

機関番号：32696

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580040

研究課題名(和文) キウイフルーツ等マタタビ属果実優良品種開発を目指した基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental experiment for cultivar development in kiwifruit and other *Actinidia* fruits.

## 研究代表者

西山 一郎 (NISHIYAMA ICHIRO)

駒沢女子大学・人間健康学部・教授

研究者番号：10183899

研究成果の概要(和文)：種々のマタタビ属果実のシュウ酸濃度、総ポリフェノール濃度およびラジカル消去活性を測定し、これらの値には大きな品種・系統間差異があることを確認した。また、キウイフルーツ果実に含まれるビタミン C、クロロフィル、カロテノイド、アクチニジンなどの測定法に改良を加え、従来法よりも簡易迅速化することに成功した。これらの知見は、従来品種よりも機能性に優れた新品種を作出するための基礎として有用である。

研究成果の概要(英文)：Oxalic acid and total polyphenol contents, and free radical scavenging activity were determined in the fruits of various *Actinidia* genotypes. It revealed that there was considerable varietal differences in the contents of these functional components in the fruits. Simple and rapid methods for determination of Vitamin C, chlorophyll, and carotenoids in *Actinidia* fruits were developed to enable effective screening for development of new *Actinidia* cultivars of commercial potential.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：キウイフルーツ、マタタビ属、ビタミン C、カロテノイド、クロロフィル、アクチニジン、ポリフェノール、ラジカル消去活性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) キウイフルーツやサルナシ等のマタタビ属果実には多種多様な品種・系統があるにもかかわらず、経済栽培が行われ流通しているものは、‘ヘイワード’、‘ホート 16A’、‘ベビーキウイ (Ananasnaya)’など、わずか数品種にすぎない。

(2) 30 種類以上のマタタビ属果実を材料とした申請者等による研究により、糖質や有機酸、ビタミン C、アクチニジン、クロロフィルおよびカロテノイドの果実中濃度には、顕著な種間および品種・系統間差異があることが示されている。

(3) マタタビ属果実の優良品種開発のためには、上記(2)に記す種々の果実成分の簡易迅速測定法を開発することが求められている。

## 2. 研究の目的

(1) マタタビ属果実成分の品種・系統間差異をさらに詳細に検討するため、シュウ酸や総ポリフェノール含量およびラジカル消去活性などを一定の方法により測定し、比較を行うことを目的とした。

(2) キウイフルーツ果実に含まれるビタミンC、クロロフィル、カロテノイド、アクチニジンなどの簡易迅速測定法を検討し、食品機能性に富む新品種を作出するための多量検体を扱うスクリーニングを効率よく行う技術の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ‘ヘイワード’や‘アボット’などの *A. deliciosa* 種、‘紅心’や‘ホート16A’などの *A. chinensis* 種、‘淡路系’、‘長野系’などの *A. rufa* 種、‘一才’や‘光香’などの *A. arguta* 種およびそれらの種間雑種の適熟期果実を用いて、以下のように果実成分の品種・系統間差異を調査した。

- ① シュウ酸濃度の測定は、果実の可食部ホモジネートを、0.5 mol/L 塩酸中で加熱処理し、シュウ酸カルシウム結晶を可溶化した後、ODSカラムを用いたHPLC法によってシュウ酸の測定を行った。
- ② 総ポリフェノール濃度の測定は、果実の可食部から、メタノール-水 (80:20) によってポリフェノールを抽出し、Folin-Ciocalteu法による総ポリフェノール濃度の測定を行った。標準物質としては、没食子酸 (galic acid, GA) を用い、実験結果は mg GA eq/100g fresh weight (FW) として表した。Folin-Ciocalteu法では、アスコルビン酸が発色に大きく影響することが知られているため、同試料のアスコルビン酸濃度をHPLC法により測定し、差し引き法にて総ポリフェノール濃度を算出した。
- ③ ラジカル消去活性は、上記②の試料について DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) 法により評価した。標準物質としては Trolox を用い、実験結果は  $\mu\text{mol Trolox eq/g FW}$  として表した。

(2) 主に‘ヘイワード’果実を実験材料として、種々の成分の簡易迅速測定法を模索した。

- ① ビタミンC、クロロフィルおよびカロテノイドの定量については、HPLC法

の測定諸条件を変えることにより簡易迅速化を図った。

- ② アクチニジンの定量はコンパクトスラブゲルを用いた電気泳動法により行い、一方、プロテアーゼ活性の測定は、適切な発色基質とプレートリーダーを組み合わせることで、迅速化を試みた。

## 4. 研究成果

(1) それぞれの品種・系統の果実におけるシュウ酸濃度、総ポリフェノール濃度ならびにラジカル消去活性を測定した結果を図1-3に示す。

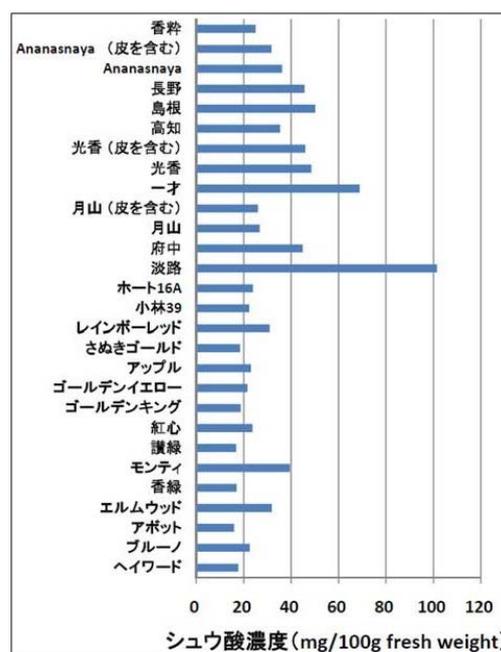


図1 シュウ酸濃度の品種・系統間差異

最も一般的に市販されている‘ヘイワード’果実におけるシュウ酸濃度は、17.7 mg/100g FWであった (図1)。 *A. deliciosa* 種の中では‘モンティ’果実のシュウ酸濃度が最も高く、39.5 mg/100g FWであった。その他の *A. deliciosa* 種果実のシュウ酸濃度は、16.0~31.8 mg/100g FWの範囲にあり、いずれも‘ヘイワード’果実と有意な差は認められなかった。一方、 *A. chinensis* 種キウイフルーツ果実のシュウ酸濃度は、18.7~30.9 mg/100g FWの範囲にあり、いずれも‘ヘイワード’果実との有意差は認められなかった。これらの中では、‘ゴールデンキング’や‘さぬきゴールド’のシュウ酸濃度が比較的低く、‘レインボーレッド’のシュウ酸濃度がやや高い傾向が認められた。実験に用いたシマサルナシ2種については、いずれの果実内シュウ酸濃度も‘ヘイワード’と比較して有意に高いことが示された。‘淡路’ならびに‘府中’果実のシュウ酸濃度は、101.5 mg/100g

FW および 44.8 mg/100g FW であり、それぞれ‘ヘイワード’の 5.7 倍および 2.5 倍にも達した (図 1)。一方、サルナシの果肉 (皮を除く) に含まれるシュウ酸濃度は、26.8~68.8 mg/100g FW と、キウイフルーツと比較して高い傾向を示すとともに、品種・系統による差異が大きいことが示された (図 1)。これらのうち、‘月山’を除くすべての品種・系統において、シュウ酸濃度は‘ヘイワード’に比較して有意に高値を示した。

‘月山’、‘光香’および‘Ananasnaya’果実では、皮を含む果実全体を試料としてシュウ酸の定量を行ったが、いずれの品種・系統においても、果肉のみを試料とした場合よりも、やや低いシュウ酸濃度を示すことがわかった。この結果から、サルナシ果実の表皮にはシュウ酸が含まれないか、あるいはその含量はわずかであることが示唆された。

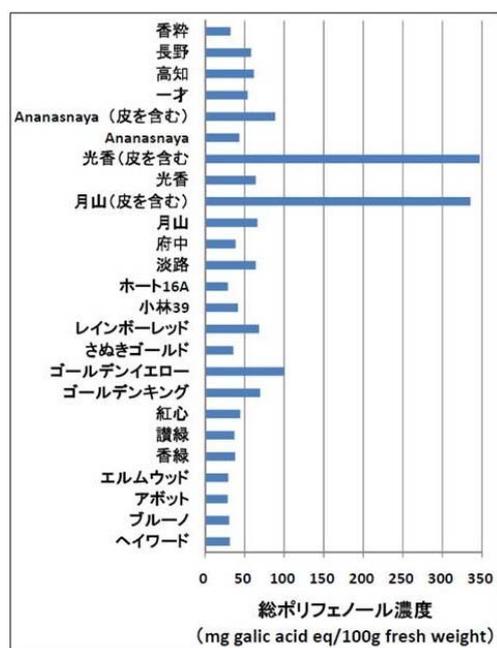


図2 総ポリフェノール濃度の品種・系統間差異

マタタビ属果実のそれぞれの品種・系統につき、果実内総ポリフェノール濃度を測定した結果を図 2 に示す。最も一般的に市販されている‘ヘイワード’果実の総ポリフェノール濃度は 31.5 mg GA eq/100g FW であった。*A. deliciosa* 種キウイフルーツの他の品種における総ポリフェノール濃度は、28.7~38.0 mg GA eq/100g FW の範囲にあり、‘ヘイワード’との有意な差は認められなかった。一方、*A. chinensis* 種キウイフルーツ果実の総ポリフェノール濃度は、28.9~100.3 mg GA eq/100g FW であり、大きなばらつきが認められた。このうち‘ゴールデンイエロー’、‘ゴールデンキング’および‘レインボーレッド’果実では、総ポリフェノール濃度が‘ヘイワ

ード’果実よりも有意に高いことが示された。シマサルナシ (*A. rufa*) およびサルナシ (*A. arguta*) 果実の皮を除いた果肉の総ポリフェノール濃度は、38.8~66.3 mg GA eq/100g FW の範囲にあり、全般に‘ヘイワード’等の *A. deliciosa* キウイフルーツ果実よりも高い値を示した。

またサルナシ果実は、キウイフルーツやシマサルナシと比較して皮が薄く無毛であり、皮ごと食用に供することができるため、‘月山’、‘光香’ならびに‘Ananasnaya’の 3 品種の果実においては、皮を含んだ果実全体からの試料作製を行い、ポリフェノール濃度の測定を行った。その結果、いずれの品種でも皮を含んだ果実全体の方が、果肉だけの場合よりも総ポリフェノール濃度が顕著に高いことが示された (図 2)。

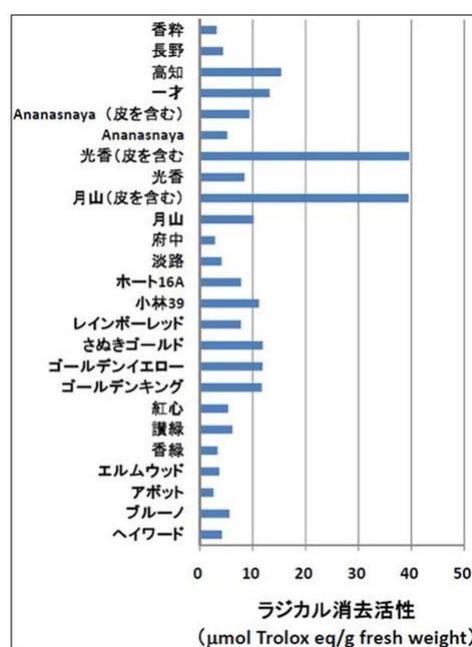


図3 ラジカル消去活性の品種・系統間差異

各マタタビ属果実抽出液の DPPH ラジカル消去活性を測定した結果を図 3 に示す。‘ヘイワード’では DPPH ラジカル消去活性が 4.17 μmol Trolox eq/g FW であったが、この値には大きな種間ならびに品種・系統間差異が認められた。*A. deliciosa* 種キウイフルーツ果実の DPPH ラジカル消去活性は、‘ヘイワード’と大きな差異は認められなかったが、‘ブルーノ’でやや高く、‘アボット’でやや低いことが示された。一方、*A. chinensis* 種キウイフルーツやサルナシ果実では、‘ヘイワード’と比較して DPPH ラジカル消去活性が顕著に高値を示す品種・系統が多く認められた。シマサルナシ果実の DPPH ラジカル消去活性には、‘ヘイワード’と有意な差異が認められなかった (図 3)。

一般にニュージーランド系のキウイフル

ーツやシマサルナシ果実と比較して、中国系キウイフルーツやサルナシ果実ではアスコルビン酸濃度が高いことが報告されている。本実験で示された DPPH ラジカル消去活性の差異の少なくとも一部は、アスコルビン酸の多寡に依存している可能性が高いと考えられる。また、‘月山’、‘光香’および‘Ananasnaya’の3種のサルナシについて、表皮の有無による DPPH ラジカル消去活性の差異を調査したところ、表皮を含む方が果肉のみの場合に比べて 1.8–4.7 倍の値を示すことがわかった (図 3)。表皮にポリフェノールが豊富である (図 2) ことから、この差異の少なくとも一部はポリフェノールの多寡に起因する可能性が考えられた。

(2) キウイフルーツ果実に含まれるビタミン C、クロロフィル、カロテノイド、アクチニジンなどの簡易迅速測定法を検討し、以下のような結果を得た。

① ビタミン C (アスコルビン酸)

種々の条件を検討し、以下の分析条件に至った。カラム：メルク社 ODS カラム (内径 4 mm×長さ 125 mm)、移動相：20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.8)、カラム温度：35℃、流速：0.8 mL/分、検出波長：243 nm。この条件でキウイフルーツ果肉抽出液を分析すると、アスコルビン酸のピークは 2.26 分前後に再現性よく検出され、1 回の分析が 3 分間程度で完了した (図 4)。またこのイソクラティック分析では、移動相の溶媒を置換することなく、すぐに次の試料の分析が可能であるため、1 時間に 20 検体の分析を行うことができる。オートサンプラーを併用すれば、多検体のアスコルビン酸測定が簡便かつ迅速に行うことが可能となるもの考えられる。

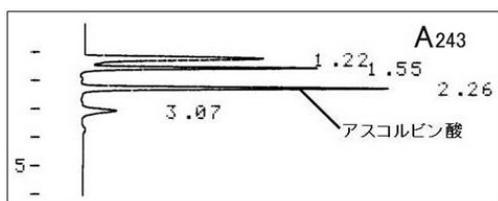


図4 ‘ハイワード’果実のアスコルビン酸の HPLC分析

② クロロフィルおよびカロテノイド

種々の条件を検討し、以下の分析条件に至った。カラム：メルク社 ODS カラム (内径 4 mm×長さ 125 mm)、移動相：A 液はアセトニトリル-水 (9:1)、B 液は酢酸エチルとし、A 液 100% から 12 分間で A 液 40%、B 液 60% となるよう直線的濃度勾配をかけ、その後 14 分までそのままとする。カラム温度：35℃、流速：1.5 mL/分、検出波長：440 nm。この条件でキウイフルーツ果肉抽出液を分析す

ると、ネオキサンチン、ビオラキサンチン、ルテイン、クロロフィル a、クロロフィル b およびβ-カロテンの同時分析が、14 分間で完了した (図 5)。溶出に用いる溶媒の濃度勾配をさらに急にすると、より短時間での分析が可能であったが、品種・系統によっては各ピークの分離が不良となったため、分析時間のさらなる短縮は困難であった。

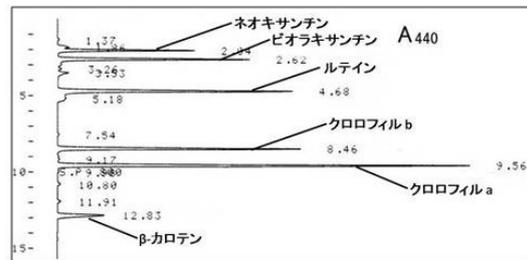


図5 ‘ハイワード’果実の色素成分のHPLC分析

③ アクチニジン

各種の人工基質を用いたときの精製アクチニジンの比活性を、表 1 に示した。アクチニジンでは、基質の P2 サイトにおける疎水性アミノ酸の存在が重要であるとされている。本実験の結果も、P2 サイトにバリンやフェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸残基をもつ人工基質で比活性が高い傾向が認められ、それらの中でも、Bz-Phe-Val-Arg-pNA が最も高い比活性を示した (表 1)。この基質では、従来システインプロテアーゼ用の基質として汎用されてきた Pyr-Phe-Leu-pNA よりも 30 倍近く高い比活性が得られた (表 1)。この結果は、Bz-Phe-Val-Arg-pNA を用いることにより、アクチニジンの迅速な測定が可能となることを意味した。

また、キウイフルーツ果実にはクエン酸やキナ酸などの有機酸が多く含まれており、その果汁は強い緩衝作用を有している。そのため、酵素活性測定に先だって果汁の pH 調整が必要であるが、感度の高い基質を用いることによって用いる果汁の体積を少なくできるため、果汁の pH 調整が不要となり前処理の手間が省ける。以上の理由により、簡易迅速測定法の開発のためには、Bz-Phe-Val-Arg-pNA を用いることが望ましいものと判断した。

表1 各種人工基質に対するアクチニジンの選択性

人工基質	比活性 (nmol pNA/min·mg protein)
Bz-Phe-Val-Arg-pNA	1268
Z-Phe-Arg-pNA	225
Bz-Pro-Phe-Arg-pNA	134
Pyr-Phe-Leu-pNA	44.0
Ac-Phe-Gly-pNA	29.2
Z-Asp-Glu-Val-Asp-pNA	3.67
Bz-Arg-pNA	2.76
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	1.17
Bz-Val-Gly-Arg-pNA	0.18
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	0.14

上記の Bz-Phe-Val-Arg-pNA を基質として 96 穴プレートを用いて酵素反応を行い、プレートリーダーでアクチニン活性を測定したところ、図 6a のような検量線が得られた。この結果より、少なくとも 50-500  $\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲において、アクチニン濃度の測定が可能であることが示唆された。

しかし、この検量線を用いて測定する場合、検量線作成のために毎回各種濃度の標準アクチニンを作製し測定する必要があり、手間と時間がかかる。そこで図 6b のようにプロットし直したところ、アクチニン濃度 50-300  $\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲では、相関係数 0.998 で濃度と吸光度との間に強い正の相関が認められた。この結果より、アクチニン濃度が 50-300  $\mu\text{g/mL}$  の範囲となるように果汁を希釈して測定を行えば、2 点検量法でも測定が可能であり、より簡略化が実現できることが示唆された。

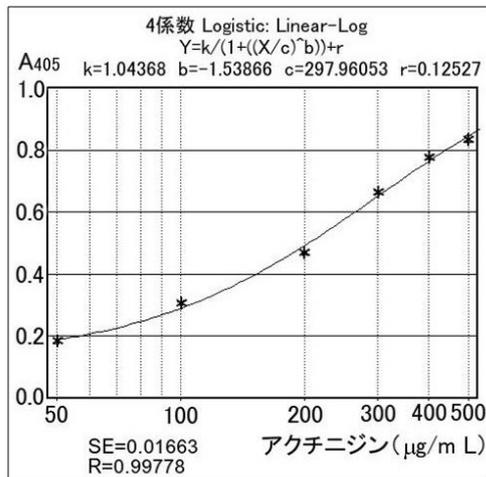


図6a 酵素活性測定法によるアクチニンの検量線 (1)

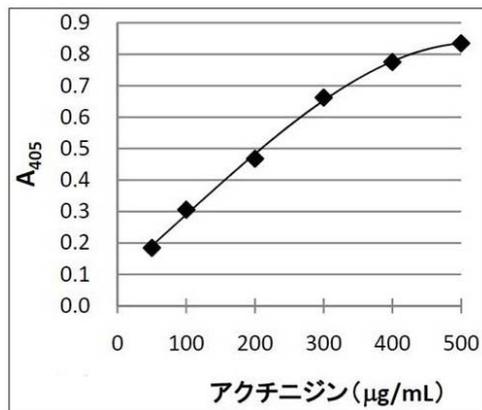


図6b 酵素活性測定法によるアクチニンの検量線 (2)

果汁中のアクチニン濃度の定量は、従来はミニスラブ電気泳動装置を用いて行ってきた。この定量方法では、電気泳動に 1.2 時間、染色および脱色に 3 時間程度を要するた

め、1 回の分析に 4.2 時間程度を要していた。本実験では、電気泳動装置をコンパクトスラブ装置 (アトー社) に替え、また染色・脱色を e-Stain (GenScript 社) で行うことにより、泳動・染色・脱色のすべての操作を 40 分間で完了できるようになった。この方法で ‘ヘイワード’ 果実から一果ごとに調製した果汁について定量分析を行った結果を、図 7 に示す。アクチニンは、分子量 24,000 前後に単一バンドとして認められた (図 7、レーン A) が、これに相当するバンドについてデンストメトリーによる定量化を行ったところ、果汁中アクチニン濃度は 0.69~1.72  $\text{mg/mL}$  であることが示された。

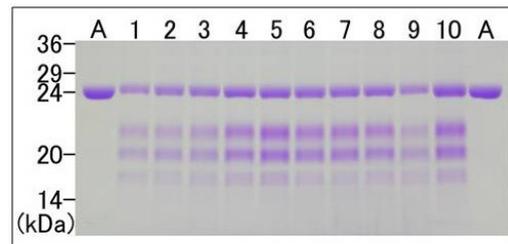


図7 ‘ヘイワード’ キウイフルーツ果汁の SDS-PAGE 像

上図 6a および 6b に示すような酵素活性測定法で求めたアクチニン濃度と、上図 7 に示すような SDS-PAGE 法により求めた値との相関性を図 8 に示す。各測定値の間には、相関係数 0.988 で非常に高い正の相関性が認められた。この結果から、96 穴プレートを用いた酵素活性測定法によって、簡便かつ迅速なアクチニン濃度の評価が可能であることが示された。

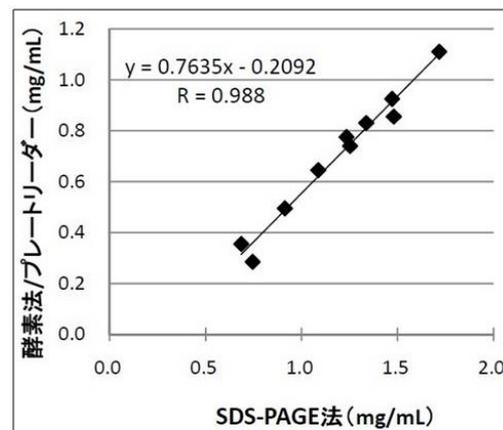


図8 SDS-PAGE法ならびに酵素活性測定法により求めたアクチニン濃度の相関性

ただし、酵素活性測定法で求めたアクチニン濃度と SDS-PAGE 法によって求めた値は一致せず、前者は後者の 60% 程度の低値を示した。この原因としては、果汁中のアクチニンの一部が不活性化されている可能性が考えられた。アクチニンが活性を示すた

めには、活性中心に存在する SH 基が重要であり、これが酸化されると不活性型に変化することが知られている。本実験において標準品として用いたアクチニジンは、コバレントクロマトグラフィーによって精製したものであるため、そのほとんどが活性型であったと考えられる。一方、キウイフルーツ果汁中のアクチニジンは、その一部が不活性型であったとすると、SDS-PAGE 法では活性型および不活性型のすべてのアクチニジンが測定されるのに対して、酵素活性測定法では活性型のアクチニジンのみが測定されることになる。そのために、定量値の不一致が生じたのではないかと推察される。

### (3) 総括

本研究成果(1)より、マタタビ属既存品種・系統の果実における、果実内シュウ酸濃度、総ポリフェノール濃度ならびにラジカル消去活性が明らかとなった。この知見は、先行研究により示されていた糖質や有機酸、ビタミン C、アクチニジン、クロロフィルおよびカロテノイド等の果実中濃度の品種・系統間差異と共に、それぞれの品種・系統特性を把握するために重要である。すなわち、新品種を育成する際に、その目的に合致した既存品種・系統を選抜するための基礎情報として必要不可欠である。

また、本研究成果(2)により報告したマタタビ属果実中のアスコルビン酸、クロロフィル、カロテノイドならびにアクチニジン濃度の簡易迅速測定法により、これら果実成分の定量に要する時間がこれまでよりも大幅に短縮された。この成果は、これらの機能性成分に富む新品種を作出するための多量検体を扱うスクリーニングを効率よく行うために、大いに貢献するものと考えられる。わが国でも香川県、愛媛県、神奈川県などを中心としてマタタビ属果実の品種改良が盛んであるが、時として数百にも及ぶ多検体に適用できる果実成分測定法の報告は例を見ない。

今後は、測定方法の簡易迅速化だけではなく、果実から試料液を調製する方法の簡易迅速化についても検討を行い、試料作製から測定終了までの労力と時間を軽減することを目指したい。また、測定に伴い発生する廃液やごみなどを少なくするよう工夫し、環境負荷が低減されるような測定方法の改良も検討したい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 岡田昌己、西山一朗、キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンの簡易測定法、駒沢女子研究紀要、査読無、17号、2011年、361-366
- ② 西山一朗、福田哲生、末澤克彦、キウイフルーツ等マタタビ属果実におけるシュウ酸含量の品種/系統間差異、駒沢女子研究紀要、査読無、17号、2011年、401-406
- ③ 西山一朗、ベビーキウイ (サルナシ) 果実の特性、日本家政学会誌、査読無、61巻、2010年、501-504
- ④ 西山一朗、高橋淑子、下橋淳子、松森慎悟、大田忠親、パパイヤ成熟果に残存するプロテアーゼ活性の評価、日本家政学会誌、査読有、59巻、2008年、321-326

[学会発表] (計 3 件)

- ① 西山一朗、福田哲生、末澤克彦、大田忠親、キウイフルーツ等マタタビ属果実におけるシュウ酸含量、日本家政学会第 61 回大会、2009 年 8 月 31 日、兵庫
- ② 西山一朗、福田 哲生、末澤 克彦、大田忠親、サルナシ果実に含まれるアクチニジン様プロテアーゼの精製、園芸学会平成 20 年度秋期大会、2008 年 9 月 28 日、三重
- ③ 西山一朗、福田 哲生、末澤 克彦、大田忠親、キウイフルーツ果汁中アクチニジンアイソザイム組成の品種/系統間差異、日本食品科学工学会第 55 回大会、2008 年 9 月 7 日、京都

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

西山 一朗 (NISHIYAMA ICHIRO)  
駒沢女子大学・人間健康学部・教授  
研究者番号：10183899

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：