

論文

アカシア・マンギウムSSRマーカーの開発

磯田圭哉⁽¹⁾・渡辺敦史⁽¹⁾

Keiya Isoda⁽¹⁾ and Atsushi Watanabe⁽¹⁾

Development of SSR markers for *Acacia mangium*

要旨：熱帯産早生樹種で主にパルプ用材として、東南アジアを中心に大規模植林が行われているアカシア・マンギウムに有用なSSRマーカーを開発した。エンリッチメント法により作成した濃縮ゲノミックライブラリから、99種類のSSRを含む領域の塩基配列が得られた。このうちの半数は、プライマーを設計することができないなどの問題があった。今回、12種類のプライマー組を設計し、PCR増幅を行った結果、6種類の多型的SSRマーカーが得られた。これらのマーカーを近縁種で雑種を作ること知られているアカシア・アウリカリフォルミスに適用したところ、アカシア・マンギウムと同様の対立遺伝子が検出された。両種間に特異的な対立遺伝子を保有するマーカーは見られなかったため、単純な雑種判別には用いることができないが、個体識別や、花粉親同定などに利用可能と考えられる。これまでに報告されているマーカーに、今回開発したマーカーを加えることにより、アカシア・マンギウム採種林および雑種採種林における花粉動態や、採種林から得られる種子の両親を決定することによる品質評価などが、より高精度で可能となると考えられる。

(1) 林木育種センター

〒319-1301 茨城県日立市十王町伊師3809-1

Forest Tree Breeding Center

3809-1 Ishi, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301 Japan

1 はじめに

アカシア・マンギウム (*Acacia mangium*) は熱帯性のマメ科植物で、オーストラリア北部やニューギニアなどに自生する。成長が早く、土地に対する適応力が高いことなどから、東南アジア諸国でパルプ用材として大規模な植林が行われている。また、近縁種のアカシア・アウリカリフォルミス (*A. auriculiformis*) としばしば種間雑種を形成するが、その生長力の高さから、雑種個体 (ハイブリッドアカシア) による植林も広く行われるようになってきた (古越, 2003)。現在植林に用いられている材料は、アカシア・マンギウムもしくは雑種、いずれの場合も由来が明確でない種子を使用したものがほとんどであり、改良することによりさらなる高収量が見込まれる。最近では、アカシア・マンギウムをパルプ用材としてだけでなく、家具用材としても利用する試みもなされており、改良種子に対する需要は高まると思われる。

1992年から2002年にかけてJICAのプロジェクトとしてインドネシア林木育種計画が行われた (Kurinobu 1999, Kurinobu and Rimbawanto 2004)。ここでは、アカシア・マンギウムの実生採種林を造成し、そこから得られた優良種子を用いて、第2世代の採種林まで造成された。このプロジェクトの中で、DNAマーカーによる採種林内の花粉動態の調査が行われた (Yuskianti and Isoda 2002)。Butcher *et al.* (2000) により開発されたSSRマーカーのうち、有用であった12マーカーを用いて採種林内の全個体を対象に父性排除検定をおこない、花粉の有効飛散距離などに関する知見を得た。しかし、用いた12マーカーでは花粉親の同定能力に限界があり、さらに多くのマーカーが必要であることが示唆されている。本研究では、アカシア・マンギウムの採種林管理をサポートするための、新たなSSRマーカーを開発することを目的とした。

2 材料と方法

2.1 供試材料とDNA抽出

林木育種センター熱帯温室に保存されているアカシア・マンギウムの成葉から改良CTAB法 (白石・渡辺, 1995) によりDNAを抽出し、SSRマーカーの開発に使用した。また、その後の解析のために、インドネシア中部ジャワ州のウォノギリにある実生採種林よりアカシア・マンギウム、アカシア・アウリカリフォルミスおよびそれらの種間雑種と思われるもの各5個体、インドネシアの南カリマンタン州プライハリにある実生採種林のアカシア・マンギウム1母樹の葉および種子8粒を採取し、同様にDNAを抽出した。

2.2 SSRマーカーの開発

SSRマーカーの開発は、ピオチンラベルしたSSRプローブによるエンリッチメント法 (Hamilton *et al.* 1999, Fukatsu *et al.* 2005) により行った。本法の概要を図1に示した。今回、ゲノムDNAを切断する制限酵素は *Nhe* I, *Hha* I および *Alu* I の3種類を用い、SSRプローブにはACの10回繰返しを用いた。塩基配列はBigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてGeneAmp 9700 (Applied Biosystems) でシーケンシング反応し、これをABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で電気泳動, sequencer 4.1.4 (Gene Code) で解析することにより決定した。得られた塩基配列情報から、有用なものについてOLIGO 4.0ソフトウェア (National Biosciences) を用いてプライマーを設計した。各プライマーは、

3 個体のアカシア・マンギウムを用いてPCR増幅後、1 %アガロースゲル電気泳動により増幅の有無を調べ、増幅が見られたものをSSRマーカーとして以下の実験に供した。

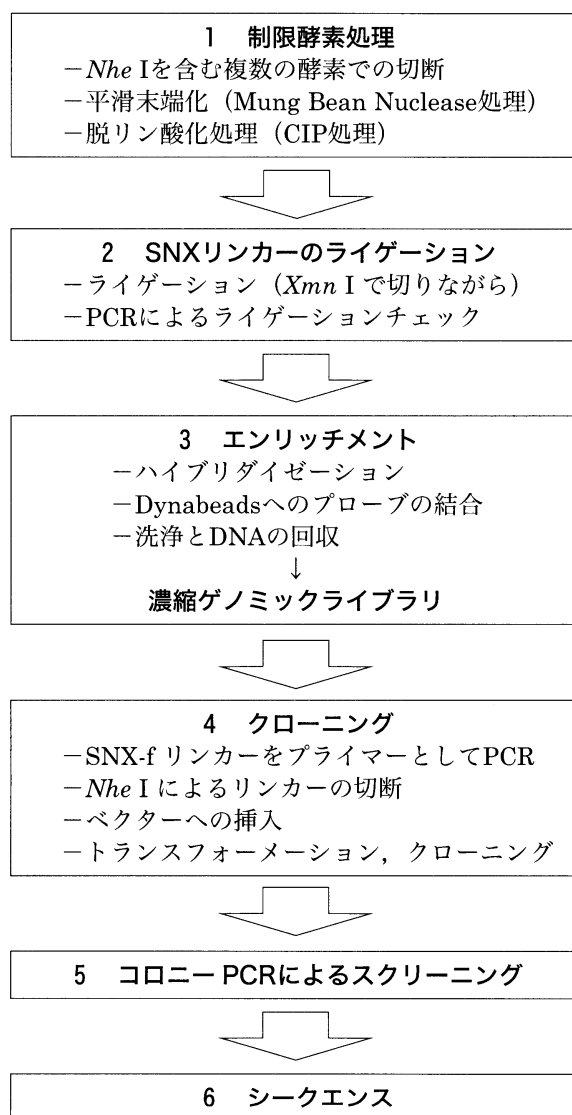


図-1 本研究で用いたSSR開発手順の概要

2.3 SSRマーカーの評価

開発したマーカーを評価するため、M13-Tailing 法 (Schuelke 2000, Boutin *et al.* 2001) により、まずアカシア・マンギウム 5 個体を用いて多型性を調べた。次に、多型的であったマーカーについて、アカシア・マンギウム 1 母樹から採取した 8 種子とその母樹の遺伝子型解析を行った。また、アカシア・アウリカリフォルミスおよび雑種個体についても開発したマーカーが利用できるかどうかを、それぞれ 5 個体について遺伝子型解析することにより調べた。PCRは10 μ l中に 1 $\times$ PCR buffer, 200 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0.01 μ M M13-tailed forward primer, 0.15 μ M reverse primer, 0.15 μ M FAM-labeled M13(-21) primer (5'-

TGTAACGACGGCCAGT-3', Applied Biosystems), 0.25U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 約20ng テンプレートDNAの反応組成で, PTC-200 (MJ Research) を用いて行った。まず94°C で1分間変性させた後, 94°C で30秒, 63-54°C (1 サイクルごとに1°C 減少, タッチダウンPCR法 (Don *et al.* 1991)) で30秒, 72°C で1分を10サイクル行い, その後94°C で30秒, 53°C で30秒, 72°C で1分を30サイクル繰返し, 最後に72°C で10分間伸長反応させた。PCR産物はABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でGeneScan 350 size standard (Applied Biosystems) とともに電気泳動し, Genotyper 3.7 (Applied Biosystems) によりサイズを決定した。

3 結果と考察

3.1 SSRマーカーの開発

今回, Hamilton *et al.* (1999) のエンリッチメント法により濃縮ゲノミックライブラリを作成した。これをクローニングして得られたコロニーから, (AC)₁₀プライマーを3番目のプライマーとしたコロニー PCRによって, SSR領域の有無をスクリーニングした。その一例を図-2 に示した。

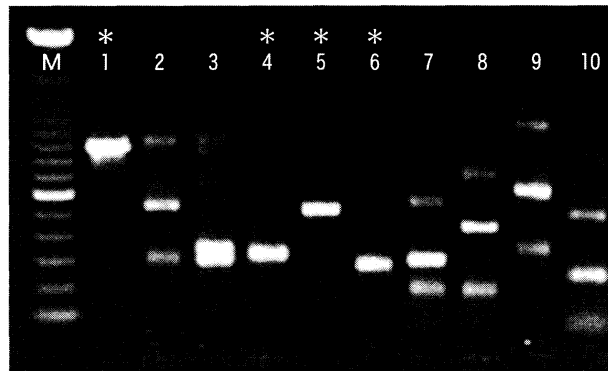


図-2 SSR保有クローンのスクリーニングのためのコロニー PCR産物の電気泳動像。
* : SSR配列を保有していないと思われるクローン, M : サイズマーカー (100bpラダー)

レーン1, 4, 5, 6 (図中アスタリスクで示した) はバンドが1本しか見られないが, それ以外は3本みられる。SSRを含むクローンは, 通常のコロニー PCR (T3およびT7プライマーによる1本のバンドが見られる) に加え, (AC)₁₀プライマーとの間でも増幅反応が起こるため, 2本以上のバンドが観察される。192個のコロニーを対象にスクリーニングしたところ, 128コロニーで陽性 (2つ以上のバンドがみられる) となり, 十分に高い濃縮効果があったことが示された。128クローンのうち, 105クローンについて塩基配列を決定することに成功した。このうち5クローンは, 5回以上の繰返し配列が見られず, 擬陽性であった。また, 2クローンは同一の領域であった。最終的に99のSSRを含む領域の塩基配列が得られた。このうちプライマーを設計するために十分な長さのフランキング領域と, 比較的多くの繰返し数を持ち, 近傍にモノヌクレオチドリピートを含まないものは48あった。

今回は, その中から12領域を選びプライマーを設計した。これらのプライマーを用いてアカシア・マンギウム

3 個体のPCR増幅を試み、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、3 プライマー (bcAM011, 015, 054) では増幅が全く見られず、bcAM043は1 個体のみ、bcAM102は2 個体のみが増幅可能であった。残りの7 プライマーは概ね良好な増幅を示したが、bcAM085は2 本のバンドが見られた。良好な増幅を示した7 プライマーについて、アカシア・マンギウム5 個体を用いてABI 3100 Genetic Analyzerによる増幅フラグメント長の解析を行った。その結果、bcAM028は単型的であったため、これ以後の解析から除外した。最終的に、6 プライマー (bcAM013, 016, 085, 091, 105, 108) を有用なSSRマーカーとした (表-1)。なお、各マーカー領域の塩基配列上に既報のプライマー (Butcher *et al.* 2000) 配列は無いことから、これらは新しいSSRマーカーであると考えられる。

表-1 エンリッチメント法により開発したアカシア・マンギウムのSSRプライマー

マーカー	モチーフ	プライマー配列 (5'→3') *	増幅**
bcAM011	(AC) ₁₄	f: (M13)-AGGTAAATACGTGTATGCTAATC r: CAACCTTCCCTTTACTTACTC	×
bcAM013	(CA) ₈ (TA) ₆ GC (GA) ₅ CA (GA) ₈	f: (M13)-CGCACTTCAATTATTTTCAAC r: GCCACCGTAAAGGTAAGAAC	○
bcAM015	(AC) ₁₂	f: (M13)-CTCCACCTTGAAGAATAATCATC r: TTTTAAGGGGAGAACTAAAGAAG	×
bcAM016	(CA) ₁₃	f: (M13)-TTGTGCAGAAAAACAAGACC r: CGGAGCACTAAAATCAAATG	○
bcAM028	(CA) ₅ C (CA) ₆ (TA) ₆	f: (M13)-GCCCAGATGGACATCACAAC r: ATAACGACAAGCGGAGGTATAAG	○
bcAM043	(AC) ₉ AA (AC) ₆	f: (M13)-GTTGAGAGGCATCCTTTAACAC r: CCACTTTTCGTTTTTGTATTTTC	1 / 3
bcAM054	(CT) ₂₀	f: (M13)-TTGAAGTCTCGACGACAGTG r: AATACTTCCCAAGAGAAGATCC	×
bcAM085	(AC) ₉	f: (M13)-AGGGTTCAAGCATCTTCTTC r: TGGGAGGCTTTGAGTATAGG	○
bcAM091	(CT) ₁₄	f: (M13)-CTCTCCCCACCTGCACCTAC r: AACCCACCACAGTAAAATGAC	○
bcAM102	(AC) ₁₉	f: (M13)-CATTCCTCCCTCTTTCATTAAAC r: GATTGTGATGGTGGTGTATGTG	2 / 3
bcAM105	(TG) ₁₄	f: (M13)-AAAAGGTGGAGATTGTGATAGAC r: ATTACCAGGCATTAGATTAAAGAG	○
bcAM108	(GT) ₈	f: (M13)-CCAAAAGTACAGCCAATACTAAG r: CACAACCTCGAATGAAAATC	○

*f: forwardプライマー, r: reverseプライマー, (M13) はテイル配列 (TGTAACGACGCGCCAGT) を示す

**PCR産物をアガロースゲル電気泳動した結果, ○: 3 個体全てで増幅, ×: 増幅せず, 1 / 3: 1 個体のみ増幅, 2 / 3: 2 個体増幅

3.2 開発したマーカーのメンデル遺伝の確認

開発したマーカーが次世代に受け継がれ、そのときメンデル遺伝をするかどうかは、種子を解析することにより調べることが可能である。図-3 にbcAM085を例として示した。母樹は150と156のアレルを保有している。

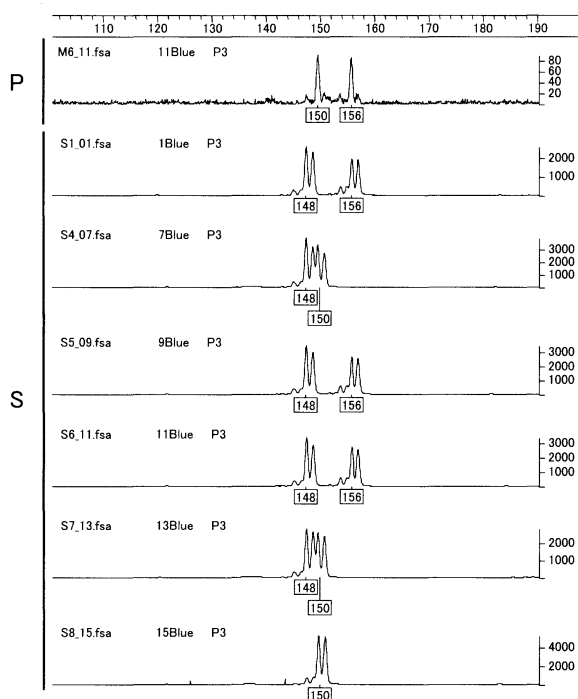


図-3 bcAM085によるアカシア・マンギウム種子と母樹の遺伝子型解析結果
P：母樹，S：種子

その下の種子をみると、150もしくは156のアレルのいずれかを保有していることが分かる。すなわち、母樹のもつ2つのアレルが分離して次世代に受継がれるメンデルの法則に適合する。実際にメンデル遺伝を検証するのであれば、複数家系のより多くの種子を用いた解析が必要であるが、今回は、1家系8種子の解析による確認だけとした。同様の解析を他の5マーカーについても行った(表-2)。

表-2 アカシア・マンギウムの種子およびその母樹における6つのSSRマーカーの遺伝子型

	bcAM013*	bcAM016*	bcAM085*	bcAM091*	bcAM105*	bcAM108*
母樹	183	182/184	150/156	184/186	149	163/164
種子1	183/187	182/184	148/156	174/184	133/149	163/164
種子2	175/183	182/184	148/156	174/184	149	160/164
種子3	175/183	182/184	148/156	174/184	149	160/163
種子4	175/183	182	148/150	174/184	149	160/164
種子5	183	184	148/156	184	149	163
種子6	175/183	182/184	148/156	184/186	133/149	160/163
種子7	183/187	182/184	148/150	174/186	133/149	164
種子8	183	184	150	ND**	149	157/164

*母樹の遺伝子型と同一のものを太字で示した

**解析上の問題により検出できず

bcAM013と105は母樹がホモ接合体であったため全ての種子で母樹のもつアレルが検出された。他の3マーカーはいずれかのアレルが種子で検出され、矛盾なく分離していることが確認された。

3.3 アカシア・アウリカリフォルミスへの適用

アカシア・アウリカリフォルミスはアカシア・マンギウムときわめて近縁な種で、しばしば自然雑種を作ることが知られている。雑種は雑種強勢を示すことがあり、それらを用いた植林も実用化されている。これまでは、偶然見つかった少数の雑種をクローン増殖により増やし、植林されてきたが、今後は遺伝的に優良な個体同士の交配や遺伝的により多様な雑種個体による植林が必要となってくると予想される。そのため、雑種を効率的に作出するための雑種採種林などの造成も試みられており、今後遺伝的に多様な雑種個体が作出されると思われる。これに際して、雑種判定や交配親の同定などの技術が必要となる。雑種判定に関しては、黄ら(2005)によって開発された共優性SCARマーカーが簡便かつ低コストであることから非常に有用であると思われる。交配親の同定については、多型性が高く、対立遺伝子の多いSSRマーカーが有用であると考えられる。よって、今回開発したSSRマーカーがアカシア・アウリカリフォルミスに問題なく使用できるかどうかを調べるため、アカシア・アウリカリフォルミスおよび雑種各5個体についてSSR解析を試みた。

図-4にbcAM085で検出されたアレルの例を示した。

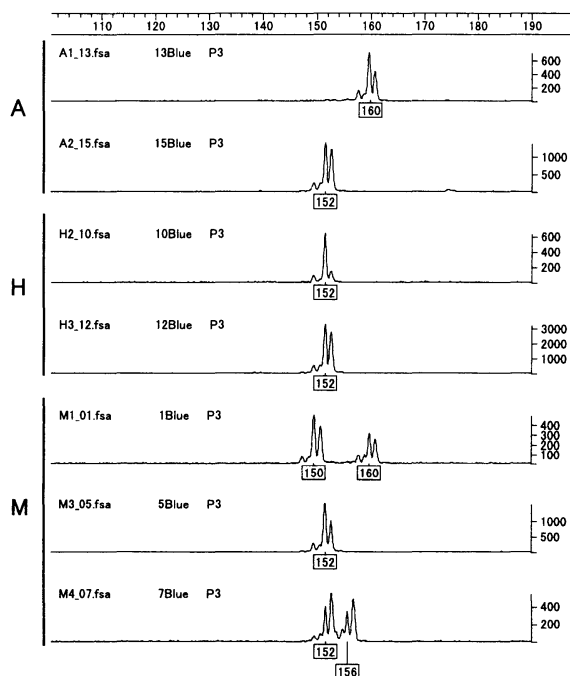


図-4 bcAM085によるアカシア・マンギウム、アウリカリフォルミスおよび雑種の遺伝子型解析結果
A：アカシア・アウリカリフォルミス，H：雑種，M：アカシア・マンギウム

アカシア・マンギウムでは150, 152, 156および160のアレルが検出され、このうち152のアレルはアカシア・アウリカリフォルミスおよび雑種においても検出された。このように、このマーカーは両種が共通のアレルを保有

していることが判明した。一方, bcAM105ではアカシア・マンギウムでは147~158のサイズのアレルが検出されたのに対し, アカシア・アウリカリフォルミスでは127および131のアレルが検出され, 雑種では両方のサイズのものが検出された(図-5)。

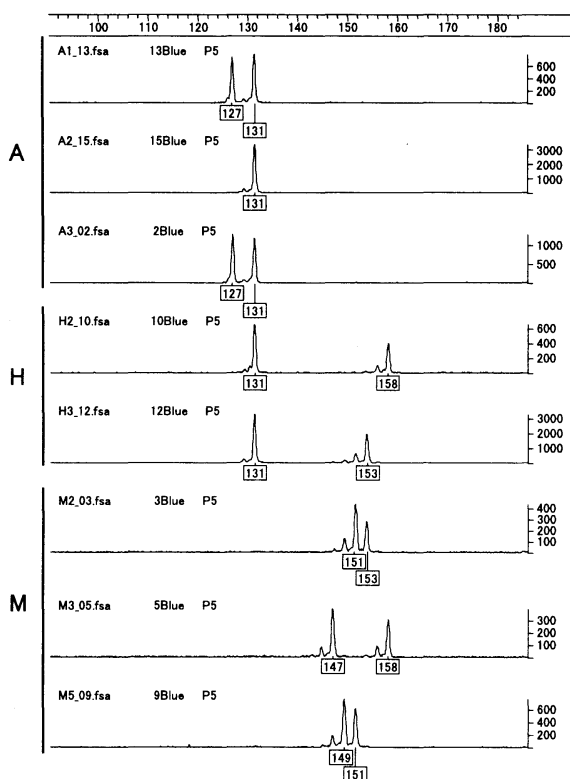


図-5 bcAM105によるアカシア・マンギウム, アウリカリフォルミスおよび雑種の遺伝子型解析結果
A: アカシア・アウリカリフォルミス, H: 雑種, M: アカシア・マンギウム

この結果からは, このマーカーは雑種判定にも使用できそうではあるが, 種子の解析ではアカシア・マンギウムにおいても133のアレルが出現しており, より多くのサンプルによる種特異性の判断が必要と思われる。その他のマーカーについても, アカシア・アウリカリフォルミスおよび雑種での増幅が可能であった(表-3)。よって, 今回開発したマーカーはアカシア・マンギウムの採種林における調査だけでなく, 両種により構成された雑種種子を得るための採種林においても利用可能であると思われる。

今回開発したマーカーを既報のマーカーと併せて使用することにより, 花粉動態を明らかにし, それに基づいて採種林の改良を行うことにより, より高い育種効果が期待される。また, 採種林で生産される種子の両親を同定し, 精英樹間交配の頻度などを推定することにより, その採種林産種子の品質評価に利用できると考えられる。

表-3 6つのSSRマーカーについてアカシア・マンギウム, アカシア・アウリカリフォルミスおよび雑種の各5個体で検出されたアレル

Marker	<i>A. mangium</i> N* Allele	Hybrids N* Allele	<i>A. auriculiformis</i> N* Allele
bcAM013	3 175, 181, 183	2 175, 183	1 175
bcAM016	4 172, 182, 184, 186	2 174, 184	1 174
bcAM085	4 150, 152, 156, 160	1 152	2 152, 160
bcAM091	4 147, 149, 151, 153	3 176, 178, 186	3 176, 178, 180
bcAM105	6 147, 149, 151, 153, 156, 158	3 131, 153, 158	2 127, 131
bcAM108	3 155, 157, 161	1 157	2 137, 142

*検出されたアレル数

謝 辞

材料の採集にあたり、九州大学大学院のVivi Yuskianti 氏、インドネシア林木育種研究開発センターのAnto Rimbawanto 博士、Yohanes Tryanta 氏のご協力をいただいた。ここに深く感謝申し上げる。本研究の一部は、日本学術振興会の特別研究員奨励費の助成により行われた。

Summary : Polymorphic SSR markers were developed and characterized in *Acacia mangium*, which is a tropical fast growing species widely planted in South-east Asia for pulp production. From enriched genomic library of *A. mangium*, 99 unique sequences containing SSR were obtained. Half of them had some problem to develop markers such as the short flanking region. In this study, 12 primer pairs were designed and consequently six polymorphic SSR markers were obtained. These SSR markers were also applied to *A. auriculiformis*, which is a close species and sometimes produce hybrids with *A. mangium*. *A. auriculiformis* possessed alleles similar to *A. mangium*. Although these markers were not useful to identify hybrids, they were still useful for clone identification and/or parentage analysis. By adding these markers to previously reported markers, it is possible to analyze pollen flow in seed orchard, to evaluate quality of seed through identification of parental trees, and so on with higher resolution.

引用文献

- 1) Boutin-Ganache, I., Raposo M., Raymond, M. and Deschepper, C.F. (2001) M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele sizing methods. *BioTechniques* 31: 24-27.
- 2) Butcher, P.A., Decroocq, S., Gray, Y. and Moran, G.F. (2000) Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1282-1290.
- 3) Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. and Mattick J.S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 4008.

- 4) Fukatsu, E., Isoda, K., Hirao, T., Takahashi, M. and Watanabe, A. (2005) Development and characterization of simple sequence repeat DNA markers for *Zelkova serrata*. Mol. Ecol. Notes 5 : 378-380.
- 5) 古越隆信 (2003) ハイブリッドアカシアの育種とその利用. 熱帯林業 58: 8-16.
- 6) Hamilton, M.B., Pincus, E.L., Di Fiore, A. and Fleischer, R.C. (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. BioTechniques 27: 500-507.
- 7) 黄発新・AYPBC Widyatmoko・張変香・白石進 (2005) 共優性SCARマーカーによるハイブリッドアカシア (*Acacia mangium* × *A. auriculiformis*) の雑種鑑定. 日林誌 87: 149-152.
- 8) Kurinobu, S. (1999) Final report on seed source evaluation. -Forest tree improvement project in Indonesia phase I-. Bull. For. Tree Breed. Center 16: 1-46.
- 9) Kurinobu, S. and Rimbawanto, A. (2004) Genetic improvement of plantation species in Indonesia. -Outline of project achievement-. Bull. For. Tree Breed. Center 20: 9-18.
- 10) 白石進・渡辺敦史 (1995) *rbcL*遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. 日林誌 77: 429-436.
- 11) Schuelke, M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology 18: 233-234.
- 12) Yuskianti, V. and Isoda, K. (2002) Mating system analysis of *Acacia mangium* using DNA marker in the SSO (group C) in the South Kalimantan. JICAインドネシア林木育種計画報告書 FTIP-P 2 -No.44.

「林木育種センター研究報告 No.22」正誤表

ページ	行	誤	正
目次	12	渡辺 敦史	渡邊 敦史
35	3	戸田忠雄 ⁽¹⁾	戸田忠雄 ⁽²⁾
35	5	Yoshitake Fujisawa and Tadao Toda	Yoshitake Fujisawa ⁽¹⁾ and Tadao Toda ⁽²⁾
35	欄外	(未記入)	(2)日中協力林木育種科学技術センター計画 (安徽省松材線虫抵抗性育種センター担当) <u>The Japan-China Cooperation Science and Technology Center</u> <u>forest Tree Improvement Project</u>
51	3	渡辺敦史	渡邊敦史
60	下から6	渡辺敦史	渡邊敦史
214	下から5	河野楯蔵	河野楯蔵
巻末「論文審査者」	2	宇都宮大学農学部 附属演習林	宇都宮大学農学部附属演習林助教授
同上	6	北海道立林業試験場林業経営部	北海道立林業試験場 林業経営部 主任研究員
同上	6	Makoto Kuromaru	Dr.Makoto Kuromaru
同上	9～10	東北大学大学院農学研究科附属 複合生態フィールド教育研究センター	東北大学大学院農学研究科 附属複合生態フィールド教育研究センター 生物共生科学研究室助教授
同上	13	(未記入)	日本森林技術協会 北海道事務所 主任研究員
同上	13	Tsugio Ohshima	Mr.Tsugio Ohshima