

(様式第 1 4 号)

学 位 論 文 要 約

氏名: 柘川 貴紀

題目:

(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)

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

土漏能 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), アントシアニジン合成酵素 (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ジ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 はペラルゴニジ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, シアニジ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, ペラルゴニジ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 *F3H* 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: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 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、魚料理の美味に最適! 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取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。七分根の多い形状は出雲神話の「八咫大蛇(ヤマタノオロチ)」を彷彿とさせ、「オロチ」にて、食べると独特な刺激があることから「出雲おろち大根」と命名しました。

島大
ラボ

●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 島根県松江市上本庄町2059
TEL.0852-34-0311 FAX.0852-34-1823

極辛旨味
島根大学発
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

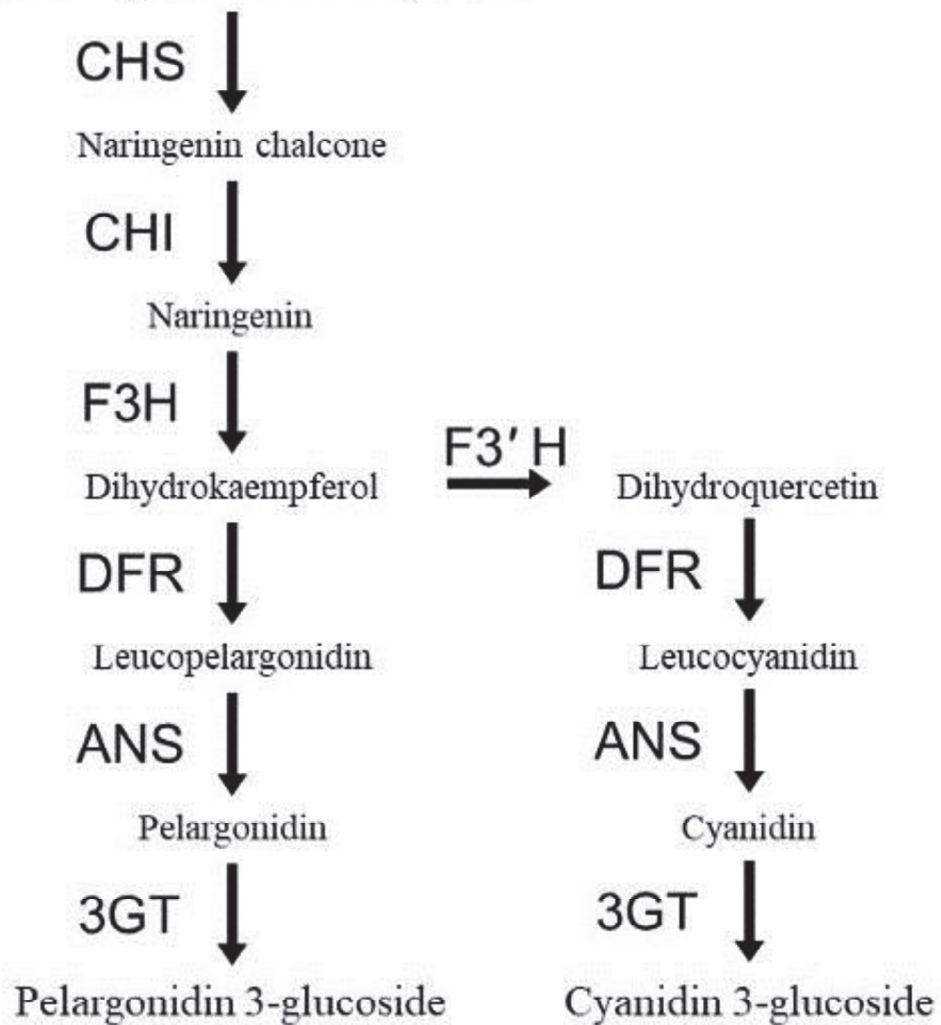


Fig.1-2. Anthocyanin biosynthetic pathway. Enzyme abbreviations: ANS, anthocyanidin synthase; CHI, chalcone isomerase; CHS, chalcone synthase; DFR, dihydroflavonol reductase; F3H, flavonone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; 3GT, flavonoid 3-glucosyltransferase.

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 F₁ を得た。2007年に紫色の根部着色を

示す F₁ 約 7 個体から自然受粉により集団選抜第 1 世代 (M₁) 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 M₁ 約 7 個体を選抜し, 自然受粉により M₂ 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 (M₃)。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 M₄~M₁₀ を得た。一方, 2012 年に紫系統および赤系統の M₅ 集団から根部着色を示す個体をそれぞれ選抜し, 蕾受粉により自殖第 1 世代 (S₁) を得た。2013~2016 年は両系統ともに根部着色を示す個体の蕾受粉により自殖系統の S₂~S₅ 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 M₆~M₁₀ と自殖系統 S₁~S₅ 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.

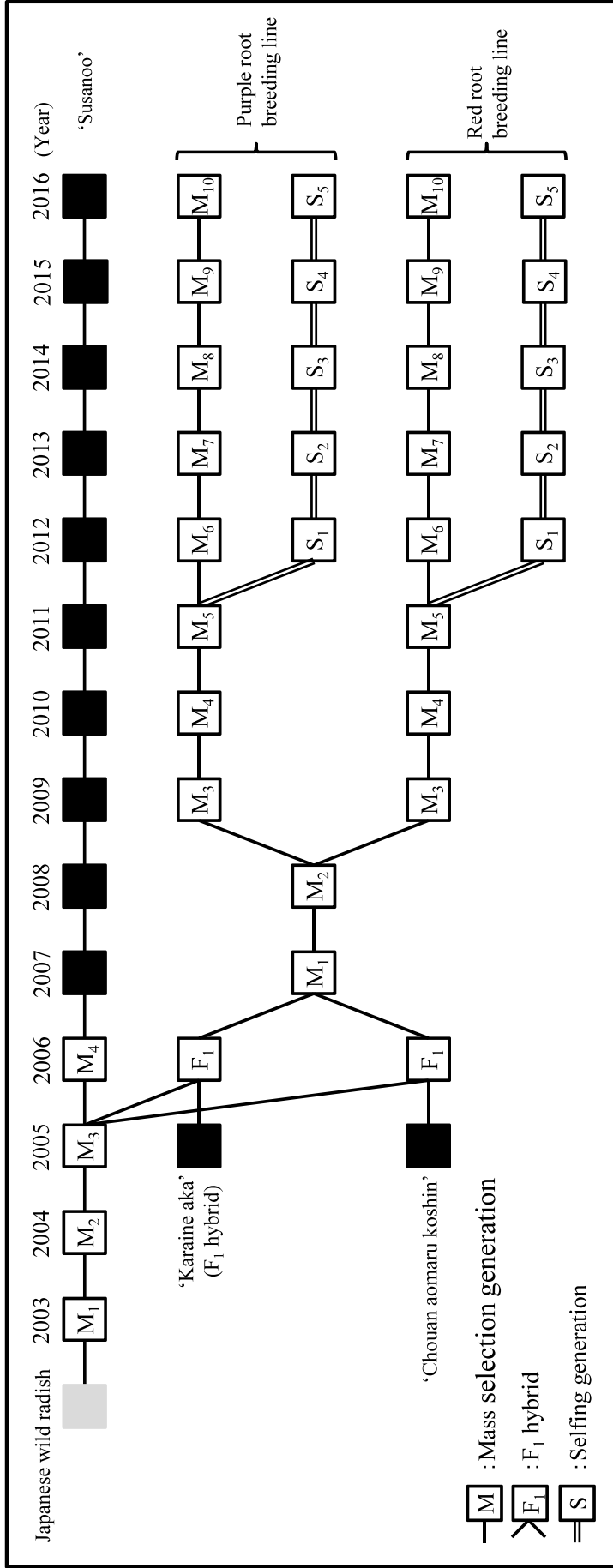


Fig. 2-1-1. Genealogical chart of purple- and red-root breeding lines. Gray, black and white boxes indicate wild species, cultivars and breeding lines, respectively.

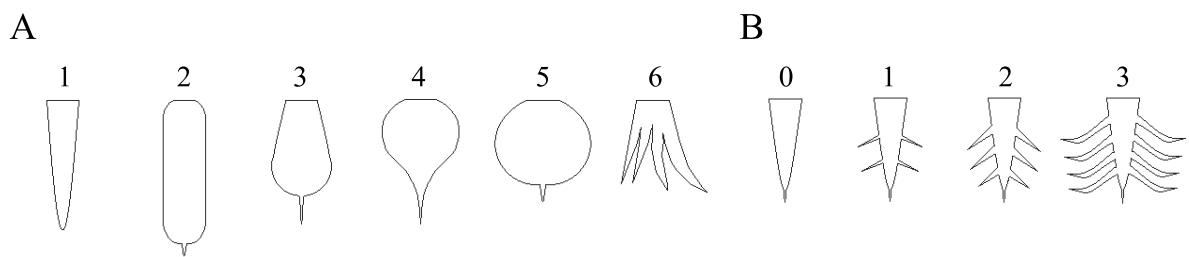


Fig. 2-1-2. Evaluation of root shape. A is taproot shape. 1: Kameido type, 2: Taibyō type, 3: Nezumi type, 4: Koshin type, 5: Shogoin type, 6: Kikon type. B is branched root level (0, 1, 2, 3).

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 M₆～M₈において，すべての個体が切れ葉を示した．主根型は，M₆～M₁₀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，M₆～M₁₀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，M₆～M₁₀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 M₆～M₁₀ 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 S₁～S₅ 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 M₆～M₁₀ 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 S₁～S₅ 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、集団選抜および蕾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現すること、さらに紫系統において赤色個体が発現することから、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の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オ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 $38.2 \pm 9.29 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$, 2014 年では $25.7 \pm 4.35 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$) は ‘スサノオ’ (2013 年では $52.8 \pm 3.14 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$, 2014 年では $37.5 \pm 6.85 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$,) や ‘辛丸’ (2013 年では $31.7 \pm 4.74 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$, 2014 年では $46.2 \pm 4.62 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$) と同等であり, ‘耐病総太り’ (2013 年では $13.7 \pm 1.22 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$, 2014 年では $22.5 \pm 1.89 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$) や交配親品種 (‘からいね赤’ は $29.0 \pm 1.57 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$, ‘長安青丸紅心’ は $23.0 \pm 1.57 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$) 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 ($26.5 \pm 1.37 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$) では ‘スサノオ’ よりも有意に低かったが, 2014 年 ($28.3 \pm 1.98 \text{ mg}/100 \text{ g juice}$) 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 $6.6 A_{520-0.25A_{657}}/100\text{gFW}$) では ‘長安青丸紅心’ ($6.3 \pm 0.05 A_{520-0.25A_{657}}/100\text{gFW}$) と同等の傾向を示した (Fig. 2-2-4). ‘スサノオ’ (2013 年では $121.3 \pm 6.40 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$, 2014 年では $146.1 \pm 20.57 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$) の DPPH ラジカル消去活性は, ‘辛丸’ (2013 年では $91.3 \pm 3.11 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$, 2014 年では $162.1 \pm 23.62 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$) ‘からいね赤’ ($130.9 \pm 24.83 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$) および ‘長安青丸紅心’ ($117.7 \pm 3.50 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$) と同等であった. 一方, 紫系統 (2013 年では $255.1 \pm 20.92 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$, 2014 年では $276.0 \pm 27.20 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$) および赤系統 (2013 年では $250.1 \pm 19.22 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$, 2014 年では $287.8 \pm 22.76 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$) 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 $25.7 \pm 7.19 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$, 2014 年では $40.6 \pm 3.60 \mu\text{mol Trolox eq}/100\text{gFW}$) 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 ^v
'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.

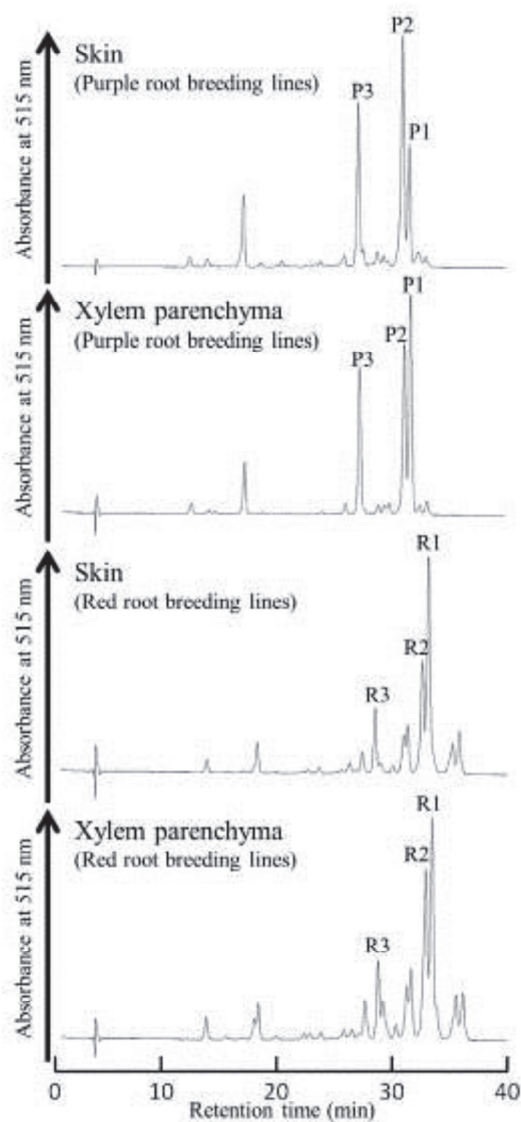


Fig.2-2-2. HPLC chromatograms of anthocyanin pigments in root skin and xylem parenchyma of purple- and red-root breeding lines. Peaks are as follows; P1: Cyanidin 3-[2-(glucosyl)-6-(trans-p-coumaroyl)-glucoside]-5-[6-(malonyl)-glucoside], P2: Cyanidin 3-[2-(glucosyl)-6-(trans-feruloyl)-glucoside]-5-[6-(malonyl)-glucoside],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

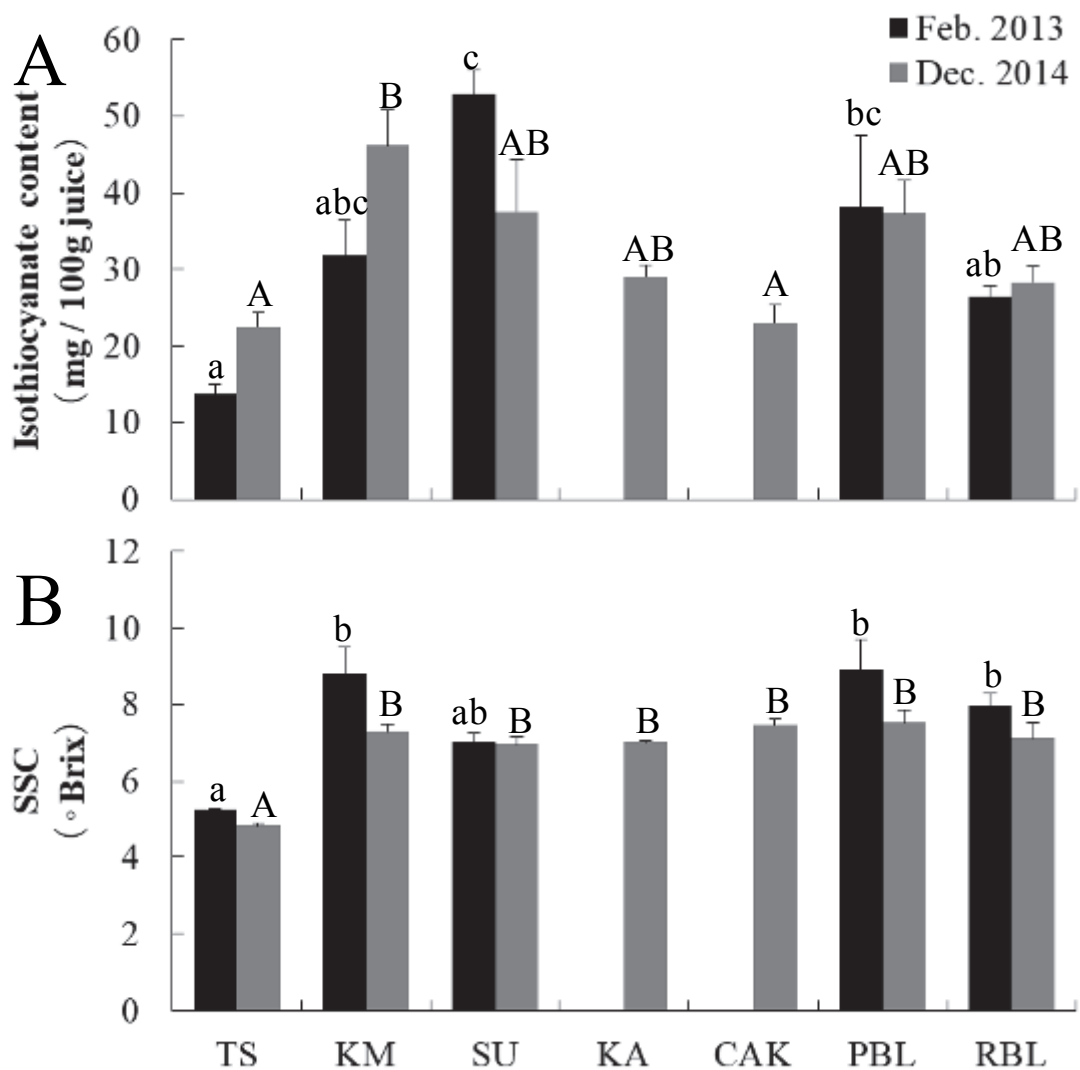


Fig. 2-2-3. Isothiocyanate content (A) and soluble solids content (SSC; B) in ‘Taibyō soubutori’ (TS), ‘Karamaru’ (KM), ‘Susanoo’ (SU), ‘Karine aka’ (KA), ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK), and purple and red root breeding lines (PBL and RBL). Bars are standard error (n=3). Different letters indicate significant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

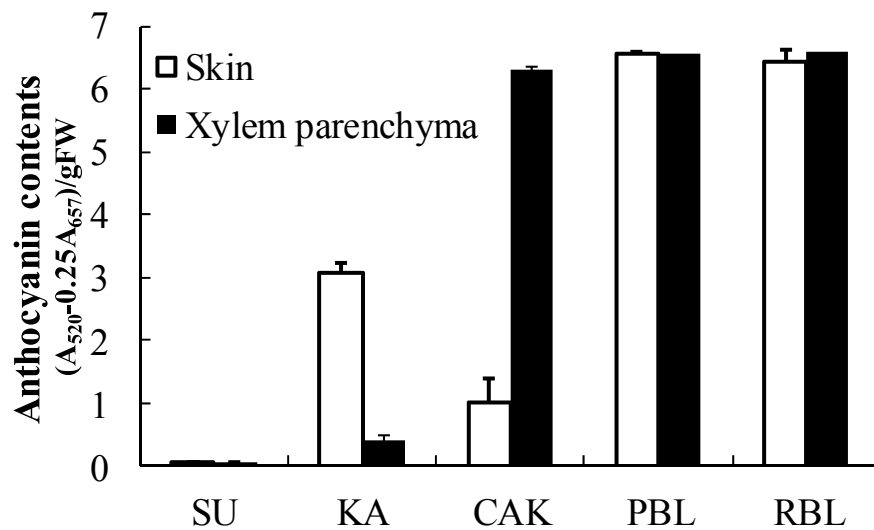


Fig. 2-2-4. Anthocyanin contents of root skin and xylem parenchyma in ‘Susanoo’ (SU), ‘Karine aka’ (KA), ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK), and purple and red root breeding lines (PBL and RBL). Bars are standard error (n=3).

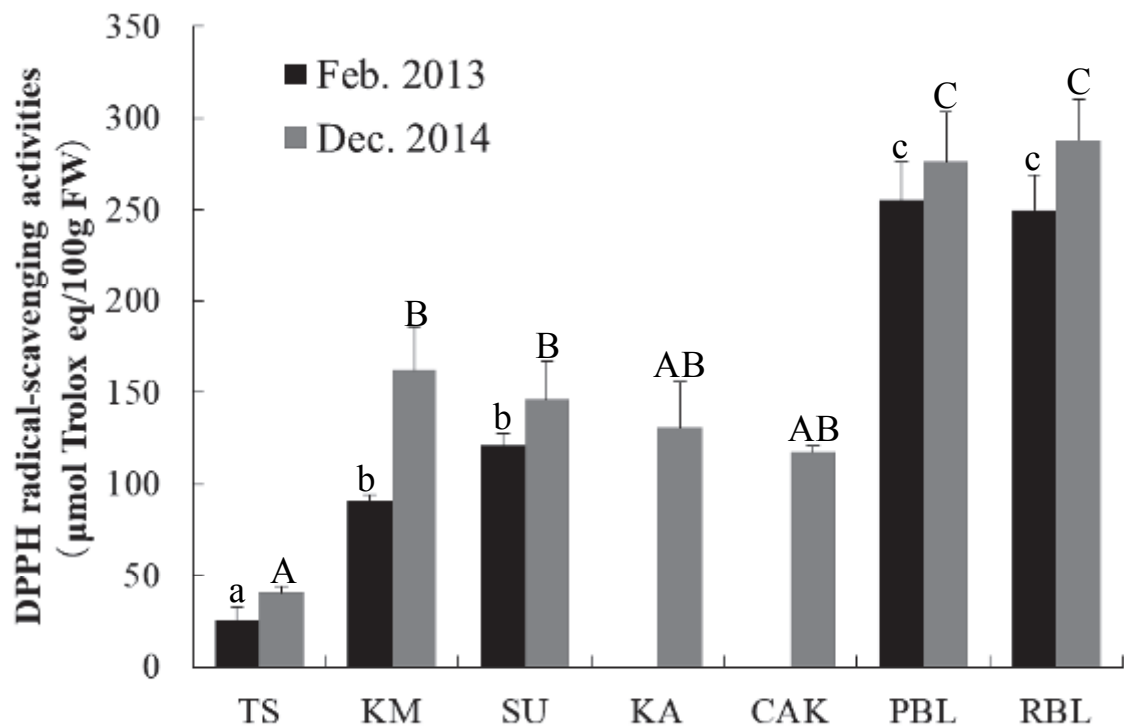


Fig. 2-2-5. DPPH radical scavenging activity of ‘Taibyso soubutori’ (TS), ‘Karamaru’ (KM), ‘Susanoo’ (SU), ‘Karaine aka’ (KA), ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK) and purple and red root breeding lines (PBL and RBL) in 2013 and 2014. Bars are standard error (n=3). Different letters indicate significant differences 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¹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², 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³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’⁴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). ‘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った (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

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。

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. アントシアニン分析

アントシアニン抽出は 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ンとペラルゴニン (Extrasynthese, Genay, France) を使用した。

アントシアニ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 1 μ g 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) を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 \times 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 10 μ L とした。PCR 反応条件は 94 $^{\circ}$ C で 2 分間に続き、94 $^{\circ}$ C30 秒、57 $^{\circ}$ C30 秒、72 $^{\circ}$ C1 分 30 秒を 35 サイクル反復後、72 $^{\circ}$ 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 は以下の通りに行った；Total DNA 500 ng に *Eco*RI を用いて 37 $^{\circ}$ 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 \times 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 10 μ L とした。PCR 反応条件は 94 $^{\circ}$ C で 2 分間に続き、94 $^{\circ}$ C30 秒、55 $^{\circ}$ C (1st PCR) / 51 $^{\circ}$ C (2nd PCR) 30 秒、72 $^{\circ}$ C3 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 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 \times 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 98 $^{\circ}$ C で 5 分間に続き、98 $^{\circ}$ C10 秒、57 $^{\circ}$ C5 秒、68 $^{\circ}$ C3 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-Taq0.25U を添加し，72°C30 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 1 μ L の cDNA, 0.5units の Ex Taq (TaKaRa), 1 \times PCR buffer (TaKaRa), 200 μ M の各 dNTP および 0.2 μ M の各プライマーとし, 液全量を 20 μ L 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 \times 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 1 μ L の cDNA, 10 μ L の SYBR Premix Ex-Taq II (TaKaRa) と 0.25 μ M の各プライマーとし, 液全量を 20 μ L 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*)

162°C (*MYB*) /56°C (26*S*) 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 $\{\Delta Ct$ (ターゲット遺伝子) $-\Delta Ct$ (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), 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 94°Cで 2 分間に続き, 94°C30 秒, 57°C (P1-P2) /57°C (P3-P4) 30 秒, 72°C5 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 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。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	GTAGCAATACTTTCACAAACATTTTTGG
<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	GGGCTTGGGTCTGTTTAAAC

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)。

アントシアニジン分析

シアニジンは‘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). 赤色品種における 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).

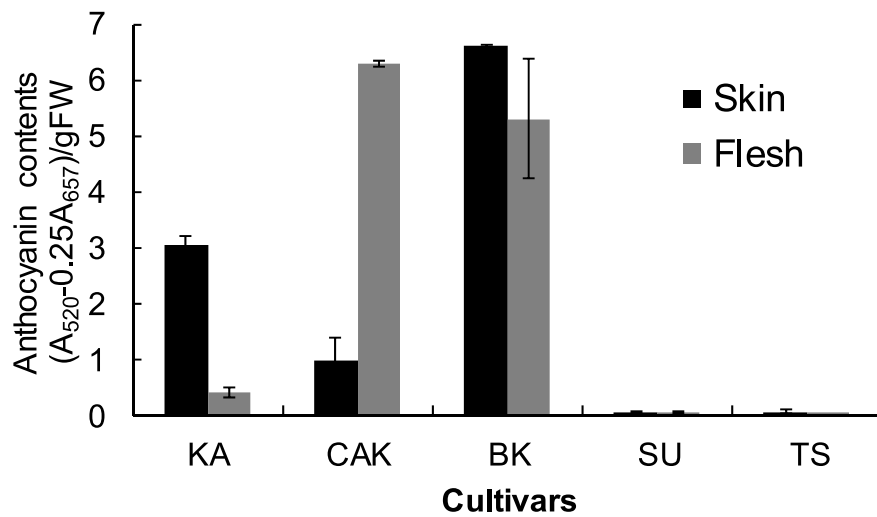


Fig. 3-1-2. Anthocyanin contents in the skin and flesh of ‘Karine aka’ (KA), ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK), ‘Benikururi 521’ (BK), ‘Susanoo’ (SU), and ‘Taibyso subutori’ (TS). Bars indicate standard errors.

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 ATGACTAATCTCTCTCCTCACAACTCTCTCCCTACTTTTCATCTTCTTATTGCGTCTTATCTCGCCGCGCAACAACCGTCTCCCTCCCGGTCCAAACCCATGGCCCATCATCGGG 120
F3'H-b 1 ATGACTAATCTCTCTCCTCACAACTCTCTCCCTACTTTTCATCTTCTTATTGCGTCTTATCTCGCCGCGCAACAACCGTCTCCCTCCCGGTCCAAACCCATGGCCCATCATCGGG 120

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

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

F3'H-a 361 TGGAGAATGTTGAGGAAGATTAGTCTGTTCATTATTTTTCAGTAAAGCTCTTGGAGATTTTAAAGATHTTGGACGGAAGAGGTTGGAAACACTCATGCCGAGCTAGCCGCTGCAAAC 480
F3'H-b 361 TGGAGAATGTTGAGGAAGATTAGTCTGTTCATTATTTTTCAGTAAAGCTCTTGGAGATTTTAAAGATHTTGGACGGAAGAGGTTGGAAACACTCATGCCGAGCTAGCCGCTGCAAAC 480

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B

```

AtF3'H 1 MATLRLTILLAVLFLLRIFSRRRNRIPGPNPWFITGNLPHMGKPHFTLSAMVVTYGPILHLRLGFVIVVAASKSVAEQFL 90
BrF3'H 1 MTNLVLTILLFTFLVVLVLSRRN----NRI PPGPNPWFITGNLPHMGKPHFTLDAMVVTYGPILHLRLGFADVVAASKSVAEQFL 86
RsF3'H-a 1 MTNLVLTILLFTFLVVLVLSRRN----NRI PPGPNPWFITGNLPHMGKPHFTLDAMVVTYGPILHLRLGFADVVAASKSVAEQFL 86
RsF3'H-b 1 MTNLVLTILLFTFLVVLVLSRRN----NRI PPGPNPWFITGNLPHMGKPHFTLDAMVVTYGPILHLRLGFADVVAASKSVAEQFL 86

AtF3'H 91 KIHDFANFASRPNSGAKHMAYNQDILVFAPYGRWRWLRKISSVHLFSAKALEDFKHVRQEEVGTLMRELARANTKEPVNLGOLVNMVVDN 180
BrF3'H 87 KVHDFANFASRPNSGAKHMAYNQDILVFAPYGRWRWLRKISSVHLFSAKALEDFKHVRQEEVGTLMRELARANTKEPVNLGOLVNMVVDN 176
RsF3'H-a 87 KVHDFANFASRPNSGAKHMAYNQDILVFAPYGRWRWLRKISSVHLFSAKALEDFKHVRQEEVGTLMRELARANTKEPVNLGOLVNMVVDN 176
RsF3'H-b 87 KVHDFANFASRPNSGAKHMAYNQDILVFAPYGRWRWLRKISSVHLFSAKALEDFKHVRQEEVGTLMRELARANTKEPVNLGOLVNMVVDN 176

AtF3'H 181 ALGREMIGRRLFGADHKAEEFRSMVTEMMALAGVNIIDGVFPLDLDLQGVAGKMKRLHHRFDFLSITLHEHE--MNGDQDKHTDM 268
BrF3'H 177 ALGREMIGRRLFGADHKAEEFRSMVTEMMALAGVNIIDGVFPLDLDLQGVAGKMKRLHHRFDFLSITLHEHE--MNGDQDKDKHTDM 266
RsF3'H-a 177 ALGREMIGRRLFGADHKAEEFRSMVTEMMALAGVNIIDGVFPLDLDLQGVAGKMKRLHHRFDFLSITLHEHE--MNGDQDKDKHTDM 266
RsF3'H-b 177 ALGREMIGRRLFGADHKAEEFRSMVTEMMALAGVNIIDGVFPLDLDLQGVAGKMKRLHHRFDFLSITLHEHE--MNGDQDKDKHTDM 266

AtF3'H 269 LSTLISLKGTDDEGGSLTDTTEIKALLNMFAGTDTSASTVDWAI AELIRHEELMVKACELDLIVVKGSELPFELIIFGAGRRI CAG 358
BrF3'H 267 LSTLISLKGTDDEGGSLTDTTEIKALLNMFAGTDTSASTVDWAI AELIRHEELMVKACELDLIVVKGSELPFELIIFGAGRRI CAG 356
RsF3'H-a 267 LSTLISLKGTDDEGGSLTDTTEIKALLNMFAGTDTSASTVDWAI AELIRHEELMVKACELDLIVVKGSELPFELIIFGAGRRI CAG 356
RsF3'H-b 267 LSTLISLKGTDDEGGSLTDTTEIKALLNMFAGTDTSASTVDWAI AELIRHEELMVKACELDLIVVKGSELPFELIIFGAGRRI CAG 356

AtF3'H 359 VFAHPPPLSLPHIASCEINGVHIPKGSLLTNIWAIAIPDQWSDPLIFRPERFLPGEKAGVDVKGSELPFELIIFGAGRRI CAG 448
BrF3'H 357 VFAHPPPLSLPHIASCEINGVHIPKGSLLTNIWAIAIPDQWSDPLIFRPERFLPGEKAGVDVKGSELPFELIIFGAGRRI CAG 446
RsF3'H-a 357 VFAHPPPLSLPHIASCEINGVHIPKGSLLTNIWAIAIPDQWSDPLIFRPERFLPGEKAGVDVKGSELPFELIIFGAGRRI CAG 446
RsF3'H-b 357 VFAHPPPLSLPHIASCEINGVHIPKGSLLTNIWAIAIPDQWSDPLIFRPERFLPGEKAGVDVKGSELPFELIIFGAGRRI CAG 446

AtF3'H 449 SLGLRTIQTLTATLVGGEDELAGGTPPEKLNMEEYGLTFLORAVPLVVHPKRLDMSAYGLGSA 513
BrF3'H 447 SLGLRTIQTLTATLVGGEDELAGGTPPEKLNMEEYGLTFLORAVPLVVHPKRLDMSAYGLGSA 511
RsF3'H-a 447 SLGLRTIQTLTATLVGGEDELAGGTPPEKLNMEEYGLTFLORAVPLVVHPKRLDMSAYGLGSA 511
RsF3'H-b 447 SLGLRTIQTLTATLVGGEDELAGGTPPEKLNMEEYGLTFLORAVPLVVHPKRLDMSAYGLGSA 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 PPGPNPWP, AGTDTS, FGAGRRI CAG, and E-R-R triad residues, and black dashed-line boxes are the F3'H-specific motifs VVVAAS, GGEK, and VDVKG, respectively.

A

M

```

1  ATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGTTGAGAAAAGGTGCATGGACTGCTGAAGAAGATAATCTCTTGAGGCAATGCATTGATAAGTATGGAGAA 90
91  GGGAAATGGCACCAAGTTCCTTTAAGAGCTGGGCTGAATCGGTGCAGGAAGAGTTGTAGACTAAGATGGTGAACATTTTGAAGCCAAGT 180
181 ATCAAGAGAGGGAAACTTAACCTCTGATGAAGTTGATCTTCTTGTTCGCCTTCATAAACTTTTGGGAAACAGGTGGTCTTTAATTGCTGGT 270
271 AGATTACCCGGTCGGACTGCCAATGATGTCAAAAATTACTGGAACACCCATTTGAGTAAGAAACATGAACCAGGTTGCAAGACCCAGATG 360
361 AAAAAAGAAAAGAGAAACATTCCTTCTCTCTACTACACTAGCCCAAAAAATCGACGTTTTCAAACCTCGACCTCGATCCTTCACCGTT 450
451 AACACCGCTGCAGCCATATTATTGGCATGCCAAAACCTGACGTTGTTCTCTATGCCTTCGATCCAACAACCAAAAAATGTTTGTGAA 540
541 AGTATTGCTACATGTAACAAAGATGACGATAAATCTGAGCTTGATAGTAATTTGATGGATGGTCAGAATATGTGGTGGGAGAGTTTGCTA 630
631 AATGAAACCAGATCCAGCTGCCTCTTTCCAGAAGCTACAGCAACAGAAAAAGCGCAACCTCCGCATTTGACGTTGAGCAACTTTGG 720
721 AGCCTGTTAGATGGAGAGACTGGAACCTGA
  
```

B

		← R2	
AtPAP2	1	MEGSSKGL--RKGAWTAEEDSLLRLCIDKYGEGKWHQVPLRAGLNRCRKSCLRLWLNLYLK	58
MdMYB10	1	MEGYNENLSVRKGAWTREEDNLLRQCVIIEGEGKWNQVSYKAGLNRCRKSCLRLWLNLYLK	60
BoMYB2	1	MEGMSKGL--KKGAWTAEEDNLLRQCIDKYGEGKWHQVPLRAGLNRCRKSCLRLWLNLYLK	58
RsMYB	1	MEGLSKGL--RKGAWTAEEDNLLRQCIDKYGEGKWHQVPLRAGLNRCRKSCLRLWLNLYLK	58
		← R3	
AtPAP2	59	PSIKRGRLSNDEVDLLIRLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWNTHLSKKHESSCK	118
MdMYB10	61	PNIKRGDFKEDVDLIIIRLHRLGNRWSLIARRLPRTANAVKNYWNTRLRIDSRMKTVK	120
BoMYB2	59	PSIKRGKLNSEVDLLIRLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWNTHLSKKHEPGC-K	117
RsMYB	59	PSIKRGKLNSEVDLLVRLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWNTHLSKKHEPGC-K	117
AtPAP2	119	SKMCK--KNIISPPPTTPVQKIGVFKPRPRSFSVNNGCSHLNGLPEVDLIPSLGLKK-NN	175
MdMYB10	121	NKSQEMRETNVIRPQPKFNRSYYLSSKEPILDHIQSAEDLSTPPQTSSTKNGNDWWE	180
BoMYB2	118	TQMKK--RNIPCSYTTTACKIDVFKPRPRSFTVNNGCSHINGMAEADIVPLCLGLNDTNN	175
RsMYB	118	TQMKKEKRNIPCSPTTLACKIDVFKPRPRSFTVNNGCSHIIIGMPKPDVVPCLLRSNNTKN	177
AtPAP2	176	VCENSITCNKDDKDDFVNLMNGDNMILENLLENQEADAIVPEATTAEHGATLAFDVE	235
MdMYB10	181	TLLEGEDTFERAAYPSIELEEELFTSEWFDDRLSPRSCANFPEGHSRSEFSFDLWNHS	240
BoMYB2	176	VSENIITCNKDDDKFELVSNLMDGQNRWWSLLEDSQDPAALFPEATATKKGATSAFDVE	235
RsMYB	178	VCESIATCNKDDDKSELDSNLMDGQNMWWSLLENPDPAALFPEATATEKGATSAFDVE	237
AtPAP2	236	QLWSLFDGETVELD	249
MdMYB10	241	KEE-----	243
BoMYB2	236	QLWSLLDGETGT--	247
RsMYB	238	QLWSLLDGETGT--	249

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.

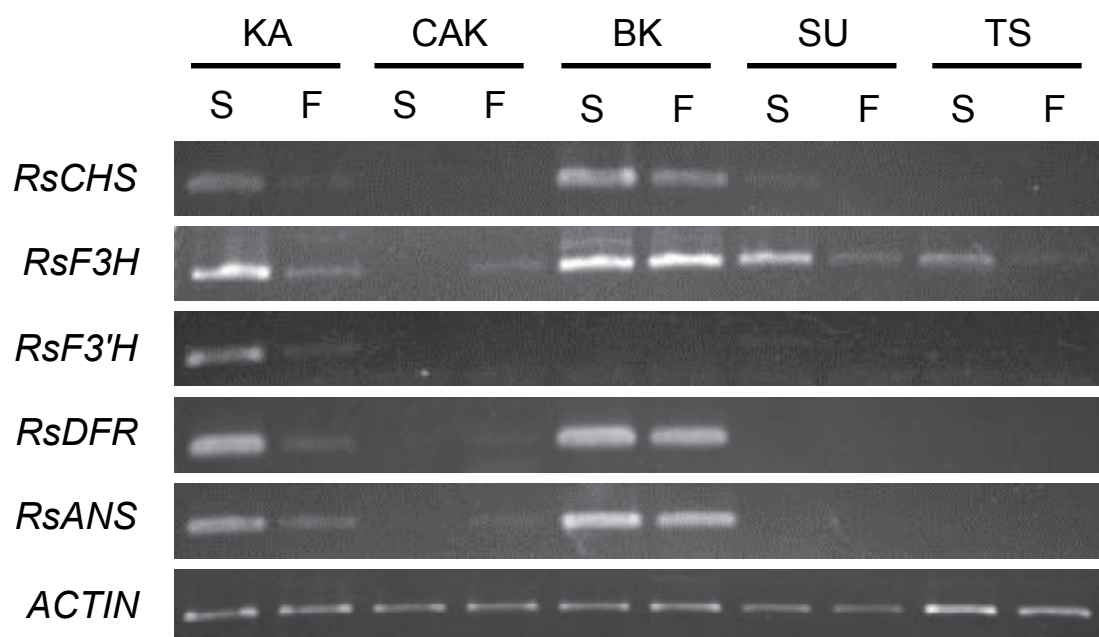


Fig. 3-1-5. Expression analysis of the anthocyanin biosynthesis genes using semi qRT-PCR in the purple root radish ‘Karaine aka’ (KA), red root radishes ‘Chouan aomaru koshin’ (CAK) and ‘Benikururi 521’ (BK), and white root radishes ‘Susanoo’ (SU) and ‘Taibyō soubutori’ (TS). Root skin (S) and flesh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

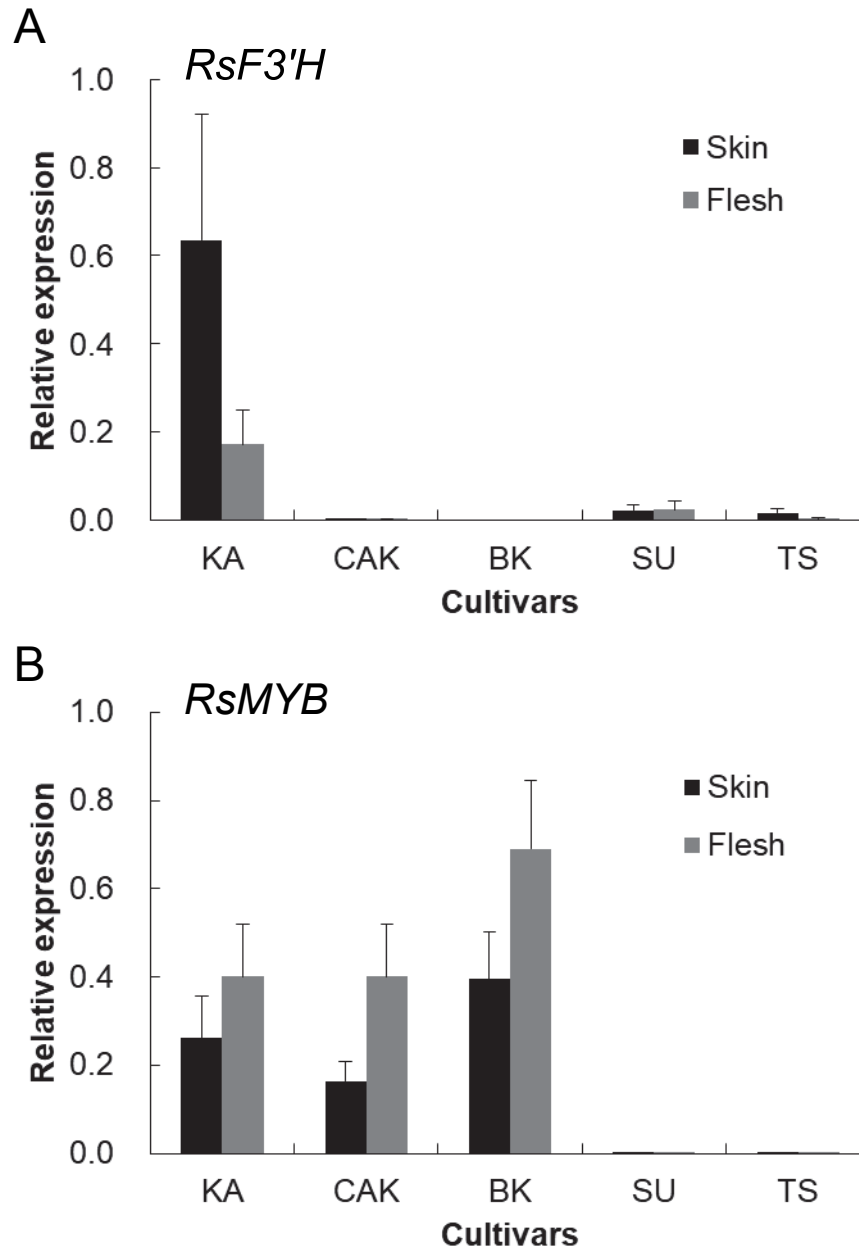


Fig. 3-1-6. Expression analysis of the *RsF3'H* gene (A) and *RsMYB* gene (B) using RT-qPCR in skin and flesh of the purple root radish 'Karaine aka' (KA), red root radishes 'Chouan aomaru koshin' (CAK) and 'Benikururi 521' (BK), and white root radishes 'Susanoo' (SU) and 'Taibyso soubutori' (TS). Radish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

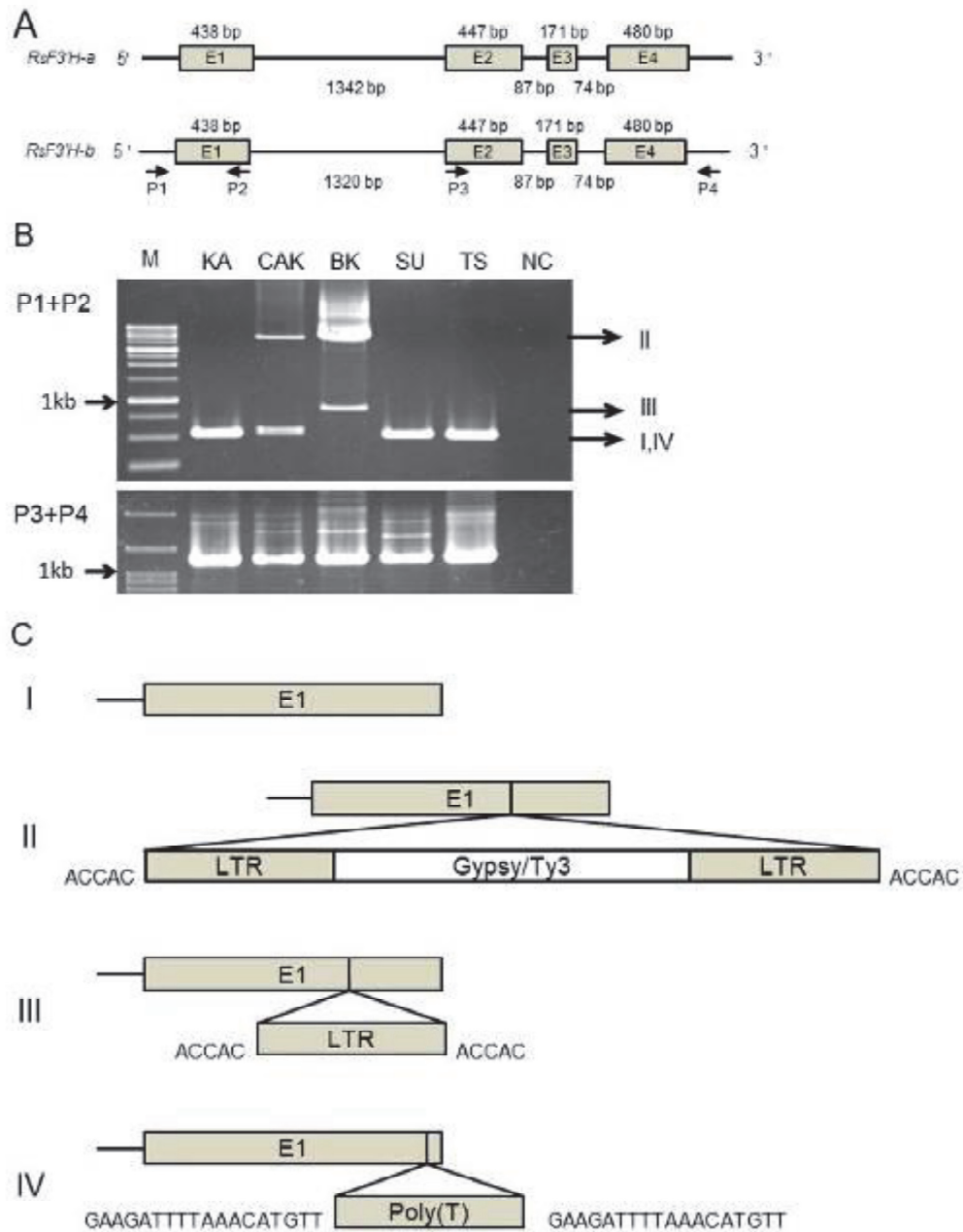


Fig. 3-1-7. Genomic structures of *RsF3'H* genes in radishes. A: Genomic structure of *RsF3'H* genes from 'Karaine-aka'. Closed boxes and E1-E4 indicate exons and first exon-fourth exon, respectively, and lines among exons indicate introns. Numbers of closed boxes (upper) and lines (lower) indicate length 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弁では、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、タバコ花弁では、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3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 M₁₀ 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 $F_3'H$ 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。

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。

※なお、一部図表等を割愛しています。