DNA フィンガープリント法によるニホンナシの品種および親子判定

寺本さゆり¹・村上（嘉納）ゆり子¹・保里昌彦²・神山清文²

¹果樹試験場 305 つくば市藤本 2-1

²帝人バイオ・ラボラトリーズ 205 羽村市緑ヶ丘 3-5-5

'DNA Finger-Printing' to Distinguish Cultivar and Parental Relation of Japanese Pear

Sayuri Teramoto¹, Yuriko Kano-Murakami¹, Masahiko Hori² and Kiyofumi Kamiyama²

¹Fruit Tree Research Station, Tsukuba, Ibaraki 305

²Teijin Bio Laboratories, 3-5-5 Midorigaoka, Hamura, Tokyo 205

Summary

'DNA finger-printing' by Restriction Fragments Length Polymorphisms (RFLPs) can distinguish individual pear cultivars by a paternity analysis as demonstrated in many other organisms, including humans. In this study, 17 cultivars of Japanese pear were identified from their specific hybridization patterns using human minisatellite DNA probes (33.6, 33.15). By using these analysis, eight hybrid Japanese pears were traced to their parents; 'Housui' was proven not to be a hybrid of 'Ri-14'×'Yakumo'.

緒 言

近年、わが国においても、欧米諸国と同様に新種苗木法の制定に伴い品種育成者の権利保護が強化され、品種登録件数も大幅に増加してきている。しかし、これらの品種の判定は、熟練者による長期間の形態的特徴の調査が必要であり、より客観的で迅速な判定法の確立が模索されている。

1980年代にヒトで開発されたDNAフィンガープリント法 (Jeffreysら, 1985a, 1985b) は、個体によって異なるDNAの塩基配列を利用するRFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) のひとつで、指紋に代り得る個体判別法とされている。この手法は、少量の材料から短時間に判定できる利点を持つことから、さまざまな動植物の個体判別法として応用されてきている (Dallas, 1988; Kuhnleinら, 1989)。

また、果樹においても環境に影響されないDNAを用いた品種・系統判定法の検討が、リンゴ (Nybohm・Scheel, 1990)、カンキツ (Matsuyamaら, 1992) な

どを材料として行われている。

これらのことから、本研究では交配組合わせが明らかで、かつ他の果樹に比べて血縁関係の濃いニホンナシ品種 (Machida, 1979; 梶浦・佐藤, 1990) を材料に用いて、DNAフィンガープリント法による品種および交配関係の判定が可能であるかを検討した。

材料および方法

1. 材 料

交配関係が明かにされている主要栽培品種 '幸水'、'筑水' など17品種のニホンナシを用い、これらの交配関係を第1図に示した。また、ニホンナシとの比較検討のため、チュウゴクナシ '鴨梨' およびセイヨウナシ 'ラ・フランス' を用いた。

2. DNA 抽出

DNAは展葉直後の新葉を材料とし、液体窒素中で破碎して、CTAB法 (渡辺・杉浦, 1989) による抽出後、核酸精製用カラム (QIAGEN Column; DIAGEN Inc.) を用いて分離精製した。

3. サザンハイブリダイゼーション

各品種から抽出したDNAは、制限酵素 *Hinf*I で完全消化し、25 cm の1.2%アガロースゲル電気泳動を約24時間、常温のTAE緩衝液 (40 mM トリスー酢

1993年9月20日 受理。

本報告の一部は、園芸学会平成2年度秋季大会で発表した。

果樹試験場業績番号 A-312

Fig. 1. The pedigree of representative cultivars of Japanese pear.

酸 pH 8.0/1 mM EDTA) 中で行った (Davies, 1988). 泳動後, DNA は常法 (Maniatis ら, 1989) にしたがってナイロン膜 (Hybond-N; アマシャム) へキャピラリートランスファー (サザンプロット) し, UV 照射により膜に固定した後, 55°C のプレハイブリダイゼーション液 (0.5 M リン酸緩衝液 pH 7.2/1% ドデシル硫酸ナトリウム) 中に数時間放置した. プローブは, Leicester Univ. が特許を持つヒトミオグロビン遺伝子のイントロン中の反復配列に由来する 2 種類のミニサテライト DNA (33.6 および 33.15) を用いた. これらのプローブを ^{32}P で標識し, ハイブリダイゼーション液 (0.2 M リン酸緩衝液 pH 7.2/1% ドデシル硫酸ナトリウム/1% 牛血清アルブミン/6% ポリエチレングリコール) に加え, 55°C で一晩サザンハイブリダイゼーションさせた. このナイロン膜を, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を用い, 室温で 30 分間 2 回, 37°C で 30 分間, ついで 45°C 30 分間の順に洗浄した後, -80°C で X 線フィルム上に感光させた.

結果および考察

DNA フィンガープリント法には, 高度に精製された DNA が要求されるが, DNA の単離に通常用いられている CTAB 法や SDS 法 (Dellaporta ら, 1983) によるナシからの DNA 単離では, 精製の過程で多糖類やポリフェノールの混在により純度の高い DNA が得られなかった. このため, DNA の精製方法を検討した結果, 核酸精製用カラムを用いる方法 (Do・

Adams, 1991) により多糖類の除去が可能で, 純度の高い DNA が得られることがわかった.

制限酵素切断および電気泳動は常法にしたがって行ったが, サザンハイブリダイゼーションの条件および洗浄の条件は, ナシではヒトの場合に比べてかなり塩濃度を高くしなければ明瞭なバンドが得られなかった. この条件は, ナシ DNA 中に存在するプローブ (ヒト) との相同部位における塩基配列が 100% 同一ではない場合でも, 両者が結合 (ハイブリダイズ) できるものであった. サザンハイブリダイゼーションの結果, 低分子側から高分子側までバンドが現れたが (DNA フィンガープリントパターン; DNA 多型), 品種ごとにそれぞれ異なる DNA 多型を示すバンドは 2 kb 以上の高分子側に偏って分布した. また, 同じ条件で 2 回反復実験を行なったが品種固有の DNA 多型の変化はなかった. このように, ヒトミニサテライト部位のプローブによりナシで DNA 多型が得られたことは, ナシ DNA 内にもヒトのミニサテライトと類似した塩基配列があることを示唆している.

DNA 多型を示した部分での独立したバンドは, 濃淡を含め, プローブ 33.6 ではナシ全体で 19 本, 平均して 10 本, プローブ 33.15 では全体で 15 本, 平均して 8 本が判別可能であった (第 2 図). ニホンナシ品種のうち, 両プローブともに '太白' が 10~13 本と最も多いバンド数を検出し, '八雲' で 7 本の最も少ないバンド数が認められた. また, '二十世紀' から繰り返し近親交配されてきた '八幸', '八里', '75-23' など

Fig. 2. 'DNA finger printing' pattern of Japanese pear.

はDNA多型が非常に相似したが、ニホンナシの各品種においてバンドの組合わせに基づくパターンの相違により、17品種の判定が可能であった。

DNAフィンガープリント法ではそのバンドがメンデリズムにしたがって遺伝することから、種間の近いもの、また血縁関係の濃いものほど多くのバンドを共有するとされる (Dallas, 1988)。第1図の結果からも、近親交配が繰り返された品種ほどそのバンドパターンは相似する傾向がみられる。また、ニホンナシ在来品種である'二十世紀'、'長十郎'、'太白'、'早生幸蔵'、'赤穂'、'君塚早生'の間で共有されるバンドが存在することから、在来のニホンナシ品種はひとつのグループとして分類できると考えられる。

一方、ニホンナシ品種との比較に用いたチュウゴクナシ'鴨梨'とセイヨウナシ'ラ・フランス'では、両プローブともに、多型を示すすべてのバンドがニホンナシ品種にはない特異的なバンドであった。このことは、遺伝子の面からもニホンナシとの分類上の距離を反映しているものと思われる。

さらに、DNAフィンガープリント法のもう1つの特徴である親子判定について、今回供試した'菊水'、'八雲'、'幸水'、'筑水'など8組合せ (第1図) を検

討した結果、すべての組合せにおいて親子関係を確認することができた (第2図)。さらに、その親子判定を明示するために、'祇園'およびその交配親である'二十世紀'、'長十郎'のDNA多型を第3図に示した。子 ('祇園') のすべてのバンドは、明らかに親 ('長十郎'・'二十世紀') のバンドに帰属しており、この手法は親子関係の確認に利用できることが示された。しかし、以前より交配親に疑問が持たれていた'豊水'は、交配親とされた'八雲'と'リー14'には見られない1本の特異的なバンドを持っており (第2図)、この交配組合せからは'豊水'が生じないことが明らかになった。また、'豊水'のDNA多型は1本の特異的なバンドを除いて供試したニホンナシの各品種とバンドを共有していることから、'豊水'はニホンナシ品種間の組合せによって生じたものと推定される。

以上のことから、ヒトのDNAフィンガープリント法で使用されている2種類のプローブから得られたナシのDNA多型によって、供試したニホンナシ17品種の品種判定および親子判定が可能であることが明らかとなった。しかし、'八里'と'八幸'のように血縁関係の濃い品種間では、DNA多型が相似しており、判定が1本のバンドの有無に基づく場合があった。この

▶ indicate the assumed bands from 'Choujyuurou'.
▷ indicate the assumed bands from 'Nijisseiki'.

Fig. 3. The analysis of parental relation.

ように、親近交配や枝変りを含むより多くのニホンナシの品種判定を行うには、さらに品種識別に適したプローブの開発が必要であるとともに、パルスフィールドゲル電気泳動などの、より精密に塩基配列の相違を判定できる手法を取り入れることも必要であると思われる。

一方、近年 PCR を用いた DNA フィンガープリント法 (RAPD 法) は、サザンハイブリダイゼーションによる DNA フィンガープリント法に比べて取扱いが簡易であるため、急速に発展している (Beyermann ら, 1992; Johansson ら, 1992)。この方法は再現性の点で問題が残るが、種苗法による登録など品種の識別同定には、サザンハイブリダイゼーション法による確実性と RAPD 法の簡易性を併せた総合的な判定が必要となってくるとと思われる。また、これらの DNA フィンガープリント法で得られる DNA 多型の情報はデータベース化されることにより、品種登録および照合が容易に実施できることから、品種の識別同定業務の負担の軽減と迅速な判定が図られるものと考えられる。さらに、データベースの蓄積によって、交配関係がまったく不明な品種でも組合わせを予想することが可能になるとと思われる。

また、果樹が栄養繁殖する作目であるという条件からも、環境に影響されない品種・系統診断法として、DNA フィンガープリント法は重要な技術となることが考えられる。今後、この技術は果樹の種苗登録業務

のほか、育種の交配親確認や導入種苗の品種・系統診断、野生種の分類同定、種苗販売時の品種証明など、さまざまな現場で活用されるようになると思われる。

謝 辞 本研究を行なうにあたり、多大な御協力を頂いた間苧谷徹果樹試験場口之津支場長ならびに鮫島宗明前農業生物資源研究所炭素代謝研究室長、眞田哲朗果樹試験場育種第 4 研究室長に心から感謝致します。

摘 要

本研究においては、ヒト・動植物の個体判別法として実用化が進んでいる DNA フィンガープリント法をニホンナシに適用した。ヒトミニサテライト配列由来のプローブを用いて DNA フィンガープリントを行なった結果、供試した 17 品種について品種判定が可能であることが明らかとなった。また、この DNA 多型に基づき 8 品種については交配組合わせを確認することができた。しかし、'豊水'については、'リ-14'×'八雲'の組合わせからは生じないことが明らかになった。

引用文献

- Beyermann, B., P. Nurnberg, A. Weihe, M. Meixener, J. T. Epplen and T. Borner. 1992. Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 691-694.
- Dallas, J. F. 1988. Detection of DNA 'finger prints' of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 6381-6385.
- Davies, K. E. 1988. Genome analysis : A practical approach. p. 153-170. In : R. A. Wells (ed.). *DNA Fingerprinting*. IRL Press, Oxford.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation : version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(4) : 19-21.
- Do, N. and R. P. Adams. 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *Biotechniques* 10(2) : 162-166.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein. 1985a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314 : 67-73.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein. 1985b. Individual-specific 'finger-prints' of human DNA. *Nature* 316 : 76-79.
- Johansson, M., H. Ellegren and L. Anderson. 1992. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *J. Heredity* 83 : 196-198.
- 梶浦一郎・佐藤義彦. 1990. ニホンナシの育種及びそ

の基礎研究と栽培品種の来歴及び特性. 果樹試報告 特別報告第1号. p. 1-329.

- Kuhnlein, U., Y. Dawe, D. Zadworny and J. S. Gavora. 1989. DNA fingerprinting : a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor. Appl. Genet.* 77 : 669-672.
- Machida, Y. 1979. Trend of breeding works for Japanese pear in Japan. *JARQ.* 13 : 234-237.
- Maniatis, T., J. Sambrook and E. F. Fritsch. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual.* 2nd

- edition. p. 9. 31-9. 55. Cold Spring Harbor Press.
- Matsuyama, T., R. Motohashi, T. Akihama and M. Omura. 1992. DNA fingerprinting in *Citrus* cultivars. *Japan. J. Breed.* 42 : 155-159.
- Nybom, H. and B. A. Scheel. 1990. DNA 'fingerprints' applied to paternity analysis in apples (*Malus x domestica*). *Theor. Appl. Genet.* 79 : 763-768.
- 渡辺 格・杉浦昌彦監修. 1989. クローニングとシーケンス. p. 252-271. 農村文化社. 東京.