

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための保存、増殖に関する基盤的研究（H22-創薬総合-指定-015）
分担研究報告書

分担研究課題：新品種育成及び種苗増殖に関する研究
—ハトムギ3系統の栽培比較試験研究—

研究分担者 杉村 康司 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 種子島研究部 研究員
研究協力者 飯田 修 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部 研究リーダー
研究協力者 香月 茂樹 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部 客員研究員

要旨：本研究では、種子島などの九州地域で生産栽培可能なハトムギの系統を検討するため、種子島選抜系統、あきしずく、岡山在来種の3系統の栽培比較試験を行った。その結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 種子島選抜系統は、他の系統に比べて低温下での発芽率が高くかつ成長が比較的早いこと、気候の変化などにあまり影響を受けることなく1株当たりの稔実果実数が安定していることに加えて、稔実率も高い値を維持していること、穂発芽数も少ないこと、病虫害の影響をあまり受けないことなど多くの利点を有していることが明らかになった。
- 2) あきしずくは、他の系統に比べて小型で茎数が多く、脱粒が少なく稔実果実数が多いという優れた特性を持つ一方で、低温下での発芽率が低く、稔実率もやや低い傾向があることが明らかになった。
- 3) 岡山在来種は、全国的に標準となる品種であるが、他の系統に比べて病虫害に弱いことに加えて、季節外れの長雨と日照不足、さらには台風などの気候影響を受けやすい系統と考えられる。
- 4) 種子島選抜系統は、他の系統に比べて環境適応力に優れているが、あきしずくに比べると1株あたりの稔実果実数が少なく収量性がやや低いいため、九州地域に特化した新品種作出のための育種素材として重要性が高い系統であると考えられる。

A. 研究目的

現在日本国内で使用されているハトムギは、中国やタイなどからの輸入品に頼っている部分が多いが、品質面での均一性に欠ける部分があるため、安全性が高く品質が安定した国内生産が期待されている。しかし、ハトムギが栽培されている地域は、北海道や本州の栃木、富山、岡山などに限られており、九州地域においてはあまり栽培されていない。

そこで、本研究では、種子島など九州地域

で生産栽培可能な系統を検討するため、種子島選抜系統、あきしずく、岡山在来種の3系統の栽培比較試験を行って、各種の栽培特性を明らかにした。

B. 研究方法

材料：種子島選抜系統（種子島2009年採取、あきしずく（九州沖縄農業研究センター2011年採取）、岡山在来種（筑波2010年採取）の種子を用いた。

栽培圃場と面積：種子島研究部第9圃場、各

系統15㎡.

栽培方法：条間60cm，株間20cmで2粒ずつ点播した。播種日は，2012年3月17日と4月19日。間引きは，草丈が10cm程度になった時に1本仕立てになるよう行った。

肥料：基肥として，10a当たり堆肥1000kg，苦土石灰100kg，窒素5kg，リン酸10kg，加里15kgを施肥した。追肥として各系統の出穂期に10a当たり窒素5kg，加里5kgを施肥した。

特性調査：2012年3月播種は，各系統の収穫日にあわせて同年8月5,16日，2012年4月播種は同年8月22,23日に実施した。調査項目は，草丈，茎数，主幹節数，稔実果実の粒数，稔実率，稔実果実の乾燥重量，穂発芽数，種子と果実の100粒重ならびに100ml容積重である。

C. 研究結果

1) 3系統の発芽開始日，発芽揃い日，出穂開始日，出穂期，開花開始日，開花盛期を見ると，種子島選抜系統が最も早く，次いであきしずくが早い傾向が見られた。それに対して，岡山在来種は，全体的にやや遅い傾向が見られた(表2)。各系統3月播種の2012年8月1日の生育状況とその後収穫した果実と種子の写真を示す(図1,2)。

2) 種子島選抜系統の発芽率は，播種時期(3月，4月)の違いにかかわらず82%以上と，他の2系統のあきしずく(3月66%，4月91%)と岡山在来(3月47%，4月56%)に比べて高かった(表1)。

3) 系統別の生育特性を表2に示す。各系統別の生育特性を見ると，草丈は，あきしずく<種子島選抜系統<岡山在来種の順に大きく，茎数は，種子島選抜系統≒岡山在来種<あきしずくの順に多く，主幹節数は，種子島選抜系統<あきしずく<岡山在来種の順に多く，3月播種の稔実果実数は，種子島選抜系統<あきしずく<岡山在来種の順に多く，4月播種の稔実果実数は，岡山在来種<種子島選抜系統<あきしずくの順に多く，稔実率は，岡山在来種<あきしずく<種子島選抜系統の順に高く，稔実果実の乾燥重量は，種子

島選抜系統≒あきしずく<岡山在来の順に多く，穂発芽数は，あきしずく≒岡山在来種≒種子島選抜系統とほぼ同じで少ない傾向が見られた。このように，種子島選抜系統は，他の2系統(あきしずく，岡山在来種)と比べると，茎数と主幹節数がやや少なく1株あたりの稔実果実数が少ないが，稔実率が80%以上と高い傾向が見られた(表2)。

4) 播種時期別の生育特性を見ると，種子島選抜系統は，他の2系統(あきしずく，岡山在来種)と比べて，稔実率と稔実果実数が3月と4月の播種時期の違いにあまり影響を受けず安定している傾向が見られた(表2)

5) 各系統別の果実ならびに種子の乾燥重量を見ると，果実の100粒重は，あきしずく≒岡山在来種<種子島選抜系統の順に重く，種子の100粒重は，あきしずく<岡山在来種<種子島選抜系統の順に重い傾向が見られた。それに対して，果実と種子の100ml容積重は，岡山在来種<あきしずく<種子島選抜系統の順に重い傾向が見られた(表3)。

6) 播種時期別の果実ならびに種子の乾燥重量を見ると，果実と種子の100粒重ならびに100ml容積重ともに，3月播種に比べて4月播種の方が軽くなる傾向が見られた(表3)。

D. 考察

1) 種子島選抜系統は，他の2系統に比べて低温下での発芽率が高く成長が比較的早いこと，1株あたりの稔実果実数が気候の変化などにあまり影響を受けることなく安定していることに加えて，稔実率が高く穂発芽数が少ないこと，果実の形状が整っていること，病虫害の影響をあまり受けないことなどの多くの利点を有していることが明らかになった。このように，種子島選抜系統は，他の系統に比べて環境適応力に優れている。しかし，あきしずくに比べると1株あたりの稔実果実数が少なく収量性がやや低いため，九州地域に特化した新品種作出のための育種素材として重要性が高い系統であると考えられる(表1,2,3)。

2) あきしずくは，小型で茎数が多い，脱粒が少なく稔実果実数が多いという優れた特

性を持つ一方で、低温下での発芽率が低く、稔実率もやや低い傾向が見られた。さらに、4月播種が開花結実する6月下旬から7月にかけて天候が悪かった影響を受けて、3月播種よりも4月播種の稔実果実数が少なく、稔実率も低下していた。これは、気候の変化などに対する環境適応力が低いためだと考えられる。

3) 岡山在来種は、植物体が大型になり果実と種子の大きさも3系統の中では最も大きくなる系統のため、うまく栽培することができれば収量が高くなると予想された。しかし、3月、4月ともに発芽率が低いことに加えて、稔実果実数のばらつきが大きいこと、さらに、不稔果実数が多く稔実率が低かった。特に、4月播種は稔実率が48.2%と極めて低い値になった。これは、岡山在来種が他の2系統に比べて病害虫に弱いことに加えて、季節外れの長雨と日照不足、さらには台風などの気候影響を受けやすく登熟できなかつたためだと考えられる。

E. 結論

種子島選抜系統は、他の系統に比べて環境適応力に優れているが、あきしづくに比べると1株あたりの稔実果実数が少なく収量性がやや低いため、九州地域に特化した新品種作出のための育種素材として重要性が高い

系統であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 ハトムギ3系統の栽培概要(2012年種子島栽培における播種日、収穫日および生育相)

系統名(播種月)	播種日	発芽率	発芽開始日	発芽揃い日	出穂開始日	出穂期	開花開始日	開花盛期	収穫日
種子島選抜系統(3月)	3/17	82%	3/29	4/10	5/28	6/3	6/10	6/17	8/6
種子島選抜系統(4月)	4/19	90%	4/27	5/8	6/10	6/17	6/23	6/28	8/23
あきしづく(3月)	3/17	66%	4/1	4/17	6/3	6/9	6/14	6/20	8/17
あきしづく(4月)	4/19	91%	4/28	5/10	6/14	6/23	6/28	7/7	8/24
岡山在来種(3月)	3/17	47%	4/1	4/16	6/5	6/11	6/18	6/26	8/17
岡山在来種(4月)	4/19	56%	4/28	5/9	6/18	6/27	7/2	7/9	8/24

表2 ハトムギ3系統における生育特性(2012年種子島栽培, 1株当たり)

系統名(播種月)	草丈* (cm)	茎数*	主稈 節数*	稔実果実数*	稔実率* (%)	稔実果実 乾燥重量* (g)	穂発芽数*
種子島選抜系統 (3月)	135.8±5.4	10.4±3.4	7.8±0.7	415.6±177.7	80.3±5.3	43.4±19.6	0.2±0.5
種子島選抜系統 (4月)	135.9±7.1	8.8±2.0	8.0±0.7	435.3±145.7	83.4±3.8	44.4±14.6	1.6±2.6
あきしずく (3月)	127.9±8.4	13.4±4.8	7.9±0.6	487.0±168.0	73.1±7.8	47.7±15.1	0.4±0.5
あきしずく (4月)	143.9±5.1	12.5±1.2	8.6±0.5	456.6±104.2	63.9±6.3	42.6±10.1	0.7±1.2
岡山在来種 (3月)	146.8±5.9	10.9±3.7	7.8±0.7	538.2±254.5	65.6±12.2	51.7±26.3	1.1±1.5
岡山在来種 (4月)	158.3±10.9	9.8±2.0	9.8±0.6	347.5±137.9	48.2±9.4	30.9±12.2	0.7±0.9

*: 平均値±標準偏差, n=20

表3 ハトムギ3系統における果実と種子の乾燥重量(2012年種子島栽培)

	100粒重* (g)		100ml容積重* (g)	
	果実**	種子	果実**	種子
種子島選抜系統(3月)	12.23±0.77	7.37±0.44	47.05±0.27	76.34±0.58
種子島選抜系統(4月)	11.55±0.58	6.80±0.32	42.47±0.54	68.52±0.15
あきしずく(3月)	10.99±0.65	6.58±0.31	44.10±0.63	68.60±0.56
あきしずく(4月)	10.69±0.74	6.15±0.37	38.06±0.44	66.56±0.56
岡山在来種(3月)	11.14±1.00	6.78±0.58	38.84±0.26	66.22±0.64
岡山在来種(4月)	10.59±0.48	6.28±0.36	34.81±0.77	64.39±0.24

*: 平均値±標準偏差, 100粒重はn=20, 100ml容積重はn=5

** : 果実は, 稔実果実

種子島選抜系統 3月播種



あきしずく 3月播種



岡山在来種 3月播種



図1 ハトムギ 3月播種, 種子島選抜系統, あきしずく, 岡山在来種の植物体. 種子, 果実の写真(2012.8.1)

種子島選抜系統 4月播種



あきしずく 4月播種



岡山在来種 4月播種



図2 ハトムギ 4月播種, 種子島選抜系統, あきしずく, 岡山在来種の植物体. 種子, 果実の写真(2012.8.1)

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための保存、増
殖に関する基盤的研究（H22-創薬総合-指定-015）
分担研究報告書

分担研究課題：外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究

研究分担者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部

主任研究員 河野 徳昭

研究協力者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部

特任研究員 乾 貴幸

要旨 我々が研究対象とする薬用植物は、一般に形質転換が困難である場合が多い。特に、未分化組織からの再分化の段階が障壁となるケースが多く、そのステップを経ない新規遺伝子導入法は、薬用植物形質転換法のブレークスルーとなる可能性が高い。本研究では、従来法では形質転換が困難であった薬用植物への迅速かつ高効率な遺伝子導入を実現するため、種子への直接遺伝子導入等の形質転換法の薬用植物への適用、最適化について検討し、脱分化、再分化過程を経ない薬用植物への新規遺伝子導入法の開発を行うことを目的とする。本年度は、生薬オウギの基原植物であるナイモウオウギの種子への高効率遺伝子導入を実現するため、前年度までに確立した種子の硬実打破・育成条件並びにエレクトロポレーション条件に従って遺伝子導入を行い、育成植物体における遺伝子導入確認を行った。緑色蛍光タンパク質遺伝子導入の結果、約7%の芽生えにおいてベクターコントロールと比較し顕著な緑色蛍光を認めた。さらに実生の育成を進め、活着植物体の約2%においてPCR法により本葉のゲノムDNAへの緑色蛍光タンパク質遺伝子の導入を確認した。以上の結果は、本手法がナイモウオウギへの遺伝子導入に適用可能であることを示すものである。

A. 研究目的

遺伝子導入技術は、遺伝子の機能解析、及び、得られた有用遺伝子を用いた植物の機能改変において欠くことのできない技術である。植物への遺伝子導入法としては、アグロバクテリウムを介した方法等が知られるが、薬用植物は、一般に形質転換が困難なことが多い。特に、未分化組織からの再分化段階が障壁となるケースが多く、そのステップを経ない高効率で簡便な新たな遺伝子導入法の開発が期待されている。そこで本研究では、(独)農業生物資源研究所 萩尾高志博士のグループが開発した再分化過程を経ない、種

子への遺伝子導入法等を利用し、従来法では形質転換植物の作成が困難であった薬用植物への迅速かつ高効率な新規遺伝子導入法の開発を行う。種子への直接遺伝子導入による形質転換法は、従来法では外来遺伝子の導入・形質転換が困難であった薬用植物へ効率的に遺伝子導入ができる画期的手法として、種々の薬用植物への応用の可能性を有する。

本年度は、従来法による形質転換が困難であり、サポニン類、フラボノイド類を含み、強壮、利尿、血圧降下作用等が知られているマメ科のナイモウオウギにおける種子への高効率直接遺伝子導入法確立のため、前年度

までに確立した方法に従って、蛍光タンパク質遺伝子をエレクトロポレーションにより種子へ導入し、得られた形質転換植物体における導入遺伝子のゲノムDNAへの挿入確認を行った。

B. 研究方法

[プラスミドDNA調製] カナマイシンを含む250 mLのLB培地で37°C、一晚培養した大腸菌より、Pure Yield Plasmid Maxiprep System (Promega) を用いて、プラスミドDNA (pWI-DsRed: 赤色蛍光タンパク質遺伝子導入ベクター、pWI-sGFP: 緑色蛍光タンパク質遺伝子導入ベクター、pWI-MCS: ベクターコントロール) を抽出し、エタノール沈殿後、プラスミドDNA濃度が1 µg/µLになるようにDNase Free水で希釈した。

[硬実打破] 2 mL容のアシストチューブ(非自立)にナイモウオウギの種子50粒をとり、乳鉢・乳棒で均一になるように破碎したビーナスライトの粉末200 mg及びステンレスビーズ2個を加えて、ビーズ破碎装置MS-100(トミー精工)で2,000 rpm、180秒間の処理を2回行った。この際、途中のインターバルの間に種子への力の偏りがないようによく内部を振り混ぜた。

[催芽処理] エレクトロポレーション (EP) buffer 2 mL (/6cm 培養シャーレ) 中に硬実打破した種子約50粒を入れ、20°C、暗所で18時間静置した。

*EP buffer 組成

滅菌水	940 µL
plasmid DNA 溶液	200 µL
1%PVP	500 µL
Silwet L-77	0.5 µL
0.1 M スペルミジン	100 µL
0.1 g/ml セルラーゼ	100 µL
2.5 M CaCl ₂	160 µL
合計	2 mL

[減圧処理] 催芽処理後の種子を氷上で2.5

時間減圧処理 (0.098 MPa 前後) し、プラスミドを含むEP bufferを種子内へ浸透させた。

[EP 処理] 減圧処理後の種子を氷上で冷却した EP 処理用のチャンバー (CUY495P10) に入れ、電極をセットした後、抵抗値が40-50 Ωになるようにキュベット内の EP buffer 量を調節し、下記条件で EP 装置 (CUY21, NEPA GENE) によりパルスを加えた。さらに、氷上で2分間静置した後、電極を逆にして再度同条件でパルスを加えた。

*EP 処理条件

Voltage: 50 V/cm

Pulse: 50 ms square pulse

Interval: 75 ms

Number of pulse: 50

EP 処理した種子を使用した buffer とともに培養シャーレに戻し、氷上で冷却しながら1時間養生した。

[種子洗浄] 有効塩素濃度 0.2% に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液/1% (g/v) ベンレート (3:2) で15分間処理後、滅菌水で3回洗浄した。

有効塩素濃度 0.01% に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液/1% ベンレート (3:2) 混液 5 mL (/6 cm 培養シャーレ) で20°C、暗所で一晚静置した。

有効塩素濃度 0.2% に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液/1% ベンレート (3:2) で5分間洗浄後、滅菌水で3回洗浄した。

[種子の発芽・育成] MilliQ 水で湿らせたビーナスライト (長野県諏訪地区和田峠付近埋蔵の黒曜石を約 1,000°C で焼成発泡した無機質超軽量礫状骨材) 5号上に洗浄種子を静置した。種子へは底面吸水により MilliQ 水を給水し、室温下で育成した。

[実生苗の移植・育成] ビーナスライト上で

発芽、成長した実生苗について本葉が伸長開始した段階で、ビーナスライト7号上あるいはあらかじめ吸水させてからオートクレーブしたジフィーセブン種まき土ポット(直径30 mm、サカタのタネ)へ移植した。土ポットに移植する際は、中心部にあけた穴の中にビーナスライトより取り出した芽生えを乗せ、土をかぶせた後、ポットをアラシステム(BMS)の給水用バット上に並べ、グロースチャンバー室内で、自動灌水装置で1日1回10分間給水し、明期14照明、温度:20°C、相対湿度:60%の条件で育成した。なお、ジフィーポット植出し後1週間程度は、プラスチックカバー等をかぶせることにより湿度を高く保ち馴化を行った。

[芽生えの蛍光観察] 上記条件で種子及び芽生えを育成し、実体蛍光顕微鏡 VG-05 シリーズ(キーエンス)を用いて、緑色蛍光観察には、バンドパスフィルター FF01-513/17-25(励起波長 455-490 nm, 透過中心波長 513 nm, Semrock)を、赤色 α 蛍光観察には、バンドパスフィルター FF01-593/40-25(励起波長 530-560 nm, 透過中心波長 593 nm, Semrock)を使用して実生の各蛍光を観察した。

[ゲノムDNA調製] グロースチャンバー内で育成した形質転換植物体の葉1枚をビーズ破碎装置 MS-100で破碎し、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出した。

[PCRによる導入遺伝子の検出] 上記ゲノムDNAを鋳型に、下記プライマー及び条件にてGoTaq Green Master Mix(Promega)を用いたPCRを行い、1%アガロースゲル電気泳動により、目的遺伝子のゲノムDNAへの挿入を確認した。

PCR 反応液組成: GoTaq Green Master Mix(Promega) 3 μ L、プライマー (Fw, Rv) 各 1 μ L、ゲノムDNA 溶液 1 μ L。

PCR 条件: 94°C 2 min \rightarrow (94°C 30 sec. \rightarrow 60°C 30 sec. \rightarrow 72°C 30 sec) x 30 cycle \rightarrow

72°C 5 min \rightarrow 4°C ∞

プライマー配列は下記のとおり。

(Fw primer) sGFPFw182:

5'-TCG TGA CCA CCT TCA CCT AC-3'

(Rv primer) sGFPRv496:

5'-AGT TCA CCT TGA TGC CGT TC -3'

もしくは、

(Fw primer) NPTII103S:

5'-CAA GAT GGA TTG CAC GCA GGT-3'

(Rv primer) NPTII793A:

5'-AGA AGA ACT CGT CAA GAA GGC-3'

C. 研究結果

遺伝子導入の困難な薬用植物への簡便かつ迅速な遺伝子導入法の開発を目的に、エレクトロポレーション(EP)を用いたナイモウオウギ種子への直接遺伝子導入法の構築を試みた。昨年度までに、ナイモウオウギの種子の硬実打破条件、EP条件、EP処理後の実生の育成条件等の詳細な検討を行い、実生における遺伝子導入を確認した(文献1、2)。本年度は、上記条件検討結果を踏まえ、EP処理後の育成植物体における導入遺伝子の確認を行った。

ベクターコントロール(MCS)導入79粒、緑色蛍光タンパク質遺伝子(sGFP)導入130粒、赤色蛍光タンパク質遺伝子(RFP)導入119粒のナイモウオウギ種子について、EPによる種子への遺伝子導入を行い(表1)、ビーナスライト上で育成を行った結果、EP処理後4日目において、70~80%の種子が発根した(表2)。これら実生について緑色及び赤色蛍光の観察を行った結果、白化した子葉や着色した根等傷害を受けた部位で顕著な自家蛍光を認めた。また、MCS導入系統の健全な実生において、緑色蛍光では比較的自家蛍光が弱かったのに対し、赤色蛍光では強い自家蛍光が認められた。そのため、RFP遺伝子導入系統では強い自家蛍光のため、導入遺伝子による赤色蛍光の有無を判断することができなかった。一方、sGFP遺伝子導入系統では、健全な実生にお

いて約7%の頻度 (9/130 粒) でベクターコントロールの自家蛍光よりも顕著な緑色蛍光を認めた (図1)。

さらに実生の育成を進めた結果、EP処理後14日目において、20~50%の種子で子葉の展開が認められた。これら実生について赤色及び緑色蛍光の観察を行った結果、EP処理後4日目の実生と比較し、葉身部分を除き、緑色蛍光の自家蛍光強度が顕著に増加していた。このため、子葉が展開する程度まで成長した実生において導入遺伝子による蛍光の有無を判断することは困難であった。一方、いずれの遺伝子導入系統にも正常に成長した本葉部分に顕著な蛍光は認められなかった (図2)。

生育が良好で本葉の展開が開始した実生 (MCS: 37個体、sGFP: 48個体、RFP: 40個体) について、ビーナスライトあるいはジフィーセブン種まき土ポットに植出した結果、90%以上の実生が活着し、正常に生育した (図3)。

EP処理後、23~30日目まで本葉が2枚以上展開した実生より、最下位の葉一枚をサンプリングし、ゲノムDNAを抽出し、PCRにより蛍光タンパク質遺伝子のゲノム導入の有無を確認した結果、RFP遺伝子導入系統では、PCR陽性の株を認めなかったが、sGFP遺伝子導入系統ではPCR陽性株1クローンを認めた (1/42個体 ; 2.2%)。なお、遺伝子導入が確認された個体の葉において顕著な緑色蛍光は観察されなかった (図4)。

D. 考察

エレクトロポレーションにより緑色蛍光タンパク質遺伝子をナイモウオウギ種子へ導入した結果、約 7%の実生で顕著な緑色蛍光を観察した。また、活着植物の約 2%で本葉のゲノム DNA への遺伝子導入を確認し、形質転換植物体の作出に成功した。以上の結果及び以前の結果 (文献 3) を合わせると、本エレクトロポレーションを用いた種子への遺伝子直接導入法は、単子葉植物のイネ科ハトムギから、双子葉植物のマメ科のナイモウオウギまで、広範な薬用

植物種に応用可能な方法であることが示唆された。

しかし、PCRにより遺伝子導入が確認された株の葉において顕著な緑色蛍光が確認できなかったことから、今後、導入遺伝子の葉における発現等についても検討する必要があると考えられた。

また、遺伝子導入操作を行わない実生では、緑色蛍光、赤色蛍光ともに顕著な自家蛍光は認められなかったが (文献 2)、エレクトロポレーション処理した実生では、赤色蛍光観察において顕著な自家蛍光が認められた。その一方で、緑色蛍光観察においては自家蛍光が比較的小さかったことから、ナイモウオウギでは、緑色蛍光タンパク質遺伝子の方が赤色蛍光タンパク質遺伝子よりも可視的選抜マーカーとして優れていると考えられた。ただし、子葉が展開する程度にまで成長した実生では、葉を除く部分の自家蛍光強度が増加したため、可視的選抜は、実生の成長の比較的初期段階にて行うことが望ましいと考えられた。

E. 結論

従来法による形質転換が困難であり、サポニン類、フラボノイド類を含み、強壯、利尿、血圧降下作用等が知られているマメ科のナイモウオウギを材料に、種子への直接遺伝子導入法の適用可否について検討した。

エレクトロポレーションにより緑色蛍光タンパク質遺伝子導入ベクターをナイモウオウギ種子へ導入したところ、ベクターコントロール導入系統と比較し、緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した系統特異的に約7%の実生で顕著な緑色蛍光を認めた。さらに、これら実生を約1ヶ月育成した植物体の本葉よりゲノムDNAを抽出し、PCRによりゲノムDNAへのsGFP遺伝子の挿入を確認した。その結果、生存個体の約2%で遺伝子導入を確認し、形質転換植物体の作出に成功した。

以上のように、ナイモウオウギの形質転換においても種子への直接遺伝子導入法が

有効であることが示された。

F. 参考文献

(文献 1) 研究代表者 飯田 修, 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業 「優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための保存, 増殖に関する基盤的研究」 (H22-創薬総合-指定-015), 平成 23 年度総括・分担研究報告書, pp. 43-54, 平成 24 年 3 月

(文献 2) 研究代表者 柴田 敏郎, 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業 「優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための保存, 増殖に関する基盤的研究」 (H22-創薬総合-指定-015), 平成 22 年度総括・分担研究報告書, pp. 31-35, 平成 23 年 3 月

(文献 3) 研究代表者 川原 信夫, 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業 (生物資源・創薬モデル動物研究事業) 「薬用植物資源の安定確保と有効活用のための基盤的技術の研究」 (H19-資源-指定-001), 平成 19 年度～21 年度 総合研究報告書, pp. 59-77, 平成 22 年 3 月

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

乾貴幸、河野徳昭、萩尾高志、吉松嘉代、柴田敏郎、川原信夫、飯田修：ナイモウオウギへの遺伝子導入法の開発(2)、第30回日本植物細胞分子生物学会（生駒）大会・シンポジウム（2012.8.3-5, 奈良）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(図表)

表1 エレクトロポレーション処理時の抵抗、電流、電圧

	MCS1		MCS2		GFP1		GFP2		GFP3		RFP1		RFP2		RFP3	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Ω	49.0	47.8	48.6	48.4	48.4	47.0	49.0	47.6	48.0	48.0	49.0	47.2	49.2	47.3	46.9	45.4
A	1.25	1.25	1.29	1.17	1.22	1.26	1.24	1.18	1.37	1.18	1.19	1.25	1.15	1.19	1.17	1.24
V	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51

表2 エレクトロポレーション処理後4日目の実生の観察

	処理種子	発根	%	子葉展開	%	枯死	%
MCS1	40	31	77.5	2	5.0	3	7.5
MCS2	39	32	82.1	1	2.6	8	20.5
GFP1	44	30	68.2	0	0	6	13.6
GFP3	43	30	69.8	2	4.7	6	14.0
GFP2	43	31	72.1	1	2.3	4	9.3
RFP1	40	28	70.0	0	0	4	10.0
RFP2	40	27	67.5	2	5.0	4	10.0
RFP3	39	30	76.9	1	2.6	4	10.3

表3 エレクトロポレーション処理後14日目の実生の観察

	処理種子	発根	%	子葉展開	%	枯死	%
MCS1	40	33	82.5	20	50.0	21	52.5
MCS2	39	32	82.1	18	46.2	21	53.8
GFP1	44	31	70.5	22	50.0	21	47.7
GFP2	43	32	74.4	18	41.9	25	58.1
GFP3	43	32	74.4	12	27.9	30	69.8
RFP1	40	29	72.5	9	22.5	33	82.5
RFP2	40	27	67.5	16	40.0	23	57.5
RFP3	39	31	79.5	18	46.2	21	53.8

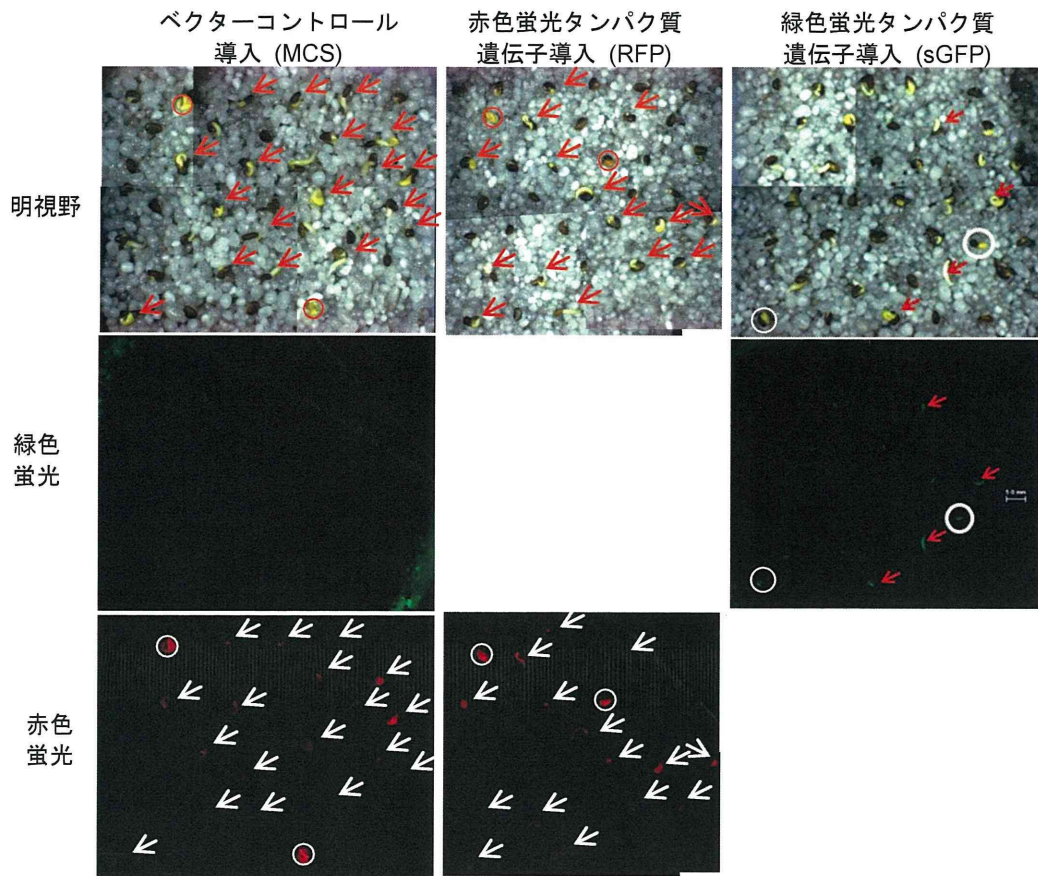


図1 エレクトロポレーション処理後4日目の実生の蛍光観察

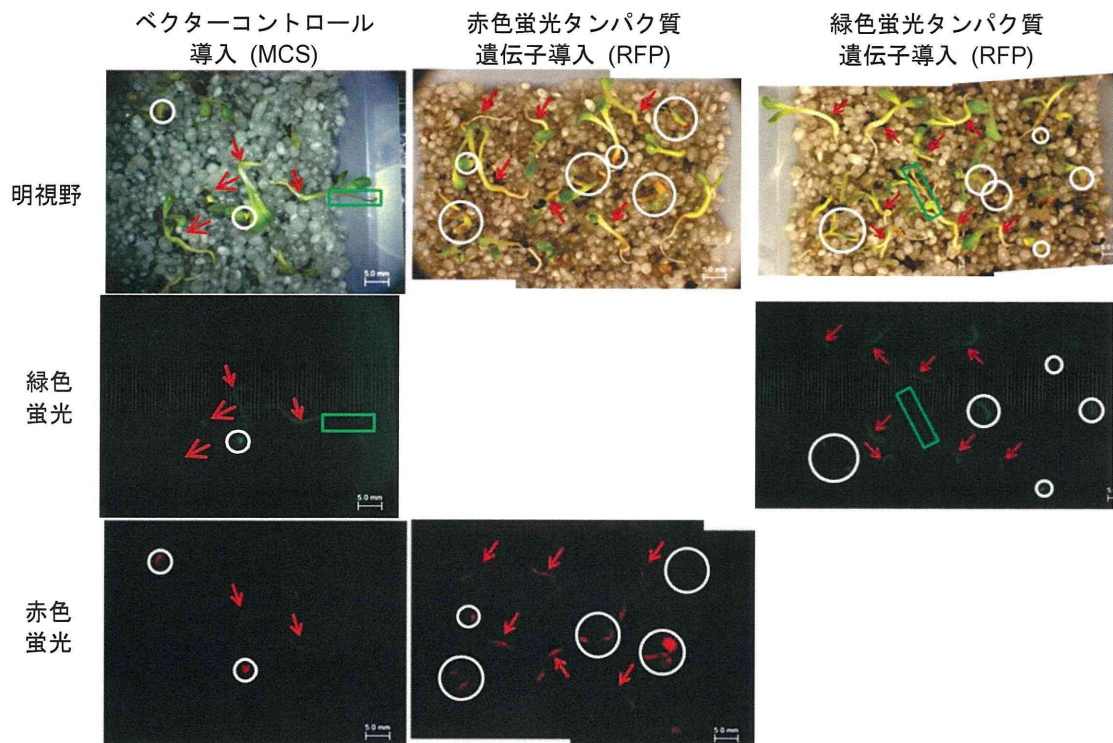


図2 エレクトロポレーション処理後14日目の実生の蛍光観察

図中の記号は以下を表す

- : 傷害が認められた実生における顕著な蛍光、→ : 傷害が認められない実生における顕著な蛍光
- : 成長した本葉

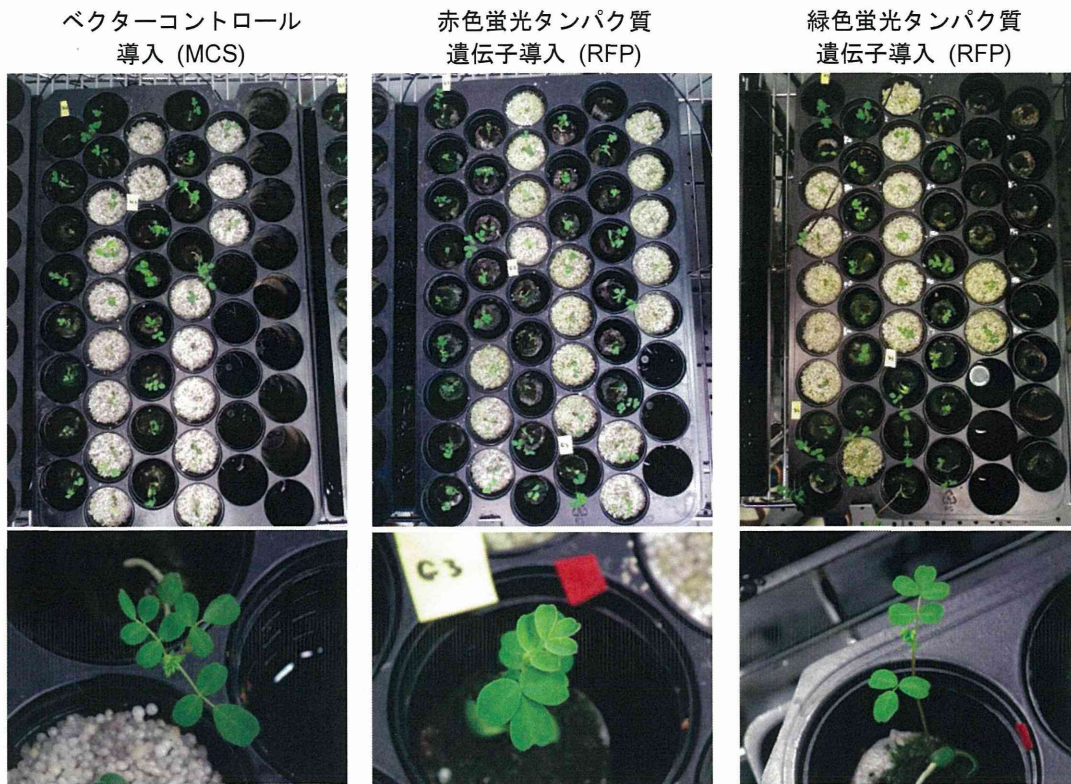
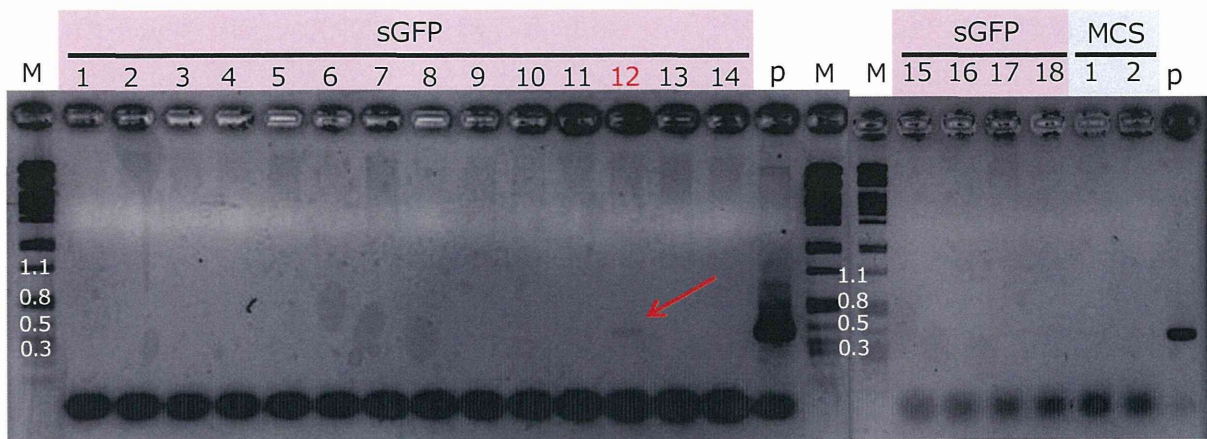


図3 エレクトロポレーション処理後26日目の実生の観察



M: サイズマーカー (*NPstI*), p: ポジティブコントロール (プラスミドDNA ; pWI-sGFP)



図4 PCRによるsGFP遺伝子導入確認及びPCR陽性株の葉のsGFP蛍光観察

平成24年度厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための
保存、増殖に関する基盤的研究 (H22-創薬総合-指定-015)
分担研究報告書

分担研究課題: 遺伝子マーカーの解明による品種識別技術の確立

研究分担者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部
主任研究員 河野 徳昭

研究協力者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部
特任研究員 乾 貴幸

要旨 優良形質を有する薬用植物新品種開発において、作出した優良系統の知的財産権の保護は今後重要な課題となると考えられる。これら優良系統は主に有用物質の高生産能や環境耐性等を示すと期待され、それらを他の一般系統と客観的かつ迅速に区別するためには遺伝子レベルでの識別法の確立が望ましい。本年度は、資源の枯渇が危惧される生薬カンゾウの基原植物のひとつであるウラルカンゾウにおいて、水耕栽培で良好な生育及び高グリチルリチン酸含量を示す優良系統をモデルとして、グリチルリチン合成経路上の 11-オキソ- β -アミリン 30 位酸化酵素 (CYP72A154) 遺伝子のゲノム DNA 配列に着目し、それらの多型情報をもとに系統間の識別を試みた。3 つの優良系統 (Gu2-3-2、GuTS71-08 IV1、GuTS71-08 IV2) から、CYP72A154 遺伝子のゲノム DNA 塩基配列情報を収集し、各優良系統間で配列を比較した。その結果、前年度までに解析を行ったスクアレン合成酵素遺伝子、 β -アミリン 11 位酸化酵素遺伝子と同様に CYP72A154 遺伝子においてもそのゲノム DNA 塩基配列の多型を利用した Gu2-3-2 系統と GuTS71-08 系統の識別が可能であった。

A. 研究目的

カンゾウ属植物 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 及び *G. glabra* L.) の根部の乾燥物は、生薬甘草として、その緩和作用・止渴作用から、多数の漢方薬に配合されている。また、カンゾウの主成分であるグリチルリチンは、抗炎症作用等を有し、さらに強い甘みを有することから、医薬品、化粧品、甘味料などとして幅広く用いられている。カンゾウの生産は、海外からの輸入、特に野生植物の採取に強く依存しているが、乱獲による環境破壊や資源の枯渇が顕在化し

つつある。そのため、カンゾウ属植物を安定供給するための栽培・増殖方法の確立が望まれており、栽培法の研究や効率的に増殖可能かつ短期間の栽培で高グリチルリチン含量を示すウラルカンゾウ優良系統の選抜などが精力的に行われている。これらの研究において新たに作出された優良系統を知的財産権の観点から保護するためには、新規優良系統と既存系統の識別法の開発が重要な課題であると考えられる。そこで、本研究では、優良系統の識別・保護のため、(独) 医薬基盤研究所 筑波研究部で見出さ

れた水耕栽培に適し、高グリチルリチン含有量を示すウラルカンゾウの優良系統をモデルとして、グリチルリチン生合成酵素遺伝子を用いた迅速かつ簡便なカンゾウ系統の遺伝子識別法の開発を目的とした。

本研究においては、カンゾウ属植物の遺伝子識別法として、植物をはじめとする生物全般に普遍的に存在する遺伝子、たとえば、核リボソームDNAのITS領域、葉緑体DNAの*trnK*遺伝子、*matK*遺伝子、*rbcL*遺伝子の塩基配列の変異（多型）を進化遺伝学的に解析し、分類するという手法ではなく、有用物質生産に関わる二次代謝酵素遺伝子群のうち、とくに鍵酵素と予想される反応段階に関わる酵素遺伝子について、塩基配列の種間、系統間変異のデータを集積し、それらの多型情報による植物種、系統、さらには個体間の識別が可能か否かを検討する点を特徴とし、本研究過程で蓄積された生合成酵素遺伝子の多型情報は、有用物質の生産性と直接リンクした有用物質高生産株の育種マーカーとしての利用の可能性も期待される。

B. 研究方法

二次代謝酵素遺伝子ゲノムDNA塩基配列の多型情報を使用するカンゾウ属植物の遺伝子識別

昨年度までに、PCR法 (SQS) または PCR-RFLP法 (CYP88D6)によりウラルカンゾウの優良系統間の遺伝子識別が可能なることを報告していたが (文献1)、本年度は、更なる識別精度の向上を目指して、11-オキソ-β-アミリン30位酸化酵素 (CYP72A154) 遺伝子のゲノムDNA情報について、ウラルカンゾウ優良系統における多型情報の収集・解析を進め、得られた多型情報に基づく系統識別を試みた。

ウラルカンゾウ植物試料

本実験では、以下のウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza ularensis* Fisch.) 優良系統3系統を対象とした。

- GuTS71-08 系統 (北海道農業試験場系統由来の実生由来):2 系統 (GuTS71-08 IV1, GuTS71-08 IV2)
- Gu2 系統 (北海道医療大学系統 導入番号 TS301-07 シュートより誘導した培養植物のサブクローン): 1 系統 (Gu2-3-2)

CYP72A154 遺伝子ゲノム DNA 配列の多型情報の解析

(1) イントロン領域の解析

ゲノム情報がデータベース上に登録されているタルウマゴヤシ、ダイズ等マメ科植物のCYP72Aファミリー遺伝子のゲノムDNAの情報より、CYP72A154遺伝子の5つのエクソン及び4つのイントロンからなるゲノムDNA構造を予測し、データベース上のCYP72A154遺伝子のコーディング配列 (AB558153.1) をもとに、各イントロンを含む領域を増幅するプライマーを設計し、CYP72A154遺伝子のイントロン領域を中心とする塩基配列情報を収集した。

識別対象試料より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて調製したゲノム DNA を鋳型とし、KOD plus (TOYOBO) を用いて、下記プライマーセット及び下記条件にて PCR を行い、増幅産物は 1%アガロースゲル電気泳動により確認した。

得られた PCR 産物の一部は、A-Attachment mix (TOYOBO) を用いて 3' 末端に dA を付加した後、DNA ligation kit ver2.1 (TAKARA BIO) を用いて pT7blue T-vector (Novagen) にクローニングし、DH5α z-competent cells (ZYMO RESEARCH) に導入した。LB-Ampicillin 培地で、37°C、一晚培養後、GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いてコロニーPCRにより目的ベクターの導入を確認した。陽性 PCR 産物には、illustra ExoStar (GE healthcare) を加え、未反応のプライマー等を除去した後、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて塩基配列を解析した。また、残りの PCR 産物の一

部は、上記と同様に、illustra ExoStar により精製し、塩基配列を解析した。

・ ゲノム DNA 配列増幅 PCR 条件

PCR 反応液組成 :

KOD-plus 0.25 μ L、ddH₂O 17.25 μ L、10 x KOD-plus buffer 2.5 μ L、2mM dNTP mix 2.5 μ L、25 mM MgSO₄ 1 μ L、プライマー (センス、アンチセンス) 各 0.5 μ L、鋳型ゲノム DNA 0.5 μ L (total 25 μ L)。

PCR 条件 :

94°C 2 min \rightarrow (94°C 15 sec. \rightarrow 60°C 30 sec. \rightarrow 68°C 1 min) x 30 cycle \rightarrow 68°C 5 min \rightarrow 4°C ∞

各イントロン増幅用のプライマー配列は下記のとおり。

イントロン 1

72A154S166: 5'-TCA CTT GAC AAC TCC
AAG CAA AC-3'

72A154A398: 5'-TTG GGG AAG TCC TGA
ATC TTG-3'

イントロン 2

72A154S341: 5'-TCA TCA CAG ACC CAG
AGC AA-3'

72A154A808: 5'-TGC CTC TTT CAA TTT
CCT TCA TC-3'

イントロン 3

72A154S609: 5'-TTG GCC CTT CCT TCA
AAA TC-3'

72A154A808: 5'-TGC CTC TTT CAA TTT
CCT TCA TC-3'

イントロン 4

72A154S1035: 5'-AAT GGT GTT ATT AGG
CAA GCA TC-3'

72A154A1274: 5'-ATT GGT ACG GAA
ACC TGT ACT CC-3'

・ コロニー PCR 条件

PCR 反応液組成 :

GoTaq Green Master Mix 7.5 μ L、ddH₂O 5.5 μ L、プライマー (U-19, R-20) 各 1 μ L (total 15 μ L)。

PCR 条件 :

94°C 2 min \rightarrow (94°C 30 sec. \rightarrow 60°C 30 sec. \rightarrow 72°C 1 min) x 30 cycle \rightarrow 72°C 5 min \rightarrow 4°C ∞ 。

プライマー配列は下記のとおり。

U-19: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG
T-3'

R-20: 5'-CAG CTA TGA CCA TGA TTA
CG-3'

(2) エキソン領域の解析

上記で得られたイントロン配列情報をもとに各配列に特異的な部位にプライマーを設計し、データベース上のコーディングシーケンスをもとにエキソン配列の末端に設計したプライマーとともに、2720 Thermal Cycler (ABI 製) を用いて、対象試料より調製したゲノム DNA を鋳型とし、KOD plus により(1)と同条件にて PCR を行った。PCR 産物は、(1)と同様に illustra ExoStar を用いて精製し、PCR ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解析した。

各エキソン増幅用のプライマー配列は下記のとおり。

エキソン 1

72A154S1: 5'-ATG GAT GCA TCT TCC
ACA CC-3'

72A154i1A(71): 5'-TCT AAA AGC TCT
CTC ATT TAA CTT CTC C-3'

72A154i1A(Gu): 5'-ATA ATC GAG AAC
AAC ATC AGT GTA TCA C-3'

エキソン 2-3

72A154S341: 5'-TCA TCA CAG ACC CAG
AGC AA-3'

72A154i3A(71): 5'-ACT AGA ACA TGC
TTA ACT TGG CTG TC-3'

72A154i3A(Gu): 5'-AAC TAG AAC ATG
CTT AAT TTG GCT GTA-3'

エキソン 4

72A154S759: 5'-GCT TCT ACC ATC AAC
TAC CAA AAG G-3'

72A154i4A(71): 5'-GTT AAG CCA GCA

GCA GTT AGT ACC-3'
 72A154i4A(Gu): 5'-TGA ATC AAA AGT
 ATT GGT ACG GAA AC-3'
エキソン 5
 72A154A1572: 5'-TTA CAG TTT ATG CAG
 AAT GAT GGG-3'
 72A154i4S(71): 5'-GGT ACT AAC TGC
 TGC TGG CTT AAC-3'
 72A154i4S(Gu): 5'-CTT TGA TGA TTA
 TTC ATA CAA TCC TTT C-3'

C. 研究結果

CYP72A154 遺伝子は、 β -amyrin の 11 位の酸化を触媒する CYP88D6 の下流で、11-oxo- β -amyrin の 30 位の三段階の酸化反応を触媒し、グリチルレチン酸を生成する反応に関わり、グリチルリチン酸生成において重要な役割を担う酵素の一つである (図 1)。

ウラルカンゾウと同じくマメ科のタルウマゴヤシ、ダイズ等の CYP72A ファミリー遺伝子を含んだゲノム配列 (タルウマゴヤシ: genbank accession number gi|357521776: c10669564-10665622 *Medicago truncatula* chromosome 8、ダイズ: genbank accession number gi|353336045: c38314642-38310575 *Glycine max* chromosome 6, V1.0, whole genome shotgun sequence) より、CYP72A ファミリー遺伝子のゲノム DNA 構造を比較すると、5 つのエキソン及び 4 つのイントロンからなるゲノム DNA 構造並びにイントロンの挿入位置がよく保存されていることが明らかとなった (図 2)。そこで得られた CYP72A ファミリー遺伝子のゲノム DNA 構造をもとにウラルカンゾウの CYP72A154 遺伝子のエキソン・イントロン構造を推定し、4 つのイントロンそれぞれを含む領域を増幅可能なプライマーを設計した。これらプライマーを用いて PCR で増幅したイントロンを中心とする配列を優良系統間で比較し、その変異点を利用した各系統の識別可能性について検討した。

ウラルカンゾウの優良系統 3 系統

(Gu2-3-2、GuTS71-08 IV1、GuTS71-08 IV2) のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、増幅配列の塩基配列情報を収集・比較した結果、Gu2 系統 (北海道医療大学系統: Gu2-3-2) では、いずれのイントロンでも 1 種類の配列のみが得られた。一方で、GuTS71-08 系統 (北海道農業試験場系統: GuTS71-08 IV1、GuTS71-08 IV2) では、イントロン 2 を除く、イントロン 1、イントロン 3、イントロン 4 において、配列長の異なる 2 種類の配列を取得した。この 2 種類の配列のうち、一方は、Gu2 系統で得られた配列とほぼ一致する共通配列であり、もう一方は、GuTS71-08 系統に特徴的な配列であった。

その結果、イントロン 2 を除く各 PCR において、GuTS71-08 系統では増幅サイズの異なる 2 本のバンドが増幅されるのに対し、Gu2 系統では 1 本のバンドのみ増幅されることから、PCR により両系統の識別が可能であった (図 3)。

取得した CYP72A154 遺伝子のイントロン配列について、Gu2-3-2 系統で得られた配列 (共通配列) と GuTS71-08 系統に特徴的な配列 (71-08 配列) で比較すると、配列長の最も長いイントロン 1 で最も変異が蓄積されており、71-08 配列は共通配列に対して、17 か所の 1 塩基置換、2 ヶ所での欠失、1 ヶ所での塩基の挿入が認められた。一方、配列長の最も短いイントロン 2 では、共通配列と 71-08 配列に差異は認められなかった。イントロン 3 では、71-08 配列は共通配列に対して、4 ヶ所の 1 塩基置換、及び、2 ヶ所での塩基の挿入が認められた。同様にイントロン 4 では、71-08 配列は共通配列に対して、3 ヶ所の 1 塩基置換、及び、2 ヶ所での塩基の挿入が認められた (表 1)。

上記イントロン配列を元に、共通配列と 71-08 配列を比較し、塩基配列の異なる部分にそれぞれの配列のみを増幅可能な特異的プライマーを設計した。これらプライマーとエキソンの末端部分に設計したプライマーを組み合わせることにより、それぞれ

のイントロン配列に対応する単一のエキソン配列の増幅が期待される。そこで、各系統のゲノムDNAを鋳型にKOD plusを用いてPCRを行い、それぞれの増幅産物について、PCRダイレクトシーケンスを行うことで、それぞれのイントロン配列に対応するエキソン配列を得た。また、PCR増幅産物を1%アガロースゲル電気泳動した結果、71-08配列特異的プライマーでは、GuTS71-08系統でのみ増幅を認め、Gu2-3-2系統とGuTS71-08系統を明確に識別可能であった(図4)。

得られたエキソン配列をデータベース上の登録cDNA配列と比較すると、共通配列の塩基配列は、登録配列とまったく同一であったが、71-08配列では、登録配列と比較し、エキソン1で2ヶ所、エキソン2で1ヶ所、エキソン3で1ヶ所、エキソン4で3ヶ所、エキソン5で3ヶ所の1塩基置換が認められた(表2)。しかし、これら変異点はアミノ酸配列で比較するといずれも同義置換であり、共通配列とGuTS71-08系統に特徴的な配列の間でアミノ酸配列に違いは認められなかった。

D. 考察

ウラルカンゾウの優良系統3系統のCYP72A154遺伝子の塩基配列多型情報を収集し、それらを利用したPCRにより、GuTS71-08系統とGu2-3-2系統の識別が可能であることが示された。今後、他のウラルカンゾウ系統を含むカンゾウ属植物及び市場品生薬等についても配列増幅及び塩基配列情報の解析を行い、識別可能範囲について確認する必要があるが、従来植物全般に普遍的に存在する遺伝子を用いた識別法と比較し、有用物質生産に関わる二次代謝酵素遺伝子群の塩基配列の多型情報を利用した識別法は、より近い系統の識別にも適用可能であり、優良系統識別に有効な手法であると考えられた。

E. 結論

グリチルリチン生合成経路上の鍵酵素遺伝子の一つCYP72A154遺伝子のゲノムDNA塩基配列の多型を利用したウラルカンゾウ優良系統の識別を試みた。その結果、CYP72A154遺伝子のゲノムDNA配列においても、GuTS71-08系統とGu2-3-2系統の間で多くの変異点を確認した。また、これら多型情報を利用したPCRにより、増幅配列の数、あるいは、増幅の有無により両系統の識別が可能で、SQS遺伝子、CYP88D6遺伝子と同様にCYP72A154遺伝子もカンゾウ属植物優良系統の系統間識別に有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

乾貴幸, 河野徳昭, 吉松嘉代, 柴田敏郎, 川原信夫, 飯田修
「薬用植物優良品種育成を指向した遺伝子鑑別法の開発(3)」
日本薬学会第133年会(2013.3.28-30, 横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(図表)

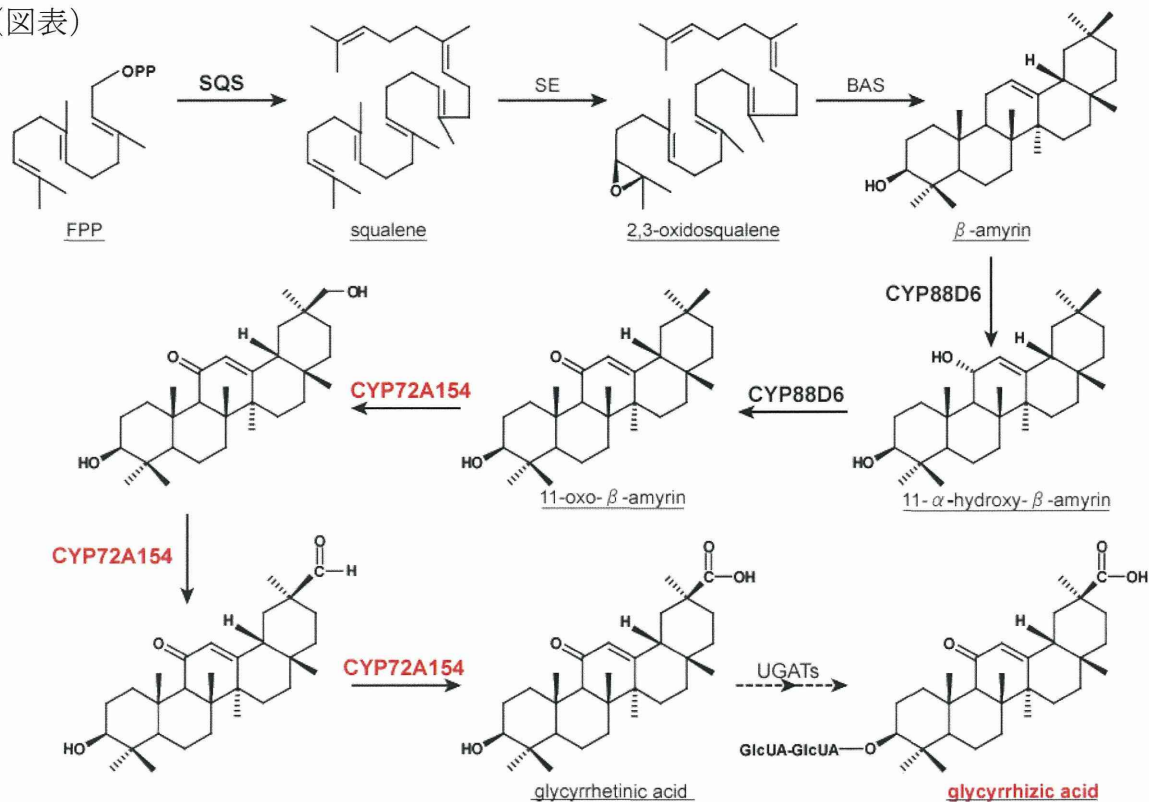


図 1 ウラルカンゾウのグリチルリチン合成経路

FPP, farnesyl diphosphate; SQS, squalene synthase; SE, squalene epoxidase; BAS, β -amyrin synthase; CYP, cytochrome P450; UGATs, UDP-glucuronosyltransferases.

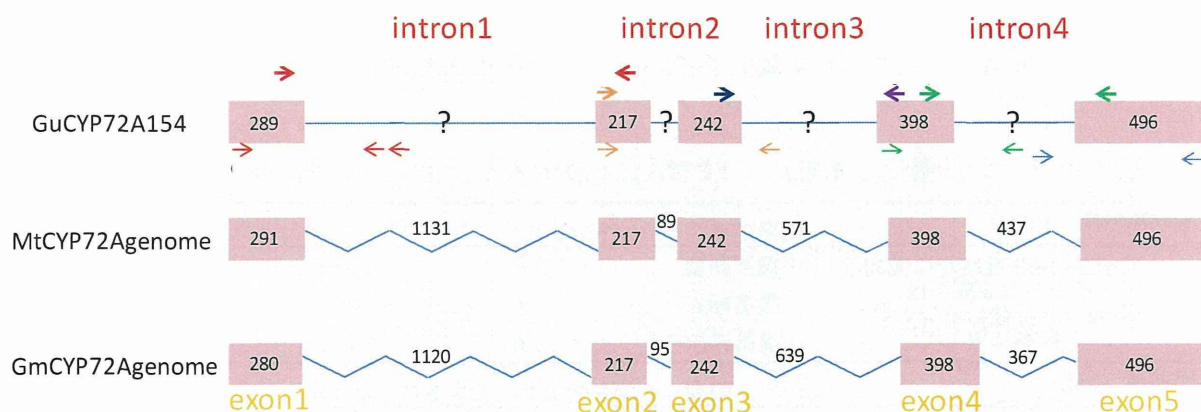


図 2 CYP72A 遺伝子のゲノム DNA (エキソン・イントロン) 構造

* → はプライマー設計部位を示す

* GuCYP72A154: GenBankID = AB558153.1

* MtCYP72Agenome: gi|357521776:c10669564-10665622 *Medicago truncatula* chromosome 8

* GmCYP72Agenome: gi|353336045:c38314642-38310575 *Glycine max* chromosome 6, V1.0, whole genome shotgun sequence

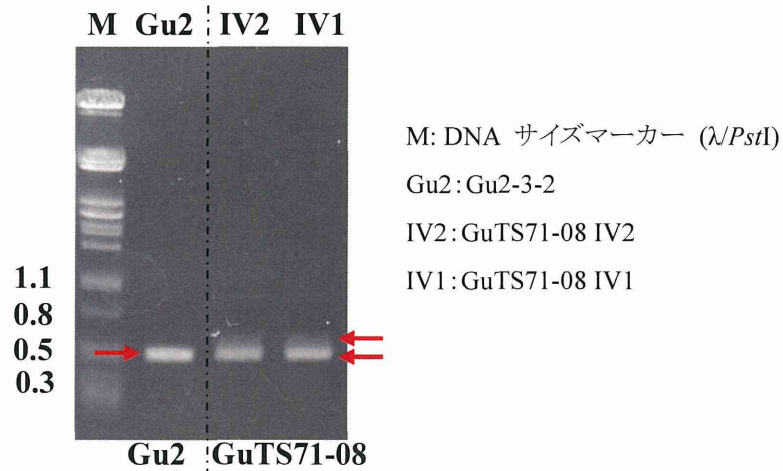


図3 CYP72A 遺伝子のイントロン4を含む配列の増幅

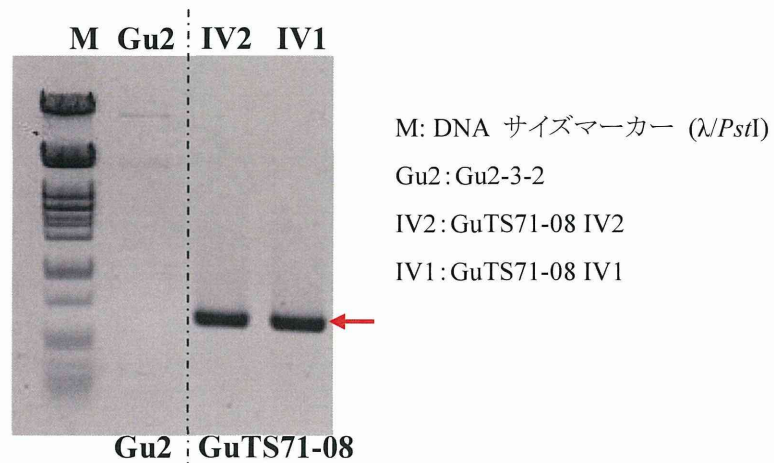


図4 CYP72A154 遺伝子イントロン4配列の多型を利用した系統識別

表1. ウラルカンゾウ優良3系統の CYP72A154 遺伝子イントロン配列の配列長及び変異点数

変異点の数 (ヶ所)	変異の種類	イントロン1	イントロン2	イントロン3	イントロン4
GuTS71-08 系統特に徴的なイントロン配列は、Gu2-3-2 系統のイントロン配列に対して	1塩基置換	17	0	4	3
	塩基挿入	1	0	2	2
	塩基欠失	2	0	0	0
配列長 (bp)	配列	イントロン1	イントロン2	イントロン3	イントロン4
	GuTS71-08 系統特徴的イントロン配列	618	88	512	304
	Gu2-3-2 系統イントロン配列	635	88	503	260

表2. ウラルカンゾウ優良3系統の CYP72A154 遺伝子エクソン配列の配列長及び変異点数

	エクソン1	エクソン2	エクソン3	エクソン4	エクソン5
1塩基置換の数 (ヶ所)	3	1	1	3	3
配列長 (bp)	289	217	242	398	496