



Title	Targeted Mutagenesis of Soybean β -amylin Synthase Genes via the iPB-RNP Method and Characterization of the Soyasaponin-Deficient Mutants
Author(s)	麻, 裕毅
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16757号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16757
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99602
Type	doctoral thesis
File Information	ASA_Hiroki_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 麻 裕 毅

学 位 論 文 題 名

Targeted Mutagenesis of Soybean β -amyrin Synthase Genes via the iPB-RNP Method and Characterization of the Soyasaponin-Deficient Mutants
(iPB-RNP 法を介したダイズ β -アミリン合成酵素遺伝子の標的変異誘発及びソヤサポニン欠損変異体の特徴付け)

ソヤサポニンとは、ダイズ(*Glycine max*)を含む一部のマメ科植物が特異的に産生する二次代謝産物である。ソヤサポニンはヒトに対する様々な薬理活性を有するが、大豆加工品の苦味の原因となりうる。世界的な人口増加及び経済発展に伴う将来的なタンパク質の供給不足への懸念を背景に、今後植物性タンパク質源として大豆加工品の利用が拡大していくことが予想される。そのため、種子中のソヤサポニン含量を低減させる遺伝的改良によって風味を改良したダイズ品種の開発は重要性を増していくと考えられる。一方、特定の植物が二次代謝産物を産生する能力は環境適応の結果として獲得したと考えられるにもかかわらず、ソヤサポニンのダイズ植物体における生物学的役割は明らかになっていない。その要因として、ソヤサポニンの化学構造が 50 種にも及ぶほど多様であることが挙げられる。ソヤサポニンは、グループ A ソヤサポニンと 2,3-dihydro-2,25-dihydroxy-6-methyl-4 H-pyran-4-one (DDMP) ソヤサポニンの 2 つのグループに大別され、さらに DDMP ソヤサポニンの分解物としてグループ B 及び E ソヤサポニンが存在する。DDMP ソヤサポニンはダイズ植物体内に広く検出される一方、グループ A 及び B ソヤサポニンは根に局在することが知られている。さらに、グループ A 及び B ソヤサポニンは根から分泌されることも明らかになっている。そのため、ソヤサポニンは分子種ごとにダイズ植物体全体で役割を分担していると考えられるが、実際にどのような役割を持つかはほとんど不明である。そこで、本研究では、風味を改良したダイズ品種の開発とソヤサポニンの生物学的役割の解明を目的として、ソヤサポニンが欠損した変異体の作出とその特徴づけを行った。

ソヤサポニンの生合成はテルペノイド生合成経路において 2,3-オキシドスクアレンから β -アミリンが合成されることが開始点となり、 β -アミリン合成酵素遺伝子 *GmBAS* の機能抑制はダイズ種子中のソヤサポニン含量を著しく低下させることが知られている。また、*GmBAS* 遺伝子には 2 つのホモログ (*GmBAS1* 及び *GmBAS2*) が存在することが知られており、その機能的な差異は不明であった。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて *GmBAS* ホモログへの標的変異誘発を試みた。本研究では、gRNA と Cas9 タンパク質の複合体 (RNP) をパーティクルガンによって直接ダイズの成長点に打ち込む in planta bombardment-ribonucleoprotein (iPB-RNP)法を用いた。本法は再分化や外来 DNA の挿入を必要としないため、CRISPR/Cas9 システムの適用品種拡大や、オフターゲット変異を生じる危険性の低減、外来 DNA の分離除去工程の省略といった利点がある。iPB-RNP 法の応用利用として *GmBAS* 遺伝子の 2 つのホモログに同時に標的変異を導入するため、両ホモログの第 1 エキソン内の共通配列を標的とする gRNA を設計した。RNP を導入した 1697 個体のう

ち 1467 個体の実生において CAPS 解析を行った結果、138 個体で変異型バンドが検出された。さらに、後代の種子において CAPS 解析を行った結果、変異の遺伝が検出された個体は 16 個体であり、両ホモログで変異の遺伝が検出された個体は 7 個体であった。また、*GmBAS1* のみ、*GmBAS2* のみで変異の遺伝が検出された個体はそれぞれ 7 個体、2 個体であった。したがって、iPB-RNP 法を介して、1 種類の gRNA を用いて 2 つの標的遺伝子に対して同時に後代に伝達する変異を誘発できることが明らかになった。続いて、フレームシフト変異を持ち各ホモログの機能が欠損したと考えられる個体を用いて、HPLC によるソヤサポニン含量の測定を行った。完熟種子、3 週齢の根、茎及び葉におけるソヤサポニン含量を測定した結果、*GmBAS1* 変異体及び二重変異体においてソヤサポニンが欠損した一方、*GmBAS2* 変異体ではソヤサポニンは欠損しなかった。したがって、ダイズ植物体におけるソヤサポニン生合成には *GmBAS1* が主要な役割を持つことが示唆された。

次に、ソヤサポニンの生物学的役割を明らかにするため、*GmBAS1* 変異体を用いてソヤサポニンの欠損がダイズ植物体に及ぼす影響を精査した。DDMP ソヤサポニンは DPPH ラジカル及びスーパーオキシドアニオンの消去能を有する抗酸化物質であることが知られている。一方、グループ B ソヤサポニンは根から分泌され、根圏細菌を誘引する効果を持つことが知られている。そこで、*GmBAS1* 遺伝子の機能欠損が種子の代謝及び根圏細菌叢の組成に及ぼす影響を評価した。まず、DPPH Antioxidant Assay Kit を用いて種子の抗酸化能を評価した結果、*GmBAS1* 変異体種子は野生型に比べ、DPPH ラジカル消去容量が有意に低いことが明らかになった。続いて、登熟種子の胚軸と子葉を用いて RNA-seq による遺伝子の網羅的な発現解析を行った結果、*GmBAS1* 変異体の胚軸では抗酸化物質として知られるフラバノールを合成する経路が活性化されていることが示唆された。そこで、FBBB 法によって総ポリフェノール含量を測定したところ、*GmBAS1* 変異体の胚軸では野生型に比べて総ポリフェノール含量が有意に高いことが示された。さらに、HPLC を用いてイソフラボン含量を測定したところ、*GmBAS1* 変異体の胚軸では野生型に比べてイソフラボン含量が有意に低いことが示された。これらの結果からも *GmBAS1* 変異体の胚軸においてフラバノールが一定量増加していることが支持された。したがって、抗酸化能の低下を補うようフラボノイド代謝が変動しているにもかかわらず、*GmBAS1* 変異体種子で抗酸化能が低下したことから、ダイズ種子においてソヤサポニンが主要な抗酸化物質であることが示唆された。さらに、16S rRNA 遺伝子のアンプリコン seq 解析を用いて *GmBAS1* 変異体と野生型の根に付着した土壤中の細菌叢組成を比較した。まず、細菌叢の多様性の尺度である α 多様性と β 多様性を、それぞれ Shannon 指数、weighted UniFrac 距離により比較したところ、*GmBAS1* 変異体と野生型の根圏土壤の間に有意な差異はなかった。一方、LEfSe 解析によって *GmBAS1* 変異体と野生型の根圏土壤の間で有意に存在量が増加した細菌を評価した結果、*Novosphingobium* 属細菌が *GmBAS1* 変異体の根圏土壤において有意に減少したことが示された。*Novosphingobium* は、グループ B ソヤサポニンによって誘引されることが知られているため、ソヤサポニンがダイズと *Novosphingobium* の特異的な相互作用を媒介していることが示唆された。以上から、ソヤサポニンはダイズ種子における抗酸化能と根圏細菌との特異的な相互作用において重要な役割を果たすことが示唆された。

本研究では、*GmBAS1* 遺伝子への標的変異の導入によって、種子及びダイズ植物体全体でソヤサポニンが欠損した変異体の作出に加え、ソヤサポニンの欠損がダイズ植物体の生理機能に弊害をもたらす可能性があることを明らかにした。今後はダイズ植物体の生理機能を損なうことなく風味の改良を達成するため、組織ごとにソヤサポニン含量を制御する遺伝的改良が重要であると考えられる。