

## α-トコフェロール含量の高いダイズ遺伝資源の同定

氏家 綾<sup>1)</sup>・山田哲也<sup>1)</sup>・藤本健四郎<sup>2)</sup>・遠藤泰志<sup>2)</sup>・喜多村啓介<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>北海道大学大学院・農学研究科, <sup>2)</sup>東北大学大学院・農学研究科)

トコフェロールは脂溶性の抗酸化物質でビタミンEとして知られる。トコフェロールの4種の同族体(α-, β-, γ-, δ-トコフェロール)のうち、α-トコフェロールは最も高いビタミンE活性を有する。ダイズ種子中では総トコフェロール含量は高いものの、α-トコフェロール含量は低く、ビタミンE活性は高くない。本研究ではダイズ種子のビタミンE活性を向上させることを目的として、まず、多数の遺伝資源ダイズのトコフェロール組成を調査することにした。栽培ダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.) 909品種および系統と野生ダイズ(*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) 200系統のトコフェロール組成をHPLCで分析した。その結果、

α-トコフェロール含量の高いダイズ遺伝資源を3品種同定した。普通品種のトコフェロール組成と比較すると、DobrogeanceとDobruoza 14 Pancevoでは総トコフェロール含量は同程度で、α-トコフェロール含量が4-7倍に増大していた。また、Keszthelyi Aprozemu Sargaではα-トコフェロール含量が上記2品種よりもさらに増大していたものの、総トコフェロール含量は減少していた。今回の調査では、α-トコフェロール含量の高いダイズ遺伝資源は栽培ダイズにのみ認められ、野生ダイズには認められなかった。

**Breeding Science** 55: 123-125 (2005)

## *Brassica rapa* (syn. *campestris*) の異なる環境条件下における抽だい性関連量の形質遺伝子座のマッピング

西岡美樹<sup>1)</sup>・田村公司<sup>1)</sup>・林 正紀<sup>1)</sup>・藤森克史<sup>1)</sup>・大川安信<sup>2,4)</sup>・釘貫靖久<sup>3,5)</sup>・原田久也<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>千葉大学大学院・自然科学研究科, <sup>2)</sup>農業生物資源研究所, <sup>3)</sup>野菜茶業研究所, <sup>4)</sup>現:農林水産技術会議事務局, <sup>5)</sup>現:(株)アサヒ農園)

*Brassica rapa* の分子連鎖地図の構築および温度や日長が異なる様々な環境条件下における早晩抽性検定に、抽だい性が大きく異なる両親系統(A9408:晩抽性, Homei P09:早抽性)とこれらに由来する倍加半数体200系統を供試した。この結果、225のAFLPマーカーからなる全長1096.6 cM, 平均マーカー間距離4.5 cMの連鎖地図が構築され、10の抽だい性関与遺伝子座が検出された。この中で最大の効果を示した遺伝子座、*Bolting Time 1* (*BT1*)は、低温処理区および自然条件下で越冬させた試験区では48.5~69.9%と非常に高い寄与率を示したのに対し、低温処理を行わない長日試験区では18.0%と明らかに減少した。この

ことから*BT1*は低温感応性に関わると示唆された。また、倍加半数体系統において*BT1*近傍のAFLPマーカー、A03dの遺伝子型分離と低温感応性について調査した結果、Homei P09型のは低温に速やかに反応するがA9408型のは低温感応性が低いと考えられた。このような晩抽性親系統A9408の低温感応性は*B. rapa*が含む主要な野菜類において非常に重要な形質であり、今後DNAマーカーを利用した晩抽性育種への貢献が期待できる。

**Breeding Science** 55: 127-133 (2005)

## F<sub>1</sub> 品種由来トウモロコシ自殖系統の系列分けに有効なSSRマーカーセットの選抜

榎 宏征<sup>1)</sup>・三木一嘉・濃沼圭一

(北海道農業研究センター, <sup>1)</sup>北海道大学大学院・農学研究科)

これまでに選定された染色体上に偏り無く分布し、寒地適応型飼料用トウモロコシ自殖系統間の近縁度解析に有効な60個のSSRマーカー(full set)からデント種とフリント種の2系列間でバンドの出現頻度の差が大きなSSRマーカー(Set 1は出現頻度の差40%以上の25マーカー, Set 2は50%以上の14マーカー)

を選定し、これらのセットによる自殖系統の系列分けの有用性について検討した。88自殖系統の多型解析を行った結果、full set, Set 1およびSet 2からそれぞれ463個, 176個および99個のバンドが得られた。これはfull setのそれぞれ38%および21%にあたる。SSRマーカーの多型解析から推定した各系列との平均

近縁度の差に基づいて系列分けを行った結果, Set 1 による系列分けの結果が full set による結果と良く一致した. さらに, Set 1 による系列分けは組合せ能力検定試験と比較した結果からも実用的な精度を持っていることが確かめられた. 以上の結果から,

Set 1 による系列分けは full set の 40% 以下のバンドによる解析で, full set とほぼ同様の精度が得られることが明らかになった.  
**Breeding Science** 55: 135–140 (2005)

## 稲作北限地域で栽培されるイネ品種群内における出穂日変異に関する QTL の同定

藤野賢治・関口博史

(北海道グリーンバイオ研究所)

地域適応性に関わる出穂日はイネの品種育成において重要な形質である. 感光性は出穂日に関連する主要因であり, これまでに多くの感光性遺伝子が同定されている. 稲作北限地域ではイネの栽培期間における自然日長時間が長いこと, 極弱の感光性を有する品種が栽培されている. このような極弱の感光性を特徴とするイネ品種群においても, 出穂日変異がみられる. 本研究では, 稲作北限地域(北海道, ポルトガル, ハンガリー, イタリア)に適応したイネ品種における出穂日変異に関わる遺伝子の同定を行った. これら地域の品種間交雑に由来する F2 世代における出穂日変異から, 用いた品種は「北海道」型と「欧州」型の 2 群に区分できた. 次に, 出穂日の QTL 解析を行い, この区分に関わる遺伝子を同定した. 「はやまさり」(北海道)と「Italica Livorno」(イタリア)の交雑に由来する組換え自殖系統(BC1F6

世代, 122 系統)を用いた出穂日の QTL 解析の結果, 2 個の QTL (第 6 染色体および第 7 染色体)が検出された. 第 7 染色体長腕末端領域に検出された qDTH-7 は, 寄与率 64.5% と極めて作用力の大きな QTL であった. また, 「ほしのゆめ」(北海道)と「Arroz Da Terra」(ポルトガル)および「Dunghung Shali」(ハンガリー)の各組合せに由来する組換え自殖系統(BC1F5 世代)においても, qDTH-7 と同じ領域に作用力の大きな QTL が存在することが明らかとなった. 品種の感光性程度から, qDTH-7 は感光性に関連する遺伝子であることが推察された. 以上のことから, qDTH-7 は稲作北限地域で栽培される品種群の区分に関わる遺伝子と考えられた.

**Breeding Science** 55: 141–146 (2005)

## 根粒超着生ダイズ品種作系 4 号における *NTS1/GmNARK* 遺伝子の解析

荒井三千代<sup>1)</sup>・林 正紀<sup>1)</sup>・高橋 幹<sup>2,3)</sup>・島田信二<sup>2)</sup>・原田久也<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>千葉大学・園芸学部, <sup>2)</sup>作物研究所, <sup>3)</sup>現: 国際農林水産業研究センター)

根粒超着生ダイズ品種「作系 4 号」における *NTS1/GmNARK* 遺伝子とそのホモログである *GmCLVIA* 遺伝子のシーケンス解析および RT-PCR 法による発現解析を行った. *NTS1/GmNARK* 遺伝子は根粒着生の自己制御機構に関与するセリン/スレオニン型受容体キナーゼをコードしており, 根粒超着生変異系統「En6500」ではロイシンリッチリピート(LRR)ドメインと膜貫通ドメインの間にナンセンス変異が生じていることがすでに報告されている. 「作系 4 号」は, この「En6500」を供与親, ダイズ品種「エンレイ」を反復親とした後代より根粒超着生でかつ多収性の系統が選抜固定され, その育成過程においてダイズ品種「タマホマレ」との自然交雑が推定されている品種であり, 不耕起狭畦密植栽培といった土壌窒素を利用しにくい条件下で多

収を得る能力を持つことがわかっている. 今回のシーケンス解析の結果, 「En6500」同様「作系 4 号」においても *NTS1/GmNARK* 遺伝子の同じ部位に塩基置換が生じていることがわかり, 「En6500」におけるナンセンス変異が遺伝していることが確認された. また *NTS1/GmNARK* 遺伝子のホモログである *GmCLVIA* 遺伝子にはイントロン部位も含め, 変異は生じていなかった. RT-PCR 法による発現解析により, *NTS1/GmNARK* 遺伝子および *GmCLVIA* 遺伝子は根粒菌感染の有無に関わらず発芽直後より発現していることが明らかになった. したがってダイズにおける根粒着生の自己制御機構は発芽直後から機能し, 根粒菌との共生バランスを維持し得るものと考えられた.

**Breeding Science** 55: 147–152 (2005)

## 出穂期イネ葉鞘のマイクロアレイ解析

高橋咲子<sup>1)</sup>・石丸 健<sup>1)</sup>・矢崎潤史<sup>1)</sup>・藤井文子<sup>2)</sup>・真保佳納子<sup>2)</sup>・山本公子<sup>2)</sup>・坂田克巳<sup>1)</sup>・佐々木卓治<sup>1)</sup>・岸本直己<sup>1)</sup>・菊池尚志<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>農業生物資源研究所, <sup>2)</sup>農林水産先端研)

イネの上位葉鞘は出穂前に多量のデンプンを蓄積し、出穂後は蓄積したデンプンをショ糖に変換して穂に送り出している。このような葉鞘のシンク-ソーストランジションの機構について解析するため、出穂期葉鞘におけるイネ EST マイクロアレイ (8987 クローン) を用いた大規模遺伝子発現モニタリングを行った。その結果、出穂期の止め葉下 1 枚目の葉鞘において生育ステージにより発現量が変化する 102 の遺伝子を同定した。同定した遺伝子中にはそれぞれ複数のデンプン合成、細胞の分裂および伸長、光合成に関連する遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子は全て早いステージに優先的に発現しており、出穂期間中の葉鞘で起こるデンプン合成の減少、伸長の終了、光合成の減少を反映していると推定される。また 2 種のデンプン合成酵素の遺伝子と  $\alpha$ -チューブリン遺伝子の発現パターンから、出穂期のごく初期には止め葉下 1 枚目の葉鞘は蓄積シンクと消費シンクの両方の機能を持つことが示唆された。一方、発芽種子 (デンプ

ン分解およびショ糖の再合成が起こっている) における発現誘導が報告されている、デンプン分解酵素およびショ糖合成酵素の遺伝子についてノーザンブロット解析を行ったところ、出穂期葉鞘においてはデンプン含量の減少が始まる時期にこれらの遺伝子の発現誘導が起こらない事が示され、出穂期葉鞘と発芽種子ではデンプン分解およびショ糖の再合成の機構が異なっていることが示唆された。マイクロアレイ解析により同定された遺伝子中には、出穂期葉鞘において生育ステージにより発現が制御される、機能未知な 18 の遺伝子が含まれていた。これら 18 の遺伝子のうち 7 つは、デンプンが主に蓄積する葉鞘基部において優先的に発現しており、デンプン合成関連の機能を持つことが期待される。今回我々が得た結果は、複雑で未解明な現象の解析手段として、マイクロアレイ解析が効果的であることを示している。

**Breeding Science** 55: 153-162 (2005)

## イネ科海水耐性シバ: *Paspalum vaginatum* の UDP-ガラクトース-エピメラーゼ (*PvUGE1*) およびメタロチオネイン (*PvMET1*) を導入したイネにおける移植期から収穫時期の耐塩性向上効果について

遠藤 昇<sup>1)</sup>・吉田光毅・秋吉美穂・吉田泰子・林 奈緒子

(大成建設(株)・技術センター, <sup>1)</sup>現:(社)国際環境研究協会)

イネの耐塩性を向上する目的で、海水 (NaCl 500 mM 相当) 栽培条件下で生存する植物の形質 (海水耐性) に関連する遺伝子の同定を試みた。日本海岸域を中心に独自に収集した 350 種以上の野生植物に加えて、オオムギ、小麦などのイネ科作物やシバ類の海水耐性を調査した。その結果、海水耐性植物は 42 種選抜された。特にイネ科ではスズメガヤ亜科に海水耐性植物群が多かった。いずれのイネ科作物も海水栽培では枯死した。これらの結果に基づき、イネ科の *Paspalum vaginatum* を遺伝子供与植物として選抜した。イネについては、ランダムに選んだアジア在来品種 369 品種と野生イネ 105 系統を用い、限界生存濃度を調査した。その結果、イネの限界生存濃度は 50 mM 付近であると推察された。次に、海水耐性シバ *P. vaginatum* の海水栽培と真水栽培との違いに基づき塩ストレスで発現量の高まる複数の cDNA を単離した。さらに、50 mM で生存する耐塩性イネ品種 Pokkali

での発現を分析した結果、UDP-ガラクトース-エピメラーゼ (*PvUGE1*) とメタロチオネイン (*PvMET1*) が *P. vaginatum* で発現量が高く特異的なクローンとして選抜された。2 遺伝子の耐塩性向上効果を調査する目的で、イネ品種日本晴に遺伝子導入し、50 mM NaCl では枯死する品種コシヒカリとの F<sub>1</sub> および BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> を作出した。PCR で導入遺伝子を保有する集団と保有しない集団に分け、50 mM NaCl 相当濃度で耐塩性検定を行った結果、*PvUGE1* 保有 F<sub>1</sub> 集団では、移植時期から収穫期 (着粒) まで耐塩性向上効果が示された。*PvMET1* の耐塩性向上効果は *PvUGE1* ほど高くはなかったが、導入遺伝子を持つ BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 集団は、もたない集団に比べ有意に高い生存率を示した。2 個の遺伝子は、*P. vaginatum* の海水耐性に関連する遺伝子と推察された。

**Breeding Science** 55: 163-173 (2005)

## パーオキシダーゼおよびエステラーゼアイソザイム多型に基づく東アジアのコムギ (*Triticum aestivum* L.) における遺伝的多様性と地理的分化

Surya Kant Ghimire<sup>1)</sup>・明石由香利<sup>1)</sup>・米谷知江子<sup>2)</sup>・中西正和<sup>2)</sup>・加藤鎌司<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>岡山大学・農学部, <sup>2)</sup>高知大学・農学部)

アジアにおける在来コムギ集団の遺伝的構造および集団間での縁縁関係を解明するために、アジア各地の在来コムギ 648 品種を供試して、パーオキシダーゼおよびエステラーゼのアイソザイム多型を解析した。多型指数は全体で  $D=0.254$  であり、コムギの起原地から東方へと減少する傾向が認められた。各集団間での遺伝的距離に基づくクラスター分析および遺伝的類似度に基づく主座標分析の結果、33 集団は 6 クラスターに分けられ、アジアのコムギが少なくとも 3 つのグループより構成されることが示された。第 1 のグループはトルコからヒマラヤ南麓を経て四川省 (中国) に至る地域のコムギ集団よりなり、ミャンマールートによりコムギが中国西南部に導入されたことを示唆している。ミャンマールートにより導入されたコムギの大部分が赤

粒タイプであることから、ヒマラヤ南麓の多湿・高温条件下で選抜されたコムギが中国に導入されたものと考えられる。第 2 のグループは、いわゆるシルクロード周辺地域のコムギにより構成された。これらの地域においては、コムギは乾燥・寒冷条件下で栽培されており、白粒タイプも多く見られる。第 3 のグループは中国沿岸部および韓国のコムギ集団よりなり、第 1 グループよりも第 2 グループとの関係が示唆された。本研究の結果は、アジアのコムギが遺伝的ならびに地理的に分化していることを示しており、栽培環境およびグループに対応して多様な遺伝資源が分布していることが明らかになった。

**Breeding Science** 55: 175–185 (2005)

## イネ品種判別と組換え自殖系統群の遺伝子型分析のためのドットプロット分析

白澤健太・岸谷幸枝・西尾 剛

(東北大学大学院・農学研究科)

日本型イネ品種を用いた AFLP 分析や PCR-RF-SSCP 分析から明らかとなった 14 個の品種特異的な挿入あるいは欠失 DNA 配列をプローブとして、ドットプロット分析を行なった。試料 DNA には、葉から簡易抽出した DNA が使用できた。米 1 粒から抽出した全 DNA では十分な強度のシグナルを得られなかったが、PCR 増幅した DNA を用いることで品種特異的なシグナルを得ることができた。10 個のプローブによるドットプロット分析によって供試したイネ 31 品種を全て識別することができた。ドットプロット分析は、組換え自殖系統群の遺伝子型判定にも

用いることができた。日本晴ゲノムに存在しない品種特異的な挿入あるいは欠失 DNA 配列を、カサラスの BAC 末端配列の BlastN 解析や、組換え自殖系統群および染色体断片置換系統群の解析から染色体上に位置付けた。以上の結果から、品種特異的な挿入あるいは欠失 DNA 配列を用いたドットプロット分析が、イネの品種判別と組換え自殖系統群の遺伝子型判定に利用できることが明らかとなった。

**Breeding Science** 55: 187–192 (2005)

## イネの分矮型矮性の 1 種である分けつ矮稲は単一劣性遺伝子によって支配されている

前川雅彦<sup>1)</sup>・高牟禮逸朗<sup>2)</sup>・Nisar Ahmed<sup>3)</sup>・経塚淳子<sup>4)</sup>

(<sup>1)</sup>岡山大学・資源生物科学研究所, <sup>2)</sup>北海道大学大学院・農学研究科, <sup>3)</sup>パキスタン農業大学・農業生化学・生物工学センター, <sup>4)</sup>東京大学大学院・農学生命科学研究科)

イネの分矮型矮性の 1 種である分けつ矮稲は 3 つの重複遺伝子 *d3*, *d4* および *d5* によって支配されていると報告されている。分けつ矮稲 H-52 と標識遺伝子系統 No. 201 ならびに H-61 との交雑  $F_2$  集団において、分けつ矮稲の分離は 15:1 の比に適合した。一方、H-52 と H-61 の  $F_1$  を雌性親にして H-52 を戻し交雑し

た  $BC_1F_1$  集団では、正常型と分けつ矮稲型の分離が 1:1 の比に適合し、 $F_1$  を花粉親にした場合の  $BC_1F_1$  集団では、分けつ矮稲型の分離が減少した。これらの結果から、H-52 と H-61 の  $F_2$  集団において観察される分けつ矮稲の過少分離は、分けつ矮稲遺伝子と連鎖する配偶体遺伝子によるものと推定された。さらに

分けつ矮稲の過少分離は、分けつ矮稲 H-125 とインド型品種 Kasalath の F<sub>2</sub> 集団でも観察され、戻し交雑後代の分離比から、配偶体遺伝子の存在により過少分離が生じていると示唆された。以上の結果から、分けつ矮稲は 1 個の劣性遺伝子に支配され

ていることが判明した。また、分けつ矮稲遺伝子は SSR マーカーを用いた連鎖分析の結果、第 6 染色体の RM587 と RM4608 の間に座乗することが明らかとなった。

**Breeding Science** 55: 193–196 (2005)

## AFLP 解析による東・南アジアのメロン遺伝資源の遺伝的関係

八城和敏<sup>1)</sup>・岩田洋佳<sup>2)</sup>・明石由香利<sup>3,5)</sup>・富田健夫<sup>1)</sup>・葛谷真輝<sup>1)</sup>・津村義彦<sup>4)</sup>・加藤謙司<sup>5)</sup>

(<sup>1)</sup>茨城県農業総合センター・生物工学研究所, <sup>2)</sup>中央農業総合研究センター, <sup>3)</sup>(株)三共種子研究所, <sup>4)</sup>森林総合研究所, <sup>5)</sup>岡山大学・農学部)

メロン (*Cucumis melo* L.) は熱帯から温帯地域にかけて栽培されている最も重要な野菜の一つであり、果実の大きさ、形、色、味などに多様な変異が存在するが、形質の変異が連続的であるため、これらの形質に基づく変種分類にはしばしば困難を伴う。東・南アジアのメロンにはうどんこ病やつる割病などの病害抵抗性を示す重要な遺伝資源が多いことが知られており、その育種の利用のためには遺伝的類縁関係を明確にしておく必要がある。本研究では、210 の AFLP 多型に基づいて東・南アジアのメロン遺伝資源 99 系統の遺伝的関係を解析した。各系統間での遺伝的距離に基づいてクラスター分析を行った結果、99 系統は大きく 3 つのクラスターに分類された。すなわち、①マクワ・シロウリのクラスター、②小粒系メロン(種子長が 9.0 mm 未満)のクラスター、および③日本の市販品種と大粒系メロン(種子長が

9.0 mm 以上)のクラスターである。主座標解析の結果、メロンは大粒系メロンと小粒系メロンの 2 グループに大別され、両タイプ間で遺伝的に分化していることが示された。マクワとシロウリが一つのグループを形成し、しかも南アジアの小粒系メロンに近い位置に分布したことから、両変種は分類上区別が困難なことと、両変種の起源が南アジアの小粒系に密接に関係することが示された。また、日本の市販品種は互いに近接して分布したことから、遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。以上のことから、日本のメロン育種が極めて限られた遺伝的背景で行われてきたことが明らかであり、今後、多様性に富むメロン遺伝資源の利用により様々なタイプの品種育成が可能になるものと期待できる。

**Breeding Science** 55: 197–206 (2005)

## EST データベース KOMUGI を利用した *Ndr* プロテインキナーゼホモログをコードするコムギ cDNA のクローニングと構造解析

今井雄大・寺地 徹

(京都産業大学・工学部)

AGC グループに属する *Ndr* は真核生物に普遍的に存在するプロテインキナーゼで、細胞の伸長や極性維持に重要な働きをしていることが知られている。植物では *Ndr* の機能は全くわかっておらず、遺伝子の情報もダイコンとシロイヌナズナを含む数種の双子葉植物に限定される。本研究では、植物の *Ndr* 遺伝子の全貌を明らかにすることを目的に、単子葉植物のパンコムギ (*Triticum aestivum*) から EST 情報を利用して *Ndr* 遺伝子 (*wheatNdr*) を単離し、その構造を解析した。パンコムギの EST データベース (Komugi) を検索した結果、ダイコンの *Ndr* 遺伝子と相同性を持つクローンが複数得られた。その情報と RACE 法により、3 種類の全長 cDNA クローンを得て、その塩基配列を決定した。これら cDNA クローンの推定翻訳産物は真核生物の Ser/Thr プロテインキナーゼに保存されている 12 個のカタリティックサブドメインをすべて含み、機能を持つと考えられた。

また、サブドメイン 7 と 8 の間に 56 アミノ酸の挿入配列を持ち、リン酸化を受けると考えられる 3 つの Ser/Thr 残基が保存されているという、真核生物の *Ndr* プロテインキナーゼファミリーに固有の特徴が備わっていることが明らかとなった。*wheatNdr* と他の AGC グループに属するプロテインキナーゼとの系統関係を調べた結果、*wheatNdr* は他の植物 *Ndr* 遺伝子と同じグループを構成した。また、3 種類の cDNA クローン間に多数の同義置換が観察されたことから、これらがパンコムギの同祖遺伝子に由来すると考えられた。パンコムギとその祖先野生種 (*T. boeoticum*, *Ae. speltoides*, *Ae. squarrosa*) の cDNA クローンの塩基配列を比較したところ、パンコムギの 3 つの cDNA クローンはそれぞれ異なるゲノムに由来する、同祖遺伝子であることが明らかとなった。

**Breeding Science** 55: 207–212 (2005)

## ジャワニカ型イネ品種 Rojolele における組換えヒトラクトフェリンの発現とその解析

Diah Rachmawati<sup>1,2)</sup>・森 拓也<sup>1)</sup>・保坂壮彦<sup>1)</sup>・高岩文雄<sup>3)</sup>・井上栄一<sup>4)</sup>・安西弘行<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>茨城大学・遺伝子実験施設, (<sup>2)</sup>Faculty of Biology, Gadjah Mada University, (<sup>3)</sup>農業生物資源研究所, (<sup>4)</sup>茨城大学・農学部)

ヒトラクトフェリン (hLF) は分子量約 80 KD の糖タンパク質で、母乳や涙等に含まれ抗菌、抗ウイルス、免疫増強活性など様々な生理活性を有している事から注目されている。我々は健康機能性作物の作出を目的として、この hLF 遺伝子のジャワニカ型イネ品種 Rojolele への導入を試みた。トウモロコシユビキチンプロモーター下流に hLF 自身のシグナル或いはイネ貯蔵蛋白質グルテリンシグナルに連結された hLF 遺伝子を導入し、アグロバクテリウム法によりイネ品種 Rojolele を形質転換したところ、共に種子、葉、根で発現した。特に種子中では全可溶性蛋

白質の 15% にも達する大量発現に成功した。発現した組換え蛋白質を陽イオンクロマトグラフィーにより精製し N 末端を解析したところ、両シグナル配列は正確に除かれ共に天然型 hLF と同一であった。しかし、分子量は糖鎖の違いから天然型に比べ約 2000 程小さくなっていて、共焦点レーザー顕微鏡により組織化学的解析を行うと、胚乳全体の細胞内、細胞間スペースに分布している事が示唆された。組換えイネの穀粒における抽出物は枯草菌に対する抗菌活性も示した。

**Breeding Science** 55: 213–222 (2005)

## PBA マーカーならびに各種 DNA マーカーを用いた 2 倍体ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の統合地図の作成

山中慎介<sup>1)</sup>・池田成志<sup>1)</sup>・今井 篤<sup>2,3)</sup>・欒 雨時<sup>1,4)</sup>・渡邊純子<sup>1)</sup>・渡邊和男<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>筑波大学大学院・遺伝子実験センター, (<sup>2)</sup>筑波大学・生物資源学類, (<sup>3)</sup>果樹研究所, (<sup>4)</sup>大連理工大学・生物工程系)

ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) における遺伝地図情報の統合を目的に、我々が開発した PBA (P450 based analogue) マーカーならびに各種 DNA マーカーを用いた遺伝地図の作成を試みた。材料には 2 倍体ジャガイモの F<sub>1</sub> 集団を用い、各種 DNA マーカーとして 111 個の SSR, 33 個の RFLP, 87 個の RFLP-STS, 45 個の CAPS, 94 個の RAPD, 15 個の PBA, 9 個の AFLP, 3 個の RGL および 4 個の ISSR からなる計 401 マーカーを両親間の多型検出に供試した。その結果、401 マーカーのうち 127 マーカー (172 遺伝子座) が両親間で多型を示し、これらを集団の多型解析に適用した。PBA マーカーは他の DNA マーカーに比べ

て効率よく多型を検出し、少なくとも 8 本の染色体上にマップされることが明らかになった。これまでのジャガイモ遺伝地図に関する研究では、各々の DNA マーカーがそれぞれ異なる集団で独自にマッピングされているために各地図間の対応関係の把握に労力を要する。そこで既存の地図情報の統合を目的に、代表的な RFLP および SSR ベースの地図と今回作成した地図の比較検討を行ったところ、今回作成した地図は既存地図情報の橋渡しとなりうる有用性が示唆された。

**Breeding Science** 55: 223–230 (2005)

## イネの晩生遺伝子 *ef4* の連鎖分析

Leang Hak Khun<sup>1)</sup>・本村恵二<sup>1)</sup>・村山盛一<sup>1)</sup>・安谷屋信一<sup>1)</sup>・野瀬昭博<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>琉球大学・農学部, (<sup>2)</sup>佐賀大学・農学部)

栽培イネ台中 65 号の同質遺伝子系統 T65-LH2 は IR8 由来の晩生遺伝子 *ef4* (t) を持っている。この遺伝子を既知の *Efx* (第 3 染色体) および *Efl* (第 10 染色体) との間で同座性検定を行い、同遺伝子の座位および座乗染色体を明らかにしようとした。その後座乗染色体上の標識遺伝子との間で連鎖分析を行った。分析の結果 *ef4* (t) は *Efx* と同座であり、*Efl* と独立であることが判

明した。*Efx* の座乗染色体である第 3 染色体には *Hg*, *dl* および *bc1* などの標識遺伝子が存在し、連鎖分析の結果 *ef4* (t) は *Hg* と 33.2%, *dl* と 16.8% の組換え価が得られ、一方 *bc1* とは独立であった。

**Breeding Science** 55: 231–235 (2005)

## イネ株開帳性を支配する遺伝子 *Spk(t)* の詳細マッピングおよび物理地図作成

宮田麻衣子<sup>1)</sup>・小森俊之<sup>1)</sup>・山本敏央<sup>1)</sup>・上田忠正<sup>2)</sup>・矢野昌裕<sup>2)</sup>・新田直人<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>オリノバ, (<sup>2)</sup>農業生物資源研究所)

イネにおいて、草型は栽培適性や収量に直接影響することから重要な育種目標である。株開帳性はイネの草型を決定する要因の一つである。本研究では、株開帳性を支配している既報の主働遺伝子 *Spk(t)* (Spreading type of Kasalath) を単離するため、第9染色体上に存在する *Spk(t)* 座候補領域の絞り込みを行った。*Spk(t)* 領域がメンデル型分離を示す日本晴とカサラスの BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 1316 個体を用いた連鎖解析により、*Spk(t)* 座は RFLP マーカー G1085 および C985 に挟まれる領域に座乗することが示された。この領域に存在する EST 情報から PCR マーカーを作成し連鎖地図に位置付けた結果、*Spk(t)* 座は E4055 および C62163 内に絞り込まれた。両マーカーおよびこの領域に存在する3個の EST マーカー (S21134, C50118, S20246) を用いて日本晴 PAC ライ

ブラリー、カサラス BAC ライブラリーから PCR スクリーニングを行い、選抜された 15 PAC クローン、1 BAC クローンを用いて PAC 整列化地図を作成した。これらのうち、PAC クローン P0012B06, BAC クローン B104D11 は *Spk(t)* 座を挟む PCR マーカー E4055 および C62163 をどちらも含んでおり、*Spk(t)* 座を保持していることが示唆された。結果として、ポジショナルクローニングに利用できる *Spk(t)* 座周辺の物理地図が作成された。また、BAC クローン B104D11 は *Spk(t)* 座において優性対立遺伝子を含んでいることから、相補性試験に使用する DNA 断片の作成に利用できると思われる。

**Breeding Science** 55: 237-239 (2005)

## 秋まき硬質コムギ系統 (ハード・レッド・ウィンター) と春まき硬質コムギ品種 (カナダ・ウェスタン・エクストラ・ストロング) の LMW-s 遺伝子の相同性

船附稚子<sup>1)</sup>・高田兼則<sup>2)</sup>・船附秀行<sup>1)</sup>・田引 正<sup>3)</sup>・伊藤美環子<sup>3)</sup>・西尾善太<sup>3)</sup>・加藤 明<sup>1)</sup>・斉藤浩二<sup>1)</sup>・八幡江梨子<sup>4)</sup>・猿山晴夫<sup>4)</sup>・山内宏昭<sup>3)</sup>

(<sup>1)</sup>北海道農業研究センター, (<sup>2)</sup>近畿中国四国農業研究センター, (<sup>3)</sup>北海道農業研究センター, (<sup>4)</sup>(株)北海道グリーンバイオ研究所)

超強力粉なみの生地物性の強さを持つ米国産秋まきコムギ (ハード・レッド・ウィンター) 系統「KS831957」の保有する低分子量グルテニンサブユニット (LMW-GS) である KS2, KS3 およびカナダ産超強力春まきコムギ (カナダ・ウェスタン・エクストラ・ストロング) 品種「Glenlea」の GL1, GL2 は小麦粉の強い生地物性に寄与することがわかっている。本研究の目的は KS831957 の KS2, KS3 と Glenlea の GL1, GL2 との相同性を明らかにすることである。DS-PAGE において、KS831957 の KS2, KS3 は Glenlea の GL1, GL2 とそれぞれ同じ易動度を示した。さらに詳細に LMW-GS を解析するために、KS831957 × 「ホロシロコムギ」に由来する2つの育成系統 (「勝系 32 号」, 「勝系 34 号」) を交配して得られた F<sub>7</sub> 世代の組み換え自殖系統 (RIL) を二次元電気泳動に供したところ、KS3 は4つのスポットに分離

されたが、そのうち、ゲル上で GL2 と同様の位置に分離される塩基性側の2つのスポット (KS3a と命名) が独立に分離して遺伝した。KS2 と GL1 もまた同様の位置に分離された。GL1, GL2 は共分離するが、KS2 と KS3a もまた共分離した。GL1/GL2 の候補遺伝子 (*GLEN42K*) を増幅したプライマーで KS831957 に対して RT-PCR を行ったところ、LMW-s に分類される遺伝子 *KANS2* が増幅し、その内部配列は F<sub>6</sub> RIL において KS2/KS3a と共分離した。よって、*KANS2* は KS2/KS3a をコードする候補遺伝子と考えられた。*KANS2* の塩基配列は *GLEN42K* の塩基配列とほぼ一致した。以上のことから、KS2/KS3a と GL1/GL2 は機能が非常に類似した LMW-GS であり、それらの候補遺伝子は汎用性の高い DNA マーカーになり得ると考えられた。

**Breeding Science** 55: 241-246 (2005)

## ISSR-suppression-PCR 法による *Brassica rapa* のマイクロサテライトマーカーの開発

田村公司<sup>1)</sup>・西岡美樹<sup>1)</sup>・林 正紀<sup>1)</sup>・張 増翠<sup>1,2)</sup>・練 春蘭<sup>3)</sup>・寶月岱造<sup>3)</sup>・原田久也<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>千葉大学大学院・自然科学研究科, (<sup>2)</sup>南京農業大学・園芸学院, (<sup>3)</sup>東京大学・アジア生物資源環境研究センター)

ISSR-suppression-PCR 法はマイクロサテライトの簡便な単離法として開発されたものでゲノミックライブラリーの構築を必

要としない。実験方法は、(1) ゲノム DNA を6種類の制限酵素で消化。(2) 各制限断片にアダプターを付加。(3) マイクロサテ

ライトモチーフの 10 反復配列とアダプター配列をプライマーとして PCR. (4) 産物をクローニング, シークエンス. (5) アダプター配列とシークエンスによって明らかとなったマイクロサテライトの片側配列を利用した nested PCR. (6) 産物のクローニング, シークエンス, といったシンプルかつ基礎的な技術で行う. 本法により *Brassica rapa* の A9709 系統および品種, '矮坑' のゲノム DNA から TG 反復配列を含む特異的断片を増幅する

51 のプライマーペアを作製し, *B. rapa* の 6 品種・系統間で多型解析を行った結果, 38 プライマーペアで多型を検出した. また, 既存の AFLP マーカーによる *B. rapa* の分子連鎖地図に 9 個のマイクロサテライトマーカーを位置づけた. 以上により, ISSR-suppression-PCR 法は園芸作物においてもマイクロサテライトの単離に有効であることが示された.

**Breeding Science** 55: 247-252 (2005)