

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780009

研究課題名(和文)大豆フラボノイドの抗酸化活性と低温ストレス耐性の関係解明と関連候補遺伝子の解析

研究課題名(英文) Study of relationship between antioxidant activity of soybean flavonoids and chilling stress, and their related gene

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・作物研究所畑作物研究領域・主任研究員

研究者番号：10360447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究から、ダイズF3'H遺伝子は毛茸色を支配する遺伝子Tであり、低温ストレス耐性に関与することが推察される。本研究では、組換えダイズを用いたF3'Hの低温ストレス耐性に対する効果の検証と形態学的解析やフラボノイド分析による低温ストレス耐性メカニズムの解明を目的とした。現在までに組換えダイズが1系統得られ、RT-PCRやフラボノイドのHPLC分析等により、導入されたF3'H遺伝子が機能していることが示唆された。形態学的解析と抗酸化能測定等から、F3'H遺伝子は未熟種皮のへそや胎座等の柔細胞の液胞膜で発現し、フラボノイド合成および組織の抗酸化活性に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our studies and others have suggested that soybean F3'H gene corresponding to the T locus, which controls pubescence color, is related to chilling stress in soybean. The aim of this study was to clarify the relationship between F3'H and chilling stress using transformed soybean, and its mechanism by morphological study and analyzing flavonoids. A transformant was obtained and gene expression was confirmed by RT-PCR and HPLC analyses of flavonoids. Morphological study and scavenging activity of the DPPH radical indicated that F3'H is localized to the tonoplast in the hilum and funiculus of the immature seed coat, affecting biosynthesis of flavonoid and antioxidant properties in those tissues.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ダイズ 低温ストレス耐性 フラボノイド

1. 研究開始当初の背景

ダイズの主産地である北海道では、約4年に一度、低温(およそ15℃)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。ダイズ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。申請者や共同研究者らの研究から、毛茸色を支配する遺伝子 *F3'H* はフラボノイド 3'-水酸化酵素 (*F3'H*) であることが示唆され(文献1~4)。さらに近年、ウイルスを用いた RNA 干渉により *F3'H* 遺伝子発現が抑制された褐毛系統が白毛の形質を示すことが報告された(文献5)。これらのことから *F3'H* 遺伝子は毛茸色を支配する遺伝子 *T* であり、フラボノイドがダイズの低温ストレス耐性に関与することが推察される。

2. 研究の目的

これまで遺伝学的手法により毛茸色と低温ストレス耐性との関係が解析されてきたため、*F3'H* 遺伝子が直接ダイズの低温ストレス耐性に寄与するのか、それとも近傍の遺伝子が関与するのか、きちんとした証明はなされていない。また、フラボノイドが植物のストレス耐性に関与する可能性が示唆されているが(文献6)、そのメカニズムはまだ明らかにされていない。そこで本研究では

- 1) *F3'H* 遺伝子を導入した組換えダイズを用いた、遺伝子の低温ストレス耐性に対する効果の検証
- 2) 低温障害の症状が顕著な未熟種皮の形態学的解析やフラボノイド分析による低温ストレス耐性メカニズムの解明

を目的とした。

3. 研究の方法

1) 材料

フラボノイド分析や形態解析には毛茸色に関する準同質遺伝子系統 To7B(褐毛)、To7G(白毛)を用いた。植物体は、ほ場もしくは植物インキュベータで下記条件で育成した。

植物インキュベータの条件: 25℃、光量 250 から 300 μmol m⁻² s⁻¹、16時間明期。

形質転換にはダイズ白毛系統 To7G もしくはカリユタカを用いた。

2) ダイズ形質転換

ダイズの形質転換は既報(文献7)に準じ、不定芽にアグロバクテリウム EHA105 を感染させる方法で行った。

3) フラボノイド分析

フラボノイドはメタノールで抽出し、DPPH ラジカル消去活性試験による抗酸化活性の

評価および HPLC 分析によるフラボノイド分子種の解析を行った。

4) RNA 抽出および cDNA 調製

組換えダイズの葉から RNeasy Plant Mini kit(キアゲン)を用いて RNA を抽出し、DNase 処理を行った後、SuperScript Vilo cDNA Synthesis kit (インビトロジェン)を用いて cDNA を調製し、RT-PCR に供試した。

5) 形態学的解析

未熟種皮の生切片はマイクロスライサー(堂阪イーエム、DTK-1000)を用いて調製した。また、組織を 1%グルタルアルデヒドで固定し、テクノビット 7100 による包埋切片を調製した。組織の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)もしくはトルイジンブルーにより染色した。また、テクノビット包埋切片の抗体染色により F3'H タンパク質の局在解析を行った。

4. 研究成果

1) ダイズ形質転換および組換え個体の解析

白毛系統「カリユタカ」について合計 159 の子葉片を用いてアグロ法により形質転換を行い、マーカーである蛍光タンパク質 Ds-Red の発現とグルホシネート耐性により選抜した結果、3 個体が得られたがいずれも T1 種子を得ることが出来ず、組換え体は途中で枯死した。一方、白毛系統「To7G」については合計 172 の子葉片を用い、1 個体の組換えダイズを選抜して T1 種子を得た。「カリユタカ」で T1 種子を得ることができなかった原因は不明であるが、一つの可能性として、導入遺伝子である *F3'H* 遺伝子の機能により蓄積するケルセチンがオーキシシン輸送の負の制御因子であることから(文献8)、導入遺伝子が植物ホルモンの機能に影響を及ぼし、何らかの生育障害に関わったことが考えられる。

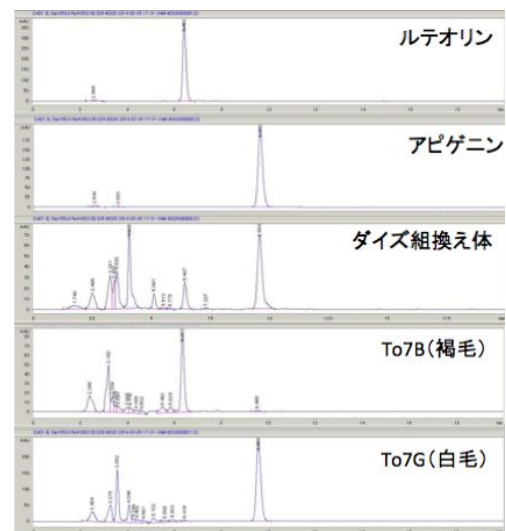


図1. 毛茸のフラボノイド HPLC 分析。縦軸はフラボノイドが持つ 350 nm の吸光、横軸は保持時間を示す。ルテオリン、アピゲニンは標品。

得られた組換えダイズの毛茸のフラボノイドを HPLC により分析した結果、褐毛に特異的なルテオリンが検出された (図 1)。

また、RT-PCR により、導入遺伝子特異的な cDNA 断片が組換え体から検出された。これらの結果から、組換えダイズにおいて導入された *F3' H* 遺伝子により *F3' H* 活性が付与されたことが示唆された。今後は組換えダイズの系統数を増やすとともに、T1、T2 世代を用いて開花期の低温ストレス耐性の評価を行う予定である。

2) *F3' H* タンパク質およびフラボノイドに関する形態学的解析

開花期約 1 週間後の未熟種皮を用いて DPBA 染色を行った結果、フラボノイドがへそおよび胎座に蓄積することが明らかとなった (図 1)。同様の結果はテクノビット包埋切片のトルイジンブルー染色像からも得られた。また、DPBA の蛍光色の違いから、To7B と To7G ではへそに蓄積するフラボノイドが異なることが示唆された (図 2)。



図 2 . DPBA 染色により検出された組織のフラボノイド。H、F はそれぞれへそ、胎座を示す。バーは 500 μm 。

抗体染色の結果、*F3' H* タンパク質はフラボノイドが検出されたへそおよび胎座の柔組織細胞で顕著に蓄積する事が示唆された。また、*F3' H* タンパク質は細胞の液胞膜に蓄積することが明らかとなった (図 3)。

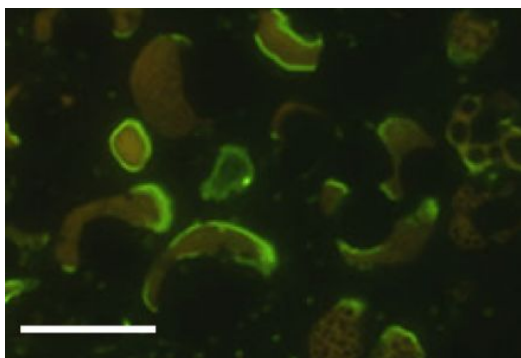


図 3 . *F3' H* の抗体染色像。緑色の蛍光は 2 次抗体に結合した Alexa Fluor 488 の蛍光。赤は液胞の自家蛍光。バーは 10 μm 。

3) 組織の抗酸化活性

組織重あたりの DPPH ラジカル消去活性は To7B のほうが To7G より高く、へそと胎座で

顕著であった (図 4)。ポリフェノール含量ではそのような傾向が見られなかったことから、抗酸化活性の違いはフラボノイド量の違いによるものではないと考えられ、*F3' H* の機能により抗酸化活性の高いフラボノイドが生合成されたことが推察される。

F3' H により B 環の 3' 位を水酸化されたフラボノイドは高い抗酸化活性を示すことが報告されている (文献 9)。このことと本研究結果から、ダイズ *F3' H* 遺伝子は珠皮のへそおよび胎座の液胞膜で発現し、蓄積するフラボノイドおよび組織の抗酸化活性に寄与することが推察された。近年、シロイヌナズナにおいてフラボノイドの過剰な蓄積により抗酸化活性と乾燥ストレス耐性が向上したとの報告がなされており (文献 10)、フラボノイドを利用したストレス耐性に関して、植物が共通のメカニズムを持つ可能性がある。今後、準同質遺伝子系統や得られた組換え体を用いてさらに解析を行う予定である。

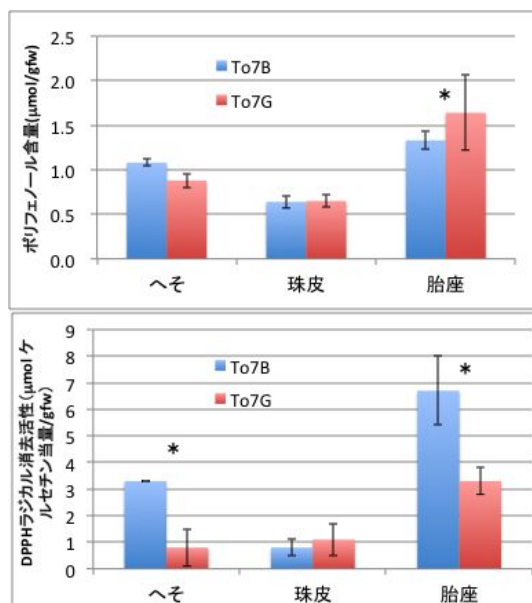


図 4 . To7B、To7G のへそ、珠皮 (へそを除く)、胎座のポリフェノール含量 (上) と抗酸化活性 (下)。* は Tukey の HSD テストにより系統間で値に有意な差があることを示す ($p < 0.05$)。

参考文献

1. Takahashi and Asanuma (1996) Crop Sci. 36, 559-562
2. Takahashi (1997) Crop Sci. 37, 1755-1759
3. Toda et al. (2002) Plant Mol. Biol. 50, 187-196
4. Toda et al. (2005) Crop Sci. 45: 2212-2217
5. Nagamatsu et al. (2009) J. Plant Physiol. 166, 32-39
6. Agati et al. (2009) Annal. Bot. 104, 853-861
7. 高木恭子、山田哲也、石本政男 (2012)

ダイズの形質転換プロトコール、形質転換
プロトコール(田部井豊編、化学同人)
40-57

8. Buer et al. (2013) Planta 238, 171-189
9. Rice-Evans et al. (1995) Free Radic. Res.
22, 375-383
10. Nakabayashi et al. (2014) Plant J. 77,
369-379

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 2件)

戸田恭子、黒岩晴子、Kalaiselvi Senthil、
嶋田典基、青木俊夫、綾部真一、嶋田勢
津子、作田正明、宮崎安将、高橋良二、
The soybean F3 H protein is localized
to the tonoplast in the seed coat hilum、
Planta、査読有、Vol 236、2012、79-89
DOI: 10.1007/s00425-012-1590-5

Felipe Rojas Rodas、Rodriguez Tito O、
村井良徳、岩科司他6名、戸田恭子、高
橋良二、Linkage mapping, molecular
cloning and functional analysis of
soybean gene Fg2 encoding flavonol
3-O-glucoside (1 6)

rhamnosyltransferase、Plant Mol Biol、
査読有、Vol 84、2014、287-300

DOI: 10.1007/s11103-013-0133-1

[学会発表](計 1件)

戸田恭子、黒岩晴子、Kalaiselvi Senthil、
高橋良二、Localization and possible role in
chilling tolerance of flavonoid

3'-hydroxylase in soybean、第27回国際
ポリフェノール会議2014名古屋(名古屋大学、
2014年9月2日-2014年9月6日)

[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]

ホームページ等

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 畑作物研究領域・主
任研究員

研究者番号: 10360447