

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05632

研究課題名(和文)ダイコン青変症の原因遺伝子の特定と発症制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of genes involved in blue discoloration of Japanese radish root

研究代表者

永田 雅靖 (Nagata, Masayasu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・ユニット長

研究者番号：60370574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ダイコンの内部が出荷後の数日間で青く変色するダイコン青変症が全国的に発生し、生産者および市場関係者の問題となっている。これまでに申請者らは、ダイコン青変症の原因となる物質を、4-ヒドロキシグルコブラシシンと同定した。本課題では、RNA-seq法により、トリプトファンを出発物質として4-ヒドロキシグルコブラシシンに至るインドールグルコシノレートの代謝関連遺伝子の発現を詳細に解析した。その結果、青変症になりやすい品種と、なりにくい品種では、グルコブラシシンから4-ヒドロキシグルコブラシシンと1-ヒドロキシグルコブラシシンに分岐する部分のCYP81F系遺伝子の発現量に有意な差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイコン青変症は、流通中に発生する生理障害である。申請者らは、ダイコン青変症の原因物質が、4-ヒドロキシグルコブラシシン(4-OHGB)であることを世界に先駆けて明らかにした。本研究では、次世代シーケンサーによるRNA-seqの手法を用いて、トリプトファンから4-OHGBに至るインドールグルコシノレート代謝経路の遺伝子発現を検討することにより、グルコブラシシンから4-OHGBと1-ヒドロキシグルコブラシシンに分岐するステップがその主要因であることを明らかにした。これらの基礎的知見は、今後、青変症になりにくい新品種育成に利用できる。また、食品ロスの削減を通じて、SDGsの推進に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Radish blue discoloration, in which the inside of radish turns blue within a few days after harvest. It has occurred nationwide, which has become a problem for producers and market participants. So far, we have identified the substance responsible for radish blue discoloration as 4-hydroxyglucobrassicin. In this study, we analyzed in detail the expression of metabolism-related genes of indole glucosinolate from tryptophan to 4-hydroxyglucobrassicin by RNA-seq method. As a result, there was a significant difference in the expression level of the CYP81F-type genes in the part where glucobrassicin branches into 4-hydroxyglucobrassicin and 1-hydroxyglucobrassicin between varieties that are prone to blue discoloration and those that are not.

研究分野：園芸利用学

キーワード：ダイコン青変症 網羅的遺伝子発現解析 RNA-seq インドールグルコシノレート代謝 Raphanus sativus

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

2001年頃から多くの産地で、出荷したダイコンの内部が、わずか数日の流通中に青く変色する現象が報告されるようになった。外部からは見えず、切断してはじめて変色していることがわかる。この現象は「ダイコン青変症 (せいへんしょう)」と呼ばれ、品種や貯蔵温度によって、発生程度に差があることが石川県農業技術センターの池下ら (2010) によって明らかにされたが、原因については不明であった (図1)。申請者は、池下らの依頼を受けて、青色物質の基本特性について解析し、抽出性やpH応答性等から、青色物質がアントシアニンであるとする従来説が誤りであることを示した (永田ら、2012)。ついで、青色色素が生体中の還元物質であるアスコルビン酸によって退色する現象を見だし、研究協力者の寺西との共同研究により、ダイコンに含まれる青色色素の前駆物質を、過酸化水素処理により人工的に青色化させて検出する方法を發明し、特許化した (寺西、永田、2017)。さらに、ダイコンに含まれる成分を分画・精製し、上記方法を応用して青色の原因となるピーク成分を単離した。この成分の機器分析により、青色色素前駆物質が、4-hydroxyglucobrassicin (4-OHGB) と同定した (Teranishi and Nagata, 2016) これまでの過程で他の研究グループとの競合等はなく、独自の研究成果である。本研究の開始時点で、前駆物質まで明らかになったが、ダイコンの品種によって4-OHGBの蓄積量に大きな差があるのか、その理由は解明されておらず、生理学的解析が求められていた。



先端に近い内部が青く変色する

図1 青変症を発症したダイコンの切断面

2. 研究の目的

これまでの研究で、ダイコン青変症の前駆物質が4-OHGBと同定できたことから、この物質の蓄積に関連する代謝制御機構を明らかにすることが本研究の目的である。

我々が開発した、青変症リスク評価法によって、現行の品種を調べてみると、9割程度の品種には4-OHGBが蓄積する一方で、4-OHGBをほとんど含まない品種も1割程度存在した。

4-OHGBは、アブラナ科植物に含まれるグルコシノレートの中でも、インドール環をもつ特異な構造をもつマイナー成分である。4-OHGBの生合成に関わる遺伝子について、実験植物である *Arabidopsis* での研究は行われているが (図2)、ダイコンにおける研究はこれまでに行われていない。また、インドールグルコシノレートの生合成経路の物質の中では、4-位に水酸基をもつ4-OHGBだけが、唯一、青色色素の前駆物質となることが我々の研究で確認されている (Teranishi and Nagata, 2016)。本研究では、一部の品種で、4-OHGBの蓄積が少ない理由を明らかにすることを目的としている。そこで、予備実験として、インドールグルコシノレートの生合成に関わる遺伝子についてディジェネレートプライマーを使用した遺伝子クローニングにより塩基配列を調べたところ、青変しにくい品種のひとつで、glucobrassicinから4-OHGBの合成に関わるCYP81系の遺伝子に nonsense

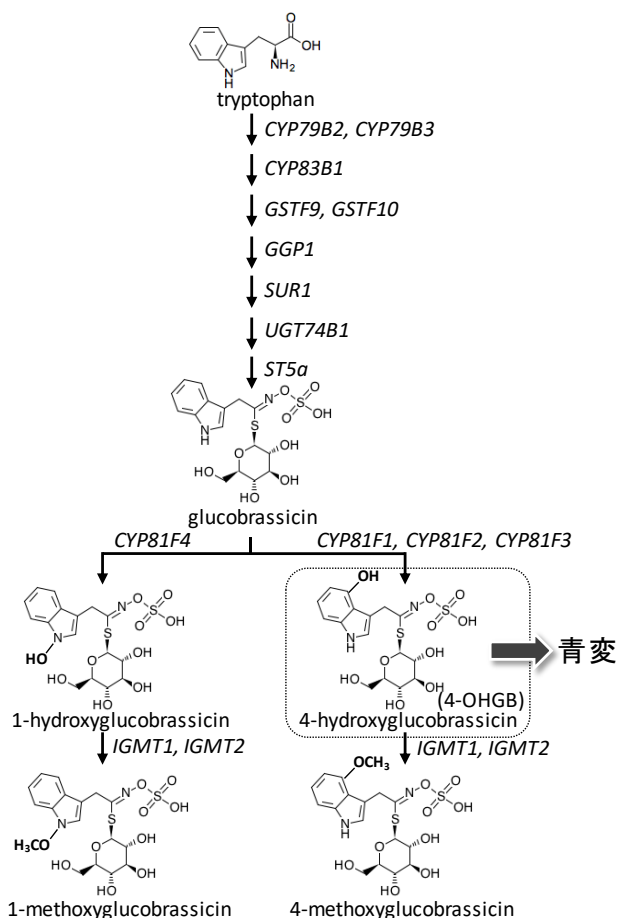


図2 インドールグルコシノレートの生合成経路
4-OHGBのみ青色色素前駆物質となる。

変異を検出した (図3)。これは、従来にはない知見である。この変異が、青変症になりにくい他のダイコン品種でも同様に4-OHGBが蓄積しない主な原因なのか、それとも、他のインドールグルコシノレート生合成関連遺伝子が関与しているのかを明らかにする。このことは、*Arabidopsis* も含め、植物におけるインドールグルコシノレートの生合成制御に関する新しい学術的知見になるだけでなく、将来的には、品質や栽培特性が良く、青変症になりにくいダイコン品種の遺伝子マーカー選抜・育成につながる実用的な側面も持っている。その一方で、4-OHGBが多く蓄積する系統や、蓄積量が増加する条件を明らかにすることによって、天然では希な青色の食品色素を多く生産する食材を作ることなど、さらに新しい応用面への発展が期待できる。

CYP81**

	Glu	Lys	Lys	Val	Lys	Leu
Normal	GAG	AAG	AAA	GTG	AAA	GCT
			717			
Mutant	GAG	AAG	AAG	TGA	AAG	CTG
	Glu	Lys	Lys	<u>Stop</u>		

図3 NormalとMutant系統のCYP81**遺伝子の塩基配列の違い
青変症になりにくい系統は、CYP81**のA(717)が欠失し、次のコドンがStopとなるnonsense変異と推定される

3. 研究の方法

ダイコンは、青変症になりにくい品種 (T)、青変症になりやすい品種 (F) および、やや青変症になりにくい品種 (Y) を用いた。それぞれのダイコンの内部からサンプリングし、RNeasy Plant Mini Kit を用いて Total RNA を抽出した。研究を加速化するために、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析の手法を採用した。RNA-seq は、タカラバイオ (株) の依頼分析により行った。核酸定量後、Agilent 2200 TapeStation による品質検定を行い、TruSeq Standard mRNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて、mRNA ライブラリを作成した。Agilent 2100 Bioanalyzer を用いてシーケンスライブラリーの品質を検定後、NovaSeq 6000 を用いて、150 base ペアエンドシーケンス (約1億リード/検体) 解析を行った。マッピングには、ゲノム配列として、GCF_000801105.1_Rs1.0_genomic.fna.gz、遺伝子情報として、GCF_000801105.1_Rs1.0_genomic.gtf.gz を用いた。アノテーションのついたデータをもとに、インドールグルコシノレートの生合成に関連する遺伝子をピックアップして発現解析を行った。

4. 研究成果

リード配列の 90.8~95.6% がマッピングされた。61,226 遺伝子について、発現のカウント数から、FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million reads mapped) を算出したデータを使って解析を行った。アノテーションのついたデータの中から、インドールグルコシノレート生合成に関連する酵素遺伝子および転写因子の発現について、3品種の比較を行った。ほとんどの遺伝子 (群) では、3品種の差が認められないか、あるいは、一定の傾向が認められなかった。

一方、他の品種に比べて顕著に青変症になりにくい品種 (T) では、glucobrassicin (GB) から 1-hydroxyglucobrassicin (1-OHGB) の生合成反応を触媒する複数の CYP81F4 遺伝子が、品種 (T) 特異的に発現していることが認められた。品種 (T) が青変症になりにくいことを考え合わせると、この遺伝子が品種 (T) に特異的に発現し、機能

していることにより、GB から 1-OHGB への反応が進む結果、青変症前駆物質である 4-OHGB の蓄積が抑制され、青変症になりにくい特性に結びついているものと推定された。

また、予備試験で得られた塩基配列の変異は、RNA-seq では確認できなかった。この理由については、さらに検討する必要がある。

以上の結果から、当該遺伝子の強い発現がある品種を親系統にして交配することによって、青

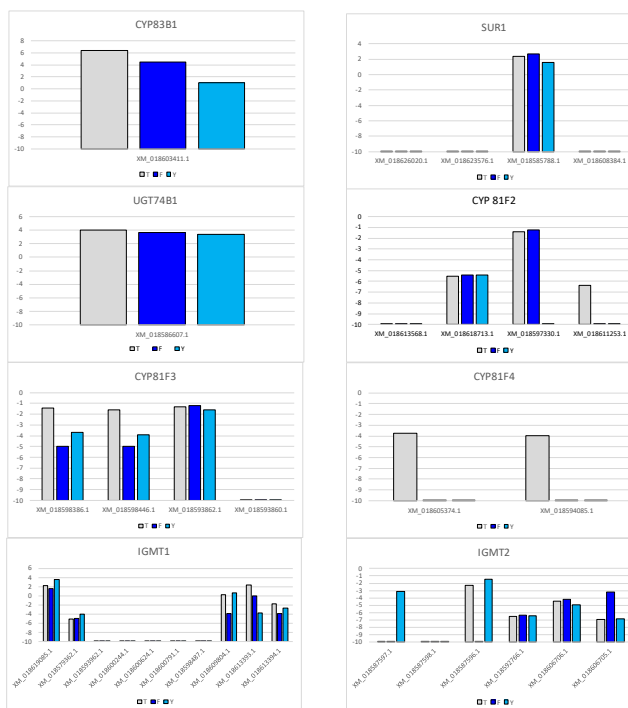


図4 異なるダイコン品種におけるインドールグルコシノレート代謝関連酵素遺伝子の相対的発現量

変症になりにくい新しい品種育成が行えることを示す生理学的な根拠が得られた。現在のダイコン品種の多くが、青変症になる素因を持っていることは、これまでに青変症に関する育種選抜が行われてこなかったことを示していると考えられる。そこで、青変症になりにくい品種の育成が行われ、流通中の青変症発生が少なくなれば、流通過程で廃棄されるダイコンも減り、現在問題となっているフードロスの根本的な削減にも寄与できるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Teranishi Katsunori, Nagata Masayasu	4. 巻 6
2. 論文標題 Prediction and suppression of internal blue discoloration in roots of daikon, the Japanese radish (<i>Raphanus sativus</i> L.)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food Science & Nutrition	6. 最初と最後の頁 2134 ~ 2140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/fsn3.774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田雅靖・寺西克倫
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたダイコン青変症原因遺伝子の推定
3. 学会等名 園芸学研究, 18 (別2), 297 (2019.9.15)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 永田雅靖	4. 発行年 2019年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス, 東京	5. 総ページ数 372
3. 書名 青果物の鮮度評価・保持技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------