

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07647

研究課題名(和文) 熱帯果樹における染色体解析法の確立とその遺伝資源およびゲノム研究への適用

研究課題名(英文) Establishment of chromosome analysis methods and their application on genetic resources and genome studies in tropical fruits

研究代表者

山本 雅史 (Yamamoto, Masashi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：00305161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 主要熱帯果樹のパイナップルおよびピタヤ染色体の分析を実施した。パイナップルでは実生、ピタヤでは挿し木苗を材料とした酵素解離法による染色体標本作製技術を確認した。いずれの樹種においても染色体のCMA+領域はDAPI-で、この部分に18S-5.8S-25SrDNA遺伝子が位置した。パイナップルにおいては5SrDNAの位置の検出にも成功した。18S-5.8S-25SrDNAと5SrDNA遺伝子が位置する染色体は異なった。ピタヤにおいては染色体構成の種間および倍数体間差異についても検討した。染色体レベルでは種間における差異は極めて小さかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体は遺伝子の担体であり、この詳細を解明することは育種や遺伝資源研究にとって重要である。本研究において世界および日本での主要熱帯果樹であるパイナップルおよびピタヤの染色体標本作製技術の開発、その利用による染色体構成の特徴を解明したことは、今後、両樹種の遺伝的改良や遺伝資源としての利用に大きく資するものである。さらに本研究ではFISH法によって染色体上でのrDNA遺伝子を検出した。この適用により、有用遺伝子の染色体での位置を解明することも可能となった。これは染色体研究とゲノム研究との融合を図るものである。成果は学術的意義だけでなく、育種等にも利用できるもので、社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)： Chromosomes of pineapple and pitaya, major tropical fruit trees, were analyzed. We have established a technique for preparing chromosome samples by the enzyme maceration method using seedlings for pineapple and cuttings for pitaya. In both fruit trees, the CMA + regions of the chromosome were corresponded with those of DAPI-, and the 18S-5.8S-25S rDNA gene was located in these regions. The positions of 5S rDNA were detecting in pineapple. The 5S and 18S-5.8S-25S rDNA sites were located on different chromosomes. In Pitaya, we examined interspecific and polyploid differences in chromosomal configuration. At the chromosomal level, the differences between species were extremely small.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：染色体 ゲノム パイナップル ピタヤ 熱帯果樹 rDNA FISH in situ ハイブリダイゼーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体は遺伝子の担体であり、遺伝・育種研究を進展するためにはその理解が不可欠である。このため、主要作物においては、その染色体研究が積極的に進められてきた。一方、果樹においては染色体が小型で観察が困難なことが多いため、その研究の進展は遅れていた。しかし、植物の小型染色体標本作製に関する画期的な酵素解離法(Fukui・Mukai, 1988)が果樹染色体研究に適用された1980年代以降、主要果樹の染色体観察法が確立され、染色体を蛍光色素であるクロモマイシン A₃ (CMA) や DAPI で染色することによる分染法の適用によって、一部染色体の識別や染色体構成を明らかとすることも可能となった (Yamamoto, 2007)。

さらに1990年代以降、果樹においても染色体解析に蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 分析が適用され始め (Yamamoto, 2012)、染色体研究が一層進展した。FISH 法の出現によって、染色体研究と遺伝子を扱うゲノム研究との融合が可能となり、ゲノム研究の面からも染色体研究の重要性が増大している。

近年、我が国においては熱帯果樹の重要性が増大しつつある。特に育種分野では、我が国の環境に適した優良な新品種の育成に大きな期待が持たれており、パインアップルでは数品種が育成された。より一層の育種の効率化を図るため、熱帯果樹においても遺伝・育種・ゲノム研究が加速しつつある。加えて、パインアップルにおいては全ゲノム配列が公開され (Ming ら, 2015)、この利用による育種の一層の進展が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は主要熱帯果樹のパインアップルおよびピタヤにおける育種、遺伝資源およびゲノム研究の発展のため、良好な染色体標本作製技術の確立、染色体の構造解明、染色体上における遺伝子の位置を決定することを目的として実施した。

特に、a. パインアップルおよびピタヤにおける酵素解離法による染色体作製技術の確立、b. パインアップルおよびピタヤにおける蛍光色素を用いた分染による染色体の識別、c. パインアップルおよびピタヤにおける染色体の FISH 法の確立、d. パインアップルにおける染色体上の rDNA による染色体の識別、e. ピタヤにおける倍数性と rDNA の位置情報からの遺伝資源の評価、を実施することを主目的とした。

3. 研究の方法

(1) パインアップル

3 組み合わせの交雑実生を材料とした。組み合わせは 'A882' × 'Soft Touch'、'150-7-08' × 'Gold Barrel' および 'Yugafu' × 'Soft Touch' である。種子をシャーレに播種し、25℃、14 時間日長下で発根させた実生根端を材料とした。一部の材料は採取後 10℃、2mM、8 - ハイドロキシキノリンで 4 時間前処理したが、他は前処理を省略した。染色体標本は酵素解離空気乾燥法により作成した。酵素の組成および濃度は以下の 3 種類を試した。i) 2% セルラーゼオノズカ RS、0.75% マセロザイム R200 および 0.15% ペクトリアーゼ Y-23、ii) 4% セルラーゼオノズカ RS および 1% ペクトリアーゼ Y-23 並びに iii) 2% セルラーゼオノズカ RS および 0.5% ペクトリアーゼ Y-23 である。すべて酵素反応は 37℃ で実施し、反応時間は 15 ~ 45 分であった。ギムザ染色で染色体像を観察した後、脱染し、0.5mg・mL⁻¹ の CMA および 1.0μg・mL⁻¹ の DAPI で染色した。蛍光顕微鏡を用いて、CMA 染色像は BV 励起、DAPI 染色像は UV 励起より観察した。続いて、コムギ由来の 18S-5.8S-25SrDNA またはパインアップルからクローニングした

5SrDNA をプローブとした FISH を実施した。rDNA はニックトランスレーション法によってビオチン標識し、フルオレセイン (FITC) - アビジン結合体によって検出した。染色体は DAPI で対比染色した。DAPI および FITC はそれぞれ UV および B 励起で観察した。

(2) ピタヤ

沖縄県農業研究センター名護支所で保存しているピタヤの *Hylocereus undatus* ' No. 22 ' *H. costaricensis* ' No. 5 ' および *Selenicereus megalanthus* ' Yellow Pitaya ' の 3 系統を供試した。挿し木苗の根を染色体観察の材料とした。挿し木苗はオキシベロン粉剤 0.5 を展着後、パーミキュライト床に挿して 25°C のインキュベーターで約 2 か月処理した。根は採取後、15°C、2mM、8 - ハイドロキシキノリンで 4 時間前処理した。酵素解離空気乾燥法の条件は、2% セルラーゼオノズカ RS、0.75% マセロザイム R200 および 0.15% ペクトリアーゼ Y-23、37°C で 45 ~ 60 分である。ギムザ染色で染色体像を観察した後、脱染し、0.5mg · mL⁻¹ の CMA および 1.0µg · mL⁻¹ の DAPI で染色した。蛍光顕微鏡を用いて、CMA 染色像は BV 励起、DAPI 染色像は UV 励起で観察した。続いて、コムギ由来の 18S-5.8S-25SrDNA をプローブとした蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を実施した。rDNA はニックトランスレーション法によってビオチン標識し、フルオレセイン (FITC) - アビジン結合体によって検出した。染色体は DAPI で対比染色した。DAPI および FITC はそれぞれ UV 励起および B 励起で観察した。

4 . 研究成果

(1) パインアップル

前処理の有無、酵素解離条件の検討には ' A882 ' × ' Soft Touch ' を材料とした。染色体数は 50 本 (2n=50) であった。染色体は小さかった。酵素反応条件について、i) 2% セルラーゼオノズカ RS、0.75% マセロザイム R200 および 0.15% ペクトリアーゼ Y-23 並びに ii) 4% セルラーゼオノズカ RS および 1% ペクトリアーゼ Y-23 の両者では、20 分の反応時間でも酵素反応が進み過ぎて、50 本の染色体が確認できないことが多かった。一方、iii) 2% セルラーゼオノズカ RS および 0.5% ペクトリアーゼ Y-23 では、約 45 分の反応で、染色体数が 50 本で比較的良好な染色体像を観察することが可能であった。したがって、これを酵素解離法の基本条件とした。前処理をすることによって、染色体長は短くなり、各染色体が類似した形態を示す傾向にあった。染色体識別には、各染色体の特徴が明らかな長い染色体が有効であるので、前処理は実施しなかった。

続いて、3 組み合わせ (' A882 ' × ' Soft Touch '、' 150-7-08 ' × ' Gold Barrel ' および ' Yugafu ' × ' Soft Touch ') の交雑実生を用いて、CMA および DAPI 染色を実施した。すべての組み合わせのほとんどの実生で、CMA 染色を行うと 2 本の染色体の端部に CMA+バンドが確認できた (表 1)。DAPI 染色すると CMA+ の部分の染色は不良で、DAPI - バンドとみなせた。CMA はグアニンとシトシンに特異的、DAPI はアデニンとチミンに特異的であるという特性から、この CMA+/DAPI - バンド領域は、染色体上のグアニンおよびシトシンが豊富な領域であると判断できた。なお、' 150-7-08 ' × ' Gold Barrel ' の一部の個体では CMA+/DAPI - バンドが 1 本しか確認できない場合もあった。これが遺伝的なものか、実験材料の作製や染色法によるものかは明らかでなかった。

続いて、' A882 ' × ' Soft Touch ' 交雑実生を用いて 18S-5.8S-25SrDNA の FISH を実施した。18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子座は、2 本の染色体の端部に確認できた。18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子座は、CMA+/DAPI-バンド領域と一致した。5SrDNA の FISH には ' 150-7-08 ' × ' Gold

Barrel' および 'Yugafu' × 'Soft Touch' 交雑実生を用いた。5SrDNA 遺伝子座は 2 本の染色体の端部に観察された (表 2)。5SrDNA 遺伝子座が位置する染色体は 18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子座が位置する染色体とは異なった。

表1 パインアップルの3組み合わせにおいて染色体に 2本のCMA+およびDAPI-バンドを備える実生数

| 組み合わせ | 供試 実生数 | 2本のCMA+と DAPI-バンド を備える 実生数 |
|----------------------------|-----------|-------------------------------------|
| 'A882' × 'Soft Touch' | 12 | 12 |
| '150-7-08' × 'Gold Barrel' | 9 | 7 |
| 'Yugafu' × 'Soft Touch' | 12 | 12 |

表2 パインアップルの3組み合わせにおいて染色体上に検出される rDNAの再現性

| 組み合わせ | 供試 実生数 | 2か所に 18S-5.8S-25S が検出される 実生数 | 2か所に 5S が検出される 実生数 |
|----------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 'A882' × 'Soft Touch' | 6 | 6 | ^z |
| '150-7-08' × 'Gold Barrel' | 5 | - | 5 |
| 'Yugafu' × 'Soft Touch' | 2 | - | 2 |

^z 未検定.

(2)ピタヤ

当初に設定した前処理条件および酵素処理条件で、細胞質がそれほど残らず各染色体が散在している比較的良好な染色体像を観察することができた。したがって、この条件によって実験を進めた。'No. 5' および 'No. 22' の染色体数は 22 本(2n=22)、'Yellow Pitaya' の染色体数は 44 本(2n=44)であった。

3 系統の CMA および DAPI 染色の結果を表 3 に示した。'No. 5' および 'No. 22' では、CMA 染色を行うと 2 本の染色体の端部に CMA+バンドが確認できた。DAPI 染色すると CMA+の部分の染色は不良で、DAPI-バンドとみなせた。'Yellow Pitaya' では 4 本の染色体の端部に CMA+バンドが確認でき、これは DAPI-バンドと対応した。CMA はグアニンとシトシンに特異的、DAPI はアデニンとチミンに特異的であるという特性から、この CMA+/DAPI-バンド領域は、染色体上のグアニンおよびシトシンが豊富な領域であると判断できた。

続いて、18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子の FISH を実施した。'No. 5' および 'No. 22' では 18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子座は、2 本の染色体の端部に確認できた。'Yellow Pitaya' では 4 本の染色体の端部に 18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子座が検出された (表 3)。3 系統における染色体上の 18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子座は、CMA+/DAPI-バンド領域と完全に一致した。

'No. 5' および 'No. 22' の染色体構成を比較したところ、種は異なるものの非常に似通っていた (表 4)。

表3 ピタヤ3種の染色体において検出されるCMA+/DAPI-バンドおよび 18S-5.8S-25S rDNAの数

| 種 | 染色体数 | CMA+/DAPI- バンド数 | 18S-5.8S-25S rDNA 検出数 |
|---------------------------------------|------|--------------------|-----------------------------|
| <i>H. undatus</i> "No. 22" | 22 | 2 | 2 |
| <i>H. costaricensis</i> "No. 5" | 22 | 2 | 2 |
| <i>H. megalanthus</i> "Yellow Pitaya" | 44 | 4 | 4 |

表4 ピタヤ2種における各染色体の相対長

| 染色体 No. | <i>Hylocereus undatus</i> | | <i>Hylocereus costaricensis</i> | |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | 相対長 (%) | 染色体 タイプ ^z | 相対長 (%) | 染色体 タイプ ^z |
| 18S-5.8S-25Sが検出される染色体 | | | | |
| 1 | 4.2±0.4 | sm | 4.5±0.3 | sm |
| 2 | 3.1±0.1 | sm | 3.5±0.3 | sm |
| 18S-5.8S-25Sが検出されない染色体 | | | | |
| 3 | 6.1±0.3 | m | 6.2±0.2 | m |
| 4 | 5.8±0.3 | m | 6.0±0.1 | m |
| 5 | 5.5±0.1 | m | 5.7±0.2 | m |
| 6 | 5.4±0.1 | m | 5.5±0.1 | m |
| 7 | 5.3±0.1 | m | 5.2±0.1 | m |
| 8 | 5.2±0.1 | m | 5.1±0.1 | m |
| 9 | 5.0±0.1 | m | 4.9±0.1 | m |
| 10 | 4.9±0.1 | m | 4.8±0.1 | m |
| 11 | 4.8±0.1 | m | 4.8±0.1 | m |
| 12 | 4.6±0.1 | m | 4.6±0.1 | m |
| 13 | 4.5±0.1 | m | 4.5±0.1 | m |
| 14 | 4.4±0.1 | m | 4.5±0.1 | m |
| 15 | 4.3±0.1 | m | 4.4±0.1 | m |
| 16 | 4.2±0.1 | m | 4.0±0.1 | m |
| 17 | 4.1±0.1 | m | 4.0±0.1 | m |
| 18 | 4.0±0.1 | m | 4.0±0.1 | m |
| 19 | 3.9±0.1 | m | 3.8±0.1 | m |
| 20 | 3.7±0.2 | m | 3.7±0.1 | m |
| 21 | 3.5±0.2 | m | 3.4±0.2 | m |
| 22 | 3.2±0.2 | m | 3.2±0.2 | m |

^zLevan ら. (1964), m: (長腕/短腕 = 1.0-1.7),
sm: (長腕/短腕 = 1.7-3.0).

(3)結論

本研究の結果、パイナップルおよびピタヤにおける酵素解離法による良好な染色体標本作製技術を確立できた。CMA および DAPI による蛍光染色ならびに rDNA の FISH にも成功した。これらの成果は両樹種における育種・遺伝資源研究の発展に資するだけでなく、染色体研究の成果をゲノム研究に適用することを可能とするものである。

<引用文献>

- Fukui, K. and Y. Mukai、 Condensation pattern as a new image parameter for identification of small chromosomes in plants、 J. Japan. Genet.、 63 巻、 1988、 359–366
- Levan, A., K. Fredga and A. A. Sandberg、 Nomenclature for centromeric position on chromosomes、 Hereditas、 52 巻、 1964、 201–220
- Ming, R., その他、 The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis、 Nature Genet.、 47 巻、 2015、 1435–1442
- Yamamoto, M.、 Application of fluorescent staining of chromosomes to genetic studies in citrus、 Japan. J. Plant Sci.、 1 巻、 2007、 12–19
- Yamamoto, M.、 Recent progress on studies of chromosome observation in deciduous fruit trees、 J. Japan. Soc. Hort. Sci.、 81 巻、 2012、 305-313

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Masashi Yamamoto, Makoto Takeuchi, Kenji Nashima and Toshiya Yamamoto | 4. 巻 88 |
| 2. 論文標題 Enzyme maceration, fluorescent staining, and FISH of rDNA of pineapple (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.) chromosomes | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 The Horticulture Journal | 6. 最初と最後の頁 455-461 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.UTD-102 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Masashi Yamamoto, Yohei Shimajiri, Kenji Nashima and Toshiya Yamamoto | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Fluorescent staining and FISH of rDNA of pitaya (<i>Hylocereus</i> spp.) chromosomes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Tropical Agriculture and Development | 6. 最初と最後の頁 217-212 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 山本雅史・島尻庸平・奈島賢児・山本俊哉 |
| 2. 発表標題 ビタヤ（ドラゴンフルーツ）の染色体観察 |
| 3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本雅史・奈島賢児・竹内誠人・山本俊哉 |
| 2. 発表標題 パインアップル染色体におけるリボゾームDNAの蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション |
| 3. 学会等名 日本熱帯農業学会第125回講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本雅史・竹内誠人 |
| 2. 発表標題 パインアップルにおける酵素解離空気乾燥法による染色体標本の作製とその蛍光染色 |
| 3. 学会等名 園芸学会平成30年度春季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 山本 俊哉 (Yamamoto Toshiya) (60355360) | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・ユニット長 (82111) | |
| 研究分担者 | 奈島 賢児 (Nashima Kenji) (30779616) | 日本大学・生物資源科学部・講師 (32665) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|