

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2019～2021
課題番号：19K22348
研究課題名（和文）植物揮発性化合物による植物-ヒト間コミュニケーションと新規品質保持技術への展開
研究課題名（英文）Plant-human communication by plant volatile compounds and its application for prolonging the shelf life of leafy vegetables
研究代表者
黒木 信一郎（KUROKI, Shinichiro）
神戸大学・農学研究科・准教授
研究者番号：00420505
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：みどりの香り（Green Leaf Volatiles、GLVs）への人工的な曝露が緑葉の黄化、品質低下、および病原菌抵抗性に与える影響について調査した結果、trans-2-ヘキセナールには過剰傷害がある一方、cis-3-hexenyl acetateには黄化や目減りを抑制する効果があること、およびアブラナ科炭疽病菌に対する抵抗性の向上効果があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

みどりの香りを外因的に施与することにより、緑葉に対して錯覚的なフィードバック制御を生じさせ、黄化の抑制や病原抵抗性の向上など、品質保持に好ましい効果を得ることができることを明らかにした。今後、産物毎の最適濃度の探索や作用メカニズムの解明が進めば、植物が本来内在する物質であるがゆえに、フードサプライチェーンで受容される新規の鮮度保持剤（ポストハーベスト農薬）としての用途が期待される。

研究成果の概要（英文）：The effects of artificial exposure to green leaf volatiles (GLVs) on yellowing, quality deterioration, and pathogen resistance of green leaves were investigated. Results showed that trans-2-hexenal has a harmful effect, whereas cis-3-hexenyl acetate has a favorable influence in reducing yellowing and weight loss, and improving resistance against *Colletotrichum higginsianum*.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：みどりの香り トランス-2-ヘキセナール シス-3-ヘキセニルアセテート 黄化 病原菌抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肉や魚などの動物性生鮮食品と異なり、青果物は加工や調理、あるいは喫食される直前まで生かした状態で貯蔵・流通されなければならない。凍結・解凍すると組織構造が破壊され商品価値が失われるため、冷凍保存もできない。凍結点以上の低温でも生理障害を生じる産物もある。この特性は、最大で収穫量の50%もの青果物が消費されること無く捨てられているという、食料のロスと廃棄の現実と直結している。収穫後青果物の品質保持技術では、氷結点以上の低温や青果物周囲の O_2 と CO_2 、および老化ホルモンの C_2H_4 濃度に主な関心が置かれてきた。しかし青果物周囲には、例えば収穫時における根や葉の切断というストレス応答により、青果物自身が生成し放出した多様な揮発性化合物もまた存在する。生育時の生物的・非生物的ストレス応答に関する近年の研究により、これらの揮発性化合物の内、みどりの香りと総称される物質群は、植物間コミュニケーションのシグナル物質となっている他、トラウマチン酸やジャスモン酸などと共に植物の2次代謝産物の生成を制御していることが明らかとなってきた(畑中, 2007)。これらの事実から、収穫後に青果物から放出されている揮発性化合物は、包装されている青果物自身の代謝変動に関与していると予想される。それらが有する生理機能を有効利用できれば、既往の代謝抑制とは異なる機作での、新規の品質保持技術を開発できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、植物内在性の揮発性有機化合物への人工的な曝露が、青果物の収穫後生理に与える影響を検証することを目的とした。供試する化合物には、*trans*-2-ヘキセナール(2-HAL、CAS No. 6728-26-3) および *cis*-3-hexenylacetate (3-HAC、CAS No. 3681-71-8)を選定した。これらは、1)みどりの香りとして知られる青葉アルデヒド、およびエステルで、2)植物内在性の化合物であるため使用者の抵抗感が低く、3)揮発性化合物であるため処理後の作物への残留性が無い、などのいわゆる人や環境に優しく使いやすい特徴を併せ持つ。また、2-Hexには、処理後1-2時間でタンパク質の安定化や抗酸化に関わる遺伝子の発現を誘導する即効性を持つことも明らかにされている(Yamauchi et al., 2015)。また対象とする植物は、アルグラ(ロケット、ルッコラ、*Eruca vesicaria*)の幼葉、あるいはシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)とした。前者は近年、成葉と比較して栄養成分の濃度が高いことや利用が容易なことなどから、消費者の食生活の多様化や健康志向に対応する食品として、さらなる普及が確実視されているものの、ひ弱な幼植物が成品であるがゆえに収穫後に急速に劣化しやすく、このことが安定供給を妨げる原因となっていることから選定した。また後者は、ゲノム解読済みのモデル植物で、ストレス応答遺伝子の発現解析に適していることから選定した。

3. 研究の方法

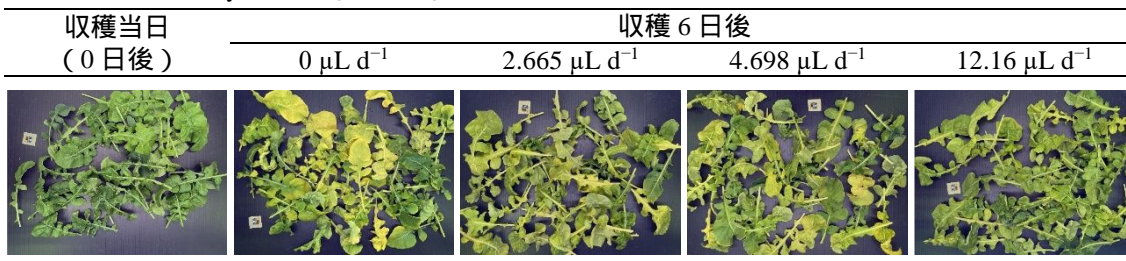
8-10 cmに成長したアルグラの幼葉を収穫し、10℃または20℃に設定したインキュベーター(Panasonic, MIR-154)に設置したアクリルチャンバー内で最大6日間貯蔵した。同チャンバー内に2-HALまたは3-HACを分注した異なる口径の容器を同封してエアポンプで通気することにより、曝露濃度段階の異なる貯蔵環境を創出した。収穫前後の重量から目減りを算出した。試料の外観を画像補正用カラーチャート(Casmatch, ベア-メディック)と共にスマートフォン(Apple, iPhone11)で撮影し、色補正およびCIE 1976 $L^*a^*b^*$ 色空間への変換を施した後、葉領域内の黄化指数 $Y_i (=L^* \times b^* / |a^*|)$ を算出した。また、2-HALの効果については、タンパク質含量、マロンジアルデヒド(MDA)当量、ジフェニルピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル消去活性、アスコルビン酸含量、カタラーゼ(CAT)活性、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)活性、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(DHAR)活性を測定して検討した。

他方、シロイヌナズナを用いた実験では、ポテトデキストロース寒天(PDA)培地での抗菌活性試験、および栽培中の個体への病原菌接種試験により、2-HALあるいは3-HACの存在の有無が半活物寄生菌であるアブラナ科炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)、腐生菌である黒斑病菌(*Alternaria brassicicola*)、および灰色カビ病菌(*Botrytis cinerea*)に対する抵抗性に与える影響を評価した。また、3-HACの効果については、野生型の他に変異体を供試し、遺伝子発現解析からアブラナ科炭疽病菌に対する防御応答経路についても調査した。

4. 研究成果

2-HALを外因的に施与した貯蔵試験の結果、高濃度で連続施与した区では、タンパク質含量が急減し、脂質過酸化物質であるMDA当量が蓄積した。活性酸素消去系酵素のCAT、APX、DHARの活性、およびDPPHラジカル消去活性も大きく低下した。また処理濃度が高かった実験区ほど収穫後6日目における目減りが大きくなった。収穫後6日目における Y_i は、2-HALが高濃度であるほど小さかった。ただしこれは、緑色の保持を意味するものではなく、脱水に伴う葉身の収縮による見かけ上の現象であった。すなわち、アルデヒドである2-HALは、高濃度の場合に植物細胞に対して毒性を持ち、抗酸化酵素活性の低下やタンパク質の分解を引き起こして鮮度劣化を促進する過剰傷害があることが確認された。一方、低濃度帯では貯蔵開始時の抗酸化酵素活性やDPPHラジカル消去活性が貯蔵6日後も維持され、特にCAT活性には2-HAL処理後の向上

図 1 *cis*-3-hexenylacetate (3-HAC) 施与が収穫 6 日後のアルゲラの外観品質に与える影響



が認められた。これらの結果より、2-HAL は、適切な濃度であれば鮮度保持に好適な可能性があるものの、過剰となる場合、抗酸化酵素群の活性低下、さらには萎れやタンパク質分解などの負の効果が直ちに生じるため、実用には課題が残ることが明らかとなった。一方 3-HAC には、施与濃度が高まるほど黄化も目減りも抑制され、本実験での施与濃度の範囲では高濃度ほど鮮度保持に有用であることが明らかとなった (図 1、図 2)。

それぞれの病原菌を PDA 培地上で培養して、表現型を観察した結果、2-HAL 添加培地では、黒斑病菌および灰色カビ病菌の強い生育阻害効果が認められた。アブラナ科炭疽病菌に対しては、菌糸形成は生じたものの孢子形成が認められなかった。3-HAC による抗菌活性はいずれの病原菌においても観察されなかった。他方、栽培中の個体への病原菌接種試験の結果、3-HAC の曝露により、黒斑病菌および灰色カビ病菌への抵抗性が低下したのに対して、アブラナ科炭疽病菌への抵抗性は向上した (図 3)。半活物寄生菌の感染を認識すると、植物体内では活性酸素種 (ROS) の生成を介して、サリチル酸が生合成され、防御関連遺伝子群の転写が開始されることから、RBOHD および XLG2 の欠損変異体を用いて ROS の関与を、ICS1 と NPR1 の欠損変異体を用いてサリチル酸の関与を調査した。その結果、いずれの蓄積にも 3-HAC の関与は否定された。そこで、3-HAC による防御応答経路に関与する G タンパク質を病原菌感染実験により探索した結果、XLG3 を欠損している場合は 3-HAC による抵抗性の向上が生じないことが分かった。3-HAC を処理した XLG3 欠損シロイヌナズナのマイクロアレイによる網羅的解析から、野生株である Col-0 と比較して、XLG3 欠損株では 3-HAC 処理により発現が誘導または抑制される遺伝子数が大幅に減少し、さらに発現の誘導が生じなくなった遺伝子の中には防御応答遺伝子が数多く含まれることが明らかとなった。以上の結果から、XLG3 を介して発現が誘導される遺伝子群によって、アブラナ科炭疽病菌抵抗性が発揮されると考えられた。

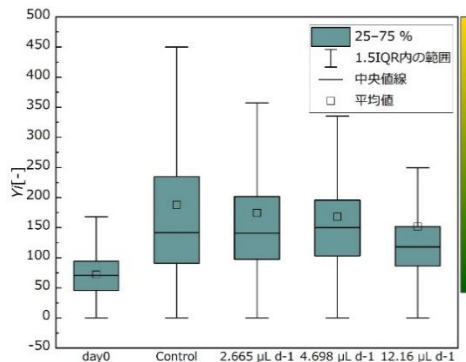


図 2 *cis*-3-hexenylacetate (3-HAC) の施与濃度と黄化指数 Y_i との関係

観察されなかった。他方、栽培中の個体への病原菌接種試験の結果、3-HAC の曝露により、黒斑病菌および灰色カビ病菌への抵抗性が低下したのに対して、アブラナ科炭疽病菌への抵抗性は向上した (図 3)。半活物寄生菌の感染を認識すると、植物体内では活性酸素種 (ROS) の生成を介して、サリチル酸が生合成され、防御関連遺伝子群の転写が開始されることから、RBOHD および XLG2 の欠損変異体を用いて ROS の関与を、ICS1 と NPR1 の欠損変異体を用いてサリチル酸の関与を調査した。その結果、いずれの蓄積にも 3-HAC の関与は否定された。そこで、3-HAC による防御応答経路に関与する G タンパク質を病原菌感染実験により探索した結果、XLG3 を欠損している場合は 3-HAC による抵抗性の向上が生じないことが分かった。3-HAC を処理した XLG3 欠損シロイヌナズナのマイクロアレイによる網羅的解析から、野生株である Col-0 と比較して、XLG3 欠損株では 3-HAC 処理により発現が誘導または抑制される遺伝子数が大幅に減少し、さらに発現の誘導が生じなくなった遺伝子の中には防御応答遺伝子が数多く含まれることが明らかとなった。以上の結果から、XLG3 を介して発現が誘導される遺伝子群によって、アブラナ科炭疽病菌抵抗性が発揮されると考えられた。

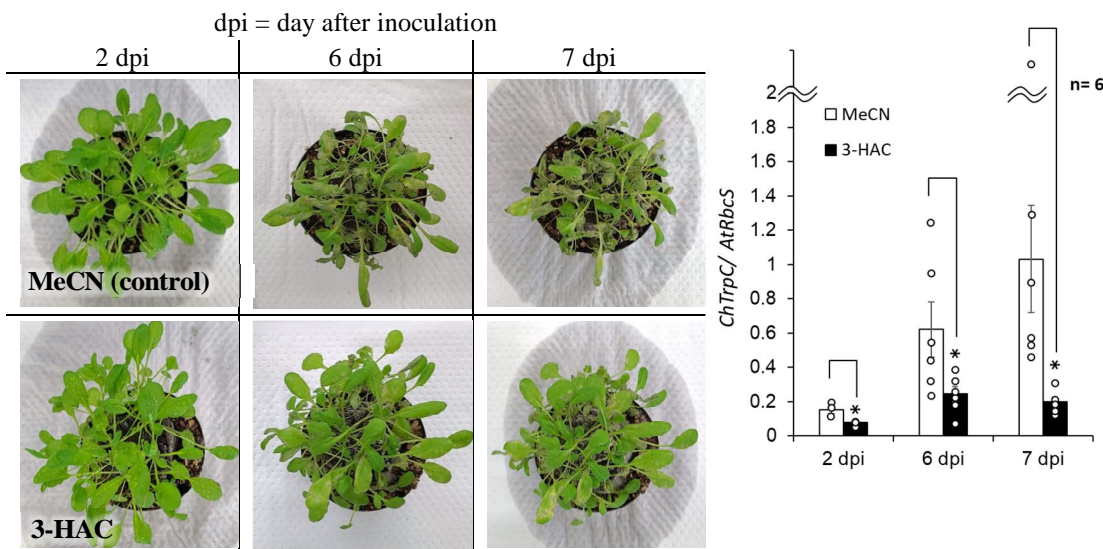


図 3 *cis*-3-hexenylacetate (3-HAC) 処理による生育中シロイヌナズナのアブラナ科炭疽病菌 (*C. higginsianum*) に対する抵抗性の変化

< 引用文献 >

- 畑中顕和, 2007. “みどりの香り”の研究 その神秘性に迫る. におい・かおり環境学会誌 38(6), 415-427
- Yamauchi, Y., Kunishima, M., Mizutani, M., Sugimoto, Y., 2015. Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression. Scientific Reports 5, 8030.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 曾我綾香, 吉田誠, 黒木信一郎, 蔦瑞樹, 中村宣貴, 今泉鉄平, タンマウォンマナスィカン, 中野浩平,	4. 巻 82
2. 論文標題 放散成分プロファイリングによるハウレンソウの鮮度マーカーの探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 農業食料工学会誌	6. 最初と最後の頁 636-641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11357/jsamfe.82.6_636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 黒木信一郎	4. 巻 4
2. 論文標題 可視近赤外分光法による野菜鮮度の非破壊推定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1143-1147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suhandy D, Yulia M, Kuroki S, Nakano K	4. 巻 1751
2. 論文標題 The Use of SIMCA Method and NIR Spectroscopy with Hand-Held Spectrometers Equipped with Integrating Sphere for Classification of Two Different Indonesian Specialty Coffees	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Physics: Conference Series	6. 最初と最後の頁 012080 ~ 012080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1742-6596/1751/1/012080	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinichiro Kuroki
2. 発表標題 Freshness evaluation of leafy vegetables with based on the cell membrane properties
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Security in Food, Renewable Resources, and Natural Medicine 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉田 誠 (YOSHIDA Makoto) (20503650)	神奈川県農業技術センター・生産環境部・部長 (82722)	
研究 分担者	山内 靖雄 (YAMAUCHI Yasuo) (90283978)	神戸大学・農学研究科・准教授 (14501)	
研究 分担者	曽我 綾香 (SOGA Ayaka) (60503638)	神奈川県農業技術センター・生産環境部・主任研究員 (82722)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	小林 英望 (KOBAYASHI Fumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------