

学 位 論 文 要 旨

氏 名

外 山 潤

題 目

飼料用サツマイモ開発のための成分特性に関する育種学的展開
(Development of a breeding strategy with focus on trypsin inhibitor for sweetpotato as feed)

サツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) は、家畜飼料として優れた作物であるが、塊根には抗栄養因子のトリプシンインヒビター (TI) が含まれており、飼料価値を低める要因となる可能性がある。そこで、サツマイモの飼料価値をさらに高める品種を開発するために、TI に関する育種学的基礎研究を行った。

1. まず、マイクロプレートを用いた TI 活性の比色定量法を開発し、測定試料の少量化と測定時間の大幅な短縮を可能にした。次に、サツマイモ塊根より粗精製した TI の比活性は、ダイズ TI の約 37% と低かったが、水溶性蛋白質の大部分を占めることより、高蛋白の塊根において比較的高 TI 活性を示す場合があると考えられた。サツマイモの育成途上系統の TI 活性は比較的広い範囲 (38-944 U/mg DW) に分布し、一部の系統では TI 活性が家畜の耐性閾値を越える可能性があるとして推定された。
2. サツマイモ塊根の TI 活性に与える環境等の影響を調査した。9-11 月の生育後期において、収穫が遅いほど TI 活性が低下する傾向が見られた。生育の停止する 11-12 月以降も塊根を畦内に放置する「畦内貯蔵」では、貯蔵可能な 12 月までの期間において、TI 活性に有意な変化は見られなかったが、でん粉は含量の低下と老化の進行が認められた。施肥量の影響は最も大きく、多施肥 (0.96kg N/a) により、塊根の TI 活性は著しく増加した。また、これらの環境等による TI 活性の増減は、粗蛋白質 (CP) 含量の増減と相関していることが明らかとなった。
3. 高蛋白や低 TI 活性サツマイモの選抜戦略を検討した。サツマイモの 7 品種 × 3 年間の栽培により、CP 含量と TI 活性は、品種間および年次間に有意差が認められた。推定された CP 含量と TI 活性の広義の遺伝率は、それぞれ 0.715 および 0.510 と比較的大きく、遺伝的改良が十分可能な形質であると認められた。また、3 年間で合計 170 系統を用いた形質間相関分析により、TI 活性は CP 含量と有意な高い正の相関が認められた。TI 活性と収量形質間には明確な相関は見られないが、CP 含量と切干歩合間には有意な負の相関が認められた。

6 年間で約 700 品種・系統のサツマイモの中から、高蛋白 (27.8-44.6 mg/g DW) の 15 系統と低 TI 活性 (11-137 U/mg DW) の 7 系統を選抜した。収量性の高い系統は、高蛋白系統よりも低 TI 活性系統の中から、比較的容易に見出せた。また、高蛋白・低 TI 活性の系統として「九系 94128-1」および「KNF94225-13」を発見することに成功した。さらに、選抜系統を用いた交雑により、CP 含量や TI 活性の変異を拡大できることが示された。

以上の結果、サツマイモ塊根の TI 活性は、系統間や栽培条件等で比較的大きく変動し、高 TI 活性系統の一部では、家畜の耐性レベルを超える可能性が指摘されたが、系統間の交雑と選抜により、TI 活性は低下し、また CP 含量や収量性は向上することが明らかになった。このような研究成果は、サツマイモの飼料価値を高めるための育種を促進するものである。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Jun Toyama

題 目

Development of a breeding strategy with focus on trypsin inhibitor for
sweetpotato as feed

(飼料用サツマイモ開発のための成分特性に関する育種学的展開)

Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) is an excellent source for animal feed. However, the presence of anti-nutritional factor, 'trypsin inhibitor (TI)' in storage root may diminish the feed value of sweetpotato. To breed sweetpotato with higher feed value, some basic researches of TI were conducted.

1. A colorimetric method for trypsin inhibitor activity (TIA) analysis using microplate was developed. This method allows sweetpotato breeders to analyse large number of samples with smaller sample size in quick time. Purified TIs from storage roots belong to sweetpotato major storage root proteins, namely sporamins. Purified sweetpotato TI showed weaker activity than soybean TI (ca. 37% of soybean TI), however, presence of large quantity of soluble protein in high protein storage roots, may lead to high TIA. The range of TIA among breeding lines were relatively wide (38–944 U/mg DW) and some of the higher TIA lines may exceed a threshold level for domestic animals estimated by the conversion value of TIA to soybean TI amount.
2. The effect of some agronomic factors on TIA of sweetpotato was investigated. During the later part of growing stages (108–161 days after planting), TIA values were found to decrease by 10–56% depending on the lines. After the growth period was over, on the other hand, the significant changes in TIA of the varieties were not recognized, however, their starch contents decreased and starch retrogradation was promoted. The increase in nitrogen fertilizer increased TIA by 37–96%, depending on the varieties. The changes in TIA with these agronomic factors were found to correlate with crude protein (CP) contents.
3. The heritability of sweetpotato CP contents (0.715) and TIA (0.510) estimated by the analysis of variance using 7 varieties for 3 years were relatively high. This indicated that the selection of sweetpotato regarding these characters were possible. In addition, TIA significantly correlated with CP content and did not always significantly correlate with storage root yield and dry matter content in 3 years.

Efforts have been made to develop sweetpotato lines with high protein content and/or low TIA. From ca. 700 breeding lines or varieties of sweetpotato grown in 1998 to 2003, 15 lines were selected as high protein content (27.8–44.6 mg/g DW) and 7 lines as low TIA (11–137 U/mg DW). Lines with high yield or high dry matter content were relatively easily found in low TIA lines, but not in high protein lines. In spite of strong positive correlation between TIA and CP content, 2 lines, 'Q94128-1' and 'KNF94225-13' which had storage roots with high protein content and low TIA, were first found as useful breeding materials to decrease TIA of high protein lines. In addition, electrophoretic analysis revealed considerably less amount of trypsin inhibitory bands in these lines.

| 学位論文審査結果の要旨 | |
|---|--|
| 学位申請者 氏 名 | 外山 潤 |
| 審査委員 | 主査 宮 崎 大学 教授 藪 谷 勤 |
| | 副査 鹿 児 島 大学 教授 坂 田 祐 介 |
| | 副査 宮 崎 大学 教授 小 川 紹 文 |
| | 副査 宮 崎 大学 教授 辰 巳 保 夫 |
| | 副査 佐 賀 大学 助教授 石 丸 幹 二 |
| 審査協力者 | |
| 題 目 | 飼料用サツマイモ開発のための成分特性に関する育種学的展開 (Development of a breeding strategy with focus on trypsin inhibitor for sweetpotato as feed) |
| <p>サツマイモ (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.) は家畜飼料として優れた作物であるが、塊根中には、抗栄養因子のトリプシンインヒビター (TI) を含んでいる。また、タンパク質含量が低いために家畜への給与量は制限されることが多い。これまで飼料用サツマイモの育種は主に塊根や茎葉部の収量面の向上に重点が置かれ、これらの成分の改良については積極的に行われていない。そこで、サツマイモの飼料価値をさらに高める品種を開発するために、TIに関する育種学的基礎研究を行った。</p> <p>まず、マイクロプレートを用いた TI 活性の比色定量法を開発し、測定試料の少量化と測定時間の大幅な短縮を可能にした。次に、サツマイモ塊根より粗精製した TI の比活性は、ダイズ TI の約 37% と低かったが、水溶性タンパク質の大部分を占めることより、高タンパクの塊根において比較的高 TI 活性を示す場合があると考えられた。サツマイモの育成途上系統の TI 活性は比較的広い範囲 (38-944 U/mg DW) に分布し、一部の系統では TI 活性が家畜の耐性閾値を越える可能性があると考えられた。</p> <p>サツマイモ塊根の TI 活性等の成分動態に与える環境の影響についてみると、9-11月の生</p> | |

育後期において、収穫が遅いほど TI 活性が低下する傾向が見られた。また、生育の停止する 11-12 月以降も塊根を畦内に放置する「畦内貯蔵」では、貯蔵可能な 12 月までの期間において、TI 活性に有意な変化は見られなかったが、デンプンは含量の低下と老化の進行が認められた。次に、施肥量と栽植密度が塊根の TI 活性等に与える影響についてみると、施肥量の影響は最も大きく、多施肥 (0.96kg N/a) により、塊根の TI 活性は著しく増加した。また、各品種の TI 活性の増加は、粗タンパク質(CP)含量の増加と密接に相関していた。一方、栽植密度が TI 活性および CP 含量に与える影響は小さかった。

サツマイモの 7 品種について 3 年間の栽培試験を実施したところ、CP 含量と TI 活性は、品種間および年次間に有意差が認められた。推定された CP 含量と TI 活性との広義の遺伝率は、それぞれ 0.715 および 0.510 と比較的高く、遺伝的改良が十分可能な形質であるとみなされた。また、3 年間で合計 170 系統を用いた形質間相関分析により、TI 活性は CP 含量と有意な高い正の相関が認められた。TI 活性と収量形質間には明確な相関は見られないが、CP 含量と切干歩合間には有意な負の相関が認められた。

高タンパクや低 TI 活性サツマイモの選抜試験では、約 700 品種・系統のサツマイモの中から、6 年間で高タンパク (27.8-44.6 mg/g DW) の 15 系統と低 TI 活性 (11-137 U/mg DW) の 7 系統を選抜した。収量性の高い系統は、高タンパク系統よりも低 TI 活性系統の中から、比較的容易に見出せた。また、高タンパク・低 TI 活性の系統として「九系 94128-1」および「KNF94225-13」を発見することに成功した。さらに、選抜系統を用いた交雑により、CP 含量や TI 活性の変異を拡大できることも示された。

以上のように、本研究では、サツマイモ塊根におけるマイクロプレートを用いた TI 活性の比色定量法を開発するとともに、その TI 活性は系統間や栽培条件等で比較的大きく変動し、高 TI 活性系統の一部では、家畜の耐性レベルを超える可能性が指摘されたが、系統間の交雑と選抜により、TI 活性は低下し、また CP 含量や収量性は向上することが明らかにされた。このような研究成果は、学術的に価値があり、本研究論文は学位論文として十分価値のあるものと判断した。

| 学力確認結果の要旨 | |
|--|--------------------|
| 学位申請者 氏名 | 外山 潤 |
| 審査委員 | 主査 宮崎 大学 教授 藪谷 勤 |
| | 副査 鹿児島 大学 教授 坂田 祐介 |
| | 副査 宮崎 大学 教授 小川 紹文 |
| | 副査 宮崎 大学 教授 辰巳 保夫 |
| | 副査 佐賀 大学 助教授 石丸 幹二 |
| 審査協力者 | |
| 実施年月日 | 平成 17 年 12 月 26 日 |
| 試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="checkbox"/> 口答・ <input type="checkbox"/> 筆答 | |
| <p>主査及び副査は、平成 17 年 12 月 26 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆記により、外国語 (英語) の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士 (農学) の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p> | |

| | |
|--------------|---|
| 学位申請者 氏 名 | 外山 潤 |
| [質問 1] | トリプシンインヒビター(TI)活性の簡易迅速測定法の特徴について何が目玉なのか？ |
| [回答 1] | マイクロプレートを用いた方法に改良することにより、分析に必要な検体量の少量化、および多検体（約90検体/プレート）の同時測定が可能になったことである。また、既存の方法では、1 検体ずつ分光光度計で測定するため、5-6サンプルを測定するのに1 時間を要していたが、改良した方法により約90検体の1 回の測定に要する時間が30分に短縮された。 |
| [質問 2] | 飼料用としてTI活性の重要性はどの程度か？ |
| [回答 2] | 通常の品種を用いた栽培をするならば、収量性等の実用形質がまず重要であり、タンパク質含量、TI活性の順と思われる。しかしながら、タンパク質が慢性的に不足するアフリカや他の発展途上国では、タンパク質含量を増やすことは重要と考えられ、それに伴い増加するTIは問題となる可能性がある。その場合は、これらの形質の改善が重要となる。 |
| [質問 3] | 粗精製TIがスポラミンであることの理由は？ |
| [回答 3] | 粗精製したTIは、塊根の水溶性タンパク質の大部分を占める成分であること、電気泳動において、還元条件下で約25kDaの1本のバンド、非還元条件下では約33kDaおよび22-21kDaの2-3本のバンドとして検出される等の特性がスポラミンの特性と類似していること、さらにスポラミンはTIの1つの型として存在し、TI活性を示すことが近年報告されていることから、粗精製TIをスポラミンであると推定した。 |
| [質問 4] | 水溶性タンパク質のほとんどがスポラミンと言われたが、高タンパク・低TI品種の場合、水溶性タンパク質のTI蛋白が少なく他のタンパク質が多いのか、そのTI活性は低いのか？ |
| [回答 4] | 高タンパク・低TI系統の2系統では、スポラミン (TI) の代わりに、それよりも高分子の多くのバンドが存在していた。また、標準的なバンドパターンを示すシロユタカでは、これらのバンドは認められなかった。さらに、高タンパク・低TI系統の2系統では、他の系統に比べて低いTI活性を示した。 |
| [質問 5] | 塊根の肥大期にTIが増加する生物学的理由は？ |
| [回答 5] | 明確な回答はできないが、指摘されたようにこの成分を発育中に蓄積することにより、動物や昆虫類の食害から身を守る機能を高める目的があるものと思われる。また、発育に伴い塊根形成に必要なタンパク質も合成されると考えられるが、TIはその大部分を占める成分として存在するため、他の機能も果たしているかもしれない。例えば、発育中に塊根組織を形成する過程において、プロテアーゼを調節する機能を果たすために増加していることも考えられる。 |
| [質問 6] | 収穫後期のTI活性の低下によって、家畜は食することが可能になるのか？ |
| [回答 6] | 通常の品種の場合だとTI活性が家畜の耐性レベルを超えることは少ないと考えられるが、栽培環境や用いる系統の影響で耐性レベルを超えるような状況の場合には、収穫遅延でTI活性を低下させ、家畜の閾値以下に低めることにより、家畜への影響を減じることになると思われる。しかしながら、本研究で示したサツマイモTIの家畜における耐性レベルは、あくまでも推定値であり、最終的には家畜への給与試験で確認する必要がある。 |
| [質問 7] | 畦内貯蔵は飼料用として一般的な貯蔵方法か？ |
| [回答 7] | 現時点では、まだ実験中であり、一般的ではないと思われる。また、それ以前の問題として、我が国では飼料用サツマイモ自体が少なすぎる。しかしながら、サツマイモを加工原料として用いる一部メーカーにおいては、通常11月の収穫期を過ぎた12月くらいまで塊根を収穫せずに畦内に放置している所も見られる。 |

[質問 8] 畦内貯蔵は、長期貯蔵としてはいろいろ問題があると思うが、どのような利点があるのか？また、その将来性についてどのように考えるのか？

[回答 8] 利点としては、収穫期間の拡大による工場の稼働率向上、貯蔵庫への搬入作業の省略、貯蔵施設の節約等がある。本研究により、長期貯蔵のためにはある程度以上の畦内の温度が必要であり、試験地の1つである都城では、用いたすべての品種で塊根が腐敗し、長期貯蔵は難しいと考えられる。しかしながら、もう1つの試験地であり、都城よりも温暖な鹿児島県頰娃町では、品種により3月まで塊根の腐敗がほとんど見られない品種も存在する。この品種でもデンプン含量の低下が見られるため、現時点での長期貯蔵は難しいが、種子島などのさらに温暖な栽培地の選択、および畦内貯蔵適性に優れた品種の選抜により、収穫期間をどこまで拡大できるかを見極める必要がある。

[質問 9] 栽培品種はTI活性が低い理由は？

[回答 9] 栽培品種は収量形質を重視して選抜されており、収量形質（特に切干歩合）と負の相関のあるタンパク質含量の高い系統は淘汰されている。よって、栽培品種のほぼすべてが低タンパク品種であり、タンパク質の主要成分のTIも低くなっているものと思われる。

[質問10] 広義の遺伝率は、サツマイモで一般に使われているか？

[回答10] サツマイモは他殖性作物であるため、広義の遺伝率が一般的に用いられている。狭義の遺伝率については、材料の都合上求めなかった。

[質問11] 第3章で、各条件によって使っている品種が違っているのは何故か？ 共通の品種を使った方が望ましいのではないか？

[回答11] 指摘されたように、すべての試験区で品種を揃えるのが望ましい。本実験では、育成中の材料も用いている都合上、材料入手および試験設定の観点からすべてを揃えることはできなかったが、2つの栽培試験ではいくつかの同じ品種・系統を用いた。残りの1つの試験でも、他品種との関係が明らかな系統を用いた。

[質問12] 系統番号の古い品種が使われているのは何故か？

[回答12] 系統番号の古い品種は、高タンパクなど何らかの形質に特徴を有するなどの理由で残されていた系統であり、選抜実験を開始した1998年の母集団に含めたためである。

[質問13] KNF94225-13は酵素パターンも違うようだが、成分の違いは見られるのか？

[回答13] この系統は、カロテンを含み切干歩合が低いことは分かっているが、他の成分については今後の調査が必要である。

[質問14] 窒素施肥でTIが半分になっているが、農家レベルで応用が可能か？

[回答14] TIが減り収量も増えるので、応用が可能である。サツマイモは、窒素施肥をしすぎると蔓が繁茂し塊根収量が減少することが一般的に分かっているため、農家では窒素施肥量は低くしていると思われる。スラリー散布などによる土壌窒素の急激な増加で、TI活性が著しく増加することには注意が必要である。

[質問15] 高タンパクのものは収量性が悪いようだが、交配して実用品種はできるのか？

[回答15] 収量形質を重視して選抜されてきた日本の育種素材の中では、タンパク質と収量形質の間に負の相関が認められるが、タンパク質含量に注目して広く遺伝資源を探索し、収量形質とタンパク質含量の両方の形質を集積させていけば、ある程度の収量性をもった高タンパク品種の育成が可能である。これまで高タンパク系統の育成を目的とした交配は全く行われていないので、少なくとも既存の高タンパク系統よりは優れた品種ができる可能性は大であるが、既存の高収量品種に匹敵する品種になるかは分からない。