

東海大学紀要 農学部

第 41 卷

2 0 2 2

-
- 高度好塩菌由来 L- アスパラギン酸脱水素酵素の構造機能解析
.....米田一成・荒木朋洋..... 1
- インジゴ還元酵素を利用した酵素化学実験の教材化
.....米田一成・吉岡観沙・山下秀次・山口 浩・荒木朋洋..... 9
- キンカン属 (*Fortunella*) 植物の形態的特徴と果実特性
.....安田喜一・八幡昌紀・國武久登.....17
- カンキツ属 4 種とキンカン属 5 種を用いたカンキツ類の遺伝解析に有用な SSR マーカーの選定
.....安田喜一・戸村大河・佐藤真衣・富永晃好・八幡昌紀・國武久登.....29
- Acetaminophen 硫酸体の有機合成
.....森田千紘・谷口玲央真・吉田実央・徳永祐希・木下英樹
小野政輝・黒木勝久・榊原陽一・水光正仁・安田 伸.....39

高度好塩菌由来 L- アスパラギン酸脱水素酵素の 構造機能解析

米田一成^{1, 3, 4, 5} · 荒木朋洋^{2, 3, 4}

Structural analysis and enzymatic characterization of extremely halophilic L-aspartate
dehydrogenase

Kazunari YONEDA and Tomohiro ARAKI

(Received 29 June 2021; accepted 5 July 2021)

Abstract

We succeeded in finding a gene (Halar_1793; Halo-aspDH) annotated as L-aspartate dehydrogenase (L-aspDH) from the genomic information of the *Halophilic archaeon* DL31. The Halo-aspDH gene was artificially synthesized, expressed in *Escherichia coli*, and purified using a His-tag affinity column. After cleaving the His-tag sequence, the N-terminal amino acid sequence was analyzed using a protein sequencer. The resulting sequence was in complete agreement with the predicted N-terminal amino acid sequence. However, L-aspDH activity was not detected upon activity measurement and staining. Further, L-aspDH activity could not be detected even after various salt and heat treatments. Nevertheless, we revealed for the first time that Halo-aspDH is an enzyme with extremely high thermal stability, which does not inactivate heat even after treatment at 100 °C for 10 min.

The three-dimensional structure of Halo-aspDH was predicted by homology modeling based on the three-dimensional structure of L-aspDH from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. The predicted three-dimensional structure of Halo-aspDH was very similar to the overall structure of *A. fulgidus* L-aspDH (RMSD = 0.130 Å), but its surface charge showed a significant negative inclination. Further, it demonstrated the structural characteristics of halophilic enzymes. Although the obtained results are preliminary, they can provide useful information for future structural and functional analyses of amino acid dehydrogenases.

緒言

L-アスパラギン酸脱水素酵素 (L-aspDH) は L-アスパラギン酸からイミノアスパラギン酸への脱水素反応を触媒する NAD⁺ 依存性脱水素酵素である。L-aspDH はバクテリアおよび好熱菌では補酵素 NAD (P)⁺ 生合成経路に関与する酵素であることがすでに報告されており、X線結晶構造解析により立体構造もすでに明らかになっている酵素である (1, 2)。我々はこれまでに超好熱菌 *Archaeoglobus fulgidus* L-aspDH の結晶構造解析を行うと共に、L-aspDH の酵素化学的性質や基質認識機構、NAD

(P)⁺ 生合成経路にどのように関与するのかを明らかにしてきた。また、本酵素は食品中や血中のアミノ酸定量用酵素として有用な酵素であり、安定性の高い酵素の取得を目的として、好熱菌由来の酵素が単離・精製されているが、好塩性 L-aspDH は未だに報告例が無いのが現状である (3-5)。食品の傷みを防ぐ目的で貯蔵や加工には高濃度の塩が使用されている。塩蔵食品中のアミノ酸を定量する場合、好塩性の L-aspDH であれば、塩に影響されることなく食品中のアミノ酸を簡便に定量することが可能になると考えられる。そこで、KEGG ゲノムネット統合データベースを利用し、*A. fulgidus* L-aspDH

¹ 東海大学農学部バイオサイエンス学科

² 東海大学総合農学研究所

³ 東海大学大学院農学研究科

⁴ 東海大学大学院生物科学研究科

⁵ 東海大学先進生命科学研究所

連絡先：米田一成 e-mail: kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp

と相同性を有する好塩菌由来の L-aspDH 遺伝子を検索した結果, *A. fulgidus* L-aspDH に28.95%とわずかではあるが, 高度好塩菌 *Halophilic archaeon* DL31由来 L-アスパラギン酸脱水素酵素 (Halo-aspDH) とアノテーションされている遺伝子 (Halar_1793) を見出した. Halo-aspDH のアミノ酸配列の特徴を解析すると, 脱水素酵素活性に必須な補酵素 NAD⁺ の結合モチーフ (GXGXXG), が厳密に保存されているだけでなく, *A. fulgidus* L-aspDH において触媒に関与することがすでに明らかになっているヒスチジン残基 (His189) が完全に保存されていた. そこで, 本研究では高度好塩菌由来 L-aspDH の構造機能解析を行うことを目的として, Halo-aspDH 遺伝子の合成および, 大腸菌における大量発現系の構築を行うと共に, 構造解析と酵素化学的実験を行った.

材料および方法

試薬

制限酵素 *Nde*I, *Bam*HI は New England Biolabs Japan (東京) から購入した. Ligation high は東洋紡 (大阪) より購入した. 電気泳動用アガロース, IPTG (イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド), 牛血漿由来トロン

ビン, L-アスパラギン酸ナトリウム, NAD⁺ はナカライテスク (京都) より入手した. 宿主細胞である BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL および, SHuffle T7 express competent *E. coli* はそれぞれ, Agilent Technologies (米国), New England Biolabs Japan (東京) より入手した. 人工遺伝子合成および, DNA シーケンス解析は株式会社ファスマック (神奈川) に依頼した. QIAprep Spin Miniprep kit および, pET22b ベクターはそれぞれ, キアゲン (ドイツ), Novagen (米国) より入手した. コバルトアフィニティーカラムである Talon はタカラバイオ (滋賀) より入手した. タンパク質結晶化キットである Wizard 1, 2, Wizard 3, 4 および, Cryo 1, 2 は Rigaku (東京) から購入した. 96穴結晶化プレートは Rigaku (東京) より購入した. その他の試薬は市販の特級または生化学用試薬を用いた.

Halo-aspDH の pET15b ベクターへのクローニング

H. archaeon DL31由来 Halo-aspDH をコードする遺伝子の合成は株式会社ファスマックに依頼した. Halo-aspDH (Halar_1793) の塩基配列は, GC 含量が高く遺伝子合成が難しいため, Halo-aspDH のアミノ酸配列に基づいて *E. coli* のコドンに最適化した塩基配列を合成し

Table 1. Nucleotide sequence of the gene encoding Halo-aspDH. The restriction sites and start and stop codons are shown in underlined and bold font, respectively.

Gene sequence	
Halo-aspDH codon optimize (<i>E.coli</i>)	
1	<u>CAT</u> ATG TCC TAT CGC ATT GGG CTC ATT GGG TAT GGC CGC ATT GGC
46	AAG GAC TTT GCC GAT CGT GTT CGC GCG GAT TCT GCG TTT GAG CTG
91	GCG TAC GTG TAT GTC CGC AGC TTG AAA CCC GAA CTG CCG GAG TCG
136	ATT CAG TCT ACC GAG CCT GCA GCC CTG GCA GCC ACA CCA GTC GAT
181	GCG GTG GTA GAA GCG GCT ACG CCA GGC GCG TTA GAA GCA CTT GCT
226	GAA CCG GCG TTA GAA GGT GGC GAT CTG TTT GTC CTG TCA GGT AGC
271	GCC TTT GCG GAC CCA GCA GTG GAG GAA CGT CTG CGT GCG CTG ACG
316	ACG AAT TCG GAC AAT GAC CTG TAT CTG CCG CAT GCA GCA CTG TTT
361	GGT ATC GAC GGT TTA GCC GAT GCA CGG GAT GAG CTT ACC AGC GTC
406	CAC ATT GAG GCC ACC AAA GCT CCG GAT CAC CTT GAT TTC GAG TAT
451	GCG GAT ACG GAA CGT CCG GAA GGC ATC GAT GGT CCG ACC GTA ATC
496	TAC GAA GGG CCT ACT CGC GGC TTG TGC AAA CGC TTT CCG CGC AAC
541	TTC AAC TCC CAT GCT GCC ATG GCG ATG GCC GGC CTG GGA CTG GAC
586	GAA ACC ACC AGT CGT TTG GTG GCT GAT CCC GAA GCG GAA ACA GCG
631	AAA CAT GTG ACG ACT GCA GAA GGT GAA GGC TTC GAA CTC GAA GCC
676	GTT CGG GAC AGT GAC ATT GCC GGT GTA ACC GGA GAT TAC ACC CTG
721	GTG TCA ACT TGG GGT AGC GTT CGT CGC GTT CTC CGC GCT GAT GAT
766	GGC CCG CAA TTC ATC TAA <u>GGA</u> TCC

た (Table 1; Halo-aspDH codon optimize [*E.coli*]). 遺伝子合成した pUC19/Halo-aspDH を *NdeI*, *BamHI* で制限酵素処理し, アガロースゲル電気泳動した後, 約800 bp のバンドを切り出し抽出することで精製した. pET15b もベクターと同様に *NdeI*, *BamHI* で制限酵素処理後, 精製を行い, 16°C 3時間ライゲーション反応を行い pET15b/Halo-aspDH の作製を行った. 高純度なプラスミド DNA の調製には QIAprep Spin Miniprep kit を用いた.

Halo-aspDH の発現および精製

pET15b/Halo-aspDH を用い, 大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL の形質転換を行った. 形質転換した大腸菌を 50 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む LB 平板寒天培地にプレーティングし, 37°C でインキュベートした. 形成したコロニーを 50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含む LB 培地 (トリプトン 1.0 g, 酵母エキス 0.5 g, NaCl 1.0 g) 100 ml に接種し, 37°C で $\text{OD}_{600}=0.6$ になるまで振とう培養した後, 1 mM になるように IPTG を加え Halo-aspDH の発現を誘導し, さらに 20°C で 16 時間振とう培養した. 培養終了後, 遠心分離 (6,000 rpm, 10 分間) により集菌を行い, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 50 ml に懸濁した. 菌体懸濁液を超音波破碎し, 遠心分離 (12,000 rpm, 10 分間) により得られた上清を粗酵素液とした. Halo-aspDH 精製には親和性クロマトグラフィーである Talon コバルトアフィニティーカラムクロマトグラフィー (His-tag アフィニティーカラム) を使用した. 平衡化バッファーには 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5 mM イミダゾールを用い, 溶出バッファーには平衡化バッファー中に 0.3 M イミダゾールを含むバッファーで溶出を行った. 酵素精製の確認には SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いた.

トロンピンを用いた His-tag の切断および N 末端アミノ酸配列分析

Halo-aspDH の N 末端に付加されている His-tag 配列の切断にはトロンピン (牛血漿由来) を用いた. トロンピンによる切断は Halo-aspDH 精製酵素 (2.2 mg/ml), 切断バッファー (10 mM Tris-HCl buffer [pH 8.0], 0.5 M NaCl, 2.5 mM CaCl_2), トロンピン (2.5 U) を用いた. 酵素反応を 4°C で 16 時間行い, SDS-PAGE で His-tag 切断の確認を行った. その後, PVDF 膜に転写し, N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (Shimadzu PPSQ-51A) を用いて 15 残基分析した.

L-aspDH の活性測定

NAD^+ 依存性 L-aspDH の酵素活性測定 (酸化的脱アミノ反応) は下記の活性測定用反応溶液を用いて行った. すなわち, 0.1 M グリシン/NaOH (pH 10), 10 mM L-アスパラギン酸ナトリウム, 1.25 mM NAD^+ , 精製酵素, Milli-Q 水が合計 1 ml になるように調製した. NAD^+ 以外の反応溶液を光路長 1 cm のキュベットに入れて混合した後, NAD^+ を添加して波長 340 nm における 1 分間の吸収の増加量 (NADH の増加量) を分光光度計 (Hitachi U-2910) を用いて室温で測定した. 酵素濃度の測定には Bradford 色素結合法を用い, 検量線作成のための標準タンパク質はウシ血清アルブミン (BSA) を用いた.

不活性型酵素を塩で処理することにより, 活性を有す成熟型へ変化する可能性があるため, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, NH_4Cl , LiSO_4 , KNO_3 , 尿素, ギ酸をそれぞれ終濃度が約 4 M になるように添加し, 1 時間後および, 4 時間後に活性測定を行った. また, 熱による酵素の成熟化の可能性も考えられたため, 20°C ~100°C の各温度で 10 分間熱処理後, 遠心分離 (12,000 rpm, 10 分間) を行い, その上清を L-aspDH 活性測定に供した. 活性染色には, フェナジンメトサルフェート (PMS) および, 臭化 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム (MTT) を用いた.

Halo-aspDH の結晶化

Amicon Ultra-15 (NMWL 10 kDa, Millipore, 米国) を使用し精製酵素を 2.6 mg/ml まで濃縮後, 補酵素である NAD^+ を終濃度 1 mM になるように加えたホロ酵素を調製後, シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化スクリーニングを行った. すなわち, 96 穴結晶化プレートを使用し, 精製酵素 2 μl とリザーバー溶液 2 μl を混合した後, リザーバー溶液 100 μl と共に密閉し, 暗所 (20°C) で約 2 ヶ月静置した.

ホモロジーモデリングによる Halo-aspDH の立体構造予測

Halo-aspDH のホモロジーモデリングは, SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) を使用した. ホモロジーモデリングのテンプレートには, 超好熱菌 *A. fulgidus* 由来 L-aspDH (PDB ID; 2DC1, 同一性 28.95%) (2) を使用した.

結果および考察

Halo-aspDH の発現および精製

His-tag アフィニティーカラムにより Halo-aspDH の精製を行い、SDS-PAGE に供した結果、0.3 M のイミダゾール溶出画分でメインバンドが得られ、ほぼ単一に精製する事に成功した (Fig. 1)。サブユニット分子量は約 28 kDa であり、アミノ酸配列から予測される分子量と

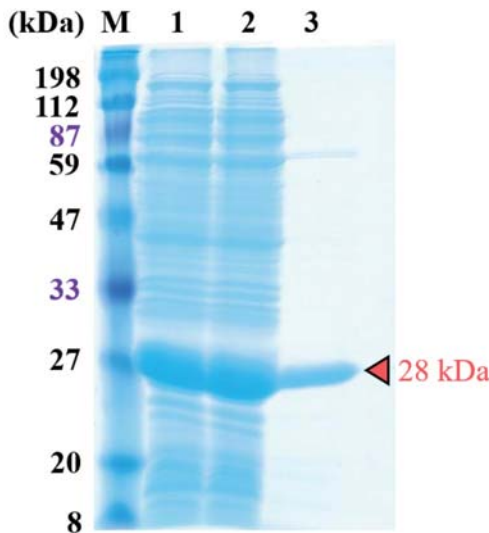


Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of recombinant Halo-aspDH. Lane M, marker proteins; Lane 1, crude extract; Lane 2, flow-through fraction; Lane 3, purified Halo-aspDH.

L-aspDH 活性の検出

精製酵素を用いて NAD^+ 依存性 L-アスパラギン酸脱水素酵素活性の測定を行った。酸化的脱アミノ反応の基質として、L-アスパラギン酸を用いたが、活性の検出はできなかった。さらに、高感度に活性を検出できる、活性染色法でも L-aspDH 活性を検出することはできなかった。ソニケーションバッファーや精製バッファー中に 2.0 M NaCl を添加した状態で精製を行っても活性は検出できず、宿主細胞を大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL から SHuffle T7 express competent *E. coli* に変更しても活性が検出されることは無かった。

好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) では、高濃度の塩で処理することにより、活性を有す成熟型へ変化することがすでに報告されている (6)。そこで、各種の塩や 20°C ~100°C の熱処理によって成熟型の酵素として活性が検出されるか検証したが、L-aspDH 活性は検出できなかった。しかし、100°C 10分間の熱処理後、遠心分離を行っ

一致しており、約 7.8 mg の精製酵素を得ることができた。

His-tag 配列を切断後、プロテインシーケンサーを用いて N 末端アミノ酸配列の分析を行った結果、SHMSYRIGLIGYGRI の配列が検出された。下線部の His-tag 残存配列以外の 13 残基は Halo-aspDH の予測される N 末端アミノ酸配列と完全に一致していることから、好塩菌由来 L-aspDH の発現、精製に成功したと言える。

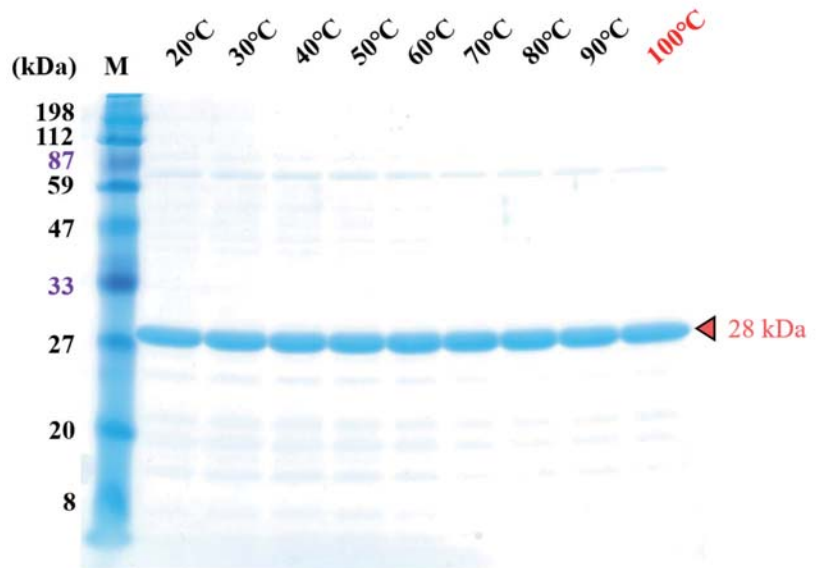


Fig. 2. Thermal stability of Halo-aspDH. After incubating for 10 min at the indicated temperatures, the enzyme samples were analyzed by SDS-PAGE.

ても、熱失活した酵素の沈殿は確認できず、SDS-PAGE においてもメインバンドが確認できることから、本酵素は熱安定性が非常に高い酵素であることを初めて明らかにすることができた (Fig. 2)。

超好熱菌 *A. fulgidus* L-aspDH の結晶構造は、すでに我々が明らかにしており (2)、その立体構造情報から補酵素および基質の結合に関わるアミノ酸残基を特定している。そこで、*A. fulgidus* L-aspDH と Halo-aspDH のアミノ酸配列を比較したところ、Halo-aspDH では NAD^+ 結合モチーフである $^9\text{GXGXG}^{14}$ のグリシンリッチな配列は完全に保存されており、本酵素は補酵素 NAD^+ を利用する L-aspDH であることが示唆された (Fig. 3)。また、*A. fulgidus* L-aspDH において触媒に関与するアミノ酸残基である His189 は Halo-aspDH では、His211 として完全に保存されていた (Fig. 3)。その他にも基質の結合に関与すると考えられるアミノ酸残基にもわずかではあるが、類似性が見られることから、Halo-aspDH は L-aspDH として機能する酵素であることが推測される。

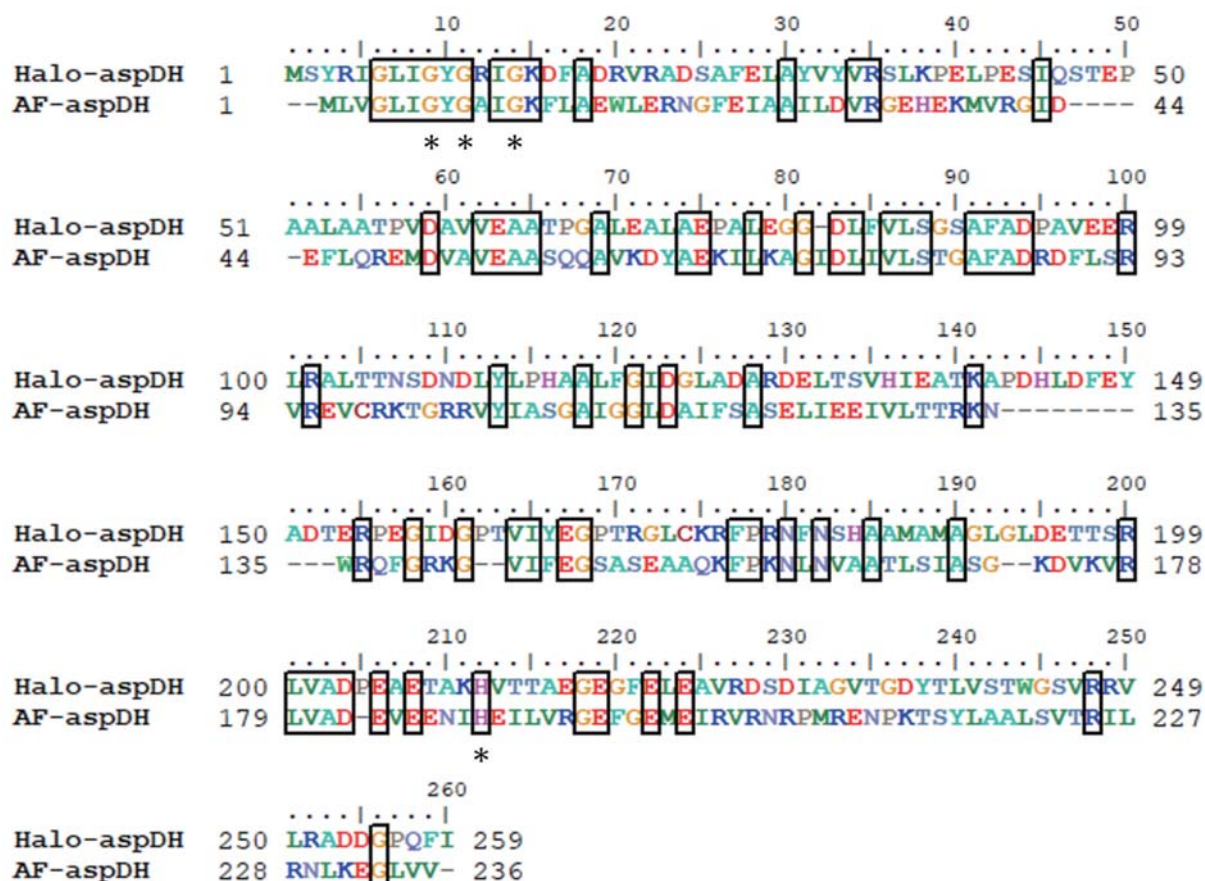


Fig. 3. Amino acid sequence alignment of Halo-aspDH and *A. fulgidus* L-aspDH. Sequences were aligned using CLUSTALW (8). The boxes indicate conserved residues. The asterisks represent the 9thGXGXG¹⁴ and catalytic His211 residues.

Halo-aspDH の結晶化およびホモロジーモデリング

本研究では Halo-aspDH の発現と精製には成功したが、L-aspDH 活性の検出には至らなかった。アミノ酸配列の比較により、超好熱菌 *A. fulgidus* L-aspDH ですでに明らかになっている触媒に関わるアミノ酸残基 (His211) や、補酵素 NAD⁺ の結合に関わるアミノ酸残基 (Gly9~Gly14)、基質の結合に関わるアミノ酸残基 (Lys140, Asn181) も Halo-aspDH には存在するが、活性が全く検出できていない (Fig. 3)。酵素活性が検出できない原因の解明だけでなく、基質結合部位の構造や好塩性、耐塩性のメカニズム解明のためにも酵素の立体構造情報は重要であると考えられる。そこで、結晶化条件を約300条件スクリーニングしたが、Halo-aspDH の結晶は取得できなかった。液体培地の容量を200 ml~400 ml に増やして培養・精製を行った後、酵素の濃縮を行っても3 mg/ml 以上の濃度の酵素を調製することが難しいことから、本酵素は溶解度が低い難結晶化酵素であると考えられる。そこで、超好熱菌 *A. fulgidus* 由来 L-aspDH の立体構造に基づいてホモロジーモデリングによる立体構造予測を行った。ホモロジーモデリングで得られた

Halo-aspDH の立体構造と *A. fulgidus* L-aspDH の全体構造を比較したところ、非常に類似していることを明らかにした (主鎖原子の RMSD = 0.130 Å, 154残基の C α を使用), (Fig. 4)。さらに、両酵素の表面電荷 (静電ポテンシャル) を比較したところ、好塩菌由来の Halo-aspDH では表面電荷が大きくマイナスに傾いた酸性タンパク質であることが明らかになり、好塩菌の酵素に特徴的な構造が観察された (Fig. 5)。Halo-aspDH と *A. fulgidus* L-aspDH の酸性アミノ酸残基数の総数 (Asp + Glu) を比較したところ、それぞれ45個および、34個であり、Halo-aspDH の方が酸性アミノ酸残基数が多く、表面電荷がマイナスに偏りやすいことを明らかにした。豊富な酸性アミノ酸残基は好塩性タンパク質の表面を負電荷でおおっている。この表面の負電荷に塩イオン (カチオン) とそれに結合した水分子が多量に群がり、hydrated ion network を形成して水和殻を作り、高濃度塩存在下でのタンパク質の安定性と機能性を維持しているとされている (7)。熱安定性の要因は、*A. fulgidus* L-aspDH においてはサブユニット間の静電的相互作用 (イオンペアネットワーク; Glu201, Arg203) が主要

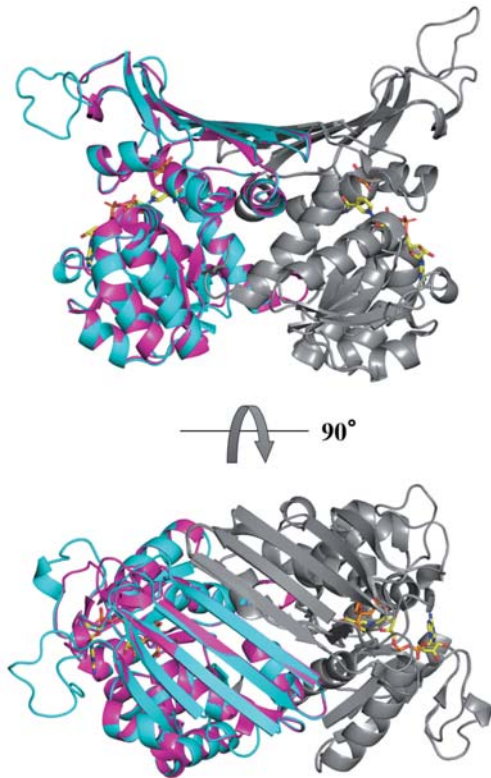


Fig. 4. The overall dimeric structure and structural comparison of Halo-aspDH (cyan) with *A. fulgidus* L-aspDH (magenta). The adjacent subunit is shown in gray. NAD⁺ (yellow) and citrate (orange) molecules are shown as stick models.

因であることがすでに明らかになっている。この部位周辺を Halo-aspDH で比較してみると、Glu201は保存されているが (Glu223), Arg203は電荷を持たないアミノ酸 (Val225) に置換しており、また、この周辺部位は全て赤色のマイナス電荷を帯びていることから、*A. fulgidus* L-aspDH とは異なる耐熱化機構であると考えられる (Fig. 5, 下図)。これらの研究結果は、今後アミノ酸脱水素酵素の発現や構造・機能解析の研究を行う上で有用な知見である。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、貴重なご意見や様々な支援を頂きました大阪工業大学工学部生命工学科 大島敏久教授、香川大学農学部応用生物科学科 櫻庭春彦教授に感謝いたします。また、N末端アミノ酸配列分析に携わって頂きました千々岩有紀技術員に感謝を申し上げます。本研究は東海大学総合研究機構の研究奨励補助、東海大学総合農学研究所プロジェクト研究の資金援助により実施されたものです。

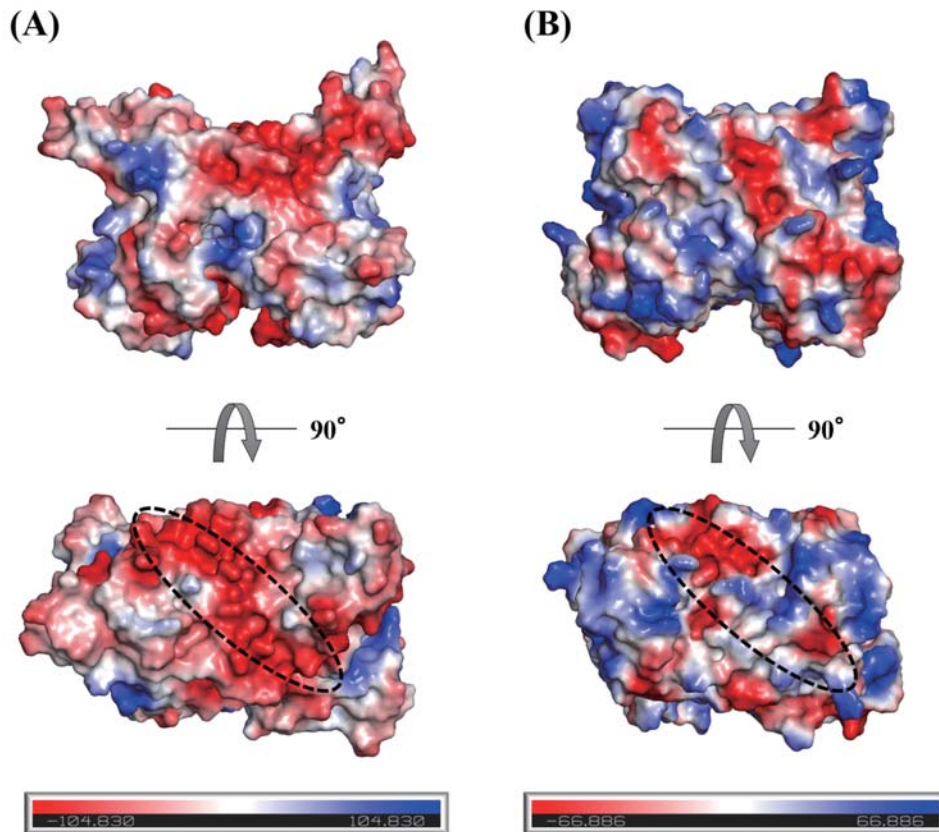


Fig. 5. Electrostatic surface potential models of Halo-aspDH (A) and *A. fulgidus* L-aspDH (B). Red and blue indicate negatively and positively charged areas, respectively. Dotted circles indicate interactions between the subunits.

要約

我々は、高度好塩菌 *Halophilic archaeon* DL31のゲノム情報から、L-アスパラギン酸脱水素酵素 (L-aspDH) とアノテーションされている遺伝子 (Halar_1793; Halo-aspDH) を見出すことに成功した。Halo-aspDH 遺伝子 を人工合成し、大腸菌を宿主細胞として大量発現させると共に、His-tag アフィニティーカラムにより精製を行った。His-tag 配列を切断後、プロテインシーケンサーを用いて N 末端アミノ酸配列分析を行った結果、予測される N 末端アミノ酸配列と完全に一致していた。しかし、L-aspDH の活性測定や活性染色を行った結果、L-aspDH 活性の検出には至らなかった。各種の塩や熱処理によって活性を有す成熟型へ変化するか検証したが、L-aspDH 活性は検出できなかった。しかし、Halo-aspDH は100°C 10分間の熱処理でも熱失活しない、非常に熱安定性が高い酵素であることを初めて明らかにすることができた。

超好熱菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 L-aspDH の立体構造に基づいて、Halo-aspDH の立体構造をホモロジーモデリングで予測した。ホモロジーモデリングで得られた Halo-aspDH の立体構造は *A. fulgidus* L-aspDH の全体構造と非常に類似 (主鎖原子の RMSD =0.130 Å) していたが、表面電荷が大きくマイナスに傾いていることを明らかにし、好塩菌由来の酵素に特徴的な構造が観察できた。これらの研究結果は、予備的な実験データではあ

るが、アミノ酸脱水素酵素の構造機能解析を行う上で有用な情報となりうる。

引用文献

- 1) Yang, Z., Savchenko, A., Yakunin, A., Zhang, R., Edwards, A., Arrowsmith, C. and Tong, L. 2003, *J. Biol. Chem.* **278**, 8804–8808.
- 2) Yoneda, K., Sakuraba, H., Tsuge, H., Katunuma, N. and Ohshima, T. 2007, *FEBS J.* **274**, 4315–4325.
- 3) Yoneda, K., Kawakami, R., Tagashira, Y., Sakuraba, H., Goda, S. and Ohshima, T. 2006, *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 1087–1093.
- 4) Li, Y., Ogola, H.J. and Sawa, Y. 2012, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 503–516.
- 5) Li, Y., Kawakami, N., Ogola, H.J., Ashida, H., Ishikawa, T., Shibata, H. and Sawa, Y. 2011, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 1953–1962.
- 6) Ohshida, T., Hayashi, J., Satomura, T., Kawakami, R., Ohshima, T. and Sakuraba, H. 2016, *Protein Expr. Purif.* **126**, 62–68.
- 7) Tokunaga, M., Tokunaga, H., Ishibashi, M. and Arakawa, T. 2009, *Seikagaku* **81**, 401–406.
- 8) Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.

インジゴ還元酵素を利用した酵素化学実験の教材化

米田一成^{1,3,4,5}・吉岡観沙¹・山下秀次^{1,3}・山口浩^{3,4,6}・荒木朋洋^{2,3,4}

Teaching materials for enzyme chemistry experiments using indigo reductase

Kazunari YONEDA, Misa YOSHIOKA, Hideji YAMASHITA, Hiroshi YAMAGUCHI
and Tomohiro ARAKI

(Received 24 August 2021; accepted 5 October 2021)

Abstract

We have found a novel indigo reductase (FMN-dependent NADH-indigo reductase) involved in indigo dyeing from *Bacillus smithii*, a thermophilic *Bacillus* bacterium, and clarified the function and structure of the enzyme. Indigo reductase is an enzyme that catalyzes an enzymatic reaction that transforms indigo (bluish color) into water-soluble leuco-indigo (yellowish color). Since the indigo becomes water-soluble by the enzymatic reaction, it becomes possible to stain the fibers. From this, it can be said that indigo reductase is responsible for the important reaction of indigo dyeing. In this study, we verified whether enzyme chemistry experiments using highly stable indigo reductase could be used as teaching materials. We introduced purification of enzymes, determination of subunit molecular weight, visualization of enzyme reactions, identification of coenzymes, and methods for drawing three-dimensional structures. If indigo dyeing of fibers using indigo reductase becomes possible, it will be effective as educational teaching material for biological university students, graduate students, high school science teachers, and high school students who are interested in the field of agricultural chemistry.

緒言

藍染は日本の伝統的な染色技法であり、藍の葉を堆肥状にした「すくも」を発酵還元（藍建て発酵）することにより繊維を染色する方法である。「すくも」に含まれるインジゴ（藍色の色素）は水に不溶であるためそのまま繊維を染めることはできない。そこで、藍建て発酵の工程では常温性の好アルカリ性菌由来のインジゴ還元酵素によってインジゴが還元されることにより、水溶性のロイコインジゴ（黄色）に変化する。この酵素反応により「すくも」のインジゴは水に溶け、繊維を染色することが可能となる（図1, A）。本研究では藍染のインジゴ還元反応に関与するインジゴ還元酵素を利用した酵素化学実験の教材化を行った。

近年、我々の研究室において藍染の染色に関わる新規な酵素（FMN 依存性 NADH-インジゴ還元酵素）を好熱性バシラス細菌である、*Bacillus smithii* から見出すと共に、インジゴ還元酵素の機能と構造について明らかにしてきた (1, 2)。また、1次構造のホモロジーから FMN 依存性 NADH-アゾ還元酵素 (EC 1.7.1.6) に分類される酵素であることも明らかになっている (3-7)。一般的に酵素の実験教材には消化酵素などの加水分解酵素が良く用いられている。これは、酵素が比較的容易に入手できることや、安定性が高いためである。一方、酸化還元酵素は酵素の安定性の低さや酵素反応の可視化という点では、扱いにくい酵素であると思われる。しかし、インジゴ還元酵素は、実は私達の身近な暮らしに関わる藍染に関与しているという意外性や、本酵素の高い安定性は実

¹ 東海大学農学部バイオサイエンス学科

² 東海大学総合農学研究所

³ 東海大学大学院農学研究科

⁴ 東海大学大学院生物科学研究科

⁵ 東海大学先進生命科学研究所

⁶ 九州教養教育センター

連絡先：米田一成 e-mail: kyonedata@agri.u-tokai.ac.jp

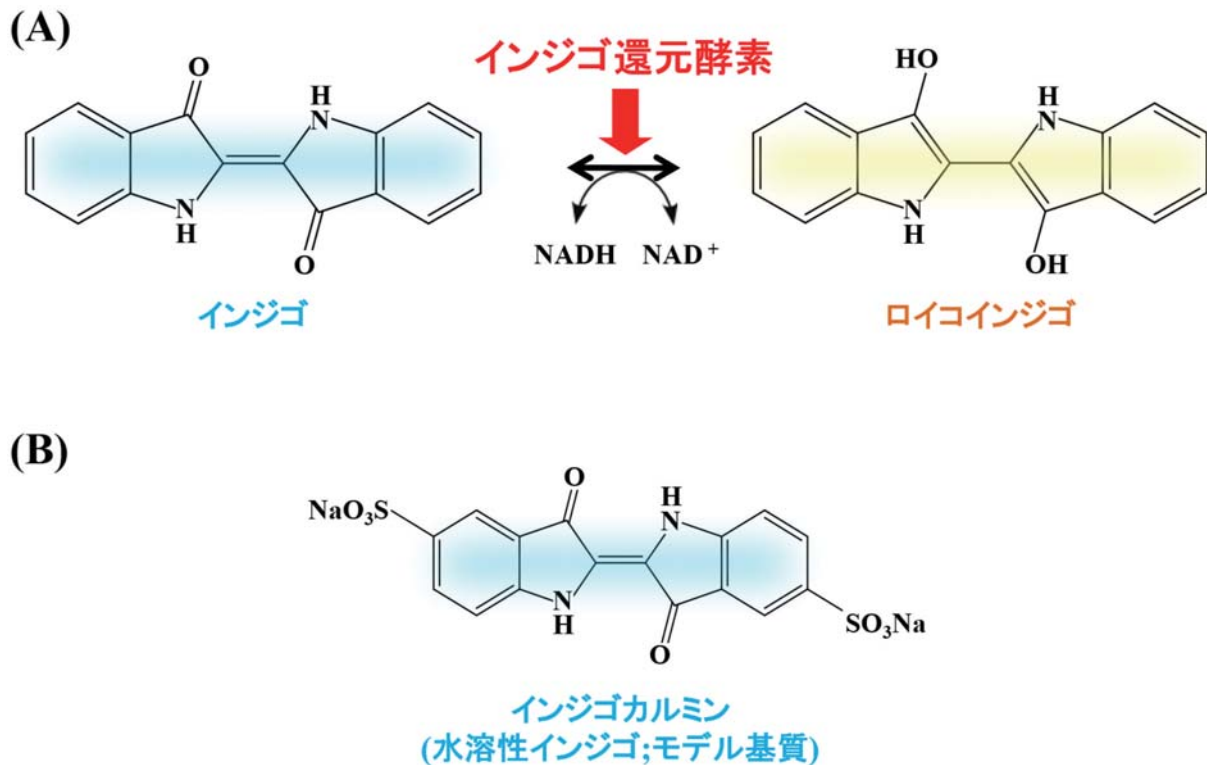


図1. インジゴ還元酵素が触媒する酵素反応 (A) および, インジゴカルミンの構造 (B)

験・実習には最適であると考えられる(4℃で保存しておけば, 3か月以上失活しない酵素である)。本酵素の実験により酵素化学の基礎的知識を広く深く学ぶことができると思われる。生物系の大学生, 大学院生, 高等学校の理科教員だけでなく, 農芸化学分野に興味を持つ高校生がインジゴ還元酵素の実験を通して酵素化学の魅力に触れ, さらなる理解を深めて頂く機会となれば幸いである。

材料および方法

試薬

インジゴカルミン, NADH はナカライテスク(京都)より入手した。宿主細胞である大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL は Agilent Technologies(米国)より入手した。コバルトアフィニティーカラムである Talon はタカラバイオ(滋賀)より入手した。薄層クロマトグラフィー(TLC)アルミシートシリカゲル60 F₂₅₄ は Merck(東京)から購入した。その他の試薬は市販の特級または生化学用試薬を用いた。

インジゴ還元酵素の発現および精製

酵素実験の教材化の場合, 酵素サンプルの入手が最も重要である。*B. smithii* 由来インジゴ還元酵素はリコン

ビナント酵素として大腸菌を宿主細胞として大量に発現, 精製する方法をすでに報告しているが(1,2), 今後可能であれば酵素製品を取り扱う, 旭化成ファーマ株式会社診断薬製品部や天野エンザイム株式会社などの企業より入手できるようにしたいと考えている。研究室で酵素を大量調製する場合には, pET15b/indigo プラスミドベクターを用い, 大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL の形質転換を行う(1)。すなわち, プラスミドベクター溶液 5 μl を大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL 100 μl の入ったエッペンチューブに入れ, 氷上で30分間放置する。次に, 42℃で45秒恒温槽につけ, ヒートショックを行った後, 1分間冷却する。続いて, SOC 培地100 μl を加え, 37℃で45分間震盪培養し, 回復培養を行う。形質転換した大腸菌を50 μg/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地にプレティングし, 37℃でインキュベートする。コロニーが形成されたことを確認し, 50 μg/ml アンピシリンを含む LB 液体培地(トリプトン1.0 g, 酵母エキス0.5 g, NaCl 1.0 g) 100 ml に植菌し, 37℃で OD₆₀₀=0.6になるまで振とう培養した後, 1 mM になるようにイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG)を加えインジゴ還元酵素の発現を誘導し, さらに20℃で16時間振とう培養することで, 酵素の大量発現を行う。培養終了後, 遠心分離(6,000 rpm, 10分間)により集菌を行い, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 50 ml に懸濁する。菌体懸濁液

を超音波破碎し、遠心分離 (12,000 rpm, 10分間) により得られた上清を粗酵素液とする。インジゴ還元酵素の精製には親和性クロマトグラフィーである Talon コバルトアフィニティーカラムクロマトグラフィー (ヒスタグアフィニティーカラム) を使用して精製を行う。平衡化バッファーには 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5 mM イミダゾールを用い、溶出バッファーには平衡化バッファー中に 50 mM ~ 100 mM イミダゾールを含むバッファーで溶出を行う。発現、精製がうまくいけば、100 ml の LB 液体培地から 10 mg 以上の酵素が容易に調製できる。

酵素精製の確認およびサブユニット分子量の測定

酵素精製およびサブユニット分子量の確認には 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いると良い。CBB 染色液で染色後、蒸留水で脱色し、分子量マーカーサンプルの泳動距離を正確に測り、相対移動度 (Rf 値) を算出する。次に、横軸に Rf 値、縦軸に Log 分子量をとり、分子量マーカーの各バンドの値をプロットし、分子量標準曲線を求める。次に、精製後の酵素の Rf 値を計算し、標準曲線の式に代入することでサブユニット分子量が算出できる。また、発展的な実験として、酵素の 4 次構造を調べたい場合にはゲルろ過クロマトグラフィーを使用することで、本酵素がダイマー構造であることを実験的に確認することができる (1)。

インジゴ還元酵素の酵素活性測定および酵素活性の可視化

インジゴは不溶性化合物であり、そのままでは分光光度計を用いた測定は不可能である。そのため、インジゴにスルホ基を導入した水溶性のインジゴカルミンをモデル基質として使用して、酵素活性を検出するのが良い (図 1, B)。NADH 依存性インジゴカルミン還元活性測定は下記の活性測定用反応溶液を用いて行う。すなわち、0.1 M リン酸バッファー (pH 7), 50 μ M インジゴカルミン, 80 μ M NADH, 精製酵素 5 μ l, 蒸留水が合計 1 ml になるように調製した。酵素以外の反応溶液を光路長 1 cm のプラスチック製キュベットに入れて混合した後、溶存酸素を除去するため窒素ガスバージを 3 分間行う。その後、酵素を 5 μ l 加え、色の変化を室温で確認する。分光光度計を使用して酵素反応を定量化する場合は、キュベット内で酵素反応を行い、610 nm の吸収の減少 (インジゴカルミンの減少) を測定することができる。また、エッペンチューブや試験管内で酵素反応を行い、インジゴカルミン (青) からロイコインジゴカルミン (黄色)

への変化を可視化し、定性的に酵素反応を観察することもできる。窒素ガスボンベや圧力調整器の購入が難しい場合には、Kenis (大阪) から安価なスプレー式実験用窒素ガスが販売されているので、購入すると良い。酵素活性を定性的に確認するだけであれば、分光光度計は不要である。

TLC を用いたインジゴ還元酵素の補酵素の同定

精製酵素を約 10 mg/ml 以上に濃縮後、100 $^{\circ}$ C, 10分間以上の熱処理を行うことでインジゴ還元酵素に結合している補酵素 (フラビン化合物) を遊離させることができる。その後、遠心分離 (12,000 rpm, 10分間) を行い、得られた黄色い上清を TLC 用のサンプルとする。TLC の展開溶媒の組成は 1-ブタノール : 酢酸 : 水が 12:3:5 になるように溶媒を混合する。最近の TLC 展開槽は少量の溶媒でも展開が可能であり、展開溶媒は 4 ml あれば十分である。flavin mononucleotide (FMN) の類似化合物である、リボフラビンや flavin adenine dinucleotide (FAD) などの標準品と共にインジゴ還元酵素抽出物を TLC プレートにアプライし、約 1 時間展開する。展開終了後、風乾し、UV (365 nm) 照射することでフラビン化合物のスポットを検出する。

インジゴ還元酵素の立体構造描画

B. smithii 由来インジゴ還元酵素の立体構造情報は Protein Data Bank (PDB; <https://www.rcsb.org/>) から入手可能である。PDB ID= 6JXN が wild type, PDB ID= 6JXS が Y151F 変異体酵素であり、Pymol (<https://pymol.org/2/>) などの構造描画ソフトで立体構造の詳細な作図が可能である。Pymol ライセンスは基本有料であるが、教育用のアカデミックライセンスはウェブ上で申請することで、無料で発行される。

結果および考察

B. smithii 由来インジゴ還元酵素の精製およびサブユニット分子量の測定

インジゴ還元酵素をヒスタグアフィニティーカラムを使用することで簡便に精製することが可能である。精製の結果を SDS-PAGE で確認した結果が図 2 (A) である。50 mM ~ 100 mM のイミダゾール溶出画分でメインバンドが得られ、ほぼ単一に精製する事ができている。この SDS-PAGE の結果を用いて、図 2 (B) のように解析することでサブユニット分子量が 23 kDa であることが分かる (1)。また、これらの結果はアミノ酸配列から予測

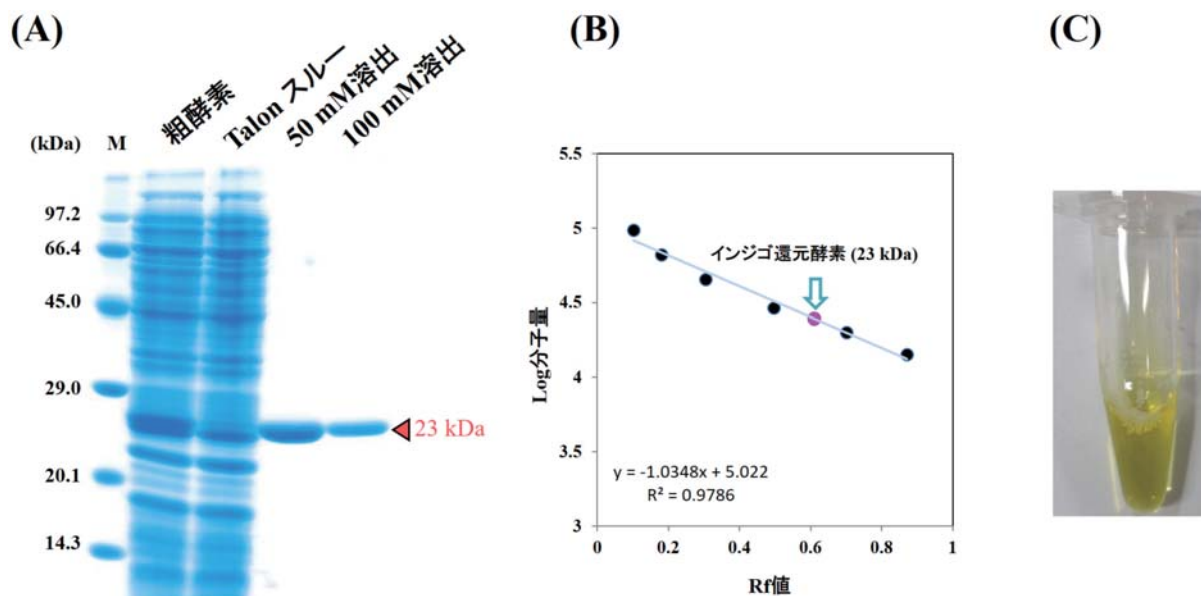


図2. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による酵素の精製の確認 (A) および、サブユニット分子量の決定 (B). 濃縮後のインジゴ還元酵素 (C).

される分子量と一致していることも確認できる。酵素の1次構造から分子量を算出する場合は、ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) を用いると便利である。本酵素は FMN を結合している酵素であるため、精製後の酵素は黄色をしており (図2, C), 吸収スペクトルの測定を行うと、フラビンに特徴的な380 nm と460 nm に吸収極大を有するスペクトルが得られる (1)。分光光度計にスペクトルスキャンの機能がある場合は測定してみると良い。

インジゴ還元酵素の酵素活性測定および酵素活性の可視化

酵素反応産物であるロイコインジゴカルミンは黄色であり、容易に酵素反応の進行を確認できる (図3)。しばらく観察していると徐々に黄色い溶液が元の青色に戻っていく。これは、酵素反応で生じたロイコインジゴカルミンが空気酸化されて再び、インジゴカルミンに戻ったためである。実際の藍染では、スルホ基の無い疎水性のインジゴが還元されて水溶性のロイコインジゴになり繊維に染み込む。その後、空気酸化されることで再びインジゴになり、繊維が染色され、何度洗濯しても色が抜けなくなる。本酵素反応を利用して繊維の藍染を行う実験の場合には、インジゴを用いるべきであるが、未だに本酵素のインジゴ還元活性は検出できていない。インジゴは水に不溶であるため、分光光度計を用いて測定することが大変難しい。本酵素を用いて繊維の藍染ができれば、さらに教育的な教材として効果的であると思われる。

さらに、本酵素はインジゴカルミン以外にも2,6-ジクロロインドフェノール (DCIP), メチルレッド, アシッドレッド88, メチルオレンジ, オレンジ II, コンゴレッドなどの様々なアゾ化合物に対する活性も有している (図4)。広い基質特異性を有す低基質特異性酵素であるため、これらの基質を分解する酵素反応の観察も可能である。例えば、DCIP (紺色) を基質とした場合、反応開始後、キュベットの溶液は瞬時に透明に変化する。インジゴカルミン以外の基質の酵素活性を測定する場合は、窒素ガスパージの必要はない。また、これらの基質を用いて分光光度計で酵素活性測定を行う場合は、各化合物の吸収極大波長を用いて活性の測定を行うと良い (1)。通常の酵素における酵素活性測定の際には、分光光度計による反応基質等の吸収を測定しなければ測定できなかったが、本酵素は基質として色素を使用しているため、容易に酵素活性を可視化できる。このため、これまで使用されてきた酵素と比較して初めて酵素活性を測定する学生にとっては酵素の挙動を把握しやすくなる。

TLC を用いたインジゴ還元酵素の補酵素の同定および立体構造描画

TLC を行うために、精製後の酵素を16 mg/ml に濃縮することにより黄色の酵素溶液を調製した (図2, C)。精製した酵素は吸収スペクトルの結果から、フラビン化合物が結合していることが強く示唆される。フラビン化合物には、リボフラビンやその補酵素型である FNM および、FAD が考えられるため、これらの化合物を標準品としてインジゴ還元酵素熱抽出物と共に TLC に供し

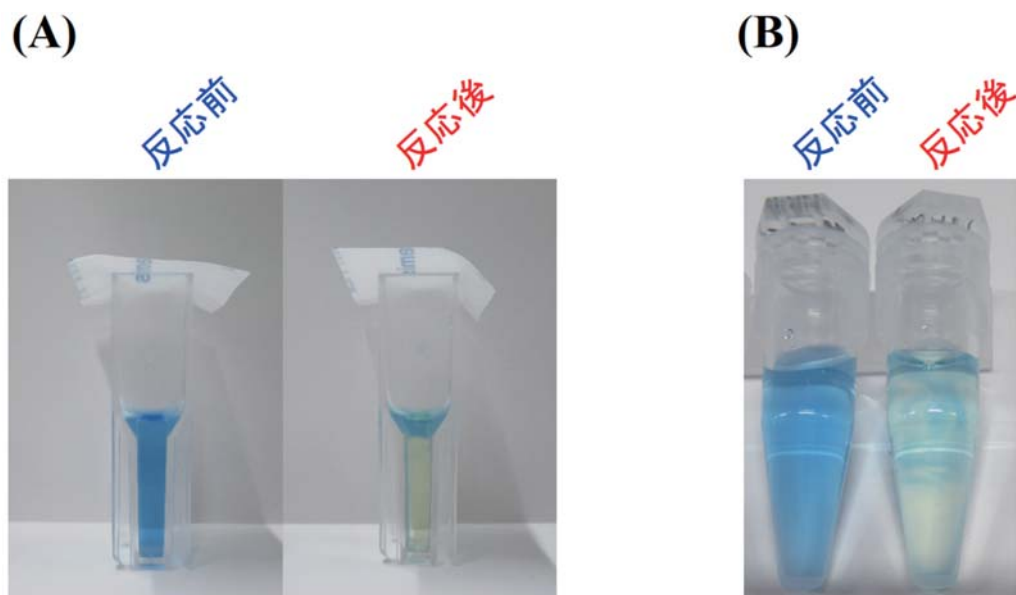


図3. キュベット (A) やエッペンチューブ (B) を使用したインジゴカルミン還元活性の確認. 酵素反応によりインジゴカルミン (反応前; 青色) からロイコインジゴカルミン (反応後; 黄色) に変化する. 反応後の溶液の上部が青いのは空気酸化によってインジゴカルミンが生成されているためである.



図4. インジゴ還元酵素が反応性を示す化合物 (各50 μ M). 基質特異性などの実験に使用することができる.

た. その結果, FMN の移動度とほぼ同じ場所にスポットが検出されていることが分かる (図5). この結果からインジゴ還元酵素は FMN を補酵素として結合していることが分かる (1). TLC のスポットの検出には様々な方法があるが, UV で簡便に検出できることは大きなメリットである.

インジゴ還元酵素の結晶構造解析はすでに解明しているため, ダイマー構造や, TLC の実験で明らかにした FMN が結合している詳細な原子レベルの構造を Pymol を使用して確認することが可能である (図6) (1, 2). 本酵素はウェットラボである酵素化学実験だけでなく, ドライラボであるコンピュータを利用した, バイオイン

フォマティクス演習などの教材としても利用可能である.

謝 辞

本論文の作成にあたり, 貴重なご意見や様々な支援を頂きました大阪工業大学工学部生命工学科 大島敏久教授, 香川大学農学部応用生物科学科 櫻庭春彦教授に感謝いたします. 本研究は公益財団法人発酵研究所 (IFO) の一般研究助成 (G-2017-2-001) の資金援助により実施されたものです.

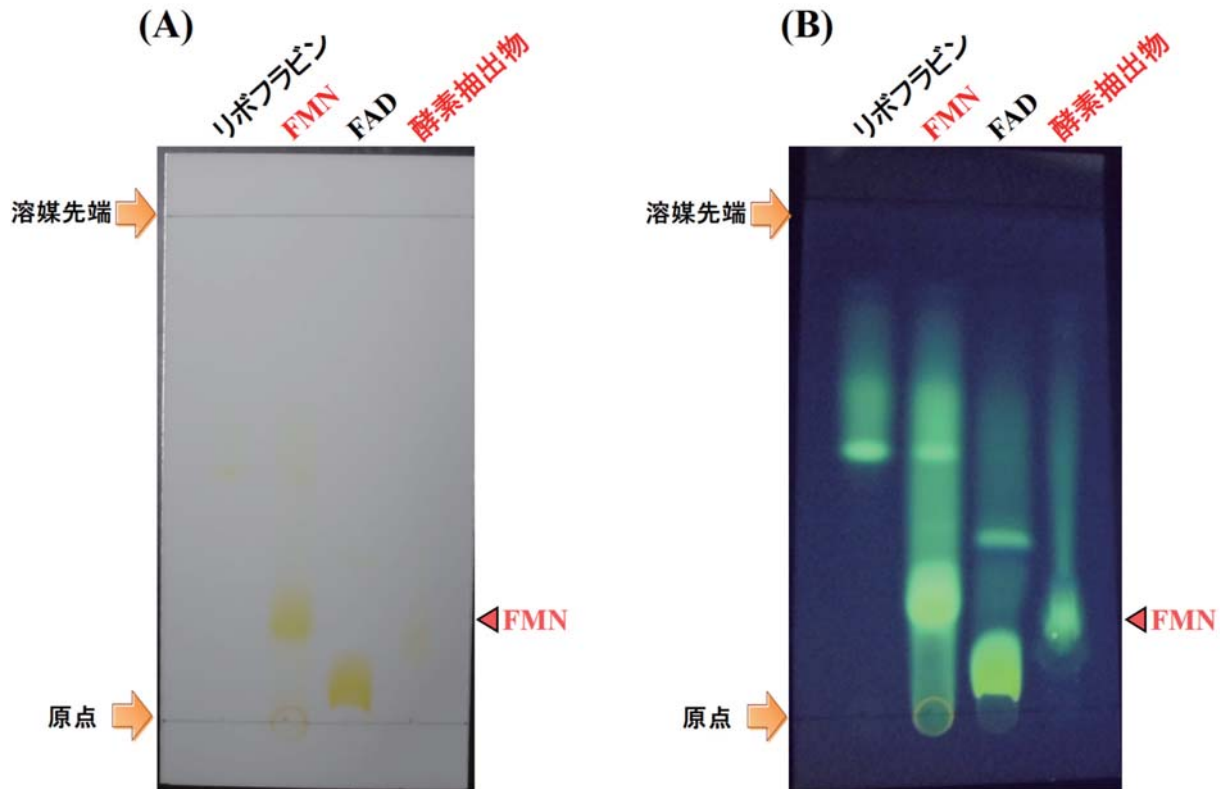


図5. TLCを用いたインジゴ還元酵素の補酵素同定. UV照射前 (A) および UV照射後 (B). UV照射前でも黄色いスポットは確認できるが, UV照射後はよりクリアにスポットが確認できる.

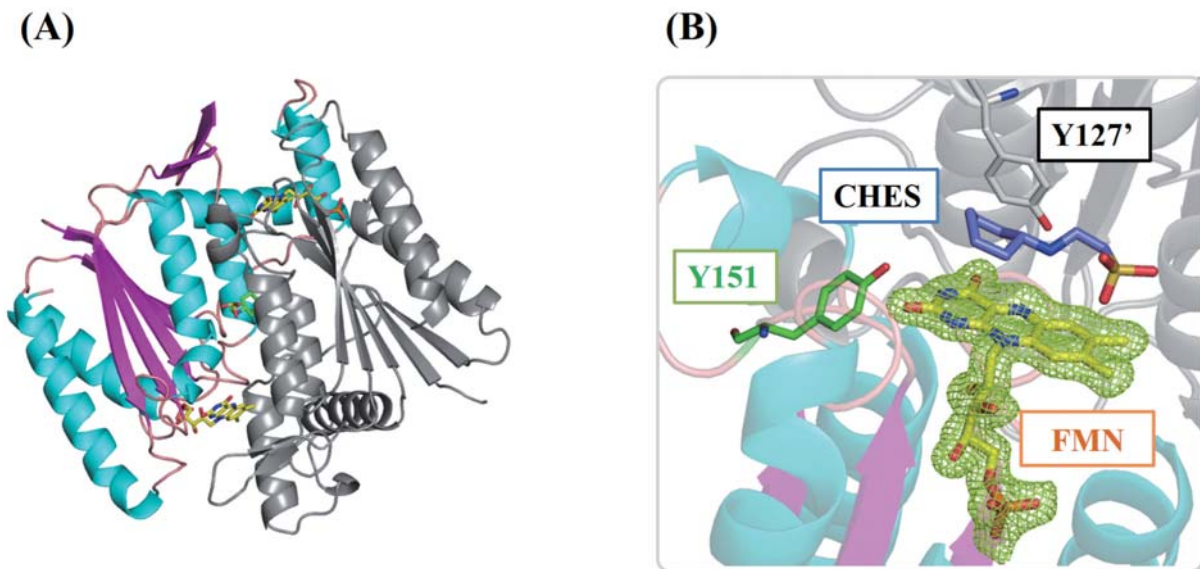


図6. Pymolを使用した *B. smithii* インジゴ還元酵素の立体構造描画. ダイマーの全体構造 (A) および活性中心の立体構造 (B). 活性中心に結合している FMN 分子を黄色の電子密度とスティックで表示した.

要約

我々は、藍染の染色に関わる新規なインジゴ還元酵素 (FMN 依存性 NADH- インジゴ還元酵素) を好熱性バシラス属細菌である、*Bacillus smithii* から見出すと共に、酵素の機能と構造について明らかにしてきた。インジゴ

還元酵素はインジゴ (青色) を水溶性のロイコインジゴ (黄色) に変化させる酵素反応を触媒する酵素である。酵素反応によりインジゴは水溶性になるため、繊維を染色することが可能になる。このことから、インジゴ還元酵素は藍染の重要な反応を担っていると言える。本研究では、安定性の高いインジゴ還元酵素を利用した酵素

化学実験が教材化できるか検証した。酵素の精製，サブユニット分子量の決定，酵素反応の可視化，補酵素の同定，立体構造の描画方法などを紹介した。本研究では，酵素反応のみを取り扱っているが，インジゴ還元酵素を用いた繊維の藍染が可能になれば，生物系の大学生，大学院生，高等学校の理科教員だけでなく，農芸化学分野に興味を持つ高校生に対して，より効果的な学習教材になりうると思われる。

引用文献

- 1) Yoneda, K., Yoshioka, M., Sakuraba, H., Araki, T. and Ohshima, T. 2020, *Int J Biol Macromol.* **164**, 3259-3267.
- 2) Yoneda, K., Sakuraba, H., Araki, T. and Ohshima T. 2021, *FEBS Open Bio.* **11**, 1981-1986.
- 3) Gao, F., Ding, H., Shao, L., Xu, X. and Zhao, Y. 2015, *Appl Microbiol Biotechnol.* **99**, 255-267.
- 4) Matsumoto, K., Mukai, Y., Ogata, D., Shozui, F., Nduko, J.M., Taguchi, S. and Ooi, T. 2010, *Appl Microbiol Biotechnol.* **86**, 1431-1438.
- 5) Pricelius, S., Held, C., Murkovic, M., Bozic, M., Kokol, V., Cavaco - Paulo, A. and Guebitz, G.M. 2007, *Appl Microbiol Biotechnol.* **77**, 321-327.
- 6) Sugiura, W., Yoda, T., Matsuba, T., Tanaka, Y. and Suzuki, Y. 2006, *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**, 1655-1665.
- 7) Yu, J., Ogata, D., Gai, Z., Taguchi, S., Tanaka, I., Ooi, T. and Yao, M. 2014, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **70**, 553-564.

キンカン属 (*Fortunella*) 植物の形態的特徴と果実特性

安田喜一¹・八幡昌紀²・國武久登³

The morphological characterization and fruit characters
of *Fortunella* species

Kiichi YASUDA, Masaki YAHATA and Hisato KUNITAKE

(Received 30 November 2021; accepted 27 December 2021)

Abstract

To evaluate all *Fortunella* 6 species introduced into Japan as a genetic resource for breeding, we investigated their morphological characteristics and fruit qualities. A high diversity of the morphological characteristics of leaves, flower and fruits was observed among all species. Novel characteristics such as extremely small fruits and deep red-orange colored fruit skin of the Hongkong kumquat (*F. hindsii* (Champ. ex Benth.) Swingle) were observed. The juice sac and peel in the kumquats showed a relatively higher sugar content than those in the satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcow.); however, only Hongkong kumquat had a very low sugar content. The Changshou kumquat (*F. obovata* hort. ex Tanaka) had a particularly high sugar content in peel. Although the major organic acid of kumquat was citric acid in juice sac, the ratios of quinic acid and malic acid were heightened in the peel. On the other hand, the β -cryptoxanthin content in the whole fruit was higher in the Hongkong kumquat, oval kumquat (*F. margarita* (Lour.) Swingle) and round kumquat (*F. japonica* (Thunb.) Swingle). Moreover, the Meiwa kumquat (*F. crassifolia* Swingle), which had the best taste quality, had lower DPPH radical scavenging activity, and the Hongkong kumquat and Malayan kumquat (*F. polyandra* (Ridl.) Tanaka) had higher DPPH radical scavenging activity than the others. Thus, these results suggest that five wild species except the cultivated species Meiwa kumquat of kumquats have important traits that may be useful in the future breeding of kumquats.

緒言

キンカン (*Fortunella* spp.) は、ミカン科 (Rutaceae) ミカン亜科 (Aurantioideae) に属する中国南部原産の常緑性低木果樹であり、産業的に重要であるカンキツ属 (*Citrus*) とカラタチ属 (*Poncirus*) を加えてカンキツ類と総称される (1, 2)。欧米諸国でマイナーな果樹である一方、アジア圏では東南アジアや中国南部を中心にいくつかの在来品種が栽培されており、特徴的な香り成分や精油成分の貴重な供給源とされる他 (3, 4)、ベトナムの旧正月の縁起物としての伝統的な家庭料理への利用されている (5)。我が国においても、キンカン属植物は、カンキツ属より比較的耐寒性や耐病害虫性が強く、樹冠が小さいため、古くから庭木として利用されてきた。また、

果実はカンキツ類の中で最も小型であるものの、果皮 (アルベドとフラベド) を生食できることがキンカン属植物の特長である。我が国では、宮崎県 (2,608 t)、鹿児島県 (909 t) および熊本県 (87 t) などの比較的温暖な気候である九州南部で盛んに経済栽培されており (農林水産省, <http://www.tdb.maff.go.jp>, 2018年産特産果樹生産動態等調査), その用途は生食をはじめ、甘露煮、マーマレード、果実酒、観賞樹など様々である。

キンカン属は、田中 (6, 7) と Swingle (8) によって分類されており、前者によればナガハキンカン [*F. polyandra* (Ridl.) Tanaka], マルキンカン [*F. japonica* (Thunb.) Swingle], マメキンカン [*F. hindsii* (Champ. ex Benth.) Swingle], ニンポウキンカン (*F. crassifolia* Swingle), ナガキンカン [*F. margarita* (Lour.) Swingle]

¹ 東海大学農学部応用植物科学科

² 静岡大学大学院総合科学技術研究農学専攻

³ 宮崎大学農学部応用生物科学科

連絡先: 安田喜一 e-mail: yk964422@tsc.u-tokai.ac.jp

およびチョウジュキンカン (*F. obovata* hort. ex Tanaka) の計6種が存在する。しかし、我が国で生食用として経済栽培されているのはニンボウキンカンのみである。また、2000年以降、キンカンの品種として‘こん太’ (9), ‘ぶちまる’ (10), ‘ゆみちゃんのほっぺ’ (11) および‘勇紅’ (12, 13), ‘宮崎夢丸’ (14), ‘宮崎王丸’ (15) および‘紅央’ (16) などが登録されているものの、それらはニンボウキンカンの枝変わりやその交雑から育成されたものである。このように、キンカンの栽培および育種は、ニンボウキンカン1種に依存しているのが現状である。

最近のカンキツ育種は、豊産性、耐病虫害性、耐寒性および耐乾性などの栽培特性や糖度、剥皮性、晩性および貯蔵性などの果実特性だけではなく、健康志向の高まりにより、健康機能性に着目した成分育種が盛んに行われるようになってきた (17, 18)。β-クリプトキサンチンは、カンキツに豊富に含まれるカロテノイドの一種であり、骨代謝調節作用をはじめ、健康のための生理機能が解明されており (18, 19)、2015年にウンシュウミカンにおいて健康機能性表示が生鮮食品で初めて登録されたことで (20)、健康機能性成分としての機運が高まっている。また、ポリフェノールやカロテノイド類、フラボノイド類、精油成分、ビタミンCおよびビタミンEなどの抗酸化活性を有する物質は、疾病の原因となる活性酸素・フリーラジカルから生体を防御すると考えられており、いくつかのカンキツ類において抗酸化活性の評価が行われている (21-23)。

今後、特徴のあるキンカン品種を育成するためには、キンカン属野生種 (本報では我が国で経済栽培されるニンボウキンカン以外の5種を示す) の遺伝資源としての評価が必要不可欠であるものの、これらに対する基礎的情報は極めて乏しい。そこで本研究では、キンカン属植物6種について、葉、花および果実の形態調査を行うとともに、果実の詳細な調査として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた糖と有機酸の含量と組成および健康機能性の評価として果実中のβ-クリプトキサンチン含量を測定した。また、抗酸化能の予備的な調査として、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去能の測定を行った。さらに、これらの結果からキンカン野生種の育種素材としての可能性をそれぞれ考察した。

材料および方法

植物材料

日本マンダリンセンター (鹿児島県出水郡長島町) 植栽の我が国に導入されているナガハキンカン (英名: Malayan kumquat), マルキンカン (Round kumquat), マメキンカン (Hongkong kumquat), ニンボウキンカン (Meiwa kumquat), ナガキンカン (Oval kumquat) およびチョウジュキンカン (Changshou kumquat) のキンカン属6種を供試した。β-クリプトキサンチン含量とDPPH ラジカル消去能の測定以外では、対照植物としてウンシュウミカン‘青島温州’ (Satsuma mandarin) (*C. unshiu* Marcow.) およびカラタチ (Trifoliate orange) [*P. trifoliata* (L.) Raf.] を供試した。なお、マメキンカンに関しては二倍体の変種 (*F. hindsii* var. *chintou*) を用いた。

形態調査

葉、花および果実の形態調査を行った。完全に展開した葉を10枚供試し、葉身長、葉幅、翼葉長の3項目を調査するとともに、トゲの有無を確認した。開花期間を観察すると同時に、7月中旬に開花した二番花を10花用い、花色、全幅 (完全開花時の最大直径)、花弁数、雌ずい数、雄ずい数、乾燥花粉の縦径と横径および花粉発芽率の8項目を測定・観察した。1月中旬に完全着色した果実 (二番花) を15果収穫し、果皮色 (色彩色差計 CR-300, コニカミノルタホールディングス株式会社)、果実重、直径、高さ、一果実あたりの種子数および種子重の6項目を調査した。なお、花粉発芽率は、10% スクロースと1% 寒天を添加した寒天培地上に花粉を置床し、25℃・暗黒10時間培養後、光学顕微鏡 (BX-51, オリジナル株式会社) 下で1反復あたり300個の花粉を供し、5反復行った。

糖および有機酸含量の測定

形態調査と同時期に収穫した果実を果肉と果皮に分け、ホモジナイズした。その後、80% 熱エタノールで抽出し、0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、分析試料を調整後、向井ら (2000) の方法に従い、HPLC を用いて糖 (検出器: Shodex RI-71 (昭和電工株式会社), カラム: Shodex SP-0810・SP-G (昭和電工株式会社)) および有機酸含量 (検出器: GULLIVER UV-970 (日本分光株式会社), カラム: Shodex Ion Pak KC-811・RS Pak KC-G (昭和電工株式会社)) を測定した。なお、試験は5反復で行った。

β-クリプトキサンチン含量の測定

形態調査と同時期に収穫したキンカン属植物6種の果実から種子を除き、果皮と果肉を分けずに可食部として供試した。凍結乾燥させた試料1.0gを0.24Mピロガロール、13.6M水酸化カリウムでけん化(56℃, 20分間)した。常温まで冷ました後、0.17M塩化ナトリウム、2-プロパノール2mLおよび酢酸エチル:n-ヘキサン(1:9)液15mLを加え、遠心分離(3,000rpm, 1分間)して上層をろ過した。さらに、水層を酢酸エチル:n-ヘキサン(1:9)液15mLで2回抽出し、ろ液をロータリーエバポレーター(35℃)で濃縮乾固した。これをエタノール25mLで定容し、0.2μmのフィルターでろ過したものを分析試料とした。移動相はアセトニトリル:メタノール:テトラヒドロフラン(55:40:5)とし、試料注入20μL、カラム温度30℃、流速1.5mL/minの測定条件下でHPLC分析(検出器:SPD-6AV(株式会社島津製作所)、カラム:Shim-pack GLC G-ODS(株式会社島津製作所))を行い、絶対検量線法によりβ-クリプトキサンチン含量を定量した。なお、試験は3反復行った。

DPPH ラジカル消去能の測定

キンカン属植物6種の果実(種子を除く)における抗酸化活性の評価として、一部修正した須田(24)のマイクロプレート法を適用し、DPPHラジカル消去能測定を行った。凍結乾燥粉末を80%エタノールで10分間抽出し、0.45μmのフィルターでろ過した。適量の200mM 2-N-モルフォリノエタン sulfon酸(MES)と20%エタノールを加えた抽出液に1.2mM DPPH(和光純薬工業株式会社)を添加し、室温で20分間静置後、分光光度計IMMUNO-MINI NJ-2300(ナルジェヌンクインターナショナル株式会社)で520nmの吸光度を測定し、Trolox(シグマアルドリッチジャパン株式会社)相当量として評価した。なお、反復試験は行っていない。

結果

キンカン属植物の葉の形態調査を行った結果(表1)、葉身長と葉幅は、ウンシュウミカンより小さかった。葉形指数より、ナガハキンカンが314.5と最も細長く、チョウジュキンカンが164.9と最も丸かった。ウンシュウミカンとカラタチにおいて観察された翼葉は、キンカン属植物では全く観察されなかった。トゲは、マメキンカン、ナガハキンカンおよびマルキンカンにおいて観察され、特にマメキンカンが鋭く長いトゲを有していた。

キンカン属植物の開花時期は、ウンシュウミカン(5月)とカラタチ(4月)と比較して、6月以降と遅かった。さらに、3カ月という長い期間に数回に渡り花を着けた(表2)。キンカン属植物6種では、チョウジュキンカンが比較的开花が早かったものの、開花期間に大きな差異は見られなかった。キンカン属植物の花の大きさは、ウンシュウミカンより有意に小さかった。キンカン属植物内では、ナガハキンカン(24.6mm)からマメキンカン(7.5mm)まで花の大きさに多様性がみられた。乾燥花粉粒径は、キンカン属植物内で顕著な差異は見られなかった。一方、花粉発芽率は、マメキンカンの5.8%からチョウジュキンカンの34.9%まで種間差異が大きかった。

キンカン属植物の果実の形態調査を行った結果(図1, 図2, 表3)、6種すべてがそれぞれの種に特有な形態的特徴を示した。まず、果皮色は、マメキンカンのa値が39.5であり、他の種より赤味が強かった。果実の大きさは、ウンシュウミカンとカラタチより有意に小さかった。キンカンの中では、チョウジュキンカンが26.7gと最も重く、マメキンカンが1.3gと最小であった。果形は、名前のようにマルキンカンが100.8と最も丸く、ナガキンカンが71.1と細長かった。果肉の砂じょうについては、チョウジュキンカンが最も発達していた。それに対し、マメキンカンと栽培種のニンボウキンカンの果肉では砂

Table 1. The morphological characteristics of leaves in 6 *Fortunella* species, Satsuma mandarin and trifoliate orange.

Genus	Species	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)	Shape index of leaf blade ^a	Leaf wing	Strength of spines		
<i>Fortunella</i>	Malayan kumquat	99.8 ± 11.0 ^a	b ^b	32.7 ± 4.5	c	314.5 ± 75.3	none	+
	Round kumquat	43.9 ± 4.6	f	17.6 ± 2.0	e	245.1 ± 40.8	none	+
	Hongkong kumquat	60.6 ± 6.8	de	21.0 ± 4.2	de	292.8 ± 42.1	none	++
	Meiwa kumquat	63.9 ± 8.4	cd	27.0 ± 3.1	cd	253.4 ± 57.3	none	-
	Oval kumquat	74.8 ± 8.4	c	27.1 ± 2.8	cd	278.9 ± 40.8	none	-
	Changshou kumquat	68.9 ± 6.0	cd	42.1 ± 5.0	b	164.9 ± 14.9	none	-
<i>Citrus</i>	Satsuma mandarin	128.2 ± 12.2	a	51.7 ± 5.1	a	248.8 ± 20.2	exist	-
<i>Poncirus</i>	Trifoliate orange	49.6 ± 5.5	ef	26.6 ± 3.6	cd	187.2 ± 13.3	exist	+++

^a Avarage ± standard deviation.

^b Different letters represent significant difference in Tukey's multiple range test, 1% level (n = 10).

^c (Leaf length / Leaf width) × 100

Table 2. The morphological characteristics of flowers in 6 *Fortunella* species, Satsuma mandarin and trifoliolate orange.

Genus	Species	Flowering season	Flower color	Flower width (mm)	Number of petal	Number of pistil	Number of stamen	Pollen grain (μm)		Shape index of pollen grain*	Pollen germination percentages (%)
								Length	Width		
<i>Fortunella</i>	Malayan kumquat	Jun.-Aug.	White	24.6 ± 2.0 ^b	5.0 a	1.0 a	22.3 ± 1.4 a	33.4 ± 1.0 bc	17.7 ± 0.5 b	188.9 ± 5.9	20.7 ± 4.6 b
	Round kumquat	Jun.-Aug.	White	16.2 ± 0.8 d	5.0 a	1.0 a	18.4 ± 1.4 b	30.6 ± 1.5 de	16.8 ± 0.7 b	183.0 ± 8.7	5.8 ± 1.4 cd
	Hongkong kumquat	Jun.-Aug.	White	7.5 ± 0.3 e	5.0 a	1.0 a	15.0 ± 1.8 d	34.2 ± 0.6 b	19.4 ± 1.1 ab	177.0 ± 10.9	19.3 ± 4.0 b
	Meiwa kumquat	Jun.-Aug.	White	19.6 ± 0.8 c	5.0 a	1.0 a	17.8 ± 1.6 bc	32.1 ± 1.2 b-d	17.6 ± 1.1 b	183.0 ± 8.7	33.8 ± 4.8 a
	Oval kumquat	Jun.-Aug.	White	18.0 ± 0.7 cd	5.0 a	1.0 a	15.7 ± 1.3 cd	31.1 ± 1.1 cd	19.2 ± 1.1 ab	162.4 ± 7.3	32.3 ± 1.9 a
	Changshou kumquat	Jun.-Aug.	White	20.0 ± 1.0 c	5.0 a	1.0 a	20.0 ± 1.1 b	33.3 ± 0.9 bc	18.0 ± 0.9 ab	186.4 ± 6.3	34.9 ± 10.1 a
<i>Citrus</i>	Satsuma mandarin	May	White	32.2 ± 2.6 a	5.0 a	1.0 a	18.7 ± 2.5 b	28.6 ± 2.8 e	20.6 ± 3.9 a	143.8 ± 32.1	1.1 ± 0.1 d
<i>Poncirus</i>	Trifoliolate orange	Apr.	White	26.1 ± 1.8 b	5.0 a	1.0 a	23.8 ± 1.1 a	36.6 ± 1.2 a	20.8 ± 1.4 a	177.2 ± 12.3	15.0 ± 0.8 bc

* Average ± standard deviation.

^b Different letters represent significant difference in Tukey's multiple range test, 1% level (Pollen germination percentages n = 5, Others n = 10).

^c (Length / Width) × 100.

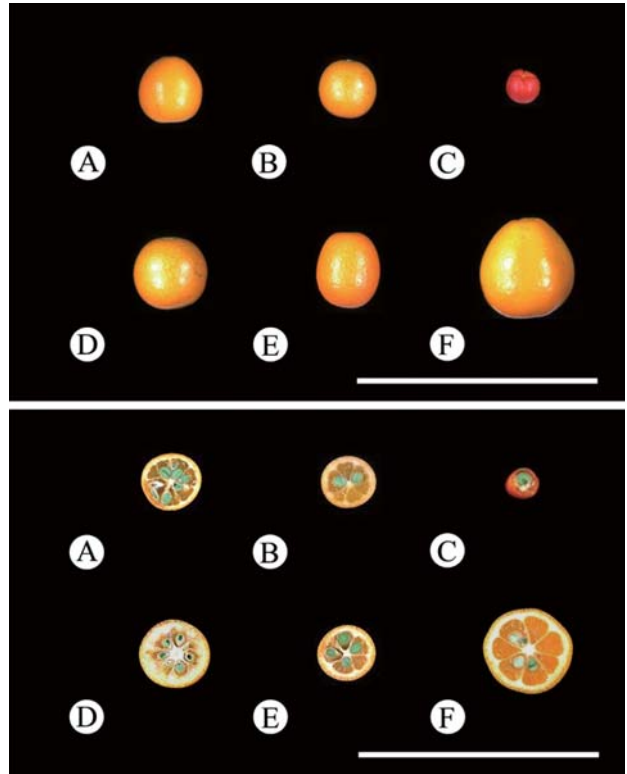


Fig. 1. Photographs of the fruits in 6 *Fortunella* species. Top: the side, Bottom: the transverse plane. Bar = 10 cm. A: Malayan kumquat, B: Round kumquat, C: Hongkong kumquat, D: Meiwa kumquat, E: Oval kumquat, F: Changshou kumquat.

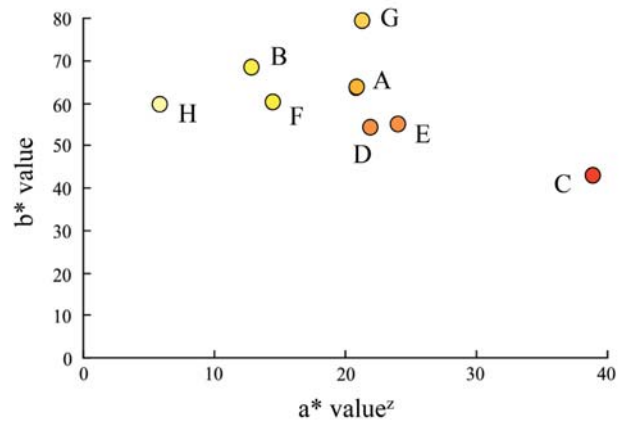


Fig. 2. Comparison of the pericarp color in 6 *Fortunella* species, Satsuma mandarin and trifoliolate orange. A: Malayan kumquat, B: Round kumquat, C: Hongkong kumquat, D: Meiwa kumquat, E: Oval kumquat, F: Changshou kumquat, G: Satsuma mandarin, H: Trifoliolate orange. ^aThe color difference measured by colorimeter CR-300 (Konica Minolta, Inc).

Table 3. The morphological characteristics of fruits in 6 *Fortunella* species, Satsuma mandarin and trifoliolate orange.

Genus	Species	Fruits weight (g)	Fruit size (mm)		Shape index of fruit ^a	Number of seeds per fruit	Seed weight (g)
			Diameter	Height			
<i>Fortunella</i>	Malayan kumquat	14.9 ± 1.0 ^e	26.2 ± 0.9 ^e	27.0 ± 1.7 ^e	97.3 ± 6.2	5.7 ± 0.6 ^b	0.11 ± 0.02 ^b
	Round kumquat	7.8 ± 0.9 ^{ef}	24.2 ± 1.4 ^e	24.1 ± 1.6 ^f	100.8 ± 4.6	3.1 ± 0.6 ^{bc}	0.11 ± 0.02 ^b
	Hongkong kumquat	1.3 ± 0.2 ^f	12.8 ± 1.2 ^f	12.2 ± 1.0 ^g	105.2 ± 7.1	2.5 ± 0.5 ^{bc}	0.10 ± 0.02 ^b
	Meiwa kumquat	16.1 ± 1.4 ^d	29.2 ± 3.2 ^d	31.6 ± 1.6 ^d	92.2 ± 7.7	5.3 ± 1.2 ^b	0.11 ± 0.02 ^b
	Oval kumquat	14.0 ± 0.8 ^{de}	25.3 ± 1.1 ^e	35.6 ± 1.8 ^c	71.1 ± 4.8	3.7 ± 0.6 ^b	0.09 ± 0.03 ^b
	Changshou kumquat	26.7 ± 2.6 ^c	35.2 ± 3.5 ^c	36.6 ± 3.7 ^c	96.4 ± 4.7	3.8 ± 0.7 ^b	0.22 ± 0.05 ^a
<i>Citrus</i>	Satsuma mandarin	135.4 ± 13.6 ^a	90.4 ± 1.6 ^a	63.0 ± 2.2 ^a	143.4 ± 4.1	0 ^c	—
<i>Poncirus</i>	Trifoliolate orange	46.7 ± 3.7 ^b	44.3 ± 0.9 ^b	43.3 ± 1.2 ^b	102.5 ± 1.4	29.0 ± 7.4 ^a	0.22 ± 0.03 ^a

^a Average ± standard deviation. The fruits of kumquats were completely colored in mid-January, and those of Satsuma mandarin and trifoliolate orange were harvested in early November.

^b Different letters represent significant difference in Tukey's multiple range test, 1% level (Seed weight n = 50, Others n = 15).

^c (Diameter / Height) × 100.

Table 4. Total sugar and organic acid contents of fruits in 6 *Fortunella* species, Satsuma mandarin and trifoliolate orange.

Genus	Species	Total sugar content (g / 100 g F.W.) ^x		Total organic acid content (g / 100 g F.W.) ^w		
		Pulp ^v	Pericarp	Pulp	Pericarp	
<i>Fortunella</i>	Malayan kumquat	4.30 ± 0.60 ^e	10.60 ± 0.63 ^c	2.29 ± 0.16 ^c	0.20 ± 0.11 ^{b-d}	
	Round kumquat	11.34 ± 0.89 ^b	14.47 ± 1.56 ^b	1.38 ± 0.53 ^d	0.15 ± 0.13 ^d	
	Hongkong kumquat	1.07 ± 0.07 ^f	4.59 ± 0.09 ^e	1.76 ± 0.20 ^{cd}	0.38 ± 0.07 ^{a-c}	
	Meiwa kumquat	13.71 ± 0.63 ^a	15.07 ± 0.30 ^{ab}	3.66 ± 0.37 ^{ab}	0.39 ± 0.06 ^{ab}	
	Oval kumquat	9.00 ± 0.78 ^c	12.15 ± 0.84 ^c	2.22 ± 0.18 ^c	0.17 ± 0.03 ^{cd}	
	Changshou kumquat	9.51 ± 0.23 ^c	16.63 ± 0.89 ^a	3.09 ± 0.29 ^b	0.21 ± 0.01 ^{b-d}	
<i>Citrus</i>	Satsuma mandarin	5.84 ± 0.33 ^d	6.88 ± 0.18 ^d	0.49 ± 0.01 ^e	0.24 ± 0.07 ^{b-d}	
<i>Poncirus</i>	Trifoliolate orange	4.82 ± 0.47 ^{de}	2.42 ± 0.13 ^f	4.19 ± 0.29 ^a	0.58 ± 0.13 ^a	

^a Average ± standard deviation.

^b Different letters represent significant difference in Tukey's multiple range test, 1% level (n = 5).

^c Total amount of fructose, glucose and sucrose.

^w Total amount of quinic acid, malic acid and citric acid.

^v Pulp: juice sac, Pericarp: flavedo and albedo.

じょうが少なかった。種子はキンカン属6種すべてで認められた。果実が最も小さかったマメキンカンが2.5個で最も少なく、ナガハキンカンが5.7個と最も多かった。栽培種のニンポウキンカンは5.3個とナガハキンカンに次いで種子が多く含まれていた。種子重は、チョウジュキンカンが0.22 g と他の種 (0.09~0.11 g) より有意に重かった。なお、ナガキンカンの種子のみが単胚性を示した (データ省略)。

次に、各試料を果肉と果皮に分け、HPLCによる糖含量と有機酸含量の測定を行った (表4)。キンカン属植物の果実における糖含量は、マメキンカンを除き他のキンカン5種の果皮の糖含量は10 g / 100 g F.W.以上であった。さらに、マルキンカンとニンポウキンカンは果肉の糖含量も10 g / 100 g F.W.以上であった。キンカン属植物の中で、最も果肉の糖含量が多かったのはニンポウキンカン (13.71 g / 100 g F.W.) で、果皮の糖含量はチョウジュキンカン (16.63 g / 100 g F.W.) であった。なお、マメキンカンが果肉 (1.07 g / 100 g F.W.) と果皮 (4.59 g / 100 g F.W.) とともにキンカン属植物内で糖含量が最も低かった。キンカン属植物の果肉における糖組成は、ウ

ンシュウミカンとカラタチよりもスクロースの占める割合が低い傾向が見られた (図3)。一方、果皮における糖組成は、ウンシュウミカンにおいてグルコースが大きな割合を占めたのに対して、キンカン属植物とカラタチは果肉と同様の糖組成を示した。有機酸含量は、ニンポウキンカンが果皮 (3.66 g / 100 g F.W.) および果肉 (0.39 g / 100 g F.W.) とともにキンカン属植物内では最も多かった (表4)。それに対し、マルキンカンは果肉が1.38 g / 100 g F.W.で、果皮が0.15 g / 100 g F.W.と最も少なかった。果肉における主要な有機酸はクエン酸で全体の80%以上を占めており、次いで、リンゴ酸とキナ酸が少量含まれていた (図4)。また、種間で組成比に大きな差はなかった。果皮の有機酸の組成比は、マルキンカンとニンポウキンカンはクエン酸が多かったが、その他の4種はキナ酸が多く、2つのグループに大別された (図4)。

最後に、健康機能性成分の評価として、キンカン属植物6種におけるβ-クリプトキサンチン含量とDPPHラジカル消去能を測定、比較した。その結果、可食部におけるβ-クリプトキサンチン含量は、マメキンカンで1.82 mg / 100 g D.W.と最も多く、ナガハキンカン、ニンポウ

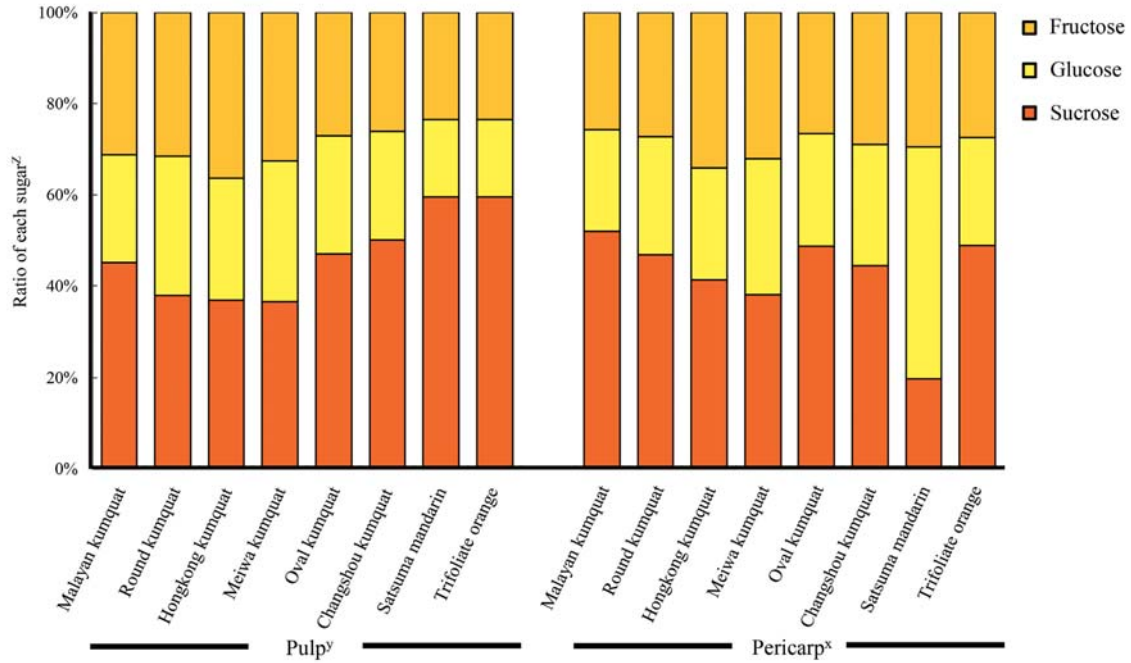


Fig. 3. Comparison of the sugar composition in the pulp and pericarp of 6 *Fortunella* species, Satsuma mandarin and trifoliolate orange.
^z Each sugar content / total of three sugars × 100 (n = 5).
^y Juice sac.
^x flavedo and albedo.

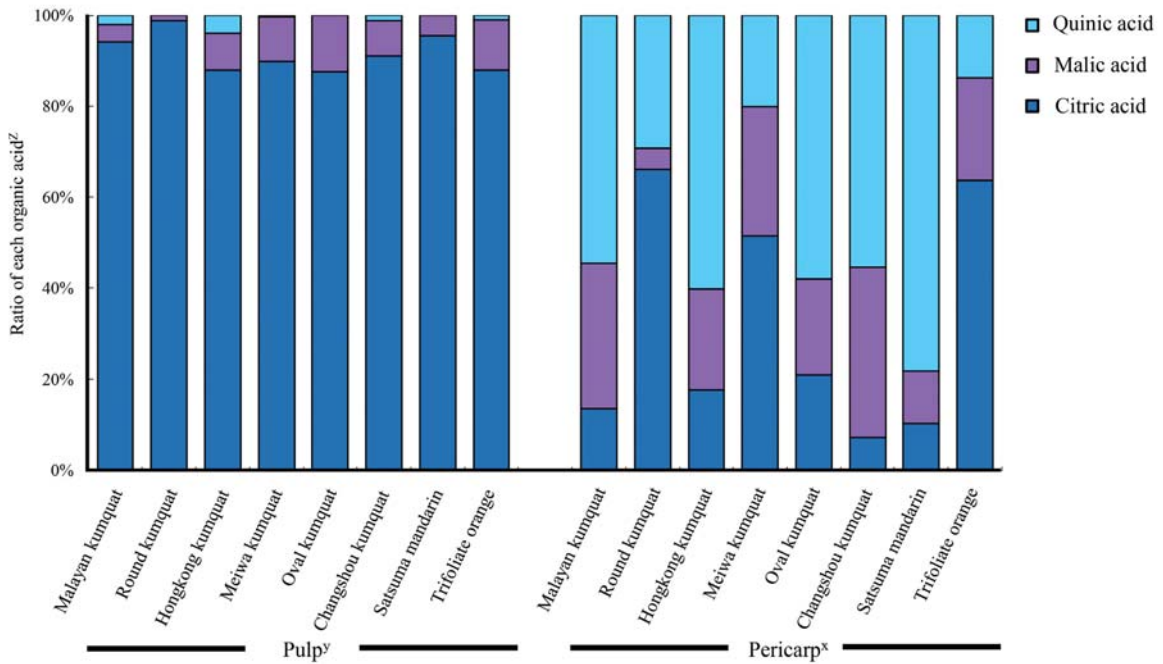


Fig. 4. Comparison of the organic acid composition in the pulp and pericarp of 6 *Fortunella* species, Satsuma mandarin and trifoliolate orange.
^z Each organic acid content / total of three organic acids × 100 (n = 5).
^y Juice sac.
^x flavedo and albedo.

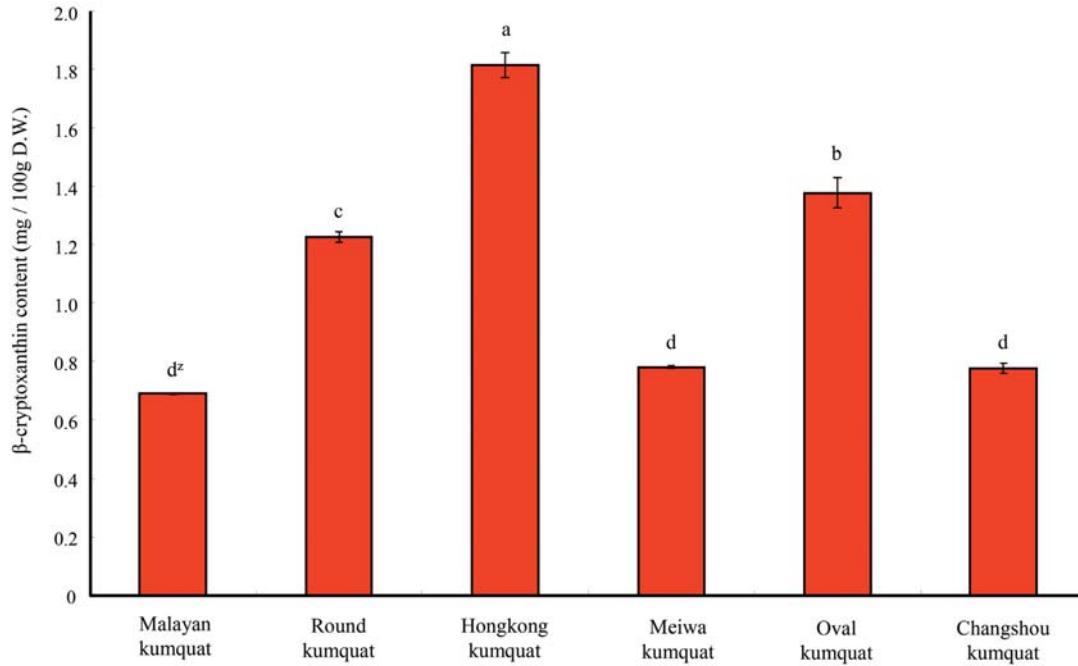


Fig.5. Comparison of the β -cryptoxanthin content in the edible part of 6 *Fortunella* species.

^z Different letters represent significant difference in Tukey's multiple range test, 1% level (n = 3).

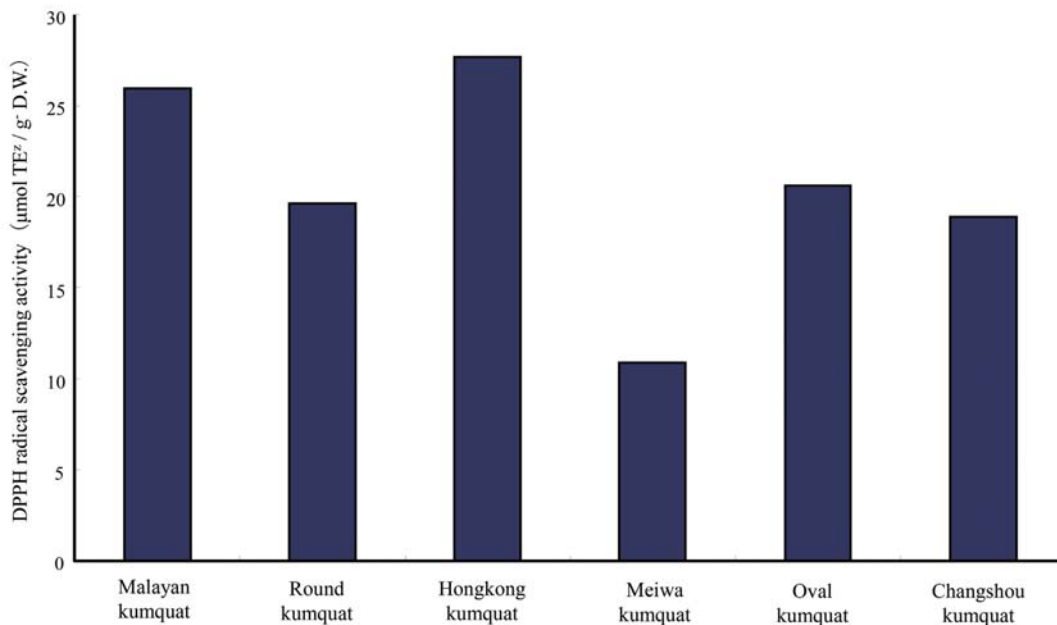


Fig.6. Comparison of the antioxidant capacity (DPPH radical scavenging activity) in the edible part of 6 *Fortunella* species.

^z TE indicate Trolox equivalent.

キンカンおよびチョウジュの3種はそれぞれ0.70, 0.78 および0.78 mg / 100 g D.W. と比較的低い値であった (図5)。また、可食部における DPPH ラジカル消去能もマメキンカンが27.65 μ mol Trolox TE / 100 g D.W. で最も高い値を示したのに対し (図6)、ニンボウキンカンが最も低い値であった (10.87 μ mol Trolox TE / 100 g D.W.)。

考 察

本研究では、特徴のあるキンカン品種を育成するために、キンカン属植物6種について、葉、花および果実の形態調査を行うとともに、健康機能性成分の評価として果実中の β -クリプトキサンチン含量の測定と DPPH ラジカル消去能の予備的な調査を行った。その結果、キンカ

ン属植物6種の間において、葉、花および果実の形態的特徴について高い多様性がみられた。また、 β -クリプトキサンチン含量やDPPHラジカル消去能は、キンカン属野生種の方がニンポウキンカンより高い傾向を示した。これらのことから、キンカン属野生種がキンカン属植物における品種改良のための材料と成り得ることが示唆された。そこで本研究で得られた知見をもとに、キンカン6種それぞれの特徴と今後の利用法について考察した。

まず、栽培種であるニンポウキンカンは、果実の大きさと果皮の糖含量の値はキンカン属植物の中でフクシウキンカンに次いで2番目に高く、果肉の糖と酸含量は最も多かった。ニンポウキンカンの優れた食味は、果肉がほとんどないため、果皮に対して果肉の割合が少なく、果実全体の糖と酸のバランスが良いことによるものと考えられる。一方、一果実あたりの種子数は、5.3個とナガキンカンに次いで多く、健康機能性である β -クリプトキサンチン含量とDPPHラジカル消去能の健康機能性はキンカン属植物内で最も低い傾向を示した。これらのことからニンポウキンカンの今後の改良点として、種子を減らし、健康機能性を向上させることが挙げられる。これらの改良点を考慮した研究が、近年様々な手法を用いて進められている。例えば、八幡ら(25)は、無核性キンカンの育種素材として、ニンポウキンカン珠心胚へのコルヒチンとオリザリンの浸漬処理により、多くの四倍体および二倍体と四倍体の倍数性キメラを作出した。さらに、糠谷ら(26)とNukayaら(27)は、それぞれニンポウキンカンの四倍体と倍数性キメラを母本とした二倍体との倍数体間交雑から、複数の三倍体雑種の獲得した。宮崎県は、ニンポウキンカンの珠心胚由来の同質四倍体(28)と二倍体の交雑より、極めて無核性の高い三倍体品種‘宮崎夢丸’を育成している。また、キンカン育種への新たなアプローチとして、Yasudaら(29)は、カンキツ優良品種である‘清見’タンゴールとニンポウキンカンとの二倍体間の属間交雑より、三倍体と三倍体様の異数体を示す雑種の獲得に成功した。Chengら(30)は、細胞融合法を用いて、ニンポウキンカンと‘バレンシア’オレンジと四倍体の体細胞雑種を作出している。ニンポウキンカンの優れた果実特性と栽培種としてのイメージの定着を考慮すると、キンカンの育種は今後当種を中心として展開されていくと考えられる。

野生種の中でも分類学的に他種と区別されており、原始キンカン亜属(*Protocitrus*)に属するマメキンカンであるが(1, 7)、最近ではDNA・染色体レベルの研究においても他のキンカンと異なることが示されている(31,

32)。本研究で調査したマメキンカンの形態的な特徴は、他の5種のキンカンとは大きく異なっていた。特徴的なものとしては、極めて小さい果実は濃橙色の果皮色を示し、キンカン属6種の中で β -クリプトキサンチン含量が最も高く、DPPHラジカル消去能も同様に最も高い傾向であり、高い健康機能性を有することが示唆された。近年、カンキツ品種において、‘不知火’や‘麗紅’のようなユニークな果形や果皮色は、品種間の差別化を図る重要な形質の一つである。食味に劣るため、これらの形質の栽培種への導入は容易ではないが、品種の多様性が低いキンカン育種にとって有用な資源であると考えられる。

マルキンカンは、栽培種であるニンポウキンカンに次いで果肉と果皮の糖含量が多かったのに対し、それらの酸含量は最も少なく、低酸を示した。さらに、 β -クリプトキサンチン含量とDPPHラジカル消去能の値はニンポウキンカンより高い傾向にあった。これらの結果から品質面では非常に有用であると言える。しかし、マルキンカンは多胚性に加え、花粉稔性5.8%と他のキンカンと比べ著しく低いことが交配親として用いるときに障害となる。Takamiら(33)は、この問題点を克服するために、マルキンカンと‘森田ネーブル’オレンジとの細胞融合を行い、四倍体の体細胞雑種を作出した。また、Nukayaら(34)は、マルキンカンの珠心胚にコルヒチン処理を行い、二倍体より花粉稔性の高い四倍体の誘導に成功し、ニンポウキンカンとの交雑で三倍体が獲得されている。これらのようにマルキンカンを使った新たな育種素材の開発が試みられている。

ナガキンカンは、供試したキンカン属6種において唯一単胚性を示す種であり、これは交雑育種を行う上で極めて重要な形質である。実際に、ナガキンカン種子親に四倍体のニンポウキンカンを交雑し、三倍体の種子数の少ない‘ぶちまる’の育成に成功している(10)。本研究の形態調査の結果では、種名の通り果実が他のキンカンより細長く、丸みを帯びた他のキンカンとは異なる形質であった。また、ナガキンカンの β -クリプトキサンチン含量、DPPHラジカル消去能は、ともに栽培種であるニンポウキンカンと比較して高い傾向を示した。これらのことから育種素材としての価値も高く、種子親として活用することで新たなキンカン品種や中間母本の育成に寄与するものと考えられる。

ナガハキンカンは、種名の通り大きく細長い葉が、他のキンカンに類を見ない特徴である。また、果実の形態がニンポウキンカンと類似したものの、その糖含量はマメキンカンに次いで低かった。一方で、DPPHラジカル

消去能がニンポウキンカンの2倍以上を示したことから、機能性キンカン育種の素材として利用できる可能性が示唆された。さらに、「大実金柑」として一般流通するチョウジュキンカンは、他のキンカンと比べ、葉が丸く、大果で果皮の糖度が最も高かった。しかし、発達した果肉の果汁には酸が多く含まれていたため、生食用としては不向きである。したがって、従来通りマーマレードをはじめとする加工品や観賞樹としての利用に限定されると思われる。ナガハキンカンとチョウジュキンカンは、それぞれキンカンとライムの属間およびキンカンの種間雑種と考えられており(1)、近年の分子学的手法(31)や染色体核型分析(32)の結果からこれら2種はカンキツとキンカン間の属間雑種であることが示唆されている。そのため、これらとキンカンやカンキツとの戻し交雑を行うことで、両属の特長を有する新奇カンキツ類の育成に繋がるかもしれない。

以上より、我が国に導入されたキンカン属植物は6種しかないものの、果実や葉の形態的特徴に多様性が存在することが確認された。果実品質は、栽培種であるニンポウキンカンが他の5種より優れていたが、健康機能性表示で期待される β -クリプトキサンチン含量は、カンキツとの属間雑種とされている2種以外の野生種で、DPPHラジカル消去能は、すべての野生種においてニンポウキンカンより高い傾向を示した。そのため、現在は主にニンポウキンカン1種に依存しているキンカン育種において、野生種を母本として用いることで、健康機能性成分やバラエティに富んだ新奇性の高いキンカン品種の育成が可能になるとと思われる。今後、これらのキンカン属植物について、開花・収穫期ごとの各種成分の変化、果皮・果肉における部位別の β -クリプトキサンチン含量、ポリフェノール含量などのより詳細な調査を行う予定である。また、予備的に実施した抗酸化能に関する調査では、水溶性・脂溶性の分画に加え、ABTSやH-ORACなどの測定法を検討すべきと思われる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、貴重な植物材料を提供頂いた日本マンダリンセンターの職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

要 約

我が国に導入されているキンカン属(*Fortunella*)植物6種すべてを育種のための遺伝資源として評価するた

めに、それらの形態学的特徴と果実特性について調査した。キンカン属植物6種の間において、葉、花および果実の形態的特徴の高い多様性がみられた。特に、マメキンカン [*F. hindsii* (Champ. ex Benth.) Swingle] は、果実が小さく濃橙色であるように、他の種と顕著に異なる形態的特徴を有していた。キンカン属植物の果実の糖含量は、果肉と果皮の両方でウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marcow.) より高い傾向が見られたが、マメキンカンのみ低い値を示した。チョウジュキンカン (*F. obovata* hort. ex Tanaka) は、果皮において特に高い糖含量を示した。キンカン属植物の果肉における主要有機酸はクエン酸であったが、果皮ではキナ酸とリンゴ酸の割合が増加した。 β -クリプトキサンチン含量は、マメキンカン、ナガキンカン [*F. margarita* (Lour.) Swingle] およびマルキンカン [*F. japonica* (Thunb.) Swingle] で高い値を示した。さらに、DPPHラジカル消去能は、栽培種であるニンポウキンカン (*F. crassifolia* Swingle) は最も低く、マメキンカンとナガハキンカン [*F. polyandra* (Ridl.) Tanaka] で高い傾向を示した。これらの結果は、キンカン属野生種が将来有望なキンカンを育種する上で重要な形質を有することを示唆した。

引用文献

- 1) Swingle, W. T. and Reece, P. C., 1967, The botany of *Citrus* and its wild relatives in the orange subfamily, p. 190-430, In: W. Reuther, H. J. Webber and L. D. Bachelor (eds.), The citrus industry, Vol. 1, University of California, Berkeley.
- 2) Yin-Min, Y., 1985, The status of *Fortunella* genetic resources in China, *Fruit Var. J.*, **39**, 17-20.
- 3) Goh, R. M. V., Pua, A., Liu, S. Q., Lassabliere, B., Leong, K. C., Sun, J., Tan, L. P. and Yu, B., 2020, Characterisation of volatile compounds in kumquat and calamansi peel oil extracts, *J. Essent. Oil Bear. Plants*, **23**, 953-969.
- 4) Wang, Y. W., Zeng, W. C., Xu, P. Y., Lan, Y. J., Zhu, R. X., Zhong, K., Huang, Y. N. and Gao, H., 2012, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) peel, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 3382-3393.
- 5) Avieli, N., 2005, Vietnamese new year rice cakes: iconic festive dishes and contested national identity, *Ethnology*, **44**, 167-178.
- 6) 田中長三郎, 1932, 金柑属総説(一), 柑橘研究,

- 5, 141-154.
- 7) 田中長三郎, 1933, 金柑属総説(二), 柑橘研究, 6, 19-40.
- 8) Swingle, W. T., 1915, A new genus, *Fortunella*, comprising four species of kumquat oranges, J. Wash. Acad. Sci., 5, 165-176.
- 9) 近藤恭史, 2002, こん太, 品種登録10249.
- 10) 吉田俊雄, 根角博久, 吉岡照高, 家城洋之, 伊藤祐司, 野々村睦子, 上野 勇, 山田彬雄, 村瀬昭治, 瀧下文孝, 2002, おちまる, 品種登録10379.
- 11) 古屋良子, 2007, ゆみちゃんのほっぺ, 品種登録14785.
- 12) 金丸 勇, 2006, 勇紅, 品種登録14416.
- 13) 安田喜一, 國武久登, 中川匠子, 黒木宏憲, 八幡昌紀, 平田力也, 吉倉幸博, 川上郁夫, 杉本安寛, 2008, ニンボウキンカン'勇紅'の倍数性周縁キメラの証明とその形態的特性, 園学研, 7, 165-171.
- 14) 竹島久善, 児玉良一, 黒木重文, 山口和典, 徳満憲治, 荒武貴浩, 黒木恒和, 木下哲次, 平田力也, 佐野真実, 2010, 宮崎夢丸, 品種登録19999.
- 15) 竹島久善, 児玉良一, 長田龍太郎, 黒木重文, 山口和典, 徳満憲治, 荒武貴浩, 黒木恒和, 木下哲次, 平田力也, 佐野真実, 串間新一, 2011, 宮崎王丸, 品種登録20868.
- 16) 江藤義敦, 2016, 紅央, 品種登録25294.
- 17) 松本亮司, 池松大亮, 吉岡照高, 山本雅史, 2008, 抗リモニン抗血清を用いた酵素免疫測定法によるカンキツの機能性成分, リモニン配糖体の定量, 園学研, 7, 481-489.
- 18) 矢野昌充, 生駒吉織, 杉浦 実, 2005, β -クリプトキサンチン研究最近の進歩, 果樹研報, 4, 13-28.
- 19) Yamaguchi, M. and Uchiyama, S., 2004, Beta-cryptoxanthin stimulates bone formation and inhibits bone resorption in tissue culture in vitro, Mol. Cell Biochem., 258, 137-144.
- 20) 杉浦 実, 2017, 国産カンキツ類に多い β -クリプトキサンチンと機能性食品の開発, 化学と生物, 55, 566-572.
- 21) 近藤 悟, 津田和彦, 武藤徳男, 中谷宗一, 2002, カンキツ果実の発育中における抗酸化機能の推移, 園学研, 1, 63-66.
- 22) Miyake, Y., 2006, Characteristics of flavonoids in Niihime Fruit – a new sour citrus fruit, Food Sci. Technol. Res., 12, 186-193.
- 23) Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M. and Patil, B. S., 2005, Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins, J. Agric. Food Chem., 53, 2009-2014.
- 24) 須田郁夫, 2000, 食品機能研究法, 光琳出版社, 京都, 218-220, 抗酸化機能, 分光光度計によるDPPHラジカル消去能の測定, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一 編.
- 25) 八幡昌紀, 柏原夕希子, 黒木宏憲, 國武久登, 小松春喜, 2004, ニンボウキンカン種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響, 園学研, 3, 11-16.
- 26) 糠谷綱希, 太田知宏, 安田喜一, 八幡昌紀, 國武久登, 小松春喜, 新居直祐, 向井啓雄, 原田久, 高木敏彦, 2011, ニンボウキンカン珠心胚へのコルヒチン処理によって得た倍数体の特性とそれらの三倍体育種への利用, 園学研, 10, 1-8.
- 27) Nukaya, T., Sudo, M., Yahata, M., Ohta, T., Tominaga, A., Mukai, H., Yasuda, K. and Kunitake, H., 2019, The confirmation of a ploidy periclinal chimera of the Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) induced by colchicine treatment to nucellar embryos and its morphological characteristics, Agronomy, 9, 562.
- 28) 河瀬憲次, 八幡昌紀, 中川匠子, 原口加奈, 國武久登, 2005, ニンボウキンカンにおける同質四倍体の選抜とその特性, 園学研, 4, 141-146.
- 29) Yasuda, K., Yahata, M., Komatsu, H., Kuroki, Y. and Kunitake, H., 2010, Triploid and aneuploid hybrids from diploid-diploid intergeneric crosses between Citrus cultivar 'Kiyomi' tangor and Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) for seedless breeding of kumquats, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 79, 16-22.
- 30) Cheng, Y. J., Guo, W. W. and Deng, X. X., 2003, Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids, Plant Cell Rep., 21, 445-451.
- 31) Yasuda, K., Yahata, M., Komatsu, H. and Kunitake, H., 2010, Phylogeny and classification of *Fortunella* (Aurantioideae) inferred from DNA polymorphisms, Bull. Fac. Agr., Univ. Miyazaki, 56, 103-110.
- 32) Yasuda, K., Yahata, M. and Kunitake, H., 2016, Phylogeny and classification of kumquats (*Fortunella* spp.) inferred from CMA karyotype composition, Hort. J., 85, 115-121.

- 33) Takami, K., Matsumaru, A., Yahata, M., Imayama, T., Kunitake, H. and Komatsu, H., 2004, Production of intergeneric somatic hybrids between round kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) and 'Morita navel' orange (*Citrus sinensis* Osbeck), *Plant Cell Rep.*, **23**, 39-45.
- 34) Nukaya, T., Sudo, M., Yahata, M., Nakajo, Y., Ohta, T., Yasuda, K., Tominaga, A., Mukai, H. and Kunitake, H., 2019, Characteristics in autotetraploid kumquats (*Fortunella* spp.) induced by colchicine treatment to nucellar embryos and their utilization for triploid breeding, *Sci. Hortic.*, **245**, 210-217.

カンキツ属4種とキンカン属5種を用いた カンキツ類の遺伝解析に有用な SSR マーカーの選定

安田喜一¹・戸村大河^{1,2}・佐藤真衣¹・富永晃好³・八幡昌紀³・國武久登⁴

Selection of useful SSR markers for genetic analysis of citrus
using 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species

Kiichi YASUDA, Taiga TOMURA, Mai SATO,
Akiyoshi TOMINAGA, Masaki YAHATA and Hisato KUNITAKE

(Received 25 November 2021; accepted 24 December 2021)

Abstract

SSR genotyping of the 9 citrus species using by public SSR markers and polyacrylamide electrophoresis was performed for screening useful DNA marker to genetic analysis in citrus. As a result, 18 markers were primary selected from a total of 281 markers because of high polymorphism and difference of amplified fragment length between their alleles, and then, 8 markers with high reproducibility and distinguishability were selected from these ones. In these SSR loci, many polymorphisms were detected among the closely related 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species, and these species could be identified by a minimum of two Markers, GSR3138 and CiBE3936. On the other hand, the direct-sequencing of bands different from the previously expected fragment length suggested that multiple alleles might exist for one SSR marker in some species. In the future, using the selected SSR markers, we plan to analyze genetic background of the tetraploids and hybrid strains produced in previous studies, and at the same time, proceed with the design of SSR markers based on the public genomic information.

緒言

カンキツ類は、一般にカンキツ (*Citrus*) 属, カラタチ (*Poncirus*) 属およびキンカン (*Fortunella*) 属の3属を示す。これらの植物群はインド, 東南アジア, 中国, フィリピン, 台湾, 日本, マレー諸島およびメラネシアの島々に分布する (1)。カンキツは生食用をはじめ加工用まで幅広く利用されており, それらに利用される品種では, 食べやすさ, 扱いやすさから, 無核 (種無し) のものが多い。そのためカンキツ類では, 無核性は極めて重要な形質である。

無核性カンキツの育成手法の一つとして, 三倍体を利用した育種が挙げられる (2-5)。三倍体では, 減数分裂時に異常な染色体数を持つ配偶子が高頻度で形成される

ため, 開花時に正常な受精が阻害され, 無核果が生じやすい。これまでに, カンキツ属やキンカン属では, 四倍体を用いた交雑によって多くの三倍体が得られており, 四倍体は無核性品種育成のための重要な育種素材であると言える (6-10)。従来, カンキツ類の同質四倍体は, 偶発的に出現する珠心胚実生から獲得されてきたが, その頻度は極めて低く, 効率的な方法とはいえない (11)。そのため, 近年ではコルヒチンやオリザリンなどの紡錘糸形成阻害剤を種子や腋芽に処理する方法が主流となっており, これまでに様々なカンキツ類で同質四倍体の作出に成功している (7, 9, 12-14)。しかし, 種子への紡錘糸形成阻害剤処理方法では, 有性胚由来の実生が混入している可能性があるため (15), 発生起源を確認する必要がある。

¹ 東海大学農学部応用植物科学科

² 静岡大学大学院総合科学技術研究農学専攻

³ 静岡大学大学院農学領域

⁴ 宮崎大学農学部応用生物科学科

連絡先: 安田喜一 e-mail: yk964422@tsc.u-tokai.ac.jp

もう一つの無核性カンキツの育成手法として、雄性・雌性不稔性を有する品種を母本とした交雑育種がある。その代表的な育種母本として、‘宮川早生’ウンシュウミカン (*C. unshiu* Marcow.) と‘トロビタ’スイートオレンジ [*C. sinensis* (L.) Osbeck] の交雑より育成された‘清見’タンゴールが挙げられる (16)。当品種は、後代に遺伝する核・細胞質型の薬退化タイプの雄性不稔性 (17, 18) を有しており、種子親として‘不知火’、‘はるみ’および‘はれひめ’などの多くの少核性・無核性品種の育成に寄与している (19)。育種年限の長い果樹において、戦略的かつ効率的な交雑育種を推進するためには、交雑実生の早期雑種性解析は必要不可欠である。また、近年では、植物の育成者権保護の関心が高まっており、DNA マーカーによる品種識別により交雑親の間違い事例が発生している。例えば、愛媛県育成品種‘甘平’は、2007年の品種登録時には‘西之香’と‘不知火’の雑種とされていたが、7年後にDNA 解析によって花粉親がポンカンであることが判明した (20)。

これまでにカンキツ類の珠心胚における有性胚と珠心胚の判別方法には、アイソザイム分析やCMA 染色体核型分析が用いられてきたが (21-24)、最近の主流として Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) や Simple Sequence Repeat (SSR) 分析のような分子生物学的手法が用いられている (11, 15, 25-28)。一方、カンキツ類の品種・種識別では、その他にも restriction fragment length polymorphism (RFLP) (29)、cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) (30)、single nucleotide polymorphism (SNP) (31) などのDNA マーカーが利用されており、交雑育種の雑種性解析に応用できる。そのなかでも、SSR は多型性・再現性が高く、共優性の遺伝様式を示し、ゲノム中に豊富に存在するため、信頼性の高いDNA マーカーとして様々な遺伝解析に用いられている。カンキツ属では、これまでに Ollitrault ら (32) や Shimizu ら (33) などによって多くの SSR マーカーが設計・公開されており、それらの情報に基づいた蛍光プライマーとキャピラリーシークエンサーを利用したフラグメント解析が主流となっている (33-35)。しかしながら、この手法では高価な機械や蛍光試薬が必要であり、その利用は限定的である。

そこで本研究では、カンキツ類における同質四倍体の発生源や交雑実生の雑種性の解析などに有用なDNA マーカーの探索を目的として、既に設計・公開されている SSR マーカーから、比較的安価かつ容易なポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) を用いた分析により選定を試みた。

材料および方法

植物材料

静岡大学農学部附属地域フィールド科学教育研究センター植栽のウンシュウミカン‘宮川早生’ (英名: Satsuma mandarin) (*Citrus unshiu* Marcow.), ポンカン‘太田ポンカン’ (Ponkan mandarin) (*C. reticulata* Blanco), タチバナ (Tachibana) [*C. tachibana* (Makino) Tanaka], シキキツ (Calamondin) (*C. madurensis* Lour.), ニンポウキンカン (Meiwa kumquat) (*Fortunella crassifolia* Swingle), マルキンカン (Round kumquat) [*F. japonica* (Thunb.) Swingle], マメキンカン (Hongkong kumquat) [*F. hindsii* (Champ. ex Benth) Swingle], チョウジュキンカン (Changshou kumquat) (*F. obavata* hort. ex Tanaka), ナガハキンカン (Malayan kumquat) [*F. polyandra* (Ridl.) Tanaka] のカンキツ属植物4種とキンカン属植物5種の計9種を供試した。なお、マメキンカンに関しては二倍体の変種 (*F. hindsii* var. *chintou*), マルキンカンについては、宮崎大学農学部植栽の実生を用いた。

ゲノム DNA の抽出

供試植物の成葉から改変CTAB法 (36) によりゲノムDNAを抽出した。すなわち、2 mL チューブに成葉約200mg とクラッシャーを入れ、液体窒素とSKミル (SK-100, Tokken, Inc.) を用いて凍結・粉碎した。そこに予熱したCTAB溶液1 mL とメルカプトエタノール10 μ L を加えて混和、ブロックインキュベーター (PowerBLOCK Shaker, ATTO) で65 $^{\circ}$ C, 600rpm, 30分間振とう、その間にRNaseを4 μ L 添加した。その後、室温, 14,000rpm, 5分間遠心分離して得られた上清について、フェノール/クロロホルムとクロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびイソプロパノール沈殿を実施し、DNAペレットをTE buffer 100 μ L に溶解した。微量分光光度計 (NanoDrop2000c, ThermoFisher Scientific K.K.) でDNA溶液の濃度を測定後、5 ng/ μ L に調整してPCRに用いた。

SSR マーカーの一次選抜

Ollitrault ら (32) がクレメンティン (*C. clementina* cv. Nules) のゲノム配列データより設計した526個のSSRマーカーより選抜した79個、Shimizu ら (33) がクレメンティン、ウンシュウミカンおよびスイートオレンジ [*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Ridge Pineapple] のゲノム配列データより設計した202個のSSRマーカーを対象とした。これらのマーカーのうち、多型性の指標である多型

情報含有量 (PIC) 値が高く, アレル間の増幅断片長の差異が約10bp 以上であるものを各連鎖群より最低1個以上選抜した。

SSR 分析および遺伝子型決定

0.5ng/μL ゲノム DNA, 0.2μM forward/reverse プライマー, 2.5μL GoTaq® Green Master Mix (Promega) を含む計5 μL を PCR 反応溶液とした。サーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice Touch, Takara) を用いて PCR 反応を行った。なお, ポリメラーゼの違いなどにより期待された増幅が得られなかった場合は, PCR 条件を再検討した。最適化された PCR 反応後, 反応溶液を100bp DNA Ladder (Bioneer) と20bp DNA Ladder (Takara) とともに12% ポリアクリルアミドゲル上にアプライし, 電気泳動用電源装置 (PowerStation Ghibli I, ATTO) を用いて200V, 80分間電気泳動を行った。泳動後, ポリアクリルアミドゲルを0.1μg/mL のエチジウムブロマイドを含む TBE バッファーで30分染色後, 紫外線照射下で可視化した。デジタル画像を Microsoft PowerPoint (Microsoft) を用いて簡易処理し, 100bp DNA Ladder 間の直線を基準として増幅バンドの多型性により遺伝子型を決定した。

ダイレクトシーケンスおよび塩基配列決定

タチバナの NSX02 遺伝子座における PCR 産物について, 4% アガロースで電気泳動し, 異なる3つの断片長のバンドを含むゲル部分をカミソリで切り出し, GENE CLEAN kit (MP Bio Japan K.K.) と GEL/PCR Purification Column (FAVORGEN Biotech Co.) を用いてゲル抽出を行った。抽出した増幅産物は, ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific K.K.) により精製し, 増幅産物13.36 μL と10 pmol のプライマー0.64 μL を混合・調整後に, FASMAC Ltd. へシーケンス分析を委託した。Forward/reverse リード配列のオーバーラップ領域で配列を決定し, 比較した。

結果

SSR マーカーの一次選抜の結果, Table 1 に示した18 マーカーを本試験に用いることとした。それらのプライマーペアを用いたカンキツ属4種とキンカン属5種の PCR では, 期待される増幅が得られなかったマーカーが多かったため, グラジエント PCR によりアニール温度を中心に条件の最適化を行った (Table 2)。その結果, 再現性が良く, 増幅断片間の識別性が高い CiBE3936,

Table 1. Information on SSR markers used in the present study with their linkage groups, primer sequences, repeat motifs, annealing temperatures, amplified fragment length, accession IDs, and bibliographic references.

Locus	Linkage group	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Sequence	Motif	Annealing temperature (°C)	Amplified fragment length (bp)	Accession ID	Reference
CiBE3936	1	GTAATGATAGCCGTTGGTCTT	TATGAGATGCCTTGTATTGCT		(TC) ¹⁶	55	251	ET104698	
CiBE1644	3	ACAGAAGAGGAGCCATTATTT	CAGAGAGAACCCGGAAGAAG		(GTT) ¹¹	55	360	ET097780	
CiBE4796	5	GATGAGAACGCTGATGCT	TTCAACCACACTGACGATAA		(AG) ¹⁰	55	194	ET110437	Ollitrault <i>et al.</i> , 2010
CiBE0447	6	CACAAGAGAGTAAACCCAAA	CGTCAAGAAAGAGAAATGATG		(TTC) ¹⁴	55	303	ET091388	
CiBE2165	7	AATCCACTCTCAAACACCAG	AACTGCCAAATAACTACCATTTC		(TG) ⁹	55	263	ET102021	
CiBE2227	8	AGAACCAAGTCACCTCACAG	AGAGAAGGATAGGGATGGAA		(AAC) ⁷	55	153	ET100673	
NSX175	1	GAGCTTACTAATAGGATACGCTG	ATTGTAAGGCGAATTGGATGG		(AAGA) ⁿ (AAT) ⁿ	56	214	scaffold_64	
GSR2101	1	AAATGAATTTGTAATAACGGAGAT	GAGATTCATAATTTGAAAGCTCTC		(TA) ⁿ (GA) ⁿ	54	113	BUZY106502.b1	
TSGR264	2	TAACACCACCTTCAATTCOCA	GGCAAACTATTAGACCTCCGT		(AAT) ⁿ	58	140	scaffold_2	
TSGR265	2	AACAGTCCGACTAATTCATCC	TATCTCAAAGACTCCAACCTC		(TA(GCA)) ⁿ (CAA) ⁿ	56	165	scaffold_2	
NSX02	3	ACATCACATCGCCAAATACCC	ACTCGTGGGACTCATFAGACTC		(TA) ⁿ (CA) ⁿ	54	143	scaffold_3	
NSX165	3	GTTCTTCTGTATGAAGGGTACAG	TTTGTCTGTCTGTGGCTTGTGTC		(AT) ⁿ (AGA) ⁿ	56	289	scaffold_57	Shimizu <i>et al.</i> , 2016
TSRA107	4	GGATTTAGAAAAGTAGAGCAACCA	TTTGAGAACCCAGCACTATACC		(TGAAGA) ⁿ	56	200	scaffold_6	
NSX43	5	TTCTGGATCAAACTAGCTTCGT	AACTTTAACCTCAATCAGCC		(TTCATGA) ⁿ	58	158	scaffold_1	
GSR3138	5	GCCTTTGCTAACTGGAAAGTC	CATAAGCTTGGGTGTGTGT		(AAT) ⁿ	54	135	BUZY63372.g1	
NSX156	6	CAGTGGTGGCTTTAAGG	GGAGTTTGACAGTTTGAACCA		(TTCCT) ⁿ (TAT) ⁿ (TCT) ⁿ	56	216	scaffold_42	
GSR6101	7	AAAAACAGAGCAGAAAGAAC	TGCAATCCATAATAGCAAG		(CCGGCA) ⁿ	60	248	BUZY128935.g1	
SSR07B25	9	AGGCTATCTCTAATCCATTGCT	GCCATTGCTGTTCACTTTACTC		(GA) ⁿ	54	211	CX074011	

Table 2. Optimization of PCR conditions for 18 SSR markers.

Locus	PCR condition [temperature · time (°C · sec)]			
	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycle
CiBE0447				
CiBE1644				
CiBE2227	94 · 60*	58 · 30	72 · 30	30
CiBE3936				
CiBE4796				
CiBE2165		60		
SSR07B25		56	· 25	
GSR3138		54		
NSX02				
TSGR265	· 20	56 · 35	· 35	
NSX175				32
TSGR264		58		
NSX156	94	55	72 · 60	
NSX43		56 · 25	· 35	
TSRA107		55 · 45	· 45	
GSR2101	· 60	52	· 60	
GSR6101		53		35
NSX165		55 · 45	· 45	

* Bold letters indicate modified conditions.

Table 3. The range of the amplified fragment length by PCR with 8 SSR markers.

Locus	Linkage group	Amplified fragment length (bp)								
		80~100	101~120	121~140	141~160	161~180	181~200	201~300	301~400	401~500
CiBE3936								1A / 1B / 1C / 1D / 1E		
NSX175	1					1A	1B / 1C	1D		
TSGR264	2	2A	2B / 2C	2D						
NSX02	3		3A / 3B	3C						
NSX165								3A / 3B / 3C	3D / 3E	
GSR3138	5		5A / 5B	5C	5D / 5E	5F / 5G				
GSR6101	7					7A	7B	7C		
SSR07B25	9					9A	9B / 9C			

NSX175, TSGR264, NSX02, NSX165, GSR3138, GSR6101およびSSR07B25の8マーカーを選抜できた。

8マーカーを用いたカンキツ属4種とキンカン属5種のPCRとPAGEを行ったところ、すべての遺伝子座で既報の期待される断片長を有する明瞭なバンドが得られた (Table 3)。しかしながら、GSR3138 (Fig. 1a)を除く7マーカーでのPCRでは、それら以外にも複数のバンドが検出されたため、既報の断片長かつ明瞭な強いシグナルを有するバンドを本研究における遺伝子型決定に用いた (Fig. 1b, Fig. 2)。供試した9種の8遺伝子座における遺伝子型をTable 4に示した。最も多くの種間多型が得られたのは第5連鎖群に座上するGSR3138であり、ウンシュウミカン、シキキツおよびチョウジュキンカンの3種間、ナガハキンカンとマルキンカンの2種間において同じ遺伝子型を示した。また、ニンポウキンカンを除く8種でヘテロ接合であった。第1連鎖群に座上するCiBE3936は9種中4種でホモ接合であったものの、種間多型は多く観察され、ウンシュウミカンとナガハキ

ンカンの2種間、ポンカン、マルキンカンおよびマメキンカンの3種間において同じ遺伝子型を示した。さらに、GSR3138で識別できなかった2組の種間では、それぞれまったく異なる遺伝子型を示した。一方、その他の5遺伝子座では、ホモ接合も多く、比較的多型性は低かった。興味深いことに、第2連鎖群に座上するTSGR264のPCRでは、キンカン属5種のみバンドがまったく検出されなかった (Fig. 1b)。

既報の期待される断片長以外のバンドがSSRであるかどうかを確認するため、代表として第3連鎖群に座上するNSX02におけるタチバナで増幅された3本のバンドのダイレクトシーケンスを実施した。最も長い鎖長のバンド (l) は技術的な問題で明瞭な波形が得られなかったが、残り2本のバンドでは一部の配列を決定することができ、中間の鎖長のバンド (m) は既報と同様の断片長を有するバンド (s) と少なくとも19塩基の差異があるSSR遺伝子座 [(TA)_n(CA)_n] であることが明らかとなった (Fig. 2)。

Table 4. SSR genotyping of 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species by using 8 markers.

Locus	<i>Citrus</i>									<i>Fortunella</i>							
	Linkage group	Satsuma mandarin 'Miyagawa-wase'	Ponkan mandarin 'Ota-ponkan'	<i>Ho/He</i>	Tachibana	<i>Ho/He</i>	Calamondin	<i>Ho/He</i>	Changshou kumquat	<i>Ho/He</i>	Malayan kumquat	<i>Ho/He</i>	Meiwa kumquat	<i>Ho/He</i>	Round kumquat	<i>Ho/He</i>	Hongkong kumquat
GtBE3936	1	1D/1D	1B/1C	<i>He</i>	1A/1B	<i>He</i>	1B/1E	<i>He</i>	1A/1A	<i>Ho</i>	1D/1D	<i>Ho</i>	1B/1B	<i>Ho</i>	1B/1C	<i>He</i>	1B/1C
NSX175		1A/1A	1C/1D	<i>He</i>	1A/1C	<i>He</i>	1C/1C	<i>Ho</i>	1C/1C	<i>Ho</i>	1A/1A	<i>Ho</i>	1B/1B	<i>Ho</i>	1B/1B	<i>Ho</i>	1B/1B
TSGR264	2	2D/2D	2A/2A	<i>Ho</i>	2B/2C	<i>He</i>	2D/2D	<i>Ho</i>	n.d. ^y	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.
NSX02	3	3C/3C	3A/3C	<i>He</i>	3C/3C	<i>He</i>	3C/3C	<i>Ho</i>	3A/3C	<i>He</i>	3C/3C	<i>He</i>	3A/3B	<i>He</i>	3A/3B	<i>He</i>	3A/3C
NSX165		3A/3E	3B/3E	<i>He</i>	3C/3E	<i>He</i>	3D/3E	<i>He</i>	3E/3E	<i>He</i>	3D/3E	<i>He</i>	3E/3E	<i>Ho</i>	3C/3E	<i>He</i>	3D/3E
GSR3138	5	5B/5C	5A/5G	<i>He</i>	5A/5A	<i>He</i>	5B/5C	<i>He</i>	5B/5C	<i>He</i>	5C/5F	<i>He</i>	5D/5D	<i>Ho</i>	5C/5F	<i>He</i>	5C/5E
GSR6101	7	7B/7C	7A/7B	<i>He</i>	7A/7B	<i>He</i>	7B/7B	<i>Ho</i>	7B/7B	<i>Ho</i>	7B/7B	<i>Ho</i>	7A/7B	<i>He</i>	7A/7B	<i>He</i>	7A/7B
SSR07B25	9	9B/9B	9B/9C	<i>He</i>	9B/9B	<i>He</i>	9B/9C	<i>He</i>	9B/9B	<i>Ho</i>	9A/9A	<i>Ho</i>	9C/9C	<i>Ho</i>	9C/9C	<i>Ho</i>	9C/9C

^x *Ho*: homozygosity, *He*: heterozygosity in SSR allele.

^y n.d.: not detected.

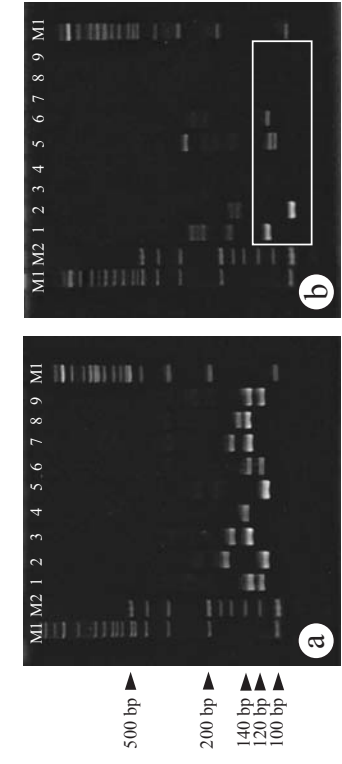
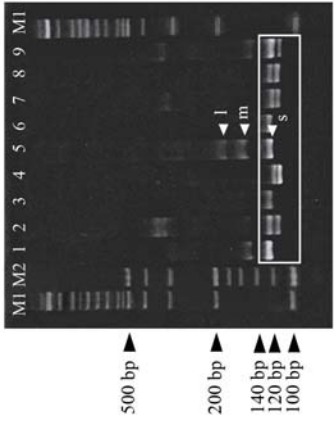


Fig.1. SSR analysis of 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species with PAGE in GSR3138 (a) and TSGR264 (b) loci.
M1: 100bp ladder, M2: 20bp ladder, 1: Satsuma mandarin 'Miyagawa-wase', 2: Ponkan mandarin 'Ota-ponkan', 3: Malayan kumquat, 4: Meiwa kumquat, 5: Tachibana, 6: Calamondin, 7: Round kumquat, 8: Hongkong kumquat, 9: Changshou kumquat. Gating: locus used for SSR genotyping.



Fig. 2. SSR analysis of 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species with PAGE in NSX02 locus (left) and the sequence of Tachibana's amplified fragments (above).
M1: 100bp ladder, M2: 20bp ladder, 1: Satsuma mandarin 'Miyagawa-wase', 2: Ponkan mandarin 'Ota-ponkan', 3: Malayan kumquat, 4: Meiwa kumquat, 5: Tachibana, 6: Calamondin, 7: Round kumquat, 8: Hongkong kumquat, 9: Changshou kumquat.
Gating: locus used for SSR genotyping, white arrowhead: bands used for direct sequencing.



考 察

本研究では、*TaKaRa Taq*TM (TaKaRa, 約27.5円/10 μ L PCR 混合液) や *rTaq DNA Polymerase* (TOYOBO, 約9.5円/10 μ L PCR 混合液) などより比較的安価で操作性の良い *GoTaq[®] Green Master Mix* (約7.8円/10 μ L PCR 混合液) を用い、供試したプライマーペアのアニール温度を最適化できた。汎用性を重視して PAGE による増幅産物の分離を試みたため、一次選抜した18マーカーのうち遺伝解析に有用なものは8個であった。これらの SSR 遺伝子座において、供試9種には3~7つのアレルが存在し、近縁であるカンキツ属とキンカン属の属間および属内で多くの遺伝子多型を確認することができた。Yasuda ら (37) は、チョウジュキンカン、ナガハキンカンおよびシキキツがカンキツ属とキンカン属の属間雑種であることを明らかにしている。そのため、本研究でキンカン属が TSGR264 のアレルを有していなかったことから、これらのうちキンカン属2種は当遺伝子座にキンカン属由来のホモ接合、シキキツはカンキツ属由来のホモもしくはヘミ接合であることが示唆された。

明らかとなった8マーカー9種の SSR 遺伝子型により、これらの種は GSR3138 と CiBE3936 の最少2マーカーで種の識別が可能であることが明らかとなった。カンキツ類の珠心胚における有性胚と珠心胚の判別には、いくつかの遺伝子座における同一性ととも、周囲に植栽している別種・品種の遺伝子混入がないことを証明する必要がある。Sudo ら (38) は、ウンシュウミカンの珠心胚より偶発的な倍加個体を獲得し、本研究で選定した NSX165 と GSR3138 を用いた遺伝解析により、この系統が珠心胚由来の同質四倍体であることを明らかにしている。一方、本研究では、すべての種において遺伝解析のために有用であるヘテロ接合のアレルを観察できた。Yasuda ら (39) は、一部の種でのみ明確なバンドが得られた NSX43 と CiBE2227 (データ省略) を用いて、'清見' タンゴールとニンポウキンカンとの二倍体間交雑より得られた三倍体と異数体の雑種における SSR 解析により、これらの倍数体化がニンポウキンカンの非還元配偶子に由来することを明らかにしている。これらのように、本研究で選定した SSR マーカーは、同質四倍体や雑種の発生起源のような遺伝解析に有用であると言える。

既報の期待される断片長以外のバンドの塩基配列決定により、一部の種において1つの SSR マーカーに対して複数のアレルが存在する可能性が示唆された。このような場合、系統分類学や集団遺伝学的な研究では高い多型性より有用なマーカーとなり得るが、優良個体の選抜

や品種識別などにはしばしば混乱を生じさせる。近年、カンキツ類と一部の近縁野生種の全ゲノム解読が進められており、スイートオレンジ (40)、クレメンティン (*C. clementina hort. ex Tanaka*) (41)、ウンシュウミカン (42)、ブンタン (*C. maxima Merr.*)、パペダ、シトロンおよびアタランティア (43)、でゲノム配列が公開されている。また、農研機構は、カンキツの DNA マーカーの開発を支援するデータベース「ミカンゲノムデータベース (MiGD)」 (<https://mikan.dna.affrc.go.jp/>) を開発・公開している。そのため、このような公開情報を利用して、将来的に単一遺伝子座かつ特異性の高い SSR マーカーの設計を行う必要があると考えられた。

本研究において、特に有用な GSR3138 と CiBE3936 を含む8つの SSR マーカーを選定し、カンキツ属4種とキンカン属5種におけるそれらの遺伝子型を明らかにすることができた。これまでに、共同研究機関である宮崎大学と静岡大学では、種子へのコルヒチンやオリザリン処理により多くの四倍体カンキツ類を作出している。一部の四倍体系統については RAPD 分析 (11, 15) および CMA 核型分析 (7) による発生起源の解析が行われているが、未解析の四倍体系統が多く残されている。今後、本研究で選定した SSR マーカーを用いて同質四倍体の発生起源を明らかにするとともに、雑種性などの遺伝解析に有用な SSR マーカーの選定・設計を進める予定である。

要 約

カンキツ類における遺伝解析に有用な DNA マーカーの探索を目的として、カンキツ類9種および既に構築された SSR マーカーを供試し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による遺伝子型決定を行った。その結果、合計281マーカーについて、多型性が高く、アレル間の増幅断片長差が大きい18マーカーを一次選抜し、さらにその中から再現性と識別性の高い8マーカーを選定することができた。これらの SSR 遺伝子座において、近縁であるカンキツ属とキンカン属の9種間に多くの多型を確認することができ、GSR3138 と CiBE3936 の最少2つのマーカーで供試した種を識別することができた。一方で、既報の期待される断片長以外のバンドの塩基配列決定により、一部の種において1つの SSR マーカーに対して複数のアレルが存在する可能性が示唆された。今後、選定した SSR マーカーを用い、これまでに作出した四倍体や雑種系統の遺伝解析を実施するとともに、公開されているゲノム情報を利用した SSR マーカーの設計を進

める予定である。

引用文献

- 1) 岩政正男, 1999, カンキツ総論, 養賢堂, 東京, 115-117, ウンシュウミカンの来歴と品種分化, 岩堀修一, 門屋一臣.
- 2) Soost, R. K. and Cameron, J. W., 1980, Oroblanco a new grapefruit hybrid, *HortScience*, **15**, 667-669.
- 3) Soost, R. K. and Cameron, J. W., 1985, 'Melogold', a new pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience*, **20**, 1134-1135.
- 4) 徳永忠士, 新居美香, 津村哲宏, 尾山正実, 2005, スダチにおける四倍体と二倍体との交雑による三倍体雑種の作出および無核品種'徳島3X1号'の育成, *園学研*, **4**, 11-25.
- 5) 吉田俊雄, 根角博久, 吉岡照高, 家城洋之, 伊藤祐司, 中野睦子, 上野 勇, 山田彬雄, 村瀬昭治, 瀧下文孝, 2003, キンカン新品種'ぶちまる', *果樹研報*, **2**, 9-16.
- 6) Esen, A., Soost, R. K. and Geraci, G., 1978, Seed set, size, and development after $4x \times 2x$ and $4x \times 4x$ crosses in *Citrus*, *Euphytica*, **27**, 283-294.
- 7) 糠谷綱希, 太田知宏, 安田喜一, 八幡昌紀, 國武久登, 小松春喜, 新居直祐, 向井啓雄, 原田 久, 高木俊彦, 2011, ニンボウキンカン珠心胚へのコルヒチン処理によって得た倍数体の特性とそれらの三倍体育種への利用, *園学研*, **10**, 1-8.
- 8) 金好純子, 加納徹治, 桑田祐二, 平尾 晃, 中谷宗一, 小林省蔵, 1997, カンキツ類の三倍体品種の育成(第1報) ウンシュウミカンと四倍体ボンカンの交雑による雑種三倍体の作出, *園学雑*, **66**, 141-146.
- 9) 金好純子, 吉田貴音, 蔵尾公紀, 山口 聡, 2008, 単胚性カンキツにおけるコルヒチン処理による四倍体の作出とその種子親としての利用による三倍体の獲得, *園学研*, **7**, 5-10.
- 10) 八幡昌紀, 岡 信孝, 國武久登, 山口清二, 小松春喜, 2003, '晩白柚'と四倍体の正逆交雑から得られた種子の重さと倍数性との関係, *園学研*, **2**, 47-252.
- 11) 河瀬憲次, 八幡昌紀, 中川匠子, 原口加奈, 國武久登, 2005, ニンボウキンカンにおける同質四倍体の選抜とその特性, *園学研*, **4**, 141-146.
- 12) Barrer, H. C. and Hutchison, D. J., 1978, Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*, *Econ. Bot.*, **32**, 27-45.
- 13) 津村哲宏, 山尾正実, 徳永忠士, 2002, カンキツ'清見'をコルヒチン処理して得られた個体の特性, *徳島果研報*, **2**, 6-12.
- 14) Wakana, A., Hanada, N., Park, S. M., Fukudome, I., and Kajiura, K., 2005, Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine, *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **1**, 93-102.
- 15) 八幡昌紀, 柏原夕希子, 黒木宏憲, 國武久登, 小松春樹, 2004, ニンボウキンカン種子へのコルヒチン及びオリザリン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響, *園学研*, **3**, 11-16.
- 16) 西浦昌男, 七條寅之助, 上野 勇, 岩政正男, 木原武士, 山田彬雄, 吉田俊雄, 岩崎藤助, 1983, カンキツ新品種'清見'について, *果樹研報*, **10**, 1-9.
- 17) Nakano, M., Nesumi, H., Yoshioka, T. and Yoshida, T., 2001, Segregation of plants with undeveloped anthers among hybrids derived from the seed parent, 'Kiyomi' (*Citrus unshiu* \times *C. sinensis*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **70**, 539-545.
- 18) Yamoto, M., Matsumoto, R., Okudai, N. and Yamada, Y., 1997, Aborted anthers of *Citrus* result from genecytoplasmic male sterility. *Scientia Horticulturae*, **70**, 9-14.
- 19) 吉田俊雄, 2003, 高品質・単胚性カンキツ品種「清見」の育成, *育種学研究*, **5**, 103-107.
- 20) 二宮泰造, 島田武彦, 遠藤朋子, 野中圭介, 大村三男, 藤井 浩, 2015, CAPS マーカーによるカンキツの品種識別法の開発と親子鑑定, *園学研*, **14**, 127-133.
- 21) Hirai, M., Kozaki, I. and Kajiura, I., 1986, The rate of spontaneous inbreeding of trifoliate orange and some characteristics of the inbred seedlings, *Japan. J. Breed.*, **36**, 138-146.
- 22) Yahata, M., Kunitake, H., Yabuya, T., Yamashita, K., Kashihara, Y. and Komatsu, H., 2005, Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **130**, 899-903.
- 23) Yamamoto, M and Tominaga, S., 2004, CMA banding pattern of chromosomes is useful for the identification of chromosome doubling in haploid citrus, *Breed. Sci.* **54**, 351-354.
- 24) Yamamoto, M., Kouno, R., Nakagawa, T., Usui, T.,

- Kubo, T. and Tominaga, S., 2011, Isozyme and DNA analyses of local *Citrus* germplasm on Amami islands, Japan, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **80**, 268-275.
- 25) Oliveira, A. C., Garcia, A. N., Cristofani, M. and Machado, M. A., 2002, Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers, *Euphytica*, **128**, 397-403.
- 26) Rao, M. N., Soneji, J. R., Chen, C., Huang, S. and Gmitter Jr., F. G., 2008, Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers, *Tree Genet. Genomes*, **4**, 113-124.
- 27) Singh, J., Dhaliwal, H. S., Thakur, A., Sidhu, G. S., Chhuneja, P. and Gmitter Jr., F. G., 2020, Optimizing recovery of hybrid embryos from interspecific citrus crosses of polyembryonic rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.), *Agronomy*, **10**, 1940.
- 28) Tan, M. L., Song, J. K. and Deng, X. X., 2007, Production of two mandarin × trifoliolate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis, *Euphytica*, **157**, 155-160.
- 29) Matsuyama, M., Motohashi, R., Akihama, T. and Omura, M., 1992, DNA fingerprinting in citrus cultivars, *Japan. J. Breed.*, **42**, 155-159.
- 30) Ueda, T., Ikeda, F., Kita, M., Shimada, T., Endo, T. and Omura, M., 2003, Evaluation of a CAPS method based on ESTs in *Citrus*, *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr.*, **2000**, 116-117.
- 31) 大村三男, 藤井 浩, 島田武彦, 遠藤朋子, 上田高則, 清水徳朗, 2004, カンキツにおける SNPs マーカーの作成と品種判別への利用, *園学雑*, **73** (別 1), 184.
- 32) Ollitrault, F., Terol, J., Pina, J. A., Navarro, L., Talon, M. and Ollitrault, P., 2010, Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in *Citrus*, *Am. J. of Bot.*, **97**, e124-129.
- 33) Shimizu, T., Kitajima, A., Nonaka, K., Yoshioka, T., Ohta, S., Goto, S., Toyoda, A., Fujiyama, A., Mochizuki, T., Nagasaki, H., Kaminuma, E. and Nakamura, Y., 2016, Hybrid origins of *Citrus* varieties inferred from DNA marker analysis of nuclear and organelle genomes, *PLOS ONE*, **11**, e0166969.
- 34) Passaro, M., Cirilli, M., Ottone, L., Rustioni, L., Barbante, A., Bassi, D. and Geuna, F., 2020, Phenotypic and genotypic characterization of 'Chinotto di Savona' *Citrus* accession, *Sci. Hort.*, **261**, 108917.
- 35) Woo, J. K., Park, Y. C., Lee, J. W., Yun, S. H., Kim, M., Park, S., Lee, Y., Song, K. J. and Kim, H. B., 2019, Evaluation of polyembryony for genetic resources and efficacy of simple sequence repeat markers for the identification of nucellar and zygotic embryo-derived individuals in citrus, *Appl. Biol. Chem.*, **62**, 30.
- 36) Doyle, J. and Doyle, J. L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.*, **19**, 11-15.
- 37) Yasuda, K., Yahata, M. and Kunitake, H., 2016, Phylogeny and classification of kumquats (*Fortunella* spp.) inferred from CMA karyotype composition, *Hort. J.*, **85**, 115-121.
- 38) Sudo, M., Yasuda, K., Yahata, M., Sato, M., Tominaga, A., Mukai, H., Ma, G., Kato, M. and Kunitake, H., 2021, Morphological characteristics, fruit qualities and evaluation of reproductive functions in autotetraploid Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcow.), *Agronomy*, **11**, e2441.
- 39) Yasuda, K., Yahata, M., Sato, M., Sudo, M., Tominaga, A. and Kunitake, H., 2021, Identification of parental genome construction and inherited morphological characteristics in triploid and aneuploidIntergeneric hybrids from a diploid – diploid cross between *Citrus* and *Fortunella*, *Agronomy*, **11**, e1988.
- 40) Xu, Q., Chen, L.-L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., Bertrand, D., Jiao, W.-B., Hao, B.-H., Lyon, M. P., Chen J., Gao, S., Xing, F., Lan, H., Chang, J. W., Ge, X., Lei, Y., Hu, Q., Miao, Y., Wang, L., Xiao, S., Biswas, M. K., Zeng, W., Guo, F., Cao, H., Yang, X., Xu, X.-W., Cheng, Y.-J., Xu, J., Liu, J.-H., Luo, O. J., Tang, Z., Guo, W.-W., Kuang, H., Zhang, H.-Y., Roose, M. L., Nagarajan, N., Deng, X.X. and Ruan, Y., 2013, The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat. Genet.*, **45**, 59-66.
- 41) Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., Perrier, X., Ruiz, M., Scalabrin, S., Terol, J., Takita, M. A., Labadie, K., Poulain, J., Couloux, A., Jabbari, K., Cattonaro, F., Fabbro, C. D., Pinosio, S., Zuccolo, A., Chapman, J., Grimwood, J., Tadeo, F. R., Estornell, L. H., Muñoz-Sanz, J. V., Ibanez, V., Herrero-Ortega, A., Aleza, P., Pérez-Pérez, J., Ramón, D., Brunel, D., Luro, F., Chen, C., Farmerie, W. G., Desany, B.,

- Kodira, C., Mohiuddin, M., Harkins, T., Fredrikson, K., Burns, P., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Reforgiato, G., Freitas-Astúa, J., Quetier, F., Navarro, L., Roose, M., Wincker, P., Schmutz, J., Morgante, M., Machado, M. A., Talon, M., Jaillon, O., Ollitrault, P., Gmitter, F. and Rokhsar, D., 2014, Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 656–662.
- 42) Shimizu, T., Tanizawa, Y., Mochizuki, T., Nagasaki, H., Yoshioka, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kaminuma, E., and Nakamura, Y., 2017, Draft sequencing of the heterozygous diploid genome of Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) using a hybrid assembly approach, *Front. Genet.*, **8**, e180.
- 43) Wang, X., Xu, Y., Zhang, S., Cao, L., Huang, Y., Cheng, J., Wu, G., Tian, S., Chen, C., Liu, Y., Yu, H., Yang, X., Lan, H., Wang, N., Wang, L., Xu, J., Jiang, X., Xie, Z., Tan, M., Larkin, R. M., Chen, L.-L., Ma, B.-G., Ruan, Y., Deng, X. and Xu, Q., 2017, Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction, *Nat. Genet.*, **49**, 765–772.

Acetaminophen 硫酸体の有機合成

森田千紘*・谷口玲央真**・吉田実央**・徳永祐希*・木下英樹***・
小野政輝***・黒木勝久***・榊原陽一***・水光正仁****・安田伸***

Chemical Synthesis of Acetaminophen *O*-Sulfate

Chihiro MORITA, Reoma TANIGUCHI, Mio YOSHIDA, Yuki TOKUNAGA, Hideki KINOSHITA,
Masateru ONO, Katsuhisa KUROGI, Yoichi SAKAKIBARA, Masahito SUIKO and Shin YASUDA

(Received 14 December 2021 ; accepted 18 January 2022)

Abstract

Sulfation is a major metabolic pathway responsible for inactivation and excretion of xenobiotics including drugs, wherein cytosolic sulfotransferases play an important role. However, it has not been fully elucidated whether these end products may possess any physiological functions, due to the difficulty of obtaining sufficient amounts of various sulfated metabolites. This study was designed to investigate whether acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol; APAP), an antipyretic analgesic drug, can react with sulfuric acid upon an established method for tyrosine *O*-sulfate synthesis to generate APAP *O*-sulfate (APAP-S). APAP was selected because it has a simple monophenol structure like tyrosine and undergoes sulfation in the body. Results demonstrated that 91.1 mg of the product was obtained as crystals from 1 g of APAP, therefore the calculated yield was 5.11% under molar basis. ¹H-NMR spectrum supported the product to be APAP-S. Moreover, a measuring of absorbance at the maximum absorption wavelength in UV absorption spectrum proved that purity of the synthesized APAP-S was 97.0% in comparison with an authentic standard. (163 words)

緒言

細胞質に存在する可溶性の硫酸転移酵素により触媒される硫酸化は、生体内ではステロイドホルモンや神経伝達物質であるカテコールアミン類の恒常性維持だけでなく、生体外異物や薬物の不活性化ならびに排泄を担う主要な薬物代謝反応経路の1つである(1-4)。しかしながら、薬物代謝後の硫酸体がしばらくは体内に残存し循環することや、ヒドロキシアリアルアミンなど一部の化合物が硫酸化によって代謝活性化される事例もあることから(5)、硫酸化後の代謝物の生理機能に関する研究は不明な部分も多く残る(6)。現状では安価で十分量の硫酸化代謝物の入手と続く代謝物研究が容易ではない場合も多い。

Acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol ; APAP) は別

名 paracetamol や *p*-acetamidophenol とも呼称され、一世紀以上の使用実績を持つ世界で広く使用される解熱鎮痛薬の1つである(7, 8)。アスピリンや、他の非ステロイド性の抗炎症剤と比較して副作用が低いなどの利点がある。APAPはフェノール構造を有しており、主要な薬物代謝経路を経て40–67%がグルクロン酸抱合へ、20–46%が硫酸抱合へ、約5%がシトクロム P450によって *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) を経てグルタチオン抱合へと代謝変換される(7)。これまでに高用量のAPAPが反応性代謝産物とされるNAPQIを介して肝毒性や細胞機能障害を引き起こすことが報告されている(9)。複数薬剤投与時の薬物間相互作用を調べた過去の報告では、APAPの硫酸化ならびにグルクロン酸抱合化の遅延をフェノバルビタールとその代謝物が引き起こすこと(10)、一方で投与条件によってはAPAP硫酸体

* 東海大学大学院農学研究科

** 東海大学農学部バイオサイエンス学科

*** 宮崎大学農学部応用生物科学科

**** 宮崎大学キャリアマネジメント機構

連絡先：安田伸 e-mail : shin.yasuda@agri.u-tokai.ac.jp

(acetaminophen *O*-sulfate; APAP-S) が APAP 自体の体内分布を促進しうること (11), APAP とは異なり APAP-S のみがアンチピリンの血中濃度の低下と脳内への移行を助長する働きを示すこと (12) が報告されている。しかしながら, 試薬が高価なこともあり, これまで APAP-S そのものの機能的有用性や生物活性についてはあまり注目されてこなかった。そのため, 簡便で安価に APAP-S を有機合成することが可能となれば今後様々な機能性研究に繋がると考えられる。

そこで本研究では既存のチロシン硫酸体 (tyrosine *O*-sulfate) 合成法 (13) を利用して, APAP を濃硫酸と反応させることで APAP-S の合成と分離精製が可能かどうかの検証を行うこととした。APAP はチロシン同様に単純なモノフェノール構造を有し, 体内では硫酸化されるため選択した。

材料および方法

試薬類

n-ブチルアルコール, イソプロパノール, 88% ギ酸, 硫酸, *p*-acetamidophenol (APAP), 水酸化バリウム8水和物 (Ba (OH)₂), 8 mol/L 水酸化カリウム (KOH) 水溶液はナカライテスク (京都) より購入した。エタノール (EtOH), 石油エーテル, Dowex™ 50W ×4 100–200 mesh (H) cation exchange resin (Dowex) は和光純薬 (大阪) より入手した。本研究では MilliQ グレードの水を使用した。APAP-S の標品として 4-acetaminophen sulfate potassium salt を Tronto Research Chemicals 社 (カナダ) より購入した。薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography; TLC) 用の silica gel 60 F₂₅₄ (1.05554.0001) プレートは Merck 社より購入した。

APAP-S の合成, 分離精製および結晶化

本研究では, Jevons のチロシン硫酸体合成法に従った (13)。濃硫酸 10 mL に 1 g の APAP を少量ずつ加え, スターラーを用いて攪拌しながら -5℃ で 40 分間反応させた。次に碎氷 (約 350 mL) と過剰量 (約 130 g) の Ba (OH)₂ に反応液を注ぎ, pH が塩基性に傾くまで攪拌した。その後, 大量に発生した硫酸バリウムを沈殿させて取り除くため, 2,500 xg で 10 分間遠心し, 上清を回収した。上清に CO₂ ガスを吹き込むことで中和し, 余剰の Ba (OH)₂ を炭酸バリウムとして析出させた後に上清を回収した。市販の pH 試験紙を用いて pH を確認し, 中性になるまで本操作を 3 回程度繰り返した。次に, TLC プレートに APAP (10 mg/mL, 5 μL) および APAP-S

(20 mg/mL, 5 μL) の標品とともに回収した上清の濃縮液 (10 μL) をスポットし, UV 照射下で反応産物を検出した。展開溶媒には *n*-ブチルアルコール: イソプロパノール: ギ酸: 水 (3:1:1:1; Vol.) を用いた (14)。

APAP-S 合成物を含む反応液を予めエバポレーターで 30 mL に濃縮後, これを Dowex 陽イオン交換樹脂カラム (10 mL 相当量) に負荷し, 水で溶出させることにより, 3 mL ずつの Fr.1 – Fr.15 の 15 画分に分画した。TLC プレートに APAP (10 mg/mL, 1 μL) および APAP-S (20 mg/mL, 1 μL) の標品とともに回収した各画分 (1 μL) をスポットし, UV 照射下で確認後, 合成物を含む画分を回収して再度濃縮を行い, 計 3 回の分離精製を繰り返した。

APAP-S 様の合成物を含む画分 (計 8 本) を混合し, 約 1 mL に濃縮した。既報 (13) に従い, これに 1 M KOH を少量ずつ加えて pH 5.0 に調整し, 10 倍量の EtOH と石油エーテル (1:1) の混合液の添加によって合成物を析出させることで APAP-S の結晶をカリウム塩として得た。APAP-S 合成物は, ろ紙 (ADVANTEC No.3, 最大孔径 5 μm) とともに吸引ろ過後, 凍結乾燥させた。

各種機器による APAP-S 合成物の測定と真正性の検証

APAP-S 合成物の真正性を調べるため, プロトン核磁気共鳴分光法 (¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy; ¹H-NMR) によるスペクトルの測定を行った。¹H-NMR は JEOL α 500 (日本電子) を用い, 試料を重メタノールに溶解後, 内部標準にテトラメチルシラン (TMS) を使用し, ケミカルシフトは δ (ppm) スケールで表示した。

高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography; HPLC) による APAP および APAP-S の分離と UV 検出は, 0.1 mM となるよう予め調製した試料溶液を用いて, 既報 (15) を一部改良して行った。HPLC システムには, 日本分光製のフォトダイオードアレイ検出器 (MD-4010) を備えた LC-2000 PLUS シリーズとクロマトグラフィーデータシステム (ChromNAV Ver.2) を使用した。即ち, YMC 社製 ODS カラム (YMC-Pack ODS-A, 内径 4.6 mm x 150 mm, 粒子径 3 μm, 細孔径 12 nm) を用いた逆相クロマトグラフィーによるアイソクラティック溶離法により, 移動相メタノール: 水を 40:60 とともに, 温度 30℃, 注入量 10 μL, 流速 0.7 mL/min, 波長 241 nm における UV 検出を行った。

APAP と APAP-S の UV 吸収スペクトルは, 0.03 mg/mL となるよう予め調製した試料溶液を用いて, 石英セルとともに分光光度計 (V-530, 日本分光) により測定した。

その他の解析法

APAP-S 合成物のサルファターゼ処理は既報に基づき, sulfatase from *Petella vulgata* type IV (keyhole limpet) (シグマアルドリッチ) を用いて行った (16). APAP-S 合成物の融点測定は常法に従い, 融点測定器 (ATM-02, アズワン) を用いて APAP-S 標品の融点との比較を行った.

結果および考察

本研究は, 既存のチロシン硫酸体合成法 (13) を利用して, APAP-S の合成と分離精製が可能かの検証を行ったものである. 各種分析手技により, 得られた合成物の真正性についても調べることにした.

APAP-S の合成, 分離精製および結晶化

濃硫酸 10 mL に 1 g の APAP を少量ずつ加えて反応させ, さらに Ba (OH)₂ 処理ならびに CO₂ ガス処理により中和後の反応液の上清を濃縮した. その一部を TLC に供した結果, APAP (R_f 値: 0.917) のほかに APAP-S 様 (R_f 値: 0.639) の反応生成物の明確なスポットを認めた (Fig. 1).

次に Dowex 陽イオン交換樹脂を用いて APAP-S 様の合成物の分離精製を行った. 反応液をカラムに負荷後, 水を溶離液として 3 mL ずつ分取し, 計 15 の溶出画分を得た. これらを TLC に供した結果, Fr. 2 から Fr. 9 までにはっきりとした APAP-S 様のスポットを認めたものの (Fig. 2 A), 本実験条件のカラムボリュームでは, いずれの画分においても APAP の混入が認められた. そのた

め, これらの Fr. 2 から Fr. 9 を回収して混合し, 再度同条件で陽イオン交換カラムに負荷して 2 回目の分画を行った. その結果, Fr. 2 から Fr. 9 までに明確な APAP-S 様のスポットを認めた (Fig. 2 B). 特に Fr. 2 から Fr. 5 までは APAP の混入も無く, 純度の高い APAP-S 様の生成物のみ画分が得られた. 生成物の収量を確保するため, APAP の混入が認められた本 Fr. 6 から Fr. 9 のみを混合してさらに同条件で 3 回目の分画を行った. その結果, Fr. 2 から Fr. 5 において APAP の混入が無い APAP-S 様のスポットのみを認めた (Fig. 2 C). 以上より, 2 回目と 3 回目の分画で得たこれら Fr. 2 から Fr. 5 までの画分には APAP の混入がほとんど無く, 高純度の APAP-S が分離精製されていると考えられた. チロシン硫酸体の合成を行った我々の先行実験では, 本研究で用いたカラム条件の半分量でも一度に分離精製が可能であった (data not shown). そのため, 分離精製の工程を簡便にするためにも, APAP-S に適したカラムボリュームの検討が今後も必要である.

分離精製後の APAP-S 様の合成物を含む計 8 本の画分を混合して濃縮し, KOH 存在下で過剰量の EtOH と石油エーテルにより APAP-S 様の生成物を析出させ結晶を得た. その結果, 1 g の APAP から 91.1 mg の生成物が得られ, モル換算で 5.11 % の収率を得ることができた. なお, Jevons の報告では 2 g のチロシンから濃硫酸との反応で 0.3 g のチロシン硫酸体を得ている (13). これまでに, 氷冷クロロホルムとピリジン溶液またはジメチルアニリン溶液と塩化スルホン酸を用いることにより, α -および β -ナフトールや, クレゾールおよびアルキルフェノール類などの目的とするフェノール性硫酸体エステル合成法 (平均収率 70-90%) や (17), 二硫化炭素と塩化スルホン酸を用いた *p*-ヒドロキシフェニルピルピン酸 (0.7 g) からの硫酸体合成法 (収量 400 mg) (18) が報告されている. また, セリルグリシンのケースでは 400 mg を 0.5 mL の濃硫酸と室温で 5 分間反応させることで 331 mg の *O* 硫酸体を得られている (19). そのため, 硫酸を用いた硫酸体合成法は汎用性に優れるとともに工程が簡便で化合物や反応条件によっては高収率が見込まれる有益な手技であると考えられる. また, 適切な溶媒の選択と低温下での析出により, 効率の良い冷却結晶化法が報告されている (15). 本研究では EtOH と石油エーテルとともに室温下で析出を行っているため, 収率向上のための溶媒選択や冷却下での結晶化を行うなど, 今後も析出条件の検討を必要とする.

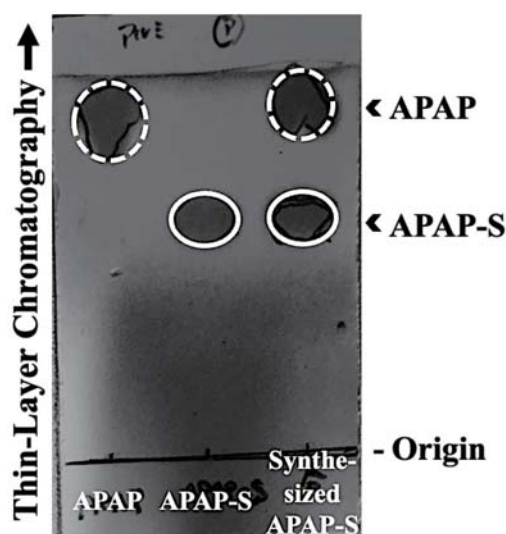


Fig. 1. Thin-layer analysis of the synthesized APAP-S with authentic standards of APAP and APAP-S. APAP was reacted with sulfuric acid for 40 minutes and neutralized with Ba (OH)₂. Detection was performed under UV irradiation at 254 nm.

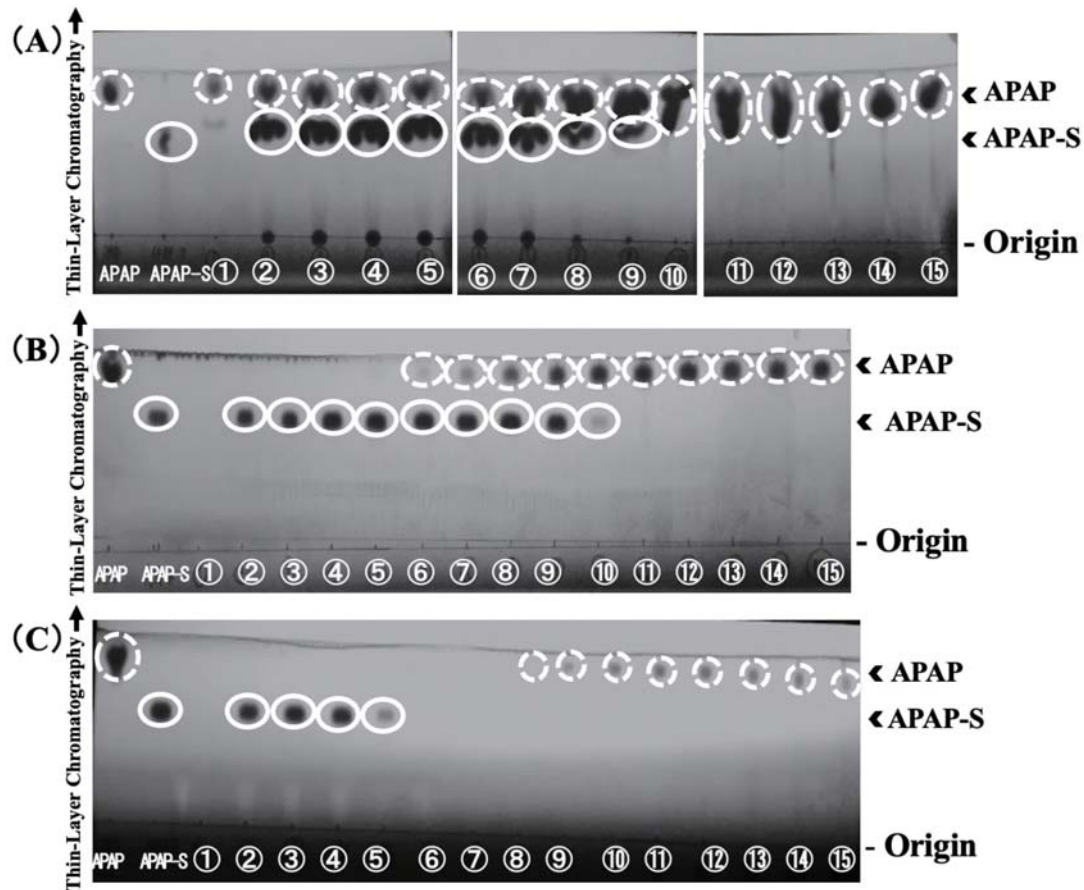


Fig. 2. Thin-layer analysis of the synthesized APAP-S after 1st (A), 2nd (B) and 3rd (C) times of Dowex column fractionations. Detection was performed under UV irradiation at 254 nm. Spots with dotted and lined circles indicate those of APAP and APAP-S, respectively.

APAP-S 合成物の真正性の検証

得られた生成物の真正性について検証を行った。Sulfatase 処理した結果、TLC 上で脱硫酸化された APAP のスポットを認めた (data not shown)。次に $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定を行った結果、(i) *p*-置換フェニル基由来の 4 個のアロマティックプロトン [δ : 7.49 (d-like, $J=9.0$ Hz), 7.23 (d-like, $J=9.0$ Hz)] および (ii) 1 個のアセチル基由来のシグナル [δ : 2.10 (s)] が認められた (Fig. 3, Table 1)。したがって、TLC で APAP と異なる R_f 値を示すこと、sulfatase 処理により脱硫酸化されうること、および $^1\text{H-NMR}$ の結果より、生成物は APAP-S であることが示唆された (20, 21)。

次に APAP-S 合成物の純度について調べた。APAP-S 合成物は標品と同一の融点を示した (data not shown)。HPLC による分離検出を行った結果、標品の APAP と APAP-S の溶出時間はそれぞれ 3.34 min (Fig. 4 A) と 1.80 min (Fig. 4 B) であり、合成物においては APAP-S 標品の溶出時間と一致する単一のピークを認めた (Fig. 4 C)。

UV 吸収スペクトルを測定した結果、APAP, APAP-S, APAP-S 合成物いずれも 241 nm 付近に極大吸収波長を

有し、合成物は APAP-S の標品と一致したスペクトルを示した (Fig. 5)。このときの極大吸収波長における吸光度より、標品 (>98%) を基準とした際に APAP-S 合成物は 97.0% の純度であることが判明した。

我々はこれまでに硫酸化代謝物の機能性に注目してきており、ナフトールを例に硫酸化代謝物の硫酸基の位置によっては不活性化されずに抗酸化活性を有する可能性があること (22)、インドキシル硫酸がマクロファージの酸化レベルの亢進と貪食能の低下を引き起こすこと (23, 24) を報告してきた。薬物代謝を通じて標的化合物の多くは代謝物として体内に存在しうるため、例えば硫酸化を介してどの程度の活性を保持しうるのかをケースバイケースで調査することは (6)、薬物代謝後の化合物の生理活性を理解する上でも重要である (25)。近年、APAP 由来の代謝物として *N*-acetylphenolamine (AM404) による受容体を介した鎮痛作用や抗炎症作用が報告されている (8)。APAP-S が免疫性血小板減少症の患者の抗体反応に感作する可能性や (26)、APAP-S のラットへの経口投与後には 25% (22-32%) が直接腸管より吸収され、50% 以上 (50-98%) が腸内細菌による脱硫酸化を経て

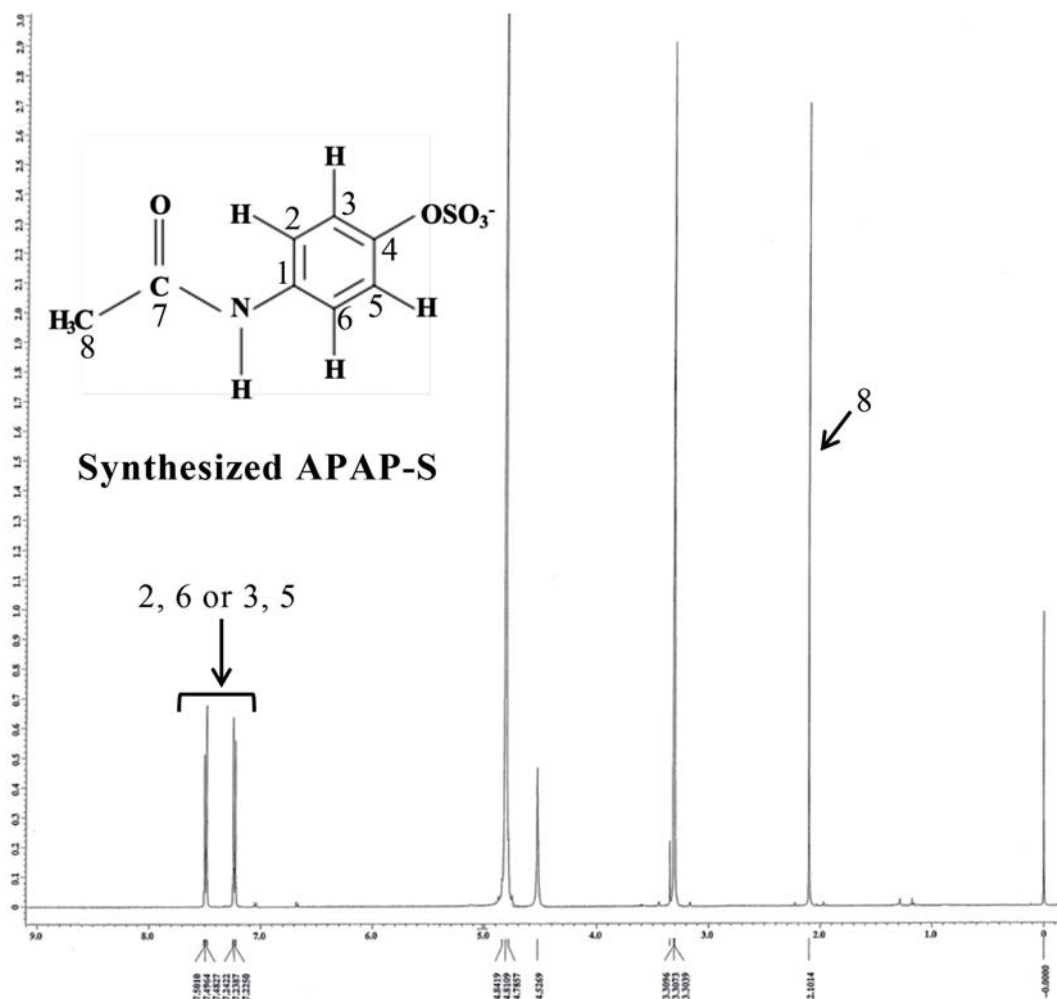


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the synthesized APAP-S (in deuterated methanol, 500 MHz) .

Table 1. $^1\text{H-NMR}$ spectral data of the synthesized APAP-S (in deuterated methanol, 500 MHz)

	Chemical shift (ppm)	Coupling constant (Hz)
2, 6 or 3, 5	7.23 d-like	(2H, d-like $J=9.0$ Hz (8.60 Hz))*
	7.49 d-like	(2H, d-like $J=9.0$ Hz (9.15 Hz))*
8	2.10 s	(3H, s)

δ in ppm from TMS (coupling constants (J) in Hz are given in parentheses).

s ; singlet, d ; doublet, d-like ; doublet-like .

*Values were considered to be equal to the theoretical 9.0 Hz.

APAPとして吸収されAPAP-Sへと代謝抱合されること(27)が報告されている。しかしながら、APAP-Sの生理作用や薬効などに着目した研究例はほとんどない。一方、フラボノイドの硫酸化がその生物活性を低下させるだけでなく(28, 29)、硫酸化される位置によっては弱いながらも活性が維持される場合など(30-32)、硫酸化される水酸基と生物活性との関連性についても注目が集まっている(25, 33, 34)。現状では各種の硫酸体の入

手が容易ではない場合も多く、研究者ごとに個々の化合物について有機合成(35-37)や酵素化学的な手技に基づく合成が行われている(31, 32)。したがって、APAPのみならず様々な硫酸化代謝物の生理機能や有効性について明らかにしていくためにも、包括的な硫酸体合成法の確立と導入、続く代謝物レベルでの機能性研究が急務である。

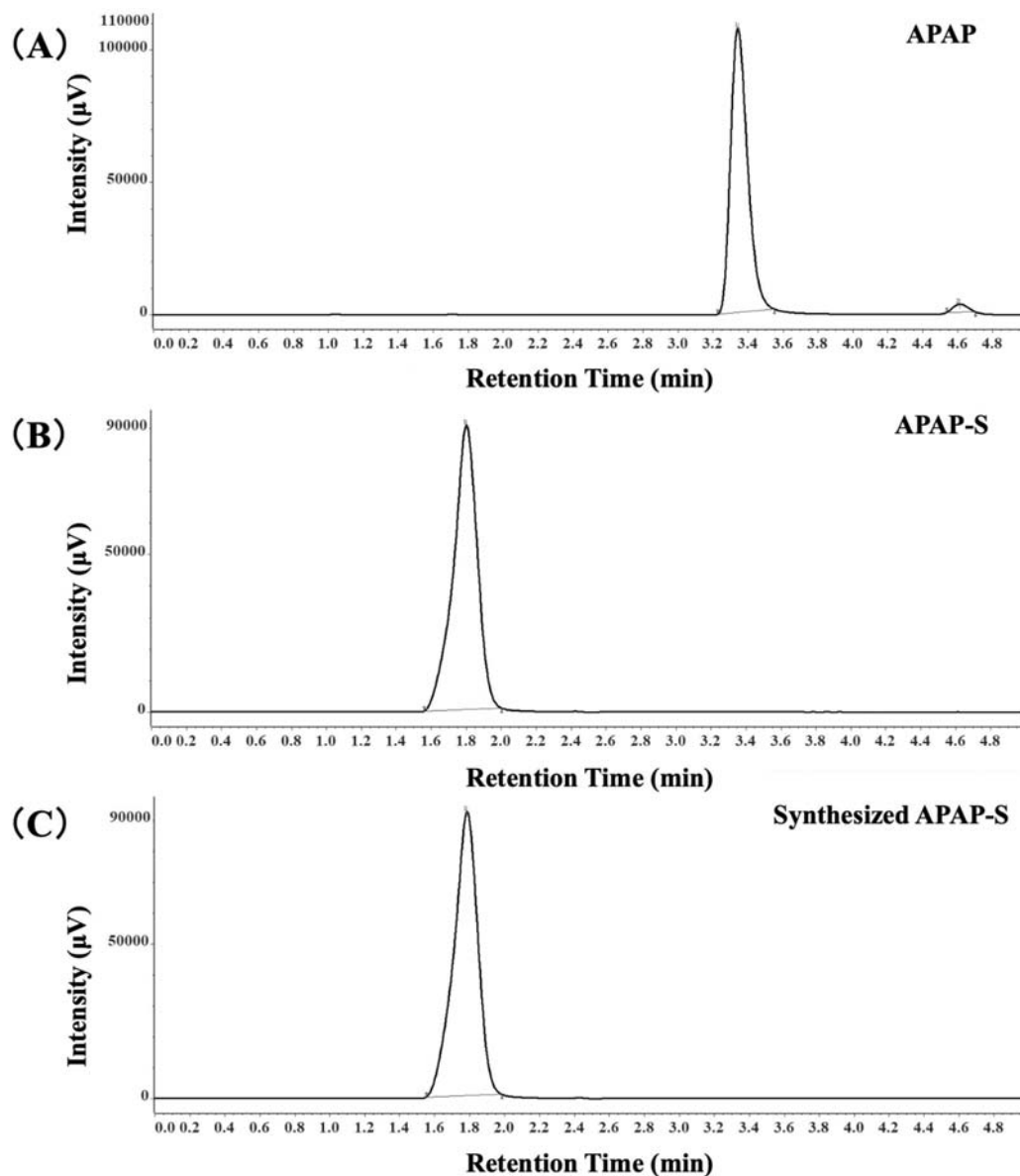


Fig. 4. HPLC chromatograms of standards of APAP (A) and APAP-S (B), and the synthesized APAP-S (C). A 10- μ L aliquot of 0.1 mM sample each was applied to HPLC. Detection was performed at 241 nm. The retention times for APAP and APAP-S were 3.34 and 1.80 min, respectively.

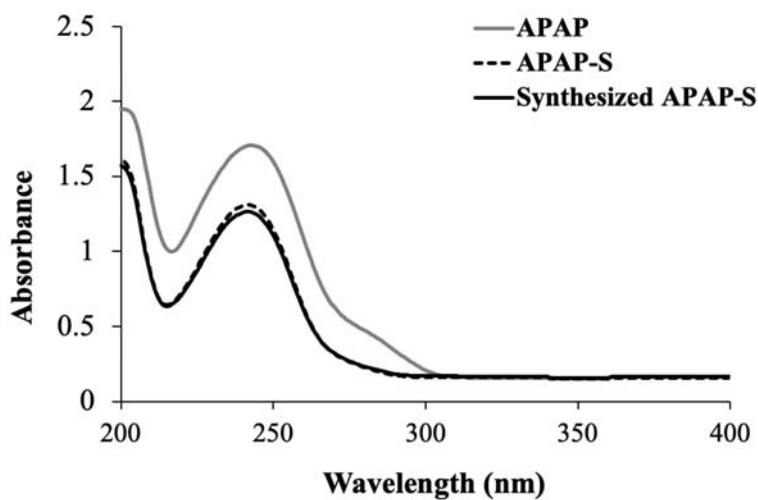


Fig. 5. UV spectrum of the synthesized APAP-S with standards of APAP and APAP-S at 0.03 mg/mL ranging from 200 nm to 400 nm.

まとめ

以上より、既存の Tyr-S 合成法を利用して、1 g の APAP から 91.1 mg の APAP-S 様の生成物を結晶として得ることができ、モル換算で 5.11% の収率を得た。続く $^1\text{H-NMR}$ および UV 吸収スペクトル等の真正性の検証結果より、生成物が高純度の APAP-S であることが確認できた。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会 JSPS の科研費基盤研究 (C) (JP20K05881) の助成を受けて実施されたものです。

要 約

硫酸化は生体外異物や薬物の不活化ならびに排泄を担う主要な代謝経路の 1 つであり、細胞質に存在する可溶性の硫酸転移酵素が重要な役割を担っている。しかしながら十分量の様々な硫酸化代謝物の入手が容易ではないことから、これら最終産物が有する生理機能の有無については完全には明らかになっていない。そこで本研究では既存のチロシン硫酸体 (tyrosine *O*-sulfate) 合成法を利用して、解熱鎮痛薬である acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol ; APAP) を濃硫酸と反応させることで APAP 硫酸体 (acetaminophen *O*-sulfate ; APAP-S) の合成と分離精製が可能か検証を行った。APAP はチロシン同様に単純なモノフェノール構造を有し、体内では硫酸化されるため選択した。その結果、1 g の APAP から 91.1 mg の生成物が結晶として得られ、モル換算で 5.11% の収率を得た。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定により APAP-S の各プロトンに由来するシグナルが認められ、生成物は APAP-S であることが支持された。さらに UV 吸収スペクトルの極大吸収波長における吸光度より、標品を基準とした際の APAP-S 生成物は 97.0% の純度であることが判明した。

引用文献

- Mulder, G.J. and Jakoby, W.B., 1990, Sulfation. in *Conjugation Reactions in Drug Metabolism* (Mulder, G.J. ed.), Taylor and Francis, London, pp.107-161.
- Falany, C.N. and Roth, J.A., 1993, Properties of human cytosolic sulfotransferases involved in drug metabolism. in *Human Drug Metabolism: From Molecular Biology to Man* (Jeffery, E.H. ed.), CRC Press, Boca Raton, pp.101-115.
- Weinshilboum, R. and Otterness, D., 1994, Sulfotransferase enzymes. in *Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity* (Kaufmann, F.C. ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.45-78.
- Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Sakakibara, Y. and Liu, M.-C., 2017, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 63-72.
- DeBaun, J.R., Smith, J.Y., Miller, E.C. and Miller, J.A., 1970, *Science* **167**, 184-186.
- Yi, L., Dratter, J., Wang, C., Tunge, J.A. and Desaire, H., 2006, *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 666-674.
- Jozwiak-Bebenista, M. and Nowak, Z.J., 2014, *Acta Pol. Pharm.* **71**, 11-23.
- Ohashi, N. and Kohno, T., 2020, *Front. Pharmacol.* **11**, 580289. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580289>
- Nagatome, M., Kondo, Y., Kadowaki, D., Saishyo, Y., Irikura, M., Irie, T. and Ishitsuka, Y., 2018, *Heliyon* **4**, e00521. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00521>
- Studenberg, S.D. and Brouwer, K.L. 1993, *J. Pharmacokin. Biopharm.* **21**, 175-194.
- Sawamoto, T., Kurosaki, Y., Sasaki, K., Kimura, T. and Nakayama, T., 1997, *Int. J. Pharm.* **146**, 181-191.
- Ohkawa, Y., Kiyohara, Y., Asoh, T., Maeda, H., Kurumi, M., Sasaki, K., Kurosaki, Y., Matsumura, M. and Nakayama, T., 2001, *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1404-1410.
- Jevons, F.R., 1963, *Biochem. J.* **89**, 621-624.
- Yamamoto, A., Liu, M.-Y., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Saeki, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C. 2015, *Biochem. J.* **158**, 497-504.
- Weber, C.C., Kulkarni, S.A., Kunov-Kruse, A.J., Rogers, R.D. and Myerson, A.S., 2015, *Cryst. Growth Des.* **15**, 4946-4951.
- Yasuda, S., Idell, S. and Liu, M.-C., 2007, *Biochem. J.* **401**, 497-503.
- Feigenbaum, J. and Neunberg, C.A., 1941, *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 3529-3530.
- Rose, F.A. and Powell, G.M., 1963, *Biochem. J.* **87**, 541-545.
- Tudball, N., Noda, Y. and Dodgson, K.S., 1965, *Biochem. J.* **95**, 678-682.
- Nakayama, T., Sawamoto, T., Kurosaki, Y. and Kimura, T., 1995, *Int. J. Pharm.* **121**, 55-63.

- 21) Winum, J.Y., Vullo, D., Casini, A., Montero, J.L., Scozzafava, A. and Supuran, C.T. 2003, *J. Med. Chem.* **46**, 2197-2204.
- 22) Sugahara, S., Fukuhara, K., Tokunaga, Y., Tsutsumi, S., Ueda, Y., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2018, *J. Toxicol. Sci.* **43**, 213-221.
- 23) Tsutsumi, S., Tokunaga, Y., Shimizu, S., Kinoshita, H., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2020, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 1023-1029.
- 24) Tsutsumi, S., Tokunaga, Y., Shimizu, S., Kinoshita, H., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2020, *J. Toxicol. Sci.* **45**, 569-579.
- 25) Beekmann, K., Actis-Goretta, L., van Bladeren, P.J., Dionisi, F., Destailats, F. and Rietjens, I.M., 2012, *Food Funct.* **3**, 1008-1018.
- 26) Bougie, D. and Aster, R., 2001, *Blood* **97**, 3846-3850.
- 27) Sawamoto, T., Kurosaki, Y., Kimura, T. and Nakayama, T., 1996, *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 77-82.
- 28) Roubalová, L., Purchartová, K., Papoušková, B., Vacek, J., Křen, V., Ulrichová, J. and Vrba, J., 2015, *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 5402-5409.
- 29) Rimbach, G., Weinberg, P.D., de Pascual-Teresa, S., Alonso, M.G., Ewins, B.A., Turner, R., Minihane, A.M., Botting, N., Fairley, B., Matsugo, S., Uchida, Y. and Cassidy, A., 2004, *Biochim. Biophys. Acta.* **1670**, 229-237.
- 30) Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., Gonzalez-Paramas, A.M. and Santos-Buelga, C., 2011, *Eur. Food Res. Technol.* **232**, 103-111.
- 31) Valentová, K., Káňová, K., Di Meo, F., Pelantová, H., Chambers, C.S., Rydlová, L., Petrásková, L., Křenková, A., Cvačka, J., Trouillas, P. and Křen, V., 2017, *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2231. doi: 10.3390/ijms18112231.
- 32) Kanova, K., Petraskova, L., Pelantova, H., Rybkova, Z., Malachova, K., Cvacka, J., Kren, V. and Valentova, K., 2020, *J. Agri. Food Chem.* **68**, 11197-11206.
- 33) Sak, K., 2017, Chapter 6 - Anticancer action of sulfated flavonoids as Phase II metabolites. in *Food Bioconversion, Handbook of Food Bioengineering* (Grumezescu, A.M. and Holban A.M. eds.), Academic Press, MA, United States, pp.207-236.
- 34) Shimohira, T., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Liu, M.-C., Suiko, M. and Sakakibara, Y., 2017, *J. Biosci. Bioeng.* **124**, 84-90.
- 35) Simpson, L.S. and Widlanski, T.S., 2006, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1605-1610.
- 36) Gomes, V.P., Torres, C., Rodríguez-Borges, J.E. and Paiva-Martins, F., 2015, *J. Agric. Food Chem.* **63**, 9565-9571.
- 37) Almeida, A.F., Santos, C.N. and Ventura, M.R., 2017, *J. Agric. Food Chem.* **65**, 6460-6466.

紀 要 委 員 会

委員長 川 邊 隆 大
委員 米 田 一 成
松 本 大 和
ロドリゲス 八木美樹

EDITORIAL COMMITTEE OF PROCEEDINGS

Chairman Takahiro Kawanabe
Member Kazunari Yoneda
Hirokazu Matsumoto
Miki Rodriguez-Yagi

Published by
School of Agriculture, Tokai University
9-1-1 Toroku, Higashi-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto,
862-8652, Japan

東 海 大 学 紀 要 農 学 部

第41巻 2022

2022年3月22日発行

発行所 東海大学農学部
〒862-8652 熊本県熊本市東区渡鹿9丁目-1-1
電話 096(382)-1141

印刷所 有限会社ベストプロセス
〒861-8038 熊本県熊本市東区长嶺東8丁目13-17
電話 096(388)-0889

PROCEEDINGS OF SCHOOL OF AGRICULTURE TOKAI UNIVERSITY

Vol. 41 2 0 2 2

- Structural analysis and enzymatic characterization of extremely halophilic L-aspartate dehydrogenase
..... Kazunari Yoneda and Tomohiro Araki 1
- Teaching materials for enzyme chemistry experiments using indigo reductase
..... Kazunari Yoneda, Misa Yoshioka, Hideji Yamashita,
Hiroshi Yamaguchi and Tomohiro Araki 9
- The morphological characterization and fruit characters of *Fortunella* species
..... Kiichi Yasuda, Masaki Yahata and Hisato Kunitake 17
- Selection of useful SSR markers for genetic analysis of citrus using 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species
Kiichi Yasuda, Taiga Tomura, Mai Sato, Akiyoshi Tominaga
Masaki Yahata and Hisato Kunitake 29
- Chemical Synthesis of Acetaminophen *O*-Sulfate
..... Chihiro Morita, Reoma Taniguchi, Mio Yoshida, Yuki Tokunaga, Hideki Kinoshita
Masateru Ono, Katsuhisa Kurogi, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko and Shin Yasuda 39