

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07666

研究課題名(和文) 顕微分光画像解析による青果物鮮度劣化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of freshness deterioration mechanism of fruits and vegetables by microspectrophotometric technique

研究代表者

黒木 信一郎 (Kuroki, Shinichiro)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：00420505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：収穫後のホウレンソウ葉を対象として、特に外観的症狀等が生じる以前の潜在的な青果物の鮮度低下過程における細胞膜の透過性、アクアポリン発現量、および膜脂質過酸化物質の変化について定量的な検討を行った。細胞膜水伝導係数の高精度算出法を新規に提案して、その有効性を実験的に証明すると共に、収穫後における流出入方向の水透過性に差が生じること、およびアクアポリン経由、およびリン脂質二重層経由の水移動の変化を明らかにした。これにより、収穫後のホウレンソウ葉における水分保持機構の解明や鮮度保持・評価技術の発展にも寄与する成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were to investigate changes in permeability of cell membrane, aquaporin gene expression level, and lipid peroxidation during freshness deterioration process of spinach leaves. We have newly proposed a computation method with high accuracy for hydraulic conductivity of cell membrane and have empirically proved its effectiveness. Experimental results revealed that difference in water permeability between inflow and outflow occurred during storage. The changes in water movement via aquaporin and phospholipid bilayer were also clarified. This study contributes to the understanding of water conservation mechanism and the development of freshness maintenance and evaluation technology.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：水伝導係数 アクアポリン 脂質過酸化 平均破壊浸透圧 プロトプラスト 萎れ 鮮度 ホウレンソウ

### 1. 研究開始当初の背景

青果物の鮮度劣化に伴う初発的な症状の一つとして、細胞膜の機能劣化が有力な候補に挙がる。細胞膜の機能が劣化すれば、細胞内コンパートメントの維持や活性酸素の除去などが滞り、内容成分や水分の損耗が加速度的に進行すると予想されるからである。収穫後における細胞膜の機能劣化は水透過性の増大として検知できる可能性が指摘されている。しかしながら、アクアポリン関与の程度やリン脂質二重層の過酸化程度への検討も要するなど、鮮度劣化と細胞膜の水透過性の関係解明には残された課題が多かった。

### 2. 研究の目的

本研究では、鮮度劣化状態が段階的に異なる試料を用い、細胞膜の水透過性を支配すると考えられる「脂質過酸化物量」や「アクアポリン発現量」、および「細胞膜水伝導係数」を実測し、鮮度劣化に伴う細胞膜の化学的性質と物理的性質の変化とそれらの関係性を明らかにすることにより、細胞膜の水透過性の観点から青果物鮮度劣化のメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

供試材料にはガラス温室で水耕栽培したホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. cv. オーライ) の成葉 (8 週齢, 葉身) を用いた。20°C 設定のインキュベータ内に設置した計測チャンパー内に収穫したホウレンソウ株を静置し、暗黒条件下で 4 日間貯蔵した。予め設定した酸素濃度 (O<sub>2</sub>: 20%, 10%, 5%; N<sub>2</sub>: balance) のガスをチャンパー内に毎分 10 mL で加湿しながら通気させることにより、青果物周囲のガス濃度と湿度を一定に制御した。所定の貯蔵期間終了後、第 3 または 4 葉から採取した 100 mg の切片を直ちに液体窒素で凍結し、Real-Time RT-PCR に供試した。PCR に供試した葉を含む第 3 から 6 葉の葉身からプロトプラストの単離および凍結乾燥試料の作製を行った。プロトプラストは細胞膜水伝導係数  $L_p$  および細胞の平均破壊浸透圧  $\mu$  の測定に、凍結乾燥試料は TBARS 法によるマロンジアルデヒド (MDA) 当量の定量にそれぞれ供試した。

また、人工気象器 (コイトロン、FR-535A、小糸工業) にて水耕栽培した 6 週齢のホウレンソウの成葉の葉身を用い、 $L_p$  計測の高度化および細胞膜上の水輸送経路について検討した。ホウレンソウ株をプラスチックバック (生産日本社、ユニパック J-8) に封入し、20°C に設定したインキュベーター (Panasonic、MIR-154) 内で暗黒条件下で 4 日間貯蔵した。酸素不足による嫌気呼吸を防ぐため、1 日毎にプラスチックバック内の換気、および霧吹きによる加湿を行った。所定の貯蔵期間終了後、第 3 または 4 葉からプロトプラストを単離し、アクアポリン阻害剤である HgCl<sub>2</sub> 添加時、および無添加時における  $L_p$  を比較した。

### 4. 研究成果

MDA 当量は収穫後日数の経過に伴い増大した。収穫後 4 日目における低酸素濃度貯蔵区 (O<sub>2</sub>: 5%、10%) の MDA 当量は、20% O<sub>2</sub> 区と比較して有意に低い値を示した。低酸素濃度貯蔵は、収穫後の時間経過に伴う膜脂質過酸化の進行を抑制した。 $L_p$  の有意な増大は MDA 当量の有意な増大後に認められたことから (図 1)、膜脂質過酸化物の蓄積は、膜の水透過性の増大よりも先駆的に生じると考えられた。

また、MDA 当量と  $\mu$  の値との間には高い正の線形関係が認められた (図 2,  $r = 0.96$ )。膜脂質過酸化物が蓄積すると、細胞膜の流動性が低下し、ゲル相領域が形成される。低張液にプロトプラストを浸漬すると、細胞内外の浸透圧差に伴い細胞内に水が流入し、膨張変形が生じる。ゲル相領域は液晶領域に比べて弾性率が大きいいため、ゲル相領域が形成された

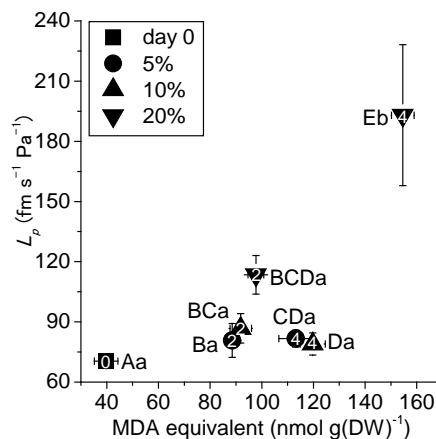


図 1. MDA 当量と水伝導係数  $L_p$  との関係  
プロット内番号は収穫後経過日数を示す  
大文字は MDA 当量の平均値、小文字は  $L_p$  の平均値の有意差を示す (Tukey's HSD test,  $p < 0.05$ )

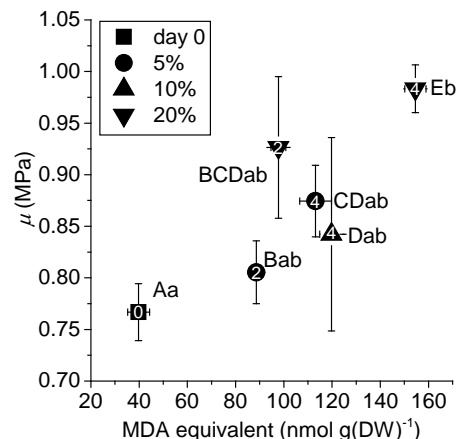


図 2 MDA 当量と細胞膜平均破壊浸透圧  $\mu$  との関係  
プロット内番号は収穫後経過日数を示す  
大文字は MDA 当量の平均値に、小文字は  $L_p$  の平均値に有意差が認められたもの (Tukey's HSD test,  $p < 0.05$ )

プロトプラストの細胞膜は破断されやすくなる。ゆえに、 $\mu$ の増大は膜脂質過酸化物の蓄積によるゲル相領域の形成に伴う細胞膜強度の低下を示していると考えられた。

プロトプラストを収縮、あるいは膨張させる浸透圧変化を与えた際の  $L_p$  の経時変化を調査した(図3)。その結果、収穫直後における  $L_p$  は流出方向(収縮)よりも流入方向(膨張)で大きいものの、2日目以降において大小関係が逆転し、流出方向が流入方向より優位のまま共に増大することが示された。小売店等で慣習的に行われている鮮度保持法に、品質低下した葉菜類を冷水に短時間浸漬することによって外観の復元を図る「蘇生」処理がある。蘇生可能な範囲は、常温域(20–25°C)で貯蔵されたホウレンソウの場合、収穫から最大38時間程度とされる。本実験の結果は、収穫後における水分保持力の低下を示すものであり、既報の知見を細胞膜の水透過性の観点から支持すると考えられた。また、 $HgCl_2$ を処理した際の  $L_p$  はリン脂質二重層経由の水輸送を示し、また対照区の  $L_p$  から  $HgCl_2$  区の  $L_p$  を減じた値はアクアポリンを経由する水輸送と推定される( $L_p = L_p^{AQP} + L_p^{PLB}$ )。流入方向の  $L_p^{AQP}$  は、収穫後から収穫後2日目までに60%低下し、4日目まで同程度の低い値を維持した。一方、流出方向の  $L_p^{AQP}$  は、収穫後の時間経過と共に増大し、収穫後4日目に収穫直後の3倍の値となった。 $L_p^{PLB}$  は透過の方向によらず貯蔵期間を通して一定の範囲を推移した。他方、収穫後におけるアクアポリン遺伝子の発現量変化は遺伝子ごとに異なり、20% $O_2$  区の収穫後4日目には *SoPIP2;1* で82%、*So $\delta$ TIP* において98%減少した(図4)。以上の結果から、アクアポリン遺伝子の発現量は、収穫後日数の経過に伴って低下するものの、細胞膜の水透過性の増大に対して支配的に寄与することが示された。リン脂質二重層の過酸化に伴うゲル相領域の形成が、細胞膜を介した水輸送の経路に与える影響については、本研究からは明らかにされておらず、今後の検討を要す。

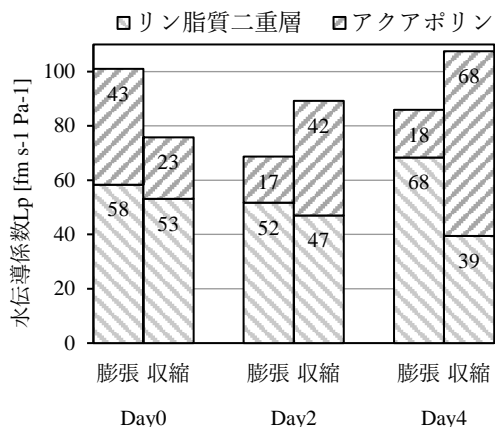


図3  $L_p$  に対するリン脂質二重層とアクアポリンの寄与

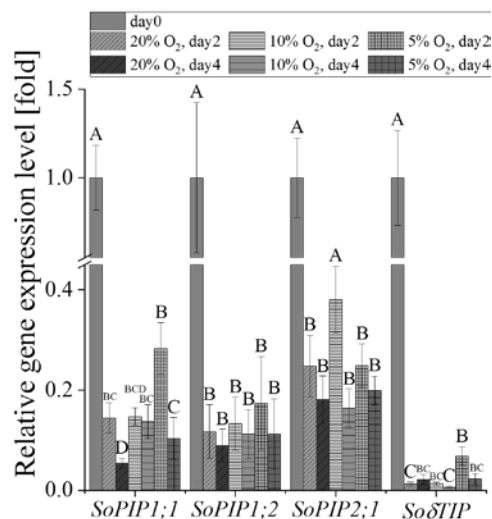


図4 収穫後経過日数増加に伴うアクアポリン遺伝子の発現量変化  
A–Dは各標的遺伝子において貯蔵試験区間で有意差を示す(Steel-Dwass test,  $p < 0.05$ )

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 黒木信一郎, シリーズ解説: 食品の非破壊評価技術(第7回) 非破壊評価に不可欠な検量モデル作成のノウハウ. 食品と容器 2018, 59 (2), 90-97.
- ② Tanaka, M., Kuroki, S., Uno, Y., Itoh, H., Nakano, K., Contribution of aquaporins to membrane water permeability of harvested spinach leaves. Proceedings of the 8th ISMAB, 2016, 287-292.

[学会発表] (計20件)

- ① 黒木信一郎, 第41回近赤外講習会(中級・上級コース)・第103回食品技術講習会, 第41回近赤外講習会(中級・上級コース)・第103回食品技術講習会, 2018.
- ② Kuroki, S., Advance technology for freshness analysis of fresh produce, The 2nd International Conference on Agricultural Engineering for Sustainable Agriculture Production, 2017.
- ③ 黒木信一郎, 近赤外光、NMR、X線による青果物の非破壊評価法, 園芸学会平成29年度秋季大会シンポジウム, 2017.
- ④ 黒木信一郎, 第39回近赤外講習会(中級・上級コース)・第99回食品技術講習会, 第39回近赤外講習会(中級・上級コース)・第99回食品技術講習会, 2017.
- ⑤ 吉海江卓, 黒木信一郎, 田中麻衣, 伊藤博通, 中野浩平, 収穫後における青果物の細胞膜機能劣化の定量化, 農業食料工学会関西支部第137回例会, 2017.
- ⑥ 中野浩平, タンマウオンマナスイカン, ダイモンシュクリ, 黒木信一郎, 蔦瑞樹,

- 吉田誠 LC/MS/MS による収穫後大豆モヤシのカルボニル化合物プロファイリング, 第 76 回農業食料工学会年次大会, 2017.
- ⑦ 椎名武夫, 中村宣貴, 永田雅靖, 椎名隆, タンマウオンマナスイカン, 黒木信一郎 オミクスを活用した青果物の TET 品質管理システムの開発, 第 76 回農業食料工学会年次大会, 2017.
- ⑧ 田中麻衣, 黒木信一郎, 吉海江卓, 伊藤博通, 中野浩平 ホウレンソウ葉肉プロトプラストの浸透圧応答と水透過性, 第 76 回農業食料工学会年次大会, 2017.
- ⑨ Tanaka, M., Kuroki, S., Uno, Y., Itoh, H., Nakano, K., Contribution of aquaporins to membrane water permeability of harvested spinach leaves. The 8th ISMAB, Niigata, Japan, 2016; pp 287-292.
- ⑩ 高木絢子, タンマウオンマナスイカン, 黒木信一郎, 中村宣貴, 曾我綾香, 吉田誠, 椎名武夫, 中野浩平 収穫後コマツナの脂肪酸および過酸化脂質含量の葉位間差異, 第 75 回農業食料工学会年次大会, 2016.
- ⑪ 田中麻衣, 黒木信一郎, 小泉高陽, 伊藤博通, 宇野雄一, 中野浩平 収穫後におけるホウレンソウ葉アクアポリンの発現量変化, 農業食料工学会関西支部第 135 回例会, 2016.
- ⑫ 田中麻衣, 黒木信一郎, 小泉高陽, 伊藤博通, 宇野雄一, 中野浩平 鮮度低下に伴うホウレンソウ葉の膜物性変化, 第 75 回農業食料工学会年次大会, 2016.
- ⑬ タンマウオンマナスイカン, 梅原仁美, 中村宣貴, 曾我綾香, 吉田誠, 黒木信一郎, 中野浩平, 椎名武夫 ブロココリーにおける物理ストレス指標遺伝子の探索, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015.
- ⑭ 吉田誠, 曾我綾香, 黒木信一郎, 中村宣貴, 椎名武夫, タンマウオンマナスイカン, 中野浩平 農産物の鮮度指標となる揮発性成分の検索, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015.
- ⑮ 高木絢子, タンマウオンマナスイカン, 黒木信一郎, 中村宣貴, 曾我綾香, 吉田誠, 椎名武夫, 中野浩平 過酸化脂質を指標とした青果物の鮮度評価, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015.
- ⑯ 小泉高陽, 黒木信一郎, 曾我綾香, 吉田誠, 中村宣貴, 椎名武夫, タンマウオンマナスイカン, 中野浩平 ホウレンソウ葉細胞膜の物理化学的特性と鮮度との関係, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015.
- ⑰ 曾我綾香, 吉田誠, 中村宣貴, 黒木信一郎, 椎名武夫, タンマウオンマナスイカン, 中野浩平 施肥条件が農産物収穫後の品質保持に及ぼす影響, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015.
- ⑱ 中村宣貴, タンマウオンマナスイカン, 黒木信一郎, 中野浩平, 椎名武夫 軟弱介護食品の輸送損傷軽減に関する検討, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015.
- ⑲ 椎名武夫, タンマウオンマナスイカン, 中村宣貴, 吉田誠, 曾我綾香, 黒木信一郎, 中野浩平 青果物の TET 品質管理とそのツールとしての遺伝子発現解析, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015.
- ⑳ 中村宣貴, タンマウオンマナスイカン, 黒木信一郎, 根井大介, 中野浩平, 椎名武夫, ニードル式酸素センサを用いた青果物内部の酸素濃度分布に関する基礎的検討, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://www.lab.kobe-u.ac.jp/ans-lieb>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

黒木信一郎 (KUROKI, Shinichiro)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：00420505

### (2)研究分担者

伊藤博通 (ITOH, Hiromichi)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00258063

### (2)研究分担者

中野浩平 (NAKANO, Kohei)

岐阜大学・大学院連合農学研究科・教授

研究者番号：20303513

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

小泉 高陽 (KOIZUMI, Koyo)

田中 麻衣 (TANAKA, Mai)

吉海江 卓 (YOSHIKAIIE, Suguru)