

全ゲノム配列多型を用いた極大粒在来大豆の分子系統解析

丹羽康夫*、佐藤光彦**、池ヶ谷篤*、磯部祥子**

(*静岡県立農林環境専門職大学、**かずさDNA研究所)

Molecular phylogenetic analysis of extra-large heirloom soybeans using whole-genome sequence polymorphisms

NIWA Yasuo*, SATO Mitsuhiro P**, IKEGAYA Atsushi*, ISOBE Sachiko**

(*Faculty of Agricultural Production and Management, ** Kazusa DNA Research Institute)

<要約>

静岡市清水区の中山間地域である両河内地区の一軒の農家で大切に受け継がれてきた在来大豆は、大粒で旨味が際立つため、通常の大豆より高値で取引されていた。「ここ豆くん」と名付けられた大豆は、国内で最大級の黄大豆であることが明らかになった。一方、峠を越えた先に位置する山梨県身延町の大粒の大豆は、その地域でしか生育できない希少性の高い幻の大豆として「あけぼの大豆」と名付けられブランド化されている。両者の特徴が極めてよく似ていたことから、全塩基配列レベルでの比較を行った。その結果、両者は塩基配列レベルで極めて高い一致率を示すが、識別は可能であることが、さらに全ゲノム配列による198大豆系統との比較から、高知県の在来大豆と最も近縁であること、さらに、これまでの知見からは、全ゲノム配列による系統関係と粒の大きさには関連が認められないことが明らかとなった。

<キーワード>

極大粒大豆、全ゲノム塩基配列解析、分子系統樹、在来作物、ダイズコアコレクション

I. はじめに

中部横断自動車道直下に位置する清水区の両河内地区は、昼夜の寒暖差が大きな中山間地域で霧がたちこめることも多く、美味しいお茶や筍、在来蕎麦を産する。かつては“塩の道”と呼ばれた駿河・伊豆の海と信濃・甲斐とを結ぶ街道により『人・モノ・情報』の活発な交流を担っていた。その一方で、2021年度には地区の三小学校が147年にわたる歴史に幕を下ろすなど、少子高齢化が頭著で農業の担い手不足も深刻である。両河内地区の一軒の農家で大切に受け継がれてきた在来大豆(図1 右、*Glycine max*)は、大粒で味わいが上品なため、通常の大豆(同左)より高値で取引されており、「ここ豆くん」と名付けられ商標登録された。大粒の大豆として、山梨県身延町の曙地区で栽培されてきた在来大豆は、「あけぼの



図1. ダイズの大きさ比較

フクユタカ(左)、ここ豆くん(右)各50粒

豆」という名称で、その地域でしか生育できない希少性の高い幻の大豆として、いち早くブランド化され、新商品の開発やインターネットを駆使した販売にも積極的に取り組んでおり、2022年3月には、農林水産物や食品を地域ブランドとして保護する国の地理的表示(GI)保護制度に登録された。清水区両河内のここ豆くんと身延町曙地区

のあけぼの大豆について、DNAレベルでの比較を行うことで両者の差異を明らかにすると共に、国内外の大豆との系統関係を明らかにすることを目的として解析を行った。

II. 材料と方法

1. ダイズ

清水区両河内地区の在来大豆「ここ豆くん」は農事組合法人「みらい」により2022年に栽培された大豆を使用。「あけぼの大豆」は2021年産の大豆を身延町役場産業課より分与された。

2. ここ豆くんの成分分析

在来大豆ここ豆くんの水分量、百粒重、ショ糖およびアミノ酸含量の測定を行った。水分量の測定は乾燥減量法で行い、粉碎した試料を105°Cで2時間加熱して乾燥後の減量を量り、その量を水分として算出した。百粒重は100粒の重量を測定し、試料の水分量が15%になるように換算して求めた。ショ糖は粉碎した試料から超音波を用いて水で抽出した後、メンブレンフィルターにてろ過し、高速液体クロマトグラフィーで定量した。アミノ酸は、アミノ酸自動分析計を用いたニンヒドリン試液によるポストカラム誘導体化法で定量した。ショ糖およびアミノ酸の分析は(一財)日本食品分析センターに委託した。

3. ゲノム解析用ライブラリーの作製

吸水後、ろ紙上で25°C、7日間の培養により発芽させた大豆各6個体をまとめてゲノム解析用の試料とした。

VD-250R Freeze Dryer (TAITEC)を用いて凍結乾燥後、マルチビーズショッカー(安井器械)で1,500 rpm、2分間粉碎した。試料にLysis Solution F(ニッポンジーン)を添加し、65°Cで10分間静置後、12,000 x g、2分間遠心した。上清を分取後にPurification Solution(ニッポンジーン)とクロロホルムを添加し攪拌後、12,000 x gで15分間遠心上清を分取した。MPure-12 システムとMPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio)を用い、分取した溶液からDNAを精製後、10% PVPP 溶液を添加した。

ライブラリーは、MGIEasy FS DNA Library Prep Setを用いてマニュアルに従い作製した。酵素切断の反応時間は8分間。アダプターは、MGIEasy DNA

Adapters-96 (Plate) Kit を使用した。

Qubit 3.0 Fluorometer と dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、ライブラリー溶液の濃度を測定後、Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Agilent Technologies) を用い、ライブラリーの品質を確認した。環状化DNAは、MGIEasy Circularization Kit (MGI Tech Co., Ltd.)を用いて作成した。

4. シーケンシング解析

シーケンシングは、DNBSEQ-G400 (MGI Tech Co., Ltd.)を用いて High-throughput Sequencing Kit により 2 x 200 bp の条件で行った。cutadapt (ver.4.0) でアダプター配列を除いた後、sickle (ver.1.33) を用いて、クオリティスコアが20未満の塩基と100塩基に満たないペアリードを除去した。マッピングは、BWA (ver. 0.7.13-r1126) を用いて、フィルタリングされたリードを Gmax_275_v2.0 softmasked sequences (<https://data.jgi.doe.gov/refine-download/phytozome?organism=Gmax&expanded=275>) を参照配列として行った。bam形式への変換や重複リードの除去は、picard (ver. 2.0.1)を用いた。バリエント (SNPs/INDELS) の検出は、GATK (ver. 3.6-0-g89b7209) を用いて行った。また、検出されたバリエントのアノテーションは snpEff を用いて行った。さらに、検出されたバリエントと農業・食品産業技術総合研究機構において整備された国内外のダイズ198品種のコアコレクションで検出されたバリエント (Kanegac *et al.* (2021)) は vcftools を用いて統合した。RAxML を用いて最尤法により系統樹探索を実施して、FigTree を用いて系統樹を描画した。

III. 結果および考察

1. ここ豆くんの成分分析および大きさの検討

甘味や旨味が強いとされるここ豆くんについて、各種成分分析を行った。ここ豆くんのショ糖含量については、100gあたり10.5gという値が得られた。図2には、平ら(1989)による栽培大豆105品種のデータから得られた、平均値に加えて、最大値、最小値と、あけぼの大豆については、公式ウェブサイト上の値を示した。その結果、ここ豆くんのショ糖含量は、文献平均値6.4gの1.6倍であり、あけぼの大豆の7.3g、文献最大値の9.64gをも上回り、

データとして確認できる大豆の中で唯一 10g/100g を超えて最大値を示すことが明らかとなった。

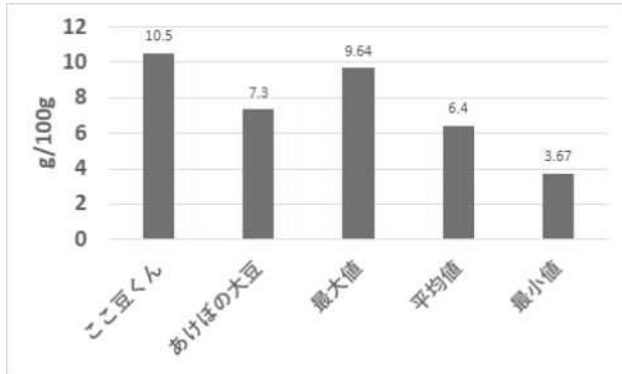


図2. ショ糖含有量の比較

平らのデータについては、論文中の平均値に加えて、最大値、最小値を、ココ豆くんとあけぼの大豆のデータとあわせ、100gあたりの含量として示す

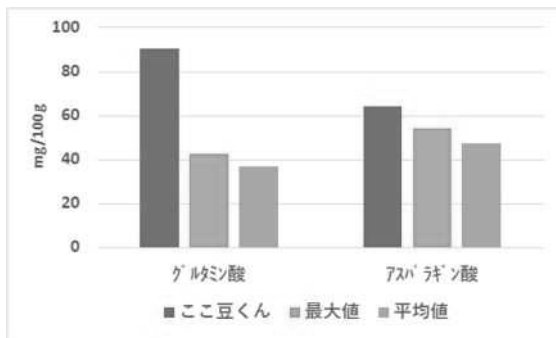


図3. グルタミン酸、アスパラギン酸含有量
水野らのデータについては、論文中の平均値と最大値を、ココ豆くんのデータとあわせ、100gあたりの含量として示す

アミノ酸含量の測定結果は、水野ら (2002) のデータと比較した。その中から、味覚に対する寄与が特に大きい旨味成分であるグルタミン酸およびアスパラギン酸の結果を図3に示す。今回の解析により、ココ豆くんのグルタミン酸含量は際立って高く、文献最大値と比較して2倍以上であることが分かった。また、運動の持久力に正の影響を及ぼすとされる3つの分岐鎖アミノ酸(BCAA:バリン、ロイシン、イソロイシン)の含有量も高い一方で、メチオニン、グリシン、チロシンは少ないことが明らかとなった (図4)。

ココ豆くんの大きさを表す指標として、百粒重を測定したところ、69.6gという値が得られた。農業生物資源ジーンバンクの遺伝資源データベース内のダイズ8579件の百粒重は、最小値: 0.5g / 最大値: 75.9g / 平均値: 22g / 中間値: 22.0gとあり、百粒重が69.6g以上の条件で検索したところ11件が該当し、育成品種の中系81号以外、他の10件はすべて黒豆と呼ばれる黒大豆であった。中系81号は、種皮色が黄色で2010年に茨城県では百粒重が70.0gという記録があるが、北海道での2000年の百粒重は41.6gと記載されている。

「タマフクラ」は晩生の良質極大粒品種の育成を目的として、北海道立中央農業試験場において、1993年に極大粒の良質黒大豆「新丹波黒」(京都府育成)を母、白目極大粒品種「ソルムスメ」(中央農試育成)を父として人工交配を行い、粒大による選抜と各種試験を重ね、2007年に北海道の優良品種に認定されたものである。タマフクラの百粒重の最高値は67.8gであった(鴻坂ら, 2021)。これらの結果から、ココ豆くんは黄大豆としては最大級であることが明らかとなった。

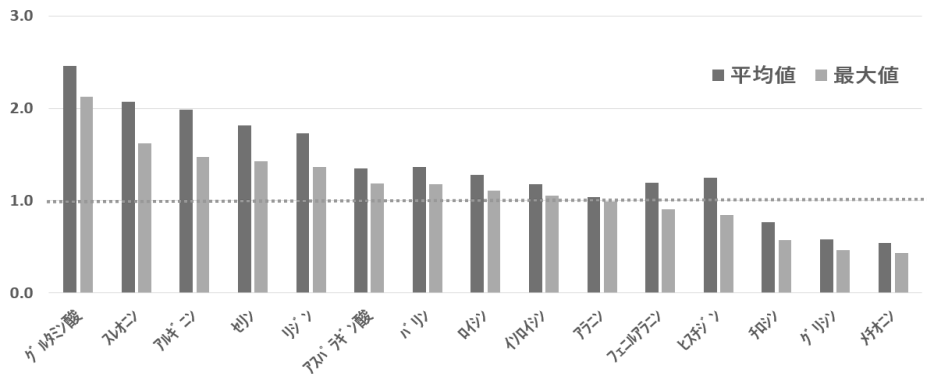


図4. アミノ酸含有量の比較

水野らのデータの平均値と最大値をココ豆くんの値との比率で示す。破線は相対値 = 1

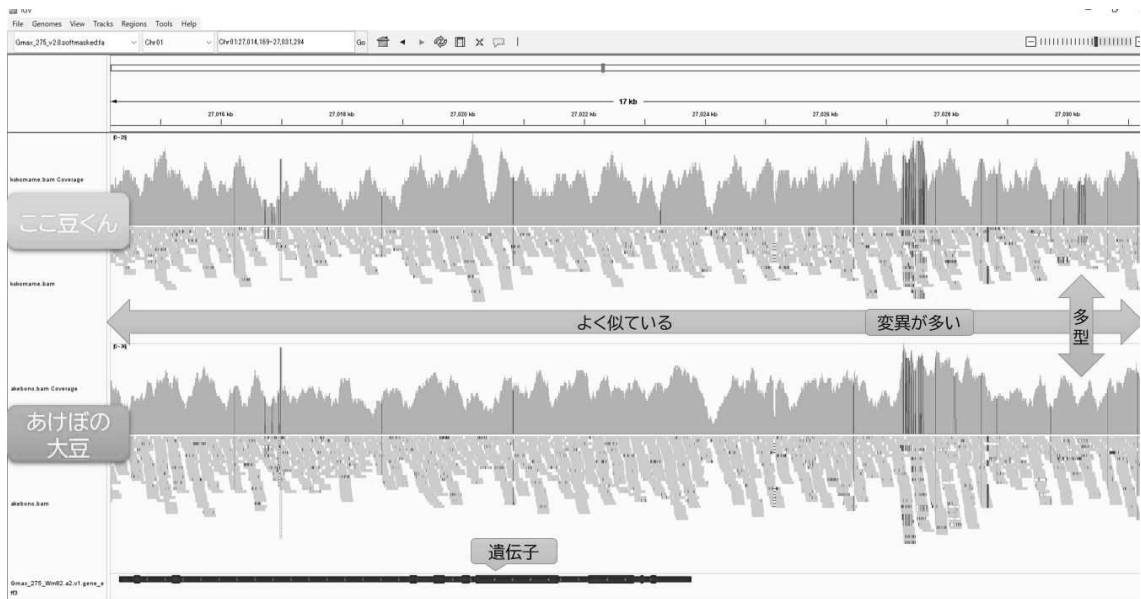


図5. ダイズ第1染色体27 Mbp 近辺での解析結果

上から、ここ豆くん、あけぼの大豆で参照配列と異なる塩基の位置が傍線として示されている。一番下段に遺伝子の構造と位置を示す

2. ここ豆くんとあけぼの大豆の遺伝子解析

ここ豆くんとあけぼの大豆の系統関係を明らかにするために、次世代シーケンサーによる両者の遺伝子解析を実施した。各々からゲノムDNAを調整した後、ライブラリーを作製しDNBSEQ-G400を用い、2x200bpの条件でシーケンシング解析を行った。その結果、遺伝子領域別の両者の変異の頻度のパターンがほぼ一致していること、さらには両者でコドンやアミノ酸の変異パターンが類似していた。図5に、ダイズ第1染色体27Mbp近辺での1塩基ごとの解析結果を示す。最下段に示した遺伝子との位置関係から、遺伝子領域内ではそれほど変異が認められないが、遺伝子から外れた領域では多くの変異が認められた。しかしながら変異の様式は両者で酷似していた。一方、遺伝子領域外の特定の箇所において、両者で多型を示す領域が存在することも確認できた。ここ豆くんとあけぼの大豆の間では、74,507個のSNPsが検出され、塩基レベルでは識別可能であることが示唆された。

次に、ここ豆くんとあけぼの大豆の近縁関係および、これらの系統に近縁な大豆を明らかにするために、今回得られたバリエーションとダイズコアコレクションのリシーケンスから検出されたバリエーションの共通サイトを検出した。全200系統におい

て共通に検出されたバリエーション数は1,128,056であり、これらを用いて、系統樹を作成した。図6に示すように、ここ豆くん・あけぼの大豆は、日本産ダイズのコアコレクション内の矢印で示した同じ場所に配置されることが明らかとなり、両者は非常に近縁であることがわかった。

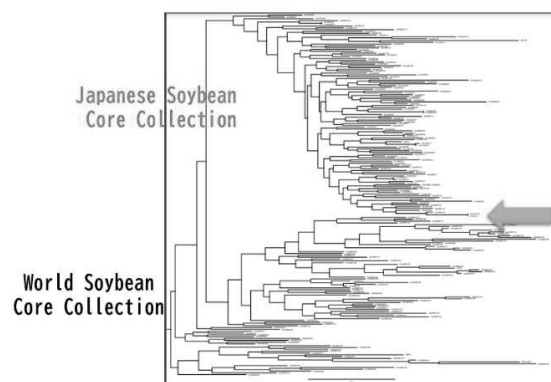


図6. ダイズ198品種による系統樹との統合結果 Kanegaeらのデータに、ここ豆くん、あけぼの大豆のデータを統合し得られた系統樹。矢印は、ここ豆くん、あけぼの大豆の位置を示す

さらにこれら2系統は、日本産大豆のコアコレクション番号のGmJMC133(高知)と最も近縁であるということが明らかとなった。続いて

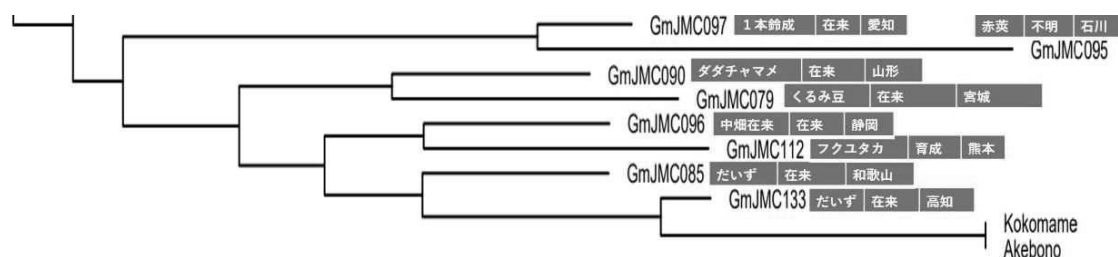


図7. 系統樹上近縁とされた品種のクローズアップ
 ダイズコアコレクション番号および、品種名、在来/育成の別、由来地を示す

GmJMC085 (和歌山)、次に GmJMC096 (静岡)、GmJMC112 (熊本) と近縁であるという結果が得られた (図7)。近縁ダイズの中で、高知、和歌山、静岡由来のダイズは在来種であったが、熊本の GmJMC112 はフクユタカという育成品種 (大庭ら、1982) であった。

ここ豆くん、あけぼの大豆ともその際立った大きさが特徴の一つとなっているが、今回の全ゲノム配列の系統関係で近縁となった4種のダイズのデータベース上の百粒重の最大値は、GmJMC133 (高知、39.3 g)、GmJMC085 (和歌山、42.2 g)、GmJMC096 (静岡、26.1 g)、GmJMC112 (熊本、33.5 g) のいずれも粒の大きさは中程度であったことから、全ゲノム配列による系統関係と粒の大きさには関連が認められないと解釈できる。しかしながら、ここ豆くんもあけぼの大豆も、昼夜の寒暖差が大きいような地域以外での栽培では、きわめて大粒で旨味が強い性質が現れないことが経験的に知られている。さらに大豆の生育には根粒菌との相互作用の影響が非常に大きいことから、今回の解析により近縁関係が明らかとなった系統について、栽培条件の検討は、今後遂行すべき興味深い課題である。

ここ豆くんに関する来歴の情報は今のところ不明であるが、あけぼの大豆は、明治時代に関西地方から導入されたことが起源とされている。今回の解析結果から起源地を特定することは困難ではあるが、ここ豆くんの栽培地である静岡市清水区両河内地区と、山梨県の身延町は、現在の中部横断自動車道と並行して、かつては塩の道でつながっていた歴史や、身延町には、宿坊の名物を湯葉とする日蓮宗総本山の身延山久遠寺もあることから、ある時代に伝わった大豆が、気候風土に合致した両地区で伝えられてきた可能性が考えられる。実際

にここ豆くんを栽培されている方からの情報として、ここ豆くんの栽培地域で、あけぼの大豆を栽培すると、葉の黄化が1~2週間ほど早いという。おそらく、より北に位置している身延町での栽培に適した遺伝的背景を持つ個体が選抜されてきたことが推測され、その違いは、両者のわずかに異なるゲノム配列の多型に由来していると思われる。

ここ豆くんのショ糖およびグルタミン酸含量は、他品種大豆の最大値と比較しても顕著に高いことが、さらにここ豆くんは、分岐鎖アミノ酸含量においても最高値となることが明らかとなった。分岐鎖アミノ酸は、運動や登山の際のサプリメントとしても商品化されていることから、峠を控えたかつての塩の道沿いで栽培が続けられてきたこととの関連にも興味を持たれる。

謝辞

ここ豆くん、あけぼの大豆をご分与いただいた、大石章博 農事組合法人みらい代表および身延町役場産業課の関係者の皆様に感謝申し上げます。

研究の一部は、静岡市産学交流センターによる「地域課題に係る産学共同研究委託事業」の支援により実施いたしました。

引用および参考文献

Kajiya-Kanegae H., Nagasaki H., Kaga A., Hirano K., Ogiso-Tanaka E., Matsuoka M., Ishimori M., Ishimoto M., Hashiguchi M., Tanaka H., Akashi R., Isobe S., Iwata H. (2021) Whole-genome sequence diversity and association analysis of 198 soybean accessions in mini-core collections. *DNA Res.* 19;28(1): dsaa032. doi: 10.1093/dnares/dsaa032.
 鴻坂扶美子、田中義則、白井和栄、村田吉平、三好智明、高宮泰宏、萩原誠司、足立大山 (2021)

- ダイズ新品種「タマフクラ」の育成、北海道立
総合研究機構農試集報、**105**, 59-70
- 水野時子、島田信二、丹治克男、山田幸二 (2002)
大豆の水浸漬による遊離アミノ酸の変動、日本
家政学会誌、**52**, (12), 1197-1202
- 大庭寅雄、岩田岩保、竹崎力、工藤洋男、異儀田和
典、小代寛正、原正紀、池田稔、高柳繁、下津
盛昌、橋本篤一、志賀鑑昭、富田貞光 (1982)
ダイズ新品種「フクユタカ」について、九州農
誌報告、**22**, (3), 405-432
- 平 春枝、田中弘美、斎藤昌義 (1989) 国産大豆の
全糖・遊離型全糖および遊離糖類の含量、日本
食品工業学会誌 **36**, (12), 968-980
- 農業生物資源ジェンバンク日本のダイズコアコレ
クション、[https://www.gene.affrc.go.jp/databases-
core_collections_jg.php](https://www.gene.affrc.go.jp/databases-core_collections_jg.php)
- 農業生物資源ジェンバンク遺伝資源データベース
[https://www.gene.affrc.go.jp/databases.php?section=pl
ant](https://www.gene.affrc.go.jp/databases.php?section=plant)