

平成22年6月16日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19780089  
研究課題名 (和文) 大豆のフラボノイド代謝機構に関わる遺伝子の探索及び分子生物・細胞生物学的解析  
研究課題名 (英文) Molecular and cellular study of flavonoid metabolism and detection of relating genes in soybean  
研究代表者  
戸田 恭子 (TODA KYOKO)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所大豆育種研究チーム・主任研究員  
研究者番号：10360447

研究成果の概要 (和文)：大豆には毛茸が褐色の系統と白色の系統があり、前者の方が低温ストレス耐性が高いが、その機構は明らかにされていない。本研究結果により、低温条件で大豆の組織抗酸化活性は上昇するが褐毛系統のほうが顕著に抗酸化活性が高いこと、一方低温による酸化ストレスは白毛系統が顕著であることが示唆された。さらに低温条件では*F3'H*、UDP-Glucose: flavonoid glucosyltransferase遺伝子等の発現が誘導され、褐毛系統にのみケルセチン等抗酸化活性の高いフラボノイドが蓄積したことから大豆の低温ストレス耐性にはフラボノイドの抗酸化活性が関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Chilling tolerance is an important trait of soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) produced in cool climates. We previously isolated a soybean *flavonoid 3' hydroxylase* (*F3'H*) gene corresponding to the *T* locus, which controls pubescence and seed coat color. A genetic link between the *T* gene and chilling tolerance has been reported, although the exact underlying mechanisms remain unclear. Using the soybean near-isogenic lines (NILs) To7B (*TT*) and To7G (*tt*), we examined the relationship between chilling injury, antioxidant activity and flavonoid profiles associated with chilling treatment (15°C). Chilling injury was more severe in the second trifoliolate leaves of To7G than in those of To7B. Lipid peroxidation was enhanced by chilling in To7G. Chilling-induced enhancement of antioxidant activity was more prominent in To7B than in To7G. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis indicated that the contents of quercetin glycosides and isorhamnetin glycosides (3',4'-dihydroxylated flavonol derivatives) increase in the second trifoliolate leaves of To7B after chilling treatment, whereas the same treatment increased kaempferol glycoside (4'-monohydroxylated flavonol derivatives) content in the corresponding leaves of To7G. Histochemical staining also demonstrated chilling-induced flavonoid accumulation. Microarray analysis and real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) demonstrated that the transcript levels of soybean *F3'H* are upregulated by chilling. The differences in chilling injury, antioxidant activity and flavonoid species between the two NILs support the notion that soybean *F3'H* affects chilling tolerance by increasing antioxidant activity via production of 3',4'-dihydroxylated flavonol derivatives.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	660,000	3,960,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学、生物有機化学

キーワード：大豆、低温ストレス耐性、フラボノイド、抗酸化活性、ケルセチン

1. 研究開始当初の背景

大豆の主産地である北海道では、約4年に一度、開花期の低温（約15度以下）により収量や種子の品質が低下することが深刻な問題となっている。大豆には毛茸が褐色の品種と白色の品種があるが、前者の方が低温ストレスに対する耐性が高い。申請者らのグループでは、遺伝学的に耐冷性を解析し、褐毛品種の低温ストレス耐性（低温条件下での種子の高い収量性、裂皮・着色抵抗性）が、毛茸色を支配する遺伝子*T*自体、あるいは*T*に強く連鎖した遺伝子に起因することを明らかにした（Takahashi and Asanuma 1996, Takahashi 1997）。さらに、遺伝子*T*はフラボノイド生合成酵素のひとつであるフラボノイド 3'-水酸化酵素（F3' H）をコードしており、白毛品種では遺伝子中に1塩基の欠失が起こり、タンパクの機能が失われていた（Toda *et al.* 2002）。F3' Hの活性により蓄積するケルセチンは植物の主要なフラボノイドであり、褐色の色素で転写制御や紫外線吸収等様々な機能を有するが、抗酸化機能が比較的強いことでも知られている。一方、植物の低温ストレス耐性には組織の抗酸化活性が関わることが知られている。しかし、フラボノイド

の抗酸化活性と低温ストレス耐性との関係を報告した研究例は我々が知る限りない。

2. 研究の目的

そこで本研究では毛茸色に関する大豆準同質遺伝子系統を用いて、

- (1) 大豆褐毛系統と白毛系統における低温障害の比較
- (2) 2系統において蓄積するフラボノイド及び組織抗酸化活性の比較
- (3) 低温で誘導されるフラボノイド生合成系遺伝子の探索
- (4) 低温で蓄積されるフラボノイドの組織・細胞学的解析

を行い、大豆フラボノイドと低温ストレス耐性との関係を解析する。

3. 研究の方法

(1) 材料

大豆準同室遺伝子系統 To7B、To7G の第2本葉を用いた。植物体は植物インキュベータ内で以下の条件で育成した。

通常条件（コントロール）：25℃、光量 250 から 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、16 時間明期。

低温条件：15°C、光量 180 から 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、16 時間明期。

### (2) 組織の酸化ストレスの評価

通常条件および低温処理 2 週間目の第 2 本葉を用い、チオバルビツール酸試験により組織の酸化ストレスを評価した。

### (3) フラボノイド解析

通常条件および低温処理 7 日目の組織メタノール抽出物を 1 N 塩酸、90°C で 1 時間処理し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で PEGASIL-ODS カラム (センシュー科学) を用いて分離分析した。移動相はアセトニトリル/水/リン酸 (35:65:0.1) を用いた。吸光度検出器を用い、検出波長を 260nm と 350nm に設定してフラボノイドを検出した。検出したフラボノイドは市販の標品と保持時間、吸収スペクトルを比較して同定した。

### (4) 抗酸化活性測定

組織メタノール抽出物の抗酸化活性は DPPH ラジカル消去活性試験により評価した。

### (5) 低温で誘導されるフラボノイド生合成系遺伝子の探索

通常条件および低温処理 24 時間目の To7B の第 2 本葉から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により低温で発現が誘導される遺伝子を探索した。得られた候補遺伝子はさらにリアルタイム RT-PCR により発現を解析した。

### (6) フラボノイド染色

第 2 本葉に蓄積したフラボノイドはジフェニルホウ酸 2-アミノエチルエステル (DPBA) を用いた生体染色により検出した。またテクノビット切片をトルイジンブルー染色し、フラボノイドの蓄積を細胞レベルで観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 大豆褐毛系統と白毛系統における低温障害の比較

第 2 本葉展開期から 2 週間低温処理を行う

と、To7B、To7G とともに第 2 本葉の脂質過酸化物が増加すること、また To7G のほうが脂質過酸化物の増加が顕著なことがチオバルビツール酸試験により示唆された (図 1)。また、低温 5 週間により、To7G の第 2 本葉で顕著な褐変化がみられた。

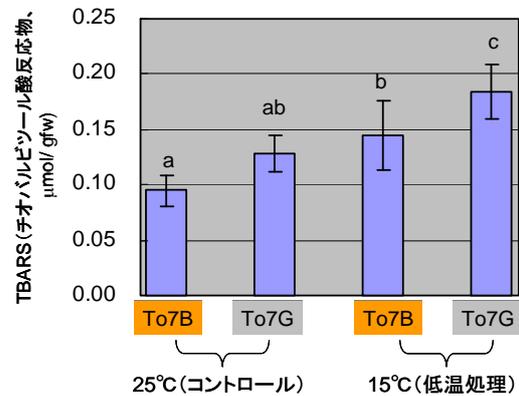


図 1. チオバルビツール酸試験による脂質過酸化度 (酸化ストレス) の評価。異なるアルファベットは 5% 水準で有意差のあることを示す。

### (2) 2 系統において蓄積するフラボノイド及び組織抗酸化活性の比較

HPLC 分析の結果、To7B では低温によりケルセチンおよびイソラムネチン (3'-O-メチルケルセチン) 配糖体が、To7G ではケンフェロール配糖体が蓄積することが示唆された (表 1)。F3' H 活性を有しない To7G ではケルセチン、イソラムネチンは蓄積しない。一般にフラボノイドの抗酸化活性はケルセチン、イソラムネチン、ケンフェロールの順に高いことが知られている。

表 1. 通常条件及び低温条件で大豆第 2 本葉に蓄積するフラボノイド

		フラボノイド蓄積量 ( $\mu\text{mol gfw}^{-1}$ )			
		ルテオリン	ケルセチン	イソラムネチン	ケンフェロール
To7B	25°C	0.53 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.94 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.08 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
	15°C	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.10 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	0.93 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
To7G	25°C	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	2.64 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>
	15°C	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	3.57 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>

異なるアルファベットは 5% 水準で有意差があることを示す。

一方 DPPH ラジカル消去活性試験により組

織の抗酸化活性が To7G より To7B のほうが高いこと、両系統とも 1 週間、もしくは 2 週間の低温処理により抗酸化活性が上昇することが示唆された (図 2)。

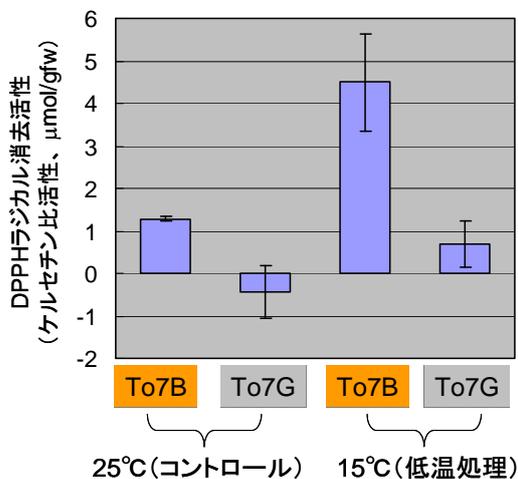


図 3. 大豆第 2 本葉の組織抗酸化活性。低温処理は 1 4 日目。

(3) 低温で誘導されるフラボノイド生合成系遺伝子の探索

マイクロアレイ解析により *F3'H* やカルコンシンターゼ遺伝子等フラボノイド生合成系遺伝子が低温により誘導されることが示唆された。これらの遺伝子のうち、*F3'H*、UDP-Glucose: flavonoid glucosyltransferase 遺伝子に関してはリアルタイム RT-PCR によっても低温で発現が誘導されることが示唆された。現在他の遺伝子についても解析中である。

(4) 低温で蓄積されるフラボノイドの組織・細胞学的解析

DPBA による染色で調べた結果、低温処理 3 日目に第 2 本葉の葉身全体でフラボノイド量が増加していることが観察された。テクノビット切片のトルイジンブルー染色によりフラボノイドは液胞に蓄積することが示唆された。

これらの結果から、大豆の低温ストレスに

は酸化ストレスが関与し、低温により蓄積されるフラボノイドの抗酸化活性が低温ストレス耐性に関わる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kyoko Toda, Ryoji Takahashi, Tsumasa Iwashina and Makita Hajika: Difference in chilling-induced flavonoid profiles, antioxidant activity and chilling tolerance between soybean near-isogenic lines for the pubescence color gene, *J. Plant Res.* 査読中、印刷中、2010、PMID: 20428921

[学会発表] (計 1 件)

- ① 戸田恭子、高橋良二、大豆におけるフラボノイド生合成と抗酸化性及び低温ストレス耐性との関係、日本植物学会第 7 2 回大会、2008

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 恭子 (TODA KYOKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所大豆育種研究チー

ム・主任研究員

研究者番号：10360447

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

岩科 司 (IWASHINA TSUKASA)

国立科学博物館 筑波試験植物園・主任研究員

研究者番号：30151731

高橋 良二 (TAKAHASHI RYOJI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所大豆生理研究チーム・上席研究員

研究者番号：90360445

羽鹿 牧太 (HAJIKI MAKITA)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所大豆育種研究チーム・チーム長

研究者番号：40414643