

## 論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名：小林 亘

学位の種類：博士（食品栄養学）

学位記番号：博（健）甲第 29 号

学位授与年月日：令和 4 年 3 月 3 日

指導教員：高崎健康福祉大学特任教授

綾部 園子



審査委員：主査 高崎健康福祉大学 教授

村松 芳多子



副査 高崎健康福祉大学 教授

岡村 信一



副査 高崎健康福祉大学 教授

田中 進



### 【論文題目】

脱水処理工程におけるダイコンの機能性成分とその代謝機構に関する研究

Functional components and metabolism during dehydration processing of radish root

### 【論文の内容の要旨】

#### 1. はじめに

「たくあん漬」は日本の代表的な漬物であり、原料であるダイコンを 2~3 週間脱水処理した後、塩糠とともに数か月間漬け込むことで製造される。ダイコンの脱水処理方法は、塩と重石を用いた「塩押し」および天日を利用した「日干し」の 2 つに分けられる。これまでの研究で、たくあん漬の製造工程における二次代謝産物を網羅的に解析してきた。その結果、たくあん漬の味や色は、ダイコンの脱水処理方法に依存すること、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) や、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) などの遊離アミノ酸が顕著に蓄積することが明らかとなっている。さらに、たくあん漬の二次代謝産物は、微生物由来ではなく、ダイコンのストレス応答によって誘導されていることが示唆されている。そこで本研究では、たくあん漬を特徴づける機能性成分とその代謝機構に着目し、脱水処理工程がダイコンの二次代謝に与える影響を明らかにすることを目指した。

#### 2. 方法

ダイコンは 2017 年 9 月~11 月下旬まで群馬県高崎市で栽培された品種「干し理想」を用い、塩押しおよび日干し処理による脱水処理を行った。試料は、縮分し急速凍結後、凍結乾燥し、マルチビーズショッカーを用いて氷温粉碎した（以下、凍結乾燥試料）。

遊離アミノ酸分析は、*o*-フタルアルデヒドおよび塩化フルオレニルメチルオキシカルボニルを用いたプレカラム誘導体化-HPLC 法 (C. Woodward ら (2007)) により行った。内部標準物質として *S*-カルボキシメチル-L-システインおよびサルコシンを用いた。アスコルビン酸の分析は、Lykkesfeldt ら (1995) の方法に従い行った。内部標準物質としてハイドロキノ

ンを用いた。グルコシノレート (GLS) の分析は、Wathelet ら (2004) の方法により行い、内部標準物質としてシニグリンを用いた。

GABA およびグルタミン酸代謝関連酵素液は、Miyashita ら (2008)、Lu ら (2005) および Miyashita ら (2005) の方法を一部改変し、氷温粉碎抽出し遠心分離した上清を粗酵素液とした。既報 (Miyashita ら (2008) ; Rhodes ら (1975) ; Ertan ら (1992) ; Kotani (1994) ; Liu ら (2011) ; Glevarec ら (2011)) に従い、各酵素活性を測定した。ミロシナーゼ活性は、Hara ら (2000) の方法を用いて測定した。酵素活性は、1 分間あたりの代謝生成物量 ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) を 1 unit (U) として算出した。

凍結乾燥試料からの total RNA の抽出は、NucleoSpin® RNA Plant and Fungi RNA extraction kit を用い、qRT-PCR 法を用いて相対定量法により遺伝子発現量を解析した。リファレンス遺伝子として  $\beta$ -アクチン遺伝子 (*ACTIN2/7*) を用いた。

遊離アミノ酸および酵素活性は、NaCl を除いたダイコン乾燥質量 (DW) に補正し、平均値  $\pm$  標準偏差で示した。脱水処理区間の比較は一元配置分散分析後、Holm-Sidak 検定 ( $p < 0.05$ ) を行った。経時的群間の比較は二元配置分散分析後、Tukey-Kramer の多重比較検定 ( $p < 0.05$ ) を行った。

### 3. 結果及び考察

遊離アミノ酸分析の結果、ダイコンを脱水処理することで、アラニン、プロリン、GABA および BCAA などの遊離アミノ酸が増加すること、これらの基質であるグルタミン酸が減少することを確認した。また、前述した各遊離アミノ酸の蓄積は、塩押し処理と比較し、日干し処理において顕著であった。GLS は塩押し処理 7 日後および日干し処理 14 日後において有意に増加した。

アラニン、プロリンおよび GABA の生合成に関わる各酵素活性は、塩押し処理 2 日後に急速に低下する傾向を示したが、日干し処理では塩押し処理と比較して保持される傾向であった。グルタミンとグルタミン酸の代謝に関わる GS/GOGAT サイクルは、塩押し処理 7 日後まで保持され、14 日後には低下した。GLS 代謝に関わるミロシナーゼ活性は、塩押し処理 2 日後で新鮮ダイコンと比較して 28.5 % まで低下したものの、完全に失活することなく保持された。

遊離アミノ酸および GLS の生合成に関わる遺伝子群の発現は、塩押し処理 2 日後と比較して、日干し処理 2 日後において有意に上昇することが明らかとなった。

本研究では、「塩押し」や「日干し」といった脱水処理がダイコンの代謝機構に影響し、結果としてたくあん漬の機能性成分を増加させるという知見を得た。今後、さまざまな野菜の脱水処理条件をより詳細に検討し、農産加工品の高付加価値化を図ることで、人々の健康増進と地域産業の振興に貢献していくことが期待される。

## 【論文審査の結果の要旨】

たくあん漬は日本の伝統的な食品であり、ダイコンの脱水処理方法には伝統的な天日による「日干し」と、近年の一般的な塩と重石による「塩押し」がある。学位申請者らは、これまでの一連の研究により、たくあん漬の色はイソチオシアネートに起因しており、その色は日干したくあん漬の方が塩押しのものに比べて濃いこと、ダイコンの脱水処理はスクロース、プロリン、GABA、およびBCAAの含有量を増加させること等を明らかにしている。

本論文は、第一章「序論」、第二章「たくあん漬の脱水処理工程におけるグルタミン酸代謝機構の解析」、第三章「たくあん漬の脱水処理工程における分岐鎖アミノ酸およびグルコシノレート代謝機構の解析」、第四章「総括」からなる。

第一章では、これまでの研究背景をふまえて、たくあん漬の「日干し」と「塩押し」の2種類の脱水処理工程の相違による代謝機構に関わる要因を検討し、二次代謝産物である機能性成分への影響を明確にすることを本論文の目的として述べている。

第二章では、たくあん漬のアミノ酸代謝の特徴を明らかにするために、遊離アミノ酸、酵素活性、遺伝子発現を定量的に解析し、アラニン、プロリン、GABA、およびBCAAなどの蓄積とグルタミン酸の減少を確認し、これらのアミノ酸合成酵素をコードする遺伝子 (*ALT1*、*P5CS1*、*GAD4*) が脱水時に有意に発現上昇することを明らかにしている。さらに、これらの影響は脱水過程における細胞のストレス応答を表している可能性も示唆している。

第三章では、ダイコンの脱水過程におけるBCAA合成機構およびGLS・ミロシナーゼ系について、代謝産物、酵素活性、遺伝子発現レベル等を包括的に検討している。その結果、ダイコンの脱水に伴い、BCAA、GLSおよびその前駆物質が一時的に発現上昇し、BCAA、GLSおよびイソチオシアネート合成に関わる遺伝子 (*BCAT4*、*MAM3*、*IPMDH1*、*RMB1*、*RMB2*および*GRS1*) が発現上昇することを明らかにしている。また、BCAAとGLSの蓄積は、ストレス応答としてこれらの合成酵素をコードする遺伝子の発現上昇の結果であることを確認している。

以上、たくあん漬に特徴的な風味と機能性成分の生成について、脱水処理に対するダイコンの生物学的応答という観点から詳細にその代謝機構について明らかにした本成果は、高く評価できる。また、これらの成果が健康増進に役立つ漬物製造のための加工パラメータの最適化に有用であることが示唆されており、さらなる発展が期待できる。

なお、本論文の第二章ならびに第三章の研究内容は、既に査読のある原著論文(英文)として掲載されている<sup>1,2)</sup>。

論文審査は主査と副査2名による審査(2021年12月23日)と、公開発表の場における最終試験(2022年2月16日)により行われた。本論文は完成度が高く、質疑に対する的確な応答等から、本研究科博士課程に相応しい内容であると言える。

以上のことから、論文審査および最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審議した結果、本論文が博士（食品栄養学）の学位を授与するに値するものと判断した。

- 1) Wataru Kobayashi, Taito Kobayashi, Asaka Takahashi, Kei Kumakura, Hiroki Matsuoka : Metabolism of glutamic acid to alanine, proline, and  $\gamma$ -aminobutyric acid during *takuan-zuke* processing of radish root, *Journal of Food Science* Vol. **86**, Iss. 2, 563-570, (2021). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15567>
  
- 2) Wataru Kobayashi, Taito Kobayashi, Asaka Takahashi, Kei Kumakura, Sonoko Ayabe, Hiroki Matsuoka : Branched-chain amino acid synthesis and glucosinolate–myrosinase system during *takuan-zuke* processing of radish root, *Journal of Food Biochemistry*, Vol. **45**, Iss. 12, December e13983, (2021). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13983>