

バンペイユ (*Citrus grandis* Osbeck forma Banpeiyu)

におけるリモノイドの移行

森下 敏子, 田中 里香, 中田 朱美, 西尾 康三

(武庫川女子大学家政学部食物学科)

Translocation of limonoid in the Banpeiyu fruits

Toshiko Morishita, Rika Tanaka, Akemi Nakata and Kozo Nishio

Department Food Science, Faculty of Home Economics,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan

The existence of limonoid in the tissue of Banpeiyu (*Citrus grandis* Osbeck forma Banpeiyu) foliage were investigated by HPLC and microscopy. Observation revealed limonoid in the phloem of the stem. Around the cortex cells were dark materials insoluble in water and soluble in dichloromethane, acetonitrile, ethyl acetate and chloroform. The amount of limonoid in the Banpeiyu leaves were indicated 3.7 ppm of limonin, 20.4 ppm of nomilin, 4.8 ppm of obacunone.

The crystalline substances extracted from the Banpeiyu leaves were detected the same retention time as nomilin by HPLC method.

カンキツ果肉に含まれる苦味成分の中でもリモノイド類は果実の成長に伴い減少し、果皮および種子に蓄積されると報告^{1)~3)}されているが、果実に移行するまでの茎葉中での苦味成分の存在状態や移行経路についての詳細は明らかにされていない。

Hasegawa は放射性同位元素トレーサー実験により、リモノエイト酸 A 環ラクトンがカンキツの若葉でさかんに合成されると報告している⁴⁾。

苦味物質の代謝過程を知ることにより、苦味の効果的な除去および収穫以前の苦味抑制も可能ではないかと考え、カンキツの葉柄中におけるリモノイドの存在および移行経路について検討した。

実験方法

1. 材料および試料調製

材料として熊本県農業技術センター、果樹研究所で9月、10月、12月、1月に採取したバンペイユ(晩白柚, *Citrus grandis* OSBECK forma Banpeiyu)の若葉および葉柄を用いた。葉の試料調製は橋永氏らの方法⁵⁾にしたがって行った。すなわち全葉75gをマ

ルチカッターで磨砕し、4倍量の0.2Mトリス緩衝液(pH8.0)を加えて24時間室温に保ち不溶性リモノイドを可溶化した。次にこれを遠心分離し(9,000 r.p.m, 20分, 0°C)上澄液をろ過した後、3%塩酸で溶液のpHを2に調製し、120mlの酢酸エチルで2回リモノイドを抽出した。減圧乾固したのち75%メタノール7mlに溶解し0.45m μ のメンブランフィルターでろ過した。さらに酸性リモノイドは次の方法により抽出した。上記の抽出液のうち1mlを分液ロートにとり、さらに33mlのジクロロメタンと35mlの5%炭酸水素カリウム溶液を加えて3分間振とうし、中性リモノイドを除去した。水溶液のpHを3%塩酸で2に調整しリモノイドのD環を閉環させたのちジクロロメタンで2回抽出した。溶媒を揮散させたのち得られた酸性リモノイドをKuhn法⁶⁾に準じてメチル化した。すなわち乾固した試料を1mlのジメチルホルムアルデヒドに溶解し、0.5mlのヨウ化メチルおよび1.5gの乾燥Ag₂Oを加え封管した。37°Cで6時間反応させた後、1夜室温に放置し、遠心分離を行い、上澄を採取した。減圧乾固し1mlのアセトニトリル

に溶解して HPLC 用試料とした。リモノエイト A 環ラクトンの分析は Chandler の方法⁷⁾によりリモニン をラクトン化した後、Maier らの方法⁸⁾により TLC で定性し、HPLC で分析した。

葉柄の試料調製は次の方法で行った。表皮(多層表皮)、皮層細胞、節部の順にカミソリで削りとり、おのおのを採取し、1g ずつを乳鉢で磨砕し葉と同様の方法でリモノイドを抽出し、HPLC 用試料とした。

2. HPLC によるリモノイドの測定⁹⁾

分析装置は日本分光製 TWINCLE, UVIDEC 100-III を用いた。カラムは Cosmosil 5C₁₈ packed column (半井化学製, 4.6×150 mm Jasco) を用い、カラム温度 35℃ で 215nm の吸光度を測定することによって各リモノイド含量を求めた。移動相は水とメタノールを 25:75 (V/V%) に混合したものを用い、1 分間に 0.2ml の流速で流してリモノイドを溶離した。定量は同一試料で 3 回の測定値の誤差が ± 0.1% になることを確認して定量値とした。

3. 顕微鏡観察

装置は顕微鏡, NIKON OPTIPHOT XF-31, 写真撮影装置 NIKON M-35FA を用いた。種子を安全カミソリの刃で横 1/2 に切断し接着剤を用いニフトコに接着した。これをフッカーミクロトームに固定し 24μm の厚さの切片を作成した。切片はろ紙上にとり、スライドガラス上で水を 2, 3 滴スポイドで滴下してプレパラートを作成し、鏡検を行った。葉柄の切片の作成は以下の方法で行った。葉柄を安全カミソリで 1 cm に切断し接着剤でニフトコに接着し、フッカーミクロトームで 24μm の切片を作成した。切片をろ紙上に採取し、ラクモイド(レゾルシンブルー-0.05g を炭酸ナトリウム 0.2g を含む 30% エタノール 20ml に溶解)で 10 分間染色後、反応皿で 3 回水洗し、プレパラートを作成した。発色剤には *P*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1g を水 37ml に塩酸 4.8ml を加えた溶液に溶解したものをを用いた。

実験結果および考察

9 月, 10 月, 12 月および 1 月に採取されたバンペイユの葉および葉柄の表皮, 皮層, 節部よりモノイドを抽出し, HPLC でリモノイド量を測定した結果を Fig. 1 に示した。葉では総リモノイド量は 10 月から 12 月まで約 27% 増加し, 1 月にかけては約 13% 減少したのに対し, 葉柄では 9 月から 10 月にかけてやや増加したのが, その後 1 月にかけて約 16% 減少し, 葉では 12 月以降, 葉柄では 10 月以降リモノイドが他

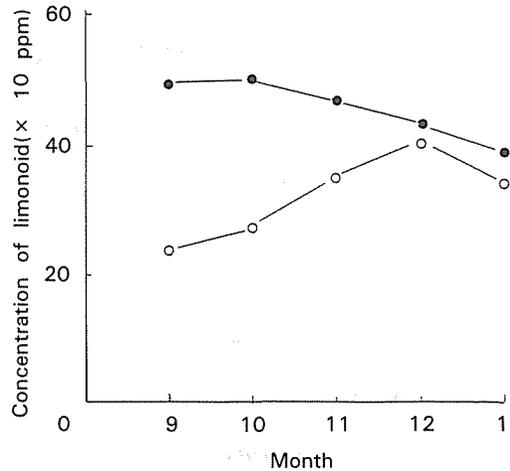


Fig. 1. Seasonal changes of limonoid in the leaves and stems of Banpeiyu

○—○ leaves ●—● stems

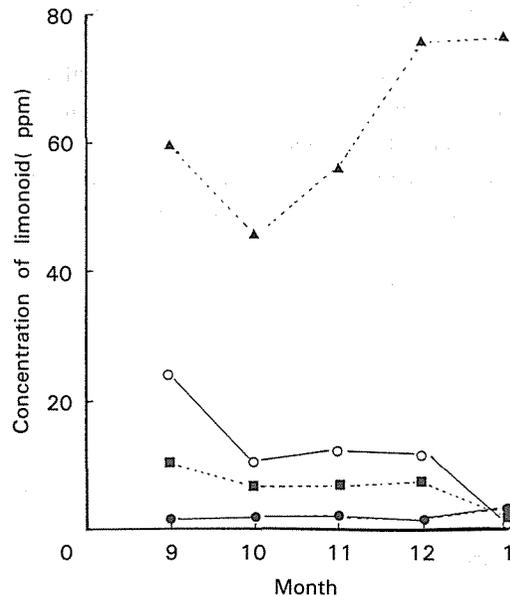


Fig. 2. Seasonal changes of limonoid extracted from the Banpeiyu stems

○—○ ; limonin ■—■ ; nomilin
●—● ; obacunone
▲—▲ ; limonoate A-ring lactone

の部位へ移行したことが示唆された。

葉柄中の各リモノイドの季節的変動を Fig. 2 に示した。リモニンおよびノミリンは 9 月から翌年の 1 月にかけて減少し, リモニンはほぼ消失した。リモノエ

バンペイユ (*Citru grandis* Osbeck forma Banpeiyu)におけるリモイドの移行

トA環ラクトンは9月から10月にかけて約32%減少したが、以後12月にかけて約82%の顕著な増加を示した。オパクノンには変化はみられなかった。オパクノン酸は10月までやや増加したが、その後、他のリモノイドと同様に減少傾向を示した。

長谷川らにより、茎では酢酸、メバロン酸およびフェルネソールリン酸などよりノミリンが合成されると報告^{10)~13)}されているが、バンペイユでは9月にノミリン量が多く、12月から1月にかけて減少した。リモニンもノミリンと同様の傾向を示したが、リモネイトモノラクトンと推定されるピークは10月から1月にかけて顕著に増加した。これよりバンペイユでは9月以前にノミリンが合成され、果実の成熟期には無味のリモノイドに代謝されることが推定された。

葉柄の部位別のリモノイド量を検討した結果をFig. 3に示した。表皮、皮層にリモノイドは多く含まれており、9月から10月にかけて約2倍の顕著な増加を示し、10月でピークを示した。さらに12月にかけて約60%減少した。篩部では表皮、皮層とは対照的な増減を示し、9月から10月にかけて約45%減少し、その後12月にかけて約2.5倍の顕著な増加を示した。木部および髄では9月から10月にかけてやや増加したが、12月には再び減少し、皮層に比べ、リ

モノイドの含有量と季節的な変動が少ないことを認めた。

これより、10月では茎の表皮、皮層に合成されたリモノイドが貯蔵され、12月では篩部へソース内短距離移動¹⁴⁾が起こったことが推定された。

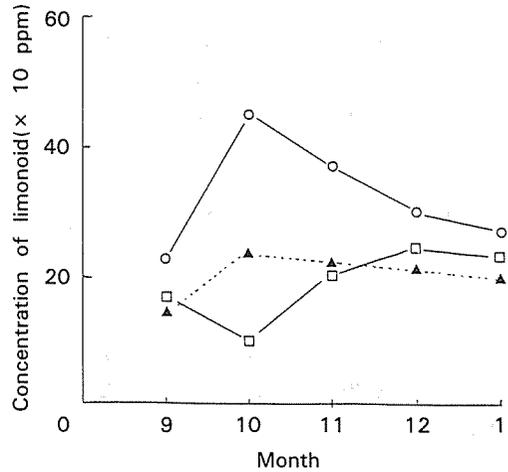


Fig. 3. Seasonal changes of limonoid in the Banpeiyu stems

○—○ ; epidermis and cortex
□—□ ; Phloem ▲—▲ ; xylem and pith

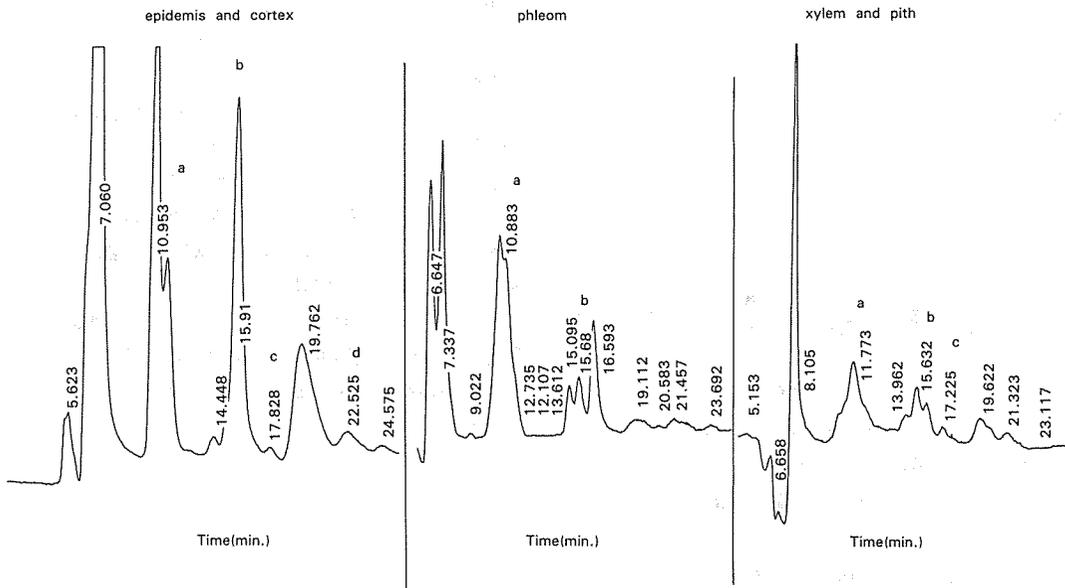


Fig. 4. HPLC chromatograms of limonoid extracted from the Banpeiyu stems

さらに, Fig. 4 に示したように, リモノエイト A 環ラクトンは表皮, 皮層, 篩部, 木部, 髄のすべての部位で検出されることより, リモノイドの葉柄中ではリモノエイト A 環ラクトンが存在することが推定された. 葉におけるリモノエイト A 環ラクトンの季節的な変動を Fig. 5 に示した. リモノエイト A 環ラクトンは葉では 9 月から 12 月にかけて約 2.7 倍の顕著な増加を示したのに対し, Fig. 2 に示したように, 葉柄では 9 月から 10 月に減少し, 10 月以降は顕著な増加を示した. これより, 9 月から 12 月にかけて葉ではリモノエイト A 環ラクトンが存在し, 葉柄では果実の稔実期である 12 月にかけて篩管を通して, 果実に移行することが推定され, Fig. 3 に示したように, 葉柄の篩管がリモノイドの移行の通路であることが示唆された. このことは, リチャードソンにより, 篩部は葉で生合成された有機同化産物が上方へも下方へも輸送される組織であり, 移動の通路は篩管であると確認されていること¹⁵⁾とも一致した.

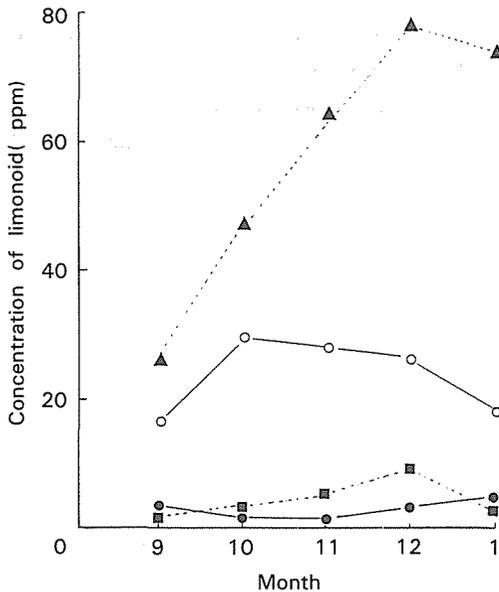


Fig. 5. Seasonal changes of limonoid extracted from the Banpeiuyu leaves

○—○ ; limonin ■·····■ ; nomilin
 ●—● ; obacunone
 ▲·····▲ ; limonoate A-ring lactone

HPLC の結果より, 葉柄の皮層および篩部に木部や髄にくらべリモノイドが多く検出されたため, 12 月のバンベイユ葉柄を用い, 検鏡によりリモノイドの確認を行った.

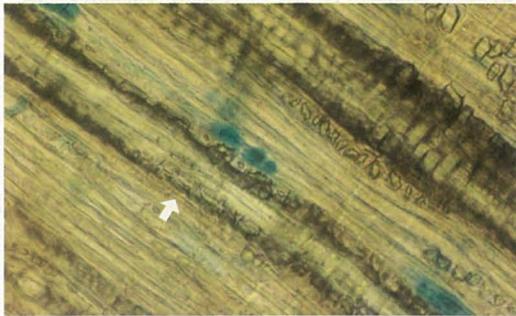
バンベイユの茎の縦断面の検鏡を行った結果を Fig. 6 に示した. 切片をラクモイドで 10 分間染色し, 篩管の位置を確認したのち, *p*-N-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液を滴下したところ, 篩管の青色は消失し, 篩部に不定形の結晶が認められ褐色に呈色した. さらに同様の方法で 1% 塩化第二鉄溶液で染色した結果, 篩管の青色は消失し, その結晶部分が紫色に呈色した. これより, OH 基を有するリモノイドではないかと推定された.

茎縦断面に酢酸エチルおよびジクロロメタンを滴下したところ結晶が消失したため, この結晶をリモノイドと認定した.

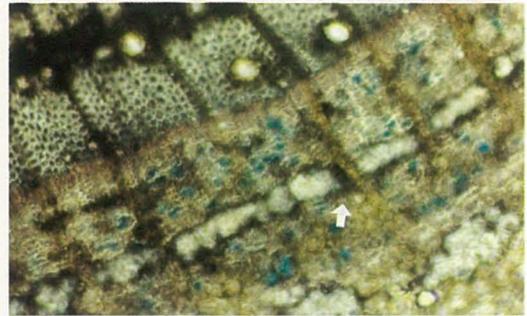
同様にバンベイユ茎の横断面の検鏡を行った結果, 上記結晶の存在および酢酸エチル, ジクロロメタンによる消失 (Fig. 7) を認めた. これらは篩部柔細胞および放射組織に局在した.

さらにバンベイユの葉の葉肉縦断面の検鏡を行った結果を Fig. 8 に示した. バンベイユの葉は背腹性葉であり, 外見上からも区別出来るが, 検鏡結果より表側には葉緑体が集積し, 裏側に暗色不定形の物質が多数検出された. 酢酸エチルおよびジクロロメタンを滴下したところ, この物質は溶解し消失したため, 暗色不定形物質はリモノイドと推定された.

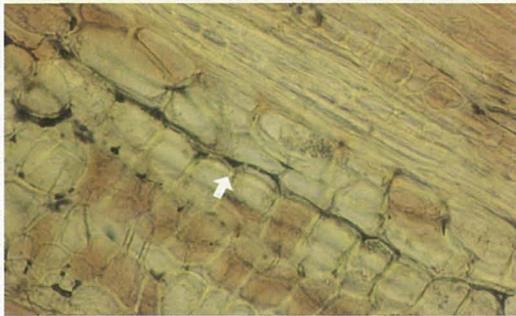
G. A. ストラッフォードにより, 有機代謝産物の移動は篩部で行われることはほぼ疑いないとされ, 篩部が有機物の輸送にあずかる主要な組織であるとされている¹⁶⁾. さらに, 葉中の塩類は色々な代謝反応に繰り込まれるが, 不要なものは時には葉から篩部へ送りこまれて, 根, 若葉, 成長点, 発達中の花や果実などへ移動するとされており, このような変化と苦味物質の移行に類似性が見出されることは, 植物体における苦味物質の存在の意味を知る上からも興味あることと考えられた.



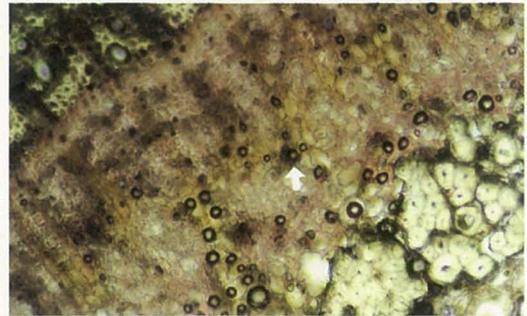
1 : dyed with lacmoid



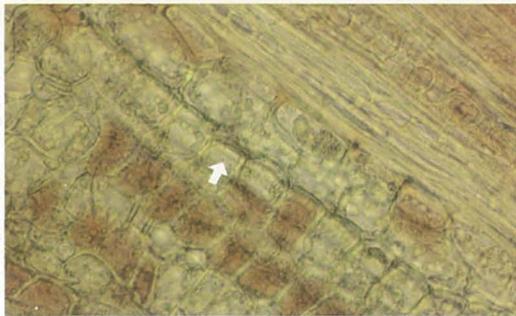
1 : dyed with lacmoid



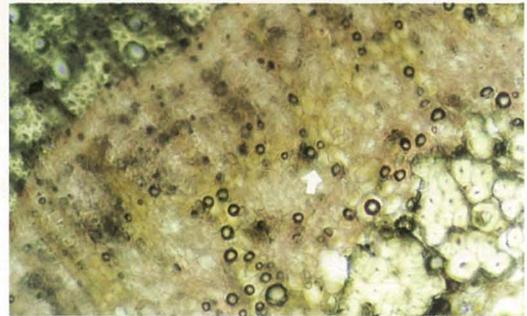
2 : dyed with iron dichloride



2 : dyed with *p*-N-dimethyl aminobenzaldehyde



3 : treated with dichloromethane



3 : treated with dichloromethane

Fig. 6. Micrographs of the longitudinal section of the Banpeiyu stem (20×15)

Fig. 7. Micrographs of the cross section of the Banpeiyu stem (20×15)



1 : control



2 : treated with dichloromethane

Fig. 8. Micrographs of the Banpeiyu leaf (20×15)

(森下, 田中, 中田, 西尾)

本研究の試料のパンペイユをご提供下さいました熊本県農業研究センター果樹研究所の榎 英雄氏に深謝申し上げます。なお、本研究は平成元年度文部省科学研究助成金の一部を用いて行った。

文 献

- 1) 長谷川 信, 化学と生物, **21**, 823(1983)
- 2) Hasegawa, S. et al., *Phytochemistry*, **23**, 1601(1984).
- 3) Hasegawa, S. et al., *Phytochemistry*, **27**, 115(1988).
- 4) Hasegawa, S. et al., *Phytochemistry*, **16**, 469(1977).
- 5) 橋永文男, 長谷川 信, 園学雑, **58**, 227(1989).
- 6) 山川民夫, 生化学実験講座 4 糖質の化学 下 (東京化学同人, 東京), p. 508(1979).
- 7) B. V. Chandler, *J. Sci. Fd. Agric.*, **22**, 635(1971).
- 8) V. P. Maiyer et al., *Phyto chemistry*, **18**, 405(1969).
- 9) 森下敏子, 陣内弘子, 仲地久子, 日食工誌, **32**, 590(1985).
- 10) S. Hasegawa, J. E. Hoagland, *Phytochemistry*, **16**, 469(1977).
- 11) Hasegawa, S., R. D. Bennett and C. P. Verdon, *J. Agric. Food Chem*, **28**, 922(1980).
- 12) Hasegawa, S., Z. Herman, E. Orme and P. Ou, *Phytochemistry*, **25**, 2783(1986).
- 13) Hasegawa, S., ACS Symp., *American Chemi. Society*, p. 84(1990).
- 14) 長南信雄: 化学と生物, **24**, 91(1986).
- 15) M. リチャードソン, 植物の物質輸送(朝倉書店, 東京), p. 45(1980).
- 16) G. A. Stratford, 植物の代謝(河出書房新社, 林孝三訳, 東京), p. 133(1973).