

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	井上 剛史
論文題目	Hesperidin Accumulation during Fruit and Leaf Development in Satsuma Mandarin (<i>Citrus unshiu</i>) (ウンシュウミカンの果実及び葉の発達時におけるヘスペリジンの集積)		
(論文内容の要旨)			
ウンシュウミカンは日本で最も生産及び消費されているカンキツ類果樹であり、諸外国ではSatsuma mandarinとして知られている種である。ウンシュウミカンはその果実や葉にヘスペリジンというフラボノイドの一種を非常に高濃度で蓄積することが知られている。ヘスペリジンは、その様々な生理作用が注目されている成分で、医薬分野をはじめ食品・飲料業界における利用を目指した研究が盛んに行われている。また、植物体内では病原菌や紫外線耐性に関与することが報告されてきた。その一方で、ヘスペリジンがウンシュウミカン植物中でどのように蓄積するのかについては未だ明らかになっていない点が多い。そこで、本研究ではウンシュウミカンに集積するヘスペリジンについて、効率的な抽出及び単離法の開発、及び植物組織内での分布と集積様態の解明を目的として実験を行った。			
1. マイクロ波支援抽出によるウンシュウミカン摘果果実の果皮からのヘスペリジンの単離			
未利用のカンキツ類バイオマスの有効利用の一環として、摘果果皮中に含まれるヘスペリジンの効率的な抽出・単離法の開発を行った。70%含水エタノールを溶媒として摘果果皮粉碎試料からのマイクロ波加熱によるヘスペリジンの抽出を試みたところ、得られたヘスペリジン量 (58.6 mg/g FW) は、植物試料中のフラボノイド類の定量時に一般的に用いられるDMSO/MeOH (1:1, v/v) 溶媒を用いた抽出による収量に匹敵する高い値を示した。また、摘果された未成熟果実の果皮生重量1 g当たりのヘスペリジン量は成熟果皮に比べて約3.2倍多かった。次に応答曲面法を用いて、マイクロ波照射による加熱温度及び加熱時間を変化させた場合、ヘスペリジンを最も良く単離できる条件を検討した。その結果、140℃、8 minでのマイクロ波支援抽出に続いて、5℃で24時間静置することで抽出量の86.8% (47.7 mg/g FW) のヘスペリジンを効率良く析出させることに成功した。			
2. 果皮におけるヘスペリジン結晶の検出及び同定			
ウンシュウミカン果皮切片を染色し、光学顕微鏡で観察した結果、無数の結晶を確認した。結晶は、成熟果皮に比べて未成熟果皮の内果皮により多く観察され、特に内果皮の上層や維管束周辺、また表皮下組織にも分布していた。走査型電子顕微鏡による結晶の形態観察では、果皮組織内において針状結晶が凝集し、それらが球状体のクラスターを形成していることが分かった。結晶の構成成分を同定するため、顕微ラマン分光法による分析を行ったところ、結晶にレーザーを照射して得られたスペクトルには、ヘスペリジンに特徴的な主要ピークが観察された。また、それらピークのラマンシフトがヘスペリジン標品由来のものと一致したことから、<i>in situ</i>分析によりウンシュウミカン果皮中で観察された結晶の主要成分がヘスペリジンであることを初めて同定した。			
3. 葉の発達時におけるヘスペリジン集積の量的変動			
ウンシュウミカンの当年枝において、ヘスペリジン結晶の検出及び同定を顕微ラマン分光法で行い、またヘスペリジンの部位別の分布及び葉の発達に伴う量的変動について明らかにするため、高速液体クロマトグラフィー分析及び質量分析を行った。ま			

ず、顕微観察にて夏枝（発達中のシュート）由来の若い葉、葉柄、茎において、その組織中に針状結晶の集積を確認した。その一方で、成長した春枝（成長したシュート）由来の成熟組織中には針状結晶はほとんど観察されなかった。観察された針状結晶は、顕微ラマン分光法による *in situ* 分析にて、ヘスペリジンから構成されることを確認した。

次に、当年枝の各部位における乾重量1 g当たりのヘスペリジン量 (mg/g DW) の分布を調べた結果、若いシュート組織では成長したシュート組織と比べてヘスペリジン濃度が高かった。特に若い茎組織では、先端の未成熟組織においてヘスペリジン濃度が高く (231.9 mg/g DW)、中間部 (122.8 mg/g DW)、基部 (39.8 mg/g DW) へ向かうに従い急激にその濃度は減少し、ヘスペリジンの濃度勾配が存在することが分かった。また、若いシュート由来の葉の発達（葉面積の拡大）に伴うヘスペリジン集積の量的変動について調べた結果、その変動パターンには2つのフェーズが存在した。発達初期（フェーズI）では、葉におけるヘスペリジン濃度は高くほぼ一定の値を示し (258.9-326.3 mg/g DW)、一方、葉一枚当たりのヘスペリジン含有量 (mg/leaf) は直線的に増加し、葉面積の拡大との強い正の相関 ($\text{adjusted } R^2 = 0.97, P < 0.001$) が確認された。葉面積が約8 cm²を超えて更に成長を続けるとヘスペリジンの量的変動パターンは変化して（フェーズII）、葉一枚当たりのヘスペリジン含有量はその増加が止まりほぼ一定の値 (24.2-27.3 mg/leaf) を示したのに対し、ヘスペリジン濃度は直線的に減少し、葉面積の拡大との強い負の相関 ($\text{adjusted } R^2 = 0.94, P < 0.001$) を示した。葉の発達に伴うヘスペリジン集積の量的変動における2つのフェーズの存在は、フェーズの転換期にヘスペリジン生合成に関わる重要な変化が植物体で起こったことを示唆している。一般に、成熟した葉では、病原菌感染や紫外線照射といった環境ストレスから内部組織を保護する役割を有するクチクラ層などの表面構造が発達している。本研究の結果からは、ウンシュウミカンではそのような表面構造が十分に発達していない未成熟な組織においてヘスペリジンが顕著に集積することが明らかになった。このことは、他の植物においてこれまでに報告されてきたヘスペリジンによる植物病原菌や紫外線などに対するストレス耐性が、ウンシュウミカンの未成熟な組織における環境ストレスからの防御機構において一定の役割をはたしている可能性を示唆するものである。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

ヘスペリジンは柑橘類の多くやハーブ類の一部に存在しているフラバノン配糖体であり、ウンシュウミカンの果実や葉などに大量に蓄積されることが知られている。古来漢方薬の陳皮の成分として知られている一方で、栽培時の摘果や工業的果汁生産の残渣として大量に排出されており、その利用は農産廃棄物の有効利用や資源循環の観点から重要である。本論文は、ウンシュウミカン果皮に含まれるヘスペリジンの新規な抽出法を開発し、植物体における集積機構について詳細に解明したものであり、評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. 摘果された未成熟のウンシュウミカン果皮から環境負荷が少なく、効果的にヘスペリジン抽出する為の方法として、マイクロ波支援抽出法と低温での析出を組み合わせた高効率な抽出方法を開発した。
2. 未成熟な果皮の組織中に針状結晶が球体状に集まった集合体を多数観察し、組織内の結晶に顕微ラマン分光法を適用することで、この結晶がヘスペリジンに由来することを初めて直接的に明らかにした。
3. 当年枝を用いた果実以外の組織の解析を行うことで、未成熟な葉、葉柄、茎においても、ヘスペリジンの結晶が観察され、果皮に匹敵する濃度で集積することを明らかにした。
4. 発達中の葉におけるヘスペリジンの葉一枚あたりの蓄積は、直線的に含有量が増える初期のフェーズに続き、含有量が一定値に達し葉の生長と共に濃度が低下する第2のフェーズが存在し、特に未熟な組織において急速に高濃度のヘスペリジンが蓄積することを示した。

以上のように、本論文は摘果して大量に破棄されるウンシュウミカン果皮がヘスペリジン生産の原料として評価できることを示し、植物内においてヘスペリジンが高度に蓄積するメカニズムについて明らかにするとともに、特に表面構造が未発達な未成熟組織において高度に集積していることを示したものである。この研究は、植物バイオマス化学、植物組織構造学、植物生理学および森林生化学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年7月22日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）