

生物学的および化学的手法を用いた機能性微量フラボノイドの生産検討

著者	小堀 亮
学位名	博士(工学)
学位授与機関	大阪電気通信大学
学位授与年度	2021
学位授与番号	34412甲第63号
URL	http://id.nii.ac.jp/1148/00000286/



博士学位論文

題 目

生物学および化学的手法を用いた
機能性微量フラボノイドの生産検討

担当指導教員名 齊藤 安貴子

2022年 3月 17日

先端理工学 専攻

DE19A001

小堀 亮

大阪電気通信大学大学院

生物学および化学的手法を用いた
機能性微量フラボノイドの生産検討

大阪電気通信大学大学院 工学研究科 先端理工学専攻

博士課程 DE19A001 小堀 亮

内容

略語集.....	5
第1章 序論.....	8
第2章 概論.....	21
2-1. フラバン-3-オール誘導体の構造と機能.....	21
2-2 ラズベリー(<i>Rubus idaeus</i>).....	21
2-3 活性酸素.....	22
2-4 生体触媒.....	22
2-4-1 植物培養細胞.....	23
・ブドウ培養細胞 (<i>Vitis vinifera L.</i>).....	23
・ラズベリー培養細胞 (<i>Rubus idaeus</i>).....	23
2-4-2 シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2.....	23
2-4-3 遺伝子組み換え酵母菌体.....	23
2-4-4 動物由来肝臓ミクロソーム.....	24
2-5 グルクロン酸抱合抱合酵素.....	24
2-6 シトクロム P450 (CYP).....	24
2-7 生物学的物質変換 (Bio-Transformation).....	24
2-8 アロステリック効果.....	24
2-9 HPLC を用いた分析.....	25
2-10 LC-ESI-MS を用いた分析.....	25
2-11 PCR 法.....	25
2-12 過去の PA の合成研究.....	26
第3章 生物学的手法を用いた生産検討.....	27
3-1. ラズベリー果実を用いた分析研究.....	27
3-1-1. 土壌栽培ラズベリー果実の成分分析とポリフェノール合成酵素の解析.....	28
3-1-2. 土壌栽培ラズベリー果実のポリフェノール類分析.....	29
3-1-3. 土壌栽培ラズベリー果実の VC 量、DPPH, ABTS ラジカル消去活性試験.....	31
3-1-4. 土壌栽培ラズベリー果実中のグルコース類分析.....	32
3-1-5. 土壌栽培ラズベリー果実中のポリフェノール化合物の分析、および、定量研究.....	34
3-1-6. 土壌栽培ラズベリー果実中に発現しているポリフェノール生合成酵素の発現確認.....	39
3-1-7. 土壌栽培ラズベリー果実の成分分析とポリフェノール合成酵素の解析 まとめ.....	42
3-2. 植物工場ユニットを用いたラズベリー果実のポリフェノール生産検討.....	43
3-2-1. LED 照射ラズベリー果実を用いたポリフェノール類分析.....	44

3-2-2. LED 照射ラズベリー果実を用いた抗酸化活性の指標となるラジカル消去活性試験	44
3-2-3. LED 照射ラズベリー果実を用いたポリフェノール化合物 LC 分析	45
3-2-4. LED 照射ラズベリー果実を用いたポリフェノール生合成酵素発現量分析	47
3-2-5. 植物工場ユニットを用いたラズベリー果実のポリフェノール生産検討 まとめ	49
3-3. 植物工場ユニットを用いたラズベリー葉のポリフェノール生産検討	50
3-3-1. LED 照射ラズベリー葉を用いたポリフェノール類分析	51
3-3-2. LED 照射ラズベリー葉中を用いた抗酸化活性の指標となるラジカル消去活性試験	51
3-3-3. LED 照射ラズベリー葉を用いたポリフェノール化合物 LC 分析	52
3-3-4. LED 照射ラズベリー葉中に発現しているポリフェノール生合成酵素の発現確認	54
3-3-5. 植物工場ユニットを用いたラズベリー葉のポリフェノール生産検討 まとめ	55
3-4. ラズベリー培養細胞を用いたポリフェノール生産検討	56
3-4-1. ラズベリー培養細胞のポリフェノール分析	56
3-4-2. ラズベリー培養細胞のポリフェノール生合成酵素の発現量分析	58
3-4-3. ラズベリー培養細胞のポリフェノール化合物の LC 分析	59
3-4-5. ラズベリー培養細胞を用いたポリフェノール生産検討 まとめ	63
3-5. 植物培養細胞を用いたフラボノイド変換反応	63
3-5-1. ブドウ培養細胞 (<i>Vitis vinifera</i> L.)を用いたフラボノイド変換反応	64
3-5-2. ラズベリー培養細胞 (<i>Rubus idaeus</i>)を用いたフラボノイド変換反応	69
3-5-3. 植物培養細胞を用いたフラボノイド変換反応 まとめ	72
3-6. 動物由来肝臓ミクロソームを用いたグルクロン酸抱合反応	73
3-6-1. 動物由来肝臓ミクロソームを用いたグルクロン酸抱合反応 まとめ	77
3-7. シロイヌナズナ由来 UGT78D2 を用いたフラボノイド配糖化反応	78
3-7-1. 糖転移酵素 UGT78D2 酵素溶液を用いた配糖体合成検討	79
3-7-2. 糖転移酵素 UGT78D2 を用いた菌体内配糖体合成検討	80
3-7-3. シロイヌナズナ由来 UGT78D2 を用いたフラボノイド配糖化反応 まとめ	83
3-8. 酵素発現酵母を用いた配糖化反応	84
3-8-1. 酵素発現酵母を用いたフラボノイドの配糖化反応	84
3-8-2. 酵素発現酵母を用いたフラボノイドの配糖化反応まとめ	85
4 章. 化学的手法を用いた生産検討	87
4-1. Procyanidin オリゴマーの合成	87
4-1-1. ラズベリーに含まれる PA オリゴマーの合成検討	88
4-2. フラバン-3-オール誘導体の配糖体合成	91

4-3. フラバン-3-オール配糖体の抗酸化活性評価.....	93
4-4. 化学的手法を用いた生産検討 まとめ.....	94
第5章 総括.....	95
第6章 実験項.....	99
参考文献.....	107
謝辞.....	121
業績.....	122

略語集

本文中以下の略語を用いた

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

4-CL: 4-coumarate-coenzyme A ligase

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ANR: anthocyanidin reductase

ANS: anthocyanidin synthase

ATP: adenosine triphosphate

Ac₂O: acetic anhydride

Ac: acetyl

AcOH: acetic acid

AgClO₄: silver(I) perchlorate

BA: benzyl adenine

BF₃OEt₂: boron trifluoride ethyl ether complex

BSA: bovine serum albumin

Bn: benzyl

CHS: chalcone synthase

CYP: cytochrome P450

Coumarol-CoA: coumaroyl-coenzyme A

DAIBAL: diisobutylaluminium hydride

DDQ: 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone

DFR: dihydro flavonol4-reductase

DMAP: 4-*N,N*-Dimethylaminopyridine

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

DTBMP: 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylpyridine

EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride

EE: ethoxyethyl

EEOH: 2-ethoxyethanol

EGC: (-)-epigallocatechin

EGCG: (-)-epigallocatechin-3-*O*-galleate

Et₃N: triethylamine

EtOAc: ethyl acetate

EtOH: ethanol

F3'H: flavanone-3'-hydrogenation
FLS: flavonol synthase
FT: flowering locus T
GST: glutathione S-transferase
Glu-6-P DH: glucose-6-phosphate dehydrogenase
Glu-6-P: glucose-6-phosphate
Gluconolactone-6-P: Gluconolactone-6-phosphate
HPLC: high performance liquid chromatography
IAA: indole-3-acetic acid
IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LAR: leucoanthocyanidin reductase
LB: luria-bertani
LC-ESI-MS: liquid chromatography–electrospray–mass spectrometry
LED: light emitting diode
MS4A: molecular sieves 4A
MS: murashige and skoog
Me: methyl
MeOH: methanol
NADP: nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAG: *N*-acetylglucosamine
NMR: nuclear magnetic resonance apparatus
NaClO: sodium hypochlorite
PA: proanthocyanidin
PAL: phenylalanine ammonia-lyase
PCR: polymerase chain reaction
PFD: photon flux density
PPFD: photosynthetic photon flux density
PPO: polyphenol oxidase
RNA: ribonucleic acid
ROS: reactive oxygen species
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate - poly-acrylamide gel electrophoresis
SDS: sodium dodecyl sulfate
TBA: thiobarbituric acid
TBDMS: *tert*-butyldimethylsilyl
TBS: *tert*-butyldimethylsilyl

TEA-3HF: triethylamine trihydrofluoride

TF₂O: trifluoromethanesulfonic anhydride

TFA: trifluoroacetic acid

THF: tetrahydrofuran

TMSOTf: trimethylsilyltrifluoromethanesulfonate

UDP-glucose: uridine diphosphate glucose

UGT: glucuronosyl transferase

UV: ultraviolet

VC: vitamin C

VR: vitis red

VW: vitis white

cDNA: complementary DNA

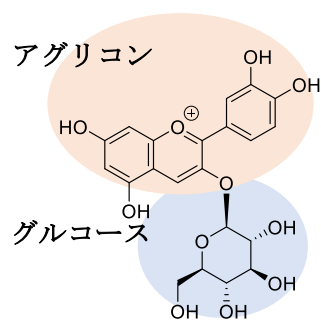
iPr: isopropyl

n-BuOH: n-butanol

第1章 序論

近年健康への関心が深まる中、食品中に含まれる機能性ポリフェノールが注目を集めている¹⁾。ポリフェノールは分子内に数個以上のフェノール性水酸基を持つ植物成分の総称で、その数は5,000種以上に及び、食物繊維に次いで多く含まれ、生体防御や種の保存に関係しているといわれている²⁾。近年、食品に含まれる強い生物活性や高い機能性を持つ化合物に注目が集まっており、様々な特定保健用食品（特保）や機能性表示食品が流通している。例えば、(株)サントリーの「伊右衛門特茶」や(株)明治の「チョコレート効果」などが挙げられる。これらの商品が注目されるのは、政府が主導する「健康寿命延伸³⁾」への世間の関心が高まっており、医療費削減に向けた社会の取り組みとして、健康食品への期待が高まっているためである。機能性を持つ化合物のなかでもポリフェノール化合物は様々な健康効果があることが科学的に証明されており、多くの健康食品が実際に流通している⁴⁾。それゆえ、ポリフェノール化合物の機能性解明を進めることは、食品が持つ活性を評価することに通じるため有益であると考えられる。しかし、ポリフェノールは植物中に含まれていて植物内で多様な修飾がなされ、混合物として得られるため、純粋にそれぞれの化合物を単離・構造決定することが極めて困難であり、生物活性試験に十分な量の化合物量を確保することが難しいことから、詳細な構造-活性相関は解明されていない⁵⁾。

また、ひとくくりにポリフェノール化合物と呼ぶが、構造の特徴によって多種類に分類されており、植物中で様々な類縁体や配糖体⁶⁾、硫酸化体⁷⁾やメチル化体⁸⁾として存在してい



Cyanidin-3-glucoside (1)

図 1-1. アントシアニンの構造

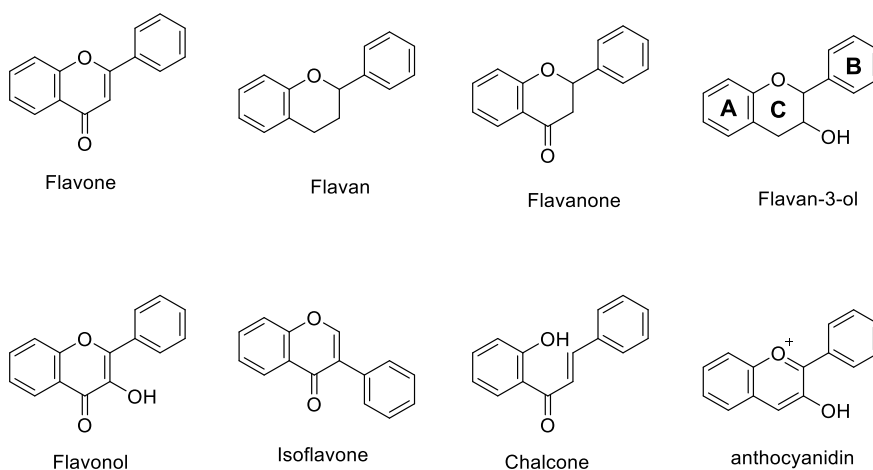


図 1-2. フラボノイドの基本骨格

る。図 1-1 に、ポリフェノールの中でもフラボノイドと呼ばれる一群の骨格を示した。フラボンは、ほとんどが無色でパセリの葉⁹⁾、コスモスの花¹⁰⁾などに含まれ、非常に多くの種類があり、配糖体として存在するが、水に溶けないアグリコンの形で葉の表面などにあるワックスに含まれている物もある。フラバノンは無色でブンタン¹¹⁾ユズ¹²⁾などに含まれている。フラボノールは無色で花や葉に多く含まれ、ムラサキツメクサの花¹³⁾、オオイタドリやアブラギリの葉^{14,15)}などに含まれている。イソフラボンは、他のフラボノイドと異なり、3-フェニルクロマン骨格をもっており、シロツメクサ¹⁶⁾などに含まれている。カルコンは、黄色～橙黄色の色素で花や葉などに含まれ、カーネーションの黄色花¹⁷⁾キバナコスモス¹⁸⁾などに含まれている。アントシアニンは、橙赤色からピンク、赤、紫、青色の色素で花や果実、紅葉や芽生え、根などに含まれており、配糖体として多くの種類がある。アントシアニンに限ってはグルコースなどの糖が付加した配糖体をアントシアニン、アグリコンをアントシアニジン¹⁹⁾といい、チリイチゴ²⁰⁾、エゾノヘビイチゴ²¹⁾などに含まれている。(図 1-2)フラバン-3-オール誘導体は無色から茶色をしており茶葉²²⁾やリンゴ²³⁾などに多く含まれている。また、ポリフェノールの中でもフラバン-3-オール誘導体は機能性が高いという報告^{24,25)}がされており、抗酸化活性²⁶⁾を始め、抗発ガン活性²⁷⁾、ガン細胞増殖抑制活性²⁸⁾、動脈硬化抑制²⁹⁾、抗ウイルス作用^{30,31)}、抗菌作用³²⁾などがある。フラバン-3-オー

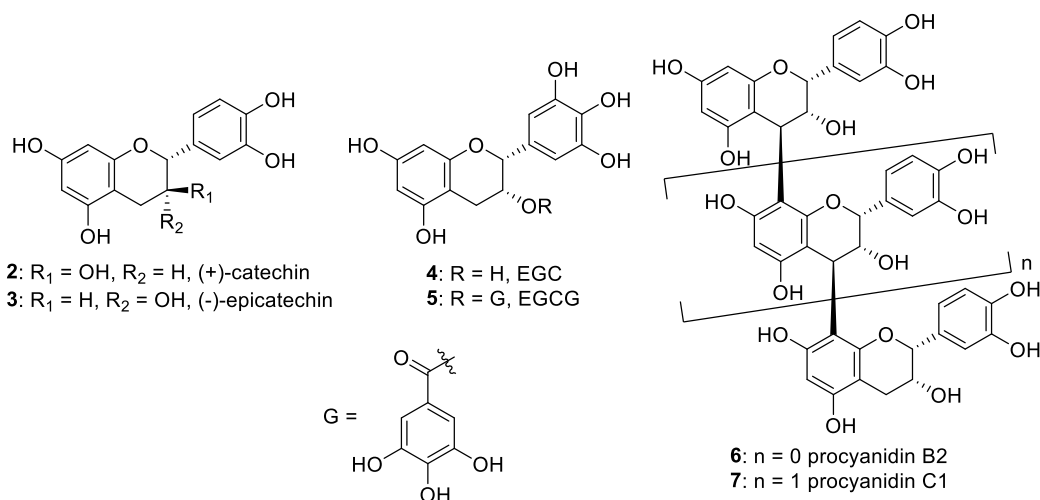


図 1-3. 植物中に含まれる一般的なフラバン-3-オール誘導体

ル誘導体は植物内で配糖体、メチル化体以外にも 2 位や 3 位の立体や水酸基の数が異なるもの、ガロイル化や縮合 (図 1-3) などがあり、多くの混合物として植物中に存在している。一般的に緑茶の主成分としてフラバン-3-オール誘導体が含有されていることが知られており³³⁾、(-)-epicatechin (3) では 2 位、3 位の立体配置は *cis* 型で、(+)-catechin (2) は *trans* 型であり、お茶カテキンの基本となる成分は(-)-epicatechin (3) や EGC (4)、EGCG (5) などになっている³⁴⁾。(-)-epicatechin (3) は B 環に 2 つのフェノール性水酸基が存在しカテコール構造をもち、また B 環にフェノール性水酸基を 3 つ持ちピロガロール構造が存在する EGC (4) や 3 位

にガロイル基を有する構造を EGCG (5) と呼ぶ。また、EGCG (5) は緑茶に大量に含まれることからお茶カテキンとも呼ばれ、様々な食機能性を示すことが化学的・生物学的に証明されている。例えば、油脂に添加することにより腐敗を防ぎ (抗菌作用) 食品中の酸化を防止 (抗酸化作用) するなど、食品添加剤として利用されている³⁵⁾ ほか、食品以外の疾病に対しても、抗ガン³⁶⁾、アレルギー緩和³⁷⁾、生活習慣病予防^{38,39)}、抗菌⁴⁰⁾、抗ウイルス⁴¹⁾ など、さまざまな生理機能が明らかにされ注目されている。最近ではその生理作用の一つである体脂肪蓄積抑制⁴²⁾ を特徴とした特定保健用食品が認可され、販売されている⁴³⁾。

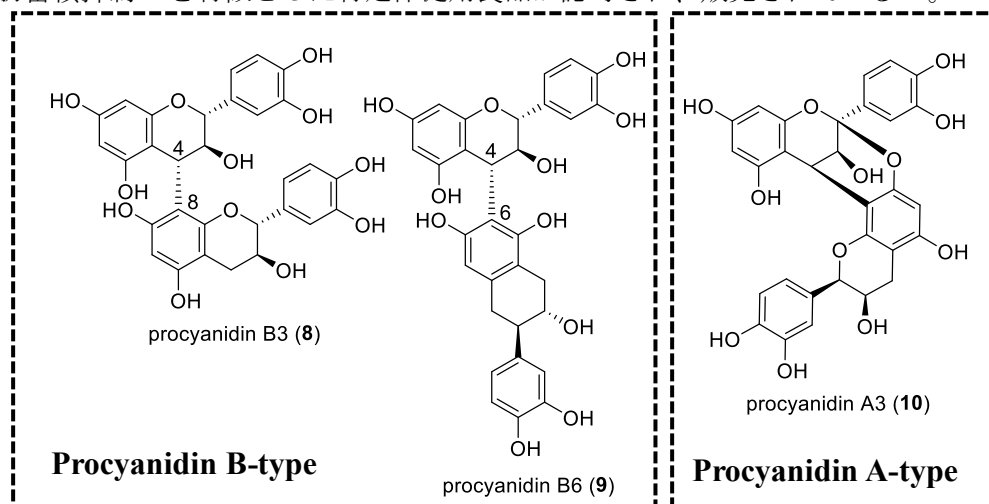


図 1-4. PA の結合様式

さらに、(+)-catechin (2) や(-)-epicatechin (3) のようなフラバン-3-オール誘導体がオリゴマー構造をとった化合物群は proanthocyanidin (PA)、あるいは、縮合型タンニンと呼ばれ、高機能性の化合物群として広く知られている。PA はフラバン-3-オール誘導体が 4-8 位、または、4-6 位で縮合した procyanidin B-type、結合様式が異なる A-type がある。(図 1-4) 植物中には PA が多く含まれており、図 1-4 で示した以外の結合の PA も含まれている。図 1-4 には、4-8 位、4-6 位で結合した構造を示したが、天然では 4-8 位で結合した化合物が最も多く存在している⁴⁴⁾。また B 環の水酸基の数によって、

prodestinidin、propelargonidin、procyanidin、prodelphinidin と呼ばれる⁴⁵⁾。これらは、鉍酸とともに加熱すると C-C 結合が開裂し赤色系の色素アントシアニジンを生じ、prodestinidin からは destinidin、propelargonidin からは pelargonidin、procyanidin からは cyanidin、prodelphinidin からは delphinidin を生成する。(図 1-5) 一般的に、天然に存在する PA の大部分は B 環に水酸基を 2 つ持つ procyanidin である

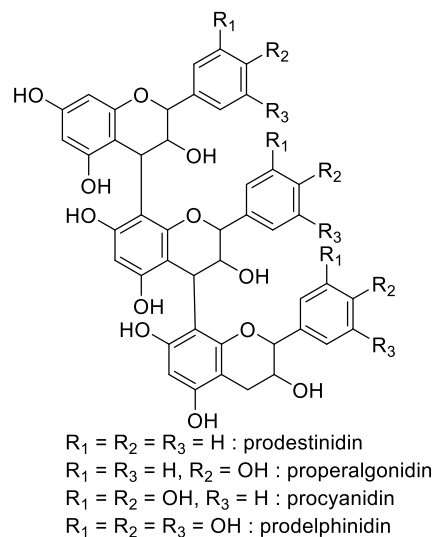
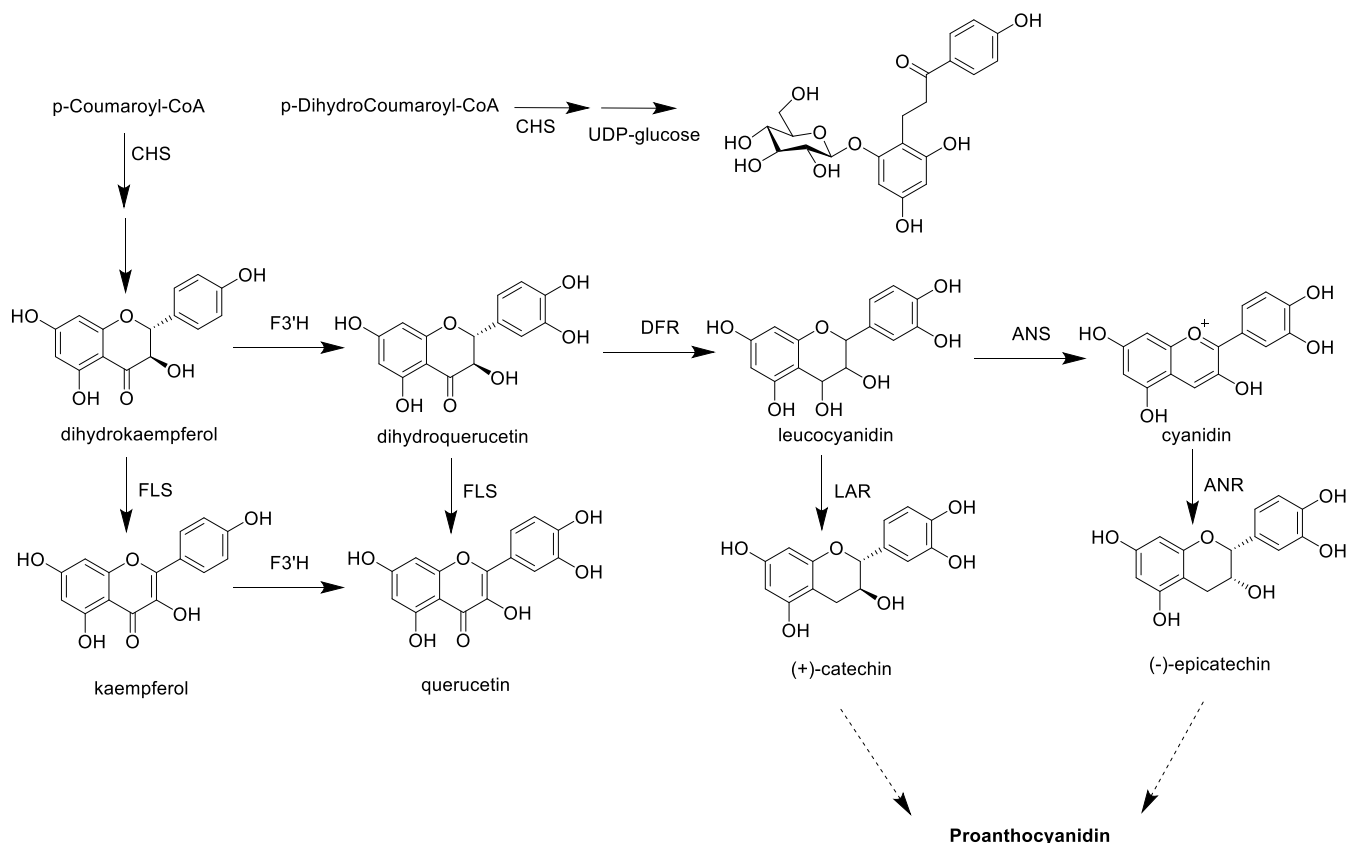


図 1-5. PA の基本構造

46,47)。

これらのポリフェノール化合物は、二次代謝産物として植物内で生合成される。一般的なフラバン-3-オール誘導体を含むポリフェノール化合物の生合成経路を示した²⁰⁾(スキーム1-1)。フラバン-3-オール誘導体は、アミノ酸であるフェニルアラニンから生合成が開始され、ポリフェノール化合物の前駆体である coumaroyl-CoA が生産される。ここから水酸化酵素



スキーム 1-1. 一般的な植物中でのポリフェノール生合成経路²⁰⁾

や還元酵素などの様々な酵素により、生合成され、フラボノールやフラバン-3-オール誘導体の化合物群となる。また、生合成の過程で植物中に多く含まれる配糖化酵素の UGT などを用いて糖化反応が進行する。糖化反応とは、図 1-1 のようなアグリコンにグルコースなどの糖が付加した化合物の総称である。植物中のポリフェノール化合物の多くは糖化されていることが知られており、一般的に糖化化合物は配糖化反応が進行するとアグリコンよりも活性が増加する場合があることが報告されている^{48,49)}。例えば、玉ねぎ⁵⁰⁾やリンゴ⁵¹⁾など

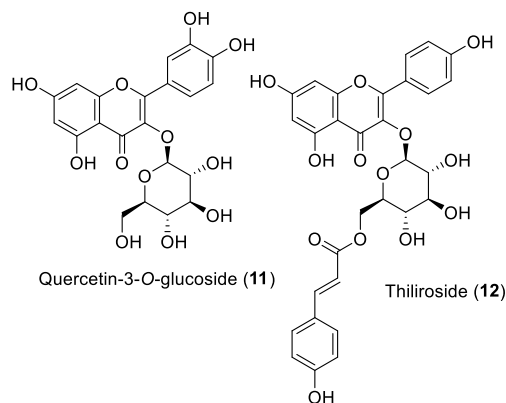


図 1-6. Quercetin-3-O-glucoside (11)、thilioside (12)の構造

に含まれる quercetin の 3 位に配糖化反応が進行した quercetin-3-O-glucoside (11) では卵巣ガン細胞において細胞内 ROS 生成の阻害効果が報告されている⁵²⁾。また、(株) サントリーの特定保健用食品 (飲料) 特茶では quercetin-3-O-glucoside (11) の機能性⁵³⁾ を利用した商品である「からだ巡茶アドバンス」ではローズヒップ由来の thilliroside (12) が含まれており、thilliroside (12) には抗酸化作用などが報告されている⁵⁴⁾。天然に存在するポリフェノール配糖体は、グルコース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、グルクロン酸などの単糖類に加え、二単糖や三単糖が結合した化合物^{51,52)}、またグルコースにフェルラ酸などが付加した配糖体の単離も報告されており多岐にわたっている。ポリフェノール化合物はベンゼン環が多く含まれ一般的に脂溶性が高い場合が多い。ここに糖が結合することによって水溶性が高まることから生体内での輸送などに都合がよいと考えられる。

植物中には前述の糖分子やメチル基など様々な官能基で修飾を受けたポリフェノール化合物が多く、それらが任意の割合で混合しており複雑な混合物として存在している。それゆえ、特定の化合物、とくに、微量成分を植物中から単離することは極めて困難である。このような複雑な混合物から化合物を単離する場合、次のような手順をとる；

- ① キログラム、あるいは、数百グラムの原料 (植物) を確保し、適した溶媒にて抽出を行う。このとき、使用する溶媒によって抽出される化合物の量や混合比率が変化するため条件検討が必要となる。
- ② 抽出された溶液を濃縮して各種機器分析、成分分析を行い (主に液体クロマトグラフィー-HPLC などを用いる)、目的の化合物を単離する戦略を立てる。
- ③ 液液分配や各種クロマトグラフィーにより、化合物を分離・精製していく。このとき、一種類の条件では分離できないことが多いため、条件を変えて数回精製を繰り返す。
- ④ 精製された化合物の構造解析を行い、先行文献などと比較して構造を決定する。構造確認には核磁気共鳴や X 線構造解析などの機器分析を行うことが多い。

このように単離を行うが、キログラムスケール、あるいは数百グラムスケールから開始しても、得られる化合物量はミリグラムスケールまで減少することが多い。このため、植物に含まれる微量のポリフェノール化合物の機能性評価や構造確認などは、現在でもほとんどなされておらず、植物から大量に、かつ、簡単に確保できる化合物を用いた研究が主流である。しかし、植物を食品として摂取した場合、微量成分も同時に摂取する。もし、ある化合物と比較して 100 分の 1 量しか含まれない化合物が、その 100 倍量含まれる化合物よりも活性が高い場合、その植物の機能性は正しく評価されていないことになると考えている。すなわち、微量成分の単離・評価は食品の機能性評価に重要であり、必要な研究であると考えている。さらに、単離すらできない現在の分析機器では検出限界以下の含有量の化合物もある可能性がある。

このような微量成分を確保する方法として、次のような方法が考えられる；

- ① 人工的に合成して確保する：有機合成と生合成酵素を利用した方法があるが、前者は合成法の開発が必要であり、後者は生合成酵素を遺伝子組み換え技術によって入手する必要がある。
- ② 機能性が高い微量成分を多く生産する栽培法を検討する：植物に含まれる二次代謝産物は、その生育条件により含有量に変化する。この方法の場合は植物の栽培をしなければならず栽培場所の確保が必要なうえ生育するまでの時間が必要となる。

大阪電気通信大学工学部齊藤研究室では、植物に含まれる微量ポリフェノールの探索⁵⁵⁾や、高い機能性を発揮する構造を明らかにすることを目的に、機能性が高いと予想される化合物を上記①、②の両方で確保する検討を行っている。また、確保した純粋な化合物を用いて構造-活性相関研究を実施し、微細な構造が生物活性に大きく影響することが確認されている。⁵⁶⁾ポリフェノールの微量成分に関する研究を実施している研究者は多いが、多くは①か②かのどちらかで実施しており、両方を実施している例は極めてまれである。以下、齊藤研究室で実施している研究について簡単に述べる。

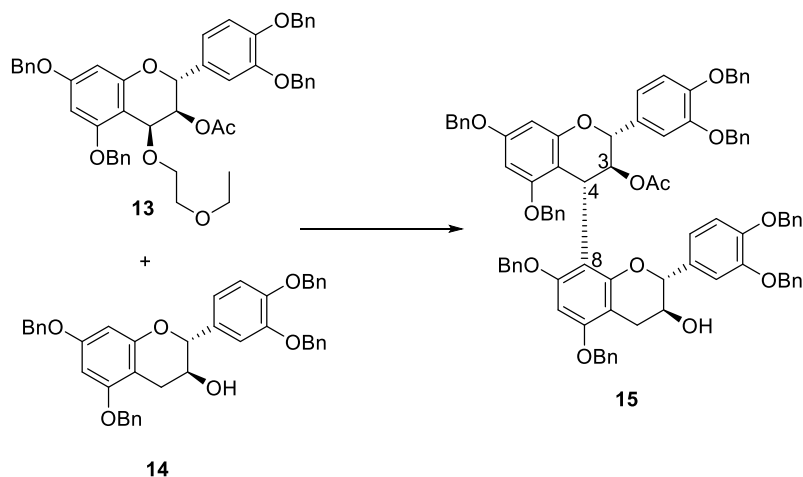
①人工的に合成で微量成分を確保する研究

齊藤らは、PA オリゴマーの合成法の検討、開発を行ってきた⁵⁷⁾。PA オリゴマーは様々な方法で合成されているが一般的な合成法は、(+)-catechin (**1**)や(-)-epicatechin (**2**)から保護基などを導入して誘導したフラバン-3-オール誘導体の4位に発生させたカチオンに、もう一分子のフラバン-3-オール誘導体を縮合させてオリゴマー構造を構築していく手法を用いている⁵⁷⁾。この4位は、ベンジル位に相当し、カチオンが安定しやすい構造である。一方で、2位もベンジル位に相当するが、2位に結合しているB環や3位の水酸基が嵩高いため、カチオンが生成しにくいと考えられる。

実際の合成法をスキーム 1-2 に示した。カチオンを発生しやすくするため、4位に脱離基を導入した求電子体 **13** を合成し、この化合物に酸触媒（ルイス酸など）を作用させ速やかにカチオンを発生させることができる。このように、2分子のフラバン-3-オール誘導体を反応させる方法を、ここでは「分子間縮合反応」による合成法と呼ぶ。新たに生成した4-8間の結合は、3位の水酸基に対して *trans* 配置をとるような生成物が優先して得られる。

このとき、求電子体 **13** の4位に、どのようにカチオンを発生させるか、求核 **14** の6位と8位のどちらを反応させるか（試薬選択）、求電子体 **13** の4位に、 α 、 β のどちらかの側から選択的に反応させるか（立体選択性）、生成したオリゴマー **15** が縮合する度合い（重合度の）をどのように制御するか、さらに、フェノール性水酸基の保護基に何を用いるか、などの検討をそれぞれ行う必要があり、これらがオリゴマー合成法開発のポイントとなる。

これまでの合成研究において様々な検討がなされ、この縮合反応については以下のことがわかっている⁵⁷⁻⁷⁴⁾。



スキーム 1-2. 分子間縮合反応による 2 量体合成法

- 1) 求電子体の 4 位の脱離基としてエトキシエタノール (EEOH) が、酸化反応で導入した求電子体の合成収率や安定性、その後の縮合において最も優れている。メチル (Me) 基、イソプロピル (iPr) 基、ベンジル (Bn) 基、アセチル (Ac) 基などでは、酸化反応の収率、縮合における反応性、求電子体の安定性において、エトキシエチル (EE) 基に劣ることが確認されている。また、水酸基の場合は、化合物自体が不安定となり、分解しやすいことも確認されている⁶⁰⁾。
- 2) 求核体の 5 位と 8 位を Bn 基や *t*-ブチルジメチルシリル (TBDMS) 基で保護した場合、8 位の反応性が 6 位に比べ圧倒的に高く、8 位が選択的に反応する。保護基がない場合では 6 位と 8 位の両方に反応するが、この場合も 8 位が優先する。当研究室卒業生の条件検討により、求核体のフェノール性水酸基の 5 位を電子吸引性の保護基で保護した場合、8 位の反応性が下がり縮合反応が進行しないことが明らかになっている⁷⁵⁾。

フラバン-3-オール(+)-catechin (**2**)は、2,3-*trans* 構造を持ち、この誘導体を求電子体とした場合は、温度などの反応条件によって選択性が変化しやすい。3 位に導入した官能基の大きさ・種類によりその立体選択性は変化する。求核体 3 位をエステル化することによる隣接基関与を利用し、かさ高い求核体を反応させた場合では、より 3,4-*trans* 体が優先して生成しやすい。また Bn 基で保護した求核体を用いた場合微量に 3,4-*cis* 体が生成されるが Bn 基よりも嵩高い TBDMS 基を用いると 3,4-*trans* 体の選択性が向上する。2,3-*cis* 型のフラバン-3-オールである(-)-epicatechin (**3**)を求電子体とした場合には、3,4-*trans* 体が選択的に生成する。これは、2 位と 3 位の置換基が同じ方向にあるため、

求電子体の攻撃が官能基と反対側から優先して起こるためである。Bn で保護した(+)-catechin (2)を用いて2量体合成を行った初めての例において、縮合位置の選択性は3,4-*trans* : 3,4-*cis* は2:1程度であった⁷⁶⁾。また、(-)-epicatechin (3)のオリゴマー合成では異性体についての記述はないことか⁷⁷⁾、他研究グループにおいても立体選択的に縮合が進行しており異性体の生成は確認されていないと考えられる。

- 3) 当研究室では、自己縮合による長鎖のオリゴマー生成防ぐために、過剰量の求核体を用いて縮合反応を行っている。求電子体の8位にハロゲン置換基を導入し、過剰な重合が起きないように工夫して合成している例も報告されている⁷⁸⁾。また、反応に用いるルイス酸の種類により自己縮合を防ぐ手法も報告されている⁷⁹⁾。
- 4) フェノール性水酸基の保護基についても多くの報告がある。Ac基やMe基は、構造決定の際の誘導体として用いられることが多く、安価に合成を行うことができる保護基であるが、これらは穏やかな条件で脱保護を行うことが難しく、PAのような反応性が高い化合物では、脱保護の条件で分解する可能性があるため、このような合成で用いられることは少ない。これにかわって水素による接触還元による脱保護が可能なBn基が主に用いられている。一方で、Bn化による副生成物として、C-Bn化合物の存在が精製を困難としていることも確認されており、保護基については検討の余地がある。

また、これらの天然の化合物の合成だけではなく、非天然のPAオリゴマーの開発も報告している。例えば、procyanidin B1(16)の下ユニット、上ユニット、それぞれをアセチル(Ac)化した化合物17と18で子宮頸ガン細胞HeLa S3に対して細胞増殖抑制活性試験を行い、

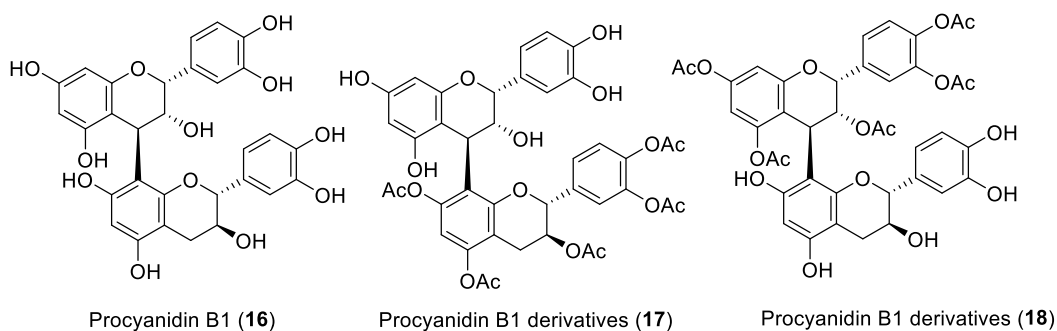


図 1-7. Procyanidin B1 誘導体

下ユニットをAc化したとき、活性が増加したことを報告している⁸⁰⁾。また、Hamadaらは、procyanidinの上下のユニットを入れ替えた19と20の2量体合成を行い、子宮頸ガン細胞HeLa S3に対する増殖抑制抑制活性では、19が20よりも活性が高いことが確認され、上部ユニットが活性に重要であることを見出して報告している⁵⁹⁾。HigashinoらはTBS基で保護されたフラバン-3-オール誘導体の5位を酸性条件で脱保護する手法を開発している⁸¹⁾。

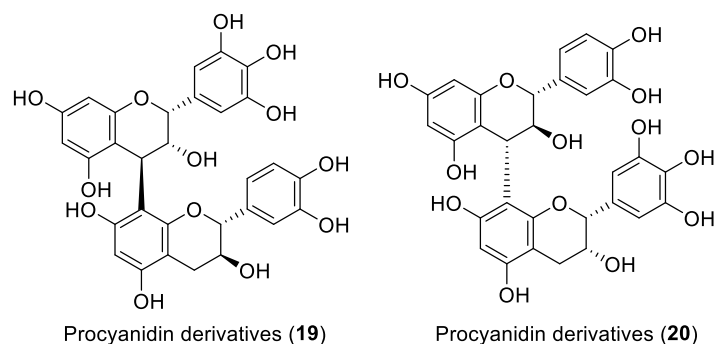
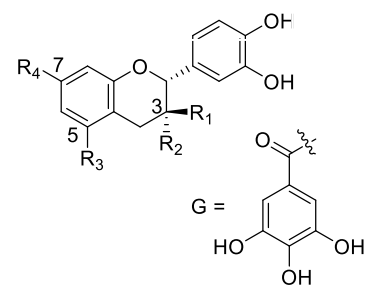


図 1-8. Procyanidin オリゴマー 誘導体

Higashino らの方法を用いて Mori らは (+)-catechin (2)や(-)-epicatechin (3) の 3,5 位、ガロイル基を導入した化合物の 21,22 の合成を行い 22 で子宮頸ガン細胞 HeLa S3 に対する増殖抑制抑制活性で活性が高いことが確認された⁵⁶⁾。また Hojima らは塩基性条件下で TBS 基で保護されたフラバン-3-オール誘導体の 7 位を脱保護する方法を開発している。この脱保護された 3,7 位にガロイル基を導入した化合物の 23,24 の合成を報告している⁸²⁾。



- 21: R₁ = R₃ = OG, R₂ = H, R₄ = OH
 22: R₁ = H, R₄ = OH, R₂ = R₃ = OG
 23: R₁ = R₄ = OG, R₂ = H, R₃ = OH
 24: R₁ = H, R₃ = OH, R₂ = R₄ = OG

図 1-9. フラバン-3-オール単量体の構造

②機能が低い微量成分成分を多く生産する栽培法を検討する

まず、栽培場所の確保・栽培法の検討を行った。栽培場所として地域の社会福祉法人の持つ畑にビニールハウスの圃場、また、学内(旧 F 号館前)に圃場を確保した。これらの場所において、機能性ポリフェノールを多く含むラズベリー(キイチゴ、フランボワーズ、学名: *Rubus idaeus*) をモデル植物として検討を行った。これらの栽培立ち上げに学部 3~4 年生の時に関与していたが、露地栽培やポットでの栽培を検討したところ、様々な問題点が明らかになった。微量成分の分析を試みたが、露地栽培やポット栽培、ハウス栽培では、その時の気候で大きく含有量に変化し複数年における再現性を確保することが難しいことが確認できた。とくに近年気候の変動が大きくデータの信頼性を確保することが難しいと考えた。そこで、環境に影響されずに栽培が可能な植物工場ユニット「アグリキューブ」を確保し検討を行うことにした。また、栽培時、土の状況によって大きく栽培環境が変化することも問題の一つであった。土の成分やそこに生育する微生物によって、生育状況が変化した。また、昆虫による食害も発生した。そこで、根の保持剤を検討したところ、四条畷市のグリーンガーデン(砂栽培の貸し農場)の協力を得て、砂を用いたラズベリーの栽培を検討した。砂栽培は液肥で栽培できるが、適度な空気を根に供給することができる方法でラズベリーの栽培が可能であることを確認した。ラズベリーを液肥で栽培した例は調べた限りでは報

告例がなく、本例が最初の例である。このように栽培環境を整え、本博士論文研究に関する研究を実施可能となった。

これらの背景をふまえ、本博士論文研究では、生体触媒を効率的に用いて新たな化合物確保の方法を開発するとともに、生物学的手法と化学的手法を用いた 2 つの方法からフラバン-3-オール誘導体の生産検討を行った。具体的には、以下の手法を用いて検討を行った。

- ① 生物学的手法として 3-1 章で植物体であるラズベリー(*Rubus idaeus*)を露地で栽培し果実が開花した段階から生育段階に分けポリフェノール化合物の成分分析や定量分析を行った内容について述べた。また上記サンプルについて PCR 法を用いたポリフェノール生合成酵素の発現確認を行った。果実では成熟するとともに機能性フラボノイドが減少傾向にあること、また、その原因が赤い色素であるアントシアニン生合成酵素 (ANS) の発現増加であることを確認した。これより、成熟した段階でのポリフェノールを増加させる必要性が示唆された。
- ② 3-2 章では植物工場ユニット内で異なる波長の LED を照射した時のラズベリー果実の成分分析や定量分析、ポリフェノール生合成酵素の発現量の確認を行ったことを述べた。3-1 章では、成熟するとともに機能性フラボノイドが減少傾向にあることを見出した。そこで、紫色光照射下で栽培することで ANS の発現を減少させることに成功し、機能性フラボノイドを果実中で増加させることに成功した。
- ③ これまで果実に異なる波長を照射し成分分析を行ってきたが、3-3 章ではラズベリー葉に LED を照射した時の成分分析を行った。葉においては、青色光照射下で栽培することで生合成経路の上流の酵素を活性化できることが確認され、機能性フラボノイドであるフラバン-3-オール誘導体を増加させることができた。
- ④ 3-4 章ではラズベリー培養細胞を樹立し培養細胞に LED を照射した時の成分分析を行った。その結果、ラズベリー培養細胞では、青色光や緑色光の照射によりフラバン-3-オール誘導体生合成経路の上流の酵素が活性化され生産量を増加させることに成功した。次に 3-5 章~3-8 章では、研究室内で保有している「有機合成フラボノイドライブラリー」中の化合物を生体触媒で変換して新たな化合物を生産する検討を行った。生体触媒として、植物培養細胞 (ブドウ、ラズベリー)、シロイヌナズナ由来糖化酵素、糖化酵素導入酵母菌体、動物肝臓ミクロソームを用いて検討を行い、各生体触媒で特徴的な化合物を確保することに成功した。
- ⑤ 3-5 章では 3 種類の植物培養細胞を用いたフラボノイド化合物の変換・配糖化反応を行った結果を示した。
- ⑥ 3-6 章では数種類の動物由来の肝臓ミクロソームを用いてフラバン-3-オール誘導体のグルクロン酸抱合反応を行った結果を報告した。
- ⑦ 3-7 章ではシロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 導入大腸菌を用いて 2 種類の方法

でフラボノイド化合物の配糖化反応を行った。

- ⑧ 3-8 章ではタルウマゴヤシ由来糖転移酵素 UGT71G1 導入酵母菌体を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応を行った。

3 章では生物学的手法を用いて研究を行ったが、4 章では化学的手法を用いて研究を行った。生物的手法ではトライ&エラーで生成物が得られる条件を探す必要があるが、有機合成は目的の化合物をデザインして得ることができる。4-1 章、4-2 章では有機合成にてラズベリーに含まれるフラバン-3-オール 3 量体の合成、および、フラバン-3-オール誘導体の配糖化に成功した。

- ⑨ 4 章では主に化学的手法について述べ、4-1 章ではラズベリーに含まれている procyanidin オリゴマーの合成を行った。

- ⑩ 4-2 章では有機合成の技術を用いてフラバン-3-オール誘導体の配糖体合成を行った。

①、②、③、④では、ラズベリー（キイチゴ、フランボワーズ、学名：*Rubus idaeus*）の植物体や植物細胞をターゲットとして研究を行った。ラズベリーは広い農場を持たない本学でも栽培が可能で、栽培にあまり手間がかからない、かつ、フラバン-3-オール誘導体を始めとして様々なポリフェノール化合物が多く含まれている^{82,83,84}。ラズベリーは、図 1-10 に示したように赤い色で、最大直径 2 センチ程度の果実が実る植物である。基本的に根茎で増殖する多年生の植物であるため栽培に手間があまりかからず、栽培にも広い場所を必要としないことから本学でも栽培が可能であると考えた。

ラズベリーの品種の選択は、1 年に 2 回収穫が可能な 2 季なり種、及び、1 年に 1 回収穫が可能な 1 季なり種がある中から、実験に必要なサンプルの確保が容易な 2 季なり種が適当だと考えた。また、品種は、種苗法に登録されている品種であれば品質や遺伝子が安定していると予想されることからヒンボートップ(種苗法登録名称 *Rafzaqu*)を選



図 1-10. ラズベリー(*R. idaeus*)

択し、研究を進めた。また、ラズベリーには、フラバン-3-オール誘導体を大量に含有しているという報告があり^{82,83,84}、その論文中には各種ベリー類の中でラズベリーの PA 量が最も多いという記述がある。一方で、ブラックベリー (*R. fruticosus*)では、抗酸化活性が高く総フェノール量や総アントシアニン量が多いということが確認されている^{85,86}。

これらを踏まえ、本研究では、ラズベリーに含まれる PA 類を含むフラバン-3-オール誘導体の定量、および、それらを増加させる栽培法・栽培条件について検討を行った。ここで重要になるのは、一定の環境下で栽培して検討することである。一般的に、植物中に含まれる化合物量は気候など（温度、湿度、光の強さなど）の変化に大きく影響される。露地栽培では年度で環境が変わるため実験の再現性が得られず、実験として成立しない場合が多い。そこで本研究では、栽培条件を一定に保つことができる植物工場ユニット中でのラズベリー栽培に挑戦した。ラズベリーのように根茎の作物について植物工場ユニット内で栽培でき

ている例はほとんど無く、ラズベリーでは調べた限り報告がなかった。植物工場ユニット内において、栽培時の光の量や波長、栽培温度などについても検討を行うことができ、その結果、光の波長によってポリフェノールの各成分量に大きな差が出ることを確認できた。

⑤、⑥、⑦、⑧では、生体触媒を用いたフラバン-3-オール誘導体の合成を試みた。当研究室では有機合成により様々なフラバン-3-オール誘導体を確保し、構造-活性相関研究を行ってきた^{59,81)}。しかし、有機合成では効率よく得ることが難しい化合物群がある。その中でも糖化された化合物（配糖体、抱合体などと呼ばれる）は有機合成が難しい。それは、フラバン-3-オール誘導体には複数の水酸基があるが、位置選択的に糖化するためには、保護基の導入など多くの工程数が必要なためである。一方で植物内には、様々な配糖体が含まれることから、配糖化する酵素が存在する。酵素は基質特異性が高く、決まった位置に決まった分子を導入することができる生体触媒であることから、有機合成で得ることが難しい配糖体を効率的に得られると考えた。まず、植物培養細胞を用いた配糖体合成を行った。配糖体合成に関する文献⁸⁷⁾に従い、同様な方法を用いてフラバン-3-オール誘導体の配糖化も可能ではないかと考え検討した。糖化反応をすることにより化合物の生物活性が上がることも報告されている^{88,89)}。また、植物培養細胞を用いるならば、その生成物は有機合成で得られたものと異なり、食品に添加することが可能となる。

⑤ポリフェノール化合物を用いた植物細胞の配糖化反応は多くの論文が報告されている^{87,90-95)}。しかし、ブドウ培養細胞やラズベリー培養細胞を用いた反応やフラバン-3-オール誘導体を用いている研究は報告されていない。

まず、ブドウ培養細胞を用いてフラボノール化合物の配糖化反応をおこない、配糖化化合物を合成することができた。フラバン-3-オール誘導体の EGCG (**5**)や(-)-epicatechin (**3**)を用いた時、配糖化反応ではなくオリゴマー化反応が進行した化合物が得られることを確認した。一方、ラズベリーの葉から樹立した培養細胞を用いた場合は、フラボノール誘導体の糖化反応が進行した。ブドウ培養細胞とラズベリー培養細胞では同じ化合物が得られたが、それぞれに特徴的な生成物が確認された。これにより、安価なフラボノイド化合物から高価な化合物を調整することが可能となった。

⑥肝臓ミクロソームは生体内に吸収された毒物を抱合化することで無毒化をされる事が知られており⁹⁶⁾、この機能性を利用し、フラバン-3-オール誘導体 **21**、**22** の2つの化合物を用いて用いてグルクロン酸抱合反応を行った。これより3位の立体が異なるだけだが複数の生成物と考えられるグルクロン酸抱合体が検出された。

⑦シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応では2種類の方法を用いて配糖体の合成を行った。1つ目として、大腸菌体で発現させ

た配糖化酵素を大腸菌から破碎し取り出し精製した酵素を用いる方法。2つ目は大腸菌体を破碎せずに配糖化反応を行った。精製した酵素を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応では、配糖化反応は進行しないことが確認された。しかし、大腸菌体を破碎せず行った方法ではフラバン-3-オール誘導体の(-)-epicatechin 誘導体で糖化反応が進行することが確認された。酵素で反応が進行しなかった理由として、酵素ではフラボノイド化合物が阻害剤として機能し反応が進行しなかったのではないかと考えた。これより、配糖化反応が難しいフラバン-3-オール誘導体の微量成分の配糖化化合物の生産を可能とした。

⑧シロイヌナズナ由来の酵素を用いた配糖化反応ではフラバン-3-オール誘導体は反応が進行しなかったことから、タルウマゴヤシ由来糖転移酵素 UGT71G1 導入酵母菌体を用いてフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応を行った。UGT71G1 導入酵母菌体を用いた時、配糖体と考えられる生成物が確認された。反応が進行した理由としては、酵素ではフラボノイド化合物が阻害剤として機能しているが、菌体内での反応の場合、様々分子が存在しており酵素の阻害が抑えられたと考えている。

これまで、植物体や生体触媒を用いてポリフェノール化合物の生産検討をおこなってきたが、⑨、⑩では化学的な手法を用いて生産検討を行った。ラズベリーには **procyanidin 3** 量体が含まれているという報告がされていたことから、3 量体の合成検討を行った。同定が難しい 3 量体を有機合成したサンプルを用いて同定することに成功している。また、これまで、フラバン-3-オール誘導体のアグリコンの合成を行ってきたが、今回、フラバン-3-オール誘導体の配糖体の合成を行った。配糖体の合成についても 3 章で得られた化合物の同定や機能性評価を行うために実施し化合物の合成に成功し、配糖体に関する抗酸化活性について検討し新たな知見を見出した。

このように、本博士論文研究では、植物体や生体触媒、有機合成の手法などを用い効率よく機能性の高い微量なポリフェノール化合物の生産を行うことを目的に研究を行った。

第2章 概論

2-1. フラバン-3-オール誘導体の構造と機能

序論に記載したように、フラボノイドは二次代謝産物として広く植物に存在し、フラボン、フラボノール、フラバノン、フラバノール、イソフラボン、カルコン、アントシアニンなどに分類され、さらに、これらに糖（単糖、二糖）が β -グリコシド結合しているため、非常に多様な構造を持つ化合物群として存在する⁹⁷⁾。

フラバン-3-オール誘導体は図 2-1 に示すような基本骨格を持ち、ベンゼン環を複数の水酸基で置換された化合物である。この構造を持つ化合物は様々な植物に含まれ古くから機能性があることが知られていたが、近年、ガン細胞増殖抑制活性⁹⁸⁾、抗酸化活性⁹⁹⁾などをはじめとする様々な強い生物活性などが報告されており、その有効利用と機能性の化学的解明研究が注目されている。

しかし、植物から得られる抽出物は複雑な混合物として得られ、それぞれの化合物を純粋に入手することが難しい。その理由として、フラバン-3-オールはC環の2位のアリール基、および3位の炭素が光学異性であること、多数ある水酸基への複雑な修飾があること、など極めて多くの類縁体が存在することがあげられる。また、それぞれの類縁体の化学的な物性は極めて似ており、化合物の性質の違いから分離する一般的な分離方法では分離が難しい。このことから複数のフラバン-3-オール誘導体を含む植物から一つの構造のみを単離することは困難とされており、混合物としての機能を証明することしかできない。それゆえ、個々の化合物の活性や構造と活性の相関、また、生体に対する化学的な機能の詳細な証明が現在でも難しい状態にある。我々は、微細な構造の違いが生物活性に大きな影響を与えていると考えているが、抽出によって得られる微量の化合物では機能解明に十分なデータが得られないうえ、対照実験に用いる化合物を入手できないため、天然から得られるサンプルでは証明が不可能である。そこで、有機合成の技術を用いてそれぞれを純粋、かつ、大量に合成し、その機能、および、構造-活性相関研究を行ってきた。

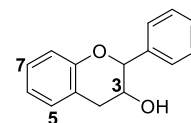


図 2-1. フラバン-3-オールの基本構造

2-2 ラズベリー(*Rubus idaeus*)

商業的に生産されているラズベリーは序論でも述べたように根茎の一年草である。日本国内では、北海道、秋田県、富山県、滋賀県などで栽培がおこなわれており、基本的に寒冷な地域で生産されることが多い。一方で、野生のキイチゴは日本全国に生育していることから、暑い地方でも生産できる可能性はある。

ラズベリーの果肉は柔らかく、遠距離の運搬は現状難しいとされている。秋田県立大学ではラズベリー専用の運搬容器の開発を行ったが実用化までには至っていない。大阪のよ

うな大都市圏でラズベリーを栽培することは、商業的にもニーズがある。

2-3 活性酸素

人間が生きていく上で酸素は必要である。人間は呼吸により酸素を取り込み、主にミトコンドリアに存在する電子伝達系により、アデノシン三リン酸(ATP)を産生し生命活動に必要なエネルギーを得ている。しかし、酸素は人間にとって有害な物質であり、人間が光や紫外線などのストレスを受けると生体内で活性酸素になり、細胞内部で様々な化学反応を引き起こす。活性酸素には、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシド、一重項酸素などがあり、これらをまとめて活性酸素種(ROS)と呼ぶ¹⁰⁰⁾。酸素が1電子還元されると、スーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)となる。スーパーオキシドがさらにもう1電子還元されたものは O_2^{2-} であるが、これに H^+ が2個つくと過酸化水素(H_2O_2)になる。過酸化水素がさらにもう1電子還元されると、O原子とO原子の間の結合は安定に存在することができず、結合が切れて、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)と水酸化物イオン(OH^-)となる^{101,102)}。

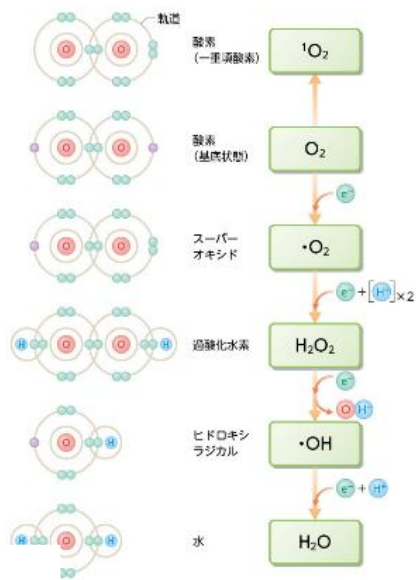


図 2-2. 活性酸素の種類

2-4 生体触媒

生体内で働く酵素や、生体そのものを化学反応に用いたりする場合、それらの酵素や生体を「生体触媒」とよぶ。酵素とは生体で起こる化学反応において触媒として機能するタンパク質であり、生体内の様々な化学反応はこの酵素が触媒として活性化エネルギーを低下させることにより、体温程度の温度でも反応が速やかに進行する。化学触媒と最も大きく異なる点としては、生体は基質特異性、あるいは、構造特異性が高い点が挙げられる。フラバン-3-オール構造のように、性質や環境の類似したフェノール性水酸基が分子内に多数存在する場合、化学反応では選択性を得ることは難しいが、生体触媒を用いた場合では選択性が期待できる。一方で、選択性が高いため、目的の化合物と反応しないことも多い。

2-4-1 植物培養細胞

植物培養細胞（カルス）は、植物が傷を受けることによって細胞が出す傷害ホルモンにより傷回りの組織が分裂してできる細胞を指す。一般の植物体は様々な器官に分化して存在しているが、植物培養細胞（カルス）は脱分化し、様々な器官に分化可能な万能細胞になる。植物体の成長速度と比較し、脱分化した培養細胞は液体培地による振盪培養が可能であり、増殖スピードが速く、条件検討を比較的短期間で行うことが可能となる。

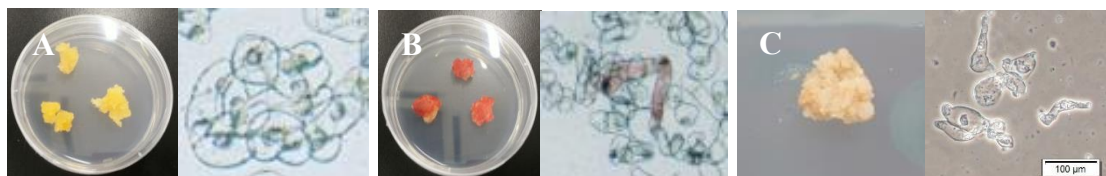


図 2-3. 研究に用いた植物培養細胞

A: ブドウ培養細胞のアントシアニン色素を合成しない VW 細胞, B:ブドウ培養細胞のアントシアニン色素を合成する VR 細胞, C: ラズベリー培養細胞

・ブドウ培養細胞 (*Vitis vinifera* L.)

ブドウ培養細胞は理化学研究所から購入したアントシニン色素を合成しない vitis white (VW)、アントシアニン色素を合成する vitis red (VR)の 2 種類の培養細胞を用いた。

・ラズベリー培養細胞 (*Rubus idaeus*)

ラズベリー培養細胞は文献を参考に構築し、品種はヒンボートップ種 (ラフザック)を選択した。ラズベリーには多くのポリフェノール化合物や生合成酵素などが含まれていることから選択した。

2-4-2 シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2

UDP 糖依存型配糖体化酵素 (UDP-sugar-dependent Glycosyltransferase:UGT)は、ホルモンや二次代謝産物などの様々な代謝物質に糖を転移する酵素である。モデル植物であるシロイヌナズナの場合、配糖化酵素が 107 種存在する¹⁰³が、その数は哺乳動物や酵母など他の真核生物と比較すると圧倒的に多く、植物の持つ多様な二次代謝産物の生産を支えると考えられている^{104,105}。低分子化合物に対する糖転移反応に関わる配糖化酵素は、ヌクレオチド糖を糖供与体として、糖受容体の水酸基やアミノ基、カルボキシ基などに糖を転移する反応を触媒する¹⁰⁴⁻¹⁰⁶。ヌクレオチドとして UDP、糖として glucose が一般的であるが、その他に galactose、rhamnose、xylose、glucuronic acid など多様な糖が利用される。UGT78D2 は糖供与体として UDP-glucose を利用し、glucose をフラボノイドの 3 位とアントシアニンの 5 位の水酸基に転移する¹⁰⁶⁻¹⁰⁸。

2-4-3 遺伝子組み換え酵母菌体

富山県立大学の生城真一教授に提供していただいた遺伝子組み換え酵母菌体を用いた。

遺伝子組み換え酵母菌体を用いることで酵素反応時に補基質として高価な UDP-glucose が不要となり静止菌体の状態において安価なグルコースで糖化反応を行うことができる¹⁰⁹⁻¹¹²⁾。

2-4-4 動物由来肝臓ミクロソーム

動物は体内に異物(化合物)が取り込まれたのち肝臓をはじめとする種々の組織において複数の代謝酵素による変換を受ける。これを薬物代謝というが、通常、代謝物は水溶性が増し、体外へ排泄されやすい形へと変換される。薬物代謝経路には酸化、還元、加水分解等を行う第I相反応と、極性の高いグルクロン酸などの置換基を付加する第II相反応に大別される^{111,112)}。今回、数種類の肝臓ミクロソームを用いて第II相反応で行われるグルクロン酸抱合反応を行った。

2-5 グルクロン酸抱合抱合酵素

グルクロン酸抱合酵素は薬物(化合物)やその代謝物の水酸基、カルボン酸、アミノ基にグルクロン酸を転移させる酵素である。グルクロン酸抱合酵素はミクロソームなどに存在し、ミクロソーム内で薬物(化合物)とグルクロン酸が抱合され無毒化されたのち尿として排出される。ミクロソーム内に多くの種類のグルクロン酸抱合酵素が存在している^{113,114)}。

2-6 シトクロム P450 (CYP)

シトクロム P450 はミクロソームに多く存在しており、分子量約5万のヘムタンパク質で複数の分子種が存在している。また、分子種によって、代謝する薬物(化合物)や局在組織が異なる^{113,114)}。

2-7 生物学的物質変換 (Bio-Transformation)

培地に特定物質を投与して培養細胞の酵素系によってその構造を修飾する生物学的物質変換は、目的とする有用物質の化学合成が難しく、植物細胞での蓄積は少ないが、培養細胞が化学合成の容易な先駆物質を効率よく転換しうる場合に有効な手段となっている¹¹⁵⁾。

2-8 アロステリック効果

活性部位とは異なるところに化学物質が結合することにより、酵素活性が変化する酵素をアロステリック酵素という。酵素に結合するアロステリックエフェクターには、正の効果をもたらす物質と負の物質をもたらす物質がある。いずれの場合も、アロステリックエフェクターが酵素し、酵素タンパク質の立体構造が変化することにより反応速度が変化する¹¹⁶⁾。

2-9 HPLC を用いた分析

HPLC は、液体の移動相をポンプなどによって加圧してカラムを通過させ、分析種を固定相及び移動相との相互作用（吸着、分配、イオン交換、サイズ排除など）の差を利用して高性能に分離して検出する分析方法である。HPLC は、溶媒に溶解できる物質ならそのまま測定ができ、分析目的以外に天然物成分や化学合成品などの分離精製するための分取装置としても用いられている^{117,118)}。

2-10 LC-ESI-MS を用いた分析

LC-ESI-MS は、liquid chromatography - electrospray ionization - mass spectrometry の略であり、分離と質量分析を同時に行うことが可能な機器である。様々な化合物が混じった混合物を液体クロマトグラフィーで分離後、分離した化合物を順次にイオン化し、各化合物の分子量を測定する。一般的に使用されている機器であるが、測定の限界がある。例えば、ピークの単離が出来ず分子量の値に信頼性が欠けてしまうこと、分子が全てイオンになってしまうこと、イオン化が行われてから様々なフラグメントイオンに分解されたりする場合があるため、データ解析を行う上で注意する必要がある。LC-MS 単体での化合物同定は化学的に不可能とされているが、有機合成によって出来た標準サンプルの測定や、実際に単離して構造決定するなどは核磁気共鳴装置(NMR)等の手法と組み合わせて測定を行うことにより、化合物の同定が可能となる。本研究では、ソフトなイオン化法の ESI 法を用いて測定を行っている。ESI 法とは、一般的な大気圧イオン化法(API)の一種であり、フラグメンテーションが少ないため、分子量そのものを検出しやすい。具体的には試料を極性溶媒に溶かし、約 2000 ~ 4000 V の電圧を印加したステンレスキャピラリーを通過させ、キャピラリー先端部から大気圧下に噴霧して出てきた溶液が脱溶媒され、帯電した液滴が静電引力と真空下の 2 つの効果によって質量分析計の内部へ輸送されて検出される¹¹⁸⁾。

2-11 PCR 法

PCR 法は、polymerase chain reaction 略で、ゲノムのような長い配列から特定の配列のみを選択して増幅する。サーマルサイクラーを用いて DNA の熱変異、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼによる相補鎖の合成を繰り返し行うことにより DNA を増幅する方法である。1 サイクルごとに DNA が 2 倍、4 倍、8 倍と指数関数的に増幅する。この方法を用いると、DNA を数時間で 100 万倍に増幅できる¹¹⁹⁾。

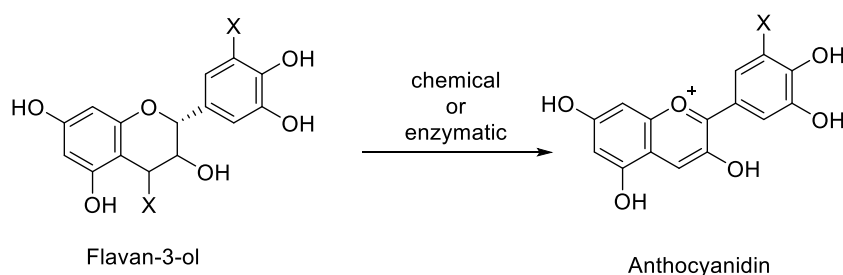
2-12 過去の PA の合成研究

PA 類は、活性酸素やフリーラジカルなどとの反応性に富み、アルカリ条件下では簡単に C 環の異性化や開環、転位反応などを引き起こす。そのうえ溶解性が悪く、反応に使用できる溶媒や合成や変換に適応できる反応に限られるなど、取り扱いやすい化合物とは言い難い。また、基本的に同じ構造単位の繰り返しであるため、オリゴマーの重合度が増すにつれ構造解析、特に NMR 測定では、ピークが同一領域に集中する傾向があり、さらに、回転異性体の出現、スペクトルのブロードニング現象などの解析を複雑にする要因が存在し、これらが合成研究の進歩を遅らせた原因と考えられる。(+)catechin (**2**)や(-)epicatechin (**3**)などのフラバン-3-オールを構造単位とする PA の立体選択的な合成研究に関して、Kozikowski ら^{120,121,122})による(-)epicatechin オリゴマーの合成研究、大森・鈴木ら¹²³)による(+)catechin 三量体の合成の報告が注目される。また現在までに真壁ら¹²⁴)による PA の合成について、吉田・近藤ら¹²⁵)によるポリフェノール化合物の合成についての総説が報告されている。

第3章 生物学的手法を用いた生産検討

3-1. ラズベリー果実を用いた分析研究

近年健康への関心が深まる中、食品に含まれる機能性物質が注目されている。その中でも多くの植物に含まれているフラバン-3-オール誘導体は、強い抗酸化活性⁹⁸⁾や、抗発ガン活性²⁸⁾、ガン細胞増殖抑制活性⁹⁹⁾、動脈硬化抑制³⁰⁾、胃潰瘍抑制^{26,30)}、抗ウイルス作用^{27,42)}、抗菌作用³³⁾などの生物活性を持つことが確認され、多くの分野で注目されている。さらに、赤いラズベリーはヒト口腔、結腸、前立腺腫瘍ガン細胞株の成長を阻害することが知られている¹²³⁾。ポリフェノールというといちごの赤色やブドウの紫色の色素であるアントシアニンを想像するが、当研究室がターゲットにしているのは赤い色素ではなく、無色または茶褐色の化合物群である。赤から紫色を示す色素であるアントシアニンは、化学的、あるいは、酵素的に、フラバン-3-オールがカチオンを持つ構造に変換されたものである。スキーム 3-1 に、その反応を示している。カチオンになることで水溶性が高くなり、フラバン-3-オール誘導体を持つ「渋み・えぐみ」が感じられなくなると同時に、ある程度の脂溶性が必要な細胞膜通過がしにくくなるため生体に対する機能性が低下する傾向がある。



スキーム 3-1-1. フラバン-3-オール誘導体から生成するアントシアニン

所属する研究室ではフラバン-3-オール誘導体の機能性の科学的証明と機能性が高い構造を明らかにし、それを人々の健康維持や疾病予防、健康寿命延伸に役立てたいと考え研究を進めている。そこで私は、本博士論文研究において、機能性の高いフラバン-3-オール誘導体が多く含まれている植物を栽培し、食品に利用できる形でのフラバン-3-オール誘導体の効率的な生産、および、提供を行いたいと考え研究を行った。栽培する植物としては、ラズベリーを選択した。ラズベリーは栽培のために広い栽培場所を必要とせず、かつ、地上部は一年で生え替わるため比較的低い背丈の植物である。本章では、学内で栽培したラズベリーの果実を成熟段階に分類して分析を行った、また、植物工場ユニットを用いて栽培環境を制御し栽培したラズベリーの分析も行ったので報告する。品種は、種苗法の登録品種であるヒンボートップ (RAFZAQC) とした。これは、遺伝子的な状態を含む苗の状態について、常に安定した品種の苗を入手できるためである。

3-1-1. 土壌栽培ラズベリー果実の成分分析とポリフェノール合成酵素の解析

本博士論文研究において選択したラズベリーは、成熟するにつれて赤色に変化していく果実である。そこでまず、機能性が高いフラバン-3-オール誘導体などのポリフェノール類がラズベリー果実のどの成熟段階において生産されるのか、また、その色と機能性ポリフェノールの含有量の変化など確認するため果実の分析を行った。

Stage 1 2 3 4 5 6 7 8



図 3-1-1. 開花からの日数による stage 分類

図 3-2-1 に示したように、開花からの日数により 8 グループに分類したラズベリーを用いて実験をおこなった。各果実成熟ステージは、果実の大きさ、色、形などから次のように定義した。

Stage 1 (S1) : 開花後 6~9 日後に採取

Stage 2 (S2) : 開花後 10~14 日後に採取

Stage 3 (S3) : 開花後 15~18 日後に採取

Stage 4 (S4) : 開花後 19~23 日後に採取

Stage 5 (S5) : 開花後 24~28 日後に採取

Stage 6 (S6) : 開花後 29~30 日後に採取

Stage 7 (S7) : 開花後 31~36 日後に採取

Stage 8 (S8) : 開花後 37~44 日後に採取

以降これらを以降 S1~8 というように表記する。

まず、土壌栽培で得られたラズベリー果実の各 stage の、各種成分分析研究をおこなった。土壌栽培で栽培し収穫したラズベリー果実をそれぞれの stage に分類し、それぞれを乳鉢ですりつぶしてメタノールで抽出し濃縮乾固後、DMSO で 100 mg/mL 溶液とした粗抽出液を用いて分析を行った。一般的にメタノール溶媒を用いることでポリフェノール化合物が抽出されることが報告されている。また、化合物の溶解性などを考えメタノールで抽出を行った¹²⁶⁾。

3-1-2. 土壌栽培ラズベリー果実のポリフェノール類分析

土壌栽培ラズベリー果実の総ポリフェノール量の分析をフォーリンチオカルト法を用いて行った (図 3-2-2)。フォーリンチオカルト法は一般的に用いられている方法で、フォーリンチオカルト試薬がフェノール性水酸基により還元されて青色に呈色することを利用した測定方法である。総ポリフェノール量では、縦軸が総ポリフェノール量 (mg/mL) になっており、総ポリフェノール量は没食子酸 (25) 量に換算した値となっている。植物抽出液中の総ポリフェノール量を測定する場合、様々な構造を持つポリフェノール化合物が含まれており、どのような構造の化合物に換算するか選択する必要がある。同様な研究をしている文献のほとんどの場合で没食子酸に換算した値を論文で採用しているため、本研究でもこれを用いた。

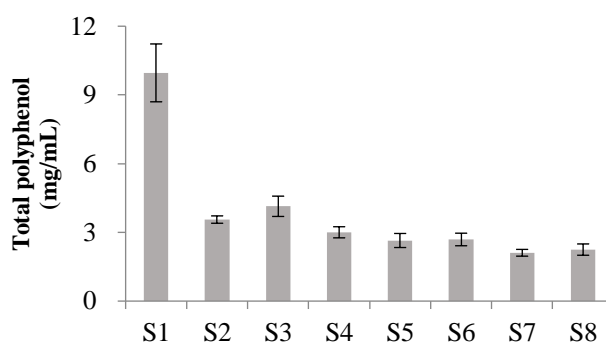


図 3-1-2. 土壌栽培ラズベリー果実の総ポリフェノール量分析

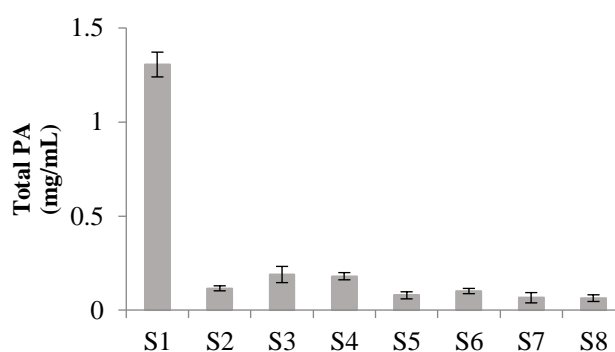


図 3-1-3. 土壌栽培ラズベリー果実の総 PA 量分析

グラフの横軸は各 stage No. を示している。グラフから、成熟度が低い S1 の総ポリフェノール量が多く 10 mg/mL 程度含まれることが確認できる。また、S2 から大きく減少することもわかる。これらの結果から、ラズベリー果実は、未熟な青い果実の時にポリフェノールを多く含み、そこから成熟とともに徐々に減少することが示唆された。

次に総ポリフェノール量を測定したものと同様の果実抽出液を用いて、ラズベリー果実各ステージの総 PA 量の測定を行った (図 3-1-3)。縦軸が総 PA 量 (mg/mL)、総 PA 量は procyanidin B2 (6) 量に換算した値となっている。この方法は、PA を含むポリフェノール化合物の多くが牛血清アルブミン BSA に非特異的に吸着することを利用した方法で、BSA に吸着させたあと、酸性の塩化鉄溶液を加えて加熱することでフラバン-3-オール誘導体のみがアントシアニジンの赤い色素となることを利用している。このとき、単量体のフラバン-3-オール誘導体が BSA に吸着しにくいことから、オリゴマー構造を持つ PA の定量が可能となる。総 PA 量においても総ポリフェノール量と同様に未成熟な S1 で含有量が多く、S2 からは大きく減少していくことが確認できた。

スキーム 3-1 で述べたように、果実が成熟につれて赤くなっていくのは、果実内でアントシアニンが生成するためである。これより総 PA 量の減少は果実内の PA がアントシアニンに変換されて減少しているのではないかと考えた。

そこで総アントシアニン量の分析を行った。アントシアニン

はメタノール溶媒だけでは分解しやすく、アントシアニンを分析する場合は、果実をメタノールで抽出したサンプルは使用できない。そこで、別途、果実を準備し、ギ酸を加えて酸性にしたメタノールで抽出を行い分析した酸性条件にすることでアントシアニンの構造が安定し分析をしやすいため酸性条件で抽出を行った。(図 3-1-4) 縦軸が 1 mL あたりに含まれるアントシアニン量 (mg/mL)、横軸が各 stage No.を示している。総アントシアニン量は塩化シアニジン(26)量に換算した値となっている。総ポリフェノール量、総 PA 量では果実が成熟していくと減少する傾向がみられたが、アントシアニン量では果実の成熟に従い増加した。つまり、果実が成熟する過程で果実に含まれるフラバン-3-オールが酵素などの影響によりフラバン-3-オールから分解してアントシアニンに変換されていることが確認され、アントシアニン量の変化は色の変化と相関があることが確認された。

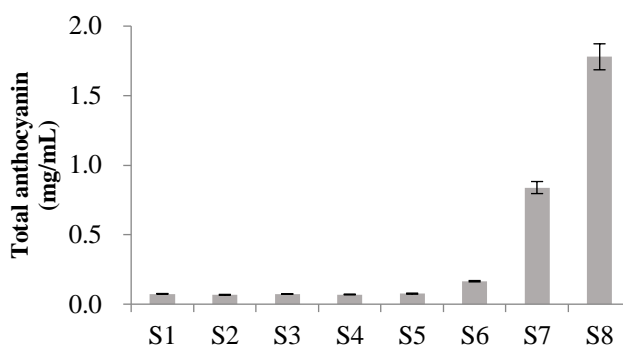


図 3-1-4. 土壌栽培ラズベリー果実の総アントシアニン量分析

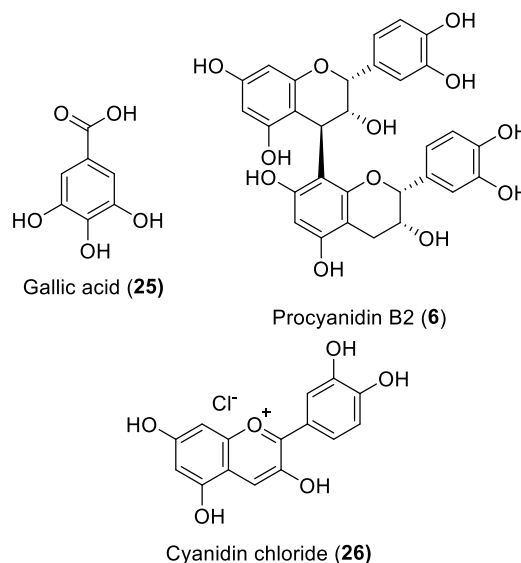


図 3-1-5. 検量線に用いた化合物群

3-1-3. 土壌栽培ラズベリー果実の VC 量、DPPH, ABTS ラジカル消去活性試験

次に、ビタミン C 量の測定を行った (図 3-1-6)。今回用いた総ポリフェノール量測定法は、化合物の還元力を測定するものであるため、還元力を持つビタミン C 量に影響されることが知られている^{127,128)}。そのため、総ポリフェノール量を測定する場合、同時にビタミン C 量も測定することで、より正確に総ポリフェノール量の変化を評価可能となる。また、ビタミン C は DPPH ラジカルを消去する能力も高い。図 3-

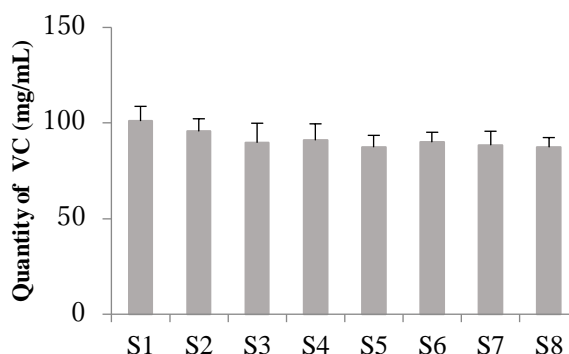


図 3-1-6. 土壌栽培ラズベリー果実の VC 量分析

1-6に、ラズベリー抽出液のビタミン C 量測定の結果を示した。縦軸がビタミン C 量 (mg/mL)、横軸が各 stage No.を示している。ビタミン C 量においては、果実が成熟してもビタミン C 量減少せず成熟段階で影響がないことが確認できた。

次に、図 3-1-7 で DPPH ラジカル消去活性試験、および、ABTS ラジカル消去活性試験を行った (図 3-1-7)。ポリフェノール化合物にはラジカル消去活性があることが知られている。総ポリフェノール量測定、及び、総 PA 測定によって、ラズベリー果実にはポリフェノール化合物が含まれていることが確認されたことから、ラジカル消去活性試験を行った。総ポリフェノール量や総 PA 量の変化と DPPH ラジカル消去活性の変化に相関があれば、化合物量の変化が活性に影響を与えていると考えることができる。

総ポリフェノール量測定、総 PA 測定に用いたラズベリー各 stage の抽出液を用いて DPPH ラジカル消去活性測定、および、ABTS ラジカル消去活性試験を行った結果を示した。縦軸がラジカル消去率 (%)、

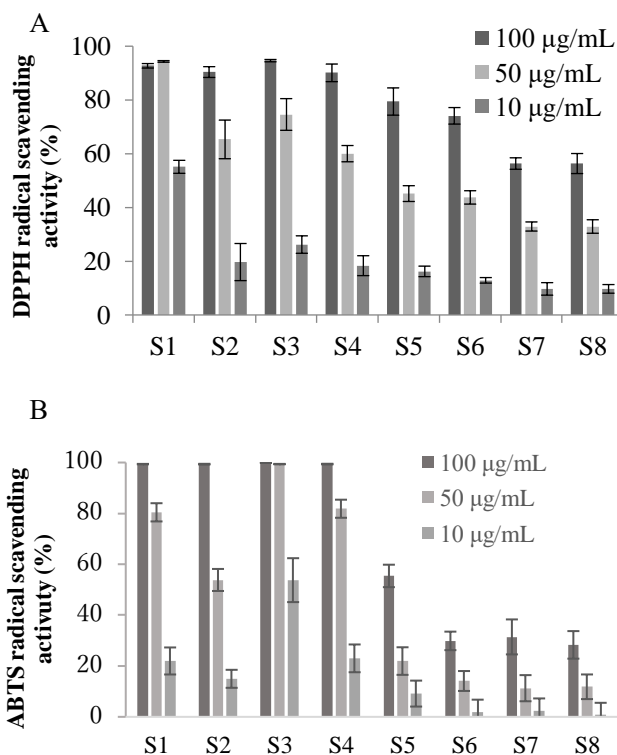


図 3-1-7. 土壌栽培ラズベリー果実のラジカル消去活性試験. A: DPPH ラジカル消去活性試験, B: ABTS ラジカル消去活性試験

横軸が各 stage No.を示している。また、測定を行った時の終濃度を 100 µg/mL、50 µg/mL、10 µg/mL となっている。DPPH ラジカル消去活性や ABTS ラジカル消去活性試験ともに S1 が最も高い活性を示し、成熟が進むにつれて活性が低下することを確認した。総ポリフェノール量や総 PA 量は S1 の果実に最も多く含まれていたが成熟段階での変化とラジカル消去活性の変化との相関性は低いと考えられた。

3-1-4. 土壌栽培ラズベリー果実中のグルコース類分析

次にラズベリー抽出液を用いてラズベリー果実に含まれる糖類の分析を行った。果実には甘味成分の糖類である、グルコースやスクロース、フルクトースなどの糖が含まれており、これらの糖類などが甘味成分となっている¹²⁹⁾。そこで、ラズベリー果実に含まれる糖類がどの程度含まれているか分析を行った。

まず、図 3-1-8 では総グルコース量の分析を行った。総グルコース量に関しては 2つの手法で分析を行った。1つ目の手法はフェノール・硫酸法¹³⁰⁾、2つ目は酵素法で糖測定キットを用いたヘキソナーゼ法^{131,132)}を用いた。フェノール・硫酸法はグルコースを硫酸と加熱することによりグルコースから furfural 誘導体が生成し、その後 furfural 誘導体のホルミル基がフェノールと縮合し発色する方法を用いた測定方法になっている (図 3-1-8-A)。酵素法を用いたヘキソナーゼ法は、グルコースをヘキソキナーゼによりグルコース-6-リン酸 (Glu-6-P)へと変換する。その後 Glu-6-P は NADP⁺ 存在下でグルコース-6-リン酸 デヒドロゲナーゼ (Glu-6-P DH)によりグルコノラクトン-6-リン酸 (Gluconolactone-6-P)へと変換され、NADP⁺は H⁺を受け取り NADPH となる。NADPH が 340 nm に発色する方法を用いた測定方法になっている (図 3-1-8-B)。これらのメリットとしては、どちらも簡便に測定できることが上げられる。しかし、フェノール・硫酸法では硫酸を用いるため危険であることが確認されており、ヘキソナーゼ法に関しては、キットを用いるため一回の測定が非常に高価になってしまうことがデメリットになっている。

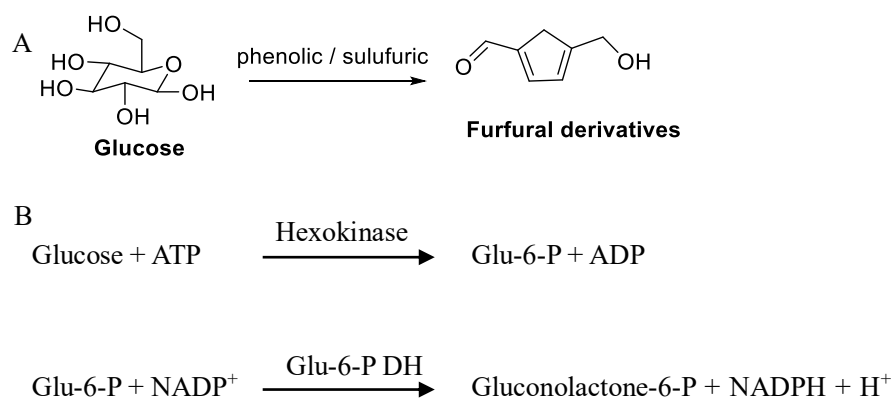


図 3-1-8. グルコース分析法

A: フェノール・硫酸法, B: ヘキソナーゼ法

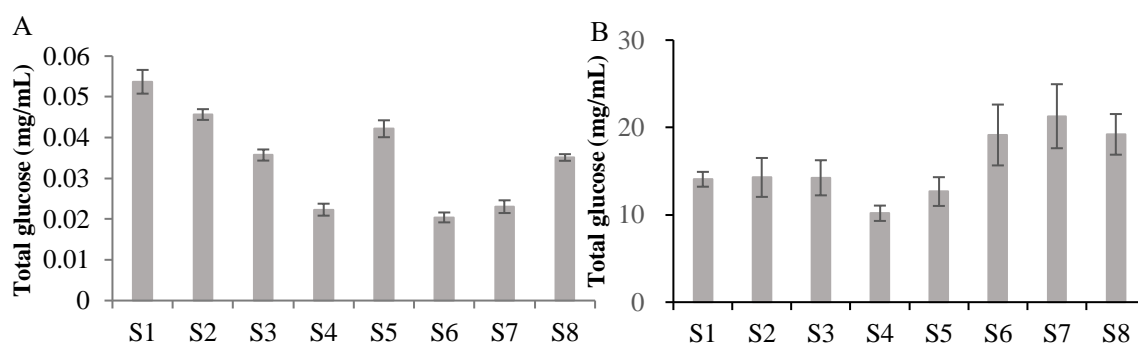


図 3-1-9. 土壌栽培ラズベリー果実中の総グルコース量

A: フェノール・硫酸法, B: ヘキソナーゼ法

縦軸がグルコース量を示しており、総グルコース量はグルコース量に換算した値となっている。Aがフェノール・硫酸法を用いて分析を行った。総グルコース量、Bがヘキソナーゼ法を用いた総グルコース量分析となっている。Aのフェノール・硫酸法を用いた総グルコース量では果実が若い時にグルコース量が多く成熟に従い減少することが確認された。Bの総グルコース量では成熟したS6~S8にかけて若い果実と比べると増加していることが確認された。これらの2つの結果の違いは、測定方法による違いであると考えている。次に総フルクトースの分析を行った(図3-1-10A)。総フルクトース量はフルクトースとグルコースを同時に測定するキットを用いて測定しており、先に測定した総グルコース量の値から総フルクトース量の総グルコース量の数値から引いた値の換算になっている。総フルクトースでは、果実が若い時は低く成熟していくと増加していくことが確認された。総スクロース

でも総フルクトース量同様に総グルコース量の数値から引いた値の換算になっている (図 3-1-10 B)。総スクロース量では一度 S4 で減少するが、stage ごとでの大きな変化は確認されなかった。

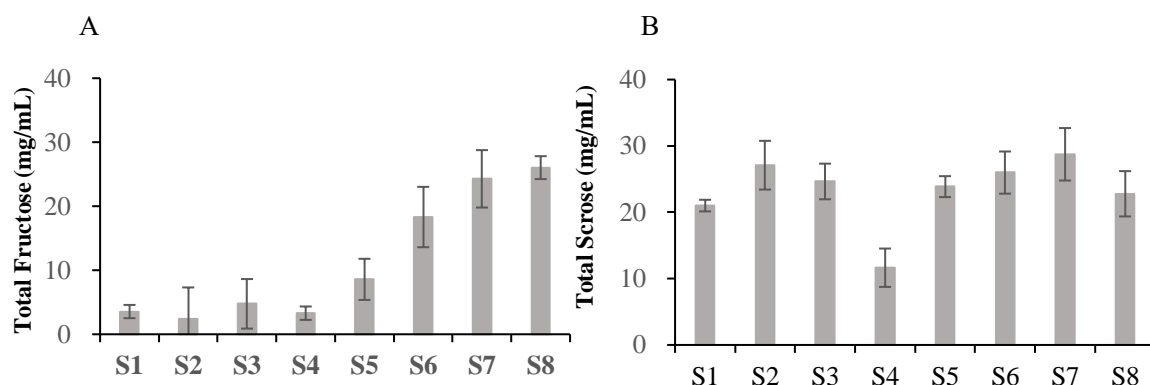


図 3-1-10. 土壌栽培ラズベリー果実中の総フルクトース量、および、総スクロース量分析
A: 総フルクトース量, B: 総スクロース量

3-1-5. 土壌栽培ラズベリー果実中のポリフェノール化合物の分析、および、定量研究

これまでの研究結果から、S1 では、ラズベリー果実のポリフェノール含有量やラジカル消去活性が最も高いことが示唆された。そこで、これらの増減の原因となる成分を確認するために、HPLC 分析を行った。化合物の同定は、LCMS と標準サンプルとの比較を組み合わせ分子量を推定することで行ったが、得られた結果は先行研究の結果と一致したことを確認した^{133,134,135}。図 3-1-11 は、S1 のラズベリー果実について得られた HPLC のクロマトグラムである。図 3-1-11 (A) は、フラバン-3-オールなどの非カチオン化合物が良好に分離される条件で得られたクロマトグラムであり、図 3-1-11 (B) は、カチオン化したアントシアニン誘導体が分離できる条件で得られたクロマトグラムである。

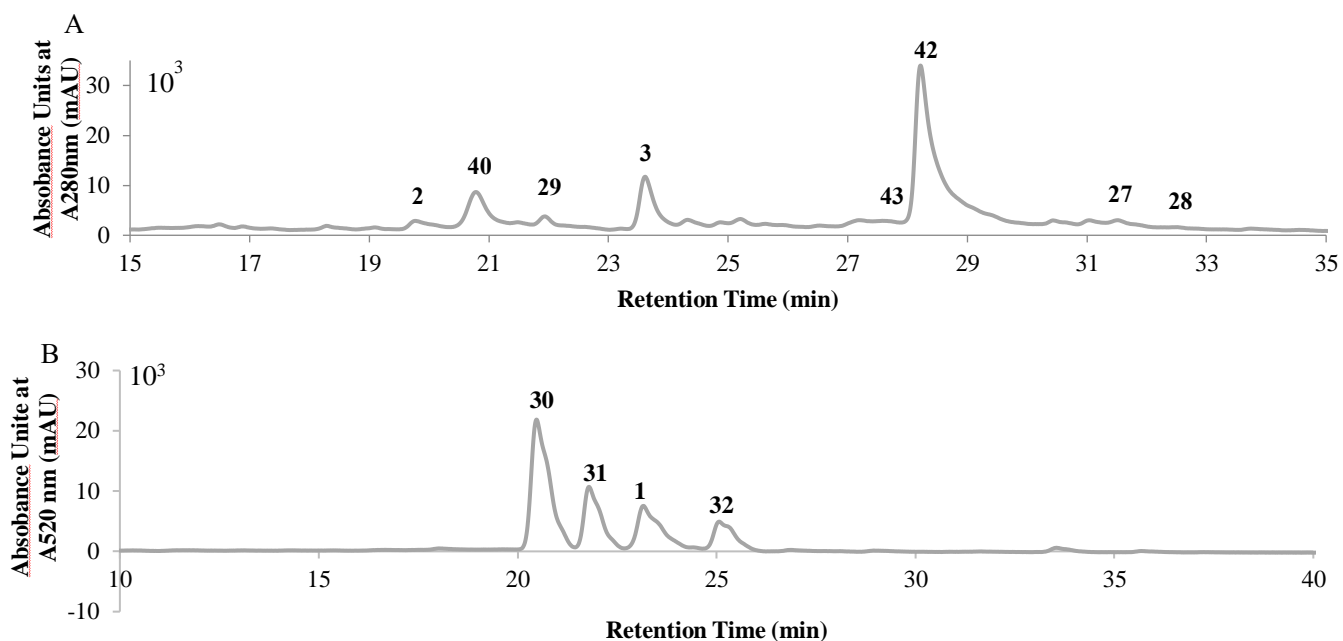
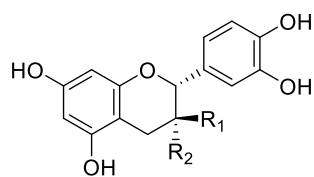
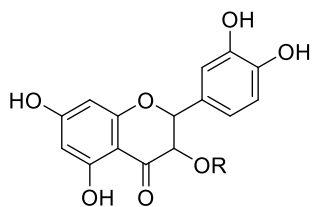


図 3-1-11. ラズベリー果実抽出液の LC クロマトグラム
 A: 280 nm の吸収波長でのラズベリー果実のクロマトグラム
 B: 520 nm の吸収波長でのラズベリー果実のクロマトグラム

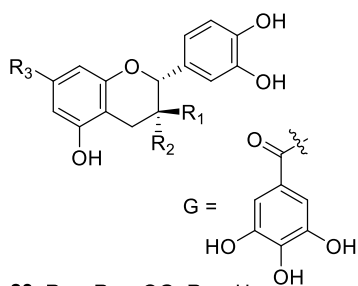
図 3-1-11 は、ラズベリー果実抽出液の LC クロマトグラムを示した。A の縦軸が 280 nm における吸光度で S1 のラズベリー果実抽出液を用いた時の LC クロマトグラム、B の縦軸が 520 nm における吸光度で S7 のラズベリー果実抽出液を用いた時の LC クロマトグラム。横軸が保持時間を示している。ピーク上の数字は化合物番号を示し、標準化合物との保持時間を比較および文献との比較によって同定したものである。LC クロマトグラムのピーク強度は、溶液中の化合物濃度に比例するため（ランベルト・ベールの法則）、それぞれのピークの強度（面積）を利用して、あらかじめ作成した検量線で計算することで、各化合物の濃度を算出することが可能である。これらの検出された化合物の定量実験を行った。ラズベリーにはフラバン-3-オール化合物を含む様々なポリフェノール化合物が含まれていることが確認されている¹³³⁾。図 3-1-12、図 3-1-13 に、ラズベリー含まれるポリフェノール化合物を示した。



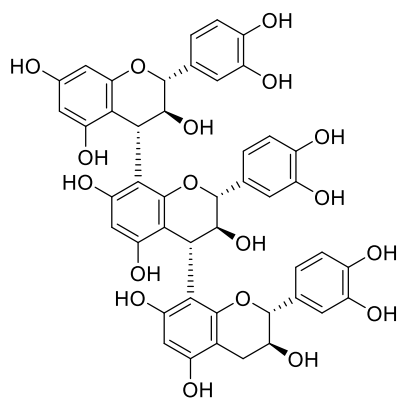
- 2: R₁ = OH, R₂ = H, (+)-catechin
 3: R₁ = H, R₂ = OH, (-)-epicatechin



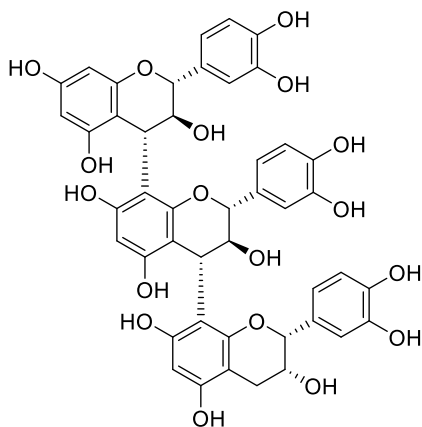
- 27: R = H, quercetin
 28: R = GluA, quercetin-3-O-glucuronide



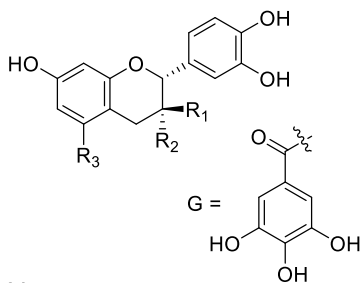
- 23: R₁ = R₃ = OG, R₂ = H
 24: R₁ = H, R₂ = R₃ = OG
 38: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OG
 39: R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OG



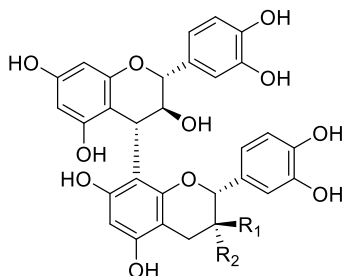
41



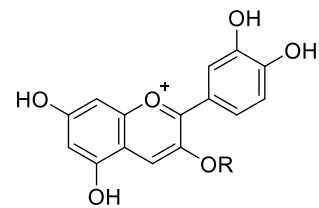
29



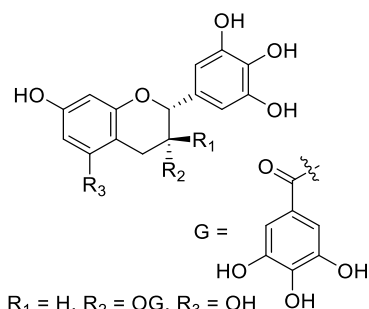
- 21: R₁ = R₃ = OG, R₂ = H
 22: R₁ = H, R₂ = R₃ = OG
 36: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OG
 37: R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OG



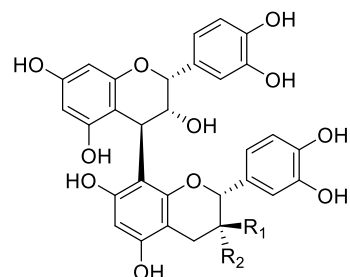
- 8: R₁ = OH, R₂ = H
 40: R₁ = H, R₂ = OH



- 30: R = Sophorose, cyanidin-3-O-sophoroside
 31: R = Sambubiose, cyanidin-3-O-sambubioside
 1: R = Glucose, cyanidin-3-O-glucoside
 32: R = Rutinose, cyanidin-3-O-rutinoside



- 5: R₁ = H, R₂ = OG, R₃ = OH
 33: R₁ = OG, R₂ = H, R₃ = OH
 34: R₁ = H, R₂ = OG, R₃ = OG
 35: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OG



- 16: R₁ = OH, R₂ = H
 6: R₁ = H, R₂ = OH

図 3-1-12. ラズベリー果実中に含まれるフラボノイド化合物

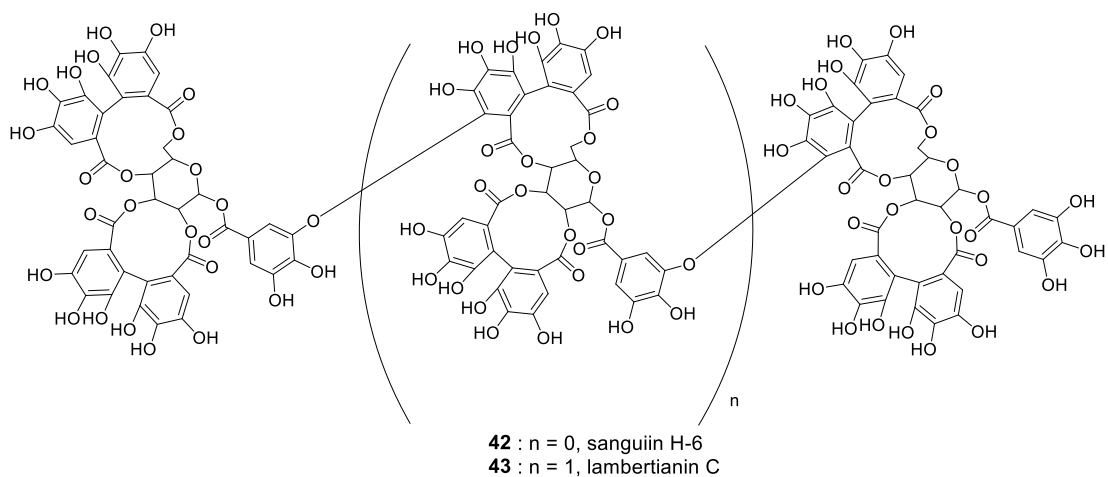


図 3-1-13. ラズベリー果実中に含まれる加水分解型タンニン

具体的には、フラバン-3-オール類の単量体(+)-catechin (2)、(-)-epicatechin (3)、2 量体の procyanidin B4 (40)、3 量体の procyanidin trimer (29)、ケルセチン誘導体の quercetin (27)、および、ケルセチンの3位にグルクロン酸が着いた、quercetin-3-*O*-glucuronide (28)、加水分解型タンニンと知られる2量体の sanguin H-6 (42)や3量体の lambertianin C (43)、アントシアニン誘導体の cyanidin-3-*O*-sophoroside (30)、cyanidin-3-*O*-sambubioside (31)、cyanidin-3-*O*-glucoside (1)、cyanidin-3-*O*-rutinoside (32)の4種類が確認できた。また、これら以外にも多くのフラバン-3-オール誘導体が葉¹³⁶⁾や果実に含まれていることを確認しており、表 3-1-1 に示した。

表 3-1-1. ラズベリー果実抽出液中のフラバン-3-オール誘導体

compound	M-H	Fruit stage							
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
2	289	○	○	○	○	○	○	○	○
3	289	○	○	○	○	○	○	○	○
5	457	○	○	○	○	○	○	○	○
33	457	○	○	○	○	○	○	○	○
36	441	○	-	-	-	-	-	-	-
37	441	○	○	○	○	○	○	○	○
38	441	-	○	-	-	-	-	-	-
39	441	○	○	○	○	○	○	○	○
21	593	○	○	○	○	○	○	○	○
22	593	○	○	○	○	○	○	○	○
23	593	○	○	○	○	○	○	○	○
24	593	○	○	○	○	○	○	○	○
34	609	○	○	-	-	-	-	-	-
35	457	○	○	○	○	○	○	○	○
16	577	○	○	○	○	-	-	-	-
6	577	○	○	○	○	○	○	○	○
8	577	○	○	○	○	-	-	-	-
40	577	○	○	○	○	○	○	○	○
41	865	○	○	○	○	○	○	○	○
29	865	○	○	○	○	○	○	○	○

次に表 3-1-2 では各化合物の定量を行った結果を示した。定量は各化合物の標準サンプルを用いて検量線を作成して行った。各化合物の定量の単位は mg/mL となっており、誤差範囲を±で示している。まず、果実の成熟段階の S1 から S8 にかけて、(+)-catechin(2), (-)-epicatechin (3), procyanidin C3(29)の含有量は、元の含有量の 87~89%まで徐々に減少した。一方、procyanidin B4 (40)と sanguin H-6 (42)の含有量は成熟するに従い著しく減少し、S8 段階では元の値の 30%と 49%のレベルになった。さらに、アントシアニン誘導体である cyanidin-3-O-sophoroside (30), cyanidin-3-O-sambubioside (31), cyanidin-3-O-glucoside (1), cyanidin-3-O-rutinoside (32)が S3-S6 で検出され、果実の成熟に伴ってその含有量が増加した。これら 4 種のアントシアニン誘導体のうち、化合物 30 は成熟後に最も多く存在した。以上

の定量的な結果から、成熟期におけるフラバン-3-オール誘導体の含有量の減少は、アントシアニン誘導体の増加に大きく関係していると考えられた。

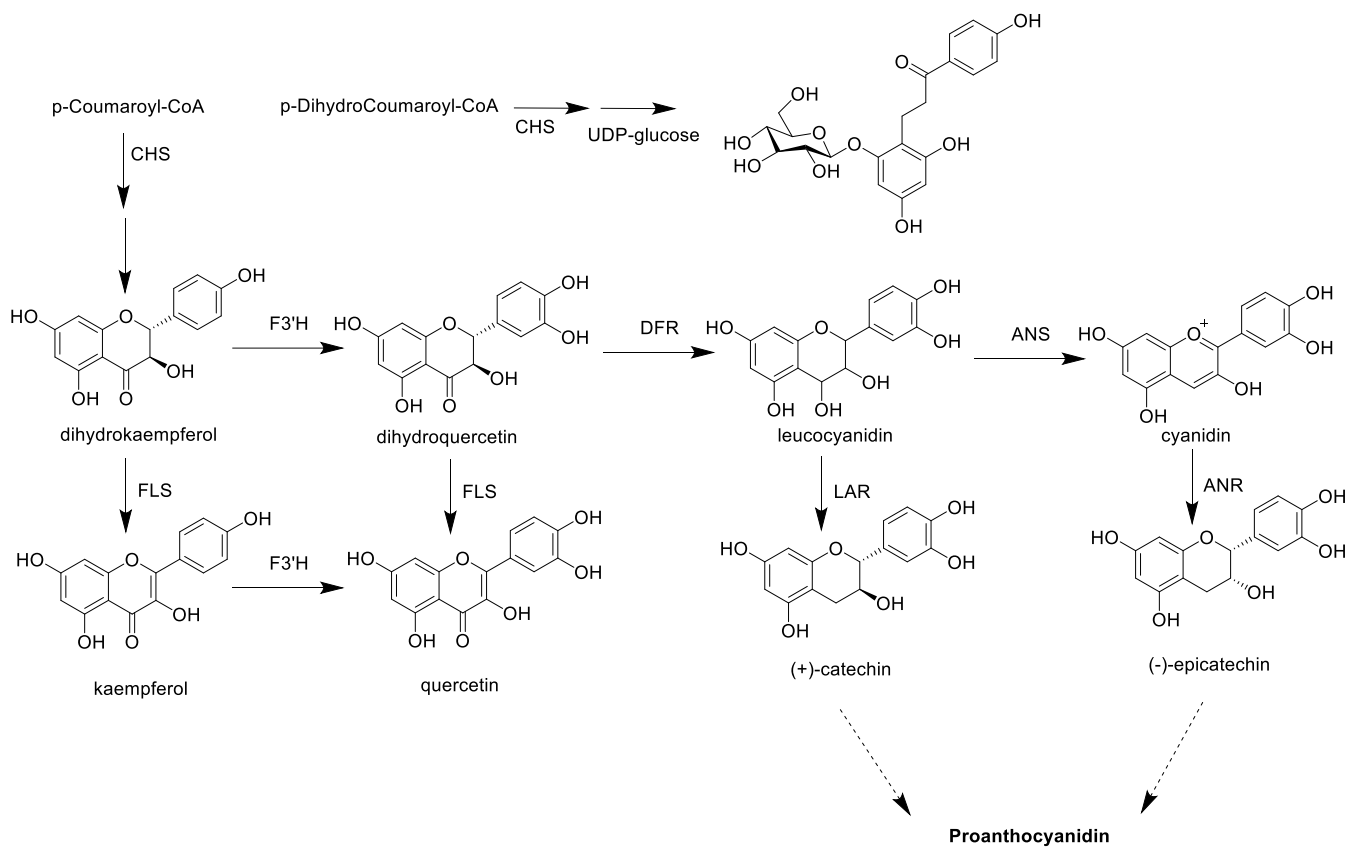
表 3-1-2. ラズベリー果実抽出液中の各化合物の含有量

mg/mL	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
(+)-catechin (2)	2.29 ±0.005	2.29 ±0.004	2.29 ±0.006	2.18 ±0.009	2.04 ±0.0006	2.02 ±0.005	2.00 ±0.008	2.00 ±0.003
(-)-epicatechin (3)	3.12 ±0.01	3.33 ±0.009	3.07 ±0.03	2.70 ±0.02	2.74 ±0.02	2.70 ±0.006	2.71 ±0.007	2.70 ±0.008
procyanidin B4 (40)	0.23 ±0.002	0.22 ±0.0001	0.21 ±0.001	0.11 ±0.002	0.09 ±0.001	0.08 ±0.001	0.07 ±0.002	0.07 ±0.001
procyanidin trimer (29)	0.35 ±0.0006	0.35 ±0.0001	0.33 ±0.0001	0.31 ±0.0005	0.31 ±0.0003	0.31 ±0.0005	0.31 ±0.0001	0.31 ±0.0003
sauguiin H-6 (42)	1.98 ±0.007	1.77 ±0.04	2.05 ±0.03	0.85 ±0.12	0.70 ±0.009	0.76 ±0.021	0.72 ±0.009	0.97 ±0.01
cyanidin-3- <i>O</i> -sophoroside (30)	-	-	-	-	0.69 ±0.001	0.68 ±0.005	1.96 ±0.002	1.59 ±0.01
cyanidin-3- <i>O</i> -sambubioside (31)	-	-	-	-	0.27 ±0.002	0.24 ±0.05	0.65 ±0.007	0.67 ±0.009
cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside (1)	-	-	0.26 ±0.005	0.21 ±0.003	0.49 ±0.003	0.50 ±0.009	0.88 ±0.02	0.83 ±0.02
cyanidin-3- <i>O</i> -rutinoside (32)	-	-	-	-	-	0.21 ±0.001	0.35 ±0.008	0.42 ±0.007

3-1-6. 土壌栽培ラズベリー果実中に発現しているポリフェノール生合成酵素の発現確認

ポリフェノール量や PA 量は、果実の成熟とともに減少し、それに従いラジカル消去活性も低下することを確認した。一方で、アントシアニン量は果実の成熟とともに増加したが、ラジカル消去活性との間に相関関係は見られなかった。これによりどのポリフェノール化合物が機能性に影響しているのか確認を行う必要があった。そこで、次にラズベリー果実中で生産されるポリフェノール生合成酵素の発現の確認を行った。植物内で生産される化合物量は、その化合物の生合成に関与する酵素の発現量と相関がある。そこで、果実中で発現している酵素の定量を試みた。スキーム 3-1-2 は²⁰⁾、ラズベリーにおけるフラバン-3-オール誘

導体の推定生合成経路を示したものである。*p*-クマロイル-CoA からジヒドロケルセチンを経由して生合成されると考えられている。Procyanidin B4 (40) とフラバン-3-オール三量体(4)は、ロイコシアニジン(ジヒドロケルセチン由来の求電子剤)と(+)-catechin (2)や(-)-epicatechin (3)などの求核剤との反応によって生成されると考えられている。また、ロイコシアニジンはシアニジンを生合成することが予想されることから、フラバン-3-オールの生合成とシアニジンの生合成は相互に影響しあっている。そこで、フラバン-3-オール誘導体生合成酵素の発現量を、果実の成熟度に応じてフラバン-3-オール誘導体生合成酵素の発現量を測定した。



スキーム 3-1-2. 推定されるポリフェノール生合成経路²⁰⁾

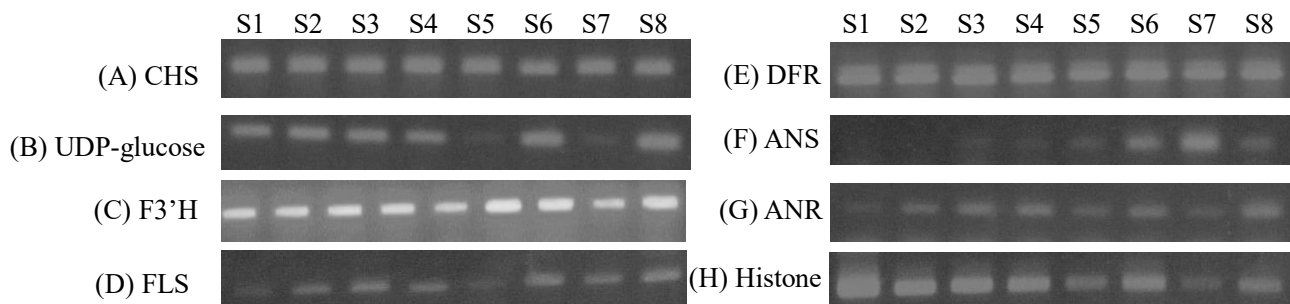


図 3-1-14. 土壌栽培ラズベリー果実中の酵素発現確認

A: Chalcone synthase (CHS), B: Uridine diphosphate glucose (UDP-glucose),
 C: Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), D: Flavonol synthase (FLS), E: Dihydroflavonol
 reductase (DFR), F: Anthocyanin synthase (ANS), G: Anthocyanin reductase (ANR),
 H; Histone.

図3-1-14は、フラバン-3-オール誘導体生合成遺伝子である CHS (A)、UDP-グルコース (B)、F3'H (C)、FLS (D)、DFR (E)、ANS (F)、ANR (G)の発現レベルを半定量 PCR 法で解析した結果である。コントロールとして histone を用いたところ、果実の成熟段階 S5 および S7 で histone の発現レベルの低下が認められた。なお、この現象の理由はまだ確認されていない。また、様々酵素の発現量の中で、最も大きく変化したのは、ロイコシアニジンからシアニジン合成する ANS であった。ステージ S5 から S7 にかけて ANS 量が大きく上昇しており、この結果はアントシアニン誘導体の量が増加した熟成段階と相関している。他の酵素については、成熟期に有意な差は認められなかったため、今回の結果は、フラバン-3-オール誘導体の外部生合成酵素の発現レベルは変化しなかったものの、フラバン-3-オール誘導体の量の減少は、ANS の発現量の増加によって引き起こされたことを示唆している。この ANS の発現量の増加により、アントシアニンの生成が促進されることから ANS の発現量を減少させなければ、フラバン-3-オール含量の減少は防げないと考えられた。この結果を受けて、現在、栽培条件によって ANS の発現量を下げることができるかどうかを検討している。しかし、果実の色は、熟していておいしいことを示しており、消費者の購買意欲を高めている。これらを踏まえ、3-2 章では ANS の発現とフラバン-3-オール誘導体の生合成との関係を詳しく調べ、ANS を発現させながらもフラバン-3-オール誘導体の量が減少しない条件などの探索・検討を行った。

3-1-7. 土壌栽培ラズベリー果実の成分分析とポリフェノール合成酵素の解析 まとめ

露地・土壌栽培で栽培したラズベリー果実を8段階の成熟段階に分類し、総ポリフェノール量や総PA量、フラバン-3-オール誘導体量およびラジカル消去活性を評価した。その結果、果実が成熟するに従いフラバン-3-オール誘導体量が徐々に減少し、それに伴いラジカル消去活性も低下することが確認された。また、これらの化合物の減少はポリフェノール生合成酵素の発現量と関係していると考え、半定量的ポリメラーゼ連鎖反応を用いて定量したところ、成熟期にアントシアニン生合成酵素の発現量が増加するという変化のみが確認された。この結果はアントシアニン量の変化と相関があった。また、生合成経路からの考察においても、フラバ-3-オール誘導体に変換されてアントシアニンになることから、ラズベリー果実の高機能フラバン-3-オール誘導体の含有量を増やすためには、アントシアニンの合成を阻害する必要があることが示唆された。今回の結果を受けて、今後は、ANSの発現とフラバン-3-オール誘導体の生合成の関係を詳しく調べ、ANSを発現させながらもフラバン-3-オール誘導体の量を減少させない条件を探す必要性があると考えている。

ここまでの成果は、以下の学術論文としてすでに受理された。

R. Kobori, S. Yakami, T. Kawasaki, A. Saito, “Changes in the Polyphenol Content of Red Raspberry Fruits during Ripening.”, *horticulturas*, 2021, 7, 569

3-2. 植物工場ユニットを用いたラズベリー果実のポリフェノール生産検討

序論でも述べたように、露地栽培果実を成熟段階に分類し各種分析を行ったが、露地栽培の場合天気や気候、その他様々な影響を受けてしまうため、毎年同じような果実を栽培するのは難しい。そこで、植物工場ユニットを用いて栽培環境を一定にした状態でラズベリーを栽培した。また、イチゴ果実などに UV などを照射するとポリフェノールが増加するということが報告されている¹³⁷⁻¹⁴²。LED による植物育成は多くの研究がなされている¹⁴³。そこで、ラズベリーにおいても与える光の波長によってポリフェノール量を増加させることができると考えた。紫外光でポリフェノール化合物が増加している文献を参考に異なる波長領域の LED を照射した時の分析を行った¹⁴⁴。栽培時にラズベリーに照射した波長の強度を表 3-2-1 に示し、LED をもちいた栽培の様子を図 3-2-1 に示した。光は粒子としての性質をもち、その一粒一粒を光子（光量子）という。この光量子の単位面積・単位時間当たりの個数を示したのが光量子束密度（PFD）単位は $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ である。さらに、植物が光合成に利用できる光は、葉緑素が吸収できる 400 nm から 700 nm の波長領域なので、その波長領域の光量子束密度を光合成光量子束密度（PPFD）という^{145,146}。PFD-R が赤色の波長を示しており、PFD-G が緑色の波長、PFD-B が青色の波長になっている。また、A が青色 LED のみ B が赤色 LED のみ C が青色 LED、赤色 LED を 1:1 で照射し栽培したラズベリーになっている。また、植物工場内で 22 °C の環境でラズベリーの栽培を行った。

表 3-2-1. ラズベリーに照射した LED 光の波長

-	A	B	C
PPFD ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)	24.06	26.99	28.15
PFD-B (Blue) ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)	23.64	0.162	13.73
PFD-G (Green) ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0.33	0.2	0.487
PFD-R (Red) ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0.09	26.62	13.93
Temperature (°C)	22	22	22



図 3-2-1. LED を用いた栽培様子

3-2-1. LED 照射ラズベリー果実を用いたポリフェノール類分析

LED を照射し栽培したラズベリー果実の総ポリフェノール量や総 PA 量の測定を行なった。(図 3-2-2)A や B の条件と C の条件を比べると総ポリフェノール量で成熟すると減少していたが S8 で増加することが確認された。これより C の条件、すなわち赤と青の混合光下で栽培することによりポリフェノール量を増加させることができることが示唆された。

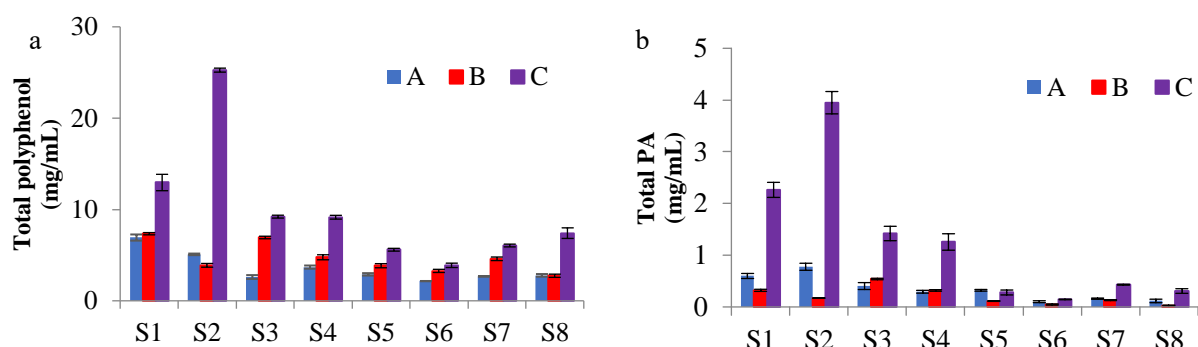


図 3-2-2. LED 照射栽培時のラズベリー果実中の成分分析
a: 総ポリフェノール量, b: 総 PA 量,

3-2-2. LED 照射ラズベリー果実を用いた抗酸化活性の指標となるラジカル消去活性試験

次に抗酸化活性の指標となる DPPH ラジカル消去活性試験や ABTS ラジカル消去活性試験を行なった。縦軸がラジカル消去活性率、横軸は stage No を示している。ラジカル消去活性試験に関しては 25 mg/mL の濃度のサンプルを用いた。DPPH ラジカル消去活性試験、および、ABTS 消去活性試験でも総ポリフェノール量、総 PA 量と同様に C の条件（赤と青の混合光下）で他の条件と比べると増加していることが確認でき、また成熟した S8 でも増加していることが確認された。この結果は 3-2-2 の総ポリフェノール量や総 PA 量の変化とも相関があることから、赤と青の混合光で栽培する方法はポリフェノール化合物を増加させ

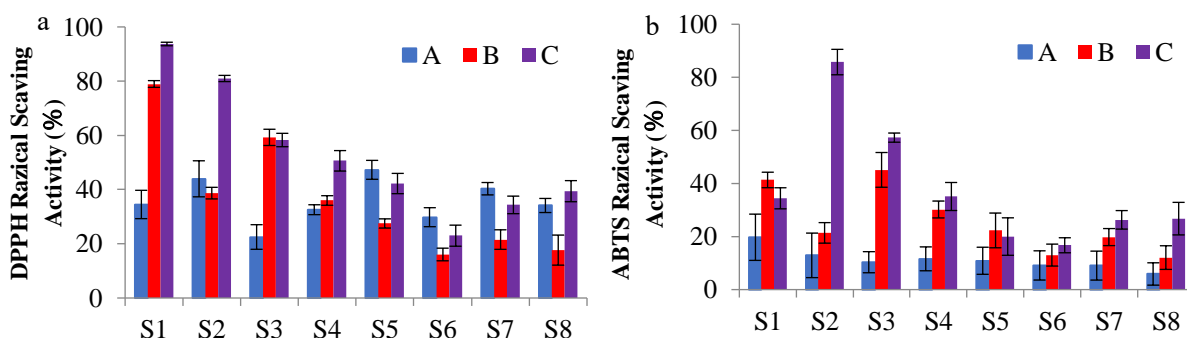


図 3-2-3. LED 照射栽培時のラズベリー果実抽出物を用いた活性評価
a: DPPH ラジカル消去活性試験, b: ABTS ラジカル消去活性試験,

ることによってラズベリー果実の機能性を向上させることが分かった。

3-2-3. LED 照射ラズベリー果実を用いたポリフェノール化合物 LC 分析

これまでの研究でCの条件で栽培したS8の果実で総ポリフェノール量が多いことが確認された。そこで、どのポリフェノール化合物が影響しているのか果実抽出液を用いてLC測定を行った。ラズベリー果実抽出液のクロマトグラムを図3-3-3に示した。縦軸が280nmにおける吸光度でS1のラズベリー果実抽出液を用いた時のクロマトグラム、横軸が保持時間を示している。クロマトグラムよりbやcの条件では加水分解型タンニンであるsanguiin H-6 (42)が検出されたがaの条件では検出されることが確認され加水分解型タンニンは青色波長だけでは生産されず赤色の波長が必要であることが確認された。

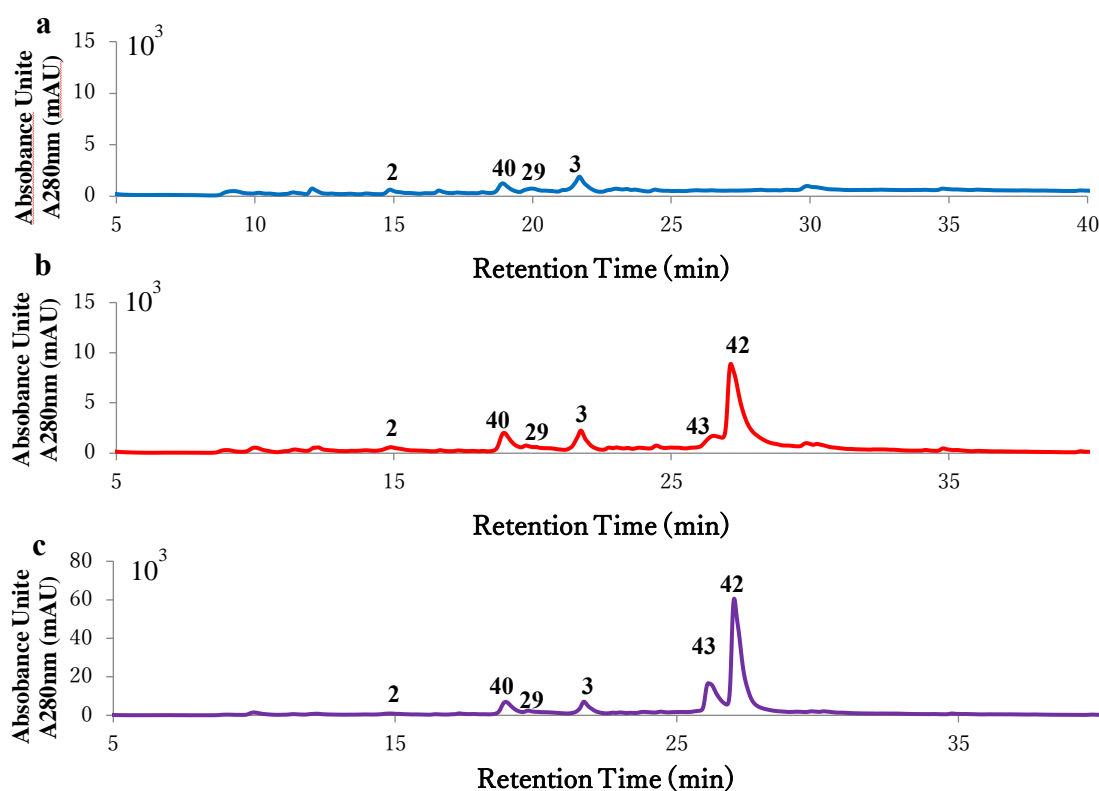


図 3-2-3. ラズベリー果実抽出液の LC クロマトグラム

S1 時の LC クロマトグラムになっている。a: A の栽培条件, b: B の栽培条件, c: C 栽培条件

次に図3-2-3では検出されたポリフェノール化合物が栽培条件でどのように増減しているのか各化合物の検量線を用いて定量を行った。これまで総ポリフェノール量や総 PA 量より C の条件の S8 でポリフェノール量などが増加することを確認してきたが、図 3-2-4 より、S8 での増加は今回定量したフラバン-3-オール誘導体以外のポリフェノール化合物の増加によることが示唆された。

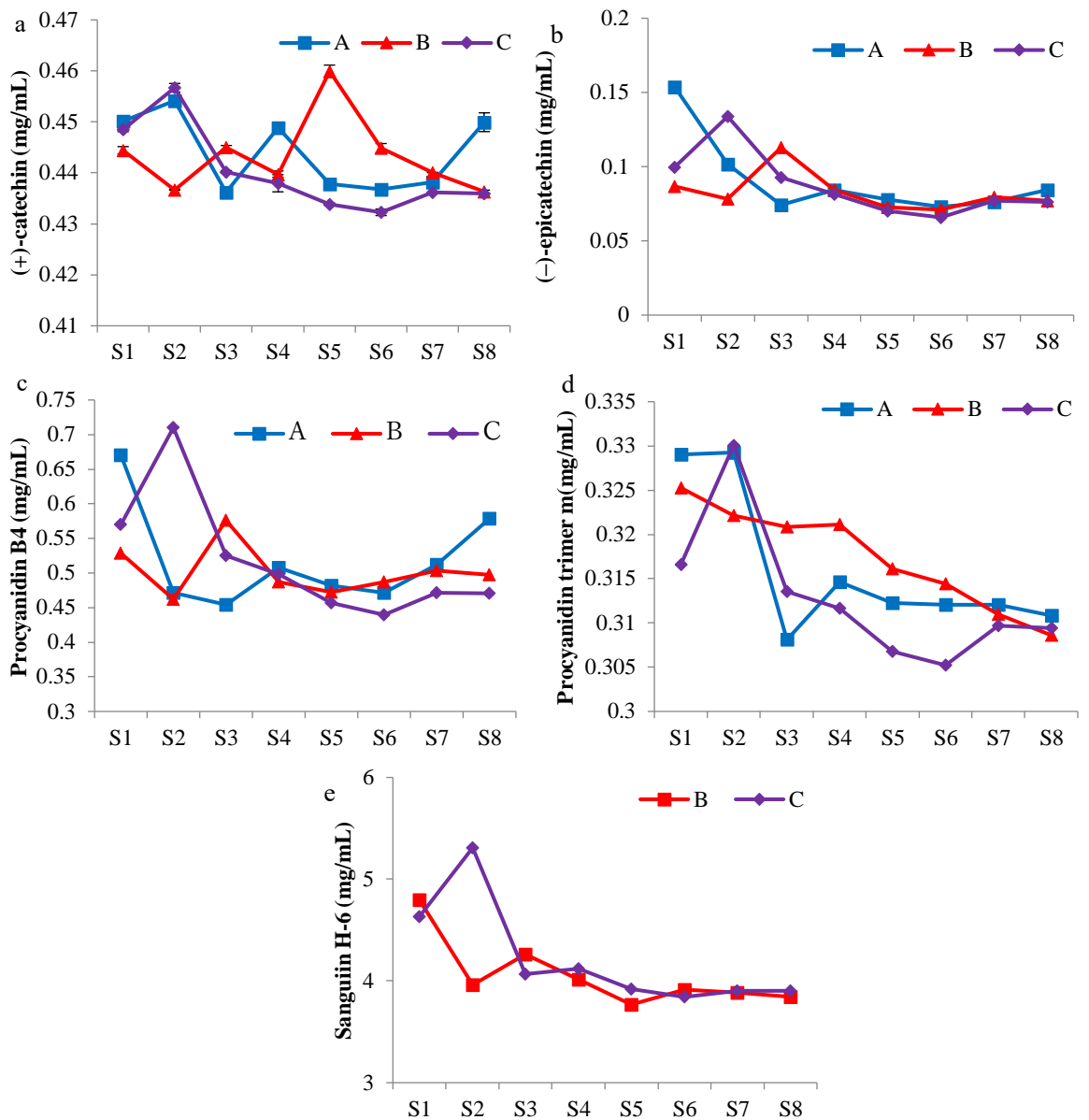


図 3-2-4. ラズベリー果実抽出液中のポリフェノール化合物の定量

a: (+)-catechin (2)の定量, b:(-)-epicatechin (3)の定量, c: procyanidin B4 (40)の定量,d: procyanidin trimer (29)の定量, e: sanguin H-6 (42)の定量

3-2-4. LED 照射ラズベリー果実を用いたポリフェノール生合成酵素発現量分析

総ポリフェノール量や総 PA 量が C（赤と青の混合光照射）の条件で成熟段階の S8 が増加したことが確認され、これは、生合成酵素が関係しているのではないかと考え、半定量 PCR を用いてポリフェノール生合成酵素の発現量を確認した。半定量 PCR で control として Histone 当たりでの各生合成酵素の発現量の数値化を行った。図 3-2-5 a はフェニルプロパノイド合成酵素 PAL、b が 4-CL の遺伝子発現、c は CHS の遺伝子発現、d は UDP-glucose の遺伝子発現、e は F3'H の遺伝子発現、f は DFR の遺伝子発現、g は ANS の遺伝子発現、h は ANR の遺伝子発現、の結果である。ANS 以外のほとんどの酵素で C の条件の S8 で増加していることが確認された。ANS はアントシアニジンを生合成する酵素で ANS の生産を減少させることにより、フラバン-3-オール誘導体の代謝を抑えることができ、結果としてフラバン-3-オール誘導体量を増加させることが示唆された。

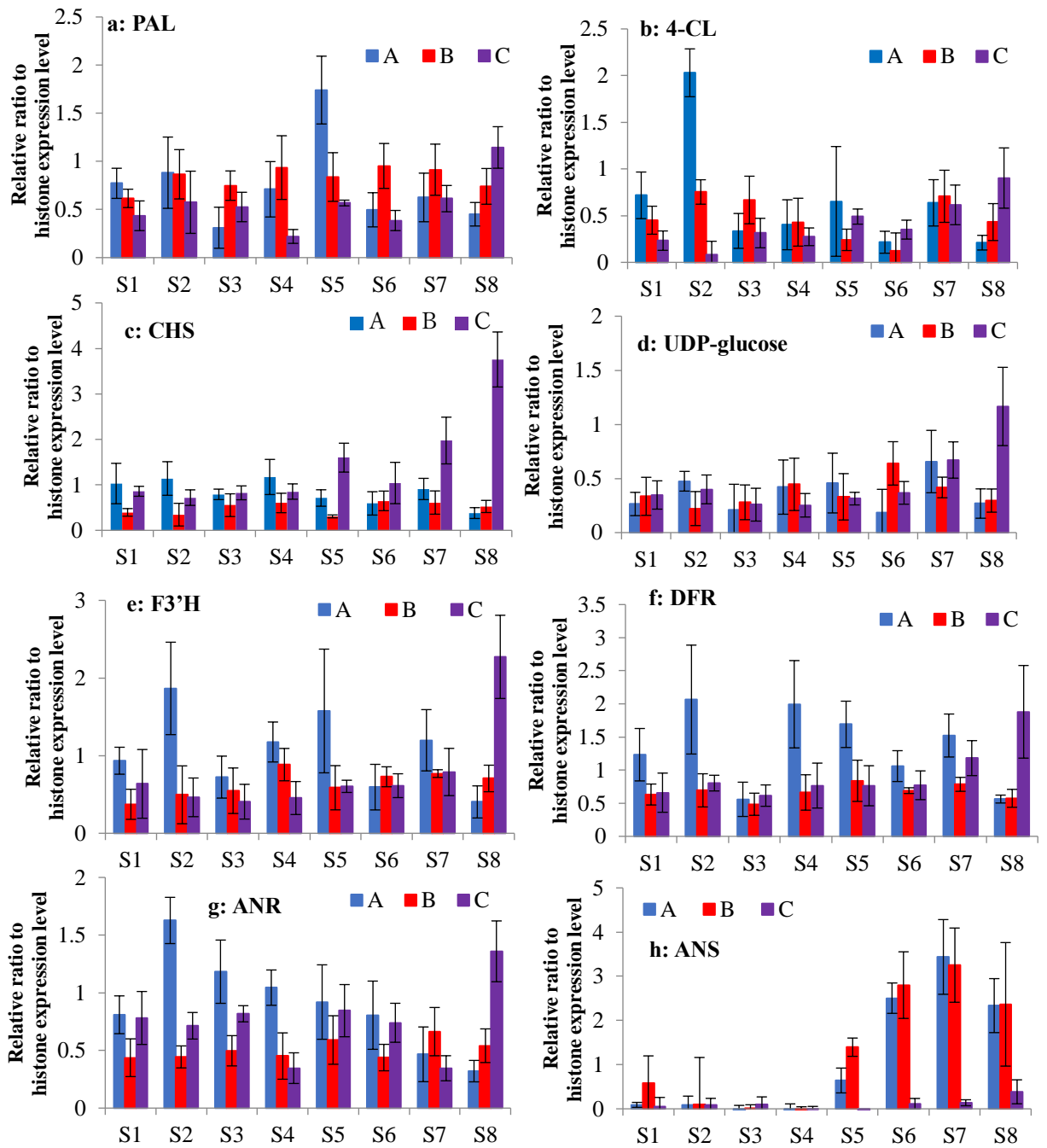


図 3-2-5. LED 照射栽培時ラズベリー果実中のポリフェノール合成酵素の発現量分析
 Histone 当たりの各合成酵素の発現量の数値化を行った a: PAL, b: 4-CL, c: CHS, d: UDP-glucose, e: F3'H, f: DFR, g: ANR, h: ANS

3-2-5. 植物工場ユニットを用いたラズベリー果実のポリフェノール生産検討 まとめ

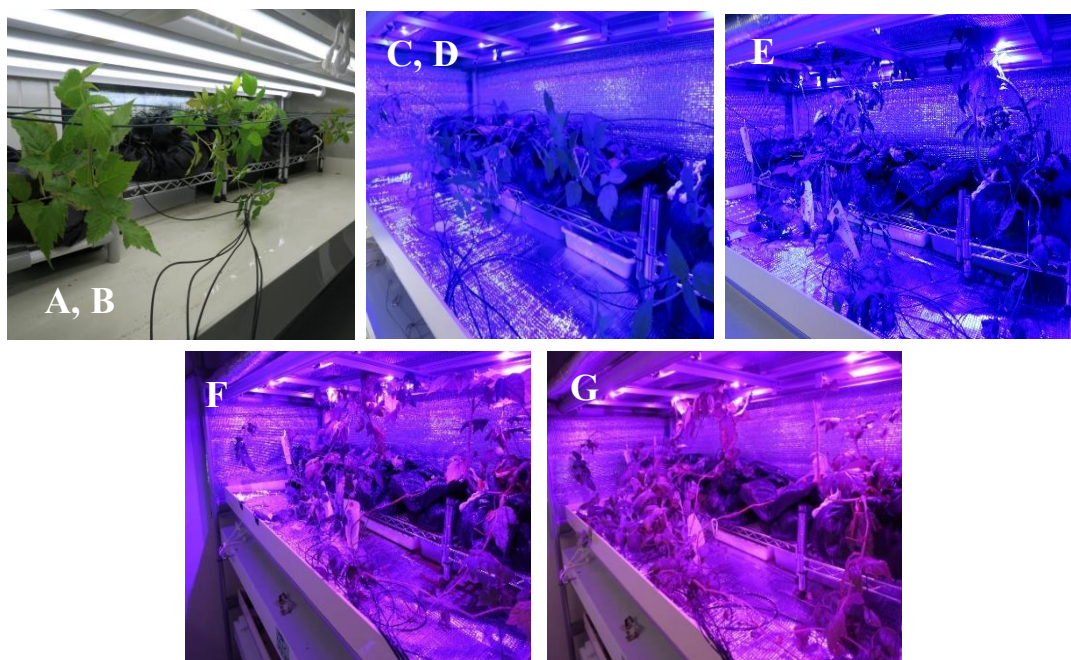
ラズベリー果実を 8 段階の成熟段階に分類し、外気的气候などに影響されない植物工場ユニットを用いて 3 種類の条件(A:青色光・B:赤色光・C: 青色光/赤色光)でラズベリーの栽培を行い、総ポリフェノール量や総 PA 量、フラバン-3-オール誘導体量、および、ラジカル消去活性を評価した。その結果、C の条件において、成熟するに従いフラバン-3-オール誘導体量が徐々に減少したが、成熟した S8 で再び増加すること確認された。また、ラジカル消去活性においても S8 で活性が増加することが確認された。また、これらの化合物の変化はポリフェノール生合成酵素の発現量と関係していると考え、半定量的ポリメラーゼ連鎖反応を用いて定量したところ、C の条件において S8 でアントシアニン合成酵素の ANS の発現量が減少していることを確認した。前章ではラズベリー果実が成熟すると ANS の発現が増加し、フラバン-3-オール誘導体が代謝されて減少している可能性が示唆されていた。その実験をふまえて栽培環境を制御できる植物工場ユニットを使用した検討を行い、C の条件 (青色光/赤色光)でラズベリーを栽培することにより ANS の増加を抑制することができフラバン-3-オール誘導体、および、ポリフェノール量を増加させることで前章の問題を解決した。

3-3. 植物工場ユニットを用いたラズベリー葉のポリフェノール生産検討

3-2 章では、ラズベリー果実を用いて露地や植物工場ユニットを用いて栽培を行い、生育過程や栽培条件での成分分析研究を行った。本章では植物工場ユニットを用いてラズベリー葉の栽培条件での分析を行った。ラズベリーに照射した波長の強度を表 3-3-1 に示し、照射した時の実際の写真を図 3-3-1 に示した。A-H の波長強度をラズベリー葉に照射し栽培温度は 22 °Cで行った。また、温度を下げた 18 °Cでも栽培を行った。温度を下げることにより植物のライチ (*Litchi chinensis* Sonn)で開花誘導遺伝子の *LcFT1* の発現が増加するなどの報告¹⁴⁷⁾があることから、温度を下げることにより、影響があると考えたため温度を変更した。

表 3-3-1. ラズベリー葉に照射した LED 光の波長

	A ¹	B ¹	C	D	E	F	G	H
PFD-B (Blue) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	7.23	7.23	30.24	30.24	40.09	3.86	16.54	-
PFD-R (Red) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	8.33	8.33	-	-	-	4.43	27.87	-
Temperature (°C)	18	22	18	22	22	22	22	22



3-3-1. LED 照射ラズベリー葉を用いたポリフェノール類分析

LED を照射し栽培したラズベリー葉の総ポリフェノール量や総 PA 量の測定を行なった (図 3-3-2)。A、および、B の条件では、総ポリフェノール量と総 PA 量の両方が 18 °C で減少し、温度がポリフェノールの生産に影響したことを確認した。また、C、および、D の条件での総ポリフェノール量は温度での大きな変化はなく、総 PA 量では 22 °C で増加することが確認された。青色 LED の光量を増やした E の条件では総ポリフェノール量は増加したが、総 PA 量は増加しないことが確認された。赤や青色 LED を照射した F や G の条件では、総ポリフェノール量に大きな変化がないことが確認された。しかし、総 PA 量では光の増加とともにわずかに増加したことが確認された。

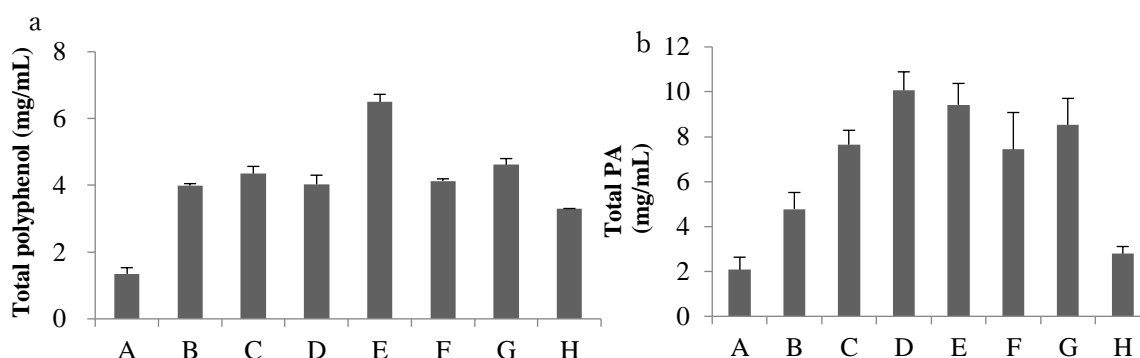


図 3-3-2. LED 照射栽培時のラズベリー葉の成分分析

a: 総ポリフェノール量, b: 総 PA 量

3-3-2. LED 照射ラズベリー葉中を用いた抗酸化活性の指標となるラジカル消去活性試験

次に抗酸化活性の指標となる DPPH ラジカル消去活性試験や ABTS ラジカル消去活性試験を行なった。A や B の条件で DPPH、および、ABTS ラジカル消去活性試験を測定し A の 18 °C で減少した。これは、総ポリフェノール量や総 PA 量と相関があることを確認した。DPPH ラジカル消去活性では E の条件で最も高い活性を示した。一方で ABTS ラジカル消去活性試験では DPPH ラジカル消去活性試験と異なる結果になったことが確認された。これは、DPPH ラジカルと ABTS ラジカルの化学構造と測定条件に大きな違いがあるためだと考えている。DPPH、および、ABTS はラジカルを持つ化合物を用いて、そのラジカル消去を指標にして活性酸素種であるラジカルを消去する能力を推定する方法である。化学反応であることから、含まれるポリフェノール化合物の構造と DPPH、ABTS が反応液中で接触しにくい構造である場合は活性に差が生じる。一方で比較的簡単に行うことができる活性測定であることから活性酸素消去能の指標として広く用いられている。今回活性差があったが、よく知られている現象でありこの差異について問題はないと考えられる。

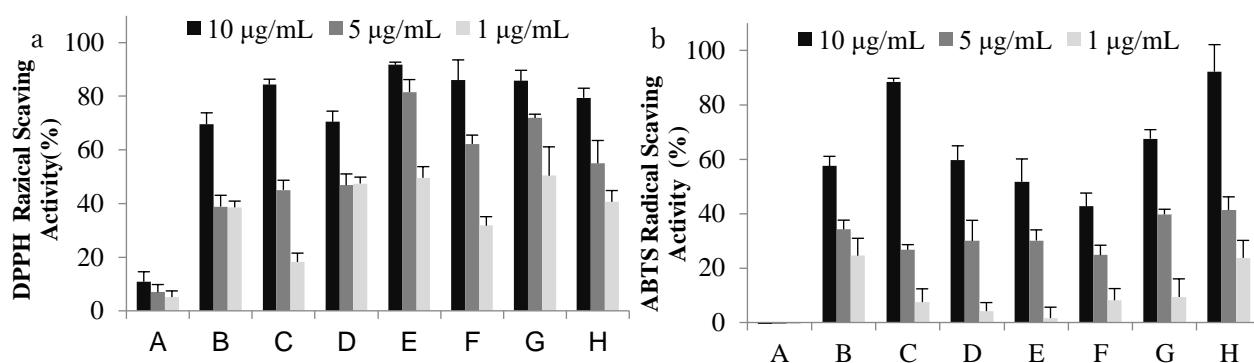


図 3-3-3. LED 照射栽培時のラズベリー葉の成分分析

a: DPPH ラジカル消去活性試験, b: ABTS ラジカル消去活性試験,

3-3-3. LED 照射ラズベリー葉を用いたポリフェノール化合物 LC 分析

ラズベリー葉中においてポリフェノールの組成は光と温度により変化することが示唆された。そこで A-H での条件で栽培したラズベリー葉抽出物を HPLC 分析により含まれる化合物がどのように変化するか確認を行った。ポリフェノール化合物は A と C の条件ではほとんど検出されなかったが B や D の条件ではポリフェノール化合物が検出された。これより栽培温度がポリフェノール化合物の生産に影響することが確認された。また、D の条件ではフラバン-3-オール誘導体の相対的含有量が増加した。これにより、青色 LED 光を照射し栽培すると、フラバン-3-オール誘導体を効率的に増やすことが出来ると示唆された。赤色 LED を照射した F や G の条件では加水分解型タンニンが増加したことを確認した。一方で、H の条件では、加水分解型タンニンは減少したが、フラバン-3-オール誘導体は比較的増加したことを確認した。これらの結果は、青色 LED または光を与えず一定期間ラズベリーの栽培を行うことでフラバン-3-オール誘導体の含有量が増加することが確認された。高機能性ポリフェノールであるフラバン-3-オール誘導体の増加は葉の機能性を向上させることが確認されたことになる。

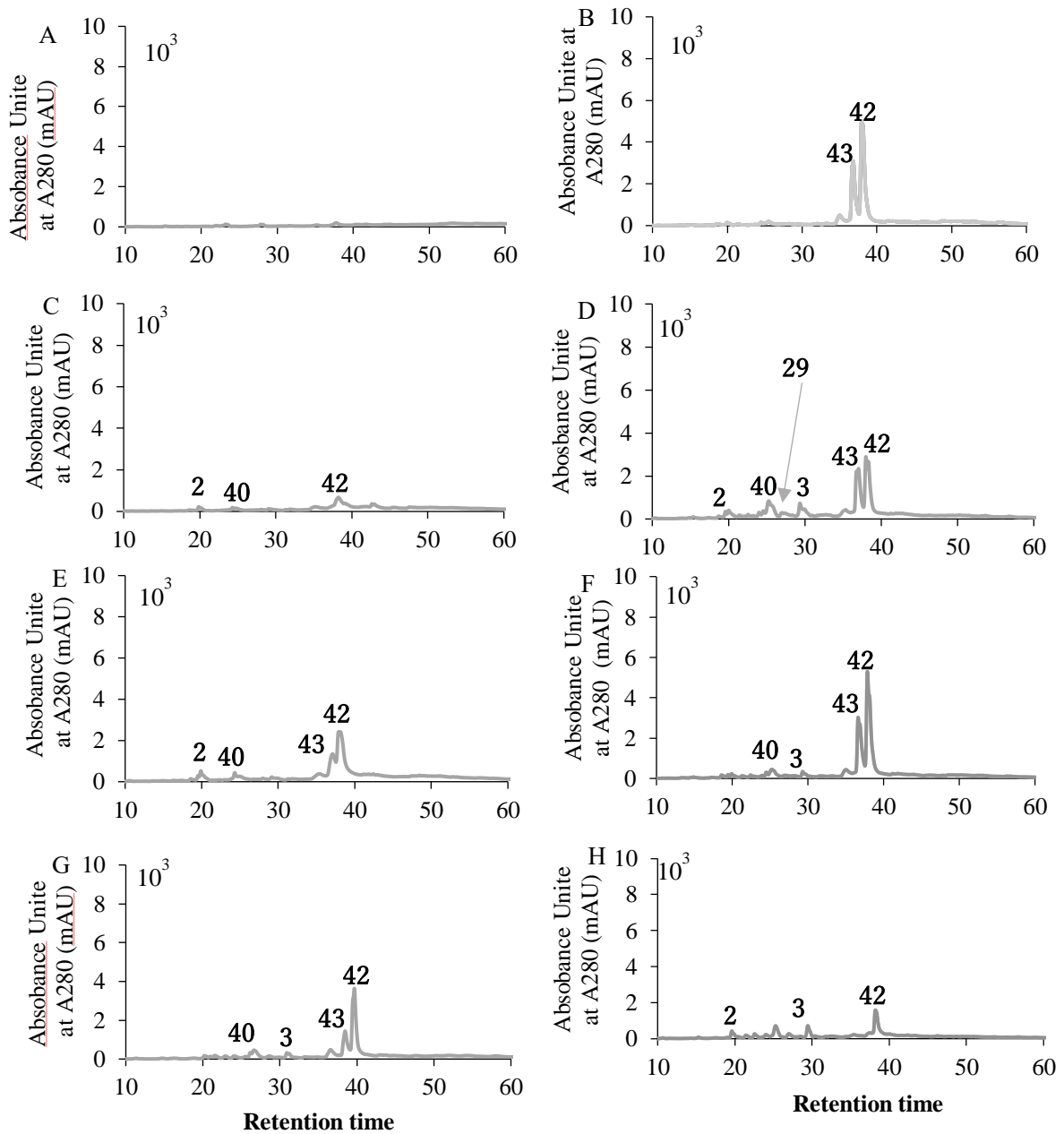


図 3-3-4. ラズベリー葉抽出液 A-H の条件での LC クロマトグラム

次に、ラズベリー葉中に含まれるフラバン-3-オール誘導体の定量を行った。フラバン-3-オール 2 量体の procyanidin B4 (40)では、D や E、H の条件で増加したことを確認した。これより、青色 LED を照射するとフラバン-3-オール 2 量体の procyanidin B4 (40)を増加させることができると示唆された。これは、図 3-3-2 の総 PA 量と相関があることが確認された。光照射によって総ポリフェノール量や総アントシアニン量の増加についての報告例はあるが、フラバン-3-オールや PA の個々の化合物の増加について明らかにした報告例はこれまでにないことから、今後の園芸分野において有用な成果である。

表 3-3-2. フラバン-3-オール誘導体の定量

	A	B	C	D	E	F	G	H
(+)-catechin (2)	0.50	0.44	0.45	0.48	0.60	0.46	0.45	0.52
(-)-epicatechin (3)	0.10	0.09	0.06	0.10	0.11	0.09	0.11	0.11
procyanidin B4 (40)	0.59	0.58	0.48	1.25	1.00	0.79	0.87	1.35
Procyanidin C3 (29)	0.34	0.32	0.30	0.38	0.38	0.34	0.37	0.39

3-3-4. LED 照射ラズベリー葉中に発現しているポリフェノール生合成酵素の発現確認

ポリフェノール量は光と温度によって変化することを確認した。この変化はポリフェノール生合成酵素が光の影響を受けていると考えたため PCR 法を用いた生合成酵素発現量の確認を行った。その結果を図 3-3-5 に示した。

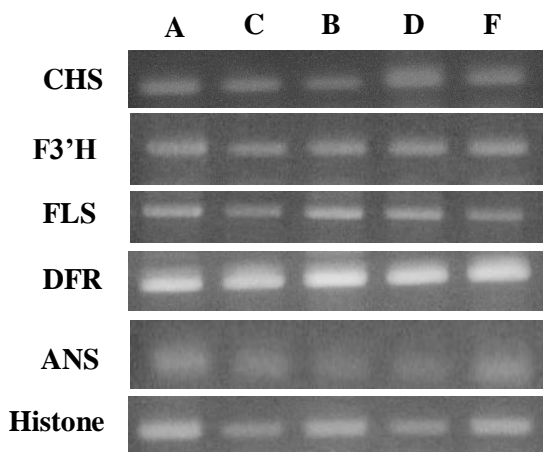


図 3-3-5. LED 照射栽培時のラズベリー葉の酵素発現確認

A や C の条件での遺伝子発現レベルは、ほとんど違いがないことが示唆され、これより 18°C で栽培した A と C の条件での総ポリフェノール量の変化は今回確認を行った生合成以外の酵素が関係していると考えている。一方で、22°C で栽培した B や D の条件では D の条件で CHS の遺伝子発現量が増加していることが確認された。青色 LED を照射する事により

CHS の発現量が増加することが示唆された。CHS (カルコンシンターゼ) はフラバン 3-オール誘導体の生合成の上流に位置し、この酵素の発現が増加していることはフラバン-3-オール誘導体全体の生産が増加していることを示している。この酵素が光に影響されるという報告例がなく、どのようにして青色光で活性化されているかは不明であるが、光合成に関連する経路と関係がある可能性がある。元来ポリフェノール化合物は植物に悪影響のある紫外線の吸収や、紫外線による活性酸素を除去する目的で生産されると考えられており、青色光のみの照射がラズベリー葉中で何らかの脅威としてとらえられている可能性がある。

3-3-5. 植物工場ユニットを用いたラズベリー葉のポリフェノール生産検討 まとめ

植物工場内でラズベリーを栽培し、光の強さ、温度、異なる波長の LED を葉に照射し、ポリフェノールの成分分析を行った。青色 LED で栽培した条件で総ポリフェノールが増加することを確認した。また、HPLC 分析よりフラバン-3-オール 2 量体の procyanidin B4 (40) が増加したことを確認した。また、半定量 PCR では青色 LED でフラバン-3-オール誘導体生合成経路の上流にある CHS 遺伝子の発現が増加するが判明した。CHS の発現量が増加するのかは不明であるが、青色光を照射し栽培を行うことにより、フラバン-3-オール誘導体が増加し機能性を向上させた。この成果はラズベリーだけではなく他の植物にも応用可能であり機能性を向上させた作物栽培に貢献すると考えている。ここまでの成果は、以下の学術論文としてすでに受理された。

R. Kobori, S. Hashimoto, H. Koshimizu, S. Yakami, M. Hirai, K. Noro, T. Kawasaki, A. Saito, "Flavan-3-ols content in red raspberry leaves increases under blue LED-light irradiation.", *Metabolites*, 2019, **9**, 56

3-4. ラズベリー培養細胞を用いたポリフェノール生産検討

植物栽培は、様々な環境要因に左右され、一定の条件下で栽培することが難しい。それゆえ、3-2章や3-3章では植物工場ユニットを用いた栽培を検討した。しかし、その場合でも、植物体をじゅうぶん大きく成長させるには長い時間を要する。そこで、植物培養細胞(未分化細胞、カルス)を用いることで、外界の環境に左右されることなく供給が可能になるのではないかと考えた。植物培養細胞であれば、増殖速度が速い。植物体は葉や根のような様々な分化した細胞から出来ているのに対し、植物培養細胞は同じ性質を持つ均質な細胞からできており、フラスコなどで培養できるため、簡単に生育条件を一定に整えることができる¹⁴⁸⁾。一般的に植物体は、根の細胞でも、葉の細胞でも、1個の体細胞が固体へと分化し得る能力、すなわち、分化全能性を持っている。分化全能性を持っている植物体は、培地の組織や培養条件を制御することで、その組織特有の分化(葉や茎など)や無限に増殖させることが可能である¹⁴⁹⁾。また、カルスに異なる波長のLEDを照射すると成長促進¹⁵⁰⁾、不定胚の成熟改善¹⁵¹⁾、アルカロイド類¹⁵²⁾が増加するという報告がある。例えば、Kubicaらは*Verbena officinalis L.* 培養細胞にLEDを照射すると蛍光灯で培養した細胞より protocatechuic acid (42)などが増加するということが確認されている¹⁵³⁾。

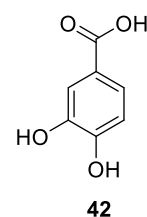


図 3-4-1. Protocatechuic acid (42) の構造

Nadeemらは、*ocimum basilicum* 培養細胞に青色LEDを照射すると総フェノール類が増加することが確認されている¹⁵⁴⁾。これより、本研究ではラズベリー培養細胞に異なる波長のLEDを照射しどの波長が効率よくポリフェノールを生産するのか検討を行った。ラズベリー培養細胞は ganborg B5 培地で培養した細胞に7日間LEDを照射した。表3-4-1にLEDを照射し培養した時の条件を示した。コントロールとして培養細胞に光を与えず培養した細胞でも研究を行った。

表 3-4-1. ラズベリー培養細胞に照射したLED ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)の波長

	A	B	C	D	E
PPFD ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0	28.62	27.79	23.88	26.18
PFD-B (Blue) ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0	8.579	26.62	0.586	0.473
PFD-G (Green) ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0	6.648	0.451	2.684	24.87
PFD-R (Red) ($\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0	13.4	0.272	20.61	0.844
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	23				

3-4-1. ラズベリー培養細胞のポリフェノール分析

ラズベリー植物体には、多くのポリフェノールが含まれていることが確認されている¹³³⁾

ため、培養細胞においてもポリフェノールが多く含まれている可能性がある。また、前項までの検討において光照射でポリフェノール量や組成が変化していることから培養細胞でも光によって影響される可能性がある。そこでまず、培養細胞にどの程度ポリフェノールが含まれているか確認するために、総ポリフェノール量、総 PA 量の測定を行った。a が総ポリフェノール量、b が総 PA 量で a の縦軸が総ポリフェノール量、b が総 PA 量、横軸が各 LED を照射した時の培養細胞になっている。

総ポリフェノール量では、光を与えていない A と比べると、赤色光照射条件 D や緑色光照射条件 E で増加することが確認された。また、総 PA 量では A と比べると緑色光照射条件 E で最も増加することが確認された。赤色光や緑色光を照射によりポリフェノール類が増加する可能性が示唆された。青色光照射条件 C では総ポリフェノール量がほとんど増加しておらず、フラバン-3-オール誘導体のオリゴマーである総 PA 量が増加していることから、C ではポリフェノール化合物の中でもフラバン-3-オール誘導体の生産が増加している可能性がある。これは植物工場で栽培したラズベリー葉での結果と相関がある。一方で緑色光照射条件 E により総ポリフェノール量、および、総 PA 量の両方が大幅に増加している。これは非常に興味深い結果であり、培養細胞の場合は緑色光により機能性ポリフェノールが増加したことを示している。植物体の場合は葉緑体が緑色を反射することで緑色光は取り入れることができず、また葉緑体では緑色光を利用するシステムがない。一方、培養細胞は葉緑体が発現しておらず無色透明の細胞であることから、すべての光が細胞内に透過する。このことから、培養細胞は緑色の光を吸収して生合成酵素を活性化する何らかのシステムを持つことが示唆された。植物体も同様な緑色光を利用できるのかもしれないが、葉緑体のために緑色を吸収できない可能性がある。

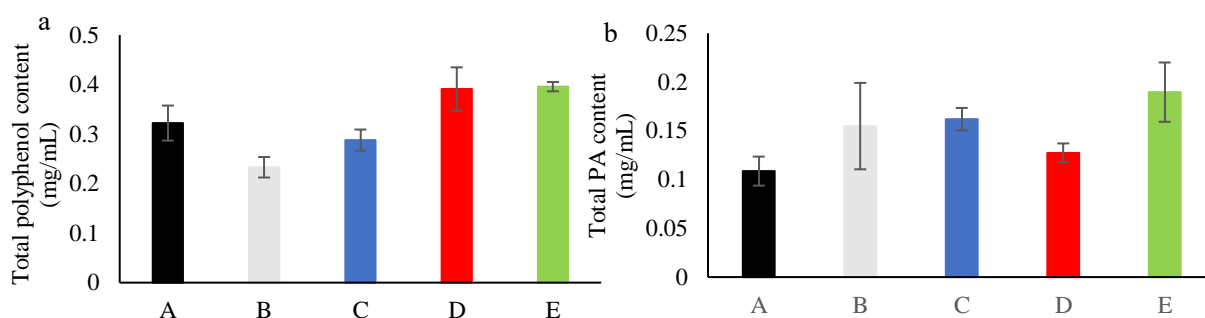


図 3-4-2. LED 照射培養時のポリフェノール分析

a: 総ポリフェノール量, b: 総 PA 量,

3-4-2. ラズベリー培養細胞のポリフェノール生合成酵素の発現量分析

次に、半定量 PCR を用いてポリフェノール生合成酵素の発現量を確認した。生合成酵素の発現量を確認することにより、図 3-4-2 の総 PA 量の A や D の条件で PA 量が減少した理由が確認できるのではないかと考えた。図 3-4-3 に LED 照射培養時のポリフェノール生合成酵素発現量分析を示した。

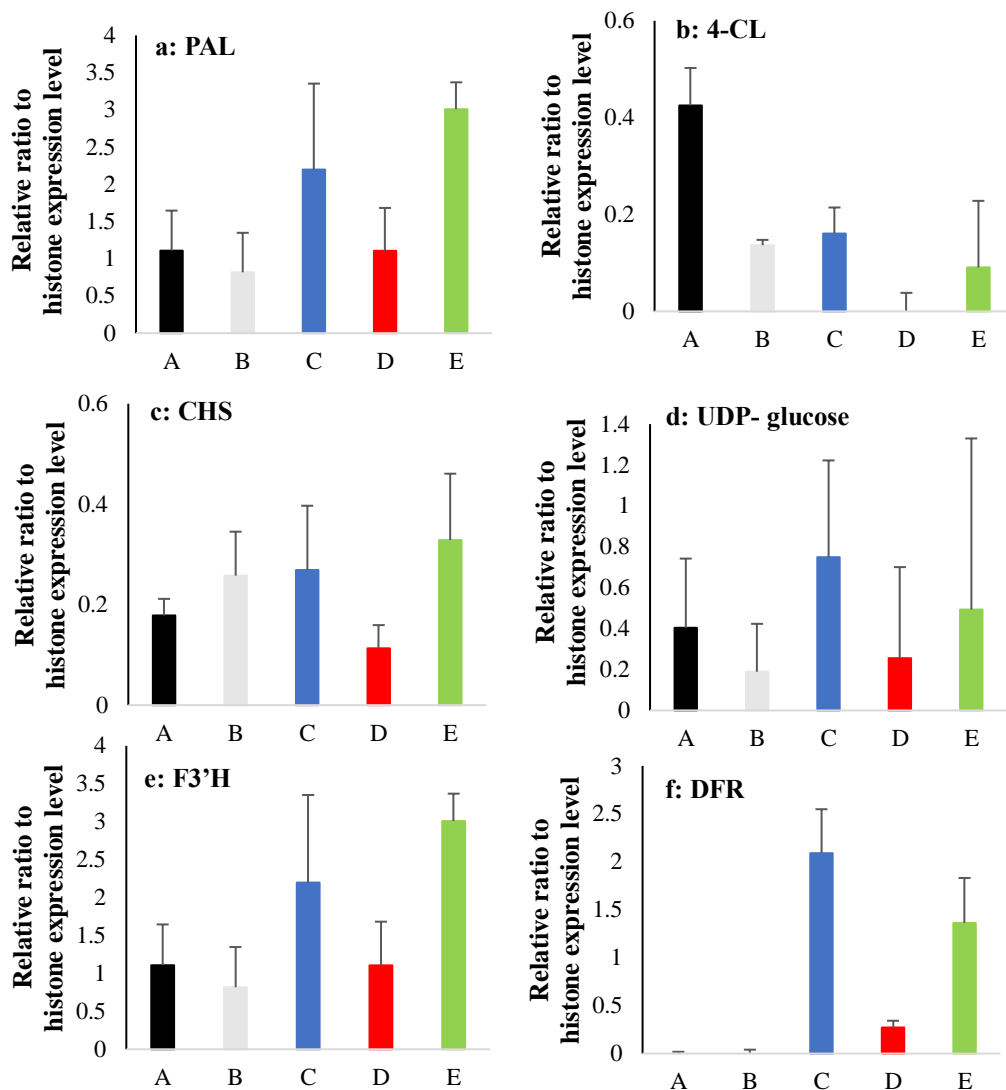


図 3-4-3. LED 照射培養時のポリフェノール生合成酵素発現量分析
a: PAL, b: 4-CL, c: CHS, d: UDP-glucose, e: F3'H, f: DFR

図 3-4-3 ではラズベリー中に発現している酵素の発現量の確認を行った結果を示している。図中、a が PAL、b が 4-CL、c は CHS、d は UDP-glucose、e は F3'H、f は DFR になっている。a の PAL では、C や E の条件で B よりも多く生合成されていることが確認された。

また、4-CL では赤、緑、青色の波長を一定の割合で照射している細胞で増加することが確認された。c は CHS、d は UDP-glucose、e は F3'H、f は DFR になっている。c の CHS では、条件ごとに大きな変化はないが、D の条件で減少することが確認され、UDP-glucose では C の条件で増加していることが確認された。F3'H では C や E の条件で増加することが確認された。DFR では A や B の条件で発現量が少ないことが確認され、C や E の条件で増加していることが確認された。青色光照射条件 C、緑色光照射条件 E では総ポリフェノール量、総 PA 量測定の結果と相関があり、フラバン-3-オール誘導体の生合成経路が主に活性化されていた。ラズベリー葉では青色光でフラバン-3-オール誘導体の生合成が増加していたが、培養細胞では青色光に加えて緑色光でも同様な酵素が活性化されている。このことから、培養細胞は緑色光で活性化されるシステムを持っていることが明らかになった。赤色光でも酵素は活性化されているが、フラバン-3-オール誘導体の増加にはあまり関与しない。この成果から青色や緑色光照射下で細胞を培養することで機能性ポリフェノールを増加させることができた。

3-4-3. ラズベリー培養細胞のポリフェノール化合物の LC 分析

前章で各条件により生合成酵素の発現量が異なることが確認され、とくに青色光や緑色光でフラバン-3-オール誘導体が増加することが明らかになった。そこでラズベリー培養細胞で生産されているポリフェノール化合物の含有量変化の確認を行った。まず、図 3-4-4 にどのようなポリフェノール化合物が含まれているのか LC 分析を行った。LC 分析の結果、11 種類のポリフェノール化合物が含まれていることが確認された。ポリフェノール化合物の構造を図 3-4-5 に示した。

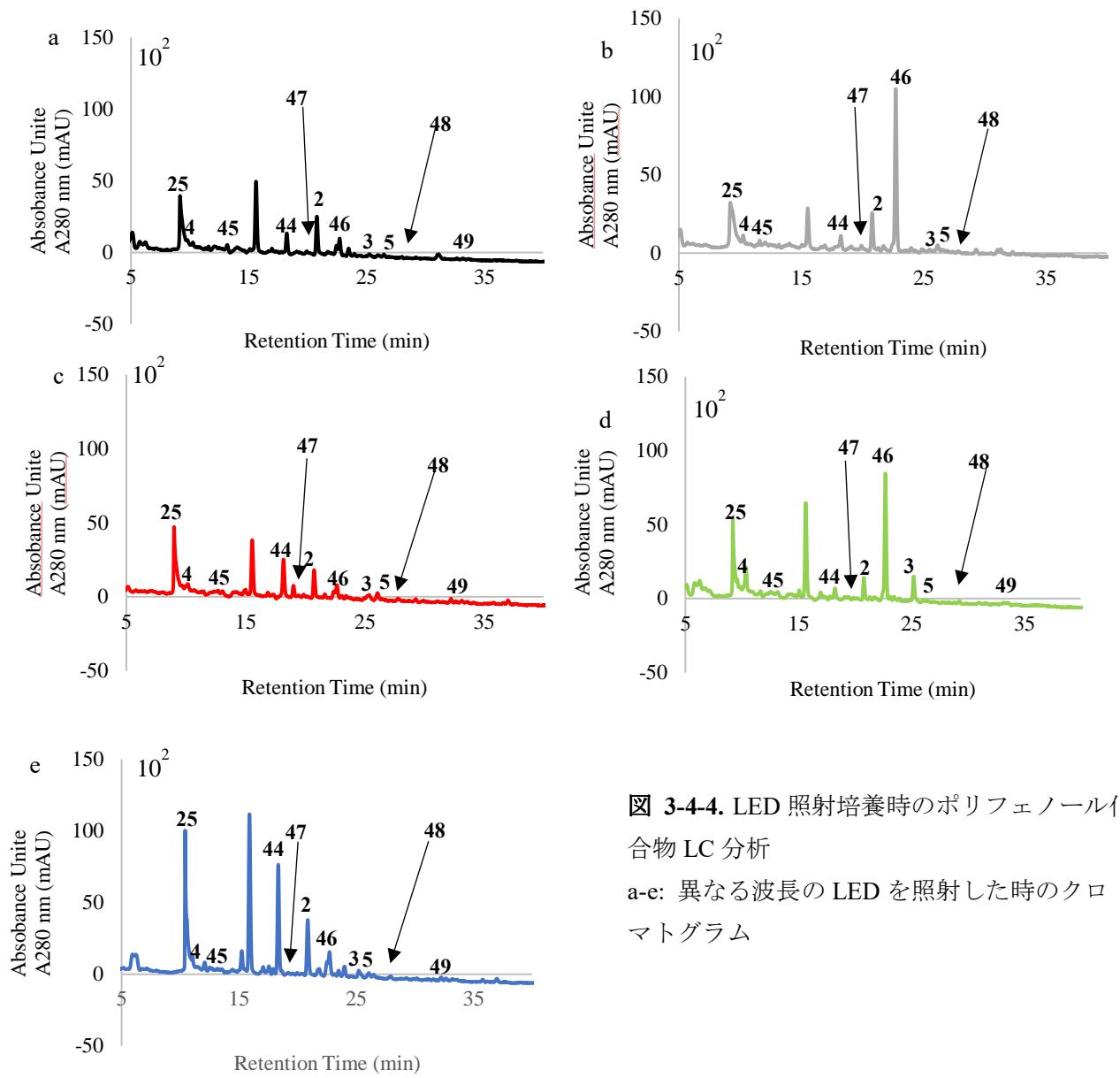


図 3-4-4. LED 照射培養時のポリフェノール化合物 LC 分析
 a-e: 異なる波長の LED を照射した時のクロマトグラム

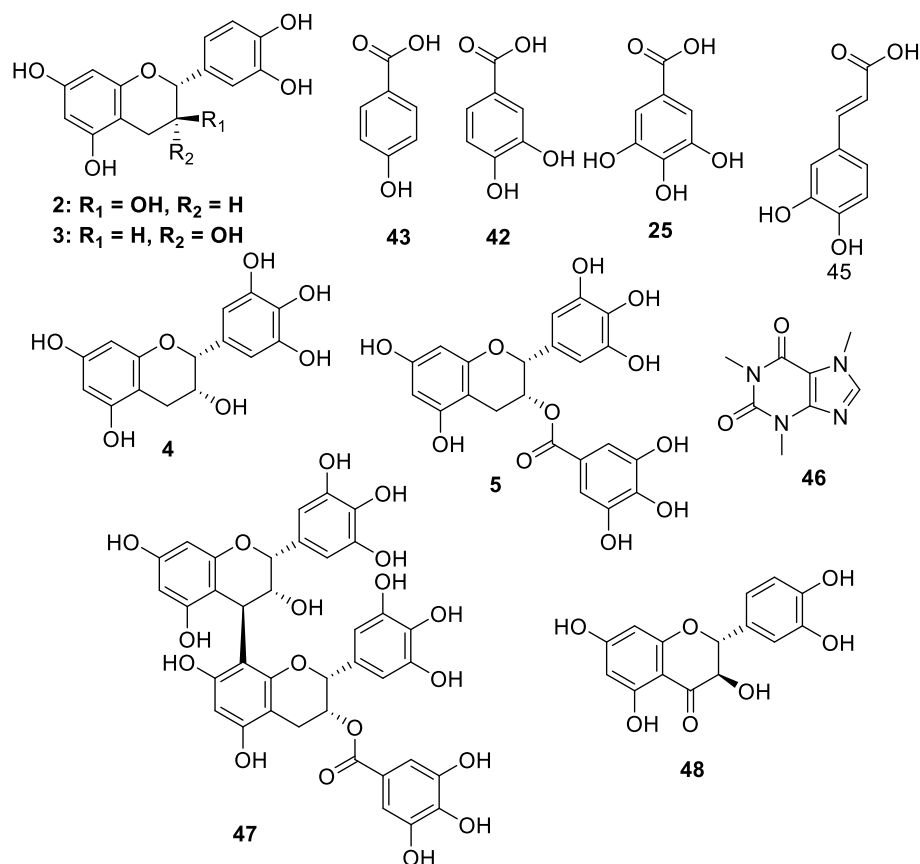


図 3-4-5. ラズベリー培養細胞中に含まれる化合物群

次に、同定された化合物が LED の照射条件によりどのように変化するのか標準化合物の検量線を用いて定量研究を行った。ラズベリー培養細胞中のポリフェノール化合物の定量を図 3-4-7 に示した。まず、フラバン-3-オール誘導体の(+)-catechin (2)、(-)-epicatechin (3) の定量を行った。(+)catechin (2) では赤色光照射下 D の条件で増加していることが確認され緑色光照射下 E の条件では減少することが確認された。また、(+)-catechin (2) とは逆に、(-)-epicatechin (3) では E の条件で増加することが確認された。4-Hydroxybenzoic acid (43) では(+)-catechin (2) と同じように D の条件で増加することが確認された。Protocatechuic acid (42) では光照射無し条件 A と E の条件で増加していることを確認した。次に gallic acid (25)、caffeic acid (45) では条件ごとに大きな差はないが青色光照射下 D の条件で増加していることを確認した。前章ではポリフェノール生合成酵素の発現量は C や E の条件で増加傾向であったが、化合物ごとに定量を行ったところ、化合物によって影響される光が異なることが確認された。これらの結果より、照射する波長を変えることにより培養細胞を用いることで選択的にポリフェノール化合物を生産できることが確認された。今回分析した化合物は市販されているが比較的高い値段で取引されている化合物である。培養細胞を大量に培養することができれば上記化合物の新たな生産法となる可能性がある。

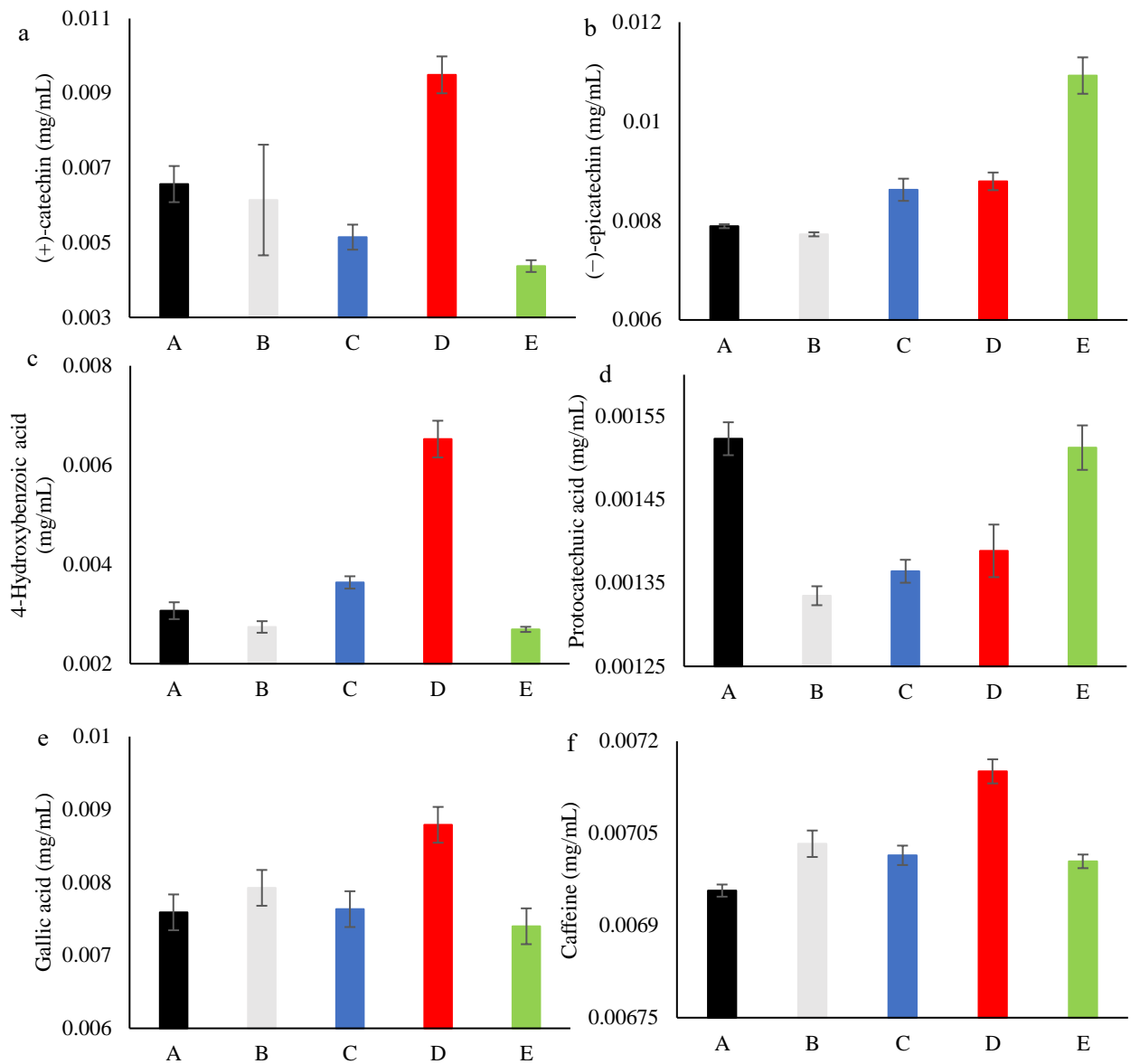


図 3-4-7.ラズベリー培養細胞中のポリフェノール化合物の定量
 a: (+)-catechin (2) の定量, b: (-)-epicatechin (3) の定量, c: 4-Hydroxybenzoic acid (44) の定量, d: protocatechuic acid (45) の定量, e: gallic acid (25) の定量, f: caffeine (46) の定量

3-4-5. ラズベリー培養細胞を用いたポリフェノール生産検討 まとめ

ラズベリー培養細胞の樹立を行い、波長の異なる LED を照射した時の総ポリフェノール量、総 PA 量やポリフェノール化合物の定量分析を行った。総ポリフェノール量や総 PA 量では青色光を照射した細胞で増加することを確認した。総ポリフェノール量や総 PA 量の変化がポリフェノール生合成酵素に影響していると考え半定量 PCR を用いて生合成酵素の発現を確認し、青色光や緑色光では、機能性ポリフェノールであるフラバン-3-オール誘導体生合成に関係する PAL や CHS などの生合成酵素が増加したことを確認した。また葉緑体を生産する植物体では見られない現象であるが、培養細胞を用いたときは緑色光でもフラバン-3-オール誘導体の生産が増加した。これは緑色の葉緑体がある場合は緑色を反射するために利用できないが、細胞中には緑色を利用できるシステムも存在することを示している。また、培養細胞を用いた場合、植物体では見られなかったガロイル化されたフラバン-3-オール誘導体が生合成されていることを確認した。

植物体と培養細胞では主に葉緑体の発現の有無が異なっている。本文では示さなかったが、培養細胞における葉緑体の発現の検討も行った。培養細胞における葉緑体の発現は培地の組成を変え光を照射することにより発現することを確認した。しかし、葉緑体の発現した細胞は成長しないため緑色の細胞にはなるがそれ以上成長しないため分析をすることが不可能であった。培養細胞は脱分化した細胞であるが、葉緑体は分化後に活性化する細胞内小器官であり、培養細胞中では基本的に発現しないことが確認された。植物体や果実で発現している ANS の発現も見られなかったことも葉緑体に原因があると考えている。

培養細胞に青色光や緑色光を照射してフラバン-3-オール誘導体を生産した例は本博士論文を執筆している現在では報告されておらず本報告が初めての例となる。

3-5. 植物培養細胞を用いたフラボノイド変換反応

前章ではラズベリー培養細胞に異なる波長の LED を照射しポリフェノール化合物の生産検討を行ったが、本章の研究では、植物培養細胞を用いて機能性が高いフラバン-3-オール誘導体を効率的に生産したいと考えた。理化学研究所から提供された植物細胞、ブドウ培養細胞 *Vitis Vinifera L.* を用いて検討を行うことにした。また、ブドウ培養細胞同様にしてラズベリー培養細胞を用い変換反応を行った。具体的には、有機合成では合成が難しいフラバン-3-オール誘導体、とくに配糖体の合成に行った。植物培養細胞で配糖体が合成できるという論文が発表されており^{88,90-94)}、同様な方法を用いてフラバン-3-オール誘導体の配糖化を合成可能だと考え検討した。糖化反応をすることにより化合物の活性が上がる可能性が示唆されている^{87,95)}。

3-5-1. ブドウ培養細胞 (*Vitis vinifera* L.)を用いたフラボノイド変換反応

ブドウには多くの配糖化酵素がふくまれている¹⁵⁵⁾。今回、用いたブドウ培養細胞は VW (*Vitis* White)株と VR (*Vitis* Red)株の2種類を用いた。VW は赤い色素であるアントシアニジンを生産する能力がない株、VR はアントシアニジンを生産する能力がある株である。(写真は2章概論で示した)。具体的な実験は次のように行った。ブドウ培養細胞をフラスコにて前培養し、そこに化合物の終濃度が2 mM になるように培養液に添加した。6日間27度で振とう培養を行い、培養液を遠心分離したのち細胞画分は破碎し、酢酸エチルで分配した。また、遠心分離して得た水層も酢酸エチルで分配した。分析の結果、植物細胞区分から抽出した酢酸エチル層にフラバン-3-オール誘導体が含まれていることが確認できた。まず、文献を参考にVW細胞を用いて quercetin (**11**)での糖化反応を行い、quercetin (**11**)の3位に糖化反応が進行した quercetin-3-*O*-glucoside (**50**)、および, isoramunetin-3-*O*-glucoside (**49**)が生成したことが確認できた^{87,156)}。VR細胞でも同様の結果が得られている。これらの化合物は基質を添加せず培養したコントロール(図3-5-1-B)では確認されていない。

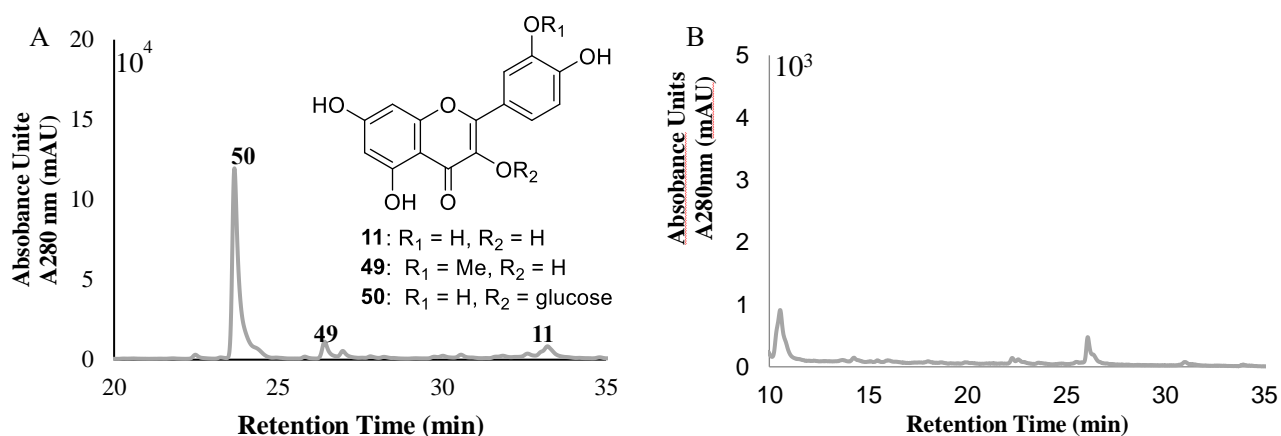


図 3-5-1. VW 細胞を用いた quercetin (**23**)の配糖化反応

A: quercetin (**27**)を用いた時の LC クロマトグラム, B: 基質を添加せずに培養したブドウ培養細胞 (ブランク)

次に、他のフラボノール化合物の fisetin (**51**)、kaempferol (**53**)、miricetin (**55**)を用いて VR 細胞で同様の変換反応を行った(図3-5-2)。アントシアニン色素を合成する VR 細胞を用いたこれらの化合物の誘導体は報告されていない。Fisetin (**51**)は quercetin (**11**)の5位に水酸基を持たない類縁体であり、VR細胞を用いて fisetin (**51**)変換した結果、3位が配糖化された化合物 (**52**)が得られた(図3-5-2-B)。Kaempferol (**53**)は quercetin (**11**)の3'位に水酸基を持たない類縁体であり、VR細胞で変換した結果 fisetin (**51**)同様に3位が配糖化された化合物 **52** が得られた(図3-5-2-C)。一方、quercetin (**11**)の5'位に水酸基が付加した誘導体である myricetin (**55**)では、3位に配糖化された化合物 (**56**) また、7位に配糖化された化合物 (**57**) が VR 細胞によって得られた(図3-5-2-D)。これらの結果は、B環上の水酸基がフラボノー

ル誘導体 quercetin (**11**)の類縁体に立体的な影響を与えている可能性を示唆している。また、myricetin (**55**)のように水酸基を3つ持つ化合物では、B環の水酸基が嵩高いために3位の反応性が低下し、7位が配糖化される可能性がある。VR細胞では、フラボノール化合物である quercetin 誘導体の配糖化反応が進行したが、フラバン-3-オール誘導体では様々な検討を行ったが配糖化反応は進行しなかったという。VR細胞は主にフラボノール化合物を変換できることが示唆された。また、VW細胞でもこれらのフラボノール誘導体を用いて同様の検討を行ったが、配糖化反応は進行しなかった。

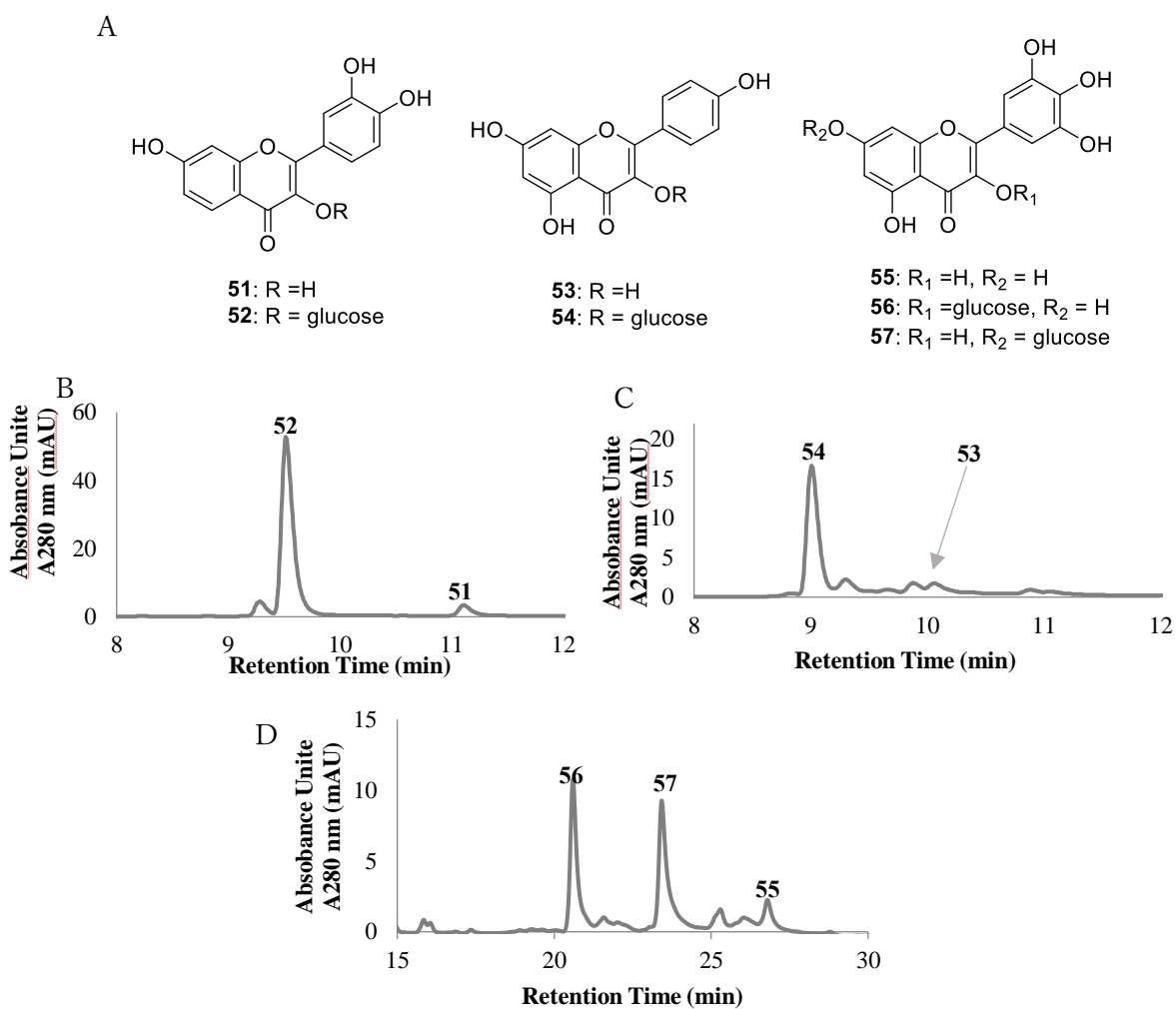


図 3-5-2. VR細胞を用いたフラボノイド化合物の配糖化反応

A:フラボノール誘導体の構造, B: fisetin (**51**)を用いた時のクロマトグラム, C: kaempferol (**53**)を用いた時のクロマトグラム, D: myricetin (**55**)を用いた時のクロマトグラム

これまで、フラボノールの配糖化反応を行ってきたが、次にフラバン-3-オール誘導体を用いて化合物変換検討を行った。まず、最初にアントシアニン色素を合成しない VW 細胞を触媒として用い基質として、EGCG (5)で反応を行った結果糖化反応は進行せず、オリゴマー化した EGCG (5)の theasinensin A(58)が生成していることが確認された。Theasinensin A (58)はウーロン茶¹⁵⁷⁾や紅茶¹⁵⁸⁾からの単離が報告されている。また、様々な方法で合成されることが報告されており、酸化剤としてフェリシアン化カリウムを用いる方法¹⁵⁷⁾、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) を用いてラジカル酸化する方法¹⁵⁹⁾、アルカリ条件下で空気酸化する方法¹⁶⁰⁾がある。また、ナシ果実ホモジネートを用いて酸化する方法¹⁵⁸⁾、及び、銅を用いて酸化も開示されている¹⁶¹⁾。さらに、三井農林によって白金族触媒を用いて酸化させる方法などがある¹⁶²⁾。また、theasinensin A(58)はアポトーシス誘導作用¹⁶³⁾、リパーゼ阻害作用¹⁶⁴⁾、抗炎症作用¹⁶⁵⁾、血圧値上昇抑制作用¹⁶⁶⁾、などの機能が報告されている高機能生ポリフェノール化合物である。また、EGCG (5)をアントシアニン色素を合成する VR 細胞を用いて変換反応を行ったが theasinensin A (58)は生成されなかった。theasinensin A (58)が生成されるためには、B 環の水酸基が酸化されてキノン型の構造になる必要がある。ポリフェノールをキノン型に変換する酵素としてポリフェノールオキシダーゼ (PPO) が一般的に知られているが、VW 細胞では EGCG の B 環を酸化する PPO が生産されているため、酸化されてオリゴマー化反応が進行したと考えられる。

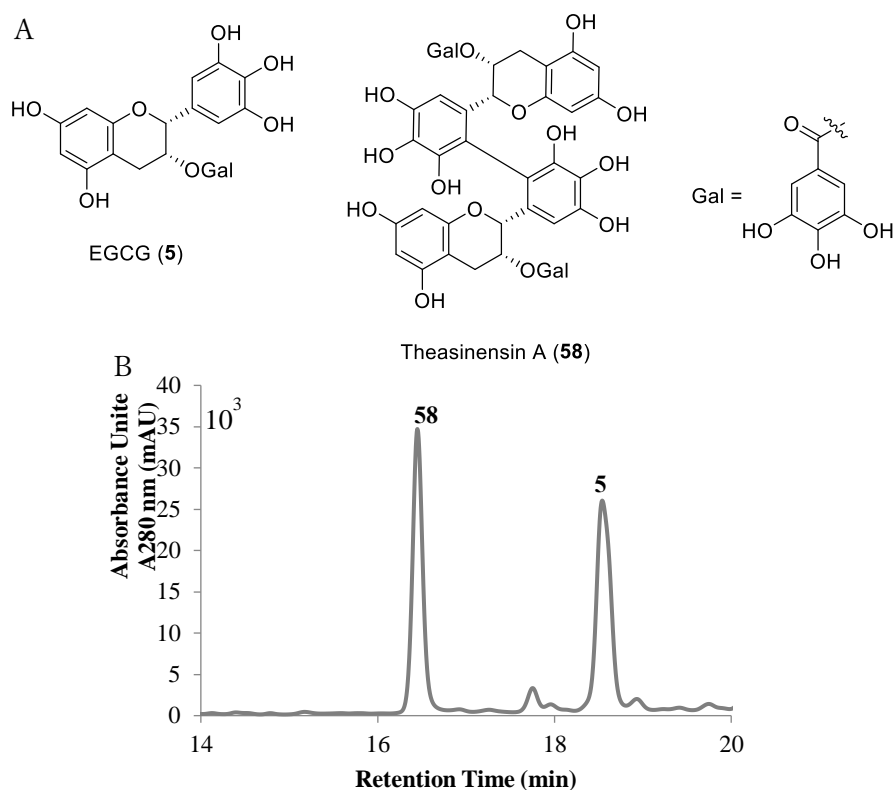


図 3-5-3. VW 細胞を用いたフラバン-3-オール誘導体変換反応

A: EGCG(5)誘導体の構造, B: VW 細胞を用いた EGCG (5)の変換クロマトグラム

VR 細胞を用いて(-)-epicatechin (3)を変換すると、オリゴマー化反応が進行し、(-)-epicatechin (3)が2分子縮合した procyanidin B2 (6)が、3分子が縮合した procyanidin C1(7)が、それぞれ 27%と 10%の収率で生成した (図 3-5-4)。アントシアニン色素を生産しない VW 細胞では、このオリゴマー化反応が起こらなかったことから、色素を生産する VR 細胞に存在する酵素が重要であると考えられる。(-)-epicatechin (3)からオリゴマーが合成されると推定される経路をスキーム 1 に示した。スキーム 3-5-1 に示すように、ジヒドロフラボノール誘導体(A)の 4 位のカルボニル基がフラバノール還元酵素で還元され、ロイコアントシアニジン誘導体 (B) が生成されることが考えられる。ロイコアントシアニジン誘導体 (B) は、アントシアニン合成酵素によってカチオン化され、アントシアニン誘導体となる。ロイコアントシアニジン誘導体 (B) の 4 位の水酸基はベンジル位であるため、脱離能力が高く、4 位にカチオンを有する中間体 (D) が生成すると考えられる。このカチオン (D) に別の分子のエピカテキンの 8 位と縮合すると二量体が生成し、既に生成している二量体と縮合すると三量体が生成すると考えられる。アントシアニン (C) を生成しない VW 細胞では、ロイコアントシアニジン誘導体 (B) の誘導体が生成されないことを考えると、VW 細胞ではオリゴマーが生成されないことが説明できる。

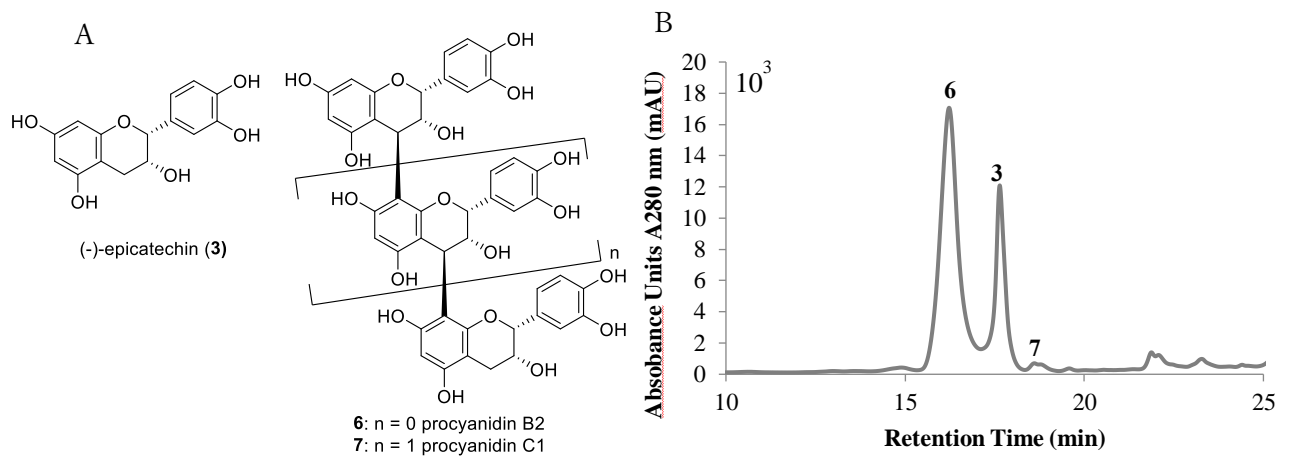
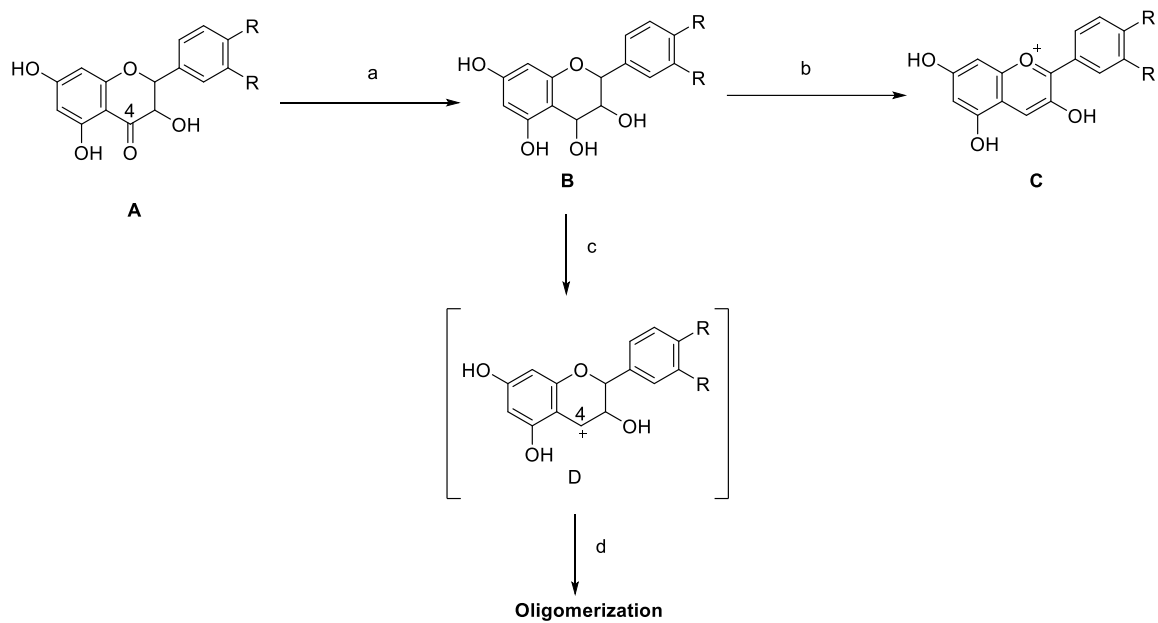


図 3-5-4. VR 細胞を用いたフラバン-3-オール誘導体変換反応

A: (-)-epicatechin (3)誘導体の構造, B: VR 細胞を用いた(-)-epicatechin (3)の変換クロマトグラム



スキーム 3-5-1. VR 細胞によるオリゴマー合成の予想経路。

(a) フラバノール還元酵素による還元反応, (b) アントシアニン合成酵素によるプロトンの脱離反応, (c) 4 位の水酸基の化学的脱離反応, (d) オリゴマーの縮合反応

3-5-2 ラズベリー培養細胞 (*Rubus idaeus*)を用いたフラボノイド変換反応

ラズベリーにも多くのポリフェノール化合物や生合成酵素が含まれていることを確認している。そこで、ラズベリー培養細胞を構築しブドウ培養細胞同様に植物に含まれている酵素の力を使い様々な配糖体や置換されたポリフェノール化合物が得られるのではないかと考えた。まず、文献を参考にラズベリー培養細胞を構築した^{167,168,169}。品種はヒンボートップ種(ラフザック)を用いた。ブドウ培養細胞と同じように実験を行い、終濃度が2 mMになるように基質を培養液に添加した。6日間23℃で振とう培養を行い、培養液を遠心分離したのち細胞画分は破碎し、メタノールで抽出を行った。その後、酢酸エチルで分配し分析を行った。まず、フラボノールのquercetin (**11**)を用いて反応を行った。

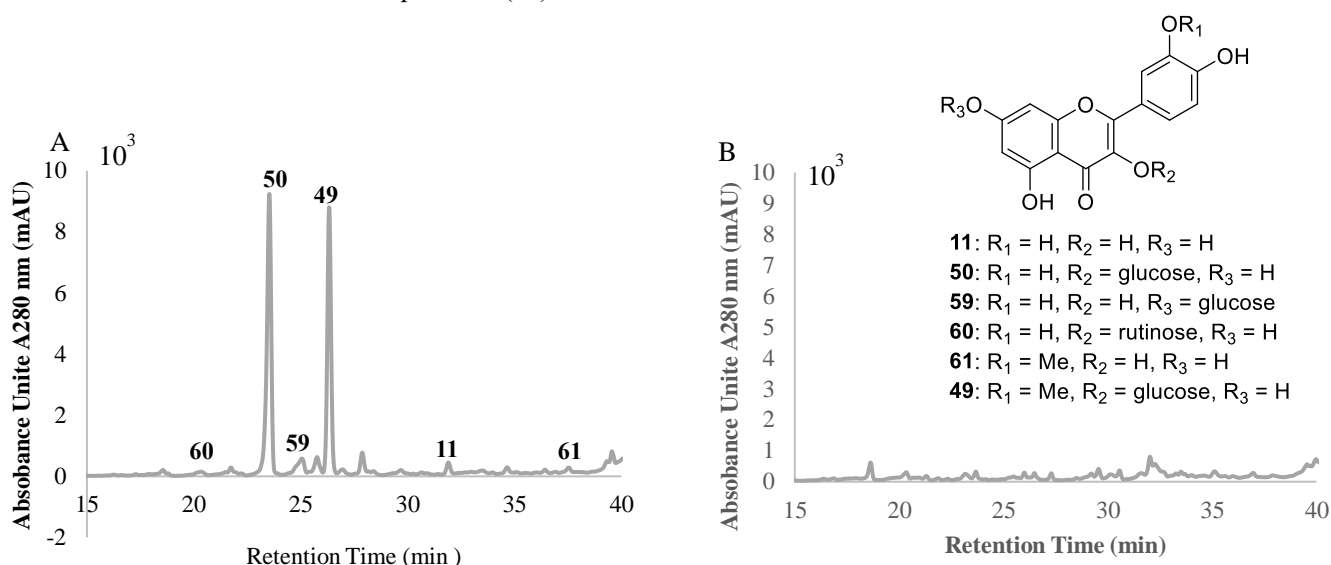


図 3-5-5. ラズベリー培養細胞を用いた quercetin (**23**)の配糖化反応

A: quercetin (**11**)を用いた時の LC クロマトグラム, B: 基質を添加せずに培養したラズベリー培養細胞 (ブランク)

図 3-5-5 にラズベリーの培養細胞を用いて quercetin (**11**) を変換した結果を示した。ブドウ培養細胞での検討と同様に、quercetin (**11**)からは、isorhamnetin (**61**)、quercetin-3-glucoside (**50**)、isorhamnetin-3-glucoside (**49**)が生成された。培養ブドウ細胞との大きな違いは、isorhamnetin-3-O-glucosid (**49**)の生産量が多いことが確認された。また、quercetin-7-O-glucoside (**59**) や 3-O-rutinoside (**60**) は少量しか生成されなかった。ラズベリーの培養細胞を用いる方法は、入手が容易な quercetin (**11**)から高価な isorhamnetin-3-O-glucoside (**49**) を合成する優れた方法になり得ると考えられる。また、ケルセチンを基質とした場合、副生成物が比較的少ないことから、この反応にはケルセチンの 5 位の水酸基が反応に重要であることが確認された。

次に、基質として fisetin (51) を用いて検討した (図 3-5-6)。生成物は複雑な混合物であったが、ブドウ細胞での fisetin (51) の反応に類似したものが得られ、7 位に配当化した fisetin-7-*O*-glucoside (62) が得られた。他にも多くの生成物が得られたが、構造の確認はできなかった。基質として添加した fisetin (51) も未反応で回収された。Quercetin (11) を基質とした場合、副生成物が比較的少なかったことから、quercetin (11) にはあり、fisetin (51) にはない 5 位の水酸基がこの反応に重要であることが確認された。

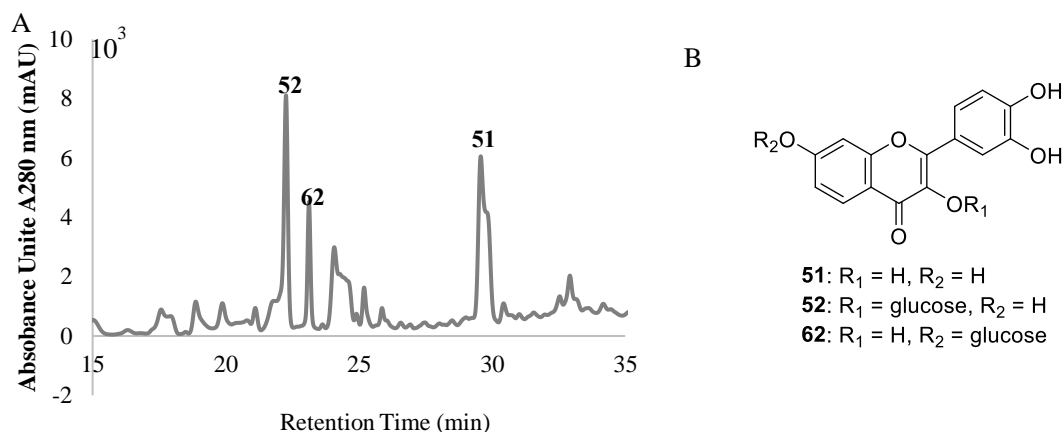


図 3-5-6. ラズベリー培養細胞を用いた fisetin (51) の配糖化反応

A: fisetin (51) を用いた時の LC クロマトグラム, B: 基質に用いた化合物、および、生成した配糖化化合物

図 3-5-7 に、quercetin (11) と同じく 5 位に水酸基を持つ kaempferol (53) を基質として用いた結果を示した。Quercetin (11) と同じように kaempferol (53) を基質とした場合、反応は効率的に進行し、基質はほとんど残らず、kaempferol-3-*O*-glucoside (54) が効率的に得られた。また、quercetin (11) と同様に、ブドウ細胞では生成されない 7-*O*-glucoside (63) や 3-rutinoside (64) も生成された。副生成物の量が比較的小さいことから、ラズベリー培養細胞を生体触媒として用いる場合には、5 位の水酸基が重要であることが示唆された。一般に、5 位に水酸基があると、4 位のケトン基と水素結合を形成することが知られており、この構造が反応に必須であることが確認された。

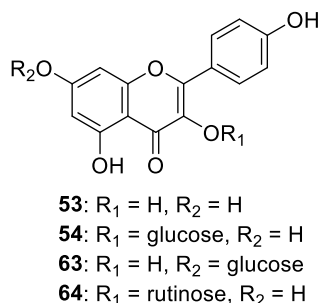
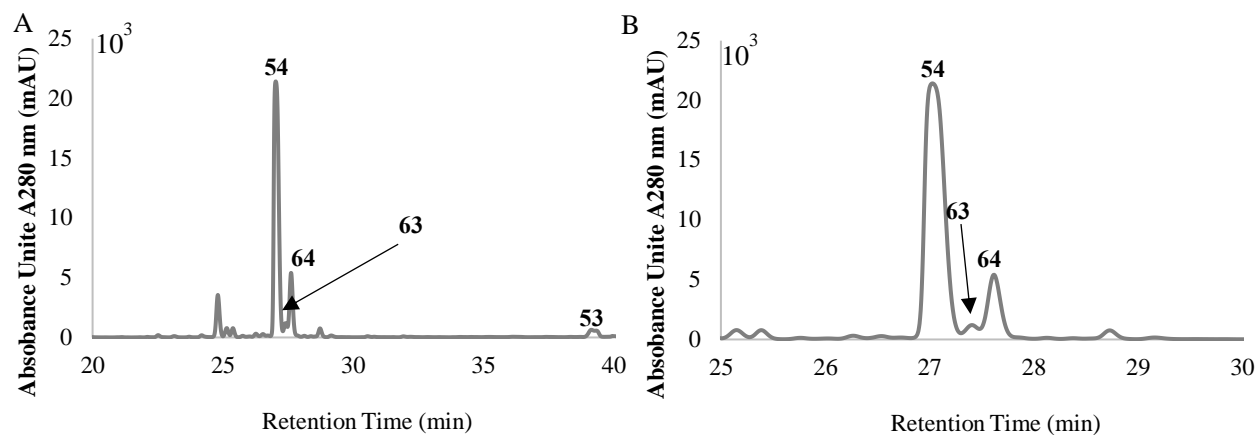


図 3-5-7. ラズベリー培養細胞を用いた kaempferol (53)の配糖化反応

A: kaempferol (53)を用いた時の LC クロマトグラム, B: 25 分-30 分までの拡大

C: 基質に用いた化合物、および、生成した化合物

次に、myricetin (55)も quercetin (11)の類縁体で、5 位に水酸基があり、B 環に 3 つの水酸基がある化合物を基質として用いた結果を示した (図 3-5-7)。Quercetin (11)は B 環に 2 つの水酸基を持ち、kaempferol (53)は B 環に 1 つの水酸基を持つため、B 環の水酸基の数はこの反応に大きな影響を与えないと予想された。ブドウの細胞を用いた場合と同様に 3-O-glucoside (56)と 7-O-glucoside (57) が得られたが、ラズベリーの細胞では 3-O-glucoside (54) が優先的に得られた。ブドウ細胞と同様に、フラバン-3-オール誘導体を基質として用いたが、非常に複雑な混合物が得られ、選択的に得られる生成物はなかった。これは、フラバン-3-オール誘導体では quercetin (11)のような 4 位のケトン基が無いことや 2 位や 3 位の立体があることから、細胞に含まれる酵素と相互作用ができず反応が進行しないため、生成物が得られなかったと考えた。

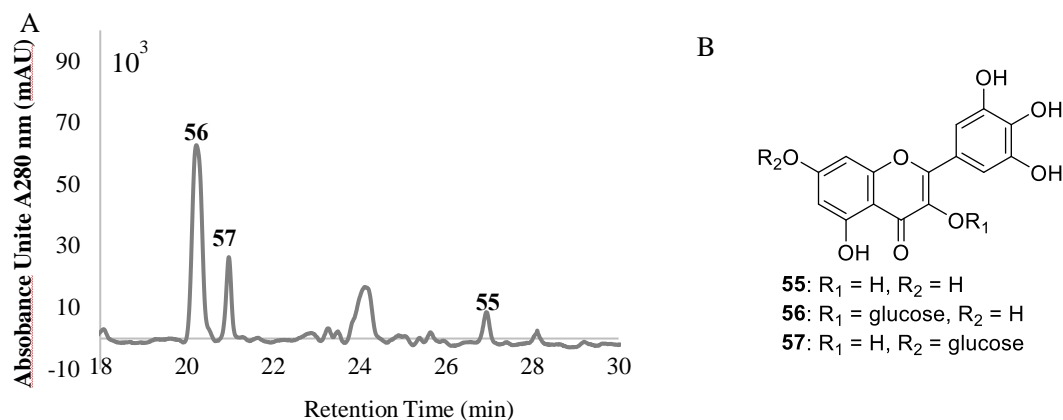


図 3-5-8. ラズベリー培養細胞を用いた,myricetin (54)の配糖化反応

A: myricetin (55)を用いた時の LC クロマトグラム, C: 基質に用いた化合物、および、生成した配糖化合物

3-5-3. 植物培養細胞を用いたフラボノイド変換反応 まとめ

ポリフェノール化合物を多く含む植物の培養細胞を生体触媒として、フラボノイド誘導体の製造を目的とした研究を行った。ポリフェノール化合物を多く生産するブドウの培養細胞とラズベリーの培養細胞を用いて、フラボノイドを基質とした変換反応を試みた。その結果、ブドウ培養細胞の VR 細胞ではフラボノール誘導体の糖化反応とフラバン-3-オール誘導体のオリゴマー化反応が、VW 細胞ではフラバン-3-オール誘導体である EGCG (5)のオリゴマー化反応が確認された。一方、ラズベリーの葉から樹立した培養細胞を用いた場合は、フラボノール誘導体の糖化反応が進行した。ブドウ培養細胞とラズベリー培養細胞では同じ化合物が得られたが、それぞれに特徴的な生成物が確認された。これらの結果は、ポリフェノールを生産する能力を持つ植物の培養細胞を用いることで、多くの誘導体を生産できることを確認した。ラズベリーから樹立した培養細胞を用いた化合物変換は本報告が最初となる。

3-6. 動物由来肝臓マイクロソームを用いたグルクロン酸抱合反応

体内に異物(化合物)が取り込まれたのち肝臓をはじめとする種々の組織において複数の代謝酵素による変換を受ける。これを薬物代謝というが、通常、代謝物は水溶性が増し、体外へ排泄されやすい形へと変換される。薬物代謝経路には酸化、還元、加水分解等を行う第I相反応と、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、メチル抱合等を行う第II相反応に大別される^{113,114)}。例えば、サル肝臓マイクロソームを用いて daidzein (72) の7位にグルクロン酸抱合反応が進行することが報告されている⁹⁶⁾。

今回、富山県立大学の生城真一教授にご教授頂いた方法で最もグルクロン酸抱合能が高い肝臓を用いて第II相反応のグルクロン酸抱合反応を行った。研究に使用した動物由来肝臓マイクロソームは犬 (Female)、ヒト (Female)、マウス (Male)、モルモット (Male)、ウサギ (Female)、子ブタ (Male) 由来を用いた。基質として化合物 **21**、**22** を用いて反応を行った。結果を図 3-6-3、図 3-6-4 に示した。図 3-6-3、図 3-6-4 より基質として用いた化合物 **21,22** のピークよりも脂溶性側に複数のグルクロン酸が縫合したと考えられるピークが検出された。これによりマイクロソームに含有する抱合酵素や CYP(概論 2-5,2-6 に記載)の違いにより反応方法が異なることが確認できた。

グルクロン酸抱合体は、我々の体内において薬物代謝の第一段階として知られている。食品や薬品として体内に取り込んだ脂溶性の高い化合物は肝臓にて代謝されてグルクロン酸で修飾されて水溶性となる。グルクロン酸で修飾された化合物は血中に入ったのち腎臓に移動して尿と一緒に排泄される。一方で、グルクロン酸抱合体の機能性などは入手が難しいことから研究が進んでいない。グルクロン酸抱合体を効率的に合成できれば、肝臓での代謝後の化合物の機能性を評価するために用いることができる。今回用いたフラバン-3-オール誘導体の **21,22** は、お茶などに微量成分として含まれる化合物であるが、ガン細胞に対して増殖抑制活性を示している。基質としてまず、ガン細胞に対して活性が低いほうの化合物 **21** を用いて反応を行い複雑な代謝物の混合物が得られたことを確認した。また、分子量解析したところ、グルクロン酸代謝物が含まれていることが確認できた。次に、ガン細胞に対して活性が高い化合物 **22** を用いた結果、化合物 **22** でも代謝が進行し、グルクロン酸抱合体が得られたことを確認した。また、**22** の抱合反応に関して、人肝臓マイクロソームと犬肝臓マイクロソームで **21** と比較すると基質として用いた **22** でグルクロン酸抱合反応が進行せず非常に多く残っていることが確認された。今回、抱合体を生産することが目的で実験を行ったが、反応しないこともよい結果だと考えている。その理由として、経口投与された化合物は、

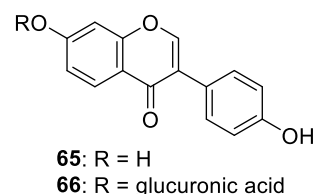


図 3-6-1. daidzein (72)
誘導体の構造

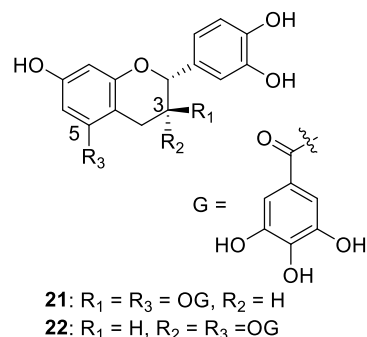


図 3-6-2. Flavan-3-ol 誘
導体の構造

肝臓で分解代謝されて血中に入り、グルクロン酸が結合した部分は尿に排泄される。グルクロン酸が結合した場合、その活性の多くは低下することが確認されている。グルクロン酸が結合せず、反応しない化合物は、その化合物の構造を保ったまま血中に入り全身に送られる。これは、薬剤としては非常に望ましい性質と考えている。また、これらの化合物は大阪電気通信大学 齊藤研究室でしか合成していない化合物であり **21,22** のグルクロン酸抱合体が単離できたならば、今後の化合物代謝研究などに貢献できると考えている。

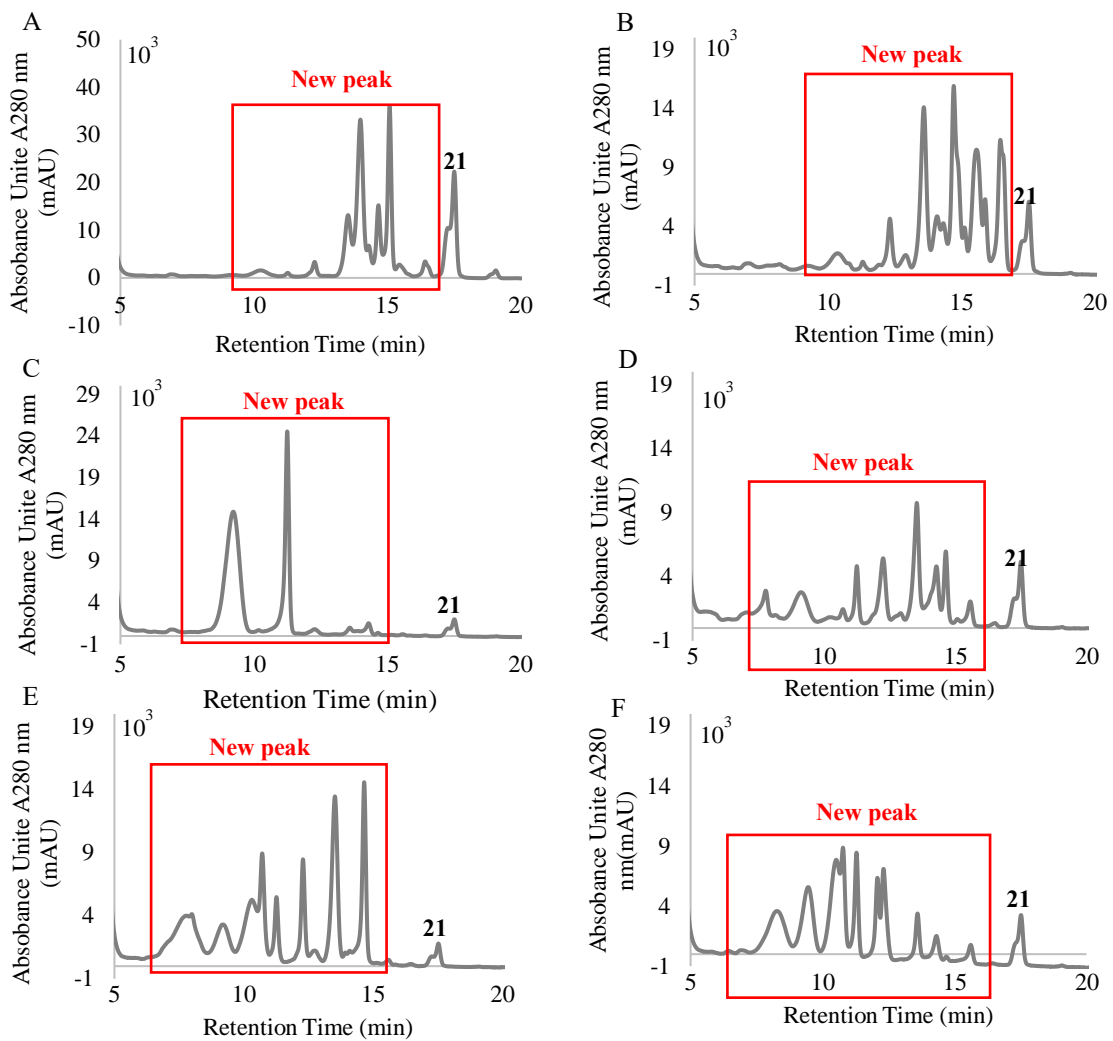


図 3-6-3. 化合物 21 を用いた肝臓マイクロソームの抱合反応

A: 犬肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応, B: ヒト肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応, C: マウス肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応, D: モルモット肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応拡大, E: ウサギ肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応, F: 子ブタ肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応

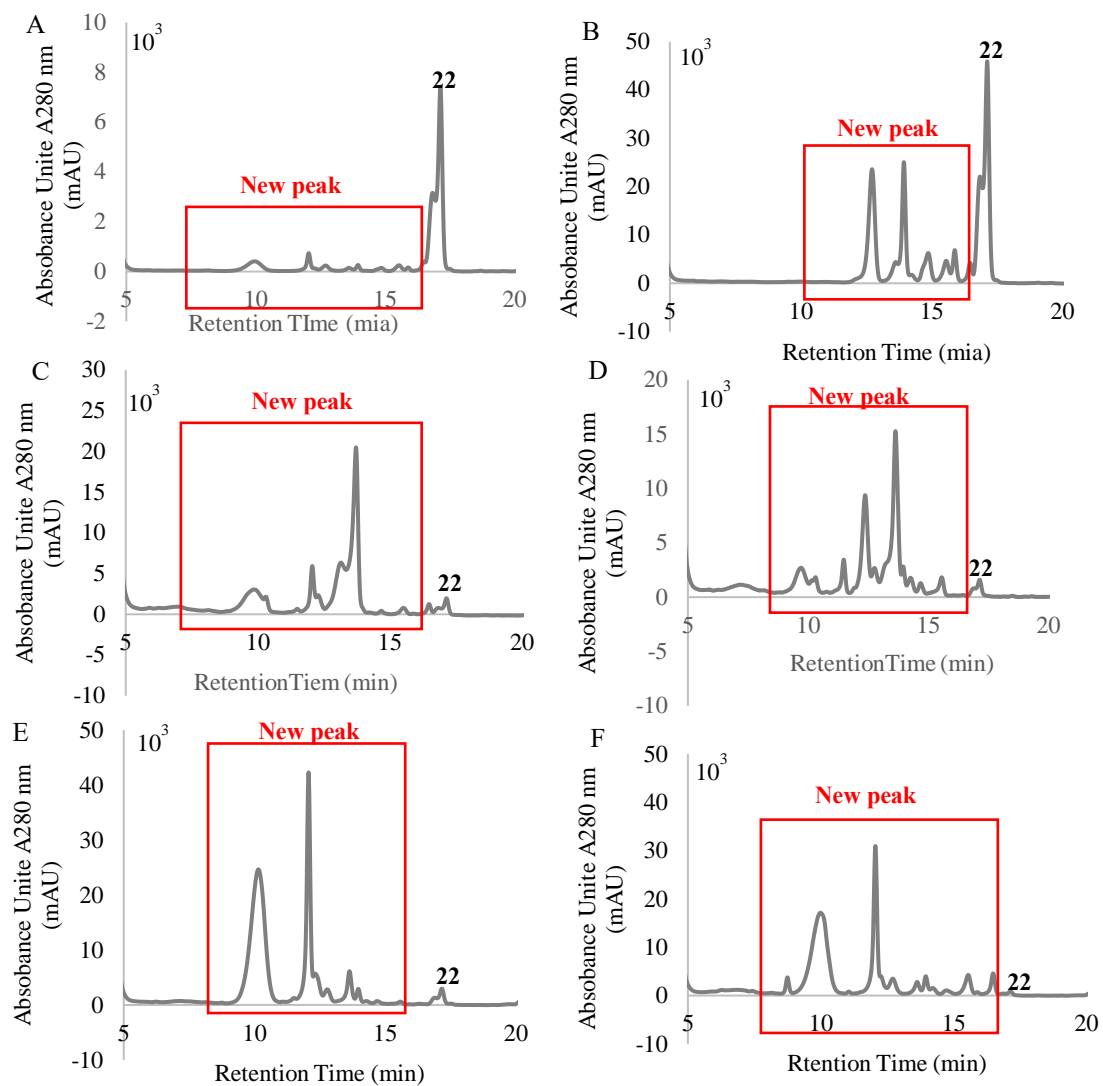


図 3-6-4. 化合物 22 を用いた肝臓マイクロソームの抱合反応

A: 犬肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応, B: ヒト肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応, C: マウス肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応, D: モルモット肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応拡大, E: ウサギ肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応, F: 子ブタ肝臓マイクロソームを用いた時の抱合反応

3-6-1. 動物由来肝臓ミクロソームを用いたグルクロン酸抱合反応 まとめ

フラバン-3-オール誘導体を基質として数種類の動物由来肝臓ミクロソーム(犬、ヒト、マウス、モルモット、ウサギ、子ブタ由来)でグルクロン酸抱合反応を行った。基質としてフラバン-3-オール誘導体の **21,22** で用いて抱合反応を行い、用いるミクロソームにより抱合反応が異なることが確認された。これは、ミクロソームに含有する抱合酵素や CYP の違いにより反応方法が異なることが示唆された。

グルクロン酸抱合体は、我々の体内において薬物代謝の第一段階として知られている。食品や薬品として体内に取り込んだ脂溶性の高い化合物は肝臓にて代謝されてグルクロン酸で修飾されて水溶性となる。グルクロン酸で修飾された化合物は血中に入ったのち腎臓に移動して尿と一緒に排泄される。一方で、グルクロン酸抱合体の機能性などは入手が難しいことから研究が進んでいない。グルクロン酸抱合体を効率的に合成できれば、肝臓での代謝後の化合物の機能性を評価するために用いることができる。今回用いたフラバン-3-オール誘導体の **21,22** は、お茶などに微量成分として含まれる化合物であるが、ガン細胞に対して増殖抑制活性を示している。基質としてまず、ガン細胞に対して活性が低いほうの化合物 **21** を用いて反応を行い複雑な代謝物の混合物が得られたことを確認した。また、分子量解析したところ、グルクロン酸代謝物が含まれていることが確認できた。次に、ガン細胞に対して活性が高い化合物 **22** を用いた結果、化合物 **22** でも代謝が進行し、グルクロン酸抱合体が得られたことを確認した。また、**22** の抱合反応に関して、人肝臓ミクロソームと犬肝臓ミクロソームで **21** と比較すると基質として用いた **22** でグルクロン酸抱合反応が進行せず非常に多く残っていることが確認された。今回、抱合体を生産することが目的で実験を行ったが、反応しないこともよい結果だと考えている。その理由として、経口投与された化合物は、肝臓で分解代謝されて血中に入り、グルクロン酸が結合した部分は尿に排泄される。グルクロン酸が結合した場合、その活性の多くは低下することが確認されている。グルクロン酸が結合せず、反応しない化合物は、その化合物の構造を保ったまま血中に入り全身に送られる。これは、薬剤としては非常に望ましい性質と考えている。また、これらの化合物は大阪電気通信大学 齊藤研究室でしか合成していない化合物であり **21,22** のグルクロン酸抱合体が単離できたならば、今後の化合物代謝研究などに貢献できると考えている。

3-7. シロイヌナズナ由来 UGT78D2 を用いたフラボノイド配糖化反応

果物の中には糖分が多く含まれ、フラバノール誘導体、フラバン-3-オール誘導体やそのオリゴマーであるプロアントシアニジンも多くは配糖体に変換されている。そのため、我々ヒトもこれらの化合物の配糖体を大量に摂取しているはずである。一方で、配糖体の機能を確認できている例は極めて少ない。その理由として、配糖体はアグリコンよりもさらに単離が難しく、生物活性などに使用する化合物の十分な量を手に入れないためである。そこで、本研究では、フラバン-3-オール配糖体の機能を解明するため、フラバン-3-オール配糖体の合成を行った。様々な糖化反応の例が報告されているが、本研究では、シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を用いた検討を行った。この酵素は、quercetin (**11**)の3位を糖化可能な酵素として知られており^{105,106}、quercetin (**11**)、kaempferol (**53**)以外の報告例は現時点でない。もしフラバン-3-オール誘導体の糖化反応が進行するならば、新規性が高く、学術的にも価値があると考えている。前述したように、ポリフェノール化合物の糖化反応は、原料である化合物が純粋な状態で入手が難しいうえ、これらの化合物が酵素反応を阻害することも予測されるため反応条件の設定が難しいと考えられる。

本研究では、シロイヌナズナ由来 UGT78D2 を用いた2種類の手法で配糖体合成検討を行った。その手法は、精製した酵素を用いて配糖化を行う反応と、大腸菌と改良型 M9 培地を用いて菌体内で配糖化を行う反応である。この2種類の反応の詳細について述べる。精製した酵素を用いた反応では、大腸菌内で酵素を生産し、大腸菌を破碎後、精製を行い、酵素として基質と反応を行う。この反応では、これまでに quercetin (**11**)の3位を配糖化できることが分かっている^{105,106}。また、quercetin (**11**)以外にも kaempferol (**53**)など主にフラボンを配糖化可能であることが知られている。この検討では、UDP-glucose を用いているため、glucose が修飾した配糖体を得ることができる。UDP-galactose や UDP-rhamnose を用いることで、galactose や rhamnose が修飾した配糖体を得ることもできる可能性がある。次に、大腸菌と改良型 M9 培地を用いた反応では、大腸菌内で酵素を生産し、改良型 M9 培地に大腸菌を添加し、菌体内で基質と反応を行う。この反応では、quercetin (**11**)で配糖化できることが分かっている¹⁷⁰。また、この反応では、菌体内であるため、酵素反応とは違い、glucose 以外にも galactose や rhamnose、xylose などが一度の反応で修飾する可能性がある。この2つの反応の大きな違いとして、大腸菌内で生産した酵素を、破碎と精製を行い酵素として反応するのか、それとも、生命活動中の菌体内で反応するのかが大きな違いである。

3-7-1. 糖転移酵素 UGT78D2 酵素溶液を用いた配糖体合成検討

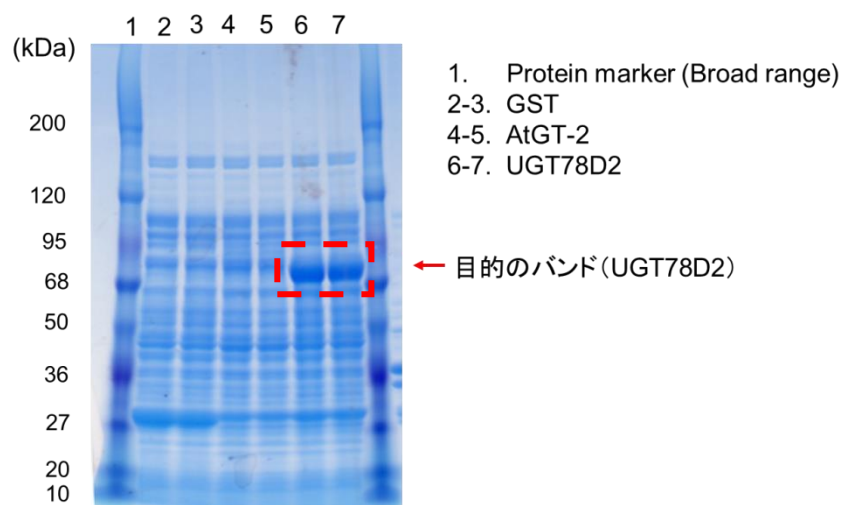


図 3-7-1. 組み換えタンパク質の発現・精製の確認

シロイヌナズナ由来の糖転移酵素 UGT78D2 の遺伝子をコードした大腸菌を発現させ、組み換え酵素を発現させた。図 3-7-1 の Lane 1 は Protein marker で、タンパク質の分子量を推定できるマーカーである。Lane 2-3 の GST は、GST タグと呼び、コントロールとして用いている。Lane 4-7 は、糖転移酵素であり lane 4,5 は AtGT2、lane 6,7 は UGT78D2 になっている。この時、lane6-7 の UGT78D2 の発現量が lane4,5 の AtGT2 よりも多かったため、本研究では UGT78D2 を用いて行った。精製した UGT78D2 酵素溶液と化合物を混合させた反応物を HPLC を用いて確認を行った。まず、文献既知の quercetin (**11**) で反応を行い、quercetin (**11**) の配糖体が生成していることを確認した。

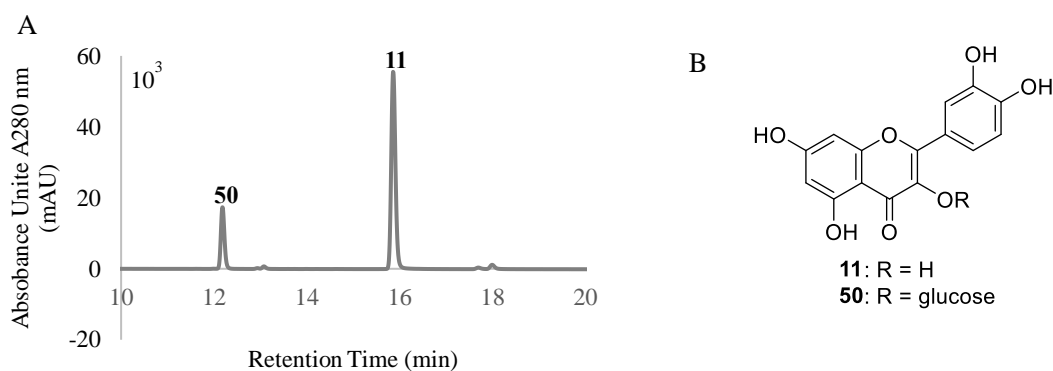


図 3-7-2. UGT78D2 酵素溶液を用いた配糖化反応

A: quercetin (**11**) の配糖化反応 LC クロマトグラム, B: quercetin 誘導体の構造

文献通り quercetin (**11**) で糖化反応が進行したことを確認したので、次に fisetin (**51**) や myricetin (**55**) でも同様に糖化反応を行った。Fisetin (**51**) での結果を図 3-7-3A に示した。3 位

に糖化反応が進行した化合物 fisetin-3-*O*-glucoside (**55**)が得られた。次に myricetin (**54**)での結果を図 3-7-3B に示した。myricetin (**55**)の 3 位に糖化反応が進行した myricetin-3-*O*-glucoside (**56**)が生成していることを確認した。

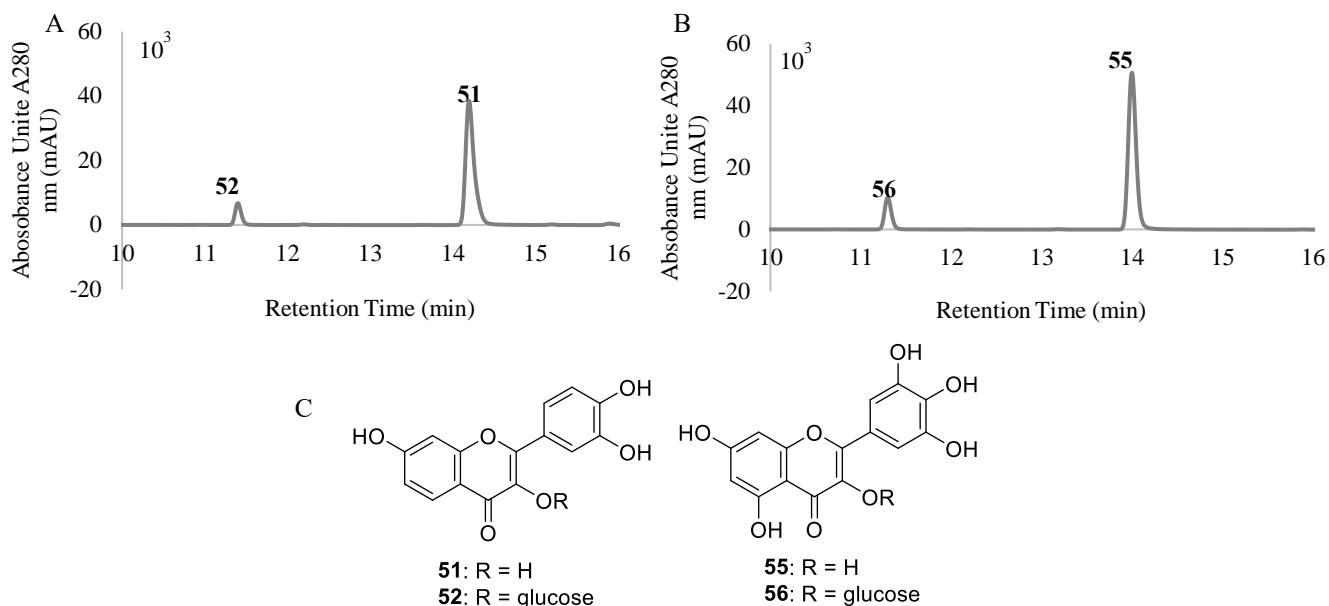


図 3-7-3. UGT78D2 酵素溶液を用いた配糖化反応

A: fisetin (**51**)の配糖化反応 LC クロマトグラム, B: fisetin (**51**)の配糖化反応 LC クロマトグラム,
C: 基質に用いた化合物、および、生成した化合物

フラボノイド化合物でも反応が進行したことから、フラバン-3-オール誘導体でも糖化反応が進行するのではないかと考えた。そこで、フラバン-3-オール誘導体の(+)-catechin (**2**)、(-)-epicatechin (**3**)などを基質として反応を確認したがフラバン-3-オール誘導体では糖化反応は進行しないことが確認された。これはフラボン骨格の 2 位と 3 位の 2 重結合、また、4 位の 2 重結合の有無が重要であることを示している。

3-7-2. 糖転移酵素 UGT78D2 を用いた菌体内配糖体合成検討

次に UGT78D2 遺伝子を組み換えた大腸菌を用いて菌体内で配糖化反応を行った研究について記載する。ここで改良型 M9 培地と記載しているが、M9 培地は通常、大腸菌を培養する培地である。しかし、本実験では、文献¹⁷⁰⁾に従い、M9 培地を作製し、反応に用いた。本反応は精製した酵素を用いた反応とは違い、UGT78D2 遺伝子を導入した大腸菌体内で反応を行う。これは大きな違いである。菌体内であるため glucose 以外にも galactose や rhamnose、

xylose などが一度の反応で修飾する可能性があり、得られる生成物のラインナップが増える。しかし、反応後のクロマトグラムが複雑になり、同定、単離、構造決定が困難になる可能性がある。まず、quercetin (**11**)を用いて文献通り配糖体が生成するか確認を行い文献通り糖化反応が進行した配糖体が得られたことを確認した¹⁷⁰⁾。

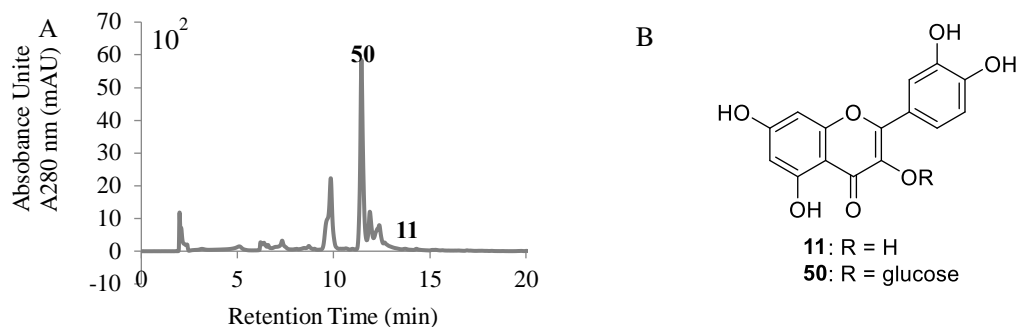
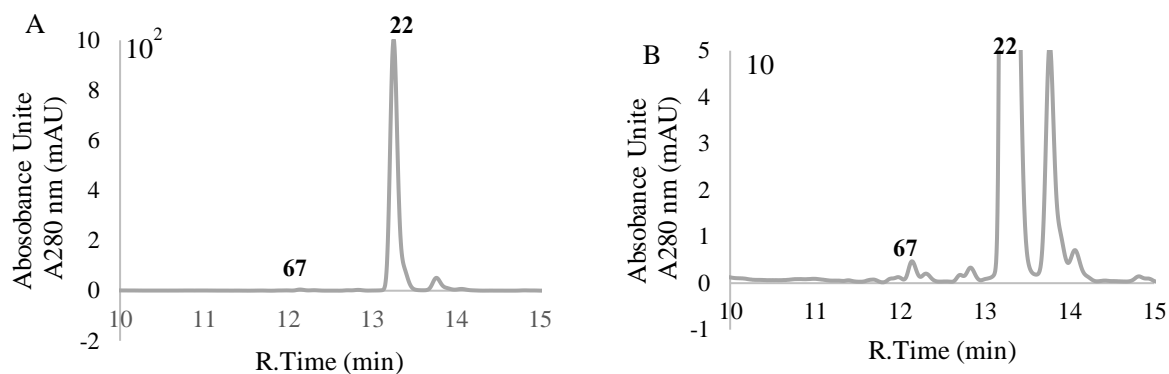


図 3-7-4. UGT78D2 導入大腸菌体を用いた配糖化反応

A: quercetin (**11**)の配糖化反応 LC クロマトグラム, B: quercetin 誘導体の構造

文献通り配糖化反応が進行することを確認できたため、フラバン-3-オール誘導体でも糖化反応が進行するのではないかと考えフラバン-3-オール誘導体である(-)-epicatechin (**3**)の3位、5位にガロイル基やプロトカテキ基が導入されている化合物で配糖化反応を行った。まず、(-)-epicatechin (**3**)の3位、5位にガロイル基が導入されている **21** を用いて反応を行った。反応を行った結果、微量に **21** の7位にグルコシル化反応が進行した化合物 **67** が得られることを確認した。



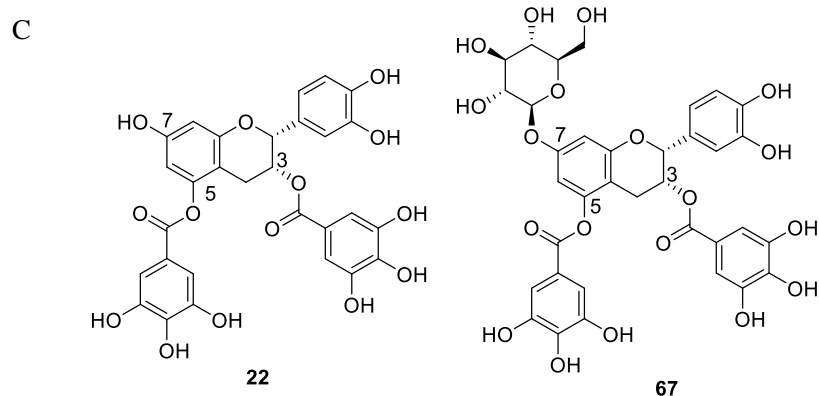


図 3-7-5. UGT78D2 導入大腸菌体を用いた配糖化反応

A: **22** の配糖化反応 LC クロマトグラム, B: 10 分から 15 分の拡大図, C 基質として用いた化合物、および、生成した化合物、

また、次に(-)-epicatechin (**3**)の 3 位、および、5 位 protocatechuic acid (**45**)が導入されている **75** に注目して検討を行った。**68** を用いて糖化反応を行ったところ **68** の 7 位にグルコシル化反応が進行している糖化体 **69** が生成していることを確認した。また protocatechuic acid (**45**)単体でも神経幹細胞を増殖させ、そのアポトーシスを阻害することが報告されている¹⁷¹⁾。また、LCMS 分析を行った結果 UGT78D2 を用いた菌体内反応で *N*-acetylglucosamine が付加したと考えられる分子量が検出された。Quercetin (**11**)で *N*-acetylglucosamine が付加するという報告があることから¹⁷²⁾ 菌体内反応で得られた生成物は *N*-acetylglucosamine が付加した化合物だと考えている。また、これらの菌体内糖化反応では(+)-catechin (**2**)誘導体では糖化反応は進行しないことを確認している。

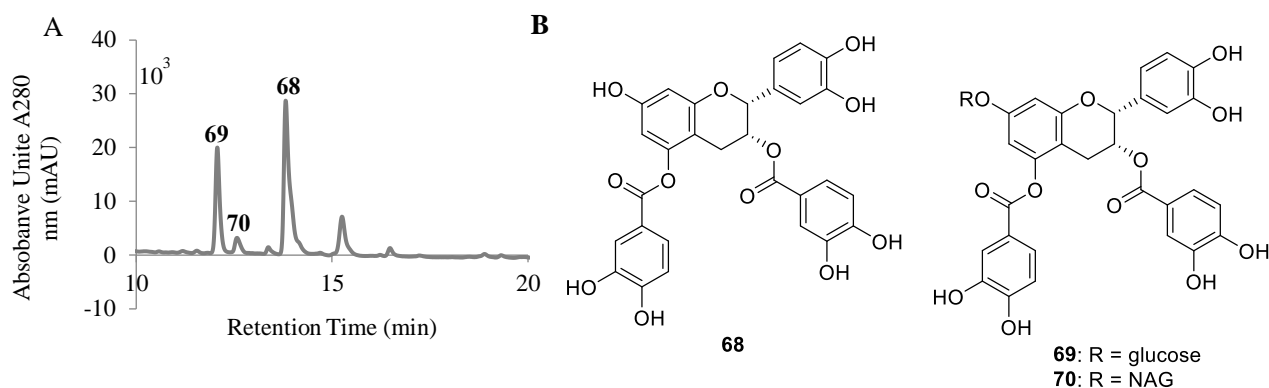


図 3-7-6. UGT78D2 導入大腸菌体を用いた配糖化反応

A: 15 の配糖化反応のクロマトグラム, B 基質として用いた化合物、および、生成した化合物

3-7-3. シロイヌナズナ由来 UGT78D2 を用いたフラボノイド配糖化反応 まとめ

シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応では 2 種類の方法を用いて配糖体の合成を行った。1 つ目として、大腸菌体で発現させた配糖化酵素を大腸菌から破碎し取り出し精製した酵素を用いる方法、2 つ目は大腸菌体を破碎せずに配糖化反応を行った。精製した酵素を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応では、配糖化反応は進行しないことが確認された。しかし、大腸菌体を破碎せず行った方法ではフラバン-3-オール誘導体の(-)-epicatechin 誘導体で糖化反応が進行することが確認された。酵素で反応が進行しなかった理由として、酵素ではフラボノイド化合物が阻害剤として機能し反応が進行しなかったのではないかと考えた。

3-8. 酵素発現酵母を用いた配糖化反応

3-8-1. 酵素発現酵母を用いたフラボノイドの配糖化反応

富山県立大学の生城真一教授に提供していただいた遺伝子組み換え酵母菌体を用いてフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応を行った。酵素発現酵母菌体を用いることで反応時に補基質として高価な UDP-glucose が不要となり静止菌体の状態において安価なグルコースで反応を行うことができる^{109-112,173,174}。この酵母菌体を用いて配糖化反応を行った。まず、酵母菌体にタルウマゴヤシ (*Medicago polymorpha*) 由来配糖化酵素 UGT71G1 を導入した酵素発現酵母用いて、**5**, **21**, **22** の 3 種類で反応を行った。反応を行った結果を図 3-8-2 (A,C,E) に示した。脂溶性側に配糖化反応が進行したと考えられるピークが検出された、しかしながら、フラバン-3-オール誘導体のガロイル基部分が緩衝液中で分解している可能性が示唆されている¹⁷⁵。そこで、タルウマゴヤシ (*Medicago polymorpha*) 由来配糖化酵素 UGT71G1 の酵素溶液で、UDP-glucuronic acid を用いた抱合反応を行った。UGT71G1 は glucose を付加させる酵素であり UGT71G1 ではグルクロン酸は付加しない。この反応条件で生成物が検出された場合、glucose や glucuronic acid の付加ではなくフラバン-3-オールのガロイル基が加水分解している。図 3-8-2 (B,D,F) に UGT71G1 を用いた酵素反応を示した。UGT71G1 を用いた酵素反応では、glucuronic acid の付加やガロイル基の加水分解は確認されなかった。これらの結果より、酵素発現酵母を用いた配糖化反応は glucose が付加した生成物であると示唆された。

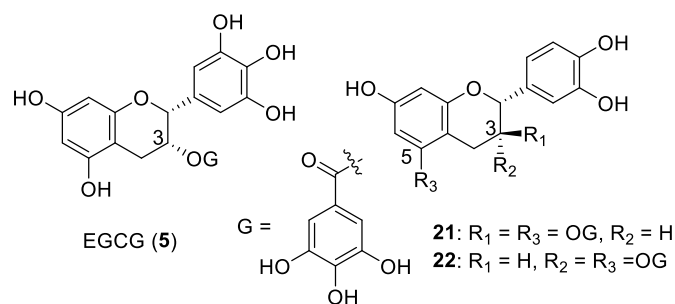


図 3-8-1. 反応に用いた flavan-3-ol 誘導体の構造

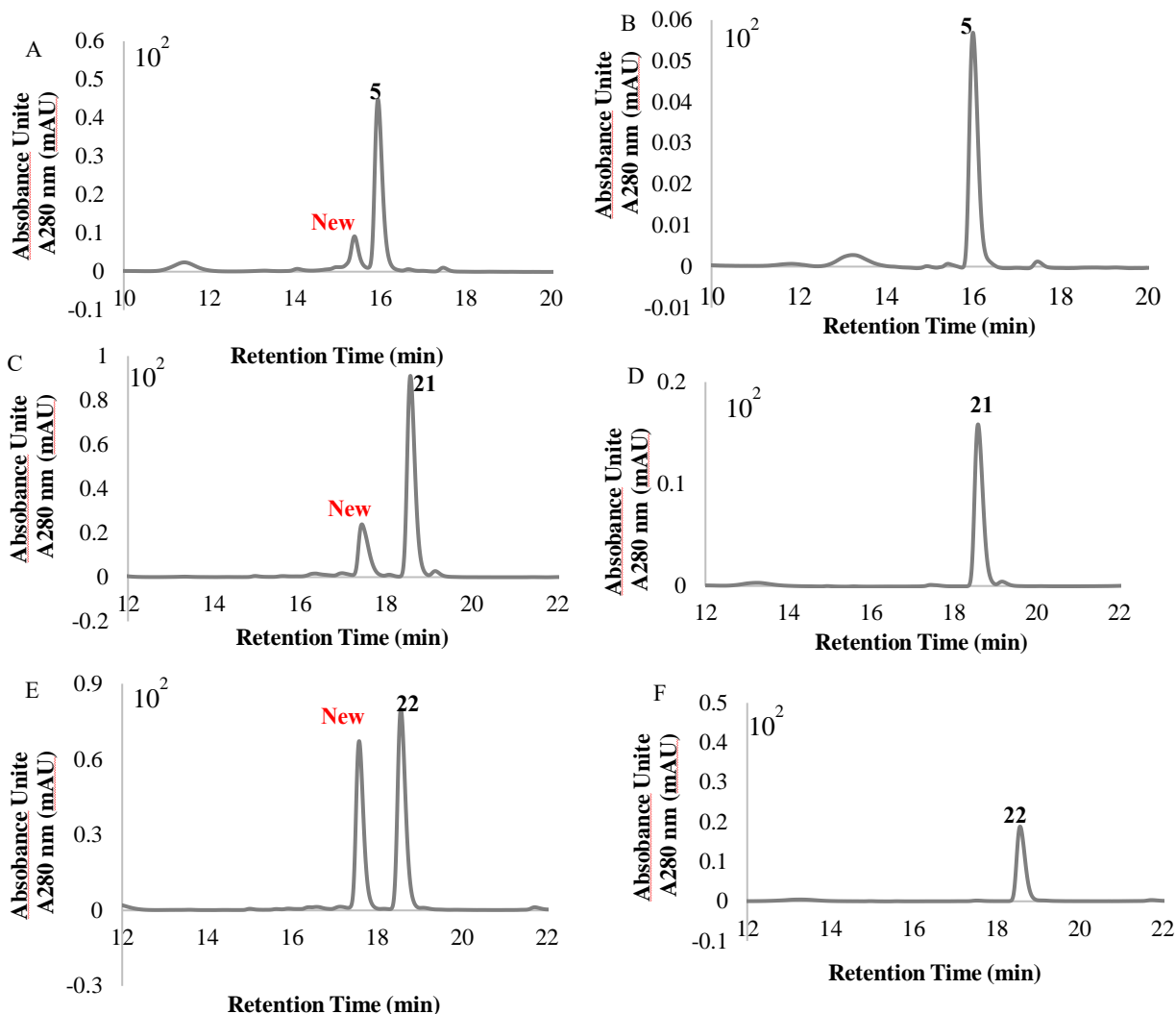


図 3-8-2. UGT71G1 を用いた糖化反応

- A: 酵素発現酵母を用いた **5** の糖化反応, B: 酵素溶液を用いた **5** の抱合反応,
 C: 酵素発現酵母を用いた **21** の糖化反応, D: 酵素溶液を用いた **21** の抱合反応,
 E: 酵素発現酵母を用いた **22** の糖化反応, B: 酵素溶液を用いた **22** の抱合反応

3-8-2. 酵素発現酵母を用いたフラボノイドの配糖化反応まとめ

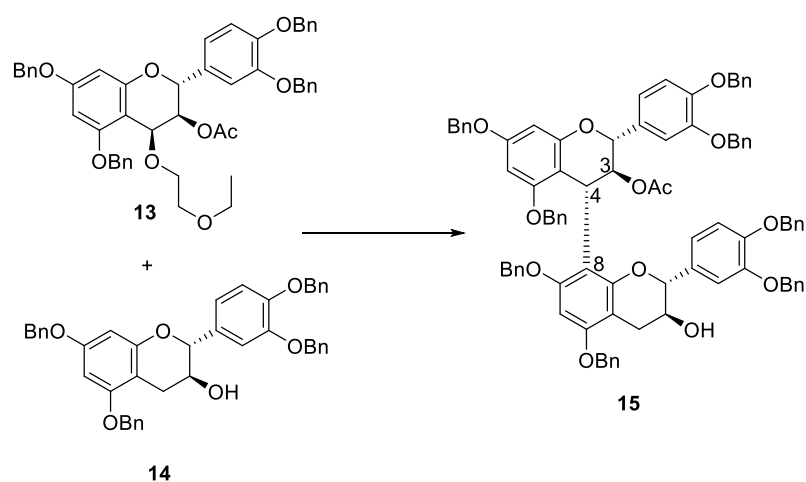
シロイヌナズナ由来の酵素を用いた配糖化反応ではフラバン-3-オール誘導体は反応が進行しなかったことから、タルウマゴヤシ由来糖転移酵素 UGT71G1 導入酵母菌体を用いてフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応を行った。UGT71G1 導入酵母菌体を用いた時、配糖体と考えられる生成物が確認された。反応が進行した理由としては、酵素ではフラボノイド化合物が阻害剤として機能しているが、菌体内での反応の場合、様々分子が存在しており酵素の阻害が抑えられたと考えている。同じ反応をする酵素であっても、使用する酵素の由来植物により酵素の配列がことなり、反応性や基質特異性に大きな影響がある。一般的に化合物

と酵素の組み合わせはトライ&エラーで実際に使用してみるしかないが、タルウマゴヤシ由来糖転移酵素 UGT71G1 で反応が進行したことから化合物の構造と酵素の組み合わせが適していることが確認された。フラバン-3-オール誘導体の糖化反応は本論文でも述べてきたように比較的難しい。本酵素による検討によりフラバン-3-オール誘導体の糖化ができることが明らかになった。

4 章. 化学的手法を用いた生産検討

4-1. Procyanidin オリゴマーの合成

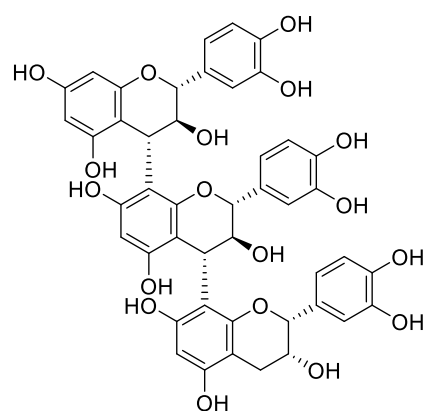
ポリフェノールの中でも機能性が高い PA オリゴマーは多くの植物や食品、また本研究で使用しているラズベリーにも多く含まれている¹³³⁾。PA オリゴマーは様々な方法で合成されているが、今回、齊藤らの分子間縮合反応を用いて PA オリゴマーの合成を行った¹⁷⁶⁾。合成法は、(+)-catechin (2)や(-)-epicatechin (3)から保護基などを導入して誘導したフラバン-3-オール誘導体の 4 位に発生させたカチオンに、もう一分子のフラバン-3-オール誘導体を縮合させてオリゴマー構造を構築していく手法を用いている。



スキーム 4-1-1. 分子間縮合反応による 2 量体合成法

4-1-1. ラズベリーに含まれる PA オリゴマーの合成検討

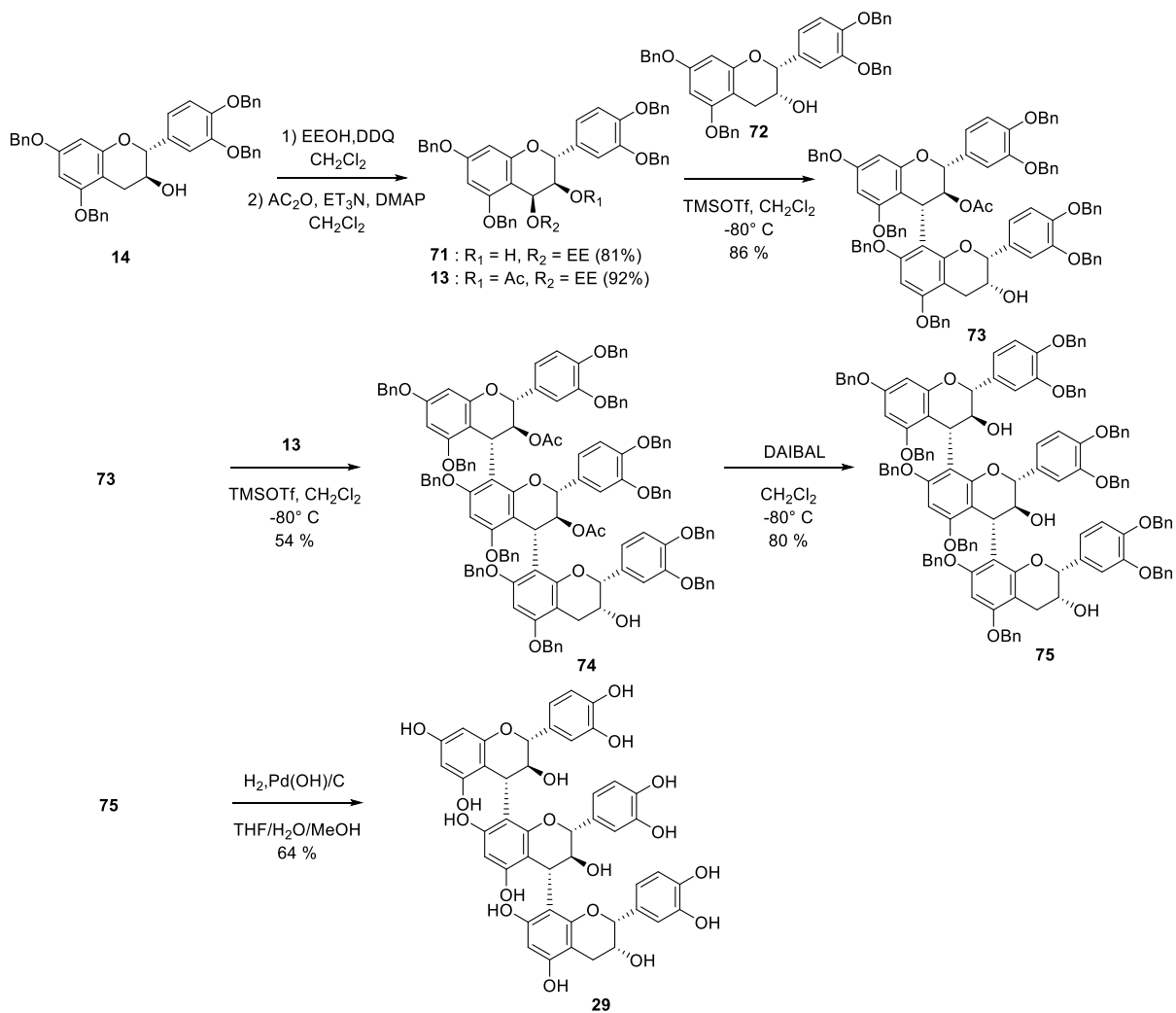
ラズベリーに含まれている procyanidin 3 量体の合成を行った。ラズベリーには procyanidin 3 量体が含まれているという報告がされていたが 2019 年まで 3 量体の構造は報告されていなかった。しかし、2019 年に Wu らの研究によってラズベリーに含まれている procyanidin オリゴマーは procyanidin C3 (**29**)であることが確認された¹⁷⁷⁾。ラズベリー中に含有している procyanidin C3 (**29**)が同定されたが、Wu らの研究は植物中からの同定であったため procyanidin C3 (**29**)の化学的な合成方法は報告されていない。そこで今回、分子間縮合反応を用いて 3 量体の合成を行った。スキーム 4-1-2 に示した。まず、フェノール性水酸基を Bn 基で保護した **14** を原料として用い、dry CH₂Cl₂ 中 EEOH を加えその後 DDQ を少しずつ反応液に



Procyanidin C3 (**29**)
図 4-1-1. procyanidin C3 の構造

添加し、酸化的に 4 位に EE 基を導入した化合物 **71** を収率 81% で得た。その後化合物 **71** の 3 位のフェノール性水酸基を Ac 化し収率 92% で化合物 **13** を得た。次に求電子体の **13** と求核体の **72** をルイス酸である TMSOTf で縮合することで、2 量体の化合物 **73** を収率 86% で得た。また、**73** に対し、再度 **13** を縮合することで、**74** が収率 54% で得た。得られた **74** の Ac 基を DAIBAL 試薬による還元反応で Ac 基の脱保護を行った **75** を 80% で得た。その後、加水素分解反応で Bn 基の脱保護を行った化合物 **29** を 64% で得た。この 3 量体の合成に関しては学術論文として報告されておらず本研究で初めての合成となっている。

得られた化合物 **22** を用いて合成したラズベリーに含まれる procyanidin C3 (**29**)がどの程度活性があるのか確認を行うため、抗酸化活性の指標となる DPPH ラジカル消去活性試験を行った。DPPH ラジカル消去活性試験に比較として用いたフラバン-3-オール誘導体は市販されている単量体の(+)-catechin (**2**)、(-)-epicatechin (**3**)、フラバン-3-オール オリゴマーで 2 量体の procyanidin B2 (**6**)、3 量体の procyanidin C1 (**76**)を用いた。図 4-1-2 に示した。終濃度が 5 μ M で測定を行い、オリゴマーになると活性が高くなると考えていたが、procyanidin C3 (**29**)は他のフラバン-3-オール誘導体と活性の差は確認されなかった。ラズベリーには procyanidin C3(**29**)が含まれていることが確認されており、3-1 章では成熟過程でのラズベリー果実の DPPH ラジカル消去活性試験を行い、未成熟果実で活性が高いことが確認されたが、この活性の影響は procyanidin C3(**29**)以外の化合物の影響であることが確認された。



スキーム 4-1-2. ラズベリーに含まれる procyanidin C3 の合成

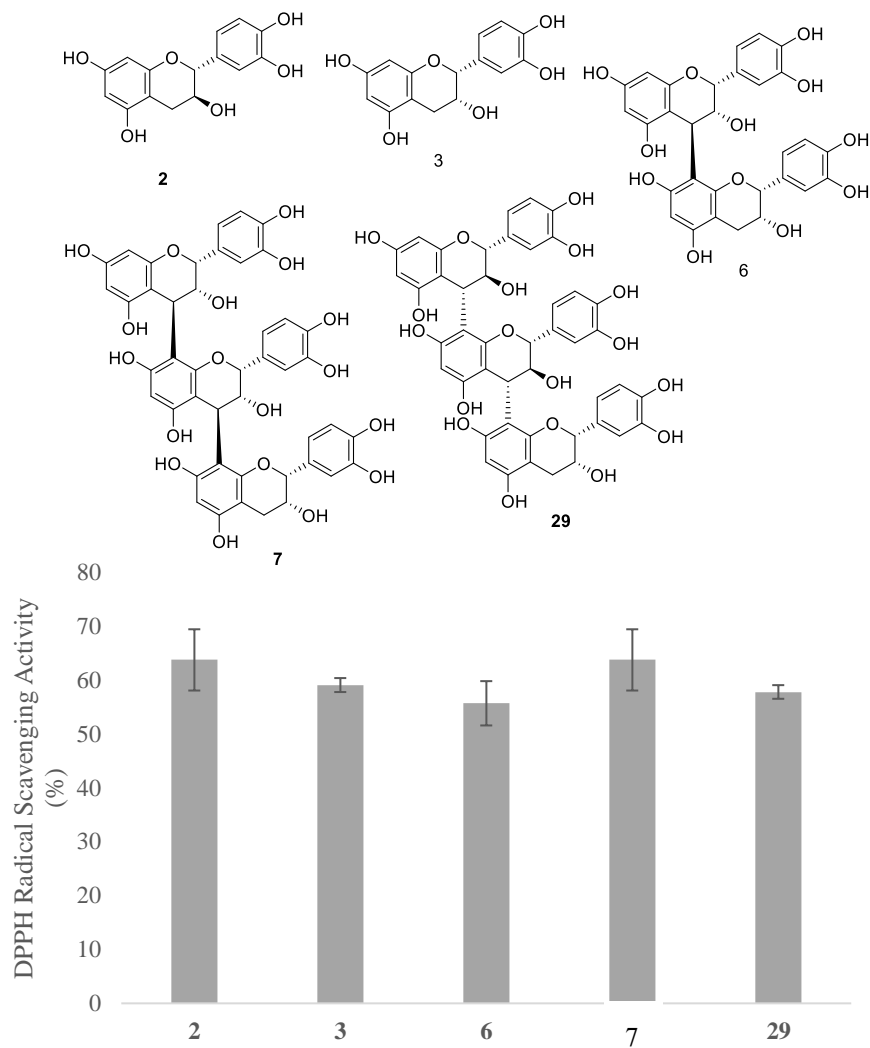


図 4-1-2. フラバン-3-オール誘導体の DPPH ラジカル消去活性試験

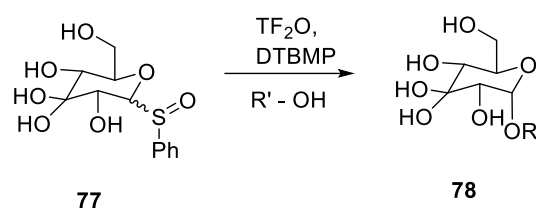
A: 活性試験に用いたフラバン-3-オール誘導体.

B: フラバン-3-オール誘導体の DPPH ラジカル消去活性試験

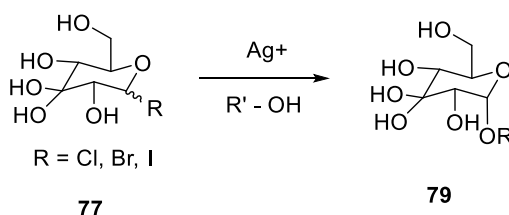
4-2. フラバン-3-オール誘導体の配糖体合成

ポリフェノール配糖体は高い機能性が報告^{88,95)}されており、様々な植物に含まれている。しかしながら配糖体は微量成分として植物中に含まれており、配糖体の機能性評価は植物抽出物などの混合物で行われているものが多い、また配糖体合成は植物中に含まれる酵素や生体内に含まれる CYP や抱合酵素などを用いて作るのがほとんどである^{96,178-183)}。これらの方法は、使用する酵素などによっては簡単に配糖体を合成できるが、大量に合成することは難しい。また、フラバン-3-オール配糖体の化学的合成はあまり報告されていない¹⁸⁴⁾。そこで、本論文では、化学的にフラバン-3-

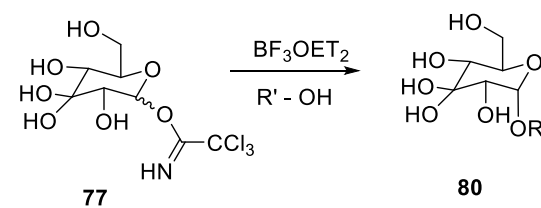
オール配糖体を合成することで機能性評価や植物中に微量成分として存在しているかの同定が可能ではないかと考え研究を行った。配糖体合成は様々な方法が報告されている。Kahne¹⁸⁵⁾らや koenigs-knorr¹⁸⁶⁾らのグルコシル化反応、schmidt^{187,188)}らのトリクロロアセトイミデートをルイス酸で活性化し、オキソニウムカチオンを発生させてグリコシル化を行う方法、mukaiyama-suzuki¹⁸⁹⁻¹⁹²⁾らの方法は、グルコースの 1 位をフッ素化したグルコシルドナーを用いてグルコシル化を行う方法である。今回、mukaiyama-suzuki らの方法を用いて配糖化反応を行った。配糖化反応を行うと機能性が増加することが確認されており^{88,95)}、フラバン-3-オール誘導体の(+)-catechin (**2**)や(-)-epicatechin (**3**)の 3 位、5 位にガロイル基が導入されている **21** や **22** は子宮頸ガン細胞 HeLa S3 に対する増殖抑制抑制活性で(-)epicatechin 誘導体 **22** で活性が高いことが確認されており⁵⁶⁾、これら化合物の配糖化を行うことでさらに機能性が高い化合物が合成できるのではないかと考え配糖体の合成を行った。フェノール性水酸基を TBS 基で保護した(+)-catechin (**81**), (-)-epicatechin (**82**)の 5 位を Higashino⁸¹⁾らの方法を用いて脱保護を行った **83** を 68 %、**84** を 53 %で得た。次に 3 位 5 位のフェノー



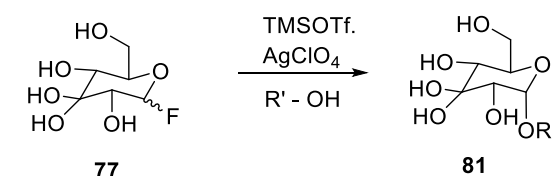
スキーム 4-2-1. Kahne グルコシル化反応



スキーム 4-2-2. Koenigs - knorr グルコシル化反応

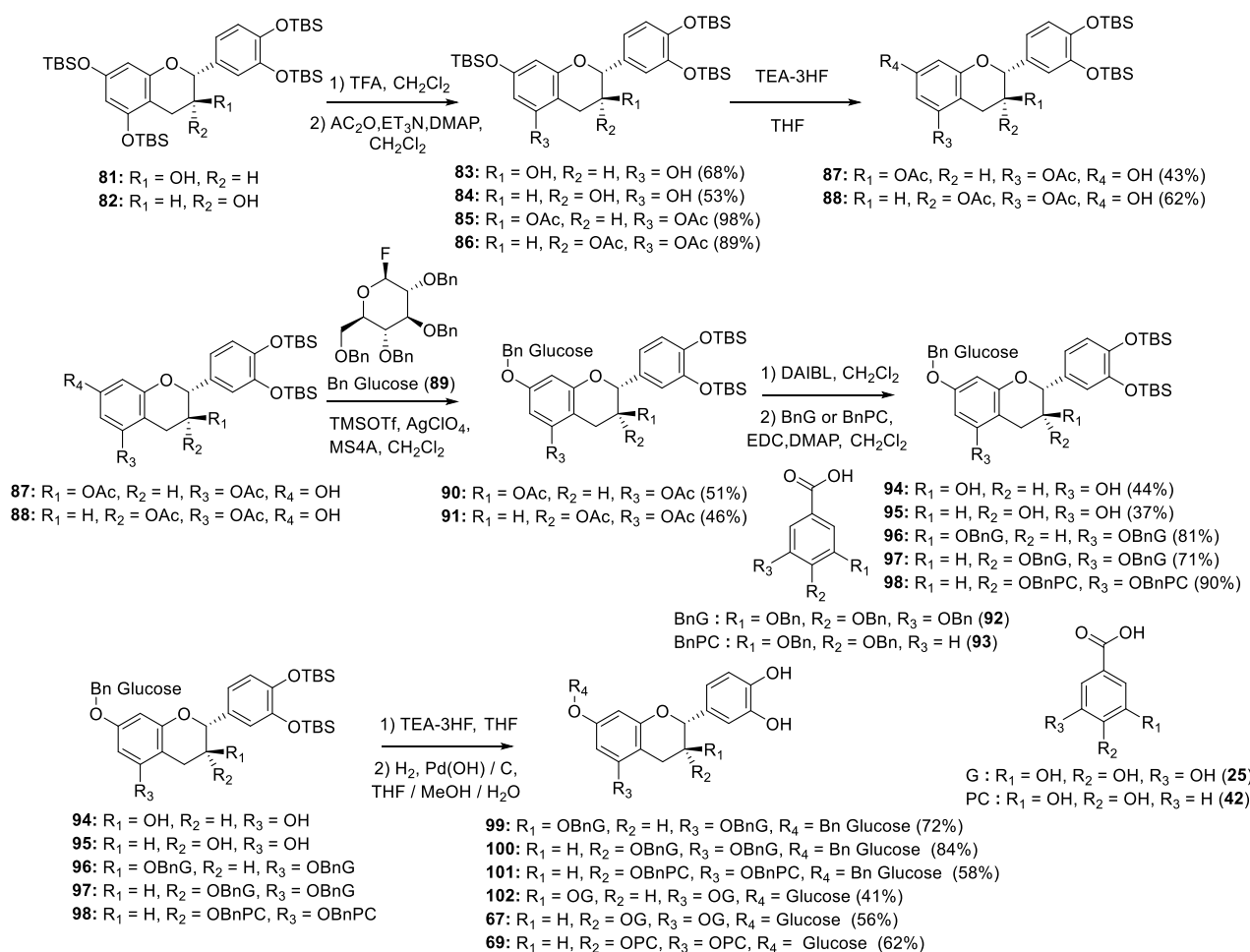


スキーム 4-2-3. schmidt グルコシル化反応



スキーム 4-2-4. Mukaiyama - suzuki グルコシル化反応

ル性水酸基を Ac 化し **85** を 98%、**86** を収率 89% で得た。次いで THF 溶媒中、HF によって 7 位の TBS 基を脱保護した **87** を 43%、**88** を 62% で得た。その後、7 位のフェノール性水酸基に Mukaiyama-Suzuki グルコシル化反応を用いて Bn 化されたグルコースの導入を行った **90** を 51%、**91** を 46% で得た。次いで 3 位、および、5 位の Ac 基を DAIBAL 試薬による還元反応により Ac 基の脱保護を行った **94** を 44%、**95** を 37% で得た。次に 3 位、および、5 位のフェノール性水酸基にガロイル基を導入した。まず、CH₂Cl₂ 溶媒中、EDC を縮合剤、DMAP を触媒として用い、BnG (**92**) を 3 位と 5 位に導入した **96** を 81%、**97** を 71% で得た。次に、フェノール性水酸基がガロイル基より 1 つ少ないプロトカテク基の BnPC (**93**) を導入した。、CH₂Cl₂ 溶媒中、EDC を縮合剤、DMAP を触媒として用い、BnPC (**93**) を 3 位と 5 位に導入した **98** を 90% で得た。その後、TBS 基の脱保護を HF を用いて行った。**99** を 72%、**100** を 84%、**101** を 58% で得た。最後に Bn 基の脱保護を Pd 触媒を用いた水素添加反応により脱保護を行った **102** を 41%、**67** を 56%、**69** を 62% で得た。配糖化されると機能性が増加するという報告があることから、得られたフラバン-3-オール配糖体を用いて 4-3 章で抗酸化活性試験を行った。



スキーム 4-2-5. フラバン-3-オール配糖体合成

4-3. フラバン-3-オール配糖体の抗酸化活性評価

合成して得られたフラバン-3-オール配糖体、および、アグリコンで DPPH ラジカル消去活性試験、ABTS ラジカル消去活性試験、TBA 法を用いて抗酸化活性の測定を行った。表 4-1-1 に示した。

まず、抗酸化活性の指標となる DPPH ラジカル消去活性試験、ABTS ラジカル消去活性試験を行った。活性が 50%程度になる濃度での活性評価を行っている。3 位、5 位にガロイル基が導入されている配糖体の **102**、**67** をアグリコンの **21**、**22** の活性と比較するとアグリコンの方で活性が高くなることが確認された。また **68** と **69** を比較するとあまり大きな差はないが配糖体の **69** で活性が高くなっていることが確認された。次に抗酸化活性の TBA 法を用いた活性評価ではアグリコンと比べると **102** と **69** で活性が高くなることが確認された。しかし **67** に関してはアグリコンの方で活性が高いことが確認された。また、配糖化されると水溶性が高くなることから脂溶性の尺度として用いられるオクタノール/水分配係数 ($\log P_{ow}$) の測定を行った。アグリコンよりも配糖体の方で水溶性が高いことが確認された

表 4-3-1. アグリコンと糖化体の活性評価

	21	102	22	67	68	69
DPPH (SC_{50})	0.98	1.01	0.98	1.31	1.06	1.19
ABTS (SC_{50})	3.23	4.35	4.53	8.13	6.27	3.20
TBA (IC_{50})	1.19	0.77	0.71	2.19	1.32	1.30
$\log P_{ow}$	1.99	0.02	1.31	-0.37	0.77	0.45

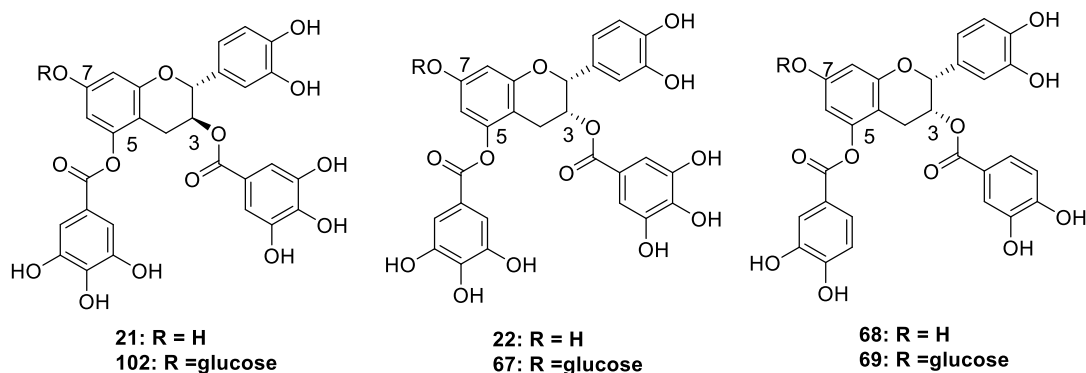


図 4-3-1. フラバン-3-オール誘導体の構造

一般的に配糖体の方がアグリコンよりも活性が高くなるということが報告されているが、フラバン-3-オール誘導体に関して 3 位、5 位に修飾をうけた化合物は 7 位の水酸基が活性に重要であることが示唆された。

4-4. 化学的手法を用いた生産検討 まとめ

4-4-1. ラズベリーに含まれる PA オリゴマーの合成検討

ラズベリーに含まれている PA オリゴマー化合物 **82** の合成を行った。2019 年に Wu らの研究によってラズベリーに含まれている procyanidin オリゴマーは procyanidin C3 (**22**)であることが確認されているが、化学的に合成された報告はされていない。そこで、分子間反応を用いて procyanidin C3 の合成を行った。合成した procyanidin C3 (**29**)を標準サンプルとしてラズベリー抽出物に含まれている 3 量体と比較を行い、ラズベリーに含まれている procyanidin 3 量体は procyanidin C3 (**29**)であることが確認された。化合物の同定を化学合成にて行ったのは本報告が初めての例となる。また、抗酸化活性の指標となる DPPH ラジカル消去活性試験を行い、フラバン-3-オール誘導体の単量体やオリゴマーと活性の差は確認されなかった。これにより、ラズベリー未熟果実での活性の高さは procyanidin C3 (**29**)以外の化合物が活性が影響していることが確認された。

4-4-2. フラバン-3-オール誘導体の配糖体合成、および、抗酸化評価

フラバン-3-オール配糖体の合成を行った。合成した配糖体化合物とアグリコンで DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性試験を行い、配糖体の **106**、**74** よりもアグリコンの **21**、**22** の方で活性が高いことが確認された。また、配糖体 **75** に関しては大きな差はないが配糖体の方で活性が高いことが確認された。次に TBA 法では、**106**、**75** でアグリコンよりも活性が高かった。しかし、**75** ではアグリコンの方の活性が高いことが確認された。また、配糖化されると水溶性が高くなることから脂溶性の尺度として用いられるオクタノール/水分配係数 ($\log P$)の測定を行った。アグリコンよりも配糖体の方で水溶性が高いことが確認された。これより、フラバン-3-オール誘導体に関して 3 位、5 位に修飾をうけた化合物は 7 位の水酸基が活性に重要であることが示唆された。

第5章 総括

生物学的手法と化学的手法を用いた2つの方法からフラバン-3-オール誘導体の生産検討を行った。まず、生物学的手法で植物体のラズベリーや植物培養細胞を用いた栽培条件による成分分析や生体触媒を用いたフラバン-3-オール誘導体の生産を行った。

3-1章では、ラズベリー果実を8段階の成熟段階に分類し、総ポリフェノール量や総PA量、フラバン-3-オール誘導体量、および、ラジカル消去活性を評価した。その結果、成熟するに従いフラバン-3-オール誘導体量が徐々に減少し、それに伴いラジカル消去活性も低下することが確認された。また、これらの化合物の減少はポリフェノール生合成酵素の発現量と関係していると考え、半定量的ポリメラーゼ連鎖反応を用いて定量したところ、成熟期にアントシアニン生合成酵素の発現量が増加するという変化のみが確認された。したがって、ラズベリー果実の高機能フラバン-3-オール誘導体の含有量を増やすためには、アントシアニンの合成を阻害する必要があることが示唆された。

3-2章では植物工場ユニットを用いてラズベリー果実の栽培を行い成分の分析を行った。露地栽培では外気の気候などに影響されてしまうため、外気の気候に影響がされない環境で栽培をする必要があった。植物工場ユニットを用いて3種類の条件(A:青色光・B:赤色光・C:青色光/赤色光)でラズベリーの栽培を行い、総ポリフェノール量や総PA量、フラバン-3-オール誘導体量、および、ラジカル消去活性を評価した。その結果、成熟するに従いフラバン-3-オール誘導体量が徐々に減少したが、成熟したS8で再び増加すること確認された。また、ラジカル消去活性もS8で活性が増加することが確認された。また、これらの化合物の変化はポリフェノール生合成酵素の発現量と関係していると考え、半定量的ポリメラーゼ連鎖反応を用いて定量したところ、S8でアントシアニン合成酵素のANSの発現量が減少していることを確認した。前章ではラズベリー果実が成熟するとANSの発現が増加し、フラバン-3-オール誘導体が減少している可能性が示唆されていた。これにより、Cの条件(青色光/赤色光)でラズベリーを栽培することによりANSを増加させることなく、前章の問題を解決したと考えている。

3-3章ではこれまでラズベリー果実の分析を報告してきたが、植物工場内でラズベリーを栽培し、光の強さ、温度、異なる波長のLEDを葉に照射し、ポリフェノールの成分分析を行った。青色LEDで栽培した条件で総ポリフェノールが増加することを確認した。また、HPLC分析よりフラバン-3-オール2量体のprocyanidin B4(40)が増加したことを確認した。また、半定量PCRでは青色LEDでCHS遺伝子発現が増加することも確認した。これより、青色光を照射し栽培を行うことにより、フラバン-3-オール誘導体が増加する可能性が示唆

された。

3-4 章では、ラズベリー培養細胞の樹立を行い、波長の異なる LED を照射した時の総ポリフェノール量、総 PA 量やポリフェノール化合物の定量分析を行った。総ポリフェノール量や総 PA 量では青色光を照射した細胞で増加することを確認した。総ポリフェノール量や総 PA 量の変化がポリフェノール生合成酵素に影響していると考え半定量 PCR を用いて生合成酵素の発現を確認し、青色光や緑色光では、機能性ポリフェノールであるフラバン-3-オール誘導体生合成に関係する PAL や CHS などの生合成酵素が増加したことを確認した。また葉緑体を生産する植物体では見られない現象であるが、培養細胞を用いたときは緑色光でもフラバン-3-オール誘導体の生産が増加した。これは緑色の葉緑体がある場合は緑色を反射するために利用できないが、細胞中には緑色を利用できるシステムも存在することを示している。また、培養細胞を用いた場合、植物体では見られなかったガロイル化されたフラバン-3-オール誘導体が生合成されていることを確認した。

。

3-5 章では、ポリフェノール化合物を多く含む植物の培養細胞を生体触媒として、フラボノイド誘導体の製造を目的とした研究を行った。ポリフェノール化合物を多く生産するブドウの培養細胞とラズベリーの培養細胞を用いて、フラボノイドを基質とした変換反応を試みた。その結果、ブドウ培養細胞の VR 細胞ではフラボノール誘導体の糖化反応とフラバン-3-オール誘導体のオリゴマー化反応が、VW 細胞ではフラバン-3-オール誘導体の EGCG のオリゴマー化反応が確認された。一方、ラズベリーの葉から樹立した培養細胞を用いた場合は、フラボノール誘導体の糖化反応が進行した。ブドウ培養細胞とラズベリー培養細胞では同じ化合物が得られたが、それぞれに特徴的な生成物が確認された。これらの結果は、さまざまなポリフェノールを生産する植物細胞を用いることで、多くの誘導体を生産できることを示唆している。

3-6 章では、フラバン-3-オール誘導体を基質として数種類の動物由来肝臓ミクロソーム(犬、ヒト、マウス、モルモット、ウサギ、子ブタ由来)でグルクロン酸抱合反応を行った。基質としてフラバン-3-オール誘導体の **21,22** で用いて抱合反応を行い、用いるミクロソームにより抱合反応が異なることが確認された。これは、ミクロソームに含有する抱合酵素や CYP の違いにより反応方法が異なることが示唆された。また、今回用いたフラバン-3-オール誘導体の **21,22** は大阪電気通信大学 齊藤研究室でしか合成していない化合物であり **21,22** のグルクロン酸抱合体が単離できたならば新規化合物として様々な知見が得られると考えている。

3-7 章では、シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応では 2 種類の方法を用いて配糖体の合成を行った。1 つ目として、大腸菌体で発現させた配糖化酵素を大腸菌から破碎し取り出し精製した酵素を用いる方法。2 つ目は大腸菌体を破碎せずに配糖化反応を行った。精製した酵素を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応では、配糖化反応は進行しないことが確認された。しかし、大腸菌体を破碎せずに行った方法ではフラバン-3-オール誘導体の(-)-epicatechin 誘導体で糖化反応が進行することが確認された。酵素で反応が進行しなかった理由として、酵素ではフラボノイド化合物が阻害剤として機能し反応が進行しないことが示唆された。

シロイヌナズナ由来の酵素を用いた配糖化反応ではフラバン-3-オール誘導体は反応が進行しなかったことから、3-8 章では、タルウマゴヤシ由来糖転移酵素 UGT71G1 導入酵母菌体を用いてフラバン-3-オール誘導体の配糖化反応を行った。UGT71G1 導入酵母菌体を用いた時、配糖体と考えられる生成物が確認された。反応が進行した理由としては、酵素ではフラボノイド化合物が阻害剤として機能しているが、菌体内での反応の場合、様々分子が存在しており酵素の阻害が抑えられ目的の反応が進行した。

植物体や植物培養細部を用いてのフラバン-3-オール誘導体の生産検討を行ってきた。次に、化学的手法を用いてフラバン-3-オール誘導体の合成検討を行った。

4-1 章ではラズベリーに含まれている PA オリゴマー化合物 **82** の合成を行った。2019 年に L. Wu らの研究によってラズベリーに含まれている procyanidin オリゴマーは procyanidin C3 (**29**)であることが確認されているが、化学的に合成された報告はされていない。そこで、分子間反応を用いて procyanidin C3 (**29**)の合成を行った。合成した procyanidin (**29**)C3 を標準サンプルとしてラズベリー抽出物に含まれている 3 量体と比較を行い、ラズベリーに含まれている procyanidin 3 量体は procyanidin C3 (**29**)であることが確認された。また、抗酸化活性の指標となる DPPH ラジカル消去活性試験を行い、フラバン-3-オール誘導体の単量体やオリゴマーと活性の差は確認されなかった。これにより、ラズベリー未熟果実での活性の高さは procyanidin C3 (**29**)以外の化合物の活性が影響していることが確認された。

4-2 章では、フラバン-3-オール配糖体の合成を行った。合成した配糖化化合物とアグリコンで DPPH ラジカル消去活性、ABTS ラジカル消去活性試験を行い、配糖体の **106**、**74** よりもアグリコンの **21**、**22** の方で活性が高いことが確認された。また、配糖体 **75** に関しては大きな差はないが配糖体の方で活性が高いことが確認された。次に TBA 法では、**106**、**75** で

アグリコンよりも活性が高かった。しかし、**75** ではアグリコンの方が活性が高いことが確認された。また、配糖化されると水溶性が高くなることから脂溶性の尺度として用いられるオクタノール/水分配係数 ($\log P$)の測定を行った。アグリコンよりも配糖体の方で水溶性が高いことが確認された。これより、7位にグルコースを導入することにより化合物が無毒化され活性が低下したと考えている。また、フラバン-3-オール誘導体に関して3位、5位に修飾をうけた化合物は7位の水酸基が活性に重要であることが示唆された。

これらの、生物学的手法と化学的手法をまとめた。

<生物学手法>フラボノイドを多く含む植物であるラズベリーをモデル植物として選び、露地と植物工場ユニット内での栽培を行い、果実と葉に含まれる機能性フラボノイドや機能性、生合成酵素の定量研究を行った。その結果、果実では成熟するとともに機能性フラボノイドが減少傾向にあること、また、その原因が赤い色素であるアントシアニン生合成酵素 (ANS) の発現増加であることを確認した。そこでLED光を用いて照射する光の波長を制御する検討を行ったところ、紫色光照射下で栽培することでANSの発現を減少させることに成功し、機能性フラボノイドを果実中で増加させることに成功した。葉においては、青色光照射下で栽培することで生合成経路の上流の酵素を活性化できることが確認され、機能性フラボノイドであるフラバン-3-オール誘導体を増加させることができた。さらに、ラズベリー葉から脱分化した植物培養細胞 (カルス) を樹立し、細胞にLED光を照射して培養する検討を行った。その結果、ラズベリー培養細胞では、青色光や緑色光の照射によりフラバン-3-オール誘導体生合成経路の上流の酵素が活性化され生産量を増加させることに成功した。通常、葉緑体を持つ緑色の植物は緑色の光を光合成に利用しない。また、培養細胞には葉緑体がなく無色透明であるが、青色・緑色光で活性化される何らかの部位があることが示された。

また、研究室内で保有している「有機合成フラボノイドライブラリー」中の化合物を生体触媒で変換して新たな化合物を生産する検討を行った。生体触媒として、植物培養細胞 (ブドウ、ラズベリー)、シロイヌナズナ由来糖化酵素、糖化酵素導入酵母菌体、動物肝臓ミクロソームを用いて検討を行い、各生体触媒で特徴的な化合物を確保することに成功した。

<化学的手法>機能性微量フラボノイドを確保する手法として有機合成も有効である。生物的手法ではトライ&エラーで生成物が得られる条件を探す必要があるが、有機合成は目的の化合物をデザインして得ることができる。有機合成にてラズベリーに含まれるフラバン-3-オール3量体の合成、および、フラボノール、フラバン-3-オール誘導体の配糖化に成功した。

第 6 章 実験項

6-1. General

本実験に用いた試薬等は全て特級グレードのものを精製せずに使用した。分析に用いたマイクロプレートリーダーは、Thermo Scientific 社の Multiskan FC を使用した。96 well プレートは THERMO 社、384 well プレートは greiner bio-one 社のものを使用した。HPLC 分析は SIMADZU LC-20AD を使用し、LC-MS 分析は SIMADZU LC-MS-2020 を、用いて行い、試薬は LC-MS 用のものを使用した。サーマルサイクラーは BIO-RAD 社の T100 Themeal Cycler 使用した。また、全ての合成反応はアルゴン雰囲気下で行い、反応確認はメルク社の 0.25 mm のシリカゲルプレート 60F₂₅₄ Art 5715 の薄層クロマトグラフィーを使用した。シリカゲルクロマトグラフィーは、関東化学 SilicaGel 60N (spherical, neutral) 63-210 μm を用い、分取用薄層クロマトグラフィーは、メルク社の 0.5 mm のシリカゲルプレート 60F₂₅₄Art5477 を用いた。合成に用いた試薬、溶媒は、全て特級のグレードを使用した。LC 分取は、HITACHI L-4000UV Detector, L-6000 Pump, L-6200 Intelligent Pump によって行い、試薬は HPLC 用のグレードを使用した。旋光度は、ATAGO AP-300 を使用した。スペクトル測定は以下の機器を使用した。¹H 核磁気共鳴スペクトルは Agilent DD2 NMR (400 MHz) を使用した。測定は TMS を基準として、CDCl₃、または、CD₃OD 中で行った。

6-2. ラズベリーのパリフェノール類抽出サンプルの精製方法

ラズベリーを乳鉢ですりつぶし MeOH で抽出した後、セライト濾過にて固形物を除去した。ろ液をロータリーエバポレーターで濃縮し、その後減圧下乾固した。乾固した濃縮物を一部とり、DMSO で 100 mg/mL の濃度に調整した。

6-3. ラズベリーのアントシアニン抽出サンプルの精製方法¹⁹³⁾

ラズベリー果実を凍結乾燥を行い水分を取り除いた後、ミニスピードミル MS-05 を用いて破砕し粉末になったラズベリー粉末 250 mg に 2% ギ酸 MeOH を 1 mL 加え、5 分攪拌し、攪拌後、5 分超音波し 4000g で 20 分遠心し上清を回収した。この操作を 3 回行った。上清を濃縮し、その後減圧下乾固した。乾固した濃縮物を一部とり、DMSO で 100 mg/mL の濃度に調整した。

6-4. パリフェノール量測定 (Folin-Ciocalteu 法)^{194,195)}

サンプル 2 μL、Milli Q 水 200 μL、10% Na₂CO₃ 水溶液 25 μL を加え攪拌後、フォーリン試薬 25 μL を加えて暗所で 30 分反応させ、生成した青色色素を 740 nm の吸光度で測定した。

6-5. PA 測定方法^{196,197)}

サンプル 5 μL 、Solution B 125 μL 、BSA 250 μL を加え攪拌し、4 $^{\circ}\text{C}$ 15 分インキュベートした。その後 15000 rpm 5 分で遠心分離したのち、上清を捨てた。そこに Solution 50 μL を加え攪拌後、遠心し、上清を捨て、5 % TEA(v/v)、10 % SDS (w/v) 溶液を 70 μL 加え攪拌した。この溶液に、10 mM FeCl_3 10 μL 加え、10 分反応させたのち、520 nm の吸光度で測定を行った。

- Solution A : 200 mM AcOH , 170 mM NaCl を pH4.9 に調整した。
- Solution B : 10 % EtOH , 5 mg /mL ロシエル塩を pH 3.3 に調整した。

6-6. DPPH ラジカル消去活性試験¹⁹⁸⁾

サンプル 1 μL 、EtOH 500 μL に 60 μM DPPH 溶液 500 μL 加え 30 分反応させたのち、520 nm の吸光度で測定を行った。

6-7. ABTS ラジカル消去活性試験¹⁹⁹⁾

7mM ABTS 溶液 5 mL に 140 mM ペルオキシ二硫酸カリウムを 88 μL 加え、12~16 h、室温、暗所で静置した。12~16 時間後、吸光度が 0.7 ± 0.02 になるように EtOH で希釈した。希釈した ABTS 溶液 1 mL にサンプル 1 μL 添加し、10 秒攪拌後、30 $^{\circ}\text{C}$ 、4 分反応させたのち、740 nm の吸光度で測定を行った。

6-8. チオバルビツール酸(TBA)法²⁰⁰⁾

サンプル 1 μL に 0.1 % リノール酸溶液 100 μL を加え、紫外線(254 nm)を 3 時間氷上で照射後、4.5 % BHT 溶液 2 μL 、20 % AcOH 溶液 150 μL 、0.8 % TBA 溶液 150 μL を加えた。その後、95 度で 1 時間加熱し、冷却したのち、n-BuOH 溶液 400 μL 加え、15000 rpm、4 分、4 度で遠心分離した。遠心分離した溶液の上層の n-BuOH 層を取り、530 nm の吸光度で測定を行った。

- 0.1 % リノール酸溶液: SDS 200 mg を 25 mL の純粋で溶かし、リノール酸を 25 μL 加えた。
- n-BuOH 溶液 : n-BuOH を 85 mL、MeOH を 15 mL 加えた

6-9. 植物からの 1 本鎖 cDNA の合成、および、PCR 法を用いた遺伝子の増幅方法

新鮮なラズベリー果実を RNeasy Mini Kit をもちいて mRNA の抽出をおこなった。その後、TURBO DNA-freeTM Kit を用いて、mRNA に含まれるゲノム DNA を取り除いたのち、mRNA 5 μL 、Oligo(dT) 0.5 μL 、5 \times Buffer 4 μL 、10 mM dNTPs 2 μL 、ReverTra Ace (100 units/mL) 1 μL 、滅菌水 7.5 μL 、加えサーマルサイクラーを用いて、70 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分、4 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分、42 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分、99 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分のプログラムを組み、1 本鎖 cDNA の合成をおこなった。次に滅菌

水 7.25 μ L、10 μ M Primer (F) 1 μ L、10 μ M Primer (R) 1 μ L、Go-Taq Master Mix 10 μ L、*R. idaeus* cDNA 0.75 μ L、を加え、各酵素の条件によって増幅をおこない、ポリアクリルアミド電気泳動を用いて確認をおこなった。また、各 primer の塩基配列を表 7-1 に示した。4-CL をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 3 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、55 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 20 秒のプログラムを組み、これを 40 cycle で増幅をおこなった。PAL をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 3 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、43 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 30 秒のプログラムを組み、これを 40 cycle で増幅をおこなった。CHS をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 3 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、50 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 22 秒のプログラムを組み、これを 40 cycle で増幅をおこなった。UDP-glucose をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 3 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、47 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 20 秒のプログラムを組み、これを 30 cycle で増幅をおこなった。F3'H をコードする遺伝子の増幅方法は、50 $^{\circ}$ C で 5 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、50 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 45 秒のプログラムを組み、これを 40 cycle で増幅をおこなった。FLS をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 5 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、57 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 45 秒のプログラムを組み、これを 40 cycle で増幅をおこなった。DFR をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 5 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、62 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 45 秒のプログラムを組み、これを 40 cycle で増幅をおこなった。ANS をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 2 分、95 $^{\circ}$ C で 1 分、55 $^{\circ}$ C で 20 秒、72 $^{\circ}$ C で 10 秒のプログラムを組み、これを 30 cycle で増幅をおこなった。CHS をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 2 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、49 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 25 秒のプログラムを組み、これを 30 cycle で増幅をおこなった。Histone をコードする遺伝子の増幅方法は、95 $^{\circ}$ C で 3 分、95 $^{\circ}$ C で 30 秒、55 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 25 秒のプログラムを組み、これを 29 cycle で増幅をおこなった。

6-10. ラズベリーに含まれるポリフェノール化合物の LCMS 分析

フラバン-3-オール誘導体の分析

A 溶媒 : Milli Q 100 %、

B 溶媒 : アセトニトリル 100%、ともにギ酸 0.05%、

カラム : MS-5C18GT、 ϕ 2.0 \times 150 mm、カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C、流量 0.2 mL/min

グラジエント(B 溶媒) : 0 分 0%、85 分 25%、95 分 100%、100 分 100%、
110 分 0%、

6-11. アントシアニンの分析

A 溶媒 : Milli Q 100 %、

B 溶媒 : アセトニトリル 100%、ともに TFA 1%、

カラム : Navi C18-5、 ϕ 4.6 \times 250 mm、カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C、流量 0.2 mL/min

グラジエント(B 溶媒) : 0 分 5%、60 分 25%、65 分 50%、70 分 80%、
72 分 5%、75 分 5%、

表 6-1. primer 配列

Gene	Accession No. of Sequence Used for Primer Design	Primer Sequence
4-CL	AF239687	F: ATG CGA AAC AAC TTG CAT TT R: GCT ACG ATT CAC GAC ATT GC
PAL	AF304366	F: AAC CCT TGT TTC TTC GTA CCA TTA R: GAT GGG TAG CTA GTA CTT ACA CAT
CHS	AF292367	F: GAT GGG TAG CTA GTA CTT ACA CAT R: GAT GGG TAG CTA GTA CTT ACA CAT
UDP-glucose	AWT04749	F: CCATGTTTTCTTGGTTTCCTT R: ATGAAAGGGTTGTTAATGAGG
F3'H	GT029980	F: TGA TGA AGC TTT ATA AGC ATG TGA GC R: GGG TCC ACT CTC TTG GTG AA
FLS	GT029981	F: AGG TGA ACAGGT GGA GTT GG R: TGA AGA CCA TCA TCG AAT GC
DFR	GT029979	F: ATG CGA AAC AAC TTG CAT TT R: GCT ACG ATT CAC GAC ATT GC
ANS	KX950789.1	F: ATC GTA ATG CAC ATA GGC GAC ACC R: CCT TGG GCG GCT CAG AGA AAA
ANR	AMP19723	F: ATC TCA AAC AAG ACT GCT TGT G R: GAG AGT ATT GAC AGT CAC TGC AG
Histone	AF301365.1	F: CAA GGA AGC AAT TGG CTA CA AGG R: AGT TGG ATA TCC TTG GGC ATA ATA

6-12. ブドウ培養細胞(*Vitis Vinifera* L.)の静置培養^{201,202)}

本実験では理化学研究所より購入したヨーロッパブドウ(ヴィニフィラ種)の一種であるブドウ培養細胞の *Vitis Vinifera* L.VW 株、VR 株を使用した。寒天培地の組成は MS 培地 4.6 g、スクロース 30 g、寒天 12 g を純粋で 1L に溶解し、pH 6.1 に調整した後、滅菌を行った。滅菌後、Modified LS-VT (×400) 2.5 mL、Kinetin 1 mL、0.2 mg/mL 2,4-D 0.25 mL を加え、植物培養細胞の植えつぎを行い、27 °C で 30 日間寒天培養を行った。

6-13. ブドウ培養細胞(*Vitis Vinifera* L.)の振盪培養、および、変換反応

振盪培養の培地は MS 培地 4.6 g、スクロース 30 g を純粋で 1L に溶解し、pH 6.1 に調整した後、滅菌を行った。滅菌後、Modified LS-VT (×400) 2.5 mL、Kinetin 1 mL、0.2 mg/mL 2,4-D 0.25 mL を加えた。その後、植物培養細胞を 27 °C で 7 日間液体培養を行い 7 日ごとに培地の交換をおこなった。7 日間振盪培養を行った植物培養細胞に終濃度 2 mM になるように基質を添加し 6 日間振盪培養を行った。その後、各種、有機溶媒で抽出を行った。

6-14. ラズベリー培養細胞(*Rubus idaeus*)の構築¹⁶⁷⁾

本実験では使用した品種はラフザック種を選択した。まず、植物体のラズベリーからカルスの作成を行った。ラズベリーの葉を水道水で軽く洗浄し、この後の作業からクリーンベンチ内で行った。次に 70%EtOH で 15 分洗浄し、NaClO で 15 分洗浄した。その後、滅菌水で 5 分洗浄を行った。この操作を 3 回繰り返し、ビタミン含有 MS 培地で 23 °C で 60 日間培養を行い、カルスの作成を行った。培地の組成はビタミン含有 MS 培地 4.4 g、2% スクロース、0.4% ゲランガムを純粋で 1L に溶解し pH 5.65 に調整した後、滅菌を行った。滅菌後 0.5 mg/L 2,4-D、を加え培養を行った。カルスが構築されたのちカルスの培養を培地の組成を変え培養を行った。組成は、ビタミン含有 MS 培地 4.4g、2%スクロース、0.4% ゲランガムを純粋で 1L に溶解し pH 5.65 に調整した後、滅菌を行った。滅菌後 IAA 4mg/mL、BA 1mg/mL を加え培養を行った。

6-15. ラズベリー培養細胞(*Rubus idaeus*)の静置培養^{168,169)}

カルスが構築されたのち生育速度を上げるため、培地の組成を変え 27 °C で 30 日間培養した。組成は、ganborg B5 培地 3.05g、3%スクロース、0.4% ゲランガムを純水で 1L に溶解し pH 5.65 に調整した後、滅菌を行った。滅菌 myo-inositol 500mg/mL、2,4-D 1mg/mL、kinetin 0.1mg/mL、adenin 1mg/mL を加え培養を行った。

6-16. ラズベリー培養細胞(*Rubus idaeus*)の振盪培養、および、変換反応

振盪培養の培地は ganborg B5 培地 3.05g、3%スクロース、0.4% ゲランガムを純粋で 1L に溶解し pH 5.65 に調整した後、滅菌を行った。滅菌後、myo-inositol 500mg/mL、2,4-D 1mg/mL、kinetin 0.1mg/mL、adenin 1mg/mL を加えた。その後、植物培養細胞を 27 °C で 7 日間液体培養を行い 7 日ごとに培地の交換をおこなった。7 日間振盪培養を行った植物培養細胞に終濃度 2 mM になるように基質を添加し 6 日間振盪培養を行った。その後、各種、有機溶媒で抽出を行った。

6-17. 植物培養細胞の変換反応の LC 分析

A 溶媒 : Milli Q 100 % 、

B 溶媒 : アセトニトリル 100% 、ともにギ酸 0.05% 、

カラム : MS-5C18GT、 ϕ 2.0×150 mm、カラム温度 : 40 °C、流量 0.2 mL/min

グラジエント(B 溶媒) : 0 分 0%、35 分 35%、45 分 100%、50 分 100%、70 分 0%、

6-18. 動物由来肝臓マイクロソームのグルクロン酸抱合反応

動物由来肝臓マイクロソームは SEKISUI XENOTECH 社で B6C3F1 Mouse Liver Microsomes Untreated, Male、Gottingen Minipig Liver Microsomes Untreated, Male、Hartley Albino Guinea Pig Liver Microsomes Untreated, Male、New Zealand Rabbit Liver Microsomes Untreated, Male、Beagle Dog Liver Microsomes Untreated, Female、Human Liver Microsomes, Female を用いた。

20mg/mL 動物由来肝臓マイクロソーム 10 μ L、10mM 基質 1 μ L、1M KPi (pH 7.4) 10 μ L、200mM MgCl₂ 2.5 μ L、100 mM アスコルビン酸 10 μ L、100 mM β -グルクロニターゼ阻害剤 2 μ L、5mg/mL alamethicin 5 μ L、20mM UDP-glucuronic acid 10 μ L、Milli Q 水 49.5 μ L を加え 37 °C で 1-3h 反応を行った。反応後、アセトニトリルを 50 μ L を加え反応を停止し、攪拌、15000 rpm で 10 分遠心後、LC 分析を行った。

6-19. 動物由来肝臓マイクロソームの LC 分析

A 溶媒 : Milli Q 100 % 、

B 溶媒 : アセトニトリル 100% 、ともにギ酸 0.05% 、

カラム : MS-5C18GT、 ϕ 2.0×150 mm、カラム温度 : 40 °C、流量 0.2 mL/min

グラジエント(B 溶媒) : 0 分 0%、45 分 45%、50 分 100%、55 分 100%、56 分 0%、

6-20. 遺伝子導入大腸菌 UGT78D2 の培養

前培養として LB 培地 4 ml に 4 μ l の 100 mg/ml アンピシリンを加えて糖転移酵素の遺伝子をコードした大腸菌を白金棒で加えて 37 °C のインキュベーターで一晩振とう培養した。100 ml の LB 培地に前述した前培養液を 2 ml、100 mg/ml アンピシリンを 100 μ l 加えて 37 °C インキュベーターで 2 h 30 min 振とう培養し本培養を行った。培養後、氷冷下で 100 mM IPTG を 1 ml 加えて 18 °C のインキュベーターで 22 h 培養した。

6-21. 遺伝子導入大腸菌 UGT78D2 の精製

前述した培養液を 50 ml 遠沈管に移し、4000 rpm, 10 min で遠心後、沈殿以外を取り除いた。そこに K_Binding buffer (100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH7.0) + 5 mM DTT を 10 ml 加え攪拌後、4000 rpm, 10 min かけて沈殿以外を取り除いた。再び、K_Binding buffer (100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH7.0) + 5 mM DTT を 5 ml 加え攪拌後、冷却しながら超音波破碎を行っ

た。破碎液を 1.25 ml ずつ 1.5 ml チューブに移し、4 °C, 15000 rpm, 30min で遠心した。遠心後、上清を回収し研究に用いた。

6-22. 遺伝子導入大腸菌 UGT78D2 酵素溶液を用いた配糖化反応

回収した酵素溶液を SDS-PAGE を用いて UGT78D2 遺伝子が発現していることを確認した後、GST カラムを用いて精製を行った。精製を行った酵素溶液をブラッドフォード法を用いてタンパク質の定量を行った。UGT78D2 酵素溶液 65 μ L、5mM 基質 15 μ L、pH7.0、1M Tris-HCl Buffer 50 μ L、5 mM UDP-Glucose 30 μ L、1M DTT 2.5 μ L、Milli Q 337.5 μ L を加え 37 °C で 3 h 反応させた。反応後 EtOAc を 500 μ L 加え、攪拌、15000 rpm で 10 分遠心後、EtOAc 層の LC 分析を行った。

6-23. 遺伝子導入大腸菌 UGT78D2 を用いた菌体内配糖化反応

本培養を行った遺伝子導入大腸菌体を 50 ml 遠沈管に移し、4000 rpm, 10 min で遠心後、沈殿以外を取り除いた。そこに、OD₆₀₀ で 3.0 になるように改良型 M9 培地を加えた。この溶液を 1 ml ずつ分注し、100 mg/ml アンピシリン 0.5 μ L、100 mM IPTG 10 μ L、5 mM 基質 20 μ L を加え、30 °C で 24 h 反応させた。その後、反応液を、90 °C で 2 min 煮沸し、4 °C、15000 rpm、10 min 遠心分離し、EtOAc 抽出を行い LC 分析を行った。

改良型 M9 培地

Milli Q 水 100 ml に対して、Na₂HPO₄ 12.8 g、KH₂PO₄ 3 g、NaCl 0.5 g、NH₄Cl 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.494 g、CaCl₂·2H₂O 0.0152 g、Thiamine 0.01 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g をオートクレーブして用いた。その後、終濃度 2% となるようにグルコース溶液を加えた。

6-24. 遺伝子導入大腸菌体 UGT78D2 の配糖化反応の LC 分析

【HPLC の測定条件】

A 溶媒 : Milli Q 100 %、

B 溶媒 : アセトニトリル 100 %、ともにギ酸 0.05 %、

カラム : Navi C18-5、 ϕ 3.0×150 mm、カラム温度 : 40 °C、流量 0.5 mL/min

グラジエント(B 溶媒) : 0 min 10%、9 min 100 %、10 min 100 %、12 min 10 %、

13 min 10 %

【LC-MS の測定条件】

A 溶媒 : Milli Q 100 % 、

B 溶媒 : アセトニトリル 100% 、ともにギ酸 0.05% 、

カラム : MS-5C18GT、 ϕ 2.0×150 mm、カラム温度 : 40 °C、流量 0.2 mL/min

グラジエント(B 溶媒) : 0 min 0 %、25 min 80 %、35 min 100 %、50 min 100 %、
60 min 0 %

6-25. 酵素発現酵母 UGT71G1 を用いた配糖化反応

富山県立大学 生城真一教授に提供していただいたタルウマゴヤシ由来 UGT71G1 導入酵母菌体を用いて研究を行った。UGT71G1 酵母菌体 (50mg) 100 μ L、100 mM 基質 2 μ L、1M KPi (pH 7.4) 20 μ L、40 % グルコース 40 μ L、Milli Q 38 μ L を加え、30°C で 24h 反応を行った。反応後、クロロホルム/メタノール 500 μ L で抽出を行い、攪拌後、15000rpm で 10 分遠心を行った。遠心後、上層、および、下層の LC 分析を行った。

6-26. 酵素発現酵母 UGT71G1 を用いた LC 分析

A 溶媒 : Milli Q 100 % 、

B 溶媒 : アセトニトリル 100% 、ともにリン酸 0.5% 、

カラム : C30-5、 ϕ 3.0×150 mm、カラム温度 : 30 °C、流量 0.5 mL/min

グラジエント(B 溶媒) : 0 min 10 %、5 min 10 %、20 min 60 %、23 min 60 %、
25 min 10 %

参考文献

1. Q. Xe, Q. Fu, Z. Li, H. Liu, Y. Wang, X. Lin, R. He, X Zhang, Z. Ju, J. Campisi, J. L. Kirkland, Y. Sun “The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activitu and increases lifespan in mice.”, *naturemetabolism*, 2021, 1-21.
2. 波多野 力, “ポリフェノール: 薬用植物および食品の機能性成分.”, シーエムシー出版.
3. 小野 佳子, 富森 菜美乃, 立石 法史, 森脇 将光, 栄村 和浩, 奥山 秀二., “クエルセチン配糖体組成物およびその調整方法.”, 2007, 特許 P3896577.
4. 近藤 雅雄, ころろとからだの健康 (10) 脳に良い食品、機能性食品とその成分, (2015).
5. 細山 浩, 有賀 敏明, 健康食品素材としてのブドウ種子抽出物, *FOOD Style*21, 66-70 (1998).
6. (a) Harborne. J.B., *The Chapman and Hall*: London. (1993). (b) Harborne. J.B., Baxter, H. *John Wiley & Sons*, NY. (1999).
7. L. Renai, C.V. Scordo, U. Chiuminatto, M. Ulaszewska, E. Giordani, W. A. Petrucci, F. Tozzi, S. Nin, M. D. Bubble, “Liquid Chromatographic Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometric Untargeted Profiling of (Poly)phenolic Compounds in *Rubus idaeus* L. and *Rubus occidentalis* L. Fruits and Their Comparative Evaluation.”, *Antioxidan.*, 2021, **10(5)**, 704.
8. 斉藤 和季, 野路 征昭, 高橋 秀樹, “植物の硫黄同化系の分子機構と制御 硫酸イオン同化によるシステイン合成.”, *化学と生物.*, 1989, **37(3)**.
9. C. Zannella, R. Gingliano, A. Chianese, C. Buonocore, G.A. Vitale, G. Sanna, F. Sarno, A. Manzin, A. Nebbioso, P. Termolino, L. Altucci, M. Galdiero, D.D. Pascale, G. Franci, “Antiviral Activity of *Vitis vinifera* Leaf Extract against SARS-Cov-2 and HSV-1.”, *Viruses.*, 2021,**13(7)**, 1263.
10. E. Vongerichten, “Uber Apoiin und Apoise.” *Justus Liebigs Ann. Chem.*1901, **318**, 121-136.
11. 中沖 太七郎, “コスモス花の成分に就いて. 白色花のフラボン族配糖体の研究.”, *薬学雑誌.*, 1935, **55**, 967-978.
12. S. Hattori, M. Hasegawa, M. Kanao, “Naring aus den Fruchtschalen von *Citrus grandis* var. *Buntan*.”, *Acta Phytochim.*, 1949, **15**, 199-200.
13. 刈米 達夫, 松野 隆夫, “柑橘類成分の研究.”, *薬学雑誌*, 1954, **74**, 363-365.
14. S. Hattori, M. Hasegawa, M. Shimokoriyama., “Uber die Struktur des Glykosids Trifolins aus den Blüten von *Trifolium pratense*, nebst einer Bemerkung uber einen gelben Begleitstoff.”, *Acta Phytochim.*, 1943, **13**, 99-107.
15. 中沖 太七郎, 森田 直賢, “いたどり及びおおいたどりの葉の成分に就いて.” *薬学雑誌*, 1956, **76**, 323-324.
16. 中沖 太七郎, 森田 直賢, 西野 真一郎, “あぶらぎり, あおぎり, いちぢく, からはなそうの葉の成分に就いて.” *薬学雑誌*,1957, **76**, 110-111.
17. J. Koster, D. Strack, W. Barz, “High performance liquid chromatographic separation of

- isoflavoneas and structural elucidation of isoflavone 7-O-glucoside 6"-malonates from *Cicer arietinum*.”, *Planta Med.*, 1983, **48**, 131-135.
18. J. B. Harborne, “Comparative biochemistry of flavonoids-I. Distribution of chalcone and aurone pigments.”, *Phytochemistry.*, 1966, **2**, 173-187.
 19. M. Shimokoriyama, S. Hattori, “Anthochlor pigments of *Cosmos Sulphureus*, *Coreopsis lanceolata*, *C. Saxicola*.”, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 1900-1904.
 20. 武田 幸作, 齋藤 規夫, 岩科 司, “植物色素フラボノイド” 文一総合出版.
 21. E. Sondheimer, E.I. Kertesz, “The anthocyanin of strawberries.”, *J. Amer. Chem. Soc.* 1948, **70**, 3476-3479.
 22. E. Sondheimer, C.B. Karash, “The major anthocyanin pigments of the wild strawberry (*Fragaria vesca*).”, *Nature*, 1956, **178**, 648-649.
 23. M.M. Yamamoto, K. Ema. M. Monobe, Y. Tokuda, H. Tachibana, “Epicatechin-3-O-(3"-O-methyl)-gallate content in various tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) and its in vitro inhibitory effect on histamine release.”, *J Agric Food Chem.*, 2012, **60**, 2165-2170.
 24. T. Shoji, M. Obara, T. Takahashi, S. Masumoto, H. Hirota, T. Miura, “The Differences in the Flavan-3-ol and Procyanidin Contents of the Japanese ‘Fuji’ and ‘Orin’ Apples Using a Rapid Quantitative High – Performance Liquid Chromatography Method: Estimation of the Japanese Intake of Flavan-3-ols and Procyanidins from Apple as Case.”, *Foods.*, 2021, **10(2)**, 274.
 25. J. B. Harborne, “The Flavonoids, Advances in research from 1986.”, *Chapman and Hall*, 1993.
 26. J. B. Harborne, H. Baxter, “Handbook of Natural Flavonoids. The Handbook of Natural Flavonoids”, *John Wiley & Sons, NY*, 1999.
 27. 有賀 敏明, 細山 浩, 徳武 昌一, 山越 純, “プロアントシアニジンの機能性解明と開発”, *日本農芸化学会誌*, 2000, **74**, 1-8.
 28. Y. Yamada, S. Iwai, A. Tsuboi, C. Kurahashi, M. Ota, T. Matsuoka, T. Sanbe, K. Oguchi, “Theanine potentiates the inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on matrix metalloprotease activity in Langerhans-like cells and on tube formation.”, *Showa Univ. J. Med. Sciences.*, 2000, **21**, 117-129.
 29. S. Gorlahc, W. Wagner, A. Podsedek, D. Sosnowska, J. Dastyh, M. Koziółkiewicz, “Polyphenols from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds induce apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 6985–6997.
 30. Y. Miura, T. Chiba, I. Tomita, H. Koizumi, S. Miura, K. Umegaki, Y. Hara, M. Ikeda, T. Tomita, “Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice.”, *J. Nutr.*, 2001, **131**, 27-32.
 31. T. Suzuki, T. Takahashi, C. T. Guo, K. I. Hidari, D. Miyamoto, H. Goto, Y. Kawaoka, Y. Suzuki, “Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication.”, *J. Virol.*, 2005, **79**, 11705-11715.

32. F. Mendel, “Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery yproducts in relation to their flavonoid content.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 6025–6042.
33. M. Toda, S. Okubo, H. Ikigai, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Hara, T. Shimamura, “The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1.”, *Microbiol. Immunol.*, 1992, **36**, 999-1001.
34. 中林 敏郎, 伊奈 和夫, 坂田 完三, “緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能.”, 弘学出版.
35. 立花 宏文 他, “茶ポリフェノールの生理機能と応用展開.”, シーエムシー出版, 2019, P3.
36. 大久 保勉, “緑茶カテキン抗酸化剤の開発と応用”, *オレオサイエンス*, 2004, **4**, 401-407.
37. Y. Yamada, S. Iwai, A. Tsuboi, C. Kurahashi, M. Ota, T. Matsuoka, T. Sanbe, K. Oguchi, “Theanine potentiates the inhibitory effect of (–)-epigallocatechin-3-*O*-gallate on matrix metalloprotease activity in langerhans-like cell and on tube formation”, *Showa Univ. J. Med. Sciences.*, 2009, **21**, 117-129.
38. M. Katsuno, “Benifuuki tea suppresses hitamine sinaling and matrix metalloproteinse-9 expression in TDI-sensitized nasal allergy model rats.”, *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 2013, **41**, 577-585.
39. Y. Kamiya, S. Iwai, K. Nara, M. Okazaki, K. Oguchi, “Effects of green tea on matrix metalloproteinases in streptozotocin-induced diabetic rats.”, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2015, **37**, 77-85.
40. I. Ikeda, Y. Imasato, E. Sasaki, M. Nakayama, H. Nagao, T. Takeo, F. Yayabe, M. Sugano, “Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats.”, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, **1127**, 141-146.
41. M. Toda, S. Okubo, H. Ikigai, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Hara, T Shimamura, “The protective activity of tea catechins against experimental infection by *vibrio cholerae* O1.”, *Microbiol. Immunol.*, 1992, **36**, 999- 1001.
42. T. Suzuki, T. Takahashi, C. Guo, K. Hidari, D. Miyamoto, H. Goto, Y. Kawaoka, Y. Suzuki, “Sialidase activity of influenza a virus in an endocytic pathway enhances viral replication” *J. Virol.*, 2005, **79**, 11705-11715.
43. I. Ikeda, R. Hamamoto, K. Uzu, K. Imaizumi, K. Nagao, T. Yanagita, Y. Suzuki, M. Kobayashi, T. Kakuda, “Dietary gallate esters of tea catechins reduce deposition of visceral fat, hepatic triacylglycerol, and activities of hepatic enzymes related to fatty acid synthesis in rats.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, **69**, 1049-1053.
44. M. Dettweilr, J.T. Lyles, Z. Nelson, B. Dole, R. M. Reddinger, D. V. Zurawski, C. L. Quave. “American Civil War plant medicines inhibit growth, biofilm formation, and uorum sensing by mulutidrug- resistant bacteria.”, *Sci ep.*, 2019, **9**, 7692.
45. 卯川裕一, 提坂裕子, “緑茶カテキン (ガレート型カテキン) の機能性研究と特定保健用食品の開発.”, *生物工学*, 2015, **93**, 634-636.

46. 齊藤 安喜子, 中島 範行, “プロアントシアニジンの立体選択的合成研究とその生物活性” *有機合成化学協会誌*, 2005, **63**, 982-994.
47. 有賀 敏明, “プロアントシアニジンの抗酸化機能および疾病予防機能とその利用”, *日本油化学会誌*, 1999, **48**, 127-136.
48. 下田 恵, 濱田 博喜, “植物培養細胞を活用した機能性化合物のグルコシル化.”, *TCI メール*, 2011, No.151
49. C. Morand, C. Manach, V. Crespy, C. Remes. “Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma.”, *Free Rad Res.*, 2000, **33**, 667-676.
50. B.R. Galdon, E.M.R. Rodriguez, C.D. Romero, “Flavonoids in onion cultivars (*Allium cepa* L.)”, *Comparative Study.*, 2008, **73**, 599-605.
51. A. Butkeviciute, M. Liaudanskas, D. Kviklys, D. Gelvonauskiene, V. Janulis, “The Qualitative and Quantitative Compositions of Phenoli Compounds in fruits of Lithuanian Heirloom Apple Cutivars.”, *Molecules.*, 2020, **25**, 5263.
52. K. Michalcova, S. Roychoudhury, M. Halenar, E. Tvrda, E. Kovacikova, J. Vasicek, P. Chrenek, S. Baldovska, L. Sanislo, V. Kren, A. Kolesarova, “*In Vitro* response of human ovarian cancer cell to dietary bioflavonoid isoquercitrin.”, *J Environ Sci Health B.*, 2019, **54**, 752-757.
53. K. egawa, M Yoshimura, N. kanzaki, J. Nakamura, Y. Kitagawa, H. Shibata, I. Fukuhara, “Body fat reducing effect and safety evaluation of long’ term consumption of green tea containing quercetin glucoside in odese subject.”, *Jan. Pharmacol. Ther.* 2012, **40**, 495-503.
54. X. Li, Y. Tiam, T. Wang, Q. Lin, X. Feng, Q. Jiang, Y. Liu, D. Chem, “Role of the p-Coumaroyl Moiety in the Antioxidant and Cytoprotective Effects of Flavonoid Glycosides: Comparison of Astragalin and Tiliroside.”, *Comparative Study.*, 2017, **22**, 1165.
55. M. Hirai, R. Kobori, R. Doge, I. Tsuji, A. Saito, “Efficient Concentration of Functional Polyphenols Using Their Interaction with Gelatin.”, *Foods*, 2021, **10**, 698.
56. K. Mori, Y. Ayano, Y. Hamada, T. Hojima, R. Tanaka, Y. Higashino, M. Izuno, T. Okamoto, T. Kawasaki, M. Hamada, N. Nakajima, A. Saito, “Role of 2,3-cis structure of (–)-epicatechin-3,5-O-digallate in inhibition of HeLa S3 cell proliferation.”, *Nat. Prod. Chem. Res.*, 2015, **3**, 172.
57. A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, “Synthetic studies of proanthocyanidins. Highly stereoselective synthesis of catechin dimer, procyanidin-B3.”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2002, **66**, 1764-1767.
58. H. Fukami, Y. Yano, T. Iwashita, “Isolation of a reduced form of cyaniding 3-O-β-D-glucoside from immature black soybean (*Glycine max* (L.) Merr) and its reducing properties.”, *J. Oleo. Sci.*, 2013, **62**, 623-629.
59. Y. Hamada, S. Takano, Y. Ayano, M. Tokunaga, T. Koashi, S. Okamoto, S. Doi, M. Ishida, T. Kawasaki, M. Hamada, N. Nakajima, A. Saito, “Structure–activity relationship of oligomeric flavan-3-ols: importance of the upper-unit B-ring hydroxyl groups in the dimeric structure for

- strong activities.”, *Molecules.*, 2015, **20**, 18870-18885.
60. A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, “Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 2. Stereoselective gram-scale synthesis of procyanidin-B3.”, *Tetrahedron.*, 2002, **58**, 7829-7837.
 61. A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, “Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 3. Stereoselective 3,4-*cis* catechin and catechin condensation by TMSOTf-catalyzed intramolecular coupling method.”, *Tetrahedron Letters.*, 2003, **44**, 5449-5452.
 62. A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, “Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 4. The synthesis of procyanidin B1 and B4. TMSOTf-catalyzed cyclization of catechin and epicatechin condensation.”, *Heterocycles.*, 2003, **61**, 287-298.
 63. A. Saito, N. Nakajima, N. Matsuura, A. Tanaka, M. Ubukata, “Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 5. Highly stereoselective synthesis and inhibitory activity of Maillard reaction of 3,4-*trans* catechin and epicatechin dimers, Procyanidin B1, B2, B3, B4 and their acetates.”, *Heterocycles.*, 2004, **62**, 479-489.
 64. A. Saito, A. Tanaka, M. Ubukata, N. Nakajima, “Efficient stereoselective synthesis of proanthocyanidin trimers with TMSOTf-catalyzed intermolecular condensation.”, *Synlett.*, 2004, 1069-1073.
 65. A. Saito, Y. Doi, A. Tanaka, N. Matsuura, M. Ubukata, N. Nakajima, “Systematic synthesis of four epicatechin series procyanidin trimers and their inhibitory activity on the Maillard reaction and antioxidant activity.”, *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, **12**, 4783-4790.
 66. A. Saito, A. Tanaka, M. Ubukata, N. Nakajima, “Stereoselection of 3,4-*cis* and 3,4-*trans* catechin and catechin condensation under intramolecular coupling method.”, *Synlett.*, 2004, 2040-2042.
 67. A. Saito, M. Emoto, A. Tanaka, Y. Doi, K. Shoji, Y. Mizushina, H. Ikawa, H. Yoshida, N. Matsuura, N. Nakajima, “Stereoselective synthesis of procyanidin B3-3-*O*-gallate and 3,3'-di-*O*-gallate, and their abilities as antioxidant and DNA polymerase inhibitor.”, *Tetrahedron.*, 2004, **60**, 12043-12049.
 68. A. Saito, Y. Mizushina, H. Ikawa, H. Yoshida, Y. Doi, A. Tanaka, N. Nakajima, “Systematic synthesis of galloyl-substituted procyanidin B1 and B2, and their ability of DPPH radical scavenging activity and inhibitory activity of DNA polymerases.”, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 2759-2771.
 69. Y. Mizushina, A. Saito, A. Tanaka, N. Nakajima, I. Kuriyama, M. Takemura, T. Takeuchi, F. Sugawara, H. Yoshida, “Structural analysis of catechin derivatives as mammalian DNA polymerase inhibitors.”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **333**, 101-109.
 70. H. Sakuda, A. Saito, Y. Mizushina, H. Yoshida, A. Tanaka, N. Nakajima, “Synthesis of galloyl-substituted procyanidin B4 series, and their deep radical scavenging activity and DNAPolymerase inhibitory activity.”, *Heterocycles.*, 2006, **67**, 175-188.
 71. A. Saito, Y. Mizushina, A. Tanaka, N. Nakajima, “Versatile synthesis of epicatechin series

- procyanidin oligomers, and their antioxidant and DNA polymerase inhibitory activity.”, *Tetrahedron.*, 2009, **65**, 7422-7428.
72. A. Saito, N. Nakajima, “Structure activity relationships of synthesized procyanidin oligomers: their DPPH radical scavenging activity and the Maillard reaction inhibitory activity.”, *Heterocycles.*, 2010, **80**, 1081-1090.
 73. S. Ishihara, S. Doi, K. Harui, T. Okamoto, S. Okamoto, J. Uenishi, T. Kawasaki, N. Nakajima, A. Saito, “Development of a new synthetic strategy for procyanidin dimer condensation using peracetylated electrophiles.”, *Heterocycles.*, 2014, **88**, 1595-1602.
 74. S. Tsukuda, K. Watashi, T. Hojima, M. Isogawa, M. Iwamoto, K. Omagari, R. Suzuki, H. Aizaki, S. Kojima, M. Sugiyama, A. Saito, Y. Tanaka, M. Mizokami, C. Sureau, T. Wakita, “A new class of hepatitis B and D virus entry inhibitors, proanthocyanidin and its analogs, that directly act on the viral large surface proteins”, *Hepatology.*, 2017, **65**, 1104-1116.
 75. 森 一起, 大阪電気通信大学 2015 年度 修士学位論文
 76. H. Kawamoto, F. Nakatsubo, K. Murakami, “Chemical Structure of Synthetic Condensed Tannin from Benzylated Flavan-3,4-diol.”, *Mokuzai Gakkaishi.*, 1991, **37**, 488-493.
 77. A. P. Kozikowski, W. Tuckmantel, Y. J. Hu, “Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 3. Stereocontrolled Synthesis of Epicatechin-4 α ,8-epicatechin, an Unnatural Isomer of the B-Type Procyanidins.”, *Org. Chem.*, 2001, **66**, 1287-1296.
 78. G. Watanabe, K. Ohmori, K. Suzuki, “A seco-catechin cyclization approach to 4 \rightarrow 6-linked catechin dimers.”, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 5210-5216.
 79. Y. Oizumi, Y. Mohri, M. Hirota, H. Makabe, “Synthesis of procyanidin B3 and its anti-inflammatory activity. The effect of 4-alkoxy group of catechin electrophile in the Yb (OTf)₃-catalyzed condensation with catechin nucleophile.”, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 4884-4886.
 80. S. Okamoto, S. Ishihara, T. Okamoto, S. Doi, K. Harui, Y. Higashino, T. Kawasaki, N. Nakajima, A. Saito, “Inhibitory activity of synthesized acetylated procyanidin B1 analogs against HeLa S3 cells proliferation.”, *Molecules.*, 2014, **19**, 1775-1785.
 81. Y. Higashino, T. Okamoto, K. Kazuki, T. Kawasaki, M. Hamada, N. Nakajima, A. Saito, “Regioselective Synthesis of Procyanidin B6, A4-6-Condensed (+)-Catechin Dimer, By Intramolecular Condensation.”, *Molecules.*, 2018, **23**, 205.
 82. T. Hojima, S. Komeda, Y. Higashino, M. Hamada, N. Nakajima, T. Kawasaki, A. Saito, “Role of 3,5-digalloyl and 3',4'-dihydroxyl structure of (-)-epicatechin-3,5-digallate in inhibition of HeLa S3 cell proliferation”, *Nat. Prod. Chem. Res.*, 2017, **5**, 250.
 83. E. Carvalho, P. Franceschi, corresponding author Antje Feller, L. Herrera, L. Palmieri, P. Arapitsas, S. Riccadonna, S. Martens, “Discovery of A-type procyanidin dimers in yellow raspberries by untargeted metabolomics and correlation based data analysis.”, *Metabolomics.* 2016, **12**, 144.

84. M. Kosmala, Z. Zdunczyk, J. Juskiwicz, A. Jurgonski, E. Karlinska, J. Macierzyński, R. Jańczak, E. Roj, “Chemical composition of defatted strawberry and raspberry seeds and the effect of these dietary ingredients on polyphenol metabolites, intestinal function, and selected serum parameters in rats.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, **63**, 2989–2996.
85. C. Zhang, H. Jia, W. Wu, X. Wang, J. Fang, C. Wang, ”Functional conservation analysis and expression modes of grape anthocyanin synthesis genes responsive to low temperature stress.”, *Gene.*, 2015, **10;574**, 166-177.
86. D. Hermanz, AF. Recamales, AJ. Martinez, ML .Miret, FJ. Heredia, ”Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 1846-1852.
87. T. Kodama, H. Ishida, T. Kokubo, T. Yamakawa, H. Noguchi, “Glucosylation of quercetin by a cell suspension culture of *vitis* sp.”, *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, 3283-3288.
88. 下田 恵, 濱田博喜, “植物培養細胞を活用した機能性化合物のグルコシル化.”, TCI メー
ル, 2011, No.151.
89. C. Morand, C. Manach, V. Crespy, C. Remes. “Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma.”, *Free Rad Res.*, 2000, **33**, 667-676.
90. 浜田 博喜, “植物培養細胞による有機化合物の変換.”, *化学と生物*, 1997, 35, 725-732.
91. 濱田 博喜, “植物培養細胞を活用して基礎研究と産学連携研究を探求して.”, 9-17.
92. 水元 元, “植物培養細胞によるフェノール化合物の配糖化.” 1986, *植物組織培養.*, **3**, 35-37.
93. 浜田 博喜, 古谷力, 大谷 修一, 谷 征彦, “特許公報(A) カテキン-β-グルコシドの製造
法.”, 2015, 2003191740.
94. 上杉 大輔 “植物培養細胞によるスチルベン誘導体の配糖化と機能性評価.”, 岡山大学
大学院理学研究科材質理学専攻 2017 年度博士論文.
95. Y. Fujitaka, H. Hamada, D. Uesugi, A. Kuboki, K. Shimoda, T. Iwaki, Y. Kiriake, T. Saikawa, “Synthesis of Daidzein Glycosides, α-Tocopherol Glycosides, Hesperetin Glycosides by Bioconversion and Their Potential for Anti-Allergic Functional-Foods and Cosmetics.”, *Molecules.*, 2019, **24**, 2975.
96. N. Hanioka, S. Ohkawara, T. Isobe, S. Ochi, T.T. Kagawa, H. Jinno, “Regioselective glucuronidation of daidzein in liver and intestinal microsomes of humans, monkeys, rats, and mice.”, Springer., 2018, **92**, 2809-2817.
97. 吉田 隆志, 有井 雅幸監修, “植物ポリフェノール含有素材の開発: その機能性と安全性.”, シーエムシー出版.
98. Y. S. Park, M. Jeon, H. J.Hwang, M. R. Park, S. H. Lee, S. G. Kim, M Kim, “Study on the hypochlolesterolesterolemic and antioxidative effects of tyramine derivatives from the root bark of lycium chenese miller.”, *Nutr. Res. Prac.*, 2011, **10**, 412-420.

99. S. Gorlahc, W. Wagner, A. Podsedek, D. Sosnowska, J. Dastyh, M. Koziółkiewicz, “Polyphenols from evening primrose (*oenothera paradoxa*) defatted seeds induce apoptosis in human colon cancer caco-2 cells.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 6985–6997.
100. 吉村 成弘, “大学で学ぶ身近な生物学.”, 羊土社.
101. 中村 成夫, “活性酸素と抗酸化物質の化学”, *日医大医会誌*, 2013, **9**, 164-169.
102. 長野 哲雄, “活性酸素種スーパーオキシドの生成と消去-活性酸素増産剤と人工スーパーオキシドディスムターゼの開発.”, *有機合成化学*, 1989, **47**, 843-854.
103. E. Martinoia, M.Klein, M. Geisler, L. Bovet, C. Forestier, U. Kolukisaoglu, B. M. Rober, B. Schulz, “Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers.”, *Plant.*, 2002, **214**, 345-355.
104. M. Montefiori, R.V. Espley, D. Stevenson, J. Cooney, P.M. Datson, A. Saiz, R.G. Atkinson, R.P. Hellens, A.C. Allan, “Identification and characterization of F3GT1 and F3GGT1, two glycosyltransferases responsible for anthocyanin biosynthesis in red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*).”, *Plant J.*, 2011, **65**, 106-118.
105. S. Sawada, H. Suzuki, F. Ichimaida, M.A. Yamaguchi, T. Iwashita, Y. Fukui, H. Hemmi, T. Nishino, T. Nakayama, “UDP-glucuronic acid: anthocyanin glucuronosyl transferase from red daisy (*Bellis perennis*) flower. Enzymology and phylogenetics of a novel glucuronosyltransferase involved in flower pigment biosynthesis.”, *J. Biol. Chem.*, 2005. **280**, 899-906.
106. W. Offen, C. Martinez-Fleites, M. Yang, E. Kiat-Lim, B.G. Davis, C.A. Tarling, C.M. Ford, D.J. Bowles, G.J. Davies, “Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification.”, *EMBO J.*, 2006, **25**, 1396-1405.
107. T. Tohge, Y. Nishiyama, M.Y. Hira, M. Yano, J. Nakajima, M. Awazuhara, E. Inoue, H. Takahashi, D.B. Goodenowe, M. Kitayama, M. Yamazaki, K. Saito, “Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor.”, *Plant J.*, 2005, **42**, 218-235.
108. K.Y. Sakakibara. T. Tohge, R. Niida, K. Saito, “Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in Arabidopsis by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics.”, *J Biol Chem.*, 2007, **282**, 14932-14941.
109. 生城 真一, 榑 利夫, 安田 佳織, “グルクロン酸転移酵素の製造方法.”, 特許第 4918582 号.
110. 生城 真一, 榑 利夫, 安田 佳織, “出芽酵母を用いたグルクロン酸抱合体の製造 方法.”, 特許第 5051485 号.
111. 生城 真一, 榑 利夫, 安田 佳織, “出芽酵母形質転換体.”, 特許第 5207201 号
112. 生城 真一, “遺伝子改変出芽酵母株を用いた医薬品代謝物調製技術の開発.”, *滋賀医大誌*, 2014, **27**(1), a12-a14.
113. 岡庭 豊, “薬がみえる vol.4.”, *MEDIC MEDIA*.

114. 加藤 基浩, “薬物動態のイロハ.”, 南山堂.
115. 駒嶺 穆, “植物細胞培養と有用物質.”, シーエムシー出版.
116. 芦原 坦, 加藤 美砂子, “図説生物学 30 講植物学 5 代謝と生合成 30 講.”, 朝倉書店.
117. 中村 洋, “高速液体クロマトグラフィー ハンドブック” 日本分析化学会関東支部 編.
118. 中村 洋, “LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用” 公益社団法人 日本分析化学会 編.
119. 養王田 正文, “もっと知りたい! PCR 実験” 講談社.
120. W. Tuckmantel, A. P. Kozikowski, L. J. Romanczyk, “Studies in Polyphenol Chemistry and bioactivity. 1. Preparation of Building Blocks from (+)-Catechin. Procyanidin Formation. Synthesis of the Cancer Cell Growth Inhibitor, 3-*O*-Galloyl-(2R,3R)-epicatechin-4 β ,8[3-*O*-galloyl-(2R,3R)-epicatechin].”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 12073-12081.
121. P. Kozikowski, W. Tuckmantel, C. George, “Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 2. ¹Establishment of Interflavan Linkage Regio – and Stereochemistry by Oxidative Degradation of an *O*-Alkylated Derivative of Procyanidin B₂ to (R)-(-)-2,4-Diphenylbutyric Acid.”, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 5371-5381.
122. P. Kozikowski, W. Tuckmantel, G. Boettcher, L. J. Romanczyk, “Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 4. ¹ Synthesis of Trimeric, Tetrameric, Pentameric, and higher aoligomeric Epicatechin-Derived Procyanidins Having All-4 β ,8-Interflavan Connectivity and Their Inhibition of Cancer Cell Growth through Cell Cycle Arrest¹.”, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 1641-1658.
123. K. Ohmori, N. Ushimaru, K. Suzuki, “Oligomeric catechins: An enabling synthetic strategy by orthogonal activation and C (8) protection” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, **101**, 12002-12007.
124. H. Makabe, “Recent Syntheses of Proanthocyanidin.”, *Heterocycles.*, 2013, **87**, 2225–2248.
125. K. Oyama, K. Yoshida, T. Kondo, “Recent Progress in the Synthesis of Flavonoids: From Monomere to Supra-Complex Molecules.”, *Curr. Org. Chem.*, 2011, **15**, 2567-2607.
126. Y. Valero, J. Colina, E. Ineichen, “Effect of processing on the antioxidant capacity of the plum (*Prunus domestica*).”, *Arch Latinoam Nutr.*, 2012, **62**, 363-369.
127. S. Navindra, P. A. Lynn, S. Z. Yanjun, L. Rupo, S. Daniel, S. Henry, S. H. David, “Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 9329-9339.
128. 鈴木誠, 渡辺 敏郎, 三浦 麻子, 原島 恵美子, 中川 靖枝, 辻 啓介, “Folin-Danis 法による総ポリフェノール量測定のための抽出溶媒の検討.”, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.*, 2002, **49**, 507-511.
129. 前橋 健二, “甘味の基礎知識.”, *日本醸造協会誌.*, 2011, **106**, 818-825.
130. M. Dubois, K.A.Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith., “Colorimetric Method for Determination of Sugars and related Substances.”, *Anal. Chem.*, 1956, **3**, 350-356.
131. 正津晃, “基礎と臨床” ライフサイエンス出版, 1993, **27**, 985.

132. 北村進一, 中屋慎, “糖の定量法.” 生物工学会誌, 2012, **90**, 790-793.
133. J. Beeekwilder, H. Jonker, P. Meesters, R.D. Hall, M. Ingrid, “Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 3313-3320.
134. M. K. baranowska, D. Gold, M. Kula, M. Majdam, R. halasa, A. Matkowski, W. Kozłowska, A, Kawiak, “Chemical composition and biological activity of *Rubus ideaus* shoots – A traditional herbal remedy of Eastern Europe.”, *BMC Compl. Altern. Med.*, 2014, **74**, 480.
135. R. Kobori, S. Hashimoto, H. Koshimizu, S. Yakami, M. Hirai, K. Noro, T. Kawasaki, A. Saito, “Flavan-3-ols content in red raspberry leaves increases under blue LED-light irradiation.”, *Metabolites*, 2019, **9**, 56
136. 橋本 誠也, 大阪電気通信大学 2020 年度 修士学位論文.
137. R. Alonso, FJ. Berli, A. Fontana, P. Piccoli, R. Bottini, “Malbec grape (*Vitis vinifera* L.) responses to the environment: Berry phenolics as influenced by solar UV-B, water deficit and sprayed abscisic acid.”, *Plant Physiol Biochem.*, 2016, **13;109**, 84-90.
138. K.V. Kiselev, O.A. Aleynova, V.P. Grigorchuk, A.S. Dubrovine, “Stillbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis pathway genes in wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr.”, *planta.*, 2017, **245**, 151-159.
139. Y. Xu, MT. Charles, Z. Luo, D. Rolland,” Potential link between fruit yield, quality parameters and phytohormonal changes in preharvest UV-C treated strawberry.”, *Plant Physiol Biochem.*, 2017, **116**, 80-90.
140. IR. de Oliveira, GR. Crizel, J. Severo, CMGC. Renard, CV. Rombali, “Preharvest UV-C radiation influences physiological, biochemical, and transcriptional changes in staaawberry cv . camarose.”, *Plant Physiol Biochem.*, 2016, **108**, 391-399.
141. Y. Xu, MT. Charles, Z. Luo, B. Mimee, PY. Veronneau, D. Rolland, D. Roussel, “Preharvest ultraviolet C irradiation increased the level of polyphenol accumulation and flavonoid pathway gene expression in strawberry fruit.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **65**, 9970-9979.
142. Y. Zhang, L. Jiang, Y. LI, Q. Chen, Y. Ye, Y. Zhang, Y. Luo, B. Sun, X. Wang, H. Tang, “Effect of red and blue light on anthocyanin accumulation and differential gene expression in strawberry (*fragaria*×*ananassa*).”, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **23**, 820-837.
143. M. Loi, A. villani, F. Paciolla, G. Mula, C. Paciolla, “Challenges and Opportunities of Light Emitting Diode (LED) as Key to Modulate Antioxidant Compounds in Plants. A review.”, *Antioxidants (Basel)*, 2021, **10**, 42.
144. Y. Zhang, W. Hu, X. Peng, B. Sun, X. Wang, H. Tang, “Characterization of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in two strawberry genotypes during fruit development in response to defferent light qualities.”, *J Photochem Photobial B.*, 2018, **186**, 225-231.
145. 愛知県農業総合試験場, “LED を利用したイチゴの電照マニュアル” 平成 25 年 10 月.

146. 高 辻正基, “図解よくわかる植物工場” B&T ブックス日刊工業新聞社.
147. H. Zhang, J. Shen, Y. Wei, H. Chen., “Transcriptome profiling of litchi leave in response to low temperature reveals candidate regulatory genes and key metabolic events during floral induction.”, *BMC Genomics*, 2017, **18**, 363.
148. 小林俊 弘, “植物培養細胞とは”, 常陽新聞連載「ふしぎを追って」, 理化学研究所, <http://rtcweb.rtc.riken.jp/joyo2/D1201.html>.
149. 能村 港二, 駒嶺 穆, “植物の培養細胞系における細胞工学.”, 最新の科学技術., 1976, 748-755.
150. D. T. Nhut, N. P. Huy, N. T. Tai, N. B. Nam, V. Q. Luan, V. T. Hien, H. T. Tung, B. T. Vinh, T. C. Luan, “Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.”, *Biotechnol Biotechnol Equip.*, 2015, **29**, 299-308.
151. F. A. Almeida, E. M. Vale, R. S. Reis, C. S. Catarina, V. Silveira., “LED lamps enhance somatic embryo maturation in association with the differential accumulation of proteins in the Carica PAPAYA L. Golden embryogenic callus.”, *Plant Physiol Biochem.*, 2019, **143**, 109-118.
152. C. C. Chen, M. R. Lee, C. R. Wu, H. J. Ke, H. M. Xie, H. S. Tsay, D. C. Agrawal, H. C. Chang, “LED Light Affecting Morphogenesis and Isosteroidal Alkaloid Content in *Fritillaria cirrhosa* D. Don An Important Chinese Medicinal Herb.”, *Plant.*, 2020, **9**, 1351.
153. P. Kubica, A. Szopa, B. Prokopiuk, L. Komsta, B. Pawtowska, H. Ekiert, “The influence of light quality on the production of bioactive metabolites verbascoside, isoverbacoside and phenolic acid and the content of photosynthetic pigments in biomass of *Verbena officinalis* L. cultured *in vitro*.”, *J Photochem Photobiol B.*, 2020, **203**, 11768.
154. M. Nadeem, B. H. Abbasi, M. Younas, W. Ahmad, C. Hano, “LED enhanced biosynthesis biologically active ingredients in callus cultures of *Ocimum basilicum*.”, *J Photochem Photobiol B.*, 2019, **190**, 172-178.
155. J. Cheng, K. Yu, Y. Shi, J. Wang, C. Duan, “Transcription Factor VviMYB86 Oppositely Regulates Proanthocyanidin and Anthocyanin Biosynthesis in Grape Berries.”, *Front Plant Sci.*, 2021, **11**, 613677.
156. 山中 隆, “ブドウ細胞培養と代謝産物生産への応用.”, *植物組織培養*, 1994, **11**, 1-5.
157. F. Hashimoto, G. Nonaka, I. Nishioka, “Tannins and Related Compounds. LXIX. : Isolation and structure elucidation of B, B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from oolong Tea.”, *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, **36**, 1676-1684.
158. T. Tanaka, S. Watarumi, Y. Matuuo, M. Kamei, I. Kouno, “Production of theasinensin A and D, epigallocatechin gallate dimers of black tea, by oxidation reduction dismutation of dehydrotheasinensin A.” *Tetrahedron.*, 2003, **59**, 7939-7947.
159. N. Zhu, M. Wang, G.J. Wei, J.K. Lin, C.S. Yang, C.H. Ho, “Identification of reaction products

- (-)-epigallocatechin,(-)-epigallocatechingallateandpyrogallolwith2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical.” *Food Chem.*, 2001, 73, 345-349.
160. T. Hatano, M. Kusuda, M. Holi, S. Shiota, T. Tsuchiya, T. Yoshida, “Theasensin A, a tea polyphenol formed from (-)-epigallocatechin gallate, suppresses antibiotic resistance of methicillin-resisitant staphylococcus aureus.”, *planta Med.*, 2003, 69, 984-989.
161. T. Shii, M. Miyamoto, Y. Matsuo, T. Tanaka, and I. Kound, “Biomimetic one pot preparation of back tea polyphenol teasinensin A from epigallocatechin gallate by treatment with Capper(II) chloride and ascorbic acid.”, *Chem. Pharm. Bull.*, 2011, **59**, 1183-1185.
162. 八木 健介, “特許公報(B) テアシネンシンの製造方法”, 2013, 2008315488.
163. 吉岡 靖雄, 穂山 浩, 庄司 俊彦, 神田 智正, 松田 りえ子, 米谷 民雄, “公開特許公報 (A) 炎症性腸疾患予防剤.”, 2007, 特許 2005-75790.
164. 中居 正晃, 福井 裕子, 浅見 純生, 橋本 文雄, “リパーゼ阻害剤.”, 2008, 特許 528911.
165. 侯 徳興, 橋本 文雄, “抗炎症剤または抗炎症作用を有する飲食品.”, 2007, 特許 119412.
166. 富田 裕次, 寺井 清宗, 玉屋 圭, 前田 正道, 林田 誠剛, 徳嶋 智則, 田中 隆, 田中 一成, 西園 祥子, 松井 利郎, “発酵茶葉およびその製造方法、発酵茶葉抽出物ならびに飲食品.”, 2007, 特許 31009.
167. E. Dziadczyk, M. Domaciuk, P. Dziadczyk, I. Pawelec, E. Szczuka, J. Bednara, “Optimization of *in vitro* culture conditions influencing the initiation of raspberry (*Rubus idaeus* L. cv. Nawojka) cell suspension culture.”, *Annales C-Biologia.*, 2013, **68**, 2.
168. A. Tita, M. Bimonte, A. Carola, A. D. Lucia, A. Barbulova, A. Tortora, G. Colucci, F. Apone., “An oil-soluble extract of *Rubus idaeus* cells enhances hydration and water homeostasis in skin cell.”, *Int J Cosmet Sci.*, 2015, **37**, 588-594.
169. A. Barbulava, A. Tita, A. Carola, M. Bimomte, F. D. Laurentis, P. D’Ambrosio, F. Apone, G. Colucci, “Raspberry Stem Cell Extract to Protect Skin from Inflammation and Oxidative Stress.”, *Cosmetics & Toileteies.*, 2010, **125**, 7.
170. H. J. Kim, B. G. Kim, J.H. Ahn, “Biosynthesis of bioactive O -methylated flavonoids in *Escherichia coli*.”, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2013, **12**, 7197-7204.
171. S. Guan, D. Ge, T. Q. Liu, X. H. Ma, Z. F. Cui, “Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in culured neural stem cell.”, *Toxicol In Vitro.*, 2009, **23**, 201-208.
172. A. R. Cho, S. J. Lee, B. G. kim, J. H. Ahn, “Biosynthesis of three N-acetylaminosugar-conjugated flavonoids using engineered *Escherichia coli*.”, *Microb Cell Fact.*, 2016, **15**, 182.
173. S. Ikushiro, M. Nishikawa, Y. Masuyama, T. Shouji, M. Fujii, M. Hamada, N. Nakajima, M. Finel, K. Yasuda, M. Kamakura, T. Sakaki, “Biosynthesis of Drug Glucuronide Metabolites in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisias*.”, *Mol Pharm.*, 2016, **13**, 2274-2282.
174. M. Nishikawa, Y. Masuyama, M. Nunome, K. Yasuda, T. Sakaki, S. Ikushiro, “Whole-cell-dependent biosynthesis of sulfo conjugate using human sulfotransferase expressing budding

- yeast.”, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2018, **102**, 723-732.
175. 西村拓哉, 大阪電気通信大学 2018 年度 修士学位論文.
176. A. Saito, Y. Mizushina, A. Tanaka, N. Nakajima, “Versatile synthesis of epicatechin seres procyanidin oligomers, and their antioxidant and DNA polymerase inhibitory activity.”, *Tetrahedron.*, 2009, **65**, 7422-7428.
177. L. Wu, Y. Liu, Y. Qin, L. Wang, Z. Wu, “HPLC ESI-qTOF-MS/MS Characterization, antioxidant activities and inhibitory ability of digestive enzymes with molecular docking analysis of various parts of raspberry (*Rubus ideaus* L.).”, *Antioxidants (Basel).*, 2019, **8**, 274.
178. F. C. Huang, A. Giri, M. Daniilidis, G. Sun, K. Hartl, T. Hoffmann, W. Schwab, “Structural and functional analysis of UGT92G6 suggests an evolutionary link between mono- and disaccharide glycoside-forming transferases.”, *Plant Cell Physiol.*, 2018, **59**, 857-870.
179. A.E. Wilson, S. Wu, L. Tian, “PgUGT95B2 preferentially metabolizes flavones/flavonols and has evolved independently from flavone/flavonol UGTs identified in *Arabidopsis thaliana*.”, *Phytochemistry.*, 2019, **157**, 184-193.
180. P. Sun, R. Cai, L. Chen, Y. Li, H. Jia, M. Yan, K. Chen, “Natural product glycosylation: biocatalytic synthesis of quercetin-3,4'-O-diglucoside.”, *Appl Biochem Biotechnol.*, 2020, **190**, 464-474.
181. A. Chen, N. Gu, J. Pei, E. Su, X. Duan, F. Cao, L. Zhao, “Synthesis of Isorhamnetin-3-O-rhamnoside by a three-enzyme (Rhamnosyltransferase, Glycine Max Sucrose Synthase, UDP-Rhamnose Synthase) cascade using a UDP-Rhamnose Regeneration System.”, *Molecules.*, 2019, **24**, 3042.
182. Y. Hu, J. Min, Y. Qu, X. Zhang, J. Zhang, X. Yu, L. Dai, “Biocatalytic synthesis of calycosin-7-O-b-D-glucoside with uridine diphosphate-glucose regeneration system.”, *catalysis.*, 2020, **10**, 258.
183. R. Horiuchi, Y. Nishizaki, N. Okawa, A. Ogino, N. Sasaki, “Identification of the biosynthetic pathway for anthocyanin triglucoside, the precursor of polyacylated anthocyanin, in red cabbage.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2020, **68**, 9750-9758.
184. 流石 啓司, 神谷 真太郎, 中川 致之, “(+)-カテキン配糖体の化学合成と酵素阻害活性.”, *茶研報.*, 2000, **89**, 29-36.
185. D. Kahane, S. Walker, Y. Cheng, D. V. Engen, “Glycosylation of unreactive substrates.”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 6881-6882.
186. W. Koenigs, E. Knorr, “Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der galactose.”, *Chem Eur.*, 1901, **34**, 951-981.
187. R. R. Schmidt, J. Michel, “Facile synthesis of a- and b-O-glycosyl imidates; preoation of glycosides and disaccharides.”, *Angewandte Chemie.*, 1980, **19**, 731.
188. G. grundler, R. R. Schmidt, “Anwendung des trichloracetimidatverfahrens auf 2-desoxy-2-

- phthalimido-D-glucose-derivative. synthese von oligosacchariden der “Core-Region” von O-glycoproteinen des mucin-typs.”, *Cabohydrate Research.*, 1985, **135**, 203-218.
189. K. Ohmori, M. Tamiya, M. Kitamura, H. Kato, M. Oorui, K. Suzuki, “Regio- and stereocontrolled total synthesis of benanomicin B.”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 3871.
190. M. Tamiya, K. Ohmori, M. Kitamura, H. Kato, T. Arai, M. Oorui, K. Suzuki, “general synthesis route to benanomicin- pradimicin antibiotics.”, *Chem Eur.*, 2007, **13**, 9791.
191. T. Matsumoto, T. Hosoya, K. Suzuki, “Total synthesis and absolute stereochemical assignment of gilvocarcin M.”, *Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3568.
192. T. Hosoya, E. Takashiro, T. Matsumoto, K. Suzuki, “Total synthesis of the gilvocarcine.”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 1004.
193. G. Borges, A. Degeneve, W. Mullen, A. Crozier, “Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberry, red currants, and cranberry.”, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3901-3909.
194. O. folin, W. Denis, “A Colorimetric method for the determination of phenols (and derivatives) in urine.”, *J. Biol. Chem.*, 1915, **22**, 305-308.
195. R. J. Tiitto, “Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics.”, *J. Agric. Food Chem.*, 1985, **33**, 213-217.
196. J. F. Harbertson, J. A. Kennedy, D. O. Adams, “Tannin in skin and seeds of cabernet sauvignon, syrah, and pinoy noir berries during ripening.”, *Am. J. Enol. Vitic.*, 2002, **52**, 54-59.
197. A. C. Mella, A. p. Neira, J. N. Bastias, C. J. Campos, R. L. Solis, J. M. Canals, “Comparison of analytical methods for measuring proanthocyanidins in wine and their relationship with perceived astringency.”, *Int. J. food. Sci. Technol.*, 2013, **48**, 2588-2594.
198. F. Nanjo, K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, Y. Hara, “Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.”, *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, **21**, 895-902.
199. R. Re. N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. R. Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.”, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 9-10.
200. 五十嵐 脩, 島崎 弘幸, “過酸化質量・フリーラジカル実験法.”, 学会出版センター, 1994, 144-145.
201. Vitis VW cell line (rpc00004) was provided by the RIKEN BRC through the National BioResource Project of the MEXT/AMED, Japan
202. Vitis VR cell line (rpc00003) was provided by the RIKEN BRC through the National BioResource Project of the MEXT/AMED, Japan

謝辞

本研究を進めるにあたって終始指導いただきました大阪電気通信大学 大学院 工学研究科 先端理工学専攻 齊藤安貴子 教授に深く感謝いたします。また、お忙しい中、副審査をお引き受けていただいた大阪電気通信大学 大学院 工学研究科 先端理工学専攻 榎本博行 教授、森田成昭 教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導をいただきました京都大学 生存圏研究所 川崎崇 特任講師、富山県立大学 工学部生物工学科・生物工学専攻 機能性食品工学 生城真一 教授に心より感謝いたします。

共同研究をしていただきました大阪電気通信大学 大学院 工学研究科 制御機械工学専攻 入部正継 教授、和歌山大学 システム工学部 システム工学科 徳田献一 先生に心より御礼申し上げます。

共に研究を行ってきた齊藤研究室の卒業生の皆様、在学生の皆様を始めとするたくさんの方々に深く感謝いたします。研究以外の何気ない会話ややり取りも研究生活の楽しみであり、また、それが研究活動において大きな支えになりました。心より感謝いたします。

最後に私が博士後期課程に進学するに対して理解、協力をして頂きました家族・友人、研究するにあたり、助言、指導をして頂いたすべての方に感謝いたします。

業績

〈学術論文〉

1. Ryo Kobori, Seiya Hashimoto, Hayato Koshimizu, Shuich Yakami, Mizuki Hirai, Kenta Noro, Takashi Kawasaki, Akiko Saito. “Flavan-3-ol Content in Red Raspberry Leaves Increases under Blue Led-Light Irradiation.” *Metabolites*, **2019**, 9, 56.
2. Mizuki Hirai, Ryo Kobori, Ryo Doge, Issei Tsuji, Akiko Saito. “Efficient Concentration of Functional Polyphenols Using Their Interaction with Gelatin.” *Foods.*, 2021, **10**, 698.
3. Ryo Kobori, Shuich Yakami, Takashi Kawasaki, Akiko Saito. “Changes in the Polyphenol Content of Red Raspberry Fruits during Ripening.” *horticulturae*, **2021**, 7, 569.

〈著書〉（分担執筆）

4. 平井瑞輝、小堀亮、道下僚、齊藤安貴子、第3章応用・製品編「緑茶カテキン誘導体の合成」、茶ポリフェノールの生理機能と応用展開、CMC 出版、2019年8月出版

〈国際会議プロシーディング〉

5. Mutsuki Kanda, Kenichi Tokuda, Masatsugu Iribe, Shigeaki Morita, Akiko, Saito, Shuich, Yagami, Ryo Kobori. “Evaluation of raspberry harvesting by Raspberry-Pi: -Part 1: Trial of machine learning considering the result of spectral analysis of berries-.” *Jsmernmd*, **2017**, 1A1-C02.
6. Masatsugu Iribe, Akiko. Saito, Tsukasa Kondo, Mami Nakagawa, Atsushi Unose, Takuya Kimura, Shuich Yagami, Ryo Kobori, Kenichi Tokuda, Shigeaki Morita, “Automated system development for raspberry harvesting: -Part 1: Whole system design and Harvesting End effector mechanism development-.” *Jsmernmd*, **2017**, 1A1-D05.
7. Mutsuki Kanda, Kenichi Tokuda, Masatsugu Iribe, Shigeaki Morita, Akiko, Saito, Shuich, Yagami, Ryo Kobori. “Evaluation of raspberry harvesting by Raspberry-Pi: -Part 3: Filter Selection for Multispectral Camera-.” *Jsmernmd*, **2018**, 1A1-A01.
8. Kenichi Tokuda, Mutsuki Kanda, Masatsugu Iribe, Shigeaki Morita, Akiko Saito, Shuich Yagami, Ryo Kobori, “Evaluation of raspberry harvesting by Raspberry-Pi -5th report: Filter Selection for Multispectral Camera-.” *Jsmernmd*, **2019**, 1A1-D02.
9. Ryo Kobori, Seiya Hashimoto, Hayato Koshimizu, Takashi Kawasaki, Akiko Saito, “Changes in polyphenol content in raspberry by cultivation environment.” *MATEC Web Conf*, **2021**, 333.
10. 小堀亮、橋本誠也、川崎崇、齊藤安貴子、“機能性フラボノイドの生産検討”，第62回天然有機化合物討論会

〈国際学会発表〉

11. ○Ryo Kobori, Seiya Hashimoto, Hayato Koshimizu, Takashi Kawasaki, Akiko Saito. “Changes in polyphenol content in raspberry by cultivation environment”APCCChE 2019 (2019年9月23-27日、札幌、ポスター発表)
12. ○Mizuki Hirai, Ryo Kobori, Seiya Hashimoto, Hayato Koshimizu, Akiko Saito. “Functionality of polyphenolic compounds binding to gelatin strongly”APCCChE 2019(2019年9月23-27日、札幌、ポスター発表)
13. ○Daiki Taga, Ryo Kobori, Koji Tsurumi, Akiko Saito. “Analytical study of processing-induced changes in polyphenol compounds contained in red raspberries”APCCChE 2019 (2019年9月23-27日、札幌、ポスター発表)
14. ○Seiya Hashimoto, Ryo Kobori, Akiko Saito “Polyphenol composition and radical scavenging activity of methanol or ethanol extracts from raspberry leaves” JSBBA KANSAI 6th Student Forum (2019年11月30日、京都、ポスター発表)
15. ○Ryo Kobori, Seiya Hashimoto, Takashi Kawasaki, Akiko Saito “Consideration on the relationship between the change of raspberry cultivation condition and the amount of flavan-3-ol derivatives” ICoFF2019 (2019年12月1-5日、神戸、ポスター発表)

〈国内学会発表〉(口頭発表)

16. ○八上修一、小堀亮、平井瑞輝、奥井志穂、重金大貴、藤見佳奈、堀潤治、齊藤安貴子
「水耕栽培ラズベリー抽出液における食機能性ポリフェノール分析研究」日本フードファクター学会 (2016年11月、富山)
17. ○小堀亮、八上修一、西村拓哉、道下僚、奥井志穂、重金大貴、川崎崇、齊藤安貴子
「ラズベリー‘ヒンボートップ’種のポリフェノール類分析と機能性評価研究」日本農芸化学会全国大会 (2017年3月、京都)
17. ○西村拓哉、柴崎亨、濱田義知、小堀亮、西野祐樹、川崎崇、齊藤安貴子
「シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖体合成研究」日本農芸化学会全国大会(2017年3月、京都)
18. ○小堀亮、北岡望、岩崎大地、道下僚、八上修一、福島淳仁、川崎崇、齊藤安貴子
「ラズベリーに含まれるフラバン-3-オール誘導体の分析研究」日本農芸化学会 関西支部会(2017年9月、大阪)
19. ○西村拓哉、小堀亮、宮形知美、柴崎亨、川崎崇、齊藤安貴子
「フラバン-3-オール誘導体の配糖体の合成研究」日本農芸化学会 関西支部会(2017年9月、大阪)
20. ○小堀亮、西村拓哉、宮形知美、恒川昂平、川崎崇、齊藤安貴子
「機能性フラバン-3-オール誘導体の効率的生産に向けた検討と生物活性評価」日本農芸化学会全国大会 (2018年3月、名古屋)

21. ○北岡望、西村拓哉、小堀亮、八上修一、橋本誠也、齊藤安貴子
「微生物を用いたプロアントシアニジン分析・代謝物の機能性評価」日本農芸化学会全国大会 (2018年3月、名古屋)
22. ○小堀亮、西村拓哉、多賀大輝、橋本誠也、輿水駿、川崎崇、齊藤安貴子
「ポリフェノールを多く含む植物の培養細胞を用いた flavan-3-ol 誘導体合成」日本農芸化学全国大会 (2019年3月、東京)
23. ○橋本誠也、輿水駿、小堀亮、多賀大輝、辻一成、川崎崇、齊藤安貴子
「青色LED光を使用して栽培したラズベリー中のポリフェノール成分変化」日本農芸化学全国大会 (2019年3月、東京)
24. ○橋本誠也、輿水駿、小堀亮、多賀大輝、辻一成、川崎崇、齊藤安貴子
「ラズベリー葉の生育ステージによるポリフェノール成分変化」日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同神戸大会(2019年9月、神戸)
25. 松坂祐哉、○小堀亮、西村拓哉、川崎崇、齊藤安貴子
「遺伝子組み換え大腸菌 UGT78D2 を用いたフラボノイド変換反応」日本農芸化学全国大会 (2020年3月、福岡)
26. ○橋本誠也、輿水駿、辻一成、小堀亮、川崎崇、齊藤安貴子
「植物工場ユニット内で栽培したラズベリー葉中ポリフェノール成分の生産量変化」日本農芸化学全国大会 (2020年3月、福岡)
27. ○小堀亮、齊藤安貴子
「ラズベリー培養細胞を用いたフラボノイド変換反応」日本農芸化学全国大会 (2021年3月、仙台)
28. ○小堀亮、道下僚、高江桃花、齊藤安貴子
「ラズベリー花に含まれるポリフェノール化合物の分析研究」日本農芸化学全国大会 (2022年3月、京都)

〈国内学会発表〉(ポスター発表)

29. ○入部正継、齊藤安貴子、近藤吏、中川真美、鶴瀬篤志、木村拓弥、八上修一、小堀亮、徳田献一、森田成昭「ラズベリー収穫自動化システムの開発 ～第一報：システム設計と収穫用エンドエフェクタ機構の開発～」ロボティクス・メカトロニクス講演会 (2017年5月、福島)
30. ○神田睦月、徳田献一、入部正継、森田成昭、齊藤安貴子、八上修一、小堀亮
「Raspberry Pi を用いたラズベリーの収穫可否判定～第一報：果実の分光分析結果を考慮した機械学習の試み」ロボティクス・メカトロニクス講演会(2017年5月、福島)
31. ○小堀亮、道下僚、宮形知美、八上修一、西村拓哉、北岡望、奥井志穂、野呂健太、柴崎亨、川崎崇、齊藤安貴子「機能性フラバン-3-オール誘導体の効率的生産に向けた検討と生物活性評価」新規素材探索学会 (2017年、神奈川)

32. ○西村拓哉、柴崎亨、濱田義知、小堀亮、川崎崇、齊藤安貴子、
「シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2(+)-カテキン-ガロイル誘導体の配糖体合成研究」新規素材探索学会 (2017年、神奈川)
33. ○神田睦月、徳田献一、入部正継、森田成昭、齊藤安貴子、八上修一、小堀亮
「Raspberry Pi を用いたラズベリーの収穫可否判定」第18回計測自動制御学会 SI 部門講演会(2017年12月、仙台)
34. ○橋本誠也、小堀亮、山本祥大、八上修一、齊藤安貴子
「ラズベリー果実・葉に含まれるフラバン-3-誘導体の分析と機能性評価」新規素材探索学会 (2018年、神奈川)
35. ○神田睦月、徳田献一、入部正継、森田成昭、齊藤安貴子、八上修一、小堀亮
「Raspberry Pi を用いたラズベリーの収穫可否判定 第三報：マルチスペクトルカメラ化のためのフィルター選択」ロボティクス・メカトロニクス講演会(2018年6月、北九州)
36. ○平井瑞樹、小堀亮、八上修一、恒川昂平、橋本誠也、多賀大輝、齊藤安貴子
「ラズベリーに含まれる機能性物質の定量と栽培法や加工による成分変化解析」日本食品工学会 (2018年8月、茨城)
37. ○小堀亮、西村拓哉、橋本誠也、多賀大輝、輿水駿、川崎崇、齊藤安貴子
「ラズベリーに含まれるフラバン-3-オール誘導体の分析研究」日本フードファクター学会 (2018年9月、京都)
38. ○西村拓哉、小堀亮、西野祐樹、道下僚、辻一成、川崎崇、齊藤安貴子
「シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 の基質特異性を評価するための新規フラバン-3-オール誘導体合成研究」日本フードファクター学会 (2018年9月、京都)
39. ○神田睦月、徳田献一、入部正継、森田成昭、齊藤安貴子、八上修一、小堀亮
「Raspberry Pi を用いたラズベリーの収穫可否判定」第19回計測自動制御学会 SI 部門講演会(2018年12月、大阪)
40. ○徳田献一、神田睦月、入部正継、森田成昭、齊藤安貴子、八上修一、小堀亮
「Raspberry Pi を用いたラズベリーの収穫可否判定 第五報：果実の反射分光を用いた熟度判定法」ロボティクス・メカトロニクス講演会(2019年6月、広島)
41. ○多賀大輝、小堀亮、齊藤安貴子
「ラズベリーの花・蕾に含まれるポリフェノール化合物の分析研究」新規素材探索学会 (2019年、神奈川)
42. ○小堀亮、多賀大輝、川崎崇、齊藤安貴子
「ブドウ培養細胞 (*Vitis vinifera* L.)を用いたフラボノイド変換研究」第37回 日本植物細胞分子生物学会 (2019年9月、京都)
43. ○小堀亮、橋本誠也、川崎崇、齊藤安貴子
「機能性フラボノイドの生産検討」第62回天然有機化合物討論会 (2020年9月、名古屋)

44. ○小堀亮、齊藤安貴子
「ラズベリー培養細胞のフラボノイド化合物生産能検討」日本ポリフェノール学会 (2021年9月、岐阜)
45. 橋本誠也、○山口祥一、小堀亮、齊藤安貴子
「LED 光照射によるラズベリー葉中に含まれるポリフェノール化合物量や糖量の変化」日本ポリフェノール学会 (2021年9月、岐阜)
46. ○小堀亮、道下僚、石丸拓実、齊藤安貴子
「UGT78D2 遺伝子導入大腸菌によるポリフェノール配糖体と SAR 研究」日本フードフエクター学会 (2021年11月、奈良)