

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2010

課題番号：19380013

研究課題名 (和文) フィチン酸の低い穀類の開発とその応用に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on the development of low-phytate grain, and its application and utilization.

研究代表者

実岡 寛文 (SANEOKA HIROFUMI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：70162518

研究成果の概要 (和文)：

穀類に含まれる有機態リン酸化合物のフィチン酸は人間、豚、鶏などの単胃動物では消化・吸収できないために大量に排泄され環境汚染、さらにフィチンと強力に結合している Fe、Zn などの微量元素の吸収を妨げる抗栄養成分として知られている。そこで、これらのフィチンに関わる問題を解決するため突然変異法および交雑育種法を用いて育成したダイズとソルガムについて生産量や成分含量の違いを普通栽培品種と比較しながら、生産性および品質のよい低フィチンダイズとソルガムの育成を行った。

研究成果の概要 (英文)：

Phytic acid (*myo*-inositol hexakisphosphate or InsP_6) is the storage form of phosphorus (P) in seeds and exists as phytate, typically representing 75±10% of the total seed phosphorus. Phytate is poorly digested by monogastric animals. Therefore, large amounts of P are present in poultry and chicken feces. As a result, P is lost to the environment in cereal-consuming regions, where it may contribute to excessive levels in soil and water. The anti-nutritional effects of phytate are primarily related to its strong chelating activity due to its six reactive phosphorus esters. Multivalent cations, such as Zn and Fe are particularly susceptible and form insoluble and indigestible complexes. In order to address these problems, we developed a low-phytate soybean and sorghum by crossing, and investigate the growth characteristics, productivity, and seed quality of this new low-phytate line compared to the parental stock.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：フィチン酸、ダイズ、ソルガム、品質、リン酸、リン酸資源

1. 研究開始当初の背景

ダイズおよびソルガムは、世界中の多くの国々で利用されている穀類であるが、ミオイノシトールにリン酸が6個結合した有機態リン酸化合物のフィチン酸 (*myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakisphosphate) が多く含まれている。フィチン酸は人間、豚、鶏などの単胃動物においては消化・吸収できないために大量のリン酸が排泄され環境汚染の一因となっている。さらに、フィチン酸に Fe, Zn などの微量元素がキレート結合したフィチン (Phytin) は、Fe, Zn の吸収を妨げるために抗栄養成分として知られ、穀類を多く消費するアフリカや中南米などの国々ではフィチンによる Fe や Zn などの微量元素の不足による栄養障害も発生している。これらの問題を解決するためにフィチン酸の低い穀類の育成を行うことが最も近道であると考えられる。しかし、わが国ではフィチン酸の低い穀類の開発に関する研究はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

フィチン酸に関わる問題を解決するために、まず始めにフィチン酸の低いダイズとソルガムの作出を行った。その後、得られた系統について生産性と品質の評価を行い、本研究で得られた低フィチン系統の有用性を検証することを主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究の材料

低フィチンダイズ、ソルガムを開発するために本課題ではエチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理による突然変異誘発法を利用した。この方法によって、これまでも低フィチントウモロコシ、コムギが育成されていることから低フィチンの育成には成功率が高い。また、EMS による育種法は遺伝子組換え法に比べてより多くの変異が得られやすく、さらに得られた植物体が圃場レベルでの実験に使用できるなどの利点がある。

フィチン酸の低いダイズはアメリカ合衆国 Victor Raboy 博士から提供していただいた変異体を低フィチンダイズの交配親として用いた。まず、2004年にこの変異体と日本で栽培されている普通栽培品種とを交配した。2004年に交配して得られた F1 系統について2005年から2010年までに連続して圃場およびポット栽培し、その系統を実験の材料に用いた。

また、ソルガムは2004年に西日本栽培品種に EMS 処理 (M1 世代) を行った突然変異体を毎年5月から11月の間に圃場栽培し選抜を繰り返した系統を実験の材料とした。

(2) 分析方法

フィチン酸 (Phy-P) および全リン酸 (TP)、無機リン酸 (Pi) は、Saneoka et al ら (Saneoka Ha and Honda N, Changes in Phytic acid-P and phosphorus compounds with the maturity of maize Grain. Grassland Sci. 49, 425-429, 2003; Saneoka H and Koba T, Plant growth and phytic acid accumulation in grain as affected by phosphorus application in maize (*Zea mays* L.). Grassland Sci. 48, 485-489, 2003) の方法により分析した。フィチン酸 (Phy-P) は、微粉碎した乾燥試料に 0.4M HCl, 10%Na₂SO₄ の混合溶液を加え18時間攪拌した後、抽出した。抽出液を遠心しその上澄み液に FeCl₃ 溶液 (15mM FeCl₃, 0.2M HCl, 5% Na₂SO₄) を加え、その沈殿物を硫酸-過酸化水素で分解した。分解液のリン酸濃度はモリブデン酸-アスコルビン酸混液を用いた比色法 (モリブデンプール法) で測定した。全リン酸 (TP) 濃度は、微粉碎試料を硫酸-過酸化水素で分解後、その分解液を用いて、また、無機リン酸 (Pi) 濃度は、12.5%トリクロロ酢酸-0.02M 塩化マグネシウム混合液で抽出し液を用いて、モリブデンプール法により測定した。さらに、0.4N HCl で抽出した液を 0.2 μm フィルターでろ過した液を陰イオン交換カラム

(IonPac AS7, Dionex 社) で分離し、高速液体クロマトグラフ (日本分光 UV-2070 型) で測定した。なお、ダイズの成長解析および品質評価などの分析法等については、それぞれの項目で実施した分析結果を記述する際に別途記載した。

(3) 低フィチンソルガムの育成

本課題ではダイズと同様ソルガムにおいても低フィチン系統の開発に EMS を利用し、2004年 EMS 処理して得られた多くの突然変異体の中から、低フィチン酸の低い系統の選抜を行ってきた。2009年度においては、2008年度に選抜した M5 世代 14 系統群を圃場に4月下旬から5月下旬に圃場に播種し、収穫適期の10月下旬から11月中旬に種子を採取した。選抜指標として種子の全リン酸 (TP)、無機リン酸 (Pi)、フィチン態リン酸 (Phy-P) 濃度を使って低フィチンダイズを選抜した。

4. 研究成果

(1) 低フィチンダイズの育成

EMS 処理によって得られたフィチン酸の低いダイズの突然変異と日本で栽培されている普通栽培品種の数品種と交配した結果、栽培品種のうち2品種と交配が成功し、多く系統が得られた。

全Pに対するフィチン態P(Phy-P)の割合が30%以下の系統を低フィチン系統と定義し、これを基準に低フィチン系統と高フィチン系統(Phy-Pの割合が60-70%)を実験に使用した。2009年夏に、変異体、親系統と同じF1系統由来の低フィチン系統を3系統、計5系統を条間90cm、株間50cm、1株1本植えて圃場栽培した。生育途中の開花日、花および毛茸色や成熟期などの生育特性と収穫後の種子の形、大きさ、個体あたりの子実重などを調査し、さらに子実の成分分析を行った。

その結果、①低フィチン系統の毛茸、花、熟莢、臍の色、裂莢性などは、変異体、親系統と同じであったが、粒形は変異体、親系統が楕円体であったにもかかわらず低フィチン系統は楕円、扁平体であった。低フィチン系統群の中でも1系統の子実外観は親系統と同じであった。②主莖長、主莖節数、総節数、個体あたりの子実重は低フィチン系統間で差が見られ、中でも1系統は、それぞれ、72cm、22、189、111.70gと他の系統に比べて大きかった。③低フィチン系統群の開花期、着莢期、成熟期は、それぞれ8月上旬、中旬、10月末~11月上旬であり、親系統に比べて速く、変異体よりやや遅かった。④変異体と低フィチン系統の子実の無機態P濃度は4.34~4.80mg/g DWであり、親系統の16~17倍高かった。さらに、⑤低フィチン系統のカチオン(Ca, Mg, K)や粗タンパク質含量は、親系統と差は見られなかった。以上の結果、低フィチン系統は、普通栽培品種の品種特性を引きつつ、子実のフィチン酸が低い。中でも低フィチン系統の1系統は、個体当たりの子実重、100粒重が多く収量性の高い系統として有望であると考えられた。

一方、わが国ではダイズは豆腐などの加工食品として利用されているが、フィチン酸含量を低めた大豆の豆腐加工適性の評価試験はこれまでなされていない。低フィチン大豆を加工食品の材料として利用するためには、豆腐加工適性の評価は重要である。そこで、低フィチン系統を用いて充填豆腐を製造し、高フィチン系統および親品種と加工適性などを比較した。豆乳中のpHは低フィチン系統と変異体および親系統と差は無かったものの、Phy-P濃度は親系統では4.0mmol/Lであったのに対して、低フィチン系統では1.2-1.8mmol/Lであり、豆乳中のフィチン酸含量が大きく低下していた。さらに、製造した豆腐中のタンパク質濃度は、親系統、低フィチン系統とも433-451mg/gDWであった。しかし、豆腐中のフィチン酸濃度は親系統では28.1mg/gDWであったのに対して低フィチン系統では8.2mg/gDWであり、低フィチン系統で豆腐中のフィチン酸含量の大きな低下が見られた。さらに、豆腐凝固剤にがり(塩化マグネシウム)の濃度の豆乳中の濃度を3.1

~15.7mmol/Lに変えて豆腐を製造し、各豆腐の破断強度をレオメーターで測定した。その結果、親系統である普通栽培品種では、が28mmol/Lで最大破断強度を示したが、にがりの濃度の減少に伴い破断強度は減少し12.6mmol/Lでは柔らか過ぎて破断強度は0であった。それに対して、低フィチン大豆の破断強度は12.6mmol/Lでも依然として高かった。豆乳タンパク質組成をSDS-PAGEで解析した結果、そのバンドパターンに大きな差は見られなかった。さらに、デントメトリーを用いて各バンドの染色強度を測定して11S/7S比を計算した結果も低フィチン系統と親系統では大きな差はなかった。以上の結果から、低フィチン系統では豆腐凝固に関係するタンパク質には差が見られなかったことおよび高フィチン系統では「にがり」の濃度が低いところで凝固が阻害されたにも関わらず低フィチン酸系統では「にがり」の濃度が低いところでも凝固が見られたことからフィチン酸が豆腐の凝固に影響を及ぼすことを始めて明らかにした(現在投稿中)。

(2) 低フィチンソルガムの育成

筆者らは国内外の農業試験場や研究所から収集した2000種余りのソルガムの系統及び品種についてTPおよびPhy-P濃度を測定した結果、すべての系統・品種でTPに対するPhy-P濃度の割合が60-80%であり、Phy-P割合が40%以下の低フィチンソルガムを見つけ出しことはできなかった。そこで、2004年に普通栽培品種にEMS処理(M1)を行い、個体選抜によって低フィチンソルガムを選抜した。2008年に14系統群の2008年度に選抜したM5世代14系統群を4月下旬から5月下旬に圃場に播種し、収穫適期の10月下旬から11月中旬に種子を採取した。選抜指標として種子のTP、Pi、Phy-P濃度を測定して低フィチンダイズを選抜した。その中からフィチン酸量の少ない8系統(M6)を得た。2009年にはこの8系統を栽培し、フィチン酸の少ない系統として3系統を選抜した。この3系統のPhy-P濃度は0.54から1.10mgP/g DW、TP濃度に対するPhy-P濃度は17.6から33.9%であったのに対して、親系統では、それぞれ2.45mgP/g DW、69.8%であり、選抜した系統では親系統に比べてPhy-P濃度およびTPに対するPhy-P濃度の割合も大きく減少した。さらに、HPLCを用いて低イノシトールリン酸化合物の分析を行った結果、Phy-P濃度は低フィチン系統では2.95mg/g DW、親系統で10.97mgP/g DWであった。親系統ではイノシトール5リン酸(IP5)の蓄積が少量認められたが、低フィチン系統では蓄積は見られなかった。

ランダムプライマーを用いてRAPD解析により系統間識別を行った結果、用いたプライ

マーにより両系統で異なる増幅断片が見られ、低フィチン系統と親系統で系統間差を確認できた。現在、この系統について圃場栽培を行って収量調査などを実施している。

一方、P 施肥量を抑制することによって種子のフィチン酸濃度が減少することが報告されている。そこで、品種 Zhengzu を P 施肥量が異なる条件で栽培し、P 施肥量の違いが種子中へのフィチン酸の集積に及ぼす影響を調査した。その結果、P 施肥量の増加に伴い全 P 濃度は増加したが、全 P に対するフィチン態 P の割合は 72~79% と大きな変化は見られなかった。その結果、P 施肥を少なくしてもフィチン態 P の割合に影響は見られず、P 施肥をコントロールすることにより種子のフィチン酸量の制御はできないことが考えられ、フィチン酸の低い穀類を開発することが重要であることが示唆された。

以上の結果から、本研究で突然変異法と交配法によりにフィチン酸の低いダイズとソルガムの育成に成功し、今後、この系統の実用化に向けて取り組むことにしている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① 福田泰子・政岡賢一・夏目悠司・実岡寛文・Victor Raboy, 低フィチンダイズと普通栽培品種の生産と環境適応性の比較. 日本作物学会中国支部研究集録, 50 巻, 査読無, 2009, pp1-2

② Fukuda Y., Natsume Y., Masaoka K., Saneoka H., Raboy V., Productivity and quality of low-phytate soybean in Japan. Abstract of World Soybean Research Conference VIII. 査読有, pp10-15, 2009, Beijing, China.

③ 岡本 祐・李 美花・実岡寛文, ソルガムにけるフィチン酸の蓄積と低フィチンソルガムの選抜, 日本作物学会中国支部研究収録, 49 巻, 査読無, 2008, pp36-37

④ 政岡賢一・二村優次・中山宣洋・実岡寛文・Victor Raboy: 低フィチンダイズの全リン酸, タンパク質及びイソフラボン含量の変動~普通栽培品種と比較して~. 日本作物学会中国支部研究収録, 48 巻, 査読無, 2007, pp30-31

[学会発表] (計 7 件)

① 実岡寛文・柿澤ハルナ・熊谷菜里・岡本

祐, P 施肥がフィチン酸の集積の及ぼす影響と低フィチンソルガムの育成, 日本土壤肥料学会関西支部会, 2010 年 12 月 10 日, 兵庫県農業会館

② 柿澤ハルナ・岡本祐・実岡寛文, ソルガムにおけるフィチン酸の蓄積と低フィチンソルガムの育成, 日本熱帯農業学会第 108 回講演会, 2010 年 10 月 10 日, 沖縄コンベンションセンター,

③ 立川瑛子・福田泰子・実岡寛文, 低フィチンダイズの育成とその品質, 日本土壤肥料学会講演会, 2010 年 9 月 7 日, 北海道大学農学部

④ 福田泰子・立川瑛子・保科亨・上藤満宏, 実岡寛文, 低フィチンダイズの生育特性と品質, 日本作物学会第 230 回講演会, 2010 年 9 月 4 日, 北海道大学農学部

⑤ 福田 泰子・夏目悠司・実岡 寛文, 低フィチンダイズと普通栽培品種の生産性の比較, 日本土壤肥料学会関西支部会, 2008 年 11 月 28 日, 徳島県郷土文化会館

⑥ 政岡賢一・福田 泰子・細川武志, 二村優次, 夏目悠司・実岡 寛文, 低フィチンダイズの選抜とその特性, 日本土壤肥料学会関西支部会, 2008 年 11 月 28 日, 徳島県郷土文化会館

⑦ 岡本祐・実岡寛文・仲川仁, ソルガム子実におけるフィチン酸の集積と低フィチン酸ソルガムの選抜, 日本土壤肥料学会, 2008 年 9 月 9 日, 名古屋市立大学

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

実岡 寛文 (SANEOKA HIROFUMI)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号: 7 0 1 6 2 5 1 8

(2) 研究分担者

猪谷 富雄 (IRANI TOMIO)
県立広島大学・生命環境学部・教授
研究者番号: 6 0 0 8 7 9 8

(H19→H21)

小櫃 剛人 (OBITSU TAKETO)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授
研究者番号: 3 0 1 9 4 6 3 2

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :