

豆腐の堅さに影響を及ぼす新規成分に関わる大豆遺伝子の同定

戸田恭子*・山田哲也・羽鹿牧太

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所

Identification of a Gene Relating to a Novel Component Affecting Consistency of Tofu

Kyoko TODA*, Tetsuya YAMADA and Makita HAJIKA

National Institute of Crop Science (NICS),
National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Ibaraki 305-8518

ABSTRACT

Consistency of tofu is an important factor for evaluating processing properties for tofu making. Our previous studies indicated that protein content, the 11S/7S ratio and phytate content affect the consistency of tofu. When the Japanese cultivars Sachiyutaka and Fukuyutaka were used, these three factors and the consistency of tofu showed a high multiple correlation. In contrast, when Enrei was used, the consistency of tofu showed higher actual values than the predicted values, which are based on the approximate straight line for Fukuyutaka and Sachiyutaka. Therefore it is predicted that Enrei has a component affecting consistency of tofu that Fukuyutaka and Sachiyutaka lack. In this study, 53 F₂ plants derived from the cross Enrei x Sachiyutaka were analyzed using SSR markers. Protein content, the 11S/7S ratio, the phytate content and the consistency of tofu were analyzed to evaluate the phenotype of the consistency of tofu, which was determined based on the ratio of the actual values (M) to the predicted values (P). We used 143 SSR markers which showed polymorphisms between Enrei and Sachiyutaka. The genotype of BARCSOYSSR_10_1614, which is located on chromosome 10, coincided with the phenotype of the consistency of tofu for 8 F₂ plants. The averages of M/P for F₂ plants showing the genotype of Enrei homozygous, heterozygous and Sachiyutaka homozygous were 1.6, 1.2 and 0.9, respectively. The Tukey's HSD test detected a significant difference between Enrei homozygous and heterozygous, and between Enrei homozygous and Sachiyutaka homozygous ($p<0.05$). The M/P of Enrei and Sachiyutaka was 1.9 and 1.0, respectively.

*〒305-8518 茨城県つくば市観音台2-1-18

The M/P of F2 Plants showing the genotype of Enrei homozygous decreased using Satt153 and BARCSOYSSR_10_1684. The M/P of F2 Plants showing the genotype of Sachiyutaka homozygous increased using BARCSOYSSR_10_1684. BARCSOYSSR_10_1614 is located between Satt153 and BARCSOYSSR_10_1684. These results indicated the possibility that a gene factor affecting the consistency of tofu might be present in the 3 Mb-region between Satt153 and BARCSOYSSR_10_1684. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 18-21, 2011.

Key words : soybean component, tofu consistency, SSR marker analysis

豆腐の堅さ（破断応力）は大豆の豆腐加工適性を評価する上で重要なポイントである。これまでに、たん白質含量、たん白質サブユニット成分比（11S/7S比）、フィチン含量が豆腐の堅さに影響を及ぼすことが明らかとなり¹⁻³⁾、国産大豆品種サチユタカ、フクユタカは上記3成分と豆腐の堅さとの間で高い重相関を示した。しかし、国産品種エンレイでは3成分と豆腐の堅さとの間で相関は低く、サチユタカ、フクユタカに関する上記3成分と豆腐の堅さとの関係を表す近似式にエンレイのデータをあてはめると、すべての実測値が予測値を上回った。これらの結果から、エンレイにはサチユタカ、フクユタカにはない豆腐の堅さに関与する成分（豆腐を堅くする成分）があり、それが堅さの変動に大きく寄与している可能性が示唆された。そこで本研究では、2009年産エンレイ、サチユタカおよびそれらのF2、53個体を用いてF3種子成分と豆腐の堅さを分析し、豆腐の堅さに影響を及ぼす新規成分関連遺伝子についてSSR (Single sequence repeat) マーカーを用いたDNAマーカー解析を行った。

方 法

分析サンプルおよび成分分析

茨城県つくば市観音台は場（当研究所は場）にて栽培したエンレイ、サチユタカ、およびそのF2個体を供試した。たん白質含量は近赤外分光分析法（Infratec1241, FOSS社）を用いて測定した。また、矢ヶ崎ら⁴⁾の方法に準じ、大豆粉から抽出したグロブリンたん白質をSDS化し、SDS-PAGEを行ってCBB（Coomassie Brilliant Blue）溶液でゲルを染色し、画像をスキャナーで取り込んだ後、解析ソフト（Lane analyzer, ATTO）でバンドの濃淡を解析して11S/7S比を評価した。豆乳中のフィチン含量は石黒ら⁵⁾の方法に準じ、水酸化ナトリウムとカルシウムの添加により溶液中のフィチンを沈殿した後、0.9規定の塩酸で

再溶解し、リン含量をFiske-Subbarow法⁶⁾により測定することにより評価した。豆乳中のカルシウム含量は3%トリクロロ酢酸でたん白質を沈殿、除去後、カルシウムE-テストワコー（和光純薬）により評価した。

SSRマーカー解析

各個体のDNAは幼葉を用いて核酸・たん白質自動精製システム（Maxwell 16, プロメガ）により調製した。エンレイ、サチユタカについてはそれぞれ4個体のDNAサンプルを用いた。SSRマーカーの情報はウェブ上（SoyBase, <http://soybase.org/>）もしくは既報⁷⁾から入手した。

結果と考察

F3種子の豆腐の堅さの実測値（M）と、たん白質含量、11S/7S比、フィチン含量からの予測値（P）の割合（M/P）は0.6から2.5となった。これまでのエンレイ、サチユタカのM/Pはそれぞれ1.4から5.7、0.5から1.4であり、2009年観音台産についてはそれぞれ1.9、1.0であることから、M/Pが1.8から2.5、0.7から0.9のF2、各4個体をそれぞれエンレイ、サチユタカ型と判定し、DNAマーカー解析に用いた。

これまでにカルシウム含量が豆乳の凝固性や豆腐の堅さに影響を及ぼすことが示唆されているが^{2), 8, 9)}、今回解析したエンレイ、サチユタカのF2に関しては豆乳カルシウム含量と豆腐の堅さとの間で有意な相関は検出されず（ $r=0.14$ ）、カルシウム含量の豆腐の堅さに対する寄与は少ないことが示唆された。

DNAマーカー解析に使用した976のSSRマーカーのうち、143マーカーでエンレイ、サチユタカ間で多型を検出した。各染色体中、多型を示したマーカー数は0から19であった。多型を示す領域には偏りがあり、第6染色体では調べた87のSSRマーカー全てに多型が検出されなかった。サチユタカはエンレイとフクユタカの交配後代でエンレイは2反復親であり、サチユタ

カのゲノムの大部分はエンレイ型であると推察される。

多型を示した143のSSRマーカーを用いて上記8個体のF2についてマーカー解析を行ったところ、第10染色体上のマーカーのみ、豆腐の堅さによる判定と遺伝子型が一致した。そこで遺伝子型が一致したSSRマーカー BARCSOYSSR_10_1614とその周辺のマーカー Satt153, BARCSOYSSR_10_1684を用いて、F2、53個体についてマーカー解析を行い、豆腐の堅さによる判定との比較を行った (Table 1)。BARCSOYSSR_10_1614の判定によるエンレイ型ホ

モ、ヘテロ型、およびサチユタカ型ホモ個体のM/P値の平均はそれぞれ1.6、1.2、0.9であり、Tukey HSD法によりエンレイ型ホモ個体の平均値は他の遺伝子型個体の平均値と5%水準で有意差を示した。その周辺のマーカー Satt153, BARCSOYSSR_10_1684に関してはエンレイ型のM/P値の減少、もしくはサチユタカ型のM/P値の増加が確認された。これらのことから、豆腐の堅さに影響を及ぼす新規成分に関わる遺伝子が、Satt153, BARCSOYSSR_10_1684に挟まれた約3 Mbの領域に座乗することが推察された。

Table 1. M/P for Enrei and Sachiutaka, and average values of M/P¹⁾ for F2 plants

SSR marker Map distance (kb) ²⁾	Average of M/P for F2 Plants showing the same genotype using SSR markers			M/P for parents	
	Satt153	BARCSOYSSR_10_1614	BARCSOYSSR_10_1684		
	0	1552	2991		
Enrei homozygous	1.5 ^a	1.6 ^a	1.5 ^a	Enrei	1.9
Heterozygous	1.2 ^b	1.2 ^b	1.3 ^{ab}		
Sachiutaka homozygous	0.9 ^b	0.9 ^b	1.0 ^b	Sachiutaka	1.0

1) Different letters of the same column show a significant difference by Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

2) Map distance was calculated based on the resources of Soybase (<http://soybase.org/>).

要 約

豆腐の堅さは大豆の豆腐加工適性を評価する上で重要なポイントである。これまでに、たん白質含量、11S/7S比、フィチン含量が豆腐の堅さに影響を及ぼすことが明らかとなり、国産大豆品種サチユタカ、フクユタカは上記3成分と豆腐の堅さとの間で高い重相関を示した。しかし、サチユタカ、フクユタカに関する上記3成分と豆腐の堅さとの関係を表す近似式にエンレイのデータをあてはめると、すべての実測値が予測値を上回ることから、エンレイにはサチユタカ、フクユタカにはない豆腐の堅さに関与する成分があり、それが堅さの変動に大きく寄与している可能性が示唆された。そこで本研究では、2009年産エンレイ、サチユタカおよびそれらのF2、53個体を用いてF3種子成分と豆腐の堅さを分析し、豆腐の堅さに影響を及ぼす新規成分関連遺伝子についてSSRマーカー解析を行った。豆腐の堅さの表現型は豆腐の堅さの実測値 (M) と、たん白質含量、11S/7S比、フィチン含量からの予測値 (P) の割合 (M/P) で評価した。エンレイ、サチユタカ間で多型を示した143のSSRマーカーのうち、第10染色体上のマーカーのみF2、8個体について豆腐の堅さによる判定と遺伝子型が一致した。遺伝子型が一致したSSRマーカー BARCSOYSSR_10_1614を用いて、F2、53個体についてマーカー解析を行い、豆腐の堅さによる判定との比較を行った結果、BARCSOYSSR_10_1614の判定によるエンレイ型ホモ、ヘテロ型、およびサチユタカ型ホモ個体のM/P値の平均はそれぞれ1.6、1.2、0.9であり、Tukey HSD法によりエンレイ型個体の平均値は他の遺伝子型個体の平均値と5%水準で有意差を示した。エンレイ、サチユタカのM/P値はそれぞれ1.9、1.0であった。BARCSOYSSR_10_1614周辺のマーカー Satt153, BARCSOYSSR_10_1684に関してはエンレイ型のM/P値の減少、もしくはサチユタカ型のM/P値の増加が確認された。これらのことから、豆腐の堅さに影響を及ぼす新規成分に関わる遺伝子が、Satt153, BARCSOYSSR_10_1684に挟まれた約3 Mbの領域に座乗することが推察された。

文 献

- 1) Toda K, Ono T, Kitamura K, Hajika M, Takahashi K and Nakamura Y (2003): Seed protein content and consistency of tofu prepared with different magnesium chloride concentrations in six Japanese soybean varieties. *Breeding Sci*, **53**, 217-223.
- 2) Toda K, Takahashi K, Ono T, Kitamura K and Nakamura Y (2006): Variation in the phytic acid content of soybeans and its effect on consistency of tofu made from soybean varieties with high protein content. *J Sci Food Agric*, **86**, 212-219.
- 3) Toda K, Yagasaki K and Takahashi K (2008): Relationship between protein composition and coagulation reactivity, particulate formation, and incorporation of lipids in soymilk. *Biosci Biotech Biochem*, **72**, 2824-2830.
- 4) Yagasaki K, Kaizuma N and Kitamura K (1996): Inheritance of glycinin subunits and characterization of glycinin molecules lacking the subunits in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Breed Sci*, **46**, 11-15.
- 5) Ishiguro T, Ono T and Nakasato K (2008): The localization of phytate in tofu curd formation and effects of phytate on tofu texture. *J Food Sci*, **73**, C67-C71.
- 6) Bartlett GR (1959): Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, **234**, 466-468.
- 7) Song Q, Jia G, Zhu Y, Grant D, Nelson RT, Hwang EY, Hyten DL and Cregan PB (2010): Abundance of SSR motifs and development of candidate polymorphic SSR markers (BARCSOYSSR_1.0) in soybean. *Crop Sci*, **50**, 1950-1960.
- 8) Toda K, Chiba K and Ono T (2007): Effect of components extracted from okara on the physicochemical properties of soymilk and tofu texture. *J Food Sci*, **72**, C108-113.
- 9) Liu ZS, Chang SKC (2004): Effect of soy characteristics and cooking conditions on coagulant requirements for making filled tofu. *J Agric Food Chem*, **52**, 3405-3411.