

報告

メタボローム解析によるウンシュウミカン 含有イオン性低分子化合物の 網羅的測定と比較

(Received Feb. 25, 2020 ; Accepted Jul. 21, 2020)

原 佑介^{1,4}, 菅原彩華², 山田クリス孝介^{1,4}, 遠藤慶子³,
芦谷早苗³, 五十嵐香織³, 曾我朋義^{1,3},
神成淳司^{1,2,4}, 黒田裕樹^{1,2,3,4*}

¹ 慶應義塾大学 大学院 政策・メディア研究科

² 慶應義塾大学 環境情報学部

³ 慶應義塾大学 先端生命科学研究所

⁴ 慶應義塾大学 SFC 研究所 AOI・ラボ

Comprehensive Measurement and Comparison of
Ionic Small Molecules Contained in *Citrus Unshiu* Marc.
Using Metabolomic Analysis

Yusuke Hara^{1,4}, Ayaka Sugawara², Kosuke Cris Yamada^{1,4},
Keiko Endo³, Sanae Ashitani³, Kaori Igarashi³,
Tomoyoshi Soga^{1,3}, Atsushi Shinjo^{1,2,4} and Hiroki Kuroda^{1,2,3,4*}

¹ Graduate School of Media and Governance, Keio University,
5322 Endo, Fujisawa, Kanagawa 252-0882

² Faculty of Environment and Information Studies, Keio
University, 5322 Endo, Fujisawa, Kanagawa 252-0882

³ Institute for Advanced Biosciences, Keio University,
246-2 Kakuganji, Tsuruoka, Yamagata 997-0052

⁴ AOI-Laboratory, Keio Research Institute at SFC, 317 Kasumi,
Nishino, Numazu, Shizuoka 410-0321

Few studies have comprehensively screened for ionic small molecules with high water-solubility in the traditional Japanese mandarin orange *Citrus unshiu* Marc. Here, we performed metabolomic analysis with capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) to comprehensively identify and accumulate gross quantitative data for water-soluble components in the different varieties of 'Aoshima' and 'Okitsu/Miyagawa Wase', according to grade and processing method. In this analysis, we focused on 151 components and showed the characteristic components related to each different variety and processing method, e.g., Met, Gly, and Asp in var. Wase; ornithine, putrescine, synephrine, and Gln in var. Aoshima; and pyroglutamate, GABA (γ -aminobutyric acid), and malonate in the juice of var. Aoshima. Furthermore, we conducted processing tests and identified components that were affected by squeezing or heating. These data represent basic data for further investigation of the metabolism of *C. unshiu* Marc. or chemical changes in their components due to external factors such as processing.

Keywords : *Citrus unshiu* Marc., metabolomic analysis, ionic component, characteristic component, processing

キーワード : ウンシュウミカン, メタボローム解析, イオン性低分子, 成分含有特徴, 加工処理

日本を代表するカンキツであるウンシュウミカン (学名 *Citrus unshiu* Marc.) は, 嗜好品として親しまれるのみならず, β -クリプトキサンチンの含有を根拠とした生鮮食品ならびに加工品の機能性表示登録が成されるなど, 健康長寿を増進する食品の例としても取り上げられている^{1)~3)}. 果実の食味や機能性は, 食品が含む様々な低分子化合物によって発揮される. ウンシュウミカンやレモン等のカンキツ類に含有される成分の研究では, 香りや抗酸化性, あるいは機能性などに着目して, 特に揮発性成分や高脂溶性成分等の解析がこれまで行われており^{4)~10)}, 特定成分の見解は蓄積されつつある. しかし, 一部の主要な成分やカンキツに特徴的な成分にのみ着目したものが多く, ウンシュウミカンの低分子化合物について総体的に捉えた研究は少ない. 特に高い水溶性を示すイオン性低分子を対象とした解析はほとんど無い. イオン性低分子には, エネルギー代謝や生合成に関わるアミノ酸や核酸, 有機酸, その他イオン性二次代謝物などが分類され¹¹⁾, その中には GABA (γ -アミノ酪酸) などの機能性が示唆される成分も含まれる. これらの分子の解析はウンシュウミカンの代謝に関わる基礎的データとなる他, これまで見過ごしてきた機能性成分を見出すことにもつながると考えられる. このような背景から, 本研究ではウンシュウミカンに含有されるイオン性低分子の総体的計測データを蓄積することを目的として解析を行った.

キャピラリー電気泳動-質量分析 (CE-MS) は 20 世紀後半に開発され, 21 世紀になって大きく普及し始めた質量分析技術であり, 水溶性かつイオン性の低分子化合物について良好な分離・解析性能を有する¹²⁾. 本研究では静岡県三ヶ日町産のウンシュウミカンを供試体とし, 代表的品種である青島温州ならびに早生温州に含まれる水溶性のイオン性成分を CE-MS で網羅的に計測し, 品種や等級, 加工品ごとの成分含有の特徴を解析した. また, 解析を進める中で加工品が果実と異なる成分プロファイルを示したことから, 搾汁や加熱等の加工品の生産工程による含有成分の変化傾向を分析したので, ここに報告する.

¹ 〒252-0882 神奈川県藤沢市遠藤 5322, ² 〒252-0882 神奈川県藤沢市遠藤 5322, ³ 〒997-0052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上 246-2

⁴ 〒410-0321 静岡県沼津市西野字霞 317

*連絡先 (Corresponding author), hkuroda@sfc.keio.ac.jp

表1 試験に使用した検体一覧

試験区分	種別	等級等	収穫・入手時期	検体番号	糖度 [BRIX]
品種・等級等 比較試験	早生温州	特選品/L	2017年12月	1	12.3
				2	12.5
				3	12.1
		良品/L		4	9.2
				5	10.2
				6	9.6
	青島温州	特選品/L	2018年2月	7	13.5
				8	14.8
				9	13.4
		良品/L		10	10.1
				11	9.3
				12	8.3
	ジュース	濃蜜青島ストレート	2017年12月	13	12.6
		ジュース		14	12.6
		純しぼり「極」		15	12.7
加工試験	青島温州	破砕物① ^{※1}	2019年1月	I	12
		破砕物② ^{※1}		II	11.7
		破砕物③ ^{※1}		III	12.4
		搾汁① ^{※2}		IV	12.1
		搾汁② ^{※2}		V	12.5
		搾汁③ ^{※2}		VI	11.9

※1 複数個体 (n=30 から 33) 由来の平均化サンプル

※2 複数個体 (n=30 から 33) 由来の平均化サンプル. 加熱試験では7つに分注して使用

1. 実験方法

(1) 分析材料

成分含有特徴の解析には、ウンシュウミカン生果、およびストレートジュースを用いた(表1)。静岡県浜松市北区三ヶ日町で栽培され、三ヶ日町農業協同組合の選果場にて選果・販売された青島温州(以降、「青島」とする)、および宮川・興津早生(以降、「早生」とする)を用いた。早生については、具体的な各品種の割合までは把握できていない。生果は品種ごとに等級(近赤外線センサー等で測定した糖度や外観を基準に選別¹⁾)が異なるサンプルを用意した。高糖度個体として三ヶ日町農業協同組合が定める特選品「ミカエース」(青島に関しては糖度13以上、早生に関しては糖度12以上)、低糖度個体として良品(青島に関しては糖度11未満、早生に関しては糖度10未満)を用いた。三ヶ日産ウンシュウミカンの加工品として、マルチ栽培や貯蔵を経た青島(製品名「濃蜜青島」)を原料として製造されたストレートジュース『三ヶ日みかんジュース純しぼり「極」』を用いた。濃蜜青島とは、1) 白色マルチシートで土壌を被覆して栽培し、2) 収穫時期を通常よりも1週間から半月遅らせ12月以降とし、高糖度で完熟に近い状態で収穫、さらに3) 収穫後は温度約8度、湿度85%を目安とした貯蔵庫で約2ヶ月間貯蔵して減酸させたものを指す。ジュースは、皮を剥いた濃蜜青島の生果をパルパーフィニッシャーで搾汁し、チューブ式殺菌機で100℃で24秒

以上で殺菌、ならびに88℃以上で加熱充填された。加工による含有成分変化の解析には、青島を用いた(表1)。三ヶ日町農業協同組合が定める秀品(糖度12以上)、優品(糖度11以上)、良品(糖度10以上)の3等級を用意し、全てLサイズを用いた。

(2) 加工試験

i) 搾汁試験

青島の秀、優、良品それぞれから10個体ずつ計30個体を選出し、外果皮を除去した上で1果実を2等分し、半分をミキサー(TM845, TESCOM)で破砕物とし、残りの半分をハンドジューサー(ステンレス製ハンドジューサーアミ付, ミネックスメタル)で搾汁とした。ジューサー内の網に残った繊維部は破棄した。得られた破砕物、果汁はそれぞれ混合して平均化し、1検体とした。試験には3検体ずつ用意し(表1, I-III, IV-VI)、メタボローム解析した。

ii) 加熱試験

採取した果汁(表1, IV-VI)をフラスコに分注し、栓をした状態で65℃, 85℃, 100℃のウォーターバスで2個ずつ湯煎した。搾汁がそれぞれ設定温度に達した後から計測して30秒および600秒間湯煎し、加熱サンプルとした。1個を室温で静置し、非加熱サンプルとした。これらの7個を1セットとしてメタボローム解析し、同試験を3反復分実施した。

(3) メタボローム解析

i) CE-MS 分析試料の調製

果実は、外果皮を除去し、中果皮、内果皮、維管束、じょうごう、果心を含む状態を可食部として重量を測定後、ミルサー (IMF-800DG, 岩谷産業) にて 30 秒ホモジナイズしたものをサンプルとした。ストレートジュースについては、内容物を十分に攪拌し分注したものをサンプルとした。試験区は表 1 の通り用意した (表 1, 1-12)。

加工による成分変化の解析においては、上述した破砕物や搾汁、ならびに異なる温度・時間で加熱処理した果汁をサンプルとした (表 1, I-VI) (実験方法 (2) を参照)。

ii) CE-MS による解析

前調製したサンプルを 4℃, 5000g で 20 分間遠心分離した上清 400 μ l を分取した上で、過去の報告した手順に準拠して実施した¹³⁾。Agilent CE-TOFMS System を用いて、陰イオン性代謝物質および陽イオン性代謝物質を測定した^{14)~18)}。測定データの解析には MasterHands (ver. 2.17.3.17, 慶應義塾大学先端生命科学研究所) を使用した。各成分の同定および定量は、標準品を用いて作成した検量線に従った。サンプル中の各成分の濃度は、内部標準検量法に従って算出した。約 520 成分について照合し、本研究の解析に用いた。

(4) データ解析

CE-MS の測定データは、Microsoft Excel を用いて数値解析、表作成、グラフ作成等を行った。主成分分析では各成分の濃度値データを使用し、R (<http://www.r-project.org>) の prcomp (scale=T) 関数により成分ごとに標準化した相関行列からの主成分分析を実施した。統計的解析は、Excel および R を用いて行った。二者間比較には Student's T-test を用いた。加熱試験における比較は、一元配置分散分析を行い、有意差が認められたものに対して、非加熱果汁と各加熱果汁をダネットの多重検定により比較した。統計解析の際、検出されなかった検体の測定値は 0 として取り扱った。

2. 実験結果および考察

(1) ウンシュウミカンおよびその加工品における水溶性成分の含有特徴

静岡県浜松市の三ヶ日町農業協同組合より青島および早生ウンシュウミカンの生果実、および青島の加工品としてストレートジュースを入手し、サンプルに含有されるイオン性代謝物の種類・量の網羅的測定を行った。解析結果のうち、成分標品と照合された成分ピークのみを取り扱った。全 15 検体中において各試験区で行った 3 回の反復試験 (表 1) のうち 2 回以上再現性良く検出された成分ピークは 151 種類存在した。これらの成分の分類は、基本アミノ酸およびその他のアミノ酸が最も多く、次いでアミンやアルカロイド等が多く検出された。含有量では、クエン酸、プロリン、スタキドリン、GABA、その他基本アミノ酸等が上位

を占めた。

次に、ウンシュウミカン生果の品種や等級ごと、およびストレートジュースの成分含有傾向の全体像を把握するため、151 成分の濃度測定データを元に主成分分析を行った。生果では青島と早生で PC2 軸方向に互いに離れて分布した (図 1A)。早生は 2 種類の等級が重複した分布を示したが、青島では特選品と良品で PC1 軸方向に別れて分布した (図 1A)。一方、ストレートジュースに関しては、生果由来の 4 試験区の分布から PC1 軸方向に更に離れて分布した (図 1A)。各サンプルに特徴的な成分を探索するため、主成分分析の因子負荷量をもとに各主成分分布に対する成分の寄与度を整理した (図 1B, 表 2)。主成分分析の結果 (図 1A) と合わせると、PC1 軸に沿ってストレートジュースに多い成分が正方向に、生果に多い成分が負方向に分布した (表 2A)。PC2 軸方向では、早生に多いものが正方向に、青島に多いものが負方向に分布した (表 2B)。各主成分軸への因子負荷量が高くかつ検出濃度が高い成分を抽出すると、早生ではメチオニン、グリシンやアスパラギン、青島ではオルニチン、プトレシン、シネフリンやグルタミン等が特徴的な成分として挙げられた (表 2B)。ストレートジュースではピログルタミン酸、GABA やマロン酸等が挙げられた (表 2A)。これらの成分を筆頭として、各軸方向に対して因子負荷量が正あるいは負方向に高い成分が、青島と早生の生果それぞれを特徴づけるものであることが示唆された。生果とストレートジュース間の成分含有傾向については、大きな差異があることがわかったが、この差異を生む原因については第 2 項で詳細に論ずる。

生果の等級を跨いだ比較では、青島でのみ生果の等級間で成分含有傾向の明確な差異が見られた (図 1A)。青島の特選品と良品の分布は PC1 軸方向に分離していたことから (図 1A)、青島で等級依存的に増減する成分は、表 2 の PC1 に示す成分であることが示唆された (表 2A)。三ヶ日町農業協同組合では、糖度や外観をもとに等級を定めている。ウンシュウミカンにおいては、糖度は重要な要素とされ、嗜好品としての価値の向上に繋がるほか、 β -クリプトキサンチンの様に高糖度個体ほど含有量が高い成分も存在し⁴⁾¹⁹⁾、特定の成分含有の担保に用いられることもある。今回の解析に用いたストレートジュースの原料は、糖度を高めることを主な目的としたマルチ栽培や貯蔵を経た青島であること、また解析に用いたサンプルの青島の特選品は良品と比較して高糖度であること (表 1) から、本解析で PC1 軸方向に分布したものの一部は糖度依存的に変化する成分と考えられる。早生においては、等級間で分布が重複しており、青島で観察された成分含有傾向と異なった。早生と青島で異なる傾向が見られる原因として、品種の違い、栽培体系の違い、収穫時期の違いなどによって代謝系が異なることが推定される。今回の試験ではこれを同定するには至らなかった。

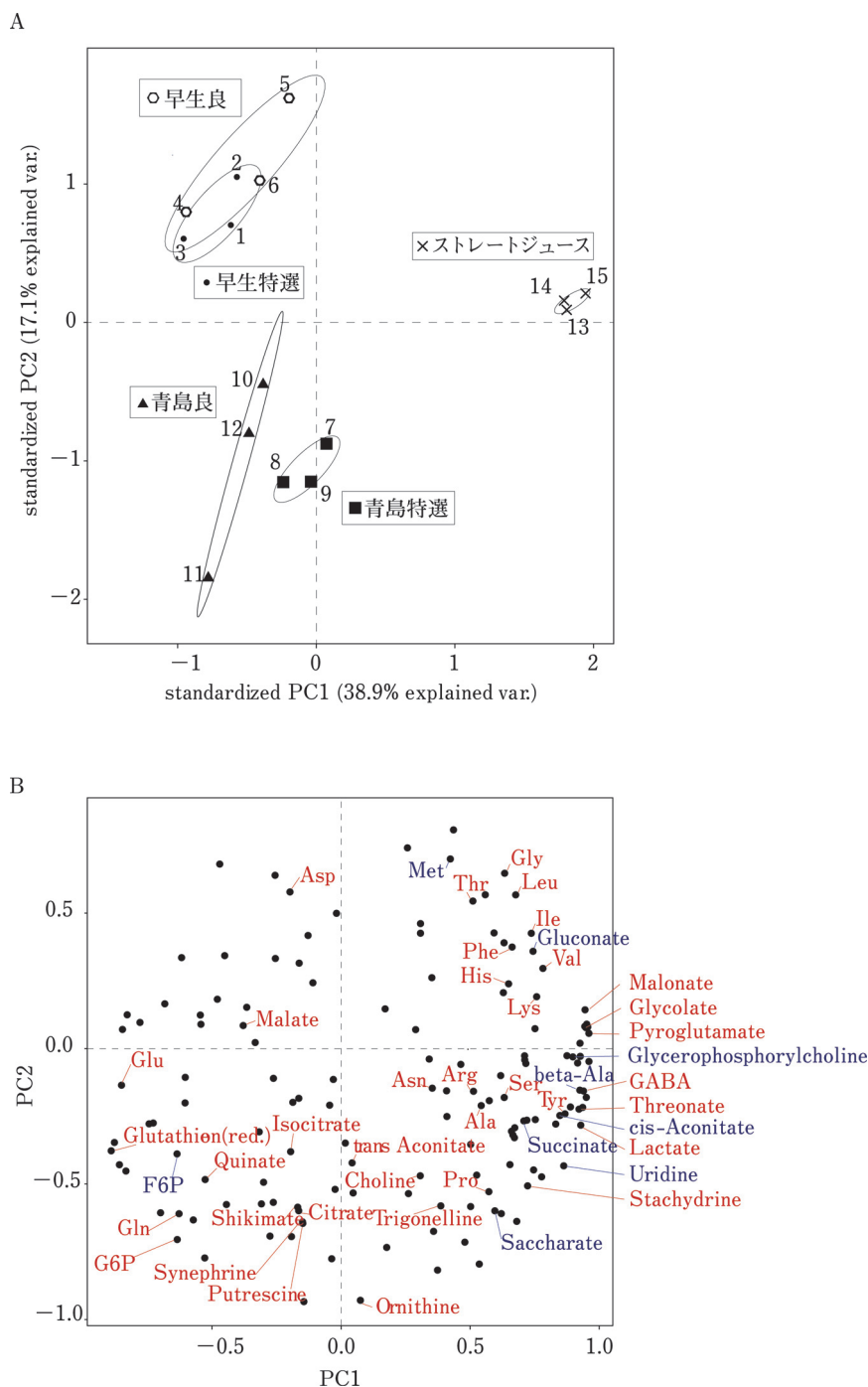


図1 主成分分析による含有成分の特徴の把握

(A) 主成分分析で得られた主成分のプロット。ウンシュウミカン4試験区(青島特選, 青島良, 早生特選, 早生良; 計12検体), およびストレートジュース1試験区(計3検体)について, 151成分の濃度測定データを用いて解析した。各軸のPCは主成分(principal component)を示し, 括弧内のパーセント数値は寄与率を示す。(B) 主成分分析で得られた因子負荷量のプロット。各点はそれぞれ1成分を示す。濃度が一定値以上高いものについて成分名をラベルし, 測定濃度が50 μ M以上は青色, 100 μ M以上は赤色で示した。

今回報告した含有成分の解析データは, 三ヶ日産のウンシュウミカンの品種等の違いが, 成分の含有パターンから科学的にも裏付けされることを示している。今後, 主成分分析の因子負荷量が高かった成分, あるいは全体を通して高含有量な成分(表2)に着目し, 特定成分の含有を根拠と

して品種等を差別化するなどの新たな販売戦略の検討につながることを期待できる。特にその中でも, クエン酸, スタキドリン, GABA, シネフリン, キナ酸などは比較的高濃度で検出され, すでに機能性表示登録があったり, 生理活性が示唆されたりしているため, ウンシュウミカンの撰

表 2 主成分分析の因子負荷量および成分の一覧

A		PC1					
ジュースに特徴的な成分				生果に特徴的な成分			
KEGG ID	成分名	因子負荷量	平均値 [μM]	KEGG ID	成分名	因子負荷量	平均値 [μM]
C00387	Guanosine	0.96	18.61	C00051	Glutathione (red)	-0.89	113.73
C01879	5-Oxoproline	0.96	418.41	C00097	Cys	-0.88	45.87
C00153	Nicotinamide	0.96	5.49	C00003	NAD+	-0.8	7.62
C00329	Glucosamine	0.96	5.64	C00197	3PG	-0.8	10.27
C03795	N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	0.96	7.34	C00025	Glu	-0.8	783.24
C01494	trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate	0.96	13.77	C00956	alpha-Amino adipate	-0.8	2.38
C00170	5-Methylthioadenosine	0.95	5.78	C00043	UDP-N-acetylglucosamine	-0.8	3.67
C02273	Digalacturonate	0.95	3.84	C00588	Phosphorylcholine (lecithin)	-0.8	24.49
C00147	Adenine	0.95	1.42	C00864	Pantothenate	-0.78	5.95
C00334	GABA	0.95	5831.18	C00357	N-Acetylglucosamine 6-phosphate	-0.74	5.62
C01546	2-Furoate	0.95	29.90	C01678	Cysteamine	-0.73	13.81
C00383	Malonate	0.95	154.46	C00019	SAM+	-0.70	2.58
C00160	Glycolate	0.94	125.04	C01029	N8-Acetylspermidine	-0.68	0.17
C00212	Adenosine	0.94	42.22	C00085	F6P	-0.54	52.50
C00140	N-Acetylglucosamine	0.94	48.15	C00092	G6P	-0.53	177.76
C00186	Lactate	0.93	193.30	C00064	Gln	-0.53	1880.99
C00106	Uracil	0.93	10.61	C00179	Agmatine	-0.52	0.70
C00191	Glucuronate	0.93	38.26	C00689	Trehalose 6-phosphate	-0.60	21.25
C00099	beta-Ala	0.93	53.78	C00346	Ethanolamine phosphate	-0.60	25.21
C01620	Threonate	0.92	117.76	C03406	Argininosuccinate	-0.57	1.67
C00021	SAH	0.92	0.32	C00074	PEP	-0.55	2.34
C00670	Glycerophosphorylcholine	0.90	80.32	C00078	Trp	-0.54	45.43
C08269	Betonicine	0.89	5.63	C00029	UDP-glucose	-0.53	42.68
C00475	Cytidine	0.88	17.94	C00296	Quinate	-0.53	727.11
C00082	Tyr	0.87	198.27	—	Cysteine-glutathione disulphide	-0.48	7.79
C00299	Uridine	0.86	55.87	C00612	N1-Acetylspermidine	-0.47	0.22
C00417	cis-Aconitate	0.85	84.75	C00491	Cystine	-0.45	0.86
C00263	Homoserine	0.83	13.46	C01046	N-Methylglutamate	-0.44	2.31
C00183	Val	0.78	279.92	C00711	Malate	-0.38	3334.53
C03761	3-Hydroxy-3-methylglutarate	0.78	7.23	C03758	Dopamine	-0.37	3.32
C00047	Lys	0.75	463.85	C01419	Cys-Gly	-0.33	1.92
C08261	Azelate	0.75	1.41	C00096	GDP-mannose	-0.32	2.40
C00122	Fumarate	0.75	9.28	C00015	UDP	-0.31	6.11
C00380	Cytosine	0.75	3.94	C00008	ADP	-0.30	2.59
C00257	Gluconate	0.74	63.01	C05382	S7P	-0.28	30.56
C00407	Ile	0.74	127.11	C00199	Ru5P	-0.26	10.60
C10172	Stachydrine	0.72	6156.91	C02630	2-Hydroxyglutarate	-0.26	8.28
C02115	Alpha-Methylserine	0.72	4.19	C03752	Glucosaminatate	-0.26	3.12
C02727	N-epsilon-Acetyllysine	0.72	1.07	C00315	Spermidine	-0.25	2.95
C02494	1-Methyladenosine	0.71	0.34	C00049	Asp	-0.20	1612.52
C00490	Itaconate	0.71	3.12	C00311	Isocitrate	-0.20	498.41
C00042	Succinate	0.71	79.51	C00250	Pyridoxal	-0.19	0.44
C00954	Indole-3-acetate	0.68	6.45	—	2-Hydroxypentanoate	-0.19	2.69
C00123	Leu	0.68	196.10	C00493	Shikimate	-0.17	102.59
C00624	N-Acetylglutamate	0.67	1.74	C00158	Citrate	-0.16	23966.03
C00719	Betaine	0.67	7.94	C00780	Serotonin	-0.16	0.86
C01234	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate	0.67	0.81	C03172	S-Methylmethionine	-0.16	34.20
C00079	Phe	0.66	298.48	C04548	Synephrine	-0.15	798.44
C02356	2AB	0.66	23.74	C00134	Putrescine	-0.15	1591.50
—	SDMA	0.65	0.45	C00354	F1,6P	-0.14	4.92

表 2 主成分分析の因子負荷量および成分の一覧 (続き)

A		PC1					
ジュースに特徴的な成分				生果に特徴的な成分			
KEGG ID	成分名	因子負荷量	平均値 [μM]	KEGG ID	成分名	因子負荷量	平均値 [μM]
C00135	His	0.35	140.80	C03626	ADMA	-0.13	9.25
C00037	Gly	0.33	255.61	C00637	Indole-3-acetaldehyde	-0.11	28.10
C00065	Ser	0.33	2086.21	C00093	Glycerophosphate	-0.04	8.65
C00993	Ala-Ala	0.33	2.63	C00979	O-Acetyserine	-0.04	3.35
—	Phe-Phe	0.33	0.21	C00483	Tyramine	-0.03	2.19
C00408	Pipecolate	0.32	5.93	C00300	Creatine	-0.02	0.99
C00489	Glutarate	0.32	5.42	C01425	Glu-Glu	-0.02	2.39
C00818	Saccharate	0.30	68.90				
C00314	Pyridoxine	0.29	0.50				
C02835	Imidazole-4-acetate	0.27	1.07				
C00148	Pro	0.27	7262.07				
C04137	Octopine	0.26	6.78				
C00041	Ala	0.24	2172.78				
C05771	Isopropanolamine	0.24	0.39				
C00879	Mucate	0.23	41.73				
C00062	Arg	0.21	5130.20				
C00188	Thr	0.21	326.31				
C01152	3-Methylhistidine	0.20	2.30				
C00103	G1P	0.20	26.79				
C02155	Gly-Leu	0.19	0.88				
C00086	Urea	0.18	49.85				
C00214	Thymidine	0.16	5.56				
C00534	Pyridoxamine	0.14	0.45				
C00073	Met	0.12	66.32				
C04501	N-Acetylglucosamine 1-phosphate	0.11	4.71				
C01035	gamma-Guanidinobutyrate	0.11	2.60				
C01004	Trigonelline	0.09	225.24				
C00327	Citrulline	0.07	7.49				
C00519	Hypotaurine	0.06	3.05				
C00152	Asn	0.05	3939.19				
C00986	1,3-Diaminopropane (trimethylenediamine)	0.05	0.84				
C03793	N6,N6,N6-Trimethyllysine	0.04	4.15				
C00437	N-Acetylmethionine	0.03	8.09				
C06213	N-omega-Methyltryptamine	0.03	0.57				
C00114	Choline	0.03	391.46				
C00788	Epinephrine	0.02	0.90				
C02640	Isoamylamine	0.02	0.40				
C01015	Hydroxyproline	0.02	10.18				
C00378	Thiamine	0.01	9.52				
C02714	N-Acetylputrescine	0.01	7.89				
C00077	Ornithine	0.01	275.49				
C02504	2-Isopropylmalate	0.01	0.93				
C02341	trans-Aconitate	0.01	238.75				
C00127	Glutathione (ox)	0.01	10.09				

表 2 主成分分析の因子負荷量および成分の一覧 (続き)

B		PC2					
早生に特徴的な成分				青島に特徴的な成分			
KEGG ID	成分名	因子負荷量	平均値 [μM]	KEGG ID	成分名	因子負荷量	平均値 [μM]
C00534	Pyridoxamine	0.81	0.45	C00354	F1.6P	-0.93	4.92
C01015	Hydroxyproline	0.74	10.18	C00077	Ornithine	-0.93	275.49
C00073	Met	0.70	66.32	C00327	Citrulline	-0.82	7.49
C00612	N1-Acetylspermidine	0.68	0.22	C05771	Isopropanolamine	-0.80	0.39
C00037	Gly	0.65	255.61	C00979	O-Acetyserine	-0.78	3.35
C03752	Glucosaminatate	0.64	3.12	C00029	UDP-glucose	-0.77	42.68
C00049	Asp	0.58	1612.52	C00378	Thiamine	-0.73	9.52
C04137	Octopine	0.57	6.78	C00086	Urea	-0.71	49.85
C00123	Leu	0.57	196.10	C00092	G6P	-0.70	177.76
C00188	Thr	0.54	326.31	C00250	Pyridoxal	-0.69	0.44
C01425	Glu-Glu	0.50	2.39	C05382	S7P	-0.69	30.56
C00437	N-Acetylmethionine	0.46	8.09	C00519	Hypotaurine	-0.67	3.05
C00314	Pyridoxine	0.43	0.50	C00134	Putrescine	-0.65	1591.50
C06213	N-omega-Methyltryptamine	0.43	0.57	C04548	Synephrine	-0.64	798.44
C00407	Ile	0.43	127.11	C00954	Indole-3-acetate	-0.64	6.45
C03626	ADMA	0.42	9.25	C03406	Argininosuccinate	-0.63	1.67
C00993	Ala-Ala	0.39	2.63	C00064	Gln	-0.61	1880.99
C00079	Phe	0.37	298.48	C00408	Pipecolate	-0.61	5.93
C00257	Glucuronate	0.36	63.01	C00019	SAM+	-0.61	2.58
C00491	Cystine	0.34	0.86	C00818	Saccharate	-0.60	68.90
C00179	Agmatine	0.34	0.70	C00158	Citrate	-0.60	23966.03
C00315	Spermidine	0.33	2.95	C00493	Shikimate	-0.59	102.59
C03172	S-Methylmethionine	0.32	34.20	C00103	G1P	-0.58	26.79
C00183	Val	0.30	279.92	C01004	Trigonelline	-0.58	225.24
C00986	1,3-Diaminopropane (trimethylenediamine)	0.26	0.84	C01046	N-Methylglutamate	-0.58	2.31
C00637	Indole-3-acetaldehyde	0.24	28.10	C00015	UDP	-0.57	6.11
C00135	His	0.24	140.80	C00199	Ru5P	-0.57	10.60
-	Phe-Phe	0.21	0.21	C02640	Isoamylamine	-0.54	0.40
C00047	Lys	0.19	463.85	C02504	2-Isopropylmalate	-0.53	0.93
-	Cysteine-glutathione disulphide	0.18	7.79	C00148	Pro	-0.53	7262.07
C01029	N8-Acetylspermidine	0.17	0.17	C00300	Creatine	-0.52	0.99
C03758	Dopamine	0.15	3.32	C10172	Stachydrine	-0.51	6156.91
C02714	N-Acetylputrescine	0.15	7.89	C00008	ADP	-0.49	2.59
C00383	Malonate	0.14	154.46	C00296	Quinate	-0.48	727.11
C00588	Phosphorylcholine (lecithin)	0.12	24.49	C03761	3-Hydroxy-3-methylglutarate	-0.47	7.23
C00074	PEP	0.12	2.34	C00114	Choline	-0.47	391.46
C00864	Pantothenate	0.10	5.95	C00879	Mucate	-0.47	41.73
C02273	Digalacturonate	0.09	3.84	C00043	UDP-N-acetylglucosamine	-0.45	3.67
C00078	Trp	0.09	45.43	C00380	Cytosine	-0.45	3.94
C00711	Malate	0.09	3334.53	C00299	Uridine	-0.43	55.87
C00160	Glycolate	0.08	125.04	C00003	NAD+	-0.43	7.62
C01494	trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate	0.08	13.77	-	SDMA	-0.43	0.45
C00329	Glucosamine	0.08	5.64	C02341	trans-Aconitate	-0.42	238.75
C00153	Nicotinamide	0.08	5.49	C00085	F6P	-0.39	52.50
C03795	N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	0.08	7.34	C00311	Isocitrate	-0.38	498.41
C00170	5-Methylthioadenosine	0.08	5.78	C00051	Glutathione (red)	-0.38	113.73
C00147	Adenine	0.08	1.42	C01152	3-Methylhistidine	-0.35	2.30
C01546	2-Furoate	0.08	29.90	C00127	Glutathione (ox)	-0.35	10.09
C00122	Fumarate	0.07	9.28	C00097	Cys	-0.35	45.87

表 2 主成分分析の因子負荷量および成分の一覧 (続き)

B		PC2		青島に特徴的な成分			
早生に特徴的な成分							
C00956	alpha-Aminoadipate	0.07	2.38	C00719	Betaine	-0.33	7.94
C00788	Epinephrine	0.07	0.90	C01234	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate	-0.32	0.81
C01879	5-Oxoproline	0.06	418.41	C00096	GDP-mannose	-0.31	2.40
C01419	Cys-Gly	0.02	1.92	C02356	2AB	-0.31	23.74
C00191	Glucuronate	0.02	38.26	C00624	N-Acetylglutamate	-0.29	1.74
				C00186	Lactate	-0.28	193.30
				C00263	Homoserine	-0.28	13.46
				C00357	N-Acetylglucosamine 6-phosphate	-0.28	5.62
				C01678	Cysteamine	-0.27	13.81
				C00042	Succinate	-0.27	79.51
				C02115	Alpha-Methylserine	-0.26	4.19
				C08261	Azelate	-0.26	1.41
				C04501	N-Acetylglucosamine 1-phosphate	-0.25	4.71
				C00417	cis-Aconitate	-0.25	84.75
				C00082	Tyr	-0.24	198.27
				C01620	Threonate	-0.22	117.76
				C00140	N-Acetylglucosamine	-0.22	48.15
				C08269	Betonicine	-0.22	5.63
				C00041	Ala	-0.21	2172.78
				C00093	Glycerophosphate	-0.21	8.65
				C00689	Trehalose 6-phosphate	-0.20	21.25
				—	2-Hydroxypentanoate	-0.20	2.69
				C02835	Imidazole-4-acetate	-0.19	1.07
				C00780	Serotonin	-0.18	0.86
				C00065	Ser	-0.18	2086.21
				C00334	GABA	-0.18	5831.18
				C00062	Arg	-0.16	5130.20
				C00212	Adenosine	-0.16	42.22
				C01035	gamma-Guanidinobutyrate	-0.16	2.60
				C00099	beta-Ala	-0.15	53.78
				C00152	Asn	-0.15	3939.19
				C00025	Glu	-0.14	783.24
				C00197	3PG	-0.12	10.27
				C00483	Tyramine	-0.11	2.19
				C02630	2-Hydroxyglutarate	-0.11	8.28
				C00346	Ethanolamine phosphate	-0.11	25.21
				C00489	Glutarate	-0.10	5.42
				C00214	Thymidine	-0.06	5.56
				C02727	N-epsilon-Acetyllysine	-0.06	1.07
				C00021	SAH	-0.05	0.32
				C00387	Guanosine	-0.05	18.61
				C02494	1-Methyladenosine	-0.04	0.34
				C03793	N6,N6,N6-Trimethyllysine	-0.04	4.15
				C00670	Glycerophosphorylcholine	-0.03	80.32
				C00106	Uracil	-0.03	10.61
				C00490	Itaconate	-0.03	3.12
				C00475	Cytidine	-0.03	17.94
				C02155	Gly-Leu	0.00	0.88

主成分分析から得られた第一主成分 (A) と第二主成分 (B) の因子負荷量のリスト。因子負荷量は 1 から -1 の値を取り、1 か -1 に近い値を持つ成分ほど、各軸方向への分布との相関が高い。濃度はウンシュウミカン 4 試験区とストレートジュース 1 試験区から得た 15 検体の平均値を示した。平均測定濃度が 50 μ M 以上は青色、100 μ M 以上は赤色で強調した。

取により機能性の発揮が期待される成分として着目していく価値があるだろう。

(2) ウンシュウミカンの含有成分が加工により受ける影響

ウンシュウミカンは果実として摂食する他、ジュースや菓子等、加工品も多く流通している。加工食品においても、生果に含まれる成分の機能性等が同等に期待できることが望ましい。そのため、果実を加工した際、含有成分にどのような変化が生じるのかを正確に把握することが、加工手法や加工品の摂取効果を検討する上で重要である。また、本研究においても、生果とストレートジュースの成分含有傾向に差異がみられたため(図1;表2)、その差異を生む原因を明確にする必要があった。そこで本研究では、ジュースを含め、多くの加工食品の工程に含まれる果実の搾汁や加熱殺菌に着目し、その工程前後の成分含有量を測定・比較した。

まず、果実の破砕物と搾果汁を比較することで、搾汁による影響を分析した。加工による影響に限定して分析するため、青島1個体の可食部を2等分し、同個体由来の破砕物と搾果汁を得た。その上で、複数の青島可食部から得た破砕物、および搾果汁をそれぞれ混合して平均化したものをサンプルとしてメタボローム解析した(表1, I-VI)。搾汁前後で水溶性含有成分を比較したところ、搾汁により39成分が有意に変化することがわかった(増加したものが2成分、減少もしくは喪失したものが37成分)(表3)。特に搾汁サンプルにおいて減少もしくは喪失する成分が多かった。果実破砕物での含有量が多い成分から挙げると、スタキドリン、GABA、プトレシン、グルタミン等が搾汁を経ることで約7割まで減じていた。一方、アルギニンとチラミンの2成分については搾汁によって増加した(表3)。表3に示した成分が搾汁によって増減した原因については、搾汁時のストレスにより果汁内での合成や分解が促進された化学的原因、あるいはアルベド等の繊維質部分が破壊される事による漏出・溶出、または繊維質部分への残留などの物理的原因などが原因として考えられる。カンキツ果実におけるフラボノイドでは、濃度および部位別含量はアルベドが最も高く、果汁においては少ないことが知られている²⁰⁾。搾汁によって劇的な減少を見せた成分については、繊維質部分にも多く含まれる成分で、これが本解析では廃棄した繊維部に残留していることが考えられる。今後、繊維部のみを対象としたより詳細な成分分析を行っていく必要がある。

次に、同サンプル由来の搾果汁を加熱前後で比較することで、加熱による成分変化を分析した。厚生労働省の定める果実搾汁の殺菌又は除菌の基準²¹⁾、ならびに一般的に生産現場で行われている殺菌条件を踏まえ、本試験では加熱条件を、65℃、85℃、100℃で30秒、10分とし、これらの加熱を経た果汁と非加熱果汁のメタボローム解析の結果を比較した。加熱前後を比較すると、32成分でいずれかの

温度帯において有意な成分の増減が見られた(図2A, B)。加熱により増加あるいは新たに獲得されたものは、20成分あった(図2A)。増加の様式は大別して3種類観察され、加熱されるほど増加したもの(ピログルタミン酸、マロン酸、ニコチンアミド(ビタミンB群)等)、85℃の温度域で増加したもの(システイン、オルニチン等)、65℃の温度域で増加したもの(アルギニン、グリセロホスホコリン)が存在した。加熱により減少したものは、12成分あった(図2B)。増加の場合と異なり、熱処理の温度が高く、処理時間が長いほど減少する成分が主であった。分散分析では差を検出したが、多重比較で帰無仮説を棄却できなかったものは6成分あり、これらは判断保留とした(図2C)。高温や処理時間が長いほど増加、あるいは減少した成分については、化学的に熱に弱く不安定で分解、変化しやすいものであると考えられる。例として、ピログルタミン酸は加熱により顕著に増加した様子が見られた。ピログルタミン酸はグルタミンやグルタミン酸の非酵素的反応および酵素的反応を介する分子内環化反応によって生じるが、この環化反応は熱や加圧などの物理的条件によっても促進される²²⁾。酸性条件での非酵素的反応によるピログルタミン酸の生成はグルタミン酸よりもグルタミンの方が起こりやすいこと²³⁾、また加熱によりグルタミンが減少してピログルタミン酸が生じることが報告されていること²⁴⁾²⁵⁾、さらに本解析ではグルタミン酸濃度は加熱により変化しなかったことなどから、本解析の結果でのピログルタミン酸の増加は主にグルタミンからの化学変化を反映したものと考えられる。表2に示した成分のうち、表3に示されていないものは加工により変化が見られなかった。これらの成分は搾汁や加熱などの影響を受けにくいものとして、ジュース化等の加工時の変動を考える必要はないであろう。

最後に、加工試験で見られた変動傾向、および青島の生果とストレートジュースのメタボローム解析結果を比較した際の成分含有量の多少比較を元にして、ウンシュウミカン含有成分の変化傾向について分析した。まず、ジュース加工する前に原料において変化すると考えられる成分を72成分リストアップした(表4A)。このうち、ジュースに多く検出されるが加工試験では増加が見られなかった51成分は、原料依存的に増加する成分と言える(表4A, #1-51)。ジュースで少なく検出されるが、加工試験では減少が確認されなかった21成分は、原料依存的に減少する成分と考えられる(表4A, #52-72)。今回メタボローム解析した生果の青島と、ジュース原料に使用された青島の素材間では、マルチ栽培や貯蔵の有無が差異としてある。そのため、上記72成分はマルチ栽培や貯蔵によって増減するものと推測される。例えば、貯蔵等を経た青島を原料としたジュースにGABAは多く含まれ、同時にGABA合成元成分であるグルタミン酸はジュースで少なかったが(表4A, #2,52)、これはウンシュウミカンにおいてGABAが貯

表3 搾汁により変化した成分

成分名	果実破砕物濃度 [uM]		压榨果汁濃度 [uM]		果汁/果実比
	平均	±SD	平均	±SD	
Stachydrine	7229.94	755.93	5101.25	441.33	0.71
GABA	5213.78	556.10	4151.20	595.95	0.79
Arg	4628.95	527.42	5639.14	179.78	1.23
Ala	2606.80	171.41	2504.91	178.02	0.96
Putrescine	1606.19	64.75	1234.41	32.39	0.77
Gln	1040.02	107.08	811.00	38.94	0.78
Syneprine	965.45	107.30	538.16	36.82	0.56
Choline	358.30	23.46	179.83	13.22	0.50
Lys	316.27	7.84	293.48	4.62	0.93
Trigonelline	218.73	13.17	111.40	12.13	0.51
Val	194.99	5.04	178.06	5.18	0.91
Glutathione (red.)	179.73	11.68	136.83	4.41	0.76
Gly	159.30	7.47	138.39	5.42	0.87
Tyr	132.05	4.17	119.73	5.34	0.91
His	69.63	2.87	51.76	0.99	0.74
F6P	61.56	4.49	42.95	4.67	0.70
beta-Ala	53.78	3.08	46.90	2.65	0.87
N-Acetylglucosamine	41.12	2.69	31.90	1.92	0.78
Glucuronate	39.88	1.37	27.61	2.02	0.69
Trp	21.48	1.83	11.24	0.76	0.53
Glucuronate	15.20	2.08	13.55	1.79	0.89
Phosphorylcholine	10.21	1.21	4.83	0.02	0.48
Hydroxyproline	9.95	0.69	6.38	0.49	0.64
N-Acetylputrescine	8.94	0.24	4.34	0.56	0.49
Betaine	8.24	0.24	5.33	0.35	0.65
3-Hydroxy-3-methylglutarate	6.89	0.36	5.14	0.29	0.75
Alpha-Methylserine	4.81	0.18	4.19	0.25	0.87
5-Aminovalerate	3.50	0.32	2.25	0.06	0.65
Thiamine	3.21	0.13	2.50	0.15	0.78
ADMA	3.18	0.33	2.25	0.18	0.71
gamma-Guanidinobutyrate	2.47	0.09	1.58	0.20	0.64
N-Acetylmethionine	2.18	0.13	1.61	0.03	0.74
Dopamine	1.81	0.10	1.35	0.07	0.75
Tyramine	1.26	0.12	1.61	0.02	1.29
Epinephrine	0.90	0.14	N.D.		N.A.
Agmatine	0.89	0.10	0.37	0.02	0.42
SDMA	0.53	0.07	0.10	0.17	0.17
1-Methyladenosine	0.41	0.03	0.33	0.03	0.81
N8-Acetylspermidine	0.26	0.08	N.D.		N.A.

本表には、果実の破砕物と搾汁した果汁の測定値を Student's t-test で比較し、 $p < 0.05$ で統計的に有意な差が見られた成分のみを挙げた。

蔵の条件によって増加するとして過去の報告と一致する²⁶⁾。上記 72 成分は、パスウェイ解析では、アルギニン生合成、バリン・ロイシン・イソロイシン生合成、アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝系、パントテン酸・CoA 生合成、グルタチオン代謝系などへの関連を示すことから、マルチ栽培や貯蔵がこれらの代謝系に主たる影響を与え、それが原料依存的な成分変動につながると考えられる。

次に、ジュース加工により変動すると考えられる成分を 22 成分リストアップした (表 4B)。ジュースに多く検出さ

れ、加工試験でも増加した 10 成分は、加工により増加する成分と言える (表 4B, #1-10)。ジュースで少なく検出され、加工試験でも減少した 12 成分は、加工により減少する成分と考えられる (表 4B, #11-22)。加工では、栄養成分や味などへの影響の有無が留意される点である。特に味については、今回の結果を踏まえると、ウンシュウミカンの主たる呈味成分と考えられるクエン酸、リンゴ酸、コハク酸、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸などは、加熱等の加工による影響はほとんど受けていないと考

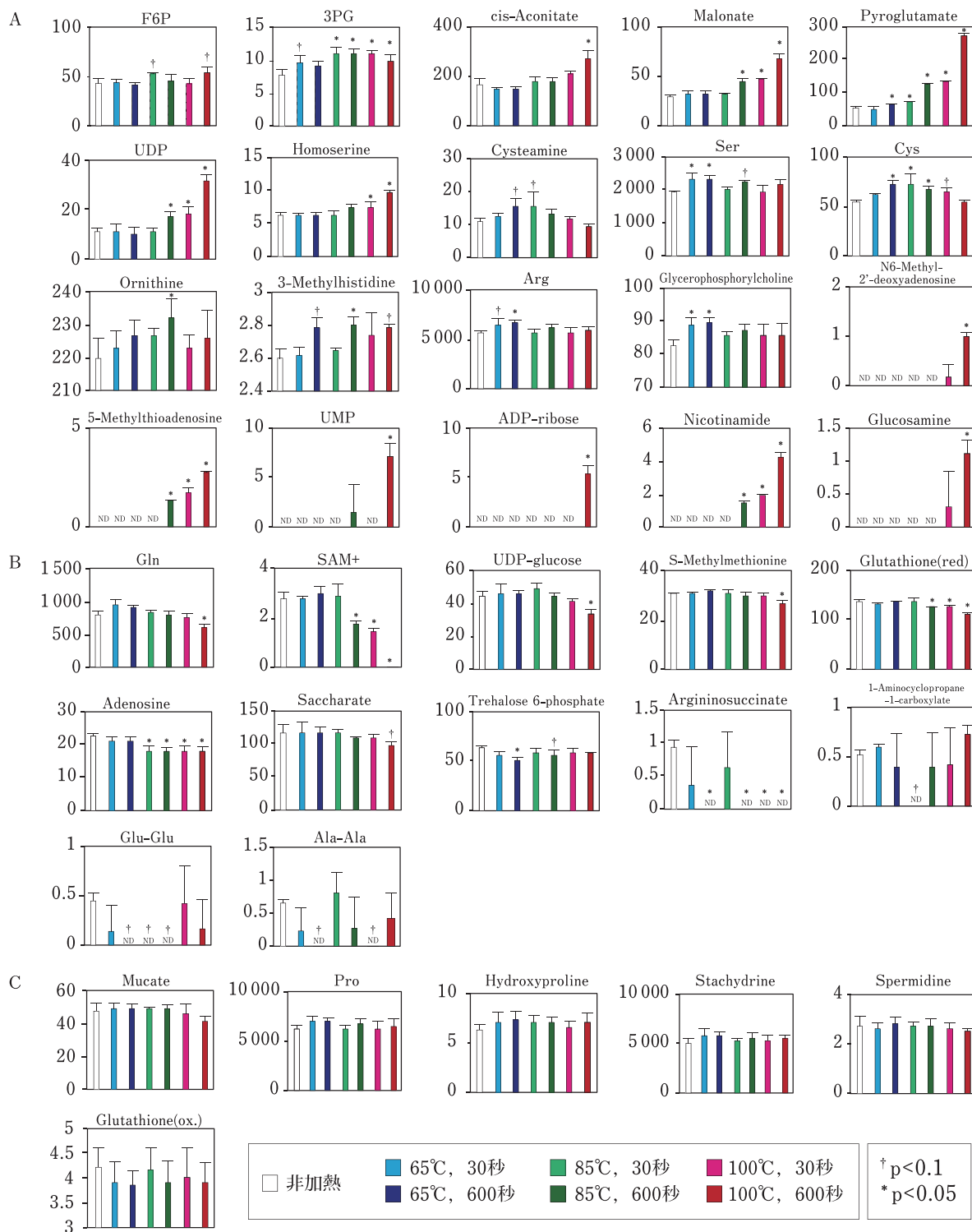


図 2 加熱による成分の変化

非加熱 1 区および加熱 6 区のそれぞれの成分の濃度変化. 各区の値は 3 回の反復試験の値を平均値±SD で示した. 測定値を ANOVA 解析し, $p < 0.05$ で有意であったものを選出した後, さらに非加熱区とそれぞれの加熱区をダネット検定により多重比較し, $p < 0.1$ 以下のものを変化傾向にあるものとした. 増加傾向にあるもの (A), 減少傾向にあるもの (B), そして多重解析では差が検出されず判断保留としたもの (C) を示した. ND は非検出を示す.

えられる. 加熱等により大きく食味が変化するとすれば, イオン性低分子以外の成分が変化することによる影響が大きいと推測される. 加熱により量が劇的に変化するピログ

ルタミン酸については, みかん果汁に対する加熱処理の度合いを反映するマーカー成分としても用いられると考えられる. ただし, 本解析では, これら 22 成分が原料依存的に

表 4 推定される変動原因による成分の分類

A	成分名	青島 平均濃度 [μM]	ジュース 平均濃度 [μM]	メタボローム解析の 比較による多少		加熱試験による変化		変動要因
				青島果実	ジュース	搾汁	加熱	
1	Stachydrine	6546.22	8089.80		○	減	判断保留	
2	GABA	5628.37	9117.64		○	減		
3	Ala	2111.35	2806.13		○	減		
4	Lys	440.21	565.02		○	減		
5	Thr	296.24	373.73		○			
6	Phe	275.52	360.86		○			
7	Val	258.44	353.23		○	減		
8	Gly	201.04	335.05		○	減		
9	Tyr	200.09	335.32		○	減		
10	Lactate	193.75	454.30		○			
11	Leu	147.77	284.51		○			
12	His	134.05	162.99		○	減		
13	Threonate	115.97	172.82		○			
14	Ile	109.43	173.08		○			
15	Succinate	84.83	114.67		○			
16	Uridine	63.91	104.68		○			
17	beta-Ala	51.29	82.27		○	減		
18	Met	49.72	81.79		○			
19	N-Acetylglucosamine	48.19	78.36		○	減		
20	Adenosine	41.29	78.08		○		減	
21	Glucuronate	31.09	68.86		○	減		
22	Gluconate	29.34	99.37		○	減		
23	2AB	23.73	29.77		○			
24	Cytidine	16.67	31.39		○			
25	Guanosine	16.64	35.76		○			
26	3-Hydroxy-3-methylglutarate	8.52	13.88		○	減		原料依存的に
27	Hydroxyproline	7.22	12.26		○	減	判断保留	増加
28	N-Acetylornithine	6.67	9.50		○	減		
29	Indole-3-acetate	5.42	8.52		○			
30	Betonicine	5.38	9.93		○			
31	Glutarate	4.74	6.84		○			
32	Cytosine	4.24	5.00		○			
33	Octopine	4.23	10.50		○			
34	Alpha-Methylserine	4.06	6.41		○	減		
35	Ala-Ala	2.05	4.02		○		減	
36	Uracil	1.35	11.44		○			
37	Imidazole-4-acetate	1.05	1.39		○			
38	N-epsilon-Acetyllysine	0.98	1.67		○			
39	Epinephrine	0.80	1.07		○	喪失		
40	N-Acetylglutamate	0.54	1.81		○			
41	Pyridoxine	0.45	0.59		○			
42	N-omega-Methyltryptamine	0.37	0.69		○			
43	1-Methyladenosine	0.34	0.42		○	減		
44	Pyridoxamine	0.33	0.55		○			
45	Digalacturonate	0.22	5.50		○			
46	Phe-Phe	0.09	0.24		○			
47	SAH	0.04	0.35		○			
48	Glycolate	N.D.	125.04		○			
49	2-Furoate	N.D.	29.90		○			
50	trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate	N.D.	13.77		○			
51	Adenine	N.D.	1.42		○			

表 4 推定される変動原因による成分の分類 (続き)

A		青島 平均濃度 [μ M]	ジュース 平均濃度 [μ M]	メタボローム解析の 比較による多少		加熱試験による変化		変動要因
成分名				青島果実	ジュース	搾汁	加熱	
52	Glu	895.38	253.76	○				
53	Quinate	825.73	571.93	○				
54	Ornithine	452.52	267.46	○			増	
55	G6P	257.02	73.46	○				
56	Cys	51.06	N.D.	○			増	
57	S7P	20.37	N.D.	○				
58	Cysteamine	12.15	N.D.	○			増	
59	3PG	10.23	1.04	○			増	
60	Cysteine-glutathione disulphide	8.97	2.88	○				
61	NAD+	8.57	N.D.	○				原料依存的に 減少
62	N-Acetylglucosamine 6-phosphate	6.32	3.27	○				
63	F1,6P	5.25	0.98	○				
64	O-Acetylserine	4.98	2.54	○				
65	UDP-N-acetylglucosamine	4.28	N.D.	○				
66	Hypotaurine	3.59	3.14	○				
67	N-Methylglutamate	3.24	1.04	○				
68	ADP	2.62	N.D.	○				
69	alpha-Aminoadipate	2.24	N.D.	○				
70	PEP	1.37	N.D.	○				
71	Cys-Gly	1.28	N.D.	○				
72	Pyridoxal	0.47	N.D.	○				
B		青島 平均濃度 [μ M]	ジュース 平均濃度 [μ M]	メタボローム解析の 比較による多少		加熱試験による変化		変動要因
成分名				青島果実	ジュース	搾汁	加熱	
1	Ser	2060.86	2549.38	○		増		
2	5-Oxoproline	98.46	1771.39	○		増		
3	cis-Aconitate	82.54	145.90	○		増		
4	Glycerophosphorylcholine	75.05	120.82	○		増		
5	Homoserine	12.39	32.41	○		増		加工により増加
6	Malonate	N.D.	235.08	○		増		
7	N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	N.D.	7.34	○		獲得		
8	5-Methylthioadenosine	N.D.	5.78	○		獲得		
9	Glucosamine	N.D.	5.64	○		獲得		
10	Nicotinamide	N.D.	5.49	○		獲得		
11	Gln	2531.85	N.D.	○		減	減	
12	Synephrine	905.10	740.10	○		減		
13	Glutathione (red.)	155.34	2.86	○		減	減	
14	UDP-glucose	72.43	10.82	○			減	
15	F6P	55.21	N.D.	○		減	増	
16	Trp	49.56	28.10	○		減		加工により減少
17	Phosphorylcholine	25.67	14.23	○		減		
18	Trehalose 6-phosphate	22.56	15.47	○			減	
19	SAM+	3.33	N.D.	○			減	
20	Dopamine	3.12	2.53	○		減		
21	Argininosuccinate	2.37	N.D.	○			喪失	
22	N8-Acetylpermidine	0.12	N.D.	○		喪失		

青島果実 (2 試験区 6 検体) とストレートジュース (1 試験区 3 検体) の測定値を Student's t-test で比較し, $p < 0.05$ で統計的に有意な差が見られた成分について, 加工試験の結果と合わせて変動原因を推測した. 原料依存的な変動 (A) と加工依存的な変動 (B) に分類した.

変化していなかったことは否定できないため、マルチ栽培や貯蔵等のみにサンプル間差異を限定した解析が今後必要となるだろう。

本研究では、静岡県三ヶ日産のウンシュウミカンを解析モデルとし、ウンシュウミカンの代表的品種である青島と早生、および青島の加工品であるストレートジュースに含有される水溶性成分を総体的に測定し、品種や加工ごとに特徴的な成分を整理した。さらに、加工による成分変化について搾汁と加熱の2種類の工程に分けて詳細に報告し、最終的に、マルチ栽培や貯蔵などにより変化すると考えられる成分を整理するに至った。これらのデータは、成分含有特徴に基づいて品質管理や製品展開に活用したり、特定成分の含有量に注目して高品質みかんのブランディングへ応用できるであろう。実際に、本研究の解析データを元に三ヶ日町農業協同組合では特定成分による新規機能性成分表示等の取り組みが現在進められている^{注)}。さらに品種や栽培方法、加工等と紐付いた総体的な成分解析データが集積されていけば、代謝経路レベルの視点からの考察や、生育予測などを通じたデータ駆動型の効率的な育種・栽培手法の検討なども現実的となる。今後、サンプリング時期や年度を跨いだ追跡調査、また三ヶ日町以外へのサンプリング地拡大を行うことで、ウンシュウミカンの含有水溶性成分の総体的分析データとしての一般化を目指したい。

3. 要約

ウンシュウミカンの成分分析では、高水溶性のイオン性低分子を網羅的に探索した研究はほとんど無い。本研究では、静岡県三ヶ日産ウンシュウミカンの‘青島温州’や‘興津・宮川早生’を対象に、高水溶性成分をキャピラリー電気泳動-質量分析法によるメタボローム解析を用いて調査し、品種、グレード、処理方法ごとの総測定データも蓄積させた。この分析では、対象とした151の成分のうち、早生ではメチオニン、グリシン、アスパラギン酸が、青島ではオルニチン、プトレシン、シネフリン、グルタミンが、青島の果汁ではピログルタミン酸、GABA (γ -アミノ酪酸)、マロン酸が、有意に多く検出された。さらに、生果と加工品、および加工前後での比較結果を統合し、含有成分量的変化に寄与すると推測される要因も整理した。これらの解析は、三ヶ日産ウンシュウミカンに含まれる高水溶性成分の基礎データとして、今後、代謝や加工による成分変化のさらなる検証につながる事が期待される。また、本研究において、クエン酸やGABAなどの機能性表示登録がすでにある成分に加えて、機能性が示唆される成分も検出された。農産物の新規機能性成分表示の検討等においてもメタボローム解析は有用であることを強く示していると言える。

注) 出版時現在、本解析データを元にして三ヶ日町農業協同組合から三ヶ日産ウンシュウミカンの新規機能性表示登録が受理されているⁱⁱⁱ⁾。

本研究は、静岡県先端農業推進拠点「AOI-PARC」を拠点とし、平成29年度から令和元年度まで行われた静岡県「ビッグデータ解析をはじめとする情報科学等を活用した農業等関連産業応用技術の開発委託」の委託研究資金によって推進されました。本研究実施にあたり、ウンシュウミカンの果実および加工品の解析用サンプルをご提供いただきました三ヶ日町農業協同組合の後藤善一代表理事組合長、縣裕一氏、成澤和久氏、宮崎裕也氏に深く感謝申し上げます。英文要旨の校正を担当して下さいました Sage K. Iwamoto 氏に感謝申し上げます。試験を補助いただいた慶應義塾大学の原佳枝氏に感謝いたします。本研究を推進する中、慶應義塾大学の矢作尚久准教授、島津秀雄特任教授からは多くのご助言とご指導を賜りましたことを深謝いたします。

データ利用可能性

本研究にて得たメタボローム解析データの提供については、要求があれば対応する。

文 献

- 1) 杉浦 実 (2019). 生鮮農産物から機能性表示食品へ; ウンシュウミカンの事例. 日本家政学会誌, **70**, 169-176.
- 2) 山本(前田)万里 (2015). 4) 食品の機能性を活用した疾病予防. 日本内科学会雑誌, **104**, 1819-1824.
- 3) Sugiura, M., Nakamura, M., Ogawa, K., Ikoma, Y., and Yano, M. (2012). High serum carotenoids associated with lower risk for bone loss and osteoporosis in post-menopausal Japanese female subjects: Prospective cohort study. *PLoS ONE*, **7**, e52643.
- 4) 久永絢美, 吉岡照高, 杉浦 実 (2018). 主要産地のウンシュウミカンに含有される β -クリプトキサンチン量の品種群間差およびその糖度との関連について. 園芸学研究, **17**, 459-464.
- 5) 久永絢美, 杉浦 実 (2018). ウンシュウミカン中のアスコルビン酸含有量の品種群による差異およびその糖度との関係について. 日本栄養・食糧学会誌, **71**, 251-256.
- 6) 馬淵良太, 趙 慧卿, 谷本昌太 (2018). 加熱処理がレモン果汁の成分プロファイルへ及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌, **65**, 183-191.
- 7) 高田優紀, 武曾 歩, 折田綾音, 山本久美, 船越淳子, 太田英明 (2018). 香酸カンキツ果汁の香気成分について. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部 研究紀要, **50**, 295-298.
- 8) 三宅義明 (2015). 国内地域特産の香酸カンキツ果実に含まれるフラボノイドの特徴. 日本食生活学会誌, **26**, 71-78.
- 9) 八巻良和 (1989). カンキツ類果汁中の有機酸組成. 園芸學會雑誌, **58**, 587-594.
- 10) 三鼓仁志 (2011). 柑橘ポリフェノール「糖転移ヘスベリジン」の機能性食品分野における可能性. 日本食生活学会誌, **21**, 263-267.
- 11) 平山明由, 曾我朋義 (2016). キャピラリー電気泳動-質量分析法によるメタボローム解析とその応用. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, **64**, 61-64.
- 12) Tomer, K. B. (2001). Separations combined with mass spectrometry. *Chemical Reviews*, **101**, 297-328.
- 13) Furukawa, T., Yamasaki, Y., Hara, Y., Otsuki, C., Maki, H., Soga, T., Moriyama, Y., and Kuroda, H. (2019). Axis elon-

- gation during *Xenopus* tail-bud stage is regulated by GABA expressed in the anterior-to-mid neural tube. *Int. J. Dev. Biol.*, **63**, 37–43.
- 14) Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., and Nishioka, T. (2002). Simultaneous determination of anionic intermediates for bacillus subtilis metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **74**, 2233–2239.
 - 15) Soga, T. and Heiger, D.N. (2000). Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **72**, 1236–1241.
 - 16) Soga, T., Igarashi, K., Ito, C., Mizobuchi, K., Zimmermann, H.-P., and Tomita, M. (2009). Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **81**, 6165–6174.
 - 17) Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., and Nishioka, T. (2003). Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, **2**, 488–494.
 - 18) Soga, T., Baran, R., Suematsu, M., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert, M., Nishioka, T., and Tomita, M. (2006). Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768–76.
 - 19) 濱崎 櫻, 大城 晃 (2003). ウンシュウミカンの果肉に含まれるβ-クリプトキサンチン量に対する栽培方法や貯蔵の影響. 静岡県柑橘試験場研究報告, **32**, 1–6.
 - 20) 野方洋一 (2005). カンキツ果実の機能性成分の検索とその有効利用に関する研究. 近畿中国四国農業研究センター研究報告, **5**, 19–84.
 - 21) 厚生労働省 (1959). 食品, 添加物等の規格基準 (昭和34年厚生省告示第370号).
 - 22) Gazme, B., Boachie, R.T., Tsopmo, A., and Udenigwe, C.C. (2019). Occurrence, properties and biological significance of pyroglutamyl peptides derived from different food sources. *Food Science and Human Wellness*, **8**, 268–274.
 - 23) 黒島英三郎, 大山義朗, 松尾隆治, 杉森恒武 (1969). 醤油醸造に与える微生物のグルタミン酸消長に及ぼす影響について—3-醤油中のグルタミン酸の形態とそれに及ぼす2,3の因子について. 醸酵工学雑誌, **47**, 693–700.
 - 24) 堀 信一, 小川鉄雄, 青木良平, 近藤安弘, 太田泰弘 (1956). 醤油中のL-グルタミン酸の消長について. 日本農芸化学会誌, **30**, 519–523.
 - 25) Ninomiya, K., Kitamura, S., Saiga-Egusa, A., Ozawa, S., Hirose, Y., Kagemori, T., Moriki, A., Tanaka, T., and Nishimura, O. (2010). Changes in free amino acids during heating bouillon prepared at different temperatures. *Journal of Home Economics of Japan*, doi:10.11428/jhej.61.765.
 - 26) 大野一仁, 笹山新生, 関 俊夫 (2011). 温州ミカンによる効率的なγ-アミノ酪酸富化方法に関する研究—γ-アミノ酪酸蓄積反応の最適条件に関する研究—. 愛媛県産業技術研究所研究報告, **49**, 1–5.

引用 URL

- i) <https://mikkabi.ja-shizuoka.or.jp/mikan/flow/> (2020. 6. 8)
- ii) <http://www.iab.keio.ac.jp/news-events/2010/11171628.html> (2020. 2. 7)
- iii) <https://mikkabi.ja-shizuoka.or.jp/news/single.html?id=176>
(令和2年2月25日受付, 令和2年7月21日受理)