

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658022

研究課題名(和文) 果実における新規機能性成分グルコース誘導体の解析

研究課題名(英文) Analysis of glucose-related metabolites as a novel functional component in fruit

研究代表者

金山 喜則 (Kanayama, Yoshinori)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10233868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：近年、果実の品質として、甘さや大きさに加えて機能性の重要性が高まっている。本研究で取り上げる物質は、従来のビタミンやポリフェノール類などのカテゴリーに入らない機能性成分であると考えられる。そこで主にシーベリーにおいてグルコース関連物質についての解析を進めたところ、グルコース誘導体は他の炭水化物の一次代謝に関わる糖類にくらべると、比較的、不活性なプールとして存在していることが明らかとなった。また成分の変動に関わると考えられる、成熟過程について調べたところ、クリマクテリック型であり、他の成分と同様に成熟時に合成や蓄積が低下することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recently, functional components become important in fruit in addition to size and sweetness. Glucose-related metabolites that were studied in this project are different from popular functional components such as vitamins and polyphenols. There could be a novel component that is not of antioxidants such as vitamins and polyphenols. In the results obtained in tracer experiments using sea buckthorn, the metabolite was metabolically inactive compared to other sugars. Ripening and environmental stress were investigated because those may affect synthesis and accumulation of the metabolites. The results suggested that the plant was a climacteric type and the accumulation decreased during ripening.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：果樹

1. 研究開始当初の背景

従来、果実は、大きさや形、さらには甘さや糖酸比を基本としたおいしさを重要な指標として評価されてきた。この指標は現在でも重要であり、見た目とおいしさの評価が高い果実が求められている。

一方、メタボリックシンドローム対策が強く求められている現在においては、果実などの青果物が果たす役割は大きい。すなわち、見た目やおいしさに加えて、国民の健全な生活を増進する機能性成分の重要性が増している。実際、果実などの青果物の市場においては、消費者の多様なニーズや輸出促進に対応した高付加価値化の必要性が求められており、甘さや大きさに加えて機能性は新たな品質形成要因となっている。

2. 研究の目的

これまで主に研究されてきた機能性成分は、ビタミンやポリフェノール類などである。特にビタミンCやポリフェノール類は、抗酸化作用を有する成分として果実をはじめとする青果物における知見も多い。本研究では、これらビタミンやポリフェノール類のカテゴリーに入らない機能性成分として、グルコース関連物質等に注目し、解析することを目的とした。

3. 研究の方法

生合成メカニズムの検討を行うためトレーサー実験を行った。すなわち、シーベリーの転流糖はスクロースであることが明らかにされているため、¹⁴Cラベルされたスクロースをシーベリー果実に加え、ラジオクロマトグラフィーによってグルコース関連物質への¹⁴Cの取り込みを調べた。また、各種成分の変動に関わると考えられる成熟ホルモンであるエチレンや環境ストレスの影響については、これまで調べられてこなかった。そこで、成熟ホルモンであるエチレンをガスクロマトグラフィーによって測定した。さらには成熟時の各種成分を高速液体クロマトグラフィーによって測定するとともに、成分含量とも関連する環境ストレス耐性についても検討した。

4. 研究成果

収穫期およびその1ヶ月前の果実に¹⁴C-スクロースを果柄から吸収させて24時間後に¹⁴C糖を分析した。その結果、いずれの時期においてももっとも¹⁴Cの分配率が高かったのはフルクトースで、次いでグルコースであった。いずれもおおむね30%から50%の間であり、スクロースへの分配は10%程度であった。一方、グルコース誘導体への分配はおおむね5%程度であった。したがって、転流してきたスクロースは主にヘキソースに分解されて利用され、あるいは蓄積すること、およびグルコース誘導体は転流してきたスクロースから合成されるものの、比較的不活性

なプールとして存在していることが明らかとなった。

シーベリー果実において主要なビタミンEである α -トコフェロール含量について、6月上旬から9月下旬までの期間における季節変動を図1に示した。果実の収穫適期と考えられる8月下旬から9月上旬にかけて、両品種とも約10 μ g/gFWと高い値を示した。五訂増補日本食品標準成分表によるとウンシュウミカンやリンゴ、モモにおける可食部1gあたりの α -トコフェロール含量はそれぞれ4, 2, 7 μ gであることから、これまでも報告されているように、シーベリーにおける α -トコフェロール含量は一般的な青果類に比べて高い値となった。しかし、成熟果実における既報の α -トコフェロール含量を新鮮重当りに換算して比較すると、本研究で得られた α -トコフェロール含量は1/2~1/4程度であった(Zadernowski, 2003; Andersson, 2008; Kallio, 2002)。既報の研究で供試された果実はいずれも北欧やロシアで生産されたものであることから、寒冷な気候といった環境要因や供試した品種の違いなどの要因によって、本研究で得られた α -トコフェロール含量が少なくなったと考えられる。

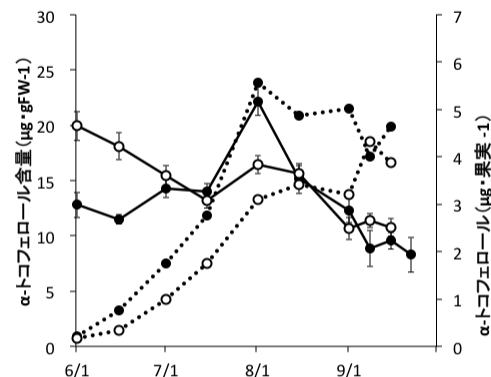


図1 *H. rhamnoides* 果実の α -トコフェロール含量の季節変動

実線は新鮮重 (FW) 当たりの α -トコフェロール含量 (μ g \cdot gFW⁻¹) を、点線は一果実当たりの α -トコフェロール含量 (μ g \cdot 果実⁻¹) を示す。黒い丸 (●) は 'Hergo' を、白い丸 (○) は 'Vitamin Jumbo' を示す。値は平均値±標準誤差 (n=3)

果実の成長・成熟に伴う α -トコフェロール含量の季節変動についてみると、新鮮重当たりの α -トコフェロール量は成熟に伴って減少していることが明らかとなった。すなわち、果実の色が緑色から黄色へと変化する7月下旬に新鮮重あたりの α -トコフェロール含量の一時的な上昇がみられ、その後の8月上旬から下旬にかけて減少がみられた。両品種とも果実の成熟過程でも果実肥大が観察されたので、新鮮重当たりの α -トコフェロール含量が低下したと考えられる。実際に、

一果実あたりの γ -トコフェロール含量は成熟期間(8月から9月)を通して、新鮮重当たりのような変化は示さなかった。また、新鮮重当たりの γ -トコフェロール含量が7月下旬に一時的に上昇したことについて、実際にこの時期と、果実の横径の伸長速度が緩まった時期とが一致していることから、成長速度の低下が γ -トコフェロール濃度の一時的な上昇の原因の一つであると考えられた。また、6月には新鮮重あたりの γ -トコフェロール含量に品種間差がみられ、'Hergo' より 'Vitamin Jumbo' のほうが高い値となった(約1.5倍)。これについても、6月における果実の縦径が 'Vitamin Jumbo' より 'Hergo' のほうが約1.5倍程度大きかったことが、品種間差が生じた原因の一つと考えられた。

果実の発育期間を通した γ -トコフェロール含量についての報告はないが、成熟期の変動についての報告はみられる。Anderssonら(2008)によれば、成熟に伴い乾物重当たりの γ -トコフェロール含量は減少することが報告されており、本研究の結果と同様の傾向がみられたと考えられる。

果実の成熟に伴うエチレン生成量の変動を図2に示した。各成熟ステージで収穫した果実が放出したエチレンの量をガスクロマトグラフィーで測定した結果である。8月中旬はエチレン生成がほとんどみられなかったが、8月下旬から増加し始め、9月20日にピークを示した。両品種とも同様な変動を示したことから、シーベリー果実は成熟に伴いエチレン生成量を増加させるクライマクテリック型果実であることが示唆された。

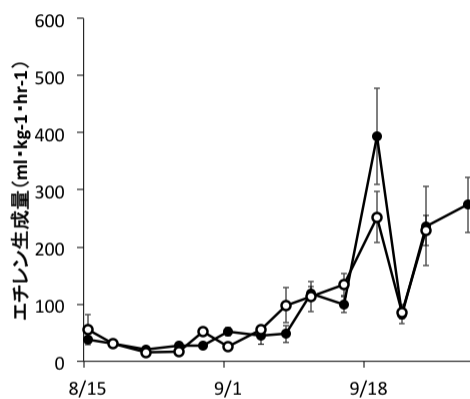


図2 *H. rhamnoides* 果実のエチレン生成量の変動

黒い丸(●)は'Hergo'を、白い丸(○)は'Vitamin Jumbo'を示す。
値は平均値±標準誤差 (n=3)

クロロフィル含量は減少傾向を示した。特に、エチレンの生成量が明らかに増加した9月上旬にクロロフィル含量も顕著な減少がみられたことから、エチレン生成の増大によってクロロフィルの分解が進み、果実の成熟が進行したと考えられる。

もう1つの成熟の指標として、成熟に伴う水溶性ペクチン量の変動を調べた。ペクチンは植物の細胞壁構成成分の一つであり、ポリガラクトuron酸を主成分とする多糖類である。ペクチンは一般的に、セルロースやヘミセルロース、リグニン、カルシウムなどと結合することで細胞同士をつなぎ合わせる「接着剤」のような働きをするとされている。果実細胞壁ではペクチンの割合が最も高く、未熟な果実ではポリガラクトuron酸の多くがメチルエステル化されており、水に不溶である。果実の成熟・軟化が進行すると、ペクチンメチルエステラーゼによって脱メチルエステル化が起こり、ポリガラクトuron酸によるポリガラクトuron酸の加水分解が可能となり、ペクチンの低分子化・可溶化が進むことが知られている(金子,1996;立石,2007)。本研究では、ペクチンやセルロース、ヘミセルロースなどの細胞壁成分の総量を、アルコール不溶性固形物(alcohol insoluble solid, AIS)として定量した。その結果、果実の成熟に伴い細胞壁成分は減少傾向を示し、逆に、AISに占める水溶性ペクチンの割合は増加傾向を示した。したがって、エチレン生成の増大によってペクチンの分解による軟化が進行し、果実の成熟が促進されたと考えられる。

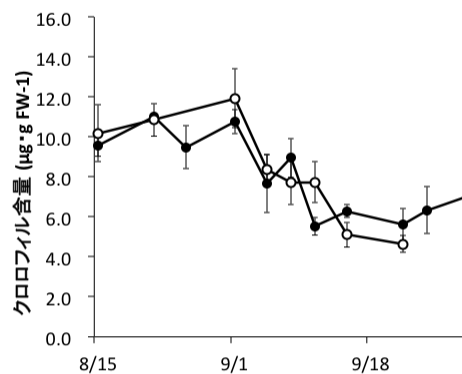


図3 *H. rhamnoides* 果実のクロロフィル含量の変動

黒い丸(●)は'Hergo'を、白い丸(○)は'Vitamin Jumbo'を示す。
値は平均値±標準誤差 (n=3)

次に、成熟の指標となる成分として、果実の成熟に伴うクロロフィル含量の変動を調べた(図3)。両品種とも果実の成熟に伴いク

以上のように、エチレン生成量の増大がみられた時期に果実の成熟が促進されたことから、シーベリーはクライマクテリック型の果実であることが考えられた。ただし、セイ

ヨウナシヤグーズベリーなどでは成熟に伴いペクチンが数倍程度に増加することが報告されているが(Hisawaら, 2004; Majumderら, 2002)、本研究における増加はそれほど顕著ではなかった。また、ペクチンの増加はエチレン生成量が増加する前の8月中旬からみられた。モモの軟化はエチレン生成量が増加する前から始まっており、この軟化の初期に発現する細胞壁分解・修飾酵素遺伝子の多くの転写が、エチレンによってむしろ抑制されるという報告がある(Trainottiら, 2003)。このように、エチレンと軟化やペクチンの可溶化の関係は複雑であり、シーベリー果実においてもエチレンの増加より前に軟化が始まっている可能性が考えられた。今後は代表的な細胞壁分解酵素の一つであるポリガラクトナーゼの酵素活性・遺伝子発現とエチレン生成との関係性を評価するなど、果実の軟化に関してはさらなる研究が必要である。成熟期とその1ヶ月前を比較すると、成熟前のスクロースからの¹⁴Cの取り込みが大きかったため、エチレンを伴う成熟期にビタミンEなど各種成分の増加が停止することに伴って、グルコース関連物質も合成や蓄積が低下することが考えられた。その他、関連成分の蓄積に関わるストレス耐性やプロトンポンプ、および糖尿病モデル動物を用いた評価系の研究等も行った。

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8件)

Yoshinori Kanayama, Kazuyoshi Sato, Hiroki Ikeda, Tomoko Tamura, Manabu Nishiyama, Koki Kanahama, Seasonal changes in abiotic stress tolerance and concentrations of tocopherol, sugar, and ascorbic acid in sea buckthorn leaves and stems, *Scientia Horticulturae*, 査読有, 164 巻, 2013 年, 232-237, DOI: 10.1016/j.scienta.2013.09.039

Yoshinori Kanayama, Kazuhisa Kato, T. Stobdan, G.G. Galitsyn, A.V. Kochetov, Koki Kanahama, Research progress on the medicinal and nutritional properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*), *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 査読有, 87 巻, 2012 年, 203-210, http://www.jhortscib.org/Vol87/87_3/2.htm

Sasaki Y, Sone H, Kamiyama S, Shimizu M, Shirakawa H, Kagawa Y, Komai M, Furukawa Y., Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Food Func.*, 査読有, 3 巻, 2012 年, 414-419, DOI:

10.1039/C2F010175K

Ardiansyah, Yamaguchi E, Shirakawa H, Hata K, Hiwatashi K, Ohinata K, Goto T, Komai M., Lupeol supplementation improves blood pressure and lipid metabolism parameters in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 76 巻, 2012 年, 183-185, DOI: 10.1271/bbb.110559

[学会発表](計2件)

Yoshinori Kanayama, Stress tolerance and fruit composition in indigenous plants, TU-SBRAS-FEBRAS-ISTS-Seminar, 2013 年 11 月 7 日、東北大学

金山喜則・Mohammed, S. A.・西尾聡悟・白武勝裕・池田裕樹・金浜耕基、トマト果実の発育における V-PPase の役割、園芸学会秋季大会、2012 年 09 月 22 日~2012 年 09 月 24 日、福井県立大

6. 研究組織

(1)研究代表者

金山 喜則 (KANAYAMA, YOSHINORI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 1023386

(2)研究分担者

白川 仁 (SHIRAKAWA, HITOSHI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 40206280

(3)海外共同研究者

Aleksey V. Kochetov
ロシア科学アカデミー・シベリア支部・
植物遺伝子工学研究室長