

令和元年5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07550

研究課題名(和文)ダイズのクロロフィル蓄積変異体における分子遺伝学的および生化学的な特徴付け

研究課題名(英文) Molecular genetic and biochemical characterization of chlorophyll accumulation mutants in soybean

研究代表者

山田 哲也 (Yamada, Tetsuya)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：70374618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズの種皮のみにクロロフィルを蓄積するstay green形質をもたらす因子Gsc1の責任遺伝子の単離を試みた。種皮緑品種と種皮無色品種の間において、特定の遺伝子に1塩基置換の存在を明らかにした。この遺伝子を過剰発現する形質転換体では、種皮におけるクロロフィルの分解が著しく抑制されることが分かった。また、種皮緑および種皮無色であるダイズ遺伝資源においてこの遺伝子の変異を調べたところ、種皮緑の系統は全て機能型の遺伝子を持つことを明らかにした。さらに、ほぼ全ての野生ダイズにおいても機能型の遺伝子を持つことを明らかにした。これらのことから、種皮緑は野生ダイズ由来の形質であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではダイズにstay green形質をもたらす主要因の一つを明らかにした。この成果により、青ダイズの主要な要因はほぼ全て明らかになった。青ダイズは通常の黄ダイズに比べクロロフィルを取り巻くタンパク質の分解が抑制されている。そのため、クロロフィル以外のカロテノイド色素も多く蓄積されるため、黄ダイズよりも生理機能性が高くなることが期待できる。また、本研究において得られた成果を活用することでより生理機能性の高い青ダイズを育成する際、DNAマーカーを用いて効率的にクロロフィル含量が高くなる個体を選抜することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We isolated the responsible gene for the genetic factor Gsc1, which causes the stay green trait of chlorophyll accumulation in soybean seed coats. The sequencing analysis revealed that there was a substitution of one-base at the gene encoding the CAAX proteinase between green and colorless seed coat varieties. Transgenic soybean lines overexpressing this gene remarkably suppressed the decrease of chlorophylls in the seed coat organs during seed filling. When the distribution of the mutation in this gene was examined in soybean germplasm including green or colorless seed coat lines, this analysis revealed that all the seed coat green lines have a functional allele for this gene. We revealed also that almost all wild soybeans have functional allele for this gene. These results support the conclusion that the green seed coat traits was a trait derived from wild soybean.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ダイズ 種皮 stay green クロロフィル 栽培化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ダイズはこれまでに stay green 形質を示す遺伝因子として核ゲノムに存在する *d1d2* 変異, ならびに葉緑体ゲノムに存在する *cytG* 変異が同定されている。これらに加え, 種皮の組織にのみ stay green 形質をもたらす遺伝因子も古くから知られているもののその責任遺伝子の同定には至っていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は, 種皮の組織にのみ stay green 形質をもたらす遺伝因子を同定することにある。当該遺伝子を同定することにより, ダイズの stay green 形質をもたらす主要な遺伝因子は全て明らかになる。また, 当該遺伝子の同定を通して青ダイズを育成する際の DNA マーカーの開発や青ダイズ種子におけるクロロフィル含量の高位安定化等質的改良に関する基礎的知見の集積も併せて行う。

### 3. 研究の方法

(1)交雑分離集団を用い 種皮緑形質をもたらす遺伝因子 (*Gsc1*) のファインマッピングと遺伝子の単離を行う。加えて, 当該遺伝子を利用したダイズ形質転換体を作成し, 種皮緑形質との関連性を検証する。

(2)在来種や野生ダイズを含めたダイズ遺伝資源において *Gsc1* 遺伝子の変異の分布を精査することで現在の黄ダイズの成立との関係性について考察する。

### 4. 研究成果

青ダイズ品種の一つ天津大青豆と黄ダイズ品種の一ついちひめとの交雑に由来する F3 世代約 1,200 個体から F4 種子を採種し, それらの種皮色を評価することで *Gsc1* 遺伝子のファインマッピングを行った。その結果, 座乗域を 37 kbp にまで狭小化することに成功した(図 1)。なお, ダイズゲノムデータベースより, これらの領域には 6 つ遺伝子の存在が予測された。そこで, これらの遺伝子の発現程度を天津大青豆といちひめの間で比較した。その結果, これら遺伝子の全てにおいて両親間で発現程度に大きな差異は認められなかった。そこで, これらの遺伝子のゲノム領域に相当する DNA についてシーケンス解析を行うことで両親間の比較を行った。その結果, Glyma.01G198500 遺伝子においてのみ一塩基の置換が認められた。この塩基置換はスプライシングの部位に相当し, 結果として両親間において転写産物の一部の配列が異なると共にその長さも異なることが明らかになった(図 2)。

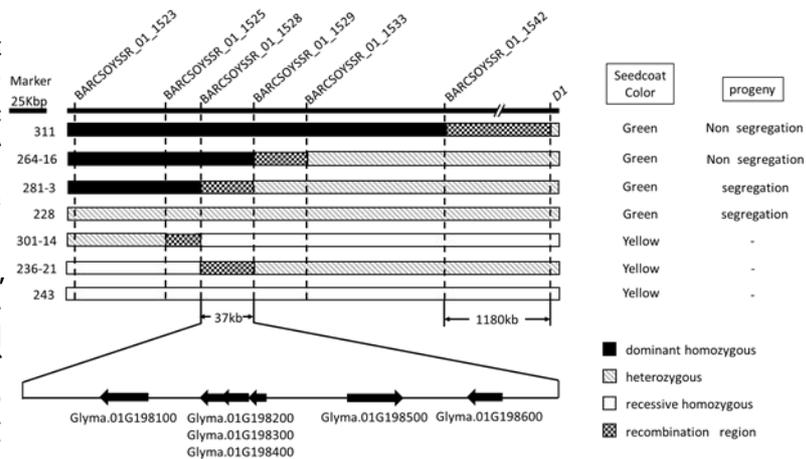


図1. *Gsc1* 遺伝子のファインマッピング

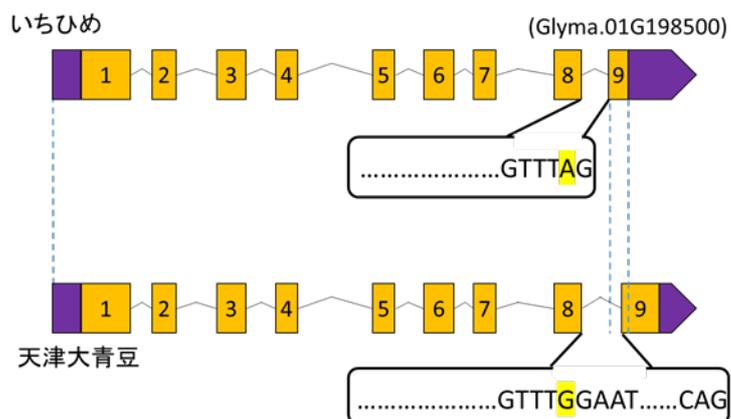


図2. 両親間に認められる一塩基置換と転写産物

天津大青豆といちひめの間で認められた一塩基置換を識別できる dCAPS マーカーを作製し, 種皮緑ダイズと黄ダイズそれぞれ約 100 系統からなるダイズ遺伝資源において当該遺伝子の塩基置換の有無を確認したところ, 種皮緑ダイズの全てが天津大青豆型, そして黄ダイズの全てがいちひめ型と一致した。このことから, 当該遺伝子における一塩基置換が種皮緑形質に関連すると考えた。さらに, 当該遺伝子について天津大青豆型の cDNA をカリフラワーモザイクウイルス

ルス 35S プロモーター制御下においた過剰発現用ベクターを構築し、黄ダイズ品種 Jack へ導入した形質転換体を作成した。形質転換 T1 世代から得た T2 種子の種皮を確認したところ、過剰発現個体の種皮が緑色になっていることを確認した(図 3)。また、種皮からクロロフィルを抽出し HPLC によって定量解析を行ったところ、当該種皮において明らかにクロロフィル含量が増加していることを明らかにした。天津大青豆型の *Glyma.01G198500* を過剰発現することによって種皮緑形質が再現できたことから、*Glyma.01G198500* が *Gsc1* 遺伝子であると結論付けた。

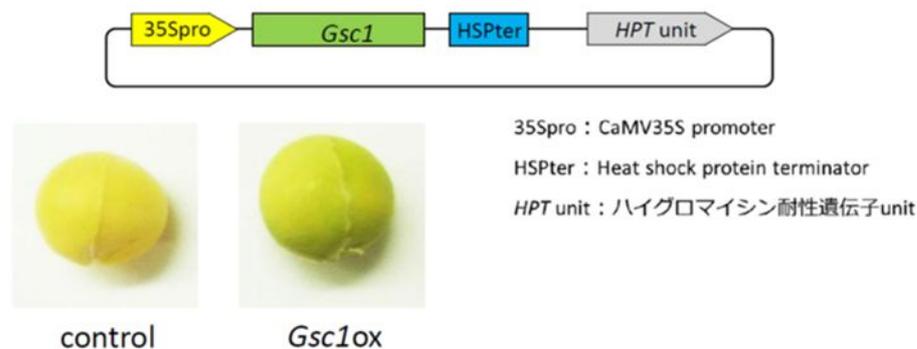


図3. *Gsc1*遺伝子過剰発現個体の作出

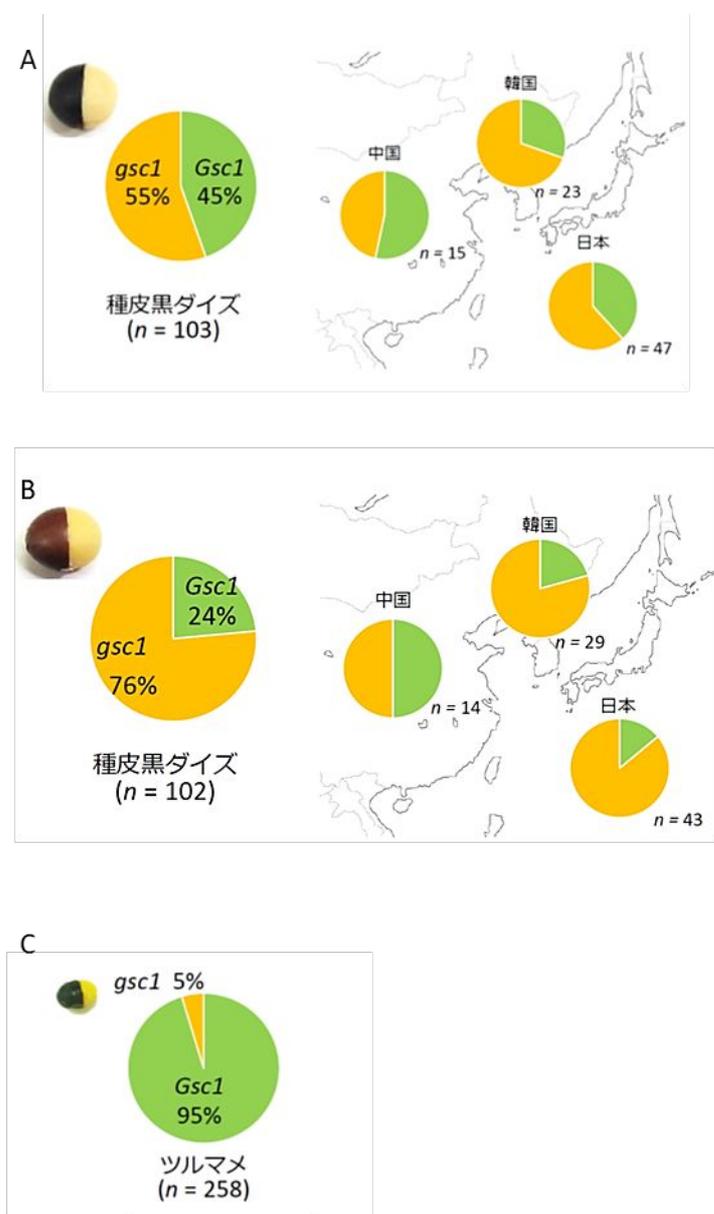


図4. ダイズ遺伝資源における *Gsc1* 遺伝子変異の分布  
A: 種皮黒遺伝資源, B: 種皮茶色遺伝資源, C: 野生ダイズ遺伝資源

種皮黒, 種皮茶および野生ダイズ(ツルマメ)において先述の dCAPS マーカーを用い、*Gsc1* 遺伝子の変異の有無についてその分布を確認した。なお、遺伝解析より天津大青豆型がいちひめ型に対して顕性を示したため、天津大青豆型を *Gsc1* として、いちひめ型を *gsc1* として解析を進めた。種皮黒の遺伝資源を解析したところ、*Gsc1* と *gsc1* の分布は半数程度となった。また、地域別に比較したところ、日本、中国、韓国共その分布に大きな差異は認められなかった(図 4A)。種皮茶の遺伝資源についても種皮黒と同様に全ての地域において両遺伝子型が存在することが明らかになった(図 4B)。また、黒および茶種皮を持つダイズ遺伝資源において種皮におけるクロロフィル含量を HPLC によって定量解析を行ったところ、*Gsc1* の遺伝子型を持つものは *gsc1* の遺伝子型に比べ明らかにクロロフィル含量が高いことも明らかになった。一方、ツルマメの遺伝資源を解析したところ、中国以外の遺伝資源については全て *Gsc1* 型となった。中国のツルマメ遺伝資源の中には *gsc1* 遺伝子型のものがわずかながら存在した。これらの遺伝資源に関しては現在、種子サンプルがなく種皮におけるクロロフィル含量の定量が行えない現状にあるが、今後の解析を踏まえこれらの遺伝資源に関しては再度解析を行う必要性があると考えた。

本研究で単離した *Gsc1* 遺伝子はデータベース上では CAAX プロテアーゼ遺伝子をコードすることが予測されている。しかしながら、この酵素と種皮における stay green 形質との間における関係性は現在も不明である。そこで、ファインマッピング時に用いた分離個体 F5 個体に由来する *Gsc1* の NIL を用い、種子における窒素含量、炭素含量および 100 粒重の比較を行った。その結果、NIL 間において大きな差異は認められなかった(図 5)。これは、*Gsc1* 遺伝子の変異が各種子形質に影響を及ぼさないことを示しているものと考えられた。

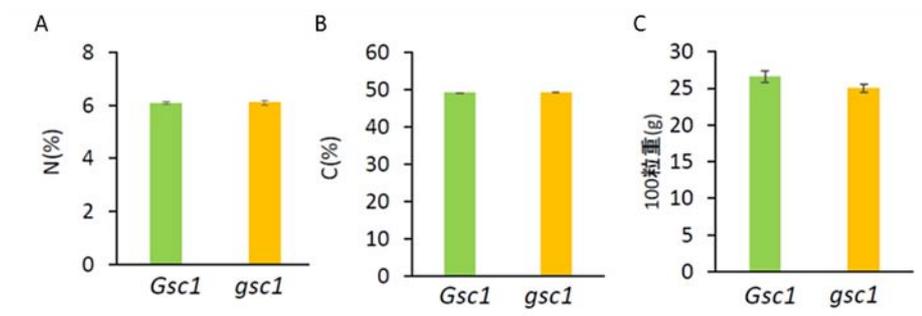


図5. *Gsc1*遺伝子座におけるNILの種子形質  
A:窒素含量, B:炭素含量, C:100粒重

ダイズにおける *d1d2* や *cytG* といった stay green 変異は葉組織や種子の子葉組織においても stay green 形質が認められるが *Gsc1* ではそのような特徴は見られなかった。そこで、*Gsc1* のホモログの存在とその発現様式を黄ダイズ品種において比較した。その結果、*Gsc1* のホモログが第 11 染色体に座乗していることが分かった。そこで、この遺伝子を *Gsc-Like* 遺伝子名付け両遺伝子の発現解析したところ、種皮組織では *Gsc1* の発現が *Gsc-Like* 遺伝子と比べ優位に高くなることが明らかになった。

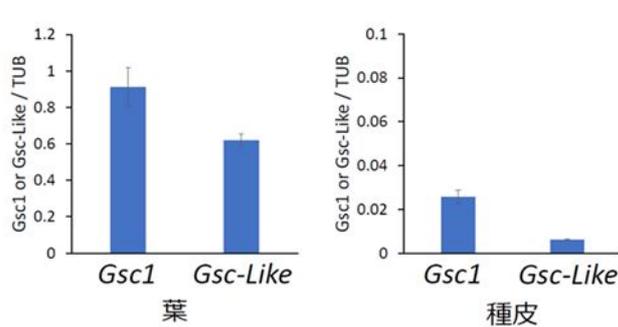


図6. *Gsc1*遺伝子およびそのホモログ(*Gsc-Like*)の発現

このことから、*Gsc1* 遺伝子の機能に関して遺伝子の発現様式によって種皮組織の方が他の組織よりも明確に影響を受けるため、*Gsc1* 遺伝子に変異が生じたものでは種皮にのみその影響が出てクロロフィルの蓄積が著しく低下したと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

神津 拓人, 徳光 雄介, 山谷 浩史, 石本 政男, 草場 信, 阿部 純, 山田 哲也 ダイズの種皮緑遺伝子 *GreenSeedCoat1* は黄ダイズの成立の過程で変異型に選抜された, 日本育種学会, 2019

徳光 雄介, 土田 まるみ, 草場 信, 阿部 純, 山田 哲也 ダイズにおける種皮緑形質のファインマッピング, 日本育種学会, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/ikushu/idenshigen/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：徳光 雄介（北海道大学修士学生）

ローマ字氏名：Tokumitsu Yusuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。