



Title	園芸作物果実の成分分析におけるMALDI-TOF MS の利用に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	堀川, 謙太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13594号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74140
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_Horikawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 堀川 謙太郎

学 位 論 文 題 名

園芸作物果実の成分分析における MALDI-TOF MS の利用に関する研究

果樹および果菜類の果実は、機能性成分および栄養成分を豊富に含むことから、健康食材として近年注目を集めている。一般に、果実の成分分析には HPLC が広く用いられているが、この方法は試料の抽出・精製に手間を要し、分析時間が長く、定量分析を行う際に標品が欠かせないなどの課題も残る。そこで本研究では、質量分析法の一つであるマトリックス支援レーザー脱離／イオン化－飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF MS）を用いて、果実成分分析の簡便化および効率化を図ろうとした。注目した成分は、アントシアニンと可溶性炭水化物である。まず、各種成分の標準溶液を用いて、濃度と MALDI-TOF MS におけるピーク高（イオン化強度）との関連性を調べ、定性および定量分析の可否を検討した。次に、ヤマブドウ（*Vitis coignetiae*）果実のアントシアニンを MALDI-TOF MS を用いて計測し、各構成成分の年次間変動、地理的分布の特徴および各種抗酸化活性との関連を明らかにすることで、MALDI-TOF MS の有用性を検証しようとした。さらに、MALDI-TOF MS のもう一つの利点である imaging 機能（MALDI-TOF MSI）を活用し、リンゴ果肉組織における可溶性炭水化物分布の可視化を図るとともに、リンゴみつ症果発生との関連が指摘されているソルビトールの果実内集積について追跡を試みた。

得られた結果の概要は、以下のとおりである。

1. MALDI-TOF MS を用いたアントシアニンおよび可溶性炭水化物の定量技術の検証

従来報告のあった各種 mono-glucoside アントシアニンに加え、di-glucoside アントシアニン（Cy3G5G、Pn3G5G および Mv3G5G）について検証した結果、いずれも濃度とイオン化強度の間に強い正の相関（ $P < 0.001$ 、 $R^2 > 0.98$ ）が確認された。4 種類の可溶性炭水化物についても、濃度とイオン化強度の間に強い正の相関（ $P < 0.001$ 、 $R^2 > 0.95$ ）が認められた。この場合、イオン化強度は炭水化物の種類ごとに大きく異なる（同じモル濃度で比較すると、スクロース＞ソルビトール＞フルクトース＞グルコースの順にイオン化しやすい）ことも明らかになった。以上の結果、アントシアニンおよび可溶性炭水化物の MALDI-TOF MS による定量が可能であると判断した。

2. MALDI-TOF MS を用いたアントシアニン定量技術のヤマブドウ果実分析への応用

HPLC、MALDI-TOF MS および ESI-FT ICR MS を用いた定性分析により、ヤマブドウ果実から 19 種類のアントシアニンが検出され、MALDI-TOF MS を用いてこれらの一斉検出が可能であることがわかった。MALDI-TOF MS は、分析時間が HPLC 法より短く、ピークの分離性も優れていた。北海道内各地に自生する 42 個体のヤマブドウ果実を 2 か年にわたって蒐集し分析した結果、

総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量の年次間変動は大きかった。一方、1 果重、総糖含量および総有機酸含量は年次間変動の小さい形質であり、総糖含量と総有機酸含量に有意な負の相関のあることが明らかになった。1 果重および総糖含量には採取地に基づく地理的分布に偏りが認められ、これは成熟に要する積算気温の多少（環境要因）が原因と推測された。一方、アントシアニン含量は個体間差が大きく、遺伝的要因の影響を受けやすい形質であると考えられた。ヤマブドウ果実は、欧州ブドウに比べて果皮および果肉の DPPH および ROO ラジカル捕捉活性値が高かった。DPPH および ROO ラジカル捕捉活性値は、各々総ポリフェノール含量と有意な正の相関（ $P < 0.001$, $R^2 = 0.61$ および 0.53 ）を示したのに対し、総アントシアニン含量との間に相関が認められなかったことから、アントシアニンはヤマブドウ果実の抗酸化性を担う主要成分ではないと判断された。

3. リンゴ果実に含まれる可溶性炭水化物分布の MALDI-TOF MSI による可視化とその応用

リンゴ果実横断切片（2cm × 2cm、100 μ m 厚）の MALDI-TOF MSI 分析で、フルクトース+グルコース（ $[M+K]^+ = 219$ ）、ソルビトール（ $[M+K]^+ = 221$ ）およびスクロース（ $[M+K]^+ = 381$ ）に相当する 3 つのピークが検出され、それらの分布を可視化したところ、ソルビトールは果芯部に多く、スクロースは果芯から果皮側にかけて高濃度に分布する傾向が認められた。組織切片を 16 分割し MALDI-TOF MSI における輝度を、隣接する組織（5mm × 5mm × 5mm）の HPLC 分析結果と比較したところ、両者にスクロースで強い正の相関（ $P < 0.001$, $R^2 = 0.6222$ ）、ソルビトールで弱い正の相関が（ $P < 0.1$, $R^2 = 0.2123$ ）認められた。従って、MALDI-TOF MSI により、リンゴ果肉組織のスクロースおよびソルビトール分布の可視化が可能であることが実証された。低分子化合物のスペクトル検出に有利な SALDI-TOF MSI 法についても試みた結果、蒸着する金属には Pt が適していることがわかった。リンゴのみつ症果発生との関連を調べるため、果実成熟に伴うソルビトール集積の変化を MALDI-TOF MSI で追跡したところ、未熟果では果芯側に多く分布していたソルビトールが、成熟に伴い果実全体に拡散することが明らかになった。また、スクロースは成熟期間をとおして果皮側で濃度が高かった。

以上の研究から、MALDI-TOF MS は多種類のアントシアニンを含有するヤマブドウ果実の網羅的なアントシアニン定量分析に威力を発揮し、分析効率を飛躍的に向上させ得ることが実証された。また、MALDI-TOF MSI は、従来困難であったリンゴ果肉組織の可溶性炭水化物分布の可視化を実現し、リンゴみつ症果発生原因を解明するツールとして有用であることが明らかになった。これらの成果は、園芸作物が含有する各種成分の分析技術向上に寄与し、園芸学の発展ならびに園芸産業の振興に貢献するものと期待される。