

日光地方の在来野菜、野口菜のグルコシノレート由来揮発性成分組成とその採取時期による変動

生物生産科学科 応用生物化学コース、応用生物学コース*

宇田 靖、橋本 啓、房 相佑*、金子幸雄*

Composition of Glucosinolate-derived Volatiles Occurring in *Noguchina*, an Indigenous Vegetable to Nikko City Region, and their Changes at Different Picking Times

Yasushi UDA, Kei HASHIMOTO, Sangwoo BANG, and Yukio KANEKO

Resume

Noguchina is a *Brassica* vegetable indigenous to Nikko city region of Tochigi prefecture. In 2007, this crop has been certified as one of the “Ark of Taste” from Slow Food Foundation for Biodiversity (Florence, Italy). In this study, volatile products derived from glucosinolates in *Noguchina* crop were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) at different picking times. 3-Butenyl, 4-pentenyl, and 2-phenethyl isothiocyanates and their related nitriles (4-pentene nitrile, 5-hexene nitrile, 1-cyano-3, 4-epithiobutane, and 1-cyano-4, 5-epithiopentane) were identified as the glucosinolate-derived volatile products. During the harvesting period (from the end of December to the end of February or early March), the highest amounts of the isothiocyanates were found at the end of December (14 weeks after sowing) and declined in late January and late February. In late January (18 weeks after sowing), the picked vegetable showed a preponderant formation of the nitriles than that of the isothiocyanates.

者がいて、地域の主な収入源になっていたが、1949年の今市地震により湧水の流れが大きく変化し、以後、栽培可能範囲が野口地区に限定された。現在の野口菜生産者は5戸、これに日光だいや川公園管理事務所の関係者数名が加わって、



Photo1 Harvested *Noguchina*

緒言

野口菜（水掛菜）は栃木県日光市野口地区に古く江戸時代から豊富な大谷川の伏流水からの湧水を畑の畝に循環させる水掛方式で栽培されてきた在来作物（Photo1）である。すなわち、当地の冬季は厳寒となるが、気温と水温とがほぼ同等に近づく11月中、下旬から湧水を畑に流し入れ、これによる野口菜の保温と生育促進を図る栽培手法（Photo2）が特徴である。野口菜は植物学的にはアブラナ属野菜（*Brassica rapa* L.）であるツケナの在来種^{1, 2)}とされている。当地の野口菜生産保存組合によれば、かつては多数の野口菜生産



Photo2 Cultivation view of *Noguchina*

全 10 アール程度の畑を確保して採種保存用と自家消費および一部流通用の栽培が続けられている。野口菜はその稀少価値と伝統野菜としての重要性から 2007 年 8 月に、生物多様性のためのスローフード基金 (Slow Food Foundation for Biodiversity, Florence, Italy) から「味の箱船: Ark of Taste」に登録される作物として認定された。全国各地における野口菜のような在来作物は貴重な遺伝資源であり、食品としてもその積極的な利用がなされるべきものとして重要であるが、それらの作物の成分的特性はほとんど研究されていないのが現状である。野口菜も例外ではなく、アブラナ属野菜としての特徴成分の分析を始め、日本食品標準成分表に記載されているような一般的な成分分析も全く見られない。

これまで、アブラナ属野菜類の特徴的な成分としては芥子油配糖体であるグルコシノレートが知られている。グルコシノレートは植物体に含まれるミロシナーゼ (thioglucoside glucosylhydrolase, EC.3.2.3.1) による加水分解を受けてイソチオシアネート類およびニトリル類を生成する (Figure 1) ことが知られている³⁾。このうち、イソチオシアネート類はグルタチオン S-トランスフェラーゼあるいはキノンレダクターゼなどの第二相解毒系酵素活性の誘導能^{4, 5)}やがん細胞のアポトーシスの誘導活性⁶⁾を有し、動物による実験においても各種臓器の発がん抑制⁵⁾に寄与するなど、機能性食品成分として期待されている。そこで、本研究では、アブラナ属野菜としての野口菜の成分特性を明らかにする目的で、播種後 11 週目 (77 日目) から 3 ~ 4 週間ごとに採取し、グルコシノレート由来の揮発性イソチオシアネート類およびニトリル類の組成と採取時期によるそれらの組成の変動について調査した。

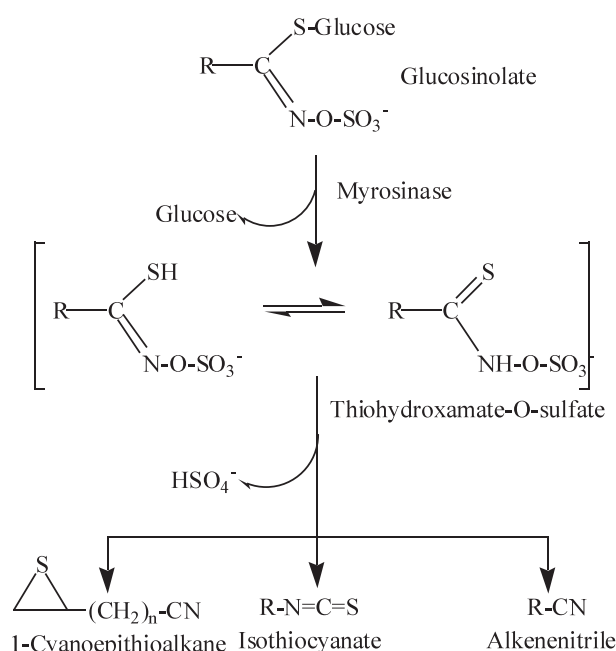


Figure1 Break down of glucosinolate by myrosinase.

実験材料および方法

1. 実験材料

野口菜は 2007 年 9 月 21 日に日光だいや川公園、だいや体験館 (日光市野口 244) に隣接の栽培用地に播種、栽培されたもので、2007 年 12 月 7 日 (播種後 11 週目) に最初の分析用採取を行った後、2007 年 12 月 27 日 (同 14 週目)、2008 年 1 月 22 日 (同 18 週目) および 2008 年 2 月 18 日 (同 22 週目) に草丈 45 ~ 50cm のものをそれぞれ採取し、その日に分析試料を調製した。ジエチルエーテル、緩衝液調製用試薬 (リン酸水素二ナトリウム、クエン酸) は、いずれも和光純薬製の特級試薬を使用した。標準イソチオシアネート類 (3-プテンニル、4-ペンテニル、2-フェネチル) は以前の方法⁷⁾で合成したものをを用いた。また、標準ニトリルとして、4-ペンテンニトリル、5-ヘキセンニトリル、3-フェニルプロピオニトリルは東京化成工業から購入した。

2. 実験方法

(1) 分析試料の調製

採取した野口菜を水道水で洗浄し、付着物を除去後、傷みが見られた葉身部および根部を除いて 100g を秤取した。これをカッターで細かくカットし、同量の純水とともにブレンダーにてピューレ状にした。これをアルミホイルにて密封した容器内で室温下 30 分放置して自家酵素であるミロシナーゼを作用させ、その後、ジエチルエーテル 150mL を加えて十分に振り混ぜた。続いて遠心分離 (1300g、3 分間) により、エーテル部を回収し、適量の無水硫酸ナトリウム粉末を加えてエーテル部を脱水乾燥した。この乾燥エーテル部から 5mL を分取し、100 μ L まで窒素気流下にて濃縮したものを分析用試料とし、分析時まで -30 $^{\circ}$ C の冷凍庫内に保存した。なお、以上の処理をもう一つ別途調製し、同様に保存し、分析用試料とした。

(2) ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS)

分析用試料は Hewlett Packard 5971A 型 GC/MS にて下記条件下で分析した。すなわち、分析カラムは、溶融シリカキャピラリーカラム (Agilent J&W 社 DB-WAX、30m x 0.25mm ID)、カラム温度は、60 $^{\circ}$ C に 3 分保持後、5 $^{\circ}$ C/min で 250 $^{\circ}$ C まで昇温、インジェクター温度は 260 $^{\circ}$ C、試料注入量は 1 μ L とした。イソチオシアネート及びニトリルの同定は標準イソチオシアネートのマススペクトルデータ及び文献データ⁸⁾との比較により行い、それぞれの成分量は、既知濃度 (2.5mg / mL) の 4-ペンテニルイソチオシアネートのアセトン溶液 1 μ L を分析し、そのピーク面積との比率から 4-ペンテニルイソチオシアネート量として算出した。それぞれの採取日ごとに別個に調製した 2 個の分析用試料を分析し、目的成分ごとの分析値を平均値で表した。

実験結果および考察

(1) グルコシノレート由来揮発性成分組成の特徴

野口菜のグルコシノレート由来分解生成物として検出された揮発性分の典型的なガスクロマトグラム (2007 年 12 月 28 日採取サンプル) を Figure2 に、また、GC/MS 分析により同定されたグルコシノレート由来成分の化学構造を Figure3 に、それらのマスペクトルデータおよび GC リテンションデータを Table1 に示す。これらのデータに見られるように、GC 保持時間とマスペクトルとの一致により、4-ペンテンニトリル (Peak A)、5-ヘキセンニトリル (Peak B) および 3-フェニルプロピオニトリル (Peak F) の 3 種のニトリルと、3-ブテンイルイソチオシアネート (Peak C)、4-ペンテンイルイソチオシアネート (Peak D) および 2-フェネチルイソチオシアネート (Peak H) がそれぞれ同定された。これらのイソチオシアネート類はそれぞれ特有の辛味を有

し、野口菜の風味に寄与しているものと考えられる。また、得られたマスペクトルデータが文献データ⁸⁾と完全に一致したことにより、1-シアノエピチオブタン (Peak E) と 1-シアノエピチオペンタン (Peak G) の 2 種類のシアノエピチオアルカンの生成も確認された。

以上の結果、野口菜の主要なグルコシノレートは、3-ブテンイルグルコシノレート (Gluconapin)、4-ペンテンイルグルコシノレート (Glucobrassicinapin) 及び 2-フェネチルグルコシノレート (gluconastutinin) の 3 種類であることが明らかになった。これまで分析されたアブラナ属野菜類、たとえば、ハクサイ類、タイサイ類、ミズナ類、カブ類、およびカラシナ類などにおいてはいずれも 4-メチルチオブチルあるいは 5-メチルチオペンチルイソチオシアネートのような ω -メチルチオアルキルイソチオシアネートが検出されている⁹⁾が、野口菜ではこれらは全く見られなかった点でユニー

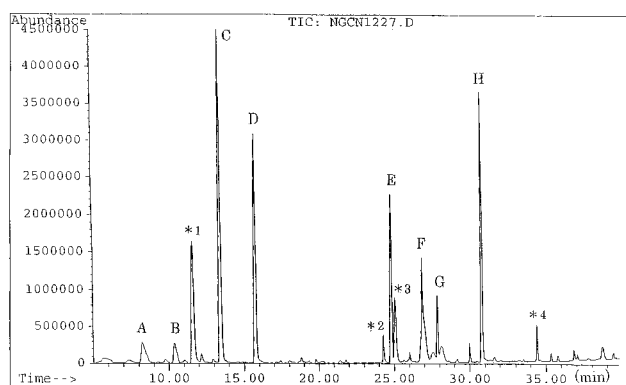


Figure2 Gas chromatogram of volatile compounds detected in the homogenate of fresh *Noguchina* picked at 27th of Dec., 2007.

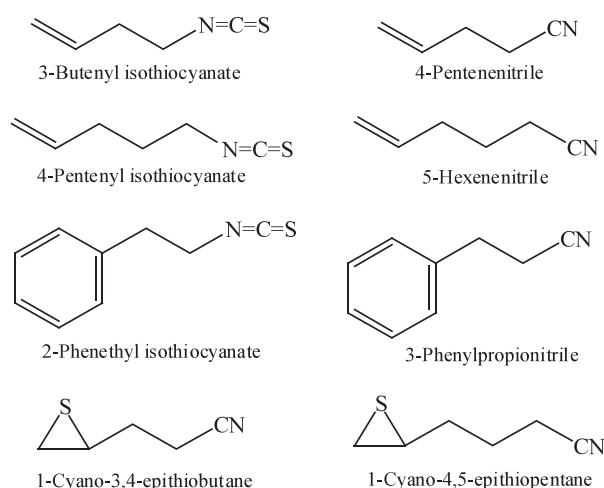


Figure3 Chemical structures of the identified constituents derived from glucosinolates in *Noguchina*.

Table1 Major volatile compounds detected in the homogenate of fresh *Noguchina*.

Compound	Peak ^{a)}	Molecular weight	GC Retention time (min)	Mass spectral data [m/z: Rel. Intensity (%)] ^{b)}	Identification method ^{c)}
4-Pentenitrile	A	81	8.4	81 (M ⁺ , 100), 80 (15), 66 (7), 54 (66)	GC, MS
5-Hexenenitrile	B	95	10.4	95 (M ⁺ , 95), 94 (18), 80 (22), 68 (55), 55 (100)	GC, MS
cis-3-Hexenol	*1	100	11.7	100 (M ⁺ 7), 82 (41), 67 (100), 55 (36)	GC, MS
3-Butenyl isothiocyanate	C	113	13.4	113 (M ⁺ , 65), 85 (12), 72 (100), 55 (20)	GC, MS
4-Pentenyl isothiocyanate	D	127	15.8	127 (M ⁺ , 77), 126 (95), 99 (72), 85 (55), 72 (100)	GC, MS
2-Phenethyl alcohol	*2	122	24.3	122 (M ⁺ , 28), 92 (54), 91 (100), 77 (6), 65 (18)	GC, MS
1-Cyano-3,4-epithiobutane	E	113	24.9	113 (M ⁺ , 100), 86 (21), 80 (17), 73 (35), 67 (15)	MS ^{d)}
BHT	*3	220	25.2	220 (M ⁺ , 22), 205 (100), 177 (9), 105 (8), 91 (9)	GC, MS
3-Phenylpropionitrile	F	131	26.9	131 (M ⁺ , 28), 91 (100), 77 (7), 65 (9), 51 (6)	GC, MS
1-Cyano-4,5-epithiopentane	G	127	27.9	127 (M ⁺ , 100), 110 (20), 100 (10), 94 (42), 85 (43)	MS ^{d)}
2-Phenethyl isothiocyanate	H	163	30.8	163 (M ⁺ , 62), 105 (15), 91 (100), 77 (12), 65 (12)	GC, MS
Indole	*4	117	34.5	117 (M ⁺ , 100), 91 (11), 90 (38), 89 (34), 63 (17)	GC, MS

a) Refer to Fig. 2.

b) M⁺, Molecular ion

c) GC, GC retention time; MS, Mass spectral data.

d) Coincidental data with those in Literature No.8.

* Constituents having no relation to glucosinolates, of which BHT was detected as the antioxidative stabilizer of diethylether.

Table2 Changes in amounts of break down products of glucosinolates in *Noguchina* picked at different days after sowing.

Constituent	Amounts of isothiocyanates and nitriles in 100g of fresh <i>Noguchina</i> picked at different days after sowing (mg/100g fresh weight)			
	Dec. 7, 2007	Dec. 27, 2007	Jan. 22, 2008	Feb. 18, 2008
(Isothiocyanate)				
3-Butenyl isothiocyanate	1.87	7.32	2.08	1.19
4-Pentenyl isothiocyanate	1.91	9.66	3.33	2.57
2-Phenethyl isothiocyanate	1.98	7.52	1.36	3.09
(Nitriles)				
4-Pentenitrile	0.16	1.13	0.41	0.66
5-Hexenenitrile	0.30	1.22	0.80	1.16
3-Phenylpropionitrile	1.35	3.57	1.73	2.58
1-Cyano-3,4-epithiobutane	0.91	3.68	2.25	3.64
1-Cyano-4,5-epithiopentane	0.36	1.06	1.76	4.45

The data are shown as the mean value from the determination of each two samples.

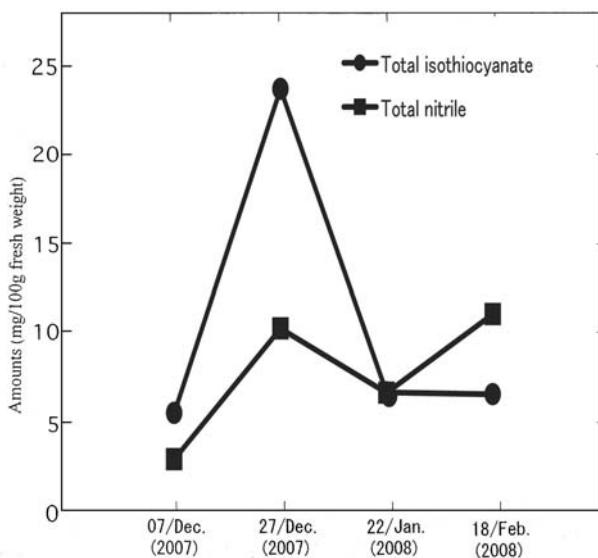


Figure4 Changes in total amounts of isothiocyanates and nitriles generated in *Noguchina* homogenates prepared at different picking times.

クなグルコシノレート組成といえる。今回、野口菜の生鮮物中に同定されたイソチオシアネートとニトリルはすべてこれら3種のグルコシノレートからの派生物である。他方、イソチオシアネートとともに、シアノエピチオアルカンなどのニトリルも生成することが確認されたが、これまでミロシナーゼによるグルコシノレート分解時において、一定量の鉄イオンの混入がニトリル生成を促進^{10, 11)}すること、また、シアノエピチオアルカンの生成には特に epithiospecifier protein (ESP) と呼ばれる助長因子の関与¹²⁾が知られている。ESPはアブラナ科野菜に広く分布する¹³⁾ことが明らかにされている。本研究により、野口菜にもこれらのニトリル生成助長因子が存在することが示唆された。

(2) 採取時期によるイソチオシアネートおよびニトリルの消長
前述のように野口菜には3種類のグルコシノレートが含まれることが確認されたが、これらのミロシナーゼ分解物の採取時期による差異を知るために、それらの同定されたグルコシノレート由来成分の消長を検討し、結果を Table2 および Figure4 に示した。なお、野口菜は9月下旬に播種し、

12月下旬から2月下旬、遅くとも3月上旬までが収穫シーズンとされている。そこで、12月初旬から2月下旬までの生育中における前記の成分動向を調べた。

播種後約80日の12月初旬(12月7日)に比べて、イソチオシアネート及びニトリルの生成量は、約100日経過した12月下旬(12月27日)に急激に増大した。その後、2月下旬まで再び低下傾向に向かう量的変動が示された。当地では、野口菜は正月から風味が増して美味になるとされており、この時期のグルコシノレート分解に伴う辛味成分としてのイソチオシアネートの生成量増大とよく符合している。また、腎臓肥大効果¹⁴⁾などが報告されているシアノエピチオアルカン類が特に1月下旬から2月下旬の時期にイソチオシアネートよりも生成量が増えることが示された。

実証データはないが、これは前述の ESP がこの時期の野口菜に増加してくるためと考えられる。ニトリル類、特にシアノエピチオアルカン類の生成抑制¹⁵⁾については、山形県在来のアブラナ属野菜である藤沢カブと雪菜において、前者は食酢で漬け込むことにより、後者は塩漬直前に沸騰水に数秒間浸す処理を2~3回行うことでいずれも劇的に生成が抑制されることが知られている。すなわち、これらのカブや菜類に含まれる ESP が熱に不安定であるためシアノエピチオアルカンが生成しなくなるためと考えられる。1月下旬から2月上旬にシアノエピチオアルカン類の生成量が増大する野口菜は、漬物にするときの湯通しや加熱調理でこの生成を抑制すれば、おいしく食べることができると思われる。以上を踏まえて、今後、野口菜のよりおいしい食べ方や利用が考案され、普及していくことで貴重な在来作物としての野口菜の存続がなされていくことを願うものである。

謝辞

本研究では日光だいや川公園管理事務所並びに同だいや川体験館の職員の方々の協力を戴き、また、貴重な試料野菜を提供戴いたことに対し、深謝致します。

引用文献

- 1) 青葉 高: 野菜-在来品種の系譜, 法政大学出版局, pp.199~217, (1981).
- 2) 農林水産省野菜試験場育種部: 野菜の地方品種 III, p.171 (1980).
- 3) Fenwick, G.R., Heaney, R.K., and Mullin, W.J.: Glucosinolates and their Breakdown Products in Food and Food Plants, in "CRC Critical Review in Food Science and Nutrition", 18, 123-201 (1983).
- 4) 森光康次郎, 内田浩二: イソチオシアネート類の第二相解毒酵素誘導による発癌抑制, 医学のあゆみ, 204, 80-84 (2003).
- 5) Zhang, Y. and Talalay, P.: Anticarcinogenic Activities of

- Organic Isothiocyanates: Chemistry and Mechanisms, Cancer Research (SUPPL), 54, 1976s-1981s (1994).
- 6) Xu, K. and Thornalley, P.J.: Studies on Mechanism of the Inhibition of Human Leukaemia Cell Growth by Dietary Isothiocyanates and their Cysteine Adducts In Vitro, Biochemical Pharmacology, 60, 221-231 (2000).
 - 7) 前田安彦, 小沢好夫, 宇田 靖: アブラナ科植物の生鮮物および塩漬の揮発性イソチオシアナートについて, 日本農芸化学会誌, 53, 261-268 (1979).
 - 8) Spencer, G.F. and Daxenbichler, M.E.: Gas chromatography-Mass spectrometry of Nitriles, Isothiocyanates, and Oxazolidinethions Derived from Cruciferous Glucosinolates, Journal of the Science of Food and Agriculture, 31, 355-367 (1980).
 - 9) 宇田 靖: アブラナ科野菜の塩漬加工に伴う芥子油およびその関連化合物の変化と生理活性, 食生活研究, 15, 9-18 (1994).
 - 10) Tookey, H.L. and Wolf, I.A.: Effect of organic Reducing Agents and Ferrous Ion on Thioglucosidase Activity of *Crambe abyssinica* Seed, Canadian Journal of Biochemistry, 48, 1024-1028 (1970).
 - 11) Uda, Y., Kurata, T., and Arakawa, N.: Effects of pH and Ferrous Ion on the Degradation of Glucosinolates by Myrosinase, Agricultural and Biological Chemistry, 50, 2735-2740 (1986).
 - 12) MacLeod, A.J. and Rossiter, J.T.: The Occurrence and Activity of Epithiospecifier Protein in Some Cruciferous Seeds, Phytochemistry, 24, 1895-1898 (1985).
 - 13) 宇田 靖, 平野浩美, 木村千夏, 沢田真治, 前田安彦: アブラナ科野菜種子および実生のシアノエピチオアルカン生成活性, 栄養と食糧, 42, 155-163 (1989).
 - 14) Gould, D.H., Gumbmann, M.R., and Daxenbichler, M.E.: Pathological Changes in Rats Fed the *Crambe* Meal-glucosinolate Hydrolytic Products, 2S-1-Cyano-2-hydroxy-3, 4-epithiobutanes [*Erythro* and *Threo*] for 90 days, Foods and Cosmetics Toxicology, 18, 619-625 (1980).
 - 15) 宇田 靖, 吉田昭市, 後藤勝利, 江頭宏昌: 藤沢カブと雪菜の生鮮物および漬物中のグルコシノレート由来揮発性成分, 日本食品科学工学会誌, 54, 559-562 (2007).
- (2008 年 8 月 30 日受付)
(2008 年 10 月 30 日受理)

