

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580017

研究課題名(和文)ダイズ耐裂莢性に関わる莢構造の解析

研究課題名(英文)Analysis of pod structure responsible for soybean shattering resistance

## 研究代表者

藤野 介延 (FUJINO, Kaien)

北海道大学・(連合)農学研究科(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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：莢の裂開 裂莢による種子の散逸はマメ科作物で重大な収量減少を起こす。ダイズにおいて、裂莢性の主要なQTLは形成性操作タンパク質をコードするPdh1遺伝子であることが判明した。難裂莢性品種は、この遺伝子の未成熟終止コドンによる欠損であった。機能のあるPdh1遺伝子は莢の厚壁組織・縫合線部位において発現した。準同質遺伝子系統を比較したところ、Pdh1遺伝子は乾燥による莢のねじれに関与し、裂莢を制御していることがわかった。これらの知見は育種だけでなく、形成性操作タンパク質の新たな役割を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Pod dehiscence (shattering) causes a significant yield loss in legume crops. However, little is known about the genetic basis of the shattering resistance in those crops. Map-based cloning of a major quantitative trait locus controlling pod dehiscence in soybean and complementation test revealed that the gene identified, Pdh1, encoded a dirigent-like protein. In shattering-resistant cultivars, the gene was defective with a premature stop codon. Functional Pdh1 was specifically expressed in pod walls. Comparison of near-isogenic lines indicated that Pdh1 regulate torsion of dried pod walls, which functions as force to dehisce binding of pod walls. These findings provide useful information for plant breeding and point to a new biological role for the dirigent-like proteins.

研究分野：作物生産科学

キーワード：ダイズ 裂莢 形成性操作タンパク質 ディリジェントタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

### 裂莢性とは

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ことを行っている。植物は風や動物などを用いた種子伝搬方法のほか、莢が容易にはじけたり(裂莢)、茎から簡単に離脱すること(脱粒)により、種子を地面に散布させ次世代の生育を可能とし生息域を拡大している。植物が本来持つ種子を伝播させる能力は、人間が栽培するようになった植物、すなわち作物にとって収量や品質を著しく低下させる要因の一つである。また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 2006, Konishi ら 2006)。

### 現段階での問題点

現在でもソバのように容易に脱粒する作物が存在し、また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要因は、成熟後、立毛状態で長期間圃場に放置する場合が近年多くなっているにもかかわらず、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。この問題の背景には機械収穫の普及、転換畑におけるダイズ栽培の増加による他の作物との作期競合、収穫期における天候不順の頻発など、ダイズ栽培を巡る環境の変化がある。

### QTL 解析による裂莢性関連遺伝子 *qPDH1* を同定

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 マーカーの作出と遺伝機構の解明を目的として、量的形質遺伝子座(QTL)解析を行い、第16染色体(旧連鎖群J)に、作用力の大きなQTL, *qPDH1* を同定した(Funatsuki ら 2006)。この正確な位置を明らかにするため、高精度マッピングを行い、高精度マーカーの作出に成功するとともに、134kb のゲノム領域内にこのQTLが存在していることを明らかにした(Funatsuki ら 2008, Suzuki ら 2010)。

### 新たな裂莢性関連遺伝子 *qPDH1*

そしてさらなる大規模集団の解析により、*qPDH1* の候補遺伝子を3つの推定される遺伝子にほぼ絞り込んだが、モデル植物のシロイヌナズナで明らかにされている裂莢性関連遺伝子(Liljegren ら 2000, 2004)のいずれのものとも異なっていた。シロイヌナズナでは、難裂莢性の突然変異体は、半分の莢と莢が結合している部分(縫合部)に形態異常(離層形成障害)があり、莢の裂開が起こらなくなっているが、ダイズの場合、*qPDH1* が難裂莢型と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見られないことも確認しており(Suzuki ら 2009)、裂莢に関し全く新規の遺伝子と機構が関与していることが示唆される。

### 引用論文

- Changbao L., et al. 2006.  
Science 311: 1936-1939
- Konishi S. et al. 2006.  
Science 312: 1392-1396
- Funatsuki H, Ishimoto M, Tsuji H, Kawaguchi K, Hajika M, Fujino K. 2006.  
Plant Breeding 125: 195-197.
- Funatsuki H, Hajika M, Hagihara S, Yamada T, Tanaka A, Tsuji H, Ishimoto M, Fujino K. 2008.  
Breeding Science 58: 63-69.
- Suzuki M, Fujino K, Nakamoto Y, Ishimoto M, Funatsuki H 2010.  
Molecular Breeding 25: 407-418
- Liljegren, SJ. et al. 2000.  
Nature 404: 766-770
- Liljegren, SJ. et al. 2004.  
Cell 116: 843-853
- Suzuki M, Fujino K, Funatsuki H. 2009.  
Plant Production Science 12: 217-223.

## 2. 研究の目的

本研究では、主要な裂莢性に関与するQTL, *qPDH1* の領域に存在するいくつかの候補遺伝子を1つに特定することを目指した。さらに特定した遺伝子の莢における生理学的役割を調べることにした。遺伝子の特定には、候補遺伝子の莢組織・莢の細胞での発現を、RT-PCR, *in situ*ハイブリダイゼーションや間接抗体法を用いて検討する。さらに、候補遺伝子の相補的な発現形質転換体の作出により、裂莢性関連遺伝子を特定する。また準同質遺伝子系統(NIL)・形質転換体の細胞壁成分を分析することにより候補遺伝子の関与する裂莢性機構の物理化学基盤を明らかにするとともに、候補遺伝子から組換えタンパク質を作製し、生化学的機能(酵素活性)を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *Pdh1* 形質転換体の裂莢性解析

難裂莢性品種 Jack に *qPDH1* の候補遺伝子の一つである *Pdh1* 遺伝子 (*Pdh1* 遺伝子上流域約 1kbp を含む) を形質転換した植物体を作成し、裂莢率やねじれの度合いについて野生型と比較・検討を行った。

### (2) 難裂莢型と易裂莢型における *Pdh1* 遺伝子の局所的発現部位の解析

*qPDH1* の候補遺伝子の一つである *Pdh1* 遺伝子の難・易裂莢性準同質遺伝子系統(NIL)の組織間・成長段階の莢における発現について、RT-PCR 法や *in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。

(3) 難・易裂莢性 NIL の莢の細胞壁の解析  
圃場で育成した難・易裂莢性 NIL の開花後 3 週間経過した未熟莢と成熟し乾燥した莢の 80%エタノール抽出物を酢酸エチルによる分配抽出を行った。酢酸エチル分画を Sep-Pak に通し、メタノール溶出分画を HPLC に供試した。

(4) シロイヌナズナにおける解析  
シロイヌナズナにおいて、*Pdh1* 遺伝子のオースログであるディリジェント遺伝子について長角果における発現について検討した。ディリジェント遺伝子のホモログからプライマーを作成し、受粉後発達中の長角果を採取し RT-PCR を行い、各遺伝子の発現量を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Pdh1* 形質転換体の裂莢性解析

難裂莢性品種 Jack の *Pdh1* 遺伝子について解析したところ、他の難裂莢性を示す品種・NIL と同一の 1 塩基置換が存在し *Pdh1* が発現していないことが確認された。難裂莢性品種 Jack に *Pdh1* 遺伝子が発現するように相補した形質転換体を作成し、裂莢率、ねじれの度合いを解析した。その結果、*Pdh1* 遺伝子を相補した形質転換体の莢は野生型に比較して裂莢率が高く、ねじれの度合いも大きかった (図 1)。

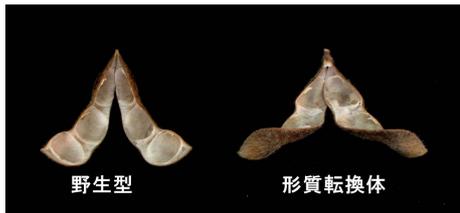


図 1 *Pdh1* 形質転換難裂莢性品種 Jack の裂莢後の莢形態

##### (2) 難裂莢型と易裂莢型における *Pdh1* 遺伝子の局所的発現部位の解析

RT-PCR を用いて難・易裂莢性準同質遺伝子系統 (NIL) の組織間・成長段階の *Pdh1* の発現解析を行った。*Pdh1* 遺伝子の発現は莢組織の厚壁組織と縫合線部分で発現が確認された (図 2)。

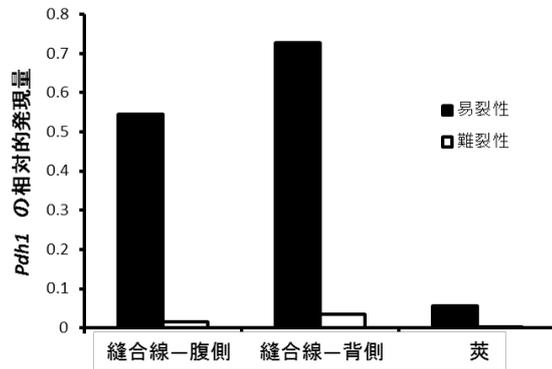


図 2 ダイズ莢組織間の *Pdh1* 遺伝子発現量

高い発現量を示した縫合線部分の *Pdh1* 遺伝子の組織・細胞間の詳細な局在性は確認されていないが、易裂莢性の莢における *Pdh1* 遺伝子の発現組織を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて特定した (図 3)。

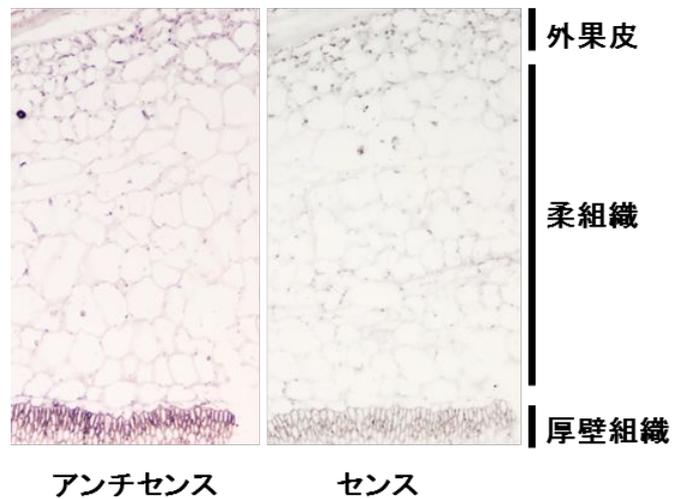


図 3 ダイズ莢縦断切片における *Pdh1* 遺伝子発現組織

(3) 難・易裂莢性 NIL の莢の細胞壁の解析  
*Pdh1* がリグニンの形成に関与していることからフェニルプロパノイド関連物質に注目し、難・易裂莢性 NIL の発達中ならびに成熟した莢から 80%メタノールで抽出される物質の C-18 カラムによる HPLC 解析を行った。成熟した莢のクロマトグラムからは顕著な違いが見られなかったが、発達中莢において再現性の高い、割合の異なるピークが見られた (図 4)。

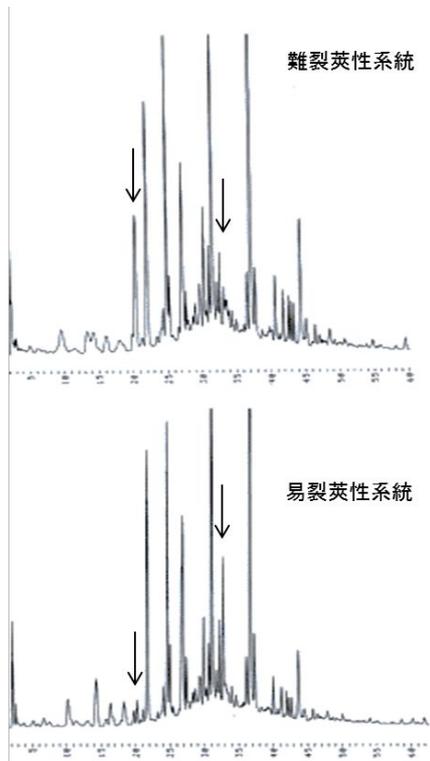


図4 難・易裂莢性準同質系統莢の80%メタノール抽出成分のクロマトグラム

(4) シロイヌナズナにおける解析

シロイヌナズナにおいて、現在まで *Pdh1* 遺伝子のオーソログであるディリジェント遺伝子の変異における長角果の裂開性変化に関する報告はない。シロイヌナズナには多くのディリジェント遺伝子のホモログ存在し、登熟中の長角果の valve においても複数の遺伝子の発現が確認された(図5)。

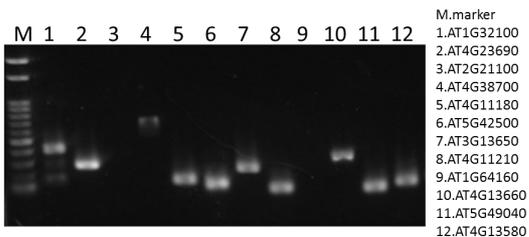


図5 受精後5日目のシロイヌナズナ長角果の valve における RT-PCR によるディリジェント遺伝子群の発現様式

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Hideyuki Funatsuki, Masaya Suzuki, Aya Hirose, Hiroki Inaba, Tetsuya Yamada, Makita Hajika, Kunihiro Komatsu, Takeshi Katayama, Takashi Sayama, Masao Ishimoto, and Kaijen Fujino

Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean  
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

査読有 111 2014 17797-17802 10.1073/pnas.1417282111/-/DCSupplemental

[学会発表](計 3件)

稲葉 大貴, 鈴木 雅也, 船附 秀行, 藤野 介延

ダイズ裂莢性 QTL に関する準同質遺伝子系統を用いた裂莢機構の生理学的解析  
 日本作物学会 2015年3月27日  
 日本大学生物資源科学部湘南キャンパス(藤沢市)

船附 秀行, 鈴木 雅也, 廣瀬 亜矢, 稲葉 大貴, 山田 哲也, 羽鹿 牧太, 小松 邦彦, 片山 健至, 佐山 貴司, 石本 政男, 藤野 介延

ダイズの脱粒性を左右する裂莢性 QTL のマップベースクローニング  
 日本育種学会 2015年3月21日  
 玉川大学(町田市)

藤野 介延, 鈴木 雅也, 廣瀬 亜矢, 稲葉 大貴, 山田 哲也, 羽鹿 牧太, 小松 邦彦, 片山 健至, 佐山 貴司, 石本 政男, 船附 秀行

ダイズ耐裂莢性遺伝子はディリジェント様タンパク質が関与する新たな裂莢機構を示す

日本植物生理学会 2015年3月16日  
 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

[その他]

雑誌 (計 1件)

船附 秀行, 藤野 介延

大豆の脱粒性を司る遺伝子を確認 難裂莢性における塩基配列を明らかに  
 ニューカントリー 査読無 62 2015 54-55

<http://dairyman.co.jp/book/newcountry/newcountry.html>

ホームページ(計 1件)

JSTサイエンスポータルニュース

[http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash\\_review/newsflash/2014/12/20141203\\_01.html](http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2014/12/20141203_01.html)

掲載新聞名(計 2件)

読売新聞(朝刊)

平成26年12月31日(25面)掲載

日本農業新聞(朝刊)

平成26年12月25日(16面)掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 介延 (FUJINO, Kaijen)

北海道大学大学院・農学研究院・准教授

研究者番号: 24580017