

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02982

研究課題名(和文) リンゴの主要エステル類の代謝制御：遺伝・環境要因とピルビン酸の分配の解析

研究課題名(英文) Pyruvate metabolism associated with ester synthesis in apple

研究代表者

田中 福代 (Tanaka, Fukuyo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・ユニット長

研究者番号：50355541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴの官能特性や嗜好性に強くかかわる香り成分であるエチルエステル類と酢酸エステル類について、その生成に関わる遺伝・環境要因を総合的に解析することを目的に実験を行った。収穫時期や収穫後の貯蔵期間、みつの入りやすさ、エチレン生成量の相違、エチルエステル類と酢酸エステル類のバランスの観点から設定した2セットの実験について香り成分と遺伝子発現を解析するとともに共発現解析を行った。

エチルエステル類の集積には嫌気条件がエチレンの増加が必須であり、生成制御には解糖系からエタノール発酵に至る遺伝子の関与が示唆された。酢酸エステルについては、エチレンの影響は小さく、LOX遺伝子との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 特徴的な香り成分特性を有する4品種における果実内部、収穫・貯蔵時期の組み合わせと、2. エチレン生成及び香り成分特性の異なるリンゴ2品種におけるエチレン抑制処理(1-MCP処理)の2実験を実施し、香り成分の網羅的解析とRNAseqを実施し、香り成分と遺伝子発現が大きく異なるデータセットを取得し、共発現解析を実施した。果実の香り成分について、このような詳細な解析事例は貴重である。エチルエステルの生成には嫌気条件またはエチレンが必須であり、酢酸エステルにはエチレンの関与は小さいこと、それぞれに関連する遺伝子が推定されたことは、風味の良い果物の育成に関して重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Esters are abundant in Japanese apple varieties. Aroma components of particular importance include acetate esters, which have a fruity aroma, and ethyl esters, which have a sweet aroma. Therefore, we conducted co-expression analysis of apple aroma and RNAseq for the purpose of identifying key genes and metabolic pathways of major ester synthesis.

In consequence, ethyl esters were strongly associated with glycolysis genes and ethanol fermentation related genes, while acetate esters were associated generation of acetyl-CoA such as lipid oxidation.

研究分野：園芸科学 メタボロミクス

キーワード：apple aroma ethyl esters acetyl esters cultivars gene expression

1. 研究開始当初の背景

1) リンゴのみつとエチルエステルの生成

ふじにおいて、みつの有無、酸素濃度分布、遺伝子発現と香り成分プロファイルを解析し、みつ入り部位のみが低酸素状態であり、みつ部位においては低酸素条件下で進行するエタノール発酵によってエチルエステル類の生成が進行するものと推定していた。

2) リンゴ香り成分の品種特性

多様な品種のりんごについて、収穫期と貯蔵後の香り成分プロファイルを解析している中で、エチルエステル類の濃度は収穫期にみつを生じない王林においても収穫の約 2 週間後には高まること、早生ふじ群は長期貯蔵後に初めて高まることを観察し、低酸素はエチルエステル生成の必須条件ではないことを確認した。また、シナノゴールドをはじめとするジョナゴールドの後代の中には、収穫直後から長期間にわたり酢酸エステルを多量に生成する品種が多いことを見出していた。

3) みつ入りリンゴの水分生理と香り成分

「ふじ」のようにリンゴの果肉の中心寄りにみつがたまるためには、外周よりも心側での水ポテンシャルが低くなっている必要がある。ところが、これまで果肉内でこのような水ポテンシャルの差は観察されておらず、果実内での水の動きと水分生理の観点からのみつ入りの解明が求められていた。

2. 研究の目的

品質に優れた国産リンゴの周年供給を目指し、リンゴの主要かつ官能特性や嗜好性に寄与の大きい香り成分であるエチルエステル類と酢酸エステル類について、その生成に関わる遺伝・環境要因について総合的に解明することを目的とする。また、未だ解明されていないリンゴのみつ入り現象について、生理学的観点から考察する

3. 研究の方法

(1) リンゴ品種による香り成分特性と各種生理特性の解析

1-1 リンゴのみつ入りと香り特性の果実内部位別の経時的解析

a. 品種間差異。みつ入り特性と香り成分特性の異なるリンゴ 4 品種について、サンプリング時期、果実内部の位置(果肉外側と内側)ごとに香り成分と遺伝子発現を比較した。試料:「ふじ」、「はるか」、「シナノゴールド」(以上盛岡市生産者)、「国光」(りんご研)。収穫適期とその 4 週前に採取し、収穫 2 日後、および適期収穫・貯蔵(4) 2 週間後に試料調製を実施した。4 果で 1 サンプル、3 反復とした。試料は果肉の外側(O)と芯寄り(I)から直径 7mm のコルクボーラーを用いてディスクを採取し、その一部を香り成分用として重量の 20%の NaCl を添加し搾汁、1.3ml ずつ分注し分析まで冷凍保存した。香り成分分析: 香り捕集剤 MonoTrap1 個をリンゴ果汁に浸漬し、30 分振とう、その後水洗し、水分をふき取り後加熱脱着(TD)-GC-MS で分析した。

b. 「ふじ」におけるみつ入りの有無の比較。リンゴの品種間のみつが入りやすい品種「ふじ」において、果実のみつ入りの有無と果実内部位すなわち果肉の外側(O)と芯寄り(I)による成分組成の相違と、水分ポテンシャルの計測からみつ入り果に特徴的な代謝過程を考察した。成分分析にはピコリットル・プレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析法(picoPPESI-MS)を用いた。浸透圧の計測は蒸気圧測定法と凝固点降下法の 2 種を実施し、計測定の比較を行った。

1-2 エチレン生成がリンゴの香り成分特性に及ぼす影響

香り成分の生成にはエチレンが関与することが知られているが、香り成分生成のエチレンに対する応答は一樣ではない。そこで、エチレン生成量の異なるリンゴ品種を供試し、1-MCP 処理による香りプロファイルの応答の差異から、エチレンによる香り生成の制御メカニズムについて解析した。同一個体について香り成分プロファイリングと RNA-seq を実施した。品種: 王林(エチレン発存量: 多, エチルエステル生成: 多), シナノゴールド(エチレン生成量: 少, 酢酸エステル生成量: 多)。処理: 1-MCP 処理の有無。各品種 × 1-MCP 処理の有無の試料について収穫後から 15 週間にかけて分析を行った

(2) 香り成分と遺伝子発現の共発現解析

1-1a, 1-2 の 2 つのデータセットについて香り成分と遺伝子の共発現解析を実施し、エステル類の生成に寄与する遺伝子を探索した。試料は、香り成分用試料採取時に一部を RNA 抽出用として分取し、液体窒素で凍結した後、用時まで -80 で保存した。RNAseq はジーンウィズ社に依頼し、共発現解析は香り成分と遺伝子発現データについて、WGCNA および独自に開発した解析ツールを用いて実施した。

4. 研究成果

(1) リンゴ品種による香り成分特性と各種生理特性の解析

1-1 リンゴのみつ入りと香り・遺伝子発現特性の果実内部位別の経時的解析

a 品種間差異

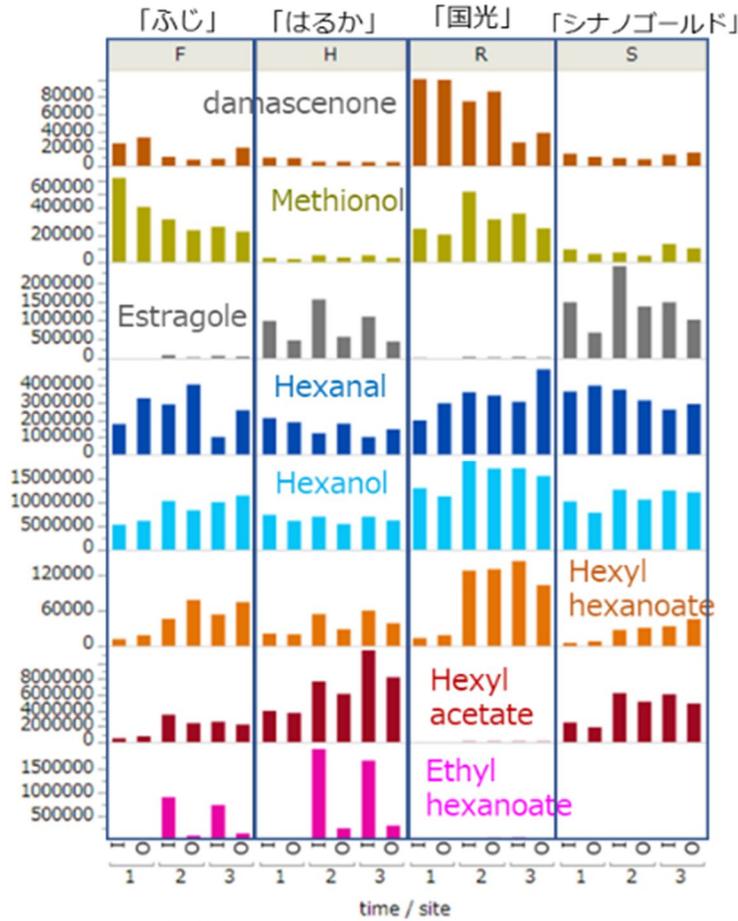


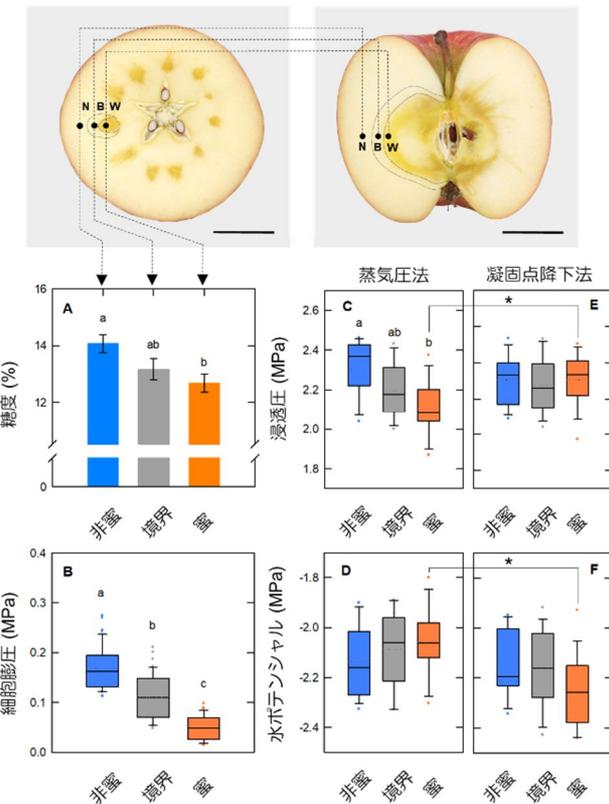
図1 品種に特徴的な香り成分

部位：I;内側（みつ部位）、O;外側（非みつ部位、） サンプルング時期：1. 未熟、2. 適熟、3. 追熟

リンゴ果実の香り成分は品種のみつり特性、収穫時期・貯蔵期間、果肉内の位置によりプロファイルが異なった。「ふじ」、「はるか」、「シナノゴールド」では適期前収穫から貯蔵後にかけてエステル類の増加が認められた。「国光」では対象期間を通じてエステル類の生成が極めて少なく、アルコールとアルデヒドが主要な成分であった。収穫、追熟期間による変動は見られたが、他の品種よりも影響は小さかった(図略)。

特徴的な挙動を示す香り成分成分を抽出して図1に示した。「ふじ」と「はるか」は適期収穫の全個体にみつが認められ、両品種ともみつ部位(I)にエチルエステルが集積し、外側とは組成が大きく異なることが確認された。一方、みつを生じない「国光」と「シナノゴールド」では果肉の外側と芯寄りの香りプロファイルに顕著な差は認められなかった。また、「シナノゴールド」は酢酸エステルが主要なエステルであり、「はるか」はエチルエステルと酢酸エステルの両方の含有量が高かった。

b. 「ふじ」におけるみつ入りの有無が物質代謝、水分ポテンシャルに及ぼす影響の比較



リンゴ「ふじ」のみつ入り果とみつ無し果について、果肉の外周部位と内側を比較すると、みつ入り果のみで内側（みつ部位）の揮発性成分が多いことが確認された(図表略)。浸透圧の計測を蒸気圧法と凝固点降下法の2種類で実施したところ、蒸気圧法ではみつ入り部位が非みつ部位より低かったが、凝固点降下法では有意差は認められなかった。これは、蒸気圧法では揮発性成分を検出できないため、みつ入り部位に多い揮発性成分の浸透圧を検出できなかったものと考えられ、凝固点降下法がより正確な浸透圧を計測していると言える。凝固点降下法による水分ポテンシャルは、みつ入り果の果実内で浸透圧の勾配が生じており、みつに向かって流れる水分を実測できた。この水分ポテンシャル勾配は非みつ果では検出されなかった(図2)。

図2 みつ入りリンゴの部位ごとの細胞水分状態
部位：I;内側（みつ部位）、O;外側（非みつ部位）
サンプルング時期：1. 未熟、2. 適熟、3. 追熟

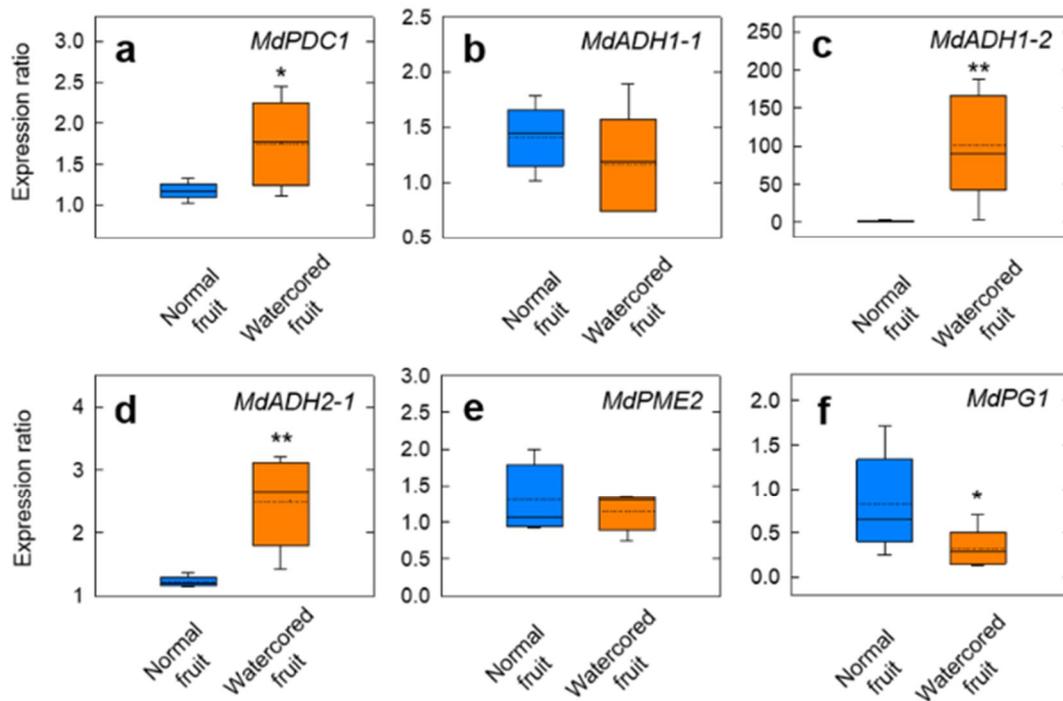


図3 「ふじ」のみつ入りの有無と着目遺伝子の発現

みつ部位に集積する揮発性成分の多くは嫌気条件で生成したエタノールとエチルエステル類と推定されるが、picoPPESI-MSではエタノールが測定対象外のため、遺伝子発現からエタノール発酵の比較を試みた。

図2とは別途用意したふじ試料を用いてエタノール発酵に関連する遺伝子のqPCRを行った(図3)。その結果 *MdPDC1*, *MdADH1-2*, *MdADH2-1* がみつ入り果において顕著に発現が強かったことから、みつ入り果でエタノールの生成が高かったと推定される。

1-2 エチレン生成がリンゴの香気成分特性に及ぼす影響

1-MCP処理によりエチレンの生成は減少した。香気成分も生成量、種類ともに減少したが、特に‘王林’での減少が顕著であり、その典型的な成分はエチルエステル類であった。一方、酢酸エステルへの影響は両品種ともに小さかった。エチレンの抑制は、エチルエステル類の生成を強く抑制することから、エチレンがエチルエステルの生成に必須である一方、酢酸エステルの生成に対する寄与は小さいと推定された。

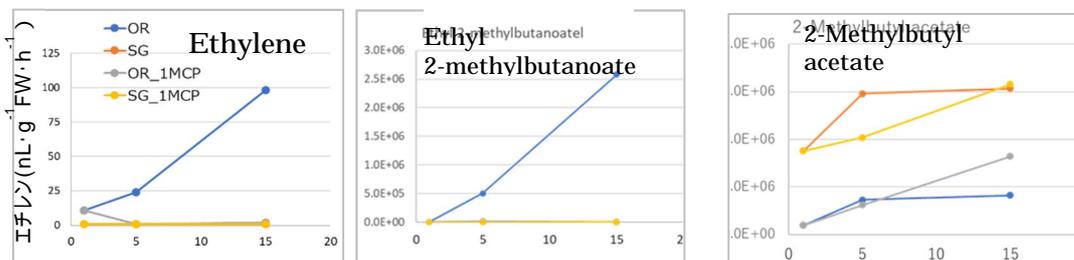
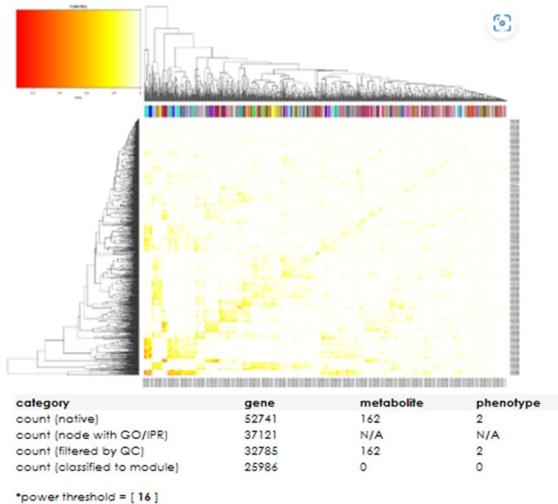


図4 1-MCP処理の有無とエチレン、エチルエステル、酢酸エステルの収穫後の経時変化
X軸は収穫後週数、Y軸は成分強度

(2) 香気成分と遺伝子発現の共発現解析

Heatmap (random sampling from the entire dataset)



Sample and CG-module clustering

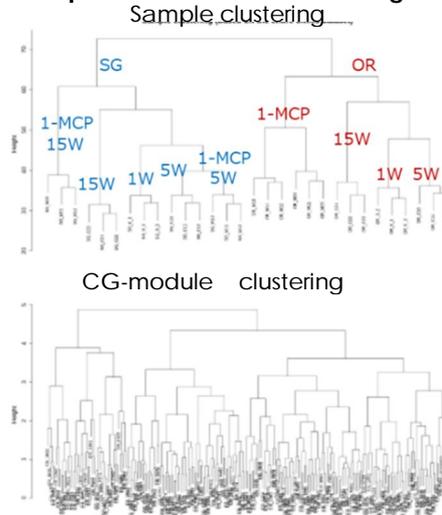


図5 遺伝子と香気成分の共発現解析 概要 (1-MCP 処理に対するリンゴ品種の応答の差異)

SG:シナノゴールド、OR:王林

1-2 エチレン生成がリンゴの香気成分特性に及ぼす影響のデータセットでは、香気成分と遺伝子発現の共発現解析の結果、まず品種で大きく分類され、品種内では王林(OR)では1-MCP 処理の有無によって分類され、シナノゴールド(SG)では経時変化の影響が大きかった(図5)。これは、エチレン生成量が大きい王林ではエチレンが抑制されることによる代謝の相違が遺伝子発現の相違や香気成分を大きく変動させた一方、エチレン生成量の少ないシナノゴールドでは影響が小さかったことによるものと推定される。

エチルエステルはエタノール生成との関連が深いと考えられることから、解糖系からエタノール生成に関連する遺伝子とその生成に寄与していると考えられる。また、エチレン生成関連遺伝子(ACS, ACO)、エステル生成に関与すると考えられているアルコールアシルトランスフェラーゼ(AAT)、脂肪酸酸化酵素(LOX)について、エチルエステル生成との関連を解析した。その結果、エチルエステルはそれぞれ ACO1, ACS1, PFK,PK,PDC の主要遺伝子と高い相関を示した。一方、ADH とは負の相関を示した。これは、1-1-a(データ略)や 1-1-b の qPCR において、みつ入り部位でエチルエステル濃度の高いサンプルで PDC,ADH が高まったことは異なる結果となった。また、1-1-a でエチルエステルとリンクして発現が強化された ADH 遺伝子は王林の老化においては応答しなかったことから、エチルエステルの生成において、要因がみつ入り(嫌気状態)と老化・ストレス(エチレンの増加)では、異なる遺伝子制御が働いていることを示すものと推定した。

酢酸エステルの生成においては、解糖系に関与する遺伝子や LOX1 遺伝子の一部と正の相関が認められた。また、酢酸エステルとエチルエステルに相関のある AAT 遺伝子が存在したが、いずれも顕著なものではなかった。以上から、エステル生成にはエステル縮合反応よりも、前駆体の生成が重要であり、酢酸エステルの生成にはアセチル CoA の生成に関わる代謝過程の関連が深いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada Hiroshi, Nakata Keisuke, Nonami Hiroshi, Erra-Balsells Rosa, Tatsuki Miho, Hatakeyama Yuto, Tanaka Fukuyo	4. 巻 8
2. 論文標題 Direct evidence for dynamics of cell heterogeneity in watercored apples: turgor-associated metabolic modifications and within-fruit water potential gradient unveiled by single-cell analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41438-021-00603-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 田中福代、和田博史	4. 巻 77
2. 論文標題 みつ入りリンゴの不思議 - 果実内を流れる水の動き	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 果実日本	6. 最初と最後の頁 62-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中福代、矢野亮一、増田甚八、葛西 智、岡崎圭毅、立木美保
2. 発表標題 1-MCP処理がリンゴの香気プロファイルに及ぼす効果と品種間差異
3. 学会等名 園芸学会 令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中福代
2. 発表標題 農産物の品種・栽培・貯蔵と香気プロファイル
3. 学会等名 農業施設学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中福代、岡崎圭毅、矢野亮一、葛西 智、和田博史、立木美保
2. 発表標題 リンゴ品種のみつ入り特性と香気プロファイルおよび遺伝子発現の比較解析 1.香気プロファイル
3. 学会等名 園芸学会 令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中福代、立木美保、岡崎圭毅、矢野亮一
2. 発表標題 Varietal characteristics of ester synthesis in apple
3. 学会等名 IV Asian Horticultural Congress - AHC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中福代、立木美保
2. 発表標題 バラ科果実の香気成分プロファイリング：風味の良い果実を求めて
3. 学会等名 2023質量分析総合討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 福崎 英一郎、田中 福代、有田 正規、新聞 秀一、櫻井 望、及川 彰、馬場 健史、早川 文代、岡崎 圭毅、馬淵 良太、谷口 百優、関山 恭代、根本 直、菊池 淳、 他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 326
3. 書名 食品分野におけるメタボリックプロファイリング	

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.ehime-u.ac.jp/data_relese/data_relese-169084/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	矢野 亮一 (Yano Ryoichi) (00443044)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・上級研究員 (82111)	
研究分担者	立木 美保 (Tatsuki Miho) (10355381)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・上級研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
アルゼンチン	University of Buenos Aires		