

論文

スギ精英樹クローン識別のためのSCARマーカーの開発

渡邊 敦史⁽¹⁾・西山 和美⁽²⁾

Atsushi Watanabe ⁽¹⁾ and Kazumi Nishiyama ⁽²⁾

Development of SCAR markers to discriminate plus-tree clones of Japanese Cedar, *Cryptomeria japonica* D. Don

要旨：RAPDマーカーによって行われてきたスギのクローン識別をより再現性の高いDNAマーカーであるSCARマーカーに変換することを試みた。27のRAPDマーカーのうち18マーカーについてSCARプライマーの設計に必要な塩基配列を得ることができた。SCARプライマーは、RAPDプライマーを14塩基伸長させる方法とソフトウェアによって最適プライマー部位を探索する方法の二つの方法で行い、両者の相違を比較した。その結果、単純に14塩基伸長させたプライマー対では多型を示す割合が高く、より効率的なマーカー開発が可能であった。多型を示すマーカーのいくつかは、対立遺伝子の関係にあると考えられる複数フラグメントを同時に増幅した。最終的に、増幅が明瞭であったSCARプライマーは9プライマーであり、マーカー数は12であった。これらのマーカーを用いることによってスギのクローン識別を行った結果、SCARマーカーがスギのクローン識別に普遍的に利用可能であることが明らかとなった一方で、これまでのRAPD分析から得られた識別率よりも低い値を示した。今後は、より高い精度でクローン識別を行うためにもSCARマーカーの蓄積が必要である。

Summary: We attempted to convert RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers which have been used to discriminate Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) plus-tree clones into SCAR (sequenced characterized amplified region) markers that guarantee high reproducibility. Twenty-seven RAPD markers were cloned and sequenced, of which, sequences derived from 18 RAPD markers were provided to design SCAR primer pairs. SCAR primer pairs were designed by two kinds of procedures. One is designing 24-mer primer pairs, simply adding 14-mer to 10-mer of RAPD primers based on sequences determined newly, and other is designing new primer pairs by software. Comparing with the two different procedures, expansion of RAPD primers was more effective to reveal polymorphisms among clones of Japanese cedar. Some SCAR primer pairs yielded two or more fragments that was likely to be allele. Eventually, nine SCAR primer pairs with 12 markers were unambiguous. When some Japanese cedar plus-tree clones were discriminated using the developed SCAR markers, these markers were useful to be clone identification while discrimination power of SCAR markers was lower than RAPD markers that have been reported. Therefore, it is essential to develop further more SCAR markers to discriminate Japanese cedar plus-tree clones with high confidence.

(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

(2) 林木育種センター関西育種場

〒709-4335 岡山県勝田郡勝央町植月中1043

Kansai Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center

1043 Uetsukinaka, Shoo, Katsuta, Okayama 709-4335 Japan

1 はじめに

スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) は、最も重要な林業樹種の一つであり、成長や通直性または病虫害抵抗性など諸形質に優れたスギ個体は精英樹としてこれまでに全国で3,651個体が選抜され、クローン増殖されてきた。これら精英樹クローンは育種母材として様々な公的機関で継続的に管理されている。一方、管理が長期間にわたる結果、植栽ミスやミスラベリングが生じる可能性が以前より指摘されている(後藤ら, 2000)。さらに、スギはさし木造林が盛んであり、精英樹として選抜されたクローンの中にはさし木品種が含まれている(宮原ら, 1994; 後藤ら, 1999; 佐々木ら, 2002)。従って、同一クローンが異なる名称のクローンとして取り扱われている場合もあり、適切な系統管理は林木育種における大きな課題の一つとなっている。そこで、種々の手法を利用することによってスギクローンの識別法の開発が行われてきた。例えば、アイソザイム分析によってさし木由来の品種を構成するクローン数の推定(Miyazaki and Sakai, 1969; 奥泉・大庭, 1990; Okuizumi, 1993) やスギ精英樹の識別が試みられている(戸丸, 1991)。RAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析(Williams *et al.* 1990) は情報量が多いこと、分析が比較的容易であることから、スギ品種または個体の識別に関する多数の報告が行われている(宮原ら, 1994; 高田・白石, 1995; 後藤ら, 1999; 金山ら, 2002; 西山ら, 2002; 佐々木ら, 2002)。最近では、スギのマイクロサテライトもしくはSSR (simple sequence repeat) が多数開発されたことから(Moriguchi *et al.*, 2003; Tani *et al.*, 2003b; Tani *et al.*, 2004), より精度の高い識別法の確立が期待されており、平尾ら(2006) は公表されたSSRマーカーを利用して関東育種基本区内スギ精英樹835クローンを識別した。SSRマーカーは自動蛍光シーケンサーの使用によってフラグメントサイズを正確な数値データに変換して蓄積することが容易であり、SSRマーカーの遺伝子型をデータベース化できる。さらに、SSRマーカーは共優性であることから、クローン識別に留まることなく、親子鑑定といった研究や分析にも容易に発展できる(Moriguchi *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2005)。従って、現時点でSSRマーカーは最も有効な分析手法である一方で、マーカーを効果的に活用するためには高額な機器が必要であり、ランニングコストは必ずしも安価ではない。これら機器やコスト面の関係からSSRをマーカーとして十二分に活用できる機関は限定されており、クローン識別には簡易な設備でも対応可能であり、より安価かつ分析が容易なマーカーを開発することができれば、多くの機関で系統管理に必要なマーカーシステムを作ることができる。

Paran and Michelmore (1993) は、RAPD分析によって得られたフラグメントのDNA塩基配列を決定し、新たなプライマーを設計することで目的のマーカーを特異的にPCR増幅するSCAR (sequence characterized amplified regions) マーカーを開発した。SCARマーカーは容易に分析可能であり、再現性が高く、簡易な設備で対応可能である。これまでに有用なマーカーをSCARマーカー化した報告例は数多い(Hernández *et al.*, 2001; Tani *et al.*, 2003a)。スギのクローン識別を目的としたSCARマーカーはすでに報告されている(久枝ら, 2000) が、プライマーおよび塩基配列情報は公表されていないため、現段階で広く利用できないのが現状である。さらに、一つのSCARマーカーが保有する情報量は少なく、遺伝的に近縁な個体間の識別にも対応可能とするためにはより多くのSCARマーカーを開発し、プライマー情報を蓄積していく必要がある。スギについてはRAPDマーカーによってクローン識別がこれまでも行われており、これらの情報を活用することでマーカーの開発は比較的容易である。

そこで、これまで報告されたRAPDマーカーのうち、西山ら(2002) が公表した25マーカーを中心にSCARマ-

カーへと発展させた。その際、二つの異なる方法によってプライマーを設計し、多型を得るための効率性について検討した。対象としたRAPDマーカーは、特定の虫害抵抗性個体の識別に利用するため開発されていたことから、SCARマーカーが他のスギ精英樹クローンの識別にも普遍的に利用可能か検討した。

2 材料および方法

SCARマーカーの識別能力の評価には、スギカミキリ抵抗性個体38クローン（植木ら，2000; 西村・佐々木，2001; 西山ら，2002）および関東育種基本区内の精英樹からランダムに96クローン，計134クローンを供試した。各クローン供試個体数は1個体である。

RAPD分析は、西山ら（2002）に従った。得られたRAPDフラグメントは、アガロースゲルから切り出した後、Gel Extraction Kit（QIAGEN）によって精製した。精製したフラグメントDNAは、TOPO TA cloning kit（Invitrogen）によってクローニングし、それぞれ8コロニーをピックアップした。アルカリミニプレップ法によってプラスミドDNAを調整し、プラスミドDNAを鋳型として、ABI 3100 genetic analyzer（Applied Biosystems）によって各フラグメントのDNA塩基配列を決定した。プライマー設計にはGeneFisher（Giegerich *et al.*, 1996）を利用した。

新たに設計したプライマーセットを用いて、PCRは2.0mM MgCl₂，0.2mM 各dNTP，0.5unit/10μl *Taq* DNA polymerase（Invitrogen），0.25μM primerの反応溶液組成で行った。PCR反応は、DNA Engine PTC-200（MJ Research）もしくはGeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems）を用いて行った。PCRは初期値としてアニリング温度を60℃に設定し、1サイクルごとに1℃ずつ下げ、10サイクル経過後50℃になった時点でアニリング温度を固定して残る20サイクルを行うtouch down PCRを用いた。すべてのサイクルで変性は94℃30秒，伸長反応については72℃90秒に固定した。増幅産物は2%アガロースゲルで電気泳動後，UVトランスイルミネーター上で検出した。

3 結果と考察

3.1 SCARプライマーの設計

SCARプライマーの開発には、スギカミキリ抵抗性クローン識別マーカーとして公表した25のRAPDマーカー（西山ら，2002）のうち、フラグメントサイズが短いため、DNA塩基配列決定後プライマー設計が困難と予想される3マーカー（U06/250・A09/250・B11/200）を除外した22マーカーと、新たに追加した5マーカーを含めた計27マーカーを対象とした。クローニング後、十分なPCR増幅産物が得られなかったマーカーと1000bpを超えるフラグメントサイズを示したマーカーについては十分な数のポジティブコロニーが得られなかったことから、最終的に18のRAPDマーカーについてDNA塩基配列を決定した（表-1）。PCRもしくはクローニングの際に生じるartifactを考慮し、複数コロニー間で一致した塩基配列のみをSCARプライマー設計の候補として選抜した。8つのRAPDマーカーでは塩基配列が異なる複数のフラグメントの存在が明らかとなった。例えば、B11/700では、703bpと686bpを示すフラグメントが混在していた。これはRAPD分析を行った際に、サイズがわずかに異なるフラグメントが複数増幅されていたにもかかわらず、アガロースゲル電気泳動では十分に分離できなかったためと考えられる。Hernández *et al.*（2001）は、RAPDフラグメントのダイレクトシーケンスがより効率的であることを報告した。しかし、今回の分析では、複数フラグメントが混在するマーカーが見出されたことから、

ダイレクトシーケンスは必ずしも最良の方法ではないと考える。

同一RAPD マーカー由来の異なった塩基配列を示すフラグメントは、全てプライマー設計を行った。一方、RAPD分析の結果から予想されるサイズを示さなかったフラグメントやRAPDプライマーの配列を塩基配列中に含んでいないフラグメントについては除外した。結果的に、SCARプライマー設計の候補となったフラグメント数は26となった（表－1）。

Paran and Micheltore (1993) は、RAPDマーカーのSCAR化に際し、10塩基のRAPDプライマー配列を単純に14塩基伸長させることによってSCARプライマーとした。一方、塩基配列を基に最適なプライマー部位を探索し新たな領域にプライマーを設計した報告も多い。そこで、それぞれのフラグメントについて、Paran and Micheltore (1993) 同様にRAPDプライマーを14塩基伸長させた24塩基のプライマー（以後、RA）とソフトウェアを利用して最適なプライマー部位の探索を行ったプライマー（以後GF）の二種類を作成し（図－1）、得られる結果の相違について検討した。二つの異なる方法によって設計するプライマー部位がほぼ重複していた場合には、ソフトウェアが最適と判断したプライマーのみを作成した（表－1）。

3.2 SCARマーカーのスクリーニング

スクリーニングは供試個体からランダムに選んだ16個体を用いて行った。その結果、RAでは設計した18プライマー中10プライマーで多型が認められた（表－1）。RAとは異なる部位にプライマーを設計したGFでは、18プライマー中わずかに3プライマーのみで多型が認められた。RAとGFでプライマー部位がほぼ重複する残る8プライマーについては3プライマーが多型を示した。以上の結果より、RAPD分析によって得られる多型の多くがプライマー部位の突然変異に起因しており、SCARマーカーの開発に際しRAPDプライマー部位を単純に伸長させたプライマーを用いた方がより効率的に多型を得ることが可能と考える。

スクリーニングの段階で多型が認められたプライマーは、RAおよびGFを併せて16プライマーであった（表－1）。このうち、cjscar 06, cjscar 08からは一本の明確なフラグメントが得られた（図－2）。同一RAPDフラグメント由来でGFおよびRA共に多型を示したcjscar 34とcjscar 35（共にQ04/670由来）は、フラグメントパターンが同一であり、より増幅が明確であったRAのプライマー（cjscar 35）のみを選択した。同様に、同一RAPDフラグメント由来のGFおよびRAであるcjscar 36とcjscar 37（共にQ04/670由来）では異なるフラグメントパターンを示したことから、それぞれのプライマーを有効と判断した。cjscar 20（E10/350由来）とcjscar 22（E10/460由来）は、RAPDフラグメントの由来が異なっていたにもかかわらず、同一のフラグメントパターンを示し、増幅がより明確であったcjscar 20由来のフラグメントをマーカーとした。cjscar 12とcjscar 14もまた、RAPDフラグメントの由来が異なっており、さらに得られたフラグメントパターンは、3フラグメントの有無によって泳動像が構成されていたことから、これらのフラグメントは対立遺伝子の関係にある可能性が高い。cjscar 27（G11/610由来）もまた、二つのフラグメントが同時に増幅した個体が認められた。cjscar 27と同様にG11/610由来であるcjscar 28はcjscar 27と同一のフラグメントパターンであり、マーカーとしては用いなかった。一方で、cjscar 30（N08/400由来）からは、不明確なフラグメントが検出された。PCR増幅条件を詳細に検討することでより明確な泳動像が得られる可能性があることから（Tanaka *et al.*, 2004）、アニーリング温度を5℃高くすることによって再分析した結果、不明確であった多くのフラグメントが消失し、クローン識別には問題ないと判断した（図－2）。しかし、cjscar 01（A04/610由来）、cjscar 16（B11/800由来）およびcjscar 41（U01/350

由来)については、PCR条件の検討後も不明確な増幅が認められたことからクローン識別には用いなかった。以上の結果から、クローン識別に有効としたプライマー数は9プライマーであり(表-2)、マーカー数は12となった(図-2)。

3.3 SCARマーカーを利用したスギ精英樹の識別

西山ら(2002)は、スギカミキリ抵抗性個体として選抜された38クローンについて25のRAPDマーカーを利用して識別した結果、ボカスギ系統の4クローンを除く34クローン(89.5%)が識別可能であると報告した。同様に、SCARマーカーを適用した結果、9プライマー12マーカーの組み合わせによって28のDNA型(73.7%)に分類できた。6タイプは2クローンで同一のDNA型を示し、それぞれのクローンを識別できなかった。ボカスギ系統4クローンもまた、RAPDマーカー同様に全て同一のDNA型であったのに加え、RAPD分析では異なるクローンとされた1クローンがボカスギ系統と同じDNA型を示した。さらに、新たに開発したSCARマーカーが普遍的に利用できるか検討するため、関東育種基本区内スギ精英樹からランダムに選抜した96クローンについて識別を行った結果、64のDNA型(66.7%)に識別できた。金山ら(2002)は、RAPD分析を用いて関東スギ精英樹約800クローンの識別を行い、73.6%の識別が可能であったことを報告している。RAPDマーカー同様に1/0データであるSCARマーカーは、フラグメントの有無が1:1であった時、そのマーカーの識別能力は最大となり、1:1からの偏りが増大するにしたがって識別能力は減少する傾向にある(Tessier *et al.*, 1999)。本研究においても、フラグメントの有無が1:1に近い値を示したのは3マーカーのみであった。新たに開発したSCARマーカーはスギ精英樹のクローン識別に普遍的に利用可能であることを示すと同時に、精度の高い識別をするためにはより識別能力の高いマーカーを開発し、マーカー数を蓄積することが必要不可欠である。

しかし、PCRとアガロースゲル電気泳動によって高い再現性を得ることができるSCARマーカーは現在までに公表されているマーカーの中でも最も安価かつ容易な分析手法である。例えば、RAPD分析では、複数回のPCRによってマーカーの再現性を評価する必要性があった(後藤ら, 1999; 金山ら, 2002; 西山ら, 2002)。SCARマーカーは、目的とするフラグメントの塩基配列が明らかとなれば、単純にプライマー配列を伸長することによって、容易に追加できる。久枝ら(2000)は、SCARマーカーのmultiplex PCRによって労力の減少を提案した。SCARマーカーは、特別な設備を必要としないマーカーであり、林木育種においてクローン識別を継続的に実施していく上で、最も現実的なマーカーの一つと考える。

4 引用文献

- Giegerich, R., Meyer, F. and Schleiermacher, C.: GeneFisher - software support for the detection of postulated genes. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 4: 68-77 (1996).
- 後藤 晋・家入龍二・宮原文彦: 福岡県におけるスギさし木品種と精英樹のRAPD分析, 日林誌 81, 187-193 (1999)
- 後藤 晋・宮原文彦・家入龍二・川内博文: RAPD分析によるスギ挿し木品種の識別とその利用, 林木の育種 197, 6-8 (2000)
- Goto, S., Watanabe, A., Miyahara, F. and Mori, Y.: Reproductive success of pollen derived from selected and non-selected sources and its impact on the performance of crops in a nematode-resistant Japanese black pine seed orchard., Silvae Genetica 54, 69-76 (2005)

- Hernández, P., de la Rosa, R., Rallo, L., Dorado, G. and Martin, A. : Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theor. Appl. Genet.* 103, 788-791 (2001)
- 平尾知士・渡邊敦史・福田陽子・近藤禎二・高田克彦 : SSRマーカーを利用したスギ精英樹のクローン識別, 日森林誌 88, 202-205 (2006)
- 久枝和彦・白石 進・栗延 晋 : MuPS(Multiplex-PCR of SCAR markers) 分析を用いた九州産スギ精英樹の識別. — 佐賀・長崎県産スギ精英樹について —, 日林九支研論文集 53, 55-56 (2000)
- 金山央子・後藤陽子・近藤禎二 : 関東育種基本区のスギ精英樹のクローン識別におけるRAPD法の有効性, 日林誌 84, 100-103 (2002)
- 宮原文彦・松田 学・前田 徹・白石 進 : RAPD分析による福岡県産スギ在来品種の構成クローン数の推定, 日林論 105, 293-294 (1994)
- Miyazaki, Y. and Sakai, K. : Use of zymography for identification of a clone in *Cryptomeria japonica* D. Don. *J. Jpn. For. Soc.* 51, 235-239 (1969)
- Moriguchi Y., Iwata, H., Ujino-Ihara, T., Yoshimura, K., Taira, H. and Tsumura, Y. : Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Thor. Appl. Genet.* 106, 751-758 (2003)
- Moriguchi Y., Taira H., Tani N. and Tsumura Y. : Variation of parental contribution in a seed orchard of *Cryptomeria japonica* determined using microsatellite markers. *Can. J. For. Res.* 34, 1683-1690 (2004)
- 西村慶二・佐々木峰子 : 林木育種プロジェクト (5) —地域虫害抵抗性育種事業—, 林木の育種 199, 32-36 (2001)
- 西山和美・渡邊敦史・久保田正裕 : RAPDマーカーによるスギカミキリ抵抗性個体の識別, 日林誌 84, 262-266 (2002)
- 奥泉久人・大庭喜八郎 : アイソザイムの4遺伝子座の遺伝子型による集殖されたオビスギ系14品種, ヤブクグリおよびメアサのさし木品種内クローン数の推定, 日林誌 72, 501-507 (1990)
- Okuzumi, H. : Clone analysis of collected Sugi-cutting cultivars of the Kyushu Region by the multilocus genotypes of twelve isozyme loci. *J. Jpn. For. Soc.* 75, 293-302 (1993)
- Paran, I. and Michelmore, R.W. : Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85, 985-993 (1993)
- 佐々木峰子・平岡裕一郎・藤澤義武 : RAPDマーカーによるスギザイノタマバエ抵抗性クローンの個体識別, 九州森林研究 55, 146-147 (2002)
- 高田克彦・白石 進 : RAPDマーカーを用いた九州地方のスギさし木品種の分類, 九大演報 75, 1-14 (1995)
- Tanaka, A., Miyazaki, K., Murakami, H. and Shiraishi, S. : Sequence characterized amplified region markers tightly linked to the mating factors of *Lentinula edodes*. *Genome* 47, 156-162 (2004)
- Tani, N., Kawahara, T., Yoshimaru, H. and Hoshi, Y. : Development of SCAR markers distinguishing pure seedlings of the endangered species *Morus boninensis* from *M. boninensis* x *M. acidosa* hybrids for conservation in Bonin (Ogasawara) Islands. *Conserv. Genet.* 4, 605-612 (2003a)
- Tani, N., Takahashi, T., Iwata, H., Mukai, Y., Ujino-Ihara, T., Matsumoto, A., Yoshimura, K., Yoshimaru, H., Murai, M., Nagasaka, K. and Tsumura, Y. : A consensus linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) from two pedigrees, based on microsatellites and expressed sequence tags. *Genetics* 165, 1551-1568 (2003b)

- Tani, N., Takahashi, T., Ujino-Ihara, T., Iwata, H., Yoshimura, K. and Tsumura, Y. : Development and characterization of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. *Ann. For. Sci.* 61, 569-575 (2004)
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J.M. and Charrier, A. : Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98, 171-177 (1999)
- 戸丸信弘 : アイソザイムによるスギの人工林および精英樹の遺伝的変異に関する研究, 筑波大学大学院学位論文, 175pp (1991)
- 植木忠二・加藤一隆・山口和穂 : 関西育種基本区におけるスギカミキリ抵抗性候補木の検定状況, 林木の育種, 特別号, 34-37 (2000)
- Williams J. G. K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535 (1990)

表-1 明らかとなった18 RAPDマーカーの塩基配列長と設計したSCARプライマー対による増幅結果

	RAPD マーカー	bp	GF		RA		RAPD マーカー	bp	GF		RA		
01	A04／610bp	650	cjscar01	P	cjscar02	M	14	G11／350bp	339	cjscar25	M	cjscar26	M
02	A04／610bp	666	cjscar03	M	cjscar04	M	15	G11／610bp	643	cjscar27	P	-	
03	A04／800bp	794	cjscar05	NA	cjscar06	P	16	G11／610bp	603	cjscar28	P	-	
04	A07／350bp	338	cjscar07	M	cjscar08	P	17	N08／400bp	400	cjscar29	M	cjscar30	P
05	A07／350bp	375	cjscar09	M	cjscar10	M	18	N08／400bp	402	cjscar31	M	cjscar32	M
06	B11／450bp	447	cjscar11	M	cjscar12	M	19	P10／500bp	481	cjscar33	M	-	
07	B11／700bp	703	cjscar13	M	-		20	Q04／670bp	685	cjscar34	P	cjscar35	P
08	B11／700bp	686	cjscar14	P	-		21	Q04／670bp	643	cjscar36	P	cjscar37	P
09	B11／800bp	703	cjscar15	M	cjscar16	P	22	Q20／370bp	357	cjscar38	M	-	
10	B16／940bp	944	cjscar17	M	cjscar18	M	23	Q20／370bp	357	cjscar39	M	-	
11	E10／350bp	352	cjscar19	M	cjscar20	P	24	U01／350bp	345	cjscar40	M	cjscar41	P
12	E10／460bp	404	cjscar21	NA	cjscar22	P	25	U03／330bp	336	cjscar42	M	-	
13	E10／460bp	432	cjscar23	M	cjscar24	M	26	U03／400bp	389	cjscar43	M	cjscar44	M

1) GF; GeneFisher によるプライマー設計, RA; RAPD プライマー+14塩基

2) P; 多型, M; 単型または変異なし, NA; 増幅しない

表-2 新たに開発したSCARプライマーの塩基配列

プライマー名	forward (5'→3')										reverse (5'→3')									
cjscar 06	AAT	CGG	GCT	GAA	AGG	GAA	AGG	AAG			AAT	CGG	GCT	GCA	TAT	ATT	ATC	GGG		
cjscar 08	GAA	ACG	GGT	GCA	TGA	ACA	ACT	AGT			GAA	ACG	GGT	GAG	GAG	ATA	ATT	GGC		
cjscar 14	GAC	CCG	TAT	CTA	GTC	TCA	CTT	TCT	G		GTA	GAC	CCG	TAA	CCA	GAC	ATG	AAG	G	
cjscar 20	CAC	CAG	GTG	AAG	AGA	GAA	TAC	ATA			CAC	CAG	GTG	ATC	CAT	TAG	ATT	GGA		
cjscar 27	GCC	CGT	CGT	CAA	ATG	CAA	CTT	CGA	T		CCC	GTC	GTT	AGT	GTA	CGC	CTA	GTT	C	
cjscar 30	ACC	TCA	GCT	CAC	AGT	ACA	TGA	AGA			ACC	TCA	GCT	CGT	GCT	AAT	TCA	TTA		
cjscar 34	CGC	TGA	AAT	TGG	GTT	GGT	TTG	GAA	G		TTA	AAT	CCG	AGC	CTG	TGT	GA			
cjscar 36	CTG	TAC	GCT	GTT	AGT	GTT	G				ACC	TTT	TAC	CTG	CCT	GCT				
cjscar 37	AGT	GCG	CTG	ACC	CTT	GAA	TGA	TCA			AGT	GCG	CTG	AAA	ACC	TTT	TAC	CTG		

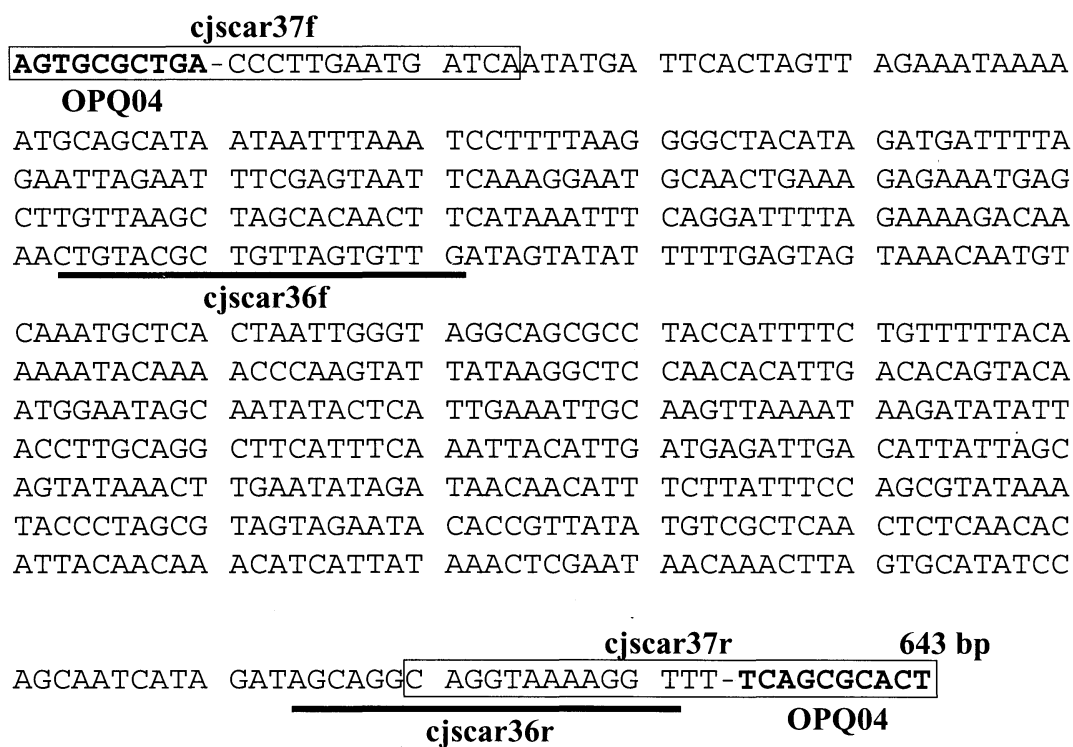
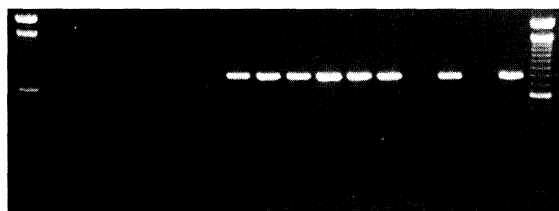


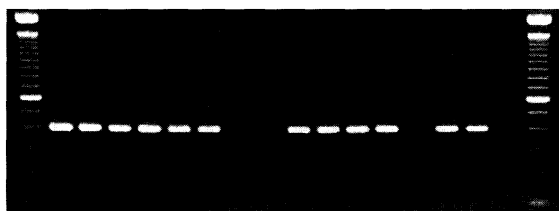
図-1 SCARプライマーの設計

— はGF, はRAを表わす。

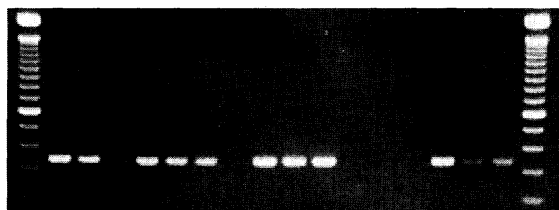
cjscar 06



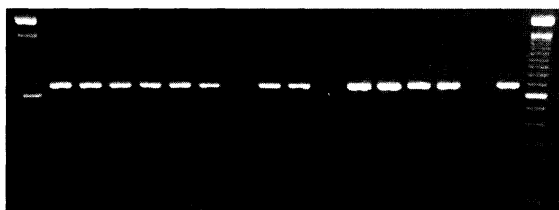
cjscar 30



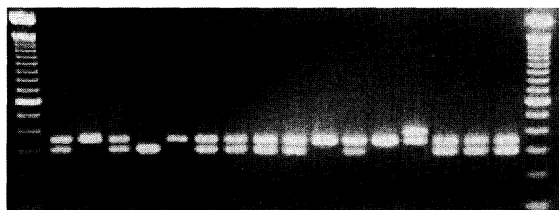
cjscar 08



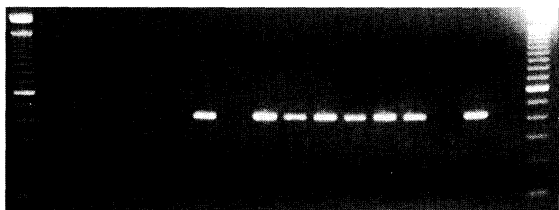
cjscar 35



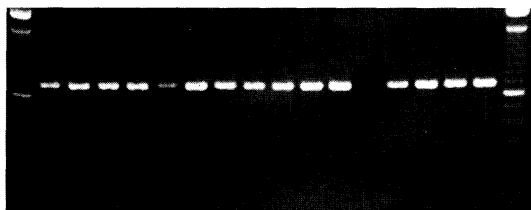
cjscar 12



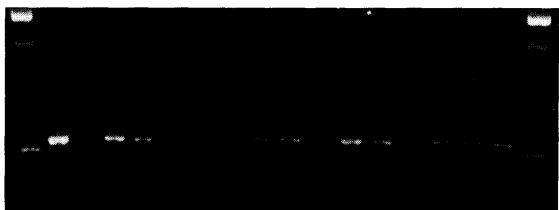
cjscar 36



cjscar 20



cjscar 37



cjscar 27

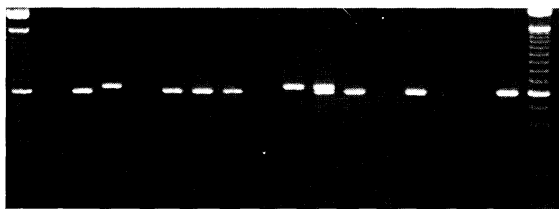


図-2 SCARプライマーによる泳動結果