



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	張, 聖珍
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/60192
Type	doctoral thesis
File Information	Jang_SeongJin_summary.pdf



博士論文要約

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

平成27年度 博士論文

北海道大学 大学院 農学院

生物資源科学専攻 博士課程

張 聖珍 (Jang Seongjin)

硬実性は、マメ科野生植物の一般的な特性であり、不確定な環境変化に対する適応戦略の一つとして、また、嗅覚を利用するげっ歯類からの捕食を回避するうえで機能することが知られている。一方、マメ科の栽培作物の多くは硬実性を失い、播種後速やかに吸水して発芽する。ダイズ品種の多くは吸水性の種子をもつが、硬実性の種子を持つ品種も存在する。ダイズにおいて、硬実性は、急激な吸水が引き起こす発芽阻害の回避や、高温過湿環境下での種子生存力の維持に関与することが知られている。一方で、硬実種子は石豆として食品加工上の問題となる。硬実性に関する研究はこれまでも盛んに進められ、硬実性の原因物質として、種皮におけるカルシウムの蓄積、ヘミセルロースの一種であるキシランや ω -ヒドロキシ脂肪酸の蓄積が関与すること、遺伝的要因として、ツルマメや半野生ダイズを用いた交雑後代の量的形質遺伝子座 (QTL) 解析から、硬実性に関与する複数のQTLが報告されてきた。本研究では、表現型に及ぼす効果が最も大きなQTLである*qHS1*の責任遺伝子を同定し、硬実性を引き起こす分子機構を明らかにすること、また、ダイズにおける種皮の硬実性から吸水性への進化機構を明らかにすることを目的とした。

連続戻し交雑により*qHS1*の硬実性遺伝子が導入された品種タチナガハの準同質遺伝子系統 (TA-HS) 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。TA-HSでは、吸水が強く抑制され、*qHS1*の硬実性遺伝子が種皮の吸水性に強く関与することが明らかとなった。ダイズ種子が最初に水を吸収する種子背面部の表面構造を走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、タチナガハでは小さな亀裂が多数観察されたが、TA-HSでは亀裂はほとんど観察されなかった。アルカリ処理により種皮表面のキューティクルを取り除いたところ、タチナガハで観察された亀裂は柵状細胞層の奥まで広がっていた。タチナガハの吸水

性は種子背面部の亀裂が水の種皮内部への侵入をもたらす結果であり、*qHS1*の硬実性遺伝子はタチナガハの軟弱な種皮構造を単独で強化する能力を持つことが明らかとなった。

*qHS1*のファインマッピングを行った結果、その候補領域を93 kbのゲノム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、種子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。準同質遺伝子系統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、タチナガハでのイソロイシンがTA-HSではセリンに置換していた。この遺伝子と70%以上のアミノ酸類似性をもつ971個のアミノ酸配列と比較したところ、TA-HSで観察されたセリンが全体の61.3%を占め、イソロイシンはダイズのゲノム解析に用いられたWilliams 82の配列にのみ認められた。このアミノ酸置換は酵素タンパク質の触媒反応に重要な触媒サブサイトに隣接しており、セリンからイソロイシンへの置換がエンド-1,4- β -グルカナーゼの酵素機能に影響を与え、硬実性から吸水性をもたらしたと推察された。この単一塩基置換を識別するDNAマーカーを作出して、アジア各地の栽培ダイズ29系統に見出された69粒の硬実種子についてその多型を解析した結果、すべての種子が硬実型塩基のホモまたはヘテロであった。これらの結果も、*qHS1*がエンド-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した先の推察を支持した。

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を用いて解析した結果、TA-HSでは柵状細胞の外層にあたる種皮キューティクルに β -1,4-グルカンが高度に蓄積しており、タチナガハとは大きく異なった。

*qHS1*の硬実性遺伝子を易吸水品種カリユタカに形質転換したT2個体を作成し、それらの硬実性ならびに種皮形態を観察した。対照個体では硬実種子はほとんど観察されなかったが、T2個体では硬実種子が観察され、また対照個体に比べてT2個体では、種子背面部種皮表面の亀裂が減少し、種皮キューティクルに β -1,4-グルカンが高度に蓄積していた。これらの結果から、セリンを有する野生ダイズ由来のエンド-1,4- β -グルカナーゼが機能的なタンパク質であり、硬実性の発生に関与することが示された。

以上の結果より、ダイズの硬実性と吸水性の差異にはエンド-1,4- β -グルカナーゼ遺伝子の非同義置換が関与しており、セリンを有する硬実型が機能型であり、種皮のキューティクルにその生成物であるキシログルカンや β -1,3-1,4- β -D-グルカンなどを蓄積することによって硬実性をもたらすと考えられた。

*qHS1*の単一塩基置換の多型を、アジア各地から収集されたダイズ1,554系統およびツルマメ428系統について調査した。調査したツルマメは全て硬実型の塩基を有していたが、ダイ

ズでは95.8%が吸水型の塩基を、残りの4.2%が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。*qHSl*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13個の塩基置換が検出され、供試系統を17のハプロタイプに分類することができた。これらのうち、ダイズでは11種類のハプロタイプが存在し、それらのうち8種類が硬実型の塩基を有していた。これらの結果から、ダイズに存在する*qHSl*座の硬実性遺伝子は起源の異なるハプロタイプからなり、栽培化初期の原始的なダイズ集団には、比較的多様な*qHSl*ハプロタイプが存在していたと考えられる。その後、特定のハプロタイプから、硬実性を吸水性に変える単一の非同義置換により吸水性遺伝子が生じ、栽培環境に適した遺伝子としてその後のダイズ集団に広がったものと思われる。一方で、様々なハプロタイプから構成された硬実性遺伝子は、主に、南アジアや東南アジアなど高温多湿環境下における適応性から、現在に至るまで利用され続けてきたと思われる。

本研究で明らかにされた硬実性の分子機構は、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思われる。