

平成30年6月19日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350229

研究課題名(和文) 地域の学校参加による「菜の花調査」の実施に向けたDNAによる種の識別技術の確立

研究課題名(英文) Development of DNA identification tool in Brassica species applicable to science education in cooperation with school

研究代表者

西沢 徹 (Nishizawa, Toru)

福井大学・学術研究院教育・人文社会系部門(教員養成)・准教授

研究者番号：80414382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：学校教育における題材としての活用を想定し、野外のアブラナ群落を構成する主要な3種(アブラナ、セイヨウアブラナ、カラシナ)を識別するための分子マーカーの開発を行った。葉緑体DNAおよび核DNAを対象とし、PCR増幅断片の解析から変異を補足する手法(SSLP, PCR-RFLP, PCR-SSCP)に基づいたマーカー開発を行った。カラシナを特異的に検出できる変異を補足し、系統が確実に判明している栽培品種では互いの識別を可能とした。一方、野生集団の解析を十分に実施するためには、外部形態からの識別が特に困難なアブラナとセイヨウアブラナを判別できるように、マーカーの解像度をさらに増強することが必要である。

研究成果の概要(英文)：To capture molecular markers that are applicable to species identification of three Brassica species (*B. rapa*, *B. napus*, *B. juncea*), I screened variations in nucleotide sequences of chloroplast and nuclear DNA. Detection of DNA polymorphisms were analyzed by PCR-RFLPs (Restriction fragment length polymorphisms) and PCR-SSCP (Single strand conformation polymorphisms), but hypervariable loci that enables us to discriminate three Brassica species could not be captured.

研究分野：植物系統分類学, 生物教育

キーワード：アブラナ類 分子マーカー DNAマーカー 生物教材 生物教育 理科教育 理科教材

## 1. 研究開始当初の背景

アブラナ科の植物の中で、黄色い花を咲かせるアブラナ属の植物(アブラナ類)は総称して「菜の花」と呼ばれる。アブラナ類の花は日本の春を代表する情景の一つであり、身近で観察が容易であることから、学校教育の教材としても度々採り上げられてきた。理科の内容では「身近な自然の観察(小学校3学年)」、「季節と生物(小学校4学年)」、「植物の体のつくりと働き(中学校1学年)」などの単元で教科書に登場する。さらに、欧米などの大学教養レベルの教科書では、アブラナ科の一つの祖先種からキャベツやカブなどの多様な野菜が選抜育種されてきた歴史を例に、系統進化を説明する題材としても採り上げられている。一方、現行の学習指導要領では、理数教育では内容の系統性と各学校段階での学習の円滑な接続を踏まえた指導内容の充実が謳われている。したがって、各学校段階を横断して統一的に活用できる生物教材や教育プログラムが、今後より一層求められている。この点で、幅広い学校段階の教科書で採り上げられ、全国に分布する馴染み深い植物でもあるアブラナ類は、汎用性が高く、理科学習におけるさまざまな単元で活用が望めることから付加価値が大きく、改めて生物教材として見つめ直す価値が十分にあると考えられる。野外の群落は3種のアブラナ類(アブラナ、セイヨウアブラナ、カラシナ)によって構成され、多様性がある。一部の植物図鑑などには「現在では、アブラナは海外から導入されたセイヨウアブラナに取って代われ、野生のアブラナの群落は少ない」という記述が見受けられるが、申請者は国内の各地でアブラナの比較的大きな群落を観察している。身近で、「菜の花」と一括りにされているためか、それぞれの種ごとにみた分布の詳細は不明であり、アブラナ類の自然群落の多様性の実態はまだ未解明である。群落の種組成の多様性を解明するためには、構成員の種を判別しそれらの存在比を明らかにする必要がある。しかし、形態から容易に識別が可能なカラシナを除くと、アブラナとセイヨウアブラナは形態の特徴がよく似ており、判別が困難な場合がある。一方、体細胞の染色体数が異なることから、細胞遺伝学的には識別が可能である。しかし多様性の解明のためには多数の個体を調査する必要があり、1個体ずつ染色体を数える手法には限界がある。したがって、アブラナとセイヨウアブラナを効率よく識別する技術の開発が望まれている。

身近な自然環境や生き物に慣れ親しむ目的で、生物の分布状況や生育環境を調査する活動が学校教育においてもさまざまな場面でおこなわれている。全国規模の取り組みとして成果を挙げている環境調査の一つが「タンポポ調査」である。タンポポ調査が軌道に乗っている要因としては、タンポポ類が全国的に広く分布する植物であること、身近で目

につきやすい植物であることが挙げられる。この点では、日本人に馴染み深く、国内に広く分布するアブラナ類も、全国規模での植物調査の対象になり得ると考えられる。そこで将来的に、学習段階の初期からアブラナに慣れ親しみ、自然群落の多様性についての理解と興味関心の喚起を図る目的で、アブラナ類の分布調査である「菜の花調査」を、地域の学校との協働学習として、全国で実施できないか構想している。菜の花調査の実現に向けてまず課題となる点は、確実に、かつ簡便に種を識別するシステムが必要なことである。そこで本研究では、野外で生育するアブラナ類を遺伝的に識別できるDNAマーカーを開発し、将来的に構想している菜の花調査の実施に向けた技術基盤の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

構想している菜の花調査で種の判別に迷った事例が出てきた際の対応策として、大学の研究室宛に一部の試料を送付してもらい、DNAによる種の判別を行う「種の分析センター(仮称)」のようなシステムの構築を構想している。本研究では、菜の花調査の実施に向けた技術基盤の確立を目的に、野外で生育するアブラナ類について、特に外部形態からの識別が困難なアブラナとセイヨウアブラナを識別するためのDNAマーカーの開発を第一の目的とした。

## DNAマーカーの開発

アブラナ類の3種を互いに識別するためのDNAマーカーを開発する。3種それぞれについて、種特異的なマーカーを捕捉することが望ましい。しかし菜の花調査の実施に向けては、互いを「識別できる系」を確立することがまず必要である。そこで、外部形態からの識別が困難なアブラナとセイヨウアブラナの判別マーカーの開発を最優先の目標とする。対象とする分子種は、マーカーの開発が比較的容易であり、遺伝的多型の検出方法も様々な手法が考案されている葉緑体DNAを優先的な対象とする。一方、アブラナ類は自然条件下でも種間交雑によって雑種を形成することが知られていることから、雑種性の検定も可能である核DNAマーカーも野生集団の多様性解析のためには有効なツールとなる。そこで、葉緑体DNAでマーカー化の目処が立ち次第、核DNAマーカーの開発にも着手する。

## マーカーの有効性の検証

複数の自然群落から試料を採取し、それらの試料を対象にDNA分析をおこない、開発したマーカーが実際の野生種の判別に適用できるのか解析し、マーカーとしての有効性を検証する。さらに、群落構成種の存在比について、図鑑類が述べるようにセイヨウアブラナが多いのか、アブラナはどの程度残っているのか、複数の種が同所的に生育する場所で雑種はあるのか、などの点から予備的な解析を進め、構想する菜の花調査の実現に向け

ての課題や実施方法を検討する。

#### 本研究の特色

将来的に構想している「地域の学校参加型植物調査プログラム“菜の花調査”」では、地域の学校が主体となることを想定しており、本学が福井県教育委員会とともに進めて成果を挙げている、コア・サイエンス・ティーチャー養成事業（CST 事業）で構築した地域拠点校などとの連携をさらに強化できる。学校現場と協働して、地域の自然を題材とした理科教材の開発や環境調査の実施に発展が期待できる。

また、群落構成種の種判別により、野生集団の多様性と分布の実体の解明に寄与できる。特に、アブラナの分布状況を明らかにすることは、国内の生物多様性保全の見地からも重要な意味を持っている。近年、輸入種子のこぼれ落ちに起因する遺伝子組換えセイヨウアブラナの生育と、花粉の飛散による在来種との交雑が問題となっている。アブラナは明治以前から日本で栽培されていた植物であることから、組換え個体との交雑には強い関心が向けられている。したがって、本研究の成果によってアブラナ類の種判別をおこなう技術が確立できれば、環境保全に関する政策や調査手法の向上にも貢献できる。

### 3. 研究の方法

自然群落を構成しているアブラナ類の3種について、互いをDNAレベルで識別するためのDNAマーカーを開発する。対象とする分子種は葉緑体DNAおよび核DNAとし、種苗メーカーから種が確実に判明している系統の種子を入手し、これを基準種としてマーカーの開発を行った。申請者らが開発した葉緑体DNAのユニバーサルプライマーや核の遺伝子領域における種間変異検出法など、申請者らによる既存の成果を存分に活用し、方法の側面においては、効率的なマーカー開発を当初の目標として設定した。

#### 標準系統試料の入手とDNA精製

- ・マーカー開発の過程では、対象とする種（系統）であることが確実に判明している個体のDNAを必要とすることから、種苗メーカーより3種（アブラナ *B. rapa*、セイヨウアブラナ *B. napus*、カラシナ *B. juncea*）の純系統種子を入手して発芽させ、幼個体の葉からDNAの精製を行った。

#### PCRベースの葉緑体DNAマーカーの開発

- ・申請者らが開発した葉緑体DNAのユニバーサルプライマー（Nishizawa & Watano, 2000）でPCR条件の検討を行い、種間変異が存在する可能性が高い遺伝子間領域を安定的に増幅できるプライマーセットを抽出した。

- ・将来的に、多試料を解析する必要があるが見込まれることや、学校現場と協働した実践活動への適用を考えると、遺伝的変異の検出法（DNAマーカーの種類）は、対象領域のPCRによる増幅とアガロースゲル電気泳動で

変異の検出を行える簡便な手法が望ましい。そこで本研究では、PCRベースの簡便な変異検出法を中心にマーカー開発を行い、SSLPマーカー（Simple Sequence Length Polymorphism: PCR増幅断片の長さの変異）とCAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequences: PCR増幅断片を制限酵素処理したDNA断片の長さの変異）の2種類の手法を採用した。葉緑体DNAマーカーの開発過程では、PCR-SSCP（Single Strand Conformation Polymorphisms）法による多型検出法についても検討を行った。

#### 検定用試料の収集と分布実態の予備調査

- ・マーカー開発の過程で検出した葉緑体DNAの変異が、実際の自然群落の個体にも存在することを確認する。福井市周辺の自然群落を対象に、3種の分布実態の予備的調査と葉片試料の採取を行った。
- ・福井市周辺から採取した野生個体のDNAを試料として、スクリーニングした葉緑体DNAのマーカー候補（SSLPとCAPS）がマーカーとして有効かどうか、すなわち「3種のPCR産物の電気泳動パターンが異なるかどうか」を解析し、マーカーとしての有効性について確認を行った。

### 4. 研究成果

葉緑体DNAのマーカー開発に際しては、Nishizawa & Watano (2000) が設計した被子植物用のユニバーサルプライマーを活用した。野外から採集した葉片試料から抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCRの増幅条件の検討を行ったところ、4領域では特に安定したPCR増幅が認められたことから、本研究ではpsbC-trnS遺伝子間領域1領域、それぞれ1つの遺伝子のイントロン領域であるrps16/1、rps16/2、UCC1、の合計4つの領域をマーカー開発のための解析対象として選抜した。

福井市周辺の自然群落から採取した個体のDNAを鋳型として、対象とした葉緑体DNAの4領域を増幅し、増幅されたDNA断片のサイズを比較した（SSLPマーカー）。しかし、4領域とも、増幅断片の分子量には試料間でほとんど差が認められず、外部形態の特徴から判断した種とも対応が認められなかったことから、増幅断片分子量の比較のみから3種を識別することは困難であった。

次に、種苗メーカーより系統が確実に判明している種子：アブラナ（オータムポエム）、セイヨウアブラナ（農林16号）、カラシナ（キカラシナ）の3種の種子を入手し、発芽させた幼個体からDNAを精製して、基準種のDNAサンプルとした。この基準3種のDNAを鋳型として、同様にこの4領域でPCRを行って増幅断片の分子量を比較した。その結果、基準種の増幅断片サイズのみを互いに比較した場合、分子量のわずかな差からカラシナを見分けることは可能であったが、アブラナとセイヨウアブラナの増幅断片には差が認められなかった。したがって、SSLPマーカーでは

アブラナとセイヨウアブラナの識別が困難であることが判った。

次のステップとして、CAPS (PCR-RFLP) マーカーによる多型検出について検討を行った。rps16/1 領域の PCR 産物を制限酵素で処理し、PCR-RFLP 解析を行った。すでに決定されている rps16/1 領域の塩基配列情報を基に、セイヨウアブラナの領域にのみ認識配列が存在している制限酵素を選択して使用した。基準とする3種のDNAを鋳型としてPCR-RFLP解析を行った結果、セイヨウアブラナのPCR増幅産物のみが切断され、既知の塩基配列から推定される多型と同じパターンが認められた。一方、福井市周辺の野外から採取した試料を対象とした場合には、PCR-RFLP解析では多型が認められなかった。このことから、野外集団を構成するアブラナ類には、基準試料であるセイヨウアブラナ(農林16号)が持つ制限酵素認識部位に変異が生じている可能性が高く、野外試料の判別にはこのPCR-RFLPマーカーが適用できない結果となった。

この4領域を対象としたSSLPマーカーやPCR-RFLPマーカーでは多型が補足できなかったことから、この4領域を対象としたPCR-SSCP法による多型検出を試みた。PCR-SSCP法は、泳動温度やゲル中のグリセロール濃度の違いによって、泳動結果が大きく異なり、安定的な泳動条件を厳密に設定することが必要となる。本研究期間内では、安定した泳動パターンが得られる条件の決定まで至らず、PCR-SSCP法による多型も補足することが出来なかった。本研究では、安定したPCR増幅が得られたものから特に4領域を選択して集中的にマーカー開発に取り組んできた。Nishizawa & Watano (2000) が設計した被子植物用のユニバーサルプライマーには、まだこの4領域以外の未検討領域があり、これらの領域を対象としたPCR-SSCP法やPCR-RFLP法によるマーカー開発を引き続いて進めていく必要がある。

核DNAマーカーの開発には、Nishizawa et al., (2012) がスクリーニングした核遺伝子のコーディング領域を増幅するプライマーセットを利用した。安定したPCR増幅が認められた4領域を選択し、その増幅断片長を比較した。しかし、野外から採取した個体間や外部形態から推定される種間で差は認められず、この4領域ではSSLPマーカーによる種判別は行うことができなかった。次に、それぞれのDNA増幅断片を制限酵素で処理するPCR-RFLP法による多型検出法を検討した。4領域をPCRで増幅し、制限酵素処理によって5遺伝子座の解析を行った(1つの領域のみ、同じ領域の増副産物を異なる2種類の制限酵素で処理した)。その結果、解析を行った5遺伝子座の中で、4遺伝子座で多型が認められた。中でも2つの遺伝子座では特に多型的であり、種判別への適用が期待できた。

一方、系統が明らかである種子由来の基準種試料のDNAを鋳型として基準遺伝子型の記

述を行った。その結果、5遺伝子座の中で、3遺伝子座では多型がみられなかったが、野外試料において特に多型的であった2遺伝子座では、それぞれ、在来アブラナ、セイヨウアブラナ、カラシナをそれぞれ特徴付ける多型が認められた。中でも1つの遺伝子座では、RFLPによって判定した遺伝子型がアブラナ類の3種それぞれに対応したパターンを示し、基準種の試料を互いに識別するためには有効に機能することがわかった。

次に、野外から採取した個体の遺伝子型をこの1遺伝子座を用いて解析した。その結果、基準種とは異なる遺伝子型を多数検出したほか、外部形態から1つの同じ種と推定される試料群(例えば、形態的特徴からセイヨウアブラナと判断される複数の試料間)には、基準種の解析では認められなかった遺伝子型とともに、複数の遺伝子型が確認され、相当量の種内変異が存在している可能性が示された。基準試料は油糧作物として育種されてきた系統であり、種内変異は少なかったと考えられるが、任意交配が行われていると考えられる野外集団には、基準種の遺伝子プールには存在しなかった対立遺伝子の存在や、基準種の遺伝子プールにはごく小さな頻度でしか存在していない対立遺伝子が高い頻度で存在する可能性がある。実践的活動における教材としての活用を目指す上では、今後、マーカーの解像度を増強することに加えて、野外集団における遺伝的多様性の実態についてもさらに明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔その他〕

2016年度 ひらめきときめきサイエンス ~ようこそ大学の研究室へ~ KAKENHI「小中学生のためのサイエンスキャンプ ~多角形・花・石や砂・理科の言葉~・生命・花のつくりから読み解く生物の多様性と共通性」実施。

2016.7.30~31. 福井大学文京キャンパス および芦原青年の家。

2015年度 ひらめきときめきサイエンス ~ようこそ大学の研究室へ~ KAKENHI「理科と数学の活用力を研くサイエンスキャンプ・生命・DNAマーカーで解き明かす菜の花のなかまたち」実施。

2015.8.11~12. 福井大学文京キャンパス。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西沢 徹 (NISHIZAWA, Toru)

福井大学・学術研究院教育・人文社会系部門(教員養成)・准教授

研究者番号: 80414382

### (2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者  
該当なし

(4)研究協力者  
該当なし