

大豆サポニンの育種的制御技術の開発

石本政男^{*1}・高田吉丈²・高橋祐也³・塚本知玄³

¹農業生物資源研究所 ²農研機構近中四農研 ³岩手大学農学部

Genetic Control of Saponin Components in Soybean Seeds Using Marker-Assisted Selection

Masao ISHIMOTO^{*1}, Yoshitake TAKADA², Yuya TAKAHASHI³ and Chigen TSUKAMOTO³

¹National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba 305-8602

²National Agricultural Research Organization Western Region Agricultural Research Center, Zentsuji 765-8508

³Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550

ABSTRACT

Soybean is an excellent source of physiologically active metabolites in addition to high-quality proteins and fats. Triterpene saponins, soyasaponins, are major components of the secondary metabolites and exhibit wide structural diversity, and their chemical properties and pharmacological effects vary depending on the structure. Group A saponins are the primary cause of the bitter astringent aftertaste, while DDMP saponins and their derivatives are suspected to have human health benefits. The structural diversity dependent on the soybean genotypes is explained by different combinations of nine spontaneous alleles at four genetic loci, *Sg-1*, *Sg-3*, *Sg-4*, and *Sg-5*, which control the sugar chain moieties of soyasapogenol glycosides and the presence of soyasapogenol A. Therefore, they appear to control saponin components genetically and partly to improve soybean quality and functional properties. Soybean hypocotyls accumulate a high amount of diversified saponins, but the excision of hypocotyl for the saponin phenotype analysis disrupts seed germination. We therefore applied marker-assisted selection (MAS) to control saponin composition by the combination of the four loci. The molecular markers were selected or designed based on their positional information, and they were validated by the analysis of a population segregating the three loci, except *Sg-4*. We precisely screened target phenotypes according to the combination of marker genotypes, indicating that the positional information including molecular markers here enables

*〒305-8602 つくば市観音台2-1-2

an efficient breeding of new varieties that might accumulate profitable saponins with health benefits and improved taste for soy food processing. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 18-24, 2014.

Key words : DNA marker, marker-assisted selection, soyasaponin, aglycon, glycosyltransferase

大豆サポニンはオレアナントリテルペン（基本骨格：アグリコン）配糖体に分類され、アグリコン分子の化学構造や糖鎖構造が異なる50種類以上の多種多様な分子種が存在する¹⁾。大豆サポニンのうち、ソヤサポゲノールAをアグリコンとするグループAサポニン類（Fig. 1）は不快味原因成分であると報告される²⁾一方、ソヤサポゲノールBをアグリコンとするDDMPサポニン（Fig. 1）とその分解産物は、日常的大豆摂取量で抗高脂血症作用³⁾、ヒト大腸がん細胞増殖抑制作用⁴⁾、甲状腺ホルモン分泌促進作用⁵⁾等、ヒトの健康維持に有用な生理活性が報告されている。大豆種子のサポニン組成は種子の部位や品種によって多様性を示す。種子胚軸は大豆種子の2%程度を占めるに過ぎないが、大豆種子全体の約30%のサポニンを蓄積する。また、種子子葉のサポニン組成がDDMPサポニンとその分解物のみの単純な組成であるのに対し、胚軸ではグループAサポニンの有無や糖鎖構造など様々な遺伝的多型が認められる⁶⁾。これまでに、大豆サポニンの遺伝的多型に関与する遺伝子座として、*Sg-1*、*Sg-3*、*Sg-4*と*Sg-5*の4座が報告されている。グループAサポニン類は基本骨格の22位（C-22）にアラビノース（Ara）とキシロース（Xyl）又はグルコース（Glc）の2種類の糖が結合し、末端糖がアセチル基で飽和されている。このアセチル化により不快味（えぐ味）を呈することが報告されている²⁾。ところが、*sg-1*変異体ではC-22位に付加される糖が1つ少ないA0-agなどのグループAサポニン類を蓄積する。この変異体の発見により、グループAアセチルサポニンに起因する不快味がない大豆品種「きぬさやか」が育成され、特徴的な食味を生かして付加価値が高い豆乳や豆腐の原料として利用されている。最近、私たちは*sg-1*変異体ではC-22位の第2糖を結合する配糖化酵素の機能を欠損していることを明らかにした^{7,8)}。また、大豆サポニンはC-3位に第1糖（グルクロン酸）-第2糖（ガラクトース（Gal）又はAra）-第3糖（Glc又はラムノース（Rha））からなる3糖を結合している。多くの栽培ダイズは子葉では第2糖にAraを有するサポニンを蓄積するのに対し、胚軸ではそのようなサポニンを蓄積しない。しかし、*Sg-4*変異体では第2糖にAraを付加した大豆サポニンを胚軸にも蓄積する⁹⁾。一方、*sg-3*変異体は第3糖（末端糖）にGlcを結合した大豆サポニンを合成することができない⁹⁾。また、最近、野生大豆からグループ

ス（Ara）とキシロース（Xyl）又はグルコース（Glc）の2種類の糖が結合し、末端糖がアセチル基で飽和されている。このアセチル化により不快味（えぐ味）を呈することが報告されている²⁾。ところが、*sg-1*変異体ではC-22位に付加される糖が1つ少ないA0-agなどのグループAサポニン類を蓄積する。この変異体の発見により、グループAアセチルサポニンに起因する不快味がない大豆品種「きぬさやか」が育成され、特徴的な食味を生かして付加価値が高い豆乳や豆腐の原料として利用されている。最近、私たちは*sg-1*変異体ではC-22位の第2糖を結合する配糖化酵素の機能を欠損していることを明らかにした^{7,8)}。また、大豆サポニンはC-3位に第1糖（グルクロン酸）-第2糖（ガラクトース（Gal）又はAra）-第3糖（Glc又はラムノース（Rha））からなる3糖を結合している。多くの栽培ダイズは子葉では第2糖にAraを有するサポニンを蓄積するのに対し、胚軸ではそのようなサポニンを蓄積しない。しかし、*Sg-4*変異体では第2糖にAraを付加した大豆サポニンを胚軸にも蓄積する⁹⁾。一方、*sg-3*変異体は第3糖（末端糖）にGlcを結合した大豆サポニンを合成することができない⁹⁾。また、最近、野生大豆からグループ

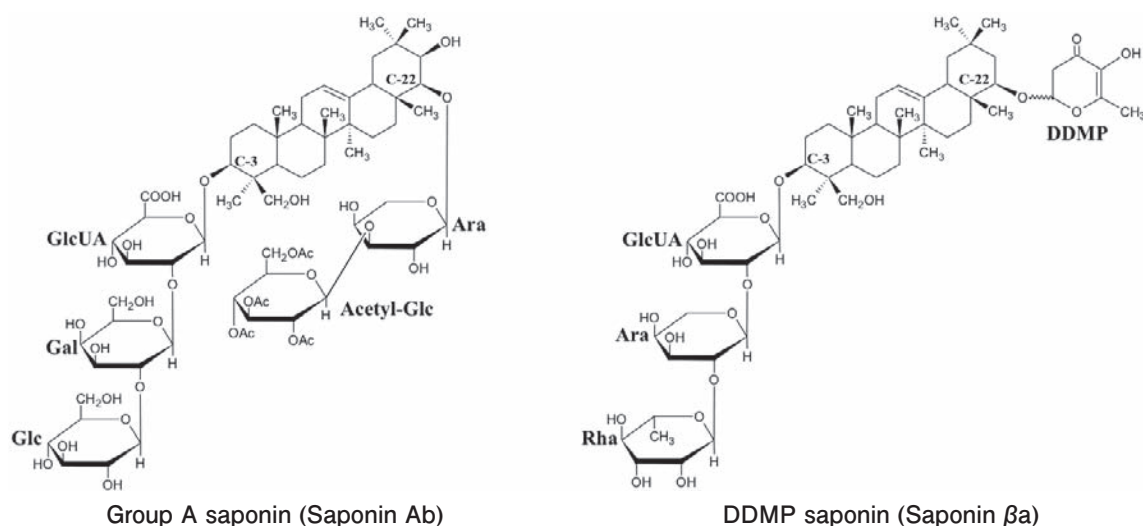


Fig. 1. Chemical structure of typical triterpene saponins (saponin Ab and saponin β a) in soybean seeds.

Aサポニンを欠失した自然突然変異体が見つかり、原因遺伝子として $sg-5$ が提唱された¹⁰⁾。 $sg-5$ 変異体ではソヤサポゲノールB合成量の増加に伴うと推定されるDDMPサポニン蓄積量の増大が確認されることから、機能性や呈味性を改良した品種の育成に有効な遺伝資源として注目されている。以上のように、これまでに見出された大豆サポニン組成の遺伝的多型を育種的に利用すれば、機能性や食味を画期的に改良した大豆食品の開発が可能になるものと考えられる。しかし、大豆サポニンは主に種子の胚軸に含まれており、サポニン組成を分析するために胚軸を切除すると、種子は発芽能力を失ってしまう。そこで本研究では、サポニン組成変異に関わる原因遺伝子座の位置情報に基づいて遺伝子型を識別するDNAマーカーを開発し、サポニン組成の育種制御の迅速化を可能にする。

方 法

サポニン組成を分離するモデル集団の育成

サポニン組成の異なる4品種（きぬさやか（ $sg-1$ ）、御厨青（ $sg-3$ ）、東北152号（ $sg-5$ ）、Jack）の交雑に由来する分離集団から、DNAマーカー解析により、これら3座について野生型遺伝子と変異遺伝子をヘテロ接合型で保持すると推定される種子を選抜した。それらの種子を温室内で栽培し、個体別に後代種子を得た。

DNAマーカー解析

大豆種子の子葉の一部をカッターナイフ等で削り取り、得られた種子粉をDNA解析用のサンプルとした。DNAの抽出は、各サンプル10 mgの種子粉から、BioSprint 96 DNA Plant Kit (QIAGEN) を用いて行った。抽出したDNA溶液1 μ L, Multiplex PCR Kit (QIAGEN) 2.5 μ L, Table 1に記載した蛍光色素を付けたM13 tailedプライマー (6-FAM-M13)¹¹⁾ および全

プライマーを0.05 μ Mに希釈し、5.5 μ L容量でマルチプレックスPCRを行い、一度に $Sg-1$ 、 $Sg-3$ 、 $Sg-5$ 座の遺伝子型を解析した。マルチプレックスPCRの手順は既報¹²⁾に従った。PCR産物は蛍光シーケンサー 3730 DNA Analyzer (Life Technologies) を使用して、増幅断片長を解析した。

サポニン成分の解析

サポニン成分は、種子を子葉と胚軸に分け80%メタノールを加え室温（20℃）にて24時間、時々攪拌しながら抽出した。アセトニトリル-水系溶媒を用いた逆相C30カラム装着LC/PDA/MS/MS (ESI+) 分析装置を用い、溶出時間とUV205 nmの吸収に加え各サポニン成分が示す特徴的なMSとMS/MSフラグメントのパターン（プロファイル）から各サポニン成分を同定した。

結果と考察

DNAマーカーの設計と確認

「きぬさやか」は大豆遺伝資源A-b(F)-A0に由来する $sg-1^{0b}$ 遺伝子を有している。この遺伝子ではたん白質をコードしている塩基配列に48 bpの欠失を生じている⁸⁾。そこで、この欠損部分を増幅するようPCRプライマーを設計した。また、 $Sg-3$ と $Sg-5$ 遺伝子座はまだ同定されていないものの、分子連鎖地図上に位置づけられている。そこで、位置情報に基づいてすでに報告されているマイクロサテライト (SSR) マーカーから原因遺伝子を挟むよう選択した。さらに、マーカー選抜 (MAS) の効率をあげるため、各プライマーセットは蛍光色素でラベルするか、M13 tailを付けたプライマーと蛍光でラベルしたM13 tailedプライマーを混合してマルチプレックスPCRを行い、 $Sg-1$ 、 $Sg-3$ と $Sg-5$ 遺伝子型判別用の5種類のDNAマーカー (Table 1)

Table 1. List of primer sets used in this study

Target locus	Marker name	Forward primer ¹⁾	Reverse primer ¹⁾	Fluorescent dye	Reference
$Sg-1$	Sg-1_exQ2	TCGCCGACACCATGTATTC	CCCTCTCTTGATCCCTTTTTC	VIC	Sayama et al. 2012
$Sg-3$	BARCSOYSSR_10_0720	CAATTCATCTGAAAGTAAAATTAGA	<u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> ACACGCAAGTTGGAATA	M13-tail (6-FAM)	Song et al. 2010 ¹³⁾
	Satt241	GCGCTTGGTCTAAGAAAACCTTTTGGT	GGGGGTTTTATCTCTTAAATGTG	PET	Takada et al. 2012
$Sg-4$	GMES0626	AGCAGGAAGTGGAGTCCTCA	CAACATTTTTCCAAACACGTTAAT	absent	Takada et al. 2012
	AG77	CCAATCTAATGAAATTGACCT	CAAAACCTTTTATGAGTATTACG	absent	Takada et al. 2012
$Sg-5$	BARCSOYSSR_15_1334	TGCTAAAATTACGTGTGAAAAGACA	<u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> TCTTAGGTAGCGCAGCA	M13-tail (6-FAM)	Song et al. 2010 ¹³⁾
	GMES0332	<u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CATTCCATGGCATC	GGGAAGTGGAGTGTTTGAA	M13-tail (6-FAM)	Takada et al. 2013
(M13-tail)	6-FAM-M13	CACGACGTTGTAAAACGAC		6-FAM	Oetting et al. 1995

1) Underlined bold letters are the identical sequences to the 6-FAM-M13 primer.

をキャピラリーシーケンサーで一度に解析した。各DNAマーカーは野生型品種と変異体との間で明瞭な多型を示した。なお、今回の研究では使用しなかったが⁸、*Sg-4*遺伝子型判別用の2種類のDNAマーカーを既報より転載した⁹⁾。

サポニン組成を分離するモデル集団の解析

Sg-1、*Sg-3*と*Sg-5*遺伝子座について野生型遺伝子と変異型遺伝子をヘテロ接合型で保持すると推定される個体に稔実した種子を、*Sg-1*、*Sg-3*、*Sg-5*遺伝子型判別用DNAマーカーセットで解析した (Table 2)。各DNAマーカーの遺伝子型は種子によって異なり、遺伝子型の頻度は野生型 (Dominant) : ヘテロ型 (Hetero) : 変異型 (Recessive) = 1 : 2 : 1の分離期待値とよく適合していた。*Sg-1*、*Sg-3*、*Sg-5*遺伝子座は、それぞれ、第7、10、15染色体に座乗し、独立に遺伝することから、これら3座について任意の対立遺伝子型の組合せを選抜することが可能である。

*Sg-1*遺伝子型判別用DNAマーカーが原因遺伝子領域そのものを識別するのに対し、*Sg-3*と*Sg-5*遺伝子座は同定されておらず、今回用いたDNAマーカーはある程度の距離で離れている。そのため、同じ個体であっても Satt241 と BARCSOYSSR_10_0720、GMES0332 と BARCSOYSSR_15_1334 ではDNAマーカー遺伝子型の不一致が認められた。どちらか一方の遺伝子型で個体を選抜すると、目的とするサポニン遺伝子型を得られない恐れがある。そのため、*Sg-3*や*Sg-5*については遺伝子型判別用の2つのDNAマーカーの遺伝子型が一致する個体を選抜する必要がある。

サポニン表現型の確認

DNAマーカーによるサポニン組成遺伝子 (*Sg-1*、*Sg-3*、*Sg-5*) 型判別の有効性を確認するために、Table 2で解析した種子の一部についてサポニン組成を分析したところ、DNAマーカー遺伝子型はサポニン組成と完全に一致した。*sg-1*遺伝子型を有すると判別された種子胚軸では、「Jack」などの普通品種が蓄積するサポニンAb (Fig. 2A) の代わりにサポニンA0-agを蓄積した (Fig. 2B)。一方、*sg-3*遺伝子型を有すると判別された種子胚軸では、C-3位の末端糖にGlcを付加することができず、サポニンAbの前駆体であるAfに加え、末端糖がRhaであるAcを蓄積した。さらに、*sg-5*遺伝子型を有すると判別された種子胚軸では、グループAサポニンを欠失していた。このようにDNAマーカー遺伝子型により、サポニン組成を正確に判定することができた。今回、これら以前から報告されているサポニン表現型に加え、変異遺伝子の集積により大きくサポニン組成を変化させることができた。*sg-1*と*sg-3*の集積によりサポニンA0-βgやA0-γgの蓄積 (Fig. 2C) が⁸、*sg-3*と*sg-5*の集積によりサポニンαgの消失 (Fig. 2D) が確認された。一方、そもそもグループAサポニンを欠失している*sg-5*遺伝子型を有する種子胚軸では、グループAサポニンのC-22位の配糖化に関わる*sg-1*の集積の効果は認められなかった (Fig. 2E)。以上のように、本研究で開発したDNAマーカーにより大豆種子のサポニン組成を正確に判定できることがわかった。

Table 2. Segregation of *Sg-1*, *Sg-3*, and *Sg-5* genotypes estimated with molecular markers

Plant number	Locus	<i>Sg-1</i>			<i>Sg-3</i>		<i>Sg-5</i>	
	Marker name	<i>Sg-1_exQ2</i>	BARCSOYSSR_10_0720	Satt241	BARCSOYSSR_15_1334	GMES0332		
#1	Dominant	36	48	49	42	45		
	Hetero	100	88	87	83	84		
	Recessive	48	48	48	59	55		
	ND ¹⁾	0	0	0	0	0		
	Total	184	184	184	184	184		
#2	Dominant	38	54	55	46	45		
	Hetero	96	86	85	100	100		
	Recessive	50	44	44	38	39		
	ND ¹⁾	0	0	0	0	0		
	Total	184	184	184	184	184		
#3	Dominant	44	52	48	37	36		
	Hetero	89	83	85	90	90		
	Recessive	50	48	51	56	58		
	ND ¹⁾	1	1	0	1	0		
	Total	184	184	184	184	184		

1) Not determined

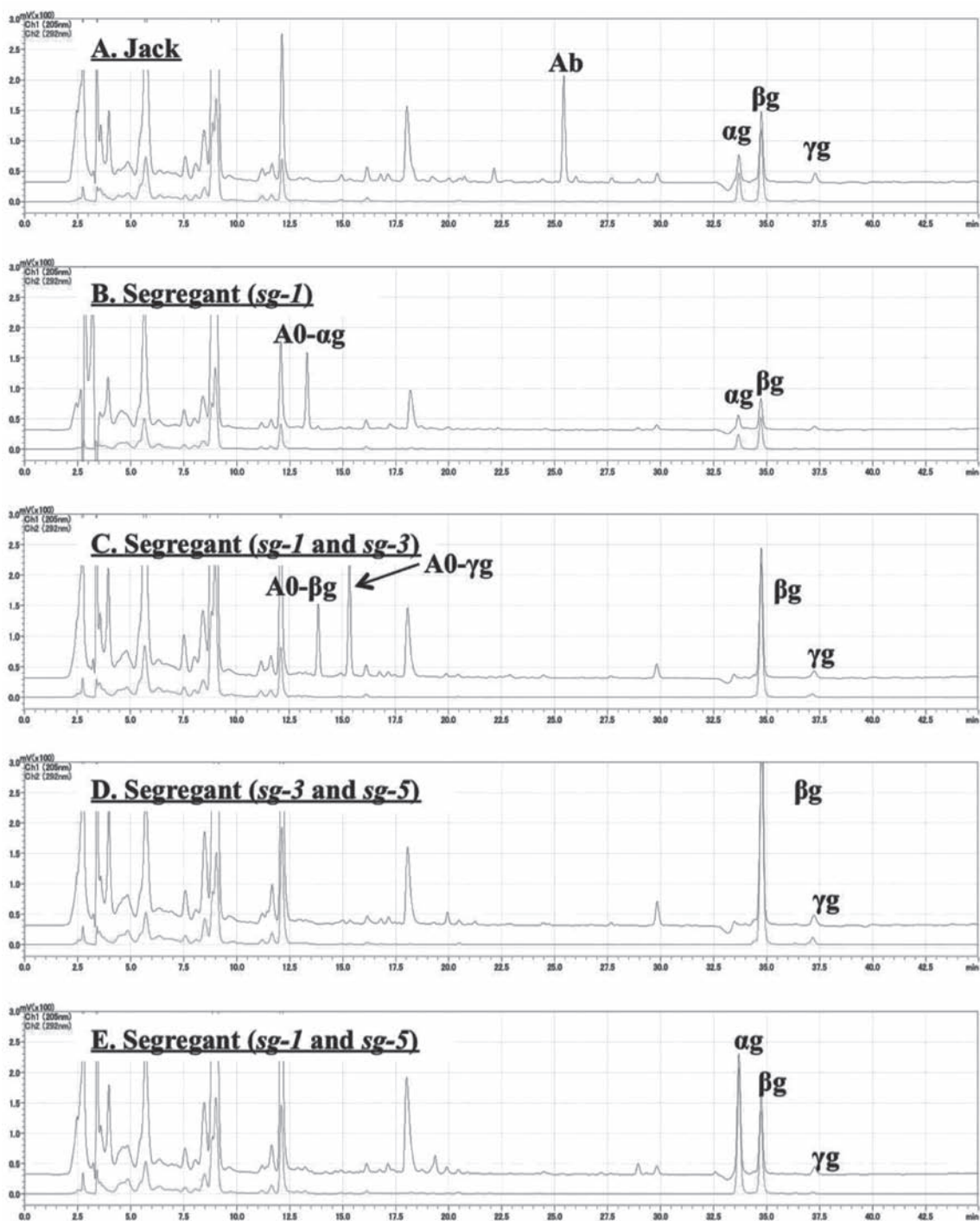


Fig. 2. HPLC chromatograph of saponin extracts from respective segregants. Extracts from seed hypocotyls by aqueous 80% methanol were separated by high performance liquid chromatography and monitored by the UV absorption at 205 nm (black) and 292 nm (red).

要 約

大豆サポニンはその化学構造によって健康機能性や呈味性が異なる。従って、大豆種子中のサポニン組成を育種的に制御できれば、機能性や食味を画期的に改良した大豆食品の開発が可能になるものと考えられる。しかし、大豆サポニンは主に種子の胚軸に含まれており、サポニン分析のために胚軸を切除すると、種子は発芽能力を失ってしまう。そこで本研究では、サポニン組成変異遺伝子型を識別するDNAマーカーを開発し、サポニン組成の育種的制御を可能にする。これまでに大豆サポニンの組成変異体の遺伝解析から、原因遺伝子として*sg-1*, *sg-3*, *Sg-4*, *sg-5*の4種類が見出されている。*sg-1*変異体ではC-22位の第2糖を付加する配糖化酵素をコードしている遺伝子の塩基配列の一部が欠損していることから、この部分を検出するDNAマーカーを設計した。また、*sg-3*, *Sg-4*, *sg-5*の変異遺伝子は、それぞれ、第10、1および第15染色体に座乗することがわかっている。そこで、染色体上の位置情報に基づいてDNAマーカーを選択、あるいは新たに設計した。サポニン組成が異なる両親間の交配種子から養成した分離集団を用いて、*Sg-4*を除く3座についてDNAマーカーの遺伝子型とサポニン組成を分析した。その結果、これらのDNAマーカーによりサポニン組成を正確に判定できることがわかった。今後、これらのDNAマーカーを利用して健康機能性や食味に優れたダイズ品種の効率的な育成が期待できる。

文 献

- 1) 塚本知玄 (2010): 配糖体成分 (サポニン, イソフラボン), 大豆のすべて, 喜多村啓介, 他編, (株)サイエンスフォーラム, 東京, pp.145-149.
- 2) Okubo K, Iijima M, Kobayashi Y, Yoshikoshi M, Uchida T and Kudou S (1992): Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 99-103.
- 3) Murata M, Houdai T, Morooka A, Matsumori M and Oishi T (2005): Membrane interaction of soyasaponins in association with their antioxidation effect. *Soy Protein Res*, **8**, 81-85.
- 4) Ellington AA, Berhow MA and Singletary KW (2006): Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity and involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, **27**, 298-306.
- 5) Ishii Y, and Tanizawa H (2006): Effects of soyasaponins on lipid peroxidation through the secretion of thyroid hormones. *Biol Pharm Bull*, **29**, 1759-1763.
- 6) Tsukamoto C, Kikuchi A, Harada K, Kitamura K and Okubo K (1993): Genetic and chemical polymorphisms of saponins in soybean seed. *Phytochem*, **34**, 1351-1356.
- 7) Takada Y, Sayama T, Kikuchi A, Kato S, Tatsuzaki N, Nakamoto Y, Suzuki A, Tsukamoto C and Ishimoto M (2010): Genetic analysis of variation in sugar chain composition at the C-22 position of group A saponins in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Breed Sci*, **60**, 3-8.
- 8) Sayama T, Ono E, Takagi K, Takada Y, Horikawa M, Nakamoto Y, Hirose A, Sasama H, Ohashi M, Hasegawa H, Terakawa T, Kikuchi A, Kato S, Tatsuzaki N, Tsukamoto C and Ishimoto M (2012): The *Sg-1* glycosyltransferase locus regulates structural diversity of triterpenoid saponins of soybean. *Plant Cell*, **24**, 2123-2138.
- 9) Takada Y, Tayama I, Sayama T, Sasama H, Saruta M, Kikuchi A, Ishimoto M and Tsukamoto C (2012): Genetic analysis of variations in the sugar chain composition at the C-3 position of soybean seed saponins. *Breed Sci*, **61**, 639-645.
- 10) Takada Y, Sasama H, Sayama T, Kikuchi A, Kato S, Ishimoto M and Tsukamoto C (2013): Genetic and chemical analysis of a key biosynthetic step for soyasapogenol A, an aglycone of group A saponins that influence soymilk flavor. *Theor Appl Genet*, **126**, 721-731.

- 11) Oetting WS, Lee HK, Flanders DJ, Wiesner GL, Sellers TA and King RA (1995): Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics*, **30**, 450-458.
- 12) Sayama T, Hwang T-Y, Komatsu K, Takada Y, Takahashi M, Kato S, Sasama H, Higashi A, Nakamoto Y, Funatsuki H and Ishimoto M (2011): Development and application of a whole-genome simple sequence repeat panel for high-throughput genotyping in soybean. *DNA Research*, **18**, 107-115.
- 13) Song Q, Jia G, Zhu Y, Grant D, Nelson RT, Hwang EY, Hyten DL and Cregan PB (2010). Abundance of SSR motifs and development of candidate polymorphic SSR markers (BARCSOYSSR_1.0) in soybean. *Crop Sci*, **50**, 1950-1960.