

大豆のルテイン分解関連遺伝子の特徴づけおよび カロテノイド代謝改変による大豆の高ルテイン化

金丸京平*・早瀬健彦・山田哲也・喜多村啓介

北海道大学大学院農学研究院

Characterization of Candidate Genes Involved in Catabolism of Lutein in Soybean Seeds and Metabolic Engineering for Generation of Lutein Rich Soybean

Kyohei KANAMARU, Takehiko HAYASE,
Tetsuya YAMADA and Keisuke KITAMURA

Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

ABSTRACT

In this study, we examined the relationships between high lutein trait of wild soybean seeds and the expression levels of two genes encoding CCDs, which are involved in lutein catabolism. Putative two genes, *GmCCD1* and *GmCCD4* were selected from the soybean genome database based on the homology with *CCD* genes in *Arabidopsis* and *Chrysanthemum*. Quantitative RT-PCR analysis revealed that two genes were always expressed during seed development. The expression levels of *GmCCD* genes of RIL with low lutein were slightly higher than that of RIL with high lutein in the middle stage of seed development. Linkage analysis using CAPS marker for *GmCCD4* gene revealed that the *GmCCD4* gene was located on the linkage group D1a. However, the position was not correspondence to QTL for lutein content detected on the linkage group D1a. In addition, we attempted to generate transgenic soybean plants for stable accumulation of lutein in soybean seeds by the metabolic engineering. We constructed RNAi vectors to knock-down the expression of *GmCCD1* or *GmCCD4* gene under the control of cotyledon specific promoter. The transformation of a Japanese soybean variety has been proceeded by *Agrobacterium*-mediated method. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 46-50, 2009.

Key words : *Glycine max*, *Glycine soja*, lutein, carotenoid cleavage dioxygenase, RNAi, 11S globulin promoter

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

ルテイン (C₄₀H₅₆O₂) はカロテノイドに分類される脂溶性の抗酸化物質である。ヒト体内において、ルテインとその構造異性体のゼアキサンチンは網膜黄斑部や水晶体等に特異的かつ高濃度に局在しており¹⁾、強い抗酸化作用と細胞損傷を誘発する有害な青色光の吸収作用により加齢黄斑変性症や白内障に対して予防・改善等の特異的な生理機能を有する²⁾。また、心疾患予防や紫外線から皮膚を保護する作用^{3,4)}も報告されており、ルテインのヒトへの栄養機能が注目されている。大豆種子は主要なカロテノイドとして低濃度のルテインを含む⁵⁾が、ルテイン含量を高める育種は行われてこなかった。これまでに、筆者らは大豆栽培品種に比べルテインを数倍高く含有する複数のツルマメ系統を同定し、本形質が遺伝形質であることを明らかにしてきた^{6,7)}。昨年度の研究において、ルテインの分解に関与する遺伝子がツルマメの高ルテイン含量形質と密接に関連していると考えられた⁸⁾。最近になって、シロイヌナズナの種子⁹⁾やキクの黄色花卉¹⁰⁾におけるルテインの蓄積にカロテノイド分解酵素(CCD)をコードする遺伝子の発現の有無が関与していることが明らかにされた。本研究では、大豆種子におけるルテインの蓄積機構とカロテノイド分解関連遺伝子(CCD)との関連性を検討するとともに、代謝制御による大豆の高ルテイン化に向けた新たな育種法を確立することを目的として遂行した。

方 法

定量RT-PCRによる大豆の推定CCD遺伝子の発現解析

大豆系統TK780と高ルテインツルマメ系統B01167の交雑に由来するRIL集団の中から、登熟時期や種子サイズが類似した高ルテイン系統(RIL89)と低ルテイン系統(RIL123)を選抜し、発現解析の供試材料とした。各RILを2008年北海道大学精密実験圃場に設置したビニールハウスで栽培し、開花後およそ30日、40日および50日の登熟種子の全RNAからcDNAを調製した。シロイヌナズナのCCD1 (At3g63520)とキクのCCD4a (EU334432)の配列情報を用いてアメリカエネルギー省(DOE)のJoint Genome Instituteで公開されている大豆ゲノムのデータベースを基に相同性検索を行った。その結果、大豆においてCCDをコードすると推定される配列(Glyma13g27220とGlyma01g35910、以下それぞれ*GmCCD1*と*GmCCD4*)を取得した。次にこれらの遺伝子に特異的なプライマーを設計し(Table 1)、定量RT-PCR法により発現解析を行った。遺伝子の発現量は18SリボソームRNA

遺伝子の発現を内部標準として、Threshold Cycle (Ct)値を基に計算した。

*GmCCD4*遺伝子の連鎖地図へのマッピング

TK780とB01167の*GmCCD4*遺伝子について、ABI3130シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。TK780とB01167の間で検出された1塩基多型を基にしてdCAPSマーカーを作製した。dCAPSプライマーを用いてPCRを行った後、制限酵素*Sma* IによりPCR産物を消化して多型を検出した(Fig. 2)。dCAPSマーカーを用いてRILs96系統の*GmCCD4*遺伝子型を決定し、Map manager QTXを用いて連鎖解析を行った。

*GmCCD1*および*GmCCD4*遺伝子のRNAi発現ベクターの構築

大豆種子のルテインおよびカロテノイドの代謝制御を目的として、大豆推定*GmCCD1*および*GmCCD4*遺伝子の発現を抑制するためのRNAi発現ベクターを構築した。形質転換植物体の選抜マーカー遺伝子*Bar*(除草剤グルフォシネート耐性)を含むバイナリーベクターpMDC123をベースに、RNAiコンストラクト作製のバイナリーベクターpBI-sense, anti sense GW(GFP)からRNAiに必要な領域(インパーテッドリピート領域)ならびにGFPレポーターカセットを挿入した。また、種子特異的に発現抑制を図るためにインパーテッドリピート領域の上流に種子貯蔵たん白質11Sグロブリン*gy1*プロモーター(11SPro)を連結した。

結果と考察

高ルテイン含量形質と推定*GmCCD*遺伝子との関係

シロイヌナズナの種子やキクの黄色花卉におけるルテインの蓄積にはカロテノイド分解酵素遺伝子の発現の有無が密接に関与することが報告されている^{9,10)}。昨年度の研究において、大豆種子のルテイン含量は種子登熟に伴い常に減少しており、これらのことから種子に蓄積するルテイン含量とその分解程度が深く関わることが予想された。先の報告にあるようにルテインの分解と密接に関連するCCDの中で、大豆のCCDをコードすると考えられる*GmCCD1*および*GmCCD4*遺

Table 1. Primer sequence for quantitative RT-PCR

<i>GmCCD1</i> -F	5'-CAGGGTCTCTATGACTTGGGAC-3'
<i>GmCCD1</i> -R	5'-CTGCAACAGGATCTGCTGACATTG-3'
<i>GmCCD4</i> -F	5'-CGGATTGAACCCCTCTTGACATGATC-3'
<i>GmCCD4</i> -R	5'-TCCATTCTCTCCAGCGCGTGC-3'
<i>18S</i> rRNA-F	5'-TGATTAACAGGGACAGTCCG-3'
<i>18S</i> rRNA-R	5'-ACGGTATCTGATCGTCTTCG-3'

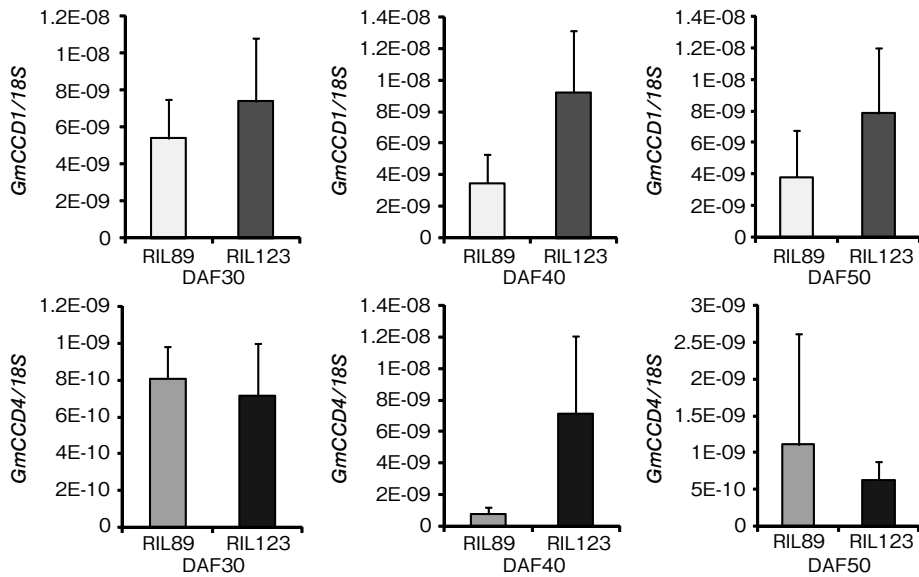


Fig. 1. Expression of *GmCCD1* and *GmCCD4* genes in the RIL123 with low lutein and RIL 89 with high lutein. The transcript levels of the genes relative to the 18S rRNA transcript level were assessed by quantitative RT-PCR. The data shown presented the mean and SD obtained from three replications. DAF, day after flowering.

伝子の発現解析を行った。その結果、高ルテイン系統RIL89と低ルテイン系統RIL123ともに開花後30、40および50日の登熟種子において両遺伝子の発現が確認された (Fig. 1)。また、開花後約40日の登熟種子において、RIL123の両遺伝子の発現がRIL89よりも若干ではあるが高い傾向にあった。このことから、*GmCCD1*あるいは*GmCCD4*遺伝子が野生大豆ツルマメに由来する高ルテイン含量形質の原因遺伝子の1つである可能性が高いと考えられた。これまでに、我々はTK780とB01167のRIL集団を用いたQTL (量的形質遺伝子座) 解析により、ルテイン含量に関与するQTLsを連鎖群D1a (寄与率 = 27%) と連鎖群D2 (寄与率 = 24%) に同定している。大豆ゲノムのデータベースから*GmCCD4*は連鎖群D1aに座乗することが推定された。そこで、ルテイン含量に関与するQTLと当該遺伝子との関連性を明らかにするために、TK780とB01167との間で認められた1塩基多型を基にdCAPSマーカーを作製し連鎖解析を行った。その結果、*GmCCD4*遺伝子は連鎖群D1aのSSRマーカー、Satt507の近傍にマッピングされた (Fig. 2)。しかし、連鎖群D1aに座乗するルテイン含量のQTLとは一致しないことが分かった。これらの結果から、ツルマメの高ルテイン含量形質は*GmCCD4*遺伝子そのものではなく、その発現制御に関わる遺伝子あるいはルテインの貯蔵・蓄積に関

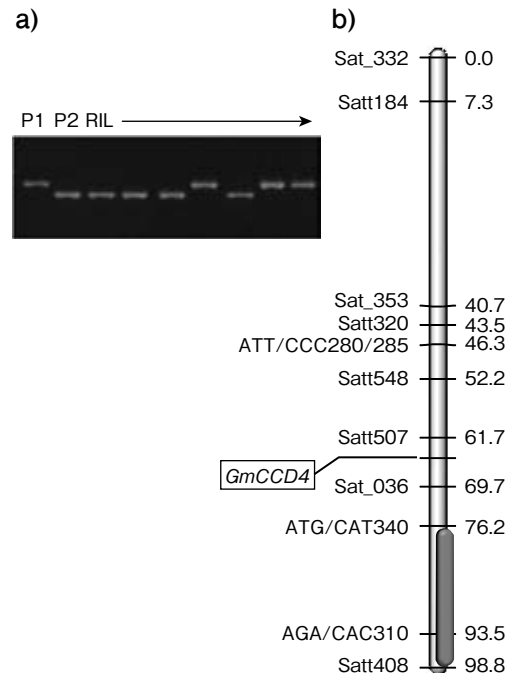


Fig. 2. a) The polymorphic bands of *GmCCD4* using dCAPS marker (*Sma* I). P1, TK780; P2, B01167. b) Map position of the loci for *GmCCD4* gene and QTL associated with lutein content of soybean seed on linkage group D1a. Bold line shows the QTL region for lutein content.

わる遺伝子が関与することも考えられる。最近、連鎖群D1aのQTL領域には緑子葉大豆として知られるStay green変異体（2重劣性*d1d1d2d2*）の原因遺伝子の1つである*Sgr2*（D1座）が座乗することが分かってきた。緑子葉大豆では黄子葉大豆に比べクロロフィルとルテインが高く蓄積することが知られており^{5,6}、*Sgr2*遺伝子はクロロフィルやルテイン等の結合する葉緑体中の集光性タンパク質複合体（LHCP）IIの分解に関与することが示唆されている¹¹。今後、ツルマメの高ルテイン含量形質についても*Sgr2*遺伝子との関連性を精査する必要がある。

カロテノイド代謝制御による大豆の高ルテイン化

シロイヌナズナでは*AtCCD1*遺伝子T-DNA挿入変異体の種子において、ルテインを主としたカロテノイド含量が増大する⁹。また、キクでは*CmCCD4a*遺伝子の変異体とそのRNAi個体において花卉のルテインおよび総カロテノイド含量増加が認められている¹⁰。Fig. 1に示したように大豆種子における*GmCCD1*と*GmCCD4*遺伝子の恒常的な発現は、大豆種子のルテインを含めたカロテノイドの分解に関与していることが考えられる。そこで、大豆における*GmCCD1*と*GmCCD4*遺伝子の機能解析および当該遺伝子の制御による大豆の高ルテイン化の可能性を検討するために、*GmCCD1*と*GmCCD4*遺伝子を標的としたRNAi形質転換体の作出を試みた。最近、複数の分子種のCCDによるカロテノイドの分解産物に由来するホルモン様シグナル（ストリゴラクトン）と分枝に関する報告がある¹²。このことは、CCDの活性が様々な生育生理に

関与することを示している。そこで、他の植物組織への影響を最小限に抑えるため、RNAiカセットを種子貯蔵たん白質（11Sグロブリン）のプロモーターの制御下に置き、種子組織特異的な二本鎖RNAの産生を試みた。RNAi発現ベクターの構築として、発現解析に用いたプライマーを用いてPCRを行い、各遺伝子の増幅断片をエンタリーベクター（pCR8/GW/TOPO）にクローニングした。本エンタリークローンとデスティネーションベクターを用いてGatewayシステムによってRNAi発現ベクターを作製し（Fig. 3）、アグロバクテリウムEHA105株に導入した。さらに、既報¹³の方法によりRNAi発現ベクターを有するアグロバクテリウムを日本大豆品種に導入した。RNAi発現ベクターは形質転換植物体の選抜マーカーとしての*Bar*遺伝子に加えレポーターとしてGFPユニットを併せ持つため常に導入遺伝子の有無を視覚的にモニターすることができる。今後、標的遺伝子の発現解析やルテインおよびカロテノイドの解析を行い、遺伝子操作による大豆種子のルテイン含量を制御する手法開発の可能性について検討する。

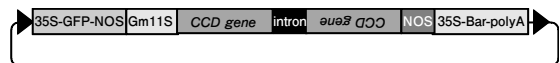


Fig. 3. Schematic of RNAi binary vector (pMDC123-GFP-Gm11S-RNAi) of *GmCCD1* and *GmCCD4* genes. 35S, CaMV35S promoter; GFP, green fluorescence protein; Gm11S, 11S globulin gyl promoter; Bar, phosphinothricine acetyl transferase gene.

要 約

本研究は、ツルマメの高ルテイン含量形質とカロテノイド分解関連遺伝子との関係について検討した。シロイヌナズナおよびキクのCCD遺伝子の配列情報を基に、大豆ゲノム情報から相同性の高い配列を抽出した。発現解析の結果、ルテイン等のカロテノイド分解に関与すると推定される*GmCCD1*および*GmCCD4*遺伝子は登熟種子において常に発現していることを確認した。また、登熟中期における遺伝子発現の程度において、高ルテイン系統と低ルテイン系統との間に僅かながら差を認めた。さらに、dCAPSマーカーを用いて連鎖解析を行った結果、*GmCCD4*遺伝子は連鎖群D1aに位置したが、連鎖群D1aに同定したルテイン含量のQTLとは一致しなかった。次に、代謝制御による大豆の高ルテイン化を検討するため、種子特異的に*GmCCD1*あるいは*GmCCD4*遺伝子の発現抑制もたらすRNAi発現ベクターを構築し、アグロバクテリウム法により大豆品種に導入した。

文 献

- 1) Landrum JT and Bone RA (2001): Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys*, **385**, 28-40.
- 2) Alves-Rodrigues A and Shao A (2004): A review. The science behind lutein. *Toxicol Lett*, **150**, 57-83.
- 3) Dwyer JH, Navab M, Dwyer KM, Hassan K, Sun P, Shircore A, Hama-Levy S, Hough G, Wang X, Drake T, Bairey Merz CN and Fogelman AM (2001): Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: *The Los Angeles Atherosclerosis Study*. *Circulation*, **103**, 2922-2927.
- 4) Heinrich U, Gartner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H and Stahl W (2003): Supplementation with β -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-Induced erythema. *J Nutr*, **133**, 98-101.
- 5) Monma M, Terano J, Ito M, Saito M and Chikuni K (1994): Carotenoid components in soybean seeds varying with seed color and maturation stage. *Biosci Biotech Biochem*, **58**, 926-930
- 6) Kanamaru K, Wang S, Abe J, Yamada T and Kitamura K (2006): Identification and characterization of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) strains with high lutein content. *Breed Sci*, **56**, 231-234.
- 7) Kanamaru K, Wang S, Yamada T, Abe J and Kitamura K (2008): Genetic analysis and biochemical characterization of the high lutein trait of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.). *Breed Sci*, **58**, 393-400.
- 8) 金丸京平, 山田哲也, 喜多村啓介 (2008): 大豆の高ルテイン化に向けた野生大豆ツルマメの高ルテイン形質の成分特性の解析およびルテイン生合成関連遺伝子の発現解析. 大豆たん白質研究, **11**, 44-50.
- 9) Auldridge ME, Block A, Vogel JT, Dabney-Smith C, Mila I, Bouzayen M, Magallanes-Lundback M, DellaPenna D, McCarty DR and Klee HJ (2006): Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J*, **45**, 982-993.
- 10) Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S and Sumitomo K (2006): Carotenoid cleavage dioxygenase (*CmCCD4a*) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiol*, **142**, 1193-1201.
- 11) Park SY, Yu JW, Park JS, Li J, Yoo SC, Lee NY, Lee SK, Jeong SW, Seo HS, Koh HJ, Jeon JS, Park YI and Paek NC (2007): The senescence-induced stay green protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell*, **19**, 1649-1664.
- 12) Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J and Yamaguchi S (2008): Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, **455**, 195-200.
- 13) Sato H, Yamada T, Kita Y, Ishimoto M and Kitamura K (2007): Production of transgenic plants and their early seed set in Japanese soybean variety, Kariyutaka. *Plant Biotechnol*, **24**, 533-536.