

DNA分子マーカーを用いたアカシデ個体群における繁殖構造の解明

九州大学農学部 渡辺 敦史・白石 進
宮崎大学農学部 伊藤 哲

1. はじめに

森林における繁殖構造を解明するためには、構成樹種の交配様式、個体群の密度、サイズなど多くの要因を考慮する必要がある。遺伝情報の本体であるDNAマーカーとして利用することで個体間の親子関係が判明すれば複雑な繁殖構造の解明を進めるうえで有用な基礎データとなりうる。本研究ではDNA分子マーカーの1種であるRAPD⁹⁾ (random amplified polymorphic DNA) マーカーを利用し、アカシデ個体群における親子関係を解明するための研究手法の確立を目指した。

2. 材料と方法

(1) 調査地と供試個体：九州大学宮崎演習林内に設置された100×80mの調査プロットに生育するアカシデ全個体(39個体)を用いた(図-1)。また、これらの樹高、胸高直径(表-1)を測定し、親子関係の推定に利用した。

(2) DNA抽出とRAPD分析：DNA抽出は生葉100mgを用いCTAB法⁹⁾を改良して行った。

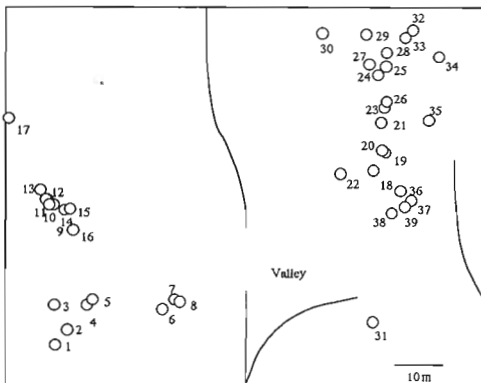


図-1 調査プロットにおける立木位置図
(アカシデのみ)

(3) RAPD分析におけるPCR (polymerase chain reaction) 反応液組成は、50mM Tris HCl pH 8.5, 5mM MgCl₂, 500μg/ml BSA, 0.5mM dNTP, 2.0% Ficoll 400, 4mM Tartrazine, 0.01mMEDIA 0.4units/10μl Tth DNA Polymerase, 0.25μM Primer, 10ng/10μl 鋳型DNAである。PCR増幅はまず94℃60秒間変性を行い、次に72℃0秒(変性), 36℃30秒(アニーリング), 72℃60秒(伸長)を1サイクルとし60サイクル行った。最後に72℃120秒間伸長反応させた。PCR産物は1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により検出した。

3. 結果と考察

(1) 有用プライマーのスクリーニング

本研究目的に合致したプライマーを探索するためにまずスクリーニングを行った。今後の実験を効率よく行うためには多型性が高く、バンドの判読が容易なB

表-1 供試個体

A group			B group		
	胸高直径	高さ	胸高直径	高さ	
1	4.4	5.2	18	12.2	9.0
2	14.1	17.6	19	14.5	13.0
3	6.2	7.5	20	19.6	13.0
4	5.8	8.0	21	22.2	13.0
5	13.8	14.7	22	12.5	11.0
6	4.6	5.5	23	23.0	16.0
7	100.0	12.0	24	8.1	9.0
8	5.7	12.0	25	4.5	7.0
9	15.0	13.5	26	3.4	6.0
10	14.5	13.0	27	4.1	7.0
11	5.2	5.5	28	3.8	6.0
12	3.9	4.5	29	9.5	11.0
13	7.4	8.0	30	7.4	8.0
14	5.5	5.0	31	4.0	8.0
15	4.8	4.5	32	10.7	8.5
16	3.0	4.2	33	9.7	7.5
17	7.0	7.5	34	14.5	10.0
			35	8.9	11.0
			36	18.8	10.5
			37	8.0	8.0
			38	14.5	9.0
			39	15.0	9.0

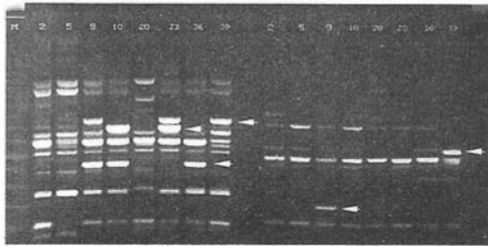


図-2 高多型性プライマーのスクリーニングの一例
(右: N-07, 左: V-05) 矢印は多型を示すバンド

表-2 各プライマーのMean 1-Fによる多型性の評価結果

プライマー	mean(1-F)値	プライマー	mean(1-F)値
A-16	0.49	O-13★	0.61
B-03	0.41	O-16★	0.81
B-11	0.50	O-18	0.70
B-12	0.18	O-19	0.70
B-18	0.51	P-04★	0.68
B-20	0.31	P-05	0.56
C-07★	0.68	R-05	0.60
C-09★	0.63	S-18★	0.57
J-01★	0.79	T-02	0.39
J-13★	0.81	T-03	0.48
J-14	0.23	T-09★	0.68
J-15	0.47	U-06★	0.69
J-18★	0.79	V-02★	0.55
K-06★	0.71	V-03★	0.75
K-16	0.47	V-05	0.61
L-17	0.32	V-06	0.70
M-04★	0.61	X-04	0.34
M-08	0.58	Z-01	0.66
M-18★	0.68	Z-02	0.30
N-03	0.52	Z-03	0.30
N-07★	0.56	Z-04	0.32
N-20★	0.54	Z-08	0.32
O-04	0.71	Z-09★	0.61

★最終的に本研究で使用したプライマー

表-3 使用したプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列	Mean 1-F値
C-07	5'-GTCCCGACGA-3'	0.63
C-09	5'-CTCACCGTCC-3'	0.63
J-01	5'-CCCGGCATAA-3'	0.79
J-13	5'-CCACACTACC-3'	0.81
J-18	5'-TGGTCGCAGA-3'	0.79
K-06	5'-CACCTTCC-3'	0.71
M-04	5'-GGCGGTTGTC-3'	0.61
M-18	5'-CACCATCCGT-3'	0.68
N-07	5'-CAGCCAGAG-3'	0.56
N-20	5'-GGTGCTCCGT-3'	0.54
O-04	5'-AAGTCCGCTC-3'	0.71
O-13	5'-GTCAGAGTCC-3'	0.61
O-16	5'-TCGCGGTTCC-3'	0.81
P-04	5'-GTGGGCTGAC-3'	0.68
S-18	5'-CTGGCGAACT-3'	0.57
T-09	5'-CACCCCTGAG-3'	0.68
U-06	5'-ACCTTCGGAC-3'	0.69
V-02	5'-AGTCACTCCC-3'	0.55
V-03	5'-CTCCCTGCAA-3'	0.75
V-06	5'-ACGCCAGGT-3'	0.70
Z-09	5'-CTCGGTATC-3'	0.61

ライマーを選抜する必要がある。プロット内の8個体を対象とし、102種類のプライマーを用いたRAPD分析の結果(図-2)から、多型バンドが2本以上確認できたプライマーは48個であった。これらについて、さらに1-F値の平均値³⁾(mean 1-F)を算出し、多型性の評価を行った(表-2)。mean 1-Fが大きいことは多型性の高いことを示しているため、この値が0.5以上であるプライマーの中からバンドが明確に判読できた21プライマー(表-3)を以後の実験に用いた。

(2) 調査プロット内における家系構造

選抜したプライマーを用いてプロット内の全個体についてRAPD分析した(図-3)。この結果から、RAPD分析の再現性を考慮し、バンドが濃く、確実にバンドの有無が判定できる29個のマーカ(バンド)を選んだ。また、本研究ではシステム上、PCRは全個体が1度で可能であるが、電気泳動には2枚のゲルが必要であった。そのため、ゲル間でのバンドの同定ミスを防ぐために、特定の個体(1, 20, 21, 39)を両ゲルで泳動することによって、確実にバンドの同定を行った。

調査プロット中央には沢があるため、これを境にアカシデ個体群はAグループ、Bグループの1つに分けることができる。なお、それぞれのグループの個体数は17個体(A)と22個体(B)である(図-1)。39個体のRAPDデータをもとに遺伝距離を算出し⁴⁾、AとBの各グループ内および両グループ間の平均遺伝距離を算出した(表-4)。Aグループ内の平均遺伝距離は0.40、Bグループ内は0.48、グループ間では0.49となり、グループ間の遺伝距離が各グループ内の値と比較して若干高かった。この結果から、調査したアカシデ個体群において弱い家系構造が形成されている可能性を示唆した。

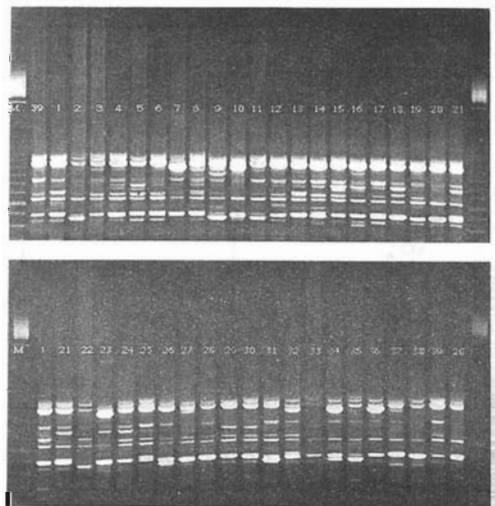
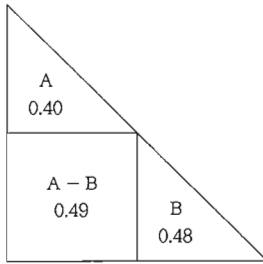


図-3 プライマーJ-13によるアカシデ39個体のRAPD分析の結果

表-4 A, Bグループ内および両者間の平均遺伝子距離



(3) 親子関係の検出

調査プロット内の全個体について、親子関係にあるか否かの検出(親子鑑定)を行った。親子関係にある3個体を仮定した場合、これら個体間のバンドパターンは8通りあり、それぞれのパターンに対応する遺伝子型は表-5のようになる。RAPDマーカーは優性マーカーであることからバンドが出現する場合は優性接合型(++)もしくはヘテロ接合型(+-)のどちらかの遺伝子型をもつ。逆にバンドがない場合の遺伝子型は劣勢ホモ型(--)となる。このことから8通りの中で両親にバンドがなく子供にバンドがあるパターンのみがメンデル遺伝の法則に反することになり、真に親子関係にある組合せでは出現し得ない。この原理を利用し、39個体間の組合せとして考えられ27417組合せについて、前出の29種類のマーカーによる各個体のDNA型データを用いて親子鑑定を行った。その結果、Aグループ内では7組、Bグループ内では6組、A、Bグループ間では157が親子関係にあると推定された。

この計170組合せについて、真の親子かを鑑定するために21プライマーで得られた全情報を利用したDNAフィンガープリント解析を行った。この場合もメンデル遺伝の法則から外れるバンドが1つでも検出された場合(両親にないバンドが出現する場合)は真の親

表-5 各バンドパターンに対応する遺伝子型

バンドパターン (表現型)				遺伝子型		
A 両親ともバンドを持つ場合						
<u>P1</u>	<u>C</u>	<u>P2</u>	→	++/+-	++/+-	++/+-
<u>P1</u>	<u>C</u>	<u>P2</u>	→	P1 +-	C --	P2 +-
B 片親だけがバンドを持つ場合						
<u>P1</u>	<u>C</u>	<u>P2</u>	→	++/+-	C +-	P2 --
<u>P1</u>	<u>C</u>	<u>P2</u>	→	P1 --	C +-	P2 ++/+-
<u>P1</u>	<u>C</u>	<u>P2</u>	→	P1 +-	C --	P2 --
<u>P1</u>	<u>C</u>	<u>P2</u>	→	P1 --	C --	P2 +-
C 両親ともにバンドを持たない場合						
<u>P1</u>	<u>C</u>	<u>P2</u>	→	起こり得ない		
<u>P1</u>	<u>C</u>	<u>P2</u>	→	P1 --	C --	P2 --

子でないと判定した。図-4に親子であると推定された4組合せについてN-07とO-16プライマーを用いて行った解析結果を示した。矢印で示したバンドはメンデル遺伝に反して子供で出現したものである。このようにDNAフィンガープリント解析を行った結果、今回の調査プロット内に両親と子供が共に存在する個体組合せは存在しないことが明らかとなった。

アイソザイムマーカーを用いた研究でアカシデはほぼ、ランダムな交配が行われていることが分かっており、種子及び花粉が広範囲に散布されるため比較的大きな範囲で更新が行われていることが報告されている¹⁾。親子関係にある個体が見つからなかった理由として、調査プロットがやや小さかったことが考えられるが、しかし、小さな範囲内で繁殖が完結していないことを実験的に証明した。

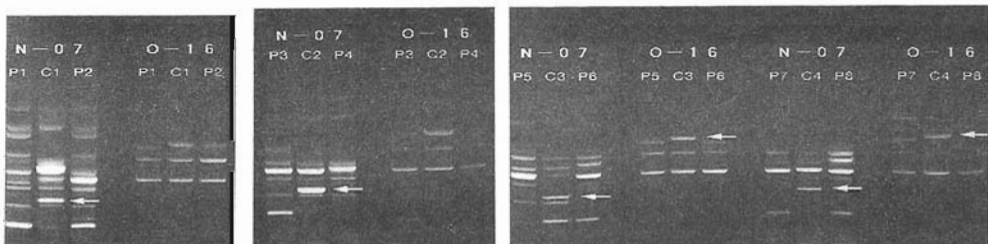


図-4 親子と想定した4組合せにおけるDNAフィンガープリント解析の結果

P1~8 : 各組合せによる親
C1~4 : 各組合せによる子供

本研究で使用したRAPDマーカーは実験が比較的簡便であり、多くの遺伝情報が容易に得ることができるため、個体間の識別には非常に有効なマーカーである。その反面、優性マーカーであるという点で、調査個体がきわめて少ない場合を除き、親子関係の推定を行うには非効率であるという欠点があった。森林における実際の繁殖構造を解明するためには多量のサンプルの分析は避けることができないため、親子鑑定を効率的に行うための分子マーカーの開発が必要不可欠である。

引用文献

- (1) KITAMURA, K., OKUIZUMI, H., SUZUKI, W. and Shiraiishi S. (1992) Hardy - Weinberg Equilibrium with Aallozyme Loci among Natural Population of *Carpinus Laxiiglora* in Ogawa Forest Reserve, Central Japan. *J.Jpn For. Soc* 74 : 346~349.
- (2) MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F.(1991) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8 : 4321~4325.
- (3) NEI, M., LI, W. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 : 5267~5273.
- (4) TAO, Y., MANNERS, M.M., HENZELL, R.G.(1993) DNA polymorphisms in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) *Theor. Appl. Genet.* 86 : 676~688.
- (5) WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., RAFALSKI, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531~6536.