

ニホンナシにおけるフィンガープリント分析

寺 本 さ ゆ り

(農林水産省果樹試験場)

は じ め に

ナシ、特にニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) の品種の同定は困難である。ニホンナシは、通常、新芽の性状、花および果実の形態、樹形から品種を同定するが、栽培品種の同定は非常に難しい。これは近代の交雑育種の中で近親交配を幾度も重ねたため(図1)、品種が外見的によく似ているためである(梶浦・佐藤 1990)。また、一般に果樹は、休眠、幼若性などの木本に特有の性質のために、結実し、品種の特性が現れるまで最低5年以上の年月が必要である。このことは育種年限の長大化をもたらし、新設果樹園での品種の選定はしばしば生産者のリスクを招くことがあり、種苗販売時のトラブル

も起こしている。このような現状から、多くの果樹研究者がさまざまな観点から簡易で迅速な品種判定の可能性を模索して来たが、果樹ではこれといった確実な手法がなかった。しかし、現在ヒトで個体識別に用いられている DNA フィンガープリント法を果樹に応用することにより、確実に品種判定ができることが示唆された(寺本ら 1991; 寺本 1992)。

遺伝子 (DNA) は、ひとつの種 (species) の中でほとんどの部分が同じであるが、個体ごとに少しずつ違った配列 (部分) を持つ。また、同一個体内の全ての細胞は全く同じ一揃いの DNA を持っている。このことは、遺伝子が葉や根などの部位での差や季節変動がなく、その一生を通じて不変であることを意味する。果樹

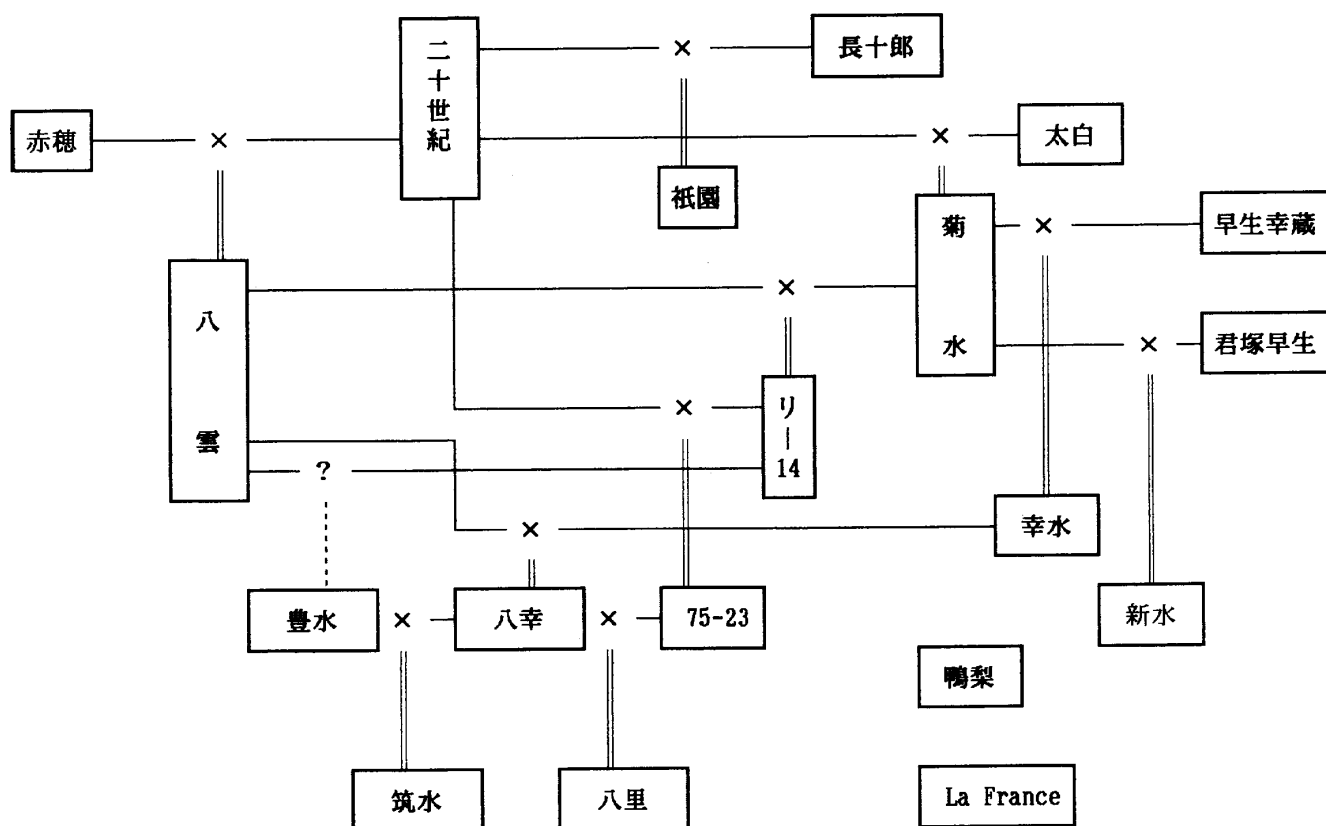


図1. ニホンナシ主要栽培品種の系図

×は交配を示し、その下の二重線は個体選抜を示す。La France はセイヨウナシの一品種であり、鴨梨はチュウゴクナシの一品種である。

の品種 (cultivar) は、通常、接ぎ木または挿し木によって繁殖・維持される一遺伝子由来の集合体 (クローン) であり、個々の個体が保有する遺伝子はまったく同じものである。

遺伝子を用いて品種の判定が出来るなら、実生や若い苗木の状態で品種の同定が可能となり、約5年後に収穫できる目的品種の保証となる。また、育種作業の上では、育種親の確認や遺伝資源として導入した品種の分類にも有効となる。DNA は取り扱い易い安定した化合物であり、アイソザイムなどの酵素のような失活の危険がなく、特別な温度条件や設備を必要としない。このような利点も品種判定に DNA を用いた理由である。

DNA フィンガープリント法

フィンガープリントとは日本語の指紋の意味である。犯罪捜査において指紋が証拠となるように、ここ数年で DNA フィンガープリントも証拠として採用されるようになってきた。人間でも個人毎に少しずつ異なる遺伝子 (DNA) を持っており、主要な遺伝子は皆同じ配列を持っている。正確にはこれらは機能のある遺伝子であり、塩基配列1つの変異や欠落によって先天性あるいは後天性異常が発生する。一方、正常な代謝等を司る遺伝子の他に、ヘテロクロマチンと呼ばれる機能を持たない不用に見える遺伝子が存在する。この遺伝子は、太古の地球に初めて生命が誕生して以来、生物が進化し続けてきた過程で不用になったものと推測されている。原始的なウイルスなどゲノムサイズが小さな生物では機能を持

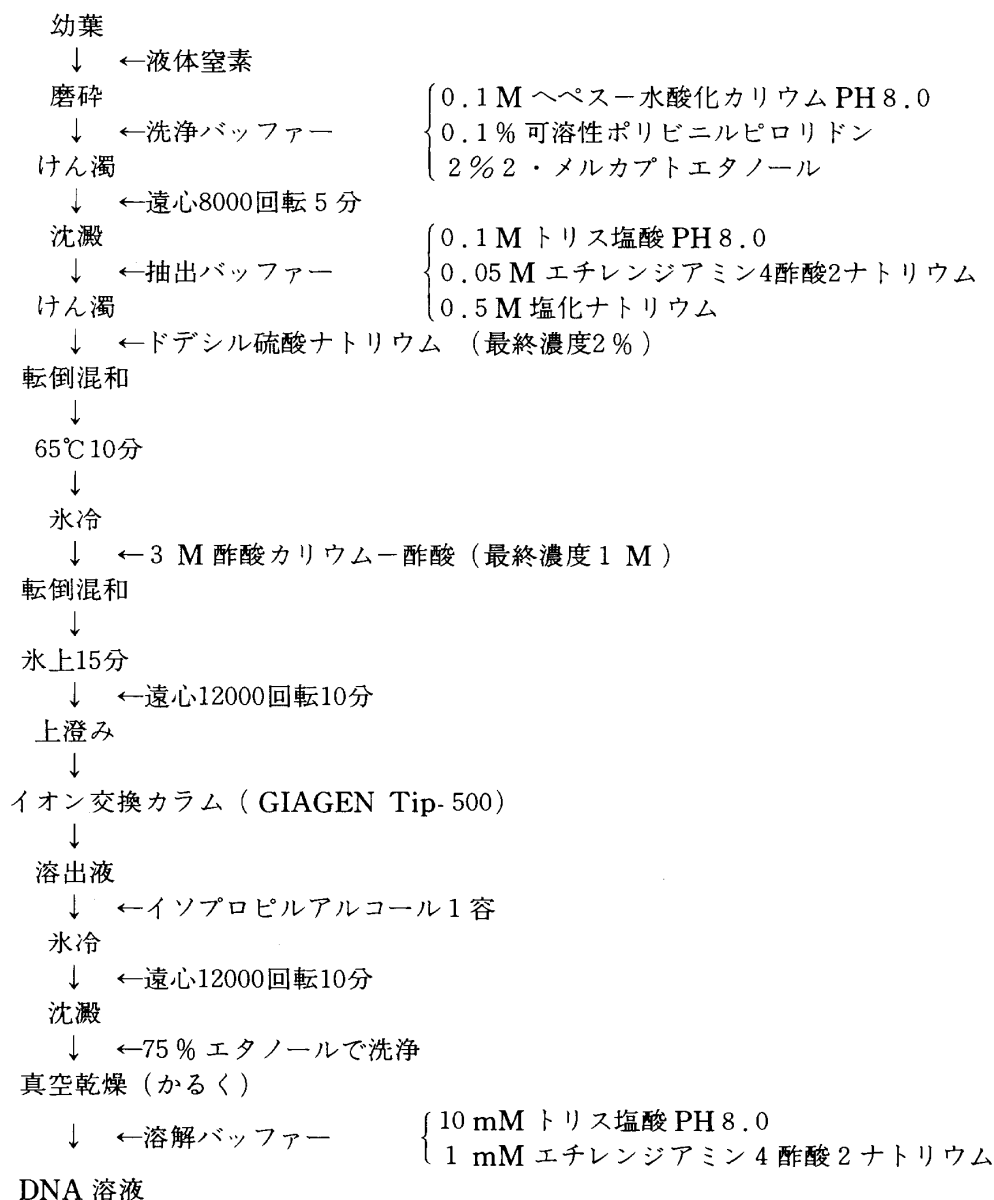


図2. SDS法によるDNAの抽出

たない遺伝子はほとんど存在しない。それどころか同一の遺伝子に複数のタンパク質をコードさせているものすらある。しかし、現在のところ進化の頂点にあるヒトに到っては約9割の遺伝子が機能を持たない遺伝子とされている。これらのうち、特に繰り返し配列と呼ばれる数十の塩基対を繰り返すものをミニサテライト DNA といひ、おもに前述のヘテロクロマチン部位に存在する。そして、その繰り返し数と染色体上の位置は個人によって異なる部位に存在することがわかっている (Alberts et al., 1989)。この繰り返し回数と染色体上の位置を検出するのが DNA フィンガープリント法であり、これから得られるパターンは個体に特有であり、個々の特徴はメンデル遺伝することがわかっている。この手法を最初に発明したのは英国の Jefferys et al. (1985 a,b) のグループである。彼らはヒトでの個体判別用の DNA プローブを作成する研究を重ね、現在、各国で特許も獲得し、犯罪捜査に実用化されるまで技術的に完成させている。ヒトに始まったこの手法は、そのほかの動物 (Kuhnlein et al., 1989) や植物 (Dallas, 1988; Matsuyama et al., 1992; Nybom 1990; Nybom & Schaal 1990 a,b; Nybom et al., 1989, 1990) でも応用され、利用範囲は考古学・動物行動学・血統証明・法医学など多岐に渡っている (木南 1989 a,b)。

ニホンナシにおける DNA フィンガープリント作成

DNA フィンガープリントの作成には、まず DNA を抽出しなければならない。ナシ属 (*Pyrus* L.) では、この DNA 抽出が最初の重要な関門となった。草本の数十から数百倍の年月を生きる果樹 (木本) は、それなりに生体防御システムが充実している。その主役はリグニンやポリフェノールなどの多糖類である。この多糖類は構造的にデオキシリボース (六炭糖) のポリマーである DNA と同じ仲間であり、精製の過程で同じ挙動を示すことが多い。しかし、DNA は細胞膜のさらに内部の核膜内に収納されており、それぞれの多糖類を組成する分子のイオン強度が異なる。この差異を利用することによってナシでは非常に純度の高い DNA を抽出できた (図2)。この抽出法はいわゆる SDS 法を修正したものであるが、若いナシの葉およそ 2 g から 500 μ g の DNA を得ることができる。次に、制限酵素の選択および電気泳動の最適条件、バンド検出の条件は、ヒトのフィンガープリントでの条件を改良することによって設定した (なお、Jeffreys らの開発したプローブは特許となっており、自由に使用出来ない)。ニホンナシでは、4 塩基認識の制限酵素の選択と低温低電圧でのゆっくりした泳動によって好結果が得られる。ハイブリダイゼーションや検出の条件はヒトとかなり違ったものである。ニホ

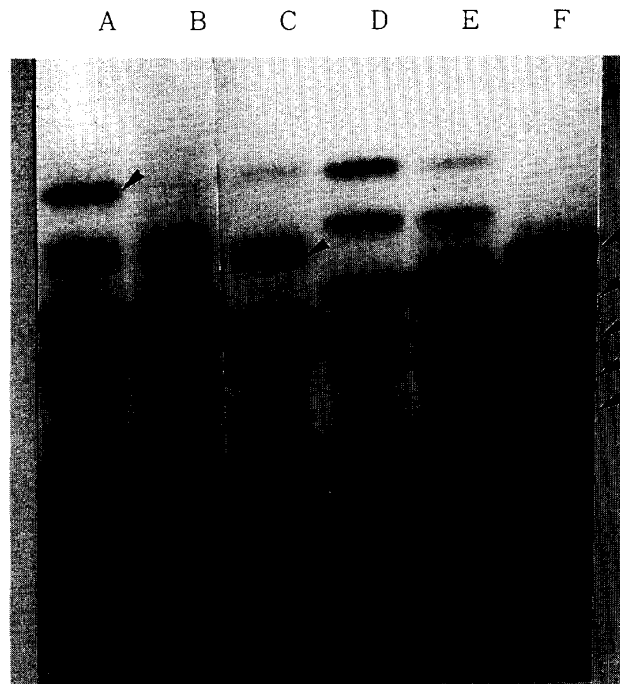


図3. ナシのフィンガープリント (寺本 未発表)

ニホンナシ A: 太白, B: 菊水, C: 長十郎, D: 八雲, E: 二十世紀
セイヨウナシ F: La France
矢印は特徴的に見られるバンドを示す。

ンナシはヒトでは考えられない程血縁関係が濃いものが多い (図1), 主要品種を判別するのは相当難しいと予想されたが、ヒトで用いられているミニサテライト配列を持つプローブ (コア・シーケンスは10-30 mer) がニホンナシにも応用できた (寺本 1992)。このことは、ヒトの個体判別の手がかりとなった配列と同じような配列がニホンナシにも存在することを意味する。

ニホンナシは古くより日本各地で栽培されており (梶浦・佐藤 1990), 品種として残っているものは遺伝的にも相当均一であると考えられる。そのうえ、近代に入ってから交雑育種ではほとんどが‘二十世紀’と交配または戻し交配されて育成されたため、現在の栽培品種は非常に血縁関係が濃い。この関係をフィンガープリントパターンで見ると (図3), 在来の品種である‘太白’, ‘二十世紀’, ‘長十郎’には、かなりのパターンの差異が見られるが、交配品種である‘菊水’と‘八雲’では在来品種にあるバンドのパターンが変化しただけのように思われる。このパターンはメンデル遺伝するため、ニホンナシの栽培品種は相互に血縁が濃いことがわかる。また、ニホンナシはナシ属やリンゴ属と交配可能であるが、セイヨウナシ (*P. communis* L.) では、フィンガープリントバンドのパターンが全く違い、セイヨウナシはニホンナシと交配可能であっても、系統としては離れていることが示唆された。また、親子判定は、子に存在するバンドが全て両親のどちらかに存在すること

から証明可能であると考えられた。

今後の展望

遺伝子を調査する DNA フィンガープリント法には、電気泳動とプローブによる手法の他に、PCR (Polymerase Chain - Reaction) による技術がある (Maniatis et al., 1989)。ここ数年の PCR 技術の発展は目ざましく、今後より有利で簡易な個体判別法として開発されていくと思われる。

ここで述べた DNA フィンガープリント法も新しい技術である PCR 法のどちらもバーコード様のバンドパターンでさまざまな判定を行うことから、種や品種の情報をデータベース化することが容易である。すでに情報化のための専用ソフトも開発されてきている。近い将来にフィンガープリント法が検出技術と情報化・解析ソフトの両面から実用化されれば、品種分類・育種・遺伝資源管理・種苗法の効率的運用などさまざまな分野での応用が期待できると思われる。

引用文献

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J.D. Watson 1989. Molecular Biology of the Cell (2nd eds.). Garland, New York.
- Dallas, J.F. 1988. Detection of DNA fingerprints of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 6831-6835.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson & S.L. Thein 1985a. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. Nature 314 : 67-73.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson & S.L. Thein 1985b. Individual specific fingerprints of human DNA. Nature 316 : 76-79.
- 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 果樹試験場報告特別報告 1 : 1-329.
- 木南凌 1989a. ミニサテライトを用いた DNA フィンガープリント法 実験医学 5 : 1041-1046.
- 木南凌 1989b. 個人識別と遺伝子診断におけるミニサテライトの応用 実験医学 7 : 128-132.
- Kuhnlein, U., Y. Dawe, D. Zadworny & J.S. Gavora 1989. DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. Theor. Appl. Genet. 77 : 673-679.
- Maniatis, T., J. Sambrook & E.F. Fritsch 1989. Molecular Cloning (2nd ed.). Cold Spring Harbor, New York.
- Matsuyama, T., R. Motohashi, T. Akihama, M. Omura, Y. Komatsu & Y. Kikuchi 1992. DNA fingerprinting in *Citrus* cultivars. Jpn. Jour. Breed. 42 : 155-160.
- Nybom, H. 1990. Genetic variation of ornamental apple trees and their seedlings (*Malus*, Rosaceae) revealed by DNA fingerprinting with the M13 repeat probe. Hereditas 113 : 17-28.
- Nybom, H., S.H. Rogstad & B.A. Schaal 1990. Genetic variation detected by use of the M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus* and *Rubus* (Rosaceae). Theor. Appl. Genet. 79 : 153-156.
- Nybom, H. & B.A. Schaal 1990a. DNA "fingerprints" applied to paternity analysis in apples (*Malus* × *domestica*). Theor. Appl. Genet. 79 : 763-768.
- Nybom, H. & B.A. Schaal 1990b. DNA "fingerprints" reveal genotypic distribution in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae). Amer. Jour. Bot. 77 : 883-888.
- Nybom, H., B.A. Schaal & S.H. Rogstad 1989. DNA fingerprints can distinguish cultivars of blackberries and raspberries. Acta Horticulture 262 : 305-308.
- 寺本さゆり 1992. DNA フィンガープリント法を用いたナシ品種の同定 Brain Techno News 29 : 3-5.
- 寺本さゆり・村上ゆり子・保里昌彦・神山清文 1991. DNA フィンガープリント法を用いたニホンナシ品種の同定 園芸学雑誌別冊 60(2) : 174-175.