

林田信明・田口悟朗・橋本昌征

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

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 programs are proceeding on these vegetables, less effort have been indexed for quality and quantity of dietary fiber in the vegetables. Because long and tedious work is needed to determine the content of dietary fiber in every F2 progeny produced in the breeding programs, it has not been realistic to set the target on the parameters of dietary fiber in the vegetables. In this work, molecular technology and mapping techniques have been used to establish the linkage map of DNA markers on the chromosomes of Chinese cabbage to provide a platform on which the DNA markers closely linked to the genes responsible for the content of dietary fiber could be found. The closely linked DNA markers will support the new breeding strategy that is free from the time consuming assays.

研究目的

ハクサイやレタスなどの野菜に含まれる食物繊維の量と質に着目した育種技術を開発するために、遺伝子解析手法を応用して DNA マーカーを多数用意し、染色体上での連鎖の度合いを示す連鎖地図を作成し、QTL 技術を用いたマーカー育種の基盤を整備する。

5 年間の研究内容と成果

ハクサイ (*Brassica rapa*) は、同じアブラナ科のキャベツやダイコン、キク科のレタス (*Lactuca sativa* L.) と並んでわが国の主要な野菜であり、長野県は国内有数の産地である。これらの野菜に対しては、公的機関と民間種苗会社で、抽台性、形態、球内色、食味性、耐病性などの付加価値的な形質について活発な品種改良が続けられている。

これらの野菜は我が国の食文化における食物繊維の主要な供給源であるにもかかわらず、食物繊維を指標とした品種改良は皆無と言っていいほど行われていない。食物繊維などの栄養成分は食味性などと違って測定に多大な労力を要するため、膨大な数の子孫を調べなければならない品種改良の作業の中で、その値を測定することなどおおよそ非現実的だったのだろう。

本研究では、遺伝子の「目印」(マーカー)を用いて作物の品質を予測できる QTL (量的形質遺伝子座) 地図の作成により食物繊維成分に注目した品種改良を可能とするために、その技術基盤の整備を行った。

材料は、長野県野菜花き試験場より提供していただいた。野菜花き試験場で 60 系統のハクサイの F2 植物を用いて部分的に始められていた制限酵素切断片長多型 (RFLP) 解析に加え、ランダム増幅多型 DNA (RAPD)、増幅断片長多型 (AFLP) の技法を用い、解析精度を上げるために植物材料も倍の 120 系統を用いて、300 マーカー規模の DNA マーカーの連鎖地図を作製するに至った。

ハクサイ染色体は 10 本であるが、マーカーの連鎖群は残念ながら 15 本に収束する。本来ならば、もう少し精度を上げて「迷子」マーカーを無くさなければならないのであるが、標的遺伝子(食物繊維関連遺伝子)の特定とクローニングをにらんだ QTL 解析を行うことは不可能ではないレベルに到達できたと考えられる。

この連鎖地図の総延長はほぼ 1000 cM で、約 2000 Mbp と予測されるハクサイゲノム上に平均 6.7 Mbp (3.3 cM) ごとに標識を置いたことになる。言い換えると、「ハクサイのどの様

な遺伝子に対しても、100の子孫のうち平均して93個体では挙動が一致する（注目した遺伝子と共に子孫に受け継がれる）DNAマーカーが、一つは見つかる」と言える密度である。

余談であるが、共同研究を行った長野県野菜花き試験場などのグループは、同連鎖地図を用いて複数の（つまり表現型では判別が困難な）ハクサイ根瘤病抵抗性遺伝子座に連鎖するDNAマーカーを、QTL地図を作製する事で、個別に特定することに成功している。今回作成した連鎖地図の有効性の証左と言える。残念ながら、食物繊維含量の測定は根瘤病抵抗性の検定よりもかなり煩雑なので、本研究では食物繊維含量のQTL地図の作製には至っていない。

レタスについても、ハクサイで進めてきたのと同様にDNAマーカーの連鎖地図の作成を試みた。レタス親品種2系統について、AFLP法を用いて約300個の多型を検出した。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のだが、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り、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まで、種々の検討を行った。その結果、先に述べた約300個の多型を高い再現性で検出でき、なおかつ、F2分離集団の多数の個体から個別にDNAを調製するのに実用的な程度に簡便な方法を確立できた。現在は、F2DNAの調製を進めると共に、少数のF2分離集団を用いた暫定的な連鎖地図の作製に着手している。

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マーカーが品種改良の現場で使いづらいのでは役に立たない。そこで、ハクサイの連鎖地図の中のRFLPマーカーを例として、より実用的なマーカーへの変換戦略を構築した。RFLPマーカーは、その検出に一週間近い時間と多大な労力と材料そして熟練した研究者を必要とする。そこで、約半日でしかも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、一般に野菜ゲノムでは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目的で、ハクサイゲノム中の類似配列を集中的に調べる戦略を開発した。そのようにして設計したSCARマーカーは、期待を裏切る事無くF2ハクサイの遺伝子型を正確に判別した。他のDNAマーカーに対してもこの戦略は適用が可能なので、今後の応用が期待される。