

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14828

研究課題名(和文)植物共生C1微生物を用いた革新的な青果物の鮮度保持技術の開発

研究課題名(英文)Development of freshness technology for vegetables using plant-symbiotic C1 bacteria

研究代表者

中川 智行(NAKAGAWA, Tomoyuki)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70318179

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、ホウレンソウの保蔵時における微生物相の推移を観察した。3日目(20)では、Erwinia属細菌が大部分を占めたが、7日目(20)にはPseudomonas属細菌が優勢属に変化していた。またメチロトローフ細菌(C1細菌)に焦点を絞り、菌相推移を解析したところ、主要種はメチロバクテリウム属細菌であり、それらは3つのグループに分けられた。ホウレンソウの保蔵中、3グループのメチロバクテリウム属細菌は支配的に生育し、これら3グループ間で支配的な種が変遷したことから、ポストハーベスト青果物でもメチロバクテリウム属細菌は菌相の変化を伴って、何らかの影響を青果物に与えていることが示された。

研究成果の概要(英文):In this study, we observed changes of microflora on the spinach leaves during the preservation at room temperature. On the third day, Erwinia was dominant genus, but dominant genus was changed to Pseudomonas on the seventh day. On the other hand, we focused to C1 bacteria, which can utilize methanol as a sole carbon source. On the spinach, dominant C1 bacteria was Genus Methylobacterium. These C1 bacteria strains were classified to three groups, as M. mesophilicum group, M. fujisawaense group and M. extorquens group. It seems that C1 bacteria strains, which classified to these 3 groups, has some important functions on the spinach during the preservation at room temperature, and these findings may lead some clues to develop the novel preservation technology for vegetables.

研究分野：応用微生物学

キーワード：鮮度保持 菌叢解析 C1微生物

1. 研究開始当初の背景

魚や肉などの死物食品とは異なり、青果物は収穫後も継続して行われる自身の代謝活性により鮮度が低下するという特徴を持つ。鮮度低下は、呼吸等の代謝過多による内容成分の自己損耗のみならず、活性酸素の生成に伴う細胞膜脂質の過酸化による膜機能の喪失に起因する。また、カット青果物の品質管理で大きな問題となる切断面の褐変は、褐変基質の酵素的酸化反応によって起こる。したがって、青果物の鮮度保持技術の開発においては、いかにして生体内の還元状態を維持するかが鍵となる。

一方、成長段階の植物には必ず共生微生物が生息する。その主要微生物である C1 微生物は、植物が蒸散する極微のメタノールを増殖に利用するかわりに、極めて強力な抗酸化力を持つ PQQ を植物に供給することで共生関係を結んでいる。申請者は C1 微生物が収穫後の野菜においてもその鮮度保持に大きく関与すると考えており、その細胞機能の青果物の鮮度保持技術への活用の可能性を考えていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、青果物のモデルとしてホウレンソウを用いて、保蔵状態における C1 微生物の挙動とその細胞機能の鮮度保持技術への応用可能性を探ることとした。種々の流通・貯蔵環境下における青果物表面に生息する C1 微生物の挙動についての知見は皆無である。

以下の 3 つの項目に沿って C1 微生物による収穫後の青果物の鮮度保持技術への応用の可能性を探っていく。

① 収穫後の青果物における微生物菌叢の解明

青果物に共生する微生物菌叢を 16S rRNA メタゲノム解析にて示す。また、その経時的変化を示す。

② C1 微生物の生態の解明と評価

青果物の葉上に共生する C1 微生物の種類、生育特性を観察する。また、その菌叢の変遷も示す。

③ C1 微生物-植物共生系を利用した青果物の鮮度保持技術の提案

青果物上の C1 微生物を制御することによるマイクロフローの制御とその鮮度の変遷を評価する。

3. 研究の方法

① 収穫後青果物における微生物菌叢の解明

小売店にて購入したホウレンソウを 20 日に保蔵し、0 日、3 日、7 日目にサンプリングし、菌叢解析に用いた。

サンプルのホウレンソウは、滅菌水に浸し、数時間、回転させることで葉上の微生物を洗い流し、それを回収し、16S rRNA V3-V4 領域を PCR にて増幅した。得られた PCR 断片を、MiSeq を用いてシーケンシングした。

② C1 微生物の生態の解明と評価

ホウレンソウ葉状の洗浄液を、メタノールを唯一の炭素源として用いたメタノール培地に塗布し、そこに生育可能なコロニー群を C1 微生物としてカウントし、ピックアップした。また、それらコロニーを、16S rRNA 配列を用いて種レベルでの同定、さらには MALDI-TOFMS を用いて同定した。

③ C1 微生物-植物共生系を利用した青果物の鮮度保持技術の提案

ホウレンソウ上に C1 微生物を塗布し、青果物の鮮度保持について観察した。鮮度はビタミン C 量およびホウレンソウの色調変化を指標に行った。

4. 研究成果

① 収穫後の青果物における微生物菌叢の解明

市販のホウレンソウを青果物のモデル材料として選抜し、ホウレンソウの保存状態 (20°C) における葉上の微生物相の推移を観察した。一般生菌数は、保蔵日数に伴い増加した。また、一般生菌数のみならず、これまで青果物の菌相変化について報告事例のないメタノールを唯一の炭素源として生育できる C1 細菌に焦点を絞り、ホウレンソウの葉上でのその菌相推移について詳細に解析をおこなったところ、ホウレンソウ葉上の C1 細菌数は、一般細菌数と同様、保蔵時間に比例して増加した。

さらに、ホウレンソウの流通状態を想定した状態 (20°C) における葉上の微生物相の推移をメタゲノム解析にて観察した。その結果、20°C 保存 3 日目には、*Erwinia* 属細菌が大部分を占めた。その主要な種は *E. mallotivora* であり、全体の 3 割程度を占めた。続いて *Pseudomonas* 属細菌、*Sphingobacterium* 属細菌、*Stenotrophomonas* 属細菌が主要な構成細菌叢であった。一方、20°C 保存 7 日目には、*Pseudomonas* 属細菌が優勢属になっており、サンプルによっては *P. moraviensis* が半数を

占めるまでに菌叢が変化していた。

このように市販のハウレンソウの葉上の細菌群は保蔵環境下で劇的に変化していた。

② C1 微生物の生態の解明と評価

ハウレンソウの葉上の C1 細菌の生息数も増加していたことから、MALDI-TOFMS と 16S rRNA 配列を用いて菌叢解析を行った。その結果、保蔵 0 日目から 7 日目まで保蔵環境下でその菌叢が変化し、最終的に大きく 3 グループの C1 細菌 (*Methylobacterium mesophilicum* グループ、*M. fujisawaense* グループ、*M. extorquens* グループ) が支配的になることが明らかとなった。

つまり、これら 3 グループの C1 微生物群がハウレンソウの保蔵において何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

③ C1 微生物-植物共生系を利用した青果物の鮮度保持技術の提案

ハウレンソウの保蔵期間 (20) で 3 グループの C1 細菌 (*Methylobacterium mesophilicum* グループ、*M. fujisawaense* グループ、*M. extorquens* グループ) が支配的になることが明らかとなったため、これら C1 細菌を主要菌として塗布することでハウレンソウの保蔵にどのような影響を与えるか観察した。

その結果、当初は C1 細菌を塗布することでハウレンソウの鮮度は保持されることを期待したが、保蔵後のハウレンソウのビタミン C レベル、さらには色調変化から C1 細菌によるハウレンソウの鮮度保持の効果は観察されず、逆に C1 細菌が鮮度劣化を促進することが明らかとなった。

④ 考察

今回の研究では、ハウレンソウ葉上の細菌群の菌叢変化と C1 細菌群の菌叢変化を示すことができた。一方、主題であるハウレンソウの鮮度保持との関連性として、C1 細菌群がハウレンソウの鮮度保持ではなく、想定外ではあるものの、鮮度劣化を促進する可能性を示すことができた。この理由として、C1 細菌群は作物の生育促進を担っていることが明らかとなっているため、ポストハーベストにおいてもハウレンソウの代謝活性を促進させた可能性が高い。つまり、ポストハーベストにおけるハウレンソウの鮮度保持においては、青果物の代謝をいかに抑えるかが一つの命題であるにも関わらず、C1 細菌群は代謝を促進させることで鮮度劣化を進める結果を示したものと考えられる。よって、私たちが初期に想定した C1 細菌群による鮮度保持は逆効果であると考えられ、ハウレンソウをはじめとした青果物の鮮度保持には C1 細菌

群を排除する方がより効果があるものと考えられる。

しかしながら、本知見は私たちに新たな青果物保蔵技術の開発に向けて非常に重要なヒントを与えている。例えば、保蔵中においては C1 細菌群を排除することで鮮度保持につながる可能性を示したものと考えている。つまり、保蔵中のハウレンソウにて C1 細菌群の生育を負に制御する因子 (C1 細菌群の生育を抑える微生物群もしくは生育を抑える抗菌物質) を探索し、さらには C1 細菌群の生育を抑えることができる保蔵条件を導き出すことで、C1 細菌群をターゲットにした新たな青果物保蔵技術の開発に結びつくものと考えている。

このように本研究で得た研究成果は、想定とは異なる結論となったが、新たな方向性を示すことができ、ポストハーベスト工学分野への貢献が達成できたものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 中川 智行, 三井 亮司, 谷 明生, 河合 啓一. (2015) レアアースを必須因子として要求する新たな代謝系 -植物共生細菌たちが持つレアアース依存型 C1 代謝-. 化学と生物. 53 : 744-750. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 中川 智行. 植物共生細菌によるレアアース元素の利用 -新奇的レアアース依存型メタノール代謝系-. 環境微生物学会合同大会 2017. 2017.8.29-9.1. 東北大学川内北キャンパス (仙台市)
2. 王 倫, 菅沼 宗矢, 谷 明生, 早川 享志, 中川 智行. 植物共生細菌 *Methylobacterium zatmanii* の重希土類元素および Ca に対する生育特性とメタノール脱水素酵素の性質. 日本農芸化学会中部支部 第 177 回例会. 2016.9.24. 名古屋大学野依記念学術交流館 (名古屋市)
3. 王 倫, 濱田 昂志, 日比野 歩美, 早川 享志, 中川 智行. 低希土類や Ca を要求しない新規な *Methylobacterium* 属細菌のスクリーニングとそのメタノール脱水素酵素の性質について. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016.3.27-30. 札幌コンベンションセンター (札幌市)
4. 菅沼 宗矢, 日比野 歩美, 海老原 章郎, 岩本 悟志, 谷 明生, 三井 亮司, 早川

享志, 中川 智行. *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール脱水素酵素 XoxF1 のレアアースに対する発現応答と性質. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016.3.27-30. 札幌コンベンションセンター (札幌市)

5. 王 倫, 濱田 昂志, 日比野 歩美, 早川 享志, 中川 智行. 重希土類を特異的に要求する新規メチロトローフ細菌の探索. 日本生物工学会 第67回大会. 2015.10.26-28. 城山観光ホテル (鹿児島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 智行 (NAKAGAWA, Tomoyuki)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号 : 70318179

(2)研究分担者

中野 浩平 (NAKANO, Kohei)
岐阜大学・連合農学研究科・教授
研究者番号 : 20303513