

カケガワザクラの起源を探る

SSR 遺伝子長によるサクラの系統解析

静岡県立掛川西高等学校 自然科学部 チームケラスス

2 年 岡本海 三澤恒汰 山下拓海

1 動機

2015 年 1 月の始業式、校長先生のお話で初めてカケガワザクラの存在を知った。このサクラは、カンヒザクラとヤマザクラの自然交配によって生じた新品種とされるが、DNA 解析からその成立は解明されていない。また、形質が似通ったカワヅザクラやシュゼンジベニカンザクラと同じ品種なのではないかという声も上がっていた。

今年度は、先輩方による昨年度の研究を引き継ぐ形で研究を始めた。

2 昨年度の研究

静岡県内で既に行われていた先行研究を参考に、サクラの SSR (単純反復配列) 遺伝子長を比較することで系統解析を行った。先行研究で用いられていた高価な機材・薬品は使えなかったため、ゲンジボタルの DNA 解析で行っていた電気泳動法で解析を行った。しかし、DNA の抽出が難しく、PCR 法 (ポリメラーゼ連鎖反応法) による DNA の増幅もできず失敗した。試行錯誤の結果、高性能なポリメラーゼ酵素を用いた方法で増幅させることができた。

カケガワザクラの親の判定に有効と考えた 5 種類の SSR 遺伝子座を選び出し、カケガワザクラ・カンヒザクラ・カワヅザクラ・シュゼンジベニカンザクラの系統解析を行ったところ、すべての SSR 遺伝子座において、カケガワザクラの SSR 遺伝子長とカンヒザクラがホモ (対) にもつ SSR 遺伝子長が一致した。このことから、カケガワザクラの片親はカンヒザクラである可能性が高いことがわかったが、もう一方の片親を見つけるには至らなかった。

〈SSR 遺伝子とは〉

SSR (simple sequence repeat) 遺伝子とは多くの生物の核 DNA に見られる単純塩基配列を示す。マイクロサテライト、STR (short tandem repeat) と呼ばれることもある。多くはタンパク質をコードする遺伝子 DNA と続く別の遺伝子 DNA の間に存在するスペーサーと呼ばれる部分に見られるもので、働きや成り立ちについてはよくわかっていない。この DNA が親から子供に伝わる際、メンデル則に従って遺伝することため、親子鑑定や類縁関係を調査する際によく使われる。タンパク質をコードしていないため本来遺伝子ではないが、便宜的に SSR 遺伝子という言葉を使っている。

3 今年度の研究方針

2016 年の研究を始めるにあたり、どのような方針で研究を進めていくのか考えた。まず最初に考えたことは、カケガワザクラと同じ遺伝子を持つサクラを探すことである。サクラは自家不和合性を持つため、種子によって同じ品種を増殖させることはできない。このため、一般に販売されているサクラは全て接ぎ木で作られている。発見者からの聞き取り調査から、カケガワザクラが苗木業者から納入されたことがわかったため、カケガワザクラと同じ品種のサクラがどこかに存在する可能性は高いと考えた。方向性として、カケガワザクラに似た形質を持つサクラを数多く調査して、同じ遺伝子を持つものがないかどうか調べる方法が一つ考えられた。

もう一つの方向性は、片親がカンヒザクラであることがほぼ明らかであるため、もう一方の親とし

て考えられるサクラを探すことである。しかし、この親となったサクラは野生のサクラである可能性もある。自家不和合性から、野生のサクラは1本1本異なった遺伝子を持っている。原木がどこできたものかもわからない状況でこの調査を行うとなると、全国に存在する全てのサクラの遺伝子調査をしなければならない。これは不可能なことである。

この2つの方向性を考えたが、後者はほぼ不可能であるため前者の方法を採った。

4 実験方法

(1) 試料のサクラ

カケガワザクラ・カワヅザクラ・シュゼンジベニカンザクラ・カンヒザクラに加え、片親がカンヒザクラとされているものの中から、カケガワザクラと開花時期・花色・花弁数が類似した、ミヤビザクラ・テンニンフジ・アタミザクラ・ゴテンバザクラ・ヨウコウ・アカンジュを試料とした。カケガワザクラは、2016年4月に原木の接ぎ木から採取した若葉を試料とした。アタミザクラ・ヨウコウ・ミヤビザクラ・ゴテンバザクラはホームセンターで苗を購入し、学校に植えている。また、苗が入手できなかったカワヅザクラ・シュゼンジベニカンザクラ・カンヒザクラは遺伝学普及会から、テンニンフジ・アカンジュは日本花の会結城農場から譲っていただいた。

(2) DNAの抽出・精製(写真1)

- ① サクラの若葉(約3mm角)にUniversAll™Extraction Buffer II(簡易DNA抽出試薬)50 μ lを加えバイオマッシャーIIで約10分間ホモジェナイズする。
- ② インキュベーターで10分間加熱(95℃)する。
- ③ 遠心分離機(写真2)にて、15,000rpmで10分間遠心分離を行う。
- ④ 遠心分離した溶液から上澄み液を吸い取る。
- ⑤ 滅菌水で10倍に希釈したものを試料とする。
(説明書に従い1倍と10倍、100倍希釈を試した結果、10倍で最もDNAの増幅が確認されたため10倍希釈とした。)



写真1 DNAの抽出



写真2 遠心分離機

(3) DNAの増幅

- ① Quicktaq(東洋紡)を含むPCR溶液(表2)を製作する。
- ② PCR溶液47 μ lと試料液1 μ l, プライマー2 μ lを混合する。
- ③ 約3時間PCR法でDNAを増幅する。

PCR温度サイクル			①⇒(②~④)×35⇒⑤
	温度(℃)	時間(秒)	PCR反応
①	94	120	熱変性-全DNAを一本鎖にする
②	98	30	熱変性-全DNAを一本鎖にする
③	57	30	アニーリング-変性したDNAにプライマーが結合する
④	68	60	伸長反応-DNAポリメラーゼにより目的のDNAを複製する
⑤	68	420	残りの伸長反応を行う

表1 PCR 温度サイクル



写真3 サーマルサイクラー

薬品	分量(μl)
Quicktaq	25
D.W.	22
プライマー(F+R)	2
DNA	1
Total	50

表2 PCR 溶液組成



写真4 アガロース S〈錠〉

- (4) ゲルの製作およびアガロースゲル電気泳動
- ① アガロース S 〈錠〉 (ニッポンジーン, 写真4) を TAE バッファー 33ml に一錠入れ室温で固形物がなくなるまで放置する。
 - ② 105°C で 1 分間オートクレーブする。
 - ③ オートクレーブしたものに GelRed を 1 μl 加え混合する。
 - ④ ゲルトレーに入れ, ゲルを固める。
※DNA の分子量が小さいことから, アガロースゲルの濃度は 1.5% としている。
 - ⑤ 100V で約 30 分間電気泳動する。



写真5 横型電気泳動槽

- (5) ポリアクリルアミドゲル電気泳動
- ① 縦型電気泳動槽 (写真6) にトリス・グリシンバッファー (表3) を浸し, ポリアクリルアミドゲルをセットする。
 - ② 増幅後の DNA および 20bp ラダーマーカー 3 μl をそれぞれローディングバッファー 1 μl を混合し, 2 μl ずつウェルにアプライする。
 - ③ 100V (50V) で約 30 分間電気泳動する。



写真6 縦型電気泳動槽

- (6) DNA 長読み取りの為の操作
- ① 泳動後のポリアクリルアミドゲルを, GelRed で約 30 分~40 分間染色する。
 - ② ゲルに紫外線を当て, 蛍光したものをマクロレンズを使ったデジタルカメラで撮影する。
※DNA は常温で分散するため, 長時間経過するとバンドがぼけてしまう。このため, 撮影は染色終了後すぐに行った。

薬品	分量(ml・g)
滅菌水	300
Tris	1.38
Glycine	6.48

表3 トリスグリシンバッファー組成

5 結果

(1) 泳動結果

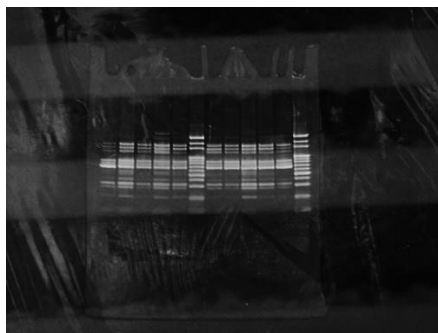


写真7 M9a 座

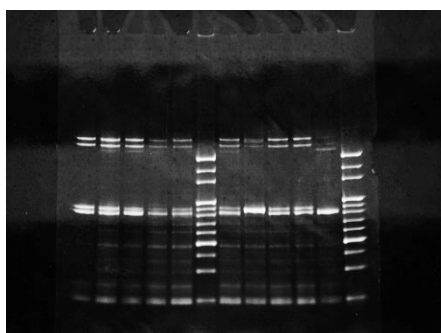


写真8 M13b 座

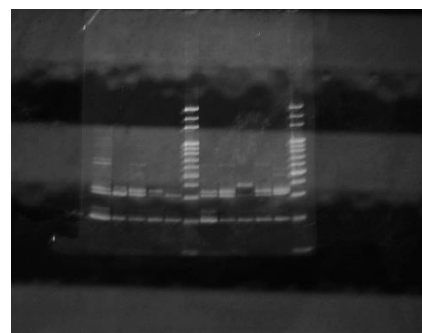


写真9 M4c座

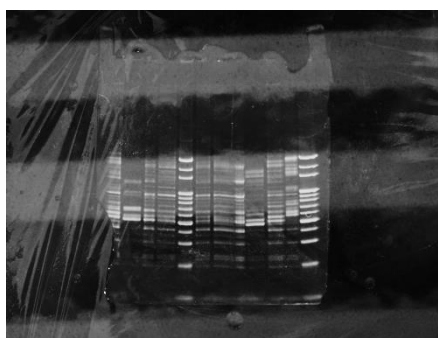


写真10 MA007a 座

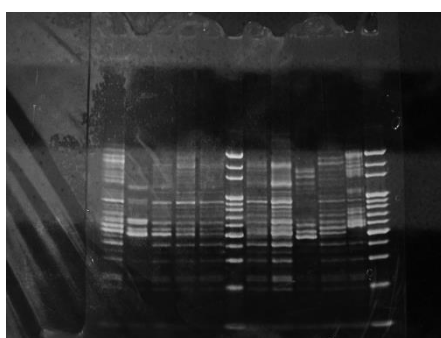


写真11 PMS67 座

(2) DNA 長の比較

泳動結果の一例から、カケガワザクラの遺伝子長と他9品種のサクラの遺伝子長が完全には一致していないことがわかる。また、残りの遺伝子座についても同様の結果が得られた。5種類の遺伝子座において遺伝子長が完全に一致するサクラは無かったことから、「解析したサクラの中にカケガワザクラと同じ品種は存在しない。」という結論が得られた。

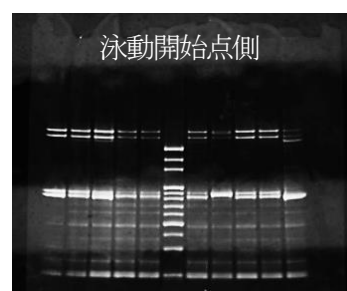


写真12 泳動結果の一例(M13b)

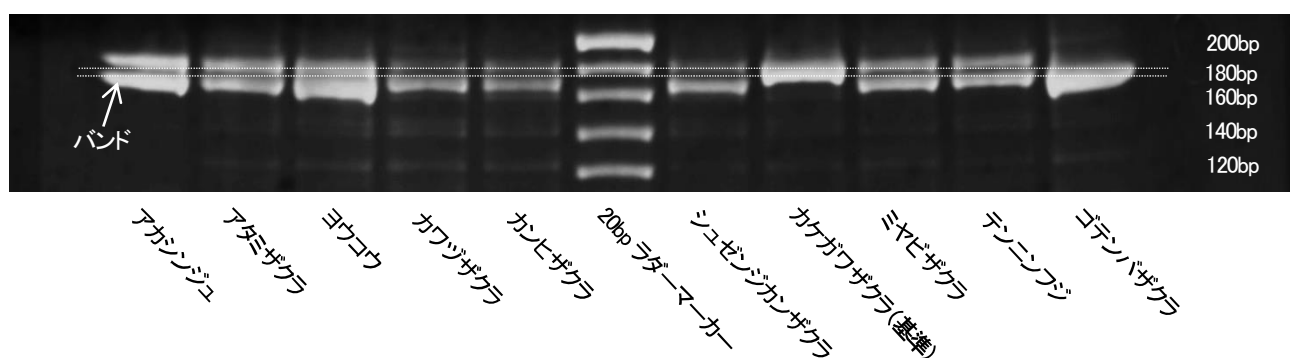
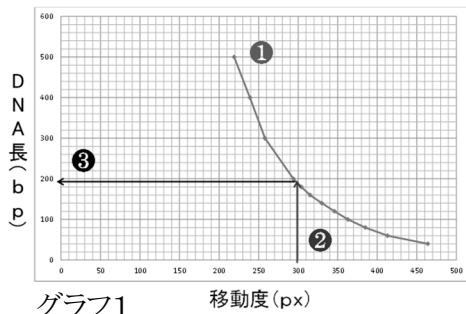


写真13 カケガワザクラのバンドを基準にした各サクラの遺伝子長の比較(写真12より)

(3) 結果の再検証

同時に、泳動結果から各サクラの遺伝子長を割り出す試みを行ったが、結論は変わらなかった。



グラフ1

DNA 長読み取り用折れ線グラフ

(測定方法)

- ① ラダーマーカーから、
DNA 長と移動度の折れ線
グラフをつくる (グラフ 1)
- ② SSR 遺伝子の移動度を測る
- ③ 移動度から DNA 長を割り出す

品種	SSR遺伝子座			単位: bp(塩基対数)	
	PMS67	M13b	M9a	M4c	MA007a
カケガワザクラ	169	177	136	75	99
	162	170	143	66	105
ゴテンバザクラ	195	174	140	75	123
	183	164	148	72	131
テンニンフジ	173	181	138	75	106
	165	167	143	68	116
ミヤビザクラ	167	177	134	85	96
	162	165	143	68	107
シュゼンジ ペニカンザクラ	167	180	136	75	105
	160	165	143	66	115
カンヒザクラ	167	179	138	68	104
	159	165	143	68	115
カワツザクラ	190	178	138	75	103
	159	165	143	68	116
ヨウコウ	190	180	140	77	106
	165	164	145	68	117
アタミザクラ	190	182	143	75	112
	165	169	150	71	119
アカシシジュ	190	184	145	79	116
	169	169	152	72	127

表 4 各サクラの SSR 遺伝子長

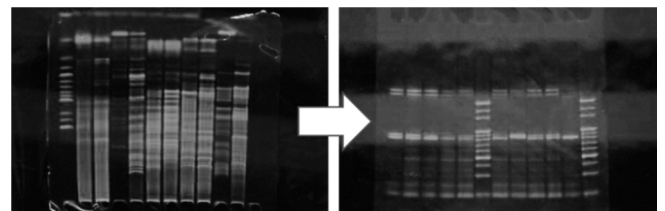
(4) 昨年との比較

昨年の泳動結果と今年のを比べたところ、昨年の結果には不要なバンド (エキストラバンド) が多く出ていたことがわかった。これは、バンドの読み違いが起きていた可能性を示している。エキストラバンドの原因としては DNA の精製ができなかったことが考えられるが、植物 DNA の精製は一般に難しいとされ、昨年は試行錯誤を重ねたものの成功には至らなかった。しかし、今年になって精製を行う DNA 抽出用バッファーが発売されたため、これを用いて再度実験を行ったところエキストラバンドの削減に成功した。

(写真 14・15)

写真 14・15

泳動結果の比較



昨年の泳動結果

今年の泳動結果

6 展望

今回の結果を、先行研究者を行われた太田智主任研究員 (果樹研究所興津拠点) に相談したところ、私たちの行った電気泳動法では、4 bp 程度という無視できない誤差が見込まれるということがわかった。そこで、ゲルからバンドを取り出しシーケンシングにより塩基配列を決定する新しい方法を考えている。

7 参考資料

- ① 掛川桜・品種同定報告書 (公益財団法人 日本花の会)
- ② 遺伝研のさくら (財団法人 遺伝学研究会)
- ③ 日本の桜 (Gakken 増補改訂 フィールドベスト図鑑 VOL. 10)
- ④ このはなさくや図鑑 (<http://www.7b.biglobe.ne.jp/~cerasus/>)
- ⑤ 核および葉緑体 DNA 多型に基づく静岡県伊豆地域のサクラの解析 (園学研 2011, 太田智ら)

8 謝辞

研究の指導をして下さいました太田智主任研究員・掛川市役所様・田旗造園建設様。試料となるサクラを提供して下さいました遺伝学普及会の皆様・日本花の会結城農場様に感謝申し上げます。

