

# Non-Isotopic RNase Cleavage Assay™ (NIRCA) による クロマツ、アカマツ、リュウキュウマツ間の *rbcL* 塩基配列多型の検出\*<sup>1</sup>

井田 和彦\*<sup>2</sup> ・ 白石 進\*<sup>3</sup>

## I. はじめに

DNA マーカーの開発には、効率的な突然変異検出方法が求められる。これまでに、sequencing (7), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (3), single-strand conformation polymorphism (SSCP) (5), cleavase fragment length polymorphism (CFLP) (6), base excision sequence scanning (BESS) (2) などの様々な手法が開発されている。これらは、作業時間、分析対象 DNA の大きさ、簡便性、突然変異検出能力などにおいてそれぞれ欠点を有している。

RNase による二本鎖 RNA のミスマッチ切断を利用して突然変異を検出する方法 (9) も考案されている。近年、その一つとして Non-Isotopic RNase Cleavage Assay™ (NIRCA) (1) が報告され、ヒト DNA 中の突然変異の検出で高い能力を示した。今回、NIRCA を用いてクロマツ、アカマツ、リュウキュウマツを対象として、*rbcL* 遺伝子の突然変異の検出を試みたので報告する。

## II. 材料と方法

クロマツ、アカマツ、リュウキュウマツ各一個体の針葉から改良 CTAB 法 (8) で DNA を単離し、MagExtractor-Plant Genome- (TOYOBO) を用いて精製して、PCR の鋳型とした。

次の一対のプライマーを用いて *rbcL* 遺伝子の一部を PCR 増幅した。プライマーの塩基配列は、5'-taatacact cactatagggGTGTCGGATTCAAAGCTGGTGT-3', 5'-taatacactcactatagggGCAATGCTTTAGCCAGTACA CG-3' である。両プライマーの 5' 末端側には 20mer の T 7 プロモーター配列 (小文字で示した。) を加えた。PCR 溶液組成 (10  $\mu$ l) は、0.2mM 各 dNTP, 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M 各プライマー, 0.0625U KOD DNA Po-

lymerase, 1  $\times$  PCR Buffer # 1 (TOYOBO), 10ng 鋳型 DNA である。PCR サイクルは、初めに 94°C 120秒間の変性後、変性 94°C 20秒間、アニーリング 30秒間、伸長 74°C 60秒間を 1 サイクルとして、これを 35 回繰り返し、最後に 74°C 180秒間の伸長を行った。アニーリング温度は、最初に 65°C とし、これから 1 サイクルにつき 0.5°C ずつ 60°C まで下げた。その後は 60°C とした。

得られた生成物を鋳型として RNA への転写を行った後に、各 RNA を組み合わせる雑種 RNA を形成させ、RNase で処理した。これらの操作には、Mutation Screener™ (Ambion) を用い、そのプロトコールに従って行った。上記反応の生成物を 2.5% アガロースゲルを用いて、0.5  $\times$  TBE 緩衝液中で電気泳動した後、紫外線下で RNA フラグメントの有無を観察した。

また、NIRCA 分析に供試したクロマツ個体とリュウキュウマツ個体の *rbcL* 遺伝子の一部について、373 DNA Sequencer Stretch (ABI) を用いて塩基配列を決定した。

## III. 結果と考察

NIRCA の電気泳動像を図 1 に示した。クロマツ、アカマツ、リュウキュウマツでは、約 1000bp の二本鎖 RNA フラグメント (A) のみが出現した (レーン 1, 3, 5)。クロマツ由来の RNA とアカマツ由来の RNA の雑種 RNA 分析 (レーン 2) では、これに加えて、約 700bp の断片 (B) と約 200bp の断片 (C) が観察された。分析した *rbcL* 遺伝子の 927bp の領域には、クロマツとアカマツ間で 5 個の塩基置換が存在する (図 2)。したがって、両種に由来する RNA から成る雑種 RNA は RNase によって 6 断片に分断されると考えられる。非常に短い断片は、電気泳動における移動度が大きく、アガロースゲル上に残らないので、これらの断片の中で

\*<sup>1</sup> Ida, K. and Shiraiishi, S.: Detection of mutation in the *rbcL* gene among *Pinus thunbergii*, *P. densiflora* and *P. luchuensis* using NIRCA.

\*<sup>2</sup> 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. of Biores. and Bioenv. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

\*<sup>3</sup> 九州大学農学研究院 Fac. of Agrc., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

長い方の2片のみが観察されたと考えられる。NIRCAでは、RNA断片長から突然変異のたまかな位置関係を推定することができる。今回の結果も両種間の変異が集中していることを示した。アカマツ由来のRNAとリュウキュウマツ由来のRNAから成る雑種RNA分析(図1のレーン4)でも同じ結果が得られた。クロマツ由来のRNAとリュウキュウマツ由来のRNAから成る雑種RNA分析(図1のレーン6)では、約1000bpのフラグメントしか見られず、両者間に突然変異が無いことが示唆された。そこで両者間の変異の有無を確かめるために本分析に供したクロマツ個体とリュウキュウマツ個体の塩基配列を決定したところ、両者は同一の塩基配列で

あった。

NIRCAは、アガロースゲル電気泳動で分析でき、比較的短時間(PCR後3~4時間)で分析できること、比較的長い領域(500~1000bp)を調べることができることなどいくつかの利点を有している。今回、この方法を用いることによりクロマツ、アカマツ、リュウキュウマツ間の突然変異の有無を簡便に調べることができた。突然変異のうち、欠失・挿入に対しては、必ずしも検出できるとは限らない(4)が、最も頻度の高い突然変異である一塩基置換を検出する方法としては有用であると考えられる。

これまでNIRCAは、植物ではほとんど利用されていない。今後、林木ににおいて、簡便な突然変異の検出手段となることが期待できる。

### 引用文献

- (1) Goldrick, M. M. *et al.* : BioTechniques, 21, 106 ~ 112, 1996
- (2) Hawkins, G. A., Hoffman, L. M. : Nat. Biotechnol, 15, 803 ~ 804, 1997
- (3) Helling, R. B., Goodman, H. M., : J. Biol., 14, 1235 ~ 1244, 1974
- (4) MutationScreener™ instruction manual, pp.14 ~ 15, Ambion, Inc., 2000
- (5) Orita, M. Y. *et al.* : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 2766 ~ 2770, 1989
- (6) Petroziello, J. M. *et al.* : Clin. Chem., 42 (11), 32 ~ 33, 1996
- (7) Sanger, F. *et al.* : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 ~ 5467, 1977
- (8) 白石 進・渡辺敦史 : 日林誌, 77, 429 ~ 436, 1995
- (9) Winter, E. *et al.* : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7575 ~ 7579, 1985

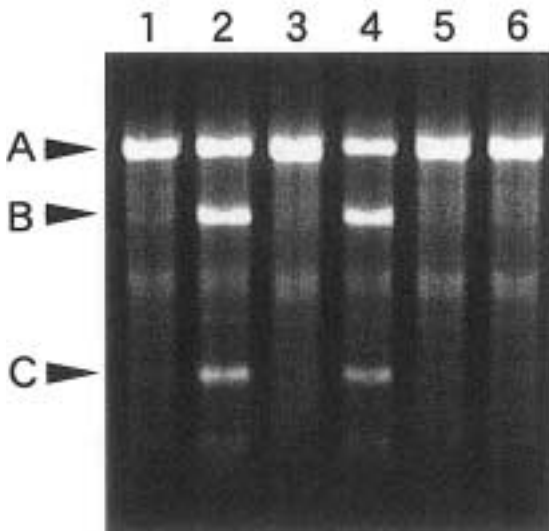


図-1 *rbcL* 遺伝子の NIRCA 分析結果

1. クロマツ-クロマツ
2. クロマツ-アカマツ
3. アカマツ-アカマツ
4. アカマツ-リュウキュウマツ
5. リュウキュウマツ-リュウキュウマツ
6. クロマツ-リュウキュウマツ

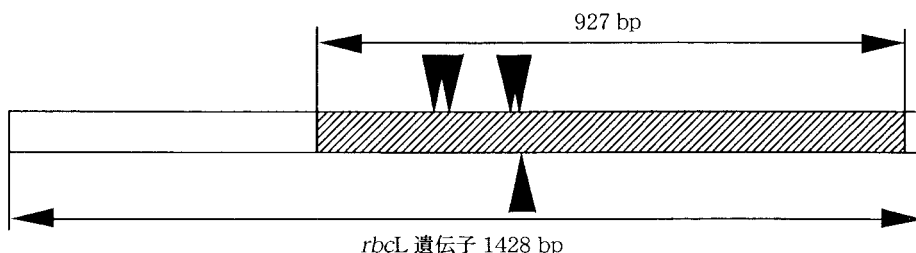


図-2 *rbcL* 遺伝子における分析対象領域と一塩基置換の位置

▨ NIRCA で分析の対象とした領域

▼ 分析対象領域におけるクロマツ、アカマツ間の一塩基置換部位