

# キメラカンキツのカロテノイド解析 (Carotenoids in *Citrus chimera* fruits)

隅田 孝司                      坂部 英理子  
(Takashi Sumida                Eriko Sakabe)

(株)えひめ飲料  
(Ehime Beverage Inc.)

生駒 吉識  
(Yoshinori Ikoma)  
農研機構 果樹研究所

脇塚 巧  
(Takumi Wakizuka)  
全農愛媛県本部

(Okitsu Citrus Research Station,  
National Institute of Fruit Tree  
Science)

(National Federation of Agricultural  
Co-operative Associations, Ehime  
Headquarters)

柑橘産業の振興のためには、多様な消費者ニーズに対応する高品質の果実の提供が必要である。品種開発の手法には交雑や変異の発見などがあるが、最近、合成キメラを利用する方法が実用化されている<sup>1)</sup>。キメラの語源は、ギリシア神話に登場する伝説の生物キマイラに由来しており、獅子の頭とヤギの胴体、ヘビのしっぽを持つといわれている。

愛媛県では、産官学が連携してキメラ柑橘の産地形成・定着化を進めている。柑橘の品質を左右する熟度や着色について、カロテノイドとの関係は重要である。また、最近果肉に含まれるカロテノイドの機能性が注目されており、柑橘の付加価値を高める結果となっている<sup>2)</sup>。今後、これらのキメラが産地化されることにより、これまでにない高品質の果汁製品を開発することが可能になると考えられる。しかし、キメラ果実が計画的に作出され始めたのは最近のことであり、キメラ果実のカロテノイドに関する研究は見当たらない。そこで、キメラ果実の基本的特性の知見を得るために、まず各種カロテノイド含量や割合を構成品種と比較・検討した。

## 実験方法

### 1. 供試材料

#### (1) 果実

植物の茎先端の生長点を茎頂分裂組織といい、外側から茎頂起原層第1層（以下L1という）、第2層（以下L2という）、第3層（以下L3という）とよばれている。植物の各組織は、これら起原層のいずれかの細胞から分化することが知られている<sup>3)</sup>。

キメラ作出法の一例として、品種 A と品種 B の実生を垂直に切断・寄せ接ぎした後水平に切断して、A と B の接合部に発生した不定芽を選別する方法がある。過去の研究結果から、安定した構造を維持できるキメラは、L1 の合成周縁キメラ (L1 と L2・L3 が互いに異なる種から構成されるキメラ) であると分かっている<sup>3)</sup>。従って、本研究で分析に供したキメラ果実も L1 の合成周縁キメラである。

全農愛媛県本部開発センターに試験栽培されているキメラ品種及びその構成品種を平成 18 年 10 月～平成 19 年 2 月まで、原則として 30 日ごとに果実を採取した。採取した果実は、目視により、果径、果重、着色程度がほぼ平均的な果実 3 個について、3 回の繰り返し分析を行なった。

## (2) カロテノイド標品

ルテインは SIGUMA 製、ゼアキサントンはフナコシ製を用いた。ビオラキサント、 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテンは和光純薬工業製を用いた。 $\beta$ -クリプトキサントンは著者らが精製した。

## 2. 試薬

メタノール (以下 MeOH という) 及び *t*-ブチルメチルエーテル (以下 BME という) は、和光純薬工業製の高速液体クロマトグラフ用 (以下 HPLC という) を用いた。酢酸アンモニウム (以下 AA という) 及びそのほかの試薬は和光純薬工業製の試薬特級を用いた。

## 3. カロテノイドの分析

### (1) 果実の前処理

果実は、果皮と果肉に分割した。果皮はアルベド部を除いて細切し、液体窒素で瞬間凍結させた後、冷凍庫に保管した。果肉は、液体窒素で瞬間凍結させた後、砂じょうを一粒毎にして冷凍庫に保管した。

### (2) HPLC 供試液の調整

試料 (果皮約 2g、果肉約 4g) を採取して精秤し、エタノール 20 ml と炭酸マグネシウム (果皮 0.2g、果肉 0.5g) を添加した後、ホモジナイザー (KINEMATICA 社製、本体 PT2100、ジェネレーターシャフト PT-DA2112/2EC) を用いて粉碎・均質化した (25,000rpm、1分)。1g のケイソウ土 (Celite545) を加えて攪拌後、ケイソウ土を薄く敷いたガラスフィルター (G3) にこの懸濁液を注ぎ入れ、ろ液の着色がなくなるまでエタノールとアセトンで洗浄抽出した。このエタノール・アセトン抽出液を分液漏斗に洗い移し、エーテルと飽和食塩水を加えて振とうし、カロテノイドをエーテルに分配した。このエーテル溶液を減圧下で濃縮し、等量の 10%MeOH 性水酸化カリウム溶液を添加して、10°C、暗所下で一晩放置した。次に、このケン化処理液からエーテルで不ケン化物を分画し、アルカリが除去されるまで蒸留水で洗浄した。続いて溶媒を減圧留去した後、移動相溶媒を加えて 10ml に定容し、0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過した溶液を HPLC 供試液とした。

### (3) HPLC 装置及び分析条件

HPLC 装置 (Waters 製、600 システム) に分析カラム (YMC 製、Carotenoid 5  $\mu$  C<sub>30</sub>、4.6mm  $\times$  250mm)、紫外可視多波長検出器 (Waters 製、996) 及びデータ処理装置 (Waters 製、Empower) を接続して用いた。その他の条件は次の通りとした。カラム温度 30°C、検出波長 270~530nm、流速 1.0ml/min、注入量 20  $\mu$  l、移動相溶媒は 0.05%AA/MeOH、BME 及び超純水 (17M  $\Omega$  以上) を用いてグラジエント分析を行なった。開始から 20 分間を MeOH 95%、BME 1%、水 4% で送液し、20 分経過後直ちに MeOH 99%、BME 1% に変更した。30 分後に MeOH 95%、BME 5%、60 分後に MeOH 50%、BME 50% に設定してリニアグラジエントにより送液した。

#### (4) 各種カロテノイドの定量

450nm における HPLC クロマトグラムに基づき各種カロテノイドの定量を行なった。各種カロテノイドは標品の保持時間及び吸収スペクトルにより判定した。分析値は 3 回の繰り返し分析して平均値を示した。Cis-ビオラキサンチンについては、文献値<sup>4)</sup> より判定を行ない、ビオラキサンチンの検量線を用いて定量した。

#### (5) 主成分分析

カロテノイド構成割合が比較的安定する 12 月から 2 月までの 7 種カロテノイド分析データから各々百分率を算出して、分散・共分散行列を用いて主成分分析を行なった。統計ソフトはエクセル統計 2002 (株社会情報サービス製) を用いた。

## 結果と考察

### 1. ‘エクリーク 94’ 及びその構成品種

果皮における ‘エクリーク 94’ (品種登録名) 及びその構成品種 (キメラの L1 を構成する ‘シイクワシャー’、L2・L3 を構成する ‘今津ポンカン’) の 7 種カロテノイド分析結果を図 1 に示した。各種カロテノイドの収穫時期別の推移は 3 種の果実とも Cis-ビオラキサンチン、ビオラキサンチン、 $\beta$ -クリプトキサンチンが増加し、逆にルテイン、 $\beta$ -カロテン、 $\alpha$ -カロテンが減少した。‘エクリーク 94’ のカロテノイドの推移は L2・L3 を構成する ‘今津ポンカン’ と類似していると考えられた。

次に果肉の分析結果を図 2 に示した。‘シイクワシャー’ は Cis-ビオラキサンチン、‘エクリーク 94’ は  $\beta$ -クリプトキサンチンと Cis-ビオラキサンチン、‘今津ポンカン’ は  $\beta$ -クリプトキサンチンの増加が特徴的であった。‘エクリーク 94’ の  $\beta$ -クリプトキサンチン含量は ‘シイクワシャー’ よりは高く、‘今津ポンカン’ よりは低いという結果であった。

$\beta$ -クリプトキサンチンは、温州みかんやポンカンに特徴的に多く含まれるカロテノイドで、発ガン抑制作用や骨粗しょう症抑制作用が知られており、現在、特に保健機能の分野で注目を集めている<sup>2)</sup>。エクリーク 94 は、‘シイクワシャー’ 独特の爽やかな風味とポンカンの甘味を併せ持った香味であり、‘シイクワシャー’ に比べて果肉に機能性カロテノイドである  $\beta$ -クリプトキサンチンを含有する点で優れていると考えられた。

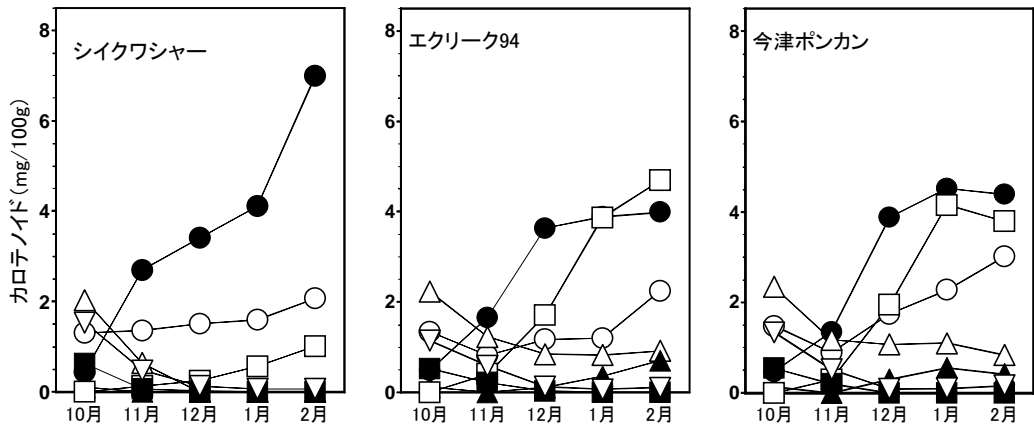


図1 ‘エクレーク94’ 及び構成品種のカロテノイド含量

○ Vio, ● cis-Vio, △ Lut, ▲ Zea, □ β-Cry, ■ α-Car, ▽ β-Car

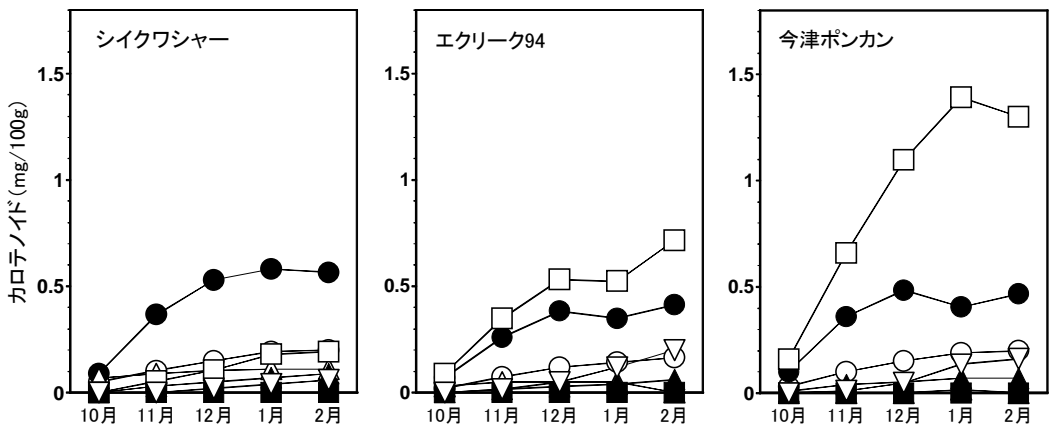


図2 ‘エクレーク94’ 及び構成品種のカロテノイド含量

○ Vio, ● cis-Vio, △ Lut, ▲ Zea, □ β-Cry, ■ α-Car, ▽ β-Car

## 2. 開発系統 ‘9516’ 及びその構成品種

果皮における開発系統 ‘9516’ 及びその構成品種の7種カロテノイド分析結果を図3に示した。本品種のL1を構成しているのは普通温州であるが、本研究では比較品種として ‘南柑20号’ の果実を供試した。L2・L3を構成しているのは ‘ハムリン’ である。各種カロテノイドの収穫時期別の推移は、3種の果実とも前述した ‘エクレーク94’ 及びその構成品種と同様の傾向が認められた。また、 ‘南柑20号’ はβ-クリプトキサンチンとCis-ビオラキサンチン、 ‘9516’ と ‘ハムリン’ はCis-ビオラキサンチンの増加が特徴的であった。 ‘9516’ のカロテノイドの推移は、キメラのL2・L3を構成する ‘ハムリン’ と類似していると考えられた。

次に果肉の分析結果を図4に示した。‘南柑 20号’と‘9516’は $\beta$ -クリプトキサンチン、‘ハムリン’はCis-ビオラキサンチンの増加が特徴的であった。‘9516’の $\beta$ -クリプトキサンチン含量は‘南柑 20号’より少なく、‘ハムリン’よりも多いという結果であった。このように、‘9516’は、外観はキメラのL2・L3を構成する‘ハムリン’と類似しており、果皮も普通温州のように柔らかくないので、インライン搾汁に適していると考えられた。また、温州ミカンの風味にオレンジの香りを併せ持った香味であり、果肉には機能性カロテノイドである $\beta$ -クリプトキサンチンを高含有する点も優れていると考えられた。

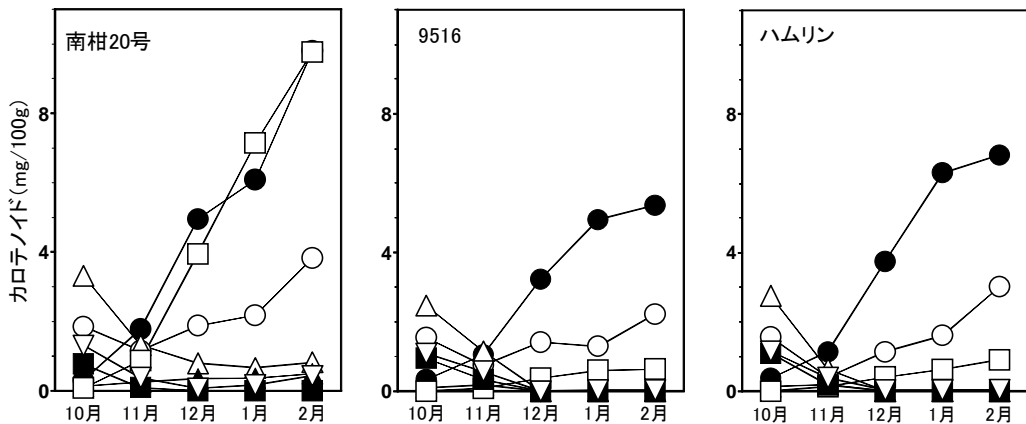


図3 開発系統‘9516’及び構成品種のカロテノイド含量

○ Vio, ● cis-Vio, △ Lut, ▲ Zea, □  $\beta$ -Cry, ■  $\alpha$ -Car, ▽  $\beta$ -Car

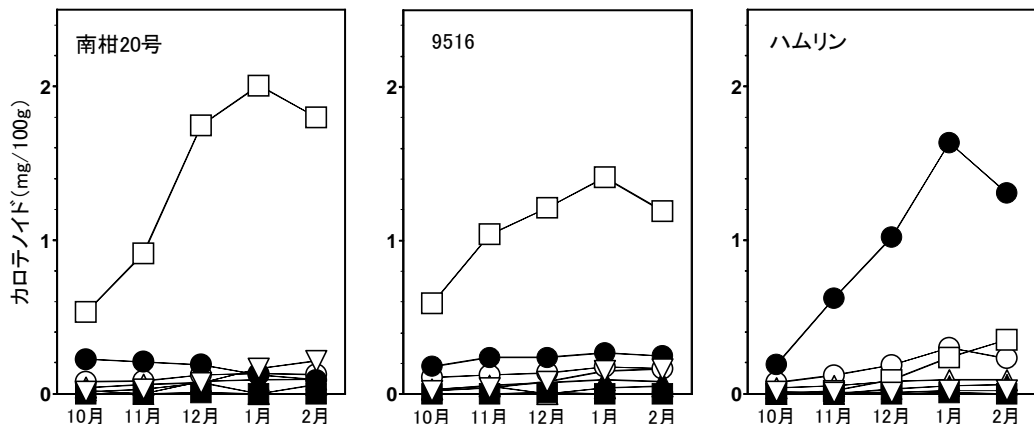


図4 開発系統‘9516’及び構成品種のカロテノイド含量

○ Vio, ● cis-Vio, △ Lut, ▲ Zea, □  $\beta$ -Cry, ■  $\alpha$ -Car, ▽  $\beta$ -Car

### 3. 主成分分析

Goodner ら<sup>5)</sup> はオレンジ、マンダリン及びその交雑種のカロテノイド分析結果を主成分分析することにより、品種の分類を試みている。そこで、主成分分析によりキメラとその構成品種の7種カロテノイド構成割合の類似性、あるいはポジショニングについて検討した。‘エクリーク 94’ 及びその構成品種の分析結果を図5に示した（横軸：第1主成分、縦軸：第2主成分）。果皮における第1主成分の寄与率は92%で、その固有ベクトルからCis-ビオラキサンチンの構成割合が高いとプラス側に、 $\beta$ -クリプトキサンチンが高いとマイナス側にプロットされた。後述する主成分分析結果も含めて第1主成分が90%を超えていることから、第1主成分により類似性、あるいはポジショニングが明らかにできると考えられた。果肉では、第1主成分の寄与率は97%で、 $\beta$ -クリプトキサンチンの構成割合が高いとプラス側に、Cis-ビオラキサンチンが高いとマイナス側にプロットされた。

‘エクリーク 94’ の果皮は、キメラのL2・L3を構成する‘今津ポンカン’と同様な位置にプロットされたことから、両品種の7種カロテノイド構成割合は類似性があると考えられた。果肉は、‘今津ポンカン’寄りではあるが‘シイクワシャー’との中間にポジショニングされた。

‘9516’ 及びその構成品種の結果を図6に示した。果皮における第1主成分の寄与率は95%で、その固有ベクトルから $\beta$ -クリプトキサンチンの構成割合が高いとプラス側に、Cis-ビオラキサンチンが高いとマイナス側にプロットされた。果肉では、第1主成分の寄与率は99%で、 $\beta$ -クリプトキサンチンの構成割合が高いとプラス側に、Cis-ビオラキサンチンが高いとマイナス側にプロットされた。

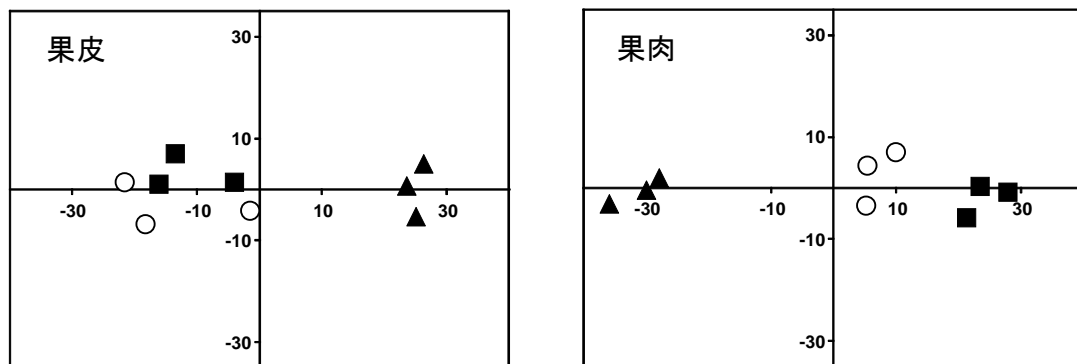


図5 ‘エクリーク94’の主成分分析結果

▲ シイクワシャー, ○ エクリーク94, ■ 今津ポンカン

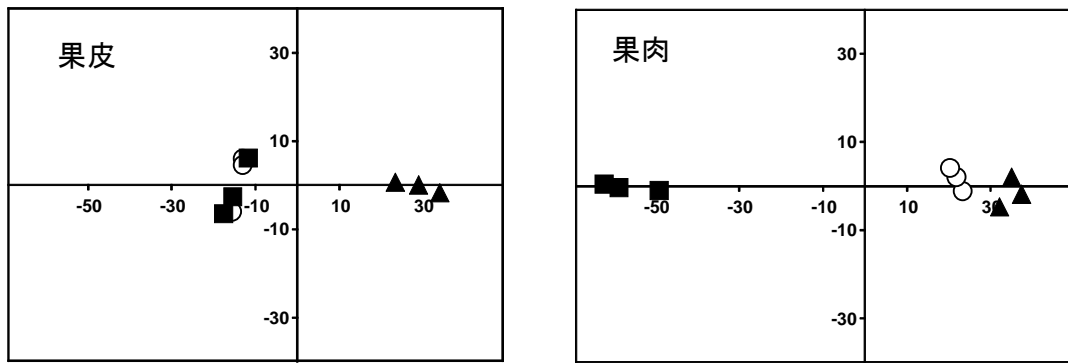


図6 開発系統‘9516’の主成分分析結果

▲ 南柑20号, ○ 9516, ■ ハムリン

‘9516’の果皮は、キメラのL2・L3を構成する‘ハムリン’と同様な位置にプロットされたことから、両品種の7種カロテノイド構成割合は類似性があると考えられた。果肉は、キメラのL1を構成する‘南柑20号’の近くにプロットされたが、この2品種は明確に区分された。

これら主成分分析の結果から、キメラ果実の果皮カロテノイドは、L2・L3を構成する品種の7種カロテノイド構成と類似しており、キメラ果実の果肉カロテノイドは、キメラを構成する両方の品種に影響を受けていると考えられた。

柑橘類の果肉の大部分である砂じょうは少なくともL1の細胞に由来し、果皮の大部分を占める中果皮(フラベドとアルベド)はL2とL3の細胞に由来することが知られている。さらに、Sugawaraら<sup>6)</sup>は砂じょうがL1由来の細胞だけでなくキメラの両構成種の細胞で成り立っていることをDNAレベルで明らかにした。本研究の結果は、これらの知見を裏付けるものであると考えられた。

また、実用キメラは、例えば‘9516’のように外観は‘ハムリン’でありながら、果肉には‘ハムリン’にほとんど含まれない機能性カロテノイドであるβ-クリプトキサンチン含有させることが可能である。今後、実用キメラの産地形成によりこれまでになく新しい果汁製品の上市が期待される。

## まとめ

全農愛媛県本部が作出したキメラ果実及びその構成品種のカロテノイド分析を行ない、各種カロテノイドの含量や割合を構成品種と比較・検討した。

その結果、キメラ果実の果皮カロテノイドは、L2・L3を構成する品種のカロテノイド構成と類似しており、キメラ果実の果肉カロテノイドは、キメラを構成する両方の品種に影響

響を受けていると推察した。

本研究では、キメラ育種は、外観がL2・L3構成品種に近似した果実が得られ、果肉にはL2・L3構成品種に含まれない機能性カロテノイドを含有させることが可能であることを明らかにした。

本研究は、「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業（課題番号 18084）」により行なわれた。

## 文献

- (1) 脇塚ら, ブレインテクノニュース 96, 9-12, 2003
- (2) 矢野昌充ら, 果樹研究所研究報告, 4, 13-28, 2005
- (3) Lyndon R. F., The shoot apical meristem, 16-42, 1998, Cambridge Univ. Press
- (4) Kato M. et al., Plant Physiology, 134, 824-37, 2004
- (5) Coodner K. L. et al., J. Agric. Food Chem., 49, 1146-50, 2001
- (6) Sugawara K. et al., J. Amer. Soc. Hort. Sci., 127, 104-7, 2002