

信州大学審査学位論文

ナスに含まれるアセチルコリンの含有量調査と降圧作用における
 γ -アミノ酪酸との併用効果

令和5年3月

信州大学大学院

総合医理工学研究科

総合理工学専攻

WANG WENHAO

王 文豪

目次

序論.....	1
1. ナス.....	1
2. アセチルコリン.....	2
3. ナスに含まれるアセチルコリン.....	3
4. 機能性表示食品.....	4
5. 本研究の目的.....	5
第一章 LC-MS/MS を用いた日本産生鮮農産物中のコリン化合物含有量調査.....	6
実験材料および方法.....	6
1. 試薬.....	6
2. 実験テクニック概要.....	7
3. PCh, BCh, LCh, EN 合成.....	7
3-1. 塩化 PCh 合成.....	7
3-2. 塩化 BCh 合成.....	8
3-3. 塩化 LCh 合成 (Nakamura, Okitsu et al., 2016)	8
3-4. 塩化 EN 合成.....	9
4. 分析試料.....	11
5. 分析試料調製.....	11
5-1. 生鮮農産物試料調製.....	11
5-2. 試薬調製.....	12
5-3. 振盪抽出.....	12
5-4. 固相抽出.....	13
6. LC-MS/MS 測定.....	13
6-1. 定量試料調製.....	13
6-2. LC-MS/MS 分析条件.....	14
6-3. 標準添加法.....	14
7. 分析法バリデーション	15
7-1. 直線性.....	15
7-2. LOD と LOQ.....	15
7-3. 精度.....	15
7-4. 真度.....	15
8. 統計処理.....	16
実験結果.....	17
1. 生鮮農産物中のコリン化合物含有量	17
2. ナス 6 品種中のコリン化合物含有量	20
3. ヒゴムラサキ試料中のアセチルコリン含有量の経時変化.....	20

考察.....	21
第二章　ナス中新規機能性化合物であるアセチルコリンの分布と含有量調査.....	23
実験材料および方法.....	23
1. 試薬.....	23
2. 分析試料.....	24
3. 分析試料調製.....	25
3－1. ナス試料調製.....	25
3－2. 試薬調製.....	26
3－3. 振盪抽出.....	26
3－4. 固相抽出.....	26
4. LC-MS/MS 測定.....	27
4－1. 定量試料調製.....	27
4－2. LC-MS/MS 分析条件.....	28
4－3. 標準添加法.....	28
5. 統計処理.....	29
実験結果.....	29
1. 26 品種ナスにおける ACh 含有量.....	29
2. ナス（千両 2 号）とトマト（ホーム桃太郎）の ACh 含有量.....	30
3. ナス果実（土佐鷹）6 部位中の ACh とコリン含有量.....	31
4. ナス果実（土佐鷹）の基部，中部，果頂部の ACh とコリン含有量.....	32
5. 加熱調理によるナス（土佐鷹）中 ACh 含有量.....	32
考察.....	33
第三章　ナスコアコレクションにおける新規食品機能性成分アセチルコリン含有量調査.....	36
実験材料および方法.....	36
1. 試薬.....	36
2. 分析試料.....	37
3. ナスコアコレクション生育条件.....	38
4. 分析試料調製.....	38
4－1. 試料調製.....	38
4－2. 試薬調製.....	39
4－3. 振盪抽出.....	39
4－4. 固相抽出.....	40
5. LC-MS/MS 測定.....	40
5－1. 定量試料調製.....	40
5－2. LC-MS/MS 分析条件.....	41
5－3. 標準添加法.....	42
6. 統計処理.....	42

実験結果.....	43
1. ナスコアコレクションの ACh, Ch 含有量.....	43
2. ナス中 ACh とコリンの関係.....	47
3. 地域別 ACh とコリン含有量調査.....	47
4. 形状別 ACh とコリン含有量調査.....	50
5. 果皮色別 ACh とコリン含有量調査.....	53
考察.....	54
第四章 ナス降圧作用に対する GABA の影響評価.....	58
試薬および方法.....	58
1. 試薬.....	58
2. 試験動物.....	59
3. 試験試料の調製.....	59
4. ACh および GABA 含有量の定量.....	60
5. LC-MS/MS 分析条件.....	60
6. 併用効果調査試験.....	61
7. ナス中 GABA 降圧作用効果確認単回経口投与試験.....	62
8. ナス中 GABA 降圧作用効果確認反復経口投与試験.....	62
9. 統計処理.....	62
実験結果.....	63
1. SHR における ACh と GABA の併用効果調査.....	63
2. 試験試料中 ACh および GABA 含有量の定量結果.....	65
3. 単回経口投与試験による短期的な収縮期血圧変化.....	66
4. 反復経口投与試験による中長期的な収縮期血圧変化.....	66
考察.....	67
総括.....	71
参考文献.....	74
謝辞.....	83
補充資料.....	84

序論

1. ナス

ナス (*Solanum melongena* L.) はトマトやピーマンなどを含むナス科ナス属に属する植物である。ナス科 (*Solanaceae*) は双子葉植物綱キク亜綱ナス目に属する一つの科であり, 115 属 2678 種からなる大きな群である (The Plant List, 2022)。ナス科に属するナスの特徴は, 繊維状の根を持つ低木, 草本または半木本植物で, 高さは 0.5~2.0 m, 花序は 1 から数輪で, 両性花と雄性花の比率は品種によって異なる。花は紫色で, 一般に 5 弁 (萼片 5 枚, 花弁 5 枚, 雄蕊 5 本) であるが, 近年の栽培品種では 6 弁, 7 弁, 8 弁のものもある。果実は下垂した多肉質の果実で, 色は緑, 白, 黄, ピンク, 紫から濃い紫まであり, 皮にはさまざまな斑点や縞模様がある。形は球形, 楕円形, 長円形から円筒形まで様々である。果実の大きさは, 長さ 4~45 cm, 直径 3~12 cm, 重さ 15~1500 g である。 (Samuel et al., 2012)。

ナスは先史時代からアジア地域で 1500 年以上栽培されてきた重要な経済作物であり, 最古の記録は西暦紀元にさかのぼるサンスクリット語の文書に記載され (Bhaduri, 1951; Khan, 1979), インド東北部とビルマからタイ北部, ラオス, ベトナム, 中国西南部が起源地と言われている (Daunay et al., 2007)。現在, ナスは世界で広く栽培され, 2020 年度の生産量は 56,618,843 トンで, 主要な野菜の中で 6 位に達している (Food and Agriculture Organization [FAO] statistic, 2020)。ナスは食物繊維を豊富に含む野菜として知られ (NIDDK, 2017; Database: USDA 2017-2018 FNDDS At A Glance - Ingredient Nutrient Values), 高コレステロール血症患者のコレステロール低下 (Guimarães et al., 2000) と女性の体脂肪低下 (Scorsatto et al., 2019) が臨床試験で検証された。さらに, ナスには, 抗炎症および抗酸化特性を持つクロロゲン酸 (Singh et al., 2009; Yun et al., 2012), 降圧作用がある γ -アミノ酪酸 (GABA) (Inoue et al., 2003; Horie et al., 2013), 抗血管新生活性を有するナスニン (Matsubara et al., 2005; Casati et al., 2016) などの機能性成分が含まれている。

7世紀から8世紀ごろに中国から伝わった（猪股，2012）ナスは，現在では，日本全国で広く栽培されている重要な経済作物の一つである．令和3年産の日本ナスの作付面積，収穫量および出荷量は，それぞれ8,260ヘクタール，297,700トン，237,800トンに達し，そのうち，出荷量上位3地域は高知県（37,400トン），熊本県（30,700トン），群馬県（23,500トン）である（農林水産省，令和4年4月28日公表）．現在，日本で栽培されているナスの種類は多く，70種類以上もあり（野菜だより編集部，2015），日本の食文化における非常に重要な野菜として知られている．

2. アセチルコリン

アセチルコリン（ACh）は酢酸と第四級アルキルアンモニウム化合物であるコリンのエステル化合物である．生体内ではアセチル CoA とコリンを原料としてコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）によって合成される．そして，コリンエステラーゼ（CE）によって速やかにコリンに分解される．ACh 合成原材料であるコリンは必須栄養素として知られている．Adolph Strecker によりブタおよびウシの胆汁中から発見されたため，胆汁を意味する *choler* からコリン（choline）と命名された（Strecker, 1862）．コリンは細胞膜の主要な構成成分であるホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンを合成する重要な原料である．コリン欠乏食を与えられたラットは肝臓と腎臓の機能不全が発症することが知られる（Zeisel, 1988），臨床試験ではコリンが含まれない栄養液を中心静脈内で長期投与を受けた患者において肝臓に脂肪沈着が認められ，肝細胞の損傷を起こすことが確認された（Zeisel, Da Costa, et al., 1991; Zeisel, 2000）．また，コリン欠乏はミトコンドリア膜電位の低下を引き起こし（Guo et al., 2005），アポトーシスを誘導することが明らかにされた（Emanuele et al., 2004; Mäntymaa et al., 2000）．コリンエステルは脂肪酸とコリンのエステル化合物の総称である．近年，ソバスプラウトを原料とした乳酸菌発酵食品から，天然物としては初めてラクトイルコリン（LCh）が発見され，自然発症高血圧ラット（SHR）に対して優れた降圧効果があることが確認された（Nakamura, Naramoto et al., 2013;）

Nakamura, Okitsu et al., 2016). ACh は広く知られているコリンエステルであり、神経伝達物質でもある。哺乳類だけでなく、他の多くの生物の神経系にも存在している (Horiuchi et al., 2003; Yamada et al., 2005). Ewins は、麦角の静脈注射によって、天然の血圧降下化合物であることを初めて発見し (Ewins, 1914), Loewi は ACh が神経活動に影響を与える化学伝達物質であることを確認した (Loewi, 1921). 1929 年に Dale と Dudley がウマの脾臓からヒスタミンとは異なる血圧降下物質を単離し、それが ACh であることを化学的に証明した (Dale et al., 1929). Dale はこれらの結果から、ACh が副交感神経終末から放出される神経伝達物質であることを発表した (Dale, 1935). 現在、神経系における ACh の機能の全貌が明らかになり、神経伝達物質としての認識が一般に広く認知されるようになった。

3. ナスに含まれるアセチルコリン

Horiuchi らの研究により数種類の植物には ACh が含まれており、ナスには ACh が多く含まれていることが確認された (Horiuchi et al., 2003). 経口摂取した ACh は生体内に偏在的な CE によってコリンに分解され、ほとんど吸収されないとされており、日本では注射剤として冠攣縮薬物誘発試験、円形脱毛症の治療、麻酔後の腸管麻痺、消化管機能低下のみられる急性胃拡張に使われている (日本薬局方：注射用アセチルコリン塩化物). 先行研究では SHR を用いてナス乾燥粉末の単回経口投与試験と反復経口投与試験を行い、有意な血圧降下作用を確認した。さらに、その血圧降下作用を発揮した物質は経口投与した ACh であることが推定され (Yamaguchi et al., 2019), ナスには ACh を関与成分とする血圧降下効果があることが示唆された。これらの結果に基づいて、血圧が高めの人を対象としたプラセボ対照二重盲検並行群間比較試験 (プラセボ対照 RCT) が行われ、2.3 mg の ACh を含むナス粉末の継続摂取により血圧や心理状態が改善することが明らかとなり、世界で初めてナスの食品機能性がプラセボ対照 RCT で実証され、ナスに含まれる ACh が降圧作用を有する新規な食品機能性成分であると報告された (Nishimura et al., 2019). ACh の降圧メカニズ

ムは、経口投与した ACh が消化管上の M₃ ムスカリン性 ACh 受容体 (M₃mAChR) に作用することにより求心性迷走神経を刺激し、自律神経反射を介して遠心性交感神経活動を阻害し、末梢交感神経からの昇圧物質であるノルアドレナリン (NAD) 分泌を阻害することであるとされている (Yamaguchi et al., 2022). こうしてナスに含まれる ACh は、血圧降下作用を有する新規な機能性食品成分であることが明らかにされた.

4. 機能性表示食品

機能性表示食品は事業者の責任で、食品の安全性と機能性に関する科学的根拠などを基に商品パッケージに機能性を表示するものとして消費者庁に届け出して受理された食品である. 2015 年 4 月 1 日から施行された改正食品表示法に基づいて、新たに機能性表示食品制度が導入された. それまでは食品の機能性を表示できる食品は、保健機能食品である特定保健用食品と栄養機能食品に限られていたが、機能性表示食品が追加され新たな市場が創出された. 現在、機能性食品の届出件数は、2015 年の 172 件から 2022 年には 5,767 件と約 34 倍に増加しており、機能性食品の市場は急速に拡大している. しかし、5,767 件の機能性表示食品届出のうち生鮮食品は 150 件のみであり、機能性関与成分の約 1/3 は GABA (53 件) である (消費者庁：機能性表示食品の届出情報データベース；2022 年 8 月 25 日閲覧). 現在、日本では少子高齢化が進展しており人々の健康意欲が高まり、機能性表示食品の市場は今後もさらに拡大することが見込まれている. 機能性表示食品制度が施行されて以来、機能性表示食品となった生鮮食品の売り上げが 1.6 倍に増加した事例が確認された (重富, 2018). さらに、高田の調査により、健康志向の高い消費者は機能性表示野菜に対して 30% 程度の価格プレミアムを受容するという結果が得られており (高田, 2018)、価格が低迷している生鮮食品の機能性表示による高付加価値化と需要増加が期待される. そのため、生鮮食品の機能性表示食品届出の増加と機能性関与成分の多様性が今後の重要な課題の一つと考えられる.

5. 本研究の目的

これまでの先行研究の成果により、ナスに含まれる ACh は血圧降下効果を持つ新規な食品機能性成分であることが明らかとなった。しかし、ナス中の ACh に関する調査研究の事例は殆どなく、ナス中の ACh 含有量レベルと分布は不明である。そこで、本研究ではナス中の ACh 含有量を明らかにするため、LC-MS/MS を用いてナス中の ACh および前駆体であるコリンを調査した。また、ナスは血圧降下作用を持つ GABA も含んでおり (Inoue et al., 2003; Horie et al., 2013; Yamaguchi et al., 2019), ナス中 GABA の降圧作用の影響も確認した。これらの結果に基づいてナスが機能性野菜として健康維持増進に有用である可能性を考察した。

第一章 LC-MS/MS を用いた日本産生鮮農産物中のコリン化合物含有量調査

コリン化合物（コリンおよびコリンエステル）は自然界に広く存在し、ヒトの健康維持に様々な機能を発揮する可能性がある。アメリカ農務省食品成分データベースによると、コリンは 630 種類の食品に含まれている（USDA Database for the Choline Content of Common Foods Release Two）。Zeisel らは、145 種類食品のコリン含有量を調査し、乾燥大豆が最も高い含有量（116 mg/100 g）であることを発見した（Zeisel et al., 2003）。一方、コリンエステル含有量に関する研究はまだ少ない。ナスは 13 種類の植物中では ACh 含量が比較的高いと報告されたが（Horiuchi et al., 2003）、他の生鮮農産物と比較した ACh 含有量レベルは不明であった。そこで、本章では 19 種類の日本産生鮮農産物におけるコリン化合物（コリン、ACh、プロピオニルコリン [PCh]、ブチリルコリン [BCh]、LCh；図 1-1）の含有量を調査した。また、乳酸菌発酵食品で発見された LCh が生鮮農産物にも含まれていることを確認するため、LCh の定量も行った。

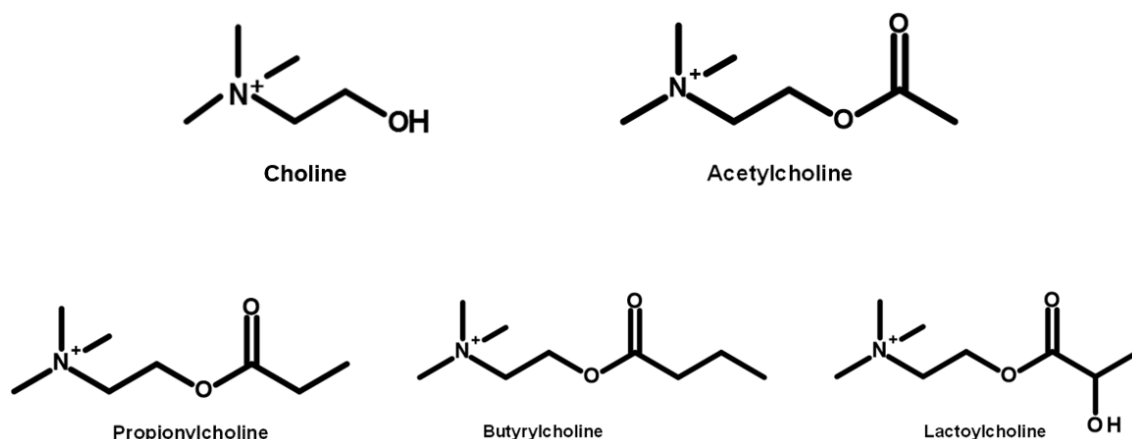


図 1-1. コリン、ACh、PCh、BCh、および LCh の化学構造.

ACh:acetylcholine; PCh:propionylcholine; BCh:butyrylcholine; LCh:Lactoylcholine.

実験材料および方法

1. 試薬

超純水は超純水製造装置（sartorius arium 611, Sartorius Co., ドイツ）から製造し

た．メタノール，塩化コリン，プロピオン酸，*n*-酪酸，酢酸エチル (EtOAc)，ギ酸，1-N 塩酸，*n*-ブタノールはナカライテスク株式会社（京都）より購入した．*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) はペプチド研究所（大阪）より購入した．4-N HCl/ジオキサン，*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) は渡辺化学工業株式会社（広島）より購入した．*N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) は国産化学株式会社（東京）より購入した．塩化 ACh，ピバリン酸，重水素酸化物は関東化学株式会社（東京）より購入した．(2-アミノエチル) トリメチルアンモニウムクロリド塩酸塩はシグマ アルドリッチ（オークビル）より購入した．ジクロロメタン (DCM)，リン酸二水素ナトリウム，リン酸水素二ナトリウム，トルエン，ヨウ化水素酸は富士フイルム和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した．D-乳酸，*p*-トルエンスルホン酸一水和物は東京化成株式会社（東京）より購入した．PCh，BCh，LCh，(2-aminoethyl) trimethylammonium pivaloylamide (EN) は所属研究室で合成された．合成法については後述した．

2. 実験テクニック概要

高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS)，核磁気共鳴 (NMR)，およびマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析 (MALDI-TOF MS) は信州大学基盤研究支援センター機器分析支援部門で実施された．LC-MS/MS 分析は Acquity UPLC システム (Waters, Co., USA) と Quattro micro API (MS) で実行された．NMR スペクトルは Bruker DRX 500 分光計 (Bruker BioSpin Corp., Billerica, MA, USA) を使用し，¹H (500MHz) と ¹³C (126MHz) の測定は 25°C で行った．高分解能 MALDI-TOF MS 分析は 1 kHz neodymium:yttrium-aluminum-garnet laser を搭載した AB Sciex TOF/TOF 5800 で実行された．

3. PCh, BCh, LCh, EN 合成

3-1. 塩化 PCh 合成

塩化コリン (Molecular Weight [Mw]: 139.62, 140 mg, 1.0 mmol) を DMF (2 mL) に溶

解し、プロピオン酸 (2.0 equivalent [eq], Mw: 74.08, density [d] = 0.990, 150 μ L, 2.0 mmol) を滴下した. DCC (2.0 eq, Mw: 206.33, 413 mg, 2.0 mmol) と DMAP (0.1 eq, Mw: 122.17, 12 mg, 0.1 mmol) を加え, 室温で2時間攪拌した. 4 N HCl/Dioxane (0.25 mL) を加え, 吸引濾過で DCurea を濾別した. 減圧濃縮後, EtOAc (10 mL) を加え結晶化し, 上清をデカンテーション (沈殿を沈降させ, 上清液のみを静かに傾けて分離する) で取り除いた. 再結晶 (DCM : EtOAc = 1 : 1) し, 塩化プロピオニルコリンを収率 92 % (0.92 mmol, 180 mg), 白色結晶で得た.

3-2. 塩化 BCh 合成

塩化コリン (Mw: 139.62, 140 mg, 1.0 mmol) を DMF (2 mL) に溶解し, *n*-酪酸 (2.0 eq, Mw: 88.11, d = 0.960, 184 μ L, 2.0 mmol) を滴下した. DCC (2.0 eq, Mw: 206.33, 413 mg, 2.0 mmol) と DMAP (0.1 eq, Mw: 122.17, 12 mg, 0.1 mmol) を加え, 室温で2時間攪拌した. 4 N HCl/Dioxan (0.25 mL) を加え, 吸引濾過で DCurea を濾別した. 減圧濃縮後, EtOAc (10 mL) を加え結晶化し, 上清をデカンテーションで取り除いた. 再結晶 (DCM : EtOAc = 1 : 1) し, 塩化ブチリルコリンを収率 89 % (0.89 mmol, 187 mg), 白色結晶で得た.

3-3. 塩化 LCh 合成 (Nakamura, Okitsu et al., 2016)

塩化コリン (Mw: 139.62, 2.79 g, 20.0 mmol), 凍結乾燥した D-乳酸 (18.02 g, 400 mmol), *p*-トルエンスルホン酸一水和物 (11.41 g, 60.0 mmol) をトルエン 150 mL に溶解し, 還流条件下で24時間攪拌した. 生成した水はディーンスターク管を用いることで, 反応系外に除去した. 攪拌後, 反応液を減圧濃縮し, 酢酸エチルを 40 mL 加え30分間振とうした. 遠心分離 (4°C, 4,000 rpm, 20 分) し, 上清をデカンテーションで除去した. 沈殿に再度, 酢酸エチルを 40 mL 加え30分間の振とう後, 遠心分離した, この操作を合計で3回繰り返した. 得た沈殿の液状物質を粗 D-LCh として得た. 粗 D-LCh を 100 mM リン酸緩衝液で 50 mg/mL に溶解し, 試料溶液とした. 弱酸性陽イオン交換カートリッジ Inert Sep CBA (10 g/60 mL, ジーエルサイエンス株式会社, 東京) にメタノール (200 mL) で活性化した後, 純水 (200

mL) に置換した。活性化したカートリッジ内樹脂に試料溶液を常圧で 20 mL 添加した。添加後、100 mM リン酸緩衝液を 10 mL×2 加え、試料溶液内の LCh を樹脂に吸着させた。不純物を純水 200 mL で洗浄し、0.1 M のヨウ化水素酸水溶液で LCh を溶出した。溶出液は減圧濃縮、凍結乾燥し、黄色液状物質が得られた。黄色液状物質に *n*-ブタノール：酢酸エチル=1:4 (v/v) (40 mL) を加え、攪拌後、4℃で一晩放冷した。放冷後、遠心分離 (3,000 rpm, 4℃, 20 min) を行い、上清をデカンテーションで除去することで、白色結晶の D-LCh ヨウ化物塩を収率 75%, HPLC 純度>98%で得た。

3-4. 塩化 EN 合成

(2-Aminoethyl)trimethylammonium chloride hydrochloride (1.00 eq, 1.00 mmol, 175.10 mg) を CH₃CN (2.00 mL) に溶解し、ピバリン酸 (2.00 eq, 2.00 mmol, 204.26 mg) を添加し、DMAP (0.10 eq, 0.10 mmol, 12.22 mg) を加えた。DCC (2.00 eq, 2.00 mmol, 412.66 mg) を加え、室温で 4 時間攪拌した。反応後、反応液を吸引濾過した後、濾液を減圧濃縮して EtOAc (10 mL) を加え結晶化した。上清を除去し、DCM を少量加え溶解し、徐々に EtOAc を加え、再結晶を行った。再結晶 (DCM : EtOAc = 1 : 1) し、EN を収率 96.1 % (0.961 mmol, 214 mg), 白色結晶で得た。

PCh, BCh, EN のスペクトルデータベースを表 1-1 に示した。

表 1 – 1. PCh, BCh, EN スペクトルデータ

^1H , ^{13}C NMR in D_2O (ppm)	Chemical shift						MALDI-TOF MS $[\text{M}]^+$ (m/z)
δ_{C}	8	27.1	53.7	58.2	64.5	176.4	
type	CH_3	CH_2	CH_3	CH_2	CH_2	C	found 160.1327
PCh δ_{H}	0.98	2.34	3.1	3.63	4.44		
multi	t	q	s	m	m		
(J in Hz)	(7.5)	(7.5)					required 160.1332
type	CH_3	CH_2	CH_3	CH_2	CH_2		
δ_{C}	12.7	17.9	35.5	53.7	58.1	64.5	176.4
type	CH_3	CH_2	CH_2	CH_3	CH_2	CH_2	C
BCh δ_{H}	0.74	1.45	2.25	3.03	3.56	4.38	
Multi	t	$sextet$	t	s	m	m	
(J in Hz)	(7.5)	(7.4)	(7.5)				required 174.1489
type	CH_3	CH_2	CH_2	CH_3	CH_2	CH_2	
δ_{C}	26.3	33.6	38.4	53.2	64.2	182.9	
type	CH_3	CH_2	C	CH_3	CH_2	C	
EN δ_{H}	1.04	3.04	3.34	3.55			
multi	s	s	m	m			
(J in Hz)							required 187.1805
type	CH_3	CH_3	CH_2	CH_2			

PCh: propionylcholine; BCh: butyrylcholine; EN: (2-aminoethyl)trimethylammonium pivaloylamide;
 δ : chemical shift; ^1H NMR: proton nuclear magnetic resonance; ^{13}C NMR: carbon-13 nuclear magnetic resonance.

4. 分析試料

試料はすべて市場で購入したもので、品種名および栽培地は表 1－2 に示した。

表 1－2. 分析試料品種名および栽培地

作物名	品種名	栽培地
きゅうり	ズバリ 163	長野県塩尻市
トマト	りんか 409	長野県塩尻市
パプリカ	スペシャル	長野県塩尻市
ピーマン	ベルマサリ	長野県塩尻市
アスパラガス	ウェルカム	長野県塩尻市
やまのいも	長いも	長野県塩尻市
キャベツ	信州 868	長野県塩尻市
レタス	シナノホープ	長野県塩尻市
にんじん	紅陽 2 号	長野県塩尻市
ししとう	万願寺唐辛子	長野県伊那市
りんご	シナノドルチェ	長野県松本市
日本なし	二十世紀	長野県伊那市
ぶどう	ナガノパープル	長野県南箕輪村
スプラウト類	かいわれ大根	株式会社サラダコスモ
	ブロッコリーの新芽	株式会社サラダコスモ
	アルファルファもやし	株式会社サラダコスモ
なす	豆苗	株式会社サラダコスモ
	ソバスプラウト	株式会社サラダコスモ
	千両 2 号	長野県塩尻市
	泉州水なす	大阪府泉州
	ばってんなす	熊本県宇城市
	広陵サラダ茄子	奈良県北葛城郡
	ヒゴムラサキ	熊本県阿蘇郡
	大長茄子	熊本県山鹿市
	筑陽	熊本県熊本市

5. 分析試料調製

5－1. 生鮮農産物試料調製

分析試料を水道水で表面を洗浄し、根、種、皮、ヘタを取り除いた。可食部を 1～3 cm にスライスし、-80℃で一晩冷凍保存した。冷凍した分析試料を凍結乾燥機（FDU-2000; Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan）で凍結乾燥した。凍結乾燥物はミルミキサー（MNN-2001; Tokyo Unicom Co., Ltd., Tokyo, Japan）で粉碎し、凍結乾燥粉末にした。また、ナスを常温保存した時の ACh 含有量の

経時変化を調べるため、新聞紙に包んで常温、暗所に保管し、1日1個体ずつ、5日目までのサンプルリングを行った。乾燥収率は補充資料表 S1 に示した。

5－2．試薬調製

1 M リン酸バッファー (PBS) : リン酸二水素ナトリウム 2042.06 mg とリン酸水素二ナトリウム 4681.84 mg を 50 mL の超純水に溶解した。

10 mM PBS : 1 M PBS を超純水で 100 希釈して調製した。

50 mM HCl : 2 mL の 1 M HCl に 38 mL の超純水を添加して調製した。

5－3．振盪抽出

凍結乾燥粉末 (10 mg) を 1.5 mL チューブに量り取り、8 μ g/mL EN 内部標準 (10 μ L) を加えた。10 mM リン酸緩衝液 (190 μ L) を添加し、ボルテックスで 3 分間攪拌した後、遠心分離 (1000 $\times g$, 室温, 3 min) し、上清を得た。残渣に再び 10 mM リン酸緩衝液 (200 μ L) を添加し攪拌、遠心分離、上清採取の操作を 2 回繰り返した。採取した上清をすべて合わせ (約 600 μ L), 抽出試料とした (図 1－2)。

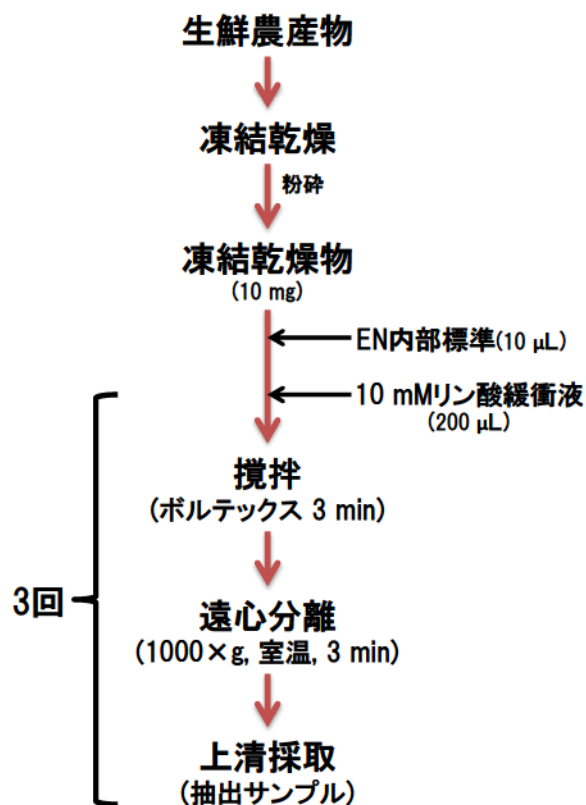


図 1－2．振盪抽出手順.

5-4. 固相抽出

固相抽出カートリッジは弱酸性陽イオン交換カートリッジ Inert Sep CBA 100 mg/1 mL (GL Science) を用いた。メタノール (1 mL)，超純水 (1 mL) で活性化した固相抽出カートリッジを 10 mM PBS (8 mL) で平衡化した後，振盪抽出で調製した抽出試料 (約 600 μ L) を添加した。10 mM PBS (600 μ L) で安定化，超純水 (2.5 mL) で洗浄後，塩酸 (500 μ L) で溶出し，1 mL メスフラスコを用いて LC-MS/MS 分析溶媒で精確に 1 mL にフィルアップした (図 1-3)。

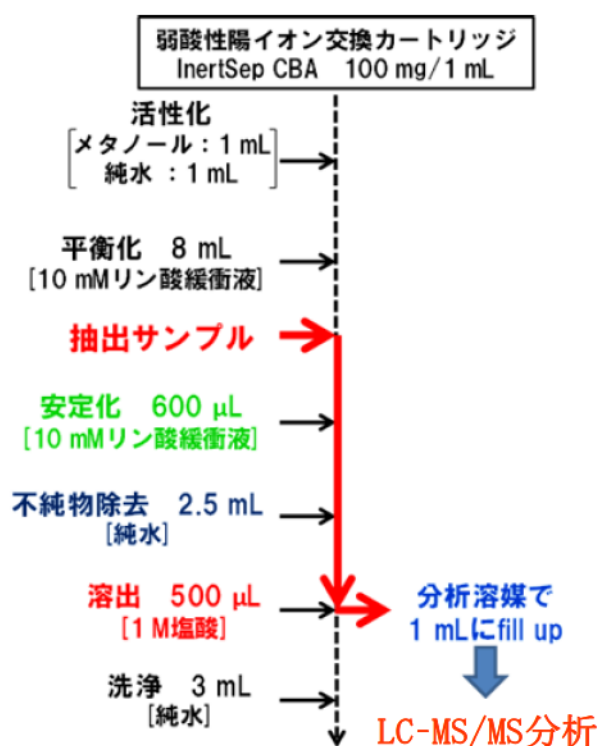


図 1-3. 固相抽出手順.

6. LC-MS/MS 測定

6-1. 定量試料調製

固相抽出液を 300 μ L ずつ 3 つに分けた。それぞれに，コリン化合物混合溶液を添加し，溶出液が 2 倍希釈になるように LC-MS/MS 分析溶媒を加え (表 1-3)，定量試料を作成した。コリン化合物混合溶液は表のように作成し，コリン化合物混合溶液無添加試料の分析結果によって各コリン化合物ストック溶液の添加濃度を決定した。コリン化合物ストック溶液は LC-MS/MS 分析溶媒に溶解して各濃度に調製した (表 1-4)。

表 1－3. 定量試料への各溶液添加量

添加溶液	各試料標品添加量 (μL)		
	A	B	C
溶出液	300	300	300
コリンエステル混合溶液	0	51	102
LC-MS/MS 分析溶媒	300	249	198
全液量	600	600	600

表 1－4. コリンエステル混合溶液調製方法

コリンエステル溶液	混合液量 (μL)
EN ストック溶液	40
ACh ストック溶液	10
PCh ストック溶液	20
BCh ストック溶液	20
LCh ストック溶液	70
Choline ストック溶液	10
合計溶液量	170

6－2. LC-MS/MS 分析条件

カラムは YMC-Triart PFP (4.6 mm×250 mm, 5 μm) を用いた. 分析溶媒に 0.01%ギ酸-33%メタノール含有水を用い, 流速は 0.5 mL/min (LC), 0.3 mL/min (MS), 注入量は 50 μL, 分離温度は 40℃, 分析時間は 30 min, イオン化モードは ESI+・MRM, Capillary Voltage は 3500 V, Cone Voltage は 10 V, Collision Voltage は 10 V, N₂ gas flow (desolvation) は 600 L/hr, N₂ gas flow (cone) は 50 L/hr, N₂ source temp は 120℃, N₂ desolvation temp が 350℃の条件で LC-MS/MS 分析を行った. 各コリン化合物の質量電荷比 (m/z) の多重反応モニタリングモード遷移は次のとおり: 187.18 → 128.15 (EN) ; 146.10 → 87.00 (ACh) ; 160.10 → 101.00 (PCh) ; 174.10 → 115.00 (BCh) ; 176.10 → 117.05 (LCh) ; 104.20 → 60.20 (Ch).

6－3. 標準添加法

LC-MS/MS 分析によって得られたクロマトグラフのピーク面積値から検量線を作成し, 標準添加法によってコリン化合物を定量した. EN 内部標準の検量線から算出した回収率で各コリン化合物濃度を補正し, 定量試料中の正解なコリン化合物濃度を算出した. 得られた濃度を凍結乾燥物中の含量 (mg/g dry weight [DW]) に換算後, 凍結乾燥前後の収率より, 新鮮重量 100 g 当たりの各コリン化

合物量 ($\mu\text{g}/100 \text{ g fresh weight [FW]}$) を算出した.

7. 分析法バリデーション

コリン化合物定量に使用された定量法の分析法バリデーションは直線性 (決定係数; R^2), 検出限界 (LOD), 定量限界 (LOQ), 精度 (日内および日間再現性), および真度 (回収率と相対標準偏差) で評価された.

7-1. 直線性

コリンエステル混合標準溶液 (ACh, PCh, BCh, LCh) を LC-MS/MS 分析溶媒で 0.01, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した. 食品中のコリン含有量が高いため, コリン標準溶液の濃度を 0.01, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 3, 15, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した. LC-MS/MS を用いて各濃度の標準コリン化合物溶液のピーク面積値を求め, 回帰直線を作成し, R^2 を算出した.

7-2. LOD と LOQ

標準溶液: 各標準コリン化合物溶液 ($n = 3$; 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は IUPAC 推奨式 (IUPAC Compendium of Chemical Terminology Gold Book) を用いて計算した ($\text{LOD} = 3.29 \sigma / S$, $\text{LOQ} = 10 \sigma / S$ σ : 標準偏差, S : 検量線の傾き).

ナス試料: ナスの試料を 3 回連続定量し, 標準溶液と同じ方法で LOD と LOQ を計算した.

7-3. 精度

標準溶液: 混合コリン化合物標準溶液 (ACh, PCh, BCh, LCh, choline) を 10 mM PBS で 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し, 日内および日間再現性で精度を評価した. 日内再現性はコリン化合物標準溶液を同日内に 3 回分析した定量値, 日間再現性は 3 日間にわたり, それぞれの日に 1 回分析した定量値の相対標準偏差 (RSD%) で評価した.

ナス試料: ナス試料を 3 日間にわたり, それぞれの日に 3 回分析した. 日内再現性は毎日の定量値の RSD% ($n = 3$), 日間再現性は 3 日間定量値の RSD% で評価した ($n = 9$).

7-4. 真度

標準溶液: 混合コリン化合物標準溶液 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を連続 5 回分析し, 回収率と RSD% を算出した.

ナス試料: ナス乾燥粉末を 2 つに分け, 標準溶液 (102 μL ; ACh: 2 μg , Ch: 30 μg , PCh: 0.0018

μg, BCh: 0.0018 μg; $n = 3$) を片方のみに加えた. 回収率は両方の差を添加した標準溶液の理論濃度で割って求めた. RSD %は得られた回収率の値 ($n = 3$) で算出した.

8. 統計処理

全ての結果は平均値と標準誤差で示し, 分散分析により, すべての結果の p 値が < 0.05 であり, 統計的有意性が示された. Tukey' s honestly significant difference test (IBM SPSS Statistics 24, IBM Corp., Armonk, NY, USA) および Student' s t -test (Microsoft Excel 2019 MSO 16.0.13328.20262) で有意差評価した場合, 標準差は $p < 0.05$ で有意と見なされた.

実験結果

1. 生鮮農産物中のコリン化合物含有量

分析法バリデーションの結果を表 1－5. に示した. すべての結果はアメリカ食品医薬品局ガイドラインの基準を参照している (Bioanalytical Method Validation Guidance Industry). ナス試料の直線性 R^2 は標準添加法で得られた検量線を毎回 0.99 以上に保証し, すべてのナス試料定量値の RSD% が 15%以下と確認した.

表 1－5. 分析法バリデーション

Types		Standard solutions					Eggplant samples			
Choline Compounds		ACh	PCh	BCh	LCh	Choline	ACh	PCh	BCh	Choline
Linearity	Range	0.010-3.0	0.010-0.50	0.010-0.50	0.010-6.0	0.010-30				
	($\mu\text{g/mL}$)									
	R^2	1	1	1	1	1				
Precision	Intraday	0.073	0.92	0.38	0.76	0.48	0.81	1.8	3.3	3.2
	(%)									
	Interday	0.52	1.3	0.68	1.6	1.2	7.3	5.4	4.2	15
	(%)									
Accuracy	Recovery	97	97	97	96	97	84	96	91	81
	(%)									
	RSD (%)	0.47	0.93	1.2	1.1	0.69	6.3	12	12	0.24
Limit	LOD	39	71	77	42	54	6.7×10^3	3.2	8.6	2.1×10^4
	(pmol/mL)									
	LOQ	13×10	24×10	26×10	14×10	18×10	2.3×10^4	11	30	7.3×10^4
	(pmol/mL)									

ACh: acetylcholine; PCh: propionylcholine; BCh: butyrylcholine; LCh: lactoylcholine; RSD: relative standard deviation; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

生鮮農産物 19 種類のコリン化合物の定量結果を表 1－6 に示した。LCh は全ての生鮮農産物中に検出されなかった。LCh は乳酸菌によって産生されるため、生鮮農産物には存在しないと考えられる (Nakamura, Okitsu et al., 2016)。定量した 19 種類の生鮮農産物全てに ACh とコリンを確認した。PCh は 17 種類の生鮮農産物で検出され、BCh は 12 種類の生鮮農産物で検出された。19 種類の生鮮農産物で最も豊富なコリン化合物はコリン (平均: 65 mg/100 g FW) であり、最も豊富なコリンエステルは ACh (平均: 0.32 mg/100 g FW) である。

生鮮農産物 19 種類の中、コリンエステル含有量上位はナス (eggplant) (6.1 mg/100 g FW)、やまのいも (Japanese yam) (8.4×10^{-2} mg/100 g FW)、ししとう (Shishito pepper) (5.5×10^{-3} mg/100 g FW) の順であった。ナスは他の生鮮農産物と比較して ACh 含有量が有意な高値を示した ($p < 0.01$)。PCh 含有量では 15 種類の生鮮農産物により有意な高値、3 種類により有意な低値が認められた ($p < 0.01$)。BCh 含有量では 1 種類の生鮮農産物に有意な高値、6 種類に有意な低値が認められた ($p < 0.01$)。また、ナスのコリン含有量は 15 種類の生鮮農産物に有意な低値が認められた ($p < 0.05$: ししとう; $p < 0.01$: その他)。

ナスの ACh 含有量は、他の生鮮農産物の平均 ACh 含有量の 2900 倍 (2.1×10^{-3} mg/100 g FW) であり、他のナス科植物より 3000 倍以上 (トマト [Tomato], パプリカ [Paprika], ピーマン [Bell pepper], ししとう; 平均: 2.5×10^{-3} mg/100 g FW) である。

次に、ナスの ACh 高含有は千両二号 (Senryo No. 2) に特有のものであるかどうかを確認するために、日本市販の異なる地域のナスを選択し、コリン化合物の含有量を調査した。

表 1－6．生鮮農産物中の各コリン化合物含有量 ($n = 3$; mg/100 g FW)

Crop	Cultivar	Choline compounds			
		ACh	PCh	BCh	Ch
Cucumber	Zubari 163	$7.8 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5**}$	$1.0 \times 10^{-2} \pm 2.5 \times 10^{-4**}$	$2.1 \times 10^{-3} \pm 5.0 \times 10^{-5**}$	32 ± 0.50
Tomato	Rinka 0409	$8.1 \times 10^{-4} \pm 5.0 \times 10^{-5**}$	ND	ND	$76 \pm 2.1^{**}$
Paprika	Special	$1.8 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-5**}$	$4.3 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5**}$	$3.5 \times 10^{-4} \pm 0.0 \times 10^{-5}$	34 ± 0.88
Bell pepper	Bell-masari	$6.0 \times 10^{-3} \pm 1.6 \times 10^{-4**}$	$1.2 \times 10^{-3} \pm 3.0 \times 10^{-5**}$	$4.0 \times 10^{-3} \pm 3.0 \times 10^{-5**}$	$84 \pm 1.5^{**}$
Shishito pepper	Manganji togarashi	$1.6 \times 10^{-3} \pm 3.0 \times 10^{-5**}$	$2.9 \times 10^{-3} \pm 6.0 \times 10^{-5**}$	$5.5 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-4**}$	$43 \pm 0.38^*$
Eggplant	Senryo No.2	6.1 ± 0.13	$6.3 \times 10^{-3} \pm 9.0 \times 10^{-5}$	$5.3 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5}$	29 ± 0.97
Asparagus	Welcome	$2.0 \times 10^{-3} \pm 2.0 \times 10^{-5**}$	$1.5 \times 10^{-2} \pm 2.7 \times 10^{-4**}$	$1.9 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5}$	$97 \pm 2.0^{**}$
Japanese yam	Nagaimo	$2.9 \times 10^{-3} \pm 6.0 \times 10^{-5**}$	$8.4 \times 10^{-2} \pm 1.8 \times 10^{-4**}$	$3.8 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-4**}$	$82 \pm 1.1^{**}$
Cabbage	Shinshu 868	$6.8 \times 10^{-4} \pm 2.0 \times 10^{-5**}$	$9.5 \times 10^{-4} \pm 3.0 \times 10^{-5**}$	$3.3 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5}$	$56 \pm 2.9^{**}$
Lettuce	Shinano hope	$3.3 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5**}$	$7.7 \times 10^{-5} \pm 0.0 \times 10^{-5**}$	ND	$44 \pm 0.79^{**}$
Carrot	Kouyou No.2	$2.2 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-4**}$	$8.0 \times 10^{-4} \pm 4.0 \times 10^{-5**}$	$6.4 \times 10^{-4} \pm 4.0 \times 10^{-5}$	$12 \times 10 \pm 3.1^{**}$
Kaiware daikon	unknown	$8.6 \times 10^{-4} \pm 3.0 \times 10^{-5**}$	$2.5 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5**}$	$3.2 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-4**}$	$77 \pm 1.4^{**}$
Broccoli sprout	unknown	$3.1 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-4**}$	$7.1 \times 10^{-5} \pm 0.0 \times 10^{-5**}$	$3.9 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-4**}$	$86 \pm 3.9^{**}$
Alfalfa bean sprout	unknown	$1.7 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-4**}$	$1.5 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-5**}$	ND	$78 \pm 0.75^{**}$
Pea sprout	unknown	$1.3 \times 10^{-3} \pm 2.0 \times 10^{-5**}$	ND	ND	$78 \pm 1.8^{**}$
Buckwheat sprout	unknown	$4.2 \times 10^{-3} \pm 5.0 \times 10^{-5**}$	$5.6 \times 10^{-4} \pm 3.0 \times 10^{-5**}$	$4.6 \times 10^{-4} \pm 3.0 \times 10^{-5**}$	$74 \pm 2.7^{**}$
Apple	Shinano dolce	$2.1 \times 10^{-3} \pm 6.0 \times 10^{-5**}$	$4.1 \times 10^{-4} \pm 2.0 \times 10^{-5**}$	ND	$49 \pm 1.9^{**}$
Japanese pear	Twentieth century	$2.6 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-5**}$	$2.9 \times 10^{-4} \pm 2.0 \times 10^{-5**}$	ND	27 ± 0.72
Grape	Nagano purple	$3.2 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-4**}$	$4.4 \times 10^{-4} \pm 2.0 \times 10^{-5**}$	ND	$69 \pm 0.19^{**}$

ACh: acetylcholine; PCh: propionylcholine; BCh: butyrylcholine; Ch: choline; ND: not detected; FW: fresh weight; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus eggplant, as evaluated by the Tukey HSD.

2. ナス 6 品種中のコリン化合物含有量

日本で市販されている 6 品種のナス中のコリン化合物定量結果を表 1－7 に示した. 定量した 6 品種のナス試料全てにコリン化合物を確認した. ヒゴムラサキ (Higomurasaki) はコリンエステル最高含有量 (ACh: 5.5 mg/100 g FW; PCh: 7.8×10^{-3} mg/100 g FW; BCh: 2.9×10^{-3} μ g/100 g FW), ばってんなす (Batten nasu) はコリン最高含有量 (36 mg/100 g FW) であった. ACh 高含有品種と低含有品種の差はわずか 2 倍程度であり, 全てのナス品種は他の生鮮農産物よりも ACh が豊富であることが示された.

表 1－7. ナス 6 品種中の各コリン化合物含有量 ($n = 3$, mg/100 g FW)

Cultivar	ACh	PCh	BCh	Ch
Higomurasaki	5.5 \pm 0.17	$7.8 \times 10^{-3} \pm 1.8 \times 10^{-4}$	$2.9 \times 10^{-3} \pm 9.0 \times 10^{-5}$	31 \pm 0.72
Chikuyo	5.5 \pm 0.088	$7.0 \times 10^{-3} \pm 1.5 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-5}$	34 \pm 1.42
Senshu mizunasu	5.2 \pm 0.10	$5.7 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-5}$	$7.4 \times 10^{-4} \pm 4.0 \times 10^{-5}$	22 \pm 0.74
Koryo sarada nasu	4.2 \pm 0.10	$3.7 \times 10^{-3} \pm 7.0 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-3} \pm 5.0 \times 10^{-5}$	20 \pm 0.34
Batten nasu	3.1 \pm 0.050	$1.5 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-5}$	$6.0 \times 10^{-4} \pm 8.0 \times 10^{-5}$	36 \pm 1.75
Onaga nasu	2.8 \pm 0.11	$5.9 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-4}$	$2.9 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-5}$	36 \pm 0.85

ACh: acetylcholine; PCh: propionylcholine; BCh: butyrylcholine; Ch: choline.

3. ヒゴムラサキ試料中のアセチルコリン含有量の経時変化

ACh 最高含有量であるナス品種ヒゴムラサキを用いて常温保存した時の ACh 含有量の経時変化を調査した (図 1－4). ACh 含有量は 1 日目 (5.5 mg/100 g FW) から 5 日目 (4.5 ± 0.05 mg/100 g FW) まで徐々に低下したことを示し, 5 日目は 1 日目と比較して有意な低値が認められた ($p < 0.01$). 従って, ナスにおける ACh の半減期は約 16 日と算出された. ナス果実は常温保存で (25℃前後) 2～3 日間が新鮮な状態を保てる期間 (消費期限) であることが報告されており (Abe et al., 1976), これはナスの ACh 半減期が消費期限よりも長いことが示唆される.

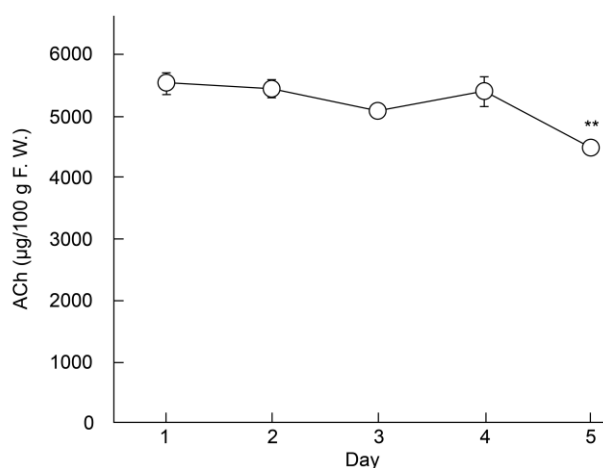


図1－4. ACh 含有量経時変化 (Higomurasaki) 25 ± 5℃で保存. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus day 1, evaluated using the Student's t -test. ACh: acetylcholine.

考察

本章では、LC-MS/MS を用いて 19 種類の生鮮農産物についてコリン化合物含有量を定量した。さらに、ナスの ACh 高含有は単一品種の現象なのかを確認するため、日本のナス 6 品種中の ACh 含有量も調査した。また、常温保存でナス中の ACh 含有量の経時変化を調査した。その結果、全ての生鮮農産物にコリン化合物が存在することを示した。そのうち、最も豊富なのはコリンであり、全ての生鮮農産物に存在していることを明らかにした。

コリンエステルも広く発見され、最も豊富なコリンエステルは ACh であった。これまでに、ナス中の ACh は高速液体クロマトグラフィー電気化学検出 (HPLC-ECD) 法によって定量されており、417 nmol/g (6.1 mg/100 g FW) 含まれていることが報告されており (Horiuchi et al., 2003), 本章における LC-MS/MS 分析の定量結果でも同等の ACh 含有量が確認された。また、コリンと同様に、ACh は全ての生鮮農産物に存在していることを明らかにした。ナスの ACh 含有量は、他の生鮮農産物よりも 2900 倍高いことが判明し、ナスと他の生鮮農産物との間の ACh 含有量の差を明らかにした。2.3 mg の ACh を含むナス粉末を継続的に摂取することで血圧が高めの人々の血圧と心理状態が改善する (Nishimura et al., 2019)。今回の結果は、ナスを機能性野菜として人々の健康促進に役立てるための大きな一歩であり、ACh が豊富なナスは日常的に摂取可能な少量で血圧を改善する可能性があるが、他の栽培作物では日常的に摂取可能な

量でその効果を達成することは困難と考えられる。本章では世界で初めてマイナーコリンエステルである PCh と BCh が生鮮農産物に存在することが示され、さらに、PCh と BCh が生鮮農産物に広く存在することが確認された。

結論として、コリン化合物は生鮮農産物に広く含まれており、生鮮農産物がコリン化合物の供給源として毎日摂取できることが示された。ナスの ACh 含有量はかなり豊富であり、ナス中の ACh 半減期は消費期限よりも長く、ナスの機能性食品としての可能性が証明された。ナスはもともと含まれる CE によって ACh が徐々に分解されるため、ACh 含有量は短時間で大量減少されることが考えられるが、今回の結果によりナスは ACh の安定的な供給源であることが示された。以上の結果によりナス中の ACh 含有量は他の生鮮農産物より非常に豊富のため、第一章以降はナス中の ACh 含有量を中心に更なる調査を行った。

第二章 ナス中新規機能性化合物であるアセチルコリンの分布と含有量調査

第一章では、19 種類の生鮮農産物のコリン化合物含有量を調査し、ナスの ACh 含有量は他の生鮮農産物の 2900 倍以上であることが明らかになった。世界保健機関は、成人が毎日少なくとも 400 g の果物と野菜を摂取することを推奨している (World Health Organization, 2003)。ナス以外の 18 種類の生鮮農産物 (平均: 2.11×10^{-3} mg/100 g FW) は、8.44 μ g ACh/日しか補うことができず、ACh 血圧降下の有効投与量のわずか 0.4% であった。一方、ナス (6.12 mg/100 g FW) では 38 g 摂取すれば血圧と心理状態を改善できる。ACh はナスの主要な機能性化合物であり、品種や部位による含有量変化、ナスの発育過程や熱処理による変化を調査することは、生産原料に加工する際に使用されるナス部位、加工方法などの参考資料になり、ナスの工業化を進める上で重要なことである。しかし、それを関連する従来研究が不足している。そこで本章では、日本国内で栽培されているナス 26 品種の ACh 含有量、ナス植物体部位別の ACh 含有量、開花後および熱処理後の ACh 含有量の変化を調べた。

実験材料および方法

1. 試薬

超純水は超純水製造装置 (sartorius arium 611, Sartorius Co., ドイツ) から製造した。メタノール, ギ酸, 1 mol/L 塩酸, 塩化コリンはナカライテスク株式会社 (京都) より購入した。リン酸二水素ナトリウム, リン酸水素二ナトリウムは富士フイルム和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。塩化 ACh は関東化学株式会社 (東京) より購入した。(2-aminoethyl)trimethylammonium pivaloylamide (EN) は第一章の方法で合成された。

2. 分析試料

26 品種ナス試料はすべて市場で購入したもので、品種名、栽培地および収穫時期は表 2－1 に示した。

表 2－1. 分析試料品種名、栽培地および収穫時期

品種または系統	栽培地	収穫時期
SL 紫水	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
みずなす	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
早生大丸	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
庄屋大長	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
くろわし (a)	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
もぎ茄	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
大芹川	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
TNA-112	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
千両	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
竜馬 (a)	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
筑陽	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
千両二号	滋賀県湖南市針	2017 年 6 月
ホワイトベル	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
ブラックベル	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
ひすいナス	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
白ナス	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
ロッサビアンコ	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
ホワイトクララ	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
パープルクララ	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
タイナス	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
フローレンスパープル	兵庫県三田市東本庄	2017 年 7 月
土佐鷹	高知県南国市廿枝	2017 年 12 月
慎太郎	高知県南国市廿枝	2017 年 12 月
竜馬 (b)	高知県南国市廿枝	2017 年 12 月
くろわし (b)	高知県南国市廿枝	2017 年 12 月
十市小ナス	高知県南国市廿枝	2017 年 12 月

植物体部位別定量試料には、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門（三重県津市安濃町）で 2017 年 10 月に栽培された千両二号の葉，根，蕾，萼片，子房，開花後 1 週間の果実，開花後 2 週間の果実，開花後 1.5 ヶ月の果実，開花後 1 週間の果皮，開

花後2週間の果皮，開花後1.5ヶ月の果皮を用いた．対照として，同様に栽培されたトマト（ホーム桃太郎）の葉，根，花，開花後2週間の果実，開花後1.5ヶ月の果実を用いた．独立3株からランダムに選抜した1試料を試験に使用した．

果実部位別定量試料には，高知県農業技術センター（高知県南国市廿枝）で2018年1月に収穫された土佐鷹の外果皮 (Exocarp)，中果皮 (Mesocarp)，隔壁 (Partition)，胎座外部 (Outer placenta)，胎座内部 (Inner placenta)，果心 (Core) (図2-1) ならびにナス果実の根元から下に向かって三等分した基部 (根に近い部分)，中部 (中央部)，果頂部 (根から離れた部分) を用いた．独立2株からランダムに選抜した1試料を試験に使用した．

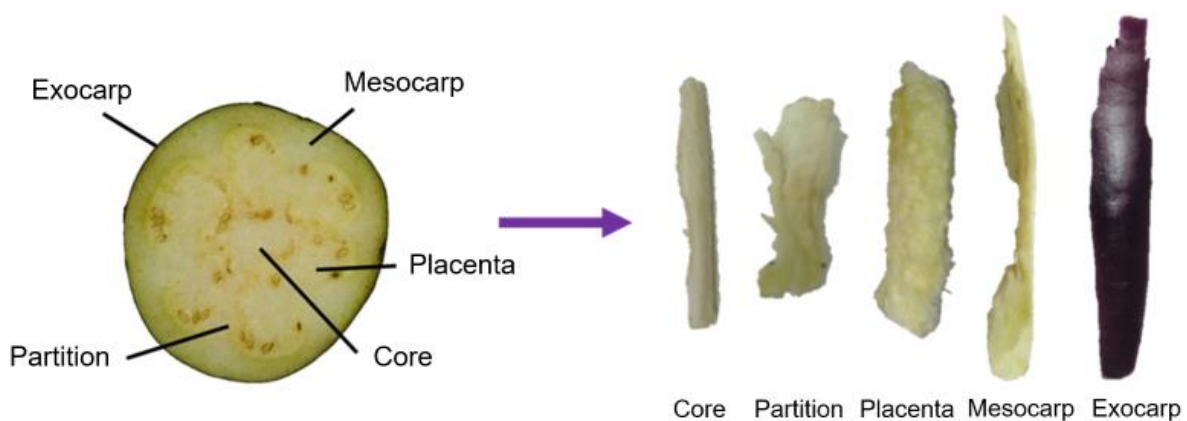


図2-1．ナス果実各部位 (Tosataka)．

3. 分析試料調製

3-1. ナス試料調製

土佐鷹の熱処理方法は，生育環境，生育期間が同一のナス9株を選択し，3株を対照試料，3株を電子レンジ加熱調理試料，3株を揚げ加熱調理試料とした．熱処理する試料は2～3 cmの小片に切断し，15秒間水で洗浄した後，10秒間脱水した．電子レンジ加熱調理試料ではナス試料を電子レンジ（700 W；1.5 min/70 g）で加熱した後（ナス内部温度約96℃），凍結乾燥して粉末化し，定量試料とした．揚げ加熱調理試料ではナス試料を180℃の油で2分間揚げた後，表面の油を吸水紙でふき取り，凍結乾燥して定量試料とした．コントロール試料およびその他の試料の処理を以下に説明します．

ナス果実は、水道水で表面を洗浄し、水分を拭き取った後、可食部のみを 2～3 cm 角に切断し、生鮮重量を記録した後凍結乾燥機 (FDU-2000; Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) で凍結乾燥した。凍結乾燥物は乾燥重量を記録した後ミルミキサー (MNN-2001; Tokyo Unicom Co., Ltd., Tokyo, Japan) で粉砕し粉末状にした。乾燥収率は補充資料表 S2-5 に示した。

3－2．試薬調製

1 M リン酸緩衝液：リン酸二水素ナトリウム (2042.06 mg) とリン酸水素二ナトリウム (4681.84 mg) を量り取り、純水 (50 mL) に溶解した。

10 mM リン酸緩衝液：1 M リン酸緩衝液 (1 mL) を純水 (99 mL) で希釈し調製した。

50 mM 塩酸：1 M 塩酸 (2 mL) を純水 (38 mL) で希釈し調製した。

3－3．振盪抽出

凍結乾燥物 (10 mg) を 1.5 mL チューブに量り取り、EN 内部標準 (10 μ L) を加えた。50 mM 塩酸緩衝液 (190 μ L) を添加し、ボルテックスで 3 分間攪拌した後、遠心分離 (1000 $\times g$, 25 \pm 5 $^{\circ}$ C, 3 min) し、上清を得た。残渣に再び 50 mM 塩酸緩衝液 (200 μ L) を添加し攪拌、遠心分離、上清採取の操作を 2 回繰り返した。採取した上清をすべて合わせ (約 600 μ L)、1 M リン酸緩衝液 (300 μ L) を添加し、抽出試料とした。

3－4．固相抽出

固相抽出カートリッジは弱酸性陽イオン交換カートリッジ Inert Sep CBA 100 mg/1 mL (GL Science) を用いた。メタノール (1.6 mL)、純水 (1.6 mL) で活性化した固相抽出カートリッジを 10 mM リン酸緩衝液 (8 mL) で平衡化した後、振盪抽出で調製した抽出試料 (約 900 μ L) を添加した。10 mM リン酸緩衝液 (1350 μ L) で安定化、純水 (2.4 mL) で洗浄後、塩酸 (500 μ L) で溶出した (図 2－2)。

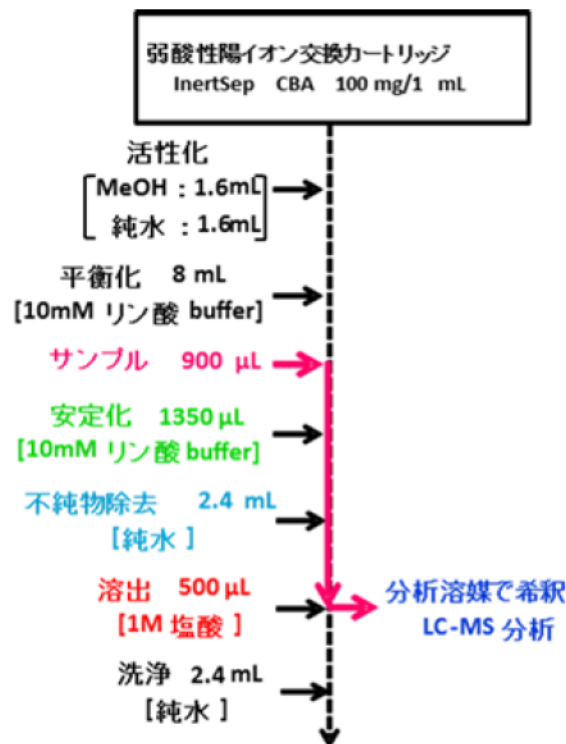


図 2 - 2. 固相抽出手順.

4. LC-MS/MS 測定

4 - 1. 定量試料調製

固相抽出で塩酸溶出した溶出液 (500 μ L) を 1 mL メスフラスコを用いて LC-MS/MS 分析溶媒で精確に 1 mL にフィルアップし, 300 μ L ずつ 3 つに分けた. それぞれに, コリン化合物混合溶液を添加し, 溶出液が 2 倍希釈になるように LC-MS/MS 分析溶媒を加え (表 2 - 2), 定量試料を作成した. コリン化合物混合溶液は表 2 - 3 のように作成し, コリン化合物混合溶液無添加試料の分析結果によって各コリン化合物ストック溶液の添加濃度を決定した. コリン化合物ストック溶液は LC-MS/MS 分析溶媒に溶解して各濃度に調製した. 分析を行わないコリン化合物がある場合, 検出されなかったコリン化合物があった場合は, 等量の LC-MS/MS 分析溶媒を加えた.

表 2－2．定量試料への各溶液添加量

添加溶液	各試料標品添加量(μL)		
	A	B	C
溶出液	300	300	300
コリンエステル混合溶液	0	51	102
LC-MS/MS 分析溶媒	300	249	198
全液量	600	600	600

表 2－3．コリン化合物混合溶液調製方法

コリンエステル溶液	混合液量(μL)
EN ストック溶液	40
ACh ストック溶液	10
Choline ストック溶液	10
LC-MS/MS 分析溶媒	110
合計溶液量	170

4－2．LC-MS/MS 分析条件

第一章の方法に基づいて LC-MS/MS システムは Nexera-i（超高性能液体クロマトグラフ [UPLC]）および LCMS-8045 (MS) が使用された（株式会社 島津製作所，京都）．カラムは YMC-Triart PFP（4.6 mm×250 mm，5 μm）を用いた．分析溶媒に 0.01% ギ酸-33% メタノール含有水を用い，流速は 0.5 mL/min，注入量は 1 μL，分離温度は 40℃，分析時間は 25 min，イオン化モードは ESI+•MRM，インターフェイス温度と DL 温度は 250℃，ヒートブロック温度は 400℃，ネブライザーガスは 3 L/min，ドライイングガスとヒーティングガスは 10 L/hr の条件で LC-MS/MS 分析を行った．各コリン化合物の質量電荷比 (m/z) の多重反応モニタリングモード遷移は次のとおり：187.30 → 128.15 (EN)；146.15 → 87.10 (ACh)；104.20 → 45.05 (Ch)．電圧設定は次のとおり：Q1 Pre-Bias (V) は，-13.0 (EN)，-15.0 (ACh)，-11.0 (コリン)；collision energy (V) は，-14.0 (EN)，-15.0 (ACh)，-22.0 (コリン)；Q3 Pre-Bias (V) は，-24.0 (EN)，-17.0 (ACh)，-17.0 (コリン)．

4－3．標準添加法

LC-MS/MS 分析によって得られたクロマトグラフのピーク面積値から検量線を作成し，標準添

加法によって ACh を定量した。EN 内部標準の検量線から算出した回収率で各 ACh 濃度を補正し、定量試料中の正確な ACh 濃度を算出した。得られた濃度を凍結乾燥物中の含量 (mg/g D. W) に換算後、凍結乾燥前後の収率より、新鮮重量 100 g 当たりの各 ACh 量 (mg/100 g FW) を算出した。土佐鷹の果実部位ならびに開花後日数の異なる土佐鷹には Ch も同様に定量した。

5. 統計処理

全ての結果は平均値と標準誤差で示し、分散分析により、すべての結果の p 値が < 0.05 であり、統計的有意性が示された。Tukey' s honestly significant difference test (IBM SPSS Statistics 24, IBM Corp., Armonk, NY, USA) および Student' s t -test (Microsoft Excel 2019 MSO 16.0.13328.20262) で有意差評価した場合、標準差は $p < 0.05$ で有意と見なされた。

実験結果

1. 26 品種ナスにおける ACh 含有量

LC-MS/MS を用いて 26 品種のナス中 ACh 含有量を定量した ($n = 3$, 図 2 - 3)。定量した 26 品種のナス試料全てに ACh を確認した。26 品種ナスの ACh 含有量平均値は 3.8 mg/100 g FW, 最大含有量は 11 mg/100 g FW (土佐鷹 [Tosataka]), 最小含有量は 0.11 mg/100 g FW (竜馬 (a) [Ryoma (a)]) であり、ACh 含有量の最大と最小品種の差は 100 倍であった。日本では、ナスが商業目的で通年栽培されているため、異なる季節に収穫されたナスの ACh 含有量を調査し、ACh 含有量の季節変化を調査した。夏から秋に生育した日本のナス品種の ACh 含有量は 0.11 (竜馬 (a)) ~5.7 mg/100 g FW (早生大丸 [Wase-daimaru]) で、平均は 2.5 mg/100 g FW であった。海外品種では 0.21 (ホワイトクララ [White clara]) ~7.6 mg/100 g FW (ひすいナス [Jade]) であり、平均は 3.7 mg/100 g FW であった。冬から春に生育した日本のナス品種の ACh 含有量は 3.5 (竜馬 (b) [Ryoma (b)]) ~11 mg/100 g FW (土佐鷹) で、平均は 6.9 mg/100

g FW であった.

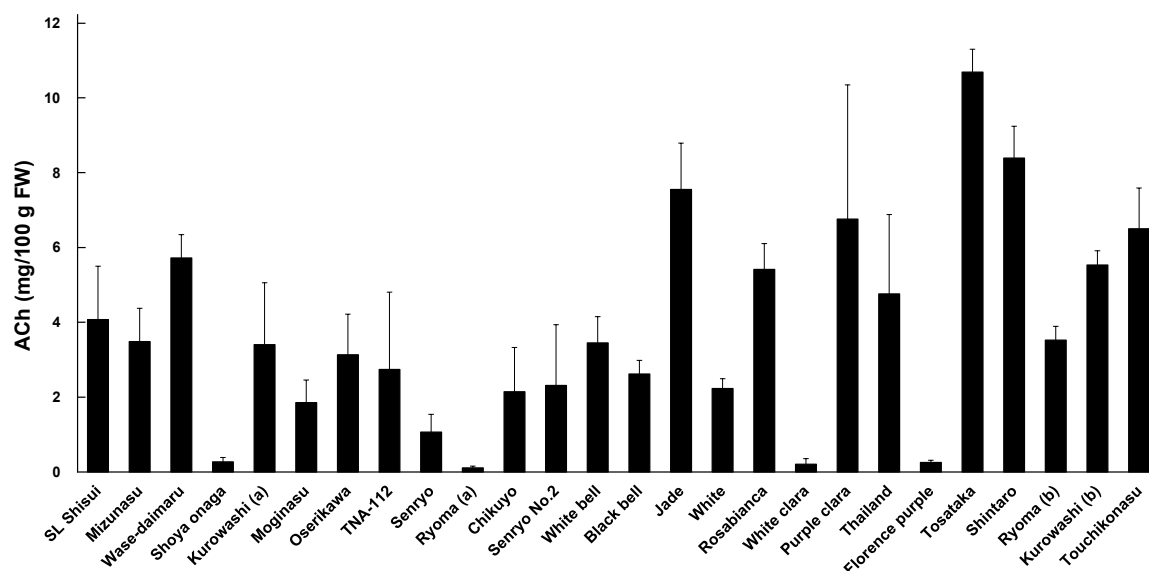


図2-3. ナス26品種のACh含有量 ($n=3$). ACh: acetylcholine; FW: fresh weight. Kurowashi (a)とRyoma (a)は夏に収穫; Kurowashi (b)とRyoma (b)は冬に収穫.

2. ナス (千両2号) とトマト (ホーム桃太郎) のACh含有量

LC-MS/MSを用いてナス植物体8部位とトマト植物体5部位に含まれるAChを定量した ($n=3$, 表2-4). AChは, ナス植物体の全部位に存在することが明らかとなった. ACh含有量が最も高い部位は果実 (Fruit) であり, 最も低い部位は根 (Root) であった. ナス果実は開花後日数の経過とともにACh含量が増加し, 開花後1.5ヶ月の果実 ($4.8 \text{ mg}/100 \text{ g FW}$) では開花日の子房 (Ovary) 試料 ($0.012 \pm 0.0031 \text{ mg}/100 \text{ g FW}$) の400倍にも達することが判明した. 一方, 同じナス科に属しているトマトはいずれの試料でもACh含有量がごく微量または検出限界以下であった. この結果は第一章の結果と一致している. ナス果実のACh含有量が最も高かったため, 続いてナス果実の6部位のACh含有量を分析した.

表 2－4. ナス (Senryo No. 2) とトマト (Home Momotaro) 中の ACh 含有量 ($n = 3$)

Crop	Part	ACh (mg/100 g FW)
Eggplant (Senryo No. 2)	Leaf	$2.5 \times 10^{-1} \pm 1.5 \times 10^{-1}$
	Root	$4.6 \times 10^{-3} \pm 2.1 \times 10^{-3}$
	Bud	$5.2 \times 10^{-1} \pm 3.7 \times 10^{-1}$
	Calyx	$8.2 \times 10^{-1} \pm 1.4 \times 10^{-2}$
	Ovary (0-week fruit)	$1.2 \times 10^{-2} \pm 3.1 \times 10^{-3}$
	Fruit (1 week after flowering)	$2.5 \times 10^{-1} \pm 7.7 \times 10^{-3}$
	Fruit (2 weeks after flowering)	$6.3 \times 10^{-1} \pm 1.8 \times 10^{-1}$
	Fruit (1.5 months after flowering)	4.8 ± 1.2
Tomato (Home Momotaro)	Leaf	ND
	Root	ND
	Flower	ND
	Fruit (2 weeks after flowering)	$4.2 \times 10^{-3} \pm 5.6 \times 10^{-4}$
	Fruit (2 months after flowering)	ND

ACh: acetylcholine; FW: fresh weight; ND: not detected.

3. ナス果実 (土佐鷹) 6 部位中の ACh とコリン含有量

LC-MS/MS を用いてナス果実 6 部位に含まれる ACh とコリンを定量した ($n = 3$, 表 2－5). ACh とコリンの含有量が最も高い部位は外果皮 (Exocarp) (ACh : 7.5 mg/100 g FW ; コリン : 3.6 mg/100 g FW), 最も ACh 含有量が低い部位は隔壁 (Partition) (6.0 mg/100 g FW) と胎座外部 (Outer placenta) (6.0 mg/100 g FW) であり, 最もコリン含有量が低い部位は中果皮 (Mesocarp) (1.3 mg/100 g FW) であった. 果肉では, ACh 含有量が最も高い部位は果心 (Core) (6.6 mg/100 g FW) であり, 最も低い部位である隔壁と胎座外部よりも 1.1 倍多く含まれているが, 果肉の各部位の ACh 含有量に有意差が認められなかった. 果実中の ACh とコリン含有量の最高と最低の差は, それぞれわずか 1.3 倍と 2.8 倍であり, ナス果実の各部位の ACh 含有量はほぼ同じであった. 次に, 重力による果実中の ACh 分布の影響について調査した.

表 2－5. ナス果実各部位中の ACh とコリン含有量 (Tosataka) ($n = 3$)

Part	ACh (mg/100 g FW)	Choline (mg/100 g FW)
Exocarp	$7.5 \pm 2.0 \times 10^{-1}$ ^a	$3.6 \pm 2.1 \times 10^{-1}$ ^a
Mesocarp	$6.6 \pm 2.7 \times 10^{-1}$ ^{ab}	$1.3 \pm 2.4 \times 10^{-1}$ ^b
Partition	$6.0 \pm 5.4 \times 10^{-1}$ ^b	$2.8 \pm 7.2 \times 10^{-1}$ ^{ac}
Outer placenta	$6.0 \pm 2.9 \times 10^{-1}$ ^b	$2.9 \pm 4.4 \times 10^{-1}$ ^{ac}
Inner placenta	$6.5 \pm 1.9 \times 10^{-1}$ ^{ab}	$1.9 \pm 1.8 \times 10^{-1}$ ^{bc}
Core	$6.6 \pm 2.6 \times 10^{-1}$ ^{ab}	$2.4 \pm 5.1 \times 10^{-1}$ ^{abc}

Values within each column with different superscripts are different at $p < 0.05$, as evaluated using Tukey HSD. ACh: acetylcholine; FW: fresh weight.

4. ナス果実（土佐鷹）の基部，中部，果頂部の ACh とコリン含有量

LC-MS/MS を用いてナス果実の基部 (Fruit base)，中部 (Fruit center)，果頂部 (Fruit top) に含まれる ACh とコリンを定量した ($n = 3$ ，表 2－6)．各部位の ACh とコリンの含有量に有意差が認められなかった．ACh 含有量が最も高い部位は基部 (7.0 mg/100 g FW)，最も低い部位は果頂部 (6.2 mg/100 g FW) であり，その差はわずか 1.1 倍であった．コリン含有量が最も高い部位は基部 (2.4 mg/100 g FW) と中部 (2.4 mg/100 g FW)，最も低い部分は果頂部 (2.3 mg/100 g FW) であり，その差はわずか 0.1 mg であった．以上の結果から，重力はナス果実の ACh 含有量の分布に影響を与えないと示唆された．

表 2－6. ナス果実の基部，中部，果頂部中の ACh とコリン含有量 (Tosataka) ($n = 3$)

Part	ACh (mg/100 g FW)	Choline (mg/100 g FW)
Fruit base	$7.0 \pm 3.7 \times 10^{-1}$	$2.4 \pm 2.2 \times 10^{-1}$
Fruit center	$6.7 \pm 5.0 \times 10^{-1}$	$2.4 \pm 1.7 \times 10^{-1}$
Fruit top	$6.2 \pm 4.4 \times 10^{-1}$	$2.3 \pm 2.7 \times 10^{-1}$

No significant difference in values, as evaluated using an analysis of variance. ACh: acetylcholine; FW: fresh weight.

5. 加熱調理によるナス（土佐鷹）中 ACh 含有量

LC-MS/MS を用いて加熱調理したナス果実に含まれる ACh を定量した ($n = 3$ ，図 2－4)．対照ナスの ACh 含有量は 3.4 mg/100 g FW ，電子レンジ加熱処理ナス (Microwaved eggplant) は 13 mg/100 g FW ，揚げ処理ナス (Fried eggplant) は 18 mg/100 g FW であった．電子レンジ

加熱処理ナスと揚げ処理ナスの ACh 含有量は対照ナスより有意に高かった（それぞれ $p < 0.05$ と $p < 0.01$ ）。

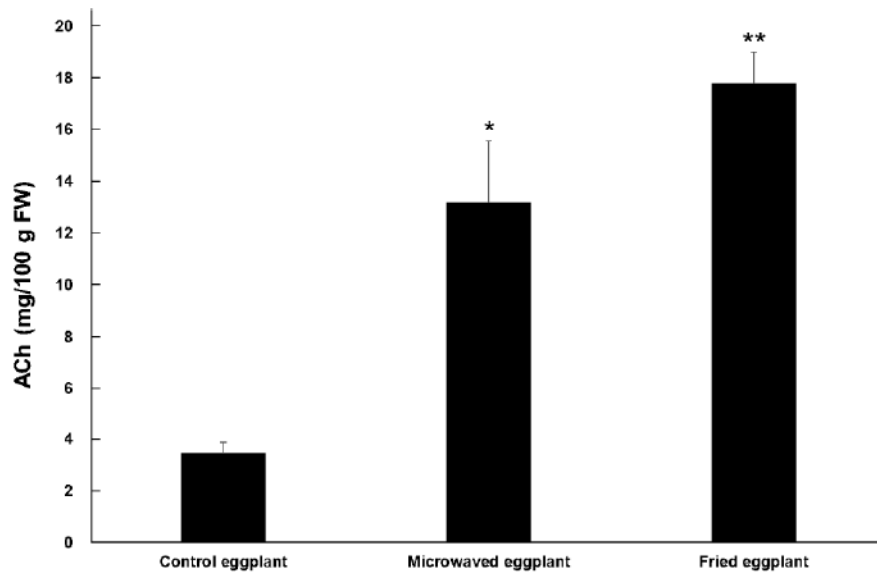


図 2-4. コントロール，電子レンジ加熱ナス，揚げナス中の ACh 含有量 ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the control eggplant, evaluated using Student's t -test. ACh: acetylcholine; FW: fresh weight.

考察

本章では，ナスを品種別，部位別，開花後日数別に ACh とコリン定量を行った。また，加熱調理による ACh 含有量の変化も調査した。その結果，ナス植物体中 ACh 含有量の部位偏在と ACh の開花後の経時変化が明らかとなった。ナス 26 品種の ACh 含有量を測定し，全ての品種に ACh が存在することを示し，第一章の結果と一致した。ナス植物体では果実が最大 ACh 含有量の部位であり，ACh はほぼ均一で果実中に分布されている。さらに，ACh 含有量は果実の成長とともに徐々に増加し，熱処理により増加した。

ACh 含有量はナス品種間での大きなばらつきが判明し，最高含有量品種と最低含有量品種では 100 倍の差が確認された。血圧と心理状態の改善に必要なナス有効摂取量 (ACh 2.3 mg/日) に基づいて (Nishimura et al., 2019)，ACh 含有量が最低含有量品種と最高含有量品種の必要摂取量は 2.1 kg FW/日と 21 g FW/日であり，品種によって有効摂取量が大きく異なる。ナス

摂取による健康促進のためには、ACh 高含有量ナスを特定または ACh 高含有量ナスを栽培することが必要である。

続いて、ナスの植物体中における ACh 分布を明らかにすべく、ナス各部位の ACh 含有量を測定した結果、全ての部位に ACh が含まれていることが確認された。ナス植物体中 ACh は果実（開花後 1.5 か月）に偏在し（4.8 mg/100 g FW）、他の部分に存在する ACh 含有量合計の 3 倍であった（1.6 mg/100 g FW；葉，根，蕾，萼片）。また開花後 1.5 ヶ月のナス果実には、開花日の子房と比較して 400 倍の ACh を含有していたことから、ナス果実の ACh は開花後から経時的に蓄積していることが示唆された（開花後 1.5 か月の果実：4.8 mg/100 g FW；子房：0.012 mg/100 g FW）。従って、収穫時期の延長はナスの ACh 蓄積にとってより有益であり、食品の機能が向上することにも繋がると考えられる。一方、トマトはいずれの部位でも ACh をほぼ含有しておらず、果実への ACh 蓄積はナス固有の事象と考えられる。冬栽培ナスの ACh 含有量は、夏栽培ナスよりも高く、これは開花から収穫までの期間に関連していると考察した。

トウガラシはナスと同じナス科に属しており、その辛み成分であるカプサイシンは胎座と隔壁に偏在することが知られている（Ota, 1962）。従って、カプサイシンを抽出するプロセスでは、これらの部分のみが使用され、生産コストが増加するだけでなく、大量な廃棄物も産出する。一方、ACh はナス果実に均一に分布しており、加工工程に無駄がなく、コストも抑えることができる優れた原料である。さらに、ナス果実の全ての部位に大量のコリンも含まれており、ナスは優れた機能性食品としての価値がさらに高まった。

ナスは加熱処理により化学組成が大幅に変化することが報告されたが（Scalzo et al., 2016）、本研究結果から、ナスの ACh は熱安定性であり、加熱処理により大幅に増加することが明らかとなり、加熱によるナスの食物機能の向上が示唆された。加熱処理されたナスは、生ナスより総フェノールとフラボノール含有量が有意に高く、優れた抗酸化能を示したことが報告されている（Arkoub et al., 2016; Samaniego et al., 2015; Martini et al., 2021）。加熱処理によるナス ACh 含有量増加の理由はまだ不明であるが、加熱調理でナスの機能性が高まることが期待できる。また、ナス果実には CE が含まれているため、ナスをカットした時に細

胞内の ACh が細胞外の CE との接触によるナス細胞内 ACh の加水分解が懸念され (Davis et al., 1978; Dunant et al., 1985; Israel et al., 1985), ナスをカットする前に加熱処理することでナスの機能性を最大限保てると考えられる. 第三章では, 世界ナス中の代表的な 100 品種・系統のセットであるナスコアコレクションの ACh 含有量を定量し, ACh 高含有量ナスの特徴を特定した.

第三章 ナスコアコレクションにおける新規食品機能性成分アセチルコリン含有量調査

世界中のナス品種は AVRDC 植物遺伝資源情報システムのデータに基づいて、4,117 系統のナスとその野生の近縁種が登録され、保存されている (AVGRIS, 2022)。幅広い遺伝的変異を示す遺伝資源は、将来のナス育種に役立つ可能性がある素材と考えられている。しかし、ナスの遺伝資源は完全に整理されず混乱を招く可能性がある。従って、可能な限り多くの遺伝資源を保存する遺伝的変異の比較的小さなサブセットを構築することは、ナス遺伝資源を効率的で実用的な使用を促進する可能性がある。ナスコアコレクション (Miyatake et al., 2019) は、世界中のナス遺伝資源の中から選定した代表的な 100 品種・系統のセットである。農研機構が保存する遺伝資源のうち、893 点を対象とし、831 の一塩基多型 (SNP) と 50 の単純配列反復 (SSR) 遺伝子型に基づき、Core Hunter II プログラムにより選定された。当該コアコレクションは、対象とした 893 点の遺伝的多様性をできる限り維持したまま、点数を絞り込んだ実験基盤であり、実験材料として極めて有用である。そして、上記遺伝子型情報に基づく STRUCTURE 分析の結果、本コアコレクションは、4 つのクラスター (S1: ヨーロッパ、アメリカ、アフリカ諸国, S2: 東アジア諸国, S3: 東南アジア諸国, S4: 南アジアおよび東南アジア諸国) に分類された。そこで本章では、世界中から選定した代表的な品種・系統であるナスコアコレクション 100 品種について、二年間にわたり ACh 含有量と ACh 高含有ナスの特徴を調査した。さらに、ナスコアコレクションで、ACh の前駆体であるコリンの含有量も調査した。

実験材料および方法

1. 試薬

超純水は超純水製造装置 (sartorius arium 611, Sartorius Co., ドイツ) から製造した。HPLC 用メタノール、ギ酸、1 mol/L 塩酸、塩化コリンはナカライテスク (京都) から入手した。リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムは和光純薬工業 (大阪) から入手した。塩化アセチルコリンは関東化学 (東京) から入手した。(2-アミノエチル) トリメチルアンモニウム

(EN) は第一章の方法で合成したものを使用した。

2. 分析試料

農研機構野菜花き研究部門安濃野菜研究拠点（三重県）で夏期露地栽培した，ナスコアコレクション，100 品種・系統を用いた（登録番号は WEC001～100）。二年間に渡り独立 2 株に由来する 3 つのナス果実を用いて定量し，その ACh 定量値の平均を各品種の ACh 含有量とした（2018 年と 2019 年）。肥料は ECOLONG413（the type released over 100 days; Jcam Agri. Co., Ltd., Tokyo, Japan）（12.5 kg/10 a; N:P:K = 14:11:13）を使用して行った。なお，本試験で使ったナスコアコレクション試料は未熟果の開花後収穫所要日数が約 2 週間から 3 週間のところ，約 1.5 カ月まで収穫日を延長した完熟果である。2019 年度の系統番号 No. 34 は大型台風の影響で，完熟する前に枯死したため試料が得られなかった。ナスコアコレクションに関する特定の情報（原産地，果皮色，形状，および遺伝情報）には以前の調査中に記録されていた（Miyatake et al., 2019）。本章では原産地（S1, S2, S3, S4），形状（球形 [Spherical]，卵形 [Ovoid]，長形 [Elongated]），および果皮色（緑 [Green]，紫 [Violet]，白 [White]）に基づいて 100 の系統を分類し，統計分析を行った（図 3－1）。

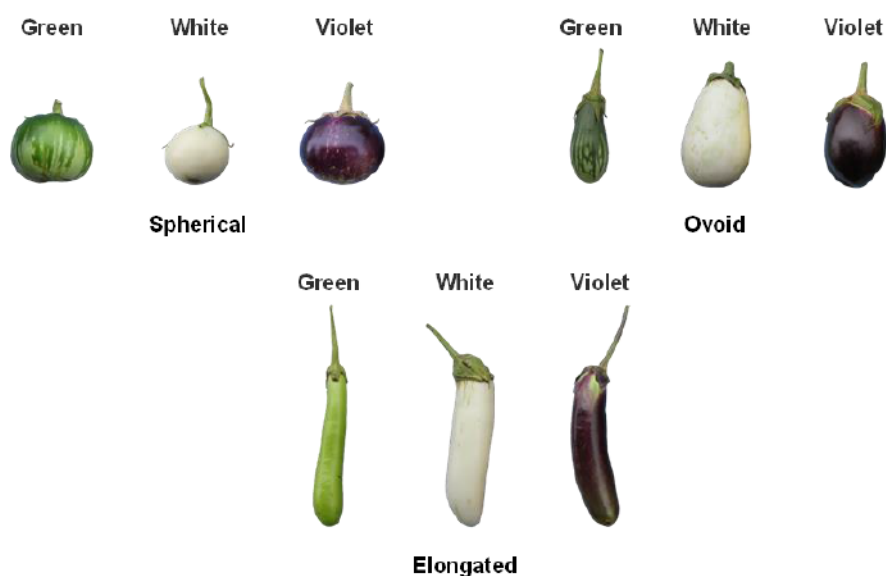


図 3－1. ナスコアコレクション果実の形と色による分類（Partly excerpted from [Miyatake et al., 2019]）。

3. ナスコアコレクション生育条件

ナスコアコレクションは開花日によって、第一弾 (First batch ; 開花日 : 2018 年 6 月 11 日および 2019 年 7 月 1 日 ; 収穫日 : 2018 年 8 月 6 日および 2019 年 9 月 16 日 ; WEC015, 016, 024, 034-036, 049-068, 074-076, 079), 第二弾 (Second batch ; 開花日 : 2018 年 6 月 18 日および 2019 年 7 月 8 日 ; 収穫日 : 2018 年 8 月 13 日および 2019 年 9 月 23 日 ; WEC001, 006-014, 019-023, 026, 028-033, 037-045, 048, 069-073, 078, 083-088, 091, 096-100), 第三弾 (Third batch ; 開花日 : 2018 年 6 月 25 日および 2019 年 7 月 15 日 ; 収穫日 : 2018 年 8 月 20 日および 2019 年 9 月 30 日 ; WEC002-005, 017, 018, 025, 027, 046, 047, 077, 080-082, 089, 090, 092-095) に分類し、収穫所用日数と平均黒球温度、一日あたりの全天日射量を表 3-1 に示した。収穫所用日数は 2018 年度が 2019 年度より 21 日短かった。黒球温度の平均と一日あたりの全天日射量は 2018 年度が第一弾を除き 2019 年度より有意な高値を示した ($p < 0.01$)。

表 3-1. ナスコアコレクションの栽培条件

Harvest batch	Duration of harvest (days)		Global temperature (°C)		Total solar irradiance (MJ/m ²) / Duration of harvest (days)	
	Year 2018	Year 2019	Year 2018	Year 2019	Year 2018	Year 2019
First batch			30	29	20**	15
Second batch	57	78	31**	29	20**	16
Third batch			31**	29	21**	16

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus 2019, evaluated using Student's t -test. First batch: WEC015, 016, 024, 034-036, 049-068, 074-076, 079; Second batch: WEC001, 006-014, 019-023, 026, 028-033, 037-045, 048, 069-073, 078, 083-088, 091, 096-100; Third batch: WEC002-005, 017, 018, 025, 027, 046, 047, 077, 080-082, 089, 090, 092-095.

4. 分析試料調製

4-1. 試料調製

ナス試料は入手後すぐに、水道水で表面を洗浄した。水分を拭き取った後、可食部位のみを必要に応じて 1~3 cm 幅に包丁でスライスした。可食部位を凍結乾燥機で凍結乾燥した後、ミ

ルミキサー（28,000 rpm, 1 min; Wonder Crusher WC-3; OSAKA CHEMICAL Co., Ltd., Osaka, Japan）で粉末化した。乾燥収率は補充資料表 S6 に示した。

4-2. 試薬調製

1 M リン酸緩衝液 (1 M PBS) : リン酸二水素ナトリウム (2042.06 mg) とリン酸水素二ナトリウム (4681.84 mg) を量り取り, 純水 (50 mL) に溶解した。

10 mM リン酸緩衝液 (10 mM PBS) : 1 M リン酸緩衝液 (1 mL) を純水 (99 mL) で希釈し調製した。

50 mM 塩酸 : 1 M 塩酸 (2 mL) を超純水 (38 mL) で希釈し調製した。

4-3. 振盪抽出

ナス凍結乾燥粉末 (10 mg) を 1.5 mL チューブに量り取り, EN 内部標準 (10 μ L) を加えた。50 mM 塩酸 (190 μ L) を添加し, ボルテックスで 3 分間攪拌した後, 遠心分離 (1000 $\times g$, 室温, 3 min) し, 上清を得た。残渣に再び 50 mM 塩酸 (200 μ L) を添加し攪拌, 遠心分離, 上清採取の操作を 2 回繰り返した。採取した上清を全て合わせて (約 600 μ L), 1 MPBS (50 μ L) および超純水 (250 μ L) を添加し, 抽出試料とした (図 3-2)。

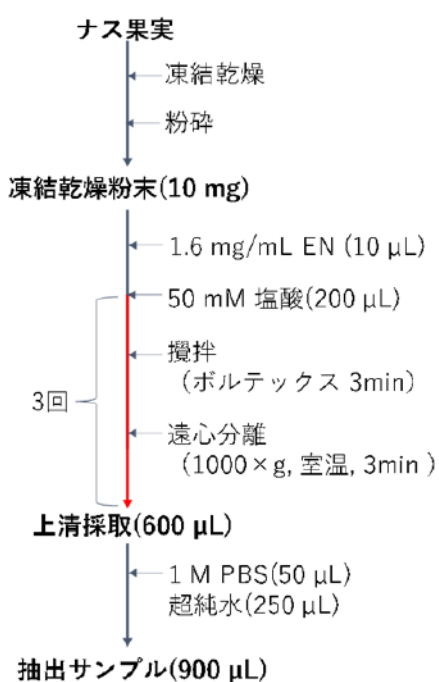


図 3-2. 振盪抽出手順.

4-4. 固相抽出

固相抽出カートリッジは弱酸性陽イオン交換カートリッジ Inert Sep CBA 100 mg/1 mL (GL Science) を用いた。メタノール (1.6 mL)、超純水 (1.6 mL) で活性化した固相抽出カートリッジを 10 mM リン酸緩衝液 (8 mL) で平衡化した後、振盪抽出で調製した抽出試料 (約 900 μ L) を添加した。10 mM PBS (1350 μ L) でチューブを洗浄し、洗浄液と超純水 (2.4 mL) でカートリッジを洗浄後、塩酸 (500 μ L) および超純水 (400 μ L) で溶出した (図 3-3)。

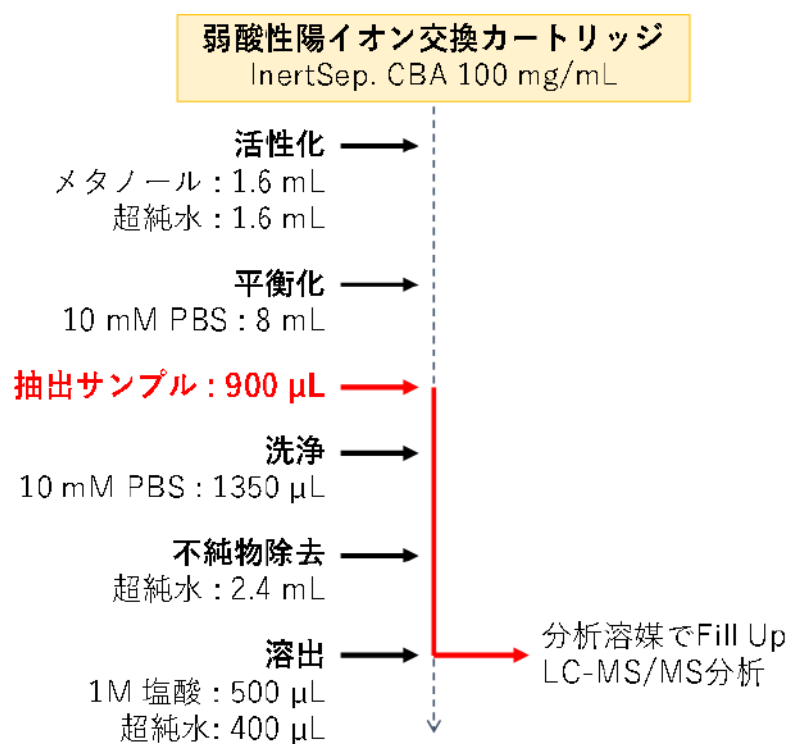


図 3-3. 固相抽出手順.

5. LC-MS/MS 測定

5-1. 定量試料調製

固相抽出で溶出した溶出液 (900 μ L) を 1 mL メスフラスコを用いて 0.01% (v/v) ギ酸-33% メタノール含有水 (LC-MS/MS 分析溶媒) で精確に 1 mL にフィルアップし、LC-MS/MS 分析溶媒で 200 倍希釈した。希釈した溶液を 300 μ L ずつ 3 つに分けた。それぞれに、コリン化合物混合溶液を添加し、溶出液が 2 倍希釈になるように LC-MS/MS 分析溶媒を加え (表 3-2), 定量

試料を作成した。コリン化合物混合溶液は表のように作成し、コリン化合物混合溶液無添加試料の分析結果によって各コリン化合物ストック溶液の添加濃度を決定した。コリン化合物ストック溶液は LC-MS/MS 分析溶媒に溶解して各濃度に調製した（表 3－3）。

表 3－2．定量試料への各溶液添加量

添加溶液	各試料標品添加量(μL)		
	A	B	C
溶出液	300	300	300
コリンエステル混合溶液	0	51	102
LC-MS/MS 分析溶媒	300	249	198
全液量	600	600	600

表 3－3．コリン化合物混合溶液調製方法

コリンエステル溶液	混合液量(μL)
EN ストック溶液	40
ACh ストック溶液	10
Choline ストック溶液	10
LC-MS/MS 分析溶媒	110
合計溶液量	170

5－2．LC-MS/MS 分析条件

システムは Nexera-I LC-2040C 3D (UPLC) と LCMS-8045 (MS)，カラムは YMC-Triart PFP (4.6 mm×250 mm, 5 μm) を用いた。分析溶媒は 0.01% (v/v) ギ酸-33%メタノール含有水を用い，流速は 0.50 mL/min，注入量は 1 μL，分離温度は 40℃，分析時間は 17 min，イオン化モードは ESI (+)・MRM，インターフェイス温度と DL 温度は 250℃，ヒートブロック温度は 400℃，ネブライザーガスは 3.0 L/min，ドライイングガスとヒーティングガスは 10 L/hr の条件で LC-MS/MS 分析を行った。各コリン化合物の質量電荷比 (m/z) の多重反応モニタリングモード遷移は次のとおり：187.18 → 128.15 (EN)；146.15 → 87.10 (ACh)；104.20 → 45.05 (Ch)。電圧設定は次のとおり：Q1 Pre-Bias (V) は，-13.0 (EN)，-15.0 (ACh)，-11.0 (コリン)；collision energy (V) は，-14.0 (EN)，-15.0 (ACh)，-22.0 (コリン)；Q3 Pre-Bias (V) は，-24.0 (EN)，

-17.0 (ACh), -17.0 (コリン).

5-3. 標準添加法

LC-MS/MS 分析によって得られたクロマトグラフのピーク面積値から検量線を作成し、標準添加法によってコリン化合物を定量した。EN 内部標準の検量線から算出した回収率で各コリン化合物濃度を補正し、定量試料中の正解なコリン化合物濃度を算出した。得られた濃度を凍結乾燥物中の含量 (mg/g DW) に換算後、凍結乾燥前後の収率より、新鮮重量 100 g 当たりの各コリン化合物量 (mg/100 g FW) を算出した。

6. 統計処理

全ての結果は平均値と標準誤差で示し、分散分析により、すべての結果の p 値が < 0.05 であり、統計的有意性が示された。有意差評価した場合、 $p < 0.05$ で有意と見なされた。

Kolmogorov-Smirnov test (IBM SPSS Statistics 24, IBM Corp., Armonk, NY, USA) を使用して、データの分布を調べ、 $p > 0.05$ の場合、データが正規分布と見なす。分析に使用したデータの正規性は補充資料表 S7 に示した。

Levene's test (IBM SPSS Statistics 24, IBM Corp., Armonk, NY, USA) を使用して、正規分布データの分散を確認した。正規分布データの分散は補充資料表 S7 に示した。Student's t -test を使用して等分散のデータグループの平均を比較し、Welch's t -test を使用して異分散のデータグループの平均を比較した (Microsoft Excel 2019 MSO 16.0.13328.20262)。

非正規分布データグループは Mann-Whitney U test を使用して二群間の差を比較し、Steel-Dwass 検定を使用して三群以上の多重比較を行った。両側 Welch's t -test を使用して、2 年間に渡る白色果皮ナスの ACh とコリン含有量を比較した。Mann-Whitney U test を使用して、アジアとアジア以外、各形状、緑色と紫色果皮二年間の ACh とコリンの含有量を比較した。Steel-Dwass test を使用して、原産地 (S1, S2, S3, S4)、形状、果皮色の ACh とコリンの含有量を多重比較した (Statcel-the Useful Add-in Forms on Excel-4th ed)。

相関係数の計算にはMicrosoft Excel を使用した.

実験結果

1. ナスコアコレクションの ACh, Ch 含有量

ナスコアコレクション二年間延べの ACh とコリン定量結果を表 3-4 (生鮮重量) と補充資料表 S8 (乾燥粉末重量) に示した ($n=3$). 定量した 100 品種のナス試料全てに ACh を確認した. 二年間の ACh 含有量の平均値は 24 mg/100 g FW, 最大含有量は 53 mg/100 g FW, 最小含有量は 7.7 mg/100 g FW であり, ACh 含有量の最大と最小品種の差は 7 倍であった. 二年間のコリン含有量の平均値は 10 mg/100 g FW, 最大含有量は 20 mg/100 g FW, 最小含有量は 4.8 mg/100 g FW であり, コリン含有量の最大と最小含有量の差は 4 倍であった. 2018 年度の平均 ACh 含有量は 2019 年度よりも有意に高かった ($p < 0.01$) のに対し, 平均コリン含有量は 2019 年度よりも有意に低かった ($p < 0.01$). ナスコアコレクション 2019 年度の ACh 含有量は 2018 年度と比較して 31 品種に有意差が認められ (16 品種, $p < 0.05$; 15 品種, $p < 0.01$), コリン含有量は 73 品種に有意差が認められた (29 品種, $p < 0.05$; 44 品種, $p < 0.01$).

2018 年度の ACh 最大含有量は 49 mg/100 g FW (WEC040), 最小含有量は 10 mg/100 g FW (WEC001), 最大と最小含有量の差は 5 倍であり, 2019 年度の最大含有量は 57 mg/100 g FW (WEC040), 最小含有量は 0.52 mg/100 g FW (WEC093), 最大と最小含有量の差は 110 倍であった. 2018 年度のコリン最大含有量は 28 mg/100 g FW (WEC093), 最小含有量は 2.8 mg/100 g FW (WEC055), 最大と最小含有量の差は 10 倍であり, 2019 年度の最大含有量は 30 mg/100 g FW (WEC063), 最小含有量は 5.5 mg/100 g FW (WEC027), 最大と最小含有量の差は 5 倍であった.

表3-4. ナスコアコレクション中のAChとコリン含有量 ($n = 3$)

ID	Origin	ACh (mg/100 g FW)			Choline (mg/100 g FW)		
		Year 2018	Year 2019	Average	Year 2018	Year 2019	Average
WEC001	Egypt	10 \pm 1.1	7.4 \pm 1.7	8.8 \pm 1.4	8.4 \pm 0.36	18 \pm 2.7*	13 \pm 4.8
WEC002	Ghana	44 \pm 3.4	29 \pm 5.9	37 \pm 7.5	8.5 \pm 0.68	16 \pm 0.85**	12 \pm 3.8
WEC003	Ghana	34 \pm 3.1	25 \pm 3.8	29 \pm 4.7	7.9 \pm 0.96	14 \pm 1.4*	11 \pm 3.2
WEC004	Brazil	12 \pm 1.7	15 \pm 3.4	14 \pm 1.6	3.7 \pm 0.16	7.5 \pm 0.61**	5.6 \pm 1.9
WEC005	Brazil	18 \pm 0.28	4.5 \pm 1.6*	11 \pm 6.8	6.5 \pm 0.16	16 \pm 1.6**	11 \pm 4.9
WEC006	Canada	17 \pm 2.7	11 \pm 0.52	14 \pm 2.8	8.4 \pm 0.72	18 \pm 2.3*	13 \pm 4.6
WEC007	Canada	27 \pm 1.2	8.5 \pm 0.93**	18 \pm 9.4	7.6 \pm 0.83	10 \pm 0.89	8.9 \pm 1.3
WEC008	Bangladesh	35 \pm 0.35	14 \pm 0.95**	24 \pm 11	9.5 \pm 1.1	17 \pm 0.64**	13 \pm 3.6
WEC009	Bangladesh	31 \pm 3.3	10 \pm 1.4**	20 \pm 10	7.6 \pm 0.93	17 \pm 1.2**	12 \pm 4.8
WEC010	Bangladesh	26 \pm 0.74	12 \pm 0.66**	19 \pm 7.0	5.8 \pm 0.38	12 \pm 0.91**	8.8 \pm 3.0
WEC011	Bangladesh	33 \pm 1.4	15 \pm 1.9**	24 \pm 8.8	5.2 \pm 0.66	14 \pm 1.9*	9.5 \pm 4.3
WEC012	Bangladesh	27 \pm 3.6	14 \pm 3.8	21 \pm 6.3	5.1 \pm 0.33	24 \pm 3.7**	15 \pm 9.5
WEC013	Bangladesh	36 \pm 5.6	15 \pm 3.7*	26 \pm 10	6.2 \pm 0.29	25 \pm 3.4**	16 \pm 9.4
WEC014	Bangladesh	35 \pm 6.7	10 \pm 1.1	23 \pm 13	6.0 \pm 0.34	13 \pm 1.1**	9.3 \pm 3.4
WEC015	China	47 \pm 13	35 \pm 5.8	41 \pm 5.9	6.9 \pm 1.9	15 \pm 1.2*	11 \pm 4.0
WEC016	China	25 \pm 4.5	25 \pm 4.1	25 \pm 0.13	5.1 \pm 0.67	13 \pm 2.1*	9.1 \pm 4.0
WEC017	India	25 \pm 1.3	17 \pm 0.59**	21 \pm 4.4	5.9 \pm 0.30	9.3 \pm 1.1*	7.6 \pm 1.7
WEC018	India	12 \pm 1.6	14 \pm 4.6	13 \pm 1.2	4.4 \pm 0.055	13 \pm 1.8*	8.6 \pm 4.3
WEC019	India	18 \pm 2.1	14 \pm 5.6	16 \pm 1.7	5.0 \pm 0.16	13 \pm 1.3**	8.9 \pm 3.9
WEC020	India	33 \pm 5.2	8.2 \pm 2.6*	21 \pm 12	11 \pm 1.2	23 \pm 2.5*	17 \pm 5.9
WEC021	India	22 \pm 1.5	12 \pm 3.3*	17 \pm 5.1	7.8 \pm 0.83	15 \pm 3.0	11 \pm 3.7
WEC022	India	31 \pm 4.1	8.8 \pm 2.8*	20 \pm 11	12 \pm 1.9	13 \pm 2.0	13 \pm 0.61
WEC023	India	37 \pm 3.1	16 \pm 4.0*	27 \pm 10	6.9 \pm 0.28	12 \pm 0.52**	9.5 \pm 2.6
WEC024	India	20 \pm 4.4	8.1 \pm 0.53	14 \pm 5.9	7.3 \pm 0.92	11 \pm 0.33*	9.0 \pm 1.7
WEC025	Indonesia	28 \pm 4.6	22 \pm 2.3	25 \pm 3.2	7.3 \pm 0.33	8.2 \pm 0.70	7.7 \pm 0.47
WEC026	Indonesia	24 \pm 4.2	3.3 \pm 0.91**	14 \pm 10	7.3 \pm 1.3	12 \pm 0.70	9.5 \pm 2.1
WEC027	Japan	18 \pm 1.0	16 \pm 3.5	17 \pm 0.78	4.1 \pm 0.060	5.5 \pm 0.59	4.8 \pm 0.73
WEC028	Japan	11 \pm 0.25	8.9 \pm 1.9	10 \pm 1.2	3.7 \pm 0.54	8.4 \pm 0.27**	6.0 \pm 2.3
WEC029	Japan	17 \pm 0.40	6.9 \pm 0.24**	12 \pm 5.1	3.8 \pm 0.26	9.1 \pm 0.59**	6.4 \pm 2.7
WEC030	Japan	13 \pm 1.6	8.2 \pm 0.081	10 \pm 2.2	4.7 \pm 0.093	23 \pm 2.1*	14 \pm 9.2
WEC031	Japan	36 \pm 5.6	22 \pm 6.0	29 \pm 7.1	8.3 \pm 1.0	21 \pm 1.1**	15 \pm 6.2
WEC032	Japan	23 \pm 3.6	10 \pm 1.3*	17 \pm 6.2	3.8 \pm 0.39	14 \pm 1.5**	8.7 \pm 4.9
WEC033	Japan	18 \pm 0.99	12 \pm 3.1	15 \pm 2.5	3.8 \pm 0.23	11 \pm 0.15**	7.2 \pm 3.4
WEC034	Japan	23 \pm 0.54	20 \pm 1.1	21 \pm 1.5	8.1 \pm 0.36	13 \pm 0.34**	10 \pm 2.3

ID	Origin	ACh (mg/100 g FW)			Choline (mg/100 g FW)		
		Year 2018	Year 2019	Average	Year 2018	Year 2019	Average
WEC035	Japan	32 ± 3.4	19 ± 1.8*	26 ± 6.5	6.9 ± 0.67	15 ± 0.91**	11 ± 4.3
WEC036	Japan	23 ± 3.0	17 ± 5.7	20 ± 3.4	4.4 ± 0.12	11 ± 0.56**	7.8 ± 3.4
WEC037	Lao PDR	40 ± 4.5	35 ± 1.4	37 ± 2.6	4.0 ± 0.037	10 ± 0.12**	7.0 ± 3.0
WEC038	Lao PDR	15 ± 1.8	10 ± 0.30	13 ± 2.7	8.4 ± 0.52	11 ± 1.4	9.7 ± 1.3
WEC039	Lao PDR	30 ± 2.8	25 ± 2.2	27 ± 2.8	9.0 ± 0.31	14 ± 0.49**	12 ± 2.5
WEC040	Lao PDR	49 ± 2.8	57 ± 7.5	53 ± 4.2	7.2 ± 0.56	18 ± 3.1*	13 ± 5.4
WEC041	Lao PDR	18 ± 2.1	13 ± 2.6	15 ± 2.8	8.9 ± 1.1	13 ± 1.5	11 ± 2.1
WEC042	Lao PDR	36 ± 5.5	50 ± 14	43 ± 7.3	4.9 ± 0.53	14 ± 1.9*	9.4 ± 4.4
WEC043	Lao PDR	42 ± 4.8	44 ± 3.0	43 ± 0.93	5.9 ± 0.53	10 ± 1.3*	8.0 ± 2.1
WEC044	Lao PDR	18 ± 4.4	42 ± 4.3*	30 ± 12	4.4 ± 0.59	8.5 ± 0.46**	6.5 ± 2.1
WEC045	Lao PDR	43 ± 2.8	52 ± 7.8	47 ± 4.6	9.3 ± 1.0	11 ± 0.88	10 ± 0.84
WEC046	Lao PDR	40 ± 2.8	14 ± 1.8**	27 ± 13	11 ± 0.78	24 ± 0.91**	17 ± 6.7
WEC047	Lao PDR	17 ± 1.7	15 ± 4.2	16 ± 1.2	6.9 ± 0.89	13 ± 0.32**	9.9 ± 3.0
WEC048	Malaysia	35 ± 3.8	16 ± 6.1	25 ± 9.6	6.7 ± 0.61	21 ± 2.8**	14 ± 7.0
WEC049	Malaysia	39 ± 5.8	40 ± 12	39 ± 0.72	5.4 ± 0.36	12 ± 1.1**	8.6 ± 3.1
WEC050	Malaysia	41 ± 2.7	29 ± 3.6	35 ± 5.9	6.4 ± 0.42	11 ± 0.83**	8.7 ± 2.3
WEC051	Malaysia	29 ± 4.3	33 ± 6.5	31 ± 2.2	5.2 ± 0.25	7.9 ± 0.61*	6.5 ± 1.3
WEC052	Malaysia	45 ± 3.2	27 ± 8.3	36 ± 8.9	14 ± 0.78	25 ± 5.2	20 ± 5.5
WEC053	Malaysia	36 ± 2.2	25 ± 5.3	31 ± 5.5	7.6 ± 0.55	11 ± 0.47*	9.1 ± 1.5
WEC054	Malaysia	27 ± 2.5	27 ± 5.4	27 ± 0.11	5.1 ± 0.88	13 ± 0.97**	9.0 ± 3.9
WEC055	Malaysia	18 ± 1.5	13 ± 2.6	15 ± 2.5	2.8 ± 0.23	8.3 ± 0.44**	5.5 ± 2.8
WEC056	Malaysia	33 ± 5.7	20 ± 1.8	27 ± 6.4	6.6 ± 0.91	9.3 ± 1.5	8.0 ± 1.4
WEC057	Malaysia	20 ± 1.4	5.6 ± 1.1**	13 ± 7.2	4.1 ± 0.56	8.6 ± 0.53**	6.4 ± 2.3
WEC058	Malaysia	23 ± 3.5	23 ± 4.1	23 ± 0.066	3.1 ± 0.78	9.1 ± 0.91*	6.1 ± 3.0
WEC059	Malaysia	48 ± 3.4	54 ± 16	51 ± 3.1	10 ± 0.93	13 ± 1.7	12 ± 1.3
WEC060	Malaysia	26 ± 2.9	25 ± 3.7	25 ± 0.81	3.6 ± 0.40	10 ± 1.3**	6.9 ± 3.3
WEC061	Malaysia	48 ± 2.0	48 ± 8.4	48 ± 0.30	9.9 ± 0.69	15 ± 1.7*	13 ± 2.8
WEC062	Malaysia	41 ± 5.7	35 ± 7.4	38 ± 2.9	7.2 ± 0.56	15 ± 1.0**	11 ± 4.1
WEC063	Malaysia	24 ± 1.2	16 ± 2.1*	20 ± 4.0	9.4 ± 0.60	30 ± 11	20 ± 10
WEC064	Malaysia	28 ± 7.3	20 ± 5.6	24 ± 3.9	7.2 ± 1.1	16 ± 2.8*	12 ± 4.6
WEC065	Malaysia	36 ± 0.63	20 ± 2.8**	28 ± 7.9	11 ± 0.50	10 ± 0.52	10 ± 0.44
WEC066	Malaysia	22 ± 1.2	9.1 ± 2.7*	16 ± 6.5	7.3 ± 0.69	21 ± 0.82**	14 ± 6.8
WEC067	Malaysia	24 ± 5.0	34 ± 11	29 ± 5.4	5.0 ± 0.99	10 ± 0.15*	7.4 ± 2.4
WEC068	Malaysia	26 ± 2.7	18 ± 3.6	22 ± 4.4	6.4 ± 0.55	10 ± 1.1	8.1 ± 1.7
WEC069	Myanmar	19 ± 2.3	38 ± 6.7	29 ± 9.6	5.2 ± 0.55	10 ± 0.59**	7.7 ± 2.5

ID	Origin	ACh (mg/100 g FW)			Choline (mg/100 g FW)		
		Year 2018	Year 2019	Average	Year 2018	Year 2019	Average
WEC070	Myanmar	25 ± 2.9	27 ± 2.4	26 ± 1.2	5.2 ± 0.27	10 ± 0.91**	7.6 ± 2.4
WEC071	Myanmar	31 ± 1.5	31 ± 3.4	31 ± 0.36	7.0 ± 0.36	10 ± 0.77*	8.6 ± 1.6
WEC072	Myanmar	34 ± 3.0	34 ± 3.6	34 ± 0.30	5.9 ± 0.69	13 ± 0.60**	9.3 ± 3.4
WEC073	Myanmar	18 ± 3.0	8.8 ± 0.76*	14 ± 4.7	5.7 ± 0.49	11 ± 1.3*	8.2 ± 2.4
WEC074	Nepal	38 ± 2.0	9.3 ± 1.8**	23 ± 14	6.5 ± 0.39	11 ± 1.5*	8.9 ± 2.4
WEC075	Nepal	25 ± 2.5	16 ± 4.0	20 ± 4.8	5.8 ± 0.43	8.3 ± 1.1	7.0 ± 1.3
WEC076	Nepal	36 ± 5.6	27 ± 6.0	31 ± 4.2	8.6 ± 0.25	7.8 ± 0.82	8.2 ± 0.41
WEC077	Pakistan	38 ± 4.3	32 ± 2.0	35 ± 2.7	10 ± 0.62	7.5 ± 0.91	9.0 ± 1.5
WEC078	Sri Lanka	33 ± 8.3	16 ± 5.1	24 ± 8.5	8.3 ± 0.80	12 ± 0.22*	10 ± 2.0
WEC079	Thailand	34 ± 4.1	21 ± 0.89*	27 ± 6.5	10 ± 1.6	22 ± 3.3*	16 ± 6.0
WEC080	Vietnam	34 ± 3.6	30 ± 2.3	32 ± 2.5	13 ± 1.5	21 ± 2.0*	17 ± 3.9
WEC081	Vietnam	37 ± 2.7	30 ± 10	33 ± 3.7	13 ± 1.8	24 ± 5.4	18 ± 5.4
WEC082	Vietnam	28 ± 4.4	23 ± 5.8	26 ± 2.4	9.6 ± 1.3	16 ± 1.2*	13 ± 3.4
WEC083	Vietnam	16 ± 2.4	14 ± 4.6	15 ± 1.1	5.8 ± 1.7	13 ± 3.2	9.5 ± 3.8
WEC084	Vietnam	24 ± 1.6	28 ± 6.3	26 ± 1.8	4.8 ± 0.43	14 ± 1.3**	9.4 ± 4.6
WEC085	Vietnam	31 ± 2.4	24 ± 5.1	28 ± 3.2	8.7 ± 1.0	9.4 ± 0.80	9.0 ± 0.35
WEC086	Vietnam	47 ± 1.5	32 ± 1.0**	39 ± 7.4	12 ± 0.68	12 ± 0.61	12 ± 0.015
WEC087	Vietnam	41 ± 6.8	30 ± 2.5	35 ± 5.8	16 ± 1.8	15 ± 0.22	15 ± 0.63
WEC088	France	18 ± 0.88	15 ± 1.3	17 ± 1.7	8.4 ± 0.27	7.0 ± 0.10*	7.7 ± 0.71
WEC089	France	15 ± 1.6	1.9 ± 0.34**	8.5 ± 6.6	2.9 ± 0.15	16 ± 0.49**	9.6 ± 6.7
WEC090	France	22 ± 2.9	Wilt		6.1 ± 0.39	Wilt	
WEC091	France	23 ± 4.3	5.5 ± 3.7*	14 ± 8.9	6.9 ± 1.5	24 ± 0.88**	15 ± 8.4
WEC092	Italy	18 ± 4.0	3.9 ± 0.57	11 ± 6.9	5.1 ± 0.54	11 ± 1.0**	8.0 ± 2.9
WEC093	Italy	15 ± 2.4	0.52 ± 0.17*	7.7 ± 7.2	28 ± 1.6	11 ± 1.2**	20 ± 8.4
WEC094	Italy	27 ± 2.6	21 ± 3.0	24 ± 3.0	12 ± 1.3	9.4 ± 0.71	11 ± 1.1
WEC095	Romania	15 ± 1.3	19 ± 0.63	17 ± 1.7	3.0 ± 0.40	12 ± 1.3**	7.3 ± 4.3
WEC096	unknown	17 ± 0.92	13 ± 3.1	15 ± 1.7	4.1 ± 0.32	10 ± 0.44**	6.9 ± 2.8
WEC097	unknown	25 ± 2.2	4.9 ± 1.1**	15 ± 9.8	3.8 ± 0.18	15 ± 2.7	9.4 ± 5.6
WEC098	unknown	16 ± 0.91	12 ± 4.2	14 ± 1.8	7.7 ± 0.79	11 ± 0.90	9.5 ± 1.8
WEC099	unknown	12 ± 1.5	10 ± 2.8	11 ± 1.0	3.9 ± 0.090	14 ± 2.2*	9.0 ± 5.1
WEC100	unknown	17 ± 3.2	4.5 ± 1.7*	11 ± 6.3	6.0 ± 1.4	16 ± 0.25**	11 ± 5.2
Accessions Average		28 ± 0.99	20 ± 1.2##	24 ± 0.84	7.2 ± 0.34	14 ± 0.49##	10 ± 0.37

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus 2018, evaluated using Student's t -test (homoscedasticity), and Welch's t -test (heteroscedasticity). #

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus the 2018, evaluated using Mann-Whitney's U test. ACh: acetylcholine; FW: fresh weight.

2. ナス中 ACh とコリンの関係

ナスコアコレクションの ACh とコリン含有量の相関係数を計算し、散布図を作成した (図 3-4). ACh とコリン含有量の関連性に対応する相関係数は $R = -0.061$ (二年間), $R = 0.36$ (2018 年度), $R = 0.0053$ (2019 年度) であった.

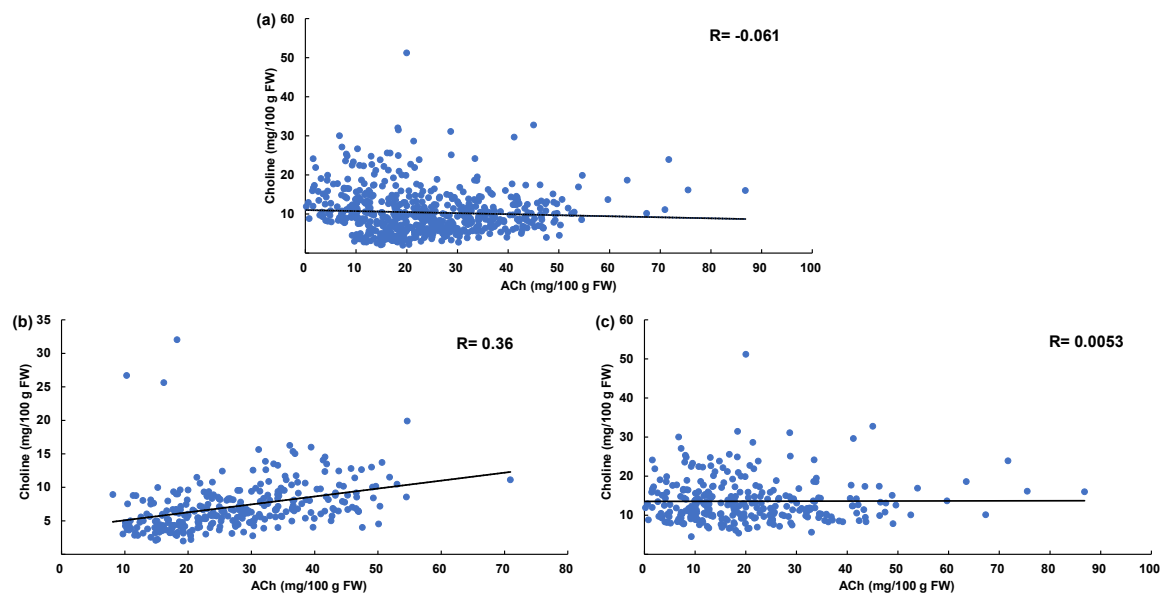


図 3-4. ナスコアコレクション中のコリンと ACh 含有量散布図 ; (a) 二年 (ACh: $n = 597$; Choline: $n = 597$), (b) 2018 年度 (ACh: $n = 300$; Choline: $n = 300$), (c) 2019 年度 (ACh: $n = 297$; Choline: $n = 297$). ACh: acetylcholine; FW: fresh weight.

3. 地域別 ACh とコリン含有量調査

ナスの原産地は四地域 (S1~S4) に分類され, 各地域ナスの ACh とコリン含有量の調査結果を図 3-5 に示した.

二年平均では, ACh 最大含有量地域は S3 (31 mg/100 g FW), 最小含有量地域は S1 (16 mg/100 g FW) であった. S3 は, S4 ($p < 0.05$), S1 および S2 ($p < 0.01$) よりも有意に ACh 高含有の傾向を示した. S4 は, S1 および S2 ($p < 0.01$) よりも有意に ACh 高含有の傾向を示した. コリン最大含有量地域は S3 (12 mg/100 g FW), 最小含有量地域は S2 (8.6 mg/100 g FW) であ

った．S3 は，S4 および S2 ($p < 0.01$) よりも有意にコリン高含有の傾向を示した．

2018 年度には，ACh 最大含有量地域は S3 (33 mg/100 g FW)，最小含有量地域は S2 (20 mg/100 g FW) であった．S3 は，S1 および S2 ($p < 0.01$) よりも有意に ACh 高含有の傾向を示した．

S4 は，S1 および S2 ($p < 0.01$) よりも有意に ACh 高含有の傾向を示した．コリン最大含有量地域は S3 (8.5 mg/100 g FW)，最小含有量地域は S2 (4.8 mg/100 g FW) であった．S3 は，S1 ($p < 0.05$)，S2 および S4 ($p < 0.01$) よりも有意にコリン高含有の傾向を示した．S1 は，S2 ($p < 0.01$) よりも有意にコリン高含有の傾向を示した．S4 は，S2 ($p < 0.01$) よりも有意にコリン高含有の傾向を示した．

2019 年度には，ACh 最大含有量地域は S3 (28 mg/100 g FW)，最小含有量地域は S1 (11 mg/100 g FW) であった．S3 は，S1，S2 および S4 ($p < 0.01$) よりも有意に ACh 高含有の傾向を示した．S4 は，S2 ($p < 0.05$) および S1 ($p < 0.01$) よりも有意に ACh 高含有の傾向を示した．コリン最大含有量地域は S3 (15 mg/100 g FW)，最小含有量地域は S2 (12 mg/100 g FW) であった．S3 は，S2 ($p < 0.05$) および S4 ($p < 0.01$) よりも有意にコリン高含有の傾向を示した．

2018 年度の四地域の ACh とコリン含有量は 2019 年度と有意差が確認された ($p < 0.01$)．

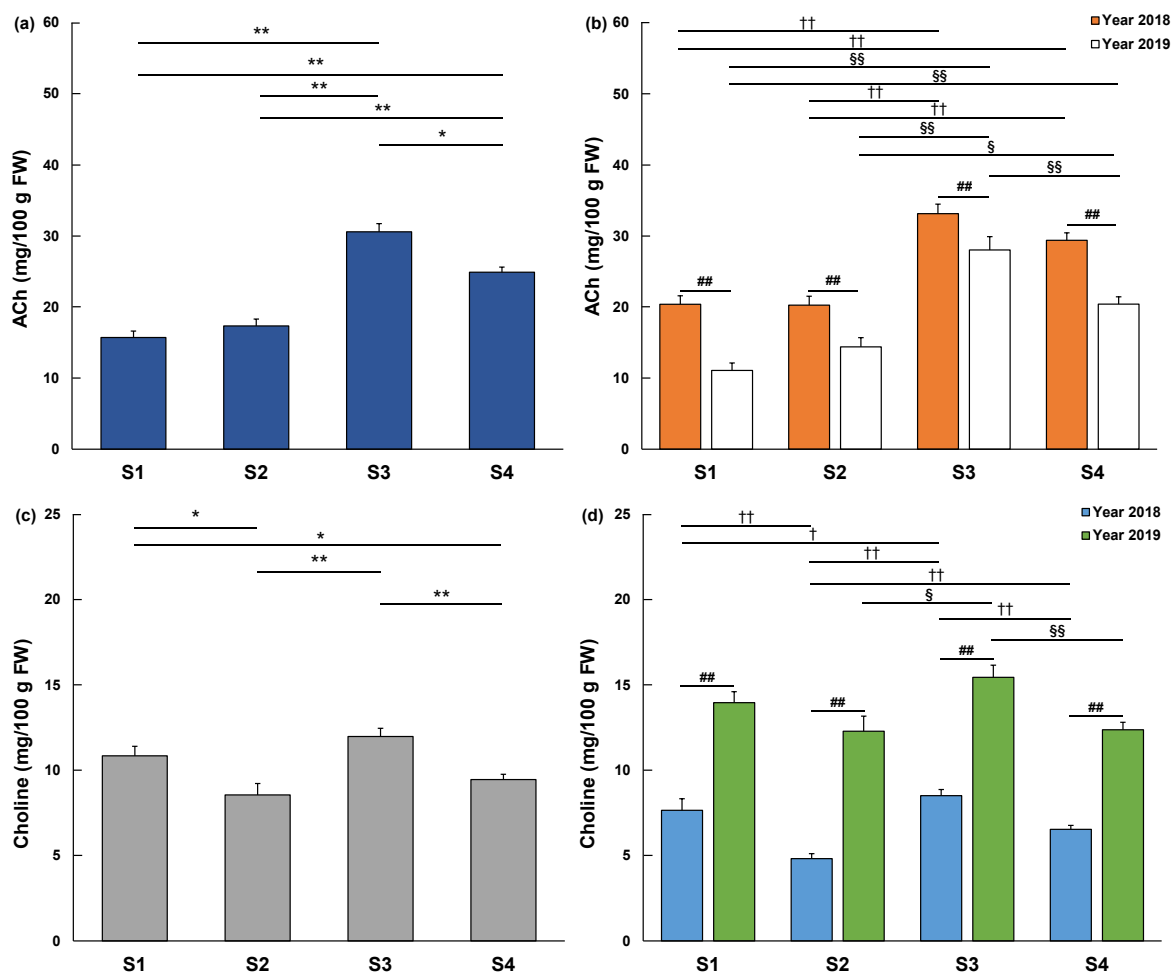


図 3-5. 原産地別によって分類されたナスコアコレクション中の ACh とコリン含有量；二年平均 (S1: $n = 60$; S2: $n = 30$; S3: $n = 87$; S4: $n = 120$), 2018 年度 (S1: $n = 63$; S2: $n = 30$; S3: $n = 87$; S4: $n = 120$), 2019 年度 (S1: $n = 60$; S2: $n = 30$; S3: $n = 87$; S4: $n = 120$). (a): 二年平均 ACh 含有量；(b): 2018 と 2019 年度 ACh 含有量；(c): 二年平均コリン含有量；(d): 2018 と 2019 年度コリン含有量. ACh: acetylcholine; FW: fresh weight. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in two-year average; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ in 2018; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ in 2019, evaluated using Steel-Dwass test. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus 2018, evaluated using Mann-Whitney's U test.

次に、ナスコアコレクションをアジア (Asia) とアジア以外 (Outside Asia) で分類し、ACh とコリン含有量を調査した結果を図 3-6 に示した。アジア以外地域の二年間 ACh 含有量の平均値はアジア地域のナスがより有意に高い傾向を示した ($p < 0.01$)。アジア以外地域の二年間の ACh 含有量はアジア地域のナスより有意に高い傾向を示した ($p < 0.01$)。また、2018 年度の ACh 含有量は 2019 年度より有意に高い傾向を示した ($p < 0.01$)。アジア以外地域の二年間コリン含有量の平均値とアジア地域のナスでは有意差が認められず、二年間にも有意差が

認められなかった。また、2019 年度のコリン含有量は 2018 年度より有意に高い傾向を示した ($p < 0.01$)。

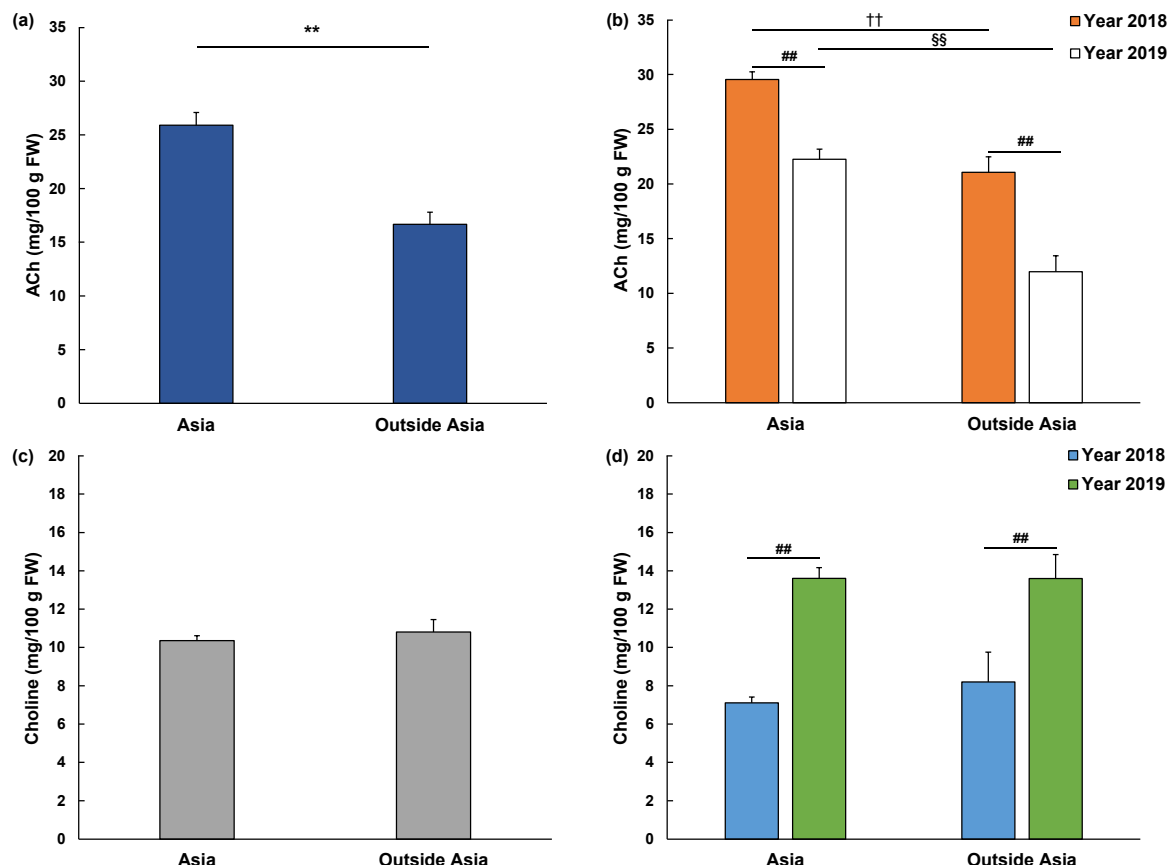


図 3-6. アジアとアジア以外によって分類されたナスコアコレクション中の ACh とコリン含有量；二年平均 (Asia: $n = 240$; outside Asia: $n = 42$), 2018 年度 (Asia: $n = 240$; outside Asia: $n = 45$), 2019 年度 (Asia: $n = 240$; outside Asia: $n = 42$). (a): 二年平均 ACh 含有量；(b): 2018 と 2019 年度 ACh 含有量；(c): 二年平均コリン含有量；(d): 2018 年度と 2019 年度コリン含有量. ACh: acetylcholine; FW: fresh weight. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in two-year average; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ in 2018; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ in 2019 versus the Asia group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus 2018, evaluated using Mann-Whitney's U test.

4. 形状別 ACh とコリン含有量調査

ナスコアコレクションを 3 形状（球形，卵形，長形）に分類し，ACh とコリン含有量を比較した（図 3-7：a-d）。

二年平均では，球形に分類される品種が ACh 最高含有量（28 mg/100 g FW），卵形に分類さ

れる品種が最低含有量 (19 mg/100 g FW) を示した。球形ナスの ACh 含有量は他の形状のナスより有意な高値を示した ($p < 0.01$)。球形ナスがコリン最高含有量 (11 mg/100 g FW)、長形ナスが最低含有量 (9.6 mg/100 g FW) を示した。球形ナスの ACh 含有量は長形より有意な高値を示した ($p < 0.01$)。

二年間では、球形ナスが ACh 最高含有量 (2018 年度 : 31 mg/100 g FW ; 2019 年度 : 25 mg/100 g FW)、卵形ナスが最低含有量 (2018 年度 : 24 mg/100 g FW ; 2019 年度 : 15 mg/100 g FW) を示した。球形ナスの ACh 含有量は、二年間共に他の形状より有意な高値を示した ($p < 0.01$)。コリン最高含有量ナス形状では 2018 年度が球形 (7.9 mg/100 g FW)、2019 年度が卵形 (15 mg/100 g FW) であった。コリン最低含有量ナス形状では 2018 年度が卵形 (6.7 mg/100 g FW)、2019 年度が長形 (12 mg/100 g FW) であった。球形ナスのコリン含有量は二年間共に長形より有意な高値を示した ($p < 0.01$)。

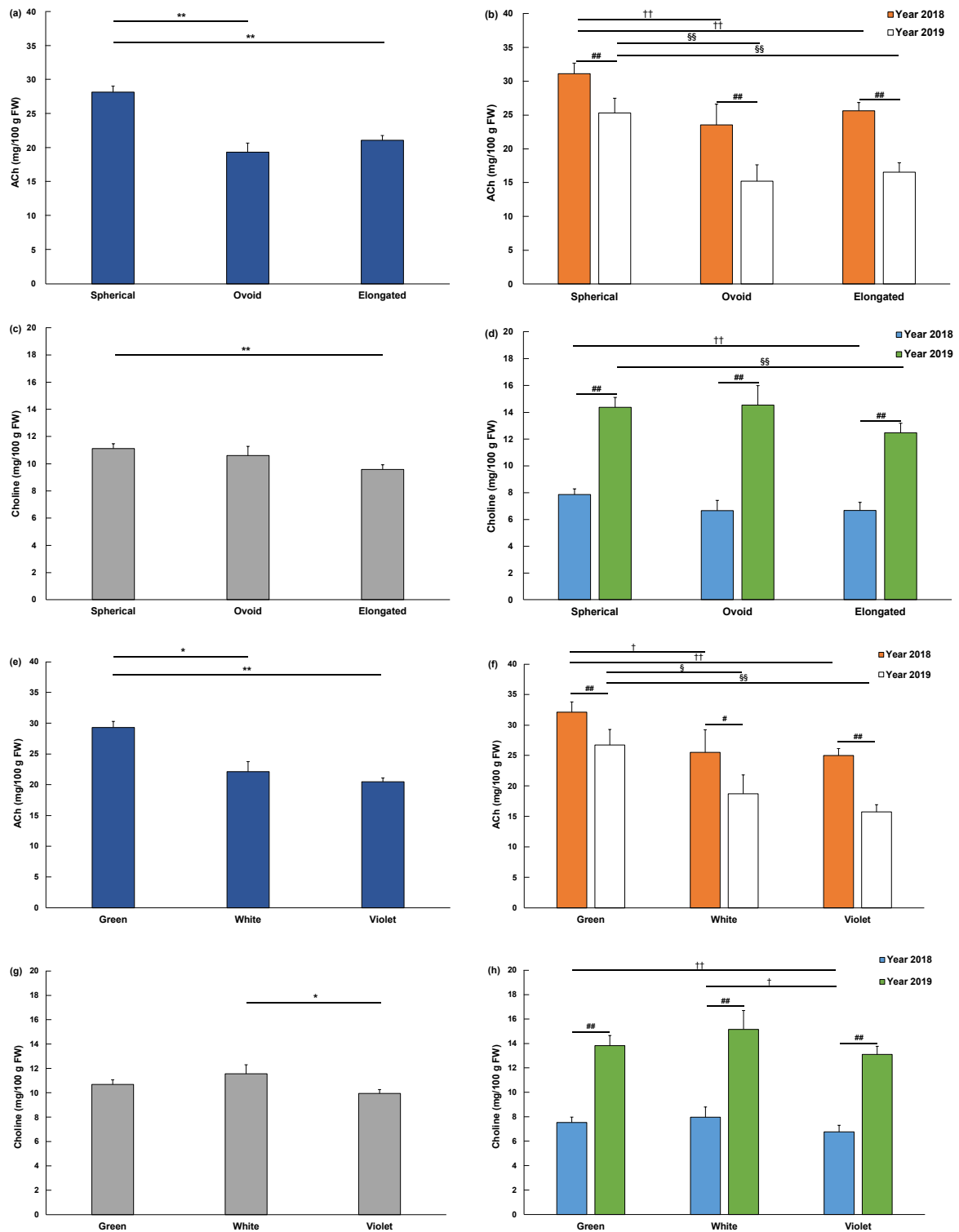


図 3-7. ナス果実形状によって分類されたナスコアコレクション中の ACh とコリン含有量；二年平均 (Spherical: $n = 129$; Ovoid: $n = 42$; Elongated: $n = 126$), 2018 年度 (Spherical: $n = 129$; Ovoid: $n = 42$; Elongated: $n = 129$), 2019 年度 (Spherical: $n = 129$; Ovoid: $n = 42$; Elongated: $n = 126$). ナス果皮色によって分類されたナスコアコレクション中の ACh とコリン含有量；二年平均 (Green: $n = 111$; White: $n = 30$; Violet: $n = 156$), 2018 年度 (Green: $n = 111$; White: $n = 30$; Violet: $n = 159$), 2019 年度 (Green: n

= 111; White: $n = 30$; Violet: $n = 156$). (a): ナス果実各形状中の二年平均 ACh 含有量; (b): ナス果実各形状中の 2018 と 2019 年度 ACh 含有量; (c): ナス果実各形状中の二年平均 コリン含有量; (d): ナス果実各形状中の 2018 と 2019 年度 コリン含有量; (e): ナス果実各果皮色中の二年平均 ACh 含有量; (f): ナス果実各果皮色中の 2018 と 2019 年度 ACh 含有量; (g): ナス果実各果皮色中の二年平均 コリン含有量; (h): ナス果実各果皮色中の 2018 と 2019 年度 コリン含有量. ACh: acetylcholine; FW: fresh weight. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in two-year average; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ in 2018; § $p < 0.05$, § § $p < 0.01$ in 2019 between shapes, evaluated using Steel-Dwass test. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus 2018, evaluated using Student's t -test (White; between two years; ACh), Welch's t -test (White; between two years; choline) and Mann-Whitney's U test (spherical, ovoid, elongated; green, violet; between two years).

5. 果皮色別 ACh と コリン 含有量 調査

ナスコアコレクション未熟果皮色を 3 色 (紫, 緑, 白) に分類し, それぞれの ACh と コリン 含有量を比較した (図 3-7 : e-h).

二年平均では, ACh 最高含有量は緑色ナス (29 mg/100 g FW), 最低含有量は紫色ナス (20 mg/100 g FW) であった. 緑色ナスの ACh 含有量は白色 ($p < 0.05$) と紫色 ($p < 0.01$) より有意な高値を示した. コリン最高含有量は白色ナス (12 mg/100 g FW), 最低含有量は紫色ナス (9.9 mg/100 g FW) であった. 白色ナスの ACh 含有量は紫色ナス ($p < 0.05$) より有意な高値を示した.

二年間では, ACh 最高含有量は, 二年間共に緑色ナス (2018 年度 : 32 mg/100 g FW, 2019 年度 : 27 mg/100 g FW), 最低含有量は紫色ナス (2018 年度 : 25 mg/100 g FW, 2019 年度 : 16 mg/100 g FW) であった. 緑色ナスの ACh 含有量は二年度共に白色 ($p < 0.05$) と紫色 ($p < 0.01$) より有意な高値を示した. 2018 年度の ACh 含有量は 2019 年度よりも有意に高かった (緑と紫, $p < 0.01$; 白, $p < 0.05$). コリン最高含有量は, 二年間共に白色ナス (2018 年度 : 8.0 mg/100 g FW, 2019 年度 : 15 mg/100 g FW), 最低含有量は紫色ナス (2018 年度 : 6.8 mg/100 g FW, 2019 年度 : 13 mg/100 g FW) であった. 紫色ナスのコリン含有量は 2018 年度共に白色 ($p < 0.05$) と緑色 ($p < 0.01$) より有意な低値を示した. 2018 年度のコリン含有量は 2019 年度よりも有意に低かった ($p < 0.01$).

考察

本章では、世界中のナスの代表的な品種・系統として選定したナスコアコレクション 100 品種について、二年間（2018 年，2019 年）に渡り果実中の ACh 含有量調査を実施し，ACh 高含有ナスの特徴を考察した．ナスは開花後収穫所要日数を延長することで ACh 含有量の増加が示唆されたので，本章では完熟果を調査対象とした．その結果，全てのナス品種に ACh が含まれることを確認した．

ナスコアコレクション品種間での ACh とコリン含有量には大きなばらつきがあることが判明した．二年間共に WEC040 の ACh 含有量が最も高かった．WEC040 の品種名は，KHEUA KHEUNE であるラオス原産緑色球形ナス（未熟果実）であり，完熟果の重量は約 40.5 g であった（Miyatake et al., 2019）．ナスコアコレクションの平均 ACh 含有量（24 mg/100 g FW）に基づくと，血圧や心理状態を改善する有効摂取量（2.3 mg ACh/日）はわずか 9.6 g/日であった．この結果からナスが有効濃度の ACh を含むことを確認し，世界中のナスは機能性食品として人々の健康を促進する可能性があることを明らかにした．現在，世界中の人々は COVID-19 によって心理的ストレスを受けているが（Kontoangelos et al., 2020），ナスは日常的な野菜として人々の心理状態を大幅に改善することに役立つ可能性があると考えられる．

2018 年度に栽培されたナスの ACh とコリン含有量だけは弱い正の相関を示し，二年間の平均と 2019 年度ナスの ACh とコリン含有量にはほとんど相関がなかった．ナスの ACh とコリン含有量の相関関係はナスの栽培環境によって異なると考えられる．

2019 年度に収穫したナス果実の ACh 平均含有量は 2018 年度よりも低値であり，そのうち最大で 29 倍の差に達する品種は WEC093 であった．2019 年度の生育期間は 2018 年度よりも長かった．第二章では，成育期間が長いほど，ACh の蓄積が多くなると確認したが，今回の結果はそれと矛盾している．原因としては，栽培年度の気候など栽培条件の差異が影響していると推測した．ナス果実の成熟期間における栽培地の黒球温度と全天日射量は，2018 年度が 2019 年度より有意な高値であり，成熟期間は 2019 年度が 2018 年度より長かった．ナスは温度が高く日射量の増加に伴い，成長が速くなると報告されている（Uzun et al., 2007）．植物は可視光

を照射すると、ACh 合成が促進され、ACh 含有量が増加する (Miura et al., 1984; Hartmann et al., 1974). ACh は水、電解質および栄養物質の輸送を促進して、植物の成長に関与している可能性が報告されており (Momonoki et al., 2000; Sagane et al., 2005; Yamamoto et al., 2009), 成長速度を増すためには大量の ACh が必要になり ACh 生成も促進されと考えられる。以上のことから 2019 年度の ACh 含有量が 2018 年度に比べて有意に低値であった 30 品種については、ACh 含有量が低下した原因として、2019 年度は全天日射量と気温が低かったために、ナスの成長速度が抑えられ ACh 合成が促進されなかったものと考察された。

本章では ACh 高含有ナスの特徴を調査するため、ナスコアコレクション品種の原産国、地域、果実の形状、果皮の色で分類し、ACh 含有量を比較した。原産国を 4 地域に分類し、地域別で ACh 含有量を比較した。その結果、ACh の含有量が最も高い地域は二年間共に S3 であった。アジアとアジア以外の地域で比較した結果、アジア地域が両年度共にアジア以外の地域より優位に ACh 含有量が高く、ACh 高含有ナスの原産地域はアジアであることが明らかになった。ナスは、インド北東部とビルマからタイ北部、ラオス、ベトナム、中国南西部が起源地と言われている (Daunay et al., 2007)。そして、ACh 高含有量ナスの原産地は、ほとんど起源地またはその付近であり、起源地に近い原産地ナスはより多くの ACh を保有している可能性があることが示唆された。続いて、3 形状の ACh 含有量を比較した結果、球形ナスが二年間共に他の形状より有意な高値を示し、ACh 高含有ナスの形状は球形であることが明らかになった。起源ナス形状は球形である可能性が最も高いと報告され (Daunay et al., 2007)、これが先祖の形状に最も近い球形ナスは他の形状より多くの ACh が蓄積された原因と考えられる。最後に、ナスコアコレクションの果皮色別で ACh 含有量を比較した。完熟したナス果皮の大半は黄色に変化し、区別出来なくなるため、未熟果の果皮色で分類した。ナスの果皮色は、アントシアニンとクロロフィルの含有量の影響を受け主に三つの色に分けた。紫果皮はアントシアニン含有量が高いことにより、緑果皮はアントシアニン含有量が低く、クロロフィルを含むことにより、白果皮は色素が含まれないことにより表した (Daunay et al., 2004)。アントシアニンは光を吸収するため (Steyn et al., 2002)、クロロフィルが利用できる光の量が減少し、紫果皮ナスが緑

果皮ナスよりも光合成速度が低くなった。また、クロロフィル含有量は光合成速度に正比例し (Buttery et al., 1977), 白果皮ナスの光合成率は緑果皮ナスよりも低くなった。ACh が光合成に関与し, 植物の水分バランスを調節すると報告されている (Wessler et al., 2001)。それに基づいて緑果皮ナスの ACh 含有量が他のナスより高い原因は, 緑果皮ナスの光合成速度が最も高く, そのために大量の ACh が合成されたと推測できる。このプロセスのメカニズムはさらに調査する必要がある。以上の調査結果から, 原産地域 S3, 果実形状が球形, 果皮色が緑色の栽培品種ナスが ACh 高含有ナスの特徴と言える。

球形ナス 43 品種のうち 77% が東南アジアのナス (33 品種) であり, 緑色ナス 37 品種の 68% が東南アジアのナス (25 品種) であった。これは S3 原産ナスの ACh 含有量が最も高かった結果と一致している。従って, S3 原産ナス品種は ACh 高含有ナスになる可能性が高いことを示した。また, ナスコアコレクション 100 品種のうち WEC040, WEC043, WEC045, WEC059, WEC061 の ACh 含有量は二年連続で全体と比較して高い ACh 含有量 (平均 49 mg/100 g FW) が確認され, 全ては東南アジア原産の球形・緑色のナス品種であった。これらの ACh 高含有の 5 品種は, 有望な機能性ナス品種として健康維持増進に役立てられる可能性が示された。

2019 年度に収穫したナス果実のコリン平均含有量は, 2018 年度よりも高値, 最大で 6 倍の差 (WEC089) であった。原因を調査するために, ナスコアコレクションに含まれる ACh とコリンの合計を計算した (補充資料表 S9)。その結果, 二年間の ACh とコリン含有量合計は有意差が認められなかった。ナスコアコレクション 100 品種の中に 16 品種のみ有意差が認められた (WEC023, 26, 44, 57, 69, 88, $p < 0.05$; WEC007, 08, 10, 29, 30, 65, 74, 86, 93, 95, $p < 0.01$)。以上の結果から, 生育環境は ACh とコリンの総量に影響を与えずに, ACh とコリンの相互変換に影響を与えると示唆された。これも, 2018 年度ナスの ACh 含有量が 2019 年度より高く, コリン含有量がより低かった理由と考えられる。原産地域 S3 のナスは最も高いコリン含有量を示し, 球形ナスは長形ナスよりもコリン含有量が有意に高く, 白果皮ナスは紫果皮ナスよりも高いコリン含有量を示した。しかし, 以上の結果からはコリン高含有ナスの特徴を判断することはまだできなく, さらなる調査が必要と考えられる。また, 人体には CE が含ま

れており (Sine et al., 1991; Grob et al., 1958; Jbilo et al., 1994), 摂取したナスの ACh をコリンに分解して吸収される. ナスの ACh 含有量はコリンの主な供給源であるホスファチジルコリン (2.05 mg/100 g FW) (Abe et al., 1978) より約 12 倍高く (二年平均: 24 mg/100 g FW), ACh もコリンの供給源になれる可能性がある.

ナスコアコレクション 100 品種の調査結果からは, 調査した全ての栽培ナス品種に ACh が含まれていたことから, ACh はナスに共通の新規機能性食品成分であると考えられた. また, ACh 高含有品種の特徴は, ナス栽培品種に東南アジア原産の球形・緑色のナス品種であると結論付けられた. ナスコアコレクション 100 品種は世界中の栽培ナス品種を網羅しているが, まだ調査できていない品種も存在している. そのため, 最終的な結論を出すためには, さらに調査が必要である. ナスは世界で最も人気の野菜の一つとして (主要な野菜の中で 6 位; Food and Agriculture Organization [FAO] statistic, 2020) 国連が提唱した持続可能な開発目標 (2016 年) 中の飢餓防止に大きく貢献している. しかし, ナスは他の野菜に比べて栄養価が低いと長い間批判されてきた. 本章の結果により, 世界各地で栽培されているナスを機能性野菜として健康維持増進に役立てられる可能性が示され, ACh 含有量が豊富なナスは国連の提唱する持続可能な開発目標 SDGs へ貢献できると考察された.

第四章 ナス降圧作用に対する GABA の影響評価

先行研究ではナスの血圧降下作用の主要関与成分は ACh であると推定され (Yamaguchi et al., 2019), 血圧が高めの人を対象とした臨床試験でナスの血圧降下効果を明らかにした. しかし, 臨床試験で使用された試料中には, ACh (1.92 mg/g DW) 以外の降圧物質である GABA (6.37 mg/g DW) も含まれていた (Nishimura et al., 2019). ナスの血圧降下臨床試験に使用されたナス試料の 1 日あたり GABA 摂取量は 7.65 mg であり (Nishimura et al., 2019), これまでに報告されていた最低有効用量 (10 mg) より少なかった (Inoue et al., 2003). 従って, ACh はナスに含まれる主要な降圧成分であると結論づけられた. しかし, GABA が降圧作用に関与していないことは証明されていない. そこで本章では, 降圧作用が示されたナス用量における GABA の降圧作用への影響を評価することを目的とし, 以下の試験を実施した. 臨床試験で使用したナス粉末と同程度の GABA 含有量で ACh 含有量を大幅に低減したナス粉末を調製し, 収穫直後のナスをナス対照試料, 純水とした対照経口投与試験を行い, 被験試料が血圧に与える影響を評価した. さらに, 併用効果を調査する際によく使用される q test を用いて, SHR の血圧低下作用に対する ACh と GABA の併用効果を評価した. 本章により, ナス摂取により血圧降下作用を発揮する主要な降圧成分が明らかになった.

試薬および方法

1. 試薬

ACh と GABA 併用効果調査試験試薬: 超純水は超純水製造装置 (sartorius arium 611, Sartorius Co., ドイツ) から製造した. 塩化 ACh は関東化学株式会社 (東京) より購入した. GABA は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した.

ナス中 GABA 降圧作用効果確認試験試薬: 超純水は超純水製造装置 (sartorius arium 611, Sartorius Co., ドイツ) から製造した. メタノール, ギ酸, 1-N 塩酸はナカライテスク株式会社 (京都) より購入した.

2. 試験動物

試験には日本チャールスリバー株式会社より購入した雄性 10 週齢または 14 週齢 SHR/NCr1Cr1j (ナス中 GABA 降圧作用効果確認試験) と日本エスエルシー株式会社より購入した雄性 10 週齢 SHR/Izm (ACh と GABA 併用効果調査試験) を用いた。搬入後のラットはプラスチックケージで飼育し、室温は $23 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $50 \pm 20\%$ 、明暗周期は 12 時間 (明期 5 時 30 分～17 時 30 分) に設定した。飼料 (MF; 日本チャールスリバー株式会社, 神奈川) および水道水は自由摂取とした。すべての動物試験は信州大学農学部動物実験指針に従って行った (承認番号: 290061)。

3. 試験試料の調製

ACh と GABA 併用効果調査試験: 試験群は ACh 群, GABA 群, ACh + GABA 群に分け, それぞれの投与濃度は表 4-1 に示した。GABA 濃度は SHR/Izm に対する血圧降下用量依存範囲 ($0.5\text{--}50 \mu\text{mol/kg body weight [BW]}$) から選定した (Hayakawa et al., 2004)。ACh 濃度は SHR/Izm に対する血圧降下最低有効用量 ($10 \mu\text{mol/kg BW}$) で設定した (Yamaguchi et al., 2021)。

表 4-1. ACh と GABA 併用効果調査試験投与量設定 ($\mu\text{mol/kg BW}$)

	ACh 群	GABA 群	ACh + GABA 群
投与量	10	5	10 + 5

ACh: acetylcholine; GABA: γ -aminobutanoic acid; BW: body weight.

ナス中 GABA 降圧作用効果確認試験: 原料に高知県産ナス (土佐鷹) を用いて被験試料およびナス対照試料を作製した。被験試料はナス果実を 2~3 cm 角に切断した後, -20°C で 15 ヶ月冷凍保存し, ACh のみを低減させた。ACh を低減させたナスを凍結乾燥機 (FDU-2110; EYELA Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) で凍結乾燥させた。凍結乾燥したナスをミルミキサー (28,000 rpm, 1 min; Wonder Crusher WC-3; OSAKA CHEMICAL Co., Ltd., Osaka,

Japan) で粉末状にし、ナス凍結乾燥粉末を作製した。これを被験試料 (ACh 低減ナス凍結乾燥粉末) とした。ナス対照試料は収穫直後のナス果実を 2~3 cm 角に切断した後、凍結乾燥機 (FDU-2110; EYELA Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) で凍結乾燥させた。凍結乾燥したナスをミルミキサー (28,000 rpm, 1 min; Wonder Crusher WC-3; OSAKA CHEMICAL Co., Ltd., Osaka, Japan) で粉末状にし、ナス凍結乾燥粉末を作製した。これをナス対照試料 (ナス凍結乾燥粉末) とした。以上の凍結乾燥粉末を純水に懸濁させてそれぞれの試験試料とした。

投与量は表 4-2 に示した。得られた試料を元に、経口投与試験での投与量を設定した。

表 4-2. ナス中 GABA 降圧作用効果効果確認試験投与量設定

		投与量 (mg/kg BW)	ACh (mol/kg BW)	GABA (mol/kg BW)
単回経口投与試験	ナス対照試料	0.059	1.0×10^{-9}	4.6×10^{-9}
	ACh 低減ナス試料	0.073	2.7×10^{-12}	
反復経口投与試験	ナス対照試料	0.59	1.0×10^{-8}	4.6×10^{-8}
	ACh 低減ナス試料	0.73	2.7×10^{-11}	

ACh: acetylcholine; GABA: γ -aminobutanoic acid; BW: body weight.

4. ACh および GABA 含有量の定量

凍結乾燥粉末 (10 mg) を 1.5 mL チューブに量り取り、50 mM 塩酸 (190 μ L) を添加し、ボルテックスで 3 分間攪拌した後、遠心分離 (1000 $\times g$, 室温, 3 min) し、上清を得た。残渣に再び 50 mM 塩酸 (200 μ L) を添加し攪拌、遠心分離、上清採取の操作を 2 回繰り返した。採取した上清をすべてメスフラスコ内で合わせ (約 600 μ L)、分析溶媒 (0.01%ギ酸 50%メタノール 含有水) を用いて 1mL にフィルアップしてよく混合し、定容後試料とした。定容後試料を分析溶媒で 50 倍希釈し、定量試料とし、LC-MS/MS を用いた標準添加法で定量した。

5. LC-MS/MS 分析条件

システムは Nexera-I LC-2040C 3D (UPLC) と LCMS-8045 (MS)、カラムは YMC-Triart PFP (4.6

mm×250 mm, 5 μm) を用いた。分析溶媒は 0.01% (v/v) ギ酸-50%メタノール含有水を用い、流速は 0.50 mL/min, 注入量は 1 μL, 分離温度は 40℃, 分析時間は 18 min, イオン化モードは ESI (+)・MRM, インターフェイス温度は 300℃, DL 温度は 250℃, ヒートブロック温度は 400℃, ネブライザーガスは 3.0 L/min, ドライイングガスとヒーティングガスは 10 L/hr の条件で LC-MS/MS 分析を行った。各化合物の質量電荷比 (m/z) の多重反応モニタリングモード遷移は次のとおり: 146.15 → 87.10 (ACh); 104.15 → 87.20 (GABA)。電圧設定は次のとおり: Q1 Pre-Bias (V) は -10.0 (ACh), -11.0 (GABA); collision energy (V) は, -14.0 (ACh), -13.0 (GABA); Q3 Pre-Bias (V) は, -17.0 (ACh), -17.0 (GABA)。

6. 併用効果調査試験

血圧の改善に対する ACh と GABA の併用効果を調査するために, q test を使用した (Jin, 2004; Su et al., 2004)。SHR/Izm を 1 週間の順化飼育後, 血圧測定を行い, 群分けを行った。試験群は ACh 群 (10 μmol/kg BW; $n = 6$), GABA 群 (5 μmol/kg BW; $n = 6$), ACh + GABA 群 (10 + 5 μmol/kg BW; $n = 6$)。10 週齢時に各試料単回経口投与を行った。各群は一夜絶食した後, 朝 9 時に経口ゾンデ投与を行い, 投与直前 0 時間および投与 6 時間後の血圧をテイルカフ法 (BP-98A, Softron Co., Tokyo, Japan) で測定した。臨床経験に基づいて収縮期血圧 (systolic blood pressure: SBP) が 20 mmHg 以上降下したラットを有効者, SBP が 20 mmHg 未満降下したラットを無効者と定義した (Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment of hypertension, 2016)。 q 値は $q = P_{A+B} / (P_A + P_B - P_A \times P_B)$ で求めた。そのうちの P (probability) は各群における有効者の確率 ($P = \text{有効者匹数} / \text{群内匹数}$) で, P_A , P_B と P_{A+B} は ACh 群, GABA 群と ACh + GABA 群の有効匹数の確率である。 P_{A+B} は有効者の実際確率であり, $(P_A + P_B - P_A \times P_B)$ は有効者の期待確率である。 $P_A + P_B$ は試薬 A と B を単独で使用した時の確率の和を示し, $P_A \times P_B$ は両試薬を単独で投与した時ラットが両試薬に反応する確率を示した。 $q < 0.85$ の場合は拮抗効果, $q > 1.15$ の場合は相乗効果, $q = 0.85 \sim 1.15$ の場合は相加効果である (Jin, 2004; Su et al., 2004)。

7. ナス中 GABA 降圧作用効果確認単回経口投与試験

SHR/NCr1Cr1j を 1 週間の順化飼育の後、血圧測定を行い、群分けを行った。試験群は被験群 (ACh 低減ナス試料投与, $n = 6$)、陽性対照群 (ナス対照試料投与, $n = 6$) および陰性対照群 (純水投与, $n = 6$) の 3 群を設定した。投与量はラット 1 匹あたり ACh 低減ナス試料を 0.073 mg/kg BW (ACh 2.7×10^{-12} mol/kg BW ; GABA 4.6×10^{-9} mol/kg BW), ナス対照試料を 0.059 mg/kg BW (ACh 10^{-9} mol/kg BW ; GABA 4.6×10^{-9} mol/kg BW) に設定した。ナス対照試料は SHR への降圧作用が確認されている ACh 用量 (10^{-9} mol/kg) を含み, ACh 低減ナス試料はナス対照試料と同量の GABA を含む量となるようにした。14 週齢時に各試料単回経口投与を行った。各群は一夜絶食した後、朝 9 時に経口ゾンデ投与を行い、投与直前および投与 3, 6, 9, 24 時間後の血圧をテイルカフ法 (BP-98A, Softron Co., Tokyo, Japan) で測定した。

8. ナス中 GABA 降圧作用効果確認反復経口投与試験

SHR/NCr1Cr1j を 1 週間の順化飼育後、血圧測定を行い、群分けを行った。試験群は被験群 (ACh 低減ナス試料投与, $n = 6$)、陽性対照群 (ナス対照試料投与, $n = 6$) および陰性対照群 (純水投与, $n = 6$) の 3 群を設定した。投与量はラット 1 匹あたり ACh 低減ナス試料を 0.73 mg/kg BW (ACh 2.7×10^{-11} mol/kg BW, GABA 4.6×10^{-8} mol/kg BW), ナス対照試料を 0.59 mg/kg BW (ACh 10^{-8} mol/kg BW, GABA 4.6×10^{-8} mol/kg BW) に設定した。10 週齢時に各試料反復経口投与を開始した。各試料は 18 時に 28 日間経口ゾンデ投与を行い、投与前および投与開始後 7, 14, 21, 28 日目の血圧をテイルカフ法 (BP-98A, Softron Co., Tokyo, Japan) で測定した。試験期間中、摂餌量、摂水量を週に 2 回、体重を週に 1 回測定した。

9. 統計処理

全て結果は平均値と標準誤差で示した。F-test を使用して、正規分布データの分散を確認した。Student's t-test を使用して等分散のデータグループの平均を比較し、Welch's t-test

を使用して異分散のデータグループの平均を比較した (Microsoft Excel 2019 MSO 16.0.13328.20262). $p < 0.05$ で有意と見なされた.

実験結果

1. SHR における ACh と GABA の併用効果調査

ACh の血圧降下作用への GABA の影響を確認するために, q test を用いて ACh と GABA の併用効果を調査した. 表 4-3 は, ACh, GABA および ACh と GABA 混合試薬を SHR に投与後 6 時間の SBP 変化を示した. 投与後 6 時間の SBP は投与前 0 時間より 20 mmHg 以上降下した場合が有効降圧と見なす. 表 4-4 は, ACh, GABA および ACh と GABA 混合試薬で処理された SHR における確率と q 値の結果を示した. ACh 群の 6 匹のうち 2 匹が有効者であり, 確率は $1/3$ となった ($P_A = 2/6 = 1/3$). GABA 群の 6 匹のうち 2 匹が有効者であり, 確率は $1/3$ となった ($P_B = 2/6 = 1/3$). ACh + GABA 群の 6 匹のうち 3 匹が有効者であり, 確率は $1/2$ となった ($P_{A+B} = 3/6 = 1/2$). 上記の確率を q test の計算式 [$q = P_{A+B} / (P_A + P_B - P_A \times P_B)$] に代入すると, q 値は 0.90 となった ($q < 0.85$ の場合は拮抗効果, $q > 1.15$ の場合は相乗効果, $q = 0.85 \sim 1.15$ の場合は相加効果). q 値は 0.85~1.15 の間であるため, ACh と GABA 混合試薬は SBP の降下に相加効果をもたらすことが確認された. 従って, GABA は ACh の血圧降下作用にほぼ影響しないと考えられる.

表 4 - 3 . ACh と GABA の併用単回投与における投与 6 時間後 SHR の SBP 変化 ($n = 6$)

Drug	Dose (mol/kg BW)	Identification	SBP (mm Hg)		
		number	Before	After	Change
ACh	10×10^{-6}	A1	178	157	-21
		A2	184	176	-9
		A3	186	163	-23
		A4	187	206	19
		A5	195	191	-5
		A6	168	161	-7
GABA	5×10^{-6}	G1	179	170	-8
		G2	170	186	16
		G3	190	169	-22
		G4	157	147	-11
		G5	188	166	-22
		G6	157	145	-11
ACh + GABA	$10 \times 10^{-6} + 5 \times 10^{-6}$	AG1	188	194	6
		AG2	191	176	-15
		AG3	176	175	-1
		AG4	176	144	-32
		AG5	191	171	-21
		AG6	206	165	-41

ACh: acetylcholine; GABA: γ -aminobutanoic acid; BW: body weight; SBP: systolic blood pressure. $q = P_{A+B} / (P_A + P_B - P_A \times P_B)$; P_A : ACh 群の確率, P_B : GABA 群の確率, P_{A+B} : ACh + GABA 群の確率.

表 4－4． ACh と GABA で投与された SHR における SBP 降下の確率と q 値 ($n = 6$)

Drug	Dose (mol/kg BW)	Probability	q Value
ACh	10×10^{-6}	1/3	0.90
GABA	5×10^{-6}	1/3	
ACh + GABA	$10 \times 10^{-6} + 5 \times 10^{-6}$	1/2	

ACh: acetylcholine; GABA: γ -aminobutanoic acid; BW: body weight; SBP: systolic blood pressure.

2. 試験試料中 ACh および GABA 含有量の定量結果

次に、ナス中 GABA の血圧降下作用を確認するために、ACh 含有量を大幅に低減したナス粉末を作製し、ACh 低減ナス試料とした。ACh 低減ナス試料の ACh 含有量はナス対照試料の 0.22% であり、ACh 含有量を大幅に低減させることができた。一方、GABA 含有量はナス対照試料と同程度であった (表 4－5)。そこで、SHR を被験者群 (ACh 低減ナス試料)、陽性対照群 (ナス対照試料)、陰性対照群 (純水) に群分けし、経口投与実験を行った。

表 4－5． ACh, GABA 定量結果 (mg/g DW)

試料名	ACh	GABA
ACh 低減ナス試料	0.0055 ± 0.00070	6.5 ± 0.28
ナス対照試料	2.5 ± 0.12	8.1 ± 0.10

ACh: acetylcholine; GABA: γ -aminobutanoic acid; DW: dry weight.

3. 単回経口投与試験による短期的な収縮期血圧変化

陽性対照群では投与後に陰性対照群に対して 3, 6 時間に低下傾向, 9 時間後に有意な低値を示し ($p < 0.05$), 陽性対照群による短期的な降圧作用を確認した. 被験群では投与後に陰性対照群に対して有意差が認められなかった. 被験群の SBP 変動は陰性対照群とほぼ同じ値を示し, 降圧作用は見られなかった.

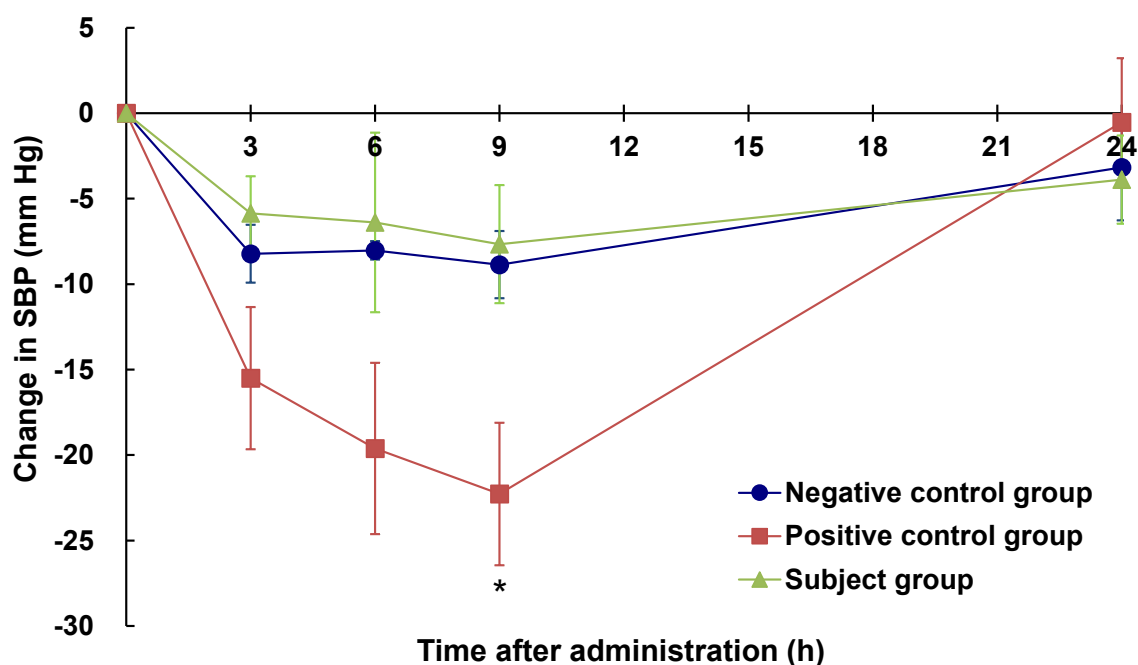


図 4-1. 単回経口投与後 SBP 経時変動. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus negative control group, evaluated using Student's t -test (homoscedasticity), and Welch's t -test (heteroscedasticity). SBP: systolic blood pressure. Negative control group: 陰性対照群; Positive control group: 陽性対照群; Subject group: 被験群.

4. 反復経口投与試験による中長期的な収縮期血圧変化

図 4-2 (d) は SBP 変動を示し, 被験群は陰性対照群との有意差はなく, 緩やかな血圧上昇を確認した. 陽性対照群は陰性対照群と比較して投与開始後 14, 21 日目に有意な低値を示し, ナスによる血圧上昇抑制作用を確認した. 以上の結果から, ナスにおける主要な降圧化合物は ACh であることが判明した. 反復経口投与試験期間中 SHR の全体的な状態は良好であり, 図 4

－ 2 (a-c) に示すように、陽性対照群と被験群の餌摂取量、水分摂取量、体重は陰性対照群と有意差が認められなかった。

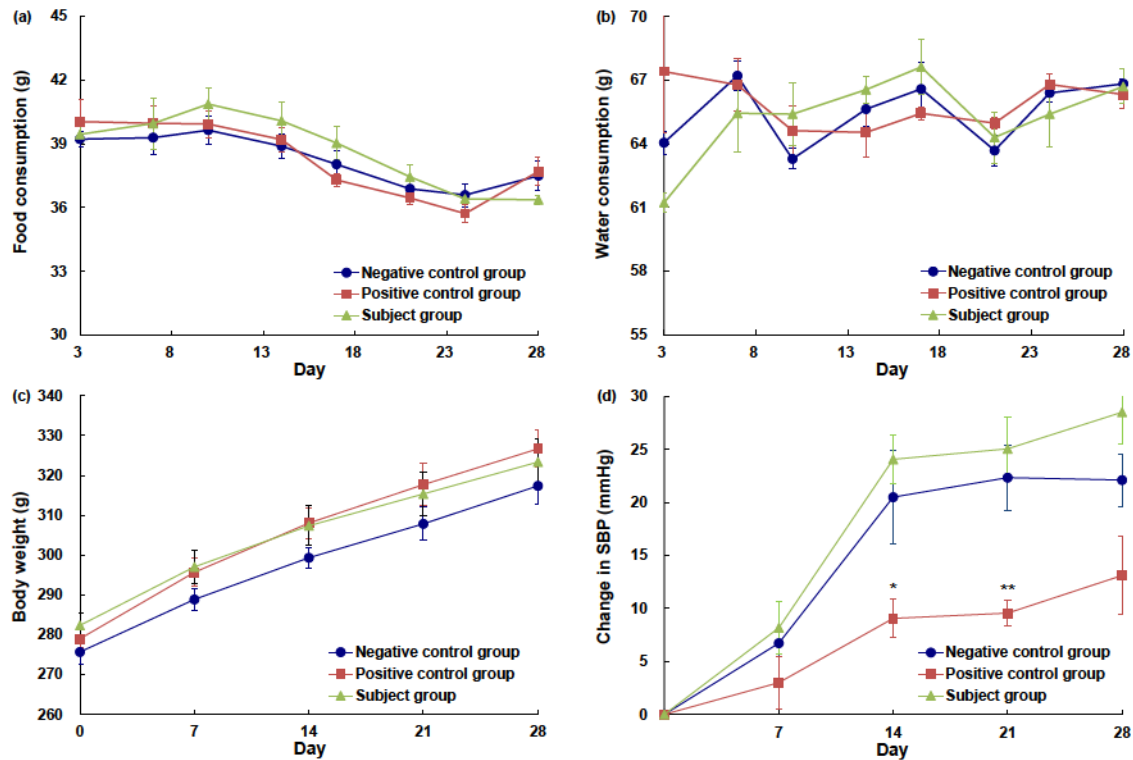


図 4－ 2. 試料長期投与中 SHR の餌摂取量 (a), 水分摂取量 (b), 体重 (c), 反復経口投与後 SBP 経時変動 (d). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus negative control group, evaluated using Student's t -test (homoscedasticity), and Welch's t -test (heteroscedasticity). SBP: systolic blood pressure. Negative control group : 陰性対照群 ; Positive control group : 陽性対照群 ; Subject group : 被験群.

考察

本章では、ナスの降圧効果に対する GABA の影響を明らかにするために、ACh と GABA の併用効果を調査した。さらに、ナスに含まれる GABA の降圧効果を確認するため、ACh 低減ナス試料を調製し、ACh の含有量を低減されて GABA 摂取による降圧作用への影響を評価した。その結果、ACh 低減ナス試料では降圧作用を示さなかったことから、ナスの主要な血圧降下化合物が ACh であり、ACh 含量を基準としたナスの降圧作用に、GABA はほぼ影響しないことを明らかにした。

併用効果調査結果により、SHR において ACh と GABA の併用効果が血圧降下に相加効果をもたらすことが明らかになった。ACh は経口摂食した後体内に吸収されず消化管上の M_3mAChR に作用することにより求心性迷走神経を刺激し、自律神経反射を介して遠心性交感神経活動を阻害し、交感神経末梢からの NAD 分泌を阻害によって血圧上昇を抑えるとされている (Yamaguchi et al., 2022)。求心性副交感神経活動の亢進は吻側延髄腹外側野の活動が抑制され、結果として吻側延髄腹外側野の活動による交感神経活動への刺激が減少する (Buckey et al., 2003; Katsurada et al., 2021)。経口投与した ACh も同じ経路で交感神経の活動を阻害したと推測される。GABA は経口摂食した後体内に吸収され (Yamatsu et al., 2016)、シナプス前部或は神経節 (末梢神経) に存在する $GABA_b$ 受容体と結合することによって交感神経の活動を直接抑制することで NAD の分泌を抑制し血圧上昇を抑えるとされている (Kimura et al., 2002; Hayakawa et al., 2002)。経口投与した ACh と GABA の血圧低下メカニズムから、ACh はシナプス前部や神経節部位 (末梢神経) の $GABA_b$ 受容体への GABA の結合に影響を与えず、ACh の経口投与により GABA の交感神経活動抑制作用が増強されることはないと考えられる。経口投与した GABA は血液脳関門を透過できないため (Kuriyama and Sze, 1971)、中枢神経系に移行できず、ACh の降圧作用に影響を与えないと示唆された。以上のことから、ACh と GABA の併用が相加効果であった要因は ACh と GABA の作用点が完全に異なり、それぞれ独立したメカニズムで交感神経活動を抑制するため、最終的な降圧作用を引き起す NAD 分泌量の減少が、それぞれの交感神経活動抑制によって減少した NAD 分泌量の和になると考えられる。以上の結果から経口投与した GABA は ACh の降圧作用に対して影響しないと判断した。併用効果に関する研究の中、フェノバルビタールとスピロノラク톤の併用効果の調査報告では、UDP-グルクロン酸転移酵素に対する作用は相加効果であることが判明されており、これはフェノバルビタールとスピロノラク톤が独立したメカニズムで作用していることが原因であると考察されている (Mottino et al., 1989)。プラバスタチンとオルメサルタンの併用効果の調査報告では、梗塞後の心筋細胞肥大に対する減弱効果は相加効果であり、その原因は異なるメカニズムによると考えられている (Lee et al., 2006)。以上の事例は、併用効果における相加効果が独立した

メカニズムによるものであることを示しており、本研究で血圧降下作用における ACh と GABA の併用が相加効果であるという結論を支持していると考えられた。

次に、ナス中の GABA の血圧降下作用を確認するため、ACh 低減ナス凍結乾燥粉末を作製した。ナス対照試料では収穫直後のナスに凍結乾燥処理を行うことに対して、ACh 低減ナス試料の調製では、収穫後-20℃で15ヶ月冷凍保存することで、ナス対照試料の0.22%にAChを低減させることができた。-20℃長期冷凍保存によってAChが低減する要因は、ナスに元来含まれるCEによって徐々にAChが分解されたためであると考えられる (Fluck et al., 1975)。

単回経口投与試験では、SHR に対して被験群、陽性対照群または陰性対照群を設け、ACh 低減ナスまたはナス試料を投与した場合の1日の降圧作用を陰性対照群と比較することで評価した。被験群は陰性対照群とほぼ同じ値を示した一方で、陽性対照群では先行研究と同様、短期的な降圧作用を確認した (Yamaguchi et al., 2021)。

反復経口投与試験では、ACh 低減ナスまたはナスを SHR に対して中長期的に投与し、生体において、一般状態および血圧の変化を陰性対照群と比較することで評価した。被験群は陰性対照群と同じ血圧変動を示し、SHR の血圧上昇を確認した一方で、陽性対照群は先行研究で示された結果と同様にナスの中長期的な血圧上昇抑制作用を確認した (Yamaguchi et al., 2019)。

ACh 低減ナス試料はナス対照試料と比較して同量の GABA を含み、ACh 含量を大幅に低減させた。ACh 低減ナス試料とナス対照試料を SHR に投与した結果、ACh 低減ナス試料群の血圧低下が見られず、ACh が分解されていないナス対照試料群でのみ降圧作用が示され、ナスの主要な血圧降下物質が ACh であることが証明された。ACh 含有量を基準としたナス中の GABA 含有量では血圧降下作用を示さないことを確認した。SHR に対して GABA の血圧降下低用量は 19 $\mu\text{mol/kg BW}$ と報告されているが (Yang et al., 2012)、今回の試験で ACh 低減ナス試料 (GABA 投与量: $4.6 \times 10^{-3} \mu\text{mol/kg BW}$) による降圧作用が見られなかったのは、投与したナス粉末中の GABA 含有量が有効用量に達していなかったためと考えられる。臨床試験で報告されている GABA の有効用量は血圧降下作用では 10~80 mg/日 (Inoue et al., 2003; Shimada et al., 2009; Matsubara et al., 2002)、精神安定作用では 26.4~70 mg/日 (Sonoda et al., 2001;

Okada et al., 2000; Horie et al., 2003) である。さらに、世界各国の多くのダイエットサプリメントにおける GABA の 1 日あたり推奨摂取量は 100 mg であり、100 mg を 1 日数回に分けて摂取することが望ましいとされていた (Oketch-Rabah et al., 2021)。一方、ACh では僅か 2.3 mg/日で血圧や心理状態が改善できる (Nishimura et al., 2019)。ACh は体内に吸収されず血圧を降下するため、過剰摂取による副作用を心配する必要がなく (Yamaguchi et al., 2022)、一般的な血圧降下成分である GABA よりも低い有効用量であることから、ACh は GABA より優れた食品機能性化合物であることが証明された。また、本章の結果から、ナスの摂食量は GABA の含有量に関わらず、ACh 含有量のみで設定できることが示唆された。

総括

ナスは世界生産量 6 位の主要な野菜として人々の食生活を支えている。しかし、ナスは栄養価が他の野菜と比較して乏しいと言われてきた。そこで、先行研究では 2019 年に臨床試験で 2.3 mg/人・日の ACh を含むナス粉末の継続摂取が血圧や心理状態を改善することが明らかとなりナスの健康維持増進の新たな可能性が明らかとなった。また、SHR を用いたナス乾燥粉末の単回経口投与試験と反復経口投与試験によって、血圧降下作用を発揮した物質が ACh であることが推定された。これらの研究によって、ACh がナスに含まれる新規な食品機能性成分であることが示された。しかし、ナス中の ACh 含量についての調査事例がなく、新規食品機能性成分である ACh の情報はまだ少ない。そこで本研究では、ナスに含まれる ACh の調査を目的として研究を行った。

第一章では、コリン化合物が生鮮農産物に広く含まれており、特にナスでは他の生鮮農産物より 2900 倍以上の ACh が含まれていることを明らかにした。ナスは品種によらず ACh 高含有であった。保存中にはナスに含まれる CE によって ACh が徐々に分解され減少するが、ナス中の ACh の半減期は消費期限よりも長く、機能性食品としてのナス使用の実現可能性が証明された。これらの結果から、ナスの ACh 含有量は他の生鮮農産物と比較して非常に多く、ナスの機能性食品活用に向けた重要な第一歩となった。

第二章では、ナス品種間で ACh 含有量に大きなばらつきがあること、ナス植物体の中ではナス果実の ACh 含有量が最も高く、ACh 含有量が成長とともに増加することを明らかにした。ナス果実中の ACh はほぼ均一に分布し、ナス中の ACh は加熱調理では減少せず、かえって増加した。これらのことから、ナスは、ナス機能性食品の工業生産に無駄なく、コストも抑えることができる優れた原料であり、多様な乾燥方法で乾燥できる安定的な機能性食品素材であることが示唆された。本章の結果はナス工業化の実現に重要な参考資料になると考えられる。

第三章では、世界各地を代表する品種・系統のセットであるナスコアコレクション 100 品種は、すべて十分量の ACh を含有しており、ACh はナス共通の食品機能性成分であることが明らかになった。ナス中の ACh の定量結果から、原産地がアジア、果実形状が球形、果皮色が緑色

のナスが ACh 高含有ナスの特徴と判明した。以上の結果から、世界中のナスは、血圧を改善する機能性食品として利用できる可能性がある。また、ACh 高含有量品種として確認された 5 品種（WEC040, WEC043, WEC045, WEC059, WEC061）は血圧降下特性を持つ優れた機能性食品素材であると予想される。本章の結果により、ACh 高含有ナスの形態的特徴と ACh 高含有ナス品種を特定した。これらの品種は原料の選定や新たな ACh 高含有品種開発の基盤になると考えられる。

第四章では、高血圧自然発症ラットである SHR を用いて、GABA のナス降圧作用に対する影響を評価し、ナス中の血圧降下作用の主要関与成分を特定した。ACh と GABA の併用効果調査の結果、ACh と GABA は相加効果が示された。次に、ナス中の GABA の血圧降下作用を確認するため、ACh をほとんど含まないが GABA を含む ACh 低減ナス試料（ACh 低減ナス凍結乾燥粉末）と ACh と GABA を含むナス対照試料（ナス凍結乾燥粉末）を SHR に投与し、血圧変化を調べた。その結果、ナス対照試料のみ血圧降下作用が示された。これらの結果からナスの血圧降下作用の主要関与成分は ACh であることが明らかとなった。ヒト臨床試験に用いた用量のナス粉末中の GABA は有効用量以下であり、また、ACh の血圧降下作用を増強する効果がないことから、GABA はナス摂取による血圧降下作用には影響しないと推定された。経口投与した ACh は体内に吸収されず、一般的な血圧降下機能性成分である GABA より有効用量が低く、少ない量で効果を発揮する生鮮農産物の安全的な機能性食品成分として優れていると考察した。

本研究により、ナス果実は、他の生鮮農産物よりも豊富な ACh を含有しており、ナスに含まれる ACh の半減期は消費期限よりも長いことが判明した。ACh はナス果実に偏在しており、果実の中では均一に分布していた。ACh は品種によらず、ナスに共通の食品機能性成分であり、原産地アジア、球形、緑果皮色が ACh 高含有ナスの特徴であった。さらに、ナス中血圧降下作用の主要関与成分は ACh であった。これらの結果から、ナスは、他の生鮮農産物よりも ACh を豊富に含んでおり、ACh を関与成分とした機能性食品の原料として優れた加工特性を有していると考えられる。ナスは機能性野菜として健康維持増進に役立てられる可能性が示され、新規な機能性食品原料として注目される。さらに、ACh はよく知られた血圧降下作用機能性成分で

ある GABA の有効用量より低く、過剰摂取による副作用を心配する必要がないことから、新規な機能性食品成分として安全且つ低用量で高血圧を予防、改善することが期待できる。将来、新規機能性食品成分 ACh を含む機能性食品有効活用するための基礎研究として本研究成果が活用され、食資源中の ACh 調査によって有望な ACh 含有量農林水産食資源が特定され、ACh の摂取源が多様化してより健康な社会が実現することを希望する。

参考文献

- Abe, K., & Ogata, K. Effects of temperature and humidity on pitting injury of eggplant fruits during storage Chilling injury in eggplant fruits. III. *Journal of institute of cold chain*, 2(3), 104-108, **1976**.
- Abe, K., & Ogata, K. Chilling Injury in Eggplant Fruits V. Changes of K ion leakage and contents of phospholipids during storage and effects of phenolic compounds on K ion leakage, phospholipid content, and ultrastructural changes of eggplant. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 47(1), 111-120, **1978**.
- Arkoub - Djermoune, L., Boulekbache - Makhlouf, L., Zeghichi - Hamri, S., Bellili, S., Boukhalifa, F., & Madani, K. Influence of the thermal processing on the physico-chemical properties and the antioxidant activity of a solanaceae vegetable: eggplant. *Journal of Food Quality*, 39(3), 181-191, **2016**.
- Bhaduri, P. N. Interrelationship of non-tuberiferous species of *Solanum* with some consideration of the origin of brinjal (*S. melongena* L.). *Indian. J. Genet.*, 11, 75-82, **1951**.
- Buckey, J. C., & Homick, J. L. (Eds.). *The Neurolab Spacelab mission: neuroscience research in space: results from the STS-90, Neurolab Spacelab mission* (No. 535). Government Printing Office, **2003**.
- Buttery, B. R., & Buzzell, R. I. The relationship between chlorophyll content and rate of photosynthesis in soybeans. *Canadian Journal of Plant Science*, 57(1), 1-5, **1977**.
- Casati, L., Pagani, F., Braga, P. C., Scalzo, R. L., Sibilia, V. Nasunin, a new player in the field of osteoblast protection against oxidative stress. *Journal of Functional Foods*, 23, 474-484, **2016**.
- Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment of hypertension. *European Medicines Agency*, **2016**.
- Dale, H. H. Walter Ernest Dixon Memorial Lecture. Pharmacology and nerve-endings. *Proc R Soc Med*, 28, 15-28, **1935**.
- Dale, H. H., & Dudley, H. W. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *The Journal of physiology*, 68(2), 97, **1929**.
- Daunay, M. C., Aubert, S., Frary, A., Doganlar, S., Lester, R. N., Barendse, G., Weerden, G., Hennart, J. W., Haanstra, J., Dauphin, F., Jullian, E. Eggplant (*Solanum melongena*) fruit color: pigments, measurements and genetics. In *Proceedings of the 12th EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant* (pp. 108-116), **2004, May**.

- Daunay, M. C., Janick, J. History and iconography of eggplant. *Chronica Horticulturae*, 47(3), 16-22, **2007**.
- Davis, R., & Koelle, G. B. Electron microscope localization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the superior cervical ganglion of the cat. I. Normal ganglion. *The Journal of cell biology*, 78(3), 785-809, **1978**.
- Dunant, Y., & Israël, M. The release of acetylcholine. *Scientific American*, 252(4), 58-69, **1985**.
- Emanuele, S., D'Anneo, A., Bellavia, G., Vassallo, B., Lauricella, M., De Blasio, A., Vento, R., Tesoriere, G. Sodium butyrate induces apoptosis in human hepatoma cells by a mitochondria/caspase pathway, associated with degradation of β -catenin, pRb and Bcl-XL. *European Journal of Cancer*, 40(9), 1441-1452, **2004**.
- Ewins, A. J. Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Biochemical Journal*, 8(1), 44, **1914**.
- Fluck, R. A., & Jaffe, M. J. Cholinesterases from plant tissues VI. Preliminary characterization of enzymes from *Solanum melongena* L. and *Zea mays* L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 410(1), 130-134, **1975**.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Statistics Division. Forestry Production and Trade. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on **10 May 2022**).
- Grob, D., & Harvey, J. C. Effects in man of the anticholinesterase compound sarin (isopropyl methyl phosphonofluoridate). *The Journal of Clinical Investigation*, 37(3), 350-368, **1958**.
- Guimarães, P. R., Galvão, A. M. P., Batista, C. M., Azevedo, G. S., Oliveira, R. D., Lamounier, R. P., Freire, N., Barros, A. M. D., Sakurai, E., Oliveira, J. P., Vieira, E. C., Alvarez-Leite, J. I. Eggplant (*Solanum melongena*) infusion has a modest and transitory effect on hypercholesterolemic subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 1027-1036, **2000**.
- Guo, W. X., Pye, Q. N., Williamson, K. S., Stewart, C. A., Hensley, K. L., Kotake, Y., Floyd, R. A., Broyles, R. H. Mitochondrial dysfunction in choline deficiency-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(5), 641-650, **2005**.
- Hartmann, E., & Kilbinger, H. Gas-liquid-chromatographic determination of light-dependent acetylcholine concentrations in moss callus. *Biochemical Journal*, 137(2), 249, **1974**.
- Hayakawa, K., Kimura, M., & Kamata, K. Mechanism underlying γ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 438(1-2), 107-113, **2002**.

- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., & Yamori, Y. Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 411-417, **2004**.
- Horie, H., Ando, A., Saito, T. The contents of γ -amino butyric acid in eggplant and its accumulation with heat treatment. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 60, 661-664, **2013**.
- Horie, K., Higashiguchi S. and Yokogoshi H. Influence of GABA upon immunity and mental health. *FOOD Style* 21, 7(3), 64-68, **2003**.
- Horiuchi, Y., Kimura, R., Kato, N., Fujii, T., Seki, M., Endo, T., Kato, T., Kawashima, K. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sciences*, 72(15), 1745-1756, **2003**.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., & Sansawa, H. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(3), 490-495, **2003**.
- Israel, M., & Manaranche, R. The release of acetylcholine: from a cellular towards a molecular mechanism. *Biology of the Cell*, 55(1 - 2), 1-14, **1985**.
- Jbilo, O., Bartels, C. F., Chatonnet, A., Toutant, J. P., & Lockridge, O. Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA. *Toxicon*, 32(11), 1445-1457, **1994**.
- Jin, Z. J. About the evaluation of drug combination. *Acta Pharmacol Sin*, 25, 146-147, **2004**.
- Katsurada, K., Ogoyama, Y., Imai, Y., Patel, K. P., & Kario, K. Renal denervation based on experimental rationale. *Hypertension Research*, 44(11), 1385-1394, **2021**.
- Khan, R. *Solanum melongena* and its ancestral forms. In Solanaceae I. The Biology and Taxonomy of the Solanaceae; Hawkes, J.G., Lester, R.N., Skelding, A.D., Eds.; Academic Press: London, UK, pp. 629-636, **1979**.
- Khan, R. *Solanum melongena* and the problem of its origin and phylogenetic affinities. *J. Indian Bot. Soc.*, 58, 99-109, **1979**.
- Kimura, M., Hayakawa, K., & Sansawa, H. Involvement of γ -aminobutyric acid (GABA) B receptors in the hypotensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 89(4), 388-394, **2002**.
- Kontoangelos, K., Economou, M., & Papageorgiou, C. Mental health effects of COVID-19 pandemia: a review of clinical and psychological traits. *Psychiatry Investigation*, 17(6), 491, **2020**.

- Kuriyama, K., & Sze, P. Y. Blood-brain barrier to H³- γ -aminobutyric acid in normal and amino oxyacetic acid-treated animals. *Neuropharmacology*, 10(1), 103-108, **1971**.
- Lee, T. M., Lin, M. S., Chou, T. F., & Chang, N. C. Additive effects of combined blockade of AT₁ receptor and HMG-CoA reductase on left ventricular remodeling in infarcted rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(3), H1281-H1289, **2006**.
- Loewi, O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 189(1), 239-242, **1921**.
- Mäntymaa, P., Siitonen, T., Guttorm, T., Säily, M., Kinnula, V., Savolainen, E. R., & Koistinen, P. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. *British Journal of Haematology*, 108(3), 574-581, **2000**.
- Martini, S., Conte, A., Cattivelli, A., & Tagliazucchi, D. Domestic cooking methods affect the stability and bioaccessibility of dark purple eggplant (*Solanum melongena*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, 341, 128298, **2021**.
- Matsubara, F., Ueno, H., Tadano, K., Suyama, T., Imaizumi, K., Suzuki, T., ... & Saruta, T. Effects of GABA supplementation on blood pressure and safety in adults with mild hypertension. *Japanese Pharmacology and Therapeutics*, 30(11), 963-972, **2002**.
- Matsubara, K., Kaneyuki, T., Miyake, T., & Mori, M. Antiangiogenic activity of nasunin, an antioxidant anthocyanin, in eggplant peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6272-6275, **2005**.
- McNaught, A. D. Compendium of chemical terminology (Vol. 1669). Oxford: Blackwell Science, **1997**.
- Miura, G. A., & Shih, T. M. Cholinergic constituents in plants: characterization and distribution of acetylcholine and choline. *Physiologia Plantarum*, 61(3), 417-421, **1984**.
- Miyatake, K., Shinmura, Y., Matsunaga, H., Fukuoka, H., Saito, T. Construction of a core collection of eggplant (*Solanum melongena* L.) based on genome-wide SNP and SSR genotypes. *Breeding Science*, 69(3), 498-502, **2019**.
- Momonoki, Y. S., Kawai, N., Takamure, I., & Kowalczyk, S. Gravitropic response of acetylcholinesterase and IAA-inositol synthase in lazy rice. *Plant Production Science*, 3(1), 17-23, **2000**.
- Mottino, A. D., Guibert, E. E., & Garay, E. A. R. Additive effect of combined spironolactone and phenobarbital treatment on hepatic bilirubin UDP-glucuronyltransferase. *Biochemical Pharmacology*, 38(5), 851-853, **1989**.

- Nakamura, K., Naramoto, K., & Koyama, M. Blood-pressure-lowering effect of fermented buckwheat sprouts in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 406-415, **2013**.
- Nakamura, K., Okitsu, S., Ishida, R., Tian, S., Igari, N., & Amano, Y. Identification of natural lactoylcholine in lactic acid bacteria-fermented food. *Food Chemistry*, 201, 185-189, **2016**.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). NIH Nutrition Research Report, 2015 & 2016; U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA, **2017**.
- Nishimura, M., Suzuki, M., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Tsubaki, K., Fujita, T., Nishihira, J., Nakamura, K. Daily ingestion of eggplant powder improves blood pressure and psychological state in stressed individuals: A randomized placebo-controlled study. *Nutrients*, 11(11), 2797, **2019**.
- Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R., Takahashi, T. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 47(8), 596-603, **2000**.
- Oketch-Rabah, H. A., Madden, E. F., Roe, A. L., & Betz, J. M. United States Pharmacopeia (USP) safety review of gamma-aminobutyric acid (GABA). *Nutrients*, 13(8), 2742, **2021**.
- Ota, Y. Physiological and genetical studies on the pungency of Capsicum, IV. Secretory organs, receptacles and distribution of capsaicin in the Capsicum fruit. *Japanese Journal of Breeding*, 12(3), 179-183, **1962**.
- Sagane, Y., Nakagawa, T., Yamamoto, K., Michikawa, S., Oguri, S., & Momonoki, Y. S. Molecular characterization of maize acetylcholinesterase. A novel enzyme family in the plant kingdom. *Plant Physiology*, 138(3), 1359-1371, **2005**.
- Samaniego-Sánchez, C., Castañeda-Saucedo, M. C., Villalón-Mir, M., & De La Serrana, H. L. Phenols and the antioxidant capacity of Mediterranean vegetables prepared with extra virgin olive oil using different domestic cooking techniques. *Food Chemistry*, 188, 430-438, **2015**.
- Samuels, J. Genetically Engineered Bt. Brinjal and the Implications for Plant Biodiversity, **2012**. Available online: <http://www.greenpeace.org/international/Global/international/publications/agriculture/2012/GE-Bt-brinjal-revisited.pdf> (accessed on **12 December 2022**).
- Scalzo, R. L., Fibiani, M., Francese, G., D' Alessandro, A., Rotino, G. L., Conte, P., & Mennella, G. Cooking influence on physico-chemical fruit characteristics of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Food Chemistry*, 194, 835-842, **2016**.

- Scorsatto, M., Rosa, G., Luiz, R. R., da Rocha Pinheiro Mulder, A., Teodoro, A. J., de Oliveira, G. M. M. Effect of Eggplant Flour (*Solanum melongena* L.) associated with hypoenergetic diet on antioxidant status in overweight women - a randomised clinical trial. *International Journal of Food Science & Technology*, 54, 2182-2189, **2019**.
- Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T., & Matsubayashi, T. Anti-hypertensive effect of γ -aminobutyric acid (GABA)-rich Chlorella on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clinical and Experimental Hypertension*, 31(4), 342-354, **2009**.
- Sine, J. P., Ferrand, R., Cloarec, D., Lehur, P. A., & Colas, B. Human intestine epithelial cell acetyl- and butyrylcholinesterase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 108(2), 145-149, **1991**.
- Singh, A. P., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G. S., Pasakdee, S. Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry*, 114, 955-961, **2009**.
- Sonoda, H. Functionality of the GABA derived from lactic acid bacterium fermentation-Effect on climacteric disturbance and presenile mental disorder. *FOOD Style* 21, 5(5), 92-96, **2001**.
- Steyn, W. J., Wand, S. J. E., Holcroft, D. M., & Jacobs, G. J. N. P. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155(3), 349-361, **2002**.
- Strecker, A. Ueber einige neue Bestandtheile der Schweinegalle. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 123(3), 353-360, **1862**.
- Su, D. F., Xu, L. P., Miao, C. Y., Xie, H. H., Shen, F. M., & Jiang, Y. Y. Two useful methods for evaluating antihypertensive drugs in conscious freely moving rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(2), 148-151, **2004**.
- The AVRDC Vegetable Genetic Resources Information System. Available online at: <https://avrdc.org/our-work/managing-germplasm> (accessed on **10 June 2022**).
- The Plant List. Available online: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Solanaceae/> (accessed on **12 December 2022**).
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry, pp. 4-10, **2018**. Available online: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (accessed on **30 July 2020**).

- USDA 2017–2018 FNDDS At A Glance – Ingredient Nutrient Values Available online: <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/food-surveys-research-group/docs/fndds-download-databases/> (accessed on **27 January 2021**).
- USDA Database for the Choline Content of Common Foods Release Two. <https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-database-choline-content-common-foods-release-2-2008/resource/7d830675-b12b-4517-adbc/> (accessed on **26 August 2022**).
- Uzun, S. Effect of light and temperature on the phenology and maturation of the fruit of eggplant (*Solanum melongena*) grown in greenhouses. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 35(1), 51–59, **2007**.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., & Kirkpatrick, C. J. The Non-neuronal Cholinergic System The Biological Role of Non-neuronal Acetylcholine in Plants and Humans. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 85(1), 2–10, **2001**.
- World Health Organization. *Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation* (Vol. 916). World Health Organization, **2003**.
- Yamada, T., Fujii, T., Kanai, T., Amo, T., Imanaka, T., Nishimasu, H., Wakagi, T., Shoun, H., Kamekura, M., Kamagata, Y., Kato, T., & Kawashima, K. Expression of acetylcholine (ACh) and ACh-synthesizing activity in Archaea. *Life Sciences*, 77(16), 1935–1944, **2005**.
- Yamaguchi, S., Hayasaka, Y., Suzuki, M., Wang, W., Koyama, M., Nagasaka, Y., & Nakamura, K. Antihypertensive Mechanism of Orally Administered Acetylcholine in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients*, 14(4), 905, **2022**.
- Yamaguchi, S., Matsumoto, K., Koyama, M., Tian, S., Watanabe, M., Takahashi, A., Miyatake, K., Nakamura, K. Antihypertensive effects of orally administered eggplant (*Solanum melongena*) rich in acetylcholine on spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 276, 376–382, **2019**.
- Yamaguchi, S., Matsumoto, K., Wang, W., & Nakamura, K. Differential antihypertensive effects of oral doses of acetylcholine between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Foods*, 10(9), 2107, **2021**.
- Yamamoto, K., Oguri, S., Chiba, S., & Momonoki, Y. S. Molecular cloning of acetylcholinesterase gene from *Salicornia europaea* L. *Plant Signaling & Behavior*, 4(5), 361–366, **2009**.
- Yamatsu, A., Yamashita, Y., Pandharipande, T., Maru, I., & Kim, M. Effect of oral γ -aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans. *Food Science and Biotechnology*, 25(2), 547–551, **2016**.

Yang, N. C., Jhou, K. Y., & Tseng, C. Y. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 132(4), 1796-1801, **2012**.

Yun, N., Kang, J. W., & Lee, S. M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(10), 1249-1255, **2012**.

Zeisel, S. H. Vitamin-like molecules. *Modern Nutrition and Health and Disease*, 440-452, **1988**.

Zeisel, S. H. Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition*, **2000**.

Zeisel, S. H., Da Costa, K. A., Franklin, P. D., Alexander, E. A., Lamont, J. T., Sheard, N. F., & Beiser, A. L. E. X. A. Choline, an essential nutrient for humans. *The FASEB journal*, 5(7), 2093-2098, **1991**.

Zeisel, S. H., Mar, M. H., Howe, J. C., & Holden, J. M. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1302-1307, **2003**.

消費者庁：機能性表示食品の届出情報データベース

https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/search/ (2023年3月14日閲覧).

学研・たまねぎ舎編『何つくる？迷ったらこの1冊！こだわり野菜づくり 品種ガイドブック 夏野菜編 133 品種』学研パブリッシング〈野菜だより特別編集〉, 29-44 頁, **2015 年 3 月 28 日**.

高田秀之. 機能性表示野菜に対する消費者意識と付加価値評価. フードシステム研究, 25(3), 97-105, **2018**.

重富貴子. 生鮮食品の「機能性表示」と新たなマーケティングの可能性 (特集 農産物の新たな市場創造). 流通情報, 50(2), 21-35, **2018**.

猪股慶子監修 成美堂出版編集部編『かしこく選ぶ・おいしく食べる 野菜まるごと事典』成美堂出版, 86-88 頁, **2012 年 7 月 10 日**.

日本薬局方：注射用アセチルコリン塩化物

https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/430574_1232400X1031_1_07 (2023年3月14日閲覧).

農林水産省「令和3年産指定野菜（春野菜，夏秋野菜等）の作付面積，収穫量および出荷量」令和4年4月28日公表.

<公表主要論文名>

Wang, W., Yamaguchi, S., Koyama, M., Tian, S., Ino, A., Miyatake, K., & Nakamura, K. LC-MS/MS analysis of choline compounds in Japanese-cultivated vegetables and fruits. *Foods*, 9(8), 1029, **2020**.

- Wang, W., Yamaguchi, S., Suzuki, A., Wagu, N., Koyama, M., Takahashi, A., Takada, R., Miyatke, K., & Nakamura, K. Investigation of the distribution and content of acetylcholine, a novel functional compound in eggplant. *Foods*, 10(1), 81, **2021**.
- Wang, W., Miyatake, K., Saito, T., Harada, Y., Yamaguchi, S., Koyama, M., & Nakamura, K. Acetylcholine Content in 100 Accessions from the Worldwide Eggplant (*Solanum melongena* L.) Core Collection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 119, 105233, **2023**.
- Wang, W., Yamaguchi, S., Koyama, M., & Nakamura, K. Evaluation of the Antihypertensive Activity of Eggplant Acetylcholine and γ -Aminobutyric Acid in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules*, 28(6), 2835, **2023**.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始熱心なご指導、ご鞭撻を頂きました信州大学学術研究院（農学系）准教授中村浩蔵先生に心より感謝致します。お忙しい中、副指導教官として貴重なご助言とご協力頂きました信州大学学術研究院（農学系）教授松島憲一先生、信州大学学術研究院（農学系）准教授河原岳志先生に深く感謝致します。また、審査委員を受けていただいた信州大学学術研究院（農学系）教授藤田智之先生、外部審査委員を引き受けてくださった山形大学教授渡辺昌規先生に感謝いたします。本研究で使用したナスのご提供、ご指導を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、宮武宏治先生、ナス果実の市販品を提供していただいたタキイ種苗株式会社および藤田種子株式会社に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行する過程で様々な御助力を頂きました食品分子工学研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

本博士論文は、筆者が信州大学大学院総合医理工学研究科総合理工学専攻博士課程において食品分子工学研究室で行った研究を、中村浩蔵准教授の指導の下でまとめたものである。

補充資料

表 S1. 各生鮮農産物における新鮮重量と乾燥重量および収率

Crop	Cultivar	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yield (%)
Eggplant	Senryo No. 2	56.59	4.49	7.93
Eggplant	Senshu mizunasu	89.24	4.73	5.30
Eggplant	Batten nasu	61.21	3.78	6.18
Eggplant	Koryo sarada nasu	41.21	2.40	5.82
Eggplant	Onaga nasu	131.96	7.98	6.05
Eggplant	Chikuyo	64.30	4.13	6.42
Eggplant	Higomurasaki	121.78	6.96	5.72
Cucumber	Zubari 163	114.52	5.90	5.15
Tomato	Rinka 409	95.37	4.99	5.23
Paprika	Special	90.61	8.90	9.82
Bell pepper	Bell-masari	25.96	3.07	11.83
Shishito pepper	Manganji togarashi	22.19	1.99	8.97
Asparagus	Welcome	17.60	1.45	8.24
Japanese yam	Nagaimo	79.76	21.23	26.62
Cabbage	Shinshu 868	129.60	7.64	5.90
Lettuce	Shinano hope	79.19	2.85	3.60
Carrot	Kouyou No. 2	113.68	13.98	12.30
Kaiware daikon	unknown	26.99	1.44	5.34
Broccoli sprout	unknown	21.92	1.12	5.52
Alfalfa bean sprout	unknown	32.17	1.70	5.28
Pea sprout	unknown	33.47	2.63	7.86
Buckwheat sprout	unknown	15.89	1.12	7.05
Apple	Shinano dolce	71.23	10.07	14.14
Japanese pear	Twentieth century	80.59	10.59	13.14
Grape	Nagano purple	71.54	14.34	20.04

yield (%)=dry weight/fresh weight \times 100.

表 S2. 各品種ナスにおける新鮮重量と乾燥重量および収率

Cultivar	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yield (%)
SL Shisui	55.96±1.60	3.16±0.10	5.65±0.02
Mizunasu	55.23±0.56	3.49±0.10	6.32±0.21
Wase-daimaru	62.43±1.90	4.43±0.31	7.11±0.51
Shoya onaga	56.63±1.30	3.84±0.12	6.78±0.22
Kurowashi (a)	63.63±3.24	4.23±0.33	6.62±0.18
Moginasu	57.44±0.39	3.44±0.11	6.00±0.22
Oserikawa	56.28±0.76	3.40±0.09	6.05±0.17
TNA-112	54.40±1.33	3.52±0.27	6.46±0.42
Senryo	56.79±0.99	4.19±0.09	7.39±0.27
Ryoma (a)	56.15±1.18	3.48±0.09	6.19±0.13
Chikuyo	55.49±1.58	3.95±0.18	7.11±0.19
Senryo No. 2	58.64±2.74	3.76±0.10	6.44±0.30
White bell	61.03±2.28	15.20±0.01	4.19±0.09
Black bell	59.49±1.28	15.19±0.02	4.61±0.11
Jade	61.31±0.62	15.24±0.02	4.66±0.15
White	55.45±2.05	15.28±0.02	4.36±0.05
Rosabianca	58.71±2.48	15.23±0.02	4.23±0.22
White clara	53.74±2.35	15.18±0.02	4.82±0.17
Purple clara	22.52±2.70	15.18±0.04	2.51±0.34
Thailand	24.98±1.84	15.15±0.03	2.96±0.23
Florence purple	59.82±1.26	15.17±0.03	5.27±0.08
Tosataka	54.44±1.36	3.68±0.23	6.79±0.59
Shintaro	55.72±1.61	3.47±0.03	6.23±0.12
Ryoma (b)	56.12±2.08	3.73±0.13	6.66±0.13
Kurowashi (b)	55.42±1.20	3.63±0.12	6.54±0.12
Touchikonasu	53.38±0.41	3.65±0.02	6.83±0.08

yield (%)=dry weight/fresh weight × 100.

表 S3. ナス植物体 8 部位, トマト 5 部位における新鮮重量と乾燥重量および収率

Crop	Part	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yield (%)
Eggplant (Senryo No.2)	Leaf	4.83±0.41	0.80±0.07	16.56±0.27
	Root	2.30±0.08	0.29±0.00	12.79±0.32
	Bud	3.47±0.38	0.66±0.04	19.45±0.95
	Calyx	3.30±0.29	0.72±0.03	21.94±0.94
	Ovary (0-week fruit)	3.67±0.52	0.44±0.08	11.76±1.67
	Fruit (1 week after flowering)	8.67±0.34	0.80±0.08	9.15±0.60
	Fruit (2 weeks after flowering)	8.20±0.22	0.69±0.03	8.37±0.15
	Fruit (1.5 months after flowering)	5.57±0.89	0.52±0.08	9.38±0.29
Tomato (Home Momotaro)	Leaf	6.57±0.80	1.09±0.18	16.27±1.10
	Root	2.43±0.19	0.17±0.02	6.96±0.12
	Flower	5.63±0.59	0.91±0.09	16.51±1.79
	Fruit (2 weeks after flowering)	4.00±0.53	0.67±0.03	17.42±1.53
	Fruit (2 months after flowering)	7.23±0.38	0.52±0.03	7.13±0.10
yield (%)=dry weight/fresh weight × 100.				

表 S4. 土佐鷹果実部位における新鮮重量と乾燥重量および収率

Part	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yield (%)
Exocarp	1.35 ± 0.03	0.11 ± 0.00	8.16 ± 0.17
Mesocarp	22.35 ± 1.55	1.45 ± 0.11	6.49 ± 0.03
Partition	6.97 ± 0.58	0.57 ± 0.05	8.11 ± 0.01
Outer placenta	8.04 ± 1.28	0.63 ± 0.10	7.85 ± 0.02
Inner placenta	6.36 ± 0.09	0.46 ± 0.02	7.23 ± 0.23
Core	3.44 ± 1.48	0.25 ± 0.10	7.25 ± 0.15
Fruit base	19.58 ± 0.74	1.36 ± 0.03	6.95 ± 0.12
Fruit center	30.62 ± 1.43	2.26 ± 0.04	7.38 ± 0.22
Fruit top	25.60 ± 0.86	1.86 ± 0.07	7.24 ± 0.05

yield (%) = dry weight / fresh weight \times 100.

表 S5. 生ナス、電子レンジ加熱ナス、揚げナスにおける新鮮重量と乾燥重量および収率

	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Yield (%)
Control eggplant	14.21 ± 0.36	0.86 ± 0.01	6.08 ± 0.20
Microwaved eggplant	10.15 ± 1.31	0.82 ± 0.09	8.09 ± 0.34
Fried eggplant	8.16 ± 1.01	1.61 ± 0.26	19.61 ± 0.84

yield (%) = dry weight / fresh weight \times 100.

表 S6. ナスコアコレクションにおける新鮮重量と乾燥重量および収率

ID	Year 2018			Year 2019		
	Fresh weight	Dry weight	Yield	Fresh weight	Dry weight	Yield
	(g)	(g)	(%)	(g)	(g)	(%)
WEC001	5.0 ± 0.35	0.58 ± 0.050	12 ± 0.20	2.4 ± 0.19	0.30 ± 0.020	12 ± 0.17
WEC002	5.6 ± 0.62	0.72 ± 0.10	13 ± 0.78	5.1 ± 0.84	0.53 ± 0.089	11 ± 0.077
WEC003	5.4 ± 0.28	0.66 ± 0.058	12 ± 0.92	4.0 ± 0.77	0.45 ± 0.087	11 ± 0.064
WEC004	5.6 ± 0.46	0.46 ± 0.043	8.2 ± 0.12	5.1 ± 0.32	0.36 ± 0.029	7.1 ± 0.15
WEC005	5.3 ± 0.28	0.40 ± 0.031	7.5 ± 0.23	3.5 ± 0.18	0.24 ± 0.012	6.9 ± 0.042
WEC006	5.8 ± 0.07	0.50 ± 0.017	8.7 ± 0.39	2.3 ± 0.34	0.20 ± 0.030	8.6 ± 0.15
WEC007	5.5 ± 0.30	0.61 ± 0.037	11 ± 0.49	3.8 ± 0.32	0.32 ± 0.027	8.4 ± 0.077
WEC008	5.3 ± 0.48	0.61 ± 0.063	12 ± 1.7	4.5 ± 0.60	0.44 ± 0.055	10 ± 0.10
WEC009	5.1 ± 0.29	0.62 ± 0.074	12 ± 2.0	2.6 ± 0.60	0.29 ± 0.072	11 ± 0.27
WEC010	5.3 ± 0.093	0.57 ± 0.022	11 ± 0.53	2.3 ± 0.13	0.20 ± 0.010	8.8 ± 0.10
WEC011	5.1 ± 0.71	0.55 ± 0.076	11 ± 0.67	3.2 ± 0.35	0.31 ± 0.035	10 ± 0.052
WEC012	5.5 ± 0.21	0.66 ± 0.0067	12 ± 0.46	3.0 ± 0.63	0.38 ± 0.085	13 ± 0.15
WEC013	5.1 ± 0.34	0.67 ± 0.084	13 ± 0.89	3.4 ± 0.60	0.42 ± 0.072	12 ± 0.084
WEC014	5.0 ± 0.036	0.65 ± 0.066	13 ± 1.2	2.4 ± 0.25	0.19 ± 0.017	7.6 ± 0.10
WEC015	5.3 ± 0.10	0.74 ± 0.15	14 ± 2.6	2.2 ± 0.25	0.31 ± 0.035	14 ± 0.014
WEC016	5.0 ± 0.23	0.57 ± 0.030	11 ± 0.75	3.1 ± 0.23	0.39 ± 0.031	12 ± 0.091
WEC017	4.5 ± 0.29	0.52 ± 0.0058	12 ± 0.73	1.9 ± 0.20	0.17 ± 0.015	9.3 ± 0.24
WEC018	5.5 ± 0.27	0.52 ± 0.024	9.5 ± 0.32	2.1 ± 0.34	0.27 ± 0.038	13 ± 0.32
WEC019	5.8 ± 0.71	0.48 ± 0.075	8.2 ± 0.34	4.9 ± 0.42	0.36 ± 0.025	7.4 ± 0.11
WEC020	5.1 ± 0.38	0.68 ± 0.055	13 ± 0.61	3.6 ± 1.1	0.43 ± 0.13	12 ± 0.11
WEC021	5.5 ± 0.45	0.57 ± 0.079	10 ± 0.87	2.7 ± 0.45	0.24 ± 0.038	8.8 ± 0.074
WEC022	4.9 ± 0.43	0.58 ± 0.085	12 ± 1.5	3.1 ± 0.38	0.25 ± 0.030	7.9 ± 0.16
WEC023	5.4 ± 0.38	0.70 ± 0.10	13 ± 1.0	3.1 ± 0.43	0.40 ± 0.054	13 ± 0.095
WEC024	5.7 ± 0.15	0.56 ± 0.035	10 ± 0.44	4.3 ± 0.091	0.42 ± 0.010	10 ± 0.15
WEC025	4.4 ± 0.14	0.56 ± 0.021	13 ± 0.15	3.4 ± 0.66	0.38 ± 0.071	11 ± 0.11
WEC026	7.4 ± 0.52	0.88 ± 0.14	12 ± 1.4	4.7 ± 1.2	0.55 ± 0.14	12 ± 0.19
WEC027	5.7 ± 0.57	0.49 ± 0.11	8.4 ± 1.1	3.4 ± 0.23	0.30 ± 0.020	8.8 ± 0.011
WEC028	5.9 ± 0.30	0.41 ± 0.049	7.0 ± 0.58	2.9 ± 0.13	0.24 ± 0.0088	8.3 ± 0.11
WEC029	5.4 ± 0.11	0.45 ± 0.0088	8.2 ± 0.059	3.8 ± 0.43	0.36 ± 0.038	10 ± 0.13
WEC030	5.3 ± 0.14	0.38 ± 0.0088	7.2 ± 0.072	3.5 ± 1.2	0.50 ± 0.17	14 ± 0.10
WEC031	5.2 ± 0.20	0.73 ± 0.066	14 ± 0.75	4.4 ± 0.46	0.52 ± 0.054	12 ± 0.067
WEC032	4.9 ± 0.20	0.43 ± 0.032	8.8 ± 0.48	3.8 ± 0.62	0.38 ± 0.064	10 ± 0.064
WEC033	5.3 ± 0.17	0.46 ± 0.018	8.7 ± 0.37	4.8 ± 0.70	0.44 ± 0.067	9.2 ± 0.038

ID	Year 2018						Year 2019		
	Fresh weight	Dry weight	Yield	Fresh weight	Dry weight	Yield	Fresh weight	Dry weight	Yield
	(g)	(g)	(%)	(g)	(g)	(%)	(g)	(g)	(%)
WEC034	5.6 ±0.31	0.47 ±0.047	8.4 ±0.47	3.2 ±0.54	0.33 ±0.052	10 ±0.14			
WEC035	5.1 ±0.37	0.62 ±0.066	12 ±0.44	2.5 ±0.29	0.28 ±0.035	11 ±0.26			
WEC036	4.9 ±0.37	0.45 ±0.029	9.2 ±0.41	3.0 ±0.13	0.29 ±0.012	10 ±0.11			
WEC037	5.5 ±0.19	0.65 ±0.033	12 ±0.51	1.8 ±0.45	0.20 ±0.052	11 ±0.16			
WEC038	5.7 ±0.68	0.92 ±0.13	16 ±0.40	3.8 ±0.64	0.40 ±0.015	11 ±1.8			
WEC039	5.9 ±0.59	0.75 ±0.084	13 ±0.19	3.9 ±0.61	0.49 ±0.079	13 ±0.14			
WEC040	5.9 ±0.21	1.2 ±0.094	20 ±1.1	3.6 ±0.26	0.70 ±0.049	20 ±0.13			
WEC041	6.5 ±0.63	1.0 ±0.20	16 ±2.3	3.7 ±0.55	0.53 ±0.078	14 ±0.080			
WEC042	5.3 ±0.43	0.91 ±0.082	17 ±0.48	3.0 ±0.085	0.51 ±0.012	17 ±0.11			
WEC043	5.8 ±0.55	0.92 ±0.073	16 ±0.36	4.0 ±0.89	0.63 ±0.14	16 ±0.13			
WEC044	7.3 ±0.68	0.73 ±0.11	10 ±0.84	4.7 ±1.0	0.50 ±0.11	11 ±0.11			
WEC045	5.9 ±0.34	1.1 ±0.080	18 ±0.75	3.1 ±0.092	0.55 ±0.019	18 ±0.073			
WEC046	4.7 ±0.12	0.73 ±0.010	16 ±0.51	2.5 ±0.084	0.34 ±0.012	14 ±0.18			
WEC047	5.8 ±0.74	0.64 ±0.094	11 ±0.31	3.5 ±0.29	0.39 ±0.038	11 ±0.18			
WEC048	5.5 ±0.041	0.63 ±0.078	11 ±1.5	4.5 ±0.71	0.44 ±0.068	10 ±0.10			
WEC049	5.7 ±0.40	0.82 ±0.061	14 ±0.19	3.3 ±0.43	0.45 ±0.062	14 ±0.11			
WEC050	5.9 ±0.33	0.83 ±0.047	14 ±1.0	2.6 ±0.47	0.27 ±0.050	10 ±0.39			
WEC051	5.8 ±0.25	0.64 ±0.027	11 ±0.019	2.9 ±0.33	0.29 ±0.035	10 ±0.26			
WEC052	4.5 ±0.14	0.96 ±0.032	21 ±0.61	2.3 ±0.13	0.51 ±0.032	22 ±0.20			
WEC053	5.0 ±0.32	0.46 ±0.043	9.0 ±0.26	3.7 ±0.59	0.38 ±0.059	10 ±0.084			
WEC054	5.6 ±0.12	0.62 ±0.012	11 ±0.11	2.7 ±0.64	0.26 ±0.061	10 ±0.18			
WEC055	5.9 ±0.22	0.44 ±0.0033	7.4 ±0.22	2.5 ±0.22	0.23 ±0.020	9.4 ±0.035			
WEC056	5.6 ±0.22	0.58 ±0.032	10 ±0.90	2.2 ±0.42	0.19 ±0.038	8.7 ±0.075			
WEC057	5.2 ±0.40	0.45 ±0.050	8.5 ±0.78	2.1 ±0.33	0.19 ±0.028	9.2 ±0.079			
WEC058	5.1 ±0.39	0.50 ±0.038	10 ±0.26	2.8 ±0.15	0.30 ±0.013	10 ±0.13			
WEC059	5.3 ±0.25	1.1 ±0.051	21 ±0.64	3.2 ±0.62	0.67 ±0.13	21 ±0.042			
WEC060	5.8 ±0.39	0.45 ±0.038	7.7 ±0.22	2.9 ±0.24	0.20 ±0.017	7.1 ±0.020			
WEC061	4.7 ±0.27	1.0 ±0.013	22 ±1.1	2.2 ±0.42	0.54 ±0.10	25 ±0.15			
WEC062	5.9 ±0.16	1.2 ±0.023	21 ±0.25	2.2 ±0.30	0.47 ±0.067	21 ±0.26			
WEC063	5.4 ±0.32	1.0 ±0.052	19 ±0.17	3.0 ±0.25	0.48 ±0.038	16 ±0.086			
WEC064	5.3 ±0.65	0.74 ±0.12	14 ±1.3	2.6 ±0.64	0.40 ±0.093	15 ±0.32			
WEC065	5.0 ±0.31	0.56 ±0.037	11 ±0.12	3.0 ±0.26	0.34 ±0.029	11 ±0.14			
WEC066	5.4 ±0.43	0.72 ±0.067	13 ±1.2	2.7 ±0.46	0.44 ±0.085	16 ±0.45			
WEC067	5.3 ±0.17	0.51 ±0.070	10 ±1.1	2.5 ±0.070	0.27 ±0.012	11 ±0.25			

ID	Year 2018			Year 2019		
	Fresh weight	Dry weight	Yield	Fresh weight	Dry weight	Yield
	(g)	(g)	(%)	(g)	(g)	(%)
WEC068	5.5 ±0.074	0.52 ±0.015	10 ±0.18	2.5 ±0.28	0.23 ±0.026	9.3 ±0.021
WEC069	5.0 ±0.27	0.58 ±0.043	12 ±1.2	3.1 ±0.30	0.40 ±0.035	13 ±0.11
WEC070	5.7 ±0.31	0.78 ±0.071	14 ±0.89	2.7 ±0.29	0.33 ±0.031	13 ±0.31
WEC071	4.9 ±0.30	0.75 ±0.041	15 ±0.12	5.9 ±0.35	0.71 ±0.032	12 ±0.19
WEC072	5.5 ±0.46	0.53 ±0.084	10 ±0.80	3.4 ±0.75	0.36 ±0.081	11 ±0.024
WEC073	5.5 ±0.21	0.59 ±0.027	11 ±0.89	2.9 ±0.19	0.21 ±0.0058	7.3 ±0.26
WEC074	5.5 ±0.11	0.67 ±0.028	12 ±0.53	2.0 ±0.21	0.19 ±0.029	10 ±0.50
WEC075	5.8 ±0.29	0.65 ±0.0	11 ±0.60	3.1 ±0.51	0.30 ±0.055	10 ±0.13
WEC076	5.2 ±0.38	0.60 ±0.022	12 ±0.47	2.4 ±0.023	0.30 ±0.0058	13 ±0.36
WEC077	6.2 ±0.31	0.72 ±0.072	12 ±0.91	3.5 ±0.18	0.43 ±0.018	12 ±0.15
WEC078	6.1 ±0.45	0.69 ±0.13	11 ±1.4	3.4 ±0.37	0.29 ±0.033	8.7 ±0.073
WEC079	5.5 ±0.12	0.74 ±0.038	13 ±0.39	2.8 ±0.50	0.43 ±0.076	15 ±0.12
WEC080	5.3 ±0.62	0.87 ±0.13	16 ±0.55	4.3 ±0.59	0.75 ±0.10	17 ±0.041
WEC081	5.6 ±0.86	1.2 ±0.20	21 ±0.57	2.2 ±0.33	0.36 ±0.056	16 ±0.29
WEC082	5.4 ±0.35	0.92 ±0.19	17 ±2.5	3.4 ±0.29	0.54 ±0.044	16 ±0.11
WEC083	6.9 ±0.14	1.0 ±0.038	15 ±0.72	3.1 ±0.29	0.44 ±0.039	15 ±0.37
WEC084	5.9 ±0.40	1.2 ±0.14	19 ±0.99	4.4 ±0.21	0.67 ±0.027	15 ±0.16
WEC085	5.8 ±0.22	0.98 ±0.11	17 ±1.3	4.1 ±0.65	0.61 ±0.090	15 ±0.16
WEC086	5.5 ±0.41	0.98 ±0.068	18 ±0.11	2.3 ±0.37	0.36 ±0.064	16 ±0.43
WEC087	5.9 ±0.50	1.2 ±0.14	20 ±0.61	3.4 ±0.15	0.61 ±0.025	18 ±0.29
WEC088	6.2 ±0.51	0.76 ±0.049	12 ±0.41	4.4 ±0.23	0.27 ±0.015	6.2 ±0.092
WEC089	5.5 ±0.38	0.32 ±0.015	5.8 ±0.12	3.3 ±0.88	0.26 ±0.072	7.9 ±0.14
WEC090	6.4 ±0.18	0.75 ±0.048	12 ±1.1	Wilt	Wilt	Wilt
WEC091	5.2 ±0.21	0.54 ±0.079	10 ±1.1	2.7 ±0.50	0.27 ±0.049	10 ±0.066
WEC092	7.2 ±0.57	0.46 ±0.028	6.5 ±0.40	3.2 ±0.12	0.17 ±0.0058	5.4 ±0.10
WEC093	5.0 ±0.53	0.84 ±0.029	17 ±1.4	2.4 ±0.075	0.19 ±0.0067	7.8 ±0.069
WEC094	6.3 ±0.25	0.59 ±0.082	9.4 ±1.1	2.6 ±0.42	0.22 ±0.036	8.5 ±0.063
WEC095	5.3 ±0.56	0.43 ±0.052	8.1 ±0.19	3.6 ±0.52	0.23 ±0.032	6.3 ±0.068
WEC096	5.1 ±0.071	0.51 ±0.020	10 ±0.44	2.8 ±0.95	0.25 ±0.083	8.9 ±0.11
WEC097	7.1 ±1.01	0.65 ±0.084	9.2 ±0.30	3.6 ±0.37	0.32 ±0.032	8.9 ±0.11
WEC098	5.4 ±0.41	0.52 ±0.031	10 ±0.40	3.3 ±0.32	0.32 ±0.035	9.8 ±0.14
WEC099	5.7 ±0.058	0.50 ±0.012	8.8 ±0.19	3.4 ±0.19	0.28 ±0.019	8.2 ±0.15
WEC100	5.7 ±0.64	0.38 ±0.058	6.7 ±0.65	3.1 ±0.34	0.24 ±0.028	7.6 ±0.12

yield (%)=dry weight/fresh weight \times 100.

表 S7. ナスコアコレクションにおける ACh およびコリン含有量データの分布と分散

Choline compounds	Year	Classification	Distribution	Variance
ACh	Two-year average	Average	Non-normal	-
		Region	S1	Non-normal
			S2	Non-normal
			S3	Normality
			S4	Normality
			Asia	Non-normal
			outside Asia	Non-normal
		Shape	Spherical	Normality
			Ovoid	Non-normal
			Elongated	Normality
		Peel color	Green	Non-normal
			White	Normality
			Violet	Non-normal
	Year 2018	Average	Non-normal	-
		Region	S1	Non-normal
			S2	Non-normal
			S3	Normality
			S4	Normality
			Asia	Non-normal
			outside Asia	Non-normal
		Shape	Spherical	Normality
			Ovoid	Non-normal
			Elongated	Normality
		Peel color	Green	Non-normal
			White	Normality
			Violet	Non-normal
	Year 2019	Average	Non-normal	-
		Region	S1	Non-normal
			S2	Normality
			S3	Non-normal
			S4	Non-normal
			Asia	Non-normal
			outside Asia	Normality

Choline compounds	Year	Classification	Distribution	Variance
Choline	Two-year average	Spherical	Non-normal	
		Shape Ovoid	Non-normal	-
		Elongated	Non-normal	
		Green	Non-normal	-
		Peel color White	Normality	Homoscedastic
		Violet	Non-normal	-
		Average	Non-normal	-
		S1	Normality	
		S2	Non-normal	
		S3	Non-normal	-
	Year 2018	Region S4	Non-normal	
		Asia	Non-normal	
		outside Asia	Normality	-
		Spherical	Non-normal	
		Shape Ovoid	Non-normal	-
		Elongated	Non-normal	
		Green	Non-normal	
		Peel color White	Normality	-
		Violet	Non-normal	
		Average	Non-normal	-
		S1	Non-normal	
		S2	Non-normal	
		S3	Normality	-
		Region S4	Non-normal	
		Asia	Non-normal	
		outside Asia	Non-normal	-
		Spherical	Normality	
		Shape Ovoid	Non-normal	-
		Elongated	Non-normal	

Choline compounds	Year	Classification	Distribution	Variance
	Year 2019	Green	Non-normal	-
		Peel color White	Normality	Heteroscedastic
		Violet	Non-normal	-
		Average	Non-normal	-
		S1	Normality	-
		S2	Normality	
		S3	Non-normal	
		S4	Non-normal	
		Asia	Non-normal	-
		outside Asia	Normality	
		Spherical	Non-normal	-
		Shape Ovoid	Non-normal	
		Elongated	Non-normal	
		Green	Non-normal	-
		Peel color White	Normality	Heteroscedastic
		Violet	Non-normal	-

The distribution of the data was investigated using the Kolmogorov-Smirnov test. The homogeneity of variances test was performed only on data that were normally distributed for both years (evaluated using Levene' s test). ACh: acetylcholine.

表 S8. ナスコアコレクション中の ACh とコリン含有量 ($n = 3$)

ID	ACh (mg/g DW)			Choline (mg/g DW)		
	Year 2018	Year 2019	Average	Year 2018	Year 2019	2-year Average
WEC001	0.88 \pm 0.080	0.60 \pm 0.13	0.74 \pm 0.14	0.73 \pm 0.038	1.5 \pm 0.20	1.1 \pm 0.36
WEC002	3.5 \pm 0.34	2.8 \pm 0.56	3.1 \pm 0.35	0.66 \pm 0.053	1.5 \pm 0.084	1.1 \pm 0.43
WEC003	2.8 \pm 0.068	2.2 \pm 0.34	2.5 \pm 0.32	0.65 \pm 0.089	1.2 \pm 0.11	1.0 \pm 0.30
WEC004	1.5 \pm 0.19	2.2 \pm 0.43	1.8 \pm 0.34	0.45 \pm 0.024	1.1 \pm 0.10	0.75 \pm 0.30
WEC005	2.4 \pm 0.10	0.65 \pm 0.24	1.5 \pm 0.88	0.87 \pm 0.036	2.4 \pm 0.24	1.6 \pm 0.75
WEC006	1.9 \pm 0.35	1.3 \pm 0.067	1.6 \pm 0.33	0.96 \pm 0.065	2.1 \pm 0.31	1.5 \pm 0.56
WEC007	2.5 \pm 0.046	1.0 \pm 0.12	1.8 \pm 0.73	0.69 \pm 0.083	1.2 \pm 0.11	1.0 \pm 0.27
WEC008	3.1 \pm 0.40	1.4 \pm 0.10	2.3 \pm 0.87	0.82 \pm 0.028	1.7 \pm 0.063	1.3 \pm 0.44
WEC009	2.6 \pm 0.41	0.89 \pm 0.11	1.7 \pm 0.85	0.61 \pm 0.011	1.5 \pm 0.072	1.1 \pm 0.46
WEC010	2.4 \pm 0.10	1.3 \pm 0.086	1.9 \pm 0.53	0.54 \pm 0.038	1.3 \pm 0.088	0.94 \pm 0.40
WEC011	3.1 \pm 0.30	1.5 \pm 0.19	2.3 \pm 0.75	0.49 \pm 0.095	1.4 \pm 0.20	1.0 \pm 0.47
WEC012	2.2 \pm 0.24	1.1 \pm 0.30	1.7 \pm 0.56	0.42 \pm 0.039	1.9 \pm 0.30	1.1 \pm 0.73
WEC013	2.7 \pm 0.24	1.3 \pm 0.31	2.0 \pm 0.73	0.48 \pm 0.027	2.1 \pm 0.27	1.3 \pm 0.79
WEC014	2.7 \pm 0.34	1.3 \pm 0.16	2.0 \pm 0.70	0.47 \pm 0.012	1.7 \pm 0.14	1.1 \pm 0.60
WEC015	3.4 \pm 0.45	2.6 \pm 0.42	3.0 \pm 0.40	0.48 \pm 0.095	1.1 \pm 0.089	0.78 \pm 0.30
WEC016	2.2 \pm 0.27	2.0 \pm 0.34	2.1 \pm 0.06	0.44 \pm 0.059	1.1 \pm 0.17	0.75 \pm 0.31
WEC017	2.2 \pm 0.20	1.8 \pm 0.057	2.0 \pm 0.22	0.51 \pm 0.033	1.0 \pm 0.11	0.75 \pm 0.24
WEC018	1.3 \pm 0.13	1.1 \pm 0.33	1.2 \pm 0.070	0.46 \pm 0.013	1.0 \pm 0.13	0.73 \pm 0.27
WEC019	2.2 \pm 0.34	1.9 \pm 0.77	2.1 \pm 0.13	0.61 \pm 0.0029	1.7 \pm 0.16	1.2 \pm 0.56
WEC020	2.5 \pm 0.47	0.70 \pm 0.22	1.6 \pm 0.90	0.82 \pm 0.069	1.9 \pm 0.19	1.4 \pm 0.55
WEC021	2.2 \pm 0.084	1.4 \pm 0.38	1.8 \pm 0.38	0.74 \pm 0.045	1.7 \pm 0.34	1.2 \pm 0.49
WEC022	2.6 \pm 0.036	1.1 \pm 0.33	1.9 \pm 0.76	0.99 \pm 0.085	1.7 \pm 0.22	1.3 \pm 0.34
WEC023	2.9 \pm 0.31	1.2 \pm 0.30	2.1 \pm 0.84	0.54 \pm 0.024	0.92 \pm 0.035	0.73 \pm 0.19
WEC024	2.0 \pm 0.36	0.82 \pm 0.065	1.4 \pm 0.59	0.74 \pm 0.091	1.1 \pm 0.049	0.91 \pm 0.17
WEC025	2.2 \pm 0.34	2.0 \pm 0.18	2.1 \pm 0.15	0.57 \pm 0.027	0.73 \pm 0.068	0.65 \pm 0.077
WEC026	2.0 \pm 0.18	0.29 \pm 0.080	1.2 \pm 0.87	0.61 \pm 0.078	1.0 \pm 0.072	0.81 \pm 0.20
WEC027	2.2 \pm 0.28	1.8 \pm 0.40	2.0 \pm 0.17	0.50 \pm 0.060	0.63 \pm 0.068	0.57 \pm 0.065
WEC028	1.7 \pm 0.16	1.1 \pm 0.24	1.4 \pm 0.29	0.52 \pm 0.048	1.0 \pm 0.027	0.77 \pm 0.24
WEC029	2.1 \pm 0.051	0.72 \pm 0.015	1.4 \pm 0.68	0.46 \pm 0.041	0.94 \pm 0.050	0.70 \pm 0.24
WEC030	1.8 \pm 0.24	0.59 \pm 0.0043	1.2 \pm 0.58	0.64 \pm 0.015	1.6 \pm 0.16	1.1 \pm 0.50
WEC031	2.6 \pm 0.32	1.9 \pm 0.51	2.2 \pm 0.37	0.60 \pm 0.058	1.8 \pm 0.094	1.2 \pm 0.58
WEC032	2.6 \pm 0.27	1.0 \pm 0.12	1.8 \pm 0.77	0.44 \pm 0.030	1.4 \pm 0.16	0.90 \pm 0.46
WEC033	2.0 \pm 0.19	1.4 \pm 0.34	1.7 \pm 0.34	0.43 \pm 0.029	1.2 \pm 0.016	0.79 \pm 0.36
WEC034	2.7 \pm 0.11	1.9 \pm 0.11	2.3 \pm 0.40	0.96 \pm 0.0056	1.2 \pm 0.033	1.1 \pm 0.14

ID	ACh (mg/g DW)			Choline (mg/g DW)		
	Year 2018	Year 2019	Average	Year 2018	Year 2019	2-year Average
WEC035	2.7 ± 0.29	1.7 ± 0.12	2.2 ± 0.50	0.58 ± 0.086	1.3 ± 0.050	1.0 ± 0.39
WEC036	2.6 ± 0.28	1.7 ± 0.57	2.1 ± 0.41	0.48 ± 0.0069	1.2 ± 0.045	0.82 ± 0.35
WEC037	3.3 ± 0.30	3.2 ± 0.12	3.3 ± 0.055	0.34 ± 0.011	0.95 ± 0.008	0.64 ± 0.30
WEC038	0.95 ± 0.09	0.93 ± 0.13	0.94 ± 0.0076	0.52 ± 0.028	1.0 ± 0.078	0.77 ± 0.24
WEC039	2.4 ± 0.25	2.0 ± 0.19	2.2 ± 0.20	0.70 ± 0.037	1.1 ± 0.051	0.91 ± 0.20
WEC040	2.5 ± 0.17	2.9 ± 0.36	2.7 ± 0.23	0.36 ± 0.029	0.92 ± 0.15	0.64 ± 0.28
WEC041	1.2 ± 0.24	0.88 ± 0.18	1.0 ± 0.17	0.57 ± 0.047	0.92 ± 0.10	0.74 ± 0.17
WEC042	2.1 ± 0.30	2.9 ± 0.80	2.5 ± 0.43	0.28 ± 0.034	0.80 ± 0.10	0.54 ± 0.26
WEC043	2.7 ± 0.33	2.8 ± 0.20	2.7 ± 0.067	0.38 ± 0.049	0.64 ± 0.082	0.51 ± 0.13
WEC044	1.8 ± 0.33	3.9 ± 0.43	2.9 ± 1.1	0.44 ± 0.057	0.79 ± 0.035	0.61 ± 0.18
WEC045	2.4 ± 0.25	2.9 ± 0.44	2.7 ± 0.24	0.52 ± 0.049	0.61 ± 0.051	0.57 ± 0.048
WEC046	2.5 ± 0.19	1.0 ± 0.13	1.8 ± 0.75	0.67 ± 0.075	1.8 ± 0.074	1.2 ± 0.54
WEC047	1.6 ± 0.12	1.3 ± 0.37	1.4 ± 0.13	0.63 ± 0.10	1.1 ± 0.011	0.89 ± 0.26
WEC048	3.1 ± 0.064	1.6 ± 0.62	2.3 ± 0.75	0.59 ± 0.037	2.1 ± 0.29	1.3 ± 0.74
WEC049	2.7 ± 0.44	3.0 ± 0.92	2.8 ± 0.13	0.37 ± 0.026	0.86 ± 0.085	0.62 ± 0.24
WEC050	2.9 ± 0.13	2.8 ± 0.26	2.8 ± 0.044	0.46 ± 0.017	1.1 ± 0.045	0.76 ± 0.31
WEC051	2.6 ± 0.38	3.3 ± 0.60	2.9 ± 0.33	0.47 ± 0.027	0.78 ± 0.047	0.62 ± 0.15
WEC052	2.1 ± 0.092	1.2 ± 0.37	1.7 ± 0.45	0.67 ± 0.062	1.1 ± 0.23	0.90 ± 0.23
WEC053	4.0 ± 0.17	2.4 ± 0.51	3.2 ± 0.79	0.84 ± 0.096	1.0 ± 0.053	0.93 ± 0.084
WEC054	2.5 ± 0.23	2.8 ± 0.55	2.6 ± 0.15	0.46 ± 0.094	1.3 ± 0.12	0.89 ± 0.43
WEC055	2.4 ± 0.13	1.3 ± 0.28	1.9 ± 0.52	0.37 ± 0.033	0.88 ± 0.044	0.63 ± 0.25
WEC056	3.1 ± 0.28	2.3 ± 0.20	2.7 ± 0.41	0.64 ± 0.073	1.1 ± 0.17	0.85 ± 0.22
WEC057	2.3 ± 0.080	0.60 ± 0.12	1.5 ± 0.87	0.47 ± 0.050	0.94 ± 0.066	0.71 ± 0.23
WEC058	2.4 ± 0.29	2.2 ± 0.41	2.3 ± 0.074	0.31 ± 0.087	0.87 ± 0.078	0.59 ± 0.28
WEC059	2.3 ± 0.18	2.6 ± 0.80	2.5 ± 0.16	0.50 ± 0.042	0.62 ± 0.082	0.56 ± 0.064
WEC060	3.4 ± 0.36	3.5 ± 0.52	3.4 ± 0.024	0.47 ± 0.077	1.4 ± 0.18	1.0 ± 0.48
WEC061	2.2 ± 0.10	2.0 ± 0.35	2.1 ± 0.11	0.45 ± 0.028	0.62 ± 0.071	0.53 ± 0.089
WEC062	2.0 ± 0.26	1.7 ± 0.34	1.8 ± 0.16	0.35 ± 0.031	0.73 ± 0.043	0.54 ± 0.19
WEC063	1.3 ± 0.055	1.0 ± 0.14	1.1 ± 0.14	0.50 ± 0.043	1.9 ± 0.68	1.2 ± 0.69
WEC064	1.9 ± 0.37	1.3 ± 0.34	1.6 ± 0.31	0.50 ± 0.063	1.1 ± 0.20	0.79 ± 0.28
WEC065	3.2 ± 0.090	1.8 ± 0.23	2.5 ± 0.72	0.95 ± 0.066	0.87 ± 0.035	0.91 ± 0.043
WEC066	1.7 ± 0.21	0.56 ± 0.16	1.1 ± 0.56	0.56 ± 0.11	1.3 ± 0.088	0.92 ± 0.36
WEC067	2.4 ± 0.33	3.2 ± 1.0	2.8 ± 0.37	0.51 ± 0.070	0.92 ± 0.024	0.71 ± 0.20
WEC068	2.8 ± 0.25	1.9 ± 0.39	2.3 ± 0.43	0.67 ± 0.060	1.1 ± 0.12	0.86 ± 0.19
WEC069	1.7 ± 0.27	3.0 ± 0.53	2.3 ± 0.67	0.44 ± 0.037	0.79 ± 0.050	0.62 ± 0.17

ID	ACh (mg/g DW)			Choline (mg/g DW)		
	Year 2018	Year 2019	Average	Year 2018	Year 2019	2-year Average
WEC070	1.8 ± 0.21	2.2 ± 0.23	2.0 ± 0.18	0.38 ± 0.034	0.80 ± 0.053	0.59 ± 0.21
WEC071	2.0 ± 0.10	2.5 ± 0.25	2.3 ± 0.24	0.46 ± 0.025	0.84 ± 0.067	0.65 ± 0.19
WEC072	3.5 ± 0.048	3.2 ± 0.33	3.4 ± 0.16	0.61 ± 0.046	1.2 ± 0.059	0.90 ± 0.29
WEC073	1.6 ± 0.15	1.2 ± 0.11	1.4 ± 0.22	0.53 ± 0.053	1.5 ± 0.18	1.0 ± 0.47
WEC074	3.1 ± 0.045	1.0 ± 0.25	2.0 ± 1.0	0.53 ± 0.035	1.2 ± 0.17	0.87 ± 0.34
WEC075	2.2 ± 0.11	1.6 ± 0.42	1.9 ± 0.31	0.51 ± 0.041	0.84 ± 0.11	0.67 ± 0.17
WEC076	3.0 ± 0.41	2.1 ± 0.41	2.6 ± 0.45	0.73 ± 0.010	0.61 ± 0.054	0.67 ± 0.061
WEC077	3.3 ± 0.34	2.6 ± 0.17	2.9 ± 0.33	0.90 ± 0.017	0.60 ± 0.080	0.75 ± 0.15
WEC078	3.0 ± 0.65	1.8 ± 0.58	2.4 ± 0.59	0.77 ± 0.066	1.4 ± 0.017	1.1 ± 0.33
WEC079	2.5 ± 0.23	1.4 ± 0.064	1.9 ± 0.55	0.74 ± 0.13	1.5 ± 0.24	1.1 ± 0.37
WEC080	2.1 ± 0.15	1.7 ± 0.13	1.9 ± 0.21	0.83 ± 0.11	1.2 ± 0.12	1.0 ± 0.20
WEC081	1.7 ± 0.17	1.8 ± 0.65	1.8 ± 0.043	0.60 ± 0.098	1.5 ± 0.35	1.0 ± 0.43
WEC082	1.7 ± 0.10	1.4 ± 0.36	1.6 ± 0.13	0.58 ± 0.054	1.0 ± 0.071	0.80 ± 0.22
WEC083	1.1 ± 0.19	0.92 ± 0.31	1.0 ± 0.076	0.40 ± 0.16	0.92 ± 0.24	0.66 ± 0.26
WEC084	1.3 ± 0.14	1.9 ± 0.39	1.6 ± 0.29	0.25 ± 0.019	0.92 ± 0.087	0.59 ± 0.34
WEC085	1.8 ± 0.061	1.6 ± 0.33	1.7 ± 0.10	0.52 ± 0.033	0.63 ± 0.048	0.57 ± 0.059
WEC086	2.6 ± 0.075	2.0 ± 0.12	2.3 ± 0.31	0.68 ± 0.044	0.76 ± 0.027	0.72 ± 0.042
WEC087	2.1 ± 0.28	1.7 ± 0.12	1.9 ± 0.21	0.81 ± 0.083	0.82 ± 0.019	0.81 ± 0.007
WEC088	1.5 ± 0.11	2.4 ± 0.25	1.9 ± 0.47	0.68 ± 0.016	1.1 ± 0.0024	0.90 ± 0.22
WEC089	2.6 ± 0.34	0.24 ± 0.040	1.4 ± 1.2	0.49 ± 0.029	2.1 ± 0.051	1.3 ± 0.78
WEC090	1.8 ± 0.084	Wilt	–	0.52 ± 0.028	Wilt	–
WEC091	2.2 ± 0.24	0.56 ± 0.38	1.4 ± 0.83	0.64 ± 0.10	2.4 ± 0.089	1.5 ± 0.86
WEC092	2.8 ± 0.62	0.72 ± 0.090	1.7 ± 1.0	0.80 ± 0.13	2.0 ± 0.15	1.4 ± 0.61
WEC093	0.86 ± 0.10	0.066 ± 0.021	0.46 ± 0.40	1.6 ± 0.049	1.4 ± 0.16	1.5 ± 0.10
WEC094	2.9 ± 0.27	2.5 ± 0.36	2.7 ± 0.21	1.2 ± 0.050	1.1 ± 0.087	1.2 ± 0.064
WEC095	1.9 ± 0.18	3.0 ± 0.073	2.5 ± 0.55	0.36 ± 0.052	1.8 ± 0.21	1.1 ± 0.74
WEC096	1.7 ± 0.10	1.5 ± 0.33	1.6 ± 0.091	0.41 ± 0.033	1.1 ± 0.038	0.76 ± 0.34
WEC097	2.7 ± 0.30	0.55 ± 0.11	1.6 ± 1.1	0.41 ± 0.016	1.7 ± 0.28	1.0 ± 0.63
WEC098	1.7 ± 0.16	1.3 ± 0.43	1.5 ± 0.19	0.79 ± 0.12	1.2 ± 0.087	1.0 ± 0.18
WEC099	1.4 ± 0.14	1.2 ± 0.32	1.3 ± 0.069	0.44 ± 0.0056	1.7 ± 0.23	1.1 ± 0.63
WEC100	2.5 ± 0.25	0.59 ± 0.22	1.6 ± 0.97	0.87 ± 0.20	2.1 ± 0.028	1.5 ± 0.64
Average	2.3 ± 0.013	1.7 ± 0.020	2.0 ± 0.056	0.59 ± 0.0035	1.2 ± 0.010	0.91 ± 0.033

ACh: acetylcholine; DW: Dry weight.

表 S9. ナスのコアコレクションにおける ACh とコリン合計含有量 ($n = 3$)

ID	Sum of ACh and choline (mg/100 g FW)				
	Year 2018		Year 2019		2-year Average
WEC001	19	± 1.0	25	± 4.2	22 ± 2.5
WEC002	53	± 4.1	45	± 6.7	49 ± 3.9
WEC003	42	± 3.9	39	± 3.2	41 ± 2.4
WEC004	16	± 1.5	23	± 3.2	19 ± 2.2
WEC005	25	± 0.16	21	± 2.4	23 ± 1.4
WEC006	25	± 2.8	29	± 2.6	27 ± 1.9
WEC007	35	± 1.5	19	± 1.7	** 27 ± 3.7
WEC008	44	± 1.6	30	± 1.5	** 37 ± 3.3
WEC009	38	± 4.1	27	± 2.5	33 ± 3.3
WEC010	32	± 0.62	23	± 0.50	** 28 ± 1.8
WEC011	38	± 1.8	29	± 3.3	33 ± 2.6
WEC012	32	± 3.4	38	± 2.5	35 ± 2.4
WEC013	42	± 5.9	40	± 5.3	41 ± 3.6
WEC014	41	± 7.1	23	± 1.1	32 ± 5.3
WEC015	54	± 15	50	± 6.9	52 ± 7.5
WEC016	30	± 5.1	39	± 4.9	34 ± 3.7
WEC017	31	± 1.7	26	± 1.7	29 ± 1.6
WEC018	16	± 1.6	27	± 6.1	22 ± 3.7
WEC019	23	± 1.9	27	± 4.3	25 ± 2.3
WEC020	44	± 4.8	31	± 4.1	38 ± 4.0
WEC021	30	± 2.3	27	± 6.3	29 ± 3.1
WEC022	43	± 6.5	22	± 4.7	33 ± 6.0
WEC023	44	± 2.9	28	± 4.0	* 36 ± 4.1
WEC024	27	± 5.5	19	± 0.81	23 ± 3.1
WEC025	36	± 5.0	30	± 1.8	33 ± 2.7
WEC026	31	± 5.7	15	± 0.85	* 23 ± 4.5
WEC027	22	± 1.1	22	± 4.0	22 ± 1.9
WEC028	15	± 0.43	17	± 2.1	16 ± 1.1

ID	Sum of ACh and choline (mg/100 g FW)					
	Year 2018		Year 2019		2-year Average	
WEC029	21	± 0.65	16	± 0.82	**	18 ± 1.2
WEC030	17	± 1.5	31	± 2.0	**	24 ± 3.3
WEC031	44	± 6.4	43	± 4.9		43 ± 3.6
WEC032	27	± 4.1	24	± 1.2		25 ± 2.0
WEC033	21	± 1.1	23	± 3.3		22 ± 1.6
WEC034	31	± 0.93	33	± 1.4		32 ± 0.84
WEC035	39	± 4.0	35	± 2.7		37 ± 2.4
WEC036	28	± 3.1	28	± 6.3		28 ± 3.1
WEC037	44	± 4.5	45	± 1.5		44 ± 2.1
WEC038	24	± 2.4	21	± 1.3		22 ± 1.4
WEC039	39	± 3.2	39	± 2.6		39 ± 1.8
WEC040	56	± 3.5	75	± 11		66 ± 6.6
WEC041	27	± 3.1	26	± 2.7		26 ± 1.9
WEC042	41	± 6.2	64	± 16		53 ± 9.2
WEC043	48	± 5.2	54	± 4.3		51 ± 3.3
WEC044	23	± 5.0	51	± 3.8	*	37 ± 6.9
WEC045	52	± 2.0	63	± 7.3		57 ± 4.2
WEC046	50	± 3.7	38	± 2.7		44 ± 3.4
WEC047	24	± 2.3	28	± 4.3		26 ± 2.3
WEC048	42	± 4.5	36	± 8.8		39 ± 4.6
WEC049	44	± 5.4	52	± 13		48 ± 6.7
WEC050	47	± 3.0	40	± 4.4		43 ± 2.9
WEC051	34	± 4.3	41	± 7.1		37 ± 4.0
WEC052	59	± 2.6	53	± 13		56 ± 6.1
WEC053	44	± 1.7	36	± 5.5		40 ± 3.1
WEC054	33	± 3.4	40	± 5.0		36 ± 3.2
WEC055	20	± 1.7	21	± 2.5		21 ± 1.3
WEC056	40	± 6.6	30	± 3.2		35 ± 4.0
WEC057	24	± 2.1	14	± 0.98	*	19 ± 2.4

ID	Sum of ACh and choline (mg/100 g FW)				
	Year 2018		Year 2019		2-year Average
WEC058	26	± 4.4	32	± 4.0	29 ± 3.0
WEC059	58	± 2.8	67	± 18	63 ± 8.4
WEC060	30	± 2.8	35	± 3.6	32 ± 2.3
WEC061	58	± 2.9	64	± 9.7	61 ± 4.7
WEC062	48	± 6.1	51	± 7.9	49 ± 4.5
WEC063	33	± 0.53	46	± 13	39 ± 6.4
WEC064	35	± 8.7	37	± 6.9	36 ± 5.0
WEC065	47	± 1.2	30	± 3.3	** 38 ± 4.0
WEC066	29	± 2.0	30	± 2.9	30 ± 1.6
WEC067	28	± 6.2	44	± 11	36 ± 6.8
WEC068	33	± 3.4	27	± 3.7	30 ± 2.6
WEC069	24	± 2.7	48	± 7.3	* 36 ± 6.4
WEC070	30	± 2.5	37	± 2.3	34 ± 2.2
WEC071	38	± 1.5	41	± 2.9	40 ± 1.6
WEC072	39	± 3.9	47	± 3.3	43 ± 2.8
WEC073	24	± 3.4	19	± 2.0	22 ± 2.0
WEC074	44	± 2.2	21	± 2.5	** 32 ± 5.5
WEC075	31	± 2.9	24	± 4.3	27 ± 2.8
WEC076	44	± 5.7	35	± 6.6	40 ± 4.4
WEC077	48	± 4.8	40	± 2.2	44 ± 3.0
WEC078	41	± 9.2	28	± 5.1	35 ± 5.5
WEC079	44	± 6.0	43	± 3.6	43 ± 3.1
WEC080	48	± 4.5	51	± 2.9	49 ± 2.5
WEC081	50	± 4.2	53	± 16	51 ± 7.3
WEC082	38	± 5.3	40	± 6.9	39 ± 3.9
WEC083	22	± 2.8	27	± 7.3	24 ± 3.7
WEC084	29	± 1.7	42	± 6.4	36 ± 4.1
WEC085	39	± 3.6	34	± 5.8	37 ± 3.3
WEC086	59	± 2.3	44	± 0.80	** 51 ± 3.5

ID	Sum of ACh and choline (mg/100 g FW)				
	Year 2018		Year 2019		2-year Average
WEC087	57	±8.9	44	±2.5	51 ±5.0
WEC088	27	±1.0	22	±1.2 *	24 ±1.3
WEC089	18	±1.6	18	±0.51	18 ±0.74
WEC090	28	±3.3	Wilt		
WEC091	30	±6.1	29	±4.4	30 ±3.4
WEC092	23	±4.6	15	±1.5	19 ±2.8
WEC093	43	±3.9	12	±1.1 **	27 ±7.2
WEC094	39	±4.0	31	±2.5	35 ±2.8
WEC095	18	±1.3	31	±1.2 **	25 ±2.8
WEC096	21	±1.3	23	±3.5	22 ±1.7
WEC097	28	±2.0	20	±3.7	24 ±2.7
WEC098	24	±1.7	24	±4.8	24 ±2.3
WEC099	16	±1.6	24	±4.9	20 ±3.0
WEC100	23	±4.9	21	±1.7	22 ±2.4
Accession Average	35	±0.74	34	±0.88	34 ±0.57

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the content in 2018, evaluated using Student's t -test (homoscedasticity), and Welch's t -test (heteroscedasticity). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus the content in 2018, evaluated using Mann-Whitney's U test. ACh: acetylcholine; FW: fresh weight.