

- ・系統、素材は公開しないでほしい、実用品種化した場合の権利等
- ・情報公開は難しい
- ・別の実施者（他文献等）、実施方法（別マーカー）の結果と照合し目的のマーカーの有無が検体別に一致するかどうかの確認。
- ・自社でも反復実験で再現性がとれる
- ・育種に関しての権利
- ・情報公開について
- ・系統名を含めた情報公開はリスクを伴う
- ・不和合性 S 因子の程度（強弱）の選抜できるマーカーが欲しい
- ・開発後の情報公開が必要であるか
- ・非公開、IP や育成者権は系統提供者へ戻す等の協議が必要

7. その他ご意見がございましたらご記入ください

- ・スライド資料があるとわかりやすかった（2 名）
- ・安価な SNP タイピング講習会を希望
- ・詰め込みすぎで内容が浅いのが残念
- ・育種利用にあたり MABC を実施する場合のサポート、リンケージドラッグをいかにして切るか等の助言があるとかずさ及び企業の利用に積極的になれる
- ・花卉関係のゲノム情報の充実、公開
- ・中小企業の種苗メーカーであるがゲノム情報活用方法が見いだせていない

3. モデル試験の実施

平成 26 年度事業で作成された計画案に基づき、検討委員会の議論等に応じて必要な調整を加えて実際の植物体を用いた試験を行った。実施する品目・形質については、おおむね半年以内に判定ができること、かつセミナーで結果を報告することを想定し、種苗業界のニーズが高く、かつ効果が分かりやすい形質として、ハクサイ根こぶ病抵抗性を試験対象とした。また、用いる DNA マーカーについては特許権等、知的財産権の問題が生

じないよう留意した。本モデル試験では論文で公表されている選抜 DNA マーカーについて簡易・低コストで解析できる手法を提示し、DNA マーカーを用いた場合の作業性やコストの参考とした。

ハクサイ根こぶ病について：ハクサイ根こぶ病は *Plasmodiophora brassicae* Woronin によって引き起こされるハクサイの重要病害である。国内の感染菌は抵抗性によって 4 つのグループに分かれており、それぞれ異なる抵抗性遺伝子が関与する。グループ 3 菌に抵抗性を発現する *CRb* 遺伝子は単離はされていないものの、近傍のマーカーが Kato et al. (Breeding Science 63:116-124, 2003)により論文で公表されている。この近傍マーカーは特許申請等がされていないことから、本モデル試験で対象にすることとした。

3.1 材料および方法

対象マーカー：Kato et al. (Breeding Science 63:116-124, 2003)で公開されている *CRb* 抵抗性遺伝子近傍の 11 マーカーとした。

材料：ハクサイ品種「秋理想」（抵抗性）、「無双」（罹病性）および「新黄」F2 集団（分離集団）

接種菌：*Plasmodiophora brassicae* グループ菌

ハクサイ種子および接種菌は（国）農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所より入手した。また、接種検定法は同研究所・野菜育種・ゲノム研究領域・葉根菜育種研究グループで実施している手法により行った。

マーカーによる多型解析を実施する前にハクサイ品種「秋理想」および「無双」の接種試験を実施し、それぞれ抵抗性および罹病性を示すことを確認し、論文に記載の抵抗性/罹病性の遺伝子型と一致することを確認した。また、簡易・低コストに解析を行うため、DNA のサンプリング、抽出法の確立および使用マーカーの選定を実施した。

3.2 結果

1. ハクサイ根こぶ病接種試験

ハクサイ品種「秋理想」および「無双」の種子を直径 9cm のポットに播種し、（国）農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所で実施している手法に従って接種した。

抵抗性品種（「秋理想」）と罹病性品種（「無双」）でそれぞれ抵抗性および罹病性を示すことを確認した（下図）。



図 接種試験の結果。グループ3 菌を接種した個体について、罹病性系統「無双」では根こぶが出来ているが、抵抗性系統「秋理想」では根こぶができていないことを確認した。

2. サンプルングおよび DNA 抽出法

サンプルングおよび DNA 抽出法は以下のとおりとした。

- ① 幼葉 2mm x 3mm 位をハサミで切り取り、96well-PCR plate の well に入れる。
- ② well あたり 70ul の bufferA を加え、組織を潰す。
- ③ サーマルサイクラーで 95℃10 分熱処理をする。
- ④ well あたり 70ul の bufferB を加えてよく混ぜる、滅菌蒸留水で 10 倍希釈して、2ul を PCR template に使用する。
- ⑤ 希釈した DNA 抽出液は-20℃に保存する。

BufferA: NaOH 0.1M, 2% Tween 20

Buffer B: 0.1M Tris-Hcl, 2mM EDTA

3. PCR

反応液組成(合計 5 μ l)は以下の通りである：1X Buffer P, 200 μ M each dNTP, 3mM MgCl₂, 0.8 μ M each primer, DNA テンプレート 2 μ l, 滅菌蒸留水 1.624 μ l。PCR はタッチダウン変法で行

い、PCR 後、反応液に 1x BPB sol.を 5ul 加えて、そのうち 8ul を 10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した（下図）。

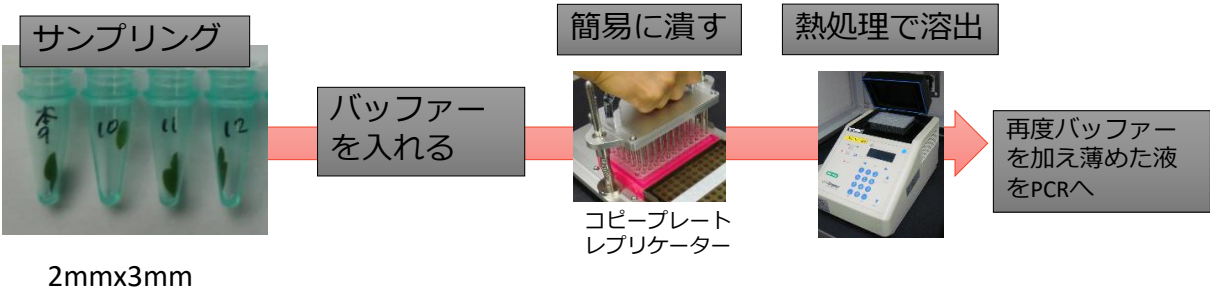


図 サンプリングおよび DNA 抽出法

4. マーカーの選定

論文に記載の 11 マーカーに対し、2 マーカーによるマルチプレックス PCR で明確にターゲットバンドが検出できるマーカーとして下記の 2 マーカーを選定した。

マーカー	FW	Rv	アレルサイズ(bp)	
			抵抗性	罹病性
B1321	AGTGAAACAGACTATGATTAATGTTTT	GTTTCAACTTTGGTATAAGCGTTGAGA	135	169
B0902	AGCCTTGCGTAAAGCAACTAC	GTTTGGAATCCGACAAATACATCCAT	160	241

5. 解析結果

確定したプロトコルとマーカーで抵抗性および罹病性の判別を行うことができた。また、分離集団においても明瞭な分離を確認できた。

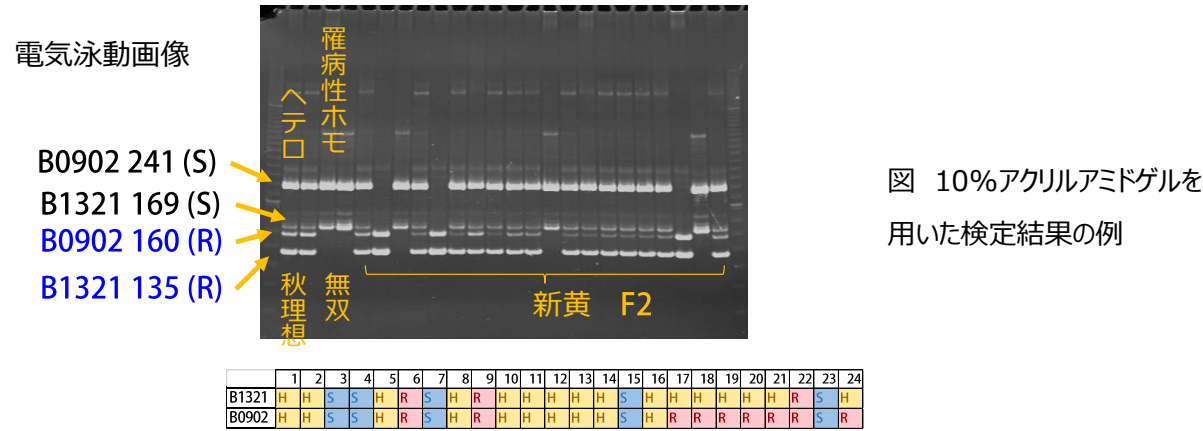


図 10%アクリルアミドゲルを用いた検定結果の例

F₂ 分離集団では多くの個体がヘテロ型を示し、またマーカー間で組み換えも生じていた。マーカーを用いることで該当領域がホモ型である個体を選べることが明らかとなり、根こぶ病抵抗性育種におけるマーカー利用の有効性を示すことができた。

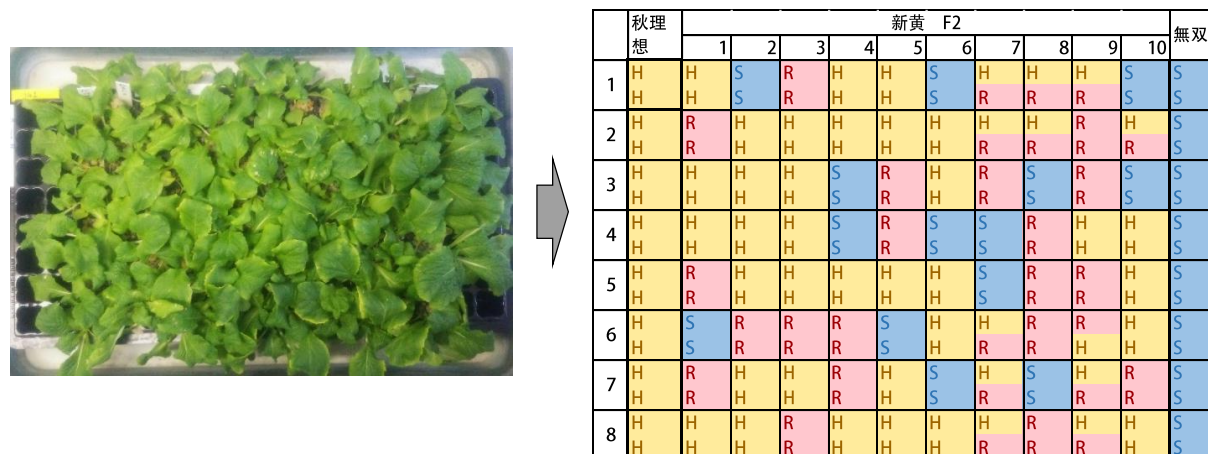


図 セルトレイに播種した F₂ 分離集団と各セル個体のマーカー遺伝子型。上段が B1321, 下段が B0902 の遺伝子型を示す。R:抵抗性ホモ、S:罹病性ホモ、H:ヘテロ型

4. 種苗産業におけるオープンイノベーションの実現にむけたアクションプラン

検討委員会での議論およびセミナーでのアンケート等を通じた種苗会社の実態調査から、種苗産業におけるオープンイノベーションに向けた今後のアクションプランを算定した。

前年度および本年度の事業から、種苗会社では DNA マーカーの導入には高い期待があるものの、十分に活用できていないことが明らかとなった。その原因は「マーカーが自分の材料で使えるか分からない」「使えるマーカーがない」「費用対効果」などだった。これを打開するには

1. 分散して存在する DNA マーカーの情報を集約して利用しやすくする
2. 遺伝子型解析サービスを受けることができる環境を整備

が有効であると考えられた。特にマーカー開発について、これまでは公的研究機関や大学等で開発が行われるのを待つのみであったが、種苗会社が自ら参画する「公的サポートによる DNA マーカーの共同開発」にも高い興味を持っていることが明らかとなった。以上の背景を踏まえ、今後のアクションプランとして以下の 2 点を提案する。

1. 「複数の種苗会社が参加した DNA マーカーの共同開発」の事例を作る

DNA マーカーの開発には多大な経費がかかるが、国内ではこれまでは各社が独立で開発を検討していたことから、取り組みが非効率であった。そこで各社の材料の機密性を保証した上で、DNA マーカーの開発に共同で取り組む事例を最初に作ることで、競争を保持しつつ協力して DNA マーカーによる選抜技術を開発する流れを生み出す。最初の事例ではゲノム全体にわたる遺伝子型を検出するための共通のマーカー基盤を確立することとし、特定の種において多型解析のための SSR または SNPs マーカーセットを作成する。これにより、系統維持管理を行うための DNA マーカーが開発されるとともに、選抜マーカー開発を行う際の基盤となる情報が整備される。すなわち「分散して存在する DNA マーカーの情報」のうち、情報量の高いマーカーを集約し、利用しやすくする最初のステップが達成できる。対象とする種については聞き取り等により選定するとともに、将来に備えて開発が必要な選抜マーカーの調査も行う。

2. 「マーカー開発・利用」に関する技術講習会

種苗産業界の DNA マーカー利用に関する技術力向上や受託解析サービスを利用する場合に役立つ基本的な技術の知識習得を図るため、実験、遺伝解析の技術講習会を実施する。将来は有料で各社が必要に応じで受講することを目指すことから、技術講習会を行える事業者を育成することも踏まえ、可能なかぎり民間業者に外注をする。

これら 2 つのアクションを通じ、国内の種苗産業において競争を保持しつつ、協力して選抜技術を開発する流れを生み出し、オープンイノベーションの実現を図る。