含まれる種間の系統関係も *rbcL* の塩基配列決定と比

較によって調べた (図4)。チャセンシダ科全体の系統関係を示した図2より解像度と信頼度は低くなっているが、いくつかの興味深い進化学的な議論には十分な解像度である。この系統樹に基づいて、ホウビシダ類の形質進化を考察してみる。

ホウビシダ属では無配生殖をする種がいくつも知られている。無配生殖とは、動物の単為生殖と同等のものである。図4では無配生殖をするものは網掛けで示してある。これを見るとホウビシダ属では、少なくともアジアで3回、新世界で1回の合計4回、独立に無配生殖が進化していることがわかる。ホウビシダ、タイワンホウビシダは日本に無配生殖型のみが知られるが、それぞれと形態的には区別がつかない2倍体雄性生殖型を中国で見つけた。どちらの場合でも日本の無配生殖型と中国の有性生殖型がごく近縁であることが図4で確認できる。

ヒメタニワタリ (*H. cardiophyllum* N. Murakami) は、小笠原の母島、沖縄の北大東島、および中国の海南島の3カ所だけに隔離分布する種で、ハート型の特殊な葉をもっている (図5)。少なくとも葉形だけを見るとホウビシダ類とは似ても似つかないが、図4の分子系統樹によるとホウビシダ類に類縁のあること、さらにホウビシダ類の多様化の歴史の中では比較的最近にナンゴクホウビシダ (*H. cataractarum* (Rosenst.) N. Murakami) やホウビシダ (狭義, *H. hondoense* (N. Murakami et Hatanaka) Nakaike) のもとになった群から進化したことがわかる。これもまた、葉形が短時間で大きく変化することを示している。

アジア産のヤクシマホウビシダ (*H. obliquissimum* Hayata) と中南米産の *H. obtusifolium* L. は共に溪流沿いのいつも水しぶきのかかる半水生の特殊な環境に生育し、細胞間隙の消失した特殊な薄い葉をもつ (図6)。このように特定の生物が特異な生育環境と形態を両方もっていると、それだけで環境と形態の間に因果関係を考えてしまいがちである。しかし、これは正しくない。たとえば、ヤクシマホウビシダと *H. obtusifolium* が単系統群だとすると、これら2つの性質を共通の祖先で1回獲得すればよいことになる。過去に1回だけ起こったことに必然性 (起こった理由) が存在するとは限らないので、これではその進化を考えても意味はない。ところが、図4の系統樹をみると、ヤクシマホウビシダと *H. obtusifolium* は、ホウビシダ類の中では比較的遠縁である。しかもそれぞれ、ウスバクジャク (*H. cheilosorum* Tagawa) や *H. riparium* N. Murakami といった通常の陸上性の生育環境と細胞間隙も発達した葉をもつ種と近縁である。ホウビシダ類の中では特殊な薄い葉はそれぞれ2回独立に、半水生の生育環境と関連して進化したことになる。したがって、半水生の生育環境

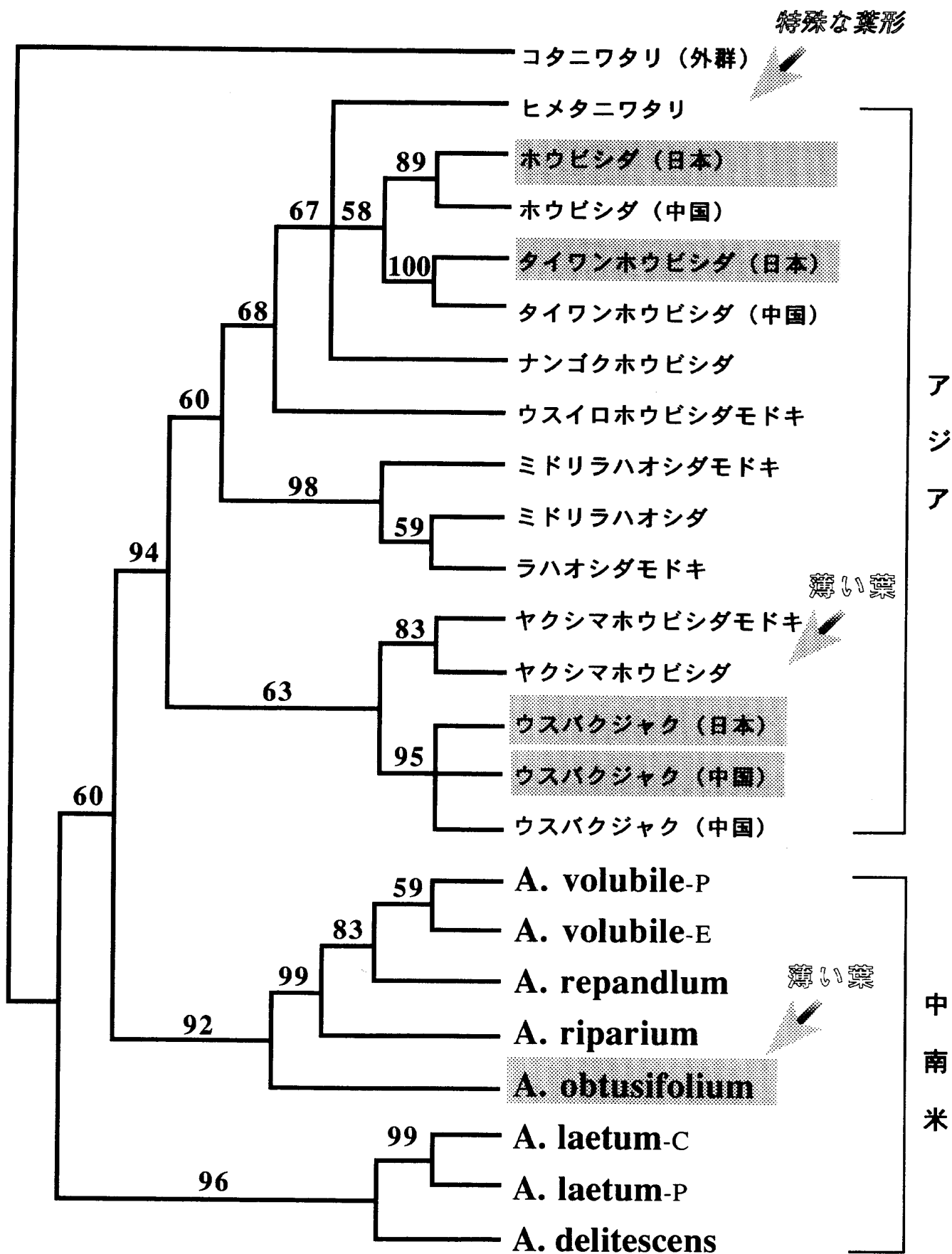


図4. ホウビシダ属の分子系統樹 (Murakami, 1995).  
系統樹の表示方法は図2と同様。網掛け 無配生殖種。

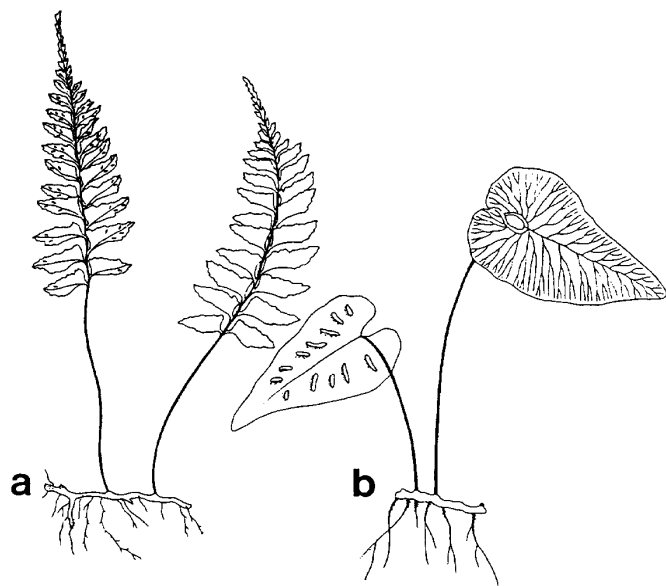


図5. ホウビシダ (a) とヒメタニワタリ (b) の外部形態。

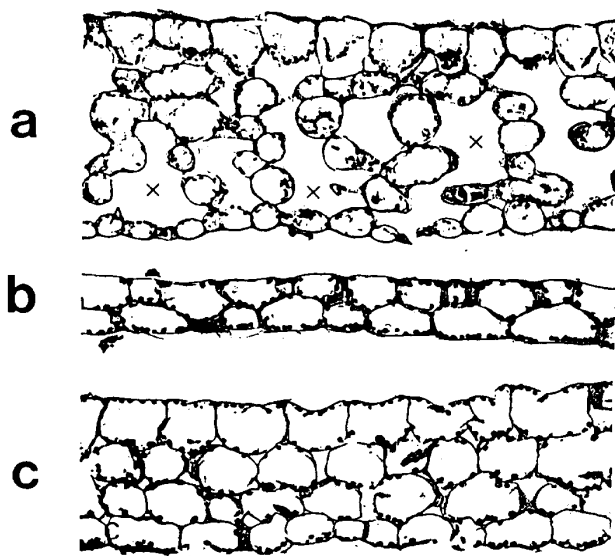


図6. ホウビシダ類の葉の断面。  
通常のホウビシダ類 (a), ヤクシマホウビシダ (b),  
*Hymenasplenium obtusifolium* (c)。

に適應して細胞間隙のない薄い葉が進化したと推論することが可能になる。このように系統関係を解明することで、ホウビシダ類のもつ興味深い形質の進化を科学的に議論できたのである。

#### (4) ヤクシマホウビシダの近縁種複合体の解析

ヤクシマホウビシダは、上で述べたように半水生の生育環境に適應した細胞間隙のない薄い葉（細胞2層）をもつ特異な種である。ところが、中国からインドシナ、ヒマラヤの地域には、これと近縁で外観はそっくりであ

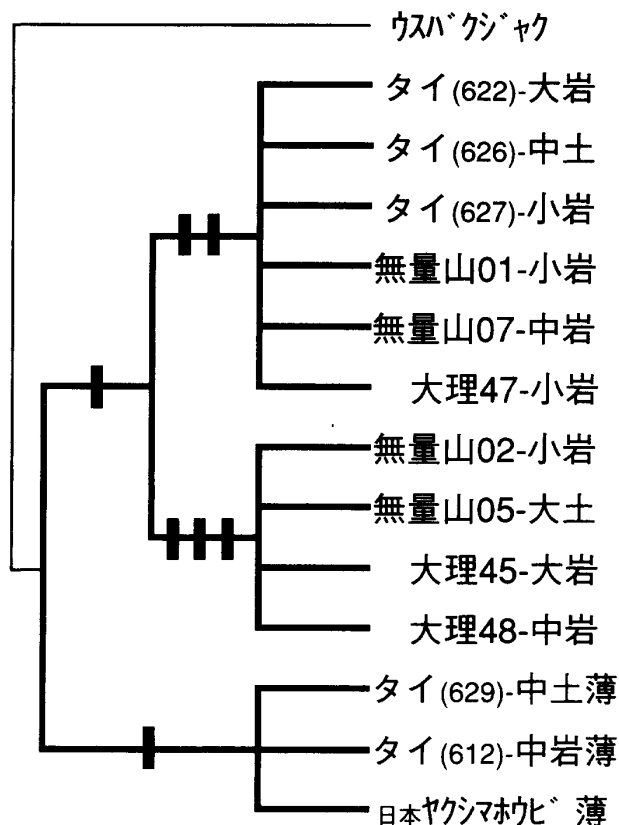


図7. ヤクシマホウビシダ複合体の分子系統樹（村上未発表）。  
それぞれの植物サンプルの産地、植物体の大きさ、生育環境および葉質を示す。

るが、細胞層が3層以上あり細胞間隙も発達する種も存在している。我々はこれを仮にヤクシマモドキ群と呼んでいる。中国の雲南省の数カ所とタイのドイ・インタノン山で採集した約20個体のヤクシマホウビシダおよびヤクシマモドキ類について、その *rbcL* の塩基配列を決定・比較して、系統樹を構築した（図7）。系統樹を作る上で意味をもっていた塩基置換をそれぞれ系統樹の枝ごとに短い太線で示してある。ヤクシマホウビシダ複合体では、もはや7つの塩基置換しかなかったわけである。それでも図7は、ヤクシマホウビシダ複合体には少なくとも3種あるらしいことを強く示唆している。これらの種は外部形態では、ほとんど識別が不可能で、DNA を調べて初めて認識できたものである。*rbcL* の塩基配列の比較は、このような近縁種群複合体の解析にも有効なのである。

以上のように、*rbcL* は科間から近縁種間、種内まで幅広い系統解析に有効である。

#### *rbcL* 遺伝子の欠点

これまで *rbcL* の長所を強調して話を進めてきたがも

ちろん欠点もある。欠点としては次の2点が挙げられる。

(1) *rbcL* は近縁な種間の比較をおこなう際には、やはり変異量が少ない。アミノ酸レベルではきわめて保存的なので、とくにコドンの1, 2番目の塩基は、ほとんど変化しない。変異が少ないことは、そのまま系統関係を示す情報が少ないことにつながる。

(2) *rbcL* には塩基置換のとくに起こりやすいホットスポットがある。5%程度の塩基配列の違いがあるような分類群を比較解析した場合、もし、コドンの3番目の塩基だけがどこも同じように塩基置換するならば、よりによって同じ塩基座位で多数回置換が起きていることはほとんどないはずである(木村 1986)。ところが、実際 *rbcL* では、このような状況下でも少なからぬ塩基座位で多数回の置換が見られる。このような座位をホットスポットと呼んでいる。同じ場所で何回も塩基置換が起これば当然ながら系統解析のための情報が失われるので、これは変異が少ないよりも大きな問題である。

系統解析における *rbcL* 遺伝子の有効性はホットスポットのおかげで限られる。有効なのは、経験的に言うと次の場合である。塩基配列が1-2%程度しか異なっておらずホットスポットでもまだ多数回置換が起きていない近縁種群、あるいは塩基配列が5-10%程度異なっておりホットスポット以外の座位でもホットスポットの悪影響を上回るほどの変異が生じている遠縁の群間で比較解析を行なう場合である。

## 今後の展望

*rbcL* のホットスポットの問題の解決策としては、ホットスポットの位置を特定して、系統解析の際にその部分を除く、あるいは形質の重みづけで軽くするなどが考えられる。これらの研究は、三中信宏(農水省農環研)、大井和之(九大理学部)両氏と計画なので、近いうちに改良策を示すことができると思う。しかし、同時に *rbcL* で高い解像度が得られないような分類群の系統解析のための技術開発も絶対必要であろう。PCR法やダイレクトシーケンシングなどの分子生物学の基本的な技術はわれわれ自身で改良できるようなものではない。われわれがすべきことは、*rbcL* よりすぐれた系統解析用の遺伝子を開発する(具体的に言うとプライマーを設計する)ことであろう。新しい系統解析用遺伝子となるために必要な条件を列挙すると次のようになる。

- (1) 大部分の緑色植物に少数コピーだけ存在する。
- (2) 挿入・欠失などDNAの長さを変える突然変異が少ない。
- (3) 保存性がとくに高い部位がある。
- (4) 分子進化速度が *rbcL* より速い(とくにコドンの

1, 2番目)。

- (5) とくに多数回置換が起こりやすい座位(ホットスポット)がない。

(1) から (3) は、*rbcL* のもっていた長所であり、この長所を欠くりボソームRNAの遺伝子(多数コピーが存在する)やスペーサー部分のDNA(遺伝子間の何も遺伝情報をもたない部分で挿入・欠失が多数起きる)などでは、系統解析用として *rbcL* と同等以上に有用であることは期待できない。(4), (5) は、*rbcL* の欠点を補うという意味である。本稿の後の記事の中で紹介されるであろう葉緑体DNA上の遺伝子 *matK*, あるいは *ndhF* などは *rbcL* より進化速度が2-3倍速いことが報告されている(Johnson & Soltis, 1995; Olmstead & Reeves, 1995)。ホットスポットや保存性の問題(どのくらい汎用性のあるプライマーが設計できるか)がみつからなければ、とくに近縁種群の系統解析では *rbcL* よりも有用であることが期待できる遺伝子である。今後の研究に期待したい。いずれにしても、*rbcL* は、ホットスポットの問題などはあるものの、その解析の簡便さ(塩基配列の決定・比較しやすさ)と適用範囲の広さから、これからも植物の系統解析の最初の一手として利用され続けることであろう。

## 引用文献

- Chase, M.W., D.E. Soltis, R.G. Olmstead, D. Morgan, D.H. Les, R.D. Mishler, M.R. Duvall, R.A. Price, H.G. Hills, Y.-L. Qiu, K.A. Kron, J.H. Rettig, E. Conti, J.D. Palmer, J.R. Manhart, K.J. Sytsma, H.J. Michaels, W.J. Kress, K.G. Karol, W.D. Clark, M. Hedroen, B.S. Gaut, R.K. Jansen, K.-J. Kim, C.F. Wimpee, J.F. Smith, G.R. Furnier, S.H. Strauss, Q.-Y. Xiang, G.M. Plunkett, P.S. Soltis, S. Swensen, S.E. Williams, P.A. Gadek, C.J. Quinn, L.E. Eguiarte, E. Golenberg, G.H. Learn, Jr., S.W. Graham, S.C. Barrett, S. Dayanandan & V.A. Albert 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from plastid gene *rbcL*. *Ann. MO Bot. Gard.* 80: 528-580.
- Harvey, P.H. & M.D. Pagel 1991. *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Johnson, L.A. & D.E. Soltis 1995. Phylogenetic inference in Saxifragaceae *sensu stricto* and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* se-

- quences. Ann. MO Bot. Gard. **82** : 149-175.
- 木村資生 1986. 分子進化の中立説 紀伊国屋書店.
- Kurata, S. 1962. Notes on Japanese ferns. J. Geobot. **27** : 66-69.
- 村上哲明 1993. 三中氏の原稿に対するコメント. 日本植物学会ニューズレター **70** : 20-23.
- 村上哲明・瀬戸口浩彰・河原孝行・津村義彦 1995. PCR法の植物系統学への応用. 島本功・佐々木卓治 (編) 植物のPCR実験プロトコール p. 147-152. 秀潤社.
- Murakami, N. 1995. Systematics and evolutionary biology of the fern genus *Hymenaspium* (Aspleniaceae). J. Plant Res. **108** : 257-269.
- Li, W.-H., C.-C. Luo & C.-I. Wu 1985. Evolution of DNA sequences. In: R.D. MacIntyre (ed.) Molecular Evolutionary Genetics. p. 1-94. Plenum Press, New York.
- Olmstead, R.G. & P.A. Reeves 1995. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. Ann. MO Bot. Gard. **82** : 176-193.
- Swofford, D.L. 1993. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.