大豆種子たん白質組成と含量の育種的改良を可能にする DNAマーカーの開発と検証

佐山貴司¹·高橋将一²·小松邦彦^{2,3}·石本政男^{*1}

1農業生物資源研究所 2農研機構九沖農研 3農林水産省農林水産技術会議

Development and Validation of Molecular Markers in Breeding for Seed Protein Components and Content in Soybean

Takashi SAYAMA¹, Masakazu TAKAHASHI², Kunihiko KOMATSU³ and Masao ISHIMOTO^{*1}

¹National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba 305-8602 ²Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, National Agricultural Research Organization Koshi 861-1192 ³Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tokyo 100-8950

ABSTRACT

Compositions and contents of seed proteins are significant targets in soybean breeding. Soybean seeds comprise $\sim 40\%$ protein, mostly consisting of the globulins, β -conglycinin (7S globulin) and glycinin (11S globulin). 7S and 11S globulins comprise three subunits (a', a, and β) and five subunits (AlaBlb, A2Bla, A1bB2, A5A4B3 and A3B4), respectively, and the respective subunits are encoded by CG-a', CG-a and CG- β and gy1, gy2, gy3, gy4 and gy5, respectively. Spontaneous or induced mutants lacking these subunits were identified except for β subunit. In addition, Scg-1 that control the deficiency of all 7S globulin subunits was identified from a wild soybean accession. Soybean seeds also contain three lipoxygenases, L-1, L-2 and L-3, that cause an undesirable bean flavor. Mutants that lack one of three enzymes were identified from soybean germplasm. Thus, the compositions of these proteins can be controlled genetically. Therefore, we designed the molecular markers to select the mutants based on their gene structures or positional information, and they were validated by the analysis of a population segregating the mutant loci. We precisely screened target phenotypes according to the combination of marker genotypes, indicating the molecular markers developed here facilitate an efficient breeding for seed protein compositions. In order to control

^{*〒305-8602} つくば市観音台2-1-2

seed protein content, we conducted quantitative trait locus (QTL) analysis using three recombinant inbred line (RIL) populations, which derived from the crosses between the parents differing in protein contents, and detected several stable QTLs beyond planting year and field. Although these QTLs were dependent on the RILs, the pyramiding of these QTLs could enable the new varieties with a high protein or oil content. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 17-27, 2015.

Key words : DNA marker, β -conglycinin, glycinin, lipoxygenase, marker-assisted selection, quantitative trait locus, recombinant inbred line

畑の肉とも呼ばれる大豆は良質のたん白質や脂質を 豊富に含んでおり,油糧原料,飼料,工業原料として 世界的な重要性がますます高まっている.一方,大豆 は「和食」の特徴である優れた栄養バランスや多様な 食材の利用を実現する上で欠かせない食材であり,大 豆を原料とした食品には,豆腐,油揚げ,煮豆,納豆, きな粉,味噌,醤油,枝豆など,私たちになじみ深い ものが並ぶ.これまで大豆食品が日常的に利用されて きた地域は日本や中国など東アジアに限定されてきた が,大豆の栄養性や健康機能性について関心が高まる につれ,欧米での大豆食品の消費が増えている.

大豆種子には貯蔵たん白質や酵素をはじめ、様々な たん白質が含まれ、その組成や含量によって栄養性、 物性、機能性が異なる、このうち主要な貯蔵たん白質 である *B*-コングリシニン(7Sグロブリン)とグリシ ニン(11Sグロブリン)の両者で種子たん白質の60~ 80%を占めるといわれている^{1,2)}. 11Sグロブリンは7S グロブリンと比較して含硫アミノ酸であるメチオニン とシステインの含量が高く,たん白質のゲル化に関与 する³⁾. これに対して、最近、7Sグロブリンに血中の 中性脂肪を下げる効果があることが報告され4),一躍 注目されるようになった. 7Sグロブリンは3種類(a', a, β), 11Sグロブリンは5種類 (A1aB1b, A2B1a, A1bB2, A5A4B3, A3B4)のサブユニットから構成され、それ ぞれ, CG-a', CG-a, CG-β とgy1, gy2, gy3, gy4, gy5の遺伝子によってコードされている.7Sグロブリ ンと11Sグロブリンの組成や比率を変えることで、食 品加工適性、栄養性や健康機能性の改良が期待できる ことから、日本を中心に組成変異体の探索が行われ、 遺伝資源からCG-βを除く各サブユニットについて機 能欠損変異が見出されている. さらに、大豆の野生種 であるツルマメから全ての7Sグロブリンサブユニッ トを欠失した変異体が見つかり5),その原因遺伝子で あるScg-1が同定された6). これら欠失性を育種的に集 積することにより、7Sグロブリンと11Sグロブリンの

組成を任意に変えることができるようになった⁷⁾. 一 方、大豆種子には過酸化酵素であるリポキシゲナーゼ が含まれ、リノール酸や a-リノレン酸などの不飽和脂 肪酸に作用し、n-ヘキサナールなどのアルデヒド類を 生成する. リポキシゲナーゼの生成物は大豆食品特有 のこくや風味をもたらす一方、青臭みの主要な成分で あり, 大豆食品を普及拡大するうえで妨げとなってい る. 何より, リポキシゲナーゼはリノール酸やα-リノ レン酸などの必須脂肪酸を酸化し変性させる. 大豆種 子にはL-1, L-2, およびL-3の3種類のリポキシゲナー ゼアイソザイムが存在し、米国を中心に変異体の探索 が行われ、各アイソザイムについて欠失変異体が見出 されている^{8~10)}.各欠失変異の集積によりL-1・L-3欠 失系統とL-2・L-3欠失系統が育成されたが、L-1とL-2 は強連鎖しており、交配では全欠系統は得られなかっ た. その後、L1・L3欠失系統とL2・L3欠失系統を 交配して得られたF。種子へ放射線を照射することによ り、L-1・L-2欠失系統が作出され、リポキシゲナーゼ 完全欠失系統の育成が可能になった¹¹⁾.これら種子た ん白質の組成の確認には、主にSDS-ポリアクリルアミ ドゲル電気泳動 (PAGE) が用いられてきた. しかし. SDS-PAGEは手間と時間がかかるうえ, Scg-1を除く 欠失変異遺伝子は劣性であることから、たん白質組成 によってヘテロ個体を識別することができない.一方. 欠失変異の多くは原因遺伝子が単離され、その構造が 明らかになっている。また、原因遺伝子の構造が不明 であっても、大豆の全ゲノム配列情報が公開されてい ることから構造遺伝子の座乗位置の情報が手に入る. そこで本研究では、これらのたん白質について遺伝子 配列情報あるいは染色体上の座乗位置情報に基づき各 変異遺伝子を判別するDNAマーカーを設計する. そ して、グロブリンあるいはリポキシゲナーゼの組成を 分離する集団を用い, DNAマーカーの有効性を検証 する.

ところで、国産ダイズの主な用途が豆腐であること

から、たん白質の組成とともに含量も重要な育種目標 の一つである.たん白質含量は豆腐の収率や凝固性な どの加工適性に関与する.大豆種内にはたん白質含量 に関して幅広い変異が存在し、遺伝率が高いことか ら、これまで多数(2015年5月20日現在152個;http:// www.soybase.org/)の量的形質遺伝子(QTL)が報 告されている.しかし、寄与率20%以上の効果の大き なQTLは、7Sグロブリン構造遺伝子のCG-a座周辺に 集中していた.多くは海外の遺伝資源を用いた解析で あることから、本研究では豆腐加工適性の高い国内主 要品種を片親とした、たん白質含量が異なる両親間の 交配に由来する3集団の組換え自殖系統を用いて、遺 伝要因の探索を行う.

方 法

分離集団の育成

7Sグロブリンおよび11Sグロブリン欠失性を集積し たJQ¹²⁾,ならびに、7Sグロブリンのβ-サブユニットの みを蓄積するJE系統を普通品種であるJackと交配して F₁種子を得た.これらF₁種子を温室で栽培し、7Sグロ ブリンおよび11Sグロブリン欠失性を分離するF₂種子 を得た.なお、JQとJEの育成経過をFig.1とFig.2に 示した.また、種子リポキシゲナーゼを完全に欠失し た品種「いちひめ」と野生型品種である「スズユタカ」 を交配してF₁種子を得て、リポキシゲナーゼ欠失性を 分離するF₂種子を得た.

たん白質組成の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で削り取 り,得られた種子粉 (10 mg)からBioSprint 96 DNA Plant Kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出した. 抽 出したDNA溶液1 µL, Multiplex PCR Kit (QIAGEN) 2.5 µL, 蛍光色素 (6-FAM) で標識したM13 tailed プ ライマー (6-FAM-M13)¹³⁾ および本研究で設計した種 子たん白質特異的プライマーを0.05 µMに希釈し、全 容量5.5 µLでマルチプレックスPCRを行った. 各種子 たん白質遺伝子を検出する特異的プライマーの配列を Table 1に記載した. CG-a', CG-a, Scg-1, Gy1, Gy2 の5遺伝子, Gv3, Gv4, Gv5の3遺伝子, そして, L-1, L-2, L-3の3遺伝子に分けて、マルチプレックスPCR により一斉に解析した. マルチプレックスPCRの手 順は既報¹⁴⁾に従った、PCR産物は蛍光シーケンサー 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を使用し て, 増幅断片長を解析し, 遺伝子型を決定した.

たん白質組成の解析

大豆種子の子葉の一部をカッターナイフで削り取 り.得られた種子粉(10 mg)に5 M尿素, 0.2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2% 2-メルカプトエタノー ルから成る抽出バッファー1 mLを加えてよく撹拌し、 15分間ほど室温で静置した。14,000 rpm (17,800×g) で10分間遠心し、上澄みをたん白質抽出液とした、リ ポキシゲナーゼおよび種子貯蔵たん白質の組成を解 析するために、たん白質50 µgおよび40 µgを含む抽出 液を. 7.5%および10.5%アクリルアミドゲルを用いた 改良SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)法¹⁵⁾ により分離後, Bio-Safe CBB G-250 stain (BIO-RAD) により染色した. 11Sグロブリンについては、イムノ ブロットにより詳細に解析した. すなわち. たん白 質50 µgを含む抽出液を10.5%アクリルアミドゲルによ り分離後, PVDFメンブレン Immonbilon-P (Merck Millipore) に転写し、抗11Sグロブリン抗体と反応させ、 ECL Select Western Blotting Detection Kit (GE) K より二次抗体の化学発光をImageQuant LAS 4000mini (GE) で検出した.

たん白質含量を制御する遺伝要因の解析

たん白質ならびに脂質含量のQTL解析には、「納 豆小粒」と「タチナガハ」の交雑に由来するNT-RIL (190系統)、「Jack」と「フクユタカ」の交雑に由来す るJF-RIL (179系統)、「一本三合」と「フクユタカ」 の交雑に由来するIF-RIL (148系統)の3集団を用い た.NT-RILは2012年茨城県つくば市および水戸市で、 JF-RILは2006年および2007年に熊本県合志市で、IF-RILは2008年に熊本県合志市で栽培した.各組換え自 殖系統のたん白質および脂質含量を近赤外分析装置 Infratec 1241 Grain Analyzer (FOSS)を用いて測定 した.

NT-RILでは222, JF-RILでは442, IF-RILでは180の simple sequence repeat (SSR) マーカーからなる連 鎖地図を用いた. Windows QTL Cartographer 2.5を 利用してcomposite interval mapping (CIM) 法によ りQTLを検出した.

結果と考察

種子たん白質組成に関するDNAマーカーの開発

7Sおよび11Sグロブリンの構造遺伝子の分子進化に ついて、Li and Chang¹⁶⁾ による詳細な報告がある、当 初、7Sグロブリン遺伝子配列は15個存在することが報 告されていたが¹⁷⁾、'Williams 82'の参照配列上には



Fig. 1. Pedigree chart of a soybean line, JQ, lacking 7S and 11S globulins



Fig. 2. Pedigree chart of a soybean line, JE, lacking 11S globulin and major components of 7S globulin.

9個の遺伝子が存在している.しかし,種子での蓄積 が確認されているのは, a, a', およびβの3種類のサ ブユニットのみである.このうちCG-aをコードする 2個の遺伝子(*Glyma20g28650*および*Glyma20g28660*) の領域には,4種類の機能欠損変異と野生型の合計5 種類のアレルが存在し、「ゆめみのり」型と*Scg-1*型 の2アレルにおいてCG-aが完全に欠失することが報 告されている^{6.18)}.これらのアレルの塩基配列に基づ き,挿入・欠失部位を判別できるプライマーを設計し た(Table 1).一方,*CG-a'*(*Glyma10g39150*)領域 は、「ゆめみのり」および祖先品種「毛振」において 欠失していることが報告されており¹⁹⁾,この欠失領域 を判別できる共有性マーカーを設計した(Table 1). また、βサブユニットを含む全ての7Sグロブリンサ ブユニットを欠失する変異遺伝子Scg-1では、CG-a をコードするGlyma20g28650とGlyma20g28660の間 の領域が欠損し、逆方向反復配列が発現することに より全7Sグロブリン遺伝子に発現抑制を生じている ことが明らかになっている⁶⁾.そのため、前述のCGαのマーカーセットを用いてScg-1による7S全欠の遺

Table 1. List of primers used in this study

Target locus	Marker name	Primer name	Primer sequence ¹⁾	Reference		
		CG-al-In	CCTTGGTGCCATCAAAGAAAG			
		CG-a2-In	GCAAGGAGATGCATTGATTATG			
Co-a		CG-all-QT2	GTGAGCGAGGAAAGTATCG			
			CACGACGTTGTAAAACGACCTGAAGTCTAAATAAT	Ishikawa <i>et al.</i> (2006).		
(and <i>Scg-1</i>)	Cg-a_indel	CG-all-Out	TTTAAGAGG	Tsubokura <i>et al.</i> (2012)		
(4114 508 1)		CG-a2vume-F	CTTCTTCTTGACGAGGTTGTG	,		
		oo abyanie i	CACGACGTTGTAAAACGACACAACAAGTGTCTCCA			
		CG-a2yume-R	GA			
		CG-aprime-Fwild	CGCTAGTCGAAAAATAGCTCTG			
- 1		CG-aprime-Fmutant	GCATTCTCAATCTTGTTTGACATC			
Cg-a'	Cg-a'_indel	• • •p	CACGACGTTGTAAAACGACTGGTAGATAGTAATCT	Kim <i>et al.</i> (2011)		
		CGg-aprime-R	ТСТСТС			
		BSSR_03_1290-F	TGAGATCAACATCATTTAAACCAA			
	BARCSOYSSR 03 1290		CACGACGTTGTAAAACGACTTGCTGATTTGCATTG	Song <i>et al.</i> (2010)		
0.1		BSSR_03_1290-R	СТ	U ()		
Gyl	DADCCOVCCD 00 1001	BSSR_03_1291-F	CACGACGTTGTAAAACGACAATGCACTCGACTTTGA	C (1 (0010)		
& Q Q	BARCSOYSSR_03_1291	BSSR_03_1291-R	CGCCAGTTTGCTCTCAAATA	Song <i>et al.</i> (2010)		
Gy2		DOOD 00 1005 D	CACGACGTTGTAAAACGACGTCACCATGGCTTTGT			
	BARCSOYSSR_03_1305	BSSR_03_1305-F	ТА	Song <i>et al.</i> (2010)		
		BSSR_03_1305-R	TTGTTGCTTCTCTACACATGGA	U ()		
Gy3		C 115	CACGACGTTGTAAAACGACTTAAGAGTTCTAATCT			
	C2 :	Gy3-F	TAATGCATG	Cl (1000)		
	Gy3_inversion	Gy3-Rwild	GTACGTGAGCCACATATATAGCA	Cho <i>et al.</i> (1989)		
		Gy3-Rmutant	GGAATAATGAGAACAAAGGAGAC			
	Gy4_snp	C 41 E	CACGACGTTGTAAAACGAC GCAAATATAAACGAAG			
		Gy4IS-F	CATGCA			
		0.41.10				
		Gy4ls-R	TCC	Kangfu <i>et al.</i> (2005)		
		Gy4as-wild343	CACTTCCTTAGTTCAATATG			
0.4		Gy4as-mutant237	GAGAGTGAAGGGCTTCCCT			
<i>GY4</i>		BSSR_10_0211-F	GCTTGTGGTCATAGTTGCGA			
	BARCSOYSSR_10_0211		CACGACGTTGTAAAACGACGGCAGAGGTTGTGTGTG	Song <i>et al.</i> (2010)		
		BSSR_10_0211-R	AT	<u>g</u> (,		
		BSSR_10_0214-F	TGGCAAAAAGAGGGATTTTG			
	BARCSOYSSR 10 0214	DCCD 10 0014 D	CACGACGTTGTAAAACGACATTCTTATCCTTCATGG	Song <i>et al.</i> (2010)		
		BSSK_10_0214-K	ТТ			
		BSSR_13_0737-F	CGCAGACAGATAATTGGTTGA			
	BARCSOYSSR_13_0737	DCCD 12 0727 D	CACGACGTTGTAAAACGACAATGTTTTGTTTTGCA	Song <i>et al.</i> (2010)		
CF		D22K_13_0/3/-K	AGTCT			
GYƏ		BSSR_13_0741-F	SSR_13_0741-F CGGCCTTATTTTAAGCCGAA			
	BARCSOYSSR_13_0741	DCCD 12 07/1 D	CACGACGTTGTAAAACGACGCAAAGAATGCAAAGA	Song <i>et al.</i> (2010)		
		D22V_12_0141-V	TG			
T_1	I owl indol	Lox1-F	CACGACGTTGTAAAACGACATTCGTCATAGCAACAC	Lonic at $al (2010)$		
L-1	LOA1_IIIUEI	Lox1-R	CAGTGAAAACCCAATTCTTATAAACC	Lenis et al. (2010)		
		Low9 F	CACGACGTTGTAAAACGACAAAATTTACAGATCTT			
L-2	Lox2_indel	LUX4-1'	CCTGG	Shin <i>et al.</i> (2012)		
		Lox2-R	CATGAGACCATGACAATTCTTTTC			
12	Lov3 indol	Lox3-F	CACGACGTTGTAAAACGACGTGAATAGCGTAACCAG	Lonic at $al (2010)$		
L-J	LUX9_IIIUEI	Lox3-R	GCACTAATAAGCTGGAGAGACAC	Lenis et al. (2010)		
(M13-tail)	6-FAM-M13	6-FAM-M13	(6-FAM) CACGACGTTGTAAAACGAC	Oetting et al. (1995)		

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

伝子型を検出することができる.また,CG-a および CG-a'の両マーカーセットを用いて「ゆめみのり」型 のPCR産物を検出することにより,低減したCG-Bの みが残存した7Sの表現型をスクリーニングできる.一 方, 'Williams 82'の参照配列によれば,11Sグロブ リンをコードする遺伝子配列は8個存在する.このう ちGy1 (Glyma03g32030),Gy2 (Glyma03g32020),

Gy3 (Glyma19g34780), Gy4 (Glyma10g04280) および Gv5 (Glyma13g18450) の5個の遺伝子が11Sグロブ リンの構造遺伝子であると考えられている¹⁶⁾. Gv4 (A5A4B3) サブユニットを欠失する「エンレイ」で は、Gy4 (Glyma10g04280)の開始コドンに塩基置換 を生じている²⁰⁾. そこで, Amplification-Refractory Mutation System (ARMS法) により²¹⁾, 塩基置換 を塩基長多型に変換したマーカーを設計した. Gy3 (A1bB2) サブユニットについては、この遺伝子をコー ドするGy3 (Glyma19g34780) を含む約2 Mbのゲノム 領域に逆位を生じた品種('Forrest')が報告されてい る²²⁾、そこで、この逆位の有無を検出するマーカーを 設計した. ところが, Gy1 (A1aB1b), Gy2 (A2B1a), およびGy5(A3B4)の各サブユニットに関してはコー ドする遺伝子配列の多型情報がなく、密接連鎖する SSR配列²³⁾のうち解析集団の両親間で共優性の多型 を示したものを各遺伝子座のマーカーとした. Gv1 (Glyma03g32030) とGy2 (Glyma03g32020) は隣接し た遺伝子であり、Gy1とGy2サブユニットを欠失する 変異体はこの周辺領域のSSRの増幅が認められず、50-100 kbの巨大な領域を欠失していることが示唆され た. また, Gy3を除く11Sグロブリン遺伝子について は密接連鎖するSSR配列多型も補助的に遺伝子型判別 用のマーカーとして用いた.

大豆種子にはL-1, L-2, およびL-3の3種類のリポキ シゲナーゼアイソザイムが含まれている. 各アイソ ザイムについては,欠失変異が見出されており,変 異遺伝子の構造も明らかになっている^{24~26)}. そこ で,各遺伝子の構造から挿入・欠失部位を判別する マーカーを設計した(Table 1). リポキシゲナーゼ全 欠ダイズ「いちひめ」は,'PI408251'に由来する*I-1* (*Glyma13g42320*),'PI86023'の*I-2*(*Glyma13g42310*), 「早生夏」('PI417458')の*I-3*を集積して育成された²⁷⁾. しかし, *L-1とL-2*が隣接していることから,予め*I-1/ I-3*あるいは*I-2/I-3*の二重変異体を作出しておき,それ らを交配して得たF₂種子に放射線を照射し,その後代 種子をスクリーニングすることにより完全欠失変異体 が見出された.そのため,この変異体は,*L-1とL-2*間 の組換え,あるいは,*I-1/L-3*あるいは*I-2/I-3*の二重変異 体への新たな変異の誘発によって作出された可能性が ある.そこで,開発したDNAマーカーで「いちひめ」 を解析したところ,既知の変異遺伝子と同じ遺伝子型 が検出されたことから,*I-1とI-2*間で組換えを生じたも のと考えられた.

種子たん白質組成に関するDNAマーカーの検証

種子たん白質成分の有無を分離するF2種子を用い て、これら開発したDNAマーカーの有効性を検証し た(Table 2).各遺伝子座の分離は、野生型:ヘテロ

 Table 2. Segregation of molecular marker genotypes

 for seed protein components in soybean

a) F_2 seeds of Jack x JE

Locus	Cg-a	Cg-a'	Gy1 & Gy2 ¹⁾	Gy3	Gy4	Gy5
Presence	222	231	218	207	218	215
Hetero	399	414	424	431	412	422
Absence	225	201	194	208	216	204
ND ²⁾	0	0	10	0	0	5
Total	846	846	836	846	846	841
$P(\chi^2)^{3)}$	0.254	0.285	0.461	0.859	0.748	0.861

1) Gy1 and Gy2 are the adjacent loci

2) Not determined (including recombinant genotype between markers)

3) Probability indicated by chi-squared test

b) F_2 seeds of Jack x JQ

Locus	Scg-1 (Cg-a)	Cg-a'	Gy1 & Gy2 ¹⁾	Gy3	Gy4	Gy5
Presence	89	382	107	99	87	84
Hetero	197	-	174	199	193	189
Absence	93	-	100	84	102	105
ND 2)	3	0	1	0	0	4
Total	379	382	381	382	382	378
$P(\chi^{2})^{3)}$	0.712	-	0.211	0.397	0.543	0.311

1) Gy1 and Gy2 are the adjacent loci

2) Not determined (including recombinant genotype between markers)

3) Probability indicated by chi-squared test

c) F_2 seeds of Suzuyutaka x Ichihime

Locus	L-1 & L-2 ¹⁾	L-3
Presence	23	26
Hetero	52	39
Absence	19	29
ND 2)	0	0
Total	94	94
$P(\chi^2)^{3}$	0.496	0.233

1) *L-1* and *L-2* are the adjacent loci

- 2) Not determined (including recombinant genotype between markers)
- 3) Probability indicated by chi-squared test

型:変異型=1:2:1の期待値とよく一致した. *Gy1* 座と*Gy2*座,および,*L*-1座と*L*-2座は互いに隣接して おり,これらの間で組換えを生じた種子は得られな かった.各解析集団から任意の遺伝子型の種子を選び, SDS-PAGEもしくは、ウェスタンブロッティングによ り,種子たん白質組成(表現型)を解析した(Fig. 3, 4および5).*Gy3*以外は、遺伝子型と表現型とが一致 しており、本研究において設計したDNAマーカーの 有効性を確認することができた.今回解析した2つの 分離集団ではGy3の蓄積を確認することができなかっ た.したがって、今回用いた交配親が何れも*Gy3*を欠 失していたか、*Gy3*の発現量が少ないことから²⁸⁾、今 回用いた組成解析法ではGy3を検出できなかった可能 性がある.以上から、今回開発したDNAマーカーを



- Fig. 3. Validation of molecular markers for seed protein components in soybean
 - a) Molecular marker genotypes of selected eight F₂ seeds of Jack (J) x JE (E) for 7S globulin (*Cg-a*, *Cg-a*') and 11S globulin (*Gy1*, *Gy2*, *Gy3*, *Gy4*, *Gy5*).
 - b) SDS-PAGE analysis of the selected F_2 seed, which are listed in (a).
 - c) Western blot analysis of the selected F_2 seed, which are listed in (a). Electrophoresis was conducted using 10.5% polyacrylamide gel under 100 V for 70 min. Genotypes were indicated by P (Presence), H (hetero), and A (Absence).

用いることで大豆種子中のたん白質組成の育種的改良 を加速できることが明らかになった.



Fig. 4. Validation of molecular markers for Scg-1 Two seeds were selected from segregating F₂ seeds of Jack x JQ according to molecular marker genotypes for 7S and 11S globulins. Electrophoresis was conducted using 10.5% polyacrylamide gel under 100 V for 70 min.



- Fig. 5. Validation of molecular markers for seed lipoxygenases in soybean
 - a) Molecular marker genotypes of selected four F₂ seeds of Suzuyutaka (S) x Ichihime (I) for lipoxygenases (*L*-1, *L*-2, and *L*-3).
 - b) SDS-PAGE analysis of the selected F₂ seed, which are listed in (a). Electrophoresis was conducted using 7.5% polyacrylamide gel under 150 V for 7 hr. Genotypes were indicated by P (Presence) and A (Absence).

大豆種子たん白質含量を制御する遺伝要因の解析

NT-RIL (つくばおよび水戸において栽培), JF-RIL (2006年および2007年に栽培), IF-RILの3集団を用い て、各系統の種子中のたん白質含量および脂質含量に ついての分布の概要をTable 3に示した. 各集団にお けるたん白質と脂質含量は、-0.742~-0.766といず れも強い負の相関を示した.このことから、高たん白 質含量かつ高脂質含量の品種を育成することは難しい と考えられた、一方、各集団のたん白質含量および脂 質含量ともに、正規分布に近い連続分布を示し、常に 両親を超越した系統が分布した.このことから、それ ぞれの含量は環境の影響を受けやすい量的形質遺伝子 座(QTL)によって制御されるが、その集積によっ て両親品種を超える品種の育成が可能であることが示 唆された.そこで、分子連鎖地図を用いて、たん白質 含量および脂質含量についてQTL解析を行った.NT-RILにおいて2つの栽培地とも第4, 11, 13, 15染色体 上にたん白質含量に関するQTLを検出した。何れの QTLも「納豆小粒」の遺伝子型でたん白質含量を高め た. このうち、第11と15染色体については同じ位置に 脂質含量に関するQTLを検出した. IF-RILでは2カ年 とも第15と18染色体上に脂質含量に関するQTLを検出 した.このうち2006年は同じ染色体領域にたん白質含 量に関わるQTLを検出した.一方, IF-RILについては 2008年の1カ年の結果しかないが、第16染色体上にた ん白質含量と脂質含量に関するQTLを検出した. 異な る環境下でも安定した効果を示したQTLは幾つか見出 されたものの、2集団以上で共通して検出されたQTL は見出されなかった(Table 4). 集団間で共通した領 域にQTLは見出せなかったが、異なる環境で比較的安 定した効果を示すQTLを見出すことができた. これら QTLを集積することで、これまでにない高たん白質、 あるいは高脂質の大豆を育成できるものと期待でき る.

Table 3. Protein and oil content (%) in the parental cultivars and their recombinant inbred lines (RIL)

Population	No. of				Parenta	al valı	ıe	Va	alues of RI	Distribution shape			
name (location or year)	RILs tested	Correlation			Pl		P2	Minimum	Average	Maximum	Kurtosis	Skewness	
NT-RILs	195	-0766	Protein	41.8	(Natto-syoryu)	40.4	(Tashinagaha)	38.1	40.7	43.5	-0.29	0.14	
(Tsukuba-2012)	100	-0.700	Oil	17.9		19.9	(1 aciliiagaila)	18.3	19.6	20.5	0.18	- 0.51	
NT-RILs	187	-0.764	Protein	42.7	(Natto quoruu)	41.2	(Tachinagaha)	38.6	42.5	46.1	0.50	-0.19	
(Mito-2012)	107	0.704	Oil	18.7	(1vallo-Syoi yu)	20.1	(1 aciiiiagaiia)	18.9	19.9	21.4	0.08	0.33	
JF-RILs	170	-0.761	Protein	41.7	(Incl.)	47.0	(Fulmentalia)	39.0	42.8	47.2	-0.31	0.34	
(Koshi-2006)	115	0.701	Oil	21.7	(Jack)	19.4	(I' unuyutana)	18.5	21.2	23.2	- 0.07	- 0.29	
JF-RILs	179	179	_0749	Protein	40.3	(Icolr)	42.6	(Ful	36.3	40.7	48.9	0.39	0.65
(Koshi-2007)	170	-0.742	Oil	23.8	(Jack)	21.9	(I'UKUYULAKA)	18.3	22.8	25.1	2.27	- 0.92	
IF-RILs	100	0.745	Protein	49.7 (Ippon conrech)	43.0	(Fukumtoko)	38.8	46.8	51.9	1.43	-0.62		
(Koshi-2008)	100	0.745	Oil	18.5	(ippoil-saligoli)	22.3	(1° ukuyulaka)	16.6	19.9	23.1	-0.17	-0.01	

							-,						
Population	Chr	Proximal	Position	LOD 1)	P1 2)	Contribution	Population	Chr	Proximal	Position	LOD 1)	P1 2)	Contribution
	0.11	marker	(cM)	100	effect	ratio (%)	1 optitution	U.II	marker	(cM)	100	effect	ratio (%)
	13	Satt663	45.5	7.6	0.43	14.0		15	Satt691	0.0	5.8	-0.13	9.8
NT-RIL	15	Satt691	1.0	5.5	0.35	10.0	NT-RIL	11	Satt519	85.3	5.2	-0.16	13.8 💥 ³⁾
(Tsukuba-2012)	4	Satt718	65.0	3.7	0.29	6.5	(Tsukuba-2012)	19	Satt373	157.7	4.7	-0.12	8.2
	11	Satt519	77.8	3.6	0.30	6.5 💥 ³⁾		13	Satt663	45.5	4.4	-0.13	7.4
	13	Satt663	45.5	6.2	0.45	11.5		15	Satt691	0.0	4.6	-0.13	8.5
NT-RIL	15	Satt212	6.0	4.5	0.38	8.5	NT-RIL	11	Satt583	108.8	4.2	-0.13	7.7 💥
(Mito-2012)	11	Satt519	77.8	3.6	0.34	6.5 💥	(Mito-2012)						
	4	Satt718	65.2	3.2	0.30	5.5							
	15	Sat_172	92.4	4.8	- 0.62	13.3		8	CSSR420	109.4	5.6	-0.29	10.4
JF-RIL	6	Satt307	170.6	4.1	0.47	7.6 💥	JF-RIL	18	Sat_131	58.1	5.0	0.29	10.0
(Koshi-2006)	18	CSTS28	66.6	4.0	-0.47	7.8	(Koshi-2006)	15	Satt263	102.3	3.8	0.23	6.5
	17	Sat_284	48.6	3.6	0.46	7.1							
IF DII	19	CSSR116	111.6	12.9	-1.20	22.9 💥	IE DII	19	CSSR116	110.6	9.0	0.42	17.2 💥
JF-RIL (Koobi 2007)	6	CSTS744	151.9	8.1	0.92	12.8 💥	JF-KIL (Koch: 2007)	18	Sat_131	55.1	6.5	0.33	10.8
(Kosni-2007)	13	Sat_313	148.2	3.4	0.61	6.7	(KOSIII-2007)	15	Sat_172	93.4	4.8	0.34	11.3
וום יוו	16	Sctt011	73.2	5.2	0.85	13.0	IE DII	13	Satt663	35.0	4.7	-0.60	19.2
IF-KIL (Kashi 2000)							11'-KIL (Koch: 2000)	5	Sat_171	46.3	4.7	-0.76	30.5
(Koshi-2008)							(NOSHI-2008)	16	Sctt011	74.2	3.8	-0.43	9.8

Table 4. QTL analysis for protein and oil content in the three RIL populations a) Protein content (%) b) Oil content (%)

1) More than the threshold calculated by 1000-times permutation test

2) P1: Natto-syoryu (NT-RILs), Jack (JF-RILs), Ippon-sangoh (IF-RILs)

3) Close to the QTLs for flowering, including E1 (Chr_6) and Dt1 (Chr19)

要 約

大豆種子には良質なたん白質が豊富に含まれている. その主要な成分は、β-コングリシニン (7S グロブリン) とグリシニン (11Sグロブリン) であり,それぞれ,3種類 (a', a, β) と5種類 (AlaBlb, A2Bla, AlbB2, A5A4B3, A3B4) のサブユニットから構成されている. 各サブユニットは, CG-a', CG-a, およびCG-β とgy1, gy2, gy3, gy4, およびgy5の遺伝子によってコードされ, CG-βを除き 各サブユニットの欠失変異が見出されている. さらに,7Sグロブリンの完全欠失性をもたらす単一 の優性遺伝子 (Scg-1) が野生大豆 (ツルマメ) に見出された. また,大豆種子には3種類のリポキ シゲナーゼアイソザイム (L-1, L-2, およびL-3) が存在し,青臭みの原因となっている. 各リポキ シゲナーゼについては欠失変異が見つかり,完全欠失品種の利用も進んでいる. そこで,これらの たん白質について遺伝子配列情報あるいは染色体上の位置情報に基づきDNAマーカーを設計した. そして,種子たん白質あるいはリポキシゲナーゼの組成を分離する集団を育成し,開発したDNA マーカーにより表現型を選抜できることを確認した. さらに,たん白質含量が異なる両親間の交配 に由来する3つの組換え自殖系統を用いて,たん白質含量に関わる遺伝要因の探索を行った. 各組 換え自殖系統から効果が安定した複数のQTLを検出したが,異なる集団間に共通するものはなかっ た. これらQTLを集積することで,これまでにない高たん白質,あるいは高脂質の大豆を育成でき る可能性がある.

- Derbyshire E, Wright DB and Boulter D (1976): Legumin and vicilin, storage proteins od legume seeds. *Phytochem*, **15**, 3-24.
- Thanh VH and Shibasaki K (1976): Major proteins of soybean seeds: a straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, 24, 1117-1121.
- Saio K and Watanabe T (1978): Differences in functional properties of 7S and 11S soybean proteins. *J Texture Studies*, 9, 135-157.
- Fukui K, Kojima M, Tachibana N, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M and Kito M (2004): Effects of soybean β-conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68, 1153-1155.
- Hajika M, Takahashi M, Sakai S and Igita M (1996): A new genotype of 7S globulin (b-conglycinin) detected in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.). *Breed Sci*, **46**, 385-386.
- 6) Tsubokura Y, Hajika M, Kanamori H, Xia Z, Watanabe S, Kaga A, Katayose Y, Ishimoto M and Harada K (2012): The β-conglycinin deficiency in wild soybean is associated with the tail-to-tail inverted repeat of the *a*-subunit genes. *Plant Mol Biol*, **78**, 301-309.
- 7) Takahashi M, Uematsu Y, Kashiwaba K, Yagasaki K, Hajika M, Matsunaga R, Komatsu K and Ishimoto M (2003): Accumulation of high levels of free amino acids in soybean seeds through integration of mutations conferring seed protein deficiency. *Planta*, **217**, 577-586.
- Hildebrand DF and Hymowitz T (1981): Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. J Am Oil Chem Soc, 58, 583-586.
- Kitamura K, Davies CS, Kaizuma N and Nielsen NC (1983): Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci*, 23, 924-927.
- Davies CS and Nielsen NC (1986): Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-2 in soybean. Crop Sci, 26, 460-463.

- 献
- Hajika M, Igita K and Kitamura K (1991): A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) induced by gamma-ray irradiation. *Jpn J Breed*, **41**, 507-509.
- 12) Kita Y, Nishizawa K, Takahashi M, Kitayama M and Ishimoto M (2007): Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Rep*, **26**, 439-447.
- 13) 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.
- 14) 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 wholegenome simple sequence repeat panel for highthroughput genotyping in soybean. DNA Res, 18, 107-115.
- 15) Kitamura K, Davies CS and Nielsen NC (1984): Inheritance of alleles for *Cgy1* and *Gy4* storage protein genes in soybean. *Theor Appl Genet*, **68**, 253-257.
- 16) Li C and Zhang YM (2011): Molecular evolution of glycinin and β-conglycinin gene families in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Heredity*, **106**, 633-641.
- 17) Harada JJ, Barker SJ and Goldberg RB (1989): Soybean β-conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and post transcriptional processes. *Plant Cell*, **1**, 415-425.
- 18) Ishikawa G, Takada Y and Nakamura T (2006): A PCR-based method to test for the presence or absence of β-conglycinin a'- and a-subunits in soybean. *Mol Breed*, **17**, 365-374.
- 19) Kim SI, Kim MY, Van K, Lee YH, Kim HS, Cai CM, Park BS, Seo HS and Lee SK (2011): The development of a co-dominant marker for the β-conglycinin a' subunit in soybeans. *Euphytica*, **177**, 355-363.

- 20) Kangfu Y, Poysa V, Haffner M, Zhang Bailing and Woodrow L (2005): Absence of the A4 peptide in the G4 glycinin subunit of soybean cultivar Enrei is caused by a point mutation in the Gy4 gene. *Genet Mol Biol*, **28**, 440-443.
- 21) Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC and Markham AF (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, **17**, 2503-2516.
- 22) Cho TJ, Davies CS, Fischer RL, Turner NE, Goldberg RB and Nielsen NC (1989): Molecular characterization of an aberrant allele for the Gy₃ glycinin gene: a chromosomal rearrangement. *Plant Cell*, **1**, 339-350.
- 23) 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.

- 24) Lenis JM, Gillman JD, Lee JD, Shannon JG and Bilyeu KD (2010): Soybean seed lipoxygenase genes: molecular characterization and development of molecular marker assays. *Theor Appl Genet*, **120**, 1139-1149.
- 25) Wang WH, Takano T, Shibata D, Kitamura K and Takeda G (1994): Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxygenase 2: Substitution of glutamine for an iron-ligand histidine. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 5828-5832.
- 26) Shin JH, Van K, Kim KD, Lee YH, Jun TH and Lee SK (2012): Molecular sequence variations of the lipoxygenase-2 gene in soybean. *Theor Appl Genet*, **124**, 613-622.
- 27) 羽鹿牧太,高橋将一,異儀田和典,酒井真次,中 澤芳則(2002):ダイズ新品種「いちひめ」の育 成とその特性.九州沖縄農業研究センター報告, 40,79-94.
- 28) Severin AJ, Woody JL, Bolon YT, Joseph B, Diers BW, Farmer AD, Muehlbauer GJ, Nelson RT, Grant D, Specht JE, Graham MA, Cannon SB, May GD, Vance CP and Shoemaker RC (2010). RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: a guide to the soybean transcriptome. *BMC Plant Biol*, **10**, 160.