

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12725

研究課題名(和文) 就眠野菜の機能性は日内リズムを刻むのか？

研究課題名(英文) Relationship between biological functions and sleep-movements exerted in leguminous plant

研究代表者

榊原 啓之 (Sakakibara, Hiroyuki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20403701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：就眠リズムを刻むことが知られているマメ科植物の中からダイズを選択し、そのイソフラボン含量や抗酸化活性、生合成系遺伝子に及ぼす収穫時刻の影響を評価した結果、次の成果を得た。(1) ダイズ葉は明確な就眠リズムを刻んでいる。(2) ダイズ葉が有する抗酸化活性は、明期開始時に比べて暗期開始時に高まる。エダマメ豆果内では、(3) 時計遺伝子であるLUXが明確な日内リズムを刻んでいる、(4) イソフラボン合成系の中で桂皮酸4-水酸化酵素(C4H)の発現が、ZT6にピークを示す日内リズムを刻んでいる可能性がある。(5) イソフラボン含量はZT6に低値を示す。

研究成果の概要(英文)：Soy bean, one of the major leguminous plants, are widely recognized to exert sleep-movement rhythm. In this study, we evaluated the relationship between biological functions and its sleep-movements, and obtained the following results. (1) soy bean leaf indicated clear sleep-movement rhythm, (2) antioxidant activity was stimulated the beginning of dark period, (3) gene expression of LUX indicated typical diurnal rhythm, (4) isoflavone amounts decreased at ZT6, and (5) gene expression of C4H concerning isoflavone synthesis reached at maximum at ZT6 in a legume.

研究分野：食品機能学

キーワード：生物時計 マメ科植物 ダイズ エダマメ 就眠リズム 抗酸化活性 イソフラボン

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究背景と国内外の研究動向・位置づけ

国民の健康増進を目的として制定された「健康日本 21」では、我々日本人は、1日 350 g 以上の野菜摂取が推奨されている。このように多くの野菜を毎日摂取すべき理由の一つは、野菜に豊富に含まれているビタミンやミネラルなどの栄養成分、食物繊維やポリフェノールなどの機能性成分にある。ところが、我が国の野菜消費量は年々減少傾向にあり、現在では1日の平均的な摂取量は 300 g に届いていない(厚生労働省、国民健康・栄養調査)。そこで、このような栄養成分や機能性成分を豊富に含んだ品種の探索や改良を目的とした研究が、近年広く行われている。つまり、ビタミンやポリフェノールなどの成分に富んだ野菜、高い機能性を有する野菜を見出す事は、重要な研究課題の一つである。

(2) 着想に至った経緯

申請者らはこれまでに、野菜中のポリフェノール含量を網羅的に測定し(Sakakibara *et al. J Agric Food Chem*, 2003)、それら成分に抗酸化などの様々な機能があることを *in vitro* 試験(Sakakibara *et al. Free Radic Res*, 2002) や *in vivo* 試験(Yokoyama, Sakakibara *et al. Free Radic Res*, 2009) で見出してきた。近年は、我々の体内に存在している一日のリズムを創り出すシステム(生物時計)に着目した研究を展開しており、例えば、機能性成分の体内動態が摂取時刻によって異なることを報告している(Tsurusaki, Sakakibara *et al. J Clin Biochem Nutr*, 2013)。一方、マメ科植物のオジギソウが刻んでいる就眠リズムを1週間測定した時に、植物も動物と同様に、光や温度の刺激とは独立して体内で時を刻む機構を有していることを知った(榊原他, *New Food Industry*, 2013)。さらに「植物は紫外線等の刺激から身を守るためにポリフェノールなどの成分を合成する」、「ハウレンソウなどの野菜は、収穫後も生物時計が日周リズムを刻んでいる(Goodspeed *et al. Curr Biol*, 2013)」などの知見から、野菜に含まれる成分や発揮される機能性に日周リズムがあることを科学的に証明できれば、機能性に富んだ収穫時間の提案が可能となると考えた。

2. 研究の目的

動植物体内には広く生物時計が存在しており、体内で見られる様々な生命現象が約 24 時間周期のリズムを刻んでいる。それ故に、近年、我々ヒトが摂取した食べ物に含まれる成分の体内への吸収量や体内で発揮される機能が、食べる時間帯によって異なる可能性を示唆する結果が注目を浴びている。ところが、植物性食品の体内で生物時計が刻んでいるリズムと、そこに含まれる成分や機能性とを結び付けた食品機能の研究は皆無である。本研究では、明確な就眠リズムを刻むマメ科

植物を栽培し、ポリフェノールなどの機能性成分の含有量、抗酸化などの機能性が一日の中で高まる時間帯があるか否かを明らかにする。この研究によって、野菜には機能性を効果的に発揮する収穫時間が存在することを示すことが可能となり、今後の食品の機能性研究の発展にも寄与できる。

3. 研究の方法

(1) 人工気象室栽培試験

主要なダイズ品種の1つであるフクユタカを、図1に示す人工気象室内にて14時間の長日環境下で栽培した(明期 ZT0~14; 暗期 ZT14~24)。人工気象室内の条件は、室温 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (明期 ZT0~14), $23 \pm 2^\circ\text{C}$ (暗期 ZT14~24)、光源のPPFD値 $2,400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} / 300 \text{ nm}$ である。発芽15日よりインターバルレコーダーを用いて、10分間隔で7日間、恒常的明期条件下で葉の挙動を撮影した。次に、発芽後12週目に、明期開始時(ZT0)および暗期開始時(ZT14)に葉および豆果(エダマメ)を採取し、DPPHラジカル消去活性法を用いて抗酸化活性を測定した。さらに、エダマメ中のイソフラボン含量をHPLC-PDA法、イソフラボンの生合成系を司っている遺伝子(C4H, IFS)の発現量を定量的RT-PCR法を用いて解析した。

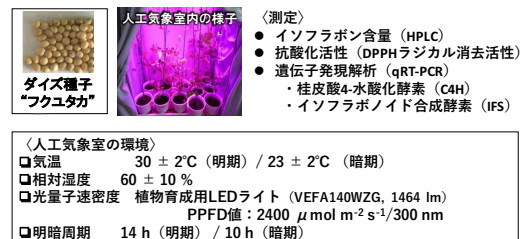


図1. 人工気象室栽培試験条件

(2) 野外ハウス栽培試験

2017年にフクユタカを宮崎大学木花フィールド(宮崎市)にて露地栽培した(図2)。発芽後99日目にエダマメ、120日目にダイズを日出時刻(ZT0)を基準として、6時間おきに豆果を5回採取し、イソフラボン含量、生物時計に関わる遺伝子(GmLUXc)やイソフラボンの生合成系を司っている遺伝子(C4H, IFS)の発現量を比較測定した。

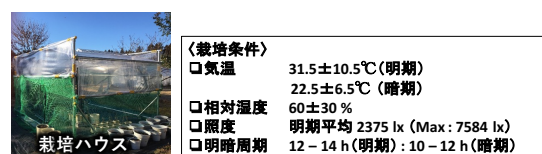


図2. 野外ハウス栽培試験条件

4. 研究成果

(1) 人工気象室栽培試験

1-1. ダイズ葉の就眠リズム

ダイズ葉が刻んでいる就眠リズムを測定した結果、日内の平均開葉時間 11.9 ± 0.1 時間、平均閉葉時間 12.1 ± 0.1 時間と、明確な就眠リズムを刻んでいることを確認した (図3)。

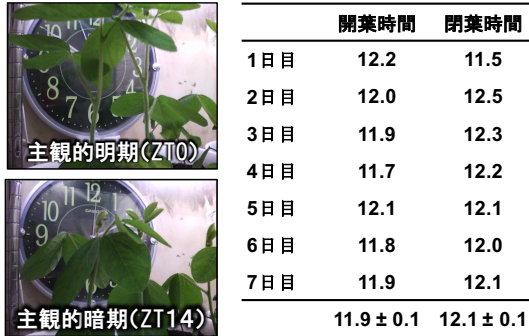


図3. ダイズ葉が刻む就眠リズム

1-2. 抗酸化効果とイソフラボン含量

ダイズ葉は、明期開始時刻 (ZT0) に比べ、暗期開始時刻 (ZT14) の方が、顕著に高い抗酸化活性を示した (図4)。一方、エダマメには活性は見られなかった。また、総イソフラボン量にはほとんど差異は見られなかった (図4)。

1-3. 遺伝子発現解析

イソフラボン合成経路の司る C4H と IFS の発現量は、共に明期開始時刻 (ZT0) で顕著に高い値を示した (図4)。

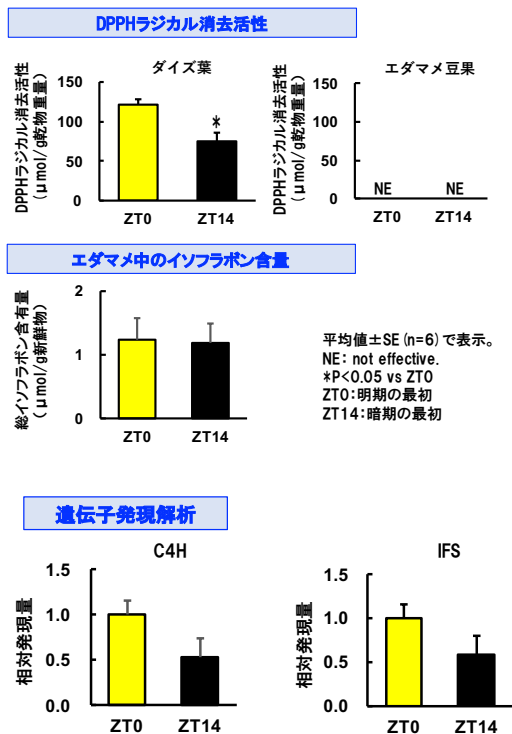


図4. 抗酸化効果とイソフラボン含量

(2) 露地ハウス栽培試験

2-1. 土壌水分含量

遺伝子発現に作用することが報告されている土壌中の水分含量は、日内リズムを刻まないことがわかった (図5)

2-2. 時計遺伝子の発現パターン

代表的な時計遺伝子である LUXc の発現量を追跡した結果、エダマメ中の発現は、明確な日内リズムを刻んでいたが、ダイズでは見られなかった。

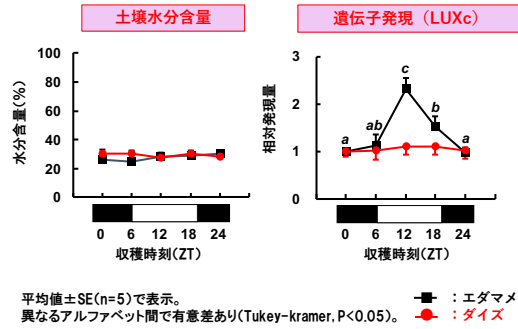


図5. 土壌水分含量と時計遺伝子 (LUXc) の日内変動リズム

2-3. イソフラボン類の合成系遺伝子発現の日内リズム

エダマメ中の桂皮酸 4-水酸化酵素 (C4H) の発現が明確な日内リズムを示した (図6)。一方、イソフラボン合成酵素 (IFS) とイソフラボン還元酵素 (IFR) の発現量については、エダマメ、ダイズ共に明確な日内リズム変動は見られなかった。

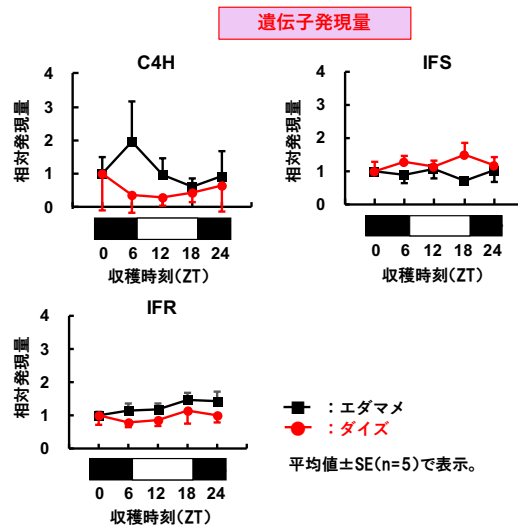


図6. イソフラボン類の合成系遺伝子発現の日内リズム

2-4. イソフラボン含量の変動

ZT6 の地点のイソフラボン量が、エダマメでは顕著に低下、ダイズでは顕著に増加した (図7)。

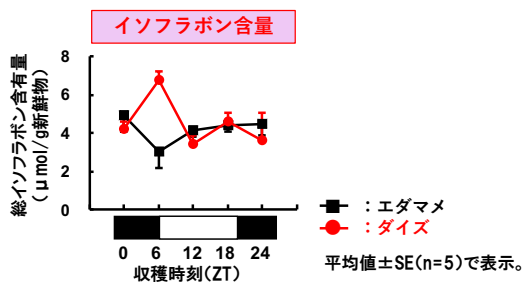


図7. イソフラボン含量の変動

(3) まとめ

以上のように、就眠リズムを刻むことが知られているマメ科植物の中からダイズを選択し、そのイソフラボン含量や抗酸化活性、生合成系遺伝子に及ぼす収穫時刻の影響を評価した結果、次の成果を得た。

- ダイズ葉は明確な就眠リズムを刻んでいる。
 - ダイズ葉が有する抗酸化活性は、明期開始時に比べて暗期開始時に高まる。
 - エダマメ豆果内では、
 - ・時計遺伝子である LUX が明確な日内リズムを刻んでいる。
 - ・イソフラボン合成系の中で桂皮酸 4-水酸化酵素 (C4H) の発現が、ZT6 にピークを示す日内リズムを刻んでいる可能性がある。
 - ・イソフラボン含量は ZT6 に低値を示す。
- ダイズ豆果中においては、抗酸化活性やイソフラボン含量のさらなる情報収集が必要であると考え、今後の研究課題としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計8件)

- ① 榊原啓之, これからの宮崎県における農と食の進化, みやざきネクストアグリ Spring Kitchen, 2018年3月25日 (宮崎)
- ② 西口弥生, 窄野昌信, 榊原啓之 他, 栽培中ダイズが有する機能性の日内リズム解析, 日本農芸化学会 2018年度大会, 2018年3月15-18日 (名古屋)
- ③ 西口弥生, 窄野昌信, 榊原啓之 他, マメ科植物が有する機能性の日内変動解析, 第19回分析講演会, 2018年2月21日 (宮崎)
- ④ 西口弥生, 窄野昌信, 榊原啓之 他, ダイズ植物が有する機能性成分の日内リズム解析, 第3回COC+ みやざき A&S ヒルズ研究会, 2017年12月16日 (宮崎)
- ⑤ H. Sakakibara, Biological rhythm and bioavailability of functional food ingredients, 1st International Conference on Green Agroindustry and Bioeconomy, October 24-25, 2017, The Singhasari Resortm Batu, East Java,

Indonesia.

- ⑥ 西口弥生, 窄野昌信, 榊原啓之 他, ダイズが有する機能性は日内変動するの?, 第21回生物機能研究会, 2017年6月16日 (広島)
- ⑦ 榊原啓之, 時間栄養学について, 平成28年度宮崎県栄養士研修会, 2017年1月28日
- ⑧ 白石翔太, 窄野昌信, 榊原啓之 他, ダイズ葉に含まれる成分と抗酸化活性の日内変動解析, 第2回COC+みやざきA&Sヒルズ研究会, 2016年11月23日 (宮崎)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 啓之 (SAKAKIBARA, Hiroyuki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 20403701

(2) 研究分担者

窄野 昌信 (SAKONO, Masanobu)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 70253515