

A377.7

H72k

95/96-S

リンゴ果皮のフラボノイド代謝と窒素多肥

課題番号 07660074

平成7年度－平成8年度科学研究費補助金(基盤研究C)研究成果報告書
(2)

平成10年5月

研究代表者 齊藤 寛
(弘前大学農学生命科学部
助教授)

平成7年度—平成8年度文部省科学研究費補助金（基盤研究C）
研究成果報告書⁽²⁾

課題番号

07660674

研究課題

リンゴ果皮のフラボノイド代謝と窒素多肥

研究組織

研究代表者：齊藤 寛（弘前大学農学部助教授）

研究経費

平成7年度	1,900 千円
平成8年度	200 千円
計	2,100 千円

研究発表

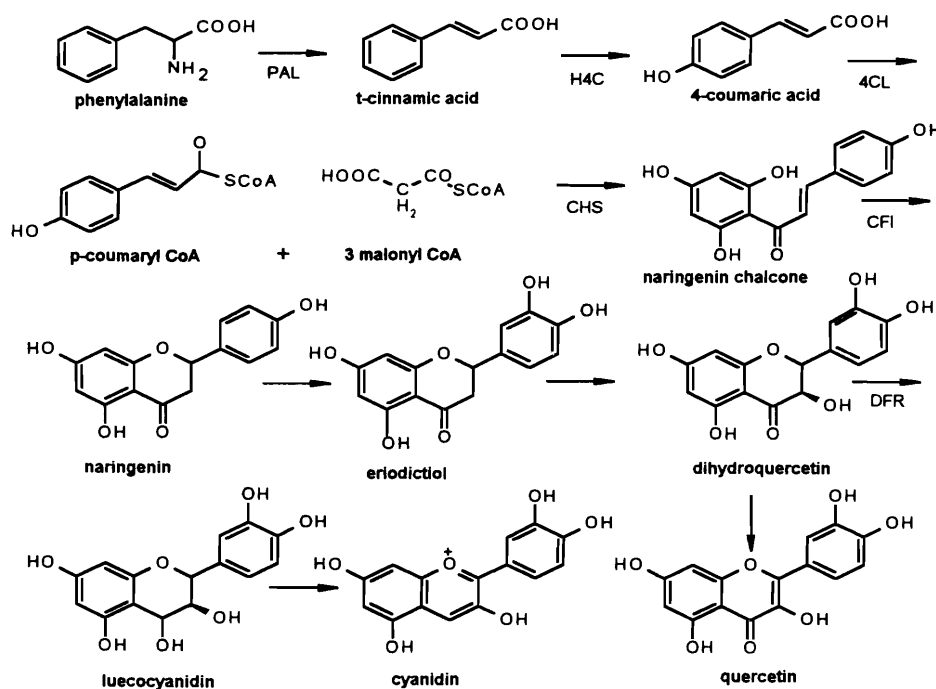
なし

緒 言

わが国においてリンゴ果実の品質に対する要求は、生産者、流通業界および消費者の思惑が絡み合い、きわめて高い。すなわち、大きい果実が好まれ、食味はもちろんであるが、果形、着色、傷や病虫害痕の有無等の外観が評価の対象となり、とくに着色は重視される。そのため生産者は精緻な剪定技術、窒素多肥、中心花への人工授粉、強度の摘果、袋掛け、除袋、着色管理、徹底した薬剤散布等に対応している。このうち、袋掛けは元来病虫害防除が目的であった。しかし、農薬による防除が可能となった現在では、袋掛けにより着色が促進されることより、遮光度の強い袋を使用した着色促進技術として位置づけられている。着色管理技術としては、葉摘み、実回し、反射シートの使用等があり、着色促進に多大な労力を払っている。

収量の増大と果実肥大の促進を期待して、生産者は多量の窒素を施肥する傾向がある。青森県におけるリンゴに対する平均窒素施肥量は 170kgN/ha であり、欧米の窒素施肥量 0-100kgN/ha に比べて多いといえる。窒素の多肥は収量増大に対して期待するほど効果はなく、むしろ着色阻害、貯蔵性低下等負の効果をもたらすことが知られている。とくに窒素多肥により着色が不良となることは重要である。

リンゴ果実の赤色色素はアントシアニンであり、主として cyanidin-3-galactoside である(3)。アントシアニン生合成経路を第1図に示す(4)。



第1図 cyanidin および quercetin の生合成経路

phenylalanine は phenylalanine ammonia lyase(PAL)により, t-cinnamic acid となり, cinnamate 4-hydroxylase(C4H)および 4-coumarate:CoA ligase(4CL)により, p-coumaryl CoA となる。p-coumaryl CoA は3分子の molonyl CoA と chalcone synthase(CHS)により縮合し, naringenin chalcone となり, chalcone-flavanone isomerase(CFI)により naringenin となる。Naringenin は flavanon 3-hydroxylase(F3H)により eriodictiol を経由して dihydroquercetin となり, dihydroquercetin は dihydroflavonol 4-reductase(DFR)により還元され leucocyanidin を経て cyanidin となる。また, dihydroquercetin は脱水素されることにより quercetin となる。従って, dihydroquercetin は cyanidin と quercetin の共通の前駆物質である。窒素多肥がこの経路にいかなる影響を与えるか明らかにすることは, 窒素多肥により着色が不良となる原因を解明する上で重要である。

筆者は連年無窒素栽培してきたリンゴ果実と窒素多肥したリンゴ果実を用いて果皮中のアントシアニン濃度とケルセチン濃度を測定し, 以下の事実を明らかにした(5)。アントシアニン濃度は常に無窒素区で高かった。全ケルセチン配糖体の濃度は窒素多肥区で無窒素区より高かった。また, アントシアニン濃度とケルセチン濃度の含量に対するアントシアニン濃度の割合は無窒素区で窒素区より高かった。これらのことと dihydroquercetin が両化合物の共通の前駆物質であることから, 無窒素区の果実では dihydroquercetin からアントシアニン合成にいたる系の活性がケルセチン配糖体合成系の活性より相対的に高いのに対し, 窒素多肥区の果実ではケルセチン配糖体合成系の活性がアントシアニン合成系より相対的に強いと結論づけた。このことが窒素多肥によりリンゴ果実の着色が不良となる直接的な原因と考えた。

しかし窒素がいかなる機作でこの経路に影響を与えるかは依然不明である。そこでこの合成経路の種々の中間代謝産物をリンゴ果皮に与え, 無窒素区の果実と窒素多肥区の果実でアントシアニンおよびケルセチン配糖体の濃度に及ぼす影響を検討することを目的にこの研究を計画した。リンゴ果皮の表面はクチクラ層で覆われているため, 果皮表面から前駆物質溶液を浸透させることは困難である。従ってリンゴ果皮のプロトプラストを調整し, プロトプラストを用いる実験系の確立を目指した。

I 無窒素区および窒素多肥区の着色率別果実収量, 果皮中のフラボノイド化合物濃度

窒素多肥によりリンゴ果実の着色が不良となることはよく知られた事実である。著者は1972年より無窒素栽培区(-N区)と窒素多肥区(+N区)を設け、窒素多肥がリンゴ樹の生育、果実収量、着色率等に及ぼす影響を継続して調査してきた。1995年の結果を示す。

実験材料および方法

供試材料

弘前大学農学部附属藤崎農場に試験区を設定した。土壌は岩木川の支流である平川の河成沖積の灰色低地土である。リンゴ園土壌として肥沃な土壌と位置づけられている。品種は丸葉台の紅玉である。-N区は1972年より処理を開始した。+N区は1997年より2kgN/樹を4月20日頃に施肥した。栽培管理は通常通りであるが、着色管理は行わなかった。10月20日に収穫し、肉眼的に着色率別(着色率90%以上, 80-90%, 60-80%および60%以下)に区分した。着色率別に収量、個数を求めた。

各着色率別に5個果実を採取し、果実の赤道面よりコルクボーラーで果皮を切り抜いた。果皮より果肉をできるだけ取り除き、液体窒素で急凍、凍結乾燥後、粉砕し、分析に供した。

分析方法

アントシアニンの定量:果皮粉末を1%HCl含有メタノールで抽出し、530nmで比色し、cyanidin 3-galactosideの分子吸光係数を34300(2)として濃度を求め、nmol/cm²で表示した。

ケルセチン(Q)配糖体の定量:果皮粉末試料30mgを70%メタノール5mlで一晩抽出した。定量はSpanosとWrolstad(6)の方法に準じて高速液体クロマトグラフィーで行った。カラムはODS,溶離液として0.07MKH₂PO₄(pH2.5)と100%メタノールを用い、2液グラジエントで行った。280nmで検出し、nmol/cm²で表示した。

結 果

第1表に1樹あたりの着色率別収量と一果重を示した。全収量は-N区で301.8kg, +N区で467.6kgであり、+N区で高かった。しかし、着色率90%以上の果実収量は-N区で

113.6kg であるのに対して、+N区では 8.9kg であった。また、着色率 60%以下の果実は -N区で 3.3kg であったのに対し、+N区では 184kg であり、窒素多肥により着色が著しく悪化することが認められた。このことは以前の結果と一致した(5)。また、一果重は+N区の果実が-N区の果実より重かった。

第1表 一樹あたりの着色率別収量および一果重

着色率	>90%	80-90%	60-80%	<60%	計
-N区					
収量(kg)	133.6	125.4	59.5	3.3	301.8
割合(%)	37.8	41.6	19.7	1.1	100.0
一果重(g)	171.1	178.4	174.0	157.0	
+N区					
収量(kg)	8.9	84.8	189.0	184.0	467.6
割合(%)	2.1	18.1	40.4	39.0	100.0
一果重(g)	196.0	195.8	183.3	163.1	

第2表 収穫時の果皮中の着色率別フラボノイド化合物濃度(nmol/cm²果皮)

着色率	アントシアニン	ロイコアントシアニン	全ケルセチン配糖体	全フラボノイド
-N区				
>90%	125 (33)*	49 (13)	209 (64)	383
80-90%	27 (23)	26 (22)	64 (55)	117
60-80%	30 (30)	29 (29)	41 (41)	100
<60%	14 (24)	29 (49)	16 (27)	59
+N区				
>90%	75 (23)	39 (12)	221 (65)	340
80-90%	54 (27)	34 (17)	111 (56)	198
60-80%	50 (27)	35 (19)	104 (55)	190
<60%	13 (10)	31 (25)	81 (65)	125

* ()内は全フラボノイド化合物に対する各フラボノイド化合物の割合(%)

アントシアニン濃度は着色率 90%以上では-N区で+N区より高かった。他の着色率では+N区で高かった。ロイコアントシアニン濃度は-N区の 90%以上を除くと+N区で高い傾向があった。また、-N区の着色率 90%以上を除くと着色率間で大きな濃度差はなかった。ケルセチン配糖体として Q-gulcoside, Q-galactoside, Q-rutinoside(rutin), Q-arabinoside, Q-xyloside および Q-rhamnoside を検出した。これらの含量を全ケルセチン配糖体濃度とした。全ケルセチン配糖体濃度はすべて

の着色率で+N区が-N区より高かった。全フラボノイド化合物濃度に対するアントシアニン濃度の割合は-N区の果実で+N区の果実より高い傾向があった。これに対し、全ケルセチン配糖体の割合は+N区で高い傾向があった。従って、-N区の果実ではアントシアニンの生合成が旺盛であり、+N区の果実ではケルセチン配糖体の生合成が活発であるといえる。このことが窒素多肥により着色が不良となる原因であると考えられ、以前の結果と一致した(5)。

Ⅱ リンゴ果皮のプロトプラスト調整とプロトプラストでのアントシアニン発現

窒素多肥したリンゴ果実の着色は不良となることを前節で示した。+N区の果実はアントシアニン濃度が低く、ケルセチン配糖体濃度の高いことが認められた。しかし、その生理的機作は不明である。前節第 1 図に示したアントシアニンおよびケルセチンの生合成経路のいずれかの段階で、窒素が影響を与えている可能性が考えられる。したがって、この経路の中間代謝産物をリンゴ果皮に添加し、アントシアニンおよびケルセチン生成に及ぼす影響を検討することで窒素の作用機作を明らかにすることができると考えられる。しかし、リンゴ果皮はクチクラ層に覆われているため果皮表面から前駆物質を浸透させることは困難である。そこで前駆物質の取り込みを容易にするために果皮のプロトプラストを調整し、それを用いて実験することを計画した。リンゴ果肉からのプロトプラストの調整例はあるが、果皮のプロトプラスト調整例は報告されていない。

実験材料および方法

- 1.実験材料** 弘前大学農学部附属藤崎農場に栽植されている未着色の紅玉果実を用いた。果実からコルクボーラーで果皮を切り取り、果肉をできるだけ除去してプロトプラストの調整に供した。
- 2.酵素液調整法** 蒸留水に 0.6M マンニトール、0.56M 塩化カルシウムとなるようにそれぞれを加え、溶解した。この溶液に 4%セルラーゼ“オノヅカ”RS、1%マセロザイム R-10、0.2%ペクトリアーゼ Y-23 をそれぞれ加え、溶解した。3500rpm で遠心分離し、pH を 5.9-5.8 に調整した。0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過滅菌した。25°Cの恒温器に 1-2 日間静置して雑菌のないことを確認してプロトプラストの調整に使用した。
- 3.培地の調整法(1)** 第 1 表に培地組成を示した。KM1-4 および MS-2 の所要量をそれぞれ蒸留水に入れ、糖を加えて pH5.6-5.8 に調整し、ろ過滅菌した。25°Cで 1-2 日静置し、雑菌の混入がないことを確認して使用した。
- 4.プロトプラストの調整** 3 枚重ねのガーゼで果皮を包み 75%エタノールで軽くすすぎ、蒸留水で洗浄した。その後、有効塩素濃度 1%の次亜塩素酸ソーダ液に入れ、15 分間脱気した。殺菌の終わった果皮を滅菌水で洗浄後、果皮 5 枚について 20ml の酵素液を加え、30°Cで 4 時間振とう処理した。8 枚重ねのガーゼでろ過して、未消化残さを除去し、ろ液を

80g で 6 分間遠心分離して、プロトプラストを分離した。

次いで、0.05M 塩化カルシウムを含む 0.56M マンニトール溶液(pH5.8)で 3 回洗浄した。その後、8P 培地および 10 μ M dihydroquercetin を含む 8P 培地で洗浄し、培地 4ml に懸濁し、照明下 25℃で培養した。

第 1 表 8P 培地の組成 Kao and Michayluk's medium (KM medium) (1)

KM-1 Major elements	mg/L	Sugars	mg/L
KNO ₃	1900	Glucose	68400
CaCl ₂ · 2H ₂ O	600	Sucrose	250
MgSO ₄ · 7H ₂ O	600	Fructose	250
KCl	300	Ribose	250
KH ₂ PO ₄	170	Xylose	250
MS-2 Na ₂ EDTA	37.3	Mannose	250
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	Rhamnose	250
KM-2 Minor elements		Cellobiose	250
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10.0	Sorbitol	250
H ₃ BO ₃	3.0	Mannitol	250
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.0	Casamino acid	250
KI	0.75	myo-inositol	100
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025		
KM-3 Organic constituents (Vitamin)			
Ascorbic acid	2.0		
Nicotin-amide	1.0		
Thiamine · HCl	1.0		
D-Ca pantothenate	1.0		
Cholin chloride	1.0		
Folic acid	0.4		
Riboflavin	0.2		
p-amino benzoic acid	0.02		
Biotin	0.01		
Vitamin B ₁₂	0.02		
Vitamin D ₃	0.01		
KM-4 Organic constituents			
Citric acid	40.0		
Malic acid	40.0		
Fumaric acid	40.0		
Na pyruvate	20.0		

結果と考察

写真 1 に示したようにプロトプラストを単離する事ができた。収量はシャーレあたり 1×10^5 個であった。細胞内物質が密に詰まったものと細胞内物質が見られない透明なものの 2 種類のプロトプラストが見られた。また、細胞の大きさが大きいものと小さいものが認められた。果皮組織の断面を写真 2 に示したが、果皮組織はおよそ 5 層の細胞からなり、第 1-2 層目は細胞内容物が詰まった小さい細胞からなり、アントシアニンの発現が認められた。3-5 層目の細胞は 1-2 層目の細胞より大きく、細胞内容物はあまり認められなかった。果肉細胞は果皮細胞よりはるかに大きいことが分かる(写真 3)。したがって、小さくて細胞内物質が密に詰まったプロトプラストは 1-2 層目に由来するものであり、透明で大きいプロトプラストは 3-5 層目の細胞に由来すると考えられる。また、細菌等によるコンタミネーションは認められなかった。

写真 4-9 に未着色紅玉果皮プロトプラストを $10 \mu\text{M}$ dihydroquercetin(DHQ)を含む 8P 培地で培養した 24 時間毎の写真を示した。培養 48 時間後でもアントシアニンの発現は認められなかった。48 時間後では崩壊した細胞が対照でも認められ、DHQ 添加により崩壊する細胞が多くなることが認められた。また、HPLC によるケルセチン配糖体の検出を試みたが、検出することはできなかった。

以上のようにリンゴ果皮からプロトプラストを調整することに成功したが、アントシアニンおよびケルセチン配糖体を検出することはできなかった。その理由の一つとして、殺菌に用いた次亜塩素酸ソーダの強い酸化力によりアントシアニン合成経路の中間代謝産物分解されたか、合成系が不調になった可能性が考えられた。その傍証として、着色した果皮でプロトプラストを調整するとアントシアニンが消失するという事実があげられる。

そこで殺菌の際、次亜塩素酸ソーダの使用をやめ、70%エタノール中で 5-15 分間殺菌する方法を検討した。5-10 分間では殺菌効果が不十分でコンタミネーションが激しく、実験には使用できなかった。15 分と処理時間を長くするとエタノールによる障害が認められ、健全なプロトプラストは得られなかった。

そのほか、抗生物質の使用等、種々の方法を試みたが、いずれにおいてもプロトプラストでアントシアニンを発現させることはできず、プロトプラストを用いた実験を断念せざるを得なかった。

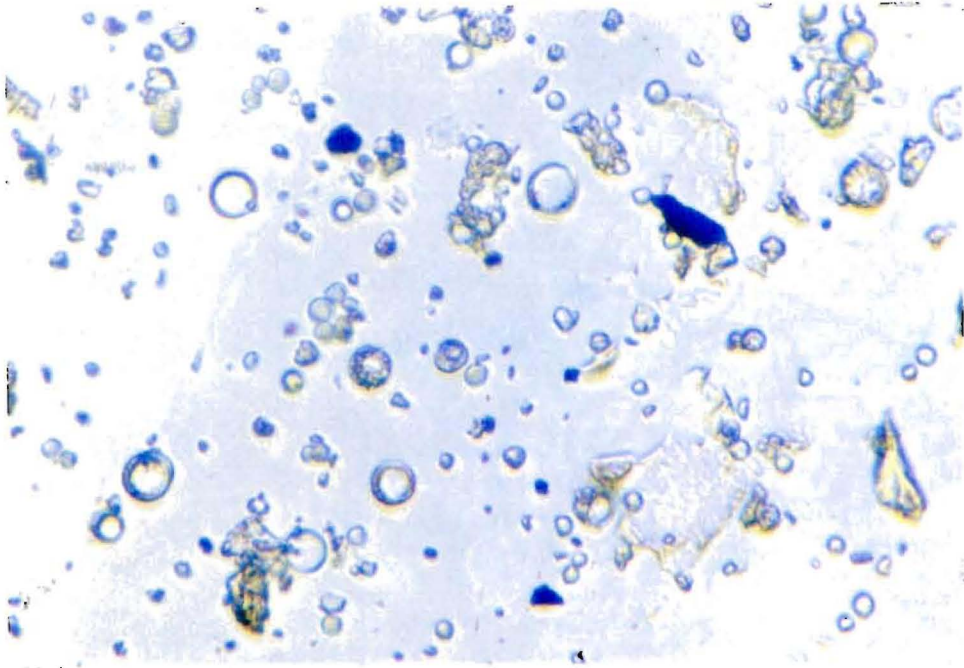


写真1 紅玉果皮から調整したプロトプラスト

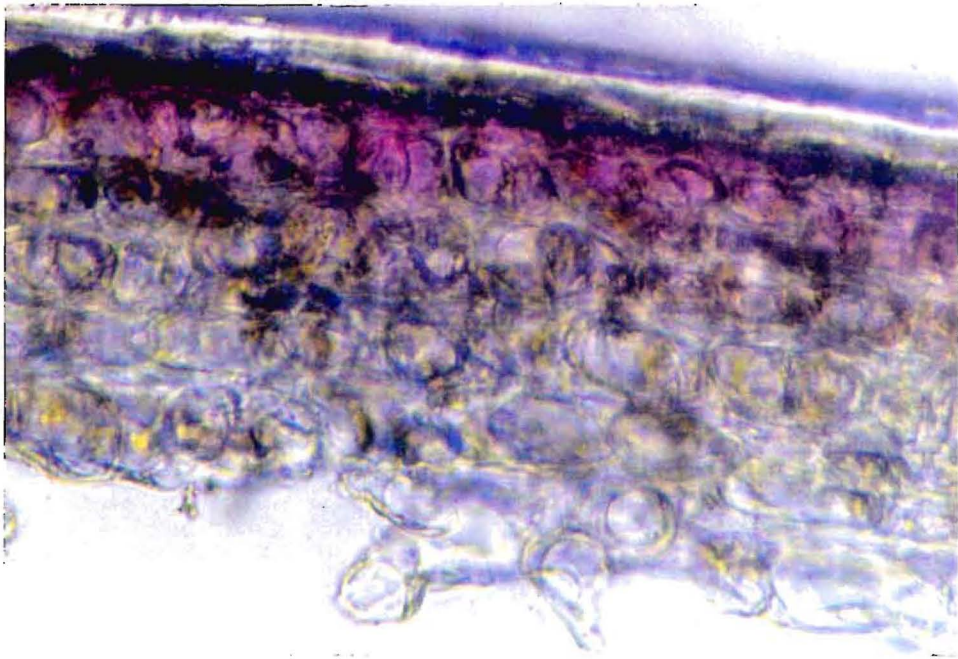


写真2 果皮の断面

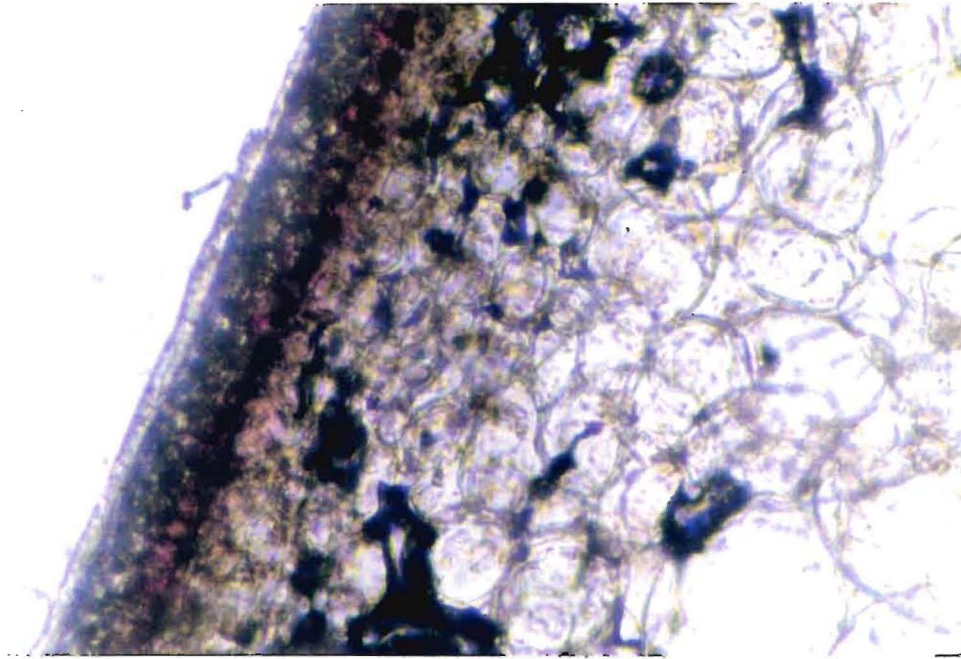


写真3 果肉組織のついた断面

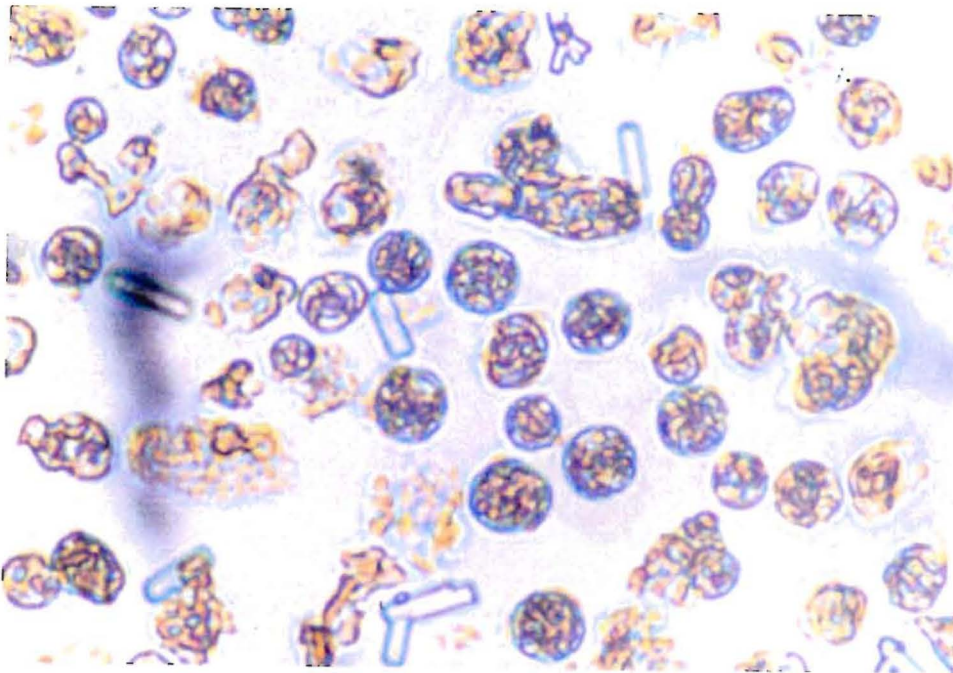


写真4 对照 8P 培地(培養開始時)

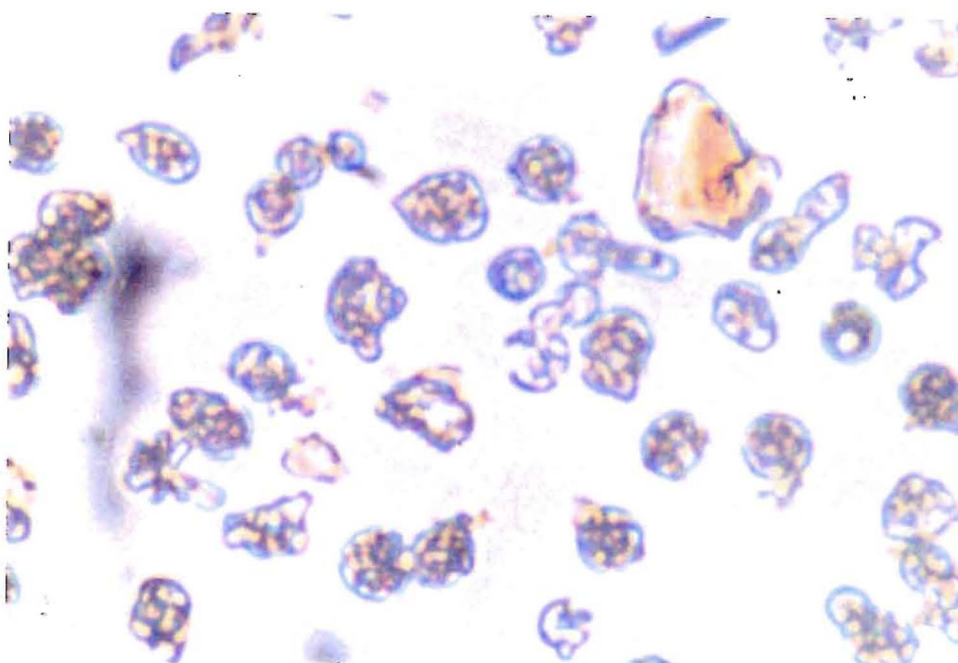


写真5 +DHQ 8P 培地(培養開始時)

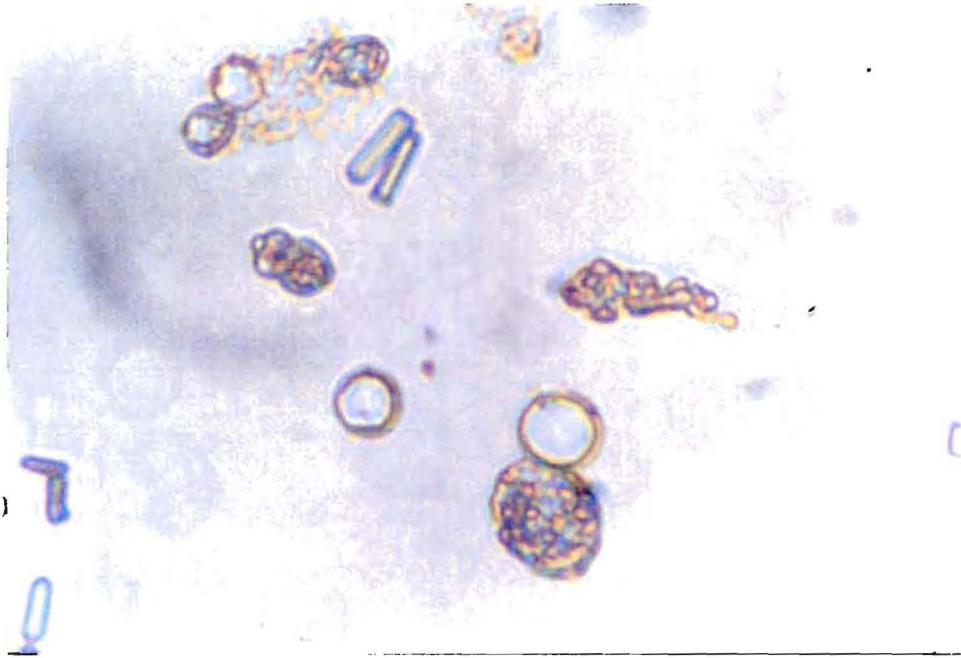


写真6 对照 8P 培地(4時間後)

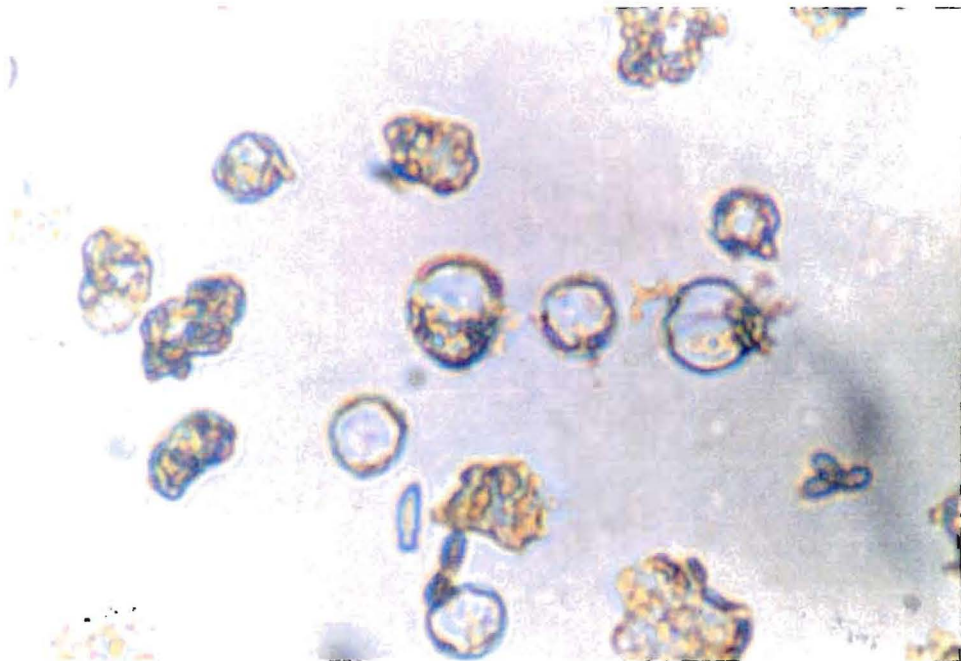


写真7 +DHQ 8P 培地(24時間後)

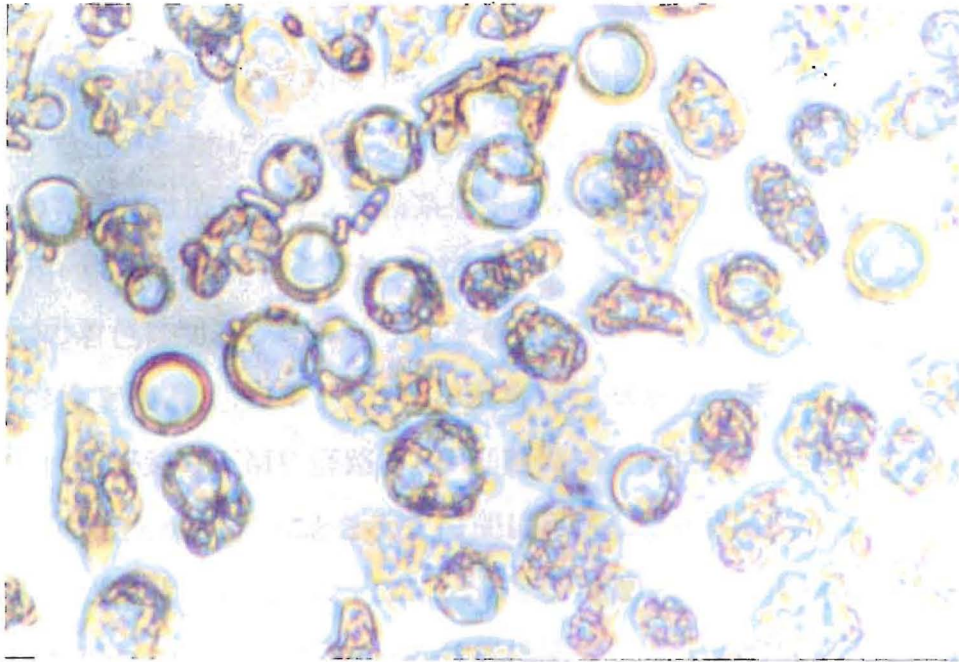


写真8 对照 8P 培地(48時間後)

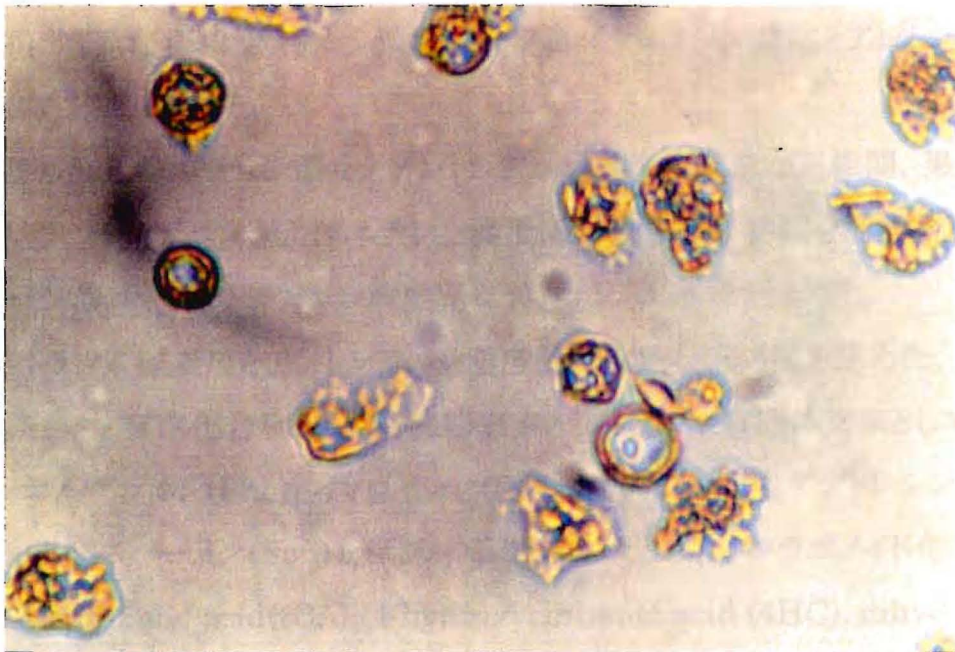


写真9 +DHQ 8P 培地(48時間後)

Ⅲ リンゴ果皮に添加した窒素化合物およびフラボノイド生合成経路中間代謝産物が アントシアニンおよびケルセチン配糖体の生成に及ぼす影響

本研究はリンゴ果皮のプロトプラストを用いて標記の実験を行うべく計画されたものであった。しかし、前節で述べたようにプロトプラストの調整には成功したものの、プロトプラストでのアントシアニンの発現には成功せず、実験系を確立することができなかった。それ故、**intact**なリンゴ果実を用いて標記の実験を行うことにした。

著者は、リンゴの着色に関連して以下のことを報告した(5)。

- 1)果実中の可溶性窒素濃度とアントシアニン濃度間に有意な負相関、可溶性窒素濃度とC6/C1比(糖代謝経路のEMP経路とPP経路の相対活性を示す値で、この比が小さいほどPP経路の活性が大きいことを示す。)間に有意な正相関、C6/C1比とアントシアニン濃度間に有意な負相関を認めた。このことは窒素施肥により果実の糖代謝はアントシアニンの前駆物質であるフェニルアラニンの合成に関与するPP経路よりEMP経路の活性が強まることを示し、着色に不利になるといえる。
- 2)果皮中の可溶性窒素は窒素多肥区で無窒素区より高かった。可溶性窒素中でもっとも濃度が高いのはアスパラギンであった。全アミノ酸濃度およびアスパラギン濃度とアントシアニン濃度間に有意な負相関、また、果皮中の遊離イソロイシン濃度とアントシアニン間に有意な正相関を見いだした。
- 3)着色開始期の果芯中エチレン濃度とアントシアニン濃度に有意な正相関、果肉中のスパーマミン濃度とアントシアニンおよびエチレン濃度間に有意な負相関を認めた。さらに果皮中のスパーマミン濃度とアントシアニン濃度間に有意な二次回帰を認めた。
- 4)果皮中のシトラマル酸濃度とアントシアニン濃度間に有意な正相関を認めた。

これらの結果から、窒素化合物として無機態窒素として硫酸、有機態窒素としてアスパラギン(Asn)、フェニルアラニン(Phe)、イソロイシン(Ile)、ポリアミン類としてプトレシン(Put)、スパミジン(Spd)およびスパーマミン(Spn)を供試することにした。また、フラボノイド生合成系の中間産物として *t*-cinnamic acid(tCA)、4-hydroxycinnamic acid (4HC)、dihydroquercetin(DHQ) を供試した。

実験材料および方法

- 1.実験材料** 弘前大学農学部附属藤崎農場に栽植の-N区と+N区の紅玉を使用した。9月中旬に未着色の果実を採取し、実験に供するまで0℃で保存した。
- 2.供試液の調整法** 各添加物質をジメチルスルホキシドの最終濃度が1%以下となるようにジメチルスルホキシドに溶解し、pHを5.6-5.8に調整し、蒸留水で所定の濃度に希釈した。
- 3.処理方法** 果実表面を75%エタノールで洗浄した。各添加液を0.6mlしみこませたガラス繊維ろ紙(3×3cm)を果面に密着させ、ラップで果実を包み一夜暗黒下、25℃で放置した。1個の果実に最大3処理する事ができたが一カ所は対照(1%ジメチルスルホキシド溶液)とした。その後、ろ紙片を取り除き、果実をラップで包み、15℃、蛍光灯下で72時間静置した。果実の処理部分を切り取り、できるだけ果肉を取り除き、2分してアントシアニンとケルセチン配糖体の分析に供した。
- 4.アントシアニンおよびケルセチン配糖体の分析方法**
アントシアニンおよびケルセチン配糖体の分析方法は第1節の方法と同様である。

結果と考察

第1表、第2表にそれぞれ窒素化合物およびフラボノイド前駆物質の添加実験の結果を示した。表示は対照区の濃度を1とした場合の相対濃度で示した。その理由は個々のリンゴにより対照の濃度が異なるからである。

第1表 窒素化合物添加実験（対照の濃度を1とした相対濃度）

	-N区		+N区	
	アントシアニン	全ケルセチン配糖体	アントシアニン	全ケルセチン配糖体
1mM 硫安	0.68	0.32	1.05	0.66
10mM 硫安	0.66	0.37	0.84	0.55
1mM Asn	0.68	0.69	0.72	0.43
1mM Put	0.77	0.55	0.73	1.23
1mM Spd	1.25	0.59	0.96	1.30
1mM Spn	0.81	0.53	0.81	1.77

窒素化合物を添加した結果-N区では1mMSpdを除くとアントシアニン濃度は低下した。全ケルセチン濃度はすべての処理で低下した。+N区では1mM 硫安を除くすべての処理でアントシアニン濃度は低下した。一方、ケルセチン濃度は硫安とAsn処理で低下したが、

ポリアミン処理では上昇した。窒素化合物の添加がアントシアニンおよびケルセチン配糖体濃度に及ぼす影響は-N区の果実と+N区の果実で異なった。とくにケルセチン配糖体にたいする影響は異なり、-N区ではすべての窒素化合物で低下したのに対し、+N区ではすべてのポリアミン類がケルセチン配糖体の濃度を上昇させた。ポリアミン濃度は+N区の果実で高いという事実(5)と考えあわせるとポリアミン類がケルセチン配糖体の濃度を高めている一因とも考えられる。

第2表 フラボノイド化合物前駆物質の添加実験(対照の濃度を1とした相対濃度)

	-N区		+N区	
	アントシアニン	全ケルセチン配糖体	アントシアニン	全ケルセチン配糖体
1mM Phe	1.45	1.42	0.88	0.36
1mM tCA	0.77	0.71	1.17	0.91
1mM 4HC	0.70	0.63	1.17	0.51
1mM DHQ	0.85	0.70	1.32	1.36

第3表 対照のケルセチン配糖体の濃度を1とした場合の相対濃度

	1mM 硫安		1mM Asn		1mM Put		1mM Spd		1mM Spn	
	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N
Q-glc	0.27	0.81	0.64	0.32	0.45	0.75	0.57	1.00	0.41	1.58
Q-gal	0.29	0.29	0.50	0.29	0.40	1.00	0.67	2.00	0.40	2.00
Q-rut	0.36	0.53	0.80	0.57	0.43	0.81	0.62	1.00	0.50	1.27
Q-ara	0.60	0.11	0.50	0.33	0.25	6.00	1.00	5.00	0.25	5.00
Q-xyl	0.31	0.69	0.73	0.46	0.68	1.00	0.63	1.13	0.62	1.70
Q-rha	0.34	1.10	0.62	0.41	0.67	2.25	0.48	1.38	0.63	2.25
Total	0.32	0.66	0.69	0.43	0.56	1.23	0.59	1.30	0.53	1.77

	1mM Phe		1mM tCA		1mM 4HC		1mM DHQ		濃度 (nmol/cm ²)	
	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N
Q-glc	1.70	0.25	0.81	0.92	0.55	0.52	0.74	1.43	30.5	37.8
Q-gal	2.00	0.50	1.00	1.00	0.67	0.60	0.33	1.50	2.5	4.0
Q-rut	1.15	0.29	0.81	0.95	0.50	0.71	0.57	1.54	16.0	20.3
Q-ara	0.60	0.75	0.75	0.83	0.88	0.67	0.25	0.75	4.8	5.0
Q-xyl	1.40	0.94	0.63	0.88	0.58	0.53	0.83	1.45	45.5	55.8
Q-rha	1.54	0.56	0.70	0.93	0.79	0.76	0.56	1.16	21.3	27.5
Total	1.42	0.36	0.72	0.91	0.63	0.51	0.70	1.36	120.5	150.3

フラボノイド化合物前駆物質の添加実験でアントシアニン濃度を上昇させたのは-N区では Phe のみであり、他の化合物は低下させた。それに対し+N区では Phe に効果は認め

られなかったが、他の化合物ではアントシアニン濃度に上昇効果が認められた。とくに DHQ で効果が大きかった。全ケルセチン配糖体に関して、-N区では Phe に上昇効果があり、他の化合物では低下した。一方、+N区では DHQ のみが濃度を上昇させた。

以上のことより、-N区の果実は Phe のプールサイズが小さく、Phe を添加によりアントシアニン生成が促進されたと考えることができる。これに対し、+N区では tCA 以降のプールサイズが小さくそれらの化合物の添加により、アントシアニン生成が促進されたといえる。しかし、+N区の対照のアントシアニン生成量は-N区のそれに比較して低く、これらの添加により-N区の果実並にアントシアニンが生成されたわけではない。全ケルセチン配糖体に関しては、-N区ではアントシアニンとほぼ同様な傾向を認めたが、+N区では DHQ のみ効果があった。このことは DHQ がフラボノイド生合成系でケルセチンの直前の化合物であることより、+N区の果実ではケルセチン合成が旺盛であることの傍証であると考えられる。

第 2 表には全ケルセチン配糖体について相対濃度を示したが、第 3 表には個々のケルセチン配糖体について対照の濃度を 1 とした場合の相対濃度を示した。第 3 表の最後の項目“濃度”は-N区、+N区それぞれ対照区での絶対濃度の平均値である。-N区 of 各ケルセチン配糖体の濃度は+N区 of 濃度より低かった。両区とももつとも濃度が高いのは Q-xyl であり、次いで Q-glc>Q-rha>Q-rut>Q-ara>Q-gal の順であった。各ケルセチン配糖体の相対濃度に及ぼす処理の影響に一定の傾向は認められなかった。したがって、各処理の影響はアグリコンであるケルセチンの生合成に及ぼしたものであり、配糖体化する際に影響を与えたとは考えられない。

IV 総 括

1. 窒素多肥した果実の着色は著しく不良となることが確認できた。+N区の一果重は-N区より重かった。果皮のアントシアニン濃度は着色率 90%以上の果実では-N区で高かったが、その他の着色率では+N区でやや高かった。ケルセチン(Q)配糖体として、Q-glucoside(Q-glc), Q-galactoside(Q-gal), Q-rutinoside(Q-rut), Q-arabinoside(Q-ara), Q-xyloside および Q-rhamnoside(Q-rha)を検出した。濃度は Q-xyl がもっとも高く、次いで Q-glc>Q-rha>Q-rut>Q-ara>Q-gal の順であった。これらの含量を全ケルセチン配糖体濃度としたが、すべての着色率において+N区で-N区より高かった。全フラボノイド化合物に対するアントシアニンの割合は-N区で高く、ケルセチン配糖体の割合は+N区で高かった。このことより、-N区の果実ではアントシアニン合成系が活発であるのに対して、+N区の果実ではケルセチン合成系が活発であることを示す。このことが窒素多肥により、リンゴ果実の着色が不良となる直接的な原因であると考えられた。
2. リンゴ果皮からプロトプラストを調整し、それを用いてフラボノイド合成経路に及ぼす窒素化合物およびフラボノイド合成系の間接代謝産物の影響を検討することを試みた。リンゴ果皮からプロトプラストを調整することに成功した。これは最初の報告であると思われる。しかし、種々検討したがプロトプラストでアントシアニンを発現させることはできず、プロトプラストを用いる実験を断念せざるを得なかった。
3. リンゴ果皮表面から窒素化合物、フラボノイド生合成中間代謝産物を吸収させ、それらがアントシアニンおよびケルセチン配糖体生成に及ぼす影響を検討した。窒素化合物を添加した結果、-N区では 1mM Spd を除くすべての化合物でアントシアニン濃度は低下した。+N区では 1mM 硫酸を除くすべてでアントシアニンは低下した。フラボノイド前駆物質を 1mM の濃度で添加したが、-N区では phenylalanine が、+N区では t-cinnamic acid, 4-hydroxycinnamic acid および dihydroquercetin がアントシアニン濃度を上昇させた。これらのことより、-N区の果実では phenylalanine のプールが小さいこと、+N区の果実では t-cinnamic acid 以降のプールが小さいことが推察された。+N区の果実でケルセチンの生合成経路の活性が強いことが示唆された。これらのことが窒素多肥によりリンゴの着色が悪化する原因と考えられた。

引用文献

1. Albert, R. : Protoplast of plant cells. *Methods of Enzymology* 69 : 69-84, 1980.
2. Buren, J.V. :Fruits Phenolics. The Biochemistry of Fruits and their Product vol 1,Hume,A.C. ed., p.269-304, Academic Press, London, 1970.
3. Chlmers, D.J.,Faragher,D.J., and Raff,J.W. : Changes in anthocyanin synthesis as an index of maturity in red apple varieties. *J. hort. Sci.* 48 : 387-392, 1973.
4. Fritsch, H and Drisebach, H.: Biosynthesis of cyanidin in cell culture of *Haplopappus gracilis*. *Phytochem.* 14 : 2437-2442, 1975.
5. 齊藤寛: リンゴの樹体生長, 収量および果実品質におよぼす窒素多肥の影響. 弘大農報 58: 198-314, 1994.
4. Spanos, G.A., and Wrolstad, E,. : Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 38 : 1565-1571, 1990.