

野生ダイズに見いだされた α -トコフェロール高含有性の分子基盤の解明と
遺伝子ピラミディングによる α -トコフェロール高含有ダイズの作出

丸山昇平・広野茉里・佐藤晶子・山田哲也・阿部 純*

北海道大学大学院農学研究院植物遺伝資源学研究室

**Molecular Dissection of High α -Tocopherol Contents in Seed Found in
Wild Soybean toward Development of Cultivars with High α -Tocopherol
Contents by Gene Pyramiding**

Shouhei MARUYAMA, Mari HIRONO, Akiko SATO, Tetsuya YAMADA and Jun ABE*

Laboratory of Plant Genetic and Evolution, Research Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060-8589

ABSTRACT

Alfa tocopherol, one of four tocopherol isoforms, possesses the highest vitamin E activity in human. Soybean, *Glycine max* (L.) Merr., produces the seeds that contain tocopherols, of which γ -tocopherol is the most predominant isoform, and the proportion of α -tocopherol is usually less than 10% of total. Molecular analysis for an elevated α -tocopherol content detected in a soybean germplasm collection has revealed that this trait is controlled by the elevated expression level of γ -tocopherol methyltransferase-3 gene (γ -*TMT3*) in developing cotyledons during maturation. We found wild soybean (ssp. *soja*) accessions that produced seeds with higher levels of α -tocopherol content than those observed in the cultivated germplasm, through a survey of wild soybean germplasm collection. We have sequenced the promoter region of γ -*TMT3* gene for 11 accessions, and classified these accessions into four haplotypes. Segregation analysis for F_2 of the cross between a soybean breeding line and a wild accession with high α -tocopherol content revealed that the high content of wild soybean is controlled by a number of genes, one of which is closely associated with a DNA marker for γ -*TMT3*. The wild accessions further exhibited a variation for thermo-sensitivity between constant temperatures of 25 and 30 degree C during maturation. The molecular mechanism for the thermo-sensitivity is currently being researched. The use of wild accessions may contribute to the breeding of a cultivar which stably produces seeds with elevated α -tocopherol content. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 18-22, 2013.

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

Key words : Soybean, *Glycine max*, α -tocopherol, Vitamin E, Genetic diversity

トコフェロールはビタミンEとして知られる脂溶性の抗酸化物質であり、がんや動脈硬化などの生活習慣病や循環器系疾患を予防する生理的な機能を持つ。トコフェロールはクロマン環と側鎖からなり、自然界にはクロマン環につくメチル基の数と位置が異なる4種の同族体 (α , β , γ , δ) が存在する。ヒト体内では肝臓内のトコフェロール結合たん白質が α -トコフェロールを特異的に選択するため、4種の同族体の中でも α -トコフェロールのビタミンE活性が最も高い¹⁾。しかしダイズ種子中に含まれるトコフェロールは主に γ 型からなり、 α 型は通常10%以下である。

Ujii et al (2005)²⁾ は、ダイズ遺伝資源のスクリーニングにより、東欧からの導入品種の中に α -トコフェロール含有率の高い品種「Keszthelyi.A.S」(KASと略す)を見出した。Dwiyanti et al (2011)³⁾ は、この品種と一般的なトコフェロール組成を示す品種「いちひめ」との交雑後代の解析から、 α -トコフェロール高含有性を支配するQTLを見出し、候補遺伝子の塩基配列解析、遺伝子発現解析ならびにプロモーター解析から、親間に見られた含有率の違いが、 γ -トコフェロールを α -トコフェロールに変換する γ -トコフェロールメチルトランスフェラーゼ3をコードする γ -TMT3遺伝子プロモーター領域の転写促進に関わるシスエレメント (CAATボックスとMYBCORE転写因子結合部位) に存在する塩基置換に原因することを明らかにした。

一方、ダイズの祖先型野生種であるツルマメにも α -トコフェロール含有率の高い系統が見いだされている。本研究の目的は、野生ダイズに見いだされた α -トコフェロール高含有性の分子機構を明らかにすることである。

材料と方法

植物材料と栽培方法

北海道大学農学研究院植物遺伝資源学研究室が保有する野生ダイズ系統から、 α -トコフェロール高含有系統として選抜された18系統を実験に用いた (Fig. 1)。これらの系統を、温室で栽培し、開花した後、温度を一定に制御した人工気象室で登熟させた。また、ダイズ系統「十系780号」と高含有野生系統B04009の交雑F₂集団を温室内で栽培し、個体別に種子を収穫した。

トコフェロールの解析方法

収穫種子を80℃で2日間乾燥させた後、乾燥種子か

ら種皮を除いた子葉をトコフェロール抽出に用いた。粉末40 mgを2 mLチューブ内で3 μ g/mLのトコール (内部標準) を含む冷アセトン500 μ Lと十分に混合させ、20分間超音波処理を施した後、4℃の下で30分静置した。混合液を4℃ 13,000 rpmで遠心分離し、得られた上清を逆相カラムInertsil OSD-3 (4.6 \times 250 mm) を用いたHPLC分析に供試した。カラム温度は40℃に設定し、酢酸エチル:75%メタノールを移動相として0.8 mL/minで溶出した。295 nmの紫外線吸収波長によってトコフェロール同族体を検出し、トコールのピーク面積を基準として各同族体の含量および含有率 (%) を算出した。

シーケンス解析

CTAB法を用いて各系統からゲノムDNAを抽出した。プロモーターを含む γ -TMT3遺伝子 (7,779 bp) を4領域に分割し、それぞれの領域をKOD-Plusを用いてPCR増幅した。得られた増幅産物を1%のアガロースゲルで電気泳動して目的断片を切り出し、ExoSAP-ITを用いて精製した。精製したPCR産物は直接シーケンス反応をさせ、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzerを用いて解析した。



Fig. 1. Wild soybean accessions with elevated α -tocopherol content in seeds.

結果と考察

野生系統の種子のトコフェロール生合成に及ぼす登熟温度の影響

18系統を異なる温度条件下で登熟させたときの α -トコフェロール含有率をFig. 2に示す。 α -トコフェロール含有率は登熟期間の温度に左右され、20℃で最も低く、25℃に温度が上昇することにより大きく増加した。25℃における α -トコフェロール含有率は12% (B02280) から43% (B0002) まで変異した。25℃から30℃へ温度を増加させた場合、 α -トコフェロール含有率も増加する傾向を示したが、系統によって温度に対する反応が異なった。特に、B00092やB04158では25℃で他の系統に比べて高い含有率を示したが、30℃においても含有率は変わらなかった。一方、B09092やB06065では、25℃では必ずしも高くなかった含有率が30℃では大きく増加した。今後、異なった温度反応に関わる分子機構について明らかにする必要がある。

α -トコフェロール高含有野生系統の γ -TMT3遺伝子の解析

高含有を示した野生系統の γ -TMT3の塩基配列を解析した。11系統について開始コドン上流域のシーケンスを解析した結果をFig. 3に示す。観察されたDNA多型を基に、これらの系統を4種類の型(ハプロタイプ)に分類することができた。その一つは、KASと同じ塩基配列を持つハプロタイプであり、KASのハプロタイプは野生サイズにも存在していた。分類された4ハプロタイプ間には様々な塩基多型が存在したが、KASのハプロタイプを特徴づけていたMYBCORE結合因子(CTGTTA)は他のハプロタイプには存在しなかった。一方、転写頻度を決定するCAATボックス内の塩基(A)ならびにその上流に存在した塩基(C)は、すべてのハプロタイプで共通しており、低含有系統である「いちひめ」やWilliams82と異なった。

栽培および野生サイズの交雑F₂集団におけるトコフェロール組成の分離

F₂集団81個体について、個体あたり5粒を供試して1粒ごとにHPLC解析を行った。種子レベルでは、 α -トコフェロール含有率と γ -トコフェロール含有率の間に負の直線的な関係が認められ、 α -トコフェロール含有率の増加は γ -トコフェロール含有率の減少と密接に対応していた(Fig. 4A)。個体レベルでは、 α -トコフェロール含有率(5粒の平均値)は8%から46%まで

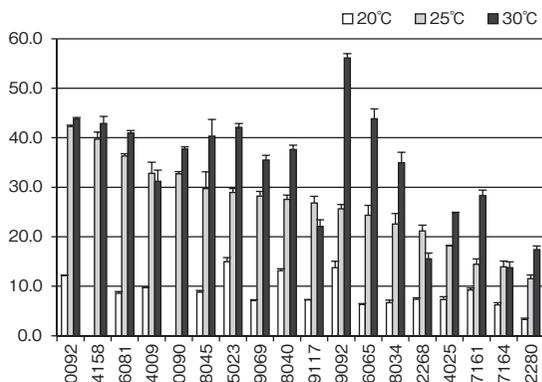


Fig. 2. Effects of different temperatures during maturation on α -tocopherol content in seeds.

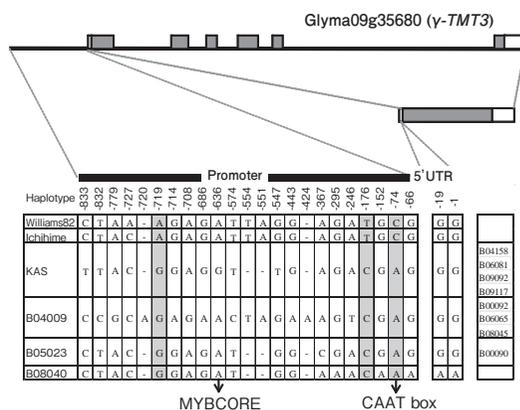


Fig. 3. Polymorphism of sequences in the promoter region of γ -TMT3 gene among 11 wild accessions with elevated α -tocopherol content in seeds. Cv. Williams 82 and Ichihime are common cultivars low α -tocopherol content. The sequences were classified into four haplotypes (combinations of polymorphisms), one of which corresponds to the haplotype of cv. Keszthelyi Aprozemu Sarga (KAS).

連続的に変異した(Fig. 4B)。低含有系統と高含有系統を特徴づけるCAATボックス内の多型を検出するDNA標識を作成してF₂個体のDNA型を決定し、含有率との関係を解析したところ、B04009型のホモ型個体(4009/4009)は、十系780号型(TK/TK)のホモ型に比べて α -トコフェロール含有率が高く、ヘテロ型を含むこれら3遺伝子型の平均含有率に5%水準で有意な差異が認められた(Fig. 5)。したがって、B04009の高含有性にもKASと同様に γ -TMT3遺伝子が関与していると考えられる。しかし各DNA型内にも α -トコフェロー

ル含有率に大きな変異が存在しており、その他の要因（たとえば γ -TMT3のホモログである γ -TMT1または γ -TMT2遺伝子）についても検討する必要がある。今後、これらの野生系統の解析から、新たな関与遺伝子が同定され、異なった温度反応性の機構が明らかになれば、ダイズにおける α -トコフェロール含量の高位安定化を目指した育種の道が開けるものと期待される。

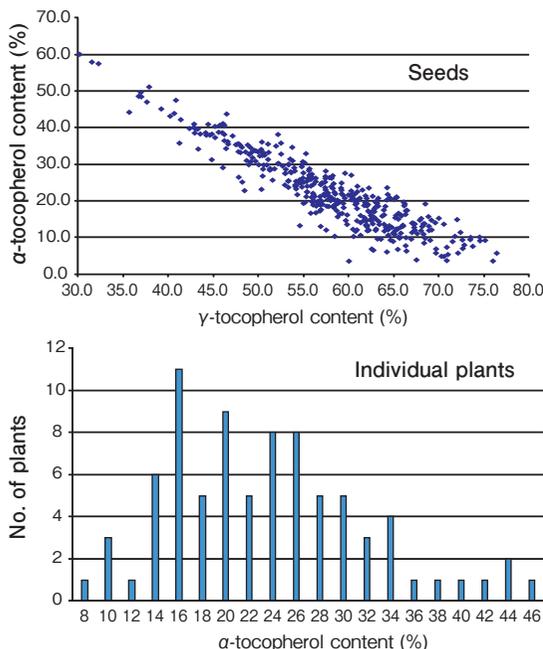


Fig. 4. Segregation of α -tocopherol content (%) in a cross between TK780 (ssp. *max*) and B04009 (ssp. *soja*). A) Correlation between α -tocopherol and β -tocopherol contents at a level of individual seeds. B) Histogram of α -tocopherol content at a level of individual plants in the F₂ population.

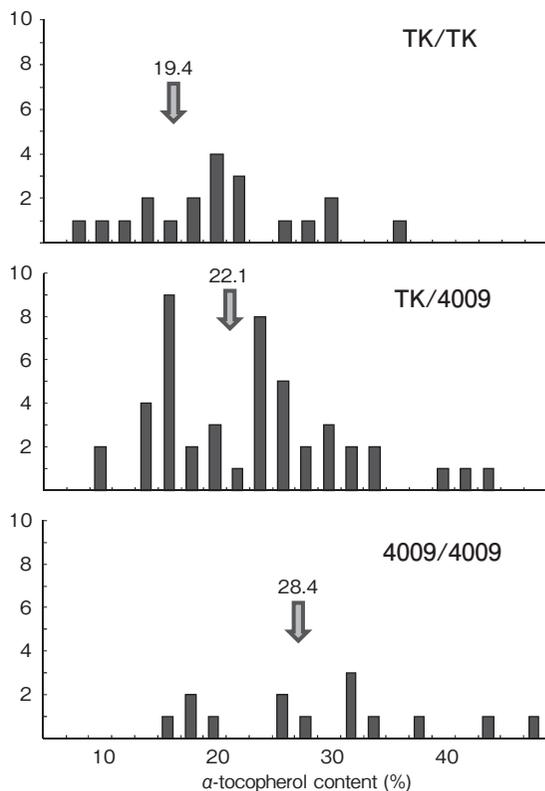


Fig. 5. Association of DNA marker genotypes for γ -TMT3 with α -tocopherol content (%) in F₂ population of the cross between TK780 (TK) and B04009 (4009). The marker genotypes are described as TK/TK for homozygote for the DNA type from TK, TK/4009 for heterozygote, and 4009/4009 for homozygote for the DNA type from 4009.

要 約

野生ダイズに見いだされた α -トコフェロール高含有性の分子機構を明らかにするため、異なる登熟温度における α -トコフェロール生合成、高含有性の既知の原因因子である γ -TMT3のプロモーター領域のシーケンス多型、低含有ダイズ系統との交雑F₂集団におけるトコフェロール組成の分離様式を解析した。野生系統の α -トコフェロール含有率は、登熟期の温度によって影響を受け、温度の増加に伴い含有率が増加したが、その反応性は系統間で異なった。シーケンス解析の結果、 γ -TMT3のプロモーター領域の塩基配列は4種類のハプロタイプに分類され、その一つはダイズの高含有系統KASと一致した。野生系統B04009と栽培系統との交雑では、複数遺伝子の関与が示唆されたが、その一つは、DNA標識を用いた解析から γ -TMT3に原因すると考えられた。今後、野生系統が有する高含有性の分子機構が明らかになれば、従来の高含有系統を凌駕する α -トコフェロール含有率を有する系統や登熟温度に影響されずに安定的に α -トコフェロールを生産する系統など、様々な α -トコフェロール改変育種が可能になる。

文 献

- 1) 福田 満 (2010):**6**. ビタミン:大豆のすべて (喜多村啓介ら編集), pp.139-142, *Science Forum*, 東京.
- 2) Ujiie A, Yamada T, Fujimoto K, Endo Y and Kitamura K (2005): Identification of soybean varieties with high α -tocopherol content. *Breeding Science*, **55**, 123-125.
- 3) Dwiyanti MS, Yamada T, Sato M, Abe J and Kitamura K (2011): Genetic variation of γ -tocopherol methyltransferase gene contributes to elevated α -tocopherol content in soybean seeds, *BMC Plant Biology*, **11**, 152.