

## 突然変異体を利用した ダイズ油脂組成の代謝工学的改良

穴井 豊昭  
佐賀大学 農学部 応用生物科学科  
植物遺伝育種分野

## 植物油脂の用途

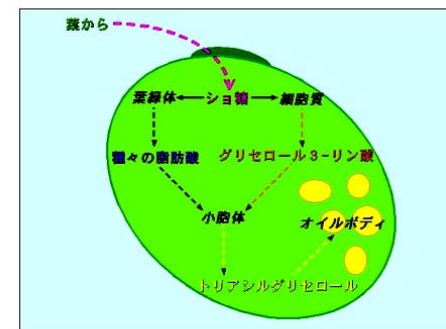


## 栽培ダイズの特徴と利点



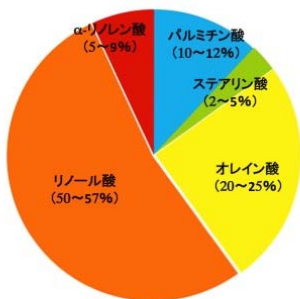
- 根粒菌との共生により自ら窒素固定を行う。  
↓  
省エネルギー・低インパクトな生産が可能
- 種子中に**40%のタンパク質**と**20%の脂質**を含む。  
↓  
搾油した後、タンパク質も利用が可能

## 植物の貯蔵脂質合成経路



植物は、光合成産物であるシヨ糖から脂肪酸とグリセロール3-リン酸を合成する。その後、トリアシルグリセロールを合成しオイルボディに蓄積する。

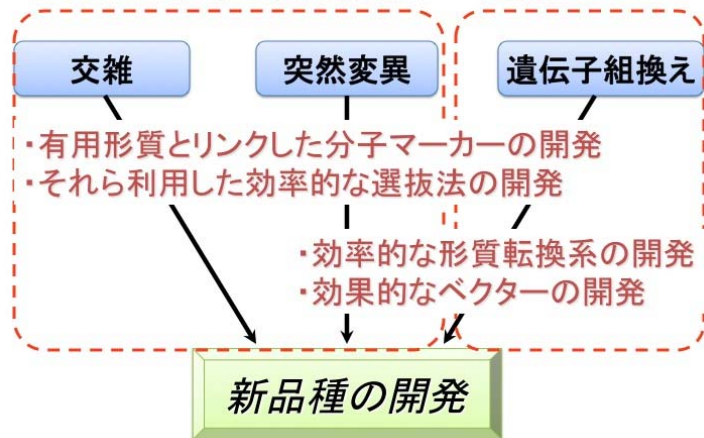
## ダイズ種子から得られる油脂の特性



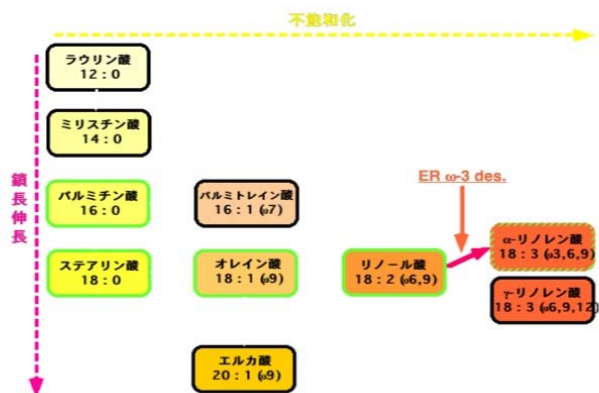
約90%のトリアシルグリセロール(TAG)、10%程度のリン脂質および2%程度の糖脂質を含む

総脂肪酸の約60%程度の多価不飽和脂肪酸(PUFA)を含み酸化安定性にやや難あり

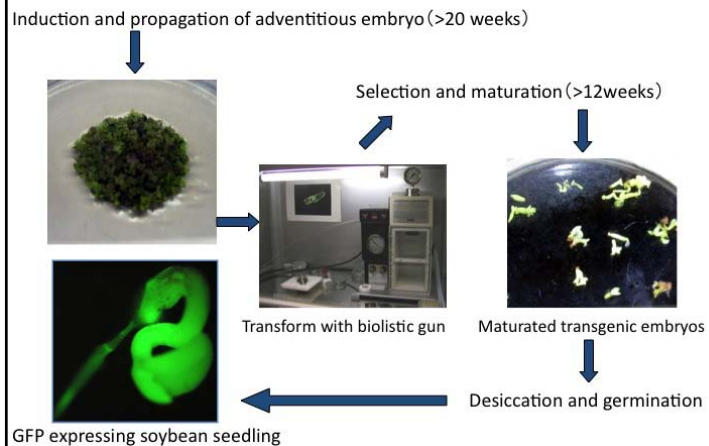
## 分子育種技術の利用



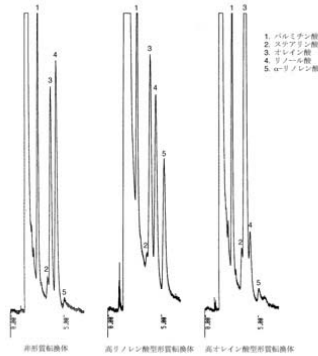
## 植物の脂肪酸合成経路



## 不定胚を用いたダイズ形質転換体の作出



## 遺伝子組換え技術を用いた 脂肪酸組成の改良



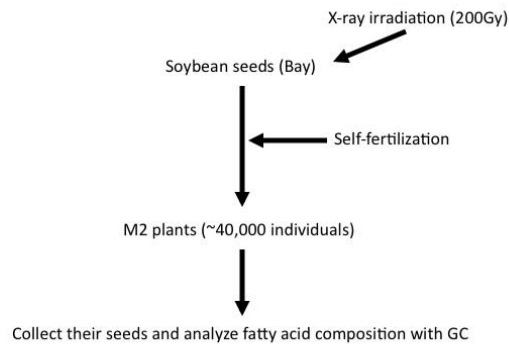
- 脂肪酸代謝に関わる遺伝子を過剰発現もしくはサイレンシングさせた遺伝子組換えイネを作成し、種子貯蔵脂質中の脂肪酸組成を劇的に改変することに成功した。

高リノレン酸型: 2% → 35%  
高オレイン酸型: 40% → 70%

## 主要なダイズ突然変異体の 脂肪酸組成と遺伝子型

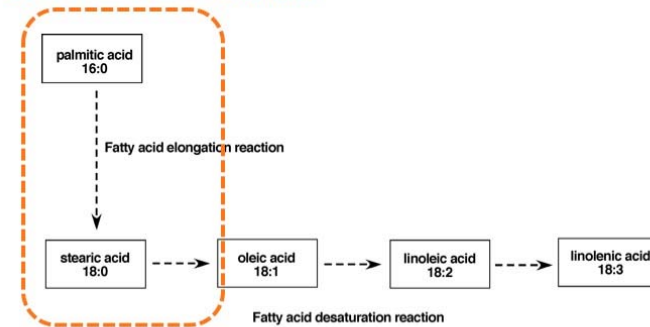
Line	Fatty acid (% of total oil)					Genotype	Character
	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic		
C1726	8.5	3.9	22.0	56.0	9.6	<i>fap1 fap1</i>	low palmitic
.B	6.1	3.4	26.5	55.4	8.6	<i>spl1 spl1</i>	
J10	17.2	5.0	19.8	48.4	9.7	<i>fap2 fap2</i>	high palmitic
KK7	14.2	5.0	23.3	48.5	8.0	<i>fap3 fap3</i>	
KK2	10.3	7.2	23.1	51.5	7.9	<i>st1 st1</i>	high stearic
M25	9.5	21.2	15.6	44.0	9.7	<i>se2 se2</i>	
KK21	10.2	3.6	40.2	37.2	8.8	<i>ola</i>	
M23	9.0	4.4	48.6	29.5	8.5	<i>ola</i>	high oleic
M11	10.3	4.3	35.8	41.4	8.2	<i>ola</i>	
J18	10.5	4.6	25.1	55.0	4.8	<i>far1 far1</i>	
KL8	8.9	4.8	24.6	54.8	6.9	<i>far2 far2</i>	low linolenic
M5	9.8	4.5	25.5	55.3	4.9	<i>far3 far3</i>	
M24	10.0	5.3	27.3	51.5	5.9	<i>far4 far4</i>	
Bay	10.6	4.2	25.2	51.7	8.3	<i>Fap1Fap1 Fap2Fap2 Spl1Spl1 Fap3Fap3 St1St1 Se2Se2 OlaOla FarFar FanFan FanxFanx</i>	normal

## X-線照射による突然変異体の誘発

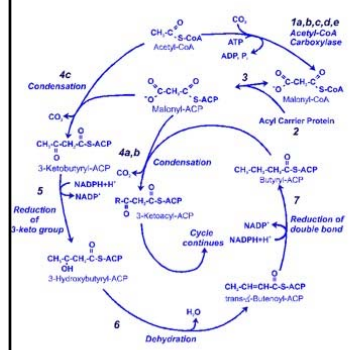


## ダイズにおける主要脂肪酸の生合成

プラスチドに存在する反応経路

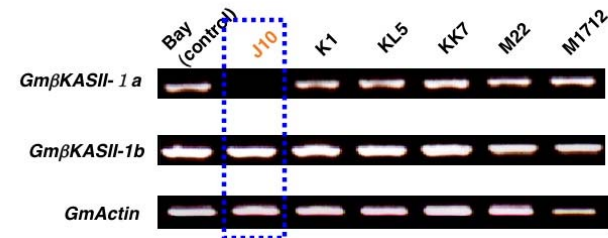


## 脂肪酸の合成(炭素鎖伸長反応)



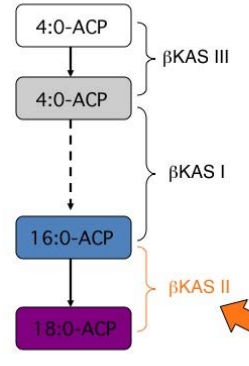
- プラスチド中でACPと結合した脂肪酸の炭素鎖は、複数の酵素が協調的に働く反応によって伸長する
- ACCase
- malonyl-CoA transacylase (MT)
- 3-ketoacyl-ACP synthase ( $\beta$ KAS I,  $\beta$ KAS II,  $\beta$ KAS III)
- 3-ketoacyl-ACP reductase (KR)
- 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase (DH)
- enoyl-ACP reductase (ER)

## J10系統では*Gm $\beta$ KASII-1a*遺伝子に大規模な欠失が生じている



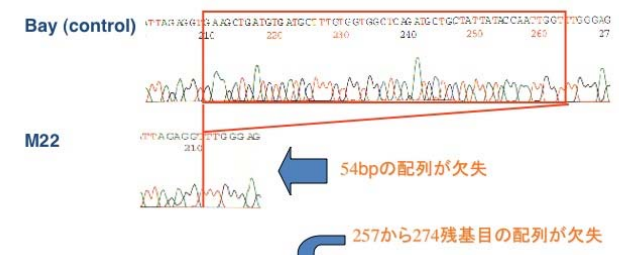
J10系統では*Gm $\beta$ KASII-1a*の転写産物は全く検出されなかった

## 脂肪酸合成酵素群



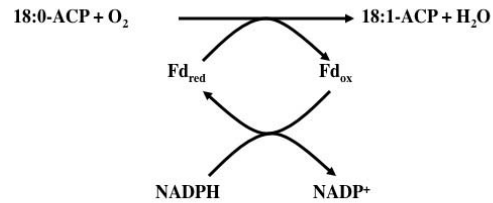
- 殆どのサブユニットは共通して使用されるが、3-ketoacyl-ACP synthaseには、3種類の分子が存在し、炭素鎖長に応じて使い分けられている
- 高パルミチン酸系統では、この遺伝子に変異した?

## M22系統では*Gm $\beta$ KASII-1b*遺伝子に54bpの欠失が生じている



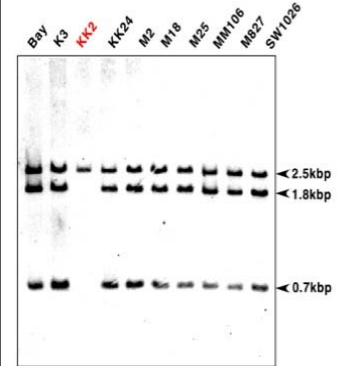
*Gm $\beta$ KASII-1b* (247) NAANHIIRGEADVMLCGGSDAAIIPICLGGFVACRALSQRNTDPTKAS (295)  
 \* \* \* \* \*  
*AtFAB1* (301) NSANHIKGEADVMLCGGSDAVIIPICLGGFVACRAFVSQRNNDPTKAS (348)  
 337残基めのロイシンがフェニルアラニンに置換

## Stearoyl-ACP desaturaseの特性



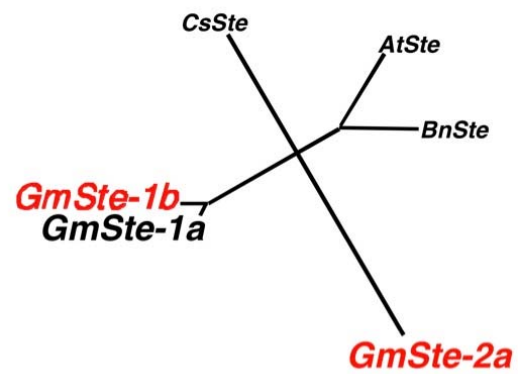
- 18:0-ACPを基質として $\Delta 9$ 位に不飽和結合を導入する可溶性の酵素であり、フェレドキシンをelectron donorして利用している

## KK2系統では*GmSte-1a*遺伝子に大規模な欠失が生じている



- KK2系統では、*GmSte-1a*遺伝子をプローブとしたサザンプロットでバンドの消失が確認された
- Specific primerを用いたRT-PCRでも*GmSte-1a*遺伝子の転写産物の消失が確認された

## ダイズより新たに得られた2種類のstearoyl-ACP desaturase遺伝子



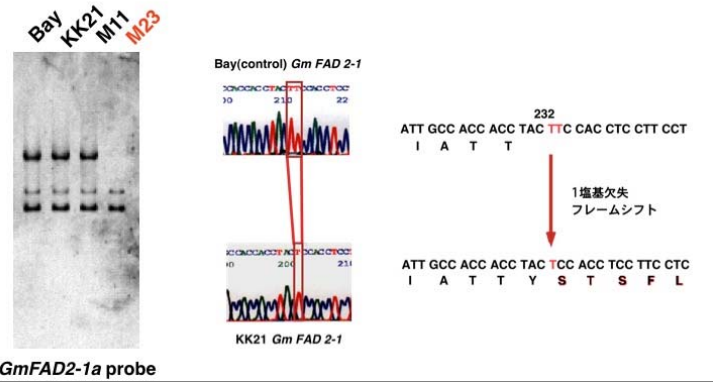
## 複数の系統で*GmSte-2a*遺伝子の転写産物が消失している

- K3, M2, M18, M25, M827およびSW1026の5系統では、転写産物も検出されないことに加え、サザンプロットでもバンドの消失観察され、*GmSte-2a*遺伝子に大きな欠失が生じたと考えられる
- MM106系統では、サザンプロットのバンドパターンに変化は認められず、*GmSte-2a*遺伝子のプロモーター領域に変異が生じた可能性が示唆される

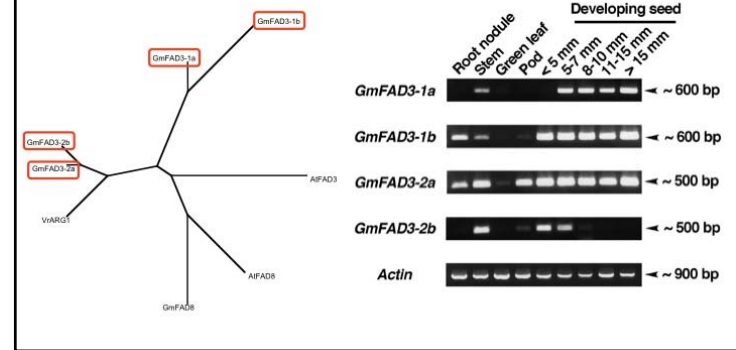




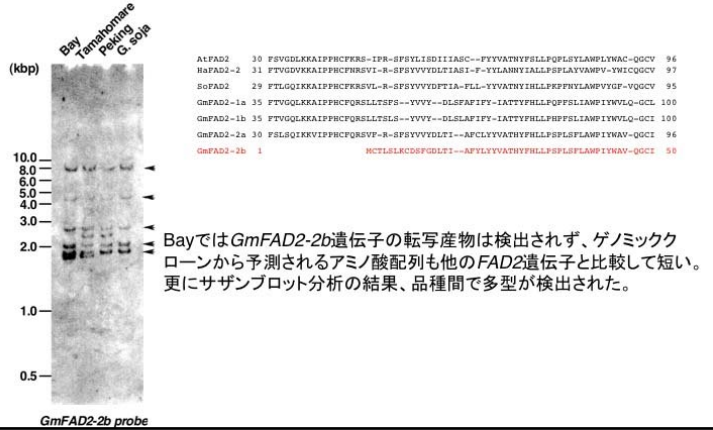
## M23及びKK21系統では*GmFAD2-1a*遺伝子に変異が生じている



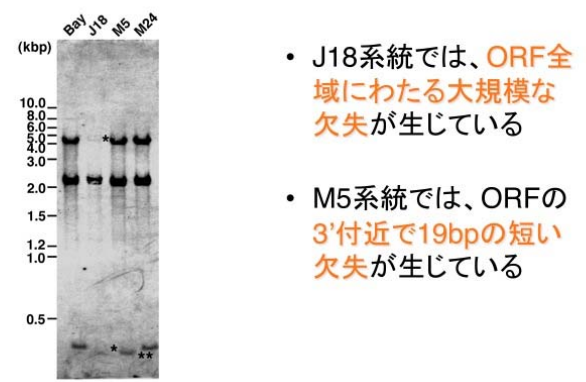
## ダイズゲノム中には少なくとも4種類の小胞体型 $\omega$ -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が存在する



## Bayの*GmFAD2-2b*遺伝子では5'領域に欠失が生じている?



## J18及びM5系統では*GmFAD3-1b*遺伝子に変異が生じている



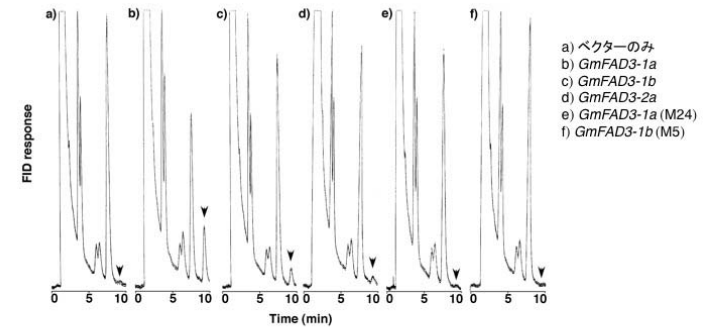
## M24系統では*GmFAD3-1a*遺伝子に変異が生じている

GmFAD3-1a (Bay) 354 QDHFVSDTGDVVYYQTDSLHLSQRD 380  
 GmFAD3-1a (M24) 354 QDHFVY**LEH**FFIRGLCSSTRNETEFOTFVWIIYWLATQITFFLMCLCEFNVE 411

GmFAD3-1b (Bay) 350 QDHFVSDTGDVVYYQTDSLHLSQRD 376  
 GmFAD3-1b (M5) 350 QD**QNH**LIRLLCSSTRNETEFOTFVWIIYWLATQITFFLMCLCEFNVE 401

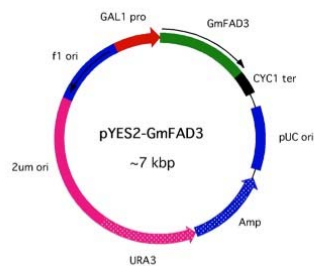
M24系統およびM5系統では、異なる遺伝子の3'付近に短い欠失が生じ、これらの変異により遺伝子産物の**フレームシフト**が引き起こされることが予想された

## C末端付近の配列に変異を生じた*GmFAD3*遺伝子産物の活性



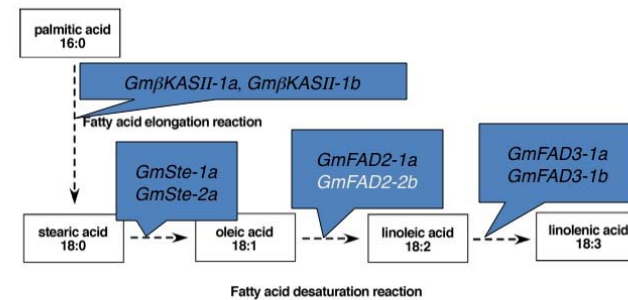
C末端付近の配列に変異を生じた*GmFAD3*遺伝子産物を酵母細胞中で発現させ、酵素活性を調査したところ、この変異により酵素活性はほぼ完全に失われていた

## 酵母を用いた脂肪酸不飽和化酵素の発現



- 出芽酵母は、本来リノール酸や $\alpha$ -リノレン酸等の多価不飽和脂肪酸を合成できない
- 細胞中に小胞体を有しており不飽和化酵素の電子ドナーとして *Cytochrome b5* を利用可能である

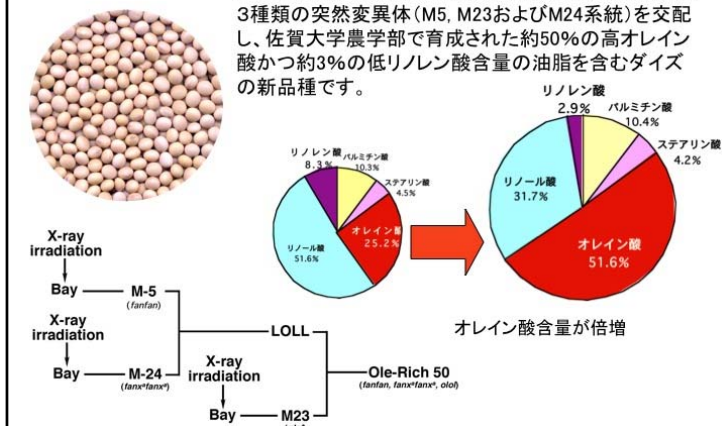
## これまでに明らかにしたダイズ脂肪酸突然変異体の原因遺伝子





## オレリッチ50の開発

オレリッチ50™とは、X-線を照射することにより得られた3種類の突然変異体(M5, M23およびM24系統)を交配し、佐賀大学農学部で育成された約50%の高オレイン酸かつ約3%の低リノレン酸含量の油脂を含むダイズの新品種です。



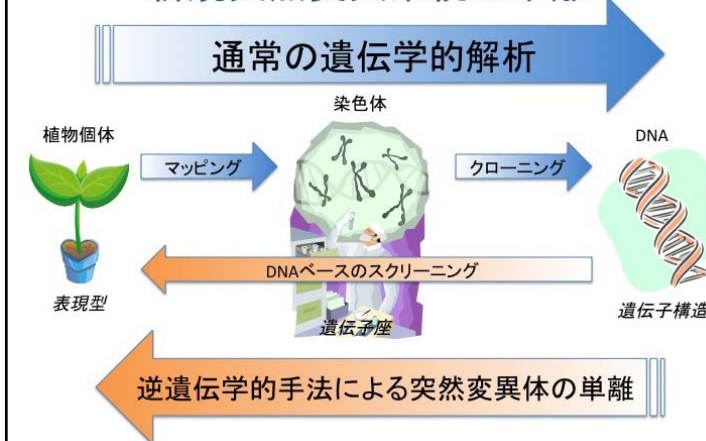
## X-線照射によって得られた突然変異体の特性-2

- EMS等に較べ変異発生率は低く、二次的変異が生じている可能性は比較的少ない
  - ⇒ バッククロス処理等の簡略化が可能
- EMS (Lotus TILLING): 1302変異/ゲノム
- X-ray (Soybean, ~200Gy): 33変異/ゲノム
- 塩基配列情報をベースとした複数のスクリーニング法が利用可能
  - ⇒ 大規模スクリーニングにも対応可能

## X-線照射によって得られた突然変異体の特性-1

- 変異箇所の塩基配列依存性は認められない
    - ⇒ randomな変異の導入が可能
  - 塩基置換は殆ど観察されず、1/3程度が100bp以下の欠失変異であると考えられる
    - ⇒ 遺伝子がノックアウトされる確率が高い
    - 効果の異なるalleleを得ることが難しい
- ORF上の小さな欠失は2/3の確率でフレームシフトを生じる  
 1bp欠失: 3系統、~50bp欠失: 2系統、  
 >2kbp欠失: 5系統(脂肪酸変異体のデータ)

## 逆遺伝学的手法を用いた新規突然変異系統の単離



## ダイズミュータントライブラリーの開発

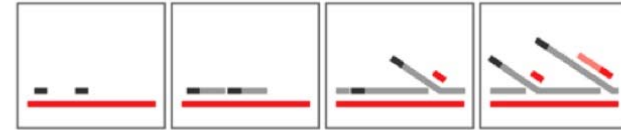


5年間で、ダイズM2個体約3万8千の系統からDNAと種子を回収し、新たなミュータントライブラリーを作成した



最終的に約5万系統規模のリソースを整備する予定

## MDA法によるゲノミックDNAの増幅



大腸菌中で発現させた $\phi$ 29ファージのDNA polymeraseと酵母のpyrophosphataseおよびexonuclease耐性のランダムプライマーを組み合わせることでゲノムDNA全体の増幅をおこなう。



一晩で約10000倍以上に増幅が可能(0.1ng → >1 $\mu$ g)

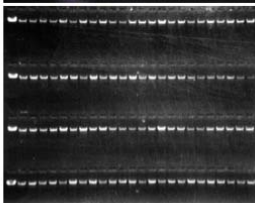
## 安価でハイスループットなDNA抽出法



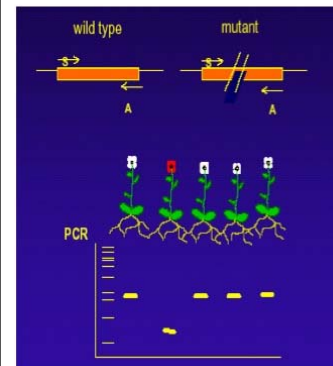
- 1人で1日に約200サンプル程度の処理が可能
- コストは、1サンプルあたり10円以下(キットでは約500円/サンプル)
- そのまま酵素反応等にも使用できる純度のDNA



- CTAB法をベースに珪藻土のカラムアレイを組み合わせた方法を開発した



## Deleteagene (Fast neutron)法

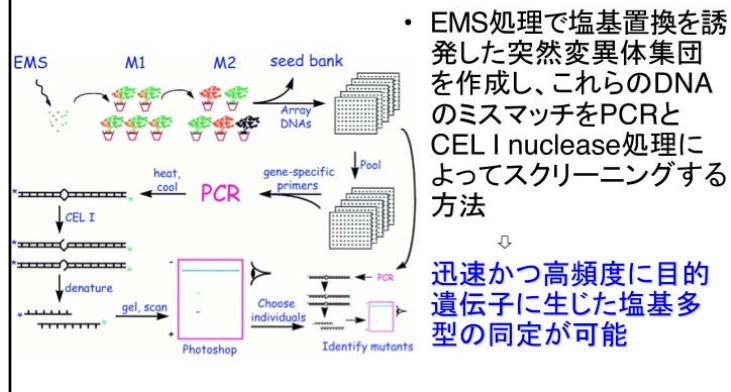


- 速中性子線照射によりゲノム中に欠失を誘導した突然変異体集団を作成し、目的遺伝子に対するPCRによってスクリーニングする方法



容易に完全な遺伝子破壊個体が得られる

## TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)法



## ダイズゲノム塩基配列情報データベースの活用

グラフィカルなインターフェースが採用されており、簡単な操作でゲノム塩基配列が得られる

ダイズミュータントライブラリーからの有用突然変異系統の単離とそれを活用した代謝工学的育種が加速化