

アルファプライマー法を用いたスギのDNA分析

九州大学農学部 富田 啓治・深田 俊武
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、林木育種へのDNA分子マーカーの利用が可能となってきた。特にPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法はDNAの特定の領域を増幅することで、遺伝情報本体であるDNAを直接調査することができる。そのなかでも1991年にWilliamsらによって開発されたRAPD(random amplified polymorphic DNA)法¹⁾は、ゲノム全体から任意に数箇所のDNA領域を増幅させる方法であり、DNA分子マーカーとして非常に有用な手法の一つである。

アルファプライマー法²⁾は、動植物、微生物のDNAシーケンスデータをもとに設計されたプライマー(主として12塩基長)を用いる、RAPD法の一つといえる。

本研究ではこの10種類のアルファプライマーを用いて、スギ精英樹の分析を行い、クローン同定法として利用できるかどうかの検討を行った。

2. 材料と方法

(1) 供試材料

農林水産省林木育種センター九州育種場に植栽されているスギ精英樹20個体を用いた(表-1)。

(2) DNA抽出

スギ針葉組織から、CTAB法³⁾を改良して抽出し、ELU-QUIK(Schleicher & Schuell社)を用いて精製した。

(3) 分析方法

PCR反応は、50mM Tris-HCl, pH8.5, 5mM MgCl₂, 500μg/ml BSA, 0.5mM dNTP, 2.0% (w/v) Ficoll 400, 4mM Tartrazine, 0.01mM EDTA, 0.4units/10μl *Tth* DNA Polymerase, 0.25μMプライマー, 10ng/10μl 鋳型DNAの溶液組成を用いて、93°Cで1分間熱変性したのち、93°C10秒(変性)-50°C30秒(アニーリング)-72°C1分(伸長)を40回繰り返す、最後に72°Cで2分間の伸長を行った。

本研究ではBEX社製のコンプライマー10種類を

用いた(表-2)PCR反応による増幅産物は、1.5%アガロースゲルを用い、TBE緩衝液で約3時間電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、302nmUVトランスイルミネーター上で観察した。

表-1 供試材料

精英樹名			
1. 八女	6号	11. 東臼杵	34号
2. 浮羽	10号	12. 熊本署	5号
3. 長崎署	6号	13. 日田	7号
4. 南高来	3号	14. 薩摩	17号
5. 諫早	2号	15. 始良	20号
6. 神崎	4号	16. 熊毛	32号
7. 藤津	15号	17. 日南	2号
8. 佐賀	3号	18. 球磨	5号
9. 玖珠署	2号	19. 綾署	3号
10. 阿蘇	9号	20. 俣肥署	8号

計20個体

表-2 使用したプライマーの塩基配列とGC含量

プライマー	塩基配列	GC含量 (%)
A-04	GCC CCG TTA GCA	66.7
A-40	GCG GAG GAA CCA	66.7
A-48	CCG CAG GGA CCA	75.0
A-70	GGT GAC TGG TGG	66.7
A-81	GGC GAG GGA GGA	75.0
A-86	TTC TGG GGC GTT	58.3
A-99	GCG GTC AGC ACA	66.7
B-26	GGC GGC ACA GGA	75.0
B-66	ACC ACT CCC GCA	66.7
B-79	ACT GAG GGG GGA	66.7

3. 結果と考察

本研究では10種類のプライマーのうち、2種類を等量ずつ混合してPCR反応を行う方法も用いたため、プライマーをそれぞれ単独で用いた場合と併せて、55通りのプライマーの組み合わせで実験を行った。プライマーを単独で用いた場合と2種類を混合して用いた場合

の泳動像の例を図-1 (A-86) と図-2 (A70 + A-86の混合) に示した。プライマーを2種類混合する場合、それぞれのプライマーを単独で用いて反応を行ったのも同時に泳動し、混合プライマーで特異的に検出されるバンドのみを用いた。

この55通りのうち、明瞭な多型を示した6通りのプライマー組合せから、12の多型バンドが得られた。得られた多型バンドのうち最も短いものは約240bpで、最も長いものは約740bpであった。これらのバンドの有無により、各供試個体のDNA型を整理した。その結果、18個体は固有のDNA型を示し、2個体は同一のDNA型を示した。この2個体は高い頻度で出現するDNA型を示したため、今回分類することができなかったが、さらにプライマーを増やすことで、この2個体の識別が可能であると考えられる。

各プライマー毎の個体識別能は表-3に示すとおりである。6通りのプライマー組合せをすべて使用した場合、平均的な判別能は 1.7×10^{-3} となり、約500個体の識別が可能である。また最低判別能は 7.3×10^{-3} であった。

今回行ったようにプライマーを2種類混合することによって、プライマー1種類を単独で用いた場合より情報量が増え、かつ低分子側に多くのバンドが表われるために、移動度の違いが正確に判読できる場合が多かった。

また、通常RAPD法で使われるプライマーのGC含量が50~60%であるのに対し、今回使用したプライマーのGC含量は高く設計されており、かつプライマー長も12merと長いいため、PCR反応におけるアニーリング温度を高くすることが可能である。これにより、1サイクル当たりの反応時間を短縮することができた。また、サイクル数¹⁾も40回と少なく設定したが、分析に十分なPCR産物を得ることができた。

以上の結果から、アルファプライマー法は従来のRAPDプライマーと同様にクローン同定に利用可能であることが示された。

引用文献

- (1) 松田 学ほか：日林九支研論，47，107 - 108，1994
- (2) MURRAY, M.G., THOMPSON, M.F.,:Nucleic Acids Res., 8, 4321 - 4325, 1980
- (3) NAKAMURA. *et al.* : 育種学雑誌 (別冊2) 40, 456 - 457, 1990
- (4) WILLIAMS, J. G. K. *et al.* : Nucleic Acids Res., 18, 6531 - 6535, 1990

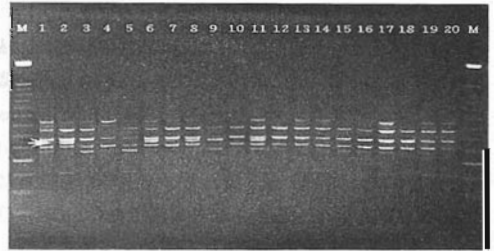


図-1 プライマーA-86による泳動像
M : サイズマーカー

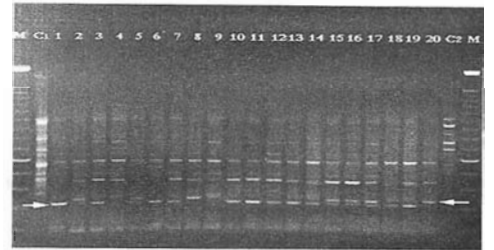


図-2 A-70 + A-86による泳動像
M : サイズマーカー
C₁ : A-70単独での熊毛32号 (レーン16) のPCR産物
C₂ : A-86単独での熊毛32号 (レーン16) のPCR産物

表-3 各プライマーのクローン識別能

プライマー	各プライマーの判別能			6プライマー組合せによる判別能		
	最低値	平均値	最高値	最低値	平均値	最高値
A-04	1.2×10^{-1}	0.9×10^{-1}	0.2×10^{-1}			
A-04+B-66	2.8×10^{-1}	2.0×10^{-1}	0.3×10^{-1}			
A-70+A-86	6.0×10^{-1}	4.2×10^{-1}	0.7×10^{-1}			
A-48+A-86	5.5×10^{-1}	5.1×10^{-1}	4.5×10^{-1}			
A-86	7.5×10^{-1}	6.3×10^{-1}	2.5×10^{-1}			
B-66	8.5×10^{-1}	7.5×10^{-1}	1.5×10^{-1}			
				7.3×10^{-3}	1.7×10^{-3}	7.1×10^{-3}