

# 遺伝子組換えを利用したシーベリー雌雄識別 DNA マーカーの開発

朝倉 史明\* 中川 理絵\*\* 河合 義隆\*\*\* 森 直樹\*\*\*\*

## Development of DNA markers to identify sexuality of *Hippophae rhamnoides* L. using recombinant DNA technology

Nobuaki ASAKURA\* Ric NAKAGAWA\*\* Yoshitaka KAWAI\*\*\* Naoki MORI\*\*\*\*

### 1. 緒言

グミ科植物の一種であるシーベリー *Hippophae rhamnoides* L. (図 1) はユーラシア大陸に分布する落葉低木果樹である。*Hippophae* 属植物は 6 種に分類されており、*H. rhamnoides* はさらに 8 亜種に分類されている<sup>[1][2]</sup>。Lian (2003) はさらに新亜種を報告していることから、現在では *H. rhamnoides* には 9 亜種が知られている<sup>[3]</sup>。シーベリーは防風や土壌保全の目的で利用される一方、果実にはビタミン、ミネラル、不飽和脂肪酸などの豊富な栄養素を含んでおり、健康食品としても利用されている<sup>[4][5][6][7][8]</sup>。シーベリーは二倍体 ( $2n=24$ ) の雌雄異株植物(雌花のみをつける個体と雄花のみをつける個体がそれぞれ独立に存在する植物) であり、風媒により種子を着ける<sup>[1][9]</sup>。X/Y 性染色体が関与する機構によって性別が決定すると考えられているが、性分化機構の詳細は不明である<sup>[10][11]</sup>。播種から開花までの 3 から 4 年間は雌雄の識別ができない。育種および果実生産の効率化のために幼苗時での雌雄識別法が求められている。



図 1. 北海道で栽培されているシーベリー

*H. rhamnoides* の雌雄識別に寄与する DNA マーカーの最初の報告は、Persson and Nybom (1998) によるオスに特異的な RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーの OPD<sub>15-600</sub> である<sup>[12]</sup>。その後、Sharma et al. (2010) はオスに特異的な一つの RAPD マーカーを報告し<sup>[13]</sup>、Korekar et al. (2012) は二つのメスに特異的な RAPD マーカーを報告し<sup>[14]</sup>、Das et al. (2017) は一つのメスに特異的な ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) マーカーを報告している<sup>[15]</sup>。最も近年では Zhou et al. (2018) によって一つのメスに特異的な RAPD マーカーが報告されている<sup>[16]</sup>。さらに *H. rhamnoides* の近縁種 *H. salicifolia* においては、Rana et al. (2009) によって一つのメスに特異的な RAPD マーカーが報告されている<sup>[17]</sup>。これらの DNA マーカーのなかには SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) マーカー化されているものもある。

既報の DNA マーカーは各々が使用している材料においては雌雄識別に有効な DNA マーカーであるが、他の系統や品種では機能しないことが多く、私たちが使用している品種 (表 1) について完全に雌雄識別に利用可能な DNA マーカーは存在しなかった (未発表)。そこで本研究では、私たちが見いだした一つの RAPD マーカーである OPAH03-500<sup>[18]</sup> と現在までに SCAR マーカー化されていない OPD15-600<sup>[12]</sup> の SCAR マーカー化を行い、適応範囲の広い、シーベリーの雌雄識別マーカーの開発を試みた。その結果、OPD15-600 由来の SCAR マーカーは私たちが使用している品種 (表 1) において完全に雌雄識別可能なものであった。今回の結果は多くのシーベリーの簡便な雌雄識別を可能にする可能性を示唆しており、今後のシーベリーの育種や果実生産への利用が期待できる。

### 2. 材料と方法

#### (1) 植物材料

四カ国で育成された合計 16 のシーベリーの品種を材料として実験を行った (表 1)。シーベリーの栽培は東京農業大学の厚木キャンパスにおいて行われた。OPAH03-500 のクローニングには Pollmix、Botanitseskaja、Prevoskhodnaya、Leikora を、OPD15-600 のクローニ

\*\*教授 工学部 神奈川大学

Professor, Fac. of Engineering, Kanagawa University

\*\*准教授 工学部 神奈川大学

Associate Professor, Fac. of Engineering, Kanagawa University

\*\*\*教授 農学部 東京農業大学

Professor, Fac. of Agriculture, Tokyo Agricultural University

\*\*\*教授 大学院農学研究科 神戸大学

Professor, Grad. Sch. of Agriculture, Kobe University

ングには Pollmix と Tolme を用いた。

表1. 今回の研究に用いたシーベリーの品種

No.	性別	品種	育成国
1	オス	Tolme	ロシア
2		Tarmo	フィンランド
3		Rudolf	フィンランド
4		Pollmix	ドイツ
5	メス	Sunny berry	ロシア
6		Botanitseskaja	ロシア
7		Otradonaja	ロシア
8		Morimorinaya	ロシア
9		Chuiskaya	ロシア
10		Prevoskhpdnaya	ロシア
11		Tytti	フィンランド
12		Terhi	フィンランド
13		Hergo	ドイツ
14		Leikora	ドイツ
15		Frugana	ドイツ
16		Shiyou	中国

## (2) DNA 抽出、RAPD-PCR と DNA クローニング

5月に採取した若い葉から DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) を用いて各品種の DNA を抽出した。10ヌクレオチドからなる二つのランダムプライマー OPD15 (5'-CATCCGTGCT-3') と OPAH03 (5'-GGTTACTGCC-3') を用いて RAPD-PCR を行った。反応液組成と反応温度については Persson and Nybom (1998)<sup>[12]</sup>に準じた。増幅 DNA 断片は 1.4%アガロースゲルを用いた電気泳動に供試した。DNA の検出にはエチジウムブロマイド溶液 (0.5 µg/ml) もしくは SYBR Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific) を用いた。目的とした DNA 断片はゲルカッターにより切り出し、QIAEXII Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いてマニュアルに従って抽出を行った。抽出した DNA 断片は電気泳動により DNA 断片長と濃度の確認を行った後、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (ThermoFisher Scientific) を用いてマニュアルに従ってクローニングを行った。この際の無菌操作と大腸菌の培養に、2019年度工学研究所共同研究の助成を受けて購入したクリーンベンチと小型恒温振とう培養器を使用した(図2)。

## (3) コロニーPCR、プラスミド抽出と塩基配列の決定

プラスミドベクターに組込まれた DNA 断片の長さをコロニーPCRによって確認した。コロニーPCRには EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara) を用いた。サーマルサイクラーの設定は、94°C・5分間熱解離した後、98°C・10秒間、55°C・30秒間、72°C・45秒間を30サイクル行った後に、72°C・5分間伸長反応とした。目的の DNA 断片が導入されていると考えられたコロニーから QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いてマニュアルに従ってプラスミドを抽出し、電気泳動による確認と濃度測定を行った。プラスミドに挿入された DNA 断片の塩基配列は、各品種8クローンずつジデオキシ法<sup>[6]</sup>により両鎖とも決定された。

## (4) プライマーの設計、PCR と増幅 DNA 断片の電気泳動

決定された各クローンの両鎖の塩基配列は GeneStudio Pro を用いてアセンブルを行った。品種ごとに ClustalW<sup>[19]</sup>を用いて比較し、塩基配列の確認を行った。得られた塩基配列をもとに、Primer3<sup>[20][21]</sup>を用いて、フォワードプライマー5種類とリバースプライマー5種類を設計した。サーマルサイクラーは様々な温度設定で PCR を実施した。PCRには二種類の DNA ポリメラーゼ、Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (New England BioLabs) と Tks Gfl DNA polymerase (Takara)を用いた。増幅 DNA 断片は 2%アガロースゲルを用いて行い、SYBR Safe DNA Gel Stain によって染色し、観察を行った。

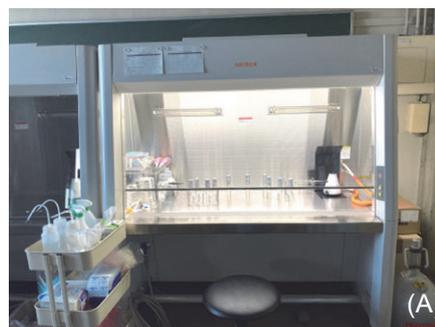


図2. 2019年度工学研究所共同研究の助成を受けて購入した機器 (A)クリーンベンチ (B)小型恒温振とう培養器

## 3. 結果と考察

### (1) OPAH03-500

OPAH03-500 はフィンランドで育成された品種を除くメスに特異的な RAPD マーカーとして見いだされた(図3)。

Botanitseskaja、Prevoskhodnaya、Leikora の三つのメス品種について OPAH03-500 をクローニングした。エチジウムブロマイド溶液よりも検出感度の高い DNA 染色試薬である SYBR Safe DNA Gel Stain を用いたところ、OPAH03-500 はわずかにオス品種でも検出できるようになった。さらにオス品種 Pollmix においても OPAH03-500 をクローニングした。塩基配列を決定した。正確な DNA 断片長は 492 bp であった。メス品種とオス品種間で塩基配列の比較を行ったところ違いが存在しなかった。このことから、OPAH03 がアニーリングする部位に特異的な雌雄間の塩基配列の差異が存在するものと考えられた。そこで、OPAH03 の SCAR マーカー化は不可能と考えられたので、これ以降の実験は行わなかった。

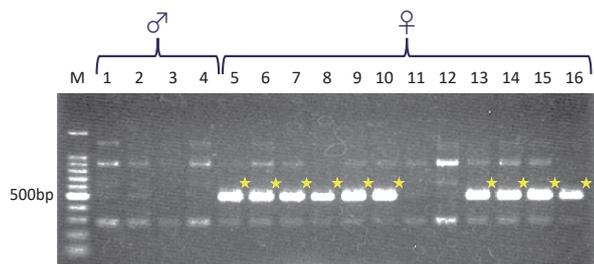


図 3. プライマー OPAH03 を用いた RAPD-PCR 産物の電気泳動パターン M: 100 bp Ladder, 1-16 は表 1 の表記の品種 ★は OPAH03-50 を示す。DNA の検出にはエチジウムブロマイドを使用した。

## (2) OPD15-600

オス品種の Pollmix において見いだされたオス特異的 RAPD マーカーの OPD15-600 であるが<sup>[12]</sup>、今回用いた品種においては、Pollmix 以外に Tolme においても検出された。そこで、この二つの品種で検出される OPD15-600 の塩基配列を決定した。両者の塩基配列は全く同じで、正確な DNA 断片長は 603 bp であった。決定した塩基配列をもとに、フォワードプライマー 5 種類とリバースプライマー 5 種類を設計した。これらを用いた PCR を行ったところ、用いた全品種において DNA の増幅が認められる場合や、オス品種に明瞭な DNA の増幅が認められるものの、一部のメス品種にもわずかに DNA の増幅が検出される場合などがあった (図 4)。

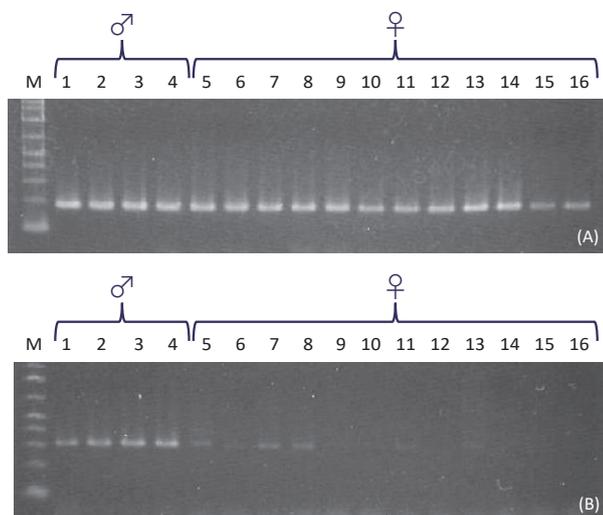


図 4. OPD15-600 の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いて行った PCR の例 (A) 全品種で DNA の増幅が見られる例 (B) 用いたオスの全品種とメスの一部の品種で DNA の増幅が見られる例

一方、用いたオスの全品種で DNA の増幅が認められるが、用いたメス品種の全品種において DNA の増幅が検出されなかったプライマー組み合わせも複数存在した。OPD15-600 は Pollmix と Tolme にもみ検出される RAPD マーカーであったが、新しい SCAR-マーカーは Tarmo と Rudolf においても検出可能となった。今回のこれら

のプライマー組み合わせによる PCR によって、OPD15-600 の SCAR マーカー化は成功に至ったこととなる。今回開発された SCAR マーカーはシーベリーの品種改良や栽培へ貢献できる可能性がある。今後、さらに多くの品種群や交配後代の雌雄が分離している集団を用いて、今回開発された SCAR マーカーの有効性を詳細に検証していく必要がある。

Mangla et al. (2019) は西ヒマラヤに分布する *H. rhamnoides* ssp. *turkestanica* において、花の器官の観察から雌雄分化が完全ではないとの観察と雌雄識別 DNA マーカー周辺のゲノム構造が雌雄間で大きく異なるわけではないことから、シーベリーの性分化は最近起こったものと考えられることを報告している<sup>[22]</sup>。OPAH03-500 と OPD15-600 の塩基配列を決定した今回の結果はこの報告を指示するものであり、雌雄識別 DNA マーカーの開発が困難なことを意味している。シーベリーの性分化が最近起こり、今も分化が進行中であると考えられることは、同時にシーベリーが性分化機構のモデルとなる可能性が考えられ、大変興味深い研究対象であることを意味している<sup>[22]</sup>。次世代シーケンサーを用いたゲノム解読から得られたコンティグのスクリーニングに本研究で開発された SCAR マーカーを用いるなど、今回の研究結果はシーベリーの品種改良や栽培の助けとなるだけでなく、シーベリーの性分化機構の解明においても一助となる可能性がある。

## 4. 謝辞

2019 年度工学研究所共同研究の助成を賜り、工学研究所関係者各位に心より御礼申し上げます。何よりもお気持ちに深く感謝申し上げます。そして、クリーンベンチと小型恒温振とう培養器はこれからも大切に活用し、研究を発展させて参ります。

研究室でシーベリーの研究に携わり、ともに汗を流した学生、横田勇人さん (総合工学プログラム一期生)、長谷川聖さん (総合工学プログラム二期生)、上野伸治さん (総合工学プログラム三期生)、櫻井快樹さん (総合工学プログラム三期生)、藤田凌雅さん (総合工学プログラム四期生)、中村恭平さん (総合工学プログラム五期生) に心から感謝申し上げます。

## 5. 引用文献

- [1] A. Rousi, The genus *Hippophae* L. A taxonomic study, *Ann. Bot. Fenn.*, 8, 177-227 (1971)
- [2] U. Swenson, and I.V. Bartish, Taxonomic synopsis of *Hippophae* (Elaeagnaceae), *Nordic J. Bot.*, 22, 369-374 (2002)
- [3] Y. Lian, X. Chen, K. Sun and R. Ma. A new subspecies of *Hippophae* (Elaeagnaceae) from China, *Novon*, 13, 200-202 (2003)
- [4] W.R. Schroeder, Shelterbelt planting in the Canadian prairies, p. 35-43, (1990) In: Protective plantation technology. Publishing House of Northeast Forestry Univ., Harbin, China.
- [5] T.S.C. Li and W.R. Schroeder, Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): a multipurpose plant, *HortTechnology*, 6, 370-380 (1996)

- [6] R. Chengjiang and L. Daiqiong, Function and Benefit of *Hippophae rhamnoides* L. improving eco-environment of Loess Plateau of China. 12<sup>th</sup> Institute of Soil and Water Conservation Conference, Shannxi, China, (2002)
- [7] C.J. Ruan, K. Rumpunen and H. Nybom, Advances in improvement of quality and resistance in a multipurpose crop: sea buckthorn, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 33, 126–144 (2013)
- [8] P.C. Sharma and M. Kalkal Nutraceutical and medicinal importance of sea buckthorn (*Hippophae* sp.). In: Therapeutic, probiotic, and unconventional foods. Academic, London, 227–253, (2018)
- [9] T.S.C. Li, Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): production and utilisation. National Research Council of Canada, Ottawa, (2003)
- [10] N.S. Shchapov, On the karyology of *Hippophae rhamnoides* L., *Citologija i Genetika* 13, 45–47, (1979) (in Russian, with English abstract)
- [11] E. Truta, G. Capraru, S. Surdu, M.M. Zamfirache, Z. Olteanu, C.M. Rosu. and L. Oprica, Karyotypic studies in ecotypes of *Hippophae rhamnoides* L. from Romania, *Silvae Genet.*, 59, 175-182, (2010)
- [12] H.A. Persson and H. Nybom, Genetic sex determination and RAPD marker segregation in the dioecious species sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.), *Hereditas*, 129, 45–51, (1998)
- [13] A. Sharma, G. Zinta, S. Rana and P. Shirko, Molecular identification of sex in *Hippophae rhamnoides* L. using isozyme and RAPD markers, *For. Stud. China*, 12, 62–66, (2010)
- [14] G. Korekar, R.K. Sharma, R. Kumar, Meenu, N.C. Bisht, R.B. Srivastava, P.S. Ahuja and T. Stobdan, Identification and validation of sex-linked SCAR markers in dioecious *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae), *Biotechnol. Lett.*, 34, 973–978, (2012)
- [15] K. Das, S.H. Ganie, Y. Mangla, T.U. Dar, M. Chaudhary, R.K. Thakur, R. Tandon, S.N. Raina, S. Goel, ISSR markers for gender identification and genetic diagnosis of *Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica* growing at high altitudes in Ladakh region (Jammu and Kashmir), *Protoplasma*, 254, 1063-1077, (2017)
- [16] W. Zhou, Y. Wang, G. Zhang, G. Luan, S. Chen, J. Meng, H. Wang, N. Hu and Y. Suo, Molecular sex identification in dioecious *Hippophae rhamnoides* L. via RAPD and SCAR markers, *Molecules*, 23, 1048-1056, (2018)
- [17] S. Rana, P. Shirkot and M.C. Yadav, A female sex associated randomly amplified polymorphic DNA marker in dioecious *Hippophae salicifolia*, *Genes, Genomes and Genomics*, 3, 96-101, (2009)
- [18] 櫻井快樹 シーベリーの雌雄判別マーカーの探索ならびに遺伝的多様性の解析 平成 29 年度神奈川大学工学部卒業論文 (2017)
- [19] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 2.0., *Bioinformatics*, 23, 2947-2948, (2007)
- [20] T. Koressaar and M. Remm, Enhancements and modifications of primer design program Primer3, *Bioinformatics*, 23, 1289-1291, (2007)
- [21] A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm and S.G. Rozen, Primer3 - new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Res.*, 40, e115, (2012)
- [22] Y. Mangla, K. Das, S. Bali, A. Heena, S.N. Raina, R. Tandon and S. Goel Occurrence of subdioecy and scarcity of genderspecific markers reveal an ongoing transition to dioecy in Himalayan seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica*), *Heredity*, 122, 120–132, (2019)