

形 態

タチナガハに発生した「石豆」における種皮表面微細凹凸構造に見られた特徴

乙部和紀^{1,3)}・吉岡邦明^{2,3)}

(¹⁾ 中央農業総合研究センター, (²⁾ 日東食品(株), (³⁾ 筑波大学大学院生命環境科学研究科)

要旨 : 「石豆」と一般的に呼称される非吸水 (または難吸水) 性のダイズ種子は, ダイズの食品加工上および栽培上の障害となる。既往の知見においてダイズの石豆は物理的休眠の一種であり, 種皮表面の微細構造の違いにより生じると推察されてきた。しかし, 従来の研究は定性的な解析にとどまっていたことから, 石豆の非吸水性機序の解明や機器測定による選別につながる知見は依然として得られていないのが実情である。本研究では, レーザ走査型三次元微細形状計測顕微鏡を用いて, 水への浸漬処理後のダイズ種皮表面の三次元微細構造を直接計測・定量化することにより, 石豆と正常粒との種皮微細構造の違いを明らかにした。石豆の発生が確認された平成 17 年埼玉県産のタチナガハを供試して調査した結果, 正常粒では種皮表面積 0.35 mm^2 あたりに存在する直径 $10 \mu\text{m}$ 以上, 深さ $10 \mu\text{m}$ 以上の深い凹み (pore) が平均 44.8 個であったのに対し, 石豆では平均 3.2 個であった。以上の知見から, 石豆の非吸水性機構における種皮微細構造上の特徴は, 単位表面積あたりの深い pore 数が極端に少なく, 水に対する障壁となる柵状細胞組織層に pore が十分陥入していない点にあると推察された。この推察を裏付けるために, 種皮表面に深さ $20 \mu\text{m}$ 程度の微小孔を多数形成する処理を石豆に施して吸水試験を行い, 吸水量が正常粒の 40% 程度まで回復することを確認した。

キーワード : 石豆, 三次元構造解析, 種皮微細構造, ダイズ, 非吸水性, pore.

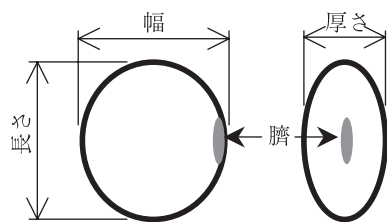
吸水がきわめて遅い, または全く吸水しないダイズ種子, いわゆる「石豆」の存在は, ダイズの食品加工産業においては重要な問題のひとつである (織茂 2005)。特に煮豆や納豆などのように, 粉碎せずに豆の形態を保持した状態で食されるもの場合には, 製品 1 パックにひとつでも石豆が混入していれば不良品とみなされ, 製品イメージに傷がつく。そのため, 石豆は納豆・煮豆加工適性項目における障害粒に分類され (平 1992), ダイズ新品種の加工適性試験においても石豆率の試験項目が設けられている (松永ら 2002)。さらに, 石豆の発生は品種特性と共に栽培条件にも左右されるとの報告もあり (Hill ら 1986a), ダイズの生産計画や育種方針の策定において, 考慮すべき要因のひとつである。

欧米において石豆は “impermeable seed” または “hard seed” と呼ばれ, 加工利用上の必要性から, ダイズの品種特性や栽培方法との関連について研究が行われてきた。最近の例として, Ma ら (2004) はタチナガハや Harosoy を含む 6 品種の種皮微細構造を走査型電子顕微鏡で観察し, 種皮表面からの水の浸透経路としてマイクロメートルレベルの微細な亀裂の存在が重要であると結論づけている。一方, Baskin ら (2000) は種子の物理的休眠 (physical dormancy) の観点から研究を行い, 被子植物の特性として種皮構造が持っている稠密な柵状細胞組織層の非透水性物質による細胞壁被覆が原因との見方を示している。また, 一般的に流通しているダイズ品種の種皮表面には pit また

は pore と表現される微小な凹みが存在しており, これが吸水特性に寄与しているとの指摘も以前からある (Calero ら 1981)。ダイズ種子が石豆となる要因が, 以上に挙げたものの何れであるかの結論はいまだ明確ではないが, 通水経路は細胞レベルや分子レベルの構造物 (例えばイオンチャネルなど) ではなく, 種皮に存在する微細な空隙構造によるものである可能性の高いことがうかがえる。実際に, 種子の物理的休眠打破のために種皮に傷をつける (scarification) のが有効であることは広く知られており, ダイズにおいても非吸水性の種子表面を紙ヤスリで擦過することにより, 吸水性を回復させて発芽試験を行う例がみられる (Noodén ら 1985, Heatherly ら 1994)。

一方, 日本国内での石豆に関する知見は, 発生件数などのデータを含めてほとんど存在せず, 欧米と比較して研究が遅れていると言わざるを得ない。ダイズ加工利用上のニーズとして, 加工前に石豆を自動選別する技術が求められているが, 正常粒と比較しても外観上の違いがわからないため, 加工前の自動選別はいまだに実現していない。そのため, 加工品生産現場における当座の対応として, 吸水後の種子サイズの違いを利用してふるい分ける装置を導入している企業もあるが, 高額な導入コストの発生などの問題を抱えている。

著者らはダイズの物理的休眠機序を考慮する際の指針として, 国内で流通している大部分のダイズ種子にみられ, かつ成熟過程において形成される種皮構造上の特性が重要



第1図 種子形状測定部位.

であると考え、種皮表面の微小な凹みに着目して石豆発生機序の解析を行っている。その過程において、平成17年産タチナガハ（栽培地：埼玉県）中に確認された石豆について、種皮表面の三次元的な微細凹凸構造を調査した結果、正常粒との顕著な差異を発見したので報告する。

材料と方法

1. 材料

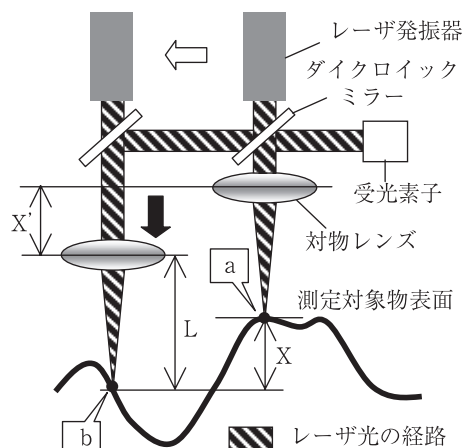
納豆の原料用として納豆製造業者に納入された平成17年埼玉県産タチナガハにおいて、蒸煮工程を経た後の目視検査により石豆が多数発見されたロットから、未使用原料500g（百粒重：25.2g）を採取して供試した。原料の種子水分は、種子10粒を135℃で3時間乾燥し、乾燥前後の重量差を湿重量で除した値の百分率である湿重量%で、平均10.4%と推定された。以降で示される種子水分量は、全て同じ要領で測定した湿重量%で表した。

2. 石豆の抽出方法

200 mL ビーカーに水道水100 mL と約50 g のダイズ種子を入れて10分間室温（25℃）下で浸漬した時点で、目視により種皮のシワや膨潤などの形態変化が生じていない種子を石豆の可能性のある種子として抽出し、これを24時間室温下で浸漬して形態変化の現れなかった種子を石豆とした。残りの原料は正常粒とみなし、樹脂バットに広げて室温下で24時間乾燥し、目視で裂皮のないものを選択して観察に供試した。乾燥後の種子水分は、平均11.6%と推定された。

3. 種子および種皮の形態測定

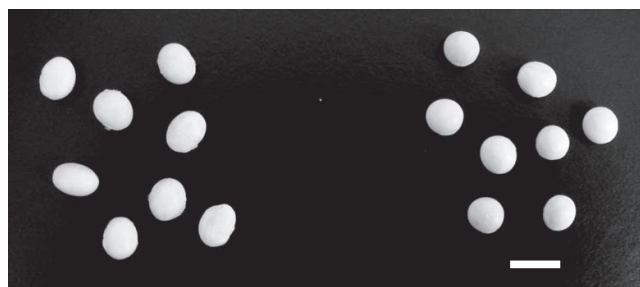
石豆の形状特性を調べるため、粒重と、ダイズ種子粒形区分（斉藤ら1980）に従って、第1図に示した種子の長さ、幅、厚さを、0.1 mm の精度でノギスにより測定した。種皮表面の微細構造ならびに種皮厚の測定には、レーザ走査型三次元微細形状計測顕微鏡（VK-8510、株式会社キーンズ製、以下では形状計測顕微鏡と略す）を用いた。この顕微鏡による三次元微小形状の測定原理を第2図に示した。実際の測定では、落射方式で対物レンズから測定対象物表面に照射される赤色レーザ光が、内蔵のガルバノミラーにより観察対象物表面を二次元的に走査するため、レーザ光源の移動なしに対象物の凹凸形状ならびに寸法を計測・記録している。このように、本測定手法では測定対



第2図 レーザ走査型三次元微細形状計測顕微鏡による形状の測定原理図.

表面形状の測定原理を単純化して説明するため、レーザ発振器（OS）、ダイクロイックミラー（DM）、及び対物レンズ（OL）が一体となったモジュール（OM）が測定対象物を二次元的に移動して、測定対象物表面を走査する機構に基づいた測定例を示す（実際の顕微鏡の構成とは異なる）。OSから射出されたレーザ光は、DMを透過したのち、OLにより集光されて対象物に照射される。一方、対象物からの反射光は照射光と同じ経路を逆方向にたどり、DMで反射されて受光素子（PD）に入射される。このとき、対象物がOLの焦点距離（ L ）と等しい位置にある場合には、単位面積あたりの照射光量と反射光量が最大となる。したがって、OLを上下に動かしながら反射光量を常にPDでモニタリングすることにより、反射光量が最大となるOLの位置を決めることができる。測定対象物表面上の2点間の高さの差（ X ）を測定する場合、はじめにa点で照射光量が最大となるようにOLの位置が求められ、続いてOMが白矢印の示す方向に動いてb点に移動し、a点と同じ測定動作を行うことにより、OLが黒矢印方向に移動する。これにより、a点とb点におけるOLの位置の差（ X' ）を求めることができる。 L は常に一定であることから、 $X=X'$ の関係が成り立つため、 X' をa点とb点の高さの差として用いることができる。以上の動作を、OMが測定対象物表面全体を二次元的に走査しながら行うことにより、基準点に対する高低差データの詳細な二次元マップ（すなわち三次元形状データ）を作成できる。

象物からの反射光量が最大となるように対物レンズの位置制御がなされている。そのため、仮に表面を被覆している透明な化学物質が存在していても、当該物質表面において反射光量が必ず最大となることから、本測定手法では仮定された当該物質の存在をも含んだ種子表面形状を測定していると言える。以上の測定原理による観察方法は、従来の微細構造観察手法に対していくつかの利点を有している。たとえば電子顕微鏡観察で微細構造の深さ（高さ）方向寸法を正確に計測するためには、構造物の側面（切断面）の観察画像取得が不可欠である。一方、形状計測顕微鏡は画像のコントラストや鮮明さにおいて電子顕微鏡に劣るが、電子顕微鏡観察の試料作製に通常用いられる組織固定や切片の調製、金属薄膜コーティングなどの操作を対象物に施すことなく微細構造の深さ（高さ）を測定できる点におい



第3図 水道水に浸漬処理したのちのタチナガハで認められた石豆（左）と正常粒（右）。スケールバーは1 cm。

て優れている。また、従来の電子顕微鏡観察では試料を真空中に置くことから、高水分の未固定組織観察の場合には急激な乾燥による組織の亀裂や収縮が懸念されるが、形状計測顕微鏡観察は大気圧下で行えるため、高水分組織の微細構造観察も可能である。

種子の成熟に伴って現れる種皮表面の微小な凹凸の計数に際しては、20倍対物レンズ、白黒超深度モード、深度方向移動ステップ1 μm にて最大深度50~80 μm 、走査範囲0.5 mm \times 0.7 mmの設定で三次元構造を記録した。記録データは、高低画像表示モードにおいて深度情報を256階調でモノクロ階調表示した二次元平面画像で表され、最大輝度の画素に対して輝度の低い画素ほど深度差が大きい地点であることを表す。この画像モードにおいてランダムに選択した微小な凹み（以下では、既往の知見に基づいてporeと称する）の最大径と深さを計測モードで読み取るにより、深度データと表示画像の濃淡との関係を把握できる。予備的な実験により、正常粒では濃淡差の大きなporeは深さ10 μm 以上である場合が大多数であったので、高低画像に基づいて深さ10 μm 以上のporeを抽出・計数した。ただし、濃淡差の強弱は測定箇所の種子表面の曲率に応じて変化する最大深度によっても異なるため、個別の画像毎に3箇所のpore深さを計測して、濃淡差と深さとの関係を確認した上で抽出・計数を実施した。石豆についても、同様の方針で高低画像から深いporeの抽出・計数を実施した。種子毎の深いpore数は、2枚の子葉中央部分をそれぞれ一箇所ずつ計数した数値の平均で表した。光学像はカラー超深度モード（深度データに基づいて撮像素子の合焦点画素のデータを合成した画像表示モード）により得られた画像を用いた。この機能により、総合倍率100倍以上の実体顕微鏡による種子表面観察において問題となる、曲面での合焦点視野の減少（焦点のあっている領域が顕微鏡視野よりも狭くなる現象）を回避している。以上の測定に加えて、さらに詳細にpore形状を測定する際には50倍対物レンズを使用し、深度方向移動ステップ0.1 μm での測定を行った。

種皮表面の微細構造の形態観察は、過去の報告（Caleroら1981, Yaklichら1986, Hillら1986a, Kulik and Yaklich 1991, Maら2004）において走査型電子顕微鏡を用いて行

第1表 石豆と正常粒の形態測定データ。

	正常粒	石豆	t検定
粒重 (g)	0.24 ± 0.02	0.32 ± 0.02	**
厚さ (mm)	6.07 ± 0.41	6.80 ± 0.33	**
幅/長さ	0.97 ± 0.04	0.79 ± 0.04	**
厚さ/幅	0.79 ± 0.05	0.90 ± 0.04	**

標本数：8粒。平均値 \pm 標準偏差で表示。**は1%水準で有意差あり。

われてきた経緯がある。そのため本報においても、正常粒および石豆の従来手法による微細構造形態を例示するため、低真空走査型電子顕微鏡（ABT-32、株式会社トプコン製）により、加速電圧15 kVにて観察を行った。電子顕微鏡観察用の試料調製方法はYaklichら（1986）の方法に従い、種子を乾燥剤入りのデシケーター内で24時間静置した後、イオンスパッタリング装置（JFC-1100 E、日本電子製）を用いて種子表面に金-パラジウム薄膜コーティングを施した。

4. 吸水特性測定

24ウェル細胞培養ディッシュ（ポリスチレン製、1ウェル容量：3.5 mL、ウェル直径：16 mm、ナルジェヌンクインターナショナル製）の各ウェルに蒸留水1 mLと種子1粒を入れ、経時的な粒重変化を測定した。各ウェルの種子を傷つけないように1時間毎に取り出して、柔らかい紙タオルを種子に軽く押し当て、表面の余分な水分を除いてから精密天秤（AG104、メトラー製）にて粒重を0.001 gの精度で秤量した。種子の吸水指標には、Maら（2004）と同様に吸水前粒重で粒重増加分を除いた値を「比吸水量」として用いた。

5. 吸水性回復処理

市販のダイヤモンド砥石（荒研ぎ用、外形25 mm \times 150 mm \times 50 mm）の上に石豆を置き、1粒ずつ人差し指で軽く押さえながら砥石上を3回転させることにより、種皮表面に微小孔を形成した。

結果と考察

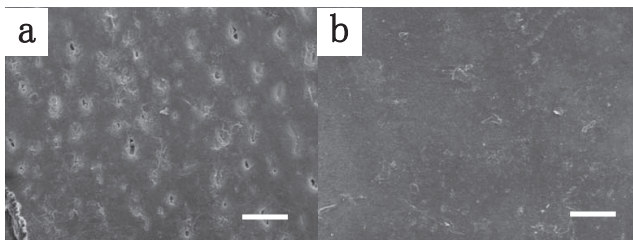
1. 種子形状の比較

水道水への浸漬処理により500 gの試料から18粒の石豆種子が抽出された。第3図に示したように、正常粒はほぼ円形で中央が盛り上がった凸レンズ型をしていたのに対して、石豆はわずかに正常粒よりもサイズが大きく、かつ長く厚みのある俵型の種子形状であった。正常粒と石豆では目視による種子形状の違いが顕著であったことから、正常粒と石豆それぞれ8粒をランダムに取り出して形状測定を実施した（第1表）。ダイズ粒形区分による幅と長さの比、および厚さと幅の比の両指標から、正常粒は偏球なのに対して石豆は長楕円体と判定された。正常粒と石豆の各形態

指標における平均値の差の検定 (t 検定) を実施した結果、すべて 1% 水準で有意となり、石豆には形態上の特徴のあることが定量的に示された。

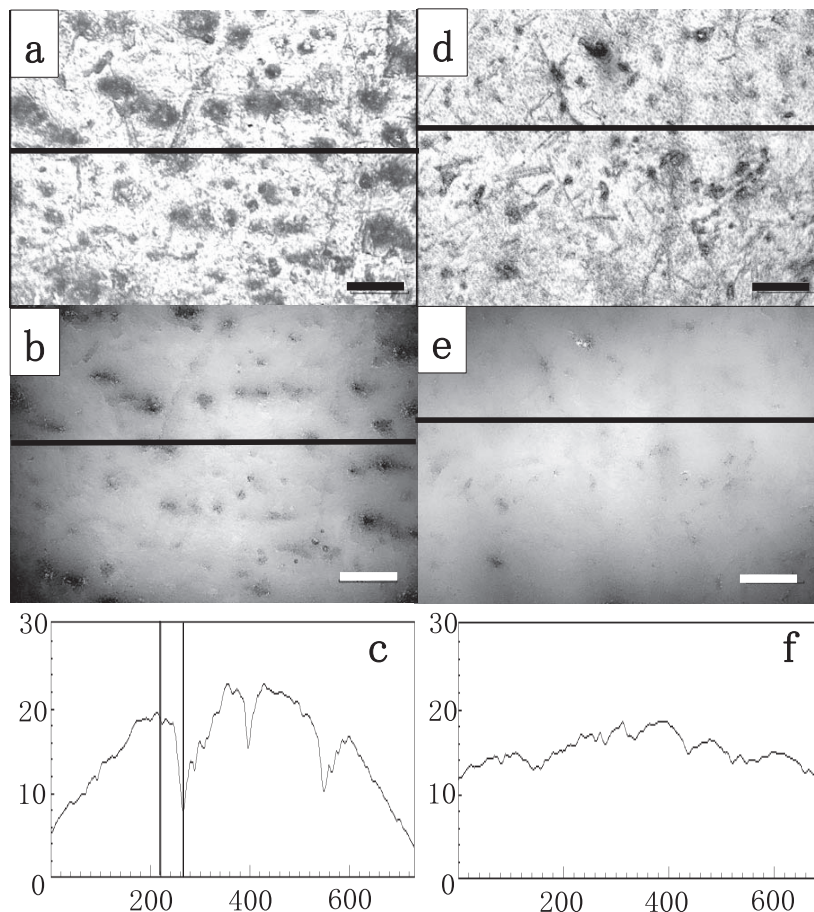
2. 正常粒と石豆の種皮微細構造比較

高倍の実体顕微鏡観察に相当する拡大率 120 倍による走査型電子顕微鏡観察では、正常粒の種皮表面 (第 4 図 a)



第 4 図 種皮表面微細構造の走査型電子顕微鏡画像 (拡大率 120 倍).
a) 正常粒. b) 石豆. スケールバーは 100 μm .

に多数の pore とみられる凹状構造が確認されたのに対して、石豆種皮表面 (第 4 図 b) は過去の報告例 (Calero ら 1981, Yaklich ら 1986, Hill ら 1986a, Kulik and Yaklich 1991) と同様にほぼ平滑であった。同様に、形状計測顕微鏡による正常粒の光学像においても、凹状構造に相当するとみられる濃淡の濃い部位が多数観察された (第 5 図 a)。一方、同じ箇所を形状計測顕微鏡の高低画像で確認すると、光学像で観察された凹状とみられる部位は、確かに周囲よりも大きく凹んだ深い pore であることを示す楕円形の低輝度パターンが多数認められた (第 5 図 b)。画素の輝度パターンが実際の高低差を反映していることを明示するために、高低画像中の水平直線部分に関して、縦軸を深さ、横軸を位置座標として形状プロファイルをグラフ化し、実際に低輝度部分が高輝度部分に比べて低くなっていることを定量的に示した (第 5 図 c)。球面状の種皮表面を測定しているために、高低画像においては中央部が相対的に高く (明る



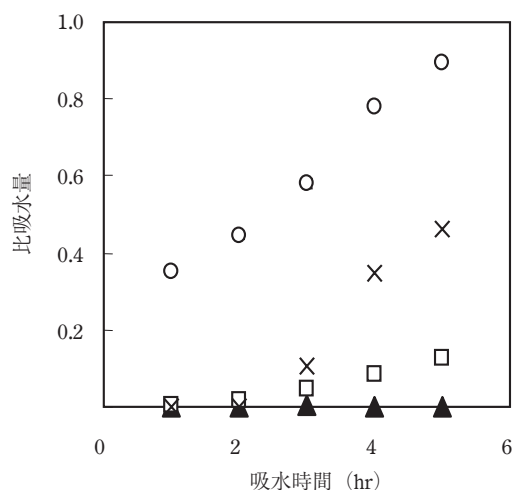
第 5 図 石豆と正常粒の種皮表面微細構造比較。

a) 正常粒の光学像. b) a) と同一部位の深度情報をモノクロ 256 階調データに変換して表示した高低画像. c) a) および b) に示された黒い水平線部分の形状プロファイルグラフ。縦軸は深さ、横軸は距離を表し、単位は μm 。図中に表示された 2 垂線の位置におけるプロファイル上の高低差は 11.7 μm である。d) 石豆の光学像. e) d) と同一部位の高低画像. f) e) および d) に示された黒い水平線部分の形状プロファイルグラフ。縦軸は深さ、横軸は距離を表し、単位は μm 。a, b, d, e のスケールバーは 100 μm 。

第2表 石豆と正常粒の種皮表面 0.35 mm^2 あたりに存在する深さ $10 \mu\text{m}$ 以上の pore 数.

	正常粒 (吸水前)	正常粒 (吸水後)	石豆
pore 数	$37.4 a \pm 3.0$	$44.8 b \pm 6.7$	$3.2 c \pm 3.2$

標本数: 8 粒. 平均値 \pm 標準偏差で表示. 平均値に付加された異なる英小文字は, 最小有意差法により pore 数の平均値間に 1% 水準で有意差のあることを表示.



第6図 石豆の比吸水量の経時変化.

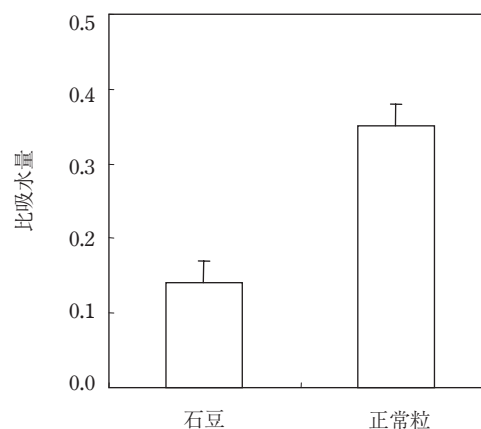
比吸水量は吸水前粒重で粒重増加分を除いた値で表示.

○: 正常粒の吸水特性. 標本数: 10 粒. ▲, ×, □: 石豆の吸水特性例. 石豆の吸水特性は種子ごとに異なるため, 例として個別の特性を示した.

く), 周縁部は低く (暗く) なることがグラフからも読み取れる. このグラフにおいて, 最も深い pore の種皮内への陥入深さは $11.7 \mu\text{m}$ であった. 伊藤ら (1993) は, 種皮厚の大きな品種の平均的な種皮厚が $100 \mu\text{m}$ 前後であると報告していることから, 正常粒の深い pore は種皮厚の 1 割以上の深さに達する場合があると推察された.

一方, 石豆の光学像では, 正常粒にみられた濃淡の濃い部位は少なく, pore と思われる円形で小さな暗点が散見された (第5図 d). 高低画像 (第5図 e) においてもほとんど濃淡差の見られない像であることから, これらの暗点は周囲との高低差がわずかな浅い pore または傷であることが示唆された. 実際に形状プロファイルグラフ上では, 光学像において濃淡差が周囲よりも大きいために pore と判定される可能性のある部位であっても, 最深部の深さは約 $4 \mu\text{m}$ であった. 以上の観察結果から, 石豆においては光学像の上で pore が存在しているようにみえても, 実際には正常粒ほど種皮に陥入しておらず, 浅いものが多いと推察された. 特に, 光学像では反射光量が少なければ深さに関係なく画像が暗くなるため pore の判定が難しく, 光学像はあくまでも pore 性状の大まかな指標にしか使えない可能性のあることが示された.

正常粒と石豆の表面微細構造上の比較により, 光学像においても高低画像においても, 正常粒と石豆の pore 密度



第7図 吸水性回復処理後の石豆と正常粒の比吸水量 (1時間浸漬後). 比吸水量は吸水前粒重で粒重増加分を除いた値で表示. 標本数: 10 粒. バーは標準誤差を表す.

と深さの違いは歴然としていることが定量的に示された. この観察結果に基づいて, 形状測定に供試した正常粒ならびに石豆各 8 粒について, $10 \mu\text{m}$ 以上の深さがあると認められる pore を高低画像上で確認しながら計数した. 加えて, 種皮の吸水による種皮伸展の影響を加味するため, 前掲の種子形状の比較結果に基づいて正常粒と推定される未吸水種子 8 粒について pore 密度計数を同様に実施した. 測定の結果, 吸水前の正常粒では平均 37.4 個, 吸水後の正常粒では平均 44.8 個であったのに対し, 石豆では 3.2 個であった (第2表). 3 群の計数結果は一元配置法の分散分析において有意であり ($F = 186.96^{**}$), 計数結果から求められた 1% 水準の最小有意差 L.S.D. (0.01) は 3.95 であったことから, 3 群の平均値間の差はすべて有意であった. 以上の結果から, 正常粒と石豆の種皮微細構造上の大きな差異は, pore 密度とともにその深さにあることが定量的に示されたとともに, 正常粒においては種皮吸水に起因する pore 密度の増加が示唆された.

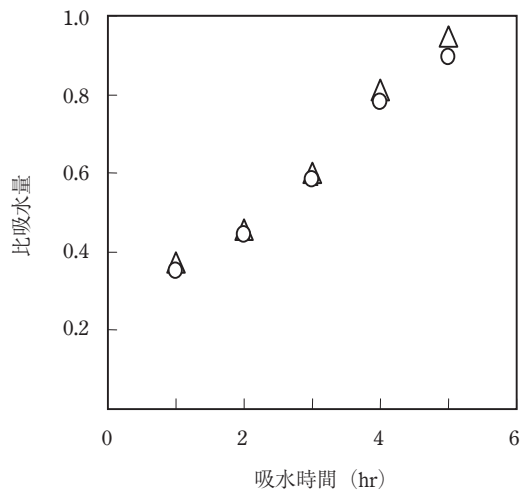
3. 石豆の吸水特性

第6図に, 石豆と判定された種子を再度水に浸漬して 1 時間毎に比吸水量を測定した結果を示した. 完全に非吸水性の石豆 (図中データシンボル ▲) では観察期間中の吸水は認められなかったが, 石豆として抽出された種子であっても何らかの要因によって自然に吸水性が回復する種子も見られた (図中データシンボル ×, □). ただし, 吸水性が回復するまでの時間や吸水性回復後の比吸水量上昇曲線

の傾きに、種子毎の差がみられた。この原因は明らかではないが、粒重秤量の際に行った種子表面の水分除去操作によって浸漬・乾燥が繰り返されて機械的ストレスが種子表面にかかり、結果として通水経路の形成につながる微小亀裂が種皮に生じた、などの要因が考えられた。

4. 石豆の吸水性回復処理

吸水特性測定に使わなかった残りの石豆種子 10 粒に吸



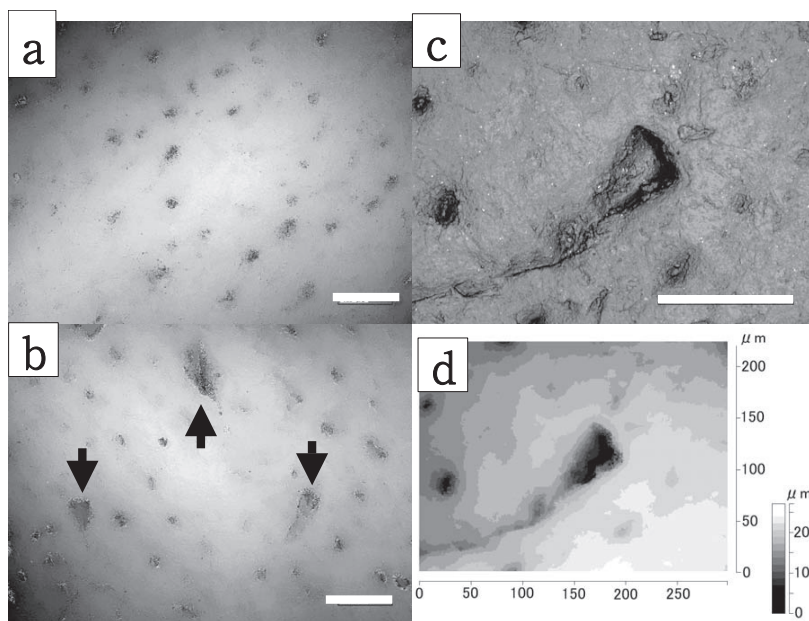
第8図 吸水性回復処理を施した正常粒の比吸水量の経時変化。

比吸水量は吸水前粒重で粒重増加分を除いた値で表示。全表示データの標準誤差は 0.05 以下。

○；無処理。△；処理。標本数：各 10 粒。

水性回復処理を施したところ、浸漬開始 1 時間後の比吸水量はすべて 0 以上、平均で 0.14（正常粒の持つ吸水能力の 40% 程度）まで回復した（第 7 図）。これにより、本報で調査した石豆についても、種皮に物理的ダメージを加えて通水経路を形成することにより、石豆に吸水性を回復させることができることを明らかにした。一方、正常粒に対して吸水性回復処理を施して吸水特性を調べたところ、正常粒に関しては、処理を施しても吸水特性にほとんど影響を与えないことが示された（第 8 図）。以上の結果から、石豆を含んだ原料種子すべてに吸水性回復処理を施しても、正常粒の吸水特性には影響を与えずに石豆の吸水性回復を図ることができる可能性が示された。

正常粒種皮表面の処理前と処理後の高低画像（第 9 図 a, b）から、吸水性回復処理によって処理前にはみられなかった三角形の凹みが形成された以外には、大きな亀裂などの種皮への表面的なダメージは認められなかった。処理によって新たに生じた凹みを 50 倍対物レンズにより拡大観察したところ、光学像（第 9 図 c）では凹みの底の部分が光って発射しやすいために深さが判断できなかったが、高低画像（第 9 図 d）では、凹み周辺部と最深部との高低差が 20 μm 以上あることが確認できた。測定モードによる実測値では、ダイヤモンド砥石に種子を押し当てることによってダイヤモンド粒子の角が種皮表面に食い込んで生じた凹みの深さは最深部で 24 μm であった。Ma ら（2004）の報告で示された品種 Williams の柵状細胞層の光学顕微鏡写真などから、この層の厚さは 40 μm 程度と見積もられ、タチナガハにおける柵状細胞層の厚さもほぼ同等と考えられた。



第9図 吸水性回復処理を施した正常粒の種子表面微細構造変化。

a) 処理前の正常粒における種子表面微細構造。b) 処理後の正常粒の種子表面微細構造。矢印はダイヤモンド粒子により形成された陥没孔。c) 陥没孔の高倍観察による光学像。d) c) と同一部位の深度情報をモノクロ 256 階調データに変換して三次元グラフィックス表示した高低画像。a~c のスケールバーは 100 μm を表す。

また、この層は組織が稠密でリグニンなどの疎水性の高い物質が細胞壁に蓄積していると考えられており (Rolston 1978), 吸水性回復処理によって形成された凹みがこの層に十分陥入していない場合には通水経路が確保されない可能性が高い。したがって以上に示された回復処理の効果は、凹みが種皮を貫通するには至っていないが、柵状細胞組織層まで達する開口部が生じると同時に、圧迫によってさらに下の層まで達する亀裂が生じた結果であることが推察された。

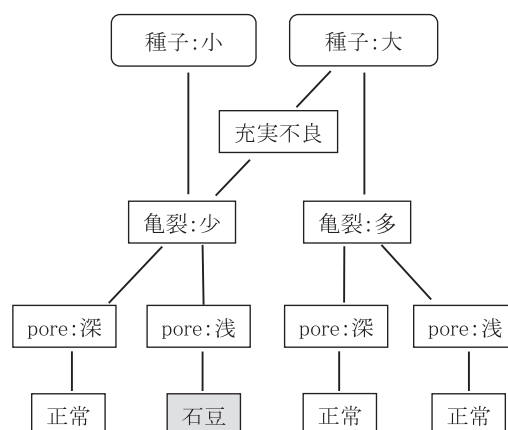
5. 非吸水性ダイズ種子と種皮の pore 性状について

ダイズ種子の非吸水性と pore 性状との関連については、Yaklich ら (1986) の走査型電子顕微鏡を用いた先駆的な研究がある。彼らの知見によると、成熟した種子表面に見られる pore の有無や密度は品種特性に起因する部分もあるが、種子成熟過程における pore の形成は多くの品種で種皮形成過程の一環として生じていると考えられている。加えて、成熟種子であっても pore の認められない、あるいは pore が存在していても非吸水性を示す品種においては、種子成熟の最終段階に莢の内果皮から分泌される物質が pore の閉塞に関与している可能性などが示唆されている。

本報で示された pore 性状と石豆との関連と従来知見との違いは、石豆種皮表面の単位面積あたりの深さ $10\ \mu\text{m}$ 以上の pore 数が正常粒に比べて 10 分の 1 以下と、顕著な差が認められることを明らかにした点にある。ただし、第 1 表に示した種子サイズの違いを考慮すると、正常粒も石豆も本来は同じ数の pore が種皮上に存在するが、石豆の種子サイズが正常粒よりも大きいために、相対的に単位面積あたりの pore 数が少ないとの解釈もあり得る。そのため、以下では種子を球と仮定して見積もられる種子表面積と pore 密度の関係から、この解釈が成り立たないことを示す。球体の面積・体積の公式から、種子半径が 2 倍になれば表面積は半径の 2 乗に比例するので 4 倍、体積は半径の 3 乗に比例して 8 倍になる。仮に正常粒が肥大化して pore 密度が見かけ上 10 分の 1 に減少したようにみえたとすれば、石豆は正常粒に比べて表面積が 10 倍、すなわち半径が 3 倍以上でなければならないが、これは第 1 表の結果と大きく異なる。以上の計算から、pore 密度の違いは石豆が正常粒よりも肥大化したためである、という単純な機構でないことが示された。

6. 種子サイズと石豆発生頻度

品種特性としての種子サイズと石豆発生頻度との関連性は従来から指摘されており、たとえば Hill ら (1986b) は、品種毎に比較した場合の種子サイズと非吸水性種子の発生頻度の間に負の相関をみだしている。同様に、Yaklich ら (1986) の報告にある非吸水性種子の頻発する品種もまた種子サイズは小さい傾向がみられる。さらに Hill ら (1986a) は、非吸水性種子が頻発する品種でも、栽培条件により種



第 10 図 種子サイズと石豆発生要因との関係仮説。

子サイズが大きくなると非吸水性を示す種子の割合が減少する傾向があると報告しており、その要因のひとつに裂皮種子発生頻度の高さをあげている。種皮の亀裂あるいは裂皮の発生要因については、品質指標として重視されていることから日本国内においても詳細な研究がなされており、子実肥大が良好な栽培環境で裂皮の発生が増加する傾向のあることが知られている (農林水産技術会議事務局 2002)。微小な亀裂の発生は栽培後の収穫・調製・貯蔵などに起因する場合もあるため、収穫前の特性である裂皮性と必ずしも同一の要因とは言えないが、微小な亀裂の発生が裂皮に至る要因であることは疑問の余地がない。したがって、裂皮性の高い品種、あるいは栽培条件による百粒重の変動が大きい品種では、石豆発生頻度は低いものと推察される。

7. pore 性状と非吸水性種子

既往の知見に基づき、非吸水性種子となるための物理的要件の観点から、品種特性としての種子サイズと裂皮発生要因との関連性に絞り、pore 性状を加味した石豆発生機序についての仮説を第 10 図にまとめた。単純化のため、この図では石豆が発生しやすい種子特性を「pore が浅く (閉塞しやすく)、種皮の微小な亀裂が少ない特性である」と定義した。また、納豆用として使われている、百粒重が 10 g 前後の小粒 (極小粒を含む) 品種では裂皮の発生が少ないことが知られており、小粒品種は品種特性として過剰な子実肥大が起こりにくいと解釈した。この図に基づくならば、種子サイズの大きな品種は子実肥大不良の場合だけ石豆の発生する可能性があるのに対し、種子サイズの小さい品種では、pore の閉塞条件 (未知) が満たされていれば、石豆の発生する可能性が常に存在すると解釈できる。本報で調査したタチナガハは、品種特性的には種子サイズが大きな範疇に属しながら、供試サンプル全体の傾向として形状が球型よりも凸レンズ型に近く、長野県の栽培試験成績 (長野県農政部 2003) に示された百粒重 (37.7~39.6 g) よりもかなり低かったことから、子実肥大不良とみなせる

状態であった。この要因に加えて、当該石豆種子には何らかの要因が作用した結果、特異的に pore の閉塞が生じたものと推察される。

以上のように、pore 性状の解析は石豆の発生要因解析に新たな指針を提供しうるが、石豆の選別・除去の観点からは、pore 密度と深さの計測に基づいた石豆判定指標は、加工前の石豆選別指標として不完全と言わざるを得ない。その理由として、環境要因によっては pore がなくても吸水を確保できる微小な亀裂が種皮に多数発生する可能性があり、そのために本来石豆になるはずの種子であっても石豆にならないケースがありうる点があげられる。しかし現状では、微小亀裂の確認のために種子全体をくまなく調べる手法は存在せず、亀裂発生の予測自体も困難である。したがって石豆の選別除去には、pore 性状の判別と同時に、亀裂の有無を簡易に判別する手法の開発が求められる。一方、石豆発生機序の解明には、pore 閉塞のメカニズムと品種特性や栽培条件との関連解明が不可欠であり、そのためには亀裂発生機序の効果を排除した上で pore 性状を調べる手法が有効である。これは、吸水特性の違いに基づいた従来の石豆検定法では不可能であり、pore 性状の解析技術が石豆研究用ツールとして有効活用されることが望まれる。

本報では主に石豆の負の側面が強調されているが、世界的には、非吸水性の種皮構造が菌類などの種皮表面からの侵入に対する防壁にもなりうるとの知見 (Kulik and Yaklich 1991) や、貯蔵特性を改善するとの知見 (Heatherly ら 1994) のように、生産上利用可能な正の側面も指摘されている。さらに生物の生存戦略としての視点から、被子植物一般に種子が非吸水性であることによって様々な環境変動に対して種としての存続が確保されとの考え方も古くから存在している (Rolston 1978)。ダイズの石豆は、生理的休眠ではなく物理的休眠であり、種皮を傷つけて吸水性を回復させることにより正常に発芽することは、これまでに挙げた欧米での石豆研究事例においてすでに確認されている。したがってダイズの安定生産という観点からも、耐環境性や耐病性に優れた石豆性を持つ品種に対して、全粒に吸水性回復処理を施して栽培するという選択があり得るかも知れない。また、石豆が加工利用上忌避される理由は吸水をコントロールできない点にあるので、品質に影響なく技術的にコントロール可能となれば石豆性の品種であっても問題ないことは言うまでもない。以上の視点に立つならば、石豆に吸水性を回復させるための、より洗練された効率のよい機械的処理装置ならびに処理方法の開発もまた、今後の重要な課題である。

謝辞：ダイズ育種の観点から本研究のご指導をいただき

ました。作物研究所大豆育種研究チーム羽鹿牧太首席研究員、ならびに高橋浩司主任研究員に、この場をお借りして御礼申し上げます。

引用文献

- Baskin, J. M., C.C. Baskin and X. Li 2000. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biol.* 15 : 139 – 152.
- Calero, E., S.H. West and K. Hinson 1981. Water absorption of soybean seeds and associated causal factors. *Crop Sci.* 21 : 926 – 933.
- Heatherly, L.G., M.M. Kenty and T.C. Kilen 1994. Effects of storage environment and duration on impermeable seed coat in soybean. *Field Crops Research* 40 : 57 – 62.
- Hill, H.J., S.H. West and K. Hinson 1986 a. Effect of water stress during seedfill on impermeable seed expression in soybean. *Crop Sci.* 26 : 807 – 812.
- Hill, H.J., S.H. West and K. Hinson 1986 b. Soybean *Glycine-max* seed size influences expression of the impermeable seed-coat trait. *Crop Sci.* 26 : 634 – 637.
- 伊藤美環子・中村茂樹・高橋浩司 1993. 大豆品種の種皮の厚さ。日作東北支部報 36 : 75 – 77.
- Kulik, M.M. and R.W. Yaklich 1991. Seed physiology, production & technology – Soybean seed coat structures; relationship to weathering resistance and infection by Fungus *Phomopsis phaseoli*. *Crop Sci.* 31 : 108 – 113.
- Ma, F., E. Cholewa, T. Mohamed, C.A. Peterson and M. Gijzen 2004. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Ann. Bot.* 94 : 213 – 228.
- 松永亮一・高橋将一・小松邦彦・羽鹿牧太・酒井真次・異儀田和典・中澤芳則 2002. ダイズ新品種「すずおとめ」の育成とその特性。九州沖縄農研報 42 : 31 – 48.
- 長野県農政部 2003. 主要穀類等指導指針第8版。253.
- Noodén, L.D., K.A. Blakley and J.M. Grzybowski 1985. Control of seed coat thickness and permeability in soybean. *Plant Physiol.* 79 : 543 – 545.
- 農林水産技術会議事務局 2002. 農林水産研究文献解題 27. 大豆 自給率向上に向けた技術開発。農林統計協会、東京。547.
- 織茂良和 2005. 表皮に傷を付けた丸大豆及びその利用。公開特許公報特開 2005 – 304409.
- Rolston, M.P. 1978. Water impermeable seed dormancy. *Botanical Review* 44 : 365 – 396.
- 斉藤正隆・大久保隆弘・橋本鋼二・西入恵二・砂田喜与志・熊野誠一・大場寅雄 1980. ダイズの生態と栽培技術 第1版。農山漁村文化協会、東京。61.
- 平春枝 1992. 納豆・煮豆用大豆の品質評価法。食料その科学と技術 30 : 153 – 168.
- Yaklich, R.W., E.I. Vigil and W. P. Wergin 1986. Pore development and seed coat permeability in soybean. *Crop Sci.* 26 : 616 – 624.

Property of the Surface Structure of the Impermeable Seed Coat of Soybean : Kazunori OTOBE^{1,3)}, Kuniaki YOSHIOKA^{2,3)} (¹⁾*Nat. Agric. Food Res. Org. Nat. Agric. Res. Ctr., Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan;* ²⁾*Nitto Foods Co. Ltd. ;* ³⁾*Univ. of Tsukuba*)

Abstract : Impermeable soybean seeds commonly referred to as 'Ishimame' in Japan are undesirable for the soybean food industries. The trait is widely accepted as a physical dormancy and its mechanism is considered as a difference in microstructure of the seed coat, which functions as a barrier to water and gases. We have hypothesized that the topography of pores in the seed coat plays an important role in water uptake. The topographic differences in pores between the permeable and the impermeable seeds were investigated by using a digital imaging microscope equipped with laser profiling system. On the permeable seeds, 44.8 pores with a 10 μm depth and width were counted in 0.5 \times 0.7 mm of the coat surface, whereas only 3.2 pores were found on the impermeable seed coat. To clarify the effect of the pores on the permeability, depth-controlled depressions (pores) were formed on the impermeable seed coat by using a commercial diamond whetstone. Pores with depths of ca. 20 μm were sufficient to restore the impermeable seeds to the permeable ones. The permeable seed coat had pores that reached the palisade layer of the coat. The pores are suggested to the major pathways for the water uptake.

Key words : Impermeable seeds, Microstructure, Pore, Seed coat, Soybean.
