

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05985

研究課題名（和文）大豆ペクチンメチルエステラーゼと煮豆の硬度との関係に関する遺伝学的・形態学的研究

研究課題名（英文）Genetic and morphological study of the relationship between soybean pectin methyl esterase and cooked bean hardness

研究代表者

戸田 恭子（Toda, Kyoko）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源研究センター・上級研究員

研究者番号：10360447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：既に煮豆硬度に関与することが明らかとなっているダイズPME遺伝子Glyma03g03360と相同性の高いGlyma19g22790の「フクユタカ」変異体を検出し、Glyma03g03360のPME非活性型である大豆品種「エンレイ」に交配によりGlyma19g22790の変異を導入した。Glyma19g22790の変異により、煮豆種皮の破断エネルギーが低下した。一方、煮豆の子葉硬度に関しては、様々な保存条件下でもGlyma19g22790変異の効果は見出せず、このPME遺伝子の煮豆種皮硬度に対する限定的な効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加熱による組織の軟化は食品加工において重要な現象である。煮豆食品、納豆、味噌、醤油等の大豆加工食品では、加工の過程で煮豆を調製するが、短時間の加熱処理で軟化する豆が望ましいとされている。本研究では既報のGlyma03g03360以外のPME遺伝子の煮豆硬度に関する影響をさらに追求し、特に煮豆種皮硬度に対する有効性を見出した。本研究の結果やデータは関連する大豆加工分野に有用な情報を提供すると期待される。

研究成果の概要（英文）：A soybean PME gene Glyma03g03360 has already been shown to be involved in cooked bean hardness. "Fukuyutaka" mutant of Glyma19g22790, which is highly homologous to Glyma03g03360, was detected and crossed with the soybean variety "Enrei", which is a PME inactive form of Glyma03g03360. A mutation of Glyma19g22790 was introduced into "Enrei." The mutation in Glyma19g22790 reduced the breaking energy of the seed coat of cooked bean. Regarding the cotyledon hardness of cooked beans, the effect of the Glyma19g22790 mutation was not found even under various storage conditions, suggesting a limited effect of this PME gene on the seed coat hardness of cooked bean.

研究分野：加工品質・成分

キーワード：ペクチン 煮豆硬度 ダイズ メチルエステラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

加熱による組織の軟化は食品加工において重要な現象である。煮豆食品、納豆、味噌、醤油等の大豆加工食品では、加工の過程で煮豆を調製するが、短時間の加熱処理で軟化する豆が望ましいとされている。これまでの研究により、煮豆の硬度や軟化のしやすさに関与する要因として、ペクチンメチルエステラーゼ(PME)遺伝子である *Glyma03g03360* の寄与が大きいことが明らかにされた( Toda *et al.* 2015 )。高度にメチルエステル化された細胞壁ペクチンは、煮豆の加熱処理により起こる 脱離反応により分解され、その結果細胞壁の崩壊により豆は軟化するが、PME により脱メチル化したペクチンでは分解が起こらないため、軟化がすすまないと考えられる。煮豆の大部分を占める子葉硬度の品種間差は *Glyma03g03360* の多型とペクチンを架橋するカルシウムによりほぼ説明できるようになった。一方、煮豆の種皮の硬度や、種子保存中に煮豆硬度が硬くなるといった現象についてはこの遺伝子では説明がつかなかった。

## 2. 研究の目的

ダイズゲノムの遺伝子配列を解析したところ、多くのダイズ PME 遺伝子の中から *Glyma03g03360* と同様、非常に相同性の高い *Glyma19g22790* を見出した( 図 1 )。この遺伝子は *Glyma03g03360* 同様、登熟後期で種子の子葉と種皮の発現が検出された。そこで本研究では、アンプリコン解析により検出した *Glyma19g22790* 変異体を用いてこの PME 遺伝子の煮豆種皮硬度や種子保存中の煮豆硬度変化との関係を検証する。また、煮豆硬度と細胞壁の特性との関係をルテニウムレッドによるペクチンの染色や抗体染色等により調べる。

## 3. 研究の方法

### ( 1 ) 供試系統

大豆品種「フクユタカ」から作出した EMS 突然変異体集団の後代より *Glyma19g22790* 変異体ホモを選抜し、*Glyma03g03360* が変異している「エンレイ」に交配により *Glyma19g22790* 変異を導入した。検出した *Glyma19g22790* の変異では、すでに煮豆硬度との関係が明らかとなった *Glyma03g03360* 変異よりも N 末側からタンパク質が欠失している。*Glyma03g03360* に関して「フクユタカ」は PME 活性型、「エンレイ」は PME 非活性型のため、交配後代では *Glyma03g03360* と *Glyma19g22790* 両方の遺伝子型を DNA マーカー等( Toda *et al.* 2020 )で判定し、*Glyma03g03360* に関しては非活性型のものを選抜した。また、種子カルシウム含量の影響を検討するため、カルシウム含量の QTL 遺伝子として同定された *Glyma.06G202300* ( *Glyma06g21920* ) に関する準同質遺伝子系統( Toda *et al.* 2022 )を供試した。準同質遺伝子系統は「納豆小粒」と「兵系黒 3 号」の組換え近交系( RIL )由来の残余ヘテロ接合体( RHL )より作出した。

### ( 2 ) 煮豆硬度測定

既報( Toda *et al.* 2015 )の方法に準じて煮豆の子葉硬度の測定を行った。

摂氏 20 度で 20 ~ 24 時間吸水させた 30 粒の大豆を沸騰水中 10 分加熱処理した。加熱処理後種皮と胚軸を取り除いた一片の子葉を 1 測定サンプルとして用い、60 サンプルの結果の平均を評価値とし

た。煮豆の硬さ測定にはヤマデンのクリープメータ(RE-3305S)を用い、直径 3mm のプローブを 1mm/s で動かし、豆に貫通する際の応力を測定する貫入試験を採用した。煮豆の種皮の硬度に関しては、別途吸水後沸騰水中 30 分加熱処理をした種子から種皮を剥がし、直径 5 mm 程度の穴の空いた円盤に挟んで直径 1.5 mm のプローブを 1mm/s で動かし、その他子葉硬度と同様の条件で貫入試験を行った。

### ( 3 ) 種子の形態学的解析

種子は吸水後、グルタルアルデヒドで固定後 Technovit7100 で包埋切片を作製し、ペクチンを検出するルテニウム染色や、抗体染色等を行った。

## 4. 研究成果

### ( 1 ) *Glyma19g22790* 変異と煮豆硬度との関係

「エンレイ」と *Glyma19g22790* 変異体ホモとの交配後代のうち *Glyma03g03360* が PME 非活性型の系統より *Glyma19g22790* の PME 活性型、非活性型のものを選抜し、煮豆硬度試験を行った結果、子葉の破断応力、破断エネルギー、及び煮豆種皮の破断応力に関しては活性型、非活性型間で有意な相関は検出されなかったが、種皮の破断エネルギーに関しては片側検定 5%水準で有意差を検出し、PME 非活性型の方が低かった(図 2)。5、37 で 7 ヶ月保存した種子を用いた煮豆子葉硬度を保存前と比較した結果、*Glyma19g22790* の PME 活性型、非活性型ともに同様に 37 で顕著に硬度が上昇した(図 3)。これらの結果より、*Glyma19g22790* は煮豆の種皮の硬度にのみ関与する可能性が示唆された。

### ( 2 ) 種子カルシウム含量と種子の保存による煮豆硬度変化との関係

カルシウム含量の QTL 遺伝子として同定された *Glyma.06G202300* に関する準同質遺伝子系統(Toda *et al.* 2022) NK8-3 (種子カルシウム含量 2819 mg/kg dw)、NK8-26 (種子カルシウム含量 2557 mg/kg dw)を用い、5、37 で 9 ヶ月保存した大豆の煮豆硬度試験を行った。硬度は子葉のみ評価した。NK8-26 (低カルシウム)は保存前、及び 5 の保存条件では NK8-3 (高カルシウム)より煮豆硬度が低かったが、37 の条件では両者とも顕著に煮豆硬度が上昇し、有意な差は検出されなかった(図 4)。

### ( 3 ) 種子の形態学的解析

エステル化ペクチンに対する抗体 LM20 で抗体染色した結果、*Glyma03g03360* の遺伝子型により子葉の細胞壁ペクチンにおけるシグナルに顕著な差が検出されたが、保存による明瞭なシグナル変化は検出されなかった。一方、ルテニウム染色の結果、保存の温度条件により染色性の異なる傾向が見出されたがその要因解明については今後の課題である。これらの結果及び(1)(2)より、*Glyma19g22790* は煮豆種皮に対してのみ関与すること、種子の保存による煮豆の子葉硬度変化にはペクチンのメチルエステル化・脱メチル化以外の要因が関与すること等の可能性が示唆された。

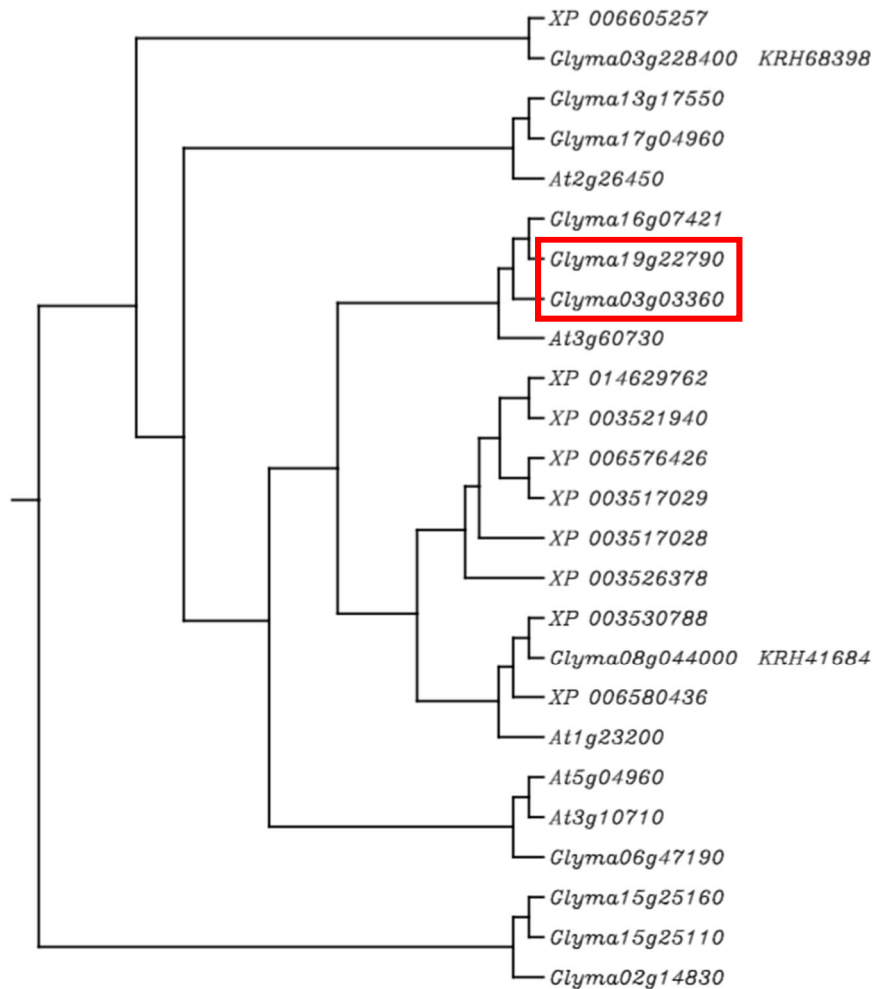


図1. ダイズ及びシロイヌナズナ PME 遺伝子の系統樹

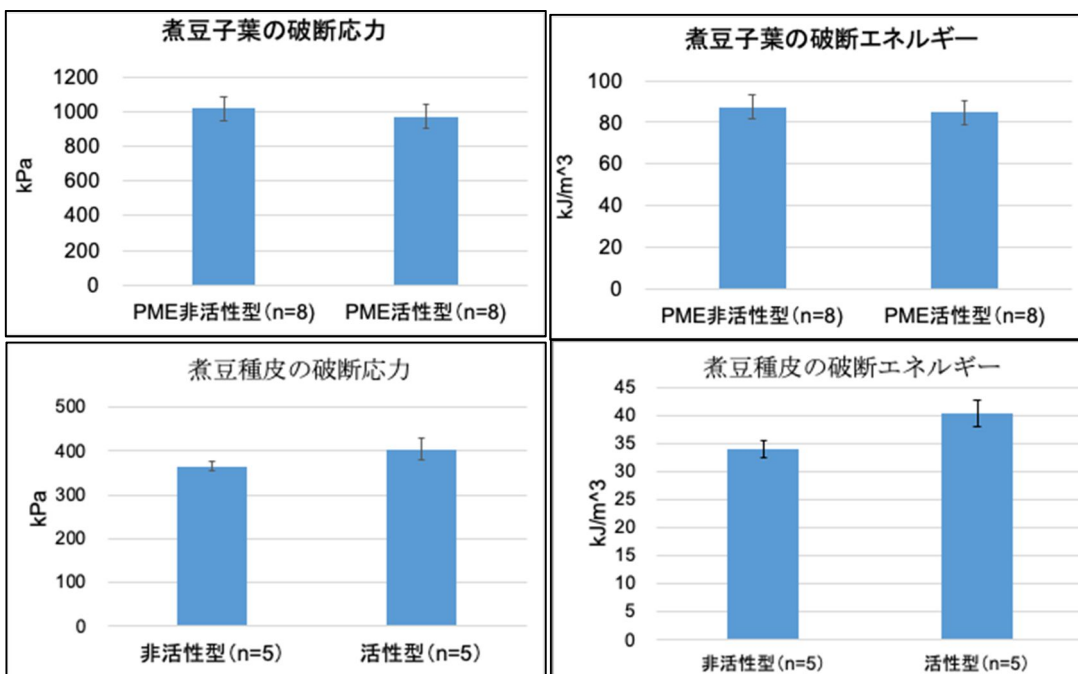


図2. 「エンレイ」と *Glyma19g22790* の変異体の交配後代の煮豆硬度。PME 活性・非活性型は *Glyma19g22790* に対応する。エラーバーは標準誤差。

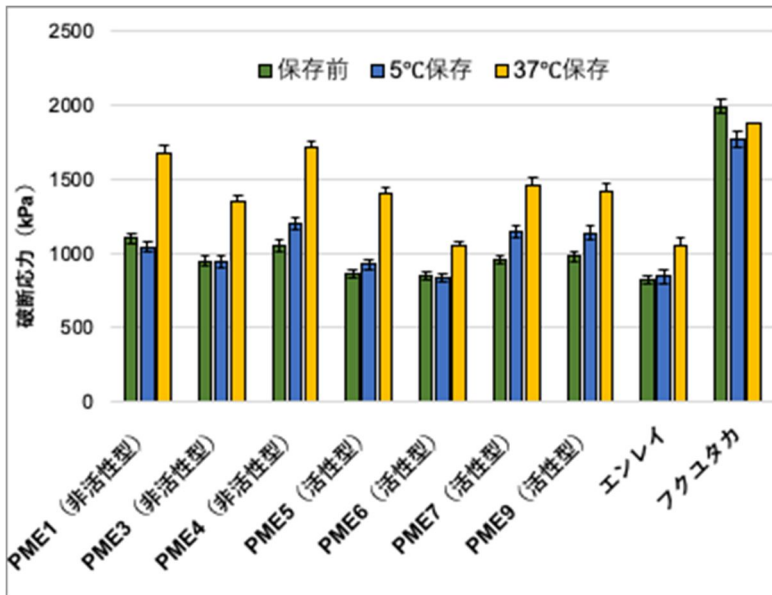


図3 . 異なる保存条件による煮豆子葉硬度。7 ヶ月保存した種子を用いた。PME 活性・非活性型は *Glyma19g22790* に対応する。エラーバーは標準誤差。

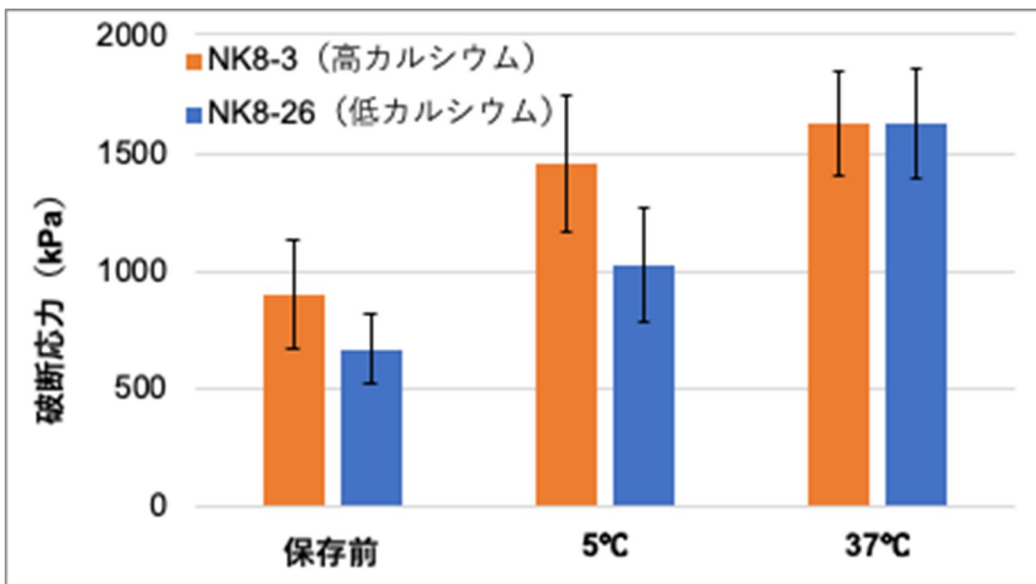


図4 . *Glyma.06G202300* に関する準同質遺伝子系統を用いた異なる保存条件による煮豆子葉硬度。9 ヶ月保存した種子を用いた。エラーバーは標準偏差。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toda Kyoko, Kato Shin, Hirata Kaori, Kikuchi Akio, Nihei Yumi, Hajika Makita	4. 巻 70
2. 論文標題 DNA marker-assisted evaluation of cooked bean hardness of three soybean progeny lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 487 ~ 493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.19171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toda Kyoko, Hirata Kaori, Yamada Tetsuya, Takahashi Koji, Ogiso Tanaka Eri, Tsubokura Yasutaka, Hajika Makita	4. 巻 2022
2. 論文標題 Flavonoid 3'-hydroxylase reduces Ca and Mg content in soybean seeds, resulting in decreased hardness of cooked beans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Crop Science	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/csc2.20743	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戸田恭子、二瓶由美、富永陽子、高橋浩司
2. 発表標題 大豆ペクチンのエステル化度、煮豆硬度および保存中における煮豆硬度変化の品種間差の関係
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸田恭子、平田 香里、山田 哲也、高橋 浩司、小木首 映里、坪倉 康隆、羽鹿 牧太
2. 発表標題 ダイズフラボノイド3'-水酸化酵素は種子カルシウム・マグネシウム含量を低下させる
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------