

博士（農 学）高 橋 良 二

学・位 論 文 題 名

Biochemical and genetic studies of the response of soybeans (*Glycine max*) to low temperatures.

(ダイズの冷温反応の遺伝・生化学的研究)

学位論文内容の要旨

北海道においては、ダイズは畑作の基幹作物として輪作体系上重要な位置を占めている。現在栽培されているダイズ品種は、低温抵抗性が不十分なため、低温年には収量と品質の低下が著しく、農業経営を不安定にする要因になっている。中でも、種子の臍色が黄色の白目ダイズは、臍色が暗褐色の褐色ダイズに比べて外観品質が優れているため需要が高いが、開花期の低温によって種子の臍周辺が褐変する低温障害粒の発生が品質の低下をきたし、また低温による収量の低下も褐目ダイズより大きい傾向がある。

本研究は、ダイズの耐冷性品種育成のための基礎的知見を得るために、ダイズの低温下での生育における遺伝子発現について、生化学的および遺伝学的観点から解析を試みたものである。結果は以下のように要約される。

1) 開花期の低温によって発生する種皮の褐変の品種間変異

ダイズの13品種を供試し、ファイトトロンで開花期に低温処理を行うことにより、種皮の褐変の品種間差異を調査した。その結果、白目品種ではすべての品種で褐変が認められたが、褐色品種では種子の臍の部分の褐変部位がやや拡大しただけで、白目品種のような濃い褐変は認められなかった。白目品種の中では、「トヨスズ」と「紫花4号」の褐変粒発生率と褐変程度が高く、「コガネジロ」、「ワセコガネ」、「トヨコマチ」の褐変粒発生率と褐変程度が低かった。低温感受性は花の発育ステージによって異なり、開花から約5日後にかけて次第に増大し、7日後から10日後にかけて次第に減少した。低温に最も感受性の高い時期は、開花後約4~14日の原胚分裂期頃であると考えられた。

2) 褐色色素の抽出・定量・分析

褐色色素はアルカリ溶液によって抽出された。開花期に低温処理した褐変種子から、非褐変種子の4倍以上の色素が抽出された。色素は褐変していない種子にも存在し、低温によって合成が促進されることが示唆された。抽出された色素は、以下のように

メラニン（フェノール類の酸化重合物）に共通の性質を示した。水と有機溶媒に不溶、アルカリ溶液に可溶、塩酸で沈殿を生じ、酸化剤で脱色され、塩化第二鉄で褐色の沈殿を生じた。紫外・可視吸光は短波長側に単調に増大した。そして、400～600 nmの吸光度の対数が直線になった。赤外吸光では3.0、3.4、6.1 μmに吸収が見られ、それぞれ（-OH）、（-CH）、キノンに相当していると考えられた。また、X線回折では4.2 Åの Bragg Spacing に対応するなだらかなピークが認められた。これはカテコールメラニンの特徴であった。さらにアルカリ溶融による色素の分解産物を薄層クロマト分析したところ、カテコールが検出されたため、この褐色色素はカテコールメラニンであると推定された。

3) 着色特性の遺伝様式と連鎖分析

開花期の低温による種子の臍周辺の褐変程度の高い「キタコマチ」と褐変程度の低い「コガネジロ」との F_1 個体の低温処理の結果より、低温感受性が抵抗性に対して不完全優性であると考えられた。 F_2 集団の遺伝分析の結果より、褐変現象には少数の主効遺伝子が関与していると推定された。また、上記の交配において F_2 分離を示す5個のマーカー遺伝子（L n, A c o 1, E n p, I d h 2, T i）と褐変を支配する遺伝子との間には、連鎖関係は認められなかった。一方、両品種は白熱灯による長日処理に対して異なった花芽分化反応を示し、長日感応性は、遺伝的特性であり、さらに、单遺伝子支配であることを明らかにした。長日感応性を支配する遺伝子と褐変を支配する遺伝子の間に連鎖が認められ、長日に感応しない遺伝子を同型接合体にもつ個体が開花期の低温による種子の臍周辺の褐変程度が高かった。したがって、長日に感応しないで、早く開花する個体を淘汰することにより、開花期の低温による種子の臍周辺の褐変程度の間接的改善が可能であるとした。

4) 耐冷性関連遺伝子の同定

白目・白毛品種と褐目・褐毛品種の耐冷性の違いには、種皮における色素の分布を支配する遺伝子I または毛茸と種皮の色を支配する遺伝子T のどちらかが関与していると考えられた。そこで、遺伝子T と I に関する準同質遺伝子系統を用いて耐冷性検定を行った。その結果、低温による種皮の褐変は白毛系統には認められたが、褐毛系統には認められなかった。また、白毛系統の中では、褐目・白毛系統では著しい褐変が認められたが、白目・白毛系統では褐変は低かった。主茎長の高さは、褐毛系統の方が白毛系統より高く推移し、生育がより旺盛であると考えられた。また開花期に低温処理を行った場合、白毛系統の莢数、子実数、子実重および開花始～開花始5日後の結莢率は、褐毛系統より著しく低い値を示し、白毛系統は褐毛系統より障害型耐冷性が低いことが明らかになった。したがって、褐毛を支配する遺伝子T（フラボノイド-3'-ヒドロキシラーゼをコードしていると推定される）、またはそれに強く連鎖した遺伝子が耐冷性機能（低温による種皮の褐変を抑制する機能、生育量を増大

させる機能、障害型耐冷性を高める機能) を支配することが明らかとなった。また、種皮の着色を抑制する遺伝子 I は、低温による種皮の褐変をある程度抑制する機能があると考えられた。

5) 低温反応遺伝子のクローニング

ダイズの低温感受性の高い生育期である本葉2葉期に、耐冷性品種「キタムスメ」の幼苗から、ディファレンシャルクリーニングによって、低温処理によって発現量の変化する3つの遺伝子 (pCR-1~3) をクローニングした。pCR-1 は低温処理によって発現量が増大したが、遺伝子発現に品種間差異は認められなかった。pCR-2 も低温処理によって発現量が増大しが、低温下での発現量は「キタムスメ」の方が低温感受性品種「コガネジロ」より大きかった。これに対し pCR-3 は、「キタムスメ」では低温処理によって発現量に差は認められなかったが、「コガネジロ」では低温処理によって発現量が顕著に低下した。pCR-2 は 1125 塩基からなり、290 個のアミノ酸をコードしていると推定された。pCR-2 のタンパク産物はプロリン、グリシン、チロシン、グルタミンからなる反復配列を多く有しており、C 末端側に疎水性の領域を有していた。pCR-3 は、747 塩基からなり、178 個のアミノ酸をコードしていると推定され、ルビスコの小サブユニットと相同性が高く、ダイズの耐冷性の品種間差異と光合成機能との関係が示唆された。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　島　本　義　也

副　査　教　授　喜　多　村　啓　介（筑波連携大学院）

副　査　教　授　三　上　哲　夫

学位論文題名

Biochemical and genetic studies of the response of soybeans (*Glycine max*) to low temperatures.

(ダイズの冷温反応の遺伝・生化学的研究)

本論文は、図33、表12、引用文献88を含み、5章からなる総頁数102の英文論文である。別に、参考論文6編が添えられている。

北海道においては、ダイズは畑作の基幹作物として輪作体系上重要な位置を占めている。現在栽培されているダイズ品種は、低温抵抗性が不十分なため、低温年には収量と品質の低下が著しい。特に、開花期の低温によって種子の臍周辺が褐変する低温障害粒の発生と生育初期の低温による生育遅延が問題となっている。

本研究は、ダイズの耐冷性品種育成のための基礎的知見を得るために、ダイズの低温下での生育における遺伝子発現について、生化学的および遺伝学的観点から解析を試みたものである。結果は以下のように要約される。

ダイズの13品種をファイトトロンで開花期に低温処理した。種子の臍の周囲に、白目品種では褐変が生じ、褐目品種では着色部位がやや拡大したのみであった。褐変粒発生率と褐変程度の両方で、白目品種の中では「トヨスズ」と「紫花4号」が高く、「コガネジロ」、「ワセコガネ」、「トヨコマチ」が低かった。低温感受性は、開花から約5日後にかけて次第に増大し、7日後から10日後にかけて次第に減少したことから、低温に最も感受性の高い時期は、開花後約4～14日の原胚分裂期であると考えられた。

アルカリ溶液によって抽出された褐変粒の褐色色素は、開花期に低温処理した褐変種子から、非褐変種子の4倍以上の量が抽出された。色素は褐変していない種子にも存在し、低温によって合成が一層促進されることが示唆された。抽出された色素は、フェノール類の酸化重合物であるメラニンに共通な性質を示した。さらに、アルカリ溶融による色素の分解産物の薄層クロマト分析により、この褐色色素はカテコールメ

ラニンであると推定された。

開花期の低温による種子の臍周辺の褐変程度の高い「キタコマチ」と褐変程度の低い「コガネジロ」との F_1 個体の低温処理の結果より、低温感受性が抵抗性に対して不完全優性であると考えられた。 F_2 集団の遺伝分析の結果より、褐変現象には少數の主効遺伝子が関与していると推定された。また、 F_2 分離を示す 5 個の標識遺伝子と褐変を支配する遺伝子との間には、連鎖関係は認められなかった。一方、両品種は白熱灯による長日処理に対して異なった花芽分化反応を示し、長日感応性は遺伝的特性であることを明らかにした。そして、その長日感応性を支配する遺伝子と褐変を支配する遺伝子との間に連鎖が認められた。 F_2 個体のうち、長日に感応しない遺伝子を同型接合体にもつ個体が開花期の低温による種子の臍周辺の褐変程度が高かったので、そのような個体を淘汰することにより、開花期の低温による種子の臍周辺の褐変程度の間接的改善が可能とした。

白目・白毛品種と褐目・褐毛品種の耐冷性の違いには、I、T のどちらかが関与していると考えられた。毛茸と種皮の色を支配する遺伝子 T と種皮における色素の分布を支配する遺伝子 I に関する準同質遺伝子系統を用いて耐冷性検定を行ったところ、T またはそれに強く連鎖した遺伝子が種々の生育段階での耐冷性を支配すること、また、I は低温による種皮の褐変をある程度抑制することが明らかとなった。

耐冷性品種「キタムスメ」から、ディファレンシャルスクリーニングによって、幼苗期の低温処理によって発現量が変化する 3 つの遺伝子をクローニングした。2 つの遺伝子は共に発現量が増大したが、1 つは発現量に品種間差異がなく、1 つは低温下での発現量は「キタムスメ」の方が低温感受性品種「コガネジロ」より大きかった。これに対し、3 つ目の遺伝子は、低温処理によって、「キタムスメ」では発現量に変化はなかったが、「コガネジロ」では発現量が顕著に低下した。この遺伝子は、クローニングの結果から 747 塩基からなり、178 個のアミノ酸をコードしており、ルビスコの小サブユニットと相同性が高く、ダイズの耐冷性の品種間差異と光合成機能との関係が示唆された。

ダイズの品質にとって重要な子実種皮において、開花期の低温による褐変現象を生化学的および遺伝学的に解析した。さらに、幼苗期の耐冷性について、分子遺伝学的に検討を加えた。得られた知見は、北海道の畑作に適したダイズ耐冷性品種の育成に寄与することが大であり、また、多くの基礎的な研究成果は、学会において高く評価されている。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者高橋良二は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。