大豆種子中のたん白質含量を制御する遺伝子の同定および機能解析
―量的形質遺伝子座qPro7の精密マッピング―

寺石政義・奥本　裕・吉川貴德・遠藤亮太・谷坂隆俊*

京都大学大学院農学研究科

Identification of Genes Controlling the Contents of Seed Storage Proteins in Soybean
―Fine Mapping of the Quantitative Trait Locus *qPro7*―

Masayoshi TERAISHI, Yutaka OKUMOTO, Takanori YOSHIKAWA, Ryota ENDO and Takatoshi TANISAKA

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

Soybean seed storage protein consists of two major components, 7S and 11S globulin, which together account for 70% of the total and have complementary relationships. We reported that QTL analysis, using 96 recombinant inbred lines derived from the cross between Peking and Tamahomare (PT-RILs), detected two QTLs, *qPro1* (linkage group I) and *qPro7* (linkage group O). These two QTLs proved to determine the content ratio of 7S globulin to 11S globulin (7S/11S ratio). Peking-type alleles of the two QTLs increased 7S globulin content and decreased 11S globulin content. 634 plants derived from a heterozygote PT-RIL line of *qPro7* region (Satt445 - Sat_318 ; 513.1 kb) were planted and relationships between their genotype around the *qPro7* region and 7S/11S ratio were examined. Peking-type homozygotes have higher 7S/11S ratios than Tamahomare-type homozygotes. Protein content analysis of the progenies, which harbored a recombination within the *qPro7* region, narrowed the location of *qPro7* in a 401.7 kb-region between Satt445 and s124-110. We suggest that a regulation factor of 7S and 11S globulin might be present in this region. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 51-54, 2010.

Key words : seed storage protein, QTL, recombinant inbred line, fine mapping

*〒606-8502　京都市左京区北白川追分町

大豆の種子貯蔵たん白質の主要成分である7Sグロブリンと11Sグロブリンは，相補的な関係にあることが知られており[1]，そのほとんどがそれぞれβコングリシニンおよびグリシニンによって占められている[2, 3]．βコングリシニンはα'，αおよびβの３サブユニット（以下，sub）から構成される３量体たん白質であり，*CG-1*～*CG-15*遺伝子にコードされており[4]，α'-subは*CG-1*，α-subは*CG-2*および*CG-3*にコードされていることが明らかにされている[5, 6]．グリシニンはI，IIa，IIb酸性サブユニットとI，IIa，IIb塩基性サブユニットより構成される６量体たん白質であり，*Gy1*～*Gy5*遺伝子にコードされていることが明らかにされている．

我々は，品種Pekingとタマホマレの組換え自殖系統（以下，PT-RILs）を用いたQTL解析により，大豆の種子貯蔵たん白質含量を制御する8QTL（*qPro1*～*qPro8*）を見出した．このうち，7Sグロブリンと11Sグロブリンの構成比（以下，7S/11S比）に関わるQTLとして*qPro1*（連鎖群I）および*qPro7*（連鎖群O）を検出した．これらQTLのPeking型アレルは7Sグロブリン含量を増大させ11Sグロブリン含量を減少させた．我々は，*qPro1*の単離を試み，*qPro1*がα-subをコードする*CG-2*および*CG-3*遺伝子そのものであり，peking型アレルは*CG-3*が欠失していることを明らかにした．

本研究では*qPro7*の単離を目的として*qPro7*近傍のSSR（Single sequence repeat）マーカーを設計するとともに，*qPro7*の精密マッピングを試みた．

材 料 と 方 法

植物材料およびたん白質含量の測定

PT-RILs96系統のうち，*qPro7*座乗領域がヘテロの遺伝子型である系統PT60の次代634個体を供試した．各個体から幼葉100 mgをサンプリングしてDNAをCTAB法[7]により抽出した後，SSRマーカーを用いたPCR法により遺伝子型を決定した．個体ごとに種子を収穫し，粉砕した種子粉100 mgにSDS-Urea溶液（2%SDS，6M尿素，10 mM 2-メルカプトエタノール，100 mM p-APMSF，1.2 μM Leupeptin，0.2 μM Pepstatin A）1 mLを加え，室温で１時間攪拌し，遠心分離（20,000×g，15分）を行った．得られた上清

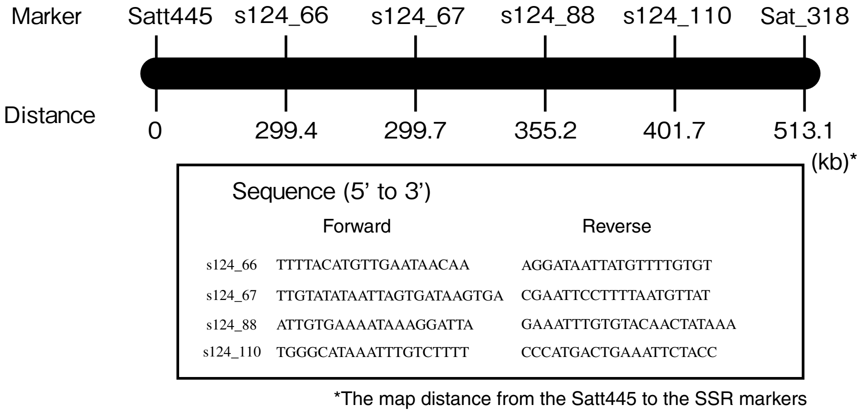

Fig. 1. Information of SSR markers designed in *qPro7* region

Table 1. The 7S/11S ratio of the progeny

SSR marker	Genotype[2]				7S/11S ratio	Estimated
	Satt445	s124_88	s124_110	Sat_318		genotype of
Map distance (kb)[1]	0	355.2	401.7	513.1		*qPro7*[3]
Peking-type	P	P	P	P	1.64 (20lines)	P
Tamahomare-type	T	T	T	T	1.29 (12lines)	T
Heterozygote	H	H	H	H	1.49 (16lines)	H
No. 31	T	P	P	P	1.65	P
No. 264	T	T	P	P	1.11	T

1) The map distance from the Satt445 to the SSR markers
2) P; Peking-type, T; Tamahomare-type, H; Hetero.
3) Estimated genotype from 7S/11S ratio

（粗抽出液）を回収し，BCA protein assay reagent kit（PIERCE社）を用いて総たん白質含量を定量した．また，SDS化した粗抽出液を供試してSDS-PAGEを行い，CBB（Coomassie Brilliant Blue）溶液でゲルを染色し，モレキュラーイメージャー FX（Bio-Rad社）により画像解析を行ってバンドの濃淡から各サブユニット含量を計算した．

PCR分析

Phytozome（http://www.phytozome.net）で公開されている大豆品種Williams82の塩基配列情報をもとに*qPro7*領域のSSRマーカーを設計した（Table 1）．プライマーの設計にはprimer3を用いた．

結果と考察

QTL解析より*qPro7*は連鎖群OのSSRマーカーSat_318とSatt445の間5.1cMの領域に存在する．そこで，Phytozomeからこの領域の塩基配列情報を取得し，SSRマーカーを設計した．その結果，４個のSSRマーカーが両親（Pekingおよびタマホマレ）間で多型を示した（Fig. 1）．これらのSSRマーカーを用いて分離集団634個体の遺伝子型を決定したところ，７個体がこの領域で組換えを起こしていた．

この領域がPeking型ホモ，タマホマレ型ホモおよびヘテロ型の個体について，SDS-PAGEを行って7Sおよび11Sグロブリン含量を測定し，7S/11S比を算出した．Peking型ホモ，タマホマレ型ホモおよびヘテロ型個体の7S/11S比はそれぞれ平均値が1.64，1.29および1.49であり，7Sグロブリン含量は*qPro7*領域がPeking型である場合に高く，タマホマレ型である場合に低くなった（Table 1）．また，この領域で組換えを起こしている個体の7S/11S比を算出したところ，Satt445とs124_88の間で組換えを起こしている個体（No. 31）およびs124_88とs124_110の間で組換えを起こしている個体（No. 264）でそれぞれ1.65および1.11であった．この２個体はs124_88を含む領域の遺伝子型が異なるだけで他の領域の遺伝子型は同じであることから，7S/11S比の違いはこの領域に存在する遺伝子によると判明した．つまり，7S/11S比を決定する遺伝子は，Satt445とs124-110に挟まれた約400 kbの領域に座乗することが明らかとなった．

Phytozomeの塩基配列情報を精査するとSatt445とs124_110の間には35個の転写領域が存在するが，この中にはたん白質合成に直接関わる遺伝子は存在しない．転写因子等の新規の遺伝子が種子貯蔵たん白質の合成および蓄積に関わっていることが示唆された．

要　　約

大豆種子の貯蔵たん白質は，7Sおよび11Sグロブリンが70%を占めており，これら２種類のグロブリンたん白質は相補的な関係にあることが知られている．われわれは，今までに，大豆品種Pekingとタマホマレとの組換え自殖系統集団96系統（以下，PT-RILs）を供試して，SDS-PAGEによる貯蔵たん白質含量に関するQTL解析を行い，7Sと11Sの構成比（以下，7S/11S比）に関わるQTLとして*qPro1*（連鎖群I）および*qPro7*（連鎖群O）を検出したこと，およびこれらQTLのpeking型アレルは7Sグロブリン含量を増大させ11Sグロブリン含量を減少させることを報告した．今年度は，昨年度の*qPro1*の単離に引き続き，*qPro7*の精密マッピングを試みた．*qPro7*領域（Satt445～Sat_318; 513.1 kb）の遺伝子型がヘテロ型であるPT-RIL由来集団634個体を栽培し，幼葉よりDNAを抽出するとともに，収穫した種子を粉砕してSDS-PAGEに供し，7Sおよび11Sグロブリンの含量を測定した．大豆品種Williams82の塩基配列情報（http://www.phytozome.net）をもとに*qPro7*領域のSSRマーカーを新たに作成し，各個体の遺伝子型を調査した．7S/11S比を計算したところ，*qPro7*領域がPeking型ホモの個体（20個体平均1.64）はタマホマレ型ホモの個体（12個体平均1.29）より高く，ヘテロ型の個体（16個体平均1.49）はその中間であった．Satt445とSat_318の間で組換えを起こしている個体の7S/11S比を調べたところ，SSRマーカーSatt445とs124_110との間がPeking型ホモである個体は7S/11S比が高く，タマホマレ型ホモである個体は低いことが明らかとなった．すなわち，*qPro7*領域をSSRマーカーSatt445とs124_110の間401.7 kbに狭めることができた．Phytozomeの情報によると，この領域には35個の遺伝子が存在しており，*qPro1*領域の場合とは異なり，7Sおよび11Sグロブリンの構造遺伝子は含まれていない．以上のことから，7Sおよび11Sグロブリンの合成を制御する因子がこの領域に存在することが判明した．

文　　献

1) Nielsen NC, Dickinson CD, Cho TJ, Thanh VH, Scallon BJ, Fischer RL, Sims TL, Drews GN and Goldberg RB (1989): Characterization of the Glycinin Gene Family in Soybean. *Plant Cell* **1**, 313-328.
2) Catsimpoolas N, Campbell TG and Meyer EW (1968): Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybean seeds. *Plant Physiol*, **43**, 799-805.
3) Catsimpoolas N and Ekenstam C (1969): Isolation of alpha, beta, and gamma conglycinins. *Arch Biochem Biophys*., **129**, 490-497.
4) Harada JJ, Barker SJ and Goldberg RB (1989): Soybean β-conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. *Plant Cell*, **1**, 415-425.
5) Doyle JJ, Schuler MA, Godette WD, Zenger V, Beachy RN and Slightom JL (1986): The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max and Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. *J Bio Chem.*, **261**, 9228-9238.
6) Yoshino M, Kanazawa A, Tsutsumi K, Nakamura I and Shimamoto Y (2001): Structure and characterization of the gene encoding α subunit of soybean β-conglycinin. *Genes Genet. Syst.*, **76**, 99-105.
7) Murray MG and Thompson WF (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4321-4326.