

クワ葉の機能性成分含量を高めるための環境要因および  
適性品種の選抜と育種に関する研究

Study on Environmental Factors for Specific Functional Component Increase in  
Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves with Selection and Breeding of  
Suitable Cultivars

杉山万里

2017



## 目次

凡例	
緒論	1
第1章 クワ葉に含まれる機能性成分含量の品種間差および品種改良	7
第1節 クワ葉に含まれる機能性成分含量の品種間差	7
第2節 ケルセチン 3-(6-マロニルグルコシド) (Q3MG) の遺伝解析 およびクワの成分育種の可能性	29
第3節 高 Q3MG 含量クワ新品種 ‘蒼楽’ の育成	36
第2章 栽培環境条件がクワ葉に含まれる機能性成分含量に及ぼす影響	53
第1節 日照がクワ葉に含まれる機能性成分含量に及ぼす影響	53
第2節 窒素施肥量がクワ葉に含まれる機能性成分含量に及ぼす影響	69
第3章 クワ葉に含まれる機能性成分の季節変化	86
第1節 クワ葉に含まれる機能性成分の季節変化	86
第2節 温度が 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) 含量に及ぼす影響	101
総合考察	105
総合摘要	112
Summary	115
引用文献	119
謝辞	125
公表論文リスト	126

## 凡例

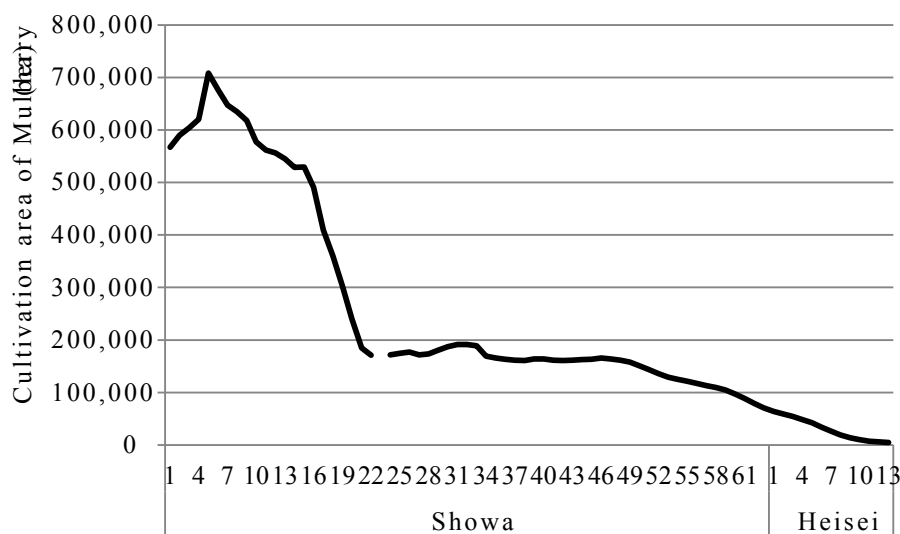
本論中に以下の略号を用いた.

DNJ	1-deoxynojirimycin
K3MG	kaempferol 3-(6-malonylglucoside)
K3RG	kaempferol 3-(6-rhamnosylglucoside)
MT	malonyltransferase
Q3AG	quercetin 3-(6-acetylglucoside)
Q3MG	quercetin 3-(6-malonylglucoside)

## 結論

クワ（桑）は寒帯から熱帯まで広く分布しているクワ科 (*Moraceae*) クワ属の喬木性の広葉樹である。クワ属は、1917年、小泉により雌ずいの花柱の長さ、柱頭の形態を主に、葉形、葉先と葉底の形状、葉脈、葉の鋸歯の形状を加味し24種1変種に分類されている(松尾, 1989)。クワは養蚕の飼料作物として古くから栽培されている。日本で主に栽培されている品種はヤマグワ (*M. bombycis* Koidz.), カラヤマグワ (*M. alba* L.), ログワ (*M. multicaulis* Perr.) の3種で、寒冷地ではヤマグワ、温暖地ではカラヤマグワ、暖地ではログワに属す品種が多い。また、西南諸島ではシマグワ (*M. acidosa* Griff.) が栽培されている。クワはそのまま放置すれば喬木となるが、通常の栽培では毎年地上部近くまで枝を切り戻し再成長する徒長枝の葉が収穫の対象となる。クワは再発芽、伸長ともに旺盛で、春萌芽前に前年枝を剪定すれば、再発芽した枝は落葉期までに3m以上に達する。

クワは日本においても昭和の中頃まで養蚕の飼料として重要な作物に位置づけられ、中山間部平野部とわず広く栽培されていた。昭和初期頃は、クワの栽培面積は50万haを超え、統計上最も栽培面積が多かったのは昭和5年の70万haであった。その後、第二次世界大戦中に20万haを下回るまで激減し、昭和50年頃まで横ばいに推移した後、徐々に減少していった(第1図)。これは昭和後期以降、化学繊維の普及による生糸産業全般の衰退、さらには生産者の高齢化、後継者難に大きく起因していると思われる。平成13年にはクワの栽培面積は5000haを下回り、その後統計調査も打ち切りとなっている(政府統計の総合窓口: e-Stat, 2011)。養蚕の廃止とともに桑園は抜根され、あるいは放置されたまま廃園となり、かつては主要作物として地図記号にもあったクワ畑も、現在ではほとんど見かけることがなくなった。



**Fig. 1.** Changes in total mulberry cultivation area in Japan

Data was searched from e-Stat (Japanese government statistics)

しかし一方で、クワは養蚕の飼料としてだけではなく、昔から果樹や漢方薬としても利用されてきている。特に漢方では、クワの枝や根の皮、実、葉などあらゆる部分が利用され、養蚕が盛んな地方では健康のためにクワの葉をお茶として飲む風習があったとされる。鎌倉時代の書物、栄西による「喫茶養生記」の中には「5種の病を、桑をもって治療する」と、お茶に並ぶ滋養を有する作物としてクワの効能、クワの飲み方が記されている。この中で、「桑粥、桑湯を服用すれば渴きを覚える飲水病（糖尿病）に数日で効果が現れる」と、クワの葉の糖尿病改善効果についての記載がある。このように、科学的根拠が明らかでない時代からクワは体に良いとして食用利用されていた。

近年、健康維持について多くの人に関心を示すようになり、食品がもつ機能性成分が注目されている。食品には、生体の生理機能を調整する働き（体調節機能）があり、食品の3次機能と呼ばれている。これは、昭和59年から61年に実施された研究：文部省特定研究「食品機能の系統的解析と展開」の成果として提唱されたものであり、世界に先駆けて、我が国において「機能性食品」の概念が生まれたとされる。さらにH27年度から、健康食品をはじめとする保健機能を有する成分を含む加工食品および農林水産物について、機能性の表示が容認された（機能性表示食品制度）。このように、食品摂取による疾病予防

の取り組みが国策として行われている。クワは古来漢方で用いられていたことから、国内外で積極的に研究が進められ、その機能性成分に関する科学的エビデンスは着実に増えてきている。

クワ葉の機能性については、高血糖抑制作用 (Andallu ら 2001 ; Evans ら, 1985 ; Kimura ら, 2007), 高血圧抑制作用 (Naowaboot ら, 2009), 動脈硬化抑制作用 (Enkhmaa ら, 2005) アルツハイマー予防効果 (Kaengkhan ら, 2009 ; Niidome ら, 2007), 抗酸化 (Choi ら, 2013a ; Katsube ら, 2006), 抗腫瘍 (Park ら, 2013), 抗炎症 (Chauhan ら, 2015 ; Chen ら, 2013), 抗肥満 (Tsuduki ら, 2013) など国内外で多くの報告があり、それら効果や成分の特定、メカニズムが解明されつつある (Butt ら, 2008 ; Nakagawa ら, 2013 ; 鈴木ら, 1996)。

クワの機能性成分の中で最も知られているのは高血糖抑制作用を示す 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) (第 2 図) で、フルクトースのアミノ化を経て生成される。糖類似アルカロイドである DNJ は蚕以外の昆虫の忌避物質として作用し、他の植物には殆ど見られないクワに特徴的な成分であり (Konno, 2011),  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害により、腸管での糖吸収を

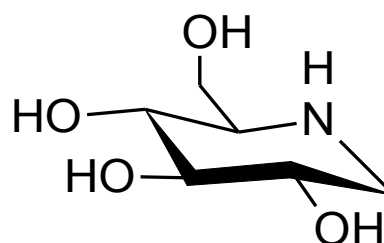


Fig. 2. 1-deoxynojirimicine

抑制する (Evans ら, 1985)。これは、前述の「喫茶養生記」でも触れられていたクワの飲水病への効果を科学的に証明したものである。

またクワは、食品の機能性として近年注目を集めている抗酸化作用も有する。クワ葉は抗酸化活性が高く、その主要成分がクロロゲン酸 (第 3 図) とフラボノールであること、フラボノールが高血圧抑制、動脈硬化抑制、癌細胞の抑制などに関与していることが報告されている (Enkhmaa ら, 2005 ; Katsube ら, 2006 ; Katsube ら, 2009 ; Naowaratwattana ら, 2010)。フラボノールはポリフェノールのひとつフラボノイドに属す。フラボノイドは、ベンゼン環 2 個を炭素 3 個で結合した C6-C3-C6 骨格を持つ化合物で、花の色素成分や木本植物の心材成分などとして存在し、紫外線に対する防御や昆虫誘引物質としての役割を果たしている。フラボノイドには、カルコン、フラバノン、フラボン、フラバノール、オーロン、イソフラボン、カテキン、ロイコアントシアニン類があり、フラボノールはフラバノールからアントシアニンと同じ代謝系で合成

される。基本骨格のC環4位がケトンで2位と3位の間が不飽和であればフラボノール、C環が完全な芳香族環で正電荷を有していればアントシアニンとなる。Katsubeら(2006)により、クワ葉に含有されるフラボノール配糖体のなかで、その主要な成分がケルセチン 3-(6-マロニルグルコシド) (Q3MG) (第4図)であること、また、Q3MGはDNJと異なる機構、つまり肝臓への酸化ストレス抑制により血糖調節作用も有する(Katsubeら, 2010)ことが明らかにされている。これらのことから、Q3MGはクワの注目すべき機能性成分の一つと考えられる。また、前述のクロロゲン酸もクワ葉に多く存在し、クワの抗酸化作用の主要成分として位置づけられている。

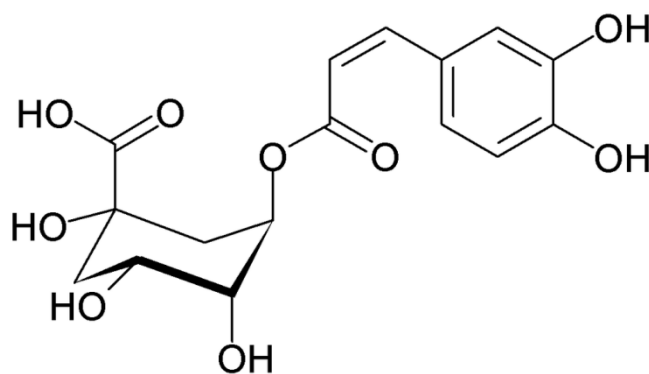


Fig. 3. Chlorogenic acid

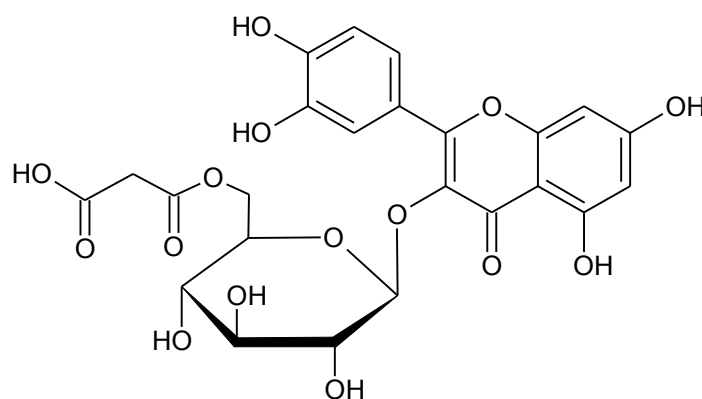


Fig. 4. Quercetin 3-(6-malonylglucoside)(Q3MG)



クワ葉の機能性に関する研究が進むとともに、近年急速にクワ葉が機能性食品として広く知られるようになった。お茶をはじめ食品原料の利用は着実に増え、クワ葉はケール、大麦若葉と並び青汁原料として定番化しつつある。また、エキス末やパウダーの形態として、お茶や麺、菓子類など一般食品などにも配合されるようになってきた。これらの原料は主に輸入に頼っているが、徐々に国内生産も広がりつつある。島根県では、十数年前からいち早くクワの機能性に着目し、遊休桑園を利用した桑茶の生産販売を開始した企業がある。これは中山間地域における雇用の創出、農業振興、健康食品産業への波及効果をもたらし、6次産業化の成功例ともなっている。この企業は、今のところ有機 JAS の認定を受けることで他産地との差別化に成功している。しかし、近年のお茶需要の減少にともない、全国的に茶栽培からクワ栽培へ変わる生産者が増えつつある。これら生産者も有機 JAS を積極的に取り入れていることから、今後販売競争は激化していくと予想され、有機 JAS に代わる商品の差別化が必要になる。

一方、栽培場面においては原料クワ葉の安定生産が望まれる。特に機能性成分の含有量は商品原料の品質として重要であり、食品の原料となるクワ葉の機能性成分含量を増やすことは、機能性食品として摂取した場合の効果を高めるうえで、さらに商品の付加価値を付与する手段として有効である。これまで養蚕業の全盛期は、養蚕栽桑に特化した研究機関も多く、クワの品種改良、栽培試験などの試験研究が盛んに行われていた。しかし、古来漢方として利用されていたとはいえ、食品としてのクワに対する研究の歴史は浅い。果実利用においては近年果実用クワ品種‘ポップベリー’‘ララベリー’などの品種がいくつか開発されてはいるものの、これまで食品、特に機能性に特化した品種改良はほとんど行われていなかった。現在日本で栽培されているクワは、養蚕の飼料用、食用ともに、‘一ノ瀬’および、‘しんいちのせ’が中心である(政府統計の総合窓口：e-Stat, 2011)。しかし、これらの品種はいずれも養蚕の飼料としての特性を目標に選抜育成された品種であり、必ずしも機能性成分等食用に適した特性を持たない。一方、クワ栽培場面でも養蚕業のために開発された技術が用いられている。クワ葉の収穫時期は蚕期・蚕齢により、また飼育方法によって大きく異なるとされるが、収量性に関しては養蚕飼料、食用いずれの栽培方法にも大きな違いはないと考えられる。しかし、一般的に作物中に含まれる多くの成分は品種、栽培方法などにより含有量が変化することが知られており、養蚕用の品種・栽培方法も必ずしも食用としてのクワに適しているとは限

らない。原料となるクワ葉の品質向上には、これらの機能性成分を安定的に高生産するようなクワ品種、栽培条件の検討が必要である。そこで、本研究では、高い機能性を有するクワ葉の安定生産を目的に、葉中機能性成分であるフラボノール（特に Q3MG）、DNJ、クロロゲン酸の高含量条件に対して、品種および栽培条件の両面からアプローチを試みた。

第 1 章では、育種の基礎的知見とするために、クワ葉中フラボノールおよび DNJ の品種間差異を明らかにするとともに、交雑育種による Q3MG 高含量品種育成の可能性を検討した。さらに、クワ葉のフラボノールとして最も重要である Q3MG をターゲットに成分育種を行い、Q3MG 高含有クワ品種の育成を試みた。第 2 章では、クワ葉に含まれるフラボノール、クロロゲン酸、DNJ に着目し、それら成分の含有量に影響を及ぼすと考えられる栽培環境要因である日照条件と窒素施肥量について検討した。第 3 章では機能性成分を多く得るための収穫時期を明らかにするために、クワ葉中フラボノール、DNJ、クロロゲン酸の季節変化を調査した。

## 第1章 クワ葉に含まれる機能性成分含量の品種間差および品種改良

現在日本で栽培されているクワ品種は、養蚕の飼料用、食用ともに、‘一ノ瀬’および、‘しんいちのせ’が中心となっている（政府統計の総合窓口：e-Stat, 2011）。しかし、これらの品種はいずれも養蚕の飼料に特化した特性を目標に選抜育成された品種であり、必ずしも機能性成分等食用に適した特性を持たない。機能性食品として摂取した場合の効果を高めるために、また商品の付加価値を付与する上で、原料であるクワ葉の機能性成分含量を増やすことが有効である。そこで、本章では既存品種の中から機能性成分を高含有する品種を選定するために、さらに成分育種による品種改良を視野に、クワの葉中機能性成分であるフラボノールおよびDNJの品種間差を調査した。また、クワ葉の主要なフラボノール配糖体であるケルセチン 3-(6-マロニルグルコシド) (Q3MG)の遺伝様式を調査し、得られた知見をもとにQ3MGを高含有する品種の開発に取り組んだ。

### 第1節 クワ葉に含まれる機能性成分含量の品種間差

‘一ノ瀬’、‘しんいちのせ’は、養蚕、食用問わず、現在最も広く栽培されているクワ品種である。これらは本来蚕の飼料として開発された品種であり、養蚕の飼料としては収量性、栽培適性、品質ともに優れているが、食用クワ葉としての適性が優れているとはかぎらない。特に、機能性成分を目的とした食用クワ葉の品質として重要とされるのはクワ葉中の含有量である。そこで、現在栽培されている‘一ノ瀬’よりクワの機能性成分として注目されるQ3MG、1-デオキシノジリマイシン (DNJ) 含量の多い品種を探索するとともに、育種の交配親選定などの基礎的知見を得る目的で、クワ葉中フラボノールおよびDNJの品種間差を調べた。また、調査期間が複数年にわたるため、これら成分は栽培環境条件の影響を受けやすいと考えられることから、年次間差についても調査した。

### 材料および方法

#### 供試材料

調査個体は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（茨城県つくば市大わし）で農業生物資源ジーンバンクの遺伝資源として栽培保存されている株を用いた。サンプリングは2007年8月1日、2008年8月5日、

2009年8月11日に行い、3年間で延べ176品種を供試した。このうち3年間にわたり供試した59品種を用いて年次間差を調査した。サンプリングは以下のとおり行った。各品種2株を用い、それぞれの最長枝条の完全展開葉のうち最も若い葉から下位3枚の葉身を採取した。供試品種の選定にあたっては、日本で主に栽培されていたカラヤマグワ (*M. alba* L.)、ヤマグワ (*M. bombysis* Koidz.)、ログワ (*M. multicaulis* Perr.) の3種を中心に、遺伝的に遠いもの、特徴的な形態を持つもの、栽培適性に優れているものなどの特性を考慮した。供試した種別品種数は次のとおりである。カラオニグワ (*M. nigriiformis* Koidz.) : 2品種、マルバグワ (*M. notabilis* C. K. Schn.) : 8品種、ヤマグワ : 42品種、シヤムグワ (*M. rotundiloba* Koidz.) : 3品種、シマグワ (*M. acidosa* Griff.) : 1品種、ハチジョウグワ (*M. kagayamae* Koidz.) : 4品種、ケグワ (*M. tiliaefolia* Makino.) : 1品種、アフリカグワ (*M. mesozygia* Stapf.) : 1品種、ヒメグワ (*M. microphylla* Buckl.) : 1品種、ログワ : 58品種、カラヤマグワ : 48品種、カントングワ (*M. atropurpurea* Roxb.) : 3品種、不明 : 1品種。

## 抽出方法

生葉は60℃で36~48時間、乾燥機 (SANYO CONVECTION OVEN) で通風乾燥し、ミルサー (IWATANI MILLSER 700G) で粉砕した。粉砕したクワ葉を100 mg 秤量し、10 ml の60%エタノール (和光純薬) を加え、30℃で3時間振とうした。10000 g で5分間遠心分離し、上澄みを0.45 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC) で濾過しサンプルとした。

## 分析方法

フラボノールの定量は Waters 社製の HPLC, Alliance Separations Module 2695, 検出器 Photodiode Array Detector 2996 を用いて以下のとおり行った。カラム wakosil-II 5C18 RS (250 × 4.6 mm) (和光純薬), 移動層 0.1%ギ酸 (ナカライテスク) を含む 20%アセトニトリル (和光純薬), 流速 1 ml/min, カラム温度 40℃, 検出波長 370 nm, の条件で定量した。標準品ルチン (和光純薬), イソケルシトリン, アストラガリン (フナコシ) は購入し, K3RG, Q3MG, K3MG, Q3AG はそれぞれクワ葉から精製し (Katsube ら, 2006) 用いた。DNJ は Kim ら (2003) の方法を用いて行った。HPLC の条件は以下のとおりである。カラム:wakosil-II 5C18 RS (250 × 4.6 mm) (和光純薬), 移動層:0.1%ギ酸を含む 45%アセトニ

トリル，洗浄 100%メタノール，流速 1 ml/min，カラム温度 40℃，励起波長 254 nm，蛍光波長 322 nm の条件で定量した．標準品 DNJ(フナコシ)は購入した．

## 統計処理

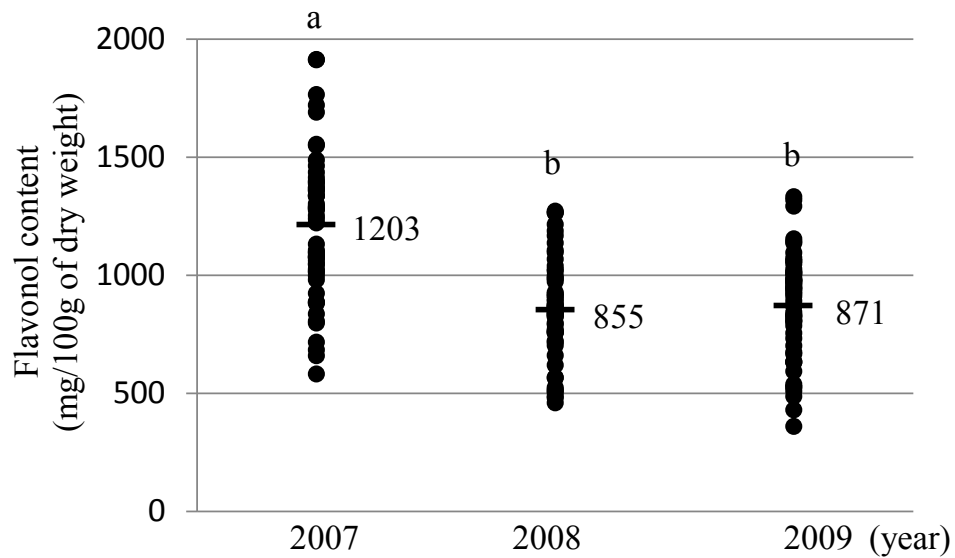
データの統計処理は統計処理ソフトウェア JMP (ver. 9.0) SAS Institute Japan を用いて行った．データは Turkey の多重比較検定により解析した．

## 結果および考察

### フラボノール含量の年次間差

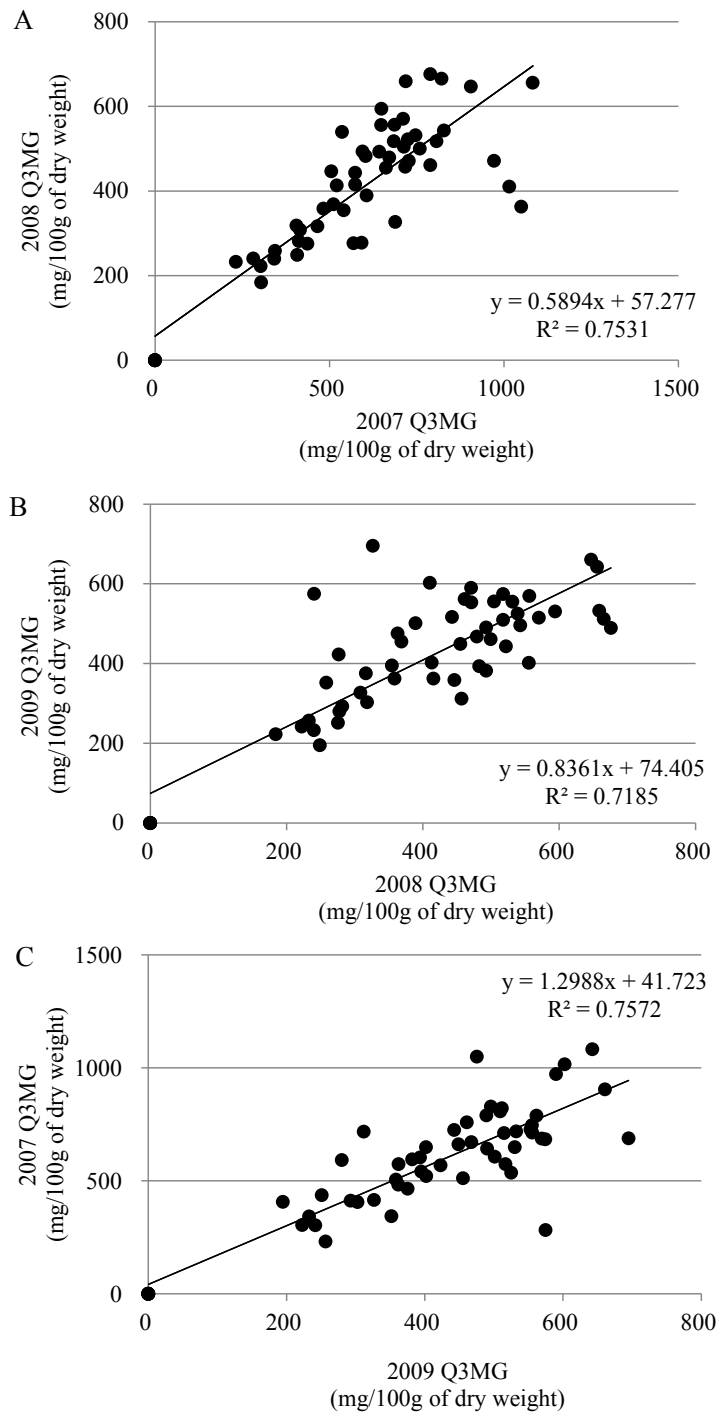
第 1-1-1 図に 2007 年，2008 年，2009 年における 59 品種のフラボノール含量を示した．各年の 59 品種のフラボノール総含有量の平均値は，2007 年が 1203 mg/100 g dry weight (DW)，2008 年が 855 mg/100 g DW，2009 年が 871 mg/100 g DW となり，2007 年と 2008 年，2009 年の間に有意差が認められた．2007 年は 2008 年，2009 年に比べて含量が高く，最大値，最小値の差が大きくなった．それに対し，含有量の低い年にはその差も小さくなり，含有量が同程度の品種においては一部順位の逆転が認められた．第 1-1-2 図に 59 品種それぞれの年次ごとの Q3MG 含量を比較した結果を示す．年次ごとの Q3MG 含量の相関係数は 2007 年と 2008 年が 0.91，2008 と 2009 年が 0.84，2007 年と 2009 年が 0.87 であり，3 年間の重相関係数は 0.88 となった．品種ごとの相対的な含有量の多少は，いずれの年においてもかわらず品種間における相関が認められた．これは，総フラボノール含量，ルチンなど他のフラボノール配糖体においても同様の傾向を示した．代表的品種のフラボノールの組成，割合の 3 年間の平均を第 1-1-1 表に示した．フラボノールの組成および割合は年次間で変わらず品種に依存した．作物の収量，品質などの年次変動はしばしば気象条件などの栽培環境により引き起こされる．同様に，機能性成分含量についても栽培環境要因に影響を受けることが知られている．例えばアントシアンの蓄積が光や温度により変化することがブドウ果皮，トルコギキョウなどで報告されている．フラボノールはアントシアニン，プロアントシアニジンと同じくフラボノイド経路を経由して生成される．したがって，フラボノールもアントシアニンと同様の制御をうける可能性が高い．サンプリング前 10 日間のつくばの平均日照時間は 2007 年が 5.3 時間，2008 年が 4.4 時間，2009 年が 1.8 時間であり，フラボノール含量が最も高い 2007 年の日照時間が 2008 年，2009 年に比べ多かったことから，クワ葉の

フラボノール含有量の年次間差に及ぼす要因の一つとして日射量が考えられた。



**Fig. 1-1-1.** Year-to-year variations of flavonol content per dry weight of leaves.

Horizontal short bars and numbers in the figure indicate the means of 59 cultivars for each year. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. There was a significant difference between a and b ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 1-1-2.** Correlation of quercetin 3-(6-malonylglucoside) (Q3MG) content in each cultivar between year (A) 2007 and 2008, (B) 2008 and 2009, and (C) 2007 and 2009.

A circle indicates each mulberry cultivar. The multiple correlation coefficient was 0.88. Each year-to-year correlations were 0.91 (2007 v.s. 2008), 0.84 (2008 v.s. 2009), and 0.87 (2007 v.s. 2009).

**Table 1-1-1.** Relative proportions of flavonol glycosides in four representative mulberry cultivars<sup>z</sup>

Cultivar	Rutin (%)	Isoquercitrin (%)	K3RG (%)	Q3MG (%)	Astragalín (%)	Q3AG (%)	K3MG (%)
Ichinose	13.6±0.7	3.9±0.1	3.0±0.2	53.5±1.4	2.9±0.2	0	23±1.5
Itouwase	32.4±3.3	11±3.5	11.5±3.2	29.1±7.0	3.2±0.5	0	12.7±2.8
Popberry	45.7±1.4	25.5±0.8	23.5±1.1	0	5.4±0.5	0	0
Keguwa	24.4±2.2	31±1.3	0.6±0.3	24.8±0.6	1.3±0.1	15.7±1.3	2.1±0.1

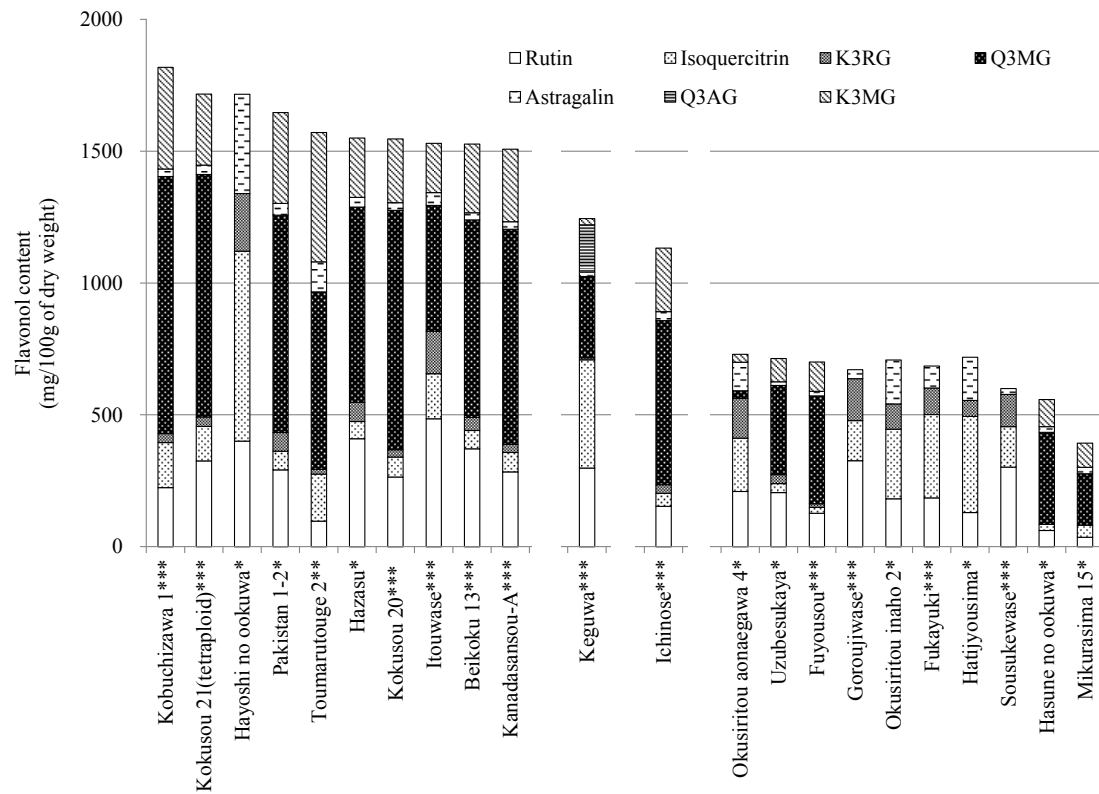
<sup>z</sup> Allmulberry cultivars are classified into four groups: Ichinose-type (largest Q3MG proportions; 155/176 cultivars), Itouwase-type (small Q3MG proportions; 6/176 cultivars), Popberry-type (no Q3MG; 14/176 cultivars), and Keguwa-type (uniquely contains Q3AG; 1/176 cultivars). Data represent the mean ± SE over three years.



## フラボノールの品種間差

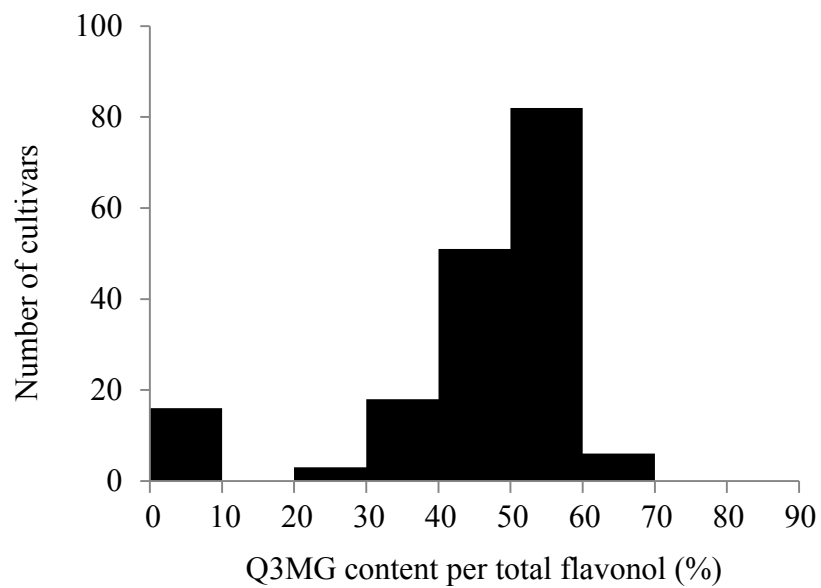
調査年は品種により 1~3 年と異なり,フラボノール含有量に年次間差が認められたことから,異なる年次に供試した品種のフラボノール含有量の比較には補正が必要である. 品種ごとの含有量,組成およびその割合は年度による影響が少ないことから,補正には 3 年に渡って供試した 59 品種の平均値を用いた. 補正值は 59 品種の平均値 2007 年 1203 mg/100 g DW, 2008 年 855 mg/100 g DW, 2009 年 871 mg/100 g DW から算出し,それぞれ 2008 年の供試品種には 1.41 を, 2009 年の供試品種には 1.38 を乗じて 2007 年度の値として表示した. 複数年供試した品種については補正後の平均値を用いた.

第 1-1-3 図に,供試 176 品種のうちフラボノール総量上位 10 品種,下位 10 品種,および現在最も多く栽培されている‘一ノ瀬’のフラボノール含有量を示した. フラボノール総量が最も高かったのは‘小淵沢 1 号’の 1819 mg/100 g DW で,最も少ない‘御蔵島 15’の 393 mg/100 g DW とは約 5 倍の差があった. また,供試した 176 品種のうち 73 品種が,現在の主流品種である‘一ノ瀬’より高い値を示した. Q3MG 含量においても‘小淵沢 1 号’は現在の主要品種である‘一ノ瀬’の 607 mg/100 g DW に対して 1082 mg/100 g DW と 2 倍程度高かった. クワ葉に含まれるフラボノールの組成は品種に特異的で(第 1-1-3 図),176 品種中,約 9 割の品種は葉中フラボノール配糖体としてルチン,イソケルシトリン,アストラガリン, K3RG, Q3MG, K3MG の成分を含有し,含有量は Q3MG が最も高かった. ケグワには特異的に,他のクワ品種に存在しない Q3AG が含有されていた. 一方,フラボノール中の Q3MG 含有率をみると,供試 176 品種のうち Q3MG を持たない 14 品種と‘祝津の大桑’,‘奥尻島青苗川’を除くすべての品種の Q3MG 含有率は 30%~62%の範囲におさまり,60%を上限とする切断正規分布を示した(第 1-1-4 図). 14 品種は Q3MG を全く持たず,それらの品種は K3MG も含有しなかった. Q3MG, K3MG を持たない品種で最も含有量の高いフラボノールは 8 品種がルチン,6 品種がイソケルシトリンであり,その含有率はそれぞれ 45~61%,39~55%であった. 供試した種,品種数および Q3MG の有無を第 1-1-2 表に示した. Q3MG を持たない品種は 12 種のうち 5 種に含まれ,8 品種がヤマグワに属した. 残り 6 品種はシャムグワ:供試 3 品種中 2 品種,ハチジョウグワ:供試 4 品種中 1 品種で,供試品種数に対する出現率が高かったが,供試品種数が多いログワ,カラヤマグワはそれぞれ 2 品種,1 品種と出現率が低かった.



**Fig. 1-1-3.** Flavonol content of mulberry cultivars.

The cultivars shown are the ten containing the highest and the ten containing the lowest amounts of total flavonols among the 176 cultivars examined. In the center, 'Keguwa' is shown as having a unique component, and 'Ichinose' is shown as a most-commonly seen cultivar. Cultivars were analyzed for 1 to 3 years. \*: tested for only one year, \*\*: mean of two years, \*\*\*: mean of three years.



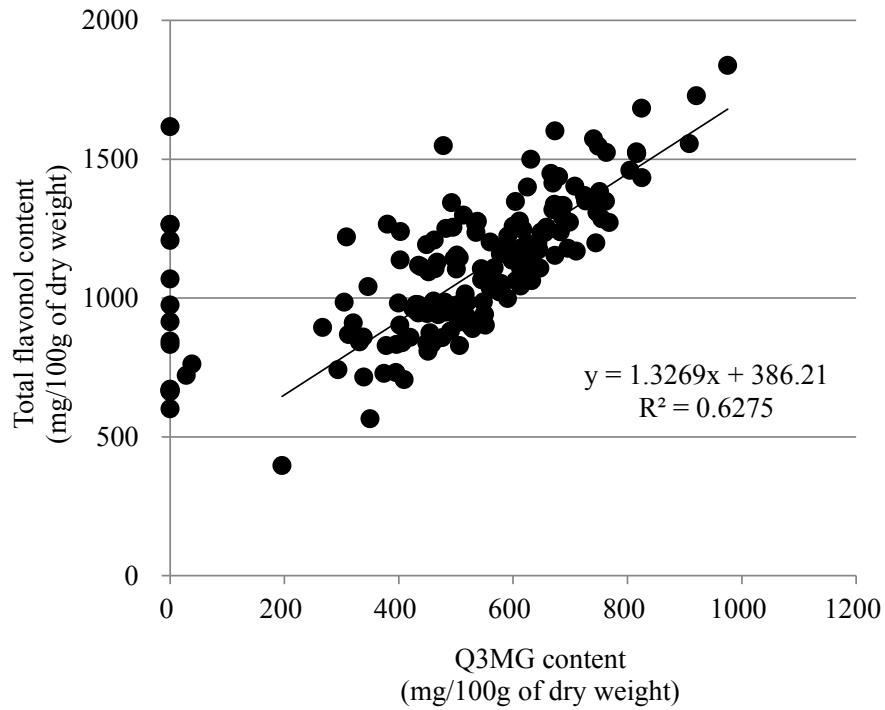
**Fig. 1-1-4.** Frequency distribution of the percent of quercetin 3-(6-malonylglucoside) (Q3MG) content per total flavonol content.

**Table 1-1-2.** Cultivars without quercetin 3-(6-malonylglucoside) (Q3MG) identified in mulberry species.

Species	Number of cultivars	Number of Q3MG-free cultivars
<i>Morus nigriformis</i> Koidz.	2	0
<i>Morus notabilis</i> C.K.Schn.	8	0
<i>Morus bombysis</i> Koidz.	42	8
<i>Morus rotundiloba</i> Koidz.	3	2
<i>Morus acidosa</i> Griff.	1	0
<i>Morus kagayamae</i> Koidz.	4	1
<i>Morus tiliaefolia</i> Makino.	1	0
<i>Morus mesozygia</i> Stapf.	1	0
<i>Morus microphylla</i> Buckl.	1	0
<i>Morus multicaulis</i> Perr.	58	2
<i>Morus alba</i> L.	49	1
<i>Morus atropurpurea</i> Roxb.	3	0

第 1-1-5 図に各品種のフラボノール総量と Q3MG 含有量の関係を示した。一部 Q3MG をもたない品種でもフラボノール高含量の品種が確認されたが、Q3MG を持つ品種においてはフラボノール総量と Q3MG 含有量の間には正の相関が認められた。また、クワの種別とフラボノール含有量には傾向は認められなかった（データ省略）。

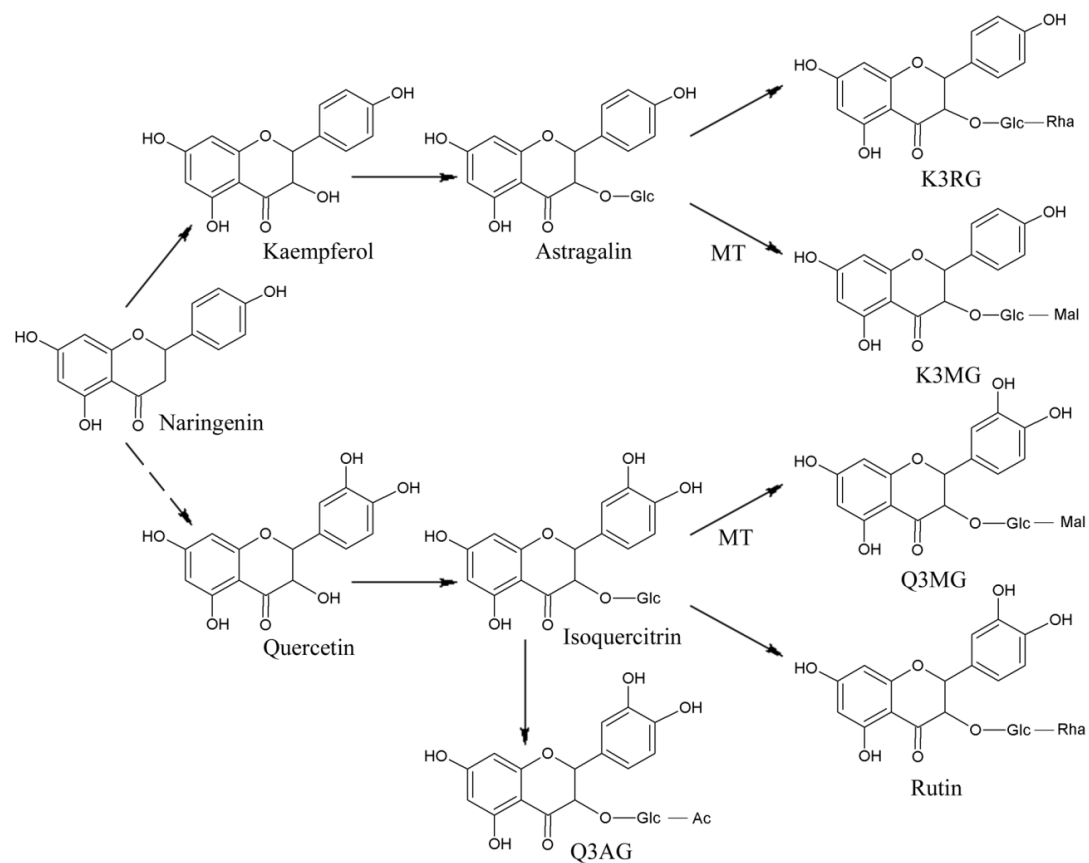
本試験では 12 種 176 品種のクワ葉中から 7 種類のフラボノール：ルチン，イソケルシトリン，K3RG，Q3MG，アストラガリン，Q3AG，K3MG，が検出され，その中で最も豊富に含まれていたのは Q3MG であった。クワ葉に含まれるフラボノールについてはこれまでにいくつか報告があり，Onogi ら(1993)は，イソケルシトリン，Q3AG，アストラガリン，K3AG が，Kim・Jang(2011)は Q3G，Q3AG，rutin，ケルセチンが，Naowaratwattana ら(2010)はルチン，イソケルシトリン，K3RG，Q3MG，アストラガリン，K3MG，ケルセチンジクマロイルグルコシド，ケンフェロールジクマロイルグルコシドが，Choi ら(2013b)はケルセチン，ケンフェロール，アストラガリンがそれぞれ検出されたとしている。これらはいずれもカラヤマグワを用いていた。また，Thabti ら(2012)は，カラヤマグワとアカミグワから，K3MG，アストラガリン，ケンフェロール-7-0-グルコシド，K3RG，Q3MG，ケルセチン-3-0-グルコシド-7-0-ラムノシド，ケルセチン-3-0-グルコシド-7-0-グルコシド，ケルセチン-3-, 7-D-0-β-D-グルコピラノサイドを見いだしたとしている。これら検出されたフラボノールの違いは主に抽出方法によると考えられるが，我々のフラボノール組成は，ケルセチンジクマロイルグルコシド，ケンフェロールジクマロイルグルコシドを除き Naowaratwattana ら(2010)とほぼ同じであった。



**Fig. 1-1-5.** Correlation between the total flavonol and quercetin 3-(6-malonylglucoside) (Q3MG) content for each cultivar.

The regression line includes all points except for those cultivars that were Q3MG-free. Each cultivar is represented by one black circle.

供試品種には、組成において2つの特徴が認められた。一つはケグワのみが持つQ3AG、もう一つはQ3MGとK3MGの有無である。第1-1-6図にクワ葉に含まれるフラボノールの代謝系を示した。クワに含まれるフラボノールであるルチン、イソケルシトリン、アストラガリン、K3RG、Q3MG、K3MGの7種はいずれもケルセチンもしくはケンフェロールの配糖体で、ミリセチンの配糖体は検出されていない。ケグワは、他の品種が含有しないQ3AGを生成する。予備的に分析を行った結果では、島根県江津市桜江町で採取したケグワの野生個体もQ3AGを含有しており、ケグワは特異的にアセチル基転移酵素を有していると考えられた。次に、主要フラボノールであるQ3MGが生成されない品種が確認されたが、Q3MGを生成しない品種はK3MGも含有しないことから、これらの品種はフラボノール合成に関与するマロニル基転移酵素を持たないと考えられる。多く供試したログワ、カラヤマグワ、ヤマグワのうち外来種であるログワ、カラヤマグワにはQ3MGなしの品種は少なく日本在来種であるヤマグワに多かった。また供試品種は少ないもののシャムグワ、ハチジョウグワにおける出現率が高かったことから、マロニル基転移酵素の欠失は地域特異的である可能性が示唆される。Sharmaら(2000)はAFLP解析によりクワ21種は4つのグループに分類され、カラヤマグワ、ヤマグワは同じグループで遺伝的に近く、形態的にも他種と大きく異なるケグワは異なるグループに属し遺伝的にも遠いとしている。ログワ、カラヤマグワ、ヤマグワ間は遺伝的に近く容易に交雑するが、ケグワは他種との交雑が容易でないと考えられる。このような遺伝的背景から、日本在来のヤマグワを含む多くの品種はQ3MGを含有するようになり、一方ケグワがQ3AGを特異的に含有することが維持されたと推測される。Kim・Jang(2011)は日本のカラヤマグワから検出されなかったQ3AGを、カラヤマグワから検出しているが、この違いは、大陸の遺伝的多様性と、日本に導入されたカラヤマグワの地理的隔離に由来すると推測される。



**Fig. 1-1-6.** Proposed metabolic pathway of flavonol glycosides in mulberry in our study.

Abbreviations: MT = malonyltransferase, K3RG= kaempferol 3-(6-rhamnosylglucoside), Q3MG= quercetin 3-(6-malonylglucoside), Q3AG= quercetin 3-(6-acetylglucoside) and K3MG= kaempferol 3-(6-malonylglucoside)



## 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) の品種間差

‘一ノ瀬’より葉中機能性成分含量の高い品種を探索するために、DNJについても品種間差を調査した(付表)。フラボノールと同様に59品種の3年間のDNJ含量の値を用いて176各品種の分析値を補正した。59品種の3年間のDNJ含量の平均値はそれぞれ、2007年：163 mg/100 g DW、2008年：232 mg/100 g DW、2009年：255 mg/100 g DWとなり、2008年の供試品種には0.70を、2009年の供試品種には0.64を乗じて含有量を補正した。複数年供試した品種については補正後の平均値を用いた。DNJ含量が最も多かった品種は‘あやのぼり’(267 mg/100 g DW)、最も少なかった品種は‘臥龍’(22 mg/100 g DW)であり、クワ品種間には10倍以上の幅広い範囲で違いが認められた。これまで、Kimuraら(2007)によりDNJ含有量が高いとされた‘鶴田’(本試験での名称は‘鶴田(福島)’)は、本試験において‘一ノ瀬’(164 mg/100 g DW)より高い値を示したものの、‘鶴田(福島)’よりDNJを高含有する品種が22品種確認された。本試験において、実測値で得られた最も高い値は435 mg/100 g DW：‘一ノ瀬(赤木)’(2008年)であった。DNJ含量もフラボノールと同様に年次変化が大きかったが、既存品種でも至適条件により400 mg/100 g DW以上の高含有が可能であることが明らかとなった。

## 葉中機能性成分高含量クワ品種の探索

Q3MGとDNJ含量の品種別含有量を第1-1-7図に、フラボノール含量およびDNJ含量の具体的データを付表に示した。フラボノール、Q3MG含量ともに最も高かった‘小淵沢1号’をはじめ、‘国桑第20号’、‘清十郎’、‘カナダ産桑A’、‘多胡早生’、‘四倍性桑’、‘米国13号’、‘あやのぼり’、‘わせみどり’、‘一ノ瀬(赤木)’、‘国桑第27号’、‘イラク3’、‘支那広東1号’、‘はやてさかり’、‘厦門1号’、‘エンブ’、‘ゆきしらず’、‘蘇州6号’、‘泰阜の大桑’、‘落井’、‘十文字’の20品種が‘一ノ瀬’よりQ3MG、DNJともに高い値を示した(第1-1-7図)。この中には、独立行政法人農業生物資源研究所(現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)による育性系統や、‘米国13号’、‘カナダ産桑A’、‘イラク3’をはじめ海外品種など多様な品種が含まれていた。DNJ含量が最も高かった‘あやのぼり’は、フラボノール含量(1350 mg/100 g DW)、Q3MG含量(727 mg/100 g DW)も高く、関東から九州地方にかけての広い範囲に適応し、年間通じて安

定的に良質多収である。‘あやのぼり’は、独立行政法人農業生物資源研究所で育成されたクワ品種で、栽培適性も優れていることから既存品種の中でも有力品種となりうる。

一般的に、育種により収量性や品質を改良する場合、目的形質の優れたものを親品種に選定することが定法である。ここで、目的とする Q3MG を持たない品種も明らかとなり、本試験で明らかにしたクワ品種の機能性成分含量は、今後成分育種を行う際の親品種選定にも利用できる。しかし、高含有する品種は交配親として有望であるものの、クワは多くが雌雄異株であること、本試験においては実用品種でない品種や、3 倍体品種等交配親に適さない品種も多い。供試品種中 Q3MG を最も高含有した‘小淵沢 1 号’ (975 mg/100 g DW) は 3 倍体の雌性であり、3 倍体品種を用いると育種効率は低下することから (小山, 1997), 3 倍体である‘小淵沢 1 号’は交配親に適さない。また、‘田中奥州’ (Q3MG 含量 804 mg/100 g DW) が有する側枝多発性などは栽培上のマイナス形質である。交配親の選定には、成分の含有量とともにこれら花性、倍数性、栽培適性等に留意しなければならない。一方で、他作物では困難である 2 倍体と 4 倍体の交雑において、クワは容易に 3 倍体の交雑実生が得られる。例えば雄性で 4 倍体の‘国桑第 21 号(4x)’ (Q3MG 含量 920 mg/100 g DW), 雌性で 2 倍体の‘国桑第 20 号’ (Q3MG 含量 908 mg/100 g DW) などは栽培適性も優れており、育種親の組み合わせとして期待できる。

本節において、フラボノール DNJ の品種間差が明らかとなり、既存品種の中で一般栽培に用いられる‘一ノ瀬’より成分を高含有する品種が示された。また、これらは育種における交配親選定の基礎データとして利用可能である。

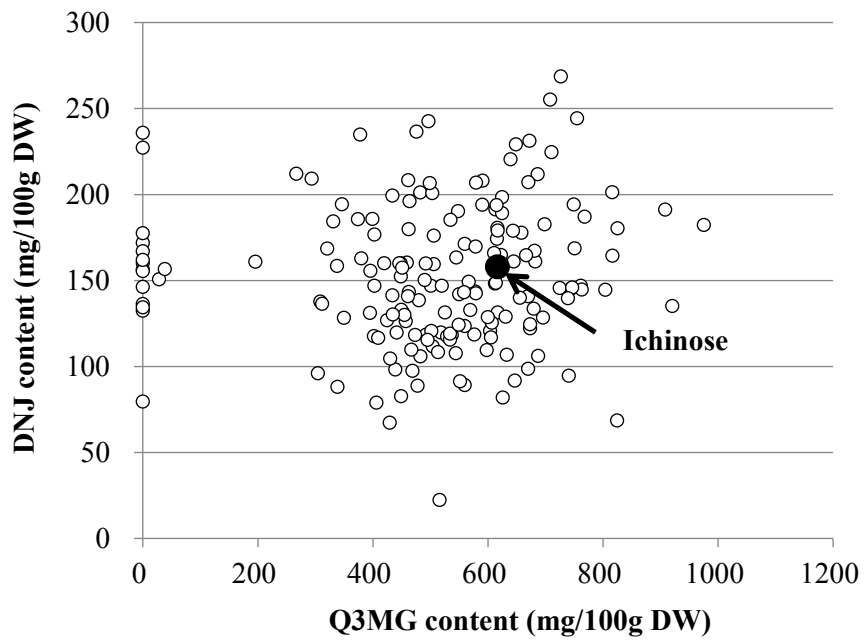


Fig. 1-1-7. Q3MG and DNJ content in mulberry leaves on mulberry cultivar.

**Supplemental data Table:** Flavonol and DNJ content of mulberry cultivar.

Cultivar of mulberry	Species	Year investigated	Flavonol content (mg/100 gDW)							DNJ content (mg/100g DW)	
			Rutin	Isoquercitrin	K3RG	Q3MG	Astragaln	Q3AG	K3MG		Total content
Kobuchizawa 1	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	224	170	34	975	28	0	385	1,819	182
Kokusou 21(tetraploid)	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	325	131	36	920	35	0	269	1,717	135
Hayoshi no ookuwa	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008	400	721	219	0	376	0	0	1,716	236
Pakistan 1-2	<i>M.notabilis</i> C.K.Schn.	2008-2009	291	71	71	825	45	0	345	1,647	69
Toumarutouge 2	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008-2009	97	179	18	673	114	0	490	1,602	125
Hazzaz	<i>M.nigriformis</i> Koidz.	2008-2009	410	66	72	741	37	0	225	1,574	95
Kokusou 20	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	265	75	28	908	29	0	242	1,556	191
Itouwase	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	485	171	161	478	49	0	186	1,549	89
Beikoku 13	<i>Mmicrophylla</i> Buckl.	2007-2009	372	70	50	749	27	0	260	1,547	194
Kanadasansou-A	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	284	73	31	816	29	0	275	1,527	201
Kokusou 21(mixoploid_244 <sup>a</sup> )	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	251	110	52	763	46	0	285	1,525	145
Kokusou 21(mixoploid_422 <sup>b</sup> )	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	291	91	48	816	41	0	224	1,521	164
Shiwassuguwa	<i>M.acidosa</i> Griff.	2007	358	88	96	631	37	0	290	1,501	129
Tanakaoushuu	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	111	102	15	804	36	0	370	1,461	145
Philippine	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	234	108	60	666	42	0	321	1,450	165
Jikunashi	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	224	114	38	680	37	0	325	1,438	134
Seijuurou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	189	67	14	825	32	0	291	1,434	180
Amoi 1	<i>M.atropurpurea</i> Roxb.	2007-2009	277	103	66	670	21	0	272	1,429	207
Turkey 3	<i>M.notabilis</i> C.K.Schn.	2009	302	84	59	670	33	0	255	1,415	99
Ichinose(akagi)	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	239	85	58	708	35	0	262	1,404	255
Ochii	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	226	55	76	625	36	0	383	1,400	198
Kinuyutaka(mixoploid_422 <sup>b</sup> )	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	177	89	26	751	31	0	294	1,384	162
Shina kanton 2	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	192	58	38	725	34	0	302	1,370	146
Lalaberry	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	238	69	29	739	38	0	234	1,357	140
Ayanobori	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	185	66	42	727	39	0	273	1,350	269
Kinuyutaka(tetraploid)	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	195	70	14	762	27	0	266	1,349	147
Akagi	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	179	116	47	604	45	0	337	1,348	121
Okushiritou aonaegawa 1	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008	62	111	0	492	93	0	529	1,344	118
Hayatesakari	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	255	66	38	672	29	0	261	1,338	231
kosou 197	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2008-2009	241	59	46	687	36	0	241	1,333	106
Shina kanton 1	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	217	69	49	681	31	0	270	1,332	167
Kokusou 21(original, diploid)	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	231	69	49	670	36	0	248	1,319	141
Natsunobori	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	184	76	11	746	29	0	249	1,310	146
Toumarutouge 1	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008-2009	76	124	29	513	80	0	438	1,299	108
Iraq 3	<i>M.notabilis</i> C.K.Schn.	2009	347	71	40	686	25	0	125	1,292	212
Yonbaiseisou	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	66	108	6	755	32	0	305	1,286	244

Cultivar of mulberry	Species	Year investigated	Flavonol content (mg/100 gDW)								DNJ content (mg/100g DW)
			Rutin	Isoquercitrin	K3RG	Q3MG	Astragalin	Q3AG	K3MG	Total content	
Morechiana	<i>M.alba</i> L.	2009	269	47	60	611	28	0	247	1,277	166
Kairyoku akita	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	304	111	73	537	32	0	219	1,277	118
Kokusou 27	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	194	85	22	699	15	0	246	1,274	183
Tagowase	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	51	76	4	768	30	0	326	1,272	187
Higashimokoto fukutomi	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008-2009	121	104	42	534	64	0	367	1,266	119
Naganuma	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	465	177	92	380	27	0	126	1,266	163
Rousanjyu	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008	230	657	137	0	347	0	0	1,265	162
Popberry	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	570	352	284	0	67	0	0	1,265	134
Higashimokoto akeo	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008-2009	74	111	12	600	70	0	365	1,259	129
Hon 02-20	<i>M.alba</i> L.	2009	241	97	85	495	36	0	284	1,255	115
Enbu	<i>M.mesozygia</i> Stapf.	2008-2009	222	129	18	658	34	0	187	1,255	178
Ka 97-05	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	366	83	87	482	29	0	190	1,251	201
Akansasu	unknown	2009	121	125	25	617	48	0	295	1,247	131
Ka 00-12	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	460	72	118	403	15	0	155	1,240	147
Kinuyutaka(original, diploid)	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	177	61	24	682	37	0	246	1,239	161
Yukishirazu	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	166	104	25	649	29	0	255	1,238	229
Shimanouchi	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	248	90	63	535	32	0	254	1,237	185
Philippine 1	<i>M.alba</i> L.	2009	193	49	41	656	30	0	252	1,237	140
English Black	<i>M.alba</i> L.	2008-2009	246	90	45	591	35	0	206	1,223	208
Keguwa	<i>M.tiliaefolia</i> Makino	2007-2009	299	411	7	309	16	180	24	1,221	138
Atsubamidori	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	412	92	76	462	26	0	142	1,209	180
Obata	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	588	235	320	0	58	0	0	1,208	172
Negoya takasuke	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	134	172	22	560	44	0	261	1,202	123
Soshuu 6	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	202	55	41	643	30	0	216	1,199	179
Keikansou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	156	48	13	745	36	0	193	1,199	145
Juumonji	<i>M.alba</i> L.	2007	138	41	37	624	36	0	320	1,196	189
Minamisakari	<i>M.alba</i> L.	2007	384	71	99	449	0	0	190	1,193	152
Iraq	<i>M.notabilis</i> C.K.Schn.	2009	284	80	39	617	28	0	136	1,183	181
Tadjikskaja	unknown	2009	197	53	28	696	26	0	173	1,179	128
Murasakiwase	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	173	51	48	579	34	0	292	1,178	207
Kinuyutaka(mixoploid_244 <sup>a</sup> )	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	165	71	24	645	26	0	232	1,175	161
Wasemidori	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	139	56	8	711	34	0	214	1,169	225
Kiryoku ichinose	<i>M.alba</i> L.	2007	210	39	52	607	0	0	262	1,169	125
Yasuoka no ookuwa	<i>M.alba</i> L.	2008	163	81	0	639	40	0	225	1,166	221
Sanish 33	<i>M.alba</i> L.	2008-2009	147	78	41	578	38	0	256	1,159	144
Kanton II kou	<i>M.atropurpurea</i> Roxb.	2007-2009	195	82	58	502	35	0	264	1,155	121

Cultivar of mulberry	Species	Year investigated	Flavonol content (mg/100 gDW)							Total content	DNJ content (mg/100g DW)
			Rutin	Isoquercitrin	K3RG	Q3MG	Astragalin	Q3AG	K3MG		
Sekizaisou	<i>M.alba</i> L.	2008-2009	252	46	0	673	29	0	145	1,154	122
Ichinose	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	153	50	33	623	34	0	241	1,148	165
Tosawase	<i>M.atropurpurea</i> Roxb.	2007	257	55	61	506	28	0	240	1,145	176
Kanrasou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	271	73	69	497	0	0	233	1,143	243
Ruinashi	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	315	90	91	402	29	0	210	1,138	177
Aobanezumi	<i>M.alba</i> L.	2007	171	56	40	598	0	0	272	1,137	109
Shuukaku ichi	<i>M.alba</i> L.	2007	181	41	35	612	29	0	236	1,134	148
Shinjiro	<i>M.alba</i> L.	2007	132	55	40	616	0	0	288	1,131	174
Philippine 2	<i>M.alba</i> L.	2009	252	44	88	467	22	0	239	1,130	110
Mitsuminami	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	305	60	80	435	25	0	207	1,119	130
Unryuu	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	220	66	71	439	33	0	264	1,114	98
Shin ichinose	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	152	52	20	616	24	0	232	1,111	158
Turkey 1	<i>M.notabilis</i> C.K.Schn.	2009	270	75	42	567	25	0	131	1,109	149
Zerbe beyadz	<i>M.alba</i> L.	2009	267	74	0	647	27	0	99	1,108	92
Chousen zairai-shu	<i>M.alba</i> L.	2007	275	86	63	464	28	0	190	1,106	196
Debabi	<i>M.nigriformis</i> Koidz.	2008-2009	238	57	55	544	28	0	168	1,106	108
Shirome keisou ♀	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	297	55	57	501	27	0	167	1,105	147
Chousa	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	176	46	36	614	30	0	201	1,103	149
Kantonmishou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	321	71	62	452	24	0	160	1,095	131
Surk-tut	<i>M.alba</i> L.	2009	155	39	0	626	24	0	236	1,094	82
Tokiyutaka	<i>M.alba</i> L.	2007	190	46	32	615	30	0	181	1,094	194
Burii	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	88	41	23	617	28	0	268	1,085	179
Hon 02-00	<i>M.alba</i> L.	2009	175	39	48	558	36	0	210	1,083	143
Senshin	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	250	46	30	560	23	0	162	1,080	171
Shounaiwase	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	252	428	183	0	237	0	0	1,069	80
France 1	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	85	77	21	545	34	0	287	1,066	163
Ooshimasou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	146	35	26	633	0	0	224	1,064	107
Algeria-atsuba	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	168	53	22	605	27	0	179	1,063	117
Suigen-ooha	<i>M.alba</i> L.	2007	226	53	36	579	0	0	159	1,053	170
Kozaemon (fukushima)	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	131	57	9	613	13	0	208	1,044	191
Ichibe	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	254	135	85	346	33	0	177	1,042	194
Turkey 4	<i>M.notabilis</i> C.K.Schn.	2009	285	50	29	579	20	0	78	1,038	142
Shirome rosou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	177	36	28	560	25	0	201	1,037	89
Tousou 2	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	217	45	35	569	0	0	166	1,032	133
Zimostojkij	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	164	53	31	576	27	0	163	1,022	118
Garyuu	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	191	39	45	516	27	0	197	1,015	22

Cultivar of mulberry	Species	Year investigated	Flavonol content (mg/100 gDW)							DNJ content (mg/100g DW)	
			Rutin	Isoquercitrin	K3RG	Q3MG	Astragalin	Q3AG	K3MG		Total content
Futsukokuruu	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	154	50	0	590	27	0	170	999	194
Rohachi	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	215	45	49	461	25	0	195	990	141
Sanish 34	<i>M.alba</i> L.	2008-2009	163	55	16	548	18	0	172	987	190
Akamerosou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	220	38	49	480	24	0	175	986	138
shinsou 2	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	188	98	90	305	40	0	266	986	96
Soshuu 1	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	196	38	36	520	22	0	162	985	147
shinsou 1	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	82	113	24	459	42	0	263	984	160
France 2	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	228	78	76	399	20	0	174	982	186
Koushuu 1	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	251	43	72	430	0	0	181	977	105
Tsuruta (fukushima)	<i>M.alba</i> L.	2008-2009	143	59	31	503	31	0	192	977	201
Asayuki	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	117	75	39	434	37	0	275	976	141
Hon 01-03	<i>M.alba</i> L.	2009	612	150	209	0	18	0	0	976	155
Turkey 2	<i>M.notabilis</i> C.K.Schn.	2008-2009	246	57	32	492	25	0	114	972	160
Myurienoaaru	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	199	35	44	499	20	0	160	966	207
Chousen karaguwa	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	274	42	50	441	21	0	130	965	120
Kiryuu nezumi gaeshi	<i>M.alba</i> L.	2007	118	34	37	473	26	0	275	964	118
Kairyuu rosou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	265	47	66	425	0	0	160	963	127
Hon 03-13	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	207	44	50	446	22	0	182	962	160
Kenmochi	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	155	51	53	429	28	0	224	957	67
Fukusima ooha	<i>M.alba</i> L.	2007	202	98	36	448	27	0	143	953	160
Hakuryuu	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2008-2009	189	52	26	483	22	0	164	949	106
Roshiya	<i>M.alba</i> L.	2009	162	34	48	434	22	0	228	947	199
Pionerskij	<i>M.alba</i> L.	2009	223	43	52	449	16	0	154	945	133
Tsuruta	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	130	38	19	550	12	0	183	942	142
Rokokuyasou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	127	39	24	549	27	0	176	941	124
Sanish 35	<i>M.alba</i> L.	2008-2009	246	40	40	469	22	0	116	941	97
Benikawa rosou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	193	41	34	518	0	0	150	935	120
Ka 96-07	<i>M.rotundiloba</i> Koidz.	2009	558	163	189	0	20	0	0	915	167
Aeagean beyadz	<i>M.alba</i> L.	2009	180	35	0	504	19	0	168	913	112
Kanmasari	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	182	101	62	320	44	0	192	911	169
Shirome keisou ♂	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	184	33	24	534	0	0	129	904	116
Italy-ronberuji	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	176	31	49	402	23	0	204	903	118
Miran 5	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	158	39	26	552	0	0	129	903	91
Yanagida	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	120	44	22	525	0	0	191	900	131
Hon 03-00	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	228	53	102	267	22	0	205	895	212
Uzbekistan	<i>M.alba</i> L.	2008-2009	106	42	9	529	18	0	173	891	118

Cultivar of mulberry	Species	Year investigated	Flavonol content (mg/100 gDW)							DNJ content (mg/100g DW)	
			Rutin	Isoquercitrin	K3RG	Q3MG	Astragalin	Q3AG	K3MG		Total content
Chijimiguwa	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	65	42	33	490	26	0	225	882	150
kosou 199	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2008-2009	155	31	35	455	25	0	158	875	130
France 3	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	268	41	71	312	17	0	150	869	136
Aizujujima	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	107	73	36	338	38	0	252	860	158
Sekaiichi	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	202	39	47	419	0	0	151	859	160
India-kagayamae	unknown	2008-2009	132	38	12	476	26	0	161	858	237
Iraq 4	<i>M.notabilis</i> C.K.Schn.	2009	128	33	24	462	20	0	177	856	143
Kibajumonji	<i>M.alba</i> L.	2007-2009	96	28	17	461	26	0	208	846	208
Siam	<i>M.rotundiloba</i> Koidz.	2009	414	317	109	0	39	0	0	845	227
Ka 96-08	<i>M.rotundiloba</i> Koidz.	2009	240	34	58	331	17	0	151	843	184
Shinkenmochi	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	160	53	38	406	22	0	161	840	79
Aokirosou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007	181	23	37	449	0	0	149	838	83
Hon 03-11	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2009	509	126	193	0	16	0	0	834	177
Tachibanasou	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	117	45	24	457	23	0	168	834	126
Mikurasima 30	<i>M.kagayamae</i> Koidz.	2008	65	117	13	396	58	0	180	833	156
Hachijouguwa	<i>M.kagayamae</i> Koidz.	2008	20	107	0	378	60	0	250	830	235
Koshiorihime	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	172	27	20	506	0	0	104	829	160
Yukishinogi	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007	95	41	24	451	22	0	176	809	157
Shukutsu no ookuwa	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008	241	267	88	38	135	0	21	762	157
Tsurugisansou	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	187	52	53	294	18	0	129	742	209
Fusoumaru	<i>M.multicaulis</i> Perr.	2007-2009	104	31	17	395	17	0	158	732	131
Chousen sensensou	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2009	89	30	30	374	17	0	177	729	186
Okusiritou aonaegawa 4	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008	210	202	152	28	108	0	30	723	151
Uzubesukaya	<i>M.alba</i> L.	2009	205	34	34	338	14	0	88	716	88
Fuyousou	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	127	22	14	409	17	0	111	707	117
Goroujiwase	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	326	152	159	0	34	0	0	672	132
Okusiritou inaho 2	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008	182	264	96	0	167	0	0	670	160
Fukayuki	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	185	317	100	0	84	0	0	665	146
Hatijyousima	<i>M.kagayamae</i> Koidz.	2008	130	365	60	0	164	0	0	664	136
Sousukewase	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2007-2009	302	153	122	0	23	0	0	601	156
Hasune no ookuwa	<i>M.bombysis</i> Koidz.	2008	62	23	0	350	21	0	103	566	128
Mikurasima 15	<i>M.kagayamae</i> Koidz.	2008	36	45	0	196	24	0	92	398	161

Abbreviations: *M.* = *Morus*, K3RG = kaempferol 3-(6-rhamnosylglucoside), Q3MG = quercetin 3-(6-malonylglucoside), Q3AG = quercetin 3-(6-acetylglucoside), K3MG = kaempferol 3-(6-malonylglucoside), DNJ = 1-deoxynojirimycin

<sup>a</sup> : superficial layer diploid cell population, deep layer tetraploid cell population periclinal chimera by treatment with colchicine

<sup>b</sup> : superficial layer tetraploid cell population, deep layer diploid cell population periclinal chimera by treatment with colchicine



## 第 2 節 ケルセチン 3-(6-マロニルグルコシド) (Q3MG) の遺伝解析

### およびクワの成分育種の可能性

第 1 節で、クワ葉中フラボノールの品種間差を調査し、品種によりフラボノールの組成および含有量が異なること、さらに Q3MG が含まれない品種の存在が明らかとなった。クワ葉の主要なフラボノールである Q3MG の遺伝様式の解明は、Q3MG をターゲットとしたクワの成分育種において重要な要素となる。そこで、Q3MG を含有する品種と Q3MG を持たない品種を用いて Q3MG の遺伝解析を行い、交雑育種による Q3MG 高含量品種育成の可能性を検討した。さらに、育種の期間短縮をめざし、クワの接ぎ木個体を用いた交配、早期選抜の可能性を検証した。

### 材料および方法

#### 供試材料

Q3MG の遺伝様式の調査は 2008 年から 2010 年に島根県農業技術センター（島根県出雲市芦渡町）で栽培した交雑実生の播種当年の個体を用い、接ぎ木交配（第 1-2-1 図）により行った。交配親は Q3MG を含有する品種として‘四倍性桑’，‘国桑第 21 号(2x)’，‘国桑第 21 号(4x)’，‘清十郎’，‘軸無’，‘国桑第 20 号’，‘カナダ産桑 A’，‘田中奥州’，‘伊藤早生’，‘会津十島’，‘根古屋高助’を、Q3MG を持たない品種として‘庄内早生’，‘惣助早生’，‘ポップベリー’を選定し、穂木を 2008 年：12 月，2009 年：12 月，2010 年：12 月にそれぞれ国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業生物資源ジーンバンクの配布規定により取得した。交配組み合わせはそれぞれ、Q3MG の有無により 1)：有×有，2)：有×無，3)：無×有，4)：無×無とした（第 1-2-1 表）。接ぎ木交配の手順を第 1-2-1 図に示した。3 から 4 芽ごとに切断した穂木を実生苗の根に接ぎ木し、27℃の恒温加湿条件で 1 週間癒合処理を行った。癒合した枝を 1 ポットあたり 10 枝程度ワグネルポット (1/2000 a) に定植後、人工気象室で栽培し開花させ人工交配した。結実した種子は 30℃で 3～4 日催芽後 2.5 号のビニールポットに播種した。7 月に本葉が 4 枚程度展開した苗を、畝間 80 cm，株間 50 cm の密度で本圃に定植した。肥培管理は常法に従った。9 月下旬から 10 月上旬，最長枝条長の完全展開葉のうち、もっとも若い葉から下位 3 葉を採取し分析に用いた。

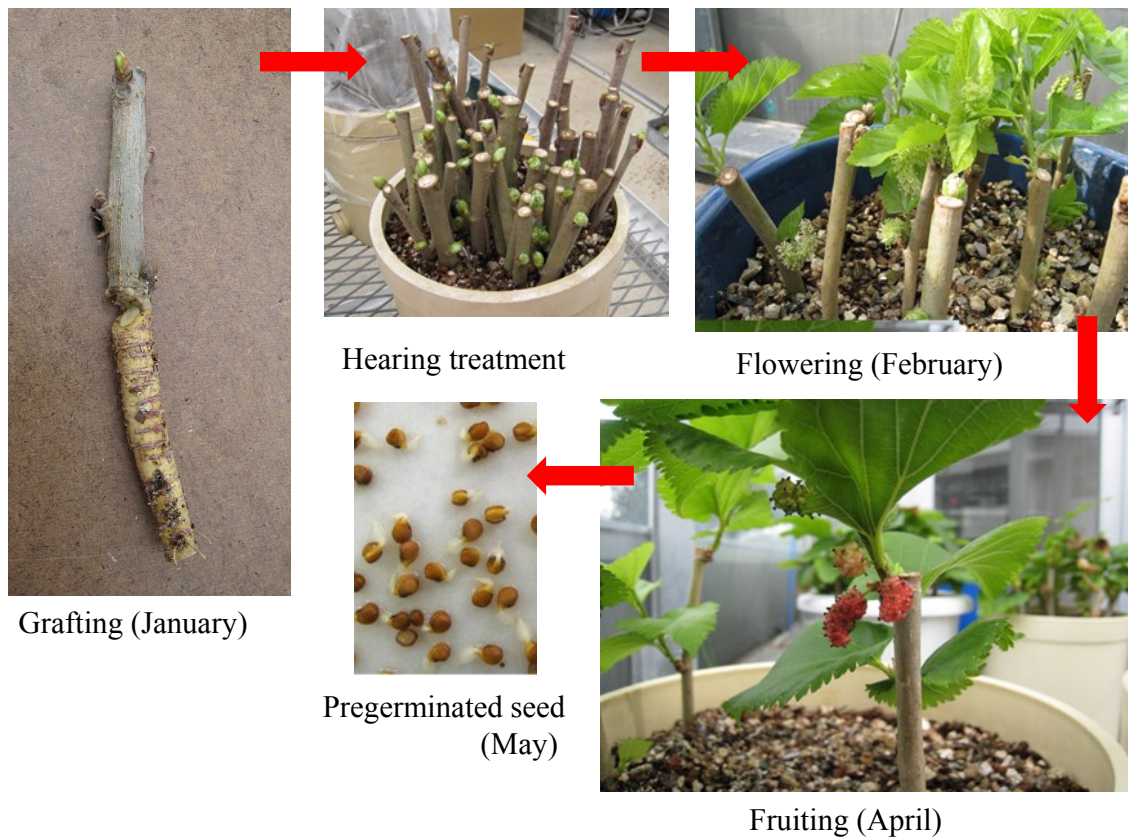


Fig. 1-2-1. Method of crossing to used grafting of mulberry.

### サンプル調整およびフラボノールの分析

第1章第1節の方法に準じて行った。

### 統計処理

第1章第1節の方法に準じて行った。

### 結果および考察

#### 接ぎ木交配

育種において、その期間短縮は重要な要素となる。そこで、交配親選定後、ただちに育種を開始し期間短縮をはかる方法として、接ぎ木交配を試みた(第

1-2-1 図). 交配に用いた品種により開花数は異なったが, いずれも穂木の開花が確認され交配が可能であった (データ省略). 12 月に穂木を取得後, 1 月に接ぎ木および癒合処理, 2 月に開花 (交配), 4 月に採種および播種, 5 月に定植, の手順により 9 月に葉身サンプルの採種が可能であった. クワは新梢の生育が旺盛であり, 通常のクワ栽培においても, 新梢の成長は 3 m を超える. 定植後, 5 月定植の交雑実生の生育は旺盛で, 9 月には 2 m を超える個体も散見され, いずれの交雑実生も葉身サンプルが採取できた. したがって, 親の品種選定から 1 年後には 1 次選抜供試個体の育成が可能であり, クワの成分育種の期間短縮の可能性が示された. 実際に接ぎ木交配を行う場合は, 品種により花穂の多少が異なることから, 選定した品種の花穂が少ない場合は個体数を増やす, また, 発芽を揃えるために雄花の接ぎ木時期をずらす等の留意が必要である.

Q3MG を含有する品種と持たない品種の組み合わせで, 交配後代の実生を用いて Q3MG 有無の発現率とその含有率を調べた (第 1-2-1 表). Q3MG を持たない品種どうしの組み合わせでは, 持たない実生個体の出現率は 100% となり, Q3MG を含有する品種と持たない品種の組み合わせでは, 持たない実生個体の出現率は概ね 50% であった. また, 2 倍体の '国桑第 20 号' と 4 倍体の '国桑第 21 号' の組み合わせにおいて, 劣性ホモの出現率: 12.5% に近い 11% の値を示した. これらの出現率から, マロニル基転移酵素は単一遺伝子でメンデルにおける優性遺伝すると推測された. '国桑第 20 号', '国桑第 21 号' はマロニル基転移酵素をヘテロで持つと推測されるが, 第 1 節 (第 1-1-3 図) で示されたように, '国桑第 20 号', '国桑第 21 号' とともに Q3MG 含量が高い. したがって, 優性ホモが必ずしも高含量の条件であるとは限らないと考えられる.

**Table 1-2-1.** Mode of inheritance of quercetin 3-(6-malonylglucoside) (Q3MG).

Cross combination				Number of seed bred	Number of Q3MG-free
♀		♂			
Cultivar	Genotype of Q3MG	Cultivar	Genotype of Q3MG		
Yonbaiseisou	MM	Kokusou 21	Mm	282	2 (1%)
Seijuro	MM	Kokusou 21	Mm	54	0
Jikunashi	MM	Kokusou 21	Mm	74	0
Kokusou 20	Mm	Kokusou 21 (4x)	MMmm	225	25 (11%)
Kanadasansou-A	MM	Kokusou 21 (4x)	MMmm	155	0
Kokusou 20	Mm	Tanakaoushuu	MM	132	0
Kanadasansou-A	MM	Tanakaoushuu	MM	132	0
Jikunashi	MM	Shounaiwase	mm	62	0
Itouwase	Mm	Shounaiwase	mm	53	30 (57%)
Sousukewase	mm	Aizujushima	Mm	55	34 (62%)
Sousukewase	mm	Nekoyatakasuke	Mm	44	20 (45%)
Popberry	mm	Nekoyatakasuke	Mm	56	23 (41%)
Sousukewase	mm	Shounaiwase	mm	58	58 (100%)
Popberry	mm	Shounaiwase	mm	10	10 (100%)

Shaded region: Q3MG-free cultivars.

Abbreviation: 4x = tetraploid

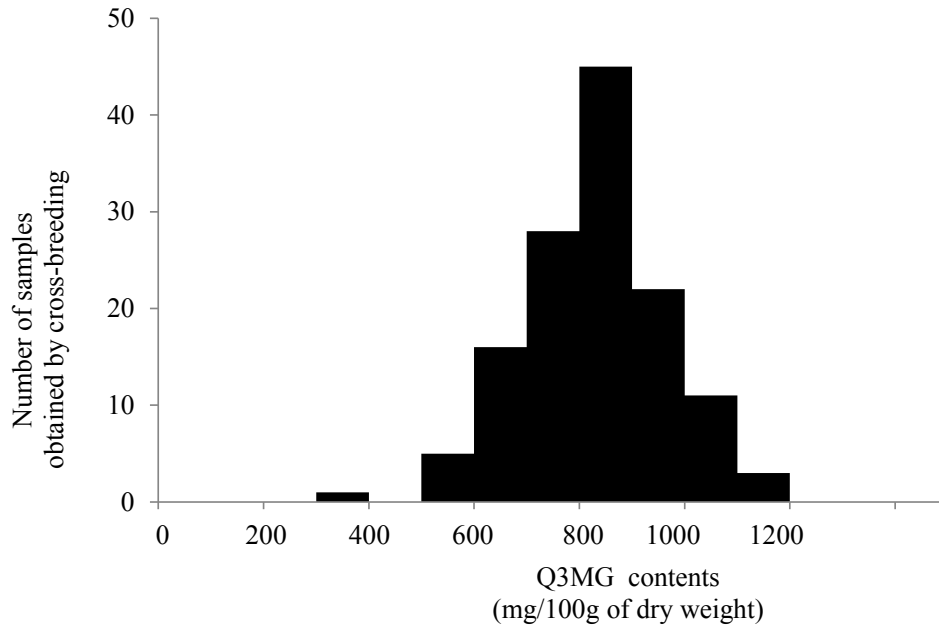
Genotype was assumed based on the presence or absence of malonyltransferase as dominant (M) or recessive (m), based on the resulting ratio of Q3MG-free offspring.

次に、第 1-2-2 図に‘カナダ産桑 A’と‘田中奥州’の交雑実生個体の Q3MG 含量の度数分布を示した。度数分布は正規分布を示し、これは他の組み合わせでも同様の結果を示した。全ての組み合わせにおいて、交配親の Q3MG 含量は全実生個体の平均値に近い値となり、いずれの組み合わせにおいても交配親より Q3MG 含量の高い個体が得られ（データ省略）、高含有品種を交配親に用いることにより Q3MG 高含有品種の育成が可能であると考えられた。

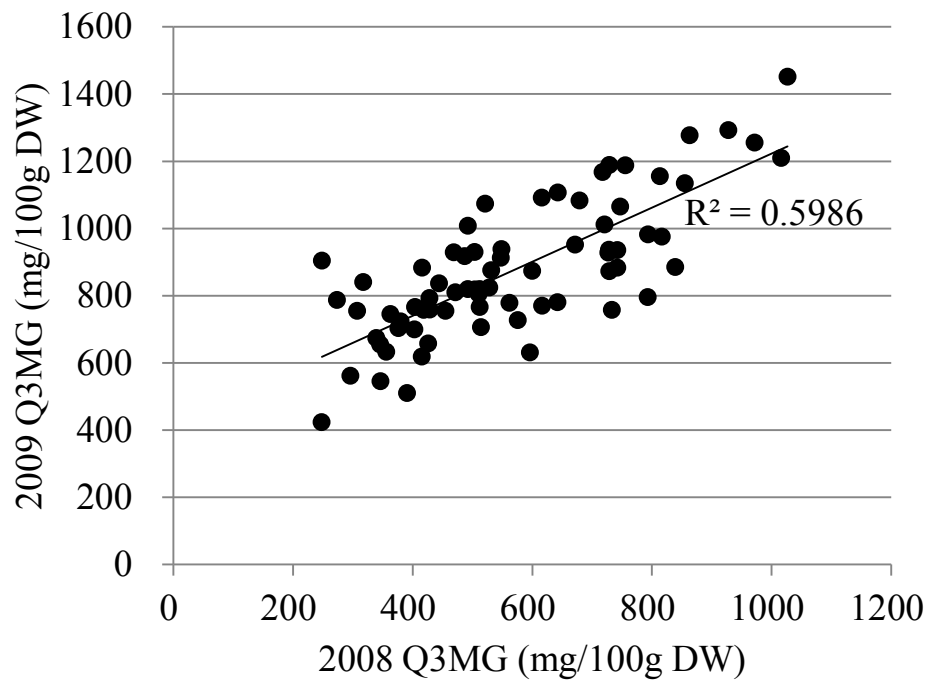
また、第 1 節でそれぞれの品種のフラボノール総量に対する Q3MG の含有率は、約 60%を上限とする切断正規分布を示し（第 1-1-4 図）、クワの Q3MG 合成における遺伝子プールの限界は概ね 60%であると推測された。このことから、Q3MG 含有率を 60%より高くすることは難しいと考えられる。しかし、Q3MG を含有する品種は Q3MG 含有量と総フラボノール含有量の間には正の相関が認められたことから（第 1-1-5 図）、フラボノール全体の含有量を増加させることによって Q3MG 含量の向上が期待できる。フラボノール総量の引き上げと、含有率 60%の維持が Q3MG 高含有品種育成の鍵になると思われる。

次に、成分育種においては、早い段階で成分による選抜を行うことが期間短縮、圃場の利用においても優位となる。そこで、交配当年の実生と 2 年目の実生の Q3MG 含量の比較により、成分含量の早期選抜の可能性を検討した。‘四倍性桑’と‘国桑第 21 号’の実生 72 個体を用いて 2008 年および 2009 年 2 年間の Q3MG 含量を比較したところ、高い正の相関が認められた（第 1-2-3 図）。これは、樹齢による葉中フラボノール含量の変化は小さく、フラボノールを対象とした成分育種においてフラボノール含量による早期選抜が可能であることを意味する。

本試験の結果、Q3MG 高含量個体を交配親に選定することにより、交雑育種による Q3MG 高含量品種育成が可能であり、接ぎ木交配、Q3MG 含量の早期選抜により育種期間の短縮がはかれることが明らかとなった。



**Fig.1-2-2.** The frequency distribution of quercetin 3-(6-malonylglucoside) (Q3MG) content in the offspring obtained by crossing ‘Kanasansou-A’ (Q3MG content: 607 mg/100 g DW) and ‘Tanakaoushuu’ (Q3MG content: 599 mg/100 g DW).



**Fig. 1-2-3.** Correlation of Q3MG content measured in 2009 and 2008 using the offspring obtained by crossing ‘Yonbaiseisou’ and ‘Kokusou 21’

Black circles indicate seedlings obtained by crossing ‘Yonbaiseisou’ and ‘Kokusou 21’, which were sampled (n = 72) on September 4 in 2008 and September 18 in 2009.

### 第3節 高 Q3MG 含量クワ新品種 ‘蒼楽’ の育成

第1章第1節において、フラボノールの品種間差を調査し、高いフラボノール含量を有する品種が明らかになるとともに、第2節で交雑育種により高含量品種の育成が可能であることを明らかにした。これらの知見をもとに、ここではクワ葉の主要な機能性成分:フラボノール配糖体である Q3MG 含量を高くすることを育種目標として、‘一ノ瀬’より高含有する品種の育成を試み、Q3MG を含有量の高いクワ新品種 ‘桑楽’ を育成した。ここでは、その育成経過と特性を報告する。

#### 来歴および育成経過

育成品種 ‘蒼楽’ の来歴を第 1-3-1 図に示した。2007 年に調査したフラボノール含量の品種比較試験の結果をもとに、Q3MG 含量の高い ‘四倍性桑’ を種子親，‘国桑第 21 号’ を花粉親に選定した。選定した両品種は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業生物資源ジーンバンクから入手し、穂木を 2008 年 1 月に島根県農業技術センターで実生苗の根に接ぎ木した。人工気象室において開花した接ぎ木個体を用いて、人工交配を行った。同年 4 月に得られた交雑実生 298 個体を 5 月下旬にセンター圃場に定植し、養成した。その後、Q3MG 含量を指標に実生 20 個体を選抜した。2009 年 5 月に 1 次選抜した 20 個体を接ぎ木により増殖し、島根県江津市桜江町市山の圃場へ各個体 5 本ずつ定植した。同年に、Q3MG 含量および形態特性を指標に 2 次選抜を行い 1 次選抜 20 個体から 2 個体選抜した。選抜した 2 個体は 2010 年、再度接ぎ木法により増殖し、桜江町大貫の圃場へ定植した。定植した苗は 1 年養成後、2011 年、2012 年に収量性を調査し有望系統 ‘Y4’ を選抜した。有望系統 ‘Y4’ は 2013 年 4 月、品種名 ‘蒼楽’ として品種登録出願を行い、2015 年に品種登録された。

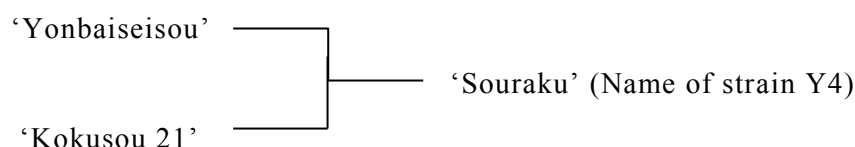


Fig. 1-3-1. Crossbreeding history of ‘Souraku’.



## 材料および方法

### 供試材料

交配および1次選抜は島根県出雲市芦渡町農業技術センターにおいて、また2次選抜以降の特性調査、生態調査、収量調査は島根県江津市桜江町市山および大貫において実施した。2008年2月に接ぎ木した親品種を人工気象室で開花させ3月に交配した(第1-2-1図)。4月に採取した交雑実生は催芽後5月12日に6cmポットに播種し養成した。同年6月18日、実生苗をセンター圃場に畝間1m、株間50cmで定植した。2009年5月市山圃場に、接ぎ木により増殖した1次選抜個体各5本を、畝間1m、株間50cmで定植し、2次選抜に供試した。2010年5月大貫圃場に、接ぎ木法により増殖した2次選抜個体を1区4畝7株の3反復となるように、畝間1.5m、株間50cmで定植し、1年間株を養成し2011年から収量調査に供試した。接ぎ木苗は、いずれも、5月上旬に接ぎ木後、30℃のインキュベーターで1週間癒合処理した後定植した。圃場定植後の肥培管理はクワの一般的な栽培方法に準じた。

### 調査方法

生育調査、収量調査は2011年、2012年に年2回7月および10月に、1区3反復各区10株を用いて行った。特性調査は、種苗特性分類調査報告書(桑)に従った。生育調査は各株の最長枝条を用いた。新梢長は新梢の基部から先端、落葉長は新梢の基部から着葉部位までをそれぞれ測定した。葉身、節間長の調査は最長枝条の先端から1/3の高さに位置する部位で行い、節間長は連続する5節を測定しその平均値で求めた。収量調査は、1株ごとに全枝条の伐採により行った。枝条重を測定後、伐採した枝条の葉をこきとり枝重を測定した。葉身収量は、葉重として枝条重から枝重を引いて算出した。

### Q3MG 分析

Q3MG分析に際し、葉身のサンプリングは、農業技術センター圃場：2008年9月4日、2009年9月18日、桜江町市山圃場：2009年9月11日、2010年10月13日、桜江町大貫圃場：2010年10月19日、2011年7月13日、2011年10月20日、2012年7月25日、2012年9月25日に行った。葉身はそれぞれの最長枝条の完全展開葉のうち最も若い葉から下位3枚採取した。抽出および分析は第1章第1節に準じた方法で行った。

## 統計処理

第1章第1節に準じた方法で行った。

## 特性の概要

### 形態および生態的特性

第1-3-1表に形態的特性を示した。‘蒼楽’はログワ系(*Morus multicaulis* Perr.)に属し、樹形はやや展開である(第1-3-2図)。冬芽は赤褐色で、三角形を呈し、枝条に平行直立に着く(第1-3-3図)。「一ノ瀬」と比較して枝条数はやや多く、矮小枝数が多い。また、「一ノ瀬」より枝条が長い。葉は切れ込みが有り、欠刻数は0~4が混在し刻々は浅い(第1-3-4図)。葉の大きさ、厚さは「一ノ瀬」と同程度で、濃緑色を呈し、葉面は平滑からやや粗の間、光沢はやや弱、縮雛は少ない。葉の着生角度は加水と水平の間である。節間は「一ノ瀬」よりやや長い。また、葉のこき取りは中程度で「一ノ瀬」よりやや堅い。花性は雌性であり、着花数は「一ノ瀬」と同じ中程度である(第1-3-5-A-B図)。3倍体のため種子はほとんど確認できない(第1-3-6図)。第1-3-2表に形態的特性を示した。春期の発芽は「国桑第21号」よりやや遅く「一ノ瀬」と同程度の晩生である。「蒼楽」には7月までの栽培期間に、芯止まりと再発芽が年により一部で確認された(第1-3-7図)。この現象は3倍体、4倍体で時々みられる現象で、蒼楽の倍数性(3倍体)に由来すると考えられるが、発生頻度は少ないため通常栽培には問題ないと思われる。

**Table 1-3-1.** Morphological characteristics

Cultiver	Form of shoot-cut training	Winter bud				Plant: number of branches	Branch			
		Shape	Size	Color	Number of accessory buds		Uniformity of length	Number of lateral branches	Number of dwarf branches	Length
Souraku	semi-erect	triangular	large	reddish brown	medium	many	medium to even	few	many	long
Ichinose	semi-erect	triangular	medium	brown	medium	medium to many	medium	few	medium	medium
Kokusou 21	open	spindle shaped	medium to large	brown	few	many	medium to even	few	few	long

Cultiver	Branch				Leaf blade					
	Diameter	Color	Zigzag form of internode	Length of internode	Leaf: phyllotaxis	Leaf: attitude	Number of sinuses	Depth of sinus	Size	Shape of apex
Souraku	medium	graysh brown	absent	long	two fifth	semi drooping	none to four	shallow	medium	obtuse
Ichinose	medium to thin	light gray	absent	medium	two fifth	horizontal	four	medium	medium	acute
Kokusou 21	medium to thick	light gray	absent	long	two fifth	horizontal	none to two		large	acute

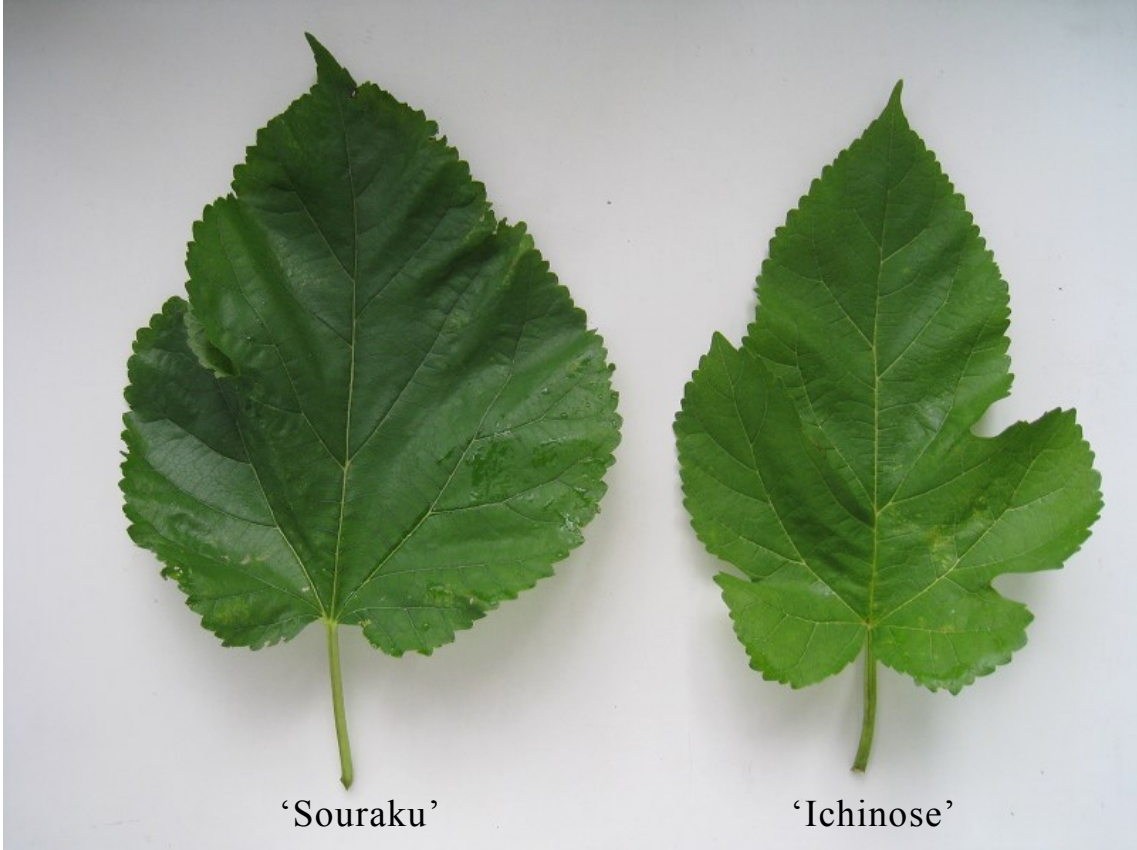
Cultiver	Leaf blade					Flower				
	Serration of margin	Shape of base	Color of upper side	Glossiness of upper side	Thickness	Petiole: length	Sex expression	Number of pistillate clusters	Length of style	Plant:ploidy
Souraku	crenate	retuse	dark green	weak to medium	medium	medium to long	pistillate	medium	medium	triploid
Ichinose	repand	cordate	medium green	medium	medium	medium	pistillate	medium	medium	diploid
Kokusou 21	crenate	cordate	medium green	strong	medium	medium to long	predominantly	very few	short	diploid



**Fig. 1-3-2.** Form of shoot-cut training of 'Souraku'.



**Fig. 1-3-3.** Winter bud shape of 'Souraku'.



**Fig. 1-3-4.** Leaf blade of 'Souraku' and 'Ichinose'.

A

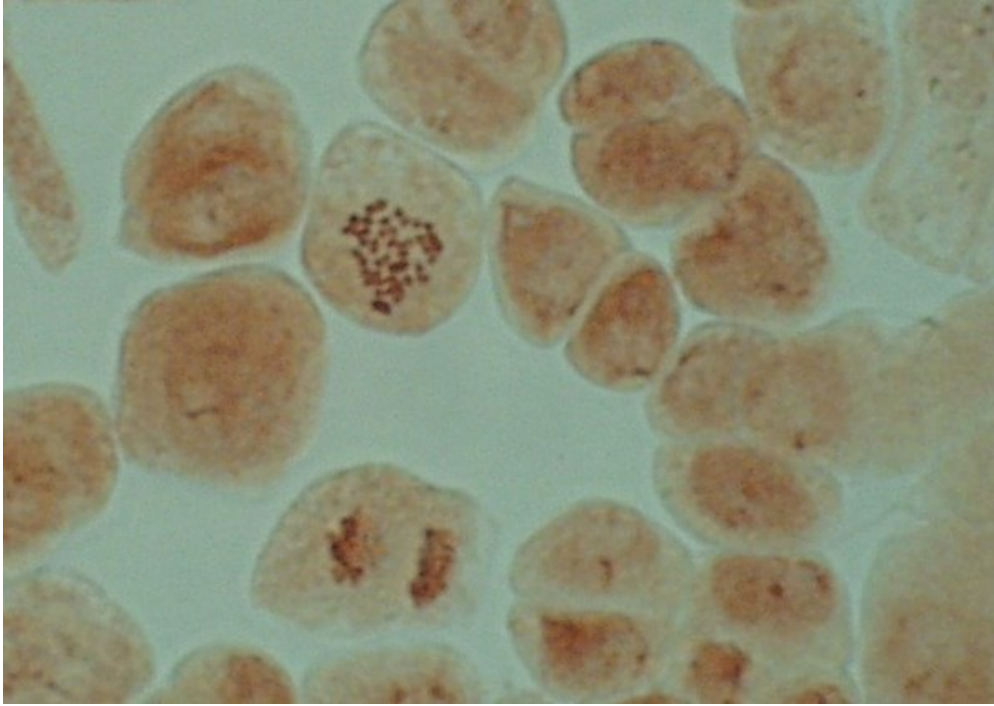


B



**Fig. 1-3-5.** Flower and fruting of 'Souraku'.

A: flower, B: fruting



**Fig. 1-3-6.** Chromosome of 'Souraku'.



**Table 1-3-2.** Bionomic characteristics

Cultiver	Tree: vigor	Branch: sprouting	Regeneration	Time of ceasing in shoot elongation	Rooting activity in cutting	Cold hardiness
Souraku	medium	late	medium	early	low	medium
Ichinose	medium	late	medium	medium	medium to high	weak to medium
Kokusou 21	medium	medium	weak to medium	late	low	weak to medium

Cultiver	Lodging resistance	Resistance to <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	Resistance to dwarf disease	Resistance to <i>Phyllactinia moricola</i>	Plant: plucking harvest for leaves	Leaf: Time of stiffening
Souraku	weak to medium	weak to medium	medium	medium	easy	medium
Ichinose	weak	weak	medium	medium	easy	medium
Kokusou 21	strong	strong	medium	medium	easy	medium



**Fig. 1-3-7.** Sprouting of axillary buds after the ceasing in shoot elongation .

## 収量性

葉量割合は‘一ノ瀬’に比べ蒼楽がやや少なかったものの、最長枝条長が‘一ノ瀬’より 30 cm 長く、葉量は‘一ノ瀬’より 1 割程度多くなった。新梢の基部から着葉部位までを測定する下部落葉長は‘一ノ瀬’に比べ‘蒼楽’が多かった。これは最長枝条長が‘一ノ瀬’に比べ長かったことから、下位葉への日照が不足したことが原因で落葉が多くなったと考えられた。また、最長枝条長が‘蒼楽’長いにもかかわらず、倒伏枝条数は‘一ノ瀬’に比べ少なかったことから、‘蒼楽’は‘一ノ瀬’より倒伏に強いと思われる（第 1-3-3 表）。

## Q3MG 含量

第 1-3-8 図に‘四倍性桑’と‘国桑第 21 号’の交雑実生における Q3MG 含量の度数分布を示した。交雑実生の Q3MG 含量は正規分布を示し、交配親より高含有量の個体が得られた。また、実生 1 年目と 2 年目の個体の Q3MG 含量を比較し、播種 1 年目の早期選抜の可能性を検討した。1 次選抜から 3 次選抜まで測定したすべての個体の Q3MG 含量について、‘国桑第 21 号’の含量を 100%として換算した結果を第 1-3-9 図に示した。‘蒼楽’の Q3MG 含量は‘一ノ瀬’に比べ約 4 割有意に高かった。

葉中フラボノールの組成割合を第 1-3-10 図に示した。交配親の‘四倍性桑’、‘国桑第 21 号’ Q3MG の割合は‘一ノ瀬’と同程度で、‘蒼楽’の Q3MG 割合も一般的なクワ品種と同様であり、Q3MG 含量は総フラボノールの 6 割弱を占めた。一方、両親の含量割合が異なったルチン（四倍性桑：4%、国桑第 21 号：18%）は、‘一ノ瀬’と同程度の 10%であった。

**Table 1-3-3.** Tree growth and leaf yield at harvesting

Cultiver	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Internode length (cm)	Longest shoot length (cm)	number of branches (/stock)	number of dwarf branches (/stock)	Shooty weight <sup>z</sup> (kg/stock)	Stem weight <sup>y</sup> (kg/stock)	Leaf yeild <sup>x</sup> (kg/stock)	Leaf/stem ratio (%)
Souraku	20.3	17.9	4.4	192.1	7.2	13.0	1091	339	788	70
Itinose	20.8	17.5	4.0	163.9	5.4	6.2	944	256	709	74

Cultiver	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Internode length (cm)	Longest shoot length (cm)	number of branches (/stock)	number of dwarf branches (/stock)	Shooty weight <sup>z</sup> (kg/stock)	Stem weight <sup>y</sup> (kg/stock)	Leaf yeild <sup>x</sup> (kg/stock)	Leaf/stem ratio (%)
Souraku	15.3	13.7	6.3	196.2	7.4	8.1	988	390	670	63
Kokusou 21	23.7	21.7	6.7	169.4	3.8	8.0	766	283	583	67
Yonbaiseisou	19.5	19.0	6.7	133.4	3.6	5.3	361	120	250	68

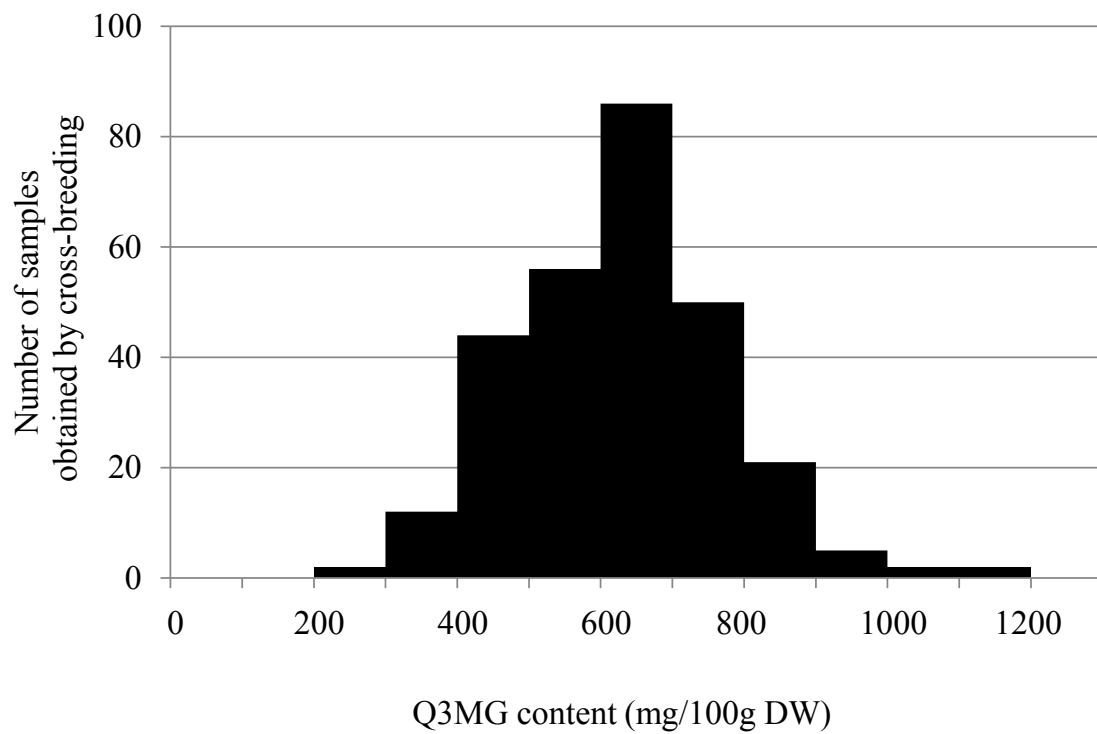
<sup>z</sup> Shoot length was measured after defoliation. The length from the base of the shoot to the remaining leaf was measured.

<sup>y</sup> Shoot includes the stem and leaves.

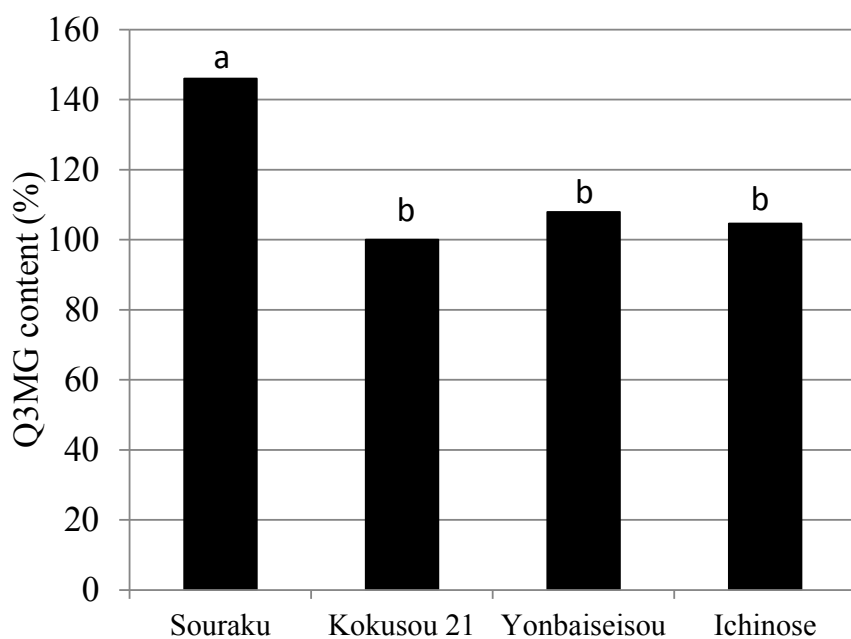
<sup>x</sup> Leaf yield was defined as leaf weight, which was calculated by subtracting the stem weight without leaves from the total shoot weight with leaves.

Upper column: Data were expressed as means measured at Onuki, Sakurae-cho, Gotsu City in July and October 2011, and July and September 2012.

Lower column: Data were expressed as means measured at Ichiyama, Sakurae-cho, Gotsu City in September 2009.

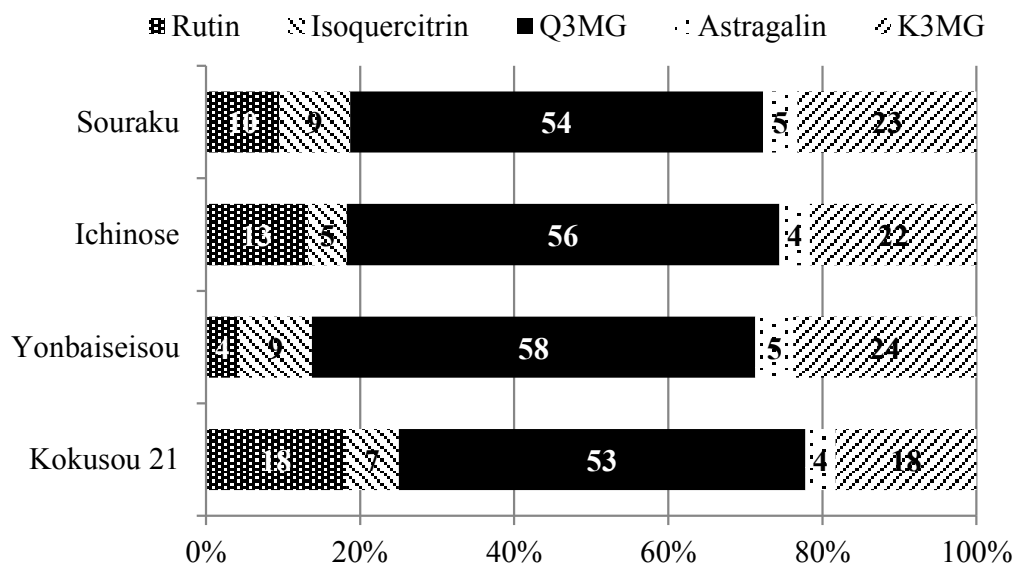


**Fig. 1-3-8.** Frequency distribution of quercetin 3-(6-malonylglucoside) (Q3MG) content in the offspring obtained by crossing 'Yonbaiseisou' and 'Kokusou 21'.



**Fig. 1-3-9.** Q3MG content in mulberry leaves comparing with ‘Kokusou 21’<sup>z</sup> as a reference standard.

<sup>z</sup> The Q3MG content was averaged after converting the data, by setting Q3MG content of ‘Kokusou 21’ as a standard value (100%). Locations and years of sampling leaves of each mulberry cultivar were as follows: ‘Souraku’, ‘Kokusou 21’, and ‘Yonbaiseisou’ at the Experiment Field of Shimane Agricultural Technology Center in 2008-2009; ‘Souraku’, ‘Kokusou 21’, and ‘Yonbaiseisou’ at the Ichiyama, Sakurae-cho, Gotsu in 2009-2010; ‘Souraku’, ‘Kokusou 21’, ‘Yonbaiseisou’; ‘Ichinose’ at the Onuki, Sakurae-cho, Gotsu in 2010-2012. The same lowercase letters indicate no significant difference assessing by Tukey’s test ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 1-3-10.** Composition of flavonol glycosides in mulberry leaves of 4 cultivars.

## 摘要

原料となるクワ葉に含まれる機能性成分含有量の向上を目的として、クワ 176 品種の葉中フラボノール配糖体および 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) の葉中含量を調べた。176 品種間におけるフラボノール含有量と組成およびその割合には幅広い品種間差異が認められた。最もフラボノール含有量の高い品種は‘小淵沢 1 号’で、最も少ない‘御蔵島 15’のフラボノール総量の約 5 倍であった。多くのクワ品種においてケルセチン 3-(6-マロニルグルコシド) (Q3MG) が最も多く含有されていたが、一部の品種は Q3MG をまったく含有しなかった。また、ケルセチン 3-(6-アセチルグルコシド) (Q3AG) は‘毛桑’にのみ含まれた。DNJ 含量が最も高い品種は‘あやのぼり’であった。一般に栽培されている品種‘一ノ瀬’よりフラボノール、DNJ とともに高含有する既存品種が明らかとなった。

クワ葉の主要フラボノールである Q3MG 高含量品種育成の基礎知見とするために、Q3MG を含有する品種、Q3MG を持たない品種の交配後代を用いて Q3MG の遺伝様式を調べた。その結果、Q3MG 合成に関与するマロニル基転移酵素は単一遺伝子でメンデル遺伝することが明らかになり、交雑実生において交配親より高含有個体が得られたことから、交雑育種による高含有個体獲得の可能性が示唆された。さらに接ぎ木交配、Q3MG 含量の早期選抜により育種年限短縮がはかれた。

品種間差の結果をもとに Q3MG 含量の高い交配親を選定し、4 倍体の‘四倍性桑’を種子親、2 倍体の‘国桑第 21 号’を花粉親としてクワの品種改良を行った。その結果、Q3MG 含量が‘一ノ瀬’より 1.4 倍高く、収量性も高い 3 倍体クワ品種‘蒼楽’を育成した。‘蒼楽’は 2013 年 4 月に品種登録出願を行い、2015 年に品種登録された。



## 第2章 栽培環境条件がクワ葉に含まれる機能性成分含量に及ぼす影響

クワの食品利用，特に機能性食品においては機能性成分の含量が重要な品質として考えられる．したがって原料の生産現場では，収量性を重視した技術開発だけでなく，クワ葉中の機能性成分含量を増やすことが重要な課題になる．一般的に植物体中の様々な成分は，品種や光，施肥量，気温などの栽培環境に影響を受けることから，品種や栽培時期，生育ステージ，遮光処理，肥培管理などの要因が作物中成分の含量に与える影響について検討されてきている．クワの機能性成分も同様に，品種，収穫時期，温度，部位産地などによる影響を受けるとされる (Bajapai・Rao, 2014; Choi ら, 2013b; Hu ら, 2013; Lee・Choi, 2012; Lou ら, 2011; Nakanishi ら, 2011; Vichasilp ら, 2012)．本研究においても第1章でフラボノールおよびDNJ含量が品種により異なることを明らかにした．DNJ含量に関してはこれまでに，Hu ら(2013)，Kimura ら, (2007)，Nakanishi ら, (2011)，Yatsunami ら, (2008)も品種間差があることを，またKimura ら, (2007)，Nakanishi ら(2011)はDNJ含量が8月に増加し，若い葉で多いことを，さらにConstantinides・Fownes(1994)は生産地によりDNJ含量が異なることを報告しているものの，詳細な検討はなされていない．さらにフラボノールに関する報告も少ないことから，本章では，機能性成分の葉中含量を高めるための基礎知見を得ることを目的に，クワ葉に含まれるフラボノール，クロロゲン酸およびDNJ含量に対する栽培環境条件の影響を調査した．第1章では特にフラボノールの中でもケルセチン 3-(6-マロニルグルコシド)(Q3MG)を中心に試験を行ったが，他のフラボノール配糖体にも抗酸化能があることからここではフラボノール総量を，さらにクワの抗酸化の有効な成分であるクロロゲン酸も対象とした．

### 第1節 日照がクワ葉に含まれる機能性成分含量に及ぼす影響

第1章第1節でクワのフラボノール含量の年次変動が明らかとなり，この年次変動は日照時間に影響される可能性が示唆された．これまでに前川ら(2006)は光強度を高めることによりアブラナ科スプラウトのフラボノール含量が高くなることを，Spayd ら(2002)はブドウ果皮のフラボノール濃度がUV遮蔽によって著しく減少することを報告している．これらから，日照がフラボノール含量

に及ぼす影響は小さくないと推察される。また、DNJ に関して日照条件との関係を検討した報告はみられない。日照とクワ葉中機能性成分含量の関係が明らかになれば、それをもとにした栽培方法、収穫時期の最適化などにより機能性成分含量の高いクワ葉生産が期待できる。そこで、本節ではクワ葉に含まれるフラボノールおよび DNJ 含量に対する日照の影響を調査した。

## 材料および方法

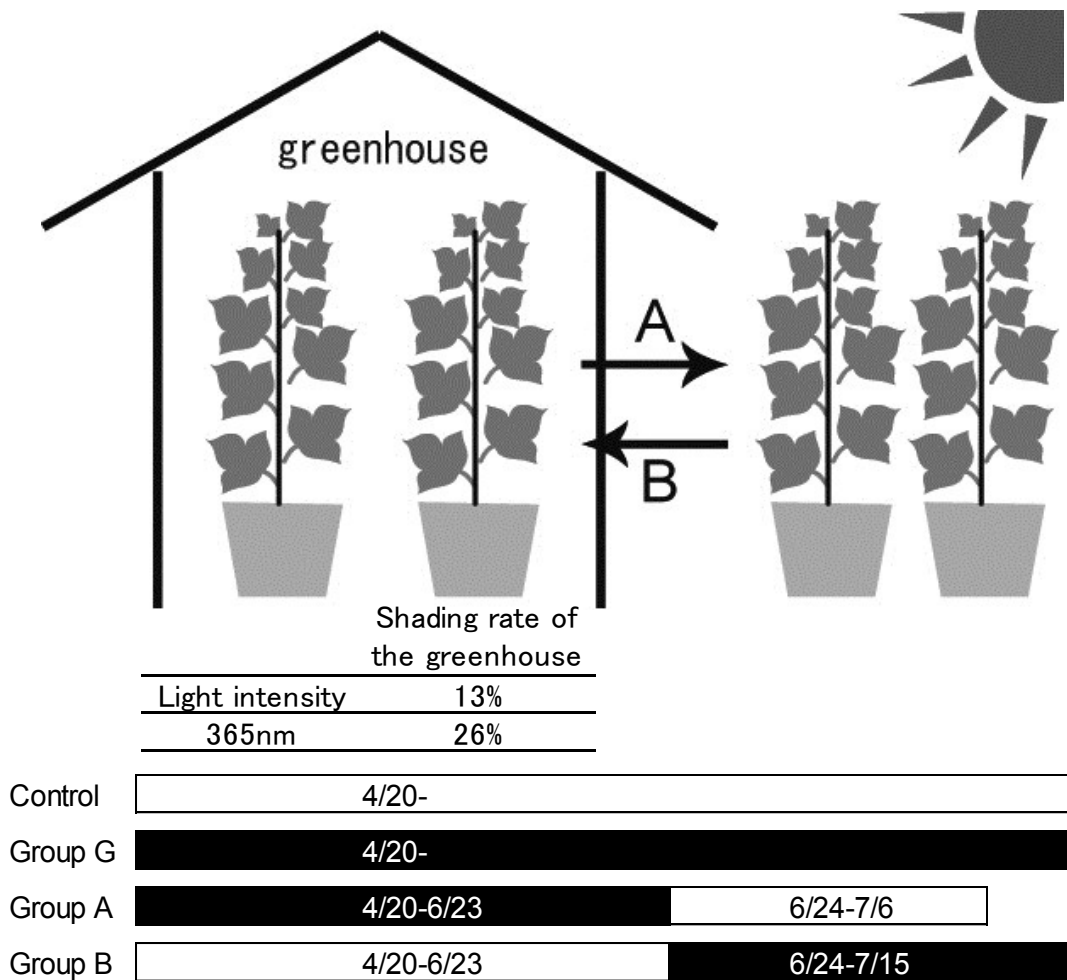
### 供試材料

機能性成分含量に対する日射量の影響は、2009 年に島根県農業技術センター(島根県出雲市芦渡町)において、クワ品種‘一ノ瀬’の鉢植えを用いて行った。‘一ノ瀬’の 2 年生苗を、まさ土：バーク堆肥(1:1)の培土を用いて容積 25 L のプラ鉢に移植し、新梢 1~2 枝となるように調整した。定植後、1 鉢あたり硫酸、苦土重焼磷、硫酸カリをそれぞれ N : 5 g, P : 0.32 g, K : 1.1 g となるように施用した。機能性成分に及ぼす日照の影響を調査するための 4 つの試験区を第 2-1-1 図に示した。日照条件は、多日照：コントロール、寡日照：グループ G, 寡日照から多日照：グループ A, 多日照から寡日照：グループ B とし、それぞれの日照条件の影響を調査した。コントロールは常時屋外で、グループ G は常時ガラス室で、グループ A はガラス室から屋外へ移動、グループ B は屋外からガラス室へ移動し、それぞれの日照条件となるように栽培した。使用したガラス室は、園芸作物の栽培に用いられる一般的なガラス室で 6 月の晴天時において屋外に比べ照度で 13%, また 365 nm の波長では 26%の遮光率であった。

また、処理期間と試料の採取は以下のとおり行った。グループ G および A におけるガラス室栽培は 4 月 20 日の萌芽時から開始した。グループ A はガラス室で養成後、6 月 23 日に屋外へ移動し、それぞれ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 日後に葉身を葉位ごとに採取した。グループ B は屋外栽培後の鉢を 6 月 23 日にガラス室へ搬入し 22 日後に葉身を葉位ごとに採取した。第 2-1-2 図にコントロール、グループ G および A の葉位とサンプリング部位を示した。葉位は先端から葉長 5 cm までの未展開葉をまとめて T とし、それ以降下位に向かって順次葉位番号を付した。また、それぞれの処理によるフラボノールおよび DNJ 含量は以下のとおり表した。コントロール、グループ G および A は、上位葉：T(5 cm 以内の未展開葉)および 1~4 の平均、中位葉(5~9), 下位葉(15, 17, 19, 21, 23)をそれぞれの葉位の平均(mg/100 g DW)として表した。また、グループ B は、上

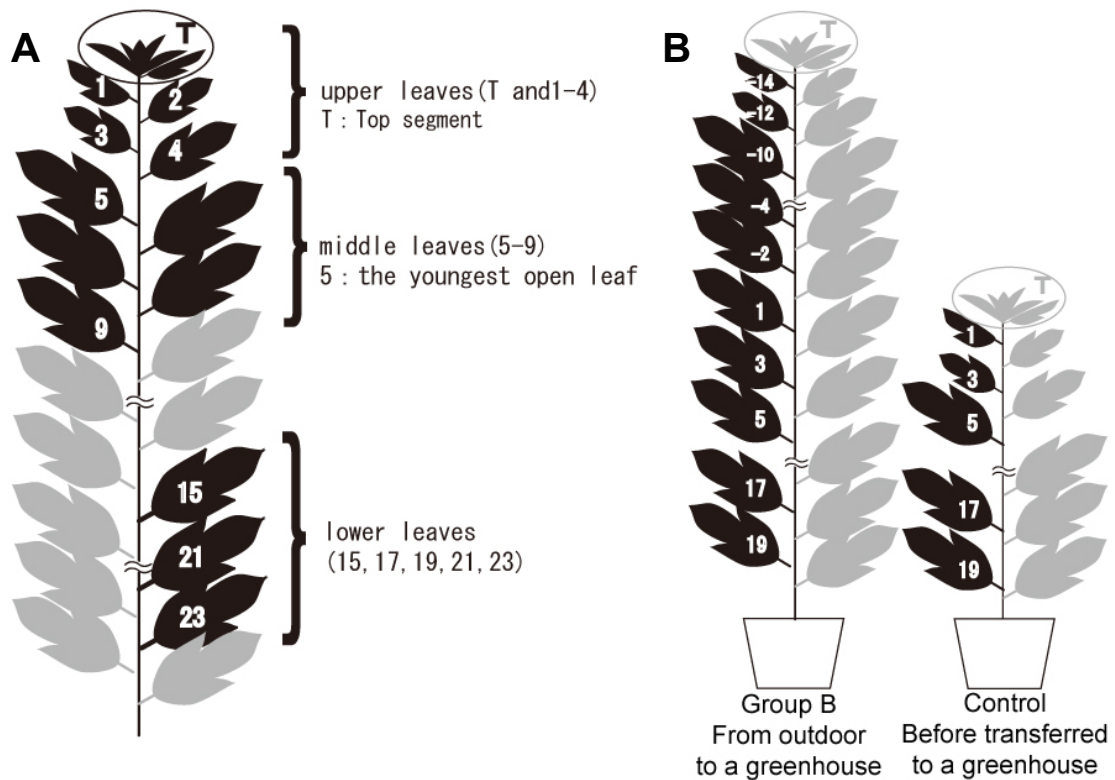
位葉を葉位 T(5 cm 以内の未展開葉)および 1~4 の平均, 中位葉, 下位葉をそれぞれ新梢中位 1/3 の葉身, 新梢下位 1/3 の葉身各 5 枚の平均 (mg/100 g DW) として表した. 第 2-1-5-B 図にグループ B の葉位とサンプリング部位を示した. 葉位は移動時の展開開始葉を 1 とし, ガラス室搬入後展開した葉はマイナス表記した. フラボノール含量は 1 葉当たりの重量で表した. それぞれの試験各 3 鉢 (各鉢 1 枝または 2 枝) で行った.

機能性成分含量に対する日照時間の影響は, 島根県江津市桜江町の一般栽培圃場で有機栽培されている ‘一ノ瀬’ を用いて, 2009 年 5 月 28 日~7 月 28 日, 2010 年 5 月 24 日~7 月 27 日に行った. サンプリングは約 10 日ごとに行い, 各 20 株の新梢 2 枝から, 完全展開葉のうち最も若い葉から下位 3 枚の葉身を採取し, 3 枚/枝の葉身をバルクで分析した. 日照時間は島根県邑智郡川本町のアメダスデータを用い, 積算時間を 14 日間の積算値で表した. 14 日間としたのは, 6 月から 7 月の葉身展開が 1 枚/1.4 日である事から, サンプリング葉 (先端から 9, 10, 11 枚目にあたる) の中間の葉 (先端から 10 枚目にあたる) の展開開始からサンプリングまでの期間が 14 日であるためである.



**Fig. 2-1-1.** Cultivation methods of the four mulberry groups.

Black bars indicate greenhouse cultivation, and white bars indicate outdoor cultivation. The mulberry trees were cultivated outdoors from the time of pruning (March 20) to bud break (April 20) in 2009. Control: cultivated outdoors; Group G: cultivated in a greenhouse; Group A: cultivated in a greenhouse and then transferred outdoors on June 23; and Group B: cultivated outdoors and then transferred to a greenhouse on June 23.



**Fig. 2-1-2.** Sampling portions of mulberry trees.

Non-opened leaves with blade lengths less than 5 cm were defined as segment T, and completely opened leaves were serially numbered towards the bottom of the stem. A: Average flavonol and 1-deoxynojirimycin contents were compared among the three areas of the plant. Upper leaves: segment T and leaf positions 1–4; middle leaves: leaf positions 5–9; and lower leaves: leaf positions 15, 17, 19, 21, and 23. B: Group B mulberry pots were harvested 22 days after transfer from the outdoors to the greenhouse (July 15). Control mulberry pots were harvested on June 23. The youngest opened leaf (with a leaf blade length > 5 cm) when pots were transferred from the outdoors to the greenhouse on June 23 was numbered '1', and the other leaves were numbered serially towards the bottom of the stem. Negative numbers indicate the leaves that opened after transferring the pots to the greenhouse.

## 抽出方法

第 1 章，第 1 節に準じた方法で行った。

## フラボノールおよび DNJ の定量

第 1 章，第 1 節に準じた方法で行った。

## 統計処理

第 1 章，第 1 節に準じた方法で行った。

## 結果および考察

### 日照条件がクワ葉中フラボノール含量に及ぼす影響

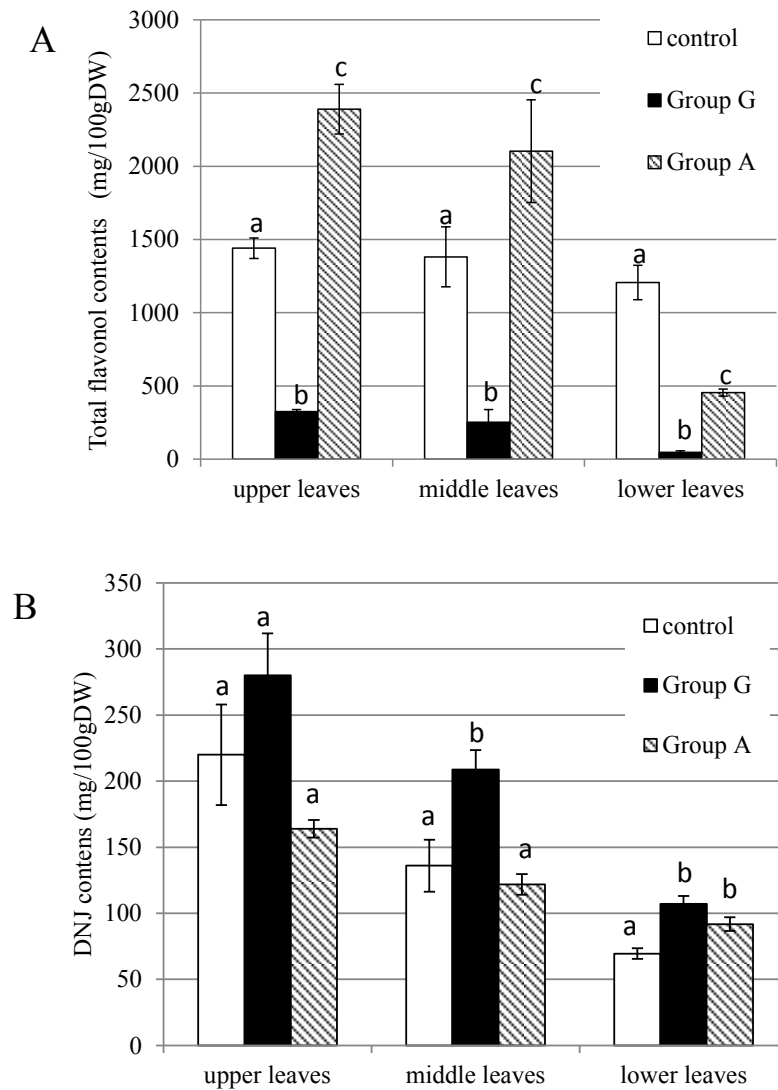
第 2-1-3-A 図にコントロール(屋外)，グループ G (ガラス室)，グループ A (ガラス室から屋外へ移動)の搬出 13 日後のフラボノール含量を示した。ガラス室の葉中フラボノール含量はコントロールに比べ，上位葉が 1/4，中位葉が 1/7，下位葉が 1/15 といずれの葉位も有意に低かった。また，グループ A のフラボノール含量は，上位葉ではガラス室に対し約 7 倍，屋外に対し 1.7 倍と著しく増加した。中位葉ではガラス室に対し約 8 倍と有意に高かったが，コントロールとの有意差は認められず，下位葉ではグループ G より有意に高くなったものの，コントロールより有意に低かった。

本試験の結果は，フラボノール含量は屋外に比べガラス室で著しく減少し，通常栽培に用いられるガラス室(遮光率は照度で 13%，365 nm の紫外部で 26%)のそれほど高くない遮光率でも合成が阻害されることが特徴的であると思われる。フラボノール合成に関しては，Price ら(1995)，Fujita ら(2006)がブドウ果皮のフラボノールが日光照射により増加することを，さらに Morales ら(2010)がフラボノイド合成に関与する遺伝子が紫外線カットにより発現が抑制されることを報告しており，本試験のガラス室栽培でみられたフラボノール含量の減少もガラス室搬入による紫外線カットの影響であると考えられる。

本試験で用いたガラス室は一般的な園芸作物栽培に使用されるタイプである。一般にアントシアニンの蓄積は光条件の影響を受けること，アントシアニン生成や関連遺伝の発現には紫外光が有効であることが知られているが (Bakhshi・Arakawa, 2006; 松丸ら, 1971; 松添ら, 1999; Mol ら, 1996; Woodall・Stewart, 1998)，ブドウ，ナス，トルコギキョウなどアントシアニンを着色成

分とする多くの園芸作物でガラス室、ビニールハウスなどの施設栽培が行われており、着色低下はそれほどみられない。すなわち、通常栽培で用いられているガラス(26%)やビニール(50%)による20~50%程度の紫外線カットによるアントシアニン合成阻害はないかあっても実用上あまり問題にならないと言える。アントシアニンとフラボノールは同じ代謝系で合成され、基本骨格のC環4位がケトンで2位と3位の間が不飽和であればフラボノール、C環が完全な芳香族環で正電荷を有していればアントシアニンとなる。Spaydら(2002)は紫外線遮蔽によりブドウ果皮のフラボノール濃度は減少するが、アントシアニンの濃度は減少しないことを報告している。本試験においても、遮光率が低いにもかかわらずガラス室栽培下でフラボノール含量が激減した。このことから、アントシアニンとフラボノールでは、合成に対する紫外線要求量が異なる可能性が示唆され、実際の栽培上特に注意を要する点である。フラボノールをターゲットとした作物の施設栽培を行う場合は、紫外線をほとんどカットしない素材を用いるなどの配慮が必要であると思われる。

日照とフラボノール含量の関係についても一つの注目すべき点は、グループAの日照の状態変化、すなわちガラス室で寡日照状態が続いた後すみやかに多日照の屋外へ移動することによって、上位葉(T, 1~4)のフラボノール含量が屋外よりも有意に高くなったことである(第2-1-3-A図)。この急激な日照変化によりフラボノール含量が高くなった原因として、植物の生育環境への適応性が考えられた。近藤(2010)は、屋外の多日照下で生育した植物は紫外線に対し適度な抵抗性を得るが、寡日照下で生育した植物は抵抗性が低下するとしている。本試験でもガラス室で紫外線に対する抵抗性が低下した後、屋外で浴びた紫外線の刺激によって過剰反応が起こり、屋外よりフラボノール含量が著しく高くなったと推測される。



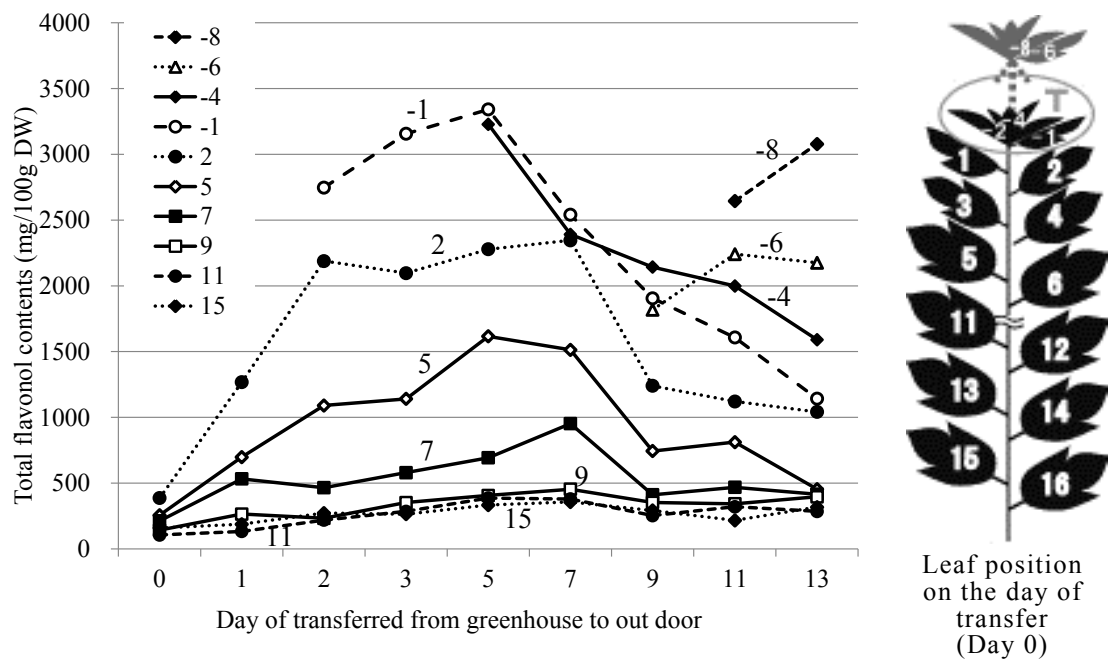
**Fig. 2-1-3.** Effect of solar radiation on flavonol and 1-deoxynojirimycin contents in mulberry leaves.

A: Flavonol contents, B: 1-deoxynojirimycin contents. The leaves were harvested on July 6, 2009. Average flavonol and 1-deoxynojirimycin contents were used to compare the three areas of the tree. Upper leaves: segment T and leaf positions 1–4; middle leaves: leaf positions 5–9; and lower leaves: leaf positions 15, 17, 19, 21, and 23. Data are expressed as means  $\pm$  SE (n = 3). Different letters among the three groups at the same leaf positions indicates a statistical difference at  $p < 0.05$  as assessed by Tukey’s test. Control: cultivated outdoors; Group G: cultivated in a greenhouse; and Group A: cultivated in a greenhouse and then transferred to the outdoors on June 23.



葉位の部位別フラボノール含量は、いずれも上位葉、中位葉、下位葉の順に多かったが、屋外栽培における上位葉と下位葉の差は1.2倍と少なく、通常栽培においては、フラボノール含量の葉位による差は比較的小さいと考えられる。一方、グループAは上位葉と下位葉の差が5倍となり、屋外多日照条件の上位葉と下位葉の差より大きかった(第2-1-3-A図)。このことを詳細に調査するため、グループAについて、屋外搬出後の各葉位のフラボノール含量の変化を調べた(第2-1-4図)。搬出後の日数経過にともない新たに葉身が展開するため、このグラフでは搬出後に展開した葉位をマイナス表記した。搬出時すでに展開していた葉(葉位2～葉位15)では、葉位2～葉位7のフラボノール含量は移動後7日まで概ね増加傾向にあり、その後減少傾向を示した。特に若い葉位ほど移動後2日までの増加が著しく、葉位2が搬出後2日に2200 mg/100 g DW、移動時完全展開葉最若葉である葉位5も1500 mg/100 g DWまで増加した。それに対し、葉位9から下位葉のフラボノール含量はいずれも調査期間を通じて低く500 mg/100 g DWを下回った。また、移動後に展開した葉(葉位-1～-8)のフラボノール含量はすべての葉位および調査日において1500 mg/100 g DW以上の高い値を示した。

このことから、フラボノールは屋外へ移動後1日からすみやかに合成が開始されることが明らかとなった。上位7葉までの増加程度は上位葉ほど大きく、日照変化がフラボノール合成に与える影響は若い葉ほど大きいと考えられた。上位葉と対照的に、葉位9より下位の葉位のフラボノール含量はわずかに増加傾向を示すもののその程度は低いまま推移した。試験開始時の6月23日における新梢の平均葉数は25枚で、この葉位9は先端から約1/3に位置している。新梢の中間部位の葉位でもフラボノールの増加が認められなくなっていることから、フラボノール合成は比較的早い段階で低下していくと推察された。屋外において葉位の違いがあまりみられなかったのは上位葉のうちにフラボノールが十分量合成されていたためと推測される。



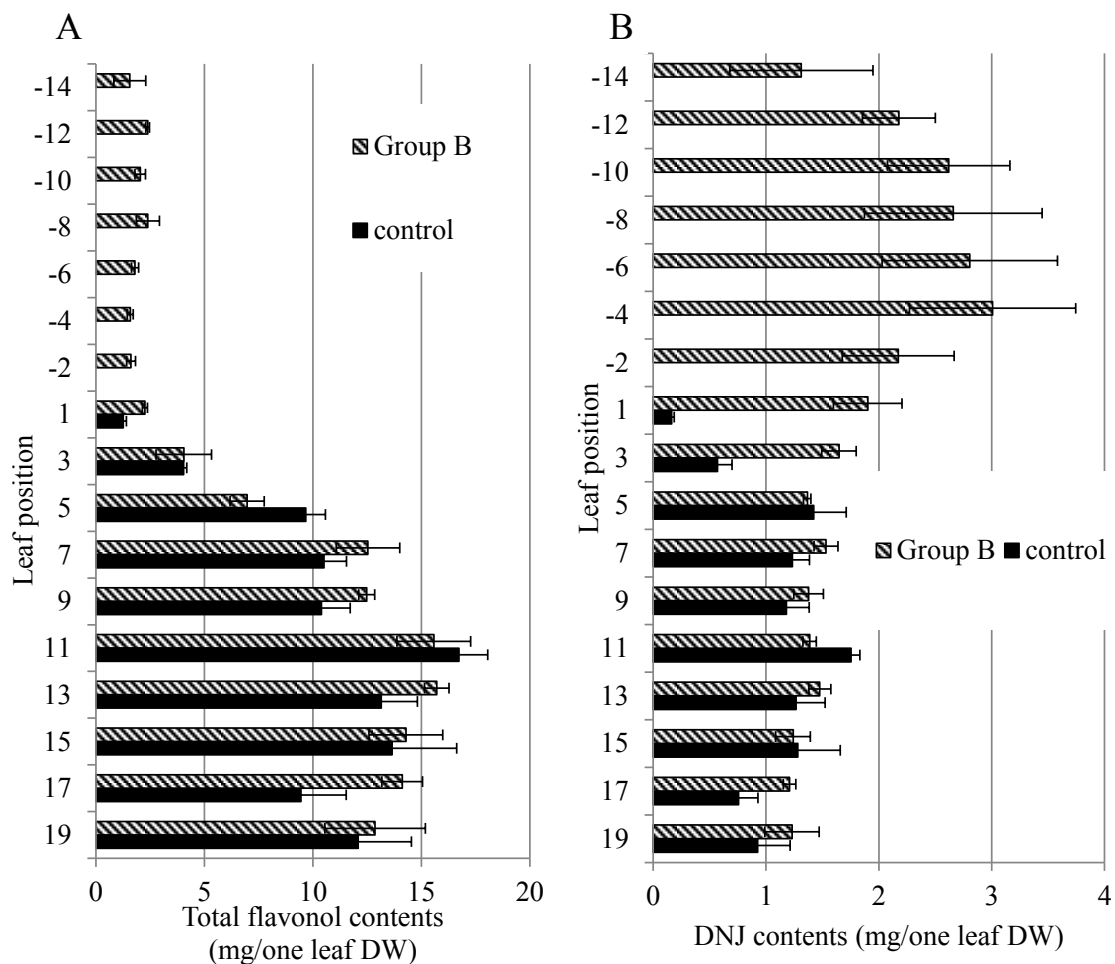
**Fig. 2-1-4.** Effect of solar radiation on flavonol contents in mulberry leaves after transferring outdoors.

The leaves at each leaf position of mulberry were harvested on 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 13 days after being transferred to the outdoors. Numbers in the figure indicate the leaf positions on the day of transfer. Negative numbers were used for new leaves that opened after being transferred to the outdoors. Data are expressed as means (n = 3). Group A: cultivated in a greenhouse and then transferred to the outdoors on June 23.

次に、グループ B(屋外→ガラス室へ移動)、すなわち日照下から寡日照へ移動した場合のフラボノール含量の変化を第 2-1-5-A 図に示した。ここでのフラボノール含量は、搬入前と日数経過した搬入後の大きさの異なる同一葉位を比較するため一葉当たりの含量で表した。ガラス室搬入後に展開した葉位-14~-2 のフラボノール含量は 1 葉当たり 1.56~2.39 mg と低かった。それに対し移動前に展開していた葉(葉位 1~19)は、移動前の屋外のフラボノール含量とほぼ同じ値を示した。搬入時に展開を始めた葉位 1 から搬入時の完全展開葉最若葉である葉位 5 までは、下位葉になるに従ってフラボノール含量は多くなり、葉位 7 より下の下位葉では 12.5~15.7 mg と幅はあるものの概ね一定の値を示した。

屋外からガラス室に移動後にガラス室内で新しく展開した葉のフラボノール含量は低いままであったが、移動前にすでに展開していた葉のフラボノール含量はガラス室搬入後 22 日でも移動前とほぼ同じ値を示した(第 2-1-5-A 図)。このことから、フラボノールの合成は紫外線カットによってすみやかに停止すること、また一度合成されたフラボノールは分解しにくいと考えられた。

以上の結果、日照がフラボノール合成を促進し、ガラス室から屋外への日照の変化によって屋外より含有量が高くなることが明らかとなった。屋外栽培での補光や寒冷紗を用いた遮光等の日照制御により、さらに日照がコントロール可能な施設栽培などでは遮光、露光の繰り返しによりフラボノール含量を高くできる可能性が示唆された。



**Fig. 2-1-5.** Effect of poor solar radiation on flavonol and DNJ contents of mulberry leaves.

A: Flavonol contents, B: 1-deoxynojirimycin contents. Group B mulberry pots were harvested 22 days after transfer from the outdoors to the greenhouse (July 15). Control mulberry pots were harvested on June 23. The youngest opened leaf (with a leaf blade length > 5 cm) when pots were transferred from outdoors to the greenhouse on June 23 was numbered '1', and the other leaves were numbered serially towards the bottom of the stem. Negative numbers indicate the leaves that opened after transferring the pots to the greenhouse. Data are expressed as means  $\pm$  SE (n = 3). Control: cultivated outdoors; Group B: cultivated outdoors and then transferred to a greenhouse on June 23.

### 日照条件がクワ葉に含まれる DNJ 含量に及ぼす影響

第 2-1-3-B 図にコントロール(屋外), グループ G(ガラス室), グループ A(ガラス室から屋外へ移動)の DNJ 含量を示した. DNJ 含量はグループ G がコントロールに比べ中位葉, 下位葉で 1.4 倍有意に高かった. また, グループ A はグループ G と比較して 0.6 倍低く, コントロールと同程度の値を示した.

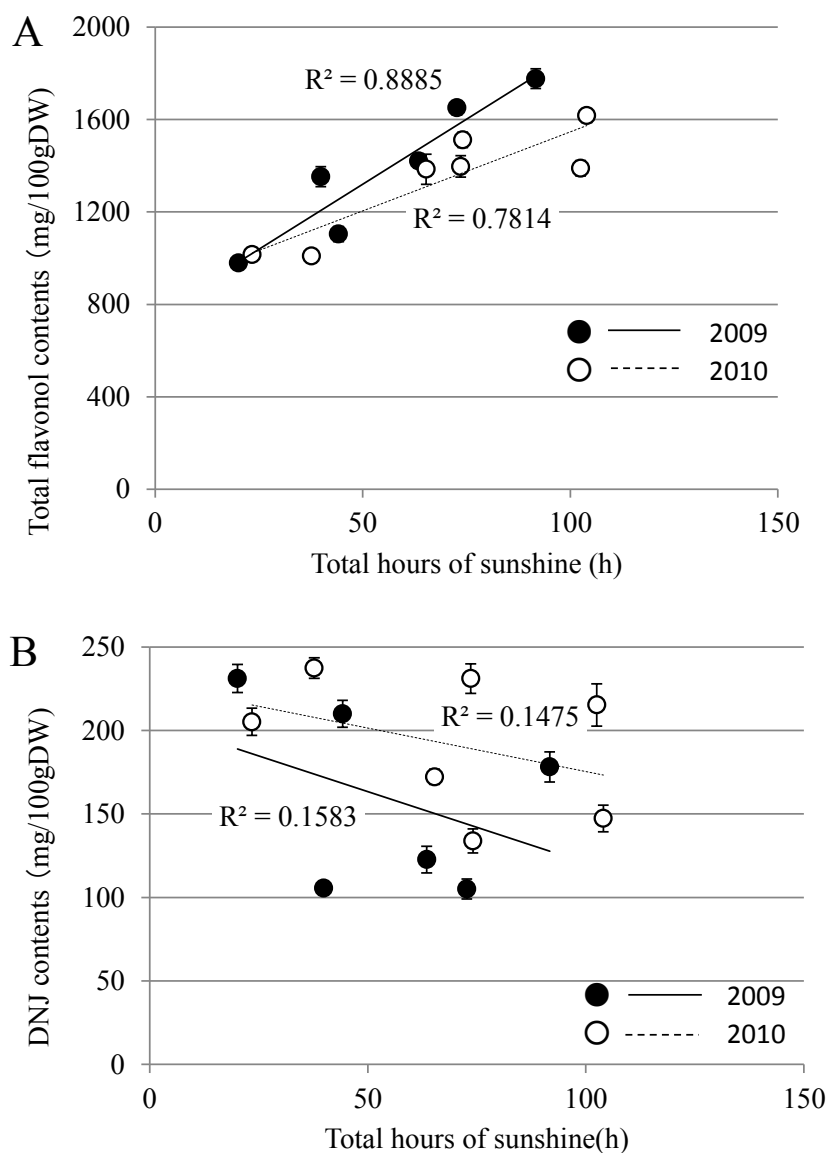
DNJ の日照に対する反応は二つの点でフラボノールの場合と異なった. フラボノール含量が多日照条件で高くなったのに対し, DNJ 含量はガラス室内の寡日照条件で増加した. 二つ目はフラボノールと比べその差はわずかだったことである(第 2-1-3-B 図). ガラス室栽培により DNJ 含量が増加したことから, DNJ は紫外線カット, つまりストレスを緩和する事により誘導される代謝産物であると推測される. また, 日照が DNJ に及ぼす影響が小さいことから, DNJ 含量の年次間差には日照以外の要因が関与している可能性が高い. クワを傷つけると維管束の周りにある乳管から乳液がしみ出してくる. この乳液に関して, Konno(2011)は DNJ が乳液に多く含まれているとし, Kimura ら(2007)は DNJ 含量がクワの生育が旺盛な夏季に多くなることを報告している. 我々の調査でも 9 月下旬~10 月の落葉前になると DNJ 含量が減少することを確認しており(データ省略), DNJ 含量と乳液量には密接な関係があると推察される. したがって, 今後 DNJ 含量を増やすには, 乳液量を増やすための栽培条件等の検討が有効であるかもしれない.

### 積算日照時間がクワ葉に含まれるフラボノールおよび DNJ に及ぼす影響

2009 年, 2010 年の一般栽培圃場において, フラボノールおよび DNJ 含量と積算日照時間との関係を調査した. 日照時間の積算日数は, 6 月の葉身展開 1 枚/1.4 日から算出した調査葉の展開直後からサンプリングまでの期間に相当する 14 日間とした. 第 2-1-6 図に 5 月下旬から 7 月下旬の積算日照時間とクワ葉のフラボノール, DNJ 含量との関係を示した. フラボノール含量と積算日照時間には, 2009 年の決定係数  $R^2 = 0.8885$ , また 2010 年の決定係数  $R^2 = 0.7814$  と, いずれも高い正の相関がみられた(第 2-1-6-A 図). これはポット試験の結果を裏付けた. したがって, フラボノールに及ぼす日照の影響は大きく, 年次間差をもたらす主要因であると考えられた. それに対し DNJ 含量は, 2009 年, 2010 年いずれも積算日照時間との相関が認められなかった(第 2-1-6-B 図). DNJ はフラボノールに比べ, 日照が及ぼす影響は小さいと考えられた.

また、フラボノールの組成割合と日照の関係を第 2-1-1 表に示した。フラボノールの組成割合は、ルチン 14~18%、イソケルシトリン 4~6%、Q3MG 58%~60%、アストラガリン 3%、K3MG 16~20%となり、日照時間、総フラボノール含量の違いに関わらず一定であった。第 1 章で、フラボノールの組成割合は品種により異なることを明らかにしたが、本試験の結果から、組成割合は日照の影響を受けないことが示された。

以上のように、紫外線はクワ葉中フラボノールと DNJ の両成分に影響を与えたが、それぞれの成分で反応が異なるため、同一条件で両成分の含有量を高めることは難しい。しかし、DNJ に対する紫外線の影響は小さいことから、クワ葉生産における日照条件はフラボノール合成への影響が大きい多日照が良いと考えて問題ないと思われる。当面、晴天が続いた後に収穫する、あるいは曇天が続いた場合は収穫を避けその後晴天が続いた時に収穫するなど収穫時の天候に留意するとともに、日当たりの良い圃場を選定することにより、フラボノール含量の高いクワ葉原料の確保が期待できる。また、DNJ を対象とする場合は寒冷紗等を利用した遮光栽培によって含有量の高い原料を得られる可能性がある。



**Fig. 2-1-6.** Correlation between the amounts of functional components and total hours of solar radiation.

A: Flavonol contents, B: 1-deoxynojirimycin contents. Data were collected every 10 days from May 28 to July 28 in 2009 (black circle), and from May 24 to July 27 in 2010 (white circle). Hours of solar radiation were measured using the Automated Meteorological Data Acquisition System located in Kawamoto-cho, Ochi-gun, Shimane, Japan. The total hours of solar radiation were calculated for 14 days before leaf sampling. Data are expressed as means  $\pm$  SE (n = 20).

**Table 2-1-1.** Relative proportion of flavonol glycosides.

Date of measurement	Total hours of sunshine <sup>z</sup> (h)	Flavonol contents (mg/100gDW)	Relative proportions of flavonol glycosides(%)				
			Rutin	Isoquercitrin	Q3MG	Astragalin	K3MG
5/28	64	1,421	18	6	58	3	16
6/08	40	1,348	17	5	58	3	16
6/18	73	1,678	14	6	58	3	18
6/30	92	1,713	15	6	58	3	18
7/14	44	1,034	15	4	58	3	20
7/28	20	986	15	4	60	3	18

<sup>z</sup>The total hours of solar radiation were calculated for 14 days before leaf sampling. Hours of solar radiation were measured using the Automated Meteorological Data Acquisition System located in Kawamoto-cho, Ochi-gun, Shimane, Japan. Data were collected every 10 days from May 28 to July 28 in 2009, and from May 24 to July 27 in 2010.



## 第 2 節 窒素施肥量がクワ葉に含まれる機能性成分含量に及ぼす影響

窒素施肥量はクワの収量に直接影響を与えることから(南澤, 1984), 窒素がフラボノールや DNJ などの機能性成分量に与える影響を調べることは重要である. 窒素施肥と機能性成分の関係について, Mudau ら(2006)はブッシュティエーのポリフェノール含量は窒素施用により増加するとしているが, Stewart ら(2001)は植物組織のフラボノール含量は窒素欠乏により高くなるとし, 松永ら(2009)は窒素施肥量を減らすことにより茶のカテキン類含有率が増加するとしている. これらのことから, クワのフラボノールや DNJ も窒素施肥により影響を受けることが推察される.

ここでは, 窒素施肥量がクワの重要な機能性成分であるクロロゲン酸, フラボノール, DNJ におよぼす影響を明らかにするために, まず現地調査により異なる栽培条件の葉中の無機成分と機能性成分含量の関係を調査した. さらに, ポット試験および圃場試験により窒素施肥量がそれぞれの機能性成分含量に与える影響を検討した.

### 材料および方法

#### 供試材料

**現地調査:** 一般栽培圃場における現地調査は 2007 年に島根県内 3 地域 4 カ所, A 圃場: 島根県江津市桜江町大貫, B 圃場: 島根県江津市桜江町鹿賀, C 圃場: 島根県邑智郡邑南町, D 圃場: 島根県雲南市木次町において行った. 桜江町は A 圃場(大貫), B 圃場(鹿賀)ともに桑茶原料として, また C 圃場(邑南)は漢方薬のための養蚕飼料として, D 圃場(木次)は生糸生産のための養蚕飼料として栽培されていた. 各圃場の立地条件および土性は以下のとおりである. A 圃場(大貫)は江の川河川敷で, 保水性および保肥力が小さく透水性の大きい砂質土の上に腐植を多く含む土壌が堆積している. B 圃場(鹿賀)は A 圃場(大貫)と同様に江の川の河川敷の砂質土であるが, 腐植を含む土壌の堆積はない. C 圃場(邑南)は山を削土した後の造成地で, れきを多く含む粘質土, D 圃場(木次)は自宅裏山の緩やかな傾斜地で, 腐植に富む砂壤土であった. 栽培されているクワ品種はいずれも‘一ノ瀬’であった. 各圃場の施肥条件を第 2-2-1 表に示した. 土壌調査は D 圃場(木次): 2007 年 6 月 7 日, A 圃場(大貫), B 圃場(鹿賀), C 圃場(邑南): 2007 年 6 月 14 日に行った. 1 圃場につき 1 箇所, 株元から 30 cm 地

点の各層位から土壌を採取後土壌分析に供した。葉身の採取は D 圃場(木次) : 2007 年 9 月 13 日, B 圃場(鹿賀), C 圃場(邑南) : 2007 年 9 月 14 日に行った。A 圃場(大貫)および D 圃場(木次)は各 20 株, B 圃場(鹿賀)および C 圃場(邑南)は各 10 株から, 一株につきそれぞれ生育が中庸な 1 枝を選び, 新梢の先端から約 1/3 にあたる位置の 2 葉を採取し成分分析に供した。

**Table 2-2-1.** Fertilization conditions of the four common cultured fields.

	Timing of Fertilization	Applied fertilizer (kg/a)				
		N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	Type of fertilizer	Compost <sup>z</sup>
Field A	December-March	-	-	-	-	200
Field B	December-March	-	-	-	-	200
	March	1.00	0.40	0.40	Chemical fertilizer	
Field C	June	0.60	0.24	0.24	Chemical fertilizer	-
	Total	1.00	0.40	0.40		
Field D	April	1.05	0.49	0.56	Slow release fertilizer	-

<sup>z</sup> Swine manure was used as compost (containing N: 1.29%; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 1.64%; K<sub>2</sub>O: 1.3%).

**ポット試験 :** ポット試験は, 2010 年に島根県農業技術センター(島根県出雲市芦渡町)において実施した。4 月 6 日にクワ品種 ‘一ノ瀬’ 2 年生苗を, まさ土 : バーク堆肥(1:1)の培土を用いて容積 25 L のプラ鉢に移植し, 新梢 1~2 枝となるように調整した。窒素施肥の処理区は 5 段階とし, 1 鉢あたり 8 鉢を供試した。処理区は以下のとおりである。それぞれ一鉢あたり窒素成分で I : 1 g, II : 2.5 g, III : 5 g, IV : 10 g, V : 15 g の硫安を, 4 月 14 日, 6 月 9 日, 7 月 2 日の 3 回施用した。また, 4 月 14 日に苦土重焼磷, 硫酸カリをそれぞれ 1 鉢あたり P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 0.32 g, K<sub>2</sub>O : 1.1 g となるように施用した。2010 年 7 月 26 日にそれぞれの新梢 2 枝の完全展開葉のうち最も若い葉から下位 3 枚の葉身を採取し分析した。

**圃場試験 :** 圃場栽培試験は島根県農業技術センターにおいて実施した。2010 年

4月8日に‘一ノ瀬’の1年生苗を畝間150 cm株間50 cmで定植した後、一般的な栽培管理で1年間株を養成した。窒素施肥の処理は、硫酸を窒素成分として0：無施肥，I：6 kg/10 a，II：15 kg/10 a，III：30 kg/10 a(標準)の4区を設定し、2011年、2012年に各処理区2反復で実施した。硫酸は、2011年は4月5日、7月15日に、2012年は4月9日、7月21日に分施した。硫酸を除く基肥は苦土重焼燐、硫酸カリを $P_2O_5$ および $K_2O$ として、それぞれ15 kg/10 a、18 kg/10 aを2011年および2012年の3月に施用した。生育調査および分析用葉身の採取は2011年7月11日、10月4日、2012年7月9日、9月19日に、収量調査は2011年7月12日、10月6日、2012年7月10日、9月19日にそれぞれ1区10株を用いて行った。生育調査は各株の最長枝条を用いた。新梢長は新梢の基部から先端を測定した。葉色はSPAD 502 chlorophyll meterで測定した。収量調査は、1株ごとに全枝条の伐採により行った。葉身収量は、枝条重を測定後、伐採した枝条の葉をこき取り枝重を測定し、枝条重から枝重を引いて算出した。生育調査、収量調査は1区10株ずつ、合計20株の平均値で示した。葉身の採取は1株につき新梢2枝の完全展開葉のうち最も若い葉から下位3枚をそれぞれ採取し成分分析に供した。

### 土壌分析

土壌の化学性分析には2 mmのふるいに通した風乾細土を供試した。pH、およびECは風乾細土：イオン交換水=1：2.5で測定した。全炭素、全窒素はCNコーダ(SUMIGRAPH NC-900 sumika chemical Analysis Service LTD Osaka, Japan)で測定した。CECはセミマイクロショールンベルガー法で、有効態リン酸はトルオーグ法で測定した。交換性陽イオンは、カリウムは炎光光度法、カルシウムとマグネシウムは原子吸光法で測定した。

### サンプル調製および無機成分分析

サンプル調整は、第1章、第1節に準じた方法で行った。

無機成分は秤量後、窒素はケルダール分解後水蒸気蒸留法で、その他の成分は乾式灰化後1 M塩酸に溶解し、リンはバナドモリブデン酸法、カリウムは炎光光度法、カルシウムおよびマグネシウムは原子吸光法で測定した。

### 機能性成分の分析

フラボノールおよびDNJの定量は第2章第1節に準じた方法で行った。

クロロゲン酸の定量はWaters社製のHPLC, Alliance Separations Module 2695, 検出器Photodiode Array Detector 2996, 分光蛍光光度計F3010(日立), カラムwakosil-II 5C18 RS (250 × 4.6 mm)(和光純薬)を用いて行った。クロロゲン酸はカラム温度40°C, 移動層に0.1%ギ酸(ナカライテスク)を含む20%アセトニトリルを用い, 流速1 ml/min, 検出波長: 280 nmの条件で定量した。標準品クロロゲン酸は和光純薬から購入した。

## 統計処理

第1章, 第1節に準じた方法で行った。

## 結果および考察

### 現地調査

各圃場の土壌化学性を第2-2-2表に示した。pHはD圃場(邑南)の下層がやや低く, C圃場(木次)が他圃場に比べやや高かった。T-CおよびT-NはA圃場(大貫), C圃場(木次)で高く, B圃場(鹿賀), D圃場(邑南)は低かった。C/N比はいずれの圃場も11~17の範囲であったが, A圃場(大貫)が他地区より高く14~17の値を示した。CEC, 交換性陽イオンはA圃場(大貫), C圃場(木次)がB圃場(鹿賀), D圃場(邑南)に比べ高かった。有効態リン酸はA圃場(大貫)が最も低く, C圃場(木次)が最も高かった。A圃場(大貫)とC圃場(木次)に比べ, B圃場(鹿賀)とD圃場(邑南)がT-C, T-Nともに低く, さらにB圃場(鹿賀), D圃場(邑南)はCEC, 交換陽イオンも低いことから肥沃度が劣っていると考えられた。ともに江の川の河川敷であるA圃場(大貫)とB圃場(鹿賀)の肥沃土の違いは, A圃場(大貫)が頻繁に冠水し腐植を含む土壌が堆積するのに対し, B圃場(鹿賀)は堤防により冠水がないことに起因すると思われる。

**Table 2-2-2.** Chemical properties in each soil layer of the four common cultured fields.

	Soil <sup>z</sup> layer	Depth (cm)	pH (H <sub>2</sub> O)	EC <sup>y</sup> (mS/cm)	Total carbon (%)	Total nitrogen (%)	C/N <sup>x</sup> ratio (%)	CEC <sup>w</sup> (me/100 g)	Cation exchanger (mg/100 g)			Available phosphoric acid (mg/100g)
									CaO	MgO	K <sub>2</sub> O	
Field A	1	0-6	5.9	0.08	4.55	0.30	15	19.5	265	51	52	16
	2	6-24	6.0	0.06	2.64	0.19	14	15.2	209	44	15	26
	3	24-48	6.4	0.02	0.34	0.02	17	5.4	67	18	15	9
Field B	1	0-18	6.1	0.10	0.80	0.07	11	7.3	89	33	29	48
	2	18-32	6.4	0.05	0.40	0.03	13	6.0	80	24	14	17
Field C	1	0-14	5.6	0.05	1.32	0.11	12	11.1	128	20	17	41
	2	14-33	4.1	0.21	0.70	0.06	12	9.7	49	9	26	45
	3	33-	3.8	0.22	0.46	0.04	12	8.1	18	2	28	19
Field D	1	0-14	7.0	0.21	2.93	0.28	11	16.4	563	33	75	77
	2	14-33	7.0	0.07	0.63	0.06	11	10.5	195	19	53	76

<sup>z</sup> Layer 1 = upper layer; layer 2 = middle layer; layer 3 = lower layer

<sup>y</sup> EC = electro-conductivity

<sup>x</sup> C/N = carbon/nitrogen ratio, which was calculated by dividing the total carbon by the total nitrogen applications

<sup>w</sup> CEC = cation exchange capacity

現地調査圃場の葉身の無機成分含量を第 2-2-3 表に、葉中機能性成分含量を第 2-2-4 表に示した。各圃場の葉中窒素の濃度は 3.26~4.14%の範囲で調査圃場によって異なったが、A 圃場（大貫）が他圃場に比べて有意に高く、B 圃場（鹿賀）、D 圃場（邑南）が有意に低かった。また、リンおよびマグネシウムは B 圃場（鹿賀）が他圃場に比べ有意に高く、カリウム、カルシウムは A 圃場（大貫）が D 圃場（邑南）、C 圃場（木次）に比べ有意に高く、D 圃場（邑南）は他圃場に比べ有意に低かった。クワの一般的な葉中の窒素含有量は 4%前後である。これに比べ、調査圃場の窒素含量は A 圃場（大貫）を除き低い傾向にあった。特に地力が低い B 圃場（鹿賀）、D 圃場（邑南）の窒素含量は 3.21%および 3.26%であり、やや窒素欠乏気味であったと考えられる。

一方、葉身の機能性成分含量は、クロロゲン酸含量、フラボノールともに圃場間の違いは小さかったが、クロロゲン酸含量は 879~1070 mg/100 g DW の範囲で、D 圃場（邑南）が C 圃場（木次）、A 圃場（大貫）に比べ有意に高く、フラボノール含量は 1122~1374 mg/100 g DW の範囲で、D 圃場（邑南）が A 圃場（大貫）、B 圃場（鹿賀）に比べ有意に低かった。それに対し DNJ 含量は A 圃場（大貫）が最も高く、D 圃場（邑南）、B 圃場（鹿賀）が低い値を示し圃場による差は大きかった。いずれの成分も圃場による有意差が認められたが、クロロゲン酸、フラボノールの最高/最低が 1.2 であり、最も高い DNJ も 1.6 にとどまった。これまで、機能性成分が品種、採取時期、年次により大きく異なることが報告されているが (Constantinides・Fownes, 1994; Hu ら, 2013; Kimura ら, 2007; Nakanishi ら, 2011; Yatsunami ら, 2008)、いずれもその差は数倍と大きい。これらに比べ、本試験での機能性成分含量の圃場間差が小さかったことから、一般栽培圃場レベルの土性、土壌化学性の差による影響は比較的小さいと考えられた。

**Table 2-2-3.** Mineral elements in mulberry leaves from the four common cultured fields<sup>z</sup>.

	N (%)		P (%)		K (%)		Ca (%)		Mg (%)	
Field A	4.14±0.28	a	0.41±0.05	b	2.95±0.14	a	2.02±0.24	a	0.23±0.04	b
Field B	3.31±0.24	b	0.56±0.10	a	2.89±0.17	ab	1.82±0.32	ab	0.29±0.03	a
Field C	3.26±0.30	b	0.45±0.06	b	2.54±0.21	c	1.18±0.19	c	0.22±0.03	b
Field D	3.40±0.36	b	0.42±0.08	b	2.66±0.36	bc	1.78±0.32	b	0.20±0.02	b

<sup>z</sup> Two leaves, which were located at the one third position from the branch top, were sampled from one branch per stock of normal growth. Data are expressed as means ± SE (n = 20 in Field A and D, n = 10 in Field B and C). The same lowercase letters indicate no significant difference (P < 0.05).

**Table 2-2-4.** Functional components in mulberry leaves from the four common cultured fields<sup>z</sup>.

	Chlorogenic acid (mg/100 g DW)		Flavonol (mg/100 g DW)		DNJ (mg/100 g DW)	
Field A	879 ± 29	b	1374 ± 40	a	180 ± 6	a
Field B	995 ± 42	ab	1318 ± 59	a	128 ± 5	cd
Field C	1070 ± 66	a	1122 ± 48	b	111 ± 7	d
Field D	897 ± 36	b	1287 ± 34	ab	148 ± 4	bc

<sup>z</sup> Two leaves, which were located at the one third position from the branch top, were sampled from one branch per stock of normal growth. Data are expressed as means ± SE (n = 20 in Field A and D, n = 10 in Field B and C). The same lowercase letters indicate no significant difference (P < 0.05).

葉中機能性成分含量と無機成分量の関係について、現地圃場 4 箇所すべての調査個体を用いた相関係数を第 2-2-5 表に示した。DNJ 含量と窒素含量の間の相関が最も高く、相関係数は 0.60 であった。窒素成分はクロロゲン酸含量とも比較的高い負の相関を示したが、フラボノール含量に対しては 0.14 と相関係数は低かった。また、クロロゲン酸含量および DNJ 含量とカルシウム含量の間にそれぞれ -0.44, 0.47 の相関が認められた。一方、マグネシウムの影響はいずれの成分に対しても認められなかった。機能性成分含量に対する葉中無機成分の影響は、窒素が最も大きかった。葉中の窒素含量は施肥や肥沃土等地力に大きく影響される。したがって、前述で認められた現地調査圃場間のクロロゲン酸や、DNJ の違いは土壌の肥沃性に起因すると考えられた。以上のことから窒素施肥量とカルシウムが機能性成分量に影響を及ぼす可能性が示唆された。

**Table 2-2-5.** Correlation coefficients between the functional components and mineral elements in mulberry leaves<sup>z</sup>.

	N	P	K	Ca	Mg
Chlorogenic acid	-0.48** <sup>y</sup>	0.22	-0.07	-0.44**	0.17
Flavonol	0.14	0.08	0.26*	0.24	0.03
DNJ	0.60**	-0.34*	0.19	0.47**	-0.21

<sup>z</sup> Leaves (n = 60) were sampled from four common cultured fields.

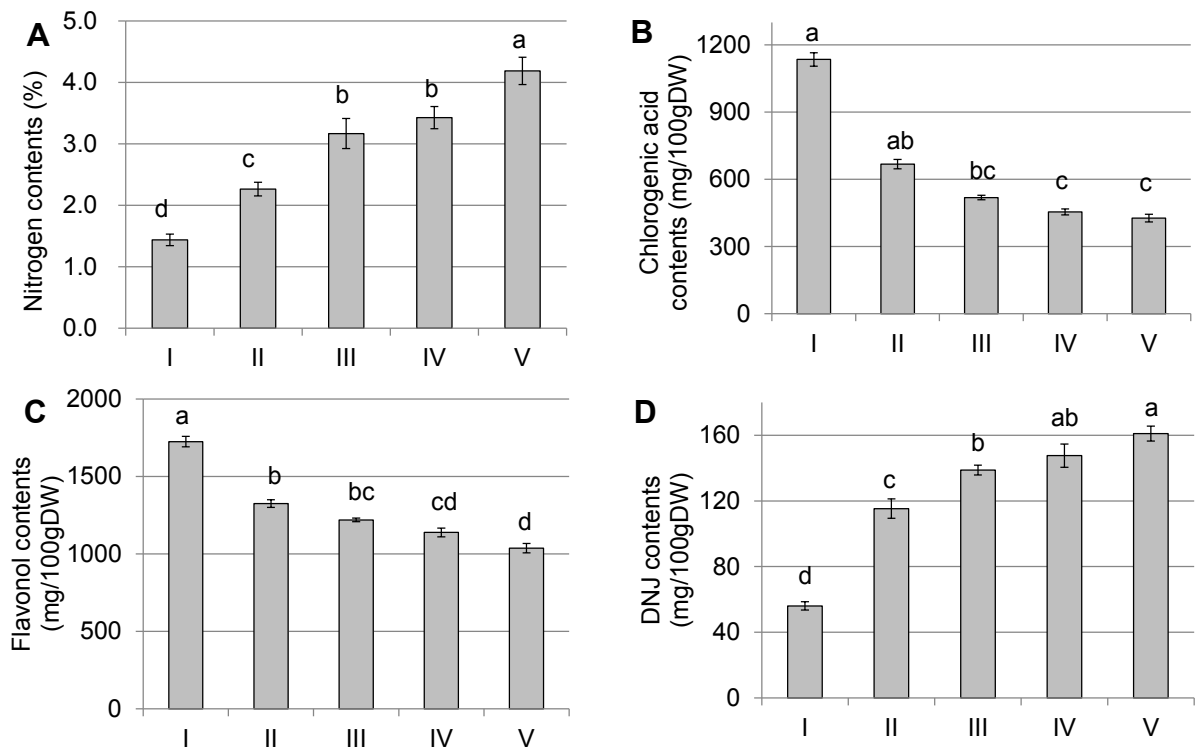
<sup>y</sup> Significant differences are shown (\*\* P < 0.01, \* P < 0.05).



## 機能性成分含量に及ぼす窒素施肥量の影響

現地調査において葉中窒素含量と機能性成分含量の関係が明らかとなったが、窒素施肥量は収量に直結する大きな要因となる。そこで、ポット試験と圃場試験により窒素施肥量が機能性成分に与える影響について検討した。

**ポット試験：**第 2-2-1 図に、ポット試験による窒素施肥量の違いと葉身中の窒素成分含量および機能性成分含量の関係を示した。ポットの施肥量は減肥区から多肥区まで I~V の 5 水準とした。葉中窒素含量は 1.44~4.19% の範囲で、窒素施肥量が多くなるほど有意に高くなり、クロロゲン酸含量は窒素施肥量が多くなるほど含量が低くなった。最も施肥量の多い V 区と最も施肥量の少ない I 区の差は 2.6 倍であった。フラボノール含量は、クロロゲン酸含量と同様の傾向を示し、窒素施肥量が多くなるほどフラボノール含量は低くなったが、その差は 1.6 倍にとどまった。一方 DNJ は、クロロゲン酸、フラボノールと異なり、窒素施肥量が多くなるほど高くなった。その差は 2.8 倍を示し、本試験で調査した機能性成分中最も大きかった。いずれの成分も I 区と II 区間の差が最も大きく、クロロゲン酸：1.7 倍、フラボノール：1.3 倍、DNJ：2.1 倍であった。ポット試験では窒素含量の増加とともにフラボノールは減少したが、現地調査の結果には窒素含量とフラボノールに負の相関が認められなかった(第 2-2-5 表)。これは、ポット試験での葉中窒素含量が 1.44~4.19% であったのに対し、現地試験では 3.26~4.14% とその範囲が小さかったことから、葉中窒素含量に起因すると考えられた。すなわち、本試験で確認された多肥区と減肥区の区間差において多肥区ではフラボノール含量の区間差が小さいことが明らかとなり、現地試験で認められた範囲の葉中窒素含量の違い(3.26~4.14%)では、フラボノール含量に大きな影響を与えないと考えられた。ポット試験の結果でも明らかのように、施肥量が少なくなるに従ってフラボノール含量の区間差は大きくなり施肥量の影響が強くなった。現地試験での葉中窒素含量の範囲、つまり一般的な窒素含量では施肥量の影響が小さいため、現地調査の結果では相関が認められなかったと推察された。以上のことから、葉中機能性成分含量は窒素施肥量の影響を強く受けることが明らかとなり、葉身中のクロロゲン酸、フラボノール含量の増加には窒素施肥量を大きく減らすことが、また DNJ 含量の増加には窒素施肥量を増やすことが有効であると考えられた。



**Fig. 2-2-1.** Nitrogen and functional component levels in mulberry leaves relative to the amount of nitrogen applied to potted plants.

A: Nitrogen, B: Chlorogenic acid, C: Flavonol, and D: DNJ.

Amounts of applied ammonium sulfate per culturing pot on April 14, June 9, and July 2: Group I = 1 g, Group IV = 2.5 g, Group III = 5 g, Group IV = 10 g, and Group V = 15 g. On July 26, completely opened leaflets of the youngest opened leaves, and the subsequent two leaves on the same branch, were sampled. Data are expressed as means  $\pm$  SE (n = 8). The same lowercase letters indicate no significant difference ( $P < 0.05$ ).

窒素が葉身中の機能性成分の濃度に及ぼす影響は明らかとなったが、圃場あたりの機能性成分の生産量を増やすためには、葉身の収量を考慮する必要がある。そこで、ポット試験の結果から 1 株あたりの機能性成分量を検討した(第 2-2-6 表)。1 株あたりの生葉重は、窒素施肥量が最も少ない I 区と最も多い V 区が II~IV 区に比べ有意に低かった。I 区では葉中の窒素含量が 1.44%と低いことから窒素欠乏による生育阻害が、V 区では追肥後の葉身の一部で発生した窒素過剰障害とみられる褐変および落葉が、それぞれ収量低下の原因と考えられた。1 株あたりの機能性成分量は、生葉重と葉中機能性成分含量および水分含量(I:74%, II:75%, III~V:76%)から算出した。クロロゲン酸の 1 株あたり成分量は I 区で最も高くなったが、フラボノールは II 区、DNJ は III 区でそれぞれ最も高い値を示した。1 株あたり機能性成分量の処理区間の最高値と最低値は、それぞれクロロゲン酸が 2.6 倍、フラボノールが 2.0 倍、DNJ が 4.2 倍となった。クロロゲン酸およびフラボノールの葉中成分含量は、葉身収量が減少する減肥条件で高くなるため、圃場あたりの機能性成分生産量を高くするためには収量と成分のバランスを考えた施肥量を検討する必要がある。一方、DNJ は葉中濃度の処理区間の最高/最低値が 2.8 倍に対し、1 株あたりの成分量では 4.2 倍と高くなった。これは収量を増やすための施肥量が葉中含量を高くする条件と一致するためである。したがって、DNJ の圃場あたりの生産量を多くする施肥条件は収量性が最も高くなる施肥量と考えて問題ないと考えられた。

**Table 2-2-6.** The functional component amounts per mulberry tree relative to the applied nitrogen levels<sup>z</sup>.

Nitrogen treatment	Fresh leaf yield (g/stock)	Functional components <sup>y</sup> (mg/stock)		
		Chlorogenic acid	Flavonol	DNJ
I	170 ± 10 b	503	764	25
II	287 ± 18 a	479	949	83
III	319 ± 17 a	397	934	106
IV	285 ± 13 a	310	777	101
V	188 ± 15 b	193	469	73

<sup>z</sup> Amount of applied ammonium sulfate per culturing pot on April 14, June 9, and July 2 : Group I = 1 g, Group IV = 2.5 g, Group III = 5 g, Group IV = 10 g, and Group V = 15 g. On July 26, completely opened leaflets of the youngest opened leaves, and the subsequent two leaves on the same branch, were sampled. Data are expressed as means ± SE (n = 8). The same lowercase letters indicate no significant difference (P < 0.05).

<sup>y</sup> The functional component amounts per tree were calculated based on fresh leaf weight, functional component amount, and water content in leaves (I: 74%, II: 75%, and III–V: 76%).

**圃場試験：**次に、ポット試験で確認された機能性成分に及ぼす窒素施肥量影響を、圃場試験で検証した。調査区は 0：無施肥区から III：標準施肥区の 4 水準とした。最長枝条長および条桑量は、2012 年秋切りの最長枝条長が 0 区でわずかに短くなったものの、区間差はほとんど認められなかった。葉色は、2011 年の夏切り、2012 年の秋切りでは処理間による差は認められなかったが、2011 年秋切りと 2012 年夏切りでは窒素施肥量の増加にともない葉色が濃くなり、その傾向は 2011 年秋切りで顕著であった(第 2-2-7 表)。

窒素施肥量の違いによる葉身各機能性成分含量を第 2-2-2 図に示した。2011 年の夏切りでは、DNJ の III 区を除き、いずれの成分も処理区間の違いは認められなかった。その後の作期では、葉中窒素含量は、窒素施肥量の増加とともに高くなり、反対にクロロゲン酸、フラボノール含量は窒素施肥量の増加にともない低くなる傾向にあった。DNJ 含量は 2012 年夏切りまでは処理区による違いが認められなかったが、2012 年秋切りでは施肥量の多い II, III 区で有意に高くなった。また、それぞれの作期の処理区間の葉中成分の最小値、最大値の差が最も大きかったのは、窒素および DNJ 含量が 2012 年秋切り、フラボノールおよびクロロゲン酸含量が 2011 年秋切りであった。年次、作期間の差は処理区間の差より大きく、試験期間の最小値、最大値の差は、窒素が 1.00%、クロロゲン酸が 630 mg/100 g DW、フラボノールが 781 mg/100 g DW、DNJ が 114 mg/100 g DW となった。

2011 年夏切りは、DNJ を除くいずれの成分も処理区間差が認められなかったが、これは 2010 年に行った株養成のための均一栽培の影響が残ったためと考えられた。しかし、機能性成分と窒素施肥量の関係は、圃場試験においてもポット試験と同様の傾向を示し、窒素施肥量の増加にともないクロロゲン酸、フラボノール含量は減少し、DNJ 含量は増加した。また、クロロゲン酸、フラボノール、DNJ いずれの成分においても、年次および作期間差が認められた。Nakanishi ら(2011)は DNJ 含量がサンプリング時期により異なるとし、本試験においても第 2 章第 2 節でフラボノール含量、DNJ 含量が日照条件により変わることを明らかにしている。本試験における年次、作期間における機能性成分含量の違いもこれら様々な栽培環境条件に起因するものと考えられた。しかし、年次、作期に関わらず、処理区間内では窒素施肥量と各成分の増減との関係は変わらないことから、窒素施肥量が機能性成分に及ぼす影響は大きいと考えられた。さらに圃場試験で注目すべき点は、葉色の違いが確認された 2011 年秋切

りにおいて、クロロゲン酸、フラボノールの処理間の最大値、最小値の差が最も大きくなり、有意差が明確に現れたことである。葉色が窒素施肥の影響を直接反映することから水稻栽培において SPAD 値が追肥の判断指標となっているように、葉色をクロロゲン酸、フラボノール含量の指標にできる可能性が示唆された。

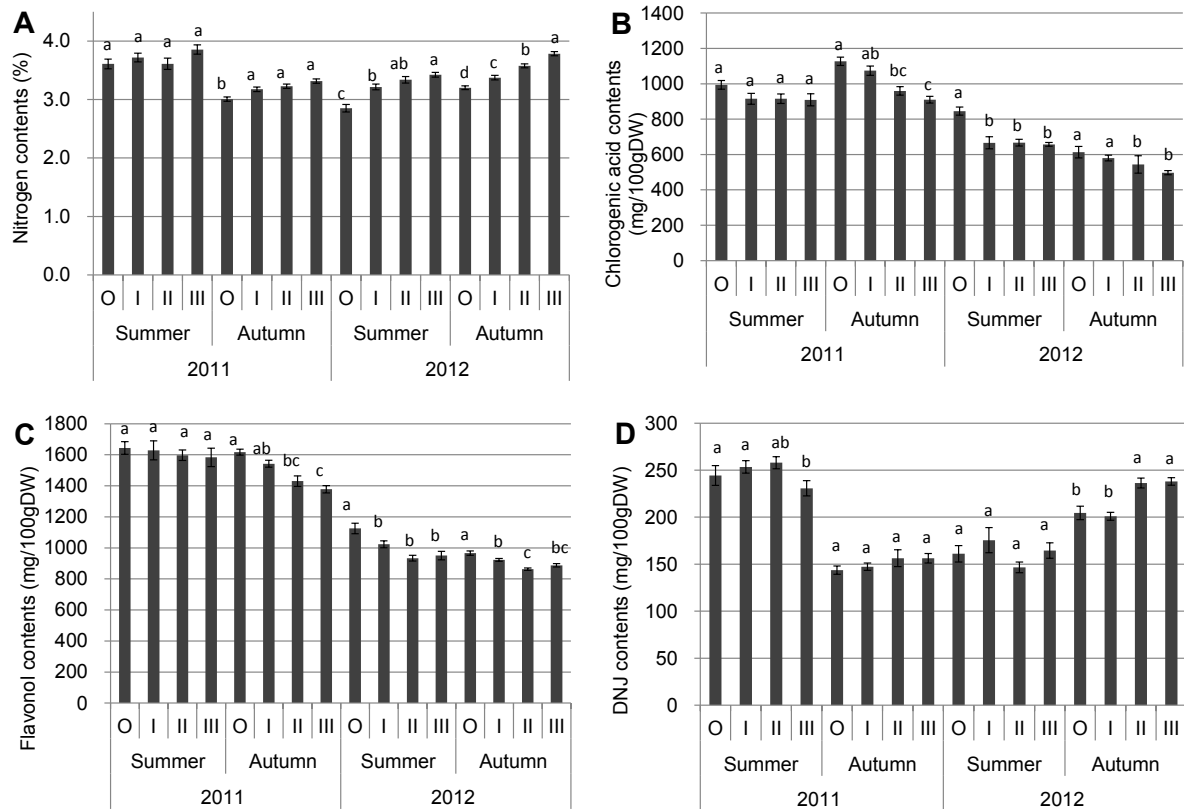
窒素施肥と成分の関係について、Mudau ら(2006)はブッシュティエのポリフェノール含量は窒素施用により増加するとしているが、Stewart ら(2001)は植物組織のフラボノール含量は窒素欠乏により高くなるとしている。本試験の結果は Stewart ら(2001)と同じ傾向を示し、窒素施肥量が少なくなるほどフラボノール含量は高くなった。フラボノールを含む抗酸化成分は様々なストレスに誘導されるとされ、第2章第1節においてもフラボノールが紫外線ストレスにより増加することを確認している。本試験でも窒素施肥量が減少するほどクロロゲン酸、フラボノールの含量が大きくなったことから、窒素欠乏のストレスによってクロロゲン酸、フラボノールが増加していったと考えられる。一方、葉中 DNJ 含量について、Kimura ら(2007)、Nakanishi ら(2011)は DNJ が夏に増加すること、新梢の先端部で多いこと、また、DNJ に起因するクワ葉の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性も高温で高くなることを報告している。さらに、Konno(2011)、Nakanishi ら(2011)は、DNJ がクワの防御物質で昆虫から身を守るために作られ、夏期、枝の先端部の若い葉、すなわち昆虫の食害が大きな被害となる期間や部位に多くなるとしている。また、我々は第2章第1節で日照と機能性成分の関係を調べた結果、DNJ 含量が日照を遮ることにより増加することを確認し、DNJ はストレスを緩和することにより誘導される代謝産物であると推測している。以上のことから窒素施肥条件においても、フラボノールおよび DNJ はこれまでの報告にあるようなストレスに対する同様の反応を示していると考えられる。すなわち、フラボノールは窒素飢餓ストレスで誘導され、窒素施肥によるストレスフリーで DNJ 合成が促進すると考えられた。

本試験において、窒素施肥量がクロロゲン酸、フラボノール、DNJ の成分に対して影響を与えることが明らかとなり、同一の施肥条件ですべての機能性成分の含有量を高くすることは難しいと考えられた。しかし、それぞれの機能性成分含量を高くする窒素施肥条件が明らかとなったことから、今後目的の成分に応じた適性施肥量を検討することで機能性成分の生産量を多くできる可能性が示唆された。

**Table 2-2-7.** Effects of applied nitrogen amounts on the appearance and yields of mulberry trees<sup>z</sup>.

	Harvesting season	Nitrogen treatment	Longest branch (cm)		Yields (g/stock)		Leaf color <sup>y</sup>	
2011	Summer	O	186 ± 2	a	207 ± 2	a	38.0 ± 0.5	a
		I	186 ± 2	a	1688 ± 73	a	38.0 ± 0.4	a
		II	189 ± 3	a	1724 ± 89	a	37.8 ± 0.7	a
		III	185 ± 3	a	1637 ± 76	a	37.8 ± 0.5	a
	Autumn	O	186 ± 4	a	1785 ± 110	a	36.6 ± 0.4	c
		I	190 ± 5	a	1884 ± 113	a	37.4 ± 0.5	bc
		II	189 ± 4	a	1856 ± 103	a	38.9 ± 0.4	ab
		III	188 ± 3	a	1884 ± 111	a	39.3 ± 0.3	a
2012	Summer	O	182 ± 4	a	1900 ± 83	a	31.8 ± 0.5	b
		I	181 ± 3	a	1862 ± 101	a	33.1 ± 0.4	ab
		II	188 ± 3	a	1966 ± 108	a	33.8 ± 0.3	a
		III	184 ± 3	a	2000 ± 120	a	34.5 ± 0.4	a
	Autumn	O	193 ± 4	b	1468 ± 67	a	36.4 ± 0.5	a
		I	201 ± 3	ab	1517 ± 91	a	37.5 ± 0.4	a
		II	209 ± 2	a	1574 ± 79	a	36.7 ± 0.4	a
		III	207 ± 2	a	1522 ± 71	a	37.7 ± 0.3	a

<sup>z</sup> Four experimental groups were formed based on the amount of applied ammonium sulfate, which provides nitrogen: O: 0 kg, I: 6 kg, II: 15 kg, and III: 30 kg per 1000 m<sup>2</sup>. The branches were harvested on July 11 and October 4 in 2011, and on July 9 and September 19 in 2012. Data are expressed as means ± SE (n = 20). The same lowercase letters indicate no significant difference (P < 0.05) during the same harvesting season. <sup>y</sup> Leaf color was evaluated using a SPAD 502 chlorophyll meter.



**Fig. 2-2-2.** Effects of applied nitrogen amounts on the nitrogen content and functional components of mulberry leaves in experimental fields.

A: Nitrogen content, B: Chlorogenic acid, C: Flavonol, and D: DNJ

Four experimental groups were formed based on the amounts of applied ammonium sulfate, which provides nitrogen: O: 0 kg, I: 6 kg, II: 15 kg, and III: 30 kg per 1000 m<sup>2</sup>. The youngest opened leaves with completely opened leaflets, and the subsequent two leaves of two branches with moderate growth, were sampled from each stock. Data are expressed as means ± SE (n = 20). Significant differences are indicated by different lowercase letters (P < 0.05) in the same harvesting season.



## 摘要

クワ葉に含まれる機能性成分の含有量の向上を目的として、栽培環境条件がフラボノールおよびDNJ含量に及ぼす影響を検討した。

葉中機能性成分に及ぼす日照の影響を、クワ鉢植えを用いた栽培条件の比較（屋外：多日照，ガラス室：寡日照）により調査した。クワ葉中フラボノール含量はガラス室栽培個体が屋外栽培に比べ著しく減少した。また，ガラス室栽培後屋外へ移動した個体のフラボノール含量は常時屋外栽培より増加し，その増加程度は葉位により異なった。上位葉では屋外より有意に高くなったが，中位葉は屋外と同程度，下位葉は屋外に比べ有意に低く，フラボノール合成に対する日照の影響は若い葉ほど強かった。一方DNJ含量はガラス室栽培が屋外より高くなったがその違いはわずかだった。日照条件は，フラボノールおよびDNJ含量に影響を与えることが明らかとなり，含有量増加の日照条件はフラボノール，DNJでそれぞれ異なった。

現地栽培圃場の異なる条件で栽培されたクワ葉中の無機成分とフラボノール，クロロゲン酸，DNJ含量の関係を調査した。現地栽培圃場のクワ葉に含まれる無機成分と機能性成分含量の関係において，窒素含量がクロロゲン酸含量に対しては $-0.4$ の負の相関が，DNJ含量に対しては $0.60$ の正の相関が認められた。現地調査により葉中機能性成分含量に及ぼす窒素の影響が示唆されたことから，ポット試験および圃場試験を用いて窒素施肥量が葉中機能性成分含有量に与える影響を検討した。窒素施肥量に対する機能性成分含量は，窒素施肥量の増加にともないクロロゲン酸含量およびフラボノール含量は減少傾向を示したが，DNJ含量は増加傾向にあった。窒素施肥量とクロロゲン酸含量およびフラボノール含量には負の相関が，DNJ含量には正の相関が認められ，窒素施肥量がそれぞれの葉中機能性成分含量に与える影響が明らかとなった。含有量を増加させるための窒素施肥条件はポリフェノール（フラボノール，クロロゲン酸）とDNJでそれぞれ異なったが，目的の成分に応じた適切な窒素施肥量を設定することにより，それぞれの機能性成分含量を増加させられる可能性が示唆された。

### 第3章 クワ葉に含まれる機能性成分の季節変化

本研究の第1章，第2章では，クワ葉中機能性成分含量の変化を調査し，フラボノール，DNJ含量が品種により異なること，フラボノールとDNJ含量は日照条件により影響を受けること，さらに窒素施肥量がフラボノール，クロロゲン酸，DNJ含量に影響を及ぼすことが明らかになった．食用クワ葉の生産においてはクワ葉の収穫は加工作業の規模に合わせて年1回，または2回行われており，養蚕で確立された栽培技術が用いられている．しかし，機能性を目的とした商品ではその成分量が重要な要素となることから，今後は機能性成分の含有量を多くするための栽培条件が重要になる．そこで本章では，クワの重要な機能性成分であるフラボノール，クロロゲン酸，DNJそれぞれの成分が高含有となる収穫時期を明らかにするために，クワ葉中機能性成分の季節変化を調査した．

#### 第1節 クワ葉に含まれる機能性成分の季節変化

緑茶や紅茶の原料となるチャの葉ではカテキン類の含量が収穫時期によって変動することが知られているように（高柳ら，1985；近藤，2007），クワ葉の機能性成分においても収穫時期がそれらの含有量に与える影響は大きいと考えられる．クワの機能性成分含量の季節変化においては，Kimuraら（2007），Nakanishiら（2011）によって，DNJ含量およびDNJに起因するクワの $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性が，気温が高くなる8月に高くなることが報告されている．また，クワ葉のポリフェノール含量に関してはLee・Choi(2012)が，クワ葉のクロロゲン酸，フラボノールの含有量が5月，7月，9月の異なる収穫時期において5月に高くなることを報告している．しかしこの方法は季節変化の推移を連続的に調べたものではなく，生産現場で行われている2回収穫にも対応していない．さらに，第2章で明らかになったように，葉中フラボノールとDNJをそれぞれ高含有するための日照や窒素施肥量の条件が相反していたことから，すべての成分を高い水準で効率的に得るためには，フラボノール，クロロゲン酸，DNJそれぞれの成分の推移を比較し，総合的に最適な収穫時期を見極める必要がある．

そこで本章では，クワ葉のフラボノール，クロロゲン酸，DNJそれぞれの成

分が高含有となる収穫時期を明らかにする目的で、クワ栽培期間中の季節変化による機能性成分含量の推移を調査し、変動の原因を考察した。

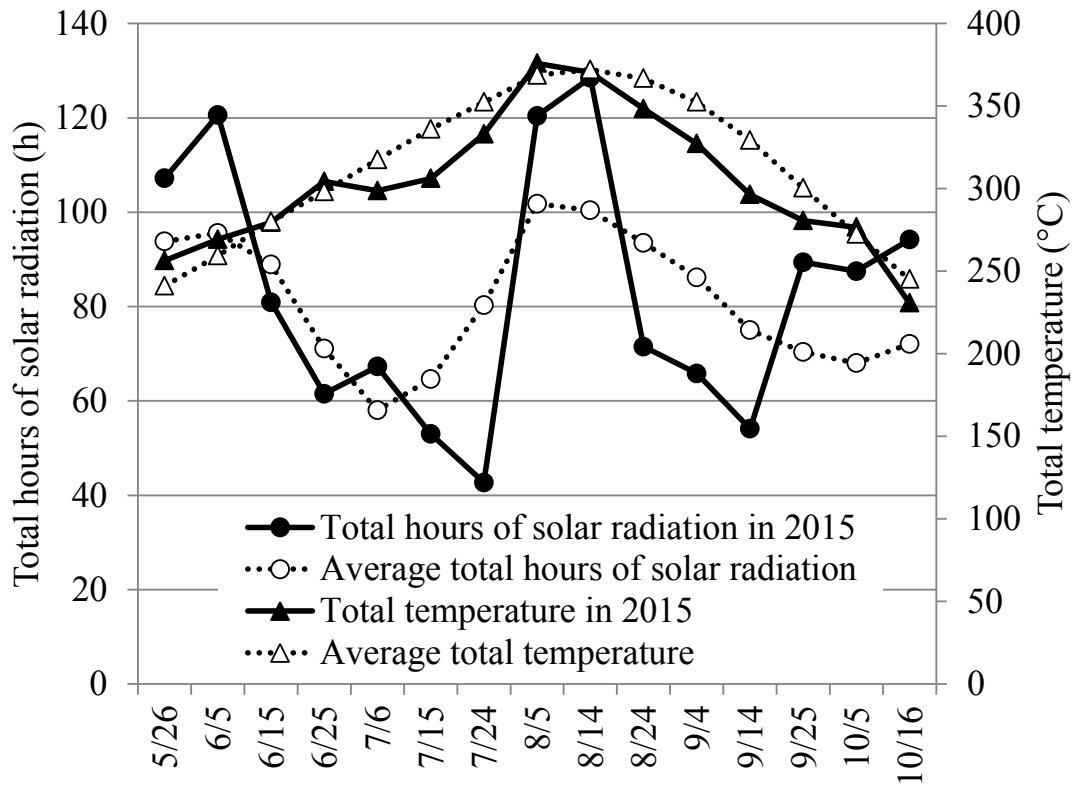
## 材料および方法

### 供試材料

クワに含まれる機能性成分含量の季節変化は、2015年、島根県出雲市農業技術センターの圃場において、クワの一般的な肥培管理により栽培されている定植5年目のクワ品種‘一ノ瀬’を用いて調査した。桑樹は3月上旬に枝条を基部から伐採し、その後伸長した枝条を調査および分析に用いた。サンプリングに用いた葉身は、常に定位置になるように先端から約20 cmの位置の完全展開葉から下位3枚、1株2枝の合計6葉を用いた。1株について6枚サンプリングされた葉は、株ごとに一つにまとめて分析された。葉身の採取は最長枝条長が40 cm以上となった5月25日から開始し、約10日ごとに10月16日まで行った。また、生産現場では年2回収穫を行うことから、中途伐採の影響を確認するために、伐採を行わない1回収穫区と2回収穫区を設定し、2回収穫区は7月15日に地上から80 cmの部位で伐採した。再発芽直後となる7月24日の葉身採取は1回収穫区のみ行った。2回収穫区は7月15日と10月26日に、1回収穫区は10月26日にそれぞれ生育調査および収量調査を行った。調査区は1回収穫区、2回収穫区ともにそれぞれ3反復とし、各区10株を調査した。生育調査は各株の最長枝条を用いた。新梢長は新梢の基部から先端、落葉長は新梢の基部から着葉部位までをそれぞれ測定した。葉身、節間長の調査は最長枝条の先端から1/3の高さに位置する部位で行い、節間長は連続する5節を測定しその平均値で求めた。収量調査は、1株ごとに全枝条の伐採により行った。枝条重を測定後、伐採した枝条の葉をこきとり枝重を測定した。葉身収量は、葉重として枝条重から枝重を引いて算出した。生育調査、収量調査は1区10株ずつ、合計30株の平均値で示した。また、収量調査時に各株から最長枝条1枝の全葉をサンプリングし、1枝あたりの葉中機能性成分含量を調査した。

気象データは島根県出雲市のアメダスデータを用いた。第3-1-1図に2015年と平年の、各サンプリング日を基点とした積算日照時間および積算温度を示した。平年値の統計期間は、平均気温が1981-2010年、日照時間が1987-2010年である。積算温度は日平均気温を用い、積算日照時間と積算温度はそれぞれサンプリング日前14日間の積算値を用いた。14日間としたのは、6月から7

月の葉身展開が1枚/1.4日であることから、サンプリング葉(先端から9, 10, 11枚目にあたる)の中間の葉(先端から10枚目にあたる)の展開開始からサンプリングまでの期間が14日となるためである。



**Fig. 3-1-1.** Total hours of solar radiation and total temperature for 14 days before leaf sampling in 2015 and average yearly values<sup>z</sup>.

<sup>z</sup>The database of the Automated Meteorological Data Acquisition System was searched to calculate the average temperature between 1981 and 2010 and the average hours of solar radiation between 1987 and 2010. The values for a period of 14 days before leaf sampling were used as standard values. Total temperature for 14 days was calculated by adding average temperature per day.

## サンプル調製

第1章，第1節に準じた方法で行った。

## フラボノール，クロロゲン酸およびDNJの定量

フラボノール，クロロゲン酸およびDNJの定量はShimadzu社製のUPLC，Nexera HPLC system：ポンプLC-30AD，オートサンプラーSIL-20A，カラムオーブンCTO-20AC，Diode Array Detector SPD-M20A，Fluorescence Detector RF-20Axsを用いて行った。カラムはShim-pack XR-ODS (50L × 2.0) (Shimadzu社製)を用いた。フラボノール，クロロゲン酸はカラム温度40℃，移動層0.1%ギ酸と0.1%ギ酸90%アセトニトリルを用い，0.1%ギ酸89%-78%のバイナリーグラジエント，流速0.6 ml/min，検出波長：クロロゲン酸280 nm，フラボノール370 nmの条件で定量した。DNJはKimら(2003)の方法を用いて，カラム温度40℃，移動層0.1%ギ酸と0.1%ギ酸90%アセトニトリル，0.1%ギ酸77.8%-33.3%のバイナリーグラジエント，流速0.7 ml/min，Ex:254 nm，Em:322 nmの条件で定量した。K3R，Q3MG，K3MGはそれぞれクワ葉から精製し用いた(Katsubeら，2006)。標準品ルチン，クロロゲン酸はWako，イソケルシトリン，アストラガリン，DNJはフナコシから購入した。フラボノール含量は，‘一ノ瀬’，‘はやてさかり’に含有される6種類のフラボノール：ルチン，イソケルシトリン，K3R，Q3MG，アストラガリン，K3MGの合計を用いた。

## 統計処理

データの統計処理は統計処理ソフトウェアエクセル統計 2015 を用いて行った。結果は平均値±標準誤差で表した。Turkey-Klamer の多重比較検定により解析した。

## 結果および考察

### クワ葉中機能性成分含量の季節変化

クワ葉中フラボノール，クロロゲン酸，DNJ 含量の季節変化を第3-1-2図のAからCにそれぞれ示した。フラボノール含量の季節変化は1134 mg/100 g DWから2230 mg/100 g DWの範囲で推移し，7月中下旬，9月上中旬に低く，5月中下旬から7月上旬，8月上中旬および9月下旬以降に高い値を示した(第

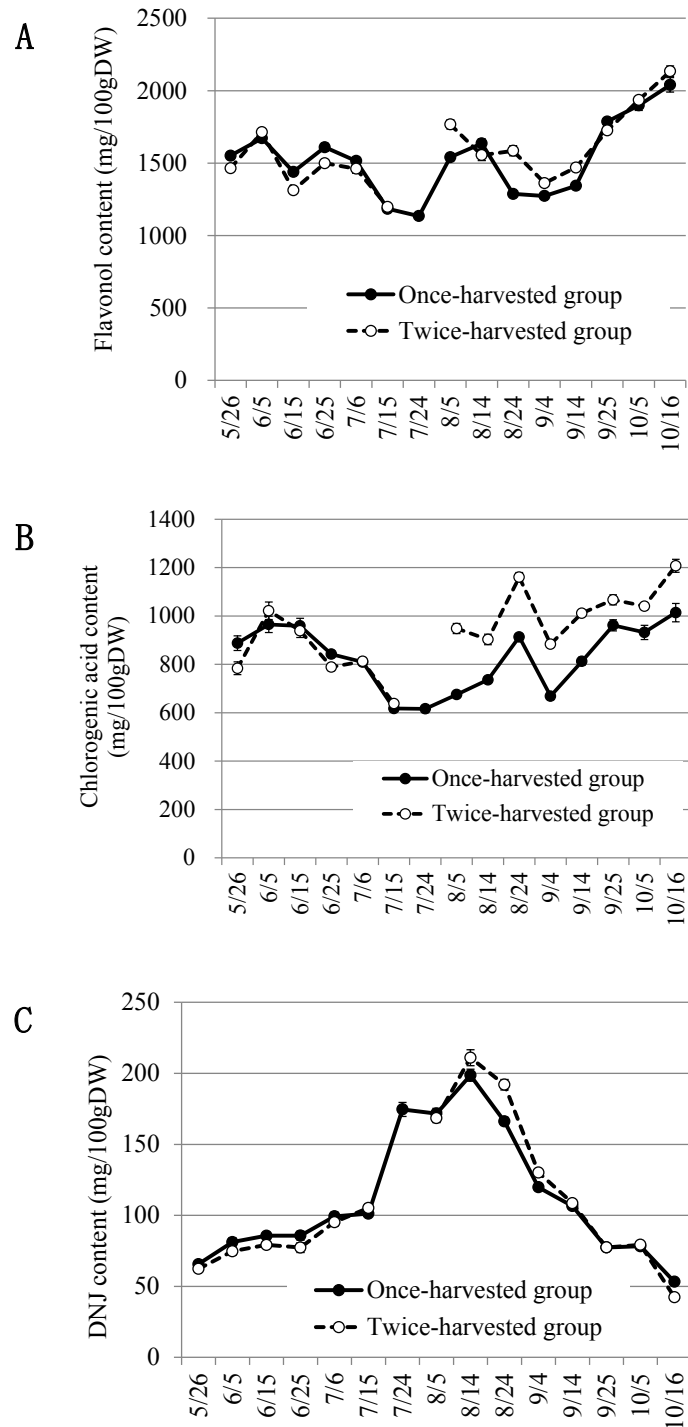
3-1-2-A 図). 特に 9 月下旬以降, 日数経過とともに増加し, サンプル最終日の 10 月 16 日に期間を通して最も高い値となった.

クロロゲン酸含量の季節変化は 616 mg/100 g DW から 1014 mg/100 g DW の範囲で推移し, 7 月中旬から 8 月中旬の間と 9 月上旬に低く, 5 月下旬から 7 月上旬, 9 月下旬以降に高い値を示した(第 3-1-2-B 図). 8 月を除きフラボノールとクロロゲン酸含量両成分の葉中含量の推移は似た傾向を示し, 最大値, 最小値はそれぞれ 10 月 16 日, 7 月 24 日であった.

フラボノール含量とクロロゲン酸含量は調査期間で大きく変化し, いずれも 9 月下旬以降の高含量が特徴的であった. 特にフラボノール含量は 9 月中旬から急激な増加傾向を示し 10 月に最も高くなった. この結果はこれまでの多くの報告と異なった. フラボノール, クロロゲン酸はいずれもポリフェノールに属しており, 葉中ポリフェノールは春に高いとする報告が多い. Kawakami ら(2010) はカキの葉のポリフェノールが 6 月に最大となり徐々に減少することを, 高橋・沖浦(2013) はイチジク葉のルチンは 5 月~6 月に高くなることを, 翠川ら(2010) はタラヨウ葉中のカフェ酸誘導体含量の季節変動について春が秋より高くなることを報告している. 一方で, 曾根原・泉(1991) は柿葉のポリフェノールは 6 月から増加し 10 月に最も高くなるとしているが, このように秋に高いとする報告はあまりみられない. クワの機能性成分について Lee・Choi(2012) は, 葉中のクロロゲン酸, フラボノールの含有量が 5 月, 7 月, 9 月の異なる収穫時期において 5 月に高くなることを報告している. しかし, 本試験の結果は 10 月 15 日に最も高い値を示し, 曾根原・泉(1991) と同様の傾向を示した. Kawakami ら(2010) はフォーリンデニス法で柿の葉の水溶性のポリフェノールを測定し, 調査している成分, 分析方法が我々と異なっていた. さらにカキは 6 月に伸長を停止し, 新梢が横に伸長することから, 葉身の受光体制はクワと大きく異なると考えられる. ポリフェノール含量の多くなる時期が我々の結果と異なった理由として, 一つにはこれら, 樹種の違いや, 分析している成分, 方法による可能性が考えられた. しかし一方で, 高橋・沖浦(2013) はイチジクの上位葉のルチンを HPLC により測定しており, 分析している成分, 方法は我々と似ていた. さらに, イチジクの新梢の伸長停止時期, 新梢の伸び方もクワと似ている. それにもかかわらず, ルチン含量の多い時期は我々の結果と異なった. 我々の結果でも, 5, 6 月のフラボノール含有量はけっして低くない. しかしそれ以上に 8 月および 9 月後半以降のフラボノール含量が高かった.

Kawakami ら(2010) , 高橋・沖浦(2013) の試験における日照条件が明らかになっていないが, 平年値の積算日照時間は, 5月から6月中旬までと8月上中旬に高い(第3-1-1図). 8月のフラボノール含量が9月後半以降より低くなった原因は, この高い日照(フラボノール含量と正の相関)と気温(フラボノール含量と負の相関)の相乗効果による可能性が示唆された.

一方, DNJ 含量の季節変化は 53 mg/100 g DW から 199 mg/100 g DW の範囲で推移し, 8月に高く, 5月, 10月で低い山なりの傾向を示した(第3-1-2-C図). しかし, その含有量の増減の割合は一定ではなく, 5月下旬から7月中旬までは徐々に増加した後8月中旬まで急増して最高値となり, その後急激に減少した. Kimura ら(2007), Nakanishi ら(2011)は, 葉中 DNJ 含量が気温の影響を受け8月に高くなるとしている. 第2章第1節で行った2009年5月28日~7月28日および2010年5月24日~7月27日の現地調査において, 調査期間中の DNJ 含量に対する積算日照時間との相関は認められなかったが, 積算温度との相関係数は, 2009年が 0.92 ( $P = 0.02$ ), 2010年が 0.89 ( $P = 0.02$ )と高く本試験と同様の結果を示していた(データ省略). 本試験においても DNJ 含量の季節変化は 8月に最も高かったことから, DNJ 含量は温度との相関が高く, DNJ 含量の高いクワ葉を得るためには高温期の収穫が適していると考えられた. また, 5月下旬から7月中旬までの増加は緩やかで, 8月下旬から後急激に減少した. Konno(2011)は DNJ が乳液に含有されるとしており, 新梢伸長初期では乳管の発達が小さく供給できる乳液が少ないとしている. このことが, 5月~7月までの DNJ 含量の増加率が低い原因であったと考えられる.



**Fig. 3-1-2.** Seasonal changes in functional component contents in mulberry leaves<sup>z</sup>  
 A: Flavonol, B: Chlorogenic acid, C: DNJ.

<sup>z</sup> The youngest open leaves with completely opened leaflets at 20 cm from the shoot tip and the subsequent two leaves were sampled. Data are mean  $\pm$  SE ( $n = 30$ ).



各サンプリング日を基点とした積算日照時間および積算温度とそれぞれの機能性成分含量の関係を第 3-1-1 表に示した。フラボノール含量に対する積算日照時間と積算温度の相関係数はそれぞれ 0.59 ( $P < 0.01$ ),  $-0.51$  ( $P < 0.05$ ) となった。また、クロロゲン酸含量に対する積算日照時間の相関は 0.33 と低かったが、積算温度との相関係数は  $-0.69$  ( $P < 0.01$ ) と高かった。DNJ 含量に対する積算日照時間の相関係数は 0.05 で相関が認められなかったが、積算温度との相関係数は 0.94 ( $P < 0.01$ ) と最も高かった。

本試験で、フラボノール含量と積算日照時間には正の相関が、積算温度とは負の相関が確認された。第 2 章第 1 節の現地栽培調査圃場においても、2009 年 5 月 28 日～7 月 28 日、2010 年 5 月 24 日～7 月 27 日の期間中、約 10 日ごとにクワ葉の機能性成分含量を調査した結果、フラボノール含量と積算日照時間に正の相関が認められている。この調査における積算温度の相関係数は、それぞれ 2009 年が  $-0.33$  ( $P = 0.32$ ), 2010 年が  $-0.49$  ( $P = 0.08$ ) となり、積算日照時間と積算温度との重相関係数は 2009 年が 0.96 ( $P = 0.02$ ), 2010 年が 0.93 ( $P = 0.02$ ) であった。また、同調査時のクロロゲン酸含量と積算日照時間、積算温度の相関係数は、それぞれ 2009 年が 0.67 ( $P = 0.18$ ),  $-0.57$  ( $P = 0.25$ ), 2010 年が 0.40 ( $P = 0.45$ ),  $-0.30$  ( $P = 0.58$ ) となり、いずれも本試験と似た傾向を示していた。このことから、本試験で、10 月に最もフラボノール含量が高くなった原因として、受光期間および気温の二つの可能性が考えられた。2015 年に行った季節変化の試験では、クワの生育停止により 9 月上旬から中旬にかけて新葉の展開がみられなくなった。その結果、上位葉による遮光の影響を受けないことから、9 月下旬以降のサンプリング葉の受光日数はそれまでのサンプリング葉より増えたと推測される。一つには、この受光期間の増加と、2015 年の 9 月下旬以降の比較的高い日照時間(第 3-1-1 図)が 9 月下旬以降の高フラボノール含量の原因であると考えられた。

一方、温度との関係について、これまでブドウでフラボノイドの蓄積と栽培環境条件に関して詳細な検討がなされている。Spayd ら(2002)は、温度はブドウ果皮のフラボノール含量にほとんど影響を及ぼさないとし、Mori ら(2005)も高夜温によりアントシアニン蓄積は低下するが、フラボノールは減少しないことを報告している。しかし、アントシアニンと温度との関係ほど明確でないと言われるものの、Azuma ら(2012)はインビトロ試験においてブドウ果皮のフラボノールが低温と光処理で高くなることを、Løvda1 ら(2010)は人工気象室内で低

窒素条件下のトマトのルチンの蓄積は低温により増加することを報告している。我々の結果は Azuma ら (2012), Løvda1 ら (2010) と同様の傾向を示した。クワの葉の収穫が可能な 5 月から 10 月の 2015 年の平均気温は 15-29°C (サンプリング前 14 日間の積算気温: 234-380°C) の範囲であったが、本屋外試験において積算気温はフラボノール含量と負の相関を示した。このようにフラボノール含量に及ぼす二つ目の要因として温度の影響が示唆された。

以上のことから、ポリフェノール含量に対しては日照 (正の相関) と温度 (負の相関) が相乗的に働くと考えられる。すなわち、9 月下旬以降のポリフェノール含量の増加は日照と気温低下の相乗効果、また 8 月の多日照下で想定よりフラボノール含量が低くなったのは高温による抑制効果が原因であると推察された。積算日照時間が長いにもかかわらず 6 月のフラボノール含量が 10 月より低くなった原因は、日照と温度のバランスにより相乗効果が現れなかったためと考えられる。

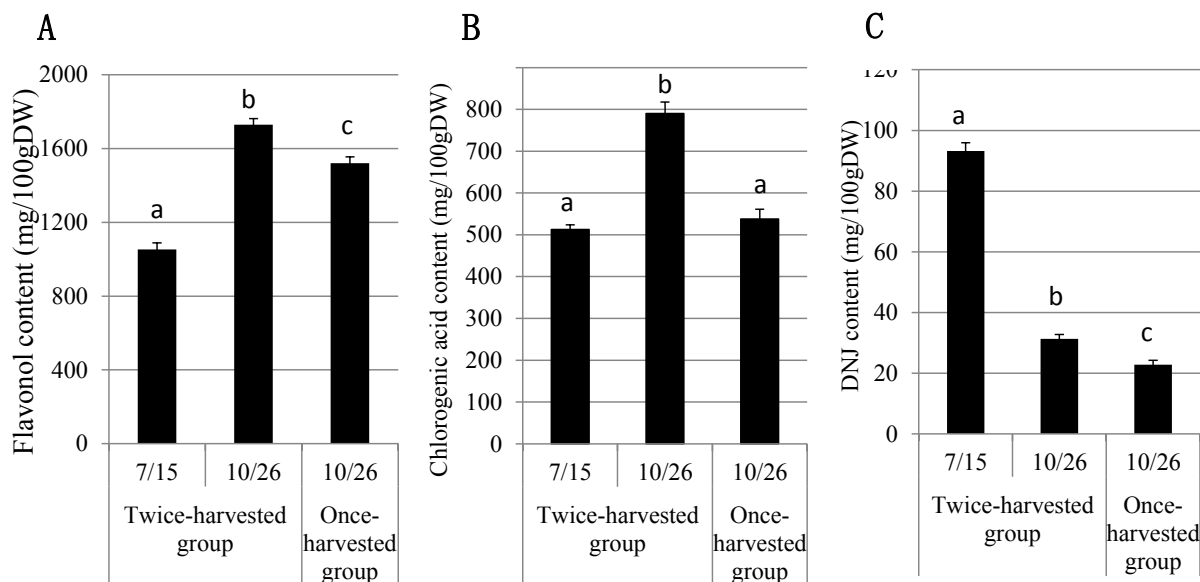
葉中機能性成分に及ぼす 2 回収穫による中途伐採の影響を調査するために、2 回収穫区と 1 回収穫区の葉中含量を比較した (第 3-1-2-A-C 図)。2 回収穫区のフラボノール含量と DNJ 含量は概ね 1 回収穫区と同程度の値を示したが、クロロゲン酸含量は 2 回収穫区で高くなった。中途伐採の影響は、クロロゲン酸含量には優位に働き、フラボノールおよび DNJ に対しては少ないと考えられた。

**Table 3-1-1.** Correlation coefficients between functional component contents in mulberry leaves and total hours of solar radiation or total temperature for 14 days before sampling<sup>z</sup>.

	Correlation coefficient	
	Total hours of solar radiation	Total temperature
Flavonol	0.59 <sup>**y</sup>	-0.51 <sup>*</sup>
Chlorogenic acid	0.33	-0.69 <sup>**</sup>
DNJ	0.05	0.94 <sup>**</sup>

<sup>z</sup> Total hours of solar radiation and total temperature in 2015 were calculated for a 14-day-period before leaf sampling.

<sup>y</sup> Asterisks indicate significant differences (\*\* P < 0.01, \* P < 0.05; Tukey's test).



**Fig. 3-1-3.** Functional component contents in mulberry leaves per shoot at harvest<sup>z</sup>

A: Flavonols, B: Chlorogenic acid, C: DNJ

<sup>z</sup> Because the functional component contents of mulberry leaves differ depending on the position of the leaf, all the leaves of each shoot were used to determine its functional component contents. All the leaves on the longest shoot of each stock were sampled to evaluate the functional component contents in bulk. Different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.01$ ; Tukey's test).

## クワ葉収量および株あたりの機能性成分量

食用クワ葉の生産において、クワ葉の収穫は加工作業の規模に合わせて年 1 回、または 2 回行われている。面積あたりの機能性成分量は、葉中含量とクワ葉の収量により大きく変動することから 1 株あたりの収量と成分量を調べた。

一般にクワの葉の収穫は伸長した枝条を伐採し、伐採した枝から葉をこき取ることで行われる。2 回収穫の場合は、7 月頃に一度収穫伐採した後、再発芽・伸長した枝を 9 月頃再度収穫する。第 3-1-2 表に収穫時における生育および葉量を示した。新梢基部から着葉部位までの枝の長さを測定した落葉長は、1 回収穫区が 2 回収穫区より約 3 倍長くなった。新梢長と落葉長は 1 回収穫区が 2 回収穫区 (10/26) に比べそれぞれ約 3 倍、約 1.8 倍長くなった。これは、新梢長が長くなった結果下位葉の受光量が低下したことによると考えられた。1 回収穫区の葉量は 2 回収穫区の 10 月収穫より多くなったものの、7 月と 10 月収穫合計の半分にとどまった。1 回収穫区の減収は、落葉長の増加による葉量の減少が大きな要因であると考えられる。

第 2 章第 1 節において、クワ葉の機能性成分含量は部位により異なり、フラボノール、DNJ とともに含有量は上位葉で高く下位葉で低くなること、さらにこの傾向は DNJ 含量において顕著であることが明らかになった。このことから、収穫されたクワ葉すべての機能性成分量を把握するためには、1 枝全葉の機能性成分含量の調査が必要である。収穫時の 1 枝全葉の機能性成分含量を Fig. 3-1-4-A-C に、さらにその値と葉量、水分含量を用いて 1 株あたりの機能性成分量を算出した値を第 3-1-3 表に示した。1 枝あたりのフラボノール含量は 2 回収穫区の 10 月 26 日収穫で最も高い値を示したが、1 回収穫区でも比較的高い値を示していた (第 3-1-4-A 図)。1 枝あたりクロロゲン酸含量は、2 回収穫区の 10 月 26 日収穫が最も高くなったが、2 回収穫区の 7 月の含量と 1 回収穫区は同程度となった (第 3-1-4-B 図)。その結果をもとに換算した 1 株あたりのフラボノールおよびクロロゲン酸含量は、2 回収穫区の合計が 1 回収穫区に比べそれぞれ 1.7 倍、2.2 倍多くなった (第 3-1-3 表)。一方、DNJ 含量は 1 回収穫区が最も低い値を示した (第 3-1-4-C 図)。1 株あたりの DNJ 量は 2 回収穫区の合計が 438 mg に対し、1 回収穫区は 78 mg と 1 回収穫区で激減した (第 3-1-3 表)。

クワ葉の収量は 1 回収穫区が 2 回収穫区の半分となり、1 株あたりの機能性成分量がいずれも 2 回収穫区で多くなったことから、クワ葉の収量だけでなく、機能性成分の生産量においても 1 回収穫より 2 回収穫が良いことが明らかとな

った。特にこの傾向は、低温による含有量の低下にくわえ、1 回収穫区による低収の影響から、DNJ において顕著であった。2 回収穫による中途伐採の影響がクロロゲン酸含量で高かったことから、収量性だけでなく機能性成分の高含有の面からも 2 回収穫が良いと考えられた。

**Table 3-1-2.** Mulberry tree growth and leaf yield at harvest

	Date of measurement	Longest shoot length (cm)	Shoot length without leaves <sup>z</sup> (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Internode length (cm)
Twice-harvested group	7/15	203 ± 3	48 ± 1	23.1 ± 0.3	18.3 ± 0.2	4.1 ± 0.1
	10/26	188 ± 2	48 ± 4	22.0 ± 0.3	18.7 ± 0.3	3.9 ± 0.1
Once-harvested group	10/26	341 ± 6	159 ± 4	22.5 ± 0.3	17.9 ± 0.3	2.9 ± 0.0

	Date of measurement	Shoot <sup>y</sup> weight (kg/stock)	Stem weight (kg/stock)	Leaf yeild <sup>x</sup> (kg/stock)	Leaf/stem ratio (%)	Leaf yield per year (kg/stock)
Twice-harvested group	7/15	1.84 ± 0.07	0.58 ± 0.01	1.26	68.5	2.17
	10/26	1.24 ± 0.05	0.33 ± 0.01	0.91	73.3	
Once-harvested group	10/26	1.94 ± 0.13	0.80 ± 0.04	1.14	58.6	1.14

<sup>z</sup> Shoot length was measured without leaves after defoliation. The length from the base of the shoot to the remaining leaf was measured.

<sup>y</sup> Shoot includes stem and leaf.

<sup>x</sup> The leaf yield was defined as the leaf weight, which was calculated by subtracting the stem weight without leaves from the total shoot weight with leaves.

**Table 3-1-3.** Amount of functional components per stock<sup>z</sup>

	Date of measurement	Flavonol (mg)		Clorogenic acid (mg)		DNJ (mg)	
		One time	Total	One time	Total	One time	Total
Twice-harvested group	7/15	3979	8700	1938	4096	352	438
	10/26	4721		2158		86	
Once-harvested group	10/26	5203	5203	1839	1839	78	78

<sup>z</sup> To evaluate the amount of functional components in the field, we measured the total amount of functional components per stock. The total amount of functional components per stock was calculated from the functional component contents in total leaves per shoot, leaf yield per stock, and average water content (70%) in leaves.

以上の結果から、1回収穫の場合、機能性成分がそれぞれ多くなる収穫時期は、フラボノール、クロロゲン酸は9月下旬以降気温が低く多日照となった時、DNJは気温が高くなる8月がそれぞれ適期であり、さらに、この3つの成分すべてを平均的に高くするための収穫時期は8月高温期の多日照時がよいと考えられた。また、2回収穫を行う場合は、収量性に係わるクワ葉の伸長も考慮し、高温で多日照が続く7月～8月上旬までに1回目の収穫を終え、その後2回目の収穫を9月末までに行うのが良いと思われた。また、本試験の結果から機能性成分がそれぞれ多くなる収穫時期は日照時間、温度を参考に推定できると考えられた。2015年と平年値の積算日照時間と積算温度を比較すると、積算日照時間の振れ幅が2015年で大きいものの、ほぼ平年値の積算日照時間、積算温度と同じ傾向を示していた(第3-1-1図)。このことから、2015年の結果で求められた機能性成分含量を高含有する時期は、一般的な気象条件の年ではほぼ同じになると考えられる。さらに、年ごとの日照時間、温度の傾向を加味することが、高含有を見据えた収穫時期決定の精度向上に有効であると考えられる。



## 第2節 高温が1-デオキシノジリマイシン (DNJ) 含量に及ぼす影響

第3章第1節でDNJ含量が積算温度により大きく変化したことから、人工気象室を用いてDNJ含量に及ぼす温度の影響を調べた。

### 材料および方法

#### 供試材料

温度がDNJ含量に与える影響は、2015年農業技術センターの人工気象室を用いて行った。クワ品種‘はやてさかり’の25L容鉢植えの2年生苗を、夏期伐採後伸長した枝を2本に調整し用いた。各処理区5鉢を屋外で栽培後、10月2日に人工気象室に移動した。処理温度は昼夜温(6時-18時、18時-6時)をそれぞれ高温区(30-25℃)、低温区(23-18℃)に設定した。移動後10月16日、11月6日に先端から約20cmの位置の葉身を採取した。また、採取時に葉身側の葉柄から滲み出る乳液を10μL採取し、乳液中のDNJ含量を調査した。

#### サンプル調製

生葉は60℃で36~48時間、乾燥機(SANYO CONVECTION OVEN)で通風乾燥し、ミルサー(IWATANI MILLSER 700G)で粉碎後、機能性成分分析に供した。粉碎したクワ葉を100mg秤量後、10mlの60%エタノールを加え、30℃で3時間振とう後、10000gで5分間遠心分離し、上澄みを0.45μmのメンブレンフィルター(ADVANTEC)で濾過しDNJの測定に供した。乳液は蒸留水で希釈後サンプルとした。

#### DNJの定量

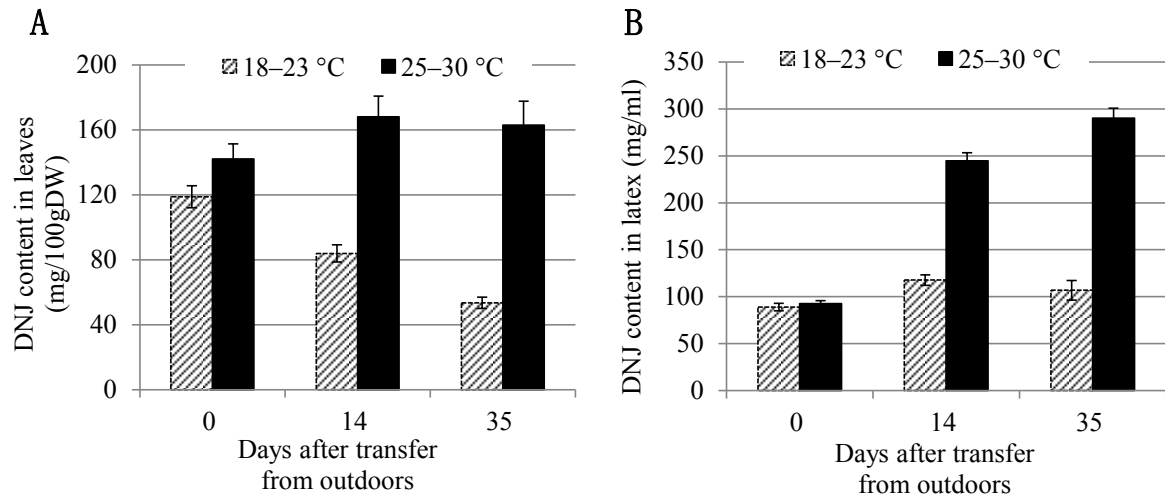
DNJの定量はShimadzu社製のUPLC, Nexera HPLC system: ポンプLC-30AD, オートサンプラーSIL-20A, カラムオーブンCTO-20AC, DiodeArray Detector SPD-M20A, Fluorescence Detector RF-20Axsを用いて行った。カラムはShim-pack XR-ODS (50L × 2.0) (Shimadzu社製)を用いた。Kimら(2003)の方法により、カラム温度40℃、移動層0.1%ギ酸と0.1%ギ酸90%アセトニトリルを用い、0.1%ギ酸77.8%-33.3%のBinary gradient、流速0.7 ml/min、Ex:254 nm、Em:322 nmの条件で定量した。

## 統計処理

データの統計処理は統計処理ソフトウェアエクセル統計を用いて行った。結果は平均値±標準誤差で表した。データは Turkey-Kramer の多重比較検定により解析した。

## 結果および考察

屋外栽培した鉢を 10 月 2 日に人工気象室に移動後、葉身および乳液中の DNJ 含量を測定した結果を第 3-2-1 図に示した。葉身の DNJ 含量は、高温区 (30-25℃) では移動後 14 日後にわずかに高くなり、その後も DNJ 含量の減少は認められなかったが、低温区 (23-18℃) では移動後日数の経過にともない減少した。一方、乳液中の DNJ 含量は日数の経過にともない高温区で増加したが、低温区ではほぼ一定の値を示した。乳液中の DNJ 含量が高温区で増加したことから、高温により乳液の DNJ 合成は促進されたと考えられた。DNJ を高含量するクワ葉を得るためには、高温期で乳液量の多い枝条伸長が盛んな時期に収穫を行うことが重要であると思われる。



**Fig. 3-2-1.** Effect of temperature on DNJ content in leaves and latex of mulberry<sup>z</sup>.

A: leaves, B: latex

<sup>z</sup> DNJ content was analyzed in mulberry trees cultivated in plastic pots, which were transferred from outdoors to artificial climate rooms on October 2. Five mulberry trees were used for each temperature treatment. Leaves located at 20 cm from shoot tip were sampled. Data are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 5).

## 摘要

クワ葉の機能性成分含量が高い収穫時期を明らかにするため、クワ栽培期間におけるサンプリング葉（完全展開葉最若葉を含む下位3葉）中のフラボノール、クロロゲン酸、DNJ含量の季節変化を調査した。5月26日から10月15日までの調査期間中、フラボノール含量は1134~2230 mg/100 g DW、クロロゲン酸含量は616~1014 mg/100 g DW、DNJ含量は53~199 mg/100 g DWの範囲で変化した。フラボノール含量は5月下旬から7月上旬、8月上中旬および9月下旬以降に高く、クロロゲン酸含量は5月下旬から7月上旬、9月下旬以降に高くなった。特に9月下旬以降のフラボノール含量は日経過とともに増加し、調査最終日の10月15日に最も高い値を示した。フラボノール含量は日照時間と正の相関、温度と負の相関を示したことから、このフラボノールの9月下旬以降の含有量増加は日照時間と低温の相乗効果であることが示唆された。一方DNJ含量は調査開始時および終了時に低く、8月中旬に最も高くなる山なりの推移を示し、積算気温（サンプリング前14日間の積算値）との高い正の相関が認められた。機能性成分がそれぞれ多くなる収穫時期は、フラボノール、クロロゲン酸は9月下旬以降気温が低く多日照となる時、DNJは気温が高くなる8月がそれぞれ適期であり、さらに、すべての成分を網羅するための収穫時期は8月高温期の多日照時がよいと考えられた。

## 総合考察

近年、健康維持の観点から、食品の生体調整機能に関わる第三次機能性に注目したクワ葉の食品利用が増加している。機能性食品として、摂取した場合の効果を高めるために、また商品の付加価値をあげる手段として、原料となるクワ葉の機能性成分含量を増やすことが重要となる。クワの食品利用としての研究は、品種、栽培技術面ともに遅れており、現在食用クワ葉の生産現場においては養蚕用に開発された品種や栽培方法が用いられている。作物中に含まれる多くの成分は品種、栽培方法などにより含有量が変わることが知られているため、生産現場においても食用として優れた品種あるいは栽培技術が求められる。機能性食品原料となるクワ葉に含まれる機能性成分を安定的に高生産させるための方法として、ひとつには品種の能力を向上させること、ふたつめはその能力を最大限に発揮できる栽培環境条件を整えること、の両面からのアプローチが考えられる。そこで、本研究では、クワ葉の重要な機能性成分を高含有させるための条件を、品種・栽培環境それぞれの方向から検討した。

はじめに、品種により機能性成分含量を高くできる可能性を検討した。ここで特に注目した成分はフラボノール配糖体の一つケルセチン 3-(6-マロニルグルコシド) (Q3MG)である。Q3MG は、低比重リポタンパク質 (LDL) の酸化を抑制し (Katsube ら 2006)、LDL レセプターノックアウトマウスに対して動脈硬化抑制作用を示すクワ葉の主要な関与成分である (Enkhmaa ら 2005)。さらに、クワ葉の摂取が高脂肪食誘導肥満マウスの肝臓の酸化ストレスを緩和し、解糖系を促進することによって糖代謝を正常に近づけると考えられ、この作用が Q3MG に起因することが報告されている (Katsube ら 2010)。また、島根県江津市桜江町桑茶生産組合の桑茶にはこの Q3MG が多く含まれるとされ、他産地との商品の差別化が図られている。現在一般にクワ栽培で使われている品種は、養蚕に適している品種として開発された‘一ノ瀬’が多い。前述の桑茶生産組合で栽培されている品種も‘一ノ瀬’が中心である。第 1 章第 1 節ではこの‘一ノ瀬’より高含有する品種選定を目的に、クワ品種の Q3MG 含量の品種間差を調査した。またここでは、クワ葉機能性成分で最も知られているクワ特異的な成分である 1-デオキシノジリマイシン (DNJ)、Q3MG 以外のフラボノールも同様に検討した。

供試品種 176 品種を用いてフラボノールの品種間差を調査した結果、品種間

のフラボノールの組成および含有量に大きな違いが認められ、供試した 176 品種のうち 73 品種が‘一ノ瀬’より高いフラボノール含量を示した。フラボノールの組成においては、供試 12 種 176 品種のクワ葉から 7 種類のフラボノール配糖体：ルチン、イソケルシトリン、ケンフェロール 3-(6-ルチノシド) (K3RG), Q3MG, アストラガリン, ケルセチン 3-(6-アセチルグルコシド) (Q3AG), ケンフェロール 3-(6-マロニルグルコシド) (K3MG) が検出され、そのうち最も豊富に含まれていたのは Q3MG であった。クワ葉に含まれるフラボノール配糖体の種類に関して、本試験の結果は Onogi ら (1993), Kim・Jang (2011), Naowaratwattana ら (2010), Choi ら (2013b), Thabti ら (2012) の報告と一部異なったが、この違いは、栽培される種あるいは品種がそれぞれの国で異なり供試品種や分析方法の違いに由来すると推察された。供試品種のフラボノール組成には、1) : Q3AG はケグワだけが含有すること、2) : 一部の品種において Q3MG と K3MG を含有しなかったこと、の 2 つの特徴が認められた。ケグワは、他の品種が含有しない Q3AG を生成したことから、特異的にアセチル基転移酵素を有していると考えられた。また、本試験で注目したクワ葉の主要フラボノールである Q3MG が生成されない品種が確認されたが、Q3MG を生成しない品種は K3MG も含有しないことから、これらの品種はフラボノール合成に関与するマロニル基転移酵素を持たないと考えられた。さらに供試品種の出現率から、マロニル基転移酵素の欠失は地域特異的であると推察された。日本在来のヤマグワに Q3MG を持たない品種が多いことから、機能性成分を目的とした食用のクワの品種選定には、主要フラボノールである Q3MG を含有しない品種の存在に留意する必要がある。さらに、育種において Q3MG の有無は重要な要素である。Q3MG を含有する品種と持たない品種による交雑実生を用いてその発現率を調べた結果、マロニル基転移酵素は単一遺伝子でメンデルにおける優性遺伝をすることが明らかとなった。品種比較試験の結果から、必ずしもマロニル基転移酵素をホモに持つ品種の Q3MG 含量が高いとは限らなかったが、Q3MG を目標とする品種育成においては、酵素をヘテロでもつ両親からは Q3MG を持たない個体が出現することに注意を要する。

一方、品種間差は DNJ 含量にも確認された。本試験の結果では、DNJ 含量が最も多かった品種は‘あやのぼり’で、最も少ない‘臥龍’とは 10 倍以上の違いがあることが明らかとなり、‘一ノ瀬’より DNJ を高含有する品種が 58 品種確認された。一方で、DNJ の含有量が高いとされていた‘鶴田’は Kimura ら (2007)

の報告に比べ低い傾向にあった。年次間差は品種間差に影響しないことから、この違いの由来は今後の課題である。しかし本試験により、現在の主流品種である‘一ノ瀬’よりフラボノール、DNJともに高含有する品種が明らかとなり、既存品種の選定によって機能性成分が向上できる可能性が示された。特に、DNJ含量が最も高かった独立行政法人農業生物資源研究所育成品種である‘あやのぼり’は、フラボノール総量およびQ3MGの含量も高く、栽培適性も優れていることから既存品種の中では有力品種となりうる。また、ここで明らかとなった各品種の機能性成分含量は、今後成分育種を行う際の親品種選定の基礎データとなりうる。例えば、雄性の‘国桑第21号(4x)’、雌性の‘国桑第20号’は栽培適性も優れ、クワは四倍体と二倍体の交配により容易に交雑実生が得られるため育種親の組み合わせとして期待できる。一方で、クワは多くが雌雄異株であること、本試験においては実用品種でない品種や、三倍体品種等交配親に適さない品種もあることから、交配親の選定にはこれらを留意する必要がある。

フラボノール、DNJともにクワ品種の葉中含有量の違いが示されたことから、成分育種による機能性成分の向上が示唆されたが、木本であるクワの成分育種においては、できるだけ早い段階で成分による選抜を行うことが、期間短縮、圃場利用の面からも有意である。本試験により、クワは穂木を用いた接ぎ木交配により1年で選抜可能な個体を得られること、さらに葉中フラボノール含量は実生1年目の個体を用いた成分分析による早期選抜が可能であることが示された。これらから、高含有個体を交配親に選定し、接ぎ木交配、成分を指標とした早期選抜により、クワの成分育種および育種期間の短縮が可能であることが明らかとなった。そこで実際に、葉中Q3MGの向上を育種目標に、クワの成分育種を試みた。4倍体の‘四倍性桑’を種子親、2倍体の‘国桑第21号’を花粉親として交雑育種を行い、栽培品種‘一ノ瀬’よりQ3MG高含有の個体を作り出し、‘蒼楽’と命名した。‘蒼楽’はQ3MG含量が‘一ノ瀬’より1.4倍高く、収量性も高い3倍体品種で、2015年に品種登録された。

このように、クワの特性を利用した成分育種によって、短期間に機能性成分高含量の品種育成が可能となったが、これはフラボノール以外の成分でも応用できる。本報ではふれなかったが、DNJ含量を高くすることを育種目標としてDNJ含量の高い系統が獲得できた。しかし一方で、Q3MGとDNJ両成分の含有量向上をめざした成分育種では、最も高い選抜個体でも‘一ノ瀬’に比べ各成分ともに1.2倍程度の増加にとどまり、複数成分を同時に大きく改善することは

難しい。当面、複数の成分含有量をともに高くするための手段としては、選抜の母集団となる実生個体を多くする、含有量が高くなる交配組み合わせの検討が効果的であると思われる。今後、合成酵素、DNA 解析等を利用したマーカー育種や分子育種など新しい育種技術に期待したい。

次に、機能性成分含量に及ぼす栽培環境の影響を調査した。一般的に植物体中の多くの成分は品種や光、施肥量、気温など栽培環境に影響を受けるが、同様に、クワの機能性成分含量も品種、収穫時期、温度、部位産地などによる影響を受けるとされる (Bajapai・Rao, 2014; Choi ら, 2013b; Constantinides・Fownes, 1994; Hu ら, 2013; Kimura ら, 2007; Lee・Choi, 2012; Lou ら, 2011; Nakanishi ら, 2011; Yatsunami ら, 2008)。本研究では葉中機能性成分含有量の向上を目的として、日照条件、窒素施肥条件が、フラボノール、クロロゲン酸、DNJそれぞれの含有量に与える影響を調査した。

クワ葉のフラボノール含量は日照条件、窒素施肥条件に大きく影響を受けた。日照の影響は寡日照条件（ガラス室）と多日照条件（屋外）の栽培場所の比較により行った。その結果、フラボノール含量は多日照の屋外に比べ寡日照となるガラス室で著しく減少し、フラボノール合成は寡日照で抑制されると考えられた。フラボノールに及ぼす紫外線や日照の影響に関しては、Price ら (1995), Fujita ら (2006)によりブドウ果皮のフラボノールが日光照射により増加することを、さらに Morales ら (2010)がフラボノイド合成に関与する遺伝子は紫外線カットにより発現が抑制されることを報告している。本試験のガラス室栽培でのフラボノール含量の減少も、紫外線カットの影響が大きいと考えられた。本試験で用いたガラス室は一般的に作物栽培で使用されるもので、アントシアニンの合成に対しては大きな影響を与えるものではない。このことから、フラボノール合成に対する紫外線量の閾値はアントシアニンのそれより高い可能性が示唆され、この点において施設でのフラボノール成分量を対象とする作物栽培は注意を要する。一方で、寡日照から多日照への状態変化によって、常時多日照条件に比べフラボノール含量が向上することが明らかとなった。これは近藤 (2010)の報告にある植物の生育環境への適応性の反応によると考えられ、日照の状態変化を利用して、屋外での栽培条件より高いフラボノール含量のクワ葉が得られる可能性を示唆した。屋外栽培での日照の制御は寒冷紗による遮光などで可能であるが、当面、収穫時の天候や栽培圃場の選定に留意することにより、フラボノール含量の高いクワ葉原料の確保が期待できる。さらに今後、



植物工場など環境のコントロールが可能な条件下においては、紫外線の補光や、遮光、露光の制御によるフラボノール高含量化の可能性が示された。

次に、作物生産においては収量に直結する重要なファクターである窒素施肥量の影響を調べた。ここでは、フラボノールと同じくポリフェノールのひとつであり、クワの抗酸化作用の主要成分として位置づけられているクロロゲン酸についても検討した。窒素施肥量の増加にともないフラボノール・クロロゲン酸含量は減少した。Stewartら(2001)は植物組織のフラボノール含量は窒素欠乏により高くなるとし、本試験の結果も同様の傾向を示した。フラボノールやクロロゲン酸などの抗酸化に関与する成分は様々なストレスに誘導されるとされ、本試験においてもフラボノールが紫外線ストレスにより増加することを確認している。これと同様に、窒素施肥量に関しても窒素欠乏のストレスによってクロロゲン酸、フラボノールが増加していくと考えられた。このように、クワ葉のフラボノール、クロロゲン酸含量の向上には減肥が有効であることが明らかとなったが、窒素は収量の増加には欠かせない肥料である。圃場あたりの機能性成分生産量を高くするためには収量の増加と成分含量の向上のバランスを考えた施肥量を検討する必要がある。したがって、生産場面においても収量性、機能性分量の両面からそれぞれの圃場に適した施肥量を見極めが重要となる。これに対しては、葉中窒素含量と相関が高い葉色計の利用等した評価方法の検討などが残された課題である。

クワ葉に含まれるもう一つの重要な機能性成分であるDNJに対する日照および窒素施肥量の影響をみると、フラボノール、クロロゲン酸が多日照、減肥条件で含量の増加が確認されたのに対し、DNJはそれとは逆の傾向を示した。すなわち、クワ葉のDNJ含量は、寡日照条件でわずかに増加が認められ、窒素施肥量が増えるにともない増加した。DNJ含有量の向上に対する日照条件は、多日照よりも寡日照がよいことが明らかとなったが、日照の違いによる含有量の増加はわずかだった。この結果からDNJに関しては栽培期間の日照を考慮しなくてもよいと思われる。一方で、DNJ含量に対する施肥量の影響は大きく、DNJの増加には窒素施肥量を増やすことが有効であることが示された。これはクワ葉収量を増やすための施肥条件と一致する。したがって、DNJの圃場あたりの生産量を多くする施肥条件は収量性が最も高くなる施肥量で問題ないと考えられる。DNJはクワの乳液に含まれ(Konno, 2011)、クワ葉のDNJ含量は乳液中の濃度、乳液の量の影響を強く受ける。乳液量の増加は乳管の発達などに

影響を受け、桑樹の生育を旺盛にすることが DNJ 含量増加の条件に直結すると推測される。フラボノール、クロロゲン酸がストレスにより増加するのに対し、DNJ 含量の向上にはストレスフリーの状態が望ましいと考えられた。

また、栽培期間における葉中フラボノール、クロロゲン酸、DNJ 含量の増減は、機能性を目的とした商品の原料生産においては重要な要素となる。それぞれの成分の含量が高くなる時期を明らかにするために、フラボノール、クロロゲン酸、DNJ 含量の季節変化を調査した。フラボノール含量とクロロゲン酸、DNJ 含量はいずれも調査期間中で大きく変化した。フラボノールとクロロゲン酸含量において注目すべき点は、栽培後期の 9 月下旬以降に含有量が高くなったことである。調査期間のフラボノール含量には、積算日照時間と正の相関が、積算温度と負の相関が確認され、さらにフラボノール含量に対する積算日照時間と積算温度の重相関係数はそれぞれの単相関より高くなった。クロロゲン酸含量もフラボノールと同様の傾向を示した。これまでフラボノールに対する温度の影響は大きくないとされていたが (Spayd ら, 2002; Mori ら, 2005), 一方で Azuma ら (2012), Løvda1 ら (2010) がフラボノール合成に対する温度の関与を報告しており、本試験はこれらを裏付ける結果となった。したがって、9 月下旬以降のフラボノールおよびクロロゲン酸含量の増加は日照と気温低下の相乗効果によると考えられた。一方、DNJ 含量の季節変化は、これまでの Kimura ら (2007), Nakanishi ら (2011) の報告と同様に、気温の高い 8 月に高く、DNJ 含量は温度との相関が高いことが明らかとなった。それぞれの成分について最適な収穫時期が明らかとなったが、高含有する条件が異なることから、温度、日照時間それぞれの成分に影響を与える条件を詳細に検討することにより、さらに、年ごとの日照時間、温度の傾向を加味することが、高含有を見据えた収穫時期決定の精度向上に重要であると考えられる。

以上のように、フラボノール、クロロゲン酸は多日照、減窒素施肥、低温により、DNJ は高温、至適窒素施肥、寡日照によって、それぞれの含有量が向上することが明らかとなり、クワ葉中機能性成分の含有量を高める条件はそれぞれ異なった。一方で、先端葉の含有量はいずれの成分も高いという結果が得られている。今後、ポリフェノールが増加するとされる水分ストレス (大江ら, 2013) をはじめ今回検討しなかった栽培環境に対する検討、さらに先端部の収穫に特化した茶刈機の利用や、再発芽性向上などそれに適した品種開発、密植栽培などの栽培技術開発により、含有量に特化した商品開発の可能性が期待でき

る.

本研究では、クワ葉に含有される機能性成分であるフラボノール、クロロゲン酸、DNJ について、品種および栽培環境からそれぞれの含有量の向上について検討した。本研究で明らかにした機能性成分の高い品種はすでに生産現場で普及しつつあり、育成品種も苗生産が開始されている。本研究で解明されたクワ葉の機能性成分の高含量化のための条件を、直ちに適用できる栽培技術として生産現場で活用していきたい。さらに、商品の差別化、高付加価値化による健康食品などへの6次産業化を通じた生産興繁に繋がることに期待したい。

## 総合摘要

本研究は、近年食品の機能性成分が注目されクワ葉の食品利用が増加していることから、原料となるクワ葉に含まれる機能性成分含有量の向上を目的として行った。品種および栽培条件の両面から、葉中機能性成分を増加させるための条件を検討した。

### 1. クワ葉に含まれる機能性成分含量の品種間差および品種改良

品種による機能性成分含量の違いを明らかにし、育種の基礎的知見とするために 176 品種の機能性成分：フラボノールおよび DNJ の葉中含量を調べた。176 品種間におけるフラボノール含有量と組成およびその割合には幅広い品種間差異が認められた。フラボノールを最も高含有する品種は‘小淵沢 1 号’であり、最も少ない‘御蔵島 15’のフラボノール総量の約 5 倍であった。多くのクワ品種においてケルセチン 3-(6-マロニルグルコシド) (Q3MG) が最も多く含有されていたが、一部の品種は Q3MG をまったく含有しなかった。また、ケルセチン 3-(6-アセチルグルコシド) (Q3AG) は‘毛桑’にのみ含まれた。交配後代を用いてクワ葉の主要フラボノールである Q3MG の遺伝様式を調べた結果、Q3MG 合成に関与するマロニル基転移酵素は単一遺伝子でメンデル遺伝することが明らかになった。また、交雑実生において高含有個体が得られたことから、交雑育種による高含有個体獲得の可能性が示唆された。

品種間差の結果をもとに、Q3MG 含量の高い交配親を選定し、4 倍体の‘四倍性桑’を種子親、2 倍体の‘国桑第 21 号’を花粉親としてクワの品種改良を行った。その結果、Q3MG 含量が‘一ノ瀬’より 1.4 倍高く、収量性も高い 3 倍体クワ品種‘蒼楽’を育成した。‘蒼楽’は 2013 年 4 月に品種登録出願を行い、2015 年に品種登録された。

### 2. 栽培環境条件がクワ葉に含まれる機能性成分含量に及ぼす影響

葉中フラボノールおよび 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) 含量に対する日照の影響を、クワ鉢植えを用いた栽培条件の比較（多日照：屋外，寡日照：ガラス室）により調査した。フラボノールはガラス室の遮光により合成が阻害され、屋外に比べフラボノール含量が著しく減少した。また、ガラス室栽培後屋外へ移動した個体のフラボノール含量は常時屋外栽培より増加し、その増加程

度は葉位により異なった。上位葉では屋外より有意に高くなったが、中位葉は屋外と同程度、下位葉は屋外に比べ有意に低く、フラボノール合成に対する日照の影響は若い葉ほど強かった。一方 DNJ 含量はガラス室栽培が屋外より高くなったがその違いはわずかだった。日照条件は、フラボノールおよび DNJ 含量に影響を与えることが明らかとなり、増加させるための日照条件はフラボノール、DNJ で異なった。

また、現地栽培圃場の異なる条件で栽培されたクワ葉中の無機成分とクワ葉中機能性成分の関係を調査した。現地栽培圃場のクワ葉に含まれる無機成分と機能性成分含量には、窒素含量とクロロゲン酸に負の相関が、窒素含量と DNJ 含量に正の相関認められた。さらに、ポット試験および圃場試験により窒素施肥量が葉中機能性成分含有量に与える影響を検討した結果、窒素施肥量と機能性成分含量の関係において、窒素施肥量が多くなるほどクロロゲン酸含量およびフラボノール含量は有意に低くなったが、DNJ 含量は有意に高くなり、窒素施肥量がそれぞれの葉中機能性成分含量に与える影響が明らかとなった。目的に応じた適切な窒素施肥量を設定することにより、機能性成分含量を増加させられる可能性が示唆された。

### 3. クワ葉に含まれる機能性成分の季節変化

クワ葉の機能性成分含量が高い収穫時期を明らかにするため、クワ栽培期間におけるサンプリング葉中のフラボノール、クロロゲン酸、DNJ 含量の季節変化を調査した。5月26日から10月15日までの調査期間中、いずれの葉中含量も大きく変化した。フラボノール含量は5月下旬から7月上旬、8月上中旬および9月下旬以降に高く、クロロゲン酸含量は5月下旬から7月上旬、9月下旬以降に高くなった。特に9月下旬以降のフラボノール含量は日経過とともに増加し、調査最終日の10月15日に最も高い値を示した。このフラボノールの9月下旬以降の含有量増加は日照時間と低温の相乗効果であることが示唆された。一方 DNJ 含量は調査開始時および終了時に低く、8月中旬に最も高くなる山なりの推移を示し、積算気温との高い正の相関が認められた。機能性成分がそれぞれ多くなる収穫時期は、フラボノール、クロロゲン酸は9月下旬以降気温が低く多日照となる時、DNJ は気温が高くなる8月がそれぞれ適期であり、さらに、すべての成分を網羅するための収穫時期は8月高温期の多日照時がよいと考えられた。

以上, 本研究によりクワ葉に含まれる機能性成分含量が高くなる条件を検討し, 品種選定や日照条件, 窒素施肥量, 収穫時期により, それぞれの成分を高くするための条件が明らかとなった. これらの知見や技術は, 今後機能性成分の高いクワ葉生産に活用することができる.

## Summary

The benefits of functional components of mulberry (*Morus alba* L.) leaves have been attracting the attention of the health food industry, with an increasing market demand. To more effectively obtain a mulberry leaf yield and high levels of functional components, the following factors were investigated: 1) selection and crossbreeding of mulberry cultivars to obtain high levels of target components, 2) effect of solar radiation and nitrogen fertilization, and 3) optimum harvesting timing using our experimental settings and common culture fields in Shimane Prefecture.

### **1. Varietal differences in the functional components of mulbeery leaves and breeding.**

The varietal differences in the flavonol glycosides contained in mulberry leaves were elucidated, including rutin, isoquercitrin, kaempferol 3-(6-rhamnosylglucoside) (K3RG), quercetin 3-(6-malonylglucoside) (Q3MG), astragalin, quercetin 3-(6-acetylglucoside) (Q3AG), and kaempferol 3-(6-malonyl glucoside) (K3MG). This information was used for breeding mulberry cultivars with high concentrations of functional components. The content, composition, and proportion of flavonols in leaves varied widely. ‘Kobuchizawa 1’ had the highest level of total flavonols, five times greater than that of ‘Mikurasima 15’. Q3MG was the most abundantly contained flavonol in many of the cultivars, although it was not contained at all in some cultivars. Q3AG was found only in ‘Keguwa’. Study of the mode of genetic inheritance and the content of Q3MG in crossbred offspring showed that malonyl transferase, an enzyme involved in the synthesis of Q3MG, was transcribed through a single gene according to Mendelian inheritance. An offspring with a higher Q3MG level than both parents could be obtained from the crossing, suggesting that crossbreeding was effective.

Then, crossbreeding was conducted using ‘Yonbaiseisou (tetraploid)’ as a

seedling parent and ‘Kokusou 21(diploid)’ as a pollen parent, and obtained a new triploid cultivar ‘Souraku’. Consequently, compared with ‘Ichinose’, ‘Souraku’ was found to have 1.4 times higher content of Q3MG and greater leaf yield. ‘Souraku’ was applied for a new variety registration in April 2013, and was accepted as a new variety in 2015.

## **2. Effect of environmental conditions on the functional components of mulberry leaves.**

Effects of solar radiation, which may influence production of flavonol and 1-deoxynojirimycin (DNJ) in mulberry leaves, were investigated by comparing greenhouse (poor solar radiation) and outdoor (rich solar radiation) settings. The level of flavonol in leaves cultivated in the greenhouse was markedly decreased when compared with those cultivated outdoors. In contrast, the DNJ content of plants cultivated in greenhouse was only slightly increased when compared with those cultivated outdoors. Interestingly, the flavonol content was markedly increased in the upper leaves of mulberry trees that were transferred from a greenhouse to the outdoors, compared with those cultivated only in the outdoors. Under high solar radiation, the flavonol level became very high but the DNJ level became slightly lower, suggesting that the impact of solar radiation is great on flavonols, but is small on the DNJ synthesis.

Then, effects of applied nitrogen amounts were investigated regarding specific functional components in mulberry leaves. The relationships between mineral elements and the functional components in mulberry leaves were examined using mulberry trees cultivated in different soil conditions in four cultured fields. Then, the relationships between the nitrogen levels and functional components in leaves were studied by culturing mulberry in plastic pots and experimental fields. In the common cultured fields, total nitrogen was negatively correlated with the chlorogenic acid content ( $R^2 = -0.48$ ) and positively correlated with DNJ ( $R^2 = 0.60$ ). Additionally,



differences in nitrogen application levels impacted each functional component in mulberry leaves. For instance, with increased nitrogen levels, the chlorogenic acid and flavonol contents significantly decreased, but the DNJ content significantly increased. The selection of the optimal nitrogen application level is important to obtain the desired functional components from mulberry leaves.

### **3. Seasonal changes in functional component contents in mulberry leaves.**

Optimum harvesting timing of mulberry leaves was investigated to obtain maximum yields of specific functional components. The components of mulberry leaves were analyzed to assess seasonal changes in the concentrations of functional components, including flavonols, chlorogenic acid, and DNJ. During the experimental period (from May 26 to October 16 in 2015), the ranges of flavonols, chlorogenic acid, and DNJ contents were 1134–2230 mg/100 g dry weight (DW), 616–1014 mg/100 g DW, and 53–199 mg/100 g DW, respectively. There were high flavonols contents in mulberry leaves from late May to early July, from early to mid-August, and after late September. There were high chlorogenic acid contents from late May to early July, and after late September. From late September, the flavonols contents increased over time, and showed the highest level on October 16, the last day of the experimental period. The increased flavonols contents after late September were due to the synergistic effects of solar radiation and lower temperature. The DNJ content showed a bell-shaped curve, peaking in mid-August, and the DNJ content was strongly correlated with total temperature. The flavonols and chlorogenic acid contents in mulberry leaves were higher after late September when the temperatures decreased and there was still high solar radiation, while the DNJ content peaked in August when temperatures were highest in the year.

Based on our experiment findings, August is considered the best time to harvest mulberry leaves to obtain the optimal yields of beneficial functional components. If

mulberry leaves are harvested twice per year, then the first harvest should be in July to August when temperatures and solar radiation hours are high, and the second harvest should be completed by the end of September.

With a series of experiment results, the conditions to obtain high levels of specific functional components in mulberry leaves were identified pertaining to the selection mulberry cultivars, the effect of solar radiation, applied nitrogen amounts, and harvest timing. This knowledge is considered useful for producing high functional components of mulberry leaves in the future.

## 引用文献

- Andallu, B., V. Suryakantham, B. L. Srikanthi, and G. K. Reddy. 2001. Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clinica Chimica Acta*. 314: 47–53.
- Azuma, A., H. Yakushiji, Y. Koshita and S. Kobayashi. 2012. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta*. 236: 1067–1080.
- Bakhshi, D. and O. Arakawa. 2006. Effects of UV-B irradiation on phenolic compound accumulation and antioxidant activity in ‘Jonathan’ apple influenced by bagging, temperature and maturation. *J. Food Agric. Environ.* 4: 75–79.
- Bajpai, S. and A. V. B. Rao. 2014. Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in different mulberry varieties of India. *J. Pharmacogn Phytochem.* 3: 17–22.
- Butt, M. S., A. Nazir, M. T. Sultan and K. Schroën. 2008. *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Trends Food Sci. Tech.* 19: 505–512.
- Chauhan, S., U. Devi, V. R. Kumar, V. Kumar, F. Anwar and G. Kaithwas. 2015. Dual inhibition of arachidonic acid pathway by mulberry leaf extract. *Inflammopharmacol.* 23: 65–70.
- Chen, Y. C., Y. J. Tien, C. H. Chen, F. N. Beltran, E. C. Amor, R. J. Wang and W. C. Yang. 2013. *Morus alba* and active compound oxyresveratrol exert anti-inflammatory activity via inhibition of leukocyte migration involving MEK/ERK signaling. *BMC complement. Altern. Med.* 13: 45.
- Choi, J., H. J. Kang, S. Z. Kim, T. O. Kwon, S. I. Jeong and S. I. Jang. 2013a. Antioxidant effect of astragalol isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* 36: 912–917.
- Choi, S. W., Y. J. Jang, Y. J. Lee, H. H. Leem and E. O. Kim. 2013b. Analysis of functional constituents in mulberry (*Morus alba* L.) twigs by different cultivars, producing areas, and heat processings. *Prev. Nutr. Food Sci.* 18: 256.
- Constantinides, M. and J. H. Fownes. 1994. Nitrogen mineralization from leaves and litter of tropical plants: relationship to nitrogen, lignin and soluble polyphenol concentrations. *Soil Biol. Biochem.* 26: 49–55.

- Enkhmaa, B., K. Shiwaku, T. Katsube, K. Kitajima, E. Anuurad, M. Yamasaki and Y. Yamane. 2005. Mulberry (*M. alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J. Nutr.* 135: 729–734.
- Evans, S.V., L. E. Fellows, T. K. M. Shing and G. W. J. Fleet. 1985. Glycosidase inhibition by plant alkaloids which are structural analogues of monosaccharides. *Phytochem.* 24: 1953–1955.
- Fujita, A., N. Goto-Yamamoto, I. Aramaki and K. Hashizume. 2006. Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 632–638.
- Hu, X. Q., L. Jiang, J. G. Zhang, W. Deng, H. L. Wang and Z. J. Wei. 2013. Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves from 132 varieties. *Ind. Crop Prod.* 49: 782–784.
- Katsube, T., M. Yamasaki, K. Shiwaku, T. Ishijima, I. Matsumoto, K. Abe and Y. Yamasaki. 2010. Effect of flavonol glycoside in mulberry (*Morus alba* L.) leaf on glucose metabolism and oxidative stress in liver in diet-induced obese mice. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2386–2392.
- Katsube, T., N. Imawaka, Y. Kawano, Y. Yamazaki, K. Shiwaku and Y. Yamane. 2006. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*M. alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.* 97: 25–31.
- Katsube, T., Y. Tsurunaga, M. Sugiyama, T. Furuno and Y. Yamasaki. 2009. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chem.* 113: 964–969.
- Kawakami, K., S. Aketa, M. Nakanami, S. Iizuka and M. Hirayama. 2010. Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* 74: 1380–1385.
- Khaengkhan, P., K. Takahashi, T. Niidome, M. Ichida, H. Sugimoto, S. Harada and K. Kamei. 2009. A comparison of the amyloid  $\beta$  fibril-destabilizing activities of leaves among varieties of the mulberry. *J. Insect Biotech. Seri.* 78: 173–176.
- Kim, J. W., S. U. Kim, H. S. Lee, I. Kim, M. Y. Ahn and K. S. Ryu. 2003.

- Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl. J. Chromatogr. A. 1002: 93–99.
- Kim, G. N. and H. D. Jang. 2011. Flavonol content in the water extract of the Mulberry (*Morus alba*L.) leaf and their antioxidant capacities. J. Food Sci. 76: 869–873.
- Kimura, T., K. Nakagawa, H. Kubota, Y. Kojima, Y. Goto, K. Yamagishi, S. Oita, S. Oikawa and T. Miyazawa. 2007. Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. J. Agric. Food Chem. 55: 5869–5874.
- 近藤知義・仲上和博・和田義彦・今村嘉博・志和将一. 2007. カテキン類利用原料としての夏秋茶の摘採時期と位置. 滋賀県農業技術振興センター研究報告. 46: 36–44
- 近藤矩朗. 2010. 紫外線増加が植物に及ぼす影響. 帝京科学大学紀要. 6: 1–7.
- Konno, K. 2011. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. Phytochem. 72: 1510–1530.
- 小山朗夫. 1997. 3倍性桑品種の稔性. 日蚕雑. 66: 200–206.
- Lee, W. J. and S. W. Choi. 2012. Quantitative changes of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves in relation to varieties, harvest period, and heat processing. Prev. Nutr. Food Sci. 17: 280–285.
- Lou, D. S., F. M. Zou, H. Yan and Z. Z. Gui. 2011. Factors influencing the biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. Afr. J. Agric. Res. 6: 2998–3006.
- Løvdaal, T., K. M. Olsen, R. Slimestad, M. Verheul and C. Lillo. 2010. Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. Phytochem. 71: 605–613.
- 前川健二郎・前田智雄・大島千周・鈴木卓・大澤勝次. 2006. 数種アブラナ科スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化能に及ぼす照射光強度の影響. 園学研. 5: 315–320.
- 松尾孝嶺. 1989. 植物遺伝資源集成. 第2巻. p. 691–693. 講談社. 東京
- 松永明子・佐波哲次・根角厚司. 2009. 窒素施肥量がチャ品種・系統の新芽中のカテキン類含有率に及ぼす影響. 茶研報. 108: 19–27.

- 翠川美穂・亀山眞由美・永田忠博. 2010. タラヨウの当年葉および古葉中のカフェ酸誘導体含量の季節変動. 日本食生活学会誌. 20: 305–312.
- 南澤吉三郎. 1984. 改訂新版栽桑学: 基礎と応用. p. 296–297. 鳴鳳社出版. 東京.
- 松丸好次・上浜竜雄・稲田勝美. 1971. ナス果皮のアントシアニン含量に及ぼす光透過性を異にした種々の被覆資材の影響. 生物環境調節. 9: 9–15.
- 松添直隆・山口雅篤・川信修治・渡部由香・東華枝・坂田祐介. 1999. 果実への暗黒処理がナスの果色と果皮のアントシアニン組成に及ぼす影響. 園学雑. 68: 138–145.
- Mol, J., G. Jenkins, E. Schäfer, D. Weiss and V. Walbot. 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Rev. Plant Sci.* 15: 525–557.
- Morales, L. O., R. Tegelberg, M. Brosché, M. Keinänen, A. Lindfors and P. J. Aphalo. 2010. Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree phys.* 30: 923–934.
- Mori, K., S. Sugaya and H. Gemma. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hort.* 105: 319–330.
- Mudau, F. N., P. Soundy, E. S. Du Toit and J. Olivier. 2006. Variation in polyphenolic content of *Athrixia Phyllicoides* (L.) (bush tea) leaves with season and nitrogen application. *South African J. Bot.* 72: 398–402.
- Nakagawa, K. 2013. Studies targeting  $\alpha$ -glucosidase inhibition, antiangiogenic effects, and lipid modification regulation: Background, evaluation, and challenges in the development of food ingredients for therapeutic purposes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 900–908.
- Nakanishi, H., S. Onose, E. Kitahara, S. Chumchuen, M. Takasaki, H. Konishi and R. Kanekatsu. 2011. Effect of environmental conditions on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of mulberry leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 2293–2296.
- Naowaboot, J., P. Pannangpetch, V. Kukongviriyapan, U. Kukongviriyapan, S. Nakmareong and A. Itharat. 2009. Mulberry leaf extract restores arterial pressure in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Nutr. Res.* 29: 602–608.
- Naowaratwattana, W., W. De-Eknamkul and E. G. De Mejia. 2010.

- Phenolic-containing organic extracts of mulberry (*Morus alba* L.) leaves inhibit HepG2 hepatoma cells through G2/M phase arrest and inhibition of topoisomerase II $\alpha$  activity. *J. Med. Food.* 13: 1045–1056.
- Niidome, T., K. Takahashi, Y. Goto, S. Goh, N. Tanaka, K. Kamei, M. Ichida, S. Hara, A. Akaike, T. Kihara and H. Sugimoto. 2007. Mulberry leaf extract prevents amyloid beta-peptide fibril formation and neurotoxicity. *Neuroreport.* 18: 813–816.
- 大江孝明・土田靖久・山崎哲弘・奥井弥生・石原紀恵・岡室美絵子・細平正人. 2013. ウメ ‘南高’樹体への乾燥ストレスおよび着果負担が果実および梅酒品質に及ぼす影響. 和歌山県農林水産試験研究機関研究報告. 1: 55–64.
- Onogi, A., K. Osawa, H. Yasuda, A. Sakaki and H. Itokawa. 1993. Flavonol glycosides from the leaves of *Morus alba* L. *生薬学雑誌.* 47: 423–425.
- Park, S., Y. S. Kim, H. A. Lee, Y. Lim and Y. Kim. 2013. Mulberry leaf extract inhibits invasive potential and downregulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in SK-N-BE (2) C neuroblastoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 722–728.
- Price, S. F., P. J. Breen, M. Valladao and B. T. Watson. 1995. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 187–194.
- Scarth, R., S. R. Rimmer and P. B. E. McVetty, 1995. Apollo low linolenic summer rape. *Can. J. Plant Sci.* 75: 203–204.
- 政府統計の総合窓口 (e-Stat). <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/eStat>
- Sharma, A., R. Sharma and H. Machii. 2000. Assessment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1049–1055.
- 曾根原直子・泉敬子. 1991. 柿葉のビタミン C とポリフェノール成分との関係. *日本栄養・食糧学会誌.* 44: 213–219.
- Spayd, S. E., J. M. Tarara, D. L. Mee and J. C. Ferguson. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 171–182.
- Stewart, A. J., W. Chapman, G. I. Jenkins, I. Graham, T. Martin and A. Crozier. 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.* 24: 1189–1197.

- 鈴木誠・高橋恭一・坂本堅吾・有賀勲. 1996. 栄養成分評価に関する研究(1) 桑葉一般成分の品種間差異. 機能性食品に関する共同研究事業報告. 第2号: 37-42.
- 高橋徹・沖浦文. 2013. イチジク葉の成分組成に及ぼす収穫時期の影響. 東洋食品研究所研究報告書. 29: 31-36.
- 高柳博次・阿南豊正・池ヶ谷賢次郎・中川致之. 1985. 茶芽の熟度と成分変動. 茶業研究報告. 61: 20-25.
- Thabti, I., W. Elfalleh, H. Hannachi, A. Ferchichi and M. D. G. Campos. 2012. Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS.J. Functional Foods. 4: 367-374.
- Tsudoku, T., I. Kikuchi, T. Kimura, K. Nakagawa and T. Miyazawa. 2013. Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. Food Chem. 139: 16-23.
- Vichasilp, C., K. Nakagawa, P. Sookwong, O. Higuchi, S. Luemunkong and T. Miyazawa. 2012. Development of high 1-deoxynojirimycin(DNJ) content mulberry tea and use of response surface methodology to optimize tea-making conditions for highest DNJ extraction. LWT-Food Sci. Technol. 45: 226-232.
- Woodall, G. S., and G. R. Stewart. 1998. Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*?. J. exp. Bot. 49: 1447-1450.
- Yatsunami K, M. Ichida and S. Onodera. 2008. The relationship between 1-deoxynojirimycin content and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity in leaves of 276 mulberry cultivars (*Morus* spp.) in Kyoto, Japan. J. Nat. Med. 62: 63-66.



## 謝辞

本論文のとりまとめに際し、ご親切なるご指導とご高閲を賜った島根大学教授板村裕之博士に厚くお礼申し上げます。多大なるご助言と激励を賜った鳥取大学教授田村文男博士，山口大学教授執行正義博士，島根大学教授松本敏一博士，島根大学教授中務明博士に感謝の意を表します。

本試験の計画および遂行にあたって始終クワの育種，栽培に関する教示いただいた元独立行政法人生物資源研究所小山朗夫氏，機能性成分に関するご教示をいただいた島根県産業技術センター勝部拓矢博士に心より感謝申し上げます。土壌，植物体の成分分析に関してご協力いただいた島根県農林水産部高橋慎氏，肥料試験に関するご教示を頂いた島根県農業技術センター藤本順子博士に深く感謝申し上げます。また，国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源センターからジーンバンク事業，MTAにより材料提供いただきました。厚くお礼申し上げます。

本試験遂行にあたって，多大なるご協力いただいた島根有機ファーム株式会社古野俊彦氏，古野利路氏，桑茶生産組合の皆様に深く感謝申し上げます。また，試験遂行にあたりご助言を頂いた島根県産業技術センターの皆様に感謝の意を表します。始終激励を賜った島根大学客員教授山崎幸一氏，元島根大学教授塩飽邦憲博士，島根大学助教山崎雅之博士に厚くお礼を申し上げます。

論文作成にあたり英語論文に関する多大なるご助言をいただいた森山 ME 翻訳工房の森山裕美子氏に心より感謝申し上げます。

本試験遂行にあたって，多大なるご協力および激励をいただいた島根県農業技術センター春木和久博士，元島根県農業技術センター北川優氏，島根県農業技術センター塚本俊秀氏，梅野康行氏，大畑和也氏，島根県東部農業振興センター持田圭介氏に深く感謝申し上げます。

最後に，島根県農業技術センター特産開発科の皆様のご協力，ご支援により試験を遂行できました。ここに感謝の意を表します。

## 学会誌公表論文リスト

### 第 1 章

題 目 : Varietal Differences in the Flavonol Content of Mulberry (*Morus* spp.) Leaves and Genetic Analysis of Quercetin 3-(6-Malonylglucoside) for Component Breeding

著者名 : Mari Sugiyama, Takuya Katsube, Akio Koyama and Hiroyuki Itamura

学術雑誌名 : Journal of Agricultural and Food Chemistry (2013) 61: 9140-9147.

### 第 2 章

題 目 : Effect of solar radiation on the functional components of mulberry (*Morus alba* L.) leaves

著者名 : Mari Sugiyama, Takuya Katsube, Akio Koyama and Hiroyuki Itamura

学術雑誌名 : Journal of the Science of Food and Agriculture (2016) 96: 3915-3921.

題 目 : Effects of Applied Nitrogen Amounts on the Functional Components of Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves

著者名 : Mari Sugiyama, Makoto Takahashi, Takuya Katsube, Akio Koyama and Hiroyuki Itamura

学術雑誌名 : Journal of Agricultural and Food Chemistry (2016) 64: 6923-6929.

### 第 3 章

題 目 : Seasonal Changes in Functional Component Contents in Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves

著者名 : Mari Sugiyama, Takuya Katsube, Akio Koyama and Hiroyuki Itamura

学術雑誌名 : The Horticulture Journal (2017) (in press)

## 参考論文

### 第 1 章

題 目 : クワの健康機能性研究の最前線.

著者名 : 勝部拓矢, 杉山万里, 小山朗夫

学術雑誌名 : 蚕糸・昆虫バイオテック(2011) 80: 19-27