

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年7月28日(28.07.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/158583 A1

(51) 国際特許分類:

A01H 6/54 (2018.01) *A23L 33/115* (2016.01)
A01H 1/02 (2006.01) *A61K 36/48* (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01) *A61P 3/02* (2006.01)
A23K 10/30 (2016.01) *C12N 15/29* (2006.01)
A23L 33/00 (2016.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/002307

(22) 国際出願日: 2022年1月14日(14.01.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-007795 2021年1月21日(21.01.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人佐賀大学 (SAGA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8408502 佐賀県佐賀市本庄町1番地 Saga (JP). 株式会社J-オイルミルズ(J-OIL MILLS, INC.) [JP/JP]; 〒1040044 東京都中央区明石町8番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 穴井 豊昭 (ANAI, Toyoaki); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡7-4-4 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 渡邊 啓史 (WATANABE, Satoshi); 〒8408502 佐賀県佐賀市本庄町1番地 国立大学法人佐賀大学内 Saga (JP). 牧田 成人 (MAKITA, Naruto); 〒1040044 東京都中央区明石町8番1号 株式会社J-オイルミルズ内 Tokyo (JP). 岡部 遼 (OKABE, Ryo); 〒1040044 東京都中央区明石町8番1号 株式会社J-オイルミルズ内 Tokyo (JP). 荒井 尚志 (ARAI, Hisashi); 〒1040044 東京都中央区明石町8番1号 株式会社J-オイルミルズ内 Tokyo (JP). 肥山 恵理奈 (HIYAMA, Erina); 〒1040044 東京都中央区明石町8番1号 株式会社J-オイルミルズ内 Tokyo (JP). 佐野 貴士 (SANO, Takashi); 〒1040044 東京都中央区明石町8番1号 株式会社J-オイルミルズ内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: SOYBEANS HAVING LOW FURANIC ACID CONTENT

(54) 発明の名称: 低フラン酸ダイズ

(57) Abstract: Provided are: modified soybeans having a reduced furanic acid content in the oils and fats contained in the soybeans; and uses of the modified soybeans. The present invention relates to modified soybeans in which the content ratio of furanic acid in the oils and fats contained in the soybeans has been reduced by genetic mutation.

(57) 要約: ダイズに含まれる油脂中のフラン酸含有量が低減された改変ダイズ、及びその用途等を提供する。本発明は、遺伝子変異によりダイズに含まれる油脂中のフラン酸の含有割合が低減された改変ダイズである。



WO 2022/158583 A1

明 細 書

発明の名称

低フラン酸ダイズ

5

技術分野

[0001]

本発明は、ダイズに含まれる油脂中のフラン酸含量が低減された改変ダイズ等に関する。

10

背景技術

[0002]

ダイズは、世界的に主要な植物由来の食用油脂供給源である。油脂に含まれる脂肪酸の組成は、油脂の品質に直接的な影響を与えるため、ダイズにおいても脂肪酸組成の改変が品種改良の主要な課題となっている。

15

一般に、食用油脂は、光や熱等によって劣化し、風味上問題になる臭いが発生する。特にダイズ油脂は、光の存在下で「明所臭（あるいは「曝光臭）」と呼ばれる特有の臭いを発生したり、加熱調理等による「加熱臭」を発生したりする。そのため、ダイズ油脂を高い割合で含む食用油脂、あるいは、ダイズ油脂を含む食品等は、賞味に耐えうる品質を保証することができないとの指摘がある（特許文献1）。こういった明所臭や加熱臭の発生の要因としては、ダイズ油脂を構成する脂肪酸組成中の「フラン酸（フラン脂肪酸）」の分解物であると考えられている。

20

[0003]

25

先行技術文献

特許文献1：特許第4290222号公報

発明の概要

[0004]

このような状況下において、ダイズに含まれる油脂中のフラン酸含量（フラン酸の産生量）が低減された改変ダイズ等の開発が望まれていた。

[0005]

5 本発明は、上記状況を考慮してなされたもので、以下に示す、改変ダイズ等を提供するものである。

（１）遺伝子変異によりダイズに含まれる油脂中のフラン酸の含有割合が低減された改変ダイズ。

（２）前記含有割合が０質量ppm以上２０質量ppm以下である、上記（１）に記載のダイズ。

10 （３）前記フラン酸が、３，４－ジメチルー５－ペンチルー２－フランノナン酸である、上記（１）又は（２）に記載のダイズ。

[0006]

（４）Glyma20g34340遺伝子及び／又はGlyma04g05690遺伝子に変異が導入されたものである、上記（１）～（３）のいずれか１項に記載のダイズ。

15 （５）前記遺伝子に導入された変異が、ミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異及びヌル変異からなる群から選択されるいずれかの変異である、上記（４）に記載のダイズ。

[0007]

（６）Glyma20g34340遺伝子に導入された変異が、

20 （i）該遺伝子によりコードされるタンパク質の第410番目のアミノ酸残基をコードするコドンの塩基に生じた変異、

（ii）該遺伝子によりコードされるタンパク質の第688番目のアミノ酸残基をコードするコドンの塩基に生じた変異、又は

25 （iii）該遺伝子の第17番目のエキソンとイントロンの境界に存在する塩基に生じた変異

である、上記（４）又は（５）に記載のダイズ。

[0008]

（７）前記（i）の変異が、グリシンのコドンからアスパラギン酸のコドンに置換される変異である、上記（６）に記載のダイズ。

(8) 前記(i)の変異が、Glyma20g34340遺伝子のcDNAにおける第1519番目の塩基であるG(グアニン)が、A(アデニン)に置換された変異である、上記(7)に記載のダイズ。

(9) 前記(ii)の変異が、アスパラギン酸のコドンからアスパラギンのコドンに置換される変異である、上記(6)に記載のダイズ。

[0009]

(10) 前記(ii)の変異が、Glyma20g34340遺伝子のcDNAにおける第2352番目の塩基であるG(グアニン)が、A(アデニン)に置換された変異である、上記(9)に記載のダイズ。

10 (11) 前記(iii)の変異が、Glyma20g34340遺伝子のmRNA前駆体における第7180番目の塩基であるG(グアニン)が、A(アデニン)に置換された変異である、上記(6)に記載のダイズ。

(12) Glyma04g05690遺伝子に導入された変異が、該遺伝子によりコードされるタンパク質の第64番目のアミノ酸残基をコードするコドンの塩基に生じた変異である、上記(4)又は(5)に記載のダイズ。

[0010]

(13) 前記変異が、アルギニンのコドンからシステインのコドンに置換される変異である、上記(12)に記載のダイズ。

20 (14) 前記変異が、Glyma04g05690遺伝子のcDNAにおける第483番目の塩基であるC(シトシン)が、T(チミン)に置換された変異である、上記(13)に記載のダイズ。

(15) フクユタカの改変ダイズである、上記(1)～(14)のいずれか1項に記載のダイズ。

[0011]

25 (16) 受託番号がFERM BP-22392であるLF65ダイズ。

(17) 受託番号がFERM BP-22413である16SN279ダイズ。

(18) 上記(1)～(17)のいずれか1項に記載のダイズ又はその処理物を含む、食品用、飼料用又は医薬組成物用の材料。

[0012]

(19) 上記(18)に記載の材料を含む、食品、飼料又は医薬組成物。

(20) 上記(1)～(17)のいずれか1項に記載のダイズから抽出されたダイズ油脂。

(21) 上記(20)に記載のダイズ油脂を含む、食品、飼料又は医薬組成物。

- 5 (22) 上記(1)～(17)のいずれか1項に記載のダイズ同士、又は当該ダイズと他のダイズ種とを交雑させることを含む、改変ダイズの製造方法。

発明の効果

[0013]

- 10 本発明により、ダイズに含まれる油脂中のフラン酸含量(フラン酸の産生量)低減された改変ダイズを提供することができる。当該改変ダイズ由来の食用油脂や当該食用油脂を含む食品等は、従来のダイズ油脂を含有するものとは異なり、ダイズ油脂特有の不快な明所臭が抑制され、加熱調理時等の加熱臭、特にダイズ油脂由来の刺激臭が抑制される。さらに、当該改変ダイズ由来の食用油脂は、従来のダイズ油脂よりも加熱時の粘度・色調・酸化上昇が抑制される。また、当該改変ダイズもしくは改変ダイズの処理物を含む食品等は、豆臭が抑制され良好な風味を有している。そのため、当該改変ダイズは有用性、実用性に優れたものである。
- 15

- 20 図面の簡単な説明

[0014]

[図1] フクユタカ(原品種)及び変異4系統(変異体1～4)のフラン酸含量(F3/内部標準(IS)×1000)を示す図(実施例1中の表1に示す結果に対応する図)である。

- 25 [図2] トヨシロメと変異体1の交雑によって得られた分離集団を用いた変異遺伝子の座乗領域の同定の概要を示す図である。

[図3] 低フラン酸含量の表現型を持つ変異体1～3に関する、Glyma20g34340遺伝子に見いだされたDNA多型・塩基多型を示す図である。

[図4] 低フラン酸含量の表現型を持つ変異体4に関する、Glyma04g05690遺伝子

(Glyma04G054100遺伝子)に見いだされたDNA多型を示す図である。

[図5A] 高融解度曲線を利用したPCRによる、変異体1 (#65) が持つダイズ20番染色体の42, 720, 119番目のDNA多型を対象にした遺伝子型判別の結果を示す図である。

- 5 [図5B] 変異体1 (#65) が持つダイズ20番染色体の42, 720, 119番目のDNA多型とフラン酸含量との関連を示す図である。

[図6A] 高融解度曲線を利用したPCRによる、変異体2 (16SN253) が持つダイズ20番染色体の42, 717, 581番目のDNA多型を対象にした遺伝子型判別の結果を示す図である。

- 10 [図6B] 変異体2 (16SN253) が持つダイズ20番染色体の42, 717, 581番目のDNA多型とフラン酸含量との関連を示す図である。

[図7A] 高融解度曲線を利用したPCRによる、変異体3 (16SN693) が持つダイズ20番染色体の42, 717, 998番目のDNA多型を対象にした遺伝子型判別の結果を示す図である。

- 15 [図7B] 変異体3 (16SN693) が持つダイズ20番染色体の42, 717, 998番目のDNA多型とフラン酸含量との関連を示す図である。

[図8A] 高融解度曲線を利用したPCRによる、変異体4 (16SN279) が持つダイズ4番染色体の4, 340, 379番目のDNA多型を対象にした遺伝子型判別の結果を示す図である。

- 20 [図8B] 変異体4 (16SN279) が持つダイズ4番染色体の4, 340, 379番目のDNA多型とフラン酸含量との関連を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015]

- 25 以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願2021-007795号明細書(令和3年(2021年)1月21日付け出願)の全体を包含する。また、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公

開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。

[0016]

1. 改変ダイズ

本発明においては、前述のとおり、遺伝子変異によりダイズに含まれる油脂中の
5 フラン酸の含有割合が低減された改変ダイズ（以下、「本発明のダイズ」又は「本発明の改変ダイズ」と称することがある）が提供される。

本発明において、「ダイズ」とは、ダイズの植物個体の全体又は一部を意味し、植物個体のほか、該植物個体の器官（種子等）、該植物個体由来の細胞又は細胞小器官などの部分構造体を意味する場合もある。

10 [0017]

本発明において、「遺伝子変異」とは、遺伝子組換えによる変異（遺伝子組換え技術による遺伝的性質の改変）であってもよいし、非遺伝子組換え型の変異、例えば、ランダム変異やゲノム編集等による変異であってもよく、限定はされない。
15 ロソメチル尿素、ニトロソメチルウレタン等）での処理、紫外線の照射による変異や、Diversify™ PCR法、エラープローン（Error-prone）PCR法、ローリングサークル型増幅（Rolling Circle Amplification: RCA）法、エラープローンRCA法、又は公知の各種ランダム変異導入キットなどを用いて導入する変異など、特に限定はされず、適宜採用することができる。

20 [0018]

また、上記の各手法により、遺伝子に導入される変異としては、例えば、ミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異及びヌル変異からなる群から
25 コドン内の塩基の変化又は置換により、そのコドンにコードされるアミノ酸の種類が変化する変異を意味する。また、「ナンセンス変異」とは、核酸配列のコドン内の変化又は置換により、そのコドンが終止コドンに変化し、そのコドンよりも3'側のORF領域が翻訳されなくなる変異を意味するものである。ナンセンス変異は、終止変異とも呼ばれる。また、「フレームシフト変異」とは、塩基の挿入又は

欠失により、その挿入又は欠失部位よりも3'側の領域でコドンの読み枠がずれる変異を意味する。さらに、「ヌル変異」とは、そのタンパク質をコードするヌクレオチド配列が完全に欠失しているか、又はヌクレオチド配列が存在していても機能性タンパク質を発現できない変異を意味する。

5 [0019]

本発明において、遺伝子変異を生じさせる前のダイズ（本発明の改変ダイズの元となるダイズ）としては、遺伝子組換え等による遺伝的性質の改変を全く経ていないダイズ育種（すなわちダイズ原種）であってもよいし、そのようなダイズ原種に何らかの遺伝的性質の改変が導入されることにより品種改良等がなされたダイズ品種であってもよく、限定はされず、例えば、「フクユタカ」、「トヨシロメ」、

10 「むらゆたか」、「Bay」といったダイズ品種が挙げられる。

本発明の改変ダイズは、ダイズに含まれる油脂中のフラン酸の含有割合が低減されたものであることを特徴とし、当該含有割合は、例えば、0質量ppm以上20質量ppm以下であることが好ましく、0質量ppm以上15質量ppm以下、0質量ppm以上10質量ppm以下、0質量ppm以上5質量ppm以下、0質量ppm以上3質量ppm以下、0質量ppm以上1質量ppm以下であ

15 ってもよく、さらには0質量ppmであってもよい。

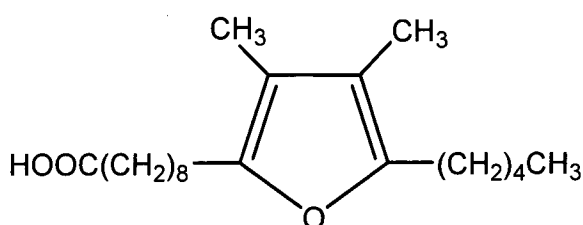
[0020]

本発明の改変ダイズにおいて低減されたフラン酸としては、限定はされないが、下記構造式で示される、3,4-ジメチル-5-ペンチル-2-フランノナン酸（「F3」とも称する）であることが好ましい。

20

[0021]

[化1]



25

[0022]

本発明の改変ダイズは、好ましくは、Glyma20g34340遺伝子及び／又は Glyma04g05690遺伝子に変異が導入されたもの（又は、当該変異を含むもの）である。ここで、「変異が導入されたもの」や「変異を含むもの」とは、ダイズ細胞内に変異遺伝子が保持されることを意味し、好ましくは、該変異遺伝子が該ダイズのゲノム中に保持されることを意味する。また、当該変異は、上記遺伝子の機能欠失型変異であってもよい。

上記Glyma20g34340遺伝子、及びGlyma04g05690遺伝子の詳細については、例えば、公知の各種データベースの1つである、「Joint Genome Institute (JGI)」(<https://jgi.doe.gov/>) の ウ ェ ブ サ イ ト 中 の 「 Phytozome 」 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) において、当該遺伝子のゲノム配列情報やcDNAの塩基配列情報、及び当該遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報や当該アミノ酸配列をコードする塩基配列領域 (CDS) の情報などが登録されている。

[0 0 2 3]

本発明においては、上記Glyma20g34340遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号1に示し、Glyma20g34340遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号2に示す。また、Glyma20g34340遺伝子のmRNA前駆体の塩基配列（ゲノムDNA配列の表記をRNAに変換（チミン(T)をウラシル(U)に変換）した配列）を配列番号5に示す。

なお、Glyma20g34340遺伝子は、上記データベース(Phytozome)の版がWm82. a2. v1では、遺伝子名が「Glyma. 20G201400. 1」又は「Glyma. 20G201400」と表記されている。

他方、上記Glyma04g05690遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号3に示し、Glyma04g05690遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号4に示す。

なお、Glyma04g05690遺伝子は、上記データベース(Phytozome)の版がWm82. a2. v1では、遺伝子名が「Glyma. 04G054100. 1」又は「Glyma. 04G054100」と表記されている。

[0 0 2 4]

上記Glyma20g34340遺伝子に導入される変異としては、限定はされないが、例えば、下記(i)～(iii)の遺伝子変異が挙げられる。

[0025]

- (i) 該遺伝子によりコードされるタンパク質の第410番目のアミノ酸残基をコードするコドンの塩基に生じた変異。

ここで、当該(i)の変異は、例えば、グリシンのコドンからアスパラギン酸のコドンに置換される変異が好ましく挙げられる。詳しくは、Glyma20g34340遺伝子のcDNA（配列番号1）における第1519番目の塩基であるG（グアニン）がA（アデニン）に置換された変異が挙げられる。

10 [0026]

- (ii) 該遺伝子によりコードされるタンパク質の第688番目のアミノ酸残基をコードするコドンの塩基に生じた変異。

- ここで、当該(ii)の変異は、例えば、アスパラギン酸のコドンからアスパラギンのコドンに置換される変異が好ましく挙げられる。詳しくは、Glyma20g34340遺伝子のcDNA（配列番号1）における第2352番目の塩基であるG（グアニン）が、A（アデニン）に置換された変異が挙げられる。

[0027]

- (iii) 該遺伝子の第17番目のエキソンとイントロンの境界に存在する塩基に生じた変異。

- ここで、当該(iii)の変異は、例えば、該遺伝子の第17番目のエキソンの直後に位置するイントロンとの境界を定める塩基に生じた変異が挙げられ、好ましくは、Glyma20g34340遺伝子のmRNA前駆体（配列番号5）における第7180番目～第7268番目の塩基により特定するイントロンの境界を指定する「GU」（第7180～7181番目）及び「AG」（第7267～7268番目）の少なくとも1つ以上の塩基に導入される変異が挙げられ、より好ましくは、該mRNA前駆体（配列番号5）における第7180番目の塩基であるG（グアニン）が、A（アデニン）に置換された変異が挙げられる。

[0028]

Glyma20g34340遺伝子に上記(i)の変異が導入された本発明の改変ダイズの例としては、「#65」系統（以下、「LF65」とも称する）のダイズ品種が挙げられ、当

該ダイズ品種は、受託番号「FERM BP-22392」として、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター（〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室）に、2020年7月16日付けで、国際寄託されている。また、上記(ii)の変異が導入された本発明の改変ダイズの例としては、「16SN253」系統のダイズ品種が挙げられ、上記(iii)の変異が導入された本発明の改変ダイズの例としては、

5 「16SN693」系統のダイズ品種が挙げられる。

[0 0 2 9]

他方、上記Glyma04g05690遺伝子に導入される変異としては、限定はされないが、例えば、該遺伝子によりコードされるタンパク質の第64番目のアミノ酸残基を

10 コードするコドンの塩基に生じた変異が挙げられる。

ここで、当該変異は、例えば、アルギニンのコドンからシステインのコドンに置換される変異が好ましく挙げられる。詳しくは、Glyma04g05690遺伝子のcDNA（配列番号3）における第483番目の塩基であるC（シトシン）が、T（チミン）に置換された変異が挙げられる。

15 Glyma04g05690遺伝子に上記変異が導入された本発明の改変ダイズの例としては、「16SN279」系統（以下、「16SN279」とも称する）のダイズ品種が挙げられ、当該ダイズ品種は、受託番号「FERM BP-22413」として、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター（〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室）に、2021年1月14日付けで、国際寄託されている。

20 [0 0 3 0]

2. 用途

本発明においては、前述の本発明の改変ダイズ又はその処理物を含む、食品用、飼料用又は医薬組成物（若しくは医薬品）用の材料が提供される。また、本発明においては、前述の本発明のダイズから抽出されるダイズ油脂も提供される。

25 さらに本発明においては、上記材料や上記ダイズ油脂を含む、食品、飼料又は医薬組成物（若しくは医薬品）も提供される。

「ダイズの処理物」とは、ダイズに、例えば酵素処理、粉末化、乾燥、加熱、凍結、精製などの処理を施して得られるものを意味する。ダイズの処理物の具体例としては、全脂ダイズ粉、脱脂ダイズ粉、ダイズタンパク質等が挙げられる。

[0 0 3 1]

「食品」とは、栄養素の摂取や嗜好を目的として飲食される物を意味する。ダイズは、古くから食品として摂取されている。本発明のダイズは、枝豆のように生鮮食品として食べてもよく、納豆のように発酵食品として食べてもよく、乾燥豆、味噌、醤油、豆腐、ゆば、豆乳、きな粉のように加工食品として飲食してもよい。前記ダイズの処理物を材料とする食品に制限はないが、例えば、ハンバーグ、パティ、餃子、唐揚げ、ソーセージ、コロッケ、ナゲット、シュウマイ、トンカツ、チキンフィレ肉、ミンチ肉、チャーハン等の米飯類の肉具材、即席麺の肉具材等の食肉加工食品に含まれる食肉の一部もしくは全部をダイズ処理物に置き換えた食品、クッキー、ケーキ、ドーナツ、パン等のベーカリー食品等が挙げられる。ダイズ油脂の用途に制限はないが、例えば、揚げ油、炒め油、炊飯油、かけ油等に使用できる。ダイズ油脂を含む食品としては、揚げ物、炒め物、米飯、米菓、麺、マヨネーズやドレッシングなどの調味料、粉末油脂、マーガリンやショートニングなどの加工油脂食品等が挙げられる。本発明のダイズは、ダイズ油脂中のフラン酸が低減され、明所臭や加熱臭が抑制されたものであるため、飲食への利用に消費者の抵抗が少ないものと期待される。また、サプリメント、健康機能食品、特定保健用食品の材料として、本発明のダイズを使用することもできる。

[0 0 3 2]

「飼料」とは、飼育動物に餌として与えられる物を意味し、「飼育動物」には、家畜、家禽、養魚、ペットなどが含まれる。ダイズは、ウシ、ブタ、ニワトリなどの家畜、家禽用の飼料やペットフードに広く用いられている。

「医薬組成物」（又は「医薬品」）とは、人や動物などの対象に投与することにより、対象の疾病の診断、治療又は予防を行うための物を意味し、このような効能が得られる限りにおいて医薬部外品を含み得る。ダイズに含まれるイソフラボンは、エストロゲン受容体に対してアゴニスト作用を示すことが知られており、骨粗鬆症の治療薬としても用いられている。

[0 0 3 3]

3. 品種交雑

本発明のダイズの特徴を有する新種の改変ダイズは、本発明のダイズ（ダイズ種）同士、あるいは本発明のダイズ（ダイズ種）と他のダイズ種と交雑させることにより製造（作出）することができる。このようにして得られる新たな改変ダイズも、前記 2. 項等で述べたように、ダイズに含まれる油脂中のフラン酸の含有割合が低減されたという特徴を有するものである。

好ましくは、本発明のダイズ種を他のダイズ種と交雑させることにより、Glyma20g34340遺伝子及び／又はGlyma04g05690遺伝子に変異（機能欠失型変異など）が導入された、新種の改変ダイズを作製することができる。例えば、本発明のダイズ種を、特定の害虫及び／又は栽培条件に耐性を有する他のダイズ種と交雑させることにより、ダイズに含まれる油脂中のフラン酸含有量が低減され、かつ特定の害虫及び／又は栽培条件に耐性を有する新種のダイズを作製することができる。

[0034]

本発明において、「交雑」とは、遺伝的組成の異なる 2 個体間の交雑であって、その結果として雑種が形成されることを意味する。交雑方法としては、戻し交雑が好ましい。交雑によって得られる新種ダイズにおいて低フラン酸含有量を実現するためには、該新種ダイズを本発明のダイズ種と戻し交雑することにより、Glyma20g34340遺伝子変異やGlyma04g05690遺伝子変異のホモ接合体を得る必要がある。「戻し交雑」とは、変異をもった親 A と持たない親 B（フクユタカなどの既存のダイズ品種）との間に生まれた子を親 B（フクユタカなどの既存のダイズ種）と交雑させて、変異型遺伝子を保持し、かつ親 B の特性を有する子孫を得る方法である。

[0035]

4. スクリーニング方法

本発明のダイズは、好ましくは、Glyma20g34340遺伝子及び／又はGlyma04g05690遺伝子に変異を有するので、これらのいずれかの遺伝子（又は両方の遺伝子）の変異を検出することにより、ダイズに含まれる油脂中のフラン酸含有割合が低減された特徴を有するダイズをスクリーニングすることができる。

[0036]

変異遺伝子の検出方法としては、

(a) 本発明の改変ダイズが有する Glyma20g34340 遺伝子及び／又は Glyma04g05690 遺伝子の変異部位の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプローブ、及び／又は前記遺伝子の塩基配列及びその相補配列の少なくとも一方を増幅した
5 ときの増幅断片中に前記変異部位が含まれるように作製されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて被検ダイズの Glyma20g34340 遺伝子及び／又は Glyma04g05690 遺伝子について増幅処理及び／又はハイブリダイゼーション処理を行う工程、並びに、

(b) 前記処理物を分析することにより変異部位を検出する工程
10 を含む方法が挙げられる。

[0037]

このような検出方法の具体例としては、PCR法、TaqMan PCR法、シーケンス法、マイクロアレイ法などの公知の方法が挙げられ、特に、機能欠失型変異が一塩基多型 (SNP) である場合には、インベーター法やTILLING法が挙げられるが、これ
15 らに限定されるものではない。

PCR法の場合、3' 末端部分が変異部位の塩基配列に相補的な配列を有するようなプライマーを作製することが好ましい。このように設計されたプライマーを用いると、鋳型となるサンプルが変異を有する場合には、プライマーが完全に鋳型にハイブリダイズするため、ポリメラーゼ伸長反応が進むが、鋳型が変異を有し
20 ない場合には、プライマーの3' 末端のヌクレオチドが鋳型とミスマッチを生じるので、伸長反応は起こらない。したがって、このようなプライマーを用いてPCR増幅を行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動などによって分析し、所定のサイズの増幅産物が確認できれば、サンプルである鋳型が変異を有していることになり、増幅産物が存在しない場合には、鋳型が変異を有していないものと判断で
25 きる。PCR及びアガロースゲル電気泳動については、以下を参照：Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0038]

TaqMan PCR法とは、蛍光標識したアレル特異的オリゴとTaq DNAポリメラーゼ

によるPCR反応とを利用した方法である (Livak, K. J. Genet. Anal. 14, 143 (1999); Morris T. et al., J. Clin. Microbiol. 34, 2933 (1996))。

シーケンス法とは、変異を含む領域をPCRにて増幅させ、Dye Terminatorなどを用いてDNA配列をシーケンスすることで、変異の有無を解析する方法である (

5 Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

DNAマイクロアレイは、ヌクレオチドプローブの一端が支持体上にアレイ状に固定されたものであり、DNAチップ、Geneチップ、マイクロチップ、ビーズアレイ等を含むものである。DNAチップなどのDNAマイクロアレイアッセイとしては
10 GeneChipアッセイが挙げられる (Affymetrix社; 米国特許第6,045,996号、同第5,925,525号、及び同第5,858,659号参照)。GeneChip技術は、チップに貼り付けたオリゴヌクレオチドプローブの小型化高密度マイクロアレイを利用するものである。

[0039]

15 インベーター法とは、SNP等の遺伝子多型のそれぞれのアレルに特異的な2種類のレポータープローブ及び1種類のインベータープローブの鋳型DNAへのハイブリダイゼーションと、DNAの構造を認識して切断するという特殊なエンドヌクレアーゼ活性を有するCleavase酵素によるDNAの切断を組み合わせた方法である (Livak, K. J. Biomol. Eng. 14, 143-149 (1999); Morris T. et al., J.
20 Clin. Microbiol. 34, 2933 (1996); Lyamichev, V. et al., Science, 260, 778-783 (1993)等)。

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) 法とは、変異導入した突然変異体集団のゲノム中の変異ミスマッチをPCR増幅とCEL Iヌクレアーゼ処理によってスクリーニングする方法である。CEL Iヌクレアーゼとは、二本鎖DNA
25 のミスマッチ部分を特異的に切断するエンドヌクレアーゼである。サンプルが、Glyma20g34340遺伝子及び／又はGlyma04g05690遺伝子に変異を含む場合、上記PCR産物にはミスマッチ部分が生じるが、変異を含まない場合には、ミスマッチは生じない。従って、変異が存在する場合には、PCR産物のミスマッチペア部位が切断されることになり、変異が存在しない場合には、PCR産物は切断されない。従って

、CEL Iヌクレアーゼ処理したPCR産物をアガロース電気泳動などで分析し、核酸配列の長さを比較することにより、変異の有無を容易に確認することができる。CEL Iヌクレアーゼの詳細については、以下の文献を参照できる：Oleykowski et al., Nucleic Acids Research, vol. 26, No. 20, 4597-4602 (1998)。

5 [0040]

上記に例示される変異検出方法においては、Glyma20g34340遺伝子及び／又はGlyma04g05690遺伝子の変異部位を含むように作製されたオリゴヌクレオチドが、プローブ又はプライマーとして使用される。従って、本発明は、Glyma20g34340遺伝子及び／又はGlyma04g05690遺伝子の変異部位を含むように作製されたオリゴヌクレオチドも提供される。

インベーター法によってGlyma20g34340遺伝子及び／又はGlyma04g05690遺伝子の変異を検出する場合、用いるプライマー若しくはプローブは、SNP部位が当該プライマー若しくはプローブの塩基配列の3'若しくは5'端に存在するように設計し、又は相補配列の3'若しくは5'端に存在するように設計し、又は前二者（プライマー若しくはプローブ、又は相補配列）の3'若しくは5'端から4塩基内、好ましくは2塩基内に存在するように設計する。あるいは、オリゴヌクレオチドの塩基配列全長の中央にSNPが存在するように設計する。「中央」とは、SNPの塩基よりも5'端に向かう塩基の数と、3'端に向かう塩基の数とがほぼ同数となる中心部の領域をいい、オリゴヌクレオチドの塩基数が奇数の場合は、「中央」は、中心部の5塩基が好ましく、より好ましくは中心部の3塩基、さらに好ましくは最も中心部の1塩基である。また、オリゴヌクレオチドの塩基数が偶数の場合は、「中央」は、中心部の4塩基が好ましく、より好ましくは中心部の2塩基である。

[0041]

また、本発明のオリゴヌクレオチドをインベーター法にアレルプローブとして使用する場合、該オリゴヌクレオチドは、変異部位を含むGlyma20g34340遺伝子及び／又はGlyma04g05690遺伝子、あるいはその相補配列とハイブリダイズする断片と、ハイブリダイズしない断片（フラップ部分）とが前記変異部位の遺伝子配列又はその相補配列を介して結合したものであることが好ましい。

本発明のオリゴヌクレオチドをサンプル中の核酸分子にハイブリダイズさせる

場合、そのハイブリダイゼーション反応は、ストリンジェントな条件下で行われる。

本発明のオリゴヌクレオチドの塩基配列の長さは、少なくとも10塩基となるように設計することが好ましく、より好ましくは10～200塩基、さらに好ましくは15
5 ～150塩基、最も好ましくは18～80塩基である。当該オリゴヌクレオチド配列は、被検遺伝子を検出するためのプローブとして使用することができ、またフォワード（センス）プライマー及びリバース（アンチセンス）プライマーのどちらに使用してもよい。

[0042]

10 以上のように設計されたオリゴヌクレオチドプライマー又はオリゴヌクレオチドプローブは、公知の手段・方法により化学合成することができるが、一般には、市販の化学合成装置を使用して合成される。

なお、プローブには、予め蛍光標識（例えば、FITC、FAM、VIC、Redmond Dye等）及び蛍光標識に対するクエンチャーを付加して作業の自動化を図ることも可能
15 である。

[0043]

5. マイクロアレイ

前述した本発明のオリゴヌクレオチドの一端をガラス、シリコン、ゲルなどの支持体に固定することでマイクロアレイを作製することができる。オリゴヌクレ
20 オチドのアレイは、例えば固相化学合成法と半導体産業において用いられているフォトリソグラフィ製造技術とを組み合わせた光照射化学合成法（Affymetrix社）により製造される。チップの化学反応部位の境界を明確するためにフォトリソグラフィーマスクを利用し、特定の化学合成工程を行うことによって、アレイの所定の位置にオリゴヌクレオチドプローブが貼り付けられた高密度アレイを構築
25 することができる。

[0044]

6. キット

本発明の別の態様においては、本発明のオリゴヌクレオチド及び／又は該オリゴヌクレオチドを用いて作製したマイクロアレイを含む、Glyma20g34340遺伝子及

び／又はGlyma04g05690遺伝子の変異検出用キットが提供される。このようなキットには、本発明のオリゴヌクレオチド又は該オリゴヌクレオチドを用いて作製したマイクロアレイ以外にも、検出反応用の溶液、コントロール用のオリゴヌクレオチド、検出反応に利用する容器、使用説明書などが含まれていてもよい。

5 [0045]

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は、本発明の例示を目的とするものであり、本発明を限定するものではない。

[実施例1]

10 [0046]

<低フラン酸ダイズ変異系統の作製>

[0047]

1. 植物材料

15 材料として使用したダイズ (*G l y c i n e m a x* (L.) *M e r r .*) 品種は以下の通りである。

(i) フクユタカ

(ii) トヨシロメ

20 変異集団の作製にはダイズ品種フクユタカを用いた。変異原として 0.3%のエチルメタンスルホン酸 (EMS) 水溶液中にダイズ種子 (M0 種子) を 1 晩浸漬した後、流水中で 8 時間すすぐことにより得られた M1 種子を圃場に播種し、常法に従って M1 個体を栽培した。稔性を保持していた植物体については個体当たり 1 粒ずつの M2 種子を回収し保存した。翌年、保存しておいた M2 種子を、再度圃場に播種し M2 個体を栽培した。各 M2 個体から得られた M3 種子を個体別に回収した 2831 系統を、低フラン酸含量の変異系統の選抜に用いた。トヨシロメ、フクユタカは別途、下記に記載された手順に従って変異系統との交配を行い、分離集団の育成に用いた。なお、上記の「M0」は変異を起こす前の元の品種を表し、「M1」は変異を起こした当初の世代であり、その後の世代が順に「M2」、「M3」となる。

[0048]

2. フラン酸の分析方法

ダイズ種子の種子粉末 100~500 mg を秤量し、5 ml のヘキサンを加えて激しく攪拌した後、60℃のアルミブロック (TAITEC: DTC-1CN) 上で 30 分間、保温した。次に、超音波洗浄機 (SHARP: UT-204) 中で 30 分間超音波処理をした後、定性ろ紙 (Whatman: No. 1 ϕ 82 mm) を用いてろ過し、ろ液を回収した。残渣に再び 5 ml のヘキサンを加えて攪拌、60℃の保温、超音波洗浄機を用いた抽出を繰り返し、ろ液を再度回収した。ガス吹きつけユニット (TAITEC: EN1-25) を用いて約 30 分間空気を吹きつけ、ろ液中に含まれるヘキサンを完全に揮発させた。遠心管中の油脂を回収しダイズ油脂のメチルエステル化に供試した。

10 [0049]

4 mg のダイズ油脂を秤量し、600 μ l の 0.2 M KOH-MeOH を加えて混合した。80 μ l の 2 M HCl を加え 1 分間混合した後、内部標準 (ベヘン酸メチル-d₃、濃度 10 μ g/ml) を加えたヘキサン溶液を 600 μ l 加え 2 分間混合した。13000 rpm で 3 分間遠心分離した後、500 μ l の上層を新しい 1.5 ml チューブに移した。そのチューブに 500 μ l の滅菌水を加えて 1 分間混合し、13000 rpm で 3 分間遠心分離した後、100 μ l の上層をガラスバイアルに移し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (Agilent Technologies 5977A) の分析試料とした。

[0050]

調製した試料の 1 μ L を、ガスクロマトグラフ質量分析計ヘスプリットレスで分析した。機器の分析条件は、ヘリウムガスをキャリアガスとして約 1 ml/min の流量、HP-88 (Agilent: ϕ 0.25 mm $\times$ 60 m) カラムを使用し、分析時間 20 分間、注入口温度が 250℃、質量分析計接続部温度が 230℃、イオン源温度が 230℃、四重極の質量フィルタ温度を 150℃に設定した。分析時間中のカラムオーブンの温度条件は、100℃で 1 分間保持した後に 20℃/min で 200℃まで 5 分間かけて昇温させ、その後、10℃/min で 240℃まで 4 分間かけて昇温させ、240℃で 4 分間保持した。その後、10℃/min で 250℃まで 1 分間かけて昇温させ、5 分間保持した。

得られたクロマトグラム、マススペクトルデータから内部標準 (IS: 分子量 357) とフラン酸 (F3 (3, 4-ジメチルー 5-ペンチルー 2-フランノナン酸): 分子量 336) のピーク面積を求め、その比を表現型データとして用いた。

[0 0 5 1]

3. 変異体のスクリーニング：

ダイズ品種フクユタカで作製した突然変異集団 2831 系統から、上記の手法を用いて各系統のフラン酸を分析し、4 系統（変異体 1～4）をフラン酸の産生量
5 に関する変異系統として同定した。異なる個体に由来する種子を用いた反復実験から、同定した 4 系統が持つ変異が遺伝的に固定していることを確認した（表 A、図 1）。

[0 0 5 2]

[表 A]

表A フクユタカ(原品種)と変異系統のフラン酸含量(3反復による測定)

系統	F3ピーク面積/ 内部標準ピーク面積 x1000	標準偏差
フクユタカ	33.7	5.39
変異体 1	1.0	0.38
変異体 2	4.0	0.37
変異体 3	0.8	0.32
変異体 4	3.3	1.04

10

[0 0 5 3]

4. 変異遺伝子が座乗する染色体領域の同定

ダイズ突然変異集団から選抜した変異系統の持つ変異遺伝子を同定するために
15 遺伝分析を行った。変異体 1 とトヨシロメを人工交配によって交配し、雑種種子を得た。交配は晴天時の午前中に行った。開花前日のトヨシロメの花を母親に、開花当日の変異体 1 の花から得た花粉を父親に用いた。具体的には、開花前日のトヨシロメの花について、がく、花びら（旗弁、翼弁、竜骨弁）をピンセットで
20 取り除き、葯が裂開していないことを目視で確認後、葯を取り除き、柱頭のめしべを露出させた。当日開花した変異体 1 の花からおしべと柱頭をピンセットで取り出し、葯が裂開していることを目視で確認した後に、おしべの先端（花粉）を用意した母親（トヨシロメ）のめしべの先端へ軽く触れ、受粉を行った。得られた雑種個体（F1 個体）を栽培し、自殖種子を得てこれを分離集団（F2 集団）として、82 個体を栽培した。

[0 0 5 4]

トヨシロメと変異体1の交配によって得られた分離集団の82個体の葉から、Yamagata, Y. et al, Breed. Sci., 2018（以下、文献A）に記載されている方法でDNAの抽出を行った。文献Aに記載されているトヨシロメとフクユタカの間
5 で多型を示すDNAマーカーならびに遺伝子型の検出技術を利用して、各個体の持つ遺伝子型を決定した。また各F2個体の自殖種子を用いて、上記の方法によって、フラン酸含量を分析した。各個体の持つ遺伝子型情報とフラン酸含量の表現型データから、Md. Abdur Rauf Sarkar et al., Breed. Sci., 2020（以下、文献B）に記載されている統計解析手法を用いて、各個体の遺伝子型と表現型に最も
10 も関連性が高い染色体領域を同定した。遺伝分析の結果、ダイズ20番染色体の41,000,000塩基（41M）から45,000,000（45M）塩基の領域で、変異体1の持つ低フラン酸含量の特性に関して高い統計値（LODスコア）を示し、43.3Mbp付近で最も高い統計値を示した。このことから、この領域内に低フラン酸含量に関与する変異遺伝子を位置づけた（図2）。なお、上記文献A及びBの詳細は、以下の通り
15 である。

[0 0 5 5]

文献A : Yamagata, Y., A. Yoshimura, T. Anai, and S. Watanabe, Selection criteria for SNP loci to maximize robustness of high-resolution melting analysis for plant breeding. Breed. Sci. 68: 488-498, 2018.

20 文献B : Md. Abdur Rauf Sarkar, Wakana Otsu, Akihiro Suzuki, Fumio Hashimoto, Toyoaki Anai, Satoshi Watanabe, Single-base deletion in GmCHR5 increases the genistein-to-daidzein ratio in soybean seed. Breed. Sci. 70: 265-276, 2020.

[0 0 5 6]

25 5. フラン酸含量の減少の原因となるDNA多型の同定

変異体1～4、フクユタカ、トヨシロメを対象に、次世代シーケンス解析によって全ゲノム塩基配列解析を行った。各個体の葉から抽出したDNAをNovogene社NGS受託解析サービスに送付し、各系統あたり170億塩基のゲノム情報を取得した。公共のデータベースである、「Joint Genome Institute（JGI）」

(<https://jgi.doe.gov/>) の ウ ェ ブ サ イ ト 中 の 「 Phytozome 」
(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) から、ダイズのゲノム情報
(Gmax_189_hardmasked.fa) を取得し、変異体 1 ～ 4、フクユタカ、トヨシロメ
の次世代シーケンス解析から得られた塩基配列情報を、前掲の文献 B に記載さ
5 れている方法で、ダイズのゲノム配列と比較し、EMS 処理によって生じた変異系
統 (変異体 1 ～ 4) に特有の塩基多型 (変異) を同定した。

[0 0 5 7]

その結果、変異体 1 ～ 3 においては、ダイズ 20 番染色体の 41M から 45M 塩基
対の間に存在する、Glyma20g34340 遺伝子 (データベース (Phytozome) の版が
10 Wm82.a2.v1 では、遺伝子名が Glyma.20G201400.1 又は Glyma.20G201400 となっ
ている) (Cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase) に共通して変異原処
理によって生じた塩基多型 (変異) を有していた。

[0 0 5 8]

具体的には、変異体 1 (「#65」とも表記する) は、ダイズ 20 番染色体配列中
15 の第 42,720,119 番目の塩基が C から T に置換した変異 (すなわち、Glyma20g34340
遺伝子の cDNA (配列番号 1) における第 1519 番目の塩基である G (グアニン) が
A (アデニン) に置換された変異; 但し、当該染色体配列に対し当該 cDNA 配列の
方向が反対向き (逆向き) であるため、当該染色体配列中の置換塩基と、当該 cDNA
配列中の置換塩基とは、相補関係にある。) を持ち、Cyclopropane fatty acyl
20 phospholipid synthase 遺伝子によりコードされるアミノ酸配列 (配列番号 2)
の中の、第 410 番目のアミノ酸がグリシンからアスパラギン酸へ変化していた。

[0 0 5 9]

変異体 2 (「16SN253」とも表記する) は、ダイズ 20 番染色体配列中の第
42,717,581 番目の塩基が C から T に置換した変異 (すなわち、Glyma20g34340 遺
25 伝子の cDNA (配列番号 1) における第 2352 番目の塩基である G (グアニン) が、
A (アデニン) に置換された変異; 但し、当該染色体配列に対し当該 cDNA 配列の
方向が反対向き (逆向き) であるため、当該染色体配列中の置換塩基と、当該 cDNA
配列中の置換塩基とは、相補関係にある。) を持ち、Cyclopropane fatty acyl
phospholipid synthase 遺伝子によりコードされるアミノ酸配列 (配列番号 2)

の中の、第 688 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンへ変化していた。

[0 0 6 0]

- 変異体 3 (「16SN693」とも表記する) は、ダイズ 20 番染色体配列中の第 42, 717, 998 番目の塩基が C から T に置換した変異 (すなわち、Glyma20g34340 遺伝子の mRNA 前駆体配列 (配列番号 5) における第 7180 番目の塩基である G (グアニン) が、A (アデニン) に置換された変異; 但し、当該染色体配列に対し当該 mRNA 前駆体配列の方向が反対向き (逆向き) であるため、当該染色体配列中の置換塩基と、当該 mRNA 前駆体配列中の置換塩基とは、相補関係にある。) を持つ。
- それにより、Cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase 遺伝子の第 17 番目のエキソンの直後に位置するイントロンの境目にある (当該イントロンの両端に存在する)、遺伝子のスプライシングに必要な GU-AG という配列 (詳しくは、イントロンのスプライシングに必要な (スプライシングの目印となる)、当該 mRNA 前駆体配列 (配列番号 5) における第 7180~7181 番目の「GU」と第 7267~7268 番目の「AG」という配列) が、AU-AG という配列に変化することで、当該イントロン (配列番号 5 中の第 7180 番目~第 7268 番目の塩基で特定される配列) におけるスプライシング異常を引き起こしていると考えられた (図 3)。

[0 0 6 1]

- 変異体 4 については、Glyma20g34340 遺伝子に EMS 処理によって生じた変異を有していなかったため、データベース (Phytozome) 上で Glyma20g34340 遺伝子の相同遺伝子としてリストアップされている Glyma04g05690 遺伝子 (データベース (Phytozome) の版が Wm82. a2. v1 では、遺伝子名が Glyma. 04G054100 となっている) の塩基配列を比較した。

- その結果、変異体 4 (「16SN279」とも表記する) は、ダイズ 4 番染色体配列中の第 4, 340, 379 番目の塩基が G (グアニン) から A (アデニン) に置換した変異 (すなわち、Glyma04g05690 遺伝子の cDNA (配列番号 3) における第 483 番目の塩基である C (シトシン) が、T (チミン) に置換された変異; 但し、当該染色体配列中の置換塩基と、当該 cDNA 配列中の置換塩基とは、相補関係にある。) を持ち、Glyma04g05690 遺伝子によりコードされるアミノ酸配列 (配列番号 4) の中

の、第 64 番目のアミノ酸がアルギニンからシステインへ変化していた（図 4）。Glyma04g05690 遺伝子の 102 番目から 377 番目のアミノ酸は Cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase and related methyltransferases の機能に関与すると予測され、Glyma20g34340 遺伝子の 559 番目から 848 番目のアミノ酸において同様の機能を持つと予測された。

[0062]

6. フラン酸含量の減少の原因となる DNA 多型の DNA マーカー化と低フラン酸含量の表現型との関連

それぞれの変異系統（変異体 1～4）で同定した DNA 多型を対象に各個体の持つ遺伝子型を判別できる DNA マーカーを開発し、低フラン酸含量の表現型との関連を確認した。DNA 多型を対象に PCR 法で遺伝子型を識別できる DNA マーカーを開発するために、文献 A に記載されている方法を用いた。具体的には、変異体 1 が持つ 42,720,119 番目の塩基を挟み込むように、PCR に用いるプライマー（フォワードプライマー：ACTATACGATTGAACTTTCAGGCTT（配列番号 6）、リバープライマー：GCTTCCTAGAATGCCATGAGCT（配列番号 7））を設計し、各個体の DNA を鋳型に PCR 法によって、多型 DNA を含む DNA 断片を増幅した。PCR 断片に含まれる塩基の違いを DNA が 2 本鎖から 1 本鎖へ融解する際の温度の違いを検出することで、各個体の持つ遺伝子型を判別した（図 5 A）。正常型は C の塩基を持ち、変異型は T の塩基を持つために、融解温度の変化量のピーク（以後、融解温度とする）は、正常型（図 5 A 中の青色のプロット）が変異型（図 5 A 中の赤色のプロット）に比べて高い融解温度を示す。一方、ヘテロ接合型の個体では正常型と変異型の DNA のいずれも持つことから、PCR 断片の融解温度は異なるパターン（図 5 A 中の橙色のプロット）を示す。上記に記載したトヨシロメと変異体 1 の交配によって得られた分離集団の各個体を示すフラン酸含量は、作製した DNA マーカーの遺伝子型によって明確に区別することができた。従って、変異体 1 が持つ 42,720,119 番目の塩基多型によって低フラン酸含量の表現型を説明できる（図 5 B）。

[0063]

変異体 2（「16SN253」とも表記する）はダイズ 20 番染色体の 42,717,581 番目の塩基が C から T に置換した変異を持ち、この変異を対象にプライマー（フォワ

ードプライマー：TCGTATTTATATGTCTTGGGCA（配列番号 8）、リバープライマー：GGACCGCATCAATTTTGT（配列番号 9）を設計し、PCR によってこの変異系統が持つ DNA 多型を含む PCR 断片を増幅し、上記と同様に PCR 断片に含まれる塩基の違いを PCR 断片の融解温度の違いとして検出した。正常型が C を持ち、変異型の T よりも高い融解温度のピークを示す（図 6 A）。この DNA マーカーを用いて、上述と同様の手順で作製したフクユタカと変異体 2 の交配によって得られた雑種個体を 2 度自殖させた F3 集団 64 個体について、遺伝子型とフラン酸含量の関係を調べた結果、変異型の遺伝子型を持つ場合に低フラン酸含量の表現型を示した。従って、この DNA 多型によって低フラン酸含量の表現型を説明できる（図 6 B）。なお、図 6 A 中の、青、赤、及び橙色のプロットの説明は、図 5 A における説明が同様に適用される。

[0 0 6 4]

変異体 3（「16SN693」とも表記する）はダイズ 20 番染色体の 42, 717, 998 番目の塩基が C から T に置換しており、この変異を対象に PCR で増幅するためのプライマー（フォワードプライマー：AGAAAAATCTCTCTCCTGATTGAAA（配列番号 10）、リバープライマー：AGTAATAAGATAGCAATCAAAGGCA（配列番号 11））を設計し、PCR 断片に含まれる塩基多型を PCR 断片の融解温度の違いとして検出した。正常型の C の対立遺伝子を持つ PCR 断片は変異型の T を含む PCR 断片よりも高い融解温度を示す（図 7 A）。上記と同様にフクユタカと変異体 3 の交配によって得られた F2 集団 32 個体を用いて、DNA マーカーの遺伝子型とフラン酸含量の関係を解析した結果、変異型の遺伝子型を持つ場合に低フラン酸含量の表現型を示した。従って、この塩基多型によって低フラン酸含量の表現型を説明できる（図 7 B）。なお、図 7 A 中の、青、赤、及び橙色のプロットの説明は、図 5 A における説明が同様に適用される。

25 [0 0 6 5]

変異体 4（「16SN279」とも表記する）が持つダイズ 4 番染色体の 4, 340, 379 番目の塩基が G から A への DNA 多型を PCR によって検出するためのプライマー（フォワードプライマー：TCATCACCAGGAGACTCACG（配列番号 12）、リバープライマー：AAGTTGGGAGGAGGGTTTG（配列番号 13））を設計し、PCR 断片に含まれる塩基多

型を PCR 断片の融解温度の違いによって検出した。正常型の塩基 G を持つ場合、変異型の A の塩基を持つ場合に比べて、PCR 断片の融解温度が高くなる (図 8 A)。この融解温度の違いを利用して、フクユタカと変異体 4 の交配によって得られた F3 集団 63 個体の遺伝子型とフラン酸含量の関係を解析した結果、変異型の遺伝子を持つ場合に、低フラン酸含量の表現型を示した。よって、この DNA 多型によって低フラン酸含量の表現型を説明できる (図 8 B)。なお、図 8 A 中の、青、赤、及び橙色のプロットの説明は、図 5 Aにおける説明が同様に適用される。

[0 0 6 6]

以上の結果から、本実施例で示した変異系統 1 ~ 4 は、原品種であるフクユタカと比較してダイズに含まれる油脂中のフラン酸含量が減少した性質を備え、Cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase and related methyltransferases をコードすると考えられる遺伝子、Glyma20g34340 と Glyma04g05690 遺伝子に生じた変異が、各変異系統が示すフラン酸含量の減少の原因であることを明らかにした。

[実施例 2]

[0 0 6 7]

<低フラン酸ダイズ由来の油脂、及び当該ダイズを用いた加工食品の評価>

[0 0 6 8]

1. ダイズ油脂の抽出及び精製

(1) ダイズ種子

佐賀大学の圃場にて栽培、収穫した下記種子を用いた。

1. フクユタカ

2. #65 (低フラン酸系統) : 実施例 1 で作製した変異体 1

[0 0 6 9]

(2) 抽出条件

ブレンダーで粉碎した各ダイズ種子を 50℃ に加熱したヘキサンに浸漬し、得られた浸漬液からヘキサンを蒸留回収して油分を抽出した。

[0 0 7 0]

(3) 精製条件

上記抽出油を一般的な精製方法である脱ガム、脱酸、脱色、脱臭処理にて精製した。

まず、80℃に加温させた抽出油に対して、85%リン酸水溶液および温水をそれぞれ0.4質量%、2.5質量%添加し、30分間攪拌後、水相を遠心除去して脱ガム油を得た。

次に、80℃に加温させた脱ガム油に対して、85%リン酸水溶液を0.05質量%、15%NaOH水溶液を0.6%それぞれ添加し、15分間攪拌後、水相を遠心除去した。得られた油相に対して、80℃でイオン交換水を15質量%添加し、15分間攪拌後、再度水相を遠心除去して脱酸油を得た。

[0071]

次に、上記で得られた脱酸油に対して、80℃で活性白土を1.5質量%添加し、減圧下で30分間攪拌後、白土をろ過で除去して脱色油を得た。

次に、上記で得られた脱色油に対して、250℃及び減圧下で2.0質量%の水蒸気を45分間吹き込んで脱臭処理を施し、前記処理油に対して、クエン酸を25質量ppm添加して脱臭油を得た。

[0072]

2. ダイズ油脂の評価

前記1. 項で精製した各ダイズ種子由来の脱臭油を用いて、下記(1)～(3)の項目に関する評価を実施した。

(1) 一般性状

脂肪酸組成：基準油脂分析試験法 2. 4. 2. 3-2013 に則って測定した。

フラン酸 (F3)：特許第6714001号公報（又はW02017/033674）の段落 [0055] ～ [0058] に記載の方法に則って測定した。

[0073]

(2) 耐光性

10 mlのバイアル瓶に脱臭油5 gを入れ、1000 luxで1週間照射させ、下記項目を評価した。なお、光照射前に各脱臭油のフラン酸含量を測定した。

POV：基準油脂分析試験法 2. 5. 2. 2-2013 に則って測定した。

明所臭：光照射後サンプルについて、ブロックヒーターで100℃に加熱した後に明所臭を評価した。(n=2)

[0074]

5 (3) 耐熱性

300 mLビーカーに油100 gを張り込み、180℃で加熱した(5hr毎にサンプリングを実施し、合計20hrまで加熱)。

酸価：基準油脂分析試験法 2. 3. 1-2013 に則って測定した。

色調：AOC S C c 13 j - 97 に則って、ロビボン自動比色計を用いて測定した。

粘度：30℃においてE型粘度計を用いて測定した。

加熱臭：加熱15hr後の油に対して、14名のパネルが各評価項目を0～5点(下記参照)で評価し、その平均値を評価値とした。

[0075]

15 評価点数：

5：非常に強く感じる

4：強く感じる

3：やや強く感じる

2：やや感じる

20 1：あまり感じない

0：感じない

[0076]

(4) 結果

上記(1)～(3)の各評価の結果を、表1～7に示す。

25 [0077]

[表1]

表1. 脂肪酸組成(質量%)

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C22:0	C24:0	その他
フクユタカ	10.1	3.0	22.8	55.8	6.8	0.3	0.4	0.2	0.6
#65	10.6	3.4	22.8	55.4	6.1	0.3	0.4	0.2	0.9

[0 0 7 8]

[表 2]

表2. フラン酸 (F3、ppm)

	フラン酸 (F3)
フクユタカ	116.0
#65	検出限界以下

5

[0 0 7 9]

[表 3]

表3. 耐光性評価結果

	POV (meq/kg)	明所臭
フクユタカ	2.1	明所臭を感じる
#65	2.3	明所臭をほぼ感じない

10 [0 0 8 0]

[表 4]

表4. 耐熱性評価結果 (色調、1inchセル)

		0hr	5hr	10hr	15hr	20hr	25hr
フクユタカ	10R+Y	0.5	1.3	3.2	7	14.4	20
	上昇率 (%)	0	160	540	1300	2780	3900
#65	10R+Y	0.6	0.9	1.4	3.1	6.9	10
	上昇率 (%)	0	50	133	417	1050	1567

[0 0 8 1]

15 [表 5]

表5. 耐熱性評価結果 (酸価)

		0hr	5hr	10hr	15hr	20hr	25hr
フクユタカ	酸価 (mg/g)	0.05	0.07	0.10	0.21	0.39	0.53
	上昇率 (%)	0	50	114	342	703	993
#65	酸価 (mg/g)	0.06	0.06	0.08	0.11	0.16	0.23
	上昇率 (%)	0	6	30	82	173	287

[0 0 8 2]

[表 6]

表6. 耐熱性評価結果(粘度)

		0hr	5hr	10hr	15hr	20hr	25hr
フクユタカ	粘度 (mPa・s)	40.96	44.83	51.08	65.7	92.8	120.3
	上昇率 (%)	0	9	25	60	127	194
#65	粘度 (mPa・s)	41.94	44.23	46.67	52.03	60.22	68.8
	上昇率 (%)	0	5	11	24	44	64

5

[0 0 8 3]

[表 7]

表7. 耐熱性評価結果(加熱臭)

	フクユタカ	#65
全体の匂い	3.32	1.91
刺激臭	2.45	1.36
酸敗臭	1.41	0.59
青臭い	0.82	0.50
金属様	0.32	0.18
ペンキ様	0.27	0.09
魚様	0.45	0.36
甘い様	0.30	0.23

10 [0 0 8 4]

6 5 から採取したダイズ油脂中のフラン酸 (F 3) は、検出限界以下であった。また、# 6 5 から採取したダイズ油脂は、フクユタカから採取したダイズ油脂と比較して、耐光性に優れており、明所臭が抑制されていた。さらに、耐熱性にも優れており、加熱時の色調上昇、酸化上昇及び粘度上昇とも抑制されており、加熱臭も抑制されていた。

15

[0 0 8 5]

3. ダイズを用いた加工食品の評価

(1) 前記 1. 項で用いた各ダイズ (フクユタカ、#65(低フラン酸系統)) を用い、

下記(i)～(v)の加工食品を試作した。

(i) ダイズハンバーグ

(ii) 豆乳

(iii) 豆腐

5 (iv) おからクッキー

(v) ダイズ粉クッキー

[0086]

(2) 試作方法

(i) ダイズハンバーグ

10 各ダイズ 150g を 4 倍以上の水に 1 晩漬け、鍋で 30 分～1 時間煮た。

ダイズ水煮 200g をフードプロセッサーでペースト状にし、表 8 中の※の材料と合わせてよくこねた。

成形して、油を引いたフライパンで焼いた。

3 分半でひっくり返し、さらに 2 分半焼き、ダイズハンバーグを得た。

15 [0087]

[表 8]

表8. ダイズハンバーグの材料

材料	重量
大豆水煮	200g
※卵	25g
※パン粉	7g
※片栗粉	20g
※塩	2.4g
市販の大豆脱臭油 (コクとうまみの大豆の油、(株)J-オイルミルズ社製)	14 g

[0088]

20 (ii) 豆乳

各ダイズ 150g を水に一晩浸けた。

軽く水で洗い、水 750g (乾燥時のダイズに対して 5 倍量) 添加し、ミキサーで粉砕した。

鍋で沸騰するまで加熱し、さらに弱火で10分加熱した。

さらしで濾し、おからと豆乳を分別し、豆乳を得た。

[0089]

(iii) 豆腐

- 5 上記(ii)の各ダイズ由来の豆乳を鍋に入れ、75～80℃に加熱後、火を消した。
にがり豆乳に対して1.5質量%添加し、少し攪拌した後、蓋をして10分蒸らした。

さらしを敷いたざるで水気を切り、豆腐を得た。

[0090]

10 (iv) おからクッキー

上記(ii)で豆乳と分別した各ダイズ由来のおからの水分をよく絞り、生おからを得た。

表9に記載された材料をボウルに入れよく混ぜた。

冷蔵庫で1時間ほど寝かせ、成形した。

- 15 170℃に予熱したオーブンで25分焼き、おからクッキーを得た。

[0091]

[表9]

表9. おからクッキーの材料

材料	重量
生おから	60g
薄力粉	40g
砂糖	15g
卵	40g
バター	40g

20 [0092]

(v) ダイズ粉クッキー

各ダイズをミキサーで粉碎し、ダイズ粉を得た。

表10に記載された材料をボウルに入れよく混ぜた。

薄く広げて冷蔵庫で1時間ほど寝かせた。

型抜き後、170 度に予熱したオーブンで 20 分焼いた。

[0093]

[表10]

表10. ダイズ粉クッキーの材料

材料	重量
大豆粉	60g
薄力粉	40g
砂糖	15g
卵	40g
バター	40g

5

[0094]

(3) 評価結果

各加工食品について、4名のパネルが、「ダイズっぽさ(豆臭)」、「後味の渋み(渋み)」を1～3点(下記参照)で評価し、その平均値を評価値とした。その評価の

10 結果を、表11～15に示す。

評価点数：

1：全く感じない

2：やや感じる

3：はっきり感じる

15 [0095]

[表11]

表11. ダイズハンバーグの風味

	フクユタカ	#65
豆臭	3	2
渋み	3	1.3

[0096]

20 [表12]

表12. 豆乳の風味

	フクユタカ	#65
豆臭	3	1.3
渋み	2	1

[0 0 9 7]

[表 1 3]

表13. 豆腐の風味

	フクユタカ	#65
豆臭	3	1.8
渋み	3	1

5

[0 0 9 8]

[表 1 4]

表14. おからクッキーの風味

	フクユタカ	#65
豆臭	3	1
渋み	2	1

10

[0 0 9 9]

[表 1 5]

表15. ダイズ粉クッキーの風味

	フクユタカ	#65
豆臭	3	1.3
渋み	2.5	1

15

[0 1 0 0]

6 5 もしくは # 6 5 のダイズの処理物を材料とした加工食品は、フクユタカ
もしくはフクユタカのダイズの処理物を材料とした加工食品と比較して、豆臭、
渋みとも抑制されており、良好な風味を有していた。

5 産業上の利用可能性

[0 1 0 1]

本発明によれば、ダイズに含まれる油脂中のフラン酸含量(フラン酸の産生量)
低減された改変ダイズを提供することができる。当該改変ダイズ由来の食用油脂
や当該食用油脂を含む食品等は、従来のダイズ油脂を含有するものとは異なり、
10 ダイズ油脂特有の不快感明所臭が抑制され、加熱調理時等の加熱臭、特にダイズ
油脂由来の刺激臭が抑制される。さらに、当該改変ダイズ由来の食用油脂は、従
来のダイズ油脂よりも加熱時の粘度・色調・酸化上昇が抑制される。また、当該
改変ダイズもしくは改変ダイズの処理物を含む食品等は、豆臭が抑制され良好な
風味を有している。そのため、当該改変ダイズは有用性、実用性に優れたもので
15 ある。

配列表フリーテキスト

[0 1 0 2]

配列番号 6 ～ 1 3 : 合成DNA

20

請求の範囲

[請求項 1]

- 5 遺伝子変異によりダイズに含まれる油脂中のフラン酸の含有割合が低減された
5 改変ダイズ。

[請求項 2]

前記含有割合が 0 質量 p p m 以上 20 質量 p p m 以下である、請求項 1 に記載
のダイズ。

[請求項 3]

- 10 前記フラン酸が、3, 4-ジメチル-5-ペンチル-2-フランノナン酸であ
る、請求項 1 又は 2 に記載のダイズ。

[請求項 4]

Glyma20g34340 遺伝子及び／又は Glyma04g05690 遺伝子に変異が導入されたもの
である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のダイズ。

- 15 [請求項 5]

前記遺伝子に導入された変異が、ミスセンス変異、ナンセンス変異、フレーム
シフト変異及びヌル変異からなる群から選択されるいずれかの変異である、請求
項 4 に記載のダイズ。

[請求項 6]

- 20 Glyma20g34340 遺伝子に導入された変異が、
(i) 該遺伝子によりコードされるタンパク質の第 410 番目のアミノ酸残基をコー
ドするコドンの塩基に生じた変異、
(ii) 該遺伝子によりコードされるタンパク質の第 688 番目のアミノ酸残基をコー
ドするコドンの塩基に生じた変異、又は
25 (iii) 該遺伝子の第 17 番目のエキソンとイントロンの境界に存在する塩基に生じ
た変異

である、請求項 4 又は 5 に記載のダイズ。

[請求項 7]

前記 (i) の変異が、グリシンのコドンからアスパラギン酸のコドンに置換され

る変異である、請求項 6 に記載のダイズ。

[請求項 8]

前記(i)の変異が、Glyma20g34340遺伝子のcDNAにおける第1519番目の塩基であるG（グアニン）が、A（アデニン）に置換された変異である、請求項 7 に記載の

5 ダイズ。

[請求項 9]

前記(ii)の変異が、アスパラギン酸のコードンからアスパラギンのコードンに置換される変異である、請求項 6 に記載のダイズ。

[請求項 10]

10 前記(ii)の変異が、Glyma20g34340遺伝子のcDNAにおける第2352番目の塩基であるG（グアニン）が、A（アデニン）に置換された変異である、請求項 9 に記載のダイズ。

[請求項 11]

15 前記(iii)の変異が、Glyma20g34340遺伝子のmRNA前駆体における第7180番目の塩基であるG（グアニン）が、A（アデニン）に置換された変異である、請求項 6 に記載のダイズ。

[請求項 12]

20 Glyma04g05690遺伝子に導入された変異が、該遺伝子によりコードされるタンパク質の第64番目のアミノ酸残基をコードするコードンの塩基に生じた変異である、請求項 4 又は 5 に記載のダイズ。

[請求項 13]

前記変異が、アルギニンのコードンからシステインのコードンに置換される変異である、請求項 12 に記載のダイズ。

[請求項 14]

25 前記変異が、Glyma04g05690遺伝子のcDNAにおける第483番目の塩基であるC（シトシン）が、T（チミン）に置換された変異である、請求項 13 に記載のダイズ。

[請求項 15]

フクユタカの改変ダイズである、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載のダイズ。

[請求項 16]

受託番号がFERM BP-22392であるLF65ダイズ。

[請求項 17]

受託番号がFERM BP-22413である16SN279ダイズ。

5 [請求項 18]

請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載のダイズ又はその処理物を含む、食品用、飼料用又は医薬組成物用の材料。

[請求項 19]

請求項 18 に記載の材料を含む、食品、飼料又は医薬組成物。

10 [請求項 20]

請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載のダイズから抽出されたダイズ油脂。

[請求項 21]

請求項 20 に記載のダイズ油脂を含む、食品、飼料又は医薬組成物。

[請求項 22]

15 請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載のダイズ同士、又は当該ダイズと他のダイズ種とを交雑させることを含む、改変ダイズの製造方法。

図 1

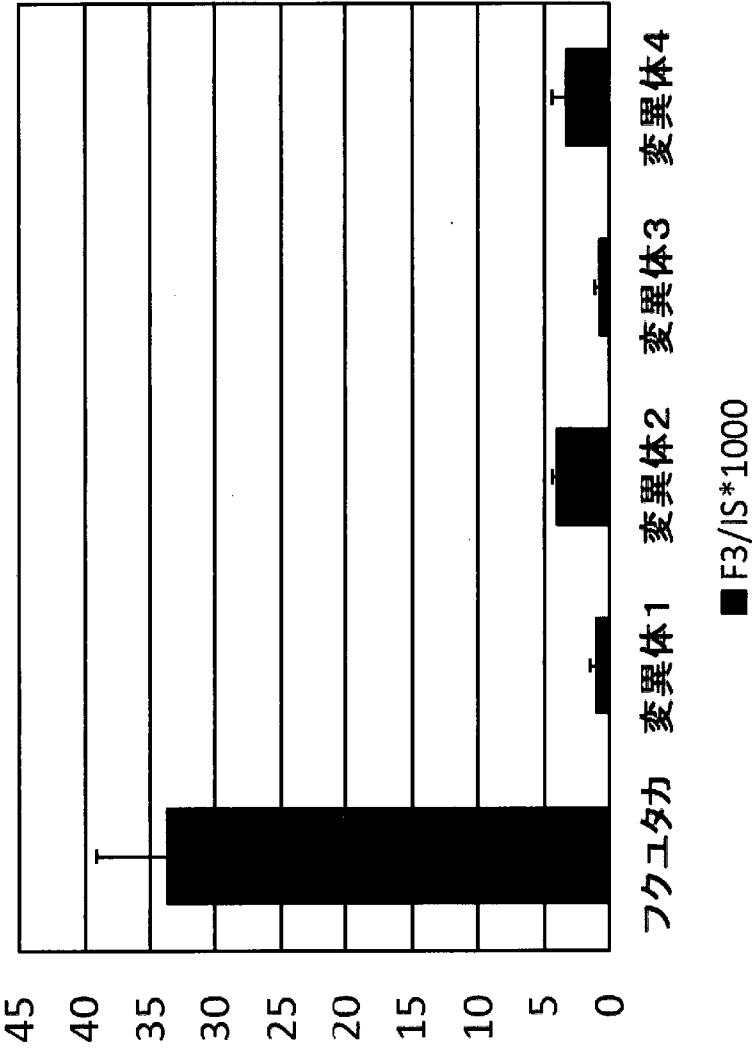
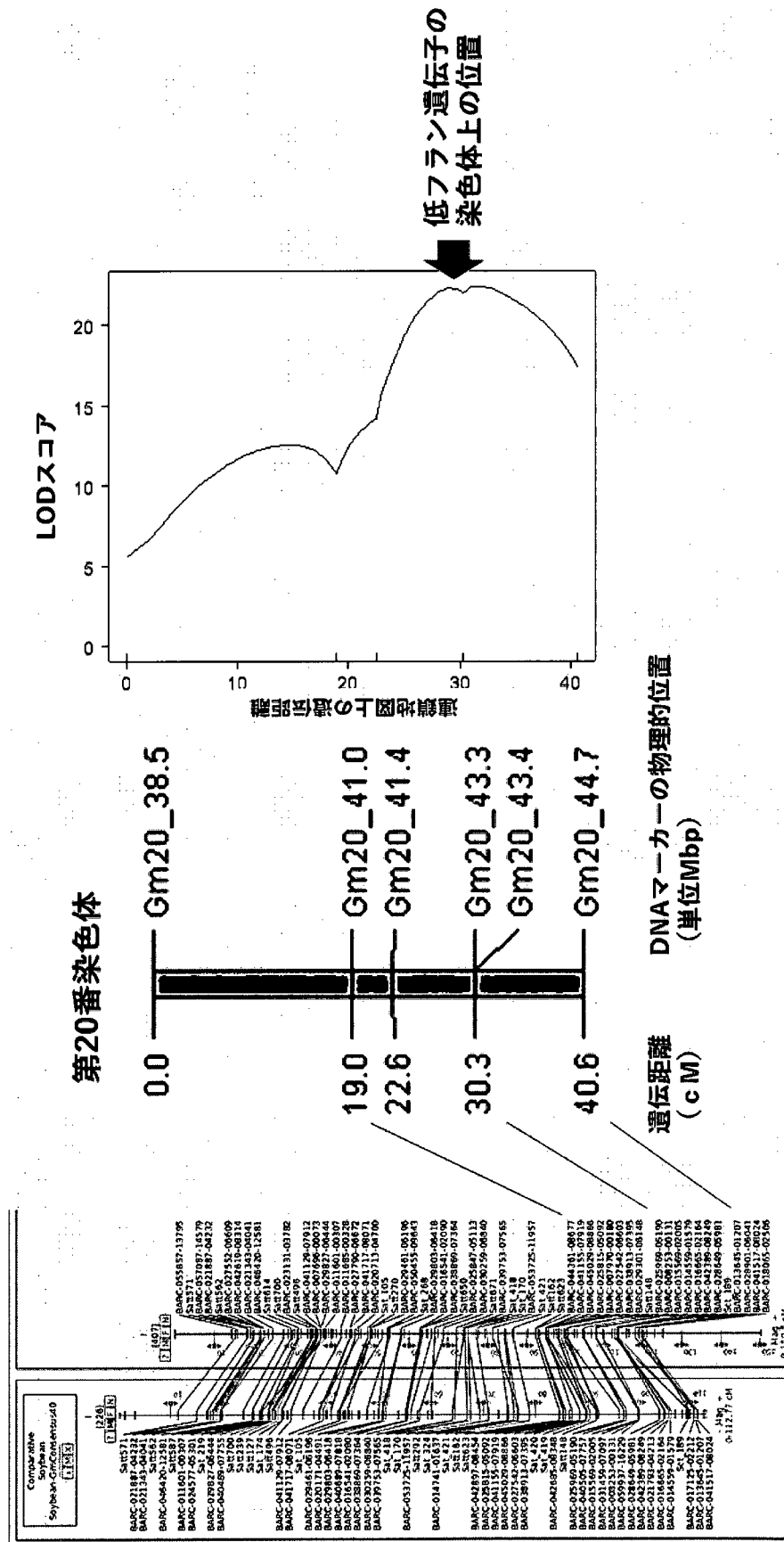


図2



データベースで公開されている
ダイズ20番染色体の連鎖地図と
DNAマーカー情報

連鎖解析で作成した連鎖地図 低フラシ遺伝子の染色体上の位置の推定

図3

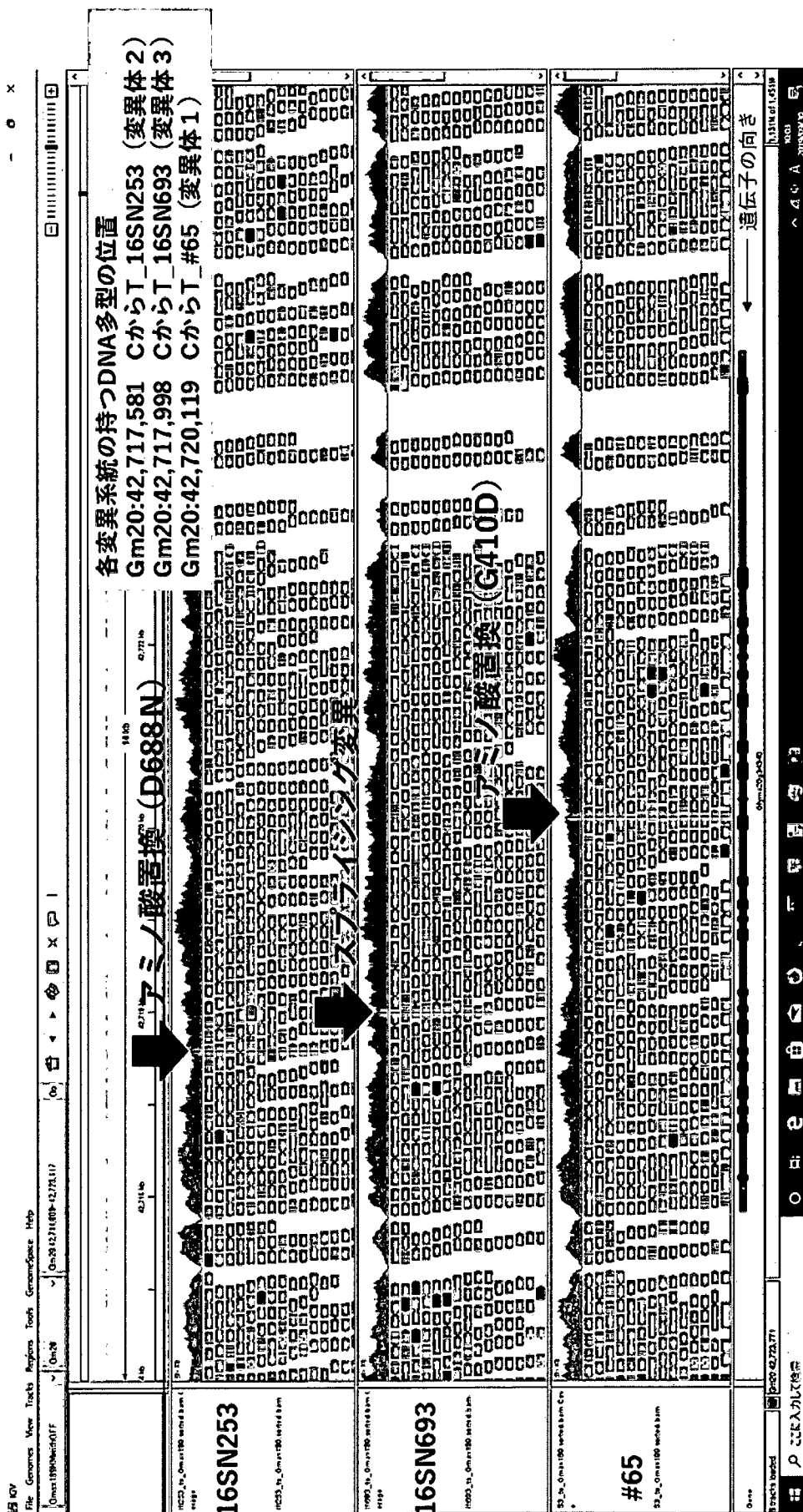


図4

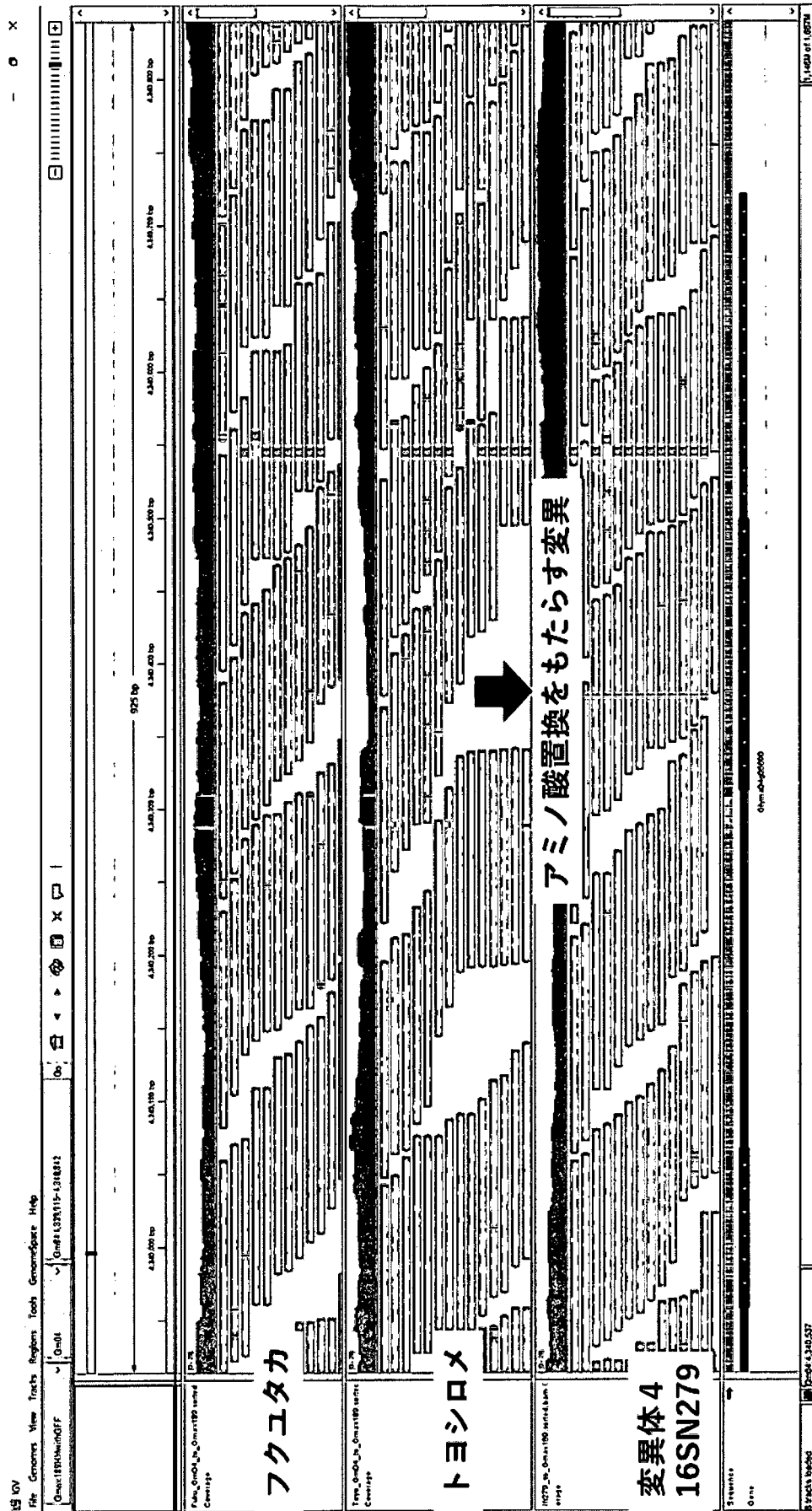


図5A

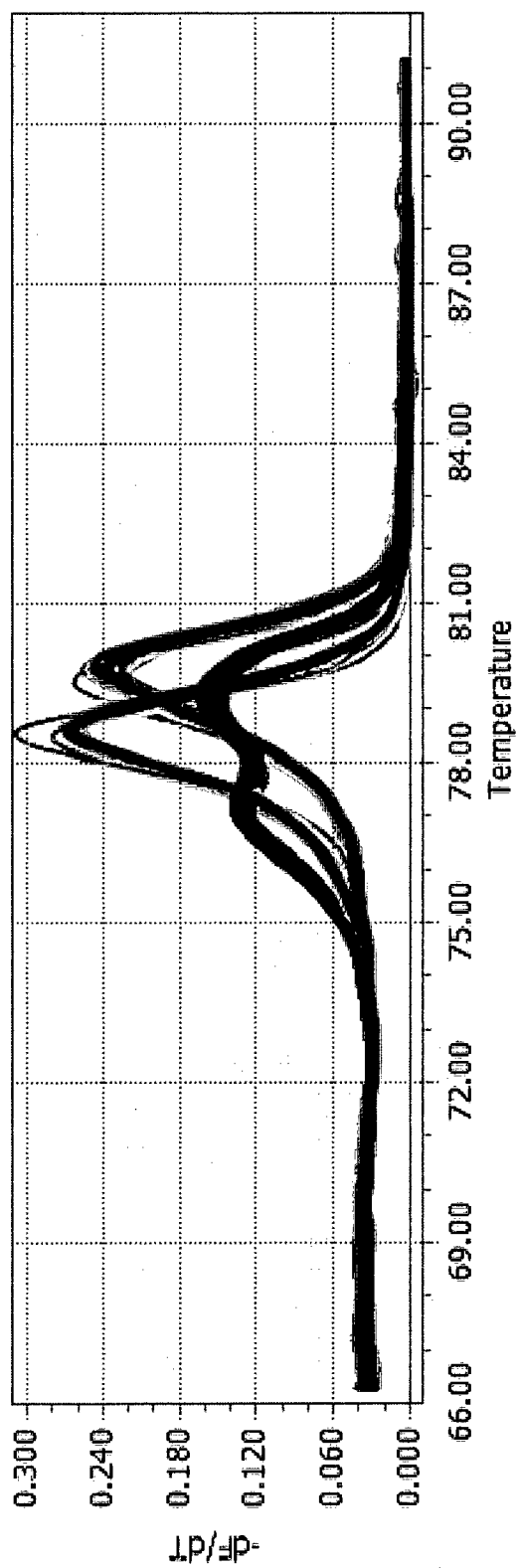


図5B

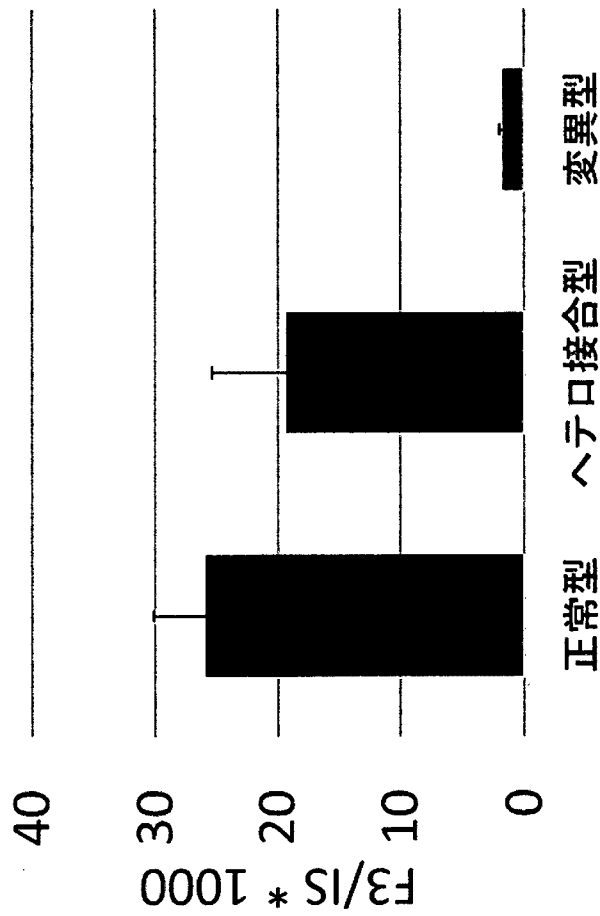


図6A

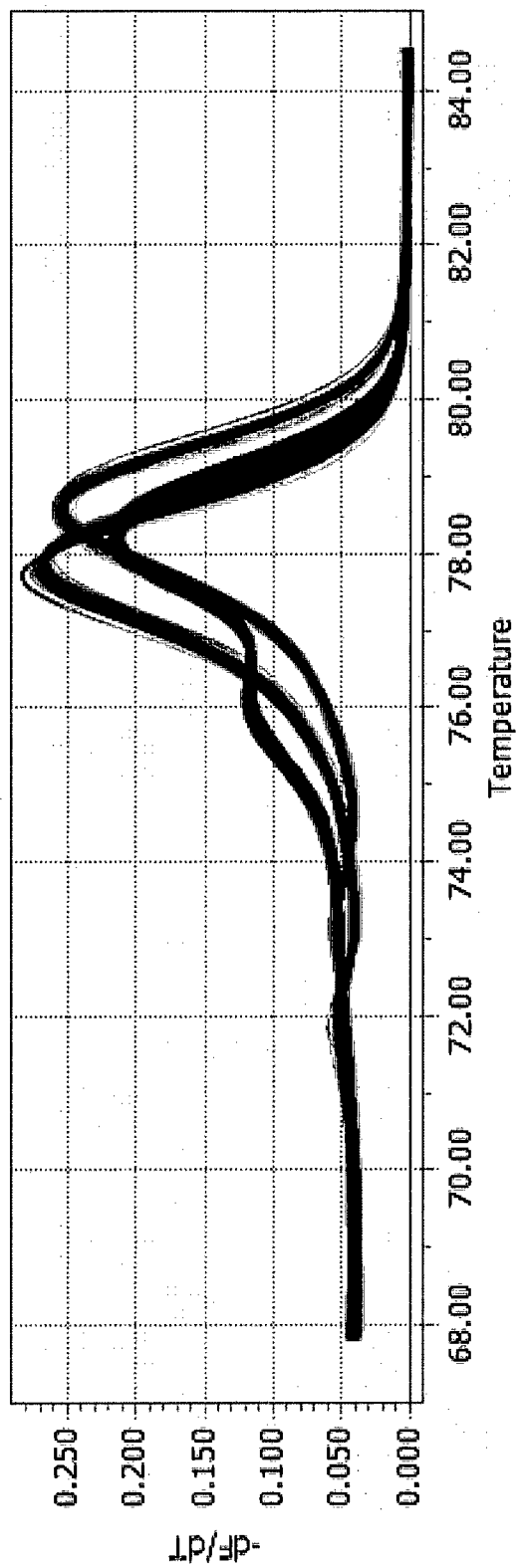


図6B

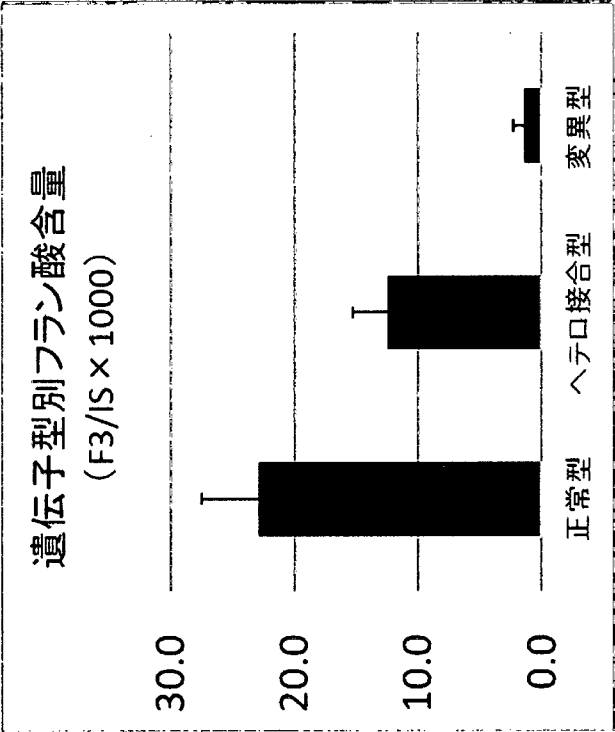


図7A

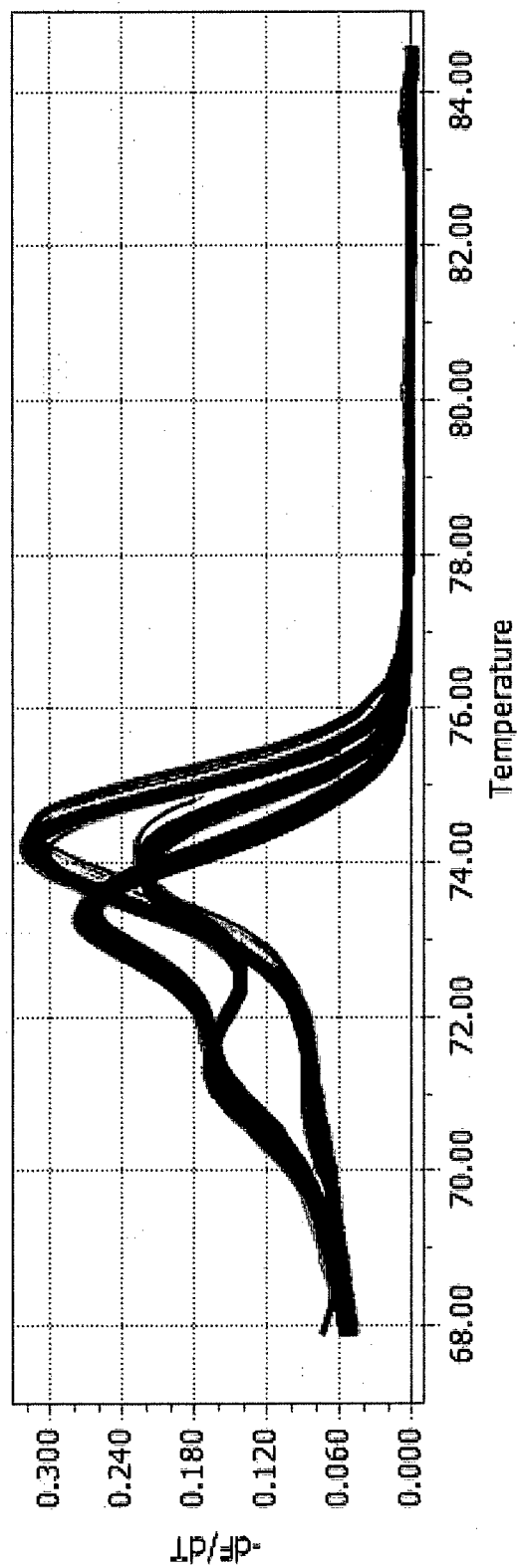


図7B

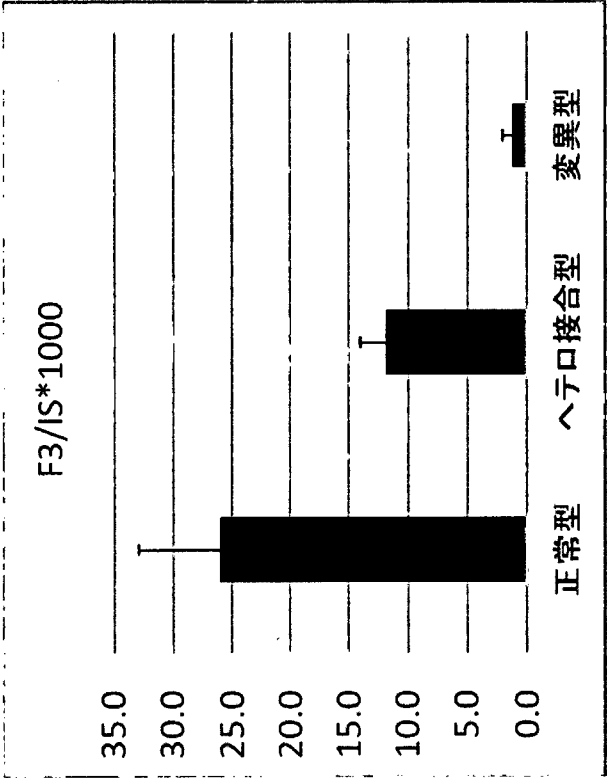


図8A

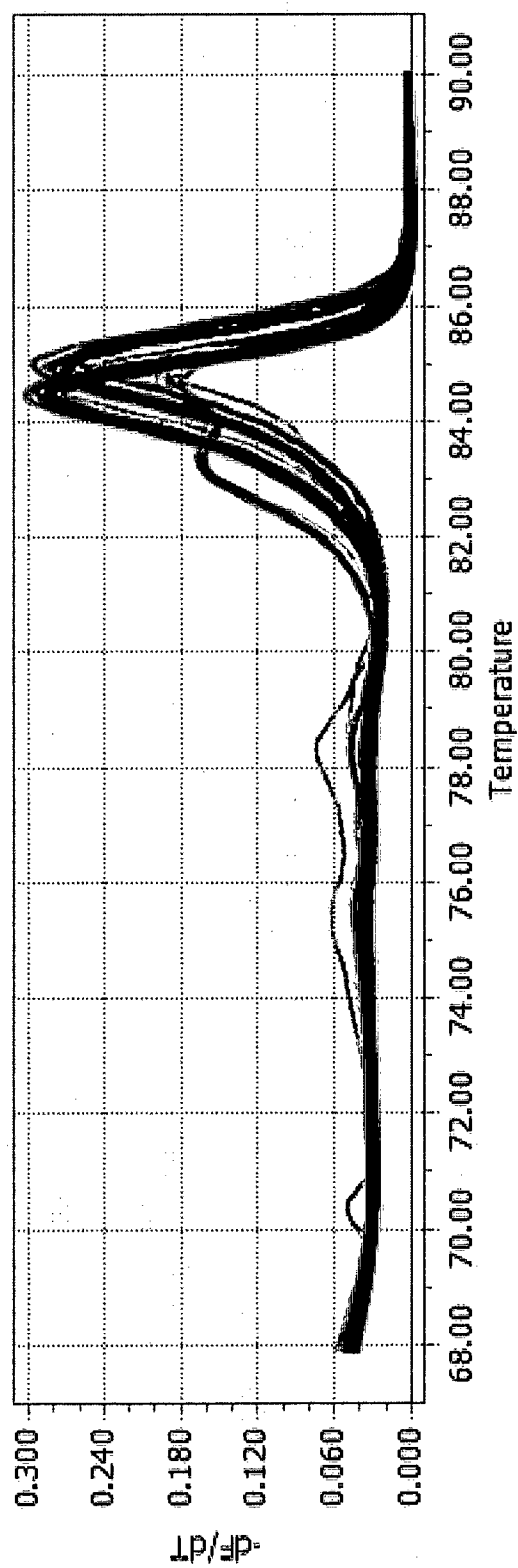
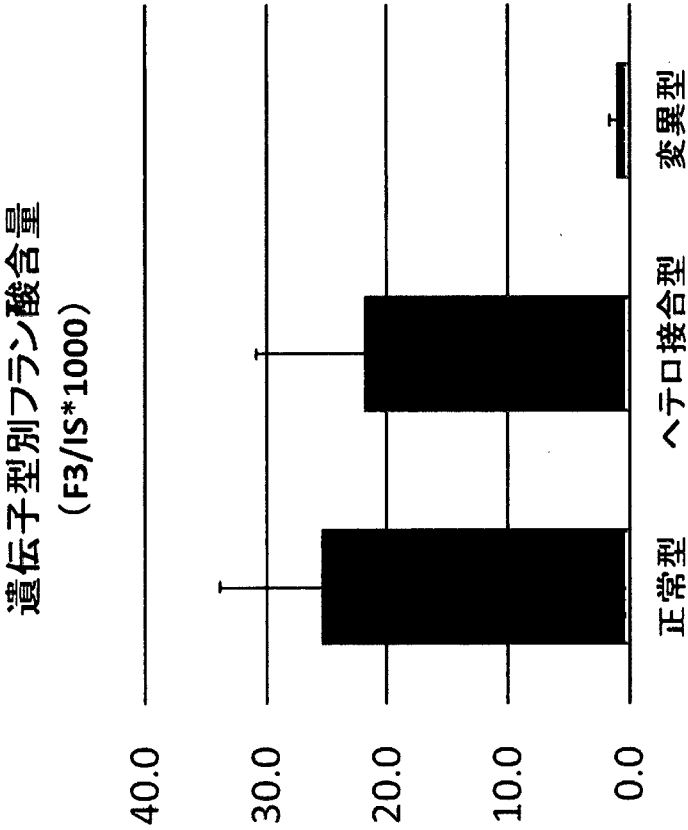


図8B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/002307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 6/54(2018.01)i; **A01H 1/02**(2006.01)i; **A01H 5/10**(2018.01)i; **A23K 10/30**(2016.01)i; **A23L 33/00**(2016.01)i; **A23L 33/115**(2016.01)i; **A61K 36/48**(2006.01)i; **A61P 3/02**(2006.01)i; **C12N 15/29**(2006.01)i

FI: A01H6/54; A01H1/02; A23L33/00; A23L33/115; A61K36/48; A23K10/30; C12N15/29; A61P3/02; A01H5/10 ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H6/54; A01H1/02; A01H5/10; A23K10/30; A23L33/00; A23L33/115; A61K36/48; A61P3/02; C12N15/29

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/033674 A1 (J-OIL MILLS INC) 02 March 2017 (2017-03-02) paragraphs [0061]-[0064], table 1	18-21
A		1-17, 22
A	穴井豊昭, ダイズ突然変異体リソースの整備と新規アレルの開発に関する研究, 育種学研究, 11 November 2020, vol. 22, doi:10.1270/jsbbr.20J18 entire text, all drawings, (ANAI, Toyoaki. Development of soybean mutant resources and identification of novel mutant alleles. Breeding Research.)	1-22
A	SANO, T. et al. Effect of Furan Fatty Acids and 3-Methyl-2,4-nonanedione on Light-Induced Off-Odor in Soybean Oil. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 18 February 2017, vol. 65, pp. 2136-2140, doi:10.1021/acs.jafc.6b05056 entire text, all drawings	1-22
A	喜多村啓介, リボキシゲナーゼ欠失大豆の特性と利用, 食品と科学, 1996, vol. 38, no. 8, pp. 102-107 entire text, all drawings, (KITAMURA, Keisuke. Characteristics and utilization of lipoxygenase deficient soybean. Food Science.)	1-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 March 2022

Date of mailing of the international search report

15 March 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/002307

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☒ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/002307

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017/033674 A1	02 March 2017	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A01H 6/54(2018.01)i; A01H 1/02(2006.01)i; A01H 5/10(2018.01)i; A23K 10/30(2016.01)i; A23L 33/00(2016.01)i; A23L 33/115(2016.01)i; A61K 36/48(2006.01)i; A61P 3/02(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i FI: A01H6/54; A01H1/02; A23L33/00; A23L33/115; A61K36/48; A23K10/30; C12N15/29; A61P3/02; A01H5/10 ZNA																				
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A01H6/54; A01H1/02; A01H5/10; A23K10/30; A23L33/00; A23L33/115; A61K36/48; A61P3/02; C12N15/29 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年										
日本国実用新案公報	1922-1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																			
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																			
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																			
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2017/033674 A1 (J-オイルミルズ) 02.03.2017 (2017-03-02) 0061-0064, 表1</td> <td>18-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-17, 22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>穴井豊昭, ダイズ突然変異体リソースの整備と新規アリの開発に関する研究, 育種 学研究, 2020.11.11, Vol. 22, doi:10.1270/jsbbr.20J18 全文、全図</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SANO, T., et al., Effect of Furan Fatty Acids and 3-Methyl-2,4-nonanedione on Light-Induced Off-odor in Soybean Oil, JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 2017.02.18, Vol. 65, pp. 2136-2140, doi:10.1021/acs.jafc.6b05056 全文、全図</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>喜多村啓介, リポキシゲナーゼ欠失大豆の特性と利用, 食品と科学, 1996, 第38巻第 8号, pp. 102-107 全文、全図</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 2017/033674 A1 (J-オイルミルズ) 02.03.2017 (2017-03-02) 0061-0064, 表1	18-21	A		1-17, 22	A	穴井豊昭, ダイズ突然変異体リソースの整備と新規アリの開発に関する研究, 育種 学研究, 2020.11.11, Vol. 22, doi:10.1270/jsbbr.20J18 全文、全図	1-22	A	SANO, T., et al., Effect of Furan Fatty Acids and 3-Methyl-2,4-nonanedione on Light-Induced Off-odor in Soybean Oil, JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 2017.02.18, Vol. 65, pp. 2136-2140, doi:10.1021/acs.jafc.6b05056 全文、全図	1-22	A	喜多村啓介, リポキシゲナーゼ欠失大豆の特性と利用, 食品と科学, 1996, 第38巻第 8号, pp. 102-107 全文、全図	1-22
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																		
X	WO 2017/033674 A1 (J-オイルミルズ) 02.03.2017 (2017-03-02) 0061-0064, 表1	18-21																		
A		1-17, 22																		
A	穴井豊昭, ダイズ突然変異体リソースの整備と新規アリの開発に関する研究, 育種 学研究, 2020.11.11, Vol. 22, doi:10.1270/jsbbr.20J18 全文、全図	1-22																		
A	SANO, T., et al., Effect of Furan Fatty Acids and 3-Methyl-2,4-nonanedione on Light-Induced Off-odor in Soybean Oil, JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 2017.02.18, Vol. 65, pp. 2136-2140, doi:10.1021/acs.jafc.6b05056 全文、全図	1-22																		
A	喜多村啓介, リポキシゲナーゼ欠失大豆の特性と利用, 食品と科学, 1996, 第38巻第 8号, pp. 102-107 全文、全図	1-22																		
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																				
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献																				
国際調査を完了した日 03.03.2022		国際調査報告の発送日 15.03.2022																		
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 太田 雄三 4B 3959 電話番号 03-3581-1101 内線 3448																		

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☐ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☒ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☒ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際出願番号
PCT/JP2022/002307

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2017/033674 A1	02.03.2017	(ファミリーなし)	