

DNA制限酵素断片長多型(RFLP)によるスギのクローン識別

問題名：生物機能の解明による新利用技術の開発

担 当：生物機能開発部遺伝子発現研究室 向井 謙
遺伝分析研究室 津村義彦・村井正文

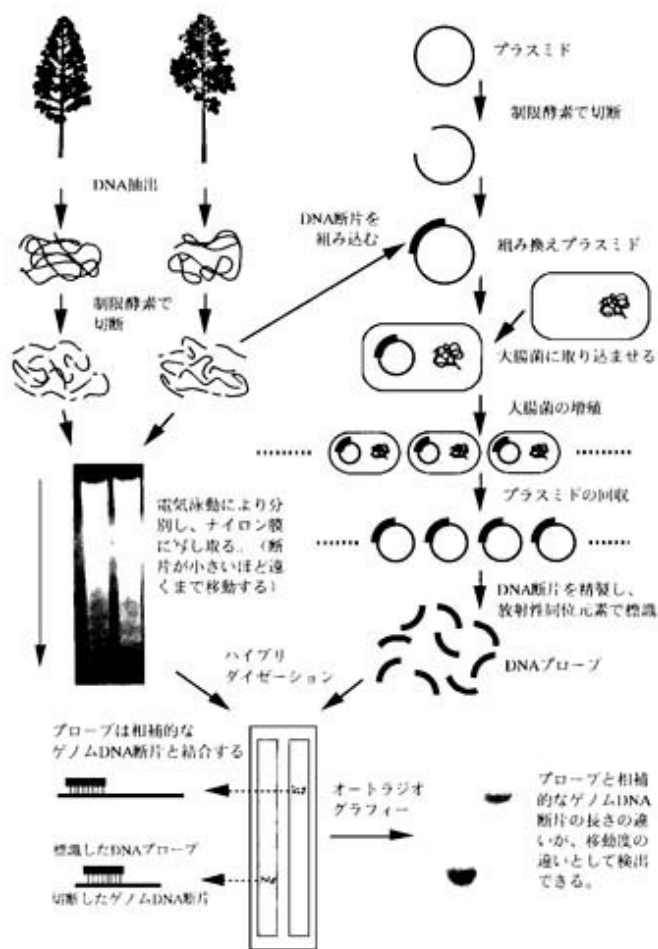
背景と目的

スギはわが国で最も重要な樹種の一つであり、精英樹をはじめ多くの育種母材が収集されている。また、アイソザイム分析などを用いて遺伝マーカーが多数探索されている。しかし、品種識別や連鎖解析などを行うにはさらに多くの遺伝マーカーが必要である。そこで、多数の遺伝マーカーが得られるDNA制限酵素断片長多型(RFLP)分析を利用してスギのクローン識別を試み、林木の遺伝研究への適用を計った。

成 果

RFLP分析を利用してスギのクローン識別や連鎖解析を行うため、大腸菌プラスミドを用いてクローン化したスギのDNA断片の中からオギノヤマスギ、クモドオシ、G-5及びミドリスギの4個体の間でRFLPを示すクローン化DNA断片(プローブ)を探索した。4種類の制限酵素(EcoRV, EcoRI, BamHI, HindIII)で切断した上記4個体のゲノムDNAを電気泳動で分離後ナイロン膜に写し取り、サザン・ハイブリダイゼーションを行い、³²Pで標識したプローブと相補的なゲノムDNA断片をオートラジオグラフィーで検出した(図1)。

所内に植栽されているスギ精英樹(一部その他の育種母材を含む)54個体を用いて13個のプローブと上記4種類の制限酵素のうち各プローブでRFLPの検出に適した1種類を組み合わせるRFLP分析を行った。その結果、9個のプローブについて解析可能なオートラジオグラムを得た(図2)。9個のプローブで得た結果を総合すると、全体の87%(47個体)が別クローンとして識別できた。また、今回用いた個体のアイソザイムの遺伝子型を既報より引用し、比較した結果、別クローンとして識別できた個体はわずか38.5%であった(図3)。RFLP分析で識別できない3組(7個体)のうち、2組(5個体)はアイソザイム分析でも識別できなかった。また、うち1組(3個体)は全て九州の挿し木(メアサ)林で選抜されたものであるため、RFLP分析でもアイソザイム分析でも識別できないこれら3個体は極めて近い類縁関係にあると示唆された。以上の結果、RFLP分析は有効なクローン識別の手段であることが明らかにされた。



(kbp)

23.1-

9.4-

6.6-

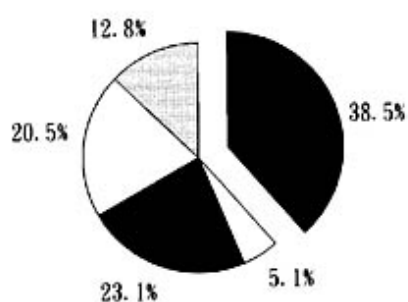
2.3-

2.0-



図2 オートラジオグラフィーで検出したスギ精英樹の RFLP

スギ精英樹各個体より抽出した DNA を制限酵素で切断し、電気泳動で分離後ナイロン膜に写し取った。 ^{32}P で標識したクローン化 DNA 断片をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーションをおこない、オートラジオグラフィーにより RFLP を検出した。



アイソザイムによる識別
(12遺伝子座)



RFLPによる識別
(9種類のプロープ)

■ 別クローンとして識別 □ 2個体が同一パターン ■ 3個体が同一パターン □ 4個体が同一パターン ■ 5個体が同一パターン

図3 RFLPとアイソザイムによるスギ精英樹のクローン識別