

カキ ‘刀根早生’ 果実の流通中の熟柿化現象の 原因究明と防止技術の開発

稲葉 昭次
(応用植物科学コース)

Mechanism Clarification and Development of Preventive Techniques in Postharvest Rapid Softening of ‘Tonewase’ Japanese Persimmon Fruit

Akitsugu Inaba
(*Course of Applied Plant Science*)

岡山大学農学部学術報告 Vol. 96, 71-77 (2007) 別刷

Reprinted from THE SCIENTIFIC REPORTS OF THE FACULTY OF AGRICULTURE
OKAYAMA UNIVERSITY Vol. 96, 71-77 (2007)

研究紹介

カキ ‘刀根早生’ 果実の流通中の 熟柿化現象の原因究明と 防止技術の開発

稲葉 昭次
(応用植物科学コース)

Mechanism Clarification and Development of Preventive Techniques in Postharvest Rapid Softening of ‘Tonewase’ Japanese Persimmon Fruit

Akitsugu Inaba
(Course of Applied Plant Science)

Field grown ‘Tonewase’ Japanese persimmon had been cultivated as a leading persimmon variety in Wakayama Prefecture without any problem until 1993. Thereafter, however, a rapid fruit softening during postharvest distribution occurred and its rate increased every year coinciding with retardation of the temperature decrease in September which is the ripening season for the fruit. This produced a serious loss to the Prefecture. We clarified the mechanism of this fruit softening and developed a completely suppressible technique based on that mechanism.

In ‘Tonewase’ persimmon fruit, water stress acted as a primary signal that triggered stress-ethylene production in the tissue of calyx through stimulating the expression of one of the ACC synthase genes, *DK-ACS2*, a stress responsible ethylene biosynthetic gene. This ethylene diffused into pulp tissue of the fruit, where transcription of *DK-ACS1* for ripening-ethylene production was activated through a positive feedback system, which in turn caused rapid fruit softening.

This fruit softening derived from stress-ethylene was completely suppressed by packaging the fruit in perforated polyethylene bags or by using carton boxes laminated with a thin layer of plastic film. These techniques that alleviated water loss from fruit completely solved the rapid softening problem during postharvest distribution in ‘Tonewase’ fruit.

Key words : Japanese persimmon, fruit softening, ethylene biosynthesis, water stress

はじめに

私は、これまで40年近くに渡って果実の成熟現象の研究に取り組んで来た。15年ほど前からは分子生物学的手法を取り入れ、エチレンの生合成や信号伝達が果実の内部でどのように制御されているかを探って来た。これまでの研究結果を振り返ってみると、果実の成熟生理の解明に少しは貢献できたと思う面もあるが、新しい結果は次の疑問を生み出し、生命現象の奥深さを痛感しているところである。ここでは、私の研究生活の中で最も感動を覚えたテーマとして、表題のような内容を紹介してみようと思う。

1. 研究の背景

我が国のカキ生産量は現在、約23万tで、年々漸減傾向にある。そのような中で、和歌山県は増加傾向を示し、2004年の統計では全国の22%に当たる5.2万tを生産しており、全国第1位の地位を誇っている。品種としては、甘柿の‘富有’と渋柿の‘平核無’および‘刀根早生’が主体で、それぞれ和歌山県のカキ総生産量の12.6%、28.6%および57.2%を占めている。このように、同県では‘刀根早生’が最も多く生産されているが、全国的にみても‘刀根早生’の全生産量の63%が同県で生産されており、50億円産業として定着している。

‘刀根早生’は‘平核無’の早生系統として発見された枝代り(突然変異体)で、‘平核無’の収穫期が10月上中旬であるのに対して、9月中下旬となっている。和歌山県では、1978年頃から、当時、全国的に問題となっていたウンシュウミカンの生産過剰に対処するため、‘刀根早生’の導入に踏み切った。早生系統の特色を生かして、導入当初からハウスを利用した加温促成栽培を実施し、7月上旬から8月下旬の出荷を目標とした。しかしながら、‘刀根早生’は夏期高温期に収穫すると流通中に急速に熟柿化する果実が多発することが判明し、ハウス栽培を普及させることはできなかった。現在でもハウス促成栽培は行われているが、‘刀根早生’全体の0.1%程度に過ぎない。今日まで、ハウス栽培の流通中の熟柿化現象の唯一の回避策として、樹上脱渋処理が採用されている。この方法は、収穫の1週間程度前に果実を固形アルコールの小片を入れたポリエチレン袋で包み、数時間後に袋を切り裂いて処理を解除するという方法である。渋柿の脱渋方法としては、収穫後に炭酸ガスまたはアルコールを用いるのが一般的であるが、樹上脱渋処理は文字通り果実が樹体に着生している状態で脱渋してしまうやり方である。この方法は、一見、熟柿化現象を回避しているようであったが、実際には収穫から脱渋が完了し出荷するまでに要する3日間が省略できるため、熟柿化する前

に消費されていただけであった。このような利点はあっても、夏期高温期のハウス内での樹上脱渋処理は過酷な作業のため、ハウス栽培には限界があった。

このような状況下において、露地栽培の‘刀根早生’は熟柿化することもなく、着実に栽培面積が増加して行った。しかしながら、1993年頃から露地物でも流通中に熟柿化する果実が現れるようになり、1997年にはその率は20%を超えるようになり、和歌山県産の‘刀根早生’は市場取引を停止する動きが出始め、大変な窮地に追い込まれていった。そこで、和歌山県農林水産総合技術センター果樹試験場かき・もも研究所の依頼を受けて原因究明と防止策の開発に着手することとなった。

2. 果実の成熟とエチレンの関係

本題に入る前に、果実の成熟とエチレンとの関係について少し触れることとする。果実は、その成熟様相からクライマクテリック型とノンクライマクテリック型に分類される (Table 1)。両型の最大の相違は、成熟現象がエチレンによって支配されているかどうかにある。前者の型に属する果実は、樹上で一定の発育段階にまで達するとエチレンを生成するようになり、そのエチレンが成熟現象全体に開始指令を出す。また、この型の果実は収穫後もその性質を維持し、エチレンを生成するようになるため、ある程度未熟状態で収穫しても流通や貯蔵中に成熟させることができる。収穫後に起こる成熟現象の進行は追熟といい、そのため、クライマクテリック型果実は追熟型果実とも呼ばれる。また、この型の果実はエチレン処理に反応して果実自体がエチレンを生成する性質があり、そのため処理エチレンを除去してもその後も成熟現象は進行する。バナナはこの性質を利用して出荷されている典型的な果実である。一方、ノンクライマクテリック型果実はエチレンを生成することもなく、また処理エチレンに対する成熟反応もみられないため、樹上でしか成熟の進行は起こらない。そのため、ノンクライマ

クテリック型果実は非追熟型果実とも呼ばれる。糖の増加、有機酸の増減、着色の進行、肉質の軟化、芳香の発生など、成熟という現象は全く同じでありながら、なぜ一方はエチレンが成熟を支配しており、もう一方にはエチレンが関与していないのか、極めて不思議でまた多いに興味をそそられる点である。

3. エチレンの生合成と信号伝達

植物によるエチレンの生合成と信号伝達に関する研究は、現在までかなりの進展をみせている。後述のカキ果実を例として、生合成と信号伝達およびそれらの内的制御様相を模式的に Fig. 1 に示した。生合成は、ACC 合成酵素 (ACS) と ACC 酸化酵素 (ACO) による 2 段階反応となっているが、一般的には前者が律速段階となっている。現在では、両酵素をコードする遺伝子は多くの植物器官で特定されており、その発現解析や内的なフィードバック制御機構もよく研究されている。果実は未熟段階でもごく微量のエチレンを生成しており、これをシステム-1-エチレンと呼んでいる。この微量エチレンが発育の進行とともに徐々に増加して果実自体がエチレン処理をされたようになり、多量のエチレンを生成するようになり成熟が開始するとされている。この多量エチレンをシステム-2-エチレンと呼ぶが、システム-1 からシステム-2 への移行機構は長い間不明であった。我々はエチレン信号伝達系の最終段階に位置する *EIN3* という転写因子の発現を抑制した形質転換トマトを作成し、システム-1-エチレンの増加は発育制御的にプログラムされた機構によることを明らかにした。これと類似の現象は、未熟段階の果実をエチレン処理しても見られ、処理エチレンがポジティブフィードバック制御により果実自体の ACS 遺伝子の発現を誘導したり、ACO 遺伝子の発現を促進するため成熟が始まると考えることができる。一方、各種のストレスが植物のエチレン生成を誘導することも良く知られている。なかでも傷害エチレンに関す

Table 1 Classification of fruit based on ripening characteristics

Postharvest ripening	Respiration	Rate of ethylene production (nL/g/h)	Fruit
Ripening type	Climacteric type	100 >	Mume, Apricot, Chinese pear, Passion fruit, Sapote, Cherimoya, Kiwifruit
		10-100	Apple, Plum, Peach, Nectarine European pear, Avocado, Papaya, Feijoa
		1-10	Banana, Mango, Japanese persimmon, Fig, Melon, Tomato, Japanese pear (Kousui, Kikusui)
Non-ripening type	Non-climacteric type	0.1-1.0	Japanese pear (Nijisseiki, Housui, Niiitaka), Olive, Pineapple, Blueberry, Watermelon
		0.1 <	Grape, Citrus fruits, Cherry, Strawberry, Squash, Cucumber, Eggplant

る研究例は多く、その大部分は ACS の発現がネガティブフィードバック制御により調節されているとされている。このように、植物のエチレン生合成の調節機構には相反するフィードバック機構が働いている。また、エチレン生成の要因や条件に対して応答する ACS 遺伝子ファミリーが異なっており、カキの場合は *DK-ACS1* が成熟エチレンに対応しており、*DK-ACS2* はストレスエチレンに、また *DK-ACS3* はオーキシン濃度が増加した場合に発現が誘導される遺伝子と考えられる。*ACO* については、このような明確な対応関係はみられない。

このような植物のエチレン生合成の内的なフィードバック制御機構の解明には、エチレン作用阻害剤の活用が極めて有効な手段となる。これまで、エチレン作用阻害剤として 2,5-norbornadiene (NBD), diazocyclopentadiene (DACP) や 1-methylcyclopropene (1-MCP) が開発されてきた。我々は、これらの化合物をいち早く合成して実験に用いてきたが、なかでも 1-MCP の作用は極めて強力で、その閾値は、50 ppb とエチレンのそれより一桁低い。例えば、1-MCP を前処理してからエチレン

処理を行っても、バナナやカーネーションのように極めてエチレンに敏感に反応して成熟や老化が誘導されるものでも、全くエチレンに反応しなくなる。これまでの多くの研究結果から、1-MCP はエチレンの受容体である ETR や ERS タンパク質と恒久的に結合してエチレン作用を阻害するとされている。1-MCP は1994年に発見されたが、合成方法については述べられていなかった。そこで我々は、いち早くこの化合物を合成しその作用力を試したところ、極めて強力であることを認め、他の研究者に先駆けて果実のエチレン生合成の内的制御機構の研究に活用した。

4. ‘刀根早生’ の流通中の熟柿化現象の原因究明

ここまでのことを基礎知識として、本題に入ることとする。上述のように、露地栽培の ‘刀根早生’ でも1993年頃から流通中の熟柿化現象が現れるようになり、その率は年々増加して1997年には窮地に追い込まれることとなった。そこで、1998年からは和歌山県との共同研究という形で原因究明に乗り出すことになった。我々の研究

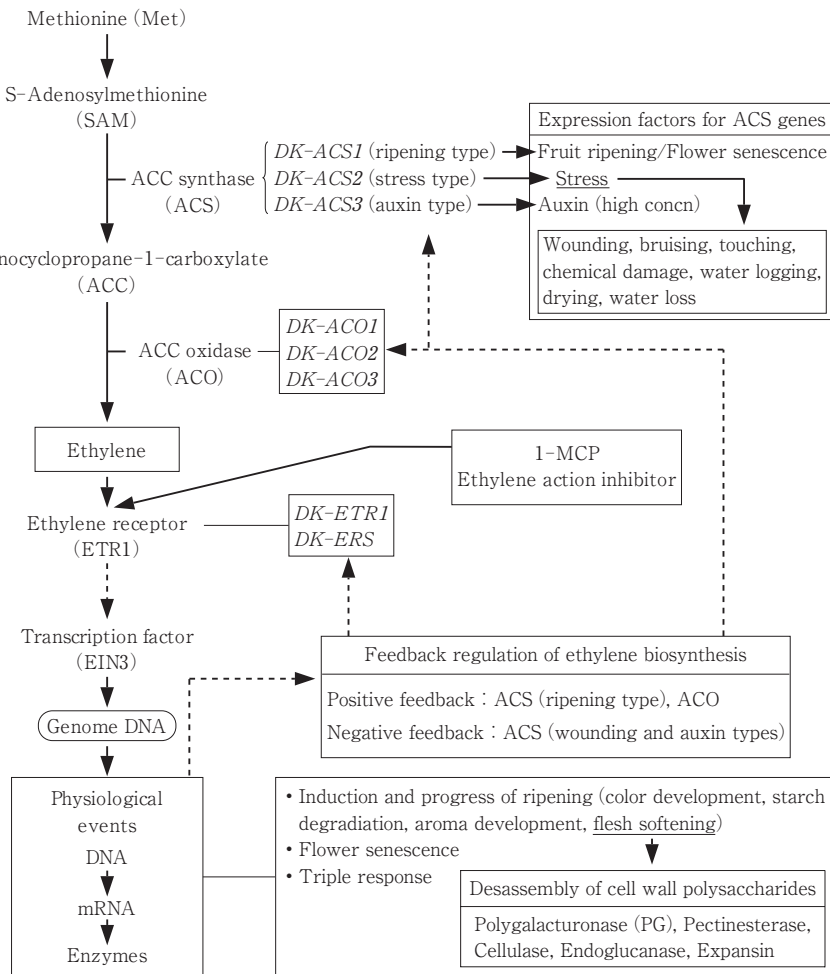


Fig. 1 Concepts of biosynthesis, signal transduction and feedback regulation system of ethylene in higher plants.

室では、それまでも多くの種類の果実を扱ってきたが、カキはクライマクテリック型に属する果実であるが、熟柿になるまでほとんどエチレンを生成しないために研究対象としては取り扱っていなかった。

果実の軟化にはエチレンが密接に関与していることは当然予測されたが、まず最初に導入当初からハウス栽培で問題になっていた早期軟化防止に関する和歌山県の試験研究結果を詳細に検討することから始めた。その結果、この現象は極めて複雑で、流通中の熟柿化の割合には、樹体の着生位置、栽培管理、果樹園の立地条件や果実の発育環境などと全く関連性が見られず、また年次変動も大きくて一貫性がなかった。唯一言えることは、当初はハウス栽培にのみ現れる現象で、露地物には全く見られないということであった。その点では、9月期の気温低下が緩慢になり始めてから露地物でも多発するようになったという点はなんとなくなぞけた。

そこで、1998年5月下旬に現地へ赴き、直接生産農家や試験場の研究員から話を聞くこととした。しかし、話を聞いても直接的な熟柿化の原因に到達するような内容は見当たらなかった。仕方がなく、幼果を持ち帰り予備実験を行うこととした。驚いたことに、持ち帰った幼果は日数の経過とともに、極めて多量のエチレンを生成し急速に軟化することが判明した。そこで、カキ果実のエチレン生成に関する過去の論文を検索したところ、カキは幼果ほど収穫後のエチレン生成量が多く、発育とともに減少して、収穫期近くになるとほとんど生成しないという論文に到達した。すぐに、本学の農場から‘平核無’を入手し、再現してみると‘刀根早生’と同様の結果が得られた。この幼果の軟化が‘刀根早生’の流通中の軟

化と同一かどうかは不明であったので、1-MCPを処理したところ軟化の進行を極度に抑制することができ、軟化には密接にエチレンが関与しており、恐らく流通現場の熟柿化現象も同じであろうという推論までに到達することができた。

次に、カキは我が国特有の果実であるため、当時としてはまだエチレン関連の遺伝子に関する報告は見られなかったため、ACS (*DK-ACS1*, *DK-ACS2*, *DK-ACS3*) と ACO (*DK-ACO1*, *DK-ACO2*) をクローニングして発現解析を行った (Fig. 2)。先述のように、カキは熟柿状態になるまでほとんど成熟エチレンを生成しない。そこで、‘平核無’の貯蔵果を用いて熟柿状態のものから mRNA を抽出しノーザン分析を行った。その結果、ACS としては *DK-ACS1* のみが発現しており、*DK-ACS2* の発現は見られなかった。次に、収穫期の1月ほど前のやや未熟段階の‘平核無’果実 (9月2日収穫) に対してプロピレン (エチレンのアナログ) 処理と切断傷害処理を行った。プロピレン処理に反応して1日後には *DK-ACS1* の強い発現誘導が見られたが、*DK-ACS2* の発現は弱かった。一方傷害処理では、9時間後に *DK-ACS2* の発現がみられ、その発現量は1-MCPの前処理によって促進される傾向があった。これらの結果からカキでは、*DK-ACS1* は成熟エチレンに関与しており、*DK-ACS2* は傷害 (ストレス) に応答する遺伝子であると結論付けることができた。これらの結果を踏まえて、‘刀根早生’の分析を行ったところ、収穫後2日には *DK-ACS1* と *DK-ACS2* の両方とも強く発現していた。このことは、‘刀根早生’の熟柿化を誘導するエチレン生成には何らかのストレスが関与しており、そのストレスエチレンが

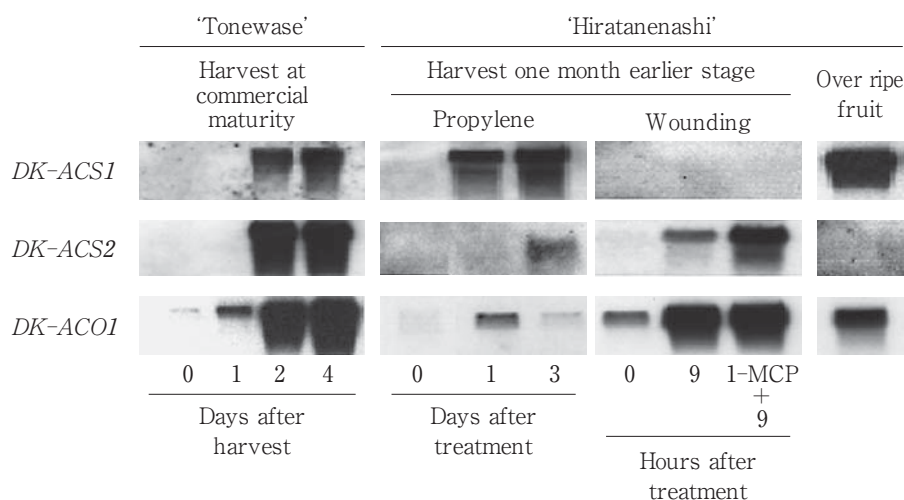


Fig. 2 Expression profiles of *DK-ACS1*, *DK-ACS2* and *DK-ACO1* genes in 'Tonewase' and 'Hiratanenashi' Japanese persimmon fruits. 'Tonewase' fruit were harvested at commercial maturity and ripened at 25°C. 'Hiratanenashi' fruit were harvested at 1 month earlier than commercial maturity and treated with propylene or 1-MCP. Propylene treated fruit were ripened at 25°C. 1-MCP treated or non-treated fruit were cut into 5mm cubes for wounding treatment. 'Hiratanenashi' fruit harvested at commercial maturity were ripened until over-ripe stage. Northern blot analyses were performed using these fruits or cubes.

果実をエチレン処理状態に追い込み、*DK-ACSI* の発現が誘導されて成熟エチレンが早期に生成するため、細胞壁分解酵素が誘導されて熟柿化するものと推論できた。*DK-ACO* の発現は、他の果実と比べて特異的なものではなかった。

5. ‘刀根早生’の流通中の熟柿化現象の防止技術の開発

次の段階として、収穫後のストレスについて研究を進めることとした。収穫という操作が果実に与えるストレスとしては、水分供給の停止ではないかということは容易に想像できる。そこで、高湿度条件下と低湿度条件下に保った果実の比較実験を行った。その際、幼果でみられた急激なエチレン生成は‘刀根早生’の流通中の熟柿化を誘導するエチレンと同一と考え、また幼果の方がエチレン生成量も多く、取扱いも容易であることから、幼果を用いて研究を進めることとした。高湿度条件は、青果物の流通・貯蔵中の「しおれ」防止技術として定着している有孔ポリエチレン袋で果実を包装（ポリ包装）することとした。袋に孔を開ける理由は、袋内が極端な低酸素および高二酸化炭素状態になるのを避けるためであるが、開孔しても袋内は十分高湿度状態になっている。結果としては、水ストレスが原因であるという推論は見事に的中した。高湿度条件下では、エチレン生成の開始が遅延し、それに伴って軟化も抑制された（Fig. 3）。

ここまでくると、実用化技術の開発には目処が立ったので、水ストレスを最初に感知する組織を特定するための実験を行った。果実をヘタ、離層部、果心部、果皮および果肉に分け、また1-MCPも活用して、先述の遺伝子の発現とエチレン生成の様相を調べた。離層部、果心部、果皮および果肉では収穫後2日目からエチレン生成は増加し初め、3日目にピークを示したが、ヘタでは1日目からエチレン生成の誘導が始まり、2日目がピークとなった。また、離層部、果心部、果皮および果肉のエチレン生成は1-MCPによって強く抑制されたが、ヘタでは逆に促進される傾向がみられた（Fig. 4）。このことは遺伝子の発現レベルでも明確に捉えられ、各組織でみられた*DK-ACS2*の強い発現は、ヘタを除く組織では1-MCP処理によって消失した（Fig. 5）。また、果心部と果肉では*DK-ACSI*の発現もみられた。これらの結果は、ヘタが最初に水ストレスを感知する器官であり、ヘタでストレス型の*DK-ACS2*が発現してエチレン生成が始まり、果肉組織がエチレン処理されて成熟エチレンの生成が始まり軟化が進行するという仮説を強く支持するものであった。しかも、ヘタで発現する*DK-ACS2*はエチレンによるネガティブフィードバック制御を受けていたが、その他の組織のエチレン生成は一般的なクライマクテリック型果実と同様にポジティブフィードバック制御下にあり、カキ果実のヘタは特異的な器官であっ

た。

ここまでの研究は‘平核無’幼果を主に用いてきたが、熟柿化現象の原因究明と防止策の開発方針は完成したと思われた。そこでいよいよ‘刀根早生’を用いて実用レベルでの研究に移ることとした。まず、適期収穫の‘刀根早生’を箱単位で有孔ポリ包装し、袋当たりの孔数と蒸散抑制程度やエチレン生成の抑制程度などの詰めを行った。その上で、実験室での静置状態の試験から動的な流通実態を想定して、和歌山から札幌まで空輸し、その後トラックで和歌山まで運ぶという輸送試験を行った。結果は良好で、和歌山へ回収後も有孔ポリ包装した箱では熟柿果実の発生は著しく遅延し、20日後ようやく発生がみられ、実用上は完全であった（Fig. 6）。しかしながら、実際の選果工程では既存の大掛かりな選果機が定着しており、その工程に有孔ポリ包装を導入すること

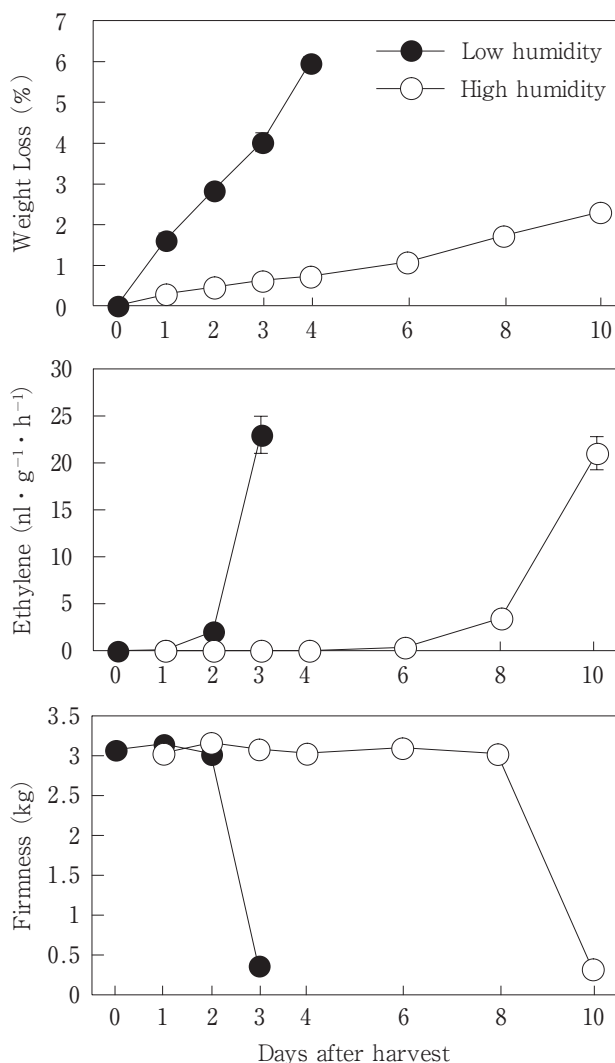


Fig. 3 Changes in weight loss, ethylene production rate and flesh firmness in young persimmon fruit held in low or high humidity conditions.

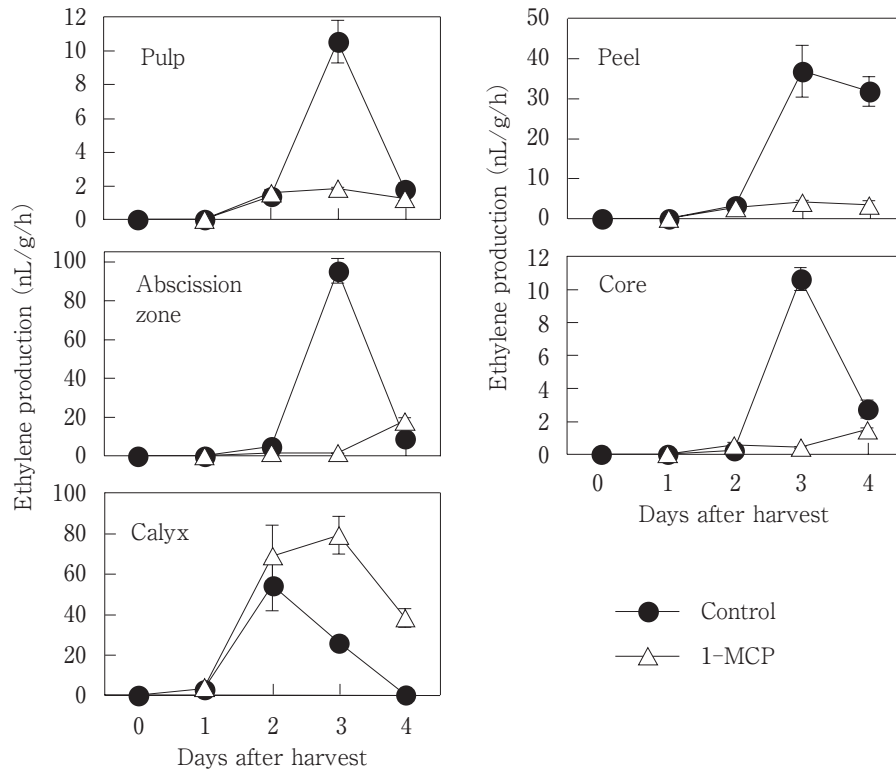


Fig. 4 Effect of 1-MCP treatment on the rate of ethylene production in pulp, peel, abscission zone, core and calyx tissues of young 'Hiratanenashi' Japanese persimmon fruit.

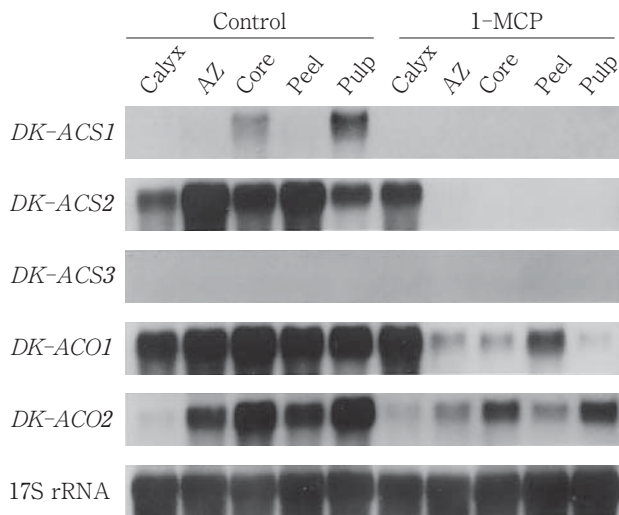


Fig. 5 Effect of 1-MCP treatment on the expression of *DK-ACS* and *DK-ACO* gene families in pulp, peel, abscission zone (AZ), core, and calyx tissues of young 'Hiratanenashi' Japanese persimmon fruit. Northern blot analysis was performed using the fruit at 3rd day after detachment with or without 1-MCP treatment.

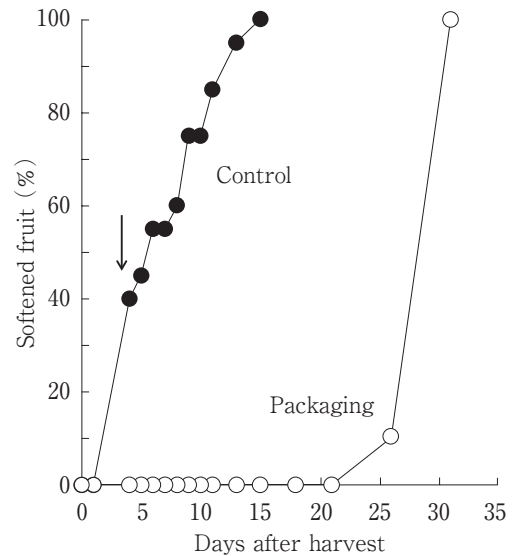


Fig. 6 Effect of perforated polyethylene bag packaging on fruit softening in 'Tonewase' Japanese persimmon fruit during transportation test. Fruit were transported from Wakayama to Sapporo by airplane and then brought back to Wakayama by truck. The arrow indicates the date when fruit were arrived at Wakayama.

は不可能であった。そこで、メーカーと共同でそれまで使っていた段ボール箱を改良し、箱の表面にプラスチックフィルムを張り合わせた防水段ボール箱を開発した。試行錯誤の末に、有孔ポリ包装に比べれば若干水分蒸散の抑制力は弱い、実用レベルでは熟柿化をほぼ完全に抑制する防水段ボール箱が完成した。この箱を用いて1999年に実際に小規模出荷を行ったところ、市場関係者は驚きをもって受入れてくれ、「完璧」であるとの判定をもらうことができた。この間、和歌山県では収穫から選果場への搬入、二酸化炭素脱渋処理およびその後の脱渋完了までの期間を通じて、果実からの蒸散を極力防止する方式を策定し、個々の農家に徹底的に浸透させた。翌2000年からは和歌山県産の'刀根早生'は9月期の温度低下が安全域に達するまでは、全てこの方式で出荷されるようになり、市場の信頼を回復することができた。このようにして、'刀根早生'の流通中の熟柿化問題は決着し、現在も9月期の温度低下の緩慢化は続いているにもかかわらず、何の問題もなく全国の市場へ安定出荷されている。

おわりに

私たちの研究室では、流通・貯蔵技術の向上を最終的な目標として、多くの果実の成熟生理の解明に取り組んで来た。研究の過程では、当時は入手不可能であった1-MCPをいち早く合成して活用することで、新規な結果に繋がった論文を多く発表することができた。これらの研究の中でも、ここで紹介した'刀根早生'の熟柿化現象は、最も強く印象に残っているものの一つである。特に、分子生物学的手法を導入した当時は、多くの人から、「ポストハーベットの研究手法ではない」という酷評にも近い言葉を聞かされた。そのつど、「新しい学問と研究手法の導入なしには、学問の進展はない」と反論して来た。その意味において、本研究は農業現場の窮地を救う

結果となり、実学としても極めて有用な研究手法であることを明確に示すことができた。本研究に関する主な成果を文献として掲載したので、興味ある方は、原著論文を一読願えれば幸いである。最後に、1-MCPの合成に際しては、現岡山大学名誉教授、河津一儀博士の懇切丁寧な指導を受けた。ここに記して、深甚なる感謝の意を表す次第である。

文 献

- 1) 播磨真志・中野龍平・山本貴司・小松英雄・藤本欣司・北野欣信・久保康隆・稲葉昭次・富田栄一：カキ '刀根早生' 促成栽培果実の収穫後の軟化発生。園芸学会雑誌, **70**, 251-257 (2001)
- 2) 中野龍平・播磨真志・久保康隆・稲葉昭次：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。園芸学会雑誌, **70**, 385-392 (2001)
- 3) 播磨真志・中野龍平・山内 勤・北野欣信・久保康隆・稲葉昭次・富田栄一：種々の保存温度下における有孔ポリエチレン包装によるハウス栽培カキ '刀根早生' 果実の軟化抑制。日本食品保蔵科学会誌, **27**, 325-330 (2001)
- 4) 播磨真志・中野龍平・山内 勤・北野欣信・久保康隆・稲葉昭次・富田栄一：有孔および無孔ポリエチレン包装によるハウス栽培 '刀根早生' 果実の軟化抑制技術の確立。園芸学会雑誌, **71**, 284-291 (2002)
- 5) Nakano R., Y. Kubo and A. Inaba : Water stress-induced ethylene in the calyx triggers autocatalytic ethylene production and fruit softening in 'Tonewase' persimmon grown in a heated plastic-house. *Postharvest Biol. Technol.*, **25**, 293-300 (2002)
- 6) Nakano R., E. Ogura, Y. Kubo and A. Inaba : Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from the fruit. *Plant Physiol.*, **131**, 276-286 (2003)
- 7) Harima S., R. Nakano, S. Yamauchi, Y. Kitano, Y. Yamamoto, A. Inaba and Y. Kubo : Extending shelf-life of astringent persimmon (*Diospyros kaki* Tunb.) fruit by 1-MCP. *Postharvest Biol. Technol.*, **29**, 319-324 (2003)