

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05571

研究課題名(和文)ゴマ種子におけるリグナン生合成経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the lignan biosynthesis pathway in sesame seeds.

研究代表者

山本 将之(YAMAMOTO, Masayuki)

富山大学・学術研究部理学系・講師

研究者番号：10456402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではゴマリグナン(セサミン、セサモリン、セサミノールなど)の生合成経路の解明を目的に、未同定のセサミノール生合成遺伝子、およびリグナン総含量の制御に関わる遺伝子の同定を試みた。本研究の結果、新規セサミノール生合成遺伝子が存在するゲノム領域を絞り込んだ。リグナン総含量に関しては、制御に関わる可能性の高い転写因子遺伝子を見出すとともに、それとは異なる制御遺伝子が存在するゲノム領域も絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、種子中のゴマリグナン総含量の制御に関わる可能性の高い遺伝子を見出すとともに、その遺伝子とは異なるゴマリグナン含量制御遺伝子が存在するゲノム領域と、未同定の新規セサミノール生合成が存在するゲノム領域を絞り込んだ。今後、これら形質に関わる遺伝子の同定や機能解析を進めることで、ゴマリグナン生合成経路が解明されるとともに、ゴマリグナンを豊富に含む、または特定のゴマリグナンのみが種子中に高蓄積する、付加価値の高いゴマ品種の育種も可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to identify novel sesaminol synthase genes and genes which are involved in the regulation of the total sesame lignan content in order to elucidate the biosynthesis pathway in sesame seeds. I identified genomic regions where the sesaminol synthase genes could be contained. As for the total sesame lignan content, we found a transcription factor gene controlling the amount of total lignans and a distinct genomic region involved in the lignan content variation.

研究分野：遺伝育種科学

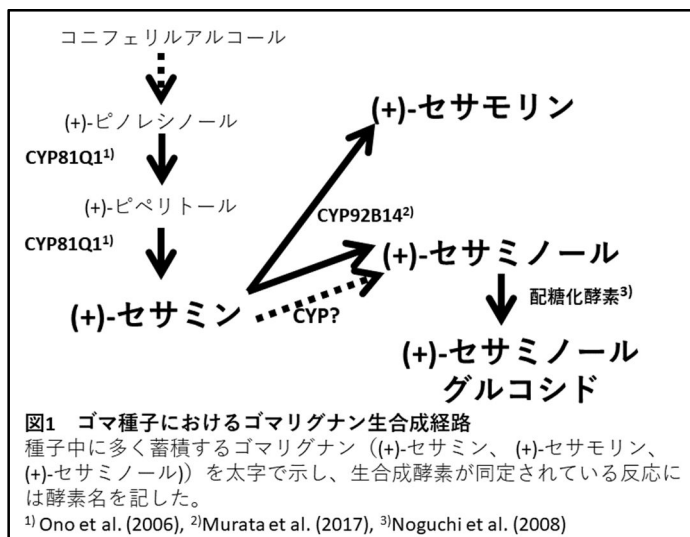
キーワード：リグナン ゴマ セサミノール

1. 研究開始当初の背景

リグナンは維管束植物の幅広い種から見出される二次代謝産物である。ゴマは種子中に多量の油脂とともに、セサミン、セサモリン、セサミノールなどのリグナン(図1, 以下、ゴマリグナンとよぶ)を豊富に含んでいる。これらのゴマリグナンは健康機能性の観点から近年注目を集めているものの、ゴマリグナンの生合成経路は完全には明らかとなっていない。また、種子中のゴマリグナンの含有量は品種・系統ごとに異なるが、ゴマリグナン含有量の制御メカニズムに関する知見もほとんど無い。ゴマリグナンの含有量や各ゴマリグナン分子種の生合成経路や生合成に関わる遺伝子が明らかとなれば、ゴマにおける主要なリグナン生合成経路が解明されるのみならず、維管束植物に含まれる様々なリグナン分子種の生合成の進化に関する重要な知見が得られる。加えて、ゴマリグナンを豊富に含む、またはリグナン分子種の含有量を変化させることにより特定のゴマリグナンのみが種子中に高蓄積する、付加価値の高いゴマ品種の育種も可能となることから、本研究を企てた。

2. 研究の目的

ゴマの種子中に主に蓄積するゴマリグナン(セサミン、セサモリン、セサミノール(種子中で配糖化されたセサミノールグルコシドとして蓄積する))の生合成酵素に関しては、セサミン生合成に関わるシトクロム P450 酵素の CYP81Q1 (Ono et al., 2006)、セサミノールに糖を付加する 2 種の配糖化酵素 (Noguchi et al., 2008) が報告されていた。加えて、研究開始直前に、セサモリンとセサミノールの生合成活性を有するシトクロム P450 酵素の CYP92B14 (Murata et al., 2017) を報告者が同定したことで、



で、ゴマ種子中に蓄積する主要なリグナン分子種の生合成酵素が明らかとなったと考えられた(図1)。しかしながら、CYP92B14の同定に用いたセサモリン低含有系統は、CYP92B14の機能が欠損しているにもかかわらずセサミノールを多く蓄積する。このことからセサミノール生合成能を有する他の酵素が存在することが強く示唆された。また、ゴマリグナンの総含量はゴマ系統ごとに異なるが、個々のリグナン分子種の生合成は、主としてセサミン生合成を起点とし、その後セサミンをセサモリン、セサミノールへと分配していると推察される。すなわち、ゴマリグナンの総含量はセサミン生合成の上流に位置する遺伝子が決定していると考えられるが、研究開始時点ではゴマリグナンの総含量の制御に関する報告はほとんどなかった。そこで本研究では、新たなセサミノール生合成酵素遺伝子と、ゴマリグナン生合成経路の上流に位置すると推察される、総リグナン含量を決定する遺伝子の同定を試みることにした。

3. 研究の方法

報告者の所属する富山大学ではゴマ属植物の遺伝資源を維持している。ゴマ遺伝資源コレクションに含まれる様々な系統より、リグナン含量が異なる系統を選んだ。遺伝集団を用いた解析では、着目したリグナン含有形質について異なる表現型を示す2系統を交雑し、遺伝集団を作出して解析に供した。供試系統、遺伝集団を温室や恒温温室で育成し、HPLCによる種子のリグナン含量測定を行った。また、DNAやRNAの抽出を行い、遺伝子配列の決定、RT-PCRによる発現解析、次世代シーケンスを用いたQTL(量的形質遺伝子座)の同定法であるQTL-seq解析に用いた。

4. 研究成果

本研究ではゴマリグナンの生合成経路の解明を目的に、(1)セサミノール含有形質、(2)総リグナン含有形質、を制御する遺伝子の同定を試みた。

(1) セサミノール含有形質の解析

セサミノール含有形質に関わるQTL領域の解析

報告者は本研究の開始以前に、セサミノール低含有系統と高含有系統の交雑に由来する組換え自殖系統(RIL)を用いた解析から、セサミノール含有形質に関与する可能性の高いQTL領域を見出していた。このQTL領域について、データベースからセサミノール生合成に関与する可能性のある遺伝子を探索したところ、シトクロムP450(CYP)遺伝子が7個見出された。これらの遺伝子について親系統型のアレルの塩基配列を決定、比較したところ、1つの遺伝子のみ

プロモーター領域に SNP (一塩基多型) が見出された。遺伝集団からセサミノール高含有と低含有の系統を選び、登熟種子における CYP の発現を RT-PCR および定量的 RT-PCR で調査した。その結果 3 つの CYP が登熟種子で発現していることが確認されたが、いずれもセサミノール含量と発現量の間に関連性は認められなかった。

新規 QTL の探索

セサミノール含有形質に関わる遺伝子領域の探索を再度行うため、QTL-seq 解析を行った。上記の RIL から、セサミノール高含有個体および低含有個体をそれぞれ複数育成し、QTL-seq 解析に供した。その結果、原因遺伝子が座すると予測される 2 つのゲノム領域が同定され、このうち 1 領域は で解析した領域と同じであった。これらの領域中から、セサミノール生合成に関与する可能性のある遺伝子を探索し、STG 高含有および低含有の個体の登熟種子を用いて発現解析を試みた。しかしながら、候補遺伝子の同定につながるような結果は得られなかった。

これらの解析を通じて、セサミノール含有形質を制御する QTL 領域の絞り込みを行うことができた。原因遺伝子の同定につながらなかった原因として、STG は播種から 10 週以上が経過した種子登熟の後期で蓄積するため、解析に用いる登熟種子サンプルの発育ステージを均一にすることが困難であったことが考えられた。今後は環境条件の変化が少ない条件下で植物材料を育成するとともに、リグナン蓄積パターンを指標に種子登熟ステージを揃えた材料を用いて、遺伝子発現解析を行うことで、原因遺伝子の同定を試みる予定である。

(2) 総リグナン含有形質の解析

NAC 型転写因子の解析

Wei et al. (2015) は、数多くのゴマ系統を用いたゲノムワイド関連解析によりセサミン、セサモリンの含量に関与する可能性がある一塩基多型 (SNP) を複数、報告した。これらの中からセサミンとセサモリン両方の含量に関わると報告された SNP についてリグナン総含量との関連を調べた。まず 226 の富山大学保存ゴマ系統のリグナン総含量を決定した。総含量が高い系統と低い系統を 6 系統ずつ選抜し、各 SNP 領域の塩基配列の比較を行ったところ、1 つの SNP について、リグナン総含量と SNP 型の間に関連が認められた。そこでリグナン総含量に関して段階的な表現型を示す 54 系統を選び、それらの SNP 配列を決定した。その結果、リグナン総含量が極端に少ないリグナン低含有系統の SNP はマイナーアレル型 (低リグナン型アレルとした) を示し、残りの系統は全て野生型であった。この SNP は NAC 型転写因子遺伝子のコード領域に存在することから、この NAC 型転写因子がリグナン総含量の制御に関わることが強く示唆された。

リグナン総含量が高い系統 (野生型アレルを有する) と低い系統 (低リグナン型アレルを有する) の交雑に由来する F₂ 集団を育成し、アレル型とリグナン総含量の関連性を調べた。その結果、野生型アレルのホモ接合体の個体はリグナン含量が高く、変異型アレルのホモ接合体およびヘテロ接合体の個体はリグナン含量が低い表現型を示し、この転写因子がリグナン総含量の決定に関与することが明らかとなった。続いて、複数の高リグナン含有系統の当該遺伝子領域 (コード域、5' 上流域、3' 下流域を含む) の配列を決定し、中程度のリグナン含量を示す系統や低リグナン系統と比較した。その結果、高リグナン含有系統では転写開始点の上流に他の系統には認められない SNP が存在する (高リグナン型アレルとした) ことが明らかになった。高リグナン含有系統と中程度のリグナン含量を示す系統の交配に由来する F₂ 集団を育成し、リグナン含量とアレル型を調査した。その結果高リグナン型アレルを持つ個体はリグナン含量が高いことが示された。

NAC 型転写因子遺伝子のアレルの差異がこの遺伝子の発現に影響を与えるかを調査した。異なるアレルを持つ複数の系統を育成し、それぞれ開花後日数 (DAF: Days After Flowering) 7、14、21 の登熟種子における各系統の NAC 型転写因子遺伝子の発現パターンを半定量的 PCR により比較した。その結果、解析に用いたすべての系統の全登熟ステージで発現が確認された。系統間の発現パターンを比較したところ、低リグナンアレル型系統の DAF21 において発現量の低下が認められた。一方で高リグナンアレル型系統と野生型系統の間で発現量に顕著な差は見られなかった。

以上の結果から、この NAC 型転写因子遺伝子には 3 つのアレルが存在し、遺伝学的解析から低リグナン型のアレルは総リグナン含量を低く、高リグナン型のアレルはリグナン含量を高くする機能を有することが示された。低リグナン型のアレルの SNP は NAC タンパク質の保存領域にアミノ酸置換をもたらす変異であることから、翻訳産物の機能欠損をもたらすことでリグナン含量を低下させる可能性が示唆された。一方で、5' 上流域に SNP をもつ高リグナン型のアレルについては、登熟種子での発現パターンに変化が認められなかった。今後は、この NAC 型転写因子がどのような遺伝子の発現制御を通じて、リグナン含量の制御に関わるかについて解析を進める予定である。

新規のリグナン含量に影響を与える遺伝子の探索

で解析した NAC 型転写因子以外の、総リグナン含有形質制御遺伝子の探索を行った。NAC 型転写因子遺伝子の影響を排除するため、この遺伝子に関して野生型のアレルを持つ系統から、総リグナン含量の高い系統と中程度のリグナン含量を示す系統を選び、両系統の交配に由来する F₂ 集団を作成した。この集団を用いて QTL-seq 解析を行ったところ、NAC 型転写因子遺伝

子座上領域とは異なる染色体領域に、原因遺伝子座上領域を検出した。今後はこの領域に存在する、新規ゴマリグナン総含量制御遺伝子の同定を行っていく予定である。

ゴマ近縁野生種の新規ゲノム解析

報告者らは栽培ゴマ以外に、ゴマの近縁野生種のリグナンについても解析を行っており、近縁野生種が蓄積するリグナン分子種は種間で多様性に富むことを見出している。栽培ゴマに加えてゴマ近縁野生種のリグナン生合成経路を解明できれば、栽培ゴマの知見と照らしあわせて、ゴマ属や近縁属のリグナン生合成経路の解明につながり、ゴマリグナン生合成の進化についても重要な知見が得られると期待される。2021年度の「先進ゲノム支援」に応募したところ採択されたため、5種のゴマ近縁野生種のゲノム解析を行うことができた。今後は得られたデータをもとに、ゴマリグナン生合成系遺伝子の単離と種間での比較を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------