

氏名・本籍	山本 涼平 (滋賀県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第24号
学位授与の日付	平成27年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	レモン (Citrus limon) 特有のフラボノイドに関する研究 —成分分析・分子特性・機能性に基づく有用性の評価—
学位論文審査委員	主査 教授 武藤 徳男 副査 教授 田井 章博 准教授 野下 俊朗 准教授 斉藤 靖和

## 学位論文の要旨

第1章では、本研究の背景ならびに目的についてまとめた。カンキツ類は古くから「陳皮」、「橙皮」、「枳実」などの漢方生薬として広く利用されてきたが、近年ではさらに果実中のポリフェノールをはじめとする生理活性物質の機能が注目されている。カンキツ類の中でもレモンは、これまで果汁の利用が主となり、全果を含めた多様な利活用やその健康効果の科学的検証は十分には行われていなかった。そこで、本研究ではレモンの有するフラボノイドの詳細かつ包括的な分析及び機能性や安全性に関する科学的評価を行うことによって、レモンの有するフラボノイド特性を明らかにし、そのフラボノイドの有効活用をめざすことを目的とした。

第2章では、レモンに含まれるフラボノイド、アスコルビン酸(ビタミンC)、クエン酸及びリモノイドの部位別の含有量を分析し、レモンに特徴的なフラボノイドであるエリオシトリン(ERI)の化学的特性を明らかにするとともにその精製法を新たに確立した。レモンに含まれるフラボノイドはERIとヘスペリジン(HSP)の2つが主成分であり、これは他のカンキツ類には見られない特徴であった。これらのフラボノイドは果皮、特にアルベド中に圧倒的に多く、ビタミンCも果皮部に多いことから、レモン果皮の有効活用の可能性を示した。さらにレモンの主たるフラボノイド成分であるERIを従来法より効率的に、かつ高純度で分離する方法を新たに確立し、非常に高い水溶性などの化学的特性を明らかにすることでERIの新たな利用可能性を示した。

第3章では、レモンの新規機能性成分であるエリオジクチオール7-O-グルコシド(EDC-G)を効率よくERIから生成する方法を確立した。酸加水分解では中間生成物の制御が困難であり、生成効率が非常に低かった。そこで、 $\beta$ -グルコシダーゼ酵素を用いてERIの加水分解を試み、

ヘスペリジナーゼやナリンギナーゼを用いて非常に高い効率で EDC-G を生成させることができた。さらに精製した EDC-G は ERI やエリオジクチオール (EDC) よりも高い  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示した。新たに確立した酵素法による EDC-G の生成法は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性に着目したレモンの機能性食品開発に向けて、コスト面からも工業的に有用な方法と考えられる。

第 4 章では、レモンフラボノイドの機能性と安全性を細胞培養実験及び動物実験により評価し、生物学的有用性を明らかにした。DPPH ラジカル消去活性試験や  $\beta$ -カロテン褪色法のいずれの試験法においても、ERI、EDC-G、EDC は C7 位に結合する糖の有無に関わらず、いずれも強い抗酸化活性を示した。また B 環に 2 つの水酸基を有するカテコール構造が活性に寄与することを明らかにし、レモンの強い抗酸化活性の根拠を明らかにした。一方、ラット小腸上皮細胞 (IEC-6) を用いた *in vitro* 細胞障害試験では、過酸化水素やドキシソルビシンによる酸化障害に対して EDC は細胞保護作用を示し、これらは細胞内への吸収量とよく相関した。さらに、レモンフラボノイドの障害性は他のフラボノイドより非常に低かった。ラットを用いた体内動態の解析では、レモンフラボノイドの胃内投与後の血中濃度は投与後 30 分に最大となり、ERI で  $0.187 \mu\text{M}$ 、ERD で  $2.53 \mu\text{M}$  であった。このことから水溶性の高い ERI の消化管からの吸収率は低く、アグリコンへの変化に伴って吸収量は増加することが示唆された。

第 5 章では、カンキツ類の有するフラバノン配糖体に注目した品種プロファイリングを行うことでレモン及び新たな開発品種の特徴付けが可能であることを示した。カンキツ類に含まれるフラボノイドは、ルチノシドとネオヘスペリドシドという 2 種類のフラバノン配糖体として分類することができ、これに基づいて新品種イエローベルはナツミカンの成分的特徴を有していることを明らかにした。さらにレモンの成熟過程においてフラバノン配糖体やビタミン C、またクエン酸の含有量が著しく変化することを見出し、青レモンの新たな活用方法についても示した。このプロファイリング法は特定成分の有効利用や新品種の育種への応用に役立てることができると考えられる。

第 6 章では、本研究の総括を行った。本研究では、レモンの成分分析、特にフラボノイドの詳細な分析を行い、レモン特有の ERI を従来法より簡便に分離する方法を確立し、その ERI から機能性成分である EDC-G を効率的に生成する酵素処理法を新たに確立し、レモンの工業的利用への道を拓いた。さらに、これらレモンフラボノイドが他のカンキツ由来フラボノイドと比べて強い抗酸化活性を有し、酸化ストレスに対して細胞保護的に機能すること、生体内動態については吸収、分布、代謝、排泄の面から安全性が高いと推察されることを明らかにした。本研究はレモン特有のフラボノイドの有用性を科学的に検証し、レモン果皮を含めた全果の食品としての多面的な利活用に向けた可能性を示すものである。

## 審査の結果の要旨

本研究は、レモンに特有のフラボノイドに焦点をあて、包括的な成分分析及び機能性や安全性に関する科学的評価を行うことによって、レモンの有するフラボノイドの特性を明らかにし、レモン全果及びそのフラボノイドの有効活用をめざすことを目的とした。

本論文は6章から構成される。第1章は緒論で、本研究の背景とこれまでの知見を要約し、レモン特有のフラボノイドに関する科学的評価を行う意義を述べた。第2章では、レモンに含まれるフラボノイド、アスコルビン酸（ビタミンC）、クエン酸及びリモノイドの部位別の含有量を詳細に分析し、レモンに特徴的なフラボノイドであるエリオシトリン（ERI）の化学的特性を明らかにするとともにその効率的な精製法を確立した。第3章では、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質としてレモンから新たに見出された機能性成分であるエリオジクチオール 7-O-グルコシド（EDC-G）を効率よく ERI から生成する方法を確立した。酵素法による EDC-G の生成は、レモンの機能性食品開発に向けて、工業的な応用を可能にする有用な方法であることを示した。第4章では、レモンの主要なフラボノイドである ERI 及び関連する EDC-G やアグリコンのエリオジクチオールの機能性（抗酸化活性）と安全性を細胞培養実験及び動物実験により評価し、他のカンキツフラボノイド類と比較した。そしてこれら3種のレモンフラボノイドの生物学的有用性が高いことを明らかにした。第5章では、カンキツ類の有するフラバノン配糖体についてルチノシドとネオヘスペリドシドに注目した品種プロファイリングを行うことで、カンキツ類及び新たなレモン開発品種の特徴付けが可能であることを示した。このプロファイリング法は特定成分の有効利用や新品种の育種への応用にも役立てることができることを示した。第6章は総括である。

本研究は、レモン特有のフラボノイドである ERI 及び ERI から産生される2つのフラボノイドの有用性を科学的に検証し、果皮を含めたレモン全果の食品としての多面的な有効活用の可能性を示すものである。これらの成果は、広島県をはじめとする国内生産地における国産レモンの生産や加工そしてその利活用に大きく寄与するものと評価される。よって、本論文は博士（生命システム科学）の学位に値するものと認められる。