

ノ ー ト

DNA マーカー選抜に用いる籾殻付きイネ種子からの DNA 抽出法

林 猛¹⁾・小林麻子¹⁾・田野井真¹⁾・富田 桂¹⁾¹⁾ 福井県農業試験場, 福井市, 〒 918-8215

A simple DNA extraction method from unhulled rice seeds for efficient marker-assisted selection in rice breeding programs

Takeshi Hayashi¹⁾, Asako Kobayashi¹⁾, Makoto Tanoi¹⁾ and Katsura Tomita¹⁾¹⁾ Fukui Agricultural Experiment Station, Fukui 918-8215, Japan

キーワード

育種, イネ, DNA 抽出, DNA マーカー選抜, 籾殻付き種子

緒 言

Marker-Assisted Selection (MAS) は品種育成において強力なツールである。MAS は遺伝子上もしくはその近傍に開発された DNA マーカーにより, 目的遺伝子を持つ個体を選抜するため, いずれの生育ステージの植物体においても実施できる。イネ (*Oryza Sativa* L.) においては, 出穂期 (Yano *et al.* 2000), 穂発芽 (Sugimoto *et al.* 2010), 病害抵抗性 (Shimono *et al.* 2007) など農業上重要な形質の遺伝子単離および機能解明が進められている (Yamamoto and Yano 2008)。同時に, これらの遺伝子の遺伝子型を判別する DNA マーカーの開発も進められ, MAS を利用可能な形質も増加している (藤井 2008, 坂ら 2010, 矢野・山本 2010)。

MAS を実施するタイミングは, 1. 移植前, 2. 移植後, 3. 収穫後の 3 つに分けられる。1. 移植前に実施する場合, 目的の遺伝子型を持つ個体のみを選んで圃場に移植できるが, 移植適期までに MAS を完了させるという時間的制約が問題となる。2. 移植後に実施する場合, 時間的制約は移植前に実施する場合に比べて少ないが, 圃場に移植した全個体のラベリングと DNA 抽出用の試料採取から始まり, MAS を実施して最終的に圃場で目的の遺伝子型を持つ個体を認識しつつ形質を評価するという一連の作業の煩雑さが問題となる。一方, 3. 収穫後に実施する場合, 栽培期間が終了しているためイネの生育による時間的制約はない。また, 圃場での達観評価による選抜と室内での形質評価による選抜後に実施すること

で選抜作業が集中せず, かつ MAS を実施する個体数を絞ることができる。

著者らの育種事業では MAS 用の DNA を Monna *et al.* (2002) の方法に準じて抽出している。この抽出法では枯れ上がった葉や乾燥した茎および穂軸などから PCR に十分な量の DNA を得ることが難しい。そこで収穫後の DNA 抽出には, 不純物が混入する原因となりうる籾殻を除去した玄米を用いている。この場合, 玄米から抽出した DNA の遺伝子型が親個体の遺伝子型をそのまま反映している訳ではないことが問題となる。イネは自殖性植物のため, 例えば, 親個体の目的遺伝子座がヘテロ型である場合, その個体上に実った種子 (玄米) では遺伝子型がホモ型とヘテロ型に分離する。そのため, 供試種子数が 1 粒または数粒の場合, 親個体がヘテロ型であるにもかかわらず, いずれか一方の交配親の遺伝子型に固定した種子のみを偶然選んでしまうことで親個体の遺伝子型を誤判別する可能性がある。従って, 選抜対象個体に実った種子を用いる MAS においては, ある一定数以上の種子を用いる必要がある。

しかし, 用いる種子数の増加に伴い, DNA 抽出の作業時間は長くなる。DNA を抽出するための砕いた玄米は, 1. 穂から種子を手で採取, 2. 手動籾摺り器を用いて種子から籾殻を除外, 3. 玄米のみ回収, 4. 玄米を薬包紙で包む, 5. ペンチで潰す, といった 5 つの工程で作成している。これらの工程のうち, 1, 3 および 5 の工程の作業時間は, 種子数の増加に伴い長くなる。

種子を用いた MAS の実用性を高めるためには, 誤判別する可能性を一定の水準以下に保ちつつ, 種子からの DNA 抽出を効率的に行う必要がある。そこで, 本研究では種子から籾殻を外す工程を省略し, 玄米を砕く工程は工作用プレス機を用いて一度に複数のサンプルを圧砕す

る方法に変更することで DNA 抽出の作業時間を短縮し、遺伝子型判別に十分な量、純度の DNA が得られるかを検討した。また、ヘテロ型個体の遺伝子型を誤判別しないために必要となる一個体あたりの最少供試種子数について検討を行った。

材料および方法

1. 供試材料

福井県農業試験場にて育成中である 38 組み合わせの交雑後代 (F_4 , F_5 世代) を 2011 年に圃場に移植し、圃場での出穂期や稈長などによる選抜と室内での玄米外観品質による選抜を終えた 3,500 個体を用いた。

2. 遺伝子型判別

各個体から採取した籾殻付きの種子各 10 粒を葉包紙で包んだ後に 30 cm 四方の鉄板の中央部に 2 行 5 列の計 10 サンプルを並べて、同形の鉄板で挟み込んだ。鉄板を工作用プレス機 (AHP-35t, マサダ製作所製) の台に置き、 $6.9 \times 10^5 \text{ N/m}^2$ で圧砕した。圧砕した種子サンプルを 1.5 mL マイクロチューブに移し、Monna *et al.* (2002) の方法に準じて、以下の手順で DNA 抽出を行った。前述の圧砕した種子サンプルに DNA 抽出液 (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 1 M KCl) 1 mL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌し、遠心機 (WRX-152, TOMY 製) にて遠心した (4°C , $25,000 \times g$, 5 分間)。上清 100 μL を 96 穴プレートに分注し、イソプロパノール 100 μL を加え、遠心機 (SORVALL Legend RT, Thermo Scientific 製) にて遠心し (4°C , $1,500 \times g$, 15 分間)、上清を除いた。次に 70% エタノール 200 μL を加えて同じく遠心した後 (4°C , $1,500 \times g$, 10 分間)、上清を除いた。その後、プレートを反転して遠心し (4°C , $30 \times g$, 30 秒間)、エタノールを除去した。最後に 0.1 $\times$ TE バッファー (1.0 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) を 150 μL 加えてサンプル DNA 液とした。サンプル DNA 液 60 点を無作為に選び、DNA 濃度と純度 (OD260/OD280) を分光光度計 (Nano Drop 1000, Thermo Scientific 製) を用いて測定した。

PCR 反応液は、1 サンプルあたり Go Taq Green Master Mix (Promega 製) 5.0 μL , 20 μM プライマー (Forward/Reverse) 各 0.25 μL , サンプル DNA 液 2.0 μL に滅菌水を加えて全 10 μL とした。PCR 反応は、サーマルサイクラー (iCycler ThermalCycler, BIO RAD 製) を用い、 94°C , 5 分保持後、熱変性 (94°C , 45 秒) とアニーリングおよび伸長反応 (50°C または 55°C , 90 秒) のサイクルを 35 反復した後、 50°C または 55°C , 7 分保持の条件で行った。増幅産物は、2.5% アガロース/TBE (44.5 mM Tris, 44.5 mM ホウ酸, 1.0 mM EDTA) ゲルで分画し、エチジウムブロマイド溶液で染色後、UV イルミネーター (GENE GENIUS SYNGENE 製) で観察して各遺伝子型のバンドの有無を

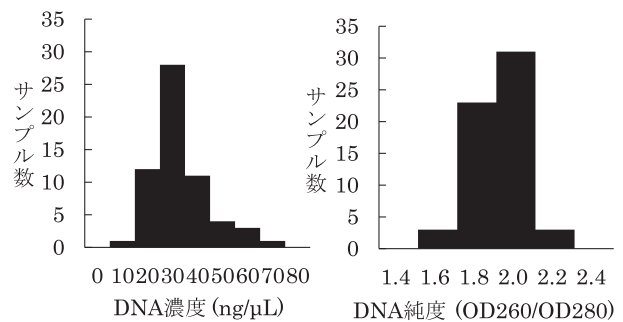


図 1. サンプル DNA 液 (60 サンプル) の濃度および純度のヒストグラム。

判定した。

調査した遺伝子は、いもち病抵抗性遺伝子 *pi21*, *Pi34(t)*, *Pi39(t)*, *Pb1*, 縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* の 5 つである。検出用マーカーはそれぞれ、43-2 (Fukuoka *et al.* 2009), RM2596, RM5473, RM206 (IRGSP 2005) および ST64 (早野・斎藤 2009) を用いた。

3. 供試種子数の検討

目的遺伝子座が抵抗型、罹病型に固定した個体の種子を用いて、10 粒のうちの割合を抵抗型 10 粒 - 罹病型 0 粒から抵抗型 0 粒 - 罹病型 10 粒まで 1 粒ずつ変えた計 11 サンプルを上記手法で DNA 抽出し、抵抗型と罹病型の両増幅産物が得られるかを検討した。

結果および考察

1. 抽出 DNA による遺伝子型判別

サンプル DNA 液の DNA 濃度と純度 (OD260/OD280) は、それぞれ 7.6~62.1 ng/ μL , 1.6~2.2 であった (図 1)。PCR 反応液中の鋳型 DNA 量は 15~124 ng となり、Go Taq の推奨濃度域内 ($< 250 \text{ ng}$) であった。また、これらのサンプル DNA 液を用いることで遺伝子型判別が可能 PCR 増幅産物が得られた。以上の結果から、本法により籾殻付きの種子 10 粒から遺伝子型判別調査が可能な量および純度の DNA を得られることが確認された。なお、籾殻のみをサンプルとした場合、前述の DNA 抽出および PCR 反応条件では増幅産物は得られなかった。よって、籾殻付き種子から得られた PCR 増幅産物は玄米由来であることを確認した。

本試験で用いた籾殻付き種子由来の DNA 抽出液では、5 つの検出用マーカーのうち、RM5473 以外の 4 マーカーは、アニーリング温度が 50°C および 55°C の両方で PCR 増幅産物が得られた。しかし、*Pi39(t)* の検出用マーカー RM5473 はアニーリング温度が 55°C では増幅産物が得られず、 50°C でのみ増幅産物が得られた。玄米のみから抽出した DNA 液では 55°C でも増幅した (データ省略) ことから、籾殻の成分が PCR 反応を阻害している可能性が考えられた。以上の結果を考慮すると、本試験で供試し

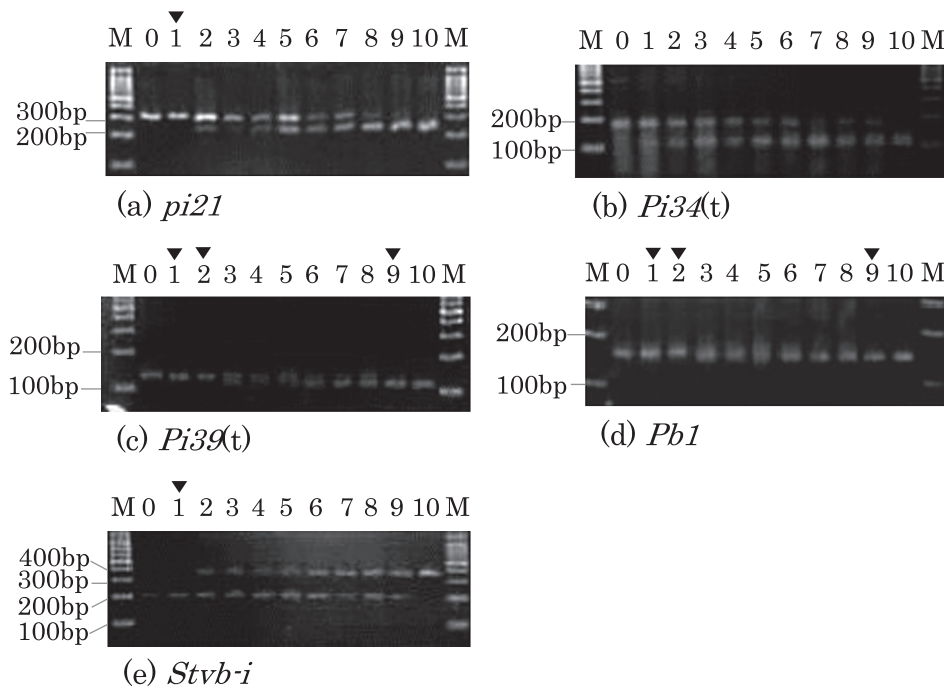


図 2. 両遺伝子型の種子割合による PCR 増幅産物の検出結果。

0～10：10 粒に占める抵抗型種子の数。▼：一方の遺伝子型の PCR 産物のみが検出されたサンプル。

検出用マーカー：(a) 43-2, (b) RM2596, (c) RM5473, (d) RM206, (e) ST64。

アニーリングおよび伸長反応は 50℃。M：DNA 分子量マーカー。

た 5 つ以外のマーカーを利用する場合においては、PCR 反応条件を確認する必要があると考えられた。

2. 籾殻付き種子からの DNA 抽出による時間短縮効果

供試した交雑後代の全サンプル (3,500 個体) の DNA 抽出工程に要した時間は 176 時間、1 サンプルあたり約 3 分であった。一方、籾殻を外して行う従来法の場合に要する時間は 235 時間、1 サンプルあたり約 4 分を必要とすることから、本法により作業時間を 59 時間、すなわち 25%削減できたことになる。

3. ヘテロ型を誤判別しないために必要な供試種子数

10 粒のうちの抵抗型と罹病型の種子数割合を 1 粒ずつ変えたサンプルから抽出した DNA を用いて PCR を行った結果、異なる遺伝子型の種子が 1 粒または 2 粒混在するサンプルにおいては、多数を占める側の遺伝子型を示すバンドのみが検出される場合があった (図 2)。本抽出法ではプレス機による種子の圧砕程度が粒毎に異なることでそれぞれの種子から抽出される DNA の量が異なると考えられる。多数を占める側の遺伝子型を示すバンドのみが検出されたサンプルでは、粒数が少ない方の遺伝子型の種子から抽出された DNA の量が PCR で増幅産物を得るには不十分であった可能性がある。

本試験では目的遺伝子座が一方の交配親の遺伝子型に固定した種子数が 30～70% (3～7 粒/10 粒) の範囲であ

れば両交配親の遺伝子型のバンドが検出された。従って、供試する種子全粒に占める一方の交配親の遺伝子型に固定した種子の割合が 70%を超える場合には、親個体の目的遺伝子座がヘテロ型であるにもかかわらずホモ型と誤判別する可能性がある。そこで、F₄ 世代と F₅ 世代の集団を本手法で抽出した DNA を用いて遺伝子型判別する場合に、供試種子数と誤判別する可能性のあるサンプルが出現する確率の関係を計算により求めた (図 3)。計算は 1. 集団中に存在するヘテロ型個体の割合、2. ヘテロ型個体から採取した種子のうち一方の交配親の遺伝子型に固定した種子の割合が 70%を超える確率の 2 項を乗じた。誤判別の可能性のあるサンプルが出現する確率が 0.1%以下となる供試種子数は、両世代とも 5 粒以上である。

著者らは MAS によって選抜された個体が目的とした形質を実際に有しているかを確認している。例えば、いもち病抵抗性遺伝子を持つ個体を MAS によって選抜した場合、次の世代以降で畑晩播法による葉いもち圃場抵抗性検定試験を行っている。このように誤判別された個体を見逃さない形質評価を品種育成の過程で実施している場合、5 粒以上の種子を供試すれば本手法によって得られた DNA を用いて実用上十分な精度で MAS を行えると判断した。

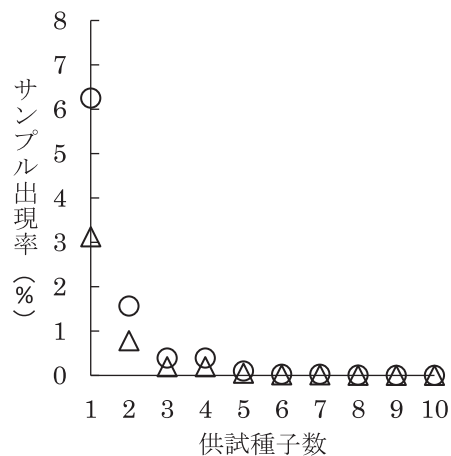


図3. 親個体の遺伝子型を誤判別する可能性のあるサンプルの出現率.

○: F₄, △: F₅. 目的遺伝子座がヘテロ型である個体が集団中に存在する割合と供試種子 (1~10 粒) の目的遺伝子座に占める一方の遺伝子型の構成割合が 70%以上になる確率を乗じ, F₄, F₅ 世代の集団において供試種子数を変えた場合に誤判別する可能性のあるサンプルが出現する確率とした.

謝 辞

本研究にあたり, 独立行政法人農業生物資源研究所, 独立行政法人農研機構近畿中国四国農業研究センターおよび北海道農業研究センターから DNA マーカー情報を提供していただいた.

引用文献

- 藤井 潔 (2008) 育種学研究 10: 151-155.
- Fukuoka, S., N. Saka, H. Koga, K. Ono, T. Shimizu, K. Ebana, N. Hayashi, A. Takahashi, H. Hirochika, K. Okuno *et al.* (2009) Science 325: 998-1001.
- 早野由里子・斎藤浩二 (2009) 縞葉枯病抵抗性イネ個体を検出する高精度 DNA マーカー. 研究成果情報 <http://naro.go.jp/project/results/laboratory/harc/cryo09-08.html>
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) Nature 436: 793-800.
- Monna, L., N. Kitazawa, R. Yoshino and Y. Minobe (2002) DNA Res. 9: 11-17.
- 坂 紀邦・福岡修一・寺島竹彦・工藤 悟・城田雅毅・安東郁男・杉浦和彦・佐藤宏之・前田英郎・遠藤征馬, 他 (2010) 愛知農総試研報 42: 171-183.
- Shimono, M., S. Sugano, A. Nakayama, C. Jiang, K. Ono, S. Toki and H. Takatsuji (2007) Plant Cell 19: 2064-2076.
- Sugimoto, K., Y. Takeuchi, K. Ebana, A. Miyao, H. Hirochika, N. Hara, K. Ishiyama, M. Kobayashi, Y. Ban, T. Hattori *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 5792-5797.
- Yamamoto, T. and M. Yano (2008) In "Rice Biology in the Genomics Era" Hirano, H. Y. *et al.* (eds.), Springer, Berlin, 295-308.
- Yano, M., Y. Katayose, M. Ashikari, U. Yamanouchi, L. Monna, T. Fuse, T. Baba, K. Yamamoto, Y. Umehara, Y. Nagamura *et al.* (2000) Plant Cell 12: 2473-2483.
- 矢野昌裕・山本敏央 (2010) 農林水産技術研究ジャーナル 33: 5-11.