

アンカーPCR (APCR)法を用いたトランスポゾンディスプレイにおける 選択塩基の効果

松井 和幸¹, 堀端 章^{2,3}

要旨

筆者らは、イネに内在するトランスポゾン *mPing* の転移を利用して挿入突然変異体を作成し、これを用いたイネの遺伝子機能解析を進めている。トランスポゾンディスプレイは *mPing* の挿入位置に関する多型を網羅的に検出する優れた方法であるが、ゲノム内に散在する *mPing* のコピー数が著しく多い場合には増幅される断片を減らす必要がある。そこで、本研究では、*mPing* によるトランスポゾンディスプレイにおいて、アダプタープライマーの 3'末端に付加した選択塩基が増幅産物の数を減らす効果を検証した。その結果、1 塩基を付加した場合には増幅産物の選択が正常に行われるが、2 塩基を付加した場合には擬陽性シグナルが生じるため、正常な選択が行われないことが明らかとなった。

1. 緒論

2002 年、International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP)によるイネのドラフト塩基配列決定が終了した。したがって、これからのイネの遺伝学は、塩基配列情報と形質を関連付ける遺伝子機能解析に移ると考えられる。遺伝子機能解析では、T-DNA やトランスポゾンのような転移性の DNA 断片による挿入突然変異体を利用することで、出現する変異形質とその原因遺伝子との関連付けを容易に行うことが可能である。

イネに内在するトランスポゾン *mPing*⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾は、品種によりかなりの変異があるものの、ゲノム内におよそ数 10 から数 100 コピー存在し、通常の栽培条件下で転移することが可能である。そこで、筆者らは、この *mPing* の転移を利用して多数の挿入突然変異体を作成し、イネの有用遺伝子の機能解析を行おうと考えた。ゲノム内における *mPing* の転移は、親子あるいは兄弟個体間で、*mPing* の挿入位置に関する多型を調査することで検出できる。*mPing* の挿入位置の可視化と多型の検出は、トランスポゾンディスプレイにより効率的に行うことが可能である。トランスポゾンディスプレイにも複数の方法があるが、筆者らは、アンカーPCR(APCR)⁽⁴⁾とキャピラリー電気泳動を利用する方法を採用した。この方法ではまず、ゲノム DNA の制限酵素処理およびアダプターライゲーションにより両端にアダプターを付加された様々な長さの DNA 断片を生成する。これを鋳型にして、*mPing* に特異的なプライマーとアダプタープライマーを用いた PCR により、*mPing* およびその隣接配列を含む断片のみを選択的に増幅する。この際、*mPing* 特異的プライマーには蛍光色素が付加されており、PCR 産物のキャピラリー電気泳動を行うことで PCR 産物の大きさ(bp)に関する分布(波形データ)を得ることが可能である。この大きさの多様性は、*mPing* 挿入位置に隣接する塩基配列に依存するため、波形データを親子間あるいは兄弟間で比較することで *mPing* の挿入多型を検出することが可能である。この方法は、ゲノム内に散在する多数の *mPing* の転移を同時にモニターすることが可能である点、また、波形データのコンピュータによる解析が可能である点で、極めて優れている。

原稿受付 2005 年 6 月 20 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.03-IV-2, 2004 の助成を受けた。

1. Graduate School of BOST, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Uchita, Wakayama 649-6493, Japan

3. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama 649-0017, Japan

確かにこの方法は、ゲノム内に散在する 100 コピー程度の *mPing* を検出し、その挿入位置を明確に識別することが可能である。しかしながら、挿入位置が異なるコピーであっても、挿入された *mPing* から制限酵素サイトまでの距離が偶然同じであれば、得られる増幅断片のサイズが等しくなり、波形上、重なって検出される可能性がある。また、多型を示した DNA 断片を回収し、*mPing* に隣接する配列の情報を得るためには、キャピラリー電気泳動より分離能の劣るポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を必要とする。これらの状況下では、1 サンプルに含まれる増幅断片の総数を少なくすることが必要になる。AFLP 法⁽⁵⁾では、アダプターに隣接するゲノム DNA 断片の末端 1 ないし 2 塩基の違いによって、増幅されるべき断片を選択し、増幅断片の数を減らす方法が一般化している。この選択的 PCR と呼ばれる方法では、アダプタープライマーの 3'末端に 1 から 2 個の選択塩基を付加したプライマーを使用して PCR を行うが、この方法は同時に高い割合の擬陽性シグナルを生み出すという問題を抱えている。

そこで、本研究では、*mPing* によるトランスポゾンディスプレイに関して、1 から 2 個の選択塩基を付加した場合の選択効果を検証した。

2. 材料および方法

予備実験の結果(データを示していない)に基づいて、ゲノム内に約 50 コピーの *mPing* をもつことが期待される実験系統(SCV 系統)の 1 個体を選び、その個体の生葉から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてゲノム DNA を抽出した。

抽出したゲノム DNA 10ng に、*mPing* 内部に 1 か所の制限サイトをもつ制限酵素 *Csp6 I* (MBI Fermentas) 0.1U、制限酵素バッファー、アダプター 0.2nM および Ligation high (TOYOBO) 3 μ l を加えて全量を 10 μ l とし、37°C 16 時間のインキュベーションを行って、ゲノム DNA の消化とアダプターの付加反応を行った。反応終了後、65°C 20 分のインキュベーションにより酵素類を失活させ、反応液に 40 μ l の TE バッファーを加えて希釈反応液とした。ついで、希釈反応液 0.5 μ l に、PCR バッファー(TOYOBO)、*mPing* 特異的プライマー(5'-TCATTTGAGAGAAGATGGTA-3'、5'末端に蛍光色素 D2 が付加されている) およびアダプタープライマー (5'-GACGATCAGTCCTGACTAC-3') 各 0.2 μ M、dNTPs 20 μ M、*rTaq* DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) 0.4U を加えて全量を 10 μ l とし、94°C 30 秒、58°C 30 秒、72°C 60 秒を 30 サイクル行ったのち 72°C 60 秒の条件で PCR を行った。この反応液にサイズマーカーを混合し、キャピラリー電気泳動装置 CEQ 2000 (BECKMAN COULTER)による電気泳動と Fragment Analysis System (BECKMAN COULTER)による波形解析を行い、増幅断片長の分布に関する波形データを得た。

一方、選択的 PCR では、アダプタープライマーの代わりに選択塩基としてアダプタープライマーの 3'末端に 1 ないし 2 塩基を付加した選択的プライマー(5'-GACGATCAGTCCTGACTACNN-3')を用いた。他の条件は上述の方法と同様である。図 1 は、選択的プライマーによる増幅産物の選択機作を示したものである。アダプタープライマーを用いる場合には、ゲノム内にあるすべての *mPing* に関して各々に隣接する配列が増幅されるが、選択的プライマーを用いる場合には、アダプターに隣接する部分の配列が選択塩基と相補的な断片のみが選択的に増幅される。このため、選択塩基として 1 塩基を付加した場合の増幅産物は、選択塩基を付加しない場合に比べておよそ 1/4 に、選択塩基として 2 塩基を付加した場合の増幅産物は、選択塩基を付加しない場合に比べておよそ 1/16 になると期待される。

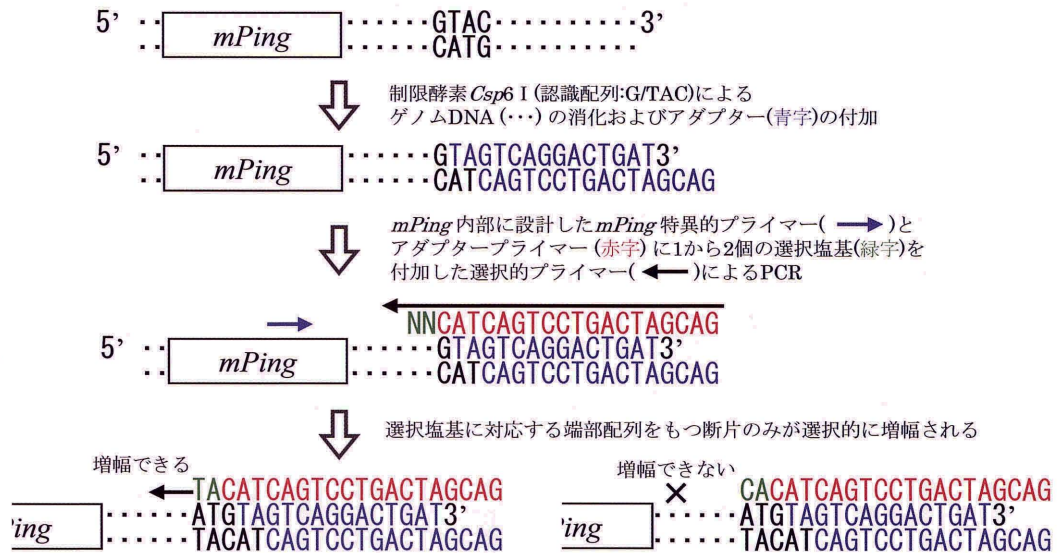


図 1 選択的プライマーによる増幅産物の選択

3. 結果および考察

トランスポゾンディスプレイの結果得られた波形データの一部を図 2 に示す。図中の濃い線は PCR による増幅断片の分布を、薄い線はサイズマーカーの分布をそれぞれ示し、数字はマーカーのサイズ(bp)である。図 2 の A は選択塩基を付加しない場合の波形データであり、B は選択塩基として A (アデニン) の 1 塩基、C は選択塩基として AT (アデニンおよびチミン) の 2 塩基、そして、D は選択塩基として AC (アデニンおよびシトシン) の 2 塩基を付加した場合の波形データである。

選択塩基を付加しない場合の PCR においては合計 64 個のシグナルが検出された(図 2A)。この結果は、この個体に 64 コピー以上の *mPing* が存在することを示している。選択塩基として A のみを付加した場合の選択的 PCR では合計 24 個のシグナルが検出され(図 2B)、選択塩基の付加によって増幅断片の数が減少した。また、これらのシグナルは全て選択塩基を付加しない場合の PCR においても検出されたことから、選択塩基の付加によって生じた擬陽性シグナルは含まれていないと考えられた。同様に、選択塩基として T (チミン)、G (グアニン) または C (シトシン) の 1 塩基を付加した選択的 PCR を行った結果、これらの場合において検出されたシグナルは全て選択塩基を付加しない場合の PCR においても検出されているものであり、擬陽性シグナルは観察されなかった。さらに、選択塩基を付加しない場合の PCR で得られた全てのシグナルに関して、1 塩基を付加した場合のシグナルとの関連を調査したところ、64 個のシグナル全てを A、T、G および C のいずれかに関連付けることができた(図 2A)。このうち 2 個のシグナルがそれぞれ G および C あるいは A および C に重複して関連付けられたため、これらのシグナルは異なる位置に挿入された 2 コピーの *mPing* から得られた増幅産物を含んでいたものと考えられる。すなわち、選択塩基の付加によって新たに 2 コピーの *mPing* が検出されたことになる。このように、1 塩基の選択塩基の付加はトランスポゾンディスプレイの増幅断片を効果的に選択していると考えられた。

一方、選択塩基として AT または AC の 2 塩基を付加した選択的 PCR では、1 塩基を付加した場合とは異なる結果が見られた。増幅されるシグナル数は、AT または AC を選択塩基として付加した場合、A のみを付加した場合の 26 のおよそ 1/4 に相当する 6 程度になるはずであるが、A のみを付加した場合と比較してシグナル数の減少が全く見られなかった(図 2C および D)。単に減少しなかっただけではなく、AT

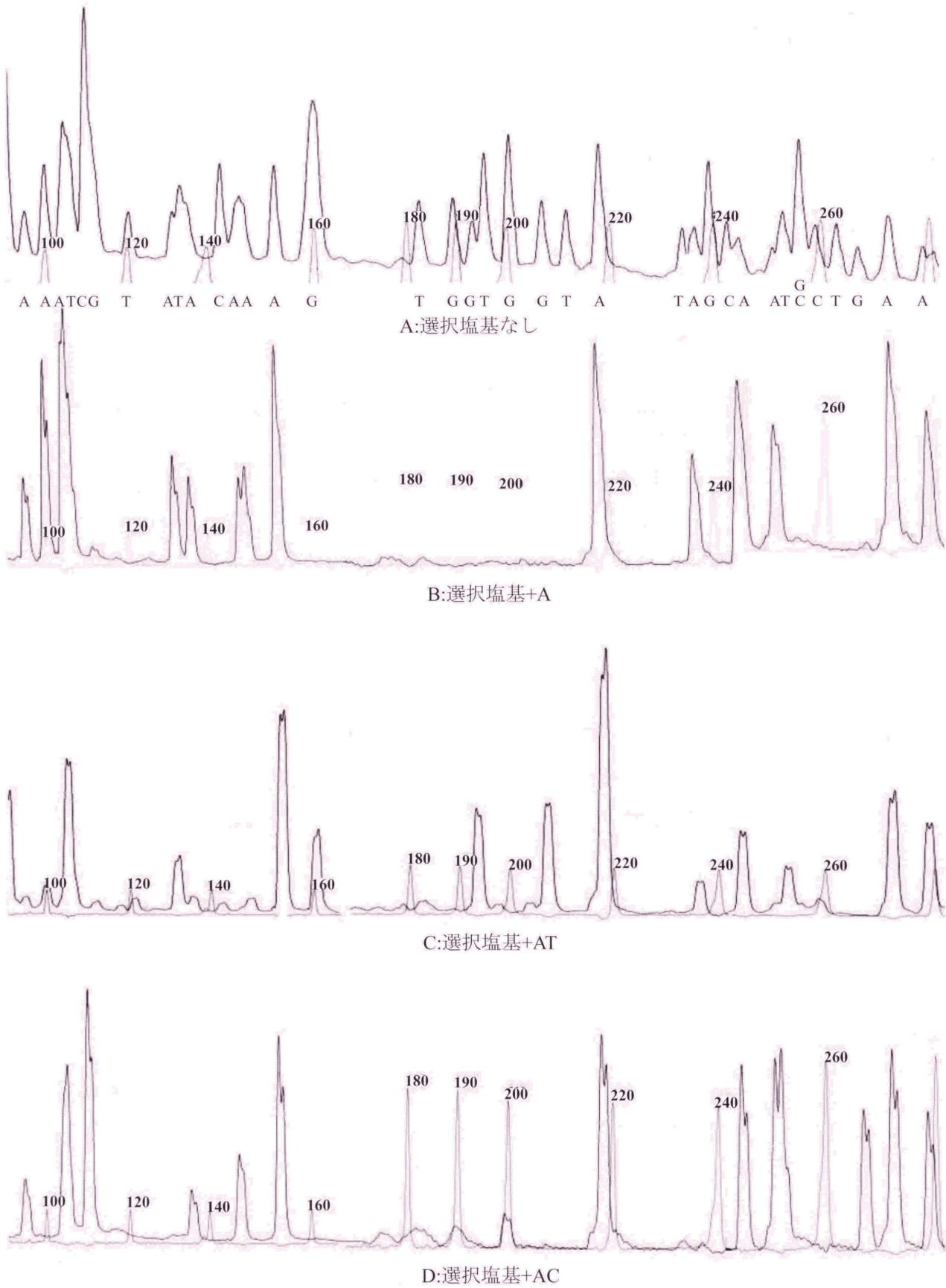


図2 トランスポゾンディスプレイの結果の一部
縦軸は蛍光強度、横軸は塩基対数 bp を表す

を付加した場合(図 2C)に見られる 160、194 および 208bp の各シグナルならびに AC を付加した場合(図 2D)に見られる 100 および 268bp の各シグナルは、A のみを付加した場合(図 2B)には認められなかったシグナルであり、これら新たなシグナルは 2 塩基目の選択塩基を付加したことによって生じた擬陽性シグナルであると考えられた。選択塩基を付加しない場合(図 2A)には、これらの擬陽性シグナルとよく似た位置にシグナルが認められることから、*mPing* 特異的プライマーは *mPing* を含む断片を正常に選択的に増幅していると考えられる。2 塩基を付加した場合の擬陽性シグナルは、1 塩基目の選択塩基がアニーリング時にスキップされて選択作用を十分に発揮できないために生じるのではないかと考えられた。本法と同様、選択塩基による選択的増幅を技術基盤とする HiCEP 法でも、アニーリング時の選択塩基のスキップが報告されている⁽⁶⁾。

以上のように、*mPing* によるトランスポゾンディスプレイでは、1 塩基の選択塩基付加はシグナル数の減少ならびに重なり合うシグナルの分離において効果的であるが、2 塩基以上の付加は擬陽性シグナルを生むために効果的ではないことが示された。ただし、PCR においてスキップを許容しないような、反応条件、プライマーおよびアダプターの塩基配列を明らかにすることが可能であれば、2 塩基の付加でも正常な選択的 PCR を行い得る可能性はまだ残るため、これからも検討を続ける予定である。

なお、本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 (No.03-IV-2, 2004) ならびに JST、和歌山県地域結集型共同研究事業によって行われたものである。ご支援をいただいた関係各位に御礼申し上げます。

4. 参考文献

- (1) Nakazaki, T., Y. Okumoto, A. Horibata, S. Yamahira, M. Teraishi, H. Nishida, H. Inoue and T. Tanisaka (2003) Mobilization of a transposon in the rice genome. *Nature* 421:170-172.
- (2) Jiang, N., Z. Bao, X. Zhang, H. Hirochika, S. R. Eddy, S. R. McCouchk and S. R. Wessler (2003) An active DNA transposon family in rice. *Nature* 421:163-167.
- (3) Kikuchi, K., K. Terauchi, M. Wada and H. Hirano (2003) The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture. *Nature* 421:167-170.
- (4) Ayyadevara, S. J. J. Thaden, and R. J. S. Reis (2000) Anchor polymerase chain reaction display: A high-throughput method to resolve, score, and isolate dimorphic genetic markers based on interspersed repetitive DNA elements. *Analytical Biochemistry* 284:19-28
- (5) Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, and M. Kuiper (1995) A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Reserch* 23:4407-4414.
- (6) 安倍真澄 (2004) 高精度遺伝子発現プロファイル解析 (HiCEP) 技術とその可能性 *放射線科学* 47 10:340-349

英文抄録

The Effects of the Selective Bases on Discrimination in Transposon Display with Anchored PCR (APCR) in Rice (*Oryza sativa* L.)

Kazuyuki Matsui and Akira Horibata

We are currently performing a functional genomics of rice (*Oryza sativa* L.) via insertion mutagenesis induced by *mPing*, an active inherent transposon of rice. Transposon display is an excellent method for exhaustive detection of numerous polymorphisms at *mPing* insertion sites in whole rice genome. In many cases, however, too many copies of *mPing* were present originally in rice genome, which makes difficult to identify truly polymorphic signals from such background involving many non-polymorphic amplified signals. In this study, we verified whether one or two selective bases added to an adapter primer could reduce the number of amplification products. We found that the addition of one base was highly effective in reducing the number of amplification products. However, the addition of two bases resulted in some pseudo-positive signals, and was therefore not considered useful for this purpose.