

DNA分子マーカーを用いた簡便なスギ品種の 分類・同定法の開発

— RAPD-SCAR マーカーのマルチローカス分析 —

九州大学農学部 久枝 和彦・白石 進

1. はじめに

当研究室では、スギ品種の分類・同定のための簡便なDNA分子マーカーとして、これまでに、RAPD (random amplified polymorphic DNA) マーカー¹⁾を SCAR (sequence characterized amplified region) 化²⁾した RAPD-SCAR マーカーの開発を行ってきた。RAPD-SCAR マーカーは再現性が高いため、多数の品種が存在するスギ品種の識別に有効であることを明らかにした(未発表)。しかしながら、RAPD-SCAR マーカーは、1回のPCRでシングルローカス(1遺伝子座)のDNA型情報しか得られず、品種鑑定分析の効率は必ずしも高くはない。より簡便迅速な鑑定を行うためには、1回のPCRでマルチローカス(多数の遺伝子座)の情報を得る必要があり、複数遺伝子座のプライマーを同一反応液に混合しPCRを行う、multiplex PCR法³⁾の導入が不可欠である。

本研究では、フラグメント長を異にする3個のRAPD-SCAR マーカーを用い、multiplex PCRの可能性について検討した。

2. 材料と方法

供試個体には、8個のスギ精英樹クローン(球磨3号、菊地1号、阿蘇8号、熊毛8号、八女6号、長崎2号、早良1号、国東17号)を用いた。それぞれのクローンの針

葉から改良CTAB法⁴⁾によりゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAをGENECLEAN III Kit (BIO 101)を用いて精製し、鋳型DNAとした。

それぞれ1個のRAPD-SCARマーカーによる分析(シングルローカス分析)とmultiplex PCRを用いた分析(マルチローカス分析)を行った。RAPD-SCARマーカーには、当研究室で開発したSCAR-1 (950bp)、SCAR-2 (690bp)、SCAR-3 (580bp)を用いた。プライマーの塩基配列を表-1に示す。10mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001% (w/v) gelatin、0.2mM 各dNTP、0.25unit AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER 社)、0.5μM 各プライマー(SCAR-1 (U)、SCAR-1 (L)、SCAR-2 (U)、SCAR-2 (L)、SCAR-3 (U)、SCAR-3 (L))、10ng/10μl 鋳型DNAの反応液組成でマルチローカス分析を行った。シングルローカス分析は、各々1対のプライマーで行った。PCRの温度条件は、95℃10分の後、95℃30秒、65℃3分を35サイクル、最後に65℃10分とした。得られたPCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、302nmUVトランスイルミネーターで観察した。

3. 結果および考察

シングルローカス分析とマルチローカス分析は、加えるプライマー対の数以外は、同様の反応条件で行った。

表-1 RAPD-SCAR プライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列
SCAR-1 (U)	5' - CTACGGAGGAGTACTACTGGGTATG - 3'
SCAR-1 (L)	5' - CTACGGAGGACAAGTGTGGAAT - 3'
SCAR-2 (U)	5' - CAGCTTAGGTTTAGAGTGTGTATTGG - 3'
SCAR-2 (L)	5' - CCAGCTTAGGCAGAAAACAATG - 3'
SCAR-3 (U)	5' - CAATCGCCGTATCCTGTGAC - 3'
SCAR-3 (L)	5' - AATCGCCGTCTATTCAAGCTAG - 3'

シングルローカス分析の結果を図-1(A)に示す。シングルローカス分析の結果、ほとんどフラグメントの増幅が良かった。SCAR-3においては、球磨3号(レーン1)の増幅効果率が悪く(図-1(A)矢印のフラグメント)、また、八女6号(レーン5)においてもやや増幅が悪かった。

マルチローカス分析の結果を(図-1(B))に示す。マルチローカス分析では、3個の遺伝子座を同時に増幅でき、マルチローカス分析を実用化できる可能性が高いものと思われる。しかし、シングルローカス分析で、増幅が悪いフラグメントは、さらに増幅が悪くなる傾向が見られた(図中*印のフラグメント)。さらに、シングルローカス分析で増幅が良好であったにもかかわらず、マルチローカス分析で、増幅が悪くなるフラグメントも観察された(図中矢印のフラグメント)。

従来の方法に比べ、より信頼性の高い品種鑑定を目指すmultiplex RAPD-SCAR法では、比較的均一なPCR増幅産物が得られることが要求される。また、さらに効率よくDNA型を決定するためには、一度により多くのプライマー対を用いたmultiplex PCRを行う必要がある。しかし、この場合、マーカー数が増えることにより、濃度の

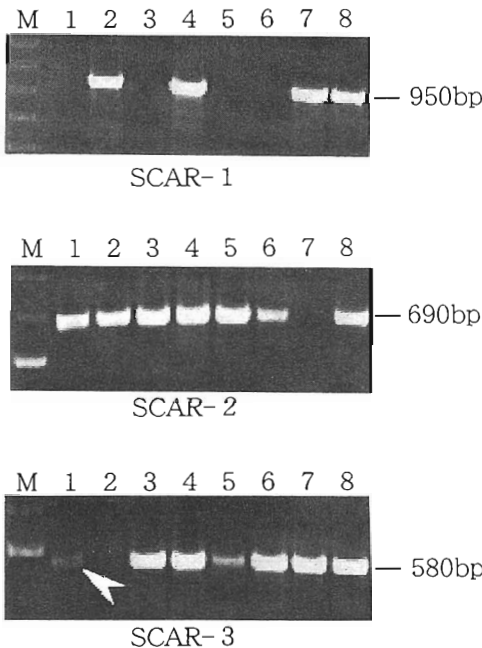
均一なフラグメントを得ることがさらに難しくなると予想される。

本研究では、マルチローカス分析を行うに当たって、シングルローカス分析で用いた反応条件をそのまま用いており、PCR反応条件のマルチローカス分析への最適化はまだ行っていない。今後、信頼性の高いマルチローカス分析結果を得るためには、PCRの種々の反応条件について詳細に検討を行い、比較的均一なフラグメント増幅を可能にするとともに、一回のPCRで増幅できる遺伝子座数についても検討する必要がある。

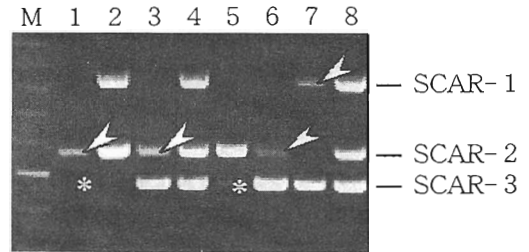
引用文献

- (1) CHANBERLAIN, J. S. *et al*: Nucl. Acids Res., 16, 11141~11156, 1988
- (2) PARAN, I., MICHELMORE, R. W.: Theor. Appl. Genet., 85, 985~993, 1993
- (3) 白石 進・渡辺敦史: 日林誌, 77, 429~436, 1995
- (4) WILLIAMS, J. G. *et al*: Nucl. Acids Res., 18, 6531~6535, 1990

(A) シングルローカス分析



(B) マルチローカス分析



- 1 球磨 3 号
- 2 菊池 1 号
- 3 阿蘇 8 号
- 4 熊毛 8 号
- 5 八女 6 号
- 6 長崎 2 号
- 7 早良 1 号
- 8 国東 17 号
- M サイズマーカー

図-1 RAPD-SCARマーカーを用いたシングルローカス分析およびマルチローカス分析の結果