

アテの遺伝子多型分析(1)

— RAPD 法によるアテのクローン識別 —

三 浦 進

要旨: アテの遺伝資源に関する情報を得ることを目的に、RAPD 法を用いたクローンの識別技術の検討を行った。その結果11種類のプライマーから得られた、32個の RAPD マーカーを用いることにより、アテのクローンを識別することが可能となった。

I 緒 言

アテ (ヒノキアスナロ: *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. var. *hondae* Makino) は能登地方の主要な造林樹種である。同種の大規模な人工植栽は全国に例のないことから、石川県の林業の大きな特色となっている。

しかし将来のアテ林業の振興には、生産の効率化と新規需要への対応が不可欠である。そのため樹木の生育段階では、耐病性や初期生長の速さ、木材としては、ねじれないなど加工の容易性や、大ロットでの材質の均一性が要求される。そこで1つのアプローチとして、形質の優れたクローンの選抜を行うことが重要である。

本研究はアテのクローンの識別法の確立と、クローン構成の解明等、遺伝資源に関する調査を行い、アテの優良形質クローンの選抜に関する基礎情報を得ることを目的とする。

アテの遺伝資源に関する研究は、中野のペルオキシダーゼアイソザイムによる、多型分析(1)がある。中野は外部形態によりアテを5品種に分類し、アイソザイム分析により、各品種はクローンコンプレックスであり、マアテとカナアテは、品種内の変異が大きいことを明らかにした。しかしアイソザイムによる多型分析は、表現型を対象とするため分析精度に限界があり、またクローンの識別への応用は困難である。

近年の遺伝子工学の発達により、遺伝子情報を比較的容易に分析することが可能となり、RAPD 法(2)や RFLP 法(3)等、遺伝子の多型を分析する手法が開発された。遺伝子多型分析は、ゲノムの塩基の置換や欠失、付加を多型として検

出し、品種識別や遺伝マーカーに活用する技術である。

種内のクローンの識別を行うには、RAPD 法が有効である。木本植物での RAPD 分析は、カラマツ(4)等いくつかの報告があるが、ヒノキアスナロでは例がない。本報告ではヒノキアスナロで RAPD 分析を行うための条件検討、並びにアテのクローン分類について報告する。

II 実 験

1 供試材料

石川県内各地から、マアテ14個体、クサアテ18個体、エソアテ2個体、カナアテ2個体、スズアテ2個体、元祖アテの計39個体のアテの葉を採集した。これらは各品種の典型的な外部形態(1)を示す個体である。

2 全 DNA の抽出

採集した葉0.1gを液体窒素で凍結し、乳鉢で粉碎した。CTAB 法(5)で粗 DNA を抽出した後、RNaseA 処理により全 DNA を単離した。

3 PCR の反応条件

反応液の量は20 μ lで、組成は次のとおりである。10mM Tris (pH8.3), 50mM KCl, 0.1% TritonX, 2.0mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.4 μ M Primer, 1.0unit *Taq* DNA Polymerase (TOYOBO), 20ng 鋳型 DNA。

反応温度は次のとおりである。熱変性は最初に94 $^{\circ}$ C 4分間行い、各サイクルで94 $^{\circ}$ C 1分間行った。伸長反応は、各サイクル72 $^{\circ}$ C 1.5分間とし、更に反応の最後に72 $^{\circ}$ C 5分間行った。反応サイクルは、

35回とした。またアニーリング温度はプライマーのT_mに応じて、最適温度を決定し、反応時間は1.5分間とした。

プライマーは12塩基のコモンプライマー（ベックス社）20種類及び、10塩基のランダムプライマー（オペロン社）10種類から、1種類または2種類を混合して使用した。

4 クローンの分類

PCRの増幅産物を0.5%アガロース（宝酒造LO3）+0.8%シーナゲル（Diversified BioTech, Newton, MA）で電気泳動し、EtBr染色により可視化した。鮮明で多型を示すバンドを、RAPDマーカーに選定し、供試試料のDNA型を決定することにより、クローン分類を行った。

Ⅲ 結果と考察

1 全DNAの単離

試料からの全DNAの単離は、CTAB法を基に行った。ヒノキアスナロの葉は多糖類の含有量が多く、CTAB法でのDNAの単離を阻害する。そこでDNA画分を回収した後、2-methoxyethanol, K₂HPO₄ (6) により、多糖類とDNAを分離した。その結果0.1gの当年葉から、1.0~1.5μgの全DNAが得られた。

2 PCRの条件検討

アニーリングの温度は、非特異的増幅の有無を左右する重要な要素である。そこで12塩基のプライマーのT_m (39℃) にそれぞれ4℃、6℃、8℃加えた温度で反応を行い、非特異的増幅の有無を比較した。その結果T_mより4℃高い43℃で

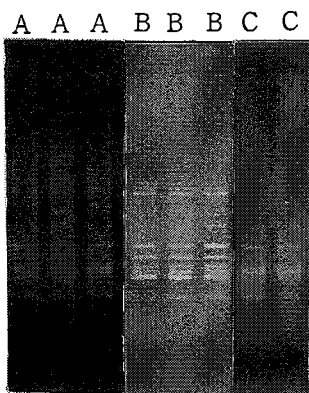


図-1 RAPD法におけるアニーリング温度の影響
 鋳型DNA：カナアテ-95 プライマー：A12
 アニーリング温度：A；43℃ B；45℃ C；47℃

表-1 PCRのプライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')
A-12	CTCCTGCTGTTG
A-39	CCTGAGGTAGCT
B-41	GACAGCGTCCTA
B-44	CCTTGGAAC TCG
C-39	CCTAAGGGGTCT
C-58	GGAAAGGAAGGC
D-70	ATCATCGGGGTG
A-83	ACTGGCCGGCAT
A-86	TCCTGGGGCGTT
A-88	GCGTCGGTTCGA

表-2 RAPDマーカーの数

プライマー	マーカー数
A12	5
A39	4
B41	3
B44	3
C58	3
D70	6
A83	4
A86+A88	2
A41+C39	2
A12+B41	4
B44+C58	2

は、低分子量の非特異的産物が多く、バンドは不明瞭となった。一方45℃では非特異的増幅は抑制され、明瞭なバンドが観察された。また47℃では、バンド数の減少が認められ、アニーリングが十分に行われなかったことが推察される(図-1)。したがって最適なアニーリング温度は45℃であると判断した。一方10塩基のランダムプライマーの場合は、T_m(35℃)と同じ35℃が最適温度であった。

またヒノキアスナロのDNA型の判定に有効なプライマーを、12塩基プライマー20種類と10塩基プライマー10種類から検索した結果、12塩基の8種類と10塩基の2種類(表-1)でRAPDマーカーが得られた(表-2)。

3 再現性の検討

RAPD法は、非特異的増幅に起因する、マーカーの再現性の不安定が指摘されている。そこでカナアテ-95を鋳型DNAに、得られるRAPDマーカーの数が多きプライマー-A12を用いて、13反復のPCRを行った。その結果いずれも同一のバンドパターンを示し、RAPDマーカーは全ての反復で同様に得られた(図-2)。

またその他の RAPD マーカーについても同様の試験を行い、再現性が認められた。

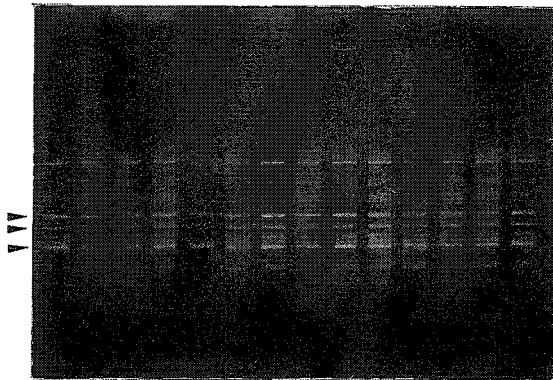


図-2 プライマー-A12による RAPD マーカーの再現性
鋳型 DNA : カナアテ-95

4 アテの DNA タイピング

主要 5 品種の 39 個体のアテについて、11 種類のプライマーを用いて PCR を行ったところ、32 個の RAPD マーカーが得られた。これらのマーカーを用いて、アテの DNA タイピングを行った(表-3) 結果、クサアテ 28 個体は 4 クローンに分類され、他の 4 品種 11 個体は全て異なるクローンに分類された。この結果供試した 39 個体のアテは 15 クローンに分類された。全クローンの平均マーカー保持数は 14 個で、最大は元祖アテの 20 個、最小はクサアテ 28 の 9 個であった。またマーカー D70-1300 は、アテの全クローンに共通な、固定遺伝子座の可能性があり、更に検討を進めたい。

一方今回のプライマーからは、各品種に特異的なマーカーは得られなかった。各品種はクローンコンプレックスであることから、品種特異的な RAPD マーカーの獲得は困難であると考えられる。遺伝子レベルで品種の識別を行うには、RAPD マーカーから遺伝距離を求めて品種を推定するか、RFLP 等の手法を用いて品種特異的なマーカーをスクリーニングすることが必要であろう。

今回の結果から、アテ(ヒノキアスナロ)のクローン識別に RAPD 法が有効であることが明らかとなった。今後さらに RAPD マーカーのスクリーニングを行い、識別精度の向上を図り、品種のクローン構成や品種間の系統関係を明らかにし、アテの遺伝資源に関する情報の蓄積に努めたい。

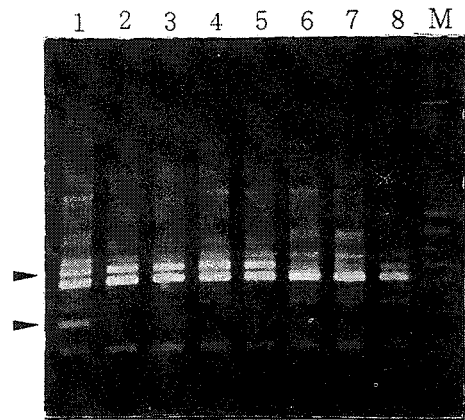


図-3 プライマー-B41+C39によるアテの RAPD 分析
1 ; 元祖アテ 2 ; カナアテ-95 3 ; カナアテ-60
4 ; エソアテ-98 5 ; クサアテ-13 6 ; マアテ-176
7 ; マアテ-173 8 ; マアテ-153 M ; 分子量マーカー

IV 参考文献

- (1) 中野徹夫(1990) アテ品種の外観的特徴とザイモグラフ. 石川県林業試験場研究報告. 21 : 14~21.
- (2) Williams, J.G.K, Kubelik, A.R., Livak, K. Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531~6535.
- (3) Vedel, F., Quetier, F., and Bayen, M. (1976) Specific cleavage of chloroplast DNA from higher plants by *EcoRI* restriction nuclease. *Nature.* 263 : 440-442
- (4) 白石進(1996) 蔵王山系馬ノ神岳に生存するカラマツの DNA 分類学的解析. 日林誌. 78 : 175~182
- (5) Murry, M.G., Thompson, M.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plants. *Nucleic Acids Res.* 8 : 4321~4325.
- (6) Kirby, K.S. (1956) A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids. *Biochem J.* 66 : 495~504.

表-3 アテクローンのDNA タイピング (抜粋)

RAPDマーカー	マアテ153	マアテ173	マアテ176	マアテ215	クサアテ13	クサアテ21	クサアテ27	クサアテ28	エンアテ13	エンアテ98	スズアテ140	スズアテ126	カナアテ60	カナアテ95	元組アテ	ネズコ
B41-780	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B41C39-390	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B41C39-750	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D70-1700	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D70-1300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D70-1000	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D70-880	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D70-800	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D70-610	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
C58-780	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C58-370	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A12-1050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
A12-910	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A12-820	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A12-570	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B44-1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B44-1200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B44-650	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A12B41-880	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A12B41-570	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A12B41-380	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A12B41-340	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A88A86-1300	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A88A86-390	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A39-1100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A39-970	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A39-880	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A39-630	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
A83-1700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
A83-1400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A83-950	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A83-370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+