

Masahiko Ishida, Yoshinao Okuyama, Yoshihito Takahata and Norihiko Kaizuma : Varietal Diversity of Seed Glucosinolates Content and its Composition in Japanese Winter Rape (*Brassica napus* L.) (English summary on p 363)

日本産ナタネにおけるグルコシノレート含量の品種間差異

石田正彦¹⁾・奥山善直^{1),3)}・高畑義人²⁾・海妻矩彦²⁾

(¹⁾東北農業試験場, 盛岡市東安庭, 〒020, (²⁾岩手大学, 盛岡市上田, 〒020, (³⁾現農業研究センター, つくば市観音台, 〒305)

摘要

日本産のナタネ (*Brassica napus* L.) 品種の種子に含まれるグルコシノレート含量の変異性を明らかにする目的で, パラジウム比色法と高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 分析によりグルコシノレートの総含量および組成の品種間差異を調べた。総グルコシノレート含量には変異がみられ, 60.5~161.4 $\mu\text{mol/g}$ の範囲に分布した。グルコシノレート含量の最も低い品種は農林 18 号で 60.5 $\mu\text{mol/g}$ であり, ついで農林 16 号が 65.4 $\mu\text{mol/g}$ であった。一方, 最も高い品種として農林 12 号 (161.4 $\mu\text{mol/g}$) とイスズナタネ (150.9 $\mu\text{mol/g}$) があつた。これらの品種はいずれも *Brassica napus* \times *Brassica campestris* の種間交雑により育成された品種であり, 種間交雑品種においてグルコシノレート含量の変異が大きい傾向にあつた。HPLC 分析では 10 の主要なピークがみられ, このうち 9 つのピークについては高速液体クロマトグラフ質量分析計による分析結果により, それぞれのグルコシノレートを同定した。総グルコシノレート含量の低かつた農林 18 号および農林 16 号では, Aliphatic 系グルコシノレートの Progoitrin, Gluconapin 含量が減少していた。一方, Indolyl 系のグルコシノレート含量は変化しておらず, 低下系統は見いだせなかつた。グルコシノレート組成に基づく日本品種の変異性を解析するため, 10 種のグルコシノレート含量による主成分分析を行い, 総合的なグルコシノレートスコアの大きさに関する第 1 主成分とグルコシノレートの 2 つの生合成系の違いを反映する因子と推察される第 3 主成分について 76 品種をプロットし, 変異の傾向の検討を行った。その結果, 日本のナタネ品種に地理的変異性が存在することが示唆された。すなわち, 北海道~東北地域に適應する品種は各グルコシノレートスコアが比較的小さく, 特に北海道・北東北の品種はその変異性に乏しいことが明らかとなった。一方, 他の品種は一般的にグルコシノレートスコアが大きく, 加えて生合成系路の異なる Aliphatic 系および Indolyl 系のグルコシノレートの相対的な含量について変異性が大きいことが判明した。この原因として, 日本のナタネ品種の遺伝的背景やグルコシノレートに関する環境要因が関係しているものと推察さ

れた。

以上の結果から, 日本品種の総グルコシノレート含量は外国の低グルコシノレート品種に比べて高く, Bronowski 種並の低グルコシノレート遺伝資源は見いだせなかつた。しかし, グルコシノレート含量と組成には品種間差異および地理的変異の存在がみられ, 中でも農林 18 号と農林 16 号はグルコシノレート含量が他の日本品種と比べてかなり低く, 組成的にも外国の低グルコシノレート品種に類似していた。

Key Words : *Brassica napus* L., rape, glucosinolate, quality, varietal diversity.

緒言

アブラナ科植物の柔組織中にはグルコシノレートと総称される含硫配糖体が含まれている (Röbbelen and Thies 1980; Underhill 1980)。ナタネ (*Brassica napus* L.) 種子に含まれるグルコシノレートは搾油後の油粕に残存し, 水分含量が十分であると酵素ミロシナーゼの作用により加水分解され, 家畜の甲状腺肥大を引き起こす oxazolidinethion や isothiocyanate などに変化する (川岸 1985)。このため, ナタネの油粕には 40% 前後の良質のタンパク質が含まれているにもかかわらず (Miller *et al.* 1976), 飼料として十分に活用できなかった (松本 1977)。

そこでナタネ粕を飼料として有効利用するために低グルコシノレート遺伝資源の探索が実施された。1967 年にグルコシノレート含量が低いポーランドの品種 Bronowski が発見され, この品種を唯一の遺伝資源としてグルコシノレート含量の低減化を目指した成分育種が進められ (Downey and Röbbelen 1989), これまでにカナダやドイツなどで多数の低グルコシノレート品種が育成されている (Sernyk 1992)。しかし, 類似した遺伝子型の拡散による遺伝的脆弱性が危惧されるため, 低グルコシノレートナタネの遺伝的多様性を図る上でグルコシノレート含量を低減化するための新たな遺伝資源を探索することが必要とされている。

ナタネ種子中のグルコシノレートは, 生合成経路の異

なるメチオニン由来の Aliphatic 系グルコシノレートとトリプトファン由来の Indolyl 系グルコシノレートに大別され (Magrath *et al.* 1993), グルコシノレートの低減化のためには, これらのグルコシノレート含量の低下が必要である。一方, 現在までに見い出されている低グルコシノレート遺伝資源の Bronowski は Aliphatic 系のグルコシノレート含量が減少していることが明らかとなっている (Josefsson and Appelqvist 1968). McDanell *et al.* (1988) は毒性の強い oxazolidinethion および isothiocyanate の前駆物質である Aliphatic 系の Progoitrin や Gluconapin は総グルコシノレート含量の約 80% を占めることを明らかにし, Progoitrin や Gluconapin 含量を減少させることで総グルコシノレート含量の低減化が可能であることを示唆した。事実, Bronowski 由来の低グルコシノレート品種では Aliphatic 系のグルコシノレート含量が減少している (Sang and Salisbury 1988)。一方, Indolyl 系グルコシノレート含量は Aliphatic 系グルコシノレートに比べて少ないが, グルコシノレート含量の一層の低減化のためには Indolyl 系グルコシノレート含量の減少も必要と考えられている (Chavadej *et al.* 1994)。しかし, 現在まで Indolyl 系グルコシノレート含量の低下をもたらす遺伝的変異系統は見い出されていない。

日本のナタネ品種には, 純系分離種や品種間交雑種あるいは *B. napus* × *B. campestris* の種間交雑により育成された品種が存在する (志賀 1971; 杉山 1972)。これまで, 日本産ナタネ品種の一部の oxazolidinethion および isothiocyanate 含量については, 仲林ら (1972), 仲林 (1974), Namai *et al.* (1972) や Namai and Hosoda (1975) が測定しているが, 供試品種は限られており, またグルコシノレート含量やその組成についての報告はない。

本報では低グルコシノレート遺伝資源の探索の一環として日本産ナタネ品種のグルコシノレート含量に関する知見を得るために, 農林登録品種全てを含む 50 品種の総グルコシノレート含量を明らかにした。また, 総グルコシノレート含量は各グルコシノレート含量に既存することから, その組成について調査すると共に, 組成に基づく日本品種の変異性についても検討した。

材料および方法

供試材料は, 1992 年 9 月から 1993 年 7 月まで東北農業試験場・盛岡試験地の沖積土圃場で栽培した植物から採種した種子を用いた。栽培条件は, 元肥として 1 a 当たり N 0.8kg, P₂O₅ 0.8kg および K₂O 0.6kg を施肥し, 畦幅 70 cm, 株間 20 cm の間隔で 3~4 粒の点播を行い, 発芽後 4~5 葉期に間引いて 1 本立ちとした。自殖種子を得るために, 開花直前の花房にパーチメント紙で作った袋を掛けて採種した。

総グルコシノレート含量の測定には, Table 1 に示した日本のナタネ 50 品種 (農林登録品種 48 と在来品種 2) と比較のために外国の低グルコシノレート 11 品種, 計 61 品種を用いた。測定法は, Bjerg *et al.* (1984) と Møller *et al.* (1985) のパラジウム比色法を用いて行った。すなわち, 供試品種の種子を乳鉢で磨砕し, それより精秤した種子粉碎物 0.2 g を 1.5 ml の 70% 熱メタノールで 10 分間 75°C で加熱し, 抽出液を調製した。抽出作業を 3 回繰り返す, 5 ml にメスアップした抽出液 1 ml を 0.5 ml の ECTEOA-セルロースを充填した 1 ml のミニカラムに通してグルコシノレート画分を得た。その後, 分光光度計を用いて 425 nm で測定し, 予め作成しておいたシニグリン (allylglucosinolate) の検量線を用いて定量した。グルコシノレート含量の測定は, 1 品種につき 3 反復実施した。

グルコシノレート組成は, Table 1 に示した日本のナタネ 65 品種 (農林登録品種 48, 在来品種 11 と育成系統 6), 外国の低グルコシノレート 11 品種の計 76 品種の種子を用いて, Bjerg と Sorensen (1987) の方法により高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略記) で測定した。総グルコシノレート含量の測定と同様に供試品種の種子を乳鉢で磨砕し, 精秤した種子粉碎物 0.2 g を 70% 熱メタノールで 10 分間, 75°C で抽出し, 内部標準として 0.8 μM のシニグリンを加え, 5 ml にメスアップした粗グルコシノレート溶液 1 ml を 0.5 ml の DEAE-セファデクス A-25 を充填した 1 ml のミニカラムに通した。その後, 吸着させたグルコシノレートを 0.3 U/ml のスルファターゼを用いて脱硫酸化し, デスルホグルコシノレートとして HPLC により測定した。各グルコシノレート含量は, The International Organization for Standardization (1992) のシニグリンに対する相対的レスポンス・ファクターを用いて求めた。HPLC の装置および分析条件は次の通りである。COSMOSIL 5 C 18 カラム (150 × 4.6 mm, ナカライテスク) およびデータ処理装置 (島津クロマトパック C-R 4 A) を装着した HPLC (島津 LC-4 A) 装置を用いた。デスルホグルコシノレートの分離は, A 液 (蒸留水) と B 液 (20% アセトニトリル水溶液) によるグラジエントにより行った。グラジエント条件は, 99% A 液 + 1% B 液で 1 分間保持し, 20 分間の直線的グラジエントにより 1% A 液 + 99% B 液とし, 3 分間保持した後, 分析開始 24 分後に初期の 99% A 液 + 1% B 液の移動相とした。流速は 1.5 ml/分, カラムの温度は 30°C, 検出波長は 229 nm, 注入量は 20 μl である。

グルコシノレートの同定は, 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS, 日立 M-2500) を用いて得られたマススペクトルの擬分子イオン (M⁺+H⁺)⁺ およびフラグメントイオンの種類を Bjerg and Sorensen (1987) と Hogge *et al.* (1988) らの報告と比較することで行った。カラムは TSKgel ODS-80 TM (150 × 4.6

Table 1. Cultivars used in the measurement of seed glucosinolates by means of colourimetric Pd-glucosinolate complex method and HPLC method

Cultivation region	Breeding method	Cultivars name
Hokkaido and Tohoku	PS	Norin 2, Taisetunatane, Mutunatane, Harunokagayaki, Aomori 1, Banseina, Azuma*, Azumashu (2)*, Daichousen-nakano (2)*, Hokkidoshu (2)*
	NN	Tisayanatane, Towadanatane, Kamikitanatane, Asakanonatane, Kizakinonatane, Tohoku 85*, Tohoku 86*, Tohoku 87*
	NC	Norin 16, Norin 18, Miyukinatane, Asahinatane, Iwashiro-natane
North Kanto, Touzan, and Hokuriku	PS	Norin 4, Norin 5, Azuma*, Wasefuji*
	NN	Abukumanatane, Bandainatane, Hokuriku 12*, Hokuriku 18*, Hokuriku 23*
	NC	Norin 7, Norin 10, Norin 13, Michinokunatane, Mihonatane
South Kanto, Toukai, Kinki, Chugoku and North Kyushu	PS	Norin 1, Norin 3, Norin 6, Norin 8, Norin 9, Hayanatane
	NN	Norin 14, Norin 17, Tsukusinatane, Suehironatane, Houmanatane, Mikawanatane, Kogananatane, Tokiwanatane, Kongounatane, Hayanatane, Oominatane, Genkainatane, Chikuzenatane, Dairyuunatane
	NC	Norin 11, Norin 12, Norin 15, Murasakinatane, Isuzunatane, Aburamasari
Europe and North America (Low glucosinolate cultivars)	NN	Grobal, Lergo, Lisandra, Bridger, Hanna, Topas, Loras, SVO212, Regent, Altex, Arabella

PS: Pure line selection.

NN: Varietal crossing (*B. napus* × *B. napus*).NC: Interspecific crossing (*B. napus* × *B. campestris*).

(): No. of cultivars

*: Cultivar used only in HPLC analysis.

mm) を使用した。MS イオン化は大気圧化学イオン化 (APCI) 法により行い、イオン化条件はイオン加速電圧を 4 kV, ニードル電圧を 7 kV, ドリフト電圧を 150 V, 霧化器温度を 250 °C, 脱溶媒室温度を 400 °C とした。

主成分分析は、内部標準に対する相対面積比で算出した 10 種のグルコシノレート含量を用い、SAS プログラムを用いて相関行列から計算した。

結果

日本品種の総グルコシノレート含量

実験に供試した 61 品種 (日本の農林登録品種 48 と在来品種 2, 外国の低グルコシノレート品種 11) の総グルコシノレート含量の分布を Fig. 1 に示した。日本品種の総グルコシノレート含量は大きな変異性を示し、60.5 $\mu\text{mol/g}$ から 161.4 $\mu\text{mol/g}$ まで変異し、平均値は 117.5 \pm 21.5 $\mu\text{mol/g}$ であり、正規分布に近い分布を示した。今回測定した日本品種の半数以上は 110.0 ~ 150.0 $\mu\text{mol/g}$ の総グルコシノレートを含んでいたが、70 $\mu\text{mol/g}$ 以下の品種も見い出され、農林 18 号と農林 16 号は最も低い値を示し、それぞれ 60.5 $\mu\text{mol/g}$ および 65.4 $\mu\text{mol/g}$ であった。逆に、グルコシノレート含量の

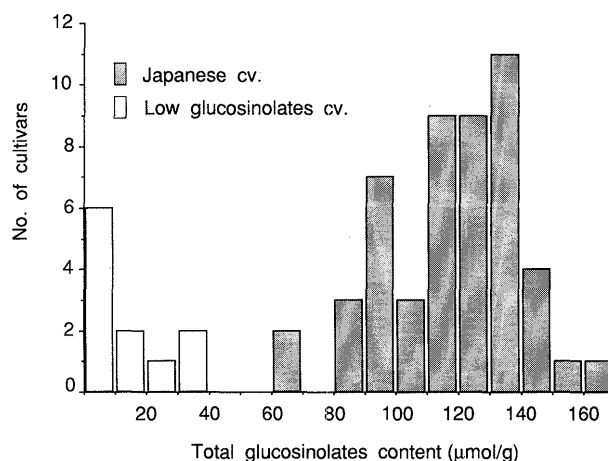


Fig. 1. Distribution of total glucosinolates content in Japanese rape (*Brassica napus* L.) and European and North American low glucosinolates cultivars.

高い品種として農林 12 号 (161.4 $\mu\text{mol/g}$) とイスズナタネ (150.9 $\mu\text{mol/g}$) があつた。これらの 4 品種は、いずれも *B. napus* × *B. campestris* の種間交雑により育成された品種であつた。他方、外国の低グルコシノレート品種の含量は Loras の 5.8 $\mu\text{mol/g}$ から Topas の 36.7 $\mu\text{mol/g}$ の範囲に分布しており、その平均値は

15.6 ± 10.6 μmol/gであった。以上の結果から、日本の品種には外国の低グルコシノレート品種と同程度の低いグルコシノレート含量を示す品種はみられなかったが、品種による変異性が大きく、60 μmol/g程度の総グルコシノレート含量を持つ品種の存在が明らかとなった。

日本品種のグルコシノレート組成

HPLC分析によるグルコシノレートのクロマトグラムを Fig. 2 に示した。供試した日本品種 66 の全てに 10 の主要なピークがみられ、各ピークには流出順にそれぞれ 1~11 (No. 2 は内部標準のシニグリン) の番号を付した。LC-MS を用いた解析の結果、No. 5 および内部標準である No. 2 を除く No. 1~11 の各ピークは、マススペクトルの擬分子イオン (M⁺+H⁺)⁺ およびフラグメントイオンの種類からそれぞれ、1: Progoitrin, 3: Glucoraphanin, 4: Napoleiferin, 6: Gluconapin, 7: 4-Hydroxy glucobrassicin, 8: Glucobrassicinapin, 9: Glucoerucin, 10: Glucobrassicin, 11: Gluconasturtiin と同定された。このうち、7 と 10 は Indolyl 系グルコシノレートであり、その他は Aliphatic 系グルコシノレートである。

供試した日本品種において各グルコシノレートの総グルコシノレート含量に占める割合は、Progoitrin (1) が約 60%, Gluconapin (6) が約 25%, 4-Hydroxy glucobrassicin (7) が約 5% であった。総グルコシノレート含量が比較的低い農林 18 号では、Progoitrin や Gluconapin 含量が低く、グルコシノレート含量が多い農林 12 号と比べてそれぞれ 37% と 89% であり、Progoitrin 含量の低下が著しかった。しかし、

4-Hydroxy glucobrassicin 含量は 103% と両品種に差はなかった。さらに、品種育成のために用いた育種法により分類した品種群間で各グルコシノレート含量の平均値の差を見ると、4-Hydroxy glucobrassicin では種内交雑品種と種間交雑品種の間で、また Glucobrassicin では純系分離品種と種間交雑品種との間でそれぞれ 5% レベルで有意な差がみられた (Table 2)。しかし、Progoitrin, Gluconapin および Glucobrassicinapin では純系分離種と種内交雑種および種間交雑種との間で有意な差はみられなかった。Table 2 に示したグルコシノレート成分以外のグルコシノレート含量は少なく、品種によってはほとんど含まれない種類のグルコシノレートも存在した (Fig. 2-A, B)。SV 0212 を初めとする外国の低グルコシノレート品種では、日本品種と比較して Progoitrin と Gluconapin 含量が著しく低かったが、4-Hydroxy glucobrassicin 含量はほとんど変化していなかった (Fig. 2-C, Table 2)。

グルコシノレート組成から見た日本品種の変異

グルコシノレート組成に基づく日本品種の変異性を解析するため、上記の 10 種のグルコシノレート含量による主成分分析を行った。第 1 主成分は固有ベクトルの係数が全て正の値を示すことから総合的なグルコシノレートスコアの大きさに関するファクター、第 3 主成分の固有ベクトルにおいては Indolyl 系のグルコシノレートが十の、Aliphatic 系のグルコシノレートが一の係数を示したことから、これはグルコシノレート各成分の生合成系の違いを反映する因子と推察され、この 2 つの主成分

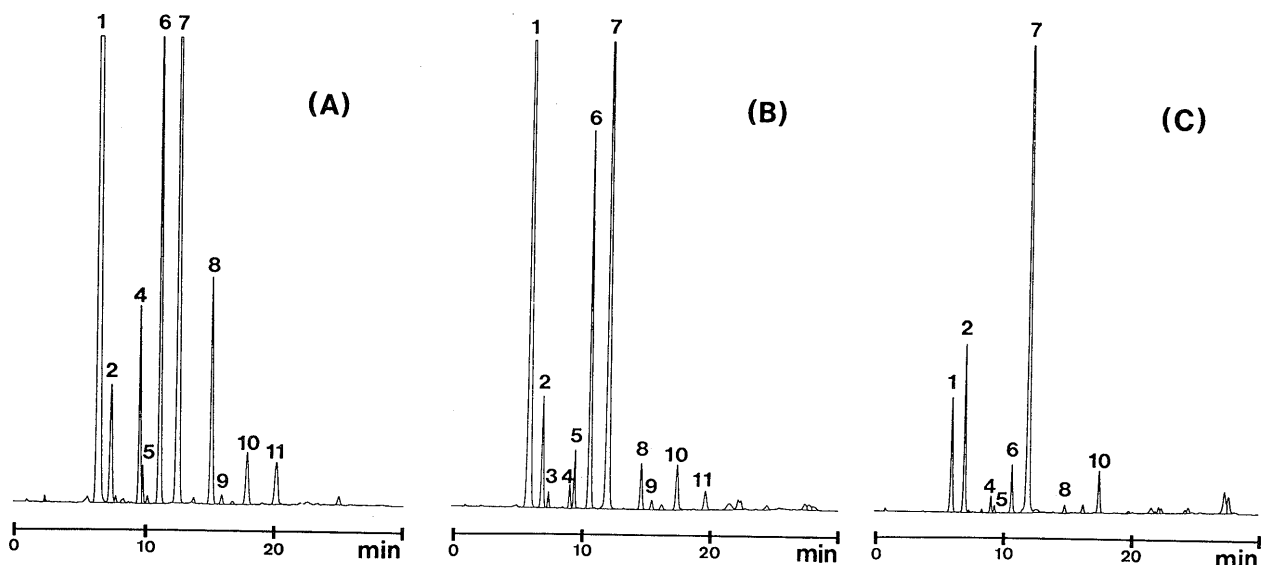


Fig. 2. HPLC chromatograms of desulphoglucosinolates of Japanese rape cv. Norin 12 (A), Norin 18 (B) and European low glucosinolates rape cv. SV0212 (C). Detection wavelength: 229 nm.

Nine peaks were identified as the following glucosinolates, respectively

- 1, Progoitrin; 2, standard (Sinigrin; 0.8 μM);
- 3, Glucoraphanin; 4, Napoleiferin; 5, unknown; 6, Gluconapin;
- 7, 4-Hydroxyglucobrassicin; 8, Glucobrassicinapin; 9, Glucoerucin;
- 10, Glucobrassicin; 11, Gluconasturtiin.

Table 2. Comparison of seed glucosinolates content among Japanese rape cultivar groups bred by three different methods

Breeding method	No. of cultivars	Seed glucosinolates contents ¹⁾ ($\mu\text{mol/g}$ seeds meal)				
		Progoitrin	Gluconapin	4-Hydroxy-Glucobrassicin	Glucobrassicin-canapin	Glucobrassicin
Pure line selection	22	56.3 \pm 12.1 ^a	28.7 \pm 7.0 ^a	6.4 \pm 1.7 ^{ab}	4.8 \pm 1.8 ^a	0.6 \pm 0.4 ^a
Varietal crossing (<i>B. napus</i> \times <i>B. napus</i>)	29	54.9 \pm 8.2 ^a	26.9 \pm 4.0 ^a	6.0 \pm 1.8 ^a	4.1 \pm 1.8 ^a	0.6 \pm 0.6 ^{ab}
Interspecific crossing (<i>B. napus</i> \times <i>B. campestris</i>)	15	59.9 \pm 15.1 ^a	25.8 \pm 5.7 ^a	7.3 \pm 1.5 ^b	5.0 \pm 2.3 ^a	1.0 \pm 0.7 ^b
Low glucosinolate exotic cv.	11	9.2 \pm 7.1 ^b	4.7 \pm 4.3 ^b	6.9 \pm 2.0 ^{ab}	1.3 \pm 2.1 ^b	0.5 \pm 0.4 ^a

¹⁾: Means \pm SD and represented as relative values to sinigrin (internal standard).
Figures followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$.

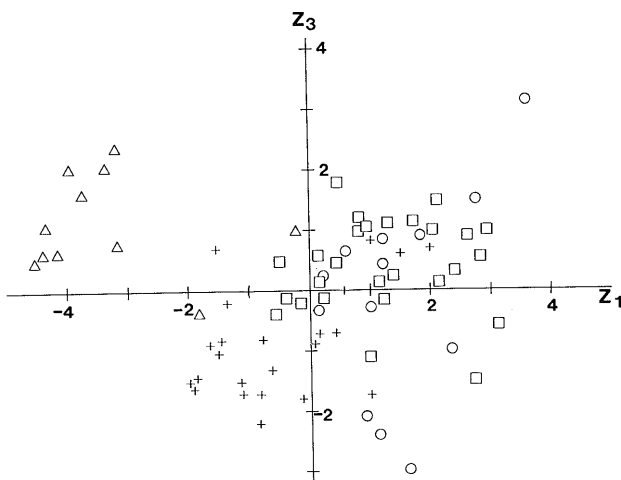


Fig. 3. Scatter diagram of 76 cultivars of rape (*Brassica napus* L.) projected on the first and third axis of principal component analysis based on seed glucosinolates.
+ : Cultivars of Hokkaido and Tohoku region;
O : Cultivars of north Kantou, Touzan and Hokuriku region;
□ : Cultivars of south Kantou, Toukai, Kinki, Chugoku and north Kyushu region;
Δ : European and North American low glucosinolates cultivars.

で全情報量の 53.8% を説明できた。第 2 主成分では全体の 22.5% の変異が抽出されたが、この主成分が何を示しているのか解釈することは困難であった。そこで、第 1・第 3 主成分のスコアを用いて各品種を栽培適地地域別に分類しプロットした (Fig. 3)。その結果、第 2 象限に小さなグループを作る外国の低グルコシノレート品種は、他の日本品種と明確に区分された。同じ第 2 象限には日本の農林 18 号が位置し、組成的にも他の日本品種に比べて外国の低グルコシノレート品種に類似していた。また北海道・東北地域の品種の多くは第 3 象限に位置しており、中でも北海道と北東北地域の品種が第 3 象限の狭い範囲に分布した。一方、北関東・東山・北陸地域の品種は、第 1・第 4 象限に広く分布しており、南関東・東海・近畿・中国・北九州地域の品種も同様の分布を示したが、その多くが第 1 象限に位置する傾向にあった。これらの結果は、日本品種のグルコシノレート組

成と栽培適地地域との間には密接な関係があり、地理的変異が存在することを示している。すなわち、北海道と東北の品種は全体的なグルコシノレートスコアは比較的小さいが、Aliphatic 系のグルコシノレート成分の占める割合は大きい。一方、他地域の品種は、全体的なグルコシノレートスコアが大きく、中でも北関東・東山・北陸地域の品種は Aliphatic 系および Indolyl 系のグルコシノレート含量の相対的割合が変異性に富んでいることが明らかとなった。また、外国の低グルコシノレート品種は全体的なグルコシノレートスコアは予想した通り非常に小さかったが、Indolyl 系のグルコシノレートの相対的割合が大きいことが示された。

考察

今回供試した日本産 50 品種の総グルコシノレート含量の平均は $117.5 \pm 21.5 \mu\text{mol/g}$ であり、外国の低グルコシノレート品種に比べて約 7.5 倍多く含まれていた。しかし品種間で大きな変異がみられ、総含量は $60.5 \sim 161.4 \mu\text{mol/g}$ の範囲に分布していた。日本の品種には、純系分離や種内交雑 (*B. napus* \times *B. napus*) および種間交雑 (*B. napus* \times *B. campestris*) により育成された品種が存在する。Namai et al. (1972) は、*B. campestris* に含まれる Progoitrin や Gluconapoleiferin の加水分解物である oxazolidinethion 含量は、*B. napus* に比べて少ないことから、種間交雑により育成された日本産のナタネ (*B. napus*) 品種は、純系分離や種内交雑により育成されたナタネ品種よりも oxazolidinethion 含量が低いことを指摘した。特に片親が種間交雑によって育成された種内交雑品種であるトキワナタネの isothiocyanate 含量が他の品種に比べて少ないことから、同品種の isothiocyanate と oxazolidinethion の総量は他のナタネ品種に比べて非常に少ないことを報告した (Namai and Hosoda 1975)。しかし、本研究結果ではトキワナタネの総グルコシノレート含量は $115.0 \mu\text{mol/g}$ で、Progoitrin 含量は $48.3 \mu\text{mol/g}$ であり、他の品種と比較して特

に低い品種とはいえなかった。さらに、本研究で得られた各グルコシノレート含量を純系分離、種内交雑および種間交雑品種別に平均値を比較したところ、総グルコシノレート含量に占める割合が高い Progoitrin や Gluconapin 含量が、Namai *et al.* (1972) の指摘するように *B. napus* と *B. campestris* の種間交雑品種において有意に低いということは認められなかった。一方、今回測定した日本品種の中で、総グルコシノレート含量および Progoitrin 含量が最も低い農林 18 号および農林 16 号は種間交雑由来の品種であり、逆に最も高い含量を示した農林 12 号およびイズナタネも種間交雑由来の品種であった。このように、たとえ種間交雑由来の品種が Progoitrin 含量において他の純系分離や種内交雑由来の品種との間で有意な差がみられなかったにしても、種間交雑品種は純系分離や品種間交雑由来の品種に比べて Progoitrin 含量の標準偏差が大きく、Progoitrin 含量に関して品種間で変異性に富んでいることが明らかとなった。

HPLC 分析により分離された 10 のグルコシノレートの中で、9 つは LC-MS およびリテンションタイムの比較によりそれぞれ同定できた。日本品種に含まれるグルコシノレートの種類や組成は、Dungey *et al.* (1988) や Sang and Salisbury (1988), Birch *et al.* (1992) によって報告された外国品種での測定結果と類似していた。国外では、総グルコシノレート含量が 80% 以上も低減された優良品種が多数育成されているが、このような品種において減少したのは Aliphatic 系のグルコシノレートであり、Indolyl 系のグルコシノレート含量はほとんど変化していないことが指摘されている (McDanell *et al.* 1988)。同様に、本研究で見い出されたグルコシノレート含量が比較的低い農林 18 号および農林 16 号も Progoitrin, Gluconapin 含量は減少していたが、4-Hydroxy glucobrassicin 含量は変化していないことから、Aliphatic 系グルコシノレート低下系統とみなされた。現在まで国外で育成されている低グルコシノレート品種は全て Bronowski を唯一の遺伝資源としているため、その遺伝的脆弱性が危惧されている。ここで見い出された低下系統は Bronowski 程の低下系統ではなかったが、各グルコシノレート含量は数個の遺伝子によって支配されていることが推察されていることから (Kondra and Stefansson 1970)、これらの品種内の変異性や突然変異によってグルコシノレート含量のより低い系統の出現が期待される。一方、Indolyl 系のグルコシノレート含量が低下した品種は、本実験で見い出すことができなかった。Indolyl 系のグルコシノレート低下品種はこれまで育成されておらず、さらにグルコシノレート含量を減少させるには Indolyl 系グルコシノレートの低下が必須であることが指摘されていることから (Chavadej *et al.* 1994)、より多くの系統を用いた低下系統の探索が必要と考えられた。

日本では明治以降それまで栽培されてきた在来ナタネ (*B. campestris*) に変わって、*B. napus* 種が外国から導入され栽培されるようになった。このとき、暖地に導入されたのが朝鮮種と呼ばれる品種で、寒地には西洋種と呼ばれる晩生の品種が導入された。その後、育種事業の開始と共に朝鮮種の純系分離から多くの品種が育成され南関東以西で普及した。さらに、これらの品種の中で耐寒性に強い品種が北上して栽培されると共に、品種間または在来ナタネとの積極的な種間交雑により多数の品種が育成され、南東北以南で普及した。このため、南東北から九州地方では多様な遺伝子型の存在が考えられる。一方、寒地に導入された西洋種は純系分離による育種操作と共に北海道・北東北向けの晩生種育成用の交配母本として用いられ、現在の品種が育成された (志賀 1971, 杉山 1972)。このため、北東北以北の狭い地域には類似した遺伝子型を持つ品種が分布するものと考えられる。これまでに育成されてきた日本のナタネ品種において、グルコシノレート含量について選抜されてきた経緯はなかった。本研究において、種子グルコシノレートに基づくナタネ品種の変異性を明らかにしたところ、地理的変異性が存在することが示唆された。この原因の一つとして、上述したような我が国のナタネ育種の歴史的背景を反映していることが考えられる。また、グルコシノレートは耐病虫性に関与していることが報告されていることから (Mithen 1992)、たとえグルコシノレート含量については選抜の対象とされていなくても何らかの選抜圧が働いて、寒地の品種はグルコシノレートについての変異性が少なく、一方、暖地では変異性に富む系統が無意識に選抜されてきたのかもしれない。しかし、これらの推察については現在のところ何の根拠もなく、今後さらなる研究が必要と考えられる。

今回、実験に供試した日本産品種の中には、グルコシノレート含量の低減化育種に利用し得る Bronowski 種並の低 Aliphatic 系グルコシノレート、または低 Indolyl 系グルコシノレート含量である遺伝資源を見いだすことはできなかった。しかし、農林 18 号や農林 16 号のように Progoitrin や Gluconapin 含量が他の日本品種と比べてかなり低く、組成的にも外国の低グルコシノレート品種に類似する品種が見いだされた。今後、これらの品種におけるグルコシノレート組成の遺伝的変異を利用して、グルコシノレート含量低減化育種を進めたい。

謝辞

グルコシノレートの測定に関して、東北農業試験場品質評価研究室の渡辺満氏にご教示を頂いた。また本論文をまとめるにあたり東北農業試験場作物開発部長、番場宏治博士に貴重な助言を頂いた。記して厚く感謝の意を表します。

引用文献

- Birch, A. N. E., D. W. Griffiths, R. J. Hopkins, W. H. M. Smith and R. G. McKinlay (1992) Glucosinolate responses of swede, kale, forage and oilseed rape to root damage by turnip root fly (*Delia floralis*.) larvae. *J. Sci. Food Agric.* 60 : 1-9.
- Bjerg, B., O. Olsen, W. K. Rasmussen and H. Sorensen (1984) New principles of ion-exchange techniques suitable to sample preparation and group separation of natural products prior to liquid chromatography. *J. Lic. Chromato.* 7 : 691-707.
- and H. Sorensen (1987) Quantitative analysis of glucosinolates and HPLC of intact glucosinolates. In "Glucosinolates in rapeseeds: Analytical aspects" Wathelet J-P. (ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 125-150.
- Chavadej, S., N. Brisson, J. N. McNeil and V. De Luca (1994) Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 : 2166-2170.
- Downey, R. K. and G. Röbbelen (1989) *Brassica* species. In "Oil crops of the world" Röbbelen G., R. K. Downey and A. Ashri (eds.), McGRAW-HILL, New York, 339-362.
- Dungey, S. G., J. P. Sang, N. E. Rothnie, M. V. Palmer, D. G. Burke, B. R. Knox, E. G. Williams, E. P. Hilliard and P. A. Salisbury (1988) Glucosinolates in the pollen of rapeseed and indian mustard. *Phytochemistry.* 27 : 815-817.
- Hogge, L. R., D. W. Reed and E. W. Underhill (1988) The identification of desulfoglucosinolates using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromato. Sci.* 26 : 348-351.
- Josefsson, E. and L.-Å. Appelqvist (1968) Glucosinolates in seed of rape and turnip rape as affected by variety and environment. *J. Sci. Food Agric.* 19 : 564-570.
- 川岸舜朗(1985)グルコシノレート—その酵素分解および分解物の反応性と毒性. *日食工会誌* 32 : 836-846.
- Kondra, Z. P. and B. R. Stefansson (1970) Inheritance of the major glucosinolates of rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Can. J. Plant Sci.* 50 : 643-647.
- Magrath, R., C. Herron, A. Giamoustaris and R. Mithen (1993) The inheritance of aliphatic glucosinolates in *Brassica napus*. *Plant Breeding* 111 : 55-72.
- 松本達郎 (1977) 飼料中のグルコシノレートと家畜・家禽への影響. *日畜会報* 48 : 691-700.
- McDanell, R., A. E. M. McLean, A. B. Hanley, R. K. Heaney and G. R. Fenwick (1988) Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins) : A review. *Food Chem. Toxic.* 26 : 59-70.
- Miller, R. W., C. H. Van Etten, C. McGrew, I. A. Wolff and Q. Jones (1976) Amino acid composition of seed meals from forty-one species of cruciferae. *J. Agr. Food Chem.* 10 : 426-430.
- Mithen, R. (1992) Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica* 63 : 71-83.
- Møller, P., A. Ploger and H. Sorensen (1985) Quantitative analysis of total glucosinolate content in concentrated extracts from double low rapeseed by the Pd-glucosinolate complex method. In "Advances in the production and utilization of cruciferous crops" Sørensen, H. (ed.), Martinus Nijhoff/DR W. Junk Publishers, Dordrecht, 97-110.
- 仲林寛明 (1974) *B. napus* L. および近縁種の種子中における抗甲状腺物質含量について. *宇大農学術報告* 9 : 1-5.
- ・大平幸次・藤原彰夫(1972)アブラナ属植物に含まれる isothiocyanate および oxazolidinethion 含量について. *宇大農学術報告* 8 : 1-8.
- Namai, H., T. Kaji and T. Hosoda (1972) Interspecific and intervarietal variations in content of oxazolidinethione in seed meals of cruciferous crops. *Jpn. J. Genet.* 47 : 319-327.
- and T. Hosoda (1975) Interspecific and intervarietal variations in content of volatile isothiocyanate in seed meals of cruciferous crops. *Jpn. J. Genet.* 50 : 43-51.
- Röbbelen, G. and W. Thies (1980) Variation in rapeseed glucosinolates and breeding for improved meal quality. In "*Brassica* crops and wild allies" Tsunoda, S., K. Hinata and C. Gómez-Campo (eds.), Japan scientific societies press, Tokyo, 285-299.
- Sang, J. P. and P. A. Salisbury (1988) Glucosinolate profiles of international rapeseed lines (*Brassica napus* and *Brassica campestris*). *J. Sci. Food Agric.* 45 : 255-261.
- Sernyk, L (1992) Catalogue of oilseed rape cultivars. Agrigenetics company madison laboratories, Madison, 1-14.
- 志賀敏夫 (1971) 品種の伝来と育種. "現代農業技術双書ナタネ" 光の家協会 東京, 34-45.
- 杉山信太郎 (1972) 朝鮮種なたねの由来について. *育雑.* 22 : 291-297.
- The International Organization for Standardization. (1992) Rapeseed-Determination of glucosinolates content. ISO 9167-1 : 1992 (2) : 1-9.
- Underhill, E. W. (1980) Glucosinolates. In "Encyclopedia of plant physiology Vol. 8" Bell, E. A. and B. V. Charlwood (eds.), Springer-Verlag, New York, 493-511.

Summary

To identify varietal diversity of seed glucosinolates content in Japanese rape (*Brassica napus* L.), total amount and composition of seed glucosinolates content were analysed on 65 Japanese rape and 11 European and North American low glucosinolates rape (Table 1) by

means of Palladium-glucosinolate complex method and high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The average of total amount of glucosinolates of Japanese cultivars varied from 60.5 $\mu\text{mol/g}$ of Norin 18 to 161.4 $\mu\text{mol/g}$ of Norin 12 (Fig. 1). In 50 Japanese cultivars, Norin 18 (60.5 $\mu\text{mol/g}$) and Norin 16 (65.4 $\mu\text{mol/g}$) showed the lowest glucosinolates contents. On the other hand, glucosinolates content of Norin 12 (161.4 $\mu\text{mol/g}$) and Isuzunatane (150.9 $\mu\text{mol/g}$) were the highest. These four cultivars were originated from interspecific crossing of *B. napus* \times *B. campestris*. HPLC analysis of seed glucosinolates revealed that rapeseed had 10 main peaks (Fig. 2). In these peaks, 9 glucosinolates were identified by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Low glucosinolates contents in Norin 18 and Norin 16 resulted from the reduction of Progoitrin and Gluconapin which are Aliphatic glucosinolate. Though, Japanese cultivars have been bred by three different breeding methods, e. g. pure line selection, varietal crossing (*B. napus* \times *B. napus*) and interspecific crossing (*B. napus* \times *B. campestris*), each glucosinolate content was not related to the breeding method (Table 2).

In order to clarify variation trend of Japanese rape based on their glucosinolates content, we attempted to carry out principal component analysis using 10 different kinds of glucosinolates. Size factor which indicates the variation in total amount was extracted by the first component. Third component axis seemed to reflect relative amount of two groups of glucosinolate components (Indolyl and Aliphatic). A scatter diagram of 76 cultivars by the score of the first and third component axis

is shown in Fig. 3. The figure suggests geographical variation in glucosinolates content among Japanese cultivars. Many cultivars of Tohoku and Hokkaido region showed a small score of glucosinolates content. On the other hand, cultivars of north Kanto, Touzan and Hokuriku region, had a large score of glucosinolates content and wide variation of glucosinolates composition. Cultivars of south Kanto, Toukai, Kinki, Chugoku and north Kyushu region overlapped area of cultivars of north Kantou, Touzan and Hokuriku region. European and North American low glucosinolates cultivars were clearly discriminated from Japanese cultivars by forming a small cluster.

From these results, it was revealed that the total amount of glucosinolates of Japanese cultivars were higher than that of European and North American low glucosinolates cultivars. However, there were varietal and geographical variations in seed glucosinolates content and composition of Japanese cultivars. Norin 18 and Norin 16 having the lowest glucosinolates content may be expected to be candidates of novel genetic resources for the reduction of seed glucosinolates.

M. Ishida¹⁾

Y. Okuyama^{1),3)}

Y. Takahata²⁾

N. Kaizuma²⁾

¹⁾ Tohoku National Agricultural Experiment Station, Higashi-aniwa, Morioka 020

²⁾ Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda, Morioka 020

³⁾ Present address : National Agriculture Research Center, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305