

日本食品保蔵科学会誌

VOL. 42 NO. 6

会 長	高井 陸雄	副 会 長	太田 英明	小宮山美弘	早坂 薫
編集委員長	太田 英明				
編 集 委 員	稲熊 隆博	井上 茂孝	今堀 義洋	恩田 匠	竹永 章生
	古庄 律	松田 茂樹	宮本 敬久		

<研究ノート> (英文)

コメ, トウモロコシ, コムギ, サツマイモおよび

ジャガイモデンプン粒表層タンパク質の抽出と同定 (237)

／塩野弘二・辻井良政・野口智弘
佐藤広顕・高野克己

紀州鯖なれずしの網羅的および単離法による微生物菌叢の解析 (243)

／中川智行・川瀬貴斗・早川享志

<技術報告>

遺伝子発現に基づくホウレンソウの鮮度評価法の開発 (247)

／永田雅靖・平賀智子・竹田尚子

<文献抄録> (255)

<本会記事> (256)

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 42 NO. 6 (2016)

<Research Note> (English)

- Extraction and Identification of Rice, Maize, Wheat,
Sweet Potato and Potato Starch Granule Surface Protein
SHIONO Kouji, TSUJII Yoshimasa, NOGUCHI Tomohiro,
SATO Hiroaki and TAKANO Katsumi (237)

- Analysis of Bacterial Biota Determined Using MiSeq
Sequencing and Culture-based Investigations in *Kishu saba-narezushi* (mackerel *narezushi*)
NAKAGAWA Tomoyuki, KAWASE Takato and HAYAKAWA Takashi (243)

<Technical Report> (Japanese)

- A Gene Expression Method for Evaluating Freshness of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves
NAGATA Masayasu, HIRAGA Tomoko and TAKEDA Naoko (247)

Extraction and Identification of Rice, Maize, Wheat, Sweet Potato and Potato Starch Granule Surface Protein

SHIONO Kouji*¹, TSUJII Yoshimasa*^{1§}, NOGUCHI Tomohiro*²,
SATO Hiroaki*³ and TAKANO Katsumi*¹

* 1 Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

* 2 Food Processing Center, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

* 3 Department of Food and Cosmetic Science, Faculty of Bio-industry, Tokyo University of Agriculture,
196 Yasaka, Abashiri-city, Hokkaido 099-2493

Starches are a major commercial food source, and different starches have distinct properties that result in part from their associated proteins. We examined the starch surface proteins (SSPs) of rice, maize, and wheat, sweet potatoes and potatoes. We identified a strong correlation between the color (b^*) of various starches stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) and their protein content ($r = 0.965$). Protein was extracted from various starches using 0.1 % sodium hydroxide. The percentage of the decreased protein using this procedure differed depending on the source: Rice, maize, wheat, sweet potato, and potato yielded 71.6, 29.8, 21.6, 60.0, and 40.0 % of their SSP, respectively. The SSPs were separated to 19 protein bands by gel electrophoresis, and we successfully identified 16 of the 19 proteins. A granule-bound starch synthase or precursor was identified from each starch. The wheat SSPs included an alpha-amylase inhibitor. The potato SSPs included aspartic proteinase inhibitor homologue and cysteine protease inhibitor 7. Furthermore, several storage proteins were identified among the SSPs, including glutelin and prolamin from rice, gamma zein from maize, globulin from wheat, and sporamin from sweet potato. Since storage proteins are commonly hydrophobic, we suggest that these proteins affect the pasting characteristics of various starches.

(Received Aug. 18, 2016 ; Accepted Sep. 21, 2016)

Key words : starch granule, starch granule surface protein LC/MS/MS

デンプン粒, デンプン粒表層タンパク質

Starches are a major commercial food source. Starch granules are synthesized and stored within amyloplasts, and differ depending on their plant of origin. For example, the granule size, amylose content, and crystallinity of starch differs between plants¹⁻³. These factors affect the pasting properties and digestion of the raw starch by amylase; however, the relationship is not well understood⁴. Starch granules contain amylose and amylopectin, along with small quantities of other components such as proteins, lipids, and minerals⁵⁻⁸. Cereal starches are approximately 0~0.25 % protein, and up to 1.0 % lipid, while root and tuber starches (e.g. from sweet potato and potato) are 0~0.05 % protein and 0.05~0.1 % lipid^{1,9-11}. Even though the protein and lipid quantities are minor, they affect both the pasting properties (viscosity, swelling

capacity, and gel formation) and the granule as a whole^{12,13}.

Wheat starch contains starch granule bound proteins¹⁴. Soft wheat possesses more starch surface protein (SSP) than hard wheat, and this protein is associated with a softer endosperm texture¹⁵. In addition, Nierle *et al.* reported that removal of wheat starch SSPs by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS) increased viscosity¹³. This result led the authors to suggest that SSP might affect the properties of the wheat starch granules. However, it has since been suggested that SDS might interact with amylose and amylopectin, and that these interactions might explain the effects of SDS on the properties of starch¹⁶. Accordingly, the effects that SSPs have on the properties of a given starch are completely unknown. Therefore, it is

important to understand the relationship between SSPs and the properties of commercially important starches.

We previously elucidated the relationship between SSP and raw maize starch digestion by alpha-amylase¹⁷⁾. We discovered that maize SSPs interacted with alpha-amylase and affected the digestion of the starch; we also proposed that SSPs affect the starch granule characteristics¹⁷⁾. To date, there have been relatively few studies examining SSPs. In this study, in order to better understand the relationship between SSPs and starch properties, we extracted the SSPs from rice, maize, wheat, sweet potatoes, and potatoes using a 0.1 % sodium hydroxide solution. We then determined the composition of the SSPs from these starches using liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF) (LC-MS/MS).

Materials and Methods

1. Materials

Rice starch was purchased from Sigma-Aldrich Co. (Japan), and maize, wheat, and sweet potato starches were purchased from WAKO Co. (Japan). Potato starch was purchased from Nacalai Tesque Co. (Japan).

2. Preparation of starch surface protein (SSP)

Starch surface protein solutions were prepared from various starches following the methods described by SHUJUN *et al.* with minor modifications¹⁸⁾. Various starches (10 g, dry weight) were added to 150 ml of pure water, and the mixtures were left at room temperature for 20 min. The supernatants were discarded after a 5 min centrifugation (9,000 × g) at 20°C, and the above steps were repeated. The precipitates were then resuspended in 0.1 % NaOH solutions (100 ml) by stirring at 4°C for 12 h. The supernatants were collected after another 5 min centrifugation (9,000 × g) at 20°C. The supernatants were then each separately dialyzed against pure water using Spectra/Por 3 Dialysis Membrane Standard Grade RC Tubing (molecular weight cut-off 3,500 Da). The resulting SSP solutions were freeze dried. The precipitates from the centrifugation were washed using pure water until they reached pH 7. These washed starches were then freeze dried. Control starch samples were prepared using the same procedure, with the exception that they were resuspended in pure water rather than 0.1 % NaOH before centrifugation.

3. Measurement of protein content in starch

The protein content was determined by based on nitrogen and carbon content using CN coder (Yanaco Technical Science Co., Japan). The amounts of nitrogen from 500 mg (dry weight) of the 0.1 % NaOH treated and control starches were measured, and the amount of protein in each was calculated using the appropriate conversion factor (rice, 5.95; maize, sweet potato, and potato, 6.25; wheat, 5.70).

4. Staining the starch surface

Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining solution was prepared by mixing 0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (WAKO Co., Japan) dye, 50 % (v/v) methanol (Kanto Chemical Co., Japan) and 10 % acetic acid (Kanto Chemical Co., Japan). The CBB staining solution (1 ml) was added to 0.1 % NaOH treated and control starch samples (100 mg dry weight), and the mixtures were incubated for 30 min at room temperature. The solutions were centrifuged at 16,000 × g for 1 min at 4°C, and the resulting supernatants were discarded. Subsequently, 1 ml of destaining solution (50 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) acetic acid) was added to each of the precipitates, and they were resuspended with mixing. The centrifugation process was repeated as described, and the precipitates were again obtained. The centrifugation and resuspension cycle was repeated five times before the pellets were finally resuspended in 1 ml of water. The color of each resulting slurry was analyzed using a CM-5 spectrophotometer (Konica Minolta Co., Japan), and the b* values were determined for each slurry.

5. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The extracted SSPs were dissolved in 10 mM MES buffer (pH 6.0), and the supernatants were collected after a centrifugation at 16,000 × g for 1 min at 4°C. Laemmli sample buffer was added to the supernatant SSP solution, and the SSPs were resolved by SDS-PAGE in a 5~20 % polyacrylamide gradient gel (ATTO Co., Japan) according to the Laemmli method¹⁹⁾. The gels were then stained with CBB staining solution, and subsequently destained using destaining solution.

6. Statistical analysis

Analysis of variance was conducted using Statcel software (OMS Publishing Inc., Saitama, Japan). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and if the means were significantly different ($p < 0.05$), they were then compared using

Fisher's protected least significant difference (PLSD) test. Pearson's correlation coefficient was also calculated²⁰⁾.

7. Protein identification by LC-MS/MS

The protein bands separated by SDS-PAGE were digested in-gel with trypsin. The gel fragments were excised from the gel, and were then decolorized with a solution of 30 % (v/v) acetonitrile and 25 mM ammonium hydrogen carbonate. The fragments were then reduced with a solution of 10 mM dithiothreitol and 25 mM ammonium hydrogen carbonate, and alkylated with a solution of 55 mM iodoacetamide and 25 mM ammonium hydrogen carbonate. The treated gels were then digested with trypsin (Promega Co., Japan).

All of the mass spectrometry experiments were performed on an Agilent 6,530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS/MS coupled to an Agilent 1,260 Infinity LC high-pressure liquid chromatography system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The analytical column was a 100 mm length InertSustain C18 column with a 1.0 mm internal diameter and 3 μ m particle size (GL Sciences Co., Japan). The mobile phase was 0.1 % formic acid (WAKO Co., Japan) with varying amounts of acetonitrile (Kanto Chemical Co., Japan). The injection volume was 5.0 μ l. Peptide separation was carried out at 70 μ l/min with a mobile phase linear gradient of 2~90 % acetonitrile for 30 min, followed by 90 % acetonitrile for 5 min. The mass spectra were compared to the subset in the NCBI nr database using an in-house MASCOT search engine.

Results and Discussion

1. Protein content and b* values of various starches

The protein content (mg protein per g of starch) and color (b*) of 0.1 % sodium hydroxide treated starches and untreated starches were analyzed, and the results are shown in Table 1. In untreated starch, the protein content was highest for rice, followed by maize, wheat, sweet potato, and lastly potato. These results are similar to the findings of previous reports^{1),9)~11)}. The b* values were highly correlated with the protein content ($r = 0.965$), and this result suggests that the b* value of CBB-stained starch is an accurate indicator of starch protein content.

The protein content of various starches was

Table 1 Relationship the b* value and the amount of protein remaining on starch granules after 0.1 % sodium hydroxide (NaOH) treatment

Results are the means calculated from three experimental replicates. Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

Samples	Amount of protein (mg per g starch)		b* value	
	Control	0.1% NaOH treated	Control	0.1% NaOH treated
Rice	0.67 ^a	0.19 ^f	-37.1 ^a	-32.1 ^f
Maize	0.57 ^b	0.40 ^g	-30.3 ^b	-28.5 ^g
Wheat	0.37 ^c	0.29 ^h	-22.1 ^c	-18.0 ^h
Sweet potato	0.15 ^d	0.06 ⁱ	-16.7 ^d	-12.5 ⁱ
potato	0.10 ^e	0.06 ⁱ	-5.7 ^e	-3.5 ⁱ

significantly decreased by treatment with 0.1 % sodium hydroxide (Table 1). The amount of protein removed during sodium hydroxide treatment was calculated for each starch type as a percentage of the total protein in the starch, based on the protein content of the appropriate untreated control. Rice starch had the highest protein loss (71.6 %), followed by sweet potato (60.0 %), potato (40.0 %), maize (29.8 %), and lastly wheat (21.6 %). Overall, the amount of SSP that dissolved in 0.1 % sodium hydroxide differed depending on the starch source. These results suggest that maize and wheat SSPs may be more hydrophobic and therefore less soluble in the sodium hydroxide solution. Additionally, the b* values were also highly correlated with the protein content, with the exception of rice starch. This correlation was expected, and the small amount of rice SSP that remained after sodium hydroxide treatment may explain the difference in the degree of CBB staining.

2. Identification of individual SSPs

The SSPs were separated and visualized by SDS-PAGE (Fig. 1). Several proteins migrating at distinct molecular weights were evident from each SSP sample. We analyzed 19 bands by MS (numbered 1-19 in Fig. 1), and successfully identified 16 proteins (Table 2). A granule-bound starch synthase or precursor thereof was present in each SSP sample. An alpha-amylase inhibitor was also identified among the wheat SSPs. Both aspartic proteinase inhibitor homologue and cysteine protease inhibitor 7 were identified among the potato SSPs (Table 2). Furthermore, we identified several storage proteins including glutelin and prolamin from rice, gamma

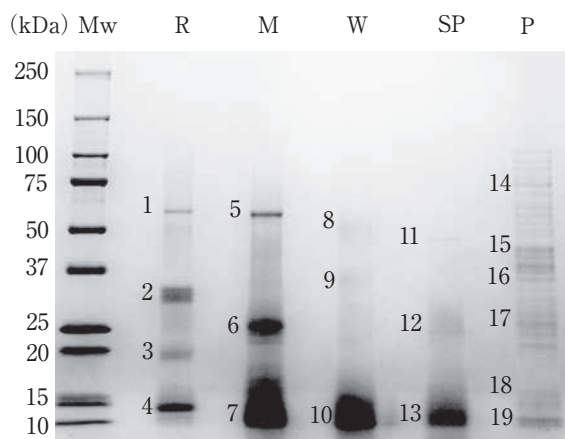


Fig. 1 Analysis of SSPs by SDS-PAGE

The SSPs from rice (R), maize (M), wheat (W), sweet potato (SP), and potato (P) were resolved on a 5–20 % gradient polyacrylamide gel and visualized with coomassie brilliant blue dye. Molecular weight markers were loaded for reference (Mw), and their sizes are indicated along the left edge of the gel (Mass). Numbers indicate individual protein bands that were excised for further analysis.

zein (glutelin-2) from maize, globulin 3 from wheat, and sporamin A from sweet potato. Collectively, these results indicate that SSPs are primarily made up of storage proteins. HAMAKER *et al.* reported that adding dithiothreitol to reduce disulfide bonds in rice powder slurry decreased the viscosity²¹⁾, and DERYCKE *et al.* showed that SSPs covering starch granules interfered with water absorption²²⁾. We

suggest that the hydrophobicity of storage proteins likely affects the pasting properties of the starch granules. In addition, some of the potato surface protein that matches on the database was not (15, 17 and 19 bands: Fig.1). It will be necessary to analysis of these protein.

We examined rice, maize, wheat, sweet potato, and potato starch surface proteins. The protein contents of their starch granules were different, and there was a strong correlation between b^* values in colorimetric analysis following Coomassie staining and protein content. Treatment with 0.1 % sodium hydroxide decreased the protein content, and accordingly b^* value, for each of the starch types. However, the amount of protein extracted by sodium hydroxide was different for each starch type, and we hypothesize that this difference reflects the variation in hydrophobicity among the SSPs of each starch. Further, we identified proteins including starch synthases and storage proteins among the SSPs. Storage proteins are commonly hydrophobic, which may explain why SSP content affects the pasting properties of starch granules.

REFERENCES

- 1) SWINKELS, J. J. M.: Composition and properties of commercial native starches, *Starch/Stärke*, **37**, 1~5 (1985)

Table 2 Identification of various SSPs with LC/MS/MS

Individual protein bands identified following SDS-PAGE were excised and digested with trypsin before analysis. The proteins were identified by comparing their resulting mass spectra to NCBI database using a MASCOT search engine.

Samples	Band*	Identified protein	Data base accession number	Matched peptides	MASCOT score
Rice	1	granule-bound starch synthase [Oryza sativa japonica Group]	gi 7798551	99	154
	2	glutelin [Oryza sativa japonica Group]	gi 119395188	73	63
	3	glutelin [Oryza sativa japonica Group]	gi 225710	79	284
	4	prolamin [Oryza sativa japonica Group]	gi 1842176	20	356
Maize	5	granule-bound starch synthase precursor [Zea mays]	gi 33321047	173	420
	6	gamma zein [Zea mays]	gi 168695	16	56
	7	legumin 1 [Zea mays]	gi 16305144	13	71
Wheat	8	granule-bound starch synthase precursor [Triticum aestivum]	gi 4760582	37	105
	9	globulin 3 [Triticum aestivum]	gi 215398470	32	88
	10	alpha-amylase inhibitor [Triticum aestivum]	gi 123963	8	52
Sweet potato	11	granule-bound starch synthase precursor [Ipomoea batatas]	gi 291461608	5	43
	12	sporamin A [Ipomoea batatas]	gi 215398470	21	43
	13	sporamin A precursor [Ipomoea batatas]	gi 168278	6	27
Potato	14	granule-bound starch synthase isoform X2 [Solanum tuberosum]	gi 565353704	20	586
	16	aspartic proteinase inhibitor homologue [Solanum tuberosum]	gi 975235	25	35
	18	cysteine protease inhibitor 7 [Solanum tuberosum]	gi 20137684	4	28

*15, 17 and 19 bands were no significant hits.

- 2) NODA, T., TAKAHARA, Y. and NAGATA, T.: Factors Relating to Digestibility of Raw Starch by Amylase, *Denpun Kagaku*, **40** (3), 271~276 (1993)
- 3) CELIA, M. L., FRANCO, SAO JOSE do RIO PRETO and CESAR, F. CIACCO.: Factors that Affect the Enzymatic Degradation of Natural Starch Granules. Effect of the Size of the Granules, *Starch/Stärke*, **44** (11), 422~426 (1992)
- 4) XIANGLI, K., PING, Z., ZHONGQUAN, S. and JINSONG, B.: Physicochemical properties of starches from diverse rice cultivars varying in apparent amylose content and gelatinisation temperature combinations. *Food Chemistry*, **172**, 433~440 (2015)
- 5) DAVID, R. L.: Current concepts of starch structure and its impact on properties, *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **33** (1), 80~88 (1986)
- 6) ZOBEL, H. F.: Molecules to granules: A comprehensive review, *Starch/Stärke*, **40** (2), 44~50 (1988)
- 7) IMBERTY, A., BULÉON, A., TRAN, V. and PÉREZ, S.: Recent advances in knowledge of starch structure, *Starch/Stärke*, **43** (10), 375~384 (1991)
- 8) RING, S. G.: Stiff tests for designer starches, *Chem. Brit.*, **4**, 303~307 (1995)
- 9) SEGUCHI, M.: Oil-binding capacity of prime starch from chlorinated wheat flour, *Cereal Chem.*, **61**, 241~244 (1984)
- 10) SKERRITT, J. H., FRIEND, A. J., ROBSON, L. G. and GREENWELL, P.: Immunological homologies between wheat gluten and starch granule proteins, *J. Cereal Sci.*, **12**, 123~126 (1990)
- 11) SUURS, L. and RAEDTS, P.: Isolation of proteins from potato-starch granules using a composite gel on the model 230A micropreparative electrophoresis system, in *Biosystems Reporter 18*, Applied Biosystems, Warrington, UK pp. 6~7 (1993)
- 12) SEGUCHI, M. and YAMADA, Y.: Study of proteins extracted from the surface of wheat starch granules with sodium dodecyl sulfate, *Cereal Chem.*, **66**, 193~196 (1986)
- 13) NIERLE, W., EL BAYÄ, A. W., KERSTING, H. J. and MEYER, D.: Lipids and rheological properties of starch. Part II. The effect of granule surface material on viscosity of wheat starch, *Starch/Stärke*, **42** (12), 471~475 (1990)
- 14) LOWRY, G. D. A., SARGEANT, J. G. and SCHOFIELD, D.: Wheat starch granule protein: The isolation and characterisation of a salt-extractable protein from starch granules, *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 371~377 (1981)
- 15) SULAIMAN, B. D. and MORRISON, W. R.: Proteins associated with the surface of wheat starch granules purified by centrifuging through caesium chloride, *J. Cereal Sci.*, **12**, 53~61 (1990)
- 16) DEBET, M. R. and GIDLEY, M. J.: Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids, *Carbohydrate Polymers*, **64**, 452~465 (2006)
- 17) NOGUCHI, T., KANEKO, M., OKA, D. and TAKANO, K.: Confirmation of the Presence of Amylase-binding Protein on Maize Starch Granules and Characterization of the Enzyme, *Food Preser. Sci.*, **38** (2), 67~71 (2012)
- 18) WANG, S., LUO, H., ZHANG, J., HE, Z. and WANG, S.: Alkali-induced Changes in Functional properties and in Vitro Digestibility of Wheat Starch: The Role of Surface Proteins and Lipids, *J. Agric Food Chem.*, **62**, 3636~3643 (2014)
- 19) LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680~685 (1970)
- 20) YANAL, H.: 4-steps Excel statistics. OMS publishing Inc., Saitama, pp.151~175 (1998)
- 21) HAMAKER, B. R. and GRIFFIN, V. K.: Effect of disulfide bond-containing protein on rice starch gelatinisation and pasting. *Cereal Chem.*, **70** (4), 377~380 (1993)
- 22) DERYCKE, V., VEREVERBEKE, W. S., VANDEPUTTE, G. E., DE, MAN, W., HOSENEY, R. C. and DELCOUR, J. A.: Impact of proteins on pasting and cooking properties of nonparboiled and parboiled rice, *Cereal Chem.*, **82**, 468~474 (2005)

コメ、トウモロコシ、コムギ、サツマイモおよび
ジャガイモデンプン粒表層タンパク質の抽出と同定

塩野弘二*¹・辻井良政*¹・野口智弘*²

佐藤広顕*³・高野克己*¹

* 1 東京農業大学応用生物科学部 生物応用化学科
(〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

* 2 東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センター
(〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

* 3 東京農業大学生物産業学部食品香粧学科
(〒099-2493 北海道網走市八坂196)

デンプン粒は、起源によって粒子径、形状、アミロース含量およびデンプン分解酵素の作用性が異なることで性状の違いがある。さらにデンプン粒の性状にデンプン粒表層のタンパク質 (SSP) の関与が推察されており、SSPを減少させたデンプンは糊化特性に変化が生じるこ

とが報告されている。しかし、SSPを構成するタンパク質に関する研究例は少ない。そこで私たちは、コメ、トウモロコシ、コムギ、サツマイモおよびジャガイモのSSPを同定することを試みた。デンプン粒のタンパク質含量は起源によって異なり、その値はデンプン粒のクマシーブリリアントブルー (CCB) による染色度 (b*値) と高い相関がみられた。0.1%水酸化ナトリウムによるデンプン粒中のタンパク質の減少率はデンプンの起源によって異なり、コメ、サツマイモ、ジャガイモ、トウモロコシ、コムギの順で高かった。SDS-PAGEにより、各起源のSSPが19のタンパク質バンドに分離され、そのうち16のタンパク質を同定した。その結果、各起源のSSPか

らデンプン合成酵素が同定されたほか、コムギSSPからは α アミラーゼインヒビター、ジャガイモからはアスパラギン酸およびシステインプロテアーゼインヒビターといった酵素阻害剤が同定された。また、コメからはグルテリンおよびプロラミン、トウモロコシからはゼイン、コムギからはグロブリン、サツマイモからはスポラミンといった貯蔵タンパク質が同定された。一般的に貯蔵タンパク質は疎水性の高いタンパク質であり、これら貯蔵タンパク質が各起源のデンプン粒の性状に影響を与えている可能性が示唆された。

(平成28年8月18日受付, 平成28年9月21日受理)

Analysis of Bacterial Biota Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-based Investigations in *Kishu saba-narezushi* (mackerel *narezushi*)

NAKAGAWA Tomoyuki*[§], KAWASE Takato*
and HAYAKAWA Takashi*

* Faculty of Applied Biological Science, Gifu University, Yanagido, 1-1, Gifu 501-1193

The microbiota of *Kishu saba-narezushi* (mackerel, *Scomber japonicus*), which is manufactured in the Hidaka region of Wakayama Prefecture, Japan, was analyzed using MiSeq sequencing and culture-based investigations. The dominant microbiota in *Kishu saba-narezushi* was *Lactobacillales* (98%), and all isolated strains were identified as *Lactobacillus plantarum*. From these findings, we concluded that *Lactobacillales* including *Lb. plantarum* is the major component of microbiota in late stage for fermentation of *Kishu saba-narezushi*.

(Received Jul. 25, 2016 ; Accepted Oct. 27, 2016)

Key words : *Kishu saba-narezushi*, the Hidaka region of Wakayama Prefecture, bacterial biota, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*
紀州鯖なれずし, 和歌山県日高地方, 微生物菌叢, 乳酸菌, *Lactobacillus plantarum*

Narezushi is a fermented food made from salted fish, mammal, or bird flesh with a cooked carbohydrate, usually rice, and it is found only in regions of Southeast and Northeast Asia¹⁾. In Japan, *narezushi* is a traditional local food, and thus several types of *narezushi* have been developed by the indigenous populations using various kinds of local fish, e.g., *samma* (saury, *Cololabis saira*)²⁾, *ayu* (sweetfish, *Plecoglossus altivelis altivelis*)³⁾, *aji* (horse mackerel, *Trachurus japonicus*)^{4)~7)}, *saba* (mackerel, *Scomber japonicus*)^{8)~10)}, and other fishes, and these recipes have been handed down to successive generations in each of the regions for many years.

Generally, *narezushi* is processed by lactic acid fermentation. In this fermentation process, lactic acid bacteria play an important role. Lactic acid bacteria produce a large amount of lactic acid in various *narezushi*, and the pH of the *narezushi* is kept low after the fermentation process. Therefore, *narezushi* utilizes one of the best preservation methods for perishable proteinaceous foods, especially fishes¹¹⁾. Indeed, bacterial biotas in several types of *narezushi* from some regions have been analyzed, and lactic acid bacteria were the dominant organisms in all of these *narezushi*^{2)~9)}.

Kishu saba-narezushi is mainly manufactured in

people's homes during the autumn season in the Hidaka region of Wakayama Prefecture (*Kishu*), Japan. In the case of *Kishu saba-narezushi*, salted *saba* is placed on cooked rice, wrapped up in leaves of *Arundo donax* (Fig. 1), and then placed in layers in a wooden tub while being weighted down. *Kishu saba-narezushi* is fermented from a week to several months under anaerobic conditions. As a result of this process, the flavor of *Kishu saba-narezushi* is distinctive compared with that of other *narezushi*.

FUJII *et al.* reported on the bacterial biota in *Kishu saba-narezushi*, and its dominant microbial flora was

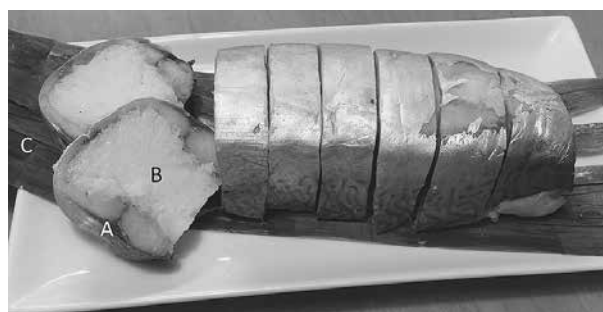


Fig. 1 Image of *Kishu saba-narezushi* (*narezushi* made of mackerel)

(A) fish portion (*saba* [mackerel]), (B) rice portion, and (C) leaves of *Arundo donax*.

composed of *Lactobacillus* (53%) and *Streptococcus* (33%) strains⁹). However, these strains were identified only by phenotypic characteristics, and there is no detailed data on the microbial population in the *Kishu saba-narezushi*.

In this study, we analyzed microbial biota of *Kishu saba-narezushi* in the Hidaka region of Wakayama Prefecture, using MiSeq sequencing and conducted culture-based investigations using the 16S rRNA gene sequence.

Materials and Methods

1. *Kishu saba-narezushi* sample and contents of organic acids

Kishu saba-narezushi, the fermentation and maturation periods of which were 5 days (2015, Nov 26-30), was collected from a local manufacturer in the Hidaka region of Wakayama Prefecture.

Contents of organic acids of *Kishu saba-narezushi* were analyzed by the method described in the Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulations¹²). In this study, we used two samples of *Kishu saba-narezushi* ($n = 2$). Thus data was shown as average of measured values and absolute error.

2. Isolation and identification of lactic acid bacteria

Samples (10 g) of *Kishu saba-narezushi* were emulsified in 90 mL of sterile water and blended for 60 s (Stomacher 400 Circulator, Seward, London, UK). The sample suspensions were diluted in sterile water and appropriate dilutions were spread on MRS plate (Lactobacilli MRS Agar; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ).

The 16S rRNA genes of isolated lactic acid bacteria were amplified from the colonies via the colony PCR method using the primers 20F and 1500R¹³).

3. MiSeq sequencing

From samples of *Kishu saba-narezushi*, we extracted total DNA using a NucleoSpin Soil kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany). The V3-V4 variable region of the 16S rRNA gene was amplified from the total DNA using the 16S metagenomic sequencing library protocol (Illumina, San Diego, CA)¹⁴). The paired-end reads were assembled using fastq-join (ea-utils version 1.1.2-537). The primary processing of sequencing reads and clustering into operational taxonomic units (OTUs) were accomplished in the context of Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, version 1.8.0)¹⁵).

Results and Discussion

At first, we performed a general chemical analysis, *i.e.*, the pH and contents of organic acids. The pH of *Kishu saba-narezushi* was 3.93 ± 0.08 . FUJII *et al.* previously reported that the pH of *Kishu saba-narezushi* was 3.95 (fish portion) and 3.75 (rice portion)⁹). Additionally, the organic acid contents such as lactic acid and acetic acid in the fish portion were 9.85 ± 0.15 mg/g and 0.51 ± 0.02 mg/g, respectively, and those contents in the rice portion were 8.70 ± 0.00 mg/g and 0.48 ± 0.05 mg/g, respectively. These findings are similar to the data obtained from commercially available samples reported by CHANG *et al.* (lactic acid, 11.4 ± 0.76 mg/g; and acetic acid, 2.06 ± 0.12 mg/g)¹⁰). These results suggest that lactic acid fermentation occurred in *Kishu saba-narezushi* and that the lactic acid contributes a sour taste to *Kishu saba-narezushi*, as it does in other *narezushi*.

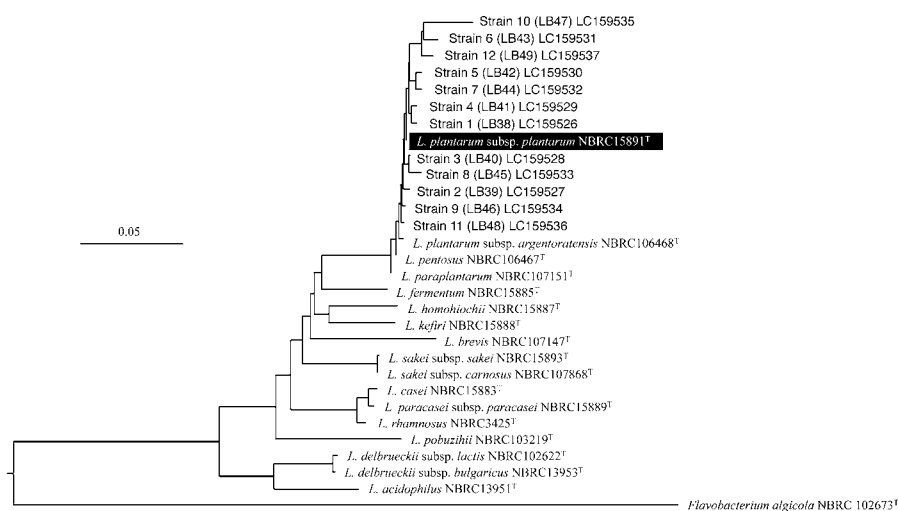
Next, we tried to determine the count of viable lactic acid bacteria in *Kishu saba-narezushi*. In *Kishu saba-narezushi* samples, the maximum viable plate counts were $3.3 \times 10^9 \pm 2 \times 10^8$ CFU/g.

We also identified the microbial biota in *Kishu saba-narezushi*. For our sample of *Kishu saba-narezushi*, 83,959 sequences were obtained and analyzed phylogenetically. These clones were classified into 336 OTUs. However, only two major orders were found in the bacterial biota of *Kishu saba-narezushi*: the dominant order was *Lactobacillales* (98%) and the other was *Bacillales* (Table 1). The most dominant family was found to be *Lactobacillaceae* (85.4%), followed by *Leuconostocaceae* (3.7%) and *Streptococcaceae* (3.6%) (Table 1). However, the genus for most reads belonging to *Lactobacillaceae* could not be identified (78.9%), although these reads did include the genus *Pediococcus* (4.0%), *Lactobacillus* (2.5%), and *Weissella* (0.1%) (Table 1). From these results, it was suggested that *Kishu saba-narezushi* contains a *Lactobacillales*-dominant microbiota.

Finally, we attempted to identify the dominant species in *Kishu saba-narezushi*. We randomly selected 12 single colonies from the *narezushi* using the MRS plate, and the 16S rRNA sequences of all strains had high homologies with the sequence of *Lb. plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891^T (> 99%) (Fig. 2). On the other hand, strains of genera *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Pediococcus* were not isolated from *Kishu saba-narezushi*, although 16S

Table 1 Read statistics of *Kishu saba-narezushi*

Order	(number of reads)	Family	(number of reads)	Genus	(number of reads)
<i>Lactobacillales</i>	82,259 (98%)	<i>Lactobacillaceae</i>	71,688 (85.4%)	not identified	71,688 (78.9%)
				<i>Pediococcus</i>	3,394 (4.0%)
				<i>Lactobacillus</i>	2,072 (2.5%)
				<i>Weissella</i>	79 (0.1%)
				<i>Leuconostocaceae</i>	3,107 (3.7%)
				<i>Leuconostoc</i>	446 (0.5%)
		<i>Streptococcaceae</i>	3,015 (3.6%)	<i>Lactococcus</i>	3,004 (3.6%)
		<i>Enterococcaceae</i>	604 (0.7%)	<i>Enterococcus</i>	604 (0.7%)
<i>Bacillales</i>	1,607 (1.9%)	<i>Staphylococcaceae</i>	1,601 (1.9%)	<i>Staphylococcus</i>	1,601 (1.9%)

**Fig. 2** Phylogenetic relationships of the isolated strains from *Kishu saba-narezushi* and several related species based on 16S rRNA gene sequences

The branching pattern was generated by the neighbor-joining method.

The bar indicates 0.05 nucleotide substitutions per site. The sequence data are cited from GenBank.

rRNAs from these genera were identified in the sample. These findings support the result of metagenomic analysis that is a *Lactobacillales*-dominant microbiota in *Kishu saba-narezushi*.

In this study, we showed that the dominant microbial biota in *Kishu saba-narezushi* was lactic acid bacteria, *Lactobacillales* (98%). Recently, the microbiota of several *narezushi* have been reported; in *Mie saba-narezushi*⁽⁸⁾, *Mie-narezushi*⁽²⁾, *Mie ayu-narezushi*⁽³⁾, *Noto aji-narezushi*^{(4)~(7)}, and *funazushi*⁽¹⁶⁾ samples, *Lactobacillales* was the dominant microbial biota just as it was in *Kishu saba-narezushi*. Taking these reports together, our results indicate that bacteria belonging to the *Lactobacillales* may play important roles in the fermentation of various types of *narezushi*.

Moreover, all strains isolated from *Kishu saba-narezushi* were identified as *Lb. plantarum* (Fig. 2).

From all findings in this study, we concluded that *Lactobacillales* including *Lb. plantarum* is the major component of microbiota in late stage for fermentation of *Kishu saba-narezushi*. It was reported that the dominant microbial flora of *Kishu saba-narezushi* was *Lactobacillus* (53%) strains, and they were identified as *Lb. plantarum*, *Lb. alimentaria*, and *Lb. coryniformis* via the colony picking method⁽⁹⁾. In contrast, MATSUI *et al.* reported that the most abundant species found in *Mie saba-narezushi* was *Lb. curvatus* (51.1%)⁽⁸⁾. At this time, we are not able to determine the exact cause for the difference in microbial biota between *Mie* and *Kishu saba-narezushi*. We speculate that one of the causes for this difference is related to the leaves, *Arundo donax*, which are used for wrapping up the salted *saba* that is placed on the cooked rice. Our next study will focus on ① identifying the origin of the

microbial biota of *Kishu saba-narezushi*, ② observing transitions of microbial biota in *Kishu saba-narezushi* during its fermentation process, and ③ refermenting the *saba-narezushi* using isolated *Lb. plantarum* strains.

Acknowledgements The authors thank Mrs. Junko Nakagawa who provided *Kishu saba-narezushi* samples to us.

References

- 1) ISHIGE, N.: Cultural aspects of fermented fish products in Asia. In: Lee CH, Steinkraus KH, Reilly APJ, eds. Fish fermentation technology. Tokyo: United Nations University Press, pp.13~32 (1993)
- 2) MATSUI, H., TSUTUYA, R., ISOBE, Y. *et al.*: Diversity of the bacterial community found in *samma-narezushi* (saury *narezushi*) revealed by the 16S rRNA gene clone library, *Biocontrol Sci.*, **13**, 97~102 (2008)
- 3) MATSUI, H., SAKA, E., ISOBE, Y. *et al.*: Comparison of the bacterial community structures of *Ayuna-narezushi* produced by two different manufacturers, *Biocontrol Sci.*, **15**, 63~68 (2010)
- 4) AN, C., TAKAHASHI, H. and KIMURA, B., *et al.*: Comparison of PCR-DGGE and PCR-SSCP analysis for bacterial flora of Japanese traditional fermented fish products, *aji-narezushi* and *iwashinukazuke*, *J. Sci. Food. Agric.*, **90**, 1796~1801 (2010)
- 5) KOYANAGI, T., NAKAGAWA, A., KIYOHARA, M. *et al.*: Pyrosequencing analysis of microbiota in *Kabura-zushi*, a traditional medieval *sushi* in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2125~2130 (2013)
- 6) KOYANAGI, T., KIYOHARA, M., MATSUI, H. *et al.*: Pyrosequencing survey of the microbial diversity of '*narezushi*', an archetype of modern Japanese *sushi*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 635~640 (2011)
- 7) KIYOHARA, M., KOYANAGI, T., MATSUI, H. *et al.*: Changes in microbiota population during fermentation of *narezushi* as revealed by pyrosequencing analysis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 48~52 (2012)
- 8) MATSUI, H., TSUTUYA, R., ISOBE, Y., *et al.*: Analysis of bacterial community structure in *Saba-Narezushi* (*Narezushi* of Mackerel) by 16S rRNA gene clone library, *J. Food. Sci. Technol.*, **50**, 791~796 (2013)
- 9) FUJII, T., SASAKI, T. and OKUZUMI, M.: Chemical composition and microbial flora of *saba-narezushi* (fermented mackerel with rice), *Nippon Suisan Gakkaishi Jpn.*, **58**, 891~894 (1992) (in Japanese)
- 10) CHANG, C. M., OHSHIMA, T. and KOIZUMI, C.: Changes in free amino-acid, organic-acid, and lipid compositions of fermented mackerel *sushi* during processing, *Nippon Suisan Gakkaishi Jpn.*, **58**, 1961~1969 (1992) (in Japanese)
- 11) COOKE, R. D., TWIDDY, D. R. and REILLY, A. P. J.: Lactic fermentation of fish as a low-cost means of food preservation. In: Lee CH, Steinkraus KH, Reilly APJ, eds. Fish fermentation technology. Tokyo: United Nations University Press; pp.291~300 (1993)
- 12) Ministry of Health, Labour and Welfare. Chapter 1.3 lipids. In: Japan Food Hygiene Association, ed. Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation. Tokyo: pp.42~63 (2005) (in Japanese)
- 13) NAKAGAWA, T., FUJIMOTO, Y., UCHINO, M. *et al.*: Isolation and characterization of psychrophiles producing cold-active β -galactosidase, *Lett. Appl. Microbiol.*, **37**, 154~157 (2003)
- 14) PARK, S. H., LEE, S. I. and RICKE, S. C.: Microbial populations in naked neck chicken ceca raised on pasture flock fed with commercial yeast cell wall prebiotics via an Illumina MiSeq Platform, *PLoS One*, **11**, e0151944 (2016)
- 15) CAPORASO, J. G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J. *et al.*: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Methods*, **7**, 335~36 (2010)
- 16) ISOBE, Y., MIZUHASHI, T. and NARITA, M.: Microbial flora of *funazushi* (pickled crucian carp), *Nippon Kasei Gakkaishi Jpn.*, **53**, 61~64 (2002) (in Japanese)

紀州鯖なれずしの網羅的および 単離法による微生物菌叢の解析

中川智行*・川瀬貴斗*・早川享志*

* 岐阜大学応用生物科学部応用生命科学課程
(〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸1-1)

本研究では、和歌山県日高地方の紀州鯖なれずしの微生物菌叢について、網羅的および単離法により同定した。紀州なれずしでは、ラクトバチルス科が98%を占める支配的な微生物群であり、単離法にて同定した12株すべてが*Lactobacillus plantarum*であった。これらのことから、*Lb. plantarum*を含む*Lactobacillus*が紀州なれずしの主要発酵菌であることが明らかになった。

(平成28年7月25日受付, 平成28年10月27日受理)

遺伝子発現に基づくホウレンソウの鮮度評価法の開発

永田 雅 靖^{*1,*2§}・平賀 智 子^{*1,*3}・竹田 尚 子^{*1,*4}

* 1 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所

* 2 (現所属) 国立研究開発法人農業・食品産業総合研究機構食品研究部門

* 3 退職

* 4 三重県立津高校

A Gene Expression Method for Evaluating Freshness of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves

NAGATA Masayasu^{*1,*2§}, HIRAGA Tomoko^{*1,*3} and TAKEDA Naoko^{*1,*4}

* 1 NARO National Research Institute of Vegetables and Tea Science,
360, Kusawa, Ano, Tsu, Mie 514-2392

* 2 Present address: NARO Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Inaraki 305-8642

* 3 Retired

* 4 Tsu High School, 3-1-1, Shinmachi, Tsu, Mie 514-0042

To date, the freshness of vegetables is evaluated mostly by appearance. In addition, several quality-related compounds are used to estimate the freshness; however, this approach is challenging because the initial amount of these compounds is affected by the cultivar or environmental conditions. In this study, we demonstrate a new method to evaluate the freshness of vegetables based on gene expression. Subtracted cDNA libraries were prepared from spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves before and after storage. Nucleotide sequences of these genes were determined. Expression of these genes was verified by northern blot analyses of RNA samples from leaves with different storage period. Specific marker genes, suitable for evaluating freshness, were selected. We developed a method of semi-quantitative multiplex PCR with combinations of these genes that can visualize the changes in freshness during storage. Using this technique, detection of the physiological changes in spinach was possible, even before the appearance of leaf yellowing. Application of this method enables the detection of differences in freshness under different packaging conditions based on gene expression.

(Received Aug. 18, 2016; Accepted Nov. 7, 2016)

Key words: *freshness evaluation, gene expression, spinach, subtraction, multiplex PCR*

鮮度評価, 遺伝子発現, ホウレンソウ, サブトラクション, マルチプレックスPCR

消費者は、青果等の農産物を購入する際に鮮度を重要視している¹⁾。しかし、青果物の鮮度は、その多くが外観による評価であり、色、つや、張りなどが主観的に評価されるため、評価者による違いが生じやすい。また、冷水等によって外観や物理性を回復させる、いわゆる蘇生を経たものをどのように評価するのか、鮮度の定義が定まっていないのが現状である。これまでに、鮮度に関して、複数の考え方が述べられてきた²⁾。

鮮度評価のひとつとして、流通・貯蔵に伴うクロロフィルなどの色素や、アスコルビン酸などの栄養成分の減

少が、鮮度低下の指標として用いられることが多い³⁾。この場合、周年供給される野菜などでは、栽培条件によって、収穫時の含量が大きく変動することが知られている。例えば、ホウレンソウのアスコルビン酸は、夏期には20mg/100g、冬期には60mg/100gであり⁴⁾、栽培環境によって収穫時の濃度が異なっているため、測定された含量の絶対値からは、鮮度低下による減少量を知ることはできない。

これらの欠点を解決して青果物の鮮度を推定する方法として、これまで2つの取り組みが知られている。ひと

* 1 〒514-2392 三重県津市安濃町草生360

* 2 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

§ Corresponding author, E-mail: masayasu.nagata@affrc.go.jp

* 3 〒514-0042 三重県津市新町3-1-1

つは、中野らによる膜脂質中の過酸化物の割合から鮮度を評価するものである。膜脂質中の過酸化物の割合は、収穫後の温度、貯蔵期間に伴って増加し、正の相関があることが示されている⁵⁾。もうひとつは、筆者らによる遺伝子発現を基礎としたものである⁶⁾。青果物は、収穫によって、それまで生育していた栽培環境下から、水、光、養分の補給のない収穫後の環境下に移される。そのため、収穫した青果物では、水ストレスや暗黒ストレス、切断傷害ストレス等に反応して、鮮度低下に伴う様々な遺伝子が発現し、それらがタンパク質に翻訳されて、酵素活性が変化し、エチレンの生成やアスコルビン酸の減少など品質成分が変動し、結果的にクロロフィルの分解を経て黄化などの現象につながるものと考えられる。これまで植物の老化に伴う遺伝子発現の変化は、*Arabidopsis*や*Brassica napus*等を用いて、それらの生育ステージの変化に伴う遺伝子の変化が調べられてきた^{7),8)}。これらの試験に用いられた植物は、根がついた intact な状態の植物体が、正常な生育に伴う葉の老化につながる現象を調べたものであった。一方、青果物として市場に出回っている野菜や果物は、先に述べたように収穫によって地上部と地下部あるいは果実が植物体から切り離されるなどにより、生育中とは異なるストレスによって葉の黄化など老化が促進されるが、これまで、収穫によって人為的に開始される遺伝子発現の変化を実際の野菜の鮮度評価に用いる観点では詳しく調べられてこなかった。

そこで、収穫後の代謝変化に伴って起こる遺伝子発現の変化に基づいた鮮度評価法を開発することを目的に実験を行った。具体的には、ハウレンソウを材料に、貯蔵前後のRNAに由来するcDNAを使ってサブトラクションを行い、発現量が増加あるいは減少する遺伝子を多数特定するとともに、黄化が始まる前の段階でそれらの発現量の変化を検出することができた。さらに、マルチプレックスPCRによって、貯蔵中の遺伝子発現の変化を可視化し、包装による鮮度保持効果を比較することができたので報告する。

材料および方法

1. 材 料

ハウレンソウは、市販のハウレンソウ4束(2009年5月11日購入)を用いた。ポリエチレン袋(PE袋、280mm×390mm×0.03mm)に折りこみ包装して10℃で貯蔵した⁹⁾。

ハウレンソウは、貯蔵0日と、葉の一部にやや黄化が認められる4日に可食部をサンプリングして、分析まで-80℃で保管した。

2. 遺伝子解析

貯蔵0日と4日のサンプルを材料に、RNeasy(Qiagen)を用いてRNAを抽出した。貯蔵0日と4日の試料から抽出したtotal RNAは、Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit(Clontech Laboratories, Inc.)で

cDNAを合成した。次にPCR-Select cDNA Subtraction Kit(Clontech Laboratories, Inc.)を用いて、4日間の貯蔵で発現が増加する遺伝子のcDNAおよび、4日間の貯蔵で発現が減少する遺伝子のcDNAを得た。これらは、TA Cloning Kit, Dual Promoter, with pCRII Vector(Invitrogen)を用いてプラスミドに組み込み、常法により*E. coli* DH5 α を用いてライブラリーを作成して、illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit(GEヘルスケア)を用いて、各クローンのプラスミドを抽出、精製した⁶⁾。

得られたプラスミド液は、核酸濃度を測った後、BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)のマニュアルに従ってシーケンス反応と精製を行い、3730 DNA Analyzer(Applied Biosystems)を用いて塩基配列を取得した。

これらの遺伝子配列を用いてBlast検索を行い、既知の遺伝子とのホモロジーを調べた。

3. 遺伝子発現解析

得られたサブトラクションクローンから塩基配列の異なる27個を選んで(表1)、貯蔵に伴う遺伝子発現の変化をノーザンプロットで確認した。これら27個の遺伝子を、DNA Data Bank of Japan(DDBJ)に登録するにあたり、上記のサブトラクションで得られた候補遺伝子クローンのうち、同一の配列を含むものは統合するとともに、DDBJの指導に従って末端のベクター配列の削除等を行ったため、特許出願時の配列長とは異なったが、アノテーションと類似度については、特許出願時のBlast結果を示した。

サンプルは、貯蔵初期の遺伝子発現を比較するため、10℃で、0、1、2、3、4日間PE袋で折りこみ包装し、貯蔵した市販のハウレンソウを用いた。発現の解析にはDIG RNA probe(Roche Diagnostics)を用いた⁶⁾。すなわち、1 μ gのtotal RNAを5.4%のホルムアルデヒド液(Wako純薬)を含む0.02M MOPSバッファー(pH6)中で、1.0%アガロースゲルを用いて電気泳動した後、バキュームプロット(VacuGene XL Vacuum Blotting System, フェルマシア)でHybond N+メンブレン(Amersham Biosciences)に転写した。それぞれのクローンに対応したDIGラベル化RNAプローブ(Roche Diagnostics)を調製してノーザンハイブリダイゼーションを行い、Anti-Digoxigenin AP conjugate(Roche Diagnostics)とCDP Star(Roche Diagnostics)の組合せでシグナルの検出を行い、Fuji X-Ray Film(Fuji Film)に感光させた後、暗室用自動現像機、富士メディカルフィルムプロセサーFPM100(富士フィルム)を用いて現像した。

4. マルチプレックスPCRによる検出

ノーザンプロット解析で、遺伝子発現に変化がみられた遺伝子の一部を用いて、PCRによって半定量的に検出する方法を試みた⁶⁾。

まず、遺伝子発現が変化する遺伝子の内部配列を増幅

表1 ホウレンソウ鮮度判別マーカー候補遺伝子のBlast解析

クローン名	Accession #	配列長	植物種	アノテーション(酵素・タンパク質等)	類似度
SO_F130	LC164192	469	<i>Beta vulgaris</i>	germin-like protein	283/354 (79%)
SO_F167	LC150043	951	<i>Ipomoea batatas</i>	cysteine proteinase-like protein	456/653 (69%)
SO_F175	LC164193	577	<i>Amaranthus cruentus</i>	metallothionein	212/260 (81%)
SO_F185	LC164194	821	<i>Suaeda maritima</i>	catalase	395/451 (87%)
SO_F188	LC150044	393	<i>Atriplex nummularia</i>	salt-induced hydrophilic protein	178/256 (69%)
SO_F304	LC164195	773	<i>Ricinus communis</i>	ATP-binding cassette transporter	364/492 (73%)
SO_F308	LC164196	429	<i>Arabidopsis thaliana</i>	phospholipase C	326/429 (75%)
SO_F309	LC164197	777	<i>Quercus robur</i>	formate dehydrogenase	505/625 (80%)
SO_F325	LC150042	1317	<i>Ricinus communis</i>	polygalacturonase precursor	607/871 (69%)
SO_F326	LC164198	787	<i>Populus trichocarpa</i>	calcium dependent protein kinase	579/740 (78%)
SO_F327	LC164199	618	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	salt-induced AAA-Type ATPase	542/611 (88%)
SO_F332	LC164200	799	<i>Arabidopsis thaliana</i>	esterase/lipase/thioesterase family	438/644 (68%)
SO_F337	LC164201	613	<i>Populus tremula x Populus alba</i>	drought-stressed	118/134 (88%)
SO_F347	LC164202	1236	<i>Artemisia annua</i>	2-alkenal reductase	558/743 (75%)
SO_F372	LC164203	817	<i>Ricinus communis</i>	copper ion binding protein	431/606 (71%)
SO_F376	LC164204	740	<i>Theobroma cacao</i>	aspartic proteinase	498/665 (74%)
SO_F382	LC164205	555	<i>Atriplex nummularia</i>	S-adenosyl-L-methionine synthase	517/557 (92%)
SO_F392	LC164206	361	<i>Ricinus communis</i>	lactoylglutathione lyase	124/166 (74%)
SO_F402	LC164207	775	<i>Beta vulgaris</i>	germin-like protein	536/660 (81%)
SO_F410	LC164208	586	<i>Ricinus communis</i>	wound-induced protein	263/360 (73%)
SO_F422	LC164209	579	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	vacuolar ATPase subunit G	308/381 (80%)
SO_F440	LC164210	553	<i>Ricinus communis</i>	endo-1,4-beta-glucanase	402/551 (72%)
SO_R137	LC164211	507	<i>Ricinus communis</i>	uv excision repair protein	133/160 (83%)
SO_R141	LC150041	801	<i>Spinacia oleracea</i>	chlorophyll a/b binding protein	701/717 (97%)
SO_R156	LC164212	804	<i>Arabidopsis thaliana</i>	translation elongation factor	210/237 (88%)
SO_R163	LC164213	669	<i>Solanum lycopersicum</i>	stress-associated protein 3	135/171 (78%)
SO_R169	LC164214	740	<i>Spinacia oleracea</i>	CP12	516/521 (99%)

注 各遺伝子の配列長は、Blast検索後、Accession#登録前に同一配列を含む遺伝子の統合と末端のベクター配列削除を行ったため、特許出願時の配列長(文献6)とは異なる。植物種、アノテーション(酵素・タンパク質等)、類似度は出願時のもの。

するプライマーを設計し、貯蔵日数の異なる試料のRNAに由来するcDNAをテンプレートとしてTaq polymerase (TaKaRa Ex Taq HS, タカラバイオ株式会社)を用いてPCRを行い、貯蔵に伴う変化として検出可能かどうか検討した(データ省略)。

さらに、各遺伝子に対応して増幅される断片の長さが異なる組合せで、それらの増幅が独立して行われるか、あるいはそれらのプライマーの最適な混合比等を検討した。検出に用いた配列を表2に示す。

PCRは、サーマルサイクラー(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice, TP600, タカラバイオ株式会社)を用いて、

表3に示す条件で行った。PCR産物は、2% Agarose S (ニッポンジーン)を用いて、1×TBEで電気泳動を行い、EtBrで染色して増幅されたDNAのバンドを検出した。

さらに、開発した方法を用いて、10℃で7日間異なる貯蔵条件で貯蔵したホウレンソウ(品種‘ソロモン’(サカタのタネ)、野菜茶業研究所安濃圃場にて慣行条件で栽培、2015年2月10日収穫)のサンプルについて、比較試験を行った。貯蔵試験では、ポリエチレン袋(PE袋、280mm×390mm×0.03mm)に直径5mmのパンチ穴を8個開けたもの(ポジティブコントロール)、PE折りこみ

表2 RT-PCRによるホウレンソウ鮮度判別マーカーの検出に用いた遺伝子クローン名および、プライマー配列と増幅されるフラグメント長

クローン名	センス側塩基配列	アンチセンス側塩基配列	フラグメント長
SO_R141	TTCTAAgAACCGTgAgCTTgAggTg	AggTTAgTTgCgAAAgACCAAgCAT	509
SO_F325	CCggAACACgATTTgAAgAATTACA	gAgTgACAgggTCCAgAgAATTTgA	403
SO_F167	gATCTAAATCCgTCCCACACTCTCC	ACAgAgTTCgACgAAggTTgTgAAg	309
SO_F188	TAgTAgACgCggTTCCTTATTCAT	AACCAAAgCAAACCAAgCAATAAT	170

表3 PCR反応液組成およびPCRプログラム

PCR反応液	
Template	0.5 μ l
10 X buffer	1.25 μ l
dNTP	1.0 μ l
Mixed primers*	3.25 μ l
H ₂ O	6.4 μ l
Ex Eaq	0.1 μ l

Mixed primers*濃度	混合割合
SO_R141 センス側 20 μ M	2
SO_R141 アンチセンス側 20 μ M	2
SO_F325 センス側 50 μ M	8
SO_F325 アンチセンス側 50 μ M	8
SO_F167 センス側 20 μ M	2
SO_F167 アンチセンス側 20 μ M	2
SO_F188 センス側 20 μ M	1
SO_F188 アンチセンス側 20 μ M	1

PCRプログラム	
96 $^{\circ}$ C	2 min
96 $^{\circ}$ C	30 sec
62 $^{\circ}$ C	1 min
72 $^{\circ}$ C	1.5 min
72 $^{\circ}$ C	7 min
4 $^{\circ}$ C	∞

包装, PE密閉包装して, 各7日経過したサンプルおよび, 貯蔵開始時(0日)のサンプルを, -80 $^{\circ}$ Cで凍結保存し, 上記と同様の方法でRNAを抽出後, 1 μ gのRNAからcDNAを合成してPCRのテンプレートとして用いた。

ゲル電気泳動の数値化は, 撮影されたゲルのJPEGファイルを, ゲル解析ソフトGelAnalyzer 2010a (GelAnalyzer.com) を用いて行った。

結果および考察

1. サブトラクションにより得られたクローン

ホウレンソウの貯蔵に伴って発現量が変化する遺伝子のライブラリーを用いて, 得られたクローンの塩基配列を解析し, 発現が増加する候補遺伝子のライブラリー(Fシリーズ)から153個, 発現が減少する候補遺伝子のライブラリー(Rシリーズ)から39個の遺伝子配列が得られた。

それらのすべてについてBlast検索を行ったところ, 何らかの類似遺伝子がヒットした遺伝子のうち, Fシリーズでは, プロテアーゼをコードしていると考えられるものが27クローン, 糖加水分解酵素をコードしているものが6クローン, その他にもアルコールデヒドロゲナーゼや, 酸化還元酵素, 感染特異的タンパク質, キナーゼ, イオンチャンネルをコードしている遺伝子などがあつた。

また, Rシリーズでは, クロロフィルa/b結合タンパク質などが得られた。

Blast検索で, 既知の遺伝子配列との類似性が低く, No significant similarity foundとなったものが48個あつたが, これらは今後, 鮮度低下にどのように関与しているのかさらなる解析が待たれる。

2. ノーザンプロット解析

上記で得られたクローンの中から, 表1に示す27個のクローンについて, 貯蔵に伴う遺伝子発現の変化をノーザンプロット分析で調べたところ, 貯蔵に伴って発現が明らかに増加するクローンとして, SO_130, SO_F167, SO_F304, SO_F308, SO_F325, SO_F332, SO_F372, SO_F402, SO_F410, SO_R137が得られた(図1)。また, 貯蔵に伴って発現が減少するクローンとして, SO_R141, SO_R156, SO_F185が得られた。一方, SO_F175やSO_F188のように, 発現量変化が少ないクローンも存在した。SO_Fの系列は貯蔵に伴って発現が増加する遺伝子, RO_Rの系統は貯蔵に伴って発現が減少する遺伝子を濃縮したライブラリーであるが, 一部, 逆の発現パターンを示すクローンがあり, ノーザン解析を行って, 発現パターンを確認することによって, 逆の発現パターンを示す遺伝子クローンを排除することができた。

貯蔵に伴って遺伝子発現が増加する遺伝子では, システインプロテアーゼ(SO_F167)やポリガラクトクロナ

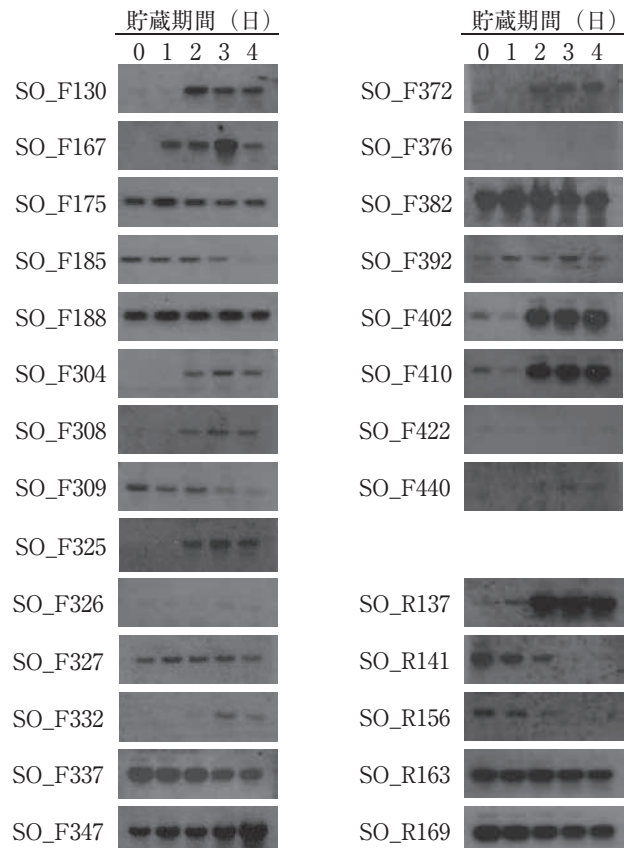


図1 ホウレンソウ鮮度判別マーカー候補遺伝子のノーザンプロット分析

ーゼ前駆体 (SO_F325) などが確認できた。一方、貯蔵に伴って発現が減少する遺伝子では、クロロフィルa/b結合タンパク質 (SO_R141) などが確認できた。

これらの結果から、発現が増減するタイミングが異なる遺伝子を組み合わせることによって、鮮度の段階づけが可能と考えられた。すなわちこれらの遺伝子を、鮮度判別マーカーとして複数の遺伝子の発現を比較することによって、鮮度低下の進み具合をとらえることができるものと考えられた。

また、鮮度の外観評価では、黄化など外観の変化が起きて初めて鮮度低下が認知されるが、今回検討している方法では、黄化に先だって遺伝子発現量が変化する過程を検出しているため、外観に変化が現れる前に鮮度低下の進み具合を段階別に検出しており、黄化してからわかるのではなく、早期に黄化の兆候をとらえることができることは、最適貯蔵条件を設定するうえでもメリットがあると考えられた。

3. マルチプレックスPCR法

複数の遺伝子の発現変化を簡便に検出可能な方法としては、マルチプレックスPCRによる検出が適当と考えられたため、貯蔵に伴って発現が減少するクロロフィルa/b結合タンパク質 (SO_R141)、貯蔵に伴って発現が増加するシステインプロテアーゼ (SO_F167)、ポリガラクトクロナーゼ前駆体 (SO_F325)、および貯蔵に伴う発現変化が小さい塩誘導疎水性タンパク質 (SO_F188) をコントロールとして用いて、それらをひとつのPCR反応系で検出可能な方法を検討した。

具体的には、ターゲット遺伝子ごとに、異なるPCRフラグメントが増幅されるように、プライマーを設計した(表2)。これらのプライマーセットごとに設計どおりのフラグメントが半定量的に増幅されるか確認した後、各組を混合してPCR反応をしても交差反応が起きないことを確認した(データ省略)。さらに、各遺伝子の発現を検出する場合に、最大の発現量が大きく異なるように、各プライマーセットを、表3に示す割合で混合し、同じく表3に示す条件でPCRを行った。貯蔵したホウレンソウを用いて、各遺伝子の発現を比較した結果を図2に示す。

クロロフィルa/b結合タンパク質をコードしているSO_R141は、ノーザンプロット分析と同様に、半定量的PCRでも貯蔵に伴って発現が減少した。一方、システインプロテアーゼをコードしているSO_F167は、貯蔵1日目から発現がみられたのに対し、ポリガラクトクロナーゼ前駆体をコードしているSO_F325は、貯蔵2日目から発現が増加した。また、塩誘導疎水性タンパク質SO_F188は、貯蔵に伴って発現量の変化が少なく、PCR反応の確認のために使用できるものと考えられた。

これらの結果は、貯蔵中のホウレンソウでは、鮮度が低下して外観に黄化の変化が現れるまでに、クロロフィル結合タンパク質遺伝子の発現が徐々に低下するととも

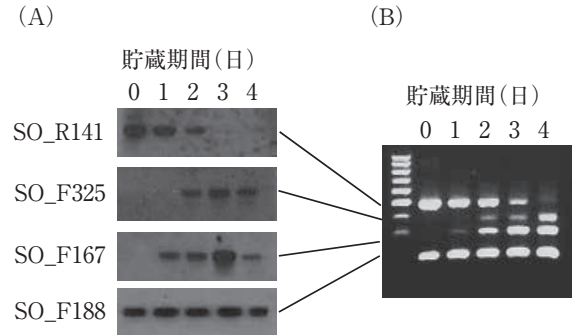


図2 ホウレンソウ鮮度判別マーカー遺伝子のノーザンプロット (A) と半定量的マルチプレックスPCR (B) との対応

に、窒素のリサイクルに関係するシステインプロテアーゼ遺伝子や、多糖の分解酵素遺伝子の発現が増加する現象がそれぞれ異なるタイミングで起きており、これらを組み合わせることにより、貯蔵開始から葉の黄化が始まるまでの外観から判別しにくい時期でも、遺伝子発現を調べることによって、鮮度低下の進み具合を検出できるものと考えられた。

貯蔵条件による比較では、貯蔵7日で、パンチ穴を開けたPE袋では、ほとんどの最外葉が黄化した。折り込みでは一部の最外葉にわずかに黄化がみられ、密閉ではほとんど黄化がなかった。貯蔵開始時に多く発現していたSO_R141は、コントロールのパンチ穴を開けたPE袋では発現が減少する一方で、SO_F167が強く発現し、SO_F325が弱く発現した。電気泳動したゲルおよび、GelAnalyzer2010aによるデンストメトリー解析の結果を図3に示す。貯蔵開始時に比べ、PE密閉包装の遺伝子発現変化がいちばん少なく、次いでPE折りこみ包装の順であった。このことは、PE密閉包装が比較的強いModified atmosphere (MA) 状態になり、次いでPE折りこみ包装が弱いMA状態、パンチ穴を開けたPEでは、空気と同じガス組成のためMAによる鮮度保持効果はないものと考えられた^{9),10)}。SO_R141は、クロロフィルa/b結合タンパク質をコードしていることから、外観における緑色保持を反映しているものと考えられた。また、SO_F167は、システインプロテアーゼをコードしていることから、植物の老化に伴うアミノ酸のリサイクルに関与していると考えられ、SO_F325はポリガラクトクロナーゼ前駆体をコードしていることから、細胞壁多糖の分解に関与しているものと推察される。

ノーザン解析には、比較的少量のRNAが必要で、検出するまでの実験手順が煩雑で時間がかかるうえに、個々の遺伝子についてそれぞれ個別に検出する必要があった。それに対して半定量的PCRでは、必要なRNA量が少なく、分析の操作が簡単で、さらにマルチプレックス化することによって、一度に複数の遺伝子の発現について比較的短い時間で可視化することができるメリットが考えられた。

以上のように、ここでは4つの遺伝子の組合せによ

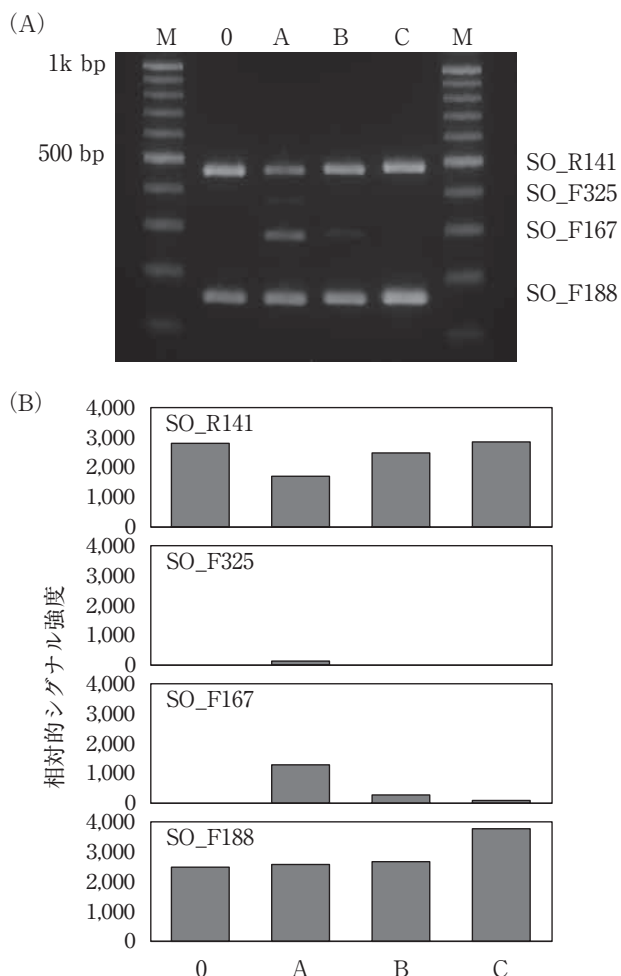


図3 包装条件の異なるホウレンソウ試料を7日間10℃で貯蔵した場合の鮮度判別マーカー遺伝子の発現 (A) と GelAnalyzer2010aを用いたデンストメトリー解析結果 (B)

0:貯蔵開始, A:パンチ穴のあるポリエチレン (PE) 包装, B:PE折りこみ包装, C:PE密閉包装, M:マーカー

て、貯蔵開始から、わずかな黄化がみられるまでの段階を検出することができたが、今後は別の遺伝子クローンの組合せにより、さらに精密なステップで鮮度低下の進み具合を検討できるものと推察される。

今後、これらの遺伝子発現の情報は、植物の代謝における役割や制御関係を考慮することによって、より鮮度低下の少ない貯蔵条件の設定にも用いることが可能と考えられる。さらに、発現マーカーである鮮度判別マーカーの情報をもとに、鮮度低下の主要因となる遺伝子が特定できれば、従来の育種や遺伝子組換えの手法¹⁾を利用して、飛躍的に鮮度保持性に優れた青果物の品種育成につながる可能性もある。今後の研究の広がりにも期待したい。

今回、遺伝子発現の変化を検出、可視化することを報告したが、将来的にはこのような鮮度低下に伴って起こる変化を非破壊的に検出できれば、流通の現場やスーパーの店頭でも利用される可能性がある。そのための基礎としても、遺伝子発現による鮮度評価について、さらに

詳しいデータを集積する必要がある。

要 約

これまで、野菜の鮮度は外観によって評価されることが多かった。さらに、品質にかかわる様々な成分が鮮度の推定に使われたが、品種や栽培条件によって初期の含量が大きく異なるために、含量だけで鮮度を推定することは困難であった。今回の試験で、私たちは、遺伝子発現を利用して野菜の鮮度を評価する新しい方法を検討した。ホウレンソウを用いて、収穫前後のサブトラクションcDNAライブラリーを調製し、貯蔵の前後で発現が変化する遺伝子の塩基配列を調べた。異なる貯蔵日数のサンプルから抽出したRNAを用いてノーザンブロット分析で遺伝子発現を確認して、鮮度評価に適したマーカーとなる複数の遺伝子を選定した。これらの遺伝子を組み合わせ、半定量的マルチプレックスPCRを行うことによって、貯蔵に伴う鮮度の変化を可視化する方法を開発した。この方法を用いることによって、外観上は葉の黄化が始まる前の段階で、ホウレンソウの中で収穫後の変化に関連する遺伝子の変化を検出が可能であった。さらに、この方法を用いて、包装貯蔵条件の異なるサンプルにおける鮮度低下の程度の違いを、遺伝子発現を基礎として検出することができた。

文 献

- 1) 岐阜県農産物流通課・農産園芸課・保健医療課：農産物購入・食生活に関するアンケート調査結果，1～11 (2015) (http://www.pref.gifu.lg.jp/kensei/kohokocho/iken-teian/11103/monitor-anketo.data/2015_05-1_nousanbutu.pdf) (参照2016-4-18)
- 2) 椎名武夫：食品の鮮度とは何か—生鮮品—，食品鮮度・食べ頃事典(サイエンスフォーラム，東京)，pp. 23～37 (2002)
- 3) 日坂弘行・小倉長雄：貯蔵中のホウレンソウ部位別のアスコルビン酸含量の変化，日食工誌，**38**，41～43 (1991)
- 4) 文部科学省：野菜類，日本食品標準成分表 (http://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/1365297.htm) (参照2016-4-18)
- 5) 中野浩平：青果物の鮮度評価方法，特許第5326166号，2013. 8. 2 (2013)
- 6) 永田雅靖：青果物の鮮度評価方法および鮮度評価用プライマーセット，特許第5652778号，2014.11.28 (2014)
- 7) BUCHANAN-WOLLASTON, V.: The molecular biology of leaf senescence, *J. Exp. Botany*, **48**, 181～199 (1997)
- 8) GEPSTEIN, S., SABEHL, G., CARP, M. J., HAJOUJ, T., NESHER, M. F., YARIV, I., DOR, C., BASSANI, M.: Large-scale identification of leaf senescence-

- associated genes. *Plant J.*, **36**, 629~642 (2003)
- 9) WATADA, A. E., KIM, S. D., KIM K. S. and HARRIS, T. C.: Quality of green beans, bell peppers and spinach stored in polyethylene bags. *J. Food Sci.*, **52**, 1637~1641 (1987)
- 10) SANDHYA : Modified atmosphere packaging of fresh produce : Current status and needs. *LWT-Food Sci. Technol.*, **43**, 381~392 (2010)
- 11) 日本学術会議編：植物における新育種技術 (NPBT : New Plant Breeding Techniques) の現状と課題, (<http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-22-h140826.pdf>) (参照2016-4-18)
(平成28年8月18日受付, 平成28年11月7日受理)
-