

酵素結合抗体法 (ELISA) によるカンキツの苦味成分, ナリンジン および関連フラバノン配糖体の検出

久原重松 (果樹試験場口之津支場)

KUHARA, S.: Detection of Bitter Principle, Naringin (Naringenin-7-Neohesperidoside) and Related Flavonoid
By Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

抗血清利用によるナリンジンの検出については Jourdan²⁾の放射標識抗体法による検出が報告されているが、著者は簡易で高精度のナリンジン検出法の必要性から、独自に酵素結合抗体法 (ELISA) による検出法の開発を進めてきた。その結果、実用的と言いつける検出が可能となったので報告する。

1. 材料および方法

1) 抗原の作成 抗原はナリンジンを構成しているグルコピラノースの部位に存在する併列2個の水酸基を通じて牛血清アルブミン (BSA) に BrCN を用いて結合させることで作成した。この方法はフラバノンの部分で結合させる Jourdan らの場合と異なっている。BSA-ナリンジン結合物の作成では1分子のBSA当たり25個のナリンジン分子が結合するように留意した。

2) 抗体の作成 上記によってえられた抗原はBSAとして1mg/mlの溶液とし、毎回0.5mlずつ、アジュバントに1:1で混合して家兎の皮下および筋肉に注射した。約2カ月後、全採血によって血清をえ、これから抗体グロブリン (IgG) を分画精製した。

3) 酵素標識ナリンジンの作成 競合法¹⁾による検出に必要な酵素標識ナリンジンの作成はBSA-ナリンジン結合物の作成と同様な操作によりアルカリフォスファターゼとナリンジンを結合させた。

4) 検出実験 上記によりえられた抗ナリンジン抗体と酵素標識ナリンジンを用い、競合法により、標品の希釈で調製したナリンジン溶液、関連フラバノン配糖体溶液、カンキツ葉片、果肉の抽出液について検出を試みた。

2. 結果および考察

1) 純化標品における検出 ナリンジンの希釈溶液における検出実験の結果は第1図のとおりで、2~5ppmのI G Gの前処理と500倍の酵素標識ナリンジン (酵素蛋白と

して1~1.5ppm)の添加により、100~0.25ppm (1.0 μ g~2.5ng)の範囲で検出できることが示された。

2) 検出の特異性 検出の特異性をみるために7つのフラバノン配糖体について検出実験を行った。その結果はナリンジンのほかにネオヘスペリディン、ボンシリンと同様の交叉反応が認められ、ヘスペリディン、ナリルチン、プルニンでは認められなかった。このことはフラバノン配糖体のうちでネオヘスペリディンを構成にもつものに交叉反応のみられることを示した。

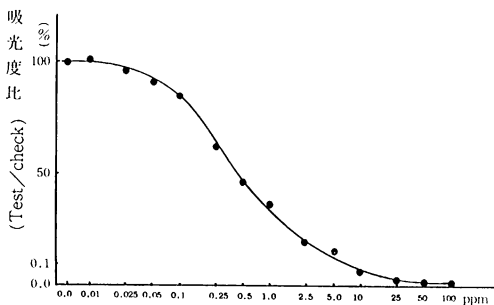
これらのほか、ディディミンについてはわずかながら反応がみられたが、液体クロマトグラフによる検査で標品中に少量のボンシリンの混入が認められたことから、この反応は混入のボンシリンにもとづくものでディディミンによるものではないと思われた。

3) 葉片および果肉からの検出 カンキツの葉片 (直径5mm, 5~7mgのディスク) および果肉 (50mg) から80%エタノール抽出によってえた試料について競合法により検出を試みた結果は、葉、果肉いずれの場合でも非特異反応がいちじるしく、品種間差異を認めえなかった。次にこれらの抽出液を四塩化炭素で処理することにより非特異反応のない優れた結果がえられた。すなわち、葉果肉ともに温州ミカン、ネーブルオレンジ、天狗では検出されず、川野ナツダイダイ、ハッサク、グレープフルーツ、河内晩柑、平戸、舟床で検出された。これらの結果は西浦ら³⁾におけるカンキツ品種のフラバノン配糖体の成績と比較するとき、ネオヘスペリシドを構成にもつフラバノン配糖体を含む品種で陽性の検出結果のえられることを示している。

以上の結果にみるように、高い精度で、容易にナリンジンおよび関連の苦味成分がELISAにより検出できるに至ったことは今後、果実の加工、貯蔵における苦味の研究、品種育成における苦味成分の遺伝様式の解明、苦味についての幼葉期における個体選抜、多胚品種の交雑における交雑個体の幼苗期での識別や交雑胚のえられる頻度、管理条件の検討などに役立つと思われる。

引用文献

- 1) 久原重松: 植物防疫, 34 (3), 129~135, 1980.
- 2) Joudan et al: Planta medica 44, 82~86, 1982.
- 3) Nishiura et al: Agr. Biol. Chem. 33 (8), 1109~1118, 1965.



第1図 ナリンジン検出の基準曲線