

スギの高密度連鎖地図の作成へ向けた基礎的研究

九州大学農学部 林 誠一・前田 一
白石 進

1. はじめに

スギは多様な用途を有し、我が国の林業樹種の中では成長がはやく、保育が容易であることなどから、古くから植林が盛んに行われてきた。しかし、育種的に解決しなければならない問題が数多く存在しており、近年、遺伝育種対応が求められている。

栽培作物に比べて生育期間が著しく長い樹木では、有用形質を早期に検定する技術の開発が重要である。これらの有用形質と密接に連鎖したマーカーの探索や、新たな有用遺伝子を同定する手段として、さらには、育種上重要な特性である成長や幹の太りなどを支配している量的形質遺伝子座を分析するためにも、その基盤情報となる連鎖地図の作成が必要である。

RAPD(random amplified polymorphic DNA)¹⁾法は、簡便に多くのマーカーの開発が可能であり、高密度の連鎖地図を作成するのに適している。一方、針葉樹の胚乳(雌性配偶体)は母樹由来の半数体である。そのため、自然交配種子の胚乳家系が利用でき、かつ連鎖解析に優性マーカーであるRAPDを用いても、戻し交配と同等の情報量を得ることが可能である。しかし、胚乳から単離できるDNA量は限られているため²⁾、連鎖地図を作成していく上で、効率的に多くの情報を得る必要がある。

本研究では、今後スギ早良1号の胚乳家系を用いて、蛍光RAPD法により高密度連鎖地図を作成する際に使用するRAPDプライマーのスクリーニングを行った。

2. 材料と方法

(1) 材料、およびDNA抽出

今回、鋳型として用いたDNAは、連鎖解析に使用する胚乳家系の母樹である九州産スギ精英樹早良1号の針葉から単離したDNAである。抽出方法に改良CTAB法³⁾を用い、GENECLEAN III Kit (BIO101, INC.)で精製した。

(2) プライマー

有用プライマーのスクリーニングには、表-1に示したオペロン社の354種類のプライマーを使用した。

(3) 分析方法

RAPD分析は総量10μlで行った。反応溶液組成は1× *ExTaq*TM Buffer (TaKaRa), 0.2mM 各 dNTP, 3.0mM MgCl₂, 0.25unit *TaKaRa ExTaq*TM DNA polymerase (TaKaRa), 0.5μM プライマー, 2.0ng 鋳型DNAである。なお、バンドパターンの再現性について評価するため、反応は各プライマー2回行った。

表-1 スクリーニングに使用したオペロン社のプライマー

OP	プライマーナンバー
A	2, 3, 13, 14, 15, 19
B	2, 3, 7, 9, 15, 17, 18
C	3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20
D	2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 18, 19, 20
E	1, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
F	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 19, 20
G	2, 3, 4, 6, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 20
H	3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20
I	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20
J	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 20
K	1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20
L	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20
M	1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19
N	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18
O	3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15
P	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20
Q	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
R	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20
S	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19
T	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20
U	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
V	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
W	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20
X	1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19
Y	1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
合計	354 プライマー

PCR反応サイクルは、最初に94℃で1分間変性処理を行った後、94℃10秒の変性、36℃30秒間のアニーリング、72℃1分間の伸長の3行程を1サイクルとして、45サイクル行った。最後に72℃2分間の伸長反応を行った。

得られた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1×TBE緩衝溶液を用いて120Vで約3時間電気泳動した。その後、増幅産物を302nmUVトランスイルミネーター上で検出した。

3. 結果と考察

実際に連鎖地図作成を行う蛍光RAPD法では、分離能の高いポリアクリルアミドゲルを用い、かつ蛍光色素を使用することにより、バンドの検出能力は著しく向上する。そのため、今回のスクリーニングでは、薄いバンドについても解析の対象とした。

354プライマーのスクリーニングの結果、合計3,769本のバンドが確認された。2回の繰り返しのうち片方のみで増幅が見られたバンドは、87本(2.3%)であった。これらのバンドは、今回の対象から外し、両方で確認された3,682本のバンドについて、解析を行った。

プライマー毎の増幅バンド数は、最小で0本、最大で24本、平均10.4本であった。バンドサイズは約400~2,700bpsの範囲であった。プライマー毎の増幅バンド数の頻度分布を、図-1に示した。9本のバンドの増幅が見られたプライマー数が最も多く、20本以上のバンドを増幅したプライマーは全体のわずか2.5%(354プライマー中9プライマー)であった。

次に、この結果をもとに、連鎖地図作成の際に必要なプライマー数の検討を行った。RAPDマーカーは優性マーカーであるため、母樹がヘテロ接合体である遺伝子座数は、半数体である胚乳では、バンドを保有するものと保有しないものが1:1の比に分離する。ここで、早良1号のヘテロ接合体率として、クロマツ6家系で算出された値(約50%未発表)を参考にし、この値よりもはるかに低い接合体率(30%)に仮定した。この条件において、連

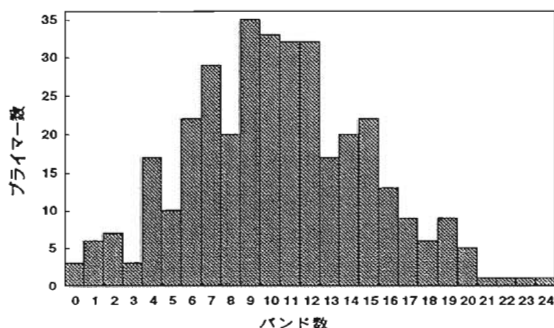


図-1 プライマー毎の増幅バンド数の頻度分布

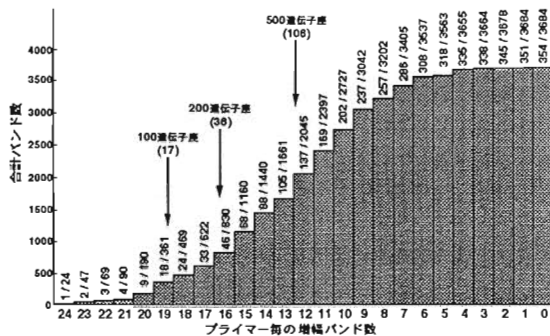


図-2 連鎖地図の作成に必要なプライマー数の検討

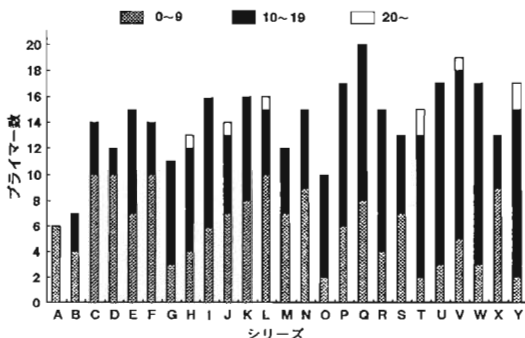


図-3 OPシリーズ別のバンド数とプライマー数の関係

鎖地図作成に必要なプライマー数を算出した結果を図-2に示す。100遺伝子座の情報を得るためには、17プライマーが必要であり、200遺伝子座では36プライマー、500遺伝子座では106プライマーが必要であることが示された。

最後に、プライマー当たりの増幅バンド数を、シリーズ別にまとめた結果を図-3に示した。各シリーズにおいて使用したプライマーの中で、10本以上のバンドが増幅されたプライマーの比率をみると、T、U、W、Yシリーズなどは、その割合が大きかった。一方、C、D、F、Xシリーズではその割合は小さかった。これは、早良1号のみでの結果ではあるが、今後スギにおいてRAPD分析を行う際には、プライマー選択上のひとつの目安として利用できるものと思われる。

今回、RAPD法により連鎖地図を効率的に作成する上で、最初に必要となる供試プライマーに関する基礎情報が得られた。今後、これらの有用プライマーを用いて、高密度連鎖地図の作成を進める予定である。

引用文献

- (1) 松田学・白石進:日林九支研論, 47, 107-108, 1994
- (2) 白石進・渡部敦史:日林誌, 77, 429-436, 1995
- (3) WILLIAMS, J. G. K. *et al.*: Nucleic Acid Res., 18, 6531-6535, 1990