

ダイズ (*Glycine max*) 種子に対する宇宙微小重力下での保管の影響

古川 一実、押川 達夫、竹口 昌之、蓮実 文彦、後藤 孝信、
藁科 知之、山根 説子、芳野 恭士*
沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)
*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

Effect of Storage under Microgravity Conditions in Space on Soybean (*Glycine max*) Seeds

Kazumi FURUKAWA, Tatsuo OSHIKAWA, Masayuki TAKEGUCHI, Fumihiko HASUMI,
Tomoyuki WARASHINA, Setsuko YAMANE, Kyoji YOSHINO
National Institute of Technology, Numazu College (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

(Received January 20, 2016; Accepted February 25, 2016)

Abstract

We examined the influence of storage under microgravity in space for two weeks on Haizu, a soybean native to Shizuoka. No difference was seen in germination rates, appearance of the plants, or rhizobial colonies between space-stored Haizu (SSH), earth-stored Haizu (ESH), and some commercial soybeans of the first, second, third, or fourth generation. Similarly, remarkable differences between these soybeans were not seen in the carbohydrate content, relative ratio of sucrose and stachyose, lipid content, lipid composition, fatty acid composition, protein content, molecular weight distribution of proteins, the types of major proteins and their contents, or the chemical structures of isoflavone and saponins, etc. Changes were not observed in the location of methylation and mutation of the endogenous specific sequence in the gene of SSH, ESH, and some commercial soybeans of the second generation. These results suggest that the storage of soybeans under microgravity in space did not affect growth, nutrients, or the gene. In addition, we found abilities of some utilizations of Haizu and its components, such as the production of soybean curd, biodiesel fuel, anhydro sugar, and 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde.

Keywords: Soybean, Microgravity in space, Nutrients, Biomass

1. 緒言

将来、人類が宇宙で生活する条件の一つとして、宇宙農業が考えられる[1]。1960年以降、コムギ、エンドウ、トウモロコシなどの30種以上の植物について、宇宙の微小重力下での種子からの栽培等が試みられている[2]。その結果、宇宙での植物栽培実験では、種子の不稔やその形成

不良が多数報告されているが、これが重力のみの影響によるのか磁場や放射線などの影響もあるのかは不明である。しかし、一方でシロイヌナズナとイネについては、スペースシャトル内での微小重力下でも、自発的形態形成が認められたという報告がある[3]。植物の抗重力反応に関する研究でも、シロイヌナズナのチューブリン変異体が、国際

宇宙ステーション（ISS）内の微小重力下では、正常に発芽して抗重力反応異常の改善が見られ、花茎の段階まで正常に生育しており[4]、徐々に宇宙微小重力の植物の生態への影響が明らかにされつつある。

株式会社リバネスは、様々な植物の種子をスペースシャトルで国際宇宙ステーションの日本実験棟「きぼう」に移送し、一定期間保管した後に地球に持ち帰り、国内の多くの教育機関で栽培や研究に供する「宇宙教育プロジェクト」を実施した。このプロジェクトの一つとして、這豆を含む20種のダイズを移送した「宇宙大豆プロジェクト」がある。這豆は、静岡原産とされるものの、現在ではほとんど栽培されていない小型のダイズである（図1）。這豆も他のダイズとともに、2011年2月にスペースシャトル「ディスカバリー」でISSに移送され、2週間の保管の後、地球に戻された。我々は、「宇宙大豆プロジェクト」に参加し、宇宙保管這豆を用いて、宇宙微小重力下における短期保管に伴う環境の変化の食用植物への影響について検討した。

2. 実験

2.1 実験試料

宇宙で保管した這豆（宇宙保管這豆）および宇宙に移送しなかった地球保管這豆は、株式会社リバネスより供与された。また、比較対照ダイズとして、市販の4品種、盆かおり（中生品種）、奥原（極早生品種）、白鳥（早生品種）、味源（早生品種）を使用した。

2.2 ダイズの栽培と形質の観察

宇宙保管這豆を栽培し、発芽率や生育時の外観、収穫量等について、地球保管這豆や市販のダイズと比較した。

第1世代の宇宙保管這豆について、地球保管這豆、盆かおり、奥原および白鳥の種子とともに、各20粒ずつ2011年5～6月に播種し、這豆以外のダイズは同年9月に、また這豆は11月にそれぞれ収穫した。得られたものを第2世代とした。

宇宙保管這豆の自殖第2世代については、地球保管這豆および味源の種子とともに、2012年5月に播種し、同年11月に収穫した。播種数は、第1世代宇宙保管這豆18株

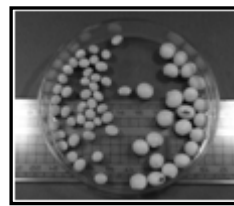


図1 本実験に用いた這豆の外観
這豆（左）と奥原（右）。

について各10粒、第1世代地球保管這豆18株について各4粒および味源4粒とした。得られたものを第3世代とした。

宇宙保管這豆の自殖第2、第3世代については、地球保管這豆および白鳥の種子とともに、2013年5月に播種し、同年11月に収穫した。播種数は、第2世代宇宙保管這豆15株について各6粒、第3世代宇宙保管這豆16株について各6～18粒、第2世代地球保管這豆18株について各3粒、第3世代地球保管這豆16株について各3粒および白鳥18粒とした。第3世代から得られたものを第4世代とした。

2.3 ダイズの根粒菌の観察[5]

播種して1週間程度で、第1世代の宇宙保管這豆、地球保管這豆、盆かおり、奥原および白鳥について、平均的な外観の株を1本ずつ抜いて、それぞれの根から根粒を採取した。各5粒の根粒を95%エタノールと10%次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌した後、滅菌水で洗浄した。根粒を滅菌水中で押し潰してバクテロイド懸濁液とした。白金耳を用い、懸濁液をYMA固体培地に画線し、数日後に根粒菌のみを新しい培地に移して再び培養した。

2.4 ダイズの成分分析

ダイズの宇宙空間における短期保管による成分への影響を、食品としての3大栄養素を中心に検討した。

2.4.1 糖成分の分析

第2世代および第3世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、第2世代の奥原および第3世代の味源のそれぞれの種子を粉碎し、冷10%トリクロ酢酸内でホモジナイズした。これを遠心分離して得られた上清について、糖質の総量をアントロン硫酸法[6]で測定した。糖質含量は、グルコース相当量として算出した。各ダイズは3株ずつ用いて、平均

±標準偏差を求めた。

第2、第3、第4世代の宇宙保管這豆と第3世代の地球保管這豆の種子に水を加え、40°Cの湯浴で2時間加熱した後、ミキサーで粉砕して凍結乾燥を行った。残渣についてn-ヘキサンで加熱還流した後ろ過する操作を2回行って脱脂した。これに80%ソルミックス水溶液を加えて、加熱還流することで糖を抽出した。抽出液を減圧濃縮し、残存する油脂をアセトンで洗浄した。重水(0.03%アセトン内部標準)に溶解させ¹H NMRによるスペクトル測定を行った[7]。各サイズは1株ずつ用いた。各サンプルの¹H NMRスペクトルとスクロース、ラフィノース、スタキオースの標準品の¹H NMRスペクトルをデータシートにより重ね合わせ、成分同定と相対量の算定を行った。各成分の定量化には、各糖質のアノマープロトンの比を用いた。各サイズは、1株ずつ測定した。以降の実験を含め、NMR装置は日本電子社製JNM-ECX 400を用いた。

2. 4. 2 脂質成分の分析

第2世代および第3世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、第2世代の盆かおり、奥原および白鳥のそれぞれの種子を蒸留水に一晩浸漬した後に粉砕した。クロロホルム-メタノール(2:1)混液を用いて、Folch法[8]により脂質を抽出した。

脂質抽出液の一部を一定量秤取し、真空デシケーター内で減圧下に溶媒を留去し、含まれる脂質の重量を測定した。各サイズについて、這豆は3株ずつ用いて平均±標準偏差を算出し、盆かおり、奥原および白鳥は1株ずつ用いた。

また、脂質抽出液について、シカゲルプレートを用いて薄層クロマトグラフィーにより分離し、脂質組成を分析した。展開溶媒にはヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸(85:10:5)を用い、また、検出試薬としては10%12モリブド(VI)リン酸n水合物-エタノール溶液を噴霧した後加熱した。標準脂質としては、トリオレインとコレステロールを用いた。各サイズは、第2世代の宇宙保管這豆5株と地球保管這豆3株、第2世代の盆かおり、奥原および白鳥のそれぞれ1株を用いた。

第2世代の宇宙保管這豆および第3世代の地球保管這豆の種子を60°Cで加熱してタンパク質を変性させ、ミキサ

ーで粉砕した後凍結乾燥した。残渣をアセトンに1日間浸漬してろ過した後、アセトン画分を減圧濃縮して粗油を得た。これについて¹H NMRスペクトルを測定し、ダイズ油脂中の共通の不飽和脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸を分析した。

2. 4. 3 タンパク質成分の分析

第2世代および第3世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、第2世代の奥原、第3世代の味源のそれぞれの種皮を除いた後、種子を粉砕した。これに100 mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0, 5 mg/mL ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 10%グリセロール, 2%メルカプトエタノール含有)を加え、5%ホモジネートを調製し、タンパク質を抽出した。3分間煮沸後遠心分離し、得られた上清についてBradford法[9]によりタンパク質量を測定した。タンパク質量は、ウシ血清アルブミン相当量で表記した。各サイズについて、這豆は3株ずつ用いて平均±標準偏差を算出し、奥原および味源は1株ずつ用いた。

また、第2世代および第3世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、第2世代の奥原、第3世代の味源について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により、含有タンパク質の分子量分布を観察した。宇宙保管這豆と地球保管這豆は3株ずつ、奥原と味源は1株を用いた。それぞれのサイズについて、前述の方法で調製したタンパク質抽出液を試料とした。分子量マーカーはアトー社製AE-1440 EzStandardを用い、タンパク質の染色はクマシーブリリアントブルーで行った。タンパク質の分子量分析は、バイオ・ラッド社製解析ソフトQuantity Oneを用いて行った。

2. 4. 4 イソフラボンの分析

第2世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、第3世代の味源について、そのイソフラボン含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法[10]により測定した。それぞれのサイズについて、1株を用いた。各サイズの粉砕物を70%エタノールで抽出し、遠心分離して得られた上清を試料とした。HPLCの分析条件は、以下のものを用いた。

カラム：和光純薬工業社製 Wakosil 5C18
(5 μm, 4.6 mm×150 mm)

溶出溶媒：蒸留水：酢酸（100：0.1）とアセト
ニトリル：酢酸（100：0.1）の75：15混液

流速：1.0 mL/min

カラム温度：35°C

検出器：分光光度計（260 nm）

イソフラボン配糖体のうち、ダイジン、グリシチン、ゲニ
スチンの3種について測定した。

次に、第2、第3、第4世代の宇宙保管這豆と第3世代
の地球保管這豆の種子を60°Cで加熱してタンパク質を変
性させ、ミキサーで粉碎した後凍結乾燥した。この粉末試
料をジイソプロピルエーテルでソックスレー抽出器を用
いて3時間脱脂した。脱脂した試料を80%ソルミックス水
溶液で抽出した後、メンブレンフィルターでろ過した。ろ
液について、減圧下で溶媒留去後、重メタノールに溶解さ
せて¹H NMRによるイソフラボンの分析を行った[11]。そ
れぞれのダイズについて、1株を用いた。

2. 4. 5 サポニンの分析

第3世代の地球保管這豆の1株について、その種子を粉
砕し、0.1%酢酸含有70%エタノールで抽出した後、遠心
分離した。得られた上清に塩酸を加え、密封して80°C、6
時間加熱した。試料を放冷後、以下の条件のHPLC法でそ
のサポニンを分析した[12]。

カラム：関東化学社製 Mightysil RP-18GP II

（5 μm, 4.6 mm×150 mm）

溶出溶媒：蒸留水：メタノール：水（75：25）

流速：0.3 mL/min

カラム温度：40°C

検出器：分光光度計（220 nm）

また、0.1%酢酸含有70%エタノールでの抽出液の上清を
濃縮し、重メタノールに溶解させたものについて、¹H NMR
による分析を行った。

2. 5 ダイズの遺伝子解析

ダイズはゲノムサイズが1.12 Gbpと非常に大きく、ま
た這豆のシークエンスの知見がないことから、宇宙保管に
おけるDNA上の変異を簡便に調査するため、メチル化
DNAの検出と内在性配列のPCRを行った。

2. 5. 1 遺伝子のメチル化の検出

第2世代と第3世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆につ
いて、DNAの構造変異を調査するために、塩基のメチル
化の検出を試みた。DNAのメチル化を検出する手法とし
て、Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by
Isoschizomers (MIAMI)法[13]を参考に、メチル化感受性
の制限酵素を利用した。

第2世代の宇宙保管這豆の7株および地球保管這豆の5
株を用いた。これらの成葉1~2 gから、cetyltrimethyl-
ammonium bromide (CTAB)法を用いてDNAの抽出を行
った。また、スピンフィルターと珪藻土を用いた迅速抽出
法でもDNAを抽出し、両手法で得られたDNAの品質お
よび収量の確認のため2%アガロースゲルを用いて10 μL
のDNAサンプルを電気泳動にかけた。DNAの定量は、
BioSpecNANO（島津社製）を用いて行った。ゲル中のDNA
の染色には、インビトロジェン社製 SYBR safe DNA gel
stain液を用いた。分子量マーカーは、タカラバイオ社製
Wide-Range DNA Ladder（100-2,000 bp）を用いた。制限酵
素は、Hpa II、Msp I、Not I、Mal IおよびHind IIIを用い
た。Mal Iはコスモバイオ社製のものを用い、その他の制
限酵素はNew England Biolabs Japan社製のものを用いた。
制限酵素処理は37°C、オーバーナイト処理を行った。

2. 5. 2 ダイズに特異的な遺伝子配列の検出

第2世代の宇宙保管這豆4株、地球保管這豆4株、盆か
おり1株、奥原1株、白鳥1株について、ダイズ内在性
DNAを検出するプライマー対（Le1-n02）を使用してPCR
を行った。PCRのプライマーはファスマック社製の
Le1-n02を用い、酵素にはKOD-FX（東洋紡社製）を用い
た。アニーリング温度は60°C、伸長反応は68°Cとし35
サイクルのPCRを行った。アガロースゲル電気泳動は、
前項と同様に行った。

2. 6 這豆の利用

2. 6. 1 豆腐の作製

第3世代の地球保管這豆を用いた豆腐の作製を行い[14]、
その食感を確認した。対照としては、北海道産の市販の食
用ダイズを用いた。

まず、北海道産ダイズを一晩水に浸漬させた後、種子の
みを取り出してすり潰し、さらに水を加えて食品用ミキサ

一で磨砕した。得られた液を湯煎し 90℃以上で 10 分間以上加熱した。これをさらし布でろ過し、固形物と豆乳に分離した。豆乳を 85~90℃に加熱し、その 250 mL に凝固剤の八宝食産社製グルコノデルタラクトン 1.0 g を混合して軽く混合し（豆乳 10 mL 当たり凝固剤 40 mg に相当）、容器内で 20 分間静置した。水中で、容器から静かに豆腐を取り出し、豆腐の外観と食味、食感を確認した。

これとは別に、同量の第 3 世代の地球保管這豆と北海道産ダイズについて同様の操作を行い、豆腐を作製した。ただし、凝固剤として、各豆乳 10 mL に対しグルコノデルタラクトンを 20, 40, 80 mg 加えた場合と市販のにがり液を 0.5, 1.0, 1.5 mL 加えた場合について、豆腐の食感の比較を 3 名のボランティアが行った。市販の豆腐の食感を 4 点とし、4 点満点で評価を行った。

2. 6. 2 バイオディーゼル燃料の試作

這豆の油脂成分をメチルエステル化することで、バイオディーゼル燃料（BDF）の作製を試みた[15]。メタノール 0.33 g と水酸化カリウム 0.045 g を混合し、耐圧容器に入れた。これに這豆から得られた油脂成分 0.30 g を加えた後、メタノールを大過剰加えてマイクロ波反応装置（東京理化学器械社製 MWO-1000S 型ウェーブマジック）で反応させた。反応温度は 70℃で、撈拌を行った。使用電力は 70W とした。6 分間反応させ、2 分ごとに反応液を採取した。

採取した反応液を放冷、静置した後、生成物の油相にクロロホルムを加えて撈拌した。分離した下層を採取し、クロロホルムを留去した。残りの油成分を重クロロホルムに溶解し、生成物について ¹H NMR による測定を行った。

2. 6. 3 レボグルコサンと 5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒドの合成

ダイズの主な糖質であるスクロースを原料として、アンヒドロ糖のレボグルコサンと 5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒド（HMF）のマイクロ波照射による合成を試みた。

三口フラスコにスクロース 0.5 g とスルホラン 5 g を入れ、マイクロ波反応装置を用いて 300 W、240℃で 12 分間マイクロ波を照射した。反応液を、以下の条件でシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにかけた。

カラム：関東化学社製シリカゲル 60N（球状、中性）

（40-50 μm, 12 mm×330 mm）

溶出溶媒：酢酸エチル-ヘキサン（1：1）と

酢酸エチル-メタノール（10：1）

流速：5.0 mL/min

検出器：分光光度計（254 nm）

酢酸エチル-ヘキサン(1:1)でスルホランを溶出した後、酢酸エチル-メタノール(10:1)でレボグルコサンと HMF を溶出した。溶出物の検出には、254 nm における吸光度を用いた。溶媒を減圧留去した後、重水（0.03%アセトン内部標準）に溶解して ¹H NMR および ¹³C NMR の測定を行った。

3. 結果および考察

3. 1 ダイズの栽培と形質の観察

2011 年に実施した第 1 世代のダイズの栽培における発芽率は、宇宙保管這豆 100%、地球保管這豆 100%、盆かおり 90%、奥原 90%および白鳥 95%であり、宇宙保管這豆と地球保管這豆あるいは市販ダイズに差は見られなかった。生育中の宇宙保管這豆の茎や葉、蕾、花等の外観は、地球保管這豆と違いが見られなかった。這豆は、他のダイズに比較して茎が上に伸びず、地面を這うように繁茂したため（図 2）、強風下でも痛むことが少なかった。這豆の莢は市販のダイズの半分ほどで、種子も小さかったが、繁殖力が強く栽培が容易な品種であることがわかった。宇宙保管這豆の収穫量は、1 株当たり 116.4±67.2 g であった。地球保管這豆は一部のみ収穫したため、1 株当たり 45.5±27.3 g であった。

2012 年に実施した第 2 世代のダイズの栽培における発芽率は、宇宙保管這豆 97.5%、地球保管這豆 88.9%および味源 50%であり、第 1 世代と同様に宇宙保管這豆と地球保管這豆に差は見られなかった。

2013 年に実施した第 2 および第 3 世代のダイズの栽培における発芽率は、第 2 世代は宇宙保管這豆 93.3%および地球保管這豆 98.1%、第 3 世代は宇宙保管這豆 96.7%および地球保管這豆 100%、白鳥 72.2%と、第 2 世代、第 3 世代ともに宇宙保管這豆と地球保管這豆に著しい差は見ら



図2 栽培中の這豆

れなかった。

いずれのダイズも、その栽培中にマメシンクイガ、ダニおよびハモグリバエの被害を同様に受けた。また、花色はすべての材料で、薄紫色を呈した。

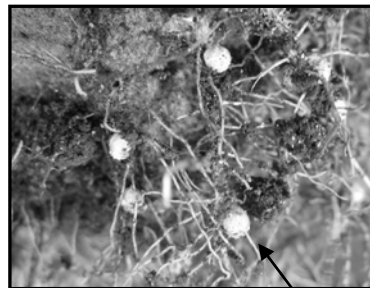
3. 2 ダイズの根粒菌

根粒菌とは、植物の根に形成される窒素固定細菌が共生したこぶ状の組織、根粒を形成する細菌である。ダイズの根粒菌としては、*Bradyrhizobium japonicum* が知られている[16]。本研究では、宇宙保管這豆、地球保管這豆、盆かおり、奥原および白鳥のいずれの根粒からも、YMA培地上でコロニーを形成する菌が採取された(図3)。菌種の同定には至らなかったが、形成されたコロニーは、いずれのダイズにおいても同様の外観を持ち、高さと光沢のある白色のものであった。このことから、宇宙保管這豆、地球保管這豆および市販のダイズには、それぞれ同様の菌の共生による根粒が形成されるものと推測された。

3. 3 ダイズの成分

3. 3. 1 糖質

第2世代のダイズの種子中の糖質の総量は、宇宙保管這豆 $7.5 \pm 1.0\%$ (w/w)、地球保管這豆 $7.3 \pm 0.4\%$ (w/w)、奥原 $5.8 \pm 0.2\%$ (w/w)であった。また、第3世代のダイズでは、宇宙保管這豆 $6.2 \pm 0.7\%$ (w/w)、地球保管這豆 $7.7 \pm 0.4\%$ (w/w)、味源 $10.0 \pm 0.3\%$ (w/w)であった。ダイズの品種間では糖質の総量に違いが見られたが、宇宙保管這豆と地球保管這豆の間には、著しい違いは見られなかった。這豆の糖質の総量は、味源に比較して少なかったものの、奥原よりは多かった。第2世代と第3世代の這豆の値の間でも、



這豆の根粒

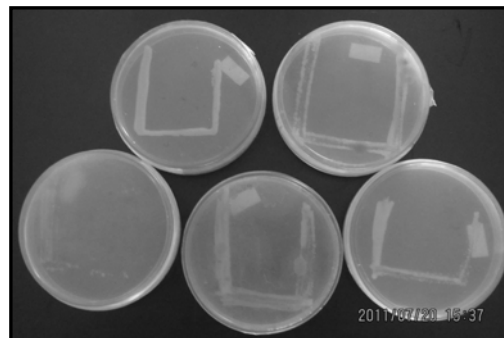


図3 ダイズから採取した根粒菌のコロニー

- 左上; 第2世代の地球保管這豆,
- 右上; 第2世代の白鳥,
- 左下; 第2世代の奥原,
- 中央下, 第2世代の宇宙保管這豆,
- 右下; 第2世代の盆かおり.

著しい違いは見られなかった。なお、一般的な日本産ダイズの炭水化物の総含量は約 28%(w/w)でありこのうち食物繊維は 17%(w/w)であるため、差し引いて得られる糖質量としては 11%程度と考えられる [17]。

第2、第3、第4世代の宇宙保管這豆と第3世代の地球保管這豆の種子中のスクロース、ラフィノースおよびスタキオースの相対比を、¹H NMR を用いて測定した。いずれの這豆のアノマープロトンも、カップリング定数が約 4 Hz であることからカープラス式よりα体の糖であることが確認された。ラフィノースのアノマープロトンは、スタキオースのアノマープロトンと重なるが、 δ 3.82 ppm に独立したシグナルが検出される。そのため、ラフィノースの検出には δ 3.82 ppm のシグナルを用いたが、ラフィノースはいずれのダイズからも検出されなかった。第2、第3、第4世代の宇宙保管這豆と第3世代の地球保管這豆の種子中のスクロースの相対比は、73%、71%、69%および 72%であった。また、それぞれのスタキオースの相対比は、27%、

29%、31%および28%であった。宇宙保管這豆の異なる世代および地球保管這豆の間の比較において、スクロースとスタキオースの相対比に著しい違いは見られなかった。図4に第3世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆の典型的な¹H NMR スペクトルを示す。なお、国産のダイズ中の糖質として、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースの含量を測定した報告では、それぞれ6%(w/w)、1%(w/w)、2%(w/w)、計9%(w/w)となっており[18]、スクロースとスタキオースの相対比は、本実験の結果とほぼ一致していた。

多糖類の中で、腸管内で消化されないあるいは消化されにくいものを食物繊維と呼ぶ。その組成としては、ヘミセルロース、セルロース、ペクチン質等が含まれる。ダイズの食物繊維には、血中コレステロール量と中性脂肪量の上昇抑制作用、脂肪肝発症予防作用が報告されている[19]。

3. 3. 2 脂質

第2世代の宇宙保管這豆、地球保管這豆、盆かおり、奥原および白鳥の種子中の脂質量は、それぞれ17.2±0.3%(w/w)、16.4±0.5%(w/w)、20.2%(w/w)、20.2%(w/w)、19.0%(w/w)であった。第3世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆の脂質量は、18.5±1.6%(w/w)および地球17.1±1.3%(w/w)であった。宇宙保管這豆の異なる世代および地球保管這豆の間の比較において、脂質量に著しい違いは見られなかったが、盆かおり、奥原、白鳥に比較して這豆の脂質量は少ない傾向が見られた。なお、一般的な日本産ダイズの脂質の含量は約19%(w/w)である [17]。

第2世代の宇宙保管這豆5株と地球保管這豆3株、第2世代の盆かおり、奥原および白鳥の脂質について、シリカゲル薄層クロマトグラフィーによる分離を行った。結果を図5に示す。トリグリセリドの標品として用いたトリオレインとコレステロールのR_f値は、それぞれ0.55と0.25であった。分析を行ったすべてのダイズの脂質で、トリグリセリドとコレステロールのスポットが検出され、その脂質組成にも差がないことがわかった。

第2世代の宇宙保管這豆と第3世代の地球保管這豆の種子に含まれる脂肪酸について、¹H NMRによる測定を行った。結果を図6に示す。得られたスペクトルにおいて、 δ 5.25 ppm～ δ 5.42 ppmの範囲にCH=CHのシグナルが出

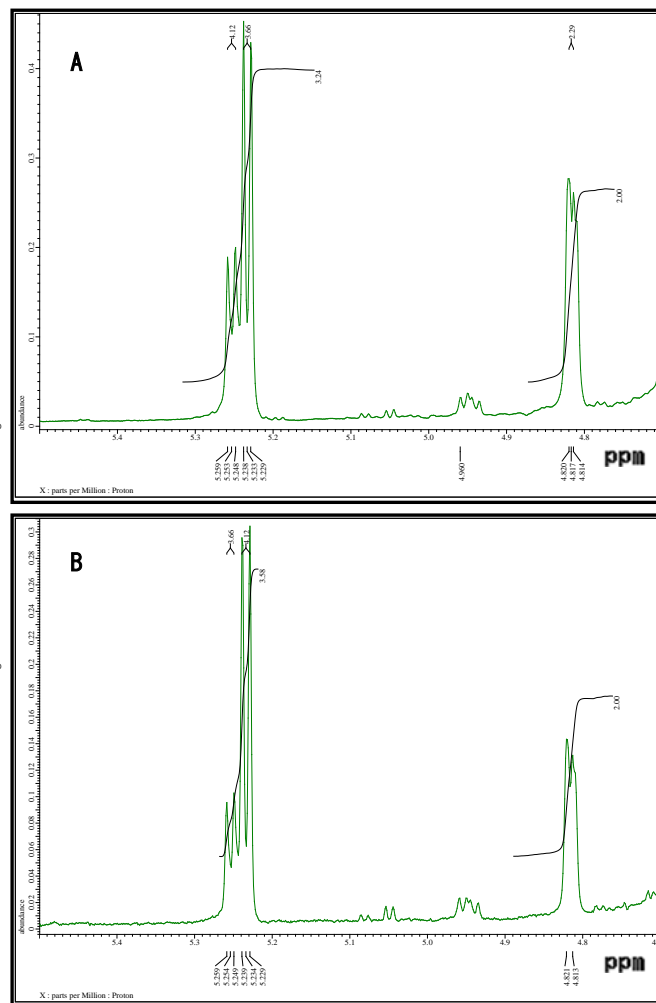


図4 這豆の糖質の¹H NMR スペクトル

A: 第3世代の宇宙保管這豆,
B: 第3世代の地球保管這豆.

現したことから、這豆の中に不飽和脂肪酸が含まれていることが確認された。また、グリセリド骨格のCH₂基のシグナルは、 δ 4.32 ppm (*dd*, $J_{\text{HH}}=12.0$ Hz, $J_{\text{HH}}=4.0$ Hz) と δ 4.15 ppm ($J_{\text{HH}}=11.6$ Hz, $J_{\text{HH}}=6.0$ Hz) に認められた。一方、トリプレットシグナルが δ 1.5 ppmに見られたことから、不飽和脂肪酸の末端CH₃基の存在が確認できた。二重結合に挟まれたCH₂基のシグナル(δ 2.75 ppm～ δ 2.82 ppm)も出現することから、這豆に含まれるトリグリセリドは、リノレン酸2個、リノール酸1個を含んでいることが推測された。宇宙保管這豆と地球保管這豆の油脂の¹H NMR スペクトルを比較しても違いは見られなかった。なお、一般的な日本産ダイズでは、一価不飽和脂肪酸

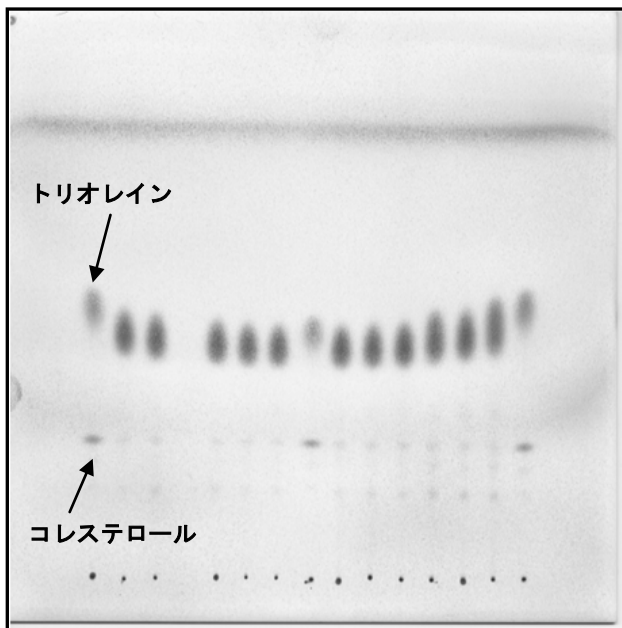


図 5 ダイズの脂質のシリカゲル薄層クロマトグラフィ一像
 左から標準脂質、第 2 世代の宇宙保管這豆 5 株、標準脂質、第 2 世代の地球保管這豆 3 株、第 2 世代の盆かおり 1 株、第 2 世代の奥原 1 株、第 2 世代の白鳥 1 株、標準脂質.

と多価不飽和脂肪酸が多く、脂肪酸総量中リノール酸を約 52%(w/w)、リノレン酸を約 11%(w/w)含んでいる[20]。

ダイズの脂質中、ステロール類[21]やポリエン類[22]、リン脂質[23]には、血中コレステロールの上昇抑制作用があることが知られている。

3. 3. 3 タンパク質

第 2 世代の宇宙保管這豆、地球保管這豆、奥原の種子中のタンパク質量は、それぞれ $16.1 \pm 0.5\%$ (w/w)、 $13.1 \pm 2.1\%$ (w/w)、 $17.0 \pm 0.2\%$ (w/w)であった。第 3 世代の宇宙保管這豆、地球保管這豆、味源のタンパク質量は、それぞれ $13.5 \pm 1.2\%$ (w/w)、 $13.0 \pm 1.2\%$ (w/w)、 $15.7.0 \pm 0.2\%$ (w/w)であった。第 2 世代の宇宙保管這豆のタンパク質量は地球保管這豆に比較して高かったが、第 3 世代では宇宙保管這豆と地球保管這豆に差は見られなかった。這豆のタンパク質量は、奥原や味源に比較して少なかった。全体に第 3 世代のダイズの方が、第 2 世代のダイズよりもタンパク質量が少ない傾向が見られた。ダイズは、土壌中の窒素を多く吸収するが、毎年同じ畑で繰り返しダイズを栽培したことが

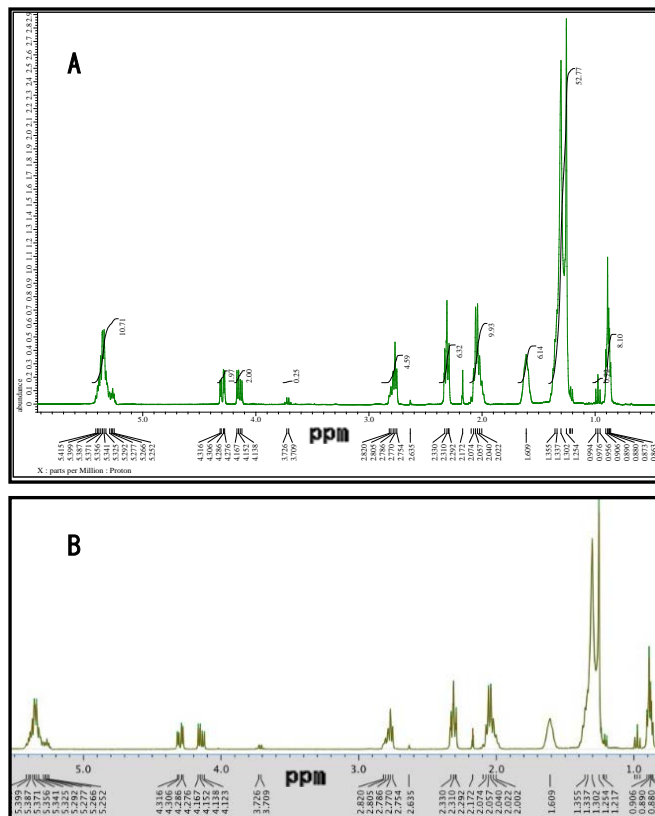


図 6 這豆の油脂の ¹H NMR スペクトル
 A: 第 2 世代の宇宙保管這豆,
 B: 第 3 世代の地球保管這豆と宇宙保管這豆の重ね合わせ.

その原因である可能性が考えられる。なお、一般的な日本産ダイズのタンパク質の含量は約 35%(w/w)である [17]。

第 2 世代および第 3 世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、第 2 世代の奥原、第 3 世代の味源について、SDS-PAGE による含有タンパク質の分子量分布を観察した結果を図 7 に示す。また、各ダイズで検出された主なタンパク質の分子量の平均値を表 1 に示す。それぞれの世代の宇宙保管這豆、地球保管這豆、奥原、味源からは、いずれも主に 8 種のタンパク質が検出された。また、各タンパク質の含有量の比もほぼ同様であり、これらのダイズに含まれるタンパク質の種類と含量比に明確な違いはないものと考えられた。

ダイズから分離されたタンパク質には、血中中性脂肪の上昇抑制作用や脂肪肝予防作用があることが知られている[24]。

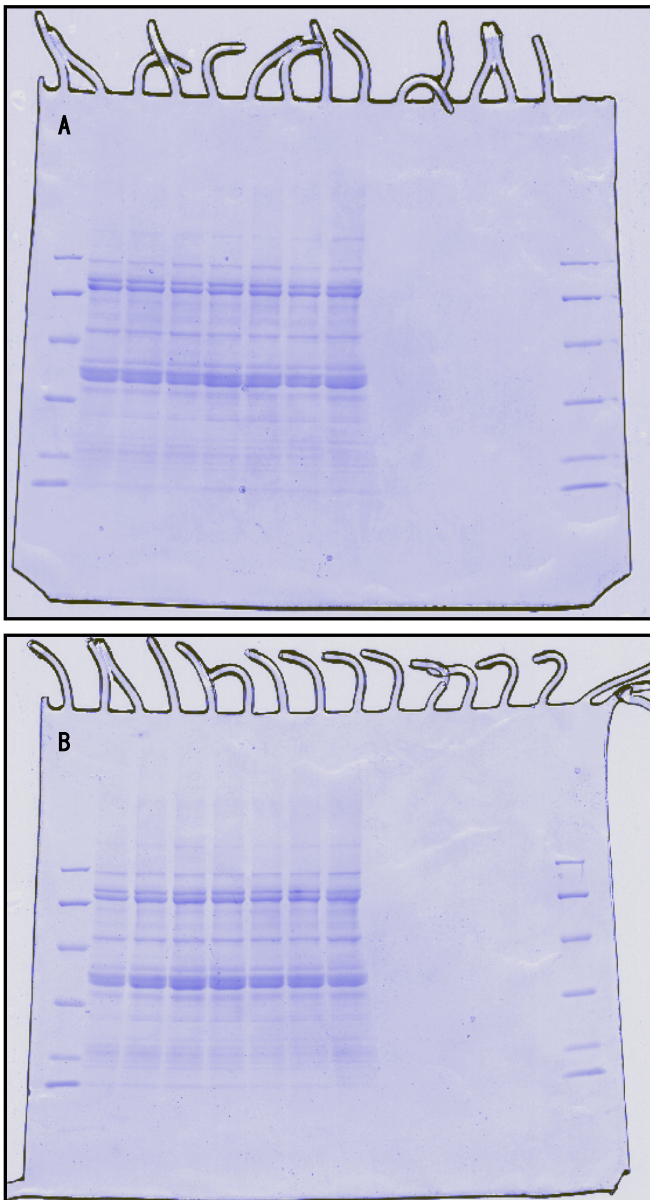


図7 ダイズのタンパク質のSDS-PAGE像
 A: 第2世代のダイズ
 左から分子量マーカー, 宇宙保管大豆3株,
 地球保管大豆3株, 奥原1株, 分子量マーカー.
 B: 第3世代のダイズ
 左から分子量マーカー, 宇宙保管大豆3株,
 地球保管大豆3株, 味源1株, 分子量マーカー.
 分子量マーカー: 14, 20, 29, 45, 66, 97 kDa.

表1 ダイズのタンパク質の分子量分布

第2世代			第3世代		
宇宙保管大豆	地球保管大豆	奥原	宇宙保管大豆	地球保管大豆	味源
93.0	90.3	90.1	93.0	90.3	90.1
75.5	73.4	72.9	75.5	73.4	72.9
69.3	67.3	66.9	69.3	67.3	66.9
48.4	46.9	47.4	48.4	46.9	47.4
38.1	37.1	37.5	38.1	37.1	37.5
35.4	34.7	34.8	35.4	34.7	34.8
33.4	32.7	32.5	33.4	32.7	32.5
30.9	30.0	30.1	30.9	30.0	30.1

数値: 分子量 (kDa).

ここまでの結果から、宇宙保管大豆の主な栄養素としての糖類、脂質、タンパク質の種類や含量は、世代による大きな違いは見られず、また地球保管大豆や他の一般的な品種のダイズとも大きな差がなかった。従って、微小重力下での大豆の短期保管は、その後の大豆の栄養に影響しないことがわかった。

3. 3. 4 イソフラボン

ダイズのイソフラボンには、女性ホルモン代替作用のほか、抗炎症作用、抗代謝症候群作用など、多様な保健作用が知られている[25]。第2世代の宇宙保管大豆と地球保管大豆、第3世代の味源について、そのイソフラボン含量を測定した結果を表2に示す。また、宇宙保管大豆のイソフラボンのHPLCクロマトグラムを図8に示す。測定した3種のダイズのいずれにおいても、ダイジン、グリシチン、ゲニスチンが検出された。このうち、グリシチンとゲニスチンの量はダイズ間に差は見られなかったが、ダイジンの量は宇宙保管大豆と地球保管大豆で味源の約2倍であった。ダイジンは豆の苦み成分であるため、大豆でその量が多いことは味の点では好ましくないものと予想される。しかし、ダイジンとそのアグリコンであるダイゼインには、ヒト乳がん細胞への抑制作用等があることが知られてい

表2 ダイズの主なイソフラボンの含有量

	ダイジン	グリシチン	ゲニスチン
第2世代の宇宙保管大豆	0.403	0.059	0.652
第2世代の地球保管大豆	0.427	0.064	0.609
第3世代の味源	0.213	0.060	0.657

数値: mg/g 種子.

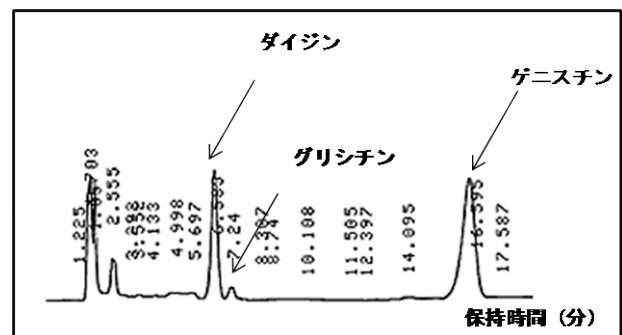


図8 第2世代の宇宙保管大豆のイソフラボンのHPLCクロマトグラム.

検出: 260 nmにおける吸光度.

る[26]。また、ダイジンやダイゼインが腸内細菌によって代謝されるとエクオールになるが、この化合物には血中脂質量低下作用や抗がん作用が期待されている[27]。従って、ダイジンの含量が多い這豆は、保健機能の強いダイズであると考えられる。

第2、第3、第4世代の宇宙保管這豆と第3世代の地球保管這豆の¹H NMR スペクトルを図9に示す。それぞれの這豆のイソフラボンに関する¹H NMR スペクトルのパターンに差は見られなかった。このことから、各這豆に含まれるイソフラボンの種類は同一であると考えられ、このことは HPLC による分析の結果と一致していた。

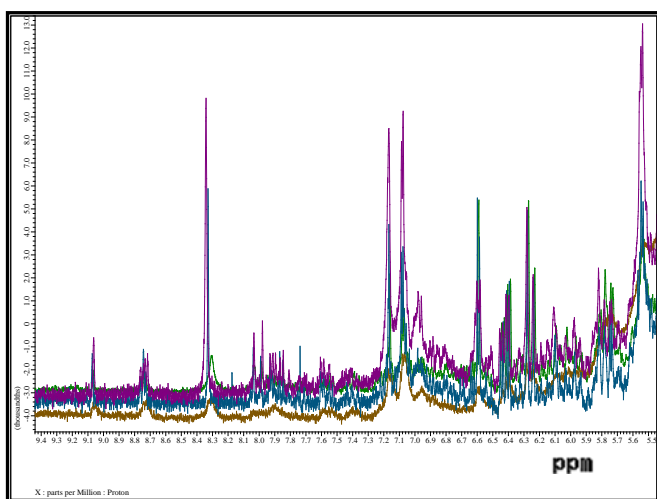


図9 第2、第3、第4世代の宇宙保管這豆と第3世代の地球保管這豆のイソフラボンの¹H NMR スペクトルの重ね合わせ。

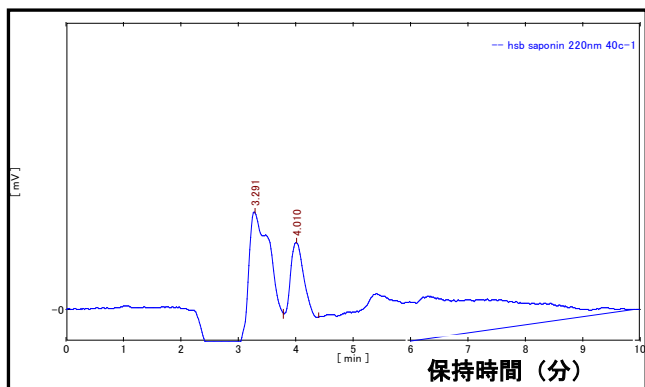


図10 第3世代の地球保管這豆のサポニンのHPLCクロマトグラム。

検出：220 nmにおける吸光度。

2. 3. 5 サポニン

ダイズに含まれるサポニンはトリテルペノイドサポニンに分類され、ソヤサポゲノール A および B の2種類のアグリコンの配糖体が知られている。これらには、抗がん作用、抗高脂血症作用、肝臓障害抑制作用などの保健作用が知られているが、ソヤサポゲノール A をアグリコンとするグループ A サポニンにはえぐ味などの不快味がある[28]。

第3世代の地球保管這豆の1株のサポニンについて、HPLCで分析した結果を図10に示す。保持時間が約3.3分と4.0分の2つのピークが検出された。220 nmでの吸光度の検出から、これらの化合物はC=C結合を含むことが予想される。図11に示す¹H NMR スペクトルにおいて、 δ 6.5 ppmのシグナルはオレフィンプロトンであることから、ステロイド骨格の存在が確認できた。さらに、糖骨格のシグナルも見られたため、サポニンの存在が推測された。しかし、アセチル基および単独のダブルレットCH₃基が観測されなかったため、ソヤサポゲノール A および B を直接確認することはできなかった。図11において、CH₃CH₂基の存在が確認できたため、這豆のサポニン中にソヤサポゲノール A および B と類似の構造とステロイドグリコシド構造を持つ化合物が主成分として含まれていることが推測された。這豆のサポニンは0.3%程度と微量であることが推測されたため、本研究でそれらを単離、同定することはできなかったが、一般のダイズに含まれるサポニンとの構造的な違いは確認できなかった。

3. 4 ダイズの遺伝子解析

3. 4. 1 遺伝子のメチル化

近年、DNA とヒストンタンパク質のメチル化は、動物だけでなく植物においても、発生および分化におけるエピジェネティックな遺伝子発現の制御機構として注目されている[29,30]。DNA 中のメチル化の位置の変化は、発現する遺伝子のパターンと形質に影響する可能性がある。そこで、本研究では、這豆を微小重力下で保管した際のDNAのメチル化の有無について検討した。

ダイズは自殖植物であるため、遺伝子に変異があれば世代を経るごとにそれが固定していくと考えられる。そのた

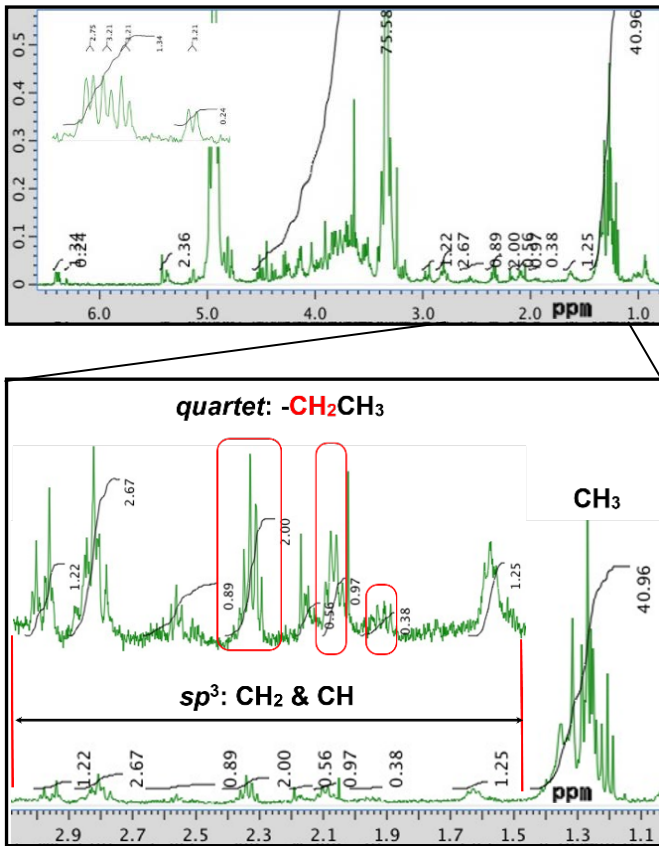


図 11 第 3 世代の地球保管大豆のサポニンの ^1H NMR スペクトル
下段は拡大図.

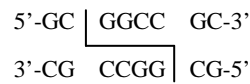
め、より後の世代の大豆で遺伝子の解析を行うのが望ましいが、本実験では第 2 世代の宇宙保管大豆の 7 株と地球保管大豆の 5 株について、DNA の抽出を行った。得られた DNA の状態を、電気泳動で観察した結果を図 12 に示す。ダイズ種子は一般的に油分やタンパク質が多いため、図 12 より宇宙保管大豆と地球保管大豆の両方で、CTAB 法で高効率で DNA が得られることがわかった。PCR では、迅速抽出法で十分であると考えられる。抽出された DNA の状態が良い試料として、今回は第 2 世代の宇宙保管大豆と地球保管大豆からそれぞれ 3 株と 2 株を選択した。

植物 DNA のメチル化は、主に CG 配列、CHG 配列、CHH 配列 (H は A, T, C) における C のピリミジン環の 5 位の炭素において起こる [29,30]。このうち、CG 配列のメチル化は遺伝子をコードしている領域に、CHG 配列および CHH 配列のメチル化はトランスポゾンや繰り返し配列などのヘテロクロマチン領域に多いことが知られている

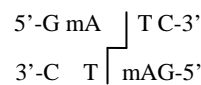
[31]。この他、メチル化は、A のプリン環の 6 位の窒素においても起こる。

本実験では、第 2 世代の宇宙保管大豆と地球保管大豆の 3 株と 2 株について、まずメチル化 DNA 特異的制限酵素 *Not* I および *Mal* I を用いて実験を行った。

Not I の切断位置は



であり、切断部位前後の C がメチル化されている場合にはこれを切断できない。また、*Mal* I の切断位置は



であり、メチル化された DNA のみを切断する。これらの制限酵素を用いた結果を図 13 に示す。無処理と *Not* I 処理の DNA はほぼ同様であったのに対し、*Mal* I で処理

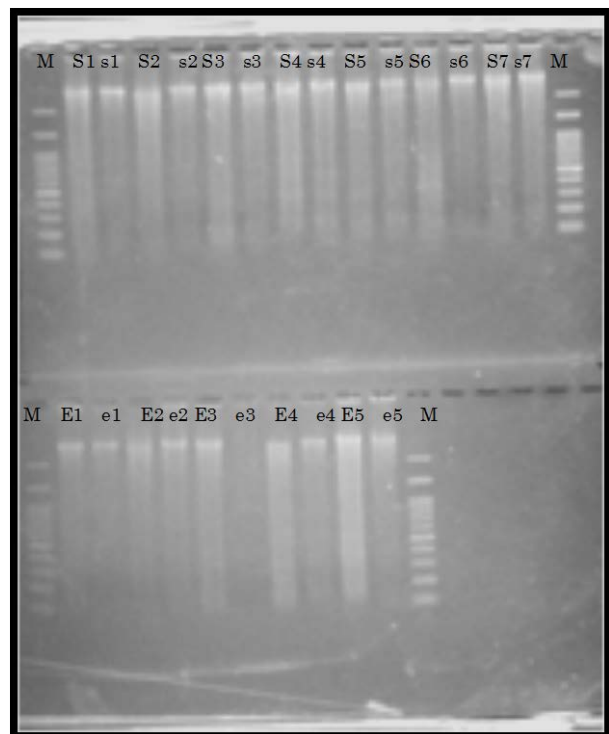


図 12 ダイズの DNA のアガロースゲル電気泳動像
上段: 第 2 世代の宇宙保管大豆の DNA 10 μL の泳動像.
大文字の S は CTAB 法, 小文字の s は簡易抽出法で得られた DNA を示す.
下段: 第 2 世代の地球保管大豆の DNA 10 μL の泳動像. 大文字の E は CTAB 法, 小文字の e は簡易抽出法で得られた DNA を示す.
上下段とも同じ数字は同じ個体を示す.
M は分子量マーカー (Gene DireX 社 100 bp DNA Ladder) .

を行った場合には、すべての試料で分子量の大きい部分と小さい部分にスミアバンドが確認された。このため、這豆の DNA に *Mal* I の処理によって切断されない部分と、細かく切断される部分が存在したものと考えられる。このことから、細かく切断されたバンドは、メチル化されていることが予想される。

次に、以下のように CCGG 配列を認識してこれを切断する *Hpa* II と *Msp* I の 2 種類の制限酵素を用いて実験を行った。



Hpa II は、内側の C がメチル化されていると DNA を切断できないのに対し、*Msp* I は内側の C のメチル化の有無にかかわらず切断する。そのため、*Hpa* II と *Msp* I による切断の結果の有無を確認することにより、DNA のメチル化を検出することができる。そこで、第 2 世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆のそれぞれ 2 株と 1 株について、*Hpa* II、*Msp* I および *Hind* III の各制限酵素で処理した。制限酵素処理のコントロールとして用いた *Hind* III の切断位置は以下のものである。



これらの制限酵素処理の結果を図 14 に示す。それぞれの DNA のバンドを比較したところ、宇宙保管這豆と地球保管這豆のいずれにおいても、*Hpa* II、*Msp* I、*Hind* III の処理ともに同様なスミアなバンドとなり、無処理の場合との違いは認められなかった。従って、今回得られた這豆の DNA は、いずれの制限酵素による処理でも切断されず、明確なメチル化は検出されなかった。しかし、宇宙保管這豆と地球保管這豆で、電気泳動のパターンに違いが見られなかったことから、このメチル化は宇宙微小重力下での短期保管によるものではないものと考えられる。本実験で用いた *Mal* I 以外の制限酵素の処理では、DNA の切断は起こらなかった。以上の結果から、這豆の DNA は、宇宙微小重力下での短期保管では、そのメチル化の位置が変化しなかった可能性が高いものの、より詳細なメチル化については染色体の免疫染色やシーケンサーによる解析を行

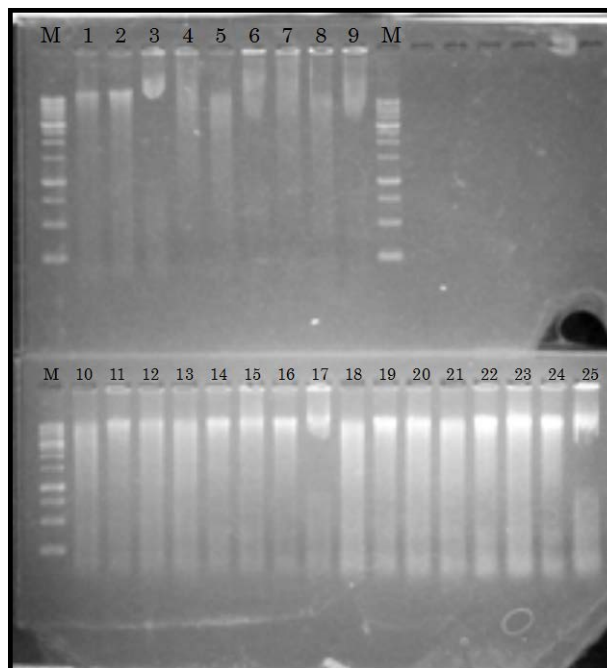


図 13 ダイズの DNA における制限酵素処理 (*Not* I, *Mal* I) の結果

上段: 左から分子量マーカー M (Gene DireX 社 1 Kb DNA Ladder),

第 2 世代の宇宙保管這豆を *Not* I 処理 (レーン 1), 無処理 (レーン 2), *Mal* I 処理 (レーン 3), 第 2 世代の宇宙保管這豆を *Not* I 処理 (レーン 4), 無処理 (レーン 5), *Mal* I 処理 (レーン 6), 第 2 世代の地球保管這豆を *Not* I 処理 (レーン 7), 無処理 (レーン 8), *Mal* I 処理 (レーン 9), 分子量マーカー (同上).

下段: 左から分子量マーカー (同上),

第 2 世代の宇宙保管這豆を *Hind* III 処理 (レーン 10), 無処理 (レーン 11), *Hpa* II 処理 (レーン 12), *Msp* I 処理 (レーン 13), 無処理 (レーン 14), *Not* I 処理 (レーン 15), 無処理 (レーン 16), *Mal* I 処理 (レーン 17), 第 2 世代の地球保管這豆を *Hind* III 処理 (レーン 18), 無処理 (レーン 19), *Hpa* II 処理 (レーン 20), *Msp* I 処理 (レーン 21), 無処理 (レーン 22), *Not* I 処理 (レーン 23), 無処理 (レーン 24), *Mal* I 処理 (レーン 25).

う必要がある。

3. 4. 2 ダイズに特異的な DNA 配列

ダイズの内在性の特異的 DNA 配列における変異の有無を確認するため、ダイズに普遍的に存在するレクチン遺伝子を指標として PCR を行った。その電気泳動像を図 15 に

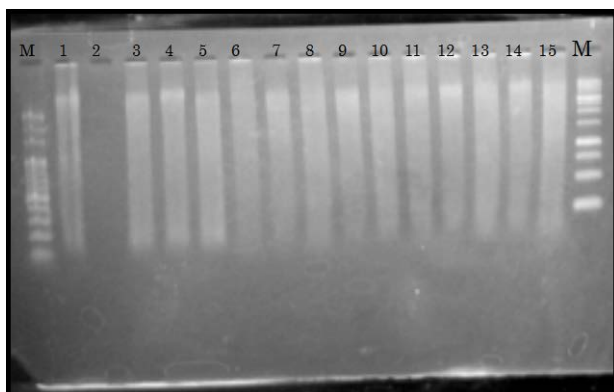


図 14 ダイズの DNA における制限酵素処理 (*Hpa* II, *Msp* I) の結果

M: 分子量マーカー (Watson 100 bp ladder), 左より、第 2 世代の宇宙保管這豆の *Hpa* II 処理後 (レーン 1), 空白 (レーン 2), *Msp* I 処理後 (レーン 3), 無処理 (レーン 4), *Hind* III 処理後 (レーン 5), 第 2 世代の宇宙保管這豆の *Hpa* II 処理後 (レーン 6), 無処理 (レーン 7), *Msp* I 処理後 (レーン 8), 無処理 (レーン 9), *Hind* III 処理後 (レーン 10), 第 2 世代の地球保管這豆の *Hpa* II 処理後 (レーン 11), 無処理 (レーン 12), *Msp* I 処理後 (レーン 13), 無処理 (レーン 14), *Hind* III 処理後 (レーン 15), 分子量マーカー (Gene DireX 社 1 Kb DNA Ladder).

示す。第 2 世代の宇宙保管這豆 4 株、地球保管這豆 4 株、盆かおり 1 株、奥原 1 株、白鳥 1 株のいずれのダイズについても、同じ位置にバンドが見られたことから、宇宙保管這豆の同配列には変異は起きていないことが確認された。従って今回用いた手法では、ISS の微小重力下で 2 週間保管した這豆に、遺伝子の変異は認められなかった。

3. 5 這豆の利用

3. 5. 1 食品としての利用

這豆は静岡原産のダイズであり、本実験で栽培が極めて容易であることがわかった。そこで、這豆を静岡の地元の食材として利用することを目指し、第 3 世代の地球保管這豆を用いて豆腐の製造を試みた。

まず、北海道産の市販の食用ダイズを用いて、常法により豆腐を作製した。凝固材としては、豆乳 10 mL に対しグルコノデルタラク톤を 40 mg を加えた。その食感、固さに不均一な部分があったものの、全体としては豆腐らしい滑らかな舌触りであった。

次に、市販のダイズと第 3 世代の地球保管這豆について、

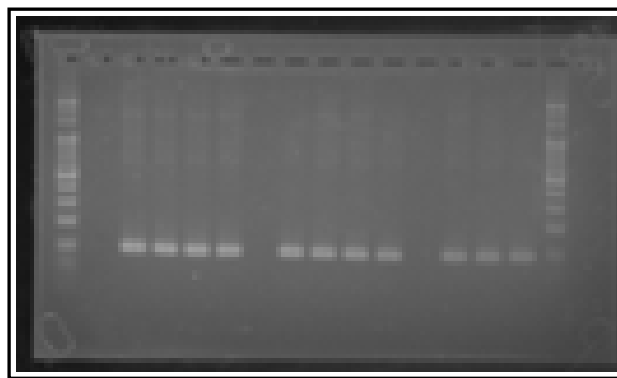


図 15 ダイズの特異的 DNA 配列 (Le1-n02) の PCR 結果
左から分子量マーカー (Watson 100 bp ladder), ネガティブコントロール (NC), 第 2 世代の宇宙保管這豆 4 株, NC, 第 2 世代の地球保管這豆 4 株, 第 2 世代の盆かおり 1 株, 第 2 世代の奥原 1 株, 第 2 世代の白鳥 1 株, 分子量マーカー (同上).

凝固剤として様々な量のグルコノデルタラク톤と市販のにがり液を用いて豆腐を作製した。3 名のボランティアによる食感の評価の結果を表 3 に示す。市販のダイズでは、豆乳 10 mL にグルコノデルタラク톤を 40 mg 加えることで、市販の豆腐とほぼ同じ食感を得られることがわかった。にがり液の場合には、0.5 mL の添加で市販の豆腐に近い食感が得られた。一方、這豆では用いた凝固剤の中でグルコノデルタラク톤を 40 mg 用いた場合に最も食感が良かった。しかし、這豆の場合、市販のダイズと比較して豆腐の食感が十分でないように感じられた。本実験の結果から、這豆は市場に出回っているダイズと比較して、糖量では差がないものの、脂質量とタンパク質量はわずかに少ない傾向が見られた。このことと食感との関連は明確ではないが、這豆の豆腐は市販のダイズと比較して凝固しにくいものと思われる。このような這豆の食感特性は、豆腐の製造のためには必ずしも有用ではないかもしれない。しかし、這豆中にはこれまで述べてきた栄養成分、保健成分が、市販のダイズと同程度に含まれていながらその食感が異なることは、このダイズの食材としての魅力の一つと考えることができる。我々は今後、豆腐だけでなく納豆など他の加工への利用に関しても、這豆の適性を検討する予定である。

ところで、ダイズから豆腐を製造する際に残る絞りカスであるオカラは、その多くが経費をかけて焼却処理されて

表 3 這豆の豆腐製造における凝固試験

凝固剤	使用量	市販ダイズ	這豆
グルコノデルタラクトン	20 mg	3.7	2.0
	40 mg	4.0	3.3
	80 mg	2.0	1.0
にがり液	0.5 mL	3.7	2.0
	1.0 mL	3.3	2.0
	1.5 mL	2.7	2.0

数値：市販の豆腐の食感を4としたときの評価。

いるが、その 10.4%が炭水化物であることからバイオマスとしての活用も期待できる[32]。

3. 5. 2 燃料としての利用

BDF は、油脂にメタノールと触媒を加えてエステル化を行い、中和処理の後、触媒とメタノールを除去することで得られる。本実験では、その製造コストを下げるため、マイクロ波による加熱と固体触媒を組み合わせるより安価で短時間に BDF を製造する新規の方法を検討した。

這豆の油成分を塩基性下でメチルエステル化した場合の ^1H NMR スペクトルを図 16 に示す。反応前の試料では、グリセロールの脂肪酸エステルであるアシルグリセロールの CH_2 基のシグナルが確認された。反応後は、アシルグリセロールの CH_2 基のシグナルが消失し、脂肪酸のメチルエステルの $\text{CH}_3\text{O}-$ に由来するシグナルが出現した。この結果、油脂のメチルエステル化が起こったことが確認できた。 ^1H NMR の積分比より、脂肪酸におけるメチルエステルの含有量の割合は 21%と推測された。従って、本法は低温、大気圧の条件下で油脂のメチルエステル化による BDF の製造を短時間で行うため、コストの面で優れた実用可能な方法であり、この方法により這豆の油脂から BDF を製造できるものと考えられる。

なお、本実験では固体酸性触媒として硫酸水素ナトリウム・二酸化ケイ素を用いて同様のメチルエステル化反応を試みたが、アシルグリセロールの CH_2 基のシグナルと脂肪酸のメチルエステルの $\text{CH}_3\text{O}-$ のシグナルの両方が認められ、この条件下ではメチルエステル化反応は不十分であることがわかった。

3. 5. 3 レボグルコサンと HMF の合成

アンヒドロ糖のレボグルコサンは、医薬品や食品添加物、生分解性プラスチック等の原料として有用である。また、

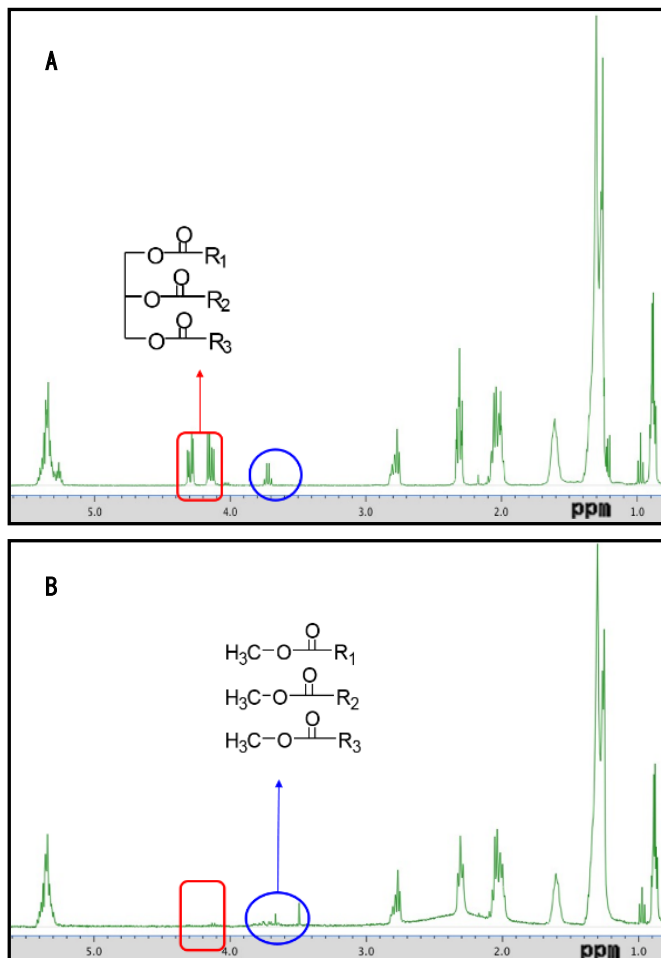


図 16 這豆の油成分をメチルエステル化して生成したバイオディーゼル燃料の ^1H NMR スペクトル
A: 反応前, B: 反応後.

HMF も医薬品、農薬、香料、各種ポリマー用モノマー、バイオ燃料等の原料として有用である。HMF の合成法の一つに、ヘキソースを非プロトン性極性溶媒中で酸触媒を用いて加熱脱水させる方法[33,34]がある。本実験では、スルホランを非プロトン性極性溶媒として用い、這豆を含むダイズの主な糖質であるスクロースをマイクロ波照射することで、レボグルコサンと HMF を合成することを試みた。スクロースからのレボグルコサンと HMF の合成反応式を図 17 に示す。

反応液をシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにかけ、得られたレボグルコサンと HMF の画分の収量を求めたところ 24.6%(w/w)であった。この画分の ^1H NMR と ^{13}C NMR のスペクトルを図 18 に示す。 ^1H NMR スペクトルの各ピークを低磁場から順に Ha~Hn、 ^{13}C NMR スペクトル

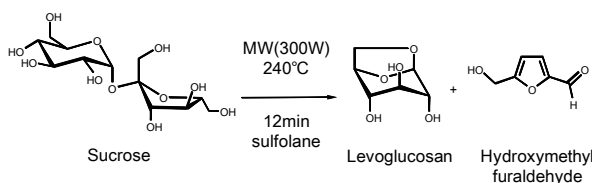


図 17 スクロースからのレボグルコサンと HMF の合成反応式

の各ピークを低磁場から順に C1~C14 とした。¹H NMR の測定結果より、 δ 9.301 ppm にアルデヒドプロトンが、 δ 7.36 ppm および δ 6.59 ppm にオレフィンプロトンがそれぞれ観測された。¹H NMR のスペクトルの化学シフトは HMF のスペクトルデータベースのものと一致した。このことから、フルクトースが脱水反応を起こし、HMF が合成されたと考えられる。

Distortionless Enhancement by Polarization ¹³C NMR

(DEPT-135) の測定結果 (図 19) より、C10 と C11 のピークが正のためこれはメチレン炭素を示す (NMR の位相が 180° 逆転しており、本来ならば負に観測される)。原料スクロース中のグルコースのメチレン炭素は、6 位の炭素のみであるため、このピークは -CH₂O- に由来するものである。Correlation Spectroscopy (COSY) ¹H NMR の測定結果 (図 20) より、Hg は Hj と相関があり、Hj は Hg および Hi と相関があった。また、Hi は Ha、Hc および Hk と相関があり、Hk は Hc、Hi、さらには微弱であるが Ha と相関があった。また Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) ¹H-¹³C NMR スペクトルの測定結果 (図 21) より、C10 は Hg および Hj と直結し、C11 は Hi および Hk と直結していた。Hi と Hk は 6 位の炭素上のプロトンであり、Ha はアノマープロトンである。¹H Detected Heteronuclear Multiple Bond Connectivity (HMBC) ¹H-¹³C NMR スペクトルの測定結果 (図 22) より、Ha と C11 に相関があることが確認された。Ha はアノマープロトンで、C11 は 6 位の炭素である。COSY 測定により Ha と 6 位の炭素上のプロトンである Hi および Hk との相関が確認されている。この相関は遠隔カップリング (ロングレンジカップリング) と考えられる。また、HMBC 測定により Ha と C11 の相関も確認された。これは、グルコースには存在しない相関関係であるため、新たな結合が形成された

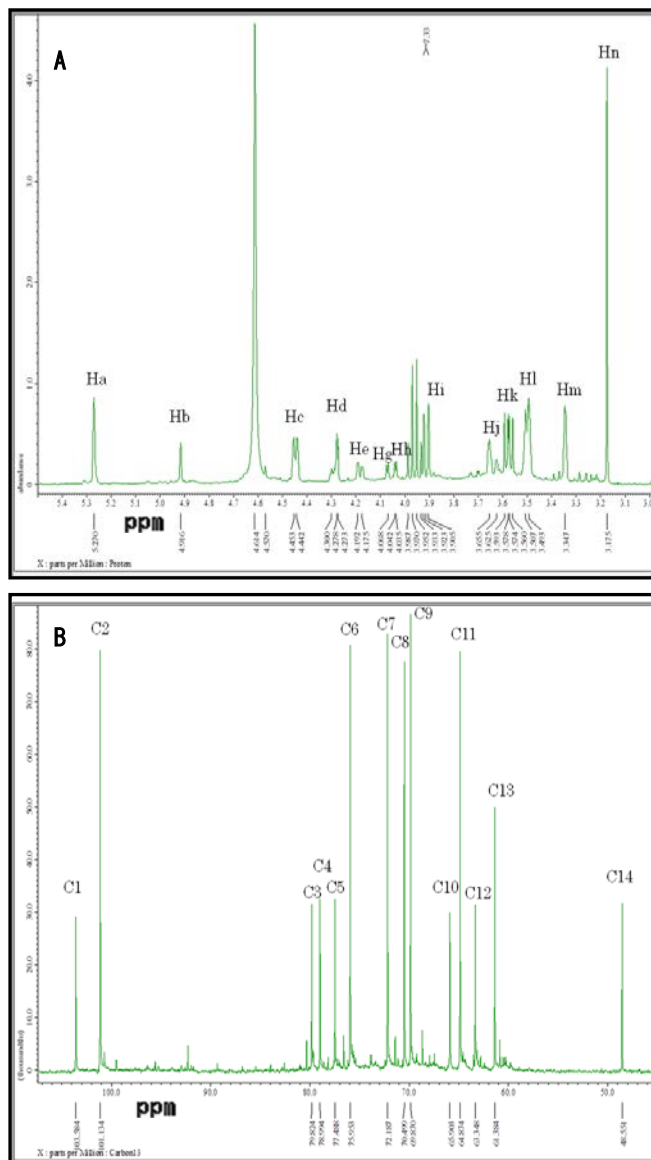


図 18 スクロースから合成したレボグルコサンと HMF 含有画分の NMR スペクトル

A: ¹H NMR スペクトル, B: ¹³C NMR スペクトル.

ことを示すものである。以上の結果より、グルコースが脱水反応を起こし、6 位の炭素と 1 位の炭素間でエーテル結合が形成され、アンヒドロ糖のレボグルコサンが生成したものと考えられる。

シリカゲルのカラムクロマトグラフィーにおける、254nm の吸光度でのクロマトグラムを図 23 に示す。極性の低い酢酸エチル-ヘキサン (1:1) で溶出したスルホランの画分がピーク A であり、極性の高い酢酸エチル-メタノール (10:1) で溶出したレボグルコサンと HMF の

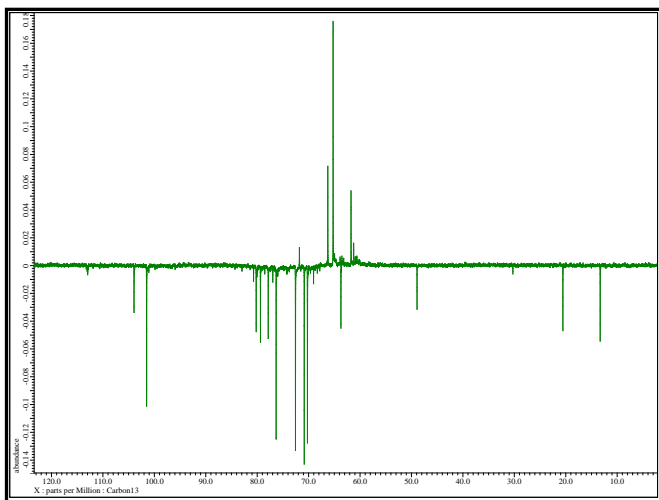


図 19 スクロースから合成したレボグルコサンと HMF 含有画分の DEPT-135 ¹³C NMR スペクトルの測定結果

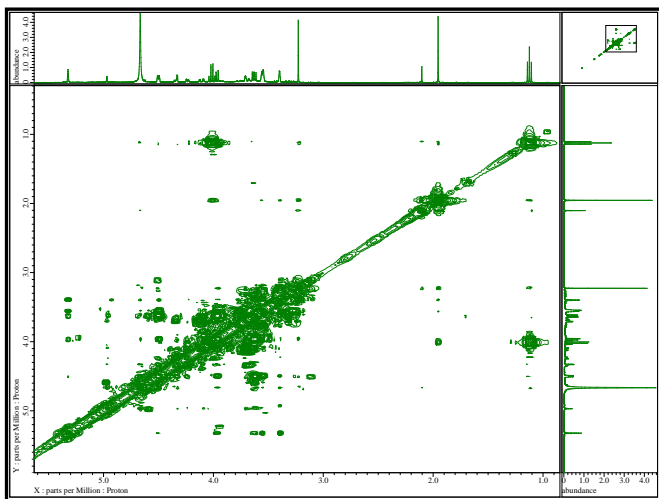


図 20 スクロースから合成したレボグルコサンと HMF 含有画分の COSY ¹H NMR スペクトルの測定結果

画分がピーク B である。ピーク A とピーク B の保持時間は、それぞれ約 18 分と 34 分であった。A はスルホラン自身に由来するピークであり、B は HMF の共役系に由来するピークであると考えられる。¹H NMR の測定結果より、共役系を持つ化合物は HMF のみと判断できる。そのため、スクロースがフルクトースとグルコースに加水分解され反応が進行したものと考えられる。本実験条件下で、スクロースからのレボグルコサンと HMF の合成は可能であり、この方法は這豆のスクロースからのこれらの化学物質の合成に応用可能と考えられた。しかし、溶媒として用いた

スルホランの除去が問題となるため、スルホラン以外の非プロトン性極性溶媒を検討する必要がある。

ここまでの結果から、這豆は特徴のある食材、あるいはバイオマス、薬品の合成材料などとして利用することが可能と考えられる。

4. まとめ

静岡原産のダイズである這豆について、宇宙微小重力下で 2 週間保管した時の影響を検討した。

第 1 世代、第 2 世代または第 3 世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、あるいは市販ダイズの栽培における発芽率と外観、根粒菌のコロニーの外観に差は見られなかった。

第 2 世代、第 3 世代または第 4 世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、あるいは市販ダイズの栄養成分については、糖質の総量、スクロースとスタキオースの相対比、脂質量、脂質組成、トリグリセリド中の脂肪酸組成、タンパク質量、タンパク質の分子量分布、主なタンパク質の種類と含量等で著しい違いは認められなかった。一部、這豆の脂質量は市販ダイズに比較して少ない、第 3 世代のダイズのタンパク質量は第 2 世代のダイズに比較して少ないといった傾向が見られた。

第 2 世代または第 3 世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、あるいは市販ダイズの保健成分については、イソフラボンやサポニンの化学構造に著しい違いは認められなかった。ただし、這豆のダイジンの量は市販ダイズより多い傾向が見られた。

第 2 世代の宇宙保管這豆と地球保管這豆、あるいは市販ダイズの遺伝子については、そのメチル化の位置の変化や内在性の特異的配列の変異は確認されなかった。

這豆は栽培が極めて容易であったため、その利用について検討したところ、豆腐の製造についてはその豆乳の凝固が市販のダイズに比較して起こりにくく、食品に用いた場合に従来のダイズ食品と食感が異なることがわかった。また、マイクロ波照射により這豆の油成分の塩基性下でのメチルエステル化により BDF を製造すること、また、ダイズの主な糖質であるスクロースからスルホラン溶媒中でアンヒドロ糖のレボグルコサンと HMF を合成することが

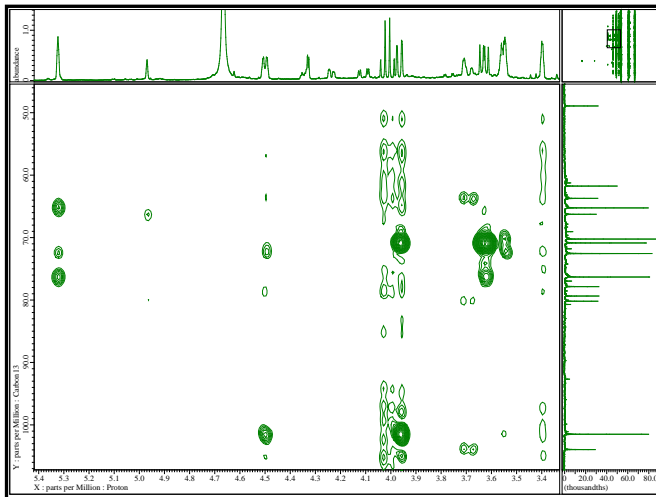


図 21 スクロースから合成したレボグルコサンと HMF 含有画分の HMQC ^1H - ^{13}C NMR スペクトルの測定結果

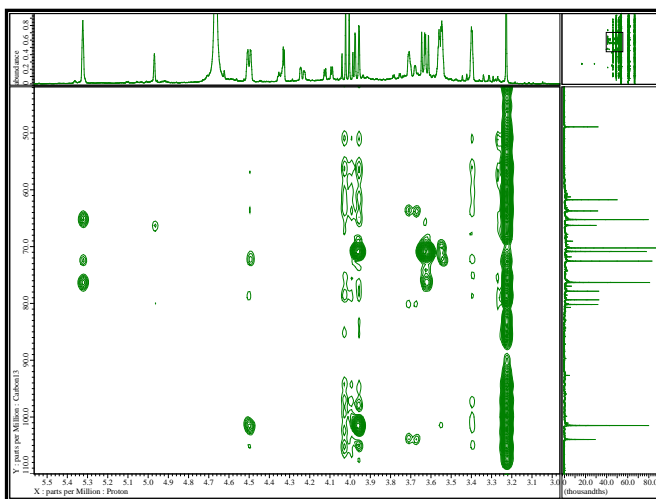


図 22 スクロースから合成したレボグルコサンと HMF 含有画分の HMBC ^1H - ^{13}C NMR スペクトルの測定結果

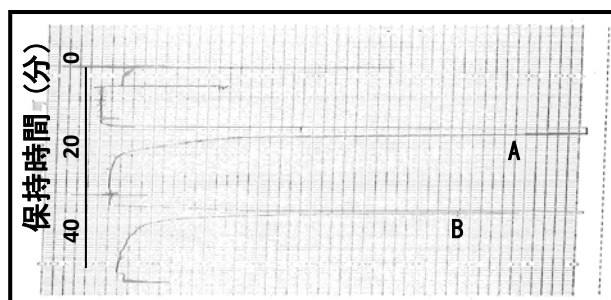


図 23 スクロースにマイクロ波照射して得られた反応液のシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにおけるクロマトグラム。

A: 酢酸エチル - ヘキサン (1 : 1) 溶出画分,
 B: 酢酸エチル - メタノール (10 : 1) 溶出画分。
 検出 : 254 nm における吸光度。

可能であることが確認され、這豆がバイオ燃料や薬品合成の中間体の原料として有用であることを示した。

謝辞

本研究における這豆の供与またはダイズの栽培等について、株式会社リバネスと三島市在住の栗原賢次氏よりご厚意、ご指導を受けました。また、本研究には、沼津工業高等専門学校物質工学科および専攻科応用物質工学専攻の 27 名の学生が参加しました。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) 増田芳雄, 宇宙農業へかける夢 : 無重力状態での植物育成. 人間環境科学, vol.6(Suppl.), pp.53-57 (1997).
- 2) 神阪盛一郎, 国際宇宙ステーションで陸上植物は種子から種子への生活環を完結できるか. 生物工学, vol.80, pp.307-311 (2002)
- 3) T. Hoson, K. Soga, R.Mori, M. Saiki, K. Wakabayashi, S. Kamisaka, S. Kamigaichi, S. Aizawa, I. Yoshizaki, C. Mukai, T. Shimazu, K. Fukui, M. Yamashita, Morphogenesis of rice and Arabidopsis seedlings in space. *J. Plant Res.*, vol.112, pp.477-486 (1999).
- 4) 保尊隆亨, 曾我康一, 若林和幸, 国際宇宙ステーション実験による植物の抗重力反応機構の解明. 生物工学, vol.88, pp.292-295 (2010).
- 5) S.R. Long, W.J. Buikema, F.M. Ausubel, Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod-mutants. *Nature*, vol.298, pp.485-488 (1982).
- 6) T.A. Scott, Jr., E.H. Melvin, Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem.*, vol.25, pp.1656-1661 (1953).
- 7) 村岡信雄, 松岡徹夫, 大豆子実の遊離糖含量. 東北農業研究, vol.45, pp.117-118 (1992).
- 8) J. Folch, I. Ascoli, M. Lees, J.A. Meath, F.N. LeBaron, Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.*, vol.191, pp.833-841 (1951).
- 9) M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, vol.72, pp.248-254 (1976).
- 10) 扇谷陽子, 相澤 博, 大谷倫子, 藤田晃三, 大豆のイ

- ソフラボン量について；産地による比較，札幌市衛研
年報，29，83-89 (2002).
- 11) A. Caligiani, G. Palla, A. Maietti, M. Cirlini, V. Brandolini, 1H NMR fingerprinting of soybean extracts, with emphasis on identification and quantification of isoflavones, vol.2, pp.280-289 (2010).
 - 12) 高田吉丈, 大豆のサポニン. 食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル, 四国地域イノベーション創出協議会 地域食品・健康分科会 編 (2011).
 - 13) I. Hatada, M. Fukasawa, M. Kimura, S. Morita, K. Yamada, T. Yoshikawa, S. Yamanaka, C. Endo, A. Sakurada, M. Sato, T. Kondo, A. Horii, T. Ushijima, H. Sasaki, Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene*, vol.25, pp.3059-3064 (2006).
 - 14) 吉田企世子, 食品加工実習・実験書, 医歯薬出版株式会社, pp.48-51, pp.79-80, 2013年.
 - 15) J.M. Encinar, J.F. Gonzalez, G. Martinez, N. Sanchez, A. Pardal, Soybean oil transesterification by the use of a microwave flow system. *Fuel*, vol.95, pp.386-393 (2012).
 - 16) J.L. Wang, M. Schindler, S.-C. Ho, The lectin recognition hypothesis in *Rhizobium*-legume interactions. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, vol.5, pp.331-342 (1993).
 - 17) 日本食品標準成分表 2010, 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会, 平成 22 年 11 月.
 - 18) 廣田智子, 田畑広之進, 小河拓也, 岩井正志, 井上喜正, 兵庫県産大豆の品質特性. 兵庫農技総セ研報 (農業), vol.53, pp.6-12 (2005).
 - 19) 永田純一, 屋 宏典, 戸田隆義, 知念 功, 大関正直, 大豆由来高食物繊維素材の物理的特性とラット脂質代謝へ及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌, vol.48, pp.133-139 (1995).
 - 20) 五訂増補 日本食品標準成分表 脂肪酸成分表編, 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会, 平成 17 年 1 月.
 - 21) D.W. Peterson, Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol.78, pp.143-147 (1951).
 - 22) G. Schlierf, Polyunsaturated Fatty Acids, ed. by W.-H. Kunau, R. T. Holman, American Oil Chemists' Society, p.183, 1977 年.
 - 23) K. Imaizumi, M. Murata, M. Sugano, Effect of dietary polyunsaturated phospholipid on the chemical composition of serum lipoproteins in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, vol.28, pp.281-294 (1982).
 - 24) N. Iritani, K. Nagashima, H. Fukuda, A. Katsurada, T. Tanaka, Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J. Nutr.*, vol.116, pp.190-197 (1986).
 - 25) 石見佳子, 大豆イソフラボンの機能性. 食品と開発, vol.34, pp.5-7 (1999).
 - 26) S. Barnes, Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer, *J. Nutr.*, vol.125, pp.S777-S783 (1995).
 - 27) 田村 基, エクオール (Equol). 本食品科学工学会誌, Vol.57, pp.492-493 (2010).
 - 28) 吉城由美子, 大久保一良, 大豆サポニンの機能性. 食品と開発, vol.34, pp.8-11 (1999).
 - 29) J.A. Law, S.E. Jacobsen, Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.*, vol.11, pp.204-220 (2010).
 - 30) X.J. He, T. Chen, J.K. Zhu, Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res.*, vol.21, pp.442-465 (2011).
 - 31) X. Zhang, J. Yazaki, A. Sundaresan, S. Cokus, S.W.-L. Chan, H. Chen. I.R. Henderson, P. Shinn, M. Pellegrini, S.E. Jacobsen, J.R. Ecker, Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, vol.126, pp.1189-1201 (2006).
 - 32) 高村基治, 食品加工副産物の有効利用-おからの再利用に向けて-. 生物機能開発研究所紀要, vol.10, pp.56-62 (2010).
 - 33) 中村好男, 5-ヒドロキシメチルフルフラ-ルの製法に関する基礎研究--D-フルクト-スの選択的脱水. 野口研究所時報, vol.23, pp.25-38 (1980).
 - 34) M.L. Mednick, The acid-base-catalyzed conversion of aldohexose into 5-(hydroxyl- methyl)-2-furfural. *J. Org.Chem.*, vol.27, pp.398 (1962).