

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02960

研究課題名(和文)ダイズにおけるフラン脂肪酸生合成経路の解明とその農業特性に与える影響に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the furan fatty acid biosynthesis pathway in soybean and its effect on agronomic performance.

研究代表者

穴井 豊昭 (Anai, Toyoaki)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：70261774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ダイズ低フラン脂肪酸突然変異体を用いて、ダイズ油脂中に含まれるフラン脂肪酸の生合成に関与する遺伝子の同定を試み、2種類の原因遺伝子を特定した。このうち1つの遺伝子は、ラン藻のフラン酸合成経路では2段階に異なる酵素が触媒する反応を1分子で触媒できる構造を持つ酵素がコードされていた。また、毛状根形質転換系を用いた過剰発現の結果、得られた2種類の遺伝子は単独でもフラン脂肪酸を合成する活性を示したが、共発現することで相乗的な効果を示した。また、この変異遺伝子を導入したダイズ系統の生育や収量に負の影響は認められず、得られたダイズ油脂からの明所臭の発生もほとんど検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラン脂肪酸は脂肪酸の構造内にフラン環を有する脂肪酸で、様々な生物種に分布しており、活性酸素除去等に関わっている可能性が示唆されているが、その生合成経路はラン藻の一種で報告があるのみで、植物では全く明らかにされていなかった。一方で、フラン脂肪酸はダイズ油脂中にも含まれているが、油脂への光照射の際にフラン脂肪酸の分解により生じる不快臭である「明所臭」の除去が極めて重要な課題となっていた。そこで、ダイズのフラン脂肪酸合成遺伝子が同定され、油脂中にフラン脂肪酸を蓄積しないダイズが実現すれば、植物におけるフラン脂肪酸の合成経路の解明に加え、ダイズ油脂の商業的価値の向上にも大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have identified two soybean genes (Glyma.04G054100 and Glyma.20G201400) that play a role in producing furan fatty acids from four low furan fatty acid soybean mutants. We also found that one of the genes (Glyma.20G201400) encodes a fusion enzyme that can catalyze a reaction typically requiring two different enzymes in the cyanobacterial pathway. When we over-expressed these genes using a hairy root system, we observed that they could synthesize furan fatty acids independently, but their co-expression had a synergistic effect. Interestingly, the soybean lines carrying the low furan fatty acid mutant gene did not experience any negative effect on their growth or yield, and we could not observe any unpleasant odor when that soybean oil was exposed to light.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：ダイズ 突然変異体 フラン脂肪酸 明所臭

1. 研究開始当初の背景

ダイズ油脂は、全世界で消費されている植物油脂のうち約 30%を占めており、比較的安価で生産量が安定していることから、食用油や調理油のほか、マーガリンやショートニング等の原料油としても重要な役割を果たしている。一般的なダイズ油脂は、パーム油やキャノーラ油と比較すると空気酸化し易く、PUFAs の酸化により「酸敗臭」と呼ばれる不快な臭気が発生することが知られていた。そのため、近年では、ダイズ油脂中に含まれる PUFAs の含量を、育種によって減少させる取り組みが進められている。これらの PUFAs のうちリノール酸は、ダイズ細胞内に存在するリポキシゲナーゼの作用で分解され「青臭み」の原因となる *n*-ヘキサナールを生成することも知られており、PUFAs 含量を減らす育種は、この臭気の原因を軽減させるために有効であった。しかしながら、これらの不快臭に加え、ダイズ油脂は光照射により、前述の「酸敗臭」や「青臭み」とは異なる「明所臭」と呼ばれる枯草様の臭気が発生させることも知られており、この原因物質の本体が 3-ヒドロキシ-3-メチル-2,4-ノナンジオンであり、ダイズ油脂中に 0.3%程度含まれているフラン脂肪酸の光酸化によって、非酵素的に生成されることが報告されていた。このフラン脂肪酸は、脂肪酸の構造内にフラン環を有する脂肪酸で、魚類に含まれる特殊な脂肪酸として発見され、その後、藻類や植物にも存在することが明らかになった。一方で、フラン脂肪酸は非常に不安定な化学物質であり、植物中での生合成経路やこれに関与する酵素をコードする遺伝子の同定はもとより、植物体におけるフラン脂肪酸の生理的機能やダイズの農業形質に与える影響は全く明らかにされていなかった。また、我々の先行研究の結果、156 系統のダイズミニコアコレクションや 98 系統のツルマメリサーチセット中にはフラン脂肪酸含量に多様性はあるものの、全く合成出来ない系統は認められず、我々が調査したダイズやその祖先のツルマメでは種子中にフラン脂肪酸を蓄積することが明らかになった。更に我々は、以前我々が開発したダイズ突然変異体ライブラリーから、種子中のフラン脂肪酸蓄積量が極めて少ない突然変異体を 4 系統単離することに成功していた。

2. 研究の目的

本研究では、ダイズ油脂における明所臭発生の原因となっている種子でのフラン脂肪酸合成に関与する遺伝子を特定し、その機能を明らかにするとともに、我々が単離した低フラン脂肪酸突然変異系統が、ダイズの明所臭の低減に資する低フラン脂肪酸遺伝資源としてダイズ育種に利用可能であるかを評価することを目的としている。

そこで、はじめに、我々が開発したフクユタカ由来の低フラン脂肪酸ダイズ突然変異体とトヨシロメを交配して F2 集団を作成し、これを利用して変異遺伝子のマッピングを行い、それぞれの変異体の持つ原因遺伝子を特定する。さらに、本来はフラン脂肪酸をほとんど蓄積しないダイズ毛状根の形質転換系を用いて、得られた候補遺伝子を毛状根中で過剰発現させ、これらの候補遺伝子がコードするタンパク質の機能を解析し、種子中でのフラン脂肪酸生合成経路およびその蓄積機構を解明する。また、すでに本研究室で育成している高オレイン酸・低リノレン酸ダイズ系統とこれらの低フラン脂肪酸突然変異系統を交配し、これらの変異遺伝子を組み込んだ新たな系統を作成

する。こうして本研究で作成した系統と親系統を圃場で栽培し、これらの変異遺伝子がダイズ種子中のフラン脂肪酸含量に与える効果を検証するとともに、これらのダイズ個体の生育や種子収量等の農業形質に与える影響を調査する。加えて、フラン脂肪酸含量を低下させた系統の種子から試験的に搾油および精製を行い、得られた油脂の酸化安定性試験や劣化試験、明所臭の発生試験等を行うことで、これらのフラン脂肪酸変異遺伝子がダイズ油脂の品質改善と明所臭低減のための育種素材としての利用価値についても評価する。

3. 研究の方法

原因遺伝子のマッピングには、フクユタカ突然変異体集団から得られた低フラン酸系統とトヨシロメの交配によって得られた F2 個体から抽出した DNA と脂肪酸分析用の F3 種子を用いた。ダイズ油脂の抽出には、ダイズ種子 5 粒をマルチピースショッカーで粉碎し、種子粉末からヘキサンを用いて油分を抽出・乾固した後、得られたダイズ油脂をメチル化して、GC/MS を用いてフラン脂肪酸の検出および定量を行った。初めに、既知の DNA マーカーを用いた連鎖分析を行い、変異遺伝子が座乗する染色体領域を決定した。その結果、第 4 番染色体上に変異が生じたと考えられた #129 系統と第 20 番染色体上に変異が生じたと考えられた #65 系統の 2 系統について、次世代シーケンサーを用いた解析を行い、原因遺伝子の同定を行った。これらの変異遺伝子産物の機能を検証するため、ダイズの毛状根形質転換系を用いて、RNAi と過剰発現用ベクターを導入した際の毛状根のフラン脂肪酸蓄積量の変化について調査を行った。

本研究で得られた低フラン脂肪酸突然変異遺伝子の育種素材としての評価を行うため、フラン脂肪酸がほとんど合成されなくなった #65 系統と高オレイン酸かつ低リノレン酸含量のダイズ育成系統（高オレイン酸・低リノレン酸 5 遺伝子集積系統）を交配し、低フラン脂肪酸・高オレイン酸・低リノレン酸含量の新たな系統（低フラン脂肪酸・高オレイン酸・低リノレン酸 6 遺伝子集積系統）を育成した。これらの系統を圃場で栽培し、種子収量を含む主要な農業形質に対する低フラン脂肪酸変異遺伝子の影響を評価した。また、得られた種子から油分をヘキサン抽出し、脱ガム、脱酸、脱色、脱臭した精製油を用いて、油脂の酸化安定性や明所臭の発生についての評価を行った。

4. 研究成果

GCMS を用いたスクリーニングの結果得られた、種子中のフラン脂肪酸含量が極めて少ない 4 系統の突然変異体（#65 系統、#253 系統、#279 系統および #693 系統）について、原因遺伝子のマッピングを行ったところ、#279 系統では Glyma.04G054100 遺伝子に、#65、#253 および #693 系統では Glyma.20G201400 遺伝子にアミノ酸置換が生じており、これらの変異によってフラン脂肪酸の生合成ができなくなった可能性が示唆された。また、これらの遺伝子のうち Glyma.04G054100 遺伝子は、ラン藻のフラン脂肪酸合成に関与する RSP_2144 遺伝子と、Glyma.20G201400 遺伝子は C 末端付近が RSP_2144 遺伝子、N 末端付近が同じくラン藻のフラン脂肪酸合成の異なるステップに関与する RSP_1091 遺伝子の構造と類似した構造を持つことが明らかになり、Glyma.20G201400 遺伝子産物はラン藻では 2 段階の反応を 1 分子で触媒できる可能性が示唆された。

そこで、これらの野生型遺伝子を単独もしくは同時にダイズ毛状根中に導入し、フラン脂肪酸の蓄積量に対する効果を評価したところ、Glyma.04G054100 遺伝子より、Glyma.20G201400 遺伝子の効果が高く、両遺伝子を同時に発現させた場合に相乗効果が観

察されることも明らかになり、これらの遺伝子産物が直接フラン脂肪酸合成に関与することが証明された。

さらに、#65 系統の変異遺伝子を導入し新たに作成した 6 遺伝子集積系統を圃場で栽培し、フラン脂肪酸の農業形質に及ぼす効果を評価したところ、低フラン脂肪酸化による悪影響は観察されなかった。また、この系統の種子から得られた油脂についての評価を行ったところ、明所臭の発生は認められず、本低フラン脂肪酸突然変異体の育種素材としての有用性も明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hoshino Tomoki, Iijima Nobushige, Hata Masakazu, Watanabe Anri, Kawakami Tamae, Anai Toyoaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Molecular characterization of high stearic acid soybean mutants and post-transcriptional control of GmSACPD genes in the mutant with a single nucleotide deletion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Gene	6. 最初と最後の頁 100207 ~ 100207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plgene.2019.100207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Agarie Sakae, Umemoto Makiko, Sunagawa Haruki, Anai Toyoaki, Cushman John C.	4. 巻 23
2. 論文標題 An <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation via organogenesis regeneration of a facultative CAM plant, the common ice plant <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Production Science	6. 最初と最後の頁 343 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1343943X.2020.1730700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kato Shin, Yokota Yuko, Suzuki Rintaro, Fujisawa Yukiko, Sayama Takashi, Kaga Akito, Anai Toyoaki, Komatsu Kunihiro, Oki Nobuhiko, Kikuchi Akio, Ishimoto Masao	4. 巻 133
2. 論文標題 Identification of a cytochrome P450 hydroxylase, CYP81E22, as a causative gene for the high sensitivity of soybean to herbicide bentazon	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 2105 ~ 2115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00122-020-03580-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sarkar Md. Abdur Rauf, Otsu Wakana, Suzuki Akihiro, Hashimoto Fumio, Anai Toyoaki, Watanabe Satoshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Single-base deletion in <i>GmCHR5</i>; increases the genistein-to-daidzein ratio in soybean seed	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 265 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Akiko, Matsunaga Ken-ichiro, Anai Toyoaki, Kawano Hitoshi, Ueda Toshihisa, Matsumoto Toshihiko, Ando Shoji	4. 巻 27
2. 論文標題 Characterization of an Intermediate Filament Protein from the Platyhelminth, <i>Dugesia japonica</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein & Peptide Letters	6. 最初と最後の頁 432 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929866526666191025102902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Anai Toyoaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Development of soybean mutant resources and identification of novel mutant alleles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Research	6. 最初と最後の頁 174 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbr.20J18	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Anai Toyoaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Improvement of soybean seed oil quality using fatty acid mutants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	6. 最初と最後の頁 47 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/nskkk.NSKKK-D-22-00056	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大曲 絢子、山田 梨裳、江頭 燦実華、海口 直弥、高濱 宏郁、元丸 潤郁、松本 茜、駿河 奈那美、木村 裕太、牧田 成人、岡本 裕樹、岡部 遼、佐野 貴志、佐藤 俊郎、鈴木 基孝、齋藤 三四郎、穴井 豊昭、渡邊 啓史
2. 発表標題 ダイズ油脂に含まれるフラン酸合成に関与する遺伝子の同定と利用
3. 学会等名 日本育種学会 第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田梨裳, 前田朱里, 堀谷正樹, 穴井豊昭, 渡邊啓史
2. 発表標題 ダイズ種子中のイソフラボン合成に関するQTL、qMGIy-11の責任遺伝子の同定
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 穴井豊昭
2. 発表標題 突然変異体を用いたダイズ油脂成分の改変
3. 学会等名 日本食品工学会 第68回大会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穴井豊昭
2. 発表標題 代替肉素材としてのダイズの 有用性と望まれる特性
3. 学会等名 令和3年度 日本栄養・食糧学会 九州・沖縄支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 北柴 大泰、西尾 剛	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 340
3. 書名 植物育種学 第5版	

1. 著者名 小泉 望、加藤 晃	4. 発行年 2023年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 184
3. 書名 植物バイオテクノロジーでめざすSDGs	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 低フラン酸ダイズ	発明者 穴井豊昭、渡邊啓史、牧田成人、岡部遼、荒井尚志、肥山	権利者 国立大学法人 佐賀大学、株式会社 J-オイル
産業財産権の種類、番号 特許、2021-007795	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 SOYBEANS HAVING LOW FURANIC ACID CONTENT	発明者 穴井豊昭、渡邊啓史、牧田成人、岡部遼、荒井尚志、肥山	権利者 国立大学法人 佐賀大学、株式会社 J-オイル
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2022/158583 A1	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 啓史 (WATANABE SATOSHI) (40425541)	佐賀大学・農学部・准教授 (17201)	
研究分担者	鈴木 章弘 (SUZUKI AKIHIRO) (50305108)	佐賀大学・農学部・教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------