



アズキにおける分子マーカーを利用した遺伝子的変異の解析

伊勢村, 武久

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-07-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2526

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002526>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【366】

氏名・(本籍) 伊勢村 武久 (京都府)

博士の専攻分野の名称 博士 (農学)

学位記番号 博い第55号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

アズキにおける分子マーカーを利用した遺伝的変異の解析

審査委員

主査 教授 上島 脩志

教授 津川 兵衛 教授 清水 晃

教授 中村 千春

我が国において、アズキ (*Vigna angularis*) は和菓子用の餡や赤飯などの材料として利用される重要な作物である。北海道立十勝農業試験場や農林水産省農業生物資源研究所などでは、数多くの在来アズキやその近縁種を遺伝資源として保存しており、これらの中には、改良された栽培アズキには無い有用遺伝子を持つものが存在すると考えられる。特に、アズキ近縁種のタケアズキ (*V. umbellata*) およびヒメツルアズキ (*V. nakashimae*) には、アズキゾウムシ抵抗性や茎疫病抵抗性などの有用遺伝子を有していることが知られている。しかし、これらをアズキ育種に有効利用するための遺伝・育種学的研究は少ない。そこで本研究では、まず、日本、韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールの在来アズキ系統を用いて、種子貯蔵タンパク質の SDS-PAGE 分析、農業形質の調査および RAPD 分析により、それらの遺伝的変異を解析した。ついで、栽培アズキとタケアズキおよびヒメツルアズキとの種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団を用いて、有用遺伝子についての QTL 解析などを行う基礎となる高密度な連鎖地図を、RAPD マーカーにより作成した。

第 1 章では、この研究を行うに至った経緯ならびに研究の目的を記述した。

第 2 章では、上記の地域から収集された在来アズキ 434 系統を用いて、SDS-PAGE により種子貯蔵タンパク質の電気泳動像変異を解析した。その結果、7 本の多型バンドの組み合わせにより、434 系統を 15 種類のタンパク質タイプ (タイプ I ~ XV) に分類できること、収集地域間でこれらのタンパク質タイプの分布と遺伝的変異性は著しく異なることが明らかとなった。すなわち、ブータンおよびネパールでは、ほとんどの系統がこの地域に特異的なタイプ I および II であり、少数の系統のみがタイプ III を示した。また、ブータンおよびネパールの系統では、Shannon-Weaver の指標により推定した遺伝的変異性は、それぞれ 0.502 および 0.636 であった。韓国には、4 タイプ (III, IV, V および VII) が存在したが、これらのうち、タイプ III と IV が主要タイプであり、遺伝的変異性は 0.854 であった。中国および台湾のすべての系統は、それぞれタイプ III および IV を示した。日本の 311 系統を 7 地域 (北海道、本州北部、本州東部、本州中部、本州西部、四国および九州) に大別して解析したところ、北海道ではタイプ III と IV が同数認められたが、他の 6 地域では、タイプ IV が多数を占めていた。また、本州東部以西では、少数ながらタイプ V, VI, VIII-XV の系統が存在した。特に、タイプ VI, VIII-XV の 9 種は日本に特異的なもので、これらは本州中部、西部、四国または九州に分布し、その多く

は日本海沿岸の地区に分布していた。遺伝的変異性は、南西日本地域の系統が北東および中部日本地域のものよりも大きく、特に、本州西部では 11 種類のタンパク質タイプが観察され、その遺伝的変異性 (1.286) はいずれの地域より高かった。

第 3 章では、189 系統の在来品種を用いて、5 つの農業形質 (開花まで日数、主茎長、分枝数、主茎節数および 20 粒重) を調査し、クラスターおよび主成分分析によりそれらの遺伝的変異を解析した。なお、集収地域は、北海道 (供試系統数 5)、本州北東部 (31)、中部 (26)、西部 (38)、四国-九州 (37)、韓国-中国-台湾 (32) およびブータン-ネパール (20) の 7 つに大別した。その結果、本州西部、四国-九州および韓国-中国-台湾地域の系統は、他の 4 地域のものよりもやや大きな変異性が認められた。また、ブータン-ネパール地域のものは他の地域のものとは著しく異なった特徴をもっていた。日本の系統では、20 粒重を除く他の 4 形質において地理的な形質傾斜が認められた。すなわち、北東日本には、草丈が低く、直立した少数の分枝を持つ早生の系統が多くみられたのに対し、南西日本には、草丈が高く、多数の分枝を生ずる晩生の系統が多かった。

第 4 章では、203 の在来系統を用いて、RAPD 分析法により DNA レベルでの遺伝的変異を解析した。48 プライマーを用いて分析した結果、全部で 413 本の明瞭なバンドが検出され、それらのうち 97 本のバンドで多型が認められた。これらの多型バンドを対象にして、Simple matching coefficient 法により非類似度を算出したところ、日本、韓国-中国-台湾およびブータン-ネパールの各地域内の系統平均値は、それぞれ 0.203, 0.193 および 0.162 であり、全系統平均値は 0.291 であった。地域間で非類似度を求めたところ、特に、ブータン-ネパール地域の系統群と日本および韓国-中国-台湾地域の系統群との間の非類似度は、それぞれ 0.615 および 0.598 と極めて大きな値を示した。また、日本と韓国-中国-台湾の系統間でも 0.226 とやや大きな非類似度が認められた。クラスター分析および主成分分析により、供試した系統は、ほぼ収集地域に対応したグループに分類することができた。また、検出された 97 の RAPD マーカーにおけるバンドの有無の組み合わせにより、供試した系統のほとんどを識別することができた。以上の結果から、アズキにおいても RAPD 分析が品種・系統の分類や識別に有効であることが明らかとなった。また、本研究に供試した 2 在来系統には、DNA レベルでも大きな遺伝的変異があることから、種

(氏名：伊勢村 武久 No. 3)

内交雑による雑種集団で DNA マーカーによる連鎖地図を作成することが可能であることが示唆された。

第 5 章では、タケアズキ×アズキおよびアズキ×ヒメツルアズキの種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団（それぞれを UA および AN 集団という）を用いて、RAPD マーカーにより高密度な連鎖地図を作成した。UA および AN 集団では、それぞれ 451 本および 432 本の RAPD バンドが検出された。これらのうち、UA および AN 集団では、それぞれ 228 本（50.6%）および 259 本（60.0%）のバンドにおいて、その分離に歪みが認められたが、連鎖解析を行った結果、両集団ともアズキの基本染色体数と同じ 11 の連鎖群からなる地図を作成することができた。UA 集団で作成された地図は、314 個のマーカーから成り、全長は 1702.0 cM（マーカー間の平均距離 5.62 cM）であった。また、AN 集団で作成されたそれは、298 個のマーカーから成り、全長は 1619.0 cM（同 5.64 cM）であった。両集団で認められた 71 本のアズキ型のバンドを共通マーカーとして両地図を比較したところ、UA 集団の第 1～第 11 連鎖群は、それぞれ AN 集団の第 4, 1, 7, 5, 3, 9, 2, 8, 10, 6 および第 11 連鎖群に対応していることが分かった。

UA および AN 集団のそれぞれについて、本研究で作成した連鎖地図と Kaga et al. (1996, 2000) が F₂ または F₃ 世代において作成したそれとの対応関係を比較したところ、以下のことが明らかとなった。すなわち、UA 集団では、63 個の共通マーカーの分布状況から、本研究で得られた 9 本の連鎖群が、それぞれ F₃ 世代の 9 本の連鎖群と完全に対応した。一方、本研究の第 1 および第 2 連鎖群は、それぞれ、F₃ 世代の第 1 と第 14 連鎖群および第 3 と第 8 連鎖群が結合したものであった。AN 集団では、75 個の共通マーカーの分布状況から、本研究で得られた 6 本の連鎖群は、それぞれ F₂ 世代の 6 本の連鎖群と完全に対応していた。しかし、本研究による第 1, 4 および第 7 連鎖群は、それぞれ、F₂ 世代の第 3 と第 12 連鎖群、第 4 と第 14 連鎖群および第 2 と第 13 連鎖群が結合したものであり、さらに、F₂ 世代の分析では 1 つの連鎖群とされていた第 5 連鎖群は、本研究の第 6 および第 11 連鎖群に分割されることが分かった。

このように、交雑組合せや分析した世代の異なる材料で得られた地図における連鎖群の対応関係を明らかにすることができ、それらに座乗する共通マーカーの配列順序も概ね一致していたことから、本研究で作成した連鎖地図は信頼性の高いものであり、タケアズキおよびヒメツルアズキが持つ有用遺伝子のマッピングや QTL 解析に十分利用できると考えられた。

(氏名：伊勢村 武久 No. 4)

第 6 章では、以上の結果を要約するとともに、本研究に供試した材料のアズキ育種素材としての重要性を記した。

氏名	伊勢村 武久		
論文題目	アズキにおける分子マーカーを利用した遺伝的変異の解析		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	上島 脩志
	副査	教授	津川 兵衛
	副査	教授	清水 晃
	副査	教授	中村 千春

印

要 旨

アズキ (*Vigna angularis*) の品種は、収量性や耐病虫性などの劣るものが多いため、その生産は一般に不安定である。これを改良するには、世界各国に存在している多数の在来アズキやアズキ近縁種がもつ有用遺伝子を育種的に利用することが有効な手段の一つであると考えられる。しかし、それらに関する遺伝・育種学的研究は少なく、有効利用するための情報が充分にあるとはいえない。そこで本研究では、まず、日本、韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールから収集された多数の在来アズキ系統を用いて、種子貯蔵タンパク質の SDS-PAGE 分析、農業形質の調査および RAPD 分析により、それらの遺伝的変異を解析し、次いで、栽培アズキとその近縁種であるタケアズキ (*V. umbellata*) およびヒメツルアズキ (*V. nakashimae*) との種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団を用いて、農業形質に関する QTL 解析などを行う基礎となる高密度な連鎖地図を、RAPD マーカーにより作成したものである。

第 1 章では、この研究を行うに至った経緯ならびに研究の目的を記述している。

第 2 章では、在来アズキ 434 系統を用いて、SDS-PAGE により種子貯蔵タンパク質の電気泳動像変異を解析した。その結果、7 本の多型バンドの組み合わせにより、434 系統が 15 種類のタンパク質タイプ (タイプ I ~ XV) に分類できること、収集地域間でこれらのタンパク質タイプの分布と遺伝的変異性は以下のように著しく異なることを明らかにしている。すなわち、ブータンおよびネパールでは、ほとんどの系統がこの地域に特異的なタイプ I および II であり、Shannon-Weaver の指標により推定した遺伝的変異性は、それぞれ 0.502 および 0.636 である。韓国には、4 種のタイプ (III, IV, V および VII) が存在するが、これらのうち、タイプ III と IV が主要タイプであり、遺伝的変異性は 0.854 である。日本の 311 系統を 7 地域 (北海道、本州北部、本州東部、本州中部、本州西部、四国および九州) に大別して解析すると、北海道ではタイプ III と IV が同数認められるが、他の 6 地域では、タイプ IV が多数を占めており、さらに、本州中部、西部、四国または九州には、日本に特異的な 9 種のタイプ (VI, VIII - XV) が存在し、特に、本州西部の系統における遺伝的変異性 (1.286) は他のいずれの地域より高い。

第 3 章では、189 系統の在来品種を用いて、5 つの農業形質 (開花まで日数、主茎長、分枝数、主茎節数および 20 粒重) を調査し、クラスターおよび主成分分析によりそれらの遺伝的変異を解析している。その結果、日本西南部や韓国の系統は、他の地域のものよりもやや大きな変異性を示すこと、ブータン-ネパール地域のもは変異性が小さく、しかも他の地域のものとは著しく異なった特徴をもっていることを明らかにしている。さらに、日本の系統についてみると、北東日本には、草丈が低く直立した少数の分枝を持つ早生の系統が多いのに対し、南西日本には、草丈が高く多数の分枝を生ずる晩生の系統が多いという、地理的な形質傾斜のあることを認めている。

第 4 章では、203 の在来系統を材料とし、RAPD 分析法により DNA レベルでの遺伝的変異を解析している。48 プライマーを用いて、97 本の多型バンドを検出し、これらの多型バンドを対象として、Simple matching coefficient 法により非類似度を求め、日本および韓国-中国-台湾の各地域内の系統平均値は約 0.20 であるのに対し、ブータン-ネパールの地域内系統平均値は、約 0.16 と小さいこと、地域間でみると、ブータン-ネパール地域の系統群は日本および韓国-中国-台湾地域の系統群との間にそれぞれ 0.615 および 0.598 と極めて大きな非類似度を示すことを認めた。さらに、クラスター分析および主成分分析により、検出された RAPD マーカーにおけるバンドの有無の組み合わせにより、

氏名 伊勢村 武久

供試系統のほとんどを識別できること、供試系統は、収集地域に対応したグループにほぼ分類できることを明らかにし、アズキにおいても RAPD 分析法が品種・系統の分類や識別に有効であることを考察している。

第 5 章では、タケアズキ×アズキおよびアズキ×ヒメツルアズキの種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団 (それぞれを UA および AN 集団という) を用いて、RAPD マーカーによりアズキの連鎖地図の作成を行った。その結果、UA 集団からは、314 個のマーカーから成る全長 1717.6 cM (マーカー間の平均距離 5.67 cM) の、また、AN 集団からは、298 個のマーカーから成る全長 1619.0 cM (同 5.64 cM) の、いずれもアズキの基本染色体数と同じ 11 の連鎖群からなる高密度な連鎖地図の作成に成功している。また、UA および AN 集団で作成された 2 つの地図における連鎖群の対応関係、および両集団のそれぞれについて、本研究で作成した連鎖地図と Kaga *et al.* (1996, 2000) が F₂ または F₃ 世代において以前作成したそれとの対応関係を明らかにし、本研究で作成した連鎖地図が信頼性の高いものであることを示唆している。

第 6 章では、以上の結果を要約するとともに、本研究に供試した材料のアズキ育種素材としての重要性を記している。

以上のように本研究は、世界各国のアズキ在来種について様々な手法を用いてその遺伝的変異の解析を行うとともに、アズキとその近縁種であるタケアズキおよびヒメツルアズキとの種間交雑による組換え近交系を用いた精密な連鎖地図作成に関する研究を行ったものであり、アズキの在来種や近縁種の育種利用、あるいは、これらもつ有用遺伝子のマッピングおよび QTL 解析の基礎となる重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者の伊勢村武久は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。