

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580002

研究課題名(和文) ダイズ低温着色抵抗性品種が種皮着色全般に及ぼす抑制作用の解明

研究課題名(英文) Suppression of seed coat pigmented phenomena in yellow soybean cultivar being tolerant to cold-induced discoloration

研究代表者

千田 峰生 (Senda, Mineo)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：30261457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：黄ダイズは種皮着色が抑制されるために、黄色を呈する。ウイルス感染や低温により、本来は種皮着色されない黄ダイズが着色する現象があり、それぞれ「褐斑」や「低温着色」とよばれている。このような着色現象は黄ダイズ品質を大きく低下させる。本研究では低温着色抵抗性品種「トヨハルカ」が褐斑形成にも抵抗性を示すかどうかについて研究を行った。その結果、トヨハルカでは低温着色だけでなく、SMV褐斑形成程度にも明らかな軽減が見られ、重要な育種材料になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Yellow soybean shows yellow color due to suppression of seed coat pigmentation. Sometimes in the seed production of yellow soybean cultivars, seeds are pigmented by virus infections or low temperatures. These seed coat pigmentation phenomena, which reduce seed commodity value, are called "seed mottling" and "cold-induced discoloration (CD)", respectively. In this study, we investigated whether a highly CD-tolerant cultivar Toyoharuka is also tolerant to the seed mottling. As a result, cv. Toyoharuka was shown to diminish the extent of SMV seed mottling as well as CD, suggesting that cv. Toyoharuka can be a useful breeding material.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：黄ダイズ 種皮着色 CHS遺伝子 RNA干渉 ウイルス 褐斑 低温着色 抵抗性品種

1. 研究開始当初の背景

(1) ダイズ種子色は種皮の色に起因する。黒ダイズのような着色種子は種皮が黒く着色されて黒色を呈しているが中身の子葉は着色されず黄色のままである。それに対して栽培ダイズの大部分を占める黄ダイズは種皮着色が抑制されるため、黄色い子葉がうすく透けて黄色く見える。申請者らは黄ダイズが黄色い仕組み、すなわち種皮の着色抑制が色素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) によることを明らかにした (Senda *et al.* Plant Cell 2004)。RNAi とは転写後に mRNA が分解されることにより、標的遺伝子の発現が抑制される現象で標的遺伝子の二本鎖 RNA (dsRNA) が引き金になる。申請者らはさらに黄ダイズの種皮着色抑制遺伝子 (I 遺伝子) の候補領域を特定し、*GmIRCHS* (*Glycine max* inverted repeat of *CHS* pseudogene) と命名した (Kasai *et al.* Plant Mol. Biol. 2007)。 *GmIRCHS* の構造的特徴として、内在性遺伝子プロモーター配列下流に *CHS* 遺伝子の一部とその相補配列が逆位反復配列を形成している。つまり *GmIRCHS* が転写された場合、*CHS* 遺伝子の dsRNA が形成され、*CHS* 遺伝子の RNAi (*CHS* RNAi) を誘導することにより種皮着色を抑制する可能性が高い。

(2) 黄ダイズにおいて黄色い外観は重要な農業形質であり、もし黄ダイズが何らかの原因で全面もしくは部分的に着色されるような種皮着色が起きてしまった場合、黄ダイズの品質を大きく低下させ、農家に収入減をもたらす。このような黄ダイズの種皮着色粒はその原因により突然変異粒、褐斑粒、低温着色粒、の3つに大別される。申請者らの研究により、*CHS* RNAi の誘導阻害 (Kasai *et al.* Plant Mol. Biol. 2007) はウイルスが作り出すサプレッサーによる *CHS* RNAi の作用阻害 (Senda *et al.* Plant Cell 2004)、低温による *CHS* RNAi の作用阻害 (Kasai *et al.* Plant Cell Physiol. 2009) であることが明らかになった。つまりこれらの要因で *CHS* RNAi が阻害された結果、*CHS* 転写産物量が種皮着色される閾値 (着色閾値) を超え、種皮着色が起こる。

(3) 低温着色とは開花数日後に低温にさらされると黄ダイズのヘソ周辺が着色される現象で、その抵抗性品種である「トヨハルカ」が低温着色抵抗性検定により育成された。申請者らはトヨハルカの低温着色抵抗性のしくみを解明した。すなわち、トヨハルカでは低温着色の原因となる、低温による *CHS* RNAi の作用阻害が起きにくいことであった (Kasai *et al.* Plant Cell Physiol. 2009)。

2. 研究の目的

(1) トヨハルカは低温による *CHS* RNAi の作

用阻害、すなわち低温着色が起きにくい。ここで1つの可能性が考えられた。「トヨハルカは、ウイルスによる *CHS* RNAi 阻害、すなわち褐斑形成も起きにくいのではないか？」もしそうであればトヨハルカのような低温着色抵抗性ダイズは褐斑粒の発生を防止する上でも有効な育種材料になる。本研究では、低温着色抵抗性品種であるトヨハルカが褐斑抵抗性も有するかどうかを調査するとともに、その分子メカニズムを解明するのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 低温着色抵抗性が褐斑粒率及び褐斑程度にも影響を与えるかどうかを調査する。本研究では低温着色程度が大きく異なる品種、低温着色感受性のトヨムスメ及び低温着色抵抗性のトヨハルカを供試する。接種するウイルスはダイズモザイクウイルス (SMV) を用いる。その理由として、トヨムスメ、トヨハルカともに SMV に感染する抗体を用いて感染が確認できるダイズ種子に褐斑がはっきり現れるため、効果を比較しやすい等があげられる。

(2) 発芽後、本葉に SMV を接種し、病徴及び SMV 抗体を用いた ELISA により、感染を確認する。感染植物体を圃場に移植し、収穫種子について褐斑粒の発生頻度 (褐斑粒率) をカウントするとともに褐斑程度について比較調査を行う。褐斑程度の分類方法は高橋ら (1980) に従い、甚: 斑紋が粒面の 1/2 以上、中: 斑紋が粒面の 1/4 から 1/2、軽: 斑紋が粒面の 1/4 以下、微: ヘソ周辺がわずかに着色の4段階に分類する。

(3) トヨムスメとトヨハルカの健全植物体及び SMV 感染植物体のそれぞれから種皮 RNA を抽出する。*CHS* 遺伝子プローブを用いた RNA ゲルブロット分析により、*CHS* 転写産物量をそれぞれ定量し比較する。SMV が作り出すサプレッサーにより *CHS* RNAi が阻害されるため、トヨムスメとトヨハルカの SMV 感染植物体はいずれも健全植物体に比べ、*CHS* 転写産物量が増加する。もし、SMV 感染トヨハルカが SMV 感染トヨムスメに比べ、増加する *CHS* 転写産物量が抑制されるならば、*CHS* 転写産物量について、SMV 感染トヨハルカは SMV 感染トヨムスメよりも少ないはずである。本実験結果から、トヨハルカにおける褐斑形成抑制が *CHS* 転写産物量の増加抑制によるものかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) トヨムスメ (TM) およびトヨハルカ (TR) において SMV による褐斑粒率及び褐斑程度を比較した。その結果、低温着色抵抗性のトヨハルカでは明らかに褐斑粒率の低下が見られた。さらに褐斑程度についてもトヨムスメに比べ、明らかな軽減が見られた。次年度も

同様に調査したところ、類似した結果が得られた。以上のことから、トヨハルカはSMVによる褐斑症状を緩和することが示唆された。

(2) 低温着色抵抗性品種トヨハルカでなぜSMV褐斑症状が緩和されるのかについて、その分子機構を明らかにするための研究を行った。RNAゲルプロット分析によってCHS転写産物量を定量比較した結果、SMV感染トヨハルカ(TR SMV)はSMV感染トヨムスメ(TM SMV)に比較してCHS転写産物量が少ないことが明らかになった。このことから、トヨハルカにおけるSMV褐斑症状の緩和はCHS転写産物量の増加抑制による可能性が高い。つまり、トヨハルカではSMVに感染してもCHS転写産物量が着色閾値を超えるまで上昇しにくいために褐斑症状が現れにくい可能性が示唆された。

(3) トヨハルカにおけるCHS転写産物量の増加抑制について、以下の可能性が考えられた。すなわち「TR SMVではTM SMVよりもSMV量が少ないために、CHS RNAi 阻害がトヨムスメほど起こらない」という可能性である。この可能性を検証するため、TM SMV 及び TR SMV において、SMV コートタンパク質遺伝子(CP 遺伝子)の転写産物量に基づき、SMV 量を定量比較した。その結果、両者に有意な差は見られず、むしろTR SMVの方にSMV量の多い傾向が見られた。したがって、SMV感染トヨハルカではSMV量が少ないために褐斑症状が緩和される可能性は低いことが示唆された。

(4) トヨハルカにおけるCHS転写産物量の増加抑制について、別の可能性も考えられた。すなわち「トヨハルカではSMV サプレッサーによる作用がトヨムスメより小さいために、CHS RNAi 阻害がトヨムスメほど起こらない」という可能性である。この可能性を検証するため、CHS 転写産物量を TM SMV/TM 及び TR SMV/TR で算出して、上昇率を算出した。その結果、トヨムスメ及びトヨハルカでは上昇率に大きな違いはなく、SMV サプレッサーによるCHS RNAi 阻害効果は両品種間で変わらないことが示唆された。

(5) トヨハルカにおけるCHS転写産物量の増加抑制について、最後の可能性として「トヨハルカではもともとCHS転写産物量がトヨムスメよりも少ない」という可能性である。実際、トヨハルカではCHS転写産物量がトヨムスメよりも少ないことが明らかになった。以上のことから、トヨハルカでSMV褐斑症状が軽減される分子機構は次のように考えられた。すなわち、トヨハルカがSMVに感染した場合、もともとCHS転写産物量が少ないためにCHS RNAi 阻害を受けても、CHS転写産物量がトヨムスメほど増加しない。そのため、CHS転写産物量が着色閾値を超えるまで上昇しにくいためにSMV褐斑症状が現れにくい、つまり

SMV褐斑症状が緩和される。なぜトヨハルカはトヨムスメよりもCHS転写産物量が少ないのか?興味あることに、トヨハルカはトヨムスメのような黄ダイズ品種に比べ、*GmIRCHS*領域に構造多型が存在する(Kasai *et al.* Plant Cell Physiol. 2009; Ohnishi *et al.* 2011 Theor. Appl. Genet.)。今後は*GmIRCHS*領域に見られたトヨハルカの構造多型がどのようにしてCHS RNAiの作用を増強しているのか、すなわち「どのようにしてCHS転写産物量をより低下させているのか?」についてさらに詳細な解析が必要である。

(6) 本研究により、トヨハルカは低温着色抵抗性を有するだけでなく、SMVによる褐斑症状も緩和することが明らかとなり、ダイズ育種にとって重要な遺伝資源である。

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5件)

Uchiyama, T., S. Hiura, I. Ebinuma, M. Senda, T. Mikami, C. Martin and Y. Kishima (2013) A pair of transposons coordinately suppresses gene expression, independent of pathways mediated by siRNA in *Antirrhinum*. *New Phytologist* 197: 431-440 査読有
doi:10.1111/nph.12041.

Rodriguez, T.O., F.R. Rodas, M.E. Oyoo, M. Senda and R. Takahashi (2013) Inverted repeat of chalcone synthase 3 pseudogene is associated with seed coat discoloration in soybean. *Crop Science* 53: 518-523 査読有
doi:10.2135/cropsci2012.09.0540

Takagi, K., K. Nishizawa, A. Hirose, T. Kurauchi, M. Senda, C. Masuta and M. Ishimoto (2013) Seed coat pigmentation in transgenic soybean expressing the silencing suppressor 2b gene of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Cell Reports* 32: 1903-1912 査読有
doi:10.1007/s00299-013-1502-6

Senda, M., S. Nishimura, A. Kasai, S. Yumoto, Y. Takada, Y. Tanaka, S. Ohnishi and T. Kuroda (2013) Comparative analysis of the inverted repeat of a chalcone synthase pseudogene between yellow soybean and seed coat pigmented mutants. *Breeding Science* 63: 384-392 査読有
doi:10.1270/jsbbs.63.384

Yamaguchi, N., H. Yamazaki, S. Ohnishi, C. Suzuki, S. Hagihara, T. Miyoshi and M. Senda (2014) Method for selection of soybeans tolerant to seed cracking under chilling temperatures. *Breeding Science* 64: 103-108 査読有

doi:10.1270/jsbbs.64.103

〔学会発表〕(計 8 件)

石郷岡直人・湯本節三・菊池彰夫・杉本琢真・千田峰生 (2012) 黄ダイズ栽培集団から見出された鞍掛突然変異体の解析 第 7 回東北育種研究集会

千田峰生・大久保喜光・松本拓郎・佐野輝男・大西志全 (2013) 低温種皮着色抵抗性黄ダイズ品種トヨハルカは SMV 褐斑症状を緩和する、日本育種学会第 123 回講演会

千田峰生 (2013) 大豆の種皮着色抑制に関与する内因性 RNA サイレンシング、富山大学理学部生物学科セミナー

平岡未帆・佐野輝男・千田峰生 (2013) ダイズモザイクウイルスによるダイズ鞍掛品種の着色パターンの変化、第 8 回東北育種研究集会

千田峰生 (2014) ダイズが黄色くなる機構と低温による品質低下との関連 - 低温着色と低温裂開について - 市民公開シンポジウム「植物遺伝子科学の進歩と品種改良への新たな展開」

Rodriguez, T., F. Rojas, M. Oyoo, M. Senda and R. Takahashi (2014) Inverted Repeat of Chalcone Synthase 3 Pseudogene is associated to Seed Coat Discoloration in Soybean. 日本育種学会第 125 回講演会

佐藤孝誠・菊池彰夫・湯本節三・千田峰生 (2014) 黄ダイズ栽培集団中に見出された鞍掛突然変異体についての解析 . 鞍掛突然変異体と黄ダイズ間の F2 植物における鞍掛着色形質の分離について 第 9 回東北育種研究集会

平岡未帆・松澤めぐみ・川崎通夫・千田峰生 (2014) ダイズ種皮における CHS 遺伝子発現部位の組織学的解析 平成 25 年度 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会

〔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：
出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/gene/send/send.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・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：