

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07268

研究課題名(和文)黄ダイズ生産における着色粒の発生及びその低減・防止に関する研究

研究課題名(英文) Occurrence of pigmented seeds in yellow soybean production and application to its reduction/prevention

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： I/I 遺伝子型を有する黄ダイズについて、種皮着色突然変異による着色粒発生率は低いことが示唆された。 I/I 遺伝子型と Ic/Ic 遺伝子型をそれぞれ有する黄ダイズ間で、全面着色粒の混入率を比較調査したところ、Ic/Ic 遺伝子型の黄ダイズでは混入が見られず、I/I 遺伝子型の黄ダイズより着色粒発生率が低い可能性が示唆された。種皮着色突然変異による着色粒で頻繁に見られる裂皮がリグニン沈着によって起こる可能性が示唆された。種皮着色突然変異により生じ、全面着色粒を生産する i/i 遺伝子型のダイズ植物体を識別するDNAマーカーを開発した。

研究成果の概要(英文)： 1. In yellow soybean cultivar with the I/I genotype, the occurrence rate of pigmented seeds by the pigmented mutation was very low. 2. In yellow soybeans with the Ic/Ic genotype, the occurrence rate of pigmented seeds by the pigmented mutation may be lower than that in yellow soybeans with the I/I genotype. 3. Defective cracking frequently observed in the pigmented seed coats of the pigmented mutant was suggested to be due to lignin deposition. 4. A DNA marker to distinguish between the I/I genotype and the i/i genotype was developed.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：黄ダイズ 種子生産 種皮着色突然変異 着色粒 裂皮 リグニン I 遺伝子 DNAマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 黄ダイズ生産現場において、種皮が全面に着色した全面着色粒(以下、着色粒と省略)が見出されることがある。黄ダイズにおいて黄色い外観は重要な形質であり、黄ダイズとは異なる着色粒の混入は黄ダイズ品質を低下させるだけでなく、黄ダイズ品種の遺伝的均一性を損なう問題となる。したがって、黄ダイズ生産現場において、着色粒の発生を低減し、防止する技術が望まれる。白目の黄ダイズ(以下、黄ダイズと省略)は *I/I* 遺伝子型を有するのに対し、着色粒は *i/i* 遺伝子型である。これらの着色粒の発生は主に *I* 遺伝子から *i* 遺伝子への突然変異、すなわち種皮着色突然変異に起因する可能性が高い。

(2) 黄ダイズの種皮着色抑制はアントシアニンやプロアントシアニジン (PA) 生合成に重要なカルコンシンターゼ (CHS) をコードする遺伝子の RNA サイレンシング (CHS サイレンシング) による (Senda et al. 2004)。我々は *I* 遺伝子の候補領域を単離し、*GmIRCHS* (*Glycine max* inverted repeat of *CHS* pseudogene) と命名した (Kasai et al. 2007)。*GmIRCHS* は pseudoCHS 遺伝子 ($\Delta CHS3$) のインバーテッドリピート (IR) 構造を有しており、その転写産物は *CHS* 遺伝子の 2 本鎖 RNA を形成する (Kasai et al. 2007; Kurauchi et al. 2011)。このことから、*GmIRCHS* が CHS サイレンシングを誘導することによって、種皮着色が抑制され、黄ダイズになる可能性が示唆された。

(3) *GmIRCHS* の下流には *CHS* 遺伝子である *ICHS1* 遺伝子が存在し、クラスターを形成している (*GmIRCHS-ICHS1* 領域)。北海道や東北の黄ダイズ生産圃場から単離された着色粒について、発芽植物体から DNA を抽出し、*GmIRCHS-ICHS1* 領域について調査を行った。その結果、いずれも CHS サイレンシング誘導に重要と考えられる $\Delta CHS3$ IR 構造の消失が見出された (Kasai et al. 2007; Senda et al. 2013)。*GmIRCHS-ICHS1* 領域に起こる構造変異パターンは様々であったが、そのうち、 $\Delta CHS3$ と *ICHS1* 間の直列反復配列を介した相同組換えによる欠失変異が最も多くを占めた (Kasai et al. 2007; Senda et al. 2013)。

(4) 低温着色抵抗性を有する黄ダイズ品種「トヨハルカ」では *I* 遺伝子の候補領域である *GmIRCHS* に構造多型が見られる。つまり、通常の *GmIRCHS* では $\Delta CHS3$ が IR 構造であるのに対し、トヨハルカでは $\Delta CHS3$ が相補領域しか存在しない (Kasai et al. 2009)。トヨハルカが有する *I* 遺伝子を「*Ic* 遺伝子」と命名した。

2. 研究の目的

本研究では、黄ダイズ種子生産過程で見出される着色粒について、①黄ダイズ生産現場

における着色粒の混入率、②全面着色に至るまでの着色過程、③褐色種皮で頻繁に起こる裂皮の発生機構等を解明するとともに、我々が今まで明らかにしてきた研究成果も応用して、着色粒発生の低減・防止に役立てることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 黄ダイズ生産現場における着色粒混入率の調査

大規模・中規模の黄ダイズ生産現場では、着色粒の発生が普遍的に見られるが、実際にどれくらいの割合で着色粒が発生するかは明らかになっていない。本研究では青森県の実験圃場に協力を依頼し、着色粒の発生割合を調査する。青森県産業技術センター農林総合研究所内の原種生産圃場 (85m × 85m) で生産された黄ダイズ品種 (青森県奨励品種おおすず) に生じた着色粒を色彩選別機で選別した後、褐斑粒等の部分的な着色粒を取り除き、全面着色粒を選別する。全面着色粒数をカウントし、百粒重より換算した全生産粒数に占める全面着色粒数の割合を算出することにより着色粒混入率を調査する。

(2) *I/I* および *Ic/Ic* 遺伝子型を有する黄ダイズ間における着色粒混入率の比較調査

Ic/Ic 遺伝子型を有する黄ダイズでは、通常の黄ダイズ (*I/I* 遺伝子型) に比べて *GmIRCHS-ICHS1* 領域に構造差異が存在する。つまり $\Delta CHS3$ と *ICHS1* の直列反復配列が存在せず、*GmIRCHS* の欠失パターンの最も多くを占めた「直列反復配列を介した相同組換え」を起こさない可能性が考えられた。そのため、トヨハルカでは種皮着色突然変異が起きにくいことが期待される。本研究では *Ic/Ic* 遺伝子型を有する黄ダイズ (トヨハルカ、十育 260 号) において、着色粒混入率を調査して、*I/I* 遺伝子型を有する黄ダイズ品種 (ユキホマレ、とよみづき、トヨムスメ) と比較する。

(3) 着色粒における着色過程の組織学的観察

日本の黄ダイズ品種の多くはアントシアニン合成に必須な R 遺伝子を有していないため、発生する着色粒の種皮着色物質は PA であると考えられる。PA 染色剤である 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) を用いて、着色粒の生育段階における PA 蓄積過程を観察することにより、着色粒の着色過程を組織化学的に調査する。さらに *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、着色粒種皮における CHS 転写産物を種子形成過程で解析する。得られたデータを基に着色粒の種皮着色過程と CHS 転写産物との関連を種皮組織レベルで明らかにする。これにより着色粒がどのような過程を経て全面着色に至るかを解明する。用いる材料は申請者が長年研究に用いてきた黄ダイズ刈系 557 号 (K557) と

その種皮着色突然変異体 (K557M) である。

(4) 褐色粒種皮におけるリグニン沈着についての組織学的観察

日本の黄ダイズ品種の多くは *rrtt* 遺伝子型を有するため、種皮着色突然変異によって出現する着色粒は褐色粒である可能性が高い。褐色粒は裂皮が生じやすい易裂皮性であり、この易裂皮性が着色粒の更なる品質低下をもたらす。しかしながら、褐色種皮における易裂皮性のメカニズムは明らかになっていない。近年、リグニン沈着が細胞壁に影響を及ぼし、植物組織の物性を変化させることが報告されている。本研究では黄ダイズ種皮と褐色粒種皮間でフロログルシノール染色法による組織学的観察を行い、リグニン沈着について比較解析を行う。

4. 研究成果

(1) 青森県の黄ダイズ品種である「おおすず」の原生産圃場において、全生産粒に対する着色粒の混入率を調査した。その結果、平成27年度は濃い褐色の着色粒が0.0088%、薄い褐色の着色粒が0.003%であった。平成28年度、同様に調査したところ、濃い褐色の着色粒が0.0006%、薄い褐色の着色粒が0.0021%であった。いずれの年度においても着色粒の混入率は非常に低く、種皮着色突然変異率の小さいことが示唆された。

(2) *I* 遺伝子を有する黄ダイズ群 (ユキホマレ、とよみづき、トヨムスメ) と *Ic* 遺伝子を有する黄ダイズ群 (トヨハルカ、十育 260号) 間で着色粒の混入率について比較調査を行った。その結果、前者は0.04%であったのに対して、後者では着色粒の混入が見出されなかった。このことから、*Ic* 遺伝子を有する黄ダイズでは、種皮着色突然変異が起こりにくい可能性が示唆された。

(3) 黄ダイズ刈系 557号 (K557) 栽培集団から見出された種皮着色突然変異体 (K557M) を用いて、全面着色に至るまでの着色過程について、PA を青く染色する DMACA 染色により組織化学的な調査を行った。その結果、開花6日後には臍およびその周辺からPAの蓄積が始まり、開花15~18日後にはすでに種皮全面にPA蓄積することが明らかとなった。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてCHS転写産物を調査した結果、開花3日後にはすでに種皮全面にわたってCHS転写産物が確認された。

(4) K557Mの褐色種皮切片についてDMACA染色を行う過程で、リグニン沈着を検出するフロログルシノール染色を予備実験で行ったところ、予期せぬ結果が得られた。すなわち、DMACA染色で黄ダイズ種皮と褐色ダイズ種皮でPA蓄積に差が見られることは予測していたが、リグニン沈着にも明らかな差が観察さ

れた。実際、北海道の黄ダイズ品種トヨホマレ (TH) とその種皮着色突然変異体 (THM) 間で細胞壁組成成分を定量比較したところ、THMではTHの約3倍のリグニン含有量が検出された (図1)。褐色種皮における易裂皮性は1930年から報告されてきたものの、その原因は未だ明らかになっていなかった。細胞壁におけるリグニン沈着と植物組織の物性変化との関連が報告されており、易裂皮性との関連が示唆される。

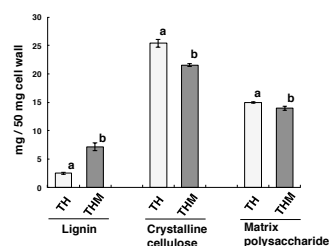


図1 黄ダイズ (TH) および褐色ダイズ (THM) の種皮における細胞壁組成成分の定量比較

つぎに種皮におけるリグニンの沈着部位について調査を行ったところ、柵状層と砂時計細胞層の境界部にリグニンが特異的に沈着していた (図2)。

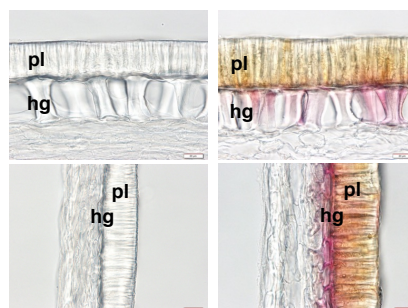


図2 黄ダイズ (TH) および褐色ダイズ (THM) 種皮におけるフロログルシノール染色を用いたリグニン沈着部位の特定
左: TH 右: THM pl: 柵状層 hg: 砂時計細胞層

また、開花後に長期間低温に曝されると種子背側が裂皮し、中身の子葉が剥き出し、裂開する「低温裂開粒」の発生についても種皮背側でのリグニン沈着の関与が示唆された。

(5) 黄ダイズ栽培集団において、*I* 遺伝子から *i* 遺伝子への突然変異が起き、*I/i* 遺伝子型を有する植物体が自殖することにより、*i/i* 遺伝子型のダイズ種子がつくられる。そして、その発芽植物体 (*i/i* 遺伝子型) が着色粒を産出する。種皮は親の組織由来であるため、種皮色は親の遺伝子型で決まる。つまりこの *i/i* 遺伝子型のダイズ種子は親の遺伝子型が *I/i* 遺伝子型であり、着色種子ではなく、黄ダイズ種子となる。そのため、種子色で除外することができない。これが黄ダイズ栽培集団で着色粒が混入する大きな原因であると考えられる。したがって、*i/i* 遺伝子型を有するダイズ植物体を検出するDNAマーカーが開発できれば、その植物体を除外する

ことよって着色粒発生の低減・防止に役立つ。本研究計画では、当初 *i* 遺伝子領域を検出する DNA マーカーの作製を目指したが、*I* から *i* への突然変異、すなわち *GmIRCHS-ICH1* 領域での構造変異パターンが様々であるため、*i* 遺伝子領域を共通して検出できる DNA マーカーの作製は困難であった。背景 (3) に前述したように、種皮着色突然変異体ではいずれも *GmIRCHS* 中の Δ *CHS3* IR 構造の消失が起きている。これを利用して、*GmIRCHS* 領域を特異的に増幅するプライマーセットを設計することにより、*I/I* 遺伝子型と *i/i* 遺伝子型のダイズ植物体を識別する DNA マーカーについて検討を行った。*GmIRCHS* には Δ *CHS3* IR が存在するため、*GmIRCHS* 領域全体を PCR 増幅することは難しい。そのため、図 3A のように *GmIRCHS* 領域を 2 つに分割してそれぞれ増幅するプライマーセット L (フォワードプライマー1&リバースプライマー2) とプライマーセット R (フォワードプライマー3&リバースプライマー4) を設計した。*I* 遺伝子領域を有する黄ダイズではプライマーセット L で 1.2kb、プライマーセット R で 1.3kb の DNA 断片がそれぞれ増幅する (図 3A)。本プライマーセットを用いて、*I/I* 遺伝子型を有する黄ダイズ品種エンレイ (En) およびその栽培集団から見出された *i/i* 遺伝子型を有する複数の種皮着色突然変異体 (EnM1-EnM7) で、PCR を行った。結果を図 3B に示す。プライマーセット R について、エンレイでは 1.3kb 断片が検出されたのに対して、EnM2 から EnM6 ではバンドが検出されなかった。しかしながら、EnM1 および EnM7 でエンレイと同じサイズのバンドが検出された。一方、プライマーセット L では、エンレイで 1.2kb 断片が検出されたのに対し、変異体についてはいずれもバンドが増幅しない、もしくは EnM1 のよう

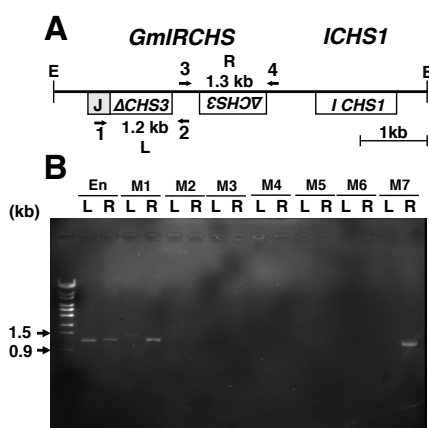


図3 黄ダイズ品種エンレイ (En) およびその種皮着色突然変異体 (M1-M7) における PCR 増幅パターン
A プライマー1, 2, 3, 4 の対合部位および予想される増幅サイズ (L: 1&2, R: 3&4)
B PCR 増幅パターン
サイズマーカー: λ DNA Sty I 分解物

に異なるサイズのバンドがわずかに増幅されるのみであった。以上のことから、プライマーセット L は *I/I* 遺伝子型と *i/i* 遺伝子型のダイズ植物体を識別する DNA マーカーとして有効である可能性が高い。今後はさらに多くの種皮着色突然変異体を供試し、プライマーセット L の有効性について調査する必要がある。

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 3 件)

① Senda, M., M. Kawasaki, M. Hiraoka, K. Yamashita, H. Maeda and N. Yamaguchi (2018) Occurrence and tolerance mechanisms of seed cracking under low temperatures in soybean (*Glycine max*). *Planta* (in press) 査読有
DOI 10.1007/s00425-018-2912-z

② Senda, M., N. Yamaguchi, M. Hiraoka, S. Kawada, R. Iiyoshi, K. Yamashita, T. Sonoki, H. Maeda and M. Kawasaki (2017) Accumulation of proanthocyanidins and/or lignin deposition in buff-pigmented soybean seed coats may lead to frequent defective cracking. *Planta* 245: 659-670 査読有 DOI 10.1007/s00425-016-2638-8

③ Yamaguchi, N., F. Taguchi-Shiobara, T. Sayama, T. Miyoshi, M. Kawasaki, M. Ishimoto and M. Senda (2015) Quantitative trait loci associated with tolerance to seed cracking under chilling temperature in soybean. *Crop Science* 55: 2100-2107 査読有 DOI 10.2135/cropsci2015.02.0081

[学会発表] (計 7 件)

① 千田峰生・川崎通夫・前多隼人・平岡未帆・山下一騎・萩原誠司・山口直矢 (2018) ダイズ低温裂開の発生機構およびその抵抗性機構について 日本育種学会第 133 回講演会

② 山下一騎・平岡未帆・千田峰生 (2017) ダイズの種皮におけるプロアントシアニン蓄積およびリグニン沈着の比較解析 平成 29 年度 日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会

③ 葦名熙公・押田和磨・齋藤生・千田峰生 (2017) 黄ダイズ栽培集団における全面着色粒の発生について 第 12 回東北育種研究集会

④ 千田峰生・山口直矢・平岡未帆・川田聡・飯吉亮太・山下一騎・園木和典・前多隼人・川崎通夫 (2017) ダイズ褐色種皮の易裂皮性に関する研究 日本育種学会第 131 回講演会

⑤ 山口直矢・山下一騎・平岡未帆・田口文緒・石本政男・川崎通夫・千田峰生 (2016) ダイズ低温裂開抵抗性に関わる QTLs についての研究. I. 準同質遺伝子系統間における裂開粒率および種皮プロアントシアニン蓄積の比較 日本育種学会第 129 回講演会

⑥ 川田聡・前多隼人・山口直矢・千田峰生 (2015) 黄ダイズおよびその種皮着色突然変異体における種皮プロアントシアニンの定量比較 平成 27 年度 日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会

⑦ 山下一騎・山口直矢・川崎通夫・千田峰生 (2015) ダイズ低温裂開抵抗性に関与する QTL についての研究－準同質遺伝子系統を用いた種皮プロアントシアニン蓄積の比較－ 平成 27 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：
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/sendu/sendu.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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

研究者番号：