

シバの AFLP 多型フラグメントからの RFLP プローブ作成と塩基配列決定

安部亜津子・蝦名真澄¹⁾・安田康明・森脇秀俊

要 約 シバ属(*Zoysia* 属)について、AFLP 多型フラグメントを単離し、共優性マーカーである RFLP プローブを作成した。また、そのフラグメントの塩基配列決定を行なった。*Z. matrella* (鹿児島県エコタイプ)と*Z. japonica* (山形県エコタイプ)の F₁ 6 個体および両親について、1 プライマーセットを用いて AFLP を行なった。電気泳動後、得られた多型バンドを切り出してプラスミドにクローニングした。RFLP プローブはプラスミドインサートの PCR により作成し、両親および F₁ 66 個体の *EcoRI* 消化ゲノム DNA にハイブリダイズした。RFLP プローブの標識および検出は ECL (Enhanced chemiluminescence)により行なった。また、各フラグメントの塩基配列は Dye terminator 法により決定した。クローニングしたフラグメントは 151 ~ 427bp の 7 クローンであった。RFLP では 202 ~ 427bp の 5 つのプローブについてシグナルが得られ、そのうち 3 つのプローブで多型が検出されたことから、シバ属では AFLP で用いる制限酵素のうち、*EcoRI* 側にも十分な頻度で多型が存在することが明らかになり、AFLP 法の多型マーカーから高い効率で RFLP マーカーが作出できる可能性が示唆された。また、シーケンスの結果、いくつかの構造遺伝子に類似した配列が認められたことから、連鎖解析によりマーカー化された AFLP 多型フラグメントは、構造遺伝子近傍に比較的高い頻度で認められることが示唆された。

島根県立畜産試験場研究報告第 35 号, 17-21, 2002

シバは低投入、持続型の放牧用草種として広く利用されている在来野草である。最近、匍匐茎の伸長性にすぐれたシバ品種「朝駆」¹²⁾など、優良形質を備えたシバ品種育成も行われており、我々も地域に適應するシバ系統の選抜を試みている。このように、自生系統あるいは交雑系統からの優良個体の選抜を効率的に行うためには、DNA マーカーの利用が有効であると考えられる。

DNA マーカーの中でも、AFLP (amplified fragment length polymorphism)は、1 回の解析で得られる情報量が多く、また、対象生物の塩基配列情報を必要としないため、ゲノムタイピングや連鎖地図上のマーカー密度を高めるのに極めて有用なマーカーである。そのため、同マーカーはさまざまな生物種のゲノムタイピングに用いられており、系統識別^{3,6)}や進化研究^{20,5,22)}に利用されている。また、最近では、AFLP 単独あるいは RFLP (restricted fragment length polymorphism)などのマーカーを併用した遺伝子マッピング^{16,18,7)}や、QTL (quantitative trait loci)解析^{23,19)}への応用も検討されている。

我々は、シバ(*Zoysia*)属において AFLP マーカーを用いた種分類および種内の系統識別を行ない、その有

用性を確認した¹²⁾。また、シバ(*Z. japonica*)とコウシュンシバ(*Z. matrella*)の種間交雑系統を作成し、AFLP の染色体上へのマッピングが行われ、連鎖解析が試みられている⁹⁾。

しかしながら、AFLP マーカーはフラグメントサイズが同じで、配列の異なる相似の DNA フラグメントを排除できないこと、また、AFLP の特性として、得られる情報もバンドの有無で表される優性マーカーであるため、連鎖解析や系統解析を行なう際にホモとヘテロが判別できないという短所を有する。

そこで、従来の AFLP の短所を補う目的で、共優性で、配列の相同性を利用した RFLP マーカーへの変換を試みた。また、多型フラグメントの特性を検討するために、AFLP フラグメントの塩基配列も決定し、既知の配列との相同性検索を行った。

材料および方法

AFLP多型フラグメントのクローニング

供試した個体は、*Z. matrella*、*Z. japonica* およびそれらの F₁ 6 個体であり、各個体から DNA を抽出してクローニングに用いた。各個体の DNA は、Plant DNAzol(GIBCO)で調製後、AFLPPlantMapping

1 独立行政法人 農業技術研究機構 畜産草地研究所

Kit™ (Applied Biosystems)を用いて常法²³⁾により AFLP 反応を行った。Selective Primer の組み合わせは MseI-CAA および EcoRI-AGC とした。AFLP 反応産物の電気泳動は、マニュアルシーケンサー (TaKaRa) により 6% シークエンスゲル、2000V で行った。泳動後のゲルの画像解析は、蛍光イメージアナライザー (BioRad) で行い、多型バンドを検出後、該当部分のゲルを切り出した。DNA の溶出は、切り出したゲルに 20 μ l の TE バッファーを添加後、凍結融解することで行った。溶出 DNA は AFLP で用いた Selective primer で増幅し、クローニングの材料とした。

クローニングには Perfectly Blunt Cloning kit (Novagen) および pT7Bluevector (Novagen) を用いた。クローニングで得られたコロニーは、color selection で 1 次スクリーニングを行ない、その内フラグメントの挿入が確認されたものについては、colony PCR により挿入配列のサイズを確認した。

RFLP 検出

AFLP 多型フラグメントのクローニングで得られたプラスミドの挿入配列は、AFLP で用いた Preselective primer で増幅した。増幅した DNA 産物は、ECL™ direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、多型の有無を検出した。ハイブリダイゼーションの標的 DNA は、*Z. matrella*、*Z. japonica* およびそれらの F₁ 66 個体のゲノム DNA (30 μ g) を EcoRI で 1晩消化した産物を用い、アガロースゲル電気泳動後、メンブランフィルター (Rosch ポジティブチャージナイロンメンブレン) に 4 時間アルカリプロットした。このフィルターに対して、標識プローブをハイブリダイズ (42 $^{\circ}$ C、16 ~ 24 時間) し、ECL の手法に従って化学発光による検出を行った。

多型フラグメントの塩基配列決定と既知遺伝子との同源性検索

AFLP 多型フラグメントのクローニングで得られたプラスミドの挿入配列は、T7 promoter primer (Novagen) および U-19mer Primer (Novagen) を用いて増幅した。増幅した DNA 産物は GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) で精製し、シーケンス反応に用いた。シーケンス反応は Dye terminator 法で行い、反応産物は ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) で電気泳動後に Sequencing Analysis™ 3.4 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を解析した。

各フラグメントの塩基配列は、解析プログラム (DDBJ

FASTA) を用いて、塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録された既知の遺伝子の塩基配列に対する同源性検索を行った。なお、検索対象は植物由来の DNA 塩基配列とした。

結 果

AFLP で得られた多型バンドを切り出してプラスミドにクローニングし、151、192、202、229、234、333、427bp の 7 クローンを単離した (図 1)

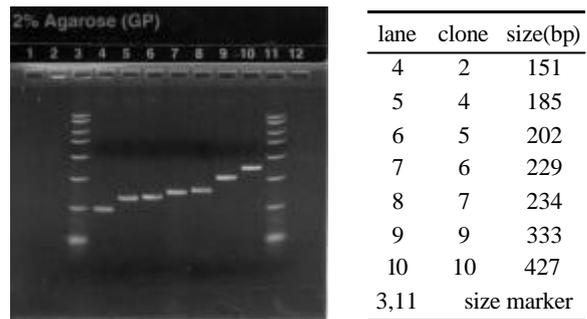


図 1 クローニングしたフラグメントの電気泳動像

AFLP フラグメントのクローニングで得られた 7 つのフラグメントを HRP 標識して作出したプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、202、234、333、427bp の 5 フラグメントから作成したプローブについてシグナルが得られたが、151、185bp のフラグメントでは明瞭なシグナルが検出されなかった (表 1)。さらに、シグナルが得られた 5 つのプローブの内、229、234、333bp のプローブについて多型が認められたが、202、427bp の 2 つについては多型が検出されなかった (図 2、表 1)

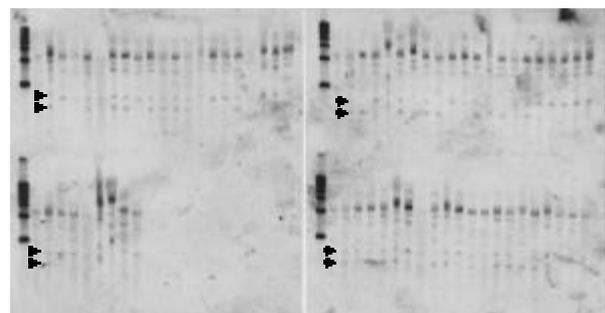


図 2 多型の認められた RFLP

注) プローブは fragment 7 を用いた。
矢印部分に多型あり。

AFLP フラグメントのクローニングで得られた 7 フラグメントのうち、151、192、202、229、234、333bp の 6 フラグメントについて塩基配列を決定した (表 2)。

これらの塩基配列について、DDBJ FASTA による相

表 1 AFLP から作出したプローブを用いた RFLP

clone	size	signal*	polymorphism*
2	151	N.D.	N.D.
4	185	N.D.	N.D.
5	202	+	N.D.
6	229	+	+
7	234	+	+
9	333	+	+
10	427	+	N.D.

* ND :検出されず

同姓検索を行なった結果、フラグメント5 (202bp) を除く 5 つのフラグメントについて、既知の構造遺伝子の一部と類似した配列が認められた(表 3)。フラグメント 2(151bp)は、シロイヌナズナの EGXT-A4 (endoxyloglucan transferase) 遺伝子⁴⁾と、フラグメント4 (192bp) は *Kluyveromyces marxianus* の ribosomal DNA (rDNA) repeat¹⁵⁾とそれぞれ相同性が認められた。また、フラグメント6 (229bp) はイネ(*Oryza sativa*)²⁵⁾ やソルガム(*Sorghum bicolor*)¹⁴⁾など、多くの植物種由来のレトロトランスポゾンの構成要素である gag/pol polyprotein 遺伝子と相同性が認められた。フラグメント 7 (234bp) はイネ²¹⁾の Tam3 トランスポゾンの

表 2 AFLP多型フラグメントの塩基配列

Clone 2

GAAACAATTTAGAAAATAGTAGATCAGAGTGAAATTATTAGAATAAAATCCTCCAAAGGGGTTC ATCGGCACGCAGGCCGAAAATATCTCAGAGCAGATATATCACTAT

Clone4

ATGCCGAGTCAGGCCAGCAAACACGAATGACTGAACACGGATAAGCTCCCATGCCTTTATTATAT ACCGCGGCAGTACTGTTGTCTGCATATGACTGTAGTTTAGTCTGTTATTTAGAGCAGCTTTTCTGTA TCTTAGGAACACACTCTGCAGG

Clone5

TACATCTGAAAAAGGAAAAAAGAAAAAACCAGAAAATCTTTGAGTTTTGGGCCGAAACTGCGCG CGGCCACTGGCTACAGTAGCGCACGCGGCCACCATTTGCTTTCGACCCGGGCTCAGCGCGC GGCGGAAAATCGGGTGAGGCAACCTAGGCCTGGAC

Clone6

CTGGACTAAATGTATCTTCATAGTCAAACCATACCTCTGCTTGAAACCTTTGGTGACTAGACGAG CTTTGTAGCGCTCTATAGAGCCATCAGCATTTTTCTTGATTTTATAGACCCACTTGCAATCAATTAC GTTTCGTCCTGGAACCTGTGCAACAAGCCGCAAGTCTTGTGCTTTGCAATGC

Clone7

TTCTGCATTGCATCTGGAGTTAGGCCTCGTAAATTTGCTTTAGATATGGATGTGAGATGGAACAGC ACTTATCTAATGCTACAGCACTTGGTTTCATACCGAGATCCCTTTGGTGTATTTATCTGTGCTAATT ATCAGGTTTCTGCTGGTGCTAGACCACTTTGACTGATGATCACTAGTATGTTGGTAATAAAATT

Clone9

GAACGTGAGGCAACCGCTAGCTTGCCTCATGCCAAGCCTCGTACGGCGTCTGCCGCCGAGCGC CTTGGTGGGCGAGCAGTTGAGGATGTAGACGGCTGTACCACCGCCTCTCCCTAGATGATGGCCG GCATCCCTCTCTGCTTGGAGGGGCTCGGGCCATCCCCACCACCGTCTGGTTGCGCCGTTTCGACGA CGCCGTTCTGCTGCGAGCTGTACGGCGTGGAGTAGTGGAGCTAAATCCCCTCGTCAGCGCAGTAC GACGTGAACCCAGCCGC

transposase、また、シロイヌナズナの Ac-like トランスポゾンの transposase 遺伝子¹³⁾など、transposase 遺伝子との相同性が認められた。さらに、フラグメント9 (333bp) は copia-like retrotransposon の gag/pol polyprotein 遺伝子⁸⁾の一部と高い相同性が認められ、6 フラグメント中、フラグメント6 および 9 の 2 クローンについてレトロトランスポゾン遺伝子領域との相同性が確認された。

表 3 DDBJ/FASTAによる Homology Search の結果

Fragment	Gene	Z-Score
2	EXGT-A4	125.2
4	part of rDNA repeat	143.9
5	none	
6	gag/pol protein*	404.8
7	tam3 transposase gene**	308.4
9	gag/pol polyprotein*	1021.4

*: Part of copia-like retrotransposon gene

** : Part of tam3 transposon gene

考 察

今回の実験では、AFLP の多型バンドを切り出し、適当なプラスミドに挿入することで多型フラグメントを単離することが可能であった。

また、これらのフラグメントを標識することで RFLP プ

ローブとして利用することが可能であると示唆されたが、フラグメントの長さが 200bp 以下の場合にはシグナルが得られなかった。このことは、HRP 標識は一本鎖 DNA に対しランダムに行われるため、フラグメントの塩基数が短い場合にラベリング効率が低くなることに伴う検出限界に起因すると考えられた。しかし、AFLP では 50bp ~ 500bp の領域にバンドを得るために最適化されている手法であり、また、100bp ~ 200bp 付近に比較的多型が多く認められることから、Inverse PCR 法等によりフラグメント前後の配列情報を得る方法や、あるいは、フラグメントまたはその近傍の目的とする多型に特異的な配列を用いて PCR による多型検出を行なうことも有効であると思われる。たとえば、Xu ら²⁶)はリンゴ(*Malus pumila*)において、遺伝子と緊密に連鎖した AFLP マーカーについて PCR-base のマーカーである、SCARs(sequence-characterized amplified regions)マーカーへの変換を試み、15AFLP マーカー中 11 マーカーを変換でき、かつ AFLP の結果と一致したと報告している。

さらに、今回は EcoRI 消化ゲノム DNA に対してハイブリダイゼーションを行なったが、シグナルが得られた 5 プローブ中 3 プローブについて多型が検出された。多型が認められなかったものについては、MseI サイトに変異があり EcoRI 側には多型がなかったと考えられた。ニワトリにおいて AFLP は EcoRI でなく 4 塩基認識制限酵素である TaqI 認識部位またはその周辺の塩基配列の多型によって生じると報告されている¹¹)ことから 4 塩基認識の制限酵素を用いた多型の検出頻度が、認識部位の多さに比例してより高頻度で検出されている。そのため、今回 EcoRI で多型が認められなかったプロローブにおいても、MseI 側の多型を検出することにより、多型が検出される可能性は高い。しかし、シバにおいては 3 プローブについて多型が認められたことから、MseI 認識部位だけでなく EcoRI 側にも多型が存在することが確認された。シバ属は雌蕊先熟で他殖が優勢な自殖可能な種であるが、このように、比較的検出されにくい EcoRI 側の多型が高頻度で保たれていることから、種内の多型性が豊富に保存されていると考えられる。また、ダイズ(*Glycine max*)において AFLP を STS (sequence-tagged site)マーカーに変換して、フラグメントの解析を行い、6 個の STS マーカー中に、8 箇所の塩基の挿入および欠失、また、2 箇所の MS-DNA (microsatellite DNA) が検出されたという報告¹⁷)もあり、AFLP は制限酵素認識部位近傍の変異だけでなく、AFLP フラグメント自体の塩基数の変異によるものも

あり、その場合は RFLP ではわずかな塩基数の変異が検出できない可能性があると考えられた。

一方、AFLP フラグメントの塩基配列について、塩基配列が決定できた 6 つのフラグメントのうち 5 つのフラグメントについて、既知の構造遺伝子との間に相同性が認められた。今回用いた AFLP 多型フラグメントは連鎖解析により連鎖地図上にマッピングされているが⁹)、このような AFLP 多型フラグメントは構造遺伝子の近傍に比較的高い頻度で認められる可能性が示唆された。

また、特徴的な点として、相同性検索の結果が得られた 6 フラグメント中の 2 つのフラグメントがレトロトランスポソンの一部と、1 つがトランスポソンの transposase 遺伝子と類似した配列を含んでいたことが挙げられる。相同性検索による機能推定を行うには、得られたフラグメントが短く、繰り返し配列などの相同性が強調される傾向がある。しかしながら、これらトランスポソンは転移因子と呼ばれる、ゲノム内を移動する性質を持つ因子である。トランスポソンは断片の切り出しと転移のみが起こるのに対し、レトロトランスポソンは加えて断片のコピー数の増加や挿入配列の変異も伴い、ゲノム構造の多様な変化をもたらすため、進化や系統解析のマーカーとして用いられている¹⁰)ため興味深い。さらに、カラスムギ (*Avena spp.*)の交雑系統から得られた AFLP を STS マーカー化し、そこから単離されたレトロトランスポソンマーカーを用いたマッピングが行われている。交雑系統内においても転移、コピー数の増加などの変異が生じ、ゲノムの多様性を高頻度でもたらすことが確認されている²⁷)。シバにおいてもこれらのフラグメントをマーカー化し、地域に適應した系統 (エコタイプ)の同定・識別や一般市販品種の同定・識別に応用できる可能性がある。また、シバのトランスポソン領域の DNA マーカーを利用した連鎖解析は効率的で、環境適應性等の量的形質の評価などとの組み合わせにより、育種目標となる形質を、簡便で再現性の高い DNA マーカーとして取り扱うことができることが示唆された。

引用文献

- 1)安部 亜津子ら(2000)日本畜産学会第 97 回大会講演要旨
- 2)安部 亜津子ら(2001)島根畜試研報 34:15-18
- 3)Ajmone, M.P. et al(1998)Theor. Appl. Genet. 96:219-227
- 4)Akamatsu T. et. al(1999)Plant Physiol. 121,715-721
- 5)Badra, et. al. (2000)Mol. Biol. Evol. 17:499-510
- 6)Barrett, B. A. and Kidwell, K. K. (1998)Crop Sci. 38:

- 1261-1271
- 7)Becker J.et.al.(1995)Mol.Gen.Genet.249:65-73
- 8)Buell,R.et.al.(2000)DDBJ/EMBL/GenBank database
- 9)蝦名 真澄ら 未発表
- 10)廣近洋彦(1996)植物のゲノムサイエンス、秀潤社
:114-121
- 11)KnorrC.et.al.(2001)Anim. Genet.32,156-159
- 12)小林 真 ら(2000)日草九州支部報 30(2)41-43
- 13)Lin,X.et.al.(1999)Nature 402:761-768
- 14)Llaca,V. et.al.(1998)DDBJ/EMBL/GenBank database
- 15)Llorente,B.et.al.(2000)FEBS Lett. 487,71-75
- 16)Meksem K.et.al.(1995)Mol.Gen. Genet. 249:74-81
- 17)Meksem K.et.al.(2001)Mol.Genet.Genomics265
:207-214
- 18)Nakamura K. et.al.(2001)Mol. Genet. Genomics 265
:687-693
- 19)OstenM.et.al. (1996)Genomics 37:289-294
- 20)Ren N.andTimkoM.P.(2001)Genome 44:559-71
- 21)Sasaki, T. et.al.(2000)DDBJ/EMBL/GenBank
database
- 22)Sharbel,T.F. et.al.(2000)Mol.Ecol.9:2109-2118
- 23)Van Hearingen W.A. et. al(2001)J Hered92:322-326
- 24)Vos,P.et.al.(1995)Nucleic Acids Res.23,4407-4414
- 25)Wing,R.A. et.al(2000) DDBJ/EMBL/GenBank
database
- 26)Xu M.et.al.(2001)Genome44:63-70
- 27)Yu GXandWiseRP(2000)Genome43:736-749