

機関番号：17701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580035

研究課題名 (和文) ナシにおける染色体識別と染色体上における有用遺伝子の可視化

研究課題名 (英文) Karyotyping and visualization of chromosomal sites of useful genes in pear

研究代表者

山本 雅史 (YAMAMOTO MASASHI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：00305161

研究成果の概要 (和文)：ナシにおけるゲノム研究を利用した画期的な育種技術の開発のため、遺伝子の担体である染色体について研究を実施した。概要は以下の通りである。(1) 酵素解離法による良好な染色体標本作製技術を確立した。(2) 蛍光色素の CMA および DAPI を用いた分染によって染色体構成を明らかにした。(3) FISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) によりリボゾームおよびレトロトランスポゾン遺伝子の染色体上での位置を決定した。

研究成果の概要 (英文)：Studies of chromosome were conducted to progress breeding of pear through genome studies. The results are as follows; (1) Preparation of good chromosome sample using enzymatic maceration and air drying method was established, (2) The chromosome configuration was elucidated by banding technique using fluorochrome of CMA and DAPI, (3) The gene sites of rDNA and retrotransposons on chromosomes were detected by FISH (fluorescent *in situ* hybridization).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：CMA、FISH、rDNA、蛍光染色、ゲノム、染色体、ナシ、レトロトランスポゾン

## 1. 研究開始当初の背景

わが国において果実は、嗜好品的側面が強調されていたが、本来、機能性成分の供給源であり、健康な生活には必須の食品である。このため、機能性に優れ、高品質で栽培容易な新品種の育種が目標とされている。しかし、

果樹は遺伝的にヘテロ性が強く、幼若期間が長いと、従来の育種法の効率は低く、より優れた育種技術の開発が求められている。

一方、近年の生物学におけるゲノム研究の進展は著しく、農学分野でのイネゲノム研究における全ゲノムの解析は、食糧生産技術開

発における新たな展開を可能にした。果樹においても、効率的かつ画期的な育種技術の開発を目指して、カンキツやブドウ等の主要果樹においては国際的な連携のもと、ゲノム研究が実施されている。しかしナシは世界的に主要な果樹であるにもかかわらず、海外ではゲノム研究の主要な対象となっていない。わが国においてニホンナシはカンキツ、リンゴに次ぐ生産量の果樹である。そのため、組織的に育種研究が進められており、その材料および知見を利用しつつ独自にゲノム研究を進展させ、連鎖地図の作成、耐病性遺伝子の解析等、様々な成果をあげつつある。

ゲノム研究が進展しているイネゲノム研究や医学分野でのヒトゲノム研究では、遺伝子だけを研究対象とするのではなく、遺伝子の担体である染色体、および染色体上での遺伝子の解析も進んでいる。ある種の疾病や特性は染色体構造の変化が原因となっている場合も多く、遺伝子だけでなく染色体を解明することはゲノム研究の発展にとっては極めて重要である。ヒトでは多色 FISH により全 23 対の染色体が識別可能であり、イネでは染色体上における有用形質等の遺伝子の位置が解明されている。しかし、ナシを含めて果樹類ではゲノム研究における染色体研究は進んでいない。

前述の通り、ナシにおいての本格的なゲノム研究はわが国のみで実施されているだけであり、研究の推進は関連分野の国内の研究者が共同で実施する必要がある。遺伝子面では先に記した種々の成果が実りつつあるものの、染色体との関連からの研究は進んでおらず、早急に研究に着手する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究はナシにおけるゲノム研究を利用した画期的な育種技術の開発のため、染色体

の面から解明を行う。研究の内容は以下の通りである。

(1) ナシにおける酵素解離法による染色体標本作製技術の確立。

(2) 蛍光色素を用いた分染による染色体の識別。

(3) リボゾーム遺伝子の FISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) による染色体の識別・同定。

(4) FISH による各種遺伝子の染色体上での可視化。

## 3. 研究の方法

(1) ナシにおける酵素解離法による染色体標本作製技術の確立

ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) ‘おさゴールド’ の自然交雑した果実の種子をシャーレに播種し、暗黒下で発根させた実生根端を材料とした。材料は採取後、直ちに 10℃、2mM、8-ヒドロキシキノリンで 4 時間前処理した。染色体標本は酵素解離法により作成した。酵素の組成、濃度、処理時間等は以下の通りである。①4%セルラーゼオノズカ RS、1.5%マセロザイム R200 および 0.3%ペクトリアーゼ Y-23 で 37℃、60 分、②4%セルラーゼオノズカ RS、1.5%マセロザイム R200 および 0.3%ペクトリアーゼ Y-23 で 37℃、80 分、③4%セルラーゼオノズカ RS、および 1%ペクトリアーゼ Y-23 で 37℃、60 分、④4%セルラーゼオノズカ RS、および 1%ペクトリアーゼ Y-23 で 37℃、120 分、⑤4%セルラーゼオノズカ RS、および 1%ペクトリアーゼ Y-23 で 37℃、180 分。染色体標本はギムザ液で染色して観察した。

(2) 蛍光色素を用いた分染による染色体の識別

ニホンナシ (*P. pyrifolia*) の ‘おさゴールド’、‘新高’、‘埼玉 8’、セイヨウナシ (*P. communis*) の ‘マックス・レッド・バートレ

ット’、‘ラ・フランス’、チュウゴクナシ(*P. bretschneideri*)の‘恩梨’、‘鴨梨’、マメナシの‘愛知マメナシ’(*Pyrus calleryana*)、種間雑種の‘岩手7号’(*P. pyrifolia* と *P. ussuriensis* との雑種)、トヨトミナシ(*P. mikawana*)を供試した。いずれも自然交雑した果実の種子をシャーレに播種し、暗黒下で発根させた実生根端を材料とした。材料の前処理法は(1)と同様である。染色体標本は酵素解離法により作成した。ギムザ染色で染色体像の位置を確認した後、脱染し、 $0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ のCMAおよび $1.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ のDAPIで染色した。CMA染色像はBV励起、DAPI染色像はUV励起により観察した。‘おさゴールド’の一部の染色体はさらにPI染色( $12.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )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、PI染色像はG励起により観察した。‘

(3)リボゾーム遺伝子のFISH(蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション)による染色体の識別・同定

ニホンナシ(*P. pyrifolia*)‘おさゴールド’、セイヨウナシ(*P. communis*)‘ラ・フランス’およびトヨトミナシ(*P. mikawana*)の自然交雑実生を供試した。材料の調整、染色体標本の作製は(2)と同様である。

FISHは以下の通り実施した。プローブとしてコムギ由来の18S-5.8S-25SrDNAおよびPCR法によって得た5SrDNAを用いた。rDNAはフルオレセイン(FITC)ーアビジン結合体によって検出し、染色体はPIまたはDAPIで対比染色した。FITCはB励起で観察した。

さらに5SrDNAおよび18S-5.8S-25SrDNAを用いてマルチカラーFISH(McFISH)も実施した。18S-5.8S-25SrDNAはテキサスレッドージゴキシングニン結合体によって検出した。FITC(5SrDNA)およびテキサスレッド(18S-5.8S-25SrDNA)はそれぞれBおよびG

励起で観察した。

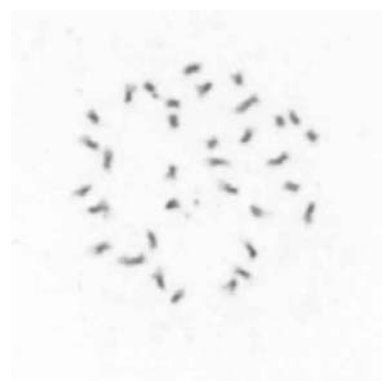
(4)FISHによる各種遺伝子の染色体上での可視化

ニホンナシ(*P. pyrifolia*)‘おさゴールド’染色体上における  *copia* 型トランスポゾン の位置をFISHにより解明した。FISHの方法は(3)と同様である。

#### 4. 研究成果

(1)ナシにおける酵素解離法による染色体標本作製技術の確立

実験条件①で比較的良好な染色体標本が作製できたが、細胞質が若干残る場合があった。それを解決するために反応時間を60分から80分に延長した②を実施したところ、細胞質を完全に除去することは可能であったが、一部の染色体が欠けてしまった。そのため、酵素組成を変更した③~⑤を実施した。その結果、③および④では細胞質が残ってしまったが、⑤では細胞質がほぼ除去できた良好な染色体標本が得られた。染色体の散在程度、染色体の長さ等も満足できるものであり、以下の実験では原則としてこの⑤の条件で染色体標本作製した(第1図)。



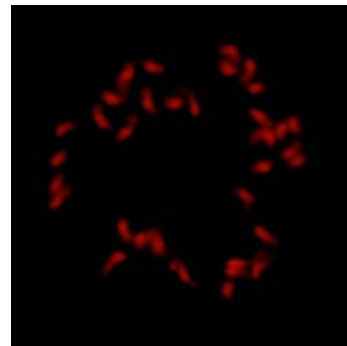
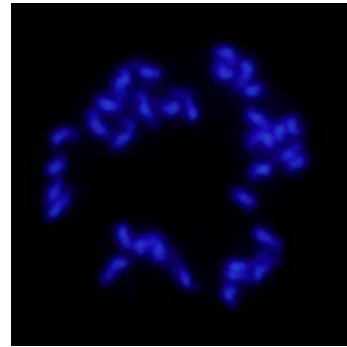
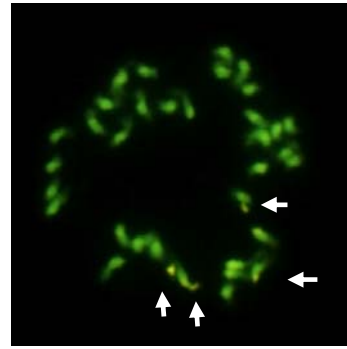
第1図 ニホンナシ(*P. pyrifolia*)‘おさゴールド’の染色体(4%セルラーゼオノズカRS、および1%ペクトリアーゼY-23で37°C、180分処理。ギムザ染色)

(2) 蛍光色素を用いた分染による染色体の識別

‘おさゴールド’染色体に CMA 染色を行うと、各 4 本の染色体の端部に CMA+バンドが確認できた。核板によって、この CMA+が 1~3 本の付随染色体として確認できるもの、付随染色体が確認できないものがあった。DAPI 染色すると CMA+部分の染色は不良で、DAPI-バンドとみなせた。PI 染色では、バンドは確認できなかった。CMA がグアニンおよびシトシンに特異的、DAPI がアデニンおよびチミン特異的、PI が塩基特異的でないことから、この CMA+バンド領域は、DNA 量が多いのではなく、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、CMA+バンドの種・品種間差異を検討することを目的に、‘おさゴールド’以外に 6 種 9 品種を供試した。いずれの種・品種においても染色体数は 34 本(2n=34)であり、CMA+は 4 本の染色体の端部に出現した。‘おさゴールド’同様、CMA+が付随染色体上に観察できる核板も多数得られた。

本研究では、材料として自然交雑実生を用いたため、いずれも原品種の遺伝子型とは厳密には異なるものの、染色体の CMA+バンド領域の位置および数に、種・品種間差異は認められなかった。このことから、ナシにおいては、種を通して CMA+が 4 本の染色体の端部に存在する共通のバンドパターンを備えることが解明でき、CMA バンドパターンの面からは、染色体の種・品種間の均一性が高いことが推察できた。



第 2 図 ニホンナシ(*P. pyrifolia*) ‘おさゴールド’の染色体の CMA(上)、DAPI(中)、PI(下)染色像、矢印は CMA+バンド

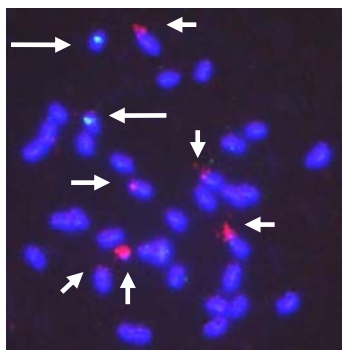
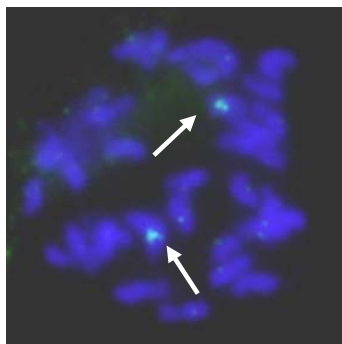
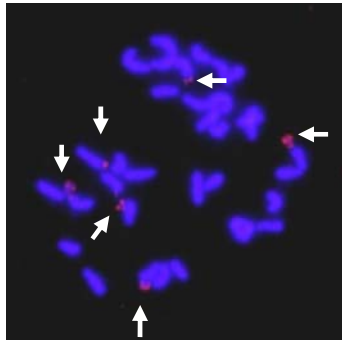
(3) リボゾーム遺伝子の FISH(蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション)による染色体の識別・同定

供試した 3 種のナシにおいて 18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子は、6 本の染色体の端部に確認できた(第 3 図)。6 か所の 18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子のうち、4 か所は CMA+/DAPI-バンドの位置と一致した。

‘おさゴールド’およびトヨトミナシの 5S rDNA 遺伝子は、2 本の染色体の動原体近傍に

確認できた (第3図)。

McFISHによって、5SrDNAと18S-5.8S-25S rDNA遺伝子の同時検出を実施すると、18S-5.8S-25SrDNA遺伝子が存在する6本の染色体には、5SrDNA遺伝子は検出されず、両者の遺伝子は別の染色体上に存在することが解明できた。この結果によってナシ染色



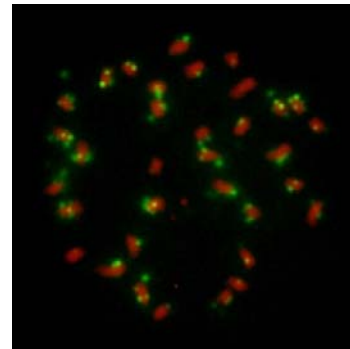
第3図 ナシにおけるrDNAのFISH、上および中：おさゴールド、下：トヨタミナシ、上：18S-5.8S-25SrDNA、中：5SrDNA、下：18S-5.8S-25SrDNAおよび5SrDNA、短矢印：18S-5.8S-25SrDNA、長矢印：5SrDNA

体34本(17対)中8本(4対)の染色体でrDNA遺伝子が確認でき、rDNA遺伝子の存在しない26本の染色体と明確に区別できた。

ナシ同様バラ科ナシ亜科に属し、染色体数もナシと同数のリングにおいては、5SrDNA遺伝子は2本の染色体の動原体近傍に、18S-25SrDNA遺伝子は8本の染色体の端部に確認されている。このように、ナシとリングのrDNA遺伝子の位置・数はほぼ一致し、両者の染色体構成の高い相同性を推察することができた。

#### (4) FISHによる各種遺伝子の染色体上での可視化

ニホンナシから単離されたCopia型レトロトランスポゾンPpcrtをプローブとしたFISHを実施した結果、遺伝子は集中して存在するのではなく、散在して検出された(第4図)。これはナシにおけるレトロトランスポゾン遺伝子の存在する部位を可視化した最初の研究であり、ナシ染色体およびゲノム情報の理解に貢献する成果である。



第4図 FISHによるニホンナシ染色体上のCopia型レトロトランスポゾン遺伝子Ppcrtの検出、緑色シグナル：Ppcrt

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

① Yamamoto, M., Takada, N., Yamamoto, T., Terakami, S., Shigeta, N., Kubo, T. and

Tominaga, S.: Fluorescent staining and fluorescence *in situ* hybridization of rDNA of chromosomes in pear (*Pyrus* spp.). Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 81(1), 35-40 (2012) 査読有

② Kim, H., Yamamoto, M., Hosaka, F., Terakami, S., Nishitani, C., Sawamura, Y., Yamane, H., Wu, J., Matsumoto, T., Matsuyama, T. and Yamamoto, T.: Molecular characterization of novel Ty1-*copia*-like retrotransposons in pear (*Pyrus pyrifolia*), Tree Genetics & Genomes, 7, 845-856 (2011) 査読有

③ Yamamoto, M., Terakami, S., Yamamoto, T., Takada, N., Kubo, T. and Tominaga, S.: Detection of the ribosomal RNA gene in pear (*Pyrus* spp.) using fluorescence *in situ* hybridization. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 79(4), 335-339 (2010) 査読有

④ Yamamoto, M., Takada, N., Hirabayashi, T., Kubo, T. and Tominaga, S.: Fluorescent staining analysis of chromosomes in pear (*Pyrus* spp.). Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 79(1), 23-26 (2010) 査読有

[学会発表] (計3件)

① 山本雅史・高田教臣・山本俊哉・寺上伸吾・滋田徳美・久保達也・富永茂人. ナシ(*Pyrus* spp.)における染色体の蛍光染色およびリボゾームDNAの蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション. 園芸学会平成23年度春季大会. 2011年3月20日. 宇都宮大学.

② Hoytaek Kim・山本雅史・保坂ふみ子・寺上伸吾・西谷千佳子・澤村 豊・松山知樹・

山本俊哉. ニホンナシにおける *copia* 型トランスポゾンの発現と系統解析. 園芸学会平成22年度春季大会. 2010年3月22日. 日本大学.

③ 山本雅史・高田教臣・平林利郎・久保達也・富永茂人. ナシ(*Pyrus* spp.)における染色体の蛍光染色. 園芸学会平成21年度春季大会. 2010年3月20日. 明治大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本雅史 (YAMAMOTO MASASHI)

鹿児島大学農学部・准教授

研究者番号: 00305161

### (2) 研究分担者

山本俊哉 (YAMAMOTO TOSHIYA)

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・研究チーム長

研究者番号: 60355360

高田教臣 (TAKADA NORIO)

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・主任研究員

研究者番号: 50355369