

サツマイモ β -amylase 遺伝子の多様性解析

眞玉橋 将央 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

サツマイモ (*Ipomoea batatas* L.) は、栽培化に至る経緯で微生物の遺伝子を取り込まれており (Kyndt *et al.* 2014)、生物学的に特徴的な研究材料である。また、農学的には痩せた土地での栽培が可能であり、世界の年間総生産量は 1 億 t を超える (FAOSTAT 2013)、重要な作物の 1 つである。

サツマイモのデンプンは加熱されると糊化し、 β -amylase 活性によりマルトースに分解される。一方で、 β -amylase が欠損すると、マルトースが生成されないため甘くならない。 β -amylase 欠損型品種であるサツマヒカリ (SH) とオキコガネ (OK) には、 β -amylase 遺伝子の exon 5 に塩基挿入があり、フレームシフトにより正しく翻訳されないことが明らかにされている (Anwar *et al.* 2009)。一方、 β -amylase 欠損型品種のジョイホワイト (JW) ではこの塩基挿入がなく、他にも欠損を引き起こす遺伝子変異が存在すると考えられる。

甘くならない品種は、じゃがいものように持続的な食用炭水化物源となる主食や惣菜として、毎日の食事に利用しやすい。そのため、 β -amylase 欠損型品種の育成意義は高いと考えられる。しかし、サツマイモは他殖性の同質 6 倍体 ($2n = 6x = 90$) であるため、遺伝子解析や農業上有利な形質を持った品種の育成には多くの時間と労力を要する。そのため、DNA マーカーなどを用いて効率良く育種する必要がある。

β -amylase 活性型品種の高系 14 号 (K14) では、その塩基配列が決定されており (Yoshida *et al.* 1992)、酵素の結合部位と活性部位が同定されている (Cheong *et al.* 1995)。また、サツマイモは倍数性であるため、時間と労力の観点から遺伝子多型解析では次世代シーケンサーの利用が効果的である (Monden *et al.* 2015)。そこで、本研究では β -amylase 欠損型 DNA を解析し、その多様性を明らかにするとともに、DNA マーカーの作成を目的として、4 品種 (K14, SH, OK, JW) を用いて、次世代シーケンサーによる β -amylase 遺伝子の多様性解析を行った。

【材料・方法】

(1) 植物材料と DNA 抽出

β -amylase 活性型の K14 と、欠損型の SH, OK, JW の 4

品種を実験材料として用いた。これらは、固形培地で継代培養し、培養室で維持した。ゲノム DNA は、葉から抽出した。

(2) PCR プライマー設計と PCR

K14 の β -amylase の塩基配列をデータベースから取得し、全 exon をカバーするように 9 つのプライマーセットを設計した (下図)。用いるシーケンサーの平均リード長が約 500 bp (Loman *et al.* 2012) であるため、各 PCR 産物が 500 bp 程度となるように設計した。抽出したゲノム DNA を鋳型に、品種別に各プライマーセットで PCR を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動し、増幅を確認した。

(3) サザンハイブリダイゼーション

β -amylase に由来しない増幅断片を確認するためにサザンハイブリダイゼーションを実施した。メンブレンは、品種毎に電気泳動後のゲルからアルカリブロットングにより作成した。プローブは品種毎に全 exon を含む領域を PCR により DIG ラベルして作成した。抗 DIG 抗体を用いて化学発光を検出した。

(4) シーケンシングと多型解析

プライマーなどの DNA 断片を除去した後、DNA 断片に MID タグをライゲーションシライブラリーを作成した。その後、GS Junior を用いて塩基配列決定した。得られたリードをタグで整列させ、データベースから取得した K14 の配列データをリファレンスとしてマッピングを行い、データ解析を行った。

【結果・考察】

PCR により増幅されたバンドパターンを K14 と比べたところ、SH と OK では、プライマーセット①、③、⑥、⑧で明らかに異なるバンドパターンを示した。一方で、JW では K14 と同様のバンドパターンを示した。多型を示した領域のうち、サザンハイブリダイゼーションにより、③と⑧で認められた多型は β -amylase に由来しない増幅断片によることが明らかとなった。従って、SH と OK では①と⑥の領域に PCR レベルでの多型が含まれる事が判明した。また、JW では PCR レベルでの比較から確認できない変異をシーケンシングによって見出したい。シーケンシングにより、品種間のより詳細な多型が検出できると考えており、 β -amylase 遺伝子の多様性を明らかにする。

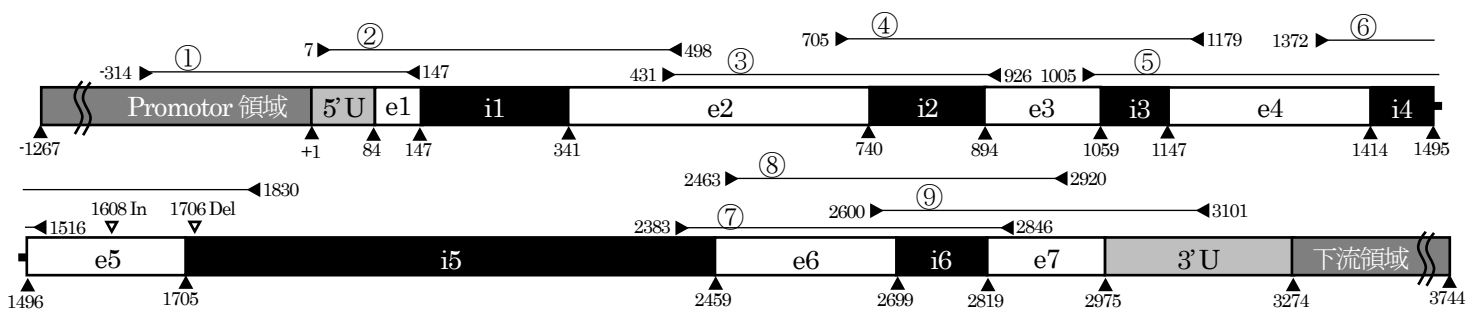


図 サツマイモ β -amylase の遺伝子構造と設計したプライマー位置

データベースの情報を基に 9 セットのプライマーを作成した。5' U: 5' 側非翻訳領域、+1: 転写開始点、e: exon、i: intron、3' U: 3' 側非翻訳領域をそれぞれ示す。また、In、Del は先行研究 (Anwar *et al.* 2009) で明らかにされた挿入、欠損変異をそれぞれ示す。