

ナタネの品質改良に関する遺伝育種学的研究

1997

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(岩手大学)

石田正彦

①

ナタネの品質改良に関する遺伝育種学的研究

1997

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(岩手大学)

石 田 正 彦

目 次

第1章 緒論	1
第2章 グルコシノレート成分の遺伝的変異性と品種育成に関する育種学的研究	6
第1節 LC/APCI-MSによるグルコシノレート成分の同定	6
第2節 日本品種におけるグルコシノレート含量の品種間差異	16
第3節 <i>Brassica</i> 属遺伝資源におけるグルコシノレート含量の評価	28
第4節 発芽子葉片を用いた低グルコシノレート個体簡易検定法の開発	40
第5節 無エルシン酸・低グルコシノレートナタネ品種の育成	51
第3章 脂肪酸組成の遺伝的変異性と高エルシン酸品種育成に関する育種学的研究	63
第1節 高エルシン酸優良遺伝資源の探索とその評価	63
第2節 高エルシン酸系統の育成	78
第4章 ナバナ優良品種の育成と遺伝育種学的研究	87
第1節 ナバナ農林1号はるの輝の育成	87
第2節 ワックスレス形質の遺伝的・組織学的特性	105
第5章 総合考察	117
摘要	121
謝辞	123
引用文献	124

第1章 緒論

ナタネとして一般に取り扱われている作物はアブラナ科の *Brassica* 属に属するナタネ（西洋ナタネ）と呼ばれる *Brassica napus* L.と、在来ナタネと呼ばれる *B. campestris* L.の2種である。ナタネは大豆、綿実、ヒマワリに次ぐ重要な油脂原料であり、1994年における世界の収穫面積は22,248千haで、総生産量は29,958千tにのぼっている（農林水産省統計情報部1996）。

ナタネの種子に含まれる油は、その脂肪酸組成によって特徴づけられる。アブラナ科植物にはエイコセン酸やエルシン酸が50%程度偏在的に含まれており、他の主要な植物種子油と比較すると、大豆油、トウモロコシ油、ヒマワリ油、サフラワー油よりもリノール酸含量が低く、オリーブ油よりもオレイン酸含量が低い（松尾1989）。しかし、ナタネ油に含まれるエルシン酸は動物実験の結果、心機能障害を起こす可能性があることから、1977年にFAO/WHOよりナタネ油を食用油として利用する際には、その含量を低減することが勧告された（FAO/WHO 合同専門委員会報告1980）。

カナダのナタネ育種グループは *Brassica* 属遺伝資源の脂肪酸組成を詳細に調査した結果、エルシン酸含量には遺伝的変異が存在することを明らかにした。そして、ドイツのナタネ（*B. napus*）品種 Liho の中に変異の大きな系統が存在することを見だし、その中からエルシン酸が含まれていない無エルシン酸個体を選抜することに成功した。また、その後の遺伝学的研究からエルシン酸は2対の同義遺伝子（ $E_1E_1E_2E_2$ ）によって支配されていることが明らかとなり、無エルシン酸個体は2重の劣性ホモ（ $e_1e_1e_2e_2$ ）であることが判明した。これらの研究成果をもとにカナダでエルシン酸が5%未満の無エルシン酸ナタネ品種の開発に成功し、その後、世界中で多数の新品種が育成されている（高柳1976、Downey and Röbbelen 1989）。無エルシン酸ナタネ油の一般的な特徴は、オレイン酸が60%程度とオリーブ油に次いで多く含まれており、リノール酸やリノレン酸の多価不飽和脂肪酸含量は大豆、綿実、ヒマワリ、トウモロコシ油よりも低いが、落花生油やパーム油よりも高い。また、パルミチン酸やステアリン酸の飽和脂肪酸含量は主要植物油の中で最も低い（藤川1988）。

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おり（Miller *et al.* 1976）、肥料のみならず飼料としても価値が高い。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が (Röbbelen and Thies 1980、Underhill 1980)、ナタネ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、ナタネの油粕を飼料として十分に活用することができなかつた (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た。その結果、カナダでグルコシノレート含量の低減化に成功し、無エルシン酸形質を併せ持つ無エルシン酸・低グルコシノレート品種 (ダブルゼロ品種) Tower を育成した (Downey and Röbbelen 1989)。その後、世界中で多数のダブルゼロ品種が育成されている (Sernyk 1992)。

我が国では、古来より在来ナタネが燈火用や食用の油糧作物として栽培されてきたが、明治時代に海外より収量性の高いナタネ (*B. napus*) が導入されると在来ナタネは栽培されなくなり、現在ではナタネのみが栽培されている。重要な油脂資源作物として、また数少ない冬作物として最盛時の 1957 年には全国で約 26 万 ha の作付面積で、32 万 t の子実が生産された (志賀 1971)。しかし、日本の経済構造の変化に伴う他産業への労働力の流出やナタネ価格の低迷、生産性の低さなどの原因で栽培が激減し、1993 年には青森県と鹿児島県を主に 734ha の作付面積で、1,510t 収穫されているにすぎない (農林水産省統計情報部 1996)。

日本では栽培面積の減少と共に育種事業の規模も縮小され (農林水産技術会議事務局・福島県農試 1973)、ナタネ油を食用として利用する際に望ましくないとされるエルシン酸の低減化がカナダやヨーロッパ諸国に比べて立ち後れた。このことがナタネ栽培の衰退にさらに拍車をかける結果となった。しかし、1990 年に初めての無エルシン酸品種アサカノナタネ (奥山ら 1993) とキザキノナタネ (奥山ら 1994) が育成されたことで、国産ナタネ油の価値が見直されており、加えて村おこしのための景観用作物としても人気が高く、ナタネ栽培の気運が高まりつつある。

植物油脂の用途はそれに含まれる脂肪酸の組成によって決まる。このため、食用や工業用に適した油脂を得るために、ダイズやヒマワリ、サフラワー、アマなどで植物に固有な

脂肪酸組成の遺伝的な改変が行われている（田代 1995）。ナタネでは無エルシン酸品種の育成により、脂肪酸組成を大きく改変することに成功した。しかし、利用目的に応じたさらなる遺伝的な改変が試みられ、酸化安定性に優れるオレイン酸を 80%にまで高めることや（Auld *et al.* 1992、Rücker and Röbbelen 1995）、必須脂肪酸ではあるが酸化しやすいリノレン酸含量を低下させる研究が実施されている（Scarath 1995）。一方、長鎖脂肪酸であるエルシン酸は熱安定性が高いために他の植物性脂肪酸では得られない性質を備えており、潤滑油や表面活性剤、可塑剤、農薬等の工業用脂肪酸としても重要な原料となっている（松尾 1991、Friedt and Lühs 1995）。このため、エルシン酸が多く含まれる従来の品種が工業用として利用されているが、遺伝的な改良によるエルシン酸含量の向上も育種目標となっており、種内外の高エルシン酸遺伝資源の利用（Albrecht *et al.* 1995、Heath and Earle 1995）や遺伝子導入技術を用いた研究が進められている（Friedt and Lühs 1995）。日本では高エルシン産ナタネ油の需要は約 1 万 t あり（油脂編集部 1992）、エルシン酸が含まれる従来の国産ナタネも工業用として利用されていることから、高エルシン酸ナタネ品種の開発も今後必要になるものと考えられる。

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。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 では、総グルコシノレート含量の約 80%を占める aliphatic 系のグルコシノレート含量が著しく減少している（Josefsson and Appelqvist 1968、McDanell *et al.* 1988）。しかし、グルコシノレートの低減化育種では Bronowski を唯一の遺伝資源として利用していることから、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が必要とされている。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をより低くするためには indolyl 系グルコシノレート含量の低減化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。

ナタネは、世界中で栽培されているほとんどが油糧資源としての子実用であるが、飼料

用や野菜としても利用されており、ヨーロッパでは飼料用のスウェーデンカブが（志賀 1989）、我が国ではハクランや千宝菜などの合成ナブスが育成されている（戸田 1989）。また、ナバナとして *B. campestris* と同様にナタネの蕾や茎葉も野菜用に利用されている。特に、ナタネは越冬性に優れ食味が良いことなどの理由から、早春の緑黄色野菜として人気が高く、東北地方を中心に栽培されている（杉山 1972）。1994年における野菜用ナタネの作付け面積（*B. campestris* を含む）は1,035haであり、その収穫量は9,446tと、近年の野菜に関する消費者ニーズの多様化に対応して年々増加している（東京青果物情報センター 1995、農林水産省食品流通局野菜振興課 1996）。このため、東北の積雪寒冷地で越冬性を有し、地域特産品として出荷する際に有利な、従来の品種とは区別性のある食味や外観の優れた良質のナバナ品種の育成が望まれていた。

以上のような背景の下に、本論文では品質を基にした新形質を有する油糧用および野菜用のナタネ品種の開発を目的として、グルコシノレート成分の低減化やエルシン酸含量の向上およびナバナの外観品質に関する遺伝・育種学的な研究を行った。

第2章では、グルコシノレート成分の低減化による低グルコシノレート品種の育成を目的として、まず、グルコシノレート含量を高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCと略す）を用いて評価する上で必要となるデスルホグルコシノレートの分離・同定をHPLCに大気圧化学イオン化質量分析計を接続したシステムを用いて行った。次に、日本産ナタネのグルコシノレート含量を明らかにすると共に、組成に基づく日本品種の変異性を明らかにした。また、グルコシノレート含量の低減化や組成を改変するための新たな遺伝資源を探索するために、*Brassica* 属6種の遺伝資源1,173点のグルコシノレート含量と組成の変異性を評価した。さらに、育種現場において低グルコシノレート個体選抜の効率化を図るために、発芽後の子葉を用いてF₂種子のレベルでグルコシノレート含量を評価できる検定法ならびに個体選抜法を開発した。そして、日本の優良系統と外国の無エルシン酸・低グルコシノレート品種との交配から、無エルシン酸・低グルコシノレートで多収の優良系統である東北90号を育成した。

第3章では工業用油脂としての需要が多いエルシン酸含量を遺伝的改変によって高めたい高エルシン酸系統の育成を試みた。まず、育種材料の探索のために日本産および外国産のナタネ遺伝資源1,114点についての脂肪酸組成を調査し、特に日本産ナタネの変異性について評価した。また、見いだされた高エルシン酸系統についてエルシン酸含量の年次間

変動を調査し、遺伝的に安定であることを確認した。さらに、高エルシン酸系統と外国のダブルゼロ品種を利用して交配を行い、日本の風土に適合した高エルシン酸・低グルコシノレートナタネの育成を試みた。

第4章では、ナタネ栽培の多様性を図る目的で、ワックスレス突然変異体を利用して越冬性および外観品質に優れた良食味のナバナ用の新品種を育成した。さらに、新品種の優良形質であるワックスレス形質について遺伝解析を行うと共に、葉面上のエピクチクラワックスを走査型電子顕微鏡を用いて観察し、その形態や量について検討した。

第2章 グルコシノレート成分の遺伝的変異性と品種育成に関する育種学的研究

本章では、グルコシノレート成分の低減化による低グルコシノレート品種の育成を目的として、日本品種に含まれるグルコシノレート成分を HPLC に大気圧化学イオン化質量分析計を接続したシステムを用いて分離・同定した。次に、これまで不明であった日本産ナタネのグルコシノレート含量に関する変異性を明らかにすると共に、グルコシノレート含量の低減化や組成の改変のための新たな遺伝資源の探索を *Brassica* 属 6 種において実施し、その変異性を評価した。また、低グルコシノレート個体選抜の効率化を図るために、半子葉法を用いた F₂ 種子 1 粒レベルでのグルコシノレート含量の評価法を確立した。さらに、日本の優良系統と外国の無エルシン酸・低グルコシノレート品種との交配から、無エルシン酸・低グルコシノレートで多収の優良系統東北 90 号を育成した。

第1節 LC/APCI-MS によるグルコシノレート成分の同定

1. 緒言

ナタネの種子には 10 数種類のグルコシノレートが含まれていることが報告されている (Birch *et al.* 1992)。しかし、現在までに報告されている品種は全て外国産であり、日本品種については多数のグルコシノレートが存在することが予想されるが、これまでに種子グルコシノレートの種類やその含量については報告されていない。

グルコシノレートの定性・定量分析は indolyl 系とその他のグルコシノレートを同一のクロマトグラム上で分離することが可能なことから (Sang *et al.* 1984)、脱硫化したデスルホグルコシノレートを逆相系カラムを装着した高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC と略する) システムを用いて、UV 検出器で測定するのが一般的である (Helboe *et al.* 1980)。著者が HPLC により日本産ナタネのデスルホグルコシノレートの分離・定量を試みたところ、多数のピークが検出された。HPLC 分析では質量や構造に関する情報が得られないため、既知の報告 (Sang *et al.* 1984; The International Organization for Standardization 1992) とクロマトグラムの比較を行った。しかし、保持時間やピークパターンがクロマトグラム間で変動するために、保持時間の比較のみでは各

ピークに対応するグルコシノレートを決定することは困難であった。このため、グルコシノレートの定量に先立ち、各ピークを同定することが不可欠であった。

デスルホグルコシノレートの同定は煩雑な前処理を行った後、ガスクロマトグラフ・質量分析計（以下、GC/MS と略す）（Eagles *et al.* 1981）や、高速原子衝撃質量分析計（FAB/MS）（Fenwick *et al.* 1980）、電子衝撃イオン化質量分析計（EI/MS）（Fenwick *et al.* 1981）、化学イオン化質量分析計（CI/MS）（Fenwick *et al.* 1982）、フィールド脱着質量分析計（FD/MS）（石井ら 1988）を用いて行われてきた。近年、技術的進歩が著しい液体クロマトグラフ/質量分析計（以下、LC/MS と略す）は、HPLC の優れた分離能力と質量分析器の幅広い定性能力を生かした分析法であり、indolyl 系グルコシノレートのように煩雑な誘導体化を必要とする物質や、熱に不安定、難揮発性などの理由から GC による分析が困難な物質についても直接分離同定することが可能である（内山ら 1991）。近年開発された大気圧化学イオン化質量分析計（以下、APCI/MS と略す）は応用範囲の広さや操作性の簡便さから、上記の質量分析計より LC/MS のインターフェースとして有望であるとされている（坂入 1993）。

そこで、本節では HPLC を用いて日本産ナタネに含まれるグルコシノレート含量を評価する上で不可欠なデスルホグルコシノレートの分離・同定を HPLC に APCI/MS を接続したシステム（以下、LC/APCI-MS と略す）を用いて行った。

2. 材料および方法

LC/APCI-MS によるグルコシノレートの同定に先立ち、ナタネ 10 数品種を供試して予備的に HPLC によるグルコシノレート抽出液のピーク分離を検討したところ、品種トキワナタネが最も良好であった。このことから、以降のグルコシノレートの同定にはトキワナタネを供試品種として用いることにし、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体から得た自殖種子を用いた。栽培条件は元肥として 1a 当たり N 0.8kg、P₂O₅ 0.8kg および K₂O 0.6kg を施肥し、畦幅 70cm、株間 20cm 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。

種子からのグルコシノレートの抽出とスルファターゼによるグルコシノレートの脱硫化は Bjerg and Sorensen (1987) の方法に従った。すなわち、供試品種の種子を乳鉢で磨碎

し、それより精秤した種子粉碎物 0.2g を 70% 熱メタノールで 10 分間、75°C で加熱し、グルコシノレート抽出した。この抽出作業を 3 回繰り返して、5ml にメスアップした粗グルコシノレート溶液 1ml を 0.5ml の DEAE-セファデックス A-25 を充填した 1ml 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 0.3U/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 LC/APCI-MS により測定した。

使用した LC/APCI-MS 装置および分析条件は次の通りである。HPLC 装置は日立 L-6200 形で、東ソー社製逆相カラム (TSK gel ODS-80TM、4.6mm × 150mm) を APCI-インターフェイスに取り付けた。また、マススペクトロメーター・コンピューター装置は日立 M-2500 形を用いた。デスルホグルコシノレートの分離は A 液 (超純水) 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。グラジエントの条件は 99% A 液 + 1% B 液で 5 分間保持し、25 分間の直線的グラジエントにより 75% A 液 + 25% B 液の移動相とした。流速は 1ml/分、カラムの温度は 40°C、検出波長は 230nm、注入量は 20 μl である。APCI-インターフェイスについてはドリフト電圧 150 V、霧化温度 250°C、脱溶媒器温度 400°C に設定した。デスルホグルコシノレートの同定は既知のマススペクトル (Hogge *et al.* 1988) やクロマトグラム (The International Organization for Standardization 1992) と比較することで行った。

3. 結果

Fig. 2-1 にトキワタネの種子デスルホグルコシノレート抽出液の HPLC クロマトグラムを示した。本実験における HPLC グラジエント・プログラムのピーク分離は良好であり、トキワタネの種子には 10 種の主要なピークが確認された。そこで、これらの主要ピークの同定を APCI/MS を用いて行った。Fig. 2-2 にはトキワタネのデスルホグルコシノレート溶液を LC/APCI-MS に注入したときの擬分子イオンのトータルイオン電流クロマトグラムを示した。10 種の主要ピークにおいて、UV 検出器とマススペクトロメーターにおける検出時間のずれは約 0.1 分であった。トータルイオン電流クロマトグラムにおける各ピークトップのマススペクトルを Fig. 2-3 に示した。各ピークにおいて擬分子イオン $[M+H]^+$ がベースピークとなり、強く観察された。また、各擬分子イオン $[M+H]^+$ に付随して、移動相溶媒である H₂O 由来のクラスターイオンが観察された。APCI/MS により、各ピークから擬分子イオン $[M+H]^+$ とグルコシノレートを特徴づけるグルコースが

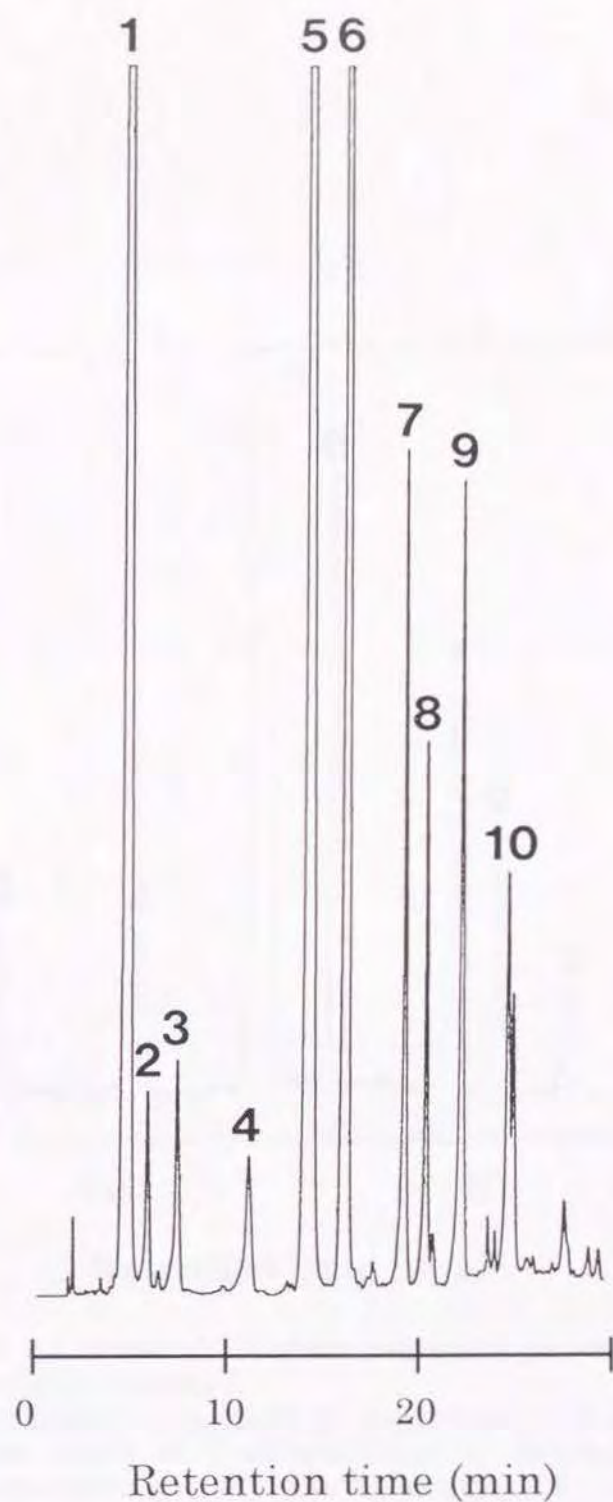


Fig. 2-1. HPLC chromatogram of desulfoglucosinolates of Japanese rapeseed cv. Tokiwanatane. Peak numbers correspond to compounds. 1: desulfoprogoitrin, 2: optical isomer of desulfoprogoitrin, 3: desulfoglucoraphanin, 4: desulfonapoleiferin, 5: desulfogluconapin, 6: desulfo-4-hydroxy-glucobrassin, 7: desulfoglucobrassicinapin, 8: desulfoglucocerucin, 9: desulfoglucobrassin, 10: desulfogluconasturtiin.

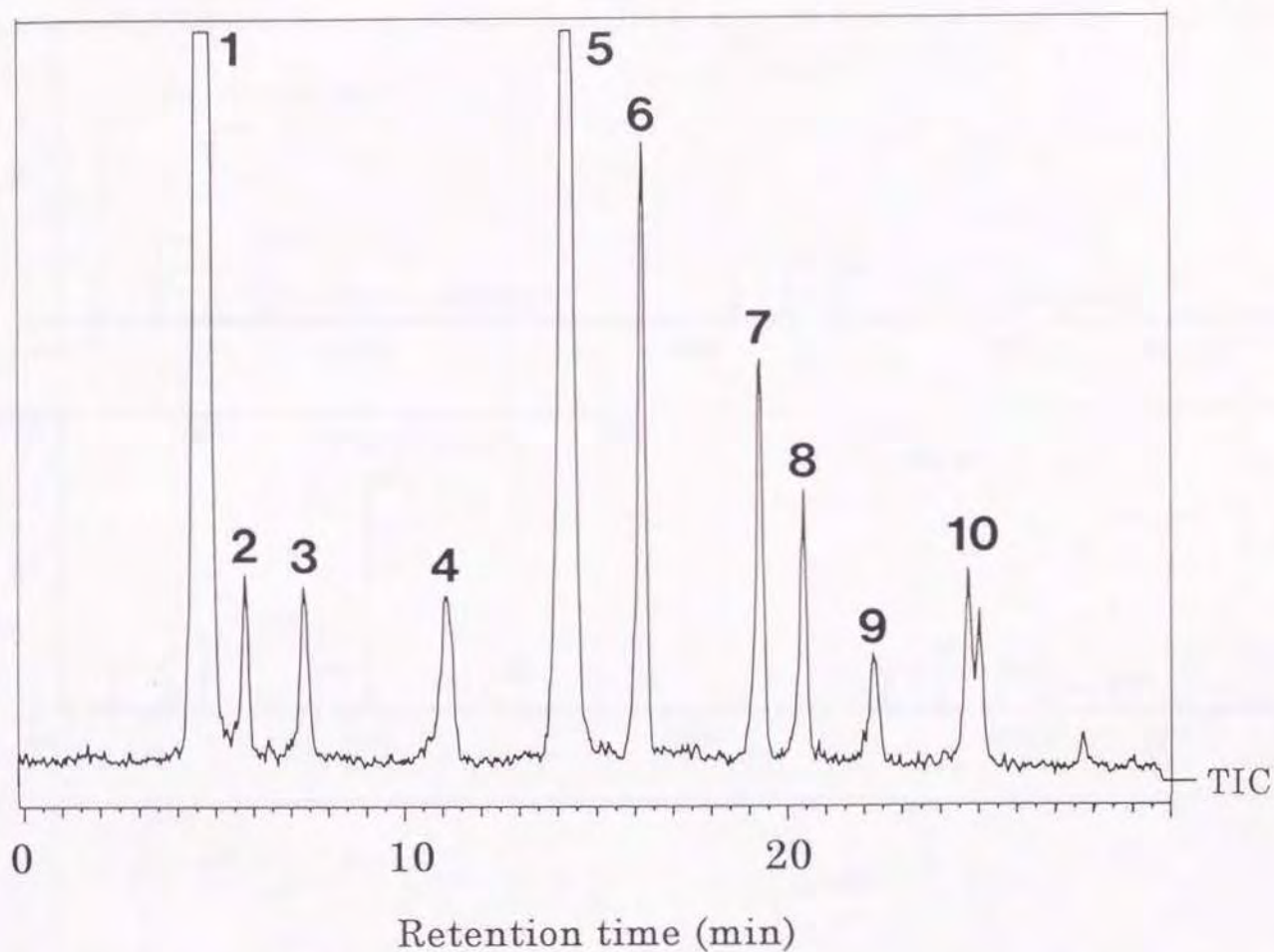


Fig. 2-2. Total ion current (TIC) chromatogram of protonated molecules of desulfoglucosinolates.

Peak numbers correspond to compounds. 1: desulfoprogoitrin, 2: optical isomer of desulfoprogoitrin, 3: desulfoglucoraphanin, 4: desulfonapoleiferin, 5: desulfogluconapin, 6: desulfo-4-hydroxyglucobrassin, 7: desulfoglucobrassicinapin, 8: desulfoglucoerucin, 9: desulfoglucobrassin, 10: desulfogluconasturtiin.

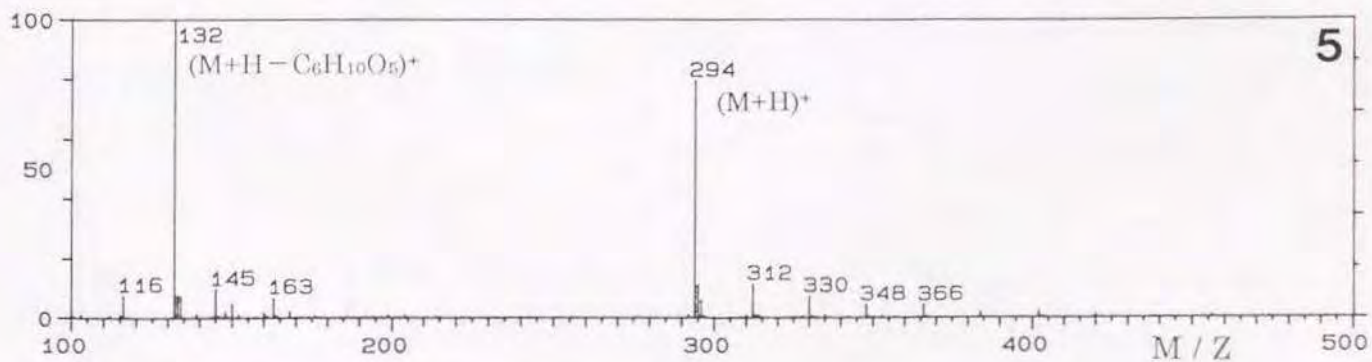
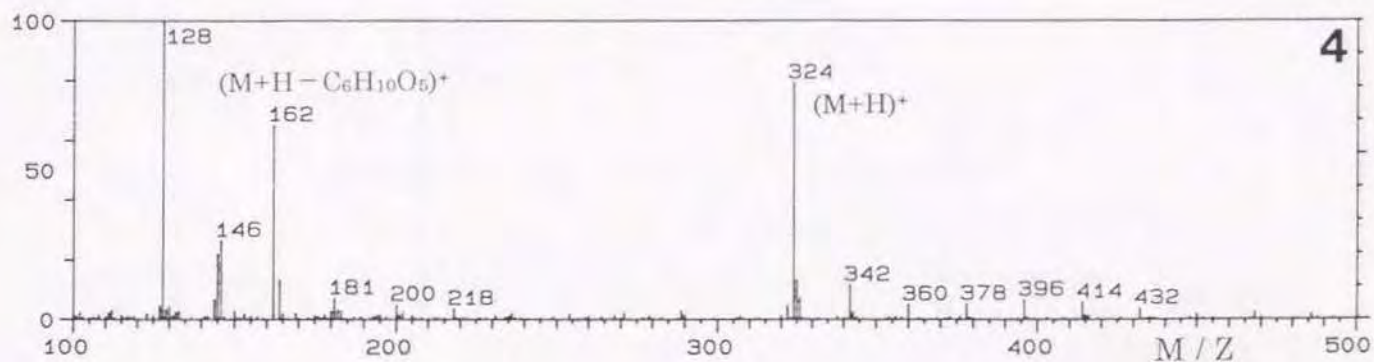
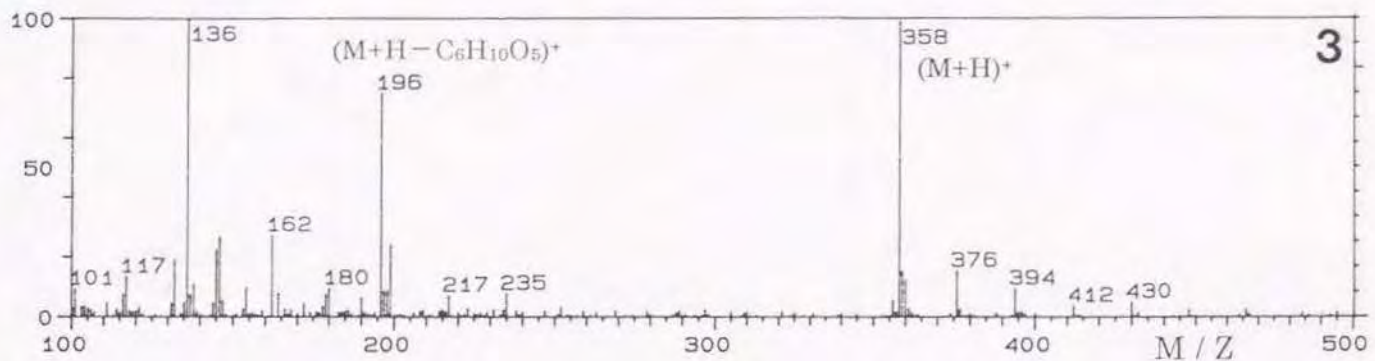
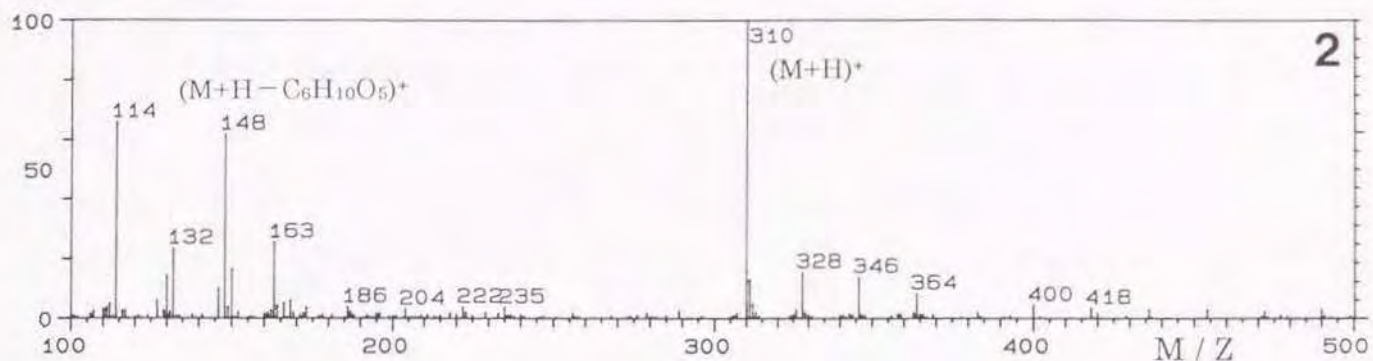
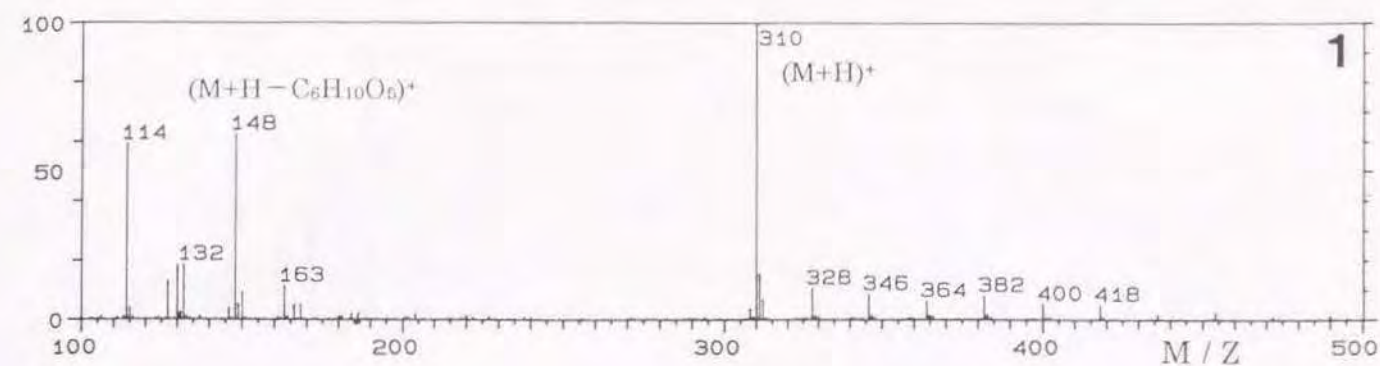


Fig. 2-3. Mass spectra of desulfoglucosinolates.

1: desulfoprogoitrin, 2: optical isomer of desulfoprogoitrin, 3: desulfoglucoraphanin, 4: desulfonapoleiferin, 5: desulfogluconapin.

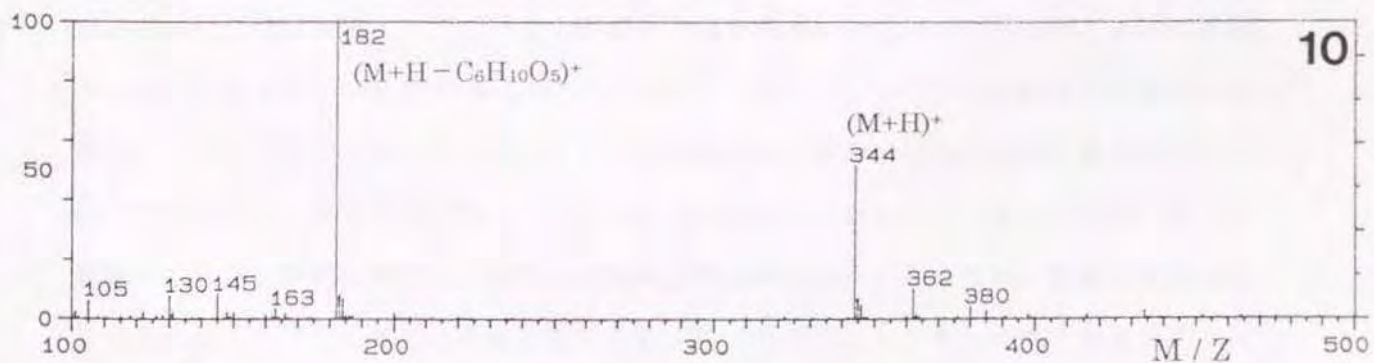
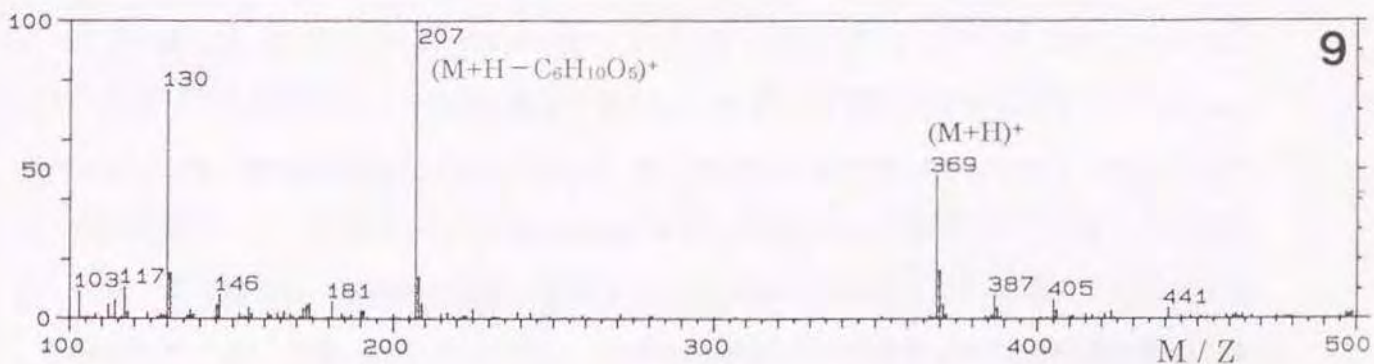
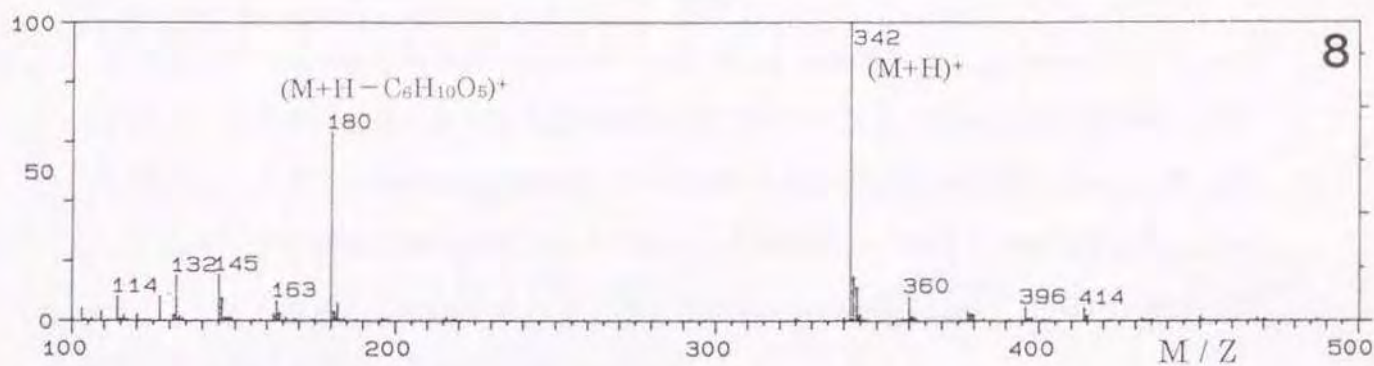
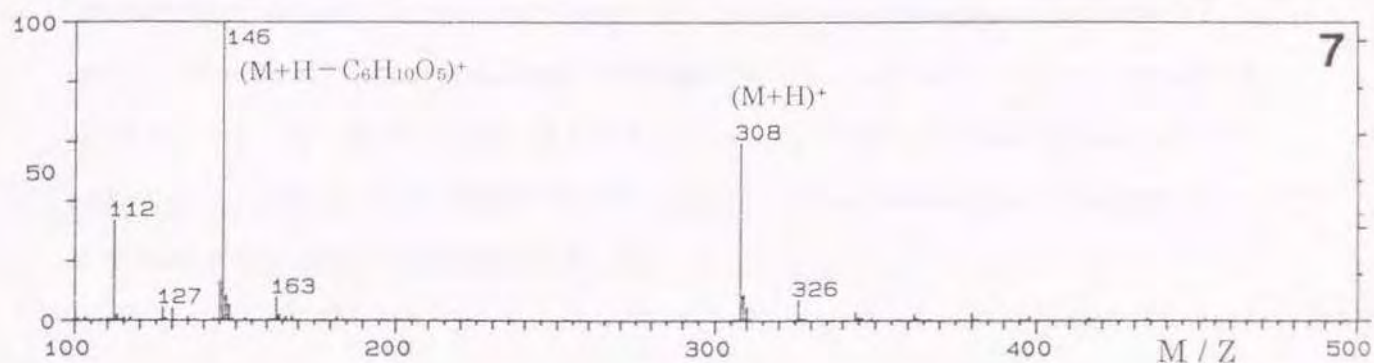
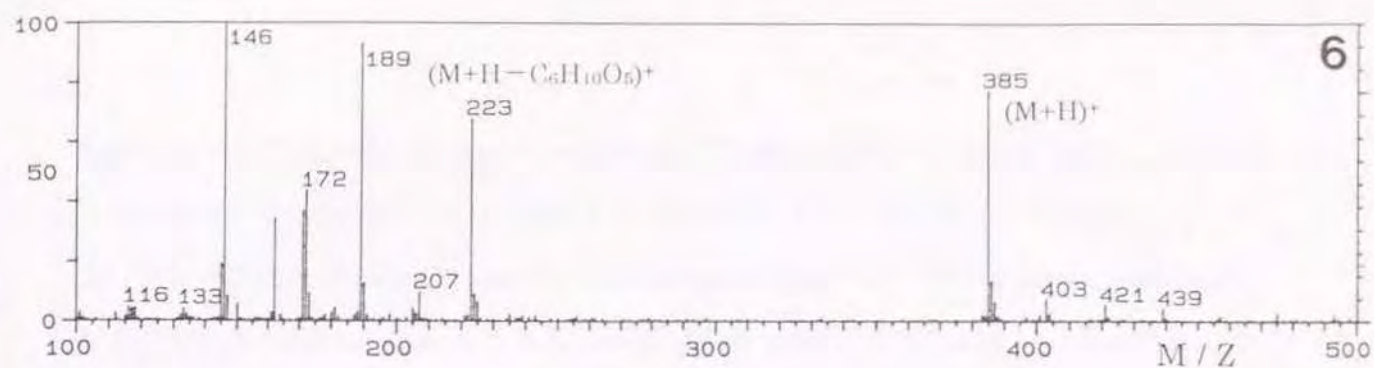


Fig. 2-3. Continued. 6: desulfo-4-hydroxy-glucobrassin, 7: desulfoglucobrassicinapin. 8: desulfoglucocerucin, 9: desulfoglucobrassin, 10: desulfogluconasturtiin.

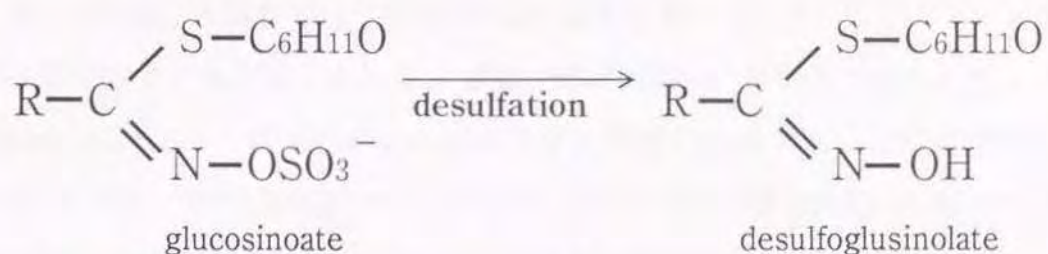
解離したフラグメントイオン $[M+H-C_5H_{10}O_5]^+$ が測定された。これらの結果と、これまでに報告されているフルスキャンスペクトルおよびリテンションタイムとを比較することで、各ピークは 1: desulfoprogoitrin、3: desulfoglucoraphanin、4: desulfonapoleiferin、5: desulfogluconapin、6: desulfo-4-hydroxy-glucobrassin、7: desulfoglucobrassicinapin、8: desulfoglucoerucin、9: desulfoglucobrassin、10: desulfogluconasturtiin と同定された。また、ピーク 2 は desulfoprogoitrin の異数体であった。このうち、6 と 9 は indolyl 系グルコシノレート、10 は aralkyl 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。これら同定されたデスルホグルコシノレートについて、Table 2-1 にアルキル (R) 基別の一般構造式を示した。

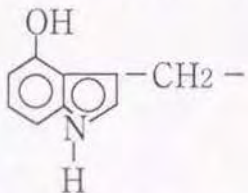
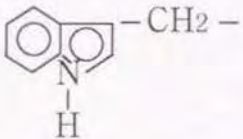
4. 考察

日本産ナタネに含まれるグルコシノレートを HPLC で分析すると 10 種のピークが分離された。これらのピークがどのような種類のグルコシノレートであるかは、既に報告されているクロマトグラムの結果と比較することで推定していたが、本研究の APCI/MS 分析により各ピークを明確に同定することができた。その結果、トキワナタネに含まれるグルコシノレートの組成は Dungey *et al.* (1988) や Sang and Salisbury (1988) が報告した外国品種における測定結果とほぼ一致していた。

これまでに LC/MS によるデスルホグルコシノレートのマススペクトル同定については、サーモスプレイ (以下、TSP と略す) 法により分析する方法が報告されている (Hogge *et al.* 1988、Mellon *et al.* 1987)。しかしながら、TSP 法の欠点としてイオン化条件の再現性が乏しいことがあげられ、Heeremans *et al.* (1989) はフラグメントイオンの相対的強度が霧化器温度や移動相の組成、流速等の TSP 実験状態により強く影響を受けることを報告している。一方、APCI 法では、これらの条件に厳密に制限されない利点を持つ。また、APCI 法では酢酸アンモニウム添加が不要であるため、フラグメントイオンの種類がシンプルであり、TSP マススペクトルに比べて APCI マススペクトルは非常に理解しやすい。しかし、その一方でマススペクトルが単純すぎ、擬分子以外の情報が得られ難いという欠点を持つ。また、正イオンマススペクトルではフラグメントイオンや付加イオンが擬分子イオンの前後に出現し、解釈を間違える可能性がある。このため、明確な構造情報を得るには、ドリフト電圧を変更することによりフラグメントイオンが多く出現したマス

Table 2-1. Structure of separated glucosinolates in this study.



No.*	Structure of R group	Trivial name
1.	$\text{CH}_2=\text{CH}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$	Progoitrin
2.	" "	Epi-progoitrin
3.	$\text{CH}_3\text{SO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Glucoraphanin
4.	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$	Napoleiferin
5.	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Gluconapin
6.		4-Hydroxy-glucobrassicin
7.	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Glucobrassicinapin
8.	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Glucoerucin
9.		Glucobrassicin
10.	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Gluconasturtiin

* : Elution order of desulfoglucosinolates from HPLC.

スペクトルを得る必要がある。さらに、負イオンマススペクトルは構造情報をほとんど与えないが擬分子イオンを明確に与えるため、負イオンマススペクトルの測定も有効であると考えられる。本研究では LC/APCI-MS によりデスルホグルコシノレートを短時間で分離することができ、さらに、質量/電荷 (m/z) の相違とフラグメントイオン $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ の確認により各ピークを容易に同定することが可能であった。LC/APCI-MS 分析では擬分子イオン $[M+H]^+$ 以外に情報が得られないため、マススペクトルのみからの物質同定は危険であるが、目的とする物質がデスルホグルコシノレートのように既知である場合、有効な同定手段となることが判明した。以上の結果から、HPLC 分析による日本産ナタネのグルコシノレートの定性および定量が可能となった。

第2節 日本品種におけるグルコシノレート含量の品種間差異

1. 緒言

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)。第1節の結果から、日本産ナタネ品種にはメチオニン由来の aliphatic 系グルコシノレート、トリプトファン由来の indolyl 系グルコシノレート、フェニルアラニン由来の aralkyl 系グルコシノレートの3種が含まれていることが確認できた。これまで、一部の日本産ナタネ品種の oxazolidinethion および isothiocyanate 含量について、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。

本節では低グルコシノレート品種育成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を評価するために、農林登録品種全てを含む 65 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依存することから、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。

2. 材料および方法

実験には Table 2-2 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 および育成系統 6) と比較のための外国の低グルコシノレートナタネ 8 品種、計 73 品種の自殖種子を供試した。栽培条件は第1節と同一である。

グルコシノレートは第1節と同様の方法で抽出・脱硫化し、デスルホグルコシノレートとして HPLC で測定した。なお、抽出1回目には内部標準として $0.8 \mu\text{M}$ のシニグリンを加えた。グルコシノレート含量は The International Organization for Standardization (1992) に従い、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 分析には、COSMOSIL 5C18 カラム (150 × 4.6mm、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-R4A) を装着した HPLC (島津 LC-4A) 装置を用いた。

各品種間のグルコシノレートに基づいた変異性を主成分分析法を用いて解析した。主成

Table 2-2. 73 cultivars used in the measurement of seed glucosinolates by means of HPLC method.

Cultivation region	Breeding method	Cultivars name
Hokkaido and Tohoku	P S	Norin 2, Taisetunatane, Mutunatane, Harunokagayaki, Aomori 1, Banseina, Azuma, Azumashu(2), Daichousei-nakano(2), Hokkidoshu(2)
	N N	Tisayanatane, Towadanatane, Kamikitatanane, Asakanonatanane, Kizakinonatanane, Tohoku 85, Tohoku 86, Tohoku 87
	N C	Norin 16, Norin 18, Miyukinatane, Asahinatane, Iwashironatane
	P S	Norin 4, Norin 5, Azuma, Wasefuji
North Kanto, Touzan, and Hokuriku	N N	Abukumanatane, Bandainatane, Hokuriku 12, Hokuriku 18, Hokuriku 23
	N C	Norin 7, Norin 10, Norin 13, Michinokunatanane, Mihonatanane
South Kanto, Toukai, Kinki, Chugoku and North Kyushu	P S	Norin 1, Norin 3, Norin 6, Norin 8, Norin 9, Hayanatanane
	N N	Norin 14, Norin 17, Tsukusinatane, Suehironatanane, Houmannatanane, Mikawanatanane, Kogananatanane, Tokiwanatanane, Kongounatanane, Oominatanane, Genkainatanane, Chikuzennatanane, Dairyuunatanane
	N C	Norin 11, Norin 12, Norin 15, Murasakinatanane, Isuzunatanane, Aburamasari
Europe and North America (Low glucosinolate cultivars)	N N	Global, Lergo, Lisandra, Hanna, Loras, SV0212, Regent, Altex

P S : Pure line selection.

N N : Varietal crossing (*B. napus* × *B. napus*).

N C : Interspecific crossing (*B. napus* × *B. campestris*).

() : No. of cultivars

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各品種の変数として用い、SAS プログラムを用いて相関行列から計算した。

3. 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 73 品種の総グルコシノレート含量の分布を Fig. 2-4 と Table 2-3 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、63.3~136.7 μ mol/g まで変異し、平均値は 100.0 ± 14.3 μ 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 90~110 μ mol/g の総グルコシノレートを含んでいたが、70 μ mol/g 以下の品種も見い出され、農林 18 号が最も低い値を示し、63.3 μ mol/g であった。次いで北海道種が 71.4 μ mol/g であった。逆に、グルコシノレート含量の高い品種として農林 7 号 (136.7 μ mol/g) と農林 2 号 (134.5 μ mol/g) があった。他方、外国の低グルコシノレート品種の含量は SV0212 の 9.6 μ mol/g から Altex の 27.5 μ mol/g の範囲に分布しており、その平均値は 16.8 ± 6.6 μ mol/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に低いグルコシノレート含量を示す品種は見られなかったが、品種による変異性が大きく、60 μ mol/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. 2-5 に示した。供試した日本品種 65 の全てに第 1 節で明らかになった 10 種の主要グルコシノレートが認められた。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含量の多いものとして progoitrin (ピーク 1) が約 57%、gluconapin (ピーク 6) が約 27%、4-hydroxy-glucobrassicin (ピーク 7) が約 6%、glucobrassicinapin が約 5% であった (Table 2-3)。Table 2-3 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. 2-5-A, B)。総グルコシノレート含量が比較的低い農林 18 号では aliphatic 系の 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、indolyl 系

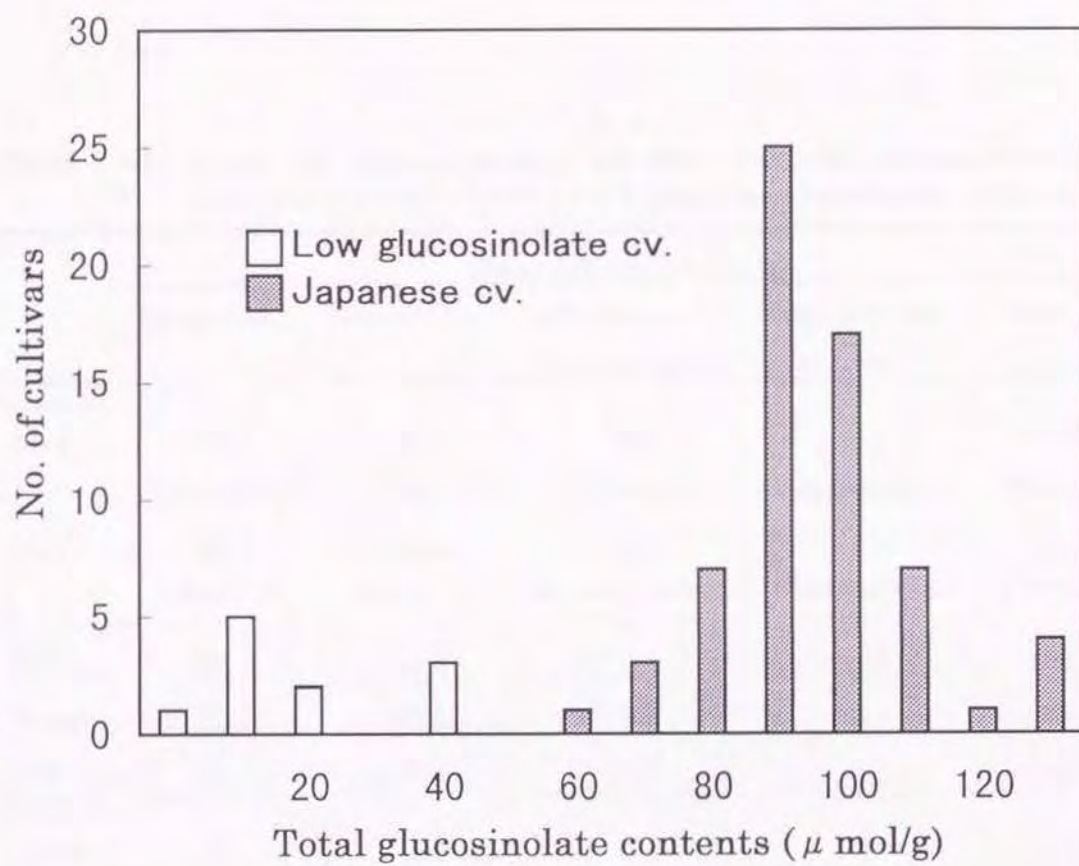


Fig. 2-4. Distribution of total glucosinolate contents in Japanese rapeseed (*Brassica napus* L.) and European and North American low glucosinolate cultivars.

Table 2-3. Range and mean contents of the major and total glucosinolates in 65 Japanese rapeseed cultivars and 8 exotic low glucosinolate cultivars.

	Glucosinolates (μ mol/g)				
	Progoitrin	Gluconapin	4-Hydroxy- Glucobrassicin	Glucobrassi- canapin	Total
<i>(Japanese cv.)</i>					
Max	96.9 (Norin 12)*	44.9 (Norin 1)	10.8 (Norin 7)	9.8 (Koganenatane)	136.7 (Norin 7)
Min	35.8 (Norin 18)	14.5 (Norin 18)	2.3 (Kizakinonatane)	1.5 (Aburamasari)	63.3 (Norin 18)
Mean	56.6	27.4	6.4	4.6	100.0
Range	61.1	30.5	8.5	8.3	73.4
D S..	11.3	5.5	1.8	1.9	14.3
<i>(Exotic cv.)</i>					
Mean	5.5	2.4	7.4	0.3	16.8
Range	9.0	4.3	4.7	0.4	18.0
D S..	3.4	1.3	1.8	0.1	6.6

*: Name of cultivar.

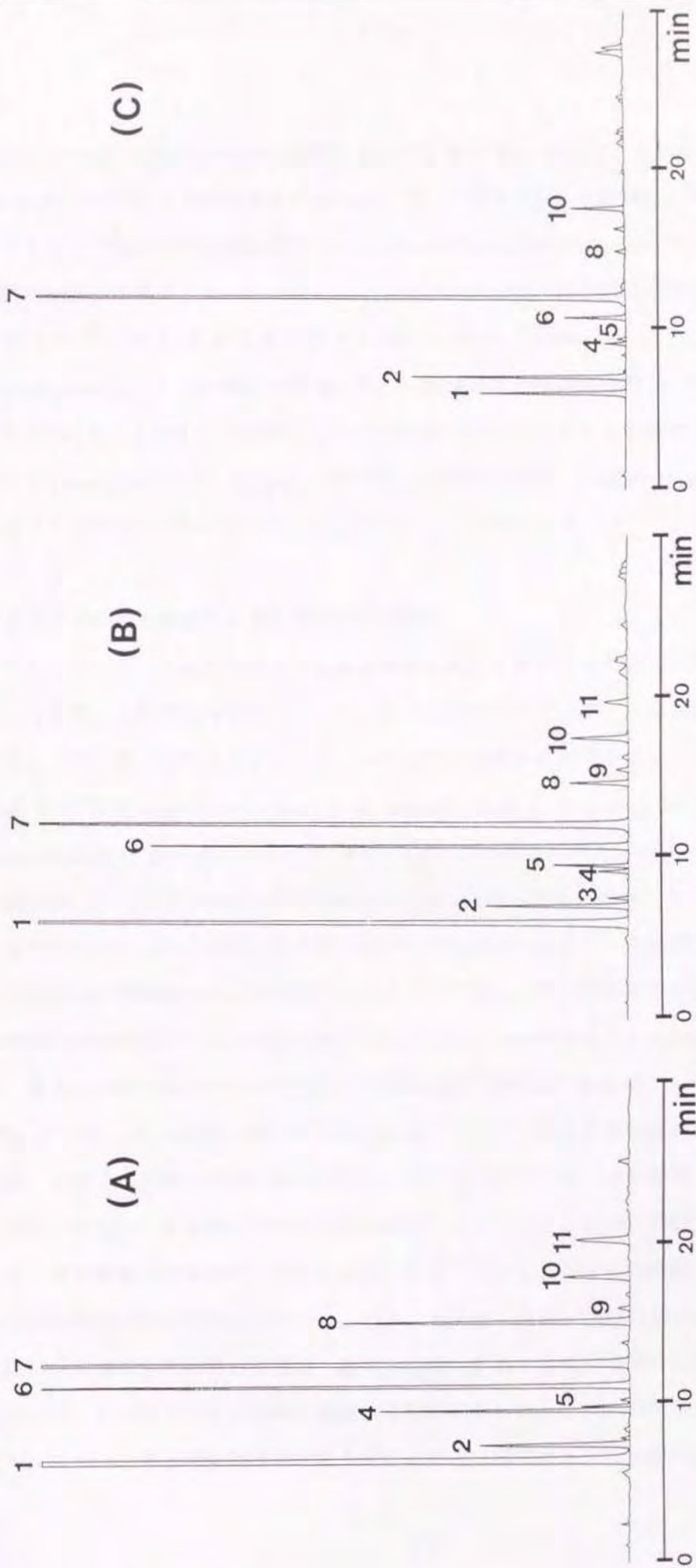


Fig. 2-5. HPLC chromatograms of desulphoglucosinolates of Japanese rapeseed cv. Norin 12 (A), Norin 18 (B), and European low glucosinolate rapeseed cv. SV0212 (C). Detection wavelength : 229 nm.

Nine peaks were identified as the following glucosinolates, respectively,

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

の 4-hydroxy-glucobrassicin 含量は 103% と両品種に差は認められなかった。一方、Table 2-4 に示すよう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みると、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見られた。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見られなかった。SV0212 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. 2-5-C、Table 2-3)。

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に、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であり、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 (4-hydroxy glucobrassicin、glucobrassicin) が+の、aliphatic 系のグルコシノレート (progoitrin、napoleiferin、gluconapin、glucobrassicinapin) が-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ファクターと推察された。この 2 つの主成分で全情報量の 53.8% を説明することができた。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応地域別に分類しプロットした (Fig. 2-6)。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応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

Table 2-4. Comparison of seed glucosinolates content among Japanese rape cultivar groups bred by three different methods.

Breeding method	No. of cultivars	Seed glucosinolates contents ¹⁾ (μ mol/g seeds meal)			
		Progoitrin	Gluconapin	4-Hydroxy-Glucobrassicin	Glucobrassicin canapin
Pure line selection	23	56.3 \pm 12.1 ^a	28.7 \pm 7.0 ^a	6.4 \pm 1.7 ^{a b}	4.8 \pm 1.8 ^a
Intraspecific crossing (<i>B.napus</i> \times <i>B.napus</i>)	26	54.9 \pm 8.2 ^a	26.9 \pm 4.0 ^a	6.0 \pm 1.8 ^a	4.1 \pm 1.8 ^a
Interspecific crossing (<i>B.napus</i> \times <i>B.campestris</i>)	16	59.9 \pm 15.1 ^a	25.8 \pm 5.7 ^a	7.3 \pm 1.5 ^b	5.0 \pm 2.3 ^a
Exotic low glucosinolate cv.	8	5.5 \pm 3.4 ^b	2.4 \pm 1.3 ^b	7.4 \pm 1.8 ^b	0.3 \pm 0.1 ^b

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

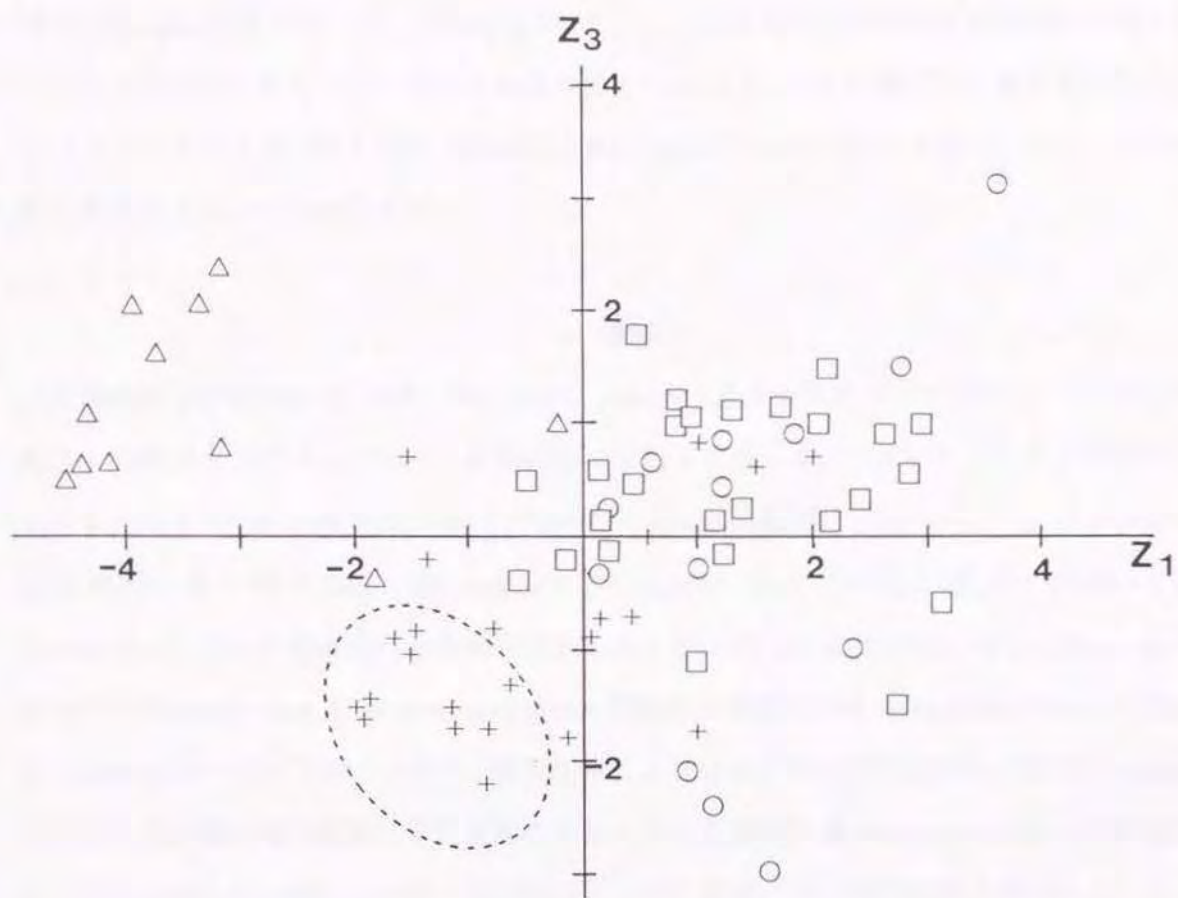


Fig. 2-6. Scatter diagram of 76 cultivars of rapeseed projected on the first and third axis of principal component analysis based on seed glucosinolates.

- + : Cultivars of Hokkaido and Tohoku region;
- : Cultivars of north Kanto, Touzan, and Hokuriku region;
- : Cultivars of south Kanto, Toukai, Kinki, Chugoku and north Kyushu region;
- △ : Europe and north America low glucosinolate cultivars.
- (dashed) area means cultivars of Hokkaido and north Tohoku region.

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では、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。

4. 考察

今回供試した日本産65品種の総グルコシノレート含量の平均は $100.0 \pm 14.3 \mu \text{ mol/g}$ であり、外国の低グルコシノレート品種に比べて約6倍多く含まれていた。しかし品種間で大きな変異が見られ、総含量は $63.3 \sim 136.7 \mu \text{ mol/g}$ 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 含量が *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 含量は他の品種に比べて低いことから、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低いことを報告した (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 $97.4 \mu \text{ mol/g}$ 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 7 号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見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。

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 号および北海道種も progoitrin、gluconapin 含量は減少していたが、4-hydroxy-gluco Brassicacin 含量は変化していないことから、aliphatic 系グルコシノレートの低下系統と見なされた。現在までに国外で育成されている低グルコシノレート品種は全てポーランドの品種 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、本研究で見い出すことができなかった。indolyl 系グルコシノレートの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*) に代わって、ナタネ (*B. napus*) 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雪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には多様な遺伝子型の品種が存在することが考えられる。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。

第3節 *Brassica* 属遺伝資源におけるグルコシノレート含量の評価

1. 緒言

世界中で育成されているグルコシノレート総含量が $30 \mu\text{mol}$ 以下の低グルコシノレートナタネ品種は、Bronowski と呼ばれる 1 品種を唯一の遺伝資源として利用している (Evans *et al.* 1989、Buzza 1995)。このため、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に遺伝的な多様性を図ることや indolyl 系のグルコシノレート含量をさらに低減化することが求められおり、新たな低グルコシノレート遺伝資源の探索や作出が必要とされている。第2節において、日本の主要品種には aliphatic 系グルコシノレート含量とその組成に品種間差異や地理的変異が存在することを明らかにした。日本には世界的にも有数のナタネ遺伝資源を含め、多数の *Brassica* 属作物が遺伝資源として保存されている (志賀 1989、農業生物資源研究所 1990)。しかし、これまでにこれら保存系統におけるグルコシノレート含量と組成についての評価は詳細に行われてこなかった。とりわけ、日本産のナタネ遺伝資源の中には種間交雑に由来する系統が多数含まれていることから多様な変異性の存在が期待される。そこで、本節ではグルコシノレート含量の低減化や組成を改変するための新たな遺伝子源を探索するために、農林水産省で保存している日本産のナタネ (*B. napus*) と在来ナタネ (*B. campestris*) および市販品種も含めた他の *Brassica* 属 6 種の遺伝資源について、そのグルコシノレート含量と組成の変異性を調査し、評価した。

2. 材料及び方法

植物材料

実験には農業生物資源研究所、東北農業試験場および野菜・茶業試験場で保存している日本産のナタネと合成ナプス (以上、*B. napus*) 857 品種・系統および在来ナタネとつげな (以上、*B. campestris*) 92 品種・系統、外国産遺伝資源および種苗会社から導入したケール、カリフラワー、ブロッコリー、野生キャベツ (以上、*B. oleracea*) 148 品種・系統、黒カラシ (*B. nigra*) 1 系統、カラシナとタカナ (以上、*B. juncea*) 57 品種・系統、アビシニアカラシ (*B. carinata*) 18 品種・系統の合計 1,173 品種・系統の種子を供試した。実験に用いた作物別の品種・系統数を Table 2-5 に示した。

Table 2-5. Individual and total glucosinolate contents in seeds of *Brassica* species.

Species (Genome symbol)	Plant name	No. of cultivar and line	Individual glucosinolate content (μ mol/g seeds)						Total content (μ mol/g meal)
			GIB	PRO	SIN	GNA	4OHG	GBC	
<i>B. napus</i> (AACC)	Rapeseed	850	—	71.8±20.0 (1.5-161.1)	—	35.1±13.2 (10.7-137.6)	8.6±1.7 (3.3-14.5)	6.9±3.4 (0.3-22.5)	140.8±26.4 (70.5-235.8)
	Synthetic napus	7	1.1±1.4 ²⁾ (0.3-4.5) ³⁾	70.4±8.8 (54.5-84.1)	14.6±19.8 (2.0-61.7)	—	30.2±8.7 (13.4-37.7)	10.0±1.3 (8.0-11.9)	8.0±2.4 (4.3-12.8)
<i>B. campestris</i> (AA)	Turnip rape	77	—	2.9±3.9 (0.3-21.1)	—	110.9±20.5 (36.9-152.1)	6.8±1.4 (3.4-10.1)	9.3±5.4 (2.4-38.9)	138.4±19.1 (85.2-178.5)
	Chinese mustard	15	—	2.4±3.4 (0.5-11.0)	—	92.4±16.9 (67.5-131.5)	7.3±1.0 (5.0-9.0)	9.9±4.6 (2.9-19.3)	122.0±14.9 (91.1-153.4)
<i>B. oleracea</i> (CC)	Kale	19	16.1±15.4 (0.2-59.0)	43.5±23.7 (11.0-97.5)	77.7±40.6 (4.0-148.4)	10.2±7.6 (0.6-30.9)	12.9±2.8 (8.5-18.4)	0.5±1.0 (0-3.8)	174.3±41.0 (103.0-254.1)
	Cauliflower	75 (34) ¹⁾	78.7±34.0 (3.9-155.2)	1.7±2.4 (0-13.0)	60.5±36.7 (1.9-149.8)	0.4±0.7 (0-4.0)	11.3±2.7 (4.3-18.9)	—	171.1±32.3 (95.1-253.9)
	Broccoli	51 (42)	10.9±31.6 (0.2-222.1)	12.0±30.1 (0-123.9)	79.5±32.9 (9.0-151.8)	1.8±4.7 (0-24.7)	8.3±2.6 (3.8-17.5)	—	145.1±41.1 (69.2-277.6)
	Wild cabbage	3	8.3±7.1 (2.4-18.3)	100.6±27.1 (67.0-133.4)	46.6±20.6 (31.9-75.8)	13.2±2.7 (9.8-16.4)	12.7±1.2 (11.4-14.3)	—	197.0±17.0 (173.1-211.1)
	Black mustard	1	0.3	0.2	231.6	5.0	2.8	—	243.9
<i>B. juncea</i> (AABB)	Leaf mustard	27	0.3±0.2 (0-0.6)	0.2±0.3 (0-1.3)	140.3±45.5 (1.7-202.4)	7.8±21.0 (0-93.7)	6.4±2.0 (0.9-10.8)	0.4±1.7 (0-9.1)	178.4±57.5 (122.5-445.3)
	Broad-leaved mustard	30	0.5±0.5 (0-2.0)	0.2±0.5 (0.1-2.7)	142.6±35.4 (3.3-204.4)	13.3±23.2 (0.5-98.4)	6.4±1.6 (4.0-10.6)	0.5±2.2 (0-12.1)	170.6±22.6 (123.7-216.9)
	Leaf mustard	18	0.2±0.1 (0-0.4)	3.9±1.8 (1.2-9.5)	163.4±26.5 (103.3-198.6)	1.1±0.7 (0.3-3.6)	6.9±0.9 (5.5-8.6)	—	180.2±26.9 (115.5-216.9)
Total		1173							

1) : No. of F₁ cultivars in the plant materials.

2) : Means ± SD.

3) : Minimum and Maximum.

GIB = Glucoiberin, PRO = Progoitirin, SIN = Sinigrin, GNA = Gluconapin, 4OHG = 4-hydroxy-gluco brassicin, GBC = Gluco brassicanapin.

サンプル調製と HPLC 分析

種子グルコシノレートは種子粉碎物 0.2g から第 1 節と同様の方法で抽出・脱硫化し、デスルホグルコシノレートとして HPLC 分析に供試した。HPLC 分析には、COSMOSIL 5C18 カラム (150×4.6mm、ナカライテスク) およびワークステーション (日立 HPLC マネージャシステム) を装備した HPLC (日立 L-7000 システム) 装置を用いた。分析および定量は第 1 節と同様に行った。新たに観察されたピークについては既知のクロマトグラム (Sang *et al.* 1984, The International Organization for Standardization 1992) との比較によりグルコシノレートを推定した。

3. 結果

ナタネを初めとして供試した *Brassica* 属 6 種の遺伝資源におけるグルコシノレート含量の最大値、最小値および平均値を Table 2-5 に示した。各グルコシノレートの組成において、種間で大きな差異が存在すると共に、種内の系統間でも大きな変異性の存在が認められた。調査した 1,173 系統の中で特に典型的なナタネ品種とグルコシノレート組成が異なっている系統について、それらのグルコシノレート含量と組成を Table 2-6 に示した。

日本産のナタネ 850 系統の総グルコシノレート含量は 70.5~235.8 μ mol/g の範囲で、平均値は 140.8±26.4 μ mol/g であり、各遺伝資源を総含量でプロットしたところ正規分布に近い分布を示した (Fig. 2-7)。最も低いのは品種チサヤナタネであり、次いで農林 18 号が 73.2 μ mol/g と低かった。一方、最も高いのは品種岩内種であった。組成について見てみると、第 1 節と第 2 節の結果と同様に progoitrin、gluconapin、4-hydroxy-glucobrassicin および glucobrassicinapin が主要成分として含まれていたが、品種アブクマナタネに見られるように新たに glucoalysin と glucoerucin と推定されるグルコシノレートを有する系統が見いだされた (Table 2-6)。総含量に占める各グルコシノレートの割合は、aliphatic 系グルコシノレートの progoitrin と gluconapin がそれぞれ 50.1% と 25.0% を含む高かったが、progoitrin 含量が著しく減少した組成を持つ系統が導入先の異なる同一品種を含めて 8 系統 (伊勢黒、東北 26 号、東海 4 号・2 系統、雑種・4 系統) 見いだされた (Table 2-6)。これらの系統は日本品種の中で総含量が最も低いチサヤナタネに比べて progoitrin 含量が 12% 以下まで低減していたが、反対に gluconapin 含量が 3~4 倍増加しており、総含量の低下は認められなかった。実験に供試した全ナタネ遺伝

Table 2-6. Composition and total content of seed glucosinolates on glucosinolate mutant in *Brassica* collection.

Species	Cultivar and line	Individual glucosinolate content (%) ¹⁾							Total GSL (μ mol/l)	
		GIB	PRO	SIN	GAL	GNA	4OHG	GBC		GER
(Typical type)	Tokiwatanane ²⁾	—	66.9	—	2.4	28.6	9.3	6.4	0.1	130.5
<i>B. napus</i>	Global ³⁾	—	2.2	—	0.4	2.0	7.0	0.1	2.0	14.4
(Mutant type)	Abukumanatane	—	2.5	—	3.1	115.4	10.2	16.9	6.8	168.1
<i>B. napus</i>	Iseguro	—	2.8	—	2.4	103.8	9.3	22.3	0.1	148.4
	Tohoku 26	—	6.0	—	1.2	137.6	7.5	16.0	0.2	176.1
	Toukai 4-1	—	2.7	—	4.7	93.1	8.5	11.9	3.4	137.4
	Toukai 4-2	—	1.6	—	4.4	134.9	8.3	9.6	1.4	171.4
	Zassu-1	—	2.5	—	0.9	123.6	5.4	10.5	0.1	148.4
	Zassu-2	—	1.6	—	0.7	121.8	7.5	9.1	0.1	147.9
	Zassu-3	—	1.5	—	0.7	120.6	8.7	7.2	0.1	146.2
	Chisayanatane	—	47.5	—	3.1	21.6	8.0	3.3	7.5	70.5
<i>B. campestris</i>	Wase zairai	—	2.2	—	1.5	74.4	8.2	7.5	0.1	108.7
<i>B. oleracea</i>	Docico	4.4	0.5	61.4	—	0.2	8.2	—	18.7	97.5
<i>B. juncea</i>	Okinawa karashina	0.2	—	89.2	—	0.6	4.5	—	—	125.9
	Prerovska	—	0.7	0.8	96.7	—	0.2	—	0.3	445.3
<i>B. carinata</i>	No. 108	—	0.2	89.4	—	—	5.5	—	—	115.5

1) Individual glucosinolate are : GIB = glucoiberin, PRO = progoitrin, SIN = sinigrin, GAL = glucoalyssin, GNA = gluconapin,

4OHG = 4-hydroxy-glucoerucin, GBC = glucobrassicin, GER = glucoerucin.

2) High glucosinolate cultivar.

3) Low glucosinolate cultivar.

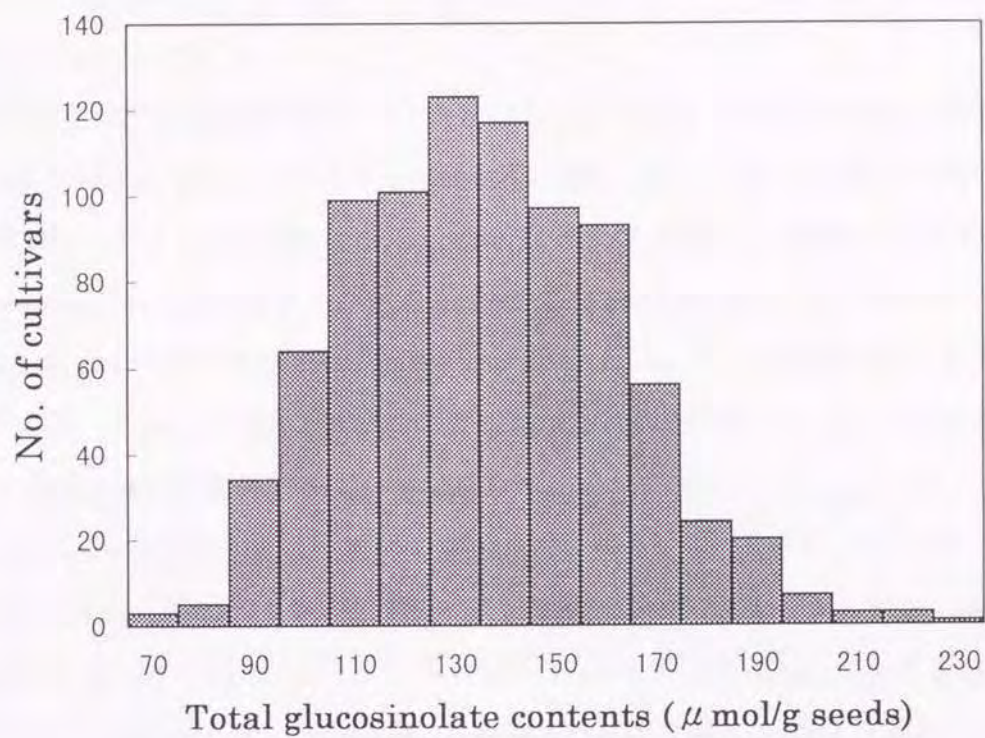


Fig. 2-7. Distribution of total glucosinolate contents in Japanese rapeseed.

資源の progoitrin 含量と gluconapin 含量が総含量に占める割合を Fig. 2-8 に示した。その結果、progoitrin と gluconapin の間には $r = -0.733$ の負の相関関係が見られ、1%水準で有意であった。progoitrin が低減した 8 系統では他の系統に比べて gluconapin の含まれる割合が極めて高く、通常では 20~40% 前後含まれている gluconapin 含量が 80% にまで増加し、反対に、40~60% 含まれていた progoitrin は 8% 以下であった。一方、indolyl 系の主要グルコシノレートである 4-hydroxy-glucoerucin では調査した全ナタネ遺伝資源において北系 56-6-6-4 の $3.3 \mu \text{ mol/g}$ から岩内種の $14.5 \mu \text{ mol/g}$ までの変異が確認された (Table 2-5)。

合成ナプスでは、総含量の変異は $125.8 \sim 171.4 \mu \text{ mol/g}$ でナタネと比較して小さかった (Table 2-5)。しかし、ナタネにはほとんど認められない新たなピークが観察され、既知のクロマトグラムとの比較より、glucoiberin および sinigrin と推察された (Table 2-5)。

B. campestris では主要グルコシノレートとして gluconapin が 74.4% 含まれていたが、progoitrin は約 2% しか含まれておらず、ナタネの progoitrin 低減化系統とその組成が類似していた (Table 2-5)。典型的な *B. campestris* のグルコシノレート組成を持つ品種として早生在来の組成を Table 2-6 に示した。

B. oleracea では作物間および品種・系統間で組成の変異が大きく、カリフラワーやブロッコリーでは glucoiberin や sinigrin が多く含まれており、progoitrin や gluconapin は少ない傾向にあった (Table 2-6)。中でもブロッコリーには progoitrin や gluconapin が含まれず、sinigrin と 4-hydroxy-glucoerucin および glucoerucin と推察されるグルコシノレートで組成を構成する品種が存在した (Table 2-6)。ケールや野生キャベツでは glucoiberin が少なく、progoitrin や gluconapin が多く含まれる傾向にあった。

B. nigra では sinigrin の総含量に占める割合が 95% と非常に高く、progoitrin や gluconapin 含量は低かった (Table 2-5)。

B. juncea のグルコシノレート組成は sinigrin と gluconapin を主な構成成分としているが、カラシナとタカナでは sinigrin と gluconapin の変異性が大きく、それぞれ $1.7 \sim 204.4 \mu \text{ mol/g}$ と $0 \sim 98.4 \mu \text{ mol/g}$ の範囲で変異していた。しかし、Table 2-6 に示すように、progoitrin や gluconapin がほとんど含まれず、*B. nigra* の組成に類似する品種・系統も認められた。さらに、4-hydroxy-glucoerucin が $0.9 \mu \text{ mol/g}$ にまで低減した品種 Prerovska が見いだされたが、glucoalyssin と推定されるグルコシノレートが $430.6 \mu \text{ mol/g}$ 含まれ

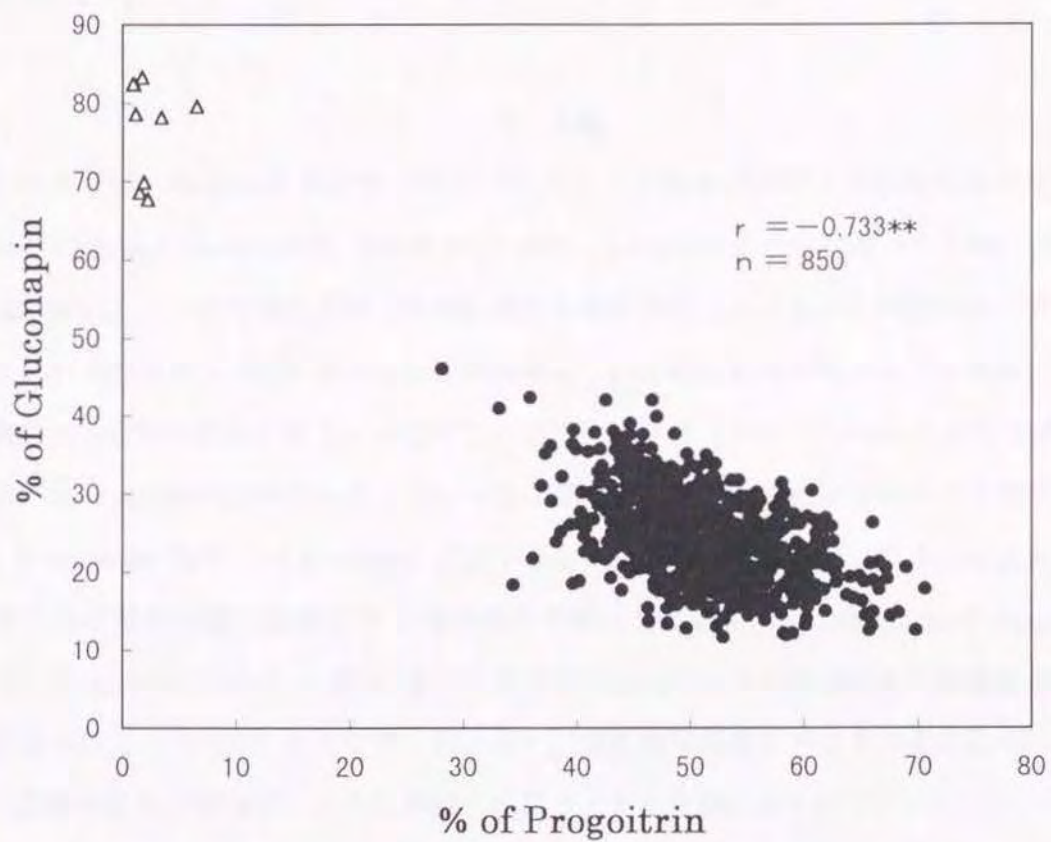


Fig. 2-8. Correlation of progoitrin and gluconapin content (in % of total glucosinolate) in Japanese rapeseed.
 ● : Normal progoitrin content type, △ : Low progoitrin type.

ており、総含量は $445.3 \mu\text{mol/g}$ であった (Table 2-6)。

B. carinata の組成は *B. nigra* に類似しており、progoitrin や gluconapin 含量は非常に低く、sinigrin が主成分であった。sinigrin の変異性は *B. juncea* よりも小さく、 $103.3 \sim 198.6 \mu\text{mol/g}$ の範囲に分布していた。特に、No.108 では sinigrin が $103.3 \mu\text{mol/g}$ と低く、総グルコシノレート含量も $115.5 \mu\text{mol/g}$ と供試した品種・系統中、最も低かった (Table 2-6)。

4. 考察

これまでに、*Brassica* 属作物のグルコシノレート組成の調査は多数報告されているが (Röbbelen and Thies 1980、Gland *et al.* 1981、Sang *et al.* 1984、石井ら 1988、Dungey *et al.* 1988)、日本の遺伝資源の評価に関する報告はほとんどない。今回供試した日本産のナタネ 850 品種・系統は農林水産省で保存している遺伝資源のほとんどを網羅しており、世界的にも有数の数といえる。その中で、チサヤナタネ ($70.5 \mu\text{mol/g}$) および農林 18 号 ($73.2 \mu\text{mol/g}$) が総グルコシノレート含量の最も低い品種として見いだされた。しかし、Bronowski 程度 ($15 \mu\text{mol/g}$) の低下系統は見つからなかった。グルコシノレートは土壌中の栄養条件等の変動による環境変異を受けやすいが (Josefsson and Appelqvist 1968、Zhao *et al.* 1994)、農林 18 号は第 2 節においても日本品種の中で総含量が最も低い品種 ($63.3 \mu\text{mol/g}$) として示されており、遺伝的な低減化系統と考えられる。このため、品種内変異の蓄積で、さらに低減化を図ることが可能かもしれない。

グルコシノレート組成について見てみると、ナタネの主要なグルコシノレートである aliphatic 系グルコシノレートの progoitrin が著しく減少した 8 系統が見いだされた。これらの系統のグルコシノレート組成は *B. campestris* の組成に極めて類似していたが、葉や花の形態、そして染色体数 ($2n=36$) から在来ナタネのエスケープではなく、progoitrin が欠失したナタネの変異体であることを確認している (データ省略)。progoitrin が含まれる aliphatic 系グルコシノレートの生合成経路は、メチオニンを出発とし、サイドチェーンの炭素数の増加の後、サイドチェーンが還元化され、propyl, butyl, pentyl 系の各グルコシノレートが生成されると考えられている (Gland *et al.* 1981, Magrath *et al.* 1993)。本研究において、全ナタネ遺伝資源の progoitrin 含量と gluconapin 含量が総含量に占める割合を調査したところ、両者の間には $r=-0.733$ の負の相関関係が見られた。このこと

から、progoitrin 低減化系統では gluconapin から progoitrin への合成経路が遺伝的にブロックされているため、gluconapin が増加しているものと推察される (Fig. 2-9)。Rücker and Röbbelen (1994) は progoitrin 含量に特徴ある人為合成ナプスを用いて progoitrin の遺伝分析を行い、A ゲノム (*B. campestris*) と B ゲノム (*B. oleracea*) に座乗する 2 つの遺伝子の関与を指摘している。今回見いだされた変異系統では、東海 4 号や雑種のようにその系譜上で在来ナタネ (*B. campestris*) との種間交雑が行われていたり、伊勢黒のように遺伝的に雑ばくな在来種 (*B. napus*) からの純系分離操作が行われている。このことから、この progoitrin 合成を阻害する遺伝子は *B. campestris* からの移入が強く示唆された。このような特徴あるグルコシノレート組成を持つナタネはこれまで報告されておらず、progoitrin の生合成系の遺伝に関するこれまでの研究は全て合成ナプスを用いて実施されていることから、今回新しく発見された progoitrin 低減化系統は progoitrin 合成に関する遺伝的解析を進める上で、新たな遺伝資源としての利用価値が高いと考えられる。

Brassica 属植物のグルコシノレート組成は、そのゲノム構成と密接に関係していることが報告されているが (Gland *et al.* 1981、Rücker and Röbbelen 1994)、本研究においてもこれらの報告を支持する結果が得られた。すなわち、aliphatic 系グルコシノレートにおいて、*B. nigra* では propyl 系グルコシノレート (sinigrin) を、*B. oleracea* では propyl 系および butyl 系グルコシノレート (gluconapin、plogoitrin) を、*B. campestris* では butyl 系および pentyl 系グルコシノレート (glucobrassicinapin) を合成するためのサイドチェーンの炭素数を増加させる遺伝子を持ち、これらを構成種とする複二倍体ではその発現に差はあるものの、それぞれの遺伝子を併せ持つ (Fig. 2-10)。このため、合成ナプスでは sinigrin および glucoiberin (sinigrin のサイドチェーンの還元により生成) が含まれていたと考えられた (Fig. 2-9)。

ナタネの構成種の 1 つである *B. oleracea* のグルコシノレート組成を広く調査した結果、ブロッコリーには progoitrin や gluconapin が含まれず、sinigrin と 4-hydroxy-glucobrassicin および glucoerucin でグルコシノレート組成が構成される品種が存在した。また、ナタネと交雑親和性の高い *B. juncea* や *B. carinata* には、ほとんど sinigrin と 4-hydroxy-glucobrassicin で構成される品種・系統も認められた (Fig. 2-10)。4-hydroxy-glucobrassicin はトリプトファン由来の indolyl 系のグルコシノレートで、育種

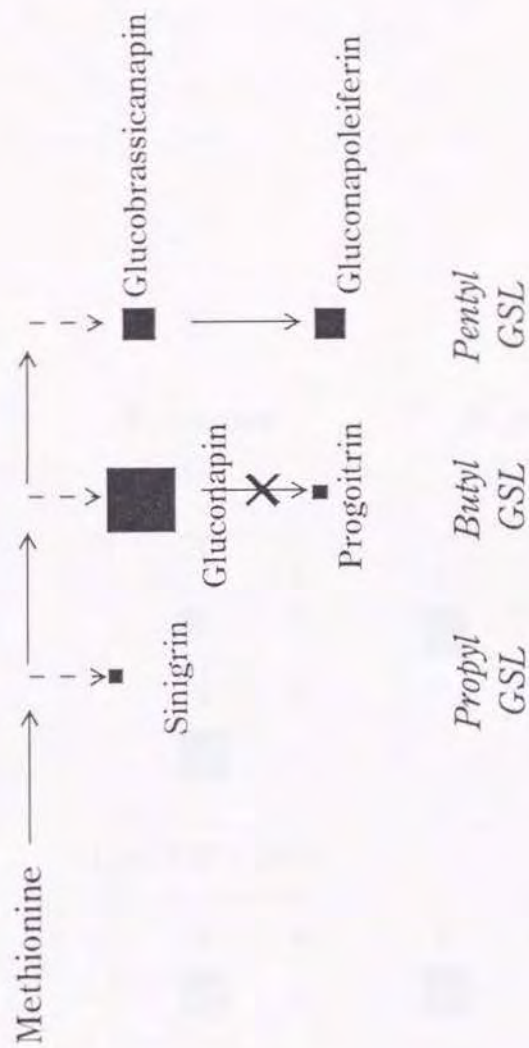
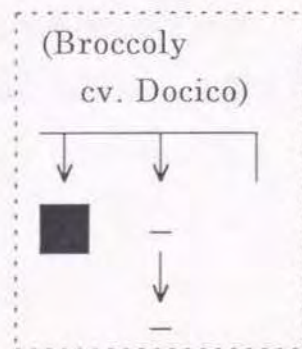
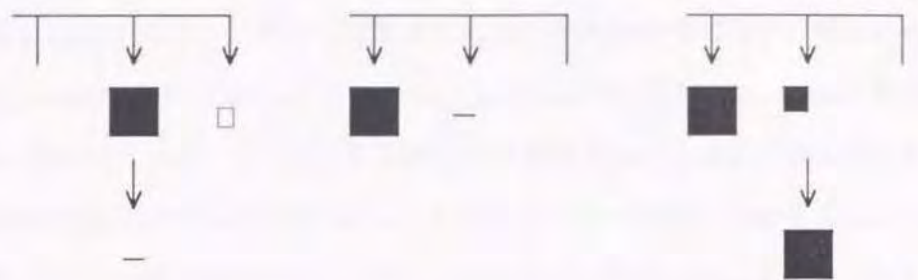


Fig. 2-9. Hypothetical biosynthetic pathway of aliphatic glucosinolate in the seed of low progoitrin rapeseed. In their horizontal and vertical order the diagrams indicate increasing activities of the elongation (\longrightarrow) and hydroxylation (\dashrightarrow) systems, respectively. The sizes of the quadratic facets symbolize the percentage proportion of the five individual glucosinolate contents within the total glucosinolate content. GSL = glucosinolate (adapted from Gland et al. 1981)

Species : *B. campestris* *B. nigra* *B. oleracea*
 Genome : AA BB CC



Species : *B. napus* *B. juncea* *B. carinata*
 Genome : AACC AABB BBCC

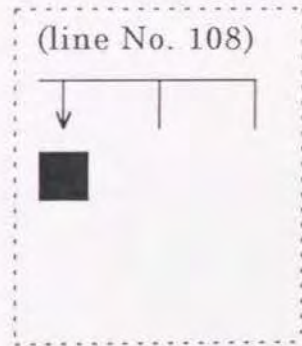
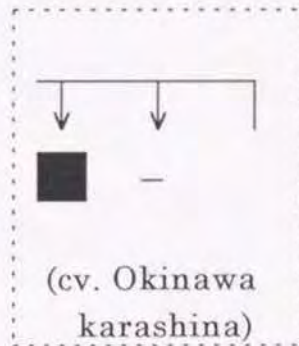
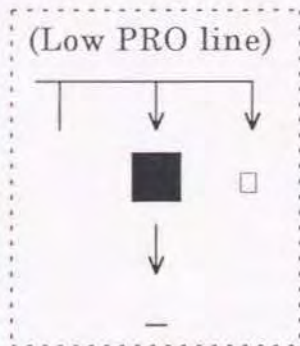
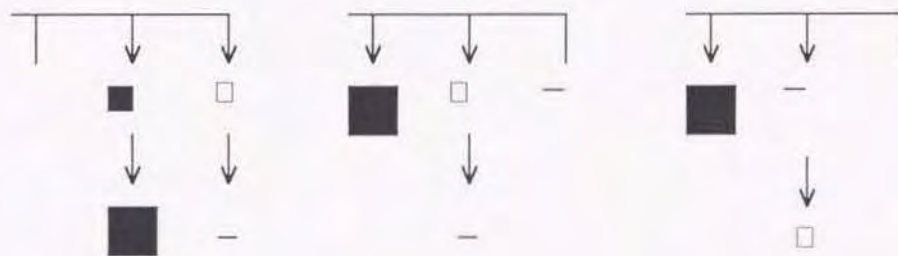


Fig. 2-10. Aliphatic glucosinolate pattern in seeds of the three basic species and of their three amphidiploid in Japanese 1,173 *Brassica* gene collection. The form of the individual diagrams corresponds to the scheme of the biosynthetic pathway in Fig. 2-9.

[---] means glucosinolate pattern of mutant type.

によって aliphatic 系グルコシノレートがほとんど含まれなくなった低グルコシノレート品種にもこれら indolyl 系のグルコシノレートが含まれている。また、aliphatic 系のグルコシノレートである sinigrin はカラシやワサビ等の辛み成分の前駆物質であり、香辛料として有用な成分である。indolyl 系の 4-hydroxy-glucobrassicin の変異性については非常に乏しいが、*B. juncea* において $0.9 \mu \text{ mol/g}$ と非常に低い品種が見つかった。今回見いだされた progoitrin 低減化系統と、このような特徴あるグルコシノレート組成を持つ *Brassica* 属作物との種間交雑により、これまで存在しない *B. nigra* のように sinigrin をグルコシノレートの主成分とする全く新しいグルコシノレート組成を持つナタネを作出できるかもしれない。また、4-hydroxy-glucobrassicin においても今回見いだされた *B. juncea* の低下系統との種間交雑で低減化できる可能性が示された。