

研究種目	： 基盤研究(B)
研究期間	： 2007～2009
課題番号	： 19380001
研究課題名(和文)	アルファトコフェロール、ルテイン等を集積した高機能ダイズの開発
研究課題名(英文)	Development of functional soybeans containing $\alpha$ -tocopherol, lutein and so on.
研究代表者	
	喜多村 啓介(KITAMURA KEISUKE)
	北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号	: 50111240

研究成果の概要 (和文) : ダイズはビタミンE活性が高い $\alpha$ -トコフェロール (以下、 $\alpha$ -Toc) 、眼の主要な疾病である加齢性網膜黄斑変性症等にかかる危険性を低減するルテインの含有量が低い。ダイズの変異品種 (「Keszthelyi A.S」、以下「KAS」) に見出した高 $\alpha$ -Toc 形質を完全に識別できる DNA マーカーを開発した。また野生ダイズであるツルマメ数系統に高ルテイン形質を認め、本形質が子葉に由来すること、および選抜マーカーの開発が可能であることを示した。実際に、高 $\alpha$ -Toc の「KAS」と高ルテインツルマメ系統の交配後代に、両成分が高い系統が出現することを示した。また、高リノレン酸形質の選抜マーカーの開発が可能であることを示した。

研究成果の概要 (英文) : Soybean seeds contain low levels of  $\alpha$ -tocopherol (Toc). Since  $\alpha$ -Toc acts as vitamin E efficiently , increasing  $\alpha$ -Toc content will improve nutritional value of soybean. Lutein shown to reduce risks for ocular diseases is found in low in the seeds. We have identified varieties with high  $\alpha$ -Toc and wild soybean strains with high levels of lutein content. Genetic analysis of the high  $\alpha$ -Toc and lutein traits, respectively, revealed that the high  $\alpha$ -Toc and lutein contents are highly heritable. Two SSR markers, Sat\_243 and Sat\_167 were shown to be associated with high  $\alpha$ -Toc content. We obtained some lines with high levels of lutein and  $\alpha$ -Toc contents in the progenies. Accumulation of high contents of  $\alpha$ -Toc and lutein was possible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：ダイズ、 $\alpha$ -トコフェロール、ルテイン、リノレン酸、高機能性

### 1. 研究開始当初の背景

(1) イソフラボン、サポニンなどの機能性成分に加え、ダイズはビタミンE活性をもつトコフェロール（以下、Toc）、眼の主要な疾病である加齢性網膜黄斑変性症や白内障にかかる危険性を低減するルテイン、また脳・神経機能にとって重要な成分であるリノレン酸などの脂溶性の機能性成分を含むが、それらの含有量が低い。

(2) 最近、これらの機能性成分を対象にわが国の遺伝資源に保存されている多数のダイズ品種や野生ダイズ（ツルマメ）系統の検索を行うことにより、これらの成分の含量や組成の改変につながる有用な遺伝変異を見出すことに成功した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)  $\alpha$ -Toc、ルテインおよびリノレン酸の高含量形質の遺伝的特性を明らかにするとともに、QTL解析を行って各形質の選抜マーカーを開発する。(2)  $\alpha$ -Toc含量、ルテイン含量およびリノレン酸の高含量形質を支配する遺伝要因を集積し、これらの機能性成分を集積することが可能かどうかを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) 「いちひめ」( $\alpha$ -Toc<10%)と「KAS」( $\alpha$ -Toc 20-30%)との交配後代種子を用いた。F<sub>2</sub>種子は半粒法で、F<sub>2</sub>個体(F<sub>3</sub>種子)および単粒系統法によって養成したF<sub>5</sub>世代(F<sub>6</sub>種子)は、バルク法でHPLCによって $\alpha$ -Toc含有量を分析した。公開されたダイズのコンセンサス連鎖地図からゲノムの全体をカバー

できるようにSSRマーカーを選び、「いちひめ」と「KAS」間における多型の有無を調査した。多型が確認されたSSRマーカーにおいて、「いちひめ」x「KAS」のF<sub>2</sub>134個体の遺伝子型を決定した。得られた多型情報から、MapManager QTXを用い、マーカーの連鎖地図を作成した。QTL解析は区間マッピング法により行った。

(2) ツルマメに同定した高ルテイン形質の遺伝解析を行うためダイズ品種x高ルテインツルマメ系統との3つの交雑組合せによる分離集団を用いた。F<sub>2</sub>種子は半粒法で、F<sub>2</sub>個体(F<sub>3</sub>種子)および組換え自殖系統RILは、バルク法でHPLCによりルテイン含量を分析した。高ルテイン含量形質のQTL解析は、ダイズのコンセンサス連鎖地図の染色体数20に対応する20連鎖群を網羅するように選抜した355個のSSRマーカーを用いて行った。高ルテインツルマメ系統の成分的特性およびその作用機序の解析は、高ルテインツルマメ系統の「GD50344」、「B09092」と「B01167」およびダイズ品種「トヨムスメ」、ダイズ系統の「十育241」と「TK780」を供試材料とし、これらの未熟種子から全RNAを抽出し、定量RT-PCRによるルテイン生合成関連遺伝子の発現解析を行った。

(3) 高 $\alpha$ -Toc含量のダイズ品種「KAS」を母親、高ルテイン含量のツルマメ系統「B09092」を父親として交配し、F<sub>1</sub>個体をガラス温室にて養成し、2006年4月に210粒のF<sub>2</sub>種子を収穫した。ビニールハウスにてF<sub>2</sub>194個体を養成し、F<sub>2</sub>個体別にF<sub>3</sub>種子を採取した。

トコフェロールおよびルテインの抽出を行い、溶出液組成と吸収波長を操作し、HPLCにより両成分を定量分析した。収穫した F<sub>2</sub> 種子 125 粒各粒の一部 (5~10mg) を削って、 $\alpha$ -Toc 含量およびルテイン含量を分析した。この中から、両成分がともに高い F<sub>2</sub> 種子を選抜し、F<sub>2</sub> 系統を養成し、各個体から F<sub>3</sub> 種子を採取した。個体あたり F<sub>3</sub> 種子 10 粒をバルクで粉碎し、各 F<sub>2</sub> 個体 (F<sub>3</sub> 種子) の  $\alpha$ -Toc 含量およびルテイン含量を調査した。高  $\alpha$ -Toc 含量・高ルテイン含量 F<sub>2</sub> 個体 (5 系統) を一回親とし、高  $\alpha$ -Toc 含量のダイズ品種「KAS」を反復親として戻し交配を行った。

(4) 高脂質含量・低リノレン酸含有率形質を示すダイズ系統「TK780」と低脂質含量・高リノレン酸含有率形質を示すツルマメ「B01167」の交雑から F<sub>2</sub> および 96 系統から成る組換え自殖系統 RIL 集団を用いて遺伝解析および QTL 解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ダイズ品種「KAS」の高  $\alpha$ -Toc 形質

##### ①高 $\alpha$ -Toc 形質の遺伝解析および QTL 解析

F<sub>2</sub> 種子の  $\alpha$ -Toc 含有率とその F<sub>2</sub> 種子由来の F<sub>2</sub> 個体に着生した F<sub>3</sub> 種子の  $\alpha$ -Toc 含有率との間に強い相関関係 ( $R=0.545$ ,  $P<0.05$ ) が見られた。また、F<sub>2</sub> 種子における広義の遺伝率は 0.645 であり、高  $\alpha$ -Toc 含有率形質は後代に強く遺伝することが示された。「いちひめ」と「KAS」の間に明瞭な多型が確認された 172 個の SSR マーカーの中から、ダイズの 20 連鎖群をカバーする 144 個のマーカーを選び、F<sub>2</sub> 個体の遺伝子型決定に用いた。連鎖地図を作成したところ、マーカー間の地図距離の平均が 23.0cM、全長 3412.8cM の連鎖地図が作成された。F<sub>2</sub> 種子および F<sub>2</sub> 個体の両世代で共通の QTL が Sat\_167 と Sat\_243 (連鎖群 K) の間

で検出された。F<sub>2</sub> 種子を用いた QTL 解析では LOD 値 19.48、寄与率 48.8%であった。一方、F<sub>2</sub> 個体を用いた QTL 解析では LOD 値 18.97、寄与率 51.8%であった。

##### ②詳細マッピングおよび候補遺伝子の解析

SSR マーカーに加え EST 情報由来の SSR マーカーの遺伝子型も調査した。SSR マーカー遺伝子型と  $\alpha$ -Toc 含有率との関連性から、候補遺伝子は KSC138-10 および KSC138-9 の間にあることが示唆された。また、 $\alpha$ -Toc 含有率と KSC138-22 マーカーの遺伝子型が一致し、 $\alpha$ -Toc 含有率を制御する遺伝子は KSC138-22 の近傍に存在すると考えられた。KSC138-10 と KSC138-9 間の領域は約 75 kbp のゲノム領域に相当し、Phytozome 情報よりシロイヌナズナ遺伝子とのアノテーションより 10 個の遺伝子が存在すると推定された。そのうち、シロイヌナズナの *VTE4* に相同性が高い Glyma09g35680.1 が存在した。*VTE4* は  $\gamma$ -Toc を  $\alpha$ -Toc に転換する  $\gamma$ -Toc メチルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -TMT) をコードしていることから、Glyma09g35680.1 の塩基配列と  $\alpha$ -Toc 含有率との関連性を調査した。「いちひめ」および「KAS」における Glyma09g35680.1 ゲノム領域の塩基配列を決定した。イントロン部位に塩基置換あるいは塩基挿入が複数存在した。両種における Glyma09g35680.1 翻訳領域を解析し、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を推測した。翻訳領域に 4 つの塩基置換が生じ、そのうち 2 つはアミノ酸置換につながる非同義置換であった。しかし、他の普通品種と高  $\alpha$ -Toc ダイズの塩基配列と比較したところ、非同義置換による酵素タンパク質活性の変化は  $\alpha$ -Toc 含有率に関連する可能性は低いと考えられた。

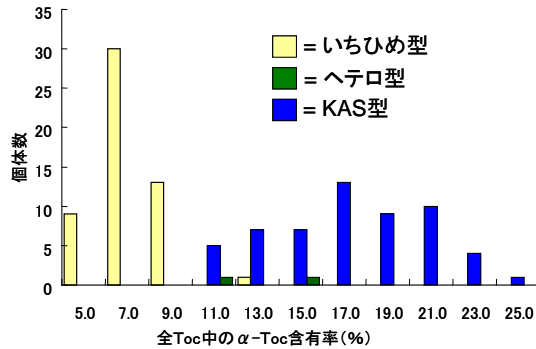


図1 いちひめ x KAS F<sub>5</sub> 個体集団における α-Toc 含有率の頻度分布

一方、エキソン2に存在する塩基の同義置換は普通品種と高 α-Toc 品種に分離していた。この塩基置換を認識できる増幅切断多型配列 (CAPS) マーカーを作成し、「いちひめ」 x 「KAS」 F<sub>5</sub> 個体における遺伝子型を調べたところ、遺伝子型と α-Toc 含有率が共分離した (図1)。

## (2) ツルマメの高ルテイン形質

### ①高ルテインツルマメ系統の特徴、遺伝解析および QTL 解析

高ルテインツルマメ系統 GD50344 の胚軸を含む子葉と種皮をそれぞれ HPLC 分析した結果、ルテインは胚軸を含む子葉に高く蓄積していることが示された。GD50344 においてルテインのピークとともに検出されたクロロフィル b、クロロフィル a と β-カロテンは、その殆どが種皮に由来していた。

ダイズ品種「トヨムスメ」 x 高ルテインツルマメ系統「GD50344」とダイズ系統「十育241」 x 高ルテインツルマメ系統「B09092」の F<sub>2</sub> 種子と F<sub>2</sub> 個体 (F<sub>3</sub> 種子)、およびダイズ系統「TK780」 x 高ルテインツルマメ系統「B01167」の RIL のルテイン含量は両親のルテイン含量の間に連続分布したが、高ルテインツルマメ系統並みに高いルテイン含量を有する後代は極少数であった。しかし、「トヨムスメ」 x 「GD50344」と「十育241」 x 「B09092」の F<sub>2</sub> 種子のルテイン含量は高い遺伝率 ( $h_B^2=0.667$ 、

$h_B^2=0.555$ ) を示すこと、および「TK780」 x 「B01167」の F<sub>9</sub> と F<sub>10</sub> 種子のルテイン含量は有意な正の相関 ( $r=0.784^{**}$ ) を示したことから、ダイズ種子のルテイン含量は後代に安定して遺伝する形質であることが示された。

「TK780」 x 「B01167」の RIL 集団および「トヨムスメ」 x 「GD50344」の F<sub>2</sub> 集団を用いてルテイン含量に関わる QTL 解析を行った。その結果、「TK780」 x 「B01167」の F<sub>9</sub> および F<sub>10</sub> 種子集団において連鎖群 D1a と D2 のそれぞれ AFLP マーカー ATG/CAT310 と SSR マーカー Set\_192 の近傍にルテイン含量に関与する QTL を同定した。「TK780」 x 「B01167」の F<sub>9</sub> 種子集団では連鎖群 C2 にもルテイン含量の QTL を検出した。「トヨムスメ」 x 「GD50344」の F<sub>2</sub> 種子集団では連鎖群 D1a の SSR マーカー Satt407 の近傍にルテイン含量に関わる QTL を検出し、F<sub>2</sub> 個体 (F<sub>3</sub> 種子) 集団では連鎖群 C2、B1、D1a、D2 および J に同定した。このうち、連鎖群 C2 の SSR マーカー Satt277 の近傍に同定した QTL は開花日に関与する QTL と完全に一致した。連鎖群 D2 のルテイン含量の QTL の近傍に種子重の QTL を検出した。連鎖群 D1a と D2 上のルテイン含量の QTLs は 2 集団の連鎖地図の相同な領域に位置したことから、連鎖群 D1a と D2 の QTLs には高ルテインツルマメ系統の「B01167」と「GD50344」に共通してルテイン含量を制御する遺伝子が座乗している可能性が示唆された。

### ②高ルテインツルマメ系統の成分的特性および作用機序の解析

高ルテインツルマメ系統では主要なルテインに加え、ネオキササンチン、ビオラキササンチンおよびアンセラキササンチン等のキサントフィル類も増大していた。これらのキサントフィル類は、「トヨムスメ」 x 「GD50344」、「十育241」 x 「B09092」と

「TK780」×「B01167」の高ルテイン含量の交雑後代においても検出された。高ルテイン含量形質はルテインを含めた種子登熟中のキサントフィル類全体の生合成または代謝分解の変異が関与する可能性が高いと考えられる。そこで、まず「TK780」×「B01167」の高ルテインと低ルテインの RIL を用いてルテイン生合成関連遺伝子の比較発現解析を行った。これらの系統間で遺伝子発現程度に顕著な差異は認められず、これらの遺伝子発現と高ルテイン含量形質との関連性を見出すことはできなかった。次に、「TK780」×「B01167」の RIL の未熟種子を用いて、ルテインの代謝分解に伴う登熟後期におけるルテイン含量の変動について精査した。高ルテインおよび低ルテインの RIL は登熟の初期段階では両者ともに高いルテイン含量を示し、種子の登熟に伴いルテインは減少したが、特に登熟後期の未熟種子におけるルテイン含量の減少程度に低ルテインと高ルテインの RIL の間で顕著な差異が認められた。このことから、未熟種子のルテインの減少にはルテインの代謝分解が密に関連することが考えられ、ルテインの分解に関わる遺伝子の変異が高ルテイン含量形質に関与する可能性が高いと推察される。

### (3) $\alpha$ -トコフェロールおよびルテインを高含量に蓄積するダイズの育成

高 $\alpha$ -Toc の「KAS」と高ルテインツルマメ「B09092」との $F_2$ 種子および $F_2$ 個体( $F_3$ 種子)に、 $\alpha$ -Toc 含量とルテイン含量が同時に高い $F_2$ 種子および $F_2$ 個体( $F_3$ 種子)が出現することを確認した。また、これら $F_2$ 種子および $F_2$ 個体( $F_3$ 種子)にける $\alpha$ -Toc 含量とルテイン含量との間に有意な正の相関を認めた。この正の相関は予想外の結果であったが、少なくとも、 $\alpha$ -Toc とルテイン含量を同時に高めたダイズを作出することは可能と考えられる。

$\alpha$ -Toc 含量およびルテイン含量が高い $F_2$ 種子を発芽させて $F_2$ 個体を養成し、各系統から収穫した $F_3$ 種子をバルク分析した。このうち、 $\alpha$ -Toc 含量およびルテイン含量がともに高いことが確認できた5系統を選抜した。これらの系統に植物生理的な異常は認められなかった。 $\alpha$ -Toc 含量とルテイン含量がともに高い $B_1F_2$ 系統を選抜した。これらの $B_1F_2$ 系統の生育は順調であり、個体あたりの収穫粒数から判断して $\alpha$ -Toc 含量とルテイン含量がともに高い個体の稔実性は正常であり、問題は全く認められなかった。

### (4) ツルマメの高リノレン酸形質の利用

ツルマメの高リノレン酸形質の遺伝率は0.660であったが、脂質含量とリノレン酸含有率との間に有意な負の相関を認めた。両形質に共通するQTLが連鎖群EのSat384近傍に検出されたことから、脂質含量とリノレン酸含有率が同一の因子によって制御される可能性が示唆された。一方、連鎖群HのSSRマーカーSat\_127および連鎖群OのSSRマーカーSat\_274近傍にそれぞれLOD値が2.55、3.51、寄与率が15.7%、20.8%のリノレン酸含有率に関するQTLが検出された。これらのQTLは脂質含量に関するQTLと連鎖していないことから、これまでに認められた脂質含量とリノレン酸含有率間の負の相関関係とは独立して、脂質含量の減少を伴わずにリノレン酸含有率を増加させることが可能であることが示唆された。すなわち、連鎖群HにおけるSSRマーカーSat\_127と連鎖群OにおけるSSRマーカーSat\_274に同定されたQTLに着目してマーカー利用選抜を進めることで、高リノレン酸含有ダイズの作出が可能と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計4件)

①Dwiyanti, M. S., A. Ujiie, L. T. B. Thuy, T. Yamada and K. Kitamura (2007) Genetic analysis of high  $\alpha$ -tocopherol content in soybean seeds.

Breeding Science, 57: 23-28. 査読有

②Wang, S., K. Kanamaru, W. Li, J. Abe, T. Yamada and K. Kitamura (2007) Simultaneous Accumulation of High Contents of  $\alpha$ -Tocopherol and Lutein is Possible in Seeds of Soybean (*Glycine max*(L.)Merr.), Breeding Science, 57: 297-304. 査読有

③Shibata, M., K. Takayama, A. Ujiie, T. Yamada, J. Abe and K. Kitamura (2008) Genetic relationship between lipid content and linolenic acid concentration in soybean seeds, Breeding Science, 58: 361-366. 査読有

④Kanamaru, K., S. Wang, T. Yamada, J. Abe and K. Kitamura (2008) Genetic analysis and biochemical characterization of the high lutein trait of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.), Breeding Science, 58: 393-400. 査読有

<学会発表> (計7件)

①金丸京平、王紹東、阿部純、山田哲也、喜多村啓介 (2007) ツルマメにおける高ルテイン形質の遺伝解析および成分的特性 育種学研究 9 (別2) 96, 2007.9.21 鶴岡

②柴田雅之、高山清彦、山田哲也、阿部純、喜多村啓介 (2007) ダイズの脂質含量とリノレン酸含有率との関係 育種学研究 9 (別2) 97, 2007.9.21 鶴岡

③Dwiyanti Maria S.、山田哲也、阿部純、喜多村啓介 (2007) ダイズ種子の $\alpha$ -トコフェロール含有量に関するQTL解析 育種学研究 9 (別2) 98, 2007.9.21 鶴岡

④柴田雅之、穴井豊昭、山田哲也、阿部純、喜多村啓介 (2008) ダイズ種子中における脂質含量及びリノレン酸含有率の制御に関わる因子の探索 育種学研究 10 (別2) 208, 2008.10.10, 彦根

⑤金丸京平、山田哲也、阿部純、喜多村啓介 (2008) ダイズ野生種ツルマメにおける高ルテイン形質の作用機序の解析 育種学研究 10 (別2) 209, 2008.10.10, 彦根

⑥Dwiyanti Maria S.、山田哲也、阿部純、喜多村啓介 (2008) ダイズ種子の $\alpha$ -トコフェロール含有量に関連する候補領域の解析 育種学研究 10 (別2) 212, 2008.10.10, 彦根

⑦Dwiyanti Maria S.、山田哲也、阿部純、喜多村啓介 (2009) ダイズにおける3つの $\gamma$ -トコフェロールメチルトランスフェラーゼ遺伝子の特徴づけ 育種学研究 9 (別2) 148, 2009.9.25, 札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

喜多村 啓介 (KITAMURA KEISUKE)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

### (2) 研究分担者

阿部 純 (ABE JYUN)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

山田 哲也 (YAMADA TETSUYA)

北海道大学・大学院農学研究院・助教