

大豆種子成分に関する育種を目的とした新規な突然変異体の作出

土屋真弓・河西めぐみ・金澤 章*

北海道大学大学院農学研究院

Production of Novel Mutants Useful for Improving Seed Components in Soybean

Mayumi TSUCHIYA, Megumi KASAI and Akira KANAZAWA*

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

ABSTRACT

Soybean is thought to be derived from an ancestral plant(s) with a tetraploid genome, and as a consequence, large portions of the soybean genome are duplicated with nearly 75% of the genes present in multiple copies. It is conceivable that such a duplicated nature of the genome is a constraint on mutant production by conventional methods of mutagenesis such as γ -ray or X-ray irradiation as well as chemical treatments. However, ion-beam irradiation is expected to cause genomic changes that are more drastic than those induced by conventional mutagenesis. In these circumstances, we have started a series of analyses to examine whether ion-beam irradiation is effective in producing mutants in soybean. We have optimized irradiation conditions and produced plant populations, which are potentially useful for breeding and/or identifying gene function. Plants that had visibly altered phenotypes were screened in the M_2 generation. Here, we examined whether seed components are altered in these mutants. We analyzed contents of isoflavones, proteins, fatty acids and starch in dried seeds. We found a decrease in isoflavone content, an increase in protein content, and both an increase and a decrease in fatty acid content in the mutants. These mutants potentially confer genetic changes that are useful for improving soybean seed components. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 23-29, 2013.

Key words : chlorophyll deficiency, ion-beam irradiation, mutagenesis, seed components, soybean

*〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

大豆の育種を進める方策の一つとして、他の重要作物の場合と同様に、誘発突然変異が利用されてきた。X線や中性子線の照射により、収量や植物体の高さ、開花時期、種子の大きさ¹⁾、種子中の油やたん白質含量²⁾に関する遺伝変異を増大させることが報告されている。また、種子成分^{3~7)}、根粒形成⁸⁾、除草剤耐性⁹⁾等に関し、望ましい形質を持った系統が放射線(X線や γ 線)の照射、ならびに化学変異原(EMS, NMU)処理による誘発突然変異を利用した育種によって作出されている。しかしながら、大豆における既存の突然変異系統は限られており、大豆の遺伝学・育種学の研究を推進する上では、突然変異系統の拡充が望まれる。

大豆は、4倍体由来の2倍体植物であり、ゲノムの大部分が重複して存在し¹⁰⁾、遺伝子の約75%に関して複数のコピーが存在している¹¹⁾。この広範な遺伝子重複が、従来の突然変異原による変異体の作出を制限している可能性がある。一方、突然変異体が高い頻度で得られること¹²⁾、ならびに生じる変異スペクトルが広いこと¹³⁾といった特徴を持つことから、イオンビーム照射が新たな有用突然変異原として認知されている。実際、イオンビーム照射によってさまざまな植物で新規な突然変異体を得られている¹⁴⁾。イオンビーム照射は高い線エネルギー付与(LET)を持ち、ゲノムに対して長いDNA領域の欠失等の大規模な変化をもたらす¹⁵⁾。こうしたことを背景として、我々は、イオンビームは遺伝子重複が多い大豆のゲノムに対して非常に有効な突然変異原であると考えた。これまでにイオンビーム照射を行った大豆集団を作出し、突然変異体の作出が可能であることを実証するとともに、効率的な変異誘発法を確立した¹⁶⁾。本研究では、最適化した照射条件により作出した、突然変異体を含むと想定される集団を対象として、種子成分の分析を行い、種子成分が変化した突然変異体の同定を試みた。

方 法

材料

イオンビームを照射した大豆系統、農林2号の種子より育成した植物体に産生した種子を採取し、この種子より育成したM₂世代の植物体において、外観による変異体の選抜を行った¹⁶⁾。この作業を繰り返すことで得られた、葉が淡緑色になった変異体由来するM₃もしくはM₄世代の成葉および種子を成分の解析に用いた。対照として、同じ条件で育成した無照射の農林2号の植物体の組織を用いた。

葉緑素含量の定量

大豆の成葉よりPorraらの方法¹⁷⁾により葉緑素を抽出し、定量した。10-30 mgの葉組織を1 mLのN, N'ジメチルホルムアミドに一晩、4℃で浸漬して葉緑素を抽出した。663.8 nmおよび646.8 nmの吸光度を吸光度計で測定し、全葉緑素量を算出した。

イソフラボン含量の定量

大豆の乾燥種子の子葉よりKitamuraらの方法¹⁸⁾によりイソフラボンを抽出・調製した。10 mgの組織を液体窒素の存在下で粉末にし、これをマイクロチューブに移した後、500 μ Lの70%エタノールを加えた。超音波処理の後、遠心分離を行い、上清をHPLCによる分析に用いた。HPLC分析は、Kanamaruらの方法¹⁹⁾を一部改変し、以下のグラジエントにより行った。移動相として、0.1%酢酸を含むアセトニトリル(A相)と0.1%酢酸を含む蒸留水(B相)の2つの溶媒系を使用した。B相の割合を分離開始時には80%として、その後の25分間に50%まで変化させ、最後の5分間に80%まで戻した。イソフラボンの各分子種は254 nm吸光度を測定することにより定量した。

たん白質の定量

大豆の乾燥種子よりたん白質を抽出し、Bradford法²⁰⁾に基づき測定した。粉碎したダイズ種子50 mgを2 mLチューブに量り取った。SDS-尿素緩衝液(2% SDS, 6 M尿素, 10 mMメルカプトエタノール)を1 mL加え、チューブミキサーで1時間攪拌したあと、4℃、15,000 rpmで20分間遠心した。遠心後の中層200 μ Lを1.5 mLチューブに移した。そのうち5 μ Lを別の1.5 mLチューブに移し、超純水95 μ Lを加え、よく混合した。96穴のウェルプレートに200 μ LのBradford液(Quick Startプロテインアッセイキット; BIO-RAD)を分注し、その中に希釈したたん白溶液4 μ Lを加えて、よく混合した。その後、595 nmで吸光度を測定した。検量線の作成のため、 γ -globulinを用いた。

脂肪酸の定量

脂肪酸組成の分析はIchiharaらの方法²¹⁾に準じて行った。種子粉末25 mgを蓋付き試験管に計りとり、ヘプタデカン酸メチルを内部標準として加えたヘキサンを2 mLと2 M水酸化カリウム/メタノール混合液200 μ Lを加えて試験管に蓋をし、1分間ボルテックスミキサーで攪拌した後、35℃に設定したウォーターバスで15分間温めた。その後、酢酸25 μ Lと超純水2 mLを加えて2,500 rpmで5分間遠心し、分離した上層のヘ

キサン層1 mLをガスクロマトグラフィー分析の試料とした。オートインジェクターでヘキサン層をガスクロマトグラフ (GC14-A; Shimadzu) に注入して脂肪酸組成を分析した。キャリアガスとしてヘリウムを使用し、カラムとしてシリカゲルを充てんした2.1 m×3.2 mmのガラスカラムを用いた。カラム温度は200℃に設定した。

デンブンの定量

デンブンの定量はJeongらの方法²²⁾ に従って行った。粉碎したダイズ種子50 mgを2 mLチューブに測り取り、遊離糖を除去するため、1.5 mLの80%エタノールを加え、4℃で超音波処理 (USK-2; SND) を10分間行った後に、4℃、15,000 rpmで10分間遠心して上清を除去した。残ったペレットに超純水を1 mL加え、予め10倍希釈した耐熱性アミラーゼ (Wako) 溶液50 μ Lと2 M酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.5) 50 μ L加え、ペレットと試薬を十分に混合した。チューブを80℃に設定したウォーターバスにて30分間反応させ、上述と同じ条件で遠心した。遠心後の上清から200 μ Lを試験管に分注した後、同量の3, 5-ジニトロサリチル酸溶液を加え、沸騰水中で5分間反応させた。その後、超純水を加え、5 mLにメスアップして分光光度計 (U-2800; HITACHI) にて535 nmで吸光度を測定した。デンブンを溶液を用いて作成した標準曲線を作成し、測定値から含量を算出した。

統計処理

統計処理はStudent-t検定を用い、データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。有意水準は5%以下とした。

結 果

最適化した条件でダイズ系統農林2号の種子にイオンビームを照射し、植物体の栽培ならびにM₂種子の収穫を行った。翌年、M₂種子を播種し、発芽後の植物体を対象に可視的な変異体の検出を行った。この作業を繰り返すことで得た変異体を成分の解析に用いた。

変異体の葉における葉緑素含量

葉が淡緑色に変化した変異体B-1, B-2, C-2, D-2のM₃世代の葉における葉緑素aとbの含量を測定した。その結果、いずれの系統も無照射の対照個体に比べ、葉緑素が減少しており、葉緑素が欠乏している変異体であることが確認された (Fig. 1)。

変異体の種子におけるイソフラボン含量

葉緑素欠乏変異系統B-1, B-2, C-1, C-2, D-1のM₃種子に関して、ダイジンとゲニスチンの含量を測定した。その結果、ダイジンに関してはC-1とD-1系統が (Fig. 2a)、ゲニスチンに関してはB-1, C-1, C-2, D-1系統が (Fig. 2b)、それぞれ、同じ条件で育成した無照射の対照個体の種子より有意に減少していた。

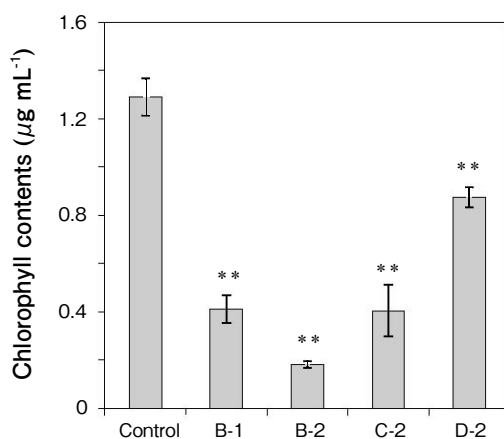


Fig. 1 Chlorophyll content in the leaf tissues of the M₃ progeny. Total chlorophyll content in non-irradiated control and four M₃ progeny plants with pale-green leaves are shown. Data represents mean $\pm$ SD obtained from three replicates. Means that are indicated by asterisk are significantly different from the mean of control plants ($p < 0.01$).

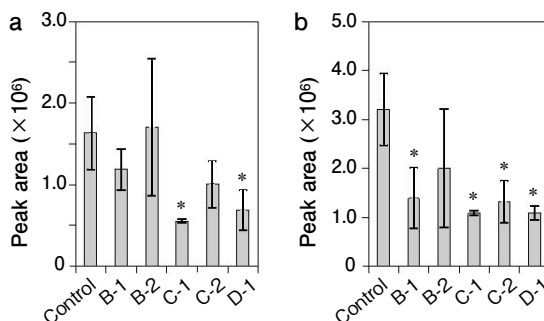


Fig. 2 Isoflavone content in the seeds of the M₃ progeny. (a) Daidzin and (b) genistin content in the seeds of non-irradiated control and five M₃ progeny plants of mutants with pale-green leaves. Data represents mean $\pm$ SD obtained from three replicates. Means that are indicated by asterisk are significantly different from the mean of control plants ($p < 0.05$).

変異体の種子におけるたん白質含量

葉緑素欠乏変異系統B-1, B-2, C-2, D-2のM₄種子に関して、たん白質含量を測定した。対照個体と比較して、全てのイオンビーム照射ダイズ後代のたん白質含有率が増加していた (Fig. 3)。

変異体の種子における脂肪酸含量

葉緑素欠乏変異系統B-1, B-2, C-2, D-2のM₄種子に関して、脂肪酸含量を測定した。脂肪酸含量は、対照と比較して、B-1, D-2系統では減少していた。一方、C-2系統では増加していた (Fig. 4a)。脂肪酸組成は、対照個体と比べてB-1系統はパルミチン酸が少なく、リノール酸が多かった。D-2系統はオレイン酸が多く、リノール酸が少なかった。B-2, C-2系統は対照個体と比べて、脂肪酸組成に大きな変化はなかった (Fig. 4b)。

変異体の種子におけるデンプン含量

葉緑素欠乏変異系統B-1, B-2, C-2, D-2のM₄種子に関して、デンプン含量を測定した。すべての系統で、対照個体との差は検出されなかった (Fig. 5)。

考 察

今回、供試したイオンビーム照射ダイズ後代系統は、クロロフィル含量が明らかに減少しており、イソフラボン含量も減少していた。すなわち、光合成能力が低下した系統であり、同化能力が低下していると推察された。そのため、一次代謝産物であるたん白質、脂肪酸、デンプン含有率は減少していると予想されたが、

B-1, D-2系統はたん白質含有率が増加し、脂肪酸含有率が減少していた。B-2系統はたん白質含有率が増加していたが、脂肪酸含有率では変化は見られなかった。C-2系統ではたん白質含有率と脂肪酸含有率の両方が増加していた。また、すべての系統でデンプン含有率には変化がなかった。

ダイズ種子の油脂含量は、一般に多数の量的遺伝子座によって支配される形質であり、たん白質含量と負の相関関係にある。B-1とD-2系統においてはこの関係があてはまっており、脂肪酸の合成・蓄積およびたん

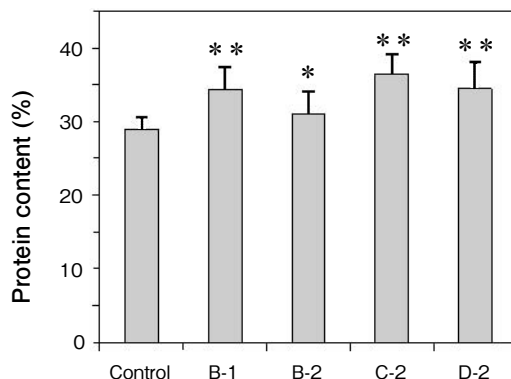


Fig. 3 Protein content in the seeds of the M₄ progeny. Protein content in the seeds of non-irradiated control and four M₄ progeny plants of mutants with pale-green leaves are shown. Data represents mean $\pm$ SD obtained from three replicates. Means that are indicated by asterisk are significantly different from the mean of control plants. * and ** Indicate significant differences at $p < 0.05$ and 0.001 respectively.

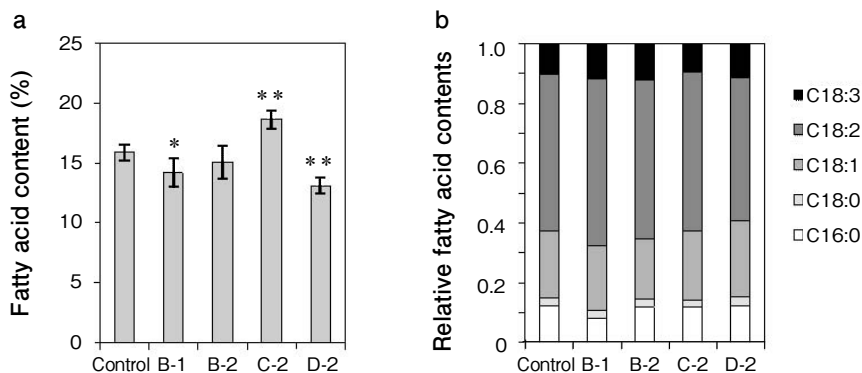


Fig. 4 Fatty acid content in the seeds of the M₄ progeny. (a) Total fatty acid content and (b) relative content of five fatty acids in the seeds of non-irradiated control and four M₄ progeny plants of mutants with pale-green leaves are shown. Data represents mean $\pm$ SD obtained from three replicates. Means that are indicated by asterisk are significantly different from the mean of control plants. * and ** Indicate significant differences at $p < 0.05$ and 0.001 respectively.

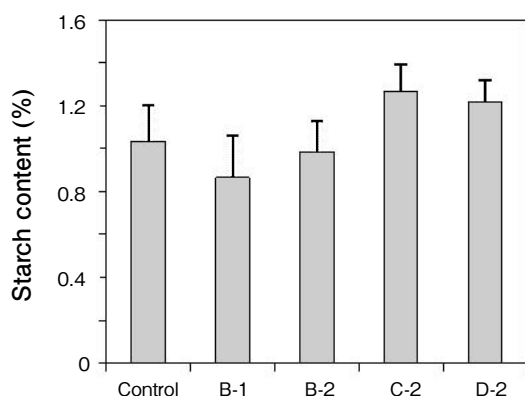


Fig. 5 Starch content in the seeds of the M_4 progeny. Protein content in the seeds of non-irradiated control and four M_4 progeny plants of mutants with pale-green leaves are shown. Data represents mean $\pm$ SD obtained from three replicates. No significant difference was detected between mutants and control plants.

白質の合成・蓄積の一方の経路に関与する酵素の遺伝子機能がイオンビーム照射によって抑制され、他方の正常な経路が壊された遺伝子の機能を補償したことで、たん白質もしくは脂肪酸の増減がおきたと想定することができる。B-1系統に関しては、対照個体と比較して、パルミチン酸の含有率の減少が見られた。脂肪酸の合成経路においては、パルミチン酸が始めに合成され、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の順に代謝される。B-1系統においては、イオンビーム照射によってパルミチン酸を合成する過程

が抑制され、脂肪酸合成の初期段階が律速となる形で、脂肪酸含有率そのものが減少し、それを補償するようにたん白質合成量が増加したのかもしれない。一方、たん白質含有率も脂肪酸含有率も増加したC-2系統においては、たん白質含有率と脂肪酸含有率の負の相関関係は見られなかった。このように一次代謝産物含量の変化の仕方は多様であった。今後、遺伝学的解析により変異形質を分離することに加え、マイクロアレイ解析等により遺伝子の発現状態を網羅的に解析することで、同化能力と成分含量の変化が説明できるかもしれない。

本研究では、成分の変化した系統の他、開花期の違う有用な形質を持つ変異体などが得られている。これらは育種素材として有用である可能性がある。このようなイオンビーム照射により得られた植物集団は、遺伝子の機能解析にも有用であろう。大豆においては最近、Dsトランスポゾンを用いたタギング系が開発された²³⁾。一方、我々は、大豆を対象としてウイルスベクターを利用した遺伝子サイレンシング (VIGS) 系を開発している²⁴⁾。こうした遺伝子機能解析の系と共に用いることで、突然変異体集団はさらに有用性が増すものと推察される。

本研究で研究材料として用いた突然変異体の作出に至る、イオンビーム照射ならびに突然変異体を含む集団の作出に関する研究内容は、文献16において公表した。その実施においては、荒瀬幸子、長谷純宏、阿部 純、山田哲也、喜多村啓介、鳴海一成、田中 淳の各氏より、ご指導・ご協力をいただいた。ここに謝意を表する。

要 約

大豆における既存の突然変異系統は限られており、大豆の遺伝学・育種学の研究を推進する上では、突然変異系統の拡充が望まれる。大豆は4倍体由来の2倍体植物であり、約75%の遺伝子がゲノム中に重複して存在する。この広範な遺伝子重複が、従来の突然変異原による変異体の作出を制限しているものと推察される。我々は、イオンビーム照射が染色体レベルで大きな構造変化を起こす特性を利用し、大豆の種子成分に関する育種に利用可能な新規な突然変異系統を作出することを目的とした研究を行ってきた。これまでにイオンビーム照射を行った大規模な大豆集団を作出し、突然変異体の作出が可能であることを実証するとともに、効率的な変異誘発法を確立した。本研究では、最適化した照射条件により作出した、突然変異体を含むと想定される集団を対象として、種子成分が変化した突然変異体の同定を試みた。イオンビーム照射した大豆個体を育成し、自殖して得た集団から淡緑色の葉を産生する可視的な変異、すなわち、葉緑素欠乏変異を示した個体を選抜し、系統群を作成した。それらに関して、種子成分の解析を行った。その結果、イソフラボン含量の減少、たん白質含量の増加、脂肪酸含量の増減等の変異が検出された。これらの系統は、将来において育種に利用可能な有用な遺伝的変異を有している可能性がある。また、種子における成分組成の制御機構の解析に利用可能であると考えられる。

文 献

- 1) Rawlings JO, Hanway DG and Gardner CO (1958): Variations in quantitative characters of soybeans after seed irradiation. *Agron J*, **50**, 524-528.
- 2) Williams JH and Hanway DG (1961): Genetic variation in oil and protein content of soybeans induced by seed irradiation. *Crop Sci*, **1**, 34-36.
- 3) Takagi Y, Hossain ABMM, Yanagita T, Matsueda T and Murayama A (1990): Linolenic acid content in soybean improved by X-ray irradiation. *Agric Biol Chem*, **54**, 1735-1738.
- 4) Hajika M, Igita K and Kitamura K (1991): A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] induced by gamma-ray irradiation. *Jpn J Breed*, **41**, 507-509.
- 5) Kitamura K (1991): Spontaneous and induced mutations of seed proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Gamma Field Symposia*, **30**, 61-69.
- 6) Takahashi K, Banba H, Kikuchi A, Ito M and Nakamura S (1994): An induced mutant line lacking the α -subunit of β -conglycinin in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Breed Sci*, **44**, 65-66.
- 7) Fehr WR, Welke GA, Hammond EG, Duvick DN and Cianzio SR (1991): Inheritance of reduced palmitic acid content in seed oil of soybean. *Crop Sci*, **31**, 88-89.
- 8) Carroll BJ, McNeil DL and Gresshoff PM (1985): Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutant that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 4162-4166.
- 9) Sebastian SA, Fader GM, Ulrich JF, Forney DR and Chaleff RS (1989): Semidominant soybean mutation for resistance to sulfonylurea herbicides. *Crop Sci*, **29**, 1403-1408.
- 10) Shoemaker RC, Polzin K, Labate J, Specht J, Brummer EC, Olson T, Young N, Concibido V, Wilcox J, Tamlonis JP, Kochert G and Boermaf HR (1996): Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus *soja*). *Genetics*, **144**, 329-338.
- 11) Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, et al. (2010): Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, **463**, 178-183.
- 12) Shikazono N, Yokota Y, Kitamura S, Suzuki C, Watanabe H, Tano S and Tanaka A (2003): Mutation rate and novel *tt* mutants of *Arabidopsis thaliana* induced by carbon ions. *Genetics*, **163**, 1449-1455.
- 13) Shikazono N, Yokota Y, Tanaka A, Watanabe H and Tano S (1998): Molecular analysis of carbon ion-induced mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst*, **73**, 173-179.
- 14) Tanaka A (2009): Establishment of ion beam technology for breeding. In *Induced Plant Mutations in the Genomics Era* (ed. Q. Y. Shu), pp. 243-246. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- 15) Tanaka A, Shikazono N and Hase Y (2010): Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *J Radiat Res*, **51**, 223-233.
- 16) Arase S, Hase Y, Abe J, Kasai M, Yamada T, Kitamura K, Narumi I, Tanaka A and Kanazawa A (2011): Optimization of ion-beam irradiation for mutagenesis in soybean: effects on plant growth and production of visibly altered mutants. *Plant Biotechnol*, **28**, 323-329.
- 17) Porra RJ, Thompson WA and Kriedemann PE (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, **975**, 384-394.
- 18) Kitamura K, Igita K, Kikuchi A, Kudou S and Okubo K (1991): Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "summer-type soybeans" [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Japan J Breed*, **41**, 651-654.
- 19) 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. *Breeding Sci*, **56**, 231-234.

- 20) Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- 21) Ichihara K, Shibahara A, Yamamoto K and Nakayama T (1996): An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids*, **31**, 889-889.
- 22) Jeong W-H, Harada K, Yamada T, Abe J and Kitamura K (2010): Establishment of new method for analysis of starch contents and varietal differences in soybean seeds. *Breed Sci*, **60**, 160-163.
- 23) Mathieu M, Winters EK, Kong F, Wan J, Wang S, Eckert H, Luth D, Paz M, Donovan C, Zhang Z, et al. (2009) Establishment of a soybean (*Glycine max* Merr. L) transposon-based mutagenesis repository. *Planta*, **229**, 279-289.
- 24) Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, Matsuura H, Kasai A, Hong J-S, Kitamura K, Abe J and Kanazawa A (2007) Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnol J*, **5**, 778-790.