新規の脂肪酸組成を持つダイズ油の突然変異による改良 Development of Novel Fatty Acid Composition in Soybean Oil by Induced Mutation

高木 胖

佐賀大学 名誉教授
〒849-0928 佐賀市若楠 1-10-11

Yutaka TAKAGI

Emeritus Professor,
Saga University
1-10-11 Wakakusu, Saga-shi, Saga,
849-0928, JAPAN

穴井豊昭

佐賀大学農学部 植物育種学分野
〒840-8502 佐賀市本庄町 1

Toyoaki ANAI

Laboratory of Plant Breeding,
Faculty of Agriculture,
Saga University,
1 Honjo-machi, Saga-shi, Saga,
840-8502, JAPAN

論文要旨：ダイズ油は、マーガリン、ショートニング、サラダ油、揚げ物用に使用されており、消費量の多い食用油脂である。ダイズ油中の多価不飽和脂肪酸を減少させる改良（オレイン酸含量を増加させリノレン酸とリノレン酸含量を減少させる）は、人の健康にまたダイズ油の酸化安定性の向上には極めて有効である。しかしながら、ダイズでは、オレイン酸とリノレン酸の含量を変える遺伝資源が限られていることから、突然変異体の利用が有効であると考えられ、化学物質や X 線照射等による遺伝変異の拡大が図られてきた。その結果、これまでに、高・低のパルミチン酸含量、高ステアリン酸含量、高オレイン酸含量、低リノレン酸含量の諸種の突然変異が得られるとともに、これらの脂肪酸組成を支配する主動遺伝子の支配が明らかにされてきた。現在では、これらの突然変異遺伝子を組合せることで、これまでにない新しい脂肪酸組成を持つダイズの育種が可能となっている。本報告では、ダイズの脂肪酸組成を大きく変える新しい遺伝子の発見を中心として、50%を越える高オレイン酸含量で3%以下の低リノレン酸含量となるダイズの作出に至る最近の育種の進歩について述べる。

Abstract: Soybean is the most widely used source of edible oil for human consumption. It is consumed predominantly in the form of margarine, shortening, and salad and frying oils. Altered unsaturated fatty acid content (elevated oleic acid and reduced linolenic acid) increases oxidative stability which have high usefulness in food for health benefits as well as in industry. Natural genetic variability for oleic and linolenic acid content in commercial soybean is limited. The most effective method for modifying fatty acid composition in soybean oil is mutagenesis. With the help of X-rays or chemical mutagens, it has become possible to develop different mutants with different fatty acid composition. Mutants with significantly reduced and elevated palmitic acid, elevated stearic acid, elevated oleic acid, and reduced linolenic acid content were isolated and found to be controlled by major genes. In this paper, gene discovery with altered fatty acid composition and development of novel soybean lines by combining multiple mutant alleles, and also recent progress of oleic acid with elevated content (50.0%) and linolenic acid with reduced content (3%) in soybean oil, are discussed.

Key words: Soybean Oil, Improvement of Fatty Acid, High Oleic Acid, Low Linolenic Acid, Induced Mutation

1 はじめに

ダイズは、ナタネに次いで油脂生産量が多く、油糧作

物として世界的に重要な位置を占めている。植物油脂の主要な用途は、調理用、生食用、ショートニング、マーガリン用などであるが、脂肪酸組成の違いは油の物理的特性、酸化安定性、栄養価等に大きな影響を与えている。Table 1 は、諸種の植物油脂の脂肪酸組成と市場価

連絡者：高木 胖
E-mail : sukeyuki@po.bunbun.ne.jp

Table 1 Fatty Acid Composition (% of total oil) of Different Vegetable Oils, and Their Market Prices.

Seed Oil	Fatty acid							Price (Yen/18 ℓ)
	Palmitic (16:0)	Stearic (18:0)	Oleic (18:1)	Linoleic (18:2)	Linolenic (18:3)	Eicosenic (20:1)	Erucic (22:1)	
Rape (classic)	4.0	1.5	17.0	13.0	9.0	14.5	41.0	5,000
Rape (zero erucic)	9.2	1.6	59.1	19.4	10.2	0.2	0.3	3,100
Soybean	11.5	3.9	24.6	52.0	8.0	—	—	3,000
Corn	12.1	2.3	28.7	56.2	0.7	—	—	3,500
Sunflower (classic)	6.4	4.8	19.6	68.7	<0.5	—	—	4,000
Sunflower (mid oleic)	4.5	4.4	54.3	36.3	<0.5	—	—	5,000
Sunflower (high oleic)	3.6	4.2	81.4	10.3	<0.5	—	—	7,000
Safflower (classic)	7.2	2.1	9.7	81.0	0.0	—	—	7,000
Safflower (high oleic)	5.4	2.3	80.0	12.3	0.0	—	—	7,000
Olive	14.6	3.1	76.2	5.5	0.6	—	—	11,000
Palm	43.0	4.1	44.2	8.7	0.0	—	—	2,500

格を示したものである。ダイズの脂肪酸組成は、低いオレイン酸含量（高リノール酸含量）と高いリノレン酸含量を特徴としており、他の植物油脂とくらべると市場価格が低くなっている。

この理由の一つとして、ダイズ油中に大量に含まれる多価不飽和脂肪酸（リノール酸とリノレン酸）は、油の自動酸化による品質の劣化と過酸化脂質発生の原因となることがあげられる。これに対して、一価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸は血液中の過剰なコレステロールを低下させる効果があることから¹⁾、血管性の疾患による心臓病（cardiovascular disease）の予防といった観点からも、高オレイン酸のヒマワリ油、ベニバナ油、オリーブ油等に注目が集まっている。また、不飽和脂肪酸の自動酸化による過酸化脂質の増加は家畜の餌となるダイズミールでも問題となっており、ダイズ油脂の酸化安定（oxidative stability）を増すために、オレイン酸含量を増加させ、多価不飽和脂肪酸を減少させる脂肪酸組成の改良が極めて重要な課題となっている^{2,3)}。具体的には、ダイズ脂肪酸組成のうち7～8%を占めるリノレン酸は空気中の酸素と反応して不快な臭い（off-flavor）の原因物質となることから⁴⁾、この含量を2～3%まで低下させる必要があるとされてきた^{3,5)}。さらに、最近では、水素添加処理の際に生成するトランス型脂肪酸を減らす目的から、ダイズのリノレン酸を1%以下にする改良が望まれている⁶⁾。

われわれは、1986年に研究を開始し、ダイズ品種 Bay に X 線を照射した変異集団から、諸種の脂肪酸含量が変化した突然変異体を単離し、ダイズの脂肪酸組成を支配する遺伝子についての解析を続けてきた。本稿では、この研究から得られた新規の脂肪酸組成を持つダイズについて、また、W.R. Fehr と E.G. Hammond ら（Iowa State University）によって行われてきたダイズ脂肪酸組成を改良する研究成果を紹介することにする。

2 油糧作物における脂肪酸組成の変異と遺伝子による支配

2.1 脂肪酸生成と遺伝子

油糧作物は、その種類によって特徴ある脂肪酸組成を持つ油脂を生産する（Table 1）。従来型のナタネ（classic）では、エイコセン酸とエルカ酸含量がそれぞれ14.5%と41.0%と高く、他の油糧作物のダイズ、トウモロコシ、ヒマワリ（classic）、ベニバナ（classic）ではリノール酸含量が52.0%、56.2%、68.7%、81.0%と高く、オレイン酸含量は24.6%、28.7%、19.6%、9.7%と低い。リノレン酸含量はダイズで8.0%と高く、他の、トウモロコシ、ヒマワリ（classic）、ベニバナ（classic）では殆ど認められない。オリーブでは76.2%の高オレイン酸含量で5.5%の低いリノール酸含量である。パームでは、パルミチン酸含量とオレイン酸含量がそれぞれ43.0%と44.2%と高いのが特徴である。このように、脂肪酸組成は油糧作物の種によって、また、ナタネ（zero erucic）、ヒマワリ（mid oleic, high oleic）、ベニバナ（high oleic）等では改良種と従来種の間で大きく異なり、極めて多様性が高い。

これら油糧作物における脂肪酸の生合成経路を整理すると、Fig. 1 に示すように、一つはすべての植物種に共通して存在しているパルミチン酸（16:0）→ステアリン酸（18:0）の炭素鎖伸長反応、およびステアリン酸（18:0）→オレイン酸（18:1）→リノール酸（18:2）→リノレン酸（18:3）への不飽和化反応の経路と、ナタネ（classic）のみに見られるオレイン酸（18:1）→エイコセン酸（20:1）→エルカ酸（22:1）への炭素鎖伸長反応がある。油糧作物に特徴的な脂肪酸組成は、脂肪酸の炭素鎖伸長反応と不飽和化反応の各ステップに関与する酵素の活性（正確には個々の酵素の活性とこれを

Fig. 1 Genes Responsible for Different Fatty Acid Biosynthesis.

コードする遺伝子数の双方) に差異があるためであり、脂肪酸生合成経路の多様な遺伝子による支配を示唆するものであった。

油糧作物の品種改良は、まずは自然集団の中から目的とする遺伝子を発見してその遺伝子を育種の場に取り込むことから始まった。例えば、従来型の高エルカ酸ナタネ (classic) を改良し、ゼロエルカ酸ナタネ (zero erucic) を作出した例では、世界各地から収集したナタネ遺伝資源の広範なスクリーニングを行い、Polish 品種からエルカ酸含量を変えてゼロにする遺伝子を発見している。従来型ナタネ (classic) は累積的に働く 2 対の同義遺伝子 $E_1E_1E_2E_2$ によりエイコセン酸 (20:1) とエルカ酸 (22:1) の合成が支配されているが、改良種 (zero erucic) では $e_1e_1e_2e_2$ となり、これらの脂肪酸の含量はゼロとなる⁷⁾。これは、ナタネの脂肪酸の生合成経路において、オレイン酸 (18:1) →エイコセン酸 (20:1) への炭素鎖伸長反応を支配する 2 個の遺伝子 E_1E_2 を e_1e_2 に変えることにより、この経路が遮断されエルカ酸を蓄積しなくなったと考えられる。また、脂肪酸含量を大きく変える他の例としては、Table 1 に示した高オレイン酸含量となるベニバナ (high oleic) がある。この場合にも、Pakistan の在来種から発見された高オレイン酸含量となる *ol* 遺伝子を利用しており、従来型のベニバナ (classic) ではオレイン酸含量が約 10% であったものを約 80% にまで増加させており、これに伴って、リノール酸含量は約 10% に減少している。これは、*ol* 遺伝子によりオレイン酸 (18:1) →リノール酸 (18:2) への

不飽和化反応が阻止されたためであると考えられた⁸⁾。

2.2 ダイズの脂肪酸組成についての品種間変異

ダイズの脂肪酸組成の品種間変異について、White と Quackenbush⁹⁾ は 251 品種について、高木ら¹⁰⁾ は日本と韓国の各地から収集した 172 品種の調査から、脂肪酸組成を支配する遺伝子の関与を示唆する広範な品種間変異を見出している。また、ダイズの脂肪酸の遺伝については、White と Quackenbush⁹⁾ が、含量を異にする品種を交雑した場合に分離世代では連続した含量の分離が観察されたことから、ダイズのリノール酸とリノレン酸含量は微動遺伝子 (poly gene) によって支配されており量的形質の遺伝を示すと報告している。他方、高木ら¹⁰⁾ は 172 品種の選抜から、脂肪酸含量の大きな品種間変異が認められた「松浦」と「オリヒメ」の交雑を行い、オレイン酸とリノレン酸含量についてそれぞれ 2 個と 1 個の遺伝子の支配があると報告している¹¹⁾。しかしながら、ダイズの自然集団について脂肪酸組成の遺伝変異は大きいものの、環境による変動はさらに大きく、脂肪酸組成を支配する遺伝子の一つ一つの効果は小さいと考えている。

既存のダイズ遺伝資源の探索では、ナタネ、ヒマワリ、ベニバナで見られるような脂肪酸組成を大きく変える遺伝子 (major gene) は見出されなかった。従って、X 線などの放射線、EMS (ethyl methanesulfonate) などの化学物質を使用した突然変異の誘発によって遺伝変異を拡大して、ダイズの脂肪酸組成を変える新たな遺伝子の探索が行われており、これらを利用した脂肪酸組成

の改良に大きな期待が寄せられることになった。

3 突然変異集団と自然集団における脂肪酸組成の比較

われわれが1987年に開始した脂肪酸の突然変異体の選抜実験では、ダイズの脂肪酸組成の遺伝変異を拡大することを目的として、ダイズ品種 Bay に X 線を照射して諸種の脂肪酸の突然変異体をスクリーニングすることを行った。その結果、合計 12,266 個体の M₂ 世代から、46 系統の脂肪酸組成に関する突然変異体を得ることに成功した。これら突然変異系統の一部を Table 2 に示すが、6.1%の低パルミチン酸含量となる J3¹²⁾、17.2%の高パルミチン酸含量となる J10¹²⁾、21.2%の高ステアリン酸含量となる M25¹³⁾、48.6%の高オレイン酸含量となる M23¹⁴⁾、4.9%の低リノレン酸含量となる M-5¹⁵⁾、18.4%

の高リノレン酸含量となる B739¹⁶⁾ といった極めて多様な突然変異体が得られた。また、詳細については次章に述べるが、これら突然変異間の交雑から、脂肪酸含量の変異をさらに大きくした系統が得られている。Table 3 は、われわれの研究によって得られた 46 系統の突然変異体の脂肪酸組成と 99 品種のダイズ在来種の脂肪酸組成の変異幅を比較したものである¹⁷⁾。その結果、突然変異体では、Bay の一品種に起源するにもかかわらず、自然集団から得られた 99 品種の脂肪酸組成の変異幅を越えた大きな含量の変異が観察された。人為突然変異の誘発では、ダイズの脂肪酸組成の遺伝的変異の拡大に極めて有効であり、交雑による遺伝子の集積によりさらに大きな脂肪酸組成の変異の拡大が可能であることが明らかになった。

Table 2 Fatty Acid Composition (% of total oil) of Different Mutant, and Their Genotypes.

	Fatty acid					Genotype
	Palmitic (16:0)	Stearic (18:0)	Oleic (18:1)	Linoleic (18:2)	Linolenic (18:3)	
J 3	6.1	3.4	26.5	55.4	8.6	<i>sop1</i>
C1726	8.5	3.9	22.1	56.0	9.6	<i>fap1</i>
LPKKC-3	4.4	3.2	27.1	55.5	9.8	<i>sop1, fap1</i>
KK7	14.2	5.0	23.3	49.5	7.9	<i>fapx</i>
J 10	17.2	5.0	19.7	48.4	9.7	<i>fap2</i>
HPKKJ10	21.6	5.7	18.0	45.6	9.0	<i>fap2, fapx</i>
KK-2	10.3	7.2	23.1	51.6	7.9	<i>st₁</i>
M 25	9.5	21.2	15.6	44.0	9.8	<i>st₂</i>
M25KK2	9.4	31.4	12.4	38.4	8.4	<i>st₁, st₂</i>
M 11	10.3	4.3	35.8	41.4	8.2	<i>ol^a</i>
M 23	8.9	4.4	48.6	29.5	8.5	<i>ol</i>
M-24	10.0	5.3	27.3	51.5	5.9	<i>fanx^a</i>
M-5	9.8	4.9	25.5	55.3	4.9	<i>fan</i>
LOLL	10.3	4.5	27.7	54.7	2.9	<i>fan, fanx^a</i>
Bay	10.6	4.2	25.2	51.7	8.3	

Table 3 Mean and Range of Fatty Acid Composition (% of total oil) in Different Mutants and Natural Varieties of Soybean.

	Fatty acid				
	Palmitic (16:0)	Stearic (18:0)	Oleic (18:1)	Linoleic (18:2)	Linolenic (18:3)
Mutants					
Mean	10.6	5.2	26.5	49.8	7.9
Range	6.3 ~ 16.7	2.9 ~ 16.1	17.5 ~ 48.2	32.2 ~ 60.5	4.6 ~ 12.6
Varieties					
Mean	12.1	2.9	25.1	51.9	8.0
Range	10.0 ~ 15.5	1.6 ~ 4.1	14.2 ~ 44.3	36.6 ~ 61.1	5.2 ~ 12.6

4 ダイズの脂肪酸組成に関与する突然変異遺伝子の発見

前述した様に X 線照射によって、われわれは、脂肪酸組成が変化した数多くの突然変異体を得ることに成功した。Table 2 には、これらの突然変異系統間で交雑を行った結果、明らかになった遺伝子型を示している。ここでは、他のグループのこれまでの研究成果も踏まえて、低パルミチン酸、高パルミチン酸、高ステアリン酸、高オレイン酸、低リノレン酸、高リノレン酸の順に脂肪酸含量に関与する突然変異遺伝子の遺伝様式について述べる。

4.1 低パルミチン酸含量となる突然変異遺伝子

通常のダイズ品種におけるパルミチン酸含量は 9 ~ 12% の範囲に分布していると考えられる。最初の低パルミチン酸含量となる突然変異体 C1726 が Erickson らにより EMS 処理集団中より単離され、*fap1* 遺伝子¹⁸⁾ が同定された。その後、*fapx* 遺伝子 (A1937NMU173)¹⁹⁾、*fap3* 遺伝子 (A22)²⁰⁾、*sop1* 遺伝子 (J3)²¹⁾ 等も同じく低パルミチン酸含量となる突然変異遺伝子として報告された。これらの低パルミチン酸突然変異遺伝子のうち *fap1* 遺伝子と *fapx* 遺伝子が 2 重劣性となった系統では、パルミチン酸含量が 4.4% となり¹⁹⁾、*fap1* 遺伝子と *fap3* 遺伝子が 2 重劣性となった系統では 3.5%²²⁾ まで低下することが報告された。われわれの研究室においても X 線照射集団から複数の低パルミチン酸突然変異体を単離しているが、このうち J3 と J.R. Wilcox から分譲を受けた C1726 との交雑後代から、*sop1* 遺伝子と *fap1* 遺伝子が 2 重劣性となりパルミチン酸含量が 4.4% の LPKKC-3 が得られている²¹⁾ (Table 2)。

4.2 高パルミチン酸含量となる突然変異遺伝子

Erickson ら¹⁸⁾ は、17.3% の高パルミチン酸含量となる C1727 突然変異体を単離し、この形質を支配する *fap2* 遺伝子について報告している。また、Rahman ら²³⁾ は、われわれの研究で得られた高パルミチン酸突然変異体のうち KK7 と J10 の交雑から、*fapx* 遺伝子と *fap2* 遺伝子が 2 重劣性となった HPKKJ10 系統を作出し、このパルミチン酸含量が 21.6% と両親を越えた高含量となること、ならびに、J10 の高パルミチン酸含量は C1727 と同じ *fap2* 遺伝子によって支配を受けていることを報告している。高パルミチン酸含量とする遺伝子については、この他にも *fap4* 遺伝子 (A24)²⁴⁾、*fap5* 遺伝子²⁵⁾、*fap6* 遺伝子²⁶⁾、*fap7* 遺伝子²⁷⁾ が報告されており、このうち *fap2-b* 遺伝子、*fap4* 遺伝子および *fap6* 遺伝子を 3 重劣性とした場合には、39.8% という更に高いパルミチン酸含量となることも明らかになっている²⁶⁾。

4.3 高ステアリン酸含量となる突然変異遺伝子

一般的なダイズ品種のステアリン酸含量は総じて低く、2 ~ 5% 程度の範囲に分布している。Graef ら²⁸⁾ は、EMS もしくはアジ化ナトリウム処理を行った集団から 3 系統の高ステアリン酸含量となる突然変異体を得ている。これら突然変異体のうちで最も効果が高かった A6 系統では、30.4% にまでステアリン酸含量の上昇が認められたが、これら全ての系統に生じた突然変異は同一の *fas*^a 遺伝子座に由来するものであったと報告している。また、Bubeck ら²⁹⁾ は、新たに単離した ST1, ST2, ST3, ST4 の 4 系統の高ステアリン酸突然変異体と前述の A6 を交雑したところ、ST2 と A6 の組み合わせでのみ両親を越える高ステアリン酸含量の子孫の分離が観察されたことから、ST2 の高ステアリン酸は *fas*^a 遺伝子とは異なる他の遺伝子座に生じた突然変異であると結論づけている。われわれも X 線照射による突然変異の誘発から、高ステアリン酸含量となる諸種の突然変異体を得ている。このうち KK-2 と M25 の交雑によって得られた *st1* 遺伝子と *st2* 遺伝子の 2 重劣性系統は、31.0% 以上という極めて高いステアリン酸含量を示すことが明らかになった³⁰⁾ (Table 2)。

4.4 高オレイン酸含量となる突然変異遺伝子

近年の健康志向から注目を集めているオレイン酸含量の品種間変異は、17.5% ~ 48.2% の範囲であり (Table 3)、他の脂肪酸と比較するとその変異の幅が比較的大きい。しかしながら、オレイン酸含量は環境（特に種子登熟期の気温）による変動が極めて大きく、不安定な形質であると考えられており、突然変異体についての報告もほとんどなされていなかった。われわれの研究グループでは、世界に先駆けて、50.2% の高オレイン酸含量となる突然変異体 M23 の X 線照射集団からの単離とその遺伝様式について報告を行っている^{14,31)}。また、異なる変異集団から得られた高オレイン酸突然変異体 M11 と M23 の交雑からは、M11 の低オレイン酸含量が部分優勢となり、F₂ 世代では両親を越える高オレイン酸含量の分離は見られなかったことから、M11 の高オレイン酸突然変異は M23 の *ol* 遺伝子と同一座に生じたものであると考え *ol*^a 遺伝子と名付けた³²⁾ (Table 2)。

4.5 低リノレン酸含量となる突然変異遺伝子

リノレン酸は、ダイズ油脂の自動酸化による品質劣化の最大の原因であると考えられており、1% 以下に低下させることが理想であると考えられている。しかしながら、ダイズの主要品種におけるリノレン酸の含量は 6% から 9% の間に分布していることから、Hammond と Fehr³³⁾ は、EMS 処理によって変異を誘発した集団から 3.4% の低リノレン酸含量となる A5 を単離し *fan* 遺伝子

を同定している。また, Fehr ら³⁴⁾ は, 新たに得られた低リノレン酸突然変異体 A23 と A5³⁵⁾ の交雑によって, *fan* 遺伝子と *fan2* 遺伝子が2重劣性となる A16 系統と A17 系統を作出し, これらの系統のリノレン酸含量が両親の含量を越えて低下したと報告している。われわれのグループにおいても, 複数の低リノレン酸含量となる突然変異体の単離に成功しているが, このうち M-24 と M-5 の交雑から得られた LOLL は *fan* 遺伝子と *fanx^a* 遺伝子が2重劣性となった系統であり, 2.9%までリノレン酸含量が低下している³⁶⁾ (Table 2)。

4・6 高リノレン酸含量となる突然変異遺伝子

われわれは, 先に述べた低リノレン酸となる変異とは逆にリノレン酸含量が増加する突然変異体も単離している。この B739 では, リノレン酸含量が18.4%まで増加しており¹⁶⁾, *lin^b* 遺伝子が原因となっていることを報告した³⁷⁾。

5 ダイズの脂肪酸生合成経路と遺伝子重複

Fig. 1 には, ダイズ種子中に蓄積される主要な脂肪酸の生合成経路を示している。パルミチン酸 (16:0) は, 脂肪酸合成の出発物質であるマロニル-ACP (4:0) が縮合を繰り返し, パルミトイル-ACP として合成された後, チオエステラーゼによって脂肪酸部分の切り出しがおこなわれる。パルミトイル-ACP は, *GmβKASII* を含む鎖延長酵素の働きによりステアロイル-ACP へと変換され, 同様にステアリン酸 (18:0) が生成される。続いてステアロイル-ACP 不飽和化酵素 (*GmSte*) の働きによってオレオイル-ACP に変換された後, チオエステラーゼの働きによってオレイン酸 (18:1) が切り出され, 小胞体型 ω-6 脂肪酸不飽和化酵素 (*GmFAD2*) および小胞体型 ω-3 脂肪酸不飽和化酵素 (*GmFAD3*) によってリノール酸 (18:2) およびリノレン酸 (18:3) の順で生合成されることが明らかになっている。

前章で述べたように, ダイズの脂肪酸組成に関する突然変異体を用いた遺伝学的解析から, 各脂肪酸生合成のステップに複数個の遺伝子が係わっていることが示唆された。そこでわれわれは, これら一連の脂肪酸生合成反応に関与する酵素のうち *GmβKASII*, *GmSte*, *GmFAD2*, *GmFAD3* をコードする遺伝子の単離を試み, それぞれ

の酵素について複数の独立した遺伝子を得ることに成功した。また, 突然変異系統から抽出したゲノミック DNA に対して, これらの遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析を行なったところ, 一部の突然変異体において特定の酵素遺伝子に欠失が観察され, 脂肪酸含量の遺伝との間に完全な一致が認められた^{38, 39, 40)}。更に詳細な分析の結果, サザンブロット分析では遺伝子の欠失が検出できなかった突然変異体の一部でも, 異なる酵素遺伝子の ORF 上に一塩基から数十塩基程度の小さな欠失が生じ, 酵素活性が消失しているものが存在することも明らかになっている。

4 倍体由来のゲノムを持つダイズでは広範囲の遺伝子重複が生じていることが明らかになっていることから, 脂肪酸生合成に関与する酵素群にも複数のアイソザイムが存在していると予想される。そこで, これらの突然変異体においてどのアイソザイム遺伝子に変異が生じたのかを分子レベルで理解することは, 今後, ダイズの脂肪酸含量についての育種を進めて行く上で非常に重要な情報となると考えられる。

ここではその一例として, リノール酸からリノレン酸への不飽和化のステップに関するわれわれの研究成果⁴¹⁾ について紹介する。われわれは, 突然変異誘発の際の原品種として使用してきた Bay より, 4 種類の小胞体型 ω-3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*GmFAD3-1a*, *GmFAD3-1b*, *GmFAD3-2a*, *GmFAD3-2b*) を単離し, これまでに得られている低リノレン酸含量となる突然変異体におけるこれらの遺伝子の変異を解析した。その結果, M-24 では *GmFAD3-1a* 遺伝子の ORF 上に1塩基の欠失が生じており, フレームシフト変異を生じていることが明らかになった。また, M-5 でも同様に *GmFAD3-1b* 遺伝子において ORF 上の19塩基が欠失しフレームシフト変異を生じていた他, J18, KM1495, IL8 では *GmFAD3-1b* 遺伝子全体にわたる欠失が生じていることが明らかになった (Table 4)。ダイズの小胞体型 ω-3 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入した出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて, これらの変異が酵素活性に与える影響を評価したところ, M-24 および M-5 で見出された変異によって, Bay 由来の *GmFAD3-1a* および *GmFAD3-1b* 遺伝子産物では検出

Table 4 Genotypes of Different Fatty Acid for Mutant Gene and Their Changes of the Coding Region.

Mutant line	Character	Genotype	Enzyme gene	Mutation type of coding region
M-24	Low Linolenic	<i>fanx^a</i>	<i>GmFAD3-1a</i>	Single-base pair deletion on ORF
M-5	Low Linolenic	<i>fan</i>	<i>GmFAD3-1b</i>	19-base pair deletion on ORF
J 18	Low Linolenic	<i>fan</i>	<i>GmFAD3-1b</i>	Large deletion containing ORF region

された酵素活性が完全に消失していることも明らかとなった。更に、酵母における実験結果と RT-PCR を用いた遺伝子発現パターンの解析結果を合わせて判断すると、*GmFAD3-2a* 遺伝子が更なる低リノレン酸含量の実現のための重要なターゲットとなることが示唆された。

6 新しい脂肪酸組成を持つダイズの作出を目指して

前章までに、われわれが行った突然変異遺伝子についての研究成果を含めダイズの脂肪酸組成の改良に利用可能な遺伝資源について述べてきた。

X 線の照射等によって得られた諸種の脂肪酸含量に関する突然変異体のうち、異なる遺伝子 (座) に突然変異を生じたもの同士であれば、交雑により組み合わせで改良に使用することが可能である。すなわち、異なる脂肪酸含量に対する突然変異遺伝子を組み合わせることにより、複数の脂肪酸含量を同時に変化させることや、同じ脂肪酸含量に対して相加的に働く突然変異遺伝子 (同義遺伝子) の組み合わせにより、特定の脂肪酸含量の変化を更に大きくすることも可能となる。

そこで本章では、これらの遺伝資源を利用したダイズの脂肪酸含量の改良の現状について、特に市場価値の高い高オレイン酸含量で低リノレン酸含量のダイズを中心に説明を行う。

多価不飽和脂肪酸 (リノール酸とリノレン酸) は、ダイズ油脂の自動酸化による品質劣化および過酸化物質発生の原因物質であることから、オレイン酸含量を高め、リノレン酸含量を低下させた品種の育成がダイズ油脂の市場価格向上のための最大のターゲットとなっている。

そこでわれわれは、高オレイン酸含量となる突然変異体 M23 系統と低リノレン酸含量となる LOLL 系統 (後述する) の組合せから高オレイン酸で低リノレン酸含量となる DHL 系統を開発した⁴²⁾。この DHL 系統は、原品種 Bay の脂肪酸組を大きく超えた高オレイン酸で (50.6%) かつ低リノレン酸含量 (2.7%) の油脂を生産する。また、DHL 系統とはほぼ同程度の高オレイン酸で低リノレン酸含量となる N98-4445A 系統が、USDA-ARS によって育成され、普及に移されている。この系統のオレイン酸含量は 58.9%, リノレン酸含量は 2.6% であり (Table 5), オレイン酸含量には 5 ~ 6 個の遺伝子が関与していると推定されている。さらに最近になって、Alt ら⁴³⁾ は、高オレイン酸含量の FA22 系統, N98-4445A 系統, M23 系統の相互交雑を行い、その後代のオレイン酸含量を調査したところ、N98-4445A 系統と M23 系統の組み合わせで、両親を越える 73 % のオレイン酸含量となる (N98-4445A × M23) -1 系統が得られたことを報告している (Table 5)。この高オレイン酸含量の系統は、M23 の *ol* 遺伝子に N98-4445A の高オレイン酸含量となる複数の遺伝子が加わって、超越分離 (transgressive segregation) を示したものであろうと考えられた。

この他にも高オレイン酸含量となるダイズとして、遺伝子組換え技術によって作成された High Oleic Soybean (Table 5) が知られている。これは *GmFAD2-1* 遺伝子をコサプレッションにより阻害したものであり、85% 以上の高いオレイン酸含量となる。また、この系統のオレイン酸含量の変動幅は 83% から 86% までであり、非常に安定していることも明らかになっている。これに対し

Table 5 Gene Combinations that Alter the Fatty Acid Composition and Some Transcendent Lines with High Oleate and Low Linolenate.

Line	Fatty acid					Genotype & Reference			
	Palmitic (16:0)	Stearic (18:0)	Oleic (18:1)	Linoleic (18:2)	Linolenic (18:3)	Palmitic	Stearic	Oleic	Linolenic
HPS	23.1	11.4	13.3	44.6	8.6	<i>sop2,fap2</i>	<i>St₁,st₂</i>	<i>Ol</i>	<i>Fan,Fanx</i>
MHPDHL	19.3	2.2	31.8	43.4	3.3	<i>Sop2,fap2</i>	<i>St₁,St₂</i>	<i>ol</i>	<i>fan,fanx^a</i>
HPLOLL	25.2	2.8	18.5	50.9	2.6	<i>sop2,fap2</i>	<i>St₁,St₂</i>	<i>Ol</i>	<i>fan,fanx^a</i>
HSO	11.2	11.8	20.4	48.2	8.4	<i>Sop1,Fap2</i>	<i>St₁,st₂</i>	<i>ol</i>	<i>Fan,Fanx</i>
DHL	11.7	2.8	50.6	32.2	2.7	<i>Sop1,Fap2</i>	<i>St₁,St₂</i>	<i>ol</i>	<i>fan,fanx^a</i>
N98-4445A	9.6	4.0	58.9	25.0	2.6	USDA-ARS/North Carolina State Univ.			
(N98-4445A × M23)-1	8.5	3.6	73.0	11.6	3.3	J.L. Alt et al., 2005.			
High Oleic Soybean	6.4	3.3	85.6	1.6	2.2	<i>GmFad2-1</i> Gene Transformation Line			
1 %Linolenate	10.3	5.0	30.0	53.4	1.3	A.J. Rosset al., 2000. <i>fan1,fan2,fan3</i>			
Bay	11.8	2.4	25.2	53.0	7.6	<i>Sop1, Fap2</i>	<i>St₁,St₂</i>	<i>Ol</i>	<i>Fan, Fanx</i>

て、われわれが単離した突然変異体 M23 系統においても、この High Oleic Soybean の標的と同じ *GmFAD2-1* 遺伝子に欠失が生じていることが明らかになっているが³⁹⁾、そのオレイン酸含量の分布は 42% から 58% までと大きな変動幅があった。これは High Oleic Soybean では、*GmFAD2-1* 遺伝子の導入が引き金となって、塩基配列の相同性が高い他の ω -6 不飽和酵素遺伝子 (アイソザイム遺伝子) についても発現の抑制 (gene silencing) が引き起こされた結果であろうと考えられる。

一方、われわれは、低リノレン酸含量となる突然変異体 M-5 系統と M-24 系統の交雑から前述の LOLL 系統を作成した。この系統では 2.8% にまでリノレン酸含量の低下が認められたが、さらに低リノレン酸含量を低下させる第 3 の遺伝子の探索を続けてきた。この間に、M-5 系統に対して X 線を再照射した集団から、さらに低リノレン酸含量となる MS382 の選抜を報告しているが⁴⁴⁾、新たな遺伝子座に生じた突然変異については未だ発見できていない。

これに対して Fehr と Hammond (Iowa State University) は、低リノレン酸含量となる *fan3* 遺伝子⁴⁵⁾ を見出し、*fan1*, *fan2*, *fan3* の三重劣性となりリノレン酸含量が 1.3% まで低下した低リノレン酸系統 (1% -Linolenate 系統) の作出に成功したと報告している⁴⁶⁾。また最近では、同じグループによって、この 1% -Linolenate 系統と前述した高オレイン酸系統の交雑により、高オレイン酸でかつ低リノレン酸含量となるダイズ品種の育種が進められている。

またわれわれのグループでは、これ以外の脂肪酸についても数種の突然変異体を組み合わせることにより、これまでにない脂肪酸組成を持ったダイズの作出を試みてきた^{42, 47)} (Table 5)。例えば、HPS 系統および HSO 系統は 3 個、HPLOLL 系統は 4 個、MPDHL 系統は 5 個の異なる突然変異遺伝子を組み合わせることにより、原品種 Bay とくらべて著しく異なる脂肪酸組成を実現したものである。

7 おわりに

現在、われわれは、前述した DHL 系統のアメリカでの試験栽培を開始する一方、国産ダイズの付加価値を向上させる目的で、佐賀県農業試験研究センターと共同して、高オレイン酸でかつ低リノレン酸含量となり、健康に対する効果が期待できる新品種の育成を進めている。

脂肪酸組成の改良のように、多数の突然変異遺伝子を組み合わせる複雑な育種を効率的に進めて行くためには、目的とする遺伝子を識別するための分子マーカーの利用が重要となる。とくに、ゲノム中での相同遺伝子の

重複度が高い植物種を対象とする場合や、環境による変動が大きな形質についての改良を行う場合は、分子マーカーの必要性がさらに高まるものと考えられる。このような観点から、われわれは、突然変異体の探索に始まり、その変異遺伝子の DNA レベルでの解析を行い、分子マーカーの開発を進めてきた。

今後、これら一連の研究から得られた知見を基にして開発された新たなダイズ品種が、広く普及し、植物油市場への大きな波及効果を生んでくれることを切に願いつつ、本稿の締めくくりとしたい。

文 献

- 1) S.M. Grundy, *New Engl. J. Med.*, 314, 745-8 (1986).
- 2) H. Liu & P.J. White, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 828-32 (1992).
- 3) T.J. Mounts, K. Warner, G.R. Rist, R. Kleiman, W.R. Fehr, E.G. Hammond & J.R. Wilcox, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 624-8 (1994).
- 4) H.J. Dutton, C.R. Lancaster, C.D. Evans & C.I. Cowan, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 28, 115-8 (1951).
- 5) C.D. Evans, H.A. Monser, D.G. McConnell, J.C. Cowan, J.L. Cartter & F.I. Collins, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 49, 578 (1972).
- 6) United States Food and Drug Administration, *A food labeling guide*, U.S. Dept. of Health and Human Serv. Publ. Washington, D.C. (1999).
- 7) B.L. Harvey & R.K. Downey, *Can. J. Plant Sci.*, 44, 104-11 (1964).
- 8) P.F. Knowles, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46, 130-2 (1969).
- 9) H. B. Jr. White & F. W. Quackenbush, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38, 113-7 (1961).
- 10) 高木 胖, 松尾 巧, 池田 邦寛, 佐賀大農彙, 47, 53-64 (1979).
- 11) 高木 胖, 松尾 巧, 岸川 英利, 育種学雑誌, 36, 163-76 (1986).
- 12) Y. Takagi, S.M. Rahman, H. Joo & T. Kawakita, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1778-9 (1995).
- 13) S.M. Rahman, Y. Takagi, K. Miyamoto & T. Kawakita, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 922-3 (1995).
- 14) S.M. Rahman, Y. Takagi, K. Kubota, K. Miyamoto & T. Kawakita, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1070-2 (1994).
- 15) Y. Takagi, A.B.M.M. Hossain, T. Yanagita, T. Matsueda & A. Murayama, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1735-8 (1990).
- 16) Y. Takagi, A.B.M.M. Hossain, T. Yanagita & S. Kusaba, *Japan. J. Breed.*, 39, 403-9 (1989).
- 17) Y. Takagi & S.M. Rahman, *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.*, 79, 23-7 (1995).
- 18) E.A. Erickson, J.R. Wilcox & J.F. Cavins, *J. Hered.*, 79, 465-8 (1988).
- 19) W.R. Fehr, G.A. Welke, E.G. Hammond, D.N. Duvick & S.R. Cianzio, *Crop Sci.*, 31, 88-9 (1991).
- 20) S.R. Schnebly, W.R. Fehr, G.A. Welke, E.G. Hammond, & D.N. Duvick, *Crop Sci.*, 34, 829-33 (1994).
- 21) T. Kinoshita, S.M. Rahman, T. Anai & Y. Takagi, *Breed-*

- ing Sci.*, **48**, 377-81 (1998).
- 22) T.F. Horejsi, W.R. Fehr, G.A. Welke, D.N. Duvick, E.G. Hammond & S.R. Cianzio, *Crop Sci.*, **34**, 331-4 (1994).
 - 23) S.M. Rahman, T. Kinoshita, T. Anai & Y. Takagi, *J. Heredity*, **90**, 423-8 (1999).
 - 24) S.R. Schnebly, W.R. Fehr, G.A. Welke, E.G. Hammond & D.N. Duvick, *Crop Sci.*, **34**, 829-33 (1994).
 - 25) D.L. Stoltzfus, W.R. Fehr, G.A. Welke, E.G. Hammond & S.R. Cianzio, *Crop Sci.*, **40**, 647-50 (2000).
 - 26) J.M. Narvel, W.R. Fehr, J. Ininda, G.A. Welke, E.G. Hammond, D.N. Duvick & S.R. Cianzio, *Crop Sci.*, **40**, 635-9 (2000).
 - 27) D.L. Stoltzfus, W.R. Fehr, G.A. Welke, E.G. Hammond & S.R. Cianzio, *Crop Sci.*, **40**, 1538-42 (2000).
 - 28) G.L. Graef, W.R. Fehr & E.G. Hammond, *Corp Sci.*, **25**, 1076-9 (1985).
 - 29) D.M. Bubeck, W.R. Fehr & E.G. Hammond, *Corp Sci.*, **29**, 652-6 (1989).
 - 30) S.M. Rahman, Y. Takagi & T. Kinoshita, *Theor. Appl. Genet.*, **95**, 772-6 (1997).
 - 31) Y. Takagi & S.M. Rahman, *Theor. Appl. Genet.*, **92**, 179-82 (1996).
 - 32) S.M. Rahman, Y. Takagi & T. Kinoshita, *Crop Sci.*, **36**, 1125-8 (1996).
 - 33) E.G. Hammond & W.R. Fehr, *Crop Sci.*, **23**, 192 (1983).
 - 34) W.R. Fehr, G.A. Welke, E.G. Hammond, D.N. Duvick & S.R. Cianzio, *Crop Sci.*, **32**, 903-6 (1992).
 - 35) D.M. Bubeck, W.R. Fehr & E.G. Hammond, *Crop Sci.*, **29**, 652-6 (1989).
 - 36) S. M. Rahman, T. Kinoshita, T. Anai, S. Arima & Y. Takagi, *Crop Sci.*, **38**, 702-6 (1998).
 - 37) S.M. Rahman, Y. Takagi & S. Towata, *Breeding Sci.*, **44**, 267-70 (1994).
 - 38) Y. Yamasita, T. Kinoshita, S.M. Rahman, K. Okada, T. Anai & Y. Takagi, *Bull. Fac. Agr., Saag Univ.*, **83**, 31-6 (1998).
 - 39) T. Kinoshita, S.M. Rahman, T. Anai & Y. Takagi, *Bull. Fac. Agr., Saag Univ.*, **83**, 37-42 (1998).
 - 40) S.M. Rahman, T. Kinoshita, T. Anai & Y. Takagi, *Bull. Fac. Agr., Saga Univ.*, **83**, 43-8 (1998).
 - 41) T. Anai, T. Yamada, T. Kinoshita, S.M. Rahman & Y. Takagi, *Plant Sci.*, **168**, 1615-23 (2005).
 - 42) S.M. Rahman, T. Kinoshita, T. Anai & Y. Takagi, *Crop Sci.*, **41**, 26-9 (2001).
 - 43) J.L. Alt, W.R. Fehr, G.A. Welke & J.G. Shannon, *Crop Sci.*, **45**, 2005-7 (2005).
 - 44) Y. Takagi, S.M. Rahman, T. Anai, S.K. Wasala, T. Kinoshita & M. Khalekuzzaman, *Breeding Sci.*, **49**, 1-5 (1999).
 - 45) W.R. Fehr & E.G. Hammond, *U.S. Patent* 55344325. Date issued: 9 Dec. (1998).
 - 46) A.J. Ross, W.R. Fehr, G.A. Welke & S.R. Cianzio, *Crop Sci.*, **40**, 383-6 (2000).
 - 47) S.M. Rahman, T. Anai, T. Kinoshita, S. Arima & Y. Takagi, *Breeding Sci.*, **54**, 225-9 (2004).