

# ダイズオリゴ糖含量を制御する遺伝子の解析および アミノ酸変異-酵素活性変化の関係の検証

農研機構遺伝資源研究センター

戸田 恭子

ダイズはショ糖、ラフィノース、スタキオースを主要なオリゴ糖として種子に貯蔵する（図1）。これら3種類のオリゴ糖は甘味に影響を及ぼす他、ラフィノースとスタキオース（ラフィノースオリゴ糖）はビフィズス菌など善玉菌に資化性を示し整腸作用等の機能性がある<sup>1)</sup>。またラフィノースオリゴ糖は納豆加工適性に関与するという指摘もあり<sup>2)</sup>、様々な大豆食品の品質に影響を及ぼすと考えられる。用途や目的により、求められるオリゴ糖組成は異なるので、各オリゴ糖含量を制御する遺伝子を品種開発に活用することにより、ダイズの機能性や食品加工品質を高めることが期待できるが、関連遺伝子についての知見はまだ少ない。

そこで本研究課題では当研究センター保有の全ゲノム解析済のダイズミニコレクション<sup>3)</sup>のオリゴ糖含量を分析し、ゲノムワイド関連解析（GWAS）によりオリゴ糖含量を制御する遺伝子、もしくは染色体領域を検出することを目的とした。

また著者らはこれまでの研究において、AlphaFold2を用いてラフィノース合成酵素（RS）の立体構造を予測し、推定された基質ポケットに影響するアミノ酸変異がラフィノース・スタキオース含量の低下を説明できることを報告した<sup>4)</sup>。さらに立体構造予測によりスタキオース合成酵素（STS）活性の上昇と関連する可能性のあるアミノ酸変異（M632K）を検出したので本研究において遺伝学的手法で検証する。

## 【実験方法】

### 1) 材料

2021年と2022年に茨城県つくば市にある農研機構の実験圃場において農研機構ジーンバンクのダイズミニコレクションを175系統栽培し、収穫できた170系統ほどを供試した。また、STS変異の効果の検証のため、632番目のメチオニンがリジンに変異している（M632K）系統とエンレイを交配した雑種第2代（F<sub>2</sub>）を2023年に栽培し、種子を個体別に収穫した。

### 2) オリゴ糖含量分析サンプルの調製

ダイズ種子15gを超遠心粉碎機（ZM200, Retsch）を用いて、スクリーン 梯形孔0.50mm、14,000 rpmで粉碎した。オリゴ糖は大豆粉1.5gから80%エタノール存在下でマルチビーズショッカー（安井器械）を用いて抽出し、45mLに定容した。調製した抽出液は-30°Cで保存した。

### 3) オリゴ糖含量のHPLC分析

オリゴ糖の分析は増田らの方法<sup>5)</sup>に準じた。2)で調製した抽出液をディスポーザブル・メンブランフィルター（水系、0.45um）で濾過し、5倍に希釈した。HPLC分析では分析カラムによる分離後塩酸グアニジンと過ヨウ素酸を用いたポストカラム反応を行い、蛍光検出器で検出した。分析条件は以下の通りである。

分析カラム：Shodex Asahipak NH2P-50 4E, 移動相：アセトニトリル/水(100/53), 流量：1.0 mL/min, 反応液の流量：0.3 mL/min, カラム温度:30°C, ポストカラムの反応温度：148°C

#### 4) オリゴ糖含量の GWAS

GWAS は R のパッケージ rMVP を用いて FarmCPU 法で行った。統計学的有意水準には Bonferroni 法による補正 ( $p < 1.48 \times 10^{-6}$ ) を用いた。

#### 5) $F_2$ ( $F_3$ 種子) の遺伝解析

開花期前の  $F_2$  個体より展開前の葉をサンプリングし、自動核酸精製装置 (Maxwell RSC Instrument, プロメガ) と専用キット (Plant DNA kit, プロメガ) を用いて DNA を抽出した。STS 遺伝子の遺伝子型は PCR-RFLP 法により分析した。STS 遺伝子の M632K に該当する塩基配列を含む DNA をプライマー (GGTAAGCGTATTATTCTATTCACATAGATG, CTGTTACATGAACAAATTGTTGTTAAC) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅し、増幅した DNA 断片は変異型 DNA 配列を認識する制限酵素 *Hind* III で処理した。処理した DNA をアガロース電気泳動により分析した。

#### 6) 統計処理

統計処理には SPSS Statistics バージョン 29 (IBM) を用いた。

### 【実験結果及び考察】

#### 1) オリゴ糖 2か年の結果と年次相関と GWAS

ショ糖・ラフィノース・スタキオース含量及びショ糖/ラフィノースオリゴ糖比は年次で有意な相関 ( $p < 0.001$ ) があった (図 2)。GWAS の結果、ショ糖含量、及びスタキオース含量に関して 2か年に共通する染色体領域をそれぞれ 2、及び 1 領域検出した。それらの領域には候補遺伝子が 1 から 3 含まれた。また、含量を低下する領域のみではなく、ショ糖含量を 0.4 % 上昇させる効果が示唆された領域もあった。今後遺伝子を同定するため、変異体を用いた解析等を検討している。

#### 2) $F_2$ の遺伝解析による M632K の効果の検証

STS の活性が上がると図 1 においてスタキオース含量が上昇し、ショ糖/ラフィノースオリゴ糖比が低下することが予測される。実際、スタキオース含量とショ糖/ラフィノースオリゴ糖比は 2か年において 0.1% 水準で有意な負の相関を示した ( $r = -0.7, -0.6$ )。

STS の M632K 変異により酵素と基質との結合親和性が高まることが立体構造予測で示唆されたため、M632K 変異に関する遺伝解析を実施した。2023 年に収穫した、M632K 変異系統とエンレイを交配した雑種第 2 代 ( $F_2$ ) 種子のショ糖/ラフィノースオリゴ糖比は 1.1 から 2.5 まで変動した (図 3)。そこで、M632K に関する STS 遺伝子型を PCR-RFLP 法により分析した結果、当該変異とショ糖/ラフィノースオリゴ糖比との間に明確な相関は見出せなかった (図 4)。この理由として、

1. M632K 変異は STS 活性に影響しない。
2. ラフィノースオリゴ糖含量に関わる遺伝的な要因が他にあり、M632K 変異の効果が顕在化しない。

等が考えられる。引き続き次世代シーケンス解析等で関連する染色体領域の検出を試み、上記 1、2 について検討する。

### 【要約】

ダイズはショ糖、ラフィノース、スタキオースを主要なオリゴ糖として種子に貯蔵する。これらオリゴ糖含量を制御する遺伝子を品種開発に活用することにより、ダイズの機能性や食品加工品質を高めることが期待できるが、関連遺伝子についての知見はまだ少ない。本研究では、およそ 170 系統のダイズミニコアコレクションを用いてオリゴ糖含量に関する GWAS を実施し、ショ糖含量、及びスタキオース含量に関して 2 年に共通する染色体領域をそれぞれ 2、及び 1 領域検出した。これら領域における候補遺伝子は 1 から 3 に絞られており、今後変異体等を用いて解析を行う。また、著者らは立体構造予測により示唆された、STS の M632K 変異の効果について遺伝学的手法で検証したが、この変異とオリゴ糖含量・組成との関係は見出せなかった。引き続き次世代シーケンス解析等で関連する染色体領域の検出を試み、M632K 変異の効果や他の要因について検討する。

### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りましたタカノ農芸化学研究助成財団様に厚く御礼申し上げます。また、立体構造予測を実施いただきました遺伝資源研究センターの前田美紀博士、GWAS を実施いただきました農研機構作物研究所の李鋒博士に感謝いたします。

### 【文献】

- 1) 松山 慎・平田秀樹・山岸 努・林 恵一・平野優子・桑田紀代美・清澤功・長澤太郎 (1992) ビフィズス菌による豆乳の発酵性と糖質化性, 日食工誌 39, 887-893.
- 2) Taira, H. (1990) Quality of soybeans for processed foods in Japan, JARQ 24, 224-230.
- 3) Kajiya-Kanegae, H., Nagasaki, H., Kaga, A., Hirano, K., Ogiso-Tanaka, E., Matsuoka, M., Ishimori, M., Ishimoto, M., Hashiguchi, M., Tanaka, H., Akashi, R., Isobe, S., Iwata, H. (2021) Whole-genome sequence diversity and association analysis of 198 soybean accessions in mini-core collections. DNA Res. 28, 1-13.

- 4 ) Maeda, M.H., Toda, K., Kaga, A. (2024) Novel soybean variety lacking raffinose synthase 2 activity, ACS Omega **9**, 2134-2144.
- 5 ) Masuda, R., Kaneko, K., Yamashita, I. (1996) Sugar and cyclitol determination in vegetables by HPLC using postcolumn fluorescent derivatization, J. Food Sci. **61**, 1186-1190.

【図】

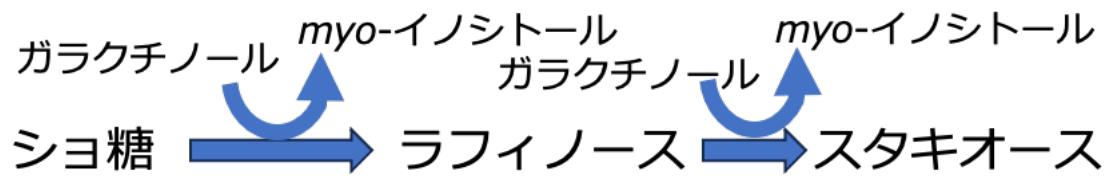


図1. 植物におけるショ糖からスタキオースの代謝経路。スタキオースからさらに5糖のベルバスコースが合成される経路があるが、ベルバスコースはダイズでは微量であることが知られており、本研究の手法では検出されなかった。

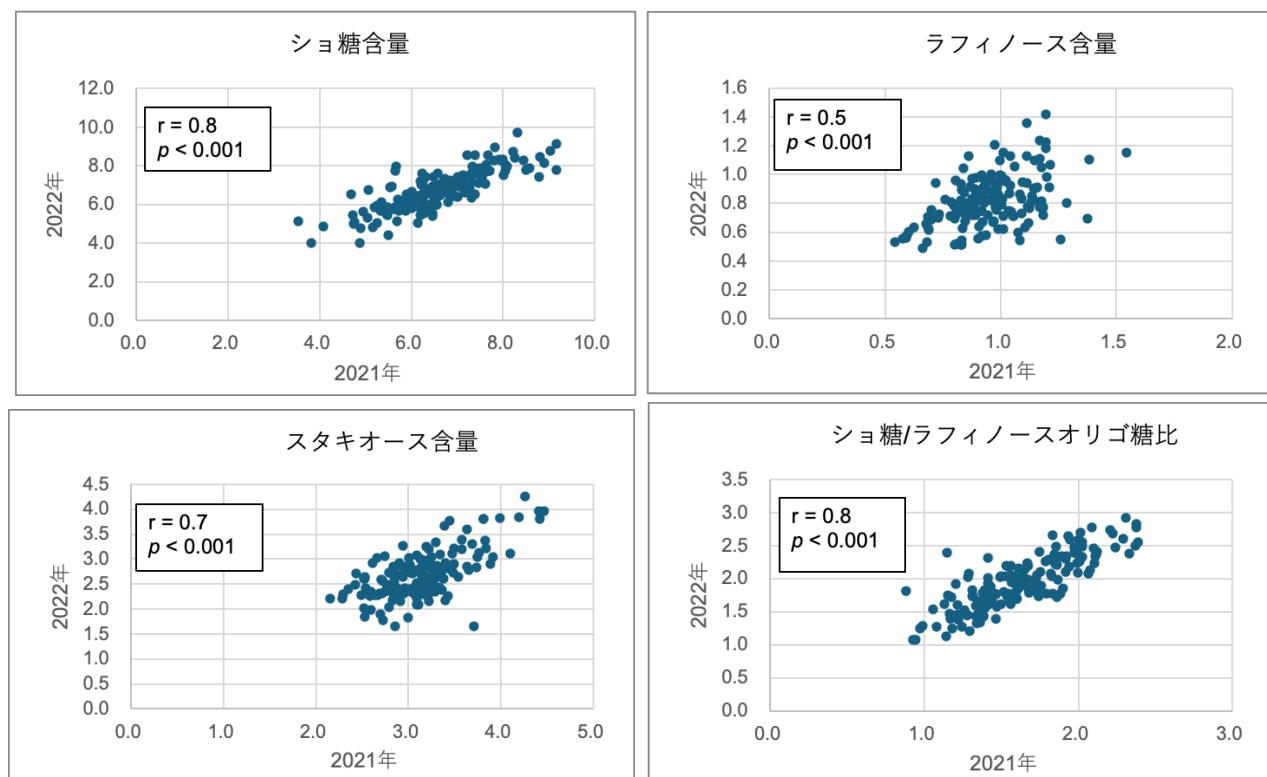


図2. ショ糖・ラフィノース・スタキオース含量とショ糖/ラフィノースオリゴ糖比の年次間相関。含量の単位は g/100 g dw。

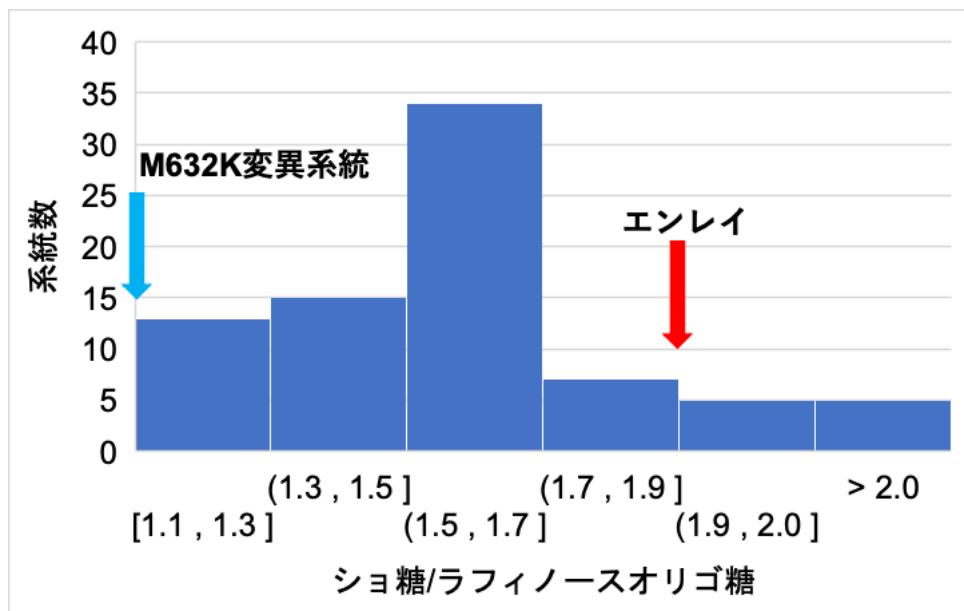


図3. 2023年にM632K変異系統とエンレイを交配した雑種第2代( $F_2$ )から収穫した種子のショ糖/ラフィノースオリゴ糖比ヒストグラム。矢印は同じ年次、圃場で栽培・収穫した親系統の値。

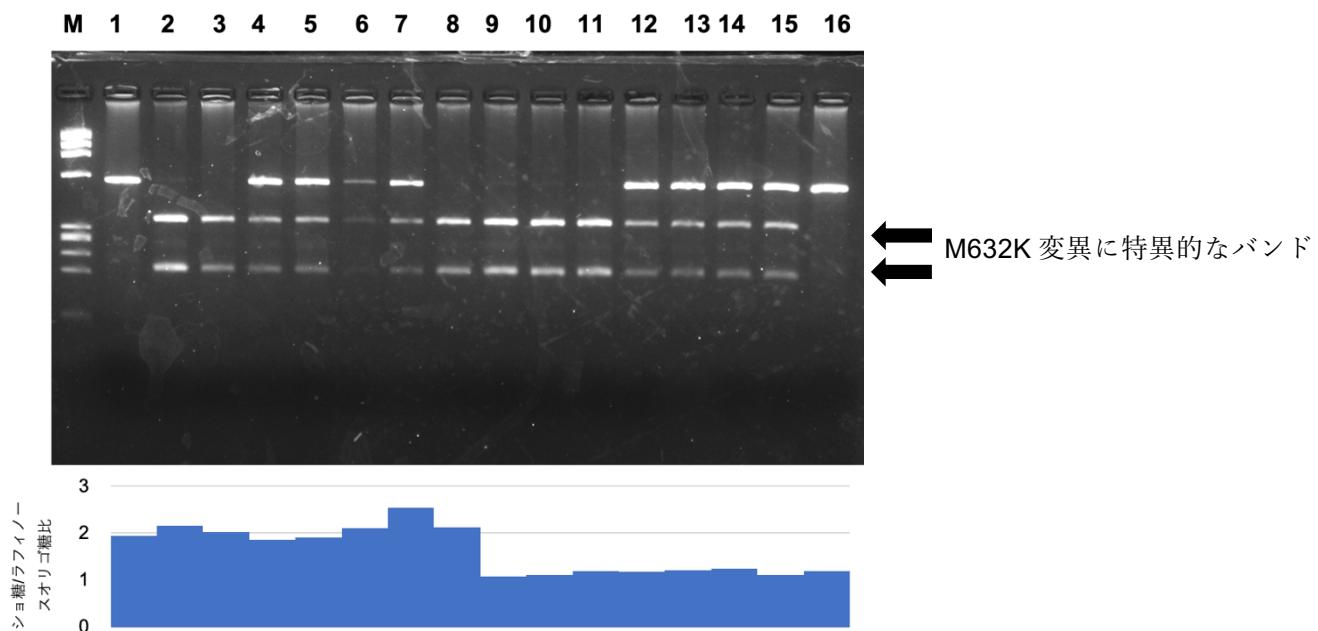


図4. 2023年にM632K変異系統とエンレイを交配した雑種第2代( $F_2$ )のM632K変異に関するPCR-RFLP。レーン番号のMはマーカー(Marker 4, ニッポンジン)。レーンの下に、DNAと同じ個体の種子におけるショ糖/ラフィノースオリゴ糖比をグラフで示す。