

エクストラバンドの減少に成功した。この結果、危惧していたように、今まで目的の SSR ではない別のものを計測していたことがわかり、これまでの結果は否定された。また、試行錯誤の結果、どんなゲルを使っても平板ゲル電気泳動法では、2bp 程度の DNA 長さの違いを読み取ることはできないことがはっきりした。

4 新たな手法による実験

4-1 分析するサクラの検討

「遺伝研のさくら (資料3)」、「日本の桜 (資料4)」、「このはなさくや図鑑 (資料5)」を参考にして、カケガワザクラと表現形質が近いものを探し出した。具体的には片親がカンヒザクラとされているサクラの中から、①花弁数が5枚の品種、②開花時期が早い品種、③花の色が濃紅色に近い品種を候補とした。この候補の中から、さらに入手できるかどうかを考慮して、従来から実験していたカワヅザクラ、シュゼンジカンザクラに、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・アカシンジュの6品種を加え、カケガワザクラ、カンヒザクラをあわせて合計10品種を対象とすることにした。

新たに選出した6品種のうち、アタミザクラ、ヨウコウ、ミヤビザクラ、ゴテンバザクラは苗を購入した。アカシンジュ、テンニンフジは日本花の会・結城農場から譲っていただいた。カケガワザクラは最初に接ぎ木されたとされる木から採取したものを、カワヅザクラ、シュゼンジカンザクラ、カンヒザクラは先輩が使用、保管していたものを継続して試料とした。

実験対象とした SSR 座は M9a、M13b、M4c、Ma007a、PMS67 である。これは先輩達がそれぞれ有用性が高いとして選んだものであり、そのまま受け継いでいる。

4-2 新たな分析方法の開発

DNAの塩基配列をシーケンサーで解析する際に、シーケンサーから蛍光色素の強度が出力されるが、この出力波形からマイクロサテライトの繰り返し回数を読み取れないかと考えた。「シーケンシングを応用した解析法」と名付け、プライマーの設計から検討してみたところ、M13b座のプライマーをそのまま使
い、Rプライマーをシーケンスプライマーとして使うと、考えていたように読み取れるだろうと予想できた。

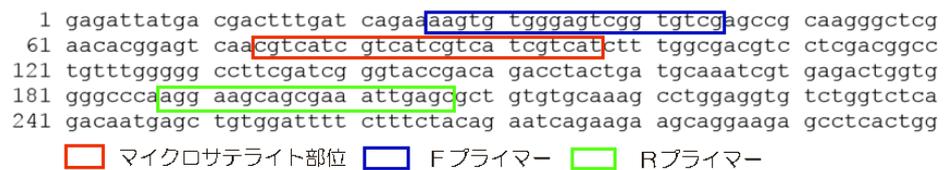


図-3 M13b座のマイクロサテライトとプライマーの位置関係

実際の実験は目的 DNA だけを精製するためにゲルカッターを使って電気泳動ゲルから DNA バンドを切り出し、再度 PCR 増幅したものでシーケンシングを行った。

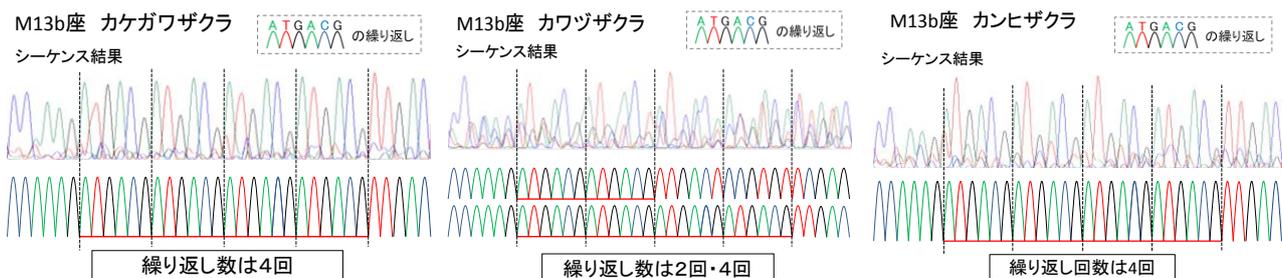


図-4 シーケンス結果から読み取った SSR の波形と繰り返し数

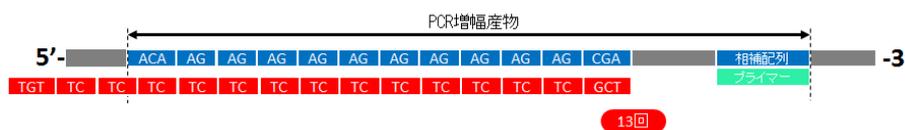
これらの結果からカケガワザクラ、カンヒザクラの M13b 座の繰り返しは4回のホモ、カワヅザクラは2回と4回のヘテロである事が確認できた。丁寧な実験を行う必要があるが、電気泳動の移

動度を数値で計測する必要がない方法であり、解析法そのものが有用であることもわかった。

もうひとつの実験方法として、PCRに使うプライマーに繰り返し配列を組み込んでしまえば、プライマーの選択性で繰り返し数が一致する場合だけPCR増幅が起こるのではないかと考えた。

この方法を「**繰り返し配列プライマーを用いた解析法**」と名付けて実践してみた。

繰り返し回数不一致の場合



繰り返し回数一致する場合

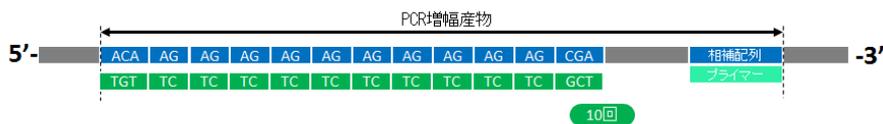


図-5 繰り返し配列プライマーを用いた解析方法

この方法がうまくいけば、DNA増幅したものをシーケンシングしなくても良いことになる。電気泳動だけで結果が求められるので、高校で全ての実験が可能になることから期待が大きかった。

資料6に掲載されていた46のマイクロサテライト座を図-6に示す選出基準をもとに絞り込みを行った結果M4c座が目的に適合していることがわかった

項目	基準
マイクロサテライト座のGC含有率	50%
マイクロサテライト領域の長さの最大	32bp
マイクロサテライト座の反復単位	2bp以上
マイクロサテライト座の反復のパターン	モチーフの単純繰り返し

図-6 マイクロサテライト座の選出基準

実際に28塩基長のプライマーを作成して、実験を行ってみたところ、全てのサクラで11回のプライマーで増幅バンドが生じた。

10回繰り返し 5' - GTT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CGC TTC GTT TCT GT
 11回繰り返し 5' - GTT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC GCT TCC TTT CT
 12回繰り返し 5' - GTT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCG GTT CCT TT
 13回繰り返し 5' - GTT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CGC TTC CT
 14回繰り返し 5' - GTT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC GGT TG
 Rプライマー 5' - GTT GAA TCT AGA TCC ATC TTC GGA ACA CTA GCC CT

図-7 作成したプライマー (35塩基長)

プライマーの特異性が不十分なのではないかと考え再度35塩基長のプライマー(図-7)を合成して実験を試みた。しかし、今度は全ての繰り返しで増幅が起こるようになった。アニーリング温度・伸長時間を変えるなどいろいろな事を行ってみたが、考えたような結果が得られることはなかった。

この頃蛍光プライマーの価格が下がり、1回だけなら予算的に可能であることがわかった。この方法を「**蛍光プライマーを使ったフラグメント解析法**」と呼ぶことにするが、先行研究で行われた方法である。

DNA増幅はFプライマーを蛍光プライマーに交換するだけで、基本的な方法は他の実験と全く同じ方法である。アガロースゲル電気泳動でDNA増幅を確認してフラグメント解析をMacrogen社に依頼した。なお、本来は増幅後に余分なプライマーを除去する操作を行わなければならないが、原理的にプライマーを除去しなくても余分なピークを生ずるだけなので、コストダウンのため余ったプライマーを処

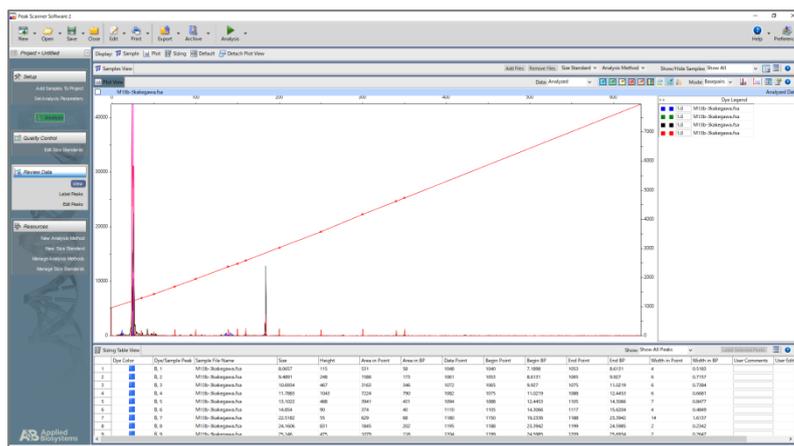


図-8 PeakScanner2を用いたDNA長の測定

理せずにフラグメント解析を行っている。

シーケンス結果は非常に特殊なフォーマットで送られてくるため PeakScanner2 というソフトウェアを使って解析した。図-8は解析の様子である。短いDNAのところには大きなピークが出ているが、これは残りのプライマーである。右側にある 1000 位の高さのピークが増幅したDNAのピークとなる。このDNA長を読み取ることでマイクロサテライトの繰り返しの数を読み取ることができる。

この方法で増幅したDNA長を読み取った。DNA増幅がうまくできず、解析できないデータもあった。

PeakScanner2 から読み取ったデータを表にまとめると図-9になる。シーケンサーを使って分析するが、いくつかの遺伝子長

品種	M4c		Ma007a				M9a		M13b		PMS67	
アカシジユ	59.06	65.45	103.6	107.6	117.7	119.8	135.2	ホモ	171.3	183.1	162.3	180
アタミ	59.09	61.16	102.9	103.7			135.2	137.2	171.4	183.1	164.2	166.2
カケガワ	59.03	65.39	109.7	107.5			135.1	137.3	184	ホモ	162.3	166.3
カワヅ	58.02	64.24	101.8	103.8			135.2	137.1	×	---	162.1	188
カヒ	58.05	ホモ	97.88	103.7			×		174.5	?	162.2	ホモ
ゴテンバ	60.97	65.36	117.6	119.7			135.1	137.3	172.2	ホモ?	173.9	185.8
シュゼンジ	---	---	107.6	109.6			135.3	137.3	---	---	162.3	168.2
テンニンフジ	59.09	65.45	103.7	113.6			135.2	ホモ	---	---	---	---
ミヤビ	---	---	97.9	107.5			135.2	ホモ	---	---	162.3	166
ヨウコウ	---	---	101.7	103.7			135.3	137.3	---	---	162.3	187.9
誤差	±0.4~0.5		±0.4~0.6				±0.3~0.5				±0.3~0.5	

図-9 PeakScanner2 で読み取ったDNA長

マーカーから検量線を作成し、これを使ってDNA長を求めているため、誤差がある。表中の-はDNA増幅がうまくいかなかったもの、×はDNA長が読み取れなかったもの、?は、はっきりとした大きなピークではないものを示している。アカシジユの Ma007a は大きなピークが4つあり、遺伝子重複の可能性はある。

5 考察

図 10 はシーケンシングを応用した解析から得られた M13b の結果である。また図 11 は蛍光プライマーを使った M13b の結果である。

品種	M13b	
カケガワ	4回	ホモ
カワヅ	2回	4回
カヒ	4回	ホモ

図-10 シーケンシングを応用した解析の結果

品種	M13b	
アカシジユ	171.3	183.1
アタミ	171.4	183.1
カケガワ	184	ホモ
カワヅ	×	---
カヒ	174.5	?
ゴテンバ	172.2	ホモ?

図-11 蛍光プライマーを使った解析法の結果

図 11 ではカンヒザクラのデータを除いて、約 12 塩基の違いが見られる。M13b

は 6 塩基 (ATGACG) をモチーフとして繰り返すため 2 回の繰り返しの差であることになる。またカンヒザクラの 174.5 近辺の値はモチーフの 6 塩基から考えて明らかに間違いであることが推定される。

図 10 と図 11 の結果は良く一致していると考えられることから、私達の考えたシーケンシングを応用した解析法は方法論として有用である事が示唆された。

図 12 は図 9 から多くのサクラで解析ができた PMS67 と M9a を取り出してまとめたものである。また、計測誤差を見込んで同じ繰り返し数と考えられるデータを色分けしてある。この結果を見ると、私達が選り出した 8 品種の中に、カケガワザクラと一致する品種が見当たらない。

	PMS67		M9a	
アカシジユ	162.27	179.97	135.17	ホモ
アタミザクラ	164.18	166.17	135.16	137.18
カケガワザクラ	162.28	166.29	135.14	137.26
カワヅザクラ	162.11	187.95	135.16	137.12
カンヒザクラ	162.2	ホモ	—	—
ゴテンバザクラ	173.86	185.78	135.14	137.26
シュゼンジカンザクラ	162.28	168.2	135.26	137.27
テンニンフジ	—	—	135.19	ホモ
ミヤビ	162.26	165.96	135.18	ホモ
ヨウコウ	162.26	187.86	135.25	137.27

図 12 調査した品種の PMS67 と M9a の DNA 長

これはカケガワザクラが新品種である可能性が高いことを示している。今回の調査で入手できな

かった品種もあるが、主要な品種は含まれていることから、カケガワザクラは新品種であるといっ
て間違いないだろう。

「カケガワザ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。」私達はこの言葉を
信じて研究を続けてきたが、今回の調査結果からこの言葉が間違いであることがわかった。

M13b 座を実験の対象とした理由は、「カンヒザクラが他のサクラが持たない独特のDNA長を
ホモに持つ」からであり、「カンヒザクラと同じDNA長をヘテロの一方に持てば、カンヒザクラ
を祖先に持つことは間違いない。」と太田先生に勧められて採用した SSR 座である。

ふたつの異なった実験結果から、カケガワザクラはカンヒザクラと同じように M13 のモチーフ
4 回繰り返しをホモに持っていると考えられる。これは少なくともカンヒザクラとヤマザクラの交
配では起こらない。すなわち、カンヒザクラを含むカンヒザクラ系のサクラと別品種のカンヒザク
ラ系のサクラの交配によって生じたことを意味する。

カケガワザクラの発見者から「九州の苗木業者から仕入れたサクラに混ざっていたもの。」とい
う由来を聞いているが、苗木業者の畑で 2 種のカンヒザクラ系のサクラが交配することは容易に考
えることができる。おそらく起源は九州の苗木業者で間違いないだろう。

4 謝辞・参考文献

今回の研究には、農研機構・果樹研究所興津カンキツ拠点の太田智主任研究員、国立遺伝学研究
所の職員の方々、日本花の会結城農場の職員の方々、静岡大学の徳元俊伸教授、静岡県立大学の河
原崎泰昌准教授、田旗造園建設の職員の方々、掛川市役所の職員の方々と非常に多くの方々にご協
力いただきました。また、顧問の鈴木先生、福田先生、松下先生にも、薬品や機材の購入、放課後・
休日の部活監督、実験方法のアドバイス等をしていただきました。深くお礼申し上げます。

また、この研究は科学技術振興機構「中高生の科学研究実践活動推進プログラム」に参加し、助
成を得て活動をしています。

資料 1 『掛川桜・品種同定報告書』（公益財団法人 日本花の会）

資料 2 『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 2 0 1 1, 太田智ら）

資料 3 『遺伝研のさくら』（財団法人 遺伝学研究会）

資料 4 『日本の桜』（Gakken 増補改訂 フィールドベスト図鑑 VOL. 1 0）

資料 5 『このはなさくや図鑑』（<http://www7b.biglobe.ne.jp/~cerasus/>）

資料 6 The Phylogenetic Study of Japanese Flowering Cherries (Prunus subgenus
Cerasus)(日本産サクラ属サクラ亜属の系統分類学的研究) 2005 The United Graduate School of
Agricultural Science, Gifu University Science of Biological Production (Shizuoka University)
OHTA, Satoshi

資料 7 PRIMER NOTE Microsatellite Markers in peach [Prunus persica (L.) Batsch]
derived from an enriched genomic and cDNA libraries T. YAMAMOTO, K. MOCHIDA, T.
IMAI, Y.Z.SHI, I. OGIWARA and T. HAYASHI