

# リポキシゲナーゼ-3に変異を誘発させた

## ダイズの生理的・生化学的な特徴付け

生物資源科学専攻 植物育種学講座 植物遺伝資源学 古川雄登

### 1. 目的

ダイズ種子は豊富なタンパク質と脂質を有する。しかし、脂質が酸化されることによってダイズ種子の品質は劣化しやすくなる。この脂質の酸化には、脂質酸化酵素であるリポキシゲナーゼ（以下、LOXと記す）が関与することが知られている。LOXはイネにおける種子の貯蔵性、ダイズの青臭みをもたらす原因物質の産生と深く関わるためLOXを不活化させる育種が行われている。ダイズ種子ではLOX-1、LOX-2およびLOX-3の3つのアイソザイムが主に脂質の酸化に関与すると言われている。一方、ダイズ種子におけるこれらアイソザイムの機能分化に関する知見は少ない。そこで、本研究はCRISPR-Cas9を用いたゲノム編集によって*Lox-3*遺伝子に変異を誘発した個体を獲得した。更に、その種子においてヘキサナールの定量解析や発芽試験を行うことにより、ダイズ種子におけるLOX-3の機能を明らかにした。

### 2. 方法

*Lox-3*を特異的に認識するgRNA及び*Cas9*を発現するベクターを構築し、アグロバクテリウム法によって国内ダイズ品種「カリユタカ」に形質転換した。得られたT<sub>2</sub>世代においてCAPS及びシーケンス解析による*Lox-3*への変異の導入を確認した。更に、変異が確認された種子を播種・養成し、T<sub>3</sub>種子を獲得した。これらの種子についてSDS-PAGEとLOX活性測定を行った。さらに、LOX-3が酵素としての働きを失ったと思われる種子について、加齢処理を行った後の発芽試験や揮発性成分を対象にしたGC-MS解析を行い、LOX-3のダイズ種子における生理・生化学的な特徴を明らかにした。

### 3. 結果と考察

形質転換体の作出を試みたところ、5つのT<sub>0</sub>個体を得た。T<sub>0</sub>個体に結実した種子を全て播種し養成することで合計136粒のT<sub>2</sub>種子を得た。これらの標的配列における変異誘発の有無を確認したところ、ホモもしくはバイアリルの変異を持つと考えられる種子は合計97粒存在した。また、変異が誘発され、外来遺伝子を持たないヌルセグリガントは9粒存在し、これらについてシーケンス解析を行った結果、1塩基および2塩基欠失のフレームシフト変異をホモに持つ種子が3粒、3塩基欠失のインフレーム変異をホモに持つ種子が2粒およびバイアリルの変異を持つ種子が4粒存在した。SDS-PAGEによるタンパク質の質的解析、呈色反応による定性的解析を行ったところ、変異体のLOX-3タンパク質は失活していることが確認された。これらの変異体は発芽試験において、加齢処理区と未処理区で発芽特性に関して大きな差異は認められず、LOX-3はダイズの種子生存力に影響を及ぼすことが示唆された。次にGC-MS測定によってヘキサナール量を分析した。変異体のヘキサナール産生量はカリユタカの約20%となり、LOX-3はヘキサナールの産生に働く主要なアイソザイムであることが明らかになった。本研究において、LOX-3の生理・生化学的な機能の特徴付けることが出来た。本研究の方法に従い、LOX-1およびLOX-2の機能を失った個体を獲得することが出来れば、各アイソザイムの機能が精査できると考えられる。