

ギニアグラスにおける SSR マーカーの開発

蝦名真澄 幸喜香織 霍田真一*

I 要 約

再現性が高く、実験操作も簡便であることから牧草類にも利用が広がっている単純反復配列 (Simple sequence repeat; SSR) マーカーをギニアグラスで開発した。開発には品種‘ナツカゼ’のゲノム DNA を用いた濃縮ライブラリー法および未熟花穂由来 mRNA を利用した発現配列タグ (Expressed sequence tag; EST) 法を用いた。さらにギニアグラス遺伝資源を利用して SSR マーカーの性能を確認したところ結果は以下のとおりであった。

1. 濃縮ライブラリー法により 8 プライマーセット, および EST 法より得られた 5 プライマーセット合計 13 プライマーセットの SSR マーカーを開発した。
2. 開発した SSR マーカーを用いて, ギニアグラスが同質四倍体であることに由来する 1 本~4 本の明瞭なバンドが得られた。
3. 開発した SSR マーカーを用いて 77 の遺伝資源に対する識別能 (Power of Discrimination; PD) および多型情報含有量 (Polymorphism information content; PIC) を調査したところ, 得られたアレル数の平均は 14.9, PD 値の平均は 0.859, PIC 値の平均は 0.774 となった。

II 結 言

ギニアグラスの豊富な遺伝資源は、遺伝資源特性調査基準に従い、出穂時期の草型や草丈などの形態的形質や出穂期などの生理的特性および牧草としての利用特性などの特性データとともに保管されており、随時育種現場での利用が可能である。さらに、DNA マーカーなどを利用した系統関係の客観的なデータが利用できれば、計画的な交配を進める上で、遺伝資源特性データの有効性はさらに高くなると考えられる。また、自生地での品種保護の観点から、遺伝資源と商業利用される品種の客観的な識別技術の開発も重要になってきている。SSR (単純反復配列; Simple Sequence Repeat) マーカーは、簡便性と再現性から識別用の DNA マーカーとして優れた性質を持っている¹⁾ことが知られているだけでなく、牧草類にもその利用が広がってきている^{2,3,4)}。また、形質との関連情報が得られれば、SSR マーカーの再現性や操作の簡便性のため、育種現場での選抜マーカーとしての利用の有効性も高く開発が望まれている。このような背景からギニアグラスの SSR マーカーの開発を試みた。

III 材料及び方法

東アフリカを中心に収集され^{5,6)}、ジーンバンクで保存されているギニアグラス 2400 系統の中から、収集地点を幅広く網羅すると考えられる 77 系統 (表 1) を選抜して、2001 年沖縄県畜産研究センターの圃場に展開し、供試材料とした。ゲノム DNA の抽出は 3~5g の成葉を用い、CTAB 法⁷⁾にて行い、500 μ l の RNase を含む TE 溶液に溶解し、利用まで 4 $^{\circ}$ C にて保存した。

SSR マーカーはゲノム DNA の濃縮ライブラリー法および未熟花穂由来 mRNA による EST 法によって行った。濃縮ライブラリー法ではギニアグラス品種‘ナツカゼ’のゲノム DNA を用いて、山本ら⁸⁾の方法に従って AG 繰り返し配列を含むクローンを選抜して行った。さらに、単離したクローンの配列情報をもとに、Oligo Primer Analysis Software Ver. 6.0 (TaKaRa) を用いて SSR プライマーを設計した。

また、EST 法では遺伝資源‘Ku5954’および有性生殖‘Noh PL 1’と品種‘ナツカゼ’の交雑後代の未熟花穂由来 mRNA から SuperScriptII Lambda cDNA construction kit (Gibco/BRL 社製) を用いて作成した cDNA ライブラリーを作成して行った。得られたライブラリーから cDNA クローンをランダムに選抜し、配列情報を得た。得られた約 2000 の EST 情報より繰り返し配列を検索し、濃縮ライブラリー法と同様に SSR プライマーを設計した。

表1 SSR マーカーの多型検出に用いたギニアグラス遺伝資源および品種

系統名 (別名)	収集地点	備考	系統名 (別名)	収集地点	備考
1	72-62	ナイジェリア	40	GR334	南アフリカ
2	72-192	ケニア	41	GR336	南アフリカ
3	73-473	ケニア	42	GR365	南アフリカ
4	73-790	ケニア	43	GR367	南アフリカ
5	73-804	ケニア	44	GR371	南アフリカ
6	73-919B	ケニア	45	GR373	エチオピア
7	73-1006	ケニア	46	GR374	モロッコ
8	GR37 (Zambezi Rivar)	品種	47	GR376	不明
9	GR45	不明	48	GR377	南アフリカ
10	GR50 (Makueni)	ケニア 品種	49	GR422-1 (PM-4)	米国
11	GR88 (Gatton)	ジンバブエ 品種	50	GR432-1	南アフリカ
12	GR101A	ナイジェリア	51	GR434	南アフリカ
13	GR120	エチオピア	52	GR440	ジンバブエ
14	GR123	ケニア	53	GR441	オーストラリア
15	GR124	ケニア	54	GR452	不明
16	GR131	ウガンダ	55	GR453	不明
17	GR133B	ウガンダ	56	GR456	不明
18	GR134B	ウガンダ	57	GR458	南アフリカ
19	GR138	ウガンダ	58	GR464	ガーナ
20	GR144	ケニア	59	GR467	オーストラリア
21	GR161	不明	60	GR470A	南アフリカ
22	GR173	エチオピア	61	GR470B	南アフリカ
23	GR186	ケニア	62	CP1210-o-8	不明
24	GR190	ケニア 有性生殖	63	K59104	ケニア
25	GR193	ケニア	64	K6343	ケニア
26	GR206	タンザニア	65	K6348	ケニア
27	GR208	ケニア	66	M70-81	南アフリカ
28	GR214	ケニア	67	M70-82	南アフリカ
29	GR215	ケニア	68	185 (Ryukyu-3)	ケニア 育種系統
30	GR218	不明	69	211	ケニア
31	GR233A	ケニア	70	214	ケニア
32	GR238	ケニア	71	パイカジ	沖縄 品種
33	GR239A	ケニア	72	hozon 35	沖縄 育種系統
34	GR243	ケニア	73	Meidai 9	不明 育種系統
35	GR248B	ケニア	74	Gatton	ジンバブエ 品種
36	GR250	ケニア	75	Monbasa	タンザニア 品種
37	GR293	タンザニア	76	Natsukaze	交配系統 品種
38	GR299	タンザニア	77	Natsuyutaka	ケニア 品種
39	GR329	南アフリカ			

設計した SSR プライマーの増幅の可否や多型の出現を確認するため、遺伝資源系統より GR123, GR124, GR190, GR174, GR245, GR250, GR373, GR376, GR456, GR458, ‘琉球3号’ および 214, また、近縁のマカリカリグラス, カブラブラグラスさらにギニアグラス品種の ‘パイカジ’, ‘ナツユタカ’, ‘ガットン’, ‘ナツカゼ’ を使用した。さらに、表1に示した77のギニアグラス遺伝資源および品種について詳細に SSR 多型を検討した。SSR 領域の増幅には Maize DB (<http://www.maizegdb.org>) の提供するプロトコルを用いた。SSR マーカーのバンドパターンを検出には ABI310 を用いた。

統計処理には調査した77のギニアグラス遺伝資源より得られた多型バンドの情報をバンドの有無によって判定し、下記の式により識別能 (PD) を算出した。

$$PD = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

p_i は77系統の遺伝資源のうち i 番目の遺伝子型の頻度で、 k はその遺伝子座の遺伝子型の総数である⁹⁾。また、多型情報含有量 (PIC) は下記の式から算出した。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

ここで、 p_i はある遺伝子座の観察されたアレルの総数のうち i 番目のアレルの頻度で、 k は遺伝子座に観察される異なるアレルの総数である¹⁰⁾。

また、SSR マーカーの遺伝特性は、有性生殖系統 ‘Nho PL 1’ および品種 ‘ナツカゼ’ の交雑後代 24

個体を用いた。ゲノム DNA の抽出および PCR 増幅はバンドパターンの検出は上記同様に行った。

IV 結果および考察

濃縮ライブラリー法によって 18 種の SSR 領域を特定した。これらは全て AG 2 塩基の繰り返し配列を持っており、そのうち 10, 3, 5 種の配列がそれぞれ、完全反復配列、中断型反復配列、複合型反復配列であった。これら 18 の SSR 領域のうちプライマーが設計できたのは 16 の領域で、それぞれ 8, 3, 5 種の完全反復配列、中断型反復配列、複合型反復配列であった。これら 16 の SSR プライマーを用いて、予備的な多型出現を調査し、11 プライマーセットで多型が認められた。

また、EST 法により、28 の SSR 領域を特定した。そのうち、14 は 2 塩基の繰り返し配列であり、そのうちの 9, 4, 1 種類の配列はそれぞれ、完全反復配列、中断型反復配列、複合型反復配列であった。残りの配列のうち 13 個は 3 塩基の反復配列で、そのうちの 8, 2, 3 種類の配列はそれぞれ、完全反復配列、中断型反復配列、複合型反復配列であった。また、残りの 1 種の配列は 4 塩基 (TGCC) が 4 回反復する完全反復配列であった。

これら EST 法により特定した反復配列のうち、プライマーを設計できたのは 19 プライマーで、そのうち 9 プライマーで上記同様に多型が認められた。以上、得られた多型プライマーのうち、濃縮ライブラリー法によるものを 8 プライマーセット、および EST 法より得られた 5 プライマーセット合計 13 プライマーセットを以後の実験に供試した (表 2)。

表 2 開発した SSR マーカー

マーカー名	由来	プライマー配列		反復配列	増幅断片 size (bp)
		Forward	Reverse		
GNK01-3	genomic	CCACAAATGCCAATGATAAC	GCTAGAGAAAAAGGTGCACAC	(AC) 4AAT (AG) 6GG (AG) 2	130
GNK01-4	genomic	CCACATTAGTAGCTTTGATT	CCTACCAAAAACGTCTCAT	(AG) 2C (AG) 2	174
GNK01-5	genomic	TGAGAGTTGCATTATCCTTAG	TATCTAGGTGCCTATCTACTT	(AG) 10	233
GNK02-2	genomic	TCTGGCTGCGAGTTTC	AGCTTGCTCATTGCGTTAGGA	(AG) 11	150
GNK02-3	genomic	GGCCATCAAGGTAAGTCA	GAAATCCGGCTGCTGGTTATA	(AG) 23	206
GNK02-4	genomic	GGCAATGCTTTATGTGTATGA	TGAAGCCATTGGGTACATC	(AG) 8, (AG) 3CG (AG) 6GG (AG) 4	195
GNK04-2	genomic	GGACGAAGAGACGAGACA	CAAAACAGTGAATACGTCCG	(AG) 4TGGTAGG (AG) 4	122
GNK05-1	genomic	GCAAGCCCAAACTGGTAC	CTGGCAAAGGAGAAGACATAA	(AG) 7	130
GNK03-e2	EST	CTCTTGTGTTTGTGGTGC	TCAAGCTCGTAGTAGTGCC	(AG) 6	168
GNK03-e4	EST	CCCGAGCGGATCCGATTCGTT	TACGGCGACGACGAGGACGA	(AG) 8	102
GNK03-e19	EST	TGTATGAGCTGAGTCGC	TGGAATCTAGTTGATATTC	(AG) 8T (AG) 7	155
GNK03-e23	EST	AGCTCATCCTTACGTCA	TTTAATCAATATCCATCGTT	(AT) 8	167
GNK03-e47	EST	CATCGCATCCGGAACT	TAAACTTCAACAACGGCGAG	(AGT) 5	155

EST 法で得られた SSR 領域のうち多型が認められた GNK03-e2 は、大麦で得られている RNase S-like protein precursor (rsh1) 配列との相同性が認められた。また、GNK03-e4 はイネで得られている BI-1 mRNA for BAX inhibitor-1 との相同性が認められ、GNK03-e19 はトウモロコシで得られている cdc2 kinase mRNA の相同性配列との相同性が認められた。これ以外の 2 つの配列は既知のデータベースと有意な相同性を示す配列はなかった。

霍田ら⁵⁾は濃縮ライブラリー法を利用し、シバより 162 のポジティブクローンから 119 の SSR 配列を同定している。また、Jones ら³⁾は *Lolium perene* を用いて同様の高い効率で SSR 配列を同定している。ギニアグラスでの濃縮ライブラリー法は、シバで行ったのと全く同じ手法を用いたが、最終的に 11 配列の多型を示す SSR プライマーが同定できたのみで、効率は悪かった。また、EST 法からも反復配列を含む領域の配列情報を得たが、9 プライマーセットの多型を示す SSR を同定したのみとなった。モチーフの種類から見ると、霍田ら⁵⁾がシバで単離した SSR では 58.8% が完全反復配列、26.9% が中断型反復配列、14.3% が複合型反復配列となっており、ギニアグラスで得られたものもほぼ同等の比率であった。

以上のように、利用できるプライマーセットは総数でも 20 種類と少ないが、アポミクスであるギニアグラスでも SSR 領域が認められ、多型が存在していた。また、多型が存在する SSR 領域は配列が変異したことによると考えられる複雑なモチーフ構造となっていることが観察できた。このことは、ギニアグラスはアポミクスである反面、遺伝資源系統は SSR 領域のモチーフ構造の複雑さがシバと同等であることから、有性生殖のシバと同様に、比較的高い頻度で条件的アポミクスの有性生殖胚を利用して

いるか、若しくは、自然界に7%程度存在¹¹⁾しているといわれている有性生殖のギニアグラスの交雑が遺伝資源のギニアグラス変異拡大に有効であると考えられ、そのため、変異の幅広い遺伝資源が存在している可能性が示唆される。

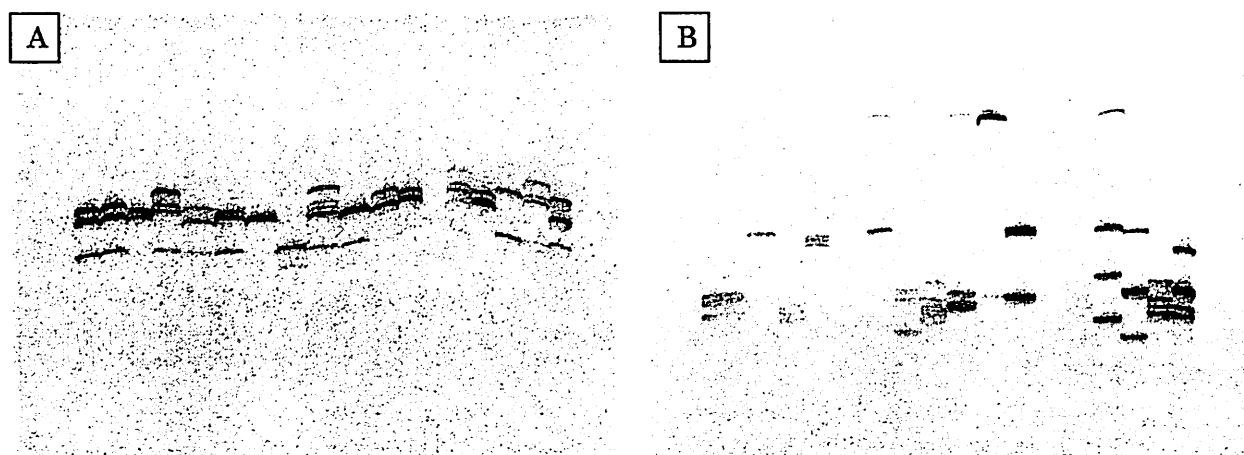


図1 開発した SSR マーカーの多型バンドのバンドパターン

A:GNK01-5 B:GNK02-2

レーンは左より, GR123, GR124, GR190, GR174, GR245, GR250, GR373, GR376, GR456, GR458, '琉球 3号', 214, マカリカリグラス, カブラブラグラス, 'パイカジ', 'ナツユタカ', 'ガットン', 'ナツカゼ'

図1に開発した SSR マーカーのうち GNK01-5 および GNK02-2 の2種類のバンドパターンを示す。異なる品種・系統ごとに1本~4本の明瞭なバンドが得られた。アレルも多型に富んでおり、品種を識別する上で有効な手段となり得ると考えられる。図1に示した GNK01-5 および GNK02-2 では、レーン右端から左へ 'ナツカゼ', 'ガットン', 'ナツユタカ', 'パイカジ' がそれぞれ異なるバンドパターンを示していた。このことから、既存品種の識別は開発した13種類の SSR マーカーで十分であり、このうちの1, 2種類を使用することで十分既存品種を識別できると考えられる。ギニアグラスと同属のカラードギニアグラス (*P. coloratum*) のうち, var kaburabura (カブラブラグラス) および var makarikariensis (マカリカリグラス) についても、開発した SSR マーカーでの検出を試みた。PCRによって増幅して得られるバンドの強度がカラードギニアグラスについては全体的に低い傾向が認められたものの、GNK01-5 のようにギニアグラスと同じアレルが観察されるものや、全くことなるアレルをもつもの、または GNK02-2 のようにバンドが出現しないものが認められた。調査した SSR マーカーの種類が13種類と少ないため、カラードギニアグラスへの SSR マーカーの適用についてはこれ以上の検討を行っていない。しかし、ギニアグラスやカラードギニアグラスを含む *Panicum* 属はイネ科のなかでも系統関係が未整理の種とされているため、近縁種の種の分類に役立つ情報が得られる可能性があり有効性が高いと考えられる。また、有性生殖である近縁の *P. trichocladum* や *P. infestum* のゲノム DNA を用いた SSR マーカーの開発も有効であることが示唆される。

表3 開発したギニアグラス SSR マーカーの性能

マーカー名	由来	アレル数	増幅断片の サイズレンジ	PD	PIC
GNK01-3	genomic	11	125-138	0.953	0.843
GNK01-4	genomic	6	144-173	0.599	0.512
GNK01-5	genomic	17	208-261	0.952	0.868
GNK02-2	genomic	39	140-228	0.968	0.951
GNK02-3	genomic	19	174-221	0.962	0.921
GNK02-4	genomic	20	166-193	0.963	0.889
GNK04-2	genomic	7	94-118	0.821	0.579
GNK05-1	genomic	15	99-140	0.933	0.824
GNK03-e2	EST	9	153-178	0.792	0.750
GNK03-e4	EST	12	88-110	0.887	0.787
GNK03-e19	EST	16	135-174	0.963	0.903
GNK03-e23	EST	13	135-171	0.931	0.831
GNK03-e47	EST	6	145-159	0.449	0.399

つづいて、13 種類の SSR マーカーについてはギニアグラス 77 系統でマーカーの識別能などの性能を確認した。バンドはギニアグラスが同質四倍体であるため、図 1 のように 1 本から 4 本の明瞭なバンドパターンを示した。また、得られた SSR マーカーのバンドパターンからそれぞれのアレル数、遺伝子型数、マーカーの識別能 (PD) および多型情報含有量 (PIC) を表 3 に示した。

これらのうち、GNK02-2 では 39 と最も多くのアレル数が観測され、PD 値は 0.968 を示した。いっぽう、GNK01-4 と GNK03-e47 ではアレル数は 6 と最も少ない観測値であった。GNK01-4 と GNK03-e47 の PD 値はそれぞれ、0.599 および 0.449 となった。調査した 13 の SSR マーカーでのアレル数の平均は 14.9、PD 値の平均は 0.859 となった。PD 値はシバや *Lolium* で観察されている値より高い値を示していたが、これは、異質四倍体のシバや二倍体の *Lolium* に比べて、ギニアグラスが同質四倍体であるため観測される遺伝子型の変異が便宜上大きくなるためであろうと考えられる。多型情報含有量 (PIC) は、GNK03-e47 で 0.399 と最も低く、GNK02-2 で 0.951 と最も高い値を示した。また、調査した 13 マーカーの PIC の平均値は 0.774 であった。PIC は SSR 領域に含まれる反復配列の反復数との相関が指摘されている³⁾が、ギニアグラスでも PIC 値と反復配列の反復回数に相関が認められた ($r=0.60$, $P=0.97$)。濃縮ライブラリー法で得た SSR マーカーの PD の平均値は 0.894、PIC の平均値は 0.798 でアレルの平均値は 16.8 であった。EST 法の同じく平均値は 0.804、0.734 および 11.2 となり、濃縮ライブラリー法でどの平均値も高い数値となったが異なる作成方法間に統計的に有意な差は認められなかった。

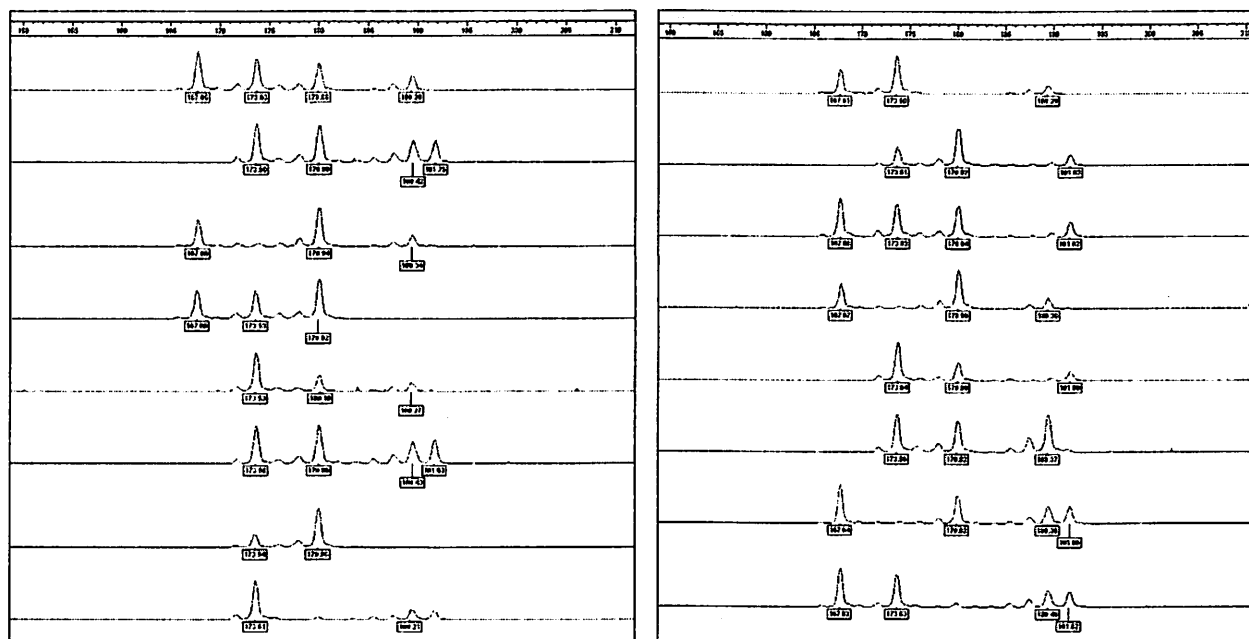


図2 開発した SSR マーカーの遺伝分離:各レーンは交雑後代のバンドパターンを示す。

交配系統を用いて実際の遺伝子型を推定する試みを行った。図 2 に GNK02-4 プライマーを用いた場合の SSR マーカーの遺伝分離を示すバンドパターンを示す。図 2 は、調査した 24 個体のうち 16 個体から得られたバンドパターンで、種子親は有性生殖系統 'Nho PL 1' および花粉親は品種 'ナツカゼ' である。遺伝分離のバンドパターンは種子親と花粉親の遺伝分離による SSR マーカーの分離パターンとして矛盾のない結果となった。このうち、GNK02-4/168bp (A) , /174bp (B) および/180bp (C) のマーカーは出現個体と欠損個体が 3:1 の出現頻度で認められるため、種子親および花粉親の双方が同じ遺伝子型を持っていると推定できる。また、GNK02-4/189bp (D) および/192bp (E) のマーカーはそれぞれ、種子親または花粉親だけに認められ、同様に 1:1 に分離した。以上から、GNK02-4 のマーカーの遺伝子型は有性生殖系統 'Nho PL 1' で ABCD および花粉親品種 'ナツカゼ' で ABCE であると推定される。

表4 開発した SSR マーカーの遺伝子型の推定

マーカー名	農1号	ナツカゼ
GNK01-3	ABBB	AAC-
GNK01-4	BC--	A---
GNK01-5	AC--	AB--
GNK02-2	DDD?	ABCD
GNK02-3	BD--	ADE-
GNK02-4	ABCD	ABCE
GNK05-1	AB--	B---
GNK03-e2	ABCD	AA--
GNK03-e4	AABC	ABCD
GNK03-e19	BBCD/BCDD	ACC-
GNK03-e23	AAB-/AB--	A---/AA--

同様に、GNK01-3, -4, -5 および GNK02-2, -3, -4, また、GNK03-e2, -e4, -e19, -e23 についてそれぞれ種子親有性生殖系統 'Nho PL 1' および 'ナツカゼ' で想定される遺伝子型について表4にまとめた。これらの遺伝子型の推定から、高い頻度でヌルアレル（バンドが出現しない）が観察された。ヌルアレルの存在頻度の高さは、ギニアグラスは同質四倍体ではあるが、部分的な異質性の混在の可能性が示唆される。

V 引用文献

- 1) Morgan C. W. and Olivieri A. M. (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3: 175-182.
- 2) Liu Z., Jarret W. R. L., Kresovich S. and Duncan R. R. (1995) Characterization and analysis of simple sequence repeat (SSR) loci in seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). *Theor Appl Genet* 91:47-52.
- 3) Jones E. S., Dupal M. P., Kolliker R., Drayton M. C. and Foster J. W. (2001) Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 102: 405-415.
- 4) Tsuruta S., Hashiguchi M., Ebina M. et al. (2005) Development and characterization of simple sequence repeat markers in *Zoysia japonica* Steud. *Grassland Sci* 51: 249-257.
- 5) Hojito S. and Horibata T. (1982) Plant exploration, collection and introduction from Africa. *Nekken Shiryo* 58. Trop. Agric. Res. Ctr., Tokyo, Japan, 1-120.
- 6) Nakajima K., Komatsu N., Mochizuki N. and Suzuki S (1979) Isolation of diploid and tetraploid sexual plants in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Jpn J Breed* 29:228-238.
- 7) Murray M. G. and Thompson W. F. (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 8: 4321-4325.
- 8) Yamamoto T., Kimura T., Shoda M., Ban Y., Hayashi T. and Matsuta N. (2002) Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol Ecol Notes* 2: 14-16.
- 9) Kloosterman A. D., Budowle B. and Daselaar P. (1993) PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *Int J Legal Med.* 105:257-64.
- 10) Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- 11) Pernès J. (1975) Organization Évolution D' un Groupe Agamique: La Section Des *Maximae* Du Genre *Panicum* (Graminées). *Memories ORSTOM*, 75. ORSTOM, Paris.