

令和元年6月17日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02581

研究課題名（和文）リポドミクスによる収穫後青果物の代謝制御予測と鮮度評価技術への展開

研究課題名（英文）Prediction of lipid metabolism regulation in fresh produces by lipidomics leading to the development for freshness evaluation methodology

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,500,000円

研究成果の概要（和文）：青果物の定量的な鮮度評価技術を開発するために、老化に伴う生体膜脂質やカルボニル化合物、揮発性化合物の動態変化を質量分析技術ベースとしたメタボロミクスによって明らかにした。特に、大豆モヤシにおいては、アブシジン酸が積算呼吸量の増加と共に増加し、鮮度マーカー代謝物となることを提案した。また、近赤外分光法や蛍光指紋法といった分光技術による青果物の非破壊鮮度検査技術の基盤理論を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鮮度は、青果物の価値を特徴付ける最も重要な要素であるにも関わらず、科学的な意味づけがなされていない曖昧な概念である。本研究では、老化に伴う生体膜の機能低下を鮮度低下と位置づけ、膜を構成する脂質の変動や過酸化・分解反応によって生ずる代謝物を鮮度マーカーとして明らかにしながら、鮮度の定量的評価理論を示したものである。さらに、近赤外分光法と蛍光指紋法を取り上げ、簡便・迅速な鮮度検査を実現するために基盤理論についても明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To develop the quantitative freshness evaluation technology for fruits and vegetables, the changes of bio-membrane lipids, carbonyl and volatile compounds during senescence were clarified by a mass spectrometry-based metabolomics. Especially in soybean sprout, we proposed abscisic acid as a freshness marker metabolite because it increases with the increase of cumulative respiration. Moreover, we have introduced a non-destructive freshness identification technology based on the spectroscopy such as near infrared and fluorescent fingerprinting.

研究分野：農業工学

キーワード：鮮度 青果物 メタボロミクス リポドミクス カルボニル化合物 アブシジン酸 近赤外分光法 蛍光指紋

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「鮮度」は、消費者が青果物購入するときに最も重視される要素である。一方で、鮮度は、主に外観等の主観的基準によって判断される曖昧な概念であるため、客観的かつ定量的な評価手法が求められていた。そこで我々は、青果物における鮮度低下は、生命体の老化と同様に、生体膜機能の低下に起因するという考えのもと、生体膜を構成する脂質の過酸化・分解反応に基づく鮮度評価法を提案した。同法では、脂質と脂質過酸化物の和に対する脂質過酸化物の割合で定義される脂質過酸化率によって青果物鮮度を評価するが、より高精度な鮮度評価には、老化過程で起こる代謝変化を分子種レベルで理解した上で、鮮度を明瞭に反映する代謝物を鮮度マーカーとして明らかにする必要がある。また同時に、非破壊・非接触の鮮度計測を実現するための技術開発が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、青果物鮮度の定量化に向けた基盤理論を構築するために、老化過程における生体膜構成脂質の動態変化を分子種レベルで解析するとともに、脂質の過酸化・分解反応における最終生成物であるカルボニル化合物や揮発性化合物を対象としたメタボロミクス(代謝物の網羅解析)によって鮮度マーカー代謝物を明らかにした。また、非破壊鮮度計測の基盤技術を開発するために、近赤外分光法や蛍光指紋法における検量モデルの構築と推定精度の検証を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) リン脂質分子種のプロファイリング

供試材料には、自家栽培したコマツナを用いた。収穫後、直ちに 20 設定のインキュベータ内に静置して4および7日間貯蔵した。葉身部 50 mg をサンプリングし、内部標準(PC 17:0/17:0, PE 17:0/17:0)を添加して MTBE 法によって脂質を抽出した。脂質成分の質量分析では、C18 カラムによる逆相モードで分離した。そして、三連四重極型質量分析計(Q-TRAP4500, AB-Sciex)を用いて、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)でイオン化し、141 種類のリン脂質をターゲットとして Multiple Reaction Monitoring (MRM) によって検出した。

#### (2) カルボニル化合物のプロファイリング

供試材料には、自家栽培した大豆モヤシを用いた。収穫後、5、10、20 に設定したインキュベータに貯蔵して適宜サンプリングした。同時に、呼吸速度(二酸化炭素排出速度)をガスクロマトグラフィーによる通気法を用いて測定した。子葉部および胚軸部をそれぞれ 100 mg 採取して、BHT 含有メタノールと共にビーズクラッシャーで破碎した。p-BOBA を内部標準として添加し、クロロホルムと共にホモジナイズして、遠心分離後、有機層を回収した。カルボニル基を特異的に修飾するダンシルヒドラジンによって有機層を誘導化し、質量分析に供した。質量分析では、C8 カラムによる逆相モードでの分離後、ESI(+)でイオン化し、Q1 を  $m/z$  275~675 の範囲で 1Da ずつ掃引しながら Q3 をダンシルヒドラジン由来の  $m/z$  236 に固定した Multiplexed MRM によってカルボニル化合物を網羅的に検出した。その他、カットキャベツやトマト、低温感受性であるキュウリについても同様の分析を実施した。

#### (3) 揮発性化合物のプロファイリング

供試材料には、ホウレンソウを用いた。15 および 25 設定のインキュベータに 5 日間貯蔵した。適宜、3 株を密閉容器に 1 時間封入し、SPME(固相マイクロ)ファイバーに揮発性物質を吸着した。これを 220 で加熱して、ガスクロマトグラフィー質量分析計(5973N, Agilent)に導入して分析した。カラムには DB-WAX(0.25mm × 30m, 膜厚 0.5 μm)を用い、50 から 220 の昇温プログラムによって分離した。

#### (4) 近赤外分光法および蛍光指紋法による分光スペクトル情報取得

供試材料には、コマツナを用いた。5、10、20 に設定したインキュベータに貯蔵して適宜サンプリングした。葉脈部および葉身部の透過反射分光スペクトルを可視-近赤外分光光度計(XDS Rapid Content Analyzer, FOSS)によって 400~2499.5 nm の範囲で 0.5nm 刻みで取得した。収穫からの積算温度を目的変数としてステップワイズ回帰により波長選択を行い、予測精度について検討した。また、重水に溶解したサンプルについて、蛍光分光光度計(F-7000, Hitachi)によって励起・蛍光マトリックス(蛍光指紋)を取得し、主成分分析(PCA)によって、積算温度の増加を説明する励起・蛍光波長の組み合わせについて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 老化に伴うリン脂質分子種の動態解析

コマツナの貯蔵中におけるリン脂質 141 種類について LC/MS/MS 分析したところ、41 種類が検出された。フォスファチジルコリン(PC)とフォスファチジルイノシトール(PI)を親水

基に持つ脂質が貯蔵に伴い増加する傾向にあり、特に、PI 14:1/16:1、PC 32:1 および PI 18:1/18:0 が有意に増加することが示された（図 1）。これらのことから、生体膜の機能低下に基づく青果物鮮度評価理論の構築にあたっては、脂質の尾部（疎水性部分）における過酸化・分解反応のみならず、頭部（親水性部分）の交換代謝についても注目する必要があることが示唆された。

### (2) カルボニル化合物の網羅解析による鮮度マーカー代謝物の同定

ダンシルヒドラジン（DH）によって大豆モヤシのカルボニル化合物（CC）を標識して LC/MS/MS 分析したところ、収穫直後では子葉部において 171、胚軸部では 228 のピークを検出した（図 2）。収穫からの積算呼吸量を教師データとして主成分分析-判別分析（PCA-DA）を行ったところ、 $m/z$  512 の誘導体イオンが積算呼吸量と強く関連していることが示された。このイオンについて、プロダクトイオンスキャンによるフラグメントパターンをデータベースで検索した上で標品のパターンと比較した。その結果、 $m/z$  512 の CC-DH 誘導体イオンは、アブシジン酸であることが同定され、これが鮮度マーカー代謝物となることを明らかにした。同様の解析をカットキャベツとトマトで行ったところ、カットキャベツでは 5 つの代謝物を、トマトでは 4 つの代謝物をマーカー候補としてリスト化できた。また、低温感受性であるキュウリを対象とした解析では、 $m/z$  488 の CC-DH が低温障害マーカーとしてスクリーニングされた。

### (3) ホウレンソウより放出される揮発性化合物の老化に伴う変化

ホウレンソウから生成される揮発性化合物を GC/MS 分析し、得られた各ピーク面積をサンプル重量で正規化して構成割合を貯蔵日数で比較した。その結果、2-Hexenal や *p*-Cymene、Ethyl Benzene は増加傾向を、3-Hexen-1-ol は減少傾向を示した（図 3）。これらのことから、放出される揮発性化合物の組み合わせによってホウレンソウの鮮度評価が可能であることが示唆された。

### (4) 近赤外分光法および蛍光指紋法による鮮度計測の検討

コマツナの貯蔵時における積算温度を推定する検量モデルの構築においては、葉脈部よりも葉身部の近赤外分光スペクトル情報を用いた方がより高精度であった。葉身部における 1100~2499.5 nm の範囲の波長のスペクトルデータに対して SNV 標準正規化と二次微分による前処理を行った後、ステップワイズ回帰を行ったところ、6 つの潜在変数によって決定係数 0.75、RMSEP15.2 の検量モデルを得ることができた。また、蛍光指紋においても、主成分分析によって、積算温度の増加と強く関連する励起・蛍光波長の組み合わせを明らかにした。これらのことから、近赤外分光法および蛍光指紋法による青果物鮮度評価の可能性が示された。

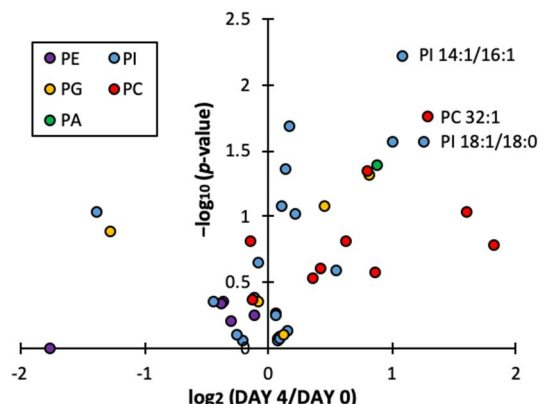


図 1 収穫直後および 20 で 4 日間貯蔵したコマツナにおけるリン脂質分子種のボルケーノプロット

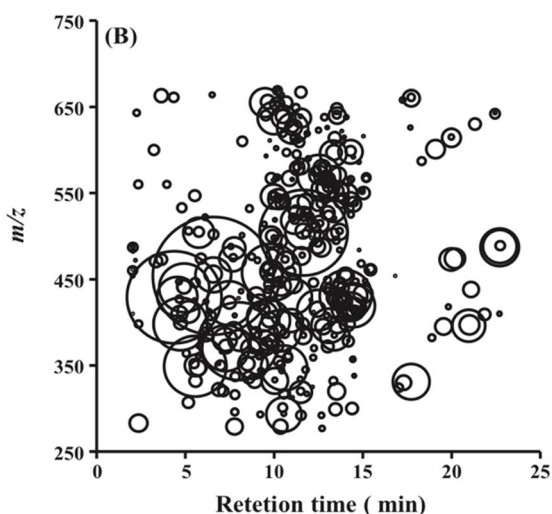


図 2 大豆モヤシ（胚軸部）におけるカルボニル化合物のプロファイル

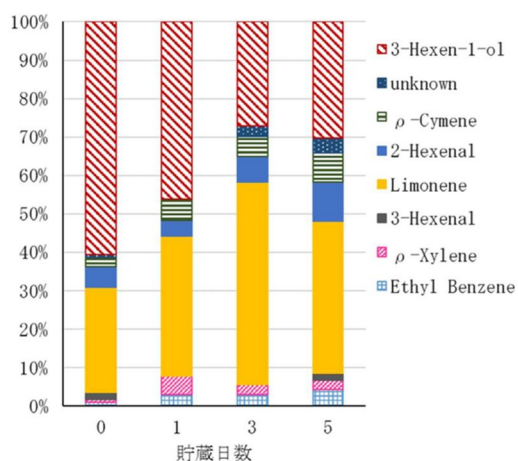


図 3 ホウレンソウより生成される揮発性化合物の変化

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計3件)

- Syukri, D., M. Thammawong, A. H. Naznin, S. Kuroki, M. Tsuta, M. Yoshida, K. Nakano: Identification of freshness marker metabolite in stored soybean sprouts by comprehensive mass-spectrometric analysis of carbonyl compounds. Food Chemistry, 査読有, Vol. 269, pp.588-594, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.036>
- Nagaya, D., D. Syukri, M. Thammawong, K. Nakano: Change of Phospholipid species in Japanese mustard spinach leaves during senescence. Proc. of the 9th Int. Symp. on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering (ISMAB), 査読有, pp.484-488, 2018.
- Tanaka, M., S. Kuroki, Y. Uno, H. Itoh, K. Nakano: Contribution of aquaporins to membrane water permeability of harvested spinach leaves, Proc. of the 8th Int. Symp. on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering (ISMAB), 査読有, pp.287-292, 2017.

### [学会発表](計15件)

- 中野浩平: 鮮度とは. 第130回農産物流通技術研究会例会, 2018(招待講演).
- 中野浩平: 青果物鮮度を定量化するためのマーカー代謝物の検索. 2017年度農業食料工学会食料・食品工学会第4回シンポジウム, 2018(招待講演).
- 椎名武夫, M. Thammawong, D. Ciptanigtyas, 中村宣貴, 永田雅靖, 中野浩平: 振動, MA包装, 保存がブロッコリーの遺伝子発現変動に及ぼす影響のマイクロアレイ解析. 園芸学会平成30年度春季大会, 2018.
- 曾我綾香, 吉田誠, 黒木信一郎, 薫瑞樹, 中村宣貴, 中野浩平: 放散揮発性成分の変動解析によるハウレンソウの鮮度評価. 農業環境工学関連5学会2018合同大会, 2018.
- 黒木信一郎, 田中麻衣, 伊藤博通, 中野浩平: 収穫後ハウレンソウ葉肉細胞の膜物性変化. 農業環境工学関連5学会2018合同大会, 2018.
- 吉海江卓, 黒木信一郎, 柳圭佑, 古財彩音, 中野浩平, 伊藤博通: プロトプラスト単離法がハウレンソウ葉の細胞膜物性に与える影響. 農業環境工学関連5学会2018合同大会, 2018.
- 森美樹, タンマウォン マナスィカン, 中野浩平: キュウリ果実の低温障害マーカーとなるカルボニル化合物の検索. 農業食料工学会関西支部第138回例会, 2017.
- 長屋大地, タンマウォン マナスィカン, 中野浩平: LC/MS/MSによる貯蔵青果物のリン脂質成分のプロファイリング. 農業食料工学会関西支部第138回例会, 2017.
- Syukuri, D., M. Thammawong, S. Kuroki, M. Tuta, M. Yoshida, K. Nakano: Profiling of carbonyl compounds in stored soybean sprout by comprehensive mass-spectrometric analysis for identification of freshness makers. International Conference on Food Quality, Safety and Security 2017, pp.12, 2017.
- 中野浩平, M. Thammawong, D. Syukuri, 黒木信一郎, 薫瑞樹, 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講演要旨, pp.175, 2017.
- Kuroki, S.: Advance technology for freshness analysis of fresh produce, The 2nd International Conference on Agricultural Engineering for Sustainable Agriculture Production, IPB International Convention Center, Bogor, Indonesia, 2017(招待講演).
- 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, pp.78-79, 2017(招待講演).
- 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: 鮮度低下に伴うハ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講演要旨, pp.236, 2016.
- 高木詢子, タンマウォン マナスィカン, 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講演要旨, pp.237, 2016.
- 田中麻衣, 黒木信一郎, 吉海江卓, 伊藤博通, 中野浩平: ハ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講演要旨, pp174, 2016.

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 黒木 信一郎

ローマ字氏名: (KUROKI, Shinichiro)

所属研究機関名：神戸大学  
部局名：大学院農学研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：00420505

研究分担者氏名：吉田 誠  
ローマ字氏名：(YOSHIDA, Makoto)  
所属研究機関名：神奈川県農業技術センター  
部局名：生産環境部  
職名：課長  
研究者番号（8桁）：20503650

研究分担者氏名：椎名 武夫  
ローマ字氏名：(SHIINA, Takeo)  
所属研究機関名：千葉大学  
部局名：大学院園芸学研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：40353974

研究分担者氏名：中村 宣貴  
ローマ字氏名：(NAKAMURA, Nobutaka)  
所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業機構  
部局名：食品研究部門  
職名：上級研究員  
研究者番号（8桁）：50353975

研究分担者氏名：蔦 瑞樹  
ローマ字氏名：(TSUTA, Mizuki)  
所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業機構  
部局名：食品研究部門  
職名：上級研究員  
研究者番号（8桁）：80425553

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。