

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03754

研究課題名(和文) 収量に關する果皮の裂開機構の生理的解析

研究課題名(英文) Physiological analysis of pericarp dehiscence mechanism involved in yield

研究代表者

藤野 介延 (Fujino, Kaien)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：80229020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：脱皮が容易なダツタンソバ品種をライスタイプといい、単一の遺伝子によって決定されるが、この遺伝子は不明だった。非ライスタイプでは表皮下の細胞の並層分裂が生じ、これらの細胞層が後に木化し、果皮の機械的強度が増加するが、ライスタイプではこの表皮下の細胞の並層分裂が生じないことが判明した。RNAシーケンスでは、ダツタンソバ(FtAG)のAGAMOUSオルソログのmRNAの一部がライスタイプに存在しないことが判明した。後代の連鎖解析により、FtAGが並層分裂を起こす細胞の分化を促進し、果皮の強度が増加する表現型を決定する遺伝子の候補であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダツタンソバは機能性成分であるルチンをフツウソバの100倍以上含有しており、近年食味も改善され機能性食品として高い評価を得ている。しかしながら、ダツタンソバのそば殻は剥けにくく、製粉時の収量の低下や雑菌の混入による品質の低下をまねいている。ダツタンソバの果皮が薄く剥けやすくなる原因遺伝子を本研究で特定したことにより、育種の遺伝子マーカーとしての利用が可能となり、加工特性が向上した新たな品種の育成に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Tartary buckwheat cultivars that allow easy dehulling are called rice-type cultivars. The rice and non-rice hull types are determined by a single gene, but this gene is unclear. Here, I show that cells underneath the epidermis in the proximity of ovary midribs undergo periclinal cell divisions in non-rice-type cultivars but do not in a rice-type cultivar. The cells that arose from the periclinal cell divisions later underwent lignification, which should increase mechanical strength of hulls. In RNA sequencing, a partial mRNA of an AGAMOUS ortholog in Tartary buckwheat (FtAG) was found to be absent in the rice-type cultivar. By RNA sequencing and linkage analysis, we also show that FtAG is a candidate for the gene that promotes differentiation of the cells undergoing the periclinal cell divisions and that thereby determines the RT and NT phenotypes in Tartary buckwheat.

研究分野：作物生理学

キーワード：果皮 ダツタンソバ ダイズ 裂莢 裂皮

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 果皮の役割

植物は子孫の維持や生息域を拡大するために、結実した種子を何らかの方法を用いて拡散する。種子の拡散や維持に深く関わっている組織の一つが子房壁が発達した果皮である。植物は果皮が動物の食用となることや、果皮である莢がはじけ(裂莢)種子を地面に散布させることで生息域を拡大している。また丈夫な果皮形成は種子を保護し生育期間を延長することで生息域の拡大に役立っている。人間が栽培するようになった植物、作物において果皮は、園芸作物では食用として利用する一方、ほとんどの食用作物では廃棄されることとなる。また作物にとって、植物が本来持つ種子を拡散させる能力は、収量や品質を著しく低下させ、輪作の栽培体系に於いては次年度の雑草発生の要因となる。それゆえ作物は長年にわたる栽培の過程で脱粒や裂莢を起こさないものが選抜・育種されてきた(Changbaoら Science 2006, Konishiら Science 2006)。

### (2) 現段階での問題点

ダイズのように、近年の栽培体系の変化により今まで問題にならなかった裂莢性が新たに大きな問題となっている作物もある。ダイズの裂莢性に関する問題の背景には、転換畑における栽培の増加による栽培を巡る環境の変化(機械収穫の普及、作期競合による圃場における成熟後の立毛状態での長期間放置、収穫期の天候不順の頻発など)があるにもかかわらず、本州以南の主要品種に難裂莢性が付与されていないことである。近年、食味を著しく改善された品種も育成され(Suzukiら Breeding Science 2014)、耕作放棄地での栽培が増加している、機能性食品として注目されるダットンソバは、果皮が種子に密着しておりフツソバやイネ、コムギのように容易に果皮を除去することができず、製粉段階での損失が大きい。種子の登熟過程において果皮が裂開する系統も存在するが(Wang & Campbell Euphytica 2007)、国際条約上、この系統を育種に利用することは困難である。

### (3) 新たな裂莢性関連遺伝子 *Pdh1*

我々は、アメリカや北海道のダイズ品種がもつ難裂莢性に関する DNA マーカーの作出と生理機構の解明を目的として、QTL 解析を行い、作用力の大きな QTL、*qPDH1* を同定し(Funatsukiら Plant Breeding 2006)、高精度マーカーの作出(Funatsukiら Breeding Science 2008, Suzukiら Molecular Breeding 2010)ならびに、さらなる大規模集団の解析により *Pdh1* 遺伝子を特定した(Funatsukiら Proc Natl Acad Sci USA 2014)。*Pdh1* 遺伝子はリグニン合成初期、リグノールからリグナンが形成される際に働くディリジェント(形成性操作)タンパク質と相同性を示した(Davinら Science 1999)。しかしながら、シロイヌナズナで明らかにされている果皮裂開関連遺伝子(Liljegrenら Nature 2000, Cell 2004)のいずれのものとも異なっていた(Funatsukiら Proc Natl Acad Sci USA 2014)。シロイヌナズナでは、果皮の裂開が起こらない突然変異体は、果皮同士が結合している部分(縫合部)に形態異常(離層形成阻害)があるが、ダイズでは *qPDH1* が難・易裂莢型の準同質遺伝子系統(NIL)間で縫合部の形態に大きな差異がなく(Suzukiら Plant Production Science 2009)、易裂莢型は難裂莢型に比べ、乾燥による捻じれの度合いが高く、莢の乾燥による収縮の原因となる細胞壁の質的な違いと考えられる(Funatsukiら Proc Natl Acad Sci USA 2014)。これらの知見はナタネやゴマなど種子の成熟とともに果皮の裂開が生じ、脱粒が起きる作物やダットンソバのように果皮が裂開しない作物の製粉歩留まりの向上にも役立つ。

果皮の性質は、上述したとおり、植物学的のみならず農業にも重要な形質である。今まで報告されている種子の脱粒耐性遺伝子の多くは、縫合部の離層形成を阻害するものである。農業上、種子を覆う果皮の分離は重要であり、作物で利用しようとした場合、コンバイン収穫における未脱粒(莢の中に残り収穫ロスとなる)の増加が懸念され、新たな収穫体系が要求される。*Pdh1* の変異は果皮の微妙な特性を変化させた現在の農業体系に適した繊細な変異である。このような繊細な変異は大きく農業体系を変化させることなく作物の品種改良につながる。またダットンソバのように製粉歩留まりに直接影響を及ぼす果皮の生理特性を解析することは、今後の環境変化に対する際の重要な基盤的情報となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、収量に直接影響をもたらす果皮の収縮による作物の裂莢・裂開の生理機構を明らかにする。ダイズの裂莢性に関与する QTL をもとに特定された遺伝子 *Pdh1* が莢の収縮に及ぼす影響や、モデル植物・シロイヌナズナを利用し、*Pdh1* がもたらす細胞壁構成成分の機能と役割を明らかにするとともに、得られた知見をもとにナタネやダットンソバの果皮の裂開における生理機構を解明する。また裂開に係る遺伝子を特定し、ダットンソバやナタネにおいてはダイズ・シロイヌナズナの知見をもとに果皮の裂開に関わる遺伝子を特定し、遺伝子マーカーの作成を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では、果皮の裂莢・裂開機構を生理的に解析するためダイズでは裂莢に及ぼす捻じれの影響について検討した。自然条件下では相対湿度 (RH) が天気や日周に変化するため、莢では乾燥による捻じれと湿潤による捻じれの回復が繰り返されていると考えられる。RH 100%・1日間という条件を周期的に繰り返し、捻じれかたが異なる易・難裂莢型 NIL 間で比較した。また莢の部位によって捻じれ方が異なるため果皮の切断面の形態観察を行った。

ダットンソバにおいては果皮が裂開する系統 (ライスタイプ) としない系統間で果皮の形態観察を行うとともに、開花時の子房において網羅的な発現解析を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) ダイズの捻じれによる裂莢

RH 100%・1日間の処理を1日、3日、5日おきに行い実験開始から26日経過後、RH 20%の環境に1日放置した後、裂莢した割合を求めた。いずれの条件においても易裂莢型のほうが裂莢した莢が多く、また湿潤条件と乾燥条件の繰り返しが多いほうが裂莢した割合が高かった (表1)。

表1 乾燥・湿潤反復条件下のダイズ裂莢率

	湿潤処理間隔 (%)		
	1日	3日	5日
易裂莢型NIL	50	40	0
難裂莢型NIL	10	0	0

#### (2) ダイズ莢の捻じれる部位

ダイズ莢では乾燥時に捻れる部分と捻れない部分があり、種子が存在している部分の果皮しか捻じれず、種子が存在しない平坦な部分は捻じれない。しかしすでに裂開している莢を湿潤状態にし捻じれを回復させ、再度乾燥させるとすべての領域で捻じれが生じ、莢全体の捻じれ方は裂開していない状態の時よりも捻じれの度合いが高かった。これは柔組織の水分含量による可塑性の変化によるものと考えられる。また種子が存在する部位の柔組織の厚さがそうでない部分と比較し薄いことから、柔組織の厚さは捻れに対し拮抗的に働くものと考えられ、さらなる解析が必要と思われる。

#### (3) ダットンソバの裂皮

ダットンソバには種子の成熟中に果皮の裂開 (裂皮) が生じる「ライスタイプ」と呼ばれる系統がある。この「ライスタイプ」の固定系統と従来品種「北海 T8 号」との果皮の組織観察を行った。開花後8日目の「北海 T8 号」の果皮では、将来厚壁組織になる数層の柔組織が観察された。表皮下の数層の柔組織は、開花後14日目において厚壁細胞へ発達し、開花後43日目にはリグニンの蓄積が観察された。「ライスタイプ」においては表皮下の細胞層が一層のままで、薄い果皮が形成された。「北海 T8 号」と比較すると厚みが薄く、開花後14日目において厚壁細胞への発達はあまり見られず、成熟した (図1)。さらにこの細胞層の分裂がいつ生じるかを調べたところ、開花時にはすでに「北海 T8 号」では子房の表皮下で並層分裂による細胞層が確認され、子房発達の初期段階で形態的に差があることが確認された。これらのことからダットンソバの果皮の発達はシロイヌナズナのものとは異なることが予想された。

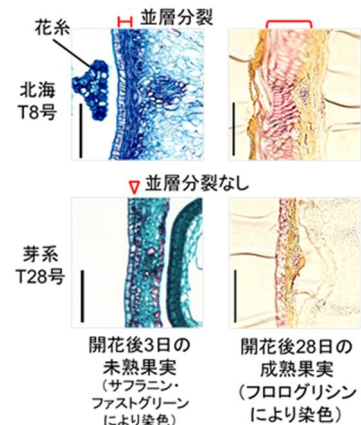


図1 ダットンソバ果皮横断面

#### (4) ダットンソバ雌蕊の網羅的発現解析

開花時の「ライスタイプ」の固定系統と従来品種「北海 T8 号」の雌蕊から RNA を抽出し網羅的発現解析を行った。RNA シークエンシングの結果、AGAMOUS オースログ (*FtAG*) の mRNA が「ライスタイプ」において42塩基欠損していることが示された (図2)。この欠損は翻訳産物に14アミノ酸の欠損をもたらすものであった。ゲノム配列を調べた結果、当該欠損領域に隣接する3'-スプライスアクセプター部位のGが「ライスタイプ」においてはAに置換されていることが明らかになった (図3)。

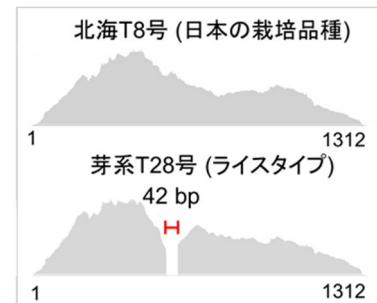


図2 AG様コンティグにマップされたリードの位置のヒストグラム

「ライスタイプ」における *FtAG* の14アミノ酸の欠損は、自身やそのホモログとの複合体形成に関わるとされるKドメインに位置していた。このことから、「ライスタイプ」の果皮の表現型は *FtAG* の複合体形成能の欠失により引き起こされていることが予想された。



図3 *FtAG* のゲノム構造

(5) ダットンソバ F2 雑種の連鎖解析

日本の栽培品種「満天きらり」とライスタイプ「芽系 T29 号」を交配し、得られた F2 後代について果皮の表現型と *FtAG* 遺伝子の一塩基多型を調べた。一塩基多型の変異を含むように *FtAG* の一部を PCR で増幅し、制限酵素 *BsI* を処理して判別した(図4)。「ライスタイプ」(A/A ホモ型)は制限酵素 *BsI* では認識されないが、従来品種「北海 T8 号」や「満天きらり」は G/G ホモ型のため制限酵素により切断された 2 本のバンドを生じた。ヘテロ型 (A/G) は 3 本のバンドが生じ、両遺伝子型のバンドが存在する泳動像を示した(図4)。

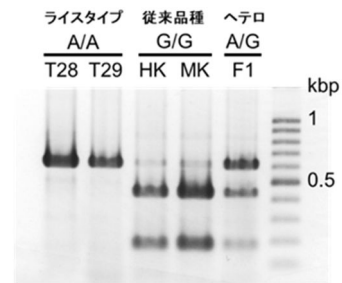


図4 *BsI* 制限酵素処理後の泳動像

「ライスタイプ」と栽培品種「満天きらり」の F1 の自殖後代・F2 雑種の果皮の表現型と *FtAG* 遺伝子の一塩基多型を調べた。F2 雑種 88 個体のうち 67 個体がむけにくい果皮、21 個体がむけやすい果皮を持っていた(分離比 3.19 : 1)(表2)。また F2 雑種の一塩基多型を調べた結果、果皮の表現型と *FtAG* 遺伝子の一塩基多型の連鎖が確認できた(表2)。これらの結果はダットンソバの *AGAMOUS* 遺伝子上の一塩基多型が果皮のむけやすさを決定することを示した。ABCE モデルで花器の形態を決定する *AGAMOUS* 遺伝子が果皮の形態にも重要な役割を果たしていることは今まで報告のない新たな現象であり、ダットンソバに関するこれらの結果をまとめて 2020 年に論文として発表した (Fukuie ら *Planta*)。

表2 F2雑種の連鎖解析

表現型	ジェノタイプング した個体数	一塩基多型		
		A/A	G/G	A/G
むけやすい	21	21	0	0
むけにくい	37	0	12	25

「ライスタイプ」の原因遺伝子を特定したことにより、今後裂皮性の遺伝子マーカーとして裂皮しやすい品種育成の効率化に役立つものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuka Fukuie, Hana Shimoyama, Toshikazu Morishita, Daisuke Tsugama, Kaien Fujino	4. 巻 251
2. 論文標題 A putative AGAMOUS ortholog is a candidate for the gene determining ease of dehulling in Tartary buckwheat ( <i>Fagopyrum tataricum</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-020-03374-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福家優花, 津釜大侑, 下山花, 森下敏和, 藤野介延
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたダツタンソバ果皮形質に関する遺伝子解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福家優花, 津釜大侑, 下山花, 森下敏和, 藤野介延
2. 発表標題 ダツタンソバの果皮のむけやすさを決定する遺伝子の候補の解析
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Fukuie, Hana Shimoyama, Toshikazu Morishita, Daisuke Tsugama, Kaien Fujino.
2. 発表標題 A putative AGAMOUS ortholog is a candidate for the gene determining ease of pericarp removal in Tartary buckwheat
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka Fukuie, Hana Shimoyama, Toshikazu Morishita, Daisuke Tsugama, Kaen Fujino.
2. 発表標題 A putative AGAMOUS ortholog is a candidate for the gene determining pericarp phenotype in Tartary buckwheat
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福家優花, 津釜大侑, 下山花, 森下敏和, 藤野介延
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたダツタンソバ果皮形質に関する遺伝子解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下山花, 津釜大侑, 森下敏和, 藤野介延
2. 発表標題 ダツタンソバの薬培養の検討
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福家優花, 下山花, 津釜大侑, 森下敏和, 藤野介延
2. 発表標題 ダツタンソバ果皮形成に関わる遺伝子解析
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森下 敏和 (Morisita Toshikazu)  (30414949)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・室長・調整監・技術支援センター長等  (82111)	
研究分担者	山田 哲也 (Yamada Tetsuya)  (70374618)	北海道大学・農学研究院・講師  (10101)	
研究分担者	津釜 大侑 (Tsugama Daisuke)  (10726061)	東京大学・アジア生物資源環境研究センター・准教授  (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------