

大豆タンパク質の遺伝的改良に関する研究

羽鹿 牧太

抄 録

大豆食品の青臭みは大豆の用途を豆腐などの伝統的食品に限定する要因の一つである。大豆の新たな用途開発に資するために、青臭みの主要因であるリポキシゲナーゼを完全に欠失した品種の育成を行った。「関係2号(L-1・L-3欠失)」と「関係1号(L-2・L-3欠失)」の交配後代に γ 線を照射した系統から、種子リポキシゲナーゼを完全に欠失した系統(後の「いちひめ」)を見だし、この系統が正常に生育し、農業特性が普通大豆と変わらないことを明らかにした。またリポキシゲナーゼ完全欠失系統が普通品種に比較して、豆乳や豆乳デザートへの加工適性に優れていることを示した。

完全欠失系統の遺伝解析から、L-1・L-2間には強連鎖が存在し、完全欠失性が見かけ上L-1・L-2欠失及びL-3欠失の2遺伝子支配であることを明らかにした。一方、カロテン退色反応を利用した簡易選抜法やDNAマーカーを利用した選抜法により完全欠失系統を選抜できることを示した。

また大豆の貯蔵タンパク質を改変して新たな用途開発に資するため、大豆の野生種であるツルマメから β -コングリシニン(7S)を欠失したQT2系統を見いだした。大豆との交雑試験からこの系統が持つ7S欠失性は単一の優性遺伝子(*Scg-1*)により支配されることを明らかにした。QT2系統や大豆に戻し交雑を行った系統の解析から、*Scg-1*による7S欠失系統でも正常型とタンパク質含有量が変わらないことから、11Sの増加により7Sの減少分が補われていると考えられた。

キーワード : 大豆、ツルマメ、リポキシゲナーゼ、タンパク質、 β -コングリシニン(7S)、DNAマーカー

Breeding research for genetic improvement of soybean seed protein components

Makita HAJIKA

Abstract

Soybean seeds are rich in protein and oil and are known as one of the most important sources of vegetable protein and oil. In addition to these, it has been demonstrated recently that soybean seeds contain many functional components, such as isoflavones, peptides, and saponins. In Japan, the level of consumption of soybean food products, such as tofu and miso, has remained constant or decreased slightly. The development of new soybean products and the breeding of new lines of soybeans using improved seeds are expected to increase soybean consumption.

In this study, soybean seeds that lacked lipoxygenases and storage proteins were developed.

1. Development of soybean seeds that lack lipoxygenases

Soybean products have an undesirable bean flavor, which limits their wider use in food products. Lipoxygenases in soybean seeds are responsible for this bean flavor, and to remove this flavor, a heat-treating method has been used. Soybean seeds contain 3 lipoxygenases - L-1, L-2 and L-3. Mutants that lacked one of these enzymes were identified from a germplasm collection. These mutants were used to breed lines that lacked L-1·L-3 and L-2·L-3, but a line that lacked all 3 lipoxygenases could not be developed by cross breeding.

Using gamma ray irradiation of the progeny derived from a cross between Kankei 2 (lacking L-1·L-3) and Kankei 1 (lacking L-2·L-3), a soybean line was isolated successfully that lacked all 3 lipoxygenases. This line grew to maturity, exhibited no abnormalities; and produced 30 seeds. These seeds also lacked all 3 lipoxygenases.

The major agricultural traits of the seeds that lacked all 3 lipoxygenases, such as maturation period, lodging resistance, and yield, were similar to those of "Suzuyutaka," which is a normal soybean cultivar and the recurrent parent of Kankei 1 and Kankei 2. In addition, the incidence of pod damage by soybean pests was the same in the line that lacked all 3 lipoxygenases and regular soybean lines. On the basis of these results, it was concluded that seed lipoxygenases do not play a very important role in soybean growth.

Sensory tests revealed that the soybean line lacking all lipoxygenases was better in terms of flavor and total evaluation than the regular soybean lines.

2. Elucidation of the genetic background of the trait of lines with a complete lack of

lipoxygenases and the development of new selection methods for lines with this trait

To determine the genetic background of the line with a complete lack of lipoxygenases, crossing tests were conducted. The segregation ratio derived from crosses between normal soybeans and the line that lacked all lipoxygenases satisfactorily fitted the ratio of 9 (normal) : 3 (lacking L-3) : 3 (lacking L-1•L-3) : 1 (lacking all). Furthermore, the segregation ratio of the cross between the line lacking L-3 and that lacking all lipoxygenases satisfactorily fitted the ratio of 3 (lacking L-3) : 1 (lacking all). From these results, it was concluded that the *Lx1-lx1* and *Lx2-lx2* loci were closely linked.

Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) is frequently used to analyze seed lipoxygenases. As alternatives to SDS-PAGE, 2 new methods were devised for the selection of seeds that lack all lipoxygenases. Carotene breaching tests are very convenient and enable the rapid selection of many seeds. However, because the trait of the lack of all lipoxygenases is controlled by a recessive gene, it is impossible to apply this method to F₁ generations.

Using a molecular biological approach, it was demonstrated that the absence of L-2 is caused by a single base change in the structural gene sequence and that of L-3 by 3 single-base changes in the promoter domain. Using these differences, DNA markers linked to the *Lx2-lx2* and *Lx3-lx3* loci were developed.

3. Development of a soybean line lacking the 7S protein

The 7S (beta-conglycinin) and 11S (glycinin) proteins account for approximately 60% of soybean storage proteins. The 11S protein contains more sulfur-rich amino acids and forms a harder gel than the 7S protein. Two mutant lines that completely lacked the 7S protein have already been reported. However, both these lines were lethal mutants and cannot be used for breeding.

In this study, a soybean line that completely lacked 7S was isolated from wild soybean collections and designated "QT2." The QT2 line was not lethal and did not show any abnormalities. Crossing tests between normal soybean and the QT2 line revealed that the trait of a complete lack of 7S is controlled by a single dominant gene. Furthermore, the protein and oil contents of the QT2 line were identical to those of normal wild soybeans. Densitometric analysis of the soybean lines that lacked 7S and were derived from the QT2 line indicated that the 11S contents of these lines were increased.

Key Words: soybean, wild soybean, lipoxygenase, protein, beta-conglycinin (7S), marker

目 次

I	緒言	25
II	リポキシゲナーゼ完全欠失大豆の作出とその特性	26
1	リポキシゲナーゼ完全欠失大豆の作出	27
2	リポキシゲナーゼ欠失系統の固定化と生育特性調査	29
3	戻し交雑による新たなリポキシゲナーゼ欠失系統の育成と生育特性の調査	34
4	リポキシゲナーゼ欠失大豆の官能評価試験	35
5	考察	37
III	リポキシゲナーゼ欠失特性の遺伝様式の解明と選抜法の開発	39
1	リポキシゲナーゼ完全欠失系統の遺伝的背景の解明	40
2	カロテン退色反応を用いたリポキシゲナーゼ完全欠失系統選抜法	41
3	DNAマーカーを用いた選抜手法の開発	44
4	制限酵素を用いた選抜手法の開発	50
5	考察	53
IV	7Sサブユニット完全欠失系統の作出とその特性	54
1	7S完全欠失系統の探索	54
2	QT2系統の遺伝的背景の解明	56
3	7S欠失特性が主要成分・加工適性に与える影響の調査	58
4	考察	61
V	総合考察	62
VI	摘要	64
VII	謝辞	66
VIII	引用文献	67

I 緒 言

大豆 (*Glycine max* (L.) Merill.) は、中国を原産地として東アジアで広く栽培されてきた作物であり、これら地域の重要な食品素材の地位を占めている。日本でも豆腐、納豆、味噌、醤油などの大豆食品は日本型食生活に欠かすことができない存在となっている (渡辺ら 1971、山内・大久保 1992)。

今日では大豆は主として油糧作物、飼料作物として世界各地に栽培が広がっており、米、小麦、とうもろこしの3大穀類に次ぐ栽培面積を持つ主要作物の一つとなっている。近年では高タンパク飼料用として大豆かすや食用油としての旺盛な需要を背景に、従来の北米に加え南米でも急速に作付が伸びている。特に中国は国内需要が増大し、最近になって急速に輸入量を伸ばしてきている。

大豆はタンパク質や脂肪を豊富に含んでおり、炭水化物を主体とする米・麦などの穀類や芋類とは異なる特徴を持つ。このため、穀類で不足するこれら栄養成分を補完できる貴重な作物であるが、同様の特徴を持つ肉類に比較した美味しさの点でやや劣り、食用として日常的に用いられている地域は東アジアに限られてきた。しかし大豆の持つ良質なタンパク質や機能性成分に関心が高まるにつれ、豆乳を中心とした大豆食品の消費が欧米諸国でも次第に増加している。

一方国内の食品用大豆消費量はほぼ横ばい状態であり、特に納豆を除く豆腐、味噌、醤油等伝統的食品については横ばいかやや減少傾向である。納豆についても消費量が増加しているのは、西日本など従来消費量が少なかった地域で消費量が増大しているため、もともと消費量が多かった地域では横ばい傾向となっている。大豆は良質なタンパク質やイソフラボン等の健康機能性成分を豊富に含み (山内・大久保 1992、菅野 1999、家森ら 2001)、国民全体の健康維持にも大きく寄与すると考えられることから、新たな利用方法を開発し、無理なく日常

の摂取量を増大する方策が求められている。

大豆の食品用途を制限している最大の要因の一つは大豆製品独特の青臭みである (Arai *et al.* 1970、Fujimaki *et al.* 1965、Rackis *et al.* 1979、Wolf 1975)。これを取り除くことにより、風味による制限が少なくなり、大豆の新たな用途が開発されることが期待される。また大豆の主要な貯蔵タンパク質は β -コングリシニン (7S) とグリシニン (11S) であり、両者でタンパク質全体の60~80%を占めると言われている (Derbyshire *et al.* 1976、Hill and Breidenbach 1974、Thanh and Shibasaki 1976)。7Sタンパク質と11Sタンパク質は、それぞれ化学的特性が異なっており (Koshiyama 1968、Coates *et al.* 1985、Staswick *et al.* 1983)、この比率を変えることにより、豆腐加工適性や栄養性の改善だけでなく、新たな用途が開発される可能性もある (喜多村・原田1989)。

このような観点から本研究では、大豆の青臭みに関与する酵素リポキシゲナーゼ及び大豆の主要な貯蔵タンパク質である7Sタンパク質を遺伝的に除去するための研究を行った。

第II章ではこれまで交配育種では作出されなかったリポキシゲナーゼ完全欠失系統を放射線突然変異を利用して作出することに成功した。作出した系統を選抜・固定化するとともに、圃場における栽培試験を実施して、生育特性・収量性等を調査して、実用的な栽培が可能であるか検討した。またリポキシゲナーゼ欠失系統を用いた加工・官能評価試験を実施し、実用化のための条件を検討した。

第III章では作出したリポキシゲナーゼ欠失系統の遺伝的背景を明らかにするとともに、実際の育種や生産現場で普通品種とリポキシゲナーゼ完全欠失品種を判別できる手法を検討した。現場でも利用可能な手法として、リポキシゲナーゼの β -カロテン退色能を用いた色素法を開発した。また育種の効率化に役立つ手法として、

リポキシゲナーゼ欠失変異のDNA配列を利用してヘテロ型でも判別が可能なDNAマーカーを開発した。

第IV章では大豆の野生種のツルマメ (*Glycine soja sieb. et Zucc.*) から貯蔵タンパク質の7Sを完全に欠失した系統を見だし、この系統の遺伝的背景を解明した。またこの系統の成分を調査するとともに、大豆に戻し交配を行って系統を育成しその成分を調査した。

第V章では本研究や本研究から育成された品種の普及の現状を総合して、これまでに育成さ

れた成分改変大豆の普及が進んでいない原因と普及のための条件を考察した。

なお、本研究は著者が農林水産省九州農業試験場 (現九州沖縄農業研究センター)、農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所に在籍している間に行ったものであり、学会誌などに公表した部分を含め (Hajika *et al.* 1991、Hajika *et al.* 1992、Hajika *et al.* 1996、羽鹿ら 1997、Hajika *et al.* 1998、羽鹿ら 2002)、北海道大学審査学位論文としたものである。

II リポキシゲナーゼ完全欠失大豆の作出とその特性

大豆の青臭みについては古くから研究が行われている。水浸漬した大豆種子を磨砕したときに、種子中に含まれる過酸化酵素であるリポキシゲナーゼが種子中のリノール酸等の不飽和脂肪酸を酸化し (Mack *et al.* 1987、Vick and Zimmerman 1987)、この際にn-ヘキサナル等のアルデヒド類を生成する。これが青臭みの主要成分であると言われている (Fujimaki *et al.* 1965、Rackis *et al.* 1979、Arai *et al.* 1970)。

伝統的な大豆の食品加工では、リポキシゲナーゼの問題を解決するために加熱処理が用いられ、大豆の食品への加工工程には加熱処理が必ず入っている。近年、エクストルーダーを用いた機械力によるリポキシゲナーゼの失活など新たな手法も考案されているが (門間ら 1990、Kovacs *et al.* 1991)、これらの手法によるリポキシゲナーゼの失活だけでは磨砕中に生じたアルデヒド類を完全に除去することはできない。このために豆乳などでは独特の豆臭さが残り、消費拡大のネックとなっている。大豆食品からのアルデヒド類の除去については溶媒による抽出や酵素による分解などが考案されたが (佐々木・千葉 1983)、コスト面等の問題が多く実用化されていない。

一方でリポキシゲナーゼ生成産物は豆腐のこく味など風味成分の一つでもあり (島田ら 1998)、

リポキシゲナーゼ活性をコントロールすることにより大豆の風味を改良できる可能性もある。

大豆種子中にはL-1、L-2、L-3と呼ばれる3種類のリポキシゲナーゼが存在し (Axelrod *et al.* 1981)、最適pH、最適温度、分子量等の化学的性質が少しずつ異なっている (Christopher *et al.* 1970、Christopher *et al.* 1972、Sessa 1979、Wang *et al.* 1990)。このため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)、免疫学的手法、リノール酸などへの基質反応性等により容易に区別することができる (Kitamura 1984、Yabuuchi *et al.* 1982、Wheelock *et al.* 1991、Evans *et al.* 1994)。

1980年代の始めから米国においてリポキシゲナーゼの変異体の探索が行われ、遺伝資源の中からL-1欠失、L-2欠失、L-3欠失系統がそれぞれ見いだされた (Hildebrand and Hymowitz 1981、Kitamura *et al.* 1983、Kitamura *et al.* 1985、Davies and Nielsen 1986)。リポキシゲナーゼ欠失の各変異の遺伝的背景については、交配実験によりそれぞれが劣性の1遺伝子支配であることが報告されている (Hildebrand and Hymowitz 1982、Kitamura *et al.* 1983、Kitamura *et al.* 1985)。

これらの変異系統を人工交配して、後代を選抜することによりL-1・L-3欠失、L-2・L-3欠失系

統が育成されたが (Kitamura *et al.* 1985、Kitamura *et al.* 1987、Davies and Nielsen 1987)、完全欠失系統は交配育種では作出されなかった。この原因としてはL-1とL-2間の強連鎖、リポキシゲナーゼが必須成分であるために全欠が致死となる等の可能性が考えられたが、十分な証明ができていない。

本研究では放射線突然変異を利用してリポキシゲナーゼ完全欠失系統を作出することに成功した (Hajika *et al.* 1991)。この系統を用いて生育特性及び成分など主要な形質を調査し、リポキシゲナーゼの欠失が生育等に与える影響を明らかにするとともに (羽鹿ら 2002)、加工適性試験を実施してその有用性を検証した。

1 リポキシゲナーゼ完全欠失大豆の作出

1) 材料と方法

(1) 突然変異処理材料

農業研究センター (現作物研究所) より分譲された「関係1号 (L-2・L-3欠失)」と「関係2号 (L-1・L-3欠失)」を交配して得られたF₁を圃場で育成してF₂種子約7,500粒を得た。このF₂種子を放射線突然変異処理用の材料として用いた。なお、「関係1号」は後の「ゆめゆたか」、「関係2号」は後の「関東102号」である。いずれも「スズユタカ」を戻し交配親として、「関係1号」は「PI86023 (L-2欠)」及び「早生夏 (L-3欠失)」からL-2欠失及びL-3欠失を導入した系統、「関係2号」は「早生夏 (L-3欠失)」及び「PI408251 (L-1欠失)」からL-1欠失及びL-3欠失を導入した系統である。

(2) 突然変異処理とスクリーニング材料の養成

突然変異処理は農業生物資源研究所放射線育種場に依頼して行った。突然変異源にはガンマー線を用い、照射強度は15kRで行った。照射して得られた突然変異処理種子は圃場 (M₁) 及びビニールハウス (M₂) で世代促進を行い、得られた約7,000粒のM₃種子をスクリーニング材料とした。

(3) リポキシゲナーゼの検定

リポキシゲナーゼの有無の検定には改良SDS-

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PA GE、Kitamura 1984) を用いた。

a) 溶液の作成

A液：SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 2.0g、Tris (トリスメチルヒドロキシアミノメタン) 181.2g、1N塩酸240mlを蒸留水に加えて混合後、500mlにメスアップした。

C液：アクリルアミド30gとBis (N,N-メチレンビスアクリルアミド) 0.8gを蒸留水に加えて混合し、100mlにメスアップした。

P液：過硫酸アンモニウム1.5gを蒸留水に加えて混合し、100mlにメスアップした。

B液：1N塩酸240mlと蒸留水200mlを良く混合した後、TrisでpH7.0に調整し、蒸留水で500mlにメスアップした。

E液：リボフラビン4mgを蒸留水と混合し、100mlにメスアップした。

抽出用バッファー：0.05M Tris-HClバッファー 100mlに2-メルカプトエタノール2mlを加え良く混合した。

泳動用緩衝液 (電解液)：グリシン14.4g、Tris 3.0g、SDS 1.25gを蒸留水に加えて混合後、1,000mlにメスアップした。

染色液：クマーシーブルー (G250) 2.25g、440mlエタノール、500ml蒸留水、60ml酢酸を混合した。

脱色液：メタノール200mlと酢酸50mlに蒸留水を加えて混合し、1,000mlにメスアップした。

b) 分離ゲルの作成 (2mm厚ゲル1枚または1mm厚ゲル2枚)

A液10.0ml、C液9.0ml、P液2.0mlに蒸留水19.0mlを加えて良く混合し、さらにTEMED 20 μ lを加えて良く攪拌し、16cm角の電気泳動用ゲル板に流し込んだ後、上部に蒸留水を静かに上層して1時間放置した。

C) 濃縮ゲルの作成

B液5.0ml、C液3.0ml、E液4.0ml、P液0.5mlに蒸留水7.5mlを加えて良く混合し、TEMED 5 μ lを加えて再度攪拌後、上層水を除去した(b)の上部に流し込んだ。ゲル化する前に20サンプル用サンプルコームを差し込み、2時間室

温で放置した。ゲルが凝固後にサンプルコームを抜き取り、泳動用ゲルとした。

d) 試料抽出

大豆種子の胚軸の反対側をカッターナイフまたは電気ドリルで削り、得られた削りかすを分析用サンプルとした。約 5 mg の種子粉にバッファ 1 ml を加えて良く攪拌し、15 分程室温で放置した。再度攪拌後 2,000rpm で 5 分間遠心し、上澄みを抽出液とした。

e) 電気泳動

アトー社製の泳動槽に泳動用緩衝液を入れた後、ゲル板をセットし、上部にも電解液を満たした。試料はサンプルコームでできたサンプル孔にマイクロシリンジで 10 μ l ずつ静かに注入した。上部槽にプロモフェノールブルー (BPB) 溶液数滴を加え、泳動マーカーとした。当初 100V で約 1 時間泳動し、マーカーが濃縮ゲルを通過後に、150V に昇圧した。マーカーが下端を通過後、泳動を停止し、ゲルをガラスプレートから外して、染色液に入れて静かに振とうした。1 時間後に脱色液に移して 12 時間脱色を行い、バンドの有無を確認した。

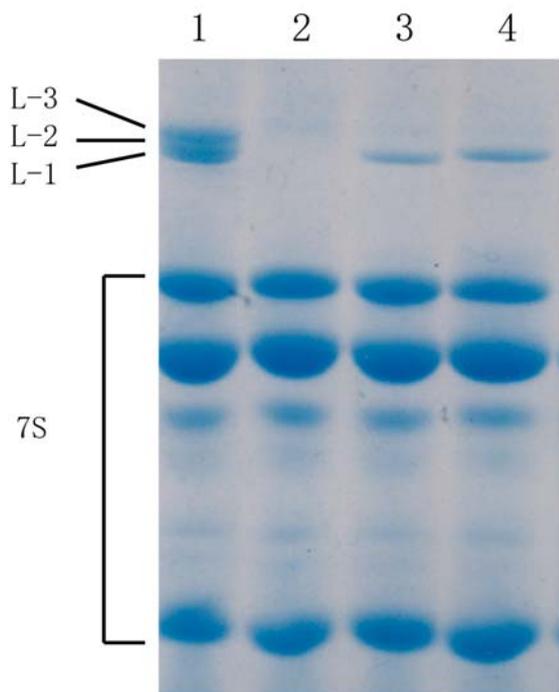


図1 リポキシゲナーゼ欠失大豆の電気泳動像

1:スズタカ(L₁₂₃), 2:いちひめ(L₀), 3:ゆめゆたか(L₁), 4:関東102号(L₂)

2) 結果と考察

突然変異処理種子 1,813 粒を SDS-PAGE で分析したところ、リポキシゲナーゼ該当部分のバンドが出現しない系統が 1 粒だけ得られた (図 1)。残る 1,812 粒は L-2・L-3 欠、L-3 欠、L-1・L-3 欠がそれぞれ 789 粒、246 粒、777 粒得られ (表 1)、L-1 と L-2 の間に強連鎖が存在すると仮定したときの分離比 7:2:7 に適合した。

リポキシゲナーゼアイソザイムがないと判断された種子を温室内で播種したところ、正常に発芽した。生育期間中は外見上の形態異常は見られず (図 2)、開花・成熟まで達し、30 粒の M₄ 種子が得られた。このうち一部を再度 SDS-PAGE で分析したところリポキシゲナーゼアイソザイムは見られず、得られたリポキシゲナーゼ完全欠失特性が遺伝的形質であることが確認できた。さらに得られた種子の一部を圃場に播種したが、M₃ 種子と同じく正常に生育し、開花・成熟したことから、種子リポキシゲナーゼの欠失は重大な生理異常を示さないことが確認できた。

本研究で得られた完全欠失特性は、放射線突然変異処理を行った種子が L-1・L-3 欠失 × L-2・L-3 欠失由来の F₂ 種子であったことから、この特性が突然変異により生じたものか、L-1 と L-2 の間に交叉が起きて生じたものかは判別できない。

Wang *et al.* (1994)、Wang *et al.* (1995) は L-2 及び L-3 の欠失機構の分子生物学的解析を行い、L-2 が 1 塩基置換によりアミノ酸が置換し、これにより L-2 の蓄積ができないこと、L-3 はプロモーター部位の 2 つの 1 塩基置換が転写を阻害していることを報告している。この中で、完全欠失系統の L-2 が「関東 102 号 (関係 2 号)」由来であることが示されている。しかし、完全欠

表 1 関係 2 号 × 関係 1 号由来の M₃ 種子の分離比 (全欠失種子を除く)

表現型			種子数	χ^2 値 (7:2:7)
L-1	L-2	L-3		
+	-	-	789 (792.75)	0.018
+	+	-	246 (226.5)	1.679
-	+	-	777 (792.75)	0.313
合計			1812	2.009 (P>0.36)

注) ()内は 7:2:7 に分離すると仮定したときの期待値。

失系統のL-1については「ゆめゆたか（関係1号）」と同一であるかは確認されていない。今後完全欠失変異が交叉と突然変異のどちらによって引き起こされたものかを確定するためには、L-1の遺伝子の解析が必要である。



図2 作出したリポキシゲナーゼ完全欠失大豆の生育

2 リポキシゲナーゼ欠失系統の固定化と生育特性調査

1) 材料と方法

(1) 選抜材料

リポキシゲナーゼ完全欠失種子を温室で世代促進して得られたM₄種子30粒のうち、18粒を系統選抜用に用いた。固定化は圃場での選抜と温室での世代促進を組合せて行い、各世代で最も有望な系統から5個体を選抜して次世代の系統とした。各系統は18個体を栽植した。選抜は草姿、倒伏程度等の生育特性及び裂皮、粒大等の品質特性などを基本にする九州農業試験場大豆育種研究室の定法に従って行い、十分固定化が進んだと思われるM₇世代より生育調査を行った。

比較品種には戻し交配親の「スズユタカ」、交配親の一つである「ゆめゆたか（L-2・L-3欠失）」及び「エンレイ」を用いた。

(2) 生育調査

生育調査は1991-1995年に九州沖縄農業試験場（熊本県菊池郡西合志町、現熊本県合志市）で実施した。播種は「スズユタカ」等の早生群の標準播種である6月中旬に行い、畦幅70cm、株間13cm、畦長2.375m、1本立とした。肥料は化成肥料（N:P:K=3:10:10）10kg/a及び苦土石灰10kg/aを全量基肥で施肥した。反復は1991年のみ2反復で、1992-1995年は3反復で行った。立毛調査は発芽期、開花期前後、収穫期に観察により行い、胚軸色、花色、開花期、立ち枯れ病・ウイルス病等の病害の発生程度、成熟期、倒伏の程度、毛茸色、莢色などを調査した。裂莢性については1991年と1995年に別途収穫した個体から100莢を採取し、25℃の恒温器内で4日間放置後に裂莢した莢数を調査した。

(3) 生産物調査

収穫は収穫適期に通路側2株と後方1株を除く全株を収穫して、十分乾燥した後に中庸の20株について主茎長、主茎節数、分枝数を調査するとともに、全重、脱粒後の子実重、百粒重を測定した。また、収穫物については観察により紫斑、褐斑、裂皮などの障害粒の程度や外観品質を調査した。

主要成分については収穫物の一部を用いて、総タンパク質含有率についてはケルダール法（N(%)×6.25）により、全脂肪含有率については近赤外分光分析法により測定した。

豆腐加工適性試験はサンプル50gを20℃で16時間水に浸漬し、原料大豆に対し6倍になるような水を加えて磨碎して「ご（呉：クリーム状に磨り潰された大豆）」を得た。「ご」は沸騰後5分間加熱して、遠心濾過器で豆乳を抽出した。豆乳は一度氷水中で冷却し、100mlずつビーカーに分注して、0.4%となるように凝固剤（GDL：グルコノデルタラクトン）を加えた。攪拌後85℃で1時間凝固させた。豆腐の硬さは株フドー社製のレオメーターで、直径15mmのプランジャーを用いて測定した。

(4) 虫害調査

食葉性害虫及び莢実害虫抵抗性については1991年と1992年に九州農業試験場の無防除圃場に播種して調査を行った。食葉性害虫については開花期に観察により被害程度を調査した。莢実害虫については開花後35日目に5個体の全莢を採取し、加害虫別に被害莢を調査した。

また主要な大豆加害カメムシの一つであるホソヘリカメムシは大豆種子と水だけで生育が可能であるので、リポキシゲナーゼ欠失大豆を用いてホソヘリカメムシの飼育実験を行った。試験は種子数個と水のみをホソヘリカメムシの1齢幼虫に与え、25℃、24時間日長下で飼育し、雌雄別に生育日数、生体重、乾物重を調査した。

2) 結果と考察

播種した18個体は圃場で個体選抜を行い、農業特性の優れた5系統を選抜した。これら5系統を温室で2回世代促進を行い、純系化を進めるとともに系統毎に種子形質等による選抜を行った。そのうち有望と思われる系統に、M₇世代で「九系100号」、M₈世代で「九州111号」の系統名を付与し、生育特性調査を行った。その結果実用栽培に支障がないと考えられたので、1996年に新品種「いちひめ」として品種登録を行った(羽鹿ら1997)。図3に育成系譜を示すが、以下表記は「いちひめ」に統一する。

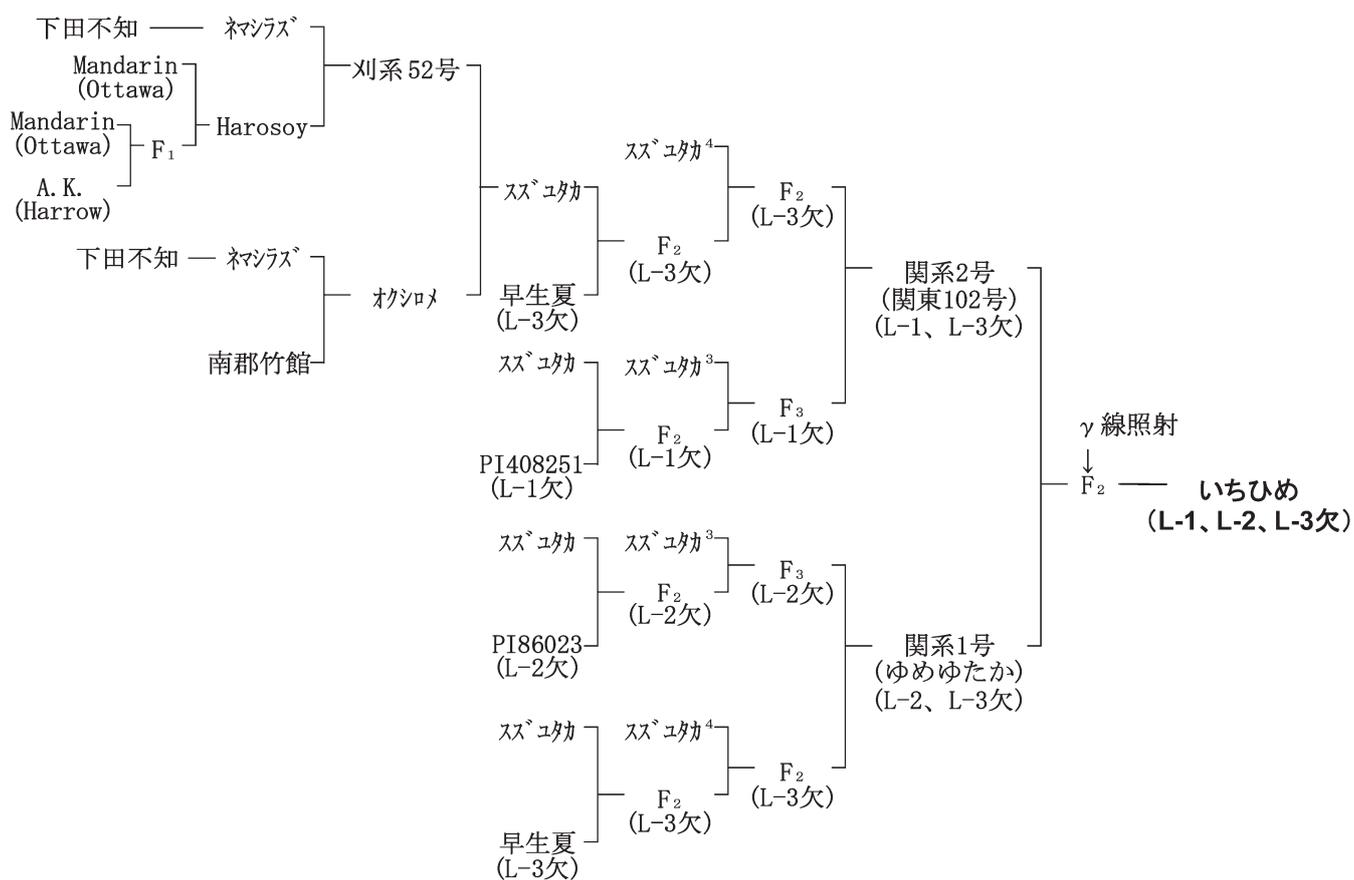


図3 「いちひめ」の育成系譜

注) 品種名の上付き数字は戻し交雑の回数を示す

表2 いちひめの生育特性調査

品種名	試験年次	開花期 (月・日)	成熟期 (月・日)	主茎長 (cm)	主茎節数	分枝数 (本)	倒伏程度	立ち枯れ	ウイルス
いちひめ	1991	7.30	10.01	34	11.3	5.1	中	無	無
	1992	7.24	9.27	47	12.8	4.9	中	無	無
	1993	7.24	9.29	27	10.5	3.1	微	無	無
	1994	7.25	10.02	28	10.4	2.4	微	無	無
	1995	7.25	10.05	34	12.4	4.1	無	無	無
	平均	7.26	10.01	36	11.7	4.1	少	無	無
ゆめゆたか	1991	7.30	10.04	27	10.5	5.9	無	無	無
	1992	7.24	9.29	48	13.0	5.1	多	無	無
	1993	7.24	9.29	28	10.6	3.6	微	無	無
	1994	7.26	10.03	29	10.7	2.6	微	無	無
	1995	7.25	10.05	35	12.5	4.3	無	無	無
	平均	7.26	10.03	35	11.7	4.5	少	無	無
スズユタカ	1991	7.30	10.02	27	10.4	6.3	微	無	無
	1992	7.23	10.01	44	12.7	5.0	中	無	無
	1993	7.23	9.29	26	10.5	3.4	微	無	無
	1994	7.25	10.03	28	10.5	2.8	微	無	無
	1995	7.24	10.05	34	12.3	4.2	無	無	無
	平均	7.26	10.03	33	11.5	4.6	微	無	無
エンレイ	1991	7.30	10.01	39	11.1	4.7	中	無	無
	1992	7.22	9.29	51	12.3	4.8	多	無	無
	1993	7.21	9.29	35	10.9	4.0	微	無	無
	1994	7.24	10.08	36	11.1	3.7	無	無	無
	1995	7.23	10.03	37	11.9	3.6	無	無	無
	平均	7.25	10.03	41	11.6	4.2	少	無	無

注) 1993年は低温年で、収量が極端に低下したので平均からは除外した。

表3 「いちひめ」の収穫物調査

品種名	試験年次	全重 (kg/a)	子実重 (kg/a)	対標比	百粒重 (g)	紫斑粒	褐斑粒	裂皮粒	品質
いちひめ	1991	52.7	30.3	100	21.3	少	無	少	中中
	1992	57.5	29.7	88	23.3	中	無	中	中中
	1993	14.4	5.9	78	15.0	少	無	微	中上
	1994	39.4	18.6	98	22.5	少	無	中	中中
	1995	56.9	31.1	102	20.2	少	無	中	中中
	平均	51.6	27.4	96	21.8	少	無	中	中中
ゆめゆたか	1991	50.1	28.2	93	22.3	中	無	少	中下
	1992	58.0	30.3	90	22.7	少	無	中	中中
	1993	17.2	7.1	93	15.5	少	無	微	中中
	1994	43.8	19.5	103	22.5	中	無	中	中中
	1995	61.6	34.1	111	21.2	少	無	中	中中
	平均	53.4	28.0	99	22.2	中	無	中	中中
スズユタカ	1991	52.0	30.2	100	22.6	中	無	少	中下
	1992	60.9	33.6	100	23.8	中	無	多	中下
	1993	16.8	7.6	100	17.9	中	微	微	中下
	1994	41.6	19.0	100	24.2	少	無	少	中上
	1995	56.8	30.6	100	21.2	少	無	微	中中
	平均	52.8	28.4	100	23.0	中	無	中	中中
エンレイ	1991	50.7	26.0	86	27.6	中	無	微	中下
	1992	53.9	25.5	76	31.3	多	無	微	中下
	1993	18.4	6.9	91	21.3	中	無	微	中下
	1994	44.0	15.2	80	28.7	少	無	少	中中
	1995	53.1	26.8	88	25.4	甚	少	無	下
	平均	50.4	23.4	82	28.3	多	無	微	中下

注) 1993年は低温年で、収量が極端に低下したので平均からは除外した。

「いちひめ」の生育調査及び収穫物調査の結果については表2及び表3に示した。1993年については、低温に加え登熟期にさび病が多発し極端な減収となったため、平均からは除外した。

「いちひめ」の開花期の平均は7月26日で「ゆめゆたか」及び「スズユタカ」と同じであり、「エンレイ」より1日遅かった。成熟期は10月1日で「ゆめゆたか」、「スズユタカ」及び「エンレイ」より2日早かった。成熟期における主茎長は「ゆめゆたか」及び「スズユタカ」と同程度であり、「エンレイ」よりやや短かった。主茎節数は「ゆめゆたか」、「スズユタカ」及び「エンレイ」とほぼ同程度であった。分枝数は「スズユタカ」よりやや多く、「ゆめゆたか」と同程度であった。子実収量は「ゆめゆたか」及び「スズユタカ」よりやや少なく、「エンレイ」より多かった。百粒重は「ゆめゆたか」及び「スズユタカ」並みで「エンレイ」より小さかった。紫斑粒の発生は「ゆめゆたか」、「スズユタカ」及び「エンレイ」より少なかった。褐斑粒はいずれの品種でも見られなかった。裂皮粒の発生は「ゆめゆたか」及び「スズユタカ」と同程度であり、「エンレイ」より多かった。外観品質は「ゆめゆたか」及び「スズユタカ」並みであった。裂莢性については「いちひめ」は

「スズユタカ」と同程度の裂莢性を示したことから、裂莢の難易は“中”と考えられた(表4)。

種子成分については、粗脂肪含有率は「スズユタカ」「ゆめゆたか」と同程度であったが、タンパク質含有量はやや低い傾向が見られた(表5)。この差はそれほど大きくなく、特性調査規準(農林水産先端技術振興センター2004)ではこれら品種と同じ「中」に区分される程度であるが、リポキシゲナーゼ欠失に伴いタンパク質含有量が減少した可能性も否定できない。主要な貯蔵タンパク質である7Sサブユニットについては7Sが減少しても11Sが補うことから総タンパク含有量は減少しないことが知られているが(高橋ら1994、水野ら1994)、酵素であるリポキシゲナーゼは代替するタンパク質が無い場合、リポキシゲナーゼの分のタンパク質が減少し、総タンパク含有量が減少した可能性がある。しかし、後でもふれるように、高タンパク質系統にリポキシゲナーゼ欠失を導入することにより、「いちひめ」よりタンパク含有量が高い系統を育成することは可能であり、もし全欠になることにより総タンパク含有量が多少減少するとしてもリポキシゲナーゼ欠失大豆の本質的な欠点とはならないと考えられる。

表4 「いちひめ」の裂莢性検定試験

品種名	年次	裂莢率(%)	判定	既往の評価
いちひめ	1991	50	中	中
	1995	49	中	
	平均	50	中	
スズユタカ	1991	54	中	
	1995	46	中	
	平均	50	中	
ゆめゆたか	1995	56	中	

表5 「いちひめ」の子実成分

品種名	タンパク質含有率(%)				脂肪含有率(%)			
	1991	1992	1995	平均	1991	1992	1995	平均
いちひめ	40.6	40.9	40.7	40.7	19.7	19.0	20.7	19.8
ゆめゆたか	42.8	41.2	42.4	42.1	18.9	18.3	20.5	19.2
スズユタカ	42.8	41.1	42.6	42.2	19.1	18.2	20.0	19.1
エンレイ	42.5	43.5	45.9	44.0	17.8	16.7	18.2	17.6

注1) 育成地における生産力検定試験(6月播種)の子実を分析。

注2) 粗タンパク含有率はケルダール法による分析値、N(%)×6.25で示す。

注3) 粗脂肪含有率は近赤外分光分析による。

表6 「いちひめ」の豆腐加工適性

品種名	年次	豆乳収量 (g)	豆乳固形分 (%)	豆乳比重 (g/ml)	豆腐の硬さ (g/cm ²)	豆腐の色調		
						Y	x	y
いちひめ	1991	254.6	10.11	1.020	81.1	74.85	0.3335	0.3476
	1992	254.3	9.64	1.019	90.0	76.41	0.3321	0.3430
	1995	260.6	10.06	1.024	101.3	77.90	0.3278	0.3411
	平均	256.5	9.94	1.021	90.8	76.39	0.3311	0.3439
ゆめゆたか	1991	256.4	10.05	1.023	81.2	74.76	0.3351	0.3488
	1992	252.4	9.71	1.021	88.7	76.59	0.3335	0.3479
	1995	265.5	9.82	1.022	106.0	78.00	0.3289	0.3426
	平均	258.1	9.86	1.022	92.0	76.45	0.3325	0.3464
スズユタカ	1991	256.0	10.28	1.024	85.4	76.09	0.3319	0.3442
	1992	255.3	9.84	1.020	105.5	77.77	0.3305	0.3433
	1995	258.1	10.32	1.025	110.0	78.87	0.3275	0.3404
	平均	256.5	10.15	1.023	100.3	77.58	0.3300	0.3426

注) 色調 Y(%) : 明るさ(数字が大きいほど明るい)、x : 赤色の鮮やかさ(数字が大きいほど赤色が濃い)、y : 黄色の鮮やかさ、冴え(数字が大きいほど黄色が濃い)。

表7 食葉性害虫及び莢実害虫に対する抵抗性

品種名	カメムシ類		サヤタマバエ		無害		葉の食害程度	
	1991	1992	1991	1992	1991	1992	1991	1992
いちひめ	8.2	14.3	39.7	30.1	47.1	44.4	微	微
ゆめゆたか	6.6	17.4	42.3	28.3	43.0	46.3	微	少
スズユタカ	6.8	15.7	42.2	33.9	45.0	42.3	微	微
エンレイ	18.3	26.2	48.4	20.0	27.8	43.8	微	微

注1) 1991年は7月18日播種、1992年は7月21日播種。
 2) 被害程度は全調査莢数に対する被害率(%)で表わした。
 3) 葉の食害程度は開花期の観察により無～甚の6段階評価を行なった。

表8 ホソヘリカメムシの飼育試験結果

雌雄	品種	供試数	羽化まで 日数	生体重 (mg)	乾物重 (mg)
♀	いちひめ	16	20.7a	91.5a	26.0a
	スズユタカ	14	21.9	86.3	24.1
♂	いちひめ	21	21.2	85.9	24.3
	スズユタカ	20	21.9	85.4	24.3

注) アルファベットは有意差(5%)があることを示す。

表9 ホソヘリカメムシの飼育試験結果(再試)

雌雄	品種	供試数	生体重 (mg)	乾物重 (mg)
♀	いちひめ	13	86.3	26.0
	スズユタカ	5	88.9	26.7
	エンレイ	5	92.8	28.9
♂	いちひめ	15	96.6	28.4
	スズユタカ	9	92.4	27.4
	エンレイ	10	94.4	27.7

注) いずれも5%水準で有意差はなかった。

「いちひめ」の豆腐加工適性を表6に示した。豆腐の硬さは「スズユタカ」よりやや軟らかいものの、「ゆめゆたか」と同程度であった。これは種子のタンパク質含有率がやや低かったためと考えられ、リポキシゲナーゼ欠失に伴うものではないと考えられた。

無防除圃場における食葉性害虫(ハスモンヨトウ等)及び莢実害虫(カメムシ類、サヤタマバエ等)に対する被害程度を調査した結果は表7のとおりとなった。「いちひめ」は食葉性害虫及び莢実害虫いずれに対しても「ゆめゆたか」、「スズユタカ」及び「エンレイ」と同程度の被害程度であった。

ホソヘリカメムシを用いた飼育試験では、

「いちひめ」「スズユタカ」とも供試したほぼすべての個体が羽化し、リポキシゲナーゼの欠失によると思われる異常個体は見られなかった。雄では「いちひめ」と「スズユタカ」の間に生育日数、生体重、乾物重とも有意差はなかったが、雌ではいずれにも5%水準で有意差が見られた(表8)。このため普通品種のエンレイを加えて再試験を行ったところ、調査ミスから生育日数のデータは得られなかったが、生体重、乾物重とも有意差は見られなかった(表9)。飼育条件等を総合的に勘案すると、リポキシゲナーゼの有無はホソヘリカメムシの成育に大きな影響を与えないものと考えられた。

以上の結果を総合すると「いちひめ」の生育

特性は両親の反復親の「スズユタカ」とほぼ同じで、種子リポキシゲナーゼをすべて欠失したことによる大きな障害は無いと考えられた。これは「ゆめゆたか」(L-2・L-3欠失)でも同様で、種子リポキシゲナーゼ特性は生育期間中の諸形質に大きな悪影響は与えないと判断される。このことから種子リポキシゲナーゼ完全欠失品種は普通大豆と変わらない栽培技術で一般栽培ができ、実用化に支障がないと考えられる。

3 戻し交配による新たなリポキシゲナーゼ欠失系統の育成と生育特性の調査

1) 材料と方法

戻し交配親には「タマホマレ」及び「フクユタカ」を用いた。交配及び交配後代の育成は温室で行い、戻し交配を2～4回行った後、圃場で九州農業試験場大豆育種研究室の定法に従って選抜を行った。

リポキシゲナーゼの有無の検定は主としてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)及びカロテン退色法(第三章参照)を用いた。

圃場調査は1995年及び1996年に九州農業試験

場で行い、「タマホマレ」戻し交配系統は6月播種、「フクユタカ」戻し交配系統は7月播種で調査を行った。生育特性調査及び収穫物調査は第2節に準じて行った。

2) 結果と考察

「タマホマレ」戻し交配系統は、「タマホマレ」を戻し交配親に戻し交配を3回行ってB₃F₅系統を育成し、「九州126号」の系統番号を付与して圃場調査を行った。「フクユタカ」戻し交配系統は全欠系統と「フクユタカ」を交配し、1回「フクユタカ」に戻し交配を行った後、「フクユタカ」の白目突然変異系統「むらゆたか」を1回交配して、臍色の改善を行い、「九州127号」の系統番号を付与して圃場調査を行った。

2年間の栽培試験の結果は表10に示す。2系統とも戻し交配親に近い生育特性を示し、リポキシゲナーゼの有無は「いちひめ」の結果と同じく農業特性に大きな影響を与えないものと考えられた。また子実成分は両系統ともタンパク質含有量が戻し交配親に比べてやや低く、脂質含有量がやや高かったが、豆乳収量・豆腐の硬さについては大きな差はなかった(表11)。

表10 「九州126号」及び「九州127号」の生育調査*

系統または 品種名	開 花 期 (月・日)	成 熟 期 (月・日)	主 茎 長 (cm)	主 茎 節 数	分 枝 数	倒 伏 程 度	立 枯 れ 病	ウ イ ル ス	全 重 (kg/a)	子 実 重 (kg/a)	対 標 比 (%)	百 粒 重 (g)	紫 斑	褐 斑	裂 皮	品 質
九州126号**	7.20	10.13	39	12.4	4.1	無	無	無	50.2	25.3	95	24.0	少	無	中	中中
タマホマレ	7.23	10.13	40	12.4	3.8	微	微	無	53.5	26.7	100	24.1	微	無	中	中中
アキシロメ	7.29	10.16	42	12.9	5.0	微	微	無	59.6	27.8	104	23.8	微	無	中	中中
九州127号**	8.19	10.27	59	14.3	3.7	少	少	無	64.1	32.7	93	28.5	少	無	少	中上
フクユタカ	8.19	10.28	59	14.2	4.2	少	少	無	70.8	37.1	100	29.8	微	無	少	中上

* 1995-1996年の平均。

** 「九州126号」は6月播種、「九州127号」は7月播種。

表11 「九州126号」及び「九州127号」の子実成分と豆腐加工適性*

系統または 品種名	タンパク質 含有率(%)	脂肪含有率 (%)	豆乳収量 (g)	豆腐の硬さ (g/cm ²)
九州126号**	38.3	23.3	263	107.5
タマホマレ	39.0	22.4	264	106.5
アキシロメ	42.0	20.3	—	—
九州127号**	42.5	20.6	267	139.5
フクユタカ	44.1	19.4	264	144.0

* 1995年だけのデータ。

** 「九州126号」は6月播種、「九州127号」は7月播種。

以上の結果から、リポキシゲナーゼ欠失特性は交配により他の品種に導入可能で、戻し交配法を併用することで農業特性も従来品種とほぼ同等のものが得られることが示された。また、これらの系統においても病虫害抵抗性が大きく劣っているとは認められず、種子リポキシゲナーゼが大豆の生育に大きな影響を与えないことが確認された。

4 リポキシゲナーゼ欠失大豆の官能評価試験

1) 材料と方法

(1) 供試材料

官能評価試験はブラジル農牧研究公社大豆研究センター (EMBRAPA) において実施した。供試材料にはEMBRAPAで2001/2002年度に収穫された「BRS213 (リポキシゲナーゼ完全欠失)」、 「BR36 (普通大豆)」の2品種を用いた。また流通過程での普通大豆の混入を想定して、「BRS213」に「BR36」を人工的に5%混入したサンプルを作り、加工試験に供試した。

(2) 官能評価に用いた加工食品

加工製品は、ブラジルでも比較的普及している大豆食品である豆乳、日系人の間ではよく食されるものの一般的にはあまり食されていない大豆食品である豆腐、及び新規食品のモデルとして牛乳の代用に豆乳を用いた豆乳デザートの3種を作成した。作成方法は以下の通りである。

a) 豆乳：1晩水に浸漬した大豆に吸水水分を含めて10倍量の水を加え、ミキサーで3分間粉碎したのち、手で搾り生豆乳を得た。これを湯煎で90℃・5分間加熱し、流水で冷まして得た。

b) 豆腐：豆腐は現地で普通に売られている堅めの木綿豆腐を作成した。a)で得られた豆乳を冷却前に0.3%のにがり (MgCl₂) を加えて、型に流し込み、1.3kgの重しを乗せて、80℃で1時間凝固させた後に型から取り出した。取り出した豆腐は分量の水で冷却するとともに余分なにがりを洗い流して官能評価試験に供試した。

c) 豆乳デザート (豆乳プリン)：a)で得られた豆乳500mlにoetker Produtos Alimenticos Ltda社製のデザート素材 (商品名：Dr. Oetker Pudium Baunilha) を1袋 (85g) を良く混和し、直火で加熱した。沸騰後さらに1分間弱火で煮た後、カップに小分けして冷却した。

(3) 官能評価試験

官能評価試験はEmbrapaの職員27人により行った。豆乳、豆腐、豆乳プリンの順に試食し、試験中は供試食品以外は水のみ摂取可能とした。食味評価は豆乳、豆乳プリンは青臭み、甘み、えぐみ、総合評価の4項目、豆腐はこれに硬さを加えた5項目の評価を行った。評価は絶対値で良い(5)～悪い(1)の5段階評価を行った。

表12 官能評価試験の評価点の平均

項目	品種	評価点の平均		
		豆乳	豆腐	豆乳プリン
青臭み	BRS213 (L ₀)	2.7	3.3a	4.3a
	BR36 (L ₁₂₃)	2.4	2.5b	2.8b
	BRS213+BR36	3.0	3.1ab	3.3b
ゲルの堅さ	BRS213 (L ₀)	—	4.0a	—
	BR36 (L ₁₂₃)	—	3.2b	—
	BRS213+BR36	—	3.5ab	—
甘み	BRS213 (L ₀)	2.7	3.2	4.2a
	BR36 (L ₁₂₃)	2.6	2.7	3.0b
	BRS213+BR36	3.0	2.8	3.6a
苦み	BRS213 (L ₀)	2.8	3.5	4.1a
	BR36 (L ₁₂₃)	3.1	2.9	3.0b
	BRS213+BR36	2.7	3.3	3.5ab
総合評価	BRS213 (L ₀)	3.1	3.7a	4.7a
	BR36 (L ₁₂₃)	2.9	3.0b	3.2b
	BRS213+BR36	3.1	3.3ab	3.6b

注) 同じ文字間で有意差無し (5%水準)。

2) 結果と考察

1名が評価表の記入を間違えたため、結果の検討は26名を対象に行った。また明らかに間違えて記入している場合は除外したので、結果の一部は回答数が少なくなった。

豆乳の青臭みについては「BR36」に比べて「BRS213」が良いと答えた人が多かったものの、苦みについては「BRS213」の方が良いとする人が多かった。総合評価では、「BRS213」の方が評価が高かったが、豆腐・プリンに比べてその差は小さくいずれも5%水準で有意な差にはならなかった(図4、表12)。青臭みの評価と苦みの評価が逆転していることから、青臭みでマスクされたサポニンなどの苦みがリポキシゲナーゼ欠失大豆では直に感じられるようになり評価を低下させた可能性がある。「BRS213」に「BR36」を5%混合した大豆は、「BRS213」と同程度の評価であったが、青臭みがないことを評価する人が多く、苦みを感じる人が多いなど、普通大豆よりはむしろリポキシゲナーゼ完全欠失大豆に近い評価が得られたためと考えられる。

豆腐については、木綿豆腐の堅さを一定にすることが困難であったため、堅さの差が評価にも多少影響した可能性がある(図5)。青臭みについては「BRS213」を評価する人が豆乳よりも多く、「BR36」に対しては有意な差が見られた。また苦みについては豆乳と評価が逆転し、「BRS213」の評価が「BR36」よりもやや高くなった(表12)。これは木綿豆腐にしたことにより、苦み成分が余分な水分とともに外へ排出されたか、もしくはタンパク質ゲルに取り込まれて感じ難くなった可能性がある。

豆乳プリンでは「BRS213」の青臭みが豆乳・豆腐に比べて「良い」とする人の割合が明らかに多かった(図6、表12)。またプリン自体の甘みが濃いためあって、甘みはすべての大豆で比較的高い評価であった(図6)が、「BRS213」の評価が特に高くなった。また総合評価では「BR36」及び「BR36」を5%混入した区は有意に「BRS213」単独のものより評価が低かった。

これらの結果を総合すると、豆乳では苦みの

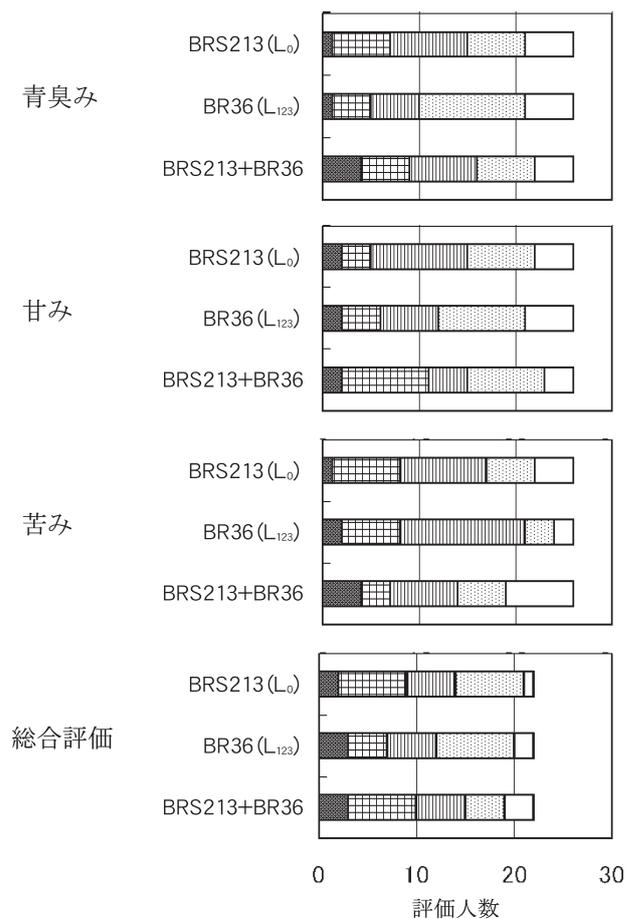


図4 豆乳の官能評価結果

良い 5 4 3 2 1 悪い

問題もあり、リポキシゲナーゼ完全欠失大豆と普通大豆の評価の差は小さいが、嗜好品であるデザート類では青臭みの評価がそのまま食味評価になり、リポキシゲナーゼ完全欠失大豆の優位性が発揮されたと考えられる。このことからリポキシゲナーゼ完全大豆は新たな大豆食品の開発のための素材となりうるということが明らかとなった。また普通大豆を混入した大豆は、豆乳では差は目立たないがデザート類では大きな差が見られたことから、用途によってはリポキシゲナーゼ完全欠失大豆の純度維持により厳密な管理が必要であることが示唆された。

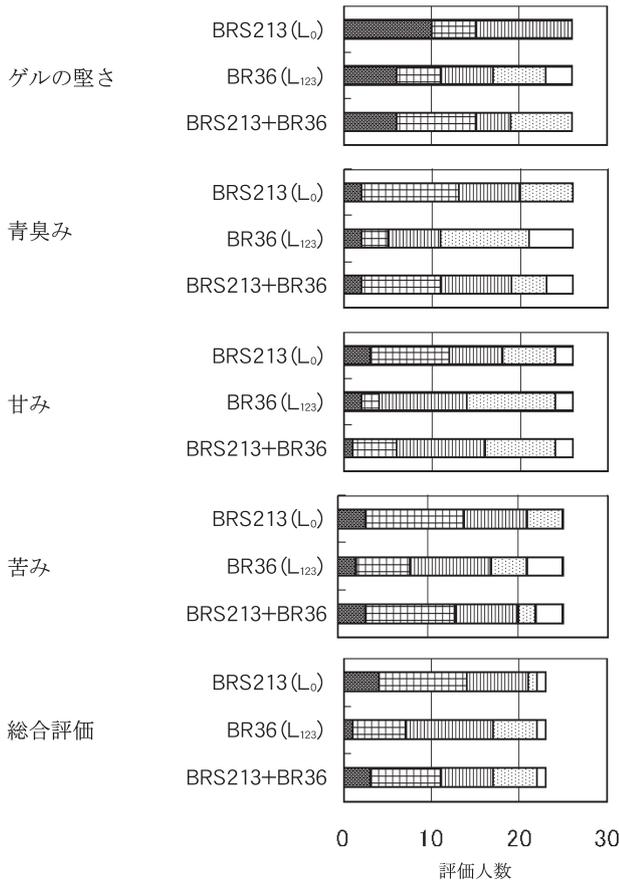


図5 豆腐の官能評価結果

良い 5 4 3 2 1 悪い

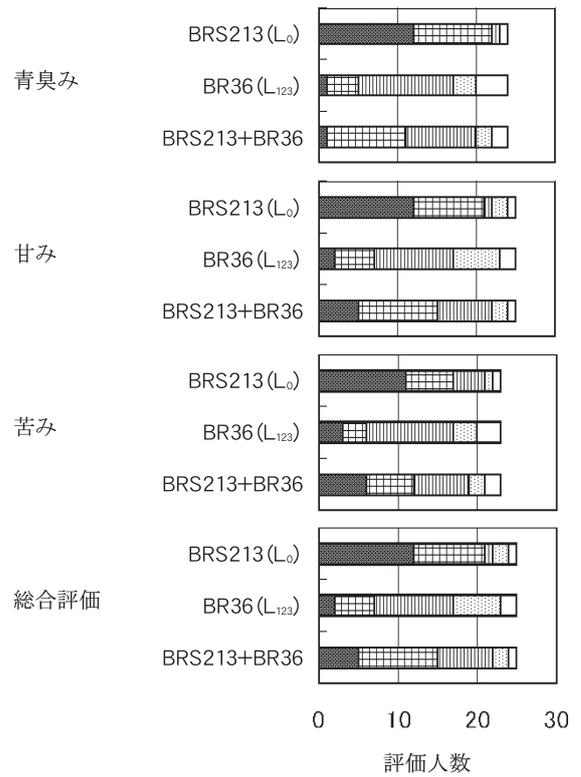


図6 豆乳プリンの官能評価結果

良い 5 4 3 2 1 悪い

5 考察

リポキシゲナーゼ欠失大豆の作出と品種化は、種子リポキシゲナーゼが種子中で果たす役割についての新たな疑問を提起した。リポキシゲナーゼ自体は多くの植物や動物でも見られるありふれた酵素の一つであるが、体内での働きはそれぞれ異なり、すべてが解明されているわけではない (Mack *et al.* 1987)。

リポキシゲナーゼの生体内での役割としては、耐病性、障害耐性などに関与することが報告されている (Bi *et al.* 1994, Hildebrand *et al.* 1989, Vaughn and Gardner 1994)。特に葉中のリポキシゲナーゼの役割についての報告は多い。

種子中のリポキシゲナーゼの役割について

は、種子の耐虫性に関与 (Shukle and Mardock 1983)、種子の老化制御に関与 (Harman and Mattick 1976)、種子の発芽制御に関与 (Holman 1948, Vernooy-Gerristsem *et al.* 1983) などの報告がなされている。

しかしながらリポキシゲナーゼ完全欠失品種は今のところ普通品種との決定的な違いは見いだせておらず、これまでに推測された役割だけでは十分な説明がつかない。リポキシゲナーゼは大豆の葉中にも存在することが知られ (Grayburn *et al.* 1991)、大豆種子リポキシゲナーゼ完全欠失系統でも発芽の過程で別のリポキシゲナーゼが発現してくることが知られている (菊池ら 1989, Kato *et al.* 1992)。このため栽培期間中における普通品種とリポキシゲナーゼ完全欠失系統の違いは種子へのリポキシゲナーゼ蓄積過程で見られると考え、莢実害虫への耐

虫性の低下を特に詳細に調査したが、欠失による影響は品種間差異を超えるものではなかった。

リポキシゲナーゼ完全欠失品種は、「いちひめ」以外にも「エルスター」「すずさやか」などが育成され、約600haの実用栽培が見られるが、病虫害の多発などの問題は報告されていない。またリポキシゲナーゼ完全欠失大豆は海外でも交配母本に用いられ多くの品種が育成されている (Fehr 2000、Kim *et al.* 2000、Fu *et al.* 2000) が、これまでのところ部分欠失大豆を含め、大きな栽培上の障害は報告されていない (Hildebrand and Hymowitz 1983、Davies and Nielsen 1987、Pfeiffer *et al.* 1992、Narvel *et al.* 1998、Reinprecht *et al.* 2006)。

これらのことを合わせると、種子リポキシゲナーゼは何らかの防御機構としての働きを持っているものの、大豆が持つ多くの防御物質の一つに過ぎず、リポキシゲナーゼの欠失は他の防御機構によりある程度カバーされてしまうため、リポキシゲナーゼ完全欠失品種と普通品種の差異が目立たなくなっていると考えられる。Mohri *et al.* (1990) はリポキシゲナーゼ部分欠失大豆を用いて大豆害虫に対する効果を調査したが、リポキシゲナーゼの欠失は既存の大豆害虫については大きな効果はないものの、やや選好性が増すことを報告している。このことはリポキシゲナーゼ単独の欠失だけでは防御機構の完全な崩壊にはならず、その影響は限定されるが、他の抵抗性機構の欠如と組み合わせた場合には完全欠失の悪影響が表面化する可能性を示唆するものと考えられる。

すなわちリポキシゲナーゼ完全欠失とともにトリプシンインヒビター、レクチン等の他の成分を欠失した系統では、病虫害に極端に感受性になってしまう可能性がある。今後タンパク質の欠失変異等を蓄積した品種を育成していくためには、単独成分での病虫害抵抗性の低下だけでなく、成分の相互作用を含めた詳細な生理機構の解明が必要と考えられる。

大豆の食品としての利用は、消費者の健康志向もあって、最近でこそ多くの国に広まっているが、日常的に食されているのは依然として東

アジアなど一部の地域に限られる。大豆が一般家庭では加工しにくい食材であること、各地域の伝統的な食生活の中の位置づけが確立していないことなども原因の一つと考えられるが、大豆が青臭みをはじめとする多くの不快味成分を含んでいることが最大の原因であろう (渡辺ら 1971)。特に大豆独特の豆乳臭、豆腐臭は大豆を美味しく食べるための大きな問題点となっている (佐々木・千葉 1983、喜多村 1991)。

今回リポキシゲナーゼ完全欠失大豆を作出したことにより、豆腐臭の発生は遺伝的に抑えることができるようになった。しかし、リポキシゲナーゼ完全欠失品種を用いた多くの官能評価試験からは、青臭みだけが大豆食品の問題点ではないことが明らかになりつつある。第4節で行った官能評価試験では青臭みの評価が直接総合評価につながっていないことが示されたが、苦みはその原因の一つと考えられる。現場における豆乳加工の工程ではリポキシゲナーゼの失活だけではなく脱皮・脱胚軸を行うことが行われているが、青臭みにより押さえられていた不快味を押さえるために胚軸に含まれるサポニン除去することがその目的である。また最近育成されたりポキシゲナーゼ・サポニン同時欠失品種「きぬさやか」はリポキシゲナーゼ欠失だけの品種よりも風味に優れていることが報告されている (湯本ら 2005)。今後はリポキシゲナーゼ特性を最大限生かすために、リポキシゲナーゼ欠失と不快味成分の除去を組合せた品種育成が育種目標の一つとなると考えられる。

風味の改善以外では、リポキシゲナーゼが大豆の加工工程中にSH基を酸化しゲル強度を低下 (Obata and Matsuura 1993) させたり、過酸化脂質生成に伴いビタミンE等の抗酸化物質を低減 (Nishiba and Suda 1998)、豆乳の色調を変化 (小幡・松浦 1997) 等の作用が報告されている。また大豆は油脂作物としても重要であるが、リポキシゲナーゼの欠失はその品質に影響を与えないことが報告されている (King *et al.* 1998)。今後はこれら風味の改善以外の利用技術の研究も進めていく必要がある。

一方リポキシゲナーゼ欠失品種育成の際に問

題点として浮上してきたのはリポキシゲナーゼ欠失大豆への普通品種の混入である。混入の原因としては①自然交配、②不注意による機械的混入がある。自然交配による混入防止のためには採種圃場の普通大豆からの隔離、不注意による混入防止には収穫機、乾燥機などの厳密な区分等が有効であると考えられるが、育種現場でも完全な防止は困難な現状では、生産現場での

完全防止は困難であろう。今後は現場での簡易な判別手法の開発とともに、白花化や黒大豆へのリポキシゲナーゼ欠失特性の導入など、混入時に普通品種と簡単に区別できるような形質マーカーの導入が必要となろう。また普通大豆の混入の許容水準は用途により異なることから、混入が生じた場合には、程度に応じて用途の変更も考慮する必要がある。

Ⅲ リポキシゲナーゼ欠失特性の遺伝様式の解明と選抜法の開発

リポキシゲナーゼの遺伝様式については、各欠失変異がそれぞれ独立の1遺伝子支配であることが報告されている (Hildebrand and Hymowitz 1982, Kitamura *et al.* 1983, Kitamura *et al.* 1985)。またこのうちL-1とL-3、L-2とL-3が独立に遺伝することも知られている (Kitamura *et al.* 1985)。L-1とL-2については交配育種によりL-1・L-2同時欠失が得られないことから (菊池・喜多村 1985, Carbone *et al.* 1998)、強連鎖の関係にあるものと推測されているが、連鎖を打破した系統が得られなかったことから最終的な結論は出ていない。

そこで、第1節では第Ⅱ章で作出した完全欠失系統の遺伝的背景を明らかにするとともに、これまでに推定されていたL-1とL-2間の強連鎖の存在を確認することを目的として、リポキシゲナーゼ完全欠失系統を用いた遺伝実験を行った (Hajika *et al.* 1992)。

一方、リポキシゲナーゼ欠失大豆の実用化のためにはより農業特性に優れた品種の育成が不可欠であるが、この際には多くの個体を選抜する簡便な選抜手法が必要となっている。これまでリポキシゲナーゼ欠失系統の選抜のためには主として電気泳動法 (SDS-PAGE)、リノール酸を基質とした酵素活性測定法、免疫学的手法などが用いられていたが (Hildebrand and Hymowitz 1981, Yabuuchi *et al.* 1982, Kitamura 1984, Wang *et al.* 1990, Hammond *et al.* 1992, Hildebrand *et al.* 1991)、いずれも時間

や手間がかかる、特殊な測定器械が必要等の問題点がある。またKikuchi and Kitamura (1987) は β -カロテンの退色能の違いを利用してL-1、L-2、L-3の判別法を開発したが、分光光度計での測定や数種類の基質溶液の作製など手間がかかり実用的ではない。このため多くの種子をより効率的に選抜する手法の開発を目的に、第2節ではKikuchi and Kitamura (1987)の手法を改良して、 β -カロテン退色法が完全欠失系統の選抜に利用可能か検討した。

さらにこれらのリポキシゲナーゼ酵素または酵素活性を分析する手法では、いずれのリポキシゲナーゼ欠失遺伝子も劣性遺伝であるため、交配当代のような遺伝的にヘテロの個体の判別は不可能である。このためリポキシゲナーゼの有無による選抜を行う場合にはホモ個体が得られる次世代以降の育成が不可欠であり、多数のホモ個体が得られる世代の進んだ集団での選抜には有効であるが、連続戻し交配には不向きである。

リポキシゲナーゼ完全欠失系統作出のために交配当代を用いた連続戻し交配を行うためには、遺伝子型がヘテロの個体を区別することが必要である。近年研究が進展しているDNAマーカーは表現型によらず遺伝子を直接識別に用いることから、遺伝子の有無を判別するために有用な手法であり、第3節以降ではDNAによる判別を利用した検定法を検討した。

Wang *et al.* (1994) はL-2の構造遺伝子につ

いて欠失系統と野生系統を用いてDNAレベルで比較・解析し、欠失系統が1596番塩基チミン(t)がアデニン(a)に置換することによってmRNAは生成されるものの、できたタンパク質が代謝されて蓄積されないためにL-2欠失となっていることを報告している。また、Wang *et al.* (1995) はL-3についても検討し、プロモーター部分に欠失系統と野生系統の間に3つの一塩基多型(SNPs)が存在することを明らかにしている。-636番目の塩基シトシン(c)がチミン(t)に、-575番目のチミン(t)がアデニン(a)に、-387番目の塩基シトシン(c)がチミン(t)にそれぞれ置換することにより、プロモーター活性を抑制することを証明した。第3節ではこのDNAレベルでの変異を利用してDNAマーカーを作製して新たなリポキシゲナーゼの判別法を開発した。

またL-2の変異箇所である1596番塩基付近は野生型でcatg、欠失型でcaagであり、この部分はNlaⅢの制限酵素サイトとなっており、野生型のDNA断片はNlaⅢで切断されるが、欠失型では切断されない。L-3についてはプロモーター領域である-636番塩基周辺の配列は欠失型ではaatatt、野生型はaactであり、6塩基認識の制限酵素SspⅠの制限酵素サイトとなっており、欠失型のDNA断片はSspⅠで切断されるが、野生型は切断されない。第4節ではこれらの制限酵素サイトを利用してこの前後にマーカーを作成して、適当な長さのDNA断片を増幅し、制限酵素処理を行うことにより、欠失型と野生型を1回の処理で判別することのできる選抜法を検討した。

1 リポキシゲナーゼ完全欠失系統の遺伝的背景の解明

1) 材料と方法

交配材料には第1節で得られたリポキシゲナーゼ完全欠失系統の一部の種子を用いた。普通大豆としては九州農業試験場で採種された「スズユタカ」及び「Bragg」、またL-3欠失系統として、農業研究センターより分譲を受けた「スズ

ユタカ」×「早生夏」の戻し交配系統(BC₄F₆)を用いた。交配は「スズユタカ×完全欠失系統」、「Bragg×完全欠失系統」、「L-3欠失系統×完全欠失系統」の3組合せを行った。交配は網室で行い、得られた種子は温室内で世代促進を行ってF₂種子を得た。

F₂種子の分析はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE: 第Ⅱ章参照)を用いた。

表13 普通品種とリポキシゲナーゼ完全欠失系統との交配後代F₂の分離比

表現型			種子数	χ ² 値 (9:3:3:1)
L-1	L-2	L-3		
スズユタカ×全欠失系統				
+	+	+	74 (83.25)	1.028
+	+	-	36 (27.75)	2.435
-	-	+	29 (27.75)	0.056
-	-	-	9 (9.25)	0.007
合計			148	3.54 (P>0.2)
Bragg×全欠失系統				
+	+	+	287 (290.81)	0.050
+	+	-	95 (96.94)	0.039
-	-	+	98 (96.94)	0.012
-	-	-	37 (32.31)	0.681
合計			517	0.78 (P>0.8)

注) ()内は9:3:3:1に分離すると仮定したときの期待値。

表14 L-3欠失系統と完全欠失系統の交配後代F₂の分離

表現型			種子数	χ ² 値 (3:1)
L-1	L-2	L-3		
+	+	-	830 (849)	0.425
-	-	-	302 (283)	1.276
合計			1132	1.70 (P>0.5)

注) ()内は3:1に分離すると仮定したときの期待値。

2) 結果と考察

野生型大豆と完全欠失大豆の交配からはいずれの組合せからも野生型、L-3欠失、L-1・L-2欠失、完全欠失の4タイプのみ分離し、その分離はそれぞれ74:36:29:9と287:95:98:37となった(表13)。この分離比はL-1とL-2の間に強連鎖が存在すると仮定して得られる分離比9:3:3:1にいずれもよく合致した。

L-3欠失系統と完全欠失系統の組合せからはL-3欠失と完全欠失の2タイプのみ得られ、その分離は830:302であった(表14)。この分離比も野生型と同じくL-1とL-2の間に強連鎖が存在すると仮定して得られる分離比3:1によく合致した。

すべての組合せでL-1とL-2の間に組み換えが起こらなかったことから、計算上の組み換え価は0%で、L-1とL-2の間には強連鎖が存在することが確認された。

本節の結果から、これまでL-1・L-3欠失×L-2・L-3欠失の交配では完全欠失が得られなかったのが、生理異常による致死のためではなく、単なるL-1とL-2間の強連鎖であったことが示されるとともに、得られた完全欠失系統が致死からの回復遺伝子等の要因ではないことも確認できた。

さらにこの交配で初めてL-1・L-2欠失系統も得られ、この系統も異常なく生育したことから種子リポキシゲナーゼの有無は大豆の生育に大きな影響を与えないことが示唆された。これでこれまでに得られている部分欠失系統や完全欠失系統を交配することにより、種子リポキシゲナーゼはすべてのタイプの欠失系統を育成することが可能となった。このことは種子リポキシゲナーゼの新たな利用方法の開発だけでなく、その役割の解明研究にも役立つものと考えられる。

一方、L-1とL-2の間に組み換えが起こらなかったことは、L-1遺伝子とL-2遺伝子がかなり近傍に位置することを示唆する。また今回の結果からは完全欠失系統の作出が突然変異によるものか交叉によるものかの推定ができない。今後完全欠失系統と「スズユタカ」及び「ゆめゆたか」のL-1遺伝子の比較等を行う必要がある。

L-1とL-2間の強連鎖はL-1かL-2のどちらかを検定することにより、これらリポキシゲナーゼの有無を確認できることから、完全欠失系統を育成する上で非常に有利な形質である。実用品種育成の場では無選抜で世代を進めても約25%の確率で完全欠失系統を得ることができる上に、戻し交配の際にはF₂世代で1/16 (6.3%) の確率で完全欠失系統を得ることができる。このことは独立の3遺伝子による戻し交配より格段に育種が容易であることを示している。また次節以降のリポキシゲナーゼ欠失系統選抜法の開発ではL-1・L-2間の強連鎖の存在により、普通品種とリポキシゲナーゼ完全欠失品種の交配後代で

は、L-3の選抜とL-1またはL-2の選抜で全欠失系統を選抜することができることを示している。

2 カロテン退色反応を用いたリポキシゲナーゼ完全欠失系統選抜法

1) 材料と方法

(1) 供試材料

リポキシゲナーゼによるβ-カロテンの退色程度の違いを確認するための試験用として、「いちひめ (L₀: 下付の数字はリポキシゲナーゼのうち残存しているものを示す。以下同じ)」、「ゆめゆたか (L₁)」、「関東102号 (L₂)」、「九州119号 (L₃)」、「スズユタカ (L₁₂₃)」及び、これらの親系統から「L-2欠失系統 (L₁₃)」及び「L-1欠失系統 (L₂₃)」を用いた。また、実際の育種への適用試験には、育成中の「エンレイ (L₁₂₃) × エンレイ B₃F₂ (L₀)」、「タマホマレ (L₁₂₃) × タマホマレ B₃F₂ (L₀)」等12組合せの戻し交配系統のF₂種子を用いた。

(2) 試薬

β-カロテンはシグマ社製のβ-Carotene Type I approx 95%を用いた。リノール酸等のその他の試薬は和光純薬工業㈱製を用いた。また、L-2酵素抽出液及びL-3酵素抽出液の調製にはそれぞれ「関東102号 (L₂)」及び「九州119号 (L₃)」の種子粉末を用いた。

a) 基質溶液の調製

リノール酸 (140mg)、Tween20 (140mg) を試験管に量り取り、脱気水を添加してピペットで静かに混和した。溶液が白濁後、1N水酸化ナトリウム溶液550mlを加え、溶液が十分に透明になったことを確認した上で、脱気水で50mlにメスアップした。溶液が十分に透明にならないときは、さらに数滴の1N水酸化ナトリウム溶液を加えた。基質液は氷冷して保存し、半日以内に使用した。

b) 色素液の作製

β-カロテン20mgにアセトン20mlを加え、攪拌後3000rpm、5分間遠心分離して上澄みをβ-カロテン液とした。β-カロテ

ン液は冷暗所で保管し、その日のうちに使用した。

c) 検出液の作製

リン酸バッファー (pH6.6) 25ml、 β -カロテン溶液 5 ml、リノール酸液 5 mlを静かに混和し、検出液を調製した。検出液は使用直前に混合して作製した。

d) 補助酵素液の作製

L-2溶液は「関東102号」の種子粉200mgに蒸留水10mlを加え静かに攪拌後、3000 rpm、5分間遠心分離して上澄みを用いた。L-3溶液は同様に「九州119号」の種子粉200mgに蒸留水10mlを加えて遠心分離して得た。補助酵素液は使用直前に作製した。

e) 補助酵素液による β -カロテン退色程度の確認

L-2溶液及びL-3溶液を試験管に25 μ l、50 μ l、75 μ l、100 μ l、150 μ l、200 μ lずつ分注し、軽く混和後、検出液1mlを加えて静かに攪拌した。3分後及び10分後にブランクと退色程度を比較した。

(3) β -カロテン退色反応

a) Test I (L-3の有無の検定)

試験管に供試大豆粉10mgを入れ、L-2溶液 50 μ lを加えた後、検出液 1 mlを加えて静かに攪拌した。5分後脱色の程度をブランクと比較して判定した。

b) Test II (L-2の有無の検定)

Test IのL-2溶液の代わりにL-3溶液を加えて同様の試験を行い、5分後脱色の程度をブランクと比較して判定した。

c) β -カロテン退色反応による選抜結果の確認

Test I及びTest IIで選抜した育成系統についてはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(第II章参照)でリポキシゲナーゼの有無を確認した。

2) 結果と考察

L-2溶液とL-3溶液の混合液の β -カロテン退色程度を図7に示した。加える酵素量が多いと脱色が速やかに進行したが、混合量が極端に少ない限り、ブランクと判別が可能であった。

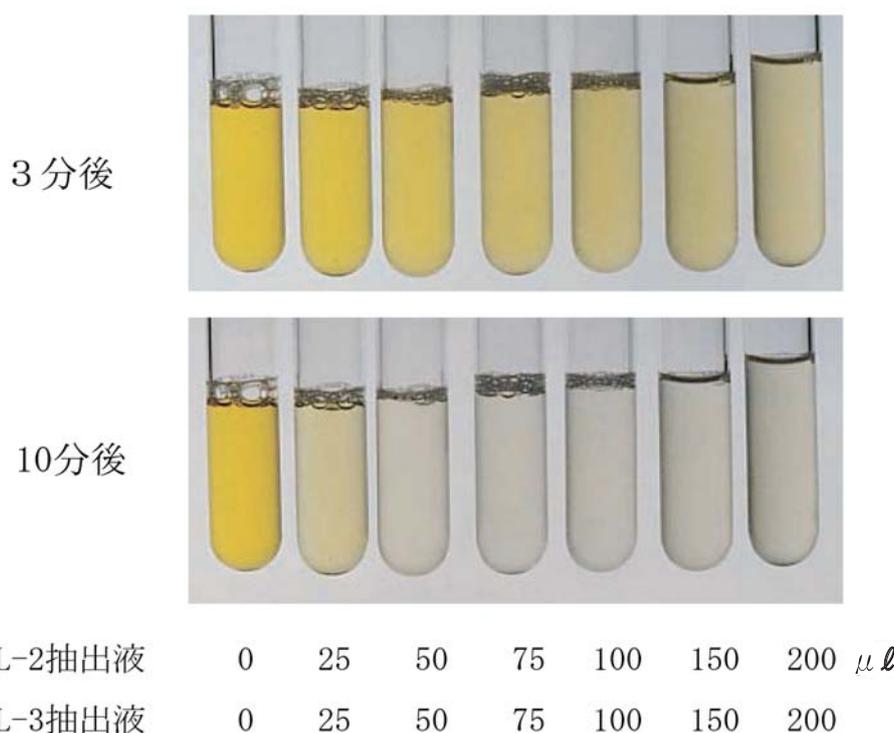


図7 L-2及びL-3の共存下の β -カロテン退色程度

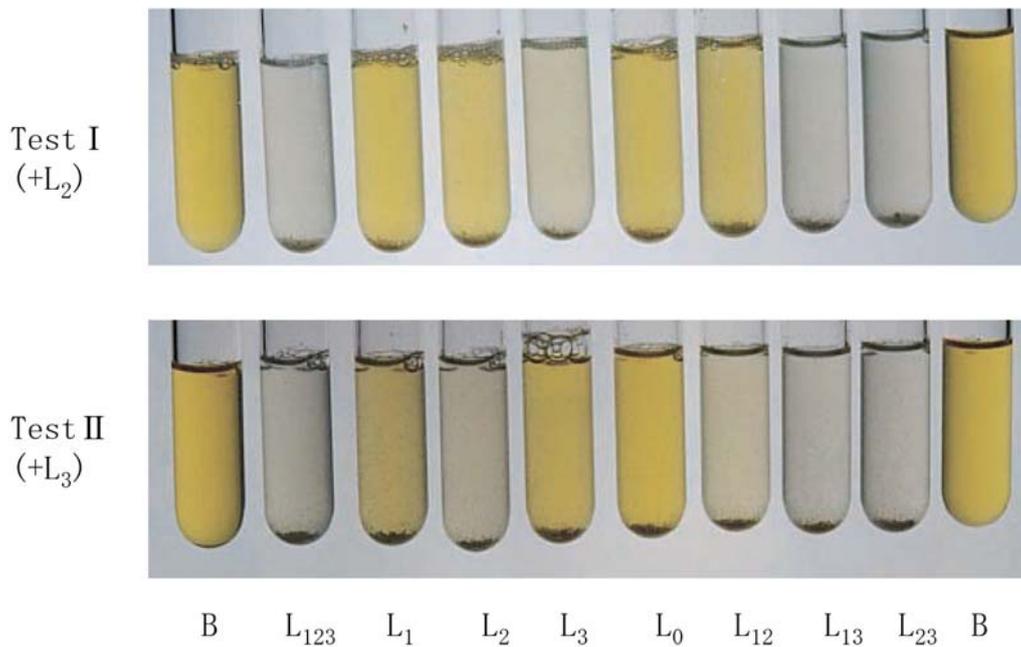


図8 リポキシゲナーゼの有無による β -カロテンの退色程度の違い

Test I 及びTest II に対する各欠失系統の β -カロテン退色程度は図8に示した。Test I (L-2存在下)ではL-3を持つ系統で β -カロテンの退色が生じ、Test II (L-3存在下)ではL-2を持つ系統で β -カロテンの退色が起こった。両方のTestで退色が生じなかったのはいちひめ(L₀)及びゆめゆたか(L₁)のみであった。

L-1はpHが9.0付近で活性が高く、今回の試験のようなpH6.5付近ではほとんど活性を持たないことから、 β -カロテン退色反応だけではL₀とL₁を区別できない。しかし、第1節の遺伝解析の結果から、L-1とL-2の間に強連鎖が存在し、普通大豆(L₁₂₃)と完全欠失系統(L₀)の交配後代からは、完全欠失、L-3欠失、L-1・L-2欠失、野生型の4つの表現型しか出現しないことが明らかになっているので、L-2を検定することで普通品種との交配後代から完全欠失系統を選抜することは可能と考えられる。

表15には実際の品種育成に β -カロテン退色反応による検定法を応用した結果を示した。全11組合せで、3,544粒を検定した結果、225粒が全欠と判定された。これをSDS-PAGEで確認したところ、「むらゆたか(L₁₂₃)×むらゆたかB₂F₂(L₀)」で3粒の判定ミスが見つかり、この組合

せでは15.8%の誤判定率となったが、その他の組合せでは誤判定はなく、全体では誤判定率は1.3%であった。誤判定した3粒はいずれも、同一ロットの試験で、SDS-PAGEの結果からL-3欠失(L₁₂)と判定された。また全体に対する完全欠失の比は6.3%で理論値6.25%に極めて近い値であったことから、表現型が完全欠失でありながら選抜から漏れた種子数はそれほど多くないものと考えられた。なお、1日当たりの検定数は500粒以上で、SDS-PAGEの2~3倍の処理が可能であった。このことから β -カロテン退色反応を用いた選抜法は品種育成に有効と考えられた。

誤判定の原因については同時に試験したロットから生じたものであったので、L-3抽出液の活性低下ではないかと推定された。このことから本検定法をより精度良く活用するためには酵素液の抽出・管理に十分注意する必要があると考えられた。また、 β -カロテン自体も自然酸化による退色が生じやすく、検定溶液は使用前にその都度作製する必要があった。

表15 β -カロテン退色法を用いた戻し交雑系統の選抜結果と誤判定率

供試系統	供試数	Test I による 選抜数	Test II による 選抜数	SDS-PAGE による 全欠判定	誤判定率 (%)
スズユタカ (L ₁₂₃) × 九州111号 (L ₀)	200	37	7	7	0.0
タマホマレ (L ₁₂₃) × タマホマレB ₃ F ₂ (L ₀)	200	55	16	16	0.0
むらゆたか (L ₁₂₃) × むらゆたかB ₃ F ₂ (L ₀)	120	26	10	10	0.0
むらゆたか (L ₁₂₃) × むらゆたかB ₃ F ₂ (L ₀)	594	137	43	43	0.0
むらゆたか (L ₁₂₃) × むらゆたかB ₃ F ₂ (L ₀)	210	53	19	16	15.8
納豆小粒 (L ₁₂₃) × 納豆小粒B ₃ F ₂ (L ₀)	140	37	11	11	0.0
エンレイ (L ₁₂₃) × エンレイB ₃ F ₂ (L ₀)	480	139	41	41	0.0
Bragg (L ₁₂₃) × BraggB ₃ F ₂ (L ₀)	220	60	15	15	0.0
群馬青大豆 (L ₁₂₃) × 群馬青大豆B ₃ F ₂ (L ₀)	420	91	19	19	0.0
こうじしらず (L ₁₂₃) × こうじしらずB ₃ F ₂ (L ₀)	200	48	11	11	0.0
コガネダイズ (L ₁₂₃) × コガネダイズB ₃ F ₂ (L ₀)	600	107	30	30	0.0
ヒゴムスメ (L ₁₂₃) × ヒゴムスメB ₃ F ₂ (L ₀)	160	32	6	6	0.0
合計	3544	822 (23.2)	228 (6.4)	225 (6.3)	1.3

注) () 内は供試数に対する割合。

3 DNAマーカーを用いた選抜手法の開発

1) 供試材料と方法

(1) 供試品種・系統

「いちひめ」「エルスター」(完全欠失: L₀)、「ゆめゆたか」(L-2・L-3欠失: L₁)、「関東102号」(L-1・L-3欠失: L₂)、九州119号 (L-1・L-2欠失: L₃)、「スズユタカ」「フクユタカ」「タマホマレ」「タチナガハ」(野生型: L₁₂₃)を用いた。

(2) 全DNA抽出

DNAの抽出は圃場で育成した播種後4週間程度の個体の展開直後の葉から行った。生葉100mgをチューブにジルコニアビーズとともに入れて、液体窒素存在下で振とう装置で磨砕した。全DNAの抽出はAutomatic DNA Isolation System、PI50 α (倉敷紡績株式会社製)で行い、自動抽出後、100 μ lのTEバッファーに懸濁してDNAの抽出を確認後、TEで60倍に希釈して用いた。

また簡易抽出法として、森ら(2003)の開発した葉からの簡易抽出法を改変して用いた。展開前の小葉片(約1 cm²)を120mm × 85 × 0.04mmのチャック付きポリエチレン袋に採取し、500 μ lのEB (100mM Tris-HCl buffer pH8.0、50mM EDTA pH8.0、500mM NaCl、1.25% SDS及び0.2% 2-mercaptoethanol)を加え、机の上で鉛筆を数回転がすことによりすり潰した。磨砕液100 μ lをエッペンチューブにとり、32 μ l

のPA (5M Potassium acetate)を加えて混和し、遠心後に上澄みを別のチューブに採取した。これに冷イソプロピルアルコール500 μ l加えて10,000gで5分間遠心後、沈殿にエタノール500 μ lを加えて混和後再度10,000g 5分間遠心した。得られた沈殿を乾燥後に50 μ lのTEに溶解してDNAの抽出を確認後、TEで50倍に希釈して用いた。

(3) プライマーの設計

プライマーの合成は北海道システム・サイエンス株に依頼して行い(ゲル濾過精製)、TEで3n mol/mlに調製して使用した。

L-2欠失検出用のプライマーには、1596番目の塩基及び1~2塩基離れた塩基を変えたプライマーとNCBIホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から検索したL-2配列を参考に作成したプライマーを作成した。

L-3検出用のプライマーには、Wang *et al.* (1995)が報告したL-3配列を利用して-636番目、-575番目、-387番目の塩基の違いを利用したプライマーを作成した(図9)。

(4) PCR反応

反応液に用いたTaqポリメラーゼ、dNTPmix、10 × TaqバッファーはTaKaRaバイオ株社製のExTaq及び付属のものを用いた。反応液は表16に示した組成で、合計20 μ lの系で行った。

サーマルサイクラーはApplied BiosystemsのGene Amp PCR System 9700を用い、PCR反応は図10の条件で行った。アニーリング温度はL-2識別マーカーでは56~60°C、L-3識別マーカー

では50~54℃で行った。

(5) ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動

ポリアクリルアミドゲルは17.5mlの蒸留水、2.5mlの10×TBE、5mlの40%ポリアクリルアミド溶液を混合し、75μlのAPS、12.5μlのTEMEDを加えて16cm×16cmの泳動用ガラスプレートに流し込み、20または26サンプル用のサンプルコームを上部に差し込んで30分程度室温で放置して0.8%ゲルを作成した。

泳動用サンプルにはPCR産物5μlにRodingバッファー1μlを加え、よく混合したものを

用いた。また分子量マーカーとして、Takaraバイオ株のφX174 Hae III digestを同時に泳動し、増幅されたDNA断片のサイズを調べた。

電気泳動は日本エイドー株の電気泳動装置を用い、1×TBEをバッファーとして、ゲルプレートを固定した。パワーサプライはBIORADのPower pac 2000を用い、150Vの定電圧で2時間泳動後、エチレンブロマイド溶液で染色、BIORAD社のGel Doc 2000でバンドの有無を確認した。

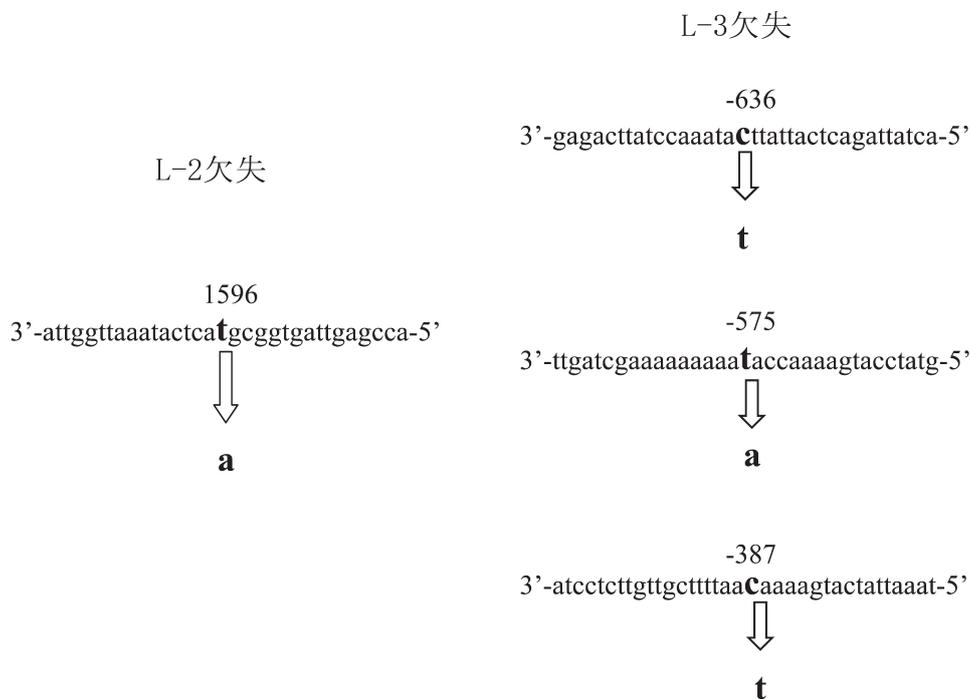


図9 リポキシゲナーゼ欠失系統の変異部分

Wang *et al.* (1994, 1995) より作成

表16 PCR反応液の組成

反応液	容量(μl)
蒸留水	8.9
10×ExTaqバッファー	2.0
2.5mMdNTPmix	1.0
ExTaq (5U/UL)	0.5
プライマー	3.0
ゲノムDNA	5.0
合計	20.0

注) バッファー等は試薬に添付のもの。

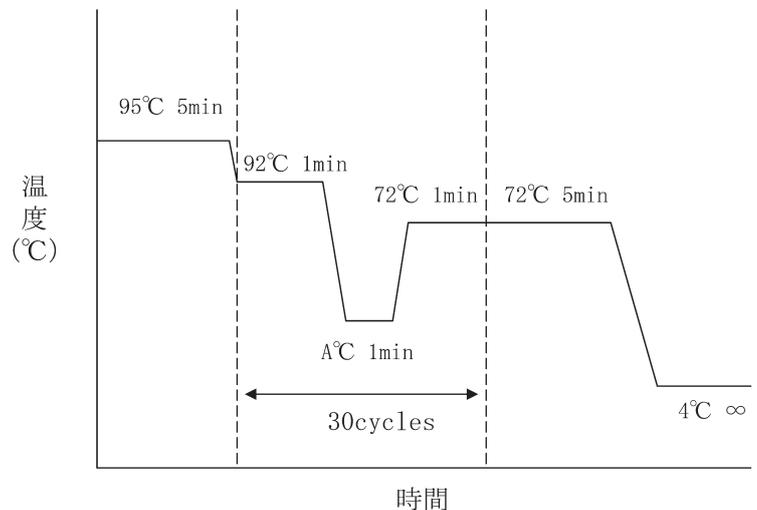


図10 基本的なPCR条件

Aはアニーリング温度を示し、L-2検出マーカーでは56~58℃、L-3検出マーカーでは50~52℃。

2) 結果と考察

L-2欠失用のプライマーとしてgagccattggttaaa tactcaa/gctcccttagatagagatgcを用い、アニーリング温度を56~58℃に設定したPCRが比較的ミスアニーリングが起きにくかった(表17、図11)が、多くの組合せで野生型でもミスアニーリングが起きやすく、このままでは利用はできないと考えられた。これは変異部分が1塩基のみであるため、ミスマッチが生じやすいことが原因と考えられる。

一方、L-2保有(野生型)用のプライマーはL-2欠失、L-2保有のいずれもバンドが出現し、有効なプライマーの組合せは見いだせなかった。

これはL-1とL-2の相同性が高いことが原因と考えられ、L-2欠失でもL-1の方にプライマーがアニーリングして伸長反応が起こってしまうためと考えられた。このことからL-1とL-2の相同性の低い部分を利用してプライマーを設計し直した結果、L-2欠失型とL-2保有型の区別が可能な組合せも見つかった。しかし、PCR条件やDNA量等の違いでバンドが生じる場合もあり、現場での利用を考慮した場合、十分安定した結果とはならなかった(表18)。なお、L-2欠失についても同時に検討したが、安定性についてはそれほど変わらなかった。

表17 L-2検出用のプライマーセット

検出	プライマーの配列 (5'→3')		アニーリング温度(℃)	生成物サイズ(bp)	評価
	Forward	Reverse			
L-2欠	gccattggttaaataactcaa	gctcccttagatagagatgc	56~58	1031	△
	gagccattggttaaataactcaa	gctcccttagatagagatgc	56~58	1033	○
	gggcaatccagatcacggtg	tgaatggctcaatcaccgct	56~58	952	×
野生型	gagccattggttaaataactcat	gctcccttagatagagatgc	56~60	1033	×
	gggcaatccagatcacggtg	tgaatggctcaatcaccgca	56~60	952	×
	gggcaatccagatcacggtg	tgaatggctcaatcaccgatgagt	56~60	957	×
	gggcaatccagatcacggtg	tgaatggctcaatcaccgatg	56~60	954	×
	gggcaatccagatcacggtg	tgatgaatggctcaatcaccgat	56~60	956	×
	gggcaatccagatcacggtg	tgaatggctcaatcaccgat	56~60	956	×

注) 評価は数回PCRを行って、○: ミスアニーリングが起これないか薄いバンドの出現が見られることがある程度で判別が可能、△: たまにミスアニーリングによるバンドが出現、×: ミスアニーリングがよく起こる、で評価した。

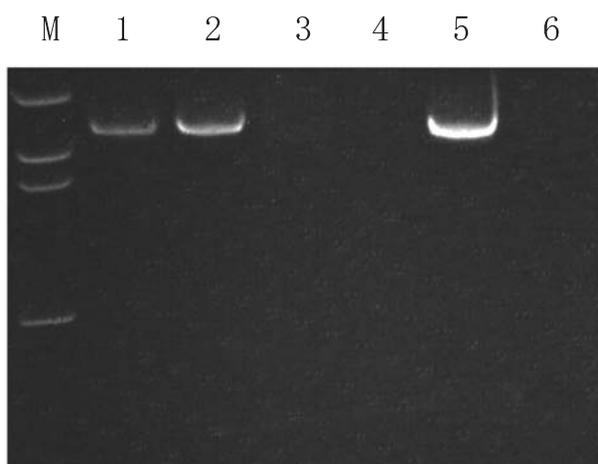


図11 DNAマーカーによるL-2欠失系統の判別

gagccattggttaaataactcaa/caaatttcaacaagctcttcaatのプライマーセットでPCR後、電気泳動。M:マーカー、1:いちひめ(L₀)、2:ゆめゆたか(L₁)、3:関東102号(L₂)、4:スズユタカ(L₁₂₃)、5:エルスター(L₀)、6:フクユタカ(L₁₂₃)

表18 L-1とL-2の相同性の低い部分を用いたL-2検出用のプライマーセット

検出	プライマーの配列 (5'→3')		アニーリング 温度(°C)	生成物サイズ (bp)	評価
	Forward	Reverse			
L-2欠	gagccattggtaaataactcatc	gtcccttagatagagatgc	56~60	1035	×
	gccattggtaaataactcaa	gtgaggagttagaagcttat	56~58	101	○
	gccattggtaaataactcaa	tcctctatcagaagtcgaa	56~58	328	×
	gccattggtaaataactcaa	caaattcaacaagcttcaat	56~58	544	×
	gccattggtaaataactcaa	aagttgggcgattcagaatg	56~58	637	×
	gagccattggtaaataactcaa	gtgaggagttagaagcttat	56~58	103	×
	gagccattggtaaataactcaa	tcctctatcagaagtcgaa	56~58	330	○
	gagccattggtaaataactcaa	caaattcaacaagcttcaat	56~58	546	×
	gagccattggtaaataactcaa	aagttgggcgattcagaatg	56~58	639	×
	野生型	gagccattggtaaataactcat	gtgaggagttagaagcttat	58	103
gagccattggtaaataactcat		tcctctatcagaagtcgaa	58	330	△
gagccattggtaaataactcat		caaattcaacaagcttcaat	58	546	×
gagccattggtaaataactcat		aagttgggcgattcagaatg	58	639	△

注) 評価は表17に準じる。

次に変異部分のすぐ前の塩基または2塩基前の塩基を変えることにより安定化が図れないか検討した(表19)。その結果、いずれの場合でも安定性が向上した。特に1598番の塩基をcからgに置き換えて、Reverseプライマーとしたagcaagtcggaggttattta/tgaatggctcaatcaccctの組合せで、アニーリング温度を56~58°Cに設定したPCRで比較的再現性良くバンドが出現した。

L3欠失検出用のプライマーとしては-636番目と-575番目の塩基の変異を利用したaaacagacacttatccaatat/catacataggtacttttggtt、野生型検出用のプライマーとしては同じ箇所の変異を利用したgcaaacagacacttatccaatat/catacataggtacttttggttaを用い、アニーリング温度を52°CとしたPCRが有効であった(表20、図12、図13)。

-387番目の塩基の変異を利用したプライマーセットはバンドが出現しなかった。これはプライマー同士のアニーリング温度が大きく異なるため、うまく伸長できなかったものと考えられた。このため、プライマーを30塩基にするとともに、欠失型については-385番目の塩基をaからgに置き換えてReverseプライマーを設計することにより、アニーリング温度の差を縮める工夫をした結果、PCR産物が得られるようになった(表21)。L-3判別用のプライマーセットは2カ所の変異を利用することができるため、1塩基の変異しか利用できないL-2判別用のプライマーセットに比べ、ミスアニーリングが起きにくく、実用性は高いと考えられた。

表19 変異部分の前後の塩基を変えたL-2検出用のプライマーセット

検出	プライマーの配列 (5'→3')		アニーリング 温度(°C)	生成物サイズ (bp)	評価
	Forward	Reverse			
L-2欠	gagccattggtaaataactcta	caaattcaacaagcttcaat	56~58	546	○
	gagccattggtaaataactcga	caaattcaacaagcttcaat	56~58	546	○
	gagccattggtaaataactgaa	caaattcaacaagcttcaat	56~58	546	○
	agcaagtcggaggttattta	tgaatggctcaatcaccgt	56~58	332	○
	agcaagtcggaggttattta	tgaatggctcaatcaccct	56~58	332	○

注) 評価は表17に準じる。

表20 L-3検出用のプライマーセット

検出	プライマーの配列 (5'→3')		アニーリング 温度(°C)	生成物サイズ (bp)	評価
	Forward	Reverse			
L-3欠	aaacagacacttatccaatat	catacataggtacttttggtt	48~52	103	○
	aaacagacacttatccaatat	tttatttaatagtagcttttt	48~52	290	×
	aaacagacacttatccaatat	aatattttttttatttaatagtagctttct	48~52	300	○
野生型	gcaaacagacacttatccaatat	catacataggtacttttggtta	48~52	104	○
	gcaaacagacacttatccaatat	tttatttaatagtagcttttg	48~52	291	×
	gcaaacagacacttatccaatat	aatattttttttatttaatagtagcttttg	48~52	301	○

注) 評価は表17に準じる。

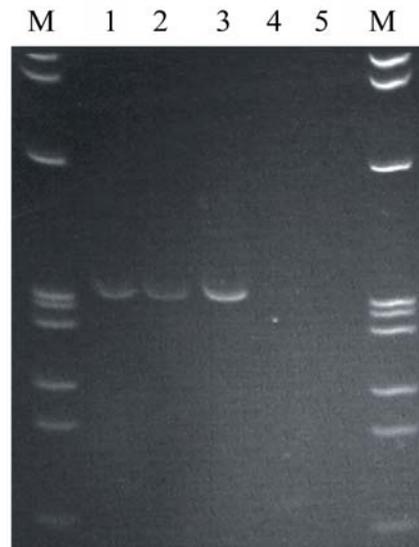


図12 DNAマーカーによるL-3欠失系統の判別

aaacagacacttatccaaatat/aatattttttttatttaaatagtagtactttctのプライマーセットでPCR後電気泳動。M:マーカー、1:いちひめ (L_0)、2:ゆめゆたか (L_1)、3:関東102号 (L_2)、4:九州119号 (L_3)、5:スズユタカ (L_{123})

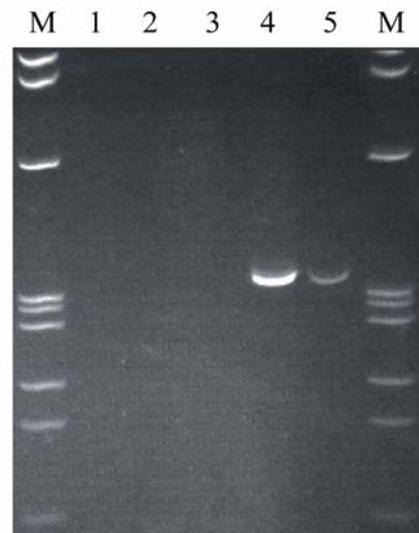


図13 改良マーカーによるL-3保有系統の判別

gcaaacagacacttatccaaatac/aatattttttttatttaaatagtagtacttttgのプライマーセットでPCR後電気泳動。M:マーカー、1:いちひめ (L_0)、2:ゆめゆたか (L_1)、3:関東102号 (L_2)、4:九州119号 (L_3)、5:スズユタカ (L_{123})

表21 改良したL-3検出用のプライマーセット

検出	プライマーの配列 (5'→3')		アニーリング温度(°C)	生成物サイズ(bp)	評価
	Forward	Reverse			
L-3欠	aaacagacacttatccaaatat	aatattttttttatttaaatagtagtactttct	48~52	300	○
野生型	gcaaacagacacttatccaaatac	aatattttttttatttaaatagtagtacttttg	48~52	301	○

注) 評価は表17に準じる。

また、L-2欠失検出用のプライマーセットとL-3検出用のプライマーセットを同時に用いてPCRを行うことも検討したが、アニーリング温度に大きな差があることや増幅DNA断片の生成量・断片長に大きな差があるため(103bpま

たは104bpと1033bp)、良い結果は得られなかった。

ミスアニーリングを防止するためにApplied Biosystems社のAmplify-Taq等を用いてHot-Start法を利用することにより、前述の作成マーカー

の安定性は増すが、実用的に使う際にはいくつかの問題点がある。最も大きな問題点は、操作ミス等によるPCRの失敗を判別するポジティブコントロールが無いことである。実際に表19で作成したマーカを用いる場合には、ゲノムDNA抽出ミス、反応液の混合ミスなどいくつかの操作ミスがあってもこれをチェックできない。また1塩基の変異を用いたマーカであるため、操作条件によってはミスマッチを起こしてバンドを生じたり、非特異的バンドが多発したりする。このため、これらの欠点を補うために、変異サイトを含み欠失型・野生型ともに伸長する

プライマーセットに、変異部分を含むプライマーを加えてPCRを行い、出現バンド数で判別できないか検討した（図14）。

L-2の欠失変異部分の前後を利用していくつかの組合せを検討したが、agcaagtcggagggtattta/(caaatttcaacaagctcttcaat+tgaatggctcaatcacccct)のプライマーセットを用いたときに、L2欠失で2本、野生型で1本のバンドが安定的に出現した。野生型でもまれに2本のバンドが現れる場合もあったが、メインのバンドに比べて薄いバンドしか現れず、バンドの比較により容易に判別がついた（図15）。

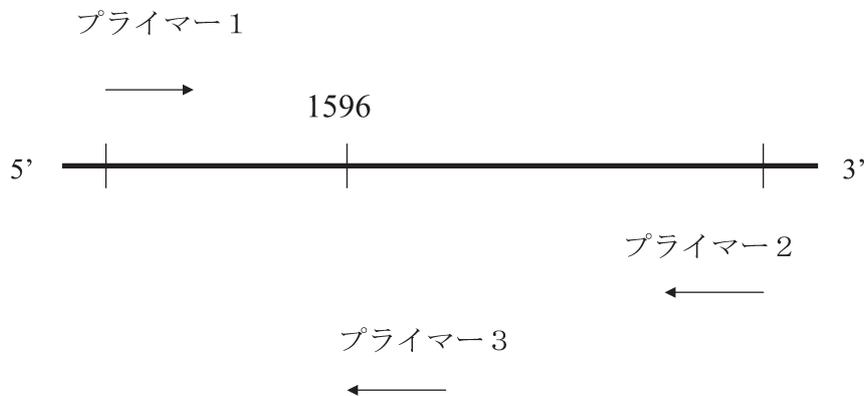


図14 混合プライマーの作成

プライマー1とプライマー2はL-1との相同性が低い部分から作成し、プライマー3は変異部分を含むように作成した。

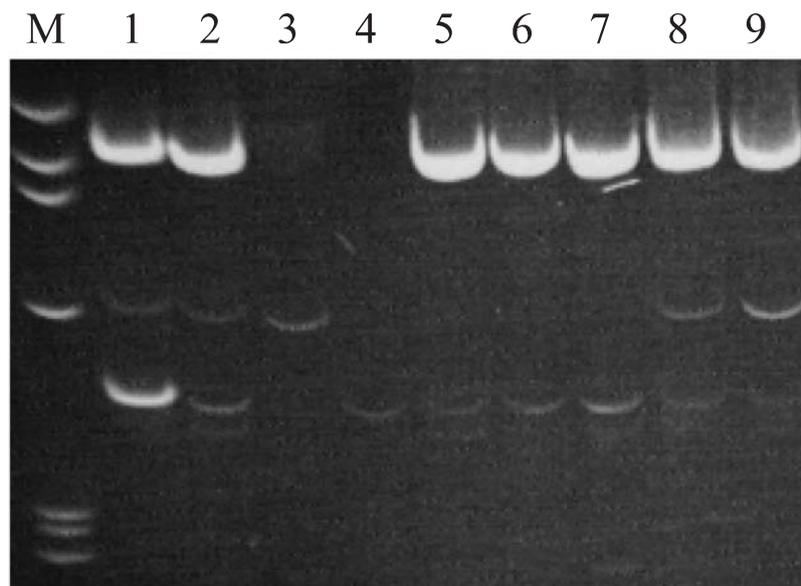


図15 混合マーカによるL-2の判別

1~9:agcaagtcggagggtattta/(caaatttcaacaagctcttcaat+tgaatggctcaatcacccct)のプライマーセットでPCR後、電気泳動。M:マーカ、1:いちひめ(L₀)、2:関東102号(L₂)、3:スズユタカ(L₁₂₃)、4:エルスター(L₀)、5:フクユタカ、6:サチユタカ、7:タマホマレ、8:おおすず、9:タチナガハ(以上L₁₂₃)
3, 4はPCR失敗、1は2本の明瞭なバンド、2, 5~9は明瞭なバンドは1本。

混合プライマーでは複数のDNA断片をPCRで生成するとき、短いDNA断片を合成するプライマーに変異部分を設定することにより、一方は短いDNA断片が長い断片とともに合成されるのに対し、もう一方はミスマッチにより多少短いDNA断片を合成しても、長いDNA断片をより多く合成するためメインのバンドに差が生じるものと考えられる。また、Hot-Start法を採用することによりプライマーのミスマッチが少なくなり、より確実に判別できた。L-3については検討していないが、同様の手法によるマーカー開発が可能であろうと思われる。

Xu *et al.* (2000) は、トリソミック分析を用いてL-1遺伝子が第13染色体に座乗していることを報告している。マーカーの比較から第13染色体はLG-Fに該当する (Cregan *et al.* 1999、原田・山中 2003) と考えられ、近傍マーカーはDNAマーカーとして利用できる可能性がある。Kim *et al.* (2004) は、「Preunkong (野生型) × Jinpungkong2 (L-2欠失)」のRILsを用いたL-2遺伝子の分離比の解析から、L-2がSSRマーカーのSatt522とSat074の間に位置することを報告しており、これらをマーカーとして利用することは可能である。しかしこれらのSSRマーカーとL-2との遺伝的距離はそれぞれ14.5cMと8.6cMで、組み換えの可能性を考えると、実際の戻し交配でこれらのマーカーを利用するにはやや不安がある。また、Satt522あるいはSat074に多型が見られない場合はさらに選抜の精度が落ちる。

本研究で得られたL-2判別マーカーは欠失変異の原因となっている塩基置換を利用したものであり、近傍マーカーと異なって組み換え価を考慮する必要がない点でこれらのSSRマーカーを用いるよりも優れている。一方、L-2欠失は1塩基の変異であるため、単純に変異点を利用したプライマーを用いたPCRでは、DNA断片が伸長しないはずのプライマーセットでもミスアニーリングが生じてバンドが現れるケースが見られた。特にDNA量が多い場合などでは非特異的生成物が増える傾向にあった。このためミスマッチを引き起こす要因となる鋳型DNA量、アニーリング温度の設定等を厳密に設定したり、

Hot-Start法などを併用してミスアニーリングを少なくすることが必要である。本研究でもすべての条件について検討を行ったわけではないので、今後さらに細かい条件を検討して安定的な系を確立する必要がある。L-3欠失については変異点が2カ所あるので、非特異的産物の生成量も少なく、比較的信頼性の高いマーカーと考えられる。

混合プライマーによるマーカー選抜は、操作ミスやDNAの抽出ミスなどのPCR失敗の有無を確認できる点だけでなく、多少の非特異的生成物が生じても2本のバンドの濃淡の差により判別できる点で優れている。SNPsを利用したマーカー開発は今後増加すると思われるが、混合プライマーを用いることにより、PCRの不安定性を改善できるものと考えられる。

4 制限酵素を用いた選抜手法の開発

1) 材料と方法

(1) 材料

供試材料は第3節で作成したゲノムDNAを用いた。

(2) プライマー

L-2欠失検出用のDNA断片増幅用には、L-1との相同性が低い部分を選び、GC含量及びSsp Iの制限酵素サイトの位置 (図16) を考慮して、1559番目塩基から20塩基と1683番目塩基から20塩基を利用したプライマーセットgctatcatcaactc atgagc/cgttgatgttcaggtgtcaを作成した。

L-3欠失検出用のDNA断片増幅用には、GC含量及びSsp Iの制限酵素サイトの位置 (図16) を考慮して、-773番塩基から23塩基と-575番塩基から24塩基を利用したプライマーセットcatg cactcaaagttatttcaac/cttataagttgtttcatatagを作成した。

(3) PCR反応

PCR反応は第3節の方法に準じて行い、アニーリング温度はL-2検出で60℃、L-3検出で52℃とした。PCR反応後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動でPCR産物の有無を確認した。

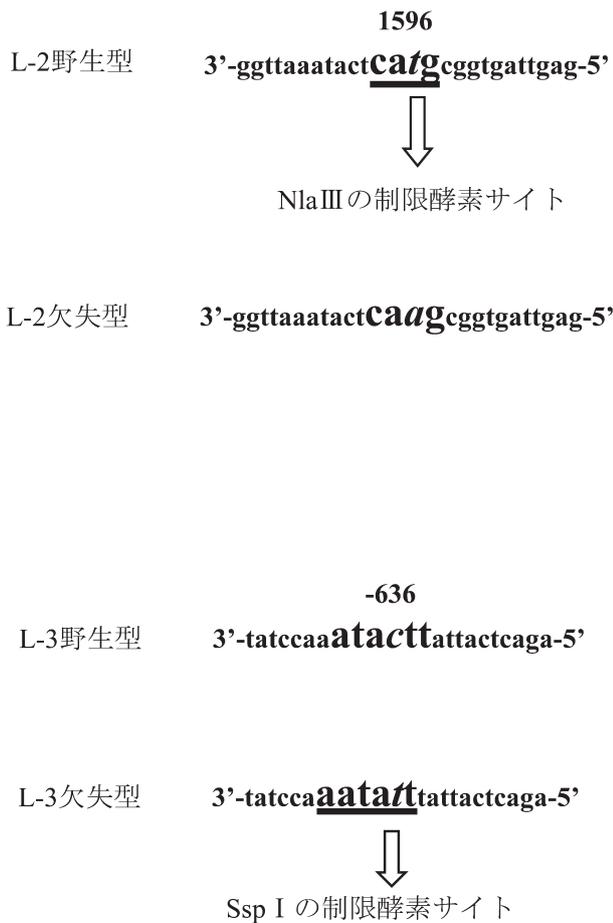


図16 L-2およびL-3の変異部分の制限酵素サイト

表22 制限酵素反応液の組成

検出	反応液	容量 (μl)
L-2	H ₂ O	2.9
	10×NEバッファー	1.0
	DNA (PCR) 液	5.0
	100×BSA	0.1
	NlaIII	1.0
合計		10.0
L-3	H ₂ O	3.0
	10×Hバッファー	1.0
	DNA (PCR) 液	5.0
	Sph I	1.0
	合計	10.0

注) バッファー等は試薬に添付のもの。

(4) 制限酵素処理

制限酵素のNla IIIはBioLabs製、NEバッファー等は付属のものを用いた (表22)。(3)で増幅したPCR産物5 μl に蒸留水2.9 μl 、10×NEバッファー1 μl 、0.1 μl のBSA、酵素液1 μl を加えて静かに混和し、37°Cで12時間保持した。

Ssp Iは東洋紡株製、バッファーは付属のH

バッファーを用いた。PCR産物5 μl に蒸留水3 μl 、10×Hバッファー1 μl 、酵素液1 μl を加えて、ピペットで静かに混和し、37°Cで12時間保持した。

(5) ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動

ゲルの組成は15.0mlの蒸留水、2.5mlの10×TBE、7.5mlの40%ポリアクリルアミド溶液とし、泳動条件その他は第3節の方法に準じて行った。

2) 結果と考察

NlaIIIによる制限酵素処理では、「スズユタカ」「フクユタカ」(L₁₂₃)では2本の切断バンドが生じたが、「いちひめ」「エルスター」(L₀)では切断されないバンドが出現した (図17)。しかし「いちひめ」「エルスター」でも「スズユタカ」「フクユタカ」と同じ位置に2本の切断バンドが見られた。これはL-2の欠失変異がリポキシゲナーゼの活性中心に近く、L-1とL-2の相同性が高いためにL-1が同時に増幅されてしまい、L-1由来のDNA断片がNlaIIIにより切断されてしまったためと考えられた。このため、L-2欠失遺伝子がヘテロ個体かホモ個体かを判定する必要がある場合には本方法は利用できないと考えられるが、戻し交配によるL-2欠失遺伝子の導入などではL-2欠失遺伝子の有無の判定ができれば良いので、切断されないバンドが生じるかどうかで判定は可能である。

Ssp Iによる制限酵素処理ではL-3欠失型ではDNA断片が制限酵素により切断され、予測される136塩基と87塩基の位置に2本のバンドが現れたものの、野生型では切断が起こらず220塩基付近に1本のバンドのみ現れた (図18)。この方法では1回のPCRで欠失型か野生型の区別が可能であると考えられた。

制限酵素処理による判別法は、PCRミスも確認でき、L-3ではホモ型・ヘテロ型の判別もできるが、PCRを行った後に電気泳動で増幅を確認して、その後制限酵素処理するため、検定に時間がかかることと制限酵素を用いるためコストが高いことが難点であり、多数の系統を判別するには問題がある。しかしながら、連続戻し

交配法など限られた系統の判定のみ必要なケースでは、判別系統数もそれほど多くないことから実用的に利用可能ではないかと考えられる。

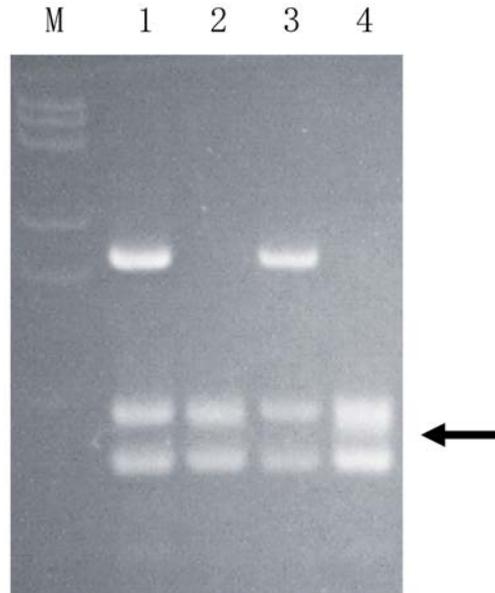


図17 制限酵素処理によるL-2欠失の判別

gctatcatcaactcatgagc/cgttgatgttcattggtgtcaのプライマーセットでPCR後、NlaIIIで12hr処理。M:マーカー、1:いちひめ (L₀)、2:スズユタカ (L₁₂₃)、3:エルスター (L₀)、4:フクユタカ (L₁₂₃)、L-1とL-2の相同性が高いために、L-1の該当部分も増幅し、L₀でも切断バンドが出現する (矢印部分)。

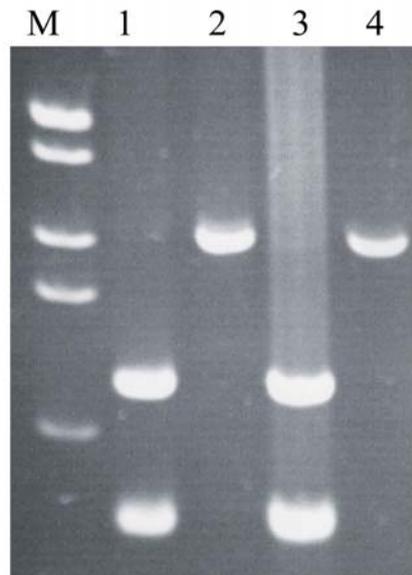


図18 制限酵素処理によるL-3欠失の判別

catgcactcaaagttatttcaac/cttataagttgttcatacataggのプライマーセットでPCR後、SspIで12hr処理。M:マーカー、1:いちひめ (L₀)、2:九州119号 (L₂)、3:ゆめゆたか (L₁)、4:スズユタカ (L₁₂₃)

5 考察

リポキシゲナーゼ品種の実用栽培で問題になるのは、普通品種の混入の問題である。大豆の他殖率は0.5%程度と言われているが、定期的な種子更新を行わなければ、機械的混入も含めてさらに混入率は高くなるものと考えられる。実際に原原種を供給する育種研究室でも年により多寡はあるものの混入は少なくない。このため種子の純系維持や混入程度の確認のため、現場で簡易にリポキシゲナーゼの有無が判別できる手法が求められている。第2節で検討した β -カロテン退色法による判別は溶液の調製や保存が簡便で、特別な設備も不要で、現場での利用が可能な判別法である。しかし β -カロテンが自然退色しやすい色素であること、L-2やL-3の活性が種子の状態により不安定であることなどの欠点もある。

Suda *et al.* (1995)は自然退色しやすい β -カロテンに代えてメチレンブルーを用いた色素退色反応を報告している。これはL-1、L-2がメチレンブルーの退色活性を持つことを利用した検定法で、すべてのタイプの欠失系統を区別できる。James *et al.* (2000)も同様の手法でリポキシゲナーゼの有無を判別している。さらにKikuchi *et al.* (1999)はバッファー濃度を工夫して、 β -カロテン退色法を実施した後にメチレンブルー退色法を実施し、試験後の呈色により完全欠失、L-3欠失、L-1・L-2欠失、野生型を区別する手法を開発し、より省力的に検定ができるようになってきている。しかしながらL-3の検定には依然L-2存在下の β -カロテンの退色による判別法を利用しており、より安定的なL-3検出法の開発のためには、失活しやすいリポキシゲナーゼ抽出液を利用しない新たな検出法が必要である。

一方、これまでリポキシゲナーゼ欠失系統の育成は主としてSDS-PAGEやメチレンブルー・カロテン退色法による選抜が行われてきた。特に色素退色法は簡便で、費用もかからないため、大規模な選抜や生産現場での判別に適している

が、欠失変異が劣性形質であるため、遺伝子がホモ型となる交配後代の育成を行わないと選抜に使えない。このため、地域の主力品種にリポキシゲナーゼ欠失特性を導入しようとしても、温室等を活用した世代促進を併用しても年に1~2回の戻し交配が限度である。ヘテロ個体でも欠失遺伝子の有無が確認でき、連続戻し交配を可能とする手法として、DNAマーカーによる判別はコストや時間がかかる欠点はあるものの利用価値が高い。

近年、大豆種子1粒からゲノムDNAを抽出する手法 (Kamiya and Kiguchi 2003)など、簡易なDNA抽出技術が発表されている。また戻し交配親の遺伝子をマーカーにより選択的に選抜することにより、目的遺伝子のみを選抜による戻し交配より少ない世代で準同質遺伝子系統を得ることが可能となっている。このような新しい技術と本研究で開発したマーカーを組み合わせることにより、数回の連続戻し交配によりリポキシゲナーゼ欠失特性を他の主要品種に導入することができ、ニーズに応じた新品種の迅速な育成が可能となる。またリポキシゲナーゼ欠失以外にも7S欠失、11S欠失、サポニン欠失など、成分改変を中心とした新しいタイプの大豆の育成が進んでいる。こうした有用形質を集積するためには今後マーカーの利用が欠かせない。他の成分特性に関与するDNAマーカーはトリプシンインヒビター (Tang *et al.* 1998)、 α 、 α' 欠失 (Ishikawa *et al.* 2006)、7S欠失性 (致死の系統: Hayashi *et al.* 2000)、7S欠失性 (ツルマメ由来のもの: Tsubokura *et al.* 2006)等が報告されており、今後も多くのマーカーが開発されるものと思われる。戻し交配とマーカーを組み合わせることにより、今後は有用形質の集積が急速に進展することが期待される。

IV 7Sサブユニット完全欠失系統の作出とその特性

大豆子実の貯蔵タンパク質は沈降法により2S、7S、11S及び15Sグロブリンに分類される (Wolf and Briggs 1956, Derbyshire *et al.* 1976)。また、免疫学的命名法ではグリシニン、 α -、 β -、 γ -コングリシニンに分類されている (Catsimpoolas 1969)。大豆の主要な貯蔵タンパク質は β -コングリシニン(7Sグロブリン)とグリシニン(11Sグロブリン)で、これら2つで全タンパク質の60-70%を占めると言われている (Derbyshire *et al.* 1976, Hill and Breidenbach 1974, Thanh and Shibasaki 1976)。7Sグロブリンはマンノース、グルコサミンを含む糖タンパクの一種で、通常 α 、 α' 、 β の3種類のサブユニットから構成され、プロテインボディ中には3量体の形で貯蔵されている (Thanh and Shibasaki 1978)。また11Sグロブリンは酸性サブユニット及び塩基性サブユニットがS-S結合で結びついたペアが6個集まって形成されている (Mori *et al.* 1981)。酸性サブユニットは6種類 (A1a, A1b, A2, A3, A4, A5)、塩基性サブユニットは5種類 (B1a, B1b, B2, B3, B4)あることが報告され、DNA配列の相同性からグループI、グループIIに分類され、グループIIはさらにIIaとIIbに分けられる (Nielsen *et al.* 1989, Yagasaki *et al.* 1996)。

7Sグロブリンと11Sグロブリンを比較すると7Sグロブリンに比べて11Sグロブリンはトリプトファン、メチオニン、シスチンなどの必須アミノ酸が高く、リジン含量が少ない (Koshiyama 1968, Staswick *et al.* 1983, Coates *et al.* 1985)。特に含硫アミノ酸であるシスチンの含量が高いため、11Sはジスフィルド結合 (S-S結合) によるタンパク質のゲル化により大きな影響を与える (Fukushima 1991, Yagasaki *et al.* 2000)。

このことは7Sグロブリン含有量を低下させて、11Sグロブリン含有量を向上させることができれば大豆の栄養価を高めるだけでなく、大

豆の主要な用途である豆腐への加工適性の向上を図ることができることを示唆している。

これまでに、11Sタンパク質変異系統としては11SのA4サブユニット、A3サブユニット欠失等が遺伝資源から見いだされ (Harada *et al.* 1983, Yagasaki *et al.* 1996)、さらに突然変異によりグループI欠失系統が作出された (小田中・海妻 1989)。これらを交配することによりすべての11Sタンパク質を欠失した系統が育成できる (Yagasaki *et al.* 2000)。

一方7Sタンパク質変異系統は、 α' サブユニット欠失系統及び α ・ β サブユニット低下系統が遺伝資源から見いだされている (Kitamura and Kaizuma 1981)。またTakahashi *et al.* (1994)は放射線突然変異を利用して α サブユニット欠失を作出し、7Sの α 、 α' 欠失品種が育成されている (高橋ら 2005)。しかしながら7S全欠失系統については、突然変異により7S完全欠失または激減系統が作出されたが、これらの系統はホモで致死となるためヘテロでのみ維持が可能で、実用的に利用可能な完全欠失系統は得られていない (小田中・海妻 1989, 北川ら 1991)。

本章では大豆の野生種であるツルマメ (*Glycine soja sieb. et Zucc.*) の中から7S完全欠失系統を見だし (Hajika *et al.* 1996)、この系統の遺伝的背景や成分特性について調査を行った (Hajika *et al.* 1998)。

1 7S完全欠失系統の探索

1) 材料と方法

(1) 1992年から1994年にかけて熊本県の阿蘇地域、球磨地域、天草地域、大分県の大野川上流域等の計80地点 (図19) から収集した、82系統のツルマメを用いた。

(2) 貯蔵タンパク質の分析はSDS-PAGE (第II章参照) で行い、ゲル濃度は6.8%または10.5%とした。収集したツルマメは遺伝的に固定して

いない可能性があるため、各系統10粒ずつを半粒法で分析した。

2) 結果と考察

分析した82系統についてはリポキシゲナーゼの欠失系統は見いだせなかったが、天草下島から収集したうちの1系統が7Sの α 、 α' 、 β の3

つのサブユニットをすべて欠失しているのを見いだした(図20)。このうちの一部を温室で育成したところ、通常ツルマメと大差のない生育を示し、外観上の異常は見られなかった(図21)。また後代種子も正常に得られ、発芽にも問題はなかった。



図19 調査したツルマメの採集地点

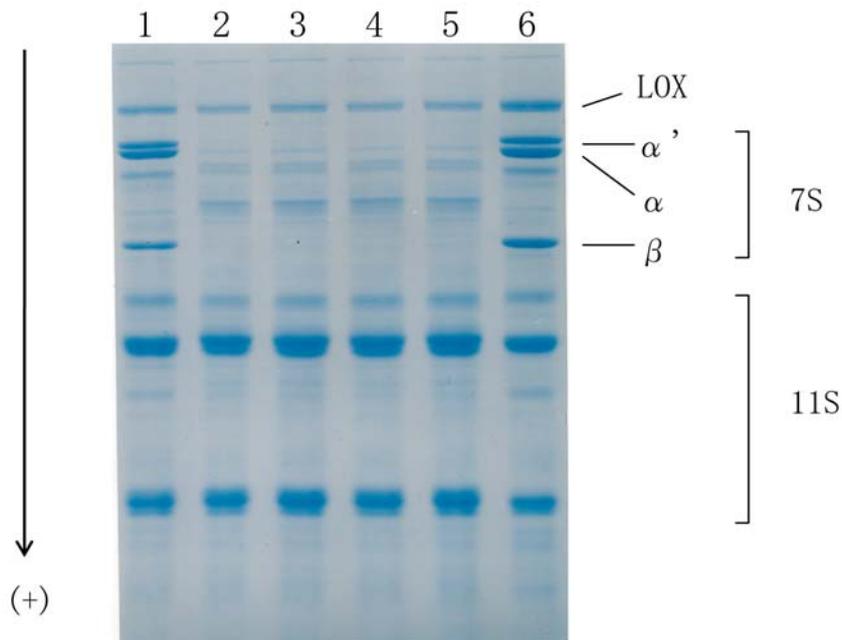


図20 7S完全欠失系統の電気泳動像

LOX:リポキシゲナーゼ, α , α' and β : 7S グロブリン(β -コングリシニン), 1:フクユタカ(野生型), 2-5:QT2, 6:タマホマレ(野生)



図21 成育中のQT2系統

得られた後代種子をSDS-PAGEで分析したところ、後代種子の7Sサブユニット構成も同様の変異を持っていたことから、この形質は環境変異によって引き起こされたものではなく、明らかに遺伝的変異であると考えられた。また数十粒を分析してすべて7S欠失型であったので、少なくとも7Sサブユニットの欠失性については固定していると考えられたので、この系統にQT2系統 (Kyushu type collection No.2の略称: 「Kyushu」の発音に近い"Q"を冠した) と名付けた。

これまでに得られた7Sの完全欠失系統はいずれも放射線突然変異によるもので、7Sを欠失した種子は生育途中で枯死し、ヘテロの状態でのみ維持が可能な系統である (小田中・海妻1989、北川ら 1991)。これは生育に不可欠の遺伝子が同時に破壊されたためと考えられている。

本研究で得られたQT2系統は7Sを欠失していても生育異常はないことから、7Sタンパク質はリポキシゲナーゼと同様に大豆の生育に不可

欠のものではないと考えられる。

なおQT2系統が得られた天草下島の富岡半島周辺は1995年に再度集中的に探索したが、QT2系統が得られた地点を含めて、7S欠失系統は得られなかった。またその後関東地域を含め300系統以上を分析したものの同様の7S欠失系統は得られていない。このことは7S完全欠失が種子の生育に不可欠のものではないとしても、種子の生存・生育に不利な形質である可能性を示唆しており、今後戻し交配を行った系統を用いて詳細に検討する必要がある。

2 QT2系統の遺伝的背景の解明

1) 材料と方法

(1) 交配材料

7S欠失を確認済みのQT2系統、野生型品種として「フクユタカ」、「トヨホマレ」、「銀杏 (無毛品種)」を交配親に用いた。また種子リポキシゲナーゼ、 α' サブユニットとの遺伝的関係を明らかにするために、リポキシゲナーゼ欠失品種の「いちひめ」及び α' 欠失の「東北101号」を用いた。

(2) 交配及び交配後代の育成

交配は「フクユタカ×QT2系統」、「トヨシロメ×QT2系統」、「銀杏×QT2系統」、「いちひめ×QT2系統」、「東北101号×QT2系統」を実施した。得られたF₁は温室で世代促進を行ってF₂種子を得た。

また「フクユタカ×QT2系統」の一部を用いて「フクユタカ×F₁ (フクユタカ×QT2)」の交配を行い、得られたB₁F₁のうち7S欠失型を温室で世代促進を行ってB₁F₂を得た。

(3) 7Sタンパク質の分析

得られた種子の表現型の分析は、第1節に準じて半粒法を用いたSDS-PAGEで行った。

2) 結果と考察

QT2系統と野生型の「フクユタカ」、「トヨシロメ」を交配したF₁はすべて7S欠失型であった (図22、表23) ことから、QT2系統が持つ7S欠失特性は優性遺伝するものと考えられた。こ

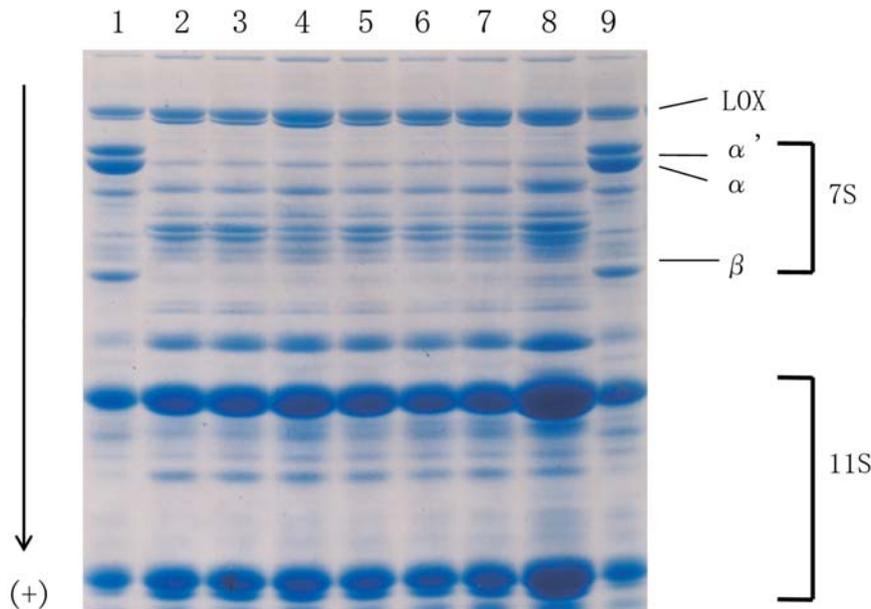
図22 F₁種子の電気泳動像1, 9:フクユタカ (野生型), 2-7:F₁ (トヨシロメ×QT2), 8:QT2系統

表23 野生型×QT2系統の交配後代の分離

表現型	トヨシロメ× QT2系統	フクユタカ× QT2系統
(F ₁)		
7S欠失型	12	3
野生型	0	0
(F ₂)		
7S欠失型	267(268.5)	220(234.75)
野生型	91(89.5)	93(78.25)
χ^2 値 (3:1)	0.03 (P>0.9)	3.71 (P>0.05)

注) () 内は期待値。

表24 フクユタカへの戻し交雑系統の分離

表現型	7S欠失型	野生型
(B ₁ F ₁)	5	5
(B ₁ F ₂)		
No. 1	19	4
No. 2	21	3
No. 3	22	7
No. 4	29	18
No. 5	28	9
合計 (No.1-No.5)	119	41
期待値	120	40
χ^2 値 (3:1)	0.01	0.03
χ^2 値合計	0.03 (P>0.9)	

のF₁系統を栽培して得られたF₂はそれぞれ7S欠失型と野生型の比が267:91、220:93となった。この比率は7S欠失型を優性とする1遺伝子支配と仮定したときの分離比3:1に良く適合した(表23)。

「フクユタカ×QT2」のF₁を「フクユタカ」に交配して得られたB₁F₁は7S欠失型が5粒、野生型が5粒であった。またB₁F₁の7S欠失型を育

成して得られたB₁F₂は7S欠失型と野生型の比率が119:41に分離した。これらの結果はいずれも7S欠失型が優性の1遺伝子支配と仮定したときの分離比に良く適合した(表24)。

これらの結果から、QT2系統の持つ7S欠失特性は7S欠失型を優性とする1遺伝子支配と考えられたので、この遺伝子にScg-1 (Suppressor of β -conglycinin) の遺伝子記号を付した (Hajika *et al.* 1998)。

リポキシゲナーゼ完全欠失系統 (いちひめ) とQT2系統の交配後代の分離は表25の通りとなった。7S欠失型とリポキシゲナーゼの欠失特性の分離比は、7S欠失、L-1・L-2欠失、L-3欠失がそれぞれ独立遺伝すると仮定したときの分離比に良く適合した。このことから種子リポキシゲナーゼとQT2の持つ7S欠失特性は独立に遺伝し、7S・リポキシゲナーゼ同時完全欠失系統の作成が可能なが明らかとなった。「東北101号×QT2系統」のF₂の分離は、7S欠、野生型、 α' 欠が593:173:55となり、7S欠失と α' 欠失は独立に遺伝すると考えられた(表26)。

また「銀杏」との交配後代の分析から、毛茸の有無と7S欠失特性も独立遺伝と考えられ、毛茸の有無はマーカーとしては使用できないと考えられた(表27)。

表25 リポキシゲナーゼ完全欠失系統とQT2系統の交配後代の分離

表現型				種子数	期待値	χ^2 値 (3:9:9:27:1:3:3:9)
7S	L1	L2	L3			
-	-	-	-	16	15.0	0.06
-	+	+	-	38	45.1	1.13
-	-	-	+	46	45.1	0.02
-	+	+	+	131	135.4	0.14
+	-	-	-	5	5.0	0.00
+	+	+	-	22	15.0	3.21
+	-	-	+	14	15.0	0.07
+	+	+	+	49	45.1	0.33
合計				321		4.97 (P>0.5)

これまでに報告された大豆種子タンパク質の欠失変異はほとんどが劣性遺伝子支配であり、7Sの α' 欠失、 α 欠失はいずれも劣性の1遺伝子支配である (Kitamura *et al.* 1984, Takahashi *et al.* 1996)。また、リポキシゲナーゼの各欠失変異 (Hildebrand and Hymowitz 1982, Kitamura *et al.* 1983, Kitamura *et al.* 1985) や11Sのサブユニット欠失性 (Harada *et al.* 1983, 喜多村・原田 1989, Yagasaki *et al.* 1996) も劣性遺伝子支配であることが明らかとなっている。

さらに7Sの α' 欠失、 α 欠失は独立に遺伝することが知られている。これらの欠失変異に対し、1優性遺伝子で別の染色体上に座乗していると考えられる7Sのサブユニットがすべて欠失するScg-1は極めて特異な遺伝子である。

これまでに一部の欠失変異についてはその遺伝的メカニズムが明らかとなっている。毛振由来の α' サブユニットはCg-1遺伝子が欠失しているためタンパク質が生産されないことが知られている (Ladin *et al.* 1984)。また α サブユニットは2つの構造遺伝子Cg-2、Cg-3のうちCg-3を欠失し、残るCg-2中の4塩基が欠失しているため正常なタンパク質が生産されない (Ishikawa *et al.* 2006)。これに対し優性の1遺伝子で7Sが欠失するScg-1は別の染色体上に座乗している3つの遺伝子を抑制することから、まったく異なるメカニズムで7S欠失を引き起こしていると考えられる。

最近になってScg-1は連鎖群Iに座乗しており、座乗領域に2つの β サブユニット、1つの α サブユニット、偽遺伝子化した α サブユニットの

表26 東北101号 (α' 欠) とQT2系統の交配後代の分離

表現型	種子数	期待値	χ^2 値 (12:3:1)
7S欠失型	593	615.8	0.84
野生型	173	153.9	2.36
α' 欠失型	55	51.3	0.27
合計	821		3.47 (P>0.1)

表27 銀杏 (無毛) とQT2系統の交配後代の分離

表現型	7S欠失型	野生型	合計	χ^2 値
無毛	82 (91.1)	34 (30.4)	116(121.5)	2.91 (P>0.4)
有毛	32 (30.4)	14 (10.1)	46(40.5)	
合計	114 (121.5)	48 (40.5)	162(162)	

注) ()内は期待値。

計4つの遺伝子からなるクラスターが存在していることが報告された (Tsubokura *et al.* 2006a)。またわずかながらmRNAが発現していることも確認されている。これらを総合するとScg-1はジーンサイレンシングにより7Sタンパク質の発現を抑えている可能性がある。

3 7S欠失特性が主要成分・加工適性に与える影響の調査

1) 材料と方法

(1) 分析用材料

QT2系統の主要成分の分析には、1994年に収集した34系統及びQT2系統の合計35系統のツルマメと、九州農業試験場保存の39品種・系統の大豆を用いた。これらを1995年に九州農業試験場の圃場で栽培して得られた種子を分析に用いた。

また7S欠失による主要成分への影響を調査するために、「フクユタカ」へ7S欠失特性を戻し交配した系統のB₅F₂を用いた。この系統をSDS-PAGEにより分析して、7S欠失型と野生型に分類し、戻し交配親の「フクユタカ」とともに1997年に九州農業試験場の圃場で栽植した。個体別に収穫したB₅F₃の7S欠失型は、収穫後に更に7S欠失型、ヘテロ型に分類し、野生型、「フクユタカ」とともに分析に用いた。

7S/11S比の分析には1997年に九州農業試験場の圃場で得られたQT2系統と大豆5品種 (「フクユタカ」、「タマホマレ」、「エンレイ」、「アキシロメ」、「いちひめ」)、及び2006年と2007年に作物

研究所の圃場で得られた7S欠失系統（フクユタカB₈F₁₀）と「フクユタカ」及び「エルスター」を用いた。また同一個体上の種子については「7S欠失系統（フクユタカB₈F₆）×タチナガハ」由来の7S欠失に関して未固定のF₂個体上のF₃種子を分析に用いた。

加工適性調査にはフクユタカに戻し交配を行ったB₅F₃系統と対照としてフクユタカ及びフクユタカにリポキシゲナーゼ全欠失特性を導入したB₃F₄系統を用いた。

(2) タンパク質含量と脂質含量の分析

供試した種子は約20gをサンプリングして粉碎後、タンパク質含量はケルダール法で、脂質含量はジエチルエーテルを用いたソクスレー法で子実成分の分析を行った。タンパク質含有量は窒素(N) %×6.25で算出した。

(3) 7S/11S比の推定

QT2系統と大豆5品種については②で用いた種子粉を分析に用いた。ツルマメであるQT2系統と大豆はタンパク質含有量が大きく異なるので、ケルダールで測定したタンパク質含有量データを用いて抽出タンパク質量が同一になるようにSDS-PAGEの抽出バッファーを加えた。各4サンプルを作成し分析に供した。

「7S欠失系統（フクユタカB₈F₁₀）」、「フクユタカ」、「エルスター」についてはも同様にしてサンプルを作成した。

「7S欠失系統（フクユタカB₈F₆）×タチナガハ」由来のF₃種子は供試種子をドリルで削り、削りかすを分析に用いた。各種子粉10mgに1mℓの抽出バッファーを加え全タンパクを抽出した。

これらの試料を第1章に準じてSDS-PAGEで泳動・染色後、背景が十分透明になるまで脱色液で脱色した。これをセロハンで挟みゲル乾燥機で乾燥後スキャナーで画像を取り込み解析した。また、未乾燥の状態で0.5mm厚のナイロン袋に空気が入らないように密封した状態でスキャナーで画像を取り込んでもほぼ同じ結果が得られたので、一部の分析は未乾燥の状態で画像解析を行った。

解析はアトー(株)のデンスイトグラフ付属の解析ソフトウェアLane Analyzerを用いて行い、リポ

キシゲナーゼ、7S及び11S該当部分のバンドの輝度積算値で含有比を推定した。

(4) 豆腐加工適性試験

豆腐加工適性試験は第II章第2節に準じて行った。各系統とも2反復で豆腐を作成し、破断強度を測定した。

2) 結果と考察

QT2系統及びその他のツルマメ、大豆の主要成分を図23に示した。大豆とツルマメを比較するとツルマメは大豆に比べて脂質含有量が明らかに低く、タンパク質含有量は高いものが多かった。QT2系統は供試した大豆品種・系統に比べて高タンパク質・低脂肪であったが、他のツルマメと比べるとその分布の範囲内に入っており、特にタンパク質含有量や脂肪含有量に特異性は見られなかった。

フクユタカ戻し交配系統のタンパク質含有量、脂肪含有量の平均値は表28に示した。脂質含有量に系統間差はほとんどなかったが、タンパク質含有量は7S欠失系統、ヘテロ系統が44.3%と野生型(43.3%)に比べやや高い傾向を示した。しかしながら個体間差異が大きいこともあり、t検定では7S欠失型と野生型では有意差がなく、ヘテロ型との間でのみ有意差が見られた。

デンスイトグラフを用いた解析ではQT2系統は11S相当部分がフクユタカ等の大豆と比べて増加しており、7S減少分を11Sが補っていることが推察された(表29)。ただし、7S相当分と11S相当分を合計した割合は、QT2系統以外が60~70%台だったのに対し、50%台であった。電気泳動像ではQT2系統はαサブユニットとβサブユニットの間にマイナーバンドが出ているので(図20)、成分組成の違いが7S相当分と11S相当分の合計が50%台となる原因と考えられる。

「7S欠失系統（フクユタカB₈F₁₀）」、「フクユタカ」、「エルスター」の解析では、「7S欠失型」が「フクユタカ」「エルスター」に比べて11S相当部分が1.2~1.3倍になっていた(表30)。また「7S欠失系統（フクユタカB₈F₆）×タチナガハ」の同一のF₂個体上のF₃種子でも11S相当部分が7S相当部分の約1.5倍となり(表31)、7Sの減少部分を

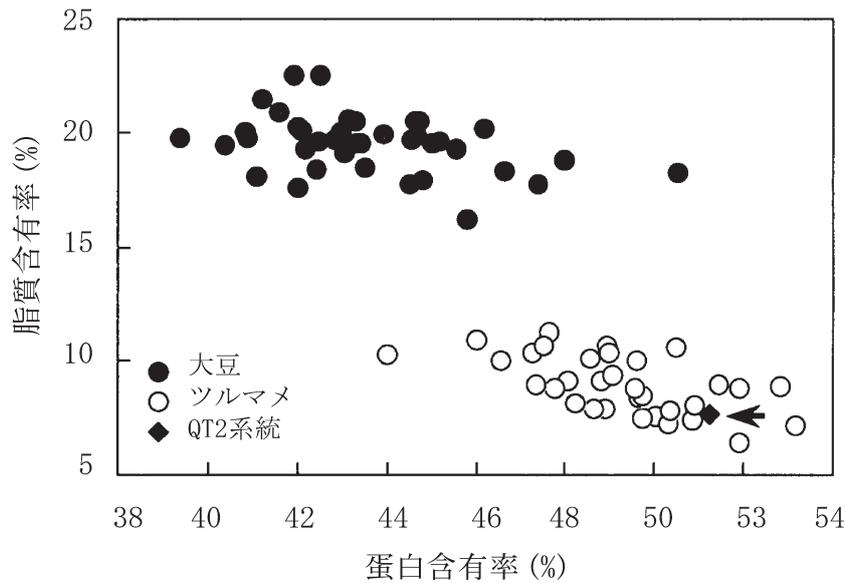


図23 QT2系統及びツルマメの蛋白含有率と脂質含有率

表28 フクユタカ戻し交雑系統の主要成分

表現型	系統数	タンパク質含有率 (%)	脂質含有率 (%)
フクユタカ戻し交雑系統B ₃ F ₂			
7S欠	14	44.3ab	19.9a
野生型	15	43.3ac	19.5b
ヘテロ型	18	44.3b	19.7ab
フクユタカ	16	43.0c	19.7b

表29 QT2系統と主要品種の11S相当部分の割合

品種・系統名	総面積に占める割合 (%)			11S/7S比	蛋白質含有率 (%)
	11S	7S	LOX		
QT2系統	54.6	—	3.9	—	51.2
フクユタカ	47.6	21.8	5.0	2.19	45.6
タマホマレ	37.6	26.5	7.0	1.41	41.6
エンレイ	43.0	27.2	3.7	1.58	48.0
アキシロメ	40.2	26.9	4.6	1.50	43.0
いちひめ	38.8	31.0	—	1.25	40.8

注) 同じ文字間で有意差無し (5%水準)。

表30 7S欠失戻し交雑系統のデンシトメトリー解析

栽培条件	成分	品種・系統名		
		エルスター	QT2 (フクユタカB ₃ F ₂)	フクユタカ
2006年 (6月播種)	LOX	1,930 ± 176	19,663 ± 203	22,135 ± 425
	7S	126,516 ± 3,246a	2,332 ± 523	120,643 ± 3,190a
	11S	207,004 ± 6,853a	261,587 ± 4,507	205,849 ± 5,279a
	積算値計	369,870 ± 11,201a	313,333 ± 5,701	372,503 ± 11,102a
2006年 (7月播種)	LOX	718 ± 53	22,862 ± 1,283a	24,994 ± 1,016a
	7S	126,776 ± 2,757a	4,725 ± 1,421	131,908 ± 2,926a
	11S	238,770 ± 1,601a	293,542 ± 6,329	239,354 ± 6,458a
	積算値計	395,950 ± 3,486a	348,558 ± 7,569	425,148 ± 10,788a
2007年 (7月播種)	LOX	479 ± 459	47,129 ± 546a	48,028 ± 1,937a
	7S	210,414 ± 11,273a	1,958 ± 1,070	223,071 ± 14,216a
	11S	326,709 ± 6,187a	379,637 ± 5,134	356,165 ± 18,931a
	積算値計	616,055 ± 29,537a	497,111 ± 2,435	710,367 ± 37,871a

注) 数値は輝度積算値、バックグラウンドのため欠失でも0にはならない。±標準誤差、同一栽培・同一成分の同じ文字間で有意差無し (5%水準)。

表31 同一個体上の7S欠失型と野生型の7S/11S比

項目	7S欠失型	野生型	
総面積に占める割合 (%)	LOX	3.86 ± 0.69	2.19 ± 0.74
	7S	2.28 ± 0.74	35.23 ± 3.90
	11S	77.62 ± 2.19	50.99 ± 5.39
相対比	7S/11S	0.03 ± 0.01	0.71 ± 0.15
	7S/LOX	0.68 ± 0.24	17.73 ± 4.89
	11S/LOX	24.36 ± 7.30	26.90 ± 11.03

注) フクユタカB₃F₂ (7S欠失) × タチナガハ由来の7S欠失に関して未固定のF₂個体上のF₂種子を分析に用いた、バックグラウンドのため7S欠失型でも0にはならない。

表32 7S欠失系統の豆腐加工適性

品種または系統名	溶出固形分 (g)	豆乳収量 (mL)	豆乳固形分 (%)	豆乳比重 (g/mL)	豆乳 pH	豆腐の硬さ (g/cm ²)
リポ全欠系統	0.292	266.8	9.115	1.020	6.66	88.8
フクユタカ	0.262	262.6	9.395	1.025	6.67	88.3
7S欠失系統	0.382	259.8	9.290	1.030	6.69	91.0

注) リポ全欠はリポキシゲナーゼ完全欠失をフクユタカへ戻した系統 (B₃F₁)、7S欠失系統は7S欠失をフクユタカへ戻した系統 (B₃F₃)。

11Sの増加で補っていることが推察された。これらの結果から、7Sタンパク質を欠失してもQT2系統はタンパク質含有量は11Sが増加し、普通大豆と変わらないと考えられた。

7Sのサブユニット欠失系統を用いたこれまでの研究から、7Sのサブユニットを欠失しても補完するように11S含有量が増加し、全タンパク質含有量は変化がないことが報告されている (水野ら1994、高橋ら1994)。一方、11Sのサブユニット欠失系統でも全タンパク質含有量は変わらず、7Sの増加により補完されていると推定されている (海妻ら 1990)。

本研究で得られたQT2系統は遺伝的な欠失機構がこれまでの7Sの部分欠失系統と異なっていると推察されるにもかかわらず、7Sの不足部分を11Sの増加が補う形でタンパク質含有量が変わらなかったことは、7Sと11Sの相補的関係を考察する上で非常に興味深い。

豆腐加工適性は7S欠失系統、フクユタカ、リポキシゲナーゼ欠失系統とも破断強度に大きな差はなかった (表32)。これまでに7Sの部分欠失品種「ゆめみのり」を用いた豆腐加工適性試験が行われ、豆乳抽出率が低く、破断強度が極端に低下したことが報告されている (高橋ら2004)。本実験では豆乳抽出率はやや低くなったものの、破断強度については変わらなかった。この違いの要因としては種子中のカルシウム含有量など微量成分が関与しているものと考えられるが、詳細に検討するためには多くの品種に *Scg-1* を導入して比較検討する必要がある。

4 考察

大豆の食品としての最大の特徴はタンパク質含有量が高い点にある。大豆のタンパク質の主要なものは貯蔵タンパク質の7Sと11Sであるが、近年本研究で見いだした7S欠失系統と11S欠失系統を交配して、7Sと11Sを同時に欠失させた系統が育成されている。この系統は貯蔵タンパク質が欠失している代わりに、遊離アミノ酸が増加しており、総窒素含有量は普通大豆と変わらないことが報告されている (Takahashi *et al.* 2002)。貯蔵タンパク質を欠失しても総窒素含有量が低下せず、遊離アミノ酸の形で蓄積することは、大豆が7Sと11S以外の形態でタンパク質を貯蔵できないことを示唆している。このため7S、11Sの欠失メカニズムの違いは7Sと11Sの相補的関係に影響を与えないものと考えられる。

ごく最近になって大豆のタンパク質には7S、11Sの貯蔵タンパク質以外に生体膜タンパク質 (リポフィリックプロテイン:LP) が多量に含まれていることが報告された (Samoto *et al.* 2007)。7S欠失系統は11Sの増加で7Sの減少を補っていると推定されたが、減少分すべてが11Sの増加で補われているどうかはデンストメーターを用いた解析では明らかではないので、LPタンパク質の増減については今後の検討課題である。

大豆の主要な加工用途である豆腐については古くから研究が行われ、種子中のタンパク質含有量、7S/11S比、サブユニット構成等が豆腐の硬さに影響することが報告されてきた (Saio *et al.* 1974、Utsumi and Kinsella 1985、Yagasaki *et al.* 2000)。本研究もこれらの研究に沿って高11S系統を育成し、豆腐加工適性の向上を図

ることを目的として行った。しかし豆腐の実際の製造現場ではこれら成分だけでは豆腐の硬さの予測は困難で、その他の成分の関与が指摘されてきた。

最近になって、凝固剤に注目した研究が進展し、凝固剤濃度を変化させて得られる最大破断強度はタンパク質含有量と相関が高いが、凝固剤濃度（にがり0.25%）を一定にした条件下では、種子中のタンパク質含有量や7S/11S比よりも種子中のカルシウム含有量やフィチン酸含有量が大きな影響を与えることが示された（Toda *et al.* 2003、Toda *et al.* 2006、高橋ら 2005）。これらの研究によると種子中のカルシウムが凝固剤の補助として働く反面、フィチン酸が凝固剤の2価イオンをトラップするため、これら微量成分の存在量を考慮しなければ豆腐の硬さは推定できない。

また7Sと11Sについても11Sがタンパクゲルの骨格を形成し、7Sがその形成速度を調節していると考えられるようになった（Yagasaki *et al.* 2000）。このため、「ゆめみのり」のような極端な高11S系統ではゲル形成が急速に生じ、もろい豆腐が形成されると考えられる。また種子中のカルシウムが凝固剤の役割を果たしうることを考慮すると、抽出時点でカルシウムイオンを核に凝集が急速に生じていることも考えられる。

同様のことがScg-1を導入した7S欠失系統でも生じると考えられ、豆腐用として7S完全欠失系統を用いる際には種子中のカルシウムやフィチン酸含量を考慮する必要があると思われる。今後は豆腐形成メカニズムの知見を活用して、カルシウム含有量を低くした7S欠失系統の育成など、新たな形質を付与した品種を開発しなければ、7S完全欠失系統は豆腐用としては利用できないと考えられる。

一方、7Sタンパク質の α サブユニット及び β サブユニットは大豆のアレルゲンタンパク質としても知られ（Ogawa *et al.* 1991、Ogawa *et al.* 1995、Samoto *et al.* 1997）、 α 欠失の「ゆめみのり」は低アレルゲン大豆食品の素材として有望視されている。大豆には少なくとも16種類のアレルゲンタンパク質が存在するために、7S欠失だけでは十分ではないが、Scg-1を導入した系統は、 α に加えて β も欠失できるので、「ゆめみのり」より低アレルゲン大豆食品の素材としては有望と考えられる。

他にも7S欠失大豆は11Sタンパク質を効率的に抽出するための素材や低7S品種とのブレンド素材などの利用法が考えられるが、十分な検討はなされていない。今後7S完全欠失系統を実用化するためには、7S欠失特性を活用した新たな利用加工技術の開発が不可欠である。

V 総合考察

近年農産物貿易の自由化による国産農産物の価格低迷、パンや肉類を多く取り入れた欧米風の食事の増加に伴う米の消費量の減少など国内農業を取り巻く社会情勢が厳しくなり、農村の過疎化・活性低下が進んでいる。このような状況の中で特色ある農産物を導入・生産し、特産物として販売することにより農村を活性化しようとする動きが広まってきている。また消費量の減少や輸入自由化による需要の減退に直面している作物では、新たな需要を開拓し、生産量

を維持・拡大しようと試みられている。

一方消費者ニーズの多様化の中で新たな食品を開発しようとする実需者の動きも強まっている。特に消費者の健康志向の高まりを背景に、食品の持つ健康機能性に注目が集まり、新たな市場が形成されつつある。

こうした動きに対応して、大豆に限らず米、麦、かんしょ、ばれいしょなど多くの作物で成分を改変した新規用途品種が育成されている。

しかしながら1990年代から次々に実用化され

た新たな形質を持つ農産物はすべてが順調に生産され、一般の食生活に浸透してきているとは言えない。「アヤムラサキ」等の有色かんしょは最も早い時期から、その機能性情報・利用加工技術とともに実用化した新形質作物の一つであるが、その普及面積は全国で100ha程度に過ぎない（農林水産省生産局 2002）。香り米、低タンパク米、有色素米などの多くの新形質品種が育成された水稲も低アミロース米を除けば普及面積はそれほど多くない（農林水産省総合食料局 2006）。もち性を付与した小麦や大麦も用途開発が進まず、数品種が育成されたもののほとんど作付はなされていない（農林水産省総合食料局 2004）。

大豆においても同様で、本研究で開発したりポキシゲナーゼ欠失大豆も1996年に登録された「いちひめ」を初めとして「エルスター」「すずさやか」「きぬさやか」などが育成されたが、すべてを合計しても600ha程度で全作付け面積に占める割合は0.5%程度に過ぎない（農林水産省生産局 2007）。

新形質作物の普及面積が少ない理由としては①品種改良が進んでいないか改変した形質が農業特性に影響を与えるために生産性が従来品種に比べて劣る、②新規形質に応じた用途開発が進んでいない、③用途開発がある程度進んでいても、製品需要に限られる、④加工技術の進歩等で改良形質の優位性が発揮できない、⑤低アレルギー米のように表示や生産管理の課題が解決されていない、などが考えられる。

リポキシゲナーゼ欠失大豆については、本研究でも示したように農業特性に大きな影響を与えず、普通品種と同等の栽培特性を有することから、生産面の問題はクリアできていると考えられるが、②以降の用途開発は多くの課題が残されている。特に加工技術の進歩でリポキシゲナーゼ完全欠失特性の優位性が低くなったことが大きい。豆乳は需要が拡大している数少ない大豆食品であるが、豆乳抽出前の加熱、脱皮・脱胚軸工程が導入されたことにより、青臭みの問題は重要度が低くなった。このためこれら新しい技術を利用できない小規模な実需者を除い

て、多くの需要が期待できなくなった。

またリポキシゲナーゼ欠失大豆が持つ大豆の食品機能性の向上効果（Nishiba and Suda 1998）も商品の付加価値としては大きくなく、小麦粉等との混和による新規食品開発も考えられているが、まだ十分な規模の市場を獲得していない。

7Sタンパク質欠失系統も同様の状況にある。2001年に育成された7Sの α 、 α' を欠失した「ゆめみのり」は、豆乳が絞りにくいことから豆腐・豆乳では利用できず、煮豆など豆乳を絞らない加工品では優位性が十分でない。このため、7Sサブユニットが大豆の主要アレルギータンパク質の一つであることに注目して、「低アレルギー大豆」として品種化された（高橋ら 2004）。しかし、「低アレルギー」の表示ができなくなったことから商品化の目処が立たなくなり、現在のところ作付はされていない。QT2系統の7S欠失特性（*Scg-1*）を導入した大豆系統も状況は同じで、7S欠失・高11Sの特性を利用した用途が開発できていないため品種化はできていない。

大豆以外で現在までに比較的普及している新形質作物は、「ミルキークイーン」などの低アミロース米や「チクゴイズミ」に代表される低アミロース小麦である。これらの品種の共通点は新規形質品種ではあるが、まったく新たな食品開発に用いられて普及したのではなく、従来型の利用加工の中で用いられ、食品の品質向上につながったために一定需要が確保できたと考えられる。

現在リポキシゲナーゼ欠失大豆が最も多く使われているのは、「油揚げ」用途である。リポキシゲナーゼは貯蔵中の種子劣化を促進する（Lambrecht *et al.* 1996）。このためリポキシゲナーゼによる貯蔵中の種子劣化を防いで、年間を通じて加工適性を安定化するために、油揚げ業界でリポキシゲナーゼ欠失大豆が用いられている。貯蔵中の品質劣化を抑える目的でリポキシゲナーゼ欠失大豆を用いるため、豆乳製造過程で容認されるよりも多少高率の普通大豆の混入も容認できると考えられ、生産流通過程にお

ける純度管理を容易にするという点でも優れた利用方法である。これは従来想定していたリポキシゲナーゼ欠失による食品の風味向上とは異なる利用方法であるが、リポキシゲナーゼの特性を利用した新たな品質向上技術であり、今後のリポキシゲナーゼ欠失大豆の普及を考える上で注目すべき利用法と考えられる。

またリポキシゲナーゼ欠失、7Sサブユニット欠失以外の新形質品種として育成された品種には、2002年に育成された「ふくいぶき」がある(島田ら 2004)。「ふくいぶき」は健康機能性成分であるイソフラボン含有量が高いが、「高イソフラボン」はセールスポイントの一つにす

ぎず、耐病虫性や耐倒伏性の優位性で普及が進んでいる。「ふくいぶき」のケースでは一部の商品で機能性の特徴を生かした製品開発を行っているものの、多くが従来の普通大豆の代替品種として栽培されていることが普及を押し進める要因となっているものと考えられる。

こうした点を考慮すると新形質品種を普及するためには、改変した成分だけでなく、その他成分にも注目して新たな利用技術の開発を行うとともに、新規形質を利用した用途開発だけではなく、当面の普及のためには従来の利用加工技術の中での新規形質の優位性を見いだすことが重要と考えられる。

VI 摘 要

大豆はタンパク質や脂肪を豊富に含んでおり、穀類で不足するこれら栄養成分を補完できる貴重な作物である。しかし同様の特徴を持つ肉類に比較した美味しさの点でやや劣る。また国内で用いられる食品用大豆は豆腐、味噌など伝統的食品が大半を占め、その需要量は横ばい状態である。大豆は良質なタンパク質やイソフラボン等の健康機能性成分を豊富に含み、国民全体の健康維持にも大きく寄与すると考えられることから、新たな利用方法を開発し、無理なく日常の摂取量を増大する方策が求められている。

大豆の食品用途を制限している最大の要因の一つは大豆製品独特の青臭みである。これを取り除くことにより、風味による制限が少なくなり、大豆の新たな用途が開発されることが期待される。また大豆の主要な貯蔵タンパク質は β -コングリシニン(7S)とグリシニン(11S)であり、両者でタンパク質全体の60~80%を占めると言われている。7Sタンパク質は11Sタンパク質に比べ含硫アミノ酸含量が少なく、ゲル化特性や栄養性の面で劣っている。このため、7Sを減少させて、11Sを増加した品種の育成が求められている。

本研究では大豆の青臭みの原因となっている

リポキシゲナーゼを完全に欠失した系統を作出し、その特性を調査した。またリポキシゲナーゼ完全欠失系統の遺伝的背景を明らかにするとともに、効率的な品種育成のために完全欠失系統の選抜技術の開発を行った。さらにツルマメの1系統に7Sタンパク質を完全に欠失している系統を見だし、その遺伝的背景と成分特性を調査した。得られた結果は次の通りである。

1. 「関系2号(L-1・L-3欠失、後の「関東102号」)と「関系1号(L-2・L-3欠失、後の「ゆめゆたか」)」を交配した後代にガンマー線処理を行った突然変異集団をSDS-PAGEでスクリーニングし、これまで交配育種では得られていなかったリポキシゲナーゼ完全欠失系統を見出した。この系統は生育異常を示さず、正常に次世代を得ることができた。また得られた種子はリポキシゲナーゼ完全欠失特性を維持しており、この形質が遺伝的形質であることを確認した。

この系統を用いて圃場での特性調査を行った結果、戻し交配親である「スズユタカ」とほぼ同等の生育特性を示し、無防除圃場における栽培試験でも虫害程度に普通品種との差は見られなかった。また主要成分・豆腐加工適性もほと

んど差がなかった。

「タマホマレ」「フクユタカ」に戻し交配を行った系統でも傾向は同じで、種子リポキシゲナーゼは大豆の生育に大きな影響を与えないと考えられた。

リポキシゲナーゼ欠失大豆を用いて行った加工適性試験では、普通品種に比べ豆乳・豆腐では官能評価の差が小さかった。しかし豆乳プリンでは大きな差が見られ、用途によるリポキシゲナーゼ欠失特性の優位性に差があることが示唆された。またリポキシゲナーゼ完全欠失系統に5%普通大豆を混入したものでは、豆乳ではリポキシゲナーゼ完全欠失大豆のみの区と総合評価は変わらなかったが、豆乳プリンでは総合評価で有意な差が出た。このことからリポキシゲナーゼ完全欠失大豆への普通品種の混入の許容度合いは用途によって異なっていると考えられた。

2. 普通品種と完全欠失系統の交配後代は野生型：L-1・L-2欠失：L-3欠失：全欠失が9:3:3:1の比に分離し、完全欠失系統とL-3欠失の交配後代のF₂はL-3欠失：完全欠失が3:1に分離した。この結果、L-1とL-2の間に強連鎖が存在することが確認された。またこの交配から初めてL-1・L-2欠失系統が作出された。

育種現場でも利用可能なリポキシゲナーゼ欠失系統の簡易迅速検定法として、リポキシゲナーゼのβ-カロテン退色能を用いた色素法を検討した。種子の一部を削って採取した種子粉に、L-2溶液 (Test I)、L-3溶液 (Test II) をそれぞれ補助酵素液として添加し、β-カロテン液を加えた後に黄色の退色度合いを肉眼で観察した。Test I ではL-3を持つ系統で退色反応が起こり、Test II ではL-2を持つ系統で退色反応が生じた。普通大豆と完全欠失系統の交配後代からは、L-1とL-2の間の強連鎖のために、野生型、L-1・L-2欠失、L-3欠失、全欠しか出現しないことから、β-カロテン退色反応により、容易に完全欠失系統を選抜できると考えられた。戻し交配系統を用いて実際にβ-カロテン退色法を検定に用いた結果、3,544粒を検定し、225粒がリポキシゲナーゼ完全欠失であると判定された。このう

ち3粒が誤判定で、誤判定率はわずか1.3%で、この検定法の信頼性は高いと考えられた。

連続戻し交配の際に、ヘテロでも判別が可能な検定法としてDNAマーカーを用いた検定法を開発した。L-2、L-3のそれぞれの欠失変異のDNA配列を利用してプライマーを設計してPCRを行った結果、L-3は2カ所のSNPsが利用できたので安定してバンドの増幅が起こったが、L-2は1カ所の変異のみであったので、ミスアニーリングが生じることがあった。そこでSNPsを利用したプライマーと、SNPsをはさむように設計した2つのプライマーを混合してPCRを行うと、ミスアニーリングで生じたバンドは濃さで判別でき、実験ミスの判定も可能であった。

より安定したリポキシゲナーゼ検定法として、制限酵素を用いて増幅DNA断片を切断し、バンドの有無で判定する検定法を検討した。L-2欠失型、L-3保有型がそれぞれ制限酵素NlaⅢとSsp Iの認識部位であることを利用して、増幅したDNA断片を制限酵素処理して切断し、電気泳動することにより、欠失型と野生型を検定できることを示した。

3. 九州各地から収集した大豆の野生種のツルマメをスクリーニングした結果、天草下島で収集したツルマメから7Sが完全に欠失した系統 (QT2系統) を見いだした。これまでに突然変異で作出された7S完全欠失系統と異なり、QT2系統は正常に生育し、次世代を得ることができた。また次世代でも7S欠失性は保持されており、QT2系統が持つ7S完全欠失性は遺伝的特性であることを確認した。

QT2系統と普通大豆の交配実験の結果、F₁はすべて7S欠失型、F₂は7S欠失型：野生型が3:1に分離し、QT2系統が持つ7S欠失性が単一の優性遺伝子 (Scg-1) に支配されることを明らかにした。またリポキシゲナーゼ完全欠失系統、α'欠失系統との交配後代の分析から、Scg-1はリポキシゲナーゼやα'サブユニットとは独立に遺伝することを明らかにした。

QT2系統や大豆への戻し交配系統の主要成分を分析した結果、7Sを欠失しても主要成分に大きな違いは見られなかった。また電気泳動像

をデンシトメトリーで分析した結果から、これまでに作出された低7S系統と同じく、7Sの減少を補う形で11Sが増加していると推測された。4. これまでにリポキシゲナーゼ欠失の「いちひめ」、「エルスター」、7Sの α 、 α' を欠失した「ゆめみのり」などいくつかの成分改変大豆が育成されているが、普及は進んでいない。この原因として、加工技術の進歩でリポキシゲナー

ゼ完全欠失特性の優位性が低くなったこと、極端な高11S（低7S）では豆乳が絞りにくく、7S欠失の優位性が発揮しにくいことが考えられる。他作物等の成分改変品種の成功例の考察から、成分を改良した品種の普及のためには、新規用途の開発だけでなく、従来の製造工程を生かした利用加工技術など、多面的な用途開発が重要であると考えられた。

VII 謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文のとりまとめにあたって北海道大学大学院農学研究院の喜多村啓介教授に懇切なご指導とご助言、ならびに本論文のご校閲を頂きました。また、農業研究センター豆類育種研究室（現作物研究所大豆育種研究チーム）ご在職中には、リポキシゲナーゼ欠失系統の分譲を頂きました。

北海道大学大学院農学研究院の佐野芳雄博士、三上哲夫博士には論文のご校閲を頂き、多大のご助言を賜りました。

元九州農業試験場作物開発部大豆育種研究室長の異儀田和典氏、酒井真次氏（現東北農業研究センター）、松永亮一博士（現九州沖縄農業研究センター）には本研究の計画、遂行にあたり懇切なご指導、ご協力をいただきました。九州沖縄農業研究センター・大豆育種研究チームの中澤芳則サブチーム長及び主任研究員高橋将一氏、元作物研究所・大豆育種研究チーム長の小巻克巳博士（現独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構）および作物研究所大豆育種研究チーム主任研究員の高橋浩司氏には、研究の計画、実験の遂行にあたって多大なご協力を頂きました。

九州・沖縄農業研究センター・機能性利用研

究チームの須田郁夫博士（現農業・食品産業技術総合研究機構）、西場洋一博士、古田収博士には大豆の利用加工技術について適切で多大なご助言、ご指導を頂きました。

北海道農業研究センター・低温耐性研究チームの石本政男博士、千葉大学園芸学部の原田久也博士（現生物資源研究所）には研究の遂行にあたって有益なご助言を頂きました。

国際農林水産業研究センターの斉藤昌義博士、ブラジル農牧研究公社大豆研究センター(EMBRAPA)のLeones A. de Almeida博士ほか職員の方々にはリポキシゲナーゼ欠失大豆の加工適性試験の計画、遂行に多大なご協力を頂きました。

「いちひめ」の品種化にあたっては、各県の試験研究機関の方々には特性検定試験、地域適応性検定試験、奨励品種を実施していただきました。

また実験材料の管理・養成には九州農業試験場（現九州沖縄農業研究センター）および中央農業総合研究センターの業務科職員の方々の多大なご協力を頂きました。

ここに、これらの方々に心から感謝の意を表します。

VIII 引用文献

- Arai, S., M. Noguchi, M. Kaji and M. Fujimaki (1970) n-Hexanal and some volatile alcohols. Their distribution in row soybean tissue and formation in crude soy protein concentrate by lipoxygenase. *Agric. Biol. Chem.* 34:1420-1423.
- Axelrod, B., T. M. Cheesebrough and S. Laasko (1981) Lipoxygenase from soybean. *Methods Enzymol.* 71:441-451.
- Bi, J. L., G. W. Felton and A. J. Mueller (1994) Induced resistance in soybean to *Helicoverpa zea*. *Journal of Chemical Ecology* 20:183-198.
- Carbone, R., J. Luquez, M. E. Weillienmann de Tau and J. C. Suarez (1998) Frequency of recombination of loci L1 and L2 that encode for presence of lipoxygenase enzymes in soybean seeds. *Soybean Genetics Newsletter* 25: 20.
- Catsimpoolas, N. (1969) A note on proposal of an immunochemical system of reference and nomenclature for the major soybean globulins. *Cereal Chem.* 46:369-372.
- Christopher, J. P., E. K. Pistorius and B. Axelrod (1970) Isolation of an enzyme of soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 198:12-19.
- Christopher, J. P., E. K. Pistorius and B. Axelrod (1972) Isolation of a third isozyme of soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 284:54-62.
- Coates, J. B., J. S. Medeiros, V. H. Thanh and N.C.Nielsen (1985) Characterization of the subunits of β -conglycinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 243(1):184-194.
- Cregan, P. B., T. Jarvic, A.L.Bush, R. C. Shoemaker, K.G. Lark, A.L. Kahler, N. Kaya, T.T. VanToai, D.G. Lohnes, J. Chung and J. E. Specht (1999) An integrated genetic map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39:1464-1490.
- Davies, C. S. and N. C. Nielsen (1986) Genetic analysis of a null allele for lipoxygenase-2 in soybean. *Crop Sci.* 26:460-463.
- Davies, C. S. and N. C. Nielsen (1987) Registration of soybean germplasm that lacks lipoxygenase isozymes. *Crop Sci.* 27:370-371.
- Derbyshire, E., D. B. Wright and D. Boulter (1976) Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochem.* 15:3-24.
- Evans, D. E., W. E. Nyquist, J. B. Santini, P. Bretting and N. C. Nielsen (1994) Immunological identification of seed lipoxygenase genotypes in soybean. *Crop Sci.* 34:1529-1537.
- Fehr, W. R. (2000) Breeding soybean for nutritional and food quality traits. The third international soybean processing and utilization conference (Proceedings),19-22.
- Fu, C., L. Qiu and R. Chang (2000) Evaluation on quality of China's soybean germplasm resources quality. The third international soybean processing and utilization conference (Proceedings), 41-42.
- Fujimaki, M., S. Arai, M. Kirigawa and Y. Sakurai (1965) Studies on flavor components of soybeans. Part 1. Aliphatic carbonyl compounds. *Agric. Biol. Chem.* 29:855-863.
- Fukushima, D. (1991) Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, Technology, and Nutrition. *Food Reviews International* 7: 323-351.
- Grayburn, W. S., G. R. Schneider, T. R. Hamilton-Kemp, G. Bookjans, K. Ali, and D. F. Hildebrand (1991) Soybean leaves contain multiple lipoxygenases. *Plant Physiology* 95: 1214-1218.

- Hajika, M., K. Igita and K. Kitamura (1991) A line lacking all the seed lipoxygenase isozymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) induced by gamma-ray irradiation. *Japan. J. Breed.* 41:507-509.
- Hajika, M., K. Kitamura, K. Igita and Y. Nakazawa (1992) Genetic relationships among the genes for lipoxygenase -1, -2 and -3 isozymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed. *Japan. J. Breed.* 42(4):787-792.
- 羽鹿牧太・高橋将一・異儀田和典・酒井真次・中澤芳則 (2002) ダイズ新品種「いちひめ」の育成とその特性. 九州沖縄農業研究センター報告 40:79-94.
- 羽鹿牧太・高橋将一・酒井真次 (1997) 大豆新品種「いちひめ」の特性. 九州農業研究 59:19.
- Hajika, M., M. Takahashi, S. Sakai and K. Igita (1996) A new genotype of 7 S globulin (β -conglycinin) detected in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.). *Jpn. J. Breed.* 46:385-386.
- Hajika, M., M. Takahashi, S. Sakai and R. Matsunaga (1998) Dominant inheritance of a trait lacking β -conglycinin detected in a wild soybean line. *Breeding Science* 48:383-386.
- Hammond, E. G., D. N. Duvick, W. R. Fehr, D. F. Hildebrand, E. C. Lacefield and T. W. Pfeiffer (1992) Rapid screening techniques for lipoxygenases in soybean seeds. *Crop Sci.* 32:820-821.
- Harada, K., Y. Toyokawa and K. Kitamura (1983) Genetic analysis of the most acidic 11S globulin subunit and related characters in soybean seeds. *Jpn. J. Breed.* 33:23-30.
- 原田久也・山中直樹 (2003) ダイズのDNAマーカーの開発とその利用. 総合農業研究叢書「わが国における食用マメ類の研究」. 中央農業研究センター 44:66-73.
- Harman, G. E. and L. R. Mattick (1976) Association of lipid oxidation with seed aging and death. *Nature* 260:323-324.
- Hayashi, M., M. Nishioka, K. Kitamura and K. Harada (2000) Identification of AFLP markers tightly linked to the gene for deficiency of the 7S globulin in soybean seed and characterization of abnormal phenotypes involved in the mutation. *Breeding Science* 50:123-129.
- Hildebrand, D. F. and Hymowitz, T. (1981) Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58:583-586.
- Hildebrand, D. F. and Hymowitz, T. (1982) Inheritance of lipoxygenase-1 activity in soybean seeds. *Crop Sci.* 22:851-853.
- Hildebrand, D. F. and T. Hymowitz (1983) Lipoxygenase activities in developing and germinating soybean seeds with and without lipoxygenase-1. *Bot. Gaz.* 144:212-216.
- Hildebrand, D. F., E. C. Lacefield and T. Pfeiffer (1991) Nondestructive rapid screening technique for lipoxygenase 1 in soybean seeds. *Soybean Genetics Newsletter* 18:312-313.
- Hildebrand, D. F., J. G. Rodriguez, C. S. Legg, G. C. Brown and G. Bookjans (1989) The effects of wounding and mite infestation on soybean leaf lipoxygenase levels. *Zeitschrift fuer Naturforschung, Section C, Biosciences* 44:655-659.
- Hill, J. E. and R. W. Breidenbach (1974) Proteins of soybean seeds. I. Isolation and characterization of the major components. *Plant Physiol.* 53:742-746.
- Holman, R. T. (1948) Lipoxygenase activity and fat composition of germinating soybeans. *Arch. Biol. Biophys.* 17:459-466.
- Ishikawa, G., Y. Takada, T. Nakamura (2006) A PCR-based method to test for the presence or absence of beta-conglycinin alpha' - and alpha-subunits in soybean. *Molecular Breeding* 17:365-374.
- James M. Narvel, Walter R. Fehr and Linda C. Weldon (2000) Analysis of soybean seed

- lipoxygenases. *Crop Sci.* 40:838-840.
- 海妻矩彦・小田中浩哉・佐藤弘一・小綿寿志 (1990) 放射線によって誘発された大豆種子タンパク質に関する遺伝的変異体について Ⅲ. 11Sグロブリン変異体の蛋白質含有量及び油脂含量. *育種学雑誌* 40 (別1):504-505.
- Kamiya, K. and T. Kiguchi (2003) Rapid DNA extraction method from soybean seeds. *Breeding Science* 53:277-279.
- 菅野道廣 (1999) “大豆製品に求められる機能性”. 大豆タンパク質の加工特性と生理機能, 建帛社, 1-16.
- Kato, T., H. Ohta, K. Tanaka and D. Shibata (1992) Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. *Plant Physiol.* 98:324-330.
- Kikuchi, A., J. R. Bordignon, J. M. G. Mandario and M. C. Carro-Panizzi (1999) Metodo simples e rapido identificacao das isoenzimas (L-1, L-2, L-3) de lipoxygenase em sementes de soja. *Congresso Brasileiro de soja (Supplement)*, 463.
- 菊池彰夫・喜多村啓介 (1985) 大豆リポキシゲナーゼの遺伝育種的除去6. L-1生産支配遺伝子座とL-2生産遺伝子座間の強連鎖について. *育種学雑誌* 35 (別1) 300-301.
- Kikuchi, A. and Kitamura, K. (1987) Simple and rapid carotene bleaching tests for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds. *Japan. J. Breed.* 37:10-16.
- 菊池彰夫・村田吉平・酒井真次 (1989) 大豆発芽種子におけるリポキシゲナーゼ活性の分布とその品種間差異. *日本作物学会東北支部会報* 32:94-96.
- Kim, M. Y., H. Bo-Keun, J. Tae-Hwan, H. Eun-Young, V. Kyujung, K. Yong and L. Suk-Ha (2004) Single nucleotide polymorphism discovery and linkage mapping of lipoxygenase-2 gene (*Lx2*) in soybean. *Euphytica* 135:169-177.
- Kim, S. D., K. H. Kim and H. K. Park (2000) Soybean Breeding for processing and utilization in Korea. The third international soybean processing and utilization conference (Proceedings), 23-28.
- King, J. M., Svendsen L. K., Fehr W. R., Narvel J. M., White P. J. (1998) Oxidative and flavor stability of oil from lipoxygenase-free soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:1121-1126.
- 北川さゆり・石本政男・菊池文男・喜多村啓介 (1991) γ 線により誘発されたダイズ7Sタンパク質サブユニット欠失または激減形質及びその遺伝様式. *育種学雑誌* 41 (別2):460-461.
- Kitamura, K. (1984) Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less and L-3-less soybeans. *Agric. Biol. Chem.* 48:2339-2346.
- 喜多村啓介 (1991) 青臭さのない大豆遺伝 45(2):8-9.
- Kitamura, K., C. S. Davies, N. Kaizuma and N. C. Nielsen (1983) Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.* 23:924-927.
- Kitamura K., C. S. Davies and N. C. Nielsen (1984) Inheritance of null-alleles for the α subunit of β -conglycinin and the A5A4B3 subunit of glycinin in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 68:253-257.
- 喜多村啓介・原田久也 (1989) ダイズ種子蛋白質の遺伝変異と品種改良. *育種学最近の進歩.* 30:26-38.
- Kitamura, K. and N. Kaizuma (1981) Mutant strains with low level of subunits of 7S globulin in soybean (*Glycine max* Merr.) seeds. *Japan. J. Breed.* 31:353-359.
- Kitamura, K., A. Kikuchi and K. Harada (1987) Performance of near-isogenic lines lacking seed lipoxygenases. *Soybean Genetic Newsletter* 14:109-112.
- Kitamura, K., T. Kumagai and A. Kikuchi (1985) Inheritance of lipoxygenase-2 and

- genetic relationships among genes for lipoxygenase-1, 2 and -3 isozymes in soybean seeds. *Japan. J. Breed.* 35:413-420.
- Koshiyama, I. (1968) Chemical and physical properties of a 7S protein in soybean globulins. *Cereal Chem.* 45:394-404.
- Kovacs, E., N. D. Lam, J. Beczner and I. Kiss (1991) Effect of irradiation and dielectric heating on soybean ultrastructure, trypsin-inhibitor, and lipoxygenase activities. *Food Structure* 10:217-227.
- Ladin, B. F., J. J. Doyle and R. N. Beachy (1984) Molecular characterization of a deletion mutation affecting the α' -subunit of β -conglycinin of soybean. *J. Mol. Appl. Genet.* 2:372-380.
- Lambrecht, H. S., S. Nielsen, B. J. Liska and N. C. Nielsen (1996) Effect of soybean storage on tofu and soymilk production. *Journal of food quality* 19:189-202.
- Mack, A. J., T. K. Peterman and J. N. Siedow (1987) Lipoxygenase isozymes in Higher plant : Biochemical properties and physiological role. *Isozymes:Current Topics in Biological and Medical Research* 13: 127-154.
- 水野由紀子・高橋浩司・生井兵治・喜多村啓介 (1994) ダイズ7Sグロブリン α 及び α' サブユニットの欠失に伴う種子成分の変動. *育種学雑誌* 44 (別1) 201.
- Mohri, S., Y. Endo, K. Matsuda, K. Kitamura and K. Fujimoto (1990) Physiological effects of soybean seed lipoxygenases on insects. *Agric. Biol. Chem.* 54:2265-2270.
- 門間美千子・杉本敏男・橋詰和宗・斎尾恭子 (1990) 大豆ホモジネート中のリポキシゲナーゼ活性に対する各種阻害剤の効果. *日本食品工業学会誌* 37:625-627.
- 森一幸・小村国則・保坂和良 (2003) 1分間DNA抽出法を用いたバレイショ育種におけるDNAマーカー選抜法. *育種学研究* 5 (別2)191.
- Mori, T., S. Utsumi, H. Inba, K. Kitamura and K. Harada (1981) Differences in subunit composition of glycinin among soybean cultivars. *J. Agric. Food. Chem.* 29:20-23.
- Narvel, J. M., W. R. Fehr, G. A. Welke (1998) Agronomic and seed traits of soybean lines lacking seed lipoxygenases. *Crop Sci.* 38:926-928.
- Nielsen, N. C., C. D. Dickinson, T. J. Cho, V. H. Thahn, B. J. Scallon, R. F. Fischer, T. L. Sims, G. N. Drews and R. J. Goldberg (1989) Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell* 1:313-328.
- Nishiba, Y. and Suda, I. (1998) Degradation of vitamin E, vitamin C, and lutein in soybean homogenate: a comparison of normal soybean and lipoxygenase-lacking (triple-null) soybean. *J. Agric. Food. Chem.* 46 (9) :3708-3712.
- 農林水産省生産局 (2002) いも類の生産流通に関する資料 <http://www.library.maff.go.jp/GAZO/3-0000130341.htm>
- 農林水産省総合食料局 (2004) 麦の品種別作付面積 平成15年産 米麦の出荷等に関する基本調査結果 <http://www.library.maff.go.jp/GAZO/3-0000172911.htm>
- 農林水産省総合食料局 (2006) 平成17年産 米穀の品種別作付状況 米麦の出荷等に関する基本調査結果 <http://www.library.maff.go.jp/GAZO/3-0000320441.htm>
- 農林水産省生産局 (2007) 大豆に関する資料 pp266.
- 農林水産先端技術振興センター (2004) 平成15年度審査基準国際統一委託事業調査報告書 pp31.
- Obata, A. and M. Matsuura (1993) Decrease in the gel strength of tofu caused by an enzyme reaction during soybean grinding and its control. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:542-545.
- 小幡明雄・松浦勝 (1997) 大豆磨砕におけるリポキシゲナーゼによる豆乳の色調変化. *日本食品科学工学会誌* 44:768-773.
- 小田中浩哉・海妻矩彦 (1989) 放射線照射によって誘発された大豆の貯蔵タンパク質に関する

- 遺伝的変異体. 育種学雑誌 39 (別1) 430-431.
- Ogawa, T., N. Bando, H. Tsuji, K. Nishikawa and K. Kitamura (1995) α -Subunit of β -conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. Biosci. Biotech. Biochem. 59:831-833.
- Ogawa, T., N. Bando, H. Tsuji, K. Okajima, K. Nishikawa and K. Sasaoka (1991) Investigation of the IgE-binding proteins in soybean by immunoblotting with the sera of the patients with atopic dermatitis. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 37:555-565.
- Pfeiffer, T. W., D. F. Hildebrand and D. M. TeKrony (1992) Agronomic performance of soybean lipoxygenase isolines. Crop Sci. 32:357-362.
- Rackis, J. J., D. J. Sessa and D. H. Honig (1979) Flavor problems of vegetable food proteins. J. Am. Oil Chem.Soc. 56:262-272.
- Reinprecht, Y., V. W. Poysa, I. Rajcan, G. R. Ablett and K. P. Pauls (2006) Agronomic performance of soybean with seed lipoxygenase nulls and low linolenic acid content. Canadian Journal of Plant Science. 86:379-387.
- Saio, K., I. Sato and T. Watanabe (1974) Food use of soybean 7S and 11S. Part II. High temperature expansion characteristics of gels. J. Food Sci. 39:777-782.
- Samoto, M., Y. Fukuda, K. Takahashi, K. Tabuchi, M. Hiemori, H. Tsuji and Y. Kawamura (1997) Substantially complete removal of three major allergenic soybean protein (Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K and the α -subunit of conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. Biosci. Biotech. Biochem. 61:2148-2150.
- Samoto, M., M. Maebuchi, C. Miyazaki, H. Kugitani, M. Kohno, M. Hirotsuka and M. Kito (2007) Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. Food Chem. 102:317-322.
- 佐々木隆造・千葉英雄 (1983) 大豆タンパク質の酵素的脱臭. 化学と生物 21:536-543.
- Sessa, D. J. (1979) Biochemical aspects of lipid-derived flavors in legumes. J. Agric. Food. Chem. 27:234-239.
- 島田和子・野村寛美・原由美・藤本房江・喜多村啓介 (1998) 豆腐の食味に及ぼす大豆リポキシゲナーゼの影響. 日本食品工業学会誌 45:30-36.
- 島田信二・高田吉丈・境哲文・河野雄飛・島田尚典・高橋浩司・足立大山・田淵公清・菊池彰夫・湯本節三・中村茂樹・伊藤美環子・番場宏治・岡部昭典・高橋信夫・渡辺巖・長沢次男 (2004) 耐病虫性・多収・高イソフラボン含量ダイズ新品種「ふくいぶき」の育成. 東北農業試験場報告 102:41-56.
- Staswick, P. E., P. Broue, and N. C. Nielsen (1983) Glycinin composition of several perennial species related to soybean (*Glycine canescens*, *Glycine tomentella*, *Glycine tabacina*, *Glycine clandestina*). Plant Physiol. 72:1114-1118.
- Suda, I., M. Hajika, Y. Nishiba, S. Furuta and K. Igita (1995) Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. J. Agric. Food. Chem. 43:742-747.
- Sukle, R. H. and L. L. Mardock (1983) Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybean: effect on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae). Environ. Entomol. 12:787-791.
- Takahashi, K., H. Banba, A. Kikuchi, M. Ito and S. Nakamura (1994) An induced mutant line lacking the α -subunit of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Breeding Science 44:65-66.
- 高橋浩司・羽鹿牧太・平賀勸・戸田恭子 (2005) ダイズ子実のカルシウム含有量は豆腐の硬さに関与する. 育種学研究 7(別1・2), 260.

- 高橋浩司・水野由紀子・小綿美環子・喜多村啓介・中村茂樹 (1994) 大豆の蛋白組成改変に関する研究 II. 放射線照射により誘発された7Sグロブリン α サブユニット欠失特性の遺伝様式及び α 欠失系統の生育・品質特性. 育種学雑誌 44 (別1) 202.
- Takahashi, K., Y. Mizuno, S. Yumoto, K. Kitamura and S. Nakamura (1996) Inheritance of the α -subunit deficiency of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* L.MERRILL) line induced by γ -ray irradiation. *Breed. Sci.* 46: 251-255.
- 高橋浩司・島田信二・島田尚典・高田吉丈・境哲文・河野雄飛・足立大山・田淵公清・菊池彰夫・湯本節三・中村茂樹・伊藤美環子・番場宏治・岡部昭典 (2004) 低アレルゲン・高11Sグロブリンダイズ「ゆめみのり」の育成. 東北農業研究センター研究報告 102:23-39.
- Takahashi, M., K. Uematsu, K. Kashiwaba, K. Yagasaki, M. Hajika, R. Matsunaga, K. Komatsu and M. Ishimoto (2002) Accumulation of high levels of free amino acids in soybean seeds through integration of mutations conferring seed protein deficiency. *Planta* 217:577-586.
- Tang, H. S., S. M. Wu, S. Jia, S. Z. Qin, A. L. Ding, J. M. Sun, R. Z. Chang and L.J.Qiu (1998) Preliminary identification of a RAPD marker linked to the null gene *Ti-ti* of Kunitz trypsin inhibitor using near isogenic lines. *Soybean Genetic Newsletter* 25:50-51.
- Thanh, V. H. and K. Shibasaki (1976) Major proteins of soybean seeds. A straight forward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem.* 24:1117-1121.
- Thanh, V. H. and K. Shibasaki (1978) Major proteins of soybean seeds. Reconstitution of β -conglycinin from its subunits. *J. Agric. Food Chem.* 26:695-698.
- Toda, K., T. Ono, K. Kitamura, M. Hajika, K. Takahashi and Y. Nakamura (2003) Characteristics of correlations between seed protein contents and consistency of tofu made with different magnesium chloride concentrations in six Japanese soybean varieties. *Breeding Science* 53:217-223.
- Toda, K., K. Takahashi, T. Ono, K. Kitamura and Y. Nakamura (2006) Variation in the phytic acid content of soybeans and its effect on consistency of tofu made from soybean varieties with high protein content. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture* 86:12-219.
- Tsubokura, Y., M. Hajika and K. Harada (2006a) Molecular characterization of a β -conglycinin deficient soybean. *Euphytica* 150: 249-255.
- Tsubokura, Y., M. Hajika and K. Harada (2006b) Molecular markers associated with β -conglycinin deficiency in soybean. *Breeding science* 56:113-117.
- Utsumi, S. and J. E. Kinsella (1985) Forces involved in soy protein gelation: Effects of various reagents on the formation, hardness, and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate. *J. Food Sci.* 50: 1278-1282.
- Vaughn, S. F. and Gardner, H. W. (1994) Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. *Journal of Chemical Ecology* 19 (10):2337-2345.
- Vernooy-Gerristsem, M., A. L. M. Bos, G. A. Veldink and J. F. Vliegenthart (1983) Localization of lipoxygenase 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiol.* 73:262-267.
- Vick, B. A. and D. C. Zimmerman (1987) Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise* (Academic Press, Orlando). 9:53-90.
- Wang, J., K. Fujimoto, T. Miyazawa, Y. Endo and K. Kitamura (1990) Sensitivities of

- lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. *Phytochemistry*, 29: 3739-3742.
- Wang, W. H., T. Kato, T. Takano, D. Shibata, K. Kitamura and G. Takada (1995) Two single-base substitutions involved in altering in a paired-box of AAATAC in the promoter region of soybean lipoxygenase L-3 gene impair the promoter function in tobacco cells. *Plant Science* 109: 67-73.
- Wang, W. H., T. Takano, D. Shibata, K. Kitamura and G. Takeda (1994) Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxygenase 2: Substitution of glutamine for an iron-ligand histidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (13): 5828-5832.
- 渡辺篤二・海老根英雄・太田輝夫 (1971) 大豆食品. 光琳, 東京, pp270.
- Wheelock, M. J., T. J. Richards, R. T. Carroll and M. O. Funk (1991) Preparation and characterization of monoclonal antibodies against soybean seed lipoxygenase isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 578-583.
- Wolf, J. W. (1975) Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.* 23: 136-141.
- Wolf, W. J. and D. R. Briggs (1956) Ultracentrifugal investigation on the effect of neutral salts on the extraction of soybean proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 63: 40-49.
- Xu, S. J., R. J. Singh, K. P. Kollipara and T. Hymowitz (2000) Primary trisomics in soybean: origin, identification, breeding behavior, and use in linkage mapping. *Crop Sci.* 40: 1543-1551.
- Yabuuchi, S., R. M. Lister, B. Axelrod, J. R. Wilcox and N. C. Nielsen (1982) Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of lipoxygenase isozymes in soybean. *Crop Sci.* 22: 333-337.
- Yagasaki, K., N. Kaizuma and K. Kitamura (1996) Inheritance of glycinin subunits and characterization of glycinin molecules lacking the subunits in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Breeding Science* 46: 11-15.
- Yagasaki, K., F. Kousaka and K. Kitamura (2000) Potential improvement of soymilk gelation properties by using soybeans with modified protein subunit compositions. *Breeding Science* 50: 101-107.
- 山内文男・大久保一良編 (1992) 大豆の科学. 朝倉書店, pp199.
- 家森幸男・太田静行・渡辺昌編 (2001) 大豆イソフラボン. 幸書房, pp165.
- 湯本節三・高田吉丈・河野雄飛・加藤信・島田信二・境哲文・島田尚典・高橋浩司・足立大山・田淵公清・菊池彰夫 (2005) 青臭みやえぐ味が少なく豆乳に好適なだいず新品種候補系統「きぬさやか (東北151号)」平成16年度東北農業研究成果情報.