

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580006

研究課題名（和文） TILLING 法を用いたダイズ脂肪酸組成の代謝工学的改良

研究課題名（英文） Metabolic engineering of fatty acid composition in soybean by using TILLING

研究代表者

穴井 豊昭（ANAI TOYOAKI）

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：70261774

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ゲノム情報に基づいた新たな植物改良法として近年注目を集めている逆遺伝学的なスクリーニング法の一つである TILLING 法を用いて、ダイズの貯蔵脂質の脂肪酸代謝に関与すると考えられる標的遺伝子を破壊した新規突然変異系統の単離と、得られた突然変異系統を組み合わせ、ダイズ貯蔵脂質中の脂肪酸組成を代謝工学的に改良することを目的とした。その結果、アシル-ACP チオエステラーゼやステアロイル-ACP 不飽和化酵素、小胞体型 ω -3 不飽和化酵素をコードする遺伝子に変異を生じた新たなダイズ突然変異系統の単離に成功した他、複数の突然変異系統間での交雑により、遺伝子組換え技術を利用することなく 80%以上の超高オレイン酸含量や 1.5%の超低リノレン酸含量の油脂を生産するダイズ系統の作出が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

TILLING is one of the most attractive methods for screening novel mutant lines with reverse genetics approach in recent years. In this study aimed at improving fatty acid composition of soybean oil by metabolic engineering, I have tried to isolate novel mutant lines and to combine their mutant alleles. As a result, I have isolated several mutant lines corresponding to acyl-ACP thioesterase, stearyl-ACP desaturase and microsomal omega-3 fatty acid desaturase genes, and successfully developed novel fatty acid mutant lines with more than 80% oleic acid or less than 1.5% linolenic acid in seed oil.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：突然変異、逆遺伝学

1. 研究開始当初の背景

近年、ダイズを含む様々な作物種のゲノム

塩基配列情報の蓄積と解析が進んでいるが、この様なゲノム研究によって得られた有用

遺伝子の情報を作物の育種に直接活用するためには、ゲノム情報に基づいた新たな植物改良技術が不可欠であると考えられた。これまで、この様な局面では、遺伝子組換え技術や分子マーカーを利用した選抜技術等の活用が想定されて来たが、遺伝子組換えを行った作物に対する日本国内の消費者の抵抗感には依然として強く、遺伝子組換え作物の普及には未だ大きな障壁が残っている。これに対して、分子マーカーを利用した選抜技術は育種の効率化のために非常に重要な技術ではあるが、この手法での改良には、利用可能な遺伝子資源の存在が前提となっており、新たな変異遺伝子を持つ遺伝資源開発のための技術開発が待たれていた。そこで本研究では、任意の標的塩基配列に変異を生じた個体を、逆遺伝学的手法を用いてスクリーニングするための手法を確立することと。この手法によって新たに得られたダイズ遺伝資源を活用して、画期的な育種を実現することを目指した。特に本研究では、これまでの研究成果を踏まえて、脂肪酸代謝に関与する主要な酵素遺伝子を標的として、この新たなアプローチについての実証を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、逆遺伝学的なスクリーニング法の一つである TILLING 法を用いて、脂質代謝に関与する標的遺伝子を破壊した新規のダイズ突然変異体を単離し、ダイズ油脂中の脂肪酸組成の代謝工学的改良に利用できる画期的な遺伝資源を開発する。更に最終的には、我々が既に保有する脂肪酸合成突然変異体と本研究で得られた新たな突然変異体との交雑により、80%以上の超高オレイン酸含量や1%以下の超低リノレン酸含量あるいは30%以上の高ステアリン酸含量といった、これまで遺伝子組換え技術を利用することなしには実現することが不可能であると考えられていた付加価値の高い油脂を生産するダイズ品種の作出を目指す。

3. 研究の方法

アシル-ACP チオエステラーゼおよびステアロイル-ACP 不飽和化酵素については、ダイズゲノム中に存在する遺伝子ファミリーのうち、改良の標的となる種子中での発現が高い遺伝子を RT-PCR 法を用いて絞り込んだ。その後、先に絞り込みを行った標的遺伝子について、我々が作製したダイズ突然変異体ライブラリーより、ハイスループット型に改良した TILLING 法による変異系統のスクリーニングを行った。こうして得られた突然変異体候補系統について、シークエンスにより変異部位の確定を行った。更に、アミノ酸配列に変化を生じていたステアロイル-ACP 不飽和化酵素の変異系統については、この変異遺伝

子を発現する組換え大腸菌株を作製して、野生型の遺伝子を発現させた大腸菌株とともに菌体の総脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸組成を分析した。これに加えて、本研究で得られた高ステアリン酸突然変異系統と以前に単離した高オレイン酸突然変異系統、低リノレン酸突然変異系統について分子マーカーを作製して、これらの変異系統間の交雑よりマーカー選抜を行い、得られた多重変異の効果について検証を行った。

4. 研究成果

TILLING 法を用いたスクリーニングの結果、アシル-ACP チオエステラーゼ遺伝子 (Glyma05g08060 および Glyma17g12940) およびステアロイル-ACP 不飽和化酵素遺伝子 (Glyma14g27990) について、複数の突然変異系統が得られた。しかしながら、ダイズ種子中の脂肪酸含量に対するこれらの変異遺伝子の効果はそれほど大きいものではなく、効果的なアシルを得るためには更なる変異体の探索が必要であると考えられた。これに対して、小胞体型 ω -3 不飽和化酵素遺伝子 (Glyma18g06950) 突然変異体である A9 系統については、組換え酵素の活性および種子中のリノレン酸含量を測定することにより、変異遺伝子の効果を評価したところ、酵素活性の消失と顕著な種子リノレン酸含量の低下が認められた。更に、我々が以前に単離していた2種類の小胞体型 ω -3 不飽和化酵素遺伝子に変異を持つ LOLL 系統と交配を行い、3種類の小胞体型 ω -3 不飽和化酵素遺伝子に変異を持つ系統を作出したところ、種子中のリノレン酸含量が総脂肪酸含量の約 1.5%程度まで低下することが明らかになった。また、小胞体型 ω -6 不飽和化酵素遺伝子 (Glyma10g42520 および Glyma20g24580) の2重変異体では、種子中のオレイン酸含量が総脂肪酸含量の 80%以上に増加することも明らかになった。

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 10 件) 全て査読有

- ① Y. Tsubokura, H. Matsumura, M. Xu, B. Liu, H. Nakashima, T. Anai, F. Kong, X. Yuan, H. Kanamori, Y. Katayose, R. Takahashi, K. Harada and J. Abe*, 2013年 Genetic Variation in Soybean at the Maturity Locus E4 Is Involved in Adaptation to Long Days at High Latitudes Agronomy, 3: 117-134
DOI: 10.3390/agronomy3010117

- ② M. Hashiguchi, J. Abe, T. Aoki, T. Anai, A. Suzuki, R. Akashi, 2012年 The National BioResource Project (NBRP) Lotus and Glycine in Japan
Breeding Science, 61: 453 - 461
DOI: 10.1270/jsbbs.61.453
- ③ Z. Xia, S. Watanabe, T. Yamada, Y. Tsubokura, H. Nakashima, H. Zhai, T. Anai, S. Sato, T. Yamazaki, S. Lu, H. Wu, S. Tabata and K. Harada*, 2012年 Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus E1, which regulates photoperiodic flowering
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109: E2155-E2164
DOI: 10.1073/pnas.1117982109
- ④ T. Anai, 2012年 Potential of a mutant-based reverse genetic approach for functional genomics and molecular breeding in soybean. Breeding Science, 61: 462 - 467
DOI: 10.1270/jsbbs.61.462
- ⑤ T. Anai*, T. Hoshino, N. Imai and Y. Takagi, 2012年 Molecular characterization of two high-palmitic-acid mutant loci induced by X-ray irradiation in soybean Breeding Science, 61: 631-638
DOI: 10.1270/jsbbs.61.631
- ⑥ T. Hoshino, N. Kawashita, Y. Takagi and T. Anai*, 2011年 Molecular characterization and marker development of mid-oleic-acid mutant M23 for the development of high-oleic cultivars of soybean Plant Breeding, 130: 544-550
DOI: 10.1111/j.1439-0523.2011.01871.x
- ⑦ S. Watanabe, Z. Xia, R. Hideshima, Y. Tsubokura, S. Sato, N. Yamanaka, R. Takahashi, T. Anai, S. Tabata, K. Kitamura, K. Harada*, 2011年 A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the GIGANTEA gene is involved in soybean maturity and flowering. Genetics, 188: 395-407
DOI: 10.1534/genetics.108.098772
- ⑧ T. Penjor, T. Anai, Y. Nagano, R. Matsumoto, M. Yamamoto*, 2010年 Phylogenetic relationships of Citrus and

its relatives based on rbcL gene sequences. Tree Genetics and Genomes, 6: 931-939
DOI: 10.1007/s11295-010-0302-1

⑨ H. Uchida, H. Yamashita, T. Anai, T. Muranaka, K. Ohyama*, 2010年 Agrobacterium-mediated transformation of Euphorbia tirucalli callus. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74: 851-853
DOI: 10.1271/bbb.90783

⑩ T. Hoshino, Y. Takagi, T. Anai*, 2010年 Novel GmFAD2-1b mutant alleles created by reverse genetics induce drastic elevation of oleic acid content in soybean seeds in combination with GmFAD2-1a mutant alleles Breeding Science, 60: 419-425
DOI: 10.1270/jsbbs.60.419

〔学会発表〕(計 15 件)

① 穴井豊昭 ダイズ突然変異リソースの開発と利用 日本遺伝学会第84回大会ワークショップ 2012.9.24~26 九州大学

② 穴井豊昭 ダイズ変異体ライブラリーの作出と利用 日本育種学会第122回講演会シンポジウム 2012.9.14~15 京都産業大学

③ T. Anai Soybean Mutant Resource for Reverse Genetic Study 第53回日本植物生理学会シンポジウム 2012.3.16 京都産業大学

④ 穴井豊昭 TILLING法に利用できるダイズ突然変異体リソース 日本植物分子細胞生物学会第29回大会シンポジウム 2011.9.7 九州大学

⑤ 星野友紀、川下宣久、高木胖、穴井豊昭、X線により誘発されたダイズ脂肪酸突然変異体におけるDNA変異形態の特徴 育種学研究 12 (別2) p76 2010.9.25 秋田県立大学

⑥ 穴井豊昭、北原阿子 ダイズの矮性突然変異遺伝子についての解析 育種学研究 12 (別2) p77 2010.9.25 秋田県立大学

⑦ 西美友紀、木下剛仁、穴井豊昭、中島寿亀 2010年 TILLING法を用いたダイズ品種「フクユタカ」からのFT3変異体の単離 育種学研究 12 (別2) p205 2010.9.25 秋田県立大学

他

〔図書〕(計4件)

① H. Nakagawa, T. Anai, A. Okabe, K. Takahashi, M. Hajika, Y. Takagi, 2011年 Mutation breeding of soybean in Japan. Breeding of Pulse Crops, p61-93 S. Khan, M. I. Kozgar 編 Breeding of Pulse Crops, Kalyani Publishers

② 星野友紀, 穴井豊昭, 2011年 植物生理化学研究と遺伝子解析法, p306-332 長谷川宏司・広瀬克利 編 最新 植物生理化学, 大学教育出版

③ Y. Takagi, T. Anai, H. Nakagawa, 2012年 Development of novel fatty acid composition in soybean oil through induced mutation, p437-444 Q. Shu, B.P. Forster, H. Nakagawa 編 Plant Mutation Breeding and Biotechnology, CABI Publishers

④ K. Harada, S. Watanabe, Z. Xia, Y. Tsubokura, N. Yamanaka, T. Anai, 2011年 Positional cloning of the responsible genes for maturity loci E1, E2 and E3 in soybean, p51-76
D. Krezhova 編
Soybean - Genetics and Novel Techniques for Yield Enhancement, InTech Publishers

〔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
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・准教授
研究者番号：70261774

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

