

RAPD マーカーを用いたスギのジーンマッピングに向けての基礎的研究

九州大学農学部 松田 学・白石 進

1. はじめに

近年の分子生物学的技術の向上により、今まで、林木育種では困難であったDNA分子マーカーの利用が可能となってきた。特に、今日では、DNA分析にとってなくてはならない技術がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。PCRが1985年に発表されてから、いままでに多くのPCRを利用した分析方法が紹介されている^{1,2)}。そのひとつに、1991年にWilliamsらによって開発されたRAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法がある³⁾。この方法は一般的なPCR遺伝子増幅とは異なり、ゲノム全体から任意に5~10の遺伝情報を増幅する方法である。

標識遺伝子として、RAPDマーカーを用いる利点は、簡便に数多くのマーカーを開発できることであり、これは今後、林木育種をより効率的に進めるために不可欠な高密度のジーンマップ作成に適している。RAPDマーカーのほとんどは優性マーカーであるため、このマーカーでジーンマッピングのための連鎖解析を行う上では、戻し交配等の交配実験が必要である。針葉樹では胚乳(雌性配偶体)が母樹由来の半数体であるため、この組織から抽出したDNAを用いて、RAPD分析できれば交配実験の必要はなくなる。

本研究では、スギにおいてRAPDマーカーを用いたジーンマッピングを進める上での基礎研究として、極めて微小な組織である雌性配偶体を利用して、迅速なジーンマッピングが可能であるかを検討した。特に、DNA抽出法について検討を加え、1雌性配偶体からRAPD分析に十分使えるだけのDNA量が採れるかについて検討するとともに、増幅条件についても検討した。

2. 材料と方法

(1) 材料

供試母樹個体としては、農林水産省林木育種センター九州育種場の採種園に植栽されている早良1号を使用した。

(2) DNA抽出

各雌性配偶体からのDNA抽出はSDS法を改良して行った。各種子から雌性配偶体を取り出し、400 μ lのDNA抽出溶液(50mM Tris-HCl, pH9.0, 1% (W/V) SDS, 10mM EDTA, 0.5% (V/V) 2-メルカプトエタノール)に入れ、65 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。200 μ lの7.5M酢酸アンモニウムを加え混合した後、30分間氷上で静置した。遠心分離(15000rpm, 40分, 2 $^{\circ}$ C)後、上澄みを回収し、700 μ lのイソプロパノールを加え、15分間室温で放置しDNAを析出させた。DNAを遠心分離した後、70%エタノールで洗浄し、減圧乾燥後、適当量の滅菌水に溶解させた。

(3) PCR

PCRは全容量10 μ lで行った。反応溶液の組成は50mM Tris-HCl, pH8.5, 5mM MgCl₂, 500 μ g/ml BSA, 2% Ficoll400, 4mM タートラジン, 0.5mM dNTP, 0.25 μ M プライマー(5'-GCCCTACGCG-3'), 0.4units/10 μ l DNAポリメラーゼ, 2ng/10 μ l 鋳型DNAである。反応サイクルは、第1段階; 93 $^{\circ}$ C 1分, 第2段階; 93 $^{\circ}$ C 10秒, 36 $^{\circ}$ C 30秒, 36 $^{\circ}$ C 1分を60サイクル, 最終段階; 72 $^{\circ}$ C 2分である。

(4) 電気泳動および多型分析

PCR産物は1%アガロースゲルを使い、エチジウムブロマイドを含むTBE緩衝液で3時間から3時間半泳動した後、トランスイルミネーター(302nm)で検出した。

3. 結果および考察

(1) DNA抽出溶液のpHとDNA収量との関係

抽出溶液のpHと得られたDNA量を比較するため、pHを4段階(8.0, 8.5, 9.0, 9.5)に設定し、各段階に6サンプルずつ計24サンプルを用いて検討した。

まず、雌性配偶体と胚を合わせた種子重量と抽出DNA量との関係を図1に示した。種子重量とDNA量間に比例的な関係(相関係数 $r=0.61$)がみられた。このことから種子重量が多いほどDNA量が増す傾向が認められた。

次に、種子重量当たりのDNA収量と抽出溶液のpHとの関係を図2に示した。この図から、抽出溶液のpHがDNA収量に及ぼす影響は少ないが、pH9.0のものが若干良いように思われる。そこでpH9.0の抽出溶液を用いて、雌性配偶体182個について調べた結果、雌性配偶体1個当たりの平均DNA収量は2.1 μ gで、少ないもので1.0 μ gあった。

(2) PCRにおける鋳型DNA量の検討

スギでは雌性配偶体1個当たり少ないもので1.0 μ gしか得られず、多数のプライマーを用いた分析を進める上で、このDNA量は大きな制約となる。そこで、鋳型DNA量について再検討を行い、泳動像の解析に有効なRAPDバンドパターンが得られる最低の鋳型DNA量を求めた。鋳型DNA量を10, 4, 2, 1ngの4段階にしてPCRを行った。結果を図3に示した。この結果から、10ngから1ngまでの鋳型DNA量の違いによるPCR増幅には大きな差のないことが判明した。さらに、鋳型DNA量を2ngと1ngに絞って増幅の違いを検討し

た。両者間に余り差異は見られないが、2ngの方が多少増幅が良かった。また、雌性配偶体のDNA収量が少ないものでも1.0 μ gあり、500回分のRAPD分析が可能となることから、この鋳型DNA量(2ng)を使用することとした。

最後に、塩基配列の異なる3プライマーを用いてRAPDを行った結果を図4に示した。1母樹由来の各雌性配偶体DNA間で、バンドの有無が確認された(図中矢印)。

以上の結果から、スギにおいても雌性配偶体を利用することにより迅速なジーンマッピングが可能であることが判明した。

引用文献

- (1) PCRとその応用 羊土社
- (2) 遺伝子増幅PCR法 共立出版株式会社
- (3) J. G. K. Williams, etc: Nucleic Acids Res Vol. 18 No.22 : 6531~6535,1990

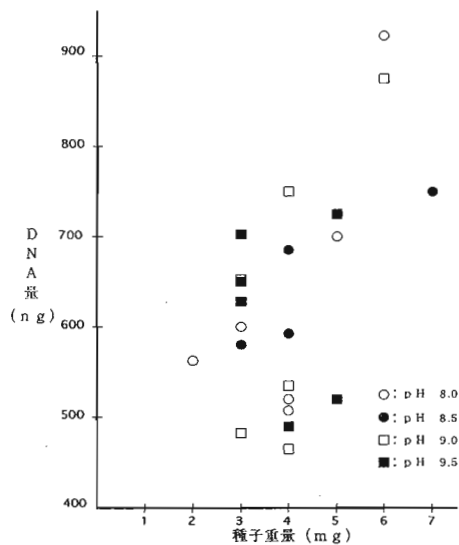


図-1 種子重量とDNA量

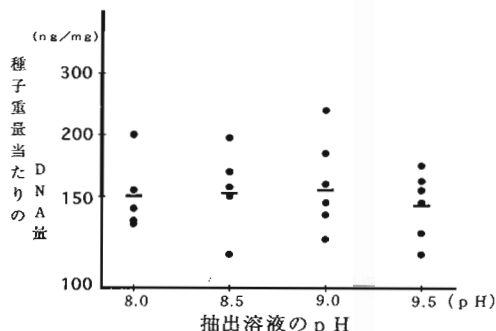


図-2 抽出溶液pHの抽出DNA量への影響

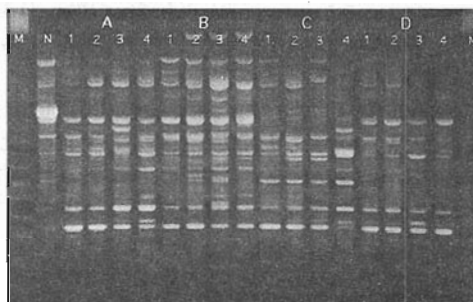


図-3 鋳型DNA量のRAPDへの影響

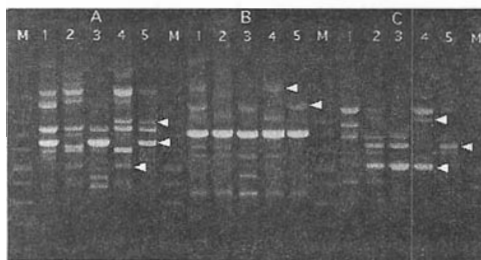


図-4 雌性配偶体DNAを用いたRAPD