

レアシュガースウィートを用いたカイワレダイコンの辛み成分増加



実施担当者
香川県立丸亀城西高等学校教諭
上原 弘幹

1 はじめに

本校の自然科学同好会は、部員数が、3年生3人、2年生2人の計5名からなり、授業中に呼びかけて興味をもって入部してきた生徒ばかりである。その後、2年生1人、1年生1人が入部し、研究活動を通して部員数が少しずつ増えている。活動時間は、毎日、平日放課後2時間程度ではあるものの、熱心に取り組み、土曜や日曜にも活動することがある。研究の成果は、香川県高校生科学研究発表会で発表を行っており、プレゼンテーションの技術も高めている。今年度から2、3年生を中心に市販品であるレアシュガースウィートを用いてカイワレダイコンの辛み成分を増やす研究に取り組んでいる。本同好会は、部活動でないため、生徒会からの部費などの予算措置がなく、部員は費用を抑えるため豆腐などの食品ケースや容器などを活用し、100円ショップで安く購入したもので工夫しながら装置などを製作している。かかった費用は部員全員で均等に負担している。しかし、吸光度計などの継続的に使用する機材の購入は困難で、研究を進める上での障壁となっていたところ、本助成により研究を進めることができた。

2 研究の成果

2-1 生徒の取り組み

カイワレ大根を1本ずつ定量する方針で生長の測定とイソチオシアネートの定量を行った。

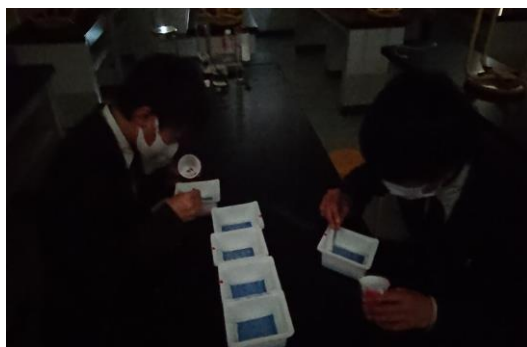


図 A 胚軸の測定を定規で一本ずつ行う



図 B 定量と検討をしている様子

実験は、4月中旬から8月上旬までの期間、県総体や考査期間を除いて土日も含めて毎日行った。また、1回の実験において、カイワレダイコン50～100個体を7日～10日間、延べ数百個体を定量した。この期間における定量個体数は10000近くに及んだ。1日分のデータを取るための所要時間が4時間程度かかり、放課後すぐに取りかかっても夜の7時～8時頃になった。そのため、効率を上げなければならず、操作の担当を割り当てて熟練させ、昼休みに準備を行うなどした。発表や報告準備のために土日は朝から夜まで時間を費やした。生徒と顧問も体調を悪くしながらでも諦めずに取り組んだ。

2-2 研究の内容と今回の成果

研究動機及び目的

希少糖を用いてカイワレダイコンに含まれるイソチオシアネートを増加させ、ワサビの代用化を目指す。

希少糖には植物の生長を抑制する働きがあることが分かっているが、他のことが確かめられていない。高校生による先行研究でカイワレダイコンに含まれるイソチオシアネートが増加することが確認されており、これらの研究を追試するとともに、他の条件におけるイソチオシアネートの増加を試みた。

仮説

カイワレダイコンを希少糖処理することでイソチオシアネートが増加する。

材料・実験器具



図1 レアシュガースウィート



図2 播種区隔を設置したもの



図3 播種容器断面の様子

- ・カイワレダイコンspraut（発芽率80%）
- ・レアシュガースウィート（株式会社レアスウィート（図1））（6.6gを蒸留水で300mlに調整）
- ・グロート試薬（ニトロプルシミドナトリウム4.75g・10%塩酸ヒドロキシルアミン水溶液50ml・炭酸水素ナトリウム9.5gを蒸留水で200mlに調整）
- ・3%臭素水
- ・エタノールアンモニア混合液（39：1）
- ・50%酢酸・イソチオシアネート

○培養器製作方法

- ①底の厚さの異なる2種類の豆腐容器を準備する。
- ②底の浅い容器は播種用とし、底を切り抜き、そこに3mmメッシュ網をグルーガンで接着した。
- ③メッシュ網に播種区隔として5mm幅に切り取ったタピオカストローを30個取り付ける。（図2）
- ④底の深い容器は培養層とし、③の容器に重ねる。（図3）

○実験器具

プロクソンミニルーターMM100（電動ホモジナイザー）遠心分離機・マイクロピペッター（20・200・1000）・PCRチューブ・マイクロチューブ・恒温槽（株式会社島津理化）・吸光度計PiCOEXPLORER（ヤマト科学株式会社）

方法

○胚軸の生長測定

- ①カイワレダイコンの種子を水に24時間・25℃・暗黒下で浸漬させた。
- ②水150mlに、希少糖液1.7gを溶かした溶液を作製した。
- ③浸漬させた種子を培養装置に15個ずつ設置し、これを各8セット製作した。
- ④インキュベーターで25℃暗黒下の条件で4日間毎日胚軸の長さを測定した。

○イソチオシアネート定量

- ①カイワレダイコンの種子を24時間浸漬させた後、1日間、2日間、3日間別々に希少糖処理を行い、水道水で培養をした。

- ②培養開始翌日から1日ごとに胚軸の長さを測定した。
- ③1本ずつマイクロチューブに入れて蒸留水 100 μ l を加え、電動ホモジナイザーで20秒間すりつぶした。
- ④③を8000rpm・5分で遠心した。
- ⑤上清 100 μ l を30℃の恒温槽で10分間静置した。
- ⑥エタノールアンモニア混合液 400 μ l を⑤に混合し、30℃の恒温槽で30分間静置した。
- ⑦25倍グロート試薬(グロート試薬(40.32 μ l)と3%臭素水(7.68 μ l)を混合し、蒸留水で1.2mlに調整)を作製した。
- ⑧50%酢酸 20 μ l を⑥に加えた。
- ⑨PCRチューブに⑦200 μ l と⑧50 μ l を混合し、37℃の恒温槽に10分間静置した。
- ⑩⑨を吸光度計で濃度測定をした。

結果

○胚軸の生長測定

4日間培養の胚軸長の差は水で5.85mm、希少糖で19.9mmとなり、生長に約3倍の差が生じたため、希少糖の生長抑制が確認された。(図4)

また、希少糖1日処理後に水で培養したものは、無処理と比較して8日目の胚軸長の差は54mmであったが、10日目の胚軸長の差は13mmとなり差が小さくなっていった。このことから希少糖処理を行っても無処理の平均的な長さで生長することが確認された。(図5)

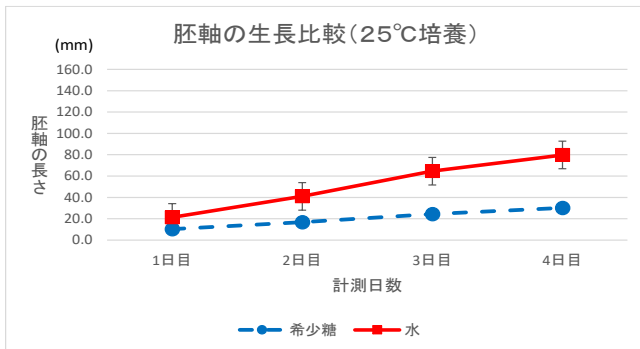


図4 カイワレダイコン胚軸の生長比較

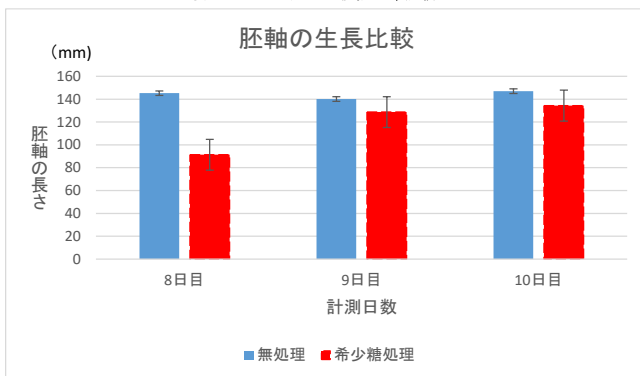


図5 希少糖1日処理後に水栽培を行った結果

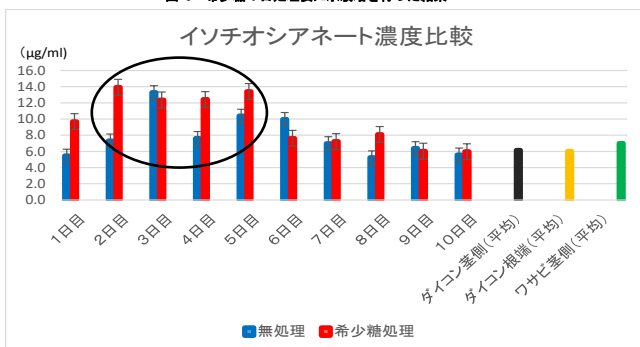


図6 希少糖1日処理後のイソチオシアネートの濃度比較

○イソチオシアネート定量

イソチオシアネート濃度が2日目と3日目では、希少糖1日処理で14.0 μ g/ml, 12.4 μ g/mlで約1.1倍の差であるのに対して、無処理は7.3 μ g/ml, 13.3 μ g/mlで約1.8倍の差となった。また、測定2日目から5日目間の平均は、希少糖処理で13.0 μ g/ml、無処理で9.7 μ g/mlとなり約1.3倍高い状態だった。

これらのことから無処理では個体差が大きく平均も低かったが、希少糖処理では個体差が小さく平均が高いことが確認できた。

(図6)

考察

○胚軸の生長測定

ジベレリンの作用は、ジベレリンとGID1(細胞内の受容体)が結合し、さらに他のタンパク質と結合して複合体をつくる。その複合体が細胞内でのシグナル伝達に関係することが知られている^{7),9)}。その際にセルロース繊維が横方向に配置され、細胞が伸長しやすくなり、茎の伸長生長に作用する⁸⁾。また、希少糖であるブシコースやアロースにはシグナル伝達を阻害する働きがあり、伸長が抑制され、阻害剤として働く¹⁾。この胚軸の生長測定では、胚軸の生長が抑制されていたことからジベレリンの作用が希少糖に阻害されたのではないかと考えられる。しかし、水での培養に切り替えると作用の阻害が解除されることが知られているため¹⁾、無処理の平均的な長さまで生長したことが考えられる。

○イソチオシアネート定量

希少糖で処理した個体でのイソチオシアネートの含有量が無処理と比べて高いということは、希少糖がカイワレダイコンに何らかの影響を与えていることが十分に考えられる。例えばイネとシロイヌナズナに希少糖処理を行うことで耐病性遺伝子群の発現が高まり、耐病性誘導作用が誘起されること¹⁾に見られるように、希少糖が作用してグルコラファサチン合成酵素遺伝子¹⁰⁾の発現が高まり、グルコシノレート濃度（イソチオシアネート濃度）が高まるなどである。しかし、カイワレダイコン1本1本のイソチオシアネート濃度が低いため、大きな誤差生じることが考えられるため別の方法でデータを取り直さなければならない。

今後の展望

実験データのT検定やF検定を行ったところ、有意な差が見られなかったため、誤差の少ない実験方法やデータの取り方を再検討し、やり直しを行う。再度、検定を行い有意差が見られた場合、希少糖処理による遺伝子の発現の様子をリアルタイムPCRで分析する。

3 まとめ

今年度の研究を終えて、3ヶ月の短期間で土日も費やして毎日行ったことを振り返ると1年間の取り組みと同等の経験が生徒には得られた。論文にまとめたり、学会などで発表したりするほどの新しい発見はまだ得られていないが、生徒たちの取り組みは、器具の操作や研究姿勢、生物の活動に合わせて研究計画を立てなければならないなど研究の進め方は十分に学ぶことができた。下級生が引き継いで現在も研究を継続しており今後も粘り強く取り組んでいく予定である。

謝 辞

香川大学農学部 秋光和也先生

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門 野菜花き品種育成研究領域 露地野菜花き育種グループ 上級研究員 柿崎智博先生

ご指導ご助言ありがとうございました。

公益財団法人中谷医工計測技術振興財団からのご支援ありがとうございました

参考・引用文献

- 1) 秋光和也、村尾孝児、小川雅廣、新谷知也、何森健（2019）さまざまな分野における希少糖作用の応用/希少糖資源による新規用途開発への挑戦・化学と生物 vol158、No. 1:50-56
- 2) 深田和宏、石井知彦、何森健（2018）希少糖の分子構造と物性/結晶及び溶液中における単糖の多様な構造. 化学と生物 vol156、No. 12:804-810
- 3) 飯田哲郎、大隈（2013）希少糖（D-プシコース、D-アロース、D-タガトース）の特性とその利用. オレオサイエンス第13巻第9号:17-22
- 4) 瀬尾光範（2018）シロイヌナズナの SWEET タンパク質は植物ホルモンジベレリンを輸送する/糖輸送体が植物ホルモンを輸送する. 化学と生物 vol. 56、No. 6:378-380
- 5) 高橋征司、古山種俊、中谷享（2011）包括的転写制御による植物インプレノイドの代謝工学、生物工学、第89巻第11号：649-652
- 6) 加藤美砂子（2019）植物生理学-生化学反応を中心に-第1版（裳華房）：45-54
- 7) 浅見患男、柿本辰男（2016）新しい植物ホルモンの科学第3版（講談社）37-52
- 8) 本川達雄、谷本英一、生物改訂版（啓林館）、222-227
- 9) 吉里勝利、阿形清和、倉谷滋、筒井和義、鏑田武志、三村徹郎、村岡裕由（2020）、八訂版スクエア最新図説生物 232-233 42-43
- 10) 柿崎智博、北柴第泰、Zhongwei Zou、Feng Li、吹野伸子、小原隆由、西尾剛、石田正彦（2017 プレスリリース）ダイコンの辛味成分を作り出す遺伝子を発見-新しい加工品の創出に適した品種育成へ-農研機構・<https://www.tohoku.ac.jp>