

高濃度ポリフェノール含有天王寺蕪スプラウト 作出のための養液条件の検討 — アミノ酸添加の影響 —

大西浩之・治京玉記

Examination of Hydroponic Culture Condition for the Development of Polyphenol-rich Tennoji Turnip Sprouts — Effects of Amino Acid Ingredients —

Hiroyuki OHNISHI, Tamaki JIKYO

Abstract

To explore an optimal condition for polyphenol-rich sprout of Tennoji turnip, we investigated the effect of amino acid supplementation in the culture medium of sprouts. Addition of phenylalanine, a substrate of flavonoid biosynthetic pathway, into the culture media significantly increased total polyphenol concentration of the sprouts postharvest, as compared with the same amount of nitrate nitrogen, a lithotrophic ingredient. Phenylalanine plus glutamine also promoted the polyphenol concentration. As for growth and yields of the sprouts, phenylalanine did not affect hypocotyl length and root length, but it significantly reduced fresh weight of the harvests. The yield-reducing effect of phenylalanine was abrogated by addition of glutamine or nitrate nitrogen into the media. Therefore, an addition of phenylalanine and glutamine to the culture medium is effective to enhance the production of antioxidants. Also, glutamine would avoid the phenylalanine-induced reduction in the growth of Tennoji turnip sprouts.

Keywords ; Tennoji turnip 天王寺蕪, Sprout スプラウト, Antioxidant 抗酸化物質,
Polyphenol ポリフェノール, Flavonoid フラボノイド, Amino acid アミノ酸

1. はじめに

カブ（蕪、学名 *Brassica rapa*）はアブラナ科植物で、古くは日本書紀にその記述があり、多くの品種が国内に存在する。その中で天王寺蕪は大阪市天王寺周辺が発祥とされ、江戸時代から栽培されている⁽¹⁾（図1）。収穫した蕪が不揃いであることや、虫害などで安定な収穫が難しいこともあり一時期市場か

ら姿を消していたものの、その美味しさや伝統野菜の復活を目指した栽培が大阪府内で広がり、現在では19品目あるなごの伝統野菜の1つとして認定されている⁽¹⁾。カブはその肥大部のみならず、葉部にも β -カロテン、アスコルビン酸、カルシウムなどの栄養素を肥大部以上に含み⁽²⁾、食用として供される。天王寺蕪の利用をさらに広げていくた



図1. 天王寺蕪（大阪府リーフレット「なにわの伝統野菜」⁽¹⁾より）

めに、栄養機能性を訴えていくことが有効であると思われる。

活性酸素やフリーラジカルの過剰産生による酸化ストレスは、心血管疾患・糖尿病・悪性腫瘍などの生活習慣病の発症をもたらす因子である⁽³⁾。この背景から、抗酸化物質を豊富に含む食品を摂取し、生活習慣病の発症予防につなげる試みが行われている。スプラウトは植物の新芽であり、アスコルビン酸やポリフェノールといった抗酸化物質を豊富に含んでいる。近年様々な植物のスプラウトが選択され^{(4), (5)}、市場にも現れるようになってきた。また、スプラウトに照射する光の波長や強度、栽培温度、養液成分など生育環境を改変することで抗酸化物質の産生を高める研究も行われている⁽⁶⁾⁻⁽⁹⁾。

植物は窒素をアンモニウムイオン (NH_4^+) あるいは硝酸イオン (NO_3^-) つまり無機態窒素の形態で吸収して同化し、アミノ酸であるグルタミンを合成する。このグルタミンをもとにしてグルタミン酸を、さらに、これに続くアミノ基転移反応によってタンパク質合成に必要な20種類のアミノ酸を生合成する(図2a)。ポリフェノールはフェノール性ヒドロキシ基を複数有する分子の総称である。ポリフェノールのうち、ダイコンやカブ、ブロッコリーなどのアブラナ科植物に豊

富なフラボノイドの生合成はアミノ酸であるフェニルアラニン为原料とし、植物体内の一連の酵素反応で行われる(図2b)。以上のことから、作物の生育には窒素が必要であることは明らかで、施肥においては無機態窒素の使用が広く行われている。一方で、無機態窒素だけでなく、アミノ酸などの有機態窒素も植物の生長に寄与することが報告されている^{(10), (11)}。しかし、与えられたアミノ酸などの有機態窒素が作物のポリフェノール含量にどう影響するかについては報告が少ない。

本研究は、ポリフェノールを豊富に含む天王寺蕪スプラウトを作出することを目的とした。水耕栽培液へのアミノ酸添加がスプラウトのポリフェノール含量を増加させるの

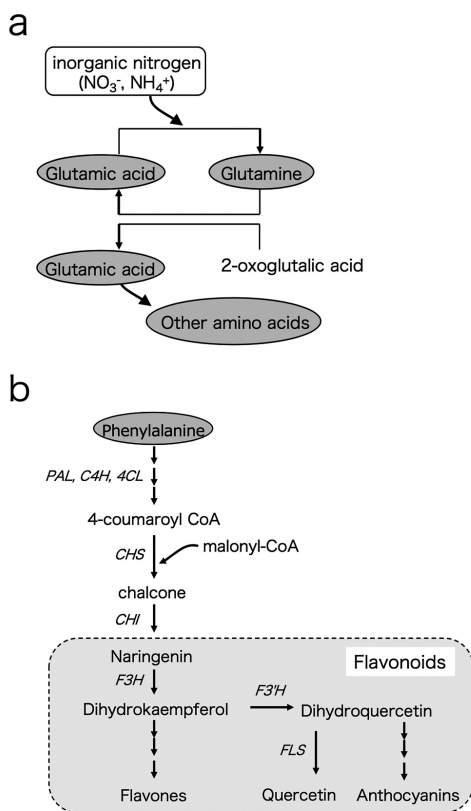


図2. アミノ酸とフラボノイドの生合成経路

a. 無機態窒素からのアミノ酸生合成。b. フェニルアラニンからのフラボノイド生合成。斜体字は各反応に関わる酵素の名称。

か、窒素同化されてはじめて合成されるグルタミンと、フラボノイド生合成経路の基質物質であるフェニルアラニンを用いて検討した。

2. 実験方法

2.1. 天王寺蕪スプラウトの栽培

天王寺蕪の種子（赤松種苗、大阪）を使用した。0.8 g の種子をスプラウト作製用の小コンテナ（「おうちでベジ」、10.2 × 14 × 6.2 cm、グリーンフィールドプロジェクト、熊本）に播種し、市販の植栽ボックス（「インテリジェント水耕野菜屋内植栽ボックス」、白色 LED 光源、50 × 35 × 27 cm、LAZHKG 社、中国）内で水耕栽培した。栽培は室温で7日間行った。種子をまず遮光下で24時間イオン交換水に漬けた。次に、下記に示す養液を使用して遮光下で5日間栽培した。さらに24時間、LED光源下で栽培して緑化スプラウトを得た。養液は窒素源としてL-グルタミン、L-フェニルアラニン、硝酸ナトリウムおよびそれらを組み合わせたものを使用し、それぞれの養液は窒素濃度が5 mM になるように調製した（組み合わせの場合は各2.5 mM ずつで混合）。また対照としてイオン交換水を用意した。すべての養液はHClあるいはNaOHでpHを5.5に調整した。

2.2. スプラウトの胚軸長・根長および新鮮重量の測定

収穫したスプラウトから20個体を無作為に抽出し、デジタルノギス（コーナン商事、大阪）で胚軸長（子葉から幼根までの長さ）および根長（幼根の長さ）を測定した。また、電子天秤を用いてそれぞれの重量を計測し新鮮重量とした。

2.3. 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノールの定量は、松本らの方法⁽⁸⁾を参考にして、フォーリン・チオカルト法による比色定量で行った。収穫後、小コ

ンテナ1つで栽培したスプラウトを1セットとし、各養液群につき6セットずつ用意して総ポリフェノール含量を測定した（n = 6）。収穫したスプラウトの地上部を細切し、0.5%の塩酸を含むメタノール溶液を加えてホモジナイズした。これを3000 rpm、10分間遠心して得た上清を試料とした。試料にフォーリン試薬（フェノール試薬、キシダ化学、大阪）を添加し3分後、10%炭酸ナトリウム溶液と混合し60分経過後に700 nmの吸光度を測定した。ケルセチン（富士フィルム和光純薬、大阪）を標準とした検量線を作成し、試料中の総ポリフェノール濃度（以下「総ポリフェノール含量」と呼ぶ）を算出した。総ポリフェノール含量は単位新鮮重量あたりの数値として求め、ケルセチン当量（mg quercetin equivalent/g fresh weight : mg QE/g fw）で示した。

2.4. 統計解析

測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析はStatView ver.5（SAS Institute, Inc., ノースカロライナ、アメリカ）を使用し、一元配置分散分析後にTukey-Kramer法で多重比較を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありとした（図3～6において、異なるアルファベット間には有意差あり）。

3. 結果

3.1. 天王寺蕪スプラウトの生長に及ぼすアミノ酸添加の影響

(1) 胚軸長

栽培7日後のスプラウトの胚軸長（Hypocotyl length）を図3に示した。対照であるイオン交換水（H₂O）群と比較して、フェニルアラニン（Phe）群以外は胚軸長が長い傾向にあったが、どの群間にも有意な差はなかった。

(2) 根長

栽培7日後の根長（Root length）を図4に

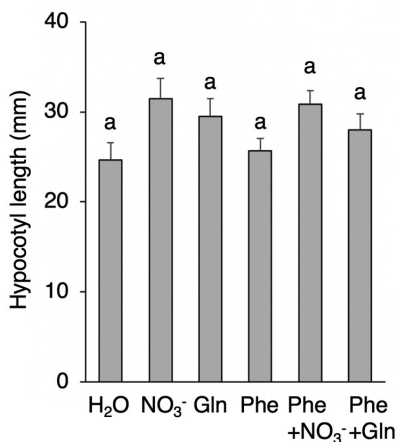


図3. スプラウトの胚軸長 (n = 20)

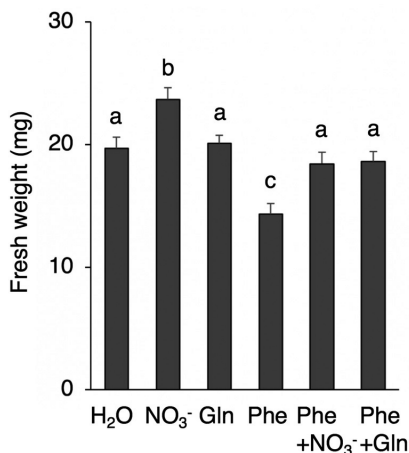


図5. スプラウトの新鮮重量 (n = 20)

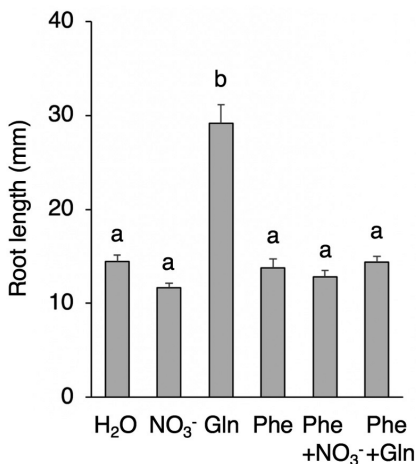


図4. スプラウトの根長 (n = 20)

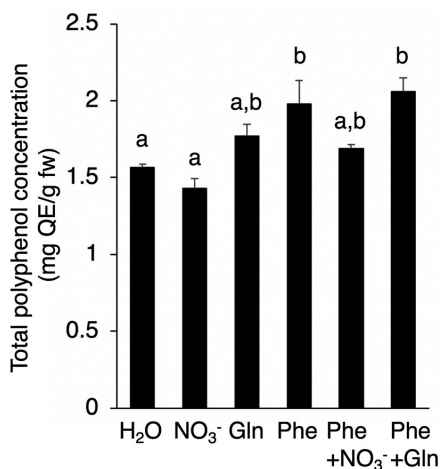


図6. スプラウト中の総ポリフェノール含量 (n = 6)

示した。H₂O 群 (14.4 ± 0.73 mm) と比較して、グルタミン (Gln) 群 (29.2 ± 1.96 mm) で有意に根長が大きかった。グルタミンにフェニルアラニンを加えた (Gln+Phe) 群では H₂O 群との差は認められなかった。このほか、硝酸ナトリウム (NO₃⁻) 群 (11.6 ± 0.49 mm) で H₂O 群よりも根長がやや短い傾向があったが、有意な差はなかった。

(3) 新鮮重量

栽培7日後における、個体当たりの胚軸部分の新鮮重量 (Fresh weight) を図5に

示した。H₂O 群 (19.69 ± 0.91 mg) と比較して、NO₃⁻ 群 (23.66 ± 0.97 mg) で有意に大きかった。また Phe 群 (14.31 ± 0.89 mg) で有意に小さかった。Gln+Phe 群では、H₂O 群と比較して新鮮重量に有意な差は認められなかった。

3.2. 天王寺蕪スプラウトの総ポリフェノール含量に及ぼすアミノ酸添加の影響

栽培7日後における、単位新鮮重量あたりの総ポリフェノール含量を図6に示した。

Phe 群および Gln+Phe 群において、H₂O 群と比較して有意に総ポリフェノール含量が高かった (H₂O: 1.57 ± 0.02、Phe: 1.98 ± 0.16、Gln+Phe: 2.05 ± 0.09 mg QE/g fw)。一方で NO₃⁻+Phe 群では、H₂O 群との差は認められなかった。

4. 考察

天王寺蕪の機能性を高め、付加価値を向上させる方法の一つとして、抗酸化物質を多く含むスプラウトの作出を検討した。養液にフェニルアラニンを添加して栽培することで、総ポリフェノール濃度が高い天王寺蕪スプラウトを得ることができた。本研究では、フラボノイド生合成の基質物質を増加させることでフラボノイド量の増加を期待したが、このほかにも、フラボノイド生合成経路に関わる酵素の発現を高めることが有効と考えられる。フラボノイドなどの抗酸化物質の産生は日光による傷害に対する植物の防御反応の一つと言え、生合成経路の酵素であるフラボノイド合成酵素 (FLS) の発現は光によって増加することが知られている⁽¹²⁾。また、ポリフェノール産生に及ぼす光の波長や強度についても検討がなされている^{(6), (7)}。本研究の結果と併せて、照射光についても最適化を図ることで、ポリフェノールを高濃度に含有する天王寺蕪スプラウトを開発できると予想される。

フェニルアラニンが天王寺蕪の総ポリフェノール含量を増加させたことから、このアミノ酸が抗酸化物質含量を増やすための有機肥料として有用である可能性が示唆された。しかし、フェニルアラニンの添加によって胚軸長や根長への大きな影響はなかったものの、天王寺蕪スプラウトの新鮮重量が抑制された。有機態窒素としてアミノ酸を養液に利用するとき、フェニルアラニンやバリンなどのアミノ酸は生育を阻害し、グルタミンやアスパラギン酸は生育を促進することが報告され

ている⁽¹³⁾⁻⁽¹⁵⁾。報告の中で、フェニルアラニンのようなアミノ酸生合成経路の末端で生成するアミノ酸は代謝利用がされにくく、植物体内に蓄積するため作物の生育が阻害されると述べられている⁽¹⁵⁾。またグルタミンは無機態窒素が同化されてはじめて生じるアミノ酸であり、植物内で効率的に利用されるため、作物の生育を促進すると推測されている⁽¹⁵⁾。本研究では、フェニルアラニンを含む養液にグルタミンも添加することで、フェニルアラニン単独で認められるスプラウトの生育抑制を軽減し、対照群と同程度の収穫量を得ることができた。一方で、フェニルアラニンに無機態窒素を添加した NO₃⁻+Phe 群では、生育抑制が見られないがポリフェノール含量の増加も認められなかった。NO₃⁻が制限されるといった、植物体にストレスがかかるような状況では、ストレス耐性の一つとしてフラボノイド産生が高まる可能性が報告されている^{(16), (17)}。このことから、無機態窒素が添加された条件では、植物体のストレスが少なく、フラボノイドの産生増強が認められなかったのかもしれない。

二瓶ら⁽¹⁸⁾はイネを用いた研究において、グルタミンは窒素同化に光合成産物を必要としないことから、特に地下部の発達に有利ではないかと述べている。彼らはグルタミンの同位体のトレーサー実験などから、グルタミンがアミノ酸として根に直接吸収されること、細胞分裂がさかんな根端組織に局在していること、グルタミンは地下部においてその90%近くがタンパク質合成に利用されること、またグルタミンは代謝を受け、窒素がアミノ基転移で使用されたのちはTCAサイクルを経由して二酸化炭素となっていることを示している⁽¹⁸⁾。本研究でも、NO₃⁻群やフェニルアラニン群と比較して、グルタミン群でスプラウトの根の発達が著しいという結果が得られた。イネ科植物とは異なるが、アブラナ科植物である天王寺蕪においても養液から

吸収されたグルタミンが根組織の発達に寄与することが推察される。このほか、グルタミンとフェニルアラニンを組み合わせて栽培したスプラウトでは、グルタミン単独のような根の生育促進は見られなかった。フェニルアラニン単独で有意な根の生長阻害は認められていないものの、新鮮重量は減少した。二瓶らの報告⁽¹⁸⁾のように、フェニルアラニンが何らかの生育阻害作用を示した可能性がある。

天王寺蕪は「天王寺浮き蕪」とも言われるように、可食部が地上に浮くように育つ。山崎⁽¹⁹⁾は、天王寺蕪の地上胚軸部を遮光して栽培すると、遮光された部分は肥大せず、その上の胚軸部が肥大することを観察している。このことから山崎は、天王寺蕪の可食部の肥大には胚軸の地上部が関係しているのではないかと推察している⁽¹⁹⁾。本研究では、ポリフェノール含量は地上部で測定している。今回のようにフェニルアラニンを用いて施肥すると、土壌栽培した天王寺蕪の肥大可食部においてもポリフェノール含量が高まるかもしれない。ただし、本研究は水耕栽培による実験であり土壌栽培とは異なること、また作物の生育段階でもアミノ酸の必要性が異なることから、天王寺蕪の土壌栽培でのアミノ酸の肥料効果についてはさらなる検討が必要である。

野菜や果実において、ポリフェノール含量と抗酸化性は良く相関するものの必ずしも一致しない^{(20),(21)}とされている。このことから、天王寺蕪スプラウトの抗酸化活性に関して、DPPH ラジカル消去能の測定といった他の指標についても解析をしていく必要がある。また、養液中のアミノ酸が植物体に直接吸収され、それがポリフェノールに代謝されるかどうかについては、無菌的な栽培をもって議論しなければならない。このほか、スプラウト内で産生されたポリフェノールがどのような物質なのか、クロマトグラフィーを用いた分

析を行うことで、天王寺蕪スプラウトの機能性の詳細とその改良方法を明らかにすることができると考えられる。これらは今後の課題であるが、今回の検討の結果、天王寺蕪の総ポリフェノール含量を、フェニルアラニンとグルタミンの養液への添加で高めることができた。本研究は、機能性スプラウトの開発に有用な知見を与え、伝統野菜である天王寺蕪の生産振興につながるものと考えられる。

5. まとめ

ポリフェノールを高濃度に含む天王寺蕪スプラウトを開発することを目的として、その養液条件の探索を、とくにフラボノイド生成の原料であるアミノ酸に着目して行った。

フェニルアラニンの養液への添加によって、スプラウト胚軸部中の総ポリフェノール含量が有意に増加した。同じ窒素源である硝酸態窒素の添加では、総ポリフェノール量の増加は認められなかった。

スプラウトの生育に関しては、フェニルアラニンの添加によって新鮮重量に有意な減少が認められた。この生育抑制効果は、養液にグルタミンを追加することで阻止された。

以上から、フェニルアラニンおよびグルタミンを添加して栽培することによって、ポリフェノール含量の高い天王寺スプラウトを効率的に栽培することができると考えられた。

6. 参考文献

- (1) リーフレット「なにわの伝統野菜」について、大阪府. 2021年12月7日閲覧。
URL : <https://www.prefosaka.lg.jp/>
- (2) 日本食品標準成分表2020年版(八訂).
- (3) Pisoschi AM., and Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.*, Vol.97, 55-74 (2015).
- (4) 間瀬民生・垣見友子・筒井三貴, 市販スプラウト類の抗酸化性を中心とした食材

- としての評価, 椋山女学園大学研究論集, Vol.39, pp.131-139 (2008).
- (5) 澤井祐典・沖智之・西場洋一・奥野成倫・須田郁夫・渡辺慎一, アブラナ科スプラウトのアスコルビン酸含量, 日本食品科学工学会誌, Vol.61, pp.218-222 (2014).
- (6) 前川健二郎・前田智雄・大島千周・鈴木卓・大澤勝次, 数種アブラナ科スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化能に及ぼす照射光強度の影響, 園芸学会雑誌, Vol.5, pp.315-320 (2006).
- (7) Ebisawa M., Shoji K., Kato M., Shimomura K., Goto F., and Yoshihara T. Supplementary ultraviolet radiation B together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.), Environ. Control Biol., Vol.46, pp.1-11 (2008).
- (8) 松本恵子・多田雄一・清水浩・澁澤栄, カイワレダイコン (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwardaikon (Japanese radish sprout)') の生育および抗酸化活性に与える気温の影響, 植物環境工学, Vol.21, pp.29-34 (2009).
- (9) 大津浩平・細見亮太・福永健治・吉田宗弘, セレン強化スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化活性の評価, Trace Nutrients Research, Vol.34, pp.27-32 (2017).
- (10) Matsumoto S., Ae N., and Yamagata M. Extraction of mineralizable organic nitrogen from soils by a neutral phosphate buffer solution, Soil Biol. Biochem., Vol.32, pp.1293-1299 (2000).
- (11) 武田容枝, 野菜の品質は有機質肥料の施用で向上されるのか?, 福島県農業総合センター研究報告, Vol.4, pp.1-14 (2012).
- (12) Ferreyra MLF., Rius S., Emiliani J., Pourcel L., Feller A., Morohashi K., Casati P., and Grotewold E. Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase, Plant J., Vol.62, pp.77-91 (2010).
- (13) Ghosh BP., and Burris RH. Utilization of nitrogenous compounds by plants, Soil Scienc., Vol.70, pp.187-204 (1950).
- (14) 森敏, 植物の無機栄養説批判, 東京大学博士論文 (1979).
- (15) 二瓶直登・増田さやか・田野井慶太郎・頼泰樹・中西友子, 無菌栽培でアミノ酸を窒素源としたときの作物の初期生育, 日本作物学会記事, Vol.81, pp.194-200 (2012).
- (16) Toor Rk., Savage GP., and Heeb A. Influence of different types of fertilizers on the major antioxidant components of tomatoes, J. Food Comp. Analys., Vol.19, pp.20-27 (2006).
- (17) Orcini F., Maggio A., Roupheal Y., and De Pascale S. "Physiological quality" of organically grown vegetables, Scientia Horticulturae, Vol.208, pp.131-139 (2016).
- (18) 二瓶直登, 植物のアミノ酸吸収・代謝に関する研究, 福島県農業総合センター研究報告, Vol.2, pp.21-97 (2010).
- (19) 山崎基嘉, 地上胚軸長の違いが「天王寺」カブの肥大生長に及ぼす影響, 近畿中国四国農業研究, Vol.19, pp.31-35 (2011).
- (20) 高橋学・樋口誠一, 県内植物資源に由来する機能性ポリフェノールの探索, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, Vol.5, pp.81-85 (2007).
- (21) 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木征吉, 各種野菜類の抗酸化性評価および数種の抗酸化成分の同定, 日本食品工業学会誌, Vol.41, pp.611-618 (1994).