

ダイズの高 α -トコフェロール含量形質の 遺伝的作用機序に関する研究

学位論文内容の要旨

α -トコフェロール（ビタミン E）は脂溶性の機能性成分であり、動脈硬化やガンなどの生活習慣病の予防効果が認められる。さらに、食品、化粧品の抗酸化物質、飼料の栄養添加物として幅広く利用される。一般的なダイズ種子には α -トコフェロールの前駆体である γ -トコフェロールが多いため、高 α -トコフェロールダイズの育種が試みられている。以前の研究で、Ujiie ら（2005）がダイズ遺伝資源より高 α -トコフェロールダイズを複数品種同定した。また、Dwiyanti ら（2007）は高 α -トコフェロールダイズの一つ“KAS”について、その高 α -トコフェロール含有性は後代に強く遺伝することを明らかにした。本研究は、ダイズにおける高 α -トコフェロール含量形質の遺伝的機序を明らかにすることを目的に研究を行った。

第 1 章では、ダイズおよび他の作物における高 α -トコフェロール含有化の育種の試み、またダイズの α -トコフェロール含量の遺伝的制御機構解明の重要性について論じた。

第 2 章では、高 α -トコフェロール含有ダイズ“KAS”と普通品種“いちひめ”との交雑後代を用いて、高 α -トコフェロール含有性に関連する遺伝子の同定を試みた。“いちひめ” $\times$ “KAS”の F_2 種子集団を用いた QTL 解析結果から、分子マーカー Sat_243 と KSC138-17 間のゲノム領域（連鎖群 K、染色体 9）に効果が大きい QTL を検出した（LOD 値 23.25、寄与率 56.0%）。この QTL は γ -トコフェロール含有率および δ -トコフェロール含有率にも関連性を示した。さらに、“いちひめ” $\times$ “KAS”の F_2 個体集団を用いた QTL 解析から、 F_2 種子集団の結果と同様に、 α -トコフェロール含有率に関連する QTL が Sat_243–KSC138-17 間に同定された（LOD 値 20.62、寄与率 55.6%）。さらに、この QTL は α -トコフェロール含量（LOD 値 21.44）と γ -トコフェロール含量（LOD 値 5.24）にも強い関連性を示した。同定した QTL 領域内に新たな SSR マーカーをマッピングし、QTL 領域を物理的距離で約 75-kbp のゲノム領域に狭めた。

ゲノムデータベース Phytozome の情報から、この QTL 領域内に γ -トコフェロールを α -トコフェロールに変換する酵素 γ -TMT をコードする遺伝子 γ -TMT3 が存在することが予測された。

第3章では、 γ -TMT3 遺伝子を含むゲノム領域がヘテロ型の個体 (RHL) を自殖させ、その個体の後代の中で、“いちひめ”型 γ -TMT3 を持つ個体 (“いちひめ”型個体) と“KAS”型 γ -TMT3 を持つ個体 (“KAS”型個体) を解析に用いた。開花後 30 日および 40 日の種子では、“KAS”型個体の γ -TMT3 発現量は“いちひめ”型より 2~3 倍高かった。一方、すべての種子登熟段階において、“KAS”型個体の α -トコフェロール含有率が“いちひめ”型より 1.5~3 倍高いことを明らかにした。総トコフェロール含量には有意な差異が認められず、 α -トコフェロール含量が常に“KAS”型個体のほうが高いことから、 α -トコフェロール含有率の増加は α -トコフェロール含量の増加に由来すると考えられた。

高 α -トコフェロールダイズ (“KAS”、Dobrogeance”、“Dobrudza 14 Pancevo”) および“いちひめ”、“Williams82”、“トヨコマチ”における γ -TMT3 プロモーターの塩基配列を比較したところ、高 α -トコフェロール含有性と強い関連を示す塩基置換が存在した。1 つの塩基置換は転写の促進に関わる CAAT box 内に存在し、もう 1 つの塩基置換では“KAS”の γ -TMT3 プロモーターに MYB 転写因子結合部位が加わった。“いちひめ”と“KAS”の γ -TMT3 プロモーターをリポーター遺伝子 intron-GUS につなぎ、シロイヌナズナへ導入した。GUS 活性測定の結果から、“KAS”型の γ -TMT3 プロモーター活性は“いちひめ”型よりおよそ 3.8 倍高いことを明らかにした。この結果は、 γ -TMT3 プロモーターの変異が“KAS”の高 α -トコフェロール含有性に関わることを強く支持した。

登熟種子および葉における γ -TMT1、 γ -TMT2、 γ -TMT3 の発現パターンを解析した。すべての遺伝子が発現することを明らかにし、“いちひめ”型個体と“KAS”型個体の γ -TMT1 と γ -TMT2 の発現量に有意な差がなかった。種子登熟期間中に、それぞれの遺伝子が異なる発現パターンを示した。そのうえ、葉では γ -TMT2 の発現量が最も高く、種子の肥大時期には γ -TMT1 が最も高い発現量を示した。これらの結果から、それぞれの遺伝子が異なる役割を持つことが示唆された。さらに、輸送シグナルペプチドの有無から、 γ -TMT2 はプラスチドに局在すると予測され、 γ -TMT1 と γ -TMT3 はプラスチド外に局在すると予測された。その結果、 α -トコフェロール生合成はプラスチド内およびプラスチド外で行われる可能性があることが示唆された。

第4章では、本研究で得られたダイズの高 α -トコフェロール含有性の遺伝的作用機序に関する知見を用いて、今後の高 α -トコフェロールダイズ育種への利用の可能性について述べた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	喜多村 啓 介
副査	教授	三 上 哲 夫
副査	准教授	阿 部 純
副査	助教	山 田 哲 也

学 位 論 文 題 名

ダイズの高 α -トコフェロール含量形質の 遺伝的作用機序に関する研究

本論文は 4 章 76 頁からなる和文論文であり、図 19、表 5 を含む。

α -トコフェロールはビタミン E の一種であり、脂溶性抗酸化作用を持ち、動脈硬化やガンなどの生活習慣病の予防効果が認められる。さらに、食品、化粧品の抗酸化物質、飼料の栄養添加物として幅広く利用される。一般的なダイズ種子には α -トコフェロールの前駆体である γ -トコフェロールが多いため、高 α -トコフェロールダイズの育種が試みられている。以前の研究で、Ujiie ら (2005) がダイズ遺伝資源より高 α -トコフェロールダイズを複数品種同定した。また、Dwiyanti ら (2007) は高 α -トコフェロールダイズの一つ「KAS」について、その高 α -トコフェロール含有性が後代に強く遺伝することを明らかにした。本研究は、ダイズにおける高 α -トコフェロール含量形質の遺伝的機序を明らかにすることを目的に研究を行った。

1. 高 α -トコフェロール含有率を支配する QTL マッピングおよび遺伝子の同定

遺伝資源から同定された品種「KAS」における高 α -トコフェロール含有性を支配する QTL のマッピングおよび支配遺伝子の同定を試みた。「KAS」と普通品種「いちひめ」の交配後代である F_2 種子集団、 F_2 個体集団を用いて QTL マッピングを行った。その結果、連鎖群 K の Sat_243 と KSC138-17 マーカー間のゲノム領域に効果が大きい QTL が検出された。その QTL の LOD 値は 20.62、寄与率 55.6%、相加効果-8.067 であった。この QTL は γ -トコフェロール含有率および δ -トコフェロール含有率にも関与することが QTL 解析から明らかになった。 γ -トコフェロール含有率に関しては寄与率 48.9%、相加効果-6.815 であった。一方、 δ -トコフェロール含有率は寄与率 12.2%、相加効果-1.669 であった。今回の研究で検出された QTL は α -トコフェロール含有率を増やし、 γ -トコフェロール含有率を減らす効果

を持つ。 γ -トコフェロールは γ -トコフェロールメチルトランスフェラーゼ (γ -TMT) によって α -トコフェロールに変換されるため、本研究で検出された QTL は γ -TMT に関連することが考えられる。

同定した QTL 領域内に新たな SSR マーカーをマッピングし、QTL 領域を物理的距離で約 75-kbp のゲノム領域に狭めた。ゲノムデータベース Phytozome の情報から、この QTL 領域内に γ -トコフェロールを α -トコフェロールに変換する酵素 γ -TMT をコードする遺伝子が存在することが予測された。ダイズ、 γ -TMT をコードする遺伝子 γ -TMT1 と γ -TMT2 はすでに単離されたため、今回同定された遺伝子は γ -TMT3 と名づけられた。高 α -トコフェロールダイズ（「KAS」、「Dobrogeance」および「Dobrudza 14 Pancevo」）と普通品種（「いちひめ」、「Williams82」および「トヨコマチ」）における γ -TMT3 プロモーターの塩基配列を比較したところ、高 α -トコフェロール含有性と強い関連を示す塩基置換が存在した。1 つの塩基置換は転写の促進に関わる CAAT box 内に存在し、もう 1 つの塩基置換では「KAS」の γ -TMT3 プロモーターに MYB 転写因子結合部位が加わった。

2. γ -TMT3 遺伝子の転写制御と α -トコフェロール含量変動との関連性

γ -TMT3 遺伝子を含むゲノム領域がヘテロ型の個体 (RHL) を自殖させ、交雑後代の中で、「いちひめ」型の γ -TMT3 を持つ個体（「いちひめ」型個体）と「KAS」型の γ -TMT3 を持つ個体（「KAS」型個体）を解析に用いた。すべての種子登熟段階において、「KAS」型と「いちひめ」型に関係なく、登熟に伴い α -トコフェロール含有率が増加した。しかし、「KAS」型個体の α -トコフェロール含有率が「いちひめ」型より 1.5~3 倍高いことを明らかになった。一方、開花後 30 日から 40 日にかけて γ -TMT3 の発現量が増加した。開花後 30 日および 40 日の種子では、「KAS」型個体の γ -TMT3 発現量は「いちひめ」型より 2~3 倍高かった。 γ -TMT3 遺伝子の転写量と α -トコフェロール含有率の変動は類似するため、 γ -TMT3 の発現変化は α -トコフェロール含有率の変化と強い関連性を持つ。総トコフェロール含量には有意な差異が認められず、 α -トコフェロール含量が常に「KAS」型個体のほうが高いことから、 α -トコフェロール含有率の増加は α -トコフェロール含量の増加に由来すると考えられた。

α -トコフェロール含有率に関連する変異を含む 1.3-kbp の γ -TMT3 プロモーター部位を「いちひめ」と「KAS」から単離し、リポーター遺伝子 intron-GUS につなぎ、シロイヌナズナへ形質転換をした。葉を用いた GUS 活性測定から、「KAS」型の γ -TMT3 プロモーター活性は「いちひめ」型の γ -TMT3 プロモーターよりおよそ 2.8 倍高いことが明らかになった。この結果は、 γ -TMT3 プロモーターの変異が「KAS」の高 α -トコフェロール含有性に関わることを強く支持する。

本研究は、ダイズ種子の高 α -トコフェロール含量の遺伝的作用機構を解明し、高ビタミン

ン E サイズ育種への応用に重要な道筋を立てるものであり、学術的に高く評価できる。

よって、審査員一同は、Maria Stefanie Dwiyanti が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。