

# AFLP 法に使用する DNA ポリメラーゼの検討\*1

村上 春樹\*2 · 渡辺 敦史\*2 · 白石 進\*3

## I. はじめに

近年植物ゲノムでは AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (10) マーカーが用いられ林木の連鎖地図が作成されている (6)。AFLP 法は RAPD 法同様、ゲノム全体からランダムに多くの DNA 分子マーカーを得ることができる。また、AFLP 法は、再現性及び一度の泳動で得られる情報量において RAPD 法よりも優れているため (5)、RAPD 法に代わる分析法として用いられるようになってきている。しかし、AFLP 法は対象となる生物種のゲノムサイズによって影響を受けるため、ゲノムサイズがきわめて大きい針葉樹では、Vos らの原法を改良して連鎖地図作成が行われている (1, 2, 7, 8, 11) が、いまだ完成された分析とは言い難い (4, 7)。

そこで本研究ではより質の高いデータを得るために AFLP 分析に使用する DNA ポリメラーゼについて検討を行った。また、胚乳家系を用いた連鎖地図作成で解決しなければならない問題の一つに、使用 DNA 量に制限があることである。再現性のある情報を得ることのできる供試 DNA 量についても検討を行った。

## II. 材料と方法

クロマツ針葉から改良 CTAB 法 (9) を用いて DNA の単離を行い、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製し供試した。

AFLP 分析は Vos らの方法を改良して行った。制限酵素切断及びライゲーション処理は 25℃ で 10 時間、4℃ で 6 時間行った。得られた反応溶液は、TE 0.1 (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0) で 5 倍希釈し、pre-amplification の鋳型とした。

Preamplification は、*TakaRa Ex Taq*<sup>TM</sup> (TaKaRa: 以下 *Ex Taq*), *AmpliTaq*<sup>®</sup> DNA Polymerase, Stoffel Fragment (Perkin Elmer: 以下 *stoffel Fragment*),

*AmpliTaq*<sup>®</sup> DNA Polymerase (Perkin Elmer: 以下 *AmpliTaq*), *PLATINUM*<sup>TM</sup> *Pfx* DNA Polymerase (LIFE TECHNOLOGIES: 以下 *Pfx*) を用いて行った。*Pfx* 以外の反応条件は、94℃ で 30 秒の変性、56℃ で 60 秒のアニーリング、72℃ で 60 秒の伸長反応を 20 サイクルである。*Pfx* では、まず 94℃ で 2 分間処理した後、94℃ で 15 秒の変性、56℃ で 30 秒のアニーリング、68℃ で 60 秒の伸長反応を 20 サイクル行った。この増幅産物をフルオロメーターを用いて定量し、DNA 濃度が 5 ng/  $\mu$ l になるよう滅菌水で希釈し、selective amplification の鋳型 DNA とした。

Selective amplification は、10  $\mu$ l 反応溶液で行った。PCR はタッチダウン法を用いて行い、*Pfx* 以外では、94℃ で 30 秒の変性、30 秒のアニーリング (温度は 65℃ から 1 サイクルごとに 0.7℃ ずつ下げた)、72℃ で 60 秒の伸長反応を 12 サイクル行った。さらにアニーリング温度を 56℃ に固定して 23 サイクル行った。*Pfx* では、まず 94℃ で 2 分間処理を行った後、94℃ で 15 秒の変性、30 秒のアニーリング (温度は 65℃ から 1 サイクルごとに 0.7℃ ずつ下げた)、68℃ で 60 秒の伸長反応を 12 サイクル行った。さらに 56℃ のアニーリング温度で 23 サイクル行った。

電気泳動は、6% 変性ポリアクリルアミドゲル (5.0M Urea) を用いて自動蛍光シークエンサー (373DNA Sequencer Stretch, ABI) で行った。得られたデータは Gene Scan 2.1 (ABI) を用いてサイズの補正を行い、Genotyper 1.1.1 (ABI) により解析した。

## III. 結果及び考察

### (1) 供試 DNA 量

制限酵素切断及びライゲーション処理に使用する DNA 量について、250ng と 500ng の 2 水準をもうけて検討した。PCR に使用した DNA ポリメラーゼは、*Ex Taq*, *stoffel Fragment*, *Ampli Taq* である。Preamplifi-

\*1 Murakami, H., Watanabe, A. and Shiraisi, S.: Screening of DNA polymerase for AFLP analysis.

\*2 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

\*3 九州大学大学院農学研究院 Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

cation 及び selective amplification の結果 (図 1), 全ての DNA ポリメラーゼにおいて供試 DNA 量が 250ng と 500ng で差は見られなかった。そのためその後は, 250ng の全 DNA を用いて AFLP 分析を行った。

(2) 使用 DNA ポリメラーゼ等の検討

*Ex Taq*, Stoffel Fragment, *Pfx* を用いて preamplification, selective amplification を行った結果, *Pfx* が最もよく増幅し, 長いフラグメントを得ることができた。また, 他の DNA ポリメラーゼに比べ鮮明なクロマトグラムが得られた (図 2)。鮮明なクロマトグラムを得ることができた理由として, *Pfx* が Terminal Transeferase 活性を持たないということがあげられる。*Taq* 系の DNA ポリメラーゼはこの活性を持つため, PCR 産物の 3' 末端にアデニンの付加を機能的に行う。そのため同一の DNA 領域から複数のフラグメント (DNA 分子) が生産される恐れがある。しかし, この活性を持たない *Pfx* は, わずかな例を除き一つの DNA 領域から種類のフラグメントしか生産しない。このため, クロマトグラムが単純化され, より正確な分析が可能になったと思われる。さらに *Pfx* は酵素活性部位に特殊なタンパク質 (抗体) が結合しており, 94℃ になるまで酵素活性を示さない。このため, 自動ホットスタートが可能であり, プライマーダイマーの生成を低く抑えることができる。これら

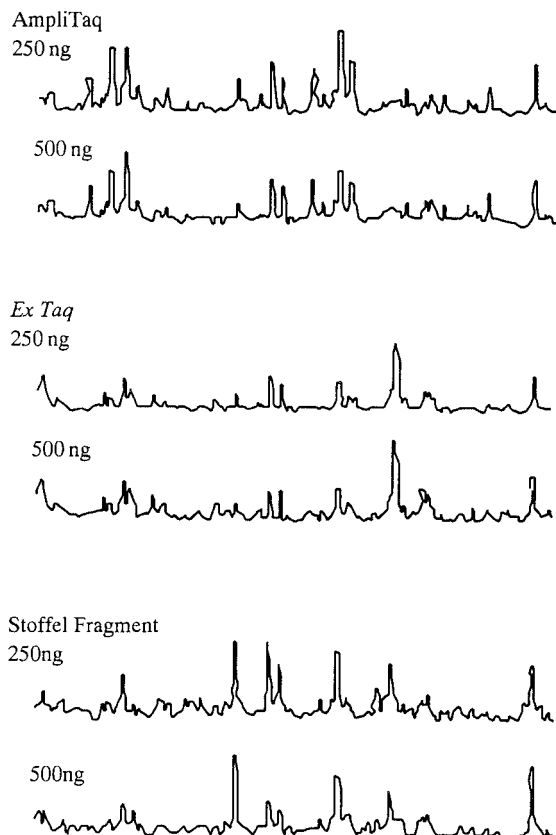


図-1 使用 DNA 量の違いによるクロマトグラムの比較

の性質により, *Pfx* はゲノムサイズが大きいために多数のフラグメントが増幅されてくる針葉樹においては, 特に有用であると考ええる。

Paglia らが *Picea abies* の AFLP 分析において高い再現性が得られないと報告している。これに対し, Estelle らは, これは細かいフラグメントの読み過ぎに起因していると反論している (3)。しかし, これは対処の処理であり AFLP 法の再現性を高める抜本的な解決にはなっていない。今後, 針葉樹における AFLP 法の再現性を高めるために, 制限酵素処理・リガーゼ反応, preamplification, selective amplification について詳細な検討を行う必要があると考える。

引用文献

- (1) Arcade, A. *et al* : Theor Appl genet 100, 299 ~ 307, 2000
- (2) Cervera, MT. *et al* : Theor Appl Genet 93, 733 ~ 737, 1996
- (3) Estelle, L., Alfred, E. S. : Heredity 82, 252 ~ 260, 1999
- (4) Hansen, M. *et al* : Theor Appl Genet 98, 845 ~ 852, 1999
- (5) Jones, CJ. *et al* : Mol Breed 3, 381 ~ 390, 1997
- (6) Malyshev, S.V., Kartel N. A. : Mol Bio 31, 197 ~ 208, 1997
- (7) Paglia, G. and Morgante, M. : Mol Breed 4, 173 ~ 177, 1998
- (8) Remington, D. L. *et al* : Theor Appl genet 98, 1279 ~ 1292, 1999
- (9) 白石 進・渡辺敦史 : 日林誌, 77, 429 ~ 436, 1995
- (10) Vos P. *et al* : Nucleic Acids Res 23, 4407 ~ 4414, 1995
- (11) Young WP. *et al* : Theor Appl Genet 99, 785 ~ 790, 1999

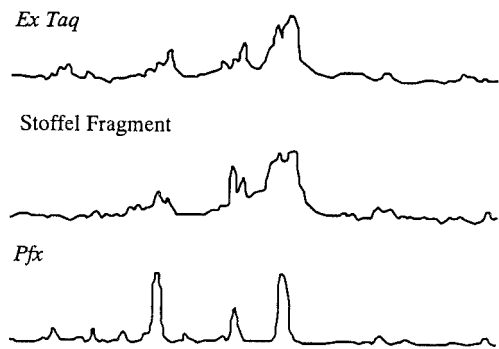


図-2 各酵素により増幅されたクロマトグラムの比較