

3. ダイズリポキシゲナーゼアイソザイムの改良簡易迅速検出法

[要約] 青臭み因子であるダイズリポキシゲナーゼアイソザイムの脱色反応利用選抜法を改良することによって、微量の同一検定試料と微量の検出溶液を用い、L-3 検定後、L-1 検定を続けて行い、全有、L-3 欠失、L-1・L-2 二重欠失および完全欠失個体を簡易、迅速に検出することが可能となる。

国際農林水産業研究センター・生物資源部				連絡先	0298 (38) 6305		
推進会議名	国際農林水産業	専門	育種	対象	だいず	分類	研究

[背景・ねらい]

ダイズリポキシゲナーゼは、3 つのアイソザイム (L-1、L-2、L-3) からなり、大豆製品の豆臭や青臭み発生の原因となっている。この不快臭は、南米諸国における食用としての消費を制限している大きな要因の一つであることから、同地域での需要拡大にとって本酵素欠失大豆品種の育成が望まれている。本酵素欠失育種において、多検体を効率的に選抜する必要があるが、これまでに報告されてきた検出手法は煩雑な操作や時間を要する問題を抱えている。ここでは、Suda ら (1995) の脱色反応利用選抜法を改良し、本酵素の簡易迅速選抜法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. Suda らの方法で用いられている L-3 検出溶液の緩衝液濃度を半分にし、緩衝能を弱めることによって、Suda らの方法とは違い、同一試料を使用して L-3 検定後、L-1 検定を続けて行うことが可能となり、準備する検定試料の量も半分となる (表 1、図 1)。
2. Suda らによる試験管を利用する方法とは違い、血液検査用などに用いられる白色トレーを使用することによって、呈色度合いが明確に判別され、各検出溶液の適用が微量 (1 試料当たり 250 μ l) となる (表 1、図 1)。
3. 本改良法によって、リポキシゲナーゼ完全欠失大豆と普通大豆との交雑後代を検定する際、全有、L-3 欠失、L-1・L-2 二重欠失および完全欠失個体を無色、黄色、青色および緑色の呈色で各々簡易、迅速に検出することが可能となる (図 1、図 2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 本改良法は、リポキシゲナーゼ完全欠失大豆を用いた交配育種を効率的に進めるための選抜法となる。
2. L-1 および L-2 生産支配遺伝子座間には非常に強い連鎖関係が存在するため、本交雑後代の検定の際、Suda らの方法で用いられている L-2 検定を省略することができる。

[具体的データ]

表 1 ダイズリポキシゲナーゼアイソザイム検定のための 須田ら (1995) の脱色反応利用選抜法と本改良法の比較

	須田らの方法	改良法
L-3検定用(1試料当たり):		
検定試料	2.5mg	2.5mg
L-2抽出液	0.5ml	10 μ l
L-3検出溶液	2.0ml	250 μ l
組成) 0.2M リン酸Na緩衝液 (pH6.6)		
10mM リノール酸溶液	25.0ml	12.5ml
蒸留水	5.0ml	5.0ml
β -カロチン飽和溶液	5.0ml	17.5ml
5.0ml	5.0ml	5.0ml
L-1検定用(1試料当たり):		
検定試料	2.5mg	不要
蒸留水	0.5ml	不要
L-1検出溶液	2.0ml	250 μ l
組成) 0.2M ホウ酸Na緩衝液 (pH9.0)		
10mM リノール酸溶液	25.0ml	25.0ml
蒸留水	5.0ml	5.0ml
100mM メチレンブルー溶液	5.0ml	5.0ml

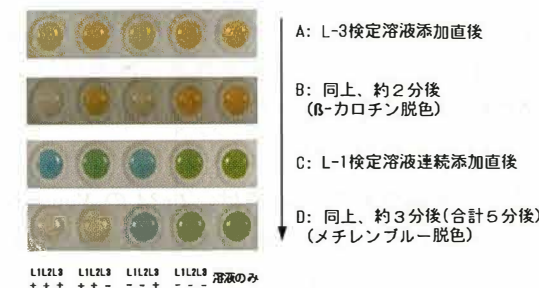


図 1 ダイズリポキシゲナーゼアイソザイムの 4 表現型の検定試料を用いた本改良法による脱色反応経過

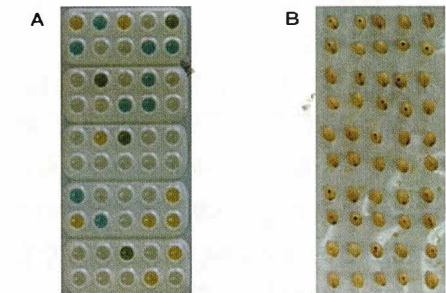


図 2 本改良法によるリポキシゲナーゼ完全欠失大豆と普通大豆の交雑 F₂ 種子分析結果
A: 分析結果 (無色: 全有, 黄色: L-3 欠失, 青色: L-1・L-2 欠, 緑色: 全欠)
B: 分析トレーに対応して並べられた検定種子 (印を付けて選抜)

[その他]

研究課題名: 大豆種子成分の遺伝的改良技術の開発
予算区分: 国際プロ [南米大豆]
研究期間: 2001 年度 (1998 ~ 2001 年度)
研究担当者: 菊池彰夫
発表論文等:

Kikuchi, A., Bordignon J. R., Mandarino J. M. G. and Carrão-Panizzi M. C. (1999): Método simples e rápido para identificação das isoenzimas (L-1, L-2, L-3) de lipoxigenase em sementes de soja. Congresso Brasileiro de Soja (Supplement), p.463 (in Portuguese).

参考文献: Suda et. al. (1995) J. Agric. Food Chem. 43 (3) 742-747.