

ダイズ種子のイソフラボン含量を支配する遺伝子の同定と

高イソフラボン系統の育成

京都大学大学院農学研究科
育種学研究室
谷坂隆俊

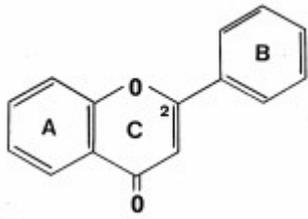
1. はじめに

イソフラボンは、主にマメ科植物に含まれる物質であり、抗菌化合物、根粒菌誘引物質および根粒形成を開始させる *nod* (*nodulation*) 遺伝子の発現誘導物質として作用することが知られている。イソフラボンは、エストラジオールと似た構造をもち (図1)、エストロジェンと弱い親和性を示す (Bamesey al. 1998)。これまでの疫学的研究により、ダイズイソフラボンを多く摂取している女性には更年期障害や骨粗鬆症、乳がん、子宮の発症が少ないこと、また、男性の前立腺がんの予防にも効果があることなどが確認されており (Lissin and Cooke 2003)、ダイズ (種子) は健康食品として高い評価を得ている。

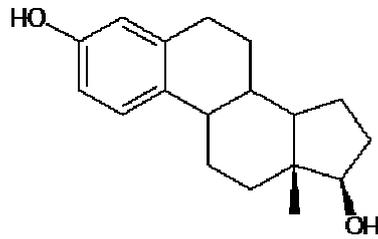
イソフラボンは 12 種類あり、それらは daidzein 誘導体 (daidzein、daidzin、acetyldaidzin、malonyldaidzin)、genistein 誘導体 (genistein、genistin、acetyl genistin、malonylgenistin) および glycitein 誘導体 (glycitein、glycitin、acetylglycitin、malonylglycitin) の 3 グループに分けられる (図2)。ダイズ種子のイソフラボン含量は、種子登熟期間の温度や土壌条件、菌感染、紫外線照射など種々の環境要因によって変動することが知られているが、イソフラボン含量を制御する遺伝的メカニズムについてはほとんど解析がなされていない。トウモロコシでは、アントシアニンの合成と蓄積にかかわるフェニールプロパノイド経路関与遺伝子 (複数) を活性化させる C1 および R 転写因子を導入すると、イソフラボン含量が劇的に増加することが知られている。したがって、ダイズにおいてもフェニールプロパノイド経路における上流遺伝子 (*CHS* や *PAL*) の転写量がイソフラボン合成の制御に強くかかわっている可能性がある。

演者らは、イソフラボン含量にかかわる遺伝的メカニズムの解明を目指して、イソフラボン含量に関する遺伝解析を進め、これまでにいくつかの関与遺伝子を見出している。また、丹波黒の高イソフラボン含量化を目指した育種を実践し、有望系統をいくつか得ることに成功している。本講演では、これら 2 点についての話題を提供したい。

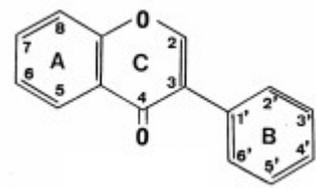
なお、これらの研究は、京都大学育種学研究室とフジッコ株式会社との産学間共同研究によって実施したものである。



フラボン



イソフラボン



エストラジオール

図1 イソフラボン、フラボンおよびエストラジオールの構造

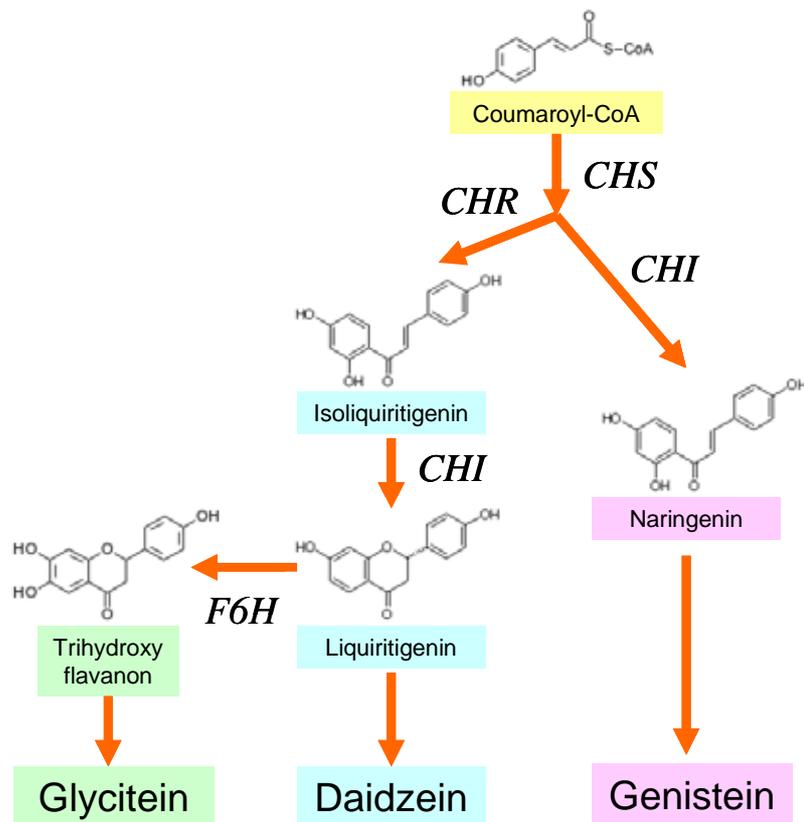


図2 フェニールプロパノイド経路

2. イソフラボン含量を支配する遺伝子の同定

ダイズ品種 Peking とタマホマレ (図3) の交雑に由来する組換え自殖系統の F₈ 集団 96 系統の F_{8:9} 種子 (京都で栽培・収穫) および F₉ 集団 96 系統の F_{9:10} 種子 (京都と長野で栽培・収穫) を供試した。系統ごとに 12 種類のイソフラボンの含量を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) によって測定したのち、それらの値を基に Daidzein、Genistein および Glycitein グループそれぞれの総含量 (それぞれ、DAC、GEC、GLC) および総イソフラボン含量 (TIC) を算出し、QTL (量的形質遺伝子座) 解析を行った。



図3 品種 Peking (左) とタマホマレ (右)

QTL 解析には分子マーカーからなる連鎖地図が必要である。そこでまず、親品種間で多型を示す SSR マーカーを用いて図4のような連鎖地図を作製した。QTL 解析の結果、TIC に関して 2 つの QTL (*qIso1*, *qIso2*)、GLC に関して 1 つの QTL (*qIso3*) が検出された。*qIso1* 領域に DAC、GEC、GLC に関与する QTL が F₈ および F₉ 集団のすべての試験区において検出されたことから、*qIso1* は全成分の増減を強く支配する遺伝的要因であることが明らかになった (図5)。*qIso2* 領域には DAC および GEC に関与する QTL が京都で栽培した F₈ および F₉ 集団において検出されたが、長野で栽培した集団では検出されなかった。したがって、*qIso2* は環境要因によりその効果が顕著に変化する遺伝的要因であることが示唆された。一方、*qIso3* は GLC に対して顕著な効果を示したのに対し、総イソフラボン含量には影響を及ぼさなかった。このことから、*qIso3* はイソフラボンの成分比を制御する遺伝的要因であると考えられた。総イソフラボン含量に対して最も顕著な効果を示した *qIso1* 近傍にはイソフラボン生合成の上流に関与する *Chalcone synthase* 遺伝子が複数 (*CHS1*, *CHS3*, *CHS4*) 座乗

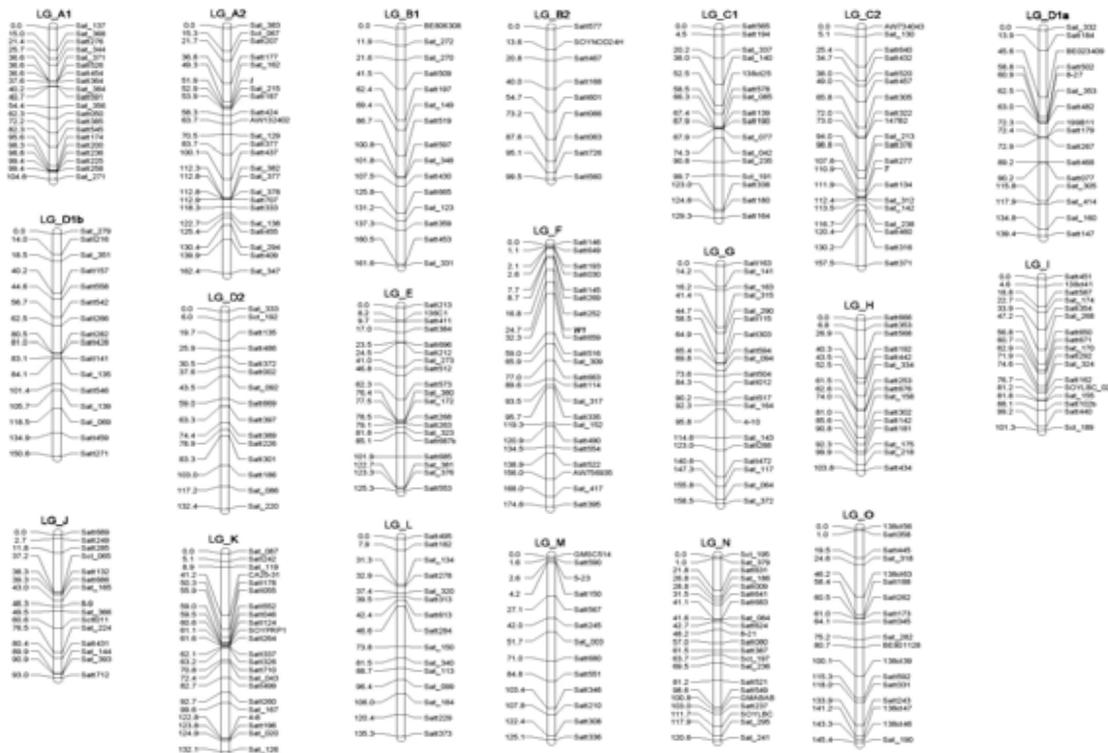


図4 SSR マーカー連鎖地図(344 マーカー、全長 2652.5 cM、平均マーカー間距離 7.6 cM)

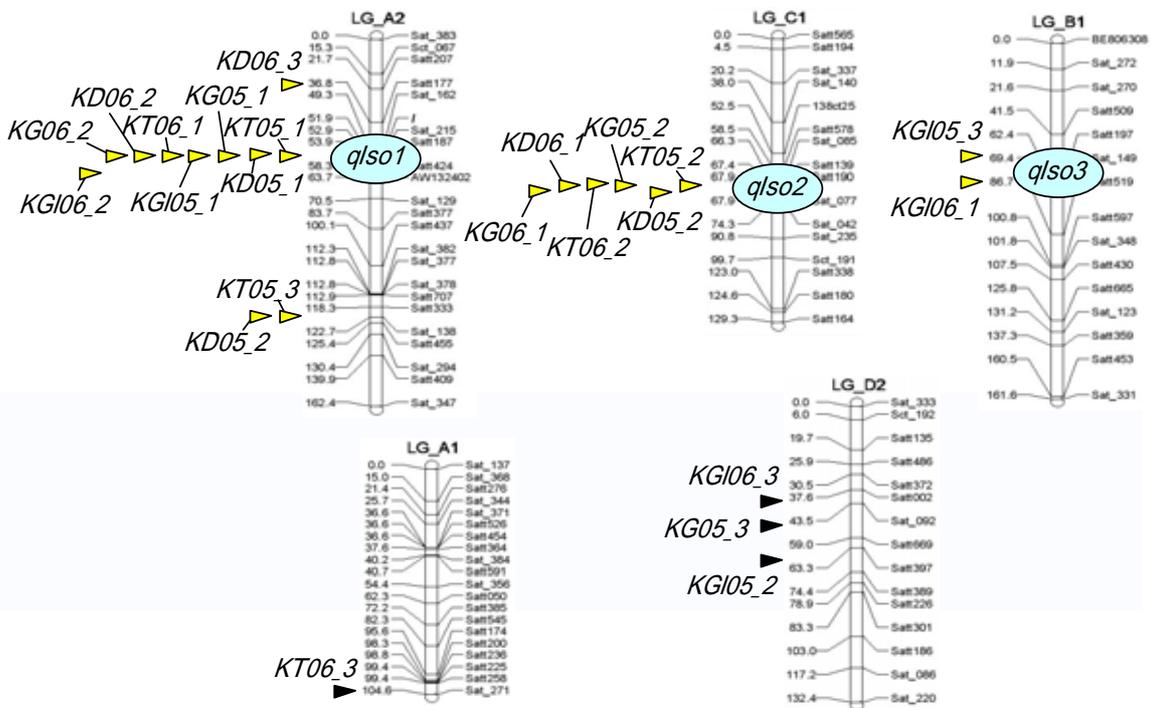


図5 検出された QTL (京都で検出された QTL)

している（複合座を形成）ことから、イソフラボンの蓄積が最も著しい登熟ステージにおいて *CHS* の発現解析を行った。その結果、*CHS1*、*CHS3*、*CHS4* の発現とイソフラボン蓄積パターンは一致せず、これらの *CHS* 遺伝子はイソフラボン生合成とは無関係であると考えられた。

3 . 高イソフラボン含量丹波黒の開発

ダイズ品種丹波黒（図6）は、正月料理に欠かせない食材である。しかし、丹波黒は、他のダイズ品種と比べてイソフラボン含量が低い（3mg/g）。このため、丹波黒のすぐれた特性を維持したまま、高イソフラボン含量化が実現すれば、丹波黒の市場での評価はさらに高まるものと期待される。丹波黒の高イソフラボン含量化は、丹波黒と高イソフラボン含量品種の交雑によって得られる高イソフラボン含量個体に丹波黒を10回程度戻し交雑することによって実現すると思われるが、これにはかなりの長い年月が必要である（通常十数年）。一方、人為突然変異を利用する突然変異育種は、丹波黒の特性をそれほど大きく変えることなくイソフラボン含量のみを高くしうる可能性があり、また、大半の染色体領域に変化を起こさないことから他の遺伝子座のホモ接合化の手間が大幅に削減される。このため、早い年月での優良品種の開発が可能である。演者らは、このような突然変異育種法の利点を用いて、丹波黒の高イソフラボン化を目指した。しかし、突然変異育種を実践するにあたっては、大量の照射後代個体に着生する種子のイソフラボン含量を測定しなければならず、HPLCを用いた通常のイソフラボン含量測定は作業上不可能であると考えられた。

そこで、まず、大量の個体のイソフラボン含量の簡易測定法の開発を行った。イソフラ



図6 ダイズ品種丹波黒

ボン含量の異なる 8 品種を供試し（図 7）、HPLC により 12 種類すべてのイソフラボン含量を測定したところ、成分比に大きな品種間差異は認められなかった（図 8）。成分ごとに 1 モルあたりの吸光係数を求め、これに各成分の総量に対する比率（上記 8 品種の平均比率）を乗じた値の総計を総イソフラボン含量としたところ、HPLC による測定結果とほぼ一致していた。このように、HPLC を使わなくても、分光光度計によって簡便に種子中の総イソフラボン含量を測定する方法を開発することができた。

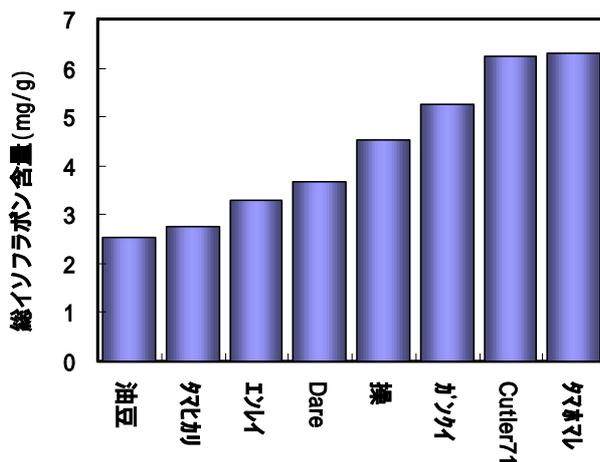


図 7 供試した 8 品種の総イソフラボン含量

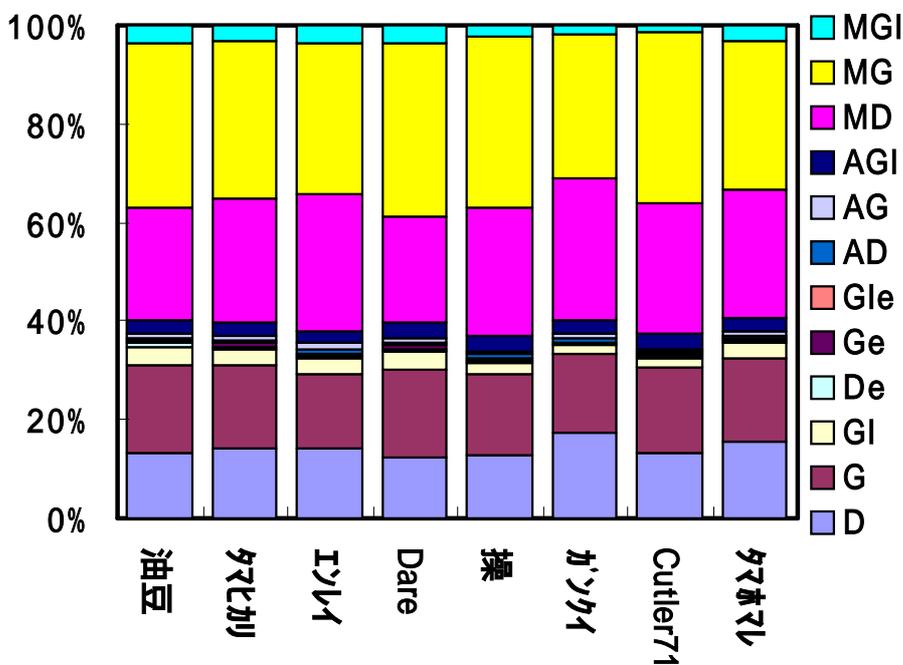


図 8 供試した 8 品種のイソフラボン成分比

この簡易測定法を用いて、ダイズ品種丹波黒のガンマ線種子照射後代 M₂ 2259 個体からイソフラボン含量変異体をスクリーニングし、まず、原品種よりイソフラボン含量が高い個体を 22 個体、低い個体を 7 個体得た。これら 29 個体の自殖次代 (M₃ 系統) 354 個体 (図 9) について二次スクリーニングを行ったところ、原品種よりイソフラボン含量が高い個体が 6 個体、低い個体が 5 個体得られた。

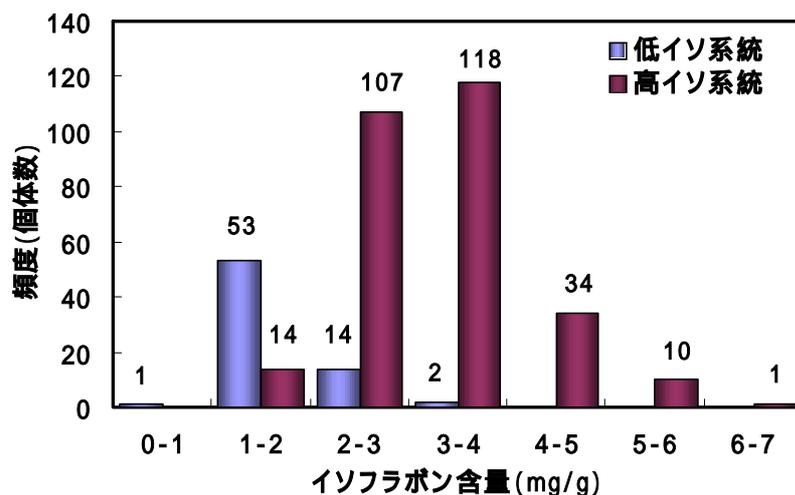


図 9 M_{2:3} で選抜された個体の次代 M_{3:4} 系統における総イソフラボン含量 (M_{2:3} で変異体とみなされた個体の多くが突然変異体であることが分かる)

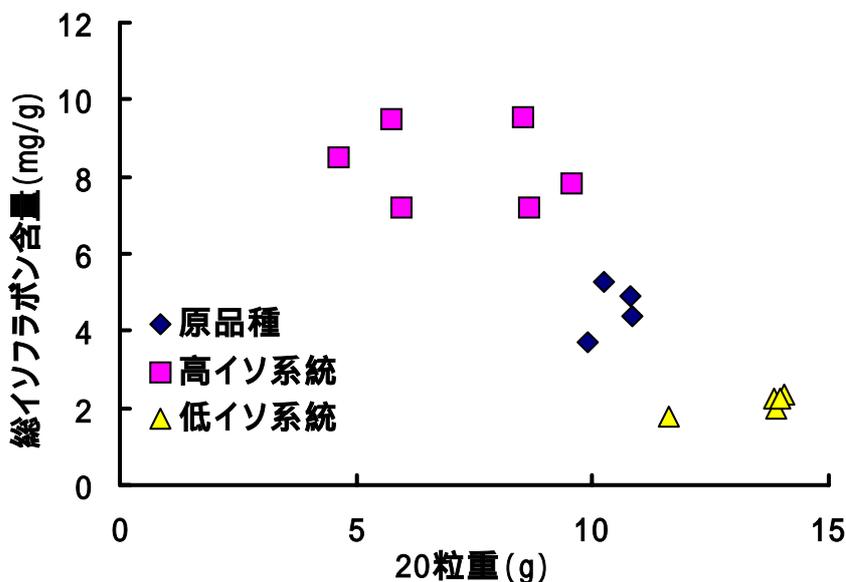


図 10 イソフラボン突然変異系統集団における総イソフラボン含量と 20 粒重さとの関係

また、イソフラボン含量の変異個体が比較的高い頻度で出現したことから、ダイズ種子中のイソフラボン含量は多様な遺伝的要因によって支配されていることが示唆された。ただし、総イソフラボン含量と20粒重との間には負の相関があり(図10)、一般的には、種子の大きな品種ほど総イソフラボン含量が低いと考えられた。

図11に示した突然変異系統は、丹波黒と比べて種子が若干大きく、また、約2倍のイソフラボン含量を有している。収量性や他の農業形質に関しても丹波黒と遜色ないことから高イソフラボン含量丹波黒として利用できるのではないかと考えている。

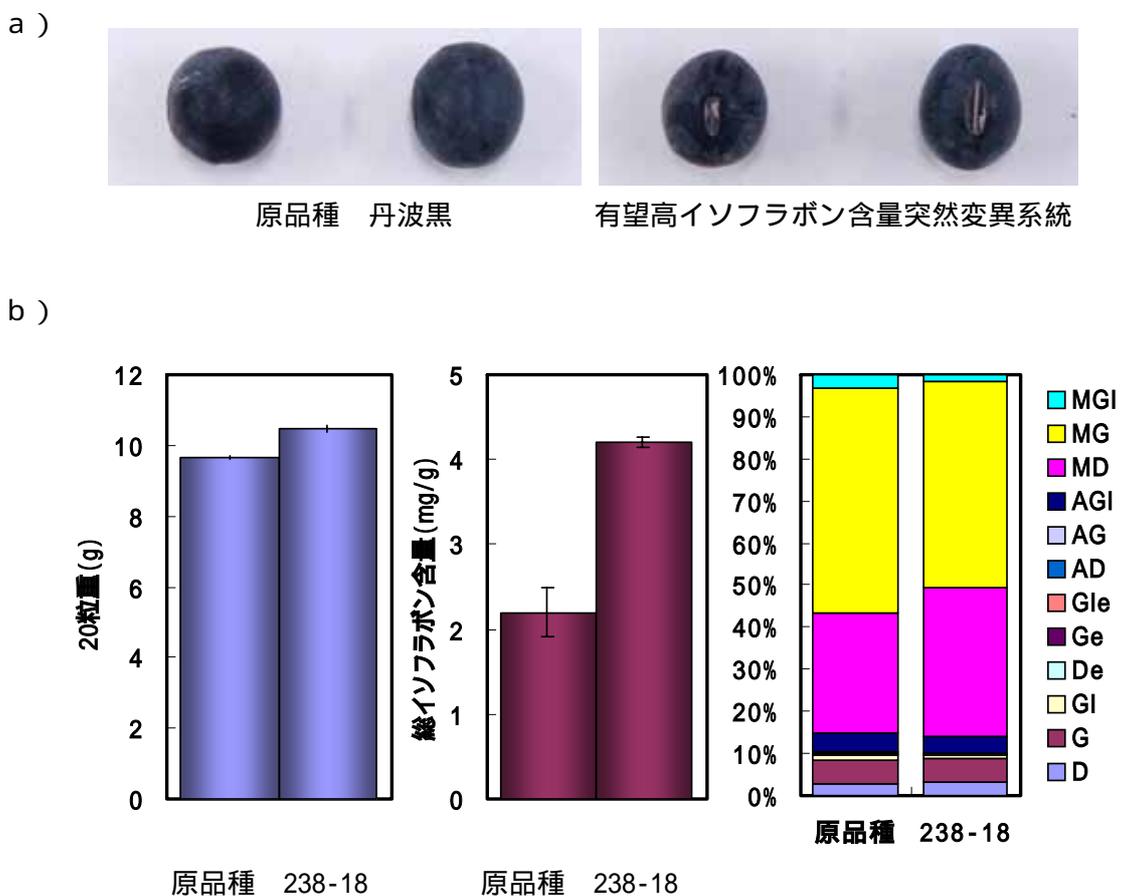


図11 獲得された有望高イソフラボン含量突然変異系統の特性
a) 外観、 b) 20粒重、総イソフラボン含量およびイソフラボンの成分比