1-methylcyclopropene (MCP) 処理がカキ ‘西条’ ドライアイス脱渋果のエチレン生成と軟化および細胞壁分解酵素活性に及ぼす影響

許 昌国¹・中務 明²・板村裕之^{2*}

¹ 鳥取大学大学院連合農学研究科 680-8553 鳥取市湖山町

² 島根大学生物資源科学部 690-8504 松江市西川津町

Effects of 1-methylcyclopropene (MCP) Treatment on Ethylene Production, Softening and Activities of Cell Wall Degrading Enzymes in ‘Saijo’ Persimmon Fruit after Removal of Astringency with Dry Ice

Chang-Guo Xu¹, Akira Nakatsuka² and Hiroyuki Itamura^{2*}

¹The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, Koyama, Tottori 680-8553

²Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Nishikawatsu, Matsue, Shimane 690-8504

Summary

The effects of 1-methylcyclopropene (MCP) treatment on flesh firmness, ethylene production and the activities of cell wall degrading enzymes in ‘Saijo’ persimmon after removal of astringency with dry ice (CO₂) were investigated. In the control fruit, rapid flesh softening and increase of α -L-arabinofuranosidase (AF-ase) activity coincided with ethylene production after removal of astringency. These processes were retarded by the MCP treatment. The activities of polygalacturonase, β -D-galactosidase and β -D-xylosidase did not parallel ethylene production during flesh softening after removal of astringency. These results suggest that the increase in AF-ase activity was induced by endogenous ethylene, leading to rapid fruit softening in ‘Saijo’ persimmon after the CO₂ treatment.

Key Words: α -L-arabinofuranosidase, ethylene, fruit softening, MCP, persimmon.

緒 言

島根県のカキ栽培は完全渋ガキの‘西条’が中心となっているが、ドライアイス脱渋後エチレンの生成に伴い、急速に果肉が軟化するため、脱渋果の流通・貯蔵上の大きな問題となっている。

最近、エチレン作用の阻害効果を有する 1-methylcyclopropene (MCP) が注目され (Sisler ら, 1996), 果実の軟化や成熟に対するエチレンの作用機作を解明する有力な手段の一つとなっている。バナナ (Jiang ら, 1999), イチゴ (Jiang ら, 2001), アボカド (Feng ら, 2000; Jeong ら, 2002) 果実では MCP 処理により果肉の軟化が抑制され、貯蔵性が向上する。カキにおいても、ハウス栽培の渋ガキ ‘刀根早生’ (中野 ら, 2001) や ‘西条’ (Nakano ら, 2001) などの脱渋果の果肉軟化が MCP 処理により抑制されることが報告されている。

一方、渋ガキの代表的品種である ‘平核無’ 脱渋果の通常の軟化過程では、ペクチン主鎖が分解して可溶化する (平ら, 1986; 石丸 ら, 2001)。また、冷蔵貯蔵後に脱渋処

理を行った ‘平核無’ (板村 ら, 1989) では、ヘミセルロースの分解が果肉の軟化と関連が深いとされている。ハウス栽培の ‘刀根早生’ 果実 (Itamura ら, 1995) の脱渋後の急速な軟化の原因は、細胞壁構成多糖類からアラビノース、ガラクトースならびにキシロースが減少することにあるとされており、このことから、ペクチン側鎖のアラビノガラクトンやアラビナンからアラビノースとガラクトースが分離し、さらに、ヘミセルロースのキシログルカンからキシロースが分離したものと考えられる。すなわち、ペクチン主鎖以外の細胞壁構成成分であるペクチン側鎖やヘミセルロースなどの非セルロース性中性多糖類の分解が軟化に関連することが示されている。また、許ら (2003) はカキ ‘西条’ 果実の急速な軟化には、細胞壁のラムノガラクトツロナン側鎖であるアラビノース残基を遊離する α -L-アラビノフラノシダーゼ (AF-ase) の活性の上昇が関与することを報告している。

本研究では、エチレン作用阻害剤の MCP 処理により、カキ ‘西条’ 果実のドライアイス脱渋後の急速な果肉軟化がエチレンによって誘導されることを再確認し、エチレン生成により誘導される細胞壁分解酵素 (ポリガラクトナーゼ (PG), AF-ase, β -D-ガラクトシダーゼ (Gal-ase) および β -D-キシロシダーゼ (Xyl-ase)) の軟化への

2003 年 4 月 17 日 受付。 2003 年 7 月 15 日 受理。

*Corresponding author.

影響を調査することで, '西条' 果実の急速な軟化のメカニズムを明らかにしようとした。

材料および方法

島根大学生物資源科学部実験圃場のカキ '西条' の成熟果を 2000 年 10 月 11 日に採取し, 供試した。果実は重量比 1.5% のドライアイスとともに, 厚さ 0.06 mm の低密度ポリエチレン袋に入れ, 密封して 20℃ 下で 4 日間脱渋処理をした。また, Nakatsuka ら (1997) の方法により, 開封 15 時間前に, 袋内に約 $20 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ の濃度になるように MCP を封入した。脱渋後の果実は 20℃ 下で貯蔵し, エチレン生成量と果肉硬度を毎日測定した。また, 果実の赤道部の果肉 22 g を液体窒素で凍らせ, -80℃ に保存し, PG, AF-ase, Gal-ase および Xyl-ase 活性の測定に用いた。エチレン生成量は 5 反復で, 果肉硬度と酵素活性は 3 反復で測定を行った。

1. 果肉硬度とエチレン生成量の測定

果肉硬度は果実の赤道部を 4 か所はく皮し, 藤原製作所製の果実硬度計 (円錐プランジャ) を用いて測定した。エチレン生成量は, ヘッドスペース法で FID 付きガスクロマトグラフ (GC-14A, 島津製作所) で測定した。

2. 細胞壁分解酵素活性の測定

1) PG の抽出および活性の測定

PG の抽出および活性測定は辻・小宮山 (1991) の方法に準じて行った。ただし, 果肉中に含まれるタンニン除去のために Badran・Jones (1965) と Liu ら (2000) に準じた方法を採用し, ポリエチレングリコール (PEG) #6000 を添加した緩衝液を使用し, かつ冷アセトンによる洗浄を組み合わせた以下のような抽出方法を用いた。すなわち, 凍結させた 5 g のサンプルを乳鉢上で粉碎した後, 氷冷した 1% PEG #6000 を含む酢酸緩衝液 (pH 5.5) 15 ml 中に入れ, 0.1 g の不溶性ポリビニルピロリドン (PVP) を加えた。その後, 氷冷しながら 20 mmHg で 30 分間減圧浸透を図った後, ホモジナイズした。その後, 30 ml の冷アセトン (-20℃) を加え, 低温 (-10℃) で遠心分離し ($10,000 \times g$, 10 分間), 得られた残渣を PG の抽出に用いた。

PG の抽出は, 上記の残渣に不溶性の PVP 16 mg と 4% NaCl 8 ml を加え, 3℃ で 2 時間攪拌抽出し, 蒸留水で 15 時間透析後に得られた液を粗酵素液とした。酵素の活性は, 粗酵素液 2 ml と基質として 0.25% ポリガラクトロン酸 1 ml, さらに, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 1 ml を混合し, 30℃ 下で 24 時間インキュベートした後, 反応生成物であるガラクトロン酸を Somogyi-Nelson 法 (福井, 1969) で測定することによって算出した。同酵素の活性は, 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のガラクトロン酸に相当する還元糖を遊離させる量を 1 単位として表した。

2) AF-ase, Gal-ase および Xyl-ase の抽出および活性測定

AF-ase, Gal-ase および Xyl-ase の抽出ならびにこれらの活性の測定は, Yoshioka ら (1995) の方法を用いて行

った。すなわち, 赤道部の果肉を 17 g 取り, 0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中でホモジナイズした後, 懸濁液を低温 (2℃) で遠心分離し ($24,000 \times g$, 10 分間), 得られた残渣を用いて 50 mM EDTA と 1.0 M NaCl を含む 0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.0) によって酵素タンパクの抽出を 1 時間行った。その後, 抽出液を硫酸アンモニウムで塩析し, さらに 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で透析したものを粗酵素液とした。活性の測定は, 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 0.45 ml と粗酵素液 0.12 ml および基質として AF-ase に対しては 13 mM p-ニトロフェニル- α -L-アラビノフラノシドを, Gal-ase に対しては 13 mM p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを, Xyl-ase に対しては 13 mM p-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドをそれぞれ 0.18 ml 加え, 37℃ で 15 分間インキュベートした後, 遊離した p-ニトロフェノールの吸光度を 415 nm で測定することによって算出した。

結果および考察

1. 果肉の軟化とエチレン生成の関係

MCP 無処理果の果肉硬度は脱渋処理期間中緩やかに低下した後, 脱渋処理終了直後から急速に低下し, 収穫後 9 日にはほぼ 0 kg になった (第 1 図 A)。これに対して, MCP 処理果では軟化が遅く, 無処理果に比べて約 3 日軟化が遅延した。果実の品質保持期間も 3 日延長したことから, MCP 処理はカキ '西条' 果実の品質保持に有望であると考えられた。

エチレン生成量は, 無処理果では脱渋処理終了直後から急速に増加し, 収穫後 6 日でピークに達した後減少した (第 1 図 B)。MCP 処理果でも同様に収穫後 4 日から 6 日にかけて急速に増加した後, 10 日まで高い値を保ち, その後減少した。エチレン生成量は, MCP 処理果の方が無処理果より多かった。MCP 処理によってカキ '西条' 脱渋果のエチレン生成量が増加することは Nakano ら (2001) も報告しており, '西条' 脱渋果の通常のエチレン生成は, 自己抑制的な制御を受けていることが考えられる。

2. 細胞壁分解酵素とエチレンの関係

PG 活性は, MCP 無処理果では脱渋開始後 1 日で収穫当日の 1.4 倍に増加したが, その後は漸減傾向であった (第 2 図 A)。MCP 処理果では活性が一時的に無処理果の約 1/2 まで抑えられ, その後も低い値で推移した。AF-ase 活性は, 無処理果で収穫後 6 日に収穫当日の約 3 倍にまで増加し, その後はほぼ一定となった (第 2 図 B)。これに対して, MCP 処理果では, 活性が無処理果より 2 日遅れて上昇し, 収穫後 12 日には無処理果の約 3 倍になった。Gal-ase 活性は, MCP 処理の有無にかかわらずほぼ同じ値で推移したが, 収穫後 8 日以降は MCP 処理果で無処理果より高い傾向が認められた (第 2 図 C)。Xyl-ase 活性は, 両区ともほぼ同じ値で推移した後, 収穫後 8 日から MCP 処理果で

Fig. 1. Effect of MCP treatment on fruit firmness (A) and ethylene production (B) after removal of astringency with dry ice. Fruit were treated with dry ice to remove astringency for 4 days (horizontal arrow) and were also treated with $20 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ MCP for 15 hr prior to completion of dry ice treatment. The values of fruit firmness and ethylene production are the means of three and five replications, respectively. Vertical bars indicate SE.

増大し、12日には収穫当日の1.5倍に達した(第2図D)。

果肉の急速な軟化が認められた期間にMCP処理によって活性が抑制された酵素は、PGとAF-aseであったことから、これらの酵素はエチレン生成と何らかの関連があるものと考えられた(第2図A, B)。アボカドの成熟果では、MCP処理後の急速な果肉硬度の低下の抑制とPG活性の上昇の顕著な抑制が認められている(Fengら, 2000; Jeongら, 2002)。このことから、アボカドに比べてカキでは、急速な果肉軟化へのPGの関与は小さいものと推測される。しかしながら、PGは今回調査した他の酵素に比べると高い活性を示したことから(第2図), 何らかの形で急速な軟化に関与している可能性は否定できないものと思われる。

Sozziら(2002a)は、アンチセンスACC合成酵素遺伝子が導入され、エチレンを生成しないトマト果実は非形質転換体の果実に比べてAF-ase活性が抑制されること、また、アンチセンス果実にエチレンを処理すると、同酵素の活性が顕著に増大することを報告している。また、トマト果実のAF-aseには三つのアイソザイムがあり、成熟に特

異的なアイソザイムⅢがエチレン依存性であることも示されている(Sozziら, 2002b)。これらの事実は、AF-aseの活性の増加がエチレンにより引き起こされていることを示しており、本実験の結果とも一致する。

果肉の急速な軟化が認められた期間に、Gal-aseとXyl-aseはMCP処理によって活性が抑制されなかったことから(第2図C, D)、これらの酵素の活性誘導にエチレンが関与している可能性は小さいものと思われる。アボカドの成熟果をMCP処理した実験でも、Gal-ase活性の抑制は認められていない(Jeongら, 2002)。一方、トマト果実にアンチセンスACC合成酵素遺伝子を導入することにより、Gal-ase活性の抑制が認められており、Gal-aseのアイソザイムの一部はエチレン依存性であることが明らかになっている(Sozziら, 1998)。これらのことから、Gal-aseがエチレン依存性であるか否かは果実の種類により異なるものと考えられる。

なお、本実験ではMCP処理果のAF-aseの活性が収穫後8日以降に増加した。これは、MCPの作用阻害効果が消失したときに、MCPにより生成が促進されたエチレンにより、AF-ase活性が誘導されたことが原因であると考えられる。また、Gal-aseおよびXyl-ase活性も収穫後同じ時期に増加したが、MCP無処理果では活性の誘導が認められないことから、これらの酵素はエチレン非依存性であると考えられる。これらの酵素の活性増加の原因については不明である。

3. 果肉の軟化と細胞壁分解酵素活性の関係

本実験でMCP処理によってAF-ase活性が抑制された際に、果肉硬度の低下が抑制された。このことは、AF-aseの活性変化がカキ‘西条’果実の急速な果肉硬度の低下に関与していることを示している。これは、‘刀根早生’(Itamuraら, 1995)や‘平核無’(板村ら, 1989)脱渋果が急速に軟化する際に非セルロース性中性多糖類の分解が見られることや、‘西条’の幼果や成熟後期の果実(許ら, 2003)の急速な軟化時にAF-ase活性が増加したこととよく符合する。しかし、MCP処理果においても収穫後8日以降にAF-ase活性が急速に増加したが、軟化の速度が緩やかであった。このことから、必ずしもAF-aseの活性増加だけではカキ‘西条’果実の急速な軟化を説明することはできないものと考えられる。本実験では酵素の抽出の際に1.0 MNaClを使用したことから、この方法では細胞壁結合型の酵素は半分程度しか抽出されない可能性が高い(Yoshiokaら, 1995)こと、およびAF-ase活性が今回調査した4酵素の中で最も低い値で推移していること(第2図)から、AF-aseの他にも重要な役割を果たしている酵素が存在する可能性も考えられよう。

以上のことから、カキ‘西条’のドライアイス脱渋果の急速な軟化には、少なくともエチレンにより誘導されたAF-aseによる非セルロース性中性多糖類の分解が関与しているものと推察された。

Fig. 2. Effect of MCP treatment on the activity changes of PG (A), AF-ase (B), Gal-ase (C) and Xyl-ase (D) after removal of astringency with dry ice. Fruit were treated as shown in the legend for Fig. 1. The values are the means of three replications. Vertical bars indicate SE.

摘 要

カキ‘西条’果実を用いて、ドライアイス脱渋期間中に1-methylcyclopropene(MCP)処理を行い、脱渋後の果肉硬度とエチレン生成および細胞壁分解酵素活性に及ぼす影響を調査した。MCP処理を行わない脱渋果では、エチレン生成の後に急速な果肉の軟化と α -L-アラビノフラノシダーゼ(AF-ase)活性の増加が認められた。果肉の軟化はMCP処理によって抑制され、このときAF-ase活性の上昇も抑制された。これに対して、ポリガラクトシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼおよび β -D-キシロシダーゼ活性については、脱渋果の急速な果肉軟化および果実のエチレン生成との関連が明らかではなかった。以上の結果から、‘西条’脱渋果の急速な軟化には少なくとも果実のエチレン生成にともなって活性が増加するAF-aseが関与することが示唆された。

引用文献

- Badran, A. M. and D. E. Jones. 1965. Polyethylene glycols-tannins interaction in extracting enzymes. *Nature* 206: 622-624.
- Feng, X., A. Apelbaum, E. C. Sisler and R. Goren. 2000. Control of ethylene responses in avocado fruit with 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 143

-150.

- 福井作蔵. 1969. 還元糖の定量法. p.10-12. 学会出版センター. 東京.
- 石丸 恵・茶珍和雄・和田安規・上田悦範. 2001. 脱渋方法の異なるカキ‘平核無’果実のペクチン質およびヘミセルロースの変化と軟化との関係. *日食保蔵誌*. 27: 197-204.
- 板村裕之・福嶋忠昭・北村利夫. 1989. カキ‘平核無’果実の軟化と細胞壁多糖成分の関係. *日食工誌*. 36: 647-650.
- Itamura, H., T. Tanigawa and H. Yamamura. 1995. Composition of cell-wall polysaccharides during fruit softening in ‘Tonewase’ Japanese persimmon. *Acta Hort.* 398: 131-138.
- Jeong, J., D. J. Huber and S. A. Sargent. 2002. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 25: 241-256.
- Jiang, Y., D. C. Joyce and A. J. Macnish. 1999. Responses to banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regul.* 28: 77-82.
- Jiang, Y., D. C. Joyce and L. A. Terry. 2001. 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. *Postharvest Biol. Technol.* 23: 227-232.
- Liu, X. J., R. Nakano, Y. Kubo and A. Inaba. 2000.

- Extraction and properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in banana fruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69: 696-701.
- 中野龍平・播磨真志・久保康隆・稲葉昭次. 2001. 有孔ポリエチレン包装によるカキ‘刀根早生’ハウス促成栽培果実の軟化抑制. 園学雑. 70: 385-392.
- Nakano, R., S. Harima, E. Ogura, S. Inoue, Y. Kubo and A. Inaba. 2001. Involvement of stress-induced ethylene biosynthesis in fruit softening of ‘Saijo’ persimmon. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70: 581-585.
- Nakatsuka, A., S. Shiomi, Y. Kubo and A. Inaba. 1997. Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. Plant Cell Physiol. 38: 1103-1110.
- Sisler, E. C., E. Dupille and M. Serek. 1996. Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. Plant Growth Regul. 18: 79-86.
- Sozzi, G. O., S. A. Camperi, O. Cascone and A. A. Fraschina. 1998. Galactosidases in tomato fruit ontogeny: Decreased galactosidase activities in antisense ACC synthase fruit during ripening and reversal with exogenous ethylene. Aust. J. Plant Physiol. 25: 237-244.
- Sozzi, G. O., A. A. Fraschina, A. A. Navarro, O. Cascone, L. C. Greve and J. M. Labavitch. 2002a. α -L-arabinofuranosidase activity during development and ripening of normal and ACC synthase antisense tomato fruit. HortScience 37: 564-566.
- Sozzi, G. O., L. C. Greve, G. A. Prody and J. M. Labavitch. 2002b. Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate α -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs. Plant Physiol. 129: 1330-1340.
- 平 智・杉浦 明・久保康隆・苫名 孝. 1986. CaCl_2 処理が‘平核無’果実の脱渋後の品質に及ぼす影響. 山形大学紀要(農学) 10: 115-120.
- 辻 政雄・小宮山美弘. 1991. 高温(30℃)下におけるスモモ果実の軟化抑制とペクチン組成及びペクチン分解酵素活性の変化. 日食工誌. 38: 1013-1018.
- 許 昌国・中務 明・加納弘光・板村裕之. 2003. カキ‘西条’果実の急速な軟化に伴うエチレン生成と細胞壁分解酵素活性の変化. 園学雑. 72: 460-462.
- Yoshioka, H., Y. Kashimura and K. Kaneko. 1995. β -D-galactosidase and α -L-arabinofuranosidase activities during the softening of apples. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63: 871-878.