

ダイズ突然変異体リソースの開発と育種利用

穴井 豊昭

佐賀大学 農学部

ダイズは東アジアに自生するツルマメから栽培化された作物種であるが、その種子は乾燥重量の約 40%のタンパク質に加えて、オリゴ糖やイソフラボン、サポニンといった機能性のファイトケミカル類を豊富に含んでおり、日本においても伝統的な食材としてのみならず健康食品としても注目を集めている。加えて、種子重量の約 20%の脂質を含むことから、油糧作物としても極めて重要な位置を占めている。また、マメ科の作物であるため、根粒菌との共生により、大気中の窒素を吸収し、自らの養分として利用することができるという特徴も備えている。

我々の研究グループでは、ダイズの作物としての可能性に注目しており、突然変異誘発技術を用いて、様々な種子成分や開花期、草型などダイズの有用農業形質の遺伝的改良に取り組んできた。この成果として、特に、ダイズ油脂を構成する種々の脂肪酸の生合成に関わる酵素遺伝子の同定と、これらの遺伝子に変異を生じた突然変異体の単離、さらに、これらの脂肪酸突然変異体を組み合わせたダイズ油脂中の脂肪酸組成の改良では、世界をリードする結果を出しており、世界初の非遺伝子組換え超高オレイン酸ダイズや超低リノレン酸ダイズ等の育成も進めている。また、この他にも、他の研究グループとも連携しつつ、イソフラボンやサポニンといった機能性を持つ二次代謝産物の代謝に関わる突然変異体の単離と原因遺伝子の探索や、ダイズの開花を制御する遺伝子や花色を制御する遺伝子についての同定も進めており、新たな機能性ダイズの育成に利用可能な多数の有用突然変異系統のコレクションを開発してきた。

また、これらの突然変異体集団（変異体ライブラリー）には、X-線と EMS という二つの異なる変異原を使用して作成したものが存在しているが、いずれの集団についても、メタボローム解析等による表現形質からの変異体スクリーニングと TILLING 法と呼ばれる逆遺伝学的な手法を用いた塩基配列からの変異体スクリーニングの双方を行ってきた実績がある。

現在、我々は、ダイズの栽培特性に影響を与える草型や種子中の主要な栄養成分についての突然変異体の単離を進めており、将来的にはこれらの突然変異遺伝子を使って、より生産性が高く栄養価の高いダイズ品種の育成を目指していることから、本講演では、我々のダイズ突然変異育種の取り組みと現状および課題について説明を行いたいと考えている。

大豆突然変異体リソースの 開発と育種利用

佐賀大学 農学部
穴井豊昭

ダイズ



根粒菌による窒素固定



共生する根粒菌により、
大気中の窒素を養分と
して利用できる



必要な窒素肥料の量が
少なく、持続的な生産
が可能

ダイズの栄養価



タンパク質: ~40%
脂質: ~20%
飽和脂肪酸: ~3%
オレイン酸: ~4%
多価不飽和脂肪酸: ~12%
炭水化物: ~30%
食物繊維: ~10%
可溶性糖類: ~8%
その他栄養成分:
イソフラボン, サポニン,
など

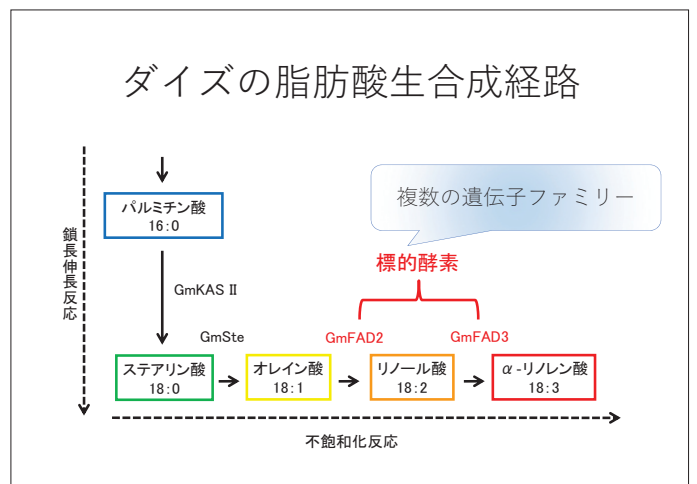
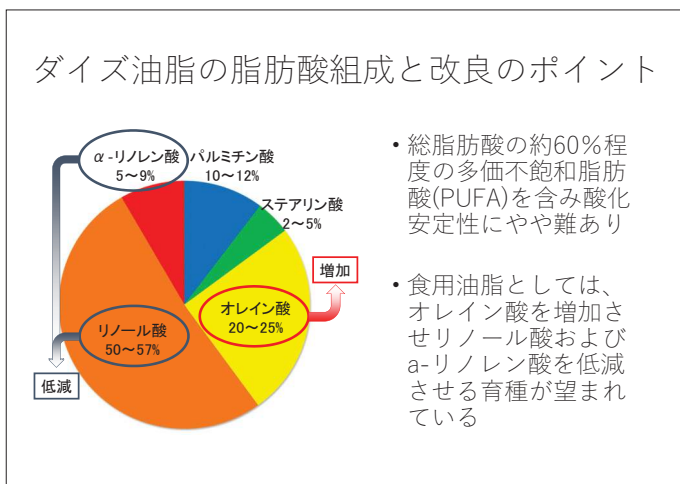
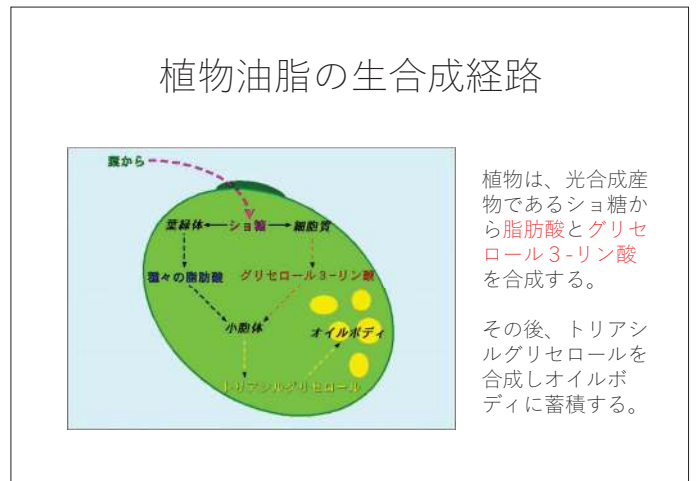
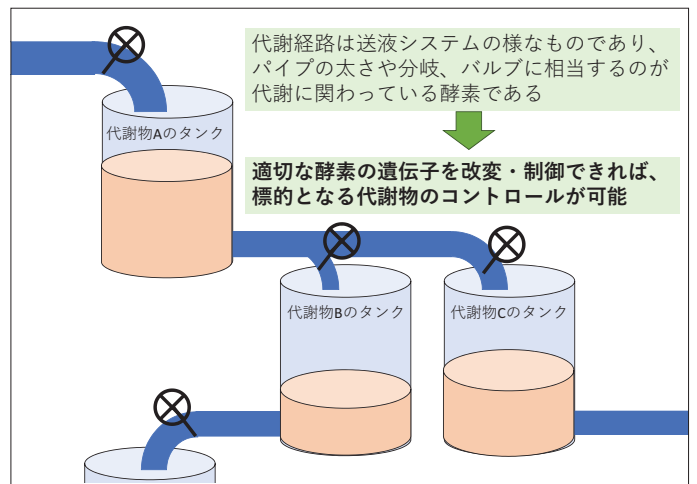
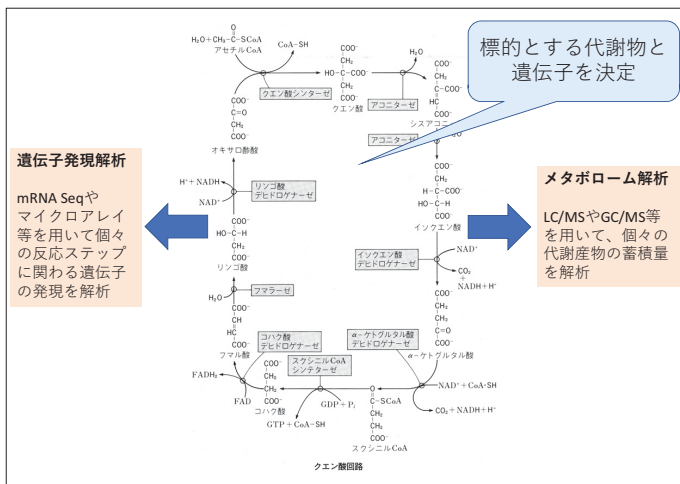
健康に対するダイズの効能

- 1999年にアメリカでは、「1日25グラム以上のダイズタンパク質を摂取すれば心臓疾患のリスクが減らせる」と表示できることになった。
- 2006年にアメリカの『ヘルス』誌が発表した世界の5大健康食品は、オリーブ油、ダイズ、ヨーグルト、ダール、キムチであった。

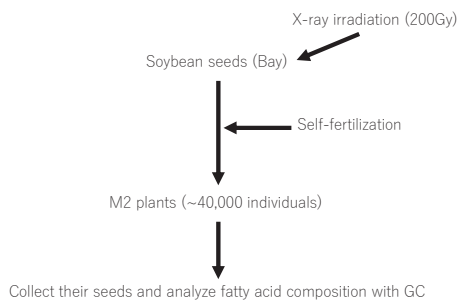
オリーブ油なみのオレイン酸含量に改良された
ダイズは高付加価値の健康食品素材となるか？

作物の代謝経路を改変する目的

- 作物の成分を改良し商品価値を高める
→ 栄養分や機能性成分の蓄積、有害・不要成分の低減
- 作物の病害抵抗性や環境適応性を高める
→ 抗菌物質や忌避物質、適合溶質等の蓄積
- 薬品や化成品の原料となる物質を生産する
→ 薬理活性や機能性を持つ成分の蓄積



X-線照射による突然変異体の誘発

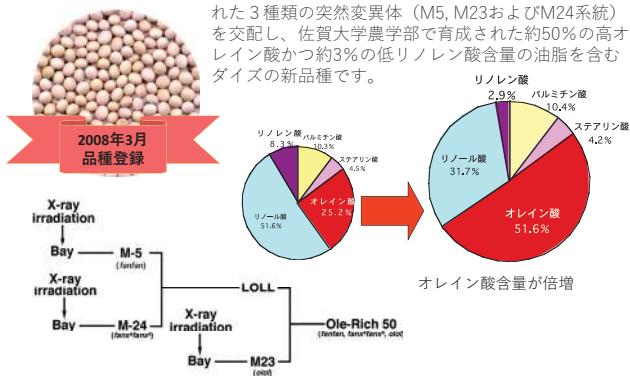


主要なダイズ突然変異体の脂肪酸組成

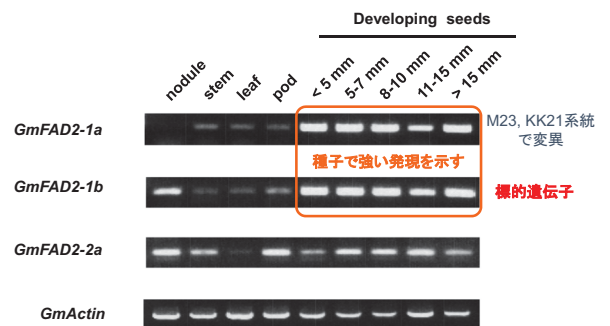
Line	Fatty acid (% of total oil)					Genotype	Character
	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Lindenic		
C1726	8.5	3.9	22.0	56.0	9.6	<i>fap1 fap1</i>	low palmitic
B	6.1	3.4	26.5	55.4	8.6	<i>spl1 spl1</i>	high palmitic
J10	17.2	5.0	19.8	48.4	9.7	<i>fap2 fap2</i>	high palmitic
KK7	14.2	5.0	23.3	49.5	8.0	<i>fap4 fap4</i>	high palmitic
KK2	10.3	7.2	23.1	51.5	7.9	<i>at181</i>	high stearic
M25	9.5	21.2	15.6	44.0	9.7	<i>at362</i>	high stearic
KK21	10.2	3.6	40.2	37.2	8.8	<i>dd</i>	high oleic
M23	9.0	4.4	48.6	29.5	8.5	<i>dd</i>	high oleic
M11	10.3	4.3	35.8	41.4	8.2	<i>cdp</i>	
J18	10.5	4.6	25.1	55.0	4.8	<i>bin1 bin1</i>	
KL8	8.9	4.8	24.6	54.8	6.9	<i>bin1 bin1</i>	
M5	9.8	4.5	25.5	55.3	4.9	<i>bin1 bin1</i>	low linoleic
M24	10.0	5.3	27.3	51.5	5.9	<i>bin1 bin1</i>	
Bay	10.6	4.2	25.2	51.7	8.3	<i>Fap1Fap1 Fap2Fap2 Spl1Spl1 Fap4Fap4 S101S1 S2S2 O1O1 FanFan FanFan</i>	normal

オレリッチ50の開発

オレリッチ50®とは、X-線を照射することにより得られた3種類の突然変異体（M5, M23およびM24系統）を交配し、佐賀大学農学部で育成された約50%の高オレイン酸かつ約3%の低リノレン酸含量の油脂を含むダイズの新品種です。

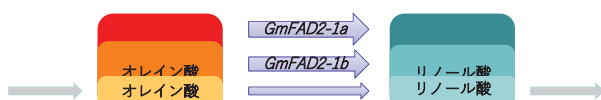


ダイズにおけるFAD2遺伝子ファミリーの発現



突然変異体ライブラリーからのGmFAD2-1b突然変異系統の検索

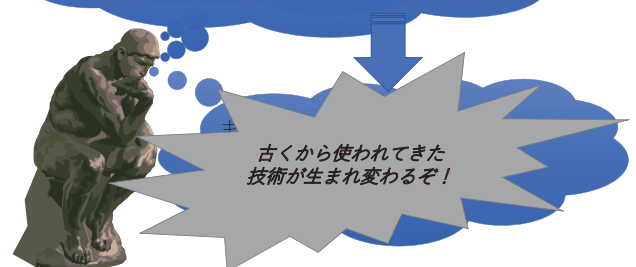
以前、我々がX-線照射集団より単離したKK21およびM23系統は共にGmFAD2-1a遺伝子上に変異を生じており、Bayバックグラウンドでオレイン酸含量が約50%に増加した



本研究では、更に高オレイン酸含量となるダイズの開発を目指して、GmFAD2-1b突然変異系統のスクリーニングした

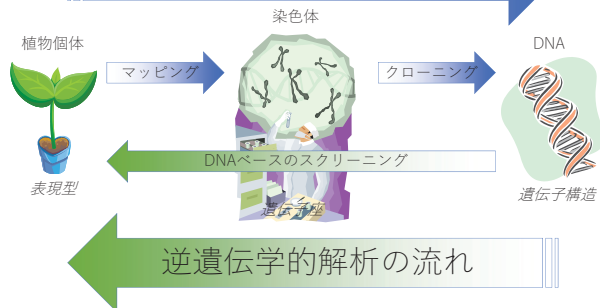
問題解決のヒント

突然変異集団とDNA分析技術を組み合わせれば問題は解決だ！

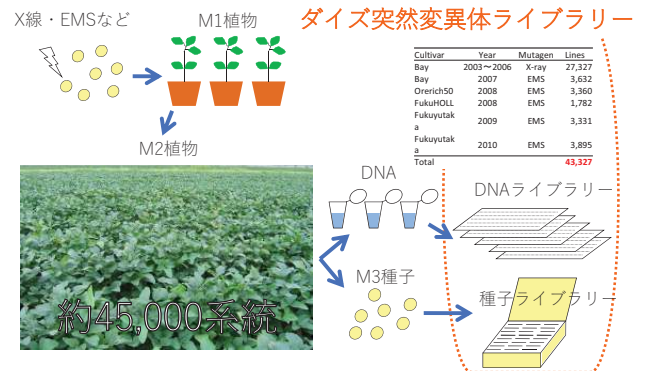


逆遺伝学とは何か？

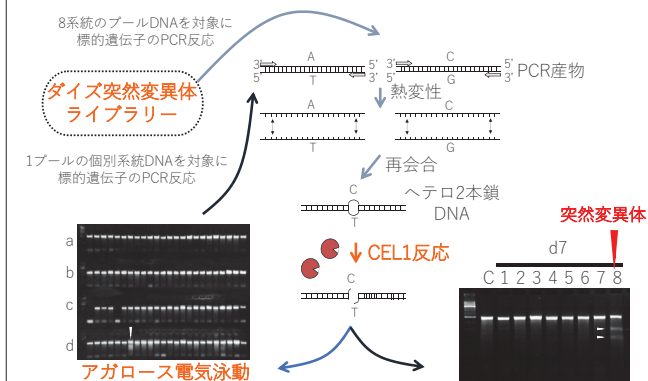
通常の遺伝学的解析の流れ



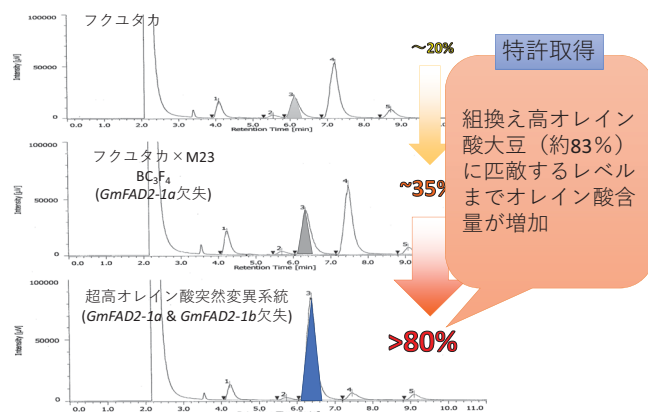
異なる変異原処理による ダイズ突然変異体ライブラリーの作成



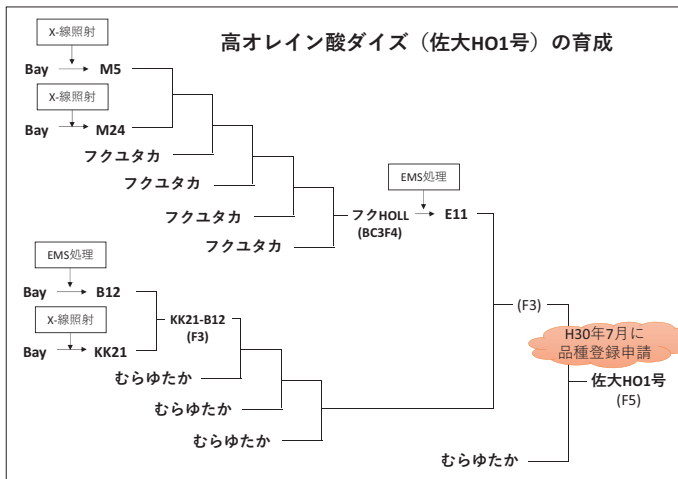
安価で効率的な改良TILLING法



超高オレイン酸ダイズ系統



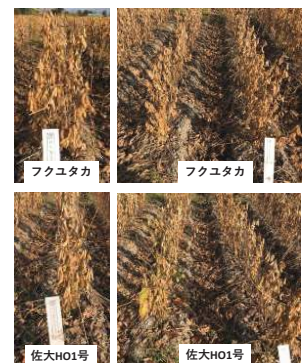
高オレイン酸ダイズ (佐大HO1号) の育成



成育期の形態 (8月下旬)



成熟期の形態 (11月中旬)



子実の形態



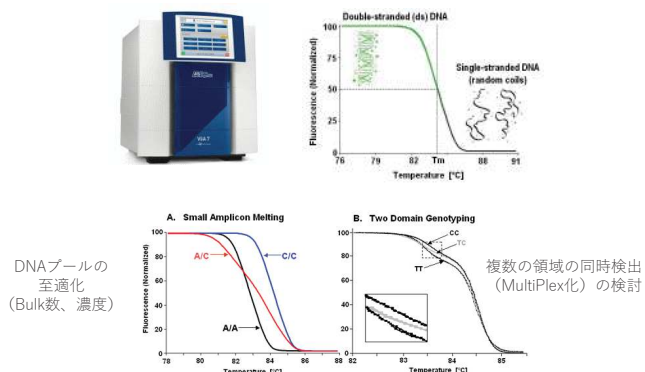
品種・系統名	開花期 (月 日)	成熟期 (月 日)	主茎長 (cm)	主茎節数 (節/本)	最下位葉葉 位置 (cm)	分枝数 (葉/本)	葉数 (葉/本)	子実重 (g/本)	同左標準比	百粒重 (g)
佐大H01号	8月27日	11月30日	68.4	14.1	17.4	3.9	96.1	24.8	97	25.7
フクユタカ	8月28日	11月9日	67.9	14.7	17.1	2.7	49.5	25.5	100	29.4

注 1) 播種日: 7月21日 収穫日: 11月23日
2) 条間: 60cm, 株間: 20cm, 2本立て栽培

品種・系統名	パルミチン酸	ステアリン酸	オレイン酸	リノール酸	リノレン酸
佐大H01号	7.2	1.1	86.2	2.4	3.1
フクユタカ	11.7	1.7	24.8	54.4	7.5

n=5

HRM (High Resolution Melting) 法による変異の検出



アンプリコンシーケンス法による変異の検出

ライブラリーに含まれている突然変異を網羅的に検索するには、全系統の全ゲノムシーケンスだが。

1. 標的遺伝子の増幅 (イントロンを含め~5kb、3種類のアンプリコン、バルクDNA使用、集団全体)



2. アンプリコンシーケンスによる塩基配列解析 (Deep Coverage、レアな変異)



3. ライブラリー全体に含まれる変異の把握

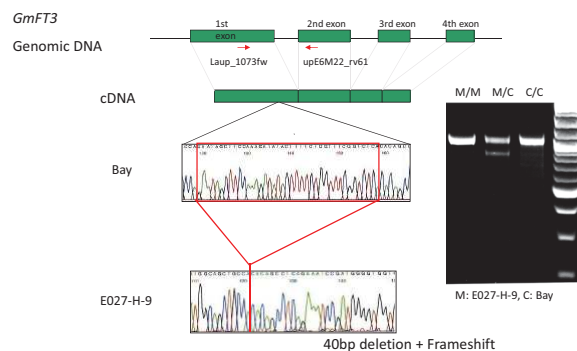


4. HRMによる変異体の検索 (非同義置換変異など、特定の変異に絞った検索)



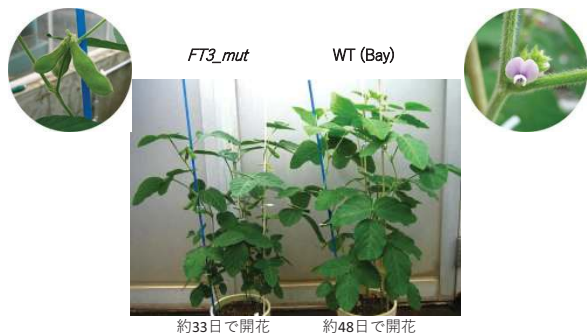
次世代型シーケンサー
(Illumina/MiSeq)

GmFT3突然変異体の単離



GmFT3遺伝子はフィトクロームAをコードしている

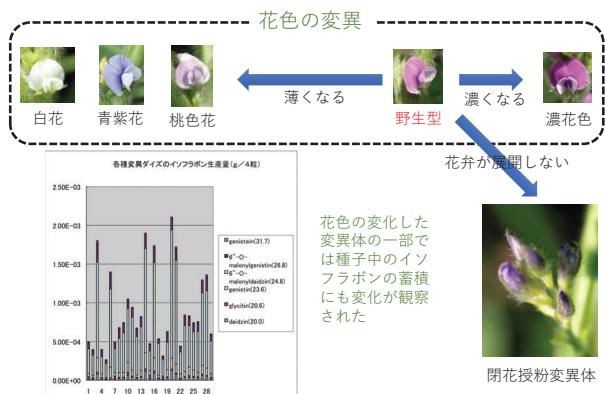
Bayの変異体ライブラリーから得られた開花期制御遺伝子の変異体



草型に関する突然変異体の例



花に関する突然変異体の例

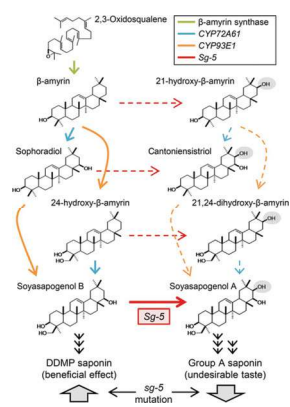


イソフラボン変異体

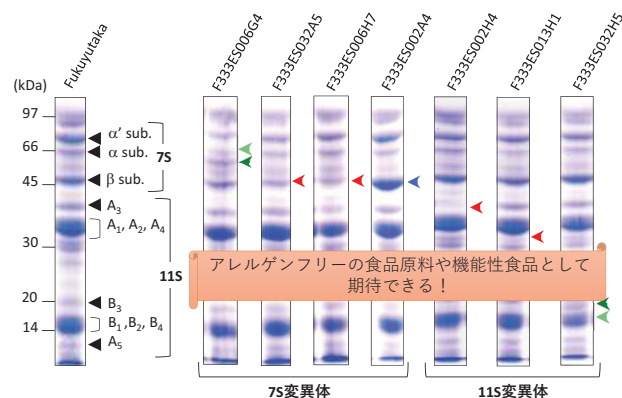
- 近年、機能性成分として注目を集めている大豆イソフラボンの代謝経路が変化した突然変異体の単離を進めており、今後は機能性食品や医薬品の原料としての育種素材として活用してゆく予定

サポニン変異体

- 大豆種子に含まれるサポニンについても様々な薬理効果が知られている
- 甘草のグリチルリチンや朝鮮人参のジンセノサイドなども共通の前駆物質から合成される
- 分子種によって不快味の原因となる



貯蔵タンパク質変異体

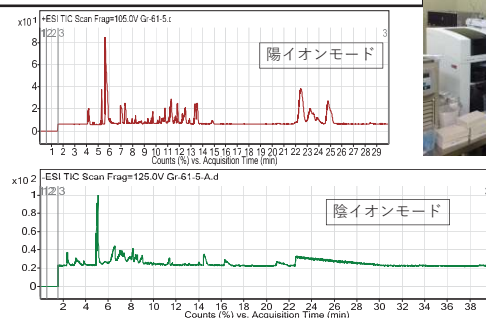


メタボローム解析に用いる分析機器

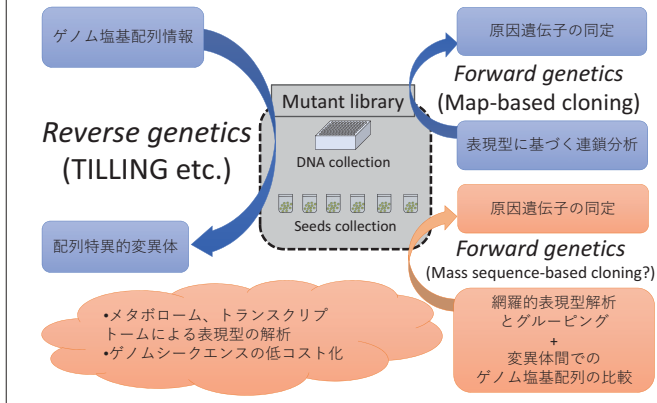


CE/MS による変異体のスクリーニング

CE/MSで同定可能なイオン性化合物
陽イオン: アミノ酸、アミン、ヌクレオチド等
陰イオン: 有機酸、ヌクレオシド等



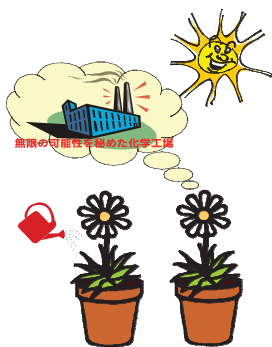
変異体ライブラリーの利用法



作物を物質生産に用いるメリット

- 多様な代謝経路が存在
→ アルカロイドやテルペノイド、フェノール化合物等の合成に特殊化した二次代謝産物の合成経路を持つ
- 効率的な栽培・収穫法が確立
→ 作物であれば栽培のためのインフラが整備されており、容易にスケールアップした生産に対応可能
- 特殊な培養設備等が不要
→ 微生物や培養細胞を利用する場合に比べて、環境制御のための設備・エネルギーが少なく済む

作物はクリーンな化学工場になる！



- 作物は水と二酸化炭素、土壌中の窒素などを吸収し、太陽光エネルギーを使って、多様な代謝産物を生産する
- 特に種子にはデンプン、油脂、タンパク質などの貯蔵物質を大量に蓄積する
- 作物として改良されてきた植物は生産性が高く、栽培のための技術やインフラも整備されている