

ヒノキマイクロサテライト分析の効率化^{*1}

— Multiplex PCR 化 —

中島康介^{*2} ・ 白石 進^{*3}

中島康介・白石 進：ヒノキマイクロサテライト分析の効率化 九州森林研究 56：69-70, 2003 ヒノキは日本における主要造林樹種であり、その育種の改良を行うため品種識別や親子鑑定技術が必要である。近年、ヒノキにおいてもマイクロサテライトマーカーが開発されている。マイクロサテライトマーカーを効率良く用いる方法の一つとして Multiplex PCR 化がある。本研究では、既に開発されているマイクロサテライトマーカーを Multiplex PCR で分析する系の開発を行った。最初に、PCR 反応における MgCl₂濃度を1.5mMとし、最適なアニーリング温度の検討を行った。その結果、55℃が最適であった。次に、既に開発されている9マーカーの中から7マーカーを選び、これらをフラグメント長により3セットに分けた。そして各セットごとのPCRにおける構成フラグメントの増幅が分析に支障がない範囲になるように、プライマー濃度比を調整した。その結果、7マーカーを3回のPCRで増幅することが可能となった。

キーワード：ヒノキ、マイクロサテライトマーカー、Multiplex PCR, SSR

I. はじめに

ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc) Sieb. et Zucc.) は日本における主要造林樹種のトップを占め、ヒノキ採種園からの育種種苗は全造林種苗の70%を超えるまでになっている (5)。そのクローン採種園は、有用な形質を持つクローン同士を交配させ、遺伝的に優れた種子を生産するという目的で作られている。つまり、採種園は限られた精英樹クローンで構成される人工遺伝子プールである。そのため最大限に遺伝的多様性が発揮されるには、採種園の構成クローン相互間の交配が均等に行われるように管理されなければならない。採種園管理を確立するためには、クローン識別、親子鑑定を効率的に行う必要がある。

近年、クローン識別、親子鑑定は、マイクロサテライトマーカーが頻繁に用いられている (1, 4, 7)。このマイクロサテライトマーカーの特徴として、1. モチーフの反復数が変異性に富む、2. 遺伝子座がゲノム中に散在している、3. 共優性マーカーである、4. サザンハイブリダイゼーションなどに比べ微量なDNAサンプルでも分析可能である、5. 異なった対立遺伝子を区別できる、などが挙げられる。このように、この手法はクローン識別、親子鑑定に適しているとされている。ヒノキにおいても、Nakao *et al.* (3) が9遺伝子座についてマイクロサテライトマーカーの開発を行っているが、MgCl₂濃度、アニーリング温度がそれぞれのマーカーで異なっている。多数のサンプルを扱うクローン識別や親子鑑定では、高い分析効率が見込まれるため、マーカーの Multiplex PCR 化が行われている (2)。

Multiplex PCRは1回のPCR増幅で複数の遺伝子座を増幅する

ことができ、多量サンプルを扱う上で手間やコストの削減につながる利点がある。

そこで本研究では、既報のヒノキマイクロサテライトマーカーを Multiplex PCR で分析する系の開発を行った。

II. 材料と方法

ヒノキ精英樹4クローン (始良32号、嘉穂4号、嘉穂5号、阿蘇4号) を用い、その針葉から改良CTAB法 (6) を用いて全DNAの単離を行い、GENECLEAN III KIT (BIO101) で精製して、PCRの鋳型とした。

まず、MgCl₂濃度とアニーリング温度の検討を行った。9遺伝子座すべてにおいてMgCl₂濃度を1.5mMに固定し、T-GRADIENT (Biometra) により、それぞれの遺伝子座についてPCR増幅を行った。温度勾配は50~60℃の範囲で12段階に設定した。この結果をもとに、9遺伝子座すべてにおいて良好な増幅が得られるアニーリング温度を選定した。なお、今回用いたPCR溶液組成 (10μl) は、1.5mM MgCl₂、0.2mM 各dNTP、0.2μM 各プライマー、0.5U PLATINUM *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen)、1× PCR Buffer、10ng 鋳型DNAである。PCRサイクルは、はじめに94℃・120秒の変性後、変性94℃・30秒間、アニーリング50~60℃・30秒間、伸長72℃・30秒間を1サイクルとして、これを35回繰り返す、最後に72℃・120秒間の伸長を行った。PCR産物をアガロースゲルで電気泳動した。

次に3色を検出できる自動蛍光シーケンサー (373DNA Sequencer Stretch, ABI など) を用いることを仮定して、フラグ

^{*1} Nakashima, K. and Shiraiishi, S.: Effective analysis of microsatellite in *Chamaecyparis obtusa*

^{*2} 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biores. and Bioenv. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

^{*3} 九州大学大学院農学研究院 Fac. Agrc., Grad. Sch. Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

メント長により3セットに分けた。またそれぞれのセットでプライマーダイマーを作らないことをOLIGO(National Biosciences)により確認した。

そして、それぞれのセットにおいてPCRにおけるフラグメントの増幅が分析に支障がない範囲になるようにプライマー濃度比の検討を行った。

III. 結果と考察

Multiplex PCR 化を行うために、MgCl₂濃度を1.5mMに固定し、アニーリング温度の検討を行った。その結果、9 遺伝子座において良好な増幅が観察されたのは、55℃であった(図-1)。この結果から、MgCl₂濃度1.5mM、アニーリング温度55℃としてMultiplex PCRを行うこととした。

次に9 遺伝子座からフラグメントの重複しない7 遺伝子座(表-1)を選択し、フラグメント長別に3つのグループに分けた。その結果、グループAとしてCo67, Co144, グループBとしてCo69, Co118, グループCとしてCo31, Co66, Co93の3セットが得られた(表-1)。

各グループでそれぞれのマーカーが良好に増幅するためのプライマー混合比を検討した。その結果、グループAでは、Co67:Co144 = 7:10, グループBでは、Co69:Co118 = 1:2, グループCでは、Co31:Co66:Co93 = 5:7:7で混合すれば、分析に支障がない範囲で増幅されることが供試した全てのクローンで確認できた(図-2)。

以上のように、既報のマイクロサテライトマーカーをMultiplex PCRで分析する系の開発を行うことができた。この分析系を用いることにより、Multiplex PCRによる効果的なDNAタイピングが可能となった。各マーカーで蛍光ラベリングしたプライマーを作成し、自動蛍光シーケンサーを用いることにより、多量サンプルを簡便で効率的に分析することができると考えられた。



図-1. Co118 マーカーの各アニーリング温度勾配におけるPCR増幅の結果(始良32号)
 レーン1~12: アニーリング温度(℃)
 1, 50.0; 2, 52.0; 3, 50.9; 4, 52.0; 5, 53.2;
 6, 54.4; 7, 55.6; 8, 56.0; 9, 58.0; 10, 59.1;
 11, 59.8; 12, 60.0

表-1. 各 Multiplex PCR グループのマーカー構成

Group	Locus	Primer sequence (5' to 3')	PCR product (bp)
A	Co144	CTTGACTTGTTGGTTGTG ATTTAGGTCTCTTTATAGTCCTT	229
	Co67	CTCAAATAACTACCCAAACACTC TCCAATGCCTTACAAAGC	298
B	Co69	TATATTGGCTCAAGGTGGGT AATCTGAGAGCTGCAAGGAA	242
	Co118	CTTGATTTATGATAGATTTGTTG GGCATTAGACTTAGTGGATT	320
C	Co31	AACAAATAGGCACCCAACCTC GATGGTGAGATGAGGGAGG	136
	Co66	CTAGGAGCCAATCTAAGACTTCTC TGACAATGAAATCCTACAAGACC	223
	Co93	CAAGCAGCTACAACAAGAATGAC AGCAAGAAGGTGAAAGTTATGAGG	257

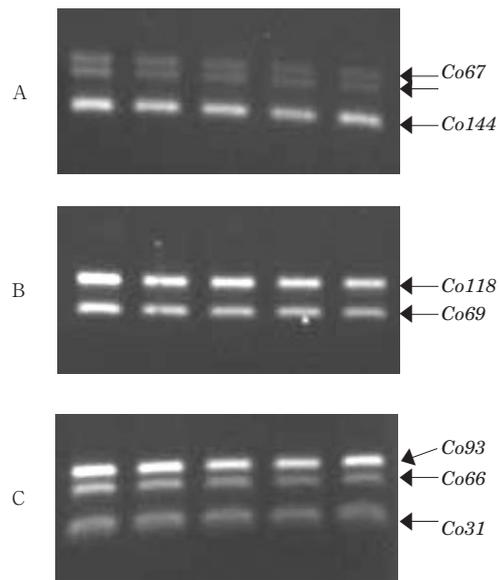


図-2. Multiplex PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像(始良32号における5回繰り返し結果)
 A, B, Cは Multiplex PCR の各グループ

引用文献

- (1) Burstin, J. *et al.* (2001) Plant Breeding 120: 311-317.
- (2) Henegariu, O. *et al.* (1997) BioTechniques 23: 504-511.
- (3) Nakao, Y. *et al.* (2001) Can. J. For. Res. 31: 2248-2251.
- (4) Primmer, C. R. *et al.* (1995) Mol. Ecol. 4: 493-498.
- (5) 清藤城宏ほか(2000) 日林誌 82: 105-108.
- (6) 白石進・渡辺敦史(1995) 日林誌 77: 429-436.
- (7) Williams, C. G. *et al.* (2000) Heredity 84: 261-268.

(2003年1月17日 受理)