



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13594
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74141
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_Horikawa.pdf



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

北海道大学 大学院農学院
生物資源科学専攻 博士後期課程

堀川 謙太郎

目次

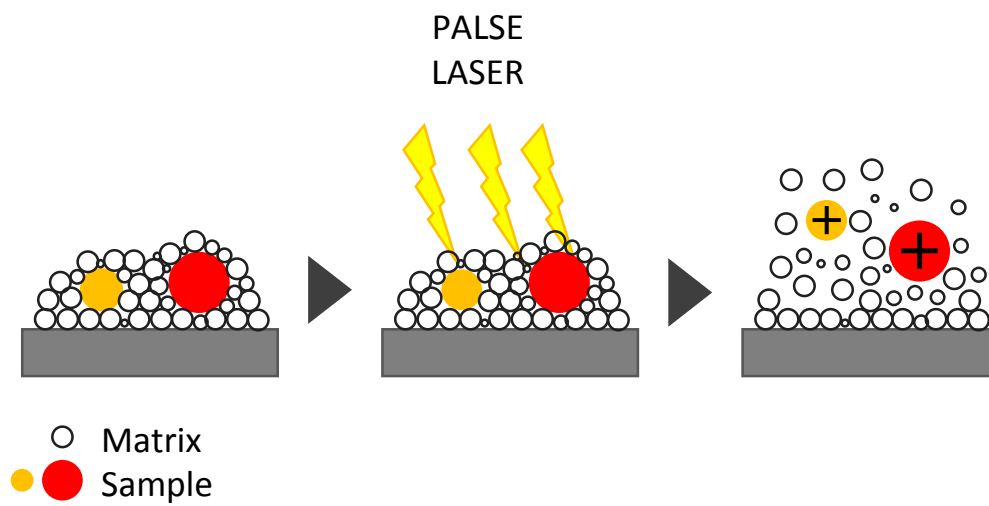
緒論	1
第 1 章 MALDI-TOF MS を用いた成分定量法の検証	5
第 1 節 アントシアニン(内部標準法)	5
第 2 節 可溶性炭水化物(直接定量法)	6
第 3 節 第 1 章の考察	9
第 2 章 MALDI-TOF MS を用いたヤマブドウ果実のアントシアニン定量分析と、その他主要成分 および抗酸化能との関連	14
第 1 節 HPLC および ESI-FT ICR MS を用いたヤマブドウ果実のアントシアニンの定性分析	15
第 2 節 ヤマブドウ果実の主要成分の年次間変動	28
第 3 節 ヤマブドウ果実の主要成分の地理的分布と気象との関連	37
第 4 節 4 種のラジカルに対するヤマブドウ果実の抗酸化能と、アントシアニンおよび ポリフェノール含量との関連	45
第 5 節 ヤマブドウ, 欧州ブドウ (<i>Vitis vinifera</i>) およびこれら交配種のラジカル捕捉活性値の 比較	51
第 6 節 第 2 章の考察	58
第 3 章 MALDI-TOF MSI を用いたリンゴ果実中の可溶性炭水化物分布の可視化	62
第 1 節 リンゴ果肉切片の MALDI-TOF MSI 分析と HPLC を用いた定量分析の比較	64
第 2 節 MALDI-TOF MSI を高解像度で行った場合の糖質分布の特徴	69
第 3 節 SALDI-TOF MSI から見た MALDI-TOF MSI 改良の可能性	71
第 4 節 リンゴ果実の成熟に伴う糖質分布の変化	78
第 5 節 リンゴのみつ症果発生品種および非発生品種間の MALDI-TOF MSI を用いた 果実内糖質分布の比較	82
第 6 節 第 3 章の考察	85
第 4 章 総合考察	87
摘要	92
謝辞	94
参考文献	95

緒論

質量分析とは、原子および分子の質量を測定する手法である。質量分析の過程は、①中性分子に電荷を付与し「イオン化」する、②磁場もしくは電場を用いて荷電粒子の運動を制御し「分離」する、③質量電荷比 (m/z) を「検出」する、という3つのステップに分類される。イオン化の方法には、電子イオン化(EI)および化学イオン化 (CI) の気相イオン化、電界脱離イオン化 (FD)、高速電子衝撃イオン化 (FAB)、マトリックス支援脱離イオン化 (MALDI) および表面支援レーザー脱離イオン化 (SALDI) の脱離イオン化、エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、大気圧化学イオン化 (APCI) および大気圧光イオン化 (APPI) などの大気圧イオン化が挙げられる。また、荷電粒子の分離装置には、磁場型 (Magnetic Sector)、四重極型 (Q)、イオントラップ型 (IT)、飛行時間型 (TOF) およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FT-ICR) などが挙げられる (Takayama *et al.*, 2013)。分析試料の揮発性、熱安定性、極性および求める分解能、分子量によって、これらの手法を組み合わせた様々な質量分析法が開発されてきた。このうち、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 (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of flight Mass spectrometry, 以下MALDI-TOF MSと略記) は、マトリックスと分析試料の混合物にパルスレーザーを照射し、脱離およびイオン化した後、高真空のフライトチューブ内を一定の加速電圧下で飛行させ、その飛行時間が質量電荷比に比例することを利用して、質量電荷比を測定する手法である(図1)。MALDI-TOF MSは、MALDI法のソフトイオン化とTOF MSの測定質量範囲の広さから、低分子量の無機・有機化合物から高分子量のタンパク質まで幅広い物質の測定が可能である。また、粗抽出物のような夾雑物の多い試料を前処理なく分析することも可能であり、試料調製から分析までを簡便かつ迅速に行える点が優れている。さらに、質量電荷比は分子によって固有の値であるため、異性体である場合を除き、複数の対象物質を同時に測定することができる。

園芸作物のうち、果樹および果菜類の果実は、機能性成分を豊富に含むことから、健康的な食材として近年注目を集めている。果実成分の中で、可溶性炭水化物は主要な一次代謝物であり、可溶性炭水化物の組成および含量は品質の評価に重要である。また、赤ワインの抗酸化成分として関心を集めているアントシアニンは、ハスカップやヤマブドウなどの北方系小果樹の果実にも豊富に含まれており、その利用が期待されている。これらの主要成分の分析には、従来 HPLC が広く用いられてきた。HPLC は成分の分離に優れ、検出器やカラムの組み合わせによって様々な物質の定量が可能である。一方、試料の前処理が煩雑なこと、完全な単離が難しい場合があること、分析条件によっては 1 検体の分析が長時間におよぶこと、並びに定量には測定対象の標品が必要であり、

MALDI



TOF

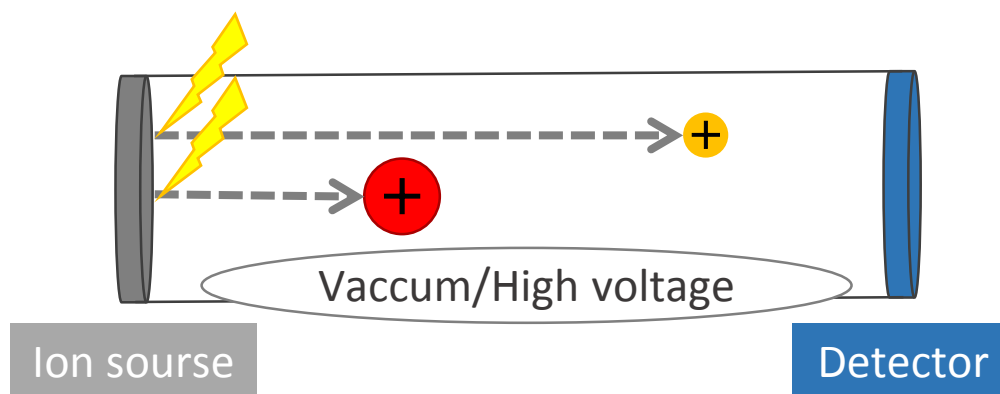


図1. MALDI-TOF MSの仕組み.

標品の入手が難しい場合は定量が困難であることなどが問題点である。Wang & Sporns (1999) は、MALDI-TOF MS の簡便さと質量電荷比に基づいた物質の分離に着目し、構造が類似しているアントシアニンの mono-glucoside について、定量性とイオン化強度の類似性を明らかにした。この手法を用いて、これまでにブルーベリーおよびスノキ属野生種 (Yokota, 2011), キイチゴ属 (Tanaka, 2012) およびハスカップ (Kuwayama, 2015) 果実に含まれるアントシアニンの特徴が明らかにされている。しかし、果実には mono-glucoside に加え、di-glucoside のアントシアニンも豊富に含まれていることが多く、これらの定量性についても検証が必要と考えられる。一方、可溶性炭水化物については、デンプン加水分解物 (Grant *et al.*, 2003) およびアスパラガス貯蔵根に含まれるフルクタン (Suzuki *et al.*, 2013) の MALDI-TOF MS を用いた定量について報告されているが、いずれもオリゴ糖に関するものであり、単糖および二糖に関する報告は見当たらない。

また、MALDI-TOF MS のもう一つの利点として、質量分析イメージング (Mass spectrometry imaging, 以下 MSI と略記) が挙げられる。これは、マイクロームで切削した薄切片にマトリックスを塗布し、レーザーの照射位置を変えながら 2 次元方向に連続的な質量分析を行い、得られたイオン化強度の相対値から目的化合物の切片上における分布を画像化する手法であり、従来の抽出操作を経てからの分析では得られなかった空間分布情報を得ることができる。MSI は医学・薬学分野において、薬剤動態や目的化合物の代謝を調査することを目的に発展途上であり、分析材料も当初は脳神経や肝臓などの動物組織に限られていたが、近年は植物組織を対象とした報告も増えている。この場合、果実などは含水率が 90%前後と高く、果肉のような大きな細胞と果皮や種子などの小さな細胞で構成されており、硬さや構造の違いが原因で切削や分析に工夫が必要であることから、先行事例は少ない (Matros & Mock, 2013)。そこで本研究では、MALDI-TOF MSI を利用して、リンゴ果実中の可溶性炭水化物分布を可視化しようと考えた。リンゴ果実にはフルクトース、グルコース、ソルビトールおよびスクロースの 4 種類の可溶性炭水化物が含まれているが、これらの果実内における分布に関する知見は少ない。特に、リンゴやナシの一部品種には、成熟期に果肉組織が水浸状になるみつ症果が発生するが、その発生機序は明らかにされていない。みつ組織にはソルビトールが多く蓄積することが知られているが、ソルビトール集積とみつ症果発生の因果関係は未解明である。これらの問題を解明する端緒として、MALDI-TOF MSI から得られる組織化学的情報が有益になるものと考えた。

以上述べたとおり、本研究では MALDI-TOF MS を利用した園芸作物果実の成分分析技術の改良を目的とし、研究を行った。まず、第 1 章ではアントシアニンおよび可溶性炭水化物の標準物質を用いて、MALDI-TOF MS を用いた定量技術の妥当性について検証した。第 2 章では、第 1

章で検証したアントシアニンの定量技術を用いてその有益性を実証するため、北海道内各地に自生するヤマブドウ果実のアントシアニンを MALDI-TOF MS を用いて定量し、他の主要成分とともにそれらの年次間変動、地理的分布の特徴、および抗酸化活性との関連について解析した。第 3 章では、リンゴ果実を材料として MALDI-TOF MSI 分析を行い、植物組織に適する分析の諸条件を検討するとともに、果肉組織における可溶性炭水化物の分布と、成熟に伴う変化について明らかにすることを試みた。最後に、第 4 章では、第 1-3 章で得られた結果について、総合的な考察を加えた。

第1章 MALDI-TOF MS を用いた成分定量法の検証

MALDI-TOF MS は操作が簡便で分析時間が短く，粗抽出物のような夾雑物の多い試料においても目的のピークを高感度で得られることから，植物や食品の分析にも広く用いられている (Sporns & Wang, 1998). また，得られた質量電荷比から未知化合物を推定する従来の定性分析としての利用に加えて，イオン化強度から対象物を定量する手法が開発されてきた. Wang *et al.* (2000) は，MALDI-TOF MS を用いて mono-glucoside アントシアニンの定量が可能であると報告し，ワインおよびブドウジュース，並びにブルーベリー果実中のアントシアニン含量を測定している. しかし，ヤマブドウやハスカップなどの果実に含まれるアントシアニンには，mono-glucoside のほかに di-glucoside も多く，これらの定量性については未だに検証が行われていない. また，可溶性炭水化物は園芸作物において主要な一次代謝物であるが，単糖および二糖について MALDI-TOF MS を用いた定量技術に関する報告は見当たらない. そこで本章では，MALDI-TOF MS を用いた各種アントシアニンおよび低分子可溶性炭水化物の定量性について，それぞれの標品の濃度とイオン化強度の相関を調べ，評価しようと考えた.

第1節 アントシアニン(内部標準法)

本節では，mono-glucoside に di-glucoside を加えた多種類のアントシアニン標品を用いて，MALDI-TOF MS のピーク高(イオン化強度)に基づく定量性に関する検証を行った.

材料および方法

アントシアニンの標品は，Pelargonidin 3-O-glucoside (Pg3G), Cyanidin 3-O-glucoside (Cy3G), Cyanidin 3,5-diglucoside (Cy3G5G), Peonidin 3,5-diglucoside (Pn3G5G) および Malvidin 3,5-diglucoside (Mv3G5G) (EXTRASYNTHÈSE, Lyon, France) の 5 種類を用いた. 各アントシアニンをそれぞれ 80%MeOH に溶解し，1 mmol/L の標準溶液を作製した. 次に，Pg3G を 1 としたときの Cy3G の濃度が 1/9, 1/4, 1/2, 1, 2, 4, 9 となるように混合し，混合標準溶液を作製した. Cy3G5G, Pn3G5G および Mv3G5G についても同様に Pg3G との混合標準溶液を作製した. 各混合標準溶液と 100 mmol/L 2', 4', 6'-Trihydroxyacetophenone mono-hydrate (THAP, in 80%MeOH) をパラフィルム上で等量ずつ混和し，0.5 μ L をターゲットプレート (MTP AnchorChip 384 BC, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) のサークル内に上層後自然乾燥し，分析に供した.

分析は, MALDI-TOF MS (ultrafleXtreme, Bruker Daltonics) を用いて, 以下の条件で行った: レーザー, 337 nm 窒素レーザー (3 ns, 20Hz); 加速電圧, 15kV; モード, ポジティブイオン・リフレクターモード; 遅延抽出, 100 ns; レーザー照射回数, 500 回; キャリブレーション, ヨウ化セシウム. 分析は, 1 スポットにつきランダムにレーザー照射を 500 回繰り返す測定を 3 回行い, それらを積算したピーク高 (イオン化強度) をそのスポットの測定値とした. 結果は, 4 スポットの平均値で表した ($n = 4$).

結果および考察

Pg3G に Cy3G, Cy3G5G, Pn3G5G または Mv3G5G を 1:1 で加えた混合標準溶液の MALDI-TOF MS におけるマススペクトラムの一例を図 2 に示した. 各アントシアニンは一価の陽イオンであることから, 全て $[M]^+$ に該当する m/z で検出された. また, Pg3G と他 4 種のアントシアニンの, 濃度比とイオン化強度比の相関を図 3 に示した. いずれの場合も, 濃度比とイオン化強度比の間には強い正の相関 ($R^2 > 0.98$) が認められたことから, Pg3G を内部標準とすることでアントシアニンの定量は可能であると考えられる. 一方, 近似直線の傾きはアントシアニンの種類ごとに異なっていた. Wang *et al.* (1999) は, Pg3G, Cy3G, Pn3G および Mv3G の濃度と相対イオン化強度の相関について, 各アントシアニンとも強い正の相関を示し, その傾きは mono-glucoside であればアントシアニジンの種類によらずほぼ同じであることを報告している. 本研究においても, mono-glucoside である Pg3G と Cy3G の相関で, 近似直線の傾きは 1.05 (ほぼ 1) を示しており, Wang *et al.* (1999) の報告と矛盾しない. 一方, di-glucoside のアントシアニンにおいては, その種類によって近似直線の傾きは大きく異なっており, di-glucoside については mono-glucoside と同じ検量線は使用できず, 別に検量線を用意する必要があることが判明した.

第2節 可溶性炭水化物 (直接定量法)

本節では, 低分子の可溶性炭水化物標品を用いて, MALDI-TOF MS のピーク高 (イオン化強度) に基づく定量性に関する検証を行った.

材料および方法

フルクトース, グルコース, ソルビトールおよびスクロースの各標品 (Nacalai tesque Inc, Kyoto, Japan) をそれぞれ蒸留水に溶解し, 0.03–3.0 mmol/L の標準溶液を作製した. これらに 100

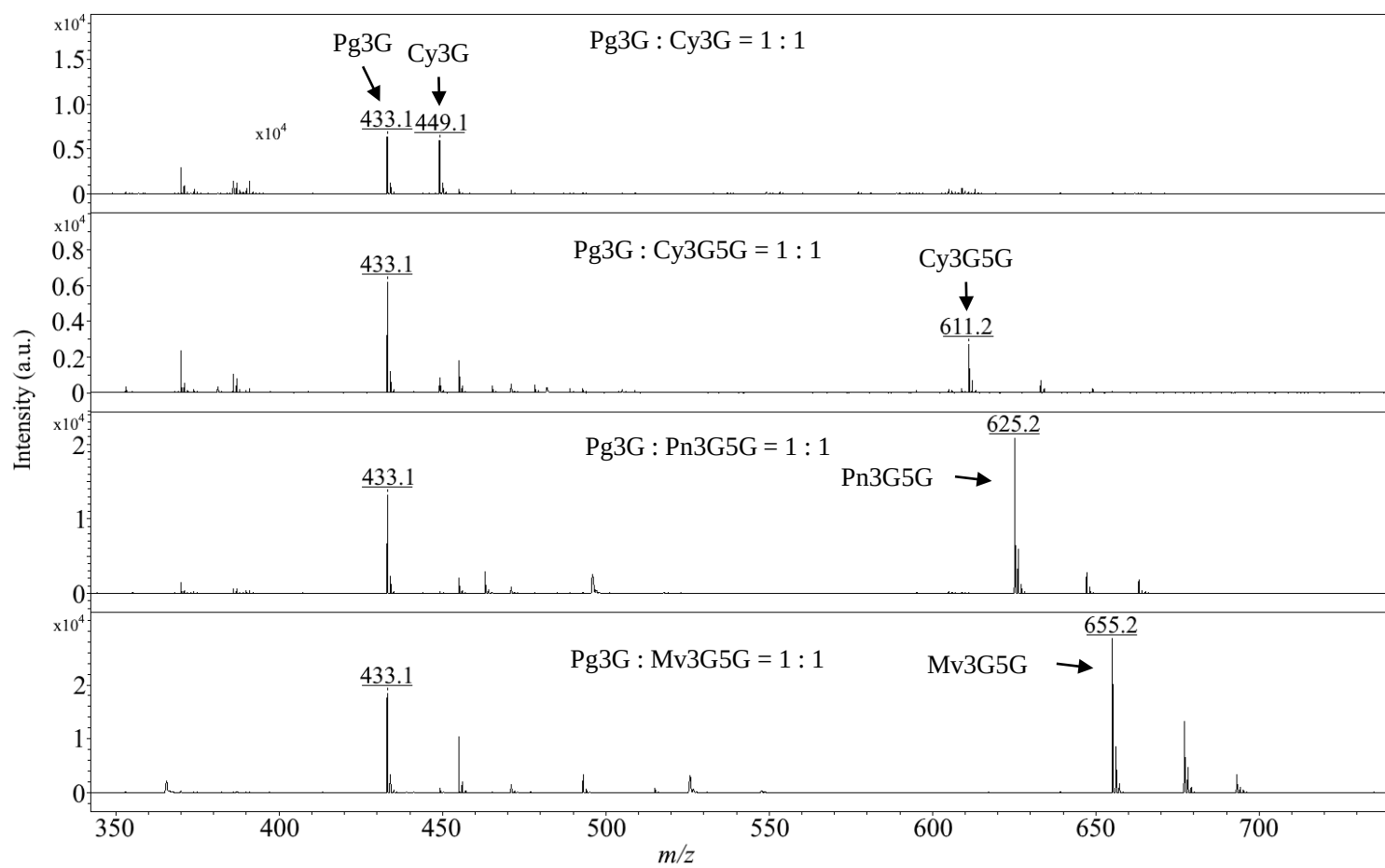


図2. アントシアニン標品のマスペクトラムの一例.

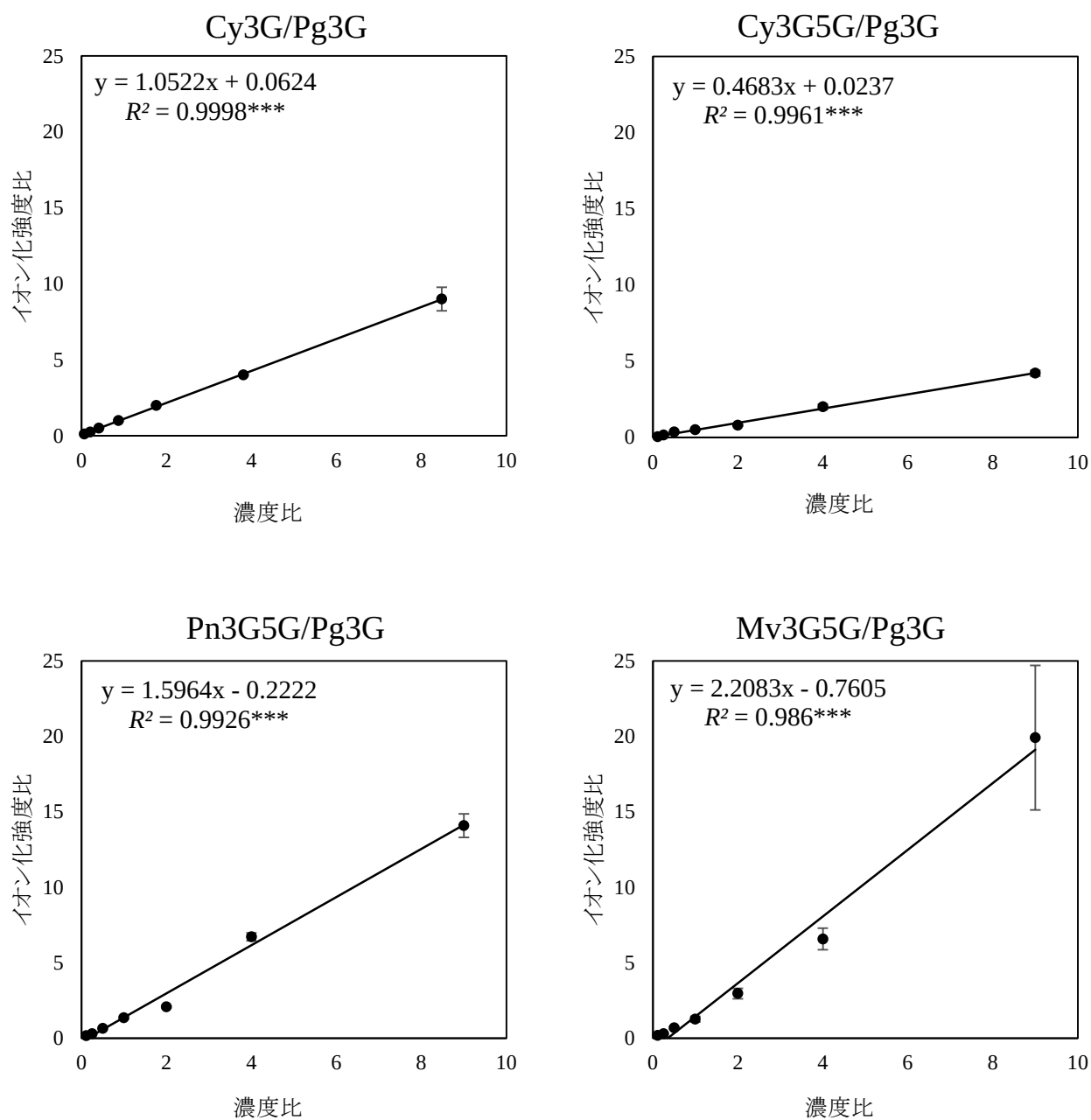


図3. Pg3GとCy3G, Cy3G5G, Pn3G5Gおよび Mv3G5Gの濃度比とイオン化強度比の相関.
 平均値 $\pm$ SE ($n = 4$), $^{***}P < 0.001$

mmol/L 2,5-dihydroxybenzoic acid (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan, 以下 DHB と略記) および 1mmol/L 塩化カリウムをパラフィルム上で等量ずつ混和し, 0.5 μ L をターゲットプレート (MTP AnchorChip 384 BC, Bruker Daltonics) のサークル内に上層後自然乾燥し, 分析に供した. この場合, 各可溶性炭水化物の最終濃度は 0.01–1.0 mmol/L とした.

質量分析は, 第 1 項と同様の方法で行った.

結果および考察

各可溶性炭水化物を 1 mmol/L の濃度で混和した標準溶液の MALDI-TOF MS におけるマスペクトラムの一例を図 4 に示した. いずれの可溶性炭水化物も $[M + K]^+$ に該当する m/z のピークのみが検出された. Na^+ を付加した分子イオンが検出されなかったのは, 試料に塩化カリウムを添加したためと考えられる. また, これらの炭水化物の該当するピークのイオン化強度は, 濃度の増加に伴い直線的に高まり, 濃度とイオン化強度の間にはいずれも強い正の相関が認められ ($P < 0.001$), 回帰直線は検量線としての役割を十分に果たすことが確認された (図 5). このことから, MALDI-TOF MS を用いて可溶性炭水化物の相対的な定量が可能であるものと考えられる.

しかし, イオン化強度は可溶性炭水化物の種類ごとに大きく異なり, 二糖であるスクロースは単糖のフルクトースおよびグルコース並びに糖アルコールのソルビトールに比べてイオン化強度が高かった. また, グルコースのイオン化強度はフルクトースやソルビトールの約 1/6 であった. 可溶性炭水化物のイオン化には, 構造末端にある $-CH_2OH$ にアルカリ金属イオンの結合が必要である. フルクトースおよびソルビトールは $-CH_2OH$ を 2 つ有するのに対し, グルコースは 1 つのみであり, この構造の違いがイオン化強度に影響したものと考えられる (図 6).

第3節 第 1 章の考察

本章では, アントシアニンおよび可溶性炭水化物の MALDI-TOF MS を用いた定量の可否を検証するため, それぞれの標品を用いて濃度とイオン化強度の相関を調べた. また, アントシアニン定量においては, 第 2 章で後述するヤマブドウ果実の成分分析に示すような抽出物の分析を想定して, 抽出物に一定量の内部標準物質を添加し, それと測定対象物のイオン化強度比から濃度を求める内部標準法を選択した. この場合, 内部標準物質添加後であれば試料の濃縮, 希釈が可能であり, アントシアニンのような微量成分の定量には特に有効である. 一方, 可溶性炭水化物定量は, 内部標準を用いることができない MSI 分析 (第 3 章で後述) においても, 濃度とイオン化強度

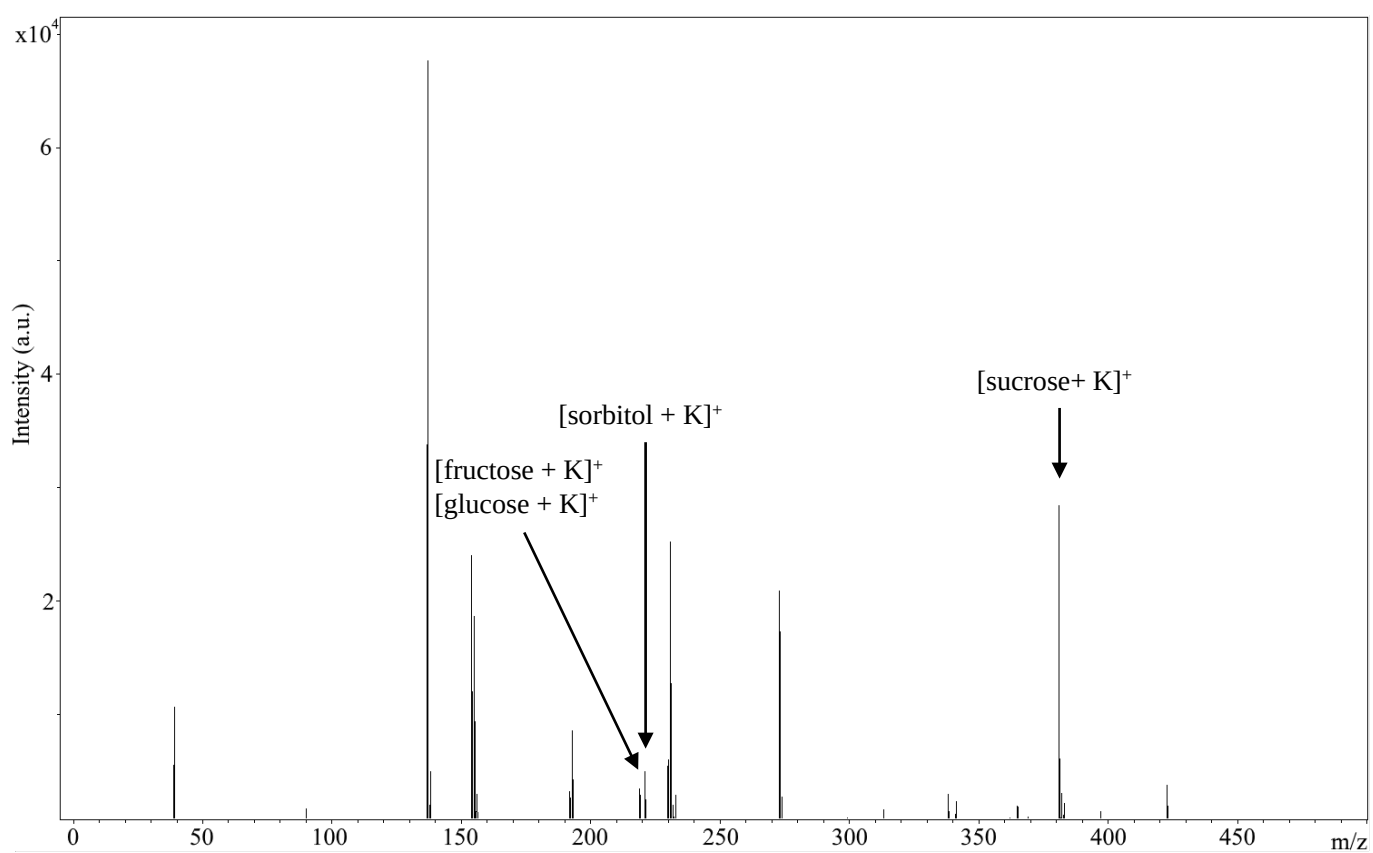


図4. 可溶性炭水化物標品のマスペクトラムの一例.

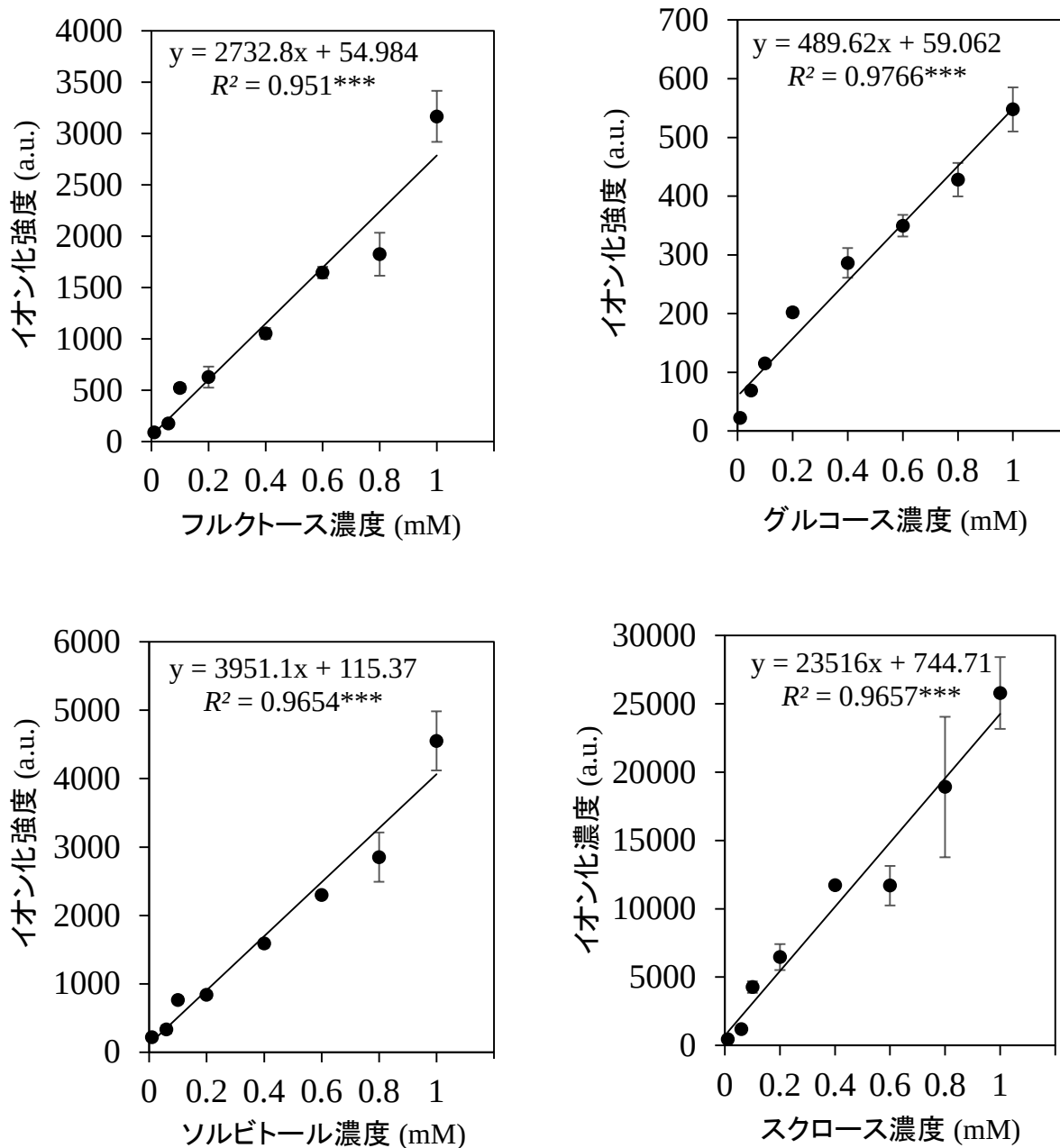
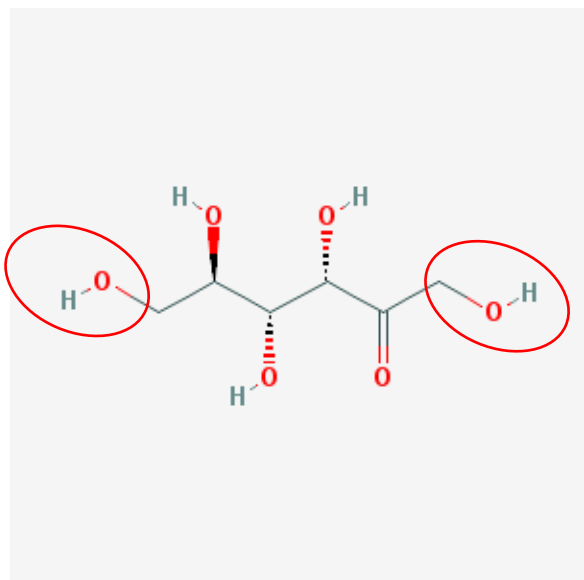
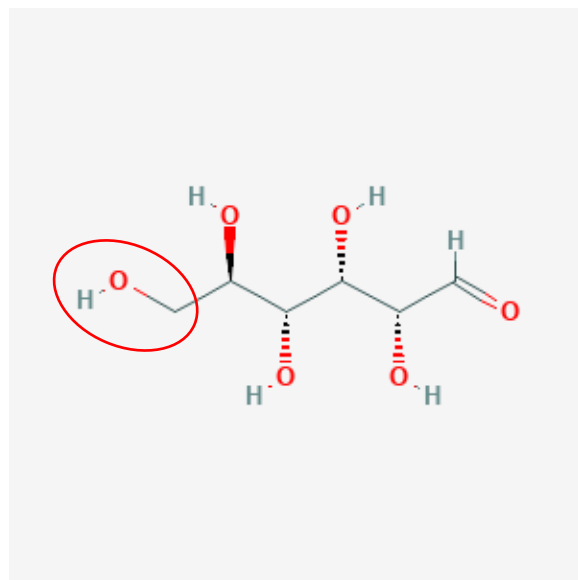


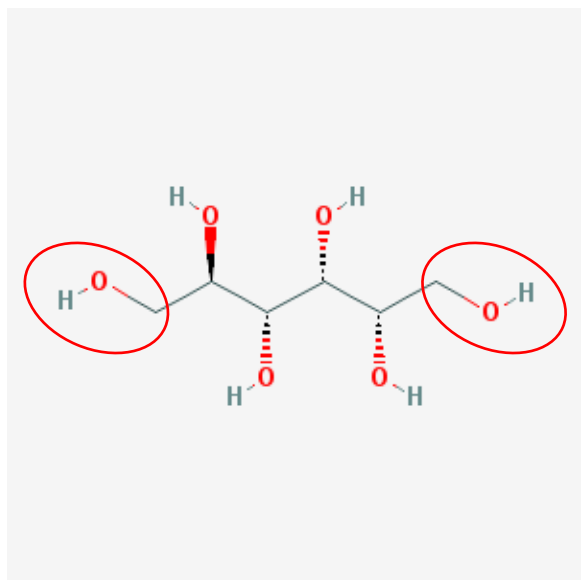
図5. 可溶性炭水化物の標品濃度とMALDI-TOF MSで測定したイオン強度との相関.
 平均値 $\pm$ SE, ($n = 3$), $^{***}P < 0.001$



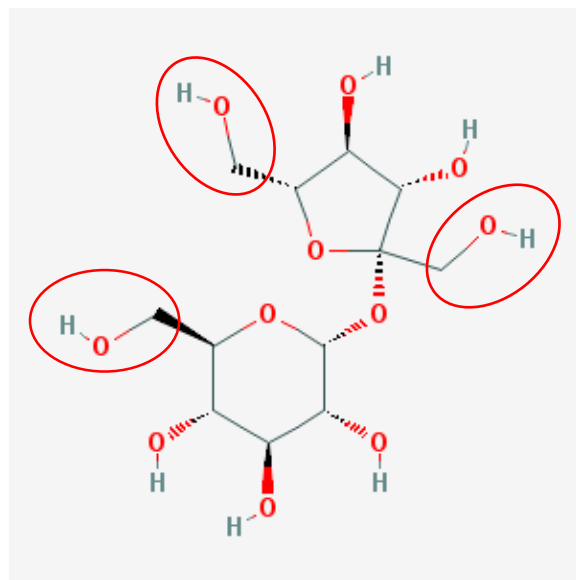
D-(-)-Fructose



D-(+)- Glucose



D-Sorbitol



Sucrose

図6. 各可溶性炭水化物の構造式(Pubchemより引用). 赤枠は $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基を示す. Fructoseは5員環と6員環構造が存在するため, 鎖状構造として示す.

の間に相関があることを検証するため、直接定量法を用いることとした。

アントシアニンでは、内部標準として用いることを想定した pg3G と、Cy3G, Cy3G5G, Pn3G5G および Mv3G5G いずれの間にも強い正の相関が認められ、これらを検量線として用いることで、アントシアニンの定量が可能であることが確認できた。また、Pg3G と Cy3G については、濃度に対するイオン化強度が過去の報告と類似しており (Wang & Sporns, 1999), 異なる質量分析装置を使用した場合でも化合物のイオン化強度に大きな違いは生じないものと考えられる。Wang *et al.* (1999) は Pg3G および Cy3G のほか、Pn3G および Mv3G を含めた mono-glucoside のイオン化強度はよく一致していたことから、MALDI-TOF MS を用いて定量を行う場合、各アントシアニンの標品を用意しなくてもこれらの測定が可能だとしている。このことから、本研究においても、本章で得られた Cy3G と Pg3G の検量線は、他の mono-glucoside の定量にも適用できると考えられる。一方、di-glucoside についてはアグリコンの種類によってイオン化強度は異なっており、単一の検量線で全てのアントシアニンを定量することは難しい。しかし、いずれのアントシアニンも Pg3G との間に強い相関を示していること、およびイオン化強度が測定機器に依存せず一定であることを考慮すると、本研究で得られた検量線を基にすれば、毎回の分析ごとに標品を用いて検量線を求める必要はないと考えられる。

次に、低分子の可溶性炭水化物については、検討した 4 種類全てで濃度とピーク高 (イオン化強度) の間に強い正の相関が認められた。これらの回帰分析における決定係数は、内部標準を添加したアントシアニンの場合と比べて低かったものの、定量性は十分に担保されており、MALDI-TOF MS を用いた低分子可溶性炭水化物の定量は、直接定量法でも可能であるものと考えられる。この場合、陽イオンモードの分析において、可溶性炭水化物は $[M + H]^+$ のほか、 $[M + Na]^+$ および $[M + K]^+$ など異なる種類のカチオンが付加した複数のアダクトピークとして検出されるのが普通である。そのため、マトリックスと共に塩化カリウムなどのカチオン添加剤を用いることで、検出されるアダクトを固定することが重要である。また、可溶性炭水化物の種類によってイオン化強度は大きく異なっており、その違いはカチオンが付加しやすい $-CH_2OH$ 基の数に起因すると考えられるので、本研究で検討した種類に加え各種炭水化物のイオン化の難易を考える上で $-CH_2OH$ 基の数を考慮することが重要である。

第2章 MALDI-TOF MS を用いたヤマブドウ果実のアントシアニン定量分析 と、その他主要成分および抗酸化能との関連

第1章では、アントシアニン分析に MALDI-TOF MS が有用であり、内部標準法による定量分析が可能であることを示した。そこで本章では、アントシアニンを豊富に含む北方系小果樹果実を材料として、MALDI-TOF MS を用いる利便性を検証しようと考えた。

ヤマブドウ (*Vitis coignetiae* Pulliat) は、北海道から四国地方に自生する日本の主要な野生ブドウであり、冷涼な気候を好むため、温帯である東北から四国にかけては標高の高い山地に分布が多く認められるのに対し、亜寒帯に属する北海道では平地から山地まで幅広い分布が確認されている (Horiuchi, 1996)。ヤマブドウは栽培ブドウの *Vitis vinifera* (欧州ブドウ) および *Vitis labrusca* (アメリカブドウ) よりも耐寒性に優れており、北海道池田町ではヤマブドウと欧州ブドウを交配・育成したワイン醸造用品種‘清舞’および‘山幸’が、ワイン産業の発展に貢献している。

果樹における果実の形質評価では、一般に果実あたりの生重(1果重)のほか、一次代謝物である糖および有機酸含量が測定されている。ヤマブドウ果実におけるこれらの主要成分については、これまで報告があるものの (Okamoto *et al.*, 2008; Poudel *et al.*, 2008), 全て圃場で栽培された数個体を対象としたものであり、広範囲に生息する野生個体から果実を収集し調査した例は無い。また、ブドウ果皮や種子にはアントシアニンをはじめとするポリフェノールが豊富に含まれており、機能性食品素材という観点からもこれらの含量を測定することに意義がある。

一方、生体内で発生する活性酸素種はガン、心筋梗塞および脳血管疾患の三大成人病リスクを高めるとされ、これらを捕捉・消去する抗酸化成分についてはこれまで多くの研究がなされてきた。ヤマブドウ果実にはアントシアニンを含むポリフェノールが豊富に含まれており、高い抗酸化性をもつことが予想される。抗酸化性評価の手法として広く用いられる DPPH 法は、人工ラジカルである 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) が還元する際の吸光度減少から抗酸化活性を求める手法で、測定が簡便である反面、DPPH ラジカルは生体内で発生する活性酸素種ではないため、生体内で発生するラジカルの捕捉能を反映しないのではないかという懸念が指摘されてきた。この点を解消するべく注目されたのが ORAC 法である。これは、脂質ペルオキシラジカル (ROO ラジカル) の捕捉活性値を測定する手法であるが、主に水溶性成分の分析を基本としており、脂溶性成分の分析に適さないという弱点を有している。さらに、ESR スピントラップ法は、スピントラップ剤と呼ばれる化合物の電子スピン共鳴 (ESR) を測定し、活性酸素種による ESR 信号の減少率から

分析試料のラジカル捕捉活性値を求める手法で、反応性の高い活性酸素種に対する捕捉活性を測定することができる。この方法は、生体内で発生する活性酸素種ごとの捕捉活性を測定できる点で優れているものの、分析機器および試薬（スピントラップ剤）が高価であり汎用性に欠けることが難点である。このように、青果物の抗酸化性を一元的に評価する指標は未だ確立されていないのが現状であり、果実に含まれる抗酸化成分と捕捉される活性酸素種との対応関係は、明確ではない。

そこで本章では、第1章で検証した MALDI-TOF MS によるアントシアニンの定量法を用いて、ヤマブドウ果実のアントシアニン含量を測定し、多数検体分析における MALDI-TOF MS の有用性を実証しようとした。第1節では、HPLC、MALDI-TOF MS および ESI-FT ICR MS を用いて、ヤマブドウ果実に含まれるアントシアニンの定性分析を行った。第2節および第3節では、各形質の年次間変動、形質間の相関、地理的分布の特徴および気象条件との関連性について解析を行い、北海道に自生するヤマブドウ果実の諸形質の特徴を明らかにしようとした。第4節では、DPPH 法、ORAC 法および ESR スピントラップ法を用いて、ヤマブドウ果実の4種のラジカル種に対する捕捉活性値を測定し、主たる抗酸化成分であることが想定されるアントシアニンおよびポリフェノール含量と各種抗酸化性との相関を調べ、ヤマブドウ果実がもつ抗酸化性の特徴を明らかにしようとした。第5節では、ヤマブドウ、欧州ブドウおよびそれら交配種果実のラジカル捕捉活性を比較するとともに、抗酸化に関わる成分の違いを解明しようとした。

第1節 HPLC および ESI-FT ICR MS を用いたヤマブドウ果実のアントシアニンの定性分析

粗抽出物に含まれるアントシアニンを MALDI-TOF MS を用いて分析する場合、事前にアントシアニンの種類を定性しておくことで、アントシアニンに由来するピークの特特定が容易になる。そこで、本節では HPLC を用いてヤマブドウ果実の粗抽出物からアントシアニンを分離した後、各ピークをフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, 以下 ESI-FT ICR MS と略記) を用いて質量分析し、MS/MS 分析によるフラグメントイオンの精密分析を行った。

材料および方法

(1) 植物材料

2013 年および 2014 年の 10-11 月に、道内各地に自生する 42 個体から、ヤマブドウ果房を 3

つずつ採取した(図 7). 1 年目の採取時に GPS の位置情報および周辺の状況(写真)を記録し, 2 年目も同じ個体から採取した. 採取した果房から病虫害のない完熟果を選び, 凍結乾燥・粉末化にして材料とした.

(2) アントシアニン抽出および分析の方法

1) 加水分解抽出と HPLC 分析

材料 200 mg にメタノール:水:12 N 塩酸 = 5:4:1 (v/v/v) の溶液 10 mL を加え, 90°C のウォーターバス中で 1 時間加熱した. その後, 上記溶液 5 mL を加え, 再び 90°C で 1 時間加熱した. 加熱後急冷し, 少量のメタノールを加えて攪拌し, 脱脂綿を詰めた漏斗でろ過したものを分析試料とした.

2) MALDI-TOF MS 分析

1)の加水分解抽出物を, MALDI-TOF MS (Voyager-DE, Applied Biosystems) で質量分析した. 分析条件は以下の通りである:レーザー, 337 nm 窒素レーザー (3 ns, 20Hz); 加速電圧, 20 kV; モード, ポジティブイオン・リフレクターモード; 遅延抽出, 100 ns; レーザー照射回数, 50 回.

3) アントシアニンの粗抽出および HPLC を用いた分離

材料 100 mg にメタノール:水:ギ酸 = 88:10:2 (v/v)の溶液 500 μ L を加え, 室温下で 30 分振とう抽出し, 遠心分離後 (12,000 $\times g$, 10 min)の上清を回収した. これを 3 回繰り返し, 抽出液 1500 μ L を得た. 抽出液は遠心エバポレーターを用いて約 50 μ L に減圧濃縮し, 分析試料とした.

HPLC 分析は, Oh *et al.* (2008) の方法に一部修正を加えた以下の条件で行った:
カラム, InertSustain C18 3 μ m (3.0 $\times$ 150 mm, ジーエルサイエンス);カラム温度, 40°C;移動相, 溶離液 A(水:ギ酸 = 95:5(v/v))と溶離液 B(水:アセトニトリル = 60:40 (v/v))のグラジエント分析;試料注入量, 10 μ L;流速, 0.5 ml/min;検出器, ダイオードアレイ検出器;検出波長, 535 nm. 溶離液 A/B のグラジエント条件は, 以下のとおりである:0–1 min, 5/95 から 22/78 への直線グラジエント; 1–13 min, 22/78 を保持;13–20 min, 22/78 から 23.8/76.2 への直線グラジエント; 20–26 min, 23.8/76.2 から 30.9/69.1 への直線グラジエント;26–31 min, 30.9/69.1 から 35.6/64.4 への直線グラジエント; 31–39 min, 35.6/64.4 を保持; 39–40

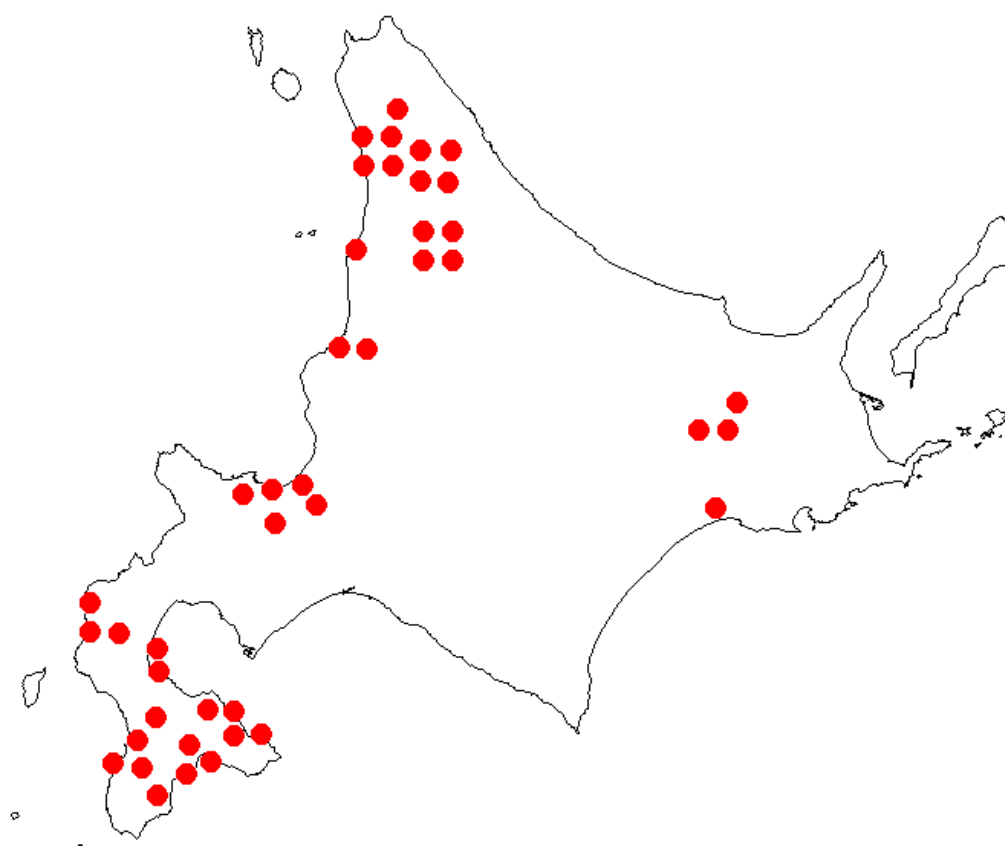


図7. ヤマブドウ果実の採取地点.

min, 35.6/64.4 から 5/95 への直線グラジエント; 40–45 min, 5/95 を保持.

4) ESI-FT ICR MS 分析

2)で分離した各ピークの質量分析は, HPC に接続された ESI-FT ICR MS (Solarix XR, Bruker Daltonics) を用いて, ポジティブイオンモードで行った. 分析条件は Solarix の標準メソッドに従った.

結果および考察

加水分解抽出物を MALDI-TOF MS を用いて質量分析した結果, m/z 287, 301, 303, 317 および 331 に大きなピークが検出され(図 8), これらは, それぞれ Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin および Malvidin のピークであると推測された(図 9). 従って, ヤマブドウ果実には, 上記 5 種類のアントシアニジンを基本骨格に有するアントシアニンが含まれていることがわかった. また, この中には Pelargonidin は含まれておらず, 内部標準物質として添加する Pelargonidin 3-O-glucoside (Pg3G) の有用性が確認できた.

次に, ヤマブドウ果実の粗抽出物を HPLC で分析した結果, 21 のピークが検出された(図 10). 各ピークを ESI-FT ICR MS で質量分析したマススペクトラムを図 11-15 に示す. 親イオンを MS/MS 分析して得られたフラグメントイオンから, 各ピークに含まれるアントシアニンの基本骨格が推定された(図 9, 表 1). これらの質量分析結果および過去の報告 (De Rosso *et al.*, 2012) に基づき, ヤマブドウ果実には表 1 に示す 21 種類のアントシアニンが含まれているものと推定することができた. なお, 本実験で使用した ESI-FT ICR MS の分析メソッドでは, 一定以上のイオン強度を示した親イオンが MS/MS 分析の候補となり, また, 分析の重複を避けるため, 一度 MS/MS 分析したイオンはその後の MS/MS 分析の対象から除外される. 図 11-15 の複数のマススペクトラムにおいて, MS/MS 分析対象となっているイオンが必ずしも最大イオン化強度を示していないのは, HPLC の吸光ピークより手前の時点で, MS/MS 分析が実施されたためである.

MALDI-TOF MS を用いて定量分析を行う場合, 同じ質量電荷比をもつ化合物は同一のピークとして検出される. 本実験で定性分析したアントシアニンは, Cy3G5G (ピーク②) および Dp3CG (分画⑱), Pn3G5G (ピーク⑤) および Pt3CG (ピーク⑳) を除いて分子量が異なっていたため, 各アントシアニンの定量が可能であると判断した. また, Cy3G5G, Dp3CG, Pn3G5G および Pt3CG は, HPLC 分析のクロマトグラム全体のピーク面積に占める

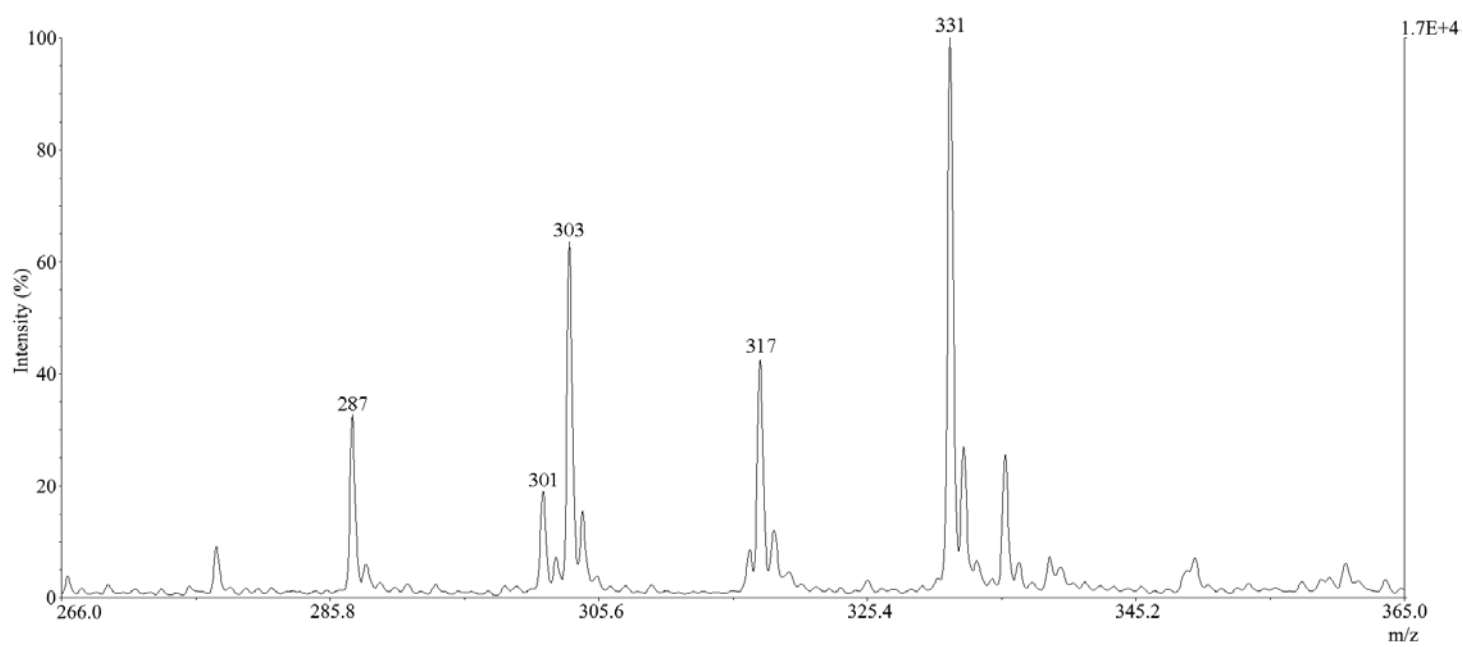


図8. ヤマブドウ果実の加水分解抽出物のマスペクトラム.

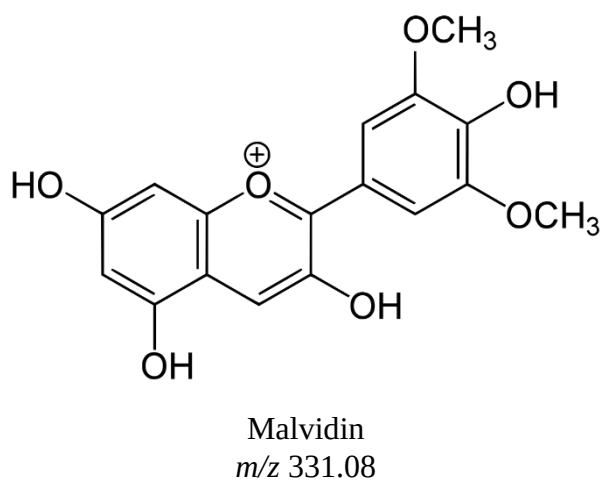
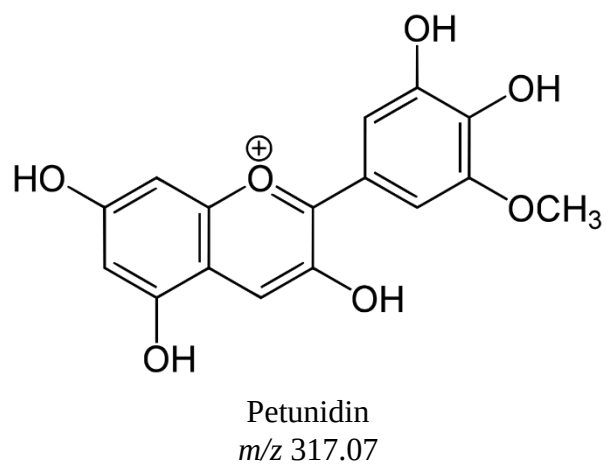
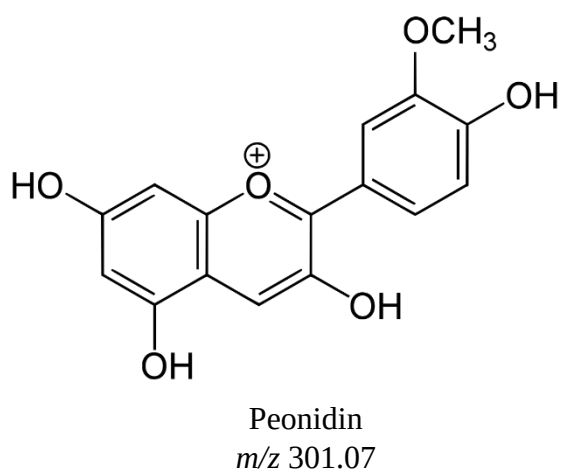
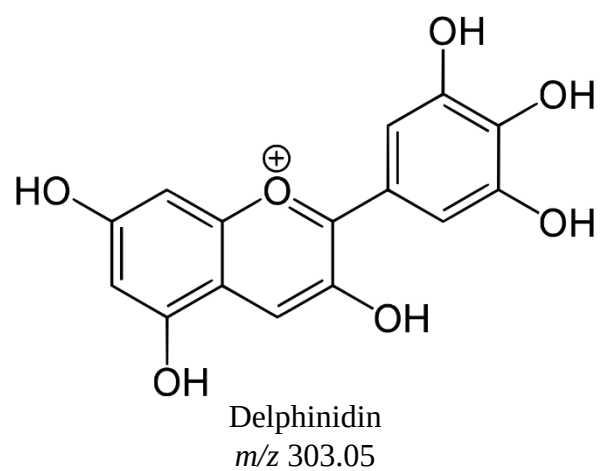
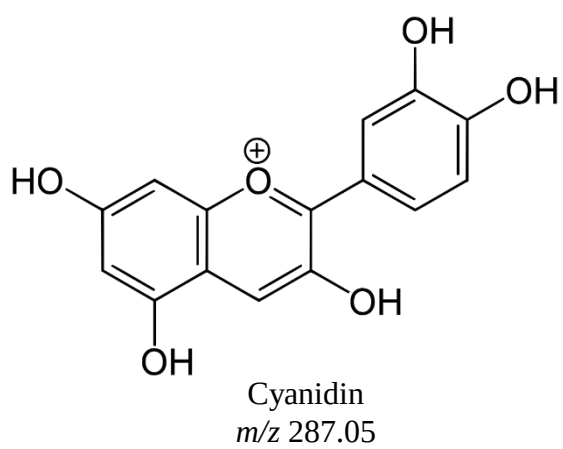


図9. ヤマブドウ果実に含まれるアントシアニンの基本骨格の構造式.

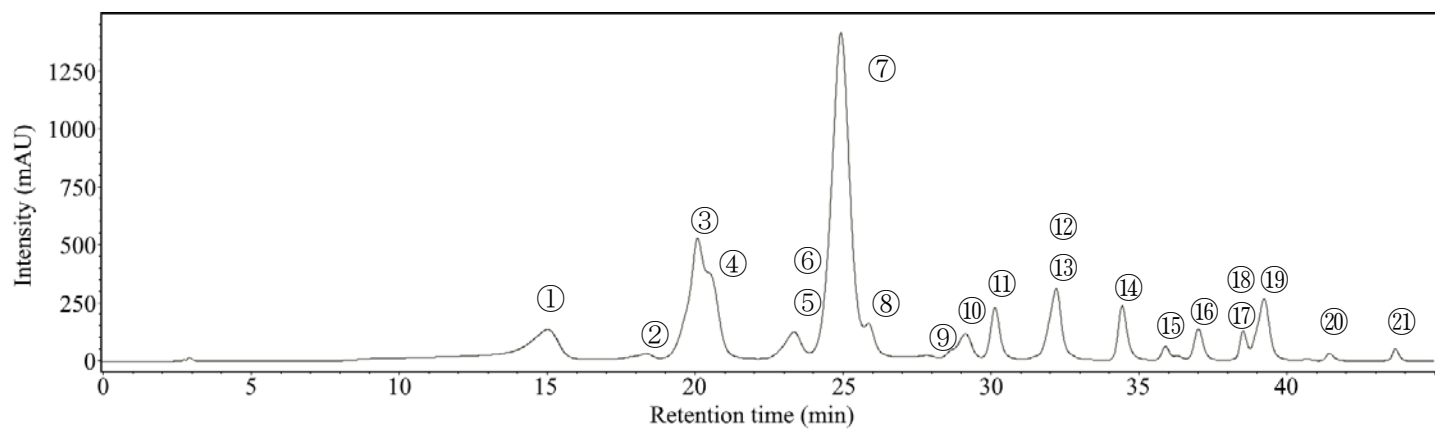


図10. ヤマブドウ果実抽出物のHPLCクロマトグラム.

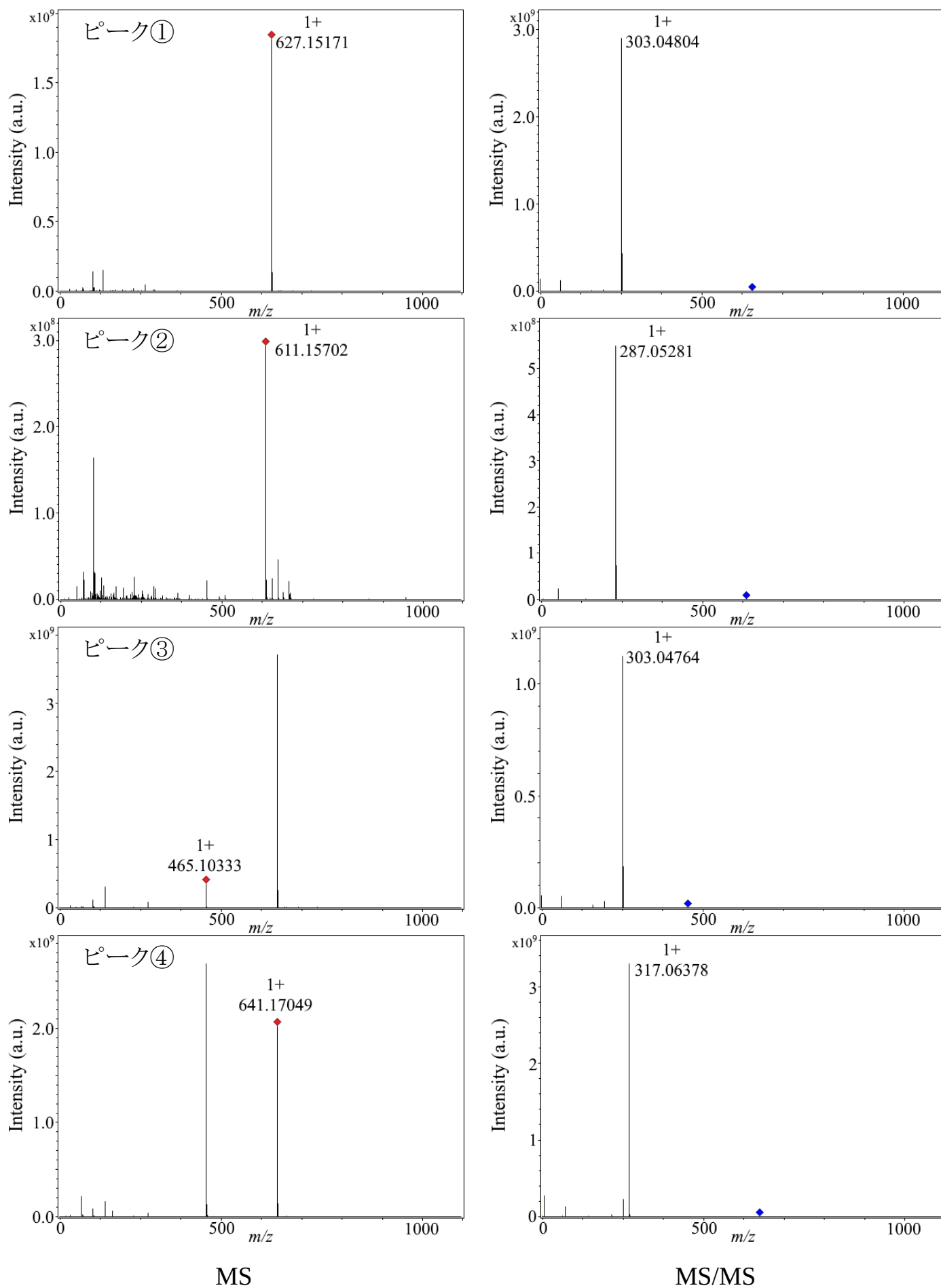


図11. ESI-FT ICR MSで得られたピーク①-④のマスペクトラム.

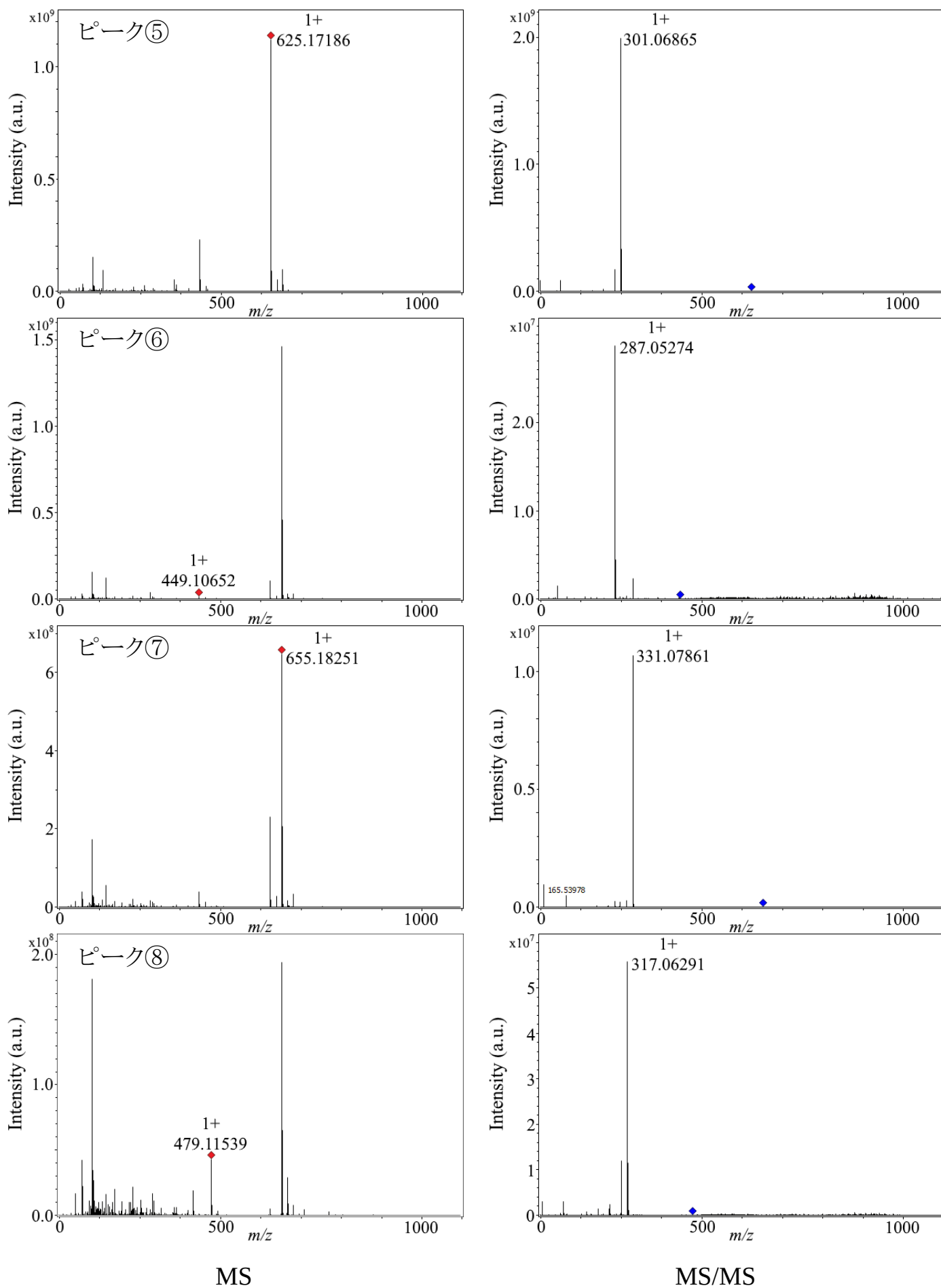


図12. ESI-FT ICR MSで得られたピーク⑤-⑧のマスペクトラム.

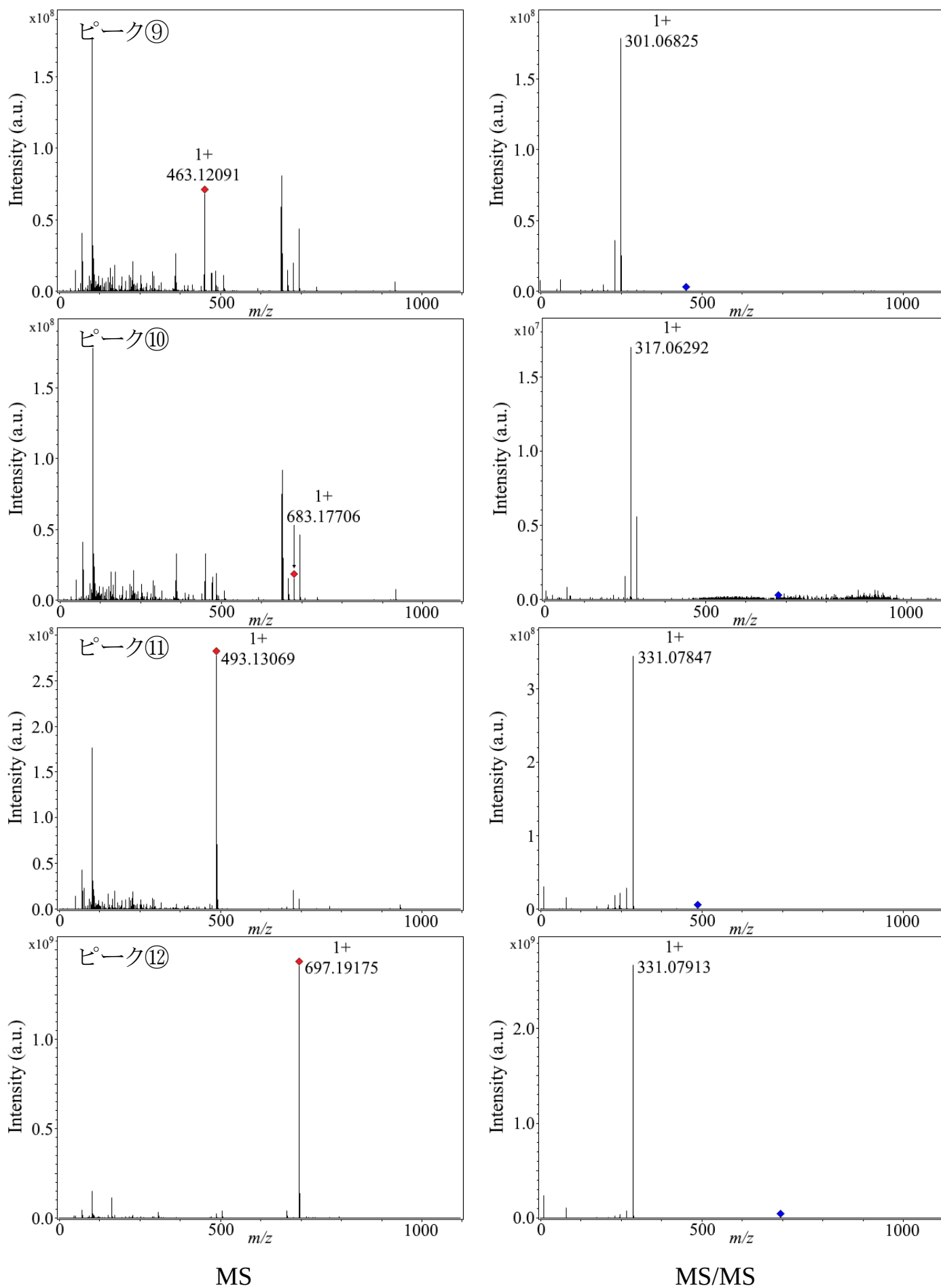


図13. ESI-FT ICR MSで得られたピーク⑨-⑫のマススペクトラム.

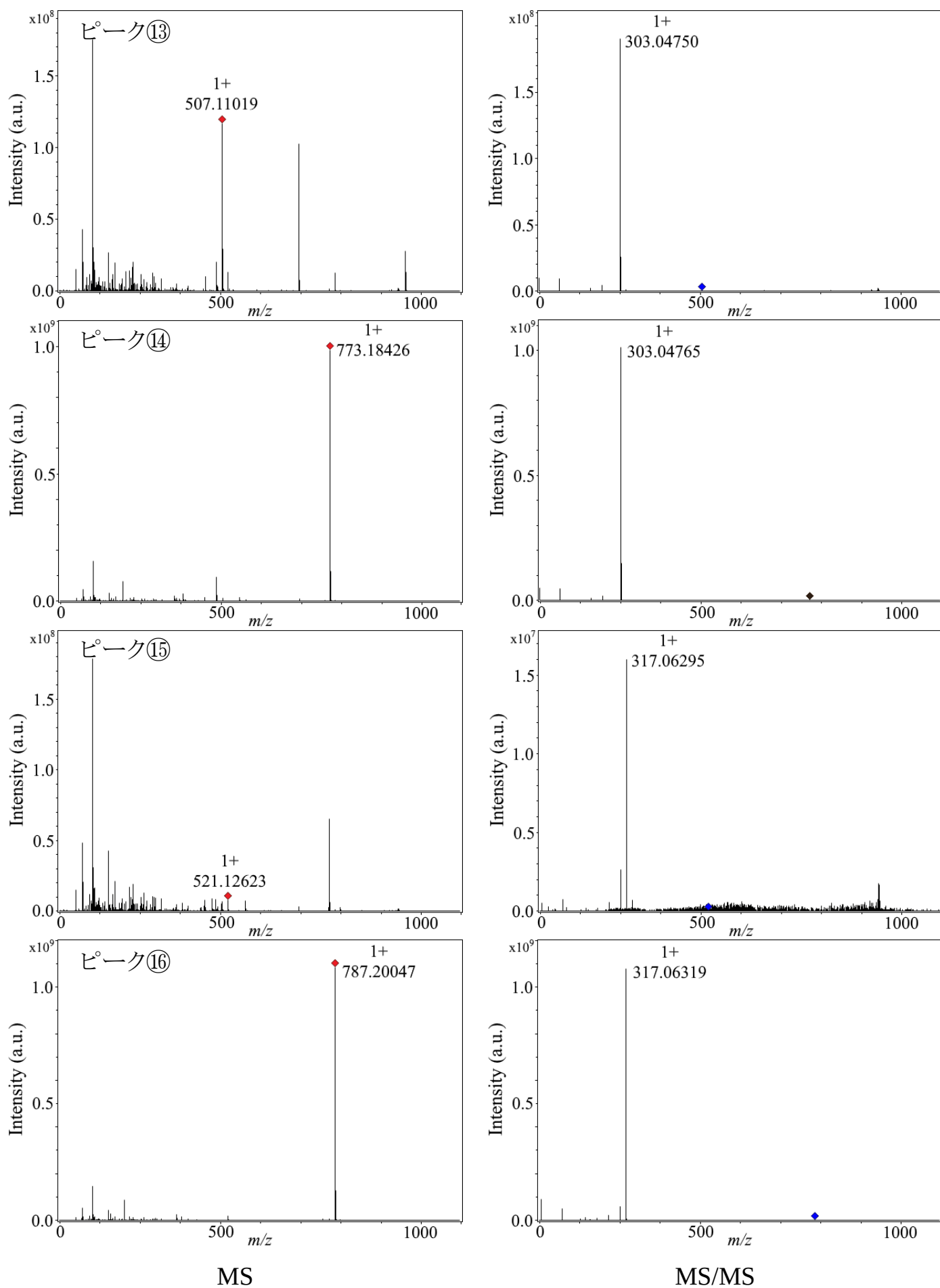
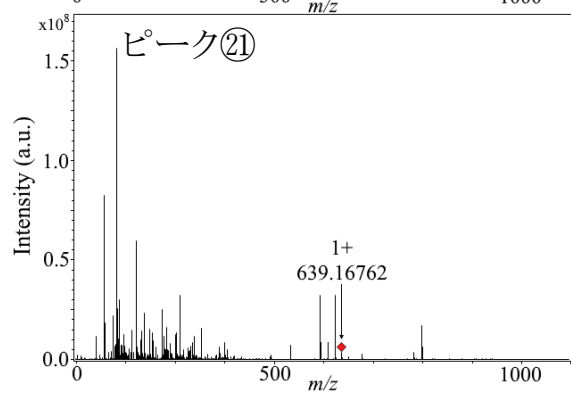
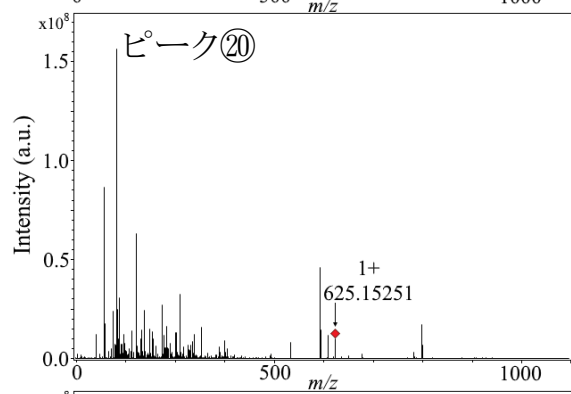
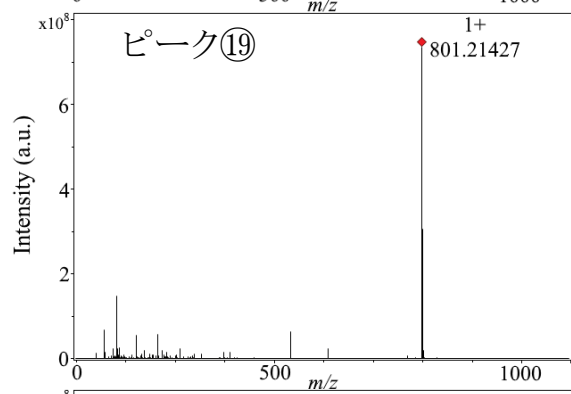
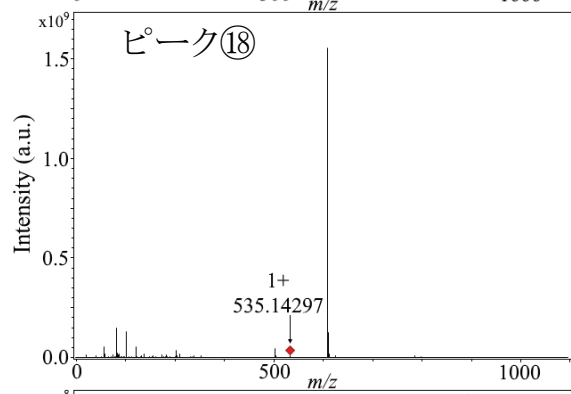
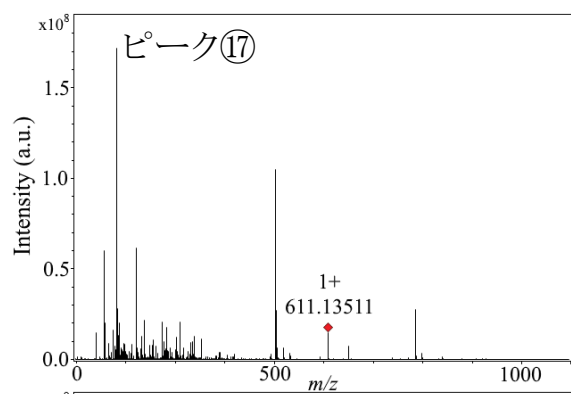
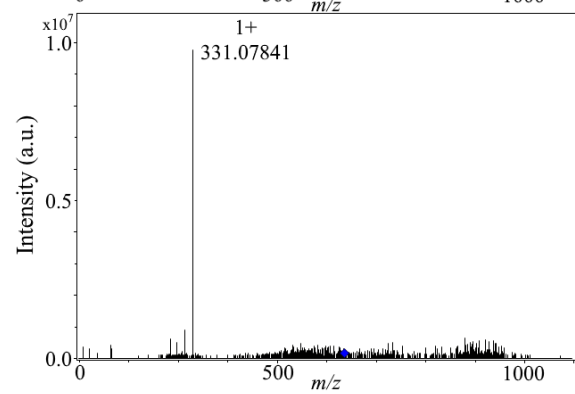
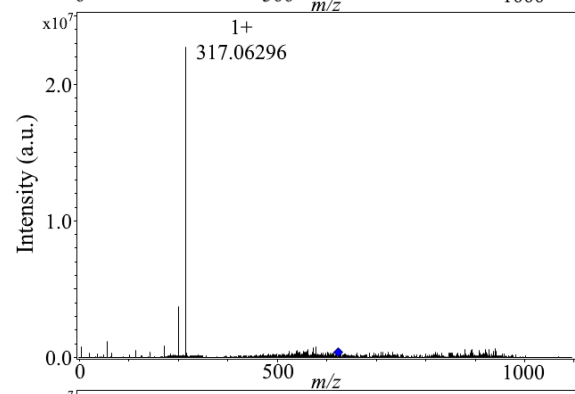
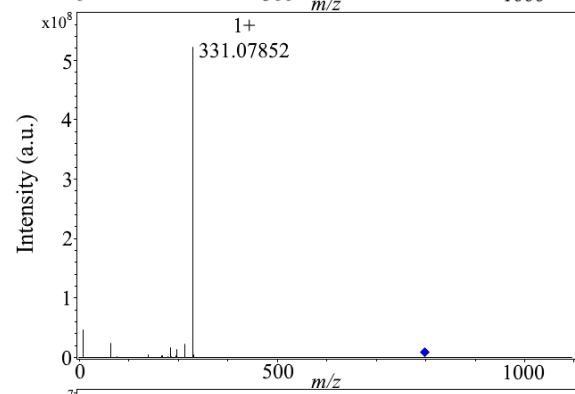
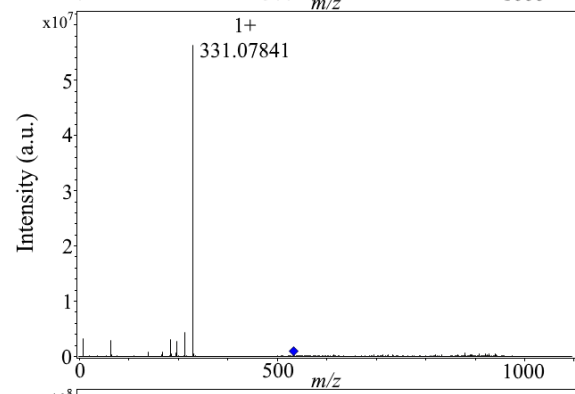
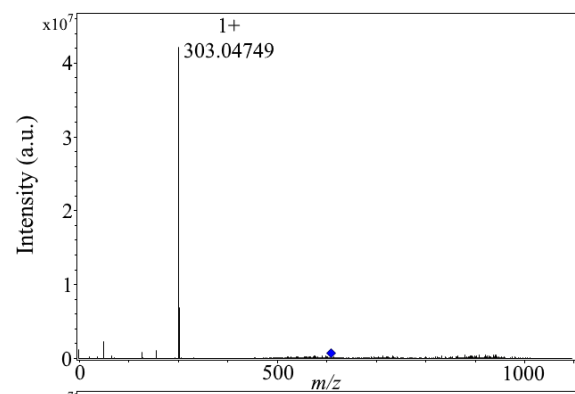


図14. ESI-FT ICR MSで得られたピーク⑬-⑯のマススペクトラム.



MS



MS/MS

図15. ESI-FT ICR MSで得られた画分①⑦-②⑪のマスペクトラム.

表1. ヤマブドウ果実に含まれると推定されたアントシアニン.

ピーク	ESI-FT ICR MS		アントシアニン
	MS	MS/MS	
①	627.15	303.05	Dp3G5G
②	611.16	287.05	Cy3G5G
③	465.10	303.05	Dp3G
④	641.17	317.06	Pt3G5G
⑤	625.17	301.07	Pn3G5G
⑥	449.11	287.05	Cy3G
⑦	655.18	331.08	Mv3G5G
⑧	479.12	317.06	Pt3G
⑨	463.12	301.07	Pn3G
⑩	683.18	317.06	Pt3AcG5G
⑪	493.13	331.08	Mv3G
⑫	697.19	331.08	Mv3AcG5G
⑬	507.11	303.05	Dp3AcG
⑭	773.18	303.05	Dp3CG5G
⑮	521.13	317.06	Pt3AcG
⑯	787.20	317.06	Pt3CG5G
⑰	535.14	331.08	Mv3AcG
⑱	611.14	303.05	Dp3CG
⑲	801.21	331.08	Mv3CG5G
⑳	625.15	317.06	Pt3CG
㉑	639.17	331.08	Mv3CG

Dp : Delphinidin, Cy : Cyanidin, Pt : Petunidin, Pn : Peonidin, Mv : malvidin,
 3G : 3-O-glucoside, 3G5G : 3,5-diglucoside ,
 Ac : Acetyl, C : coumaroyl

割合が小さいことから、ヤマブドウ果実における主要なアントシアニンではないものと考えられる。このため、質量分析法を用いてアントシアニンを定量する際に、これらの成分が結果に及ぼす影響は極めて小さいものと考えられる。また、ヤマブドウ果実の粗抽出物の MALDI-TOF MS において、各アントシアニンに由来するピークは、全てマトリックス (THAP) のフラグメントピークと重複しておらず (図 16)、アントシアニン分析に用いるマトリックスとして THAP の選択は妥当と考えられる。

第2節 ヤマブドウ果実の主要成分の年次間変動

第 1 節では、ヤマブドウ果実に含まれるアントシアニンの定性分析を行い、19 種のアントシアニンが含まれていることを明らかにした。本節では、これらのアントシアニンについて、第 1 章第 1 節で得られた検量線を用いて定量分析を試みるとともに、1 果実あたりの重さ (1 果重)、総糖含量、総遊離糖含量および総ポリフェノール含量も併せて測定し、これらの年次間変動および各形質間の相関について調査しようと考えた。

材料および方法

(1) 植物材料

材料は、本章第 1 節と同様である。

(2) 分析方法

1) 糖分析

抽出は、材料 20 mg に 80% エタノール 0.8 mL および内部標準物質として 20 mmol/L ラクトース溶液 0.4 mL を加え、70℃のウォーターバス中で 30 分間加熱後、遠心分離 (12,000×g, 10 min) して得た上清を、遠心エバポレーター (CVE-200E, 東京理科機械) を用いて約 200 μL に減圧濃縮したものを分析試料とした。

糖分析は HPLC を用いて、以下の条件で行った: カラム, NH2P50-4E (Shodex); カラム温度, 30℃; 溶離液, アセトニトリル: 水 = 75:25 (v/v); 流速, 0.7 mL/min; 試料注入量, 10 μL; 検出器, 示差屈折率計。測定では、最初にフルクトース、グルコースおよびスクロース標品の混合溶液 (各 0.03 mol/L) を分析し、サンプルの分析で出現したピークの保持時間 (Retention Time, RT) を標品のそれとの比較する方法により各遊離糖を定性した。さらに、

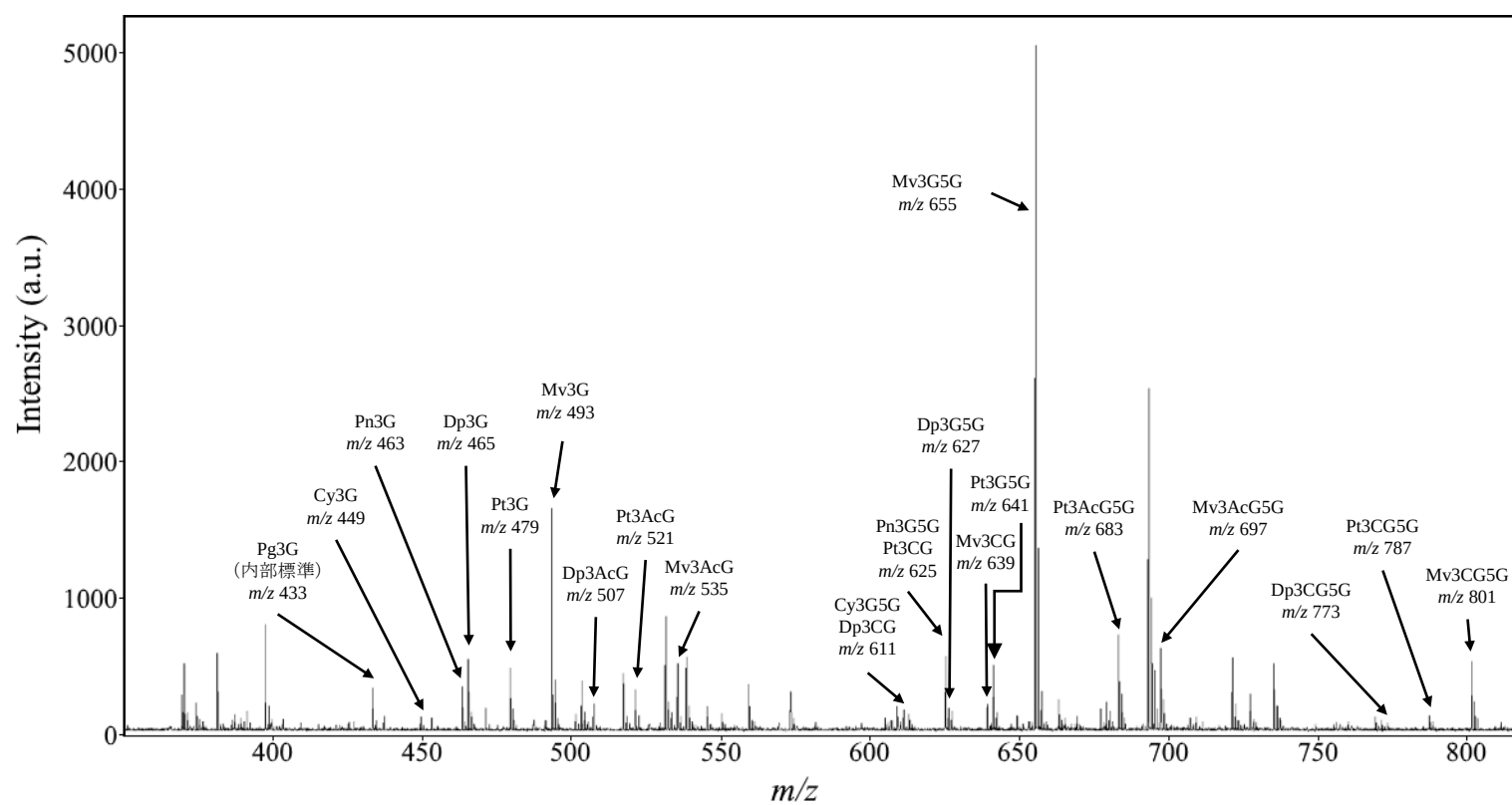


図16. MALDI-TOF MSで分析したヤマブドウ果実粗抽出物のマスペクトラムの一例.

内部標準物質として加えたラクトースのピーク面積に基づき、試料中の各遊離糖濃度を算出した。

2) 有機酸分析

抽出は、材料 10 mg に蒸留水 1 mL を加え 1 時間振とう抽出し、遠心分離 ($12,000 \times g$, 10 min) 後の上清を回収して分析試料とした。

有機酸分析は、GL science のアプリケーションノート(Data No. LA894-0894) に従い、HPLC を用いて以下の条件で行った: カラム, InertSustain C18 3 μ m (3.0 $\times$ 150 mm, ジーエルサイエンス); カラム温度, 40 $^{\circ}$ C; 溶離液, 10 mmol/L リン酸二水素アンモニウム (pH2.6); 流速, 0.5 mL/min; 試料注入量, 10 μ L; 検出器, ダイオードアレイ検出器; 検出波長, 210 nm. 測定は、最初に酒石酸およびリンゴ酸の標準溶液 (0, 0.25, 0.5 および 1.0 mg/mL) を分析し、次いでサンプルを分析した際の標品の RT との比較から各有機酸を同定し、さらに標準溶液のピーク面積に基づく外部標準法により定量を行った。

3) 総アントシアニン含量

抽出は、材料 100 mg にメタノール: 水: ギ酸 = 88:10:2 (v/v) の混合溶液 500 μ L および内部標準物質として 1 mg/L Pelargonidin-3-glucoside 10 μ L を加え、室温下で 30 分振とう抽出し、遠心分離後 ($12,000 \times g$, 10 min) の上清を回収した。これを 3 回繰り返し、抽出液 1,500 μ L を得た。抽出液は遠心エバポレーターを用いて約 50 μ L に減圧濃縮しこれを分析試料とした。

各種アントシアニンの測定は、第 1 章第 1 節と同様である。得られた Pg3G と各アントシアニンの濃度比から、第 1 章第 1 節で得られた検量線に基づいて算出した。この場合、Cy3G5G, Pn3G5G および Mv3G5G についてはそれぞれの検量線を、mono-glucoside およびその他のアントシアニンは Pg3G と Cy3G の検量線を用いた。

4) 総ポリフェノール含量の測定 (フォーリンデニス法)

抽出は、材料 5 mg に 80%MeOH 1 mL を加え 3 時間振とう抽出し、遠心分離 ($12,000 \times g$, 10 min) 後の上清を回収して分析試料とした。

分析には次の試薬を用いた。50% フォーリンデニス試薬は、タングステン酸ナトリウム 2.5 g, リンモリブデン酸 0.5 g, リン酸 1.25 mL および蒸留水 20 mL をナス型フラスコに

入れ、ウォーターバスで 90℃に加熱しながら 2 時間還流煮沸し、加熱後室温に戻るまで静置後、蒸留水で 50 mL に定容して作製した。この他に 5%炭酸ナトリウム水溶液、200 ppm クエルセチン溶液および 30%メタノールを適宜作製し使用した。

96 穴マイクロプレートに、希釈クエルセチン溶液 150 μ L もしくは抽出試料 30 μ L を分注した後、抽出試料のウェルにのみ 30%メタノール 120 μ L を加えた。次に、全てのウェルに 50%フォーリンデニス試薬 75 μ L を加え、攪拌した。1 分間静置後、5%炭酸ナトリウム水溶液 75 μ L を加え攪拌し、直ちに室温・暗黒下に静置した。60 分後、マイクロプレートリーダー (Synergy HT microplate reader, BioTek) を用いて 700 nm における吸光度を測定した。分析試料の総ポリフェノール含量は得られた検量線を基にクエルセチン当量として求めた。測定反復は同一プレート上の 2 ウェルで測定した値の平均をそのプレートの測定値とし、1 サンプルあたり 3 プレートで測定した ($n = 3$)。

結果および考察

HPLC を用いた糖分析では、内部標準のラクトース (RT 17.96 min) を含め 4 つのピークが検出され、それぞれ標品と RT を比較した結果、フルクトース (RT 9.50 min)、グルコース (RT 11.84 min) およびスクロース (RT 15.66 min) 由来のピークであった (図 17)。これらの組成比は、フルクトースが約 51%、グルコースが約 43%、スクロースが約 5%であり、2 か年を通じて組成比にほぼ違いはみられなかった。

同じく HPLC を用いた有機酸分析では、酒石酸 (RT 1.95 min) およびリンゴ酸 (RT 2.49 min) の 2 つのピークが検出され、これらの組成比は酒石酸が約 54%、リンゴ酸が 46%であり、2 か年を通じて組成比にほぼ違いはみられなかった (図 18)。

図 19 に1果重および各成分の定量値の分布を示した。1果重、総糖含量および総有機酸含量は 2 か年で有意な差は認められなかったのに対し、総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量は 2014 年の方が有意 ($P < 0.01$) に高い値を示した。また、1 果重、総糖含量および有機酸含量は年次間に有意な ($P < 0.001$) 正の相関が認められたのに対し、総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量ではそのような関連は見出せなかった (図 20)。これらの結果より、1 果重、総糖含量および総有機酸含量は年次間変動が小さく、個体ごとの差も小さい形質であるのに対し、総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量は年次間変動が大きい形質であると考えられる。

調査した 2 か年における総糖含量と総有機酸含量の相関を図 21 に示した。年次を問わず、総糖含量と総有機酸含量には強い負の相関が認められた。しかし、他の形質間に何らかの関連性を見

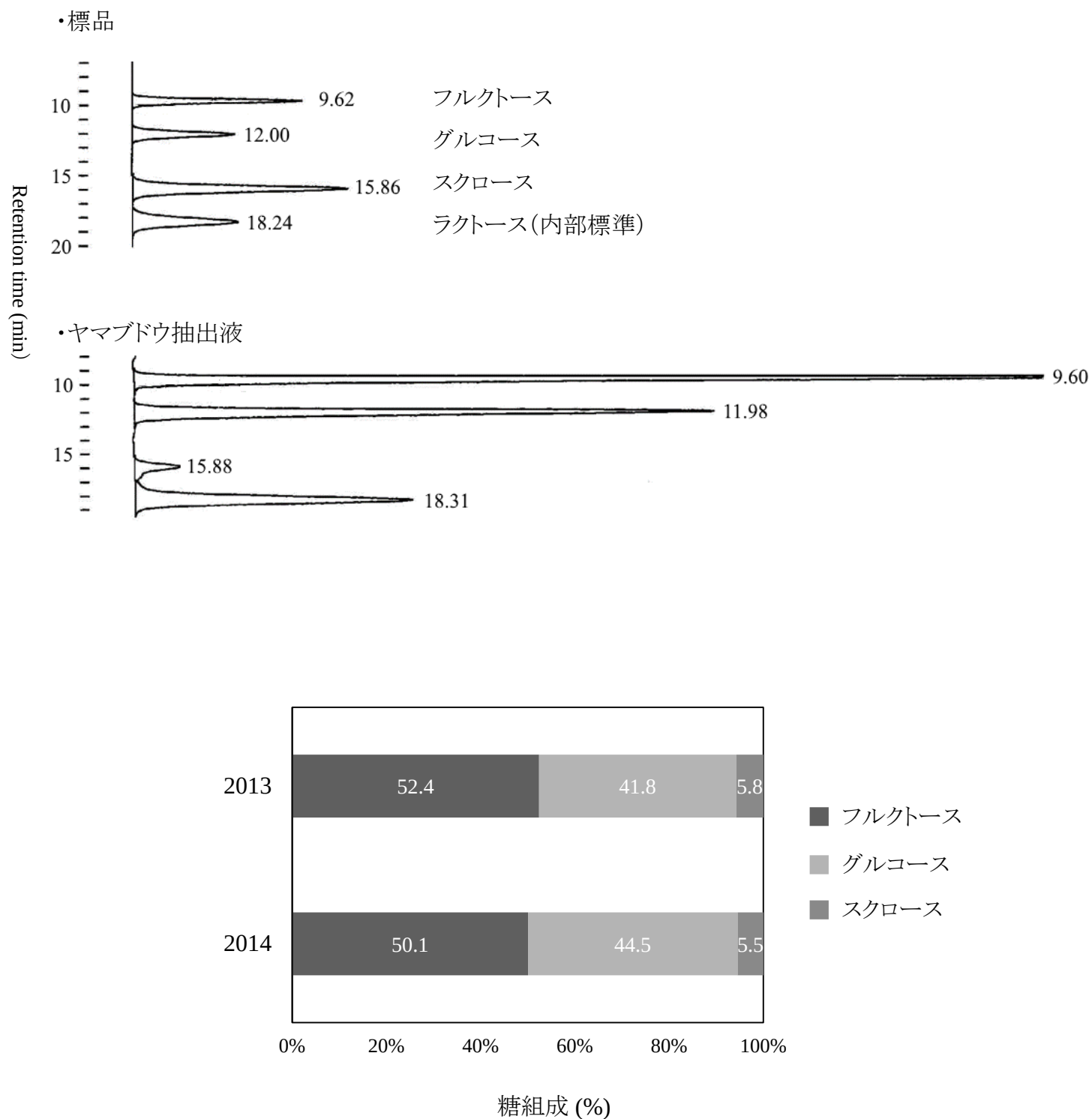


図17. HPLC分析で得られた可溶性炭水化物のクロマトグラム(上)と2か年の可溶性炭水化物組成(下).

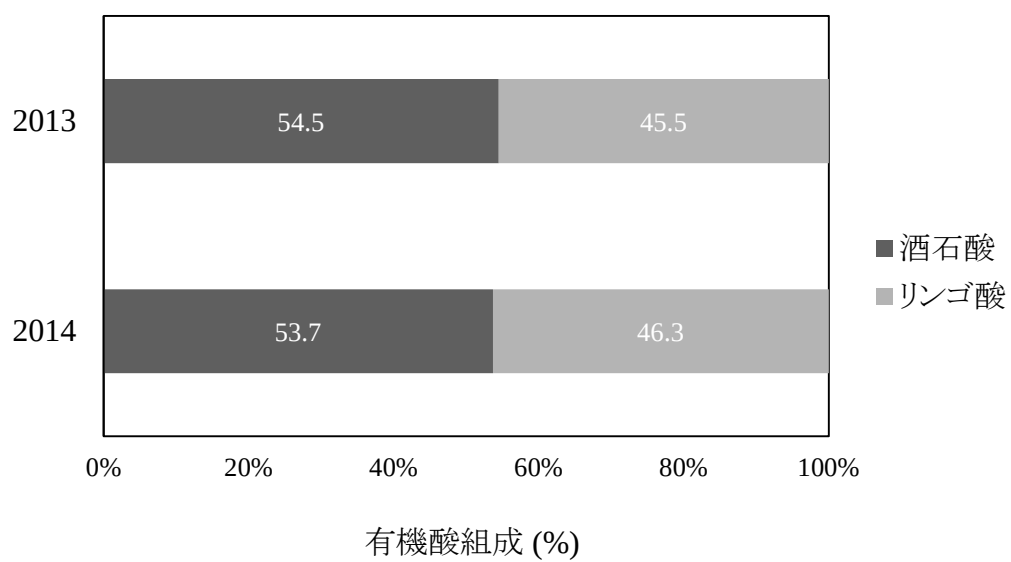
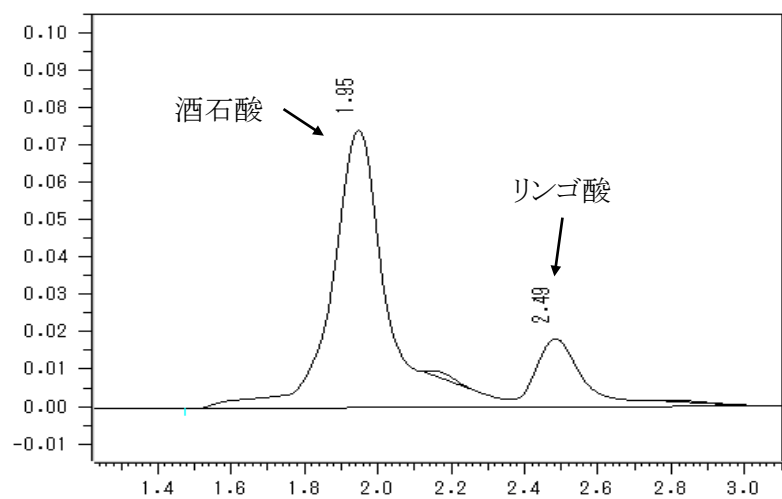


図18. HPLC分析で得られた有機酸のクロマトグラム(上)と2か年の有機酸組成(下).

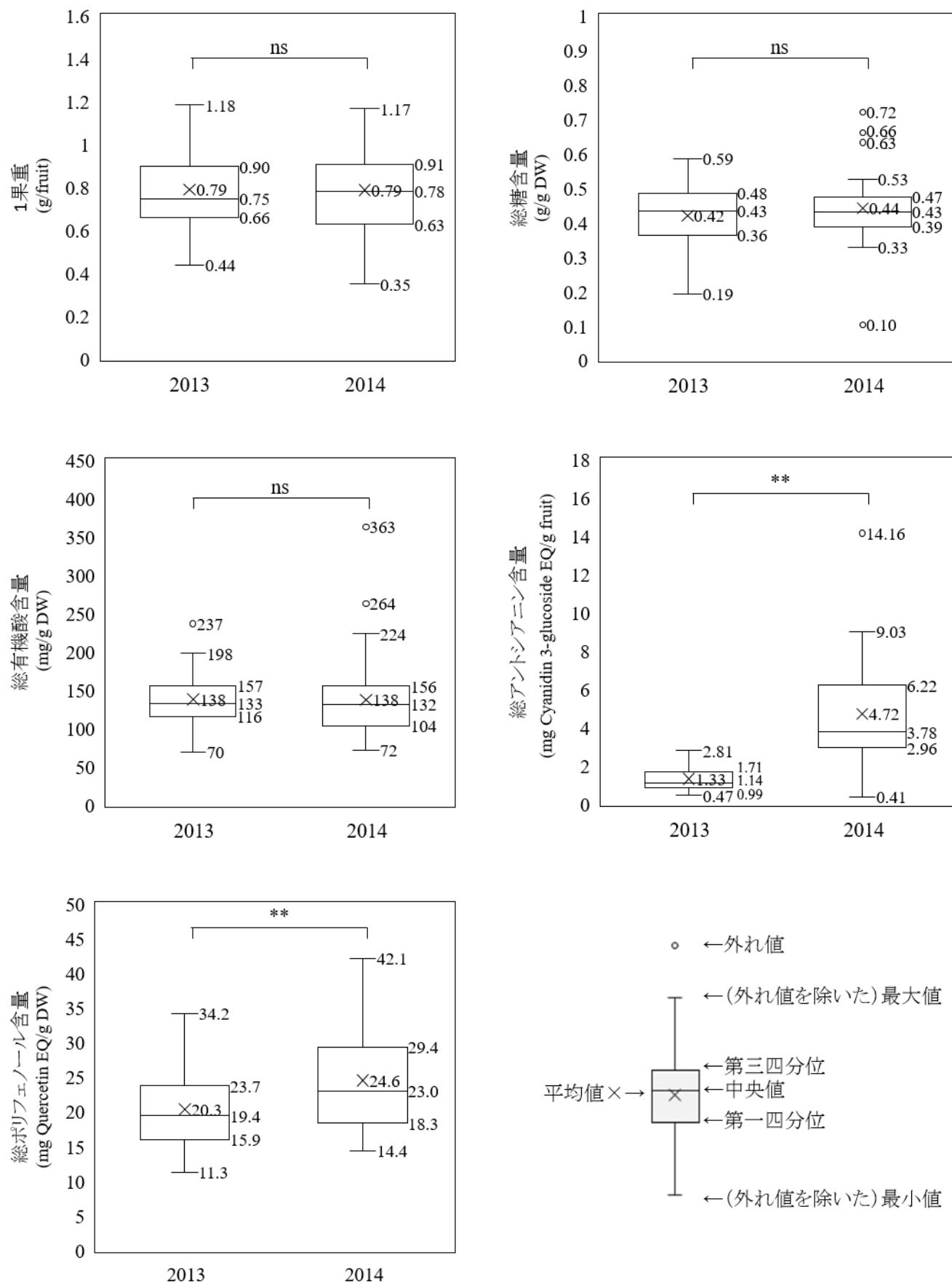


図19. ヤマブドウ果実の1果重および各成分含量の分布.

** $P < 0.01$, ^{ns} P not significant

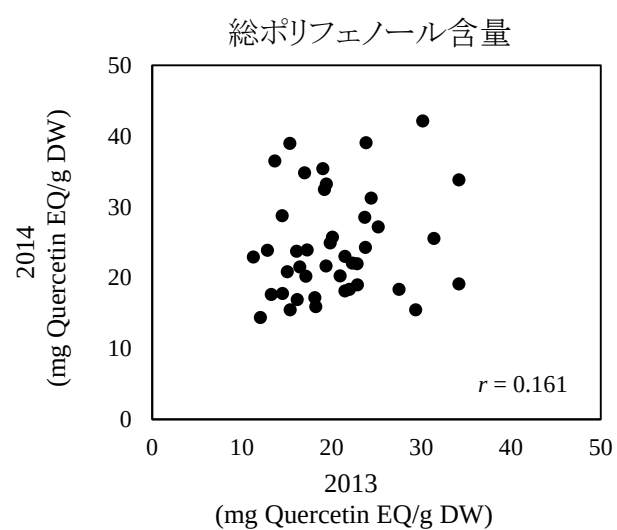
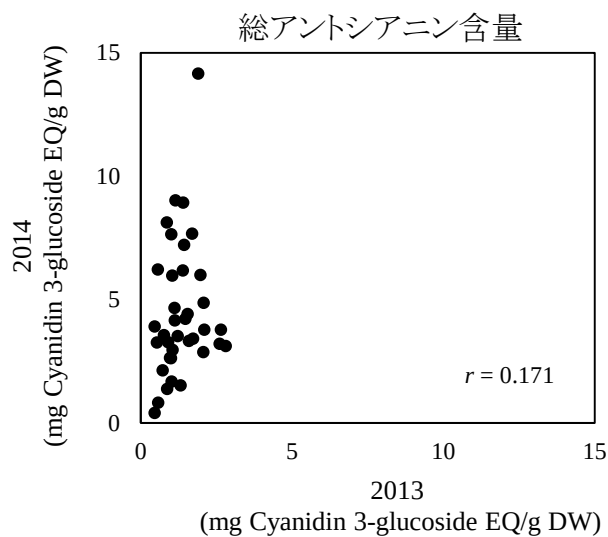
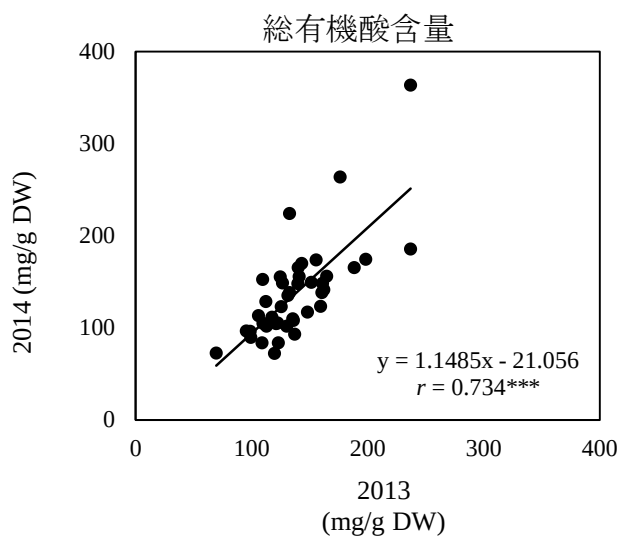
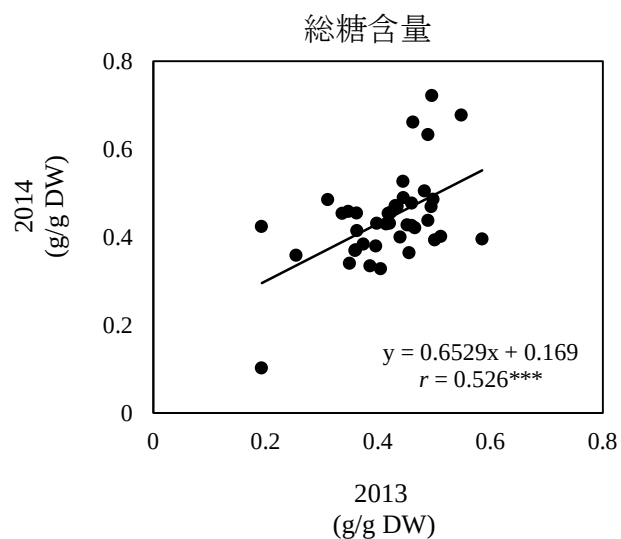
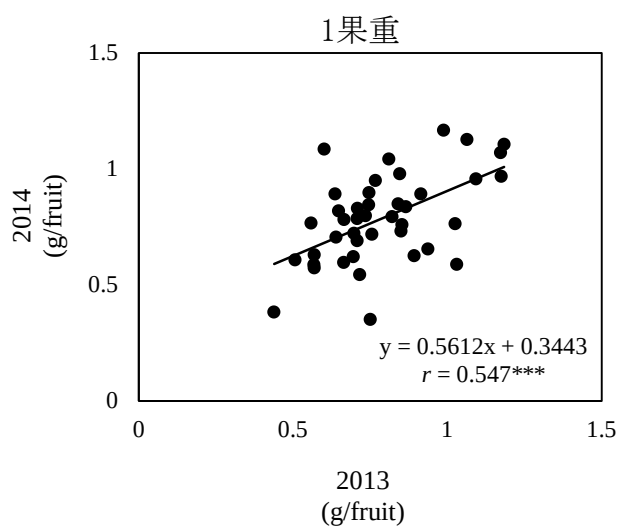
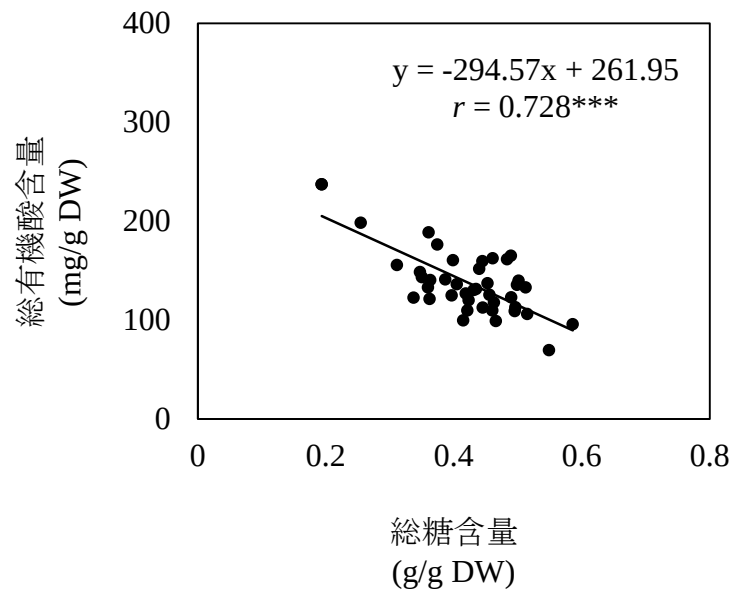


図20. 1果重および各成分含量の年次間の相関.
*** $P < 0.001$

2013年



2014年

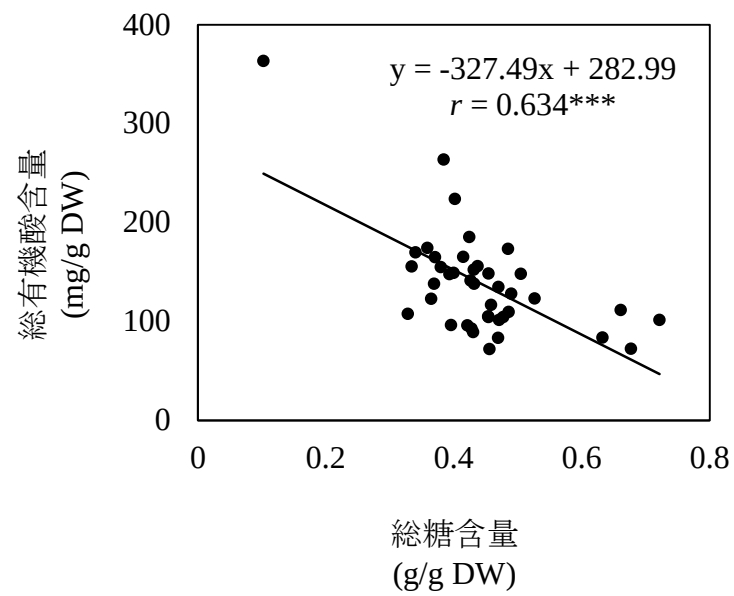


図21. 総糖含量と総有機酸含量の相関.
*** $P < 0.001$

出すことはできなかった。

第3節 ヤマブドウ果実の主要成分の地理的分布と気象との関連

第2節で得られた各形質に関し、地理的分布との関連を明らかにするため、カラーチャートでマッピングを行った。さらに、各形質に及ぼす気象条件の影響についても解析した。

材料および方法

材料および各形質の測定方法については、本章第1節および第2節と同様である。各形質の地理的分布はR softwareを用いて、カラーチャートで表記した。また、採取地点から最も近くにある気象観測所で観測された各月の気温、降水量および日射量と各形質との関連を調査した。

結果および考察

各形質における地理的分布の差異を図22-26に示した。1果重は、道南地域の個体が他の地域に比べ高い傾向を示した。総糖含量は、札幌および小樽周辺の個体で値が高く、2014年においてその傾向が顕著であった。総有機酸含量は、道北地域の個体で値が高い傾向が認められた。総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量には、地理的分布と関連する一定の傾向は認められなかったが、両年を通して高い値を示す個体が確認された。

気象条件と各形質との相関を調べた結果、ブドウ果実の成熟開始(ベレーゾン)期から完熟期に相当する8-10月の積算気温と1果重および総糖含量の間に有意($P < 0.05$)な正の相関が認められた(図27-28)。一方、4-10月の積算気温との間には相関は認められなかった。これらの結果より、1果重と糖含量に見られた地理的分布の傾向は、成熟期における積算気温の差に起因するものと考えられる。また、有意な相関は認められなかったものの、道北地域で有機酸含量が高い傾向にあったことも、この地域の気温が他地域に比べて低く推移したことが影響したものと推測される。アントシアニン生合成は温度の影響を受けることが知られているが(Azuma *et al.*, 2012)、本研究ではこの点を明らかにすることはできなかった。その原因として、温度以外にも、個体ごとの細かい生育環境の違い、および日照と温度の相互作用など、複合的な要因が作用したことが予想される。

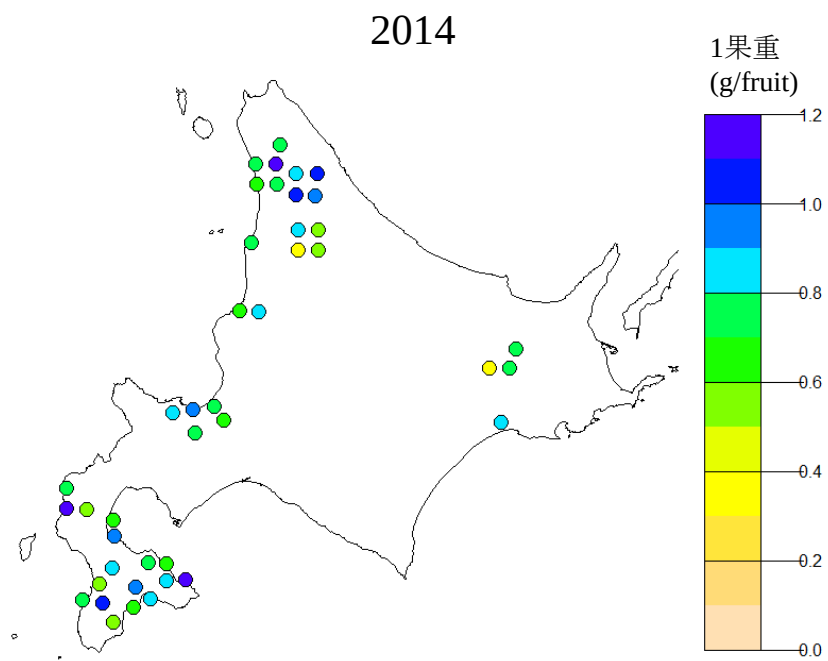
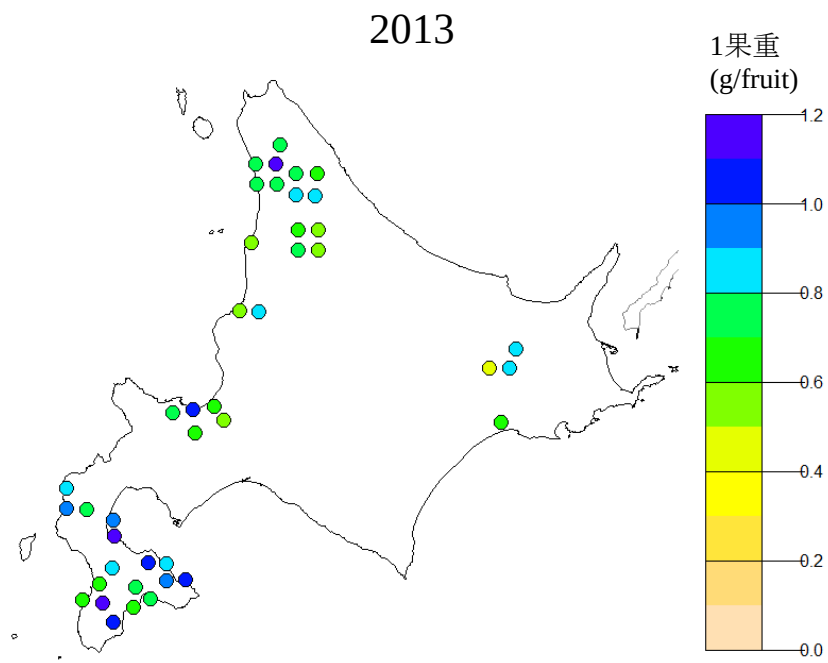


図22. 採取地ごとの1果重の分布.

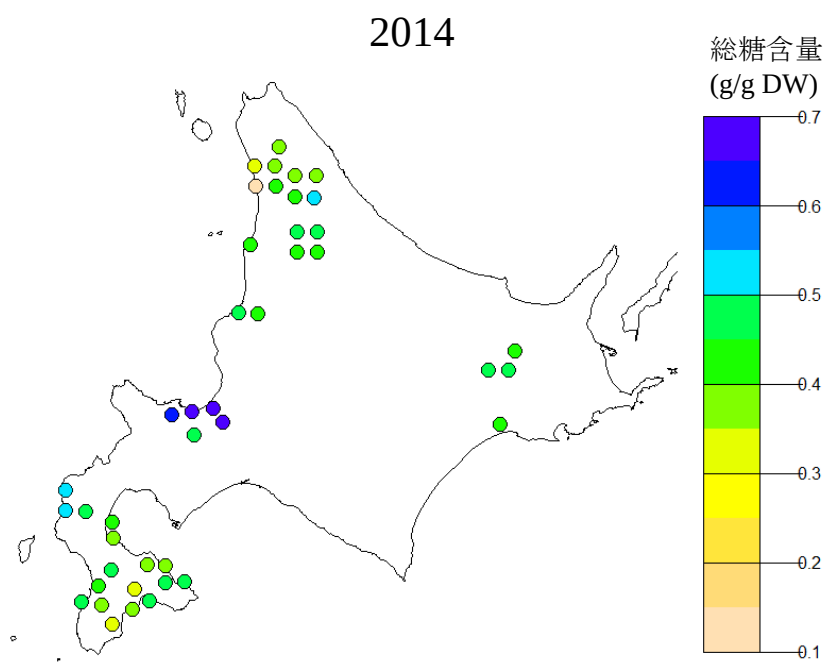
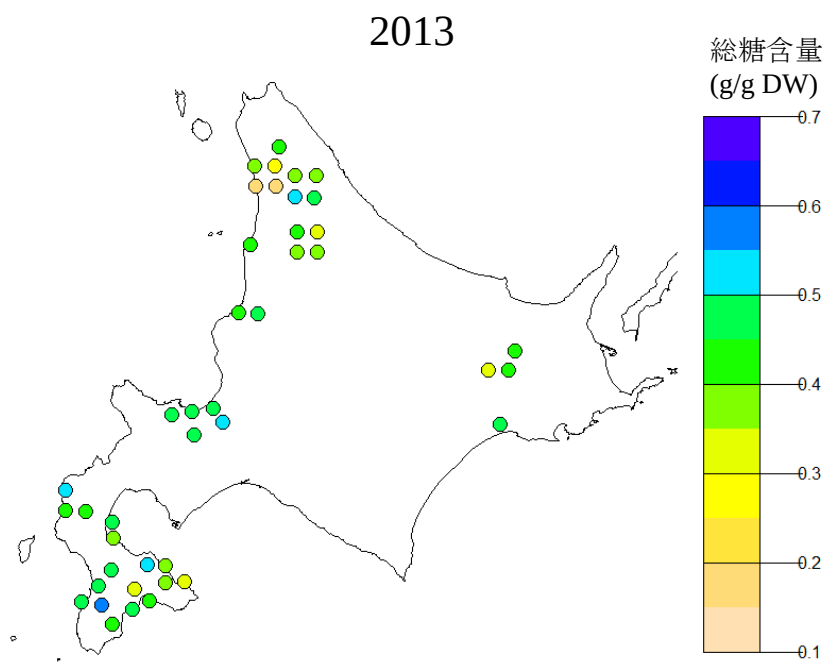


図23. 採取地ごとの総糖含量の分布.

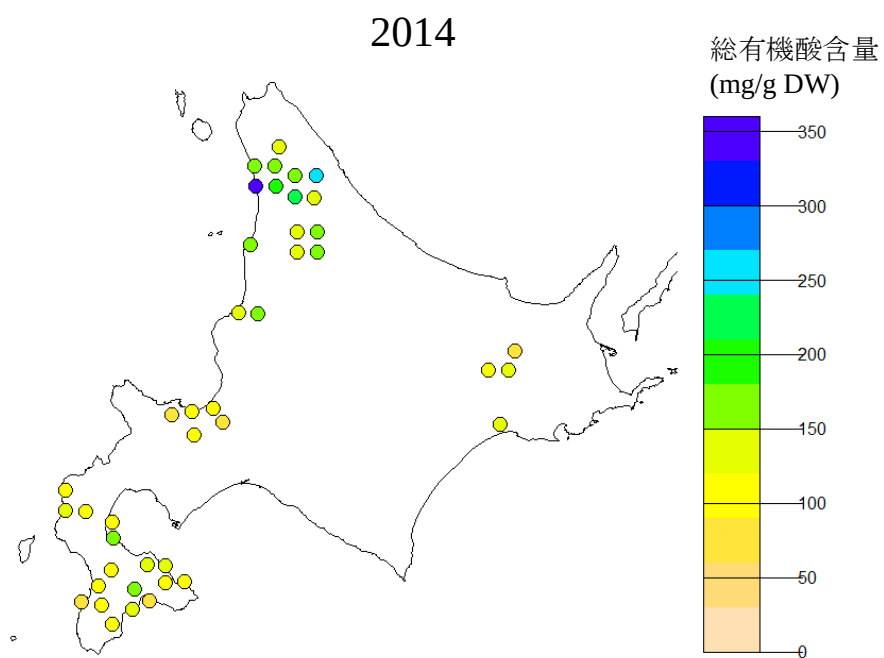
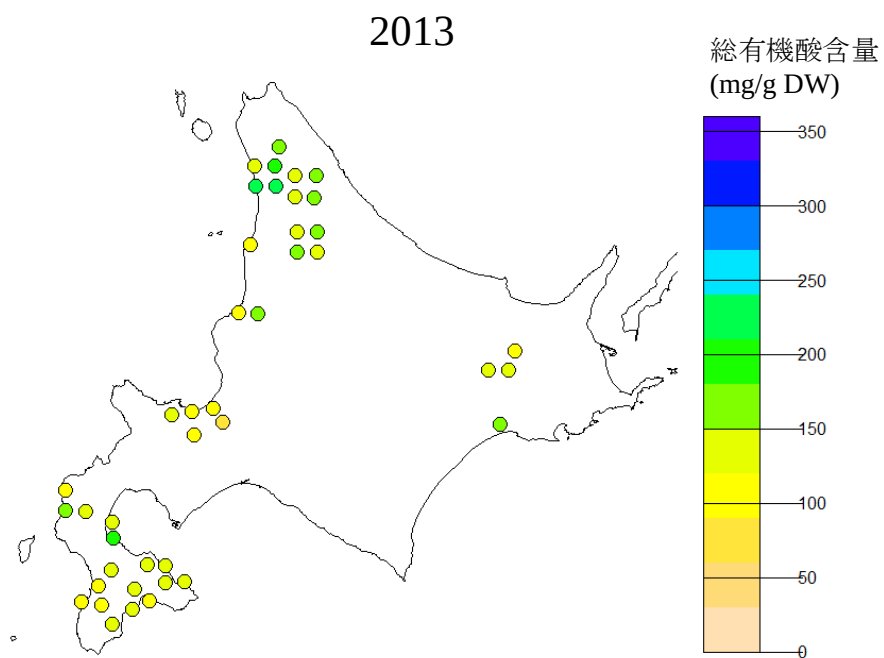


図24. 採取地ごとの総有機酸含量の分布.

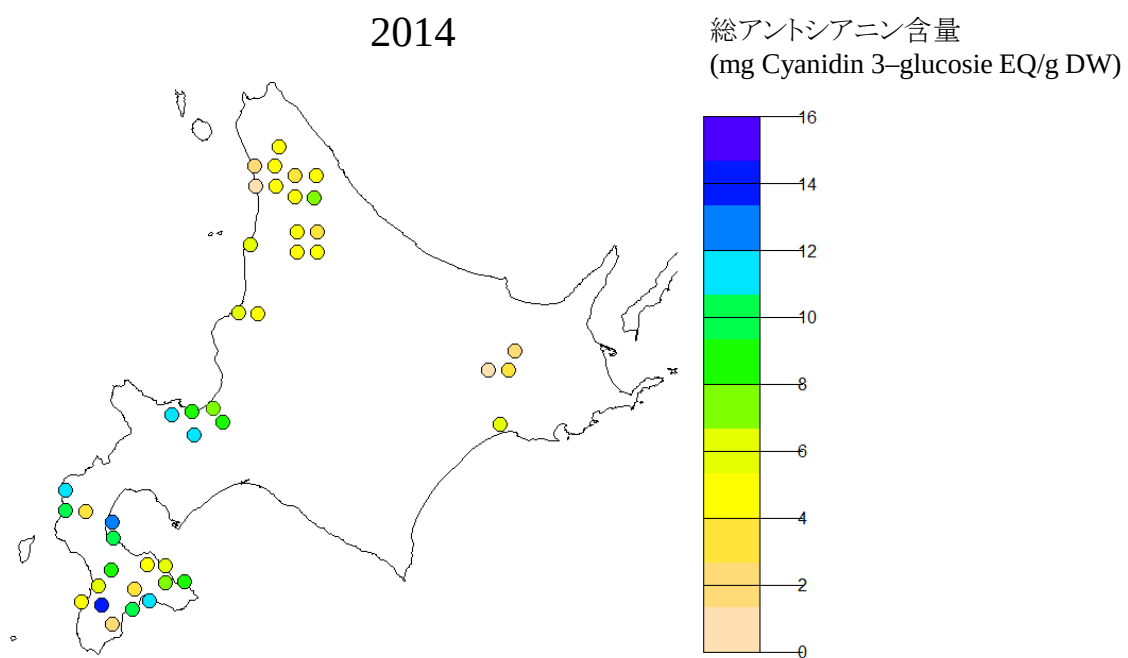
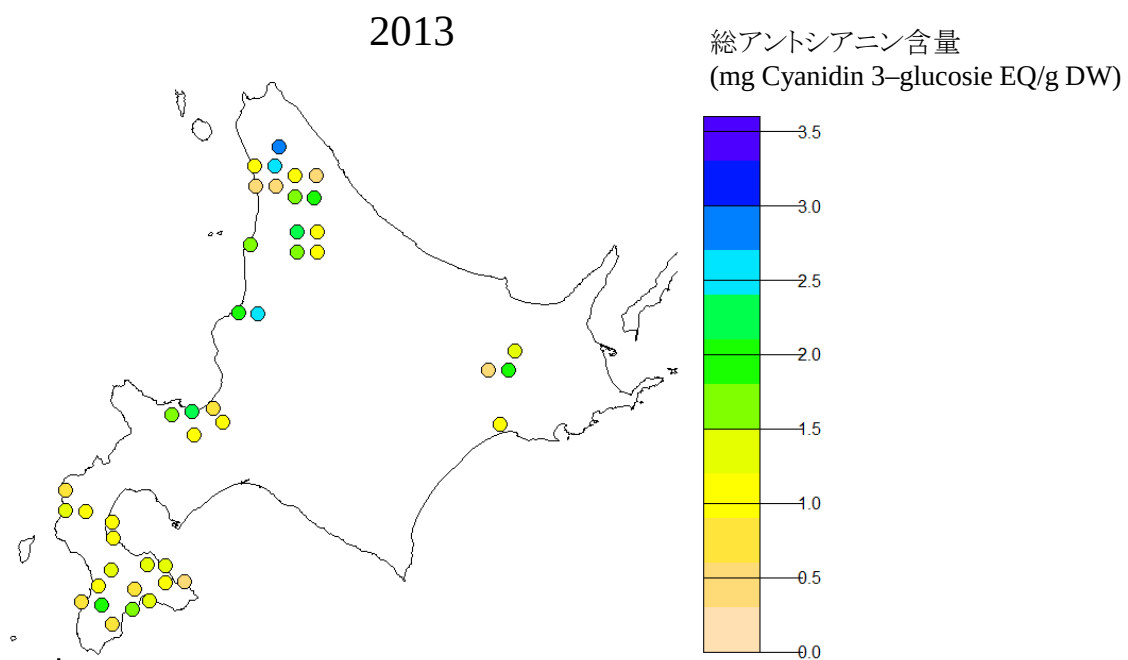


図25. 採取地ごとの総アントシアニン含量の分布.

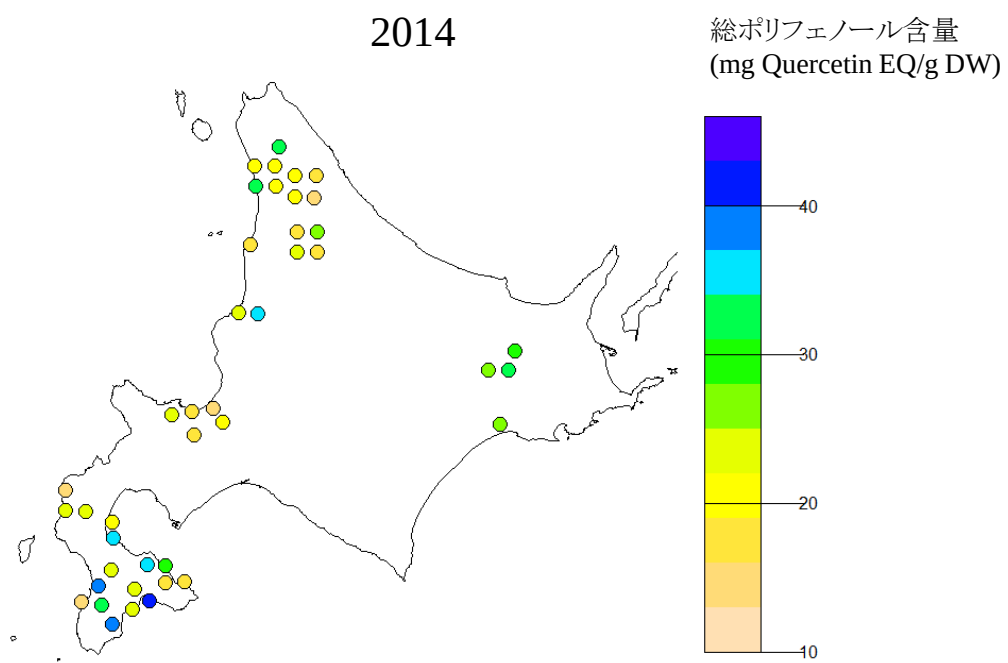
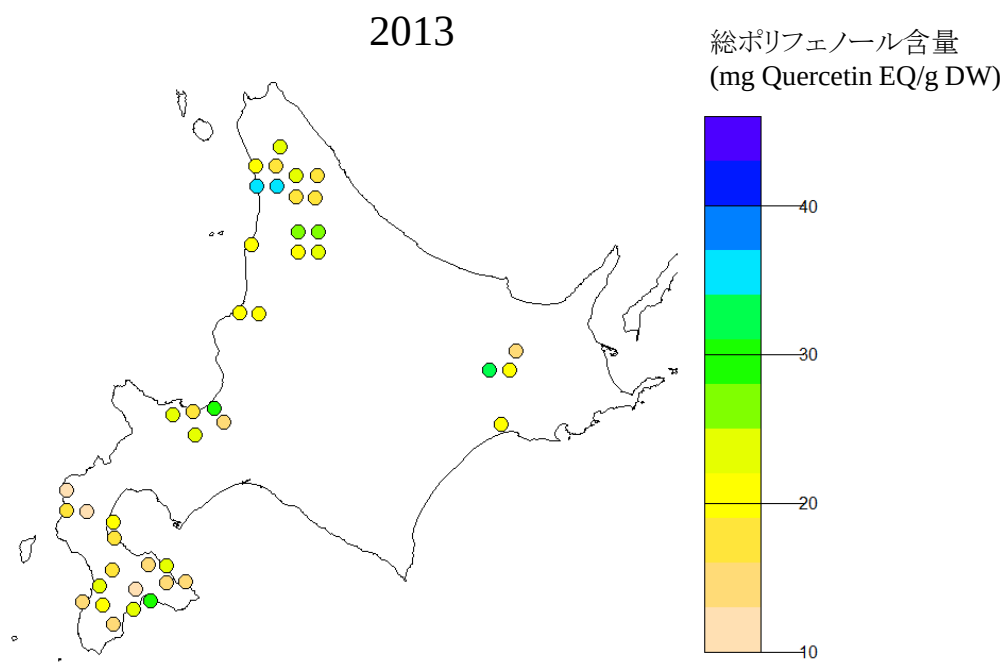


図26. 採取地ごとの総ポリフェノール含量の分布.

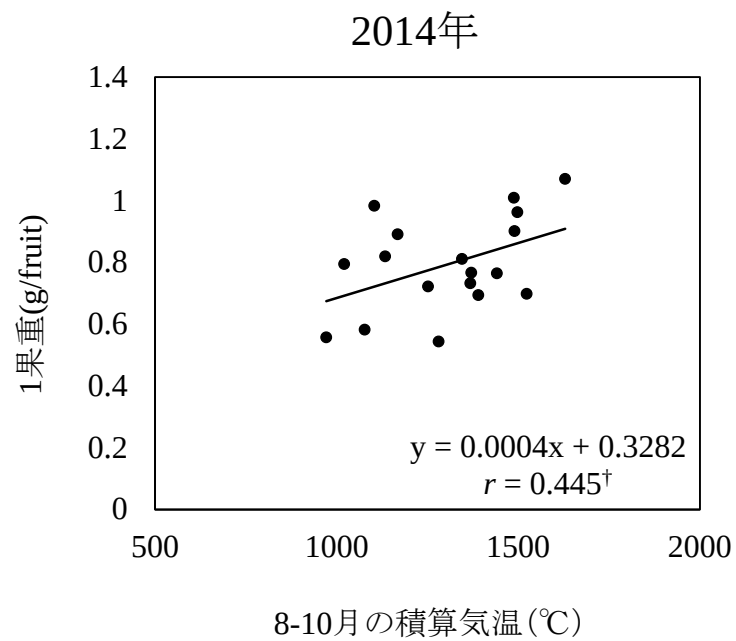
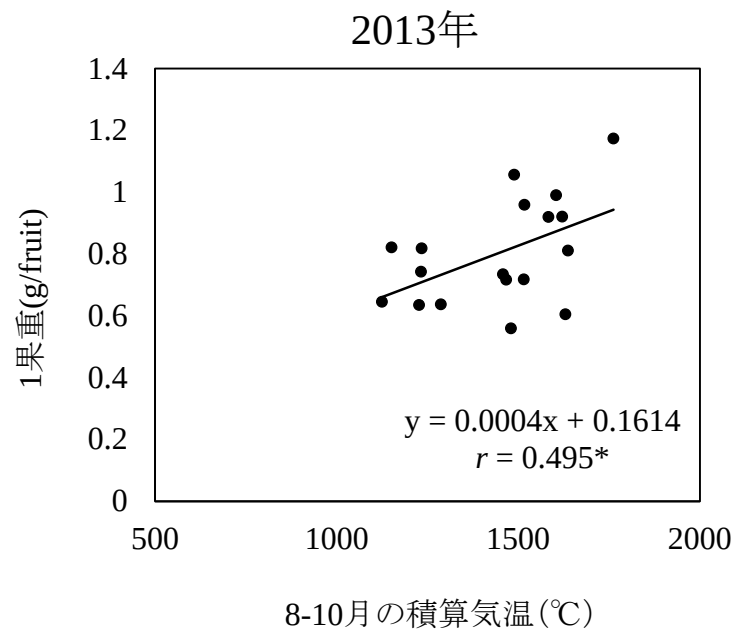


図27. 8-10月の積算気温と1果重の相関.
 $^*P < 0.05$, $^\dagger P < 0.1$

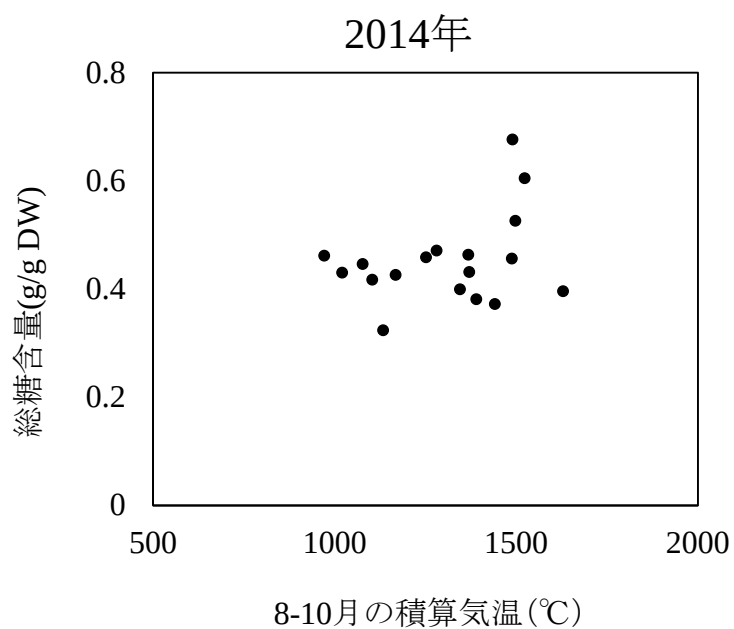
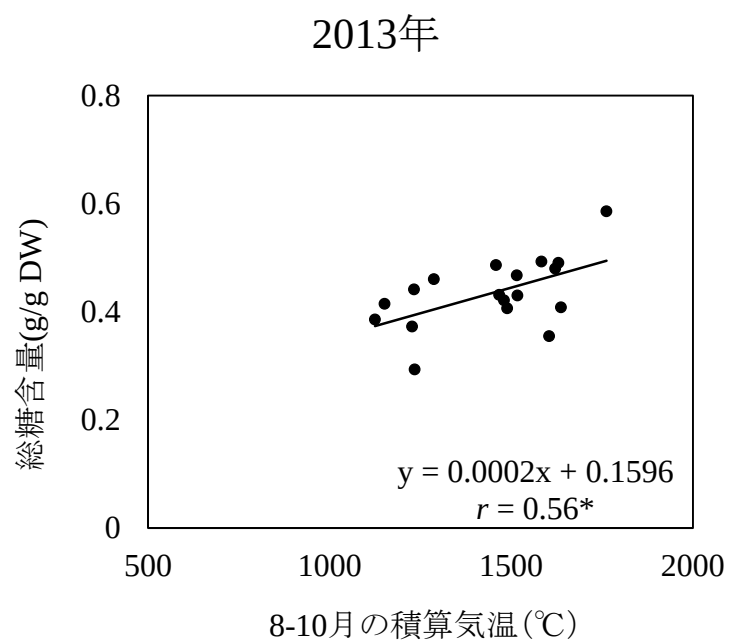


図28. 8-10月の積算気温と総糖含量の相関.
* $P < 0.05$

第4節 4 種のラジカルに対するヤマブドウ果実の抗酸化能と、アントシアニンおよびポリフェノール含量との関連

ヤマブドウ果実は、アントシアニンを始めとして各種のポリフェノール化合物を豊富に含むことから、高い抗酸化活性を持つことが予想される。本節では、ヤマブドウ果実の抗酸化性を表す指標として 4 種類のラジカルに対する捕捉活性を測定し、同じ北方系小果樹であるハスカップのそれと比較した。また、第 2 節で定量したアントシアニンおよびポリフェノール含量との関連についても調査した。

材料および方法

(1) 植物材料

DPPH ラジカル, ROO ラジカルおよび OH ラジカル捕捉活性値については、2013 年 10 月に採取したヤマブドウのうち、野生株 59 点および栽培品種 5 点を分析対象とした。なお、 $O_2^{\cdot -}$ ラジカル捕捉活性値については野生株 28 点および栽培品種 2 点を分析した。

(2) 抗酸化性評価方法

1) DPPH ラジカル捕捉活性 (DPPH 法)

抽出は、果実粉末 5 mg に 80%EtOH 1 mL を加え、室温下で 3 時間振とう抽出し、遠心分離 ($12,000 \times g$, 10 min) 後の上清を回収して分析試料とした。分析は Suda *et al.* (2008) に従い、96 穴マイクロプレートに分析試料あるいは Trolox 標準溶液 (0, 2, 4, 8, および 16 $\mu\text{mol/mL}$) 50 μL を分注した後、200 mM 2-Morpholinoethanesulfonic acid mono-hydrate (MES) buffer (pH6.0, 和光), 400 μM DPPH in 100% EtOH および 20%EtOH を等量混和した反応液 150 μL を分注し、室温・暗黒条件下で 20 分静置した後、マイクロプレートリーダー (Synergy HT microplate reader, BioTek) を用いて 520 nm における吸光度を測定した。分析試料の DPPH ラジカル捕捉活性は Trolox 標準溶液を用いて作成した検量線を基に Trolox 当量として求めた。測定反復は、同一プレート上の 2 ウェルで測定した値の平均をそのプレートの測定値とし、1 サンプルあたり 3 プレートで測定した ($n = 3$)。

2) ROO ラジカル捕捉活性 (ORAC 法)

抽出は、果実粉末 5 mg に WMA 溶液 (MeOH : Water : Acetic acid = 90 : 9.5 : 0.5, v/v/v) 1 mL を加え、室温下で 3 時間振とう抽出し、遠心分離 ($12,000 \times g$, 10 min) 後の上清を回収して分析試料とした。分析は Watanabe *et al.* (2012) の方法に従い、96 穴マイクロプレートの各ウェルに分析試料、ブランクとして MWA 35 μ L あるいは Trolox 標準溶液 (6, 12, 24, および 48 μ mol/L) を分注後、110.7 mmol/L フルオレセイン溶液 (Sigma-Aldrich) 115 μ L および 31.7 mmol/L 2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) dihydrochloride (AAPH, 和光) 50 μ L を分注した。プレートをフィルム (NJ500, タカラバイオ) で覆い、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した (励起波長, 485 nm; 検出波, 530 nm; 庫内温度, 37°C; 測定間隔および時間, 2 分間隔で 90 分間)。測定により得られたグラフに基づき、サンプルの曲線下面積 (AUC : area under the curve) からブランクの AUC を減じた値を実測値とし、Trolox の標準溶液から作成した検量線を用いて H-ORAC 値 (ROO ラジカル捕捉活性値) を Trolox 当量として算出した。測定反復は DPPH 法と同様である。

3) O₂⁻ラジカル捕捉活性 (ESR スピントラップ法)

抽出は ORAC 法と同様である。分析は, Ukai *et al.* (2013) の方法に従って行った。試料またはブランク (超純水) 50 μ L に, 200 μ M Riboflavin 20 μ L, EDTA-2Na 20 μ L, 10mM 2-(5,5-Dimethyl-2-oxo-2 λ 5-[1,3,2]-dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide (CYPMPO) 100 μ L, グリシン 20 μ L および 100 mM リン酸バッファー (pH7.4) 50 μ L を加えて混合し, フラットセル (ラジカルリサーチ (株)) で吸い上げ, ESR キャビティー内にセットした。次に, セル内の溶液に 40 秒間 UV 照射 (ランプ : LC8 (浜松ホトニクス), 光源 : 200W Hg-Xe アーク灯) し, 直ちに ESR でアダクト信号を測定した。ブランクの ESR 信号 (I_0) と分析試料の ESR 強度 (I) から減少率 ($[I_0/I]-1$) を算出した。ESR 分光器は X バンド (9.8 GHz) の EMX-plus (JES-RE1X, JEOL) を用い, 測定条件は以下のとおりである : 中心磁場, 3,521 G ; 測定磁場範囲, 150 G ; 磁場変調幅, 1 G ; マイクロ波強度, 6 mW。また, あらかじめ用意した α -Lipoic acid の標準溶液 (0.1, 0.3, 0.5 および 0.8 mM) を同様に分析し, 得られた検量線に基づき O₂⁻ラジカル捕捉活性値を α -Lipoic acid 当量

として算出した．測定反復は各試料 6 回とし，最小値および最大値を除いた平均値を測定値とした．

4) OH ラジカル捕捉活性 (ESR スピントラップ法)

抽出は ORAC 法と同様である．分析は，Kameya & Ukai (2012) の方法に従い行った．試料またはブランク（超純水）50 μL に，1% H_2O_2 50 μL ，DTPA 30 μL ，10 mM CYPMPO 15 μL および 100 mM リン酸バッファー(pH7.4) 50 μL を加え混合し，フラットセルで吸い上げ，ESR キャビティ内にセットした．次に，セル内の溶液に 5 秒間 UV 照射し，直ちに ESR でアダクト信号を測定した．減少率の算出および ESR 分光器の測定条件については 4)と同様である．また，あらかじめ用意した L-ascorbic acid (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, および 0.5 mM) を同様に分析し，得られた検量線に基づき OH ラジカル捕捉活性値を L-ascorbic acid 当量として算出した．測定反復は 3)と同様である．

結果および考察

ヤマブドウ野生株のラジカル捕捉活性値の平均値を表 2 に示した．また，比較として Kuwayama (2014) が報告した野生ハスカップ果実のラジカル捕捉活性値の平均値を併記した．ヤマブドウの各種ラジカル捕捉活性値をハスカップのそれと比べると，DPPH ラジカル捕捉活性値は同程度，ROO ラジカル捕捉活性値は約 1/3，OH ラジカル捕捉活性値は約 8 倍であり，植物種ごとに各種ラジカル捕捉活性は大きく異なることが明らかとなった．

次に，ヤマブドウ果実に含まれる抗酸化成分として，第 2 章第 2 節で測定した総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量と各種ラジカル捕捉活性値との相関を調べた（図 29－図 30）．この場合，ハスカップについては，Kuwayama (2014) が報告した DPPH ラジカル，ROO ラジカルおよび OH ラジカル捕捉活性値との相関について併記し，ヤマブドウのそれと比較した．ヤマブドウの場合，総アントシアニン含量は各種ラジカル捕捉活性値との間に関連を示さなかったのに対し，総ポリフェノール含量は DPPH ラジカルおよび ROO ラジカル捕捉活性値との間に強い正の相関 ($P < 0.001$) を示した．一方，ハスカップの場合，総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量のどちらも，DPPH ラジカルおよび ROO ラジカル捕捉活性値との間に強い正の相関を示した．これらの結果は，ハスカップ果実に含まれる主たる抗酸化成分がアントシアニンであるのに対し，ヤマブドウ

表2. ハスカップとヤマブドウのラジカル捕捉活性値の平均値.

植物種	ラジカル捕捉活性値			
	DPPH $\cdot$ (μ mol Trolox EQ/g DW)	ROO $\cdot$ (μ mol Trolox EQ/g DW)	$\cdot$ OH (mmol Ascorbic acid EQ/g DW)	O $_2^{\cdot-}$ (mol α -Lipoic acid EQ/g DW)
ヤマブドウ	132.0 $\pm$ 30.5	285.6 $\pm$ 68.5	4.92 $\pm$ 3.55	586.9 $\pm$ 341.8
ハスカップ	154.0 $\pm$ 45.5	808.4 $\pm$ 242.0	0.60 $\pm$ 0.19	—

平均値 $\pm$ SD

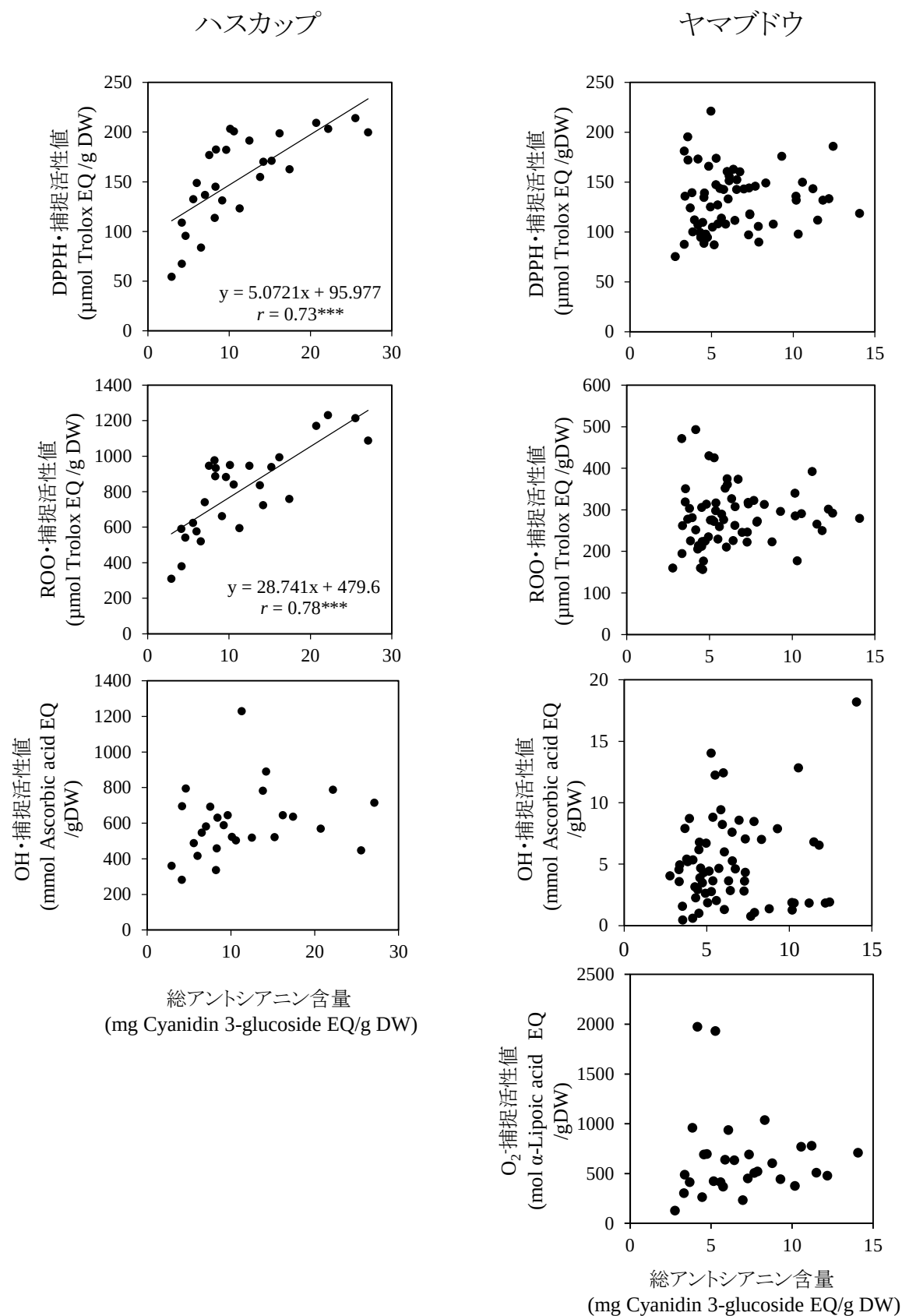


図29. ハスカップとヤマブドウの総アントシアニン含量とラジカル捕捉活性値の相関.

*** $P < 0.001$

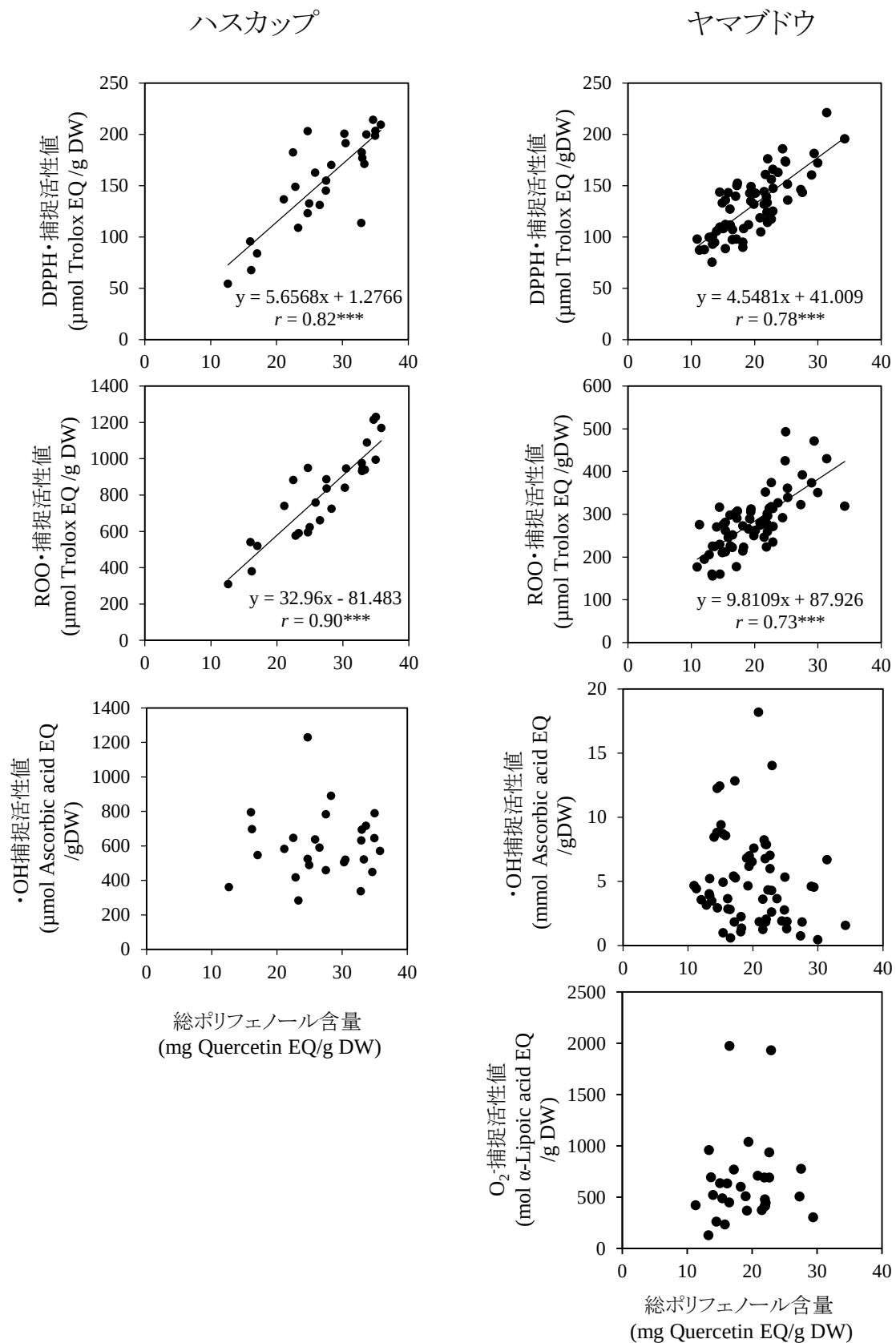


図30. ハスカップとヤマブドウの総ポリフェノール含量とラジカル捕捉活性値の相関.
*** $P < 0.001$

果実ではアントシアニンとは別のポリフェノール化合物が抗酸化性に寄与している可能性を示している。一方、OH ラジカルおよび $O_2^{\cdot-}$ ラジカル捕捉活性値は、総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量のいずれとも有意な相関を示さなかった。OH ラジカルは、糖や有機酸によっても捕捉されることが、複数の研究で報告されている (Gil *et al.*, 2000; Kayashima & Katayama, 2002; Morelli *et al.*, 2003) ことから、第 2 章で測定した総遊離糖含量および総有機酸含量と OH ラジカル補足活性値の相関についても検討したが、いずれも有意な相関は認められなかった (図 31)。従って、OH ラジカルおよび $O_2^{\cdot-}$ ラジカルは、特定のポリフェノール化合物に特異的に捕捉される活性酸素種ではないものと考えられる。

第5節 ヤマブドウ, 欧州ブドウ (*Vitis vinifera*) およびこれら交配種のラジカル捕捉活性値の比較

第 4 節で、ヤマブドウ果実の各種ラジカル捕捉活性値を分析し、その特徴を明らかにした。また、DPPH ラジカルおよび ROO ラジカル捕捉活性値には、ヤマブドウ果実に含まれるポリフェノール化合物が大きく寄与していると考えられる。そこで、本節では、ヤマブドウ, 欧州ブドウ (*Vitis vinifera*) およびこれらの交配種の DPPH ラジカルおよび ROO ラジカル捕捉活性値を比較するとともに、HPLC を用いて抽出物の吸光を連続的に測定し、各ブドウ種果実の成分の特徴を明らかにしようとした。

材料および方法

(1) 植物材料

材料の採取は 2014 年 10 月に行い、ヤマブドウは、北海道大学構内に自生している個体の果実を材料とした。また、欧州ブドウ品種として‘ピノ・ノワール’および‘ツヴァイゲルトレーベ’を、それぞれ札幌市と余市市のブドウ農家で栽培されている樹木から採取した。ヤマブドウと‘清見’ (欧州ブドウ品種である‘セイベル 13053’の選抜系統) の交配品種である‘清舞’および‘山幸’は、池田町ブドウ・ブドウ酒研究所で栽培されている樹木から採取した。果実は種子と果肉・果皮に分けた後、凍結乾燥・粉末にして抽出材料とした。

(2) 抗酸化性評価方法

DPPH 法および ORAC 法については、第 4 節と同様である。

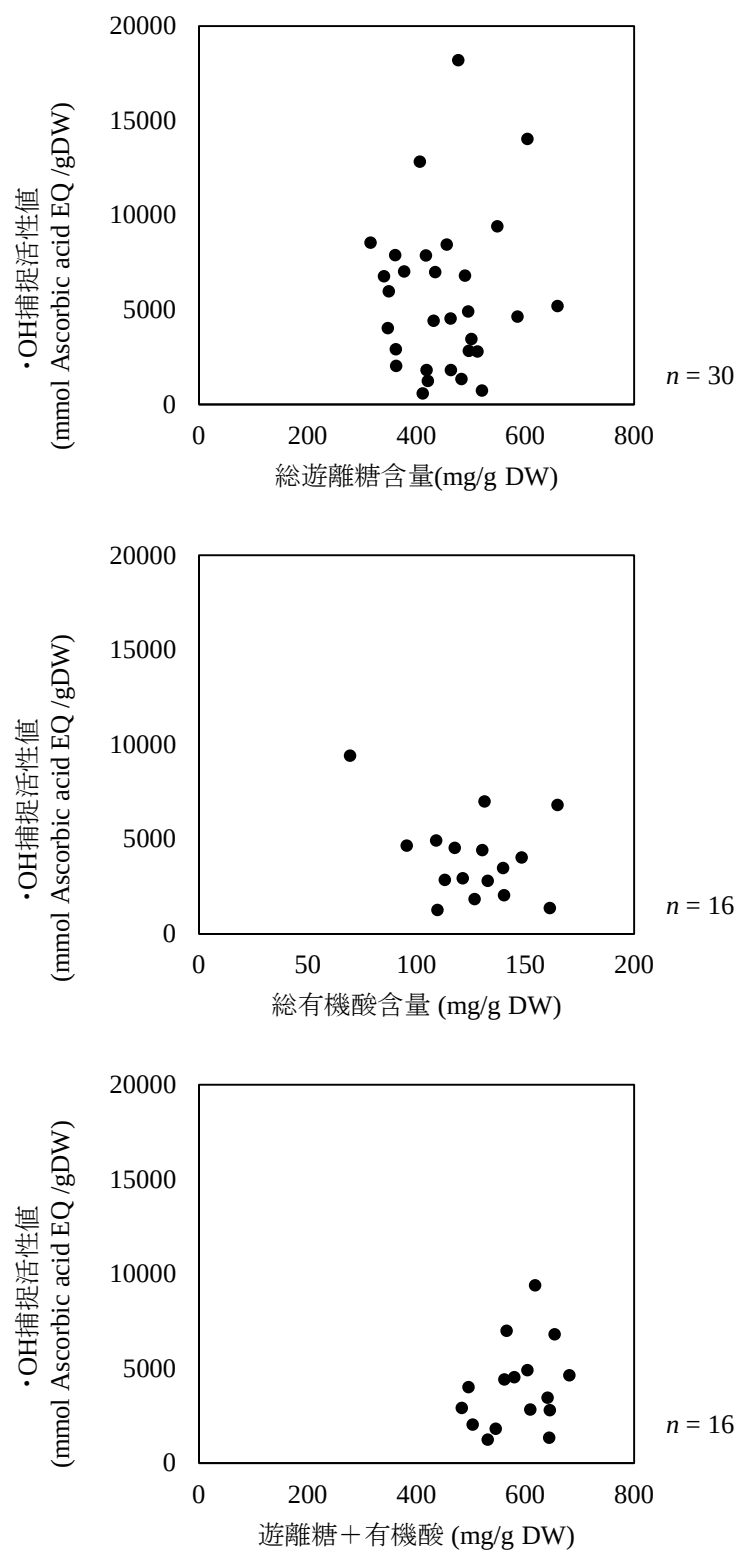


図31. ヤマブドウの総遊離糖含量および総有機酸含量とOHラジカル捕捉活性値の相関.

(3) HPLC 分析

材料 100 mg に 0.1%ギ酸を含む 90%MeOH を加え、室温下で 1 時間振とう抽出し、遠心分離 (12,000 × *g*, 10 min) 後の上清を回収して分析試料とした。

HPLC 分析は以下の条件で行った：カラム, InertSustain C18 3 μm (3.0×150 mm, ジーエルサイエンス)；カラム温度, 40℃；移動相, 溶離液 A (1%ギ酸) と溶離液 B (メタノール) のグラジエント分析；試料注入量, 10 μL；流速, 0.5 mL/min；検出器, ダイオードアレイ検出器；検出波長, 300-550 nm. 溶離液 A/B のグラジエント条件は、以下のとおりである：0-5 min, 95/5 から 82/18 への直線グラジエント；5-17 min, 82/18 から 60/40 への直線グラジエント；17-30 min, 60/40 から 40/60 への直線グラジエント；30-31 min, 40/60 から 5/95 への直線グラジエント；31-35 min, 5/95 を保持。

結果および考察

各種ブドウ果実 (5 種類) の DPPH ラジカルおよび ROO ラジカル捕捉活性値を図 32 に示した。果肉＋果皮抽出物について、DPPH ラジカルと ROO ラジカル捕捉活性はどちらもヤマブドウで値が最も高かった (それぞれ 108 μmol Trolox EQ/g DW, 253 μmol Trolox EQ/g DW)。一方、種子抽出物について、DPPH ラジカルと ROO ラジカル捕捉活性はどちらも‘ピノ・ノワール’で最も高かった (それぞれ 954 μmol Trolox EQ/g DW, 2476 μmol Trolox EQ/g DW)。従って、種子とそれ以外の可食部に含まれる成分は、ヤマブドウと欧州ブドウで大きく異なり、その違いが抗酸化性の差に反映されたものと考えられる。

次に、ヤマブドウと欧州ブドウに含まれる抗酸化成分の特徴を調べるため、抽出試料の HPLC 分析を行った。HPLC における 300 - 550 nm の連続吸光のうち、特徴的な吸光を示した 320 nm および 520 nm のクロマトグラムを図 33—37 に示した。果皮＋果肉抽出物の 320 nm のクロマトグラムでは、RT 9.5 min および 12.0 min において大きなピークが検出され、いずれもヤマブドウが他に比べ顕著に高かった (図 33)。これらは、吸収極大波長がそれぞれ $\lambda_{\max} = 313$ および 326 であったことから、300 nm 付近に吸光極大をもつフラボノイド類であるものと推測される (図 34)。

果肉＋果皮抽出物の 520 nm のクロマトグラムにおいて、ヤマブドウからは RT 9.6 min, 11.6 min および 13.3 min に主要なピークが検出され、これらは欧州ブドウの 2 品種からは検出されなかった (図 35)。これらのピークは、その吸光値からアントシアニン由来のも

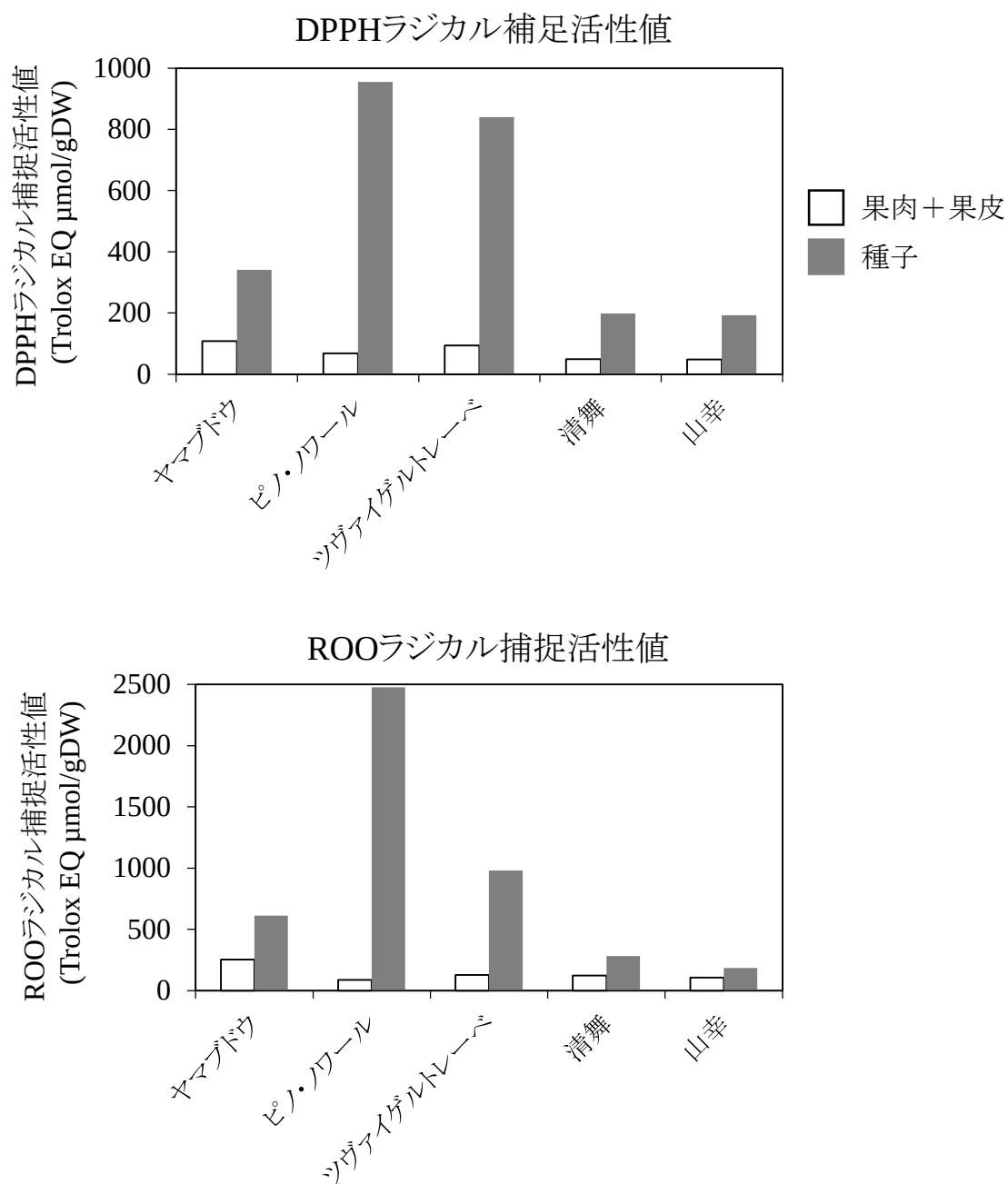


図32. 種の異なるブドウ果実のラジカルDPPHラジカルおよびROOラジカル捕捉活性値.

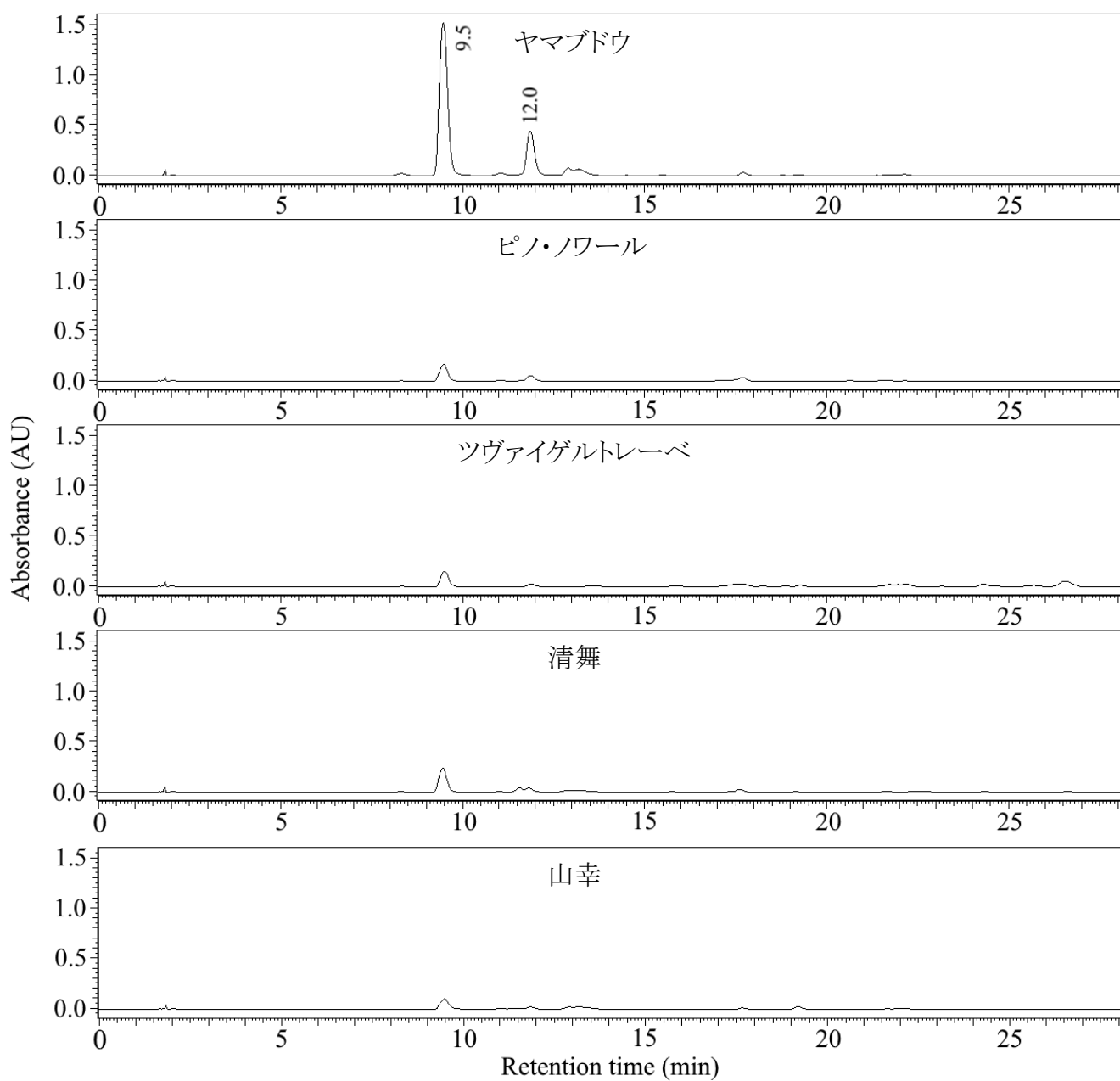


図33. 果肉＋果皮抽出物のHPLCクロマトグラム(320 nm).

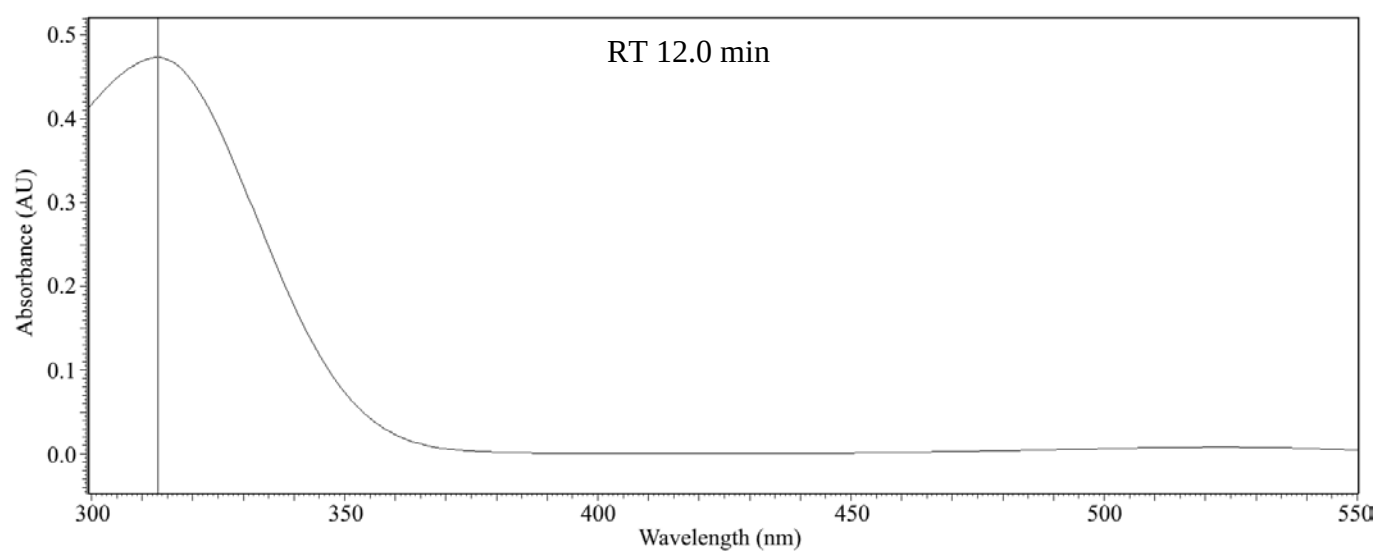
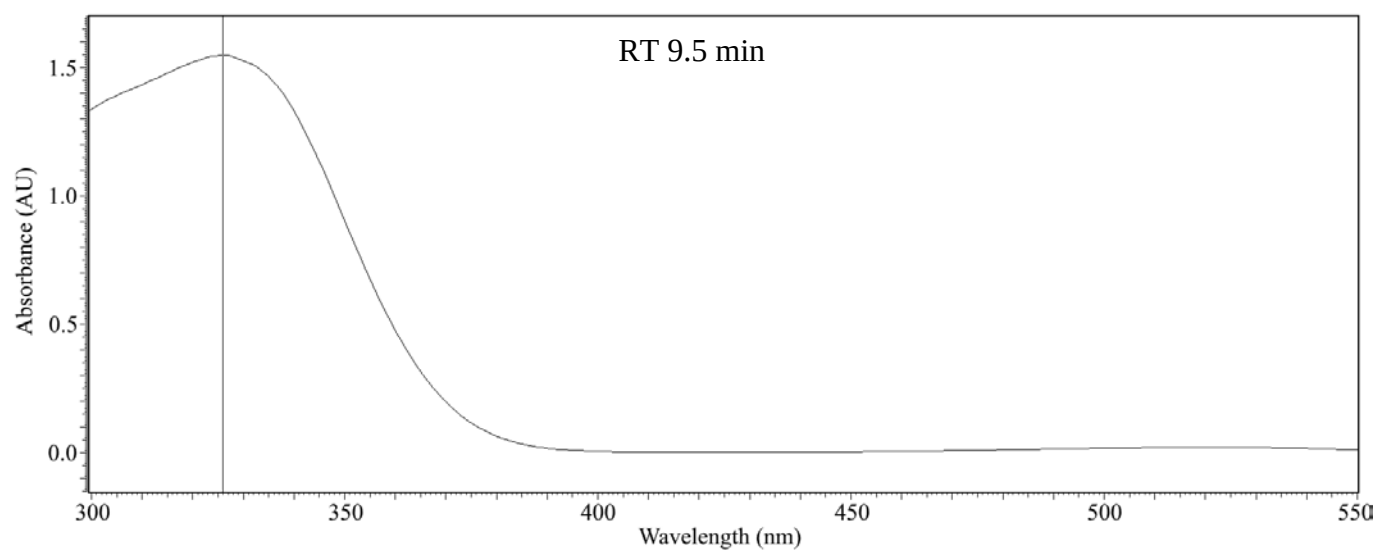


図34. 果肉＋果皮抽出物の主要ピークの吸収スペクトル.

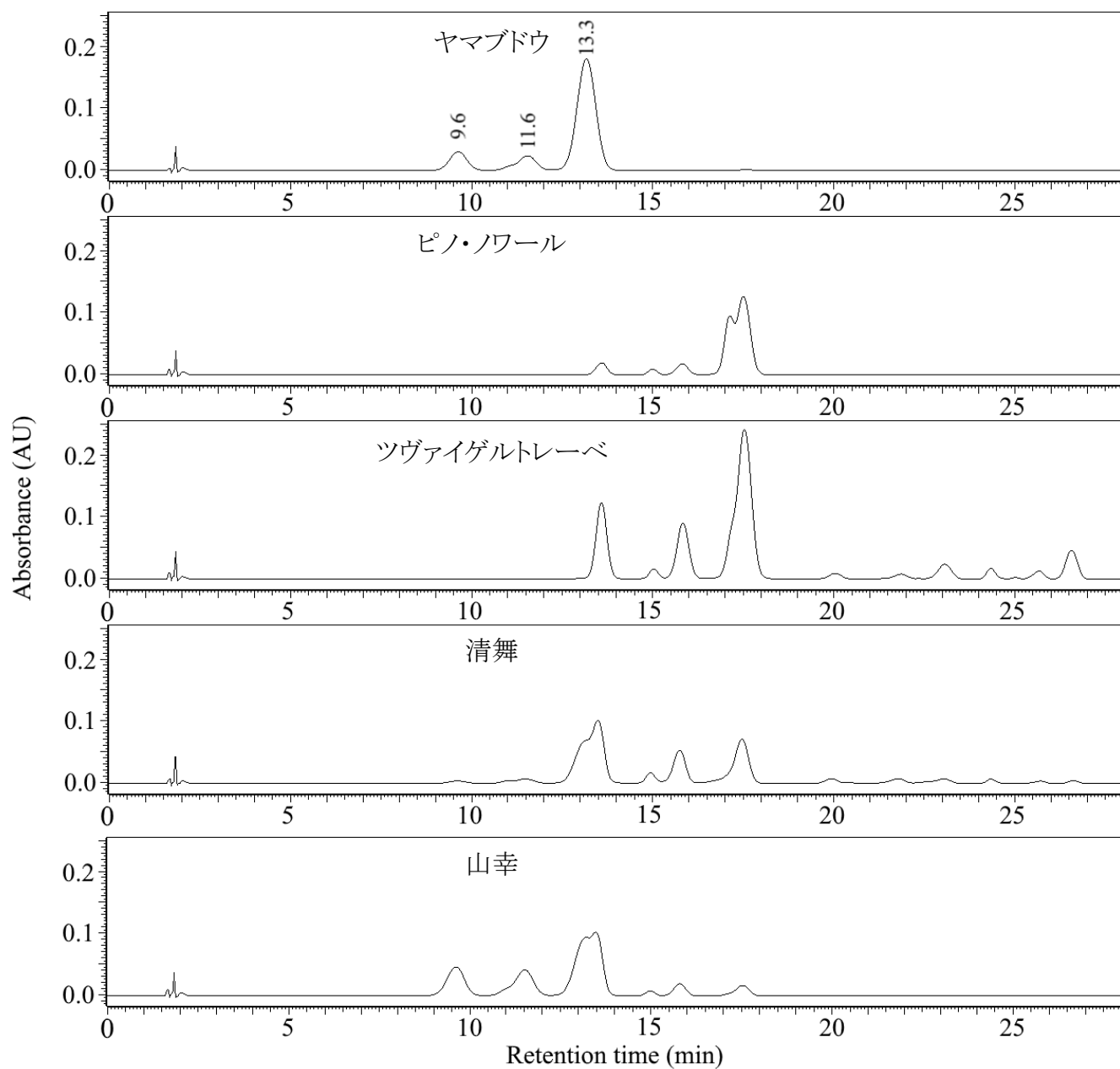


図35. 果肉＋果皮抽出物のHPLCクロマトグラム(520 nm).

のと推測される。一方、欧州ブドウからは RT 13.6 min 以降に 3 つの主要なピークを含む複数のピークが検出されており、これらはヤマブドウからは検出されなかった。ヤマブドウと欧州ブドウの交配品種である‘清舞’および‘山幸’からは、両親それぞれの固有ピークが両方とも検出された。

種子抽出物の 320 nm のクロマトグラムでは、‘ピノ・ノワール’から RT 11.5 min ($\lambda_{\max} = 313$), 12.9 min および 22.8 min ($\lambda_{\max} = 312$) に 3 つの高いピークが検出された (図 36-37)。RT 12.9 min の吸収極大波長は、その波形から今回の測定範囲より短い波長にあると予想される。なお、520 nm ではどの果実試料からも吸光ピークは検出されなかった。

第6節 第 2 章の考察

第 2 章では、多量検体の迅速分析および複数化合物の同時定量が可能である MALDI-TOF MS の、園芸作物への利用を実証することを目的に、ヤマブドウ果実のアントシアニンを含む主要成分についてその組成と含量を測定した。また、それらの年次間変動、形質間の相互作用および地理的分布の特徴について明らかにしようとした。

HPLC および ESI-FT ICR MS を用いたアントシアニン定性分析の結果、ヤマブドウ果実には 21 種のアントシアニンが含まれていることが明らかとなった。Choi *et al.* (2010) は、韓国に自生するヤマブドウ果実のアントシアニンの定性分析を報告しており、本研究でも彼らが報告したものと同じアントシアニンが検出された。また、これらのアントシアニンは 4 種類を除いて分子量が異なっており、また分子量が同一な 4 種 2 組み合わせについても主たるアントシアニンではないと考えられたことから、MALDI-TOF MS を用いた定量は可能と判断できる。さらに、ヤマブドウ果実には Pelargonidin を基本骨格とするアントシアニンが含まれていなかったことから、Pg3G を内部標準とする定量法を適用することができ、第 1 章で検証した複数の検量線を用いることで、ヤマブドウ果実におけるアントシアニン組成および定量分析を実施することができた。

ヤマブドウ果実における主要形質のうち、1果重、総糖含量および総有機酸含量は年次変動が小さく、また糖含量と有機酸含量については強い負の相関が認められた。また地理的な分布にも特徴が認められ、道央地域で採取した果実は糖含量が高く、道北地域で採取した果実は有機酸含量が高い傾向が認められた。これは、成熟期の積算気温が、道央地域で他地域に比べ高く、道北地域で低いことに起因するものと考えられる。一方、総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量は年次間の変動が大きく、また地理的分布についても一定の傾向は認められなかった。

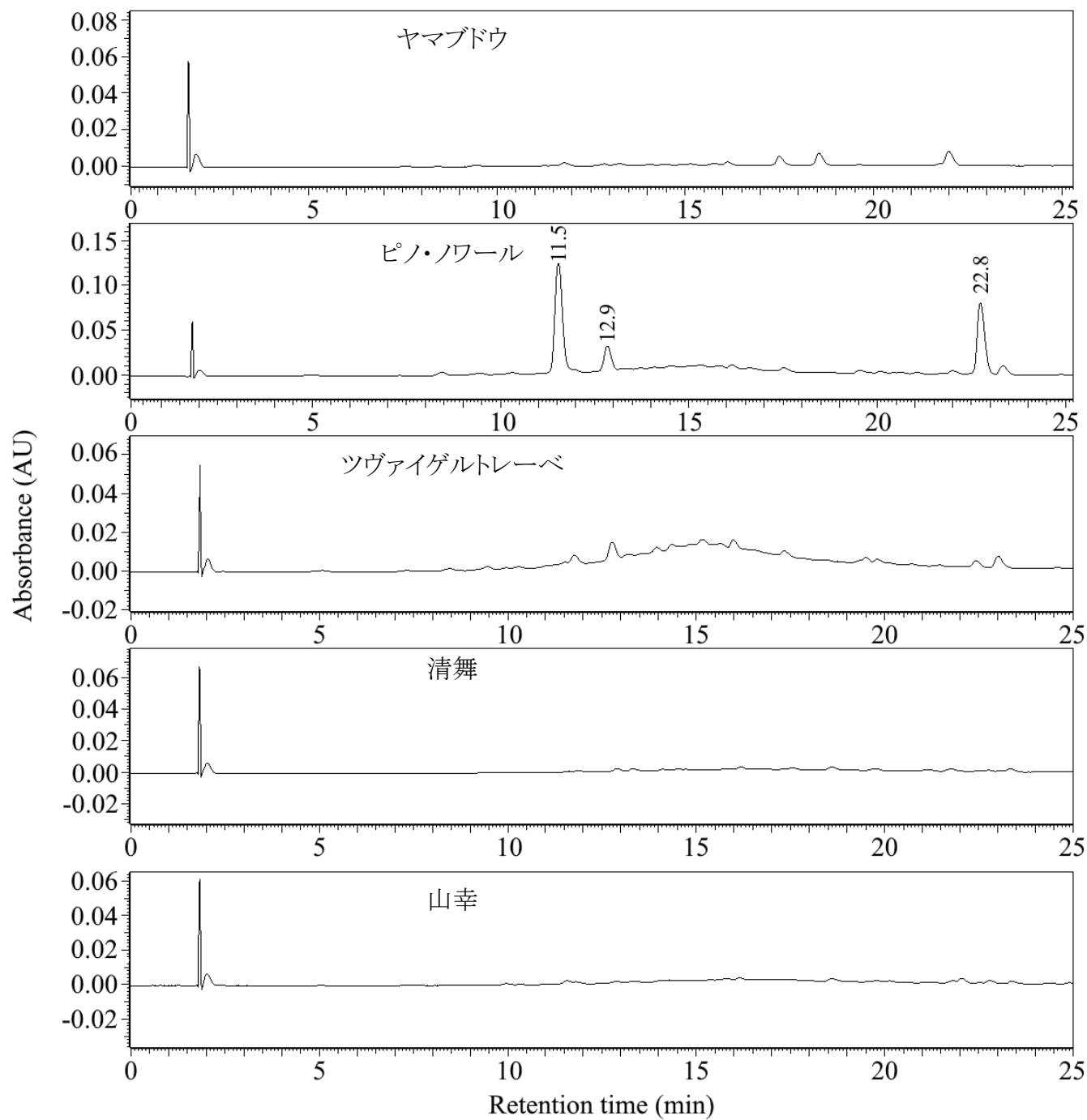


図36. 種子抽出物のHPLCクロマトグラム(320 nm).

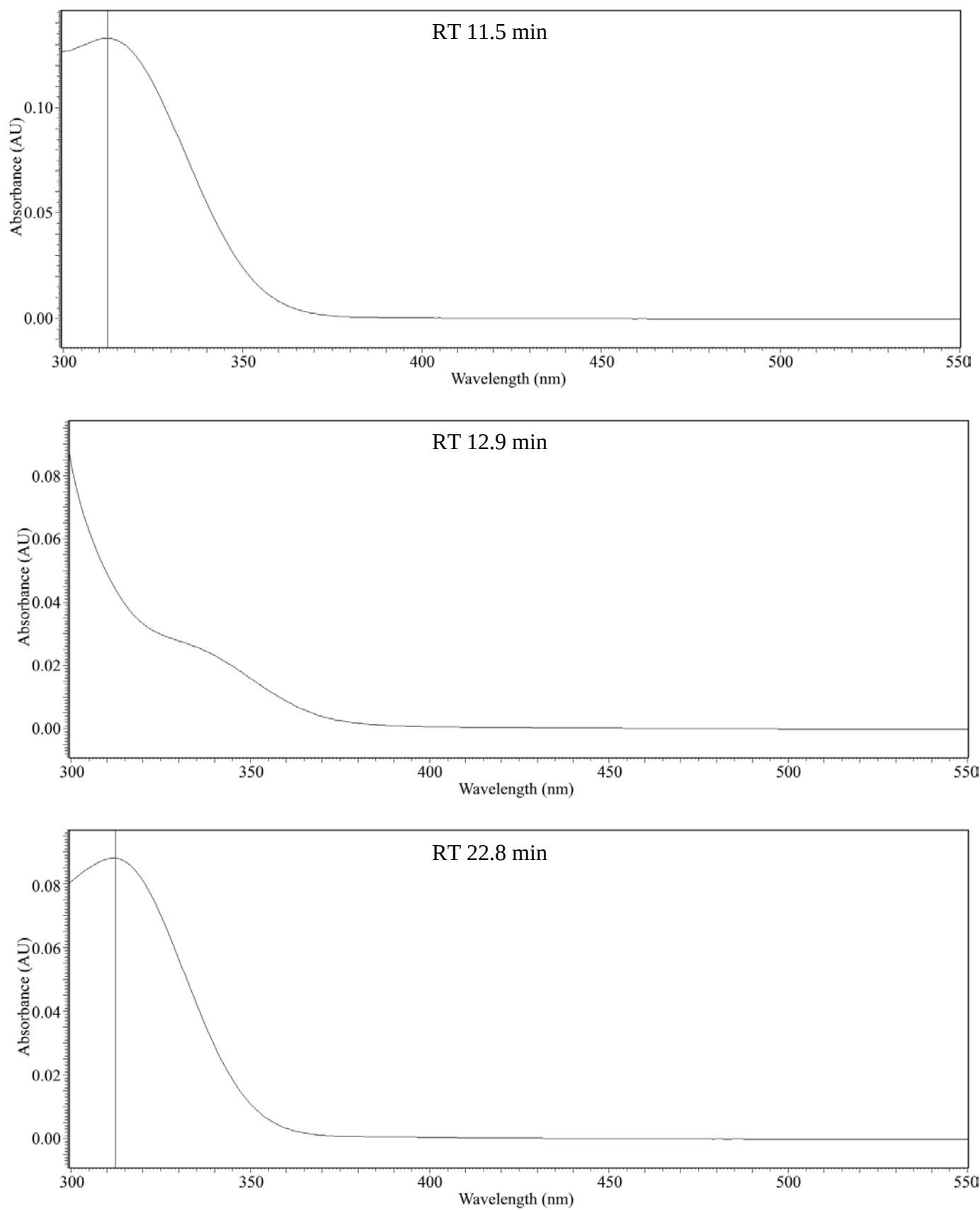


図37. 種子抽出物の主要ピークの吸収スペクトル.

本章ではヤマブドウ果実の抗酸化能を4種のラジカル補足活性値で評価した。抗酸化活性の評価には、これまで数々の手法が開発されており、同じ試料や抗酸化化合物でも、対象とするラジカルによってその捕捉活性は異なるため、抗酸化能の評価は複数のラジカルに対する捕捉活性値から総合的に評価することが望ましい。ヤマブドウと同じく寒冷地小果樹であるハスカップと比較して、ヤマブドウ果実は ROO ラジカル補足活性値が低く、OH ラジカル補足活性値が高かった。Tanaka (2012) は、北海道に自生するキイチゴ属野生種の DPPH ラジカルおよび OH ラジカル補足活性について調査し、それぞれ 154.5 $\mu\text{mol Trolox EQ/g DW}$ および 73.2 $\mu\text{mol AA EQ/g DW}$ であったと報告している。この結果から、ヤマブドウのもつ OH ラジカル補足活性値は他の小果樹と比較しても非常に高いものと考えられる。欧州ブドウ品種と比較した場合においても、果肉および果皮のラジカル捕捉活性はヤマブドウの方が高かった。

ヤマブドウのラジカル捕捉活性とアントシアニンおよびポリフェノール含量の相関を調べた結果、いずれのラジカル補足活性値もアントシアニンとは相関を示さなかったが、DPPH ラジカルと ROO ラジカルはポリフェノール含量と強い正の相関を示した。また、ヤマブドウの果肉+果皮抽出物からは、320 nm 付近に吸光極大をもつピークが複数検出された。ブドウ果実にはヒドロキシ酸、フラバン-3-ol、フラボノールおよびプロアントシアニンなど、様々なフェノール化合物が含まれており (Rodríguez *et al.*, 2006) これらが複合的に各種ラジカル捕捉活性値を高めたものと推測される。

OH ラジカル補足活性値は、アントシアニンおよびポリフェノール含量と関連を示さなかった。Falchi *et al.*, (2006) はブドウの DPPH ラジカル捕捉活性値とポリフェノール含量には有意な正の相関があったが、OH ラジカル捕捉活性とは相関が認められなかったことを報告しており、本研究の結果もこれらと一致した。また、Scalzo *et al.* (2012) は、10 種類のワインを用いて、主要成分の OH ラジカル補足活性値に対する寄与率を調査し、総ポリフェノールは 6-30%、有機酸は 17-28%、糖は 2-5%、グリセリンは 52-61%だったと報告している。本研究では、OH ラジカル捕捉活性値と有機酸および遊離糖の間に相関は認められなかったが、これらを含めた様々な化合物が OH ラジカルと反応し、高い捕捉活性を示しているものと考えられる。

第3章 MALDI-TOF MSI を用いたリンゴ果実中の可溶性炭水化物分布の可視化

MALDI-TOF MSI は、組織切片上にマトリックスを均一に散布後、等間隔でレーザー照射し、各照射部位におけるイオン化強度を指標として、知りたい化合物の濃度分布を可視化する手法である。近年、医薬学系分野を中心に開発・改良が進められてきた技術であり (Källback, 2017)、植物材料に関する報告は少ない。この場合、分析対象とする化合物のイオン化強度が、濃度を反映するものでなければ意味がない。本論文の第 1 章では、可溶性炭水化物の濃度とイオン化強度の相関を調べ、イオン化強度を指標とした定量が可能であることを示した。そこで本章では、リンゴ果実を材料として、MALDI-TOF MSI を用いた可溶性炭水化物分布の可視化を試みた。

リンゴを含めた一部のバラ科植物においては、ソルビトールが主な転流糖であることが知られている。Loescher & Kennedy (1982) は、リンゴの葉における全可溶性炭水化物の 61.5%がソルビトールであったと報告している。ソルビトールはグルコース-6 リン酸、NADPH および H^+ を基質として、ソルビトール-6 リン酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.140) およびソルビトール-6-フォスファターゼ (EC 3.1.3.50) の 2 種類の酵素によって合成される (Kanayama, 1998)。果実に転流したソルビトールは NAD 依存性ソルビトール脱水素酵素 (NAD-SDH) によってフルクトースに、あるいは NADP 依存性ソルビトール酸化酵素 (NADP-SOD) によってグルコースに変換される。リンゴ果肉組織におけるスクロースの合成は、UDP-グルコースとフルクトース-6-リン酸を基質として SPS (EC 2.4.1.14) および SPP (EC 3.1.3.24) によって触媒されるか、UDP-グルコースとフルクトースを基質として SuSy (EC 2.4.1.13) によって触媒される。Fuleki *et al.* (1994) は成熟果実から搾汁した果汁のソルビトール含量は、全可溶性炭水化物の 2.7% (0.28 g/10.34 g) だったと報告しており、果実のソルビトール含有率は葉のそれに比べ極めて低い。上記の報告によると、他の可溶性炭水化物の濃度はそれぞれ、フルクトース (52.2%, 5.40 g), スクロース (31.4%, 3.25 g), グルコース (12.9%, 1.33 g) であった。このように、果実全体における可溶性炭水化物の含量については多くの報告があるが、果実内におけるこれらの濃度分布については明らかにされておらず、その解明は果実の糖質代謝機構を解明する上で重要である。

リンゴのみつ症果とは果肉組織が水浸状で半透明化する生理障害の一つであり、ナシにも発生が認められる。Suzuki *et al.* (2003) は Cryo-SEM を用いてみつ症発生部位の細胞を観察し、細胞間隙が水溶液で満たされていることを報告している。リンゴにおけるみつ症果は市場での付加価値が高い反面、収穫後の貯蔵性が悪化 (果肉組織にゴム病が発生) することから問題視されている。

みつ症果の発生とソルビトール集積に関連のあることは古くから指摘されており、Marlow & Loescher (1984) は果実に転流したソルビトールを細胞が吸収できないことが原因であると指摘し、Harker *et al.* (1999) は高濃度のソルビトールが細胞間隙に集積すること自体が発生原因であると推測している。一方、Sasaki (2001) は、遠心分離で採取したみつ組織細胞間隙の水溶液を HPLC で分析したところ、ソルビトールの顕著な集積は確認できないことを報告した。また、Kamijo (2014) は、みつ症果発生品種と非発生品種について、果実成熟に伴う果肉組織のソルビトール含量の変化を経時的に調査したところ、両方でソルビトール含量に有意な差が認められなかったことを報告している。従って、みつ症果の発生とソルビトール集積との因果関係は、未だ未解明のまま残された課題である。

次に、リンゴ果実を対象とした質量分析イメージングによる研究について、Zhang *et al.*, はコロイドグラファイトをマトリックスの代わりに用いる方法で、フラボノール、有機酸およびオリゴ糖の分布の可視化を試みている (Zhang *et al.*, 2007)。また、Franceschi *et al.* (2012) は、MALDI-TOF MSI を用いて‘ゴールデン・デリシャス’果実におけるフラボノールおよび dehydrocalcones の分布を可視化したことを報告している。しかし、前述したリンゴ果実に含まれる 4 種類の可溶性炭水化物(フルクトース、グルコース、ソルビトールおよびスクロース)に関する報告は見当たらない。

そこで本章では、MALDI-TOF MS を用いた果実内成分測定に関する応用事例の二つ目として、リンゴ果実に含まれる可溶性炭水化物の濃度分布を MALDI-TOF MSI で可視化しようと考えた。まず、第 1 節では、実際のリンゴ果実を用いて MALDI-TOF MSI 分析を実施し、可溶性炭水化物測定における適切なマトリックスの選択と、MALDI-TOF MSI によって得られた各糖質の濃度分布が正確であるか、HPLC を用いた定量値と比較する方法により検証を試みた。第 2 節では、MALDI-TOF MSI のより詳細な画像を得ることを目的に、レーザー照射の間隔を狭くして、再度果肉組織の糖質分布解析を行った。第 3 節では、低分子領域のイオン検出に有効と考えられる表面支援レーザー脱離イオン化法 (SALDI) を MALDI と比較し、MSI 分析への応用可能性について検討した。第 4 節では、果実の成熟に伴う糖質分布の変化をより詳細に調べるため、凍結マイクロームで切削した切断面のより大きい試料(リンゴ果実の縦断切片の縦半分)の薄切片を用いて MALDI-TOF MSI 分析を行った。第 5 節では、みつ症果を生じる品種と生じない品種を用いて、成熟に伴う果実の MALDI-TOF MSI 分析を行い、みつ症組織の発生とソルビトール集積との関連について明らかにしようと考えた。

第1節 リンゴ果肉切片の MALDI-TOF MSI 分析と HPLC を用いた定量分析の比較

第 1 章第 2 節では、可溶性炭水化物の標品を用いて、濃度とイオン化強度の間に正の相関があることを確認した。本節では、リンゴ果肉組織を用いて MALDI-TOF MSI 分析を行うとともに、切削した切片直下の組織を分割して HPLC を用いて各可溶性炭水化物を定量し、MSI 分析の結果と比較して、その妥当性を評価しようとした。

材料および方法

(1) 植物材料

2015 年 11 月初旬に北海道大学生物生産研究農場に栽植されている 12 年生 ‘ふじ’ から果実を採取し、材料とした。材料は、実験を行うまでの間、0°C 暗所で保管した。

(2) MALDI-TOF MSI

1) 組織切片の作製

果肉の中心部を約 2 cm 四方の立方体状に切り出し、スライド式マイクローム (Double cylinder type; Yamato Koki Industrial Co. Ltd., Asaka, Japan) を用いて厚さ約 200 μm の切片を作製した (図 38)。切り出した切片を酸化インジウムスズ (Indium Tin oxide, ITO) コーティングスライドガラス (75 mm $\times$ 25 mm $\times$ 0.9 mm, Bruker Daltonics) 上にマウントし、直ちに -30°C で凍結させた後、凍結乾燥した。凍結乾燥後の切片の表面を、厚さ 100 μm のトレーシングペーパーをスパーサーとして、プラスチックシャーレに貼り付けた目の細かい紙やすりを用いて均一に削り、約 100 μm の厚さに調整した。

2) マトリックスの塗布

切片へのマトリックス塗布は、ImagePrep (Bruker Daltonics) を用いて行なった。マトリックスとして DHB (3% (w/v), 0.2% TFA を含む 50% MeOH に溶解) もしくは α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, 3% (w/v), 0.2% TFA を含む 50% アセトニトリルに溶解) を用いた。塗布量および塗布時間は、ImagePrep の標準メソッドに従った。

3) MALDI-TOF MSI 分析と画像解析

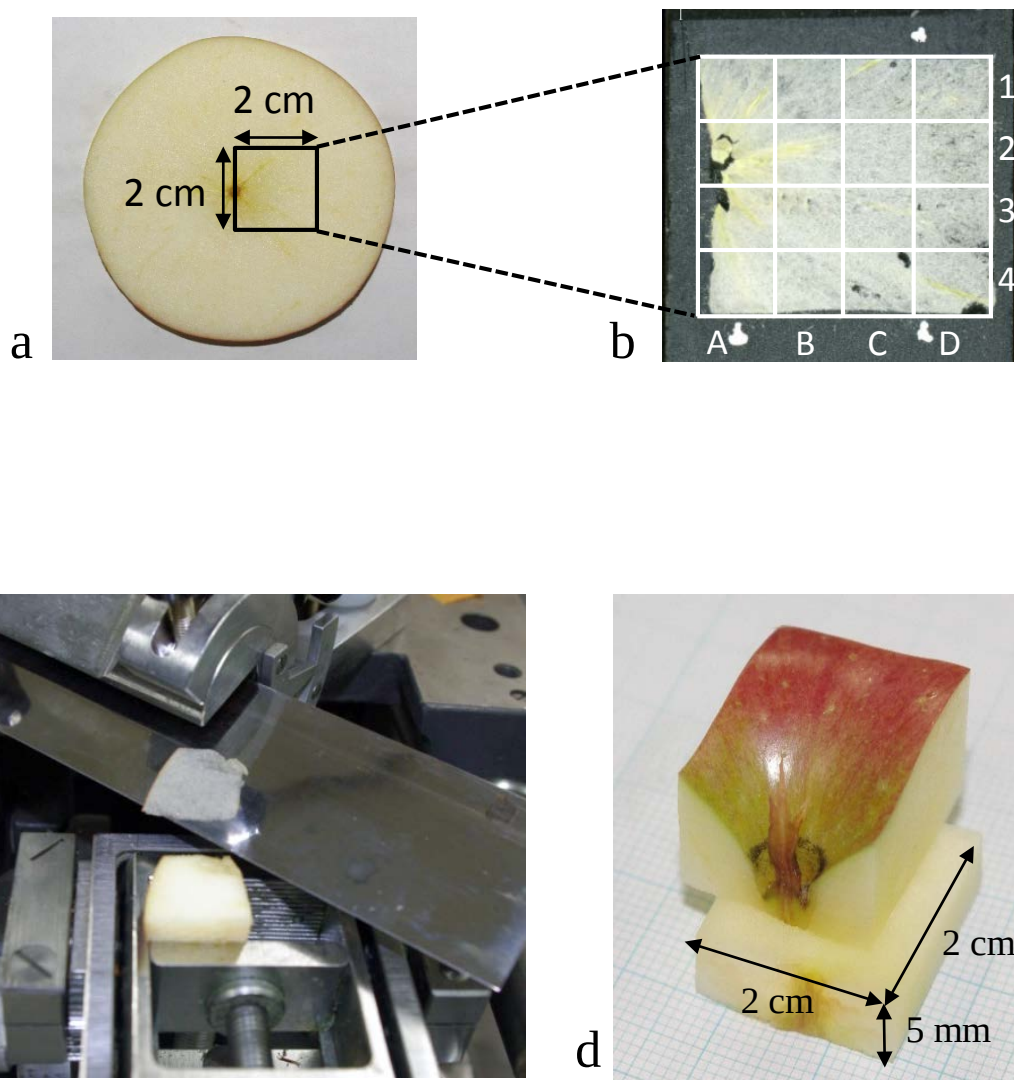


図38. 切片の作成工程. a, 切片作製に用いた果実部位; b, 作製した切片. 白枠の格子はHPLC分析用ブロックの位置; c, スライド式マイクロームで切片を切り出した様子; d, 切片切り出し後の果肉組織. 切片直下の5 mmを16分割してHPLC分析に供試した.

質量分析装置および分析条件は第 1 章第 1 節と同様である．空間分解能（レーザーを照射するスポットの間隔）は 500 μm とした．各可溶性炭水化物の濃度分布図は flexImaging v4.0 (Bruker Daltonics) を用いて作製した．また HPLC で得た定量値との相関分析のため，ImageJ software (NIH) を用いて濃度分布画像をグレースケールに変換し，各ブロックの輝度の平均値を求めた．

(3) HPLC 分析

上記(2)-1)で，切り出した切片直下の果肉組織を 5 mm 四方の 16 ブロックに切り分け，各ブロックを凍結乾燥して HPLC 分析に供した．HPLC を用いた糖分析の条件は，第 2 章第 2 節と同様である．

結果および考察

MSI 分析によって得られたマススペクトラムの一例を図 39 に示した．質量電荷比の値および標品との比較から， m/z 219.0 のピークが[fructose + K]⁺および[glucose + K]⁺， m/z 221.0 が[soritol + K]⁺， m/z 381.1 が[sucrose + K]⁺と推測した（図 39a, b）．各可溶性炭水化物は K⁺ アダクトのみが検出され，H⁺ および Na⁺ アダクトは検出されなかった．リンゴ果実に含まれるカリウムは 109 mg/100 g FW に対し，ナトリウムは 1 mg/100g FW であるため(USDA nutrient database)，カリウムイオンが優先的に付加したと考えられる．

マトリックスとして DHB を塗布した場合，リンゴ切片の外側の領域では各可溶性炭水化物の m/z と重複するピークは検出されなかったが（図 39c），CHCA の場合は m/z 381.2 にマトリックス由来のピークが検出された（図 39d）．低分子量の化合物を MALDI-TOF MS を行う際のマトリックスには，一般に DHB もしくは CHCA が用いられる．また，Franceschi *et al.* (2012) は，リンゴ果実のフラボノール分析には CHCA が適していることを報告している．しかし，本実験の結果から，低分子の可溶性炭水化物の測定には，CHCA より DHB が適しているものと考えられる．

MSI 分析によって得られた各可溶性炭水化物の濃度分布と，HPLC で分析したブロックごとの定量値を図 40 に示した．HPLC 分析の結果，ソルビトールは果芯側の濃度が果皮側と比較して高く（ブロック A2 および A3），スクロースは果皮側の濃度が高かった（列 D）．一方，フルクトースおよびグルコースの濃度分布に，偏りは認められなかった．これらの傾向は，MALDI-TOF MSI で可視化した画像の濃度分布と良く一致していた．そこで，16

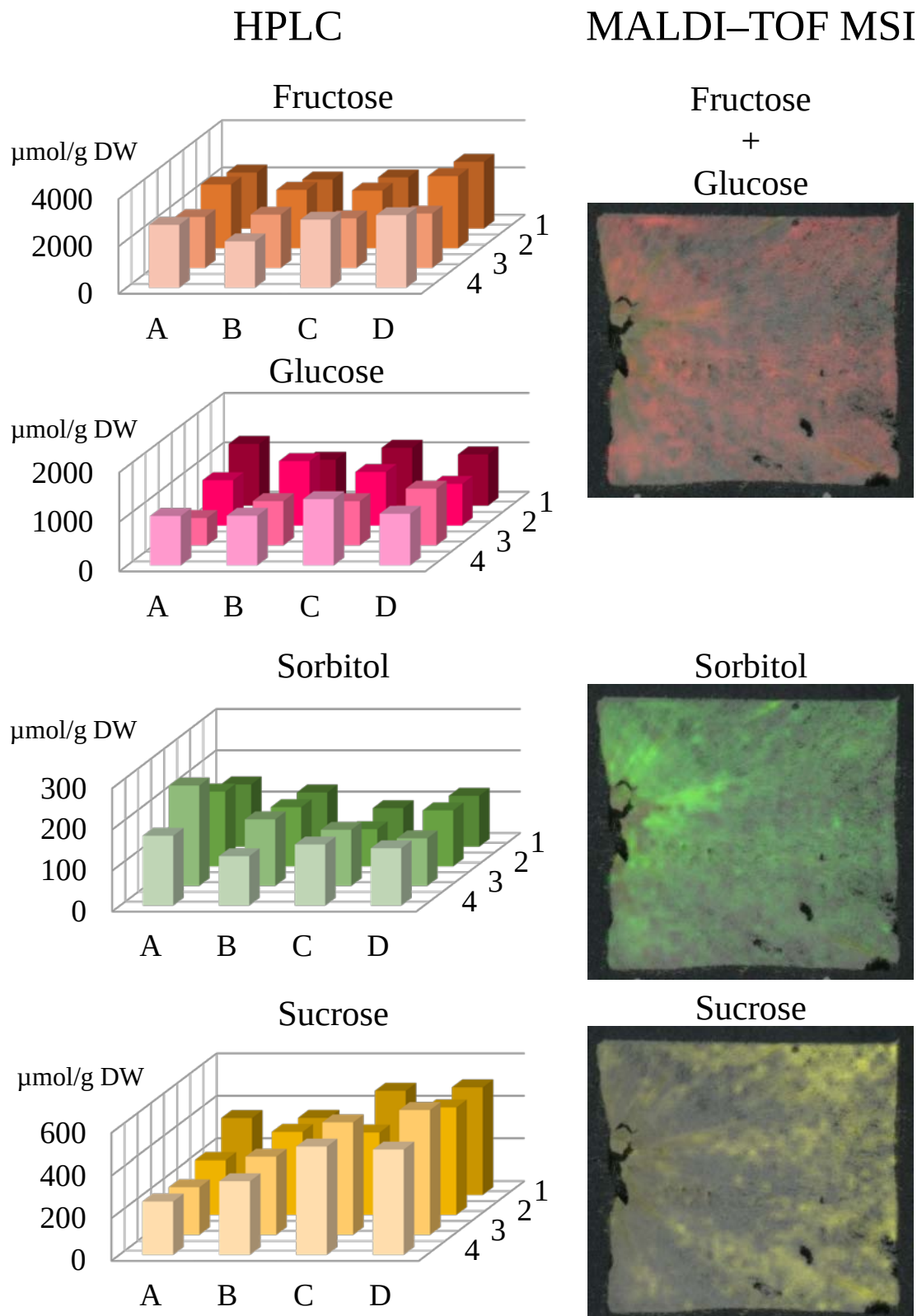


図40. HPLCで定量した16ブロックの糖含量とMSI分析で得られた各可用性炭水化物の濃度分布図.

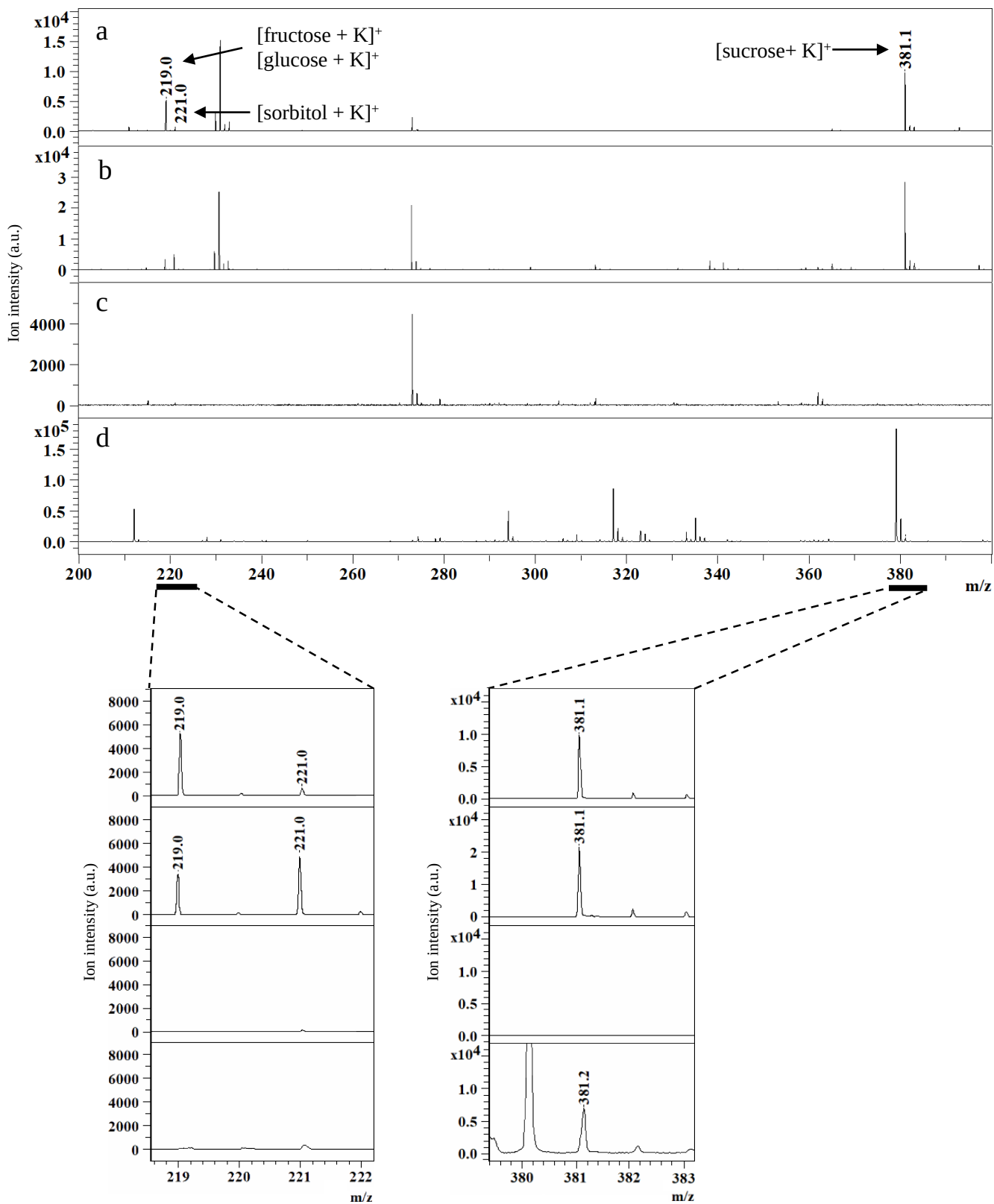


図39. MALDI-TOF MSで得られたマスペクトラムの一例. a, DHBを塗布したリンゴ切片上のスポット; b, MALDIプレート上で測定した混合標品 (マトリックスはDHB); c, DHBのみ; d, CHCAのみ.

分割したブロックごとの各可溶性炭水化物含量について、MALDI-TOF MSI に基づく濃度分布（輝度）と HPLC の定量値との相関を調べた（図 41）。この場合、第 1 章第 2 項で明らかにしたとおり、分子量が同じフルクトースとグルコースについては、MALDI-TOF MS におけるイオン化強度が大きく異なっていた点を考慮し、以下の計算式に基づく補正値を用いた。

$$[\text{補正値}] = [\text{フルクトースの定量値}] \times 0.848 + [\text{グルコースの定量値}] \times 0.152$$

$$0.848 = 2732.8 / (2732.8 + 489.6)$$

$$0.152 = 489.6 / (2732.8 + 489.6)$$

なお、数値の 2732.8 および 489.6 は、各々図 5 に示したフルクトースおよびグルコースに関する回帰直線の傾きを表している。すなわち、 $[M + K]^+ = [180 + 39]^+$ 分子イオンピークに対するフルクトースおよびグルコースの寄与率が、各々 84.8% および 15.2% であったという判断に基づいている。また、輝度は 16 ブロックの合計値を 100 とした時の各ブロックの輝度を%として示した。HPLC の定量値と輝度結果、スクロースでは HPLC の定量値と画像の輝度の間に強い相関が ($P < 0.001$)、ソルビトールでは弱い相関が ($P < 0.1$) 認められた。スクロースで強い相関が得られたのは、切片上のスクロース濃度の範囲が広く、明らかな勾配があったためと考えられる。一方で、ソルビトールでは濃度の範囲が狭く、また高濃度に分布しているのが果芯部の一部のみで勾配が少なかったため、弱い相関を示したと考えられる。単糖については、定量値と輝度の間に有意な相関は認められなかった。これは、単糖の分布が均一であったことや、同質量であるフルクトースとグルコースが混在することで、イオン化強度に影響を与えたことが原因ではないかと考えられる。

第2節 MALDI-TOF MSI を高解像度で行った場合の糖質分布の特徴

MALDI-TOF MSI では、レーザー照射の間隔を変えることで得られる濃度分布の分解能を調節することができる。照射間隔を小さくすると、面積に対する照射スポット数が多くなるため、分析時間およびデータ量が増加するが、より高解像度の分布情報を得ることができる。そこで、本節では、リンゴ果肉組織を高解像度条件で MALDI-TOF MSI 分析し、維管束とその周辺領域における可溶性炭水化物の濃度分布について解析を試みた。

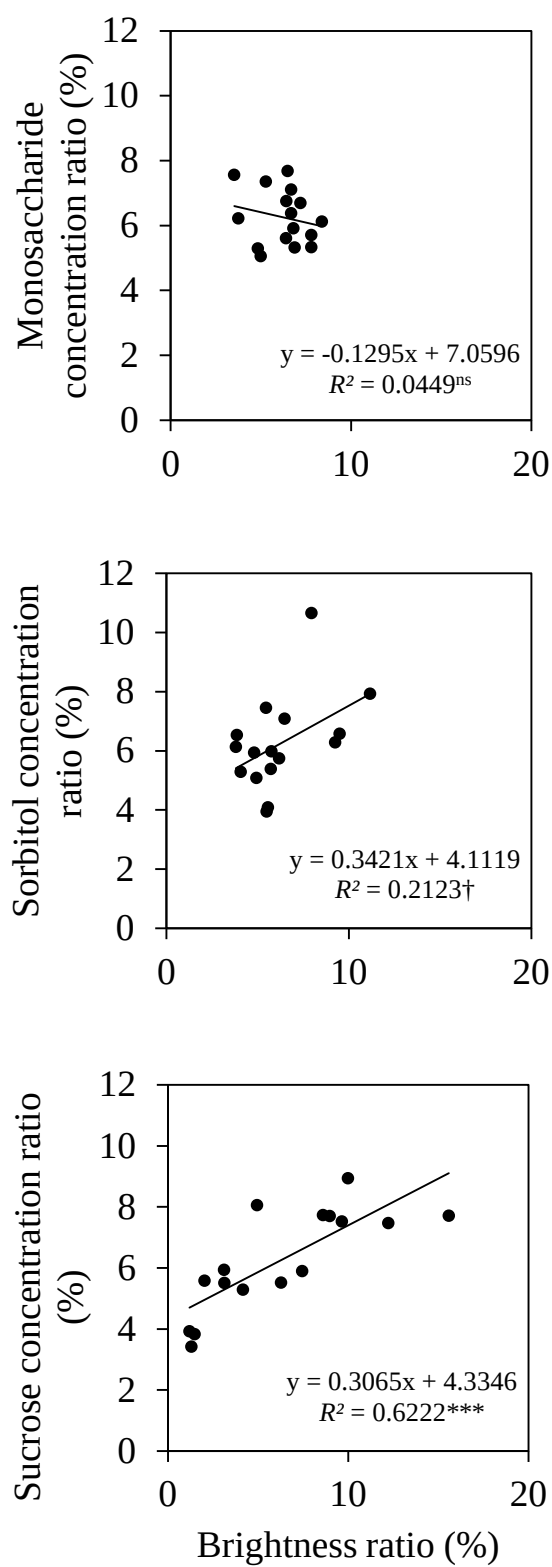


図41. MSI画像から得た16ブロックの輝度の平均値とHPLCで測定した糖含量の相関.
 $*** P < 0.001$, $^{\dagger} P < 0.1$, $^{ns} P$ not significant

材料および方法

植物材料は、第 3 章第 1 節と同様である。本実験では、果肉の中心部約 2 cm 四方を切り出し、カルボキシメチルセルロース (CMC) に包埋後、直ちに -30°C で凍結した。次に、凍結マイクロトーム (Leica CM3050 S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Germany) を用いて果肉縦断面の組織切片 ($20\text{ }\mu\text{m}$) を切り出し、ITO スライドガラスにマウントして凍結乾燥した (図 42)。凍結マイクロトームの庫内温度および組織固定台温度は -35°C に設定した。マトリックスは DHB (5% (w/v), 70% MeOH に溶解) を用い、溶液 1 mL をエアブラシで切片表面に均一に散布した。

MALDI-TOF MSI の方法および分析条件は第 1 章第 1 節と同様とし、空間分解能 (レーザー照射間隔) は $100\text{ }\mu\text{m}$ とした。

結果および考察

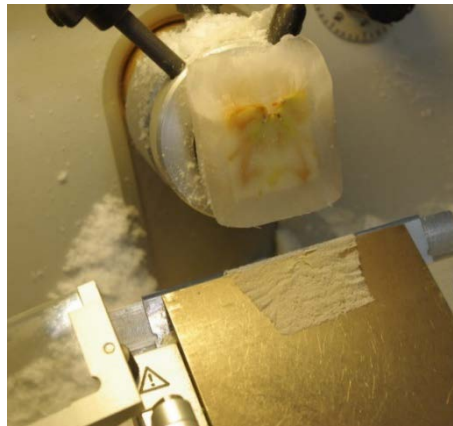
図 43 に 2 個の果実からそれぞれ作製した切片横断面および各可溶性炭水化物の濃度分布を示した。第 1 節の結果と同様に、単糖は切片全体に、ソルビトールは果芯部側に、スクロースは果皮側に多く分布していた。また、ソルビトールとスクロースは、果芯部から伸びる維管束上および近接した領域にも顕著に偏在していた。ソルビトールが維管束周辺に局在していた事実は、果梗からソルビトールを含む樹液が流入後、果肉中の主要な維管束を通して果実全体に拡散している可能性を示している。また、スクロースが果肉の皮層部側に多く分布する点については、維管束周辺部とそれ以外の組織でスクロース合成能に違いがある可能性を示唆している。また、スクロース合成の基質であるフルクトースおよびグルコースが部位特異的な偏在を示していないことから、スクロース濃度分布の違いが基質濃度の差に依存するものではないと考えられる。

第3節 SALDI-TOF MSI から見た MALDI-TOF MSI 改良の可能性

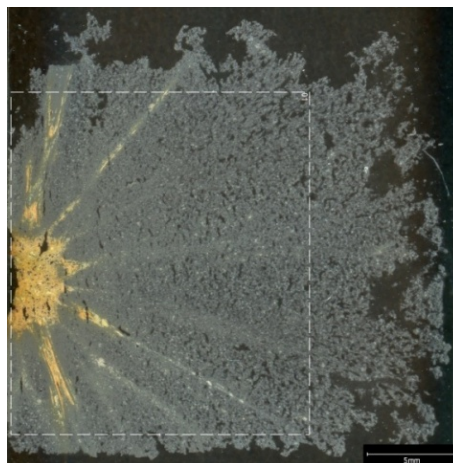
表面支援レーザー脱離イオン化法 (SALDI) は、MALDI で通常用いられる DHB などの有機マトリックスを使用せず、導電性の無機ナノ粒子や金属ナノ構造表面プラズモンを利用して目的とする化合物を励起しイオン化を図る方法で、マトリックス由来のピークに妨害されることなく、低分子化合物を検出できるという利点がある。試料にレーザー照射を



a



b



c

図42. 凍結マイクロームと作成した切片. a, 凍結マイクロームの外観; b, 切片作製の様子;
c, 切り出した切片. 白点線枠はMSI分析を行った領域

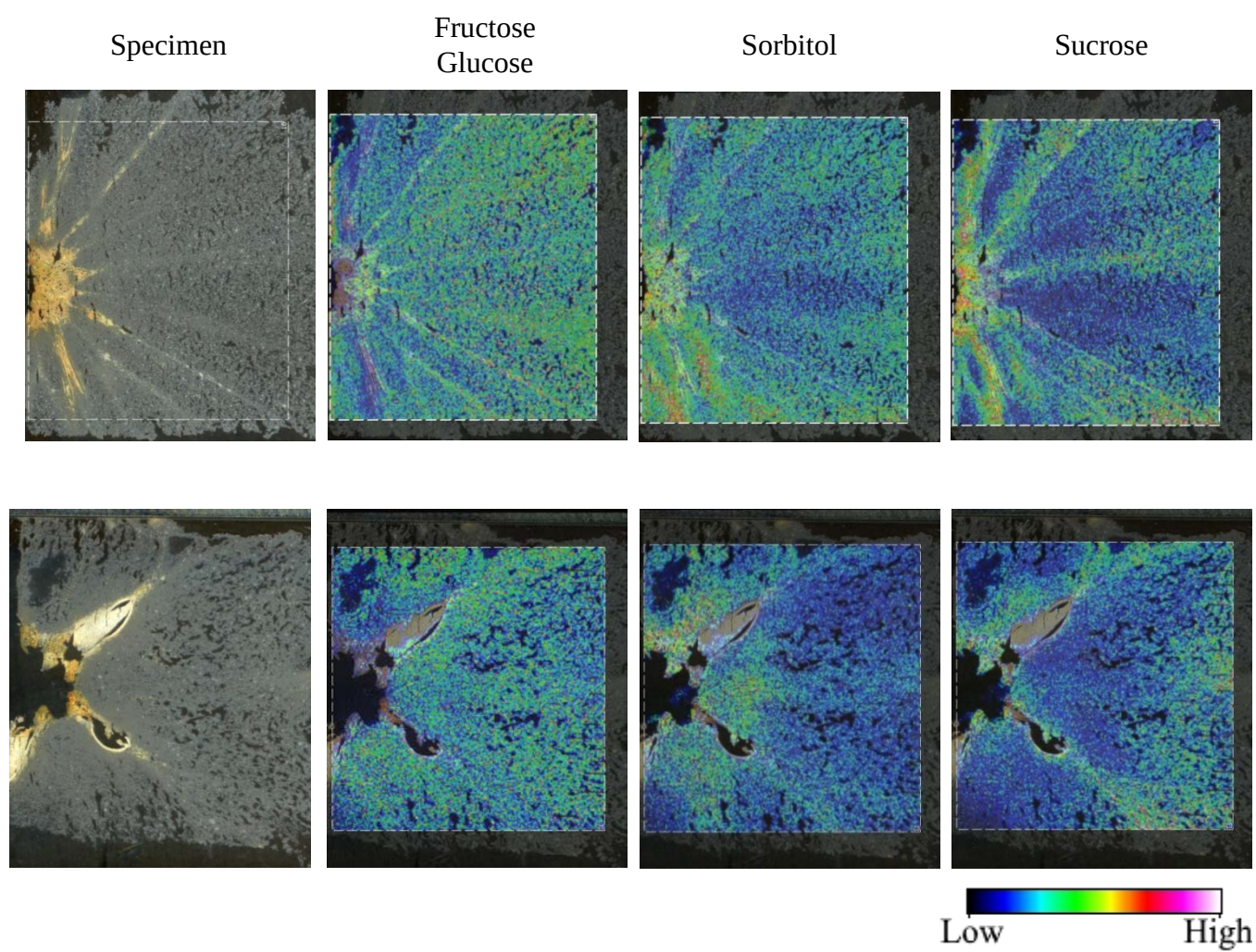


図43. 可溶性炭水化物の濃度分布図.

行う点で MALDI と原理は同じであり、Tanaka *et al.* (1988) が世界で初めてタンパク質のレーザー脱離／イオン化に成功した実験でも、金属粒子が用いられた。Zhang *et al.* (2007) は、グラファイトコロイド表面に載物したリンゴおよびイチゴ果肉組織の SALDI-TOF MSI を行った。また、Kawasaki *et al.* (2012) は、TLC プレート上にスパッタリングで白金蒸着すると、分離した糖の質量分析が可能であったことを報告した。しかし、組織切片に対し、スパッタリングによるナノ粒子蒸着後に SALDI-TOF MSI を行った報告は見当たらない。そこで本研究では、MALDI-TOF MSI の改良を図るための基礎的知見を得ることを目的として、白金に加え、金および炭素をスパッタリングで蒸着したリンゴ果肉組織の SALDI-TOF MSI を行い、得られた画像を MALDI-TOF MSI のそれと比較しようと考えた。

材料および方法

植物材料、切片の作製および MALDI-TOF MSI におけるマトリックス (DHB) 散布の方法は、第 3 章第 2 節と同様である。SALDI-TOF MSI における金 (Au)、炭素 (C) および白金 (Pt) の蒸着には、マグネトロンスパッタリング装置 (E-1030, Hitachi) を用い、蒸着厚は 10-12 nm とした (図 44)。また、各標準物質のイオン化強度を比較するため、フルクトース、ソルビトールおよびスクロースの標準溶液 (1mmol/L) を ITO スライドガラス表面に滴下・乾燥させたものを別に用意し、上記と同様の方法で、マトリックス (DHB) 散布並びに Au, C または Pt の蒸着処理を行った。

MSI 分析に用いた装置および分析条件は、第 1 章第 1 節と同様である。本実験で、空間分解能 (レーザー照射位置の間隔) は 500 μm とした。

結果および考察

図 45 に、DHB および各ナノ粒子をスパッタリングしたスライドガラスの、切片領域外のマススペクトラムの一例を示した。DHB では m/z 100-1000 の間にマトリックス由来のピークが多数検出されているのに対し、Pt 処理では m/z 195 および 390 に Pt クラスタ由来の微小ピークが検出された以外はピークが認められなかった。一方、Au 処理や C 処理では、Pt 処理に比べるとクラスタ由来のバックグラウンドピークの数が多かった。

Au, C または Pt 蒸着を施した 3 種類の可溶性炭水化物標品におけるイオン化強度の差異を図 46 に示した。可溶性炭水化物の種類によらず、イオン化強度は DHB で最も高く、次いで C, Pt, Au の順に高かった。また、リンゴ果肉組織切片の MSI で得られたマススペ

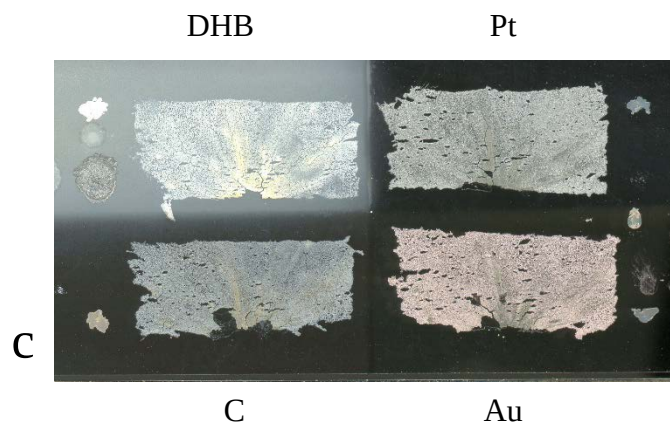
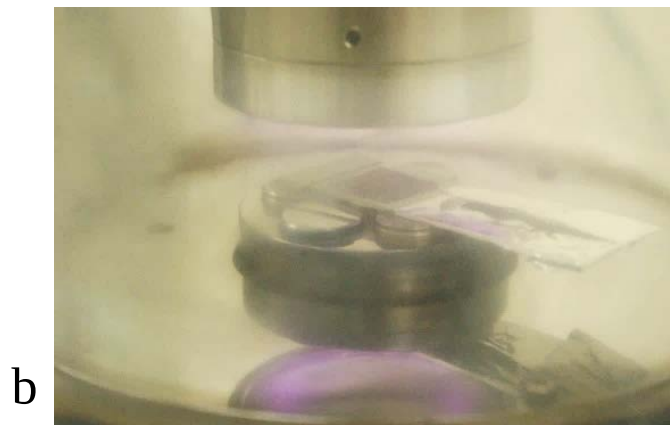


図44. スパッタリングの工程. a, スパッタリング装置の外観; b, スパッタリング中の様子. 紫色は真空放電;
c, 蒸着後の切片の様子.

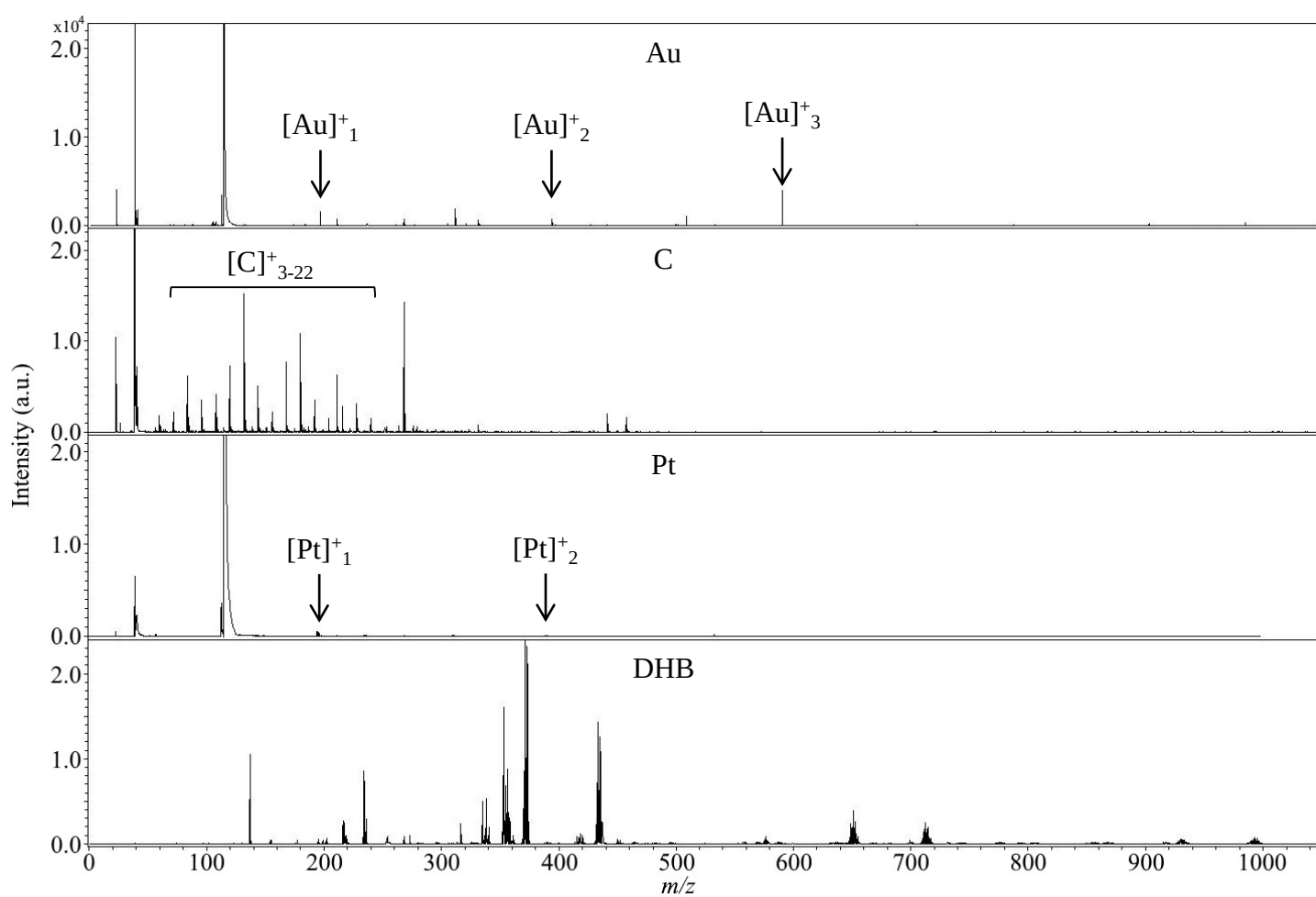


図45. ナノ粒子由来のマスペクトラム.

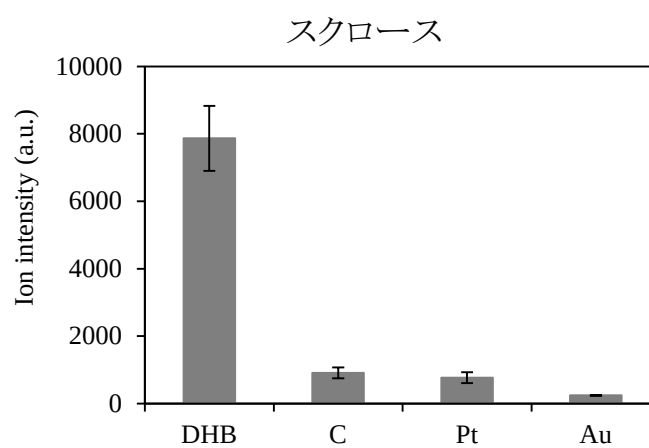
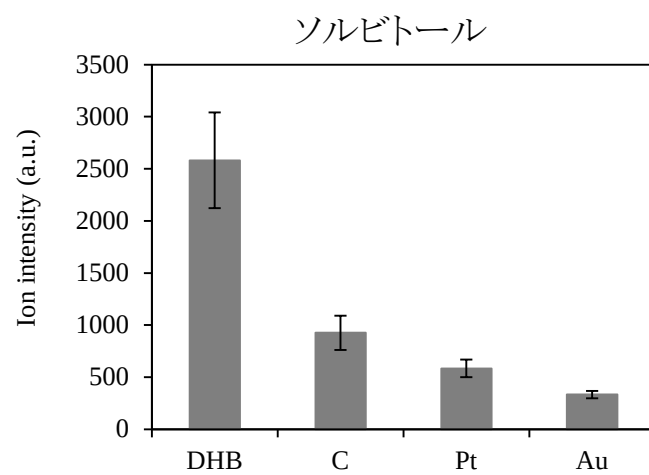
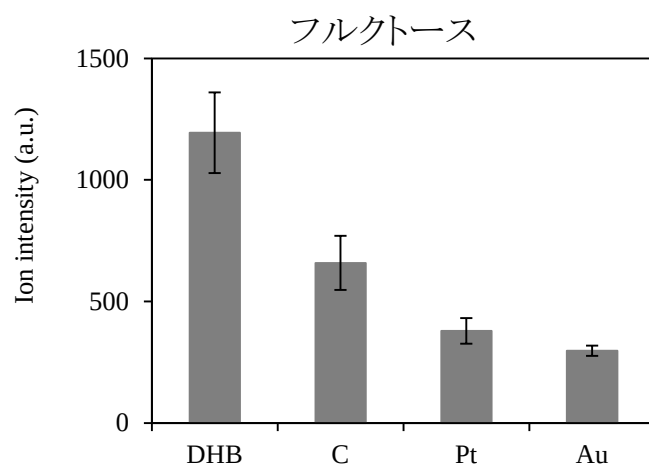


図46. 異なるナノ粒子における可溶性炭水化物のイオン化効率.
平均値 $\pm$ SE ($n = 3$)

クトラムの平均値で比較すると、各可溶性炭水化物のピーク高（イオン化強度）は、DHB > Pt > C > Au の順に高かった（図 47）。

SALDI-TOF MSI で可視化した各可溶性炭水化物の濃度分布を図 48 に示した。Au および C をスパッタリングした切片では、ピークが検出されない領域が多かったのに対し、Pt 処理では組織切片の全領域で目的化合物のピークが検出できており、各可溶性炭水化物の分布は DHB を用いた MALDI-TOF MSI のそれと類似していた。以上の結果より、白金スパッタリング処理による SALDI-TOF MSI は、イオン化強度は MALDI-TOF MSI に及ばないものの、目的化合物が低分子領域にある場合、マトリックスを用いる MALDI-TOF MSI よりも有効な手法となり得る可能性が考えられる。しかし、イオン化強度の観点を重視すれば、マトリックスのフラグメントイオンが邪魔しない限り、現時点で MALDI-TOF MSI は SALDI-TOF MSI よりも優れた実験手法であると言える。

第4節 リンゴ果実の成熟に伴う糖質分布の変化

成熟期における果実では、同化産物の流入および代謝が原因で、可溶性炭水化物の濃度分布は劇的に変化していると考えられる。本節では、果実成熟期にリンゴ果実を経時的に採取し、MALDI-TOF MSI を用いて可溶性炭水化物の濃度分布を比較し、その特徴を明らかにしようとした。

材料および方法

2016 年 10-11 月にかけて、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター余市果樹園で栽培されているリンゴ‘こうとく’果実を経時的に採取した。切片作製およびマトリックス塗布は本章第 3 節に準じて行った。なお、切片作製の条件を事前検討した結果、CMC 包埋なし、かつ切片厚 70 μm が適当であった。また、切削面積が広がったため、ITO スライドガラスは、大型サイズ（75 mm $\times$ 50 mm $\times$ 0.9 mm）を用いた。

質量分析装置および分析条件は、本章第 1 節と同様である。本実験では測定試料の面積が広いため、空間分解能（レーザ照射位置の間隔）は 400 μm とした。

結果および考察

採取日ごとの果実の外観および縦断面を図 49 に示した。採取一回目の 10/7 は果皮が緑

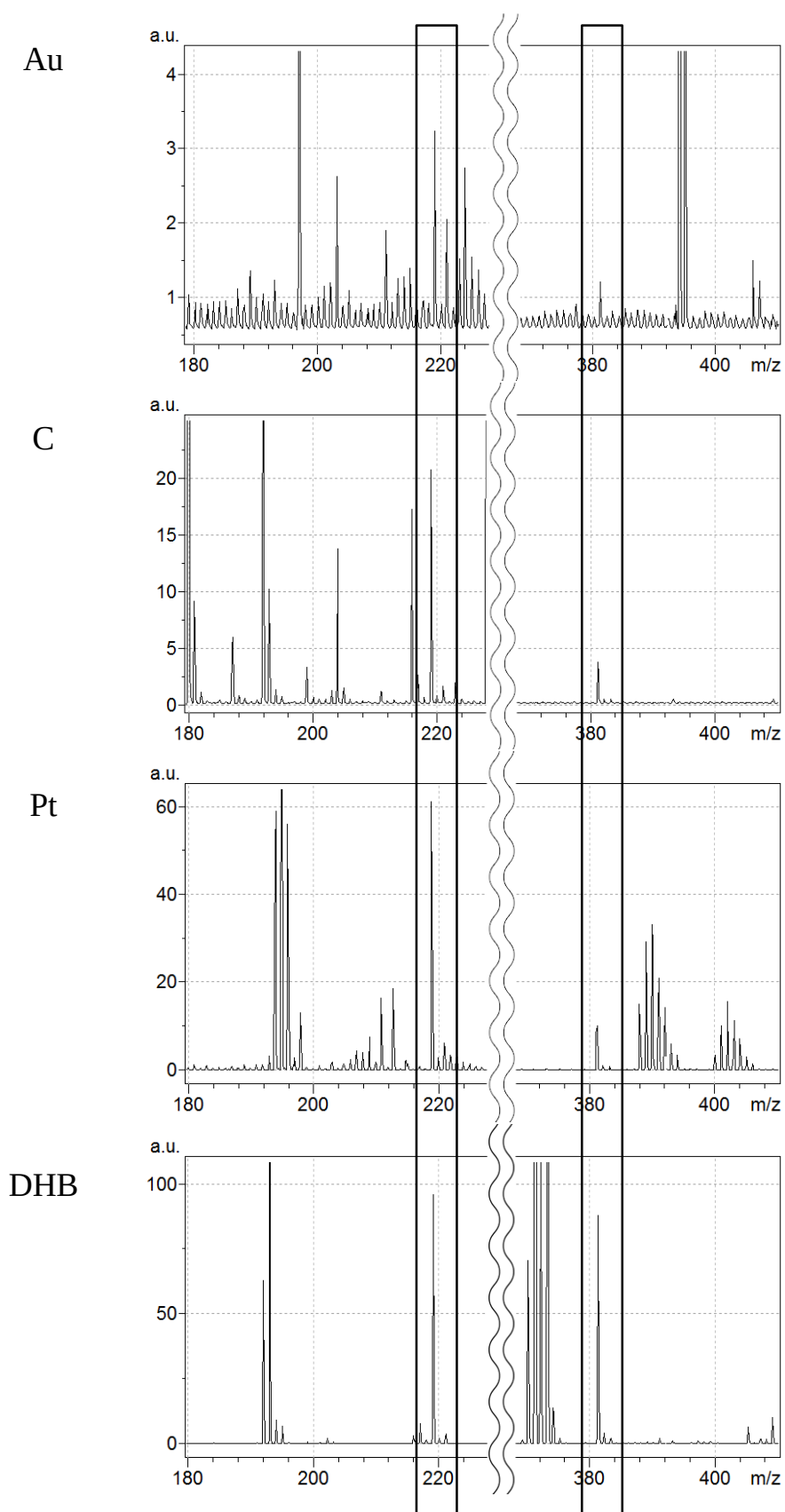


図47. 異なるナノ粒子を用いて測定したリング切片上の平均マススペクトラム。黒枠は可溶性炭水化物由来のピークを示す。

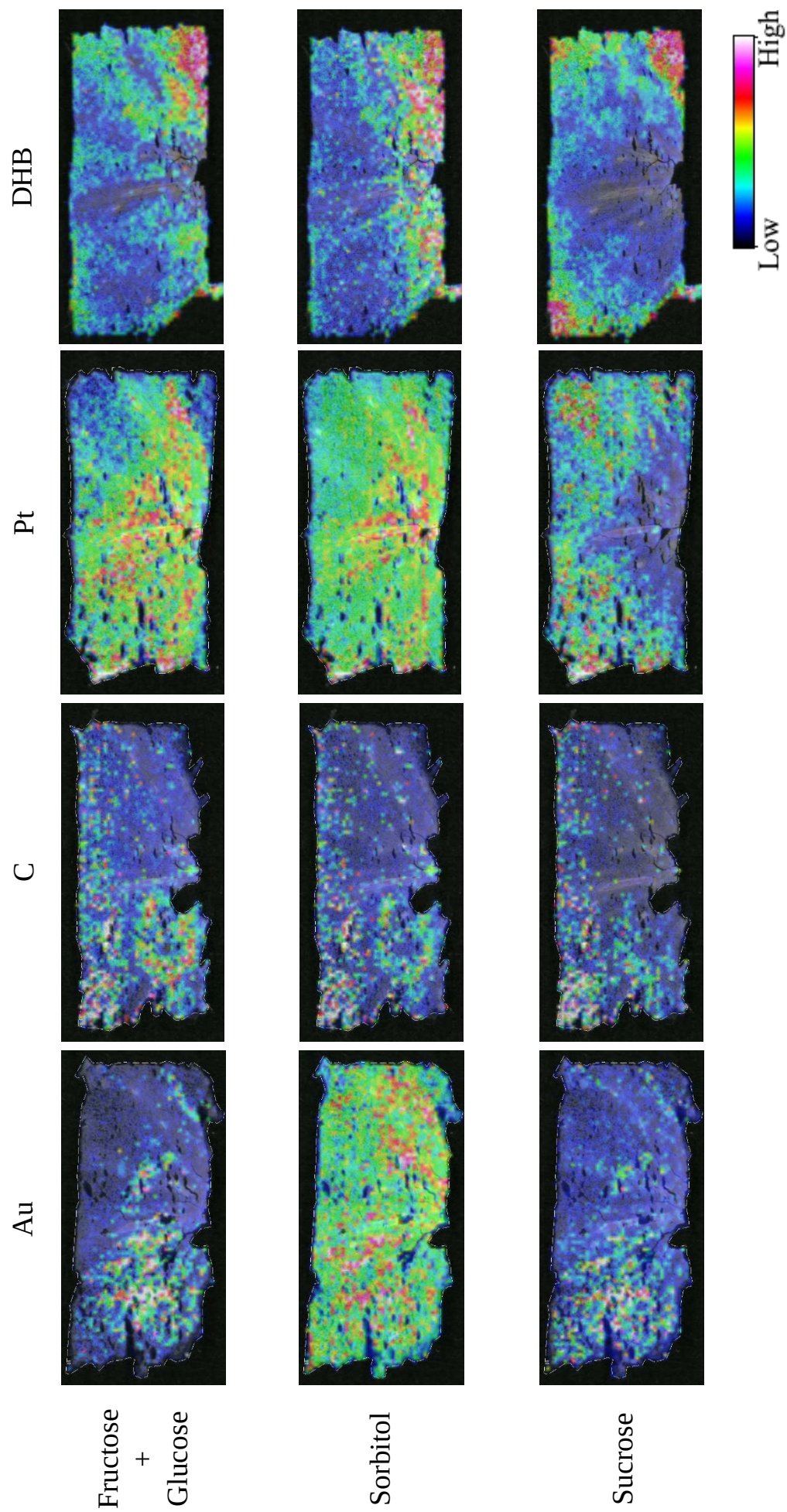


図48. 異なるナノ粒子を用いて測定したリング切片の可溶性炭水化物の濃度分布図.



図49. 収穫日ごとの‘こうとく’果実外観および縦断面.

色でまだ未成熟であった。また、10/28の果実では、果芯部の種子周辺にみつ症の発生が認められ、11/7の収穫適期には、みつ組織の領域が拡大していた。

MALDI-TOF MSI 分析で得られた、採取日ごとの各可溶性炭水化物の分布を図 50 に示した。単糖（フルクトース＋グルコース）は未成熟果では果実全体に均一に存在しているが、成熟が進むにつれ果皮側の濃度が果芯側に比べ低くなっていた。一方、ソルビトールは、未熟果では果心側により多く分布しているが、成熟に伴い果実全体に分布が拡散していた。スクロースについては成熟期間を通して果実全体に分布が見られ、どの時期においても果皮側の濃度が相対的に高い傾向にあった。10/28 および 11/7 における、単糖とスクロースの分布は相反しており、これは成熟に伴うスクロースの合成によって単糖が減少したことが原因と考えられる。また、ソルビトールは果実の収穫適期直前に増加したことが報告されており (Kamijo, 2014), 11/7 の果実で果肉組織全体にソルビトールが分布していたことは、この時期に果実内へソルビトールが流入した可能性を示唆している。

第5節 リンゴのみつ症果発生品種および非発生品種間の MALDI-TOF MSI を用いた果実内糖質分布の比較

本節では、リンゴ果実におけるみつ症果の発生とソルビトール集積との因果関係を明らかにする目的で、果実内のソルビトール濃度分布を MALDI-TOF MSI で可視化し、みつ組織発生部位との関連を明らかにしようとした。

材料および方法

みつ症果発生品種として‘こうとく’および‘レッドゴールド’を、非発生品種として‘王林’を用いた。材料は、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター余市果樹園に栽培されているリンゴ樹から採取した。採取日は以下のとおりである：‘こうとく’，10/28 および 11/7；‘レッドゴールド’，10/14 および 10/21；‘王林’，10/21。MALDI-TOF MSI の方法は、本章第 4 節と同様である。

結果および考察

図 51 に各品種の果実の縦断面および MALDI-TOF MSI に基づくソルビトールの濃度分布を示した。‘こうとく’および‘レッドゴールド’果実の果芯部周辺にみつ組織の発生が

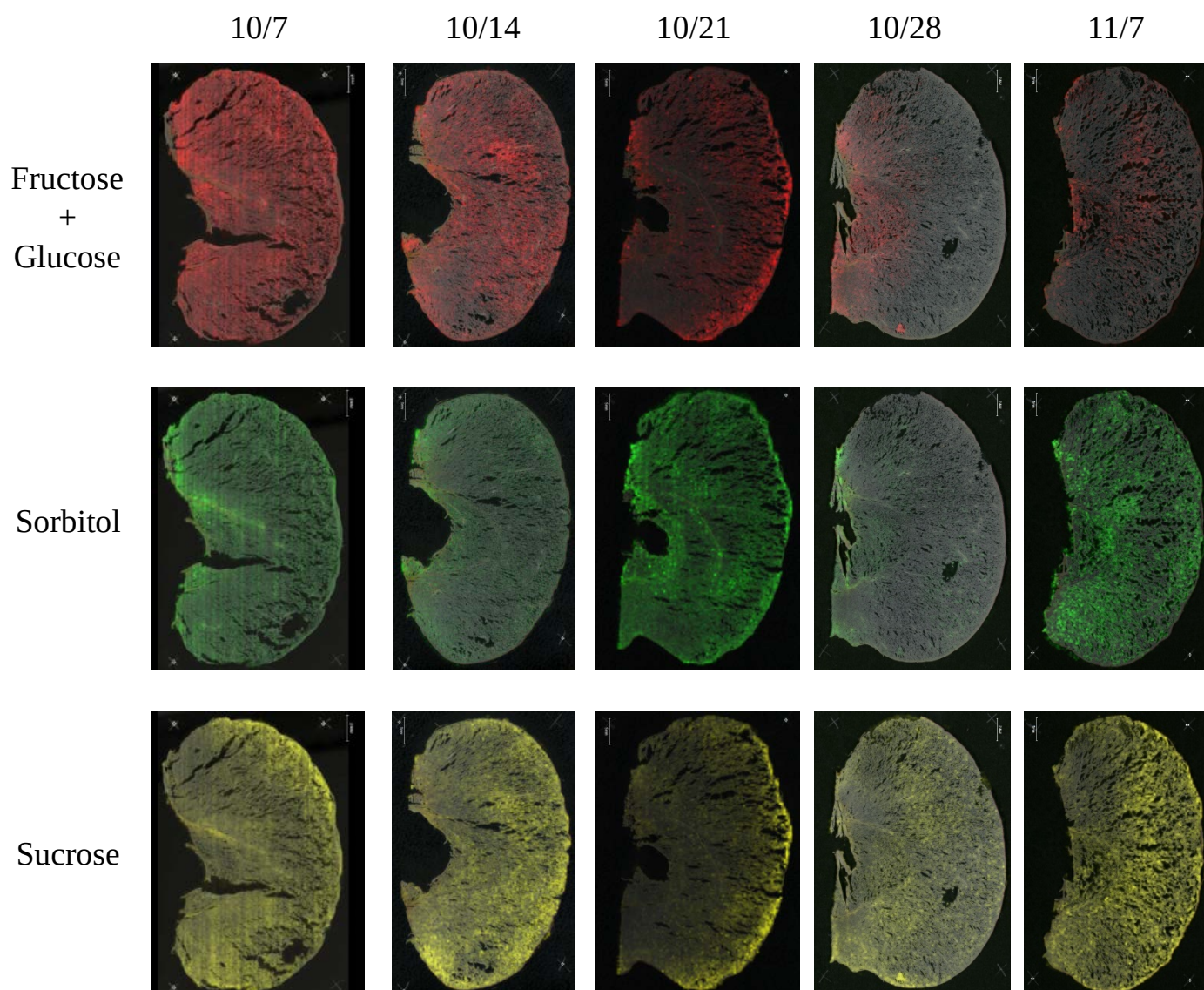


図50. リンゴ果肉組織における採取日ごとの各可溶性炭水化物の濃度分布.

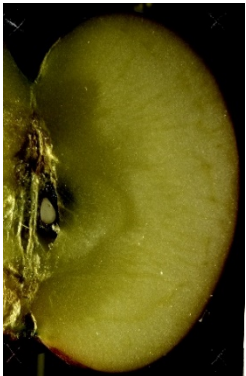
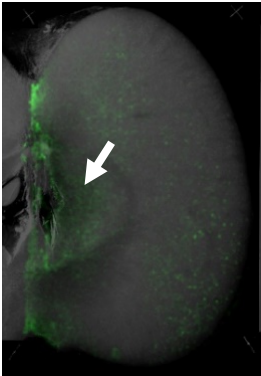
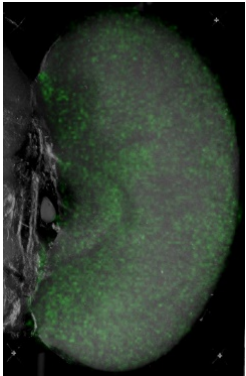
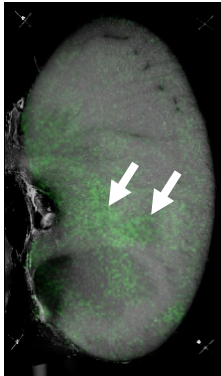
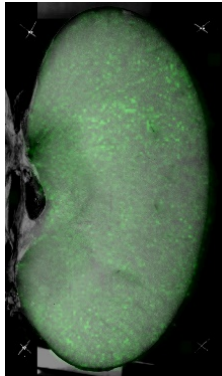
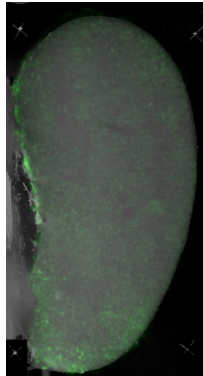
	‘こうとく’		‘レッドゴールド’		‘王林’
	10/28	11/7	10/14	10/21	10/21
果実 縦断面					
ソルビトール 集積部位					

図51. みつ症発生果および非発生果における果実縦断面写真とソルビトール集積部位の対応関係.
矢印はみつ症発生部位のうち、ソルビトールの集積が認められた部分を示す.

確認できたが，‘王林’果肉にみつ組織の発生は認められなかった．10/28 の‘こうとく’および 10/14 の‘レッドゴールド’では，みつ組織のソルビトール濃度が周囲に比べて高い傾向を示した（図中矢印で示した領域）．一方，11/7 の‘こうとく’および 10/21 の‘レッドゴールド’果実で，みつ組織以外の領域にもソルビトールの集積が認められた．従って，みつ症果におけるソルビトールの集積部位は，みつ組織と必ずしも一致しないことが明らかになった．

第6節 第3章の考察

本章では，MALDI-TOF MS の利用拡大を図る上で，先に動物組織を用いて開発・改良が進められてきた MALDI-TOF MSI を植物へ適用することを考え，リンゴ果実を材料として可溶性炭水化物の可視化を試みた．第1章第2節で示したとおり，本研究で分析対象とした4種類の可溶性炭水化物は，いずれも MALDI-TO MS 分析で得られるイオン化強度と濃度に正の相関があることから，切片上の各スポットにおけるイオン化強度の違いは，各可用性炭水化物の濃度差を反映していると考えられる．しかし，本研究で検量線の作成に用いた濃度より高濃度の可溶性炭水化物溶液では，得られるピーク強度が急激に低下した．この時のマトリックスと可溶性炭水化物溶液の混合物のスポット表面を観察すると，ガラス状に硬化している様子で，レーザーを反射していた（図 52）．同様の現象は，本章第2節で用いた切片を，紙やすりで削らずに直接測定した場合にも観察された．このことから，果実のような高濃度の可溶性炭水化物を含む材料を MALDI-TOF MSI で分析する場合には，マトリックスに溶出する炭水化物濃度が適切な範囲に納まるような切片厚を選択することが重要と考えられる．

また，本研究では，マトリックスの候補として DHB および CHCA の2種類を検討した結果，分析対象の可溶性炭水化物とマトリックス由来のフラグメントピークが重複しない DHB が適していることを明らかにした．すなわち，DHB は CHCA に比べ低分子領域のフラグメントが少なく，未知試料を分析する際，最初に選択するマトリックスとして優れている．一方，CHCA は陽イオンと陰イオンモードの両方で利用できるという利点を有することから，分析目的に応じてマトリックスを選択することが望ましい．

MALDI-TOF MSI で得られる濃度分布の确实性を立証するため，切片を切り出した直下の果肉組織を 16 分割して HPLC で糖の定量を行い，MALDI-TOF MSI で得られた画像の輝

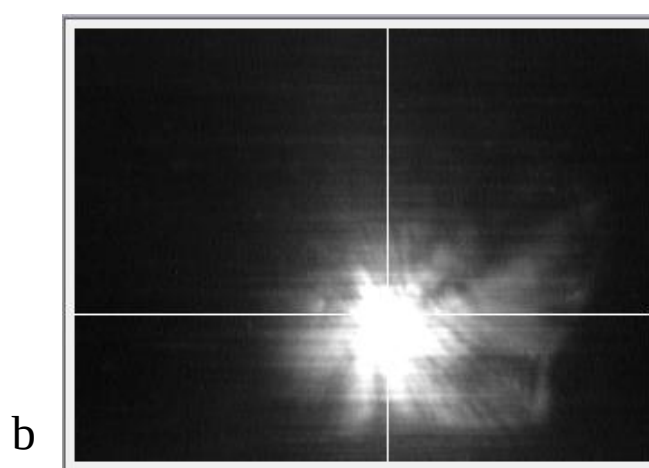
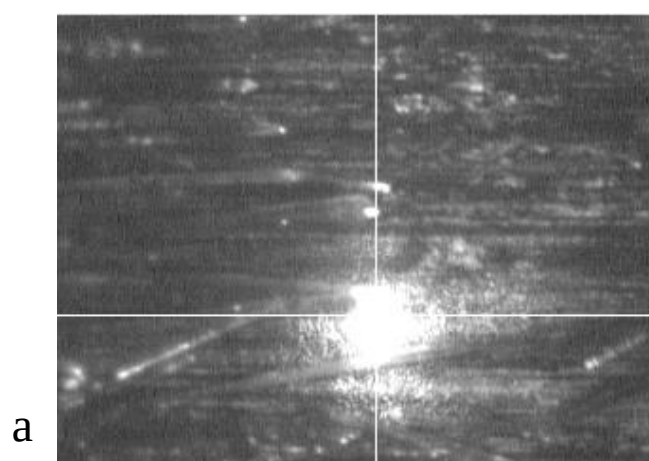


図52. MALDI-TOF MSのレーザー照射の様子. a, DHBのみ; b, DHBと高濃度の糖溶液の混合物.

度を数値化したものと比較した。MALDI-TOF MSI の画像から視覚的に読み取れる各可溶性炭水化物の濃度分布は、HPLC のそれとよく一致していた。また、画像解析で得られた輝度および HPLC の定量値は、分析試料を MSI の解像度と同程度まで細かく分割できない（各ブロックで平均化された値である）ものの、スクロースおよびソルビトールの濃度分布について、両者に正の相関が認められた。従って、MALDI-TOF MSI の画像は、これらの可溶性炭水化物の果肉組織内濃度分布を十分に反映しているものと思われる。他方、単糖のフルクトースおよびグルコースについては、質量数が同じで区別できないことに加え、イオン化強度が大きく異なること（第 1 章第 2 節）、並びに輝度と HPLC の定量値の間に相関が認められなかったことから、MALDI-TOF MSI で得られる濃度分布が、実際の濃度分布とは必ずしも一致しない可能性がある。この点については、更なる検証が必要である。

第 3 節では MALDI-TOF MSI を発展させる可能性を探るため、SALDI-TOF MSI を行い、MALDI-TOF MSI との比較を試みた。その結果、クラスタ由来のバックグラウンドピークが少なく、かつ得られた可溶性炭水化物のピーク強度の平均値が高かった Pt が、スパッタリングの素材として最も適していることが明らかになった。MALDI-TOF MSI では、CHCA フラグメントピークとスクロースのピークが重複してしまった例（本章第 1 節）のように、マトリックスが分析の邪魔をする場合がある。一方、SALDI-TOF MSI は、こうした問題が起きにくいので、低分子量化合物の分布の可視化に力を発揮する可能性が考えられる。

本章第 2 節から第 4 節にかけて、リンゴ果実内における可溶性炭水化物の分布の特徴が明らかとなった。すなわち、転流糖であるソルビトールは流入部の果芯部周辺やそこから伸びる維管束上に多く分布しており、また成熟に伴って果実全体に拡散していた。収穫直前の完熟した果実では十分な量のスクロースが蓄積されてスクロース合成能が低下した結果、基質となるソルビトールの蓄積が起こったのではないかと考えられる。一方、スクロースは維管束周辺、並びに成熟期間を通して果芯側よりも果皮側に高濃度で分布する傾向にあり、この結果は果実内でスクロースの合成能に部位間差があることを示唆している。

第 5 節では、みつ症果発生品種の果実を用いて、みつ組織とソルビトール集積との関係の解明を試みた。‘こうとく’ および ‘レッドゴールド’ のどちらも、収穫適期より 7-10 日前の果実では、みつ組織の一部にソルビトールの集積が認められたのに対し、収穫直前の果実ではソルビトールはみつ組織に拘らず果肉全体から検出されており、みつ症の発生とソルビトールの蓄積に明確な因果関係を見出すことはできなかった。

第4章 総合考察

本研究ではまず、MALDI-TOF MS の園芸作物果実の成分分析への利用の 1 つとして、アントシアニンと可溶性炭水化物を対象に、これらの定量性を検証した。MALDI-TOF MS を用いたアントシアニンの定量法については、mono-glucoside を対象とした先行事例があるが、本研究では先の定量法を発展させる意味で、di-glucoside アントシアニンの定量について検討した。Wang & Sporns (1999) は、4 種類の主要な mono-glucoside のアントシアニンにおいて、濃度とイオン化強度の間に強い正の相関が認められ、また各アントシアニンの相関の傾きは類似しているため、分析対象の標品がない場合においても、他のアントシアニンで作成した検量線を用いて定量が可能であることを報告している。本研究では、Wang *et al.* (1999) が測定した Pg, Cy, Pn および Mv の di-glucoside の標品を用いて濃度とイオン化強度の相関を調べた結果、いずれのアントシアニンにおいてもイオン化強度との間に高い正の相関が認められ、MALDI-TOF MS を用いたアントシアニンの定量法を di-glucoside にも拡張することができた。果実に含まれるアントシアニンは、mono-glucoside あるいは di-glucoside が大半を占めるため、diglucoside の定量が可能になることで、園芸作物果実のアントシアニンをより正確に定量できる。

また、可溶性炭水化物の MALDI-TOF MS を用いた分析については、これまでデンプン加水分解物 (Grant *et al.*, 2003) およびフルクタン (Yuguchi *et al.*, 2013) の MALDI-TOF MS を用いた定量に関して報告されているが、これらは分子量が 500 以上のオリゴ糖を対象としたもので、単糖および二糖の低分子可溶性炭水化物については報告が見当たらない。本研究では、単糖、二糖および糖アルコールについて、濃度とイオン化強度の間に相関があり、直接定量が可能であることを明らかにした。一方、相関が認められた濃度(0.01-1.0 mmol/L)を超えると、イオン化強度が急激に減少することが確認されたことから、高濃度の可溶性炭水化物はマトリックスの正常な結晶化を阻害している可能性があり、MALDI-TOF MS の試料作製に際し、濃度の適切な選択が重要であると考えられる。

ヤマブドウは、北半球の亜寒帯に広く分布し耐寒性に優れることから、北海道で栽培されるブドウの育種に利用されてきた。また、栽培品種が多い欧州ブドウに比べ、アントシアニンを始めとするポリフェノール類が豊富に含まれていることから、近年機能性食品素材としての果実の利用が注目されている。一方、ヤマブドウ果実の主要成分に関する報告は少なく、既存の報告も圃場で栽培されている数個体の調査にとどまっている。先に述べた通り、HPLC を用いた定量に労力を要することが、研究が停滞している一因である可能性も考えられる。本研究でも、HPLC を用いてアントシアニ

ンの定性分析を行ったが、1 検体の分析に凡そ 50 分を要したうえ、複数のピークが重複しており、それらの単離は困難を極めた。一方、MALDI-TOF MS を用いた定量分析では、1 検体の分析は試料調整を含めて 10 分程度で済む上、ほとんどのアントシアニンがその質量電荷比に基づき単一のピークとして検出された。このことから、MALDI-TOF MS は、従来の HPLC ではピークの分離が困難な、類似化合物の一斉分析に非常に有効であると考えられる。本研究では、ヤマブドウ果実の糖含量は HPLC を用いて定量したが、第 1 章で確認できた直接定量を基に、MALDI-TOF MS で内部標準法による定量も可能ではないかと考え、アントシアニン定量分析の際に得られたマススペクトラムから、単糖および二糖に相当するピークと Pg3G とのイオン化強度比と、HPLC を用いた定量結果の相関を調べたが、有意な相関は認められなかった。一方、三糖のラフィノースを内部標準とした場合、単糖および二糖の標品との濃度比とイオン化強度比の間には非常に強い正の相関が認められた(図 53)。従って、内部標準物質は分析対象と類似した構造の化合物を用いることが必須であり、可溶性炭水化物とアントシアニンのそれぞれの内部標準を試料作製の最初の段階で同時に添加することにより、これらの同時定量が可能であるものと考えられる。

MALDI-TOF MSI は、医学・薬学分野において開発が進められてきたため、その分析材料は動物組織が主体であったが、近年、植物組織の脂質、アミノ酸、有機酸、フラボノイド類およびオリゴ糖などの報告事例も増えている(Matros & Mock, 2013)。しかし、植物は動物組織に比べ、水分が多く、器官によって細胞の大きさ、密度、硬さなどが異なり、試料調整や分析に工夫が必要である(Grassl *et al.*, 2011)。先行事例においても、葉、茎、花卉および穀物を材料に用いた報告は多いが、植物組織の中でも特に含水量が多い果実を材料として用いた報告はごくわずかである。動物組織の切片作製では、凍結マイクロームを用いる手法が広く用いられているが、本研究では、先に Franceschi *et al.* (2012) が用いた、スライド式マイクロームを用いて、生のまま切り出す手法を用いた。また、凍結マイクロームを用いる場合は、設定温度を-35℃程度の低温に維持するほか、切削の方向を調整し、包埋剤を用いることにより切片の作製が容易になった。マトリックスの選択においても、複数のマトリックス候補を用意し、目的物質とマトリックスのフラグメントイオンピークが重複しないことを確認することが、特に低分子領域をターゲットとする植物の MALDI-TOF MSI では重要である。適切な有機マトリックスが見つからない場合には、白金スパッタリングによる SALDI-TOF MSI も有効な選択肢になり得るものと考えられる。

第 3 章第 1 節で示したとおり、リンゴ果実における MALDI-TOF MSI で得られた可溶性炭水化物の濃度分布と HPLC で分析した定量値は、同様の傾向を示したことから、MSI 分析の有用性を立証できた。この場合、スクロースおよびソルビトールについては、画像の輝度と HPLC の定量値と

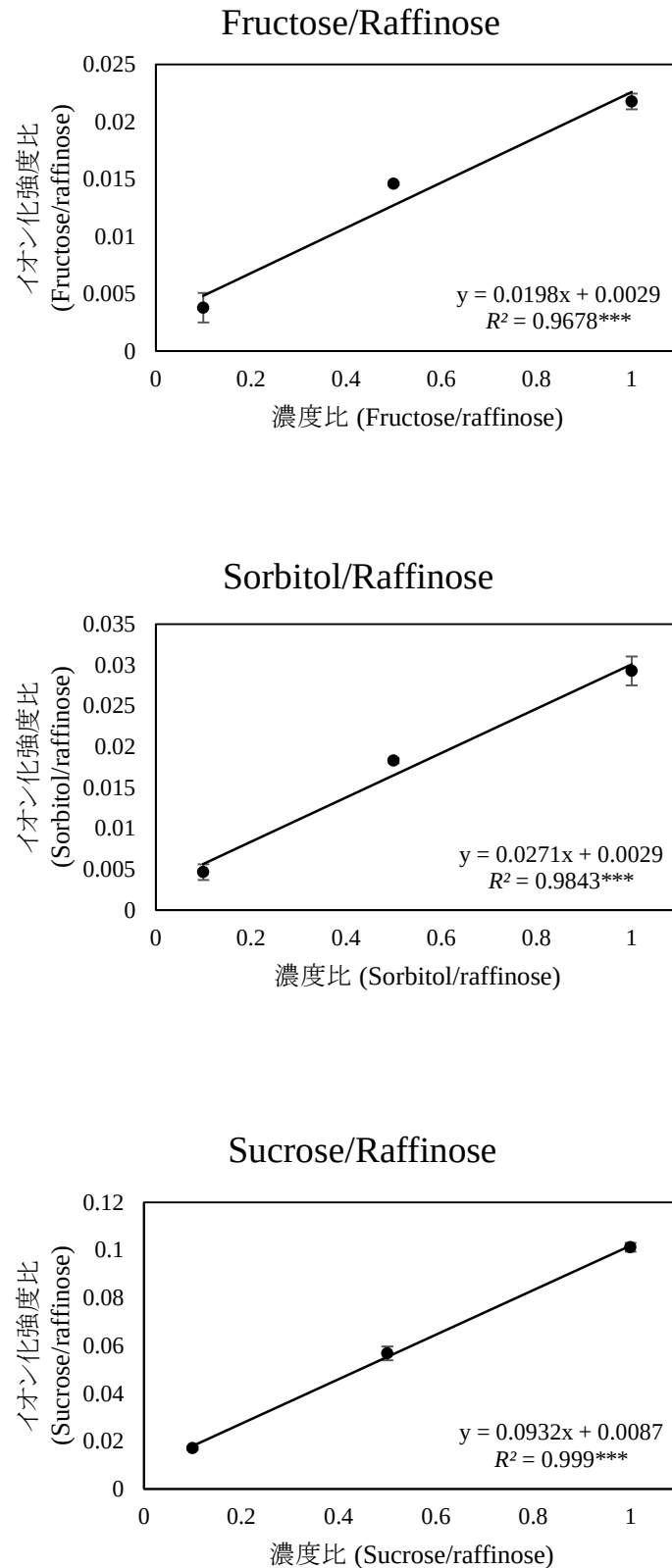


図53. ラフィノースとフルクトース、ソルビトールおよびスクロースの濃度比とイオン化強度比の相関。
 平均値±SE ($n = 4$), *** $P < 0.001$

の間に有意な正の相関が認められたが、単糖については相関が認められなかった。これは、フルクトースのイオン化強度がグルコースの約 6 倍と両者は大きく異なっており、MALDI-TOF MSI ではこれらが単一のピークとなることから、実際の濃度分布を必ずしも反映していないためと考えられる。しかし、分布濃度については正確性を欠くとしても、分布の有無についての情報は得られるものと判断できる。ところで、MALDI-TOF MSI で得られる濃度分布は、測定範囲内で得られた各スポットのイオン化強度の相対値であり、異なる分析の結果を比較することはできない。Källback (2017) は、脳組織を材料とした神経伝達物質の MSI 分析において、切片上に ^{13}C でラベルした標品を内部標準として塗布することで、絶対的な定量化が可能であることを報告しており、今後可溶性炭水化物に対しても検討する価値があると考えられる。しかし、同様の手法を可溶性炭水化物の MALDI-TOF MSI に応用する場合には、先に述べた高濃度の可溶性炭水化物によるマトリックスの結晶化阻害について考慮する必要がある。

植物材料を用いた MALDI-TOF MSI のこれまでの報告は、そのほとんどが測定法の確立に主眼をおいたものであり、得られた化合物の濃度分布を植物生理学の観点から考察した例はごくわずかである。本研究ではリンゴ果肉における可溶性炭水化物を、果実全体のマクロなレベルで分析し、果皮および果芯部の濃度分布のほか、より詳細な解像度で維管束とその周辺部位における組織レベルの濃度分布の特徴も明らかにした。さらに、成熟期間の果実を経時的に測定することで連続的な代謝変化に伴う可溶性炭水化物の動態や、それに伴う生理障害に可溶性炭水化物が与える影響についても解明を試みた。今後、分析対象化合物の範囲を広げることで、MALDI-TOF MSI を用いた網羅的な代謝系の動態評価が可能になるであろう。

MALDI-TOF MS は、1987 年にその原理が報告されて以降、この 30 年で劇的な発展を遂げてきた。当初は数百程度であった分解能は、現在小数点以下まで向上しており、分析試料は抽出物のみから組織切片の直接分析も可能になった。本研究で得られた知見が、今後さらに発展するであろう MALDI-TOF MS 分析技術発展の礎となり、園芸学の進展に貢献することを願う。

摘要

MALDI-TOF MS を用いたアントシアニンおよび可溶性炭水化物分析の定量性を立証した。MALDI-TOF MSI 法を用いてリンゴ果実中の可溶性炭水化物の濃度分布を可視化できることを示し、成熟期間における可溶性炭水化物の分布の変化およびみつ症の発生との関連について調査した。また、ヤマブドウ果実のアントシアニン含量を MALDI-TOF MS を用いて定量しその有効性を実証するとともに、ヤマブドウ果実の主要成分の年次変動や地理的分布、主要成分と抗酸化活性の関連について調査した。

1. MALDI-TOF MS を用いた成分定量法の確立

- (1) Pg3G と Cy3G の濃度比を変えた混合標品を MALDI-TOF MS で測定した結果、濃度比とイオン化強度比の間には高い正の相関が認められた。Cy3G5G, Pn3G5G および Mv3G5G についても同様であったことから、得られた近似直線を用いて、Pg3G を内部標準としたアントシアニン定量が可能であることが示された。
- (2) 4 種類の可溶性炭水化物(フルクトース, グルコース, ソルビトール, スクロース)の標品を濃度別に MALDI-TOF MS で測定した結果、いずれも可溶性炭水化物においても濃度とイオン化強度の間には高い正の相関が認められ、これらの直接定量が可能であることが示された。

2. MALDI-TOF MS を用いたヤマブドウ果実のアントシアニン定量分析と、その他主要成分および抗酸化能との関連

- (1) HPLC および ESI-FT ICR MS を用いたアントシアニン定性分析の結果、ヤマブドウ果実には、5 種のアントシアニジンを基本骨格とする 21 種のアントシアニンが含まれていると推定された。このうち 17 種は、 m/z が異なっていたため、MALDI-TOF MS で一斉検出が可能だった。
- (2) HPLC によるアントシアニン分析では、1 検体あたりの分析時間に約 50 分を要し、また、一部のアントシアニンはピークが重複し定量が困難と推測された。一方、MALDI-TOF MS を用いた定量分析では、試料調製を含めた 1 検体あたりの分析時間は約 10 分と HPLC に比べ短く、また、ほぼ全てのアントシアニンは m/z に基づいて単一のピークとして検出され、分析時間および分離の観点から、HPLC を用いた定量分析に比べ優れていた。

- (3) 北海道に自生する 42 個体のヤマブドウ果実を 2 カ年にわたって収集し, 1 果重および主要成分について調査した結果, 1 果重, 総糖含量および総有機酸含量は年時間変動が小さかった. 一方, 総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量は年次間変動が大きかった. また, 2 カ年とも総糖含量と総有機酸含量は有意な負の相関を示した.
- (4) 各形質の地理的分布を調査した結果, 1 果重は道南地域, 総糖含量は道央地域, 総有機酸含量は道北地域の個体が他地域に比べて高い傾向にあった. このうち, 1 果重および総糖含量の差異は, 成熟期間の積算気温の多少に起因するものと考えられる.
- (5) ヤマブドウ果実は, 他の北方系小果樹と比較して, OH ラジカル捕捉活性値が非常に高かった. また, 果皮および果肉の DPPH ラジカル捕捉活性値および ROO ラジカル捕捉活性値は, ヨーロッパブドウに比べて高く, 機能性食品素材としての利用が期待される.

3. MALDI-TOF MS imaging (MALDI-TOF MSI) 法を用いたリンゴ果実中の可溶性炭水化物分布の可視化

- (1) リンゴ果実の横断切片を分析試料とした MALDI-TOF MSI 分析の結果, 4 種類の可溶性炭水化物に相当するピークが検出された. 各可溶性炭水化物のイオン化強度から算出した濃度分布の傾向は, HPLC のそれと一致していたため, MALDI-TOF MSI 法を用いたリンゴ果実中の可溶性炭水化物の分布可視化は可能であると判断された.
- (2) MSI 分析の結果, ソルビトールは果芯部側に, スクロースは果皮側に多く分布する傾向にあり, またこれらは維管束およびその周辺領域に多く分布していることが明らかとなった. なお, 単糖(フルクトース, グルコース)は特徴的な濃度分布は示さず, 切片に一様に分布していた.
- (3) 白金スパッタリングによる SALDI-TOF MSI 法を用いた MSI 分析の結果, リンゴ果肉切片の可溶性炭水化物を検出することができた. この場合, マトリックス由来のフラグメントピークが検出されないため, 低分子領域のスペクトル検出に有効な手法であった.
- (4) 成熟期別の MSI 分析の結果, ソルビトールは未熟果では果芯側に多く分布し, 成熟に伴い果実全体に拡散していた. スクロースは成熟期間をとおして果皮側の濃度が高い傾向にあった.
- (5) ‘こうとく’および‘レッドゴールド’のみつ発生果では, 収穫適期より 7-10 日前の果実でみつ組織の一部にソルビトールの集積が認められたが, 収穫直前の果実ではソルビトールの分布はみつ組織と必ずしも一致しなかった.

謝辞

本研究の遂行および本論文の執筆に際し、多大なるご指導、ご鞭撻およびご校閲の労を賜りました、北海道大学大学院農学院准教授 鈴木 卓 博士に心より御礼申し上げます。また、本研究の遂行ならびに論文執筆にあたりご指導を賜りました、同教授 近藤則夫 博士、同教授 松浦英幸 博士、同講師 実山 豊 博士、同講師 志村華子 博士に、衷心より感謝申し上げます。

北海道大学大学院医学研究院特任助教 早坂孝宏 博士には、MSI 分析について貴重なご指導、ご助言を賜りました。北海道教育大学函館校前教授 鶴飼光子 博士には、ESR スピントラップ法を用いたラジカル補足活性測定の手法について丁寧なご指導を賜りました。深く感謝申し上げます。

北海道大学大学院農学研究院 GC-MS & NMR 測定室 高田祐輔 氏ならびに北海道大学北方生物圏フィールド科学センター 中野英樹 氏には、実験の遂行にあたり多くのご助言、ご協力をいただきました。また、本研究の遂行に関する事務処理にご協力頂いた石山佐知子 氏、北海道大学アイソトープ総合センターの職員の皆様、実験の遂行にご協力いただいた園芸学研究室の長田亜梨沙 氏をはじめとする学生諸氏に、心より感謝いたします。

最後に、研究生活を支えてくれた家族と友人に、心より感謝いたします。

参考文献

- Azuma, A., Yakushiji, H., Koshita, Y., & Kobayashi, S. (2012). Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta*, 236(4), 1067–1080. <http://doi.org/10.1007/s00425-012-1650-x>
- Choi, J. Y., Lee, S. J., Lee, S. J., Park, S., Lee, J. H., Shim, J.-H., El-Aty, A. M. A., Jin, J. S., Jeong E. D., Lee, W. S., & Shin, S. C. (2010). Analysis and tentative structure elucidation of new anthocyanins in fruit peel of *Vitis coignetiae* Pulliat (meoru) using LC-MS/MS: Contribution to the overall antioxidant activity. *Journal of Separation Science*, 33(9), 1192–1197. <http://doi.org/10.1002/jssc.200900748>
- De Rosso, M., Tonidandel, L., Larcher, R., Nicolini, G., Ruggeri, V., Dalla Vedova, A., De Marchi, F., Gardiman, M., & Flamini, R. (2012). Study of anthocyanic profiles of twenty-one hybrid grape varieties by liquid chromatography and precursor-ion mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 732, 120–129. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.045>
- Falchi, M., Bertelli, A., Lo Scalzo, R., Morassut, M., Morelli, R., Das, S., Cui, J., & Das, D. K. (2006). Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6613–6622. <http://doi.org/10.1021/jf061048k>
- Franceschi, P., Dong, Y., Strupat, K., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2012). Combining intensity correlation analysis and MALDI imaging to study the distribution of flavonols and dihydrochalcones in Golden Delicious apples. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1123–1133. <http://doi.org/10.1093/jxb/err327>
- Fuleki, T., Pelayo, E., & Palabay, R. B. (1994). Sugar Composition of Varietal Juices Produced from Fresh and Stored Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(6), 1266–1275. <http://doi.org/10.1021/jf00042a003>

- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581–4589.
<http://doi.org/10.1021/jf000404a>
- Grant, G. A., Frison, S. L., Yeung, J., Vasanthan, T., & Sporns, P. (2003). Comparison of MALDI-TOF mass spectrometric to enzyme colorimetric quantification of glucose from enzyme-hydrolyzed starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6137–6144.
<http://doi.org/10.1021/jf034118l>
- Grassl, J., Taylor, N. L., & Millar, A. H. (2011). Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging. *Plant Methods*, 7(1), 21-31. <http://doi.org/10.1186/1746-4811-7-21>
- Harker, F. R., Watkins, C. B., Miller, M. J., Reid, S., Jackson, P. J., Bielecki, R. L., & Bartley, T. (1999). Maturity and regional influences on watercore development and its postharvest disappearance in “Fuji” apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(2), 166–172. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033066169&partnerID=40&md5=018dfb0cf9870c9f586d022b68ed1692>
- Horiuchi, S. (1996). 日本ブドウ学. (S. Nakagawa, Ed.). 養賢堂.
- Källback, P. (2017). *Development and Application of Software Tools for Mass Spectrometry Imaging*. Retrieved from <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-328016>
- Kameya, H., & Ukai, M. (2012). Hydroxyl Radical Scavenging Ability of Instant Coffee Evaluated by ESR Spin Trapping. *Journal of Cookery Science of Japan*, 45(1), 33–36.
<https://doi.org/10.11402/cookeryscience.45.33>
- Kamijo, K. (2014). *In vitro*におけるリンゴ組織のソルビトール代謝に及ぼす成長調節物質の影響.

北海道大学大学院農学院 生物資源科学専攻平成25年度修士論文.

Kanayama, Y. (1998). Molecular biology of sugar metabolism and its regulation in fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67(6), 1203–1208.
<https://doi.org/10.2503/jjshs.67.1203>

Kawasaki, H., Ozawa, T., Hisatomi, H., & Arakawa, R. (2012). Platinum vapor deposition surface-assisted laser desorption / ionization for imaging mass spectrometry of small molecules, (March), 1849–1858. <http://doi.org/10.1002/rcm.6301>

Kayashima, T., & Katayama, T. (2002). Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1573(1), 1–3.
[http://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00338-0](http://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00338-0)

Kuwayama, K. (2015). ハスカップ野生個体群における果実の形質および抗酸化能の多様性と栽培化に伴う変化. 北海道大学大学院農学院 生物資源科学専攻平成26年度修士論文.

Loescher, W. H., Marlow, G. C., & Kennedy, R. A. (1982). Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiology*, 70(2), 335–339.
<http://doi.org/10.1104/pp.70.2.335>

Marlow, G. C., & Loescher, W. H. (1984). Horticultural Reviews. In J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews* (Vol. 6, pp. 189–251). The AVI Publishing Company, Inc.
<http://doi.org/10.1002/9781118060797>

Matros, A., & Mock, H. P. (2013). Mass spectrometry based imaging techniques for spatially resolved analysis of molecules. *Frontiers in Plant Science*, 4(89),
<http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00089>

Morelli, R., Russo-Volpe, S., Bruno, N., & Lo Scalzo, R. (2003). Fenton-Dependent Damage to

Carbohydrates: Free Radical Scavenging Activity of Some Simple Sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7418–7425. <http://doi.org/10.1021/jf030172q>

Oh, Y. S., Lee, J. H., Yoon, S. H., Oh, C. H., Choi, D. S., Choe, E., & Jung M. Y. (2008). Characterization and Quantification of Anthocyanins in Grape Juices Obtained from the Grapes Cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. *Journal of Food Science* 73 (5) 378-389. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00756.x>

Okamoto, G., Goto, S., & Ueki, K. (2008). ヤマブドウ研究-樹及び果実の特性-. 岡山大学農学部学術報告, 97, 69–81.

Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I., & Mochioka, R. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 622–625. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.003>

Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J. L., Martínez Gascueña, J., & García Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 687–693. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.003>

Sasaki, Y. (2001). リンゴみつ症果の発生動態並びにみつ症の組織・細胞学的特性の解明. 北海道大学大学院農学院 生物資源科学専攻平成12年度修士論文.

Scalzo, R. Lo Morassut, M., & Rapisarda, P. (2012). Oxygen radical scavenging capacity of phenolic and non-phenolic compounds in red and white wines. *Central European Journal of Biology*, 7(1), 146–158. <http://doi.org/10.2478/s11535-011-0095-8>

- Sporns, P., & Wang, J. (1998). Exploring new frontiers in food analysis using MALDI-MS. *Food Research International*, 31(3), 181–189. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00076-3](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00076-3)
- Suda, I. (2000). Determination of DPPH radical scavenging activity by spectrophotometry. In Shinohara, K., Suzuki, T., & Kaminogawa, S., (Eds.). *The methods of food functions analysis* Tokyo: Korin [in Japanese]. 218-220.
- Suzuki, T., Maeda, T., Grant, S., Grant, G., & Sporns, P. (2013). Confirmation of fructans biosynthesized in vitro from [1-13C]glucose in asparagus tissues using MALDI-TOF MS and ESI-MS. *Journal of Plant Physiology*, 170(8), 715–722. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.12.005>
- Suzuki, T., Sasaki, Y., Kuroda, K., & Oosawa, K. (2003). Histological features and dynamics of the development of water core in apple (*Malus domestica*) fruit. *Acta Horticulturae*, 628, 495–500. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.628.61>
- Takayama, M., Hayakawa, S., Takinami, Y., & Wada, Y. (Eds.). (2013). 現代質量分析学. 化学同人.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., & Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8), 151–153. <http://doi.org/10.1002/rcm.1290020802>
- Tanaka, N. (2012). 北海道のキイチゴ属野生種および栽培種を用いた果実機能性成分および抗酸化能の評価ならびに種間雑種作出の試み. 北海道大学大学院農学院 生物資源科学専攻平成23年度修士論文.

- Ukai, M., Kawamura, S., Kishida, K., & Kameya, H. (2013). ESR スピントラップ法による緑茶のスーパーオキシドラジカル捕捉活性計測方法 Superoxide Radical Scavenging Ability of Green Tea Measured. *Journal of Cookery Science of Japan*, 46(1), 45–49.
<https://doi.org/10.11402/cookeryscience.46.45>
- Wang, J., & Sporns, P. (1999). Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2009–2015.
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf981008j>
- Wang, J., Kalt, W. & Sporns, P. (2000). Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis of anthocyanins in highbush blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3330-3335. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf000101g>
- Watanabe, J., Oki, T., Takebayashi, J., Yamasaki, K., Takano-Ishikawa, Y., Hino, A., & Yasui, A. (2012). Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Analytical Sciences* 28 (2) 159-165.
<https://doi.org/10.2116/analsci.28.159>
- Yokota, R. (2011). 北海道に自生するスノキ属植物の栽培化と利用に関する基礎的研究. 北海道大学大学院農学院 生物資源科学専攻平成22年度修士論文.
- Yuguchi, Y., Hashimoto, K., Yamamoto, K., Suzuki, S., & Kitamura, S. (2013). Extension of Branched Chain of Amylopectin by Enzymatic Reaction and its Structural Characterization. *Journal of Applied Glycoscience*, 60, 131–135. <http://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2012>
- Zhang, H., Cha, S., & Yeung, E. S. (2007). Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization MS and MSⁿ of small molecules. 2. Direct profiling and MS imaging of small metabolites from fruits. *Analytical Chemistry*, 79(17), 6575–6584. <http://doi.org/10.1021/ac0706170>