

カラマツの RAPD 分析における多型/単型バンドの出現頻度

九州大学農学部 植崎 康二・白石 進

1. はじめに

カラマツ (*Larix kaempferi*) は、日本に天然分布するカラマツ属植物の一種で主に中部山岳地帯に分布する落葉性針葉樹である。また、カラマツは他のカラマツ属との種間交雑育種において優秀な性質を示すことから、林木育種上重要な樹種とされており、今後林木育種を進めてゆく上で、遺伝的な基礎情報の集積が必要となってくる¹⁾。

従来、遺伝的変異を検出するための集団遺伝学的解析にはアイソザイム分析が用いられてきたが、近年の DNA 分析技術の発展により、RFLP、マイクロサテライトなどの DNA 分子マーカーも用いられるようになってきた。これらの DNA マーカーは共有性マーカーであり集団遺伝学的解析に適していることから利用されているが、操作が煩雑であるなどの短所がある。DNA 分子マーカーの一つである RAPD²⁾ マーカーは、得られる情報量が多く、また簡便、迅速に分析を行うことができるが、優性マーカーであるため集団遺伝学的解析に用いることには難がある。そこで、RAPD 分析において出現する単型バンドを SSCP 分析³⁾ することにより、RAPD マーカーを共優性化する方法の開発を目指している。本研究では、その基礎情報収集を目的として RAPD 分析において出現する多型バンド、単型バンドの出現頻度を調査した。

2. 材料と方法

(1) 供試個体

北アルプス、富士山、日光、馬ノ神岳の4地域から各1個体、計4個体のカラマツを用いた。

(2) DNA 抽出と精製

DNA 抽出は、針葉約 130mg を用いて CTAB 法を改良して行った⁴⁾。精製は、GENE CLEAN III (BIO 101 Inc.) を用いて行った。

(3) RAPD 分析

RAPD 分析における PCR 反応液の組成は、10mM

Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 0.8mM dNTP, 3.5mM MgCl₂, 0.25unit/10 μ l *AmpliTaq* DNA polymerase (Stof-fel Fragment : PERKINELMER 社), 0.2 μ M primer, 10ng / 10 μ l 鋳型 DNA である。反応処理は GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社) を用い、最初に 95 $^{\circ}$ C で 60 秒間変性処理を行った後、95 $^{\circ}$ C 30 秒 (変性), 37 $^{\circ}$ C 30 秒 (アニーリング), 72 $^{\circ}$ C 30 秒 (伸長) の 3 行程を 45 サイクル行った。最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分間伸長反応を行った。PCR 増幅産物は 2% アガロースゲル, 1 \times TBE 緩衝溶液を用いて、電圧 120V で約 3 時間電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドで染色し、302nm UV トランスイルミネーター上で観察を行った。

3. 結果と考察

RAPD 分析は、SSCP 分析の突然変異の検出率が約 500bps 以上の DNA 分子では極めて低くなることを考慮して、500bps 以下の増幅産物を得るのに適した *Ampli-Taq* DNA polymerase を用いて行った。144 プライマーを用いて行った RAPD 分析の結果、452 のバンド (PCR 産物) を得ることが出来た。これらのバンドを長さごとに分類し、それぞれ多型バンドおよび単型バンドの割合を算出し、結果を表-1 にまとめた。また RAPD 分析では、図-1 に示すような変異があるバンド (G-05 320bps) を多型バンド、変異がないバンド (G-05 190bps) を単型バンドとした。

バンドの長さごとにその出現した数をみると、300bps から 400bps の間の長さのものが最も多く、計 452 のバンドのうち 156 であった。次いで 200bps から 300bps, 400bps から 500bps の順で多く、それぞれ 112, 100 であった。また、200bps 以下および 600bps 以上のバンドはそれぞれ 13, 19 となっており、200bps から 500bps のものと比べ非常に少なかった。

600bps 以上の高分子のバンドは多型の割合が最も高く 57.9% であった。次いで高かったのが 200bps 以下の低分子のバンドで 38.5% であった。また、最も単型バンドの割合が高かったのは、300bps から 400bps の間の長

さのもので71.8%，次いで高かったのが200bpsから300bpsの間で67.0%であった。600bps以下のバンドにおいて単型バンドの割合が60%以上であったのに対し、600bps以上の高分子のバンドにおいて多型の割合が高かったのは、本研究で用いた増幅条件では600bps以上の高分子側での安定した増幅反応が十分に行われていなかったことに起因していると思われる。

以上より、本研究で用いたRAPD分析条件で、200bpsから400bpsの間において最も安定して単型的なバンドを得られることが判明した。

今後は、RAPD分析において出現する200bpsから400bpsの間の長さのバンドについてSSCP分析を行い、変異性を内在させている遺伝子座を検出し、RAPDマーカーの共優性化を進める予定である。

引用文献

(1) ORITA, M. *et al.*: Pro. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766 - 2770, 1993

(2) 白石 進・渡辺 敦史: 日林誌, 77: 429-436, 1995
 (3) 東京農工大学農学部林学科編: 林業実務必携, 第三版, 128-146, 朝倉書店, 東京, 1987
 (4) WILLIAMS, J. G. K. *et al.*: Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535, 1990

表-1 多型/単型バンドの出現頻度

| SIZE (bps) | N | P (%) | M (%) |
|------------|------------|-------|-------|
| 100~ | 13 (2.9) | 38.5 | 61.5 |
| 200~ | 112 (24.8) | 33.0 | 67.0 |
| 300~ | 156 (34.5) | 28.2 | 71.8 |
| 400~ | 100 (22.1) | 36.0 | 64.0 |
| 500~ | 52 (11.5) | 36.5 | 63.5 |
| 600~ | 19 (4.2) | 57.9 | 42.1 |
| 計 | 452 | 33.6 | 66.4 |

N: バンド数(全バンド数に対する割合)

P: 多型バンドの割合

M: 単型バンドの割合

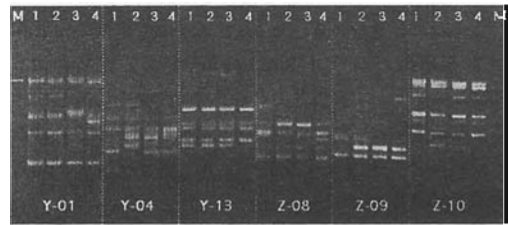
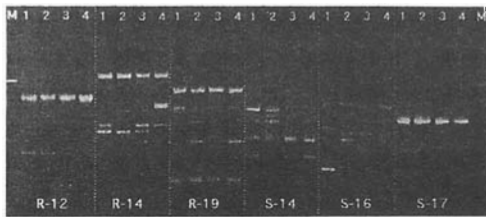
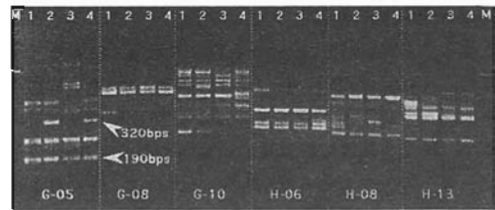
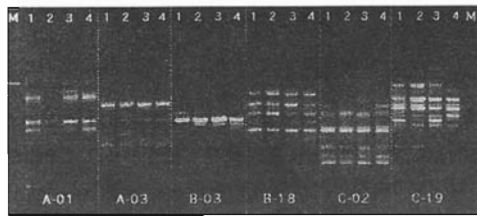


図-1 RAPD分析の結果の一部

M: サイズマーカー 1: 北アルプス 2: 馬ノ神岳 3: 日光 4: 富士山