

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380001

研究課題名（和文）ダイズにおける低温着色抵抗性識別マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of a DNA marker for detecting tolerance to cold-induced seed coat discoloration in soybean

研究代表者

千田 峰生（SENDA MINEO）

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：30261457

研究成果の概要（和文）：開花数日後に黄ダイズ植物体が低温に遭遇した場合、生産種子の臍周辺が着色してしまう現象がある。これを低温着色といい、種子品質を大きく低下させる。そのため、低温着色抵抗性品種の作出が重要であり、選抜のための分子マーカーが必要であるが、低温着色がなぜ起こるかさえわかっていなかった。本研究では、低温着色及びその抵抗性の分子機構を明らかにした。さらに得られた知見を基に低温着色抵抗性識別に有効な DNA マーカーの開発も行った。

研究成果の概要（英文）：In yellow soybean, seed coat discoloration occurs when plants are exposed to low temperature after the onset of flowering, a phenomenon named cold-induced discoloration abbreviated as CD. CD reduces the commercial value of yellow soybean, and therefore DNA markers are required to create CD-tolerant cultivars. However, it was not even known how low temperature causes discoloration in the seed coat. In this study, we investigated the occurrence and tolerance mechanisms of CD. Furthermore, based on the findings, we developed a DNA marker being effective in selecting the CD-tolerant plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：抵抗性・耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 黄ダイズにおいて、種子の黄色い外観はその品質を左右する最も重要な形質の1つである。もし、黄ダイズ種子に予期せぬ着色が起きた場合、大幅な品質低下を招く。黄ダイズ生産の主要産地である北海道において、開花数日後に低温に遭遇した場合、生産種子

の臍周辺が着色してしまう現象が見られる。この現象を低温着色といい、生産農家には深刻な被害をもたらすため、低温着色に抵抗性の黄ダイズ品種の育成が求められている。

(2) 低温着色程度には品種間差があり、トヨムスメのような感受性品種ではその程度が

大きいものに対して、トヨハルカのような抵抗性品種では着色がほとんど見られない。

(3) 黄ダイズの種皮着色抑制はフラボノイド生合成の第一反応を触媒するカルコンシンターゼ (CHS) をコードする遺伝子の RNA 干渉 (RNAi) によることが明らかになった。黄ダイズゲノムに座乗する種皮着色抑制遺伝子である *I* (Inhibitor) 遺伝子候補領域の構造が解析され、内在性遺伝子のプロモーター配列と、pseudoCHS 遺伝子のインバーテッドリピート (IR) 配列を含むことが明らかになった。この領域は *GmIRCHS* と命名され、転写産物が CHS 遺伝子の二本鎖 RNA (dsRNA) を形成するため、CHS 遺伝子の RNAi を誘導すると考えられている。

2. 研究の目的

(1) 低温着色及びその抵抗性の仕組みは明らかになっていない。本研究ではこれらの仕組みを解明し、低温着色防止に役立てることが目的である。

(2) 低温着色抵抗性の黄ダイズ品種を育成する場合、大型人工気象器を用いた低温着色抵抗性検定による個体選抜が必要となる。しかしながら、このような選抜の実施には多くの費用がかかるだけでなく、検定処理個体数も制限される。もし、低温着色抵抗性を識別できる分子マーカーが開発できれば低温着色抵抗性選抜育種の大幅なコスト削減や時間短縮が見込まれる。本研究ではトヨムスメ及びトヨハルカ間で低温着色に関与する遺伝子領域について構造多型を調査し、それに基づき低温着色抵抗性識別マーカーを開発することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 低温着色感受性品種トヨムスメ (TM と表記) を材料に低温着色の仕組みを明らかにするとともに、低温着色抵抗性品種トヨハルカ (TR と表記) を材料に低温着色抵抗性の仕組みを明らかにする。

cv. Toyomusume (TM)



cv. Toyoharuka (TR)

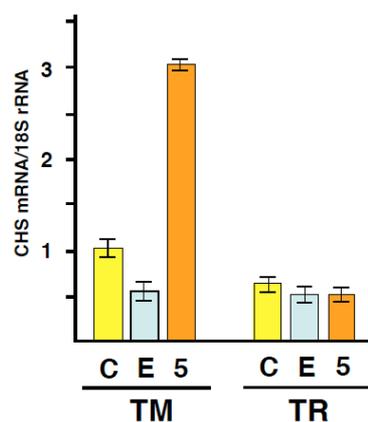


(2) トヨムスメ及びトヨハルカにおいて、*GmIRCHS* 領域の構造を比較し、両者を識別できる DNA マーカーを開発する。トヨハルカと

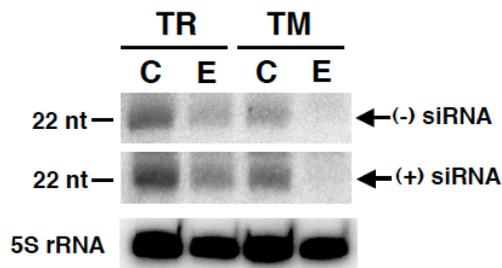
トヨムスメ間の RILs において、本 DNA マーカーを用いたタイプ同定と低温着色抵抗性検定を同時に行うことにより、本 DNA マーカーが低温着色抵抗性識別に有効かどうかを調査する。

4. 研究成果

(1) 低温処理したトヨムスメ及びトヨハルカの植物体より種皮を単離し、RNA を抽出した。CHS 転写産物量を非処理区と比較調査した結果、低温処理後 5 日目 (5 と表記) に両品種で明らかな差が見出された。すなわち、低温着色感受性のトヨムスメでは転写産物量が非処理区 (C と表記) に比べ明らかに上昇していた。それに対して、低温着色抵抗性のトヨハルカでは非処理区に比べ大きな差は見出されなかった。このことから低温処理後の CHS 転写産物量の上昇が低温着色に関与し、低温処理後の CHS 転写産物量の上昇防止が低温着色抵抗性に関与している可能性が示唆された。

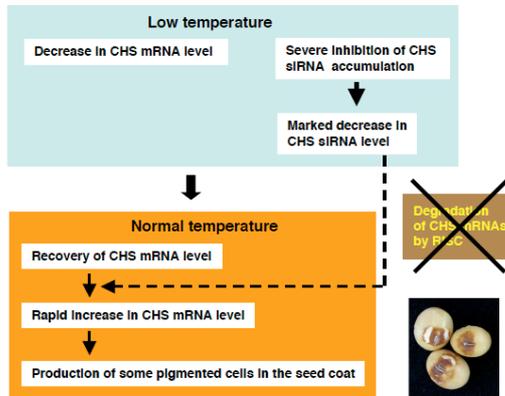


(2) 低温処理後 5 日目に両品種で明らかな差が見出された原因について調査するため、CHS 遺伝子の RNAi に関与している CHS 遺伝子の siRNA 量を比較した。その結果、トヨハルカでは低温処理最終日 (E と表記) に siRNA がある程度蓄積しているのに対して、トヨムスメでは siRNA が検出されない位まで大きく減少していることが明らかになった。

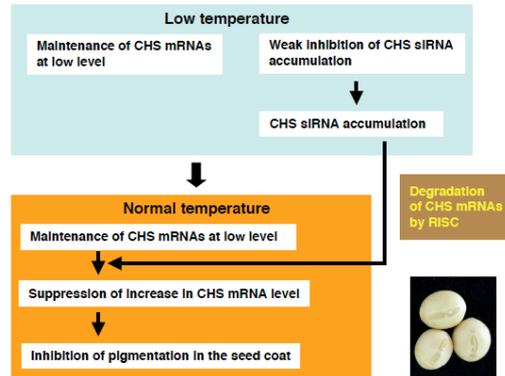


(3) (1)及び(2)の結果から、低温着色 (A) 及びその抵抗性 (B) について、以下の分子モデルを構築した。

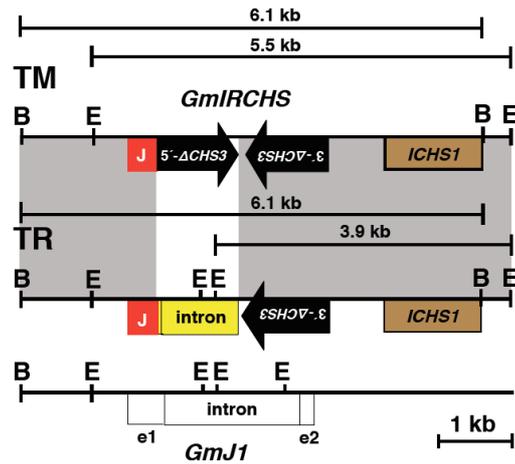
A Sensitivity mechanism of CD



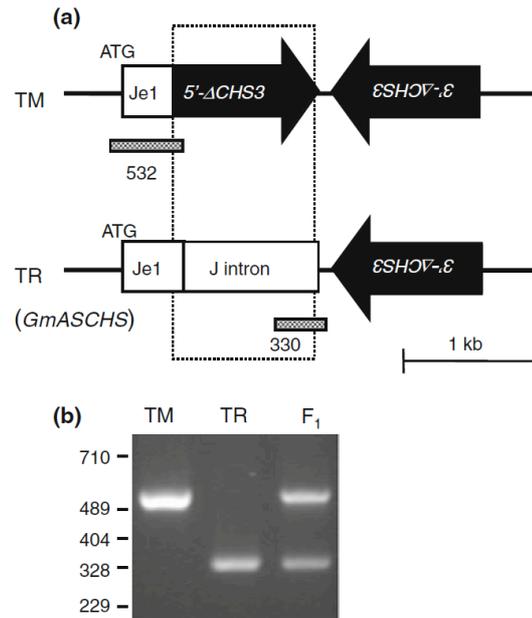
B Tolerance mechanism of CD



(4) *CHS* 遺伝子の RNAi が *GmIRCHS* によって誘導されることが示唆されている。*GmIRCHS* は 5' 領域の欠損した *CHS3* 遺伝子 (以降、*pseudoCHS3* と表記) の逆位反復配列を含んでいる。本研究ではトヨムスメ及びトヨハルカよりゲノム DNA を抽出し、*CHS* 及び *CHS1* 遺伝子プローブをそれぞれ用いたサザンブロット分析により *GmIRCHS* 領域の構造について比較調査を行った。その結果、*EcoRI* ブロットにおいてトヨハルカで多型断片が検出された。次にトヨハルカにおける多型断片をインバース PCR により増幅し、その塩基配列を特定したところ、トヨハルカで *GmIRCHS* 領域内に明らかな構造差異を確認した。すなわち、トヨハルカゲノムの *GmIRCHS* 領域には *pseudoCHS3* が逆位反復配列ではなく、相補配列しか存在しないことが明らかとなった (トヨハルカ型の *GmIRCHS* を *GmASCHS* と命名)。したがって、この構造差異を利用して、低温着色抵抗性であるトヨハルカ型を特異的に検出できる DNA マーカー作出の可能性が考えられた。

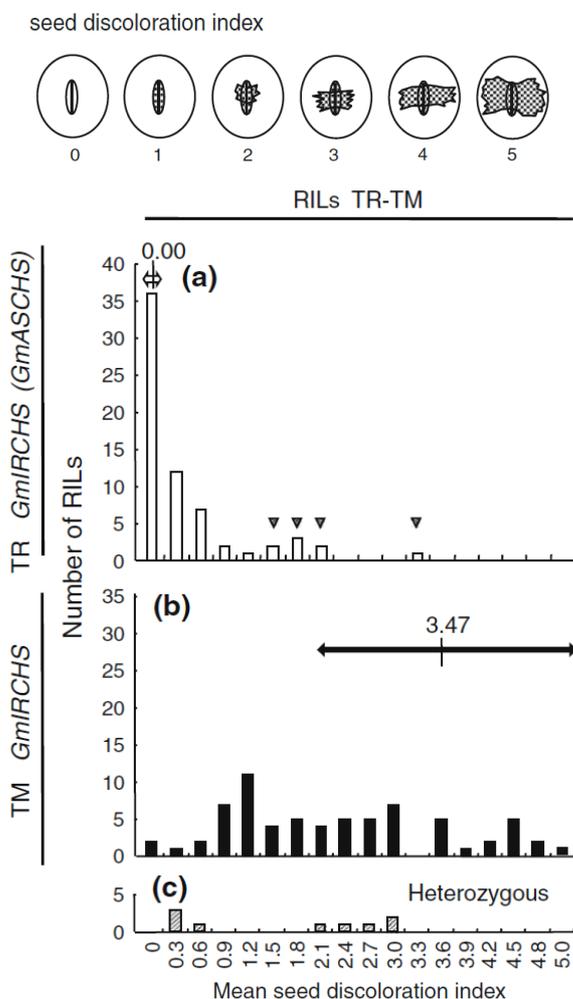


(5) トヨハルカに見出された構造差異を利用して、トヨムスメ型及びトヨハルカ型 *GmIRCHS* をそれぞれ検出できるプライマーセットをデザインした (a)。実際、本プライマーセットを用いた PCR を行うことによってトヨムスメ型及びトヨハルカ型 *GmIRCHS* を特異的に識別できることを確認した (b)。



(6) トヨハルカ×トヨムスメ RILs の植物体について低温着色抵抗性検定を行い、生産種子の低温着色程度を 0 から 5 までの数値 (seed discoloration index) で示し、各植物体毎にその平均値 (mean seed discoloration index) を算出した。次に本 DNA マーカーを用いて、各植物体がトヨハルカ型かトヨムスメ型かについて多型解析を行った。その結果、トヨハルカ型ホモの植物体のほとんどが低温着色抵抗性を示すことが判明し、本 DNA マーカーが低温着色抵抗性識別マーカーとして有効である可能性が示

唆された (a)。しかしながら、トヨハルカ型ホモであっても低温着色感受性を示す植物体 (a 矢頭で示す) もわずかに存在する。このことから、本マーカーのみでは完全な識別が不可能であり、マーカー選抜精度をさらに向上させるために、今後は第二の識別マーカー開発が必要であると考えられた。



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7件)

- ① Kurauchi, T., A. Kasai, M. Tougou and M. Senda (2011) Endogenous RNA interference of chalcone synthase genes in soybean: Formation of double-stranded RNA of GmIRCHS transcripts and structure of the 5' and 3' ends of short interfering RNAs. *Journal of Plant Physiology* 168: 1264-1270 査読有
- ② Ohnishi, S., H. Funatsuki, A. Kasai, T. Kurauchi, N. Yamaguchi, T. Takeuchi, H. Yamazaki, H. Kurosaki, S. Shirai, T.

Miyoshi, H. Horita and M. Senda (2011) Variation of *GmIRCHS* (*Glycine max* inverted-repeat *CHS* pseudogene) is related to tolerance of low temperature-induced seed coat discoloration in yellow soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 122: 633-642 査読有

- ③ Kurauchi, T., T. Matsumoto, A. Taneda, T. Sano and M. Senda (2009) Endogenous short interfering RNAs of chalcone synthase genes associated with inhibition of seed coat pigmentation in soybean. *Breeding Science* 59: 419-426 査読有
- ④ Kasai, A., S. Ohnishi, H. Yamazaki, H. Funatsuki, T. Kurauchi, T. Matsumoto, S. Yumoto and M. Senda (2009) Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean. *Plant and Cell Physiology* 50: 1090-1098 査読有
- ⑤ Ikeda, T., S. Ohnishi, M. Senda, T. Miyoshi, M. Ishimoto, K. Kitamura and H. Funatsuki (2009) A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1477-1488 査読有

[学会発表] (計26件)

- ① 松澤めぐみ・西村さつき・乗田理恵・川崎通夫・千田峰生、着色ダイズにおける種皮着色過程の解析、日本育種学会、2012年3月30日、宇都宮大学(栃木県宇都宮市)
- ② 佐野麻衣子・松澤めぐみ・森あゆみ・穴井豊昭・川崎通夫・千田峰生、黄ダイズ品種フクユタカの臍着色形質に関する解析、日本育種学会、2012年3月30日、宇都宮大学(栃木県宇都宮市)
- ③ 千田峰生・種田晃人、黄ダイズの種皮着色抑制に関する内在性 siRNA の解析、ミヤコグサ・ダイズシンポジウム、2011年5月27日、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)
- ④ 千田峰生、黄ダイズの種皮着色抑制と種皮着色現象、ダイズ研究会、2011年3月5日、北海道大学(北海道札幌市)
- ⑤ 松本拓郎・千田峰生、ダイズ種皮着色抑制に関する *CHS* 遺伝子由来の内在性 siRNAs に関する研究 I. ノーザンプロット分析を用いた解析、日本育種学会、2010年3月27日、京都大学(京都市)
- ⑥ 倉内佑・種田晃人・佐野輝男・千田峰生、ダイズ種皮着色抑制に関する *CHS* 遺伝子由来の内在性 siRNAs に関する研究 II. 次世代シ

ーケンサーを用いた解析、日本育種学会、2010年3月27日、京都大学（京都市）

⑦ 千田峰生、RNA サイレンシングと有用形質、日本育種学会シンポジウム、2009年9月25日、北海道大学（北海道札幌市）

⑧ 葛西厚史・大西志全・船附秀行・千田峰生、低温着色感受性および抵抗性ダイズ品種間に見出された GmIRCHS 領域の構造変異、日本育種学会、2009年9月26日、北海道大学（北海道札幌市）

⑨ 大西志全・千田峰生・葛西厚史・船附秀行・山崎敬之・山口直矢・三好智明、ダイズ GmIRCHS 領域の構造差異は低温着色抵抗性と強く関連づけられ選抜 DNA マーカーとして有用である、日本育種学会、2009年9月26日、北海道大学（北海道札幌市）

⑩ 船附秀行・池田達哉・千田峰生・大西志全・夏正俊・原田久也・中本有美・小松邦彦・石本政男・喜多村啓介（2009）ダイズ I 遺伝子座近傍のゲノム構造変異と耐冷性 QTL、日本育種学会、2009年9月26日、北海道大学（北海道札幌市）

⑪ 葛西厚史・大西志全・山崎敬之・船附秀行・倉内佑・松本拓郎・湯本節三・白井滋久・三好智明・千田峰生、ダイズにおける低温着色粒発生の分子メカニズムの解明、日本育種学会、2008年10月11日、滋賀県立大学（滋賀県彦根市）

⑫ 池田達哉・大西志全・千田峰生・三好智明・石本政男・喜多村啓介・船附秀行、ダイズにおける新規耐冷性 QTL の同定、日本育種学会、2008年10月11日、滋賀県立大学（滋賀県彦根市）

〔図書〕（計2件）

① 千田峰生、他、講談社、植物の分子育種学、2011、156-166

② 千田峰生、他、学会出版センター、種子の科学とバイオテクノロジー、2009、131-134

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/gene/sendai/sendai.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千田 峰生 (SENDA MINEO)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：30261457

(2) 研究分担者

佐野 輝男 (SANO TERUO)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：30142699

(3) 連携研究者

()

研究者番号：