

[成果情報名]遺伝子発現を利用したニラの鮮度評価法

[要約]ニラの収穫後に起きる遺伝子発現の変化を明らかにして、貯蔵に伴って発現が特徴的に変動する遺伝子を特定し、RT-PCR で半定量的に検出することにより、ニラの収穫後の鮮度評価を行うことができる。

[キーワード]鮮度評価、遺伝子発現、RT-PCR、マルチプレックス、ニラ、黄化

[担当]野菜茶研・野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム

[代表連絡先]電話 059-268-4635

[区分]野菜茶業・野菜品質・機能性、食品

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

消費者が野菜を購入する際に鮮度は重要な評価項目である。しかし、現状では野菜の鮮度の定義や評価法は定まっていない。多くの場合、鮮度は外観や物性、品質成分の変化などで評価されるが、栽培時期によって収穫時の成分含量や物性値は一定ではないため、野菜の生理状態を反映した鮮度評価は困難である。

野菜の流通や貯蔵に伴い、切断傷害や流通中の水分ストレス、暗黒ストレスなどによって様々な生理変化が起こる。この過程では、まず遺伝子が発現し、それが酵素活性の変化となって成分含量や物性が変化していく。そこで、収穫後に特異的な発現変化を示す遺伝子を特定するとともに、これらの遺伝子を鮮度のマーカーとして利用して鮮度低下を評価できる方法を開発する。さらに、PCR 装置を有する研究施設であればどこでも鮮度評価が実施できるように、マルチプレックス RT-PCR 化する。

[成果の内容・特徴]

1. ニラを 10°C で貯蔵して 6 日後に葉先の一部に黄化が認められた試料と、貯蔵前の試料から RNA を抽出して、サブトラクション法で発現量の異なる遺伝子を濃縮し、塩基配列が明らかになったのは 216 クローンである。
2. 他の植物種の既知遺伝子と類似性のある 27 個の遺伝子について、ノーザンプロット法により貯蔵に伴う発現変化を調べ、それぞれの遺伝子の増減のタイミングによりグループ分けする。各グループから 1 つずつ遺伝子を選び、RT-PCR によってそれらを検出するプライマーを設計する。
3. さらに、各遺伝子の発現を、1 本の PCR 反応で異なった位置に検出できるようにプライマーの塩基配列（表 1）や濃度等を調整すると、マルチプレックス RT-PCR によって、半定量的に鮮度低下の進行を簡易に可視化することができる（図 1）。
4. この方法を利用して、外観に黄化が見られる前に、鮮度低下の兆候を ALT_A85、ALT_F04 クローンの発現として検出できる（図 2）。鮮度保持包装により黄化が抑制されているニラでは、これらのクローンの発現が抑制される。
5. RNA の抽出から結果が得られるまでおよそ半日で解析できる。

[成果の活用面・留意点]

1. 本法のプライマーセットはニラの鮮度評価専用であるが、同様の研究手法は他の品目に応用可能である。

[具体的データ]

表1 ニラの各クローンの検出に用いるプライマーセットと増幅されるフラグメントの長さ

ニラ クローン	類似した配列を持つ植物種 酵素・タンパク質	センス側塩基配列 アンチセンス側塩基配列	増幅される フラグメント長
ALT_R68 706 bp	<i>Solanum tuberosum</i> alcohol dehydrogenase	TCgTgAACACATTGgAAAGCAgATA TTGAggATCAACACCgATAgAggAg	515 bp
ALT_A85 421 bp	<i>Cucumis melo</i> pathogen-related protein	ACTCAgTTTACTCCCTGactttt gCATATgCACAATCATACgCAAATC	396 bp
ALT_F04 399 bp	<i>Ipomoea nil</i> cysteine protease	CCAgTAgTTCAAggggTTTgAAAgg ACTCTgTggTCAggCCTTgTTTT	318 bp
ALT_F24 308 bp	<i>Prunus persica</i> endo-1,4-beta-glucanase	gggCAAAATCTGgCACATAAAGTCC CATggCTCTACAgAgCAACAAATgA	206 bp

RNA抽出 → cDNA合成 → マルチプレックスPCR

PCR program
 96°C 2 min
 96°C 0.5 min
 64°C 1 min } 30cycles
 72°C 1.5 min }
 72°C 7 min
 4°C ∞

図1 鮮度評価のための実験手順の概要

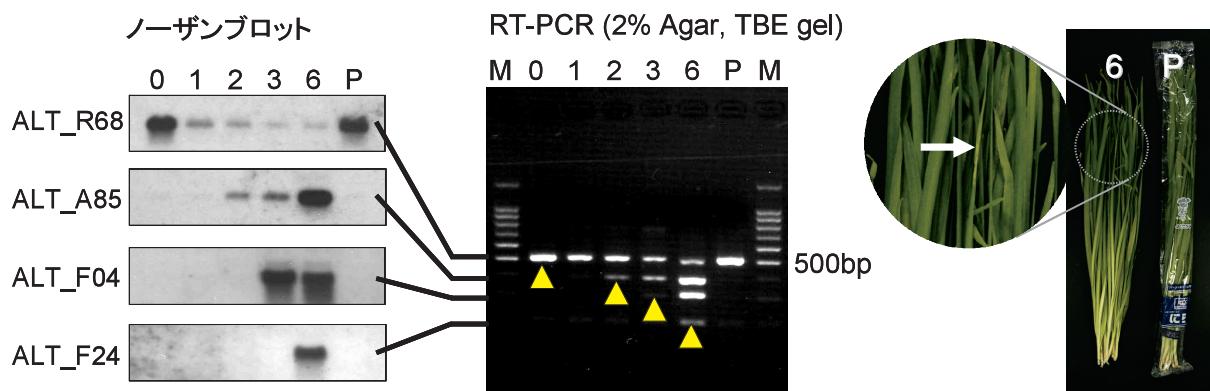


図2 各クローンのノーザンプロット(左)とRT-PCR(中)による検出の対応

0 ~ 6 は 10°Cでの貯蔵日数。P は鮮度保持包装で 10°C 6 日貯蔵後。M はマーカー。RT-PCR 中の△印は各クローンが検出されたサンプルと位置を示す。この試料では、貯蔵 6 日目に葉先の一部が黄化したが(拡大写真の矢印)、P は黄化していない(写真右)。

(永田 雅靖)

[その他]

研究課題名：野菜・茶の食味食感評価法の高度化と高品質流通技術の開発

課題 ID : 311g

予算区分：実用技術

研究期間：2007～2009 年度

研究担当者：永田 雅靖

発表論文等：永田「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」特願

2010-117512