

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19580001

研究課題名（和文）ダイズ硬実性に関与する遺伝子の単離と機能解析

研究課題名（英文）Isolation and functional analysis of the gene controlling hard seededness of wild soybean

研究代表者

阿部 純（ABE JUN）

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：00192998

研究成果の概要（和文）：種子の硬実性は、栽培植物であるダイズと野生植物であるツルマメの違いを特徴付ける形質の一つである。本研究では、硬実性に関与する遺伝子の連鎖地図上の位置を、DNA 標識を利用した遺伝解析から明らかにし、その座乗領域を 70 K b の領域に絞ることができた。また、候補遺伝子として、種皮のリグニンやタンニン合成に関与するラッカーゼ遺伝子の塩基配列を比較解析したが、ラッカーゼ遺伝子は直接の候補にはならなかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to determine the genomic position of the gene controlling hard seededness of wild soybean, and identify the candidate gene. A laccase gene, which is involved in lignin biosynthesis, was not involved in the difference in hard seededness between wild and cultivated soybeans. By fine-mapping with newly-developed DNA markers, the possible location of the gene could be identified in a range of around 70 kb in length.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ダイズ、硬実性、遺伝子単離、種皮、遺伝資源

1. 研究開始当初の背景

栽培作物が含有する遺伝的変異性は、栽培化の過程で生じたピン首効果により、野生祖先型に比べると著しく狭い。そのため、野生祖先型に含まれる遺伝的変異の利用は栽培作物の改良に欠かせない。野生遺伝資源を有効にかつ効率良く利用するには、野生型に含まれる遺伝的変異の構造や野生型と栽培型を分かつ形質（栽培化症候群）の遺伝的基礎を理解する必要がある。本研究代表者は、アイソザイムや細胞質ならびに核の DNA 多型の解析から、(1) ダイズは、栽培化後に伝播した様々な地域で野生祖先型であるツルマメとの雑種形成を繰り返し、地域固有のダイズ品種群を確立してきたこと、(2) アジアのダイズ集団が大きく中国と日本の二つの生殖質プールからなること、などを明らかにしてきた。これらの研究をさらに発展させるべく、ダイズの栽培化症候群に関する遺伝学的研究を進めている。特に、ダイズとツルマメに見られる種子の吸水性に関する差異は、自然または栽培環境に対する分断淘汰の結果であり、そのような適応形質の遺伝的機構を DNA レベルで明らかにすることができれば、形質進化の機構を理解する一助となるばかりではなく、「単起源か多起源か」といったダイズにおける進化的問題に答えを見出すこともできる。また、種子の吸水性は、種皮の組織化学的および生化学的特性に原因しており、その遺伝的機構の理解は、出芽時の冠水耐性育種などダイズの栽培・育種にとっても有意義である。

2. 研究の目的

本研究は、ツルマメのもつ硬実性に関与する遺伝子の連鎖地図上の位置を、DNA 標識を用いた量的遺伝子座 (QTL) 解析により明らかにし、モデル植物や他の植物種で報告されている最新の知見を基にした候補遺伝子解析により、また、詳細な連鎖地図に基づいたゲノムウォーキング法により、その原因因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験材料には、研究代表者が育成したダイズとツルマメの交雑に由来する組み換え近交系統 (RIL) を用いた。この RIL 集団については既に、ダイズの 20 連鎖群をカバーする全長 2383cM の連鎖地図が構築されている。各系統の硬実性のデータを基に QTL 解析を行い、硬実性に関与する主要な QTL を検出した。

候補遺伝子解析の候補遺伝子として、シロイヌナズナの種皮色と吸水性に関する変異体 (*Transparent Testa 10*) の原因遺伝子であるラッカーゼ遺伝子に着目した。このラッカーゼ遺伝子は、縮合型タンニンやリグニンを合成する際の前駆物質 (プロアントシアニンジンやコニフェルアルコール) の酸化重合を司る。

一方、QTL 近傍域の微細連鎖地図を作成するために、ダイズゲノムデータベースを基に近傍域の存在する単純反復配列 (SSR) を検出し、その領域を増幅するプライマーを設計し、PCR 法により増幅断片の長さの多型を解析した。

4. 研究成果

(1) QTL 解析に基づく硬実性遺伝子の座乗領域の決定

QTL 解析の結果、D1b 連鎖群上に、観察された変異の約 40% を説明する大きな QTL が検出された (図 1)。この QTL は、これまでに報告されている異なる交雑組み合わせで見出された QTL とほぼ同じ位置にあり、ダイズとツルマメの硬実性の差異を特徴づける重要な QTL であると考えられた。

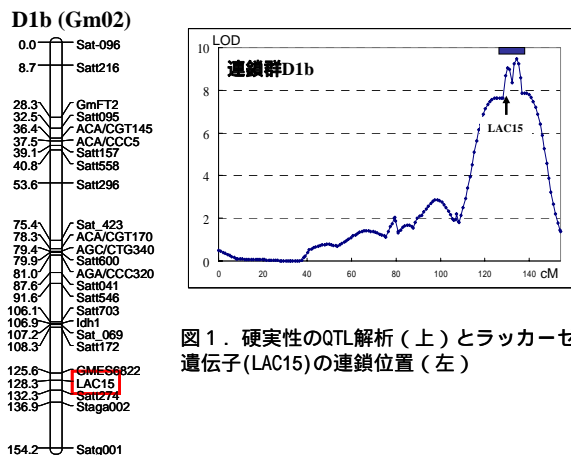


図 1. 硬実性の QTL 解析 (上) と ラッカーゼ遺伝子 (LAC15) の連鎖位置 (左)

(2) ラッカーゼ遺伝子の塩基配列分析

硬実性 QTL の座乗領域について、ダイズゲノムシークセンスデータベースを用いて塩基配列情報を解析したところ、ラッカーゼ遺伝子が見出された。この遺伝子のホモログは D1b 連鎖群と同祖関係にある B2 連鎖群を始め、B1 連鎖群や G 連鎖群に座乗していた。既に塩基配列が決定されていた G 連鎖群の遺伝子情報を参考に、プライマーを設計して実験に用いた交雑の親系統から遺伝子領域を PCR 方により増幅し、それらの塩基配列を決定した。単離された遺伝子は 5 個のエキソンからなると想定された (図 2)。硬実系統であるツ

ルマメと吸水系統であるダイズ系統の間には、いくつかの塩基置換ならびに欠失・挿入変異が認められた。特に、開始コドン直前に 8 塩基の欠失変異がダイズ親系統で観察された。同じ配列がこの遺伝子のホモログである B1 連鎖群の遺伝子には保存されており、ダイズとツルマメの間の吸水性的差異に関わる DNA 多型の候補と考えられた。しかし、他の交雑組み合わせに利用されたツルマメとダイズの間で塩基配列を比較したところ、ツルマメにおいて同様な欠失が観察され、この欠失はダイズとツルマメを識別する変異ではないことが示唆された。

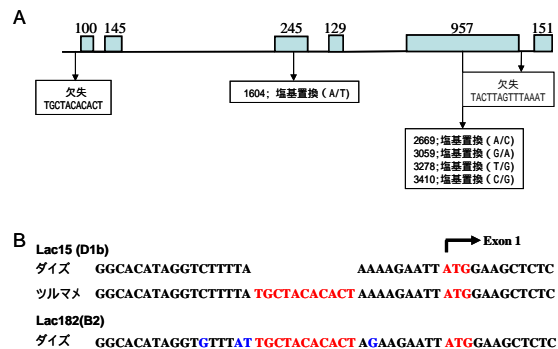


図 2. ラッカーゼ遺伝子 (LAC15) の構造とダイズとツルマメの間の遺伝的多型 (A) およびダイズに見られる開始コドン直前の 11 塩基の欠失 (B)

(3) 硬実性 QTL 近傍域の微細染色体地図

硬実性 QTL の候補として、ラッカーゼ遺伝子以外の遺伝子の可能性が高くなったことから、改めて座乗領域の絞込みを行った。正確な座乗領域を決定するために、その近傍域のゲノムシークセンス情報を基に新たに単純反復配列 (SSR) の反復回数に関する多型を解析するためのプライマーを設計した。解析には当該領域で組換えが生じている 3 系統を用いた。その結果、QTL の座乗領域を約 85kb の領域に特定づけることができた。この領域には 1 1 個の遺伝子が予測されているが、種

皮構造に直接関与すると考えられる遺伝子は存在していない。一方、B1連鎖群の同祖領域に存在する予測遺伝子の配列と比較すると、この領域には両連鎖群の間で染色体領域の転座などの構造変化が生じていると推察され、B1連鎖群に存在する複数の遺伝子が欠落していた。欠落した遺伝子の中にはペクチン合成に関与する遺伝子なども含まれ、QTLの原因遺伝子になる可能性が示された。

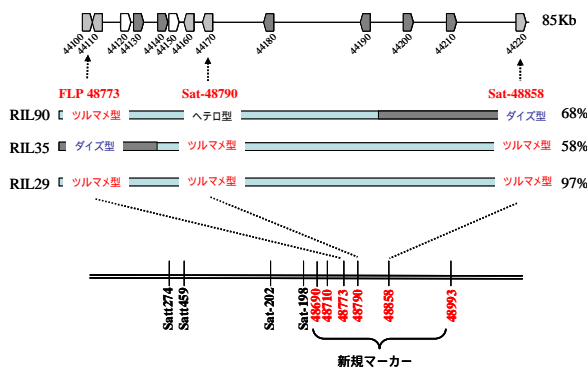


図3. 領域内組換え系統(RIL29, 35, 90)の新規DNA標識の遺伝子型構成とダイズゲノムデータベースの予測遺伝子

(4) 今後の展望

本研究結果より、当初候補遺伝子の一つとして取り上げたラッカーゼ遺伝子は、ダイズとツルマメに共通に存在するQTLの候補としては考えられないことがわかった。詳細な染色体地図の作出により、候補領域を11個の予測遺伝子が存在する85kbの領域に絞ることができた。今後ツルマメのバクテリア人工染色体(BAC)のライブラリーを作成することにより、本研究で明らかにした硬実性QTLのタギングマーカーを用いて選抜することが可能である。また、この領域が導入された戻し交雑均交系統が作出されており、ダイズの耐湿性等、過湿条件下での出芽性に関わる育種にも貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Liu, B., Fujita, T., Abe J. 他 QTL mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*). *Annals of Botany* 100 ; 1027 - 1038、2007 (査読有り)

[学会発表](計4件)

阿部 純 野生ダイズの遺伝的多様性：栽培ダイズとの関わり合い、日本遺伝学会第11回遺伝学談話会、札幌 2008/5/9

阿部 純 ダイズの成立-遺伝的変異の解析から、総合地球環境学研究所プロジェクトシンポジウム、京都 2009/2/21

阿部 純 東南アジアの極小粒ダイズ：山戎菽の末裔？ 総合地球環境学研究所プロジェクトフォーラム「東アジア原産栽培植物の起源と多様性」、大阪 2009/3/1

Abe J. 他、Utilization of wild soybean in breeding research in Japan、The 8th world soybean research conference、中国北京、2009/8/15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 純 (ABE JUN)
研究者番号：00192998