

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 2 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：2013～2015

課題番号：25450003

研究課題名(和文)ゴマ種子中のリグナン含量を左右する遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of genes controlling the contents of sesame seed lignans

研究代表者

山本 将之(YAMAMOTO, Masayuki)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・講師

研究者番号：10456402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：セサミン、セサモリン、セサミノールトリグルコシド(STG)はゴマ種子中に豊富に含まれるリグナン(ゴマリグナン)である。本研究ではゴマリグナン含量の異なる2系統の交雑に由来する遺伝集団を用い、分子遺伝学的手法によりゴマリグナンの生合成や蓄積に関与する遺伝子の同定を試みた。その結果、ゴマリグナン総含有形質およびSTG含有形質は、それぞれ複数、少数の遺伝子が制御することが示された。セサモリン含有形質の原因遺伝子はCYP92B14であり、CYP92B14はセサミンを基質にセサモリンとセサミノールを生成する能力を有する新規のシトクロムP450酵素遺伝子をコードすることが示された。

研究成果の概要(英文)：Sesamin, sesamolignin and sesaminol triglucoside (STG) are major lignans accumulated in sesame seeds. In this study, to identify the genes involving accumulation and biosynthesis of the lignans, I first investigated the inheritance patterns of the lignan contents in sesame seeds using F5 and F6 generations from the cross between a sesamolignin-deficient and a high lignan strains. The results indicate that the contents of sesamin and the sum of the three lignans are quantitative traits and might be controlled by a number of genes. In contrast, the content of sesamolignin and STG were shown to be determined by a single gene and several genes, respectively. I also showed that sesamolignin-deficiency was associated with the mutation of a CYP92B14 gene which encodes a novel cytochrome p450 enzyme with biosynthetic activity to convert sesamin to sesamolignin, and, unexpectedly, sesaminol.

研究分野：植物育種学

キーワード：リグナン ゴマ 機能性成分

1. 研究開始当初の背景

リグナンは広範囲な維管束植物に見出される植物二次代謝産物である。ゴマは種子中にセサミン、セサモリン、セサミノール(種子中では配糖体化され、主としてセサミノールトリグルコシド (STG) として存在する)などのリグナン(ゴマリグナンとよぶ)を豊富に含んでいる。近年、ゴマリグナンの持つ健康機能性に関して知見が多く集積するとともに、注目が集まっている。しかしながら、ゴマの種子中におけるゴマリグナンの生合成や蓄積に関する知見は限られたものであり、研究開始時に同定されていた遺伝子はセサミン合成酵素遺伝子 1 種 (Ono et al., 2006) とセサミノール配糖体化酵素遺伝子 2 種 (Noguchi et al., 2008) のみであった(図 1)。また、なぜゴマが他の植物と比べて種子中に多量のゴマリグナン蓄積するかについての知見も得られていなかった。

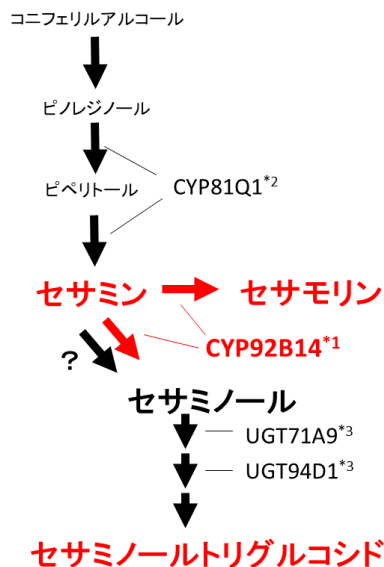


図1 ゴマ種子中のゴマリグナン生合成経路
赤字はゴマ種子から主に検出されるリグナンを示す。生合成酵素が同定されている反応には酵素名を記した。赤矢印は本研究で生合成遺伝子が同定された反応を示す。*1 本研究、*2 Ono et al. (2006)、*3 Noguchi et al. (2008)

2. 研究の目的

ゴマリグナンの生合成や蓄積に関する遺伝子の同定は、ゴマにおける有用物質の生合成や蓄積に関する知見のみならず、特定のリグナンを多く含むゴマ品種や、高リグナン含有ゴマ品種の育成の省力化につながると期待される。しかしながら上述の通り、ゴマリグナンの生合成に関しては一部の生合成酵素遺伝子が同定されているに過ぎなかった。そこで、本研究ではゴマにおけるゴマリグナンの生合成や蓄積メカニズムの解明を目的に、未解明の、リグナン生合成や蓄積にかかわる遺伝子を単離することを試みた。

3. 研究の方法

供試材料

報告者の所属する富山大学はゴマ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のゴマリグナン含有量の調査結果より、各ゴマリグナンの含有量やゴマリグナンの総含有量は系統間でばらつきがあることが示されている(図 2)。セサミンとセサモリン含量の調査結果をもとに、異なるリグナン含量を示す 2 系統、すなわちリグナン含量が高い ITCFA2002 と中程度のリグナン含量を示し、セサモリンを含まない #4294 を選び、両系統の交雑に由来する遺伝集団 (F₅-F₆ 世代) を作出し解析に用いた。

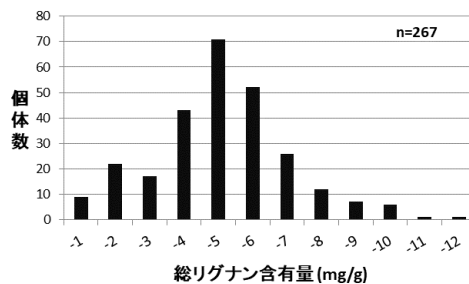


図2 富山大学系統の種子中のリグナン含有量
富山大学で保存しているゴマ系統のうち、267系統について種子1gあたりに含まれる総リグナン含有量を計測した。ここではセサミン、セサモリン、セサミノールトリグルコシドの含有量の総和を、総リグナン含有量とした。3種のゴマリグナンの含有量も系統間で異なることが示されている。

4. 研究成果

(1) リグナン含有形質の遺伝様式の調査

親系統の STG 含有量の調査

これまで未解析であった STG について解析するにあたり、まず両親系統の STG 含有量を調査した。その結果、高リグナン系統からは STG はほとんど検出されず、一方で低セサモリン系統は高い含有量を示した。この結果より、両系統の交雑に由来する遺伝集団は、STG 含有形質の遺伝解析にも適した材料であることが示された。

種子登熟過程における各リグナン蓄積時期の調査

両親系統を恒温室内 (25) で育成し、種子登熟過程における各リグナンの蓄積時期の調査を行った。その結果、セサミンとセサモリンは開花後 2-3 週目にかけて、STG は開花後 6 週目から 7 週目にかけて蓄積を開始することが明らかとなった。また、高リグナン系統では STG は、低セサモリン系統ではセサモリンは調査したいずれの登熟ステージからも検出されなかった。このことから、高リグナン系統では STG 生合成経路が、低セサモリン系統ではセサモリン生合成経路が機能していないことが推察された。

組換え自殖系統の作出およびリグナン含有形質の詳細な遺伝様式の調査

リグナン含有形質の詳細な遺伝解析を行うため、すでに得られていた F_2 遺伝集団の世代を進め、 F_5 世代および F_6 世代の組換え自殖系統 (RIL) を得た。RIL を温室で育成後、各個体の種子に含まれるリグナン含有量を測定し、リグナン含有形質の遺伝様式の調査を行った。

その結果、リグナン総含有量 (セサミン、セサモリン、および STG の含有量の総和) とセサミン含有率 (リグナン総含有量に対するセサミン含有量の割合) の分布はいずれも連続的であり、含有量や含有率の高低には複数の量的形質遺伝子座が関与することが示唆された。セサモリンに関しては、高いレベルの含有率を示すグループと低いレベルを示すグループに分かれ、それぞれの個体数の比は 1:1 に適合した。したがって、低セサモリン系統ではセサモリン生合成に関与する単一の遺伝子の機能が損なわれている可能性が高いと結論付けた。STG の含有率に関しては連続的な分布が確認されたが、含有率が低い個体が大半を占めた。述べたように STG の蓄積時期は種子登熟の後期であるため、気温の低下が STG の生合成に影響を与えている可能性が考えられた。すなわち、今回用いた両親系統は開花期に極端な差異が認められるため、RIL の個体のうち、開花期が遅い個体では STG が十分に蓄積されないと考え、この可能性について検討した。開花期の遅いグループと早いグループの STG 含有率をそれぞれ調査したところ、開花期の遅いグループでは高いレベルの含有率を示した個体はほとんど認められなかったのに対して、開花期の早いグループでは含有率の低い個体と高い個体が認められた。このことから今回用いた遺伝集団を用いた調査の際に、STG の蓄積に気温の影響を受けたことが示された。予備的な結果ではあるが、解析から開花期の遅い個体を除き、蓄積時期に十分な温度が確保されたと考えられる開花期の早いグループのみを調査したところ、含有率の高い個体数と低い個体数の比はおよそ 1:3 の割合となり、STG 含有率の決定に 2 つの遺伝子が関わる可能性が示された。

F_1 および F_2 種子におけるセサモリン含有率の遺伝様式

述べたように、セサモリン含有形質が 1 対の対立遺伝子によって決定されているとすれば、両親系統の交雑に由来する F_1 個体に結実する種子 (F_2 世代種子) からセサモリンが検出されるものに加えて、ほとんど検出されないものが得られると期待される。しかし、 F_2 世代種子 1 粒に含まれるセサモリン量を測定したところ、セサモリンが検出できない種子は見出されなかった。続いて、低セサモリン含有系統とセサモリン含有系統を親とし、雌雄の組み合わせが異なる 2 種類の交雑種子

(F_1 世代種子) を新たに得て、種子 1 粒のセサモリン含有量を測定した。その結果、どちらの交配組み合わせの交雑種子のセサモリン含有レベルもそれぞれの母親のレベルと同程度であり、セサモリン生合成能は母親個体の遺伝子型により決定されている可能性が高いことが示唆された。

(2) ゴマリグナン含有形質に関する連鎖解析

RAD-seq 解析

ゴマにおいて 2014 年にゲノム情報の解読および連鎖地図の報告がなされた (Wang et al., 2014) ことから、分子遺伝学的手法を用いた、原因遺伝子の同定が容易になると考えられた。そこで、本研究で用いた遺伝集団に関して、大量の DNA マーカーを得るために、次世代シーケンサーを用いた一塩基多型 (SNP) 検出法である、RAD-seq (Restriction-site Associated DNA Sequencing) 解析を行った。 F_6 集団の各個体から DNA を調製し、RAD-seq 解析を行ったところ、十分な数とはいえないものの、多くの RAD マーカーを得ることができた。

連鎖解析

F_6 -RIL を用いて RAD-seq 解析により得られたマーカーの遺伝子型データと、RIL の各個体の種子中のリグナン含有量データを用いて、リグナン含有形質に関する連鎖解析もしくは QTL 解析を行った。

複数の遺伝子が形質の制御に関わると考えられた、総リグナン含有形質と STG 含有形質に関しては QTL 解析を行ったところ、総リグナン含有形質に関しては、両親系統間における総リグナン含有量の差異がそれほど多くなかったためか、QTL を検出することはできなかった。一方で STG 含有形質に関しては、効果の大きな QTL が少なくとも 1 つ検出された。この QTL に関しては現在、遺伝子の同定に向けて解析を進めている。

1 つの遺伝子が関与すると考えられたセサモリン含有形質に関しては、この形質と強く連鎖する RAD マーカーの探索を行った。その結果、形質に完全に連鎖する 1 つのマーカーが得られた。

(3) セサモリン含有形質原因遺伝子の同定
セサモリン含有形質候補遺伝子の探索

得られた RAD マーカーについては、 F_6 -RIL すべての個体の遺伝子型が決定されていなかったため、セサモリン含有形質に完全に連鎖するマーカー (#90036) およびこのマーカーから約 800 kbp 離れて位置するマーカー (#86884) を PCR マーカー化し、 F_6 -RIL 160 個体の遺伝子型を決定し、連鎖解析を行った。その結果、#90036 はセサモリン含有形質と完全に連鎖し、#86884 は連鎖地図上で 1.8 cM 離れて位置することが明らかとなった。

#90036 の近傍に存在する、セサモリンの生

合成に関わる遺伝子をゴマの公開ゲノムデータを用いて検索した。その結果、シトクロム P450 をコードする遺伝子 (CYP) が 4 種見出された。これら CYP 遺伝子をセサミン含有形質の候補遺伝子とした。

候補遺伝子の発現解析と塩基配列の比較
候補遺伝子の発現種子における発現を RT-PCR により調査した。その結果、2 つの CYP 遺伝子がセサミン蓄積時期の発熟種子で発現していることが示された。これら 2 つの CYP 遺伝子について、両親系統の塩基配列を決定し、比較を行ったところ、1 つ遺伝子に関して、低含有系統の遺伝子のタンパク質コード域の終止コドン近傍に、含有系統の遺伝子には存在しない 1 塩基の挿入が認められた。挿入変異の結果、低含有系統の遺伝子では、フレームシフト変異が生じ、含有系統のものに比べて 4 アミノ酸短いポリペプチドをコードしていることが予測された (図 3)。両親系統とは異なる、セサミン含有系統と低含有系統を用いて、この 1 塩基挿入の有無について調査したところ、調査した低含有系統は同じ 1 塩基挿入を有しており、これは含有系統からは検出されなかった。従って、この CYP 遺伝子 (CYP の命名法に従い、CYP92B14 と名付けた) における 1 塩基挿入がセサミン低含有形質の原因である可能性が強く示唆された。

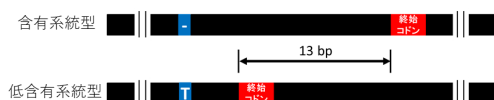


図3 CYP92B14遺伝子の塩基配列の比較
セサミン含有系統型と非含有系統型のCYP92B14遺伝子の塩基配列を比較したところ、非含有系統型の遺伝子には含有系統型遺伝子には存在しない1塩基の挿入変異が認められた。この挿入の結果、非含有系統型の遺伝子は含有系統型遺伝子よりも4アミノ酸短いポリペプチドをコードすることが示された。

候補遺伝子の酵素活性の調査

CYP92B14 を酵母で発現させ、様々なゴマリグナンに対するセサミン合成能を調査した。その結果、ゴマ由来の P450 還元酵素と共発現させた場合、セサミンからセサミンを効率的に生成した。加えて、CYP92B14 はセサミンを基質にセサミノールも生成する能力があることが明らかとなった。

以上の結果から、セサミン含有形質の原因遺伝子は、新規のシトクロム P450 酵素をコードする CYP92B14 であり、CYP92B14 はセサミンを基質にセサミンとセサミノールを生成する酵素であることが明らかとなった。

今後は総リグナン含有量の著しく異なる系統を用いて同様の調査を行うことにより、総リグナン含有量を制御する遺伝子の解析を行うとともに、STG 含有形質の解析によって示唆されている新たな STG 含有量を制御する遺伝子の同定を進めることにより、ゴマリグナン合成の全容が明らかになると期待される。

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)

Oxidative rearrangement of (+)-sesamin by CYP92B14 co-generates twin dietary lignans in sesame.

Murata J, Ono E, Yoroizuka S, Toyonaga H, Shiraishi A, Mori S, Tera M, Azuma T, Nagano AJ, Nakayasu M, Mizutani M, Wakasugi T, Yamamoto MP*, Horikawa M* (*co-corresponding author)

Nat. Commun. 8:2155 (2017)

〔学会発表〕(計 3 件)

山本 将之、鎧塚 清吾、後藤 望、増田 恭次郎、若杉 達也、山田 恭司、ゴマ種子中のリグナン含量の遺伝様式、日本育種学会第 126 回講演会、2014 年 9 月 27 日、南九州大学都城キャンパス (宮崎県都城市)

鎧塚 清吾、増田 恭次郎、山田 恭司、若杉 達也、山本 将之、ゴマリグナン合成遺伝子の遺伝解析、第 30 回日本ゴマ科学会大会、2015 年 10 月 3 日、竹本油脂株式会社本社 (愛知県蒲郡市)

鎧塚 清吾、村田 純、小笠 栄一郎、白石 慧、永野 惇、若杉 達也、堀川 学、山本 将之、ゴマにおけるセサミン含有形質制御遺伝子の同定、日本育種学会第 132 回講演会、2017 年 10 月 7 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 将之 (YAMAMOTO, Masayuki)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・講師

研究者番号：10456402