

ジネンジョ塊茎の機能性成分とその品種間差異

竹内 若子

Functional Components and Differences among Species in Yam (*Dioscorea Japonica*)

Wakako TAKEUCHI

緒 言

「ジネンジョ」(*Dioscorea Japonica*) は日本原産の伝統的な食材で、もともと山野に自生しているイモを「自然薯, ジネンジョ」としてきたが, 現在では, 栽培法の改良等に伴って野生種から選抜・栽培された栽培種が市場に多く出回るようになってきた。

ジネンジョは古来より滋養強壮効果のある代表的な食材の一つとしてよく知られているが「ナガイモ」(*Dioscorea batatas*) に比べるとその市場性は低い。また, その希少性から価格的にも高価であり, もっぱら贈答用や専門業者用としての限られた消費に過ぎない現状にある。

食用植物としての「ヤマノイモ」(*Dioscorea opposita*) は, 世界におよそ600種類, 年間約2,000万トンが生産され, そのうち日本では約15万トンほどが生産されており^{1-2), 7)} 「ジネンジョ」と「ナガイモ」とが「ヤマノイモ」として混同されることも多い。しかしながら, 両者は植物学的には全く別種であり, この両者の交配もないとされている。

「ジネンジョ」にはナガイモとは比較にならない特有の強い粘りの主成分の酸性の糖タンパク質をはじめ, 数種の機能性物質を多量に含有しているという観点から滋養強壮効果が強調されている反面, この機能性成分に関する具体的な情報は極めて少ない。そこで本研究では愛知県の農業試験場から供与された5品種のジネンジョを研究材料とし, 生活習慣病の制圧に向け, ジネンジョ塊茎中の健康機能性成分およびその品種間差異等について比較・検討することを目的とした。

実験方法

1. 実験材料およびその調製法

本実験で用いたジネンジョは, 愛知県農業総合試験場 山間農業研究所で2007年度に栽培・収穫された5品種①稲武2号(以下, 稲武), ②P-16, ③短系, ④大筒早稲(以下, カネコ), ⑤山口県産(以下, 山口)で, 供与された生のまま, もしくは凍結乾燥したものをを用いた。生イモは洗浄後, 塊茎の中央部から上部の(細い方)芽側と下部の(太いほう)根側とに切り分け, ひげ根だけを軽くガス炎で焼却したあと皮付きのまま凍結乾燥化した。これをミルで粉碎化し, 使用まで-30℃で保存した。これより以下の実験(粘性の測定を除く)では, この凍結乾燥粉末を用いた。なお, コントロールとして市販のナガイモ(青森県産)

を同様に処理した凍結乾燥品を用いた。

2. 粘度の測定

音叉型 振動式SV-10粘度計 (エー・アンド・デイ製) を用い、皮付きの生ジネンジョをすり鉢ですりおろした後、測定用の容器に取り入れ、空気を抜いた後、約3分から5分間継続測定をした。

3. 粗タンパク質の測定

凍結乾燥粉末 2~3 gを用い、セミマイクロケルダール法によって分析した。なお、窒素-タンパク質係数は6.25を用いた。

4. デンプン分解酵素 (α -、 β -アミラーゼ) 活性の測定

両活性ともMegazyme社のAssay Kitを用いて測定した。凍結乾燥粉末(0.75g)を採取し、Ceralpha抽出緩衝液(pH 5.4)5.0 mlを加えて磨砕・抽出し、冷却遠心(約24,000×g)後の上清を粗酵素液とした。 α -アミラーゼ活性は α -グリコシダーゼを含むブロック

-ニトロフェニルマルトヘプタオサイド(BPNPG7)を基質としたCeralpha法により、もう一方の β -アミラーゼ活性は

-ニトロフェニルマルトペンタオサイド(PNPG5)を基質としたBetamyl法によった。両活性は、凍結乾燥品 (g) あたりのUnitsによって示した。

5. レジスタントスターチの測定

Megazyme社のResistant Starch Assay Kit によって測定した。すなわち、凍結乾燥粉末サンプルの一定量(100±5 mg)をふた付ねじ口試験管にとり、初めにパンクレアチン α -アミラーゼおよびアミログルコシダーゼ(以下、AMG)処理(37°C, 16 h)後、水溶性変性エタノール処理を繰り返し、沈殿画分を分取した。さらに、この沈殿を2 M-KOHにて溶解後、酢酸ナトリウム緩衝液(pH 3.8)とAMG(300U/ml)を添加・処理して一定希釈した。このうちの一部を検液として用い、グルコース酸化酵素(GOD)、ペルオキシダーゼ(POD)による発色に基づく吸光度を測定(510 nm)し、この値をもとに算出した。

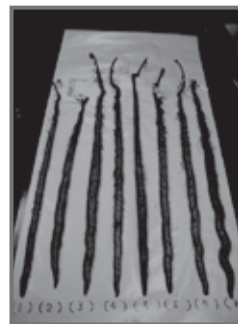
6. タンパク質の抽出およびDEAE-カラムクロマトグラフィーによる分画

凍結乾燥粉末 40g を抽出用緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA)とともに乳鉢で磨砕し、冷却遠心(19,000×g, 30min)後の上清を得た。この上清の40~80%飽和硫酸沈殿画分を分取し、緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 8.0 with 10%グリセロール, 5 mM EDTA)で一晩透析したのち、同一緩衝液で5倍希釈した遠心後の上清をDEAE-Toyopearl(東ソー)カラムクロマトグラフィーの検液とした。溶出はNaCl濃度0から1 Mまでの直線濃度勾配によった。

7. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、等電点電気泳動(IEF)およびPVDF膜転写による糖鎖の検出(PAS染色)

DEAEカラムクロマトグラフィー後のピーク画分をロータリーエバポレーターで2倍に

Sprout side



Root side

Fig. 1 Japanese Yam
: Jinenjyo (*Dioscorea japonica*)

濃縮し、電気泳動用の検液とした。SDS-PAGEはLaemmli³⁾の方法に従い、8～18%グラジエント(Excel Gel, Amersham)を用いて行なった。泳動後のタンパク質バンドの検出はCBB染色または銀染色法によった。また、IEFゲル(pH 4.0～6.5, GEヘルスケア)についても同様に実施した。また、SDS-PAGE、およびIEF泳動後、直ちにPVDF膜にタンパク質を転写し、過ヨウ素酸-シッフ反応(PAS染色Kit, Sigma)による糖鎖の検出をした。

8. 赤血球凝集反応によるレクチン活性^{4-5,8)}

ウサギ保存血(日本バイオテスト)を用い、Tris-HCl with Saline, pH 7.4 with 5 mM EDTAによる2%(v/v)赤血球浮遊液を調製した。

マイクロプレート(96穴, U底プレート)法によって試料溶液50 μ lを2倍毎の希釈列を作成したあと、調製した2%赤血球浮遊液を50 μ lずつ添加し、混合1時間後に血球の凝集反応の有無を判定した。この赤血球凝集反応がみられた最低濃度をレクチン活性値とした。

9. 硫酸化多糖の測定

SDS-電気泳動後のタンパク質をPVDFメンブレンに転写したのち、1,9-ジメチルメチレンブルー(以下、DMB, Sigma製)法により硫酸化多糖の検出をした。

実験結果および考察

1) 粘度における品種間差異と粗タンパク質量

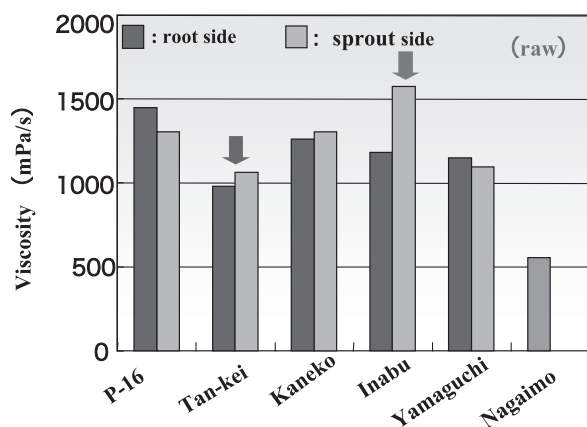


Fig. 2a Comparison of viscosity in Japanese Yams.

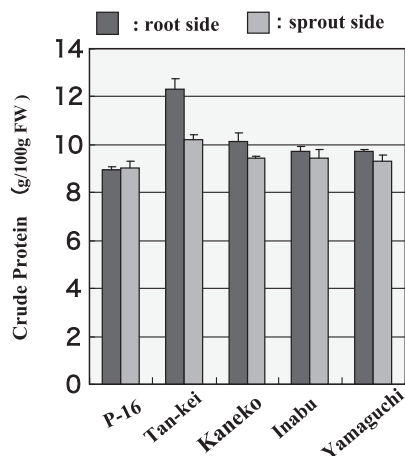
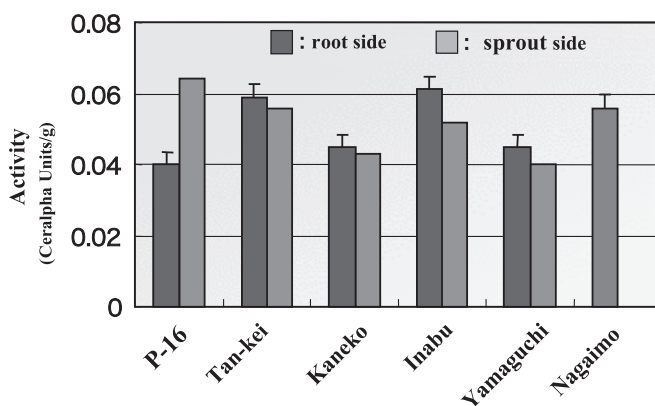
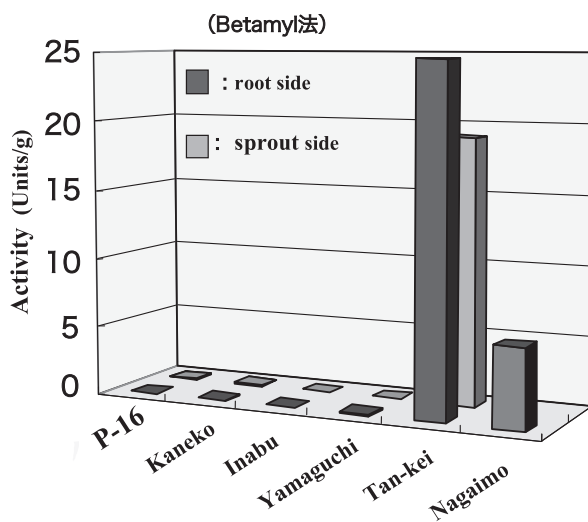


Fig. 2b Comparison of crude protein in Japanese Yams.

5品種のうち粘度の最大値を示したのは「稲武」芽側でおよそ1,600 mPa/s、最小値は「短系」の1,000 mPa/sと、品種間での差異とともに、どちらかといえば根側よりも芽側の方に粘度が高い傾向もみられた(Fig. 2a)。いずれの品種の「ジネンジョ」も「ナガイモ」に比べると2～3倍の強い粘性を確認した。このジネンジョ特有の強い粘性と粗タンパク質含量(Fig. 2b)との間には、それほど強い相関性は認められなかった。

2) α , β -両アミラーゼ活性の比較

「ジネンジョ」は生食であっても毒性がないのはアミラーゼ活性が強いためだという説⁶⁾もあるが、 α -アミラーゼ活性については、ナガイモと類似した挙動がみられた (Fig. 3a)。もう一方の β -アミラーゼ活性においては、「短系」のみが他の4品種に比べ、約300倍 (約25U/g)、「ナガイモ」の3~4倍といった高い活性 (Fig. 3b) を示し、本実験で用いた「ジネンジョ」の中では特異的な存在であった。さらに「ナガイモ」と「ジネンジョ」とは種が異なることから交配は考えられず、「ナガイモ」に近い特徴をもつ品種ではないかと推察された。

Fig. 3a Comparison of α -Amylase activity in Japanese Yams.Fig. 3b Comparison of β -Amylase activity in Japanese Yams.

3) レジスタントスターチ量の比較

α , β の両アミラーゼ作用による消化性デンプンだけでなく、最近、難消化性デンプン（レジスタントスターチ）の果たす機能が注目されているが、このレジスタントスターチ量の測定結果はFig. 4のとおりであった。 α , β -アミラーゼ活性は、根側に高く、このレジスタントスターチも同様の傾向がみられ、平均的にみても「ナガイモ」の約1.3倍高い結果であった（Fig. 4）。

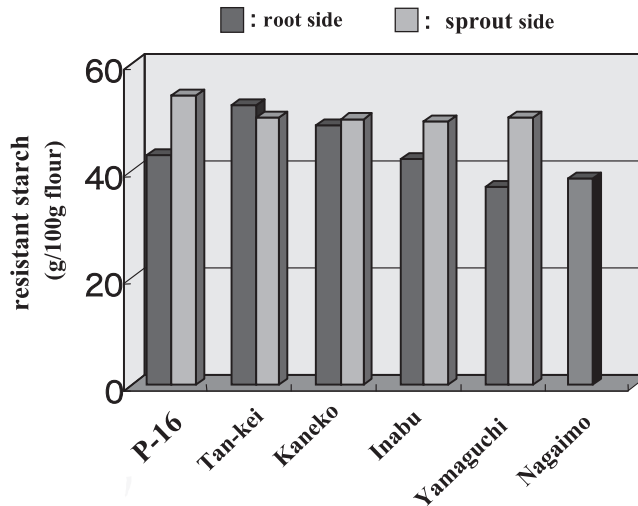


Fig. 4 Amount of resistant starch in Japanese Yams.

4) カラムクロマトグラフィーによる糖鎖の検出とレクチン活性

レクチン活性は、DEAE-Toyopearlカラムクロマトグラフィー（0～1.0 M NaCl溶出）からの3ピーク画分を（Fig. 5 a）を用いた。すなわち、ウサギ赤血球細胞の凝集活性みること（実施し）その結果はTable 1に示した。3ピークのうち、ピーク1,2はレクチン活性をもつことから糖たんぱく質であることが示唆された。

Table 1 Measurement of aggregation activity using DEAE-fractions

「Inabu」	最低凝集濃度 (μ g protein/ml)
Peak I	488
Peak II	430
Peak III	ND *

* ND : not detect

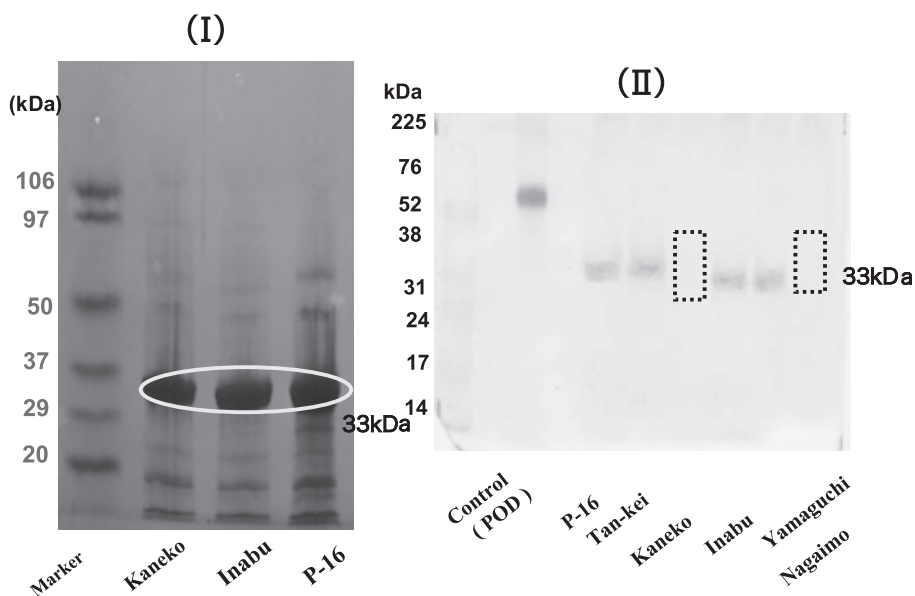


Fig. 5a SDS-PAGE and detection of a glycoprotein using PAS staining.

I : SDS-PAGE (8~18% gradient gel)

II : Transcription by Western blotting (14% homogeneous gel)

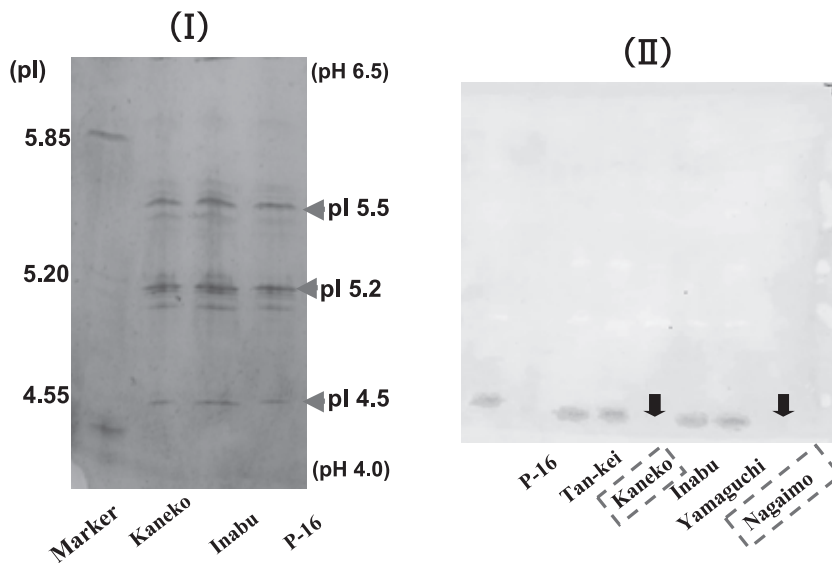


Fig. 5b Isoelectric focusing gel electrophoresis detection of a glycoproteins using PAS staining.

I : IEF (pH 4.0~6.5) gel electrophoresis

II : IEF-Western blotting (PAS-staining)

本実験におけるレクチン活性は、ウサギ赤血球による凝集反応によったが、ウサギとヒト赤血球との比較をした場合、ウサギ赤血球の不安定さが示唆されていることから、ヒト赤血球を用いた検討が必要である。

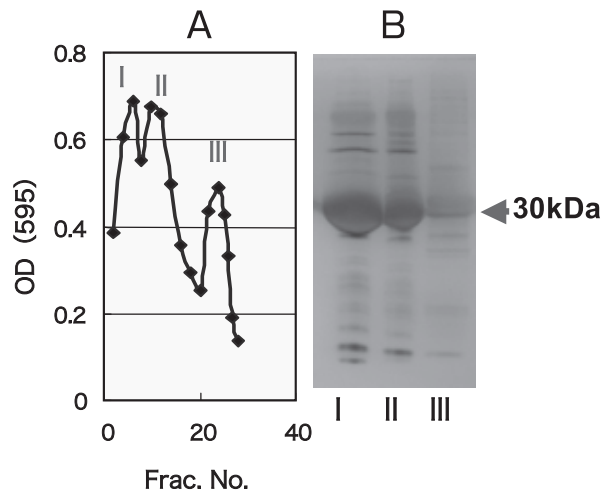


Fig. 6 Elution profile of protein on a column of DEAE-Toyopearl and SDS-PAGE pattern.

A : DEAE-Toyopearl 650M

B : 8~18% gradient gel

要 約

選択栽培された5品種の「ジネンジョ」塊茎を生のまま、あるいは凍結乾燥化し、これらをもとに物理的な性質をはじめ、ジネンジョ特有の強い粘性成分の酸性糖タンパク質等の機能性成分ならびに品種間差異について比較・検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. 物理的な性質として、粘度は最高値が「稲武: Inabu」、最低値が「短系: Tan-kei」で、それぞれ1,600 mPa/s, 980 mPa/sとなり、両者間には約1.6倍もの差異がみられた。また、根側に比べ、芽側で粘りが強い傾向がみられ、同じイモでの局在性の違いが明らかになった。
2. デンプン分解酵素のうち、 β -アミラーゼ活性では「短系」が顕著に高く(他品種の300倍)その特異性を確認し、ナガイモ的な特徴をもつ品種ではないかと推察した。
3. SDS-PAGE後の主要タンパク質バンドは約33 kDaは、等電点電気泳動ならびにDMB法、PAS染色法によって硫酸化多糖であることを確認した。
4. 赤血球(ウサギ)凝集反応の結果、最低濃度430 μ g pro./mlにて凝集反応を確認した。これより本ジネンジョ糖タンパク質は、レクチン活性をもつことが示唆された。

謝 辞

最後に、本研究にあたり「ジネンジョ」の提供ならびにご助言を賜りました愛知県農業総合

試験場 山間農業研究所園芸グループに深謝致します。また、実験にご協力いただきました本学平成19年度卒論生、花鳥茉莉子・松田法子さんに感謝の意を表します。

なお、本研究の一部は本学2008年度特別研究助成により行ったことを記すとともに、この内容の一部については日本食品科学工学会第55回大会（2008年9月、京都大）において口頭発表した。

文 献

- 1) 志和地 弘信, 遠城 道雄, 林 満:形態的形質および RAPD 法によるヤマイモ (*Dioscorea spp.*) の種の分類と系統の区分, 熱帯農業 44 (4), 229-237 (2000)
- 2) 飯田孝則:ジネンジョ, 農文協, (2008)
- 3) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4; Nature, 227,680 (1970)
- 4) Julie Wild, Donald Robinson and Bryan Winchester : Isolation of mannose-binding proteins from human and rat liver, Biochem. J., 210, 167-174 (1983)
- 5) 谷口直之 編:わかる実験医学シリーズ「ポストゲノム時代の糖鎖生物学がわかる」, 羊土社 (2007)
- 6) 荒井 滋, 浅尾浩史, 小島博文, 平井正志:貯蔵蛋白分析によるヤマイモ類の識別, 奈良農試研報20, 59-63 (1989)
- 7) 浅見 逸夫, 田中 喜久:凍結乾燥によるジネンジョの有効利用に関する研究, 愛知農総試験報24, 173-181 (1992)
- 8) 山崎信行, 八木史郎, 小田達也, 畠山智充, 小川智久:レクチン研究法, 生物化学実験法52, 学会出版センター (2007)