

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450009

研究課題名(和文) 重複遺伝子を持つダイズフラボノイド代謝経路の転写因子を標的とした改変

研究課題名(英文) The modification of flavonoid metabolic pathway in soybean which is controlled with duplicated transcription factor genes as the targets.

研究代表者

穴井 豊昭 (Anai, Toyoaki)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：70261774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ダイズ種子中に含まれる機能性成分の一つであるイソフラボン類の代謝工学的改変を行うため、フラボノイド代謝に関与する酵素をコードする遺伝子の発現を制御するMYB転写因子を同定するための新たな技術の確立を目指した研究を行った。その結果、標的遺伝子の発現制御に関わる転写因子評価システムを開発し、ゲノム中に多数存在する転写因子のうち標的遺伝子の発現制御に関わる分子を特定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish a novel metabolic engineering approach to modify the key transcriptional factor, MYB, which coordinately regulate multiple target genes involved in the flavonoid metabolic pathway for modification of isoflavone content in soybean seed. As a result, we could develop a novel heterologous transcriptional factor evaluation system for target gene promoter via agr-infiltration system of *N. Benthamiana*, and achieved to identify the MYB gene that regulates a target, CHS7 gene expression.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：ダイズ イソフラボン MYB 転写制御 変異体

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドはポリフェノールの一種で、カルコン合成酵素 (CHS) の作用によって p-クマロイル CoA と三分子のマロニル CoA が縮合されたカルコンから派生した一群の二次代謝物である。これらにはアントシアニンを始めイソフラボンやカテキン等の化合物も含まれ、様々な糖と結合した配糖体も考慮すると植物界で数千種類ものバリエーションが存在することが知られている。これらは植物体内では花や果実、植物体の着色やファイトアレキシンの生成、ストレス耐性機構にも関与する他、マメ科植物では根粒菌とのシグナル物質としても重要な機能を果たしていることが明らかになっている。また、フラボノイドは一般的に試験管内で比較的強い抗酸化活性を持ち、ヒトが摂取した際にも様々な薬理効果を示すことから、近年、食品の機能性成分としても注目を集めている。このうちイソフラボン類の代謝経路はマメ科ソラマメ亜科とアヤメ科アヤメ属の一部のみに特異的に存在する 5-deoxy 型フラバノンであるリキリチゲニンを経由して一連の代謝経路によって生合成される。これらのイソフラボン類のうち、ダイズ子実中に含まれるゲニステインは弱いエストロゲン様作用を示すほか、ダイズインやそのアグリコンであるダイゼインには骨粗しょう症を予防する効果があることも知られており、ダイズのフラボノイド代謝経路の改変により、子実中のイソフラボン蓄積量を増加させる試みが進められてきた。しかしながら、これらの多くは遺伝子組換え技術を用いてフラボノイド代謝酵素の遺伝子を過剰発現もしくはサイレンシングさせたものやフラボノイド代謝経路の制御に関わる転写因子を過剰発現させたものであり、現状ですぐに実用に供するのは困難であると考えられる。

これに対して、我々はダイズを材料として、任意の標的遺伝子に突然変異を生じた系統を迅速に選抜することを目指して、4 万系統を超す突然変異体と TILLING 法を組み合わせた逆遺伝学的変異体スクリーニングシステムを構築しており、脂肪酸代謝経路の改変や開花期調節関連遺伝子変異体の単離等にも成功している。そこで本研究では、この手法を利用してダイズ子実中のイソフラボン含量の改変に利用できる新たな遺伝資源となりうる突然変異体の単離を目指す。

2. 研究の目的

本研究の対象となるイソフラボンを含むフラボノイド代謝経路は非常に複雑であるため、複数の代謝反応を協調的に制御する必要がある。加えて、ダイズは古 4 倍体由来の重複したゲノムを持つため、一つの代謝反応を触媒する酵素をコードする遺伝子も重複して存在しており、一つの酵素遺伝子に変異を導入しても劇的な効果は期待できないと考えられる。そこで、フラボノイド代謝の複

数のステップを触媒する酵素をコードする遺伝子の発現を協調的に制御している MYB 転写因子に変異が導入されたダイズ系統を単離し、一つもしくは少数の変異遺伝子によって代謝経路を大幅に変化させ、子実中のイソフラボン含量の変異を拡大した遺伝資源を得ることを最終的な目的としている。

しかしながら、ゲノム中に多数存在する MYB 転写因子のうち、種子中のフラボノイド生合成遺伝子群の発現調節に関与している分子種を発現パターンや構造のみから絞り込むことは困難であるため、はじめに標的となる MYB 転写因子を機能的に同定するための新規なアッセイ系を構築し、このアッセイ系により得られた標的遺伝子のダイズにおける機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

ダイズゲノム中に 665 コピー存在する MYB 転写因子ファミリーのうち、フラボノイド代謝経路に関与すると考えられる候補遺伝子の絞り込みを行うため、これらの MYB 転写因子ファミリーの分子系統樹を作製し、他の植物種でフラボノイド代謝経路の制御に関与していると報告された遺伝子との類似性による絞り込みを行った。また、登熟中の異なる時期のダイズ子実から抽出された mRNA を鋳型としてプローブを調整し、DNA チップ解析装置を用いて、種子中のイソフラボンの蓄積と同調的に発現している候補遺伝子を更に絞り込んだ。

さらに、得られた候補遺伝子について、特異的なプライマーを用いた qRT-PCR 法による発現解析を行い、発現パターンの確認を行った。また、MYB 転写因子の標的特異性を検証するための新規アッセイ系として、フラボノイド代謝経路中で MYB により発現制御を受ける代謝酵素の一つである CHS 遺伝子のプロモーターと GUS レポーター遺伝子を融合させたキメラ遺伝子を組み込んだ *N.benthamiana* 系統を作成した。

これと並行して、発現パターンの解析によって絞り込みを行った候補 MYB 遺伝子のコード領域をミヤコグサ由来のコピキチンプロモーター下流に結合したバイナリーベクターを作成し、アグロバクテリウム EHA105 株に導入したものを先に作成した組換え *N.benthamiana* 系統の緑葉にアグロインフィルトレーション法を用いて感染させ、X-Gluc を基質とした組織科学的染色によって、GUS 活性を検出した。

4. 研究成果

ダイズ品種「フクユタカ」を用いて登熟中の種子におけるイソフラボン類の蓄積パターンを解析したところ、開花後 40 日目から急激に蓄積量が増加することが明らかになった。そこで、ゲノム中に存在する 600 個以上の MYB 遺伝子の中から、塩基配列情報に

基づいた構造解析と DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現パターンの解析により、一次候補遺伝子を約 50 個まで絞り込むことができた。さらに、qRT-PCR 法により、このうち約 20 個の遺伝子について、発現のタイミングが一致していることが確認され、このうちでも発現量が高かった 7 個の遺伝子を二次候補遺伝子とした。

CHS8-Pro::GUS 遺伝子を組み込んだ *N.benthamiana* 系統を作成し、この植物体に対して、以前にダイズのフラボノイド代謝経路の調節に関する報告がある MYB176 遺伝子を組み込んだ、バイナリーベクターを保持するアグロバクテリウム株を、アグロインフィルトレーション法によって感染させたところ、48 時間後の葉片で GUS 活性による青色色素の生産が確認された。この結果より、本研究で作成したアッセイ系を用いることにより、CHS8 プロモーターを活性化する転写因子の同定が可能となった。

しかしながら、本研究で絞り込みを行った 7 個の遺伝子についての活性評価については、現在も研究を継続中であり、新規の変異体の作成には至らなかった。

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 5 件)

M. Tsuda, A. Kaga, T. Anai, T. Shimizu, T. Sayama, K. Takagi, K. Machita, S. Watanabe, M. Nishimura, N. Yamada, S. Mori, H. Sasaki, H. Kanamori, Y. Katayose, M. Ishimoto, 2015 年

Construction of a high-density mutant library in soybean and development of a mutant retrieval method using amplicon sequencing.

BMC Genomics, 16, 1014 査読有

M. Nagata, N. Yamamoto, T. Shigeyama, Y. Terasawa, T. Anai, T. Sakai, S. Inada, S. Arima, A.M. Hirsch, A. Suzuki, 2015 年

Red/far red light controls arbuscular mycorrhizal colonization via jasmonic acid and strigolactone signaling

Plant and Cell Physiology, 56, 11, 2100-2109 査読有

D. Cao, Y. Li, S. Lu, J. Wang, H. Nan, X. Li, D. Shi, C. Fang, H. Zhai, X. Yuan, T. Anai, Z. Xia, B. Liu and F. Kong, 2015 年

GmCOL1a and GmCOL1b function as flowering repressor in soybean under long-day conditions.

Plant and Cell Physiol, 56, 12, 2409-2422 査読有

F. Yan, S. Di, F. R. Rodas, T. R. Torrico, Y. Murai, T. Iwashina, T. Anai, R. Takahashi, 2014 年

Allelic variation of soybean flower color gene W4 encoding dihydroflavonol 4-reductase 2

BMC Plant Biology, 14: 58 査読有

T. Hoshino, S. Watanabe, Y. Takagi, T. Anai, 2014 年

A novel GmFAD3-2a mutant allele developed through TILLING reduces

-linolenic acid content in soybean seed oil

Breeding Science 64: 371-377 査読有

[学会発表](計 1 件)

弥吉俊樹、渡邊啓史、穴井豊昭、2015 年 8 月 27 日

ダイズのイソフラボン生合成を制御する MYB 転写因子の探索

第 10 回 九州育種談話会 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

[図書](計 1 件)

T. Anai, 2015 年

Mutant-Based Reverse Genetics for Functional Genomics of Non-model Crops, pp 473-487

J. M. Al-Khayri, S. M. Jain, D. V. Johnson 編

Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools, Springer International Publishing AG

[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

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

穴井 豊昭 (ANAI , Toyoaki)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号 : 70261774

(2)研究分担者

渡邊 啓史 (WATANABE , Satoshi)

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号 : 40425541

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号 :