

林田信明・田口悟朗

目的別テーマ：バイオテクノロジーを活用した新規繊維生物の作出

17年度研究テーマ

15-2-11：野菜の食物繊維に影響を与える遺伝子の探索

ABSTRACT

Chinese cabbage, cabbage, radish and lettuce are major agricultural products of Nagano prefecture, and are main resources of dietary fiber. Although many breeding are progressing on these vegetables, less effort dealt dietary fiber as index. Because long and tedious work is needed to determine the content of dietary fiber in every F2 progeny for breeding, it has not been realistic to breed vegetables changed in quality and quantity of dietary fiber. In this work, molecular technology and mapping techniques will be used for the effort with DNA markers closely linked to the genes responsible for the content of dietary fiber.

研究目的

ハクサイの連鎖地図の精度を上げる。
レタスのDNAの抽出を終え、マーカーの整備を開始する。
食物繊維定量法の簡便化を終了し、ハクサイのF₂の測定を開始する。
商品価値・品種開発に影響するその他の形質の評価を試みる。

一年間の研究内容と成果

レタスについて、昨年度までに白菜で進めてきたのと同様のDNAマーカーの連鎖地図の作成を試みた。レタス品種2系統について、約600個の多型をAFLP法で検出した。次に、これらの多型間の相互の連鎖の程度を、2系統の掛け合わせ後代のF₂分離集団を用いて解析するが、その際にしばしば問題となる再現性についても検討した。RAPDなどの簡便な方法では、再現性が低く、F₂個体を数多く調べないと十分に信頼性における統計的処理のできるデータが得られない。そこで、親株とF₂の10個体について改めてDNAの精製法を検討し、サンプルの破碎法から始まって、市販のDNA精製キットおよび精製キット使用後のフェノール処理などの追精製の組み合わせを検討した。その結果、先に述べた約600個の多型を高い再現性で検出でき、なおかつ、F₂分離集団の約200個体から個別にDNAを調製するのに実用的なレベルで簡便な方法を確立できた。現在は、F₂DNAの調製を進めている。

食物繊維含量や品質に関わる遺伝子に連鎖するDNAマーカーを確立する事が本研究の最終目標の一つである。しかし、そのDNAマーカーが品種開発の現場で使いづらいのでは、役に立たない。そこで、昨年度までに整備した白菜のDNAマーカー連鎖地図の中から適当な制限酵素切断片長多型(RFLP)マーカーを選択し、より実用的なマーカーへの変換を試みた。RFLPマーカーは、その検出に多大な時間と労力と材料を必要とするサザンハイブリダイゼーション法を基礎としており、目的遺伝子を受け継いでいるか否かの判別までには少なくとも1週間程度を要する。しかも、再現性、感度、明瞭性の点でも、熟練した研究者を必要とする。そこで、このRFLPマーカーに相当する白菜遺伝子を精査する事により、約半日で、高い再現性と感度で、初心者でも簡単に遺伝子型を判別できるPCR法を基礎とするSCARマーカーに変換する事が望まれる。しかし、一般に野菜ゲノムの複雑度が高い事から、プライマーの設計は難しく、必ずしもRFLPやRAPDのマーカーがSCARマーカーに変換できるとは限らない。その問題を克服するために、プライマーの設計の礎であり、バックグラウンドの元にもなる、白菜ゲノム中の類似配列を集中的に調べる事を考えた。そのようにして集めたデータから設計

したSCARマーカーは、予想と期待を裏切る事無くF2白菜の遺伝子型を判別した。同じ考え方で、他のマーカーも実用的なものへと変換が可能なはずである。従って本研究では、発見が容易であるが実用に支障があるDNAマーカーを実用的なSCARマーカーへ変換するためのガイドラインを見いだした事になる。

食物繊維定量法は、食物繊維を取り出す作業が繁雑であり、育種目的に用いるには、多数の検体を処理しなくてはならない。本年度は、そのような簡便化を行うための条件検討を継続した。

展望

来年度は、食物繊維定量法の簡便化を進め、ハクサイについてはF2系統の食物繊維含量の測定を行い、食物繊維の合成と蓄積に影響する遺伝子のDNAマーカーの探索につなげたい。レタスについても連鎖地図の作成を見込んでいる。また、食感や葉の巻き数など、食物繊維に間接的に影響する因子についても評価を進めたい。さらに、本年度成功したSCARマーカーへの変換技術（実用化の手順）についても、一般的に使えるものかどうか、検証していきたい。