

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580056

研究課題名(和文) 遺伝子発現を利用した青果物の鮮度評価技術の開発

研究課題名(英文) Development of the freshness evaluation technology of the greengrocery using gene expression

研究代表者

永田 雅靖 (NAGATA, Masayasu)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所 野菜病虫害・品質研究領域・上席研究員

研究者番号：60370574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：野菜の鮮度の客観的な評価法を開発するため、特に鮮度低下の激しい葉菜類を対象に、野菜の収穫の鮮度低下に伴って発現が増加あるいは減少する遺伝子群を特定し、それらの発現を検出することによって、鮮度を推定する方法を検討した。

ホウレンソウ、ブロッコリー、レタスの貯蔵前後で発現量に差のある約500個の遺伝子の塩基配列を決定した。これらのうち、数個の遺伝子の発現をマルチプレクスRT-PCRによって検出し、鮮度を推定する評価法を開発した。さらに、ホウレンソウのシステインプロテアーゼ配列をもとに設計したディジェネレートプライマーを使って、ホウレンソウとブロッコリー共通の鮮度マーカーとなることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：To develop an objective method for evaluating the freshness of vegetables, the specific genes up or down regulated during storage were identified, and using them to estimate the freshness of vegetables were investigated.

About 500 genes, changing expression during storage of spinach, broccoli and lettuce were cloned and sequenced. Of these genes, combinations of specific genes were detectable by multiplex RT-PCR, which was found to be good markers standing for freshness. A pair of degenerated primers from spinach cysteine protease that amplify a 506 bp fragment were found to be applicable for estimating the freshness on different species of plants such as spinach and broccoli.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：鮮度評価 青果物 遺伝子発現 マルチプレクスRT-PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 野菜の「鮮度」は、主に外観で評価され、物性、内容成分の変化も補助的に用いられてきた。しかし、栽培時期によって、収穫時の物性や内容成分の傾向は異なっているため、これらの数値のみで野菜の鮮度を客観的に評価することは困難であった。そこで、特に鮮度低下の激しい葉菜類を対象に、野菜の収穫後に起きる生理変化と、その原因となる遺伝子の発現に基づいた鮮度評価法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

(1) 葉菜類の鮮度低下に伴って、発現量が顕著に増加あるいは減少する遺伝子を特定して、貯蔵中の遺伝子発現変動を明らかにするとともに、それらの変化を効率よく検出可能な「鮮度マーカー」を開発する。

(2) 具体的には、ホウレンソウ、ブロッコリー、レタスを材料として、貯蔵の前後で発現が顕著に増加あるいは減少する遺伝子を明らかにする。

(3) 複数の遺伝子の発現変化を組み合わせ、鮮度低下を検出可能な「鮮度マーカー」を開発する。

(4) 種の異なる野菜品目でも、共通して「鮮度マーカー」として利用できるプライマーを開発する。

3. 研究の方法

(1) ホウレンソウ、ブロッコリーおよびレタスを材料として、貯蔵中の外観や成分の変化を調べるとともに、経時的なサンプリングを行った。貯蔵した野菜の試料は、サンプリング後、ただちに5mm角程度に細切して液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。全RNAの抽出は、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)により行った。cDNAの合成は、SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech)により行った。貯蔵前と貯蔵後の遺伝子発現の差は、上記のcDNAを用いて、Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Takara)を用いて、貯蔵に伴って遺伝子発現が増える遺伝子のクローンが濃縮されたライブラリー (F シリーズ) および、これとは逆に、貯蔵に伴って遺伝子発現が減る遺伝子のクローンが濃縮されたライブラリー (R シリーズ) を調製した。これらの遺伝子断片のライブラリーは、TA クローニングによって pCRII ベクターに組み込んで、E. coli DH5 α を形質転換し、plasmid を精製して塩基配列を決定した。配列データをもとに Blast 検索を行い、既知の遺伝子との類似性を解析した。

(2) 貯蔵中に経時的にサンプリングした試料の RNA を用いて、ノーザンブロット分析を行った。遺伝子発現の検出は、DIG-RNA プロ

ーブ (Roche) のシステムにより行った。

(3) 上記の方法で各貯蔵サンプルから抽出したトータル RNA を用いて、Takara Primescript RT reagent kit with gDNA eraser (Perfect Real Time) により cDNA を合成した。また、Assay Design Center (Roche Applied Science) を用いてリアルタイム PCR プライマーの設計を行った。リアルタイム PCR の反応は、Takara SYBR Premix EX Taq II (Tli RNaseH Plus) を用いて、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) で遺伝子発現の経時的な変化を調べた。また、これらのプライマーが、種の異なる品目に適用可能かどうか併せて検討した。

(4) 貯蔵に伴って遺伝子発現が増加あるいは減少する遺伝子の配列をもとに、当該野菜品目の cDNA をテンプレートとして PCR で増幅し、ゲル電気泳動で検出可能な「鮮度マーカー」およびマルチプレクス化の検討を行った。

(5) ブロッコリーとホウレンソウの経時的貯蔵サンプルから全 RNA を抽出し、Arabidopsis のオリゴ DNA マイクロアレイ ver 4.0 (Agilent) を用いて、1色法によるラベリングで発現解析を行い、貯蔵に伴って発現が変化する候補遺伝子の探索を行った。

(6) 「鮮度マーカー」となりうる遺伝子の塩基配列および他種植物の類似遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の情報をもとに、ディジェネレートプライマーの設計を行い、ホウレンソウとブロッコリーの cDNA をテンプレートとして、共通に使用可能なプライマーの組合せを検討した。

4. 研究成果

(1) ホウレンソウを 10°C で貯蔵し、貯蔵開始時と、葉が黄化した貯蔵4日目の試料を用いて発現量に差のある遺伝子を濃縮したライブラリーから、177 個の遺伝子の塩基配列を決定した。Blast 検索により、既知の遺伝子と類似性を示すものをリストアップして、重複を除いた結果、169 個の異なるクローンを得た。ブロッコリーを 20°C で貯蔵し、貯蔵開始時と花蕾が黄化した貯蔵4日目の試料を用いて発現量に差のある遺伝子を濃縮したライブラリーから、178 個の遺伝子の塩基配列を決定した。レタスでも同様の試験を行い、貯蔵によって変化する 137 個の遺伝子の塩基配列を得た。

(2) ホウレンソウの遺伝子のうち、既知遺伝子と類似性を示す 27 個のクローンについてノーザンブロット分析を行い、貯蔵に伴う発現パターンによってグループ分けした。ホウレンソウの黄化に伴って、システインプロテアーゼ、germin 様タンパク質、ATP 結合タン

パク質、ポリガラクトクロナーゼ、リパーゼ、銅結合タンパク質、傷害誘導タンパク質等の発現量が増加した。一方で、カタラーゼ、デヒドロゲナーゼ等は発現量が減少した。また、メタロチオネインや塩類誘導タンパク質は、ほとんど発現が変化しなかった。ブロッコリーの黄化に伴って発現量が増加する遺伝子として、17個のクローンについてノーザンブロット分析を行い、ペルオキシダーゼ、システインプロテアーゼ、ACC オキシダーゼ、リパーゼ、ペクチナーゼ等のホモログが特定された。レタスの遺伝子のうち、18個のクローンについてノーザンブロット分析を行い、 β -グルカナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、感染誘導タンパク質、キチナーゼ等のホモログが特定された。

(3) ホウレンソウのリアルタイム PCR では、65個の遺伝子について発現の変化を調べ、ノーザンブロット分析と発現パターンが良く一致することを確認するとともに、機能未知の遺伝子や、既知の遺伝子と類似性がないクローンについても発現の変化を明らかにした。ブロッコリーのリアルタイム PCR では、37個の遺伝子について発現の変化を調べ、ペルオキシダーゼやACC オキシダーゼでは、ノーザンブロット分析と発現パターンが良く一致することを確認した。一方で、ホウレンソウの配列をもとに設計したリアルタイム PCR のプライマーをブロッコリーの cDNA テンプレートに適用した場合や、その逆の場合には、貯蔵に伴う遺伝子発現の傾向は、一貫した結果が得られなかった。これは、設計されたリアルタイム PCR のプライマーの特異性が高いために、異なる種では目的とするフラグメントの増幅が起こらないものと考えられた。

(4) ホウレンソウの貯蔵に伴って遺伝子発現が変化する 9 個の遺伝子の配列をもとに、RT-PCR によって遺伝子発現の変化を検出可能なプライマー (25 mer) の組合せおよび、混合した場合に交差反応等で干渉しない組合せを検討した結果、クロロフィル結合タンパク質 (SO_R141: 509 bp)、ポリガラクトクロナーゼ前駆体 (SO_F325: 403 bp)、システインプロテアーゼ様タンパク質 (SO_F167: 309 bp)、塩誘導疎水性タンパク質 (SO_F188: 170 bp) の組合せで、独立したフラグメントが確認され、外観では鮮度低下の判断が難しい貯蔵 2 日目の段階で、SO_F167 の遺伝子発現により鮮度低下の兆候を検出できた (図 1)。図の中で、各レーンの数字 (1~4) は、野菜試料の貯蔵日数を表す。M は DNA ラダーマーカー。以下の図でも同様。この結果から、クロロフィル結合タンパク質 (SO_R141) は、貯蔵に伴って発現が減少しているのに対し、ポリガラクトクロナーゼ前駆体 (SO_F325) と、システインプロテアーゼ様タンパク質 (SO_F167) は、貯蔵前には発現していないが、

貯蔵に伴って顕著に発現量が増加した。塩誘導疎水性タンパク質 (SO_F188) は、貯蔵中にはほとんど発現量が変わらず、発現のノーマライズとして使用できるものと考えられた。

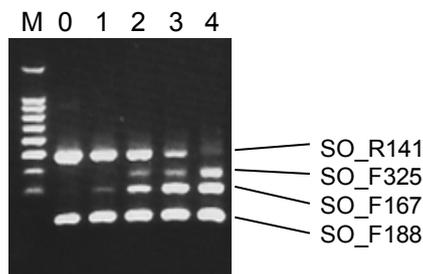


図1 ホウレンソウの鮮度低下の検出

ブロッコリーでは、グルタミン酸脱水素酵素 (BO_F106: 397 bp)、糖加水分解酵素 (BO_F361: 298 bp)、ペクチン分解酵素 (BO_F367: 198 bp) の組合せで RT-PCR により鮮度評価を行うことが可能になった (図 2)。

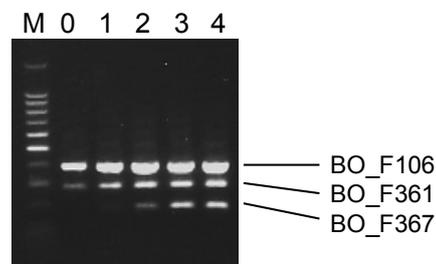


図2 ブロッコリーの鮮度低下の検出

レタスでは、カタラーゼ (LS_F434: 640 bp)、ポリフェノールオキシダーゼ (LS_F428: 398 bp)、感染特異的タンパク質 (LS_F366: 235 bp)、プロテアーゼインヒビタ (LS_F314: 189 bp) の組合せで RT-PCR により鮮度評価を行うことが可能になった (図 3)。

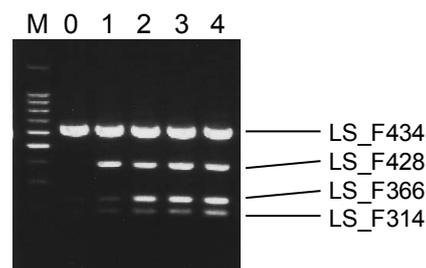


図3 レタスの鮮度低下の検出

(5) ブロッコリーおよびホウレンソウの貯蔵に伴って、Arabidopsis の DNA アレイ上のグリコシルトレンスフェラーゼや、NAC ドメインを持つタンパク質とハイブリダイズする遺伝子の発現が共通して上昇した。一方で、クロロフィル結合タンパク質や RuBisCO の small chain、機能未知のタンパク質も発現が減少することが明らかになった。

(6) ノーザンブロット分析あるいはリアルタイム PCR 分析等によって遺伝子発現の変化

が大きい遺伝子のうち、ホウレンソウでは、類似の配列はヒットするが機能未知のタンパク質（2種類）、germin 様タンパク質、システインプロテアーゼ、ATP 結合タンパク質、リパーゼ、 β -グルカナーゼ、ブロッコリーでは、ペルオキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ストレス応答タンパク質のうち、塩基配列あるいはアミノ酸配列で既知の遺伝子と相同性が比較的高い部分を選んで、ディジェネレートプライマーを設計して、ホウレンソウおよびブロッコリーの cDNA をテンプレートとして PCR を行ったところ、ホウレンソウのシステインプロテアーゼ配列をもとにディジェネレートプライマーのうち、増幅されるフラグメントが 506 bp となる組合せ (dgSO_F167_139s, dgSO_F167_645a) が、共通の「鮮度マーカー」となることを見いだした。これらの結果は、種特異的なプライマーでは、特異性が高く、他種の「鮮度マーカー」として使えない場合でも、ディジェネレートプライマーとする配列の部分や組合せを検討することによって、異なる種の野菜でも「鮮度プライマー」となることが示された最初の成功例である。今後、より多くの「共通鮮度マーカー」の開発につながるものと考えられる (図4)。

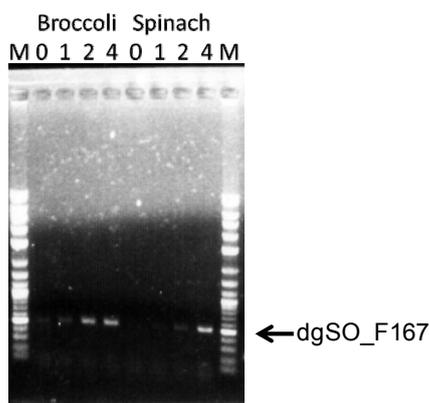


図4 ディジェネレートプライマーを共通の鮮度マーカーとしたブロッコリーとホウレンソウの鮮度低下の検出

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 永田雅靖、ODS 系カラムによるビタミンC の高速液体クロマトグラフィー分析. 日本食品科学工学会誌、査読有、60 巻、2 号、2013、96-99
DOI:10.3136/nskkk.60.96
- ② 永田雅靖、加工・業務用キャベツの収穫時期と貯蔵後の品質特性、日本食品科学工学会誌、査読有、59 巻、1 号、2012、40-44
DOI:10.3136/nskkk.59.40

〔学会発表〕 (計3件)

- ① 永田雅靖：遺伝子発現を利用した野菜の鮮度マーカーの開発、園芸学会平成 24 年度秋季大会、平成 24 年 9 月 22 日、福井県立大学 (福井県)
- ② 永田雅靖、神尾尚子、ホウレンソウの貯蔵に伴う遺伝子発現変化とマルチプレックス RT-PCR による検出、園芸学会平成 24 年度春季大会、平成 24 年 3 月 29 日、大阪府立大学 (大阪府)
- ③ 永田雅靖：エチレン非感受性遺伝子組換えレタスの貯蔵特性、園芸学会平成 23 年度秋季大会、平成 23 年 9 月 25 日、岡山大学 (岡山県)

〔図書〕 (計3件)

- ① 永田雅靖、野菜茶業研究所、野菜の鮮度、野菜茶業研究所ニュース、49、2013、1-6
- ② 永田雅靖、誠文堂新光社、遺伝子発現を利用した野菜の鮮度評価、農耕と園芸、67(10)、2012、32-35
- ③ 永田雅靖、農産物流通技術研究会、遺伝子発現解析を利用した野菜の鮮度評価、農流技研会報、290、2012、14-17

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 雅靖 (NAGATA, Masayasu)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所・野菜病害虫・品質研究領域・上席研究員

研究者番号：60370574

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：