

# 東海大学紀要 農学部

## 第 43 卷

2 0 2 4

---

生分解性ポリアミド4分解菌の単離とその分解性評価

.....唐渡龍平・森上佳衣子・橘弘一郎・本田正義  
阿部英喜・下田誠也・外村彩夏..... 1

*Brassica rapa* 近交系における

次世代シーケンサーを用いた変異の検出

.....岡本慧森・郷正明・川邊隆大..... 7



# 生分解性ポリアミド4分解菌の単離とその分解性評価

唐渡龍平<sup>1,2</sup>・森上佳衣子<sup>3</sup>・橋弘一郎<sup>4</sup>・本田正義<sup>5</sup>  
阿部英喜<sup>4</sup>・下田誠也<sup>2,3</sup>・外村彩夏<sup>1</sup>

Isolation of polyamide 4-degrading bacteria and the degradation behaviors of polyamide 4

Ryuhei KARATO, Keiko MORIKAMI, Koichiro TACHIBANA, Masayoshi HONDA,  
Hideki ABE, Seiya SHIMODA, Ayaka HOKAMURA

(Received 30 November 2023 ; accepted 28 January 2024)

## Abstract

Polyamide 4 (PA4), which can also be synthesized from biomass, is a biodegradable plastic with excellent physical properties. In this study, we isolated PA4-degrading microorganisms from soil samples and examined the degradation behavior of polyamide 4 by the isolates. In addition, the degradation behavior of P (pyrrolidone-co-caprolactone) was also evaluated because copolymerization with other monomers is expected to improve the thermal and mechanical properties of the polymer. By screening using MS agar plate medium including PA4 or P (pyrrolidone-co-caprolactone), PA4-degrading microorganisms were isolated. The three isolate strains with a clear zone surrounding colony were identified and named *Pseudomonas* sp. TN-N6, *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N26 and *Pseudomonas* sp. TN-N27 based on 16S rRNA analysis.

The weight of PA4 and P (pyrrolidone-co-caprolactone) films, which were cultivated with *Pseudomonas* sp. TN-N6, *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N26 and *Pseudomonas* sp. TN-N27, decreased, and that they showed higher degradability for copolymer films than for PA4 films. LC/MS analysis of the supernatant after cultivation of PA4-degrading isolates in this study detected PA4 monomer and dimer, then it was found that biodegradation by isolates was hydrolyzed the amide bonds of PA4. In addition, SEM images showed that PA4 biodegradation is expected to occur from the surface.

## 緒言

プラスチックは、化学的および光に強く、軽量で強度や耐久性もあり、低コストで大量生産できることから、包装や輸送、建設、電子機器や家庭用品、医療現場など、さまざまな分野で重要な役割を果たしている。その利便性から私たちの生活に欠かせない有機合成高分子材料であるが、エチレンやプロピレンなどのプラスチックの製造に使用されるモノマーの大部分は、化石燃料に由来している。しがたって、一般的に使用されているプラスチックのほとんどが埋立地や自然環境で分解することができず、半永久的に残留し、蓄積している (1)。プラス

チックゴミは、海洋においても問題となっており、年800万トンものプラスチックゴミが海に流出しているとの報告もある (2)。海洋プラスチックは、海洋生物の生態系への破壊、海洋環境の悪化や海岸機能の低下に加え、漁業や観光にも影響を及ぼしている (3, 4)。また、近年、マイクロプラスチックによる海洋生態系への影響も懸念されており、世界的な問題となっている (3, 4)。こうした状況を背景に開発が進められてきたのが、化石燃料由来のプラスチックに代わる環境調和型の生分解性プラスチックである。生分解性プラスチックとは、通常の使用状況では一般のプラスチックと同様に使用でき、使用後は自然界に存在する微生物の働きによって、最終的に

<sup>1</sup> 東海大学農学部

<sup>2</sup> 熊本県立大学大学院環境共生学研究科

<sup>3</sup> 熊本県立大学環境共生学部

<sup>4</sup> 理化学研究所環境資源科学研究センター

<sup>5</sup> 東京理科大学工学部

連絡先：外村 彩夏 E-mail: inada.ayaka.s@tokai.ac.jp

二酸化炭素と水にまで分解され、自然界の炭素循環サイクルに組み込まれるものである。

これまで、生分解性プラスチックの代表的なものとして、ポリ乳酸のようなポリエステル類が多く研究されている。これらは、比較的安価で大量に生産される汎用プラスチックに使用する目的で開発されている。一方、ポリアミド（ナイロン）類は、耐薬品性に優れ、アミド結合間の水素結合により、強靱で、耐熱性・耐薬品性・高い機械的特性を有することから、金属代替可能な高機能なエンジニアリングプラスチックとして発展してきた。ポリアミド（PA）はその化学構造のために、一般的に自然環境中で難分解性を示す。しかしながら、PAの中でも、2-ピロリドンと直接の出発原料とするPA4は、生分解性を示すことが報告されており、分解菌として *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Fusarium* sp. および *Pseudoxanthomonas* sp. が同定されている (5-7)。また、2-ピロリドンは、グルコースの発酵により生成されるグルタミン酸を経由して得られる $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）を加熱重縮合することによっても合成可能であり、PA4はバイオマスプラスチックとしても期待されている (8)。しかしながら、安価で効率的な生産方法の確立、分解の制御、物性の改善といった課題が存在するために、PA4の実用化に至っていない。特に実用化に向けて、通常の使用時には高機能・高性能を示しながらも、廃棄する際は易分解性を示すといった分解の制御が必要となり、PA4の生分解メカニズムの解明が求められる。また、物性面における課題の解決方法として、他のモノマーとの共重合化があげられる。そこで本研究では、土壌よりPA4分解菌を単離し、単離した菌の同定および分解性評価を行った。さらには、物性面の観点から、2-ピロリドンと生分解性を有する $\epsilon$ -カプロラクトンとの共重合体を作製し、共重合体の分解性評価も行った。

## 材料および方法

### PA4および共重合体の合成

PA4は、カリウム *t*-ブトキシドを触媒とした2-ピロリドンの開環重合により合成した。共重合体については、カリウム *t*-ブトキシドを触媒とした反応により、2-ピロリドン： $\epsilon$ -カプロラクトン = 81.5% : 18.5% の共重合体を合成した。

### PA4分解菌の単離

熊本県にある2箇所の野菜圃場の土壌をサンプルとして採取し、それらのサンプルを1%肉エキス（極東製

薬工業株式会社）、1% Bactopeptone（Difco）および0.5% NaClを含むNB培地（pH7.0）にて培養した。PA4分解菌のスクリーニングを行うために、0.15%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.9%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.5% 寒天および0.1% trace element solution (9)を含むミネラル（MS）寒天平板培地を作製した。シクロヘキシミドを加えた0.2% PA4あるいは0.2% 共重合体含有のMS寒天平板培地にNB培地菌体培養液をストリークし、30°Cで培養した。生育したコロニーを用いて、数回この操作を繰り返し、コロニーの周囲に明瞭なクリアゾーンを形成した菌株をPA4および共重合体分解菌として単離した。

### PA4分解菌の同定

単離した菌の同定を進めるために、16S rRNA 遺伝子の解析を行った。PA4分解菌のゲノムDNAは、NucleoSpin Microbial DNA（MACHERY-NAGEL）を用いて抽出した。抽出したゲノムDNAを鋳型として、63f primer（5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'）および1387r primer（5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'）、LA taq HS（TaKaRa Bio）を用いた反応により16S rRNA 遺伝子断片を増幅させた。PCR増幅産物は、NucleoSpin Gel and PCR Cleanup（MACHERY-NAGEL）を用いて精製し、塩基配列の解析を行った。得られた16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、BLAST検索にて解析を行った。

### キャストフィルムの作製

0.4 gのPA4あるいは共重合体粉末（2-pyrrolidone： $\epsilon$ -caprolactone = 81.5% : 18.5%）を10 mLの2,2,2-トリフルオロエタノールに溶解し、1日静置した。その後、シャーレへ5 mLずつ移し、キムワイブをかぶせ、溶媒を揮発させた。

### 分解性試験

PA4および共重合体キャストフィルムを4-7 mgに切断し、重量を測定した。5 mLのMS液体培地にそれぞれ1枚ずつ切断したフィルムを加え、分解性試験用の培地とした。菌株をLB液体培地に接種して一晚30°Cで振とう培養した前培養液を、分解性試験用の培地に50  $\mu\text{L}$ 接種した。同様に、菌を接種しない培地を用意し、コントロールとした。分解性試験は30°C、120 strokes/min、振とう培養にて行い、7日間ごとに、培養液からフィルムを回収し、乾燥したのち、重量を測定した。分解性試験開始時に対する分解性試験後のフィルムの残存率を算出した。

## 培養液上清のLC/MS分析

分解性試験後の培養液は、4℃、3500 rpm、10分間遠心分離を行い、回収した上清を0.2 μmのフィルターでろ過したのち、-80℃で急速凍結させ、凍結乾燥を行った。乾燥した培養上清2 mgを20%アセトニトリル水溶液1 mLに溶解し、1 μLをC18M 2Dカラム(2 mm × 150 mm)を用いたLC/MS-2020 (Shimazu)にて分析した。カラム温度40℃、流速0.2 mL/min、アセトニトリルと水を溶離液とするグラジエントモードにて行った。

## フィルム表面のSEM分析

分解性試験後のフィルムにプラズマを照射して前処理を行い、Quattro SEM (Thermo Fischer Scientific)にて表面を観察した。

## 結果および考察

## PA4分解菌の単離と同定

0.2% PA4あるいは0.2% 共重合体含有のMS寒天平板培地を用いたスクリーニングの結果、PA4分解菌として20株、共重合体分解菌として40株以上を単離した。そのうち、PA4および共重合体いずれにおいても明瞭なクリアゾーンを形成した3株(No. 6株、No. 26およびNo. 27株)を選抜し、16S rRNA解析および分解性試験を行った。16S rRNA解析の結果、No. 6株は、*Pseudomonas plecoglossicida*と95%、*Pseudomonas taiwanensis*と95%の相同性を、No. 26株は、*Pseudoxanthomonas indica*と96%、*Pseudoxanthomonas japonensis*と95%の相同性を、No. 27株は、*Pseudomonas multiresinivorans*と97%、*Pseudomonas nitroreducens*と97%の相同性を示した。本研究では単離した菌株それぞれについて、No. 6株を*Pseudomonas sp. TN-N6*、No. 26株を*Pseudoxanthomonas*

*sp. TN-N26*、No. 27株を*Pseudomonas sp. TN-N27*と名付けた。*Pseudomonas*属(5)および*Pseudoxanthomonas*属(7)については、これまでもPA4分解菌として報告がされているが、今後、これらの菌株の形態学的観察や生化学的性質について詳細に検討し、さらなる同定を進める必要がある。

## PA4分解菌によるキャストフィルム残存率

切断したPA4および共重合体キャストフィルムを加えた分解性試験用培地に、*Pseudomonas sp. TN-N6*、*Pseudoxanthomonas sp. TN-N26*および*Pseudomonas sp. TN-N27*を接種し、分解性試験を行った。PA4キャストフィルムの分解性試験の結果、試験開始後7、14、21、28日目に回収したフィルムの残存率は、それぞれコントロールで91.3%、92.6%、91.9%、91.9% (Fig. 1)、TN-N6株で85.2%、87.5%、81.9%、77.8% (Fig. 1A)、TN-N26株で84.0%、79.0%、75.0%、74.5% (Fig. 1B)、TN-N27株で81.4%、75.4%、78.7%、76.8%であった (Fig. 1C)。この結果から、TN-N6株、TN-N26株およびTN-N27株がPA4を分解していることがわかる。しかしながら、7日目以降は、いずれの菌株においても、わずかながらPA4フィルムの重量の減少はみられたものの、その分解率は大きく変化することはなかった。本研究では、培地の入れ替えを行わず、同じ培地中で連続的に分解性試験を行ったため、培地中のミネラル不足やpHの低下により細菌の生育が抑えられた可能性がある。また、いずれの菌株においても、培養温度30℃、120 strokes/minの振とう条件にて分解性試験を実施したが、それぞれの菌株が有する分解酵素の最適温度や最適pHが異なる可能性も考えられるため、今後、分解試験中における培地の交換や培養条件の検討が必要である。

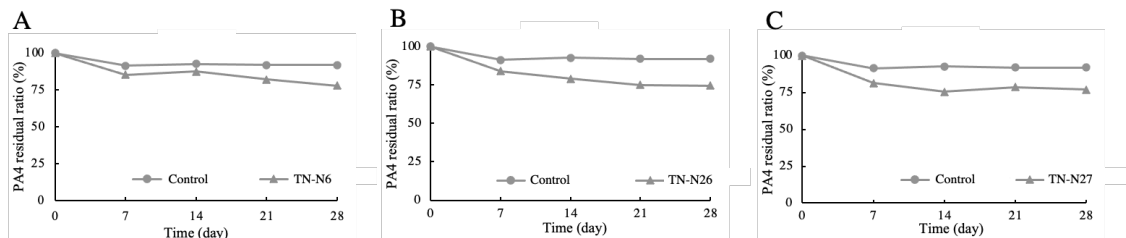


Fig. 1. The percentage of PA4 film residual ratio degraded by PA4-degrading microorganisms. (A) *Pseudomonas sp. TN-N6*, (B) *Pseudoxanthomonas sp. TN-N26*, (C) *Pseudomonas sp. TN-N27*. Closed circles, control PA4 film; closed triangles, PA4 film degraded by PA4-degrading strains TN-N6, TN-N26 or TN-N27.



次に、分解性試験7日目に回収したPA4キャストフィルムをSEMにより観察した。共重合体キャストフィルムに関しては、ほとんどのフィルムが目視できないほど分解されていたため、SEMによる表面観察はできなかった。TN-N 6株、TN-N 26株およびTN-N 27株による分解試験後に回収したPA4キャストフィルムのSEM画像をFig. 4に示す。Fig. 4に示した通り、フィルムが白くなっ

ている部分において小さな穴がいくつも観察でき、分解が進んでいることがわかった。また、回収したフィルムについて観察すると、フィルムの重量は減少しているものの、形状は保ったままうすくなっていた。これらのことから、PA4の分解は、内部からではなく、表面から起きていることが予想された。

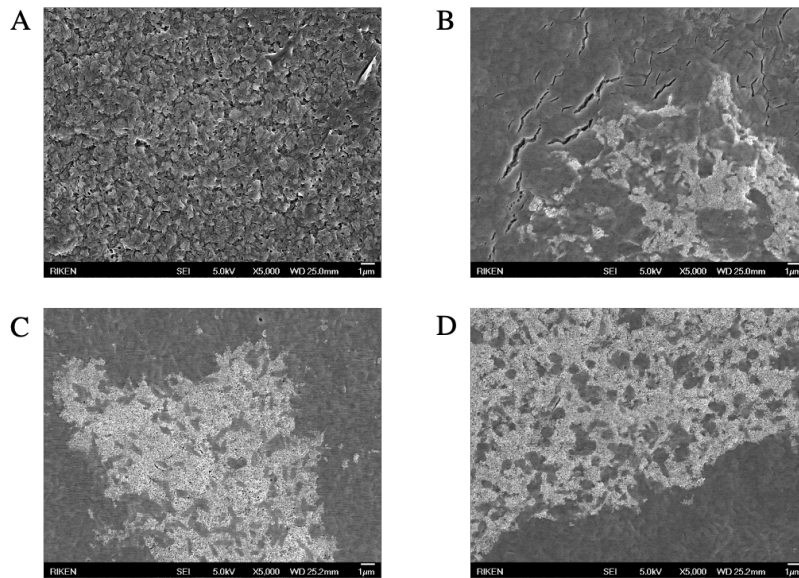


Fig. 4. SEM images of the surface of PA4 film degraded by PA4-degrading microorganisms. (A) original PA4 film, (B) PA4 film degraded by *Pseudomonas* sp. TN-N6, (C) PA4 film degraded by *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N26, (D) PA4 film degraded by *Pseudomonas* sp. TN-N27. The strains were cultivated at 30°C for 7 days with PA4 film.

## まとめ

熊本県の土壌より、PA4 およびその共重合体を分解する菌として40株以上単離した。それらのうち、3株について、16S rRNA 遺伝子の解析および分解性評価を行った。その結果、PA4 キャストフィルムは表面から分解されており、加水分解の酵素が関与していることが示唆された。PA4 は、環境調和型のエンジニアリングプラスチックであり、実用化のためにも今後、分解の制御が求められる。本研究で単離した分解菌の酵素の同定や様々な組成の共重合体の分解性評価を行うなどして、詳細な生分解メカニズムを解明する必要がある。

## 謝 辞

本研究は、JSPS 科研費若手研究 (JP18K14265) の助成を受けて実施されたものです。

## 要 約

ポリアミド (ナイロン) 類は高機能なエンジニアリングプラスチックとして広く使われている。その中でもポリアミド4 (PA4) は、生分解性を有し、原料がバイオマスから合成可能な $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) であるため環境調和型プラスチックとして期待されている。PA4 の実用化のためには、使用時は高機能・高性能を示しながらも、廃棄時には易分解性を示すといった分解の制御が求められる。PA4 の生分解メカニズムを明らかにする必要がある。そこで、本研究では土壌よりPA4分解菌を単離し、それらの分解性評価を行うことを目的とした。さらに、他のモノマーと共重合することで、熱的および機械的特性の改善が期待されることから、共重合体の分解性も評価した。

0.2% PA4 あるいは共重合体含有ミネラル寒天培地を用いてスクリーニングを行い、PA4分解菌を単離した。その中で明瞭なクリアゾーンを形成した3菌株を選抜し、

16S rRNA 解析を行い, *Pseudomonas* sp. TN-N 6, *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N26, *Pseudomonas* sp. TN-N27 と命名した. これらの菌株を用いて PA4 および共重合体キャストフィルムの分解性試験を実施した結果, いずれの菌株においてもフィルムの重量減少が確認され, PA4 フィルムよりも共重合体フィルムに対してより高い分解能を示した. さらに, 分解性試験後の培養液上清を LC/MS にて分析した結果, PA4 フィルムを用いた試験においては, PA4 由来のモノマーおよびオリゴマー分解産物が, 共重合体を用いた試験では共重合体の分解産物が検出され, 加水分解が起こっていることがわかった. これに加えて SEM 観察の結果から, PA4 の分解は, 表面から進むことが予想された.

### 引用文献

- 1) Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R.C. and Barlaz, M., 2009, *Philos. Trans. R. Soc. B*, 364, 1985-1998.
- 2) Geyer, R., Jambeck, J. R. and Law, K. L., 2017, *Science Advances*, 3, e1700782. doi: 10.1126/sciadv.1700782.
- 3) Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R. and Law, K. L., 2015, *Science*, 347, 768-771.
- 4) Thompson, R. C., Olsen, Y.O., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J. John, A. W. G., McGonigle, D. and Russell, A., 2004, *Science*, 304, 838.
- 5) Yamano, N., Nakayama, A., Kawasaki, N., Yamamoto, N. and Aiba, S., 2008, *J. polym. Environ.*, 16, 141-146.
- 6) Tachibana, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, M. and Okawa, H., 2010, *Polym. Degrad. Stabil.*, 95, 912-917.
- 7) Sasanami, Y., Honda, M., Nishiki, H., Tachibana, K., Abe, H., Hokamura, A. and Yamada, M., 2022, *Polym. Degrad. Stabil.*, 197, 109868, <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.109868>.
- 8) 中山敦好, 2010, *SEN'I GAKKAISHI (繊維と工業)*, 66, 368-378.
- 9) Kato, M., Bao, H. J., Kang C.-K., Fukui T. and Doi, Y., 1996, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 363-370.
- 10) Nakayama, A., Yamano, N., Kawasaki, N. and Nakayama, Y., 2013, *Polym. Degrad. Stabil.*, 98, 1882-1888.



# *Brassica rapa* 近交系における 次世代シーケンサーを用いた変異の検出

岡本慧森<sup>1</sup>・郷正明<sup>1</sup>・川邊隆大<sup>1</sup>

Identification of Variations in *Brassica rapa* Inbred Lines  
Using Next Generation Sequencers.

Emori OKAMOTO, Masaaki GO, Takahiro KAWANABE

(Received 30 November 2023 ; accepted 26 January 2024)

## Abstract

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertion-deletion (In/Dels) are the most abundant genetic variants that are widely distributed throughout the plant genome, making them versatile DNA markers. *Brassica rapa* is one of the most important agricultural vegetables grown and consumed worldwide, including the leafy vegetables Chinese cabbage and komatsuna, the root vegetable turnip, and the oilseed crop *Brassica napus*. In this study, we performed whole-genome resequencing of two inbred lines, JKRB-T04 (Chinese cabbage) and OSD2 (komatsuna), to identify variants in both lines. A total of 542,015 SNPs and 200,460 In/Dels were identified, of which 118,519 SNPs and 27,470 In/Dels were JKRB-T04-specific and 268,180 SNPs and 136,718 In/Dels were OSD2 specific variants. In addition, 60.1 % of the genes annotated in the Fast pants reference genome were variants, and there were approximately 3,300 genes with mutations that had a significant impact on gene function in both strains. In addition, the analysis focused on flowering control genes, which are important for breeding, and revealed the presence of variants in 17 flowering control genes. The large number of SNPs and the In/Dels dataset identified in this study will provide a valuable marker resource for genetic and genomic studies of *B. rapa*.

## 緒 言

アブラナ科 (*Brassicaceae*) には、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) をはじめ、食用となるハクサイやカブ (*Brassica rapa*)、キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー、ケール、コールラビ (*B. oleracea*)、油糧作物として利用されるナタネ (*B. napus*) といった様々な経済的に重要な農作物が多く含まれている (1)。加えて、アブラナ科にはアブラナ属の他にもダイコン属 (*Raphanus*)、ワサビ属 (*Eutrema*) 等の野菜や香辛料として利用されている属も含まれている。キャベツ、ハクサイ、ダイコンは、日本で栽培されている野菜のうち全体の生産量の8割を占めている指定野菜に含まれており、それらの生産量は野菜の国内生産量12846万トンの約27%を占めている。

*B. rapa* の全ゲノム配列は2011年にハクサイの半数体

倍加系統である Chiifu-401-42でアブラナ科作物の中で初めて決定され、約4万種の遺伝子が同定された (2)。その後、イエローサルソン (var. *tricoloris*) およびパクチョイ (var. *chinensis*) の配列解読が行われている (3)。これらのゲノム配列は精度の向上した解析技術により更新されながら、*B. rapa* の遺伝学およびゲノム学的研究のための重要な情報として品種育成や他のアブラナ科との比較ゲノム解析に利用されている (4)。DNA マーカーは、遺伝子型のフィンガープリント、遺伝地図の作成、QTL (Quantitative Trait Loci) マッピング、association analysis、DNA マーカーを利用した選抜 (MAS: marker-assisted selection) など、植物の遺伝学および育種学研究のための重要なツールの一つである。これまで、制限酵素断片長多型 (RFLP)、増幅断片長多型 (AFLP)、単純配列反復 (SSR)、挿入/欠失 (In/Dels)、一塩基多型 (SNP) など、数多くの DNA マーカーが植物において開

<sup>1</sup> 東海大学農学部応用植物科学科  
連絡先：川邊隆大 e-mail:kt341178@tsc.u-tokai.ac.jp

発されてきている。特に SNPs および In/Dels は、植物のゲノム全体に広く分布している最も豊富な遺伝的変異であることから、DNA マーカーとしての汎用性が高い。*B. rapa* においても種皮の色、トライコーム、葉の形態、開花期などの表現型の同定に SNP を利用した DNA マーカーが開発されている (5, 6, 7)。近年、ゲノム配列が解読されている種の既知ゲノム配列を参照として、種内や近縁種の多数の系統を用いて、次世代シーケンサーショートリードをマッピングし、SNP や In/Dels 等の参照配列との違いを検出するリシーケンス解析が行われる植物が増えており、その情報を利用した DNA マーカーの作成も行われている (8, 9)。

植物は開花に至るまでに栄養成長から生殖成長へと移行する。栄養成長期に蓄積したエネルギーを子孫繁栄のための生殖成長期に利用するため、開花は植物のライフサイクルの中で重要な発達過程となっている。植物には、一定期間の低温にさらされることで開花に至る春化 (バーナリゼーション) と呼ばれる現象がある。春化は冬の寒さに遭遇する前に開花することを防ぎ、春の良好な気象条件下で開花するためのメカニズムである (10, 11)。春化はアブラナ科野菜の収穫物の質と量に深く関わっており、低温に対する感受性が高いために早く抽だいや開花が起ると、収量や商品価値の低下に繋がってしまう可能性がある (12)。このことから、アブラナ科野菜において開花時期を調節することは育種の重要な目標となっている。近年は、シロイヌナズナを用いた春化の分子機構の研究が盛んに行われ、機能喪失変異体の解析や遺伝子導入植物の解析から、180以上の遺伝子が開花時期の制御に関与していることが明らかにされている (13, 14, 15)。これらの遺伝子は、光周期依存経路、春化依存経路、低温受容性経路、高温受容性経路、加齢経路、自律的経路、ジベレリン依存経路など、開花時期を制御する主要な経路に分類されている (16)。

前述のようにアブラナ科野菜において花機構は農業上重要な形質であるため開花制御遺伝子の解析は盛んに行われている (13)。Fast Plants はウィスコンシン大学の Paul H. Williams 博士が、実験室内で栽培しやすいよう早い成長速度や高い種子生産能力、栽培の容易さといった特徴を持つよう開発した矮小化した *B. rapa* の変種である (17)。このような特徴を持つことから、Fast plants と栽培種とのゲノム配列を比較することで農業上重要な遺伝子の同定に繋がることが期待される。本研究では、ハクサイ近交系 (JKRB-T04) とコマツナ近交系 (OSD2) において全ゲノムリシーケンス解析を行い、両系統が持つ変異 (SNPs, In/Dels) の同定を *B. rapa* Fast Plants

リファレンスゲノムと比較することにより行った。さらに、同定した変異が開花制御遺伝子に与える影響についても解析を行った。

## 材料および方法

### 植物材料

*B. rapa* 系統 Fast Plants, JKRB-T04 と OSD2 は 25℃ の温室で育成し、明期 16 時間・暗期 8 時間で育成した。2 週間生育させた葉から DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, USA) を用いてゲノム DNA を抽出した。DNA のクオリティは 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) を用いて確認し、NeoPrep ライブラリー調整システム (illumina, USA) によりライブラリーを作成した。作成したライブラリーは NextSeq500 (illumina, USA) を用いてシーケンスを行い、150 bp ペアエンドの配列データを取得した。

### シーケンスデータの解析

得られた配列データは FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) を用いてクオリティチェックを行った。トリミングには、Trimalore!v0.4.5 (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) を用いて低クオリティのリードを除去した。リードの 5' 末端から 14 bp の除去、クオリティまたはアダプターのトリミングのため 33 bp よりも短いリードの除去、および配列のトリミングを必要とするアダプター配列のオーバーラップを 3 に設定して行った。その後、Bowtie 2 (18) を用いて、リファレンスゲノム BrapaFPsc\_277\_v1.3 にデフォルトのパラメーターでマッピングを行った。SAMtools (19) を使用して、Bowtie 2 から得た SAM 形式のマッピングファイルの処理を行った。BAM 形式への変換、BAM ファイルのソート後、GATK program (GATK) により変異箇所同定の解析を行った (20)。同定した変異の解析には snpEff4.3i (SNPEff) を使用した (21)。リファレンスゲノムとして用いた BrapaFPsc\_277\_v1.3 及び、そのアノテーション情報は phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) より入手し、ソフトウェアの操作は、マニュアル ([http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff\\_manual.html](http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff_manual.html)) に従った。Gene Ontology (GO) 解析には agriGO を使用した (22)。

### PCR による変異の検証

見出された変異の内、挿入・欠失の変異の検証を行うために、PCR を 94℃ 3 分間の 1 サイクル、94℃ 30 秒、

55℃ 30秒, 72℃ 60秒の35サイクル, 最終伸長は72℃ 3分間で行った. 増幅産物を13% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, ゲルを Gelstar 溶液 (0.1 µl/10ml; Takara Biomedical, Japan) で染色した.

### 結果および考察

JKRB-T04, OSD2 から DNA ライブラリーを作成し, 150 bp 長のペアエンドリードを取得した. 低品質のリードを除去したところ, 高品質 (Q>25) のリードがそれぞれ103,472,345リード, 107,584,683リード得られ, これらを後の解析に用いることとした. 公開されている *B. rapa* Fast Plants リファレンスゲノムにマッピングを行ったところ, JKRB-T04では79,964,611リード, OSD2では84,820,124リードがマップされた (Table 1). 全リードは, 平均リード深度37×以上, 全ゲノムカバレッジ77%以上でマップされた. また, 各染色体の1番染色体から10番染色体までの個々の平均リード深度は26.2×を超え, JKRB-T04とOSD2では染色体あたり72%以上のカバレッジであった (Table 2). リファレンスゲノム

と比較して, 変異の同定を行ったところ, JKRB-T04とOSD2でそれぞれ196,177個と345,838個のSNPが見つかり, また挿入はそれぞれ22,534箇所と76,439箇所見つかかり, 欠失はそれぞれ23,072箇所と78,415箇所であった (Table 3). 77,658個のSNPと, 8,962箇所の挿入, 9,174箇所の欠失が2系統間で共有されていた.

次に, 各変異が存在する部位について, 遺伝子領域との位置関係に対応させて分類した (Table 1). JKRB-T04におけるエクソン領域の変異は, 36,003個で, 変異全体の5.66%, OSD2では86,827個となり, 全体の6.41%を占めていた. この中で同義変異はJKRB-T04とOSD2でそれぞれ20,678個, 48,944個であり, 非同義変異はそれぞれ14,970個, 32,622個であった. また, イントロンにはそれぞれ45,249個, 97,301個の変異が見られ, 5'非翻訳領域 (5'UTR) には3,812個, 12,710個, 3'非翻訳領域 (3'UTR) には9,521個, 21,877個の変異がそれぞれ存在していた. JKRB-T04とOSD2で遺伝子間領域にそれぞれ153,131個, 294,955個の変異が存在し, 遺伝子の上流領域にはそれぞれ189,683個, 423,277個, 下流領域はそれぞれ195,149個, 405,969個の変異が確認できた.

Table 1. Mapping and variant summary of *B. rapa* inbred lines

	Mapping information					Variant data						
	Total Raw Reads	Mapped Reads	Unmapped Reads	Fold genome coverage	Coverage (%)	Non-synonymous	Synonymous	Intron	5'UTR	3'UTR	Intergenic	Total
JKRB-T04	103,472,345	79,964,611	23,507,734	37.70	77.28	14,970	20,678	45,249	3,812	9,521	153,131	247,361
OSD2	107,584,683	84,820,124	22,764,559	40.01	78.84	32,622	48,944	97,301	12,710	21,877	294,955	508,409

Table 2. Covered bases, Mean depth of coverage and breadth of coverage of mapped reads in the *B. rapa* inbred lines

Chr	Chromosome size (bp)	JKRB-T04			OSD2		
		Covered bases (bp)	Coverage (%)	Mean Coverage depth	Covered bases (bp)	Coverage (%)	Mean Coverage depth
A01	30,984,273	22,386,765	72.25	32.29	23,289,975	75.17	36.54
A02	32,762,445	23,770,595	72.55	27.76	24,151,157	73.72	29.44
A03	25,115,505	19,866,989	79.10	26.26	20,121,307	80.12	27.19
A04	21,597,147	16,306,509	75.50	32.36	16,567,652	76.71	32.79
A05	28,488,603	21,084,777	74.01	35.12	21,121,975	74.14	38.84
A06	29,376,280	21,835,613	74.33	39.43	21,998,279	74.88	38.99
A07	27,477,424	20,728,716	75.44	30.35	20,911,375	76.10	32.58
A08	23,189,089	17,466,835	75.32	29.93	17,328,798	74.73	30.14
A09	44,888,295	32,708,293	72.87	39.56	33,354,354	74.31	40.70
A10	19,914,974	15,054,543	75.59	34.92	15,039,754	75.52	34.56

Table 3. Number of SNPs and In/Dels in the JKRB-T04 and OSD2 with respect to the Fast plants reference genome

	JKRB-T04		OSD2	
	vs. Reference	Unique	vs. Reference	Unique
SNP	196,177	118,519	345,838	268,180
Insertion	22,534	13,572	76,439	67,477
deletion	23,072	13,898	78,415	69,241

挿入と欠失 (In/Del) について、各ギャップの大きさについて調べた (Fig. 1). JKRB-T04で最も頻度が高かったのは1塩基挿入で13,301箇所 (29.2%) で、次いで1塩基欠失12,983箇所 (28.5%) であった. OSD2で最も頻度が高かったのは1塩基欠失で44,178箇所 (28.52%) であり、次いで1塩基挿入44,087箇所 (28.47%) であっ

た. 2つの系統でも7塩基以上の挿入や欠失はまれで、各カテゴリーは1.0%以下であった. しかし、7塩基以上の挿入と欠失箇所の合計はJKRB-T04とOSD2において、挿入ではそれぞれ1,627箇所と3,937箇所見つかかり、欠失はそれぞれ2,426箇所と4,900箇所であった.

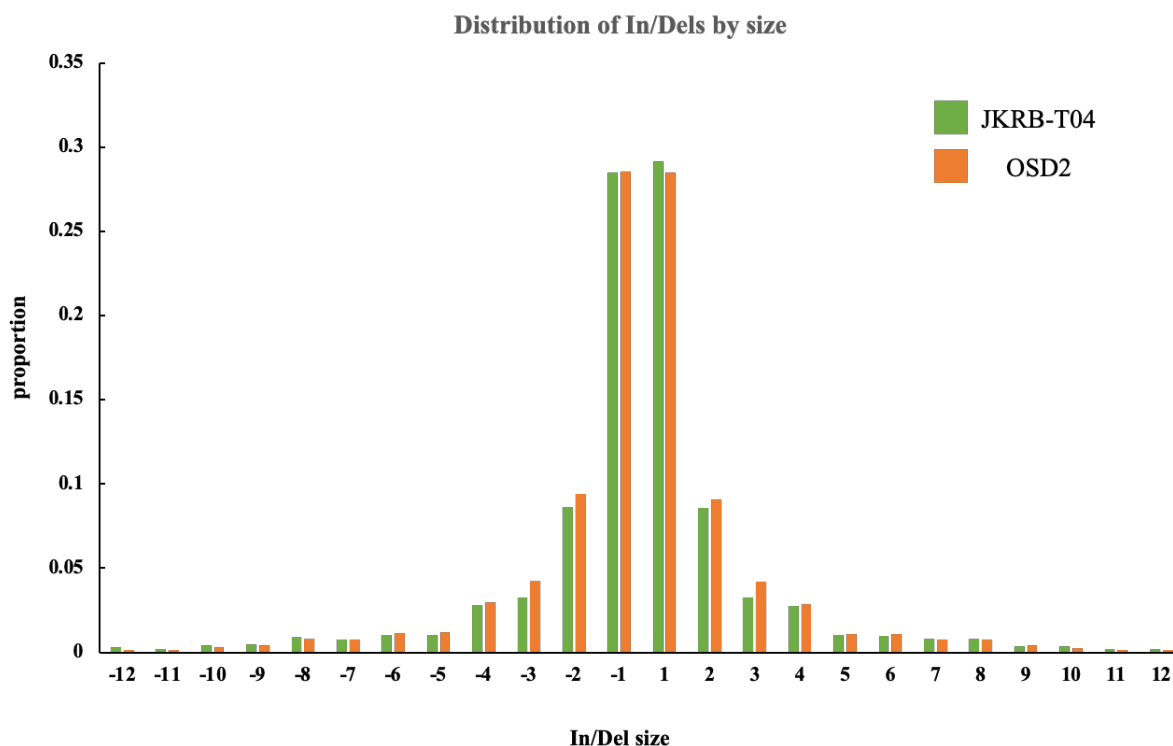


Fig. 1. Genome-wide analyses the proportion of In/Dels in the two Brassica inbred lines.

SNPについて各塩基置換の頻度を調べたところ、JKRB-T04で最も多く見られた塩基置換は、G → A 28,369個 (14.5%)、次いでC → T 28,321個 (14.4%)、T → C 25,517個 (13.0%)、A → G 25,212個 (12.9%) となった (Fig. 2). プリミジン (C, T) 間、またはプリン (A, G) 間の変異である転移 (Transitions) の合計は107,419個、プリミジンとプリン間の変異である転換 (Transversions) の合計は88,758個であり、転換に対する転移の比率 (Ts/Tv) は1.21であった. また、OSD2

においては、G → A 48,988個 (14.2%)、次いでC → T 48,826個 (14.1%)、T → C 46,829個 (13.5%)、A → G 46,378個 (13.4%) となった. 転移の合計は191,021個、転換の合計は154,817個で、転換に対する転移の比率 (Ts/Tv) は1.23であった.

各変異が近傍の遺伝子に与える効果について snpEffを用いて4段階で予測した (Table 4). 予測される効果は (High, Moderate, Low, Modifier) の順に分類され、タンパク質の機能喪失など該当する遺伝子に与える影響が

Table 4. Prediction of variant effects and variant types

Impact type	JKRB-T04		OSD2	
	Number of effects	Number of variant genes	Number of effects	Number of variant genes
High	613	537	3,519	2,505
Moderate	15,159	8,152	35,423	15,092
Low	24,534	11,199	58,607	18,938
Modifier	596,080	-	1,255,402	-

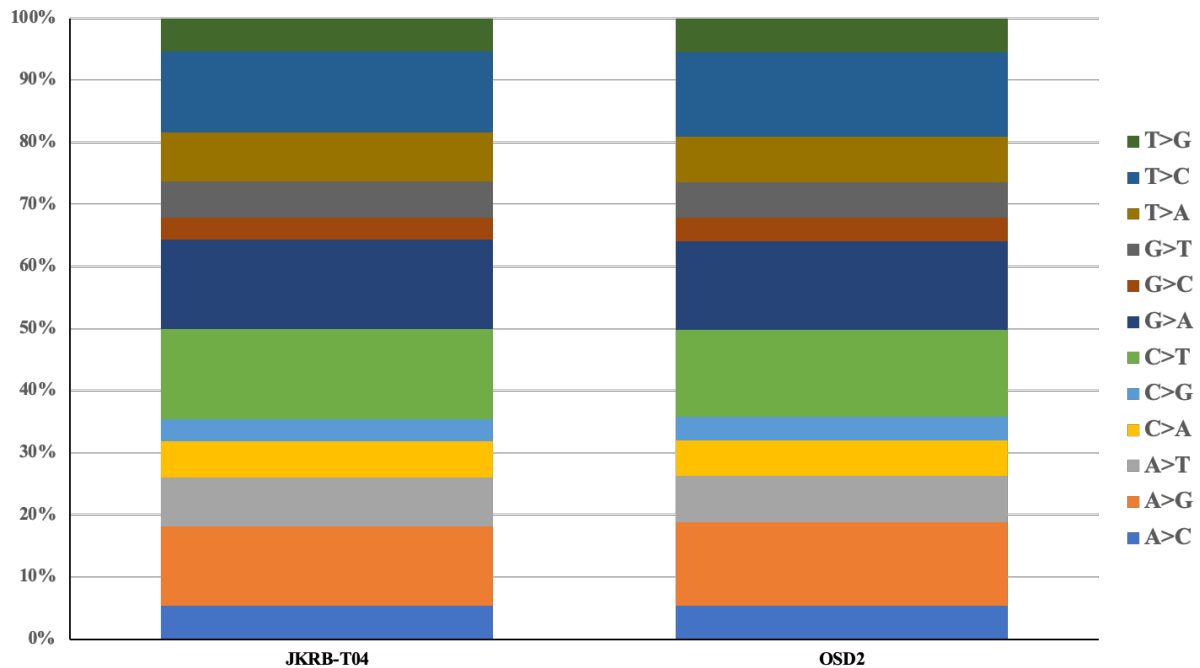


Fig. 2. Genome-wide analyses the proportion of SNPs in the two Brassica inbred lines.

高いほど高い効果に分類される。合計 613 個と 3,519 個の JKR-B-T04 と OSD2 固有の SNPs と In/Dels が「High」に分類され、それら変異を含む遺伝子の数は、JKR-B-T04 で 537 個、OSD2 で 2,505 個であった。このうち、235 個の遺伝子が JKR-B-T04 と OSD2 の間で重複していた。中程度の効果を与える「Moderate」に分類された変異は JKR-B-T04 と OSD2 においてそれぞれ 15,159 個、35,423 個であり、低効果の「Low」に分類されたものはそれぞれ 24,534 個、58,607 個であった。「Modifier」は遺伝子に全く影響を及ぼさないか、その効果が不明なものとして分類され、対象となる遺伝子隣接している場合には重複して検出される。そのため、同定した変異数よりも多く検出され、JKR-B-T04 と OSD2 においてそれぞれ 596,080 個、1,255,402 個に分類された。分類した変異の中で、JKR-B-T04 においてミスセンス変異は 15,012 個 (41.9%)、ナンセンス変異は 122 個 (0.34%) であり、OSD2 ではミスセンス変異は 32,699 個 (39.9%)、ナンセンス変異は 245 個 (0.30%) であった。遺伝子機能に影響を与える変異、つまり、「High」、「Moderate」、「Low」に分類された遺伝子の合計は、両系統合わせて 24,587 遺伝子に生じており、これは Fast Plants リファレンスゲノムにおいてアノテーションされている遺伝子である全 40,492 個のうち 60.1% であった。これまでの研究からシロイヌナズナにおいて約 180 個の遺伝子が開花時期に影響を与えることが知られている (13, 16)。そこで、これらの相同遺伝子において「High」に分類される変異が

生じているかを調べたところ、JKR-B-T04 では CRYPTOCHROME INTERACTING BASIC-HELIX-LOOP-HELIX1 (CIB1), EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2), FLOWERING WAGENINGEN (FWA), GIBBERELLIN20-OXIDASE1 (GA20ox1) の 4 遺伝子、OSD2 では SPA1-RELATED4 (SPA4), FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN ALPHA (FCA), VERNALIZATION INDEPENDENCE4 (VIP4), FLOWERING LOCUS D (FD) など 13 個の遺伝子に変異が生じていた (Table 5)。*B. rapa* はシロイヌナズナから分岐後、全ゲノム 3 倍体化が起きており、そのためシロイヌナズナの相同遺伝子が複数個ゲノム中に存在している (2)。この 12 個の遺伝子は、遺伝子機能喪失など重大な影響を生じさせる変異を持つが、それぞれの相同遺伝子には変異が見られないため、開花時期の表現型が相補されている可能性が考えられた。しかし、FWA, SPA4, FCA はゲノム中に 1 コピーしか存在せず、また SPA18 は 2 コピーの遺伝子両方に変異が生じていた。このことより、これらの遺伝子の変異が早期開花する Fast plants と春化を必要とする他の *B. rapa* 系統との違いをもたらしていると考えられるが、その解明にはさらなる解析が必要である。

SNP および In/Del によって引き起こされる効果「High」に分類された遺伝子について Gene Ontology (GO) 解析を行ったところ、JKR-B-T04 では特異的なカテゴリーは見出されなかったが、OSD2 では Molecular Function に属するカテゴリーが 21 個見出され ( $p < 1.0E-10$ )、その中に

Table 5. Flowering-related genes classified as High impact in two *B. rapa* inbred lines

	Gene ID in <i>Brassica rapa</i>		Gene ID	Gene name	Pathway	
	HIGH impact gene	homologous gene	in <i>Arabidopsis thaliana</i>			
JKRB-T04	Brara.A00369.1	Brara.H01197.1	AT4G34530	CIB1 (CRYPTOCHROME INTERACTING Bhlh)	PHOTOPERIOD PATHWAY, CIRCADIAN CLOCK, LIGHT SIGNALING	
	Brara.C01483.1	Brara.B01566.1, Brara.C01484.1, Brara.J00615.1	AT5G51230	EMF2 (EMBRYONIC FLOWER 2)	VERNALIZATION and AUTONOMOUS PATHWAYS	
	Brara.A01546.1	-	AT4G25530	FWA (FLOWERING WAGENINGEN)		
	Brara.K00199.1	Brara.A01538.1	AT4G25420	GA2ox1 (GIBBERELLIN 20-OXIDASE 1)	GIBBERELLIN SIGNALING and METABOLISM	
OSD2	Brara.E01100.1	Brara.D01997.1	AT2G32950	COPI (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1)	PHOTOPERIOD PATHWAY, CIRCADIAN CLOCK, LIGHT SIGNALING	
	Brara.E01550.1	-	AT1G53090	SPA4 (SPA1-RELATED 4)		
	Brara.F03851.1	Brara.A00065.1, Brara.H01801.1	AT4G39400	BR11 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1)	VERNALIZATION and AUTONOMOUS PATHWAYS	
	Brara.B01566.1	Brara.C01483.1, Brara.C01484.1, Brara.J00615.1	AT5G51230	EMF2 (EMBRYONIC FLOWER 2)		
	Brara.A01919.1	-	AT4G16280	FCA (FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN ALPHA)		
		Brara.E00472.1	Brara.D02720.1	AT2G44950	HUB1 (HISTONE MONOUBIQUITINATION 1)	VERNALIZATION and AUTONOMOUS PATHWAYS
		Brara.F02378.1	Brara.B03928.1	AT5G65060	MAF3 (MADS AFFECTING FLOWERING 3)	
		Brara.B03752.1	Brara.I00649.1	AT5G61150	VIP4 (VERNALIZATION INDEPENDENCE 4)	
		Brara.G03586.1	Brara.B02317.1, Brara.G03584.1	AT1G78440	GA2ox1 (GIBBERELLIN 2-OXIDASE 1)	GIBBERELLIN SIGNALING and METABOLISM
		Brara.C02302.1, Brara.E00518.1	-	AT2G45640	SAP18 (SIN3-ASSOCIATED POLYPEPTIDE 18)	MERISTEM RESPONSE and DEVELOPMENT
	Brara.D00262.1	Brara.G01764.1	AT3G57920	SPL15 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 15)		
	Brara.A00255.1	Brara.H01621.1, Brara.K01339.1	AT4G35900	FD (FLOWERING LOCUS D)		

Table 6. The information of validated genes and primer sequences in two *B. rapa* inbred lines

	Gene ID	Description	In/Del size	Primer Sequence (5'-3')
JKRB-T04	Brara.B03474	Filamin/ABP280 repeat (Filamin)	20	CAACGGTGGTAAAAAGACTCATCTC ACAACGAGTGACAATCTTGTGAA
	Brara.E03329	F10A16.22 Protein	26	CCATCTCCAATATCCTACTGATAA GCTCAAACCAATAGAAAAACACAC
	Brara.J00273	F-box associated ubiquitination effector family protein-related	14	GGACTCTTTCTCGGAATTAACACA GAGATGCAAAGAAGTTTTCTGAAG
OSD2	Brara.B01005	Serine/threonine-protein kinase rio/subfamily not named	16	GTTAGAGATCATGAAAAAGCTGACC TCCTCTAATCATCTATCCCATGA
	Brara.C03289	F-box associated ubiquitination effector family protein-related	19	GATATGATCAAAACATGGCGAGACT GGTTATCTCCTTTATCTCCTGTTG
	Brara.I05136	Plant protein of unknown function (DUF863)	33	ATGTTCTTGTAATAACGAACCAAC CAAACAAAACCAAGCTTCCATATAC
	Brara.J00384	Domain of unknown function (DUF966)	28	AAGTTCCTGTCTTCCAAGCTTCT TATTACTCCCATCTCCGATAATGAA
	Brara.A02540	S-locus glycoprotein domain (S_locus_glycop) // D-mannose binding lectin (B_lectin) // Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr)	10	GCAGAACTGTGCATGTTTCTTAAC CACTACAACATCAGATCTTCCATCA
	Brara.B00274	Protein DR1 homolog	9	TATTCATGGAACAAGTAATCTACCG AAACGTTTACCTTTAGGAAGCAAAG
	Brara.E01810	Cyclin-A3-2-Related	9	GTCTCCGACATCTACGAGTATCTTC ATCTGGAATTGAGACTCTTCAGACC

は GO term 'poly saccharide binding', 'ATP binding', 'protein kinase activity' などが含まれていた。これらのカテゴリーに属する遺伝子には、cell wall-associated kinase, Wall-associated kinase family protein などや Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family, LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein など、BAK1-interacting receptor-like kinase 1 や cysteine-rich receptor-like protein kinase などをコードする遺伝子群が含まれていた。

見出された変異の検証を PCR 法により行った (Fig. 3)。9 bp 以上の In/Del をもつ遺伝子をランダムに10個選定し、Fast Plants とそれぞれの系統を比較したところ、Brara.B01005以外の9個の遺伝子において増副産物の泳動パターンにサイズの差が確認できた。

Shea らは、ハクサイ近交系のリシークエンス解析を行い、得られた SNP 情報から多くの cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーの作成に成功している (8)。今回、我々は系統特異的 SNPs を2系統合計で 386,699個、In/Dels を 164,188箇所同定することと、約 3,300の遺伝子において機能喪失をもたらす変異を同定することができた。今後は、これらを利用した DNA マーカーの開発や、同定した変異を標準系統に戻し交配などにより導入することで、その遺伝子の機能解析を行うことも可能になる。このことから、本研究で得られたデータセットは、*B. rapa* の遺伝学および育種学研究を行う際有用な情報となるであろう。

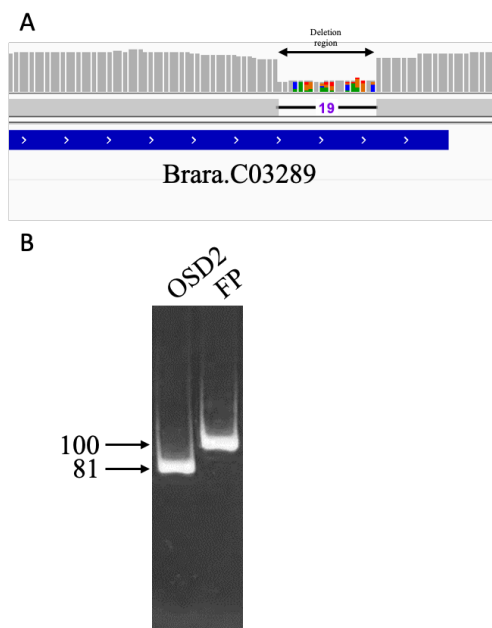


Fig. 3. Identification of the variant allele using Indel primers.  
 (A) Target site and deletion size.  
 (B) DNA banding pattern of Indel-Brara. C03289 marker for detection of variant allele. OSD2; *Brassica rapa* inbred line OSD2, FP; Fast plants.

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、貴重なご意見や様々な支援を頂きました京都産業大学生命科学部の河邊昭教授、木村成介教授に感謝いたします。また、京都産業大学において次世代シーケンサーによる塩基配列解析を行ってくださった降旗初佳さんに感謝します。

## 要 約

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) および insertion-deletion (In/Dels) は、植物のゲノム全体に広く分布している最も豊富な遺伝的変異であることから、DNA マーカーとしての汎用性が高い。*Brassica rapa* は、葉菜類のハクサイやコマツナ、根菜類であるカブ、油糧作物であるアブラナなどを含み、世界中で栽培・消費されている農業上重要な野菜のひとつである。本研究では、ハクサイ近交系 (JKRB-T04) とコマツナ近交系 (OSD2) において全ゲノムリシーケンス解析を行い、両系統が持つ変異の同定を行なった。その結果、合計 542,015 個の SNPs と 200,460 箇所の In/Dels を同定し、このうち 118,519 個の SNPs、27,470 箇所の In/Dels は JKRB-T04 特異的変異であり、268,180 個の SNPs、136,718 箇所の In/Dels は OSD2 特異的変異であった。また、*Brassica rapa* Fast Plants においてリファレンスゲノムにおいてアノテーションされている遺伝子のうち 60.1% の遺伝子

に変異が存在しており、遺伝子機能に重大な影響のある変異をもつ遺伝子が両系統合わせて約 3,300 個あった。また、育種上重要である開花制御遺伝子に注目して解析したところ、17 個の開花制御遺伝子においても変異が存在することが判明した。本研究で同定された多くの SNPs および In/Dels のデータセットは、*B. rapa* の遺伝学およびゲノム学的研究に貴重なマーカーリソースを提供するであろう。

## 引用文献

- 1) Akter A., Itabashi E., Kakizaki T., Okazaki K., Dennis E.S., Fujimoto R., 2020, *Fron. plant sci.* 11, 619417.
- 2) Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium, 2011, *Nat. Genet.* 43 (10), 1035-1039.
- 3) Li P., Su T., Zhao X., Wang W., Zhang D., Yu Y., Bayer P.E., Edwards D., Yu S., Zhang F., 2021, *Plant Biotechnol. J.* 19, 966-976.
- 4) Zhang L., Cai X., Wu J., Liu M., Grob S., Cheng F., Liang J., Cai C., Liu Z., Liu B., Wang F., Li S., Liu F., Li X., Cheng L., Yang W., Li M.H., Grossniklaus U., Zheng H., Wang X., 2018, *Hortic. Res.* 5:50.
- 5) Li F., Kitashiba H., Inaba K., Nishio T., 2009, *DNA Res.* 16, 311-323.
- 6) Rahman M., McVetty P.B., Li G., 2007, *Theor. Appl. Genet.* 115, 1101-1107.
- 7) Zhang J., Lu Y., Yuan Y., Zhang X., Geng J., Chen Y., Cloutier S., McVetty P.B., Li G., 2009, *Plant Mol. Biol.* 5, 553-563.
- 8) Shea D.J., Shimizu M., Itabashi E., Miyaji N., Miyazaki J., Osabe K., Kaji M., Okazaki K., Fujimoto R., 2018, *Breeding Sci.* 68, 375-380.
- 9) Li Y., Luo X., Peng X., Jin Y., Tan H., Wu L., Li J., Pei Y., Xu X., Zhang W., 2023, *BMC Genomics* 24, 445.
- 10) Bloomer R.H. and Dean C., 2017, *J. Exp. Bot.* 68 (20), 5439-5452.
- 11) Leijten W., Koes R., Roobeek I., Frugis G., 2018, *Plants*, 7 (4), 111.
- 12) Itabashi E., Osabe K., Ryo F., Kakizaki T., 2018, *Plant Cell Rep.* 37 (1), 87-101.
- 13) Fabio F., de Montaigu A., Coupland G., 2010, *Cell* 141 (3), 550-550e2.
- 14) Luo X. and He Y., 2020, *J. Integr. Plant Bio.* 61 (1), 104-117.
- 15) Antoniou-Kourounioli R.L., Zhao Y., Dean C., Howard

- M., 2021, *Front. Plant Sci.* 12, 628726.
- 16) Andrés F. and Coupland G., 2012, *Nat. Rev. Genet.* 13, 627-639.
- 17) Lauffer H.B., Lauffer D. Williams P., 2012, Wisconsin Fast Plants Program.
- 18) Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. 2009, *Genome Biol.* 10 (3), R25.
- 19) Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., 2009, *Bioinformatics* 25, 2078-2079.
- 20) Van der Auwera G.A., Carneiro M.O., Hartl C., Poplin R., Del Angel G., Levy-Moonshine A., Jordan T., Shakir K., Roazen D., Thibault J., Banks E., Garimella K.V., Altshuler D., Gabriel S., DePristo M.A., 2013, *Curr. Protoc. Bioinformatics* 43:11. 10. 1-11. 10. 33.
- 21) Cingolani P., Platts A., Wang le L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M., 2012, *Fly* 6 (2), 80-92.
- 22) Tian T., Liu Y., Yan H., You Q., Yi X., Du Z., Xu W., Su Z., 2017, *Nucleic Acids Res.* 45 (W1) , W122-W129.



## 紀 要 委 員 会

委員 長 川 邊 隆 大  
委員 平 野 将 司  
佐 藤 祐 介

## EDITORIAL COMMITTEE OF PROCEEDINGS

Chairman Takahiro Kawanabe  
Member Masashi Hirano  
Yusuke Sato

Published by  
School of Agriculture, Tokai University  
871-12 Sugido, Mashiki-machi, Kamimashiki-gun, Kumamoto,  
861-2205, Japan

## 東 海 大 学 紀 要 農 学 部

第43巻 2024

2024年3月15日発行

発行所 東海大学農学部  
〒861-2205 熊本県上益城郡益城町杉堂871-12  
電話 096(382)-1141

印刷所 有限会社ベストプロセス  
〒862-0920 熊本県熊本市東区月出3丁目2-62  
電話 096(284)-1628

PROCEEDINGS  
OF  
SCHOOL OF AGRICULTURE  
TOKAI UNIVERSITY

---

Vol. 43    2 0 2 4

---

- Isolation of polyamide 4-degrading bacteria and the degradation behaviors of polyamide 4  
..... Ryuhei Karato, Keiko Morikami, Koichiro Tachibana, Masayoshi Honda  
Hideki Abe, Seiya Shimoda, Ayaka Hokamura..... 1
- Identification of Variations in *Brassica rapa* Inbred Lines  
Using Next Generation Sequencers.  
..... Emori Okamoto, Masaaki Go, Takahiro Kawanabe ..... 7