

平成26年度種苗産業におけるオープンイノベーションの推進委託事業

DNAマーカー育種モデル試験計画案

公益財団法人かずさDNA研究所

1. 目的

平成26年度種苗産業におけるオープンイノベーションの推進委託事業における

- ① 利用可能な野菜・花きの DNA マーカーの情報収集
- ② 国内の種苗会社へのアンケート調査およびヒアリング
- ③ 研究機関等の情報収集
- ④ 海外における実態調査

の調査項目の結果を踏まえ、次年度以降に実施する DNA マーカー育種モデル試験の計画案を作成する。おおむね半年以内に判定ができることを目安とする。

2. 調査から得られた育種モデル試験の立案に関わる結果の概要

- ① 利用可能な野菜・花きの DNA マーカーの情報収集

調査の結果、現在利用可能な野菜・花きの DNA マーカーは少なくとも 800 以上あることが明らかとなった。一方、その精度については玉石混合であり、利用者による精査が必要だった。

- ② 国内の種苗会社へのアンケート調査およびヒアリング

対象とする作物種は野菜、花きが多く、次いで果樹、穀物だった。また、育種関係者が DNA マーカーの利用に関して高い関心を持っていることが明らかとなった。一方、マーカーの使い方が分からない、保有する材料に対する有効性や精度が不明であるといった不安が指摘された。また、新規の選抜マーカーを一から作出することはコスト高から困難であることが指摘された。さらに、DNA マーカー解析を委託した場合、時間がかかるという欠点がマイナス点としてあげられており、DNA 解析の作業効率を上げる必要性も示唆された。

- ③ 研究機関等の情報収集

SNP の受託解析機関が充実しつつあった。とくに LGC Genomics 社が開発している KASP マーカーは選抜マーカーとして広く使われている。さらに DNA 抽出においても独自に開発したキットを用いて簡易にサンプルを送付出来る体制を整えている。

- ④ 海外における実態調査

韓国の Golden Seed Project では論文に公開されている情報等をもとに選抜マーカーとしての精査と再設計を実施し、トマトでは2年間で50を超える選抜マーカーの再整備に成功した。

3. DNAマーカー育種モデル試験の概要

調査の結果を踏まえ、以下の2点をモデル試験として実施することが有用であると考えた（図1）。

① 既知の情報に由来する選抜マーカー再設計のモデル試験

調査の結果から、選抜マーカーの開発において既知の情報を積極的に活用する必要があることが示唆された。一方、既知の情報には精度に大きな開きがあり、採用する前に保有する材料での適用性を検討し、場合によってはプライマー設計等を再度行うことが不可欠である。そこでトマトの芯止まり性の変異に関する既知の SNP 情報（Pnueli et al. 1998）を例に、選抜マーカーとして再設計を行う一連の作業をモデル試験として実施する。一連の作業を実施することで、選抜マーカーの再設計に関する時間や費用の目安となる情報を提供する。

② 受託解析を前提とした DNA マーカー選抜モデル試験

アンケート結果から、DNA マーカー選抜解析を実施する種はナス科やアブラナ科などの野菜種が多いことが予想された。これらの種はセルトレイ等で育苗した後にポットで2次育苗、または本圃に定植するケースが多い。このような場合には、セルトレイで育苗した苗の段階で DNA マーカーによる遺伝子型解析を行い、ターゲットとする遺伝子型をもった個体のみ2次育苗または本圃定植する幼苗検定が最も一般的になると想定した。そこでマーカーによる幼苗選抜をより簡便に実施できるよう、サンプリングから遺伝子型判別まで簡易に行えるモデルパッケージをトマトを例として作成する。なお、育種機関と遺伝子型解析は別機関で実施することを想定する。サンプル送付から幼苗選抜までに要する労力や消耗品コストなどの情報を提供する。

引用文献

Pnueli et al. (1998) The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL-1*. Development 125, 1979-1989.

4. DNAマーカー育種モデル試験計画案

① 既知の情報に由来する選抜マーカー再設計のモデル試験

対象とする遺伝子：トマトの芯止まり性に関する遺伝子 *SELF-PRUNING* (*SP*) 遺伝子配列中の SNP により (CCT→CTT) により生成されるアミノ酸がプロリンからロイシンに変異したことで芯止まり性となる。なお、芯止まり性は劣性遺伝である。遺伝子配列は4つのエキソンと3つのイントロンから構成され、全長は2161塩基である（図2）。

対象とする系統：トマトの芯止まり性系統と非芯止まり性系統各6品種程度を対象と

する。*SP* 遺伝子の配列情報の公開が可能であることを前提に公的機関および民間種苗会社から系統を収集する。

解析手法：SP 遺伝子の4つのエキソン領域を増幅するようにプライマーを設計し、PCR 増幅産物の配列解析をサンガー法で実施する。芯止まり性と非芯止まり性間の多型を検出し、多型が SNP である場合には KASP マーカーを設計する。SNP でない場合には多型の種類に応じて適したマーカーを設計する。設計したマーカーによる多型解析を実施し、マーカーの多型検出精度を確認する（図3）。

② KASP マーカーによる選抜モデル試験

サンプリングおよび DNA 抽出法の検討：KASP マーカーによる解析を前提として、トマトの簡易 DNA 抽出法を検討する。DNA 抽出法はガラス濾紙抽出法を第一候補とする。また、サンプリング現場において取得した葉をガラス濾紙におしつけ、葉粗抽出液が付着したガラス濾紙を受託解析会社に送付することを想定して、最適サンプリング法と保管・輸送時の条件、ならびに DNA 抽出法を検討する（図4）。さらに千個体単位の解析を前提として、作業性についても考慮する。

幼苗選抜のパッケージモデル作成：個体毎のサンプル ID をセルトレイ単位で管理し、タブレット端末を利用してサンプリングおよび選抜を間違えることなく実施できるパッケージをモデルとして作成する。作成したパッケージ上で幼苗選抜を行った場合に、サンプリング→サンプル送付→DNA 抽出→KASP 解析→結果のとりまとめ→選抜個体の決定→現場での選抜作業に関わる作業性を検討する（図5）。

図 1

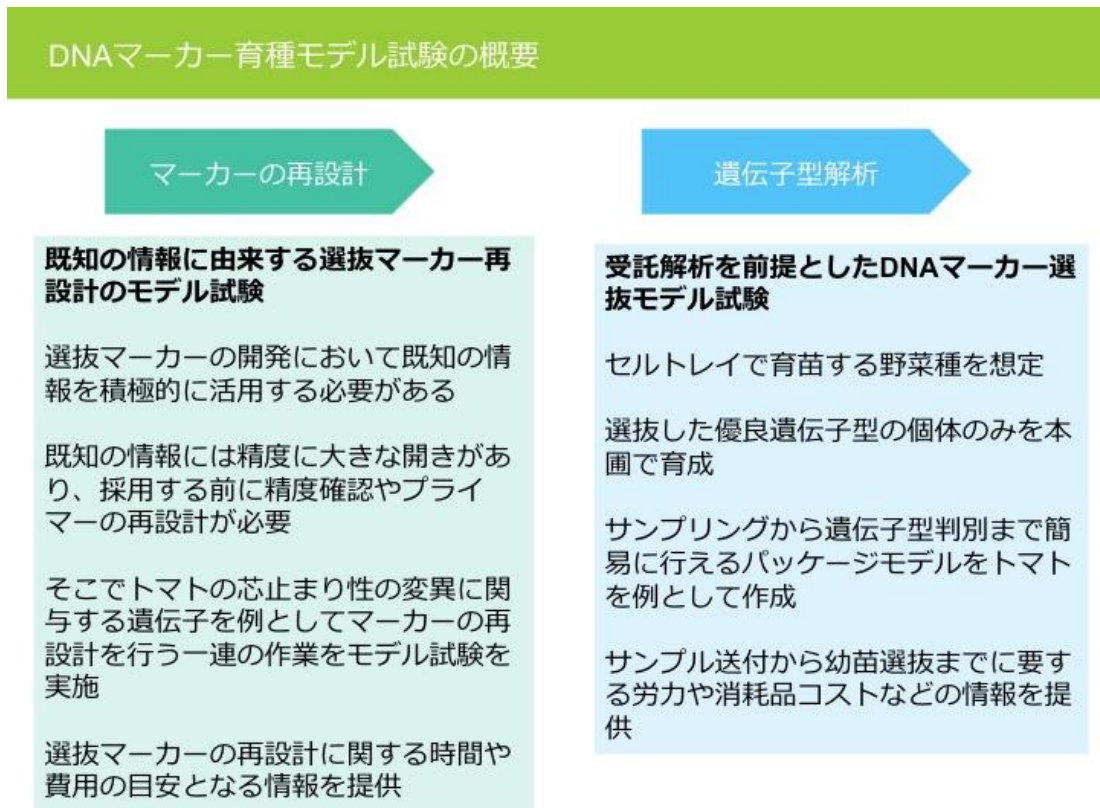


図 2

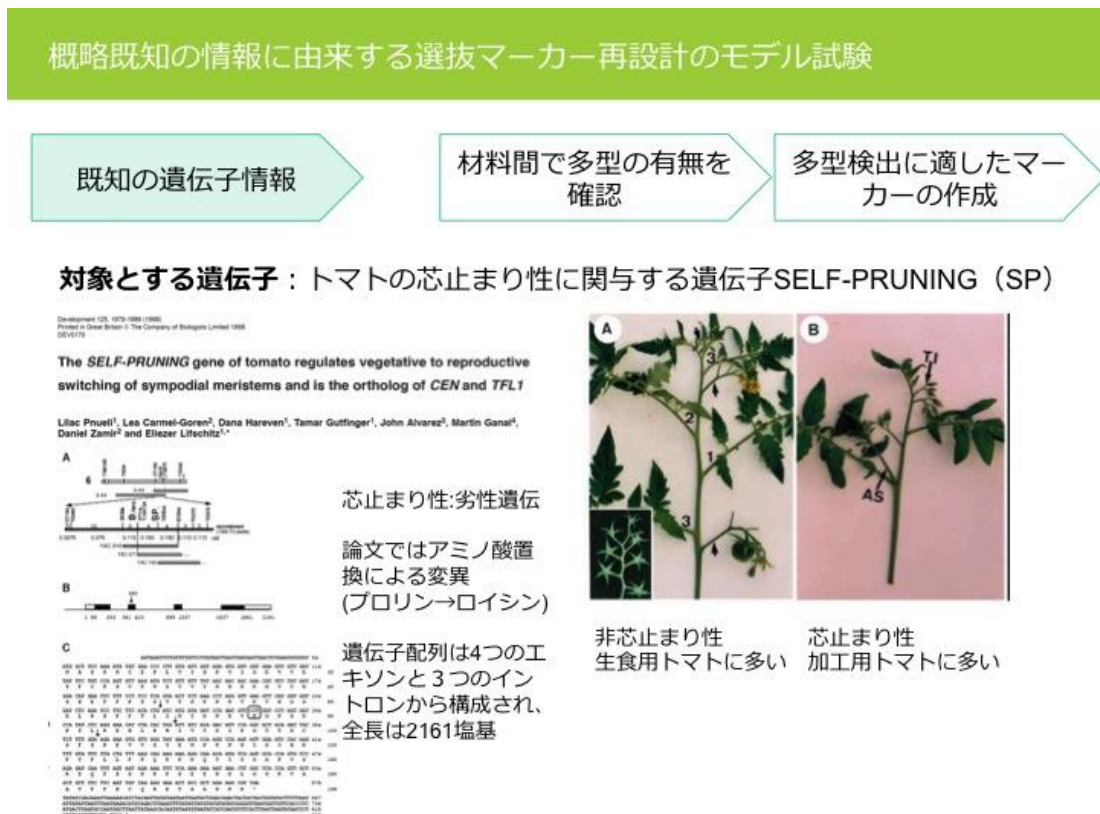


図 3

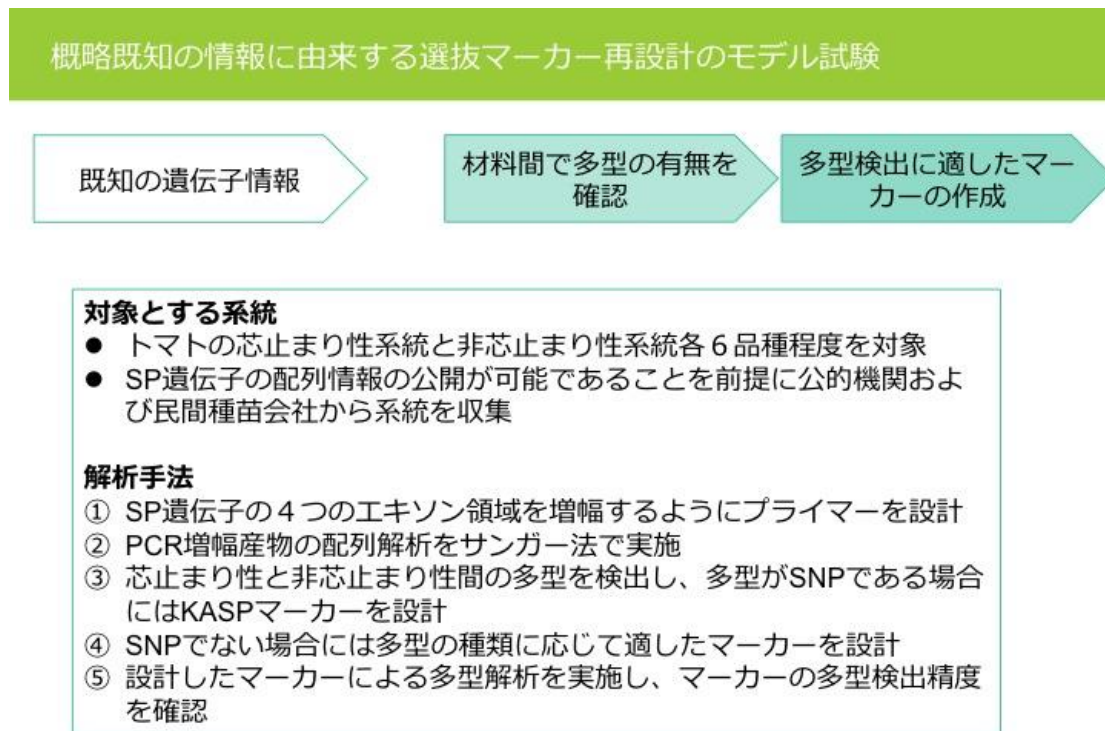


図 4

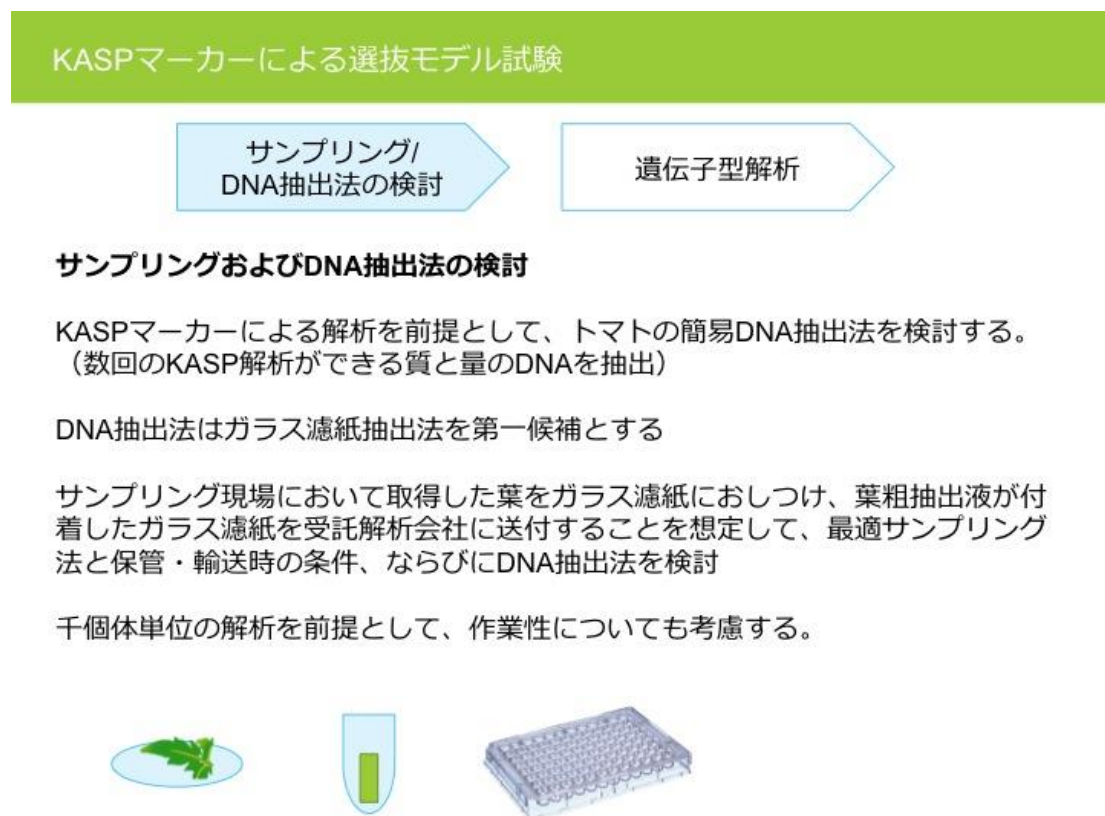


図 5

KASPマーカーによる選抜モデル試験

サンプリング/
DNA抽出法の検討

遺伝子型解析

幼苗選抜のモデルパッケージ作成

個体毎のサンプルIDをセルトレイ単位で管理し、タブレット端末を利用してサンプリングおよび選抜を間違えることなく実施できるパッケージをモデルとして作成

作成したパッケージ上で幼苗選抜を行った場合に、サンプリング→サンプル送付→DNA抽出→KASP解析→結果のとりまとめ→選抜個体の決定→現場での選抜作業に関わる作業性を検討。

