

草原植生における種組成測定のための 定量的 PCR の開発

Development of quantitative PCR to measure
the floristic composition in grassland vegetation

横山 智子*・藤村 達人**・水野 幸一**・及川 武久***

Tomoko YOKOYAMA*,
Tatsuhito FUJIMURA**, Kouichi MIZUNO**
and Takehisa OIKAWA***

はじめに

現在、草原植生の現存量を推定する方法は多くあるが、コドラートを用いた刈り取りによる標本調査法に基づいた推計学的手法が一般的である。地上部の植物体を直接刈り取って現存量を推定することは可能であるが、より簡便にさらに測定結果の信頼性を上げるような推定方法も開発されなければならない。また、従来の方法では、草原の地下部を採取して種別に定量することが困難であったため、その情報は極めて少ない。そのため、混生草原の地下部を種別に定量する方法を開発することは、生態学的に有益であると思われる。本研究では近年発展、展開のめざましい定量的 PCR を利用して、混生した草原群落の種ごとの現存量を間接的に測定する方法の開発をめざした。この方法が確立されれば、混生群落でサンプリングされた植物体を種ごとに分別することなく種別の現存量を推定することができ、また、今まで困難であった地下部の測定にも利用できるのではないかと期待している。

PCR の原理とカイネティクス分析による定量

PCR (Polymerase chain reaction) の原理は、図 1 に示すように 3 段階から成る DNA 合成反応を繰り返しておこなうことにある。各サイクルごとに二本鎖のゲノム DNA を短時間熱処理し、鎖を分離する (第一段階, denature)。次に、増幅したい特定部位の DNA の両端に相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で冷却し、オリゴヌクレオチドとゲノム DNA とハイブリッド形成させる (第二段階, annealing)。次に、DNA ポリメラーゼと 4 種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸を加えて反応させ、それぞれのプライマーから下流の DNA 領域を選択的に合成させる (第三段階, extension)。

一回の合成反応で生成した DNA は次の反応の鋳型となるため、1 回のサイクルで 2 倍ずつ合成され、 n サイクル反応が繰り返されると 1 分子の DNA から 2^n 分子増幅されることになる。そのため、PCR は、極めて微量な鋳型 DNA を容易に検出することが可能であり、近年様々な形で応用されている。

しかし、PCR は指数関数的に DNA を増幅する

*筑波大学第二学群生物学類 **筑波大学農林工学系 ***筑波大学生物科学系

PCRの原理

標的DNA配列を酵素を使って増幅することによって、同じ配列のDNA分子を大量に増やす技術。

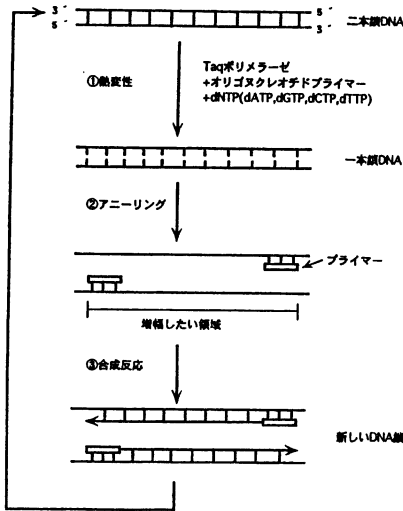


図1 PCRの原理

とはいえ、全く無制限にDNAを増やすわけではない。実際のPCRでも、反応生成物がある程度蓄積されるまでは、反応生成物量は概ね指数関数的に増加することがわかっているが、反応が進んで生成物量が増加するにつれて増加率は低下し、最終的には反応生成物量はプラトーに達して一定の値をとるようになる。このことは十分なサイクル数のPCRを行った場合には、初期鋳型DNA量に関わらず、ほぼ同じ量のPCR反応生成物が得られることを示しており、PCRを用いて定量を行うにあたって、この点に十分注意しなければならない。

カイネティクス分析から初期鋳型DNA量を推定する具体的な方法は、測定する全ての試料についてカイネティクスのグラフが直線性を示す範囲を求め、その範囲内の同じサイクル数における反応生成物量から初期鋳型量の相対比を算出する方法である。しかしながら、比較する試料間で初期鋳型量に著しい差がある場合には、グラフが直線性を示す範囲に重なりがなくなってしまう、直接比較することができない。しかし、このような場合でも、PCRのカイネティクス全体が分かっているならば、直線部分から増

加率や初期鋳型量を求めることにより比較を行うことができる。

方法

本研究では、定量的PCRの条件を検討するために、多数の遺伝子について解析情報があるイネのDNAを用いた。まず、定量的PCRに最適なプライマーの選択・PCR条件の検討を行い、反応液中にイネのDNAのみが入った様々な濃度の試料をPCRにかけカイネティクス分析を行うことにより未知濃度の試料を定量できる方法の確立をおこなった。次に、イネDNAの入った試料に他の草本（オニウシノケグサ）由来のDNAを混在させた状態で定量性を確認した。

結果

イネDNAをモデル植物として定量的PCRの条件を検討した結果、PCR反応組成は、鋳型DNAとしてイネDNA 0.1~100ng、プライマーを各25 μ mol, 10 \times buffer (15mM Mg²⁺)を5 μ l, dNTPsを4 μ l, Gene Taq (ニッポンジーン)を0.2unit入れたものを滅菌水で全量を50 μ lにした。反応温度は、94 $^{\circ}$ Cで1'30の後、94 $^{\circ}$ Cで0'30, 56 $^{\circ}$ Cで0'30, 72 $^{\circ}$ Cで1'00を20~32サイクル行うこととした。反応生成物量の測定には、反応液をゲル電気泳動法により、0.8%アガロースゲルを用いてDNA断片の分離・同定をおこなった後、蛍光色素物質（エチジウムブロマイド）を結合させ紫外線照射により発光させた。これをCCDカメラ（プリントグラフAE6912型、アトー株式会社）で撮影し、NIH-Image (U.S. National Institutes of Healthが開発。Internetを介して<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>から入手できる)に取り込み画像処理を行い発光強度を数値化させ、これを反応生成物量とした。

以上に示した条件のもと、単一DNAサンプルを用いてカイネティクス分析を行った結果、各濃度系列で図2に示す増加曲線が得られた。全ての濃度系列で、増加が指数関数的でかつ検出可能なある一定の値（ここでは3000）に達するサイクル数を計算し、

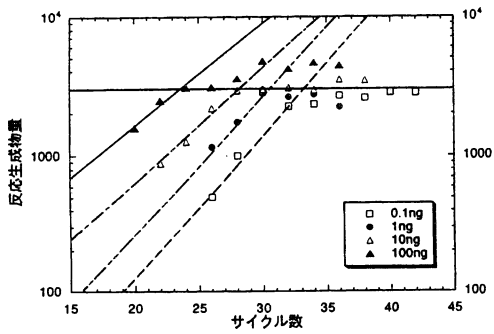


図2 単一 DNA サンプルでの増加曲線

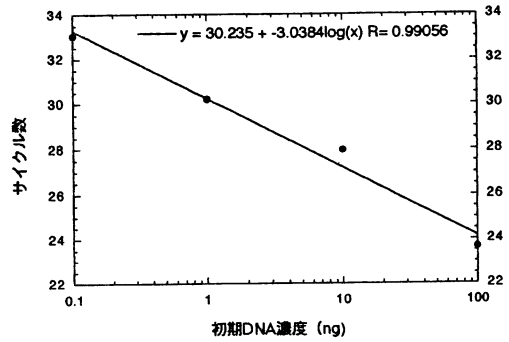


図3 単一 DNA での鋳型 DNA 量と PCR サイクル数との関係

そのサイクル数と試料の初期 DNA 濃度から図 3 に示す逆相関直線が得られた。

つまり、試料中にプライマーがターゲットとする鋳型 DNA のみが試料中に存在する場合、今回の実験では DNA 濃度が 0.1~100ng/50 μ l の範囲で定量性が得られ、このことより未知濃度の試料を同様に PCR にかけて、ある一定の値（ここでは 3000）に達するサイクル数を求めることによって、初期 DNA 量を定量できることを確認した。

次に、試料中に鋳型となるイネ DNA 以外に、他の草本 DNA（オニウシノケグサ由来）が混在する条件下で、単一 DNA の場合と同様にカイネティクス分析により定量できるかどうかを検討した。反応液中に鋳型となる DNA を 0.1, 5.0, 10ng/50 μ l となるように調製し、さらに反応液中の全 DNA 量が 10ng/50 μ l となるように混入 DNA（オニウシノケ

グサ DNA）を混ぜ PCR にかけて。各試料で、図 4 に示す増加曲線が得られた。単一 DNA の場合と同様に、全ての試料で増加が指数関数的でかつ検出可能なある一定の値（ここでは 3000）に達するサイクル数を計算し、そのサイクル数と試料の初期鋳型 DNA 濃度から図 5 に示す逆相関直線を得た。

考 察

本研究で、定量にカイネティクス分析を採用した理由は、PCR 反応生成物検出機械の限界能力範囲の狭さのためである。カイネティクス分析に至るまでに、様々な方法（例えば、シャトル PCR）で定量を試みたものの検出限界範囲が狭いため、定量できる DNA 濃度の幅が非常に狭いものであった。

カイネティクス分析を採用したことにより、定量できる DNA の範囲は単一 DNA サンプルで 0.1~

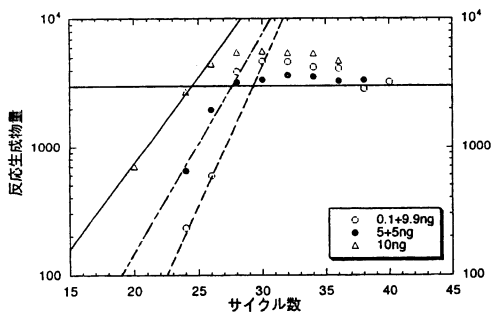


図4 混合 DNA サンプルでの増加曲線

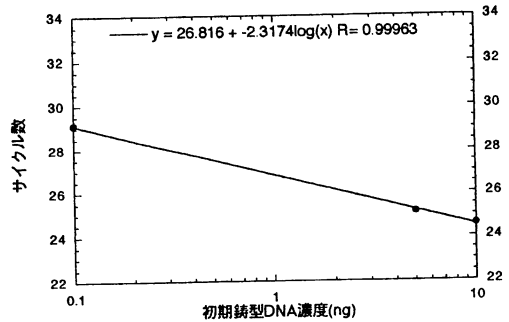


図5 混合 DNA サンプルでの初期鋳型 DNA 量と PCR サイクル数との関係

100ng/50 μ lまで広がった。この結果は、全ての反応生成物量を検出範囲内で測定でき、かつ比較する試料間で初期鋳型量に著しい差がある場合でも可能である、というカイネティクス分析の特徴を最大限に利用したものといえるだろう。

また、混合DNA試料の定量では、単一DNA試料と比べると測定可能範囲が0.1~10ng/50 μ lと狭くなった。これは、他の草本由来のDNAが鋳型DNAの増幅に影響を与えていると考えられる。よって混合試料では、現時点で限られた狭い範囲でしか定量を行うことができない。今後は、内部標準などを用いて更なる定量性の向上をめざす予定である。

しかしながら、今回プライマーが既に作られているにもかかわらず、プライマーの選択やPCR条件の検討にかなりの時間がかかったこと、今後調査したい草本の全ての遺伝子が解析されていないことなどから、現時点ではこの方法は実用的ではないと考える。しかし、将来、遺伝子解析の技術がさらに進歩し安価に実験が行えるようになれば必ずや有効な手段になると考えられるので、このような遺伝子工学的技術は生態学での一つの手段となるのではないかと考えている。

謝 辞

本研究の実験室として使用させていただいた筑波大学植物遺伝子工学研究室の方々には、多くの知識

的および技術的なアドバイスをいただきました。また、三井化学ライフサイエンス研究所赤木宏守博士（現在秋田県立大学生物資源科学部助教授）には多くのイネプライマーの提供をして頂きました。

これらの様々な方々のご協力のもとに、本研究が意義ある成果を果たせたことを喜びと感じております。ここに記し、その感謝の意を表したいと思いません。

引用文献

- 島田饒・川鍋祐夫・佳山良正・伊藤秀三（1973）：
「生態学研究シリーズ5 草地の生態学」築地
書館
- 島本功・佐々木卓治（1997）：「細胞工学別冊 植
物細胞工学シリーズ7 新版 植物のPCR実
験プロトコールー核酸の単離法とゲノム・遺
伝子発現の最新解析法ー」秀潤社
- 中山広樹（1998）：「細胞工学別冊 目で見える実験
ノートシリーズ 新版 バイオ実験イラストレ
イテッド 3+ 本当にふえるPCR」秀潤社
- James W. Larrick（1997）：「The PCR Technique：
Quantitative PCR」Eaton Publishing
- H. Akagi, Y. Yokozeki, A. Inagaki, T. Fujimura
（1996）：Microsatellite DNA markers for rice
chromosomes. *theor Appl Genet*, **93**: 1071-
1077