

豆類の高速かつシンプルでハイスループットの 栄養表現型解析

Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計を用いた栄養素の評価



概要

この技術概要では、豆類の高速でシンプルなハイスループットの表現型解析のための [Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計](#) のアプリケーションについて調査します。豆類は、その高い栄養素含有量で評価されており、繁殖プログラムでは、栄養品質の向上とターンアラウンドタイムの短縮を実現する、最適化されたワークフローが必要になります。従来の表現型解析メソッド（例えば、酵素アッセイや GC/MS など）は、労力、コスト、時間を要します。これに対して、フーリエ変換赤外（FTIR）分光分析は、最小限のサンプル前処理、高速な分析、サンプル破壊の低減、簡略化されたワークフローによる、有望な代替手段を提供しますこの技術概要では、豆類中のタンパク質の品質、消化率、脂肪酸組成、デンプン含有量の予測において、Cary 630 FTIR 分光光度計が効果的であることを実証します。この分光光度計は、コンパクトな設計、手頃な価格、使いやすさにより、作物および植物の繁殖プログラムに最適なツールとなります。

はじめに

豆類（ヒヨコマメ、レンズマメ、乾燥エンドウマメなど）は、植物性タンパク質、低消化性炭水化物、および多くの微量栄養素を含む、栄養素含有量が高い作物です。^{1、2}したがって、豆類は農業において基盤となる中心的作物であり、繁殖プログラムでは、ターンアラウンドタイムと栄養品質を改善するための最適化されたワークフローが必要になります。さらに、豆類の繁殖に使用する量的形質遺伝子座（QTL）および遺伝子パスウェイの同定には、膨大な量の表現型解析データが必要です。^{3、4}ワークフローの最適化は、コスト削減と高速なデータ取り込みを確保して、より効率的な作物生産の可能性を高めるために重要になります。ハイスループット表現型解析（HTP）は、従来の栄養表現型解析メソッドと比較して、低コスト化、現場での使いやすさを目標としており、予測的意思決定のためのデータ量を大幅に増加させることができます。

FTIR 分光分析は、豆類の栄養表現型解析において、非常に有望なハイスループットメソッドとして登場しました。FTIR は、最小限の労力とサンプル前処理により、短いターンアラウンドタイム（1 ～ 2 分）を実現できます。これは、GC/MS や酵素メソッドなどの従来の技術の複雑さ、高コ

スト、長いターンアラウンドタイムとは対照的です。さらに、FTIR ではサンプル破壊が大幅に低減されるため、必要に応じて再分析が容易に実施できます。^{5、6}

さまざまな研究により、Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計（図 1）が、豆類の表現型解析に有効に活用することができ、表現型解析データを取得するシンプルでハイスループットな低コストの手段を提供できることが示されています。^{5～8}システムの操作は容易で直感的であり、データ解析や解釈の必要性が最小限になるため、熟練した作業者の必要性とトレーニングコストを削減できます。

この概要では、繁殖プログラムのワークフロー改善のための豆類の表現型解析において、Cary 630 FTIR 分光光度計が有望な機器であることを実証しています。この分光光度計は、Agilent Cary 630 FTIR ダイアモンド減衰全反射（ATR）モジュールと組み合わせて使用することにより、豆類中のタンパク質の品質と消化率、および脂肪酸とデンプンの組成を堅牢かつ高い信頼性で予測することに成功しました。



図 1. ダイアモンド ATR モジュールを備えた Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計は、作物サンプル中の栄養素を高速かつ容易に分析するための最適なツールです。

実験方法

サンプル前処理

従来の GC/MS や酵素メソッドによるアプローチでは、膨大なサンプル前処理が必要になり、危険な化学物質に依存することが多くなりますが、FTIR 分析では、サンプル前処理がほとんど、またはまったく必要ありません（図 2 の例を参照）。

機器とソフトウェア

本研究における FTIR 分光分析データはすべて、ダイヤモンド ATR モジュールを備えた Cary 630 FTIR 分光光度計を用いて収集しました。分光分析データは、Agilent MicroLab Expert ソフトウェアで解析しました。

豆類の栄養表現型解析に対して従来の分析メソッドを実施し、実際のサンプルパラメータを決定しました。次に、これらの値を用いて、FTIR 分光分析（ケモメトリックスモデリング）のための部分最小二乗回帰（PLSR）モデルを構築して検証しました。

これらの従来のメソッドは、以下のプラットフォームと方法を用いて実施しました。

- タンパク質分析
 - 燃烧窒素アナライザ
 - Agilent 1100 シリーズ HPLC システム
 - タンパク質消化率補正アミノ酸スコア（PDCAAS）酵素アッセイ
- 脂肪酸分析
 - Agilent 5977B 質量分析検出器を備えた Agilent 8860 GC システム
- デンプン分析
 - 改良型 Megazyme レジスタントスターチアッセイメソッド

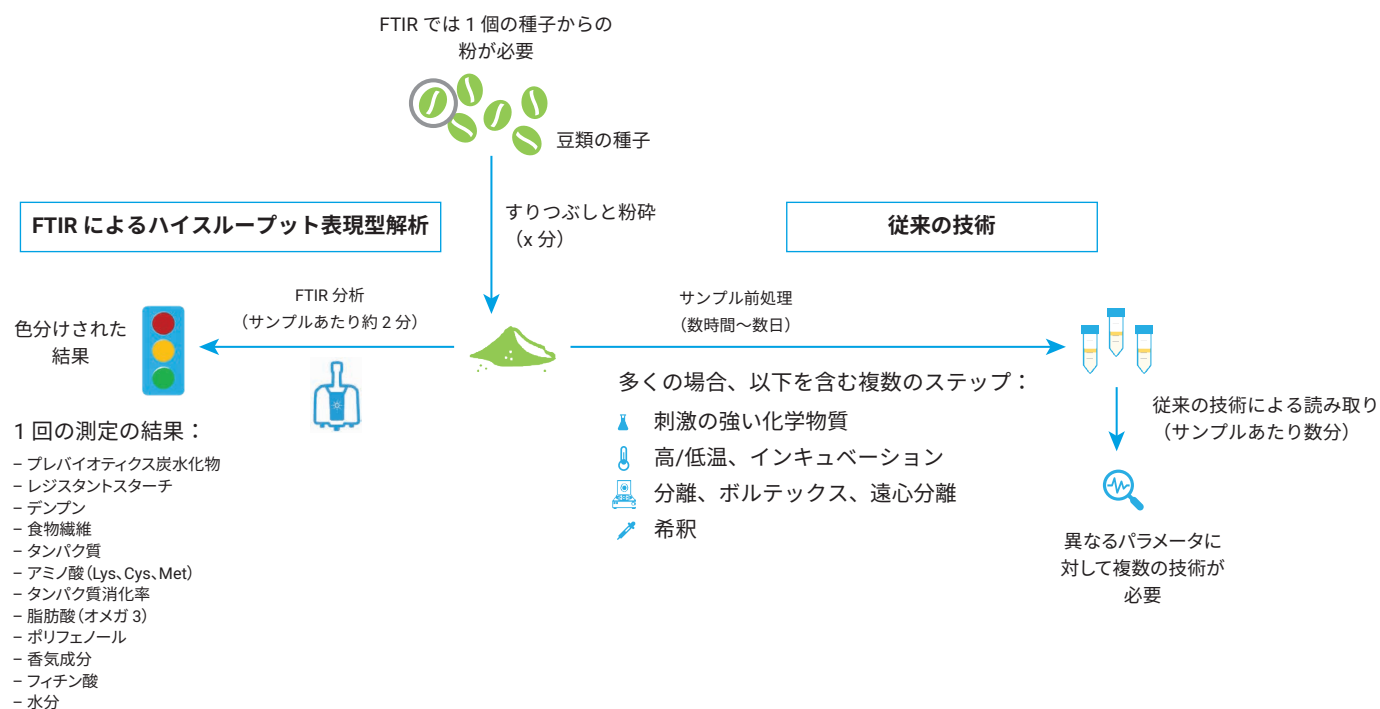


図 2. 従来の技術と FTIR 分光分析を用いた豆類の表現型解析におけるサンプル前処理の比較

ケモメトリックスモデリング

PLSR モデリングを用いて、FTIR スペクトルデータの予測測定値と、従来のメソッド（例えば、HPLC、GC、PDCAAS など）から得られた実際の値との間の関係を確立しました。

栄養素パラメータを FTIR スペクトル特性に関連付ける、各種パラメータ向けのケモメトリックスモデルは、高度なスペクトル解析用 FTIR ソフトウェアである MicroLab Expert ソフトウェアで生成しました。MicroLab Expert ソフトウェアは「キャリブレーションウィザード」を使用して、ケモメトリックスモデルの生成方法をユーザーにガイドします（図 3）。

その後、生成されたケモメトリックスモデルを、作物サンプルのルーチン分析のために Agilent MicroLab ソフトウェアへ実装することができます。

MicroLab ソフトウェアは、画像ガイド付きワークフローを使用して分析の各ステップをユーザーにガイドし、最終結果を色分けして表示します。これにより、システムの操作と結果の解釈がきわめて容易になるため、トレーニングの必要性和取り扱いミスが低減されます（図 4）。



図 3. キャリブレーションウィザードを用いたケモメトリックスモデルの生成



図 4. Agilent MicroLab ソフトウェアと Agilent FTIR 分光光度計を使用した 3 つのシンプルなステップにより、分析を簡単に実施できるため、トレーニングが不要になります。

豆類の栄養表現型解析のための定量モデル開発
(代表的な例)

ヒヨコマメ、乾燥エンドウマメ、レンズマメの粉中のタンパク質
の品質と消化率

豆類は、植物性タンパク質の供給源としてますます人気が高まっています。したがって、タンパク質の品質と消化率は、繁殖プログラムが対象とする重要な表現型形質です。豆類は、硫黄含有アミノ酸 (SAA) である L-メチオニンと L-シスチンが少ないことで知られています。⁹ 栄養素含有率を向上させるために、SAA を多く含む品種の生産が注目されています。さらに、繁殖プログラムでは、タンパク質消化率、すなわち必須アミノ酸を放出するために消化できるタンパク質の分画に関するデータが必要になります。消化率は、二次構造 (アルファシートおよびベータシート) の影響を受け、ベータシートの分画が低いほど消化率が高くなる傾向にあります。¹⁰

アミノ酸分析の一般的なメソッドでは、多くの場合、サンプル消化に 2 ~ 3 日を要し、その後 HPLC を用いた定量が行われます。消化率は通常、PDCAAS メソッドを用いて測定しますが、これには膨大なサンプル前処理と高コストのラボ手順が必要になります。このような分析技法では、高度なトレーニングを受けた作業者が必要になり、繁殖プログラムにおいて、ハイスループットのデータ取り込みを妨害するボトルネックが発生します。

Cary 630 FTIR 分光光度計の使用は、SAA および消化率などのタンパク質分析において、有効かつ効率的なアプローチであることが実証されました。タンパク質分析のための多変量モデルは、良好な予測精度と適合性を示しています ($R^2 \geq 0.815$ 、表 1)。⁷ さらに、t 検定では、実際のタンパク質の SAA 濃度と予測濃度の間に有意な差は認められませんでした ($\alpha = 0.05$)。⁷

表 1. 豆類中のタンパク質分析のための多変量モデル統計量⁷

モデル名	R ²	RMSEC	RMSECV	RMSEP	SEP	偏り
ヒヨコマメ 総タンパク質	0.948	0.093	0.093	0.10	0.10	-0.0057
乾燥エンドウマメ 総タンパク質	0.845	0.096	0.096	0.093	0.091	0.0039
レンズマメ 総タンパク質	0.845	0.13	0.13	0.11	0.11	0.016
レンズマメ SAA	0.827	0.014	0.014	0.022	0.021	-0.0066
レンズマメ メチオニン	0.815	0.0075	0.0075	0.014	0.014	0.0011

RMSEC = キャリブレーションの二乗平均平方根誤差

RMSECV = クロスバリデーションの二乗平均平方根誤差

RMSEP = 予測の二乗平均平方根誤差

SEP = 予測の標準誤差

タンパク質消化率について、モデルは、実際の測定値と予測値において高い R^2 値 (≥ 0.88) を達成しています (図 5)。⁸

また、両側 t 検定および F 検定 ($\alpha = 0.05$) でも、実際の消化率測定値と予測値の間に有意な差は認められませんでした。⁸

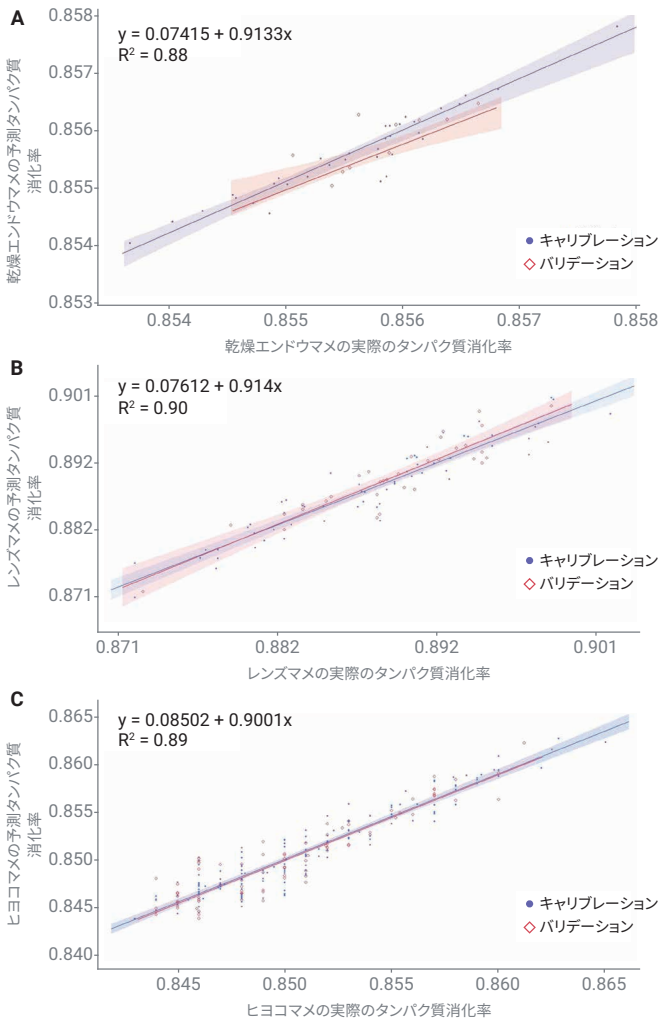


図 5. サンプルの実際のタンパク質消化率と FTIR 分析を用いた予測タンパク質消化率。精度と信頼性を確保するため、これらの分析には、キャリブレーションサンプルセットとバリデーションサンプルセットの両方を含めました。(A) 未消化の乾燥エンドウマメの粉の PLSR モデル性能。(B) 未消化のレンズマメの粉の PLSR モデル性能。(C) 未消化のヒヨコマメの粉の PLSR モデル性能⁸

ヒヨコマメの粉中の脂肪酸

ヒヨコマメは、他の豆類と比較して脂肪含有量が高くなっています（4～10%）。¹¹ヒヨコマメの脂肪酸は飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸であり、繁殖プログラムでは、リノレン酸（LA）やオレイン酸（OA）などの有益な脂肪の含有量が高い品種が対象となります。

Cary 630 FTIR 分光光度計は、ヒヨコマメの脂肪酸分析を高速かつ容易に行う有望なメソッドとして実証されており、総脂肪酸（TFA）、総不飽和脂肪酸（TUSFA）、総飽和脂肪酸（TSFA）の濃度を正確に予測できることが確認されました。3 モデルすべてにおいて、 R^2 値が 0.90 を超えていました（図 6）。⁵両側 t 検定（ $\alpha = 0.05$ ）では、実際の値と FTIR による予測値の間に有意な差は認められませんでした。⁵

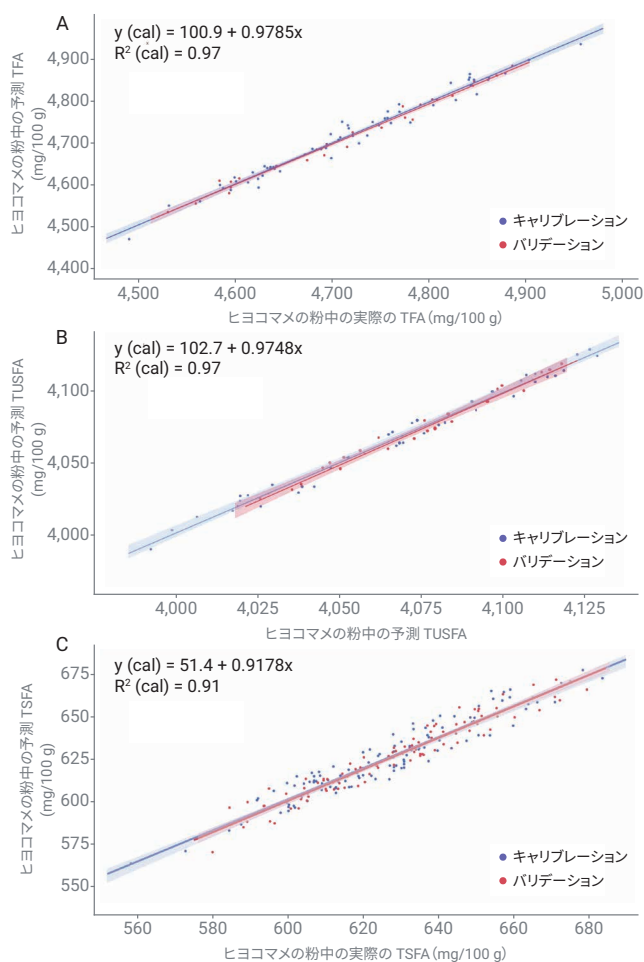


図 6. 実際の脂肪酸の測定値と FTIR 分析を用いた予測脂肪酸の測定値。精度と信頼性を確保するため、これらの分析には、キャリブレーションサンプルセットとバリデーションサンプルセットの両方を含めました。(A) 総脂肪酸（TFA）、(B) 総不飽和脂肪酸（TUSFA）、(C) 総飽和脂肪酸（TSFA）に対する PLS 回帰モデル⁵

ヒヨコマメ、乾燥エンドウマメ、レンズマメの粉中のデンプン分析

豆類中の炭水化物含有量の約 70～80% はデンプンであり、中でも顕著なのがレジスタントスターチ（RS）です。¹²RS は、健康な腸内細菌叢の促進など、多くのヒト健康効果を有する食物繊維として知られています。比色アッセイや酵素加水分解などの従来のデンプン定量メソッドは、ターンアラウンドタイムが長いと高コストになります。したがって、Cary 630 FTIR 分光光度計を使用することは、高速なデンプン分析のための有望な代替手法となります。

図 7 は、これらの作物中の実際のデンプン濃度と予測濃度を示しています。⁶

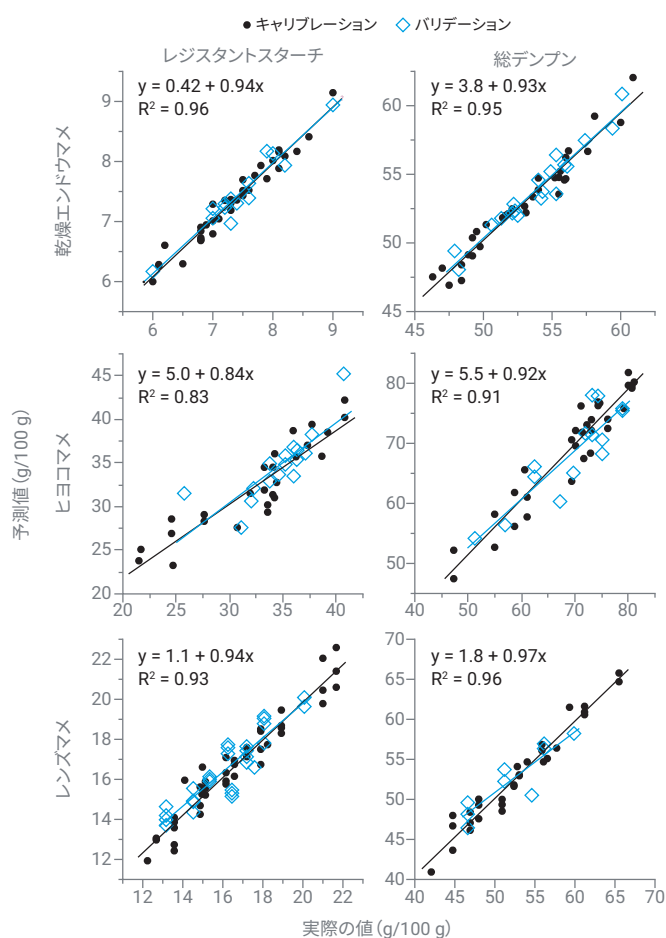


図 7. 乾燥エンドウマメ、ヒヨコマメ、レンズマメの粉中の実際のレジスタントスターチ濃度および総デンプン濃度、ならびにモデル予測した濃度。精度と信頼性を確保するため、これらの分析には、キャリブレーションサンプルセットとバリデーションサンプルセットの両方を含めました。キャリブレーションデータについては、方程式と R^2 値を示しています。⁶

FTIR モデルを用いた予測測定値は、高い多変量 R^2 値と十分な RMSEC 値を示しており、良好な性能を発揮しました（表 2）。⁶

表 2. 豆類中のレジスタントスターチおよび総デンプン（RS および TS）分析のための多変量モデル統計量⁶

モデル名	R^2	RMSEC	RMSECV	RMSEP	SEP
乾燥エンドウマメ RS	0.96	0.16	0.15	0.16	0.16
乾燥エンドウマメ TS	0.95	0.95	0.89	0.78	0.78
ヒヨコマメ RS	0.96	0.72	0.59	0.98	0.80
ヒヨコマメ TS	0.91	3.2	2.9	4.0	3.9
レンズマメ RS	0.93	0.84	0.70	0.84	0.77
レンズマメ TS	0.94	1.8	1.4	2.4	1.7

RMSEC = キャリブレーションの二乗平均平方根誤差

RMSECV = クロスバリデーションの二乗平均平方根誤差

RMSEP = 予測の二乗平均平方根誤差

SEP = 予測の標準誤差

作物サンプルの高速かつ容易なルーチン分析

高度な MicroLab Expert ケモメトリックスモデルエンジンを用いて開発および評価された予測モデルは、MicroLab ソフトウェアに実装可能であるため、作物サンプルの高速かつ容易な分析を実現できます（図 8）。

複数のモデル、したがって栄養素パラメータを単一のメソッドで適用できるため、1 回の測定で作物の特性の全体像を把握できます。これにより、オペレータのトレーニングの必要性、ユーザーエラーのリスクが低減され、結果生成までの時間が短縮されます。

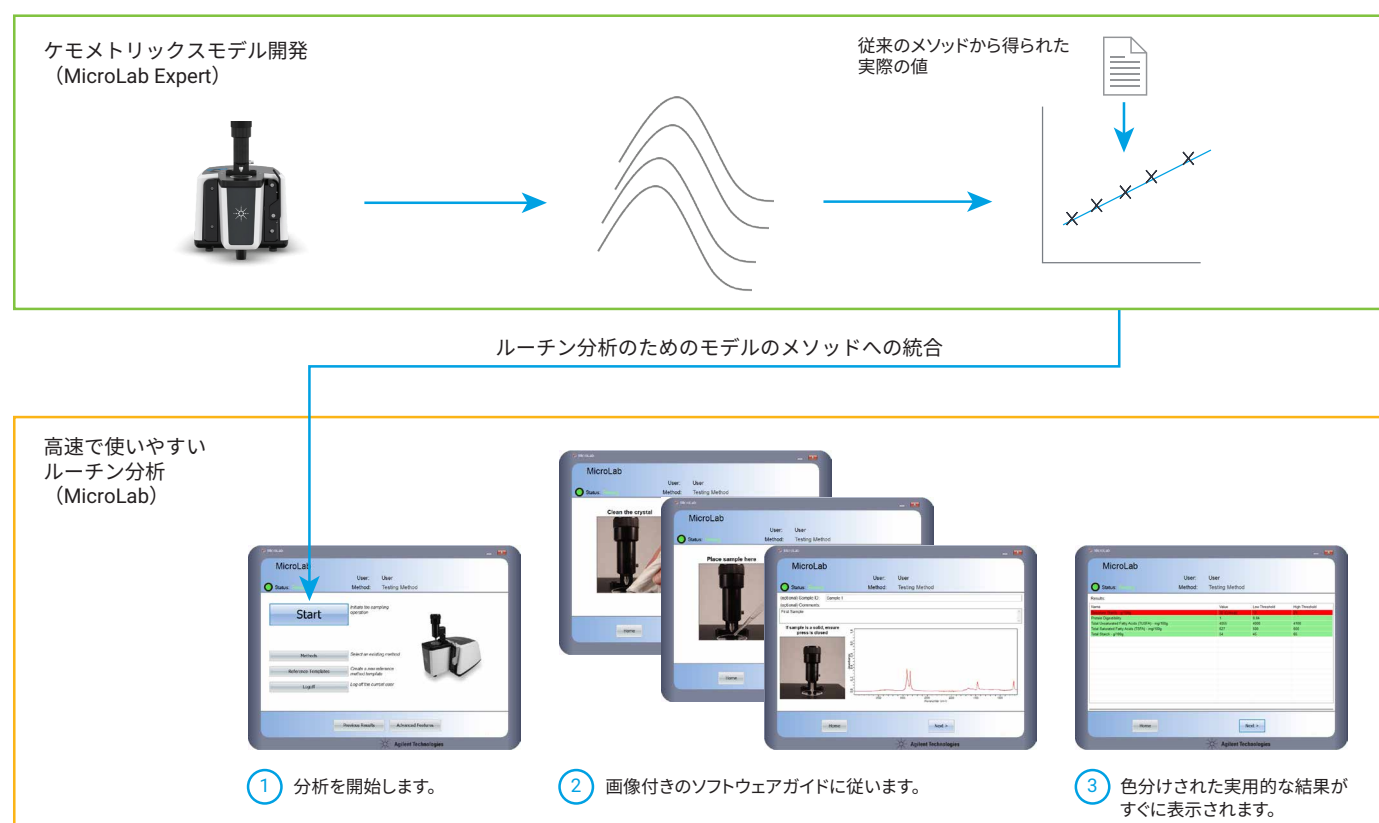


図 8. Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計を用いた高速かつ容易なルーチン分析への道筋。Agilent MicroLab Expert ソフトウェアと MicroLab Expert ケモメトリックスモデルエンジンにより、包括的なケモメトリックス予測モデルを開発することができます。このモデルはその後、使いやすい MicroLab ソフトウェアへ実装することができるため、分析の複雑さが解消されます。

結論

豆類の世界的な需要増加に伴い、これらの食料源の栄養表現型解析は、効率的かつ効果的な繁殖プログラムを確保するために不可欠です。さらに、分子繁殖技術（例えば、マーカー支援戻し交配やゲノム全体の関連研究など）の登場により、大規模な表現型解析データセットを効率的に収集する必要があります。ただし、従来の表現型解析メソッドでは、多くの場合、高コストの装置や化学物質を必要とする複雑で時間のかかるワークフローが必要になります。これによりスループットが低下して、豆類繁殖プログラムのニーズに適さない結果となります。

フーリエ変換赤外（FTIR）分光分析は、このような従来のメソッドの有望な代替技術として登場しています。Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計は、超コンパクトで手頃な価格かつ使いやすいパッケージにおいて、ハイスループットな結果を提供するように設計されています。操作には、技術的なトレーニングがほとんど、またはまったく必要なく、強力な MicroLab ソフトウェアにより操作が簡略化されています。このソフトウェアには、視覚的にガイドされたワークフローと、結果の高速かつ容易な解釈のための色分け機能が搭載されています。

さまざまな研究により、Cary 630 FTIR は、タンパク質^{7, 8}、脂肪酸⁵、デンプン⁶などの、豆類の栄養表現型形質を正確に分析および予測できることが示されています。Cary 630 FTIR 分光光度計を用いた高速かつコスト効率の優れた分析をワークフローに導入することにより、繁殖プログラムは、ゲノム発見の加速と世代時間の短縮を実現できる可能性があります。さらに、これらのソリューションは、栄養摂取の改善のため、資源不足の国々へのプログラム拡大の機会も提供することができます。

謝辞

この技術概要につながる研究およびサポートに対して、Dil Thavarajah 教授、Pushparajah Thava 博士、MBA、そして研究グループにアジレントから謝意を表します。

参考文献

1. Johnson, N.; Johnson, C. R.; Thavarajah, P.; Kumar, S.; Thavarajah, D. The Roles and Potential of Lentil Prebiotic Carbohydrates in Human and Plant Health. *Plants* **2020**. DOI: 10.1002/ppp3.10103.
2. Foyer, C. H.; Lam, H.-M.; Nguyen, H. T.; Siddique, K. H. M.; Varshney, R. K.; Colmer, T. D.; Cowling, W.; Bramley, H.; Mori, T. A.; Hodgson, J. M.; et al. Neglecting Legumes Has Compromised Human Health and Sustainable Food Production. *Nature Plants* **2016**, 2, 16112. DOI: 10.1038/nplants.2016.112.
3. Liu, X.; Qin, D.; Piersanti, A.; Zhang, Q.; Miceli, C.; Wang, P. Genome-Wide Association Study Identifies Candidate Genes Related to Oleic Acid Content in Soybean Seeds. *BMC Plant Biol.* **2020**, 20(1), 1–14. DOI: 10.1186/s12870-020-02607-w.
4. Sab, S.; Lokesh, R.; Mannur, D. M.; Somasekhar, J. K.; Mallikarjuna, B. P.; Laxuman, C.; Yeri, S.; Valluri, V.; Bajaj, P.; et al. Genome-Wide SNP Discovery and Mapping QTLs for Seed Iron and Zinc Concentrations in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Front. Nutr.* **2020**, 7, 559120. DOI: 10.3389/fnut.2020.559120.
5. Madurapperumage, A.; Johnson, N.; Thavarajah, P.; Tang, L.; Thavarajah, D. Fourier-Transform Mid-Infrared (FT-MIR) Spectroscopy as a High-Throughput Phenotyping Tool for Measuring Total Fatty Acids in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Flour. *ACS Food Sci. Technol.* **2023**, 3(9), 1568–1576. DOI: 10.1021/acsfoodscitech.3c00239.
6. Johnson, N.; Thavarajah, P.; Madurapperumage, A.; Windsor, N.; Tang, L.; Thavarajah, D. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy: An Inexpensive, Rapid, and Less-Destructive Tool for Starch and Resistant Starch Analysis from Pulse Flour. *Plant Phenome J.* **2023**, 6(1), 1. DOI: 10.1002/ppj2.20086.

7. Madurapperumage, A.; Johnson, N.; Thavarajah, P.; Tang, L.; Thavarajah, D. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) as a High-Throughput Phenotyping Tool for Quantifying Protein Quality in Pulse Crops. *Plant Phenome J.* **2022**, 5, e20047. DOI: 10.1002/ppj2.20047.
8. Madurapperumage, A.; Windsor, N.; Johnson, N.; Thavarajah, P.; Tang, L.; Thavarajah, D. Fourier-Transform Mid-Infrared Spectroscopy for In Vitro Protein Digestibility Measurement of Pulse Crops. *Crop Sci.* **2024**, 1–12. DOI: 10.1002/csc2.21300.
9. Boye, J.; Wijesinha-Bettoni, R.; Burlingame, B. Protein Quality Evaluation Twenty Years After the Introduction of the Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score Method. *Br. J. Nutr.* **2012**, 108 (2, Suppl), S183–S211. DOI: 10.1017/S0007114512002309.
10. Carbonaro, M.; Maselli, P.; Nucara, A. Relationship Between Digestibility and Secondary Structure of Raw and Thermally Treated Legume Proteins: A Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic Study. *Amino Acids* **2012**, 43(2), 911–921. DOI: 10.1007/s00726-011-1151-4.
11. USDA: Food Data Central. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/174288/nutrients> (accessed 2023-06-01).
12. Ren, Y.; Yuan, T. Z.; Chigwedere, C. M.; Ai, Y. A Current Review of Structure, Functional Properties, and Industrial Applications of Pulse Starches for Value-Added Utilization. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, 20(3), 3061–3092. DOI: 10.1111/1541-4337.12735.

詳細情報

- Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計
- Agilent MicroLab ソフトウェア
- Agilent MicroLab Expert ソフトウェア
- FTIR 分析およびアプリケーションガイド
- FTIR 分光分析法の基礎 – FAQ

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-004512

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, April 7, 2025

5994-8264JAJP