# 短時間吸水により機能性を高めた大豆素材の開発と DNAマイクロアレイ解析による経時的特性評価

田村倫子\*

東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科

## Characterization of the Quality of Imbibed Soybean at an Early Stage of Pre-Germination for the Development of a New Protein Food Item

Tomoko TAMURA\*

Department of Nutrition and Food Safety, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156-8502

## ABSTRACT

This is a pilot study to develop a new protein food item from imbibed soybean before germination. The present work noticed the significant of a short stage after imbibition and before germination and we found that vitamin C production was activated in as short as 16 h from the start of imbibition, without particular influence on the soy protein quality and sensory acceptability, while longer imbibition made the imbibed soybean activate its phytophysiological metabolism for germination. DNA microarray analysis followed by gene ontology statistics revealed that, prior to 16 h, (i) genes for carbohydrate metabolism giving rise to nutrients as the primary metabolism were up-regulated; (ii) genes response to water-, temperature-, and light-stimulation which may not be related to soybean protein properties were down-regulated; and (iii) gene associated with lipid metabolism and secondary metabolite production were changed. This information will contribute to better understanding how to develop a new soy protein item in pregermination before active physiological processes begin. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 127-134, 2014.

Key words : soybean; imbibition; pregermination; DNA microarray

大豆を加工する際,伝統的に数時間の浸漬がほどこ されている.吸水における栄養素の化学的変化は調べ られているが<sup>1~3)</sup>,食品の機能性に着目したオミック ス解析は少なく,短時間吸水における網羅的な遺伝子 発現変動については報告例がない.しかし,生体に有益な成分に関わる遺伝子の発現変動と,その周辺の代 謝変動を網羅的に解析することは,食品の二次・三次 機能に関わる物質が増減するしくみを理解し,より機 能性の高い食品を効率的に得るために重要である.今 回,0 (dry seeds),8,16時間吸水させた大豆のマイ

<sup>\*〒156-8502</sup> 東京都世田谷区桜丘1-1-1

クロアレイ解析を行い,食品の質に関わる因子をコー ドする遺伝子の発現変動を網羅的に解析した.また, 2つの化合物についてはそれらの合成・分解経路の遺 伝子の経時的な発現量の変化を調べた.

## 方 法

#### 試料調製

大豆 (スズマル) を25℃, 恒暗条件下で, 湿潤した 脱脂綿上で0, 8, 16, 24, 32, 40, 48時間吸水させた. RNA抽出には, 吸水後ただちにドライアイスととも に粉砕後-80℃で保存したサンプルを用い, その他の 実験には吸水後速やかに供試した.

#### GABAおよびビタミンC含有量の測定

GABAはダブシルクロライドでラベル化し, CrestPak C18Sを用いたHPLCで定量した.

ビタミンC含有量はヒドラジン比色法を用いて総ビ タミンC量を測定した.

#### SDS-PAGEによる大豆たん白質分析

吸水させた大豆0.1 gを乳鉢に入れ,抽出バッファー (0.05 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.4%SDS, 5 M Urea, 1.5% 2-メルカプトエタノール)4 mLとともに10分間摩砕し た. その後,22℃,12,000 rpmで10分間遠心分離し, 上清をSDS-PAGEに供しCBB染色でたん白質を検出し た.

#### 官能試験とたん白質の凝集試験

吸水0, 16, 32, 48時間の大豆から豆乳を調製した. 官能試験は,被験者1人について4試料の豆乳を順不同 で提示し,11段階でおいしさを評価してもらった.72 名の被験者を対象に行い,4分位範囲の1.5倍を外れる ものを外れ値候補として除外し,平均と標準偏差を求 めた.次に多重比較(Tukey-kramer)のHSD検定を行っ た.たん白質の凝集試験は,50倍稀釈した豆乳に終濃 度3.5%となるようグルコノ-δ-ラクトンを加え沈澱の 形成を調べた.

#### RNA抽出とDNAマイクロアレイ解析

QIAGEN RNeasy plant mini kitを 用 い て 全RNA を抽出した. DNAマイクロアレイには0, 8, 16時間 吸水させた大豆を用いた. 全RNA200 ngから, Low Input Quick Amp Labeling Kitを使用してCy3ラベル cDNAを合成した. ラベル化cRNA 1.65 µgを用いてフ ラグメンテーションを行った後, ダイズオリゴDNA 44チップ (Agilent) を用いて一晩ハイブリダイゼー ションを行った.翌日スキャナコントロールソフト Ver. 8を用いてスキャンした.以上の工程は, Agilent Gene Expression 1色法プロトコルに従った.

正規化はGene spring GX11.5を用いて75 percentile shiftで行った.次いで言語R(Ver. 2.1.4.0)を利用し pvclust関数を用いた階層的クラスター解析を行い, conditioning treeを作成した.その後の統計処理は, corrected p-value cut-offを0.01に設定し,Tukey HSD とOneway ANOVAを用いて行った.隣り合う吸水時 間において5倍以上の発現変動が見られた遺伝子に対 して階層的クラスタリングを行い,ヒートマップを作 成した.これを5つのクラスターに分類し,Biomart を用いて大豆の遺伝子IDをシロイヌナズナのThe *Arabidopsis* information resource (TAIR) IDに変換し た後,各クラスターでGene Ontology解析を行った.

#### RT-PCR

1 $\mu$ gの全RNAを用いてFirst-Strand cDNA Synthesis Kit (GEヘルスケア) によりcDNA合成をした. PCR は1<sup>st</sup>-strand cDNAを鋳型とし、コントロールにアク チンを用い、各遺伝子に特異的なプライマーを用い て行った. 解析にはThermal Cycler Dice Real Time Software (TaKaRa)を使用し、*actin*で補正し0時間の サンプルの遺伝子発現量を1とし、その相対値で示し た.

#### 結果と考察

## GABAおよびビタミンCの含有量とそれらの代謝酵素 遺伝子の変動

大豆を吸水させると、24時間後に種実の重量が2倍 となり発芽した(Fig. 1A). ビタミンCは吸水前は 1.6 mg/100g種子であり、吸水8時間後に2倍に増加し た(Fig. 1B). 吸水16時間後で0時間よりも有意に増 加し、その後も増加し続けた. RT-PCRを行うと、ビ タミンC合成の律速酵素であるL-galactono-1,4-lactone dehydrogenase(LGDH)をコードする遺伝子は吸水 後徐々に増加し48時間後に有意に増加した(Fig. 1C).

γ-アミノ酪酸(GABA)は乾燥種実に23.6 mg/100 g種子であり、吸水後32-40時間で35.8から98.3 mg/100 g種子に増加した(Fig. 1D).GABAは主にグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)により生成されるが<sup>40</sup>,GADは8時間後に0時間の2.7倍となり、16時間後に37.2倍になった(Fig. 1E).一方、GABAを分解する酵素であるGABAトランスアミナーゼ(GABA-T) の遺伝子は8時間後に2.3倍になり、その後も増加し続けた (Fig. 1F). よってGABA量の変動に8-16時間先立って、遺伝子の発現が変動した.

#### 吸水によるたん白質の質的変動

グルコノ-δ-ラクトンによるたん白質の凝集性を調 べると、吸水48時間まではたん白質の沈殿が観察され (Fig. 2A),その形成時間や量に差は認められなかっ た.吸水6日後に初めて沈殿が形成されなかった.貯



Fig. 1. Time course changes of soybean by imbibition. A, Picture of samples used in experiments. Bar = 5 mm. B-F, Time course change of Vn. C, γ-Aminobutyric acid (GABA), and those related genes after imbibition. Concentration of Vn. C (B) and GABA (D) in the dry seeds by colorimetric method using 2,4-dinitrophenylhydrazine and HPLC analysis, respectively, and genes expression of ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (LGDC, C), GABA synthesizing enzyme glutamate decarboxylase (GAD, E), and GABA degraded enzyme GABA transaminase (GABA-T, F) by RT-PCR analysis.

蔵たん白質をSDS-PAGEに供したところ,48時間まで は大きな変動や消失したバンドは認められなかった (Fig. 2B).そこで,吸水大豆を用いて豆乳を調製し 官能試験を行うと,0時間と16時間の評価は同じであっ たが,32時間以降に有意に評価が低下した.RT-PCR で遺伝子発現が吸水24時間以降大きく変動したことか ら,32時間以降の食味の低下は,吸水後の発芽成長期 において植物の二次代謝産物量が増加したことに起因 した可能性があると考えられた.そこで,発芽前の0, 8,16時間におけるDNAマイクロアレイ解析を行い, 網羅的な遺伝子発現変動を検討した.



Fig. 2. Quality changes of seed storage protein after imbibition. A, glucono- $\delta$ -lactone-induced protein precipitability. B, SDS-PAGE analysis. C, Sensory evaluation of soy milk samples prepared from imbibed bean. Different letters indicate significant differences (p < 0.05). Boxplots show the 25 th and 75 th percentiles (boundary of the box) and median (line).

### DNAマイクロアレイのデータ解析 GO解析

3ステージ8サンプルを、75パーセンタイルシフトで 正規化し、クラスターデンドログラムを構成すると、 吸水0、8時間のサンプルが最も近くに配置され、吸水 16時間のサンプルは吸水0、8時間と異なるクラスター に属した(Fig. 3).次に、gene springを用いて統計処 理を行うと7792遺伝子が残った.これらから、隣り合 うステージ間で5倍以上発現が変動した遺伝子を抽出 すると、1160遺伝子であった.

1160遺伝子を発現パターンで分けると、5つに分か れた (Fig. 4A). クラスター1と3には吸水後に発現 がup-regulateされた遺伝子が配属され、クラスター 2,4,5には乾燥種子中における発現量は異なるが、吸 水後にdown-regulateされた遺伝子が配属された. 各 クラスター内でGO解析を行い,有意に濃縮されたGO termsをTable 1に示した. P値が最も小さい3つのGO termにグレーの背景を付した. 吸水後に発現がupregulateされた遺伝子を多く含むクラスター1は、ホ スホエノールピルビン酸カルボキシラーゼや鉄シャペ ロンのように金属イオンを補因子とする酵素をコード する遺伝子が含まれた.また、アスコルビン酸パーオ キシダーゼやP450のような酸化還元に関わる酵素の 遺伝子も含まれた。 クラスター3もまた吸水後に発現 が増加した遺伝子を含むが、ここにはω-3脂肪酸デサ チュラーゼ,キシログルカンエンドトランスグリコシ ラーゼヒドロラーゼなど、細胞内の炭水化物の代謝に 関わる遺伝子群が含まれた.また、細胞内アミノ酸誘 導体の生合成に関連した遺伝子群もクラスター3に含 まれており、アルカロイドやフラボノイドの生合成酵 素をコードする遺伝子が属していた、さらに、リポキ



Fig. 3. Conditioning tree of 8 samples from 3 imbibition stages constructed using the 'pvclust' function.



a: Numbers of probes assigned to 5 clusters

- b: Numbers of soybean genes assigned to TAIR locus ID
- c: Numbers of TAIR locus ID without overlapping with the TAIR locus  $\mathrm{ID}^{\,\mathrm{b}}$
- Fig. 4. Cluster dendrogram for genes expressed in imbibed soybean. Genes extracted with fold change>10 when compared between two adjacent stages were used and after hierarchical clustering analysis, genes were divided into 5 groups.

シゲナーゼ (LOX) を含むジャスモン酸生合成に関わ る遺伝子も有意に濃縮された.一方,吸水後にdownregulateされた遺伝子を含むクラスター2,4,5には, LOX2を含む脱水に応答する遺伝子群,温度・光・ア ブシシン酸に応答する遺伝子群が含まれた.よって, 休眠打破や発芽といった植物生理学的遺伝子発現は吸 水16時間までにdown-regulateされ,その間に多糖類 やアミノ酸の代謝に関わる酵素の遺伝子がup-regulate されることが明らかになった.

#### 機能性に関わる遺伝子の解析

食味に関わる遺伝子の発現変動に着目すると(Table 2), たん白質分解酵素が吸水によりup-regulateされた. これまでに、グリシニンの塩基性サブユニットとβ-コ ングリシニンは吸水120時間後に検出できるが、グリ シニンは吸水72時間後により急激に減少することが報 告されている5). 今回これより短い吸水時間に着目す ると、メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、シ ステインプロテアーゼは吸水8時間以内に出現し、16 時間吸水でup-regulateされた.一方でアスパラギン 酸プロテアーゼといくつかのセリン・システインプロ テアーゼは吸水8-16時間でdown-regulateされた. 瑞 穂ら6)は種子中の遊離アミノ酸は吸水24時間では変化 がないが、48時間で2倍量になると報告している。そ れに先立ち、プロテアーゼ遺伝子が発現変動してい た、筆者は、モルシンによる大豆たん白質の分解は、 20 kDa以下のたん白質を消失させ豆腐をクリームチー ズのような食感に変化させることを報告したが7,今 回の吸水時間ではSDS-PAGEによるたん白質の大きな 変動はなく、グルコノ-δ-ラクトンの凝集性にも影響 がなかったため、大豆の加工特性を大きく変化させな いことが示唆された.一方, Bowman-Birk型とシス テインプロテアーゼインヒビターは8-16時間でdownregulateされ, Kunitz型プロテアーゼインヒビターは 吸水でup-regulateされた.

その他の成分では、ヘキサナールはα-リノレン酸 がLOXおよびヒドロキシパーオキシドリアーゼに より分解されることで生じるが、16時間吸水によ b, GLYMA13G42320 (LOX1), GLYMA13G42310 (LOX2), GLYMA07G00920 · GLYMA15G03030 (LOX3) はdown-regulateされ、ヒドロパーオキシド リアーゼは発現変動しなかった. LOXによる不飽和脂 肪酸の酸化はジャスモン酸生合成の B 酸化ステップに 含まれるが、クラスター3のGO解析にも認められた. また、サポニン生成に関連するスクアレンモノオキシ ゲナーゼ遺伝子は、サポニン自体は吸水1日で2倍にな ることが報告されているが<sup>8)</sup>,吸水16時間で出現した. レクチン遺伝子は吸水8-16時間で発現が増加し、フィ チン酸合成に関与するミオイノシトール-1-リン酸シン ターゼは吸水8-16時間で発現が減少した. イソフラボ ンはイソフラボンシンターゼにより合成され、レダク ターゼによりファイトアレキシンに変換されるが.吸 水でシンターゼ遺伝子の発現は変動しなかった一方 で、レダクターゼ遺伝子が吸水で増加した.

Cluster	Providence	GO term	Number	0/	n Value
	Function		of genes	%	p-value
Cluster 1	Response to stimulus	GO:0050896	27	34.6	7.73E-04
	Response to chemical stimulus	GO:0042221	18	23.1	5.67E-04
	<sup>L</sup> Response to inorganic substance	GO:0010035	9	11.5	8.51E-04
	Response to metal ion	GO:0010038	9	11.5	8.55E-05
	<sup>L</sup> Response to cadmium ion	GO:0046686	6	7.7	0.00748
	Metabolic process				
	<sup>L</sup> Single-organism metabolic process				
	Oxidation reduction process	GO:0055114	14	17.9	3.52E-04
Cluster 2	Response to stimulus				
	<sup>L</sup> Response to abiotic stimulus	GO:0009628	7	13.2	0.027
	Response to water stimulus				
	Response to water deprivation	GO:0009414	4	7.5	0.005
	Regulation of cell communication	GO:0010646	3	5.7	0.025
	<sup>L</sup> Negative regulation of cell communication	GO:0009966	3	5.7	0.078
	<sup>L</sup> Negative regulation of signal transduction	GO:0010646	3	5.7	0.078
	5 5 5				
Cluster 3	Carbohydrate metabolic process	GO:0005975	27	9.0	2.71E-04
	Cellular carbohydrate metabolic process	GO:0044262	20	6.7	4.08E-05
	Polysaccharide metabolic process	GO:0005976	10	3.3	0.002
	<sup>L</sup> Glucan metabolic process	GO:0044042	8	2.7	0.004
	<sup>L</sup> Cellular glucan metabolic process	GO:0006073	6	2.3	0.006
	Cellular component organization	GO:0016043	26	8.7	0.021
	<sup>L</sup> External encapsulating structure organization	GO:0045229	14	4.7	1.17E-04
	<sup>L</sup> Cell wall organization	GO:0007047	13	4.3	2.67E-04
Cluster 4	Response to abiotic stimulus	GO:0009628	14	22.6	9.03E-06
	<sup>L</sup> Response to temperature stimulus	GO:0009266	9	14.5	3.87E-06
	Response to heat	GO:0009408	6	9.7	2.20E-05
	<sup>L</sup> Response to cold	GO:0009409	4	6.5	0.025
	Response to radiation	GO:0009314	8	12.9	2.70E-04
	Response to light intensity	GO:0009642	7	11.3	3.89E-08
	Response to high light intensity	GO:0009644	7	11.3	1.17E-09
Cluster 5	Response to stimulus	GO:0050896	30	26.1	0.002
	<sup>L</sup> Response to chemical stimulus	GO:0042221	22	19.1	9.69E-05
	<sup>L</sup> Response to hormone stimulus	GO:0009725	12	10.4	0.002
	Response to abscisic acid stimulus	GO:0009737	11	9.6	5.81E-07
	<sup>L</sup> Abscisic acid mediated signaling pathway	GO:0009738	3	2.6	0.044
	Response to inorganic substance	GO:0010035	6	52	0.098
	<sup>L</sup> Response to water stimulus	GO:0009415	8	7.0	2.00E-05
	<sup>L</sup> Response to water deprivation	GO:0009414	8	7.0	1.45E-05

Table 1. Significantly enriched gene ontology (GO) terms found in each group

Shaded in gray terms; three GO terms which have the lowest FDR-corrected p values of the categories.

Description	Ensembl gene ID			Hours after imbibition			
Description			I AIK ID	0 h	8	3 h	16 h
Metalloproteinase	GLYMA02G03230, GLYM	MA02G03250,	AT1G59970				
	BE658306, GLYMA02G0	)3290,				1	
	GLYMA02G03210, GLYM	MA02G03320					
	GLYMA02G03250				1	1	
Aspartic protease	GLYMA14G39350, Gmax	x_FG19545,	AT1G62290, AT5G37540	_		~	
	GLYMA17G01500, GLYM	MA02G41070				•	
Serine proteinase	GLYMA17G17850		AT5G67360		1	1	
	GLYMA09G32760, GLYM	MA17G17850	AT1G32940, AT5G67360	-		7	
	GLYMA10G43460				<b>→</b>	7	
Cysteine protease	GLYMA06G03050, GLYM	MA15G19580,	AT3G45310	_		7	
	GLYMA17G05670						
	GLYMA17G35720		AT1G47128	-		_	+
	GLYMA15G19580, GLYM	MA14G40670,	AT3G45310, AT1G47128		<b>→</b>	7	
	GLYMA09G08100, GLYM	MA14G09440					
	GLYMA12G04340		AT4G39090		1	$\rightarrow$	
	GLYMA10G35100		AT3G54940		$\rightarrow$	×	
Bowman-Birk type	GLYMA14G26410, GLYM	MA16G33400,	AT3G12490				
protease inhibitor	GLYMA13G25870, GLYM	MA15G36180,			$\rightarrow$	1	
	GLYMA14G04250						
Kunitz type protease	GLYMA09G28310		AT1G17860	_		_	+
inhibitor	GLYMA08G45520		AT1G17860		<b>→</b>	1	
Cysteine proteinase	GLYMA13G25870, GLYM	MA15G36180,	AT3G12490		<b>→</b>	ς.	
inhibitor	GLYMA14G04250					*	
Cellulase	GLYMA11G11910		AT4G39010	-		1	
$\beta$ -Glucosidase	GLYMA12G05770		AT2G44480	_		_	+
	GLYMA15G05720, GLYM	MA07G38840	AT5G64570, AT1G61820	-		1	
	GLYMA20G33990		AT3G24180		$\rightarrow$	7	
Sucrose synthase	GLYMA15G20180, GLYM	MA09G08550	AT3G43190		$\rightarrow$	1	
Lipoxygenase	GLYMA13G42330, GLYM	MA15G03050,	AT1G55020				
	GLYMA07G00900, GLYM	MA13G42340,		-		_	+
	GLYMA16G01070						
	GLYMA13G42310, GLYM	MA07G00920,	AT1G55020		<b>→</b>	ς.	
	GLYMA15G03030, GLYM	MA13G42320				*	
Squalene monooxygenase	GLYMA14G10290		AT1G58440	-		_	+
Lectin	GLYMA07G04080		AT5G13640		$\rightarrow$	1	
MIPS*	GLYMA18G02210		AT2G22240		$\rightarrow$	Ŕ	
Isoflavone reductase	GLYMA01G37810, GLYM	MA11G07510	AT4G39230	-		1	
Ferritin	GLYMA03G06420		AT5G01600		<b>→</b>	1	
	* myo-Inositol-1-phosphat	te synthase					
	–, not detected; +, de	etected; 🦯 ,	up-regulated; 🔍, down	-regu	lated		

Table 2. Gene titles related to food function and expression changes compared between two adjacent stages

吸水により大豆種子は糖質,たん白質,脂質等の代謝をドラスティックに変動させ,食品として の機能性を向上させる.大豆を吸水させると,吸水時間に比例して,ビタミンCとGABAの量が増 加したが,各吸水時間で調べた豆乳の嗜好性は,吸水16時間以降低下した.そこで,吸水0,8,16 時間における大豆のDNAマイクロアレイ解析を行うと,炭水化物の代謝に関わる遺伝子群は吸水 8-16時間に発現増加するクラスターに配属された一方,いずれの時間も発現増加した遺伝子は炭素 固定や鉄代謝に関わる酵素をコードする遺伝子群であった.吸水8-16時間に発現が低下した遺伝子 の多くは,水・温度・光・障害に応答するたん白質をコードする遺伝子群であった.次に,たん白 質,脂質代謝に関わる酵素をコードする遺伝子や,二次代謝産物に関わる酵素の遺伝子に着目する と,プロテアーゼ,プロテアーゼインヒビターにおいては各種類によって異なる発現パターンを示 した.以上から,吸水による大豆の二次代謝産物の合成が活性化する前の機能性の高まる時点を明 らかにし,大豆加工における基盤を得ることができた.

- Wai KNT, Bishop JC, Mack PB, and Cotton RH (1947): The vitamin content of soybeans and soybean sprouts as a function of germination time. *Plant Physiol*, **22**, 117–126.
- Komatsuzaki N, Tsukahara K, Toyoshima H, Suzuki T, Shimizu N and Kimura T (2007): Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *J Food Eng*, **78**, 556–560.
- Cartea ME and Velasco P (2008): Glucosinolates in brassica foods: Bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev*, 7, 213-229.
- Matsuyama A, Yoshimura K, Shimizu C, Murano Y, Takeuchi H and Ishimoto M (2009): Characterization of glutamate decarboxylase mediating γ-amino butyric acid increase in the early germination stage of soybean (*Glycine max* [L.] Merr). *J Biosci Bioeng*, **107**, 538–543.

## 献

文

- Kim HT, Choi UK, Ryu HS, Lee SJ and Kwon OS (2011): Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. *Biochim Biophys Acta*, **1814**, 1178–1187.
- 6)水野時子,山田幸二(2007):市販大豆もやしの 生育過程における y-アミノ酪酸および遊離アミノ酸組成の変動.日本食生活学会誌,17,51-57.
- 7) Nishinoaki M, Asakura T, Watanabe T, Kunizaki E, Matsumoto M, Eto W, Tamura T, Minami M, Obata A, Abe K and Funaki J (2008): Application of an *Aspergillus saitoi* protease preparation to soybean curd to modify its functional and rheological properties. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72**, 587-590.
- Jyothi TC, Kanya TCS and Rao AGA (2007): Influence of germination on saponins in soybean and recovery of soy sapogenol I. *J Food Biochem*, **31**, 1-13.