

RAPD-PCRを利用したワサビクローン間の識別

杉山 万里*・春木 和久*・山田 員人**

Discrimination among Clones of Variations in Japanese Horseradish
(*Wasabia japonica* Matsumura) Propagated *in vitro* by Using RAPD-PCR.

Mari SUGIYAMA, Kazuhisa HARUKI and Kazuto YAMADA

目 次

I 緒 言	109	V 茎頂培養増殖苗の変異性の検出への応用 例	116
II PCR条件の検討	110	VI 考 察	118
III 植物体からのテンプレートDNAの抽出	113	VII 摘 要	121
IV プライマーの検索	115	引用文献	121
		Summary	123

I 緒 言

ワサビは主に山間部で生産されており、島根県においては山間地域の重要な特産物となっている。ワサビの増殖は、ほとんどの品種で株分けによる栄養体繁殖によって行われている。しかし、栄養体繁殖を長年繰り返すことによって原種と異なった形態を示す個体が見られるようになった。

組織培養による増殖は、同一クローン株を大量に生産できる方法として、近年様々な作物で利用されている(大山, 1990)。当県でもワサビにおいて茎頂あるいは花茎腋芽を培養して発生したシュートを試験管内で分割増殖することによる大量増殖法を開発した(山田ら, 1992)。現在では、ワサビ優良系統の組織培養苗が島根県匹見町の増殖センターから県内に供給されている。このような組織培養苗の普及に伴い長期間

分割増殖を繰り返すことによる培養苗の遺伝的均一性が問題視されるようになってきつつある。遺伝変異は一般に圃場での形態的な差により判断されているが、この方法では環境条件による影響を受けやすく、判別が困難な場合が多く、労力や時間もかかることなどから実施が容易ではない。アイソザイムや、貯蔵蛋白質の電気泳動も、検出される多型が限られるため遺伝型の近い血縁の区別が難しく、表現型に現れないDNA上での違いを識別することは困難である。

近年様々な動植物で、DNAの断片長多型を利用したRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) やDNAフィンガープリント法(Jeffreysら, 1985 a, 1985 b)などが、個体識別、一代交配種の純度検定、品種・系統間の識別などに用いられるようになってきた(Dallas, 1988; Kuhnleinら, 1989)。RFLPはこれらの識別に最も多く使用されている手法で

あるが、多数のマーカースを得るために、多くの費用、時間、労力がかかる。更に、この方法では高純度かつ多量のDNAを必要とする。しかし、Saikiら (1985) により開発されたPCR (Polymerase Chain Reaction) を用いる方法により、現在では遺伝子レベルでの識別が比較的簡便に行われるようになった。PCRは目的とするDNA領域を挟む2種類のプライマーを用いてDNAポリメラーゼによる合成反応を繰り返すことにより、目的のDNA断片を数十万倍に増幅させる反応である。増幅されたPCR産物はアガロースの電気泳動により長さに応じて分離した後、エチジウムブロマイドによる染色を行うことにより容易に検出できる。この方法では、DNA断片を増幅して検出するため、鋳型は少量の未精製のDNAでよく、繁雑な操作やラジオアイソトープなども必要ない。また、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) - PCR (Williamsら, 1990) は、ゲノム上の特有の塩基配列を必要とせず、異なったプライマーを用いることによって多様なPCR増幅産物を得ることができる。さらに、オープンリーディングフレーム領域以外の表現形質でない領域の違いも識別することができるという利点もある。

そこで組織培養で増殖したワサビにおいて、RAPD-PCRを用い遺伝子レベルでの品種・系統識別の可能性と、分割増殖苗の変異性について検討したのでその結果を報告する。

なお、本研究は、1990年から1993年にかけて農林水産省農林水産技術会議の地域バイオテクノロジー実用化研究開発促進事業によって行ったものであり、関係機関に深く感謝の意を表す。

II PCR条件の検討

RAPD-PCRは任意の塩基配列のプライマーを用い、ポリメラーゼの反応を利用してDNAのプライマーに挟まれた領域を増幅する方法である。そのためには鋳型となるテンプレートDNA、原料であるデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP)、プライマーとなるオリゴヌクレオチド、耐熱性のDNAポリメラーゼが必要

である。また、DNA増幅の反応は、DNA 2本鎖の熱変性、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼの伸長反応に対応する3段階の温度変化によって行われる。PCRに関するプロトコールは数多く発表されている (藤永, 1990; 斉藤, 1991) が、反応液の組成はそれぞれ若干異なり、また、アニーリング温度が高くなるとプライマーのアニーリング部位の特異性が強くなる傾向がある (斉藤, 1991)。これら諸条件の差によって、得られるPCR産物のバンドパターンが異なる場合が考えられるため、ワサビに対する反応液組成、反応温度の最適条件の検討を行った。

1. 材料及び試験方法

1) PCR反応液組成及び最終容量の検討

材料には組織培養で増殖し、ガラス室で育成中のワサビ「島根3号」を用いた。

展開直後の直径約5cmの新葉0.3gを試料とし、液体窒素中でパウダー状になるまで粉碎後、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) 法 (渡部・杉浦, 1989) によってDNAを抽出した。プライマーは8及び10merのランダムプライマーをDNAシンセサイザー (Pharmacia Gene Assembler Special) により合成して用いた。10×PCRバッファー (TOYOBO) {500mM塩化カリウム (KCl), 100mMトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸 (Tris-HCl) pH9.0, 1%オクタフルフェノールポリエチレングリコールエーテル (TritonX-100)} 10 μ L, 25mM塩化マグネシウム (MgCl₂) 10 μ L, 各25mM dNTPs 0.5 μ L, Taqポリメラーゼ (5 Unit/ μ L: TOYOBO) 0.5 μ L, 100 μ Mプライマー 2 μ L, テンプレートDNA (1 ng/ μ L) 1 μ L, 最終容量100 μ Lを基本の反応液とし、各成分の濃度について、最適条件を検討した。

dNTPs及びテンプレートDNA濃度については、各25mM dNTPsを最終濃度0.25, 0.125, 0.025mMに対し、テンプレートDNAの最終濃度を0.1, 0.2, 1.0, 5.0ng/ μ Lに変えてPCRを行った。また、Taqポリメラーゼについては、最終濃度0.025, 0.05, 0.1Unit/ μ Lとなるように調整し、各々に対して最終容量100, 50, 25 μ Lの3水準を設定して、PCRを行った。この2つの試験ではプライマーは#126と#130 (第2表) を

組み合わせて用いた。

MgCl₂及びプライマーの濃度については、MgCl₂最終濃度0, 0.5, 2.5, 5 mMの4水準に対し、プライマーは#128 (第2表)を用い、最終濃度1, 2, 4 μMの3水準を検討した。

反応液はそれぞれ0.5mL容マイクロチューブに分注し、ミネラルオイルを滴下後、プログラム可能なヒートブロックにセットした。PCRの温度条件は熱変性を94°C 45秒、アニーリングを40°C 1分、伸長反応は72°C 1分で行い、60回繰り返した。最終伸長反応は72°C 5分で1回行った後4°Cで保存した。反応はATTOZYMOREACTER II, DNA Thermal Cycler™

(Perkin-Elmer)によって行った。1×TAEバッファー{0.4mM Tris-酢酸 pH8.0, 10mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)}を用いた1.5%アガロースゲル電気泳動によりPCR産物を分離し(50V, 約1時間)、エチジウムブロマイドによる染色及び紫外線照射によって検出した。電気泳動の分子量マーカーはすべてTOYOBOの1Kベースラダーを用いた。PCRの反応条件及びPCR産物の検出は特筆しない限り以下の試験も同様とした。

2) PCR温度条件及びサイクル数の検討

ワサビ品種‘ふじだるま’を用い、後述の改良簡便法でテンプレートDNAを抽出した。PCRの反応液組成は10×PCRバッファー5 μL, 25mM MgCl₂ 5 μL, 各25mM dNTPs 0.25 μL, Taqポリメラーゼ (5 Unit/μL TOYOBO) 0.25 μL, 100 μMプライマー(#128) 1 μL, テンプレートDNA 1 μL, 最終容量50 μLとした。PCRのアニーリングの温度は40°C, 50°C, 55°Cの3通り、反応時間は1分で行い、熱変性と伸長反応温度は定法により94°C 45秒, 72°C 1分, サイクル数60回とした。

サイクル数の検討では‘島根3号’を用い、CTAB法でテンプレートDNAを抽出し、プライマーとして#126, #127, #128の3種類及び#126と#130を組み合わせたものを用いた。上記の反応液組成の割合のまま、最終容量100 μLの反応液とし、PCRを行った。サイクル数として30, 35, 40, 45, 50, 55, 60回の7水準を設定し、設定サイクル毎に反応液から10 μLずつサンプリングし、PCR産物を検出した。

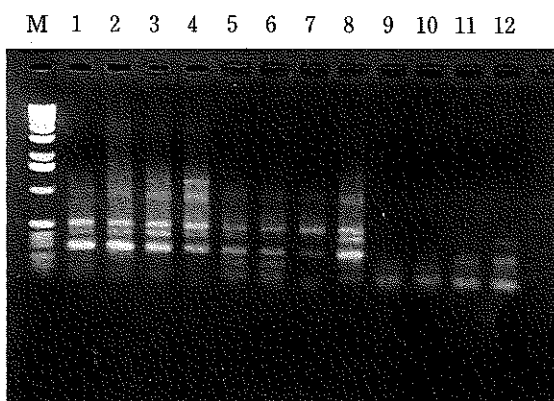
2. 試験結果

1) PCR反応液組成及び最終容量の検討

dNTPs及びテンプレートDNAの濃度について検討した結果を第1図に示した。

dNTPsが0.025mMのときは短い断片しか得られず、dNTPsの濃度により検出できるバンドの本数、増幅されるDNAのバンドパターンが異なった。さらに、濃度が高くなるにしたがって、バンドが濃くなった。それに対し、テンプレートの濃度を変えても、0.1~5 ng/μLの範囲内では、バンドパターンの変化はみられなかった。

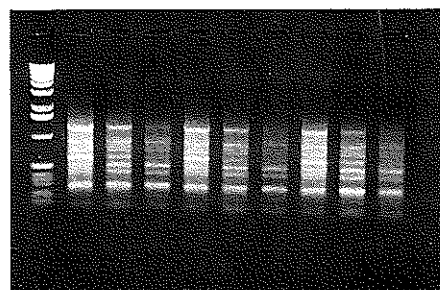
Taqポリメラーゼの濃度及び最終容量を変え



第1図 異なるテンプレートDNA濃度及びdNTPs濃度における増幅されたDNAのバンドパターン (プライマー#126+130)

dNTPs 1~4: 0.25, 5~8: 0.125, 9~12: 0.025mM
テンプレートDNA 1,5,9: 0.1, 2,6,10: 0.2, 3,7,11: 1.0, 4,8,12: 5.0ng/μL M: DNA分子量マーカー (以下の図も同じ)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



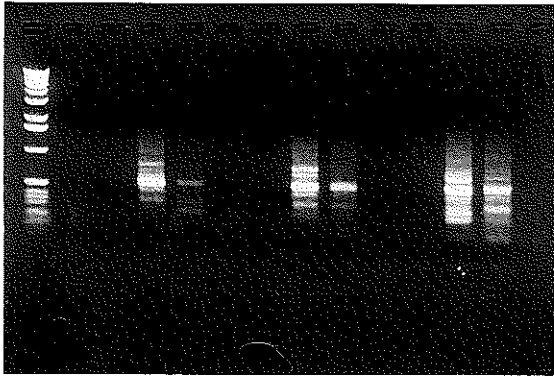
第2図 異なるTaqポリメラーゼ濃度及び最終容量における増幅されたDNAのバンドパターン (プライマー#126+130)

Taqポリメラーゼ 1,4,7: 0.1, 2,5,8: 0.05, 3,6,9: 0.025Unit/μL
最終容量 1~3: 100, 4~6: 50, 7~9: 25μL

た場合の増幅されたDNAのバンドパターンを第2図に示した。Taqポリメラーゼの量が少なくなるに従って、バンドは薄くなる傾向に、また、Taqポリメラーゼ濃度が0.025Unit/ μ Lの場合、長い断片が少なくなる傾向にあった。最終容量を100, 50, 25 μ Lと減らしても増幅されたDNAのバンドパターンに変化は認められなかった。

MgCl₂及びプライマーの濃度を変えた場合の増幅されたDNAのバンドパターンを第3図に示した。MgCl₂が無添加及び0.5mMの濃度ではバンドを検出することができず、PCRの反応には少なくとも0.5mMより高いMgCl₂濃度を必

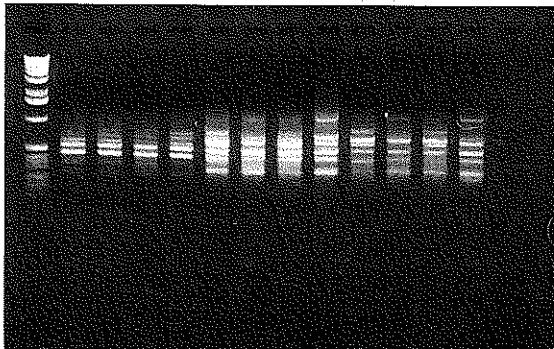
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



第3図 異なるMgCl₂濃度及びプライマー濃度における増幅されたDNAのバンドパターン (プライマー#128)

MgCl₂ 1,5,9: 0, 2,6,10: 0.5, 3,7,11: 2.5, 4,8,12: 5.0mM
 プライマー 1~4: 1, 5~8: 2, 9~12: 4 μ M

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



第4図 異なるアニーリング温度における増幅されたDNAのバンドパターン (プライマー#128)

1~4: 40, 5~8: 50, 9~12: 55 $^{\circ}$ C

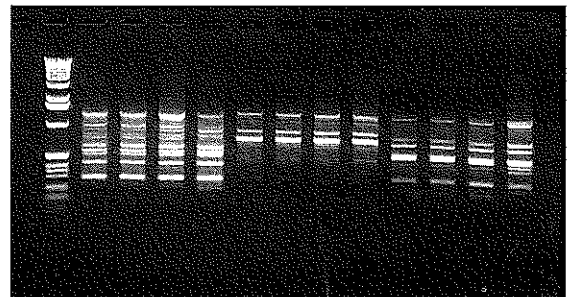
要とした。MgCl₂濃度2.5mMと5mMの場合、どちらもバンドの確認はできたが、バンドパターンにはそれぞれ違いがみられた。プライマーについては、1, 2, 4 μ M全ての濃度でバンドが検出できたが、dNTPsやTaqポリメラーゼの場合と同様に、濃度によるバンドパターンの変化がみられた。プライマー濃度が高くなるにしたがって検出できるバンド数は増えたが、バンド毎の境界が鮮明でなくなった。

2) PCRの温度条件及びサイクル数の検討

40, 50, 55 $^{\circ}$ Cとアニーリング温度を変えることによって得られたバンドパターンを第4図に示した。アニーリング温度が異なるとバンドパターンが変わった。50 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ Cでは、40 $^{\circ}$ Cの場合に比べ、バンド数が増加したが、50 $^{\circ}$ Cではバンド毎の境界が不鮮明になった。

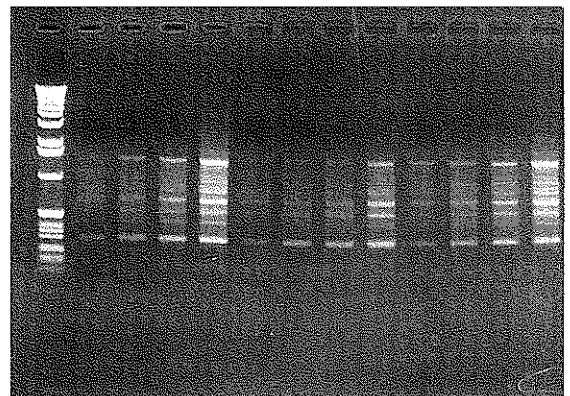
第5図及び第6図にサイクル数を変えた場合のバンドパターンを示した。サイクル数が50回より少ない場合は、バンドが薄く不明瞭で、パ

— #126 — | — #127 — | — #128 —
 M 50 55 60 60 50 55 60 60 50 55 60 60



第5図 異なるサイクル数における増幅されたDNAのバンドパターン

M 30 40 50 60 35 45 55 60 35 45 55 60

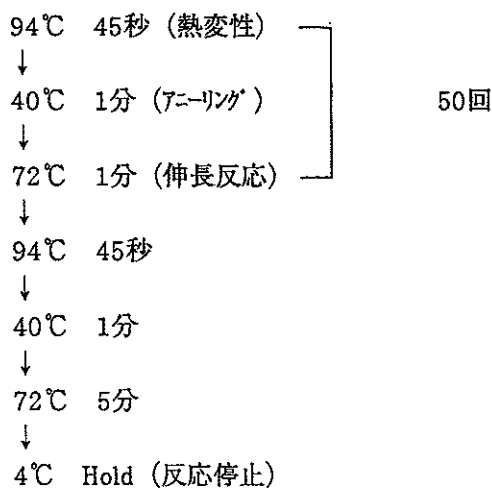


第6図 異なるサイクル数における増幅されたDNAのバンドパターン (プライマー#126+130)

第1表 PCR反応液組成

テンプレートDNA*	1 μ L
100 μ Mプライマー	1 μ L
10 \times PCRバッファー	5 μ L
25mM MgCl ₂	5 μ L
各25mM dNTPs	0.25 μ L
Taqポリメラーゼ	0.25 μ L
H ₂ O	
最終容量	50 μ L

*改変簡便法による



第7図 PCRの温度条件

ターンの比較が困難な場合があった。しかし、50回以上ではいずれのプライマーを用いた場合でも、サイクル数の違いによるバンドパターンの変化はほとんどみられなかった。

以上の結果からPCRの反応液組成及び反応条件を第1表、第7図のように設定することができた。

III 植物体からのテンプレートDNAの抽出

テンプレートDNAの抽出は、一般にCTAB法が用いられているが、この方法は、繁雑であるため多量のサンプルを処理する場合には適さない。また、液体窒素による粉碎、CTABによる処理等、多くの過程を経るためDNAの物理的切断も考えられる。PCRのテンプレートとしてのDNAは、純度をあまり問題としないため、精製過程における簡便化が図られる。そこでCTAB

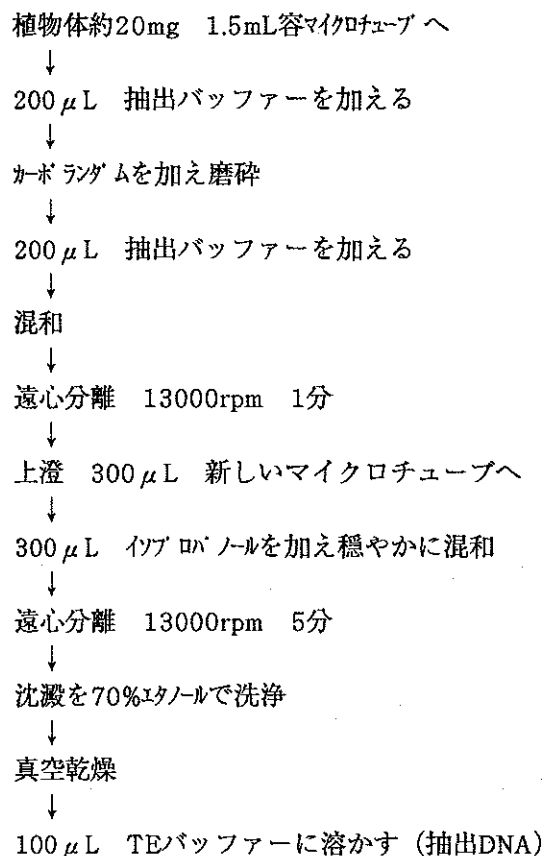
法に変わる簡単なDNAの抽出方法を検討した。PCRのためのDNA抽出についていくつかの方法が報告されている (Yoshimuraら, 1992; Dellaportaら, 1983; 古川ら, 1993; Stewartら, 1993) が、ここではEdwardsら (1991) の簡便法について検討した。

RAPD-PCRは全DNAの塩基配列の違いにより個体間の識別を行う。植物では、異なる組織の細胞間でDNAの塩基配列に違いはない。そのため、基本的には植物体のDNAの抽出部位によるPCRバンドパターンの変化はないと考えられるが、安定して効率よくテンプレートDNAを得るために、適切な部位について検討した。

1. 材料及び試験方法

1) テンプレートDNA抽出方法の検討

材料には '島根3号' 8個体、及び '島根3号' の耐暑性系統、'さぶみ'、'さんべ'、'だるま'、'真妻' 各1個体の展開直後の新葉を用い、約7mm角の葉片約20mgを採取した。Edwardsらの簡便迅速法を以下のとおりに一部改変し (第8図、以下改変簡便法と略称)、DNAを抽出した。Edwardsらの方法では磨砕時に抽出バッ



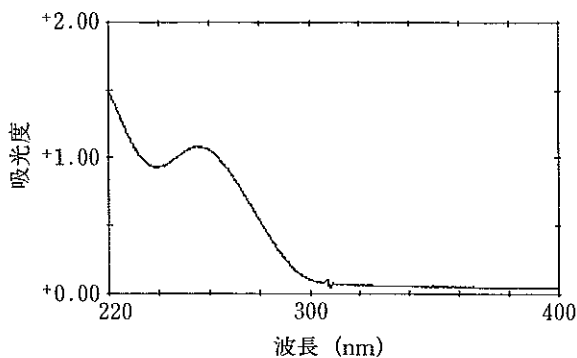
第8図 改変簡便法によるDNAの抽出

ファー (200mM Tris-HCl pH7.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS) を加えないが、ここでは磨砕前に抽出バッファの半量200 μ L加え、滅菌したガラス棒でカーボランダムと共に磨砕した。また、イソプロパノールによる抽出の後、70%エタノールで洗浄し真空乾燥する操作を加えた。真空乾燥したDNAはTEバッファ (10mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA) 100 μ Lに溶かし、-30 $^{\circ}$ Cで保存した。抽出したDNAは260nmの吸光度及び電気泳動によって確認した。

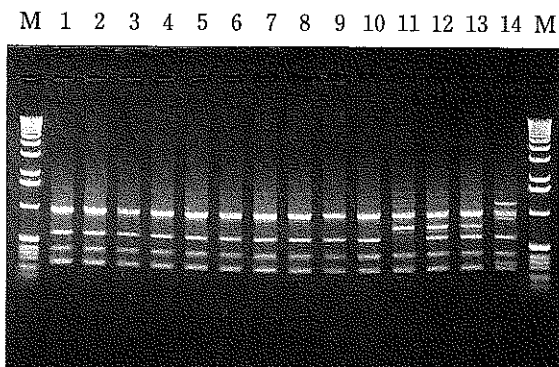
比較には、CTAB法によって抽出した‘島根3号’のDNAをテンプレートとして用いた。

2) DNA抽出部位の検討

材料には‘大神2号’の組織培養苗を用いた。展開葉(新葉, 中葉, 古葉), 葉柄, 根の5カ所の部位からそれぞれ40mgをサンプリング



第9図 改変簡便法で抽出したDNAの紫外線吸収曲線



第10図 改変簡便法による品種別の増幅されたDNAのバンドパターン (プライマー#145)

1~9: 島根3号, 10: 耐暑性島根3号, 11: さぶみ, 12: さんべ, 13: だるま, 14: 真妻, 1のみCTAB法DNA抽出

し、改変簡便法によってDNAを抽出した。展開直後の新葉及び根については、更に個体数を増やして同様の検討を行った。

2. 試験結果

1) DNA抽出方法の検討

第9図に改変簡便法で得られたDNAの紫外線吸収曲線を示した。260nmが核酸, 230nmが多糖類などの吸収波長であり、本法では230nmでの吸収が高く、抽出されたDNAの純度はよくなかった。しかし、この抽出方法により、DNA抽出の全工程にかかる時間は大幅に削減された。

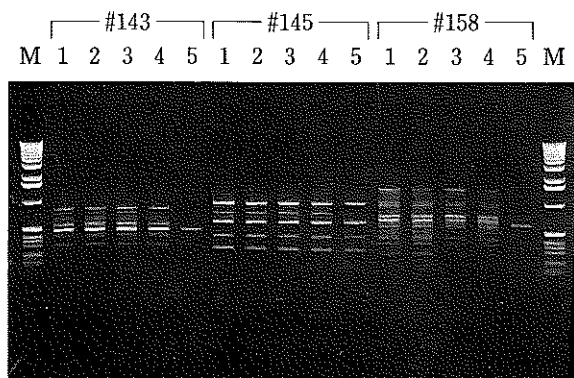
改変簡便法で抽出したDNAをテンプレートとして行ったPCRのバンドパターンを第10図に示した。

‘島根3号’において改変簡便法で抽出したいずれの個体も、CTAB法で抽出した個体と同じバンドパターンを示した。他品種を用いても‘島根3号’と同様にDNAの抽出が可能であり、安定してバンドパターンが得られた。

2) DNA抽出部位の検討

植物体の部位別に抽出したDNAをテンプレートに用いて増幅したDNAのバンドパターンを第11図に示した。根以外では採取部位によるバンドパターンの違いは認められなかった。しかし、根から抽出したDNAをテンプレートにした場合、いずれのプライマーを用いた場合でも検出されたバンドは薄く、プライマーによっては検出はされないバンドもあった。

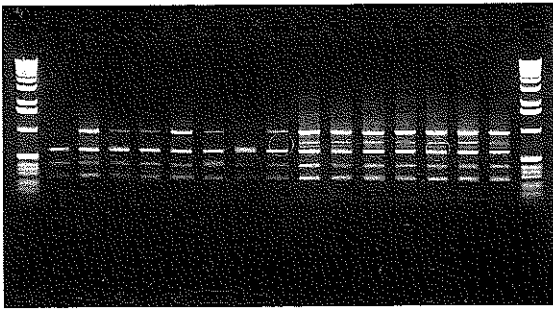
個体数を増やし、根と葉からの抽出を比較した結果を第12図に示した。葉から抽出した場合



第11図 異なる植物体部位の試料から抽出したDNAにおけるバンドパターン

1: 新葉, 2: 中葉, 3: 古葉, 4: 葉柄, 5: 根

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



第12図 根及び葉から抽出したDNAにおけるバンドパターン (プライマー#145)

1~8:根, 9~12:葉

にはどの個体のバンドパターンも同じで再現性が良かったが、根を用いた場合は上記の場合と同様に再現性が悪く、一部、葉では見られないバンドの出現もみられた。

IV プライマーの検索

PCRで増幅できる断片長は約2 Kbpと短く、植物体全DNAのほんの一部分に過ぎない。短い断片からDNA塩基配列の変異を検出するためには、数多くの断片による情報が必要となる。そのためにはプライマーの種類を増やすか、あるいはプライマーを組み合わせるにより、変異を検出できるバンドの数を増やす必要がある。また、検出の精度をあげるためにも数多くのプライマーを必要とする。

そこでワサビでのクローン間の識別、変異性の検討を行うためのプライマーの検索を行った。

1. 材料及び試験方法

CTAB法で抽出した‘島根3号’のDNAをテンプレートに用い、プライマーの検索を行った。検索したプライマーの塩基配列は第2表の通りで、0.2 μ molのサポートカラムを用いて、DNAシンセサイザーにより合成した。一部すでに他作物でバンドが検出されているものを参考とし(#121~165)、その他のプライマーのデザインは任意に行った(#101~116, #201~205)。シンセサイザーにより合成されたDNAは以下の方法で切出しを行った。合成したDNAを含むサポートカラムを1.5mL容マイクロチューブにセットし、5000rpmで30秒間遠心分離してア

セットニトリルを除去した。新しい1.5mL容マイクロチューブにセットし直したサポートカラムに25%アンモニア水1mLを加え、室温で16時間放置した。5000rpmで30秒間遠心分離し、アンモニアとともにオリゴヌクレオチドを回収した。真空乾燥機でアンモニアを蒸発させオリゴヌクレオチドを得た。これを100 μ MとなるようにTEバッファーに溶かし、-30 $^{\circ}$ Cで保存し、必要に応じて溶解して用いた。

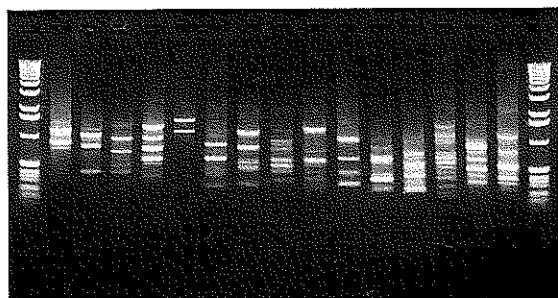
一部の種類のプライマーについては、更に‘島根3号’、‘さんべ’、‘さぶみ’、‘真妻’、‘羅漢2号’、‘大神2号’、‘8603’それぞれの品種・系統の葉片から改変簡便法で抽出したDNAをテンプレートにしてPCRを行った。

2. 試験結果

それぞれのプライマーを用いてPCRを行い、検出できたバンドの数を第2表、またそのバンドパターンの一部を第13図に示した。供試したプライマー45種類のうち29種類で1~10数本のバンドが検出された。CG含量が40%以下のプライマーでは、ほとんどバンドが検出されないものが多かった。

次に、複数のバンドが認められたプライマーを用いてワサビの品種間差を調べた結果の一部を第14図の1と2に示した。用いた18種類のプライマーのうち#110, 121, 128, 132, 138, 143, 145, 158の8種類でバンドパターンの品種間差が認められた。それら品種間の差については、はっきりとしたメジャーなバンドの有無によるものだけでなく、同じ位置にあるバンドの濃淡によるもの、薄いマイナーなバンドの有無及びそれらが組合さったバンドのパターンの違いな

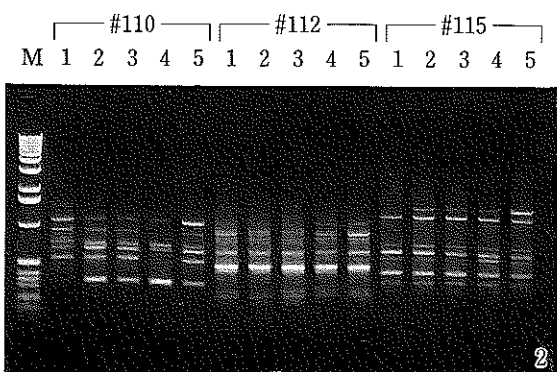
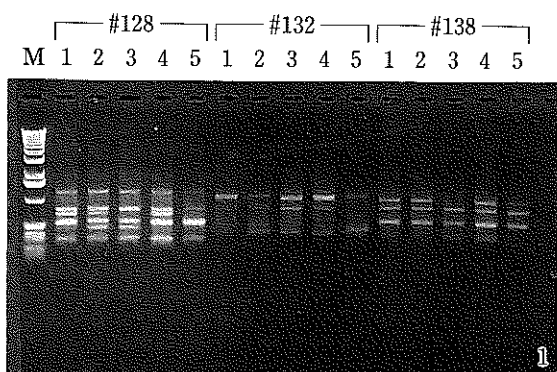
#131 133 135 141 144 151 158 163
M 132 134 138 143 145 152 165 M



第13図 各種プライマーによる増幅されたDNAのバンドパターン

第2表 合成プライマーの塩基配列と検出されたバンド数

No.	塩基配列	GC含量(%)	バンド数	No.	塩基配列	GC含量(%)	バンド数
#101	5'-TGTGAAACCC-3'	50	6	#128	AGCGACGCTG	70	5
102	TTCTGGTTAG	40	—	129	CTGCGGTCGT	70	8
103	ATTTTGTATC	20	—	130	TCGCCTTAAC	50	3
104	TTTCCAAAAC	30	—	131	ACCACCTGGC	70	4
105	CACAACATCA	40	5	132	GTTTTCCCAG	50	5
106	TTAGGAGTTC	40	—	133	CAGGAAACAG	50	6
107	GCTAAGAGTT	40	—	134	CCCGGCATAG	70	6
108	GATCATGCTT	40	—	135	TCTCCGCTTG	60	2
109	AATGTTCTTA	20	—	138	TCGTTCCGCA	60	7
110	TGGTCAATCC	50	6	141	TGAGCCTCAC	60	5
111	TTCCCCGGGA	70	1	132	ACTCCTGCGA	60	7
112	GTGAAGCCAG	60	10	144	GTCCCGTGGT	70	7
113	TCTCACTCCC	60	4	145	CCACACTACC	60	4
114	GATCAAAATG	30	—	151	GGACACCACT	60	7
115	CATTTTCGCC	50	11	152	AAGCGGCCTC	70	6
116	TAGTATCATA	20	—	158	CGGGTCCCAA	70	11
121	ATGGCCACTC	60	9	163	AGGCCAGACC	70	6
122	ATGTCGACGC	60	7	165	AGCCGCCCAA	70	7
123	TCGACGCCGG	80	1	201	AATCCCAT	38	—
124	GAGAGCACGC	70	7	202	TCTTTAGA	25	—
125	ATTTCCCTTGA	30	—	203	TCCCTTAG	50	—
126	GTCGGGTGAA	60	6	204	AGAGAACC	50	—
127	GTTGCCATTG	50	5	205	GTCTCATT	38	—



ど様々な相違がみられた。その結果、これらのプライマーを用いることによってワサビの品種・系統間の識別が可能であった。

V 茎頂培養増殖苗の変異性の検出への応用例

近年、組織培養による苗の大量増殖が多くの作物で行われるようになってきているが、カルスを経由する組織培養に比べ、茎頂培養による組織培養苗は変異が少ないとされている。そこ

第14図 各種プライマーにおけるバンドパターンの品種間差

1 ; 1 : 島根3号, 2 : 羅漢2号, 3 : 大神2号, 4 : さんべ, 5 : 真妻
2 ; 1 : 羅漢2号, 2 : 大神2号, 3 : さんべ, 4 : 真妻, 5 : 島根3号

で、RAPD-PCR法を用いて、実生による増殖苗との比較により、茎頂培養増殖苗の遺伝子レベルにおける変異性を検討した。

また、農家圃場で栽培中の、匹見町の増殖センターから配布された培養増殖苗‘羅漢2号’の中から、他の個体と比べ特に生育のよい2株の個体が認められた。それら2個体を選抜し、増殖センターで培養中の他品種・系統とともにRAPD-PCRを行った。

1. 材料及び試験方法

1) 実生繁殖苗と茎頂培養増殖苗の比較

実生苗のサンプルは現地の圃場で栽培中の‘島根3号’を用いた。‘島根3号’は、ワサビの中では比較的遺伝的に安定で一般に実生繁殖により増殖されている。茎頂培養増殖苗は、当场育成のワサビ品種・系統‘羅漢2号’、‘大神2号’、‘8603’を用いた。これらは当场(出雲市)で培養開始後、匹見町に分譲し、6年間、それぞれの地域で分割増殖中の個体である。それぞれのサンプルの展開直後の葉片から改変簡便法によりテンプレートDNAを抽出した。プライマーは前記試験で再現性と品種間の識別性がよかった#128, 143, 145の3種類のプライマーを用いた。

2) 現地圃場における品種・系統混在株のRAPD-PCRを利用した識別

ガラス室で育成中の農家選抜個体2株の全DNAを展開直後の新葉から改変簡便法によって抽出した。同様に、出雲市及び匹見町の‘羅漢2号’、‘8603’、‘大神2号’についてもDNAを抽出し、PCRに供試した。

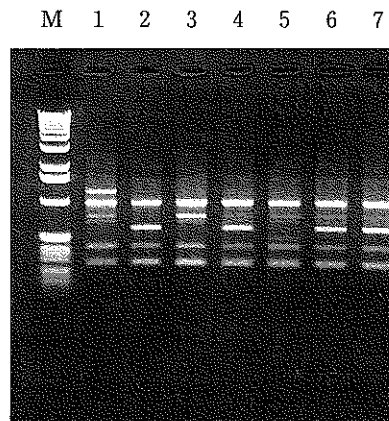
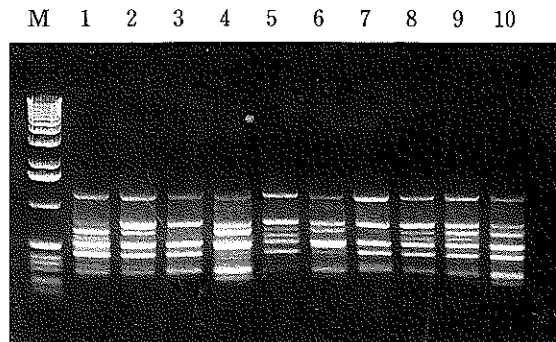
プライマーはワサビの判別プライマーとして識別性、再現性ともによかった#127, 128, 145を用いた。

2. 試験結果

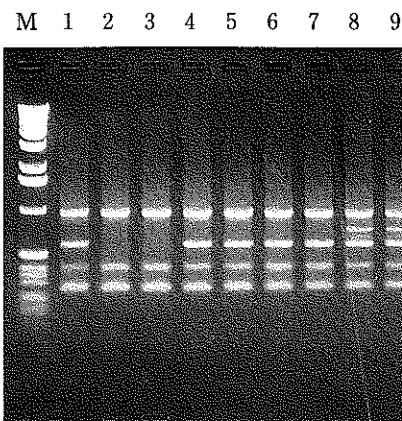
1) 実生繁殖苗と茎頂培養増殖苗の比較

実生繁殖苗における増幅されたDNAのバンドパターンの一部を第15図に示した。#128と#145で幾つかのバンドパターンが検出された。実生繁殖苗で検出したパターン数と、品種間で比較した場合に検出したパターン数はほぼ同程度みられた。

出雲市、匹見町でそれぞれ分割増殖中の‘羅漢2号’、‘大神2号’、‘8603’のクローン間同士



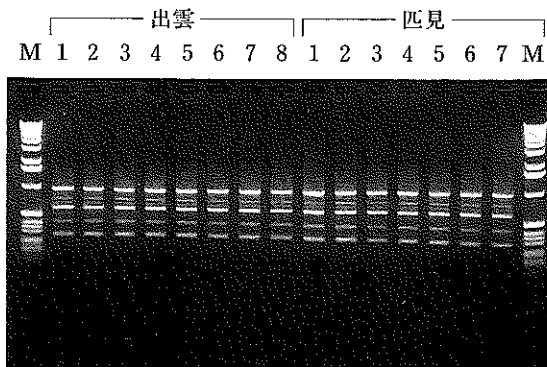
第15図 実生増殖苗における増幅されたDNAのバンドパターン(プライマー 上段：#128, 下段：#145)



第16図 各系統の出雲及び匹見のクローン個体における増幅されたDNAのバンドパターン(プライマー#145)

1：島根3号，2：羅漢2号(出雲)，3：羅漢2号(匹見)，4,5：農家選抜個体，6：8603(出雲)，7：8603(匹見)，8：大神2号(出雲)，9：大神2号(匹見)

で比較したバンドパターンを第16図に示した。このプライマーによる品種間差は判然としていたが、同一の品種・系統については出雲市と匹見町による違いは認められなかった。大神2号



第17図 '大神2号'の出雲及び匹見のクローン個体における増幅されたDNAのバンドパターン (プライマー#145)

について個体数を増やして比較した結果が第17図であるが、これについてもバンドパターンの違いはほとんど認められなかった。

したがって、6年間の継代培養を続けても実生で見られるような変異はみられないことを認めた。

2) 現地圃場における品種・系統混在株のRAPD-PCRを利用した識別

第16図に示すように、'羅漢2号'の中での農家選抜個体2個体はいずれも'8603'と同様のパターンを示した。

VI 考 察

遺伝子レベルでの個体識別は、医学をはじめ犯罪捜査など様々な場面で利用されており、農学の分野においても、RFLP, DNAフィンガープリント, マイクロサテライト, PCRなどを利用した個体識別が盛んに行われるようになってきている。その中でもRFLP用プローブを用いた方法は現在最もよく使われており、ニホンナシ(寺本ら, 1994), カンキツ(Matsuyamaら, 1992)などで品種間, 種間の識別が可能と考えられている。しかし, この方法は多数のサンプルを取り扱う場合には繁雑で向いていない。

近年, Williamsら(1990)は, 任意のプライマーを利用したPCRによるランダムなDNA配列を増幅することによる新しいテクニック(RAPD-PCR)を開発した。この方法はブロッコリー・カリフラワーの品種の同定(Huら, 1991), キュウリF1種子の純度検定(Matsuura

ら, 1994), スイカ・トマトのF1種子の純度検定(Hashizumeら, 1993), イネの品種識別(Yoshimuraら, 1992), ユリ属(山岸, 1993)・キク属(清水ら, 1993)の品種識別及び分類, ウメ(島田ら, 1992)・アンズ(武田ら, 1993)・スモモ(島田ら, 1993)の品種識別や親子鑑定などに利用されている。このRAPD-PCRは, RFLPに比べ, 迅速に多数の多型を簡易に検索する能力を持ち, 更に極少量の未精製のDNAからでも増幅できるという利点をもつ。しかし, 感度が極めて鋭敏のため, PCR反応液組成の濃度, PCRの反応温度等の諸条件, あるいは少量の他DNAの混入による非特異バンドの出現などにより, 再現性に若干の問題が認められる(藤永, 1990; 斎藤, 1991)。そこで筆者らは, ワサビにおいて, RAPD-PCRを行うための諸条件と, テンプレートDNAの抽出方法を確立し, 遺伝子レベルでの品種・系統識別について検討した。

反応液の組成は, dNTPs, テンプレートDNA, Taqポリメラーゼ, プライマー, $MgCl_2$ であるが, それらの濃度の変化によって検出できるバンドの本数, パターンが異なった。テンプレートDNAは, 0.1~5 ng/ μL の範囲では, バンドパターンの変化は認められなかった。このことによりテンプレートDNAを抽出する際, サンプル毎に濃度を調整する必要がなくなり, 多数のサンプルの処理が可能となる。

ポリメラーゼでは, 濃度が高くなるにつれてバンドは濃くなったが, バックグラウンドも同様に濃くなったためバンドが鮮明でなくなった。逆に濃度の低下によって, バックグラウンドは薄くなったがバンドも共に薄くなるのを認めている。これはポリメラーゼの濃度が高くなることにより非特異的なPCR生成物が生じ, また, 低濃度では産物の収量が低下する(藤永, 1990)ためであると考えられた。また, 耐熱性ポリメラーゼはTaqだけでなく, メーカーから様々なものが市販されている。更に, Taqポリメラーゼだけを用いた場合でも製造元によって, 組成, アッセイの条件等が異なるため, 反応結果が一致しない場合がある。ここでは, TOYOBOのTaqポリメラーゼを用いたが, 今後ポリメラーゼを変えた場合, バンドのパター

ンが変わる可能性が考えられるため、その度にパターンをチェックが必要となる。

最終容量は、スケールダウンすることにより、コストの低減が計られる。実際に、最終容量10 μ Lの反応液で行われている場合もある（島田ら、1992）が、微量分注操作の面から、50 μ Lが適切であると判断された。

TaqポリメラーゼはテンプレートDNA、プライマー、dNTPの結合の際に遊離のマグネシウムイオンを必要とし、通常PCRには0.5~5 mMのマグネシウムが必要とされる（藤永、1990）。今回の結果では、MgCl₂無添加及び0.5 mMではバンドが全く検出できず、2.5 mM以上のMgCl₂濃度を必要とした。これは、プライマーや、テンプレートDNAのストック溶液に含まれるEDTAなどのキレート作用により、遊離のマグネシウムが減ったためと考えられる。

dNTPs、プライマーはいずれの濃度を用いても、バンドの検出は可能であるため、検出できるバンドの本数及び鮮明さ、分注の操作性、コストの面を踏まえ、それぞれ妥当と考えられる濃度を用いることとした。

プライマーのアニーリングに必要な温度及び時間は、プライマーの塩基配列、長さ及び濃度によって決まる。通常アニーリング温度は $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ （A：アデノシン，C：シチジン，G：グアノシン，T：チミジンの個数）とすると T_m °Cから $(T_m - 20)$ °Cの間が適切とされている（藤永、1990）。しかし、RAPD-PCRのように短いプライマーを用いる場合は目的のテンプレートDNAとミスマッチが生じやすいため40から45°C付近が良いとされている（藤永、1990）。ワサビで40、50、55°Cでの検討を行った結果、どのアニーリング温度でもバンドが検出でき、この範囲内では検討したいずれの温度も利用できることを認めた。しかし、温度によってバンドパターンに変化がみられたため、一連の実験ではアニーリング温度を統一する必要がある。また、佐藤ら（1993）は、アニーリング温度を高くすることによって不鮮明なバンドは減少したが、再現性がなくなると報告しており、筆者らも、これと同様の結果を認めている。

一般にプライマーやdNTPsに制限がない限

り、PCRのサイクル数が増加するほど生産されるDNA断片は多くなる。しかし、サイクル数を増やすと、非特異的な産物も検出されるようになるため、少なめにする方がよいとされている（藤永、1990）。今回の試験では、サイクル数50回以上では、バンドの濃さはほとんど変わらなかった。これは、ポリメラーゼの活性や、プライマー、dNTPsが制限因子となるためであると考えられる。また、サイクル数が50回未満の場合は、バンドが薄く不明瞭で、パターンの比較が困難な場合を認めた。鮮明なバンドの確保、非特異産物の回避などの点から、サイクル数は50回程度が適当であると考えられる。

したがって、ワサビに適用するPCRの反応液組成及び、反応条件は第1表、第7図に示す条件が適切であると判断される。

テンプレートDNAの抽出には多くの方法（Yoshimuraら、1992；Dellaportaら、1983；古川ら、1993；Stewartら、1993）があるが、多数のサンプルを処理する場合は、操作の簡便さが必要となる。要求されるDNAの精製度は、検定方法によって異なり、PCR法については比較的未精製でも利用可能である。イネでは、粗抽出液をそのまま用いる方法も検討されており（Yoshimuraら、1992）、多数のサンプルを効率的に調整できるが、プライマーによっては再現性が認められないので、検討の余地がある。また、一般に用いられているCTAB法（渡部ら、1989）に変わる抽出方法として、Edwardsら（1991）の簡便法、修正SDSによる方法（古川ら、1993）などが検討されている。筆者らは、Edwardsらの簡便法を一部改変して用いた。Edwardらの方法を用いた場合、抽出したDNAの一部の試料でDNAの分解を認めた。これは、試料を磨砕する前にバッファーを加えないため植物体自身のDNAaseが働いたのではないかと考えられる。磨砕前にバッファー半量を加えることにより、再現よくDNAを抽出することができるようになった。更に、イソプロパノール抽出の後、70%エタノール洗浄の操作を加え、ワサビではこの方法がDNA抽出に利用可能であった。

テンプレートDNAを抽出する部位の検討はほとんど行われていない。今回ワサビでは、葉

片から抽出した場合にバンドパターンの再現性がよかったのに対し、根からの抽出では、全体にバンドが薄く、上記の反応液組成、反応条件では再現性のあるバンドが得られず、かつ、葉片から抽出した場合にはみられなかったバンドが検出された。この原因としては、外部からの微量DNAの混入、プライマー同士のアニーリング、テンプレートの濃度差によるミスマッチなどが考えられた。PCRは、その感度の鋭敏さゆえに、外部からの微量のDNAの混入も検出する可能性がある。屋外で栽培されている植物体は、様々な細菌、菌類などが繁殖し、特に地下部は土壌中の微生物による汚染も多いものと推察され、DNA抽出時にこれが混入する可能性があると考えられた。また、筆者らは、テンプレートDNAを加えずにPCRを行うネガティブコントロールにおいて、プライマー同士のアニーリングと考えられる非特異なバンドが出現するのを確認している。これは、短いプライマーを用いた時、テンプレートDNAの濃度が極めて低いか、あるいはない場合によく見られた。これらのことから、PCRにおいて再現性を得るためには展開直後の新葉を用いるのがよいと考えられた。抽出部位を葉片に限った場合、抽出された全DNAはほぼ $0.1\sim 50\text{ng}/\mu\text{L}$ の濃度になるため、濃度調節の必要も認められなかった。

プライマーの検索は45種類の合成プライマーを用いて行い、29種類のプライマーでバンドを検出した。バンドが検出できなかった多くのプライマーは、GC含量40%以下であり、藤永(1990)が、PCRにおけるプライマーは、GC含量50%以上のものがよいとしていることと類似の結果が得られた。本試験ではほとんど単独のプライマーを用いたが、プライマーを組み合わせることで用いることによって、検出バンド数を多くすることも可能と考えられる。バンドが検出できた29種類のうち、品種間の識別に利用できることが明らかとなった8種類のプライマーにおいても、薄いバンドについて再現性の悪いものを認めた。これらの再現性のないバンドはプライマーのテンプレートとのミスマッチにより生じる可能性等も考えられるため、今後更に検討が必要である。

ワサビでは実生繁殖苗の‘島根3号’の個体

間において、品種間差に匹敵するほど多様なバンドパターンが検出された。これは、品種識別や親子鑑定がなされているウメ(島田ら, 1992)やスモモ(島田ら, 1993)などに比べDNAレベルでの多様性が大きいと考えられる。‘島根3号’の例からも、ワサビにおいて実生繁殖の品種間の近縁関係を判別することは困難であった。これに対し、同一クローンにおける個体間で比較するとバンドのパターンは全く同じであり、クローン間の識別は可能であることが明らかとなった。更に、クローン増殖中に一部の個体で変異が発生した場合、この方法により変異を検出できるものと考えられる。今回の実験では、6年間の継代培養を続けたクローンにおいて変異を認めなかった。また、未公表の実験において、株分けによる増殖苗の個体間で、PARD-PCRのバンドパターンの変異を確認した。これと比較しても、組織培養による増殖は遺伝的に安定であった。

組織培養苗については、実際の圃場で栽培されている個体についてもRAPD-PCRによりクローンを識別することができた。匹見町の増殖センターから配布された培養苗‘羅漢2号’の中から選抜されたと思われる2個体はいずれも‘8603’と同様のパターンを示した。したがって、圃場に定植するときに‘8603’が混入した可能性が非常に大きいと考えられた。このようにRAPD-PCRはクローンの識別に有効な手段になり得ることが明らかとなった。

作物のDNA多型性を利用した品種・系統の識別法は栽培条件の影響を受けないこと、また、識別できる頻度、精度が高く、迅速簡便かつ個人の主観による影響を受けないことなどの利点から、今後、ますます利用されるものと考えられる。農林水産省種苗管理センターでは1992年からDNA多型性を利用した作物の品種・系統識別法の実用化調査が開始され、登録品種の後代検定や純度検定、原種生産における変異チェックなど、圃場栽培による検定に先立つ一次スクリーニングとしての実用化が考えられている(矢野, 1993)。RAPD-PCRによる品種識別は、塩基配列による感度がよすぎるため遺伝的に遠いものについての識別には適さないが、使用するプライマーや、反応条件を検討すること

により品種内のレベルでは利用可能であると考えられる。RAPD-PCRは再現性や、他DNAの汚染などに問題が残るが、DNAフィンガープリント法に比べ迅速、簡便なため、今後、種苗法による登録などでの品種の識別同定にはこれらの方法による確実性とRAPD-PCRの簡易性をあわせた総合的な判定が必要となってくると考えられる。更に、RAPD-PCRによるDNA多型と各種抵抗性遺伝子のリンケージなどから、これによる抵抗性の検出マーカーとしての利用、育種での利用など、今後この技術は他のDNA検出技術と同様に様々な現場で活用されるようになると考えられる。

VII 摘 要

RAPD-PCRを利用したワサビクローン間の識別における組織培養増殖苗の変異性の検討を行った。

PCRの反応液組成は、10×PCRバッファー 5 μ L, 25mM MgCl₂ 5 μ L, 各25mM dNTPs 0.25 μ L, Taqポリメラーゼ (TOYOBO) 0.25 μ L, 100 μ M プライマー 1 μ L, テンプレートDNA (改変簡便法による抽出) 1 μ L, 最終容量50 μ L とするのが適切であった。また、温度条件は熱変性94°C 45秒, アニーリング40°C 1分, 伸長反応72°C 1分でサイクル数50回とするのが適切であった。

植物体からのテンプレートDNAの抽出法として、改変簡便法が利用可能で、この方法を用いることにより、抽出に要する時間を削減できる。テンプレートDNA抽出に用いる植物体の試料採取部位は、展開直後の葉片が適切であった。

ワサビクローン間の識別には、検討した18種類のうち8種類のプライマーが利用できた。

実生繁殖品種においては、個体間で増幅されたDNAのバンドパターンの明らかな違いが認められたが、茎頂培養増殖苗では、同一品種・系統内でバンドパターンの違いは確認できず、RAPD-PCRはクローンの識別に有効な手段となり得ることが明らかとなった。

引用文献

- Dallas, J. F. (1988) Detection of DNA 'finger prints' of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6381-6385.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1 (4), 19-21.
- Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic acids res. 19 (6), 1349.
- 藤永 恵編 (1990) 遺伝子増幅PCR法. 共立出版株式会社, 228pp
- 古川 一・日岡千之 (1993) 修正SDS法で抽出したいくつもの野菜のDNAの特性. 園学雑62 (別1), 186-187.
- Gawel, N. J. and A. C. Bartlett (1993) Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. Insect Molecular bio. 2 (1), 33-38.
- Hashizume, T., T. Sato and M. Hirai (1993) Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) by using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Japan. J. Breed. 43, 367-375.
- Hu, Jinguo., and Carlos. F. Quiros (1991) Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports 10, 505-511.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein. (1985 a) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 314, 67-73.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein. (1985 b) Individual-specific 'finger-prints' of human DNA. Nature 316, 76-79.
- Kuhnlein, U., Y. Dawe, D. Zadworny and J. S. Gavora. (1989) DNA fingerprinting; a tool

- for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor. Appl. Genet* 77, 669-672.
- Matsuura, S., A. Saito and Y. Fujita (1994) An approach for checking of seed purity by RFLP analysis of nuclear DNA in F_1 hybrid of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63 (2) 379-383.
- Matsuyama, T., R. Motohashi, T. Akihamā and M. Omura (1992) DNA fingerprinting in *Citrus* cultivars. *Japan. J. Breed* 42, 155-159.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Flooka, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- 大山勝夫 (1990) 細胞育種の現状と展望. 組織培養の植物科学・産業技術への利用, 6-9.
- 斎藤 隆監訳 (1991) PCR実験マニュアル. HBJ 出版局, 406pp.
- 佐藤孝子・水野直美 (1993) DNAフィンガープリント (AFLP_s) 法によるワサビの品種鑑定について. *園学雑*62 (別1), 188-189.
- 島田武彦・保坂和良・中西テツ・尾崎 武・吉田雅夫・山本 仁・藤本欣司 (1992) RAPD マーカー法によるウメの品種分類と親子鑑定. *園学雑*61別1, 140-141.
- 島田武彦・土師 岳・山口正巳・野村啓一・吉田雅夫 (1993) RAPD分析法のスモモ系統分類への適用. *園学雑*62 (別2), 130-131.
- 清水明美・池田 広・平井正志 (1993) キク属野性種の分類におけるRAPD-PCR法の検討. *園学雑*62 (別1), 338-339.
- Stewart, C. N. Jr, and L. E. Via (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Bio Techniques* 14 (5), 748-749, 751.
- 武田敏秀・島田武彦・土師 岳・山口正巳・野村啓一・吉田雅夫 (1993) RAPD分析法のアンズ系統分類への適用. *園学雑*62(別2), 128-129.
- 寺本さゆり・村上 (嘉納) ゆり子・保里昌彦・神山清文 (1994) DNAフィンガープリント法によるニホンナシの品種および親子判定. *園学雑*63, 17-21.
- 矢野 博 (1993) DNAフィンガープリント法による作物の品種・系統識別. *農および園*68, 25-31.
- 山田員人・春木和久 (1992) ワサビの茎頂培養による大量増殖法. *島根農試研報*26, 86-95.
- 山岸真澄 (1993) PCRによるユリ属のDNA多型の検出 (第1報) 種, 品種及び野性種の個体の識別. *園学雑*62 (別1), 336-337.
- Yoshimura, T., A. Yoshimura and N. Iwata (1992) Simple and rapid PCR method by using crude extracts from rice seedlings. *Japan. J. Breed* 42, 669-674.
- 渡部 格・杉浦昌彦監修 (1989) クローニングとシークエンス. 農村文化社, 252-271.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids res.* 18, 6531-6535.

Summary

Discrimination among clonal variations of Japanese horseradish (*Wasabia japonica* Matsumura) propagated *in vitro* was examined by using RAPD-PCR.

The preferable reaction mixture for PCR consisted of 10 x PCR buffer 5 μ l, 25mM MgCl₂ 5 μ l, 25mM dNTPs 0.25 μ l, Taq polymerase (TOYOBO) 0.25 μ l, 100 μ M primer 1 μ l, template DNA (extraction by modified simple method) 1 μ l and made up to a final volume of 50 μ l with distilled water. Reaction condition for PCR was performed 50 cycles of the denaturation at 94 °C for 45 sec, the annealing at 40 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min.

The modified simple method for extraction of template DNA from plants can be used to reduce extraction time. A younger leaf just after unfolding was available to extract template DNA.

Eight of 18 primers could be used for discrimination among clonal variations of wasabi.

In cultivars propagated by seed, there were obvious differences in amplified DNA banding patterns. In shoot tip cultured plant, there were no differences in DNA banding patterns. RAPD-PCR, therefore, can be a useful method for the discrimination among clonal plants.