

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12739

研究課題名(和文)GIS技術による在来種の遺伝的特性に関する起原解明と機能性食品素材評価

研究課題名(英文)Elucidation of Genetic Characteristics of Native Species by GIS Technology and Evaluation of Functional Food Materials

研究代表者

渡辺 高志(WATANABE, TAKASHI)

熊本大学・薬学部附属薬用資源エコフロンティアセンター・教授

研究者番号：70210911

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文):GIS技術による在来種の遺伝的特性に関する起原解明と機能性食品素材評価研究として、ツルマメに絞り込んでフィールド調査を実施した。調査には、高知工科大学の研究協力者らの橋梁を得ながらフィールド調査を遂行した。高知工科大学システム工学群の研究協力者と学生にも同行いただき第1期合同調査と合わせデータの構築を行った。

大豆の主要な貯蔵蛋白質の1つである育成大豆の α -conglycinin濃度を指標とし、ツルマメ及び在来大豆19種類の α -conglycinin濃度を定量分析した。低濃度・高濃度な29種類の大豆の蛋白質の発現量に特異性があり、それは遺伝子及び環境によって生じると示唆された。

研究成果の概要(英文):Field investigation was carried out by narrowing down to the wild beans of Shikoku, Kochi prefecture and Kyushu as the research on the genetic characterization of native species by GIS technology and functional food ingredient evaluation research. This year we operated the UAV in earnest and finished as planned without any schedule of overcrowding about aerial photographs in full scale operation. In the two years from June 27, 2016 to March 24, 2018.

α -conglycinin, one of the major storage proteins of soybean, is one of the major allergen proteins of soybean, while having the function of lowering triglyceride, using the α -conglycinin concentration of the grown soybean as an index, Quantitative analysis of α -conglycinin concentrations of 19 kinds of conventional bean and conventional soybean. It was suggested that the expressions of 29 low-concentration and high-concentration proteins of soybean are specific, which is caused by genes and environment.

研究分野：機能性食品学、薬用植物学

キーワード：GIS技術 在来種の遺伝的特性 機能性素材評価

1. 研究開始当初の背景

研究では、代表者らが有する植物資源データベースと地域基盤情報GIS技術を駆使した統合地域基盤情報システムを利用し、四国から九州（中北部）にかけてのソハヤキ植物要素区系における植物の多様性から在来種の起源植物とその応用について検討する。

我々日本人の生活習慣病患者の46.3%が自己判断で服薬を中止し、重篤化や合併症を起こしている。加えて、残された薬の額は約500億円に上り、医療費の無駄が問題になっている。こうした背景から在来種の潜在価値を高める上で医薬品に代わる代替機能性素材（医薬品、健康食品、そして化粧品素材）となり得る数百種におよぶ伝統的品種が未利用、未開拓の状態にあることを解決したい。当研究室では、既に代替機能性素材候補の四国産有用植物354種を対象に薬理活性評価研究を包括的に行なってきた。そして、食経験を有し、かつ抗アレルギーに関する文献数が少ない植物の一次スクリーニング試験を行なった結果、数種の植物に活性がみられた。従ってその応用研究として、本研究では、四国から九州地区に系統保存されてきた在来種（みさを大豆、土佐伝来の元親大豆とその起源種（Fig. 1）、そして水菜の起源種である潮江菜（Fig. 2）などが有する活性本体の成分を解明し、それらの在来植物を用いて、今年度から制定された機能性表示研究の基礎研究を行なうと共に、食文化への応用を図る。



Fig. 1 在来種大豆とその起源種（?）



Fig. 2 伝統品種・潮江菜と栽培農家の熊沢氏

2. 研究の目的

我が国には各地で在来種が残されているが、熊本の肥後野菜として代表的な野菜として、水前寺菜が知られている。一方、伝統野菜として江戸末期以降の野菜を伝統種として良いのか論点があるのも確かである。九州では高菜類が広く栽培されており戦後の食糧難の時期に大量増殖による交雑化が進んだ象徴であり、純粋な系統保存事業がなされないまま今日に至っている状況である。本研究は、こうした在来種（伝統的品種）の復活を目指し、さらに高付加価値のある活性成分を解明することで、遺伝的要素と地理環境情報との相関を連携させる GIS 技術を駆使した在来種の機能性食品としての持続的利用及び食文化観光への活用を進めて行く。

3. 研究の方法

3-1. 研究計画

在来大豆（土佐元親大豆）の原種であるツルマメ及びヤブマメを対象として調査し、研究対象地域内の分布マップを作成する。特に、四国県内～九州産ツルマメの GIS 自生地インベントリー調査を行い（Fig. 3）、GPS 情報を地図上にプロットする。そして、収集した各地の試料を用いて主成分の抗酸化および抗老化など生活習慣病に対する評価に加え、在来大豆の生育地環境が人の大豆アレルギー反応の強弱に及ぼす影響について調査する。また、伝統品種「潮江菜」の含有成分とその薬理活性評価を行いことで、起源種と想定されている水菜に対する品種の起源解明と GIS 技術によるフィールド調査を実施し、栽培適地の評価研究を行う。

3-2. 方法（概要）

【平成 28 年度】

九州・四国地方の植物誌などを用いて植物の自生地を確認しておく。また、現地の植

物採集会の方々と交流し、具体的かつ最新の自生地を特定していく。

- ・現地向かい植物採集を行なう。採集作業の際に生植物を 5kg 以上採取する。これは、構造解析を行なうのに最低 500 g の乾燥試料（植物）を準備。

- ・採集した植物を葉・茎・果実など部位ごとにわけ、3日から4日かけて乾燥する。

- ・乾燥後、各部位の乾燥重量を測り、細かく切り刻み試料として調整する。この試料調整の仕上げ次第で、含有成分の抽出収率を上げることができる。切り分け後、1週間 70%MeOH で抽出し、植物中の成分を抽出する。

- ・抽出した成分をカラムクロマトグラフィー（下記の Fig. 4 に示す各種カラム担体を用いて）にかけ、含有成分を単離する。単離した成分を NMR により同定する。

- ・単離 (Fig. 4) した成分が新規化合物の場合、スクリーニング試験と同様な実験系で実験し、活性成分の本体を解明する。

- ・新規化合物以外の、既知の化合物も単離同定されるので、それら化合物との兼ね合いをみて、単離成分に対する生理活性の再評価を経て、機能性表示食品へ応用研究を進める。

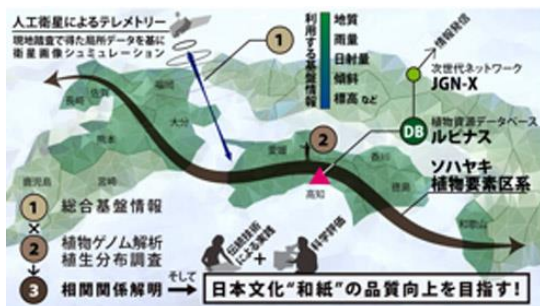


Fig. 3 GIS 自生地インベントリー調査概略図 *ソハヤキ植物要素区系：ソハヤキ（襲速紀）：ソ＝「襲の国（九州南部）」，ハヤ＝「速吸瀬戸（豊予海峡）」，キ＝「紀の国（和歌山県と三重県南部）」

【平成 29 年度】

在来種の起源となる植物について成分分析

（継続）を行い、薬効のもととなる成分を同定する (Fig. 4)。薬効の強さに遺伝的要因が関係するのかを検討するため、DNA 多形の検出を行う。DNA の抽出は Quiagen のキットを用い、抽出した DNA について、ランダムプライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動で DNA フラグメントを分離した後、エチレンブロマイド染色にて DNA のバンドを検出する。ランダムプライマーを用いた PCR で DNA 多型が検出できない場合は、マイクロサテライトマーカでの解析を試みる。ツルマメについてはダイズのマーカが利用できると考えられる。また、在来種ムギ「だるま」、「土佐小麦」については、大麦の多型検出に二倍体小麦類のマイクロサテライトマーカが利用された報告があることから、それが利用できると思われる。

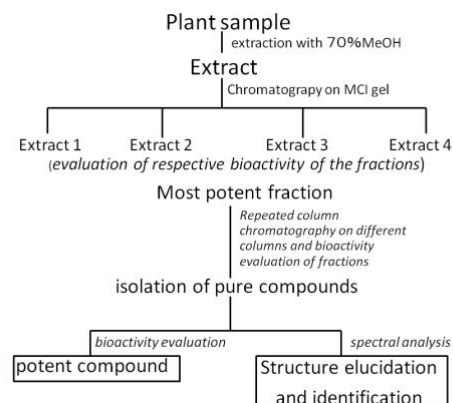


Fig. 4 試料抽出方法から、分離・単離同定までのフローチャート

4. 研究成果

四国（高知県）と九州（大分県～熊本県）のツルマメに絞り込んで調査を展開した。調査には、環境理工学群の古澤教授の研究室の福田理沙さんはじめ、研究協力者の村井亮介研究員と稲垣典年客員研究員（高知工科大学）の橋梁を得ながらフィールド調査を遂行した。村井研究員には、高知工科大学のシステム工学群の高木研学生との別部隊を編成し同時進行で調査を進められればと計画し、合同調査を終えた。

【総括】

本研究では、大豆の品種改良の育種材料として利用可能な大豆品種の探索および大豆が持つ特性を見出すことに着目した。そのために、5種類の育成大豆と原種ツルマメ、19種類の在来大豆から抽出したサンプルを用いて、サンドイッチ ELISA 法により大豆種子 1g 中の β -conglycinin 濃度を算出した。この結果から、 β -conglycinin 含有量をコントロールできている品種は機能性大豆のみであることが判明した。 β -conglycinin 含有量が高い大豆と低い大豆そして平均的な大豆をそれぞれ9種類、4種類、4種類選抜し電気泳動にかけた。大豆たんぱく質を分離した結果、 β -conglycinin 含有量が多い大豆品種は β -conglycinin の3つのサブユニットのうち、 α, α' サブユニットのバンド濃度が β サブユニットのバンド濃度よりも濃いことが分かった。また、 β -conglycinin 含有量が少ない大豆品種は α, α' サブユニットのバンド濃度のみが著しく希薄化し、 β サブユニットのバンド濃度は β -conglycinin 含有量が高い大豆品種と同程度であった。原種ツルマメと育成大豆、在来大豆と育成大豆をそれぞれ比較した結果、機能性をもつ育成大豆の蛋白質のバンドの位置は原種ツルマメに類似し、商用大豆は在来大豆に類似していた。以上の結果から、機能性をもつ大豆を育種する場合はツルマメの特性に着目し、育種材料として利用すること。また、商用大豆を育種する場合は在来大豆の特性に着目し、目的に合った在来大豆を育種材料として利用することが望ましいと考えられる。

アブラナ科 *Brassica* 属の潮江菜（ウシオエナ）の機能性成分の解明

○ 中間報告（研究継続中）

1.1 はじめに

日本では、各地域で古くから食されている野菜があり、伝統野菜と称されている。アブラナ科 *Brassica* 属の潮江菜（ウシオエナ）

は、高知県の伝統野菜の一つとして知られている。本植物はミズナ（水菜） *Brassica rapa* L. var. *nipposinica* (L.H.Bailey) Kitam. (Syn. *Brassica rapa* L. var. *laciniifolia* (L.H.Bailey) Kitam.) の一地方品種であり、ミズナの原種として推定されるものである。かつては高知県の食卓によく並ぶ地野菜であったが、現在ではあまり見られなくなっている。しかしながら、潮江菜はミズナよりも味が濃く煮込んでも柔らかくなりすぎないという食味のよさから、鍋料理の食材などとして、再注目されている。そのため、潮江菜を復活させようという活動もなされている。

現在までに潮江菜の含有成分については研究がなされていないため、本研究では可食部である地上部の成分研究を行うこととした。

2. 実験・結果

潮江菜の地上部を 70% MeOH で抽出し、その抽出物を MCI gel CHP20P, ODS, Sephadex LH20 と silica gel の各種カラムクロマトグラフィーを用いて、2個の化合物（論文投稿後に発表）を単離した。これらの化合物は ^1H -, ^{13}C -NMR スペクトルを用いて構造解析を行った。TLC の結果からフラボノイド等の成分が含まれていることも分かっており、今後これらの成分分析を進めていく。

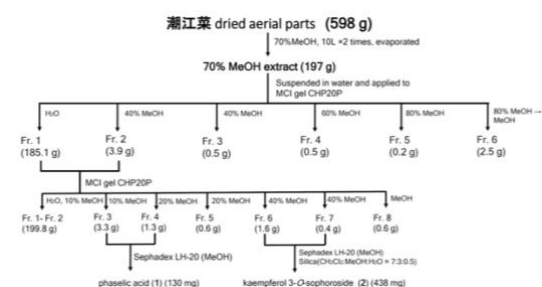


図1. Extraction and isolation

図2. NMR data of Compound 1（論文投稿後発表）

図3. NMR data of Compound 2（論文投稿後発表）

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2件)

- 1) T. Watanabe, K. Sugimura, Risa Fukuda, Hiroshi Furusawa, J. Tanefuji, and T. Yamaguchi (2016), Food Vision as Agro-medicine to research both native variety and local vegetables of Japan toward the Tokyo 2020 Olympics, Bulletin of Patheia University, the third Myanmar-Japan Symposium, (1)289-289.8 (査読なし)
- 2) Hori Kengo, Mikiyo Wada, Shoji Yahara, Takashi Watanabe and Hari Prasad Devkota (2017), Antioxidant phenolic compounds from the rhizomes of *Astilbe rivularis*, *Natural Product Research* (1)1-4. (査読有り)

[学会発表] (計 4件)

- 1) T. Watanabe, K. Sugimura, Risa Fukuda, Hiroshi Furusawa, J. Tanefuji, and T. Yamaguchi, Food Vision as Agro-medicine to research both native variety and local vegetables of Japan toward the Tokyo 2020 Olympics, The Third Myanmar-Japan Symposium(招待講演)(国際学会), Convocation Hall of Patheia University, Patheia, Ayeyarwady Region, Myanmar, 2016年12月04日
- 2) Risa Fukuda, Takashi Watanabe, Hiroshi Furusawa, Search of the origins of the Soja bean in Japan, The Third Myanmar-Japan Symposium(招待講演)(国際学会), Convocation Hall of Patheia University, Patheia, Ayeyarwady Region, Myanmar, 2016年12月04日
- 3) 香西はな, 伊藤彩華, 大西律子, 中根一恵, 渡邊章子, 田中守, 保育所給食のアレルギー対応における小麦代替品の提案, 第

12 回日本給食経営管理学会学術総会 (兵庫), 2016年11月27日.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 渡辺高志 (WATANABE, Takashi) {教授, 熊本大学大学院薬学教育部・薬学部附属薬用資源エコフロンティアセンター}, 研究者番号: 70210911
- (2-1) 研究分担者 和田美貴代 (WADA, Mikiyo) {特任准教授, 熊本大学大学院薬学部・えがお機能性食品共同研究講座}, 研究者番号: 80771188
- (2-2) 研究分担者 ハリー・デヴコッタ (HARI, Devkota) {特任助教, 熊本大学大学院薬学部}, 研究者番号: 90750042
- (3) 連携研究者 (なし)
- (4-1) 研究協力者 渡邊将人 (WATANABE, Masato) {技術職員, 熊本大学大学院薬学部附属薬用資源エコフロンティアセンター}
- (4-2) 研究協力者 稲垣典年 (INAGAKI, Noritoshi) (植物解説員, 高知県立牧野植物園)
- (4-3) 研究協力者 古沢 浩 (FURUSAWA, Hiroshi) {教授, 高知工科大学環境理工学群}
- (4-4) 研究協力者 福田理沙 (FUKUDA, Risa) (大学院・修士1年, 高知工科大学環境理工学群)
- (4-5) 研究協力者 田中 守 (TANAKA, Mamoru) {助教, 高知県立大学健康栄養学部}