

大豆フラボノイドの分子育種に向けた生合成関連遺伝子の発現制御

山田哲也*・喜多村啓介

北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門植物遺伝資源学

Gene Manipulation of the Biosynthetic Pathway for Molecular Breeding of Soybean Flavonoids

Tetsuya YAMADA and Keisuke KITAMURA

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

ABSTRACT

Flavonoid content and composition in soybean seeds are sensitive to a change in the growth environment. In breeding soybeans, it is important to maintain stable high flavonoid content in soybean seeds, because flavonoids are known to possess various pharmaceutical effects for human health. Some transcriptional factors that control the expression of the enzymatic genes involved in the biosynthetic pathway of flavonoids have been used to improve the flavonoid components in higher plants by a transgenic technology. We produced transgenic plants over-expressing a Myb-like transcriptional factor gene, *LjMyb12*, from *Lotus japonicus* to improve flavonoid composition in soybean. We generated transgenic soybean lines by repeating self-fertilization to fix transgenes in the genome of transgenic plants. Quantitative RT-PCR analysis of flavonoid biosynthesis-related genes was conducted in a soybean transgenic line, indicating that expression of 4-Coumarate:CoA ligase, Chalcone isomerase, Flavanone 3-hydroxylase (*F3H*), and Flavonol synthase (*FLS*) genes were increased in young leaves of the transgenic line. The expression of *F3H* and *FLS* genes was also enhanced in developing seeds. LC-MS/MS analysis revealed that glycosides of kaempferol, which is one of the flavonols, were markedly increased in mature seeds of transgenic soybean. On the other hand, changes of isoflavone content were not detected. Thus, we demonstrated that over-expression of the *LjMyb12* gene could be useful for molecular breeding of soybean flavonoids. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 37-42, 2010.

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

Key words : transgenic technology, transcriptional factor, flavonoid biosynthesis, soybean, molecular breeding

大豆種子におけるフラボノイド化合物は、その生育環境の変動によって含量や組成が変化する¹⁾。フラボノイドには様々な薬理効果が報告されており、これらのフラボノイドを高位安定に維持することは、大豆における成分育種の観点からも重要な課題と考えられる。高等植物におけるフラボノイドは、各酵素の触媒作用によっていくつもの過程を経て生合成されるが、これらの過程にかかわる酵素遺伝子の発現様式は環境の変動に伴い変化する。これらの遺伝子発現は主として少数の転写因子によって制御されていることが多く、転写因子遺伝子を過剰に発現させ酵素遺伝子群の発現を人為的に制御することで特定の生合成経路を活性化することが可能となる。

フラボノイドの生合成にかかわる転写因子はMyb (myeloblastosis) 様のものが多く、シロイヌナズナ^{2,3)}やトウモロコシ⁴⁾を用いた研究を通して、その制御対象となる酵素遺伝子と生合成される化合物との関係が明らかにされている。これらのMyb様転写因子を過剰発現することで大豆⁵⁾やトマト⁶⁾においてフラボノイド組成を改良した応用研究も行われている。これらのMyb様転写因子は、フラボノイドの中でも特にアントシアニンの生合成経路を活性化するのがほとんどである。近年、シロイヌナズナ³⁾とトマト⁷⁾においてフラボノールの生合成経路を特異的に活性化するMyb様転写因子 (Myb12) の存在が報告されている。これらの転写因子を人為的に制御することで、アントシアニンとは異なる別のフラボノイド化合物の生合成経路を特異的に活性化することが期待できる。我々は、先行研究においてマメ科のモデル植物であるミヤコグサからMyb12遺伝子のオルソログLjMyb12を単離した。このオルソログを過剰発現した形質転換ミヤコグサの解析から、本転写因子もMyb12と同様にフラボノールの生合成経路を活性化することが明らかとなっている (未発表データ)。

本研究は、ミヤコグサに由来するLjMyb12遺伝子を過剰発現する大豆形質転換体を作成し、その形質転換体の解析を通して大豆フラボノイド生合成経路における制御機序の理解とフラボノイド組成の改変に向けた大豆分子育種の可能性について検討した。

方 法

材料

形質転換に用いた材料は北海道産の大豆品種カリユタカ (JP86520) を用いた。本品種はアグロバクテリウムを介した形質転換が可能かつ、その培養特性として形質転換当代 (T₀個体) から極めて早期にT₁種子を得ることができる特徴をもつことが明らかにされている⁸⁾。

発現ベクターの構築と大豆の形質転換

Satoら (2007)⁸⁾のベクターをもとに、カリフラワーモザイクウイルス35S (CaMV 35S) プロモーターの下流にLjMyb12遺伝子を繋ぎ大豆形質転換用の発現ベクターを構築した (Fig. 1)。また、対照個体は野生型カリユタカ他、sGFP遺伝子を挿入した発現ベクター (Fig. 1) の形質転換実験から得た系統⁸⁾を用いた。大豆への形質転換方法はSatoら (2007)⁸⁾およびYamadaら (2010)⁹⁾の方法に従った。

形質転換系統の作出

T₀個体から得たT₁種子を播種し、実生個体の展開葉に希釈したバスタを塗布し、その耐性程度から選抜マーカー遺伝子の有無を判断した。バスタ耐性を示すT₁個体においてサザンブロット分析を行うとともに導入遺伝子の発現をRT-PCRによって確認した。加えて、T₂個体以降も同様にバスタの耐性試験を行い、最終的に導入遺伝子を1コピーだけ持つ形質転換系統を作出した。本系統を以後の解析に供試した。

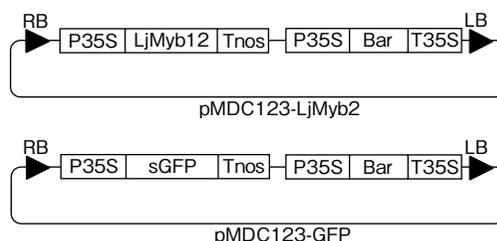


Fig. 1. Expression vectors for soybean transformation mediated by *Agrobacterium*. P35S, cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; Tnos, terminator of nopaline synthase; T35S, polyA signal of CaMV; Bar, phosphinothricin acetyltransferase gene; RB, right border; LB, left border.

フラボノイド生合成関連遺伝子の発現解析

LjMyb12 遺伝子過剰発現系統（以下 *35S:LjMyb12*）、対照系統（以下 *35S:GFP*）および野生型カリユタカの葉組織と開花20日後の未熟種子からそれぞれ抽出した全RNAを用い、定量RT-PCRによりフラボノイド生合成関連遺伝子の発現解析を行った。

完熟種子におけるLC-MS/MS解析

完熟種子を乳鉢内ですり潰した粉末を1サンプルにつき40 mgを5倍量の80%メタノール水溶液で抽出し、遠心分離後にフィルター濾過したものを分析に用いた。なお、種子のLC-MS/MS解析は独立行政法人理化学研究所植物科学研究センターの齊藤和季博士ならびに松田史生博士に依頼した。なお、ピークのアノテーションは標準物質のクロマトグラムデータとの比較および、MS/MSスペクトラムの解釈によって行った。

結 果

形質転換体の作出

発現プラスミドを持つアグロバクテリウムを外植片へ感染してから約3ヶ月で T_0 個体を得た。これらの個体をポットへ移植し、培養室で養成した。養成約3ヶ月後に T_1 種子を得た。バスタ耐性を示す T_1 個体のみを養成し、PCR分析による導入遺伝子の確認に加え、サザンブロット分析により導入遺伝子が1コピーのものを選抜し、自殖を繰り返すことで導入遺伝子の固定化を図った。*35S:LjMyb12* 系統は対照個体である *35S:GFP* と同様の形態を示し、種子の形状についても正常であった (Fig. 2)。

形質転換系統におけるフラボノイド生合成に関連する酵素遺伝子の発現解析

35S:LjMyb12 系統および対照個体において、葉組織と未熟種子のフラボノイド生合成に関連する酵素遺伝子の発現解析を行った。各酵素遺伝子が触媒する反応をFig. 3に示した。これら酵素遺伝子は大豆ゲノム内において遺伝子のコピーが存在するため、一つの酵素に関して複数の遺伝子を対象にしたものもあり、結果的に *4CL1*, *4CL2*, *CHS1*, *CHS2*, *CHS3*, *CHR*, *CHI1A*, *CHI1B*, *CHI2*, *F3H*, *F3'H*, *DFR1*, *DFR2*, *FLS*, *IFS1*, および *IFS2* の計16遺伝子に関して定量RT-PCRを用いて発現量を比較した (Fig. 3)。*35S:LjMyb12* 系統は葉と未熟種子の両組織において *LjMyb12* 遺伝子の発現を認めた (Fig. 4a, 4g)。加えて、葉組織では *4CL1*, *CHIA1*, *CHI2*, *F3H* および *FLS* 遺伝子において発現量の増加を認めた (Fig. 4b-f)。一方、未熟種子組織では、*F3H* と *FLS* 遺伝子に発現の増加を

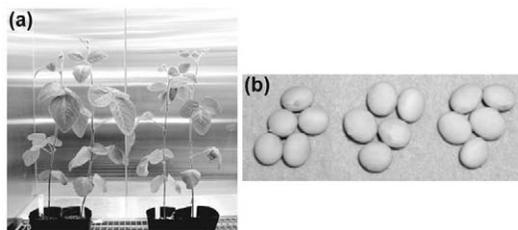


Fig. 2. Transgenic soybean lines. (a) Transgenic plantlets of *35S:GFP* (left) and *35S:LjMyb12* (right) grown in culture room. (b) Mature seeds obtained from Kariyutaka (left), *35S:GFP* (middle), and *35S:LjMyb12* lines.

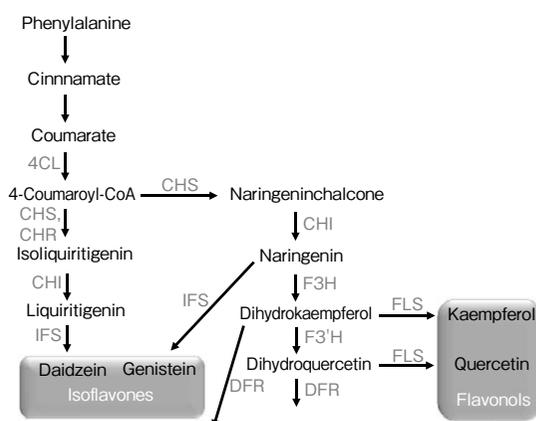


Fig. 3. A partial diagram of the synthetic pathway of flavonoids. Enzymes involved in each step are indicated as follows: *4CL*, 4-coumarate: CoA ligase; *CHS*, chalcone synthase; *CHR*, chalcone reductase; *CHI*, chalcone isomerase; *F3H*, flavanone 3-hydroxylase; *F3'H*, flavonoid 3'-hydroxylase; *DFR*, dehydroflavonol reductase; *FLS*, flavonol synthase; *IFS*, isoflavone synthase. Each sequence of genes used in the quantitative RT-PCR analysis is referred to as follows: *β-tubulin*, M21296 (accession number); *LjMyb12*, AB334529; *4CL1*, AF29267; *4CL2*, AF002259; *CHS1*, AI855764; *CHS2*, X65636; *CHS3*, X53958; *CHR*, X55730; *CHI1A*, AY595413; *CHI1B*, AY595414; *CHI2*, AY595415; *F3H*, AY595420; *F3'H*, AB061212; *DFR1*, AF167556; *DFR2*, EF187612; *FLS*, AB246668; *IFS1*, AF195798; *IFS2*, AF195799.

認めた (Fig. 4h, 4i)。これらのことから、両組織においてフラボノイド生合成にかかわる複数の酵素遺伝子の発現が *35S:LjMyb12* 系統において増加していることが明らかとなった。

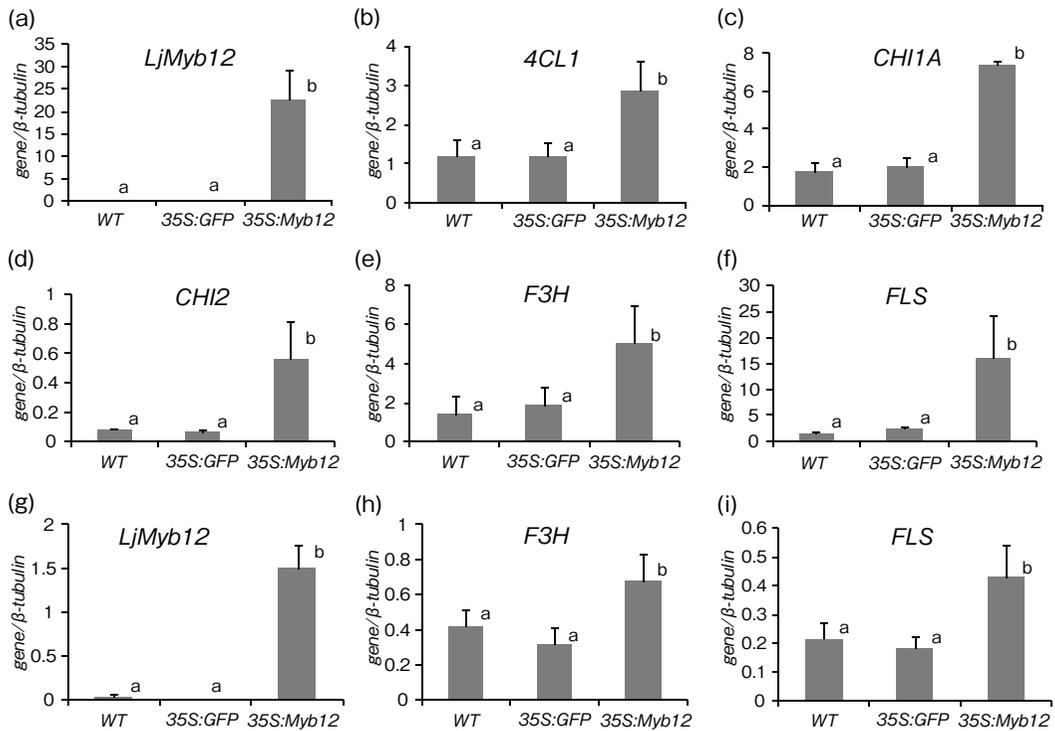


Fig. 4. Quantitative RT-PCR analysis of *LjMyb12*, *4CL1*, *CHI1A*, *CHI2*, *F3H*, and *FLS* genes in leaves (a-f) and developing seeds (g-i) of Kariyutaka (WT) and transgenic lines (35S:GFP and 35S:Myb12). Relative expression level was determined by normalizing the PCR threshold cycle number of each gene with that of the β -tubulin reference gene. Data are means \pm SD from the three independent experiments. Superscript letters (a and b) indicate significant differences at the 5% level as judged using the Tukey-Kramer test.

完熟種子における代謝物の分析

完熟種子における成分組成の変化を確認するためにLC-MS/MS分析を通して、代謝物のプロファイリングを行った。その結果、35S:*LjMyb12*系統は、一部の遊離アミノ酸およびイソフラボンに関して変動はほとんどなかったものの、フラボノールの一つであるケンフェロールの配糖体が対照個体と比べ有意に増大していることが明らかとなった (Fig. 5)。

考 察

*LjMyb12*遺伝子を過剰発現することによって、大豆植物体においてフラボノール生合成経路が活性化されることが明らかとなった。フラボノイドの生合成にかかわるMyb様転写因子の多くは、アントシアニン生合成経路を活性化する。一方、本研究ではアントシアニン生合成経路へ分岐する反応を触媒するDFRの遺伝子発現に変化は認められなかった。このことから、大豆

種子においてフラボノイドの中でも特定の生合成経路を活性化させることが可能であることがわかった。すなわち、大豆種子を有色にすることなくフラボノイド組成が制御できることが示唆された。

35S:*LjMyb12*系統の葉と未熟組織において各遺伝子の発現程度が異なったのは、CaMV 35Sプロモーターの特性が関与しているものと考えられた。現在、種子において*LjMyb12*遺伝子をより強く発現させるため、種子特異的プロモーター制御下にある形質転換体の作出に着手している。これらは、フラボノイド生合成に関連する遺伝子の発現がより強く活性化されることが期待される。

当初、*LjMyb12*遺伝子はマメ科植物のミヤコグサに由来するため、イソフラボンの生合成経路の活性化も期待したが結果として大きな変動は認められなかった。本研究の発現解析から、*LjMyb12*により*4CL*遺伝子から*CHI*遺伝子まで活性化されることから、*IFS*遺伝子は別の転写制御を受けることが明らかとなった。

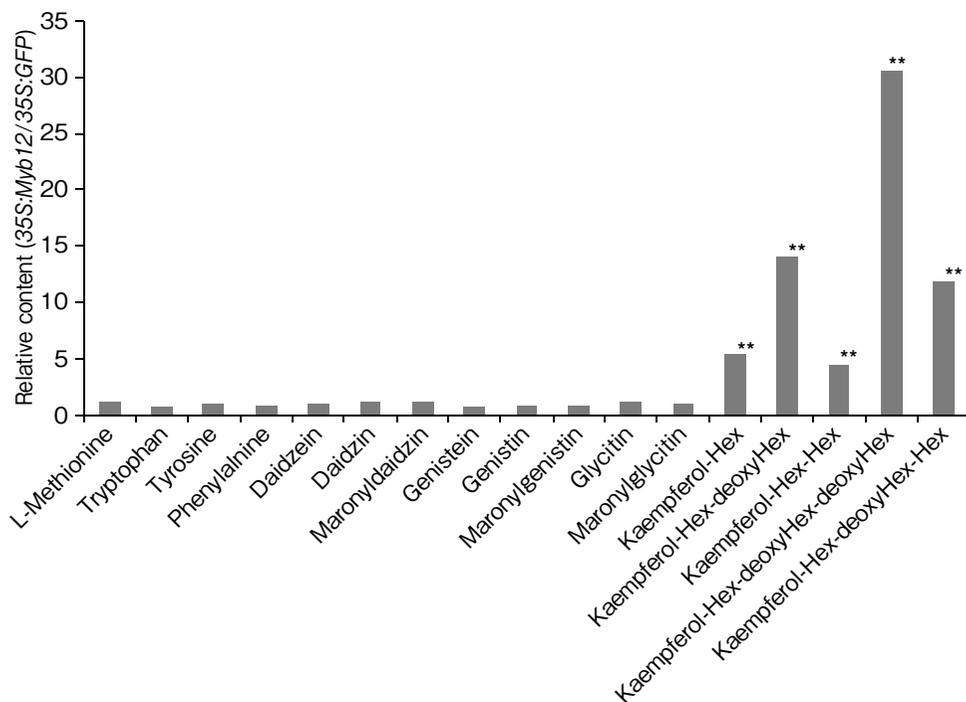


Fig. 5. Relative content of amino acids, isoflavones, and flavonols in mature seeds of *35S:LjMyb12* and *35S:GFP* lines. Relative content is expressed on the value of *35S:LjMyb12* per the value of *35S:GFP* based on the metabolic profiling by LC-MS/MS analysis. Hex and deoxyHex indicate hexose and deoxyhexose, respectively. Data are means from the three independent experiments. ** indicates significant difference at the 1% level as judged using the Student *t* test.

IFSはイソフラボンの生合成に関して鍵酵素として働くものと考えられている¹⁰。そのため、*LjMyb12*に加え、IFSを単独で発現制御したものと組み合わせることによって、イソフラボン生合成経路を強く活性化することが可能であると考えられる。

本研究により、転写因子遺伝子を利用することで大豆種子成分における分子育種が可能であることが示唆された。今後は、導入遺伝子の組織特異的制御によって、さらに飛躍的な種子成分改変への展開が期待される。

要 約

大豆種子におけるフラボノイドの含量やその組成は、植物体が生育する環境条件の変動に影響を受ける。フラボノイドには様々な薬理効果が知られているため、種子におけるフラボノイドを高安定に保つことは成分育種の観点からも重要である。高等植物において、フラボノイドの生合成に関連する酵素遺伝子群を一括制御する転写因子を利用して、フラボノイドの含量や組成比を改変した報告がある。我々は、大豆のフラボノイド組成を改変するためにミヤコグサに由来するMyb様転写因子遺伝子の一つ*LjMyb12*を過剰発現する形質転換大豆個体を作出した。さらに、これら形質転換個体の自殖を繰り返し、導入遺伝子を固定化することで形質転換系統を作出した。この形質転換系統において、フラボノイドの生合成に関連する酵素遺伝子の発現を定量RT-PCRによって確認した。その結果、葉組織において、4-Coumarate:CoA ligase, Chalcone isomerase, Flavanone 3-hydroxylase (*F3H*) およびFlavonol synthase (*FLS*) 遺伝子の発現が上昇していることが分かった。加えて、登熟中の種子においても*F3H*および*FLS*遺伝子の発現が高くなっていることが明らかとなった。完熟種子において、LC-MS/MS解析を行ったところ、形質転換系統の種子においてフラボ

ノール一つであるケンフェロールの配糖体が顕著に増加していた。一方、イソフラボンに関して変化は認められなかった。本研究において、我々は*LjMyb12*遺伝子の過剰発現が大豆フラボノイドの分子育種に有効であることを示した。

文 献

- 1) 境 哲文, 高田吉丈, 河野雄飛, 高橋浩司, 島田信二 (2006): ダイズ種子中のイソフラボン含量に及ぼす品種と栽培条件の影響. *Jpn J Crp Sci*, **75**, 296-305.
- 2) Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA and Lamb C (2000): Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, **12**, 2383-2394.
- 3) Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P and Weisshaar B (2005): The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol*, **138**, 1083-1096.
- 4) Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA and Saedler H (1987): The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J*, **6**, 3553-3558.
- 5) Yu O, Shi J, Hession AO, Maxwell CA, McGonigle B and Odell JT (2003): Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry*, **63**, 753-763.
- 6) Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock H-P, Matros A, Peterek S, Schijlen EGWM, Hall RD, Bovy AG, Juo J and Martin C (2008): Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnol*, **26**, 1301-1308.
- 7) Ballester AR, Molthoff J, de Vos R, Hekkert BL, Orzaez D, Fernández-Moreno JP, Tripodi P, Grandillo S, Martin C, Heldens J, Ykema M, Granell A and Bovy A (2010): Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: deregulated expression of the gene encoding transcription factor SIMYB12 leads to pink tomato fruit color. *Plant Physiol*, **152**, 71-84.
- 8) 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*, **5**, 533-536.
- 9) Yamada T, Watanabe S, Arai M, Harada K and Kitamura K (2010): Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Plant Biotechnol*, **27**, 217-220.
- 10) Jung W, Yu O, Lau S-MC, O'Keefe DP, Odell J, Fader G and McGonigle B (2000): Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavone in legumes. *Nature Biotechnol*, **18**, 208-212.