

‘日向夏’系統間における突然変異検出技術の開発

神尾章子¹⁾・荒木勇二²⁾・清水徳朗³⁾

¹⁾ 静岡県中遠農林事務所,

²⁾ 静岡県農林技術研究所伊豆農業研究センター,

³⁾ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所

Exploitation of Mutant Detection Method among *Citrus Tamurana* Strains

Akiko Kamio¹⁾ Yuji Araki²⁾ and Tokurou Shimizu³⁾

¹⁾ Shizuoka Chuen Agriculture and Forestry Office,

²⁾ Institute Izu Research Center / Shizuoka Res. Inst. of Agric. and For.,

³⁾ National Institute of Fruit Tree Science

Abstract

Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) was applied to look for distinctions among the varieties of Hyuganatsu.

1. The proper cycle of LA-PCR for non-marked primer was 28 cycles.
2. The proper cycle of LA-PCR for marked primer was 26~28 cycles.
3. The best fluorescent pigment for analysis was FITC. Although most of spots were observed in all 4 varieties and strains, one strain being investigated in the field had 2 spots which were not observed in the other varieties.

キーワード：日向夏，改変RLGS法，品種識別，非標識プライマー

I 緒 言

カンキツ類には多様な遺伝資源が存在し，それを利用した交雑育種が進められて特徴のある品種が多く育成されている。現在の主力品種であるウンシュウミカンやスイートオレンジ，グレープフルーツなどにも多数の品種・系統が存在するが，これらは枝変りとして発見されたものや，珠心胚実生から選伐されたものである。静岡県で多く栽培されているカンキツ‘日向夏’にも，これまでに‘日向夏’から派生した系統として，‘オレンジ日向’，‘室戸小夏’，‘早生日向’などの枝変り変異系統が見出されている。県内主産地の伊豆地域においては，自家受粉で結実し含核数の少ない‘白鳥日向’，自家受粉で結実する‘井

原日向’（仮称，品種登録出願中），‘オレンジ日向’から派生して果肉が濃橙色の田原系など，多様な枝変り系統が発祥してきた。

一方，昨今では育成品種の海外への不正流出や国内外を通じて無断増殖した農産物の増加が疑われるなど，育成者権侵害の問題が浮上し品種保護対策は重要性を増している。これまでに見出された品種・系統の育成権を確保する目的で，これらの枝変り品種・系統を判別するためのDNAマーカーの開発が期待されている²⁾⁶⁾⁸⁾。カンキツでは交雑で育成された品種を対象に，CAPSマーカーなどを利用した品種判別が可能である。しかし枝変りや珠心胚実生に由来するものは遺伝的にほぼ同等であり，品種・系統間での変異幅は非常に狭く，DNAマーカー

開発のための品種・系統間の多型を見出すことは非常に困難である。これまでに、二次元電気泳動解析を利用したRLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning) 法を用いて、ウンシュウミカンの品種間で多型を効率よく見出したという報告がある⁷⁾。

RLGS法とは、DNAを複数の制限酵素で段階的に切断して二次元電気泳動により分離し、制限酵素の認識サイトをランドマークとしたDNA断片を二次元のスポットパターンとして検出し、多型を検出する手法であり高感度に多型を検出する能力を持つ³⁾。本法は、微細な遺伝子変異を検出する有効な手法として、作物の近縁品種間識別⁴⁾や植物病原菌の菌株識別¹⁰⁾¹¹⁾に応用されているほか、重イオン線を照射した植物の影響を解明するゲノム診断¹²⁾として活用され、研究がすすめられている。しかし、多型を視覚化するためにラジオアイソトープを使用する操作であることから実験環境が限られるうえ、作業が長時間にわたる等の問題点がある。そこで本研究では、‘日向夏’ ‘オレンジ日向’ ‘井原日向’ (仮称、品種登録出願中)、および現地調査中である ‘日向夏’ 無核系統を対象に、放射性物質を利用しない蛍光標識法を使った改変RLGS法により実験条件を検討し、品種・系統間の多型検出について検討を行った。

II 材料及び方法

1. 供試材料とDNAの抽出

実験には、(独)果樹研究所興津拠点(静岡市清水区興津中町)内に植栽されている普通系 ‘日向夏’ (Citrus tamurana hort. ex T. Tanaka), ‘オレンジ日向’, ポット植栽の ‘井原日向’ (仮称、品種登録出願中)および伊豆地域で発見された無核系統を供試した。採取した生葉約1gを裁断し、液体窒素により直ちに凍結した。凍結葉を破碎し、改変CTAB法によりDNAを抽出した。

2. 検定用DNAの調製

鋳型DNAを制限酵素Mlu Iにより消化し、フェノール・クロロフォルム抽出後エタノール沈殿によりDNAを回収した。得られたDNAを少量の水に溶解し、DNA濃度を50ng/ μ Lに調製した。DNA濃度の定量にはDyNA Quant 蛍光分光光度計(Amershamライフサイエンス社)を使用した。Mlu I消化したDNAを一部取り、DNA Ligation kit ver.2.1(Takara)を用いてR Mlu I 24/12アダプタプライマー (60pmole/ μ L)と16℃で2時間ライゲーションした。70℃で10分間加熱して酵素を失活後、水を加えて最終濃度を0.5ng/ μ Lとした。

3. LA-PCRの条件検討

普通系 ‘日向夏’, ‘オレンジ日向’ および ‘井原日向’

の3品種を用いて、アダプターを付加したDNAを鋳型としてR Mlu 24プライマーを用いてLA-PCR(Takara)によるPCR反応の条件を検討した。PCRは、75℃ 5分のホットスタート→94℃ 2分→97℃ 20秒、70℃ 8分(サイクル数20~35)→72℃ 10分とし、サイクル数を20, 23, 26, 29, 32, 35の間で変化させた。反応液を一部取り、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、染色後撮影して増幅産物の量と産物長の分布を確認した。

4. 蛍光色素の種類と最適LA-PCR条件の検討

プライマーの標識に適した蛍光色素を選択する目的で、TAMRA™(TRITC 励起波長555nm, 蛍光波長580nm), ROX™(XRITC 同570nm, 同596nm), FITC (FAM™ 同495nm, 同521nm)の3種類の蛍光色素について検討した。各蛍光色素を付加したR Mlu 24プライマーを用いて、3項と同様にPCR反応を行った。サイクル数は23, 25, 27, 29, 31, 34サイクルとし、サンプルには普通系 ‘日向夏’を用いた。PCR後の反応液を一部取り、0.8%アガロースゲルとエチジウムブロマイド染色によるバンドパターンと、5%アクリルアミドゲルで分離後のバンドパターンを蛍光イメージアナライザによりスキャンして泳動像を検証した。

5. RLGS分析による変異スポットの検出

RLGS法による分析は、浅川の方法¹⁾を参考に、FMBIO II 蛍光イメージアナライザ(Takara社)のゲルスキャンサイズ(20×40cm)に合わせて特注した泳動装置を使用して下記のように行った。

(1)電気泳動

一次元電気泳動は、0.9%アガロースゲルを用いた。蛍光標識プライマーによるPCR反応液をアプライし、170Vで20時間電気泳動して分離した。泳動終了後のゲルを取り出し、一次元目電気泳動緩衝液を1×K bufferに置換後、制限酵素Mbo I (Takara)により37℃で2時間ゲル内消化した。ゲル緩衝液を1×TBEに置換後、二次元電気泳動ゲルと接続した。二次元電気泳動は、30%アクリルアミドゲルにより120V 39時間泳動した。

(2)画像解析

二次元電気泳動後の泳動像は、蛍光イメージアナライザ(FMBIO II Multi-View, Takara社)によりスキャンした。蛍光色素の波長に合わせた検出フィルターによりスキャンを行い、泳動像はTIFFイメージとして保存した。得られたTIFFイメージを、二次元電気泳動画像解析ソフトウェア(PD-Quest Bio-Rad社)により解析した。イメージごとにバックグラウンド補正と検出スポットの位置補正を行い、総スポット数と、各品種・系統間の多型スポットを確認した。

III 結果および考察

1. 最適LA-PCRの条件

今回使用した改変RLGS法は、制限酵素消化したDNAにアダプターを付加し蛍光標識したプライマーを用いてPCR反応を行うことで、特定の制限酵素消化DNA断片のみを特異的に蛍光標識する。原法で使用している放射性物質のかわりに蛍光色素で標識することで、通常の実験室でも操作が可能になる他、検出対象とするDNA断片のみをPCR反応により特異的に増幅することで、検出感度と電気泳動の際の分離能の向上が期待される。しかしRLGS法の一次元で分離対象とするDNAの分子サイズは通常のPCR反応で増幅される産物長(通常kb以下)よりも長く、また低分子の鋳型DNAが優先的に増幅されやすいという特性がある。そこで本研究では、長鎖のDNA増幅に優れたLA-Taq酵素(Takara社)を用いることで、LA-PCRにより一次元電気泳動に適したDNAを増幅するための反応条件を検討した。また、PCR反応のサイクル数を増やすとそれに比例して増幅産物の量も増大するが、産物量が飽和して鋳型DNAと産物量が比例しなくなるという問題点がある。そのため、使用した鋳型DNA量に比例した増幅産物量が得られるPCR反応のサイクル数についても検討した。

普通系‘日向夏’、‘オレンジ日向’および‘井原日向’の3品種について、非標識プライマーを用いてLA-PCRを行い、泳動後のバンドパターンを検討した(図1)。今回用いた条件において、いずれの品種においても500bpから11kbの範囲で良好な増幅が認められた。PCR反応のサイクル数を変化させたところ、26サイクルまではサイクル数に比例して増幅産物長も増加した。増幅量の多いいくつかのバンドでは、29サイクルを超えるとサイクル数と増幅産物量が比例しなくなったことから、26サイクルから29サイクルの間でPCR反応が飽和したと考えられた。以上の結果から、鋳型中の各DNA断片の存在比を反映しつつ、実験に必要なDNA量を確保するためのサイク

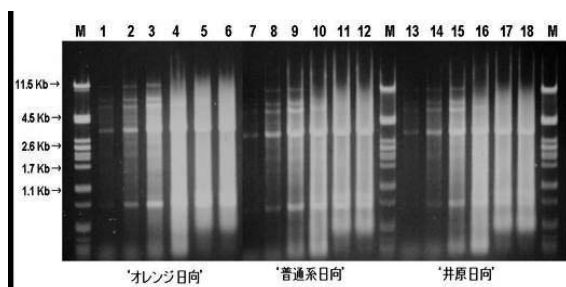


図1. LA-PCRサイクル数の違いによる増幅後のバンドパターン
M: λ -Pst I マーカー
レーン1, 7, 13: 20サイクル レーン2, 8, 14: 23サイクル レーン3, 9, 15: 26サイクル
レーン4, 10, 16: 29サイクル レーン5, 11, 17: 32サイクル レーン6, 12, 18: 35サイクル

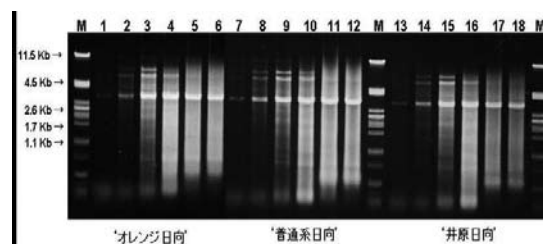


図2 PCRサイクル数の違いによる増幅後のバンドパターン
(蛍光プライマー使用)

M: λ -Pst I マーカー
レーン1, 7, 13: 20サイクル レーン2, 8, 14: 23サイクル レーン3, 9, 15: 26サイクル
レーン4, 10, 16: 29サイクル レーン5, 11, 17: 32サイクル レーン6, 12, 18: 35サイクル

ル数として、増幅産物量が飽和する直前の28サイクルを適当なLA-PCR条件と判断し、以後の実験で参照することとした。

2. 蛍光色素を付加したプライマーを用いた場合の増幅と最適LA-PCR条件

PCRプライマーに蛍光色素を付加するとTm値が変化し、PCRの増幅性が変わる場合のあることが知られている。そこで、普通系‘日向夏’、‘オレンジ日向’および‘井原日向’の3品種について、非標識プライマーと蛍光色素(FITC)で標識したプライマーを用いて同様の条件でPCR反応を行い、増幅性とバンドパターンの違いについて検討した。その結果、いずれの品種でも29サイクルまでに増幅生産物量は徐々に増加して29サイクルの時点で急激な増加がみられ、29サイクルを超えると若干の減少がみられ、29サイクル程度で飽和量に達していると考えられた(図2)。電気泳動像のバンドパターンに差異がないことから、蛍光色素を付加したプライマーを用いた場合にも通常のプライマーを用いた場合と同様にDNAが増幅されることが考えられた。蛍光標識プライマーを使用する場合、26～28サイクルが最適なLA-PCR条件であると判断された。

3. 蛍光色素の種類と最適LA-PCR条件

分析に適した蛍光色素を検討する目的で、TAMRA、ROX、FITCの3種類で標識したプライマーを用いてPCRを行い、至適サイクル数と増幅産物の分子量分布を比較した。増幅産物をアガロースゲルにより分離し、エチジウムブロマイド染色して得られた泳動像は、いずれの蛍光色素においてもバンドパターンには明らかな差異はみとめられなかった(図3)。PCR反応のサイクル数を変化させた場合、23～27サイクルまではサイクル数に比例して増幅産物が増加したが、29サイクル以上では増幅産物量はほぼ一定となった。以上の結果から、アガロースゲル上ではいずれの蛍光色素を用いても、26サイクル程度が適当と判断された。一方で、増幅産物をアクリルアミドゲルで分離し、蛍光イメージアナライザを用いて得ら

れた泳動像を確認したところ、蛍光色素の種類ごとに低分子領域におけるバンドパターンには違いが認められた。蛍光色素にTAMRAを用いると、プライマーから外れた蛍光色素がバンドパターンと重複し、解析が困難な領域があった。ROXにおいても、位置は異なるもののプライマーから脱離した蛍光色素が認められた。標識したプライマーからの蛍光色素の脱離は標識プライマーの凍結融解により加速される傾向が認められた。FITCはTAMRAやROXと比較するとモル分子蛍光係数が低く、検出感度は劣るものの、凍結融解を繰り返しても蛍光色素の脱離は認められず安定しており、PCR産物量も他のものよりも多い(図4)ことから、FITCで標識したプライマーを以後のRLGS分析に使用した。

4. RLGS分析による変異スポットの検出

FITC標識したプライマーを使用し、決定した条件によりPCR反応を行った。得られた増幅産物を制限酵素EcoRVで消化後、一次元目の電気泳動を行い、制限酵素Mbo Iによりゲル内消化後、二次元目の電気泳動で分離した。泳動後のスポットパターンを蛍光イメージアナライザでスキャンし、スポットの検出と多品種・系統間の多型について検討した。その結果、今回使用した条件では各品種・系統について約170のスポットが確認された。

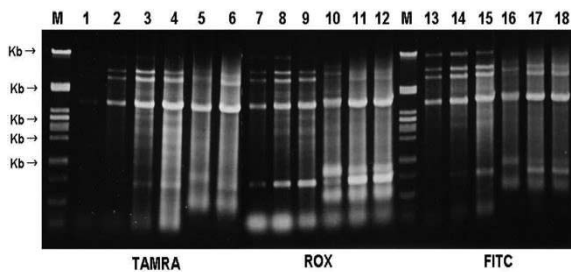


図3 PCRサイクル数の違いによる増幅後のバンドパターン
(蛍光プライマーの種類ごと アガロースゲル)

M: λ -Pst I マーカー
レーン1, 7, 13: 20サイクル レーン2, 8, 14: 23サイクル レーン3, 9, 15: 26サイクル
レーン4, 10, 16: 29サイクル レーン6, 11, 17: 32サイクル レーン7, 12, 18: 35サイクル

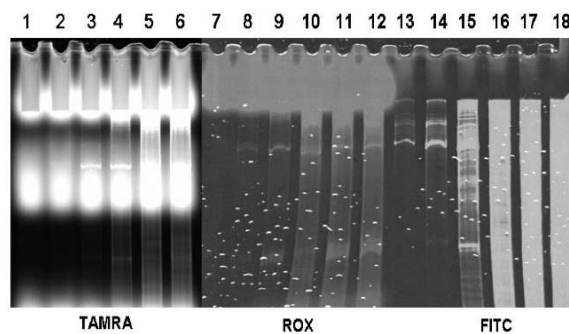


図4 PCRサイクル数の違いによる増幅後のバンドパターン
(蛍光プライマーの種類ごと アクリルアミドゲル)

M: λ -Pst I マーカー
レーン1, 7, 13: 20サイクル レーン2, 8, 14: 23サイクル レーン3, 9, 15: 26サイクル
レーン4, 10, 16: 29サイクル レーン6, 11, 17: 32サイクル レーン7, 12, 18: 35サイクル

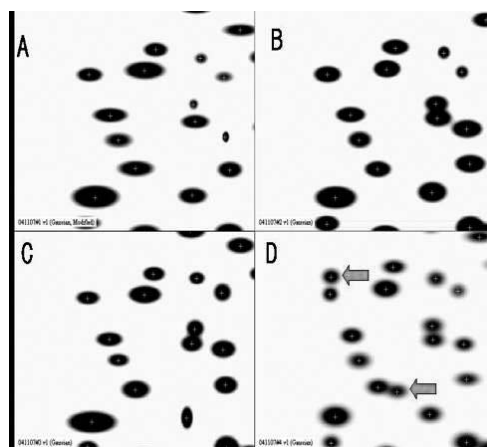


図5 日向夏4品種・系統間で多型が認められたスポット

A: '普通系日向夏' B: 'オレンジ日向'
C: '井原日向' D: 現地調査中の無核系統

‘日向夏’の4品種・系統間でスポットを確認したところ、ほとんどのスポットに違いはみられなかったが、日向夏無核系統(現地調査中)においては他の品種には認められないスポットを2個見出した(図5)。それぞれの品種・系統ではスポットパターンに再現性が認められた。

今回の試験では、‘日向夏’系統間で改変RLGS分析法を利用するにあたっての、LA-PCRの最適条件と‘日向夏’枝変り系統間での変異遺伝子のスポット検出を確認した。

一般に、RLGS法を用いる多型検出は、ラジオアイソトープ施設内での作業となり、また二次元スポットを視覚化するためにX線フィルムを用いたオートグラフィーによる検出を行うために煩雑で実験に長時間を要する。今回の試験ではラジオアイソトープの代わりに蛍光標識したプライマーを使ってDNAを増幅し、イメージアナライザによるイメージング手法を試みたところ、RLGSプロファイルは再現性よく見られ、迅速に多型スポットを得ることが可能であった。

改変RLGS法を用いた場合にも普通系‘日向夏’と比較して、普通系‘日向夏’から派生した果実の着色変異系統である‘オレンジ日向’、および同じく普通系‘日向夏’から派生した自家和合性系統である‘井原日向’(仮称、品種登録出願中)の3品種・系統間に変異スポットは確認されなかった。しかし、‘日向夏’無核系統(現地調査中)については、上記3品種・系統と比較して異なる多型スポットが確認されたことから、枝変り系統間といった微細な遺伝子変異の検出についても本法の有効性が示された。

今後、制限酵素の種類やPCR条件の改良を重ねることによって枝変りや珠心胚実生間での識別方法として活用できると考えられる。

IV 摘 要

‘日向夏’の品種間における識別を目的として改変RLGS法を用いた検出手法を試みた。

1. 非標識プライマーを用いてLA-PCRを行い、28サイクルを適当な条件と判断した。
2. 蛍光色素で標識したプライマーを用いてLA-PCRを行い、26～28サイクルを適当な条件と判断した。
3. 分析に適した蛍光色素は、FITCと判断した。
4. 4品種・系統間において、ほとんどのスポットに違いはみられなかったが、現地調査中の1系統については、他の品種には認められないスポットを2個見出した。

V 引用文献

- 1) 浅川順一(1996)：核酸の高分解能2次元電気泳動法を用いたRLGS改良法. 蛋白質 核酸 酵素41(2), 170～177.
- 2) DNA品種識別技術検討会(2004). 植物のDNA品種識別についての基本的留意事項－技術開発と利用のガイドライン－.
- 3) Hatada, I., Y. Hayashizaki, S. Hirotsune, H. Komatsubara, and T. Mukai(1991)：A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (88), 9523～9527.
- 4) 河瀬眞琴・石原次郎(1994)：ゲノムスキニング法を適応した植物の新しいフィンガープリント. 育種44(別1), 135.
- 5) Matsuyama, T., T. Abe, C. Bae, Y. Takahashi, R. Kikuchi, T. Nakano, T. Asami and S. Yoshida(2000)：Adaptation of Restriction Landmark Genomic Scanning(RLGS) to Plant Genome Analysis. Plant Molecular Biology Reporter (18), 331～338.
- 6) 農林水産省生産局種苗課(2004)：農政のポイント種苗法及び関税定率法の一部改正－育成者権の保護強化について－. 農業技術(58), 331.
- 7) 清水徳朗・河瀬眞琴・富岡啓介(1998)：ゲノムスキニング法によるウンシュウミカンの遺伝子変異の解析. 園学雑誌別冊68(1), 138.
- 8) 清水徳朗・藤井浩・島田武彦・遠藤朋子・西川英美恵・大村三男(2005)：カンキツにおけるゲノム研究と課題. 果樹バイオテクノロジー研究会抄録集, 13.
- 9) 谷畑勇夫(2006)：バイオクロストーク研究. 理研研究年報, 1265.
- 10) 富岡啓介・佐藤豊三・河瀬眞琴・石原次郎・笹谷孝英・小金沢碩城(1998)：RLGSによる糸状菌のDNA多型検

出. 日植病報(64), 615.

- 11) Tomioka, K., T. Sato, M. Kawawase, J. Ishihara, T. Sasaya and H. Koganezawa(2000)：Difference of RLGS profiles between nit 1 mutants and their wild type of *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology(90) (supplement), S77.
- 12) 上野敬一郎・永吉実孝・田中淳・鹿園直哉・長谷純宏(2004)：イオンビームを用いた輪ギクの再改良. イオンビーム育種研究会講要.