

大豆 γ -トコフェロールメチルトランスフェラーゼ遺伝子の 温度応答性に関わる分子遺伝学的研究

山田哲也*・丸山晃平・阿部 純

北海道大学大学院農学研究院

Molecular Genetic Study of Temperature Responsive γ -Tocopherol Methyltransferase Genes in Soybean Seeds

Tetsuya YAMADA*, Kohei MARUYAMA and Jun ABE

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

ABSTRACT

Tocopherol content and composition were examined in mature seeds obtained from six soybean varieties grown under different temperature conditions (low, middle, and high) during the seed filling. Three of six varieties increased the total tocopherol content in seeds filling under the high temperature condition. There was no significant difference in total tocopherol content in the other varieties. We focused on the content of α -tocopherol in seeds filling under the different temperature conditions, because α -tocopherol possesses the highest vitamin E activity in mammals. The content of α -tocopherol was significantly increased in seeds of all varieties grown under the high temperature condition, indicating that high temperature during seed filling enhanced the biosynthesis of α -tocopherol in soybean seeds. There was a varietal difference for the amount of increased α -tocopherol. The expression levels of γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT) and methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase (MPBQMT) genes, which were closely related to the biosynthesis of α -tocopherol, were evaluated in seeds filling under the different temperature conditions by quantitative RT-PCR analysis. The gene expression analysis revealed that the expression of γ -TMT2 among three γ -TMT genes was significantly increased in seeds of five varieties grown under the high temperature condition in comparison with those grown under other temperatures. On the other hand, there was no change for the expression of the MPBQMT gene in most varieties grown under the different temperature conditions. We concluded that the expression of the γ -TMT2 gene in response to temperature during seed filling was closely associated with the biosynthesis of α

*〒060-8589 北海道札幌市北区北9条西9丁目

Key words : *Glycine max*, tocopherol, seed filling, temperature, gene expression

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) は古くから日本をはじめとしたアジア諸国で栽培され、枝豆やもやしとして利用の他、豆腐、納豆、醤油や味噌などの加工食品として私たちの身近にある重要な作物の一つと言える。また、豊富な脂質を含むことから世界的には主要な油糧作物として知られている。大豆種子は良質なたん白質と脂質に加え、イソフラボン、サポニン、ルテインおよびトコフェロール (Toc) などの機能性成分に富んでいることが知られている。よって、種々の成分の高位安定化に向けた成分育種が進められていることが大豆育種の特徴といえる。

Tocは機能性成分の一つとして知られており、天然には α -、 β -、 γ -および δ -Tocの4種の同族体がある。中でも、 α -Tocは生体内においてビタミンE結合たん白質との親和性が一番高く、結果として同族体の中で最もビタミンE活性が高くなる。ビタミンEの摂取源は主に植物であるが、植物種やその器官によって α -Toc含量は大きく変わる。大豆種子は他の植物種子と比較して総Toc含量は高いものの α -Tocの割合は低い¹⁾。よって、大豆種子において α -Tocの割合を高めることは大豆種子の機能性を強化することに繋がる。大豆種子ではこれまでに遺伝子組換え技術を利用して α -Toc含量を高めた研究報告がある^{2~4)}。これらの組換え体は α -Tocの生合成に重要な γ -Tocメチルトランスフェラーゼ遺伝子 (γ -TMT) を過剰発現することで α -Toc含量が増加している。一方、大豆遺伝資源のスクリーニングから高い α -Toc含量をもつ品種も見出されている^{5,6)}。このうち、1つの高 α -Toc品種については交雑分離集団を用いたマップベースクローニングによって γ -TMT遺伝子が原因因子であることが特定されている⁷⁾。また、その高 α -Toc品種では γ -TMT遺伝子の1つが他の品種と比べ有意に発現が高くなっていた⁷⁾。大豆種子におけるToc含量は栽培地における環境の影響も強く受けることが知られている^{8,9)}。しかしながら、大豆種子におけるToc含量が環境の違いにより変動する機序は不明である。

本研究の目的は、大豆種子におけるToc含量が環境の影響を受けて増減する機序を明らかにすることである。特に、種子の登熟中における温度とTocの生合成が深く関係していると考え、登熟中の温度が異なる条

件で養成した大豆においてToc含量の定量解析と登熟種子における γ -TMT遺伝子の発現解析を行い両者の関係性を考察した。

方 法

材料

大豆6品種、エンレイ、Keszthelyi Aprozemu Sarga (KAS)、音更大袖、田螺大豆、トヨムスメおよびWilliams82を供試材料として用いた。

実験材料の養成

各品種を培養土に播種し開花期まで25℃一定の14時間日長の人工気象器内で養成した。さらに、各品種について最初の花が開花した後、20℃ (低温区)、25℃ (標準区) および30℃ (高温区) 一定にした人工気象器へ移動し完熟まで養成した。日長条件は開花までと同様に14時間とした。

完熟種子におけるTocの定量解析

各個体あたり5粒の完熟種子から子葉のみを取り出し、種子粉末を準備した。さらにこれらの種子粉末からTocを抽出し高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でTocの分離・定量を行った。本分析では β -Tocと γ -Tocのピークが重なるため、全て γ -Tocとして算出した。

登熟種子のサンプリングと遺伝子の発現解析

低温、標準および高温区で養成した6品種について登熟種子の肥大が最大となり退緑が始まった段階 (R6.5) の種子をサンプリングした。それぞれの処理区において各品種3個体からサンプリングを行った。これらの登熟種子から全RNAを抽出し、逆転写反応を介してcDNAを合成した。定量RT-PCRによりToc生合成に関連する遺伝子の発現解析を行った。対象とした遺伝子は γ -TMTに加え、methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinoneメチルトランスフェラーゼ (MPBQMT) 遺伝子とした。それぞれの遺伝子は18S rRNA遺伝子をリファレンスとして相対値を求め発現解析を行った。

結 果

完熟種子における総Toc含量

完熟種子においてTocを定量解析したところ、全ての品種全ての処理区において α -, γ -および δ -Tocが検出された。これらToc同族体の含量の総和を総Toc含量とした。総Toc含量が最も低い値を示したのは低温区で養成した田螺大豆で 27.1 ± 1.9 mg/100g DWとなった (Fig. 1)。一方、高温区で養成したWilliams82が最も高い総Toc含量 (40.0 ± 2.5 mg/100g DW) を示した (Fig. 1)。また、エンレイ、田螺大豆およびWilliams82については低温、標準および高温区において総Toc含量が有意に異なる値を示した (Fig. 1)。処理区間における総Toc含量の最大差異は低温区と高温区で養成したWilliams82で約8.7 mg/100g DWであった (Fig. 1)。この3品種以外はそれぞれの区で養成した植物体の種子における総Toc含量において明瞭な差異は認められなかった (Fig. 1)。

完熟種子における α -Toc含量

最もビタミンE活性の高い α -Toc含量について各品種・各処理区で比較を行った。その結果、総Toc含量の変化と比べどの品種においても処理区間において

大きな差異が認められた。総じて登熟期の温度が高くなると α -Toc含量が増加する傾向にあった (Fig. 2)。しかしながら、その増加の程度や様式は品種間差異が認められた。トヨムスメの除く5品種については低温区と標準区において α -Toc含量に差異は認められなかったものの、高温区では有意に α -Toc含量が増加した (Fig. 2)。また、KASと音更大袖は低温区と高温区での α -Toc含量の差異が10 mg/100g DW以上となった (Fig. 2)。トヨムスメにおいては、低温区、標準区および高温区全てにおいて α -Toc含量に有意な差が認められた (Fig. 2)。しかしながら、低温区と高温区との差異は1.6 mg/100g DWと他の品種と比べ小さかった (Fig. 2)。

登熟種子における α -Tocの生合成に関連する遺伝子の発現解析

登熟温度に応答して含量が大きく変化する α -Tocについてその生合成に関与すると考えられる γ -TMTとMPBQMT遺伝子を対象に発現解析を行った (Fig. 3)。大豆ゲノムデータベースにおいて両遺伝子のオルソログを検索した結果、3つの γ -TMTと2つのMPBQMT遺伝子を対象とした。 γ -TMT遺伝子はデータベース上のGlyma12g01680, Glyma12g01690およびGlyma09g35680をそれぞれ γ -TMT1, γ -TMT2および

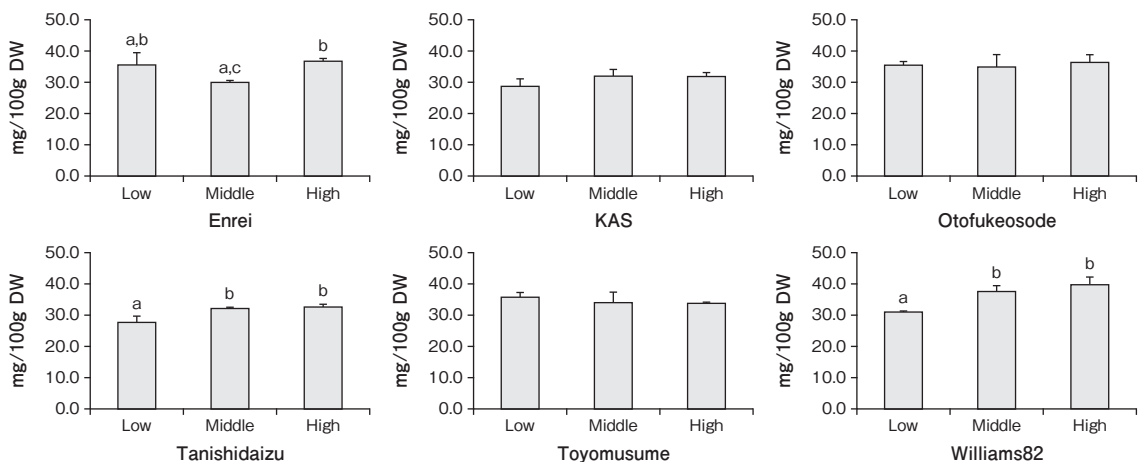


Fig. 1. Total tocopherol content in mature seeds of soybean grown under low (20°C), middle (25°C), and high (30°C) temperature conditions. Data are means $\pm$ SD from three independent experiments. Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences at the 5% level as judged using the Tukey-Kramer test.

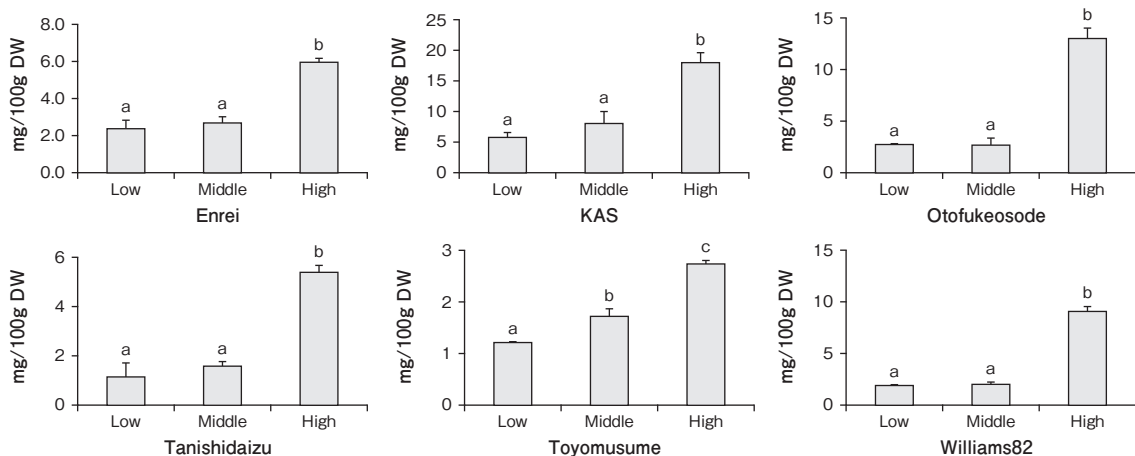


Fig. 2. *a*-tocopherol content in mature seeds of soybean grown under low (20°C), middle (25°C), and high (30°C) temperature conditions. Data are means $\pm$ SD from three independent experiments. Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences at the 5% level as judged using the Tukey-Kramer test.

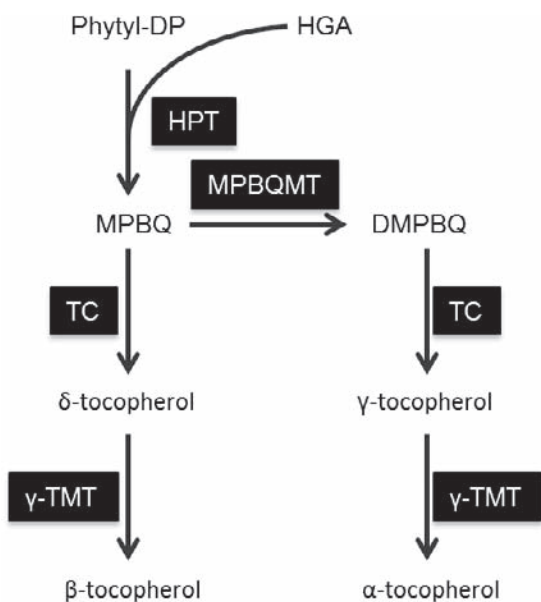


Fig. 3. Tocopherol biosynthetic pathway in higher plants. Phytyl-DP, HGA, MPBQ, and DMPBQ indicate phytyl diphosphate, homogentisic acid, methyl-6-1,4-benzoquinone, and 2,3-dimethyl-6-phytyl-plastoquinol, respectively. HPT, MPBQMT, TC, and γ -TMT indicate phytyl transferase, MPBQ methyltransferase, tocopherol cyclase, and γ -tocopherol methyltransferase, respectively.

γ -TMT3とした。MPBQMT遺伝子はGlyma02g00440とGlyma10g03590をそれぞれMPBQMT1およびMPBQMT2とした。 γ -TMT1遺伝子の発現様式はKASでのみ高温区で発現量が有意に増加した (Fig. 4)。一方、 γ -TMT2遺伝子の発現様式はほとんどの品種において高温区でその発現量が有意に増加した (Fig. 5)。 γ -TMT3遺伝子はKASでのみ高温区で極度にその発現の上昇が認められた (Fig. 6)。MPBQMT1遺伝子は全ての品種の登熟種子においてほとんど発現は認められなかった。一方、MPBQMT2遺伝子は登熟種子において高い発現を示したがKASを除く全ての品種において高温による発現量の増加は認められなかった (Fig. 7)。また、KASに関しては高温区において当該遺伝子の発現が有意に上昇した (Fig. 7)。

考 察

本研究で供試した6品種において総Toc含量やその組成が登熟温度に応答して変動することが明らかとなった。これは、異なる地域で栽培することでToc含量が異なる事例^{8,9)}を説明できるものであった。すなわち、登熟時の高温はToc生合成量を高める方向に進むことを示唆する結果となった。本供試材料に用いたKASはもともと*a*-Toc含量が高い品種として選抜されてきた⁵⁾。本品種による高*a*-Toc形質は γ -TMT3遺伝子の発現が他の品種よりも高くなること起因することが明らかにされている⁷⁾。当初、この γ -TMT3が高温に応答することで*a*-Toc含量が増加するものと予想し

ていた。しかしながら、 γ -TMT3遺伝子の発現はKASにおいて高温条件下で高くなるもののその他供試した品種について γ -TMT3遺伝子の発現量が α -Toc含量の増加を説明することはできなかった。一方、ほとんどの品種において登熟時の温度の上昇に伴い γ -TMT2遺伝子の発現量が増加したことから、当該遺伝子が高温に応答し発現が上昇することで α -Tocの生合成が進むものと考えられた。

γ -TMT2遺伝子における温度に対する応答性と α -Toc含量との関係から、トヨムスメは高温に応答はするもののその遺伝子の発現程度は他の品種と比べ小さく、結果的に α -Toc含量の増加も同様に小さかった。一方、音更大袖は登熟期の温度に対して敏感に応答し γ -TMT2遺伝子の発現は高温区で顕著に上昇した。その結果、 α -Toc含量も低温区と比べ大きく増加した。このことから、 γ -TMT2遺伝子の高温に対する応答能

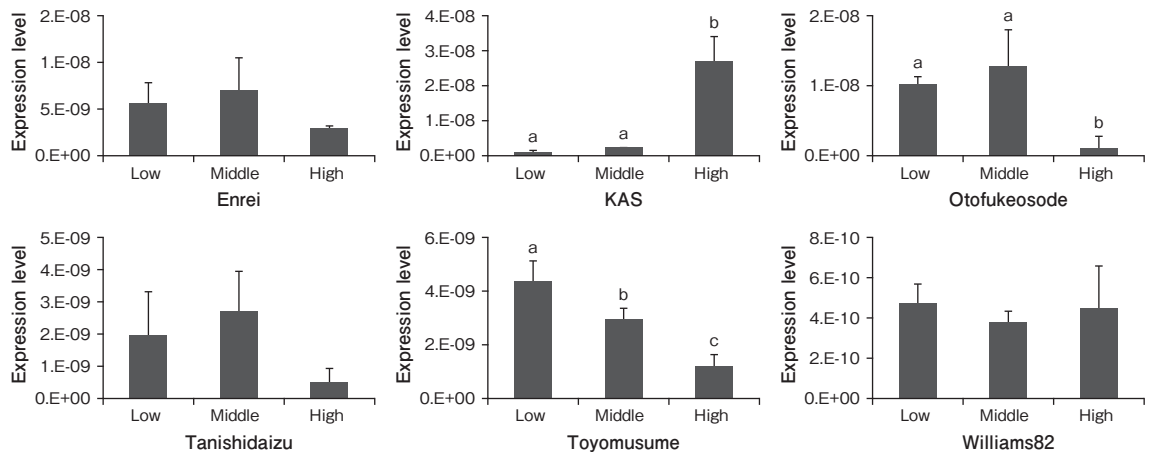


Fig. 4. Quantitative RT-PCR analysis of γ -TMT1 gene in seeds of soybean grown under low (20°C), middle (25°C), and high (30°C) temperature conditions. Relative expression level was determined by normalizing the PCR threshold cycle number of each gene with that of the 18S rRNA reference gene. Data are means $\pm$ SD from the three independent experiments. Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences at the 5% level as judged using the Tukey-Kramer test.

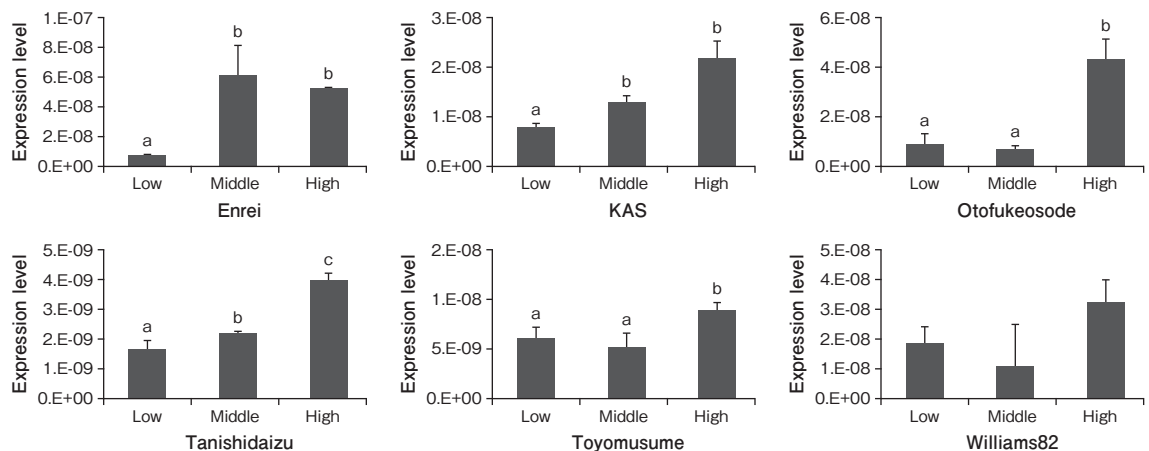


Fig. 5. Quantitative RT-PCR analysis of γ -TMT2 gene in seeds of soybean grown under low (20°C), middle (25°C), and high (30°C) temperature conditions. Relative expression level was determined by normalizing the PCR threshold cycle number of each gene with that of the 18S rRNA reference gene. Data are means $\pm$ SD from the three independent experiments. Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences at the 5% level as judged using the Tukey-Kramer test.

が α -Toc含量を強く反映することが示唆された。これは γ -TMT2遺伝子のプロモーター領域における塩基配列の違いもしくは、品種そのものが具備する温度に対する感受性の差異が関与しているのかもしれない。

本研究により、登熟中の温度が大豆種子における α -Toc含量に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。また、 α -Tocの生合成に関連する酵素遺伝子のう

ち少なくとも γ -TMT2遺伝子が温度に応答することで α -Toc含量が増減することが明らかになった。これらのことから、養成温度を工夫することによって高 α -Toc含量化が可能であることが分かった。また、これらの遺伝的変異を集積することでより高位に α -Tocを蓄積させることが可能性であると考えられた。

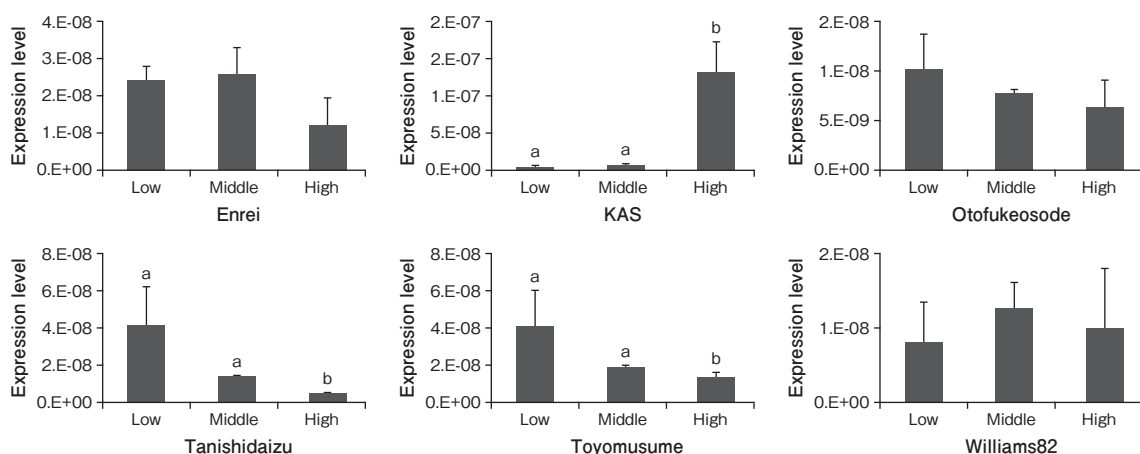


Fig. 6. Quantitative RT-PCR analysis of γ -TMT3 gene in seeds of soybean grown under low (20°C), middle (25°C), and high (30°C) temperature conditions. Relative expression level was determined by normalizing the PCR threshold cycle number of each gene with that of the 18S rRNA reference gene. Data are 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.

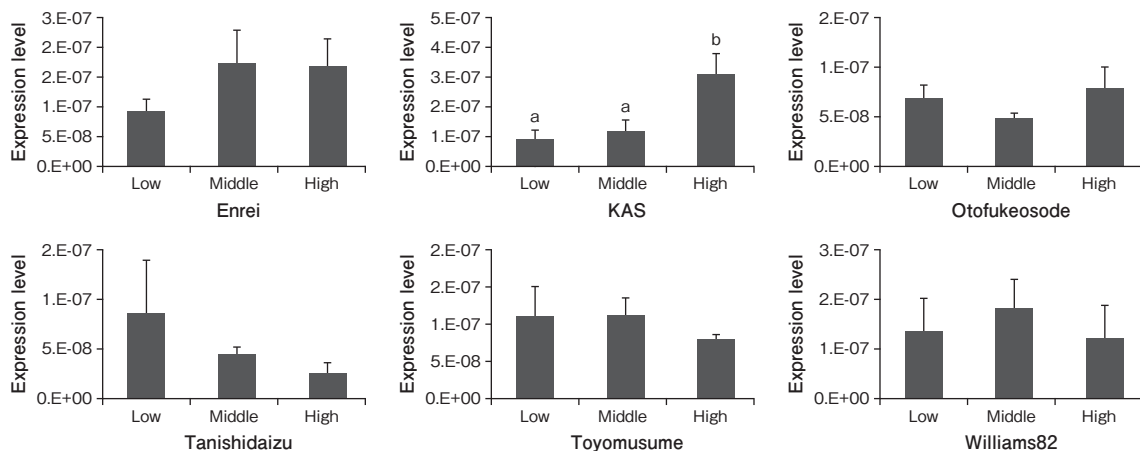


Fig. 7. Quantitative RT-PCR analysis of MPBQMT2 gene in seeds of soybean grown under low (20°C), middle (25°C), and high (30°C) temperature conditions. Relative expression level was determined by normalizing the PCR threshold cycle number of each gene with that of the 18S rRNA reference gene. Data are 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.

要 約

登熟期間のみ異なる温度条件下（低温、標準および高温区）で養成した大豆6品種のトコフェロール含量およびその組成を分析した。その結果、3つの品種において高温条件下で登熟した種子の総トコフェロール含量が増加した。一方、残りの3品種に関しては登熟中の温度に関係なく総トコフェロール含量に変化は認められなかった。さらに、生体内で最もビタミンE活性の高い α -トコフェロールに着目したところ、高温条件下で養成した全ての品種において α -トコフェロール含量が増加することが明らかになった。このことは登熟中の高温が α -トコフェロールの生合成を促進することを示唆した。また、その増加程度には品種間差異が認められた。次に、登熟種子において α -トコフェロールの生合成に関連する γ -トコフェロールメチルトランスフェラーゼ遺伝子（ γ -TMT）および methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinoneメチルトランスフェラーゼ遺伝子（MPBQMT）の発現を定量RT-PCRにより解析した。その結果、高温区で養成した5品種において大豆ゲノム中に存在する3つの γ -TMT遺伝子のうち γ -TMT2遺伝子のみの発現が他の処理区よりも有意に高くなることが明らかとなった。一方、MPBQMT遺伝子はほとんどの品種において異なる温度条件間でその発現に変化はなかった。以上のことから、大豆種子において γ -TMT2遺伝子が登熟中の温度にตอบสนองしてその発現を変化させることが α -トコフェロールの生合成量に大きく影響を及ぼすものと結論付けた。

文 献

- 1) Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA and Wagner K-H (2000): Vitamin E. *J Sci Food Agric*, **80**, 913-938.
- 2) Van Eenennaam AL, Lincoln K, Durrett TP, Valentin HE, Shewmaker CK, Thorne GM, Jiang J, Baszis SR, Levering CK, Aasen ED, Hao M, Stein JC, Norris SR and Last RL (2003): Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. *Plant Cell*, **15**, 3007-3019.
- 3) Chen DF, Zhang M, Wang YQ and Chen XW (2012): Expression of γ -tocopherol methyltransferase gene from *Brassica napus* increased α -tocopherol content in soybean seed. *Biologia Plantarum*, **56**, 131-134.
- 4) Arun M, Subramanyam K, Thebora J, Sivanandhan G, Rajesh M, Dev GK, Jaganath B, Manickavasagam M, Girija S and Ganapathi A (2014): Transfer and targeted overexpression of γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT) gene using seed-specific promoter improves tocopherol composition in Indian soybean cultivars. *Applied Biochem Biotechnol*, **172**, 1763-1776.
- 5) Ujiie A, Yamada T, Fujimoto K, Endo Y and Kitamura K (2005): Identification of soybean varieties with high α -tocopherol content. *Breed Sci*, **55**, 123-125.
- 6) Dwiyanti MS, Ujiie A, Thuy LTB, Yamada T and Kitamura K (2007): Genetic analysis of high α -tocopherol content in soybean seeds. *Breed Sci*, **57**, 23-28.
- 7) Dwiyanti MS, Yamada T, Sato M, Abe J and Kitamura K (2010): Genetic variation of γ -tocopherol methyltransferase gene contributes to elevated α -tocopherol content in soybean seeds. *BMC Plant Biol*, **11**, 152.
- 8) Almonor GO, Fenner GP and Wilson RF (1998): Temperature effects on tocopherol composition in soybeans with genetically improved oil quality. *J Am Oil Chem Soc*, **75**, 591-596.
- 9) Britz SJ, Kremer DF and Kenworthy WJ (2008): Tocopherol in soybean seeds: Genetic variation and environmental effects in field-grown crops. *J Am Oil Chem Soc*, **85**, 931-936.