

根粒形成を誘引するダイズ根滲出イソフラボンの制御機構  
に関する遺伝学的解析

京都大学大学院 農学研究科

寺石 政義

マメ科植物においては共生関係を結んだ根粒菌から窒素が供給されるため、窒素源が少ない土壌でも生育することができる。ダイズの根から滲出するイソフラボンは根粒菌に根粒形成を促すシグナルとして知られており、ダイズが根粒菌との共生関係を築くうえで重要な代謝物である。根粒形成が活性化し植物が根粒菌との良い共生関係を構築することは、圃場への窒素投入量が減ることから、持続的な農業生産を可能とし、環境保全型農業システムの構築に寄与する。ダイズにおいては、イソフラボン生合成経路について詳細に解明されているとともに、種子中のイソフラボン含有量に関する QTL(量的形質遺伝子座)解析もいくつか報告されている<sup>1-4)</sup>が、根から滲出するイソフラボンに関する遺伝学的知見<sup>5)</sup>は乏しい。本研究では、組換え近交系を用いて根から滲出するイソフラボン量に関する QTL 解析を行った。本研究の進展は、ダイズと根粒菌との共生関係の改善に貢献し、根粒形成を促すための基礎研究となりうる。

## 実験方法

ダイズ品種 *peking* とタマホマレの組換え近交系 (F<sub>6</sub> 世代) 93 系統 (以下 PT-RIL 系統と略す) を親品種とともに種子を各 5 粒供試した。種子を 70%エタノールで表面殺菌した後、滅菌蒸留水で洗浄し、バーミキュライトの入ったプラグマスター PEC-32 角 (日新農工) に播種し、暗黒下 25°C で 1 週間栽培した。その後、発芽したダイズ個体を抜いて、畑土壌 2g を含む水耕液の入った試験管に移植し、日長 16 時間 25°C で 2 日間栽培した。さらに畑土壌を含まない水耕液の入った試験管に移植し、日長 16 時間 25°C で 2 日間栽培した。水耕液を回収し、5N 塩酸で pH3 に調節した後、InertSep Slim C18 カラム(ジーエルサイエンス社)を用いた固相抽出を行い、フラボノイド類を精製した。精製した水耕液は凍結乾燥機で乾固させた後、1%ギ酸を含むメタノール 2ml に再溶解して、HPLC 分析に供試した。HPLC 分析は、LC-10(島津製作所)に ODS カラム (YMC-Pack ODS-AM-303、YMC co.)を取り付け、0.1%酢酸を含む 15%アセトニトリルおよび 0.1%酢酸を含む 35%アセトニトリルを移動相として用意し、アセトニトリル濃度勾配 15-35%、50 分、流速 1ml/分を条件として、イソフラボンを波長 254nm で検出した。各ピーク面積から水耕液中に含まれる含量を求めた。水耕液の組成は 0.28 mM MgSO<sub>4</sub>、0.6 mM KNO<sub>3</sub>、0.084 mM KCl、0.13 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.24 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、2 μM Fe-EDTA、4.5 μM KI、28 μM MnCl<sub>2</sub>、19 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、2.3 μM ZnSO<sub>4</sub>、0.5 μM CuSO<sub>4</sub>、0.003 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> で、pH6.0 に調整した。

## QTL 解析

QTL cartographer version 2.5<sup>6)</sup>を使って QTL 解析を行った。LOD 値の閾値は 1000 回 permutation test の結果から 2.8 に設定し、LOD 値 2.8 を超過した領域を QTL 領域とみなした。

## 実験結果及び考察

根から滲出するイソフラボンの種類と量について調査した。根から滲出するイソフラボンとしてダイゼインとゲニステインが検出され、ダイゼインの滲出量がゲニステインに比べ多かった。

PT-RIL 集団を用いて QTL 解析を行ったところ、ダイゼイン、ゲニステインの滲出量およびダイゼインとゲニステインの滲出量比 (De/Ge 比) に関してそれぞれ 1 個の QTL を検出した(図 1、表 1)。ダイゼインとゲニステインの滲出量に関する QTL は 15 番染色体の同じ領域に検出された。ともにタマホマレ型ハプロタイプが滲出量を多くする効果があった。De/Ge 比に関する QTL は 6 番染色体に検出された。Peking 型ハプロタイプが De/Ge 比を大きくする効果があった。

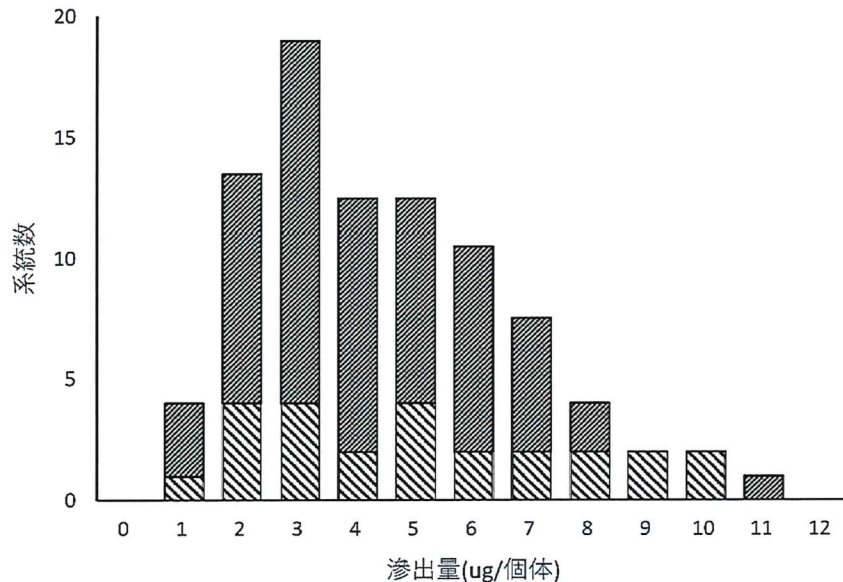
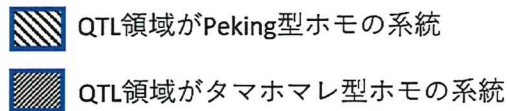


図 1 PT-RIL集団におけるダイゼイン滲出量



Ramongolalaina ら<sup>7)</sup>の行った研究では、根粒菌および土壌を含まない、水耕液のみの環境下で PT-RIL 集団を栽培し、根から滲出するイソフラボン量について QTL 解析を行った。ダイゼインに関して 8 番染色体および 10 番染色体に、ゲニステインに関して 6 番染色体、13 番染色体および 18 番染色体に QTL が検出された。

表 1. 根滲出イソフラボン含量に関するQTL

形質	染色体番号	ピーク(cM)	LOD値	相加効果*	寄与率(%)
De*滲出量(ug/個)	15	61.3	3.72	-0.89	14.14
Ge*滲出量(ug/個)	15	61.3	2.93	-0.05	10.92
De/Ge比	6	5.1	3.14	4.71	8.85

De:ダイゼイン

Ge:ゲニステイン

相加効果:「Peking」型アレルの相加効果を表す、滲出量において、マイナスの値は「タマホマレ」型アレルで滲出量が多くなることを示し、De/Ge比において、プラスの値は「Peking」型アレルで比が大きくなることを示す。

本研究と Ramongolalaina ら<sup>7)</sup>では、交配親が同じ集団を用いているが、根滲出イソフラボン量に関する QTL 領域が異なった。この原因として、実験手法の差が考えられる。つまり、Ramongolalaina ら<sup>7)</sup>では根粒菌との接触がない環境下で調べたのに対し、本研究では根粒菌を含んだ環境下で調べており、その差が根滲出イソフラボン量に影響したことが示唆された。根粒が放出する代謝物に誘発されてダイズイソフラボンの根滲出メカニズムが変化するかもしれない。

根粒菌の有無が根滲出イソフラボン量に与える影響を調べるために、Peking およびタマホマレを供試して調査した(図 2)。エタノールで表面殺菌した Peking およびタマホマレの種子を暗黒下 25°C で 1 週間栽培した後、土壌を含む(根粒菌との接触あり)もしくは含まない(根粒菌との接触無し)水耕液で 2 日間栽培し、更に土壌を含まない水耕液で 2 日間栽培し、水耕液からイソフラボンを C18 カラムで精製した。根から滲出するイソフラボンは、ダイゼインとゲニステインのみであり、Peking のダイゼイン滲出量については、接触がある方が高くなったが、他の 3 形質については、接触のないほうが高くなった。ただし、これらの形質値について有意差は認められなかった。De/Ge 比で検出された QTL は Peking 型で De/Ge 比が高くなっていたことから、この QTL が根粒菌との接触によって活性化し、ダイゼイン滲出量が増えることが示唆された。

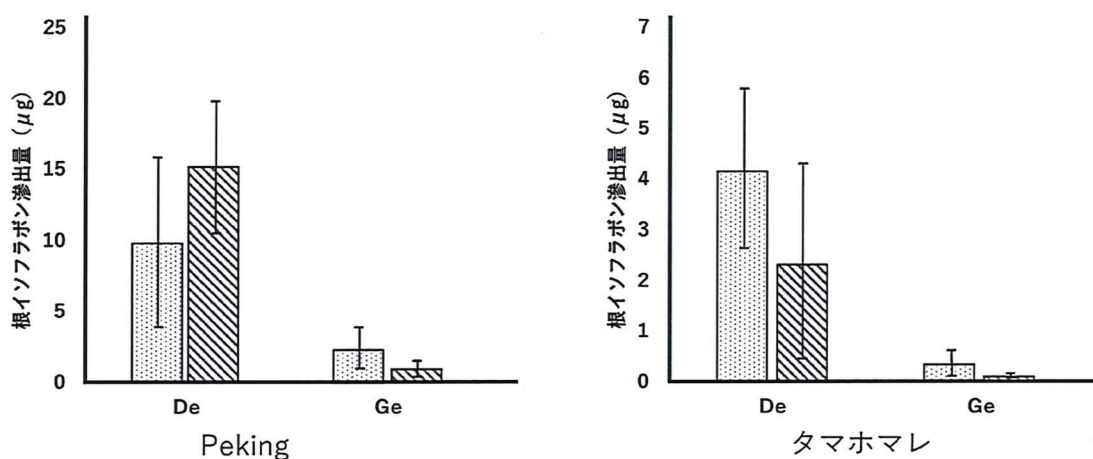


図2. 根粒菌との接触の有無による根イソフラボン分泌量の差違

De:ダイゼイン Ge:ゲニステイン

■ 根粒菌との接触なし ■ 根粒菌との接触あり

Yoshikawa ら<sup>4)</sup>によって PT-RIL の種子に蓄積されるイソフラボン量に関する QTL が報告されているが、本研究で検出された QTL は、Yoshikawa らの報告する QTL 領域とは異なる。根分泌のイソフラボン制御に関わる遺伝因子は、種子蓄積イソフラボンとは異なる制御メカニズムであることが示唆された。

## 要約

ダイズ根から分泌するイソフラボンは根粒菌との共生シグナル物質として知られている。根粒形成が活性化し、植物が根粒菌との良い共生関係を構築することは持続的な農業生産を可能とし、環境保全型農業システムの構築に寄与する。本研究では、根から分泌するイソフラボン量に関する QTL 解析を行った。

ダイズ品種 peking とタマホマレとの組換え近交系 (PT-RIL) を供試し、畑土壌を含む水耕液で栽培した。水耕液から固相抽出によってイソフラボンを精製し、HPLC 解析を行った。イソフラボン量について QTL 解析したところ、ダイゼインとゲニステインの根分泌量に関する QTL は 15 番染色体の同じ領域に検出されたことから、同一の遺伝子がダイゼインとゲニステインの根分泌量を制御していることが示唆された。ダイゼインとゲニステインの分泌量比 (De/Ge 比) に関する QTL は 6 番染色体に検出された。

根粒菌との接触の有無が根分泌イソフラボン量に及ぼす影響を調べるために、水耕液に土壌を含む条件下および含まない条件下でのイソフラボン量を比較した。有意差が認められなかったが、Peking のダイゼイン分泌量については土壌を含む水耕液で栽培した方が

高くなったが、Peking のゲニステイン滲出量ならびにタマホマレのダイゼイン滲出量およびゲニステイン滲出量については土壌を含まない水耕液で栽培した方が高くなった。Peking のダイゼイン滲出量に関わる遺伝因子のみが根粒菌との接触によって活性化されることが示唆された。

## 謝辞

本研究に多大なご支援をいただきましたタカノ農芸化学研究助成財団ならびに関係者の方々に心より深謝いたします。また、実験を行うにあたり、協力を頂きました京都大学大学院農学研究科吉川貴徳先生、実験を精力的に手伝っていただきました研究室の学生に感謝いたします。

## 文献

- (1) Yoshikawa T, Okumoto Y, Ogata D, Sayama T, Teraishi M, Terai M, Toda T, Yamada K, Yagasaki K, Yamada N, Tsukiyama T, Yamada T, Tanisaka T (2010) Transgressive segregation of isoflavone contents under the control of four QTLs in a cross between distantly related soybean varieties *Breeding Sci.* 60:243-254.
- (2) Zhang HJ, Li JW, Liu YJ, Jiang WZ, Du XL, Li L, Li XW, Su LT, Wang QY, Wang Y (2014) Quantitative trait loci analysis of individual and total isoflavone contents in soybean seeds. *J Genet.* 93:331-338.
- (3) Cai Z, Cheng Y, Ma Z, Liu X, Ma Q, Xia Q, Zhang G, Mu Y, Nian H (2018) Fine-mapping of QTLs for individual and total isoflavone content in soybean (*Glycine max L.*) using a high-density genetic map. *Theor Appl Genet.* 131:555-568.
- (4) Wu D, Li D, Zhao X, Zhan Y, Teng W, Qiu L, Zheng H, Li W, Han Y (2020) Identification of a candidate gene associated with isoflavone content in soybean seeds using genome-wide association and linkage mapping. *Plant J.* 104:950-963.
- (5) Sugiyama A, Yamazaki Y, Hamamoto S, Takase H, Yazaki K (2017) Synthesis and Secretion of Isoflavones by Field-Grown Soybean. *Plant Cell Physiol.* 58:1594-1600.
- (6) Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2012) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)
- (7) Ramongolalaina C, Teraishi M, Okumoto Y (2018) QTLs underlying the genetic

interrelationship between efficient compatibility of Bradyrhizobium strains with soybean and genistein secretion by soybean roots. *PLoS One* 13:e0194671.