

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 成分的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

金丸京平*・山田哲也・喜多村啓介

北海道大学大学院農学研究院

Biochemical Characterization of High Lutein Trait of Wild Soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) and Expression Analysis of Gene Encoding Enzymes Involved in Lutein Biosynthesis for the Breeding of Lutein Rich Soybean

Kyohei KANAMARU, Tetsuya YAMADA and Keisuke KITAMURA

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

ABSTRACT

Soybean seeds contain low levels of lutein which is beneficial to human health. We characterized the carotenoid composition of wild soybean seed with high lutein. The peaks of xanthophylls such as neoxanthin, violaxanthin and antheraxanthin in addition to the major peak of lutein were separated by high performance liquid chromatography (HPLC). These xanthophylls were mainly originated from the cotyledon of the seed. These xanthophylls identified were positively correlated with the lutein content in the progeny populations derived from the interspecific crosses between soybean and wild soybean, suggesting that the high lutein traits of wild soybean strains might be implicated in the biosynthesis and/or accumulation of xanthophylls during the seed filling. Expression of genes encoding enzymes involved in lutein and the other xanthophylls biosynthesis was analyzed by quantitative RT-PCR. There existed no difference between the expression levels of xanthophylls biosynthetic genes in RIL with high lutein and RIL with low lutein during the seed development. Whereas, the difference between the reduction of lutein in RIL with high lutein and RIL with low lutein during the seed development was observed. These results suggested that the high lutein trait of the wild soybean strains might be related in the catabolism of lutein and xanthophylls during the seed development. Further studies are in progress for characterization of the genetic mechanism that regulates the lutein content in wild soybean seeds for the breeding of lutein rich soybean. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 44-50, 2008.

Key words : soybean, wild soybean, lutein, xanthophyll, lutein biosynthesis

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

ルテインは α -カロテンに水酸基が2つ付加したキサントフィル類の一つである。黄色色素として自然界に広く分布し、緑黄色野菜や果実等に多く含まれ光合成補助色素、抗酸化物質および媒介生物などの誘引色素としての働きを有している^{1,2)}。一方、ヒトではルテインとその異性体のゼアキササンチンだけが眼の網膜および水晶体に特異的に含まれており、加齢黄斑変性症や白内障等の眼病に対して予防効果を示す機能性成分として知られる³⁻⁵⁾。また、心疾患予防⁶⁾や紫外線から皮膚を保護する作用⁷⁾を有しており、ルテインのヒトへの栄養機能性が注目されている。大豆種子は主要なカロテノイドとしてルテインを含むが一般にその含有量は低く⁸⁻¹⁰⁾、これまで大豆種子中のルテイン含量を高める育種試みは行われてこなかった。最近、我々は遺伝資源として保存されている多数の大豆(490品種および系統)および野生大豆ツルマメ(610系統)のルテイン含量のスクリーニングを行い、ツルマメにルテインを高く含有する系統を同定し、この特性が遺伝支配形質であることを明らかにしたことにより^{10,11)}、大豆の高ルテイン化育種が可能となってきた。新規栄養機能性成分として期待できる大豆種子のルテインの向上に向けて、本研究ではルテインの蓄積機構を考察するために高ルテイン形質の成分的特性を解析した。次に、ルテイン生合成に関わる酵素遺伝子の発現解析を行い、高ルテイン形質の遺伝的作用機序について考察した。

方 法

材 料

高ルテインツルマメGD50344、B09092とB01167および普通大豆品種トヨムスメ、大豆系統十育241とTK780を供試材料とした。また、トヨムスメとGD50344、十育241とB09092のそれぞれの交配に由来するF₂種子を2007年北海道大学精密実験圃場で栽培し収穫したF₃種子ならびにTK780とB01167の交配に由来する組換え自殖系統(RIL)のF₁₀種子を供試材料とした。

ルテインの抽出および分析

ルテインの抽出は、種子粉末25 mgに内部標準物質として β -apo-8'-carotenal (0.1 μ g/mL)を含むアセトン:エタノール(1:1)を加えて攪拌し、15分の超音波処理した後、冷蔵庫内で静置溶出させ、2回遠心した上層液20 μ Lを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(Hitachi LaChrom Elite, Hitachi High-Technologies Corp., Japan)のサンプルとした。酢酸

エチルと75%メタノールを用いたグラジェント分析によりルテインおよびカロテノイドを分離した。即ち、初期酢酸エチル濃度を25%に設定し、22分間で25%から100%に上昇させ、その後1分間で初期値の25%に戻し、分析開始から25分後に次のサンプル注入を行った。流速は1.0 mL/minで行い、測定波長447 nmによりルテインおよびカロテノイドを検出した。ルテイン、ネオキササンチン、ビオラキササンチンおよびアンセラキササンチンの各溶出ピークは標準物質との一致により確認した。標準物質の溶出ピーク面積との比較によりルテインおよびキサントフィルの含量を算出した。

定量RT-PCRによるルテイン生合成関連遺伝子の発現解析および未熟種子中のルテインの分析

大豆系統TK780と高ルテインツルマメB01167は種子のサイズや開花期および登熟期が大きく異なることから、TK780とB01167の交配に由来するRIL(F₁₀種子)96系統から、種子サイズや登熟期が類似した高ルテイン系統(RIL103)と低ルテイン系統(RIL123)を選抜し、発現解析の材料とした。各RILを2007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日の未熟種子をサンプリングし、-80℃に保存した。-80℃保存種子サンプルから全RNAを抽出し、cDNAを調製した。ルテインおよびキサントフィル生合成に関わる酵素遺伝子(Phytoene synthase, *Phytoene desaturase*, ζ -carotene desaturase, *Lycopene ϵ -ring cyclase*, *Lycopene β -ring cyclase*, *Carotene ϵ -ring hydroxylase*および*Carotene β -ring hydroxylase*)に特異的なプライマーを作成し、定量RT-PCR法により各遺伝子の発現解析を行った。また、各登熟段階の未熟種子4粒を凍結乾燥した後粉碎し、その種子粉末を用いて登熟種子のルテイン含量を上記方法に従い分析した。

結果と考察

高ルテイン形質の成分的特性

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析によると、高ルテインツルマメではルテイン以外のカロテノイド含量も増大していることが推察された¹⁰⁾。そこで、Monmaら(1994)⁸⁾の方法を一部改変したHPLC分析法によりカロテノイド成分組成を解析した。その結果、高ルテインツルマメGD50344、B09092およびB01167では、ルテインの主要ピークに加えてネオキササンチン、ビオラキササンチンおよびアンセラキササンチン等のキサントフィルの溶出ピークを与えた(Fig. 1)。一方、大豆トヨムスメ、十育241およびTK780ではルテインの

溶出ピークは認められるが、その他のキサントフィルの溶出ピークは認められない (Fig. 1). 大豆の登熟中の種子やStay green変異である緑色子葉大豆ではクロロフィルと共にルテインおよび僅かなキサントフィルの蓄積が認められる^{8,9)}. 一方、高ルテインのツルマメ、RILおよびF₃種子 (F₂系統) の種子子葉は、クロロフィルを殆ど蓄積していないこと (Fig. 2) から、検出したキサントフィルが未熟種子由来ではないこと、また、ツルマメの高ルテイン形質はStay greenの作用機序と異なることが考えられた. ネオキササンチン、ピオラキササンチンおよびアンセラキササンチンの溶出ピークは

大豆TK780とツルマメB01167の交雑に由来する組換え自殖系統 (RIL) や大豆トヨムスメとツルマメGD50344の交雑から得た高ルテインのF₃種子 (F₂系統) でも検出され、それらは種子子葉に由来することが示された (Fig. 2). さらに、大豆品種トヨムスメと高ルテインツルマメGD50344の交配に由来する124個体からなるF₃種子集団において、ルテインとネオキササンチン、ピオラキササンチンおよびアンセラキササンチンとの間にそれぞれ相関係数が0.758, 0.741および0.607の有意な正の相関関係を認めた (Table 1). これらの結果から、高ルテイン形質のツルマメや系統ではルテイン

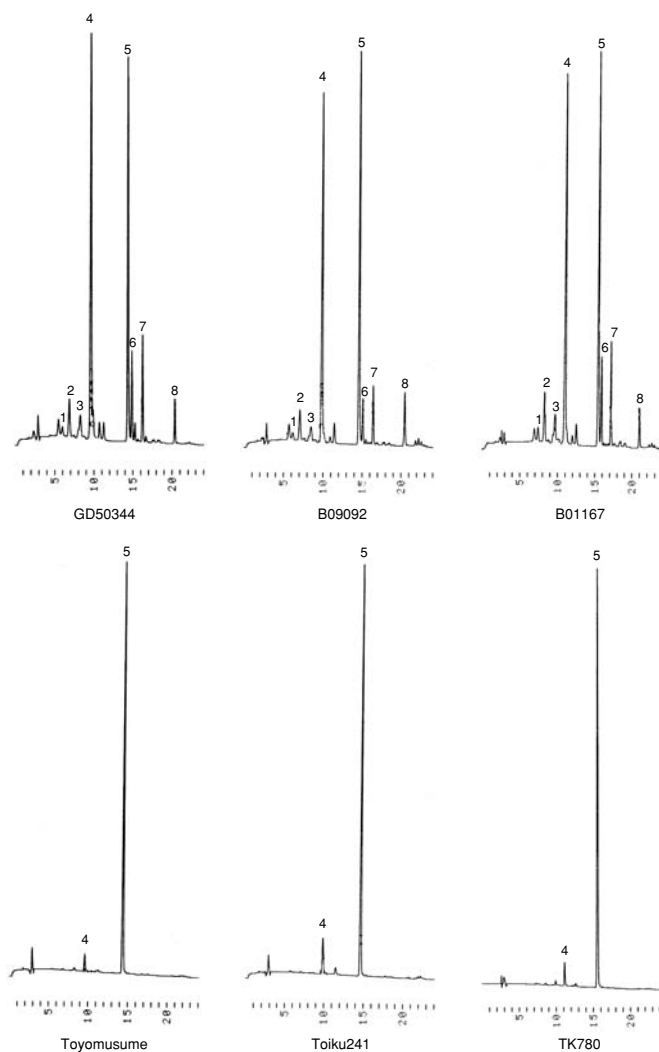


Fig. 1. HPLC chromatograms of carotenoids in soybean and wild soybean seeds. Peaks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 correspond to neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, lutein, internal standard, chlorophyll b, chlorophyll a and β -carotene, respectively.

と同時にその他のキサントフィルも特異的に高いことが示され、ツルマメの高ルテイン形質は種子登熟時のルテインを含めたキサントフィル類の生合成または蓄積の変異による可能性が高いと考えられた (Fig. 3). そこで、大豆TK780とツルマメB01167の交雑RILの登熟種子を用いて、ルテイン生合成関連遺伝子の発現解析を行った。

Table 1. Correlation coefficients among the carotenoids analyzed in a total of 124 F₃ seeds

	Neoxanthin	Violaxanthin	Antheraxanthin
Lutein	0.758**	0.741**	0.607**
Neoxanthin		0.667**	0.502**
Violaxanthin			0.673**

** significant at 1% level

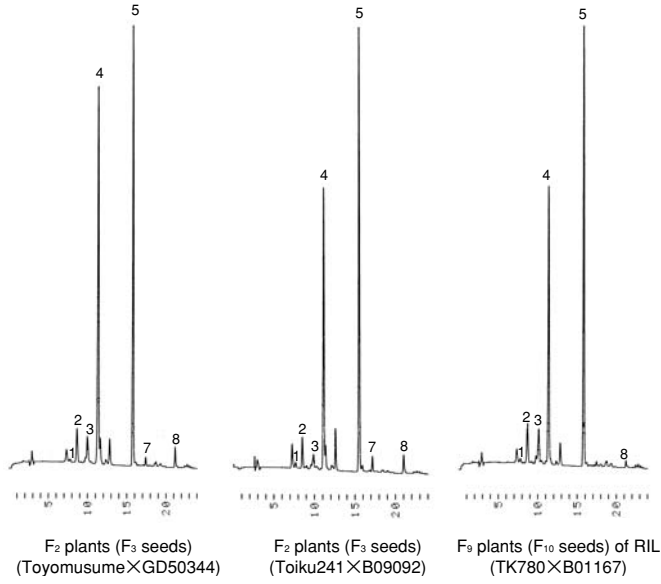


Fig. 2. HPLC chromatograms of carotenoids in the cotyledon of the seeds of F₃ and RIL. Peaks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 correspond to neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, lutein, internal standard, chlorophyll b, chlorophyll a and β -carotene, respectively.

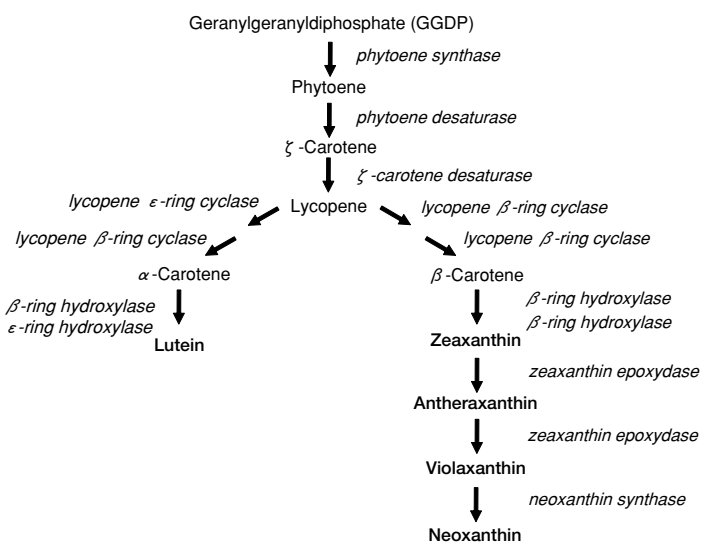


Fig. 3. Carotenoid biosynthetic pathway in higher plant. Enzymes are indicated in *italic*. Xanthophylls are indicated in **bold**.

ルテイン生合成関連遺伝子の発現解析および登熟種子におけるルテインの蓄積

大豆とツルマメは開花期や種子サイズ等形質が大きく異なる。そこで、種子サイズ、開花期および登熟期の類似したRIL (TK780×B01167) を選び、その登熟種子 (開花後約30, 40および50日) を供試材料とした。高等植物においてルテインおよびその他のキサントフィルの生合成経路が明らかにされている (Fig. 3)。そ

こで、ルテインおよびキサントフィル生合成遺伝子 (*Phytoene synthase*, *Phytoene desaturase*, ζ -*carotene desaturase*, *Lycopene ϵ -ring cyclase*, *Lycopene β -ring cyclase*, *Carotene ϵ -ring hydroxylase*および*Carotene β -ring hydroxylase*) に特異的なプライマーを作成し、定量RT-PCR法により各遺伝子の発現を検討した。各遺伝子の発現量は内在コントロール*Actin*遺伝子の発現量に対する相対値で示

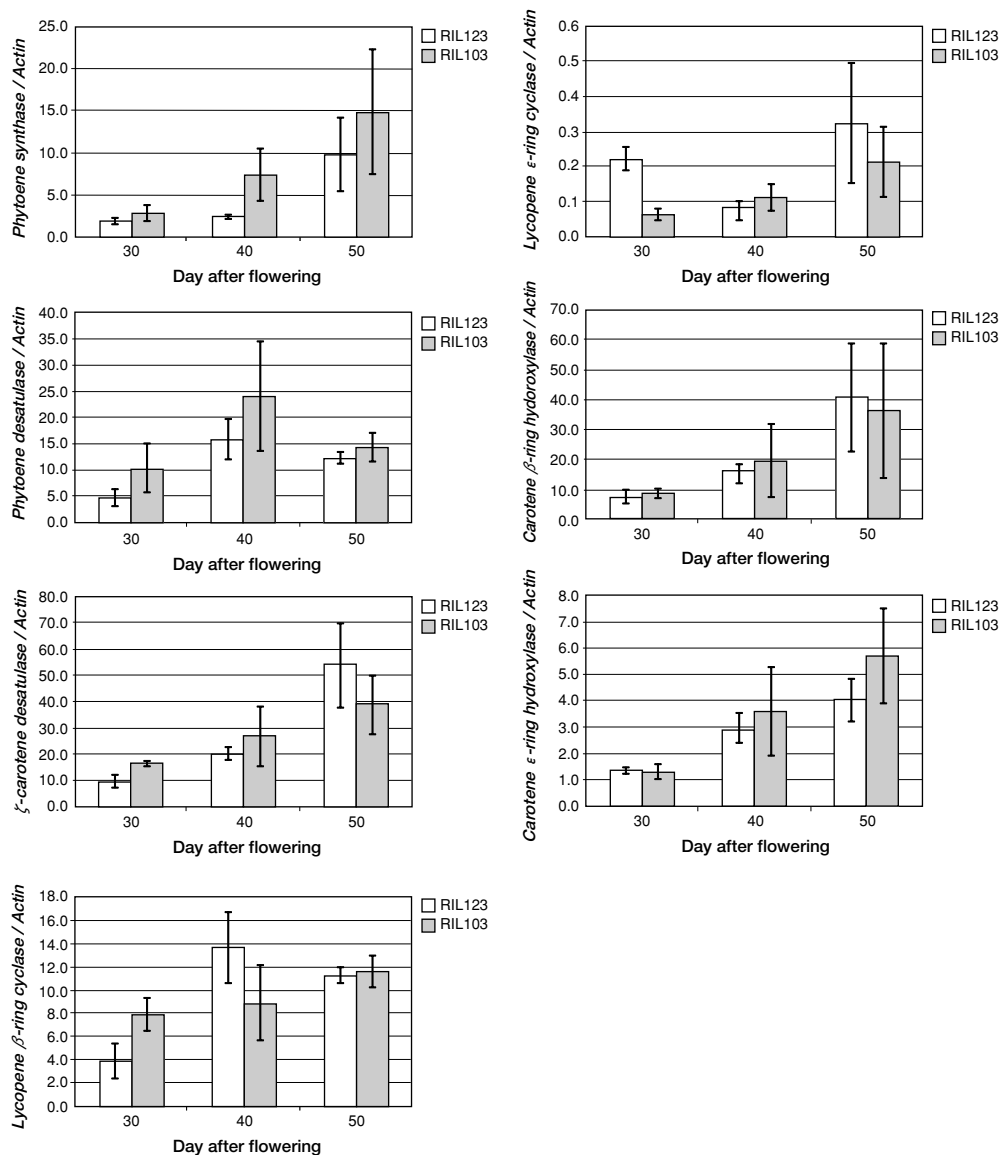


Fig. 4. Expression of xanthophyll biosynthetic genes in the RIL123 with low lutein and RIL103 with high lutein. Relative expression levels of xanthophyll biosynthetic genes was determined by normalizing the PCR threshold cycle number of each with that of the *Actin* reference gene. The data shown presented the mean and SD obtained from three replications.

した。その結果、高ルテイン系統と低ルテイン系統の間でこれらの遺伝子の発現程度に顕著な差は認められなかった (Fig. 4)。今回解析した系統数や登熟段階に限りはあるが、少なくとも、ルテインおよびキサントフィル合成関連遺伝子の発現程度はルテインおよびその他のキサントフィルの蓄積量とは密接に関連していないと考えられた。一方、何れの遺伝子も開花後50で発現が増大する傾向が認められたが、これは内在コントロールの *Actin* 遺伝子の発現が登熟期間を通して一定ではなく、後期にその発現が減少していたことから相対値が増大したと考えられる。

大豆系統TK780と高ルテインツルマメB01167とその交配に由来する4系統にRILの登熟種子（開花後約30, 40および50日）のルテインの蓄積量をFig. 5に示した。開花後約30日の登熟種子では大豆TK780とツルマメB01167およびRIL 4系統は何れも高いルテイン含量を示した。TK780と低ルテイン系統のRIL82とRIL123では種子登熟に従いルテインは減少し、完熟種子では低いルテイン含量を示した。一方、高ルテインツルマメB01167と高ルテイン系統のRIL89とRIL103では登熟に従いルテイン含量が減少するものの、TK780, RIL82とRIL103に比べその減少程度が緩やかであり完熟種子ではTK780やRIL82およびRIL123に比べ明らかに高いルテイン含量を示した。これらの結果から、種子登熟過程においてルテインが分解を受けている可能性が示唆され、その分解程度が高ルテイン形質と密接に関連していることが考えられた。我々は複数の集団を用いた解析からルテイン含量に関与するQTL

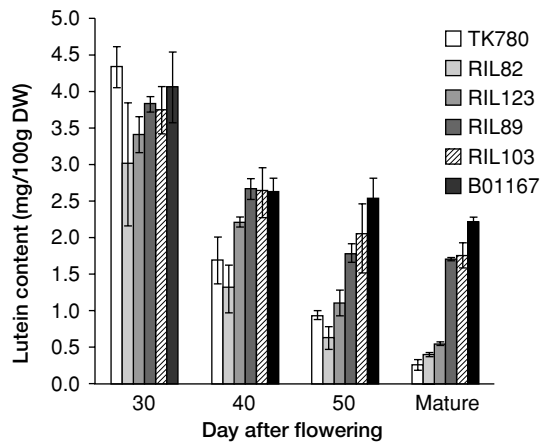


Fig. 5. Lutein level in developing seeds of TK780, B01167 and RILs. The data shown represent the mean and SD obtained from three replications.

(Quantitative trait loci) を同定している。最近公開されたダイズゲノム情報からルテイン含量のQTLの一つにルテインまたはカロテノイドの分解に関わると推定される遺伝子が近傍に存在することが分かった。また、他植物においてルテインと他のカロテノイドの蓄積に複数のカロテノイドの分解に関わる CCD (carotenoid cleavage dioxygenase) 遺伝子の関与が報告されている¹²⁾。以上の考察から、今後ツルマメの高ルテイン形質に関与すると考えられるルテイン分解に関わる因子の同定が重要な研究課題と考えられる。

要 約

本研究では、高ルテインのツルマメが主要なルテインに加えてネオキササンチン、バイオキササンチンおよびアンセラキササンチン等のキサントフィルを含むことを示した。これらのキサントフィルは普通大豆品種と高ルテインツルマメの複数の組合せの交配による後代においても検出され、ルテインとの間に有意な正の相関を認めた。このことからツルマメの高ルテイン形質は種子登熟時のキサントフィル類の生合成または蓄積の変異による可能性が高いと考えた。そこで、普通大豆と高ルテインツルマメの交配後代の登熟種子を用いてルテイン生合成関連遺伝子の発現解析を行った。高ルテインと低ルテインの系統との間でその発現程度に顕著な差は認められなかった。一方、高ルテインと低ルテインの系統の登熟種子はルテインを高く蓄積するが、登熟中のルテインの減少程度に差異が認められたことから、その分解程度が高ルテイン形質と密接に関連していると考えられた。

文 献

- 1) Fraser PD and Bramley PM (2004): A review. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, **43**, 228-265.
- 2) Baroli I and Niyogi KK (2000): Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 1385-1394.
- 3) Landrum JT and Bone RA (2001): Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys*, **385**, 28-40.
- 4) Mares-Perlman JA, Millen AE, Ficek TL and Hankinson SE (2002): The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J Nutr*, **162**, 518S-524S.
- 5) Alves-Rodrigues A and Shao A (2004): A review. The science behind lutein. *Toxicol Lett*, **150**, 57-83.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Simonne AH, Smith M, Weaver DB, Vail T, Barnes S and Wei CI (2000): Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing. *J Agric Food Chem*, **48**, 6061-6069.
- 10) 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.
- 11) Wang S, Kanamaru K, Li W, Abe J, Yamada T and Kitamura K (2007): Simultaneous accumulation of high contents of α -tocopherol and lutein is possible in seeds of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) *Breed Sci*, **57**, 297-304.
- 12) Auldridge ME, McCarty DR and Klee HJ (2006): Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 315-321. Review.