特集記事

ダイズ突然変異体リソースの整備と新規アリの開発に関する研究

穴井豊昭

佐賀大学農学部, 佐賀市, 〒 840-8502

Development of soybean mutant resources and identification of novel mutant alleles

Toyoaki Anai

Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840-8502, Japan

キーワード

ダイズ, 突然変異体, TILLING, 遺伝子機能, 育種素材

はじめに

ダイズ [*Glycine max* L. (Merr.)] は, 世界で年間 34,180 万トン (SoyStats 2019) 生産される重要なマメ科作物である。その種子には, 乾燥重量の約 40% のタンパク質と約 20% の油脂が含まれており, 栄養価が高く, 今後も増加し続ける世界人口を支える重要な戦略作物の一つである。そのため, 世界的な人口増加や温暖化等にも対応する必要がある。高温障害や湿害, 病害虫の発生といった困難な課題を克服し, 生産性の更なる向上や安定化を実現することが求められている。我が国において, ダイズは伝統的な食品である豆腐や納豆, 味噌等の原料として古くから利用されており, 我々の食文化とは切り離せないものとなっている。一方, 世界的にみると, ダイズの用途は, 搾油用が最も多く, 次いで飼料用, 食用となっており, 油脂成分の改良も極めて重要な課題である。また, 近年では, イソフラボンやサポニンといった機能性成分にも注目が集まっており, 食と健康といった観点から, これらの分子を標的とした成分育種にも期待が寄せられている。加えて, タンパク質を豊富に含むという特徴を生かして, 食肉の代替となる植物肉としての利用も急増している。この様に多様化する用途に対応した新品種の育成を推進するためには, 望まれる形質に関する遺伝子の特定と機能解析を進めるとともに, 既存の遺伝資源の利用はもとより, 突然変異誘発やゲノム編集等の技術を用いて種内変異を拡大し, 育種に利用可能な新規アリの開発を加速する必要があると考えられる。

そこで, 我々は, 従来の形質ベースの順遺伝学的スク

リーニングと塩基配列ベースの逆遺伝学的なスクリーニングの双方に対応可能なダイズの突然変異体リソースの整備に取り組み (Anai 2012, Tsuda *et al.* 2015), これらのリソースを活用した有用遺伝子の機能解析ならびに新規アリの開発を進めてきた。ここでは, 我々が本研究に取り組むに至った経緯と, 開発したダイズ突然変異体リソースおよび得られた変異体についての概要を紹介し, これらの変異体を活用したダイズ育種の可能性と, 我々が特に注力してきた油脂成分改良の現状についても報告する。

1. 脂肪酸含量変異体の単離と原因遺伝子の同定から変異体リソースの整備へ

ダイズ油脂は, 全世界で生産される植物油脂の約 28% を占めており, パーム油脂に次いで第 2 位となっている。また, 比較的安価で生産も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脂としても重要な役割を果たしている。さらに, 近年では, 石油の代替品として, インクや機械油, バイオディーゼル等の化成品原料にも利用が増加している。しかしながら, 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いことから, 常温で長期保存した場合や高温調理時の酸化と, それに伴うオフフレーバーの発生が問題とされてきた。このような油脂の酸化の原因は, ダイズ油脂中に豊富に含まれているリノール酸や α -リノレン酸といった多価不飽和脂肪酸であり, これらの多価不飽和脂肪酸を減少させるためには, ダイズの脂肪酸代謝経路を遺伝的に改良することが有効であると考えられる。

高木らは, 約 2 万系統の「Bay」に由来する X-線照射後代を調査し, ダイズ油脂に含まれる主要な 5 種類の脂

脂肪酸組成が変化した変異体を単離して、これらの遺伝様式について報告している（高木・ラーマン 2002）。しかしながら、筆者がこの課題に取り組み始めた 1990 年代後半、これらの変異体が保持する変異アリルについての情報は、ほとんど明らかになっていなかった。そのため、ダイズの脂肪酸合成経路の解明と育種のための変異アリの分子マーカ化を目指して、これらの原因遺伝子の同定に取り組むことにした。また、当時は、ダイズはもとより、イネやシロイヌナズナですら全ゲノム塩基配列が決定されていなかったため、他の一部の植物種で報告されていた脂肪酸合成酵素遺伝子をプローブとして、cDNA ライブラリーやゲノミックライブラリーから、類似した塩基配列を持つ遺伝子ファミリーを単離し、個々の遺伝子の発現パターンや組換えタンパク質の酵素活性を指標として、それぞれの変異アリルとその酵素活性との対応を調査した。

その結果、以前の研究で得られていた脂肪酸含量変異体の大部分について、原因となる変異アリの同定に成功したが（Anai *et al.* 2003, Anai *et al.* 2005, Anai *et al.* 2008, Anai *et al.* 2012, Hoshino *et al.* 2011, Hoshino *et al.* 2020）、ダイズゲノム中には、登熟中の種子で発現し、正常な活性を持つ酵素をコードするにもかかわらず、これらに対応する変異体が報告されていない遺伝子も少なからず存在することが明らかになった。これは、個々の脂肪酸の合成には、機能的に重複する複数の遺伝子が関与している上、脂肪酸組成が気温などの栽培環境による影響を受けやすいことから、表現型に基づく変異アリのスクリーニングでは、効果の大きい変異アリルが優先的に得られた結果であると考えられた。そこで、まだ得られていない変異アリの、迅速かつ確実に単離する方法

を模索する中で、従来からの表現型に基づいたスクリーニングの限界を再認識し、逆遺伝学的なスクリーニング系の必要性を痛感するに至った。

2. 突然変異体リソースと逆遺伝学的スクリーニング系の整備

広範囲の作物種において、祖先種からの進化の過程で異種間交雑やゲノムの倍加を経験しており、ダイズでも 2 回のゲノム倍加を経て栽培種が成立しており、ほとんどの遺伝子について機能的重複が認められる。この様にゲノム重複が生じている作物種においては、単一の遺伝子に変異を生じた個体であっても、表現型の変化が少なかったり、ほとんど変化が観察されなかったりする場合も多く、表現型から変異の有無を判別することが困難なことも多い。これに対して、逆遺伝学的な変異アリのスクリーニングは、表現型の変化が少なく判別が難しい遺伝子を標的とした場合に特に有効である。また、逆遺伝学的なスクリーニングを行う際には、変異密度が高い突然変異体集団の作成と簡便で正確な変異アリル検出法の確立が、この成否に大きな影響を与えることになる。

そこで、演者は、TILLING (targeting induced local lesions in genomes) 法 (McCallum *et al.* 2000) を含む複数の逆遺伝学的なスクリーニング法を比較・検討し、比較的容易に変異アリの検出可能な改良 TILLING 法を開発した。また、これと並行して、二世代にわたって EMS を反復処理することにより、生理的な障害を最小限に抑えつつ、極めて高密度に変異を導入した突然変異体集団が作成できることも明らかにした (図 1) (Anai 2012)。その後、この技術を使用して、我が国で最も生産量の多い「フク

図 1. ダイズの高密度突然変異集団の作成と TILLING 法による検出 (Anai 2012 より改変)。

表 1. 突然変異リソースを利用して改良されたダイズの脂肪酸組成

品種/系統名	脂肪酸組成 (%)					備考
	パルミチン酸	ステアリン酸	オレイン酸	リノール酸	α -リノレン酸	
フクユタカ	11.2	2.5	22.0	56.2	8.1	基準品種
佐大 HO1 号	7.6	2.5	82.0	4.2	3.7	二重変異体
高オレイン酸・低リノレン酸系統	7.7	2.2	80.6	8.4	1.0	五重変異体

ユタカ」や、生産量が第2位の「エンレイ」(Tsuda *et al.* 2015), 耐病性等に特徴を持つ「Peking」(Ishibashi *et al.* 2019)などを親品種とした変異体集団の作成にも取り組み, これらの突然変異リソースの一部は, 我が国のダイズ研究コミュニティ内において, 多様な新規形質に関わる変異アリのスクリーニングに活用されている。

一方で, ポジショナルクローニングによって見出された新規遺伝子の機能解析を目的として, 候補遺伝子上に生じた変異アリの単離するといった利用も可能となり, 開花期関連遺伝子の単離などにも貢献することが出来た (Watanabe *et al.* 2009, Watanabe *et al.* 2011, Xia *et al.* 2012). その後, 変異アリのスクリーニング法についても TILLING 法に加えて, 電気泳動が不要な HRM (high resolution melt) 法, スクリーニング時点でアミノ酸配列の情報も得られるアンプリコンシーケンス法など新たな選択肢も増え, より利用しやすい環境が整っている。

また, これらの高い変異密度を持つ突然変異体リソースは, 表現型に基づいたスクリーニングにおいても有用であることから, サポニン (Yano *et al.* 2017, Yano *et al.* 2018, Takagi *et al.* 2018, Krishnamurthy *et al.* 2019) やイソフラボン (Sarkar *et al.* 2020) などの二次代謝変異体をはじめ, 小葉の形を制御する遺伝子 (Sayama *et al.* 2017) やカドミウムの蓄積に関与する遺伝子 (Hirata *et al.* 2019), 除草剤抵抗性に関与する遺伝子 (Kato *et al.* 2020) の機能解析, メタボローム解析による一次代謝物を対象とした変異体の単離とその変異アリのカタログ化などにも活用されている。これら一連の研究で得られた突然変異体には, 脂肪酸, イソフラボン, アミノ酸および糖などの代謝が変化したものが含まれており, これらは, 今後のダイズ種子成分育種を進める上で貴重な遺伝資源となると考えられる。

3. 新たな脂肪酸突然変異体の単離とダイズ油脂改良の現状

一般的なダイズ油脂の脂肪酸組成をみると, 酸化安定性が低いリノール酸や α -リノレン酸といった多価不飽和脂肪酸が, 総脂肪酸の6割以上を占めている。これらの多価不飽和脂肪酸の含量は, それぞれ, 小胞体型 ω -6 脂肪酸不飽和化酵素をコードする *GmFAD2* 遺伝子ファミリーと小胞体型 ω -3 脂肪酸不飽和化酵素をコードする *GmFAD3* 遺伝子ファミリーの働きによって制御されてい

る。また, *GmFAD2* 遺伝子ファミリーでは, *GmFAD2-1a* と *GmFAD2-1b* の2遺伝子が (Anai *et al.* 2005), *GmFAD3* 遺伝子ファミリーでは, *GmFAD3-1a*, *GmFAD3-1b* および *GmFAD3-2a* の3遺伝子が (Anai *et al.* 2008) 登熟中の種子で特異的に発現し, ダイズ油脂の脂肪酸組成に影響を与えていることが明らかになった。このうち, *GmFAD2-1a*, *GmFAD3-1a* および *GmFAD3-1b* 遺伝子の変異アリについては, 表現型に基づいたスクリーニングで既に得られていたが, *GmFAD2-1b* と *GmFAD3-2a* 遺伝子の変異アリについての報告は全くなかったため, 前述の「フクユタカ」由来の変異体リソースに対して, TILLING 法を用いた逆遺伝学的スクリーニングを行ったところ, それぞれの遺伝子に対応する変異アリが得られた。更に, *GmFAD2-1a* と *GmFAD2-1b* 遺伝子の二重変異系統を作出したところ, オレイン酸が総脂肪酸の80%以上にまで増加しており, 多価不飽和脂肪酸は10%以下に減少することが明らかになった (Hoshino *et al.* 2010)。また, *GmFAD3-1a*, *GmFAD3-1b* および *GmFAD3-2a* 遺伝子の三重変異系統では, α -リノレン酸含量が総脂肪酸の1%台にまで減少することも明らかになった (Hoshino *et al.* 2014)。

その後, これらのうち *GmFAD2-1a* と *GmFAD2-1b* 遺伝子の二重変異を導入したダイズ新品種「佐大 HO1 号」を育成して, 2018 年に品種登録の申請を行なった。この「佐大 HO1 号」から抽出した油脂について, CDM 試験により酸化安定性を評価したところ, 基準品種の「フクユタカ」と比較して約5倍も高い酸化安定性を持つことが示された。加えて, 豆乳加工時等にリポキシゲナーゼがリノール酸を分解することで発生し, 青臭みの原因となる *n*-ヘキサナールについても, 基質となるリノール酸の含量が極めて低いことから, ほとんど発生が認められないことも明らかになっている。また, 高オレイン酸型の二重変異系統と低 α -リノレン酸型の三重変異系統の交配後代から, 約80%のオレイン酸かつ約1%のリノレン酸含量となる五重変異系統 (高オレイン酸・低リノレン酸系統) の選抜にも成功しており (表1), 酸化安定性が極めて高い油脂を生産するダイズ品種の育成が可能であることが示された。

4. おわりに

筆者が本研究に着手した頃を思い返してみると, モデ

ル植物であるシロイヌナズナやイネを材料とした分子遺伝学研究は随分と先を走っており、ダイズを材料とした研究には、技術的にも解決すべき課題が山積していた。しかし、その後のゲノム解析技術の進歩やゲノム編集技術の出現により、ダイズを研究材料とした場合の技術的な障壁もずいぶんと解消されたのではないかと感じている。近年では、世界規模での食料問題や地球温暖化問題を解決する糸口となる可能性を秘めた、植物肉の原料といった新規用途に適したダイズの需要増加も見込まれることから、多様化する需要にマッチした品種の育成も望まれており、その育種素材となる変異体の重要性は益々高まるのではないだろうか。

最後に、本研究で取り組んだダイズ突然変異体リソースについても、今後、多くのダイズ研究者や育種家に活用され、新たな遺伝子の発見や新たな品種の育成につながることを願ってやまない。

謝 辞

本研究は、多くの共同研究者、研究協力者のサポートを受けて実施されたものであり、関係の皆様には、この場を借りて、心より感謝の意を表したい。

特に、ダイズの突然変異体研究へと導いていただいた佐賀大学の高木胖名誉教授、ならびに共に研究に汗を流してくれた植物遺伝育種学研究室のメンバーに、厚くお礼を申し上げる。

引用文献

- Anai, T., M. Koga, M. Tanaka, T. Kinoshita, S.M. Raman and Y. Takagi (2003) *Plant Cell Rep.* 21: 988–992.
- Anai, T., T. Yamada, T. Kinoshita, S.M. Rahman and Y. Takagi (2005) *Plant Sci.* 106: 1615–1623.
- Anai, T., T. Yamada, R. Hideshima, T. Kinoshita, S.M. Rahman and Y. Takagi (2008) *Breed. Sci.* 58: 447–452.
- Anai, T. (2012) *Breed. Sci.* 61: 462–467.
- Anai, T., T. Hoshino, N. Imai and Y. Takagi (2012) *Breed. Sci.* 61: 631–638.
- Hirata, K., K. Takagi, T. Yamada, T. Sayama, T. Anai, A. Kikuchi and M. Ishimoto (2019) *Breed. Sci.* 69: 345–351.
- Hoshino, T., Y. Takagi and T. Anai (2010) *Breed. Sci.* 60: 419–425.
- Hoshino, T., N. Kawashita, Y. Takagi and T. Anai (2011) *Plant Breed.* 130: 544–550.
- Hoshino, T., S. Watanabe, Y. Takagi and T. Anai (2014) *Breed. Sci.* 64: 371–377.
- Hoshino, T., N. Iijima, M. Hata, A. Watanabe, T. Kawakami and T. Anai (2020) *Plant Gene* 21: 100207.
- Ishibashi, K., M. Saruta, T. Shimizu, M. Shu, T. Anai, K. Komatsu, N. Yamada, Y. Katayose, M. Ishikawa, M. Ishimoto *et al.* (2019) *Nat. Commun.* 10: 4033.
- Kato, S., Y. Yokota, R. Suzuki, Y. Fujisawa, T. Sayama, A. Kaga, T. Anai, K. Komatsu, N. Oki, A. Kikuchi *et al.* (2020) *Theor. Appl. Genet.* 133: 2105–2115.
- Krishnamurthy, P., Y. Fujisawa, Y. Takahashi, H. Abe, K. Yamane, K. Mukaiyama, H.-R. Son, S. Hiraga, A. Kaga, T. Anai *et al.* (2019) *Plant Cell Physiol.* 60: 1082–1097.
- McCallum, C.M., L. Comai, E.A. Greene and S. Henikoff (2000) *Nat. Biotech.* 18: 455–457.
- Sarkar, M.A.R., W. Otsu, A. Suzuki, F. Hashimoto, T. Anai and S. Watanabe (2020) *Breed. Sci.* 70: 265–276.
- Sayama, T., T. Tanabata, M. Saruta, T. Yamada, T. Anai, A. Kaga and M. Ishimoto (2017) *Breed. Sci.* 67: 363–369.
- SoyStats (2019) The American Soybean Association. [<http://www.soystats.com/>].
- Takagi, K., R. Yano, S. Tochigi, Y. Fujisawa, H. Tsuchinaga, Y. Takahashi, Y. Takada, A. Kaga, T. Anai, C. Tsukamoto *et al.* (2018) *Phytochem.* 156: 96–105.
- 高木 胖・S.M. ラーマン (2002) *育種学研究* 4: 25–31.
- Tsuda, M., A. Kaga, T. Anai, T. Shimizu, T. Sayama, K. Takagi, K. Machita, S. Watanabe, M. Nishimura, N. Yamada *et al.* (2015) *BMC Genom.* 16: 1014.
- Watanabe, S., R. Hideshima, Z. Xia, Y. Tsubokura, S. Sato, Y. Nakamoto, N. Yamanaka, R. Takahashi, M. Ishimoto, T. Anai *et al.* (2009) *Genetics* 182: 1251–1262.
- Watanabe, S., Z. Xia, R. Hideshima, Y. Tsubokura, S. Sato, N. Yamanaka, R. Takahashi, T. Anai, S. Tabata, K. Kitamura *et al.* (2011) *Genetics* 188: 395–407.
- Xia, Z., S. Watanabe, T. Yamada, Y. Tsubokura, H. Nakashima, H. Zhai, T. Anai, S. Sato, T. Yamazaki, S. Lu *et al.* (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: E2155–E2164.
- Yano, R., K. Takagi, Y. Takada, K. Mukaiyama, C. Tsukamoto, T. Sayama, A. Kaga, T. Anai, S. Sawai, K. Ohyama *et al.* (2017) *Plant J.* 89: 527–539.
- Yano, R., K. Takagi, S. Tochigi, Y. Fujisawa, Y. Nomura, H. Tsuchinaga, Y. Takahashi, Y. Takada, A. Kaga, T. Anai *et al.* (2018) *Plant Cell Physiol.* 59: 797–810.