

大豆種子で発現する遺伝子の同定と連鎖分析

原田久也^{*1}・穴井豊昭²

¹千葉大学園芸学部 ²佐賀大学農学部

Identification and Linkage Analysis of the Genes Expressed in Soybean Seeds

Kyuya HARADA¹ and Toyoaki ANAI²

¹Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo 271-8510

²Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840-8502

ABSTRACT

Map-based cloning is a general method for isolating genes responsible for agriculturally important traits. The use of cDNA markers makes the method more effective. To identify the genes for seed traits including seed quality and quantity of seed constituents, high quality cDNA libraries were made from developing soybean seeds. The 5' partial sequences of 1,500 randomly selected clones were determined and the 3' partial sequences of 233 non-redundant clones were also determined to develop locus-specific cDNA markers by PCR. Ribosomal proteins were most highly expressed and electron transferring proteins had a relatively high expression in the early stage of developing seeds, while storage proteins were highly expressed in the middle stage. Proteinase inhibitors showed relatively high expression in both stages. Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) and acetyl-CoA carboxylase (ACCase) were selected as putative candidate enzymes for protein and lipid contents respectively. Their loci were determined based on RFLP and PCR-RFLP using recombinant inbred lines and compared with the quantitative traits loci (QTLs) for protein and lipid contents, but there was no correspondence among the enzyme loci and the QTLs. Further analyses are necessary to identify QTLs for protein and lipid contents by cDNA mapping and map-based cloning. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 18-21, 2003.

Key words : soybean, seed, quantitative trait locus (QTL), EST, cDNA marker

種子で発現している遺伝子の連鎖地図上の位置と種子の形質遺伝子に対応づけることにより、種子の形質

に関する遺伝子の同定に役立てることができる。本研究では登熟中の種子のmRNAに由来する高品質のcDNAクローンを多数単離して、5'末端部分塩基配列から発現している遺伝子の同定を行うと共に、3'末端

*〒271-8510 千葉県松戸市松戸648

部分塩基配列を決定してDNAマーカー開発の基盤を確立すること、種子のたん白質含量に關与する可能性のあるPhosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase)¹⁾と脂質含量に關与する可能性のあるプラスチド型のacetyl-CoA carboxylase (ACCase)²⁾の連鎖地図上の位置を決定することを目的とした。

方 法

cDNAの調製

品種「農林2号」の登熟中の種子を経時的に採取して、長径5 mm以下、5~7 mm、7~9 mm、9~12 mmに分けて凍結保存し、5 mm以下、7~9 mmの試料をcDNAの合成およびライブラリー作製の材料として用いた。酸性フェノール/SDS法で抽出し、2M LiClで沈殿させた後、グラスファイバーマトリックスを用いて精製した全RNAを用いてCreator SMART cDNA Library Construction Kit (クロンテック社)によりcDNAの合成、ライブラリーの作製を行った。このライブラリー (ベクターpDNR-L1B) を大腸菌ElectroMax DH10B (インビトロジェン社)にエレクトロポレーション法で導入した。

塩基配列の決定

各クローンのプラスミドを抽出してM13~20プライマーを用いてシーケンス反応を行い、シーケンサーABI310により、5'末端からの塩基配列を決定した。3'末端領域の塩基配列決定には、Tの15回反復の3'側にAA, AG, AC, AT, GA, GG, GC, GT, CA, CG, CC, CTの配列を結合した混合プライマーまたはRVプライマーを用いた。

相同性検索

塩基配列の相同性検索にはBLASTプログラムを用いた。まずESTデータベースを検索し、ここでホモロジーが見つからなかったものはその後nrデータベースに対する検索を行った。データベースにヒットしたものは、ダイズと他種の生物に分類した。

連鎖解析

ダイズ品種「ミスズダイズ」と「秣食豆公503」に由来する組換え近交系156系統を用いた。各系統の葉からCTAB法によりゲノムDNAを抽出した。同じ両親に由来するF2集団を用いて作製した連鎖地図上からほぼ等間隔に選んだ約300のRFLPマーカー、またはSSRマーカーを連鎖を解析するためのマーカーとした。エンドウのプラスチド型のACCaseを構成するbiotin carboxylase (BC), biotin carboxyl carrier protein (BCCP), carboxyltransferase (α -CT), イネのPEPCaseに対するcDNAをプローブと

して、8種の制限酵素ApaI, BamHI, BglII, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnIでゲノムDNAを処理して両親のRFLPを解析した。多型が見出された制限酵素を用いて各系統のサザンハイブリダイゼーションのパターンを調べ、DNAマーカーとの連鎖を解析した。ダイズのPEPCaseの塩基配列情報からプライマー5'-GTCATCATTATTTGCGGGGCTGTG-3'および5'-TCCACTAGGCTTTCTCTTTGCTGG-3'を設計し、両親のゲノムDNAを鋳型にして得られたPCR産物を26種の制限酵素で処理してPCR-RFLPを解析した。多型の得られた制限酵素を用いて各系統のPCR-RFLPパターンを調べ、DNAマーカーとの連鎖を解析した。連鎖地図はプログラムMAPMAKER/EXP 3.0を用いて作製した。

結果と考察

ダイズ種子で発現している遺伝子

長径5 mm以下の種子から得られた約1,000クローン、長径7~9 mmの種子から得られた約500クローンを無作為に選び、5'末端部分塩基配列を決定した。相同性検索の結果、相同性が見いだせなかったクローンは84、機能のわからない遺伝子と相同であったクローンは60あった。完全長と予想されるクローンは約70%で、品質のよいライブラリーであった。機能が推定できるクローンを重複を除いて表にまとめた。長径5 mm以下の種子からのクローンはダイズの遺伝子と相同性のあったものが102、ダイズ以外の種の遺伝子と相同性のあったものが131、合計233であった。長径7~9 mmの種子からのクローンはダイズの遺伝子と相同性のあったものが15、ダイズ以外の種の遺伝子と相同性のあったものが28、合計43であった。総計276クローンのうち、両端からの部分塩基配列が決定できたクローンは233であった。長径5 mm以下の種子ではリボソームたん白質をコードする遺伝子が最も多く発現しており、電子伝達系に關するたん白質、酵素の遺伝子も多数発現していた。この時期の種子は登熟初期に当たり細胞伸長を続けて、たん白質合成の準備、エネルギー代謝が盛んなためと考えられる。長径7~9 mmの種子では貯蔵たん白質をコードする遺伝子の発現が多かった。この時期の種子は登熟中期に入ったところで、貯蔵成分の合成が始まっている。両者に共通して多かったのはproteinase inhibitorの遺伝子であった。たん白質含量に關与する可能性のあるPEPCase, asparaginase, 脂質含量に影響する可能性のあるACCase, diacylglycerole acyltransferaseのクローンは得られなかった。登熟中期以降のクローンを増やす必要がある。

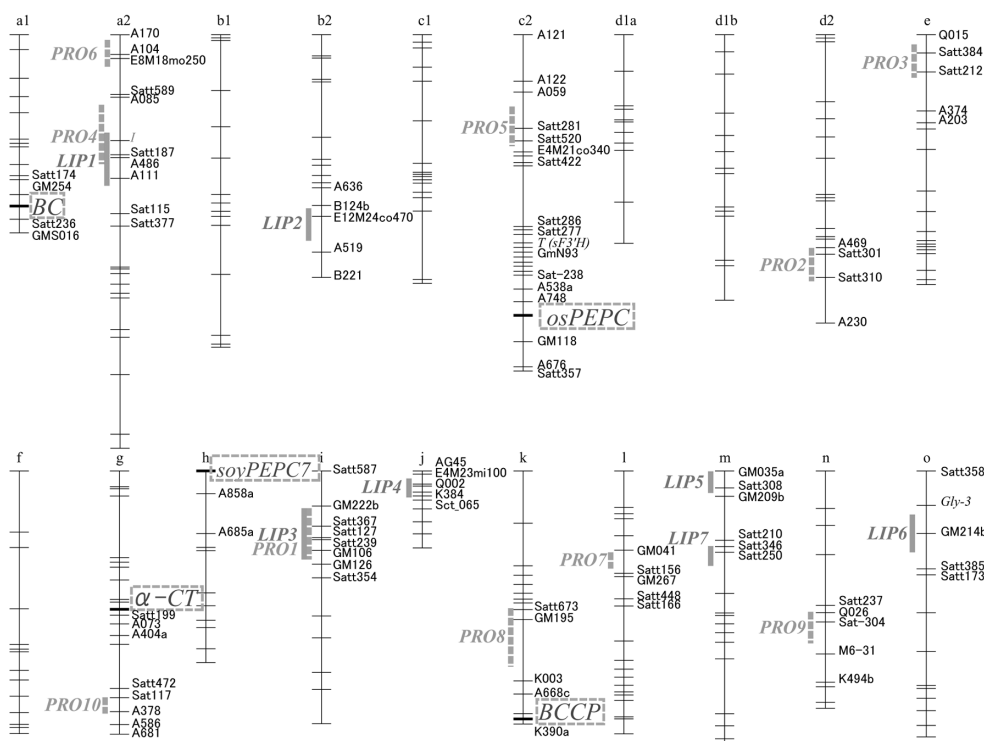


Fig. 1. Map position of the loci for 5 enzymes on the soybean linkage groups. Bold dotted lines and black lines show the QTL regions for protein and lipid contents respectively.

ACCCase, PEPCase遺伝子のマッピング

マッピングを行った酵素とそれらの遺伝子座の名称はTable 1に示した。BCと α -CTはEcoR Iで、BCCPとosPEPCはEcoRVで多型が得られた。BCは連鎖群a1のGM254から2.7 cMの位置に、BCCPは連鎖群kのK390aから2.7 cMの位置に、 α -CTは連鎖群gのSatt199から3.3 cMの位置に、osPEPCは連鎖群c2のA748から7.1 cMの位置にマッピングされた (Fig. 1)。soyPEPC7を位置づけるために行ったPCR-RFLP解析では、Ava II, BsuR I, Rsa Iで多型が得られ (Fig. 2)、連鎖群hの末端にマッピングされた (Fig. 1)。これらの解析で得られた位置はたん白質含量、脂質含量の量的遺伝子座 (QTL) 解析で得られた領域と一致するものがなかった。QTLと関連すると思われる酵素についてさらに解析を続けると共に、QTLのmap-based cloningを行う必要がある。

謝辞 イネのPEPCase cDNAを分譲いただいた神戸大学の杉本敏男博士とエンドウのBC, BCCP, α -CT cDNAを分譲いただいた名古屋大学の永野幸生博士に感謝いたします。

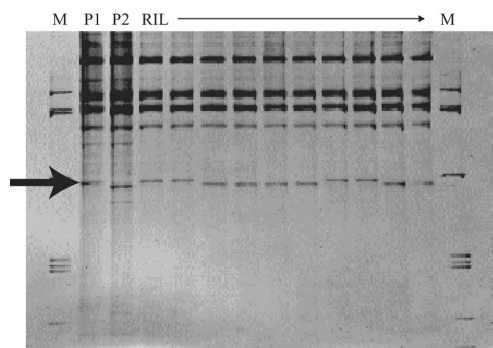


Fig. 2. Genetic analysis of soyPEPC7 using PCR-RFLP (BsuR I). The polymorphic bands were shown by an arrow. M, size marker (ϕ X174/HaeIII); P1, Misuzudaizu; P2, Moshidou Gong 503.

Table 1. List of the polypeptides of ACCase and PEPCase located on the soybean linkage map

Polypeptide	Source of gene	Locus name
Biotin carboxylase	Pea	BC
Biotin carboxylase carrier protein	Pea	BCCP
Carboxyltransferase α subunit	Pea	α -CT
Phosphoenolpyruvate carboxylase	Rice	osPEPC
Phosphoenolpyruvate carboxylase	Soybean	soyPEPC7

要 約

種子の品質や種子成分の含量に関与する遺伝子を同定するために、登熟種子から完全長cDNAクローンを豊富に含むライブラリーを作製して無作為に選んだ約1,500クローンの5'末端部分塩基配列を決定した。さらに機能が推定され、重複を除いたクローンの内、233クローンについては3'部分塩基配列も決定した。これらの情報は遺伝子座特異的なPCRに基づくcDNAマーカーの作出に用いることができる。登熟初期にはリボソームたん白質が最も多く発現しており、電子伝達系に関するたん白質も比較的多数発現していた。登熟中期では貯蔵たん白質の発現が多かった。両者に共通して多かったのはproteinase inhibitorであった。たん白質含量に影響すると考えられるPEPCaseと脂質含量に影響すると予想されるACCaseの遺伝子の連鎖地図上の位置を決定して、たん白質含量、脂質含量のQTLと比較したが一致するものは見いだせなかった。今後はcDNAマーカーを多数位置づけると共に連鎖地図に基づきこれらQTLの単離を行う必要がある。

文 献

- 1) Sugimoto T, Tanaka K, Monma M, Kawamura Y and Saio K (1989): Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlates to its contents of protein and lipid. *Agric Biol Chem*, **53**, 885-887.
- 2) 木崎暁子(1999)：工業用植物油の効率的生産技術の開発。BIO INDUSTRY, **16**, 34-41.