

[研究報文]

ブドウのAFLP解析に対する制限酵素濃度の影響、
並びにAFLP解析による‘Pinot noir’及び‘Pinot blanc’の識別

後藤 (山本) 奈美

国税庁醸造研究所 〒739-0046 東広島市鏡山3-7-1

Effect of Concetration of Restriction Enzyme on AFLP Analysis in Grape,
and Differentiation of ‘Pinot noir’ and ‘Pinot blanc’ by AFLP Analysis

Nami Goto-Yamamoto

National Research Institute of Brewing,
3-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-0046, Japan

AFLP (amplified fragment length polymorphism) analysis of grapevine DNA was tested. When the restriction enzyme activity was multiplied by 10 with respect to the standard activity, 1 U/100 ng DNA, some bands disappeared while other bands appeared more strongly. It was presumed that over-digestion of DNA resulting from the star activity of restriction enzymes caused this phenomenon. Though complete restriction digestion is required for AFLP analysis, star activity should be avoided. AFLP analysis using two primer pairs revealed several different bands between Pinot noir and Pinot blanc, which have been reported to be indistinguishable by other means of DNA analysis such as RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), and the use of microsatellite markers. Thus, AFLP analysis seems to be a useful method for the identification of grape cultivars.

Key words: AFLP, DNA, Pinot noir, Pinot blanc

緒 論

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 解析は、近年開発されたDNA配列の多型解析方法で、制限酵素消化とPCRを組み合わせた方法である (16)。AFLP解析 (Fig. 1) では、まずDNAをEcoRIとMseIの2種類の制限酵素で消化し、生じたフラグメントの両端にEcoRI及びMseIアダプターをライゲートし、アダプターと制限酵素認識サイトをプライマーに利用してPCRを行う。従って、厳しいアニーリング条件でPCRを行うことができ、若干のミスマッチを許してPCRを行うRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 解析より、再現性が高いと考えられる。実際に、共通のサンプルを用いていくつかの研究室で再現性を検討したところ、AFLP解析はRAPD解析よりもはるかに高い再現性が示された (10)。また、制限酵素消化によって生じる非常に多くの断片が

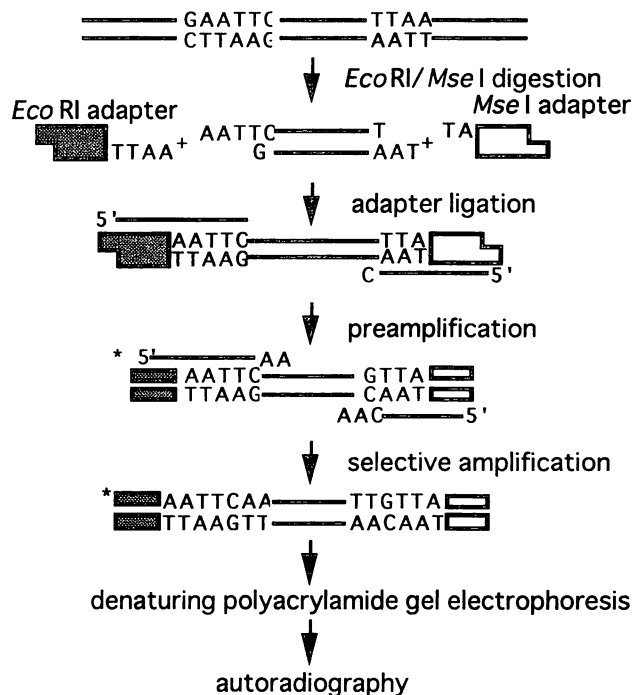


Fig. 1. Procedure of AFLP analysis.
Modified from the instruction manual of
Gibco BRL, AFLP system II.

1998年7月28日受理

ら、アダプターと制限酵素認識サイトの配列よりも2~3塩基長いプライマーを使用して、選択的に断片の増幅・検出を行うため、多くのバンドが得られ、多型の検出感度は非常に高いと考えられる。オオムギを用いて、シングルコピーのプロープを用いたRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析、RAPD解析、マイクロサテライトDNAなどの繰り返し配列の長さを調べるSSR (Simple Sequence Repeat) 解析、及びAFLP解析の多型の検出頻度を調べたところ、AFLP解析が1回の解析で識別できる品種が最も多く、RFLP解析が最も少なかったと報告されている(12)。同様に、Linら(11)もRFLP及びRAPD解析と比較した場合のAFLP解析の多型の検出感度の高さを報告している。

AFLP解析は、栽培植物の種及び品種の類縁関係の推定(6, 8, 9)や、染色体地図の作製(5)、さらに耐病性のような計量形質とのリンクを解析するため(14)に利用されている。ブドウでは、Sensiら(13)がAFLP解析とISTR (Inverse Sequence-Tagged Repeat) 解析によって‘Sangiovese’及び‘Colorino’グループの栽培品種の類縁関係を報告している。ここでは、AFLP解析によるブドウ栽培品種の識別と類縁関係の推定を検討するにあたり、制限酵素消化条件がAFLP解析結果に及ぼす影響を検討し、RFLP、RAPD及びマイクロサテライト・マーカ解析では差異が検出されないと報告されている‘Pinot noir’と‘Pinot blanc’が、AFLP解析によって識別可能であることを見いだしたので報告する。

材料と方法

1. ブドウDNA

供試した‘Pinot noir’、‘Pinot blanc’、‘Cabernet Sauvignon’、‘Cabernet franc’及び‘Merlot’の苗木は植原葡萄研究所より購入した。DNAは、十分に開いた新葉から、以前に報告した、破碎・洗浄した葉から、Sarkosylを含む溶解バッファーでDNAを溶出し、CsCl密度勾配超遠心で精製する方法(18)で抽出した。

2. AFLP解析

Gibco BRL社製AFLP Analysis System II (small genome用)を用い、プロトコールに従って、EcoRI及びMseIによる制限酵素消化、アダプターライゲーション、プレアンプリフィケーション及びセレクトティブアンプリフィケーション、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びオートラジオグラフィーを行い、バンドを検出した。高濃度の制限酵素消化条件の検討には、20 U/mlのEcoRI (Takara) 及びMseI (New England Bio Labs) を使用した。PCRは、MJ Reserch社製、MiniCycler™PTC-150-16を用い、プロトコールのPerkin-Elmer 480-thermal cycler用のプログラムで行った。プライマーのラベルには³²P-γ ATP (Amersham)、Taq polymeraseはTaKaRa Taq (Takara)を用いた。6%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、ATTO社製ジェノケンサーAE-6155型電気泳動装置を用い、ゲル厚0.35 mm、50 Wで2時間行った。分子量マーカーとして、M13ファージDNAのシーケンスラダーを泳動した。他の実験条件は、キットのプロトコールに従った。

結果及び考察

1. 低濃度及び高濃度制限酵素消化によるAFLPパターンの変化とスター活性の影響

AFLP解析の原報、及びGibco社製キットのプロトコールでは、100 ng DNA当たりEcoRI及びMseIを各1 U使用して制限酵素消化を行っている。しかし、ブドウDNAの精製にあたっては、多糖類と推定される粘性物質のコンタミネーションがしばしば認められ、制限酵素消化やPCR反応が困難な場合があったため、1 U/100 ng DNAの条件で未消化のフラグメントがないかを検討するため、100 ng DNAあたり0.25 U、1 U、及び10 Uの両酵素で消化した場合のAFLPパターンを比較した(Fig. 2)。なお、10 U/100 ng DNAの消化には高濃度酵素を使用し、酵素添加量が反応液量の1/10を越えないよう留意した。その結果、0.25 U及び1 U/100 ng DNAで検出されるが10 U/100 ng DNAでは検出されないバンド、及び0.25 U/100 ng

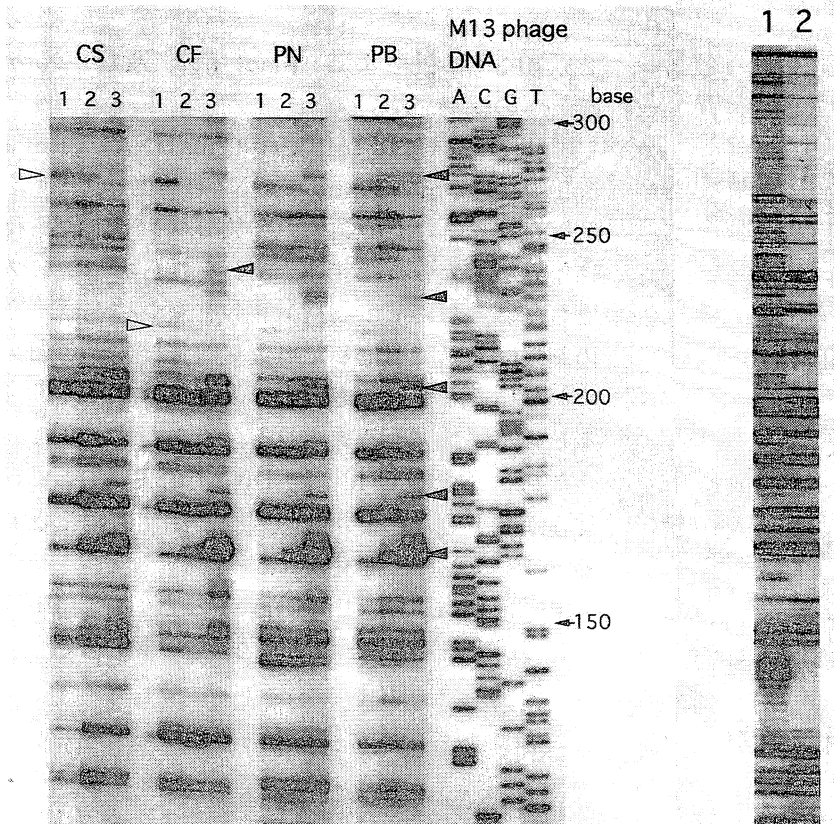


Fig. 2. Effect of restriction enzyme activities on AFLP patterns. CS: Cabernet Sauvignon, CF: Cabernet franc, PN: Pinot noir, PB: Pinot blanc. Unit of *Eco* RI and *Mse* I / 100 ng DNA: 1, 0.25; 2, 1; 3, 10. *Eco* RI primer: E-AC, *Mse* I primer: M-CTG.

DNAでは検出されないが10 U/100 ng DNAでは検出されるバンド観察された。しかし、この現象は特定のバンドでのみ認められ、他の大部分のバンドではシグナルの強度に変化が認められなかった。

一方、低濃度制限酵素でDNAの消化が不十分と考えられる場合は、Vos ら (16) の指摘どおり、中～高分子域に多数の淡いバンドを生じ、制限酵素濃度を上げることによって、これらのバンドが消失した。しかし、新たに強いバンドが生じる現象は認められなかった (Fig. 3)。制限酵素消化が不十分な場合は、切れ残りがランダムに生じるため、本来生じるバンドが全く検出されないとは考えにくい。なお、この実験では、使用した制限酵素の失活が疑われるため、Fig. 2及びFig. 5と制限酵素活性を比較することはできない。

従って、Fig. 2で認められた現象は未消化の

Fig. 3. Effect of incomplete restriction digestion of Merlot DNA on its AFLP pattern. Amount of *Eco* RI and *Mse* I / 100 ng DNA: 1, x1; 2, x2. The restriction enzymes were probably partially inactivated, and hence their units cannot be indicated.

DNAが完全消化したことに起因するのではなく、高濃度の制限酵素を使用したため、制限酵素のスター活性によってDNAが消化されたことに起因すると推察された。制限酵素の中には、基質となるDNAに対して大過剰の制限酵素を用いた場合などに、その特異性が低下して本来の認識配列とは一部異なる塩基配列を切断するものがあり、この現象は制限酵素のスター活性と呼ばれている。今回使用した制限酵素のうち、*Eco*RIは本来GAATTCを認識するが、スター活性 (*Eco*RI*活性) によってNAATTN (Nは任意の塩基) と表記される塩基配列のうち、AAATTT、GAATTTなどのいくつかの配列、及びGGATTTを切断することが明らかにされている (17)。本来生じるDNAフラグメントのなかに*Eco*RI*活性で切断される配列が含まれていると、10 U/100 ng DNAの条件ではバンドが消失する。また、AATTCの配列が*Eco*RI*活性で切断されると、*Eco*RI消化と同じ切断サイトを生じ、

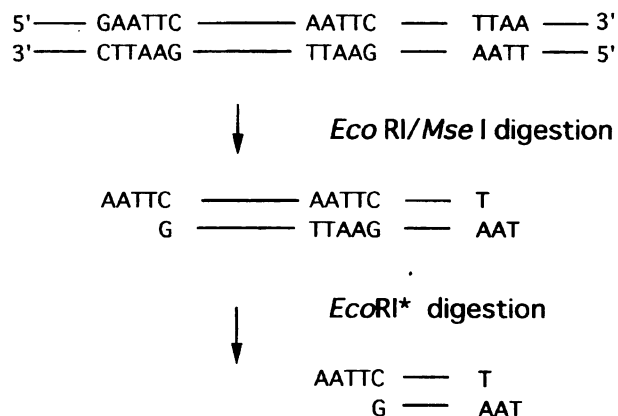


Fig. 4. Possible scheme of the effect of star activity of *EcoRI* on AFLP analysis.

AFLP解析で本来ないはずのバンドを生じると考えられた (Fig. 4)。今後、過剰の制限酵素によって生じた、若しくは消失したバンドをクローニング及びシーケンスするなどして、スター活性による現象かどうかを確認したいと考えている。

大部分の制限酵素の活性は、1 mgのλファージDNAを50 μlの反応液中で37℃、1時間で完全に切断する量を1 Uと定義されており、通常は1 μg DNAに数 Uの制限酵素を使用する。また、*EcoRI*は反応液中のグリセリン濃度が5 %程度になるとスター活性が現れ始めると指摘されている (1)。従ってプロトコール通りの1 U /100 ng DNAは十分な酵素量であり、キットの制限酵素を使用した場合のグリセリン濃度は4 %で、スター活性の現れにくい条件に設定されていると考えられる。しかし、0.25 U/100 ng DNAでは検出されず、10 U/100 ng DNAで非常に強く検出されるバンドは、1 U/100 ng DNAでもやや弱く検出されており、1 U/100 ng DNAでも若干のスター活性を生じているものと推定された。通常、制限酵素活性は購入した際に表示されている値を用いるが、保存状態によっては徐々に失活する場合もある。他方、DNAの精製が不十分な場合は、制限酵素によって完全に消化されない場合もありうる。従って、AFLP解析においては、制限酵素消化が完全に行われ、かつスター活性が現れていないかに、十分な注意が必要であることが示された。

2. AFLP解析による 'Pinot noir' 及び 'Pinot blanc' の識別

0.25 U、1 U、及び10 U/100 ng DNAで 'Pinot noir' 及び 'Pinot blanc' のDNAを消化し、AFLP解析を行った。その結果、複数のバンドで両品種に差異が認められた (Fig. 5)。これらのバンドのうち、黒三角で示したバンドの有無や強弱は、どの制限酵素量で消化した場合も顕著な差異が認められないことから、未消化やスター活性に起因するものではないと考えられる。また、白三角で示したバンドは10 U/100 ng DNAで消失、もしくは強度が減少したことから、スター活性で消化されるフラグメントと推定される。

'Pinot blanc' は 'Pinot gris' とともに、'Pinot noir' の芽条変異とされており、'Meunier' も

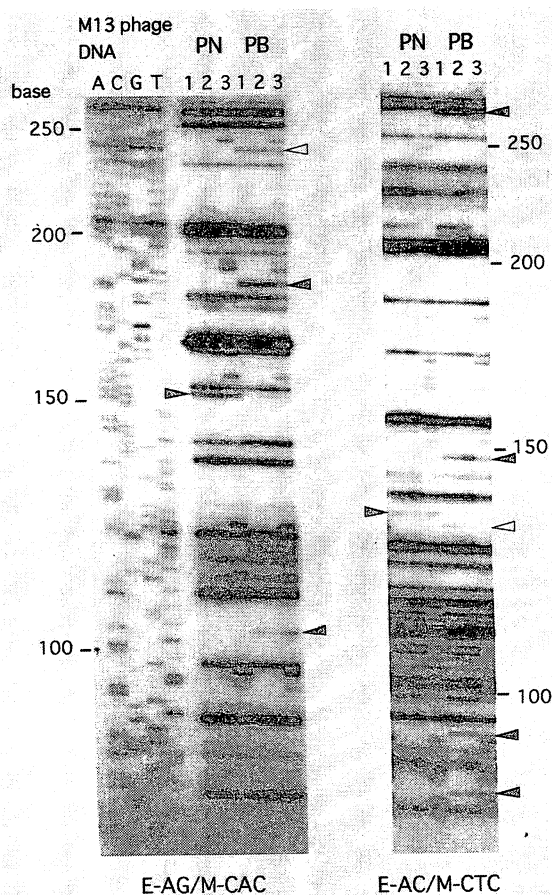


Fig 5. AFLP patterns of 'Pinot noir' and 'Pinot blanc' for three different activities of the restriction enzymes. Abbreviations are same as Fig. 2.

‘Pinot noir’ から生じたものであろうと考えられている (7)。Bourquin ら (2) は、‘Pinot noir’、‘Pinot blanc’、‘Pinot gris’ 及び ‘Meunier’ が46通りのプローブ/制限酵素の組み合わせによる RFLP解析で識別できなかつたと報告している。Cipriani ら (4) は、5種類のマイクロサテライト・マーカーによる解析では ‘Pinot noir’、‘Pinot blanc’ 及び ‘Pinot gris’ が識別されなかつたと報告している。同様に、Bowers ら (3) も Cipriani らとは異なる4種類のマイクロサテライト・マーカーによる解析で ‘Pinot noir’、‘Pinot blanc’、‘Pinot gris’ 及び ‘Meunier’ が識別できなかつたと報告している。RAPD解析では、Tschammer と Zyprian (15) が20種類のプライマーを用いたが、‘Pinot’ の4品種は識別できず、これらの品種は1塩基置換でしか異ならないのではないかと推察している。

しかし、2組のプライマーを用いた AFLP解析で、‘Pinot noir’ と ‘Pinot blanc’ の複数のバンドに差異が認められたため、両者は少なくともポイント・ミュレーションではないことが示された。AFLP解析は多型の検出感度が高いため、栽培品種の識別や類縁関係の推定だけでなく、近年重視されているクローンの識別も可能ではないかと考え、今後検討する予定である。

要 約

ブドウDNAのAFLP解析において、制限酵素量を標準的な1 U/100 ng DNAの10倍にしたところ、いくつかのバンドが消失し、いくつかのバンドが強く現れた。これはDNAが制限酵素のスター活性によって過剰に消化されたためと推察された。従って、AFLP解析には、消化が完全に行われ、かつスター活性が現れていないかに、十分な注意が必要であることが示された。また、これまで、RFLP、RAPD、及びマイクロサテライト・マーカーによるDNA多型解析では識別が困難とされていた ‘Pinot noir’ と ‘Pinot blanc’ に、AFLP解析では複数のバンドの差異が認められた。

引用文献

1. 野村信夫. 第3章DNA修飾酵素. pp. 77-92. 遺伝子工学の基礎技術. 山本雅 編. 羊土社、東京 (1993).
2. Bourquin. J. -C., A. Sonko, L. Otten, B. Walter. Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 87:431-438 (1993).
3. Bowers, J. E., G. S. Dangl, R. Vignani and C. P. Meredith. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39:628-633 (1996).
4. Cipriani, G., G. Frazza, E. Peterlunguer and R. Testolin. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. *Vitis* 33:211-215 (1994).
5. van Eck, H. J., J. R. van der Voort, J. Draaistra, P. van Zandvoort, E. van Enkevort, B. Segers, J. Peleman, E. Jacobsen, J. Helder and J. Bakker. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol. Breeding* 1:397-410 (1995).
6. Ellis, R. P., J. W. McNicol, E. Baird, A. Booth, P. Lawrence, B. Thomas and W. Powell. The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Mol. Breeding* 3:359-369 (1997).
7. Etablissement National Technique pour l'Amélioration de la Viticulture (ENTAV). Description of the selected wine grape varieties. pp. 23-160. Catalogue of selected wine grape varieties and clones cultivated in France. ENTAV, Le Grau du Roi, France (1997).
8. Hartl, L. and S. Seefelder. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 96:112-

- 116 (1998).
9. Hill, M., H. Witsenboer, M. Zabeau, P. Vos, R. Kesseli and R. Michelmore. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genet.* 93:1202-1210 (1996).
 10. Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M. O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmiroli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp. Reproducibility testing of RAPD, AFLP, and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding* 3:381-390 (1997).
 11. Lin, J.-J., J. Kuo, J. Ma, J. A. Saunders, H. S. Beard, M. H. MacDonald, W. Kenworthy, G. N. Ude and B. F. Matthews. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD, and AFLP DNA mapping technique. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14:156-159 (1996).
 12. Russell, J. R., J. D. Fuller, M. Macaulay, B. G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95:714-722 (1997).
 13. Sensi, E., R. Vignani, W. Rohde and S. Biricolti. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35:183-188 (1996).
 14. Toojinda, T., E. Baird, A. Booth, L. Broers, P. Hayes, W. Powell, W. Thomas, H. Vivar and G. Young. Introgression of quantitative trait loci (QTLs) determining stripe rust resistance in barley: an example of marker-assisted line development. *Theor. Appl. Genet.* 96:123-131 (1998).
 15. Tschammer, J. and E. Zyprian. Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. *Vitis* 33:249-250 (1994).
 16. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Rijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414 (1995).
 17. Woodbury, C. P. Jr., O. Hagenbüchle and P. H. von Hippel. DNA site recognition and reduced specificity of the *EcoRI* endonuclease. *J. Biol. Chem.* 255:11534-11546 (1980).
 18. Yamamoto, N., G. Ono, K. Takashima and A. Totsuka. Restriction fragment length polymorphisms of grapevine DNA with phenylalanine ammonia-lyase cDNA. *Japan. J. Breed.* 41:365-368 (1991).