日本食品保蔵科学会誌

VOL. 42　NO. 3

会　　長　高井　陸雄　　副　会　長　太田　英明　　小宮山美弘　　早坂　　薫
編集委員長　太田　英明
編 集 委 員　稲熊　隆博　　井上　茂孝　　今堀　義洋　　恩田　　匠　　竹永　章生
古庄　　律　　松田　茂樹　　宮本　敬久

＜報　　文＞
プルーン果実の成熟に伴う呼吸量およびエチレン生成量の変化……（99）
／大畑和也・都間三鶴・内田吉紀・板村裕之

＜技術報告＞
山梨県産ザクロ果実の理化学的特性 ……（111）
／小宮山美弘・尾形（斎藤）美貴・木村英生
西田典永・長友暁史・須山　建
吉野智恵・辻　政雄・村松　昇

イトヨリダイ冷凍すり身のゲル形成能低下の要因と
　プロテアーゼ阻害剤および大豆ホエーの効果について ……（119）
／野口治子・岡崎敏樹・簑島良一
若宮英倫子・辻井良政・髙野克己

＜総　　説＞
トマトおよびカキ果実の成熟と軟化に関する分子生物学的研究 ……（125）
／中務　明

＜講　　座＞
HACCP教育講座（13）　新たな食品表示法と食品表示基準 ……（131）
／池戸重信

＜文献抄録＞ ……（137）

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 42 NO. 3 (2016)

<Article> (Japanese)

Characteristics of Respiration and Ethylene Production of Prune Fruit at Different Maturity Stages
OHATA Kazuya, TSUMA Mitsuru, UCHIDA Yoshinori and ITAMURA Hiroyuki …… (99)

<Technical Report> (Japanese)

Physico-Chemical Characteristics of Pomegranate Harvested in Yamanashi Prefecture in Japan
KOMIYAMA Yoshihiro, OGATA (SAITOU) Miki, KIMURA Hideo,
NISHIDA Norihisa, NAGATOMI Akifumi, SUYAMA Takeru,
YOSHINO Chie, TSUJI Masao and MURAMATSU Noboru …… (111)

Factors Decreasing the Gel-forming Ability of Threadfin Bream Surimi
and Effect of Soybean Whey Addition
NOGUCHI Haruko, OKAZAKI Toshiki, MINOSHIMA Ryouichi,
WAKAMIYA Eriko, TSUJII Yoshimasa and TAKANO Katsumi …… (119)

<Review> (Japanese)

Studies on Fruit Ripening and Softening in Tomato
and Persimmon Based on Molecular Approach
NAKATSUKA Akira …… (125)

<Serialization Lecture> (Japanese)

New Food Labeling Law and Standard in Japan
IKEDO Shigenobu…… (131)

プルーン果実の成熟に伴う呼吸量およびエチレン生成量の変化

大畑和也[*1,*2]・都間三鶴[*1]・内田吉紀[*1]・板村裕之[*3§]

＊１　島根県農業技術センター栽培研究部
＊２　鳥取大学連合大学院農学研究科
＊３　島根大学生物資源科学部

Characteristics of Respiration and Ethylene Production of Prune Fruit at Different Maturity Stages

OHATA Kazuya[*1,*2], TSUMA Mitsuru[*1], UCHIDA Yoshinori[*1] and ITAMURA Hiroyuki[*3§]

＊１　*Agricultural Technology Center, Shimane Prefecture, 2440　Ashiwata-cho, Izumo, Shimane　693−0035*
＊２　*The United Graduate School of Agricultural Science, Tottori University, 4−101 Koyama-Minami, Tottori　680−8553*
＊３　*Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane　690−8504*

To determine the ripening characteristics of prune (*Prunus domestica* L.) fruits, we investigated, using eight different prune cultivars, whether there was (I) an increase of respiration and ethylene production on trees at the mature stage (except in 'Puchull'), (II) an increase after picking from trees at the mature stage, and (III) autocatalytic ethylene production or a respiration increase in mature fruit after exogenous ethylene treatment. The respiration and ethylene production of fruit on trees were estimated from the respiration and ethylene production values determined for picked harvested fruits, which were kept at 20℃ for 24 hours before measurement. All cultivars showed a gradual decrease of estimated respiration on trees from the early immature to late immature stages, reaching their lowest respiration levels. Then, six cultivars (excepting 'Edwards'), exhibited a climacteric rise at the mature stage. Seasonal changes in internal ethylene concentration and estimated ethylene production on trees showed almost the same tendency　tendency. Ethylene production on trees was low at the immature stage in all cultivars, and exhibited a climacteric rise at the mature stage in six cultivars (not includingexcept 'Edwards'). 'Stanley' and 'Valor' showed increases of both respiration and ethylene production after exposure to 500 ppm exogenous ethylene for 48 hours. From these results, 'Puchull' and 'Edwards' were categorized as suppressed-climacteric types, while the other six cultivars, 'Purple Ais', 'Blue Tan', 'Stanley', 'Valor', 'President' and 'Marjorie's Seedling', were categorized as climacteric types.

(Received Oct. 9, 2015；Accepted Mar. 31, 2016)

Key words：*Prunus domestica L., climacteric, suppressed-climacteric, ethylene, respiration*
プルーン，クライマクテリック型，抑制型クライマクテリック型，エチレン，呼吸量

Biale (1960)[1]は，果実を成熟に伴う呼吸量の変化に基づいてクライマクテリック型果実とノンクライマクテリック型果実に大別した。前者は成熟期になると採取後の呼吸活性が一時的に増加するタイプ，後者は採取後の呼吸活性が漸減するタイプである。この呼吸活性の急増によって生成するエネルギーは，軟化，着色，芳香成分の生成，デンプンの糖への分解，有機酸の減少など成熟現象に利用される[2]。

また，クライマクテリック型果実の多くは呼吸量の増加に伴ってエチレン生成量も増大し，このエチレンによ

＊１　〒693−0035　島根県出雲市芦渡町2440
＊２　〒680−8553　鳥取市湖山町南４丁目101
＊３　〒690−8504　島根県松江市西川津町1060
§　Corresponding author, E-mail : itamura@life.shimane-u.ac.jp

って成熟が促進される[3]。一方，ノンクライマクテリック型果実は成熟中にも呼吸とエチレン生成の急増を示さない。

このように，果実の成熟には呼吸とエチレン生成が深く関与している。一般にクライマクテリック型果実のエチレン生成量は，未熟な段階では微量であるが，成熟に伴い急増する[4]。そして未熟果の段階で生成されるエチレンはシステム１エチレンと呼ばれ，自己抑制的なエチレン生成を示す。これに対して，クライマクテリック型の成熟果で生成されるエチレンはシステム２エチレンと呼ばれ，自己触媒的なエチレン生成となっている[3]。

スモモ類（Plum）はバラ科サクラ属スモモ亜属に分類され，温帯地域で広く栽培されている果樹である。その中で，生食用として栽培されているのはニホンスモモ（*Prunus salicina* L.）とヨーロッパスモモ（*P.domestica* L.）である。欧米ではヨーロッパスモモの内，高糖度で乾果に適する品種群をプルーンという場合もあるが，一般にはヨーロッパスモモ全体がプルーンと呼ばれている[5]。

果実の成熟特性から，スモモ類はクライマクテリック型果実に分類されている[6]。Abdiら（1997）[7]は，ニホンスモモは成熟に伴う呼吸量とエチレン生成量の変化から２つのグループに分けられるとしている。最初のグループは呼吸量とエチレン生成量が増加する典型的なクライマクテリック型を示す。もうひとつのグループは，成熟過程の後半に呼吸量とエチレン生成量が増加するが，クライマクテリック型と比較してその量が少ないため，抑制的クライマクテリック型としている。

Biale（1960）[8]によってプルーンはクライマクテリック型かノンクライマクテリック型の分類はなされていない。Sekse（1988）[9]，Rato（2003）[10]，LippertとBlanke（2003）[11]，KožíškováとGoliáš（2013）[12]，LarsenとVangdal（2013）[13]はプルーン数品種がクライマクテリック型であると報告しているが，広く栽培されている品種の成熟型に関する報告はない。

また，一般的に果実の成熟型を分類する方法として，①樹上での成熟期における呼吸量またはエチレン生成量増加の有無[14),15)]，②成熟期に収穫した果実における採取後の呼吸量またはエチレン生成量増加の有無[1),16),17)]，③外部エチレンまたはプロピレン処理による自己触媒的なエチレン生成の有無[4),6)]，がある。

そこで，本研究ではプルーン主要品種の成熟型を明らかにするため，収穫期が８月中旬から10月下旬のプルーン８品種を用いて，上記①～③について検討した。①については，未熟期から成熟期において樹上果実で推定される呼吸量およびエチレン生成量の変化とした。②は，成熟期における採取果の貯蔵中の呼吸量およびエチレン生成量の変化，‘スタンレイ’における幼果期から過熟期における採取果の貯蔵中の呼吸量およびエチレン生成量の変化とした。③は，プルーン２品種の成熟果に対するエチレン処理後の呼吸量およびエチレン生成量の変化などとした。

実 験 方 法

１．供試品種および栽培方法

島根県農業技術センターに植栽した雨よけ平棚栽培プルーン‘プチュール’（成熟期：８月中旬，以下同様），‘パープルアイ’（８月中旬～下旬），‘ブルータン’（８月下旬），‘エドワーズ’（９月上旬～中旬），‘スタンレイ’（９月中旬～下旬），‘ベイラー’（９月下旬～10月上旬），‘プレジデント’（10月上旬～中旬）および‘マジョリース・シードリング（以下マジョリース）’（10月中旬～下旬）の８品種を各２～３樹用い，調査は2012～2014年に行った。栽培管理は，島根県におけるプルーン栽培の慣行管理[18]に従って行った。

２．果実の発育解析

果実の成長を解析するため，2012年に果実重および着色の変化を調査した。７月２日から約１週間間隔で外観が平均的な果実を各品種３～５果ずつ採取した。採取した果実は１果重および着色程度を測定し，果実肥大および発育段階を推定した。着色程度は目視による果実表面の着色割合を基に，０：０％（未着色：緑色）～10：100％（完全着色：黒紫色，紫色など各品種の固有色）の11段階で評価とした。果実肥大第Ⅰ期は幼果期，第Ⅱ期および第Ⅲ期の前半は未熟期，第Ⅲ期の後半の８割着色以降は成熟期とした。

３．樹上果における推定される呼吸量およびエチレン生成量の変化

（１）果実内部エチレン濃度の測定　樹上での果実のエチレン生成量の時期別変化を推定するため，果実内部エチレン濃度を測定した。調査は2012年に行い，‘プチュール’を除く７品種について７月６日から約１週間間隔で外観が平均的な果実を各品種３～５果ずつ採取した。内部エチレンの採取および測定はItamuraら（2000）[19]の方法に準拠して行った。すなわち，約４分の１に切った1.5ℓのペットボトルの上部分を飽和食塩水が入ったデシケーター内に入れ，そのペットボトル中に果実をひとつずつ入れて中の空気をすべて飽和食塩水に置換して口に厚さ３㎜程度のゴム栓をした。次に，デシケーター内をポンプで減圧，脱気し，ペットボトル上部に気体が十分に貯まった時点でデシケーター内を常圧に戻した。ペットボトルの口のゴム栓に注射針を差し込み，ヘッドスペースガスを１㎖採取し，活性アルミナカラムとFID検出器付きのガスクロマトグラフ（GC－18A，島津製作所）に注入することでエチレン濃度を測定した。ガスクロマトグラフのカラム温度は130℃，注入口温度は150℃，検出器温度は180℃とした。

（２）未熟期から成熟期にかけての樹上における果実の呼吸量およびエチレン生成量の推定　調査は2012年および2013年に行った。2012年は‘プチュール’を除く７

品種を用い，果実は満開後約80日の７月２日から成熟期まで約１週間隔で各品種３～５果を採取した。2013年は８品種を用いた。果実は着色期前後（‘プチュール’：７月26日，‘パープルアイ’，‘ブルータン’，‘エドワーズ’および‘スタンレイ’：７月12日，‘ベイラー’および‘プレジデント’：８月23日，‘マジョリース’：９月５日）より，採取した。

未熟期から成熟期の樹上における果実の呼吸量とエチレン生成量を推定するためにSmockとNeubert（1950）[14]の方法に準拠して，採取後24時間静置した果実の呼吸量とエチレン生成量を測定した。すなわち，採取した果実は直ちに空調管理された20℃の恒温室（4.9m×5.5m×2.5m）に運び，450mℓのポリプロピレン容器プラスチック容器内に果実を１果ずつ入れ，果実の過乾燥を防止するため容器上部を密閉しない程度に紙で軽く覆った。24時間静置後に果実重を測定し，ポリプロピレン容器を密閉した。24時間後，ヘッドスペースガスをシリンジで採取し，呼吸量とエチレン生成量を測定した。呼吸量はヘッドスペースガスを0.5mℓ採取し，並列分流カラム（ポラパックQとモレキュラーシーブ）とTCD検出器付きのガスクロマトグラフ（GC－14B，島津製作所）に注入することでCO_2濃度を測定した。カラム温度は50℃，注入口温度は80℃，検出器温度は100℃とした。また，エチレン生成量はヘッドスペースガス１mℓを採取して内部エチレンの測定と同様な方法で測定した。

４．採取後貯蔵中の呼吸量およびエチレン生成量の変化

（１）成熟期に採取した果実における貯蔵中の呼吸量およびエチレン生成量の変化　調査は2012年と2013年に行った。成熟期の異なる２～３時期に採取した果実を用いて，採取後１～７日までの呼吸量およびエチレン生成量を測定した。上記３の（２）と同様にして呼吸量およびエチレン生成量を測定したが，20℃における封入時間は２～４時間とし，ヘッドスペースガス採取後は容器の蓋を解放し，容器上部を紙で軽く覆った。各品種の果実採取日は，‘プチュール’：７月25日および８月７日，‘パープルアイ’および‘ブルータン’：８月１日および８月23日，‘エドワーズ’：８月23日および９月２日，‘スタンレイ’：９月２日，９月13日および９月27日，‘ベイラー’：９月13日および９月27日，‘プレジデント’および‘マジョリース’：９月27日および10月12日，であった。

（２）幼果期から過熟期に採取した果実における貯蔵中の呼吸量およびエチレン生成量の変化　調査は2012年と2013年に‘スタンレイ’の果実を用いて行った。2012年は未熟期の７月２日から，2013年は幼果期である満開後30日の５月15日から，約２週間間隔で果実を採取し，採取後１日～７日まで呼吸量およびエチレン生成量を測定した。測定条件などは４の（１）と同じとした。

５．成熟果に対するエチレン処理による呼吸量，エチレン生成量および軟化程度の変化

調査は2014年に行い，９月14日に採取した‘スタンレイ’および10月１日に採取した‘ベイラー’の果実を各10果用いた。採取果は直ちに20℃の恒温室に入れてしばらく静置し，450mℓのポリプロピレン容器に１果ずつ封入した。そのうち５果は500ppmのエチレンで48時間処理した。呼吸量およびエチレン生成量は処理後開封６日（採取後８日）まで，20℃における封入時間を２時間として上記３と同様に，ガスクロマトグラフで測定した。果実軟化程度は０：十分な弾力がある，１：やや軟らかいが商品性はある，２：果実全体が軟らかく，商品性はない，４：果実が変形するほど軟らかい，の４段階で評価した。

実験結果

１．果実重および着色程度の時期別変化

2012年に採取した果実の１果重および着色程度の変化をFig.1に示した。‘パープルアイ’の１果重は７月２日以降S字曲線を描きながら増加し，７月30日から８月５日にかけて最大となり，その後収穫期にやや減少した。‘マジョリース’の１果重は収穫期まで増加し続けた。他の品種における果実重の変化は‘パープルアイ’における変化と類似しており，果実重が最大となった後，変化しないか，またはやや減少した。

‘パープルアイ’，‘ブルータン’，‘エドワーズ’および‘マジョリース’では収穫期間中も着色が進んだが，他の３品種では，収穫前に着色が一定となった。

２．成熟型を分類するための呼吸量およびエチレン生成量の変化

（１）樹上における推定される呼吸量とエチレン生成量の時期別変化

１）果実内部エチレン濃度の時期別変化：2012年に調査したプルーン果実内部エチレン濃度の時期別変化をFig.2に示した。

調査した７品種の未熟期における内部エチレン濃度はほとんどの時期で0.2ppm以下だった。しかし，‘ベイラー’および‘マジョリース’では内部エチレン濃度は成熟期において0.2ppmより有意に高くなった。また，‘パープルアイ’，ブルータン’および‘プレジデント’では内部エチレン濃度が0.2ppmより高くなる果実が認められた。

２）未熟期から成熟期にかけての推定される樹上における果実の呼吸量およびエチレン生成量の変化：2012年および2013年に調査したプルーン果実の樹上において推定される呼吸量およびエチレン生成量の変化をFig.3およびFig.4に示した。

①　樹上果における推定される呼吸量の時期別変化；調査した７品種の樹上果における呼吸量は，未熟期に漸減した後，一定となった。その後，‘スタンレイ’の呼

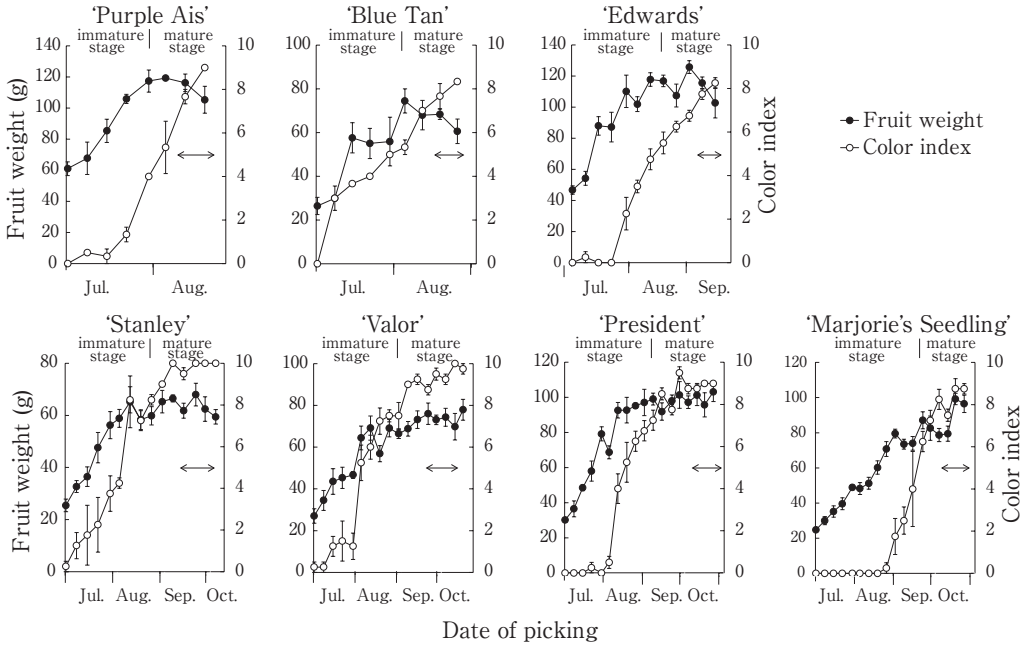

Fig. 1 Seasonal changes in weight and color index of prune fruit cultivated under a rain shelter and harvested at different stages in 2012

The color index was calculated on a scale from 0 (green) to 10 (full color). The vertical bars indicate SE (n = 3 to 4) and the horizontal arrows indicate the harvesting period.

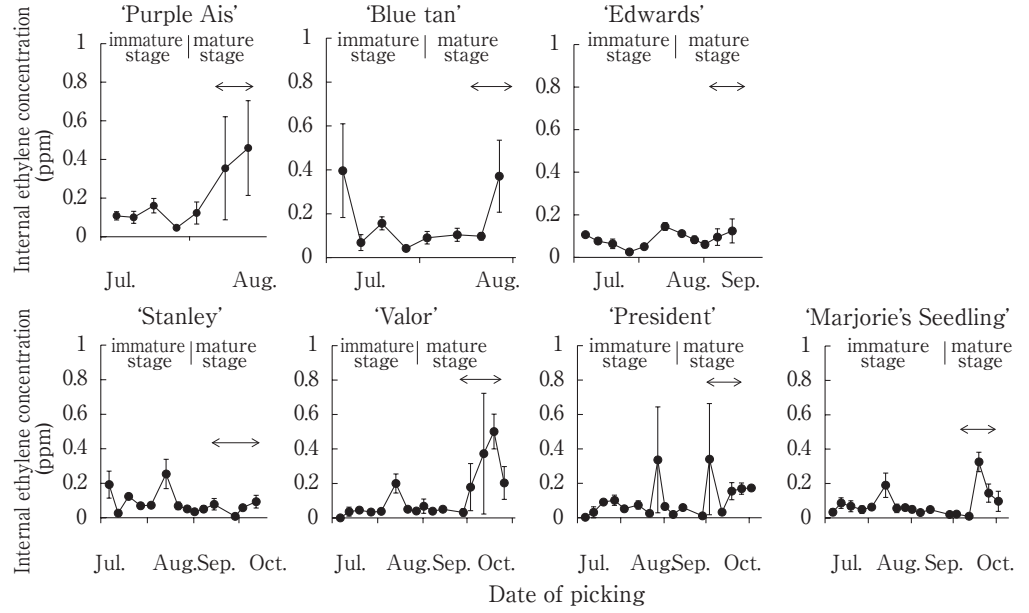

Fig. 2 Seasonal changes in the internal ethylene concentration of prune fruit on trees cultivated in rain shelter conditions and harvested at different stages in 2012

The vertical bars indicate SE (n = 3 to 5) and the horizontal arrows indicate the harvesting period.

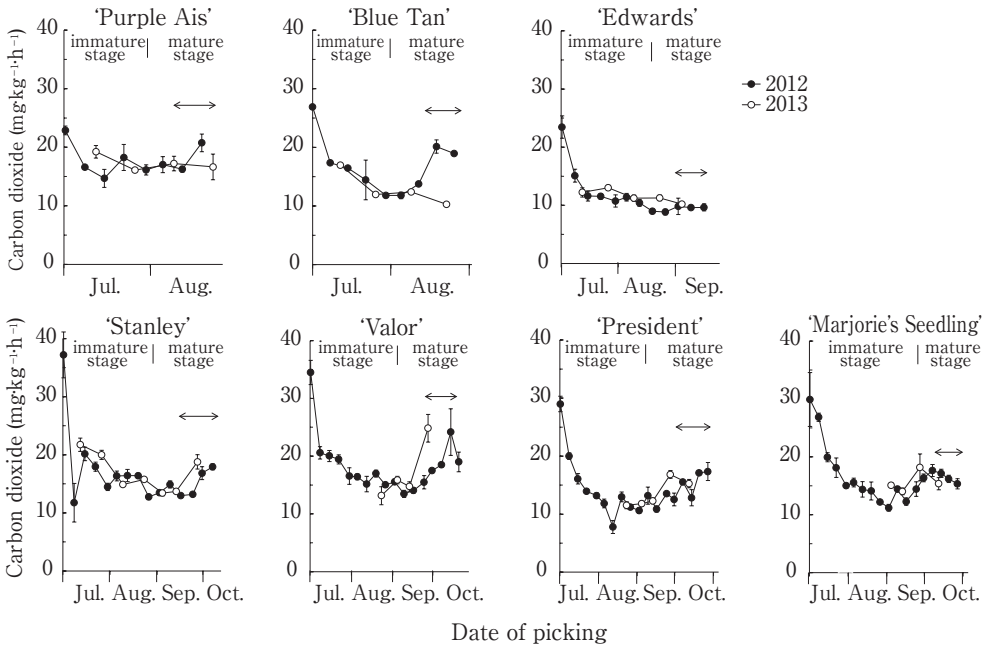

Fig. 3　Seasonal changes in the estimated respiration of prune fruit on trees cultivated under a rain shelter and harvested at different stages in 2012 and 2013

Respiration and ethylene production were measured after equilibration at 20℃ for 24 h. The vertical bars indicate SE（n = 3 to 4）and the horizontal arrows indicate the harvesting period.

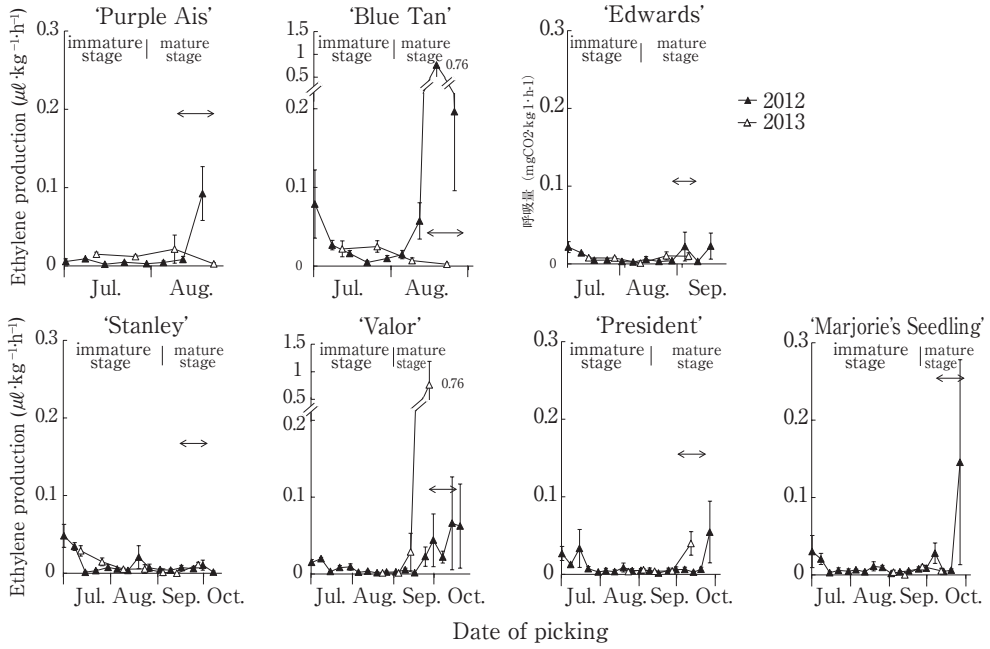

Fig. 4　Seasonal changes in the estimated ethylene production of prune fruit on trees cultivated under a rain shelter and harvested at different stages in 2012 and 2013

Respiration and ethylene production were measured after equilibration at 20℃ for 24 h. The vertical bars indicate SE（n = 3 to 4）and the horizontal arrows indicate the harvesting period.

吸量は，調査を行った2年間ともに成熟期に17mg·kg^{-1}・h^{-1}へと増加した。‘ベイラー’，‘プレジデント’および‘マジョリース’の樹上果における呼吸量も，‘スタンレイ’とは値が異なるものの同様に変化した。‘パープルアイ’および‘ブルータン’の成熟期における呼吸量は，2012年では増加したが，2013年では‘パープルアイ’では変化せず，‘ブルータン’では減少した。‘エドワーズ’の呼吸量は10mg·kg^{-1}・h^{-1}程度に漸減した後，成熟期においても変化しなかった。

②　樹上果における推定されるエチレン生成量の時期別変化；プルーン果実は樹上でいずれの時期においてもほとんどエチレンを生成しなかった。しかし，‘ブルータン’および‘ベイラー’はエチレン生成を行わない果実がある一方で，成熟期に1.8～1.9$\mu\ell$・kg^{-1}・h^{-1}程度のエチレン生成を行う果実が認められた。

（2）採取後の果実における呼吸量およびエチレン生成量の変化

1）成熟期における採取果の呼吸量およびエチレン生成量の採取後の変化：2013年に8品種を用いて成熟期間内の異なる2～3時期に採取した果実における20℃貯蔵中の呼吸量およびエチレン生成量の変化を調査し，それぞれFig. 5およびFig. 6に示した。

‘パープルアイ’および‘ブルータン’の呼吸量は増加し続け，貯蔵後6日にそれぞれ，27および30mg・kg^{-1}・h^{-1}の値となった。‘スタンレイ’，‘ベイラー’，‘プレジデント’および‘マジョリース’の呼吸量も増加したが，‘パープルアイ’および‘ブルータン’と比較すると緩やかであった。一方，‘プチュール’および‘エドワーズ’の呼吸量は変化しなかった。

成熟期における採取果のエチレン生成量は，呼吸量とほぼ同様に変化した。‘パープルアイ’および‘ブルータン’のエチレン生成量は，貯蔵後6日にそれぞれ7.9および13.6$\mu\ell$・kg^{-1}・h^{-1}まで増加した。‘スタンレイ’および‘ベイラー’のエチレン生成量も，それぞれ4.9および2.8$\mu\ell$・kg^{-1}・h^{-1}まで増加した。‘プチュール’，‘エドワーズ’および‘マジョリース’のエチレン生成量は0.1$\mu\ell$・kg^{-1}・h^{-1}程度であった。

2）幼果期から過熟期における採取果の呼吸量およびエチレン生成量の時期別変化：2012年および2013年に調査した幼果期から過熟期における‘スタンレイ’果実の採取後20℃貯蔵中の呼吸量およびエチレン生成量の変化をFig. 7に示した。

幼果期である5月15日採取果の呼吸量は，貯蔵後2日に190mg·kg^{-1}・h^{-1}の値でピークを形成し，その後減少した。その後，発育ステージが進むにつれ呼吸量のピーク値は減少していき，7月中旬以降，未熟期の採取果における，呼吸量はピークを形成しなくなった。その後，成熟期後半の採取果における呼吸量は増加した。

また，5月15日採取果のエチレン生成量は，呼吸量がピークとなった1日後の採取後3日に1.1$\mu\ell$・kg^{-1}・h^{-1}の値でピークとなり，その後減少した。その後のエチレン生成量は，呼吸量と同様，採取後低い値で推移した。また，成熟期後半における採取果のエチレン生成量は，貯蔵後4日以降増加し続け，4$\mu\ell$・kg^{-1}・h^{-1}以上となった。

なお，他品種の未熟期における採取果の呼吸量およびエチレン生成量の変化は‘スタンレイ’と同様であった（データ未掲載）。

（3）成熟果に対するエチレン処理による果実の呼吸量，エチレン生成量および軟化程度の変化　‘スタンレイ’および‘ベイラー’の成熟果を用いて48時間エチレン処理を行い，20℃貯蔵中の呼吸量，エチレン生成量および軟化程度の変化をFig. 8に示した。

‘スタンレイ’のエチレン処理果における呼吸量はエチレン処理中に34mg·kg^{-1}・h^{-1}まで増加して無処理果と比較して高い値となり，エチレン処理解除後1日から6日までは，ほぼ一定で推移した後，採取後7日以降さらに増加し，採取後8日には44mg·kg^{-1}・h^{-1}となった。‘ベイラー’のエチレン処理果における呼吸量はエチレン処理解除後2日に25mg·kg^{-1}・h^{-1}へと増加し，それ以降はほぼ一定の値で推移し，常に無処理果より高い値で推移した。

‘スタンレイ’のエチレン処理果におけるエチレン生成量はエチレン処理解除後1日に30.8$\mu\ell$・kg^{-1}・h^{-1}となり，無処理果の430倍となった。採取後5日にピーク値となり，その後減少した。‘ベイラー’のエチレン処理果におけるエチレン生成量もエチレン処理解除後増加したが，その値は無処理果の1.5～2.3倍であった。

果実軟化はエチレン処理果でみられた。‘スタンレイ’の軟化はエチレン処理解除後にゆっくりと進んだ。一方‘ベイラー’の軟化はエチレン処理解除後2日以降急激に進んだ。

考　察

1．プルーン果実の生育特性

一般にモモやオウトウなどの核果類は2重S字曲線を描きながら生育していくことが知られており，今回調査を行った7月以降は，果実肥大の第Ⅱ期からⅢ期に相当すると考えられる。

平（2013）[20]は成熟とは果実がほぼ本来の大きさに発育して成分的にも充実し，収穫が可能になった状態で，その時点で可食可能か，その後の追熟などで可能になることである，としている。このことから，プルーンでは，肥大第Ⅱ期および第Ⅲ期で果実が品種固有の大きさとなり，8割程度の着色となるまでの期間が未熟期に相当し，それ以降が成熟期に相当し，収穫期を迎えると考えられた（Fig. 1）。

2．プルーン果実はクライマクテリック型かノンクライマクテリック型か

（1）樹上における推定される呼吸量またはエチレン生成量の変化　KIDDとWEST（1930）[16]はリンゴが成熟期

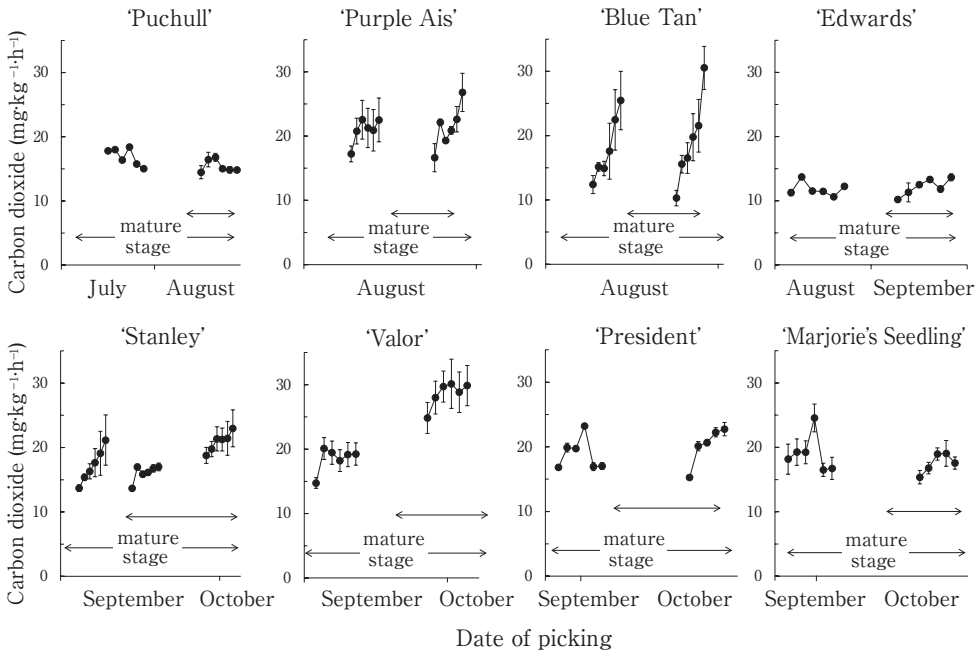

Fig. 5 Changes in the respiration of prune fruit cultivated under a rain shelter, picked at the mature stage and kept at 20℃ in 2013

The vertical bars indicate SE（n = 3 to 5）and the horizontal arrows indicate the harvesting period.

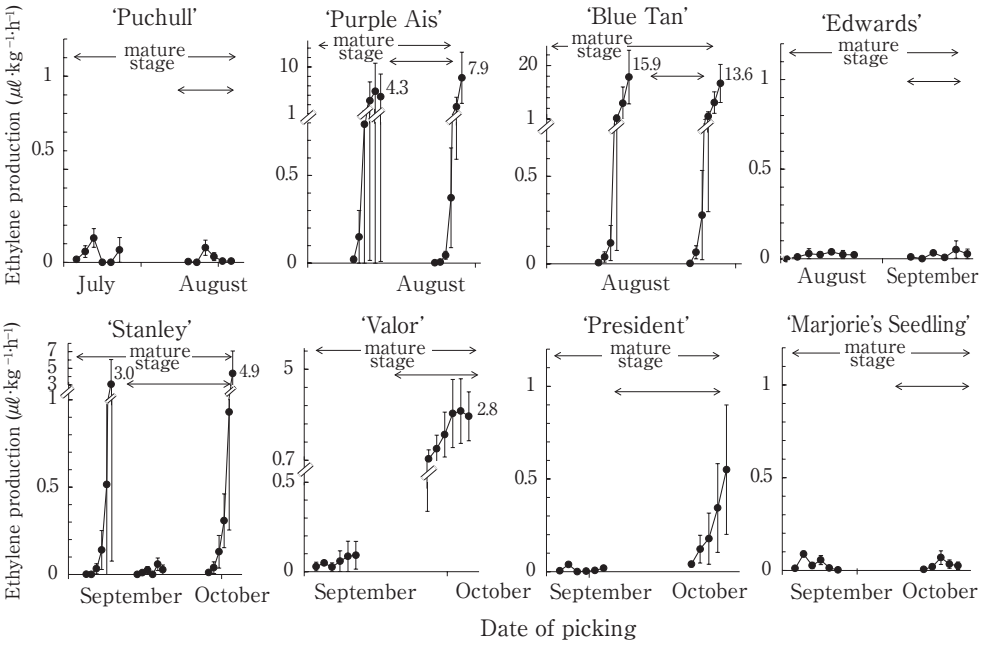

Fig. 6 Changes in the ethylene production of prune fruit cultivated under a rain shelter, picked at the mature stage and kept at 20℃ in 2013

The vertical bars indicate SE（n = 3 to 5）and the horizontal arrows indicate the harvesting period.

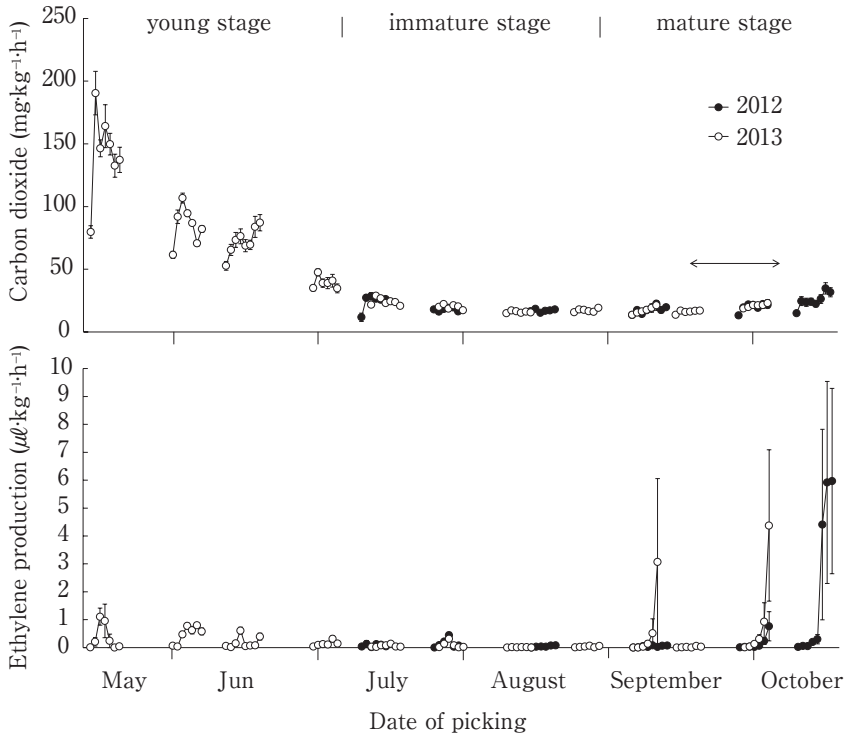

Fig. 7 Changes in the respiration and ethylene production of 'Stanley' prune fruit cultivated under a rain shelter, harvested at different stages and kept at 20℃ in 2012 and 2013

The vertical bars indicate SE (n = 3 to 5) and the horizontal arrows indicate the mature harvesting period.

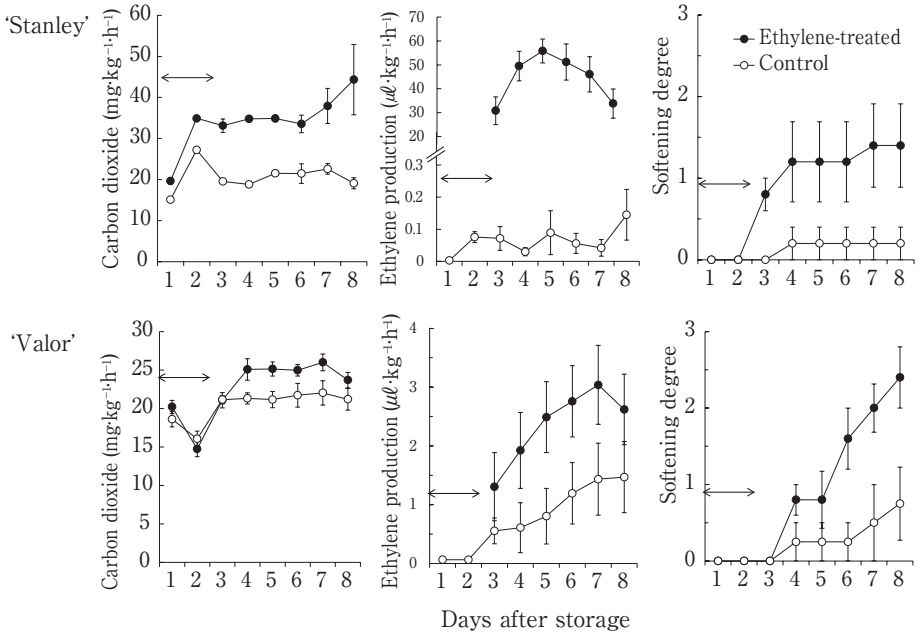

Fig. 8 Changes in the respiration, ethylene production and softening degree of ethylene-treated and non-treated prune fruit cultivated under a rain shelter, harvested at the mature stage and kept at 20℃ in 2014

'Stanley' fruits were harvested on 14 September and 'Valor' fruits were harvested on 1 October. The ethylene-treated fruits received 500 ppm ethylene for 48 h after harvest. The softening degree is expressed on a scale of 0 (moderately elastic) to 3 (very soft). The horizontal arrows indicate the ethylene treatment period and the vertical bars indicate SE (n = 3 to 5).

に移る時，貯蔵中の果実呼吸量が増加するクライマクテリックライズという現象を発見した。SMOCKとNEUBERT (1950)[14]は，樹上でのクライマクテリックライズを推定するためにはリンゴの果実を生育期間中に数回採取し，毎回約20℃の恒温下に静置して，24時間後の呼吸量を測定するのが適切であるとしている。この方法は簡便であるため，広く使われ，カキ[21),22)]，リンゴ[15),23),24)]，ナシ[25)]，ニホンスモモ[26)]などで利用されている。

本調査において，‘プチュール’を除く7品種を用いてプルーン果実の樹上における呼吸量を7月から成熟期まで上記とほぼ同様に測定した。その結果，呼吸量は，年次変動があるものの，漸次減少して最低値を示し，‘エドワーズ’以外の品種においてその後増加するクライマクテリックライズを示した（Fig. 3）。他の樹種についてみると，リンゴ[15),24)]，セイヨウナシ[25)]，ニホンスモモ[27)]ではクライマクテリックライズを示すことから，プルーン果実の樹上における呼吸活性はこれらの樹種に近いと考えられた。北村ら（1980）[15]はリンゴ‘国光’において，果実がほとんど落果した時期まで樹上における呼吸量を測定した結果，呼吸量が増加し続けたことを報告している。プルーン‘エドワーズ’においても，落果時期まで調査を継続して行えば，クライマクテリックライズが認められたかもしれない。

BURGとBURG（1962）[28)]はクライマクテリック型果実においてエチレンがクライマクテリックライズの引き金として作用することを明らかにし，エチレンは成熟ホルモンであるとした。クライマクテリック型果実では，樹上において呼吸量の増加に伴ってエチレン生成量が増加することが知られている。本調査において，プルーン果実の内部エチレン濃度は，いずれの品種も未熟期において概ね0.2ppm以下と低くであり，成熟期になると‘エドワーズ’と‘スタンレイ’以外は高くなる傾向がみられた（Fig. 2）。また，樹上で推定されるエチレン生成量は，内部エチレン濃度と同様に変化した（Fig. 4）。すなわち，未熟期の樹上における推定されるエチレン生成量は0.02 $\mu\ell \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$以下と低く推移した後，‘エドワーズ’および‘スタンレイ’以外は高くなる傾向にあった。

（2）採取後の果実における呼吸量およびエチレン生成量の変化　BIALE（1960）[1)]は，やや未熟な段階から採取した果実を用いて貯蔵中の呼吸量を調べ，クライマクテリック型果実とノンクライマクテリック型果実の2つに分類した。成熟期において，クライマクテリック型果実では採取後数日で呼吸量およびエチレン生成量は増加し，ピークに達した後減少するのに対して[1),29)]，ノンクライマクテリック型果実では，採取後に呼吸量およびエチレン生成量は増加しない[1)]。成熟期におけるプルーン採取果の呼吸量およびエチレン生成量は，成熟期後半に増加を示すタイプが多く，‘プチュール’と‘エドワーズ’以外の品種はクライマクテリック型と考えられた。

‘スタンレイ’果実では，採取後の呼吸量およびエチレン生成量は，クライマクテリック様の増大を示し，発育が進むにつれ，その増大がはっきりしなくなり，成熟期では再び増大した（Fig. 7）。同様な呼吸量の変化はカキ[21),22)]，モモ[30)]でも認められる。一方，ノンクライマクテリック型のカンキツでは，幼果期における採取果の呼吸量とエチレン生成量はクライマクテリック様に増加するが，生育が進むと不明確となり，成熟期では増大しない[31)~33)]。‘スタンレイ’果実は収穫期にそれらが増大するため，カンキツとは明らかに呼吸とエチレン生成増大のパターンが異なった。他の品種における採取果の呼吸量およびエチレン生成量の幼果期から成熟期にかけての変化も‘スタンレイ’と同じパターンを示すのではないかと考えられた。

（3）エチレン処理による呼吸量とエチレン生成量の変化　クライマクテリック型果実とノンクライマクテリック型果実の違いは，エチレン処理によって前者は自己触媒的にエチレン生成が誘導されるのに対して，後者はエチレン生成が誘導されないことである[4)]。成熟期の‘スタンレイ’および‘ベイラー’果実を用いてエチレン処理を行った結果，両品種ともエチレン処理後に呼吸量およびエチレン生成量は増加し，果実の軟化も促進された。このことから，両品種はクライマクテリック型果実であると考えられた。‘スタンレイ’のエチレン処理果におけるエチレン生成量のピーク値は無処理果における値の600倍となり，‘スタンレイ’はエチレン処理の影響を受けやすいと考えられた。また，‘ベイラー’では‘スタンレイ’に比べてエチレン処理果におけるエチレン生成量の増加は僅かであったにも関わらず軟化は促進された。プルーン果実において，果実の軟化に関与するβ－ガラクトシダーゼおよびポリガラクツロナーゼ活性には品種間差があると報告されており[34)]，‘ベイラー’ではエチレン処理によってこれらの酵素活性が高くなる可能性が考えられる。

（4）プルーン果実の成熟型　上記（1），（2），および（3）の3つの観点において，各品種別に呼吸およびエチレン生成の増大を判定した結果をTable 1に示した。判定基準は○：呼吸やエチレン生成の増大が認められる，△：呼吸やエチレン生成の増大が不明瞭，×：呼吸やエチレン生成の増大が認められないとした。‘スタンレイ’および‘ベイラー’は各調査において呼吸またはエチレン生成が増加する項目数が多く，成熟期における採取果のエチレン処理によって呼吸およびエチレン生成が増大したことから，クライマクテリック型であると言える。‘パープルアイ’，‘ブルータン’，‘プレジデント’および‘マジョリース’は各調査において呼吸またはエチレン生成が増加する項目数が多いことから，エチレン処理による自己触媒的エチレン生成の有無は確認していないものの，クライマクテリック型であると推定された。また，‘プチュール’および‘エドワーズ’は，樹上および採取後の呼吸およびエチレン生成の増大が明

Table 1 Respiration and ethylene production characteristics in different prune fruit cultivars

Cultivar	Experiment[z]							Synthetic judgement
	1			2		3		
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	
'Puchull'	−[y]	−	−	△	△	−	−	Suppressed-climacteric
'Purple Ais'	○	○	△	○	○	−	−	Climacteric
'Blue Tan'	○	○	○	○	○	−	−	Climacteric
'Edwards'	△	△	△	△	△	−	−	Suppressed-climacteric
'Stanley'	△	○	△	○	○	○	○	Climacteric
'Valor'	○	○	○	○	○	○	○	Climacteric
'President'	○	○	○	○	○	−	−	Climacteric
'Marjorie's Seedling'	○	○	○	○	○	−	−	Climacteric

[z]1: Seasonal changes in internal ethylene concentration (1), estimated respiration (2) and estimated ethylene production (3) of prune fruit on the tree.
2: Changes in respiration (4) and ethylene production (5) of prune fruit picked at the mature stage and kept at 20℃.
3: Changes in respiration (6) and ethylene production (7) of ethylene-treated or non-treated prune fruit picked at the mature stage and kept at 20℃.
[y]○: An increase of respiration or ethylene production was observed, △: No clear increase of respiration or ethylene production, ×: No increase of respiration or ethylene production was observed, -: Not tested

Table 2 Classification of prune cultivars according to maximum ethylene production in fruit picked at the mature stage and kept at 20℃ in 2012 and 2013

Rate of ethylene production ($\mu\ell\ kg^{-1}h^{-1}$)	Cultivar
>10	'Blue Tan'
5～10	'Purple Ais'
1～5	'Stanley', 'Valor'
<1	'Puchull', 'Edwards', 'President', 'Marjorie's Seedling'

瞭ではなかったことからABDI (1997)[7]らが述べている抑制型クライマクテリックに似ていると考えられた。これらのことから，プルーン果実は一般にクライマクテリック型であると考えられるが，各品種の成熟型を確定するには，成熟期における採取果を用いて，エチレンまたはプロピレン処理を行い，呼吸またはエチレン生成が増大するかどうかを調査する必要がある。

久保 (2007)[35]は種々の果実をその呼吸型と常温下で貯蔵中の最大エチレン生成量をもとに分類をしている。今回調査したプルーン品種は，成熟期における採取果の最大エチレン生成量からTable 2のように4つのグループに分類できた。具体的には，最大エチレン生成量が1 $\mu\ell\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$以下：'プチュール'，'プレジデント'および'マジョリース'，1～5 $\mu\ell\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$：'スタンレイ'および'ベイラー'，5～10$\mu\ell\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$：'パープルアイ'，10$\mu\ell\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$以上：'ブルータン'，であった。各樹種におけるエチレン生成量と品種の関係は，リンゴ[24),36)]，ニホンナシ[37)]，モモ[38)]などで検討され，早晩性や貯蔵性との関連性についても議論されている。リンゴでは，成熟期の遅い'ふじ'および'国光'で貯蔵中のエチレン生成量が少なく，貯蔵性が高いとされている[39)]。ニホンナシでは，'幸水'，'新水'などは貯蔵中に急激なエチレン生成が起こり，貯蔵性も低いが，'二十世紀'，'新高'，'晩三吉'などはエチレン生成量が少なく，1か月以上果実品質が維持できるとされている[37),40)]。今後，プルーンにおいてもエチレン生成量と貯蔵性の関係について検討する必要がある。

要　約

プルーン果実の成熟型を明らかにするため，8品種を用いて，① 樹上での成熟期における呼吸量またはエチレン生成量増加の有無（'プチュール'を除く7品種），② 成熟期に採取した果実における採取後の呼吸量またはエチレン生成量増加の有無，③ 成熟果に対する外部エチレン処理による自己触媒的なエチレン生成の有無を調査した。樹上における呼吸量およびエチレン生成量は，採取後20℃で24時間放置した後測定した値を推定値とした。樹上における推定呼吸量は，いずれの品種も未熟期の始めから終わりまで漸次減少して最低値となり，'エドワーズ'を除く6品種では，その後成熟期に増加するクライマクテリックライズを示した。樹上における内部エチレン濃度と推定エチレン生成量は未熟期から成熟期にかけてほぼ同様の変化を示した。すなわち，未熟期の樹上でのエチレン生成量は全品種ともごく僅かであり，成熟期に'エドワーズ'と'スタンレイ'を除く5品種で高くなる傾向にあった。成熟期に採取した果実における採取後20℃貯蔵中の呼吸量およびエチレン生成量は，'プチュール'および'エドワーズ'を除く6品種で増加した。'スタンレイ'および'ベイラー'の成熟期に

採取した果実を用いて500ppmのエチレンガスで48時間処理すると，呼吸量およびエチレン生成量が増加した。以上の結果を総合的に判断すると，‘プチュール’および‘エドワーズ’は抑制型クライマクテリック型，その他の‘パープルアイ’，‘ブルータン’，‘スタンレイ’，‘ベイラー’，‘プレジデント’および‘マジョリース・シードリング’はクライマクテリック型に属すると考えられた。

文　献

1）Biale, J. B. : The postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits, *Adv. Food Res*., **10**, 293～354（1960）

2）Seymour, G. B., Taylor, J. E. and Tucker, G. A. : Biochemistry of fruit ripening（Chapman and Hall, London）, pp. 1～18（1993）

3）Lelièvre, J. M., Latche, A., Jones, B., Bouzayen, M. and Pech, J.-C. : Ethylene and fruit ripening, *Physiol. Plant*., **101**, 727～739（1997）

4）McMurchie, E. J., McGlasson, W. B. and Eaks, I. L. : Treatment of Fruit with Propylene gives Information about the Biogenesis of Ethylene, *Nature*, **237**, 235～236（1972）

5）宮澤孝幸・田尻勝博：新特産シリーズ　プルーン（農文協，東京），p. 26（2003）

6）Li, K.－T. : Physiology and classification of fruits. Hand book of fruits and fruit processing,（Wiley-Blackwell, UK）, pp. 8～ 9 （2012）

7）Abdi, N., Holford, P., McGlasson, W. B. and Mizrahi, Y. : Ripening behaviour and responses to propylene in four cultivars of Japanese type plums, *Postharvest Bio. Tech*., **12**, 21～34（1997）

8）Biale, J. B. : Respiration of fruits, *Handbuch der Pflanzenphysiogie*, **12**（Part II）, 536～592(1960)

9）Sekse, L. : Respiration of plum（*Prunus domestica* L.）and sweet cherry（*P. avium* L.）fruits during growth and ripening, *Acta Agricul. Scand*., **38**, 317～320（1988）

10）Rato, A. E. : Ethylene production and respiration rate in 'Green Gage' plums（*Prunus domestica* L.）. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III*,（*IOS Press, Amsterdam*）, **349**, 449～450（2003）

11）Lippert, F. and Blanke, M, M. : Effect of mechanical harvest and timing of 1－MCP application on respiration and fruit quality of European plums（*Prunus domestica* L.）, *Postharvest Biol. Technol*., **34**, 305～311（2004）

12）Kožíšková, J. and Goliáš, J.: Influence of ripening on the ethylene and carbon dioxide production during storage of plum fruits, *Acta Univ. Agricul. Silvic. Mendelianae Brun*., **60**, 133～140（2013）

13）Larsen, H. and Vangdal, E.: Variation in ethylene production and respiration rate for Norwegian grown plums（*Prunus domestica* L.）in relation to packaging parameters, *Scientia Hort*., **154**, 109～114（2013）

14）Smock, R. M. and Neubert, A. M.: Apples and apple products,（Interscience Publisher, New York and London）, pp. 141～142（1950）

15）北村利夫・岩田　隆・落合利理・福島忠昭：果実・野菜の成熟生理と貯蔵に関する研究（第１報）リンゴ果実の呼吸量，エチレン生成量及び組織内エチレン濃度の変化と成熟現象に関する品種間差異，園学雑，**49**，277～285（1980）

16）Kidd, F. and West, C. : Physiology of Fruit -I. Changes in the Respiratory Activity of Apples during their Senescence at Different Temperatures, *Proc. Roy. Soc. London Ser. B*, **106**, 93～109（1930）

17）稲葉昭次・中村怜之助：ウメ果実の樹上および収穫後の成熟，園学雑，**49**，601～607（1981）

18）島根県・JA全農島根県本部：果樹栽培指針，pp. 137～143（2001）

19）Itamura, H., Yoshioka, M. and Nakatsuka, A. : The effects of internal ethylene production on coloration and on-tree fruit softening of Japanese persimmon, *Acta Hort*., **601**, 165～169（2000）

20）平　　智：果樹園芸の基礎（農文協，東京），p. 125（2013）

21）高田峰雄：カキおよびトマト果実の生育ならびに成熟に伴う呼吸量の変化，園学雑，**36**, 357～362（1967）

22）板村裕之：成熟段階の異なるカキ“平核無”果実のアルコール脱渋に伴う軟化と呼吸量及びエチレン生成量の関係，園学雑，**55**，89～98（1986）

23）中島武彦・田村　勉：リンゴ果実の成熟に関する研究（第１報）果実（旭）の呼吸クライマクテリックと熟度の関係，園学雑，**39**，283～83（1970）

24）加藤公道・阿部　薫・佐藤良二：リンゴ果実の成熟（第１報）成熟期の呼吸量，エチレン排出量および内部エチレン濃度の変化，園学雑，**46**, 380～388（1977）

25）北村利夫・岩田　隆・福島忠昭・古川良茂・石黒運弥：果実・野菜の成熟生理と貯蔵に関する研究（第２報）ナシ果実の呼吸量及びエチレン生成量と種間及び品種間差異，園学雑，**49**，608～616（1981）

26）Ponce, N. M., Ziegler, V. H., Stortz, C. A. and Sozzi, G. O. : Compositional changes in cell wall polysaccharides from Japanese plum（*Prunus salicina* Lindl.）during growth and on-tree ripening, *J. Agric. Food Chem*., **58**, 2562～2570（2010）

27）北村利夫・板村裕之・福島忠昭：スモモ果実の成熟

に伴う呼吸量，エチレン発生量及びアブシジン酸含量の変化，園学雑，**52**，325～331（1983）

28）BURG, S. P. and BURG, E. A. : Role of ethylene in fruit ripening, *Plant Physiol*., **37**, 179～189（1962）

29）BIALE, J. B. : Postharvest physiology and biochemistry of fruits, *Ann. Rev. Plant Physiol*., **1**, 183～206（1950）

30）蔡　龍銘・水野　進・小机信行：果実の追熟，老化に伴う呼吸及びエチレンの発生とアブシジン酸の消長について，園学雑，**52**，458～463（1984）

31）EAKS, I. L. : Respiratory response, ethylene production, and response to ethylene of citrus fruit during ontogeny, *Plant Physiol*., **45**, 334～338（1970）

32）HYODO, H.: Ethylene production and respiration of Satsuma mandarin（*Citrus unshiu* Marc.）fruit harvested at different stages of development, *J. Japan. Soc. Hort. Sci*., **45**, 427～432（1977）

33）兵藤　宏・郵由卓夫：いろいろ生育段階における温州ミカン果実のエチレン生成，園学雑，**41**，405～410（1972）

34）KOVÁCS, E. and KÁLLAY, E.: Quality change of plums as a function of ripening and cultivars, *Acta Hort*., **734**, 217～223（2007）

35）久保康隆：エチレンの制御とクライマクテリックライズの機構，園芸生理学,（文永堂出版，東京），pp. 189～201（2007）

36）壽松木章・高橋　敦・青葉幸二・増田哲男・樫村芳記：リンゴ数品種の成熟期における樹上果実および収穫果実のエチレン生成の比較，園学雑，**66**，495～503（1997）

37）田辺賢二・田村文男・伴野　潔・栗山吉弘・大旗英次：果実のエチレン生成特性によるニホンナシ品種の類別，鳥大農日本梨開発実験報告，**5**，21～54（1991）

38）HAJI, T., YAEGAKI, H. and YAMAGUCHI, M. : Varietal differences in the relationship between maturation characteristics, storage life and ethylene production in peach fruit, *J. Japan. Soc. Hort. Sci*., **71**, 97～104（2004）

39）吉岡博人・青葉幸二・福元将志：リンゴ果実の貯蔵に伴う品質及び生理的変化と果実の成熟期との関連，園学雑，**58**，31～36（1989）

40）ITAI, A., KAWATA, T., TANABE, K., TAMURA, F., UCHIYAMA, M., TOMOMITSU, M. and SHIRAIWA, N. : Identification of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid synthase genes controlling the ethylene level of ripening fruit in Japanese pear（*Pyrus pyrifolia* Nakai）, *Mol. Gen. Genet*., **261**, 42～49（1999）

（平成27年10月 9 日受付，平成28年 3 月31日受理）

山梨県産ザクロ果実の理化学的特性

小宮山美弘[*1§]・尾形(斎藤)美貴[*2]・木村英生[*2]
西田典永[*3]・長友暁史[*3]・須山　建[*3]
吉野智恵[*3]・辻　政雄[*4]・村松　昇[*5]

＊1　テクノ・サイエンスローカル事務所
＊2　山梨県工業技術センター
＊3　森下仁丹(株)大阪テクノセンター
＊4　山梨学院大学
＊5　山梨大学生命環境学部

Physico-Chemical Characteristics of Pomegranate Harvested in Yamanashi Prefecture in Japan

KOMIYAMA Yoshihiro[*1§], OGATA (SAITOU) Miki[*2], KIMURA Hideo[*2],
NISHIDA Norihisa[*3], NAGATOMO Akifumi[*3], SUYAMA Takeru[*3],
YOSHINO Chie[*3], TSUJI Masao[*4] and MURAMATSU Noboru[*5]

＊1　*Techno-Science Local Office, 353−27,wado, Kofu, Yamanashi　400−0812*
＊2　*Yamanashi Industrial Technology Center, 2094, Otsu, Yamanashi　400−0055*
＊3　*Osaka Techno Center, Morishita Jintan Co.,Ltd. 2−11−1, Tsudayamate, Hirakata, Osaka　573−0128*
＊4　*Yamanashi Gakuin university, 2−4−5, Sakaori, Kofu, Yamanashi　400−8575*
＊5　*Faculty of Life and Environmental Sciences, Yamanashi University, 4−4−37, Takeda, Kofu, Yamanashi　400−8510*

To elucidate the physico-chemical properties of the juice and the fruit as a whole for pomegranates harvested in the Yamanashi prefecture in Japan compared to that of the imported ones, following analysis were conducted. ① On average, the domestic fruit weight was approximately 150g per fruit, while the aril and juice ratios to the fruit weight were about 60% and 42%, respectively. The juice ratio to the aril weight was approximately 70%. These ratios were lower than those calculated for the imported fruit (approximately 400g per fruit), and not dependent on the fruit size. ② The brix measurement of pomegranate juice from domestic fruit was 17 and the sugar was glucose and fructose, while both ratios were nearly equivalent, it was slightly high in fructose. The same results were obtained for imported fruits. Titratable acidity in the imported fruit was much higher than that in the domestic fruit, which mainly composed of 0.7% oxalic acid. However the organic acid content in the imported fruit was 1.5% citric acid with a small amount of malic acid. ③ The dominant free-amino acids in the juices listed in order of high to low concentration were glutamine, glutamic acid, aspartic acid and serine. There were no significant differences between the juices from domestic And the imported fruit. Small quantities of sarcosine were detected in both juices. ④ Total polyphenol content in the juices was approximately 100mg% and 200mg% in the domestic and imported fruit, respectively. The HPLC analysis of the polyphenol revealed that punicalin and punicalagin were detected in the juices from the domestic fruit and not the imported fruit.

(Received Nov. 16, 2015；Accepted Mar. 24, 2016)

Key words：*Pomegranate, Aril, Fruit, Punicalin, Punicalagin*
ザクロ，アリル，果実，プニカリン，プニカラジン

＊1　〒400−0812　山梨県甲府市和戸町353−27
§　Corresponding author, E-mail：sumomo@nns.ne.jp
＊2　〒400−0055　山梨県甲府市大津町2094
＊3　〒573−0128　大阪府枚方市津田山手２−11−１
＊4　〒400−8575　山梨県甲府市酒折２−４−５
＊5　〒400−8510　山梨県甲府市武田４−４−37

ザクロ（*Punica granatum*）はミソハギ科の落葉小高木である。日本では漢字で石榴，柘榴あるいは若榴とも標記するが，原産地についてはトルコやシリア[1]，イラン[2]周辺とする説，北アフリカのカルタゴが発祥[3]である等諸説があるが，これといった定説はない。世界の現在の主要産地が地中海沿岸地域からイランさらにはインド，中国南部に渡っていることから推察すると，いずれの説も許容できるものと考えられる。中国には3世紀末頃インド，チベットを経由して渡来したようであり[2]，日本への渡来は9世紀[3]と言われている。

明治時代から昭和初期に至るまでには，花ザクロの一大ブームがあったようで，森崎順三著の「柘榴全書」[4]，農業世界編輯局「柘榴の作り方」[5]が出版されている。

戦後は1976年に村田憲司と村田圭司共著の「花もの盆栽」[6]がある。しかしいずれも観賞用としてのザクロの栽培を主目的として出版されたものである。

山梨県は果実王国と言われ，ブドウ，モモおよびスモモはいずれも国内において最大の生産量を誇っている[7]が，気候的に良環境から他の多くの果実の栽培も局所的には盛んに行われている。しかし，ザクロは庭木として多くの住宅の庭に栽培されてはいるものの，食用専用としての集積栽培はみられず，道の駅等で秋になると完熟した赤い外果皮の果実，あるいは不規則に裂けた果実が販売されている。日本の他の地域の栽培現状も同様であり，一般に国内の果実は大きさも100～200ｇ程度と小さいが，スーパーや百貨店では，400～500ｇあるいはそれ以上の大きさを有するアメリカ産あるいはメキシコ産輸入ザクロがみられる。また，5月頃になると南半球のチリ産ザクロが店頭にみられるようになってきている。

ザクロは果実が肥大するに従い，果実の中に多汁性の果肉を含んだ無数のAril（種衣）が現れ，このAril（以下アリルと表記）一つひとつの中に種子が存在するという極めて特徴的な果実である。一般的にはこの種子が食用とした場合の食べやすさの障害となっているものと考えられ，国内においての流通は極めて限定的で，利用方法についても検討されていないのが実状である。2000年頃このザクロにエストロゲンが含まれているとの情報により，一時ザクロブームの兆しがあったが，国民生活センターの検証により検出されないことが明らかとなった[8]ことにより，日本では栽培環境の構築には至らなかった。一方近年世界的にはザクロに特徴的なポリフェノールであるプニカリンやプニカラジン等のエラジタンニン類の抗酸化活性を中心とした各種健康機能性が着目され，栽培面積および生産量の顕著な増大や果汁等の利用拡大がみられるようになってきている[9]。

山梨県内においては，江戸時代の甲斐叢記に甲斐八珍果の中にザクロは記されている[10]ものの，食用として商業ベースで利用されていない唯一の果実でもある。したがって庭木として数多くのザクロが植樹されているにもかかわらず，その物理化学的特性や嗜好性の調査分析は皆無に近い。

筆者等は海外での栽培環境やマーケットの動向から国産ザクロの産地化を図ることを狙いに，まず国内で植樹されているザクロの理化学的特性について調査を行うこととした。しかし，栽培品種の特定も困難であり，伝聞的な品種情報を用いることも正確ではなことから，その手始めとして樹勢が旺盛でかつ植樹環境も良好なザクロ樹を選択し，今後系統的な調査を行う基礎として，輸入果実の理化学的性質と比較調査を行ったので報告する。

実 験 方 法

1．供 試 材 料

山梨県甲府市和戸町で植樹され，外観的にも一般的かつ着果も良好で，果実の収穫も豊富なザクロ樹（品種不詳）15年生を使用した。ザクロ果実（以下ザクロ）は，その一部が赤色化し，黄色部分が50%以上残存しているものを未熟果，実割れしてアリルが十分赤色化したものを適熟果として採取した。収穫期は2012年9月23日，10月16日および22日とした。ザクロの収穫期の判断は難しいので，後述の理由により，最終的には搾汁したアリル果汁の吸光度を基準として未熟および適熟の判断も取り入れた。また比較対象として大阪市内のスーパーで販売されていた果皮が全面的に赤色化したアメリカ産ザクロを2012年10月1日，11月7日，2013年1月11日に購入し，これを適熟果として使用した。

2．果実中のアリルから果汁の取得と果汁の処理方法

ザクロは，不規則裂果のないものはナイフによって亀裂を入れた後破断し，裂果果実はそのまま手作業で破断し，無数のアリルを掻き出した。このアリルを石臼型のシャープ㈱社製スロージューサーEJ-CP10Aに投入して搾汁を行った。本装置は果汁部分と種皮粕部分を分別できるが，種子中の成分の溶出は避けられない。果汁部分はそのまま－20℃以下で冷凍保存した。分析に際しては，解凍後5,000rpmで20分間遠心分離を行い，0.45㎛のミクロフィルターで濾過して分析に供した。

3．一般成分分析

（1）一般分析　果汁のpHおよびBrix（以下Bx）はpH計および屈折糖度計をそれぞれ用いて調べ，滴定酸度は0.1NNaOHの滴定値で示した。

（2）糖組成および有機酸組成　いずれも㈱島津製作所製LC－10ADvpを用いたHPLC法により分析した。糖組成は示差屈折計検出器（RID－10A）により，有機酸組成はポストカラムpH緩衝化法による電気伝導度検出器（CDD－6A）を用いて調べた。

（3）遊離アミノ酸分析　日本電子㈱製JLC－500/V2型アミノ酸分析計によって調べた。

（4）果汁の色調（最大吸収）　果汁の最大吸収は，㈱島津製作所製UV－1800型分光光度計により可視部の波長をスキャニングして調べ，最大吸収波長と吸収強度を調べた。

4．全ポリフェノールとプニカリンおよびプニカラジンの分析

（1）全ポリフェノール　Folin-Denis法[11]により，Folin試薬を用いて没食子酸エチル相当の含量として示した。

（2）プニカリンおよびプニカラジン　HPLC法により分析し[12]，標準品については岡山大学より分与していただいた精製品を用いた。両者が含有されていることを確認するため，プニカリンとプニカラジン標準品を約1mgずつ精秤し，DMSO 1 mℓを正確に加えて溶解した。本標準液は使用後－20℃以下に凍結保存し，使用時には解凍して繰り返し使用した。HPLCは，Waters 2690装置を用い，380nmの紫外部吸収により測定した。

測定条件は以下のとおりである。

カラム：Inertsil ODS－3（5 μm，4.6×250㎜）

Table 1　Conditions of the mobile phase for HPLC

Time	0.5% phosphoric acid.	Acetonitrile
0min	95%	5%
10min	85%	15%
30min	75%	25%
35min	95%	5%

These conditions were used for punicalin and punicalagin measurements.

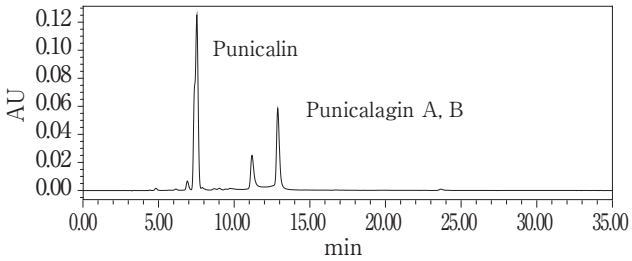

Fig. 1　HPLC Chromatogram of punicalin and punicalagin

AU: Absorbance unit

Analytical conditions;

Column: Inertsil ODS－3（5μm, 4.6×250㎜）Column temp.: 40℃

Mobile phase: 0.5% phosphoric acid/acetonitrile（linear gradient）Flow rate: 1.0mℓ/min, sample size: 25μℓ.

カラム温度：40℃　移動相：0.5%リン酸/アセトニトリル　リニアグラジエント（Table 1），流量：1.0mℓ/min，注入量：25μℓ。得られたクロマトグラムはFig. 1のとおりであり，検量線を作成して定量した。

5．分析データの統計解析

収穫ザクロの個体分析データについては，山梨県産と輸入果実との比較も行ったが，比較試料数が異なるため，その有意差を検証するためTukey法による多重比較法を用いた。

実験結果

1．ザクロの破砕部位別比率

ザクロの収穫適期の判断は，当初果皮色の変化や大きさを基準にして収穫しようとしたが，剥皮してザクロ特有のアリルの着色度合を観察すると必ずしも相関がみられないことから，今回収穫ザクロとして未熟，適熟を問わずその果実の部位別特性をまず比較することとした。その比較対象としては，市販のアメリカ産輸入ザクロを用いた。ザクロの特徴としては可食部のアリルの変化をとらえることによって示すことができると考えられるので，Table 2に示したように果実重とアリルおよびその搾汁率を比較した。収穫ザクロは最大では400gを越えるが，収穫果の平均値は150g位であった。輸入ザクロは400gを越え，最大値は600gに迫る大きさを示している。ランダムに収穫・購入しているが，樹上においても店頭においても大きさのバラツキがみられた。一方アリルの果実全体に占める比率には収穫および輸入果実とも大差はなく，おおよそ60%程度の比率を占めた。また，標準偏差から判断して，果実の大きさには影響を受けることなく一定の比率であることが推察された。一方，果実に対する搾汁率の比率は果実の大きさに影響されると考えられ，輸入果実のほうが高いが，果実の大きさに比較して果汁の搾汁率の影響はかなり小さいと言える。アリルに対する比率もほぼ同様な傾向を示しているが，輸入果実のほうが高く，80%を越えている。しかし，収穫果実でも70%を越えており，果実の大きさが同じであればその影響は少ないのではないかと思われた。搾汁率の収穫および輸入果実の搾汁率のバラツキは少なかった。

これらのデータを用いて，tukey検定を行うと重量，

Table 2　Weight, arils and juices from domestic and imported pomegranates

	Domestic[1]				Imported[2]				tukey test
	Average	Maximum	Minmum	Std.D	Average	Maximum	Minmum	Std.D	1) and 2)
Fruit weight（g）	157.3	420.1	72.3	73.8	423.6	586.8	249.4	141.4	$p<0.05$
Aril ratio to fruit（%）	60.4	69.1	39.8	6.7	57.4	66.1	48.8	4.8	
Juices to fruit（%）	42.6	51.4	23.5	6	47.6	57.5	35.7	5.5	$p<0.05$
Juice to aril（%）	70.6	80	59	5.4	82.3	85.7	73.1	4.2	$p<0.05$

Domestic fruits（n＝26） were harvested three times on September 24 as well as October 16, and 22 in 2012.

Imported furuits（n＝10） were purchesed from supermarket in Osaka in October and November of 2012 and January of 2013.

Std.D=Standard Deviation

果実重量に対する搾汁率およびアリルに対する搾汁率において，国産と輸入品に有意差（$p<0.05$）が認められた。

2．果汁のBx，滴定酸および最大吸収波長

結果はTable 3 に示した。収穫果実の果汁中のBxは平均値で17を示し，他の果実に比較しても低い値ではない[13]。しかも果皮の外観色から未熟期と適熟期と概ね分けて収穫したが，最も低くても14.5であり，標準偏差値からみても熟期の差異が大きく影響していないと考えられる。収穫期間が１か月間の差異はあってもわずかに10月下旬に18まで上昇したものの，その差は平均値を高く超えることはなかった。輸入果実は，果実の外観および形態と，輸入業者の情報から世界で最も普及しているワンダフル種と考えられるが，店頭段階でも収穫ザクロとほぼ同様であった。有機酸はその組成が品種によって大差があることから[14)~17)]，まず滴定酸度として示した。収穫果実は0.7mℓ前後で，輸入果実の1.9mℓとは大きな差異が認められた。しかも輸入果実のほうがその変動は大きかった。ザクロのアリルは収穫期になると赤色色素が急激に蓄積してくるので，最大吸収波長を確認した。両者の比較では６nmの差異しかなく，収穫果実のほうがややピンク系が強いことがわかった。この果汁の色素量を最大吸収波長の強さで比較すると，一部を除くと圧倒的に輸入果実の色素量の多いことがわかった。今回当初果皮の赤色度合で熟期を判定しようとしたが，成分的には明らかに相関がみられなかったので，本報では収穫果実の場合，便宜的に0.300を目安とし，それ以下を未熟期と判断して分類した。その結果26点中８果実が未熟期に含まれた。しかしながら，Bxからはこれを裏づけるような数値は得られなかった。Tukey検定では，最大吸収波長および最大吸収値並びに滴定値のみに収穫果実と輸入果実に有意差（$p<0.05$）が認められた。

3．糖，有機酸およびアミノ酸組成

以上の結果から，収穫果実の未熟期，適熟期および輸入果実から４点を選択し，その果汁を混合して糖と有機酸組成を調べ，Table 4 に示した。糖組成はグルコースとフルクトースのみで，他の糖は検出されず，イチゴ，メロン，ブドウ等と同様な還元糖型の中の等量型に分類された[17]。いずれも果糖がやや多いのが特徴である。含量は果実の中では多い部類に入ると考えられ[13]，収穫果実のほうが高い傾向であった。有機酸組成は，両者で大きな違いがあり，収穫果実はシュウ酸が最も多く，輸入果実はそのほとんどがクエン酸であった。収穫果実には少量のクエン酸と微量のリンゴ酸が検出され，輸入果実にはシュウ酸は検出されず，微量のリンゴ酸が含有されていたことから，両者に特徴的な差異がみられた。次に主要遊離アミノ酸組成をTable 5 に示した。25種類のアミノ酸が検出されたが，１mg%以上含まれているアミノ酸は18種類であった。グルタミンが主要アミノ酸であり，次いでセリン，アスパラギン酸等である。果実のアミノ酸分類からはグルタミン系果実に入る[18]。アミノ酸量は多くはなく，わずかではあるが，サルコシンが含まれていることが特徴的であると思われた。

4．全ポリフェノールおよびプニカリンとプニカラジン含量

植物のポリフェノール成分の加水分解型タンニンの中で，ザクロに特有に存在するエラジタンニンとしてプニカリンとプニカラジンの存在が知られており[19]，これら

Table 3 Characteritics of pomegranate juice

	Domestic[1)]				Imported[2)]				tukey test
	Average	Maximum	Minimum	Std.D	Average	Maximum	Minimum	Std.D	1) and 2)
Bx	17	18.3	14.5	0.9	17.3	18.5	15.5	0.8	
Titratable value(ml/ml juice)*	0.73	0.85	0.55	0.07	1.92	2.7	1.2	50.52	$p<0.05$
Max absorption (nm)	521	524	518	1.3	515	516	514	0.8	$p<0.05$
Max absorbance**	0.532	1.439	0.069	0.431	2.6	3.525	1.7	0.832	$p<0.05$

Domestic fruits (n = 26) were harvested three times on September 24 as well as October 16, and 22 in 2012. Imported fruits (n = 10) were purchesed from supermarket in Osaka in October and November of 2012 and January of 2013. Std.D=Standard Deviation. *Value obtained in 0.1N NaOH. **Intensity of absorbance at maximum (Max) absorption measured in the juice.

Table 4 Sugar and organic acid compositions in pomegranate juice

Maturity	Sugar (g/100g juice)			Organic acid (g/100g juice)			
	Glucose	Fructose	Total	Citric	Oxalic	Malic	Total
Immature	7.62	8.11	15.73	0.14	0.58	0.06	0.78
Ripe	9.25	9.63	18.88	0.12	0.55	0.05	0.72
Imported	8.15	8.85	17	1.47	0	0.07	1.54

Analytical data were obtained from each mixed juice at two maturity levels. Measurements of immature fruit were taken at OD values <0.3 while measurement of ripe fruit were taken at OD values: >0.3.

Table 5 Major free-amino acid composition in pomegranate juice

	Immature	Ripe	Imported
	(mg/100mℓ)		
Phos-ser	0.7	0.8	1
Aspartic acid	15.9	10.1	14.5
Threonine	2.5	1.2	1.9
Serine	12.4	7.7	12.6
Asparagine	3	1.7	3
Glutamic acid	13.3	10.7	11
Glutamine	52.6	36.7	61.4
Serine	2		
Sarcosine	4.2	8.1	7.3
α-ABA	1.5	1.1	2.1
Valine	2.6	1.5	3.6
Methionine	2.5	1.5	1.9
Tyrosine	1.31	0.7	2.6
γ-ABA	2.7	1.41	0.5
Histidine	1.8	1.2	8.2
Lysine	2.2	1.2	1.7
Tryptophan	1	1.4	0.9
Arginine	12.6	5.9	4.4
Total	134.81	92.9	148.6

Sample conditions were the same as those indicated in Table 4

を含めた多様な機能性が評価されている。しかし，国内産ザクロについて網羅的に両成分を調査報告はいまだ見当たらない。そこで果汁中の全ポリフェノールおよびプニカリンおよびプニカラジンを調べた。結果はTable 6に示した。果汁中のポリフェノール含量としては比較的多く存在しているが，輸入果実のほうが高かった。一方収穫果実では全ポリフェノールはやや少ないもののプニカリンとプニカラジンは含まれており，いずれもプニカラジンのほうが多かった。今回用いた輸入果実には両者ともほとんど検出できなかった。本結果からのみ結論づけはできないが両成分とも未熟期に多い可能性がある。

考　察

日本のザクロは観賞用が中心で，商業流通は皆無と言ってよい。近年各地の農産物直売所に散見されるが，その品質調査等も全くされていない。こうした中で，スーパーマーケットの店頭では裂果の全くない大きさも揃ったザクロがみられるようになった。この理由としては消費者の目新しさを求める動きとザクロに多様な生理活性がみられ，諸外国ではその生産量や消費量が拡大していることがひとつの要因であろうと思われる。いまだに10年程前のエストロゲン作用の誤情報[8]も商業レベルでは影響があるものと思われる。

日本で植樹されているザクロの品種は遺伝的・系統的な分類は皆無で，種苗業者の品種名をそのまま用いているところもある。今般用いた15年生のザクロ樹も品種名は定かではないが，日照量も十分確保され，樹体の成長や樹勢も良好であり，花の着果や果実成長も良好でザクロとしては標準的な果実であることから分析対象として選択した。輸入ザクロの多くはアメリカから輸入されたものであり，その形態的特徴と現地品種の多くが世界で最も多く栽培されている品種‘ワンダフル’と考えられるが，これを輸入果実として比較した。収穫ザクロ樹も開花後多量に着生する花の摘花を十分行っていないので，大きさにはバラツキが生じているものと考えられる。外国産の商業栽培では，300～500g超に成長する[16),20)]ものが多く，品種による差の大きいことも考えられる。しかし，Table 3に示したように果実重に対するアリルの比率，果汁の搾汁率およびアリルの搾汁率は，果実の大きさにはあまり影響はされず，バラツキも少ないことがわかった。ただ，搾汁率は輸入果実のほうが高いことはtukey検定からも明かである。RAJASEKARら[21)]のアメリカ産では，ブレンダーで42%，圧搾機で38%，FAWOLら[22)]の南アフリカ産では未熟期で30～42%，やや未熟期で44～51%，完熟期で55%である。熟期が進むに従って搾汁率は上昇しており，用いた収穫果実と輸入果実も含め，概ねこの範疇に入ると考えられる。

Bxはいずれも平均値として17で（Table 3），外国産でも収穫適期では，14～17[16),20),21),23)]であることから，今回用いたザクロはやや高いレベルにあるのではないかと考えられる。赤色系の色素は基本的にCyanidin系色素[22)]であり，その濃度は品種や熟期によって大きく異なる。収穫果実はすべて520nm付近に集中し，輸入果実は少し低波長にシフトしているが，ほぼ同様と言える。ただ，その吸光度には大差が認められ，輸入果実は濃赤色を呈し，収穫果実はピンク系で，外観色は日本人の嗜好性に合致しているのではないかと思われた。呈味成分のひとつである糖組成は，外国産も含めてブドウ糖と果糖が主要構成糖であり，その比率は品種によって異なっており，微量のショ糖やマルトースを含むものもある[14)]。一方有機酸組成は品種により組成および含量に大差がある。主要酸としてクエン酸[14)]，リンゴ酸[14),17)]，キナ酸[17)]が占める品種があり，また，シュウ酸が主要酸に近い品種[15)]もある。また，含量にも大差がある等極めて多様である。その他，微量の酒石酸，コハク酸，フマール酸も検出さ

Table 6 Total polyphenol, punicalin and punicalagin in pomegranate juice

Maturity	Total polyphenol (mg%)	Punicalin (mg%)	Punicalagin (mg%)
Immature	95	5	10
Ripe	117	nd	7
Imported	194	nd	nd

Sample conditions were the same as those indicated in Table 4. nd=Non detection

れている[14]。こうしたことから，ザクロは0.3%程度の酸含量をSweet系，それ以上で0.7～0.8%程度までをSour sweet系，それ以上の含量はSour系として酸の含量から分類している[14]。Sour系の果実は酸含量としては，２%を越えるものが多く，クエン酸とリンゴ酸が主要構成酸を占めるが，両者を比較すると，圧倒的にクエン酸が主要有機酸の場合が多い。シュウ酸はいずれの品種にも認められ，Sweet系の場合，含有率が高くなるものの主要酸にまでには至らない[15]。こうしたことから，収穫ザクロの有機酸組成は相当異なる品種系統の可能性もある。輸入果実は，クエン酸が主要酸であり，諸外国のデータと概ね一致する。

このようにシュウ酸を主要有機酸とするザクロは，外国産品種とは異なることも十分予測され，更なる幅広い調査によって果実の評価を行うことが必要であると同時に遺伝子レベルでの品種分類が今後必要と考えられる。

遊離アミノ酸組成は特に特徴がある組成とは言い難いが，筆者等の分類からはグルタミン系果実[18]である。この加水分解物であるグルタミン酸，あるいはアスパラギン酸も比較的多く，これらが主要アミノ酸と考えられる。収穫果実と輸入果実を比較して量的には差異はあるものの，その組成に顕著な差はない。少量アミノ酸としてはγ―ABA，アルギニンが比較的多く，果実にはあまりみられないサルコシンが含有されているのが特徴と言える。

近年世界的にザクロの機能性が着目されているが，これまでその主要ポリフェノールとしてエラジタンニン中のプニカリンとプニカラジンの存在がある[19]。この２種類のポリフェノールはザクロに特徴的に含まれている。今回その存在について確認したところ，Table 6 に示したとおりである。収穫果実ではいずれもプニカラジンが多く，プニカリンは含まれていないものもみられた。一方，今回用いた輸入果実にはいずれも検出されなかった。ザクロのポリフェノール含量は他の果実に比較して高いレベルにあるが[24]，プニカリンおよびプニカラジンの含量は品種によって大差があることが知られている[9]。両者のうちプニカラジンは抗酸化活性と高い相関があると報告されている[19]。したがって，プニカラジン含量がザクロの利用適性に関する選択の指標として重要と考えられる。また，最近ザクロに新しいエラジタンニンオリゴマーが分離・同定[25]された他，機能性評価のニュース等が発表され，ザクロポリフェノールの抗糖化作用[26),27)]等多様な健康機能性が明らかにされつつある。

本報告では，品種が特定できないとはいえ，国内で植樹され，成長が順調なザクロ樹を対象に品質および成分調査を行い，最も多く輸入されている果実と比較した結果，山梨県産ザクロの特徴の一部を明らかにすることができた。今後はさらに幅広い多くのザクロ樹を調査すると共に遺伝子レベルでの品種特定や選抜を行うことにより，日本に適した嗜好性を有したザクロを育成する必要がある。

要　約

国内で植樹されているザクロとして，山梨県産ザクロとその果汁を用い，輸入果実と比較し，その理化学的特性を調べた。

① 平均値としておよそ150g/個，果実に対するアリル率と搾汁率はそれぞれ60%および42%であり，アリルに対する搾汁率は70%であった。輸入果実は400 g/個であり，その他の特性値は採取果実よりわずかに高かったが，重量による影響は少なかった。

② Bxは17，糖組成はグルコースとフルクトースのみで輸入果実と同様であり，わずかにフルクトースの比率が高かった。適定酸度は輸入果実と大差があり，輸入果実が顕著に高く，有機酸組成は前者がシュウ酸，後者はクエン酸が主要有機酸であった。

③ 遊離アミノ酸は，グルタミンが主要アミノ酸で，次いでグルタミン酸およびアスパラギン酸であった。輸入果実も同様であり，果実にあまり含まれないサルコシンが含まれていた。

④ ポリフェノール含量は果実の中では多く，ザクロに特徴的なプニカリンとプニカリンが含まれていたが，国産果実のみに検出された。

本研究は平成24年度農林水産省「緑と水の環境技術革命プロジェクト事業」の補助を受けて実施したものであり，一部は平成25年度日本食品保蔵科学会年次大会（山形県鶴岡市）において発表した。

文　献

1）Smith, R. E. : Chapter I, Introduction, Pomegranate - Botany, Postharvest Treatment, Biochemical Composition and Health Effect（Nova Science publishers, New York）, p. 1（2014）

2）佐藤公一他編：その他の落葉果樹類，果樹園芸大事典（養賢堂，東京），pp. 1036～1037（1984）

3）内林政夫：ザクロ：語源と漢土への到来，薬史学雑誌，**37**，152～154（2002）

4）森崎順三：柘榴全書（嵩山房，東京），p. 380（1934）

5）農業世界編輯局：柘榴の作り方（博文館文庫，東京），p. 112（1942）

6）村田憲司・村田圭司：花もの盆栽（保育社，大阪），pp. 25～33（1976）

7）日本園芸農業協同組合連合会編：平成27年度版果樹統計，p. 31，32，36（2014）

8）国民生活センター記者発表用資料：自主調査テストNo. H12－1，「エストロゲンは本当に含まれているの？ザクロを使った健康志向食品」，平成12年４月６日発表

9）Yuan, Z., Wilkins, E. and Wang, D. : Proceedings of the Third International Symposium on

Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits (*ISHS, Bergium*), p. 493 (2015)
10) 大森快庵：版本地誌大系12「甲斐名所図会」甲斐叢記（臨川書店，京都），p. 43（1996）
11) Folin, O. and Denis, W.: On phosphotungstic - phosphomolybdic compounds as color reagent, *J. Biol. Chem*., **12**, 239～243（1912）
12) Zhang, Y., Wang, D., Lee, R., Henning, S.M. and Heber, D.: Absence of pomegranate ellagitannins in the majority of commercial pomegranate extracts : Implications for standardization and quality control, *J. Agric. Food Chem*., **57**, 7395～7400（2009）
13) 小宮山美弘・原川　守・辻　政雄：果実類の熟度と貯蔵条件に基づく糖組成の特徴，食化工，**7**, 522～529（1985）
14) Mergarejo, P., Salazar, D.M. and Artes, F.: Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits, *Eur Food Res Tecnol*, **211**, 185～190（2000）
15) Cam, M., Hisil, Y. and Durmaz, C.: Characterization of Pomegranate juices from ten cultivars grown in Turkey, *International of Journal of Food Properties*, **12**, 388～395（2009）
16) Legua, P., Melgarejo, P., Martinez, J., Martinez, R. and Hernandez, F.: Evaluation of Spanish pomegranate juices : organic acid, sugars, and anthocyanins., *Intn. J. Food Pomeric*, **15**, 481～494（2012）
17) Legua, P., Melgarejo, P., Abdelmajid, H., Martinez, J., Martinez, R., Ilham, H., Hafida, H., and Hernandez, F.: Total phenols and antioxidant capacity in 10 Moroccan pomegranate varieties, *J. Food. Sci*., **71**, c115～c120（2012）
18) 小宮山美弘・辻　政雄：果実類の熟度と貯蔵条件に基づくアミノ酸組成の特徴，山梨県食品工業指導所報告，**18**, 22～31（1986）
19) Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M. and Amir, R.: Antioxidant Activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions, *J. Agric. Food Chem*, **55**, 9559～9570（2007）
20) Martinez, J.J., Hernadez, F., Abdermajid, H., Legura, P., Martinez, R., Amine, A. and Mergarejo, P.: Physico - chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco : Processing and fresh market apitudes, *Scientina Horticulturae*, **140**, 100～106（2012）
21) Rajasekar, D., Akoh, C.C., Maetino, K.C. and Maclean, D.D.: Physico-chemical characteristics of juice extracted by blender and mechanical press from pomegranate cultivars grown in Gorgia, *Food Chemistry*, **133**, 1383～1393（2012）
22) Fawol, O.A., Opara, U.L.: Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. 'Bhagwa', *South African Journal of Botany*, **85**, 23～21（2013）
23) Borochov-Neori, Judeinstein, H., Tripler, E., Harari, M., Greenberg, A., Shomer, H. and Holland, D.: Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit, *J. Food Comp. Anal*., **22**, 189～195（2009）
24) 木村英生・長沼孝多・小嶋匡人・小松正和・恩田匠・辻　政雄：山梨県産果実の総ポリフェノール含量とそのDPPHラジカル消去活性，山梨県工業技術センター研究報告，**22**, 59～63（2008）
25) Ito, H., Li, P., Koreishi, M., Nagatomo, A., Nishida, N., and Yoshida, T.: Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products, *Food Chemistry*, **152**, 323～330（2014）
26) 日経産業新聞，7月20日号（2012）
27) 健康産業新聞，8月1日号（2012）

（平成27年11月16日受付，平成28年3月24日受理）

イトヨリダイ冷凍すり身のゲル形成能低下の要因とプロテアーゼ阻害剤および大豆ホエーの効果について

野口治子[*1§]・岡崎敏樹[*2]・簑島良一[*2]
若宮英倫子[*1]・辻井良政[*1]・髙野克己[*1]

＊1　東京農業大学応用生物科学部
＊2　日清オイリオグループ(株)中央研究所

Factors Decreasing the Gel-forming Ability of Threadfin Bream Surimi and Effect of Soybean Whey Addition

NOGUCHI Haruko[*1§], OKAZAKI Toshiki[*2], MINOSHIMA Ryouichi[*2], WAKAMIYA Eriko[*1], TSUJII Yoshimasa[*1] and TAKANO Katsumi[*1]

＊1　*Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo　156-8502*
＊2　*Central Research Laboratory, The Nisshin Oillio Group, Ltd., 1-Banchi, Shinmei-cho, Yokosuka, Kanagawa　239-0832*

Factors that deteriorate the quality of the fish paste products containing threadfin bream and the ability to suppress these effects were investigated. The myosin heavy chain (MHC) in the gel of threadfin bream surimi was degraded by heating from 40 to 60℃. The gel strength of threadfin bream was softer than that of Alaska pollack. The protease activity in threadfin bream surimi was 799 mU/g, which was approximately 6-fold higher the activity of Alaska pollack surimi. One trypsin-like serine type protease and two metalloproteases were detected using threadfin bream surimi. MHC degradation in the gel was suppressed by the addition of protease inhibitor. These results indicate that the decrease in the gel-forming ability in threadfin bream surimi was caused by internal protease that decomposed MHC. The addition of the trypsin inhibitor (TI) and soybean whey containing TI was effective for suppressing these effects.

(Received Feb. 3, 2016；Accepted Apr. 4, 2016)

Key words：*Nemipterus virgatus, surimi, myofibril-bound serine protease, trypsin inhibitor*
イトヨリダイ，すり身，筋原線維結合型プロテアーゼ，トリプシンインヒビター

水産練り製品の原料魚には，一般的にスケトウダラの冷凍すり身が利用されている。スケトウダラは日本近海で漁獲量が大幅に減少したため，そのすり身の国内生産量は減少し，その代替品として東南アジアより輸入したイトヨリダイの冷凍すり身が用いられるようになった[1)]。しかし，イトヨリダイのすり身は，加工時の物性低下が問題となっている[2)]。

この物性低下の原因として，すり身に内在するプロテアーゼの作用による「戻り」現象であることが知られている[3)]。戻りは，原料すり身を副原料と混合した後の加熱工程において，緩慢な温度上昇において50～60℃の温度帯を通過する際，魚肉タンパク質中のミオシン重鎖が分解されることで，製品の弾力性が大きく弱化する現象であり，さまざまな魚種で報告されている。

そこで，本研究ではイトヨリダイのすり身のゲル形成能低下の要因とメカニズムを理解し，その抑制法を提案することを目的として検討を行ったので報告する。

実験方法

1．実験材料

イトヨリダイ（*Nemipterus virgatus*）の冷凍すり身（陸上加工，KA級）およびスケトウダラ（*Theragra*

＊1　〒156－8502　東京都世田谷区桜丘１－１－１
＊2　〒239－0832　横須賀市神明町１番地
§　Corresponding author, E-mail：h3noguch@nodai.ac.jp

chalcogramma）の冷凍すり身（船上加工，KA級）を試料として用いた。大豆ホエーの調製は以下の方法にて行った。脱脂大豆粉（ソヤフラワーA，日清オイリオ社製）10ｇに純水90mℓを加え溶解させた後，30%酢酸溶液にてpH4.0に調整し1時間静置した。遠心分離（8,000 rpm，室温，10分間）後の上澄液を5M水酸化ナトリウム溶液にて，pH7に中和し大豆ホエー画分として用いた。

2．すり身ゲルの調製と物性の測定

解凍後粗ずりしたすり身1,000ｇに食塩30ｇ，馬鈴薯デンプン100ｇおよび大豆ホエー3 ｇを分散させた水400 gを添加し，本ずり（10分間）を行った。これをケーシング（塩化ビニリデン製）に充填し，92℃で40分間加熱したもの（コントロール）と60℃で30分間加熱後に92℃で40分間加熱したもの（戻り条件）を調製し，それぞれ冷却後に物性を測定した。ゲル硬さはテクスチャーアナライザーTA.XT.plus（Stable Micro System社製）を用いて測定した。球形プランジャー（直径8㎜）を1㎜/secで侵入させたときの破断荷重（g）および凹み（㎜）を測定し，その積（g・㎜）をゼリー強度とした。

3．ミオシン重鎖のSDS-PAGE[4)~8)]

冷凍すり身5ｇに50mMトリス・塩酸緩衝液（pH8.0，3%塩化ナトリウム）20mℓを加え，ワーリングブレンダーにて破砕（4℃，3分）した。このすり身液3mℓを小試験管に入れ湯浴中で30～80℃の各温度で2時間加温しゲルを調製した。

ゲル1ｇに50mMリン酸緩衝液（pH7.5，8M尿素，10% 2－メルカプトエタノール，2% SDS）5mℓを加え，一晩放置し可溶化したものを電気泳動用の試料とした。SDS-PAGEはLaemmli法[9)]にて行った。電気泳動はAE－6500ラピダス・ミニスラブ電気泳動装置と泳動ゲルにe-PAGEL（T＝7.5%），分子量マーカーとしてXL-Ladder High（いずれもATTO社製）を用いて行った。泳動後のゲルは0.125%クマシーブリリアントブルー（CBB）溶液にて染色し，タンパク質バンドパターンを比較した。

4．筋原線維結合型プロテアーゼ（MBP）の抽出，活性測定およびその阻害[10),11)]

（1）MBPの抽出　冷凍すり身10gに25mMリン酸緩衝液（pH7.5）40mℓを加え，ワーリングブレンダーにて破砕（4℃）した後，遠心分離（16,000g，10分，4℃）により沈殿を回収し，この操作を4回繰り返した。洗浄したすり身から酵素を抽出するために0.5Mの塩化カリウムを含む25mMリン酸緩衝液（pH6.4，1mM塩化マグネシウム，5mM $Na_4P_2O_7$）80mℓを加え，ワーリングブレンダーにて破砕した。さらに0.5%（w/w）となるようツイーン80を加え撹拌（4℃，1時間），溶解させた後，遠心分離（16,000g，10分，4℃）にて得られた上澄液に対して硫安塩析（40%飽和）を行った。これを遠心分離（16,000g，10分，4℃）し，得られた上澄液に対して硫安塩析（80%飽和）を行い，遠心分離（16,000g，10分，4℃）して沈殿を回収した。沈殿物は少量の10mMリン酸緩衝液（pH7.5）で溶解後，同緩衝液にて透析し，得られた溶液をMBP粗酵素液とした。

（2）プロテアーゼ活性の測定

1）フルオレセインチオカルバモイル（FTC）カゼイン法：96穴ホワイトプレート（NUNK社製）に500ng/mℓのFTC－カゼイン（Thermo Fisher Scientific社）を10μℓ，0.2Mマックルベン緩衝液（pH7.0）20mℓ，酵素溶液を30μℓ添加し，37℃で1時間反応を行った。30%トリス溶液160μℓを加えて反応を停止させた後，蛍光強度プレートリーダー（Infinite® 200PRO, TECAN社製）にて蛍光強度を測定（励起波長485nm，蛍光波長535 nm）した。酵素力価が既知のトリプシン（SIGUMA社）を用い同様の活性測定を行い，試料との蛍光強度の比より酵素力価を算出した。

2）ザイモグラフィー法による検出[12)]：ゼラチンを含むゲルを用いてプロテアーゼの活性染色を行った。分離ゲルにゼラチン（0.3mg/mℓ）を含むゲルに酵素溶液（18 mU）を添加し，SDS-PAGE（T＝10%）をLeammli法にて行った。マーカーはXL-Ladder Broad（ATTO社製）を用いた。泳動後のゲルは2.5%トライトンX溶液による置換（室温，30分）を2回行い，タンパク質をリフォールディングした。ゲルを50mMトリス・塩酸緩衝液（pH8.0）にて平衡化した後，0.2M塩化ナトリウムを含む50mMトリス・塩酸緩衝液（pH8.0，5mM塩化カルシウム，0.02%アジ化ナトリウム）に浸漬し，酵素反応（37℃，18時間）を行った。反応後のゲルは50%メタノール－10%酢酸溶液と純水の順で振とうした後，CBB溶液にて染色し，脱色後のゲルを観察した。

（3）MBP活性に対する阻害剤の影響　ザイモグラフィー法における反応液にセリンプロテアーゼを阻害するフッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF），金属プロテアーゼを阻害するEDTAおよびo-フェナントロリン，チオールプロテアーゼ阻害剤のN－エチルマレイミド（NEM）およびアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤のペプスタチンを各終濃度1mMを加え反応を行った。また，トリプシン阻害剤のトリプシンインヒビター（TI，大豆）であるKunitz型TI（KTI）とBowman-Birk型TI（BBI）を0.01または0.1mg/mℓ，加え同様に試験した。

結果および考察

1．イトヨリダイとスケトウダラのすり身ゲルの物性比較

両すり身よりゲルを調製し，そのゼリー強度を測定したところ，コントロールにおいてイトヨリダイは4,095 g・㎜，スケトウダラは13,133g・㎜で，イトヨリダイはスケトウダラの約1/3の強度であった。両すり身を戻り加熱した場合，イトヨリダイのゼリー強度は626g・㎜，スケトウダラは2,036g・㎜であり，コントロールに比べゲル強度の低下率は約15%と同程度であった。

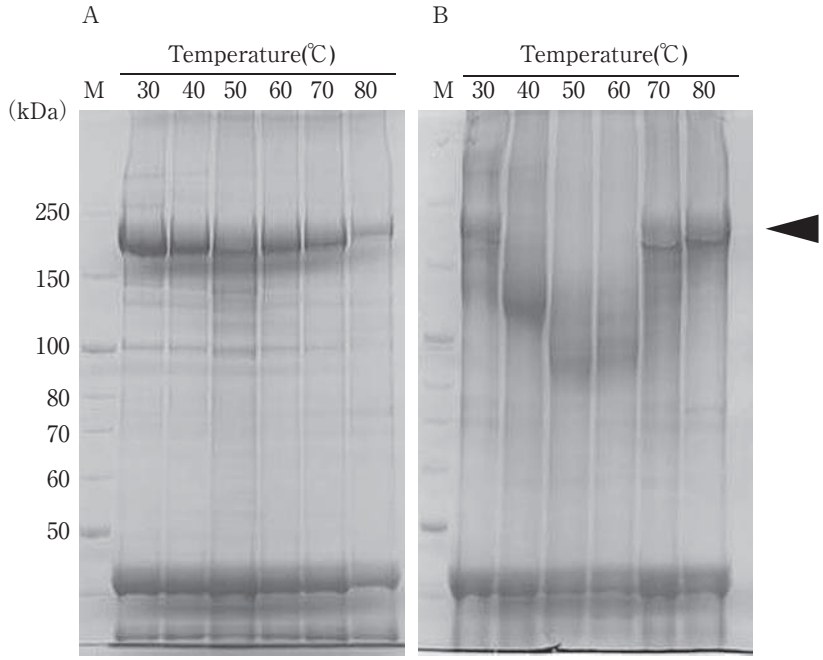

Fig. 1　Effect of heating on actomyosin of surimi

M; molecular marker. Triangular shape indicated myosin heavy chain. SDS-PAGE (T=7.5)

2．イトヨリダイとスケトウダラすり身の加熱ゲルにおけるミオシン重鎖に及ぼす加熱温度の影響

30～80℃の各温度にて加熱し調製したゲルをSDS-PAGEに供し，加熱温度とミオシン重鎖の変化について，イトヨリダイとスケトウダラを比較した。スケトウダラにおいては，50℃においてはミオシン重鎖のバンドがやや薄くなり，スメアなバンドが観察されたが，その他の温度帯においてはミオシン重鎖のバンドに変化はみられなかった（Fig. 1－A）。イトヨリダイでは30，70および80℃ではミオシン重鎖のバンドに違いはみられなかったが，40～60℃において，ミオシン重鎖の200kDa付近のバンドが消失し，低分子量側にスメアなバンドが検出された（Fig. 1－B）。戻り条件におけるイトヨリダイのすり身ゲルの強度低下は，プロテーゼによってミオシン重鎖が分解されることによって惹起されたものであることが示唆された。一方，スケトウダラでは，戻り条件におけるゲル強度の低下とミオシン重鎖の分解との関連はみられなかった。

3．イトヨリダイの筋原線維結合型プロテアーゼ（MBP）の検出と性状

各すり身より調製したMBPのプロテアーゼ活性量を測定した。その結果，スケトウダラのプロテアーゼ活性は144mU/すり身1gであったのに対し，イトヨリダイは799mU/すり身1gとなり，イトヨリダイは約6倍高いプロテアーゼ活性を示した（Fig. 2）。

活性阻害剤を加え，ゲルを作成したところ，PMSFおよびEDTAの添加によってミオシン重鎖の分解は抑制された（Fig. 3）。一方，NEM，ペプスタチン，o－フェナントロリンでは分解は抑制されなかった。ミオシン重鎖の分解に，セリンおよび金属プロテアーゼの関与が明らかになった。なお，o-フェナントロリンでミオシン重鎖の分解が阻害されなかったのは，添加量が少なかったためと考えられた。

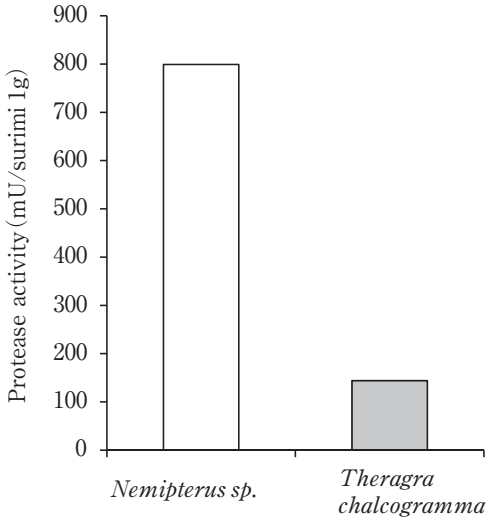

Fig. 2　Protease activity of crude enzyme from surimi

イトヨリダイのすり身ゲルの物性がスケトウダラのそれに比べて劣るのは，イトヨリダイでは40～60℃においてミオシン重鎖の低分子量化がみられたこと，MBP活性値がスケトウダラに比べ高いことから，これらのプロテアーゼがミオシン重鎖を分解し，その結果イトヨリダイすり身ゲルの強度が低下したためと推察された。

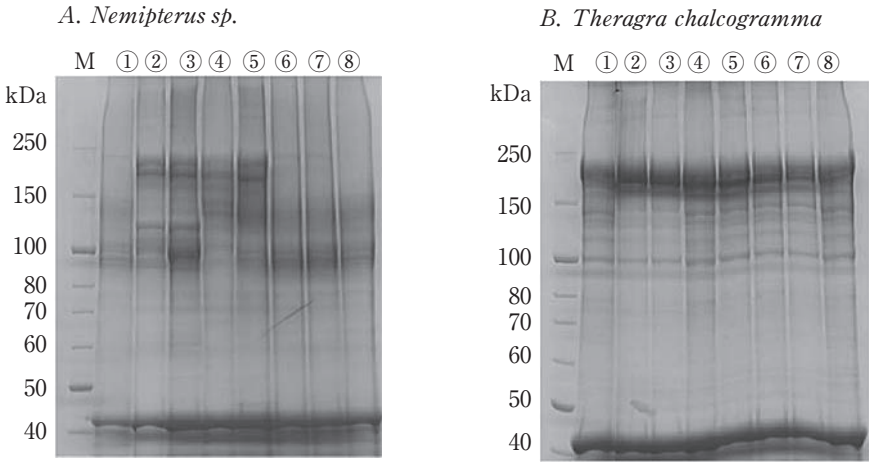

Fig. 3　Effect of various inhibitor on MHC degradation from surimi

① non-additive, ② KTI, ③ BBI, ④ PMSF, ⑤ EDTA, ⑥ pepstatin, ⑦ o-phenanthroline, ⑧ NEM. SDS-PAGE was done, T＝7.5%. Enzyme reaction was carried out on 50℃.

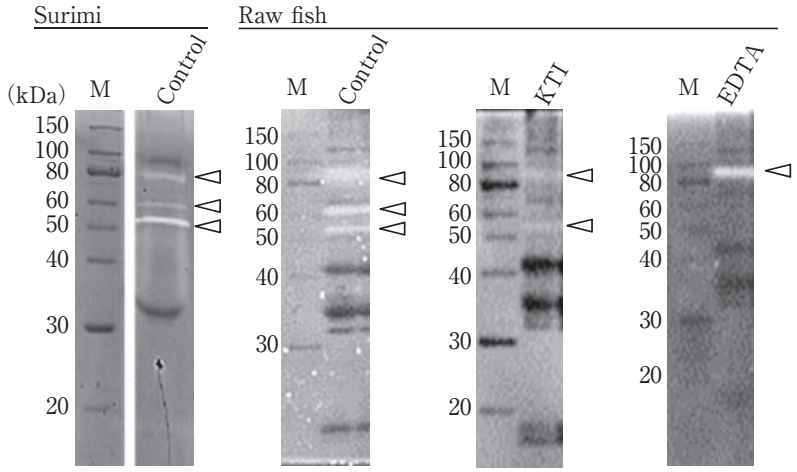

Fig. 4　Effect of inhibitors on protease activity from surimi and raw fish meat of golden threadfin bream

M; molecular marker. Triangular shape indicated an activation band of protease. Control was not contained inhibitor.

MBPをザイモグラフィーに供した結果，イトヨリダイでは50，60および80kDa付近に3本の活性バンドが検出された（Fig. 4）。また，イトヨリダイ鮮魚より調製したMBPにおいても同様の位置に活性バンドを確認した。KTIの添加によって，60kDa付近のバンドが消失した。また，EDTA添加により50kDaおよび60kDaのバンドが消失した。これらのことより，イトヨリダイ冷凍すり身にはセリンプロテアーゼ（トリプシン）1種，金属プロテアーゼ2種の少なくとも3種のMBPが存在することを確認した。

4．イトヨリダイすり身のミオシン重鎖の分解に関与するセリンプロテアーゼと金属プロテアーゼ

ミオシン重鎖の分解に関わるMBPを明らかにするため，各阻害剤を添加しすり身ゲルを調製し，SDS-PAGEでミオシン重鎖の挙動を調べた。その結果，イトヨリダイすり身のみではミオシン重鎖の分解が確認されたが，PMSFおよびEDTA添加ではミオシン重鎖の分解はみられなかった（Fig. 3）。さらに，Fig. 4にてイトヨリダイ鮮魚より分離したMBPの活性がKTIおよびBBIにて阻害されたことから，同阻害剤を添加したゲルをそれぞれ調製したところ，ミオシン重鎖の分解を阻害することを確認した（Fig. 3）。これらの結果から，イトヨリダイすり身から調製した加熱ゲルにおける低ゲル強度の要因は，トリプシン様のセリンプロテアーゼと金属プロテアーゼであると推察された。

5．大豆ホエーによるイトヨリダイすり身ゲルのミオシン重鎖分解の抑制

先の結果によって，MBPであるトリプシン様のセリンプロテアーゼと金属プロテアーゼの作用を阻害することでイトヨリダイすり身の加熱ゲルの物性が改善されることが明らかになった。

そこで，トリプシンの阻害剤であるTIを含有する大豆ホエー[13),14)]の効果について検討を行った。イトヨリダイすり身に大豆ホエー（4%w/w，TI活性2.3×10^3U/

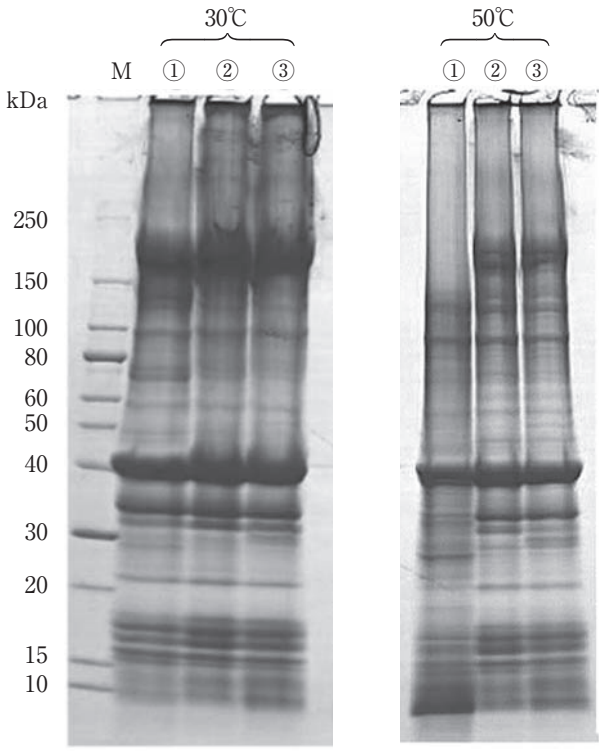

Fig. 5　Effect of soybean whey on MHC degradation from surimi

① non-additive, ② KTI, ③ soybean whey. TI activity of soybean whey was equal to that of 1mM KTI. SDS-PAGE was done, T＝7.5%. Enzyme reaction was carried out on 30℃ and 50℃.

g）を加え加熱ゲルを調製し，SDS-PAGEにてミオシン重鎖の挙動を検討した。Fig.5に示したように，大豆ホエーの添加により，KTIと同様に50℃におけるイトヨリダイのミオシン重鎖の分解が効果的に阻害された。TI添加の結果から，イトヨリダイのミオシン重鎖分解は主にトリプシン様セリンプロテアーゼの作用であることが明らかになった。

以上のことから，イトヨリダイすり身のゲル物性を改良するためには，すり身に含有されるトリプシンの作用を阻害することが有効であり，TIおよびTIを含有する大豆ホエーの利用が効果的であった。

要　約

練製品の原材料であるイトヨリダイの冷凍すり身を用いて，製品の品質を大きく低下させる要因とその抑制について検討した。イトヨリダイすり身ゲルを40～60℃で加熱するとミオシン重鎖の低分子量化が確認された。プロテアーゼ活性は，低分子量化が弱かったスケトウダラに比べ，イトヨリダイでは6倍高い値を示し，そのゲル物性は柔らかかった。イトヨリダイすり身にトリプシン様セリンプロテアーゼ1種，金属プロテアーゼ2種を検出した。これらのプロテアーゼの作用を阻害するとミオシン重鎖の分解は抑制された。

以上のことより，イトヨリダイすり身の加熱ゲルの低ゲル強度現象は，内在するプロテアーゼによるミオシン重鎖の分解が要因であり，特にTIやTIを含む大豆ホエーの添加が効果的に抑制することを確認した。

文　献

1）水産庁ホームページ（http : //www.jfa.maff.go.jp/j/policy/kihon_keikaku/siryou/pdf/031302-06.pdf）

2）劉　達嘉・加納　哲・丹羽栄二：スケトウダラ塩すり身の坐りに及ぼすシステインプロテアーゼ阻害剤の影響，日水誌，**62**（2），275～279（1996）

3）須山三千三・三輪勝利：水産加工（建帛社，東京），p.157（1986）

4）Suwansakornkul, P., Itoh, Y., Hara, S. and Obatake, A. : The Gel-Forming Characteristics of Lizardfish, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1029～1037（1993）

5）Suwansakornkul, P., Itoh, Y., Hara, S. and Obatake, A. : Indentification of Proteolytic Activities of Gel-Degrading Factors in Three Lizardfish Species, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1039～1045（1993）

6）加藤　登・及川　寛・安永廣作・矢野　豊・北上誠一・新井健一：*Pacific Whiting*冷凍すり身のゲル化に伴って起こる筋原繊維タンパク質の変化と牛血漿粉末添加の効果，東海大学紀要海洋学部，**1**，51～57（2003）

7）野村　明・伊藤慶明・宗園貴仁・小畠　渥：土佐湾産魚種の戻り発現に及ぼす水晒しの影響，日水誌，**59**，857～864（1993）

8）今野久仁彦・今村浩二：スケトウダラ肉糊の加温中に生成する150および70kDa成分の同定とその存在状態，日水誌，**66**，869～875（2000）

9）Laemmli, UK. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. **227**（5259），680～685（1970）

10）山本晃司・小出良美，戻りに関与するプロテアーゼのイトヨリダイ筋肉からの分離精製とその性質について，愛知県食品工業技術センター年報，**40**，19～24（2000）

11）Guo, C., Cao, M.-J., Liu, G.-M., Lin, X.-S., Hara, K. and Su, W.-J. : Purification, Characterization, and cDNA Cloning of a Myofibril-Bound Serine Proteinase from the Skeletal Muscle of Crucian Carp（*Carassius auratus*）. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1510～1516（2007）

12）Felberg, H. S., Hagen, L., Slupphaug, G., Batista, I., Nunes, M. L., Olsen, R. L. and Martinez, I. : Partial characterisation of geltinolytic activities in

herring (*Clupea harengus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) possibly involved in post-mortem autolysis of ventral muscle, *Food Chemistry*, **119**, 675～683 (2010)

13) SOBRAL, P. A., PALAZOLO, G. G., and WANGNER, J. R.: Effect of water content on thermal behavior of freeze-dried soy whey and their isolated protein. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 3950～3956 (2011)

(平成28年 2 月 3 日受付, 平成28年 4 月 4 日受理)

トマトおよびカキ果実の成熟と軟化に関する分子生物学的研究

平成27年度日本食品保蔵科学会奨励賞

中 務　明*§

＊　島根大学生物資源科学部

Studies on Fruit Ripening and Softening in Tomato and Persimmon Based on Molecular Approach

NAKATSUKA Akira*§

＊　*Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Nishikawatsu 1060, Matsue, Shimane　690−8504*

Key words：*cell wall degrading enzyme, ethylene, expressed sequenced tag, on-tree softening*
エチレン，細胞壁分解酵素，発現配列タグ，樹上軟化

1．はじめに

トマトやカキはクライマクテリック型果実に分類され，後熟期に呼吸の一時的な増加と平行して，エチレン生成の顕著な増加がみられる。エチレンにより成熟そのものが促進され，内部成分（糖・有機酸）や軟化・肉質の変化が起こるため，貯蔵性の向上にとって，エチレン生成あるいはエチレン反応の抑制が品質維持に重要である。本研究では，トマトおよびカキ果実を用いて，果実の貯蔵性向上を目指した果実の成熟・軟化現象に対する分子生物学的解析を行った。特にエチレン生合成と細胞壁分解酵素に着目し，その動向を調査した。

2．エチレン関連遺伝子のフィードバック制御

果実は成熟中の多量なエチレン生成の有無あるいは外生エチレン処理への反応によりクライマクテリック型と非クライマクテリック型に分類される[1]。クライマクテリック型果実は，成熟開始までエチレンはほとんど生成されないが，成熟開始時に呼吸のクライマクテリック上昇に伴い，エチレン生成が促進される。エチレン生合成経路はS−アデノシルメチオニンを基質として，1−アミノシクロプロパン−1−カルボン酸（ACC）合成酵素（ACS）とACC酸化酵素（ACO）が働くことで合成され（図１），この２つの酵素がエチレン生成の律速段階となり，エチレン生成が調節されている[2]。またエチレン生合成はエチレン自身によるポジティブとネガティブの両方のフィードバック調節を受けていることが知られている[2]。ポジティブフィードバック調節は成熟果実や老化した花で行われているが，多量なエチレンを生成している果実において継続的に働いているかどうかは不明であった。そこでエチレン作用阻害剤（1−メチルシクロプロペン：１−MCP）を用いて，多量エチレン生成時においてポジティブフィードバック調節がACSとACOの遺伝子発現に対して行われているかを調査した[3]。成熟開始時に収穫したトマト果実では，エチレン生成・ACC含量・ACSおよびACO活性は熟度の進行とともに増加し，*ACS2*，*ACS4*と*ACO1*の発現も同様に変化した。これらの増加は1−MCP処理により大きく抑制されたことより，多量エチレン生成時においても強いポジティブフ

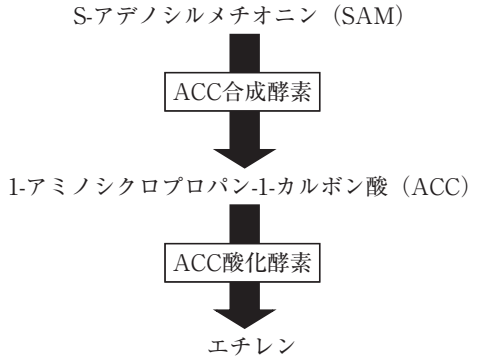

図１　エチレン生合成経路

＊　〒690−8504　島根県松江市西川津町1060
§　E-mail：nakira@life.shimane-u.ac.jp

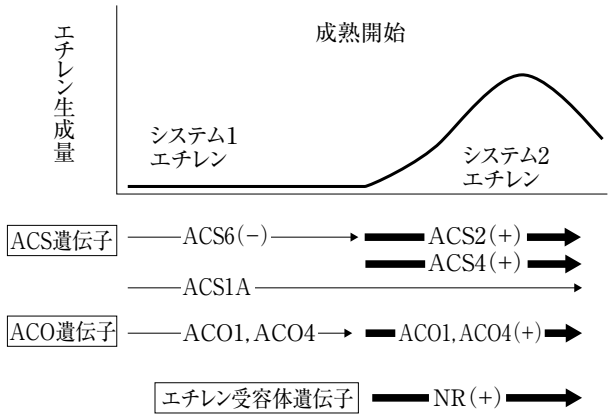

図2　トマト果実のエチレン生合成経路に対する内的フィードバック調節

（−）はネガティブフィードバック，（+）はポジティブフィードバックを示す

ィードバック機構がエチレン生合成を遺伝子転写レベルで調節していることが確認できた。

一方，クライマクテリック前の果実が生成する微量エチレン（システム１）と，成熟時に生成する多量エチレン（システム２）の２つのエチレン生成の概念が提唱されていたが[4]，ACSとACOの遺伝子発現との関連が明らかでなかった。そこでトマト果実の発育・成熟中に個々のエチレン生合成関連遺伝子がどのように関与しているかを調査した[5]。ACS遺伝子を発現解析したところ，発育期の微量エチレン生成に*ACS6*が，成熟期の多量エチレン生成に*ACS2*と*ACS4*が関与しており，これらのACS遺伝子はプロピレンおよび1−MCP処理への反応から，エチレンによる正反対のフィードバック制御を受けていることが示唆された（図２）。*ACS1A*の発現は，エチレンによる制御を受けず，未熟果実から成熟果実まで一定のレベルを維持した。また未熟果実から発現していたACO遺伝子*ACO1*と*ACO4*は，成熟の進行に伴いその発現が増加した。以上の結果は，微量なシステム１エチレンは自己抑制的，多量のシステム２エチレンは自己触媒的調節を受けており，特にACS遺伝子が重要であることが明らかになった（図２）。加えてエチレン受容体タンパク遺伝子*NR*が成熟果実から発現しており，エチレン感受性の変化がシステム２エチレン生成に関与していることが示唆された。

３．果実軟化と細胞壁分解酵素遺伝子発現

植物の１次細胞壁はセルロース繊維とペクチン・ヘミセルロースのマトリックス多糖類で構成されている。果実の軟化は細胞壁の修飾と関連する複雑な過程であり，これらの修飾はポリガラクツロナーゼ（PG）・ペクチンメチルエステラーゼ（PME）によるペクチン多糖類の主鎖に対する加水分解もしくは脱メチルエステル化，βガラクトシダーゼ（Gal）・αアラビノフラノシダーゼ（Arf）によるペクチンもしくはヘミセルロース多糖類の側鎖に対する加水分解が関与している[6]。

一方，研究開始時のカキの果実軟化における知見として，細胞壁成分含量あるいは細胞壁分解酵素活性の変化から，ペクチンとヘミセルロースの両方の低分子化や含量減少が軟化過程に起こっている報告はみられたが[7]，遺伝子発現に関してはKUBOら（2003）[8]のエタノール脱渋処理により軟化した‘平核無’果実の報告のみであった。そこで，ペクチンおよびキシログルカン（ヘミセルロースの主要成分）の分解酵素遺伝子を単離し，‘平核無’と‘西条’を用いて熟柿状に軟化するまでの遺伝子発現の変化を調査した。

（１）ペクチン分解酵素遺伝子の発現解析

ストレスにより10月上旬に樹上軟化した‘西条’果実を異なる４つの軟化度（表１）[9]で収穫し，すべての果肉を混合したcDNAライブラリーを作成し，発現配列タグ（EST）解析を行った[10]。EST解析とは，一度に多くの遺伝子情報を獲得できる方法である。得られた4701のEST情報をデータベース検索した結果，多くの細胞壁分解酵素遺伝子が含まれていた。そこでペクチン分解酵素遺伝子（３つのPG，２つのPME，２つのGal，および１つのArf）に着目して，老化によって樹上軟化した‘平核無’果実を用いて発現解析を行った[11]。

内部エチレンは軟化の進行に伴って増加した（図３）。*DkACS1*と*DkACS2* 遺伝子はエチレンの律速段階であり，*DkACO1*と*DkACO2* 遺伝子は恒常的に発現した。軟化度1.5（軟化度１と２の中間）と比較して軟化度４（熟柿状態）では，*DkPG1*と*DkPG2*遺伝子は12倍および10倍に，*DkArf 1*と*DkGal1* 遺伝子は９倍および３倍にそれぞれ増加した（図４）。*DkPME1* は軟化度1.5で最大の発現を示した。*DkPG3*，*DkPME2*，および*DkGal2*の発現は低いレベルを維持した。以上の結果から，樹上で老化によって軟化したカキ‘平核無’では，PMEが作用した後に*DkPG1*，*DkPG2*，*DkGal1*，および*DkArf1*が協調的に果実軟化に働いていると考えられた。

表１　軟化度の判定基準

軟化度	果実の状態
1	果実に十分な硬度があり，手で押しても変化しない状態。
2	手で押した場合に変形するが，元の形に戻る状態。
3	手で押した場合に変形し，元の形に戻らない状態。あるいは果実が部分的に水浸状に軟化したり，軟化が進んで果形が部分的に変形した状態（商品性がない）。
4	果実全体が軟化し，手で容易に握りつぶせる熟柿状態。

IWATAら（1969）を参考に作成

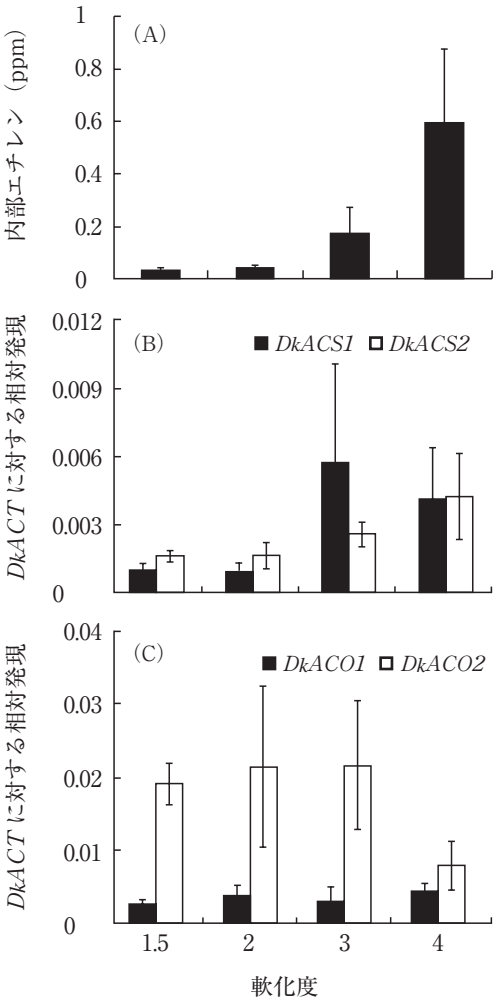

図 3　樹上軟化した異なる軟化度のカキ‘平核無’果実における内部エチレン（A），ACC合成酵素遺伝子（B）およびACC酸化酵素遺伝子（C）の発現

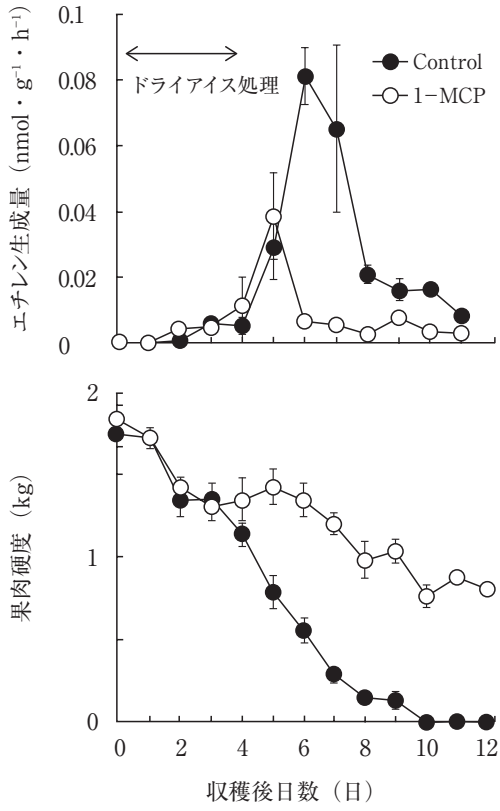

図 5　ドライアイス脱渋処理後の‘西条’果実におけるエチレン生成量（A）および果肉硬度（B）

Nakatsukaら（2011）[12]より作成

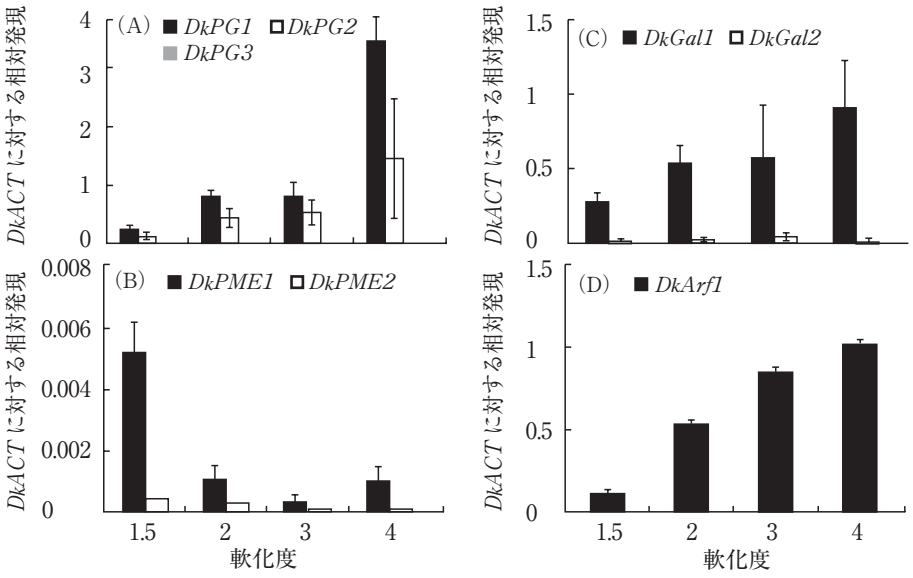

図 4　樹上軟化した異なる軟化度の‘平核無’カキ果実におけるペクチン分解関連遺伝子の発現

（A）PG，（B）PME，（C）Gal，（D）Arf

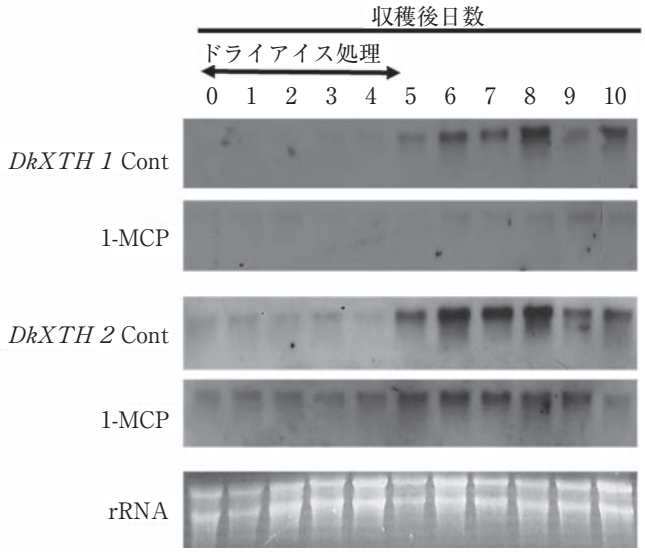

図6　ドライアイス脱渋処理後の‘西条’果実における XTH遺伝子発現

ドライアイス処理は4日間行った。
Nakatsukaら（2011）[12]より作成

（2）キシログルカン分解酵素遺伝子の発現解析

カキ‘西条’果実よりキシログルカン転移酵素・加水分解酵素（XTH）遺伝子を単離するとともに，エチレン依存性を調査するため1－MCP処理後の果実軟化との関連を調査した[12]。ドライアイス処理後，‘西条’果実は急速にエチレン生成が増加し，それに伴い果肉硬度が低下した（図5）。エチレン作用阻害剤の1－MCP処理すると，ポジティブフィードバック制御を受けるエチレン生成の減少と，果実軟化の抑制が認められた。ドライアイス脱渋処理した‘西条’カキ果実から2つのXTH遺伝子（*DkXTH1*と*DkXTH2*）を単離し，発現解析したところ，2つのXTH遺伝子は果肉硬度の低下に伴って強く発現し，ドライアイス脱渋後の急速な果実軟化に関与していることが明らかとなった（図6）。加えて1－MCPに対する発現抑制から，*DkXTH1*はエチレン依存性を示した。

4．ま　と　め

トマト果実において，エチレン生合成経路に対するエチレンの自己触媒的（ポジティブ）および自己抑制的（ネガティブ）フィードバック調節をACS遺伝子発現レベルで確認することができた。果実の貯蔵性向上のためには，成熟・老化に加えて傷害などの外的ストレスを含む他のエチレン誘導要因も併せて考慮することが重要であると考えられる。またカキ果実の軟化に関して，老化により緩やかに樹上軟化した‘平核無’と脱渋処理で急速に軟化した‘西条’において，エチレン応答の細胞壁分解酵素遺伝子が協調的に働くことが示された。この軟化期間の違いは，エチレン生成が異なる要因で誘導されたためと考えられた。今後も引き続いて，マトリックス多糖類の新たな分解酵素遺伝子の発現解析を進めて，果実軟化の全体像の理解を深めていきたい。

謝　辞　この度の平成27年度日本食品保蔵科学会奨励賞の受賞に際して，ご高配を賜りました学会関係者の皆様に謹んで御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり，終始ご指導賜りました岡山大学農学部稲葉昭次教授・中村怜乃輔教授，島根大学生物資源科学部板村裕之教授に御礼と感謝を申し上げます。また岡山大学農学部・島根大学生物資源科学部並びに明治大学農学部の皆様に感謝申し上げます。

文　献

1）Biale, J.B. and Young, R.E.: Respiration and ripening in fruits. Retrospect and prospect. In: RECENT ADVANCES IN THE BIOCHEMISTRY OF FRUITS AND VEGETABLES. Eds. Friend, J. and Rhodes, M.J.C.（Academic Press, London）, pp. 1～39（1981）

2）Kende, H. Ethylene biosynthesis. *Annual Rev. Plant Biol*., **44**, 283～307（1993）

3）Nakatsuka, A., Shiomi, S., Kubo, Y. and Inaba, A.: Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. *Plant Cell Physiol*., **38**, 1103～1110（1997）

4）Mcmurchie, E.J., Mcglasson, W.B. and Eaks, I.L.: Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature*, **237**, 235～236（1972）

5）Nakatsuka, A., Mumachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y. and Inaba, A.: Differential expression and internal feedback regulation of 1－aminocyclopropane－1－carboxylate synthase, 1－aminocyclopropane－1－carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol*., **118**, 1295～1305（1998）

6）Rose, J.K.C., Catala, C., Gonzalez-Carranza, Z.H. and Roberts, J.A.: Cell wall disassembly, In: THE PLANT CELL WALL, Ed. Rose, J.K.C., pp. 264～324（2003）

7）Yakushiji, H. and Nakatsuka, A.: Recent persimmon research in Japan. *Jpn. J. Plant Sci*., **1**, 42～62（2007）

8）Kubo, Y., Nakano, R. and Inaba, A.: Cloning of genes encoding cell wall modifying enzymes and their expression in persimmon fruit, *Acta Hort*., **601**, 49～55（2003）

9）Iwata, T., Nakagawa, K. and Ogata, K.:

Relationship between the ripening of harvested fruits and the respiratory pattern(I). On the class of respiratory pattern of Japanese persimmons (*Diospyros kaki* Linn. f.), *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **38**, 194～201（1969）

10）Nakatsuka, A., Itamura, H., Yano, K., Abe, R., Someya, T. and Nakagawa, T.: Analysis of expressed sequence tags from rapidly softened pulp of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *Acta Hort*, **996**, 111～116（2013）

11）Nakatsuka, A., Nakagawa, T., Yano, K., Sun, N., Sakata, H., Koyama, K., Kobayashi, N., Esumi, T. and Itamura, H.: Gene expression of pectic polyssaccharide degrading enzymes in on-tree softened 'Hiratanenashi' persimmon fruit. *Food Preser. Sci.*, **40**, 185～193（2014）

12）Nakatsuka, A., Maruo, T., Ishibashi, C., Ueda, Y., Kobayashi, N., Yamagishi, M. and Itamura, H.: Expression of genes encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase in 'Saijo' persimmon fruit during softening after deastringency treatment. *Postharvest Biol. Technol.*, **62**, 89～92（2011）