



Title	ダイズの硬実性に関する分子機構と進化機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	張, 聖珍
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11999号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60191
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Jang_SeongJin_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

氏 名 張 聖 珍

学 位 論 文 題 名

ダイズの硬実性に関与する分子機構と進化機構に関する研究

種子の硬実性は、マメ科の野生植物にとり不安定で予測不可能な環境変化に対する適応を支える重要な特性である。その栽培型では、硬実性が喪失し種子は播種後速やかに吸水して発芽が始まる。ダイズ品種の多くは易吸水性の種子を持つが、系統の中には硬実性の種子を持つ品種が存在する。ダイズの硬実性は、高温多湿環境下における種子の生存力の維持、病原菌の種子内部への感染防御、過水分下での発芽力の維持などの適応的役割を果たす。一方で、硬実種子は、石豆としてダイズ種子の食品加工の問題となる。栽培および種子の加工上の意義にもかかわらず、硬実性の誘発機構や遺伝機構については十分に理解されていない。本研究では、野生ダイズの硬実性がダイズ品種に導入された準同質遺伝子系統を用いて、硬実性に関与する量的遺伝子(QTL)の責任遺伝子を特定し、その機能を形質転換による相補実験ならびに組織化学的解析を通じて検証した。さらに、硬実性から吸水性への変化を司るDNA多型ならびに硬実性遺伝子のシーケンス解析から、ツルマメからダイズへの栽培化や、種子吸水性の進化機構を考察した。

(1) 連続戻し交雑により、硬実性に関与するQTL—*qHS1*の硬実性遺伝子が導入されたタチナガハの準同質遺伝子系統を用いて、*qHS1*が硬実性および種皮形態に及ぼす効果を解析した。*qHS1*の硬実性が導入された硬実型NILでは、吸水が抑制され、高湿ならびに乾燥条件下での種子水分含量の変化が易吸水品種タチナガハに比べて著しく低く、導入された*qHS1*の硬実遺伝子が種皮の吸水性に強く関与することが明らかになった。走査型電子顕微鏡を用いた観察から、タチナガハでは、初期の水の侵入口と考えられる種子背面部の種皮表面に、柵状組織の奥深くまで広がる大小多数の亀裂が存在したが、硬実型NILにはほとんど亀裂は観察されず、*qHS1*の硬実遺伝子は、亀裂の生じやすいタチナガハの軟弱な種皮の構造を、単独で強化する能力を持ち、その結果硬実種子をもたらすことが明らかとなった。

(2) *qHS1*のファインマッピングを行った結果、*qHS1*の候補領域を93kbの領域に狭小化することができた。この領域に予測された10遺伝子について、登熟過程の種皮における発現を解析した結果、グリコシル水酸化酵素ファミリーに属する2遺伝子に発現が認められた。硬実性と吸水性のNIL間に発現量の差が認められなかったことから、両遺伝子のcDNAシーケンスを解析した結果、エンド-1,4-β-グルカナーゼをコードする遺伝子に単一塩基の非同義置換が観察され、タチナガハではイソロイシンが硬実型NILではセリンに置換していた。この遺伝子の推定アミノ酸と70%以上の類似性をもつ971個のアミノ酸配列と比較した所、硬実型NILで観察されたセリンが全体の61.3%を占めたのに対して、イソロイシンを持つ配列はダイズのゲノム解析に用いられたWilliams 82の配列のみであった。アミノ酸置換が認められた部位は触媒反応に重要な役割をもつ触媒サブサイト-2に隣接しており、この部位のアミノ酸置換は基質特異性などの酵素機能に影響を与えると推察された。観察されたSNPを識別するDNAマーカーを作出して、アジア各地から収集されたダイズ194系統の種子の吸水試験を行い、29系統に由来する69粒の硬実種子についてSNP解析を行った結果、すべての硬実種子がSNPに関して硬実型のホモまたはヘテロであった。これらの結果も、*qHS1*はエンド-1,4-β-グルカナーゼ遺伝子であり、観察された非同義置換が吸水性の差の原因であるという先の推察を支持した。

(3) *qHS1*の責任遺伝子として特定されたエンド-1,4-β-グルカナーゼの機能を検証するために、種皮におけるβ-1,4-グルカンの蓄積をカルコフロールホワイト染色により観察した結果、β-1,4-グルカンの蓄積を示す強い蛍光が硬実性NILの種皮キューティクルに観察されたが、易吸水のタチナガハではそのような蓄積は認められなかった。さらに、硬実型NILに由来する*qHS1*遺伝子を易吸水晶種カリユタカに形質転換したT2個体の硬実性ならびに種皮形態を調査した。対照に用いた選択マーカーGFPのみが導入された系統では、硬実種子はほとんど観察されなかったのに対して、硬実遺伝子が導入された T2個体では硬実種子が観察され、また、それらの種子の背面部の種皮には亀裂が減少し、種皮キューティクルにβ-1,4-グルカンが蓄積していた。これらの結果から、*qHS1*はエンド-1,4-β-グルカナーゼを支配しており、セリンを有する硬実型NIL由来の遺伝子が機能的であることが示された。

(4) *qHS1*のSNPの多型をアジア各地から収集されたダイズ1,554系統とツルマメ428系統について調査した。調査したツルマメ全系統で硬実型の塩基を有していたが、一方ダイズでは95.8%にあたる1,498系統で吸水型の塩基を、残りの66系統で硬実型の塩基を有していた。硬実型の塩基を有する系統は主に中国南部から東南アジアやアジア中央部で観察された。*qHS1*の5'非翻訳領域から3'非翻訳領域にいたる3,344塩基の配列をダイズ25系統ならびにツルマメ14系統について解析した。全体で、特定したSNPに加えて13個のSNPが検出され、供試系統は17のハプロタイプに分類することができた。ダイズでは11種類のハプロタイプが観察され、これらの内3種が吸水型のSNPをもつハプロタイプであった。一方、硬実型のハプロタイプが8種類存在し、ダイズに存在する硬実型SNPを持つ系統は、異なるハプロタイプに由来することが明らかとなった。

これらの実験結果から得られた知見を基に、ダイズにおける硬実性の分子機構と、表現型に及ぼす効果、ならびに、ダイズにおける栽培化のプロセスと硬実種子から吸水種子への進化機構を考察した。硬実性の分子機構の理解は、種子の貯蔵性の改良、病原菌の種子への感染防御ならびに発芽における過水分に対する抵抗性など、ダイズ種子の農業特性に関わる育種に貢献すると考えられた。