

2021年度博士論文

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

小林 亘

2021年度 博士論文

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

高崎健康福祉大学大学院健康福祉学研究科  
保健福祉学専攻 博士後期課程

学籍番号	1910502
氏名	小林 亘
指導教員	綾部 園子

# 目次

第一章 序論 .....	1
1.1. 食生活の変遷と和食.....	2
1.2. 野菜の魅力を引き出す漬物.....	3
1.3. ダイコンおよびたくあん漬の文化と機能性.....	4
1.4. 本研究の目的と意義.....	7
1.5. 本論文の概要 .....	7
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 .....	13
2.1. はじめに .....	14
2.2. 試料および方法 .....	16
2.2-1. たくあん漬の調製.....	16
2.2-2. 水分量, NaCl 濃度および pH の測定 .....	16
2.2-3. 遊離アミノ酸の分析.....	17
2.2-4. 酵素活性試験.....	17
2.2-4-1. Glutamic acid decarboxylase 活性試験.....	17
2.2-4-2. GABA transaminase および glutamine synthetase 活性試験 .....	18
2.2-4-3. グルタミン酸代謝関連酵素活性試験 .....	19
2.2-5. 遺伝子発現解析.....	20
2.2-6. 統計解析 .....	21
2.3. 結果および考察 .....	24
2.3-1. 塩押しダイコンにおける遊離アミノ酸の変化.....	24
2.3-2. 塩押しダイコンにおける酵素活性の変化.....	25
2.3-3. 塩押しダイコンにおける遺伝子発現の変化.....	26
2.3-4. 日干しダイコンにおける遊離アミノ酸の変化.....	27
2.3-5. 日干しダイコンにおける酵素活性の変化.....	27
2.3-6. 日干しダイコンにおける遺伝子発現の変化.....	28
2.3-7. 脱水処理工程におけるダイコンのグルタミン酸代謝.....	28
2.4. 要約 .....	38

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 .....	39
3.1. はじめに .....	40
3.2. 試料および方法 .....	42
3.2-1. たくあん漬の調製.....	42
3.2-2. 水分量, NaCl 濃度および pH の測定 .....	42
3.2-3. グルコシノレート (GLS) の分析.....	42
3.2-4. アスコルビン酸 (AsA) の分析 .....	42
3.2-5. 遊離アミノ酸の分析.....	43
3.2-6. ミロシナーゼ活性試験.....	43
3.2-7. 遺伝子発現解析.....	44
3.2-8. 統計解析 .....	45
3.3. 結果および考察 .....	47
3.3-1. 塩押しダイコンにおける遊離アミノ酸, グルコシノレートおよびアスコルビン酸の定量結果 .....	47
3.3-2. 塩押しダイコンにおけるミロシナーゼ活性の変化.....	48
3.3-3. 塩押しダイコンにおける遺伝子発現の変化.....	48
3.3-4. 日干しダイコンにおける遊離アミノ酸, グルコシノレートおよびアスコルビン酸の定量結果 .....	49
3.3-5. 日干しダイコンにおけるミロシナーゼ活性の変化.....	50
3.3-6. 日干しダイコンにおける遺伝子発現解析.....	51
3.3-7. 脱水処理工程におけるダイコンの分岐鎖アミノ酸およびグルコシノレート代謝 .....	51
3.4. 要約 .....	59
第四章 総括 .....	60
参考文献 .....	63
謝辞 .....	73

## 略称一覧

### 【化合物名】

GABA	$\gamma$ -Aminobutyric acid
BCAA	Branched-chain amino acids
GLS	Glucosinolates
ITC	Isothiocyanate
MTBGLS	4-Methylthio-3-butenyl glucosinolate
MTBITC	4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate
TPMT	2-[3-(2-Thioxopyrrolidin-3-ylidene)methyl]-tryptophan
MeSTP	3-Methylthiomethylene-2-thioxopyrrolidine
TPC	2-Thioxo-3-pyrrolydinecarbaldehyde
TPCC	1-(2-Thioxopyrrolidine-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid
SCMC	S-(Carboxymethyl)-L-cysteine
PLP	Pyridoxal-5-phosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DTT	Dithiothreitol
2-OG	2-Oxoglutarate
ATP	Adenosine triphosphate
$\gamma$ -Glu-HXM	L-Glutamic acid $\gamma$ -hydroxamate
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced type)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized type)
AsA	Ascorbic acid

### 【酵素名】

GAD	Glutamic acid decarboxylase
GABA-T	GABA transaminase
ALT	Alanine transaminase
P5CS	$\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase
NADH-GDH	NADH-glutamic acid dehydrogenase
NAD <sup>+</sup> -GDH	NAD <sup>+</sup> -glutamic acid dehydrogenase
GS	Glutamine synthetase
GOGAT	Glutamic acid synthase
LDH	Lactate dehydrogenase

**【遺伝子名】**

<i>GAD1</i>	<i>GLUTAMIC ACID DECARBOYLASE 1</i>
<i>GAD2</i>	<i>GLUTAMIC ACID DECARBOYLASE 2</i>
<i>GAD4</i>	<i>GLUTAMIC ACID DECARBOYLASE 4</i>
<i>GABA-T1</i>	<i>GABA TRANSAMINASE 1</i>
<i>ALT1</i>	<i>ALANINE TRANSAMINASE 1</i>
<i>P5CS1</i>	<i>Δ1-PYRROLINE-5-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE 1</i>
<i>GDH1</i>	<i>GLUTAMIC ACID DEHYDROGENASE 1</i>
<i>GDH2</i>	<i>GLUTAMIC ACID DEHYDROGENASE 2</i>
<i>GS1</i>	<i>GLUTAMINE SYNTHETASE 1</i>
<i>GS2</i>	<i>GLUTAMINE SYNTHETASE 2</i>
<i>GLT1</i>	<i>GLUTAMIC ACID SYNTHASE 1</i>
<i>MYB28</i>	myb domain protein 28
<i>MYB29</i>	myb domain protein 29
<i>BCAT2</i>	<i>BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 2</i>
<i>BCAT3</i>	<i>BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 3</i>
<i>BCAT4</i>	<i>BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 4</i>
<i>IPMDH1</i>	<i>ISOPROPYLMALATE DEHYDROGENASE 1</i>
<i>MAM3</i>	<i>METHYLTHIOALKYLMALATE SYNTHASE 3</i>
<i>GRS1</i>	<i>GLUCORAPHASATIN SYNTHASE 1</i>
<i>RMB1</i>	<i>RADISH MYROSINASE B TYPE 1</i>
<i>RMB2</i>	<i>RADISH MYROSINASE B TYPE 2</i>

**【その他】**

RD	Raw daikon: 生大根
SD	Shio-oshi daikon: 塩押しダイコン
HD	Hoshi daikon: 干しダイコン
JSCC	Japan society of clinical chemistry: 日本臨床化学会
FW	Fresh weight: 湿潤質量
DW	Dry weight: 乾燥質量
HPLC	High performance liquid chromatography: 高速液体クロマトグラフィー
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
qRT-PCR	Quantitative (real-time) RT-PCR: 定量的ポリメラーゼ連鎖反応, リアルタイム PCR

# 第一章

## 序論

## 1.1. 食生活の変遷と和食

私たちを取り巻く食環境は、戦後の経済成長に伴い著しい変化を遂げてきた。殊に、1950～1970年代の高度経済成長期には、欧米の豊かな食生活に憧れ、パン、肉類および油脂の摂取量が増加し、濃厚な風味が好まれるようになるなど、いわゆる「食の欧米化」が急速に進んだ。さらに、核家族化や共働き世帯の増加によるライフスタイルの変化と、食品流通システムの発達は、「外食」あるいは「中食」といった食の外部化の進展をもたらした。外部化の進展は、孤食あるいは個食などの食の個人化傾向を進め、各自が自己で食事をコントロールしなければならない状況を生み、コントロールできない場合には食事バランスの乱れにつながる。また、家庭内で食事を作る機会が減り、親から子へと受け継がれてきた食文化が失われつつあると危惧される。こうした背景から、日本人の精神や日本の気候風土に根差した和食文化を見直し、次世代につなげていく活動が国を挙げてなされ、2013年には「和食；日本人の伝統的な食文化」としてユネスコ無形文化遺産に登録された<sup>1)</sup>。なお、ここで定義されている「和食」は料理そのものではなく、「自然を尊ぶ」という日本人の気質に基づいた「食」に関する「習わし」と位置付けている。

日本では、天武4年(675年)に肉食禁止令が定められて以降、明治4年(1871年)に肉食が解禁されるまで、畜肉の摂取が表向きには制限されていた。このような状況下で、先人たちの知恵と経験によって、油脂に頼らず、多様で新鮮な食材を用い食材のうま味を最大限に引き出す調理・加工方法が生み出されてきたと考えられる。日本の食事スタイルはご飯、汁物、焼物や煮物、そして香の物(漬物)の「一汁三菜」による構成を基本とし、季節や風土に合わせた食材を取り入れることで、理想的な栄養バランスを実現している。欧米の食文化では、単に food (食べ物) や dish (料理) と表現され、主食・副食といった概念は存在しない<sup>2)</sup>。日本では、米を炊いた「飯」は食事を意味し、「ご飯」を主食として、それを食べる菜である「おかず」で食事が構成されている。このように、「飯」が食事の意味を兼ねることは、日本に限らず米食の東アジア一帯に共通している。



## 1.2. 野菜の魅力を引き出す漬物

和食が世界から注目されている理由の一つとして、野菜類を主とした副菜と味付けや調理法の工夫が挙げられる。日本列島の地形は南北約 2,500 km に広がり、その気候は亜熱帯から亜寒帯まで様々である。したがって、それぞれの耕地に適合した地方野菜が栽培され、かつては野菜の摂取量の多い食事がなされてきた。近年では、多くの疫学研究によって、野菜類の習慣的な摂取による健康維持・増進効果が認められており<sup>3-5)</sup>、食物繊維による腸内環境の改善効果<sup>6,7)</sup>、ビタミン類やポリフェノール類による抗酸化作用およびがん抑制効果などが報告されている<sup>8,9)</sup>。実際に、医療費の増大が問題となっていた米国では、野菜および果物の消費拡大を推進する「ファイブ・ア・デイ運動」によって、がんや心疾患による死亡率が低下したと報告されている<sup>10)</sup>。しかしながら、日本の 1 人 1 年あたりの野菜摂取量は年々減少傾向にあり<sup>11)</sup>、がんや心疾患による粗死亡率は依然として高く推移している<sup>12)</sup>。そのため、我が国でも、厚生労働省が提唱する「健康日本 21」において、1 日当たり 350 g の野菜類を摂取することが推奨されている。

また、日本の味噌、醤油、納豆、日本酒および漬物といった発酵食品は今や世界的に認知されており<sup>13)</sup>、和食文化を豊かにしている陰の主役ともいえる。その特徴として、高い保存性、消化吸収性の良さ、微生物発酵による香りや栄養成分などが挙げられる。なかでも「漬物」は、貯蔵技術が発達していなかった時代において、貴重な野菜類の保存性を高めるために塩漬けにしたことが始まりとされ、長い伝統をもった加工食品である。正確な起源は定かではないが、縄文時代には製塩および漬物用の容器が存在したと考えられている。また、奈良時代に成立した万葉集では、製塩に関する歌が収められており、正倉院文書には多様な漬物が記載されている。

野菜の細胞膜に食塩が触れると、浸透圧によってその原形質が収縮して、細胞壁と細胞膜間に食塩が浸透しやすくなる。さらに、原料野菜の自己消化によって生成する糖、アミノ酸、核酸関連化合物および香辛成分などが食塩と混和し、細胞内にスープを形成する。この状態を「浸かる」と言い、一種の野菜の調理方法と捉えることができる。漬物の種類は、塩を主

とした材料で漬け込んだ「塩漬」、乳酸菌による発酵を促した「発酵漬物」、および高濃度の食塩で野菜を漬け込み、製造時に脱塩・調味を行う「調味漬け」に大別される (Fig. 1-1)<sup>14)</sup>。また、食塩濃度が2%程度で、新鮮な野菜の風味を生かした塩漬は新漬 (浅漬) と呼ばれている。さらに、日本の漬物は他国と比較して、原料および製法が極めて多岐にわたり、江戸時代後期には現在の形として確立されたとされている<sup>15)</sup>。

近年、消費者の食志向の変化および健康志向の高まりを受けて、塩蔵食品である漬物の消費は減少傾向であるが<sup>16)</sup>、貯蔵・流通技術の発展と漬物企業のたゆまぬ努力の結果、従来のおいしさを保持した減塩漬物が開発されている。しかしながら、減塩漬物は野菜の自己消化による呈味成分や乳酸菌による発酵生成物が減少しているため、伝統的な漬物の味は損なわれているとも考えられる。

漬物に関してさまざまな機能性研究が行われているが、熟成過程で起こる微生物発酵および有用微生物の利用についてなされているものが多い。例えば「ぬか漬け」、「すんき漬け」および「キムチ」などの漬物では、乳酸菌発酵によって、抗高血圧因子である $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)、および疲労回復効果のあるバリン、ロイシンおよびイソロイシンといった分岐鎖アミノ酸 (BCAA) を蓄積する<sup>17-19)</sup>。京都の伝統的な漬物「すぐき」から採取された乳酸菌 *Lactobacillus brevis* KB290 には、整腸作用<sup>20)</sup>および免疫系の働きに関わるインターフェロン- $\alpha$  の産生能亢進効果<sup>21)</sup>が報告されている。実際に食品メーカーからは、腸内環境改善効果、美肌効果および集中力向上作用を示す乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* TK61406 を含むキムチが開発・販売されている<sup>22)</sup>。また、漬物は野菜を脱水した食品であることから、濃縮された食物繊維による整腸作用およびプレバイオティクス効果も期待されている<sup>23)</sup>。しかしながら、漬物の市場規模は味噌および醤油などの発酵調味料と比較して小さく、その文化、製造技術および健康機能性に関するエビデンスは多いとは言えない状況である。したがって、漬物の健康効果が注目される中、現代の食志向に合わせた研究・開発が望まれている。

### 1.3. ダイコンおよびたくあん漬の文化と機能性

我が国の野菜出荷量は 1,119 万トンであり、馬鈴薯、キャベツおよびダイコンなどが主要な野菜として挙げられる<sup>24)</sup>。なかでも、ダイコンは総出荷量の約 10 %を占めており、古くから栽培・利用されてきた野菜の一つである。ダイコンの原産地は地中海沿岸、西南アジアもしくは東南アジアと推定され、我が国に渡来したのは 1300 年以上前と考えられている。古事記には既に於朮泥（おほね）の名称で記載されており、供物としても利用されてきたこと、平安時代には「すずしろ」とも呼ばれ、春の七草として日本の行事食にも利用されてきた。また、「日本見聞録」（1609）によれば、「日本人の常食は米、大根・茄子などの野菜とまれに魚類」とあり、1785 年には「大根一式料理秘密箱」という、大根料理だけの料理本が刊行されるなど、和食文化と深い結びつきをもった食材といえる。

ダイコン (*Raphanus sativus* L.) は、植物学的にはアブラナ目アブラナ科に分類され、同じアブラナ科野菜として、キャベツ、ハクサイ、カブ、ワサビおよびブロッコリーなどが挙げられる。アブラナ科の植物はミロシン細胞と呼ばれる異形細胞を有し、その液胞は加水分解酵素であるミロシナーゼを多量に含んでいる<sup>25)</sup>。さらに、アブラナ科の植物はグルコシノレート (GLS) 類を特異的に含んでおり、咀嚼やすりおろしによって損傷を受けることでミロシナーゼと反応し、特有の辛味成分であるイソチオシアナート (ITC) 類を生成する<sup>25)</sup>。ITC 類はアブラナ科野菜を特徴づけるフレーバーであり、代表的なものとしてワサビの Allyl isothiocyanate やブロッコリーの Sulforaphane などがある (Fig. 1-2)。ダイコンの主要な GLS は 4-Methylthio-3-butenyl glucosinolate (MTBGLS) であり、そこから生成される ITC は 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) である。これら GLS 類および ITC 類は抗菌、抗血小板凝集、抗肥満、および抗がん効果に関する多くの報告があり、アブラナ科野菜のフィトケミカルとして重要な役割を果たしている<sup>26-29)</sup>。実際に、以前に日本国立がん研究センターで行われた前向きコホート研究は、複数のアブラナ科野菜およびそれらの漬物の摂取が多いグループについて、男性ではがん死、女性では心疾患死および外因死のリスクを下げることが報告されている<sup>30)</sup>。また、近年流通が増加しているカット野菜を用いた研究では、ダイコンの千切りおよび搾汁の添加による、遊離アミノ酸減少抑制、褐変防止および一般生

菌増殖抑制効果などが明らかとなっている<sup>31)</sup>。このように、アブラナ科野菜の生理作用および生鮮食品の鮮度保持効果について、食品関連業界における様々な利用が期待されている。

ダイコンは交雑しやすく、用途に合わせた品種開発が積極的に行われており、現在日本では100種以上の品種が存在する<sup>32)</sup>。また、その形態や加工のしやすさから、保存用の野菜としても重宝されてきた。ダイコンを塩漬けた「たくあん漬」は、江戸時代から続く日本の代表的な漬物であり、越冬のための保存食として親しまれてきた。名前の由来については諸説あるが、考案者である臨濟宗の沢庵和尚にちなんだという説が有力である<sup>33)</sup>。たくあん漬は一般的に、原料となるダイコンを脱水処理した後、塩糠とともに数ヶ月間漬け込み、脱塩・調味漬けを経て製造される (Fig. 1-3)。ダイコンの脱水処理方法は、塩と重石を用いた「塩押し」と、天日を利用した「日干し」に大別され (Fig. 1-4)、現在の漬物業界では製品の安定性という面から「塩押し」が主流である。

他方、たくあん漬の特徴である鮮やかな黄色は、ダイコンの特性に由来する天然色素によるものである。たくあん漬の塩蔵プロセスでは、MTBGLS が出発物質として、特徴的な天然の黄色色素である 2-[3-(2-Thioxopyrrolidin-3-ylidene)methyl]-tryptophan (TPMT), 3-Methylthiomethylene-2-thioxopyrrolidine (MeSTP), 2-Thioxo-3-pyrrolydinecarbaldehyde (TPC) および 1-(2-Thioxopyrrolidine-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (TPCC) を生成する<sup>34-36)</sup>。しかし、たくあん漬の黄色色素は蛍光灯の光によって退色しやすいことから、市販品では着色料が添加されていることが多い。また、たくあん漬特有の含硫系フレーバーは、黄変化反応の副産物である Methanthiol によるものであり、いわゆる「たくあん臭」の原因となる<sup>36)</sup>。近年では、農研機構の研究グループによって、黄変および臭気のもととなる MTBGLS 欠損性のダイコン品種「悠白」および「サラホワイト」が開発された。「悠白」および「サラホワイト」の主要な GLS は 4-Methylthiobutyl glucosinolate (glucoerucin) であり、ミロシナーゼと反応することで 4-Methylthiobutyl isothiocyanate (erucin) を生成する<sup>37)</sup>。辛味成分である Erucin は水存在下でも安定であるため、たくあん臭の原因となる Methanthiol が

発生しないが、加工製品中に辛味が残存すること、新品種であるため普及に時間を要することが課題となっている。

たくあん漬の黄色色素である TPMT、TPC および TPCC には、抗酸化作用、抗菌作用および抗変異原性を持つことが明らかとなっている<sup>38-41)</sup>。また、鹿児島県の山川漬（つぼ漬）、宮崎県および群馬県のたくあん漬では、血圧上昇抑制因子である GABA が蓄積すること、GABA および分岐鎖アミノ酸（BCAA：バリン、ロイシンおよびイソロイシン）が、ダイコンの脱水処理工程において顕著に蓄積することが報告されている<sup>42-44)</sup>。さらに、高血圧モデルラットを用いた動物実験によって、たくあん漬の血圧上昇抑制効果が明らかとなっている<sup>45)</sup>。しかしながら、たくあん漬に含まれる機能性成分の代謝機構については科学的に未解明な点が多く、特に生体への影響については十分に検討されていないのが現状である。

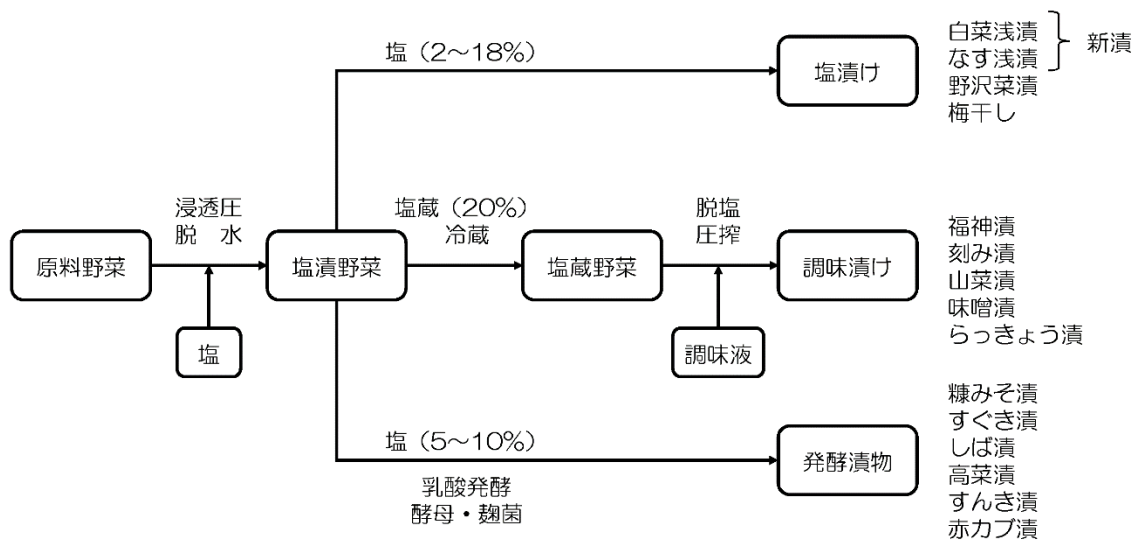
#### 1.4. 本研究の目的と意義

これまでの研究で、たくあん漬製造におけるダイコンの脱水処理工程において、GABA をはじめとする機能性成分が顕著に蓄積することが明らかとなっている<sup>44)</sup>。さらに、これらの二次代謝産物は発酵微生物由来ではなく、ダイコンが本来持つ代謝機構により生成することが示唆されている。また、漬物研究の機能性研究では微生物発酵が注目されているが、原料野菜の分子機構に焦点を当てた例は稀である。そこで、本研究では、たくあん漬製造の初期工程である「脱水処理」が、原料となるダイコンの二次代謝機構とその発現機構に与える影響を明らかにすること、ダイコンをたくあん漬に加工することの付加価値を見出すことを目的とした。

#### 1.5. 本論文の概要

本論文は四章により構成され、第二章では、脱水処理中に顕著な蓄積が見られた GABA、アラニンおよびプロリンの代謝動態を明らかにすることを目的として、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による遊離アミノ酸の定量分析、各アミノ酸代謝に関連する酵素活性

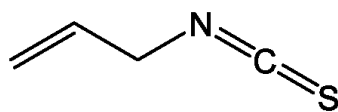
試験および定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)による酵素遺伝子の発現解析を行った。第三章では、脱水処理工程がダイコンのBCAAおよびGLS代謝に与える影響を明らかにすることを目的として、MTBGLSの代謝動態を包括的に解析した。最後に、第四章として総合的考察を行った。



出典：宮尾茂雄（2017）『日本の漬物』， p.212

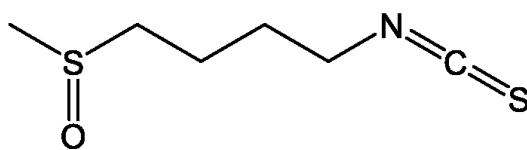
Fig. 1-1 Main manufacturing method of Japanese pickles.

ワサビ



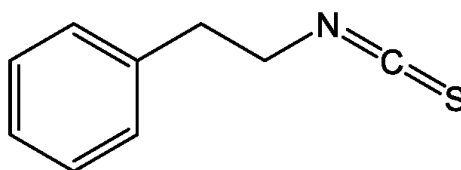
allyl isothiocyanate

ブロッコリー



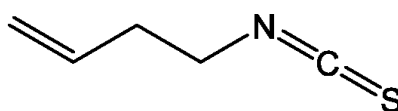
sulforaphane

カブ  
ノザワナ



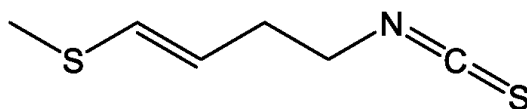
phenethyl isothiocyanate

キャベツ  
クレソン



3-butenyl isothiocyanate

ダイコン



4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate

Fig. 1-2 Molecular structure of typical isothiocyanates in Brassicaceae vegetables.



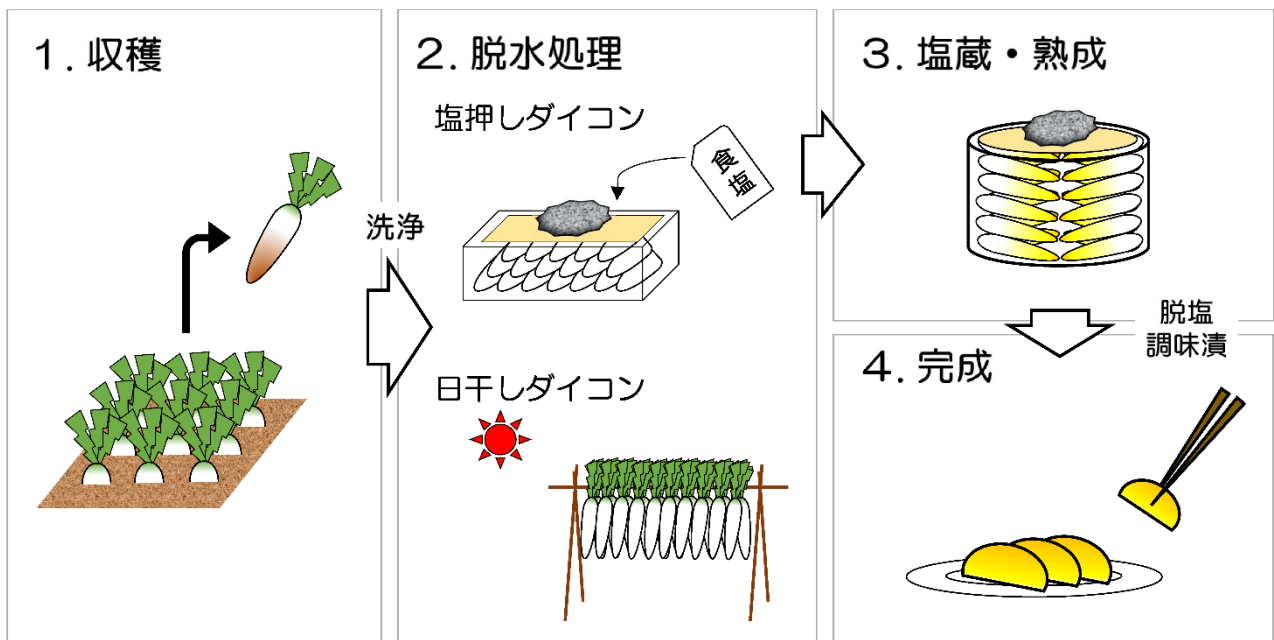


Fig. 1-3 Typical manufacturing method of salted radish root (*Takuan-zuke*).

塩押し処理の様子



日干し処理の様子



Fig. 1-4 Appearances of both dehydration process in *takuan-zuke* manufacturing.

## 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

## 2.1. はじめに

これまでの研究で、たくあん漬の脱水処理工程において、GABA、アラニンおよびプロリンなどの遊離アミノ酸が蓄積すること、塩押し処理と比較して日干し処理で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<sup>44)</sup>。GABAは脊椎動物において抑制性神経伝達物質として働き、交感神経からのノルアドレナリンの放出を阻害することによって、血圧上昇を抑制することが報告されている<sup>46, 47)</sup>。また、アラニンは甘味を呈するアミノ酸であり、核酸系うま味成分である5'-イノシン酸の添加により相乗的な旨味増強効果を示す<sup>48, 49)</sup>。さらに、プロリンは甘味、酸味および苦味を呈し、食品の味に深みを与えるアミノ酸である<sup>49)</sup>。よって、上述した遊離アミノ酸は、たくあん漬の食品機能性を向上する重要な成分であると示唆される。

他方、GABA、アラニンおよびプロリンは植物の代表的なストレス誘導性アミノ酸であり、塩、乾燥および浸透圧などの環境ストレス曝露によって蓄積する<sup>50-52)</sup>。また、GABA、アラニンおよびプロリンはグルタミン酸を前駆体として、それぞれ Glutamic acid decarboxylase (GAD)、Alanine transaminase (ALT) および  $\Delta$ 1-Pyrroline-5-carboxylic acid synthase (P5CS) によって合成される (Fig. 2-1)。したがって、たくあん漬における機能性成分の蓄積は、ダイコン自体がもつ脱水ストレス反応機構が強く影響していると推測される。たくあん漬の脱水方法としては、伝統的な日干し処理よりも、食品工業的に品質管理のしやすい塩押し処理が一般的である。漬物業界では塩漬けを「塩殺し」と呼んでいるが、たくあん漬における二次代謝反応は、植物の栽培中に誘発されるストレス反応とは異なる可能性がある。そこで本章では、たくあん漬の遊離アミノ酸と、その代謝にかかわる酵素活性および遺伝子発現を解析することで、ダイコンのストレス反応機構、特に脱水処理工程がグルタミン酸代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

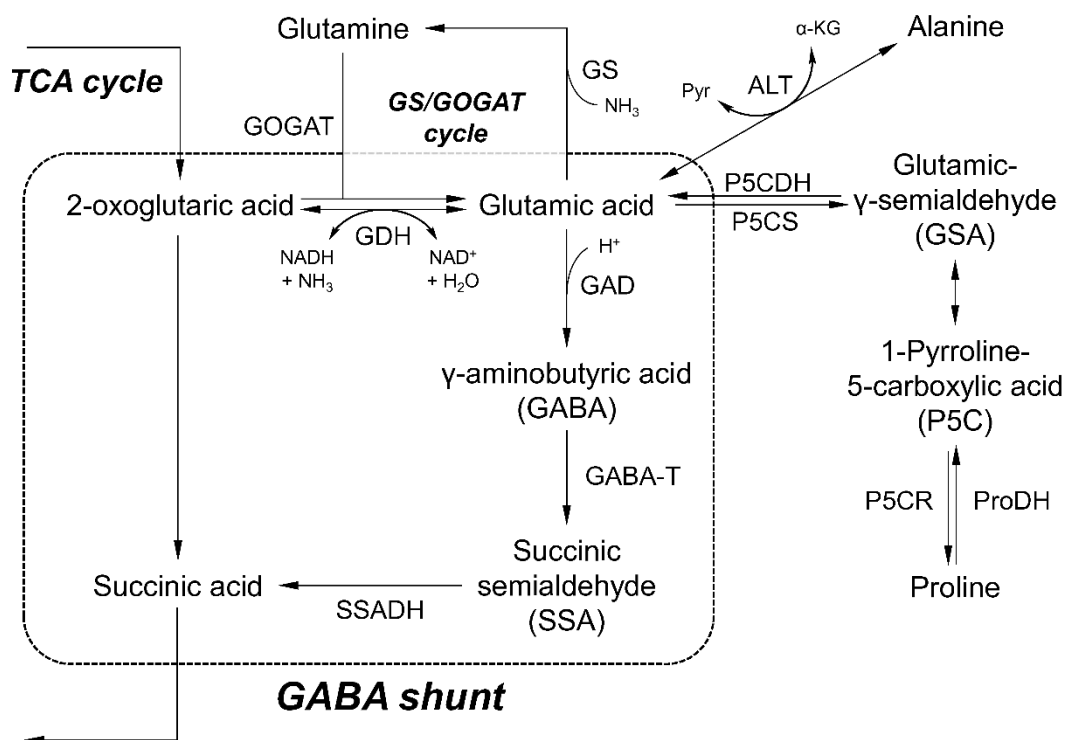


Fig. 2-1 Metabolic pathway of GABA, alanine, proline and glutamic acid.

## 2.2. 試料および方法

### 2.2-1. たくあん漬の調製

たくあん漬の調製は、Takahashi ら<sup>36)</sup>の方法を一部改変して行った (Fig. 2-2)。本研究では、2016年8月~11月に群馬県高崎市で栽培されたダイコン品種「干し理想」(タキイ種苗)を使用した。原料となるダイコンは収穫・水洗後、その日に塩と重石を用いた塩押し(塩押しダイコン:SD)および日干し(干しダイコン:HD)を開始した。また、塩押し処理には、白塩 M<sup>®</sup>(日本海水)を用いた。

塩押し処理:基部および根端部3~5cm切り落としたダイコン(114kg)に、8wt%の食塩を加え、2倍重の重石を乗せ脱水処理を開始した。脱水2日目にダイコンに対して2wt%の食塩を加え、12日間の脱水を行った。塩押し処理は、2°Cの低温管理下で、計14日間行った(第一章, Fig. 1-4)。

日干し処理:根端部3~5cm切り落としたダイコン(151kg;葉部を含む)をはぎ掛けし、風通しの良い日陰で14日間の脱水を行った(第一章, Fig. 1-4)。

たくあん漬試料は、新鮮ダイコン(RD)および各脱水処理の2日後(SD-2d/HD-2d)、7日後(SD-7d/HD-7d)、14日後(SD-14d/HD-14d)にサンプリングを行った(Fig.2-2)。試料は液体窒素を用いて急速凍結後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥した試料はマルチビーズシヨッカー<sup>®</sup>(MB901THW-S;安井器械)を用いて、氷温粉碎および均質化を行い、使用時まで真空包装し-30°Cで保管した。

### 2.2-2. 水分量, NaCl 濃度および pH の測定

水分量は、湿潤質量から凍結乾燥後のダイコン質量を差し引くことによって求めた。NaCl濃度は、乾燥粉末試料100mgに対し、凍結乾燥前ダイコン質量あたり2倍重の純水を加え、転倒混和した。4°C, 20,630 × gで10分間の遠心分離後、上清を20倍希釈し、塩分分析計(SAT-210;DKK-TOA)を用いて電量滴定法によって測定を行った。pHは凍結乾燥試料に超純水を加え湿潤質量に戻し、pHメーター(HM-30;DKK-TOA)を用いて直接測定を行っ

た。

### 2.2-3. 遊離アミノ酸の分析

乾燥粉末試料 50 mg にメタノール/クロロホルム/水 (5:5:2) 混液 2.25 mL を加え、37°C, 300 rpm で 30 分間振とう抽出を行った。水 900  $\mu$ L を加え、4°C, 1,450  $\times$  g で 3 分間の遠心分離後、水相 1.8 mL を真空濃縮し、水で最終容量 1.5 mL に調整した。

遊離アミノ酸の分析は、*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<sup>53)</sup>により行い、内部標準物質として *S*-カルボキシメチルシステイン (SCMC) およびサルコシンを用いた。HPLC 装置は、Agilent 1100-1200 シリーズ (Agilent Technologies) を使用した。

### 2.2-4. 酵素活性試験

#### 2.2-4-1. Glutamic acid decarboxylase 活性試験

GAD 活性試験は Miyashita ら<sup>54)</sup>の方法を一部改変して行った。乾燥粉末試料 50 mg にポリビニルピロリドン (PVPP) 10 mg および GAD 抽出緩衝液 (100 mM トリス-塩酸 (pH 7.5), 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) および 10% (v/v) グリセロールを含む) 1 mL を加え、マルチビーズショッカー®を用いて氷温粉碎抽出を行った。4°C, 20,630  $\times$  g で 10 分間の遠心分離後、上清を GAD 抽出液として用いた。

GAD 反応緩衝液 (150 mM リン酸カリウム (pH 5.8), 0.1 mM ピリドキサールリン酸 (PLP), 20 mM グルタミン酸および GAD 抽出液 20  $\mu$ L を含む) 200  $\mu$ L 中で、40°C, 2 時間インキュベートを行った。1.2 M 過塩素酸 200  $\mu$ L を加えることで反応停止した。内部標準溶液 (3.6 mM SCMC) 100  $\mu$ L およびアセトニトリル 1.5 mL を加え、4°C, 1,450  $\times$  g で 10 分間遠心分離後、上清中の GABA を上記の方法<sup>53)</sup>に従い定量した。GAD 活性 (U) は、40°C, pH 5.8 における 1 分間あたりの GABA 生成量 ( $\mu$ mol min<sup>-1</sup>) を 1 unit として求めた。

## 2. 2-4-2. GABA transaminase および glutamine synthetase 活性試験

GABA-T および GS 抽出液は Lu ら<sup>55)</sup>の方法に従い、酵素抽出緩衝液 (100 mM トリス-塩酸 (pH7.6), 1 mM EDTA, 1 mM 塩化マグネシウムおよび 10 mM 2-メルカプトエタノール含む) を用いて調製した。GABA-T および GS の抽出は、前述した GAD 抽出方法に沿って氷温粉碎抽出を行った。

GABA-T 活性試験は Miyashita ら<sup>54)</sup>の方法に従い、GABA-T 反応緩衝液 (50 mM トリス-塩酸 (pH 8.0), 1.5 mM ジチオスレイトール (DTT), 0.75 mM EDTA, 0.1 mM PLP, 16 mM GABA, 4 mM 2-オキソグルタル酸 (2-OG) および GABA-T 抽出液 20  $\mu$ L を含む) 200  $\mu$ L 中で、37°C, 2 時間インキュベートを行った。8 mM 5-スルホサリチル酸 200  $\mu$ L を加えることで反応停止した。内部標準溶液 (3.6 mM SCMC) 100  $\mu$ L およびアセトニトリル 1,500  $\mu$ L を加え、4°C, 1,450  $\times$  g で 10 分間遠心分離後、上清中のグルタミン酸を上記の方法<sup>53)</sup>に従い定量した。GABA-T 活性 (U) は、37°C, pH 8.0 における 1 分間あたりのグルタミン酸生成量 ( $\mu$ mol min<sup>-1</sup>) を 1 unit として求めた。

GS 活性試験は Rhodes ら<sup>56)</sup>および Viégas ら<sup>57)</sup>の方法に従い、GS 反応緩衝液 (50 mM イソダゾール-塩酸 (pH 7.2), 18 mM アデノシン三リン酸 (ATP), 45 mM 硫化マグネシウム, 6 mM 塩化ヒドロキシルアミン, 92 mM グルタミン酸および GS 抽出液 20  $\mu$ L を含む) 160  $\mu$ L 中で、37°C, 2 時間インキュベートを行った。塩化鉄溶液 (10% (w/v) 塩化鉄 (III)/ 24% (v/v) トリクロロ酢酸 / 6 M 塩酸 (1:1:1)) 200  $\mu$ L を加え反応停止した。反応混合液をプレートフィルター (AcroPrep™ Advance Filter Plate; ポアサイズ 0.2  $\mu$ m; Pall) でろ過し、マイクロプレートリーダー (SH-9000Lab; CORONA ELECTRIC) を用いて、560 nm における吸光度を測定した。外部標準物質として、 $\gamma$ -グルタミルモノヒドロキサム酸 ( $\gamma$ -Glu-HXM) を用いた。GS 活性 (U) は、37°C, pH 7.2 における 1 分間あたりの  $\gamma$ -Glu-HXM 生成量 ( $\mu$ mol min<sup>-1</sup>) を 1 unit として求めた。



### 2.2-4-3. グルタミン酸代謝関連酵素活性試験

粗酵素抽出液は Miyashita ら<sup>58)</sup>の方法に従い、酵素抽出緩衝液 (100 mM トリス-塩酸 (pH7.5), 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 10 mM システイン, 0.1 mM PMSF および 5  $\mu$ M ロイペプチンを含む) を用いて調製した。粗酵素の抽出は、前述した GAD 抽出方法に沿って氷温粉碎抽出を行った。

Glutamic acid synthase (GOGAT) 活性試験は Ertan ら<sup>59)</sup>の方法に従い、粗酵素抽出液 20  $\mu$ L に GOGAT 反応緩衝液 (62.5 mM トリス-塩酸 (pH7.6), 3.75 mM 2-OG および 62.5  $\mu$ M 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) を含む) 160  $\mu$ L を加え、30°C で 5 分間予備加温を行った。50 mM グルタミン 20  $\mu$ L を加え反応を開始し、30°C, 340 nm における吸光度を 5 分毎、20 分間カイネティック測定した。

ALT 活性試験は日本臨床化学会 (JSCC) 標準法<sup>60)</sup>に従い、粗酵素抽出液 15  $\mu$ L に ALT 反応緩衝液 (111 mM トリス-塩酸 (pH7.5), 2.5 U mL<sup>-1</sup> 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH), 0.015 % (w/v) 牛血清アルブミン (BSA), 0.25 % (v/v) グリセロール, 625 mM アラニンおよび 0.2 mM NADH を含む) 120  $\mu$ L を加え、37°C で 5 分間予備加温を行った。150 mM 2-OG (in 111 mM トリス-塩酸緩衝液, pH7.5) 15  $\mu$ L を加え反応を開始し、37°C, 340 nm における吸光度を 1 分毎、10 分間カイネティック測定した。

P5CS 活性試験は Liu ら<sup>61)</sup>の方法に従い、粗酵素抽出液 20  $\mu$ L に P5CS 反応緩衝液 (100 mM トリス-塩酸 (pH 7.2), 20 mM 塩化マグネシウム, 75 mM グルタミン酸および 5 mM ATP を含む) 160  $\mu$ L を加え、30°C で 5 分間予備加温を行った。0.4 mM NADH 20  $\mu$ L を加え反応を開始し、30°C, 340 nm における吸光度を 5 分毎、20 分間カイネティック測定した。

Glutamic acid dehydrogenase (GDH) 活性試験は Glevarec ら<sup>62)</sup>の方法に従い、グルタミン酸合成方向 (NADH-GDH) および 2-OG 合成方向 (NAD<sup>+</sup>-GDH) を解析した。

NADH-GDH 活性試験：粗酵素抽出液 20  $\mu$ L に NADH-GDH 反応緩衝液 (100 mM トリス-塩酸 (pH 8.0), 1 mM 塩化カルシウム, 50 mM 硫化アンモニウムおよび 0.25 mM NADH を含む) 160  $\mu$ L を加え、30°C で 5 分間予備加温を行った。130 mM 2-OG (in 100 mM トリス-

塩酸緩衝液, pH 8.0) 20  $\mu$ L を加え反応を開始し, 30°C, 340 nm における吸光度を 5 分毎, 20 分間カイネティック測定した。

NAD<sup>+</sup>-GDH 活性試験: 粗酵素抽出液 20  $\mu$ L に NAD<sup>+</sup>-GDH 反応緩衝液 (100 mM トリス-塩酸 (pH 9.0), 1 mM 塩化カルシウムおよび 0.25 mM 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>) を含む) 160  $\mu$ L を加え, 30°C で 5 分間予備加温を行った。130 mM 2-OG (in 100 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 9.0) 20  $\mu$ L を加え反応を開始し, 30°C, 340 nm における吸光度を 5 分毎, 20 分間カイネティック測定した。

GOGAT, ALT, P5CS および GDH 活性 (U) は, 各反応緩衝液の pH および反応温度における 1 分間当たりの NADH 酸化還元量 ( $\mu$ mol min<sup>-1</sup>) を 1 unit として求めた。各酵素活性試験における吸光度測定は, マイクロプレートリーダー (SH-9000Lab; CORONAELECTRIC) を用いて行った。NADH のモル吸光係数は 6.3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> とした。

## 2. 2-5. 遺伝子発現解析

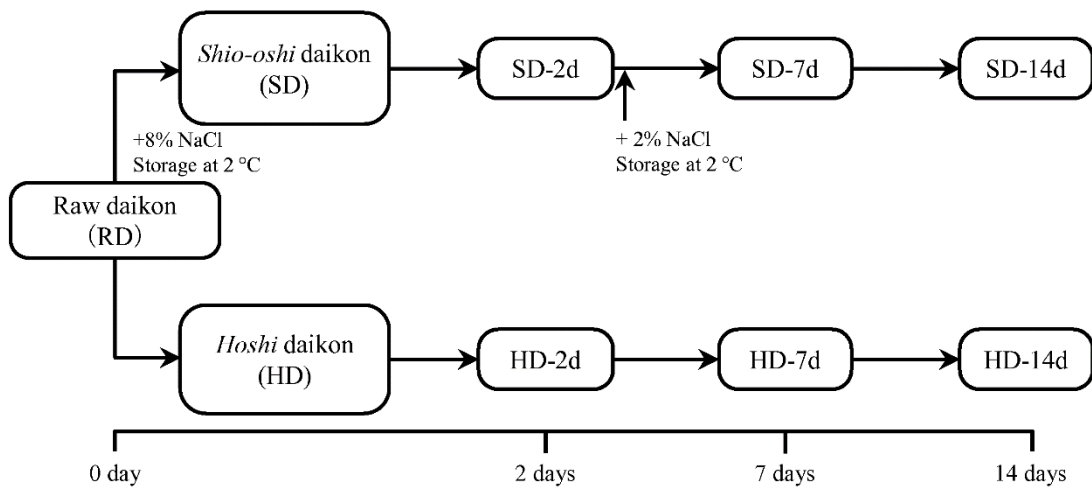
乾燥粉末試料 50 mg を滅菌マイクロチューブに秤量し, RNA 抽出キット (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant and Fungi; MACHEREY-NAGEL) を用いて, メーカープロトコルに従い total RNA を抽出した。次いで cDNA 合成キット (PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix; TaKaRa bio) を用いてメーカープロトコルに従い, 37°C-15 分間, 85°C-5 秒間の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行った。RT-PCR は, PCR Thermal CyclerDice<sup>®</sup> Touch (TaKaRa bio) を用いて実施した。

グルタミン酸代謝に関わる遺伝子発現について, TB Green<sup>™</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa bio) を用いてメーカープロトコルに従い, 相対定量法によるリアルタイム PCR (qRT-PCR) を行った。qRT-PCR に使用したプライマーを Table 2-1 に示した。リファレンス遺伝子として  $\beta$ -アクチン遺伝子 (*ACTIN2/7*) を使用した。qRT-PCR は以下の条件で行った: *GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE 1 (GAD1)*: 95°C-5 秒間, 56°C-30 秒間, 40 サイクル; *Δ1-PYRROLINE-5-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE 1 (P5CS1)*: 95°C-5 秒間, 60°C-30 秒間, 72°C-20 秒間, 40

サイクル； *GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE 2 (GAD2)*, *GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE 4 (GAD4)*, *GABA TRANSAMINASE 1 (GABA-T1)*, *ALANINE TRANSAMINASE 1 (ALT1)*, *GLUTAMINE SYNTHETASE 1 (GS1)*, *GLUTAMINE SYNTHETASE 2 (GS2)*, *GLUTAMIC ACID SYNTHASE 1 (GLT1)*, *GLUTAMIC ACID DEHYDROGENASE 1 (GDH1)* および *GLUTAMIC ACID DEHYDROGENASE 2 (GDH2)* : 95°C–5 秒間, 60°C–30 秒間, 40 サイクル。qRT-PCR は, TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Real Time System II (TaKaRa bio) を用いて実施した。

#### 2. 2–6. 統計解析

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) で補正し, 平均値 ± 標準偏差で示した。脱水処理区間比較は一元配置分散分析後, Holm-Sidak 検定 ( $\alpha = 0.05$ ) を行った。経時的群間比較は二元配置分散分析後, Tukey-Kramer の多重比較検定 ( $\alpha = 0.05$ ) を行った。統計解析は GraphPad Prism version 8 for Mac (Graphpad Software) を用いて行った。



**Fig. 2-2 Pickling schedule of *takuan-zuke*.**

**Table 2–1** Primer sequences and amplicon size for the reference genes. Amplification was carried out as described in Experimental procedures.

Name	Forward Primer Sequence [5'-3']	Reverse Primer Sequence [5'-3']	Amplicon Size (bp)
<i>ACTIN2/7</i>	GGCATCACACTTCTACAACG	CTGAATGGCAACATACATGGC	155
<i>GAD1</i>	CGCAGAGAGACTTGTGATCG	CTTCACGGTCACCATCAAG	135
<i>GAD2</i>	ACACTTGCGGAGAGACTTGT	CCATCAGAATGTCCCTTTCCA	145
<i>GAD4</i>	G TTCACGCCAAGATGGCTAA	GCAAATCTGTTCTTGTTAGTG	129
<i>GABA-T1</i>	GCAGGAGATAGCATAATGATG	CTTCTTTTGCTGAGTCTTGAG	135
<i>ALT1</i>	CTGTAATATCGGAAATCCGC	CCAACAACGCTGTGTGGGA	92
<i>P5CS1</i>	CAGATGGATAATGAGAGGAA	ACGAACAGAACAAAGGAA	254
<i>GDH1</i>	CAAGGGTTTATGTGGGAAG	CGAGCCACACGGTTAACACC	149
<i>GDH2</i>	GGGTTTATGTGGGAAGAGGA	GCGACACGGTTAACTCCAAG	143
<i>GS1</i>	GGATATGAGAAGCAAAGCCAGG	GCCTGTGCTTGAACCATCATA	91
<i>GS2</i>	ATCCGCAAGCTATCTTCAGAGA	TCTCAGCAGCTCTTGCCCGT	120
<i>GLT1</i>	TTGGACCTGAGCCAACACTTG	CATCCTCGTCTTTGCTGAGGA	213

### 2.3. 結果および考察

新鮮、塩押しおよび日干しダイコンにおける遊離アミノ酸の定量結果を、Table 2-2, 2-3, 2-4 および 2-5 に示した。なお、脱水処理による質量変化を考慮して、Table 2-2 の値は NaCl を含む湿潤質量 (FW) 100 g あたりのアミノ酸質量 (mg)、Table 2-3 の値は NaCl を除いた 100 g FW あたりのアミノ酸質量 (mg)、Table 2-4 の値は NaCl および水分を除いた乾燥質量 (DW) 1 g あたりのアミノ酸質量 (mg)、Table 2-5 の値は NaCl および水分を除いた 1 g DW あたりのアミノ酸質量 ( $\mu\text{mol}$ )で示した。

各脱水処理工程におけるダイコンの平均質量、歩留まり、水分量、NaCl 濃度および pH の値を Table 2-6 に示した。塩押し処理 2 日後、7 日後および 14 日後におけるダイコンの歩留まりは、それぞれ 77.8%、67.2% および 58.1% であった。一方、日干し処理 2 日後、7 日後および 14 日後におけるダイコンの歩留まりは、それぞれ 81.4%、52.1% および 34.1% であった。

#### 2.3-1. 塩押しダイコンにおける遊離アミノ酸の変化

新鮮ダイコンおよび各脱水処理工程におけるグルタミン酸、グルタミン、アラニン、プロリンおよび GABA の定量結果について、Fig. 2-3 に示した。塩押し処理では、湿潤質量あたりの総遊離アミノ酸濃度は、SD-7d まで経時的に増加し、SD-14d で減少した (RD vs. SD-7d: 181.7% ; SD-7d vs. SD-14d : 58.6%) (Table 2-2)。塩押し処理では高濃度の食塩をダイコンに添加して脱水する。したがって、塩押し処理 7 日後までは脱水による成分の濃縮およびストレス応答による遊離アミノ酸の誘導が起きたと示唆された。さらに、塩押し処理 7~14 日後の間に細胞膜の半透性が失われたことで、所謂「漬かった」状態となり、細胞内の遊離アミノ酸が上がり水中に流出したと示唆された (Table 2-2)。

アラニンおよびプロリン含量は、新鮮ダイコンでそれぞれ  $9.10 \pm 0.16 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$ 、 $13.95 \pm 0.35 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$  であり、新鮮ダイコンと比較して塩押し処理中に有意な変化は観察されなかった。GABA 含量は、新鮮ダイコンで  $5.57 \pm 0.56 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$  であり、塩押し処理によ

って、以前の報告<sup>44)</sup>と同様に GABA の有意な蓄積を示した (RD vs. SD-14d : 9.6 倍,  $p < 0.001$ )。グルタミン酸含量は新鮮ダイコンで  $37.89 \pm 1.10 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$  であり、新鮮ダイコンと比較して塩押し処理 2 日後において 12.2 %まで急速に減少した。グルタミン酸含量は新鮮ダイコンで  $37.89 \pm 1.10 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$  であり、新鮮ダイコンと比較して塩押し処理では 2 日後において 12.2 %まで急速に減少した。

### 2.3-2. 塩押しダイコンにおける酵素活性の変化

機能性成分である GABA、アラニンおよびプロリンは、Fig. 2-1 に示す代謝経路によって蓄積する。そこで、新鮮ダイコンおよび各脱水処理工程における酵素活性を測定し、その変化について Fig. 2-4 に示した。GAD 活性は、新鮮ダイコンにおいて  $7.02 \pm 0.18 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  であり、新鮮ダイコンと比較して塩押し処理 7 日後において 21.9 %まで低下した。GABA-T 活性 (GABA からコハク酸セミアルデヒドへの分解反応) は、新鮮ダイコンにおいて  $0.12 \pm 0.01 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  であり、GAD 活性と比較して顕著に低かった。さらに、GABA-T 活性は新鮮ダイコンと比較して塩押し処理 2 日後において約 75 %低下した。ALT 活性 (アラニンおよびグルタミン酸の可逆的反応) は、新鮮ダイコンにおいて  $5.25 \pm 0.49 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  であり、塩押し処理 2 日後において約 85 %低下した。P5CS (プロリン合成における律速段階) 活性は、新鮮ダイコンにおいて  $0.19 \pm 0.01 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  であり、各脱水処理 2 日後において約 40 %低下した。

NADH-GDH 活性 (2-OG からグルタミン酸への代謝反応) は、新鮮ダイコンにおいて  $10.1 \pm 0.18 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  であり、塩押し処理 2~7 日後にかけて有意に増大した ( $p < 0.001$ )。NAD<sup>+</sup>-GDH 活性 (グルタミン酸から 2-OG への代謝反応) は、新鮮ダイコンにおいて  $1.47 \pm 0.06 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  であり、塩押し処理 7 日後において 61.2 %保持されていたものの、7~14 日後にかけて有意に低下した ( $p < 0.05$ )。GS 活性 (植物における重要な窒素同化酵素) および GOGAT 活性 (グルタミンからグルタミン酸への代謝反応) は、新鮮ダイコンにおいてそれぞれ  $1.18 \pm 0.11 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  および  $0.27 \pm 0.03 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  であり、塩押し処理 2~7 日後にかけて、約

60%保持されていた。

これまでの研究で、たくあん漬の製造工程において、グルタミン酸から GABA、アラニンおよびプロリンが合成されること、ダイコンの脱水処理が GAD を活性化し、GABA 含量を増加させることが明らかとなっている<sup>44, 63)</sup>。本研究で得られた結果はこれらの報告を支持するものであり、塩押し処理 2 日後まで GAD 活性が約 40%保持されていた。また、GABA 分解酵素である GABA-T 活性は、GAD 活性の 5%未満であったことから、塩押し処理工程では、GABA シヤントを介した TCA サイクルへの導入は低いことが示唆された。ALT 活性は日干し処理 2~7 日後にかけて増大したが、塩押し処理では 2 日後で急速に失活した。P5CS 活性は各脱水処理において増大したが、塩押し処理では Fig. 2-3 に示したように、プロリンの蓄積が観察されなかった。これは、塩押し処理 2 日後においてグルタミン酸が急激に減少したためと示唆される。

一般的には、含塩食品の摂取は高血圧のリスクになるとされているが、Kumakura ら<sup>45)</sup>は動物実験において、含塩食品であるたくあん漬の摂取による降圧作用および腎機能改善効果を報告している。さらに、グルタミン酸を含む調味液にたくあん漬を浸漬し乳酸菌発酵させることで、より多くの GABA を生成することが明らかとなっている<sup>63)</sup>。したがって、たくあん漬の摂取は必ずしも高血圧症のリスク要因にはならず、適量であれば降圧効果があると考えられる。

### 2.3-3. 塩押しダイコンにおける遺伝子発現の変化

qRT-PCR による遺伝子発現解析の結果を Fig. 2-5 に示した。各脱水処理 7~14 日後の試料は、mRNA が断片化していたため、発現解析を行わなかった。GAD 遺伝子の発現は、塩押し処理 2 日後において *GAD1* および *GAD2* が低下傾向を示し、*GAD4* が有意に増大した ( $p < 0.001$ )。ALT の発現は、塩押し処理 2 日後に有意に増大した ( $p < 0.001$ )。GABA-TI の発現は塩押し処理 2 日後に有意に低下し ( $p < 0.05$ )、P5CS1 の発現も低下する傾向を示した。GDH 遺伝子および GLTI の発現は、塩押し処理 2 日後において有意な変化は観察され



なかった。GS1 の発現は、塩押し処理 2 日後に有意に低下したが ( $p < 0.05$ ), GS2 の発現に変化は見られなかった。

#### 2.3-4. 日干しダイコンにおける遊離アミノ酸の変化

日干しダイコンにおけるグルタミン酸, グルタミン, アラニン, プロリンおよび GABA の定量結果について, Fig. 2-3 に示した。たくあん漬の遊離アミノ酸レベルは, 塩押し処理と比較して日干し処理で高いとされるが<sup>44)</sup>, 本研究においても総遊離アミノ酸濃度が示すように, 同様の結果を得ることができた (総遊離アミノ酸: SD-14d:  $215.5 \pm 20.6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$ ; HD-14d:  $345.5 \pm 29.1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$ ) (Table 2-5)。アラニン, プロリンおよび GABA 含量は, 以前の報告<sup>44)</sup>と同様に, 新鮮ダイコンと比較して日干し処理 14 日後において有意な蓄積を示した (RD vs. HD-14d; アラニン: 3.2 倍,  $p < 0.001$ ; プロリン: 4.8 倍,  $p < 0.001$ ; GABA: 18.6 倍,  $p < 0.001$ )。また, 日干し処理におけるグルタミン酸含量は, 塩押し処理と比較して緩やかに減少した (Fig. 2-3)。

#### 2.3-5. 日干しダイコンにおける酵素活性の変化

日干しダイコンにおける各酵素活性試験の結果について, Fig. 2-4 に示した。日干し処理中の GAD 活性は, 脱水開始 2~7 日にかけて約 60%が残存していた。また, 日干し処理中の GABA-T 活性は, 塩押し処理とは対照的に, 脱水開始から 7 日後まで保持されていた。日干し処理中の ALT 活性は約 40%保持されており, 脱水開始 2~7 日後にかけてわずかに増大した。日干し処理中の P5CS 活性は, 脱水開始 2~7 日後にかけてわずかに増加した。日干し処理中の NADH-GDH 活性は, 脱水開始から 7 日後にかけて保持されていた。一方, NAD<sup>+</sup>-GDH 活性は日干し処理 2~7 日後にかけて増大した。GS 活性は日干し処理 2~7 日後にかけて, 約 60%保持されていた。さらに, 日干し処理 14 日後における GS 活性は  $0.73 \pm 0.03 \text{ U g}^{-1} \text{DW}$  であり, 塩押し処理と比較して長期間保持されていた。GOGAT 活性は日干し処理 2 日後にかけて増加した。

### 2.3-6. 日干しダイコンにおける遺伝子発現の変化

qRT-PCRによる遺伝子発現解析の結果を Fig. 2-5 に示した。*ALT1* の発現は、新鮮ダイコンおよび塩押し処理2日後と比較して、日干し処理2日後に有意に増大した ( $p < 0.001$ )。*P5CSI* の発現は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理2日後で有意に増大した ( $p < 0.001$ )。*GAD* 遺伝子の発現は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理2日後において *GAD2* が低下傾向を示した。一方、*GAD4* の発現は、新鮮ダイコンおよび塩押し処理2日後と比較して、日干し処理2日後において有意に増大した ( $p < 0.001$ )。*GABA-T1* の発現は、塩押し処理2日後と同様に、日干し2日後においても低下傾向を示した。*GDH1* の発現は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理2日後に有意に増大した ( $p < 0.05$ )。*GDH2* の発現は、塩押し処理2日後と同様に、日干し2日後においても有意な変化は観察されなかった。*GS* 遺伝子および *GLT1* の発現は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理2日後において有意な変化は観察されなかった。

アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナでは、全ゲノム解読によって5つの *GAD* 遺伝子配列が同定されている<sup>50)</sup>。さらに、シロイヌナズナの根部では主に *GAD1* および *GAD2* が発現しており、低酸素ストレスにより *GAD4* の発現が増大することが明らかとなっている<sup>50)</sup>。また、シロイヌナズナには4つの *ALT* アイソザイムが存在し、根部では主に *ALT1* が発現している<sup>58)</sup>。さらに、タバコおよびダイコンでは、脱水ストレスによる *P5CSI* の発現増大が報告されている<sup>61, 64)</sup>。これらの報告は、本研究の結果を裏付けるものと考えられる。すなわち、本研究では、ダイコンの脱水処理によって *GAD4*、*ALT1* および *P5CSI* の発現が増大し、*GAD*、*ALT* および *P5CS* が活性化したため、二次代謝産物 (*GABA*、アラニンおよびプロリン) が誘導されたことが示唆された。

### 2.3-7. 脱水処理工程におけるダイコンのグルタミン酸代謝

日干し処理は、たくあん漬の栄養および健康機能性を向上させる有効な方法であること

が示唆されている<sup>44)</sup>。本研究においても、塩押し処理と比較して日干し処理においてアラニン、プロリンおよび GABA が顕著に蓄積した (Fig. 2-3)。しかしながら、ダイコンをはじめとする天日干し野菜は生産効率が悪く、食品業界における利用は少ない。したがって、実際に市販されている漬物の多くは、野菜を塩または塩水で脱水して調製されている。本章では、塩押しダイコンにおいて、日干しダイコンほど顕著ではないが、新鮮ダイコンと比較して遊離アミノ酸の蓄積が観察された。これは、塩押し処理においても、一時的なストレス反応が生じていることを示唆している。

本研究で解析した各酵素活性は、塩押し処理と比較して日干し処理において保持されていることが明らかとなった。植物は窒素同化の過程で、GDH および GS/GOGAT によってグルタミン酸を合成する<sup>65)</sup>。さらに、グルタミン酸は GABA、アラニンおよびプロリン合成の基質であり、ダイコンの脱水処理によって誘発される遊離アミノ酸の変化は、重要なストレス反応であると示唆される。トマトおよびイネでは、中程度の塩ストレスによる GS および NADH-GDH の活性化が報告されている<sup>66,67)</sup>。本研究では、塩押し処理において GDH によるグルタミン酸合成が増大した (Fig. 2-4)。また、塩押し処理は GS/GOGAT サイクルを阻害し、日干し処理では保持・増大することが明らかとなった (Fig. 2-4)。したがって、各脱水処理間におけるグルタミンおよびグルタミン酸動態の差異は、GS/GOGAT サイクルが寄与しており、既存の酵素活性に起因すると考えられた。また、ダイコンの脱水処理はグルタミン酸合成を誘発し、GABA、アラニンおよびプロリンなどの浸透圧調節物質 (オスモライト) を蓄積すると示唆された。

**Table 2-2** Free amino acids of raw daikon and during dehydration for *takuan-zuke* preparation. The unit was shown mg/100 g<sup>-1</sup> FW with NaCl.

	Salt-pressing ( <i>shio-oshi</i> )			Sun-drying ( <i>hoshi</i> )			
	Raw	SD-2d <sup>a</sup>	SD-7d <sup>a</sup>	SD-14d <sup>a</sup>	HD-2d	HD-7d	HD-14d
Asp	13.2 ± 0.5	3.7 ± 0.3 (0.0 ± 0.0)	5.7 ± 0.4 (0.0 ± 0.0)	3.8 ± 0.1 (0.8 ± 0.7)	8.7 ± 0.6	6.8 ± 0.2	7.6 ± 0.4
Glu	36.4 ± 1.1	7.1 ± 0.4 (1.0 ± 0.9)	10.1 ± 0.4 (0.7 ± 0.6)	4.4 ± 0.2 (0.7 ± 0.6)	35.3 ± 0.4	28.1 ± 0.5	13.2 ± 0.5
Asn	3.3 ± 0.1	4.3 ± 0.2 (0.2 ± 0.2)	6.7 ± 0.3 (0.3 ± 0.2)	3.9 ± 0.1 (0.9 ± 0.8)	6.6 ± 0.2	11.9 ± 0.2	17.1 ± 0.3
Ser	3.4 ± 0.2	4.1 ± 0.3 (0.4 ± 0.4)	5.2 ± 0.2 (0.6 ± 0.5)	2.7 ± 0.1 (1.1 ± 1.0)	6.0 ± 0.4	15.9 ± 0.4	17.3 ± 0.4
Gln	93.2 ± 1.3	95.4 ± 0.9 (2.5 ± 2.2)	156.4 ± 2.8 (3.4 ± 2.9)	90.4 ± 0.6 (14.1 ± 12.2)	144.0 ± 1.6	251.3 ± 5.5	233.2 ± 2.7
His	0.7 ± 0.0	1.3 ± 1.0 (0.0 ± 0.0)	1.2 ± 0.2 (0.0 ± 0.0)	0.8 ± 0.0 (0.5 ± 0.4)	1.1 ± 0.0	3.3 ± 0.1	7.5 ± 0.4
Gly	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.4 (0.1 ± 0.1)	4.4 ± 0.2 (0.2 ± 0.2)	1.9 ± 0.1 (0.8 ± 0.7)	2.7 ± 0.3	3.8 ± 0.2	6.3 ± 0.2
Thr	3.1 ± 0.0	4.0 ± 0.5 (0.1 ± 0.1)	5.3 ± 0.4 (0.2 ± 0.2)	3.4 ± 0.1 (0.9 ± 0.8)	5.9 ± 0.1	12.5 ± 0.2	17.1 ± 0.4
Arg	3.2 ± 0.1	5.1 ± 0.2 (0.3 ± 0.3)	6.6 ± 0.3 (0.3 ± 0.3)	4.9 ± 0.3 (1.0 ± 0.9)	7.0 ± 0.2	7.5 ± 0.2	19.7 ± 0.4
Ala	5.3 ± 0.1	13.9 ± 0.3 (0.6 ± 0.5)	20.3 ± 0.3 (1.9 ± 1.6)	11.3 ± 0.1 (4.4 ± 3.8)	13.6 ± 0.6	32.3 ± 1.0	52.4 ± 0.8
GABA	3.8 ± 0.4	42.4 ± 0.7 (1.1 ± 0.9)	57.3 ± 0.4 (4.2 ± 3.6)	40.6 ± 0.4 (13.5 ± 11.7)	27.2 ± 0.4	79.9 ± 1.7	213.5 ± 1.2
Tyr	0.1 ± 0.2	1.3 ± 0.8 (0.0 ± 0.0)	1.4 ± 0.8 (0.0 ± 0.0)	0.7 ± 0.0 (0.4 ± 0.4)	0.4 ± 0.3	2.0 ± 0.0	4.0 ± 1.0
Val	4.6 ± 0.0	5.2 ± 0.6 (0.2 ± 0.2)	9.3 ± 0.4 (0.0 ± 0.3)	5.8 ± 0.1 (1.4 ± 1.2)	7.5 ± 0.1	20.6 ± 0.3	26.5 ± 1.0
Met	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.6 (0.0 ± 0.0)	0.5 ± 0.5 (0.0 ± 0.0)	0.1 ± 0.1 (0.2 ± 0.2)	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.8 ± 1.0
Trp	0.0 ± 0.0	1.4 ± 1.0 (0.0 ± 0.0)	1.3 ± 0.9 (0.0 ± 0.0)	0.1 ± 0.2 (0.3 ± 0.4)	0.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	4.0 ± 1.2
Phe	0.6 ± 0.1	2.0 ± 0.9 (0.0 ± 0.0)	2.4 ± 0.8 (0.0 ± 0.0)	1.4 ± 0.0 (0.6 ± 0.5)	1.2 ± 0.1	7.5 ± 0.2	10.3 ± 1.0
Ile	2.3 ± 0.0	3.4 ± 0.7 (0.1 ± 0.1)	5.1 ± 0.7 (0.0 ± 0.2)	3.4 ± 0.0 (0.7 ± 0.7)	4.2 ± 0.2	12.0 ± 0.2	16.9 ± 0.8
Leu	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.7 (0.0 ± 0.0)	1.7 ± 0.6 (0.0 ± 0.0)	1.5 ± 0.0 (0.6 ± 0.5)	1.1 ± 0.0	5.7 ± 0.1	7.9 ± 0.8
Lys	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 (0.0 ± 0.0)	0.0 ± 0.0 (0.0 ± 0.0)	0.0 ± 0.0 (0.0 ± 0.0)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Hyp	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.5 (0.0 ± 0.0)	0.0 ± 0.0 (0.0 ± 0.0)	0.0 ± 0.0 (0.2 ± 0.4)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 1.8
Pro	10.5 ± 0.3	22.5 ± 1.0 (0.0 ± 0.0)	37.9 ± 1.4 (0.0 ± 1.5)	17.6 ± 0.3 (5.2 ± 4.5)	26.1 ± 1.7	86.0 ± 4.8	155.3 ± 1.5
BCAA <sup>b</sup>	7.3 ± 0.2	10.1 ± 1.9 (0.3 ± 0.3)	16.2 ± 1.7 (0.0 ± 0.5)	10.7 ± 0.2 (2.6 ± 2.4)	12.8 ± 0.3	38.3 ± 0.6	51.3 ± 2.6
Total free amino acid	186.5 ± 4.6	224.6 ± 12.9 (6.7 ± 5.9)	338.8 ± 12.0 (11.7 ± 12.1)	198.7 ± 3.0 (48.3 ± 42.4)	298.6 ± 7.6	589.4 ± 16.1	831.4 ± 17.7

Amino acid were presented as the mean ± standard deviation in triplicate analysis.

<sup>a</sup>The parentheses values were shown the analysis of *agari-mizu*. <sup>b</sup>BCAA was expressed as the mean ± standard deviation of valine, leucine and isoleucine.

**Table 2–3** Free amino acids of raw daikon and during dehydration for *takuan-zuke* preparation. The unit was shown mg 100 g<sup>-1</sup> FW without NaCl.

	Raw	Salt-pressing ( <i>shio-oshi</i> )			Sun-drying ( <i>hoshi</i> )		
		SD-2d	SD-7d	SD-14d	HD-2d	HD-7d	HD-14d
Asp	13.2 ± 0.5	3.7 ± 0.3	5.4 ± 0.4	3.7 ± 0.1	8.4 ± 0.5	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.3
Glu	36.4 ± 1.1	7.1 ± 0.4	9.7 ± 0.4	4.3 ± 0.2	34.2 ± 0.4	26.2 ± 0.5	11.2 ± 0.4
Asn	3.3 ± 0.1	4.3 ± 0.2	6.4 ± 0.2	3.7 ± 0.1	6.4 ± 0.2	11.1 ± 0.2	14.6 ± 0.2
Ser	3.4 ± 0.2	4.1 ± 0.3	5.0 ± 0.2	2.7 ± 0.1	5.8 ± 0.4	14.8 ± 0.4	14.8 ± 0.3
Gln	93.2 ± 1.3	95.7 ± 0.9	150.1 ± 2.7	87.7 ± 0.6	139.5 ± 1.6	234.3 ± 5.2	199.0 ± 2.3
His	0.7 ± 0.0	1.3 ± 1.0	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1	6.4 ± 0.3
Gly	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.4	4.3 ± 0.2	1.8 ± 0.0	2.6 ± 0.3	3.5 ± 0.2	5.4 ± 0.2
Thr	3.1 ± 0.0	4.0 ± 0.5	5.0 ± 0.4	3.3 ± 0.1	5.8 ± 0.1	11.7 ± 0.2	14.6 ± 0.3
Arg	3.2 ± 0.1	5.1 ± 0.2	6.3 ± 0.3	4.8 ± 0.3	6.8 ± 0.2	7.0 ± 0.2	16.8 ± 0.3
Ala	5.3 ± 0.1	14.0 ± 0.3	19.5 ± 0.3	11.0 ± 0.1	13.1 ± 0.6	30.1 ± 0.9	44.7 ± 0.6
GABA	3.8 ± 0.4	42.6 ± 0.7	55.0 ± 0.4	39.4 ± 0.4	26.3 ± 0.4	74.5 ± 1.6	182.2 ± 1.0
Tyr	0.1 ± 0.2	1.3 ± 0.8	1.3 ± 0.7	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.3	1.9 ± 0.0	3.4 ± 0.9
Val	4.6 ± 0.0	5.2 ± 0.6	9.0 ± 0.4	5.6 ± 0.1	7.3 ± 0.1	19.3 ± 0.2	22.6 ± 0.9
Met	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.6	0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.9
Trp	0.0 ± 0.0	1.4 ± 1.0	1.3 ± 0.9	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	2.1 ± 0.1	3.4 ± 1.0
Phe	0.6 ± 0.1	2.0 ± 0.9	2.3 ± 0.8	1.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1	7.0 ± 0.1	8.8 ± 0.9
Ile	2.3 ± 0.0	3.4 ± 0.7	4.9 ± 0.6	3.3 ± 0.0	4.1 ± 0.2	11.2 ± 0.2	14.4 ± 0.7
Leu	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.6	1.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	5.3 ± 0.1	6.7 ± 0.6
Lys	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Hyp	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.9 ± 1.6
Pro	10.5 ± 0.3	22.6 ± 1.0	36.4 ± 1.4	17.1 ± 0.3	25.3 ± 1.7	80.2 ± 4.5	132.5 ± 1.3
BCAA <sup>a</sup>	7.3 ± 0.2	10.1 ± 1.9	15.5 ± 1.6	10.4 ± 0.1	12.4 ± 0.3	35.7 ± 0.5	43.8 ± 2.2
Total free amino acid	186.5 ± 4.6	225.1 ± 12.9	325.3 ± 11.5	192.9 ± 2.9	289.4 ± 7.3	549.7 ± 15.0	709.6 ± 15.1

Amino acid were presented as the mean ± standard deviation in triplicate analysis.

<sup>a</sup> BCAA was expressed as the mean ± standard deviation of valine, leucine and isoleucine.

**Table 2–4** Free amino acids of raw daikon and during dehydration for *takuan-zuke* preparation. The unit was shown mg g<sup>-1</sup> DW without NaCl.

	Raw	Salt-pressing ( <i>shio-oshi</i> )			Sun-drying ( <i>hoshi</i> )		
		SD-2d	SD-7d	SD-14d	HD-2d	HD-7d	HD-14d
Asp	2.0 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Glu	5.6 ± 0.2	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.6 ± 0.0	3.7 ± 0.0	2.2 ± 0.0	0.7 ± 0.0
Asn	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0
Ser	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.2 ± 0.0	0.9 ± 0.0
Gln	14.3 ± 0.2	9.3 ± 0.1	15.4 ± 0.3	12.2 ± 0.1	15.3 ± 0.2	19.7 ± 0.4	11.6 ± 0.1
His	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Gly	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Thr	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0
Arg	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Ala	0.8 ± 0.0	1.4 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.4 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.0
GABA	0.6 ± 0.1	4.1 ± 0.1	5.6 ± 0.0	5.5 ± 0.1	2.9 ± 0.0	6.3 ± 0.1	10.6 ± 0.1
Tyr	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1
Val	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.3 ± 0.0
Met	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1
Trp	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1
Phe	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1
Ile	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0
Leu	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Lys	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Hyp	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
Pro	1.6 ± 0.0	2.2 ± 0.1	3.7 ± 0.1	2.4 ± 0.0	2.8 ± 0.2	6.7 ± 0.4	7.7 ± 0.1
BCAA <sup>a</sup>	1.1 ± 0.0	1.0 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0	3.0 ± 0.0	2.5 ± 0.1
Total free amino acid	28.5 ± 0.7	21.8 ± 1.3	33.4 ± 1.2	26.9 ± 0.4	31.6 ± 0.8	46.1 ± 1.3	41.2 ± 0.9

Amino acid were presented as the mean ± standard deviation in triplicate analysis.

<sup>a</sup> BCAA was expressed as the mean ± standard deviation of valine, leucine and isoleucine.

**Table 2-5** Free amino acids of raw daikon and during dehydration for *takuan-zuke* preparation. The unit was shown  $\mu\text{mol g}^{-1}$  DW without NaCl.

	Raw	Salt-pressing ( <i>shio-oshi</i> )			Sun-drying ( <i>hoshi</i> )		
		SD-2d	SD-7d	SD-14d	HD-2d	HD-7d	HD-14d
Asp	15.2 ± 0.5	2.7 ± 0.2	4.2 ± 0.3	3.9 ± 0.1	6.9 ± 0.4	4.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Glu	37.9 ± 1.1	4.7 ± 0.2	6.8 ± 0.3	4.1 ± 0.2	25.4 ± 0.3	15.0 ± 0.3	4.4 ± 0.2
Asn	3.8 ± 0.1	3.1 ± 0.2	5.0 ± 0.2	3.9 ± 0.1	5.3 ± 0.2	7.0 ± 0.1	6.4 ± 0.1
Ser	5.0 ± 0.2	3.7 ± 0.3	4.9 ± 0.2	3.5 ± 0.2	6.1 ± 0.4	11.8 ± 0.3	8.2 ± 0.2
Gln	97.5 ± 1.4	63.3 ± 0.6	105.3 ± 1.9	83.6 ± 0.6	104.4 ± 1.2	134.5 ± 3.0	79.2 ± 0.9
His	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.6	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.6 ± 0.0	2.4 ± 0.1
Gly	5.0 ± 0.3	3.2 ± 0.5	5.8 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.9 ± 0.5	4.0 ± 0.2	4.2 ± 0.2
Thr	4.0 ± 0.0	3.3 ± 0.4	4.3 ± 0.3	3.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1	8.2 ± 0.1	7.1 ± 0.2
Arg	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.2	4.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1	5.6 ± 0.1
Ala	9.1 ± 0.2	15.2 ± 0.4	22.4 ± 0.3	17.2 ± 0.2	16.1 ± 0.7	28.3 ± 0.9	29.2 ± 0.4
GABA	5.6 ± 0.6	39.9 ± 0.6	54.7 ± 0.4	53.2 ± 0.5	27.9 ± 0.4	60.6 ± 1.3	102.7 ± 0.6
Tyr	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.9 ± 0.0	1.1 ± 0.3
Val	6.0 ± 0.1	4.3 ± 0.5	7.9 ± 0.4	6.7 ± 0.1	6.8 ± 0.1	13.8 ± 0.2	11.2 ± 0.4
Met	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.3
Trp	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.3
Phe	0.5 ± 0.0	1.2 ± 0.5	1.4 ± 0.5	1.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.3
Ile	2.7 ± 0.0	2.5 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.5 ± 0.0	3.4 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.4 ± 0.3
Leu	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.5	1.3 ± 0.5	1.5 ± 0.0	0.9 ± 0.0	3.4 ± 0.1	3.0 ± 0.3
Lys	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Hyp	0.0 ± 0.0	2.2 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.7
Pro	13.9 ± 0.3	18.9 ± 0.9	32.4 ± 1.2	20.7 ± 0.4	24.0 ± 1.6	58.4 ± 3.3	66.9 ± 0.6
BCAA <sup>a</sup>	9.2 ± 0.2	7.9 ± 1.5	13.0 ± 1.3	11.7 ± 0.2	11.1 ± 0.3	24.3 ± 0.4	20.6 ± 1.0
Total free amino acid	210.3 ± 5.3	174.7 ± 9.4	266.5 ± 8.6	215.5 ± 3.1	242.3 ± 6.5	366.6 ± 10.3	345.5 ± 6.6

Amino acid were presented as the mean ± standard deviation in triplicate analysis.

<sup>a</sup> BCAA was expressed as the mean ± standard deviation of valine, leucine and isoleucine.

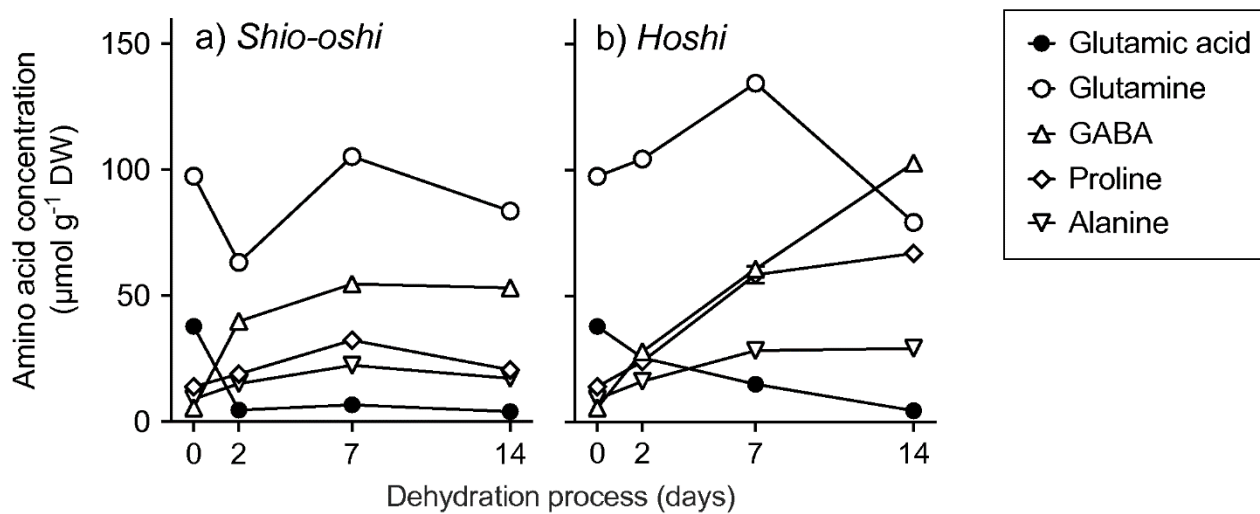
**Table 2–6** Weight, mass yield, moisture content, salt content, and pH of raw daikon and *takuan-zuke*.

	Raw	Salt-pressing ( <i>shio-oshi</i> )			Sun-drying ( <i>hoshi</i> )		
		SD-2d	SD-7d	SD-14d	HD-2d	HD-7d	HD-14d
Weight (kg/radish)	1.67 <sup>a</sup>	1.30 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>	0.97 <sup>b</sup>	1.36 <sup>a</sup>	0.87 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>
Mass yield (%) <sup>c</sup>	100.0	77.8	67.1	58.1	81.4	52.1	34.1
Moisture (%) <sup>d</sup>	93.5 ± 0.1	90.6 ± 0.1	80.8 ± 0.0	83.1 ± 0.5	90.6 ± 0.0	87.2 ± 0.2	79.8 ± 0.6
NaCl (%) <sup>e</sup>	–	6.0 ± 0.3	9.1 ± 0.4	9.6 ± 0.1	–	–	–
pH <sup>c</sup>	6.3 ± 0.0	6.7 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.4 ± 0.0	6.4 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0

Weight indicates total weight of radishes divided by the number of radishes.

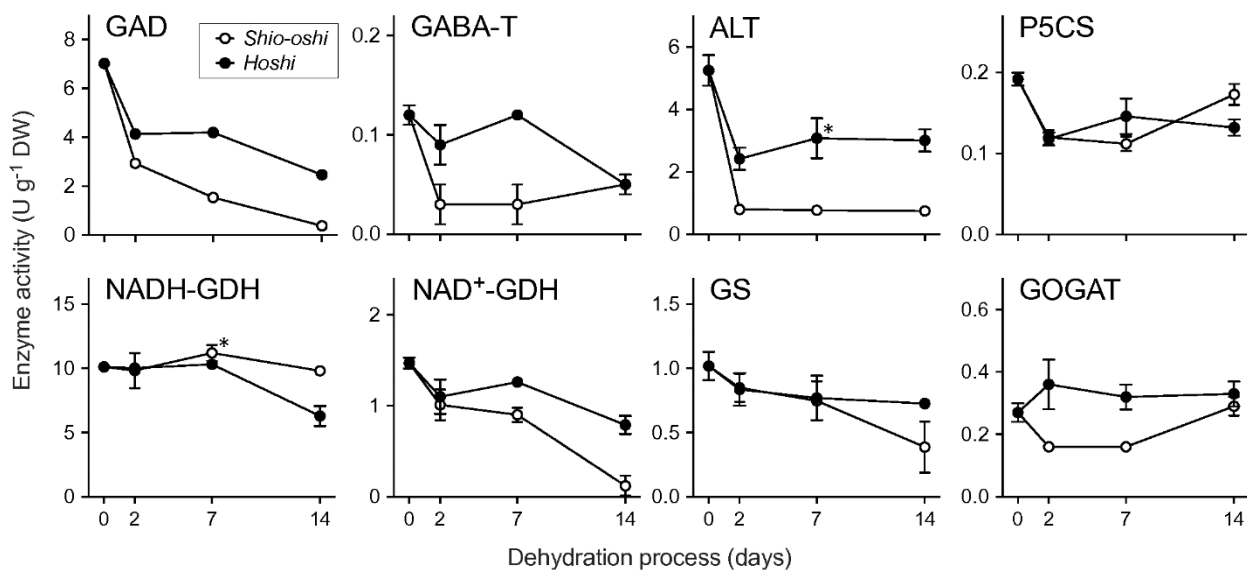
<sup>a</sup> Raw, HD-2d, HD-7d, and HD-14d are expressed as mean weights of radish including leaves. <sup>b</sup> SD-2d, SD-7d and SD-14d are expressed as mean weights of radish excluding radish base and tip cut by 3–5 cm. <sup>c</sup> Mass yield rate are expressed as a value relative to the weight of raw daikon. <sup>d</sup> Moisture content volatilized by lyophilizing is expressed as means ± standard deviation in duplicate. <sup>e</sup> NaCl concentration and pH are presented as means ± standard deviation in triplicate.





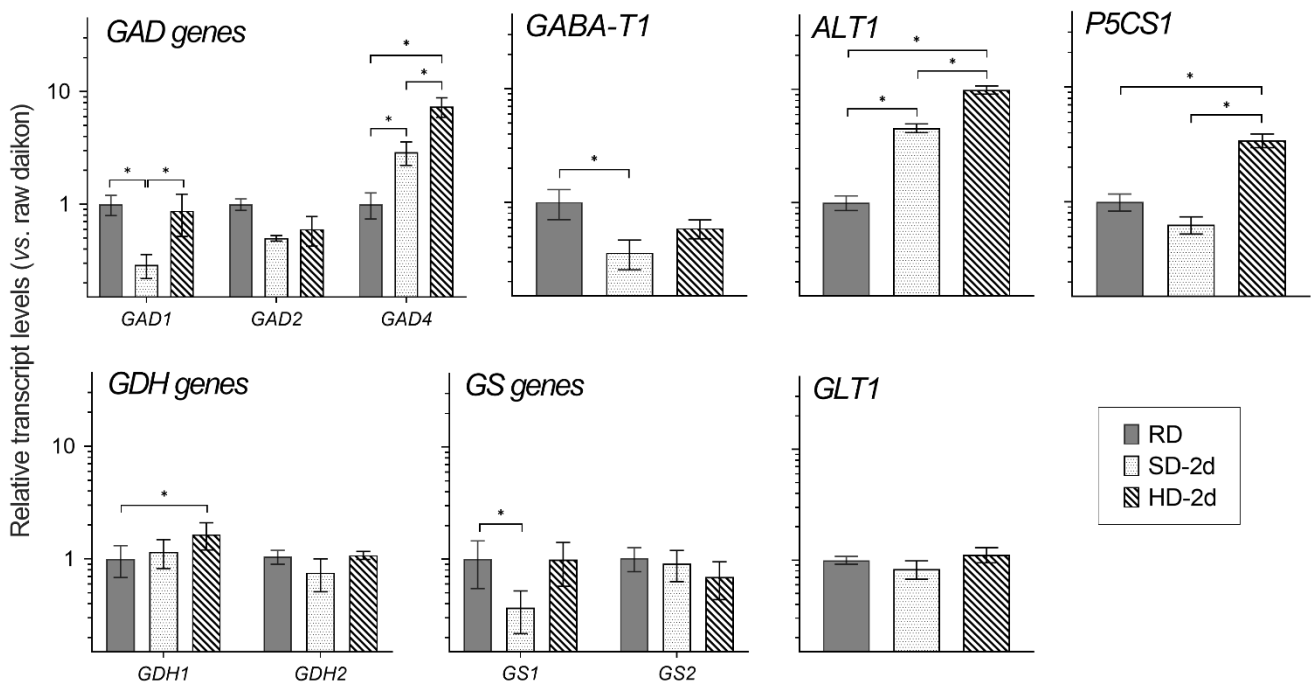
**Fig. 2–3 Changes in free amino acids during *takuan-zuke* processing.**

a) *Shio-oshi* samples. b) *Hoshi* samples. The x-axis denotes processing time; the y-axis denotes concentration per grams dry weight ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  DW; mean  $\pm$  standard deviation). Data are means  $\pm$  standard deviation of triplicate samples. Error bars shorter than the size of the symbol are not drawn.



**Fig. 2-4 Temporal changes in enzyme activity during daikon dehydration.**

The x-axis denotes processing time; the y-axis denotes enzyme activity per grams dry weight (U g<sup>-1</sup> DW; mean ± standard deviation). Data are presented as means ± standard deviation of triplicate samples (\**p* < 0.05 as determined by the Tukey-Kramer method). Error bars shorter than the size of the symbol are not drawn. DW, dry weight; GAD, glutamic acid decarboxylase; GABA-T, GABA transaminase; ALT, alanine transaminase; P5CS,  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase; NADH-GDH, NADH-glutamic acid dehydrogenase; NAD<sup>+</sup>-GDH, NAD<sup>+</sup>-glutamic acid dehydrogenase; GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamic acid synthase.



**Fig. 2–5 Transcriptional modulation of target genes after 2 d dehydration of *shio-oshi* and *hoshi*.**

The legend denotes a processing step (RD, raw daikon; SD-2d, after 2 days *shio-oshi* drying; HD-2d, after 2 days *hoshi* drying). Data are presented as means  $\pm$  standard deviation (\* $p < 0.05$  as determined by the Tukey-Kramer method;  $n = 4-6$ ).

#### 2.4. 要約

たくあん漬は、原料となるダイコンを「塩押し」または「日干し」による脱水処理をした後、塩蔵熟成することで製造される。先行研究では、上述した脱水処理工程において、ダイコン中にアラニン、プロリンおよび GABA などの遊離アミノ酸が経時的に蓄積し、これらの前駆体であるグルタミン酸が減少すること、脱水処理方法によってアミノ酸動態が異なることが明らかとなっているが、その代謝機構については不明な点が多い。そこで、本研究では、脱水処理工程におけるダイコンの遊離アミノ酸、酵素活性および遺伝子発現を定量的に解析した。

研究の結果、ダイコン中のアラニン、プロリン、GABA およびグルタミン酸代謝に関連する各酵素活性は、脱水処理工程において保持されていた。さらに、アラニン、プロリンおよび GABA 合成酵素をコードする遺伝子発現が、脱水処理によって、特に日干し処理において有意に増加することが明らかとなった。

以上のように、本章では、たくあん漬の脱水処理工程が、ダイコンのグルタミン酸代謝に及ぼす影響について、遺伝子発現レベルで明らかにできた。これは、脱水処理工程がダイコンのストレス反応を誘発し、たくあん漬中の機能性成分の増加に寄与していることを示唆している。また、その影響は塩押し処理と比較して日干し処理で顕著であり、得られた結果はこれまでにない知見である。しかしながら、脱水処理工程におけるダイコンのストレス反応と、様々な生育環境下におけるモデル植物のストレス反応とでは、誘導される分子機構が異なることが示唆され、その詳細については検討の余地がある。

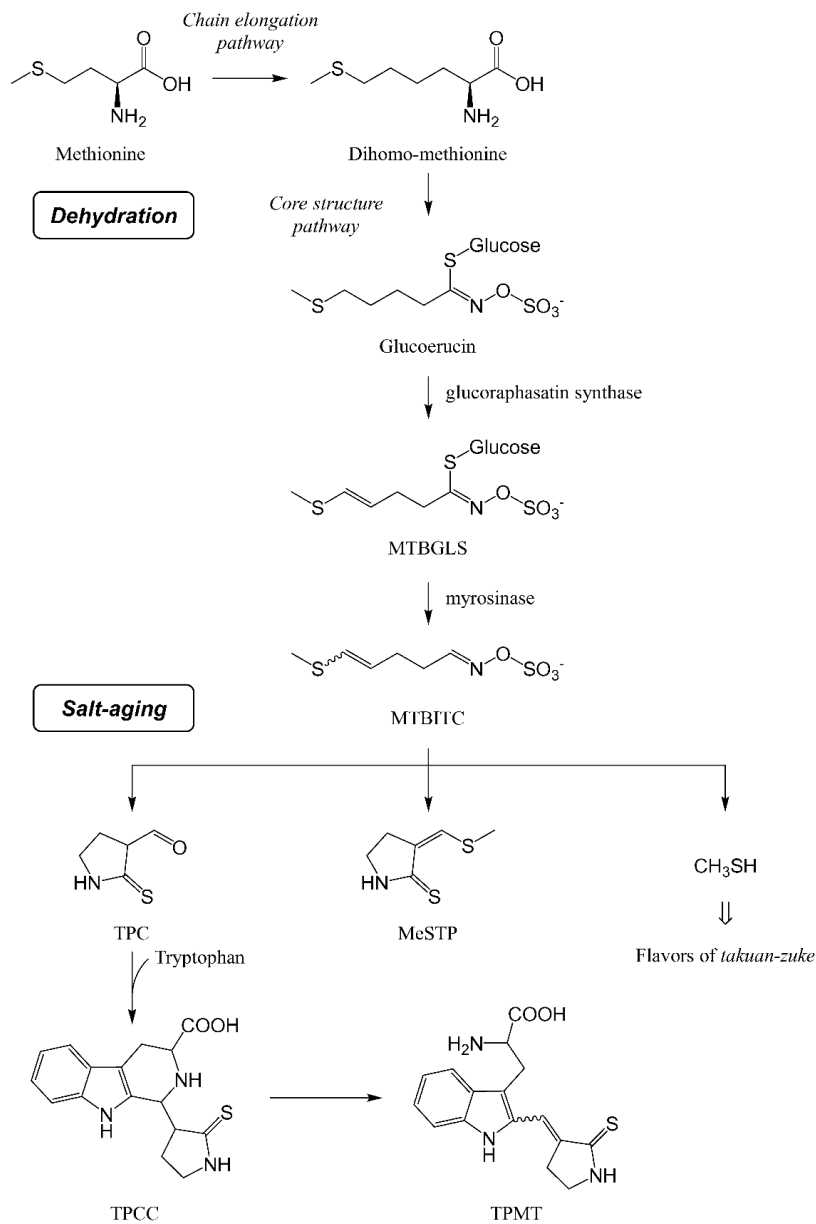
### 第三章

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

### 3.1. はじめに

アブラナ科野菜特有の成分であるグルコシノレート (GLS) 類は現在 130 種以上が同定されており、前駆体アミノ酸の種類によって、脂肪族 GLS (アラニン, イソロイシン, ロイシン, バリンおよびメチオニン由来), 芳香族 GLS (チロシンおよびフェニルアラニン由来) およびインドール GLS (トリプトファン由来) に分類される<sup>25)</sup>。ダイコンの主要な GLS である MTBGLS は脂肪族 GLS に分類され, たくあん漬の黄変化反応および健康機能性に寄与する重要な成分である (Fig. 3-1)。他方, GLS の生合成における反応ステップの一部は, BCAA の生合成経路と一致しており, 相互に関連していることが示唆されている<sup>26)</sup>。植物生理学分野では, 植物の成長条件と環境ストレスが BCAA および GLS の含有量に大きな影響を与えることが知られている<sup>68, 69)</sup>。特に, 塩および浸透圧ストレスに曝されたアブラナ科植物では, BCAA および GLS 濃度が増加することが報告されている<sup>70-72)</sup>。これらの BCAA, GLS および ITC を積極的に摂取することによる, 抗肥満効果, 2 型糖尿病のリスク改善作用などが, 動物実験によって明らかとなっている<sup>29, 73-75)</sup>。

先行研究では, たくあん漬の脱水処理工程において, 機能性成分である BCAA が蓄積することが報告されている<sup>44)</sup>。また, GLS 代謝酵素であるミロシナーゼは, NaCl およびのアスコルビン酸 (AsA) によって濃度依存的に活性化することが明らかとなっている<sup>76)</sup>。第一章の結果から, 脱水処理によりダイコンのストレス反応が誘導され, GABA, アラニンおよびプロリンが蓄積すること, それを促進する酵素作用および遺伝子発現について検討し, 塩押し処理と比較して日干し処理で顕著であること, GS/GOGAT サイクルがグルタミン酸動態に寄与すること, 遺伝子発現レベルで変動がみられることを明らかにした<sup>77)</sup>。そのメカニズムについて十分な説明には至っていない。次いで本章では, たくあん漬の脱水処理工程がダイコンの BCAA および GLS 代謝に及ぼすメカニズムを明らかにするために, 二次代謝産物, 酵素活性および遺伝子発現の包括的解析を行った。



**Fig. 3–1 Glucosinolate and isothiocyanate metabolic pathways of daikon.**

MTBGLS: 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate; MTBITC: 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate; TPC: 2-thioxo-3-pyrrolydinecarbaldehyde; MeSTP: 3-methylthiomethylene-2-thioxopyrrolidine; TPCC: 1-(2-thioxopyrrolidine-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid; TPMT: 2-[3-(2-Thioxopyrrolidin-3-ylidene)methyl]-tryptophan.

### 3.2. 試料および方法

#### 3.2-1. たくあん漬の調製

ダイコンおよびたくあん漬試料は、第二章 2.2-1 で調製したものを使用した。

#### 3.2-2. 水分量, NaCl 濃度および pH の測定

水分量, NaCl 濃度および pH の測定は、第二章 2.2-2 と同様に行った。

#### 3.2-3. グルコシノレート (GLS) の分析

GLS の分析は、Wathelet ら<sup>78)</sup>の方法に従って行った。乾燥粉末試料 50 mg を秤量し、75°C で 1 分間加熱した。75°C で 1 分間予備加熱した 80 % (v/v) メタノール 0.75 mL および内部標準溶液 (5 mM シニグリン) 0.1 mL を加え、75°C で 10 分間加熱した。試料混合液を氷冷後、1,450 × g で 5 分間遠心分離を行い、上清を回収した。残渣は 80 % (v/v) メタノールによる熱抽出を 2 回繰り返し、回収した上清を約 2.5 mL に調整したものを粗抽出液とした。カラムに 1 g の陰イオン交換樹脂 (DEAE Sephadex A-25; GE Healthcare) を充填し、下記の順序で通液した: 水 1 mL × 2, 粗抽出液 1 mL, 水 1 mL × 2, 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) × 2。カラムにエンドキャップをした後、スルファターゼ溶液 75 μL を加え、25°C で一晩反応させた。その後、水 0.5 mL によって回収し、HPLC による定量解析を行った。

HPLC 装置は Agilent 1100-1200 シリーズ (Agilent Technologies) を使用し、下記の条件で分析を行った: 分離カラム: Poroshell 120 EC-C18 (φ3.0 × 50 mm, 2.7 μm, Agilent Technologies); カラム温度: 35°C; 流速: 0.85 mL min<sup>-1</sup>; グラジエントプログラム: 0.2 %B (0.00–0.25 min), 0.2 - 19.8 %B (0.25–6.00 min), 19.8 %B (6.00–7.00 min); 溶離液 A: 50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0); 溶離液 B: メタノール。

#### 3.2-4. アスコルビン酸 (AsA) の分析

AsA の分析は Lykkesfeldt ら<sup>79)</sup>の方法に従って行った。乾燥粉末試料 50 mg に内部標準溶液



(1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ハイドロキノン (in 5% メタリン酸)) 5 mL を加えた。5 分間の超音波処理後、1,450  $\times g$  で 5 分間の遠心分離を行った。上清をディスクフィルター (Nylon, 13 mm, 0.2  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies) でろ過し、AsA 抽出液を得た。AsA 抽出液 500  $\mu\text{L}$  に 10 mM DTT (in 0.5 M トリス-塩酸緩衝液, pH 9.0) 250  $\mu\text{L}$  を加え、25°C で 5 分間反応させた。反応後、0.2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  500  $\mu\text{L}$  を加え反応停止した。反応混合物の AsA 濃度は、電気化学検出-HPLC 法により定量した。

HPLC 装置は HITACHI L-2000 シリーズ (HITACHI High-Technologies) を使用し、下記の条件で分析を行った：分離カラム：Inertsil<sup>®</sup> ODS-4 ( $\phi 3.0 \times 150$  mm, 3.0  $\mu\text{m}$ , GL Sciences)；カラム温度：35°C；流速：0.22  $\text{mL min}^{-1}$ ；15%B (アイソクラティック)；溶離液 A：50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0)；溶離液 B：メタノール。電気化学検出器は DECADE II (Antec Scientific) を使用し、下記の検出条件で行った：フローセル：glassy carbon-Hyref；検出電圧：+0.38 v。

### 3.2-5. 遊離アミノ酸の分析

遊離アミノ酸の分析は、第二章 2.2-3 と同様に行った。

### 3.2-6. ミロシナーゼ活性試験

ミロシナーゼ活性試験は、Hara ら<sup>80)</sup>の方法を一部改変して行った。乾燥粉末試料 250 mg に 5 mM DTT 5 mL を加え、4°C で 15 時間の振とう抽出を行った。抽出液を 4°C, 1,450  $\times g$  で 30 分間遠心分離後、上清をセライトろ過した。ろ液 500  $\mu\text{L}$  を限外ろ過 (Amicon<sup>®</sup> Ultra-0.5, 30 k, Merck Millipore) し、残渣を回収した。残渣を 5 mM DTT 250  $\mu\text{L}$  に懸濁し、ミロシナーゼ抽出液とした。

ミロシナーゼ反応緩衝液 (120 mM リン酸カリウム (pH 6.6), 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  シニグリンおよびミロシナーゼ抽出液 30  $\mu\text{L}$  を含む) 100  $\mu\text{L}$  中で、37°C, 30 分間インキュベートを行った。沸騰水中で 10 分間加熱し、反応を停止した。0.5 M 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン 100  $\mu\text{L}$  および 1 M 水酸化ナトリウム 10  $\mu\text{L}$  を加え、70°C で 15 分間インキュベートした。5 分間

の氷冷後、1 M 塩酸 10  $\mu$ L およびクロロホルム 200  $\mu$ L を加えた。4°C, 20,630  $\times g$  で3 分間遠心分離し、上清中のグルコースを HPLC で定量した。試料中のグルコース濃度は、10  $\mu$ M ~1.0 mM グルコースを用いた5 点検量線法によって求めた。ミロシナーゼ活性 (U) は、37°C, pH 6.6 における1 分間あたりのグルコース生成量 ( $\mu$ mol  $\text{min}^{-1}$ ) を1 unit として求めた。

HPLC 装置は Agilent 1100-1200 シリーズ (Agilent Technologies) を使用し、下記の条件で分析を行った：分離カラム：Poroshell EC-C18 ( $\phi$ 3.0  $\times$  150 mm, 2.7  $\mu$ m, Agilent Technologies)；カラム温度：40°C；流速：0.85 mL  $\text{min}^{-1}$ ；グラジエントプログラム：21.3 %B (0.00 - 3.50 min), 21.3 – 75.0 %B (3.50 - 4.50 min), 70.0 %B (4.50 - 7.00 min)；ポストタイム：1.5 min；検出波長：245 nm；溶離液 A：20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)；溶離液 B：アセトニトリル。

### 3. 2-7. 遺伝子発現解析

Total RNA の抽出は、第二章 2. 2-5 と同様に行った。qRT-PCR は iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) を用いてメーカープロトコルに従い、相対定量法による解析を行った。qRT-PCR に使用したプライマーを Table 3-1 に示した。リファレンス遺伝子として  $\beta$ -アクチン遺伝子 (*ACTIN2/7*) を使用した。qRT-PCR は以下の条件で行った：myb domain protein 29 (*MYB29*), *BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 2 (BCAT2)*, *BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 3 (BCAT3)* および *GLUCORAPHASATIN SYNTHASE 1 (GRS1)*：95°C–5 秒間, 58°C–30 秒間, 40 サイクル；*BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 4 (BCAT4)*, *ISOPROPYLMALATE DEHYDROGENASE 1 (IPMDH1)*, *METHYLTHIOALKYLMALATE SYNTHASE 3 (MAM3)* および *RADISH MYROSINASE B TYPE 2 (RMB2)*：95°C–5 秒間, 60°C–30 秒間, 40 サイクル；myb domain protein 28 (*MYB28*) および *RADISH MYROSINASE B TYPE 1 (RMB1)*：95°C–5 秒間, 62°C–30 秒間, 40 サイクル。qRT-PCR は、CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) を用いて実施した。

### 3. 2-8. 統計解析

統計解析は第二章 2. 2-6 と同様に, GraphPad Prism version 8 for Mac (Graphpad Software) を用いて行った。

**Table 3–1** Primer sequences and amplicon size for the reference genes. Amplification was carried out as described in Experimental procedures.

Name	Forward Primer Sequence [5'-3']	Reverse Primer Sequence [5'-3']	Amplicon Size (bp)
<i>ACTIN2/7</i>	GGCATCACACTTTCTACAACG	CTGAATGGCAACATACATGGC	155
<i>MYB28</i>	CATCATGCTTCATGCTTCTCG	GGCTTGTGAGTCACGGGATC	150
<i>MYB29</i>	GTTTCTCGCAGTTTATCGAGC	CGGATCATATGAAGTTCTTGTC	228
<i>BCAT2</i>	TCGGACAATCTCAACTCCTG	CTGCCTTCTCTACTACCTGAT	110
<i>BCAT3</i>	GGTGGTACCGGAGGTGTT	GCAAGACGAGACCTCCTC	144
<i>BCAT4</i>	AACGCTCTCCGCCTTCAGTC	CCGAGGGACAAGGCATACA	55
<i>IPMDH1</i>	GGAAAATGCAGATCTCTCAACGA	TGCGGCGCACCTTACTCTAC	60
<i>MAM3</i>	CTCAAACCCGTCGTGAAAAG	GTTCTTGTGCGGAAGCTTGTC	50
<i>GRS1</i>	TCACCATTCTAGGTTACACCA	TCAAACACAGTTCGAGAGAAGAAG	150
<i>RMB1</i>	AAGAAGCCGCACTCGTTGCC	TTTACGCCAGCGTCATCCTG	129
<i>RMB2</i>	GGGTGTCAACGTGAGAGGAT	CTTGAGCGGAGGAAATCTTG	204

### 3.3. 結果および考察

各脱水処理工程におけるダイコンの平均重量, 歩留まり, 水分量, NaCl 濃度および pH の値を Table 3-2 に示した (第二章, Table 2-6 再掲)。新鮮, 塩押しおよび日干しダイコンにおける遊離アミノ酸, グルコシノレートおよびアスコルビン酸の定量結果を, Table 3-3 に示した (第二章, Table 2-5 一部再掲)。

#### 3.3-1. 塩押しダイコンにおける遊離アミノ酸, グルコシノレートおよびアスコルビン酸の定量結果

塩押し処理中の BCAA および MTBGLS 前駆体アミノ酸 (グルタミン酸, アスパラギン酸, アラニン, セリンおよびメチオニン), MTBGLS および AsA の変化について, Fig. 3-2 に示した。Table 3-3 に示すように, 塩押し処理中の総遊離アミノ酸濃度は, 新鮮ダイコンと比較して, SD-2d: 83.1 %, SD-7d: 126.7 %, SD-14d: 102.5 %であった。BCAA 濃度は, 新鮮ダイコンと比較して, 塩押し処理 7 日後に 1.4 倍に増大した。MTBGLS 濃度は, 新鮮ダイコンと比較して SD-2d: 66.1 %, SD-7d: 113.3 %, SD-14d: 56.9 %であった。新鮮ダイコン中の AsA 濃度は,  $11.1 \pm 0.8 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$  であり, 塩押し処理 2 日後に 62.2 %まで低下したが, その後有意な変化は見られなかった。BCAA および MTBGLS の前駆体アミノ酸 (グルタミン酸, アスパラギン酸, アラニン, セリンおよびメチオニン) の変動は以下の通りであった: グルタミン酸およびアスパラギン酸濃度は, 塩押し処理 2 日後に, それぞれ 12.4 %および 17.8 %まで急激に低下し, その後顕著な変化は観察されなかった。アラニン濃度は, 新鮮ダイコンと比較して, 塩押し処理 7 日後に 2.5 倍に増大したが, その後有意に減少した ( $p < 0.001$ )。セリン濃度は, 塩押し処理 2 日後に有意に減少したが ( $p < 0.001$ ), その後顕著な変化は観察されなかった。新鮮ダイコン中のメチオニン濃度は,  $0.1 \pm 0.1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$  であり, 塩押し処理中に有意な変化は観察されなかった。

本研究で分析した二次代謝産物は, 塩押し処理 7 日後に増加し, その後減少する傾向を示した。これは, 塩押し処理中に原料であるダイコンの二次代謝, とくにアミノ酸代謝が持続

していること、脱水処理によって遊離アミノ酸、アスコルビン酸およびグルコシノレートが水分（上がり水）とともに溶出したことを示唆している。AsA はヒトが体内で合成することのできない必須ビタミンに分類され、野菜や果物はその主要な供給源である<sup>81)</sup>。しかしながら、AsA は水溶性であり、易酸化性であるため、調理および貯蔵工程における損失が大きい<sup>82)</sup>。したがって、ダイコンの塩押し処理中に溶出した AsA は、酸素と接触しやすくなったため、速やかに酸化分解されたことが示唆された。

### 3.3-2. 塩押しダイコンにおけるミロシナーゼ活性の変化

新鮮ダイコンおよび2つの脱水処理中のミロシナーゼ活性の変化を Fig. 3-3 に示した。ミロシナーゼ活性は、新鮮ダイコンで  $0.96 \pm 0.07 \text{ U g}^{-1} \text{ DW}$  であり、塩押し処理2日後に 28.5% まで低下したものの、その後有意な変化は見られなかった。ミロシナーゼは GLS を ITC に代謝することでダイコンの辛味発現に寄与する酵素である<sup>25)</sup>。さらに、ミロシナーゼの活性は AsA および NaCl 濃度により影響され、カブおよびハクサイの浅漬けでは、0.01~0.1% AsA, 0.1~1.0% NaCl の範囲で濃度依存的にミロシナーゼ活性が増大するが、1.0% AsA および 10.0% NaCl 条件下ではミロシナーゼ活性が抑制されることが報告されている<sup>76)</sup>。本研究では、塩押し処理中の湿潤質量あたりの AsA 濃度は SD-2d:  $15.8 \pm 0.6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ , SD-7d:  $12.4 \pm 0.6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  および SD-14d:  $11.6 \pm 0.6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  であり、0.01% (w/w, 10.0 mg 100 g<sup>-1</sup>) 以上保持されていたことが明らかとなった。さらに、塩押し処理中のダイコンのミロシナーゼ活性は、完全に失活することなく、低い値で保持されていた。これは、塩押し処理によってダイコン中の NaCl 濃度が急激に上がり (Table 3-2), ミロシナーゼ活性が低下したものの、AsA 濃度が湿潤質量あたり 0.01% 以上であったため賦活作用が働き、ミロシナーゼが完全には失活しなかったと示唆された (Table 3-3)。

### 3.3-3. 塩押しダイコンにおける遺伝子発現の変化

脱水処理工程における二次代謝物動態について、分子レベルから把握するために qRT-PCR

による遺伝子発現解析を行い、その結果を Fig. 3-4 に示した。2つの脱水処理 7~14 日後の試料は、mRNA が断片化していたため、qRT-PCR の解析に使用しなかった。

*MYB28* および *MYB29* は、MTBGLS などのメチオニン由来 GLS の正の調節因子として同定されているが<sup>83,84)</sup>、本研究では塩押し処理 2 日後に減少傾向を示した。この結果は、塩押し処理 2 日後における MTBGLS の減少に対応する。BCAA 合成および MTBGLS 合成の初期（メチオニン鎖延長反応）を担う *BCAT2*、*BCAT3* の発現は、塩押し処理 2 日後に低下傾向を示した。また *BCAT4* の発現は、有意差は得られなかったものの、塩押し処理 2 日後に増大傾向を示した。*BCAT* 遺伝子と同様に、メチオニン鎖延長反応を行う *MAM3* および *IPMDHI*、ミロシナーゼ遺伝子である *RMB1* および *RMB2*、MTBGLS 合成酵素である *GRS1* の発現は、塩押し処理 2 日後に低下傾向を示した。

MTBGLS 濃度は塩押し処理 7 日後に増大しているが (Fig. 3-2)、これはミロシナーゼ遺伝子 (*RMB1* および *RMB2*) の減少によりミロシナーゼ活性が低下 (Fig. 3-3)、MTBGLS が MTBITC へと代謝されなかったため、一時的に蓄積したものと考えられる。ブロッコリーやラディッシュスプラウトなどのアブラナ科野菜では、塩ストレスによる GLS 類の蓄積が報告されている<sup>70,71,85)</sup>。しかしながら、スプラウトのような植物の成長過程と比較して、ダイコンのたくあん漬加工過程における塩ストレスでは影響が異なるものと考えられる。すなわち、塩押し処理ではその工程において細胞膜の損傷および成分の流出が懸念され、遺伝子発現レベルも低下していることから、BCAA は維持されているものの、ミロシナーゼ活性が低下したため MTBGLS が一時的に増加したと示唆された。

### 3.3-4. 日干しダイコンにおける遊離アミノ酸、グルコシノレートおよびアスコルビン酸の定量結果

次に日干し処理中のダイコンの遊離アミノ酸、アスコルビン酸およびグルコシノレートの定量結果を述べる。Table 3-2 に示すように、日干し処理中の総遊離アミノ酸濃度は、新鮮ダイコンと比較して、HD-2d: 111.2 %, HD-7d: 157.0 %, HD-14d: 141.7 %であった。BCAA

濃度は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理 7 日後に 2.6 倍に増大した。MTBGLS 濃度は、新鮮ダイコンと比較して HD-2d: 68.6 %, HD-7d: 72.2 %, HD-14d: 84.4 %であり、日干し処理 2 日後で低下したが、2 日後から 14 日後に経時的に増加した ( $p < 0.001$ )。AsA 濃度は、新鮮ダイコンと比較して、HD-2d: 104.5 %, HD-7d: 55.9 %, HD-14d: 61.3 %であり、日干し処理 2 日後まで同等の AsA が保持されていた。アスパラギン酸濃度は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理 2 日後に 45.4 %まで急激に低下した。しかし、グルタミン酸濃度は、塩押し処理と比較して保持されていた: HD-2d: 67.0 %; HD-7d: 39.6 %; HD-14d: 11.6 %; vs. RD (新鮮ダイコン)。アラニン濃度は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理 7 日後に 3.1 倍、日干し処理 14 日後に 3.2 倍に増加した ( $p < 0.001$ )。セリン濃度は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理 7 日後で 2.4 倍に増加し、その後有意に減少した ( $p < 0.001$ )。メチオニン濃度は、日干し処理中に有意な変化は観察されなかった。

遊離アミノ酸の中でも、BCAA はヒトが合成できない必須アミノに分類され、野菜類はその重要な供給源の一つである。血中および組織中の BCAA 濃度が上昇することにより耐糖能の上昇およびタンパク質分解抑制などの生理機能を示す<sup>86,87)</sup>。さらに、BCAA、GLS および ITC を積極的に摂取することで、2 型糖尿病のリスクを改善することが報告されている<sup>73-75)</sup>。最近の動物実験では、ダイコン由来の MTBITC を摂取することで抗肥満効果が示されている<sup>29)</sup>。

本研究の結果は、日干し処理 14 日後の総遊離アミノ酸および BCAA 濃度は、塩押し処理 14 日後と比較して顕著に高く、我々の以前の研究を裏付けるものである<sup>44)</sup>。さらに、ダイコン中の MTBGLS 濃度は、日干し処理によって緩やかに増加することが明らかとなった。すなわち、天日に曝されたダイコンが徐々に乾燥し、グルコシノレートの前駆体アミノ酸 (Glu, Ala, Ser および Asp など) の代謝が活性化し、そして塩押し処理のように浸出液 (上がり水) への成分の流出がないため、BCAA および MTBGLS が誘導されたと示唆された。

### 3.3-5. 日干しダイコンにおけるミロシナーゼ活性の変化



Fig. 3-3 に示すように、日干し処理中のダイコンのミロシナーゼ活性は、新鮮ダイコンと比較して、HD-2d: 79.4%, HD-7d: 66.9%, HD-14d: 32.8%であった。すなわち、日干し処理中のミロシナーゼ活性が、塩押し処理と比較して、長い期間保持されていたことを示す。したがって、日干し処理中の AsA 濃度が脱水開始 2 日後まで新鮮ダイコンと同等であったこと (Fig. 3-2)、湿潤質量あたりの AsA 濃度 (HD-2d:  $19.3 \pm 0.7 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ ; HD-7d:  $14.0 \pm 0.6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ ; HD-14d:  $24.1 \pm 0.2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ ) が塩押し処理と比較して高いレベルで保持されていたことが、日干し処理におけるミロシナーゼ活性の保持に寄与していると示唆された。

### 3. 3-6. 日干しダイコンにおける遺伝子発現解析

Fig. 3-4 に示すように、メチオニン鎖延長に関連する *BCAT2* および *BCAT3* の発現は、新鮮ダイコンと比較して、日干し処理 2 日後に有意な変化は観察されなかった。一方で、*BCAT4*, *MAM3* および *IPMDHI* の発現は、日干し処理 2 日後において有意に増大した ( $p < 0.001$ , vs. 新鮮ダイコン)。このことは、Fig. 3-2 の経路においてメチオニンおよびグルタミン酸から BCAA の合成系が促進され、BCAA が蓄積することを説明できる。MTBGLS 合成酵素である *GRS1* の発現は、日干し処理 2 日後において有意に増大した ( $p < 0.001$ , vs. 新鮮ダイコン)。また、MTBGLS の合成系は塩押し処理と比較して日干し処理で促進されることを示唆するが、MTBGLS の量的な増加は認められなかった。このことは、日干し処理による脱水ストレスによって、MTBGLS など脂肪族 GLS の調節因子である *MYB* 遺伝子の発現は低下するものの、メチオニン鎖延長酵素 (*BCAT4*, *MAM3* および *IPMDHI*)、MTBGLS 合成酵素 (*GRS1*) およびミロシナーゼ遺伝子 (*RMB1* および *RMB2*) の発現が増大したことで、MTBGLS 濃度は収支として、新鮮ダイコンの 6 割以上を保持しているものと示唆された。

### 3. 3-7. 脱水処理工程におけるダイコンの分岐鎖アミノ酸およびグルコシノレート代謝

本研究で明らかとなった、脱水処理によるダイコンの分岐鎖アミノ酸およびグルコシノ

レート代の代謝機構を Fig. 3-5 に示した。様々な植物種において、浸透圧ストレスの曝露によって BCAA が蓄積すること、BCAT 遺伝子の誘導によって BCAA 合成が活性化することが報告されている<sup>72, 88-90)</sup>。本研究では、MYB 遺伝子の発現は各脱水処理 2 日後に低下したが、BCAA および GLS 合成酵素遺伝子、ミロシナーゼ遺伝子の発現は、日干し処理で増大することが明らかとなった (Fig. 3-4)。したがって、日干しのような脱水処理によって、ダイコンの BCAA および MTBGLS 合成を誘発すること、グルコシノレート-ミロシナーゼシステムを活性化することが示唆された。

**Table 3–2** Weight, mass yield, moisture content, salt content, and pH of raw daikon and *takuan-zuke* (reposted Table 2–6).

	Raw	Salt-pressing ( <i>shio-oshi</i> )			Sun-drying ( <i>hoshi</i> )		
		SD-2d	SD-7d	SD-14d	HD-2d	HD-7d	HD-14d
Weight (kg/radish)	1.67 <sup>a</sup>	1.30 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>	0.97 <sup>b</sup>	1.36 <sup>a</sup>	0.87 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>
Mass yield (%) <sup>c</sup>	100.0	77.8	67.1	58.1	81.4	52.1	34.1
Moisture (%) <sup>d</sup>	93.5 ± 0.1	90.6 ± 0.1	80.8 ± 0.0	83.1 ± 0.5	90.6 ± 0.0	87.2 ± 0.2	79.8 ± 0.6
NaCl (%) <sup>e</sup>	–	6.0 ± 0.3	9.1 ± 0.4	9.6 ± 0.1	–	–	–
pH <sup>e</sup>	6.3 ± 0.0	6.7 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.4 ± 0.0	6.4 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0

Weight indicates total weight of radishes divided by the number of radishes.

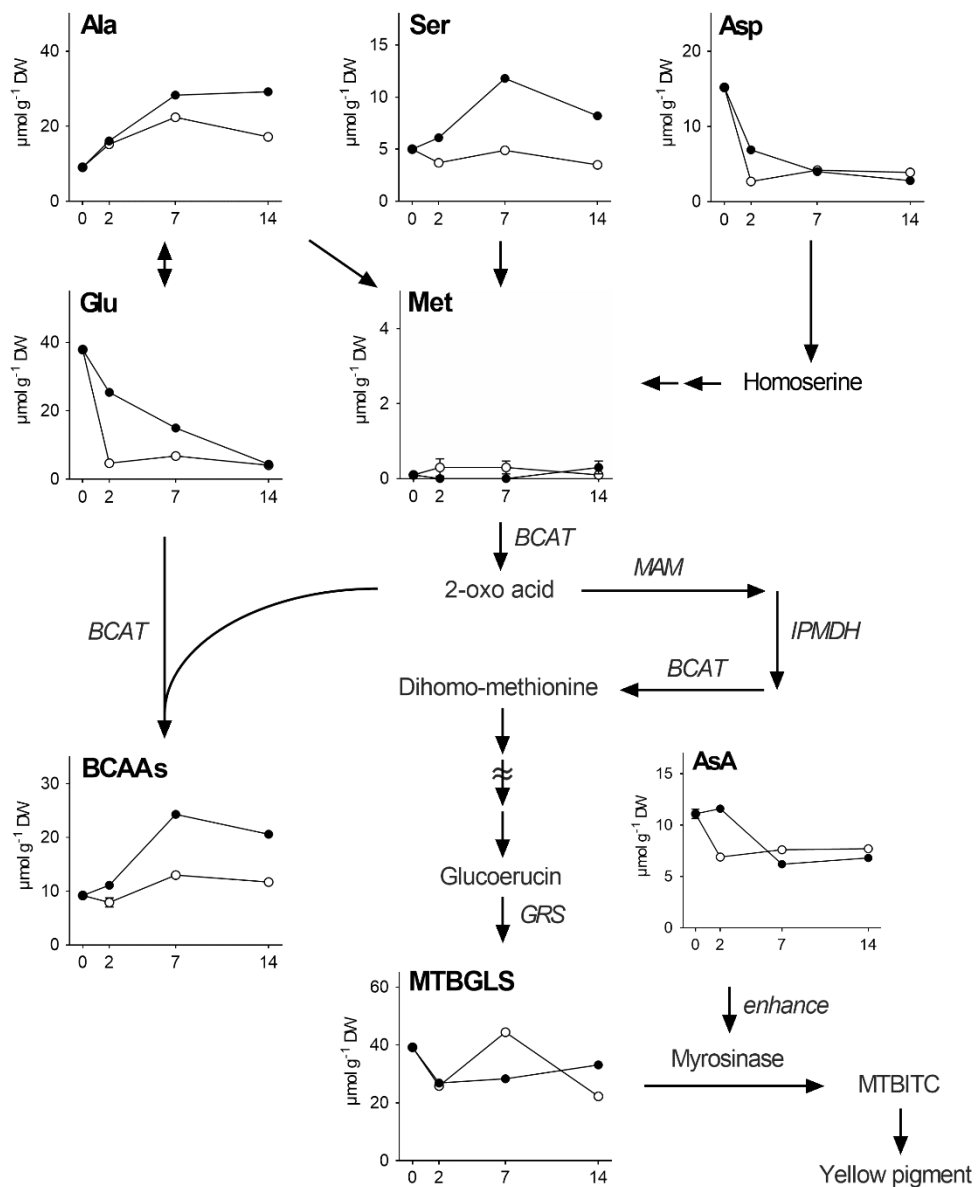
<sup>a</sup> Raw, HD-2d, HD-7d, and HD-14d are expressed as mean weights of radish including leaves. <sup>b</sup> SD-2d, SD-7d and SD-14d are expressed as mean weights of radish excluding radish base and tip cut by 3–5 cm. <sup>c</sup> Mass yield rate are expressed as a value relative to the weight of raw daikon. <sup>d</sup> Moisture content volatilized by lyophilizing is expressed as means ± standard deviation in duplicate. <sup>e</sup> NaCl concentration and pH are presented as means ± standard deviation in triplicate.

**Table 3-3** Free amino acids, ascorbic acid, 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate of raw daikon and during dehydration for *takuan-zuke* preparation (reposted the free amino acid analysis in Table 2-5). The unit was shown  $\mu\text{mol g}^{-1}$  DW without NaCl.

		Salt-pressing ( <i>shio-oshi</i> )			Sun-drying ( <i>hoshi</i> )			
		Raw	SD-2d	SD-7d	SD-14d	HD-2d	HD-7d	HD-14d
Free amino acids	Asp	15.2 ± 0.5	2.7 ± 0.2	4.2 ± 0.3	3.9 ± 0.1	6.9 ± 0.4	4.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1
	Glu	37.9 ± 1.1	4.7 ± 0.2	6.8 ± 0.3	4.1 ± 0.2	25.4 ± 0.3	15.0 ± 0.3	4.4 ± 0.2
	Asn	3.8 ± 0.1	3.1 ± 0.2	5.0 ± 0.2	3.9 ± 0.1	5.3 ± 0.2	7.0 ± 0.1	6.4 ± 0.1
	Ser	5.0 ± 0.2	3.7 ± 0.3	4.9 ± 0.2	3.5 ± 0.2	6.1 ± 0.4	11.8 ± 0.3	8.2 ± 0.2
	Gln	97.5 ± 1.4	63.3 ± 0.6	105.3 ± 1.9	83.6 ± 0.6	104.4 ± 1.2	134.5 ± 3.0	79.2 ± 0.9
	His	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.6	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.6 ± 0.0	2.4 ± 0.1
	Gly	5.0 ± 0.3	3.2 ± 0.5	5.8 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.9 ± 0.5	4.0 ± 0.2	4.2 ± 0.2
	Thr	4.0 ± 0.0	3.3 ± 0.4	4.3 ± 0.3	3.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1	8.2 ± 0.1	7.1 ± 0.2
	Arg	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.2	4.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1	5.6 ± 0.1
	Ala	9.1 ± 0.2	15.2 ± 0.4	22.4 ± 0.3	17.2 ± 0.2	16.1 ± 0.7	28.3 ± 0.9	29.2 ± 0.4
	GABA	5.6 ± 0.6	39.9 ± 0.6	54.7 ± 0.4	53.2 ± 0.5	27.9 ± 0.4	60.6 ± 1.3	102.7 ± 0.6
	Tyr	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.9 ± 0.0	1.1 ± 0.3
	Val	6.0 ± 0.1	4.3 ± 0.5	7.9 ± 0.4	6.7 ± 0.1	6.8 ± 0.1	13.8 ± 0.2	11.2 ± 0.4
	Met	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.3
	Trp	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.3
	Phe	0.5 ± 0.0	1.2 ± 0.5	1.4 ± 0.5	1.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.3
	Ile	2.7 ± 0.0	2.5 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.5 ± 0.0	3.4 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.4 ± 0.3
	Leu	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.5	1.3 ± 0.5	1.5 ± 0.0	0.9 ± 0.0	3.4 ± 0.1	3.0 ± 0.3
	Lys	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Hyp	0.0 ± 0.0	2.2 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.7
Pro	13.9 ± 0.3	18.9 ± 0.9	32.4 ± 1.2	20.7 ± 0.4	24.0 ± 1.6	58.4 ± 3.3	66.9 ± 0.6	
BCAA <sup>a</sup>		9.2 ± 0.2	7.9 ± 1.5	13.0 ± 1.3	11.7 ± 0.2	11.1 ± 0.3	24.3 ± 0.4	20.6 ± 1.0
Total free amino acid		210.3 ± 5.3	174.7 ± 9.4	266.5 ± 8.6	215.5 ± 3.1	242.3 ± 6.5	366.6 ± 10.3	345.5 ± 6.6
AsA		11.1 ± 0.8	6.9 ± 0.3	7.6 ± 0.4	7.7 ± 0.4	11.6 ± 0.4	6.2 ± 0.3	6.8 ± 0.1
MTBGLS		39.2 ± 1.7	25.9 ± 0.8	44.4 ± 0.4	22.3 ± 0.5	26.9 ± 0.9	28.3 ± 0.9	33.1 ± 0.5

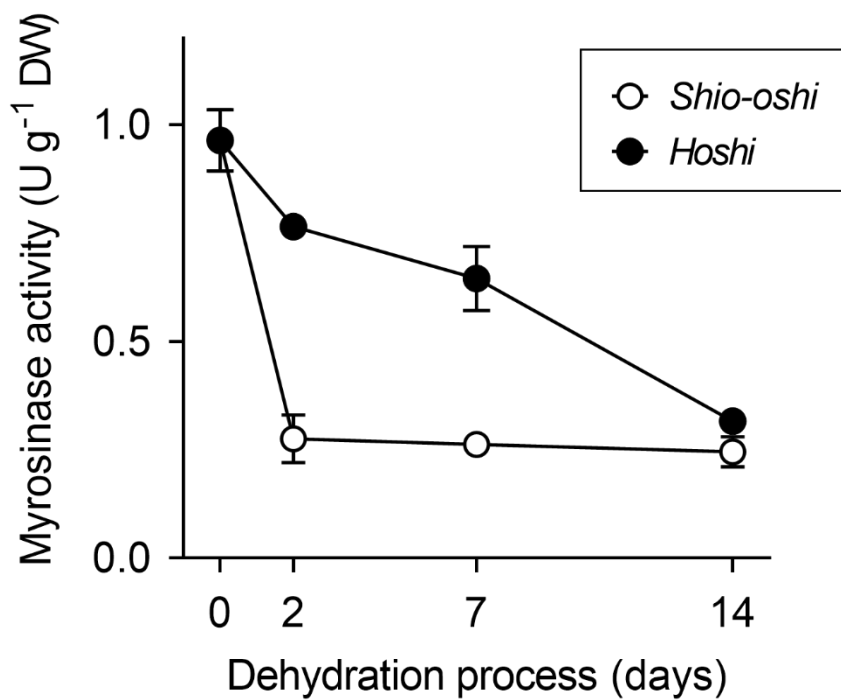
Amino acid were presented as the mean ± standard deviation in triplicate analysis.

<sup>a</sup> BCAA was expressed as the mean ± standard deviation of valine, leucine and isoleucine.



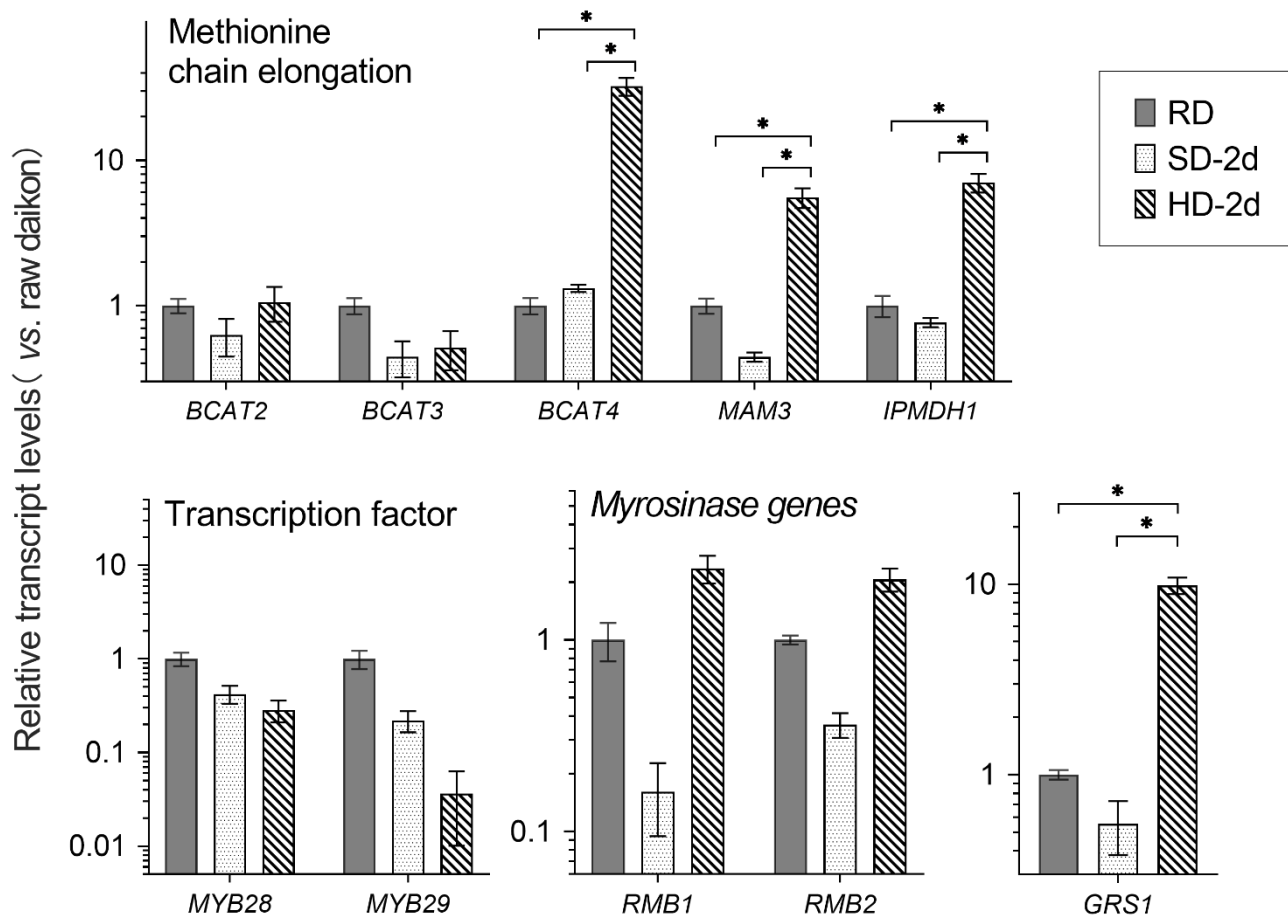
**Fig. 3–2 Secondary metabolic pathway of BCAAs and MTBGLS in takuan-zuke based on the concentrations of various metabolites during daikon dehydration (time: 14 days).**

Data are presented as mean value  $\pm$  standard deviation (triplicate samples).  $\circ$  *Shio-oshi* samples.  $\bullet$  *Hoshi* samples. Error bars shorter than the size of the symbol are not drawn. DW: dry weight; Ala: alanine; Ser: serine; Asp: aspartic acid; Glu: glutamic acid; Met: methionine; BCAAs: branched-chain amino acids; MTBGLS: 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate; AsA: ascorbic acid; MTBITC: 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate; BCAT: branched-chain aminotransferase; MAM: methylthioalkylmalate synthase; IPMDH: isopropylmalate dehydrogenase; GRS: glucoraphasatin synthase.



**Fig. 3–3 Myrosinase activity in *takuan-zuke* during daikon dehydration for 14 days.**

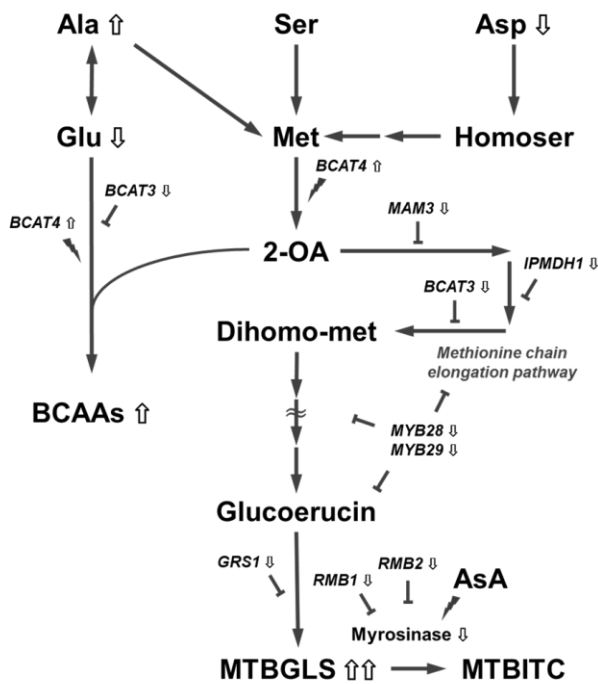
Data presented as mean value ± standard deviation (triplicate samples). Statistical significance ( $p < 0.05$ ) was determined using the Tukey-Kramer method. Error bars shorter than the size of the symbol are not drawn (DW: dry weight)



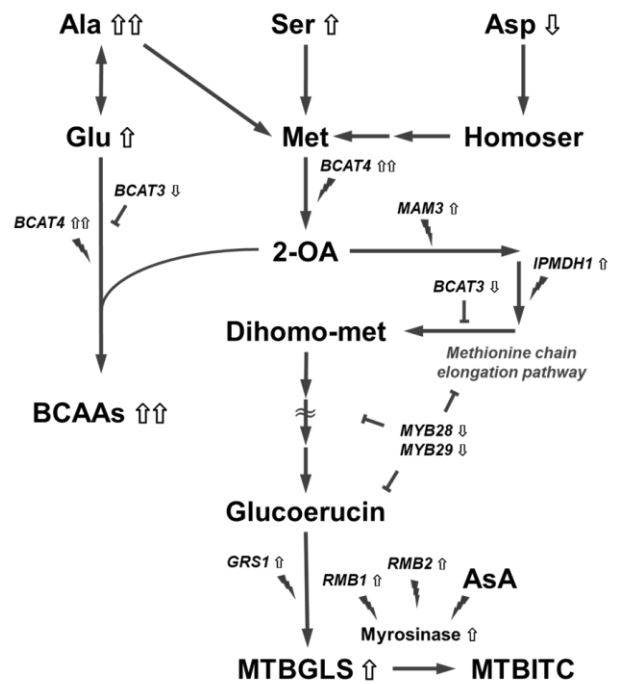
**Fig. 3–4** Transcriptional modulation of target genes after 2 d of *shio-oshi* and *hoshi* dehydration.

Data presented as mean value  $\pm$  standard deviation. Statistical significance ( $*p < 0.05$ ) was determined using the Tukey-Kramer method;  $n = 4-6$ . raw daikon (RD); after 2 days *shio-oshi* processing (SD-2d); after 2 days *hoshi* processing (HD-2d).

a) *Shio-oshi*



b) *Hoshi*



**Fig. 3–5 Schematic diagram of branched-chain amino acid glucosinolate metabolism during daikon dehydration.**

Ala: alanine; Ser: serine; Asp: aspartic acid; Glu: glutamic acid; Met: methionine; Homoser: homoserine; 2-OA: 2-oxo acid; Dihomo-met: dihomomethionine; BCAAs: branched-chain amino acids; MTBGLS: 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate; AsA: ascorbic acid; MTBITC: 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate; *BCAT3*: branched-chain aminotransferase 3; *BCAT4*: branched-chain aminotransferase 4; *MAM3*: methylthioalkylmalate synthase 3; *IPMDH1*: isopropylmalate dehydrogenase 1; *GRS1*: glucoraphasatin synthase 1; *MYB28*: MYB domain protein 28; *MYB29*: MYB domain protein 29; *RMB1*: radish myrosinase B type 1; *RMB2*: radish myrosinase B type 2.



### 3.4. 要約

本章では、ダイコンの脱水処理工程が、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) およびグルコシノレート (GLS) –ミロシナーゼシステムに与える影響について、二次代謝産物、酵素活性および遺伝子発現レベルで包括的に解析した。研究の結果、ダイコン中の BCAA, GLS およびそれらの前駆体アミノ酸は、脱水処理工程において一時的に増加することを確認した。さらに、BCAA, GLS およびイソチオシアネート合成に関連する一連の酵素遺伝子群 (*BCAT4*, *MAM3*, *IPMDH1*, *RMB1*, *RMB2* および *GRS1*) の発現が、脱水処理工程において顕著に増大することを明らかにした。これらの結果は、ダイコンの生物学的反応が、たくあん漬に特徴的な風味や健康機能性を付与することを示唆している。

さらに、たくあん漬を摂取した際の健康機能性を考慮すると、塩押し処理と比較して日干し処理の方が優れていることが示唆された。市販の漬物は脱水後に調味液に浸漬して供給されている。塩漬でも短いプロセスであれば健康機能性を向上させることが可能であり、植物のストレス応答メカニズムを応用した調製条件の制御により、健康有益性の高い漬物の生産が可能となる。今後、漬物の製造条件をより最適化することで、高機能性を備えた漬物の製造に貢献することが期待される。

## 第四章

### 総括

筆者らの先行研究では、伝統的漬物「たくあん漬」製造の初期段階、すなわち「塩押し」や「日干し」といった脱水処理工程において、グルタミン酸を基質として様々な遊離アミノ酸が蓄積すること、それらがたくあん漬の味や健康機能性の向上に寄与することを明らかにした。さらに、ダイコンの二次代謝反応は、微生物発酵によるものではなく、ダイコンの脱水ストレス応答に依存していることが示唆された。そこで本論文では、上述の脱水処理工程が、たくあん漬の原料となるダイコンの分子機構に与える影響を明らかにするため、ダイコン中の二次代謝産物と、機能性成分の代謝に関わる酵素活性および遺伝子発現の変化を経時的かつ網羅的に解析し、以下の三章にまとめ報告した。

第一章では、緒言として、我が国の食生活の変遷、和食文化を背景に、漬物の歴史、利用、健康機能性、漬物関連産業の動向および課題について具体例を挙げた後、これまでに行ってきたダイコンおよびたくあん漬の機能性研究を踏まえ、本研究の目的と意義、本論文の概要を5つの項目にまとめて述べた。

第二章では、ダイコンの脱水処理工程における遊離アミノ酸の代謝動態を明らかにするため、二次代謝物とそれらの代謝に関連する酵素活性および遺伝子発現を解析した。これにより、たくあん漬の特徴的な成分である GABA、アラニンおよびプロリンなどの遊離アミノ酸は、脱水処理によるダイコン由来関連代謝酵素 (GAD, ALT および P5CS) の活性化、酵素遺伝子 (*GAD4*, *ALT1* および *P5CS1*) の発現増大によって蓄積することを明らかにした。

第三章では、第二章の結果から、「塩押し」や「日干し」といった脱水処理工程が、アブラナ科野菜特有の機能性成分である GLS、およびたくあん漬の特徴的な成分である BCAA の代謝を活性化すると仮定し、その分子機構について標的オミックス解析を行った。これにより、ダイコン中の GLS および BCAA は、各脱水処理によって蓄積または増加傾向を示すことを確認した。さらに、GLS および BCAA の合成に関わる一連の酵素遺伝子群 (*BCAT4*, *MAM3*, *IPMDHI* および *GRS1*)、ダイコンの辛味発現と黄変化反応に関連するミロシナーゼ遺伝子 (*RMB1* および *RMB2*) の発現が増大することを明らかにした。

日本の食卓では、ダイコンをはじめとするアブラナ科野菜は漬物の原料として広く利用されており、それらは前処理として「下漬け」と呼ばれる脱水プロセスが含まれるほか、一部の野菜（カブ、ハクサイなど）は天日を利用した脱水処理を行う場合もある。また、下漬けや塩蔵を伴わず、少量の塩で短期間（数日から一週間程度）に調理された「浅漬け」も普及している。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分子機構を活性化し、結果としてたくあん漬の機能性成分を増加させることを明らかにした。また、本研究で分析したダイコン中の機能性成分、酵素活性および遺伝子発現の変化は、日干し処理において顕著に増大する傾向であったが、塩押し処理においても、短いプロセスであればGABA等の機能性成分を増加させることが可能であると示唆された。

漬物に関する機能性研究は、熟成過程で起こる微生物発酵および有用微生物の利用によるものが多くなされてきた。しかしながら、本研究の結果は、「原料野菜の生理学的反応」が漬物中の機能性成分増加に大きく寄与していることを示唆している。今後の研究によって、様々な漬物の脱水処理条件を詳細に検討し、従来の製品以上の機能性成分高含有漬物を開発することで、農産加工品の高付加価値化や関連産業の振興が期待される。さらに、培養細胞系試験および動物実験系試験等により漬物の健康機能性を実証することで、人々の健康増進に貢献していくことが望まれる。食品栄養学分野において、「食」すなわち生命をつなぐ日々の営みを科学的姿勢で探求するとともに、人々が健やかな生活を送り、日本が誇る和食文化を後世へと保護・継承していくことを切に願い、本博士論文の結びとする。

## 参考文献

1. 江原絢子. ユネスコに登録された 「和食」 とは何か, 日本食生活学会誌, 2017, **28**, 3-5.
2. 高田公理. 和食の輪郭を描く, *Vesta*, 2014, **94**, 6-10.
3. B. Trock, E. Lanza and P. Greenwald. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence, *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, **82**, 650-661.
4. A. R. Ness and J. W. Powles. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review, *International Journal of epidemiology*, 1997, **26**, 1-13.
5. J. John, S. Ziebland, P. Yudkin, L. Roe and H. Neil. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial, *The Lancet*, 2002, **9322**, 1969-1974.
6. Y. Zhu, T. M. Luo, C. Jobin and H. A. Young. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis, *Cancer letters*, 2011, **309**, 119-127.
7. H. Zeng, D. L. Lazarova and M. Bordonaro. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention, *World journal of gastrointestinal oncology*, 2014, **6**, 41-51.
8. W. N. Shebawy, M. El-Sibai, K. B. Smith, M. C. Karam, M. Mroueh and C. F. Daher. The antioxidant and anticancer effects of wild carrot oil extract, *Phytotherapy Research*, 2013, **27**, 737-744.
9. S.-M. Shim, H.-L. Yi and Y.-S. Kim. Bioaccessibility of flavonoids and total phenolic content in onions and its relationship with antioxidant activity, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2011, **62**, 835-838.
10. R. Siegel, D. Naishadham and A. Jemal. Cancer statistics, 2012, *CA: a cancer journal for clinicians*, 2012, **62**, 10-29.

11. 厚生労働省, 平成 30 年国民健康・栄養調査報告, [https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/kenkou/eiyuu/h30-houkoku\\_00001.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/eiyuu/h30-houkoku_00001.html), (2021.11.30).
12. 厚生労働省, 平成 30 年 (2018) 人口動態統計 (確定数) の概況, <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei18/>, (2021.11.30).
13. J. P. Tamang, K. Watanabe and W. H. Holzapfel. Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages, *Frontiers in Microbiology*, 2016.
14. 宮尾茂雄. 日本の漬物, 日本海水学会誌, 2017, **71**, 211-221.
15. 小川聖子. 日本の漬物の成立, *Vesta*, 2018, **109**, 12-16.
16. 農林水産省, 食品産業動態調査, [https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j\\_doutai/doutai\\_top.html](https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j_doutai/doutai_top.html), (2021.11.30).
17. 寺島晃也, 鹿島真樹, 多田耕太郎.  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌の分離と GABA 生産特性の解明, 富山県食品研究所研究報告, 2008, **85**, 45-49.
18. 早川潔, 上野義栄, 河村真也, 谷口良三, 小田耕平. 乳酸菌による  $\gamma$ -アミノ酪酸の生産, 生物工学会誌, 1997, **75**, 239-244.
19. S. Tomita, T. Nakamura and S. Okada. NMR-and GC/MS-based metabolomic characterization of sunki, an unsalted fermented pickle of turnip leaves, *Food Chemistry*, 2018, **258**, 25-34.
20. Y. Nobuta, T. Inoue, S. Suzuki, C. Arakawa, T. Yakabe, M. Ogawa and N. Yajima. The efficacy and the safety of *Lactobacillus brevis* KB290 as a human probiotics, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 2009, **4**, 263-270.
21. A. Kishi, K. Uno, Y. Matsubara, C. Okuda and T. Kishida. Effect of the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* on interferon-alpha producing capacity in humans, *Journal of the American College of Nutrition*, 1996, **15**, 408-412.
22. 森下美香, 西尾翔子, 伊與田哲也, 小室あゆ美, 河本哲宏. 漬物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* TK61406 の摂取が腸内環境, 肌状態および集中力に及ぼす影響のランダム化比較試験検討, 新薬と臨牀, 2016, **65**, 1274-1294.

23. 小泉武夫. 漬物と日本人, *Vesta*, 2018, **109**, 8-11.
24. 農林水産省, 作況調査 (野菜), [https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_yasai/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/index.html), (2021.12.28).
25. A. Petersen, C. Wang, C. Crocoll and B. A. Halkier. Biotechnological approaches in glucosinolate production, *Journal of integrative plant biology*, 2018, **60**, 1231-1248.
26. C. Zhang, Z.-Y. Su, T. O. Khor, L. Shu and A.-N. T. Kong. Sulforaphane enhances Nrf2 expression in prostate cancer TRAMP C1 cells through epigenetic regulation, *Biochemical pharmacology*, 2013, **85**, 1398-1404.
27. K. F.-J. Tierens, B. P. Thomma, M. Brouwer, J. Schmidt, K. Kistner, A. Porzel, B. Mauch-Mani, B. P. Cammue and W. F. Broekaert. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of Arabidopsis to microbial pathogens, *Plant Physiology*, 2001, **125**, 1688-1699.
28. Y. Morimitsu, K. Hayashi, Y. Nakagawa, F. Horio, K. Uchida and T. Osawa. Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in japanese domestic horseradish, *wasabi*, *Biofactors*, 2000, **13**, 271-276.
29. H. Okamoto, S. Ino, N. Nihei, N. Ikuta, C. Ueno, A. Itoi, Y. Yoshikawa, K. Terao and N. Sakamoto. Anti-obesity effects of  $\alpha$ -cyclodextrin-stabilized 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from daikon (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*) in mice, *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2019, **65**, 99-108.
30. N. Mori, T. Shimazu, H. Charvat, M. Mutoh, N. Sawada, M. Iwasaki, T. Yamaji, M. Inoue, A. Goto and R. Takachi. Cruciferous vegetable intake and mortality in middle-aged adults: A prospective cohort study, *Clinical Nutrition*, 2019, **38**, 631-643.
31. 齊藤千佳, 杉田和俊, 大仲賢二, 良永裕子. カットレタスの品質保持に及ぼすダイコンの揮発成分の効果, 日本調理科学会大会研究発表要旨集, 2019, **31**, 150.
32. 石田正彦, 吉秋斎, 畠山勝徳, 永田茂穂, 長友文彦. 南九州におけるアブラナ科野菜在来

- 種の調査と収集, 植物遺伝資源探索導入調査報告書, 2006, **22**, 37-45.
33. 宮尾茂雄, 沢庵和尚とたくあん漬け, 食品と科学, 2021, **63**, 65-73.
34. H. Matsuoka, A. Takahashi, Y. Ozawa, Y. Yamada, Y. Uda and S. Kawakishi. 2-[3-(2-thioxopyrrolidin-3-ylidene)methyl]-tryptophan, a novel yellow pigment in salted radish roots, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, **66**, 1450-1454.
35. H. Matsuoka, S. Honzawa, A. Takahashi, H. Yoshikawa, E. Watanabe, T. Watanabe, Y. Ozawa, Y. Yamada, T. Iizuka and Y. Uda. Photoisomerization of 2-[3-(2-thioxopyrrolidin-3-ylidene)methyl]-tryptophan, a yellow pigment in salted radish roots, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, **72**, 2262-2268.
36. A. Takahashi, T. Yamada, Y. Uchiyama, S. Hayashi, K. Kumakura, H. Takahashi, N. Kimura and H. Matsuoka. Generation of the antioxidant yellow pigment derived from 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate in salted radish roots (*takuan-zuke*), *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, **79**, 1512-1517.
37. 石田正彦, 森光康次郎. 4-メチルチオ-3-ブテニルグルコシノレート欠失性ダイコン加工品におけるグルコシノレート分解物の化学的变化, におい・かおり環境学会誌, 2013, **44**, 307-314.
38. J. Barillari, R. Cervellati, M. Paolini, A. Tatibouët, P. Rollin and R. Iori. Isolation of 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate from *raphanus sativus* sprouts (kaiware daikon) and its redox properties, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2005, **53**, 9890-9896.
39. A. F. A. Razis and N. M. Noor. Cruciferous vegetables: dietary phytochemicals for cancer prevention, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2013, **14**, 1565-1570.
40. P. R. Hanlon, D. M. Webber and D. M. Barnes. Aqueous extract from spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzymes in the HepG2 human hepatoma cell line, *Journal of agricultural food chemistry*, 2007, **55**, 6439-6446.
41. A. Takahashi, H. Matsuoka, K. Yamada and Y. Uda. Characterization of antimutagenic mechanism



- of 3-allyl-5-substituted 2-thiohydantoins against 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline, *Food and Chemical Toxicology*, 2005, **43**, 521-528.
42. 瀬戸口眞治, 鶴木隆文, 下野かおり, 前野一朗. 山川漬の製法および成分特性に関する調査, 鹿児島県工業技術センター報告, 2005, **19**, 11-14.
  43. 長友絵美, 福山明子, 柚木崎千鶴子. 宮崎県産干したくあんの成分特性, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, 2007, 69-72.
  44. K. Kumakura, R. Kato, T. Kobayashi, A. Sekiguchi, N. Kimura, H. Takahashi, A. Takahashi and H. Matsuoka. Nutritional content and health benefits of sun-dried and salt-aged radish (*takuan-zuke*), *Food Chemistry*, 2017, **231**, 33-41.
  45. K. Kumakura, R. Kato, T. Kobayashi, N. Kimura, H. Takahashi, A. Takahashi and H. Matsuoka. The salted radish *takuan-zuke* shows antihypertension effects in spontaneously hypertensive rats, *Food & Function*, 2017, **8**, 3491-3500.
  46. K. Inoue, T. Shirai, H. Ochiai, M. Kasao, K. Hayakawa, M. Kimura and H. Sansawa. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives, *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003, **57**, 490-495.
  47. A. M. Abdou, S. Higashiguchi, K. Horie, M. Kim, H. Hatta and H. Yokogoshi. Relaxation and immunity enhancement effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans, *Biofactors*, 2006, **26**, 201-208.
  48. M. Kawai, A. Okiyama and Y. Ueda. Taste enhancements between various amino acids and IMP, *Chemical Senses*, 2002, **27**, 739-745.
  49. S. S. Schiffman and C. Dackis. Taste of nutrients: amino acids, vitamins, and fatty acids, *Perception & Psychophysics*, 1975, **17**, 140-146.
  50. A. Bown and B. Shelp. The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid, *Plant Physiology*, 1997, **115**, 1-5.
  51. C. De Sousa and L. Sodek. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean

- (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia, *Environmental and Experimental Botany*, 2003, **50**, 1-8.
52. A. Hmida-Sayari, R. Gargouri-Bouزيد, A. Bidani, L. Jaoua, A. Savouré and S. Jaoua. Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants, *Plant Science*, 2005, **169**, 746-752.
  53. C. Woodward, J. Henderson and T. Wielgos. *High-speed amino acid analysis (AAA) on 1.8 mm reversed-phase (RP) columns*, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA, 2007.
  54. Y. Miyashita and A. G. Good. Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology*, 2008, **49**, 92-102.
  55. B. Lu, Y. Yuan, C. Zhang, J. Ou, W. Zhou and Q. Lin. Modulation of key enzymes involved in ammonium assimilation and carbon metabolism by low temperature in rice (*Oryza sativa* L.) roots, *Plant Science*, 2005, **169**, 295-302.
  56. D. Rhodes, G. Rendon and G. Stewart. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L, *Planta*, 1975, **125**, 201-211.
  57. R. A. Viégas and J. d. Silveira. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long term exposure to NaCl-salinity, *Revista brasileira de fisiologia vegetal*, 1999, **11**, 153-159.
  58. Y. Miyashita, R. Dolferus, K. P. Ismond and A. G. Good. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 2007, **49**, 1108-1121.
  59. H. Ertan. Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*, *Archives of microbiology*, 1992, **158**, 35-41.
  60. K. Kotani, M. Maekawa and T. Kanno. Reestimation of aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) ratio based on JSCC consensus method--changes of criteria for a differential diagnosis of hepatic disorders following the alteration from Karmen method to JSCC

- method, *The Japanese Journal of Gastroenterology*, 1994, **91**, 154-161.
61. C. Liu, L. Zhao and G. Yu. The dominant glutamic acid metabolic flux to produce  $\gamma$ -amino butyric acid over proline in nicotiana tabacum leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity, *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, **53**, 608-618.
62. G. Glevarec, S. Bouton, E. Jaspard, M.-T. Riou, J.-B. Cliquet, A. Suzuki and A. M. Limami. Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*, *Planta*, 2004, **219**, 286-297.
63. 加藤亮, 林里美, 小林泰斗, 高橋仁恵, 木村紀久, 高橋朝歌, 熊倉慧, 松岡寛樹. たくあん漬け製造時における  $\gamma$ -アミノ酪酸とグルタミン酸脱炭酸酵素活性の解析, *日本食品科学工学会誌*, 2015, **62**, 492-500.
64. X. Sun, L. Xu, Y. Wang, X. Luo, X. Zhu, K. B. Kinuthia, S. Nie, H. Feng, C. Li and L. Liu. Transcriptome-based gene expression profiling identifies differentially expressed genes critical for salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.), *Plant cell reports*, 2016, **35**, 329-346.
65. C. V. Givan. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants, *Phytochemistry*, 1979, **18**, 375-382.
66. Z. Wei, S. Qing-Jie, Z. Chu-Fu, Y. Yong-Ze, Z. Ji and L. Bin-Bin. Effect of salt stress on ammonium assimilation enzymes of the roots of rice (*Oryza sativa*) cultivars differing in salinity resistance, *Acta Botanica Sinica*, 2004, **46**, 921-927.
67. M. Debouba, H. Gouia, A. Suzuki and M. H. Ghorbel. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings, *Journal of plant physiology*, 2006, **163**, 1247-1258.
68. A. Aires, E. Rosa and R. Carvalho. Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, **86**, 1512-1516.

69. E. Ciska, J. Honke and H. Kozłowska. Effect of light conditions on the contents of glucosinolates in germinating seeds of white mustard, red radish, white radish, and rapeseed, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, **56**, 9087-9093.
70. C. López-Berenguer, M. C. Martínez-Ballesta, C. García-Viguera and M. Carvajal. Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli, *Plant Science*, 2008, **174**, 321-328.
71. G. Yuan, X. Wang, R. Guo and Q. Wang. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts, *Food Chemistry*, 2010, **121**, 1014-1019.
72. T. Huang and G. Jander. Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 2017, **246**, 737-747.
73. T. Kuzuya, Y. Katano, I. Nakano, Y. Hirooka, A. Itoh, M. Ishigami, K. Hayashi, T. Honda, H. Goto and Y. Fujita. Regulation of branched-chain amino acid catabolism in rat models for spontaneous type 2 diabetes mellitus, *Biochemical and biophysical research communications*, 2008, **373**, 94-98.
74. Z. Bahadoran, M. Tohidi, P. Nazeri, M. Mehran, F. Azizi and P. Mirmiran. Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind clinical trial, *International journal of food sciences and nutrition*, 2012, **63**, 767-771.
75. K. Kurotani, A. Nanri, A. Goto, T. Mizoue, M. Noda, M. Kato, M. Inoue, S. Tsugane and for the Japan public health center-based prospective study group. Vegetable and fruit intake and risk of type 2 diabetes: Japan Public Health Center-based Prospective Study, *British journal of nutrition*, 2013, **109**, 709-717.
76. 宮澤紀子, 阿部雅子, 木村典代, 松岡寛樹, 田中進, 森光康次郎, 中村宜督, 綾部園子, 小澤好夫. アブラナ科野菜漬物 (カブ, ハクサイ) のイソチオシアネート生成に関する塩化ナトリウム (NaCl) およびアスコルビン酸の影響, *日本調理科学会誌*, 2016, **49**, 138-

- 146.
77. W. Kobayashi, T. Kobayashi, A. Takahashi, K. Kumakura and H. Matsuoka. Metabolism of glutamic acid to alanine, proline, and  $\gamma$ -aminobutyric acid during takuan-zuke processing of radish root, *Journal of Food Science*, 2021, **86**, 563-570.
78. J.-P. Wathélet, R. Iori, O. Leoni, A. Quinsac and S. Palmieri. Guidelines for glucosinolate analysis in green tissues used for biofumigation, *Agroindustria*, 2004, **3**, 257-266.
79. J. Lykkesfeldt, S. Loft and H. E. Poulsen. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection—Are they reliable biomarkers of oxidative stress?, *Analytical biochemistry*, 1995, **229**, 329-335.
80. M. Hara, Y. Fujii, Y. Sasada and T. Kuboi. cDNA cloning of radish (*Raphanus sativus*) myrosinase and tissue-specific expression in root, *Plant and Cell Physiology*, 2000, **41**, 1102-1109.
81. S. Tewari, R. Sehrawat, P. K. Nema and B. P. Kaur. Preservation effect of high pressure processing on ascorbic acid of fruits and vegetables: A review, *Journal of Food Biochemistry*, 2017, **41**, e12319.
82. 小島彩子, 尾関彩, 中西朋子, 佐藤陽子, 千葉剛, 阿部皓一, 梅垣敬三. 食品中ビタミンの調理損耗に関するレビュー (その2), *ビタミン*, 2018, **91**, 87-112.
83. M. Y. Hirai, K. Sugiyama, Y. Sawada, T. Tohge, T. Obayashi, A. Suzuki, R. Araki, N. Sakurai, H. Suzuki and K. Aoki. Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**, 6478-6483.
84. T. Gigolashvili, R. Yatusевич, B. Berger, C. Müller and U. I. Flügge. The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 2007, **51**, 247-261.
85. C. López-Berenguer, M. d. C. Martínez-Ballesta, D. A. Moreno, M. Carvajal and C. García-Viguera. Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of

- broccoli, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009, **57**, 572-578.
86. Y. Zhang, K. Guo, R. E. LeBlanc, D. Loh, G. J. Schwartz and Y.-H. Yu. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms, *Diabetes*, 2007, **56**, 1647-1654.
87. D. MacLean, T. Graham and B. Saltin. Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise, *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 1994, **267**, E1010-E1022.
88. D. H. Sanchez, M. R. Siahpoosh, U. Roessner, M. Udvardi and J. Kopka. Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity, *Physiologia plantarum*, 2008, **132**, 209-219.
89. K. Urano, K. Maruyama, Y. Ogata, Y. Morishita, M. Takeda, N. Sakurai, H. Suzuki, K. Saito, D. Shibata and M. Kobayashi. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics, *The Plant Journal*, 2009, **57**, 1065-1078.
90. H. Less and G. Galili. Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses, *Plant Physiology*, 2008, **147**, 316-330.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科 綾部園子教授（現高崎健康福祉大学大学院健康福祉学研究科 特任教授）に深甚なる謝意を表します。

本研究に対して、ご指導、ご助言を賜りました高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科（現農学部生物生産学科）松岡寛樹教授、永井俊匡准教授、熊倉慧准教授、小林泰斗助教に深く感謝の意を表します。

たくあん漬製造においてご指導、ご助言を賜りました群馬県産業技術センター バイオ食品係の木村紀久様、高崎市路地野菜等生産者の会の高橋幸友様に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究協力者としてご協力いただいた高崎健康福祉大学大学院健康福祉学研究科食品栄養学専攻 頓宮寧々院生、富澤歩美院生、健康福祉学部健康栄養学科 長田英里香学部生および松岡研究室の皆様に感謝いたします。

本論文のご校閲とご助言をいただきました高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科 村松芳多子教授、岡村信一教授および田中進教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、心身ともに支えてくれた家族に心より感謝申し上げます。