

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24658138

研究課題名（和文） RSE-PCRと次世代シーケンサによるマイクロサテライトマーカーの簡便大量開発法

研究課題名（英文） A simple system for developing the microsatellite markers using RSE-PCR and pyrosequencing

研究代表者

白石 進 (SHIRAIISHI SUSUMU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70226314

研究成果の概要（和文）：

近年、育種学、遺伝学および生態学の分野で広く用いられている DNA マーカーの中で、最も変異性（多様性）に富み、高い遺伝情報量を有するマイクロサテライト（以下、MS）マーカーの新規開発法を構築した。次世代シーケンサーの特性を活用することにより、従来法で膨大な作業と大きな経費を要していた MS 領域の DNA 断片のクローニングと塩基配列情報の取得を、簡便・安価に行うことが可能となった。

研究成果の概要（英文）：

DNA molecular markers were widely utilized as powerful tool in breeding, genetics, and ecology. Among these markers, microsatellite marker is highly variable, and possesses a large quantity of genetic information. Constructing a new system, a next generation sequencer (pyrosequencing) was introduced to gain the huge sequences of microsatellite regions in genomes. The new system showed the possibility for a simple and inexpensive microsatellite development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：DNA マーカー、マイクロサテライト、4塩基繰返し、森林科学、育種学、分子生態学

1. 研究開始当初の背景

今日、DNA マーカーは育種学、遺伝学および生態学の分野で広く用いられている。種々の DNA 分子マーカーの中で、マイクロサテライト（以下、MS）マーカーは、高い変異性を持ち、豊富な遺伝情報量を有していることから、マーカー開発が盛んに行われている。

従来、ハイブリダイゼーションを用いて MS 領域をエンリッチメントする方法が広く用いられてきたが、効率性が低いことが問題になっていた。また、dual-suppression-PCR

を用いた方法 (Lian and Hogetsu, 2002) も提案されており、今日、大量開発ではハイブリダイゼーション法が、小規模開発では Lian-Hogetsu 法が主として使用されている。

一方、ヒト法医学の DNA 鑑定では、信頼性の高い遺伝情報が得られる 4 塩基繰返しもしくは 5 塩基繰返し ((CATA)_n など) の MS マーカーが使用されているが、他分野では、未だ 2 塩基繰返し ((GT)_n など) の MS マーカーが主流である。

これまで、樹木（スギと馬尾松等）において、4 塩基繰返し MS マーカーの開発を進め

てきた。しかし、従来の2方法によるマーカー開発は煩雑で時間とコストを費やすことから、大規模プロジェクト研究を除き、樹種当たりの開発マーカー数は10~20個程度に限られているのが現状である。

最近、アダプターライゲーションを必要としない RSE-PCR (Restriction Site Extension PCR) 法が発表され、既知の遺伝子探索への利用が報告されている。一方、これまでのサンガー法による塩基配列分析に代わり、Pyrosequence 法が開発され、この原理を用いた次世代シーケンサーが登場した。

2. 研究の目的

本研究では、前述の最新の分析技術について検討を加え、これまでの弱点を克服した効率的な MS マーカーの開発系の可能性を評価した。具体的には、(1) ゲノム中の特定領域を簡便に増幅することができる RSE-PCR 法を評価すると共に、次世代 DNA シーケンサーを用いた塩基配列解析法により、多樹種において大量の MS マーカーを一括して開発できる簡便・安価な方法を確立する。さらに、(2) 確立された分析系を用い、わが国の主要針葉樹等において、多数マーカーを開発するための MS 領域のエンリッチライブラリーを構築する。

3. 研究の方法

① RSE-PCR 法

Ji and Braam (2010) の原法に従い、RSE-PCR を実施した。使用した制限酵素は、*SacI*, *KpnI*, *NsiI*, *PstI* の6塩基認識酵素である。

② アダプター付加法

6塩基認識制限酵素 (*NsiI*) で切断後、両端にアダプター配列をライゲーションし、通常の PCR により MS 領域のエンリッチを行った (Guan and Shiraishi 2011)。

③ モデル DNA の作製

PCR 産物の両端に上記の制限酵素認識配列をもち、中央部に6種類の4塩基繰返し配列 ((AAAC)₁₀, (AAAG)₁₀, (ACAG)₁₀, (ACAT)₁₀, (AGAT)₁₀, (AGTG)₁₀ と、6種類の3塩基繰返し配列 ((AAC)₁₀, (AAG)₁₀, (ACC)₁₀, (ACG)₁₀, (AGC)₁₀, (AGG)₁₀) を、さらに対照として2種類の2塩基繰返し配列 ((AC)₂₀, (AG)₂₀) をもつ、計14種類のモデル DNA を PCR により作製した。

4. 研究成果

① RSE-PCR 法とアダプター付加法との比較検討

RSE-PCR による MS 領域のエンリッチメントについて検討を行い、4種類の制限酵素を用いた分析系を構築した。また、1制限酵素を用いたアダプター付加法による分析系を構築し、両者を比較した。その結果、

RSE-PCR 法は簡便性では優れていたが、再現性ではアダプター付加法の方がはるかに優れていたことから、以降、アダプター付加法を採用することとした。

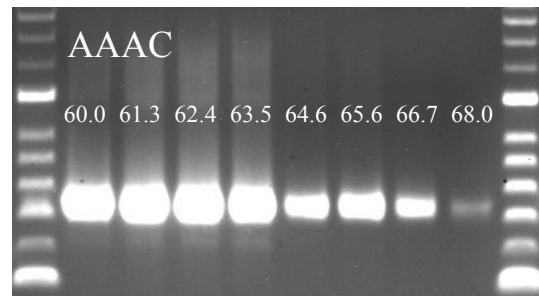
② モデル DNA による MS マーカー作出プロトコルの確立

DNA 配列中に6種類の4塩基繰返し配列 ((NNNN)_n) と6種類の3塩基繰返し配列 ((NNN)_n)、2種類の2塩基繰返し配列 ((NN)_n) を組み込んだモデル DNA を作成し、アダプター付加法におけるエンリッチメント等の PCR 条件を検討した。

4塩基繰返しおよび3塩基繰返し MS を選択的に増幅する PCR 条件 (特に、アニーリング温度) を確定した。各モチーフ配列における最適アニーリング温度は、図-1 と表-1 に示す通りである。

エンリッチのための PCR 作業を効率的に行うために、PCR 条件を Shuttle-PCR (変性: 94°C, アニーリング・伸張: 69°C) と 3 step-PCR (変性: 94°C, アニーリング: 59°C, 伸張: 72°C) の2種類の増幅条件に整理した。(ACAG)₇, (AGTG)₇, (ACC)₈, (ACG)₈, (AGC)₈, (AGG)₈ は前者の条件で、(AAAC)₇, (AAAG)₇, (ACAT)₇, (AGAT)₇, (AAC)₈, (AAG)₈ は後者の条件でエンリッチメントを行った。

この条件での PCR の特異性の確認を行った結果、10種類のモチーフでは、高い特異性が確認されたが、(ACAT)₇, (AGAT)₇ の2つのモチーフでは2塩基繰返し配列のモデル DNA を鋳型とした場合にも PCR 産物が産生され、非特異的な増幅が認められた (図-3 の"↑")。この2種類のモチーフを用いてエンリッチされたライブラリー中には、2塩基繰返し MS が混入することから、信頼性の高い MS マーカー (4塩基繰返し MS マーカー) のみの開発を目指す場合には、今後より厳密な PCR 条件を明らかにする必要がある。他の10種類のモチーフ配列では、類似配列に対する非特異的な増幅は観察されなかった (図-3)。



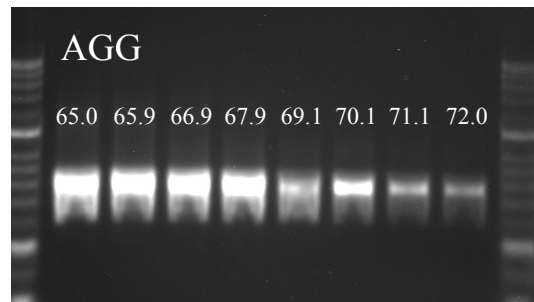
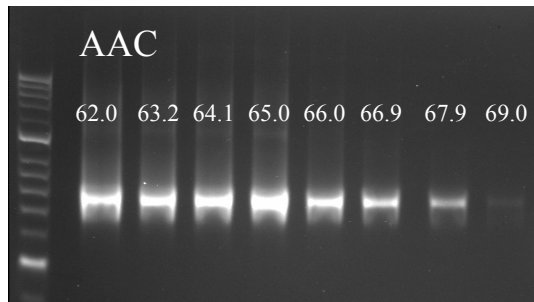
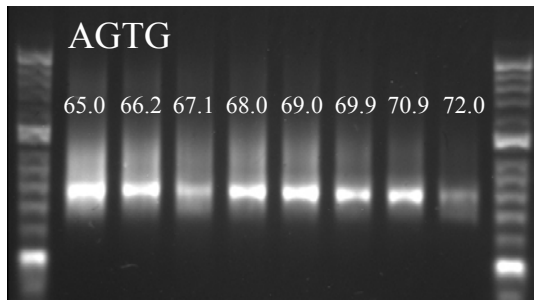


図-1 温度勾配 PCR による最適アニーリング温度の決定 (プライマー: (AAAC)₇, (AGTG)₇, (AAC)₈, (AGG)₈ の場合)

表-1 各モチーフプライマーの塩基配列と最適アニーリング温度 (T_a)

Motif seq	Primer sequence	T _a
AAAC	AACAAACAAACAAACAAACAAACAAACA	66.7
AAAG	AAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGA	60.0
ACAG	GACAGACAGACAGACAGACAGACAGACA	70.1
ACAT	ACATACATACATACATACATACATACAT	60.9
AGAT	AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAT	59.0
AGTG	TGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAG	70.9
AAC	AACAACAACAACAACAACAACAACAAC	65.0
AAG	AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG	60.0
ACC	CACCACCACCACCACCACCACCACCAC	70.9
ACG	GACGACGACGACGACGACGACGACGAC	70.9
AGC	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	66.9

AGG	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	60.0
-----	-----------------------------	------

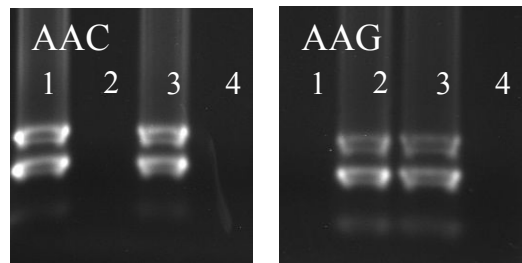
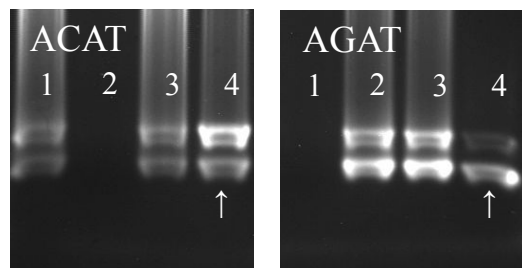
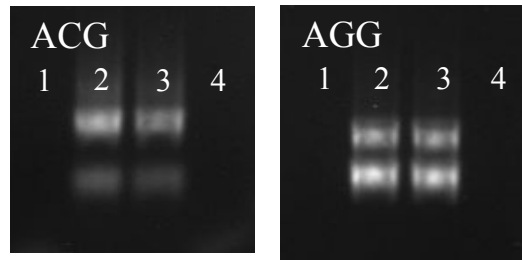
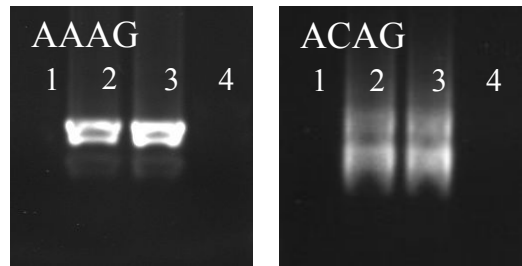
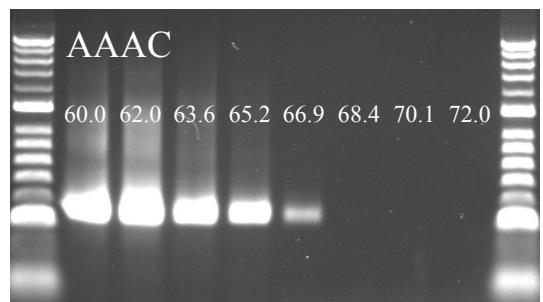


図-2 混合モデル DNA (鋳型 DNA) による PCR 条件の検証

1: (CAA)_n + (CATA)_n + (CAA)_n + (CAC)_n + (CAG)_n,
 2: (GAAA)_n + (GACA)_n + (GATA)_n + (GTGA)_n + (GAA)_n
 + (GAC)_n + (GAG)_n, 3: 1 + 2, 4: (CA)_n + (GA)_n



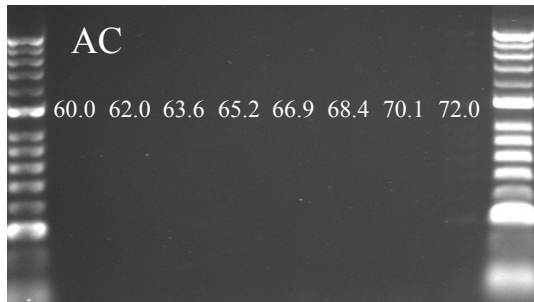
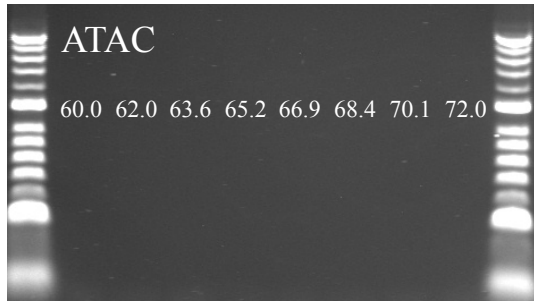
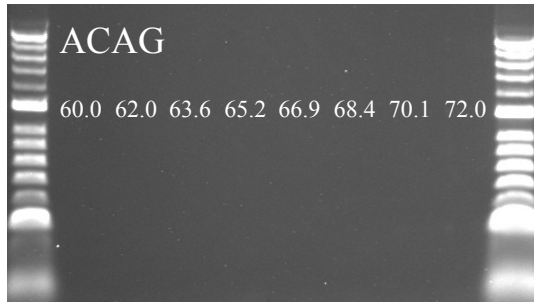


図-3 (AAAC)₇, プライマーを用いた場合の4種類の鋳型 DNA ((AAAC)₁₀, (ACAG)₁₀, (ATAC)₁₀, (AC)₂₀)に対する非特異的増幅の検証

③ スギおよびクロマツにおける MS エンリッチライブラリーの構築

スギ (*Cryptomeria japonica*) とクロマツ (*Pinus thunbergii*) において、4塩基繰返しおよび3塩基繰返し MS を開発のための MS エンリッチライブラリーを上記方法で作成した。

④ 従来法と新規法の比較

新規法と従来法でのマーカー開発の効率等々を評価するため、マツ属の2樹種 (*Pinus Kesiya*, *P. merkusii*) において従来法による4塩基繰返し MS マーカーの開発を行った。従来法で開発されたマーカー数は、*P. kesiya* で12マーカー(表-2)、*P. merkusii* で13マーカー(表-3)であった。

従来法での大量マーカー開発が困難である最大の理由は、サンガー法によるシーケンス効率が高くないという制約要因になっていると思われる。

表-2 *Pinus kesiya* で開発された4塩基 SSR マーカー (プライマーの塩基配列)

Marker	Primer sequence
PK701	F:TTGGATTGGTATCTGTCCCAIT R:TGCCAAAGTGGTTTATGGTTC
PK704	F:ATATAATTGGGAATTTAGGGGGAC R:TGCACCAATGTGTGTAATCGAA
PK815	F:GGCCTAGTTTAGAACCTACAGC R:AATATGTAAGTCATGGAATTGTGCGAT
PK827	F:AGTCATAGTACACTCCAAGGCTTA R:GCGAATTGATTGACTCCATTGCTT
PK830	F:TCACAACCCTGTCAGACATCG R:ACAAGAAGATGATTGTCTTATGCTA
PK832	F:ATCAATTCATTGGAGCTTGGG R:GGCAGAAAACAAGATTAACCTCA
PK836	F:AAAACCTTACTTAGTCAAACCCTC R:AAAGGACTCTCGACATAAACGTG
PK838	F:GGAGCTCATGTTATTGAAAATCCTT R:TGGCAACATACATGAACATATGCATT
PK840	F:TATGTGCGTGTGTTAATGGTTT R:TCGATTTATTGACAGGCTCG
PK707	F:GATCTATGGATGTTGCAGTATATACA R:CTCCACAACCTCAAACTATGGC
PK708	F:ACACACAAAACTTTTATAGGCAT R:ATCGTTCTAATTGTCGCATATCGG
PK711	F:ATCAATCATCGTCAACTATGCACA R:TGACCATGATTCACAATGCTCGAT

表-3 *Pinus merkusii* で開発された4塩基 SSR マーカー (プライマーの塩基配列)

Marker	Primer sequence
PM504	F:GGAAATAATCCTTCTCTCGCCTCC R:AGCCTCAAATCTGTTTAAAGTGAC
PM509	F:AATTTTTGAAGACATTGAACTCAT R:GCACACAATAGATTTGGAAACCTC
PM510	F:TACTAAGACACCTTCGTTGGGGCTA R:CAAAGGGTCTCCATTATTTTACTCA
PM514	F:CTTGTGACCTAGCAAACCTAGCC R:CAAGGTAATTTCTCATTATCTTCTCAT
PM518	F:AGCCTCTCGTCAATGTTTACTTAAAGTGG R:AAAGCAAGCTCAATTTTTAAACTTC
PM522	F:TTTCCCGATGCGATAATGAAGCTC R:AGCAGTATAGCAACGAAACCTT
PM526	F:CTCCCTCGAAAAGTCTTATAACACCT R:ATATGTCCTTACAGGCTCAATGCAA
PM530	F:CAGAGGAACCTTTGCCTACGTGCTT R:AATAGGTTTCATGGGTACCAAGTGT
PM535	F:CATTAGCAAGCTGAGACCCTG R:TGGCACAACATGTATATGAACACA
PM519	F:ATACGAAATTGCACCATGGATTGCT R:CCACAGAAGATTAATTCGTGTAGGCAAG
PM541	F:GTCGTTCATAAGAATTTGACCATTCAAGA R:AGTTCCCTCCTACTTGGAATTGTGG
PM525	F:TCATTACAAGTGAAGGATTCCCTC R:CGCTCATATAAGTTCTCATGCACTCC
PM538	F:GGACCTACGAATCCTTGTGACT R:ACATAAAAGAGATAGGCTACTCATTCCC

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Thao DV, Yamashita M, Watanabe A,

Shiraishi S: Development of tetra-nucleotide microsatellite markers in *Pinus kesiya* Royle ex Gordon. Conservation Genet Resour 5: 405–407, 2013

- ② Thao DV, Widyatmoko AYPBC, Guan L, Watanabe A, Gotoh E, Shiraishi S: Isolation and characterization of tetranucleotide microsatellite markers for *Pinus merkusii*. Conservation Genet Resour 5: 433–436, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 進 (SHIRAISHI SUSUMU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70226314