

## RT-PCRによる植物有用遺伝子のcDNAクローニングと 育種への応用

北 宜裕・柳下良美・大矢武志・道券秀雄\*・河田隆弘・上西愛子・野村 研

### RT-PCR as a Powerful Tool for Plant cDNA Cloning and Molecular Breeding

Nobuhiro KITA, Yoshimi YAGISHITA, Takeshi OHYA, Hideo DOKEN\*,  
Takahiro KAWATA, Aiko KAMINISHI, and Ken NOMURA

#### 摘 要

近年、急速な発展を遂げているDNAマーカーを利用した育種手法は、園芸作物のような個別性が求められる品種開発を短期間で実施する上で極めて有効な手法である。DNAマーカーの開発には数多くの有用遺伝子を単離する必要があるため、ダイアンサス、タマネギ及びカラシナ等の園芸植物にRT-PCR法を適用し、アントシアニン色素や辛味成分の生成に関与する遺伝子群の単離を試みた。RT-PCRで利用するプライマーは、公開されている遺伝子データベースを利用した相同性解析等により設計した。その結果、3科3属12種の作物から19の部分cDNA断片を単離することができ、さらに、これをRFLP解析に用いたところ多型が検出され、DNAマーカーの開発に適用できることが明らかになった。以上の結果から、RT-PCR法はゲノム解析の進んでいない園芸作物からの効率的な有用遺伝子の単離及びDNAマーカー開発に極めて有効な手法であることが示された。

#### 謝 辞

本研究を実施するにあたり、横浜市立大学木原生物学研究所笹隈哲夫教授には終始ご指導をいただくとともに、本報告を作成するにあたってはご校閲の労をとっていただいた。ここに記して感謝の意を表する。

キーワード：RT-PCR, DNAマーカー, 相同性解析, ゲノム解析

#### Summary

Recent advance in the development of DNA markers contributes to the efficient breeding for a wide range of horticultural crops. RT-PCR was applied to clone useful cDNAs for developing DNA markers conferring genes involved in anthocyanin biosynthesis, allicin and isothiocyanate formation from *Dianthus* plants, onion, mustard green, respectively. Primers used in the RT-PCR were designed on the basis of sequence homology of the corresponding genes using public databases and/or computer-based analysis of the homologous cDNAs. Nineteen clones of partial cDNA fragments for chalcone synthase, dihydroflavonol 4-reductase, anthocyanidin synthase and myrosinase have been cloned from 3 families, 3 genus and 12 species. Some of the cloned cDNAs were used as probes for southern blot analysis, which revealed RFLPs among 5 different mustard green varieties. These results indicate that RT-PCR is a powerful tool for cloning cDNAs from various horticultural crops, of which genome analysis have not been performed.

**Keywords:** RT-PCR, DNA marker, homology analysis, genome analysis

## 緒 言

近年、急速な発展を遂げているDNAマーカーを利用した育種は、園芸作物のような個別性が高く、商品性が要求される品種開発を短期間的に実施する上では極めて有効な手法である (Williams and Earle 1991)。育種に利用できるDNAマーカーを効率的に開発するためには、有用遺伝子を数多く単離する必要があるが、園芸作物では、イネやトウモロコシ等の主穀類あるいは実験植物であるシロイヌナズナ等とは異なり、ゲノム解析を含めた遺伝子レベルでの研究はほとんど行われていない (出畑 2001)。このような状況の中で、近年、効率的な遺伝子単離手法としてRT-PCR法が開発された (Lee ら 1987)。RT-PCRは、mRNAを鋳型にした逆転写によりcDNAを合成し、引き続いてそのcDNA内部の特定領域に作成した1組の特異的プライマー組合せによりその該当する部分cDNAをPCRにより増幅・単離する手法である。

このRT-PCR法が、園芸作物における部分cDNAクローニングに広く適用できるかどうかについて体系的に検討された事例はない。しかし、有用なcDNAが単離できれば、全長cDNAクローンの単離のみならず、RFLPs (Botstein ら 1980) やCAPS解析 (Konieczny and Ausubel 1993) に適用することにより、DNAマーカーを開発するのは技術的に難しいことではない。

RT-PCR法では、逆転写及びその後のPCR段階で利用するプライマーの設計がポイントになる。目的遺伝子にホモログが多数存在する場合には、遺伝子配列に関する各種データベースを利用した相同性解析により保存領域を抽出し、そこに配列特異性の高いプライマーを設計する手法が一般的に適用されている (今西・宮崎 2001, 池尾 2001)。また、理論的には、単離されている相同なcDNA数が少なくても、育種対象となる形質に関わる遺伝子のホモログが同種あるいは近縁植物で単離されれば、その構造解析に基いて特異性の高い部位にプライマーを設計することによって目的遺伝子を高い確率でクローニングできるはずである。

そこで、本研究では、現在育種に取り組んでいるタマネギ、ダイアンサス属植物及びカラシナ・タカナ類等の園芸作物にRT-PCR法を適用し、アントシアニン色素の生合成系やアリシンあるいはイソチオシアネート等の植物の二次代謝産物の生成に関与する遺伝子群の単離を試みた。その結果、ユリ科、ナデシコ科及びアブラナ科の3属12種の園芸品種・作物からDNAマーカーとしても利

用可能な19のcDNAクローンが単離できた。さらに単離したcDNAをRFLP解析に用いることにより、多型も検出されるなどDNAマーカー開発にも適用できることが明らかになったので、それらを取りまとめて報告する。

## 材料及び方法

### 1. 植物材料

本研究では、ゲノムサイズが極めて大きいタマネギを含むユリ科ネギ (*Allium*) 属 (Arumuganathan and Earle 1991, Lambani and Elkington 1987)、カーネーションのほか、当所で多くの野生種を保有しているナデシコ科ダイアンサス (*Dianthus*) 属植物、多くの有用野菜類が含まれ、当所での育種実績のあるアブラナ科ブラシカ (*Brassica*) 属のカラシナ (*B.juncea*) 及びこれらの植物種とは遠縁の花き園芸種であるリモニウム (*Limonium hybrid*) を用いた。ネギ属については、タマネギ (*A.cepa*, ‘早生湘南レッド’ 及び ‘ホワイトスパニッシュ’), アサツキ (*A.schoenoprasum*, 新潟園試系), ニンニク (*A.sativum*, ‘ホワイト六片’), ワケギ (*A.wakegi*, 当所保存系統), ニラ (*A.tuberosum*, ‘グリーンベルト’), ラッキョウ (*A.chinense*, ‘らくだ’), シャロット (*A.ascalonicum*, 当所保存系統) 及びネギ (*A.fistulosum*, ‘湘南’) を使用した。ダイアンサス属植物については、野生種の *D.superbus*, *D.monspessulanus*, *D.tymphaestens*, *D.gallicus*, *D.gratianopolitanus* 及び *D.plumarius* を用いた。また、カラシナ (*B.juncea*) については、‘大山菜’, ‘晩生平茎大葉高菜’, ‘清国青菜’, ‘大山そだち’ 及び ‘さがみグリーン’ の5品種を供試した。リモニウムについては、‘ミスティブルー’ 及び同品種から芽条変異により育成された ‘ミスティピンク’, ‘サンシャインブルー’ 及び ‘オーシャンプルー’ の4品種を用いた。

種子繁殖性植物であるタマネギ, ニラ, ネギ及びカラシナについては、ガラス温室内で播種し、育成した複数の個体からmRNA及び全DNAを抽出した。栄養繁殖性植物であるアサツキ, ニンニク, ワケギ, ラッキョウ, シャロット, すべてのダイアンサス属植物及びリモニウムについては、ビニルハウスまたはガラス室で育成した複数のクローン個体を供試した。

### 2. mRNAの抽出

各植物からのmRNAの抽出には、いずれもQuick Prep Micro mRNA Purification kit (アマシャムファルマシアバイオテック; グアニジウムチオシアネート法)

第1表 本研究で作成したプライマーの塩基配列

名称	塩基配列	塩基数	対象 cDNA	参照配列*
oni-alli361F	5'TGGCACAGAATGAGCTACTT	20	アリイナーゼ	L48614(白タマネギ), Z12622(ニンニク), AB004269(ニラ), Z12620(シャロット)
bar-chsF	5'-GGAGCCGATTACCAACTCAC-3'	20	カルコン合成酵素	Z67982(カーネーション)
car-chsF	5'-TGTAGTAGAAAAATGGCATCA-3'	22	カルコン合成酵素	X58339(オオムギ), D10661(エンドウ)
car-dfrF	5'-TGTGATTCAAGTTCTTGTATG-3'	21	ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ	Z67893(カーネーション)
car-dfr39F	5'-CATTTGTAACAAAAAATG-3'	20	ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ	Z67893(カーネーション)
car-dfr1142R	5'-TGCATCGTTACATCAGGACTG-3'	21	ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ	Z67893(カーネーション)
car-f3h87F	5'-ATCAACTACGACTGCATATT-3'	20	フラバノン3-ヒドロキシラーゼ	DCFHT(カーネーション)
car-f3h1240R	5'-TATAATGAAACCAACCAAG-3'	20	フラバノン3-ヒドロキシラーゼ	DCFHT(カーネーション)
maiz-f3h187F	5'-GCGAGGACTGGGGCATCTT-3'	19	フラバノン3-ヒドロキシラーゼ	U04434(トウモロコシ)
fsy-ans122F	5'-CAATCAATCCCCAAAGAGT-3'	19	アントシアニン合成酵素	Y07623(レンギョウ)
car-ans61F	5'-CATTCCTAAGGAGTATGTGA-3'	20	アントシアニン合成酵素	U82432(カーネーション)
car-ans112F	5'-CGTATTCGAGGAGGAAAAGA-3'	20	アントシアニン合成酵素	U82432(カーネーション)
car-ans1093F	5'-ACAAACACACAATCGTAAAC-3'	20	アントシアニン合成酵素	U82432(カーネーション)
mt-dmyrF	5'-TATTAACCATGAAGCTTC-3'	18	ミロシナーゼ	L11258(カブ), X79080(ナタネ), X59879(シロガラシ)
oligo dT M13M4`	5'-(T) <sub>30</sub> -GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	37	ポリ A 付加配列	-

\* カスタムプライマーを作成するときの相同性解析等で参照した塩基配列の GenBank 登録番号, \* 構造遺伝子断片の配列, \* これのみ宝酒造社製

を用いた。ネギ属植物では多糖類を中心としたきょう雑物が少ない葉しょう部または根の、ダイアンサス属植物についてはつぼみ花卉の及びその他の植物では若い葉の組織100mgからkitのプロトコルに従って、それぞれ mRNA を抽出した。

### 3. 特異的プライマーの設計

RT-PCRに用いる特異的プライマーの設計には、まず、GenBankに登録されているDNA配列情報データベースを利用して目的遺伝子のホモログを検索し、解析ソフト GENETYX™を用いて相同性解析を行うことにより保存領域を抽出した。次に、解析ソフトOLIGO™を利用して、保存領域のうち最も特異性が高く、自己相補的な配列を含まず、かつできるだけ大きいクローンが得られる部位を選び、そこに18~22塩基対のオリゴ核酸プライマーを設計した。プライマーは、アマシャムファルマシアバイオテク社にカスタムプライマーとして合成委託した。今回作成したプライマーの塩基配列及び参照した遺伝子のGenBank登録番号等は第1表に取りまとめた。

ネギ属特有の辛味成分の生成に関わる酵素であるアリイナーゼ(alliinase (ALLi), EC 4.4.1.4) のcDNAについては、タマネギ、ニンニク、ニラ及びシャロットからそれぞれ単離されているALLi-cDNAの間で相同性解析を行って保存領域を抽出し、さらに白タマネギ品種 'Southport White Globe' から単離されているALLiの構造遺伝子との配列比較により、イントロンが含まれない部位で、最も大きなcDNA断片が得られる上流域に

oni-alli361Fを設計した。

フラボノイド合成系の起点物質で、アントシアニン色素の前駆体でもあるカルコンの生成に関わるカルコン合成酵素(chalcone synthase (CHS), EC 2.3.1.74)については、既報の単子葉植物のオオムギ(*Hordeum vulgare*)と双子葉植物のエンドウ(*Pisum sativum*)のCHS-cDNA間で相同性解析を行い、抽出されたcDNA上流域の保存性の高い部位にオオムギの塩基配列をもとにbar-chsFを作成した。また、ダイアンサス属植物については、カーネーションのCHS-cDNAの開始コドンを含む部位にcar-chsFを設計した。

アントシアニン色素合成系のキーエンザイムであるジヒドロフラボノール4-レダクターゼ(dihydroflavonol 4-reductase (DFR), EC 1.1.1.219), フラバノン3-ヒドロキシラーゼ(flavanone 3-hydroxylase (F3H), EC 1.14.11.9)及びアントシアニン合成酵素(anthocyanidin synthase (ANS), EC 1.14.1.1)については、それぞれカーネーションのDFR-cDNAをもとにcar-dfrF, car-dfr39F及びcar-dfr1142Rを、トウモロコシとカーネーションのF3H-cDNAをもとにmaiz-f3h187F, car-f3h87F及びcar-f3h1240Rを、また、レンギョウ(*Forsythia × intermedia*)及びカーネーションのANS-cDNA配列をもとにfsy-ans122F及びcar-ans61F, car-ans112F及びcar-ans1093Rをそれぞれ設計した。

ブラシカ属植物に特徴的な辛味成分であるイソチオシアネートの生成を触媒する酵素、ミロシナーゼ

(myrosinase (MYR), EC 3.2.3.1)のcDNAについては、カブ(*B.campestris*)から単離されているMYRの構造遺伝子配列、ナタネ(*B.napus*)及びシロガラシ(*Sinapis alba*)のMYR-cDNA配列との相同性解析から、保存性が高く、イントロンを含まない開始コドン周辺領域に *mtd-myrF* を設計した。

#### 4. RT-PCR

RT-PCRは、RNA PCR kit (AMV) ver.2.1 (宝酒造)を用い、kitのプロトコルに従って、GeneAmp™ PCRシステム (パーキンエルマー)で実施した。逆転写は42°C、30分とし、PCRに移行する前に99°Cで5分間処理して逆転写酵素を不活化した。続くPCRにおけるフォワードプライマーには前項3で設計したプライマーを用いたが、リバースプライマーには主にポリA付加配列を標的にしたoligo dT にM13M4を付加したoligo dT M13M4 (宝酒造)を用いた(第1表, 第1図)。ただし、nested PCRでは、フォワード及びリバースプライマーともに既知のcDNA配列内に設計したプライマーを用いた。PCRは、いずれも94°Cで4分間、熱変性前全処理を行った後、熱変性は94°Cで30秒、伸長反応は72°Cで2分及び最終伸長反応は72°Cで4分とし、30または35サイクル反応させた。アニーリング温度については、再現性が高く、安定した増幅DNA断片が得られる温度を個別

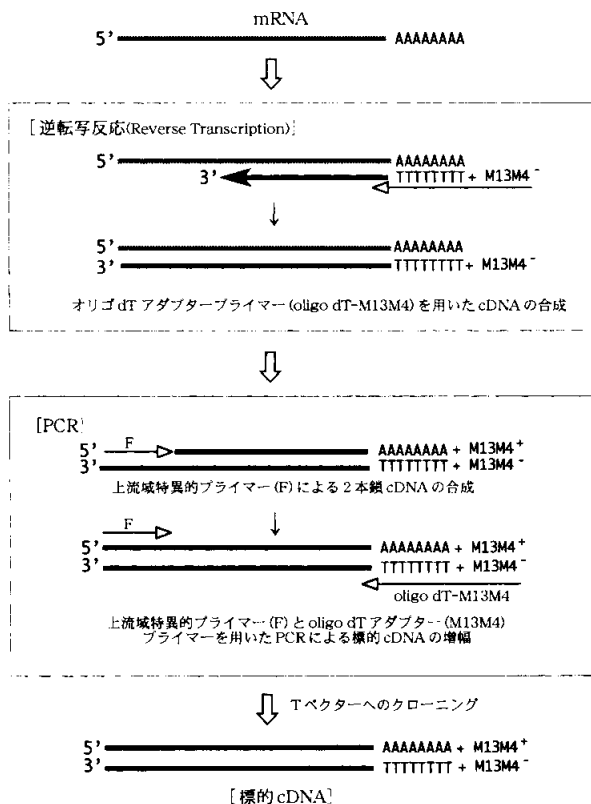
に検討して設定した。

#### 5. 増幅されたcDNAのクローニングと塩基配列の決定・解析

増幅cDNA断片を含むRT-PCR産物は、アガロースゲル(1%)電気泳動により分画し、使用したプライマーの位置から予想される大きさのDNA断片を切り出し、スピнкаラムを用いて精製した後、Ligation kit ver.2 (宝酒造)を用いて、pT7Blue (ノバジェン)に連結・挿入した。このコンストラクトを大腸菌JM109系統(宝酒造)に形質転換し、制限酵素切断またはPCRにより挿入DNA断片の存在を確認した後、塩化セシウム法により純化した。以上の一連の操作は、Sambrookら(1989)の方法に従った。pT7BlueにクローニングされたDNA断片の塩基配列は、ダイデオキシシクロシークエンシング法によりDNAシークエンサABI373S (エービーアイ)を用いて決定した。塩基配列は、pT7Blueのマルチクローニング部位の両端に配置されているT7プロモータ及びU19領域特異的なT7(5'-TAATACGACTCACTATA-3')及びU19(5'-GGTTTTCCCAGTCACGACG-3')ユニバーサルプライマーを用いて挿入DNA断片の両端をまず決定した後、既読配列内に順次シークエンプライマーを設計することにより、オーバーラップさせながら双方向から全塩基配列を読み取った。塩基配列が明らかになったDNA断片については、BLASTを用いた相同性検索により相同性の高い塩基配列データを抽出し、GENETYX™を利用して相同性解析を行った(今西・宮崎 2001, 池尾 2001)。

#### 6. サザンブロット解析

各植物の全DNAについては、いずれもPhytoPure DNA Extraction kit (アマシャムファルマシアバイオテック)を用いて、mRNA同様に若い葉または葉しょう部の組織1gからkitのプロトコルにしたがって調製した。サザンブロット解析には、その10 µgを37°Cで8時間、適切な制限酵素で消化し、1%アガロースゲル電気泳動により分画した。臭化エチジウム染色により分離パターンを確認した後、ナイロンメンブレン (Hybond N+ ; アマシャムファルマシアバイオテック)に転写し、0.4Mの水酸化ナトリウム溶液でアルカリ固定した。ハイブリダーゼーションシグナルの検出には、AlkPhos DIRECT kit (アマシャムファルマシアバイオテック ; カリウム/SDS法)を用い、kitのプロトコルに従ってアルカリフォスファターゼ標識した標的cDNAをプローブにして30分間プレハイブリダイゼーションした後、2時間ハイブリダイズした。



第1図 RT-PCRによる標的cDNA断片の単離手法

第2表 すでに単離されているタマネギの茎葉発現型(L)<sup>2</sup>及び根発現型(R)<sup>1</sup>アライナーゼcDNA 配列と本研究で8種のネギ属作物から単離したcDNA間(左下段)およびその推定アミノ酸配列(右上段)間における相同性(%)

組み合わせ	タマネギ(L)	タマネギ	アサツキ	ニンニク	ワケギ	ニラ	ラッキョウ	シャロット	ネギ	タマネギ(R)
タマネギ(L)	—	100	96.4	91.2	100	85.8	93.6	98.6	57.5	58.6
タマネギ	99.9	—	96.4	91.2	100	85.8	93.6	98.6	57.5	58.6
アサツキ	94.2	94.1	—	90.3	96.4	85.5	93.0	95.0	58.4	58.9
ニンニク	90.5	90.8	89.6	—	91.2	83.1	91.2	89.8	57.8	56.6
ワケギ	99.9	99.8	94.1	89.4	—	85.8	93.6	98.6	57.5	58.6
ニラ	85.3	85.4	83.9	81.9	84.9	—	87.7	84.4	57.9	57.5
ラッキョウ	92.9	93.3	91.9	88.8	92.2	84.0	—	92.2	57.5	57.5
シャロット	99.5	99.5	93.8	89.5	98.9	84.8	92.3	—	56.4	57.8
ネギ	64.2	64.0	64.5	63.5	63.6	63.0	63.3	63.4	—	79.1
タマネギ(R)	62.8	63.0	62.8	62.1	61.9	63.2	62.7	62.0	76.5	—

GenBank 登録番号: <sup>1</sup>M98267, <sup>2</sup>AF126049

## 結 果

### 1. ネギ属植物からのアライナーゼcDNA断片の単離

赤タマネギ, アサツキ, ニンニク, ワケギ, ニラ, ラッキョウ, シャロット及びネギの8種のネギ属からALLi-cDNAの単離を試みた. ALLi-cDNA特異的プライマーとして設計したoni-alli361Fとoligo dT M13M4とを用いて, 上記8種のネギ属植物から抽出したmRNAを鋳型にRT-PCRを行った. その結果, PCRでのアニーリング温度を50℃とし, 35サイクル反応させたところ, いずれのネギ属植物においても再現性良く, 単一のDNA断片が増幅された(第2図). この増幅DNA断片をクローニングし, それらの塩基配列及び推定アミノ酸配列における相同性解析を行った(第2表). その結果, ネギ以外のcDNAについては, 既報のタマネギ茎葉発現型(M98267 (GenBank 登録番号, 以下同様))のALLi-cDNAと80~100%の極めて高い相同性が認められた. 一方, ネギから単離されたcDNAは, 茎葉発現型ALLi-cDNAとは60%程度の低い相同性しか示さなかったが, Lancasterら(2000)が単離したタマネギの根発現型ALLi-cDNA (AF126049)とは77%の相同性が認められた. そこで, 今回単離したすべてのcDNAに, 既報のタマネギの茎葉発現型と根発現型ALLi-cDNAを加えて, その推定アミノ酸配列レベルでのアライメント解析を行ったところ, 共通アミノ酸残基が4残基以上続く保存領域が12箇所を検出された(第2図, アンダーライン部分). 以上の結果から, 今回設計したoni-361Fプライマーを用いたRT-PCRにより, 8種のネギ属植物から単離されたcDNAは, ALLi-cDNAをコードしているこ

と(第3表)及びALLiには茎葉発現型及び根発現型の少なくとも2種類のアイソザイムが存在することが明らかになった.

### 2. タマネギからのカルコン合成酵素及びジヒドロフラボノール 4-レダクターゼcDNA断片の単離

赤タマネギCHS及びDFRのcDNAを単離した. ネギ属植物からは, いずれのcDNAあるいはその構造遺伝子とともに単離されていないため, CHSについてはbar-chsFを, また, DFRについてはcar-dfrFを用い, oligo dT M13M4とそれぞれ組み合わせて, 赤タマネギ品種‘早生湘南レッド’及び白タマネギ品種‘White Spanish’から抽出したmRNAを鋳型にRT-PCRを行った. その結果, PCRでのアニーリング温度を57℃とし, 35サイクル反応させた場合, いずれのプライマー組み合わせにおいても, 両タマネギ品種から再現性良く, 単一のDNA断片が増幅された(CHSについては第2図B, DFRについてはデータ未掲載).

このDNA断片の塩基配列を決定したところ, CHSについては, 既報のエンドウ及びガーベラのCHS-cDNA(それぞれD10661及びZ38096)といずれも83%の高い相同性が認められた. また, DFRについては, カーネーションのDFR-cDNA (Z67983)とは98%の, また, ガーベラのDFR-cDNA (Z17221)とも89%の高い相同性が認められたことから, 得られたcDNAクローンはそれぞれ目的とするタマネギのCHS及びDFRをコードする部分cDNA断片であると判断された(第2, 3表).

タマネギ葉型	1: <u>WHRMSYF</u> FNP--VS-NFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVLSLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTK	87
タマネギ	1: <u>WHRMSYF</u> FNP--VS-NFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVLSLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTK	87
アサツキ	1: <u>WHRMSYF</u> FNP--VS-NFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVLSLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTK	87
ニンニク	1: <u>WHRMSYF</u> FNP--VS-NFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVLSLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTK	87
ワケギ	1: <u>WHRMSYF</u> FNP--VS-NFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVLSLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTK	87
ニラ	1: <u>WHRMSYF</u> FNP--VS-NFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVLSLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTK	87
ラッキョウ	1: <u>WHRMSYF</u> FNP--VS-NFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVLSLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTK	87
シャロット	1: <u>WHRMSYF</u> FNP--VS-NFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVLSLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTK	87
ネギ	1: <u>WHRMSYF</u> LDPSFIPDNFMSKELDKHIRLLHKAVGNQAKVDKFLVFGNVTQLLNGVITLSLSPNMTATPSAPIKVVAVYVPYVFKSQTK	90
タマネギ根型	1: <u>WHRMSYF</u> L--G---HNFMSDELDRHIRLLHNAVGNQAKVDKFLVFGNVTQLLNGVITLSLSPNMTATPSAPIKVVAVYVPYVFKSQTS	85
*****		
タマネギ葉型	88: YFDKKG <sup>Y</sup> EWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	177
タマネギ	88: YFDKKG <sup>Y</sup> EWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	177
アサツキ	88: YFDKKG <sup>Y</sup> EWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	177
ニンニク	88: YFDKKG <sup>Y</sup> EWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	177
ワケギ	88: YFDKKG <sup>Y</sup> EWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	177
ニラ	88: YFDKKG <sup>Y</sup> EWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	177
ラッキョウ	88: YFDKKG <sup>Y</sup> EWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	177
シャロット	88: YFDKKG <sup>Y</sup> EWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	177
ネギ	91: FFRFRGYEWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	180
タマネギ根型	86: FFRFRGYEWKGNAAADYVNTSTPEQFIEMVTS <sup>PNN</sup> FEGLLRHEIVIKGCKSIYDMVY <sup>WPHY</sup> TIKYKADEIDIMLFTMSKYTGHSGRFGWA	175
*****		
タマネギ葉型	178: LLIKDETVYNNLLNYMTKNTGEGTSRETLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	267
タマネギ	178: LLIKDETVYNNLLNYMTKNTGEGTSRETLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	267
アサツキ	178: LLIKDETVYNNLLNYMTKNTGEGTSRETLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	267
ニンニク	178: LLIKDETVYNNLLNYMTKNTGEGTSRETLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	267
ワケギ	178: LLIKDETVYNNLLNYMTKNTGEGTSRETLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	267
ニラ	178: LLIKDETVYNNLLNYMTKNTGEGTSRETLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	267
ラッキョウ	178: LLIKDETVYNNLLNYMTKNTGEGTSRETLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	267
シャロット	178: LLIKDETVYNNLLNYMTKNTGEGTSRETLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	267
ネギ	181: FVRDRAYYDKLKTVMATNSEGVSRDQLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	269
タマネギ根型	176: FVRDRAYYDKLKTVMATNSEGVSRDQLRSLKILKEVIAMVKTQKGTMRDLNTFGFQKLRERWVNITSLLDKSDRFSYQKLQPSQYCNFY	264
*****		
タマネギ葉型	268: RRMRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	354
タマネギ	268: RRMRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	354
アサツキ	268: RRMRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	354
ニンニク	268: RRMRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	357
ワケギ	268: RRMRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	354
ニラ	268: RRMRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	352
ラッキョウ	268: RRMRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	354
シャロット	268: RRMRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	354
ネギ	270: KRVDRPSPSYAMV <sup>KCE</sup> WEEDKDCYQTFQNGRINTQNGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	359
タマネギ根型	265: QRTRNPSPTYGNL <sup>KCE</sup> WEEDTDCAVLQNGIILTQSGVLFEASSRYARLSLTKTKDDFDQLMYYLKNMVEAKRKTPLIKQLSNDQ---IS	352
*****		
タマネギ葉型	355: <u>RRPFI</u> -----	359
タマネギ	355: <u>RRPFI</u> -----	359
アサツキ	355: <u>RRPFI</u> -----	359
ニンニク	358: <u>RRPFI</u> -----	362
ワケギ	355: <u>RRPFI</u> -----	359
ニラ	353: <u>RRPFI</u> -----	357
ラッキョウ	355: <u>RRPFI</u> -----	359
シャロット	355: <u>RRPFI</u> -----	359
ネギ	360: <u>RRPFI</u> YGGDQGSYESF	375
タマネギ根型	353: <u>RRPFI</u> YGGDEGSYEST	368
*****		

第2図 8種のネギ属植物から単離された ALLi-cDNA 間の推定アミノ酸レベルでのアライメント解析。

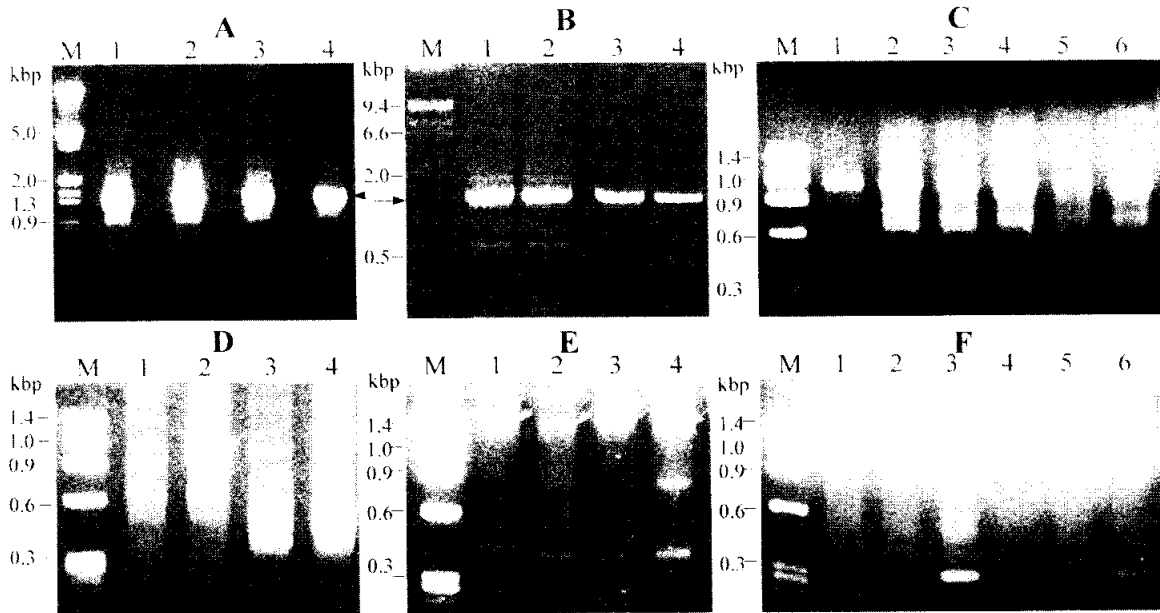
すべての cDNA クローンに共通するアミノ酸残基には「印を、また、そのうち共通するアミノ酸が4残基以上続く領域についてはアンダーラインを付すとともに該当アミノ酸残基を枠で囲った。

### 3. ダイアンサス属植物からのアントシアニン色素合成系に関するcDNA断片の単離

花壇苗として最近需要が伸びているダイアンサス属の野生種から、アントシアニン色素合成系に関する3種類のキーエンザイムであるCHS, DFR, F3H及びANSの部分cDNA断片をRT-PCRあるいはRT-PCR産物のnested PCRを組み合わせることで単離した。

CHS-cDNA は、*D. superbus*, *D. monspessulanus*, *D. tymphaestens*, *D. gallicus*, *D. gratianopolitanus*及び*D. plumarius*の6種から抽出したmRNAを鋳型に、bar-chsとoligo dT M13M4を用いてRT-PCRを行った。

PCRでのアニーリング温度を57°Cとし、30サイクル反応させた場合、1.0kbpのDNA断片が増幅された(第2図C)。このうち、*D. gratianopolitanus*及び*D. plumarius*のDNA断片の塩基配列を調べたところ、いずれもカーネーションのCHS-cDNAと77~80%の極めて高い相同性が認められ、相互にも90%以上の高い相同性を有していたことから、いずれのDNA断片ともCHSの部分cDNAをコードしているものと判断された(第3表)。また、*D. monspessulanus*については、カーネーションのCHS-cDNAの配列をもとに作成したcar-chsFとoligo dT M13M4とを組合せて、同様の条件でRT-PCRを行っ



第3図 RT-PCRによるDNA断片の増幅状況

(A) プライマー(oni-361F)はタマネギのアリナーゼ(ALLi)cDNA 配列をもとに設計. 鋳型 mRNA は, ネギ(レーン1), ニラ(レーン2), タマネギ葉鞘及び根(レーン3, 4)から抽出. リバースプライマーは oligo dT M13M4. アニール温度 45°C.

(B) プライマー(bar-chsF)はオオムギのカルコン合成酵素(CHS)cDNA 配列をもとに設計. 鋳型 mRNA は, 白タマネギ品種 'ホワイトスパニッシュ' (レーン1, 2)及び赤タマネギ品種 '早生湘南レッド' (レーン3, 4)から抽出. リバースプライマーは oligo dT M13M4. アニール温度 55°C.

(C) 上記 bar-chsF を用い, 鋳型 mRNA は 6 種のダイアンサス植物から抽出. レーン1: *D. superbus*, 2: *D. monspessulanus*, 3: *D. tymphaestens*, 4: *D. gallicus*, 5: *D. gratianopolitanus* 及び 6: *D. plumarius*. リバースプライマーは oligo dT M13M4. アニール温度 57°C.

(D) トウモロコシのフラバノン3 ヒドロキシラーゼ(F3H)cDNA およびレンギョウのアントシアニン合成酵素(ANS)cDNA 配列をもとにプライマー(maiz-f3h187F:レーン1, 2)及び(fsy-ans122F:レーン3, 4)それぞれ設計. 鋳型 mRNA は *D. gratianopolitanus* (レーン1, 3, 4)及び *D. plumarius* (レーン2)からそれぞれ抽出. リバースプライマーは oligo dT M13M4. この場合のアニール温度は 52°C としたが, いずれの増幅 DNA 断片ともその塩基配列から F3H あるいは ANS の cDNA ではないことが明らかになった.

(E) カーネーション(*D. caryophyllus*)の ANScDNA 配列をもとにプライマー(car-ans61F:レーン1, 3 及び car-ans112F:レーン2, 4)をそれぞれ設計. 鋳型 mRNA は, *D. gratianopolitanus* (レーン1, 2)及び *D. plumarius* (レーン3, 4)からそれぞれ抽出. リバースプライマーは oligo dT M13M4. アニール温度は 50°C.

(F) 上記 E の全増幅 DNA 断片(レーン1-3: *D. gratianopolitanus*, 4-6: *D. plumarius*)を鋳型に, カーネーション ANSc-DNA の3'末端領域にリバースプライマー(car-ans1093R)を作成し, car-ans61F(レーン1, 4)及び car-ans112F(レーン2, 3, 5, 6)と組み合わせた nested PCR で増幅された DNA 断片. アニール温度は 51°C.

た. その結果, 予想される1.3kbpの単一のDNA断片が増幅され, また, その塩基配列がカーネーションのCHS-cDNAと97%の高い相同性を示したことから, 増幅されたDNA断片はCHSのcDNAをコードしていることが明らかになった.

ANS及びDFRについては, *D. gratianopolitanus*及び *D. plumarius* の2種を, また, F3Hについては *D. gratianopolitanus*を用いた. ANS及びF3Hでは, それぞれ fsy-ans122F 及び maiz-F3H187F と oligo dT M13M4を用いてRT-PCRを行ったが, 反応条件をさまざまに変えても再現性のあるDNA断片の増幅は認められなかった(第2図D). また, 増幅DNA断片の一部を

クローニングしてその塩基配列も調べたが, いずれも標的とするcDNAの塩基配列とは一致しなかった.

そこで, ANSについてはカーネーションのANS-cDNA配列をもとに設計した car-ans61F 及び car-ans112F と oligo dT M13M4 とを組み合わせて同様にRT-PCRを行った. その結果, PCRステップでのアニール温度を50°Cとし, 30サイクル反応させた場合, 増幅量は少ないもののいずれのプライマー及び植物組合せにおいても期待された1.0kbpのDNA断片が増幅された(第2図E). さらに, car-ans61F 及び car-ans112F とカーネーションのANS-cDNAの3'末端領域に設計した car-ans1093R とを組み合わせ, 第2図Eで得られたRT-PCR

第3表 本研究で単離した部分 cDNA 断片

名称	大きさ (bp)	推定遺伝子産物	由来 (品 種)	GenBank accession 番号	機 能
ALLi-1A	1618	アリイナーゼ alliinase	赤タマネギ <i>Allium cepa</i> (早生湘南レッド)	AF124405	含硫アミノ酸であるアリインを加水分解して催涙性辛辣成分のアリシンを生成させる
ALLi-ast	1197	アリイナーゼ alliinase	アサツキ <i>A.schoenoprasum</i> (新潟園試系)	AF409951	
ALLi-glc	1245	アリイナーゼ alliinase	ニンニク <i>A.sativum</i> (ホワイト六片)	AF409952	
ALLi-wkg	1253	アリイナーゼ alliinase	ワケギ <i>A.wakegi</i> (神奈川農総研系)	AF409947	
ALLi-nira	1227	アリイナーゼ alliinase	ニ ラ <i>A.tuberosum</i> (グリーンベルト)	AF409949	
ALLi-rkyo	1243	アリイナーゼ alliinase	ラッキョウ <i>A.chinense</i> (らくだ)	AF409948	
ALLi-shlt	1264	アリイナーゼ alliinase	シャロット <i>A.ascalonicum</i> (神奈川農総研系)	AF409950	
ALLi-negi	1311	アリイナーゼ alliinase	ネ ギ <i>A.fistulosum</i> (湘南)	AF409954	
CHS-WSR	1114	カルコン合成酵素 chalcon synthase	赤タマネギ <i>A.cepa</i> (早生湘南レッド)	AF268382	フラボノイド生合成系の起点物質であるカルコンを合成する酵素
CHS-DPl	1153	カルコン合成酵素 chalcon synthase	<i>Dianthus plumarius</i>	未登録	
CHS-DMn	1369	カルコン合成酵素 chalcon synthase	<i>D.monspessulanus</i>	AF267173	
CHS-DGr	1020	カルコン合成酵素 chalcon synthase	<i>D.gratianopolitanus</i>	未登録	
DFR-WSR	915	ジヒドロフラボノール4-リダクターゼ dihydroflavonol 4-reductase	赤タマネギ <i>A.cepa</i> (早生湘南レッド)	AF268383	アントシアニン生合成系においてロイコ型アントシアニン(無色)を生成させる酵素
DFR-DPl	953	ジヒドロフラボノール4-リダクターゼ dihydroflavonol 4-reductase	<i>D.plumarius</i>	AF267172	
DFR-DGr	1150	ジヒドロフラボノール4-リダクターゼ dihydroflavonol 4-reductase	<i>D.gratianopolitanus</i>	AF291097	
F3H-DGr	1173	フラバノン3-ヒドロキシラーゼ flavanone 3-hydroxylase	<i>D.gratianopolitanus</i>	未登録	アントシアニン生合成系においてフラバノンの3位を水酸化する酵素
ANS-DGr	1053	アントシアニン合成酵素 anthocyanidin synthase	<i>D.gratianopolitanus</i>	未登録	ロイコ型アントシアニンからアントシニン色素を合成する酵素
ANS-DPl	1053	アントシアニン合成酵素 anthocyanidin synthase	<i>D.plumarius</i>	未登録	
MYF	1803	ミロシナーゼ myrosinase	カラシナ <i>Brassica juncea</i> (大山東)	AY014960	グルコシノレートを加水分解しイソチオシアネートを生成するチオグルコシダーゼ

産物を鋳型にnested-PCRを行ったところ、いずれも期待される1.0kbpのDNA断片が大量に増幅された(第2図F)。このDNA断片の塩基配列は、いずれもカーネーションのANS-cDNAクローンと96%の、また、サツマイモ(*Ipomea batatas*)のANS-cDNAクローンとも81%の高い相同性が認められたことから、いずれもANSの部分cDNAをコードしているものと判断された(第3表)。

F3Hについても、car-F3H87Fとoligo dT M13M4によるRT-PCR産物を鋳型にしたnested-PCRを、car-F3H87Fとcar-F3H1240Rとを用いて、アニーリング温

度50°Cで35サイクルで行った。その結果、期待される1.0kbpのDNA断片が増幅され、その塩基配列がカーネーション及びダイズのF3H-cDNAとそれぞれ99及び81%の相同性を示したことから、得られたcDNA断片は*D.gratianopolitanus*のF3H-cDNAと判断された(第3表)。

DFRについては、*D.plumarius*ではcar-dfrFを、*D.gratianopolitanus*ではcar-dfr39Fを用い、いずれもoligo dT M13M4を組み合わせてRT-PCRを行った。PCRステップでのアニーリング温度をそれぞれ62及び50°Cとし、30及び35サイクル反応させた結果、



*D. plumarius*では単一のDNA断片が再現性良く増幅されたが、*D. gratianopolitanus*ではDNA増幅が不十分であった。そこで、後者について、そのPCR産物を鋳型にcar-dfr39Fとcar-dfr1142Rを用いたnested PCRを行ったところ、単一のDNA断片が増幅された。上記2種から得られたDNA断片の塩基配列は、いずれもカーネーションのDFR-cDNA (Z67983)とそれぞれ98及び96%の、また、両者間でも98%の高い相同性が認められたことから、得られたcDNAクローンはDFRをコードする部分cDNA断片であると判断された(第3表)。

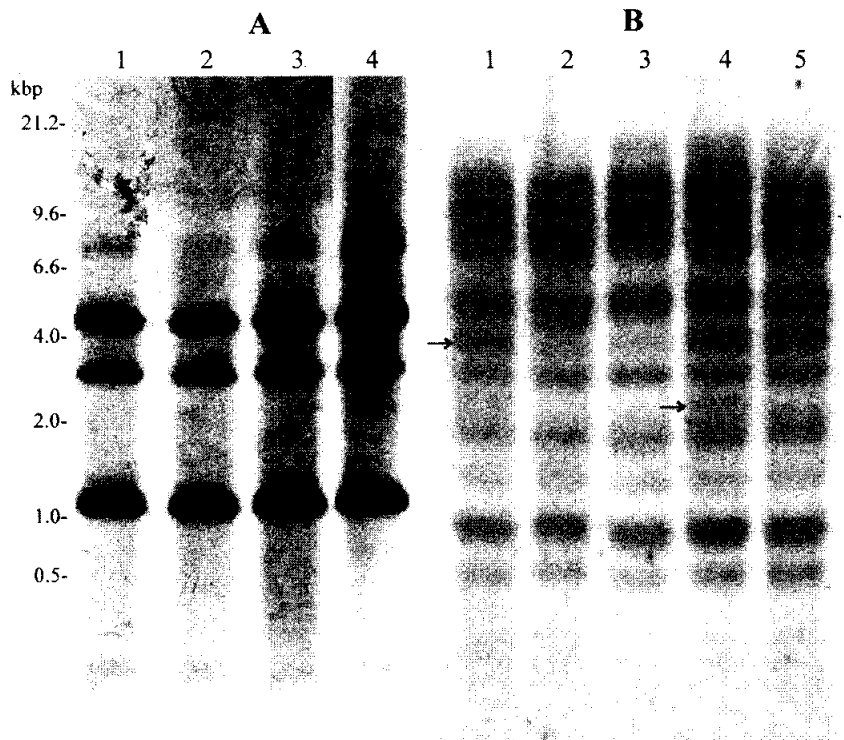
#### 4. カラシナからのミロシナーゼcDNA断片の単離

カラシナのMYR-cDNAについては、‘大山菜’のmRNAを鋳型に、mtd-myrFを用いたRT-PCRにより単離した。PCRステップでのアニーリング温度は50°Cとし、35サイクル反応させた結果、予想される1.8kbpのDNA断片が増幅された。その塩基配列を調べたところ、他のカラシナ及びナタネから単離されているMYR-cDNAといずれも90%の高い相同性が認められたことか

ら、得られたDNA断片はMYRをコードしているものと判断された(第3表)。

#### 5. RFLP解析

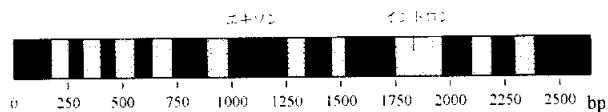
本研究で、赤タマネギ品種‘早生湘南レッド’から単離したDFRのcDNAをプローブに、タマネギとは極めて遠縁のリモニウムに対してサザンブロット解析を適用した。サザンブロットには、‘ミスティブルー’ほか4品種から調製した全DNAの*EcoRI*消化産物を用い、52°Cでハイブリダイズさせた。その結果、いずれの品種においても同じ分子量の強いシグナルが3か所で認められ、リモニウムのゲノムDNAにもタマネギと相同性の高いDFR構造遺伝子が存在することが明らかになった(第4図A)。次に、カラシナから単離したMYR-cDNAをプローブに、‘大山菜’ほか5品種から調製した全DNAの*EcoRV*消化産物に対するサザンブロット解析を行った。MYRの構造遺伝子は、イントロンにより11断片に細かく分断されているため(第5図)、MYR-cDNAを用いた場合、十分にハイブリダイズしない可能性が予想された。



第4図 RT-PCRにより単離したcDNAクローンをを用いた制限酵素断片長多型

(A) 赤タマネギ品種‘早生湘南レッド’から単離したジヒドロフラボノール4-レダクターゼ(DFR)cDNAをプローブに、タマネギとは極めて遠縁のリモニウム4品種から調製した全DNAの*EcoRI*消化産物に対するサザンブロット解析像。レーン1:ミスティブルー, 2:ミスティピンク, 3:サンシャインブルー, 4:オーシャインブルー。ハイブリターゼーション温度は52°C

(B) カラシナ品種‘大山菜’から単離したミロシナーゼ(MYR)cDNAをプローブに、相互に類縁関係にあるカラシナ5品種から調製した全DNAの*EcoRV*消化産物に対するサザンブロット解析像。レーン1:大山菜, 2:晩生平茎大葉高菜(晩平菜), 3:清国青菜, 4:大山そだち(大山菜×晩平菜), レーン5:さがみグリーン(大山菜×清国青菜)。ハイブリターゼーション温度は48°C。矢印は、いずれも多型バンドを示す。



第5図 ミロシナーゼ(MYR)のゲノム遺伝子構造\*

\*カブ(*B.campestris*)から単離されているMYR構造遺伝子配列(GenBank登録番号L11258)と今回単離したカラシナ(*B.juncea*)のcDNA配列から作成した。

そこで、48°Cという低い温度でハイブリダイズさせたところ、シグナル強度はやや弱いものの、複数のハイブリダイゼーションバンドが検出され、一部に多型も認められた(第4図B)。

## 考 察

植物育種において、DNAマーカーはあくまでも従来の形態的あるいは生化学的マーカーと同じレベルで利用されるものである。しかし、DNAマーカーを利用すれば、小さな植物体の段階で特定形質の評価・判定ができるため、時間とスペースを顕著に省くことができる(Cramer and Harvey 1999)。ゲノム解析が進んでいない園芸作物において、育種に利用できるDNAマーカーを開発するためには、サザンブロットによるRFLP法(Botsteinら 1980)やPCRを利用したRAPD法(Williamsら1990)、AFLP法(Vosら 1995)、SSR法(Szewc-McFaddenら 1996)あるいはCAPS法(Konieczny and Ausubel 1993)等がある。このうち、RAPDあるいはAFLP法は、全DNAまたはその制限酵素消化産物を鋳型にランダムプライマーを用いて無作為にPCRを行ったときに生じる多型をもとにDNAマーカーを選抜する方法である。したがって、手法自体には論理性はなく、開発効率は悪いものの、操作が簡単で、遺伝的背景さえしっかりしていれば必ず異なるDNA配列を抽出することができる。しかし、マーカー化されたDNA配列は、ほとんどの場合、目的とする形質に直接関与する遺伝子配列ではなく、その遺伝子が座乗している遺伝子座に連鎖しているに過ぎない(Kingら 1998a)。これに対して、目的形質に直接関与する遺伝子を標的にし、その遺伝子が座乗している周辺のゲノムDNA構造の違いを検出するRFLP法や標的遺伝子の内部変異をPCRにより検出するSSRs法やCAPS法等は、直接的であるだけに、実用的なDNAマーカーの効率的な作成を可能とする(Kingsら 1998b)。この場合、効率的なcDNAの単離が極めて重要となるが、従来は遺伝子発現パターン之差を利用して、目的とするcDNAを単離する

ディファレンシャル・ディスプレイ法等が利用されてきた(Liang and Pardee 1992)。しかし、個別性が高く、研究対象としてもマイナーな園芸作物については、DNAマーカー開発のための標的として直接利用できるcDNAの単離は極めて難しい。

このような状況の中で、本研究では、タマネギ、ダイアンサス属植物あるいはカラシナ等の園芸作物における2次代謝産物の生成に関与する酵素群のうち、そのcDNAあるいは構造遺伝子が既に単離されているALLi, CHS, DFR, F3H, ANS, F3H及びMYRの7種の酵素に注目し、RT-PCRにより各植物から各酵素タンパクをコードするcDNA断片の単離を試みた。RT-PCRで利用するプライマーのうち、ALLi及びMYRについては、それぞれ同属異種植物から単離されているcDNA配列をもとに特異的プライマーを設計した。これらの特異的プライマーと高等生物のmRNAに特有なポリA付加配列を認識するoligo dT M13M4とを組み合わせるRT-PCRを行ったところ、いずれも同属の複数種から目的とするcDNA断片を再現性よく単離することができた。一方、CHSは植物に共通するフラボノイド生合成系(Grisbachら 2000)のキーエンザイムであることから、遠縁植物種のcDNA配列をもとにプライマーを設計しても目的のcDNAホモログが単離されるものと予想された。そこで、本研究ではオオムギとエンドウのCHS-cDNAの塩基配列から保存領域を抽出し、そこに特異的プライマーを作成して、タマネギ及びダイアンサス属野生種からそれぞれ調製したmRNAを鋳型にRT-PCRを行ったところ、いずれの植物からもCHS-cDNAのホモログが得られた。DFRについても、植物のアントシアニン色素生合成系で機能する酵素であることから(Holton and Cornish 1995)、カーネーションのDFR-cDNA配列をもとに作成したプライマーを同属の野生種のみならず植物的には遠縁のタマネギにも適用したところ、再現性よくDFR-cDNAのホモログを得ることができた。また、ANS及びF3Hについても、アントシアニン色素生合成系の酵素であることから(Holton and Cornish 1995)、それぞれレンギョウ及びトウモロコシから単離されているcDNA塩基配列をもとにプライマーを設計し、ダイアンサス属野生種から調製したmRNAを鋳型にRT-PCRを行った。しかし、この場合は、いずれのダイアンサス属野生種からもANS及びF3H-cDNAのホモログは単離できなかった。そこで、cDNAがすでに単離されているカーネーションのANS及びF3HのcDNA配列をもとにプライマーを設計し、同様にRT-PCR及びそれに引き

続くnested PCRを行った結果、いずれの植物からもANS及びF3HのcDNAホモログを得ることができた。

以上のように、ゲノム解析が進んでいない園芸作物においても、植物に共通する機能をつかさどる遺伝子であれば遠縁種の、また、種特異性の高い遺伝子については近縁種から単離されているDNA断片の配列をもとに適切なプライマーを設計してRT-PCRを行えば、目的とするcDNAを効率的に単離できることが明らかになった。

しかしながら、特定遺伝子を標的にしたDNAマーカー開発にはいくつかの問題点が存在する。特に、標的遺伝子が複数コピーで存在する場合や、不活化された偽遺伝子の存在は検出精度に強く影響する。通常、植物ゲノム内には同一遺伝子が複数コピー、ゲノム上の異なる部位に座乗していることも多いので (Tabataら 2000)、PCRにより単一DNA断片として検出されても、そのままではマーカー化はできない。これを解決する方法としては、異なる品種あるいは系統間に存在する遺伝的背景の差を検出するRFLPs法がある (Botsteinら1980)。RFLPs法では、単離したcDNAをプローブにして、適切な制限酵素とを組み合わせたサザンブロットにより多型を検出する手法で、作物育種分野ではこれまで多方面で利用されてきた (佐々木ら2000)。本研究では、タマネギのDFR-cDNAをプローブに、タマネギとは極めて遠縁のリモニウムに対して行ったサザンブロットでも明確なシグナルが検出された。また、カラシナにおいては、多数のイントロンにより断片化されているMYR構造遺伝子 (第5図) を標的に、そのcDNAをプローブにサザンブロットを行ったところ、明確なシグナルが検出されるとともに、一部に多型も認められた。解析に用いたカラシナ品種のうち、'大山そだち'は'大山菜'に'清国青菜'を、'さがみグリーン'は'大山菜'に'晩生平茎大葉高菜'をそれぞれ交雑し、その後代選抜により育成された品種である。したがって、ここで認められた多型を利用することにより、今後、これらの品種の相互判別を可能とするDNAマーカーが作成できるものと期待される。

今回は、RT-PCRを用いて複数の園芸作物から、効率よく目的遺伝子のcDNAを単離できること及びそのcDNAクローンがDNAマーカー開発に利用できることを明らかにした。DNAマーカーを利用した育種は、農業分野においてもはや実用段階に到達している。今後、多くの作物でもゲノム解析が急速に進展するとともに、有用遺伝子についてはその特許化も進むものと予想される (田畑2001)。このような状況の中で、育種対象とする園芸作物から有用遺伝子のcDNAを数多く単離し、そ

れらを実用DNAマーカー化として積極的に利用することにより、育種の効率化がさら進展するものと期待される。

## 引用文献

- Arumuganathan, K. and E.D.Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:208-218.
- Botstein,D.,R.L.White,M.Skolnick, and R.W.Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hem. Genet.* 32:314-331.
- Cramer,C.S., and M.J.Hayvey. 1999. Morphological, biochemical, and molecular markers in onion. *HortSci.* 34:589-593.
- Grisbach, R.J., R.M.Beck, and J.R.Stehmann. 2000. Molecular heterogeneity of the chalcone synthase intron in *Petunia*. *HortSci.*35:1347-1349.
- Holton,T.A. and E.C.Cornish. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7:1071-1083.
- 池尾一穂. 2001. 配列に共通のパターンを探す. 蛋白質・核酸・酵素 46:1299-1305.
- 今西 規・宮崎 智. 2001. 既知の配列と比較する: 相同性検索. 蛋白質・核酸・酵素 46:856-862
- King,J.J., J.M.Bradeen, O.Bark, J.A.McMallum, and M.J.Harvey. 1998a. A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. *Theor.Appl.Genet.* 96:52-60.
- King,J.J., J.M.Bradeen, and M.J.Harvey. 1998b. Variability for restriction fragment-length polymorphisms (RFLPs) and relationships among elite commercial inbred and virtual hybrid onion populations. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 123:1034-1037.
- Konieczny,A., F.M.Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4:403-410
- Labani,R. and T.Elkington. 1987. Nuclear DNA variation in the genus *Allium* L.(Liliaceae). *Heredity* 59:119-128.
- Lancaster,J.E., M.L.Shaw,M.D.Joyce, J.A.McCallum, and M.T.McManus.2000. A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization and cDNA cloning. *Plant Physiol.* 122:1269-1279.
- Lee,C.C., X.W. Wu, R.A. Gibbs, R.G.Cook, D.M.Muzny, and C.T.Caskey. 1988. Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence:cloning of urate oxidase. *Science* 239:1288-1291.
- Liang,P. and A.B.Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Sambrook,J.,E.F.Fitsch,T.Maniatis. 1989. *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Press.

- 佐々木卓治・田畑哲之・島本 功. 2000. 植物ゲノム研究  
プロトコール. 細胞工学別冊. 植物細胞工学シリーズ  
14. 秀潤社.
- Szewc-McFadden, A.K., S.Kresovich, S.M.Bliek, S.E.Mitchell,  
and J.R.McFerson. 1996. Identification of polymorphic,  
conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated  
Brassica species. *Theo.Appl.Genet.* 93:534-538.
- Tabata et al. 2000. Sequence and analysis of chromosome 5  
of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408:823-826.
- 田畑哲之. 2001. シロイヌナズナの全ゲノム解読と植物学  
の新たな展開. *細胞工学* 20:57-60
- Vos, P., R.Hoger, M.Bleeker, M.Reijans, T.van de Lee,  
M.Hornes, A.Frijters, J.Pot, J.Peleman, M.Kuiper, et al.  
1995.AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.  
*Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K. J. Livak, J.A.Rafalski, and  
S.V.Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by  
arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic  
Acids Res.* 18:6531-6535.