

島根県特産香辛野菜「出雲おろち大根」への
アントシアニン着色形質の導入に関する研究

Studies on the introduction of colored root characteristics
into the local pungent radish of Shimane prefecture “Izumo orochi daikon”

鳥取大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻

枅川 貴紀

2018

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 紫系および赤系「出雲おろち大根」育成系統の作出とその特性評価	
第 1 節 根部着色形質を導入した「出雲おろち大根」の作出とその形態特性	8
第 2 節 紫系統および赤系統における根部内成分および食品機能性の評価	20
第 3 章 ダイコンにおけるアントシアニン生合成関連遺伝子の解析と着色形質に関する DNA マーカーの開発	
第 1 節 ダイコンにおけるアントシアニン着色とその生合成関連遺伝子について	35
第 2 節 着色に関連する変異型 <i>F3'H</i> アレル検出マーカーの開発	58
第 4 章 総合考察	73
摘要	77
本研究で単離した遺伝子のリスト	80
引用文献	81
Summary	88
本論文の基礎となった学会誌公表論文リスト	91
謝辞	92

第1章 緒言

1. 我が国で栽培されているダイコンと「出雲おろち大根」について

ダイコン (*Raphanus sativus* L.) はアブラナ科ダイコン属の植物で、世界中で栽培されている野菜の一つである。ダイコンの原産地は地中海沿岸や西南アジアから東南アジアなど諸説あるが、中央アジアを起源地とする説が有力であり、そこから東西に分かれ2次中心地が地中海沿岸から黒海沿岸地方一帯と中国になったと考えられる (青葉, 2013)。ダイコンの栽培・利用の歴史は古く、ピラミッドの碑文にニンニクやタマネギとともにハツカダイコンを労働者に食べさせたことが記されていたことから、今から5000年以上前の古代エジプト時代には栽培されていたと推定される。我が国では『古事記』(712年)に「都藝泥布 夜麻志呂賣能 許久波母知 宇知斯淤富泥 泥士漏能 斯漏多陀牟岐 麻迦受祁婆許曾 斯良受登母伊波米(つぎねふ山代女の 木鋏持ち打ちし大根 根白の白腕 枕かずけばこそ 知らずとも言はめ)」という仁徳天皇が皇后に贈った歌が記録されており、1300年以上前には我が国に伝来し、栽培されていたものと考えられる。奈良時代に作成された正倉院文書(762年)によると当時のダイコンは高級野菜であったと推定される。鎌倉時代になると全国で農地の開墾が進んで、イネとともにダイコンが広く栽培されるようになった。室町時代には、尾張ダイコンとして甚目寺村方領を中心に方領ダイコンが栽培されていた(相賀, 1989)。江戸時代になると様々な品種が生まれ、その土地に合った栽培方法や時期も工夫されるようになったため、全国各地で地方ダイコンが作られた。一般的に青首ダイコンと呼ばれる宮重系品種や練馬系品種はこの時代に成立したといわれている。今日では、ダイコンは農林水産省が定める指定野菜に指定されており、その生産規模は栽培面積 32300ha、出荷量 1,105,000t (農林水産省

平成 28 年) であり、重要な野菜の一つとなっている。

ダイコンをはじめブロッコリーやキャベツなどアブラナ科植物はフェノール類、ビタミン、グルコシノレートおよびアントシアニンなど人間にとって有益な植物性化学物質を豊富に含んでいる (Wei et al., 2011)。特に、グルコシノレートは内在するミロシナーゼによって辛味成分であるイソチオシアネートに変化する。イソチオシアネートは抗菌性 (Hashem and Saleh, 1999)、抗変異源性 (Hamilton and Teel, 1996) および抗がん性 (Hecht, 1999) などの機能性を有することが報告されている。ダイコン属植物のなかでも、辛味ダイコンは豊富にグルコシノレートを含有している (Ishida et al., 2012)。

近年、地方の人口減少や高齢化に歯止めをかけ、日本全体の活力を上げるために地方創生が進められており、全国各地で在来品種や特産品などの地域資源を活用した地域振興が行われている。秋田県ではダイコンの在来品種を活用し、‘秋農試 39 号’や‘あきたおにしぼり’など新たな地方品種が育成されており、野菜生産量振興拡大が期待されている (椿ら, 2014; 2015)。島根県では出雲地域の宍道湖畔や島根半島の浜辺に自生するハマダイコン (*Raphanus sativus* L. f. *raphanistroides* Makino) を選抜育種により品種改良し、ひげ根の多い根部形状と強い辛みの特徴を有する辛味ダイコン新品種「出雲おろち大根」「スサノオ」が育成され、島根県を代表する地方品種として普及が進んでいる (Fig.1-1) (伴ら, 2009; 小林, 2010; 小林ら, 2017 印刷中)。さらに、大学、県および県内企業が協力し、「出雲おろち大根」を活用したみぞれソースなど新規加工品も開発され、特産品として流通している (小林, 2014)。一方、2006 年より「出雲おろち大根」を育種素材として活用し料理の色どりや食品色素源などの利用幅拡大を目指して、根部がシアニン系色素による紫色およびペラルゴニン系色素による赤色に着色する系統の育成を進めている。(小林ら, 2012)。

2. ダイコン類におけるアントシアニン

アントシアニンはビタミンやグルコシノレートなどと同様に人間にとって有益な植物性化学物質の一つであり、現在確認されているだけでも、抗酸化性をはじめ抗変異原性や血圧上昇抑制作用など多くの機能性を持つことが明らかとなっている（五十嵐ら，2000）。また，アントシアニンを豊富に含有する製品は心血管疾患やがんを予防するなど人間の健康にとって有益であると示唆されている（de Pascual-Teresa and Sanchez-Ballesta, 2008）。

我が国においてダイコンは青首ダイコンなど白系品種が一般的に栽培されているが，根部にアントシアニンを蓄積する紫系や赤系品種も栽培されている。ダイコンにおけるアントシアニンの化学構造は様々な研究グループにおいて明らかにされており，それらの化学構造はコーヒー酸やクマロイル酸などの有機酸の導入によりアシル化されたシアニジン誘導体もしくはペラルゴニジン誘導体であると報告されている（Giusti et al., 1998 ; Otuski et al., 2002 ; Tatsuzawa et al., 2008, 2010）。ダイコンのアントシアニンは色素として利用する際，広い pH 範囲において鮮やかな色を示すことに加え，複数のヒドロキシケイ皮酸によりアシル化されているため，酸性条件下において熱安定性を示すことが報告されている。（Jing et al., 2012）。また，そのアントシアニンは安定した色を示し，抗酸化活性などの健康効果を有するため，天然色素として広く利用されている（Matsufuji et al., 2007; Rahman et al., 2006）。天然色素源などの利用幅拡大を目的とした有色ダイコン類の新品種育成のために，紫系や赤系の園芸品種の主要アントシアニンが調査されており，紫系品種では既知のアシル化したシアニジン 3-ソホロシド-5-グルコシド，赤系品種では既知のアシル化したペラルゴニジン 3-ソホロシド-5-グルコシドであることが明らかとなっている（加藤ら，2013）。

アントシアニンは一次代謝産物に様々な酵素が触媒するアントシアニン

生合成経路を経て合成される。その経路は7つの核となる酵素，すなわち，カルコン合成酵素（CHS），カルコン異性化酵素（CHI），フラバノン3-水酸化酵素（F3H），フラボノイド3'-水酸化酵素（F3'H），ジヒドロフラボノール4-還元酵素（DFR），アントシアニン合成酵素（ANS）およびフラボノイド3-グルコシル転移酵素（3GT）から構成されており，この経路によりシアニン系色素が合成される（Fig.1-2）（Grotewold, 2006; Koes et al., 2005）．この経路において，F3'H はペラルゴニン前駆体であるジヒドロケンフェロールにおけるB環の3'位を水酸化し，シアニン前駆体であるジヒドロケルセチンを生成する（Koes et al., 1994; Werck-Reichhart et al., 2002）．そのため，F3'H の変異体はジヒドロケンフェロールからジヒドロケルセチンへの経路が進まず，ペラルゴニン系色素を合成する（Hoshino et al., 2003）．

ダイコンにおいてアントシアニン生合成に関連する分子生物学レベルでの研究として，赤系品種と白系品種における根色と *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR* および *ANS* の遺伝子発現の関係について報告されている（Park et al., 2011）．しかし，根色と *F3'H* の発現との関係については報告されていない．

3. 本研究の目的と本研究の構成

出雲地域原産の新品種「出雲おろち大根」‘スサノオ’は他の品種と比較して，遊離アミノ酸，イソチオシアネート含有量，DPPH ラジカル消去活性が顕著に高く，高い食品機能性を有する品種であると評価されている（小林ら，2017 印刷中）．2006 年より‘スサノオ’の食品機能性の向上や食品色素源などとして利用幅拡大を目的とした紫系および赤系「出雲おろち大根」の育成を進めている．本研究では紫系および赤系「出雲おろち大根」育成系統（以下，紫系統および赤系統）における根部着色形質などの各種形質の固定およびその特性評価を目的としており，各種形質を評価するために，形態

調査，根部内成分および食品機能性の分析を行った．さらに，ダイコンにおけるアントシアニン着色制御機構を明らかにすることを目的に，アントシアニン生合成に関連する遺伝子の解析を行った．本論文の第 2 章以下の構成は次の通りである．

第 2 章：第 1 節では‘スサノオ’に紫系および赤系園芸品種から根部にアントシアニン着色形質を導入することにより紫系統および赤系統を作出し，各世代におけるアントシアニン着色や根部形態などの形質の固定度を評価し，紫系および赤系「出雲おろち大根」の育種プログラムについて考察した．第 2 節では紫系統および赤系統におけるアントシアニン組成やイソチオシアネート含量などの根部内成分および抗酸化能を評価し，アントシアニン着色形質の導入による根部内成分および食品機能性の変化について考察した．

第 3 章：第 1 節ではダイコン園芸品種を用いてアントシアニン生合成に関連する遺伝子の解析を行い，ダイコンにおけるアントシアニン着色とその生合成関連遺伝子の関係について考察した．第 2 節ではダイコンゲノム DNA の構造変異に基づいた着色形質に関する選抜マーカーを開発し，‘スサノオ’と‘長安青丸紅心’の交雑後代にて利用可能か検討した．

第 4 章：第 2 章の調査および第 3 章の解析から得られた結果を踏まえ，紫系統および赤系統の特性，利用および品種化とその課題について考察した．

そばや肉、魚料理の薬味に最適!! ハマダイコン新品種 **出雲おろち大根**

島根大学発の地域特産新食材

出雲おろち大根

登録品種名「スサノオ」

「出雲おろち大根」は、出雲地域の宍道湖畔や鳥居半島の浜辺に自生する、ハマダイコン(別名「野大根」)を品種改良した辛味大根で、正真正正の出雲産の新香辛野菜です。七ヶ根の多い形は出雲神話の「八岐大蛇(ヤマタノオロチ)」を彷彿させ、「オロチ」を「オ」で、食べると強烈な刺激があることから「出雲おろち大根」と命名しました。

島根大学
大
ブレバ

●お問い合わせ先
島根大学生物資源科学部
附属生物資源教育研究センター 本庄総合農場
〒690-1102 島根県松江市上木庄町2059
TEL.0852-34-0311 FAX.0852-34-1823

極辛旨味
島根大学発
出雲特産
出雲おろち大根

Fig.1-1. Advertising printing of our new local pungent radish “Izumo Orochi Daikon”; ‘Susa-no-o’. Its breeding process, origin of the name and reference address are described with the photograph.

4- Coumaroyl-CoA + 3Malonyl-CoA

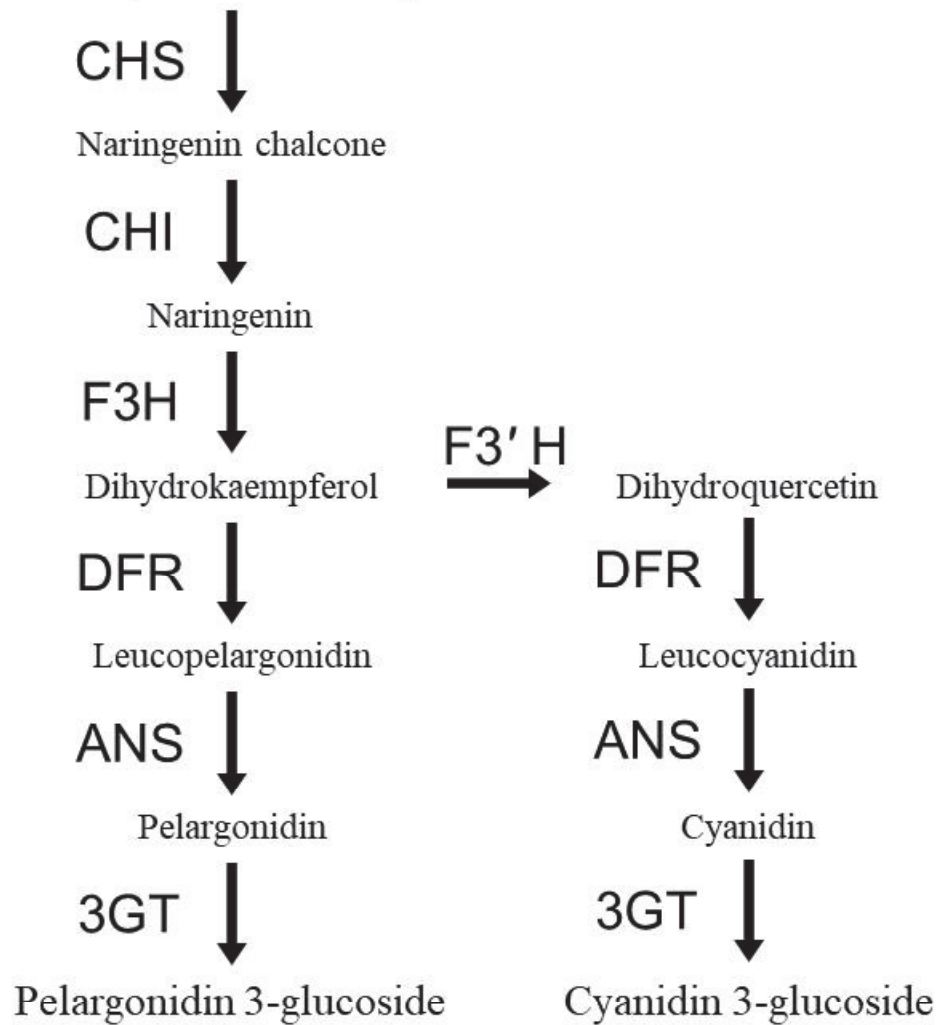


Fig.1-2. Anthocyanin biosynthetic pathway. Enzyme abbreviations: ANS, anthocyanidin synthase; CHI, chalcone isomerase; CHS, chalcone synthase; DFR, dihydroflavonol reductase; F3H, flavonone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; 3GT, flavonoid 3-glucosyltransferase.

第2章 紫系および赤系「出雲おろち大根」育成系統の作出とその特性評価

本章では「出雲おろち大根」の食品機能性の向上や食品色素源などの利用幅拡大を目的に、根部に紫系および赤系園芸品種からアントシアニン着色形質を導入することにより紫系統および赤系統を作出し、その着色形質や根部形態などの形態調査、アントシアニン組成やイソチオシアネート含量などの根部内成分および抗酸化能の分析を行った。

第1節 根部着色形質を導入した「出雲おろち大根」の作出とその形態特性

本節では紫系および赤系品種からアントシアニン着色形質を「出雲おろち大根」へ導入することにより紫系統および赤系統を作出し、それらの形態調査を行った。各世代の形態調査により得られた結果から、紫系統および赤系統の固定度を評価し、紫系および赤系「出雲おろち大根」の育成経過について考察した。

材料および方法

1. 紫系統および赤系統の育成経過

紫系統および赤系統の育成系統図を Fig.2-1-1 に示した。園芸品種からアントシアニン着色形質を導入するために、2006年5月に「スサノオ」にシアニジン系色素の遺伝資源として紫系品種「からいね赤」（株）渡辺採種場）とペラルゴニジン系色素の遺伝資源として赤系品種「長安青丸紅心」（タキイ種苗（株））を正逆交配し F_1 を得た。2007年に紫色の根部着色を示す F_1 約7個体から自然受粉により集団選抜第1世代 (M_1) を得た。2008年に

根部着色を示し，‘スサノオ’と同様の根形および強い辛味を有する M_1 約 7 個体を選抜し，自然受粉により M_2 を得た．2009 年に根部の表現型に基づいて紫系個体および赤系個体をそれぞれ約 7 個体選抜し，紫系統および赤系統に分離した (M_3)．2010～2016 年は両系統ともに‘スサノオ’と同様の根形および強い辛味を有する約 15 個体の集団選抜により M_4 ～ M_{10} を得た．一方，2012 年に紫系統および赤系統の M_5 集団から根部着色を示す個体をそれぞれ選抜し，蓄受粉により自殖第 1 世代 (S_1) を得た．2013～2016 年は両系統ともに根部着色を示す個体の蓄受粉により自殖系統の S_2 ～ S_5 を得た (Fig.2-1-1)．

集団選抜系統は島根大学神西砂丘農場にて，自殖系統は島根大学生物資源科学部実験圃場（以下，川津圃場）にて栽培した．いずれの世代も 9 月に播種・栽培し，翌年 2 月に収穫した．

2. 紫系統および赤系統の根部および葉の形質調査

紫系統および赤系統の集団選抜系統 M_6 ～ M_{10} と自殖系統 S_1 ～ S_5 における根部着色，主根型，岐根程度，葉のアントシアニン着色程度および葉形について収穫後，調査した．

調査基準は次の通りとした；葉形：切れ葉，切れ葉と板葉の中間葉，板葉の 3 択．主根型：農林水産省種苗登録の特性調査基準に従い亀戸型，耐病型，ねずみ型，紅心型，聖護院型，岐根型の 6 択 (Fig. 2-1-2A)．岐根程度：レベル 0～3 の 4 択 (Fig. 2-1-2B)．葉のアントシアニン着色程度：無，弱，中，強の 4 択．根部着色：根部全体が紫色（根部表皮，皮層および木部柔組織に紫色を呈する.），根部の一部が紫色（根部表皮，皮層および木部柔組織のいずれかに紫色を呈する.），根部全体が赤色（根部表皮，皮層および木部柔組織に赤色を呈する.），根部の一部が赤色（根部表皮，皮層および木部柔組織

のいずれかに赤色を呈する.), 根部全体が白色 (着色無し) の 5 択.

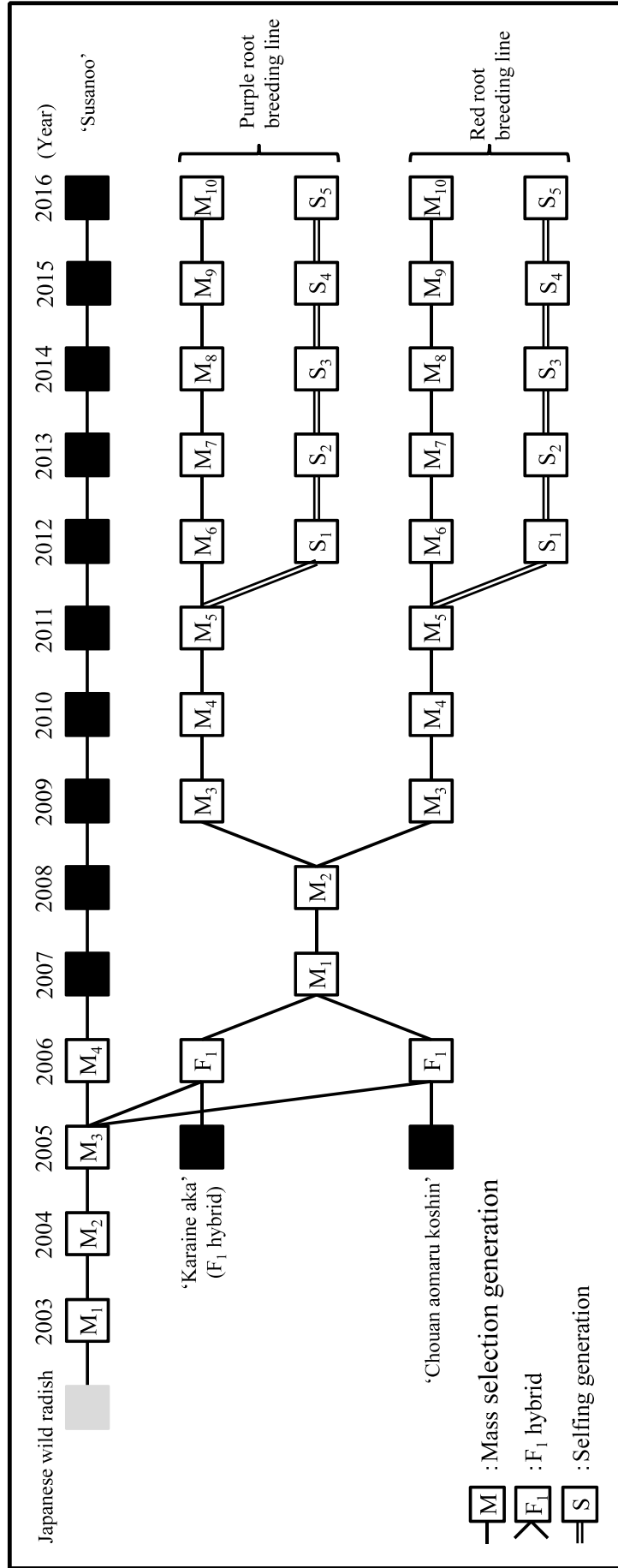


Fig. 2-1-1. Genealogical chart of purple- and red-root breeding lines. Gray, black and white boxes indicate wild species, cultivars and breeding lines, respectively.

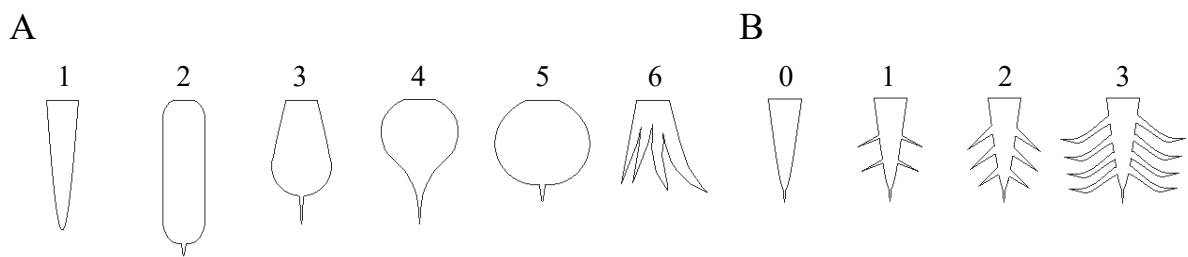


Fig. 2-1-2. Evaluation of root shape. A is taproot shape. 1: Kameido type, 2: Taibyō type, 3: Nezumi type, 4: Koshin type, 5: Shogoin type, 6: Kikon type. B is branched root level (0, 1, 2, 3).

結果

紫系統の葉形，主根型および岐根程度の調査結果を Table2-1-1，同系統の葉のアントシアニン着色程度および根部着色形質の調査結果を Table2-1-3 に示した．一方，赤系統の葉形，主根型および岐根程度の調査結果を Table2-1-2，同系統の葉のアントシアニン着色程度および根部着色形質の調査結果を Table2-1-4 に示した．

紫系統および赤系統の葉形は $M_6 \sim M_8$ において，すべての個体が切れ葉を示した．主根型は， $M_6 \sim M_{10}$ の紫系統では世代により 61.3～90.5%，同世代の赤系統では世代により 56.3～83.9%の個体が育種目標である亀戸型を示した．岐根程度は， $M_6 \sim M_{10}$ の紫系統では世代により 66.7～79.7%，同世代の赤系統では世代により 67.9～91.5%の個体が育種目標であるレベル2以上を示した．葉のアントシアニン着色は， $M_6 \sim M_{10}$ の紫系統では世代により 77.0～98.9%，同世代の赤系統では世代により 71.6～94.3%の個体が生じた．紫系統において，根部着色は $M_6 \sim M_{10}$ 集団では根部全体が紫色，根部の一部が紫色，根部全体が赤色，根部の一部が赤色および未着色が出現し，その出現率は世代によりそれぞれ 55.8～81.6%，0～3.3%，0～4.8%，0～0.8% および 18.4～39.6%であった．一方，同系統の $S_1 \sim S_5$ では根部全体が紫色，根部の一部が紫色，および未着色形質が出現し，その出現率はそれぞれ 71.4～93.3%，0～14.3% および 6.7～27.0%であった．

赤系統の根部着色は $M_6 \sim M_{10}$ では，根部全体が赤色，根部の一部が赤色 および未着色が出現し，その出現率はそれぞれ 60.8～83.3%，0～5.8% および 15.3～33.4%であった．一方，同系統の $S_1 \sim S_5$ では全体が赤色，根部の一部が赤色，および未着色形質が出現し，その出現率はそれぞれ 25.0～85.9%，0～37.5% および 14.1～37.5%であった．

Table 2-1-1. Ratio of leaf- and root-shape characters in mass selection breeding lines of purple-root breeding lines.

Generations	Number of individuals	Leaf shape type (%)			Taproot shape type ^z (%)						Lateral root level ^z (%)			
		lobed leaf	Middle leaf	Entire leaf	Kameido	Taibyō	Nezumi	Koshin	Shogoin	Kikon	0	1	2	3
M ₆	682	100	0	0	74.2	1.8	0.1	6.9	0	17.0	0.6	34.1	41.2	24.1
M ₇	121	100	0	0	76.1	0.8	0.8	5.8	0	16.5	0	16.5	47.9	35.6
M ₈	725	100	0	0	92.6	0.1	0.5	5.0	0.3	1.5	0.6	38.1	46.3	15.0
M ₉	147	— ^y	—	—	87.8	0	0.7	5.4	0	6.1	0	9.5	54.4	36.1
M ₁₀	88	—	—	—	73.9	0	3.4	15.9	0	6.8	0	32.9	59.1	8.0

^z Morphology was shown in Fig. 2-1-2.

^y Non-data.

Table 2-1-2. Ratio of leaf- and root-shape characters in mass selection breeding lines of red-root breeding lines.

Generations	Number of individuals	Leaf shape type (%)			Taproot shape type ^z (%)						Lateral root level ^z (%)			
		lobed leaf	Middle leaf	Entire leaf	Kameido	Taibyau	Nezumi	Koshin	Shogoin	Kikon	0	1	2	3
M ₆	1190	98.9	1.0	0.1	56.3	0.2	8.3	21.2	0	14.0	0.1	26.5	47.6	25.8
M ₇	603	99.8	0.2	0	64.3	0	1.5	29.9	0	4.3	0	9.1	48.9	42.0
M ₈	1177	100	0	0	79.3	0	0.6	18.2	0.2	1.7	0.2	27.0	56.7	16.1
M ₉	881	— ^y	—	—	83.9	0	0.2	10.6	0	5.3	0	8.5	49.8	41.7
M ₁₀	53	—	—	—	79.2	3.8	0	13.2	0	3.8	0	32.1	67.9	0

^z Morphology was shown in Fig. 2-1-2.

^y Non-data.

Table 2-1-3. Ratio of leaf- and root-color characters in mass selection breeding lines and inbred lines of purple-root breeding lines.

Breeding lines	Number of individuals	Anthocyanin pigmentation of leaf (%)				Root color (%)				
		None	Weak	Medium	Strong	Wholly purple	Partially purple	Wholly red	Partially red	White
Mass selection breeding lines										
M ₆	682	23.0	33.2	25.3	18.5	56.9	1.4	2.1	0.8	38.8
M ₇	121	6.6	48.8	31.4	13.2	55.8	2.0	2.1	0.5	39.6
M ₈	725	15.4	44.7	27.2	12.7	61.0	3.3	4.8	0	30.9
M ₉	147	4.1	48.3	28.6	19.0	81.6	0	0	0	18.4
M ₁₀	88	1.1	37.5	51.2	10.2	77.3	0	0	0	22.7
Inbred lines										
S ₁	50	— ^z	—	—	—	73.0	0	0	0	27.0
S ₂	59	—	—	—	—	81.3	10.2	0	0	8.5
S ₃	14	—	—	—	—	71.4 (33.3–100) ^y	14.3 (33.3–100)	0	0	14.3 (0–33.4)
S ₄	55	—	—	—	—	81.8 (69.2–93.1)	0	0	0	18.2 (6.9–30.8)
S ₅	45	—	—	—	—	93.3 (66.7–100)	0	0	0	6.7 (0–33.3)

^z non-data.

^y Variation in each inbred lines.

Table 2-1-4. Ratio of leaf- and root-color characters in mass selection and inbred lines of red-root breeding lines.

Breeding lines	Number of individuals	Anthocyanin pigmentation of leaf (%)					Root color (%)				
		None	Weak	Medium	Strong	Wholly purple	Partially purple	Wholly red	Partially red	White	
Mass selection breeding lines											
M ₆	1190	28.4	25.4	27.4	18.8	0	0	60.8	5.8	33.4	
M ₇	603	8.8	56.2	26.9	8.1	0	0	69.2	5.0	25.8	
M ₈	1177	6.8	33.7	27.5	32.0	0	0	72.1	0.5	27.4	
M ₉	881	24.1	33.1	15.4	27.4	0	0	83.3	1.4	15.3	
M ₁₀	53	5.7	32.1	54.7	7.5	0	0	81.1	0	18.9	
Inbred lines											
S ₁	43	— ^z	—	—	—	0	0	69.1	13.1	17.8	
S ₂	48	—	—	—	—	0	0	72.9	10.4	16.7	
S ₃	16	—	—	—	—	0	0	25.0 (0-66.7) ^y	37.5 (0-60.0)	37.5 (33.3-40.0)	
S ₄	71	—	—	—	—	0	0	85.9 (77.8-100)	0	14.1 (0-22.2)	
S ₅	57	—	—	—	—	0	0	71.9 (42.9-100)	0	28.1 (0-57.1)	

^z non-data.

^y Variation in each inbred lines.

考察

本研究では‘スサノオ’に着色形質を導入するために、紫系品種の‘からいね赤’および赤系品種の‘長安青丸紅心’を交雑し、集団選抜および蓄受粉による自家受粉により紫系統および赤系統を作出した。

根部着色形質は‘スサノオ’に導入することができたが、両系統の M₁₀ では約 2 割程度の未着色個体が含まれていた。ペラルゴニジンを根部表皮に蓄積する赤系ハツカダイコン品種‘コメット’と白系品種‘聖護院大根’の交雑試験では、F₁ の根色はすべて紫色を示し、その F₂ の根色は紫色、赤色、白色に分離し、その分離比は 9:3:4 であった (Hoshi et al., 1963)。本研究において、紫系統および赤系統における集団選抜された個体の多くはアントシアニン着色についてヘテロ接合体であるために、次世代において未着色個体が出現すると考えられた。また、紅芯大根と白系品種の雑種後代における根色の分離はメンデルの遺伝の法則に従わないことが報告されている (宋ら, 1919)。さらに、紅芯大根の‘紅心青’と白系品種における F₂ の根色は着色と未着色に分離し、その分離比は 2:1 であったことから、紅芯大根の根部着色には着色から未着色へ変化させる易変遺伝子の影響が示唆されている (建部, 1940)。本研究においても‘紅心青’と遺伝的に近い‘長安青丸紅心’を交配親として用いているため、紫系統および赤系統において未着色個体は高い割合で出現すると示唆された。一方で、ペラルゴニジンを主たるアントシアニンとして蓄積しているダイコン中間母本「乾谷」において着色形質は自家受粉によって固定されている (浅子ら, 2011)。本研究においても自殖系統における根部着色率は集団選抜系統よりも高く全個体が着色した系統も出現したことから (Table2-1-3, 2-1-4)、自家受粉は根部着色形質についてホモ接合性個体の割合を高めるのに効果的であった。紫系統および赤系

統の育成過程において、根部着色形質の固定は根部着色を制御する遺伝子を同定し、自家受粉を重ねることにより可能であると考えられた。

‘スサノオ’の形態的特徴として、葉の形状は切れ葉を示し、根部の形状は紡錘形である亀戸型の主根に加え、適度な岐根を示す。紫系統および赤系統における葉の形状は初期世代では‘スサノオ’由来の切れ葉と‘長安青丸紅心’由来の板葉が出現していたが、集団選抜を重ねることで切れ葉に固定された。両系統の根部の形状も集団選抜を重ねることで安定し、M₇以降では‘スサノオ’と同様の根形を示す個体の割合は三分の二以上を占めていた。今後、さらに集団選抜を重ねることで両系統の形態形質は‘スサノオ’と同様の形態に固定されると示唆された。

本節では、紫系および赤系の根部着色を園芸品種から‘スサノオ’へ導入することに成功した。そこで、本章第2節では紫系統および赤系統の根部内成分および食品機能性を評価するために、アントシアニン組成やイソチオシアネート含量などの根部内成分および抗酸化能を調査した。一方、両系統において未着色個体が発見すること、さらに紫系統において赤色個体が発見することから、根部着色形質の固定が必要である。そのため、ダイコンにおける着色制御機構を明らかにすることを目的に、第3章ではダイコン園芸品種におけるアントシアニン着色とその関連遺伝子との関係性について調査した。

第2節 紫系統および赤系統における根部内成分および食品機能性の評価

本節では第1節で作出した紫系統および赤系統のアントシアニン組成やイソチオシアネート含量などの根部内成分および食品機能性として抗酸化能を調査し、交配親品種と比較した。得られた結果から、根部着色形質の導入による根部内成分および食品機能性の変化について考察した。

材料および方法

1. 紫系統および赤系統の根色とアントシアニン組成

根色の評価およびアントシアニン分析のために、2012年9月に川津圃場にて播種し、同年12月に収穫した‘スサノオ’、紫系統および赤系統のM₆を各3個体供試した。さらに、両系統の根色と比較するために、2015年9月に川津圃場にて播種し、同年12月に川津圃場にて収穫した‘からいね赤’および‘長安青丸紅心’を各3個体供試した。根部表皮および木部柔組織の根色は日本園芸植物標準色票、王立園芸協会カラーチャート(RHSCC)および色彩色差計(ColorReaderCR-10 コニカミノルタ(株))を用いて評価した。‘スサノオ’、紫系統および赤系統の根色は日本園芸植物標準色票を用いて組織ごとに評価したのち、RHSCCのコードNo.に対応させた。一方、‘からいね赤’および‘長安青丸紅心’の根色はRHSCCを用いて着色組織を評価したのち、日本園芸植物標準色票の系統色名と対応させた。

紫系統および赤系統の根部表皮および木部柔組織は40℃で一晩通風乾燥させ、アントシアニン分析まで4℃で保存した。乾燥した各組織それぞれ約10mgにMAW(MeOH:HOAc:H₂O=4:1:5)1mlを加えて、冷蔵庫内で12時間アントシアニンを抽出した。抽出液をメンブランフィルターで濾過

した後、HPLCにより分析した。HPLC分析の条件は次の通りである：機器：LC10A システム（(株) 島津製作所），カラム：Water C18（4.6×250mm），カラム温度：40℃，移動層：A液（1.5%リン酸），B液（1.5%リン酸，20%酢酸，25%アセトニトリル），濃度勾配：20–85%（40分），流速：1.0ml/分，検出波長：515nm。得られた分析結果は交配親品種のアントシアニンプロファイル（加藤ら，2013）と比較した。

なお、本分析におけるHPLC分析は岩手大学農学部立澤文見准教授に依頼して行ったものである。

2. 根部内成分および抗酸化能の評価

2012年9月に川津圃場にて播種・栽培し，2013年2月に収穫した‘耐病総太り’，‘辛丸’，‘スサノオ’および紫系統と赤系統のM₆を供試した。また，2014年9月に川津圃場にて播種・栽培し，同年12月に収穫した‘耐病総太り’，‘辛丸’，‘スサノオ’，‘からいね赤’，‘長安青丸紅心’および紫系統と赤系統のM₈も供試した。収穫した個体の根部の重量を測定後，各ダイコンの中央部約5 cmを横断し皮付きのまま市販のおろし器でおろしたものをイソチオシアネート含量，可溶性固形物含量および抗酸化能の分析サンプルとした。

イソチオシアネート含量の分析

イソチオシアネート含量の分析は伴ら（2009）の方法に準じて行った。すなわち，おろしたサンプルを2層のガーゼで搾汁し，密閉容器に入れ，30℃で30分間インキュベートし，イソチオシアネートを生成させた。サンプル5 mLに20 mLのエタノール-アンモニア溶液（39：1，v/v）を添加し，30℃で60分間インキュベートし，チオウレアを生成させた。サンプル25 mLに

1 mL の 50% 酢酸水溶液を添加し、濾紙で濾過した。サンプル 1 mL に 4 mL の改良グロート試薬（江崎・小野崎，1980）を添加し、37°C で 45 分間インキュベートした。サンプルの 600 nm の吸光度を測定し、あらかじめ作成したアシルチオウレアの検量線からイソチシアネート含量を算出した。

可溶性固形物含量の分析

おろしたサンプルを 2 層のガーゼで搾汁した後、その搾汁液をデジタル糖度計（PR-101α 株式会社アタゴ）を用いて分析した。

アントシアニン含量の分析

根部表皮および木部柔組織をそれぞれ液体窒素にてホモジナイズしたものを分析サンプルとした。アントシアニン含量の分析は Pattanaik et al. (2010) の方法を一部改変して行った。すなわち、ホモジナイズした各組織それぞれ約 0.5g に 1% 塩酸メタノール 1.5mL を加えて、冷蔵庫内で 12 時間アントシアニンを抽出した。1mL の蒸留水を加えたのち、クロロフィルを除去するために等量のクロロホルムを加え、遠心分離を行った。上澄みのメタノール層を回収し、上澄み溶液の 520nm および 657nm の吸光度を測定した。アントシアニン含量は次式から算出した；

$$Q_{\text{Anthocyanin}} = (A_{520} - 0.25 \times A_{657}) \times M^{-1}.$$

$Q_{\text{Anthocyanin}}$ ：アントシアニン含量， A_{520} および A_{657} ：520nm および 657nm における吸光度， M ：アントシアニン抽出に用いたサンプルの重量（g）。

抗酸化能の評価

抗酸化能の評価は須田（2000）の方法を参考に DPPH ラジカル消去活性を測定した。すなわち、おろしたダイコン約 5 g に 18 mL のエタノールを添加

し、乳鉢と乳棒で磨砕し、80%エタノールで 50 mL にメスアップ後、濾紙で濾過し分析サンプルとした。分析サンプル 400 μ L に 80%エタノールを 400 μ L 加え、混合溶液（400 μ M DPPH : 0.2 M MES Buffer : 20%エタノール=1 : 1 : 1, v/v/v) 2.4 mL を添加後、攪拌し、室温で 20 分間インキュベートした。その後、溶液の 520 nm の吸光度を測定した。抗酸化値はあらかじめ作成した Trolox 検量線から算出した。

統計処理

各品種および系統におけるイソチオシアネート含量、可溶性固形物含量および DPPH ラジカル消去活性の平均値は Tukey 法により同じ年度内に栽培した品種間において 5% 水準で多重比較を行った。なお、可溶性固形物含量は角変換した後、多重比較を行った。統計解析ソフトは IBM SPSS Statistics 22 を用いた。

結果

紫系統および赤系統の根色とアントシアニン組成

交配親品種の根色は、‘スサノオ’の根部表皮 (L^* : 82.2, b^*/a^* : 11.29 ± 2.23) および木部柔組織 (L^* : 79.1, b^*/a^* : 8.34 ± 0.95) では黄白 (RHSCC No. NN155A; white group) であったのに対し、‘からいね赤’の根部表皮組織 (L^* : 48.3, b^*/a^* : -0.47 ± 0.02) では浅赤味紫 (N81D; Purple-violet group), ‘長安青丸紅心’の根部木部柔組織 (L^* : 36.3, b^*/a^* : -0.08 ± 0.01) では鮮紫赤 (64A; Red-purple group) であった (Table 2-2-1). 一方, 育成系統の根色は紫系統の根部表皮組織 (L^* : 34.0, b^*/a^* : -0.26 ± 0.03) では濃赤味紫 (77A; Purple group), 木部柔組織 (L^* : 40.0, b^*/a^* : -0.26 ± 0.04) では明赤味紫 (N78B; Purple group), 赤系統の根部表皮組織 (L^* : 39.6, b^*/a^* : -0.04 ± 0.02) では明赤紫 (67B; Red-purple group), 根部木部柔組織 (L^* : 39.7, b^*/a^* : -0.03 ± 0.01) では濃紫赤 (61A; Red-purple group) であり, ‘からいね赤’ および ‘長安青丸紅心’ と同様の根色を示した (Table 2-2-1, Fig. 2-2-1).

紫系統および赤系統におけるアントシアニンの HPLC 分析の結果, 紫系統の主要アントシアニンは根部表皮および木部柔組織ともに P1: シアニジン 3-パラ-クマロイル-ソホロシド-5-マロニル-グルコシド, P2: シアニジン 3-フェロイル-ソホロシド-5-マロニル-グルコシド, P3: シアニジン 3-カフェオイル-ソホロシド-5-マロニル-グルコシドであった (Fig. 2-2-2). 一方, 赤系統の主要アントシアニンは根部表皮および木部柔組織ともに R1: ペラルゴニジン 3-フェロイル-ソホロシド-5-マロニル-グルコシド, R2: ペラルゴニジン 3-パラ-クマロイル-ソホロシド-5-マロニル-グルコシド, R3: ペラルゴニジン 3-カフェオイル-ソホロシド-5-マロニル-グルコシドであった (Fig. 2-2-2). 紫系統および赤系

統の主要アントシアニンは‘からいね赤’および‘長安青丸紅心’のアントシアニンプロフィール（加藤ら，2013）とそれぞれ一致した。

根部内成分および抗酸化能の評価

紫系統のイソチオシアネート含量（2013年では $38.2 \pm 9.29 \text{ mg/100g juice}$ ，2014年では $25.7 \pm 4.35 \text{ mg/100g juice}$ ）は‘スサノオ’（2013年では $52.8 \pm 3.14 \text{ mg/100g juice}$ ，2014年では $37.5 \pm 6.85 \text{ mg/100g juice}$ ）や‘辛丸’（2013年では $31.7 \pm 4.74 \text{ mg/100g juice}$ ，2014年では $46.2 \pm 4.62 \text{ mg/100g juice}$ ）と同等であり，‘耐病総太り’（2013年では $13.7 \pm 1.22 \text{ mg/100g juice}$ ，2014年では $22.5 \pm 1.89 \text{ mg/100g juice}$ ）や交配親品種（‘からいね赤’は $29.0 \pm 1.57 \text{ mg/100g juice}$ ，‘長安青丸紅心’は $23.0 \pm 1.57 \text{ mg/100g juice}$ ）よりも高い傾向を示した。赤系統のイソチオシアネート含量は2013年（ $26.5 \pm 1.37 \text{ mg/100g juice}$ ）では‘スサノオ’よりも有意に低かったが，2014年（ $28.3 \pm 1.98 \text{ mg/100g juice}$ ）では‘スサノオ’と同等であった（Fig. 2-2-3A）。紫系統（2013年では $8.9 \pm 0.80^\circ \text{Brix}$ ，2014年では $7.5 \pm 0.32^\circ \text{Brix}$ ）および赤系統（2013年では $8.0 \pm 0.33^\circ \text{Brix}$ ，2014年では $7.1 \pm 1.98^\circ \text{Brix}$ ）の可溶性固形物含量は‘耐病総太り’（2013年では $5.3 \pm 0.03^\circ \text{Brix}$ ，2014年では $4.8 \pm 0.07^\circ \text{Brix}$ ）より有意に高く，‘辛丸’（2013年では $8.8 \pm 0.71^\circ \text{Brix}$ ，2014年では $7.3 \pm 0.20^\circ \text{Brix}$ ），‘スサノオ’（2013年では $7.0 \pm 0.22^\circ \text{Brix}$ ，2014年では $7.0 \pm 0.19^\circ \text{Brix}$ ），‘からいね赤’（ $7.0 \pm 0.03^\circ \text{Brix}$ ）および‘長安青丸紅心’（ $7.5 \pm 0.15^\circ \text{Brix}$ ）と同等であった（Fig. 2-2-3B）。紫系統および赤系統のアントシアニン含量は根部表皮組織（紫系統は $6.6 \pm 0.03 A_{520-0.25 A_{657}}/100 \text{ gFW}$ ，赤系統は $6.4 \pm 0.20 A_{520-0.25 A_{657}}/100 \text{ gFW}$ ）では‘からいね赤’（ $3.1 \pm 0.17 A_{520-0.25 A_{657}}/100 \text{ gFW}$ ）よりも高く，根部木部柔組織（紫系統は $6.6 A_{520-0.25 A_{657}}/100 \text{ gFW}$ ，赤系統は $6.6 A_{520-0.25 A_{657}}/100 \text{ gFW}$ ）では‘長安青丸紅心’（ 6.3 ± 0.05

A₅₂₀-0.25A₆₅₇/100gFW) と同等の傾向を示した (Fig. 2-2-4). ‘スサノオ’ (2013 年では 121.3±6.40μmol Trolox eq/100gFW, 2014 年では 146.1±20.57μmol Trolox eq/100gFW) の DPPH ラジカル消去活性は, ‘辛丸’ (2013 年では 91.3±3.11μmol Trolox eq/100gFW, 2014 年では 162.1±23.62μmol Trolox eq/100gFW) ‘からいね赤’ (130.9±24.83 μmol Trolox eq/100gFW) および ‘長安青丸紅心’ (117.7±3.50 μmol Trolox eq/100gFW) と同等であった. 一方, 紫系統 (2013 年では 255.1±20.92μmol Trolox eq/100gFW, 2014 年では 276.0±27.20μmol Trolox eq/100gFW) および赤系統 (2013 年では 250.1±19.22μmol Trolox eq/100gFW, 2014 年では 287.8±22.76 μmol Trolox eq/100gFW) の DPPH ラジカル消去活性は ‘スサノオ’ より約 2 倍と有意に高く, ‘耐病総太り’ (2013 年では 25.7±7.19μmol Trolox eq/100gFW, 2014 年では 40.6±3.60μmol Trolox eq/100gFW) よりも 7~10 倍の値となった (Fig. 2-2-5).

Table 2-2-1. Evaluation of root color in cultivars and breeding lines.

Cultivars and breeding lines	Skin			Xylem parenchyma		
	RHSCC (group name) ^w	L*	b*/a*	RHSCC (group name)	L*	b*/a*
'Susanoo' ^z	NN155A (White group)	82.2	11.29 ± 2.23 ^y	NN155A (White group)	79.1	8.34 ± 0.95 ^y
'Karaine aka' ^{y,x}	N81D (Purple-violet group)	48.3	-0.47 ± 0.02	—	—	—
'Chouan aomaru koshin' ^{y,x}	—	—	—	64A (Red-purple group)	36.3	-0.08 ± 0.01
Purple-root breeding lines ^z	77A (Purple group)	34.0	-0.26 ± 0.03	N78B (Purple group)	40.0	-0.26 ± 0.04
Red-root breeding lines ^z	67B (Red-purple group)	39.6	-0.04 ± 0.02	61A (Red-purple group)	39.7	-0.03 ± 0.01

^z Cultivated from September to December in 2012.

^y Cultivated from September to December in 2015.

^x Measured in mainly pigmented part of cultivar.

^w Royal Horticultural Society Colour Chart.

^v Mean±SE.



Fig.2-2-1. Photograph of 'Susanoo' (left) and purple and red root breeding lines (center and right) in 2012 (A) and their cross section (B–D). Bar indicates 10cm.

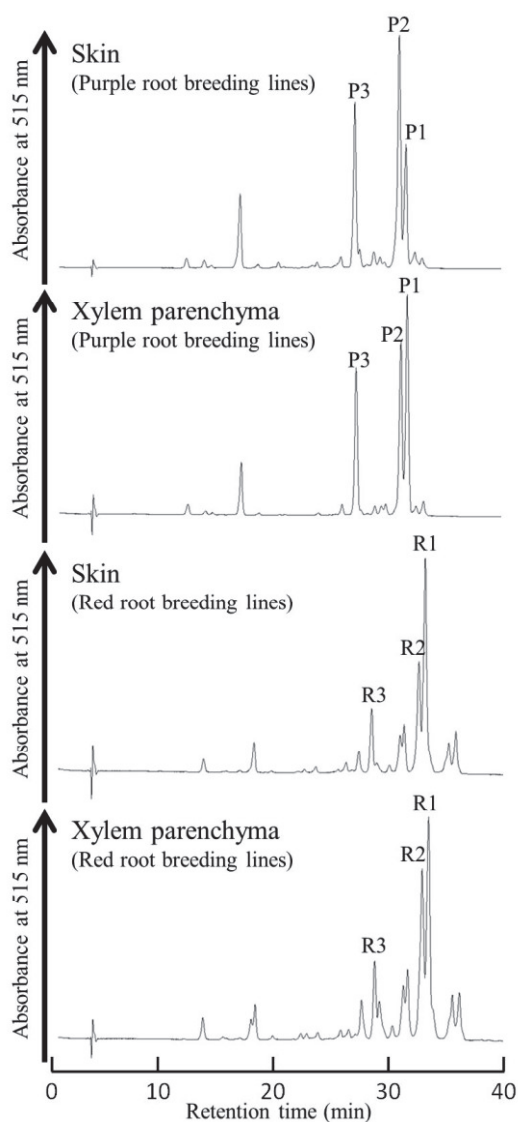


Fig.2-2-2. HPLC chromatograms of anthocyanin pigments in root skin and xylem parenchyma of purple- and red-root breeding lines. Peaks are as follows; P1: Cyanidin 3-[2-(glucosyl)-6-(trans-p-coumaroyl)-glucoside]-5-[6-(malonyl)-glucoside], P2: Cyanidin 3-[2-(glucosyl)-6-(trans-feruloyl)-glucoside]-5-[6-(malonyl)-glucoside], P3: Malonyl cyanidin 3-[2-(glucosyl)-6-(trans-caffeoyl)-glucoside]-5-glucoside, R1: Pelargonidin 3-[2-(glucosyl)-6-(trans-feruloyl)-glucoside]-5-(6-malonyl-glucoside), R2: Pelargonidin 3-[2-(glucosyl)-6-(trans-p-coumaroyl)-glucoside]-5-(6-malonyl-glucoside), R3: Pelargonidin 3-[2-(glucosyl)-6-(trans-caffeoyl)-glucoside]-5-(6-malonyl-glucoside).

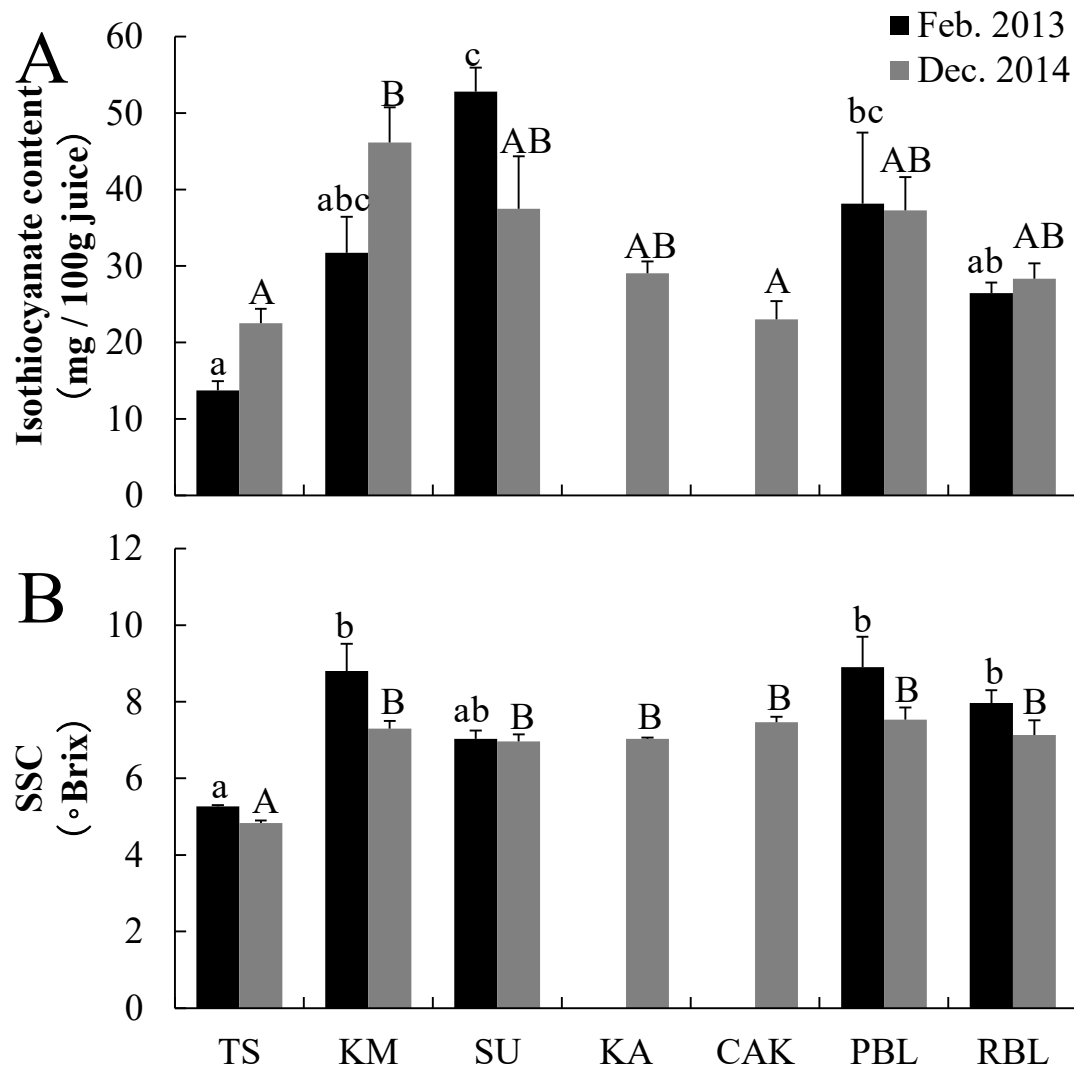


Fig. 2-2-3. Isothiocyanate content (A) and soluble solids content (SSC; B) in ‘Taibyosoubutori’ (TS), ‘Karamaru’ (KM), ‘Susanoo’ (SU), ‘Karine aka’ (KA), ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK), and purple and red root breeding lines (PBL and RBL). Bars are standard error (n=3). Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ (Tukey’s multiple comparison tests) among same year.

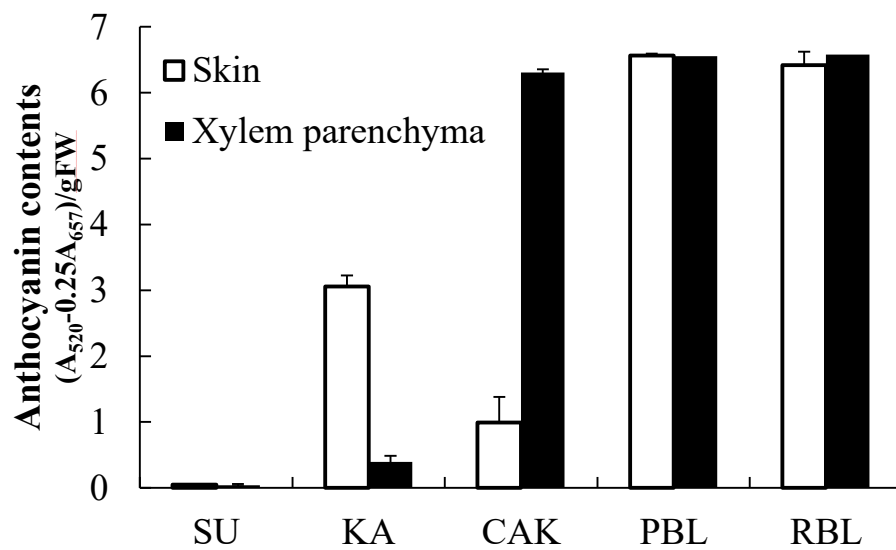


Fig. 2-2-4. Anthocyanin contents of root skin and xylem parenchyma in ‘Susanoo’ (SU), ‘Karine aka’ (KA), ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK), and purple and red root breeding lines (PBL and RBL). Bars are standard error (n=3).

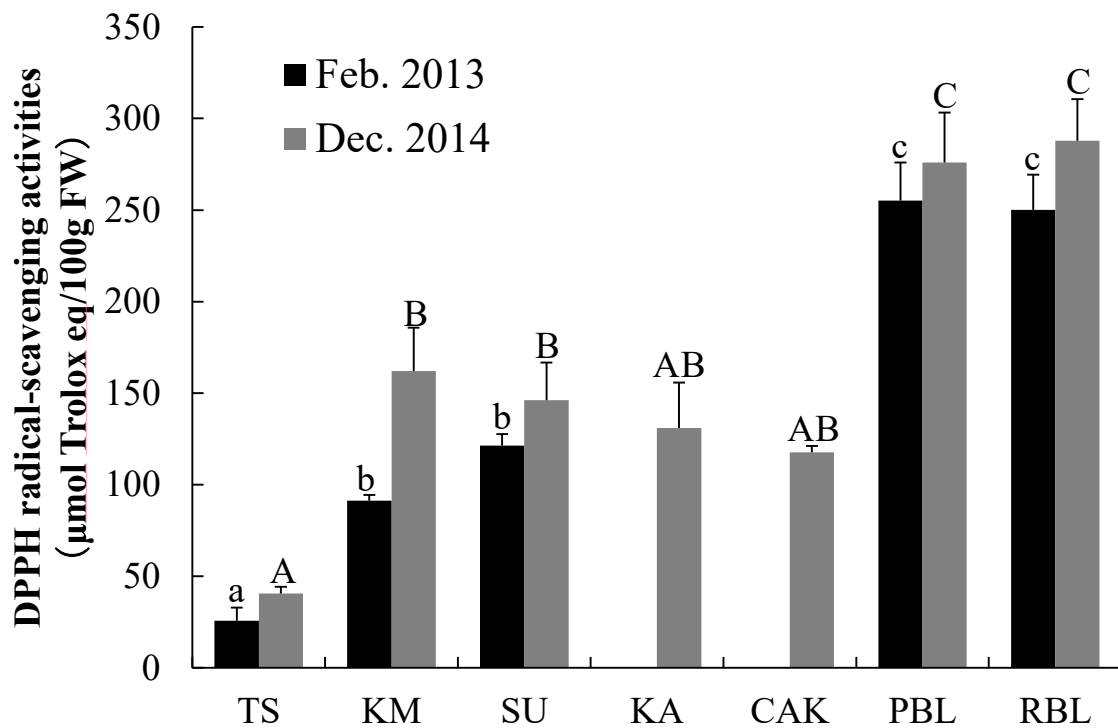


Fig. 2-2-5. DPPH radical scavenging activity of ‘Taibyso soubutori’ (TS), ‘Karamaru’ (KM), ‘Susanoo’ (SU), ‘Karine aka’ (KA), ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK) and purple and red root breeding lines (PBL and RBL) in 2013 and 2014. Bars are standard error (n=3). Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ (Tukey’s multiple comparison tests) among same year.

考察

ダイコン類における主要アントシアニンには紫系品種ではアシル化されたシアニジン 3-ソホロシド-5-グルコシド、赤系品種ではアシル化されたペラルゴニジン 3-ソホロシド-5-グルコシドであることが報告されている(加藤ら, 2013)。紫系品種の‘からいね赤’では、根部表皮組織は紫色、根部木部柔組織はわずかに紫色を示す。対称的に、赤系品種の‘長安青丸紅心’では、根部表皮組織は緑色、根部木部柔組織は赤色を示す。根部全体にアントシアニン着色を示す「出雲おろち大根」を育成するために、‘スサノオ’と‘からいね赤’および‘長安青丸紅心’を交雑し、その F₁ 後代の集団選抜により紫系統および赤系統を作出した。主要アントシアニンの異なる品種を交配親として用いることで、紫系統および赤系統の主要アントシアニンはシアニジン系色素とペラルゴニジン系色素が混在すると考えられた。しかし、根部着色について表現型を基に選抜を重ねた紫系統および赤系統の主要アントシアニンは交配親品種である‘からいね赤’および‘長安青丸紅心’のそれとそれぞれ一致していた。

‘スサノオ’と比較して、紫系統および赤系統のイソチオシアネート含量および可溶性固形物含量は同等であった (Fig. 2-2-3)。色素を高含有する野菜において DPPH 分析による抗酸化能はフェノール含量やアントシアニン含量に比例することが報告されている (Li et al., 2012)。¹ ‘水ナス’の果実において、果皮のアントシアニン含量とその DPPH ラジカル消去活性は正の相関を示した (橘田ら, 2005)。また、赤キャベツにおいて、アントシアニン含量の増加は抗酸化活性の向上に関連していることが報告されている (Yuan et al., 2009)。アシル化されたペラルゴニジン系色素の DPPH ラジカル消去活性はペラルゴニジンやペラルゴニジン-3-グルコシドのそれよりも高かつ

た (Matsufuji et al., 2007). 本研究において, 紫系統および赤系統のアントシアニン含量は交配親品種よりも高い傾向を示した (Fig. 2-2-4). 両系統の DPPH ラジカル消去活性は ‘スサノオ’ よりも約 2 倍となったことから, ‘スサノオ’ の食品機能性はアシル化されたアントシアニンを導入することにより向上することが明らかとなった.

以上の結果から, 紫系統および赤系統は交配親品種と同様のアントシアニンを含有し, ‘スサノオ’ に比べ, さらに高い機能性を付加した辛味大根であると評価された. ダイコンにおいて, 根部全体にアントシアニン着色する形質を導入することにより, 高い食品機能性を有する品種の育成が可能であると示唆された.

第3章 ダイコンにおけるアントシアニン生合成関連遺伝子の解析と 着色形質に関する DNA マーカーの開発

前章では紫系および赤系「出雲おろち大根」の育成を進めてきた。根部着色形質は‘スサノオ’に導入することができたが、紫系統および赤系統の M₁₀ では約 2 割程度の未着色個体が含まれていた。根部着色形質の固定化のためにはダイコンにおける根部着色制御機構を解明する必要がある。本章ではダイコン園芸品種を用いてアントシアニン生合成に関連する遺伝子の解析を行い、ダイコンにおけるアントシアニン着色とその生合成関連遺伝子の関係について考察した。さらに、ダイコンゲノム DNA の構造変異に基づいた根部着色形質に関する選抜マーカーの開発を試みた。

第1節 ダイコンにおけるアントシアニン着色とその生合成関連 遺伝子について

ダイコンの主要色素は紫系品種ではアシル化されたシアニジン 3-ソホロシド-5-グルコシド、赤系品種ではアシル化されたペラルゴニジン 3-ソホロシド-5-グルコシドであることが報告されている(加藤ら, 2013)。本節では、紫系、赤系および白系園芸品種を用いてアントシアニン含量とアントシアニジンを同定した後、アントシアニン生合成関連遺伝子の単離・発現解析およびゲノム DNA の構造解析を行い、ダイコンにおけるアントシアニン着色とその生合成関連遺伝子の関係性について考察した。

材料および方法

1. 植物材料

紫系品種の‘からいね赤’((株) 渡辺採種場), 赤系品種の‘長安青丸紅心’ (タキイ種苗 (株)) および ‘紅くるり 521’ (松永種苗 (株)) ならびに白系品種の ‘スサノオ’ (島根大学) と ‘耐病総太り’ (タキイ種苗 (株)) の 5 品種を供試した (Fig. 3-1-1). いずれの品種も 2012~2015 年の 9 月上旬に島根大学の川津圃場にて播種し, 一般的なダイコンの慣行法に従って栽培した. 12 月に収穫後, 組織および器官別 (根部表皮組織, 木部柔組織および葉) にサンプリングした. 遺伝子解析のために各組織および器官は液体窒素で凍結させた後, -80°C で保存した.

2. アントシアニン含量の分析

赤系品種 ‘紅くるり 521’ および白系品種 ‘スサノオ’ および ‘耐病総太り’ の根部表皮および木部柔組織におけるアントシアニン含量を分析した. アントシアニン含量の分析は第 2 章第 2 節と同様の方法で行った. 紫系品種 ‘からいね赤’ および赤系品種 ‘長安青丸紅心’ のアントシアニン含量は第 2 章第 2 節で得られたデータを用いた.

3. アントシアニジン分析

アントシアニジン抽出は Mizuta et al. (2009) の方法に準じて行った. すなわち, 生の根部表皮および木部柔組織 (ca 0.5g) を一晩 4°C で 10mL の 50% 酢酸水溶液に浸漬し, 粗抽出液を得た. 濾過 (No.1, 東洋濾紙 (株)) 後, 減圧濃縮したのちに 2N 塩酸を加え, 100°C で 60 分加水分解した. 得られた加水分解産物を濾過 (No.2, 東洋濾紙 (株)) し, Sep-pak C18 カートリッジ

(Waters) に通して吸着させた。その後、カートリッジを 1% 酢酸水溶液で洗浄したのち、少量の 50% 酢酸水溶液でアントシアニジン を溶出した。溶出液の一部を Millipore フィルター (DISMIC-25_{HP}, 東洋濾紙 (株)) で濾過し、HPLC 分析試料とした。色素同定の標品として市販のシアニジンとペラルゴニジン(Extrasynthese, Genay, France)を使用した。

アントシアニジン分析は脱ガス装置を取り付けた GL サイエンス HPLC システム (GL-7410, GL-7420, GL-7432, GL-7452A, GL-7480 ; GL sciences Inc.) を用いて行った。分析条件は、カラム : Inertsil ODS-4 column (4.6 × 150 mm, GL sciences Inc.), カラム温度 : 40°C, 検出波長 : 520 nm, とした。溶液システムは 55% の溶媒 A (1.5% リン酸), 45% の溶媒 B (1.5% リン酸, 20% 酢酸, 25% アセトニトリル水溶液), 流速 1.0 mL・分⁻¹ で 25 分間維持した。

なお、本分析は筑波大学生命環境系の水田大輝博士に依頼して行った。

3. 全 RNA およびゲノム DNA の抽出と cDNA 合成

各品種の根部表皮および木部柔組織から Hot Borate 法 (Wan and Wilkins, 1994) により Total RNA を抽出した。抽出した RNA から DNase I (TaKaRa) によりゲノム DNA を除去した後, Total RNA 1μg と ReverTra-Ace (Toyobo) を用いて逆転写により cDNA を合成した。さらに、各品種の葉から改変型 CTAB 法 (Kobayashi et al., 1998) によりゲノム DNA を抽出した。

4. アントシアニン生合成関連遺伝子の単離

CHS, *F3H*, *DFR* および *ANS* 遺伝子の部分配列単離

アントシアニン生合成経路遺伝子 *CHS* (AF031922), *F3H* (AB087211), *DFR* (KF280272) および *ANS* (KR262954) を単離するために紫系品種 ‘からいね赤’ の根部表皮組織由来の cDNA と 3'-Full RACE Core Set (TaKaRa)

を用いて RACE PCR を行った。

増幅した PCR 産物は pGEM®-T Easy Vector (Promega) と HST08 Premium Competent Cell (TaKaRa) 用いてクローニングを行った。塩基配列は FastGene Plasmid Mini kit (Nippon Genetics Co.) を用いて抽出したプラスミド DNA 200ng と BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて決定した後、Genetyx ver.11 (Software Development Co., Tokyo, Japan) の Blastx 機能を用いて相同性を比較した。

F3'H 遺伝子の全長鎖単離

アブラナ属の NCBI 情報 (*Brassica napus F3'H*, DQ324379) を基に *F3'H* 遺伝子のプライマーを設計した (Table 3-1-1) 後, ‘からいね赤’ の根部表皮組織由来 cDNA から遺伝子を PCR 増幅した。PCR 溶液は 2.5 ng の cDNA, 0.25units の Ex Taq (TaKaRa), 1×PCR buffer (TaKaRa), 200μM の各 dNTP および 0.2μM のプライマーとし, 液全量を 10μL とした。PCR 反応条件は 94°C で 2 分間に続き, 94°C30 秒, 57°C30 秒, 72°C1 分 30 秒を 35 サイクル反復後, 72°C で 1 分 30 秒間反応を行った。得られた PCR 増幅産物のシーケンスは上記に示した方法で行った。

単離された遺伝子におけるリバースプライマー領域の塩基配列を確認するために ‘からいね赤’ の根部表皮組織由来 cDNA と 3'-Full RACE Core Set (TaKaRa) を用いて 3'-UTR を単離した。フォワードプライマー領域の確認のために, ‘からいね赤’ のゲノム DNA を用いてインバース PCR (Ochman et al., 1988) により 5'-UTR を単離した。インバース PCR は以下の通りを行った ; Total DNA 500 ng に *EcoRI* を用いて 37°C 12 時間制限酵素処理を行った。T4 Ligase を用いてセルフライゲーションを行ったのち, ネステッド PCR により未知領域を増幅させた。PCR 溶液は 2.5 ng の DNA, 0.25units の Ex Taq

(TaKaRa), 1×PCR buffer (TaKaRa), 200μM の各 dNTP および 0.2μM のプライマーとし, 液全量を 10μL とした. PCR 反応条件は 94°C で 2 分間に続き, 94°C 30 秒, 55°C (1st PCR) / 51°C (2nd PCR) 30 秒, 72°C 3 分を 35 サイクル反復後, 72°C で 5 分間反応を行った. 得られた PCR 増幅産物のシーケンスは上記に示した方法で行った.

完全な *F3'H* および *MYB* 配列を単離するために, ‘からいね赤’ の根部表皮組織由来 cDNA と特異的なプライマーセットを用いて PCR 増幅した. 増幅した増幅産物は上記に示した方法で配列決定した.

‘からいね赤’ のゲノム DNA から 5' 上流と 3' UTR 間の PCR 増幅により *F3'H* 遺伝子の全長鎖を単離した. PCR 溶液は 20ng のゲノム DNA, 0.5units の PrimeSTAR GXL polymerase (TaKaRa), 1×PCR buffer (TaKaRa), 200μM の各 dNTP および 0.2μM のプライマーとし, 液全量を 20μL とした. PCR 反応条件は 98°C で 5 分間に続き, 98°C 10 秒, 57°C 5 秒, 68°C 3 分を 35 サイクル反復後, 72°C で 10 分間反応を行った. TA クローニングを行うために Ex-Taq 0.25U を添加し, 72°C 30 分のインキュベーションにより増幅断片に A を付加した. 目的の断片は pGEM-T easy vector (Promega) と *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (TaKaRa Bio) でクローニングした. プラスミド抽出およびシーケンスは上記に示した通り行った.

MYB 遺伝子の全長鎖単離

アブラナ属の NCBI 情報 (*Brassica oleracea MYB2*, GU219987) を基に *MYB* 遺伝子のプライマーを設計した (Table 3-1-1) 後, ‘からいね赤’ の根部表皮組織由来 cDNA から遺伝子を PCR 増幅した. PCR 溶液は 2.5 ng の cDNA, 0.25units の Ex Taq (TaKaRa), 1×PCR buffer (TaKaRa), 200μM の各 dNTP および 0.2μM のプライマーとし, 液全量を 10μL とした. PCR 反

応条件は 94°Cで 2 分間に続き, 94°C30 秒, 60°C30 秒, 72°C1 分を 35 サイクル反復後, 72°Cで 1 分 30 秒間反応を行った. 得られた PCR 増幅産物のシーケンスは上記に示した方法で行った. 単離された遺伝子におけるリバープライマー領域の塩基配列を確認するために ‘からいね赤’ の根部表皮組織由来 cDNA と 3'-Full RACE Core Set (TaKaRa) を用いて 3'-UTR を単離した. フォワードプライマー領域の確認のために, ‘からいね赤’ のゲノム DNA を用いてインバース PCR (Ochman et al., 1988) により 5'-UTR を単離した. インバース PCR は次の通りに行った; Total DNA 500 ng に PstI を用いて 37°C 12 時間制限酵素処理を行った. T4 Ligase を用いてセルフライゲーションを行ったのち, ネステッド PCR により未知領域を増幅させた. PCR 溶液は 2.5 ng の DNA, 0.25units の Ex Taq (TaKaRa), 1×PCR buffer (TaKaRa), 200μM の各 dNTP および 0.2μM のプライマーとし, 液全量を 10μL とした. PCR 反応条件は 94°Cで 2 分間に続き, 94°C30 秒, 60°C (1st PCR) /60°C (2nd PCR) 30 秒, 72°C3 分を 35 サイクル反復後, 72°Cで 5 分間反応を行った. 得られた PCR 増幅産物のシーケンスは上記に示した方法で行った.

完全な *MYB* 配列を単離するために, ‘からいね赤’ の根部表皮組織由来 cDNA と特異的なプライマーセットを用いて PCR 増幅した. 増幅した増幅産物は上記に示した方法で配列決定した.

5. アントシアニン着色関連遺伝子の発現解析

紫系, 赤系および白系品種の根部表皮および木部柔組織におけるアントシアニン生合成遺伝子の発現解析のために半定量 RT-PCR およびリアルタイム PCR を用いた定量 RT-PCR を行なった. 単離した各遺伝子情報を基に発現解析のためのプライマーを設計した (Table3-1-1).

半定量 RT-PCR 分析の反応溶液は 1μL の cDNA, 0.5units の Ex Taq (TaKaRa),

1×PCR buffer (TaKaRa), 200μM の各 dNTP および 0.2μM の各プライマーとし, 液全量を 20μL とした. なお, ハウスキーピング遺伝子の *ACTIN* (FY430005) を内部標準として用いた. PCR 反応条件は 94°Cで 2 分間に続き, 94°C30 秒, 58°C (*F3'H*) /60°C (*CHS, F3H, DFR* および *ANS*) /61°C (*ACTIN*) 30 秒, 72°C30 秒を 35 サイクル反復後, 72°Cで 5 分間反応を行った. PCR 産物は 0.5×TBE の 1%アガロースゲルで分離し, エチジウムブロマイドで染色した.

紫系, 赤系および白系品種における *F3'H* および *MYB* 遺伝子の詳細な発現解析を行うために, リアルタイム PCR を行った. ハウスキーピング遺伝子はリボソーム RNA 26S (Park et al., 2011) を内部標準として用いた. 反応溶液は 1μL の cDNA, 10 μL の SYBR Premix Ex-Taq II (TaKaRa) と 0.25 μM の各プライマーとし, 液全量を 20μL とした. PCR 反応は Thermal Cycler Dice Real-Time System (TaKaRa) を用いて, 95°C 30 秒に続き, 95°C5 秒, 58°C (*F3'H*) /62°C (*MYB*) /56°C (*26S*) 10 秒, 72°C20 秒を 50 サイクル反復した. なお, 各サンプルにつきリアルタイム PCR を 3 反復行った.

リファレンス遺伝子に対するターゲット遺伝子の相対的発現量は $\{ \Delta Ct (\text{ターゲット遺伝子}) - \Delta Ct (\text{リファレンス遺伝子}) \} ^{1/2}$ の計算で求めた. この値を元に品種間の *F3'H* および *MYB* 遺伝子の発現量を相対比較するため, 全個体中の最大値を 1 として標準化した. そして, 標準誤差 (SE) は相対的発現量値から計算した (Cheon et al., 2011).

5. ダイコン *F3'H* ホモログのゲノム DNA 構造解析

ゲノム DNA の構造解析のために *F3'H* 遺伝子に特異的な 2 つプライマーセットを用いて各品種の PCR 増幅とシーケンスによる構造解析を行った. PCR 溶液は 20 ng のゲノム DNA, 0.5units の Ex Taq (TaKaRa), 1×PCR buffer

(TaKaRa), 200 μ M の各 dNTP および 0.2 μ M のプライマーとし, 液全量を 20 μ L とした. PCR 反応条件は 94 $^{\circ}$ C で 2 分間に続き, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 57 $^{\circ}$ C (P1-P2) /57 $^{\circ}$ C (P3-P4) 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 5 分を 35 サイクル反復後, 72 $^{\circ}$ C で 5 分間反応を行った. 得られた PCR 産物は 0.5 \times TBE バッファの 1%アガロースゲルで電気泳動確認した. P1 および P2 プライマーで増幅した断片は TOPO-XL PCR cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (TaKaRa) を用いてクローニングし, そして上記に示した方法でシーケンスを行った. ‘長安青丸紅心’ と ‘紅くるり 521’ から得られた塩基配列は Genetyx ver.11 を用いて紫系品種の ‘からいね赤’ と比較した.



Fig. 3-1-1. Photographs of the five radish varieties used in this study: (A) 'Karaine aka', (B) 'Chouan aomaru koshin', (C) 'Benikururi 521', (D) 'Susanoo', and (E) 'Taibyو sobutori'. Bars indicate 10 cm.

Table 3-1-1. Primer used for isolation of *F3'H* gene, expression analysis of radish anthocyanin biosynthesis genes and DNA analysis.

		Sequence(5'-3')
Isolation for <i>RsF3'H</i> and <i>RsMYB</i>		
<i>RsF3'H</i>	Forward	ATGACTAATCTTTACCTCACAATCC
	Reverse	TTAAGCCGACCCGAGTCCGTAAGCACTC
<i>RsMYB</i>	Forward	ATGGAGGRTWYGTCCAAASGGT
	Reverse	TCAAGTTYMGYYTCTCCAT
Inverse PCR to confirm the 5' upstream region		
<i>RsF3'H</i> First PCR	Forward	TTCTAACGCTATAGCTCACC
	Reverse	CTGTCGAACATGTTTAAAATCTTC
<i>RsF3'H</i> Second PCR	Forward	GTATATTGAGTTATTCGAATTA
	Reverse	ATCGTGAACCTTCAAGAACT
<i>RsMYB</i> First PCR	Forward	GAGGCAATGCATTGATAAGTATGG
	Reverse	TATCTTCTTCAGCAGTCCATGCAC
<i>RsMYB</i> Second PCR	Forward	AATCGGTGCAGGAAGAGTTGTAGA
	Reverse	AGTCCATGCACCTTTTCTCAACC
Isolation for complete <i>RsF3'H</i> and <i>RsMYB</i>		
<i>RsF3'H</i>	Forward	ATGACTAATCTCTTCCTCACAATCC
	Reverse	GTTTAAACAGACCCAAGCCC
<i>RsMYB</i>	Forward	TATCGTTGGTCCATGGAGG
	Reverse	CACTAGTTCACACGCAAGCA
Isolation of <i>F3'H</i> gene from gDNA		
	Forward	CTAACCGAGATATGCATGGT
	Reverse	ATTACACAAACATCACAAGGC
Gene expression		
<i>CHS</i>	Forward	TCCAAGCGGAGTATCCTGACTAC
	Reverse	GCACATGTTAGGGTTCTCTTTCAA
<i>F3H</i>	Forward	TGATCTAACCCCTCGGACTCA
	Reverse	TCTGGAACGTGGCTATTGAT
<i>F3'H</i>	Forward	GCCGAACAGTTCTTGAAAGT
	Reverse	CTGTCGAACATGTTTAAAATCTTC
<i>DFR</i>	Forward	ACCGGATGGATGTATTTTCATGTC
	Reverse	ATGATGGAGTAATGTGCCTCGTT
<i>ANS</i>	Forward	GAGCCTGACCGTCTAGAGAAAGA
	Reverse	CAAACCAGGAACCATGTTGTGTA
<i>MYB</i>	Forward	AGAAAAGAGAAACATTCCTTGCTCTC
	Reverse	GTAGCAATACTTTCACAAACATTTTGG
<i>ACTIN</i>	Forward	CGATGGTGAGGACATTCAAC
	Reverse	TCACCAGAGTCGAGCACAATA
26S ribosomal RNA	Forward	AACACCCTTTGTGGGTTCTAGGT
	Reverse	GCCCTCGACCTATTCTCAAACCT
DNA analysis		
P1	Forward	CTAACCGAGATATGCATGGT
P2	Reverse	CTGTCGAACATGTTTAAAATCTTC
P3	Forward	GAAGAGGTTGGAACACTCATG
P4	Reverse	GGGCTTGGGTCTGTTAAAC

結果

アントシアニン含量

紫系品種と赤系品種の根部表皮および木部柔組織でのアントシアニンの蓄積が確認された。アントシアニン含量は‘からいね赤’の根部表皮組織では $3.1 \pm 0.17A_{520-0.25A_{657}}/gFW$, 根部木部柔組織では $0.4 \pm 0.09A_{520-0.25A_{657}}/gFW$, ‘長安青丸紅心’の根部表皮組織では $1.0 \pm 0.39A_{520-0.25A_{657}}/gFW$, 根部木部柔組織では $6.3 \pm 0.05A_{520-0.25A_{657}}/gFW$, ‘紅くるり 521’の根部表皮組織では $6.6 \pm 0.04A_{520-0.25A_{657}}/gFW$, 根部木部柔組織では $5.3 \pm 1.08A_{520-0.25A_{657}}/gFW$ であった。しかし、白系品種では根部表皮および木部柔組織ともにアントシアニンの蓄積は確認されなかった (Fig. 3-1-2)。

アントシアニン分析

シアニジン‘からいね赤’の根部表皮および木部柔組織から検出された。ペラルゴニジンは‘長安青丸紅心’と‘紅くるり 521’の根部表皮および木部柔組織から検出された。一方、これら2種類のアントシアニジンは白系品種‘スサノオ’と‘耐病総太り’では検出されなかった (Table 3-1-2)。

RsF3'H 遺伝子の単離

‘からいね赤’の根部表皮組織から *RsF3'H-a* (1536 bp, DDBJ accession number LC202035) と *RsF3'H-b* (1536 bp, DDBJ accession number LC202037) を単離した (Fig. 3-1-3A)。2つの遺伝子は1塩基のみ異なり、*RsF3'H-a* ではグアニン、*RsF3'H-b* ではシトシンであった。これら2つの遺伝子のアミノ酸配列は *Brassica rapa* F3'H (ABY89687) と 97%、*Arabidopsis* F3'H

(AAF73253)と 90%の相同性を示した (Fig. 3-1-3B).

‘からいね赤’のゲノム DNA から単離した 2 種類の遺伝子 *RsF3'H-a* および *RsF3'H-b* の全長鎖はそれぞれ 3039bp および 3017bp であった (DDBJ accession numbers LC202034 および LC202036). これら 2 つの遺伝子は 3 つのイントロンを有しており, 第 1 イントロンの塩基数が異なっていた (Fig. 3-1-7A).

RsMYB 遺伝子の単離

‘からいね赤’の根部表皮組織から 750bp の塩基をコードする *RsMYB* を単離した (Fig. 3-1-4A). *RsMYB* 遺伝子のアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* PAP2 (OAP17920)と 92%, *Brassica oleracea* MYB2 (ADP76650) と 89%, *Malus domestica* MYB10 (ABB84753)と 83%の相同性を示した (Fig. 3-1-4B).

アントシアニン生合成関連遺伝子の発現解析

半定量 RT-PCR による発現解析の結果, *RsCHS*, *RsF3H*, *RsDFR* および *RsANS* は ‘からいね赤’ の根部表皮組織, ‘長安青丸紅心’ の根部木部柔組織, ‘紅くるり 521’ の両組織において発現が確認された. しかしながら, 白系品種では *RsDFR* および *RsANS* の発現は確認されなかった. *RsF3'H* は主に ‘からいね赤’ の根部表皮組織で発現していたのに対し, *RsF3'H* の発現は赤系品種では確認されず, 白系品種では低かった (Fig.3-1-5). ダイコン品種のリアルタイム定量 PCR 分析において, *RsF3'H* 遺伝子は赤系および白系品種に比べ紫系品種 ‘からいね赤’ で高い発現が確認された (Fig.3-1-6A). さらに, *RsMYB* は白系品種に比べ紫系および赤系品種で高い遺伝子発現レベルを示した (Fig.3-1-6B).

RsF3'H 遺伝子のゲノム DNA 構造解析

RsF3'H 遺伝子の PCR 増幅の結果, P3-P4 領域は全品種で約 1kbp の増幅バンドが確認された. 一方, P1-P2 領域は紫系および白系品種では約 500bp の増幅バンドのみ確認されたのに対し, 赤系品種の‘長安青丸紅心’では約 500bp と約 5kbp, ‘紅くるり 521’では約 800bp と約 5kbp の増幅バンドが確認された (Fig. 3-1-7B). 赤系品種における P1-P2 領域のシーケンスの結果, ‘長安青丸紅心’では Poly (T) が挿入された配列 (IV) と *Gypsy/Ty-3* タイプのレトロトランスポゾンが挿入された配列 (II) が確認され, ‘紅くるり 521’では上記と同じレトロトランスポゾンが挿入された配列 (II) とレトロトランスポゾンが抜けて片側の LTR 領域が残った配列 (III) が確認された (Fig. 3-1-7C).

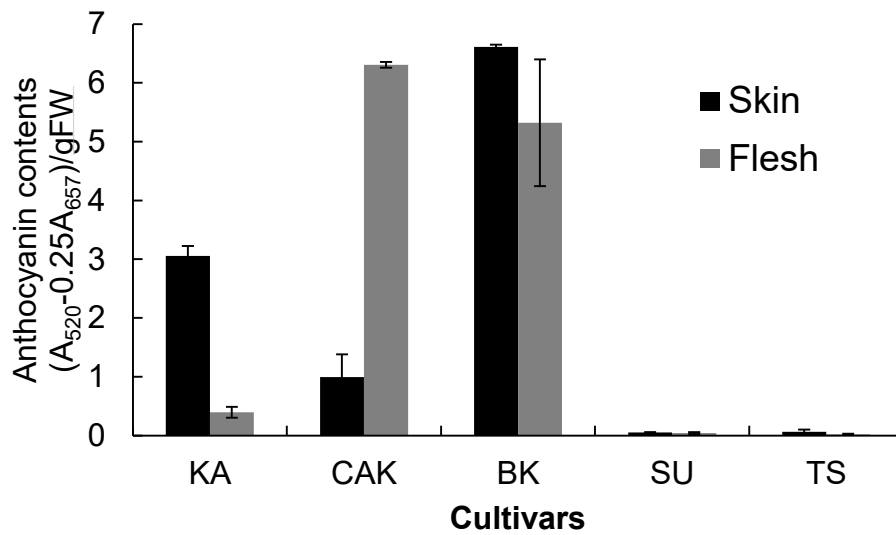


Fig. 3-1-2. Anthocyanin contents in the skin and flesh of ‘Karaine aka’ (KA), ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK), ‘Benikururi 521’ (BK), ‘Susano’ (SU), and ‘Taibyō soubutori’ (TS). Bars indicate standard errors.

Table 3-1-2. Anthocyanidin in the skin and flesh of purple, red, and white radishes.

Anthocyanidins	Purple ^z		Red ^z				White ^z			
	'Karaine aka'		'Chouan aomaru koshin'		'Benikururi 521'		'Susanoo'		'Taiby sobutori'	
	Skin	Flesh	Skin	Flesh	Skin	Flesh	Skin	Flesh	Skin	Flesh
Cyanidin	+ ^y	+	- ^x	-	-	-	-	-	-	-
Pelargonidin	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

^zRoot color.

^ydetected.

^xnot detected.

A

M

```

F3'H-a 1 ATGACTAATCTCTCTCCACAATCTCTCCCTACTTTCATCTCTCTTATGTCGCGTCTTATCTGCCGCCGCAACAACCGTCTCCCTCCCGGTCCAAACCCATGGCCATCATCGGG 120
F3'H-b 1 ATGACTAATCTCTCTCCACAATCTCTCCCTACTTTCATCTCTCTTATGTCGCGTCTTATCTGCCGCCGCAACAACCGTCTCCCTCCCGGTCCAAACCCATGGCCATCATCGGG 120

F3'H-a 121 AACCTCCCTCACATGGGCCCTAAACCCCATCAAACTAGCCGCATGGTAACACATACGGCCCTATCCCTCACCTACGGGTAGGGTTCGCCGACGTTGTGGTTGGCCGCTCAAATCC 240
F3'H-b 121 AACCTCCCTCACATGGGCCCTAAACCCCATCAAACTAGCCGCATGGTAACACATACGGCCCTATCCCTCACCTACGGGTAGGGTTCGCCGACGTTGTGGTTGGCCGCTCAAATCC 240

F3'H-a 241 GTGGCGAACAGTCTTGAAGTTCACGATGCCAATTTGTAGCCGACCACTAACTCCGAGCAACACATGGCATACAATATCAAGATCTTGTCTTTGGCCCTATTGACACAAGA 360
F3'H-b 241 GTGGCGAACAGTCTTGAAGTTCACGATGCCAATTTGTAGCCGACCACTAACTCCGAGCAACACATGGCATACAATATCAAGATCTTGTCTTTGGCCCTATTGACACAAGA 360

F3'H-a 361 TGGAGAATGTTGAGGAGAGATTAGTCTGTTCAATTTTTCAGCTAAAGCTCTGGAAGATTTTAAAGATGTTGACAGCAAGAGAGTTGGAACACTCTATCCGGCACTAGCCGCTGCAAC 480
F3'H-b 361 TGGAGAATGTTGAGGAGAGATTAGTCTGTTCAATTTTTCAGCTAAAGCTCTGGAAGATTTTAAACATGTTGACAGCAAGAGAGTTGGAACACTCTATCCGGCACTAGCCGCTGCAAC 480

F3'H-a 481 ACGAACCAGTGAACCTAGCCGCTGTTGATGACATGCGGTACTCAACGCCCTTGGACGAGAGATGATCGGACGGCGGTGTTCGGCCGCGGAGCCGATCACAAGCGGAGGATTTTGA 600
F3'H-b 481 ACGAACCAGTGAACCTAGCCGCTGTTGATGACATGCGGTACTCAACGCCCTTGGACGAGAGATGATCGGACGGCGGTGTTCGGCCGCGGAGCCGATCACAAGCGGAGGATTTTGA 600

F3'H-a 601 TCAATGGTACAGAAATGATGGCTCTGCCCGAGTGTCAACATCGGAGATTTCTGCCCGCACTTGATGTTTAGACTTACAAGCGCTCGTGGTAAAATGAACGCTCCACAAGAGG 720
F3'H-b 601 TCAATGGTACAGAAATGATGGCTCTGCCCGAGTGTCAACATCGGAGATTTCTGCCCGCACTTGATGTTTAGACTTACAAGCGCTCGTGGTAAAATGAACGCTCCACAAGAGG 720

F3'H-a 721 TTCGACGCTTTTCTATCGTCAATTTTGAAGAGCAGAGATGATGAAGAAGCGTCAAGTCAAAAGCACACGGACATGCTTAGCACTTAAATCTCGTAAAGGGGACTGATTTGACGGT 840
F3'H-b 721 TTCGACGCTTTTCTATCGTCAATTTTGAAGAGCAGAGATGATGAAGAAGCGTCAAGTCAAAAGCACACGGACATGCTTAGCACTTAAATCTCGTAAAGGGGACTGATTTGACGGT 840

F3'H-a 841 GACGCTGGAACACTAAGGATGATGAGATCAAGCCCTGCTATTGAACATGTTTACTGCTGGAACACTGACACGTCAGCAAGTACGGTGGACTGGCCATAGCTGAATGATCGCTCACCCG 960
F3'H-b 841 GACGCTGGAACACTAAGGATGATGAGATCAAGCCCTGCTATTGAACATGTTTACTGCTGGAACACTGACACGTCAGCAAGTACGGTGGACTGGCCATAGCTGAATGATCGCTCACCCG 960

F3'H-a 961 GAGATAATGACAAAAGCCCAAGAGCTTGATTCGCTCGTCCGACGTTGGAAGGCCATTAACGAGTCAAGCTCTCTCAGCTTCCCTTACCTTACGGCGGTTATCAAGAGAAATTCAGA 1080
F3'H-b 961 GAGATAATGACAAAAGCCCAAGAGCTTGATTCGCTCGTCCGACGTTGGAAGGCCATTAACGAGTCAAGCTCTCTCAGCTTCCCTTACCTTACGGCGGTTATCAAGAGAAATTCAGA 1080

F3'H-a 1081 CTCATCCACCAACAGCACTCTCTTACACACATCGCATCAGAGAGCTGTGAGATCAAGCGCTATCATATCCGAAAGGATCAACCCCTTTGACAAACATATGGGCCATAGCCCTGAC 1200
F3'H-b 1081 CTCATCCACCAACAGCACTCTCTTACACACATCGCATCAGAGAGCTGTGAGATCAAGCGCTATCATATCCGAAAGGATCAACCCCTTTGACAAACATATGGGCCATAGCCCTGAC 1200

F3'H-a 1201 CCGGCAATGGACGACCGCTTATGTTTTCAGCCGAGAGATTTACCCGCTGGTGAAGAACGCCGCTGATGTGAAAGAAACGACTTCGAGCTTATACCCGTTGCGGACGAGG 1320
F3'H-b 1201 CCGGCAATGGACGACCGCTTATGTTTTCAGCCGAGAGATTTACCCGCTGGTGAAGAACGCCGCTGATGTGAAAGAAACGACTTCGAGCTTATACCCGTTGCGGACGAGG 1320

F3'H-a 1321 AAGATCGGCCCGGCTGATTTAGGTTACGGACGATTCACTACTGACGGCAGCCTTGTGACGGATTTGAATGGAACTGGCCGAGGAATACCGCGGAGAAGTGAACATGGAG 1440
F3'H-b 1321 AAGATCGGCCCGGCTGATTTAGGTTACGGACGATTCACTACTGACGGCAGCCTTGTGACGGATTTGAATGGAACTGGCCGAGGAATACCGCGGAGAAGTGAACATGGAG 1440

F3'H-a 1441 GAGACTTATGGGATCACTCTGCAAGAGCGGTTCTTGGTTGTTTCATCTAAGCCAGGTTGGATATGAGTGTCTACGGGCTTGGGCTGTTTAA 1536
F3'H-b 1441 GAGACTTATGGGATCACTCTGCAAGAGCGGTTCTTGGTTGTTTCATCTAAGCCAGGTTGGATATGAGTGTCTACGGGCTTGGGCTGTTTAA 1536
    
```

B

```

AtF3'H 1 MATLELTILLAVLEFLILRIFSRRRNRNRI PPGNPNWP IIGNLPHMCKPHRTLSAMVITYGPI LHLRLGFV VVVAAS KSVAEQFL 90
BrF3'H 1 MTNLVLTILLTFLFLVVLVLSRRN ---NRI PPGNPNWP IIGNLPHMCKPHRTLSAMVITYGPI LHLRLGFV VVVAAS KSVAEQFL 86
RsF3'H-a 1 MTNLVLTILLTFLFLVVLVLSRRN ---NRI PPGNPNWP IIGNLPHMCKPHRTLSAMVITYGPI LHLRLGFV VVVAAS KSVAEQFL 86
RsF3'H-b 1 MTNLVLTILLTFLFLVVLVLSRRN ---NRI PPGNPNWP IIGNLPHMCKPHRTLSAMVITYGPI LHLRLGFV VVVAAS KSVAEQFL 86

AtF3'H 91 KIHDFANFASRP PNSGAKHMAYN YODLVFAPYGRWRRLRKISSVHL FSAKALED FKHVROEEVGTLMRELVRVGT KPVNLSGOLVNM CVVN 180
BrF3'H 87 KVHDFANFASRP PNSGAKHMAYN YODLVFAPYGRWRRLRKISSVHL FSAKALED FKHVROEEVGTLMRELVRVGT KPVNLSGOLVNM CVVN 176
RsF3'H-a 87 KVHDFANFASRP PNSGAKHMAYN YODLVFAPYGRWRRLRKISSVHL FSAKALED FKHVROEEVGTLMRELVRVGT KPVNLSGOLVNM CVVN 176
RsF3'H-b 87 KVHDFANFASRP PNSGAKHMAYN YODLVFAPYGRWRRLRKISSVHL FSAKALED FKHVROEEVGTLMRELVRVGT KPVNLSGOLVNM CVVN 176

AtF3'H 181 ALGREMIGRRLFGADADHKADEF RSMVTMMALAGVFNIGDFVPLDLDLQGVAGKMKRLHHRFDAFLS SILEHEHE --MNGDQDKHTDM 268
BrF3'H 177 ALGREMIGRRLFGADADHKADEF RSMVTMMALAGVFNIGDFVPLDLDLQGVAGKMKRLHHRFDAFLS SILEHEHE --MNGDQDKHTDM 266
RsF3'H-a 177 ALGREMIGRRLFGADADHKADEF RSMVTMMALAGVFNIGDFVPLDLDLQGVAGKMKRLHHRFDAFLS SILEHEHE --MNGDQDKHTDM 266
RsF3'H-b 177 ALGREMIGRRLFGADADHKADEF RSMVTMMALAGVFNIGDFVPLDLDLQGVAGKMKRLHHRFDAFLS SILEHEHE --MNGDQDKHTDM 266

AtF3'H 269 LSTLISLKGTD DDEGGSLTDTEIKALLNMF IAGTDTASTVDWAI AELIRHEIMTKAQCELD SVVGRERFINESDLSQLPYLOAVIK 358
BrF3'H 267 LSTLISLKGTD DDEGGSLTDTEIKALLNMF IAGTDTASTVDWAI AELIRHEIMTKAQCELD SVVGRERFINESDLSQLPYLOAVIK 356
RsF3'H-a 267 LSTLISLKGTD DDEGGSLTDTEIKALLNMF IAGTDTASTVDWAI AELIRHEIMTKAQCELD SVVGRERFINESDLSQLPYLOAVIK 356
RsF3'H-b 267 LSTLISLKGTD DDEGGSLTDTEIKALLNMF IAGTDTASTVDWAI AELIRHEIMTKAQCELD SVVGRERFINESDLSQLPYLOAVIK 356

AtF3'H 359 VVVAAS HPP PPLSLPHIASE SCEINGVHIPKGSTLLTNIWAIA RPDQNTDPLERPERFLP GGEKSGVDVKGDFELIIFGAGRRICAG 448
BrF3'H 357 VVVAAS HPP PPLSLPHIASE SCEINGVHIPKGSTLLTNIWAIA RPDQNTDPLERPERFLP GGEKSGVDVKGDFELIIFGAGRRICAG 446
RsF3'H-a 357 VVVAAS HPP PPLSLPHIASE SCEINGVHIPKGSTLLTNIWAIA RPDQNTDPLERPERFLP GGEKSGVDVKGDFELIIFGAGRRICAG 446
RsF3'H-b 357 VVVAAS HPP PPLSLPHIASE SCEINGVHIPKGSTLLTNIWAIA RPDQNTDPLERPERFLP GGEKSGVDVKGDFELIIFGAGRRICAG 446

AtF3'H 449 SLGLRTIQQLTATLVHGFENELAGGV TPEKLNMEESYGLTLQRAVPLVVHPKRLDMSAYGLGSA 513
BrF3'H 447 SLGLRTIQQLTATLVHGFENELAGGV TPEKLNMEESYGLTLQRAVPLVVHPKRLDMSAYGLGSA 511
RsF3'H-a 447 SLGLRTIQQLTATLVHGFENELAGGV TPEKLNMEESYGLTLQRAVPLVVHPKRLDMSAYGLGSA 511
RsF3'H-b 447 SLGLRTIQQLTATLVHGFENELAGGV TPEKLNMEESYGLTLQRAVPLVVHPKRLDMSAYGLGSA 511
    
```

Fig. 3-1-3. Isolation of *RsF3'H* genes from ‘Karaine aka’. A: Comparison of *RsF3'H-a* and *RsF3'H-b* mRNA sequences from the start codon to stop codon. The symbol M and asterisk indicate the start and stop codon, respectively. A black box indicates different sequences in *RsF3'H-a* and *RsF3'H-b* sequences, respectively. Close triangles indicate insertion of retrotransposon and its long terminal region, and open triangles indicate insertion of a poly (T)₂₂ sequence. Horizontal and vertical arrows indicate the primer region for expression analysis and intron regions, respectively. B: Multiple sequence alignment of *Arabidopsis* F3'H (NP_196416), *Brassica rapa* F3'H (ABY89687) and the deduced amino acid sequences for *RsF3'H-a* and *-b*. Black line boxes are P450 motif PPGNPNWP, AGTDTS, FGAGRRICAG, and E-R-R triad residues, and black dashed-line boxes are the F3'H-specific motifs VVVAAS, GGEK, and VDVKG, respectively.

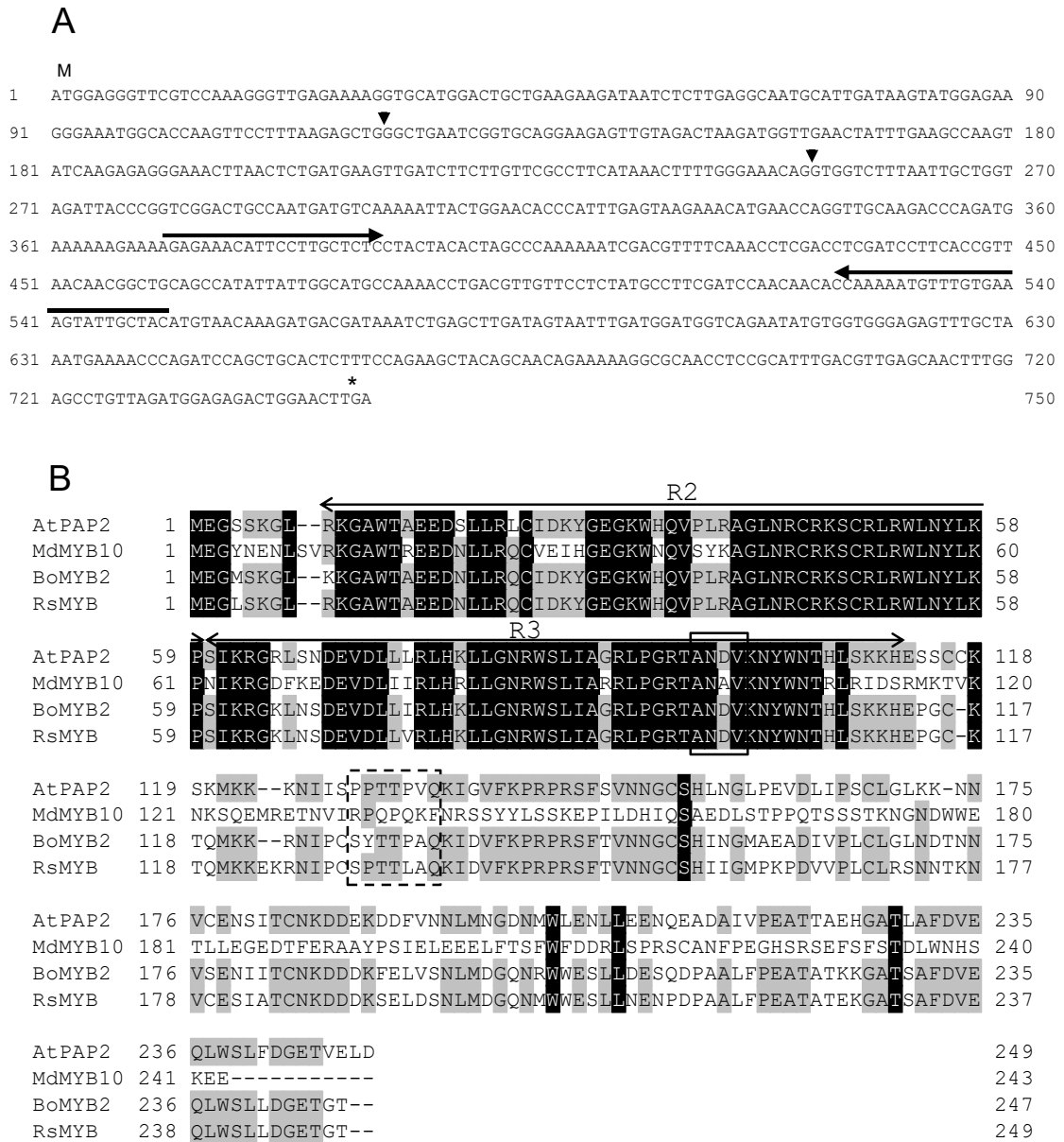


Fig. 3-1-4. Isolation of *RsMYB* genes from ‘Karaine aka’. A: mRNA sequences from the start codon to stop codon. The symbol M and asterisk indicate the amino acid and stop codon, respectively. B: Multiple sequence alignment of *Arabidopsis* PAP2 (OAP17920), *Malus domestica* MYB10 (ABB84753), *Brassica oleracea* MYB2 (ADP76650) and the deduced amino acid sequences for *RsMYB*. Horizontal arrows indicate specific residues that contribute to a motif implicated in bHLH co-factor interaction in *Arabidopsis*. Black line boxes are motif ANVD in the R2R3 domain for dicot anthocyanin-promoting MYBs, and black dashed-line boxes are the C-terminal-conserved motif KPRPR[S/T]F for *Arabidopsis* anthocyanin-promoting MYBs.

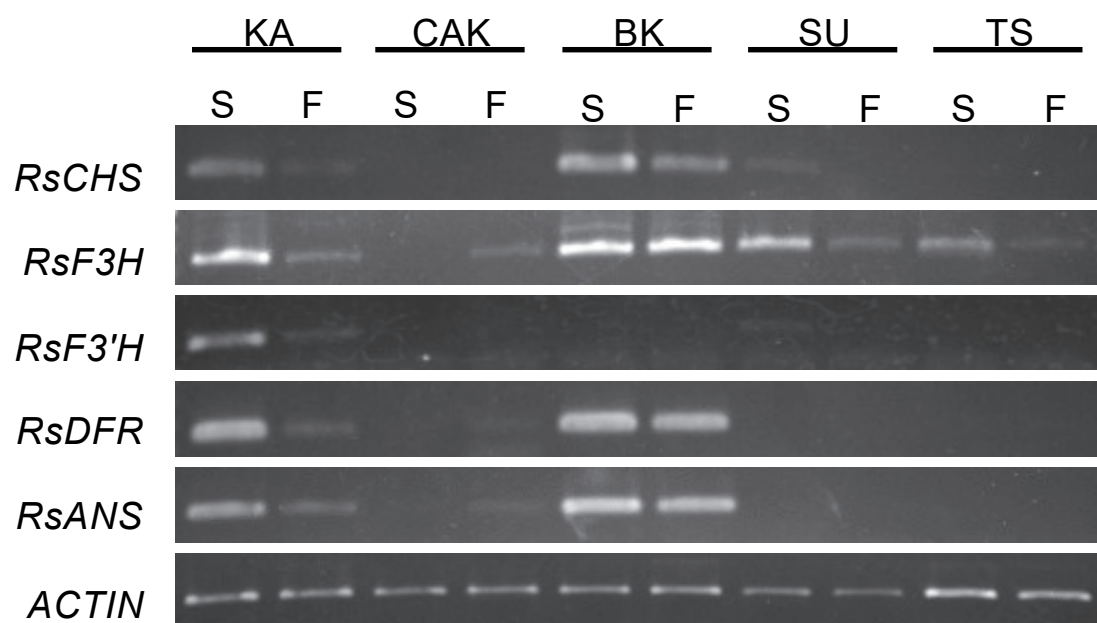


Fig. 3-1-5. Expression analysis of the anthocyanin biosynthesis genes using semi qRT-PCR in the purple root radish ‘Karaine aka’ (KA), red root radishes ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK) and ‘Benikururi 521’ (BK), and white root radishes ‘Susanoo’ (SU) and ‘Taibyso soubutori’ (TS). Root skin (S) and flesh (F). Radish *ACTIN* was used as an internal control.

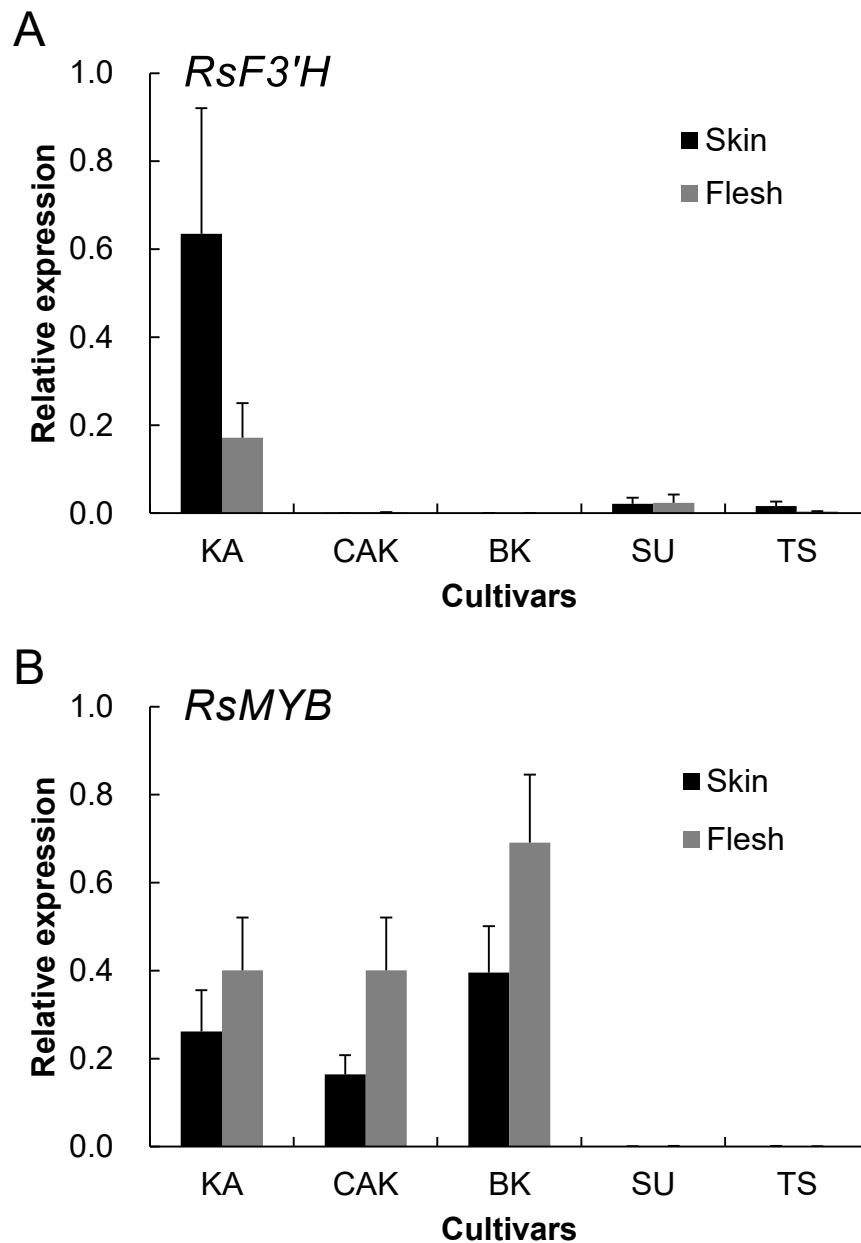


Fig. 3-1-6. Expression analysis of the *RsF3'H* gene (A) and *RsMYB* gene (B) using RT-qPCR in skin and flesh of the purple root radish 'Karaine aka' (KA), red root radishes 'Chouan aomaru koshin' (CAK) and 'Benikururi 521' (BK), and white root radishes 'Susanoo' (SU) and 'Taibyso soubutori' (TS). Radish 26S was used as an internal control. The data represent the mean and standard errors obtained from three technical replicates.

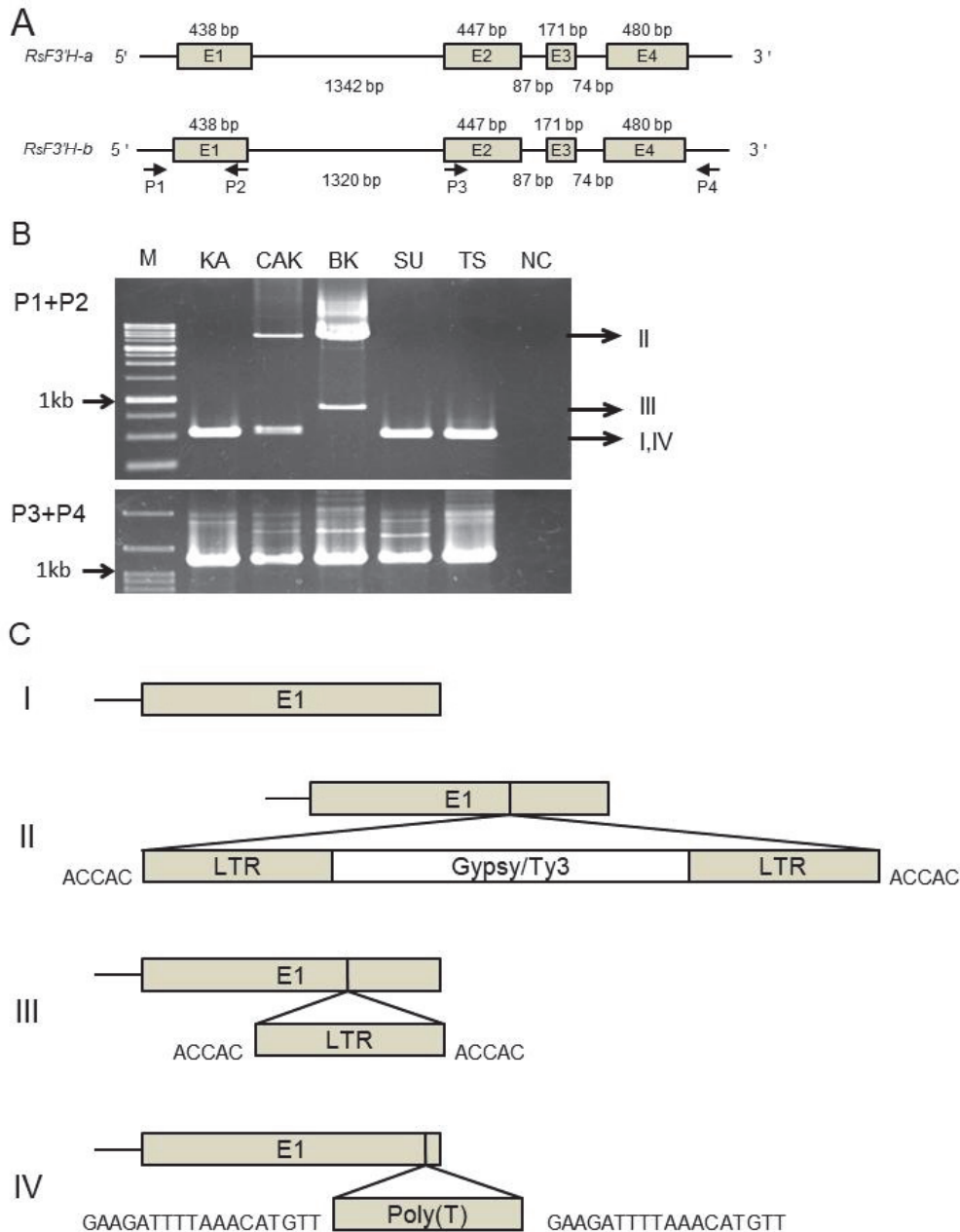


Fig. 3-1-7. Genomic structures of *RsF3'H* genes in radishes. A: Genomic structure of *RsF3'H* genes from 'Karaine-aka'. Closed boxes and E1-E4 indicate exons and first exon-fourth exon, respectively, and lines among exons indicate introns. Numbers of closed boxes (upper) and lines (lower) indicate length of exons and introns, respectively. Horizontal arrows indicate the primer region and direction for PCR analysis, respectively. B: Amplified PCR products of two primer sets (P1+P2; amplify region between 5' upstream region and first exon and P3+P4; amplify region between second exon and 3' UTR). M: 1 kb DNA Ladder (Nippon Genetics). 'Karaine aka' (KA), 'Chouan aomaru koshin' (CAK), and 'Benikururi 521' (BK). 'Susanoo' (SU) and 'Taibyso sobutori' (TS). NC: Negative control. C: Genomic structure of the first exon of *RsF3'H* genes from five cultivars, I: 'Karaine aka', 'Susanoo', and 'Taibyso sobutori', II and IV: 'Chouan aomaru koshin', II and III: 'Benikururi 521'. LTR: long terminal repeats, *Gypsy-Ty3*: a retrotransposon of *gypsy-Ty3*, Poly (T): Poly (T)₂₂ sequence.

考察

キンギョソウ、ヤグルマギク、カーネーションなどのシアニジン系色素を野生型として蓄積する植物種は変異型としてペラルゴニジン系色素を蓄積する (Beale, 1941). Tatsuzawa et al. (2008, 2010) は紫系および赤系ダイコン園芸品種はそれぞれアシル化されたシアニジン系およびペラルゴニジン系色素を蓄積していることを報告している. さらに, 加藤ら (2013) は紫系および赤系ダイコン園芸品種のアグリコンはそれぞれシアニジンおよびペラルゴニジンであることを報告している. 本研究においてもシアニジンおよびペラルゴニジンはそれぞれ紫系および赤系品種から検出されたことから, ‘からいね赤’ における紫色の根部着色はシアニジン系色素の蓄積, ‘長安青丸紅心’ と ‘紅くるり 521’ における赤色の根部着色はペラルゴニジン系色素の蓄積によるものであることが明らかとなった.

ダイコン品種におけるアントシアニン着色とその生合成関連遺伝子との関係を探るために, アントシアニン生合成経路遺伝子の発現解析を行った. その結果, シアニジン系およびペラルゴニジン系色素の蓄積は *RsF3'H* 遺伝子の発現と関連した. ペチュニアにおいて, 内在する *F3'H* 遺伝子の発現を低下させ, バラ由来の *DFR* 遺伝子を過剰発現させることにより, 花色はシアニジン系色素による赤色からペラルゴニジン系色素による橙色に変化することが報告されている (Tsuda et al., 2004). また, オステオスペルマムの花卉では, RNAi によって *F3'H* 遺伝子の発現を抑制し, ガーベラ由来の *DFR* 遺伝子を過剰発現させることにより, ペラルゴニジン蓄積が促された (Seitz et al., 2007). さらに, タバコ花卉では, ガーベラ由来の *DFR* 遺伝子を過剰発現させ, *F3'H* および *FLS* 遺伝子の発現を抑制することで, ペラルゴニジン系色素が蓄積された (Nakatsuka et al., 2007). 本研究においても, ‘長安青

丸紅心’の木部柔組織と‘紅くるり 521’の根部表皮および木部柔組織では‘からいね赤’の根部表皮組織に比べ *RsF3'H* 遺伝子の発現量が低下していたために、赤系品種はペラルゴニジン系色素を蓄積することが明らかとなった。

赤系品種において、*RsF3'H* の発現量低下の原因を調査するためにゲノム DNA の構造解析を行った。紫系および白系品種のエキソン 1 領域では構造変異は確認されなかった。一方、赤系品種のエキソン 1 領域では、‘長安青丸紅心’はレトロトランスポゾンの挿入配列および Poly (T) 配列を、‘紅くるり 521’はレトロトランスポゾンの挿入配列および片側の LTR の配列が確認された (Fig.3-1-7C)。マルバアサガオでは、*IpF3'H* 遺伝子の第 3 エキソン領域への挿入変異は *IpF3'H* 遺伝子の機能を欠如させ、花色を紫色からピンク色へ変化させることが報告されている (Zufall and Rausher, 2003)。また、カーネーションでは、*F3'H* の第 2 エキソン領域への活性型 *hTA* 型トランスポゾンエレメント *Tdic101* の挿入変異は花色の紫色から深いピンク色への変化を引き起こしていた (Momose et al., 2013)。本研究では、赤系品種は *RsF3'H* 遺伝子のエキソン 1 領域にレトロトランスポゾンの挿入が起こることより、*F3'H* の機能が欠如するため、根部にペラルゴニジン系色素による赤色を呈すると考えられた。

白系品種は根部にアントシアニンを蓄積していなかった。半定量 RT-PCR による発現解析の結果、白系品種は紫系および赤系品種に比べ *F3H* より下流の *F3'H*、*DFR* および *ANS* 遺伝子の発現が低かった。さらに、リアルタイム PCR によって *RsMYB* 遺伝子の発現量を調査した結果、白系品種は紫系および赤系品種に比べ発現量が著しく低いことが明らかとなった。中国系ダイコン品種においても白系品種は *DFR* および *ANS* 遺伝子の発現が赤系品種に比べ低下していた (Park et al., 2011)。アントシアニン生合成は様々な植物

種において転写因子による制御が報告されている (Koes et al., 2005). ダイコンでは R2R3-MYB 転写因子 *RsMYB1* による制御が報告されている (Lim et al., 2016). 本研究において, 白系品種は紫系および赤系品種に比べ *RsMYB* 遺伝子の発現が低下していたことから, ダイコンにおけるアントシアニン着色は *MYB* 遺伝子によって制御されている可能性が示唆された. 今後, *MYB* 遺伝子の詳細な構造解析を行うことにより, ダイコンにおける未着色の原因が明らかとなり, 根部着色制御機構が解明できると考えられる.

第2節 着色に関連する変異型 *F3'H* アレル検出マーカーの開発

前節にて赤色ダイコン品種の *F3'H* 遺伝子の第1エキソン領域にレトロトランスポゾンによる挿入変異が確認された。本章ではその挿入変異配列に基づいてプライマーを設計し、様々な品種や赤系と白系品種の雑種後代に適用することで、着色形質に関する選抜マーカー開発の可能性について検討した。

材料および方法

1. *F3'H* 遺伝子型マーカーの開発

第3章第1節にてアントシアニン生合成関連遺伝子の解析に用いた5品種、紫系品種‘からいね赤’、赤系品種‘長安青丸紅心’と‘紅くるり 521’および白系品種‘スサノオ’と‘耐病総太り’に加え、紫系品種‘もみじ’（トーホク種苗（株））、赤系品種‘天安紅心’（（株）サカタのタネ）、‘北京紅心’（トーホク種苗（株））、‘春京赤長水’（（株）サカタのタネ）、白系品種‘辛丸’（（株）サカタのタネ）、‘辛吉’（（株）サカタのタネ）、‘夏みの早生 3号’（タキイ種苗（株））、‘からいね’（（株）渡辺採種場）、‘伊吹大根’（（株）太田種苗）、緑系品種‘青長大根’（タキイ種苗（株））および黒系品種‘黒丸大根’（福井シード（株））、‘黒長大根’（藤田種子（株））を供試した（Table 3-2-2）。さらに、根部着色形質の濃淡の異なる紫系統および赤系統を供試した。

ダイコン園芸品種のアントシアニンジプロフィールは前節および加藤ら（2013）から引用した。紫系統および赤系統のアントシアニン分析は日本大学生物資源科学部水田大輝博士に依頼して行った。

各植物体の葉から改変 CTAB 法（Kobayashi et al., 1998）を用いてゲノム

DNA を抽出した。根部着色形質に関連する *F3'H* 遺伝子型を識別するために 3 つのプライマーを設計し (Fig. 3-2-1, Table 3-2-1), マルチプレックス PCR を行った。P1 および P2 プライマーの組合せでは約 450bp の正常型 *F3'H* を増幅し, P1 および P3 プライマーの組合せでは約 750bp の変異型 *F3'H* を増幅するように, これら 3 つのプライマーを設計した。PCR 溶液は 10 ng のゲノム DNA, 0.25units の Ex Taq (TaKaRa), 1×PCR buffer (TaKaRa), 200μM の各 dNTP および 0.2μM のプライマーとし, 液全量を 10μL とした。PCR 反応条件は 94°C で 2 分間に続き, 94°C30 秒, 58°C30 秒, 72°C30 秒を 30 サイクル反復後, 72°C で 1 分間反応を行った。得られた PCR 産物は 0.5×TBE バッファの 1%アガロースゲルで電気泳動確認した。

2. ‘長安青丸紅心’ と ‘スサノオ’ の雑種後代における根部着色形質と *F3'H* 遺伝子型の比較

根部着色形質の遺伝分析のために, F₁ および F₂ 集団を赤系品種 ‘長安青丸紅心’ と白系品種 ‘スサノオ’ の交雑により得た (Table3-2-3)。2014 年 4 月に ‘長安青丸紅心’ と ‘スサノオ’ の正逆交配を行い, F₁ 種子を獲得し, 同年 9 月に川津圃場にて播種・栽培した。2015 年 2 月に F₁ 集団から紫色の根部着色を示す 8 個体を選抜し, 同年 4 月に個体ごとに蕾授粉による自家受粉を行い, F₂ 種子を獲得し, 9 月に川津圃場にて播種した。根部着色形質について 2015 年の 2 月に F₁ 後代, 同年 12 月に F₂ 後代を調査した。根部着色を有する個体は紫系統および赤系統の RHSCC No. とアントシアニジンの比較した結果から, RHSCC No.75~81 をシアニンによる紫色, RHSCC No.65~74 をペラルゴニンによる赤色と判断した。

‘長安青丸紅心’ と ‘スサノオ’ の雑種後代における *F3'H* 遺伝子型を調査するために, F₁ 紫色 8 個体, 赤色 1 個体, 白色 1 個体の計 10 個体, 紫色

の F₁ の蓄受粉によって得られた F₂348 個体を供試した. ゲノム DNA 抽出およびマルチプレックス PCR は上記に示した通り行った.

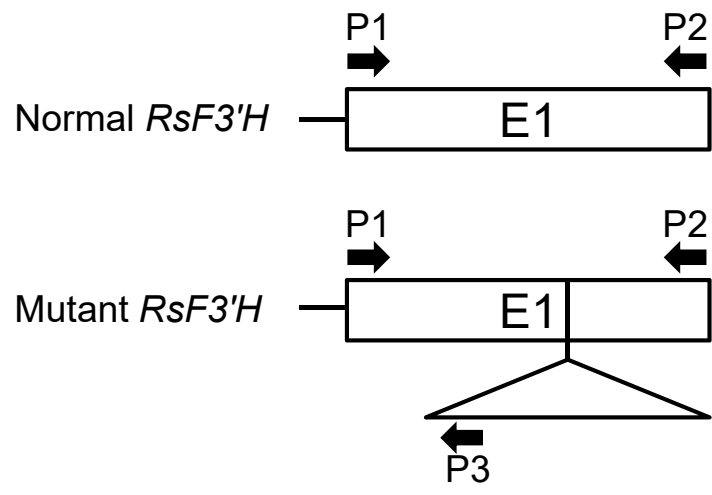


Fig. 3-2-1. Schematic diagram showing the primer regions that distinguish normal and mutant alleles. E1 indicates first exon of the *RsF3'H* genes. Horizontal arrows indicate region and direction of primers.

Table 3-2-1. Primer used for multiplex-PCR.

		Sequence(5'-3')
P1	Forward	ATGACTAATCTCTTCCTCACAATCC
P2	Reverse	CTGTCGAACATGTTTAAAATCTTC
P3	Reverse	ACCTCCTCTGATGATTCGAA

結果

F3'H 遺伝子型マーカーの開発

正常型 *F3'H* アレルと変異型 *F3'H* アレルを識別するために、マルチプレックス PCR を行った。P1 と P2 プライマーの組合せにおいて、変異型 *F3'H* アレルに挿入されている約 5kbp のレトロトランスポゾンの増幅断片はこの PCR 条件では検出されなかった。約 450bp の増幅断片は紫系および白系品種から得られたのに対し、約 750bp の増幅断片は赤系品種から得られた (Fig. 3-2-2A)。さらに、園芸品種においてマルチプレックス PCR により *F3'H* 遺伝子型を調査した結果、紫系品種‘もみじ’は約 450bp および 750bp (*F3'H/f3'h*) を示したのに対し、赤系品種は約 750bp のみ (*f3'h/f3'h*) を示した。一方、白系、緑系および黒系品種は約 450bp のみ (*F3'H/F3'H*) を示した (Table 3-2-2)。

紫系統において、RHSCC No.75~80 の根部着色形質を示す個体はシアニン系色素を含有しており、それらの遺伝子型は *F3'H/F3'H* を示した。一方、赤系統において、RHSCC No.61~67 の根部着色形質を示す個体はペラルゴニン系色素を含有しており、それらの遺伝子型は *f3'h/f3'h* を示した (Table 3-2-3)。

赤系と白系品種間の雑種後代における根色と *F3'H* 遺伝子型の比較

‘長安青丸紅心’と‘スサノオ’の F_1 の根色はほぼ全ての個体が紫色を示した。根部が紫色の F_1 の自殖により得られた F_2 の根色は紫色、赤色、白色に分離した。 F_2 の根色について χ^2 検定を行った結果、SU×CAK-3 self, -4 self, CAK×SU-1 self, -2 self は 2 遺伝子座で支配されていると仮定した場合の分離比、紫色：赤色：白色=9:3:4 と一致したが、 F_2 全体ではその分離比と一致しなかった (Table 3-2-4)。

‘長安青丸紅心’と‘スサノオ’の F_1 および F_2 において、マルチプレックス PCR により $F3'H$ 遺伝子型を調査した。 F_1 において、根部が紫色および白色個体は $F3'H/f3'h$ を示したのに対し、赤色個体は $f3'h/f3'h$ を示した。 F_2 において、紫色個体は $F3'H/F3'H$ または $F3'H/f3'h$ 、赤色個体は $f3'h/f3'h$ を示したのに対し、白色個体はこれら 3 つのいずれかの遺伝子型を示した (Fig. 3-2-2B, Table 3-2-5)。 F_2 の $F3'H$ 遺伝子型について χ^2 検定を行った結果、すべての交配組合せにおいて $F3'H/F3'H : F3'H/f3'h : f3'h/f3'h = 1:2:1$ の分離比を示した。

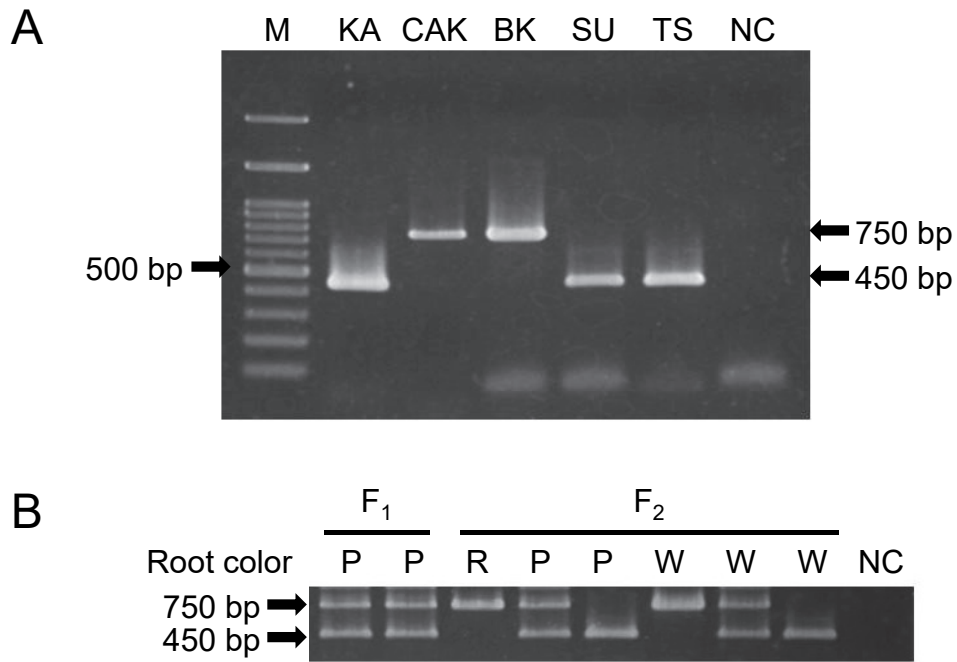


Fig. 3-2-2. Multiplex PCR for the detection of the normal *RsF3'H* allele linked to purple root and of the mutant *RsF3'H* allele linked to red root. A, PCR amplification of five cultivars which were used in chapter 3, section 1. M: 100 bp DNA Ladder (Nippon Genetics). Purple root radish 'Karaine aka' (KA), Red root radish 'Chouan aomaru koshin' (CAK) and 'Benikururi 521' (BK), White root radish 'Susa-no-o' (SU) and 'Taibyō soubutori' (TS). NC: Negative control. C, PCR amplification of progenies of the cross between CAK and SU. The labels at the top of the gel show root color. P: purple root, R: red root, W: white root. NC: Negative control.

Table 3-2-2. *F3'H* genotype profiles obtained from the first exon of *RsF3'H* genes in radish cultivars.

Cultivars	Anthocyanidin	<i>F3'H</i> genotype
‘Karaine aka’	Cyanidin	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Momiji’	Cyanidin	<i>F3'H/f3'h</i>
‘Chouan aomaru koshin’	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>
‘Benikururi 521’	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>
‘Ten-an koshin’	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>
‘Pekin koshin’	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>
‘Pekinmizu daikon’	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>
‘Susanoo’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Taibyō soubutori’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Karamaru’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Karayoshi’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Natsumino wase 3go’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Karaine’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Ibuki daikon’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Aonaga daikon’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Kuromaru daikon’	—	<i>F3'H/F3'H</i>
‘Kuronaga daikon’	—	<i>F3'H/F3'H</i>

Table 3-2-3. Relationship between RHSCC number and *F3'H* genotype in purple and red root breeding lines.

Breeding lines	RHSCC No. (Color group)		Anthocyanidin	<i>F3'H</i> genotype	
	Skin	Flesh			
Purple root	77A (Purple)	N78B (Purple)	Cyanidin	<i>F3'H/F3'H</i>	
	N78D (Purple)	76C (Purple)	Cyanidin	<i>F3'H/F3'H</i>	
	77D (Purple)	N80D (Purple-violet)	Cyanidin	<i>F3'H/F3'H</i>	
	N78C (Purple)	N78C (Purple)	Cyanidin	<i>F3'H/F3'H</i>	
	76D (Purple)	79C (Purple)	Cyanidin	<i>F3'H/F3'H</i>	
	155A (White)	155A (White)	—	<i>F3'H/F3'H</i>	
	Red root	67B (Red-purple)	61A (Red-purple)	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>
		63C (Red-purple)	67B (Red-purple)	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>
62D (Red-purple)		64D (Red-purple)	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>	
NN155D (White)		61A (Red-purple)	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>	
158B (Yellow-white)		67A (Red-purple)	Pelargonidin	<i>f3'h/f3'h</i>	
157C (Green-white)		157D (Green-white)	—	<i>f3'h/f3'h</i>	

Table 3-2-4. Segregation of root color in F₁ and F₂ progenies from the cross between CAK and SU.

Combinations	Generation	Observed (P:R:W)	Expected (P:R:W)	χ^2	<i>P</i>
SU×CAK	F ₁	18:0:2	1:0:0	—	—
CAK×SU	F ₁	15:1:0	1:0:0	—	—
SU×CAK-1 Self	F ₂	16:13:16	9:3:4	7.90	0.019
SU×CAK-2 Self	F ₂	23:7:20	9:3:4	6.04	0.049
SU×CAK-3 Self	F ₂	18:10:8	9:3:4	1.93	0.382
SU×CAK-4 Self	F ₂	24:10:16	9:3:4	1.63	0.443
CAK×SU-1 Self	F ₂	30:15:15	9:3:4	1.67	0.435
CAK×SU-2 Self	F ₂	13:5:12	9:3:4	3.66	0.160
CAK×SU-3 Self	F ₂	20:4:20	9:3:4	10.46	0.005
CAK×SU-4 Self	F ₂	11:11:11	9:3:4	7.74	0.021
Total		155:81:120	9:3:4	20.99	0.00003

Table 3-2-5. Relationship between genotype and root color phenotype in progenies from the cross between CAK and SU.

Combinations	Generations	Root color	<i>F3'H</i> genotype			χ^2 (1:2:1)	P
			<i>F3'H/F3'H</i>	<i>F3'H/f3'h</i>	<i>f3'h/f3'h</i>		
SU×CAK	F ₁	Purple	–	4	–	–	–
		Red	–	–	–		
		White	–	1	–		
CAK×SU	F ₁	Purple	–	4	–	–	–
		Red	–	–	1		
		White	–	–	–		
SU×CAK-1	F ₂	Purple	1	15	–	2.20	0.333
		Red	–	–	13		
		White	7	7	2		
SU×CAK-2	F ₂	Purple	5	18	–	4.08	0.130
		Red	–	–	7		
		White	13	6	1		
SU×CAK-3	F ₂	Purple	4	14	–	0.44	0.801
		Red	–	–	10		
		White	6	2	–		
SU×CAK-4	F ₂	Purple	9	15	–	2.16	0.340
		Red	–	–	10		
		White	8	7	1		
CAK×SU-1	F ₂	Purple	6	24	–	0.40	0.819
		Red	–	–	15		
		White	9	4	2		
CAK×SU-2	F ₂	Purple	–	13	–	1.47	0.480
		Red	–	–	5		
		White	7	5	–		
CAK×SU-3	F ₂	Purple	2	18	–	4.50	0.105
		Red	–	–	4		
		White	12	7	1		
CAK×SU-4	F ₂	Purple	3	8	–	3.67	0.160
		Red	–	–	11		
		White	8	3	–		

考察

前節にて、根部着色を有するダイコン園芸品種においてペラルゴニジンの前駆体からシアニジンの前駆体を誘導する *F3'H* 遺伝子を解析したところ、赤色品種では同遺伝子の第 1 エキソン領域へのレトロトランスポゾン挿入により、*F3'H* の機能が欠如するため、根部にペラルゴニジン系色素による赤色を呈することを明らかにした。本節では、ダイコンにおける *F3'H* の遺伝子型を識別するために、3 つのプライマーを設計し、マルチプレックス PCR を行った。赤系品種からは変異した *RsF3'H* 由来の 750bp のみの増幅産物が得られたのに対し、紫系および白系品種からは正常な *RsF3'H* 由来の 450bp の増幅産物が得られた。‘長安青丸紅心’ と ‘スサノオ’ の交雑後代において、根部が紫色の F_1 からは 450bp および 750bp の両方 (*F3'H/f3'h*) の増幅産物が得られた。 F_2 集団において *F3'H* 遺伝子型を調査したところ、赤色個体は *f3'h/f3'h*、紫色個体は *F3'H/F3'H* または *F3'H/f3'h* を示したのに対し、白色個体は個体によりいずれかの遺伝子型を示した。これらの結果から、変異型 *F3'H* アレル検出マーカーは *F3'H* の遺伝子型をマルチプレックス PCR によって識別することができ、園芸品種だけでなく、育成系統にも利用可能であると示唆された。

赤系ダイコン品種 ‘コメット’ と白系ダイコン品種 ‘聖護院’ の交雑試験において、 F_1 の根色はすべて紫色を示し、その F_2 の根色は紫色、赤色および白色に分離し、その分離比は 9 : 3 : 4 であった (Hoshi et al., 1963)。さらに、赤色カブと白色カブの交雑試験において、すべて F_1 の根色は紫色を示し、その F_2 の根色は紫色、赤色および白色に分離し、その分離比は 9 : 3 : 4 であった (Hoshi et al., 1975)。一方、赤系ダイコンの「乾谷」と白系品種の F_1 の根色は紫色を示し、その F_2 の根色は紫色、赤色および白色に分離し

たが、その分離比は 9 : 3 : 4 と一致しなかった (浅子ら, 2011). 本研究において, ‘長安青丸紅心’ と ‘スサノオ’ の F₁ の根色は紫色だけでなく赤色と白色も示した. F₁ において, 赤色個体の *F3'H* 遺伝子型は *f3'h/f3'h* を示したため, 赤色個体は交雑の失敗により出現したと考えられた. 一方, 白色個体の *F3'H* 遺伝子型は *F3'H/f3'h* を示したため, 交雑は成功したと考えられた. 根部が紫色の F₁ の自殖により得られた F₂ の根色は紫色, 赤色および白色に分離したが, その分離比は 9 : 3 : 4 と一致しなかった. F₂ の *F3'H* 遺伝子型を調査したところ, その分離比は全ての組合せにおいて 1 : 2 : 1 のメンデル比を示したことから, *F3'H* の遺伝様式は 1 遺伝子座支配であると推察された. そして, F₁ における白色個体の出現および F₂ の根色における分離比のゆがみはアントシアニン着色遺伝子に何らかの原因があるため生じると考えられる. これまでの研究において, 紅芯大根の根部着色形質には易変遺伝子の関与が示唆されている (建部, 1940). そして, 椿 (2015) はアントシアニン生合成の経路遺伝子ではなく, その制御遺伝子への易変遺伝子の関与の可能性を示唆している. 多くの植物種において, アントシアニン生合成は MYB など転写因子によって制御されている. ダイコンにおいて, *RsMYB1* の遺伝子発現が白系ダイコンよりも赤系ダイコンで高かったことから, *RsMYB1* はアントシアニン生合成の正の制御因子であると示唆されている (Lim et al., 2016). しかし, 白系ダイコンと赤系ダイコンのゲノム構造は明らかとなっていない. リンドウにおいて, 白色花変異体はトランスポゾンエレメント, 同定されていないエレメントおよび 1 塩基の挿入によって引き起こされた不完全な *GtMYB3* を有していた (Nakatsuka et al., 2012). また, リンゴ果実の黄色表皮は *MdMYB10* のプロモーター領域におけるメチル化によるエピジェネティックな制御により引き起こされている (El-Sharkawy et al., 2015). ダイコンにおいても, 白色個体の MYB 遺伝子にゲノム構造の変異

が起きている可能性が考えられる。

今後、MYB 遺伝子の構造解析を行うことで白系品種における *RsMYB* の発現低下の原因が明らかとなり、未着色形質の原因解明につながると考えられる。

第4章 総合考察

「出雲おろち大根」「スサノオ」は島根県の宍道湖畔や島根半島に自生するハマダイコンを選抜育種した辛味大根であり、「出雲そば」をはじめ、肉や魚料理などの薬味として主に利用されており、島根県を代表とする地方辛味ダイコン品種として普及が進んでいる（小林ら，2017印刷中）。一方，料理の色どりや食品色素源など利用幅拡大を目指した紫系および赤系「出雲おろち大根」の育成を進めており（小林ら，2012），本研究では，園芸品種からアントシアニン着色形質を「スサノオ」に導入し，得られた紫系統および赤系統の各種形質の固定化とその特性評価ならびにダイコンの根部着色制御機構の解明を目的とし，各種形態形質調査，根部内成分および食品機能性の分析ならびにアントシアニン着色関連遺伝子の解析を行った。

紫系統および赤系統の特性とその利用について

本研究の根部内成分の分析により，紫系統および赤系統は交配親品種と同様のアントシアニンを含有する辛味大根であると評価された。紫系統および赤系統は「スサノオ」と同様に薬味として利用することにより，料理の薬味としてだけでなく料理を彩る天然色素としても利用可能であると考えられた。また，赤系品種由来のダイコンアントシアニンは酸性域で橙から赤，中性域でも赤い色調を示す（津久井・林，2000）ことから，紫系統および赤系統に酸度の強い食材や調味料を合わせることでダイコン本来の色調だけでなく，色調の変化も楽しむことが可能である。さらに，ダイコンアントシアニンは加熱やUV照射に対し非常に安定であるため（Hayashi et al., 1996），紫系統および赤系統は天然色素源としての利用が期待される。また，抗酸化能の分析により，紫系統および赤系統は交配親品種と比較して抗酸化能が高

いことが明らかとなり、紫系統や赤系統を積極的に食事に取り入れることで健康面に好影響を与えることが期待される。

紫系統および赤系統の品種化とその課題

近年、‘スサノオ’の地域普及が進む一方で、生産者からは紫系統および赤系統の早期普及が望まれている。紫系統および赤系統を‘スサノオ’の新品種として品種登録するためには、根部の形状や着色形質の固定は必要である。本研究により、紫系統および赤系統における葉および根部の形状は‘スサノオ’と同様の形状を示し、安定していることが明らかとなった。しかし、紫系統および赤系統は集団選抜を重ねた M_{10} であっても約2割程度の根部未着色個体が出現し、根部着色形質の安定性に課題が残った。これまでに、紅芯大根と白系品種の交雑試験から紅芯大根の根部着色形質には易変遺伝子の関与が示唆されている（建部，1940）。本研究において、紫系統および赤系統は色素源として紅芯大根を用いているため、それらの根部着色形質には易変遺伝子が関与していると考えられる。紫系統および赤系統の根部着色形質の固定化には易変遺伝子の排除もしくはその影響を抑える必要がある。椿（2015）は易変遺伝子と推察される遺伝因子が着色制御遺伝子に関与する可能性を示唆している。第3章のアントシアニン着色関連遺伝子の発現解析の結果から、ダイコンのアントシアニン着色には本研究で単離された *MYB* 遺伝子の関与が示唆された。しかし、本研究は着色に関わる構造変異までは明らかにすることはできなかった。今後、*MYB* 遺伝子を含む着色制御遺伝子のより詳細な構造解析により、ダイコンの着色に関わる易変遺伝子が明らかになることで、着色形質の完全な固定化が期待される。

一方、 M_5 から自殖を繰り返した S_5 では全個体が着色する系統が得られた。中間母本「乾谷」の根部着色形質は自殖の繰り返しにより固定されている（浅

子ら, 2011) ことから, 自殖の繰り返しは易変遺伝子の影響を最小限に抑えることが可能であると示唆された. しかし, アブラナ科のダイコンは自家不和合性植物であるため, 自殖の繰り返しにより近交弱勢を示すことが知られている. 本研究において, 紫系統および赤系統の自殖により得られた S_5 は集団選抜により得られた M_{10} や交配親品種と比較して植物体が小さく, 「出雲おろち大根」の新品種として普及させるためには近交弱勢を回避する必要がある. 一代雑種 (F_1) は交配親系統よりも強勢で, 形態形質や成分に関して均一である. そのため, F_1 化は近交弱勢を回避するために有効な手法である. 紫系統の F_1 化はその S_5 と赤系統の S_5 を交雑することにより可能であると考えられ, 現在, 紫系統と赤系統間の F_1 の育成を進めている. 一方, 赤系統の F_1 化は $F3'H$ に関して劣性のホモの自殖系統が本系統のみであるため, 新たな自殖系統の作出が必要である.

我が国において栽培されている根部着色を有する辛味大根は‘からいね赤’や‘親田辛味’など限られており, 本研究で作出された紫系統および赤系統は全国的にも珍しい機能性を有した辛味大根である. 紫系統および赤系統はその希少性から新たな需要が見込まれ, ‘スサノオ’とともに島根県の地域振興に寄与できるであろう.

変異型 $F3'H$ アレル検出マーカーの利用について

本研究により開発された変異型 $F3'H$ アレル検出マーカーはマルチプレックス PCR により *Gypsy-Ty3* タイプのレトロトランスポゾンの挿入変異により $F3'H$ 機能が欠如したアレルを検出することが可能である. 赤系品種と白系品種の交雑により新たな紫系品種や中間母本を育成する場合, F_1 および F_2 の紫色個体における $F3'H$ 遺伝子型は $F3'H/F3'H$ または $F3'H/f3'h$ があり, 表現型から $F3'H$ 遺伝子型の識別は不可能である. 本 DNA マーカーを利用

することにより $F3'H/F3'H$ の遺伝子型を有する個体の選抜が容易であり、 $F3'H$ 遺伝子の固定を効率的に行うことが可能であると考えられる。しかし、白色個体において、本 DNA マーカーにより $F3'H$ 遺伝子型の識別は可能であるが表現型とは一致しないため、着色の有無を識別できる DNA マーカーの開発が期待される。また、本マーカーは現在育成中の紫系統と赤系統の交雑により得られた F_1 の F_1 純度検定にも利用可能であると考えられる。そのため、本 DNA マーカーは育種マーカーとしてだけでなく、検定マーカーとしても利用が期待される。

本研究の成果は紫系統および赤系統に関する基本情報を得たことであり、今後の紫系統および赤系統の普及および品種登録に向けた育成方針を定めるために役に立つであろう。また、本研究で得られたダイコンのアントシアニン着色関連遺伝子情報が、根部着色制御機構を明らかにするための基礎情報となれば幸いである。

摘要

「出雲おろち大根」‘スサノオ’は、出雲地域に自生するハマダイコン (*Raphanus sativus* L. f. *raphanistroides* Makino) を選抜育種により品種改良した島根県を代表する地方辛味ダイコン品種である。本研究では料理への色どり付加や食品色素源としての利用幅拡大を目指し、紫色および赤色の根部着色形質を導入した固定系統を育成して新品種の開発を試み、その根部内容成分含量および機能性を調査した。さらに、アントシアニン生合成関連遺伝子の解析により、フラボノイド 3'-水酸化酵素 (F3'H) 遺伝子と根部着色色素との関係を解明し、ダイコンの根部着色形質に関する育種マーカーとしての利用が期待される変異型 *F3'H* アレル検出マーカーを開発することができた。以下に各研究の具体的な内容と成果を示す。

1. 紫系および赤系「出雲おろち大根」育成系統の作出とその特性評価

「出雲おろち大根」に紫系園芸品種‘からいね赤’および赤系園芸品種‘長安青丸紅心’を交雑し、紫系統および赤系統に分離して集団選抜を重ねることにより、根部着色形質を「出雲おろち大根」へ導入した。集団選抜第 10 世代では約 8 割の個体が根部着色を示した。根部着色形質を導入した「出雲おろち大根」のアントシアニン分析の結果、主要アントシアニンは紫系統ではアシル化されたシアニジン 3-ソホロシド-5-グルコシド、赤系統ではアシル化されたペラルゴニジン 3-ソホロシド-5-グルコシドであり、交配親品種とそれぞれ一致することが明らかになった。紫系統および赤系統のイソチオシアネート含量および可溶性固形物含量は‘スサノオ’や辛味ダイコン品種‘辛丸’と同等であった。一方、抗酸化能の指標である DPPH ラジカル消去活性は‘スサノオ’よりも約 2 倍高く、‘耐病総太り’よりも 7~

10 倍高い値を示した。これらの結果から、紫系統および赤系統は交配親品種と同様のアントシアニンを含有し、‘スサノオ’よりもさらに高い機能性を有した辛味大根であると評価された。

2. ダイコン根部着色形質に関するアントシアニン生合成関連遺伝子の解析と DNA マーカーの開発

紫系、赤系および白系品種のアントシアニン分析により、紫系品種ではシアニジン系、赤系品種ではペラルゴニジン系のアントシアニンの蓄積が確認されたのに対し、白系品種での蓄積はなかった。紫系品種の根部着色部位からカルコン合成酵素 (CHS)、フラバノン 3-水酸化酵素 (F3H)、ジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DFR) およびアントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子の部分配列と F3'H および MYB 遺伝子の全長配列を単離し、これらの遺伝子を用いて、紫系、赤系および白系品種の発現解析を行った。その結果、紫系品種ではこれら 6 遺伝子の発現が確認されたが、赤系品種では F3'H 遺伝子、白系品種では DFR、ANS および MYB 遺伝子の発現は確認されなかった。さらに、赤系品種由来の F3'H 遺伝子のゲノム構造解析により、第 1 エキソン領域にレトロトランスポゾンの挿入が発見され、この挿入変異に起因する同酵素の機能喪失により根部にペラルゴニジン系色素が蓄積して赤色を呈することが明らかになった。

次に、この F3'H の変異を用いて、ダイコンの着色に関する変異型 F3'H アレル検出マーカーを開発した。各種園芸品種、紫系統ならびに赤系統を用いてマルチプレックス PCR により F3'H アレル解析を行ったところ、正常型の約 450bp の増幅断片は紫系品種および紫系統などから得られたのに対し、変異型の約 750bp のみの増幅断片は赤系品種および赤系統のみで得られた。赤系品種‘長安青丸紅心’と‘スサノオ’の交雑後代では、ほぼすべての

F₁ 個体は紫色の根部を示し，正常型と変異型の増幅断片を有していた．その F₂ 集団では，紫色個体は正常型のみまたは正常型と変異型のバンドパターンを示したのに対し，赤色個体は変異型のみのバンドパターンを示した．一方，白色個体はいずれかのバンドパターンを示した．以上の結果から，この DNA マーカーは根部着色形質にリンクする変異型 *F3'H* アレルの検出が可能であり，紫系および赤系「出雲おろち大根」をはじめとするダイコンの根部着色形質に関する育種において利用可能であると考えられる．

本研究で単離した遺伝子のリスト

Table. List of isolated genes in this study.

Gene name		Cultivar	Accession number
<i>RsCHS</i>	mRNA	‘Kraime aka’	LC202030
<i>RsF3H</i>	mRNA	‘Kraime aka’	LC202031
<i>RsF3'H-a</i>	mRNA	‘Kraime aka’	LC202035
<i>RsF3'H-a</i>	gDNA	‘Kraime aka’	LC202034
<i>RsF3'H-b</i>	mRNA	‘Kraime aka’	LC202037
<i>RsF3'H-b</i>	gDNA	‘Kraime aka’	LC202036
<i>RsDFR</i>	mRNA	‘Kraime aka’	LC202032
<i>RsANS</i>	mRNA	‘Kraime aka’	LC202033
<i>RsF3'H</i>	gDNA	‘Chouan aomaru koshin’	LC205688
<i>RsF3'H</i>	gDNA	‘Chouan aomaru koshin’	LC205690
<i>RsF3'H</i>	gDNA	‘benikururi 521’	LC205689

引用文献

- 青葉 高. 2013. 日本の野菜文化史事典. p. 317–330. 八坂書房. 東京.
- 浅子洋一・大脇裕介・小関良宏・佐々木伸大・阿部 裕・百瀬忠征・下村講一郎. 2011. 地下部内部全体にペラルゴニジンの主たるアントシアニンとして蓄積するダイコン (*Raphanus sativus* L.) の中間母本「乾谷」とその遺伝様式. 育種学研 13: 65–73.
- 伴 琢也・小林伸雄・本谷宏志・門脇正行・松本真悟. 2009. ハマダイコンの栽培化と利用について. 園学研. 8: 413–417.
- Beale, G. H. 1941. Gene relations and synthetic processes. *J. Genet.* 42: 197–214.
- Cheon, K.-S., A. Nakatsuka and N. Kobayashi. 2011. Isolation and expression pattern of genes related to flower initiation in the evergreen azalea, *Rhododendron × pulchrum* ‘Oomurasaki’. *Sci. Hortic.* 130: 906–912.
- de Pascual-Teresa, S. and M. T. Sanchez-Ballesta. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Photochem Rev.* 7: 281–299.
- El-sharkawy I., D. Liang and K. Xu. 2015. Transcriptome analysis of an apple (*Malus × domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation. *Journal of Experimental Botany* 66: 7359–7376.
- 江崎秀男・小野崎博通. 1980. 大根中の辛味成分の比色定量法. 栄養と食糧. 33: 161–167.
- Giusti, M. M., H. Ghanadan and R. E. Wrolstad. 1998. Elucidation of the Structure and Conformation of Red Radish (*Raphanus sativus*) Anthocyanins Using One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 46:4858–4863.
- Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev.*

- Plant Biol. 57: 761–780.
- Hamilton, S. M. and R. W. Teel. 1996. Effects of isothiocyanates on cytochrome P-450 1A1 and 1A2 activity and on the mutagenicity of heterocyclic amines. Anticancer Res. 16: 3597–3602.
- Hashem, F. A and M. M. Saleh. 1999. Antimicrobial components of some Cruciferae plants (*Diplotaxis harra* Forsk. and *Erucaria microcarpa* Boiss.). Phytother. Res. 13: 329–332.
- Hayashi, K., N. Ohara and A. Tsukui. 1996. Stability of Anthocyanins in Various Vegetables and Fruits. Food Sci. Technol. Int. 2: 30–33.
- Hecht, S. S. 1999. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. J. Nutr. 129: 768S–774S.
- Hoshi, T. 1975. Genetical study on the formation of Anthocyanins and flavonols in turnip varieties. Genetical study on Anthocyanins in Brassicaceae II. Bot. Mag. Tokyo 88: 249–254.
- Hoshi, T., E. Takemura and K. Hayashi. 1963. Genetic modification of hydroxylation pattern in radish anthocyanins. Studies on Anthocyanins, XLII. Bot. Mag. Tokyo 76: 431–439.
- Hoshino, A., Y. Morita, J.-D. Choi, N. Saito, K. Toki, Y. Tanaka, and S. Iida. 2003. Spontaneous mutations of the flavonoid 3'-hydroxylase gene conferring reddish flowers in the three morning glory species. Plant Cell Physiol. 44: 990–1001.
- 五十嵐喜治・佐藤充克・寺原典彦・津田孝範・津志田藤二郎・梶本修身. 2000. アントシアニンの生体調節機能. p. 103–186. 大庭理一郎・五十嵐喜治・津久井亜紀夫編著. アントシアニン：食品の色と健康. 建帛社. 東京.
- Ishida, M., M. Nagata, T. Ohara, T. Kakizaki, K. Hatakeyama and T. Nishio. Small variation of glucosinolate composition in Japanese cultivars of radish

- (*Raphanus sativus* L.) requires simple quantitative analysis for breeding of glucosinolate component. 2012. *Breed Sci.* 62 : 63–70.
- Jing, P., S. J. Zhao, S. Y. Ruan, Z. H. Xie, Y. Dong and L. Yu. 2012. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.), and their stability to heat and pH. *Food Chem.* 133: 1569–1576.
- 加藤一幾・佐藤和成・金澤俊成・庄野浩資・小林伸雄・立澤文見. 2013. ダイコン類 (*Raphanus sativus* L.)における根色とアントシアニン. *園学研.* 12: 229–234.
- 橋田浩二・中村 隆・森田尚文・今堀義洋・鈴木敏征・池田英雄. 2005. ‘水ナス’果実の抗酸化活性並びに外傷によるその活性の増大. *園学研.* 4: 229–232.
- 小林伸雄. 2010. ハマダイコン新品種「出雲おろち大根」の育成と地域普及. *植調.* 44: 262–265.
- 小林伸雄. 2014. 平成 25 年度新需要創造フロンティア育成事業: 「出雲おろち大根」の成分評価と新加工食品成果報告書. p.1–76. 島根大学生物資源科学部.
- Kobayashi, N., T. Horikoshi, H. Katsuyama, T. Handa and K. Takayanagi. 1998. A simple and efficient DNA extraction method from the plants, especially from woody plants. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 4: 76–80.
- 小林伸雄・柘川貴紀・門脇正行・中務 明・伴 琢也. 2017. 地域遺伝資源を活用したハマダイコン新品種 ‘スサノオ’ の育成・普及とその各種形質について. *園学研.* In press.
- 小林伸雄・柘川貴紀・田中万美子・星田知亜紀・水田大輝・門脇正行・安田登・中務明・伴琢也. 2012. 紫系および赤系 ‘出雲おろち大根’ 育成系統の作出とその特性評価. *園芸学会中四国支部要旨* 51:39.
- Koes, R. E., F. Quattrocchio and J. N. M. Mol. 1994. The flavonoid biosynthetic

- pathway in plants: function and evolution. *Bioessays* 16: 123–132.
- Koes, R., W. Verweij, F. Quattrocchio. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* 10: 236–242.
- Li, H., Z. Deng, H. Zhu, C. Hu, R. Liu, J. C. Young and R. Tsao. 2012. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food Research International* 46: 250–259
- Lim, S. H., J. H. Song, D. H. Kim, J. K. Kim, J. Y. Lee, Y. M. Kim and S. H. Ha. 2016. Activation of anthocyanin biosynthesis by expression of the radish R2R3-MYB transcription factor gene *RsMYB1*. *Plant Cell Rep.* 35: 641–653.
- Matsufuji, H., H. Kido, H. Misawa, J. Yaguchi, T. Otsuki, M. Chino, M. Takeda and K. Yamagata. 2007. Stability to light, heat, and hydrogen peroxide at different pH values and DPPH radical scavenging activity of acylated anthocyanins from red radish extract. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3692–3701.
- Mizuta, D., T. Ban, I. Miyajima, A. Nakatsuka and N. Kobayashi. 2009. Comparison of flower color with anthocyanin composition patterns in evergreen azalea. *Sci. Hortic.* 122: 594–602.
- Momose, M., M. Nakayama, Y. Itoh, N. Umemoto, T. Toguri and Y. Ozeki. 2013. An active *hAT* transposable element causing bud mutation of carnation by insertion into the *flavonoid 3'-hydroxylase* gene. *Mol. Genet. Genomics* 288: 175–184.
- Nakatsuka, T., Y. Abe, Y. Kakizaki, S. Yamamura and M. Nishihara. 2007. Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* 26: 1951–1959.
- Nakatsuka T., M. Saito, Y. Sato-Ushiku, E. Yamada, T. Nakasato, N. Hoshi, K. Fujiwara, T. Hikage and M. Nishihara. 2012. Development of DNA markers

- that discriminate between white- and blue-flowers in Japanese gentian plants. *Euphytica* 184: 335–344.
- Ochman, H., A. S. Gerber and D. L. Hart. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621–623.
- Otsuki, T., H. Matsufuji, M. Takeda, M. Toyoda and Y. Goda. 2002. Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.). *Phytochem* 60:79–87.
- Park, N. I., H. Xu, X. Li, I. H. Jang, S. Park, G. H. Ahn, Y. P. Lim, S. J. Kim and S. U. Park. 2011. Anthocyanin accumulation and expression of anthocyanin biosynthetic genes in radish (*Raphanus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* 59: 6034–6039.
- Pattanaik, S., Q. Kong, D. Zaitlin, J. R. Werkman, C. H. Xie, B. Patra and L. Yuan. 2010. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco. *Planta* 231:1061–1076.
- Rahman, M. M., T. Ichianagi, T. Komiyama, Y. Hatano and T. Konishi. 2006. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic. Res.* 40: 993–1002.
- Seitz, C., M. Vitten, P. Steinbach, S. Hartl, J. Hirsche, W. Rathje, D. Treutter and G. Forkmann. 2007. Redirection of anthocyanin synthesis in *Osteospermum hybrida* by a two-enzyme manipulation strategy. *Phytochemistry* 68: 824–833.
- 宋 正雄・今井喜孝・寺澤保房. 1919. だいこんの非「メンデル性」遺伝に就て. *植学雑.* 33: 21–30.
- 相賀哲夫. 1989. 園芸植物大事典. p.126–129. 小学館. 東京.
- 須田郁夫. 2000. 分光学的抗酸化機能評価. p.218–220. 食品機能研究法. 篠原和毅・上野川修一・鈴木建夫編著. 光琳. 東京.
- 建部民雄. 1940. ダイコンの色の遺伝研究 (II). *園学雑.* 11: 300–316.

- Tatsuzawa, F., N. Saito, K. Toki, K. Shinoda, A. Shigihara and T. Honda. 2010.
Acylated cyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from the purple roots of red radish (*Raphanus sativus* L.) 'Benikanmi'. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 79: 103–107.
- Tatsuzawa, F., K. Toki, N. Saito, K. Shinoda, A. Shigihara and T. Honda. 2008.
Anthocyanin occurrence in the root peels, petioles and flowers of red radish (*Raphanus sativus* L.). Dyes and Pigments 79: 83–88.
- 椿 信一. 2015. 秋田県におけるダイコン地方品種の育成と, それに関わる諸形質の遺伝・育種学的研究. p1–159. 秋田県立大学.
- 椿 信一・佐藤友博・檜森靖則. 2014. 肉質の硬い漬物加工用ダイコン '秋農試 39 号' の育成とその特性. 園学研. 13: 67–73.
- 椿 信一・篠田光江・三浦一将・佐野広伸・佐藤孝夫. 2015. 辛味ダイコン 'あきたおにしぼり' における在来品種 F₁ 化の効果. 園学研. 14: 141–146.
- Tsuda, S., Y. Fukui, N. Nakamura, Y. Katsumoto, K. Yonekura-Sakakibara, M. Fukuchi-Mizutani, K. Ohira, Y. Ueyama, H. Ohkawa, T. A. Holton, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2004. Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. Plant Biotechnol. 21: 377–386.
- 津久井亜紀夫・林 一也. 2000. アントシアニンの原料および食品加工利用. p. 57–102. 大庭理一郎・五十嵐喜治・津久井亜紀夫編著. アントシアニン: 食品の色と健康. 建帛社. 東京.
- Wei, J., H. Miao and Q. Wang. 2011. Effect of glucose on glucosinolates, antioxidants and metabolic enzymes in *Brassica* sprouts. Scientia Horti. 129: 535–540.
- Werck-Reichhart, D., S. Bak and S. Paquette. 2002. Cytochromes P450. Arabidopsis Book. (<http://dx.doi.org/10.1199/tab.0028>).

- Yuan, Y., Chiu LW, Li L. 2009. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage. *Planta* 230:1141–1153.
- Zufall, R. A. and M. D. Rausher. 2003. The genetic basis of a flower color polymorphism in the common morning glory (*Ipomoea purpurea*). *J. Hered.* 94:442–448.

Summary

“Izumo orochi daikon,” ‘Susano’ is a newly developed, pungent and savory local radish variety that has been domesticated from the Japanese wild radish (*Raphanus sativus* L. f. *raphanistroides* Makino) which occurs in the Izumo region of Shimane prefecture. To extend the appeal of this variety to color dishes with natural pigments, we bred for color-fixing of purple and red roots that accumulate cyanidin and pelargonidin as their main anthocyanidins. To establish root color characteristics, purple and red root mass selection breeding lines were established by crossing with colored root parental cultivars. The stability of these characteristics, root components, and food functionality were evaluated. Anthocyanin biosynthesis-related genes were characterized to establish the relationship between *F3'H* and root color pigment. Moreover, a mutant *F3'H* allele-based marker can function as a breeding tool for colored root radish. Our results pertaining to the breeding trial and the isolation of a DNA marker for root color are presented below.

1. Breeding and characterization of purple and red roots for “Izumo orochi daikon”

Purple and red pigmentation was successfully introduced into “Izumo orochi daikon” through the crossing and mass selection of purple radish ‘Karaine aka’ and red radish ‘Chouan aomaru koshin’. In the M_{10} generation, 80% of individuals had colored roots. Pigment composition, isothiocyanate and soluble solid content, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in the root were investigated. The main anthocyanins in the deep reddish purple colored purple root lines were acylated cyanidin

3-sophoroside-5-glucosides, and those in the vivid purplish red colored red root lines were acylated pelargonidin 3-sophoroside-5-glucosides, which corresponded to the main root anthocyanins in their respectively colored parental cultivars. The isothiocyanates and soluble solid content in the purple and red root lines was similar to that in 'Susanoo'. The DPPH radical scavenging activity of the purple and red root lines was almost two times higher than that of 'Susanoo', and seven to ten times higher than that of 'Taibyō soubutori'. These results showed that purple and red roots "Izumo orochi daikon" give a pungently flavored radish with similar anthocyanins to those of parent cultivars.

2. Analysis of anthocyanin biosynthesis-related genes and development of a DNA marker for root color in radishes

Anthocyanin and its biosynthesis-related genes were investigated in purple, red, and white radishes. Cyanidin-based anthocyanin accumulated in purple radishes and pelargonidin-based anthocyanin in red radishes, while anthocyanins were absent in white radishes. Genes related to anthocyanin biosynthesis were isolated in the root skin of the purple radish, and their expression was analyzed in purple, red and white radishes. The following partial- or full-length cDNA sequences of six structural genes related to anthocyanin biosynthesis were isolated from root epidermis of the purple radish: *chalcone synthase* (CHS), *flavonon 3-hydroxylase* (F3H), *flavonoid 3'-hydroxylase* (F3'H), *dihydroflavonol reductase* (DFR), *anthocyanidin synthase* (ANS) and MYB transcription factor. The expression of these six genes was detected in purple radish, whereas F3'H expression was not found in red radishes, and DFR, ANS and MYB expression was not found in white radishes. In structure analysis, a retrotransposon, *gypsy-Ty3*, was identified in the

first exon of the *F3'H* homolog in the red radishes. These results indicated that the lack of *F3'H* function due to the retrotransposon insertion contributed to pelargonidin-based anthocyanin accumulation in the red radishes. A mutant *F3'H* allele-based marker was developed, and multiplex-PCR was performed to investigate the *F3'H* allele in several cultivars, purple and red root breeding lines, and progenies of red radish and 'Susanoo'. A normal allele 450-bp fragment was amplified in cultivars such as purple-, white-, green-, and black-root radishes, whereas only a mutant allele 750-bp fragment was amplified in red-root radishes. In progenies of red radish 'Chouan aomaru koshin' and 'Susanoo', almost all F₁ progenies had purple roots with normal and mutant allele fragments. In their F₂ progenies, purple root individuals exhibited amplified two band patterns with either normal allele or both normal and mutant allele fragments, whereas red root individuals exhibited amplified one band patterns of solely mutant allele fragments. In contrast, white root individuals showed three band patterns. This gene-based DNA selection marker can detect mutant *F3'H* alleles linked with colored root characteristics and is a useful breeding tool for colored root radish, including purple and red roots, in the "Izumo orochi daikon" radish variety.

本論文の基礎となった学会誌公表論文リスト

第 2 章

Takanori Masukawa, Masayuki Kadowaki, Toshikazu Matsumoto, Akira Nakatsuka, Kyeong-Seong Cheon, Kazuhisa Kato, Fumi Tatsuzawa and Nobuo Kobayashi. 2018. Enhancement of Food Functionality of Local Pungent Radish “Izumo Orochi Daikon” ‘Susanoo’ by Introduction of a Colored root Character. Hort. J. (doi: 10.2503/hortj.OKD-132).

第 3 章第 1 節

Takanori Masukawa, Kyeong-Seong Cheon, Daiki Mizuta, Akira Nakatsuka and Nobuo Kobayashi. 2018. Insertion of a Retrotransposon into a *Flavonoid 3'-hydroxylase* Homolog Confers the Red Root Character in the Radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* L. H. Bailey). Hort. J. 87:89–96.

謝辞

本研究の遂行と本論文の取りまとめにあたり、終始ご指導、ご鞭撻をいただいた島根大学生物資源科学部教授 小林伸雄博士に心より感謝の意を表する。

さらに、本研究の遂行と本論文の作成にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜った島根大学生物資源科学部准教授 門脇正行博士, 中務 明博士に心より感謝の意を表する。

加えて、本研究の遂行と本論文の作成にあたり、貴重なご助言ならびにご高閲の労を賜った山口大学農学部教授 執行正義博士に心より感謝の意を表する。

第2章第2節のアントシアニン組成を分析していただき、さらに、貴重なご助言とご激励を賜った岩手大学農学部准教授 立澤文見博士に深く感謝の意を表する。

第2章の取りまとめにあたり、貴重なご助言とご激励を賜った東北大学大学院農学研究科准教授 加藤一幾博士に深く感謝の意を表する。

第3章第1節のアントシアニジン进行分析していただき、さらに、貴重なご助言とご激励を賜った日本大学生物資源科学部特任講師 水田大輝博士に深く感謝の意を表する。

実験技術に関するご指導に加え、貴重なご助言とご激励を賜った島根大学生物資源科学部教授 松本敏一博士に深く感謝の意を表する。

実験技術に関するご指導に加え、有益なご助言とご激励を賜った Genomics Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA 研究員 千慶晟博士に深く感謝の意を表する。

そして、紫系および赤系「出雲おろち大根」の栽培にあたりご協力賜わった島根大学生物資源科学部附属生物資源教育研究センター農業生産科学部門・技術専門職員の武田久男氏，安田 登氏に深く感謝の意を表する．

さらに，島根大学生物資源科学部育種学分野の学生各位のご協力をいただいた．深く感謝の意を表する．

加えて，島根大学生物資源科学部の諸先生方，ならびに学生各位のご協力をいただいた．深く感謝の意を表する．

最後に，家族や友人をはじめ，私とこの研究室を支えて下さったすべての方々に心より 感謝の意を表する．

平成 30 年

柘川貴紀