

カイワレダイコン種子およびスプラウトへのセレンの蓄積

岡田 敏 英, 福 永 健 治, 吉 田 宗 弘, 老 川 典 夫
(関西大学工学部生物工学科*)

Accumulation of Selenium in Seeds and Sprouts of Kaiware Daikon

Toshihide OKADA, Kenji FUKUNAGA, Munehiro YOSHIDA, Tadao OIKAWA
Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University

Abstract

To prepare selenium (Se) -enriched sprouts, accumulation of Se in seeds and sprouts of kaiware daikon (A type of *Raphanus sativus*, the sprouts of which are eaten in Japan) was examined. The seeds were kept in a graded concentration (1 to 100 $\mu\text{g Se/ml}$) of selenite solution at room temperature for 48 h and cultivated to sprouts on absorbent cotton holding deionized water. After being kept in the selenite solution for 48 h, the seeds accumulated Se dose-dependently. The seeds kept in a 100 $\mu\text{g Se/ml}$ of selenite solution accumulated Se at a level of more than 250 $\mu\text{g/g}$ dry weight. Abilities of germination of the seeds were significantly inhibited by the selenite solution at a level of more than 20 $\mu\text{g Se/ml}$. However, almost all the seeds kept in 20 $\mu\text{g Se/ml}$ of selenite solution had abilities of germination and could grow to the sprouts normally. After cultivation of the sprouts for 7 days, Se concentration of the sprouts derived from the seeds kept in the 20 $\mu\text{g Se/ml}$ solution was about 40 $\mu\text{g/g}$ dry weight. Analysis using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICPMS) showed that chemical species of most Se in the sprouts was Se-methylselenocysteine.

セレンは必須の微量ミネラルとして知られている。最近では、疫学研究や動物実験によってセレンの抗腫瘍活性に関する認識が広まり、高セレン含量の食品やセレンサプリメントに対する一般の関心が高まっている^{1, 2)}。たとえば、皮膚がんの既往歴のある人を対象とした疫学的介入研究では、所要量を上回る量のセレン投与が、全がんの発生率と死亡率の相対危険度を低下させることが認められている³⁾。また、動物実験においては、高セレン土壌で栽培したセレン強化ニンニクやブロッコリに含有されるSe-メチルセレンシステインなどの特殊な含セレンアミノ酸の抗腫瘍活性が、他のセレン化合物よりも高いことが報告されている⁴⁻¹¹⁾。これらのことから、セレン強化野菜を積極的に栽培・調製してがん予防に活用すべきであるとの意見も多い。しかし、セレン強化野菜を大規模に栽培する場合、人工的に高セレン土壌を作成する必要があるため、毒性の高いセレンの環境汚染を引き起こす危険性が高い。カイワレダイコンや豆モヤシなどのスプラウト類は、閉鎖環境で水耕栽培できるため、環境汚染を起こすことなくセレンなどの微量ミネラルを強化できる。われわれは、すでにカイワレダイコンなど多種の野菜のスプラウトを亜セレン酸溶液で水耕することにより、Se-メチルセレンシステインを高濃度に含有するセレン強化スプラウトの調製に成功している¹²⁾。本研究では、セレン強化スプラウトの調製において、セレンの回収を容易にする目的で、カイワレダイコンの種子をセレン溶液に浸漬してセレンを蓄積させた後、脱イオン水で水耕栽培することを試みた。

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

実験方法

1. 種子へのセレンの蓄積とセレン強化スプラウトの調製

セレン濃度1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜セレン酸ナトリウム溶液にカイワレダイコンの種子を25℃で一定時間浸漬した。浸漬後、脱イオン水を浸した脱脂綿上に種子を播き、25℃で1週間栽培した。一方、これとは別にセレン濃度10 $\mu\text{g}/\text{g}$ の亜セレン酸ナトリウム溶液を含む脱脂綿上にカイワレダイコンの種子を播き1週間栽培した。

2. 種子およびスプラウト中のセレンの定量

浸漬後の種子と栽培後のカイワレダイコンスプラウトを凍結乾燥後、ミルで細粉化した。調製した乾燥粉末0.1 gを試験管にとって濃硝酸2 ml加え、90℃で加熱分解した。不溶物が消失したら、分解液を水で100 mlにメスアップし、メンブランフィルター (0.45 μm) を用いて濾過した。濾液を高周波プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) で分析し、種子およびスプラウト中のセレン含量をもとめた。なお、ICP-MSにおける検出質量数は82を用いた。

3. 種子およびスプラウト中のセレンの化学種の同定

種子またはスプラウトの乾燥粉末0.1 gに0.2M塩酸を2 ml加え、十分に攪拌した。その後、遠心分離 (3000 rpm, 10分) し、上清をメンブランフィルター (0.45 μm) で濾過した。濾液を高速液体クロマトグラフィーと高周波プラズマ質量分析装置を連結した系 (HPLC-ICPMS) で分析し、セレンの化学種を同定した。HPLC-ICPMSにおけるカラムはDevelosil RP-Aqueous (野村化学)、移動相は0.1%トリフルオロ酢酸、検出質量数は82である。なお、セレンの化学種の同定に用いる標準セレン化合物 (亜セレン酸, セレノシスチン, Se-メチルセレノシステイン, セレノメチオニン) は、いずれも0.2M塩酸に溶解し保存した。4℃で保存した場合、0.2M塩酸中でこれらセレン化合物は少なくとも1年間安定であった。

結果と考察

1. 種子のセレン濃度

Fig. 1に、種々の濃度の亜セレン酸ナトリウム溶液に浸漬したカイワレダイコン種子のセレン濃度を示した。浸漬に用いた溶液のセレン濃度、および溶液への浸漬時間に応じて、カイワレ種子中のセレン濃度は明らかに増加していた。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のセレン溶液に48時間浸漬した場合、種子のセレン濃度は乾燥重量あたり250 $\mu\text{g}/\text{g}$ をこえていた。また、高濃度のセレン溶液に長時間浸漬したとき、乾燥種子粉末は赤色味を帯びていた。浸漬時間を48時間よりもさらに延長すると、一部の種子が溶液中で発芽をはじめたり、カビが繁殖する場合があった。このため今回の実験では、浸漬時間は48時間とした。

2. 種子の発芽率

各溶液に48時間浸漬した種子の発芽率をFig. 2に示した。浸漬に用いた溶液のセレン濃度が20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの発芽率は90%以上であったが、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を超えると濃度依存的に低下し、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では約75%、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では約55%、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では約30%であり、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では0%となった。以上より、カイワレダイコンの種子の発芽は、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までのセレン濃度ではほとんど影響を受けないが、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をこえると阻害されることが確認された。

3. スプラウト中のセレン濃度

セレン濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜セレン酸ナトリウム溶液を用いてカイワレダイコンの種子を7日間水耕栽培したとき、得られたカイワレダイコンスプラウトのセレン濃度は、乾燥重量あたり80~120 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。このセレン濃度は先に報告した結果¹²⁾と同様であった。

Fig. 3は、セレン濃度10~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜セレン酸溶液に48時間浸漬後、脱イオン水を用いて栽培したカイワレダイコンスプラウトのセレン濃度を示したものである。セレン濃度は、栽培日数の延長に応じて多少低下した。たとえば、発芽阻害が生じなかった20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液に浸漬した場合、乾燥重量あたりで比較すると、栽培前の種子中では約50 $\mu\text{g}/\text{g}$ のセレン濃度であったのが、栽培7日目のスプラウトでは約40 $\mu\text{g}/\text{g}$ のセレン濃度に低下した。このスプラウト中セレン濃度は、亜セレン酸溶液で水耕栽培したときの約半分であった。種子中濃度に比較してスプラウト中濃度

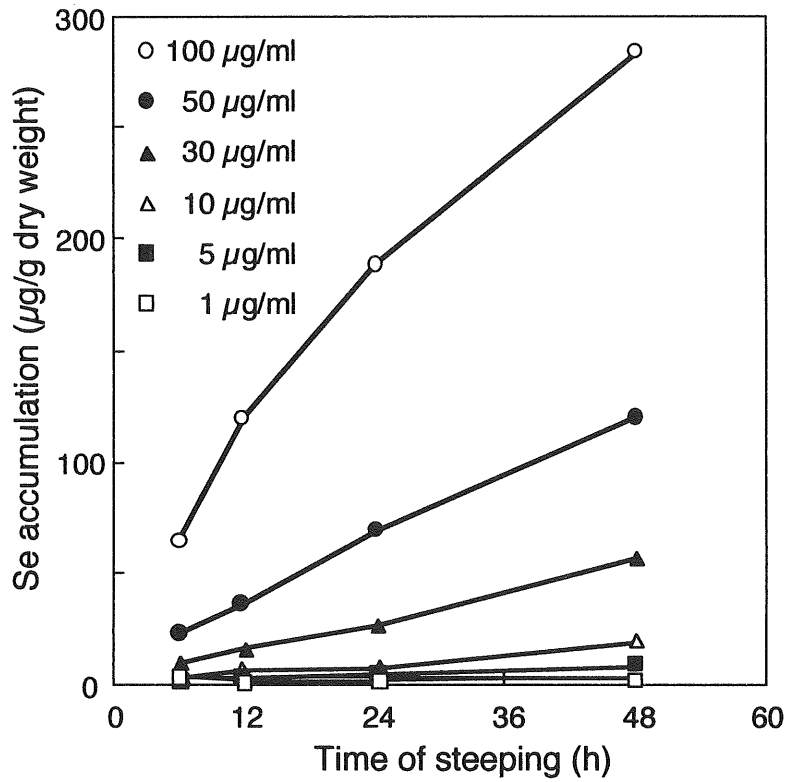


Fig. 1 Accumulation of selenium in seeds of kaiware daikon by steeping in a graded concentration of selenite solution

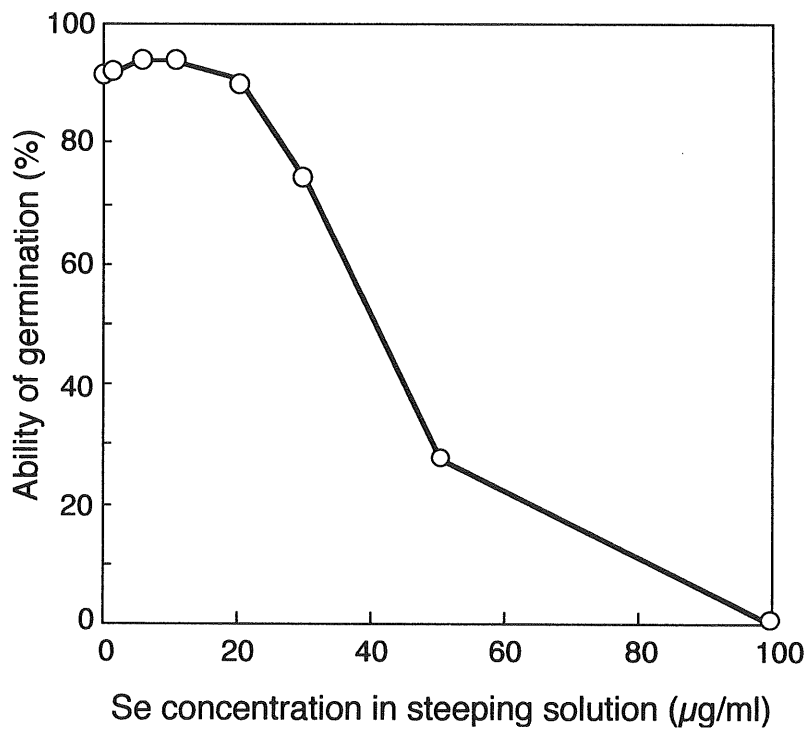


Fig. 2 Effect of steeping kaiware seeds in selenite solution on their abilities of germination. After being kept in each selenite solution for 48 h, seeds were stayed on adsorbent cotton holding deionized water at 25°C. Ability of germination is defined as follows: [(numbers of seeds germinating)/(total numbers of seeds)] x 100

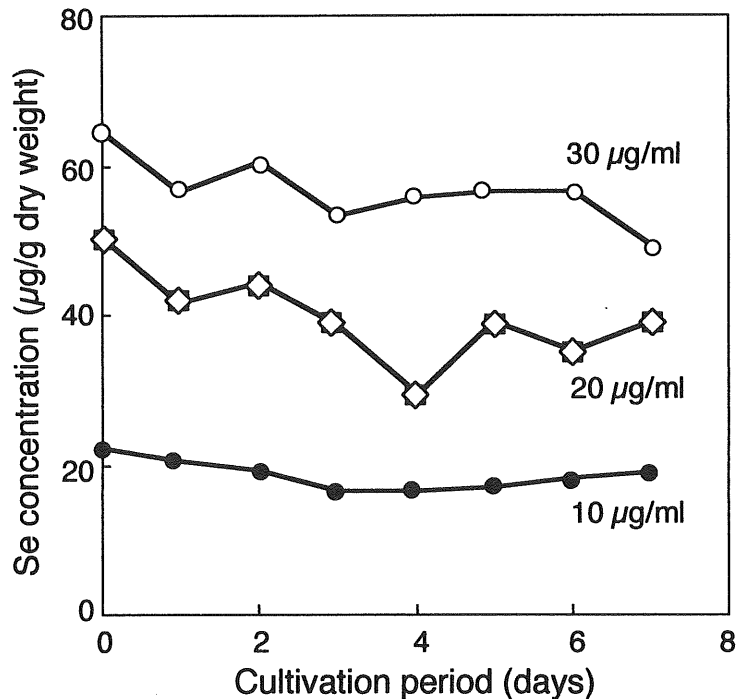


Fig. 3 Se concentration in sprouts of kaiware daikon derived from seeds kept in selenite solution at a level of 10 to 30 µg Se/ml for 48 h.

が低下するのは、スプラウトの成長とともにセレン以外の成分が増加したことによる相対的なものと考えられる。

4. セレンの分子種の同定

亜セレン酸溶液 (セレン濃度 20 µg/ml) に浸漬した種子から調製したスプラウトの 0.2M 塩酸抽出液には、含有セレンの 90% 以上が抽出された。このことは、スプラウト中のセレンが、セレン化物のような酸性条件下で揮発しやすい形態ではないことを意味している。この 0.2M 塩酸抽出液を HPLC-ICPMS を用いて分析した結果を Fig. 4 に示した。種子を亜セレン酸溶液に浸漬後、脱イオン水で栽培したスプラウト中のセレンの主形態は、亜セレン酸溶液で栽培したスプラウトと同様に Se-メチルセレンシステインであった。一方、種子に蓄積させたセレンは、0.2M 塩酸ではあまり抽出できず、HPLC-ICPMS を用いた分析でも HPLC のカラムにほとんどすべてが吸着したため、分子種の同定を直接行うことができなかった。高濃度のセレン溶液に長時間浸漬したとき、乾燥種子が赤色味を帯びていたこと、かつ 0.2M 塩酸では種子中セレンが抽出されにくいことから判断して、種子に蓄積したセレンの一部は元素状セレン (Se(0)) の形態だと考えられる。

今回、種子を亜セレン酸溶液に浸漬後、脱イオン水で栽培する方法によっても、亜セレン酸溶液で栽培する方法と同様に、Se-メチルセレンシステインを含有するセレン強化スプラウトを調製することが可能であった。種子を亜セレン酸溶液に浸漬後、脱イオン水で栽培する方法は、亜セレン酸溶液で栽培する方法に比較して、得られるセレン強化スプラウトのセレン濃度は低いものの、種子浸漬時のみセレンを用いるため、セレンの使用量が少なく、かつセレン回収も容易であることから、環境汚染の危険性がより低いセレン強化スプラウトの調製法といえる。

本研究は、平成 16 年度関西大学学術研究助成基金 (共同研究) において、研究課題「穀・豆類の芽生えの機能解析とこれを利用した機能性微量有用物質の生産」として研究費を受けたものの成果として公表するものである。

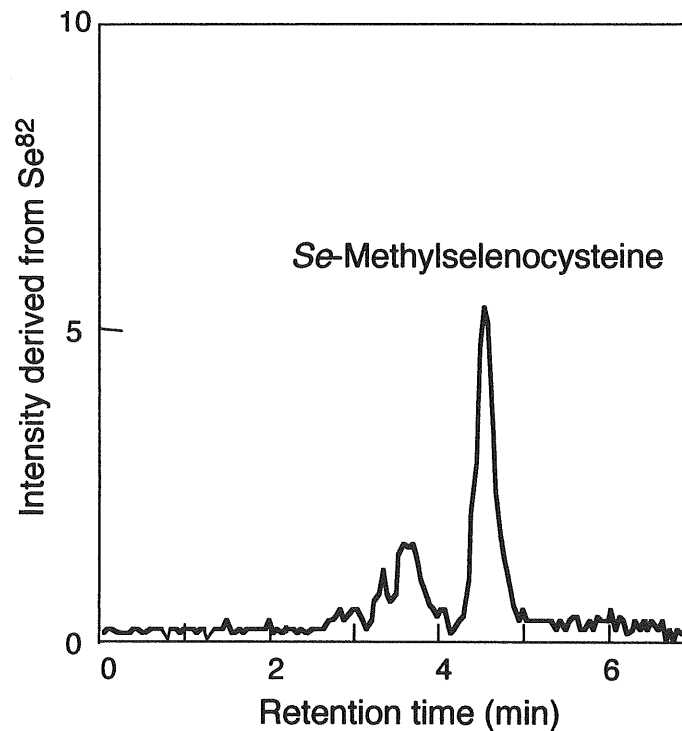


Fig. 4 HPLC-ICPMS chromatogram of 0.2 N HCl extract from Se-enriched kaiware daikon sprouts

参考文献

- 1) Combs GF Jr and Gray WP (1998) Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* 79: 179 - 192.
- 2) Schrauzer GN (2000) Anticarcinogenic effects of selenium. *CMLS Cell Mol Life Sci* 57: 1864 - 1873.
- 3) Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs GF Jr, Slate EH, Fischbach LA, Marshall JR, Clark LC (2002) Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the nutritional prevention of cancer trial. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 11: 630 - 639.
- 4) Cai XJ, Block E, Uden PC, Quimby BD, Sullivan JJ (1995) Allium chemistry: Identification of natural abundance organoselenium compounds in human breath after ingestion of garlic using gas chromatography with atomic emission detection. *J Agric Food Chem* 43: 1751 - 1753.
- 5) Cai XJ, Block E, Uden PC, Zhang X, Quimby BD, Sullivan JJ (1995) Allium chemistry: Identification of selenoamino acids in ordinary and selenium-enriched garlic, onion and broccoli using gas chromatography with atomic emission detection. *J Agric Food Chem* 43: 1754 - 1757.
- 6) Whanger PD (2002) Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am Coll Nutr* 21: 223 - 232.
- 7) Ip C, Birringer M, Block E, Kotrebai M, Tyson JF, Uden PC, Lisk DJ (2000) Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer. *J Agric Food Chem* 48: 2062 - 2070.
- 8) Whanger PD, Block E, Ip C, Welbaum G (2000) Tumorigenesis, metabolism, speciation, bioavailability, and tissue deposition of selenium in selenium-enriched rampa (*Allium tricoccum*). *J Agric Food Chem* 48: 5723 - 5730.
- 9) Dong Y, Lisk D, Block E, Ip C (2001) Characterization of the biological activity of γ -glutamyl-Se-methylselenocysteine: A novel naturally occurring anticancer agent from garlic. *Cancer Res* 61: 2923 - 2928.

- 10) Finley JW, Davis CD, Feng Y (2000) Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *J Nutr* 130: 2384 - 2389.
- 11) Finley JW, Ip C, Lisk DJ, Davis CD, Hintze KJ, Whanger PD (2001) Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. *J Agric Food Chem* 49: 2679 - 2683.
- 12) Sugihara S, Kondô M, Chihara Y, Yûji M, Hattori H, Yoshida M (2004) Preparation of selenium-enriched sprouts and identification of their selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 193 - 199.