ファルカタリアにおける 4 塩基繰返しマイクロサテライトマーカーの開発

Vivi Yuskianti¹・管 蘭 華^{2,4}・後藤 栄 治^{2,5}
 Anthonius YPBC Widyatmoko¹・白 石 進^{*,3}

アジアの熱帯地域における重要な森林資源であるファルカタリア (*Falcataria moluccana* (Miq.) Barneby & J. W. Grimes) において、ligation-mediated suppression PCR 法を用いて 10 個の 4 塩基繰返しマイクロサテライトマーカーを開発した。天然林由来の 33 個体を用いてこれらのマーカーの多様性評価を行った結果、各マーカーの対立遺伝子数は 9–16 (平均値: 12.4)、ヘテロ接合体率 (期待値) は 0.752–0.924 であった。これらの多型マーカーはファルカタリアの遺伝的資源および遺伝的多様性の評価と保全に向けた集団遺伝学、保全遺伝学、分子生態学的研究に活用できる。

キーワード: ファルカタリア, 4 塩基繰返しマイクロサテライト, suppression PCR

Vivi Yuskianti,¹ Lanhua Guan,^{2,4} Eiji Gotoh,^{2,5} Anthonius YPBC Widyatmoko,¹ Susumu Shiraishi^{*,3} (2012) Development of Tetranucleotide Microsatellite Markers in *Falcataria moluccana*. J Jpn For Soc 94: 92–94 *Falcataria moluccana* (Miq.) Barneby & J. W. Grimes is an important forest resource in tropical Asia. Ten polymorphic tetranucleotide microsatellite markers were isolated using a ligation-mediated suppression PCR technique. The polymorphism of these markers was investigated in 33 individuals from natural populations. The number of alleles ranged from nine to 16 with an average of 12.4 alleles per marker, and the expected heterozygosities of the 10 markers ranged from 0.752 to 0.924. These polymorphic markers will be powerful tools for use in population genetics, conservation genetics, and molecular ecology studies to evaluate and conserve genetic resources and biodiversity in *F. moluccana*.

Key words: *Falcataria moluccana*, tetranucleotide microsatellite, suppression PCR

I. は じ め に

ファルカタリア (*Falcataria moluccana* (Miq.) Barneby & J. W. Grimes; ファルカタ (falcata), セゴン (sengon)) は東南アジアの熱帯林における重要な森林資源であり、近年、この樹種の遺伝的資源の特性評価と保全のための研究および育種事業が進められている。これらの遺伝研究や育種事業を進める上で、高い多型性と信頼性をもったマーカーが求められている。本樹種においては、既に、6 個の 2 塩基繰返しマイクロサテライトマーカー (以下、2 塩基マーカー; 井出ら 2008)、5 個の SCAR (sequence characterized amplified region) マーカー (Yuskianti and Shiraishi 2010a) および 12 個の SNP (single nucleotide polymorphism) マーカー (Yuskianti and Shiraishi 2010b) が開発されている。

遺伝子型の決定におけるタイピングミスを減少させるためには信頼性の高いマーカーが不可欠である (Pompanon *et al.* 2005)。2 塩基マーカーは、PCR (polymerase chain reaction) 中に起こる slippage により副次的産物 (stutter band) を生成し (Ellegren 2004)、正確なタイピングを困

難にしている。一方、4 塩基繰返しマイクロサテライトマーカー (以下、4 塩基マーカー) では stutter band の発生が著しく抑制されるため、より正確なタイピングが可能になる (Eckert *et al.* 2002; Munyard *et al.* 2009)。このため、ヒトの法医学における DNA 鑑定では 4 塩基または 5 塩基マーカーが使用されている (Faria *et al.* 2011)。また、短い PCR 産物であれば、高性能分析機器 (DNA シーケンサ等) を用いなくても、高分離能アガロースゲル (MetaPhor, Lonza 等) やポリアクリルアミドゲルなどで DNA タイピングが可能である。そこで、本研究では、Lian and Hogetsu (2002) が考案した ligation-mediated suppression PCR を用いた方法を応用し、ファルカタリアの 4 塩基マイクロサテライトマーカーの開発を行った。

II. 材料と方法

無作為に選ばれたファルカタリア 8 個体の葉から抽出された全 DNA を同量混合し、ゲノミックライブラリーの作成に供した。この混合 DNA を制限酵素 (*Sau* 3AI) で切断し、断片の両端にアダプター (5'-CTGGTGC AAGGTTCAAGCTACTGGAGGGCAGGCACGGGA-3' と 5'-

* 連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: sushi@agr.kyushu-u.ac.jp

¹ Center for Forest Biotechnology and Tree Improvement, Jl Palagan Tentara Pelajar Km. 15 Purwobinangun, DI Yogyakarta, Indonesia

² 九州大学大学院生物資源環境科学府 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1 (Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 6-10-1 Higashi-ku, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan)

³ 九州大学大学院農学研究院 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1 (Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Higashi-ku, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan)

⁴ 湖北省林木育種センター 中国湖北省武漢市洪山区雄楚大街 339 号 (Hubei Forest Tree Breeding Center, Wuhan 430079, China)

⁵ 九州大学大学院理学研究院 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1 (Faculty of Science, Kyushu University, 6-10-1 Higashi-ku, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan)

(2011 年 12 月 19 日受付; 2012 年 1 月 23 日受理)

GATCTCCCGTGCCTGC-3' (5'末端をリン酸化, 3'末端をアミノ基で修飾))を付加した。(CATA)_nのマイクロサテライト領域をもつ断片をライブラリーの中から選択的に増幅するために, 5'末端にアンカーをもつ繰返し配列特異的プライマー (DB(TACA)₆TA, BV(ACAT)₆A, VB(CATA)₆とBD(ATAC)₆Aの混合液)とアダプターの一部配列からなるプライマー (5'-CTGGTGCAAGGTTCAAGCTACT-3')を用いてPCRを行った。PCR条件は, Guan and Shiraishi (2011)に従った。このPCR産物を, plasmid vector (pGEM-T Vector System, Promega)と*E. coli* (JM109 Competent Cell, TOYOBO)を用いてクローニングした。得られた組換え体コロニーをABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて分析し, 繰返し配列に隣接する片側の領域の塩基配列を決定した。

これらの塩基配列情報をもとに隣接領域特異的プライマーを2個(それぞれ1回目(preamplification)と2回目のPCR(nested PCR)に使用)設計し, Lian and Hogetsu (2002)に従って他方の隣接領域の塩基配列を決定した。なお, アダプター特異的プライマーの配列は, 5'-CTGGTGCAAGGTTCAAGCTACT-3' (preamplification)と5'-AGGGCAGGCACGGGAGAT-3' (nested PCR)である。両隣接領域の塩基配列を結合し, 繰返し配列を挟んで1対のプライマーを設計した。このプライマー対で得られるPCR産物をQIAxcel System (QIAGEN, QIAxcel DNA High Resolution Kitを使用)を用いて分析し, シングルコピーでかつ塩基長多型を示すことを確認した。最終的に選ばれたマーカーについて, そのプライマー対の一方(表-1のFプライマー)を蛍光色素(6-FAM/VIC, Applied Biosystems)でラベルし, ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)でフラグメント分析を行った。

各マーカーのヘテロ接合体率(観察値(H_0)と期待値

(H_E)), ヌル対立遺伝子(null allele)頻度および多型情報含有値(PIC, polymorphic information content)は, 表現型データからCERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.* 2007)を用いて算出した。また, ハーディ・ワインベルグ平衡(HWE, Hardy-Weinberg equilibrium)と連鎖不平衡(LD, linkage disequilibrium)については, それぞれGENEPOP 4.0 (Rousset 2008)とBonferroni補正法を用いて解析した。

III. 結果と考察

クローニングによって得られた192コロニーについてコロニーPCRを行い, 約100 bp以上のフラグメント挿入が確認された133コロニーについて片側の隣接領域の塩基配列分析を行った。これにより70種類の塩基配列が得られた。この中から, 繰返し数の多いものから順に48領域を選び, 他方の隣接領域の配列分析を試みた結果, 両隣接領域の塩基配列が得られたのは11領域であった。これらの領域についてマイクロサテライトを増幅するためのプライマー対を設計し, 増幅の確認と多型の検証を行った結果, QIAxcel Systemを用いた分析で全ての領域がシングルコピーでかつ塩基長多型を示した。自動蛍光シーケンサを使用し, インドネシアのBiak, Wamena, Manokuwari (以上, Irian Jaya), Halmahera, P. Makian (以上 Maluku 諸島)の5地域の天然林由来とされる33個体を用いて多型性を評価した。このうちの1領域で5個の対立遺伝子が確認されたが, 全ての個体がいずれか1種類の対立遺伝子しか保有しないことから, オルガネラDNA由来であると思われる。このため, 今回の研究からは除外した。残る10領域(マーカー)ではいずれも高い多型性が認められた。

各マーカーの繰返しモチーフ(repeat motif)とPCRプライマー対の塩基配列(primer sequence)は表-1のとおりである。各マーカーの対立遺伝子数は9~16個で, 平

表-1. ファルカタリアで開発された4塩基マイクロサテライトマーカーの諸特性
Characteristics of tetranucleotide microsatellite markers developed for *Falcata moluccana*.

Market	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	Allele		H_0	H_E	Null allele frequency	PIC	Accession no.
			No.	Size (bp)					
F504	(TACA) ₉	F: GAGTCTGATTCCTCAACTCTTACATAC R: TTAGAACTAAATAGTATACTGTGTGTGTG	11	76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 108, 112, 116, 120	0.697	0.752	0.038	0.709	AB674579
F506	(CATA) ₁₀	F: ATGGTCTAAAGGGTTATAAAGACTTGT R: ATCCCTTTTACGAGCTTGACCATC	15	313, 321, 325, 329, 333, 337, 341, 345, 349, 353, 357, 361, 365, 377, 381	0.758	0.904**	0.074	0.881	AB674580
F507	(TACA) ₉	F: TTCTTTCTTCATCTCGGTGCGGGAC R: CTAAATTTACATCCCCATCTATGTGGC	9	268, 284, 288, 292, 304, 308, 312, 324, null	0.970	0.813*	-0.107	0.773	AB674581
F514	(CATA) ₁₁	F: GGGACTTACAGCCTTAGACATCCTC R: ACCCTTATATAAAGAGGTGTTACGC	14	426, 430, 434, 438, 446, 454, 458, 466, 470, 474, 478, 482, 486, 490	0.697	0.854*	0.089	0.824	AB674582
F516	(TACA) ₉	F: AACCAACTCAGATTGACATAGGTGGC R: AATCGCTTCTCTAATAATGTGTTGGTA	12	226, 230, 234, 238, 242, 246, 250, 254, 262, 266, 270, null	0.788	0.833*	0.010	0.798	AB674583
F520	(ATAC) ₇	F: AGATTGATTAAATCTTGAGGAAAATTGTGC R: TTTCCTTAAATTTGTGTGCTCGGTA	10	123, 127, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 199, 207	0.939	0.881**	-0.044	0.854	AB674584
F521	(TACA) ₇ ;T(AG) ₈	F: AGCCCTATCATTTATTAGAAATCGTGGAC R: TCTCGACTTGCTTCCCTTCCACTT	16	313, 321, 325, 329, 333, 337, 341, 345, 349, 353, 357, 361, 369, 373, 381, 385	0.909	0.917	-0.044	0.896	AB674585
F535	(TACA) ₇	F: CCACCTATTTATATCCTGAAAATGGTACG R: CCTTGATGGCTTCTTAATTGGTT	13	225, 229, 233, 237, 241, 249, 253, 257, 261, 265, 269, 273, null	0.636	0.890**	0.139	0.864	AB674586
F536	(TACA) ₁₀	F: AGCTACATGCTCCTTTTACGAT R: AATATCTAACATACATAATAGGCAAACCAT	15	426, 430, 434, 438, 442, 446, 450, 454, 458, 462, 466, 470, 474, 478, 482	0.848	0.924	0.035	0.904	AB674587
F545	(ATAC) ₈	F: GAGAGAGGACCAGGCCAGAGTG R: CACCCATATTTTCATCAACCCCAT	9	222, 226, 230, 234, 238, 242, 258, 264, null	0.909	0.801	-0.083	0.759	AB674588

F, Forward primer; R, Reverse primer. H_0 , Observed heterozygosity; H_E , Expected heterozygosity; PIC, Polymorphic information content; Accession no., DDBJ accession numbers. * and ** indicate significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

均 12.4 であった。F545 マーカーの 1 対立遺伝子 (サイズ: 264 bp) を除く全ての対立遺伝子間のサイズ (bp) 差は 4 の倍数であったことから、今回確認された対立遺伝子の大多数はマイクロサテライト領域の 4 塩基繰返し数における変異を反映していると思われる。なお、2 塩基 (AG) 繰返し配列を合わせもつ F521 マーカーにおいても全ての対立遺伝子間のサイズ差は 4 の倍数であったが、2 塩基繰返し領域における変異により生じた対立遺伝子を含んでいる可能性はある。ヘテロ接合体率は、 H_0 が 0.636~0.970 (平均値: 0.815), H_E が 0.752~0.924 (平均値: 0.845) となった。ハーディ・ワインベルグ平衡 (HWE, Hardy-Weinberg equilibrium) と連鎖不平衡 (LD, linkage disequilibrium) 分析の結果、6 マーカー (F506, F507, F514, F516, F520, F535) の HWE, および F504~F516 間と F516~F535 間の LD が有意となった。この原因としては、サンプル数が少ないこと、ヌル対立遺伝子の存在等が考えられる。実際、天然林由来のサンプルの分析において、F507, F516, F535, F545 マーカーでヌル遺伝子のホモ接合体が確認された。ヌル遺伝子をもつマーカーでも育種における個体識別や家系管理技術および個体群の繁殖構造研究等には利用可能であるが、集団の遺伝的構造解析等の集団遺伝学的研究では、集団の対立遺伝子頻度の推定精度を大きく低下させる等の問題もあることから、今後さらにサンプルサイズを増やし、集団構造等を解析することにより明確にする必要がある。10 マーカーの PIC は 0.709~0.904 で、平均値は 0.826 であった。この値は、既に開発されている 12 個の SNP マーカー (0.158~0.582 (平均値: 0.345), Yuskianti and Shiraishi 2010b) に比べてはるかに高い。また、井出ら (2008) によって開発された 6 個の 2 塩基マーカーの PIC (0.194~0.999 (平均値: 0.752)) と同様、高い多型性を示した。

一般に、4 塩基マーカーは 2 塩基マーカーに比べ変異性が低いとされている (Chakraborty *et al.* 1997) が、今回開発された 4 塩基マーカーは高い多型性を示した。これは、マイクロサテライトの繰返し数と変異性との間に正の相関がある (Ellegren 2004) とされることから、マイクロサテライト領域の選抜で繰返し数の多いものを選んだ効果と思われる。これらの 4 塩基マーカーは、分子マーカーに求められる高い多型情報量と正確な DNA タイピング能力を合

わせもつことから、今後のファルカタリアにおける育種事業および集団・保全遺伝学的、分子生態学的研究において、有用な DNA マーカーとして利用できるものと考えられる。

本研究に用いたサンプルは、Center for Forest Biotechnology and Tree Improvement (インドネシア) の Muji Susanto 氏より提供いただいた。また、CSIRO (オーストラリア) の Chris Beadle 氏には貴重な助言をいただいた。ここに感謝の意を申し上げる。

引用文献

- Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R (1997) Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1041-1046
- Eckert KA, Mowery A, Hile SE (2002) Misalignment-mediated DNA polymerase beta mutations: comparison of microsatellite and frame-shift error rates using a forward mutation assay. *Biochemistry* 41: 10490-10498
- Ellegren H (2004) Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5: 435-445
- Faria DA, Mamani EMC, Pappas Jr GJ, Grattapaglia D (2011) Genotyping systems for *Eucalyptus* based on tetra-, penta-, and hexanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests. *Tree Genet Genom* 7: 63-77
- Guan L, Shiraishi S (2011) Tetranucleotide microsatellite markers in *Cryptomeria japonica* D. Don. *Conservation Genet Resour* 3: 283-285
- 井出雄二・齊藤陽子・石尾将吾・中村健太郎 (2008) DNA マーカーによる個体識別法の開発, (「森林造成技術の高度化による熱帯林の CO2 シンク強化」最終報告書, 井出雄二代表, 環境省)
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error and increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16: 1099-1106
- Lian C, Hogetsu T (2002) Development of microsatellite markers in black locust (*Robinia pseudoacacia*) using a dual-suppression-PCR technique. *Mol Ecol Notes* 2: 211-213
- Munyard KA, Ledger JM, Lee CY, Babra C, Groth DM (2009) Characterization and multiplex genotyping of alpaca tetranucleotide microsatellite markers. *Small Rumin Res* 85: 153-156
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 6: 847-859
- Rousset F (2008) GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8: 103-106
- Yuskianti V, Shiraishi S (2010a) Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) markers in Sengon (*Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen. *HAYATI J Biosci* 17: 167-172
- Yuskianti V, Shiraishi S (2010b) Developing SNP markers and DNA typing using multiplexed single nucleotide primer extension (SNuPE) in *Paraserianthes falcataria*. *Breed Sci* 60: 87-92