

学位論文題名

ダイズの生殖生長期間における低温並びにウイルス感染による障害発生機作の解析

学位論文内容の要旨

北海道のダイズ栽培では夏季の低温による障害がしばしば問題となる。ダイズの冷害は、“障害型”、“生育不良型”及び“遅延型”などに分類されるが、障害型冷害による被害がもっとも大きい。障害型冷害は、開花期前後の低温による受精率の低下や登熟不良として現れる。しかし、ダイズでは生育ステージが斉一な花を大量に得にくく、また栄養競合など受精不良以外の原因による落莢が多いなどの理由から受精率に対する低温の影響についての解析が難しい。このため、低温がどのような機作で受精率に影響を与えているのかは、これまで十分明らかにされていない。障害型冷害に次いで重要な低温障害は種皮の低温着色である。種皮の低温着色は、開花 5~8 日後に低温に遭遇することによって、ダイズ子実の臍およびその周辺の種皮が褐変する現象である。種皮の低温着色はダイズの外観を損ない、ダイズの商品価値を著しく低下させる。また、この着色は熱に対して耐性をもつことから、煮豆などに加工しても消えることがなく、煮豆加工用として評価の高い北海道産のダイズにとっては特に大きな問題である。種皮の低温着色に対する抵抗性は品種によって異なることから、ダイズの選抜試験では人工気象室を使って開花 7~21 日後について低温処理(昼 18°C/夜 13°C)を行い、生じた低温着色粒を調査することによって有望系統の低温着色抵抗性を評価している。しかし、現行の評価手法では年間数十点を評価するのが限界であり、これ以上の規模の拡大が難しい。このため、DNA マーカーのように多くの材料を評価できる手法の開発が求められている。また、この種皮の低温着色と類似の現象として、ウイルス感染により生じる種皮の褐斑が知られている。種皮の褐斑は、キュウリモザイクウイルス(CMV)、ダイズモザイクウイルス(SMV)などのウイルス感染により生じるが、北海道ではこれらの発生が限定的なことから大きな問題とはなっていない。しかし、本州および海外では、ウイルス感染による褐斑の発生はダイズの外観品質を低下させる大きな問題である。褐斑はダイズにおける色素合成経路の部分的な活性化と考えられ、局所的な“gain of function”であり非常に興味深い現象である。しかし、ウイルス感染によりなぜ褐斑が生じるのか、そのメカニズムは明らかになっていない。

本研究では、北海道のダイズ栽培における最も重要な低温障害である障害型冷害と、それに次いで重要な種皮の低温着色について研究を行い、ダイズ品種の障害型冷害抵抗性及び低温着色抵抗性の向上に貢献できる重要な知見を得た。障害型冷害による受精率の低下については、生殖生長期間中の低温感受性期を解明するため、播種時期をずらすことにより得た、様々な生育ステージの植物体に 7 日間 15°C(昼)/10°C(夜)の低温処理を行い、個々の花において低温を受けたステージと受精率との関係を詳細に追跡する方法を確立した。なお、本研究では開花 7~12 日後の莢の伸長の有無で莢の受精の有無を判定している。この方法を用いて解析した結果、低温感受性期は開花直前(開花 3~4 日前)と四分分子期前後(開花 12.5~13.5 日前)に存在することが明らかとなった。さらに、低温による受精率の低下は柱頭上の花粉数の減少が原因であることが示された。また、花粉の形態を調べた

ところ、四分子期前後に低温に遭遇したと考えられる花からは形態が異常な花粉粒が多数観察されたことから、四分子期前後に受けた低温については花粉の形態異常とこれに伴う葯の裂開不良が受精率低下の原因であると推定された。これらの知見を踏まえ、障害型冷害による被害の大きかった 2003 年に子実重の低下が小さかった「十系 978 号」と、子実重の低下が大きかった品種「トヨムスメ」について受精率に対する低温の影響を上述の方法で詳細に解析した結果、「トヨムスメ」の受精率が 50%前後まで低下したのに対し、「十系 978 号」の受精率は 68%までしか低下せず、「トヨムスメ」と比較して明らかに抵抗性が強いことが示された。また、「十系 978 号」の障害型冷害抵抗性は主に四分子期前後の低温感受性期における抵抗性によるものであることが明らかとなった。本研究により、従来の障害型冷害抵抗性の評価方法では区別できなかった開花期前後のステージにおける抵抗性と四分子期前後の抵抗性を分けて評価することが可能になったことから、今後のダイズの耐冷性育種ではより精度の高い検定が行えるものと期待される。

ダイズの種皮色は *GmIRCHS* 遺伝子座によって決定されているが、これまでの研究によりこの *GmIRCHS* 遺伝子における配列の変異と低温着色抵抗性との関連が示唆されていた。そこで、本研究では *CHS* の逆位反復配列である *GmIRCHS* を有し低温着色抵抗性が弱い「トヨムスメ」と、*GmIRCHS* の対立遺伝子で逆位反復構造をとらない *GmASCHS* を有し低温着色抵抗性が強い「トヨハルカ」との間で作成した組換え自殖系統 (RILs) 144 系統を用いて、*GmIRCHS* 座の遺伝子型と低温着色抵抗性との関連を調査した。その結果、*GmIRCHS* 座の遺伝子型と低温着色抵抗性との間には強い関連が認められ、ほとんどの RILs の低温着色抵抗性を *GmIRCHS* 座の遺伝子型で説明することができた。このことから、低温着色抵抗性の品種間差は、主に種皮色決定遺伝子座である *GmIRCHS* の遺伝子型によることが示唆された。また、由来の異なる 40 品種・育成系統を使って *GmASCHS* の効果を検証したところ、「トヨハルカ」と同じ *GmASCHS* をもつ系統は全て一定のレベル以上の低温着色抵抗性を示した。以上の結果から、*GmIRCHS* 座における配列変異を低温着色抵抗性の選抜 DNA マーカーとして利用することは有用であると考えられた。また、RILs の QTL 解析によって *GmIRCHS* 座以外にも「トヨハルカ」由来の低温着色抵抗性に関与する寄与率の小さい QTL が存在することが明らかになった。この QTL を *GmASCHS* と組み合わせることで、より強い低温着色抵抗性を付与できるものと考えられた。

ウイルス病による褐斑粒の発生についてそのメカニズムを明らかにするため、CMV のダイズ系統と CMV の Y 系統の間でシュードリコンビナントウイルスを作成し、CMV ゲノムのうちダイズ種皮の褐斑発生に関与するゲノムを調べたところ、RNA2 がダイズ系統由来である場合に褐斑を生じ、Y 系統由来である場合は褐斑を生じないことが明らかとなった。さらに、RNA2 について CMV ダイズ系統と CMV の Y 系統の間でキメラウイルスを作成し褐斑を生じる遺伝子の同定を試みたところ、褐斑が生じるかどうかは 2b 遺伝子を含む領域によって決定されていることが明らかになった。種皮色が黄色のダイズでは、色素合成のキーエンザイムである *CHS* 遺伝子が RNAi により抑制されているため色素合成が抑えられている。CMV の 2b タンパクが宿主の RNAi に対するサブプレッサーであることを考えると、CMV の 2b タンパクによってダイズにおける *CHS* 遺伝子の RNAi が阻害され、その結果種皮における色素合成が部分的に活性化されて種皮に褐斑が生じているのではないかと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 増 田 税
副 査 教 授 上 田 一 郎
副 査 准教授 阿 部 純
副 査 講 師 犬 飼 剛

学位論文題名

ダイズの生殖生長期間における低温並びにウイルス感染による障害発生機作の解析

北海道のような冷涼地のダイズ栽培では、生殖成長期間における低温による着莢障害と種皮の着色が大きな問題となる。本研究では、これらの生殖成長期間における2つの低温障害について、障害発生の機作および品種間差を解析した。また、ウイルス感染による種皮の褐斑発生が種皮の低温着色と類似の現象であることに着目し、その機作を解析して比較した。以下に主要な研究成果について要約する。

1) ダイズにおける低温着莢障害の機作および低温感受性の品種間変異の解析

北海道のダイズ栽培では、開花期前後の低温による受精率の低下により収量が低下することが大きな問題である。しかし、ダイズにおいて低温がどのような機作で受精率に影響を与えているのか十分明らかにされていない。そこで、本研究では様々な生育ステージの植物体に低温処理を行い、個々の花において低温を受けたステージと受精率との関係を詳細に追跡する方法を確立した。この方法により解析した結果、低温感受性期は開花直前（開花3～4日前）と四分子期前後（開花12.5～13.5日前）に存在することが明らかとなった。また、花粉の形態および柱頭上の花粉数の観察から、四分子期前後に受けた低温については花粉の発達異常と、これに伴う葯の裂開不良が受精率低下の原因であると推定された。さらに、障害型冷害年に子実重の低下が小さかった「十系978号」について上述の方法等で解析した結果、「十系978号」受精率の低下は他の品種・系統より小さく、「十系978号」は四分子期前後の低温感受性期における抵抗性が優れることが明らかになった。本研究により、従来の障害型冷害抵抗性の評価方法では評価できなかった四分子期前後の抵抗性を評価することが可能になった。

2) ダイズ種皮における低温着色抵抗性の原因遺伝子の解明

障害型冷害に次いで重要な低温障害は種皮の低温着色である。種皮の低温着色は、開花 5~8 日後に低温に遭遇することによって、ダイズ子実の臍とその周辺の種皮が褐変する現象である。種皮の低温着色はダイズの外観を損なうことから、北海道のダイズ栽培において大きな問題である。種皮の低温着色に対する抵抗性は品種によって異なり、ダイズの育種プログラムでは人工気象室を使って有望系統の低温着色抵抗性を評価している。しかし、現行の評価手法では年間数十点を評価するのが限界であり、多くの材料を評価できる DNA マーカーの開発が求められていた。ダイズの種皮色は、CHS 遺伝子の逆位反復配列である GmIRCHS によって決定されているが、これまでの研究により、GmIRCHS の構造の違いと低温着色抵抗性の品種間の違いの関連が疑われていた。そこで、本研究では低温着色抵抗性が弱く通常の GmIRCHS をもつ「トヨムスメ」と、低温着色抵抗性が強く、GmIRCHS が通常と異なる構造 (GmASCHS) をもつ「トヨハルカ」との間で作成した組換え自植系統 (RILs) を解析することにより、低温着色抵抗性の品種間差が GmIRCHS によって決定されていることを明らかになった。さらに、GmIRCHS の効果を様々な遺伝的背景をもった材料で検証し、GmIRCHS が低温着色抵抗性の選抜のための DNA マーカーとして利用できることが明らかにした。

3) キュウリモザイクウイルスの感染による種皮異常着色の原因解明

種皮の低温着色と類似の現象として、ウイルス感染により生じる種皮の褐斑が知られている。種皮の褐斑は、キュウリモザイクウイルス (CMV) などのウイルス感染により生じ、ダイズの外観品質を低下させるため、ダイズ栽培において問題になっている。しかし、ウイルス感染によりなぜ褐斑が生じるのか、そのメカニズムは明らかになっていない。ウイルス病による褐斑粒の発生メカニズムを明らかにするために CMV ダイズ系統と CMV の Y 系統の間でシュードリコンピナントウイルスを作成し、ダイズ種皮に褐斑を生じるかどうかを調査したところ、褐斑が生じるかどうかは、ウイルスの 2b 遺伝子を含む領域によって決定されていることが明らかになった。種皮色が黄色のダイズでは、色素合成のキーエンザイムである CHS 遺伝子が RNAi により抑制され、色素合成が抑えられており、また CMV の 2b 遺伝子は宿主の RNAi のサプレッサーである。これらのことと本研究の結果から、CMV は自身のもつ 2b 遺伝子により、ダイズ種皮の RNAi を抑制し、色素合成を部分的に復活させることによって、種皮の褐斑を生じさせている可能性が示唆された。

よって、審査員一同は、大西志全氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。