



HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士（農学） 氏名 麻 裕 毅

審査担当者	主 査	准教授	山 田 哲 也
	副 査	教 授	金 澤 章
	副 査	教 授	久 保 友 彦
	副 査	助 教	Maria Stefanie Dwiyanti

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)

本論文は図 18 および表 13 を含む 4 章からなる総頁数 85 の英語論文であり、別に参考論文 1 編が添えられている。

ダイズ (*Glycine max*) に含まれるソヤサポニン¹⁾は、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。ヒトの健康に対しては抗炎症作用や脂質代謝改善などの様々な薬理活性を持つことが報告されているが、食品科学の観点からは大豆加工品特有の苦味やえぐみの原因物質として知られている。現在、世界的な人口増加と経済発展に伴い、動物性タンパク質に代わる持続可能な植物性タンパク質源への需要が急増している。この背景から、ダイズの利用拡大において風味の改良は極めて重要な課題であり、ソヤサポニン含量を制御した品種の開発が強く求められている。一方で、植物が特定の二次代謝産物を産生する能力は、進化の過程における環境適応の結果として獲得されたものである。しかし、ソヤサポニンがダイズ植物体そのものにおいてどのような生物学的役割を果たしているのかについては、未だ不明な点が多い。その主な要因は、ソヤサポニンの化学構造が極めて多様であり、現在までに 50 種以上の分子種が確認されていることにある。ソヤサポニンは大きく、グループ A ソヤサポニンと DDMP (2,3-dihydro-2,25-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) ソヤサポニンの 2 群に大別される。DDMP ソヤサポニンは不安定であるため、その分解物としてグループ B および E ソヤサポニンが存在する。これらの分子種は植物体内での分布が異なり、DDMP 型は植物体全般に、グループ A および B 型は主に根に局在し、さらに根から分泌されることも判明している。本研究では、風味改良ダイズの開発と、分子種ごとに分担されていると考えられる生物学的役割の解明を目指し、ソヤサポニン欠損変異体の作出と解析を行った。

ソヤサポニン生合成は、テルペノイド生合成経路の分岐点において、2,3-オキシドスクアレ
ンから β -アミリン合成酵素遺伝子 (*GmBAS*) の機能を抑制すれば、種子中のソヤサポニン含
量を劇的に低減できることが知られている。ダイズには 2 つのホモログ (*GmBAS1* および
GmBAS2) が存在するが、それぞれの機能的差異はこれまで不明であった。そこで、これらの

遺伝子を対象に標的変異誘発を試みた。本研究では、効率的かつ迅速な変異体作出のため、CRISPR/Cas9 システムを用いた iPB-RNP 法 (in planta bombardment-ribonucleoprotein 法) を採用した。両ホモログの第 1 エキソン内にある共通配列を標的とする gRNA を 1 種類設計し、同時変異誘発を試みた。RNP を導入した 1,467 個体の実生に対して CAPS 解析を行った結果、138 個体で変異が確認された。さらに後代種子への遺伝を調査したところ、16 個体で変異の遺伝が確認され、そのうち 7 個体は両ホモログに同時に変異を持つ二重変異体であった。得られた各変異体 (*GmBAS1* 単独, *GmBAS2* 単独, 二重変異体) の完熟種子, 根, 茎, 葉におけるソヤサポニン含量を HPLC で測定した。その結果, *GmBAS1* 変異体および二重変異体においてソヤサポニンが完全に欠損した一方で, *GmBAS2* 変異体では野生型と同等の含量が維持されていた。この結果から, ダイズ植物体全体のソヤサポニン生合成において, *GmBAS1* が主要な役割を担っていることが初めて明確になった。

次に, 作出した *GmBAS1* 変異体を用いて, ソヤサポニン欠損がダイズの生理状態にどのような影響を与えるかを精査した。DDMP ソヤサポニンは, DPPH ラジカルやスーパーオキシドアニオンを消去する強力な抗酸化能を持つことが知られている。*GmBAS1* 変異体種子の抗酸化能を評価したところ, 野生型と比較して DPPH ラジカル消去容量が有意に低下していた。興味深いことに, 登熟種子の胚軸を用いた RNA-seq 解析では, 変異体において抗酸化物質であるフラバノールの合成経路が活性化している兆候が見られた。実際に分析を行うと, 変異体の胚軸では総ポリフェノール含量が増加し, 逆にイソフラボン含量が減少していた。これは, ソヤサポニンという主要な抗酸化能力を失ったストレスを補償するために, 植物側がフラボノイド代謝を変動させて他の抗酸化物質を増産しようとした結果と考えられる。しかし, それでもなお種子全体の抗酸化能が野生型に及ばなかった事実は, ダイズ種子においてソヤサポニンが代替不可能な主要抗酸化物質であることを裏付けている。

グループ B ソヤサポニンは根から分泌され, 特定の根圏細菌を誘引するシグナル物質としての役割が想定されている。そこで, 野生型と変異体の根に付着した土壤の細菌叢を 16S rRNA アンプリコン解析により比較した。細菌叢全体の多様性 (多様性・多様性) については, 野生型と変異体の間で顕著な差異は見られなかった。しかし, LEfSe 解析 (存在量の有意な差を検出する解析) により詳細に検討したところ, 変異体の根圏において *Novosphingobium* 属細菌が有意に減少していることが明らかになった。*Novosphingobium* は, 過去の研究でグループ B ソヤサポニンによって誘引されることが報告されている属である。今回の変異体を用いた実証実験により, ダイズが分泌するソヤサポニンが, 特定の有益な細菌との相互作用を媒介するメディエーターとして機能していることが強く示唆された。

以上, 麻 裕毅はゲノム編集技術を駆使してソヤサポニン生合成の主導的な遺伝子 *GmBAS1* に変異を誘発することで, ソヤサポニン欠損ダイズの作出に成功した。さらに, ソヤサポニンが単なる二次代謝産物ではなく, 種子の抗酸化維持や根圏における微生物とのコミュニケーションにおいて重要な生物学的役割を担っていることを解明した。これらの知見は, 風味を改良した大豆の開発において, 植物の生存戦略に不可欠な抗酸化能や根圏相互作用を損なうことなく, 特定の成分のみを最適化する精密育種, および代謝経路の再編成を伴う高度な育種開発に向けた重要な知見を提示した。よって, 審査員一同は, 麻 裕毅が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。