九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

登熟温度がダイズのイソフラボン含有率の推移に及ぼす影響

山川, 武夫
九州大学大学院農学研究院

仲野, 快恵
九州大学大学院生物資源環境科学府

梶原, さゆり
九州大学農学部附属農場

望月, 俊宏
九州大学大学院農学研究院

https://hdl.handle.net/2324/1793445

出版情報：日本土壌肥料学雑誌. 78 (1), pp.39-44, 2007-03. 日本土壌肥料学会
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

登熟温度がダイズのイソフラボン含有率の推移に及ぼす影響*1

山川武夫*2・仲野快恵*3・梶原さゆり*4・望月俊宏*2

キーワード　イソフラボン，配糖体，ダイズ種子，登熟温度，マロニル配糖体

1. 緒　　言

ダイズ種子のイソフラボン含量は遺伝的・環境的な影響を受ける[1]ことが知られており，我々は前報[2]において，登熟時の温度がダイズ種子のイソフラボン含有率に大きく影響を与えること，特に登熟期の温度が30°C近くになると極端に低下することを明らかにした．また，ダイズ種子は開花後35日頃からイソフラボン成分の蓄積が始まり，登熟（種子の肥大）に伴い蓄積量が増大する[3]こと，ダイズのイソフラボン含量が登熟期（種子肥大期）の温度に影響され，子葉部分よりも胚軸部分での含有率が高い[4]ことが指摘されている．しかし栽培時の温度条件をコントロールして比較した例はない．そこで，遺伝的にイソフラボン含量が異なるダイズ品種を用いて，イソフラボンの生成に及ぼす温度の影響を明らかにし，遺伝的なイソフラボン含量の差が温度感受性に差があるかを明らかにする必要がある．

本研究は，遺伝的にイソフラボノイド生産能力が異なると考えられる数種のダイズ品種を温度条件が異なる環境下で栽培し，登熟過程のイソフラボンの量的・質的遷移を調査することで，イソフラボノイド生産に及ぼす登熟温度と遺伝的特性を明らかにすることを目的とする．

2. 材料と方法

1）植物材料

2002年度は2001年に九州大学附属農場で栽培された奥原1号（Ia）の種子を用いた．2003年度は，2002年に台湾のAVRDC（Asian Vegetable Research and Development Center）より分譲された遺伝的にイソフラボン含量が高いダイズ品種AGS 292[5]を同年に栽培・収穫した種子と，2001年に九州大学附属農場で栽培されたサチユタカ（IIIc）とフクユタカ（IVc）の3品種を用いた．（　）内に示した生態型の表記法は，福井・荒井[6]によるダイズ品種の生態型の分類法に従った．

奥原1号は，枝豆として利用される品種で，フクユタカは大粒系のダイズで，西南暖地で奨励品種として広範囲に栽培される優良品種である．サチユタカは，フクユタカとエンレイの交雑後代から育種された大粒系の品種で，西南暖地でのダイズの増収が期待されている．AGS 292は，アメリカ合衆国でBurker's Favorieという名前で市販され，野菜として利用されている品種名Kaohsiung No 1というダイズで，台湾への導入品種である[7]．

2）ダイズの栽培とサンプリング

ダイズの栽培には，二日市土壌（砂壌土，全窒素：0.10%，陽イオン交換容量：8.3 $cmol_c\ kg^{-1}$）を用いた．2002年度は1/2,000 aワグネルポットを6ポット，2003年度は18ポット用意し，各ポットに小石2 kgと2002年は乾土約13 kg，2003年は乾土14 kgを充填し，上層約20 cmの土に，播種の約1週間前にpH 6.5となるよう炭酸苦土石灰を施用し，数日後肥料としてくみあい豆化成300号（N：3%，P_2O_5：10%，K_2O：10%，（株）菱東肥料製）をポット当たり8 g施肥した．

ポットにダイズ種子を4粒ずつ2箇所に播種し，ポット当たり2株植えとした．初生葉展開後のV 3期に間引き，1株2個体とした．莢が2 cm程度に伸長するR 4期までは網室で栽培した後ファイトトロンへ移動した．その後登熟が終了するまで，ファイトトロンの20，25，30°Cの異なる温度条件下で栽培した．ダイズの発育段階の表現法についてはFehrら[8]に従った．栽培は品種ごとに各温度処理につき2ポットで行った．灌水は，最初適時行い，莢肥大期後半は週2回程度行った．2株のうち1株を経時的な莢サンプリング用，1株を黄熟期での収穫用とした．

経時的な莢のサンプリングは，莢サンプリング用の株から週に1ないし2回平均的に成長した莢を選び，1ポットにつき5莢（種子が小さいものは6莢）をチャック付きポリ袋にサンプリングした．莢が黄熟し始めた頃に莢のサンプリングを終了した．サンプリングした莢は，氷の入った発泡スチロールの箱に入れて直ちに冷却して成分の分解を防いだ．その後，−85°Cで凍結した．凍結乾燥（FDU-506，EYELA，東京）後，莢殻と種子に分けた．それぞれの乾物重を測定後，振動ミル（TI-100，平工製作所，東京）で粉砕し分析用試料とした．

黄熟期（R 8）に収穫用の株を根元で刈り取り，屋内で

---

*1 本報告の概要は2004年9月，日本土壌肥料学会大会（福岡）において発表した．

*2 九州大学大学院農学研究院（812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1）
*3 九州大学大学院生物資源環境科学府（812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1）
*4 九州大学農学部生物資源環境学科附属農場（811-2307 福岡県糟屋郡粕屋町原町111）

2006年7月5日受付・2006年8月22日受理
日本土壌肥料学雑誌　第78巻　第1号　p. 39〜44（2007）

風乾させた後，種子，莢殻，茎に解体し，種子約 3 g，莢殻 10 個，茎約 5 g をサンプリングして凍結乾燥した．それぞれの乾物重を測定した後，振動ミルにて粉砕して分析用試料とした．また，分析試料以外の種子の数とその乾物重を測定し，百粒重を求めた．

3）イソフラボンの分析

経時的にサンプリングした種子（2002 年：奥原 1 号，2003 年：AGS 292，サチユタカ，フクユタカ）と莢殻（2003 年：AGS 292），収穫後の全品種の種子，莢殻，茎の粉砕試料を用いた．抽出溶媒の作成には蒸留水を，HPLC に用いる溶媒の作成には超純水を用いた．

1.5 mL 容エッペンに粉砕試料 150 mg を秤取し，0.75 mL の 70%エタノールを加え，ボルテックスで軽く攪拌後，振とう機（150 rpm）により抽出を行った（25°C，2 時間）．抽出後，遠心分離（13,000 rpm，10 min，4°C）し，上清を HPLC（7000 シリーズ，日立製作所，東京）により分析した．分析用カラムとして YMC-Pack ODS AM-303（4.6×250 mm）を用いた．分離条件は，分析開始から 0～10 分は 15%アセトニトリル（0.1%酢酸），10～50 分で 15～35%アセトニトリル（0.1%酢酸）の濃度勾配で，50～55 分は 35%アセトニトリル（0.1%酢酸）に設定した．イソフラボノイド 9 種（アグリコンである daidzein，glycitein，genistein，それらの配糖体である daidzin，glycitin，genistin，マロニル配糖体である malonyldaidzin，malonylglycitin，malonylgenistin）の定量は，山川ら[9]の方法に従った．収穫後の茎と莢殻については試料 300 mg，70%エタノール 1.5 mL で同様に抽出・分析を行った．分析はすべてのサンプルについて 2 連で行った．1 日に約 20 サンプル抽出し，24 時間以内に分析した．

3．結果と考察

1）異なる温度条件でのダイズの生育

2002 年度は，5 月 24 日に播種を行った．奥原 1 号の開花日は 6 月 20 日であった．ファイトトロンへの移動は，R 4 期に当たる 6 月 27 日に行った．R 5 期以降の 7 月 12 日からサンプリングを開始した．8 月 16 日にサンプリングを終了し，9 月 12 日に収穫を行った．

2003 年度は，7 月 28 日に播種した．開花日は，AGS 292，サチユタカ，フクユタカでそれぞれ 8 月 23 日，8 月 28 日，9 月 3 日であった．それぞれ R 5 期に当たる 9 月 23 日，9 月 26 日，10 月 11 日からサンプリングを開始し，10 月 25 日，10 月 25 日，11 月 5 日にサンプリングを終了し，10 月 28 日，10 月 28 日，11 月 8 日に収穫した．

温度処理による生育への影響は，主茎長においては差が見られなかったが，全品種とも 30°C で処理したダイズより 25°C，20°C のダイズの方が黄化の開始が 2，3 日程度早かった．百粒重は 3 種の温度処理のうち，奥原 1 号，フクユタカでは 25°C，AGS 292 では 20°C で高い値を示した（表 1）．サチユタカは 30°C の百粒重が高い値を示したが，収穫した種子数では 20°C で 153 粒，25°C で 133 粒，30°C で 92 粒であった．20°C でより多くの種子を着生した．このことより，ダイズの登熟温度は 20，25，30°C の中では 20°C がより適温と考えられた．

表 1　各温度条件下で栽培したダイズ種子の百粒重(g)

ダイズ品種	百粒重(g) 処理温度 20°C	25°C	30°C
奥原 1 号	36.6±1.1	37.2±1.5	27.0±0.6
AGS 292	31.9±0.6	30.6±1.3	29.0±6.9
サチユタカ	27.6±2.0	26.0±1.7	28.2±2.7
フクユタカ	28.6±0.0	30.8±4.2	24.3±1.4

データは，3 連の平均値±標準偏差で示す．

2）栽培温度がイソフラボンの集積に及ぼす影響

ダイズ種子中イソフラボン含量（mg seed^{-1}）は登熟に伴い増加し，その増加程度は 20°C＞25°C＞30°C の順で高かった（図 1-1，1-2）．すなわち，登熟時期が 7 月上旬から 8 月上旬であった奥原 1 号，また 9 月下旬から 10 月下旬であった AGS 292，サチユタカとフクユタカにおいても，その温度環境を 20°C 近くに保つことで，種子中イソフラボンの含有率は，他の温度（25°C や 30°C）に比較し安定的に増加した．AGS 292 以外のダイズ品種では，開花後 40 日程度までは含有率の上昇は各温度処理条件で同程度であったが，その後 25°C では含有率の上昇率が急激に低下した．しかし，30°C まで気温を上昇させると，登熟開始からイソフラボン含量の増加程度は低く，登熟後期のイソフラボンの種子中の集積が著しく抑制された．これらの結果から，イソフラボンの合成は，気温が 25°C を超えると抑制され，30°C 程度でイソフラボンの種子での集積が抑制，すなわち分解が促進されるとも考えられた．AGS 292 の種子中イソフラボン含量は，用いたダイズ品種の中で最も高く，20°C や 25°C で登熟した種子で奥原 1 号やサチユタカの 2 倍程度あり，最初の設定通り AGS 292 がイソフラボン生産能力の高い品種であった．

また，種子中のイソフラボンは，どの品種でも登熟前半からマロニル配糖体が主要であり[2,3]，アグリコンはほとんど検出されなかった．登熟後半になると奥原 1 号，サチユタカで malonyldaidzin と malonylgenistin が同程度で主要なイソフラボンであり，AGS 292 では malonyldaidzin が最も多く集積して推移し，フクユタカでは malonylgenistin が最も多く集積した（図 1-1，図 1-2）．マロニル配糖体の中で malonylglycitin の含量は最も低く推移し，サチユタカは他の品種に比べて malonylglycitin の含量が高かった．アグリコンの含量は登熟中期に高くなったものの総じて最も低く推移した．これらのことは，ダイズでのイソフラボンの合成がフェニルプロパノイドを経由し，その後配糖体やマロニル配糖体として液胞に蓄えられるとした報告[10]から推察されるように，最初に合成されるアグリコンが種子中には何らかの原因で集積しにくく，配糖

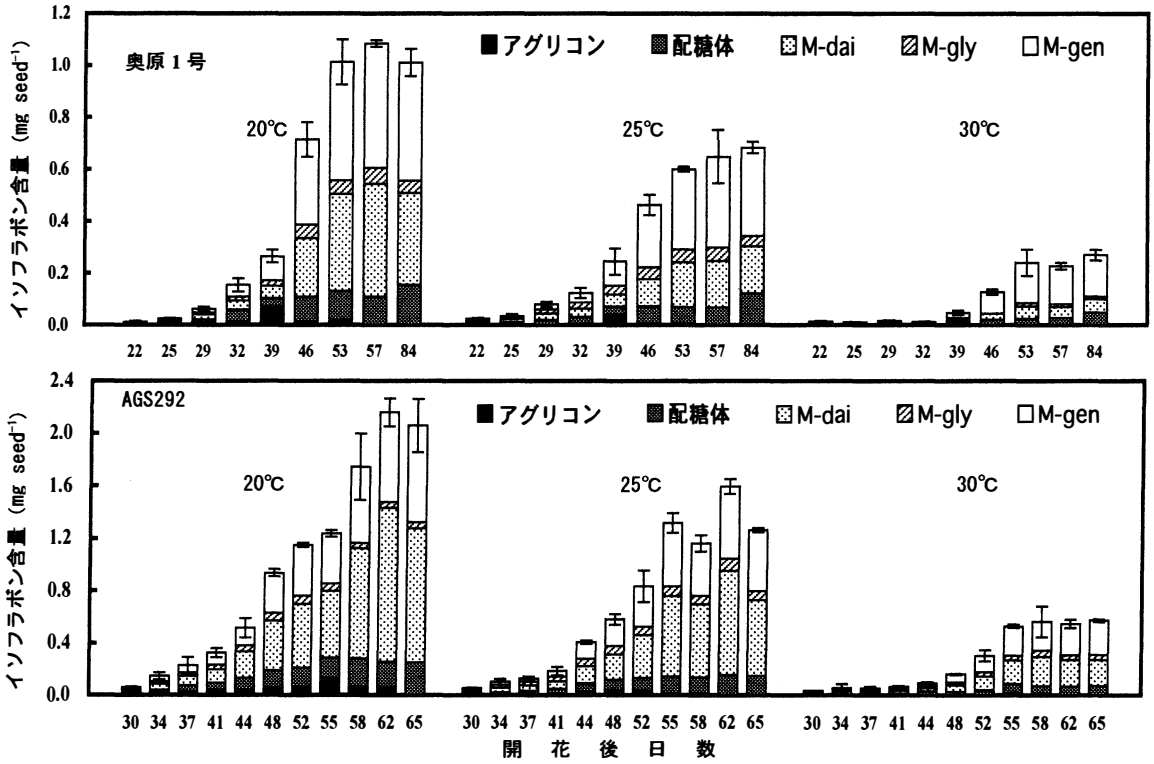

図1-1　奥原1号とAGS 292の登熟過程での種子中のイソフラボン含量（mg seed^{-1}）の推移に及ぼす処理温度の影響

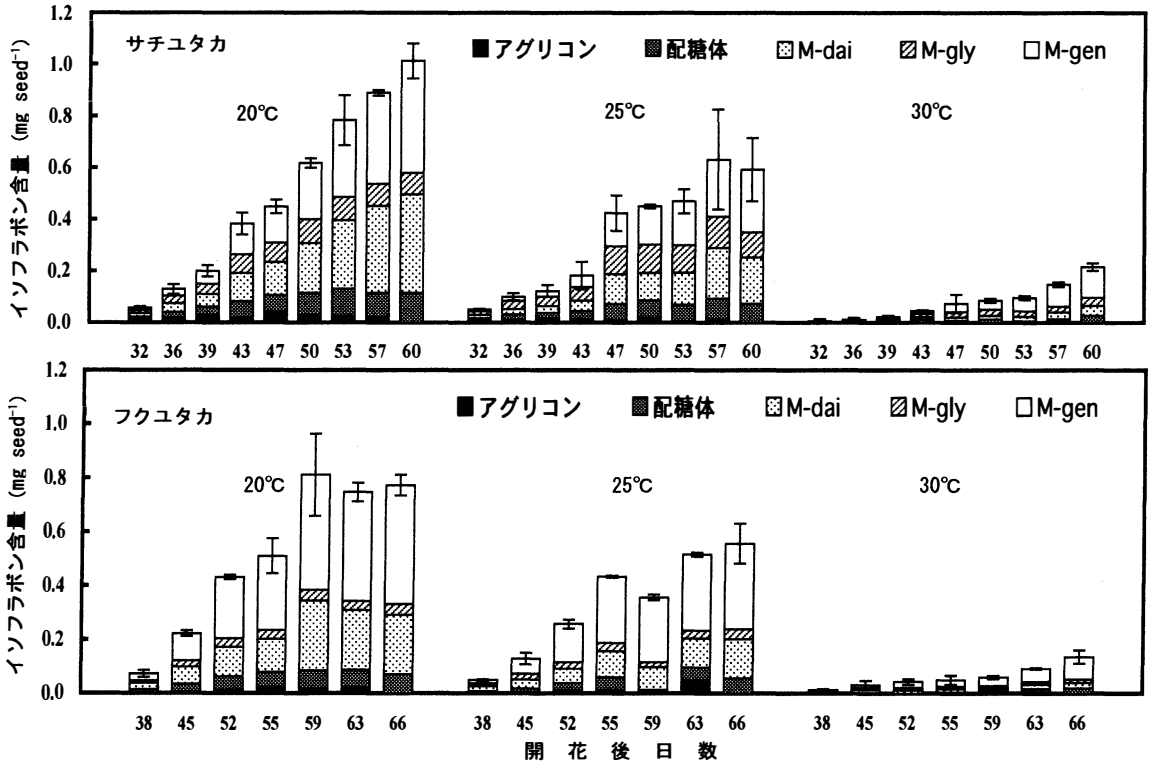

図1-2　サチユタカとフクユタカの登熟過程での種子中のイソフラボン含量（mg seed^{-1}）の推移に及ぼす処理温度の影響

体，特にマロニル配糖体でのみ集積が可能であることを推察させる．

経時的なAGS 292の莢殻中イソフラボン含有率も登熟に伴い増加したが，種子中の含有率の5分の1以下で推移し（図2），25℃や30℃では含有率の登熟による上昇は見られなかった．ただ，種子と比べアグリコンの占める割合

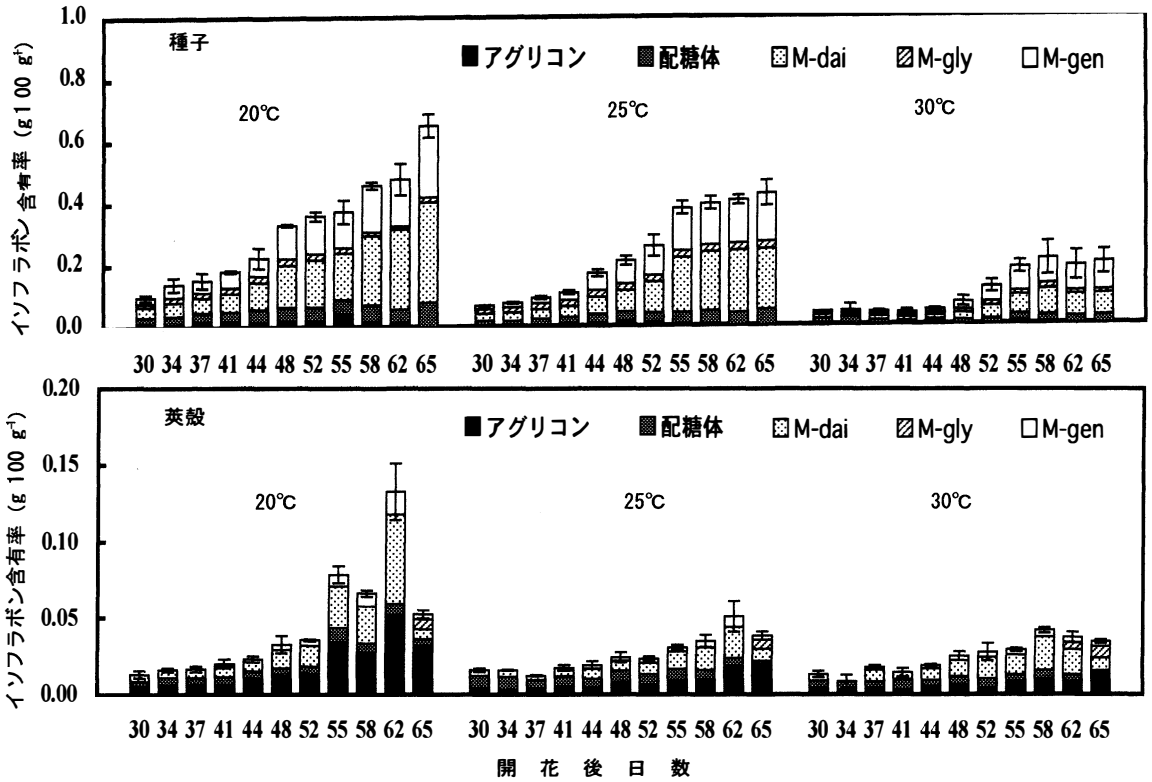

図 2　AGS 292 の登熟過程での種子中と莢殻中のイソフラボン含有率（g 100 g^{-1}）の推移に及ぼす処理温度の影響

が高かった．これは，種子と莢殻ではイソフラボノイド合成系の温度感受性の違いや貯蔵可能なコンパートメントの違いが推測され，イソフラボノイドが莢でも合成されていることが示唆された．

また，収穫時の莢殻のイソフラボン含有率は，AGS 292 を除いて種子での傾向と大きく違い，処理温度の影響が認められず，その含有率も 5 分の 1 から 10 分の 1 程度であった（図 3）．茎に含まれるイソフラボンも，莢殻同様温度処理による影響は見られず，AGS 292 の場合，温度の上昇とともにその含有率に増加が見られた（図 3）．奥原 1 号の茎では，20°Cで処理した場合に種子のイソフラボン含有率の 30%程度であり，30°Cで処理した場合の種子中と同程度の含有率を示した．この品種の茎でのイソフラボンの生産能力は高かったが，サチユタカやフクユタカでは莢殻と同程度に低かった．種子中の主要なイソフラボンは malonyldaidzin と malonylgenistin で，莢殻，茎はこれらに加え，daidzein と genistein も多く含んでいた．

以上のことから，ダイズ種子の登熟過程で温度の影響が見られるのは，日平均気温が 20°Cから 25°Cに上昇するときで，登熟後半のイソフラボンの集積が低下し，その種子内での分解が促進され，日平均気温が 30°C程度になるとイソフラボンの合成も抑制され，分解がさらに促進されると推察した．したがって，ダイズ種子のイソフラボンの合成能力を最大限に発揮させ，その集積を促進させるためには，登熟後半の温度を可能な限り低温に推移させる必要がある．現在，福岡県で行われている標準的な播種期は 7 月

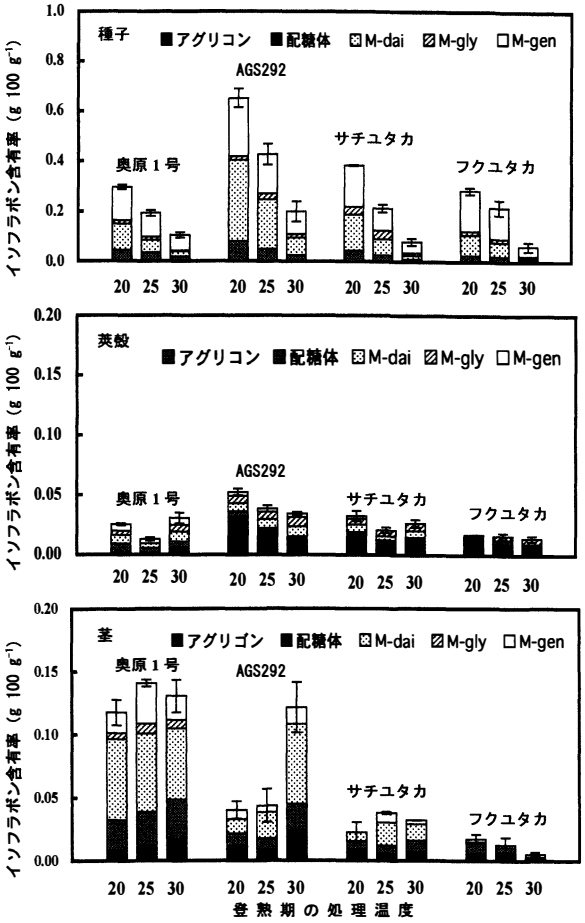

図 3　収穫期の各ダイズ品種の種子，莢殻，茎中のイソフラボノイド含有率（g 100 g^{-1}）に及ぼす温度処理の影響

10日前後であり，サチユタカおよびフクユタカの開花期は8月13日前後および8月20日前後であり，成熟期は11月1日前後および11月10日前後である[11]．また，晩播栽培の播種期は7月25日前後であり，サチユタカおよびフクユタカの開花期は8月23日前後および8月30日前後であり，成熟期は11月5日前後および11月15日前後である[12]．これらのダイズ種子が肥大しイソフラボンが集積する期間は，10月上旬から10月下旬に当たり，この時期の福岡管区気象台の平年の最高気温は，25.3℃から20.6℃である．本実験結果から，イソフラボン含有率は登熟温度が25℃以上になると，その上昇率が急激に低下することが明らかである（図1-1，1-2）．ゆえに，開花後40日以降に当たる登熟後半の最高気温をイソフラボンの集積速度が低下しない20℃以下に保つ必要がある．このためには，播種時期を現行の晩播よりさらに遅らせて8月上旬～中旬にすることで，最高気温が20℃以下になる11月下旬まで登熟期を遅らせれば，ダイズ品種フクユタカでイソフラボン含量の高い種子の生産が可能になると推定した．近年，北部九州では梅雨の時期との関連から8月上旬に播種期が変わりつつある[13]．大分県での研究例[14]でフクユタカの晩播による密植栽培で8月4日に播種して11月18日に収穫した例があり，前述した8月中旬播種による栽培も可能だと考えられる．

用いたダイズ品種の中で，特にイソフラボノイドの生産能が高い品種はAGS 292であった．

4．要　　約

ダイズ種子の登熟中の温度条件は，種子中のイソフラボン含有率に大きな影響を与えた．イソフラボン含有率は，20℃で最も高く，次いで25℃で，30℃で最も低かった．また，20℃と25℃で栽培されたダイズ種子の百粒重は，30℃で栽培されたものに比較し大きかった．以上のことから，これらの温度条件の中で，20℃の温度条件が最もイソフラボン含量を高める温度環境であると結論した．この実験に用いたすべてのダイズ品種で，種子中の主要なイソフラボンはmalonyldaidzinとmalonylgenistinであり，配糖体やマロニル配糖体が登熟とともに増加した．ゆえに，種子でのイソフラボンの主な貯蔵形態はマロニル配糖体であることが明らかとなった．福岡県のダイズ栽培では，現行の耕種期は7月中旬から7月下旬であり，成熟期は11月上旬から11月中旬である．イソフラボンの含量を上昇させるためには，登熟期の温度を20℃以下に保つ耕種期を再検討する必要がある．そのためには，成熟期が11月下旬になるように播種期を8月上旬から下旬まで遅らせることが必要である．その結果，ダイズが保有するイソフラボン合成能力が最大限に引き出され，イソフラボン含量の高いダイズ種子が生産されると推定した．

文　　献

1) Vyn, T. J., Yin, X., Bruulsema, T. W., Jackson, C. C., Rajcan, I. and Brouder, S. M.: Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3501～3506 (2002)
2) 山川武夫・仲野快恵・山田亜里砂・梶原さゆり・望月俊宏：ダイズ種子中のイソフラボン含有率の品種・収穫年度による差異，土肥誌，**78**，33～38 (2007)
3) Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T. and Kitamura, K.: Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2227～2233 (1991)
4) Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M. and Okubo, K.: Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1184～1192 (1995)
5) Tsou, C. S.: Isoflavone content in soybean. AVRDC Report 2000, p. 74～76, Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan (2001)
6) 福井重郎・荒井正雄：日本における大豆品種の生態学的研究，1 開花日数と結実日数による品種の分類とその地理的分布について，育種学，**1**，27～39 (1951)
7) Shanmugasundaram, S.: AVRDC vegetable soybean evaluation trial (AVSET). AVRDC Report 1998, p. 55～56, Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan (1999)
8) Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T. and Penningston, J. S.: Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.*, **11**, 929～931 (1971)
9) 山川武夫・仲野快恵・山田亜里砂：ダイズイソフラボンのHPLCでの精製と定量方法，土肥誌，**78**，印刷中 (2007)
10) Graham, T. L.: Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.*, **95**, 594～603 (1991)
11) 緒方武文・佐藤大和・内村要介・陣内暢明・岩渕哲也・川村富輝・松江勇次：福岡県における新しい大豆奨励品種‘サチユタカ’の品種特性，福岡農総試研報，**23**，32～36 (2004)
12) 松永亮一・高橋将一・小松邦彦：耐倒伏性に優れるダイズ新品種「サチユタカ」の密植・無中耕無培土栽培，日作九支報，**69**，53～55 (2003)
13) 森田　敏・小田俊介・吉永　優・中澤芳則・氏原邦博・岩永喜裕・小野祐幸・武田善行・假屋堯由・松岡秀道：農作概況，九農研，**66**，5～12 (2004)
14) 大分県農業技術センター水田利用部：14 晩播ダイズの密播による無中耕無培土栽培技術，平成15年度九州沖縄農業研究センター研究成果情報 (2003)

Effect of Filling Temperature on the Isoflavone Content in Soybean Plants

Takeo Yamakawa, Yoshie Nakano*, Sayuri Kajiwara** and Toshihiro Mochizuki
(*Dept. Plant Resour., Fac. Agric., Kyushu Univ., *Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., **Univ. Farm, Sch. Agric., Kyushu Univ.*)

The temperature of the filling of soybean seeds had a drastic influence on the isoflavone content in the seeds. The content of isoflavone was the highest at 20°C, followed by 25°C, and the lowest at 30°C. Moreover, the 100 grains weight of soybeans grown at 20°C and 25°C was large in comparison with that of the soybeans grown at 30°C. From the above, a temperature of 20°C was concluded to be the environment to increase most greatly the isoflavone content in soybean seeds among these conditions. In all the soybean cultivars used in this experiment, the main isoflavones accumulated in soybean seeds were malonyldaidzin and malonylgenistin, and the content of glucosides and malonylglucosides increased with the filling of the seeds. Therefore, it became clear that the main storage form of isoflavone in the soybean seeds was malonylglucosides. In the soybean cultivation of Fukuoka Prefecture, the present seeding period is mid-to late-July, and the maturity period is early-to mid-November. To increase the content of isoflavone in seeds, the seeding period must be reexamined to keep the temperature of the maturity period at less than 20°C. For that achievement, it is necessary to delay the seeding period from early- to mid-August so that the maturity period may be late-November. As a result of that, it is estimated that the isoflavone synthesis ability of soybean seed will be brought out to the full and that the soybean seeds with a high content of isoflavone can be produced.

Key words filling temperature, glucoside, isoflavone, malonylglucoside, soybean seed

(Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., **78**, 39-44, 2007)