

## 喜界島在来カンキツのリモニン配糖体およびリモニン含量

山本雅史<sup>1\*</sup>・松本亮司<sup>2</sup>・上地義隆<sup>3</sup>・伊地智 告<sup>3</sup>・久保達也<sup>1</sup>・  
富永茂人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鹿児島大学農学部果樹園芸学研究室 〒890-0065 鹿児島市郡元

<sup>2</sup>佐賀大学農学部 〒840-8502 佐賀市本庄町

<sup>3</sup>喜界町役場 〒891-6202 鹿児島県大島郡喜界町

### Contents of Limonin Glucoside and Limonin in Local Citrus Accessions in Kikai-jima Islands of Kagoshima Prefecture, Japan

Masashi Yamamoto<sup>1\*</sup>, Ryoji Matsumoto<sup>2</sup>, Yoshitaka Uechi<sup>3</sup>,  
Tsuguru Ijichi<sup>3</sup>, Tatsuya Kubo<sup>1</sup> and Shigeto Tominaga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Fruit Science, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto,  
Kagoshima 890-0065

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Saga University, Honjo-machi, Saga 840-8502

<sup>3</sup>Town Office of Kikai-Cho, Kikai-cho, Kagoshima 891-6202

#### Summary

Concentrations of limonin glucoside and limonin, one of the phytonutrient components of citrus, in juice of local citrus accessions cultivated in Kikai-jima island of Kagoshima prefecture were studied. The quantification of these components was determined by enzyme immunoassay developed by the authors (Matsumoto et al., 2008). Limonin glucoside is the major component in limonins in all accessions used in this study. The concentration of limonin glucoside in juice of Keraji (*Citrus keraji* hort. ex Tanaka), Kikaimikan (*C. keraji* hort. ex Tanaka), Kunenbo (*C. nobilis* Lour.), Shiikuwasha, (*C. depressa* Hayata), Shiiku (*C. sp*) and Fusuu (*C. rokugatsu* hort. ex Y. Tanaka) which are the major local citrus in Kikai-jima, were almost at the same level as or lower than that of satsuma mandarin (*C. unshiu* Marcow.) and ponkan (*C. reticulata* Blanco), known as the moderate limonin glucoside contents species. On the other hand, the limonin glucoside concentration was high in juice of Kawamine-10, a chance seedling related in *C. depressa*, at approximately 100 ppm.

**Key Words:** Keraji, Kikaimikan, Kunenbo, phytonutrients, Shiikuwasha

キーワード：キカイミカン，機能性，ケラジ，クネンボ，シクワサー

#### 緒 言

筆者らは奄美諸島の在来カンキツをこの地域の特産品として利用することを目指して、奄美大島、加計呂麻島、与路島、請島、喜界島、徳之島、沖永良部島および与論島において遺伝資源調査を行ってきた（山本ら，2006）。この調査において、喜界島が在来カンキツの栽培が最も盛んであり、これらが現在でも小規模ながら商品として流通していることを知ることができた。

しかしながら、喜界島においても在来カンキツの栽培は減少傾向にあり、さらなる特産化のためには何らかの方策をとる必要があると考えられた。一方、沖縄では、特産のシクワサー (*Citrus depressa* Hayata) 果実に

機能性成分のポリメトキシフラボノイドが多く含まれることが報告されて以来（矢野，2002；吉岡ら，2001），その生産および消費が急増している（矢野，2002）。そこで、シクワサーの例を参考に、機能性成分によって在来カンキツ果実に付加価値をつけることを考え、これらのポリメトキシフラボノイド含量を測定したところ、喜界島で栽培されるケラジおよびキカイミカンに本成分が高含有されていることを明らかにした（山本ら，2008）。

カンキツにはポリメトキシフラボノイド以外にも特徴のある機能性成分が存在する。このうち、リモノイドは果樹においてはカンキツ類に特有のトリテルペノイドであり、これらには腫瘍形成抑制作用等の機能性があることが解明されている（Lam ら，1994；Tian ら，2001）。主要リモノイドであるリモニンは苦みを呈するが、その配糖体であるリモニン配糖体は無味である。スイートオレンジ等では、果実の成熟に伴ってリモニン配糖体含量

2009年11月27日 受付日

2010年1月29日 受理日

\* Corresponding author. E-mail: yamasa@agri.kagoshima-u.ac.jp

が増加することから (Hasegawa ら, 1991), リモニン配糖体は苦みがない機能性成分として極めて価値が高いと考えられる。

しかし, 従来のリモニン配糖体の定量は, 前処理が煩雑であったり, 分析に長時間を要したり, 高価な設備を必要とするなどの問題があった (Brekša・Ibarra, 2007; Herman ら, 1990; Schoch ら, 2001)。筆者らは, その解決のために抗リモニン抗血清 (山本・松本, 1999) を用いた酵素免疫測定 (EIA) 法によるリモニン配糖体の簡便, 迅速, 高感度である定量法を開発し, それにより多数のカンキツ品種の果汁中リモニン配糖体を測定した (松本ら, 2009)。本研究においてはこの EIA 法を用いて, 喜界島における主要な在来カンキツの果汁に含まれるリモニン配糖体およびリモニンを定量したので, その結果を報告する。

## 材料および方法

### 1. 材料

2004年度および2005年度に本研究を実施した。両年度あるいは単年度に喜界島において栽培されているケラジミカン (*Citrus keraji* hort. ex Tanaka), キカイミカン (*C. keraji* hort. ex Tanaka), クネンボ (*C. nobilis* Lour.), シクワサー (*C. depressa* Hayata), シークー (*C. sp*) (ダイダイ類縁と考えられるが, 来歴は不明である) およびフスー (*C. rukugatsu* hort. ex Y. Tanaka) を供試した。併せて, 偶発実生由来と考えられ果実形質に特徴のあるものも供試した。川嶺-10はシクワサー類縁と考えられる小果のマングリンで, 極めて高酸であり香酸カンキツとしての利用が考えられる。西目-5は比較的減酸が早く, 食味が優れる。蒲生-14は果実がケラジミカンに似るが, 高酸である。なお, 仮称および果実特性は山本ら (2006) に拠った。

両年度における供試系統は Table 1, 2 の通りである。原則として, 1系統につき複数の樹を供試し, それらは異なる地域から選んだ。果実の採取時期は, 各系統の利用時期に合わせた。従って, 早生のケラジミカンおよびキカイミカンは他よりも早めに調査した。対照には, 喜界島で栽培されているウンシュウミカン (*C. unshiu* Marcow.) およびボンカン (*C. reticulata* Blanco) 並びに鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園 (鹿児島市) で栽培されている喜界島の在来カンキツなどを用いた。平均的な果実を1樹から5~10果採取した。その後, 鹿児島大学農学部において果汁を搾汁後,  $-45^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 2. リモニン配糖体およびリモニンの分析方法

リモニン配糖体およびリモニンの定量における果汁の前処理は, 松本ら (2008) の方法に準拠した。解凍した果汁を遠心分離し, その上清 1 mL と塩化メチレン 1 mL を試験管に採り振とうし, しばらく静置した後, 水層 (上層) を抜き取り, この液をリン酸緩衝液 (PBS-0.5% Tween20, pH7.3) で1,000倍に希釈し EIA に供した

(リモニン配糖体分析用)。また塩化メチレン層 (下層) の入った試験管に蒸留水を適量加え, 水層を抜き取り, 再度蒸留水を適量加えこの操作を4回繰り返した。最後に水層を完全に抜き取り, 残った塩化メチレン層を  $95^{\circ}\text{C}$  で10~15分ほど乾熱固化し, 1 mL のアセトニトリルを添加して溶解した。これに 9 mL のリン酸緩衝液 (PBS-0.5% Tween20, pH7.3) を加え, 果汁の10倍液とした。さらにこの溶液をリン酸緩衝液 (PBS-0.5% Tween20, pH7.3) で20倍に希釈し200倍液とし EIA に供した (リモニン分析用)。

EIA には山本・松本 (1999) が作製した抗リモニン抗血清を用い, 高感度であるビオチン-アビジンシステムによる間接競合法 (BAS-ICEIA) を実施した (松本ら, 2008)。リモニン-オキシム-オバルブミン (Li-Ox-OVA) またはリモニン配糖体-オバルブミン (LG-OVA) を固相化抗原とした。Li-Ox-OVA (0.2 ppm) または LG-OVA (1 ppm) 液 200  $\mu\text{L}$  を各ウェルに加え,  $4^{\circ}\text{C}$  で一夜静置し, 固相化した。次に, ブロックエース (雪印乳業) で非特異吸着を防いだ。リモニン配糖体 (LKT Laboratories, Inc, USA), リモニン (アメリカ合衆国農務省果実・野菜研究所, 長谷川 信博士から恵贈) の標品あるいはサンプル液と同量の 100  $\mu\text{L}$  のビオチン化抗リモニン抗血清 (LG:1 ppm, Li:0.2 ppm) を各ウェルに加え,  $4^{\circ}\text{C}$  で一夜競合させた。次に, 200  $\mu\text{L}$  のアビジンアルカリ性フォスファターゼコンジュゲート (SIGMA) を加え, 室温で180分反応させた。最後に200  $\mu\text{L}$  のパラニトロフェノールリン酸液を各ウェルに添加し, 室温で90~150分発色させ, マイクロプレート光度計 (ImmunoMini NJ-2300, NalgeNunc) で405 nm の吸光度を測定した。それぞれの反応の後にマイクロプレートはマイクロプレート・ウォッシャー (マルチウォッシュ II, Tricontinent) を用い, リン酸緩衝液 (PBS-0.5% Tween 20, pH7.3) で洗浄した。

## 結果および考察

2004年度における結果を Table 1 に, 2005年度における結果を Table 2 に示した。リモニン含量はいずれにおいても少なく, 喜界島における最高は2005年度のケラジミカンの 2.88 ppm, 最低は2005年度のフスーの 0.00 ppm であった。リモニンは 6 ppm 以上で苦みを感じる (Guagagni, 1973) とされているため, これらの少ないリモニン含量は, 消費には好都合であると考えられた。リモニン配糖体含量においては, 喜界島で2か年調査した系統では, シクワサーにおける2004年度の方が高い傾向にあったが, ケラジミカンおよびキカイミカンでは両年の定量値に大差は認められなかった。各系統における栽培地の別, 調査時期の違いもリモニン配糖体含量に大きく影響しなかった。

喜界島における各系統のリモニン配糖体含量は, ケラジミカンではほぼ20~30 ppm, キカイミカンでも例外はあるもののケラジミカン程度, クネンボは10 ppm 前後,

Table 1 Limonin glucoside and limonin content of juice in local citrus accession cultivated in Kikai-jima islands and their control accessions (2004-2005).

Accession	Latin name	Place	Year	Date	Limonin glucoside (ppm)	Limonin (ppm)
Keraji	<i>Citrus keraji</i>	Nishime, Kikai-jima	2004	Sep. 17	7.21	1.16
				Oct. 27	29.12	0.82
		Akaren, Kikai-jima	2004	Sep. 17	3.46	0.79
				Oct. 27	19.25	0.89
				Dec. 8	34.95	0.35
Kikaimikan	<i>C. keraji</i>	Nishime, Kikai-jima	2004	Sep. 17	3.95	0.81
				Oct. 27	19.86	0.79
				Dec. 8	11.05	0.05
		Akaren, Kikai-jima	2004	Sep. 17	2.93	0.77
				Oct. 27	38.50	1.04
				Dec. 8	18.43	0.85
Shiikuwasha	<i>C. depressa</i>	Nishime, Kikai-jima	2004	Sep. 17	9.98	0.88
				Oct. 27	35.20	0.95
				Dec. 8	31.67	1.88
		Kadon, Kikai-jima	2004	Jan. 21	33.07	0.26
				Feb. 28	42.00	0.20
Kawamine-10 <sup>z</sup>	<i>C. depressa</i> relative	Kawamine, Kikai-jima	2004	Sep. 17	15.09	0.89
				Oct. 27	20.95	0.64
				Dec. 8	42.20	2.07
Nishime-5 <sup>z</sup>	<i>C. sp</i>	Mishime, Kikai-jima	2004	Sep. 17	15.09	0.89
				Oct. 27	20.95	0.64
				Dec. 8	42.20	2.07
Kamo-14 <sup>z</sup>	<i>C. keraji</i> relative	Kamo, Kikai-jima	2004	Sep. 17	15.09	0.89
				Oct. 27	20.95	0.64
				Dec. 8	42.20	2.07
Control						
Sasshu	<i>C. reticulata</i>	Ikeji, Kikai-jima	2004	Dec. 8	64.96	2.70
Keraji	<i>C. keraji</i>	Kagoshima <sup>y</sup>	2004	Oct. 27	10.08	0.95
				Dec. 8	26.93	0.98
Kikaimikan	<i>C. keraji</i>	Kagoshima <sup>y</sup>	2004	Oct. 27	5.58	0.46
				Dec. 8	13.31	0.03
Shiikuwasha	<i>C. depressa</i>	Kagoshima <sup>y</sup>	2004	Sep. 17	15.09	0.89
				Oct. 27	18.07	0.90
				Dec. 8	18.90	1.07
Okitsu wase	<i>C. unshiu</i>	Kagoshima <sup>y</sup>	2004	Jan. 21	21.91	0.25
Yoshida ponkan	<i>C. reticulata</i>	Kagoshima <sup>y</sup>	2004	Dec. 8	104.69	1.00

<sup>z</sup> Tentative name.<sup>y</sup> Toso Orchard of Faculty of Agriculture, Kagoshima University.

Table 2 Limonin glucoside and limonin content of juice in local citrus accession cultivated in Kikai-jima islands and their control accessions (2005-2006).

Accession	Latin name	Place	Year	Date	Limonin glucoside (ppm)	Limonin (ppm)		
Keraji	<i>Citrus keraji</i>	Akaren, Kikai-jima	2005	Oct. 18	32.68	2.88		
		Keraji, Kikai-jima	2005	Oct. 18	21.46	2.20		
Kikaimikan	<i>C. keraji</i>	Akaren, Kikai-jima	2005	Oct. 18	37.79	1.71		
		Aden, Kikai-jima	2005	Oct. 18	4.70	0.57		
		Kawamine, Kikai-jima	2005	Oct. 18	28.40	1.32		
Kunenbo	<i>C. nobilis</i>	Aden, Kikai-jima	2006	Jan. 17	14.60	1.30		
		Kawamine, Kikai-jima	2006	Jan. 17	5.10	0.10		
Shiikuwasha	<i>C. depressa</i>	Urahara, Kikai-jima	2005	Dec. 8	10.90	2.70		
			2006	Jan. 17	18.10	1.70		
		Kawamine, Kikai-jima	2005	Dec. 8	13.00	0.90		
			2006	Jan. 17	16.90	0.10		
		Nishime, Kikai-jima	2005	Dec. 8 Jan. 17	12.50 13.50	2.00 0.40		
Shiiku	<i>C. sp</i>	Aden, Kika-jima	2006	Jan. 17	10.60	0.60		
				Feb. 17	27.40	0.90		
		Isaneku, Kikai-jima	2006	Jan. 17	12.00	1.50		
				Feb. 17	31.20	1.70		
Fusuu	<i>C. rokugatsu</i>	Akaren, Kikai-jima	2006	Jan. 17	0.00	0.80		
				Feb. 17	6.80	0.20		
		Urahara, Kikai-jima	2006	Jan. 17	10.60	0.90		
				Feb. 17	10.60	0.10		
		Kawamine, Kikai-jima	2006	Jan. 17	6.70	0.30		
				Feb. 17	7.10	0.00		
		Control						
Kagoshima wase	<i>C. unshiu</i>	Nakazato, Kikai-jima	2005	Oct. 18	12.90	2.44		
Sasshu	<i>C. reticulata</i>	Ikeji, Kikai-jima	2006	Jan. 17	31.30	1.90		
Kikaimikan	<i>C. keraji</i>	Kagoshima <sup>z</sup>	2005	Oct. 19	19.80	1.13		
Shiikuwasha	<i>C. depressa</i>	Kagoshima <sup>z</sup>	2005	Dec. 13	12.70	0.90		
Shiiku	<i>C. sp</i>	Kagoshima <sup>z</sup>	2006	Jan. 24	0.20	0.10		
				Feb. 20	0.90	0.20		
Fusuu	<i>C. rokugatsu</i>	Kagoshima <sup>z</sup>	2006	Jan. 24	3.70	0.20		
				Feb. 20	9.60	2.00		
Juman unshiu	<i>C. unshiu</i>	Kagoshima <sup>z</sup>	2004	Oct. 27	39.70	3.68		

<sup>z</sup> Toso Orchard of Faculty of Agriculture, Kagoshima University.



シーカーもケラジミカン程度、フスーは約10 ppm 以下であった。シクワーサーでは2004年度にほぼ30 ppm 強、2005年度に20 ppm 以下となった。偶発実生由来の川嶺-10は約100 ppm、西目-5は約70 ppm、蒲生-14は約17 ppm であった。鹿児島で栽培した果実においても、ほとんどは同一系統では喜界島のものとほぼ同じ値を示したが、フスーは鹿児島産果実のリモニン配糖体含量が少なかった。また、ウンシュウミカンおよびボンカンでは2005年度の喜界島産「かごしま早生」のリモニン配糖体含量が12.9 ppm であったことを除くと約25~100 ppm であった (Table 1, 2)。

松本ら (2008) は、我が国で生産した主要カンキツ100品種以上のリモニン配糖体およびリモニン含量について報告している。その結果によると、ブタン類を除いて、総リモニン含量 (リモニン配糖体とリモニン含量の合計) の90%以上がリモニン配糖体である。同様に、本研究においてもリモニン含量はリモニン配糖体含量と比較すると非常に少なかった。さらに松本ら (2008) は、リモニン配糖体を100 ppm 以上含有する品種が多数存在し、中には300 ppm 以上にもなる品種があることを明らかにしている。本研究の対照として用いたウンシュウミカンおよびボンカンのリモニン配糖体含量には品種間差異が認められるものの、多様な品種の中ではほぼ中位のリモニン配糖体含量を示す。

本研究でウンシュウミカンおよびボンカンよりも明らかにリモニン配糖体含量が多かったのは川嶺-10のみであった。他はこれらと同等もしくはこれらよりもリモニン配糖体含量が少なかった。クネンボ、キカイミカンと同種であるカブチーおよびシクワーサー数系統のリモニン配糖体含量は既に報告され、これらは多様なカンキツ類の中ではリモニン配糖体含量が少ないグループに属す (松本ら, 2008)。これらと本研究におけるクネンボ、キカイミカンおよびシクワーサーの結果を比較するとほぼ同じ値であった。これらのことから、ケラジミカンおよびキカイミカンなど喜界島の主要な在来カンキツで、現在の主要種であるウンシュウミカンおよびボンカンよりもリモニン配糖体含量の面から優れているものは見出せなかった。しかし、川嶺-10のみは約100 ppm と高いリモニン配糖体含量を示した。川嶺-10はシクワーサータイプのマンダリンである。本研究および松本ら (2008) の結果から、シクワーサーはリモニン配糖体含量が少ない。川嶺-10はシクワーサーのその欠点を克服する新たな遺伝資源として注目する価値があるかもしれない。

前報 (山本ら, 2008) のポリメトキシフラボノイド含量においては、同系統の場合、喜界島で生産された果実が鹿児島市で生産されたものより高い値を示した。一方、リモニン配糖体含量ではフスーで喜界島産果実が鹿児島産よりも高かったことを除いては、そのような傾向は認められなかった。しかし、喜界島においても栽培地、採取時期の違いによってリモニン配糖体含量には変動が認められた。スイートオレンジのようにリモニン配糖体の

多いものでは、これは果実成熟に伴って増加するとされているが (Hasegawa ら, 1991)、リモニン配糖体含量に影響する栽培・環境条件については不明であるので、その点についての検討が必要である。本研究で用いた EIA 法は迅速・簡便で正確な定量が可能であるので (松本ら, 2008)、その際には有効な分析法となるものと考えられる。

以上、本研究の結果、喜界島における主要な在来カンキツは、特段リモニン配糖体が多くなく、本機能性成分については特徴が乏しいことが判明した。しかし、川嶺-10のように本成分を高含有する系統が存在することは明らかにできた。さらに、喜界島以外の奄美諸島にも多数の固有の在来カンキツが存在するので (山本ら, 2006)、今後はそれらの機能性成分の解明にも着手する必要がある。

## 要 約

鹿児島県喜界島で栽培されている在来カンキツについて、果汁に含まれる機能性成分であるリモニン配糖体およびリモニン含量を測定した。これら成分の定量においては、筆者らが開発した (松本ら, 2008) 酵素免疫測定法を用いた。いずれの系統でも、果汁中の主要なリモニン類はリモニン配糖体であった。喜界島で栽培の多い在来カンキツであるケラジミカン (*Citrus keraji* hort. ex Tanaka), キカイミカン (*C. keraji* hort. ex Tanaka), クネンボ (*C. nobilis* Lour.), シクワーサー (*C. depressa* Hayata), シーカー (*C. sp*) およびフスー (*C. rokugatsu* hort. ex Y. Tanaka) のリモニン配糖体は、これを中程度に含有することが知られているウンシュウミカンおよびボンカンと同程度、あるいは少なかった。一方、シクワーサー類縁の偶発実生である川嶺-10のリモニン配糖体含量は約100 ppm と多かった。

## 引用文献

- Brekas, A. P. and P. Ibarra. 2007. Colorimetric method for the estimation of total limonoid aglycones and glucoside contents in citrus juices. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5013-5017.
- Guadagni, D. G., V. P. Maier and J. G. Turnbaugh. 1973. Effect of some citrus juice constituents on taste thresholds for limonin and naringin bitterness. *J. Sci. Food Agric.* 24: 1277-1288.
- Hasegawa, S., P. Ou, C. H. Fong, Z. Herman, C. W. Coggins, Jr. and D. R. Atkin. 1991. Changes in the limonoate A-ring lactone and limonin 17- $\beta$ -D-glucopyranoside content of navel oranges during fruit growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 39: 262-265.
- Herman, Z., C. H. Fong, P. Ou and S. Hasagawa. 1990. Limonoid glucosides in orange juice by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1860-1861.

- Lam, L. K. T., J. Zhang and S. Hasegawa. 1994. Citrus limonoid reduction of chemically-induced tumorigenesis. Food. Technol. 48: 104-108.
- 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.
- Schoch, T. K., G. D. Manners and S. Hasegawa. 2001. Analysis of limonoid glucosides from *Citrus* by electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 49: 1102-1108.
- Tian Q. G., E. G. Miller, H. Ahmad, L. L. Tang and B. S. Patil. 2001. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. Nutr. Cancer International J. 40: 180-184.
- 山本雅史・松本亮司. 1999. 酵素免疫測定法によるカンキツ果汁及び新梢中のリモニンの定量. 果樹試報. 33: 113-125.
- 山本雅史・松本亮司・上地義隆・伊地智 告・久保達也・富永茂人. 2008. 喜界島における在来カンキツのポリメトキシフラボノイド含量. 鹿大農学術報告. 58: 1-7.
- 山本雅史・松島健一・伊地智 告・上地義隆・川口昭二・中野八伯・野村哲也・谷村音樹・久保達也・富永茂人. 2006. 奄美諸島における在来カンキツ遺伝資源の調査とその保存. 鹿大農場研報. 29: 5-11.
- 矢野昌充. 2002. 沖縄産カンキツ（シイクワシャー）の健康維持・増進効果. 農業技術. 57: 30-33.
- 吉岡照高・比嘉 淳・新崎正雄・松本亮司. 2001. シイクワシャー系統の果皮および果汁中のポリメトキシフラボン含量. 園学九研集, 9: 5.