

学位論文題名

大豆の成分改良に関する研究

学位論文内容の要旨

大豆はたん白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。大豆は良質な蛋白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蛋白質は β -コングリシニン(7S)とグリシニン(11S)であり、両者で蛋白質全体の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。本研究ではこれらの成分を改変した大豆品種の作出とその特性の解明を行った。

第Ⅰ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作出することに成功した。この系統を用いて圃場における栽培試験を実施し、リポキシゲナーゼの栽培に与える影響について検証した。

関係2号(L-1・L-3 欠失)と関係1号(L-2・L-3 欠失)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、1粒のリポキシゲナーゼ完全欠失系統を見つけ出した。この系統を温室で栽培したところ生育異常は見られず、正常に次世代種子を得ることができた。次世代でもリポキシゲナーゼ完全欠失特性は維持されており、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、戻し交雑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」に戻し交雑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・豆乳では官能評価の差が小さかったが、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。

第Ⅱ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、リポキシゲナーゼ完全欠失品種を検定可能な新たな手法を検討した。

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た。戻し交雑系統を用いて実際に検定した結果、誤判定率は 1.3% で、信頼性は高いと考えられた。

連続戻し交雑の際に、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 を行くと、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。また時間やコストがかかるものの、より安定した検定法として、制限酵素を用いた検定法を開発した。L-2 欠失型、L-3 保有型がそれぞれ制限酵素 *Nla* III 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。

第 III 章では、貯蔵蛋白質の 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するとともに、蛋白成分の変化について検討した。

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。QT2 系統は正常に生育し、次世代でも 7S 欠失性は保持されていた。QT2 系統と普通大豆の交配実験の結果、 F_1 は全て 7S 欠失型、 F_2 は 7S 欠失型 : 野生型が 3:1 に分離し、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。またリボ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* はリボキシゲナーゼや α' サブユニットとは独立に遺伝することが明らかとなった。

QT2 系統や大豆への戻し交雑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ストメトリーで分析した結果から、7S の減少を補う形で 11S が増加していると推測された。

第 IV 章の総合考察では、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。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、多面的な用途開発の重要性を指摘した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜多村 啓 介

副 査 教 授 佐 野 芳 雄

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

大豆の成分改良に関する研究

本論文は 4 章 123 頁からなる和文論文であり、図 23、表 32 および要約を含む。

大豆の種子リボキシゲナーゼは大豆製品独特の青臭みの原因となっている酵素である。これを取り除くことにより、大豆製品の風味改善ができるとともに、青臭みによる大豆の用途制限が少なくなり、新たな大豆製品の開発が期待される。また大豆の主要な貯蔵蛋白質は β -コングリシニン(7S)とグリシニン(11S)であり、両者で蛋白質全体の 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。

本研究ではこれらの成分を改変した大豆品種の作出を行い、その特性の解明や選抜技術の開発を行った。得られた結果は以下の通りである。

1 リボキシゲナーゼ完全欠失大豆の作出とその特性

これまで得られていなかったリボキシゲナーゼ完全欠失系統を、ガンマー線処理を行った突然変異集団から見いだした。この系統を温室で育てたところ、生育異常は見られず、次世代でもリボキシゲナーゼ完全欠失特性は維持されていた。この系統を用いて圃場での特性調査を行った結果、戻し交雑親とほぼ同等の生育特性、収量性等を示したことから、種子リボキシゲナーゼは大豆の生育等に大きな影響を与えないと考えられた。リボ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、用途によりリボ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。

2 リボ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

リボキシゲナーゼ欠失系統と普通品種と完全欠失系統の交配後代は L-1 と L-2 間の

強連鎖を仮定したときの分離比に良く適合した。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。

リボキシゲナーゼ欠失系統の簡易迅速検定法として、 β -カロテン退色能を用いた色素法を検討した。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することにより、L-2 及び L-3 の有無を判別できた。普通大豆と完全欠失系統の交配後代からは、L-1・L-2 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。

またヘテロでも判別が可能な検定法として欠失変異の配列情報をもとにした DNA マーカーを用いた検定法を開発した。L-3 は 2 カ所の SNPs を利用したプライマーで PCR を行うことにより判別が可能であった。また、L-2 は 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、ミスマーキングで生じたバンドと本来の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。より安定した検定法として、L-2 欠失型、L-3 保有型がそれぞれ制限酵素 *Nla* III 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 7S サブユニット完全欠失系統の作出とその特性

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を見いだした。この系統は正常に生育し、次世代でも 7S 欠失性は保持されていた。また普通大豆との交配実験の結果、7S 欠失性は単一の優性遺伝子 (*Scg-1*) に支配されることを明らかにした。さらにリボ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* はリボキシゲナーゼや 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雑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ストメトリーで分析した結果から、7S の減少を補う形で 11S が増加していると推測された。

本研究は、世界で初めて大豆の種子リボキシゲナーゼ完全欠失系統を作出し、その生育特性や加工特性を明らかにした。また遺伝的特性を明らかにして、簡易なりボキシゲナーゼ完全欠失系統選抜法を開発した。

さらに大豆の野生種のツルマメから、生育異常を示さない 7S タンパク質完全欠失系統を見だし、その遺伝的特性を明らかにした。これらの成果は大豆の成分改変品種の実用化に重要な道筋を立てるものであり、学術的に高く評価できる。

よって、審査員一同は、羽鹿牧太氏が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。