

亜鉛の過不足によるカイワレダイコン (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwaredaikon') スプラウトの亜鉛濃度 および遺伝子発現量への影響

高井 彩帆, 細見 亮太[†], 福永 健治, 吉田 宗弘

(関西大学 化学生命工学部 食品栄養化学研究室*)

Influence of a Zinc Excess and Deficiency on Zinc contents and Gene Expression Profiles in Radish Sprouts (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwaredaikon')

Ayaho TAKAI, Ryota HOSOMI, Kenji FUKUNAGA and Munehiro YOSHIDA

Laboratory of Food and Nutritional Science, Faculty of Chemistry Materials and Bioengineering,
Kansai University

Summary

Radish sprouts (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwaredaikon') were hydroponically cultivated in an environment exposed to zinc at a level of 0, 20, 50, 100, and 200 ppm as zinc sulfate. Growth was inhibited in sprouts exposed to zinc at a level of 50 ppm or more. Zinc contents in sprouts increased in a manner that was dependent on zinc exposure levels up to ppm; the zinc content in sprouts exposed to 100 ppm was 83.3 $\mu\text{g/g}$ fresh weight. However, no significant differences were observed in vitamin C or chlorophyll contents in sprouts irrespective of zinc exposure levels. A DNA microarray analysis was conducted and revealed that the expression of 1275 genes was significantly different between radish sprouts exposed to zinc at a level of 20 ppm and those exposed to a zinc deficiency, whereas the expression of 1379 genes was altered by a zinc excess. Gene ontology terms related to organic acid metabolism, response to a stimulus, carbohydrate metabolism, lipid metabolism, and aromatic metabolism were significantly enriched with exposure to zinc at a level of 0 ppm, while response to a stimulus, organic acid metabolism, lipid metabolism, and oxidation reduction were significantly enriched with exposure to zinc at a level of 100 ppm. No significant differences were observed in zinc transporters with a zinc excess and deficiency. These results indicate that hydroponic cultivation in an environment exposed to zinc is useful for producing radish sprouts with higher zinc contents.

水耕環境下で発芽・生育させたスプラウトはヒトに対して生理活性を示すファイトケミカルを効率的に摂取できる利点を持ち注目されている。ファイトケミカルの多くは植物の自己防衛物質であると考えられており、発芽直後の幼植物体が成植物体よりも多く含まれている例が報告されている¹⁾。ファイトケミカルの中でもアントシアニンやフラボノイド類には高い抗酸化活性や抗炎症作用^{2,3)}、イソチオシアネートの一種であるスルフォラファンは抗がん作用が報告されている⁴⁾。またスプラウトは、水耕に用いる溶液に添加された低分子化合物を容易に取り込むため、意図的に栄養素濃度を高めることが可能である。このようなコンセプトのもと、アブラナ科に属するダイコンスプラウトにビタミン B₁₂ を高濃度に取り込ませた商品が市販されて

いる。微量ミネラルに関しても、鉄やセレン強化スプラウトの調製が試みられている⁵⁾。著者らは水耕栽培によって亜鉛強化カイワレスプラウトを調製し、ラットを用いた動物実験において硫酸亜鉛と同等の栄養有効性であることを報告している⁶⁾。

植物は、日照や気温、降雨、乾燥などの変動や化学物質の曝露など、常に環境変化に晒されており、常々適応することを余儀なくされている。このような環境変化に適応するために、植物は遺伝子の転写、翻訳、タンパク質の翻訳後修飾などの段階で調節を行っている。DNA マイクロアレイを用いた発現解析は、環境に対する生体の応答を遺伝子転写レベルで網羅的に解析できる有用な手法である。全ゲノム完全解読が終了しているシロイヌナズナを対象とし

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

[†]連絡先 (Corresponding Author) : Tel : 06-6368-1765, E-mail : hryotan@kansai-u.ac.jp

た研究は多いが、カイワレダイコンを対象とした研究事例は少なく、栽培環境と生育の関連について十分に明らかにされていない。2014年にダイコンゲノムの塩基配列が決定したことを受け⁷⁾、カスタムオリゴDNAマイクロアレイにてカイワレスプラウトの遺伝子発現量を評価することが可能になった。そこで本研究では、水耕栽培下でのカイワレダイコン (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwardaikon') の遺伝子発現量の網羅的解析によって、スプラウトの芽生え期に及ぼす亜鉛の過不足の影響を検討した。

実験方法

1. 亜鉛強化カイワレダイコンスプラウト調製条件

亜鉛強化カイワレダイコンスプラウトの調製法として、水耕栽培中に亜鉛曝露を行う方法(水耕中曝露法)を用いた。亜鉛濃度 0, 20, 50, 100, または 200 ppm の硫酸亜鉛溶液 70 mL を含ませた 2.5 g の脱脂綿をポリエチレン製クリーンカップ (129 φ × 88 mm, リスパック株式会社, 岐阜) の底に敷き詰め、株式会社トーホク (宇都宮, 日本) から購入したカイワレダイコン (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwardaikon') の種子約 2 g を播き、暗所 25°C に 2 日間静置して発芽させ、その後蛍光灯下 25°C で 5 日間栽培した。

2. ビタミン C およびクロロフィル含量の測定

スプラウトの双葉中ビタミン C 含量はヒドラジン法によって測定した⁸⁾。またクロロフィル含量は Porra らの方法に従い測定した⁹⁾。

3. DNA マイクロアレイ用亜鉛強化スプラウトの調製

亜鉛濃度 0, 20, 100 ppm の硫酸亜鉛溶液を用い、蛍光灯下で 5 日間栽培し亜鉛強化スプラウトを調製した。0 および 100 ppm では 20 ppm と比較し生長阻害が見られたために、0 および 100 ppm で 5 日間栽培した長さと同様になるように、20 ppm では栽培期間を調整したスプラウトを 2 種類栽培した (0 ppm 用に 4 cm, 100 ppm 用に 2.5 cm)。採取した双葉を RNA レーター (シグマアルドリッチジャパン合同会社, 東京, 日本) に 4°C で 1 日浸漬後、分析まで -70°C 保存した。

4. RNA 抽出と DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

カイワレダイコンスプラウトの双葉から Trizol (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan) を用いた方法で総 RNA 抽出を行った。抽出した総 RNA は Experion (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) による品質検査を行った。抽出した総 RNA の純度 (A260 / A280) が 1.9-2.1 以内および Experion の結果より RNA が分解していないことを確認したサンプルを DNA マイクロアレイ解析に供した。各 50 ng の総 RNA を用いて、Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit, one-color

(Agilent Technologies, CA, USA) によりラベリング反応を行った。DNA チップはダイコン (*Raphanus sativus* L.) の遺伝子データベース (<http://radish.kazusa.or.jp/index.html>) を用いて作成したカスタムアレイカスタムオリゴ DNA マイクロアレイ (Radish, カイワレ) を使用した。Agilent 社推奨のプロトコルで、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャンにより遺伝子発現強度を数値化した。0 ppm で長さ 4 cm と 20 ppm で長さ 4 cm, 20 ppm で長さ 2.5 cm と 100 ppm で長さ 2.5 cm 間で遺伝子発現量を比較した。実際の操作は株式会社セルイノベーター (福岡, 日本) に依頼した。

5. Gene Ontology および Pathway 解析

Ratio が 2 倍以上または 0.5 倍以下および Z-Score が -2 以下または +2 以上に変動している遺伝子を抽出した。ダイコンゲノムには機能未知遺伝子が大半を占めているために、比較的近縁であるアブラナ科のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ゲノムを用いて BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による相同性解析を行い、両種で第一位の相同性になった遺伝子をシロイヌナズナ遺伝子と相同性を有するダイコン遺伝子として定義し、ダイコン遺伝子のアノテーション情報とした。このアノテーション情報を利用して Gene Ontology (GO) の Biological Process に基づいて DAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) の gene-annotation enrichment analysis¹⁰⁾ と Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)¹¹⁾ によって解析した。また Pathway 解析は DAVID において KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) を利用して解析した

6. 統計解析

スプラウトの重量、長さおよび成分含量については、一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差について Tukey-Kramer の多重比較を用い p 値が 0.05 以下を有意差ありとした。また DNA マイクロアレイデータは、Benjamini p 値¹²⁾ が 0.05 以下を有意差ありとした。

結果と考察

Table 1 は、種々の水準の亜鉛曝露を行って 7 日間栽培後に、10 本のスプラウトを無作為に選抜し、1 本ずつの重量および長さを測定した結果をまとめたものである。曝露水準が 50 ppm 以上において重量および長さの有意な低下がみられたことから、高濃度の亜鉛曝露による明らかな生育阻害が認められた。亜鉛 100 ppm 曝露の場合、重量および長さのいずれも非曝露に比較してほぼ半分の数値であった。肉眼的にも、スプラウトは曝露水準 100 ppm において、茎が曲がるなどの異常が認められた。

Table 2 は、亜鉛曝露 7 日栽培後の双葉に含まれる亜鉛、ビタミン C とクロロフィル含量をまとめたものである。

Table 1 Influence of a zinc excess and deficiency on growth parameters in radish sprouts

Zinc concentration (ppm)	Weight (mg)	Length (cm)
0	178 ± 4 ^c	7.5 ± 0.4 ^b
20	195 ± 5 ^c	8.9 ± 0.4 ^b
50	108 ± 6 ^b	4.6 ± 0.4 ^a
100	96 ± 5 ^{ab}	3.5 ± 0.4 ^a
200	73 ± 6 ^a	2.8 ± 0.4 ^a

The values represent the means ± SEM (n = 10).

Values in the same row not sharing a common letter were significantly different at p < 0.05 according to the Tukey-Kramer test.

Table 2 Influence of a zinc excess and deficiency on zinc, vitamin C, and chlorophyll concentrations in radish sprouts

Zinc concentration (ppm)	Zinc (μg/g)	Vitamin C (μg/g)	Chlorophyll (μmol/g)
0	6.3 ± 1.0 ^a	6.36 ± 0.01	0.375 ± 0.002
20	20.8 ± 5.1 ^b	6.34 ± 0.01	0.377 ± 0.001
50	33.2 ± 5.7 ^c	6.28 ± 0.06	0.353 ± 0.002
100	83.3 ± 4.6 ^c	6.34 ± 0.02	0.364 ± 0.003
200	190.1 ± 14.0 ^d	6.35 ± 0.01	0.317 ± 0.004

The values represent the means ± SEM (n = 4).

Values in the same row not sharing a common letter were significantly different at p < 0.05 according to the Tukey-Kramer test.

Table 3 Significantly enriched GO terms found in changed genes between 20 ppm and 0 ppm

GO-ID	GO-Term	Benjamini p-value
Up regulate (20 ppm/0 ppm)		
	Organic acid metabolism	
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	3.85E-05
GO:0009066	aspartate family amino acid metabolic process	6.97E-05
GO:0000096	sulfur amino acid metabolic process	5.94E-04
GO:0006555	methionine metabolic process	4.44E-03
GO:0009067	aspartate family amino acid biosynthetic process	1.93E-02
GO:0009088	threonine biosynthetic process	4.35E-02
	Response to stimulus	
GO:0009743	response to carbohydrate stimulus	1.77E-03
GO:0009611	response to wounding	4.64E-03
GO:0009753	response to jasmonic acid stimulus	6.63E-03
GO:0010033	response to organic substance	7.48E-03
GO:0010200	response to chitin	8.45E-03
GO:0009628	response to abiotic stimulus	3.67E-02
	Carbohydrate metabolism	
GO:0016144	S-glycoside biosynthetic process	5.77E-04
GO:0019758	glycosinolate biosynthetic process	5.77E-04
GO:0016051	carbohydrate biosynthetic process	8.56E-03
GO:0005976	polysaccharide metabolic process	3.85E-02
GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	7.40E-03
	Lipid metabolism	
GO:0008610	lipid biosynthetic process	1.04E-02
	Aromatic metabolism	
GO:0046148	pigment biosynthetic process	3.76E-02
GO:0009699	phenylpropanoid biosynthetic process	8.18E-05
GO:0009813	flavonoid biosynthetic process	8.89E-05
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	8.23E-04
GO:0009309	amine biosynthetic process	2.07E-03

曝露水準 200 ppm までは、スプラウト中の亜鉛濃度は曝露水準にほぼ比例して増加した。ビタミンCおよびクロロフィル濃度には大きな影響はみられなかった。平成22年と23年の国民健康栄養調査における18歳以上の日本人成人の亜鉛摂取量中央値は、男性が7.9～8.9 mg/日、女

性が6.6～7.3 mg/日であり¹³⁾、日本人の食事摂取基準における18歳以上の亜鉛の推定平均必要量である男性9～10 mg/日、女性7～8 mg/日¹⁴⁾を下回っている。今回調製した亜鉛スプラウトの亜鉛濃度は新鮮重量当たりで83.3 μg/gであることから、10 g 強の摂取で1 mg 程度の亜鉛

Table 4 Significantly enriched GO terms found in changed genes between 100 ppm and 20 ppm

GO-ID	GO-Term	Benjamini p-value
Up regulate (100 ppm/20 ppm)		
	Response to stimulus	
GO:0010033	response to organic substance	7.94E-04
GO:0009753	response to jasmonic acid stimulus	3.76E-03
GO:0009628	response to abiotic stimulus	5.24E-03
GO:0009719	response to endogenous stimulus	4.12E-03
GO:0009416	response to light stimulus	1.35E-02
GO:0009314	response to radiation	1.48E-02
GO:0048585	negative regulation of response to stimulus	2.54E-02
	Organic acid metabolism	
GO:0042398	cellular amino acid derivative biosynthetic process	2.88E-02
Down regulate (100 ppm / 20 ppm)		
	Response to stimulus	
GO:0009611	response to wounding	1.13E-03
GO:0009737	response to abscisic acid stimulus	5.34E-03
GO:0010033	response to organic substance	9.63E-03
	Organic acid metabolism	
GO:0009695	jasmonic acid biosynthetic process	2.14E-03
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	2.76E-02
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	2.76E-02
	Lipid metabolism	
GO:0008610	lipid biosynthetic process	2.91E-02
GO:0031408	oxylipin biosynthetic process	2.13E-03
	Oxidation reduction	
GO:0055114	oxidation reduction	9.70E-03

摂取を実現でき、日本人の亜鉛摂取状況の改善に役立つものと思われる。根からの亜鉛の取り込みに関わる亜鉛トランスポーターである iron-regulated transporter (IRT1) は、植物内に亜鉛が十分に貯蔵されていると亜鉛供給によって IRT1 の mRNA およびタンパク質発現は消失することが報告されており、高濃度の亜鉛を含有する植物の栽培は困難であった^{15, 16)}。そのため、葉面散布による亜鉛高濃度含有植物の栽培が行われている¹⁷⁾。本研究で用いた水耕栽培は亜鉛曝露濃度依存的に亜鉛が蓄積することから、亜鉛高濃度含有植物栽培に有効であると考えられる。

亜鉛濃度を高めるために家畜・家禽の糞を肥料とした亜鉛含量が約 25 $\mu\text{g/g}$ の土壌での栽培が行われているが、ダイコンでの生育阻害は述べられていない¹⁸⁾。このことは、20 $\mu\text{g/mL}$ の亜鉛曝露がスプラウトの生育阻害を起していない本報および前報の結果と整合している⁶⁾。また亜鉛曝露濃度 20 ppm は、各亜鉛曝露濃度のスプラウト重量および長さが一番高値を示した (Table 1)。これらのことからマイクロアレイ解析では、亜鉛曝露濃度 20 ppm で生育させたスプラウトを対照とし、0 または 100 ppm で生育させたスプラウトとの比較を行った。

亜鉛曝露濃度 0 と 20 ppm 間での比較では、0 ppm に対して抽出された遺伝子は 1275 遺伝子あり、そのうち 724 遺伝子は上方制御され、551 遺伝子は下方制御されていた。1275 遺伝子のうち、シロイヌナズナ遺伝子のアノテーション情報が付加できたのは 347 遺伝子で、そのうち 224

遺伝子は上方制御され、123 遺伝子は下方制御されていた。また亜鉛曝露濃度 20 ppm と 100 ppm 間での比較では、20 ppm に対して抽出された遺伝子は 1379 遺伝子あり、そのうち 656 遺伝子は上方制御され、723 遺伝子は下方制御されていた。1379 遺伝子のうち、アノテーション情報が付加できたのは 344 遺伝子で、そのうち 123 遺伝子は上方制御され、221 遺伝子は下方制御されていた。

これら発現変動遺伝子について、GO Biological Process のアノテーションに基づき gene-annotation enrichment analysis を行った。Table 3 に亜鉛曝露濃度 0 ppm と 20 ppm 間の発現変動遺伝子中に有意に濃縮された GO-term を示した。発現上昇した遺伝子セットには、アミノ酸代謝、ストレス応答、糖質代謝、脂質代謝、芳香族代謝などの GO term が顕著に濃縮されていた。一方、発現低下した遺伝子セットで濃縮された GO term においては有意差のあるものは確認されなかった。Table 4 に亜鉛曝露濃度 20 ppm と 100 ppm 間の発現変動遺伝子中に有意に濃縮された GO-term を示した。発現上昇した遺伝子セットには、ストレス応答とアミノ酸代謝などの GO term が顕著に濃縮されていた。一方、発現低下した遺伝子セットで濃縮された GO term においては、ストレス応答、有機酸代謝、脂質代謝、酸化還元に関わるものが濃縮されていた。100 ppm でみられ生長阻害は、亜鉛曝露によるストレス応答に関わる遺伝子発現の増減が影響していると予測される。

さらに 2 倍以上発現変動した遺伝子を DAVID の

Table 5 Number of genes significantly changed* in a pathway analysis of DNA microarrays

Pathway	20 ppm/0 ppm	100 ppm/20 ppm
alpha-linolenic acid metabolism	4	7
biosynthesis of plant hormones	–	16
cysteine and methionine metabolism	7	–
flavonoid biosynthesis	3	3
glucosinolate biosynthesis	5	–
glycine, serine and threonine metabolism	4	–
metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3	–
nitrogen metabolism	–	4
starch and sucrose metabolism	–	5
valine, leucine and isoleucine degradation	4	–

* Benjamini p-value < 0.05.

Table 6 Influence of a zinc excess and deficiency on the expression of genes related to zinc in radish sprouts

Compare	Probe ID	Gene title	Gene expression*
20 ppm/0 ppm	Rs00221_026	B-box type zinc finger protein with CCT domain	DOWN
	Rs01223_002	HCP-like superfamily protein with MYND-type zinc finger	DOWN
	Rs03341_004_N1	zinc induced facilitator-like 2	DOWN
100 ppm/20 ppm	Rs03378_002	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	UP
	Rs00991_010	B-box zinc finger family protein	UP
	Rs00715_006	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	UP
	Rs00944_003	B-box zinc finger family protein	DOWN

* Satisfies the following conditions: ratio was changed by more than 2-fold and the Z-score was smaller than - 2 or larger than + 2.

KEGG アノテーションを用い、発現変動遺伝子中に濃縮された KEGG パスウェイを検討した結果を Table 5 に示した。亜鉛曝露濃度 0 ppm と 20 ppm 間では、主に Cysteine and methionine metabolism, Valine, leucine and isoleucine degradation, Glycine, serine and threonine metabolism などのアミノ酸代謝の変動がみられた。これは亜鉛欠乏によってアミノ酸代謝酵素遺伝子の発現量が低下したことが起因していると考えられる。しかし、亜鉛存在条件下である 20 ppm と 100 ppm 間での比較ではアミノ酸代謝に変化はみられなかった。一方、亜鉛曝露濃度 20 と 100 ppm 間では Biosynthesis of plant hormones や alpha-Linolenic acid metabolism といった植物ホルモン合成系代謝で発現変動がみられた。とくに alpha-Linolenic acid metabolism 内のジャスモン酸類合成系代謝が亜鉛曝露濃度 100 ppm で発現低下していた。ジャスモン酸類は光合成や生長といった幅広い変化を制御する脂質ホルモンシグナル物質であり⁶⁾、高濃度の亜鉛がストレスとなり誘導されると予測される。また亜鉛曝露濃度 100 ppm において、Flavonoid biosynthesis 代謝内のカテキンやケルセチン合成に関わる Leucoanthocyanidin dioxygenase と Flavonoid 3'-monooxygenase 遺伝子発現の増大がみられることから、これらの含有量増加が期待される。

亜鉛が関連している遺伝子を選抜し、Ratio および Z-Score で 2 倍以上の発現変動のみられた遺伝子を Table 6 に示した。亜鉛をタンパク質内に取り込む zinc finger

family protein の発現量の変動がみられ、特に 100 ppm においては 3 つの zinc finger family protein の発現量増大が確認された。細胞内の亜鉛濃度はトランスポーターによって厳密にコントロールされていることが予測されたが、両比較間 (20 ppm/0 ppm および 100 ppm/20 ppm) で亜鉛の取り込みや排出に関わる zinc transporter, metal tolerance protein, iron-regulated transporter に大きな変動はみられなかった。

本研究で行った GO および Pathway 解析は、シロイヌナズナと高い相同性が得られたダイコン遺伝子のみを抽出して行っているために、種間で保存性の高い代謝系遺伝子の変動ばかりが多くみられた可能性がある。以上のことから、亜鉛曝露により相当数の遺伝子発現量の変動がみられたが、まだ機能の不明確な遺伝子が多く存在しているため、今後ダイコン遺伝子の機能が明らかになることで、さらに具体的な解析を行うことができると期待される。

謝 辞

本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (次世代ベンチトップ型シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究) の援助により実施したものである。

参考文献

- 1) 前川健二郎, 前田智雄, 大島千周, 鈴木卓, 大澤勝次 (2006) 数種アブラナ科スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化能に及ぼす照射光強度の影響. 園芸学研究 : 315-320.
- 2) Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD (2003) Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Letters* 194: 13-19.
- 3) Le Marchand L (2002) Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomed Pharmacother* 56: 296-301.
- 4) Sestili P, Fimognari C (2015) Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. *Biomed Res Int.* 2015: 402386.
- 5) Sugihara S, Kondo M, Chihara Y, Yuji M, Hattori H, Yoshida M (2004) Preparation of selenium-enriched sprouts and identification of their selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 193-199.
- 6) 吉田宗弘, 高井彩帆, 山根綾子, 福永健治, 西山利正 (2014) 亜鉛強化カイワレダイコンスプラウトの調製と栄養有効性の評価. *Biomedical Research on Trace Elements* 25 : 8-13.
- 7) Kitashiba H, Li F, Hirakawa H, Kawanabe T, Zou Z, Hasegawa Y, Tonosaki K, Shirasawa S, Fukushima A, Yokoi S, Takahata Y, Kakizaki T, Ishida M, Okamoto S, Sakamoto K, Shirasawa K, Tabata S, Nishio T (2014) Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome. *DNA Res.* 21: 481-490.
- 8) 細見亮太 (2013) 基礎食品分析実験, 文教出版, 大阪 : pp. 157-174
- 9) Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975: 384-394.
- 10) Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57.
- 11) Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R (2009) QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* 25: 3045-3046.
- 12) Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Statist Soc B* 57: 289-300.
- 13) 厚生労働省 (2013) 国民健康・栄養調査特別集計 国民健康・栄養調査 (平成 22 年, 23 年) http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkou_eiyouchousa_tokubetsushuukei_h22.pdf: p. 18, 2015 年 7 月 9 日アクセス.
- 14) Yoshida M, Kikunaga S, Yamauchi J, Tsubota-Utsugi, M, Kodama H, Morita A, Esashi T (2013) Dietary reference intakes for Japanese 2010: Microminerals. *J Nutr Sci Vitaminol* 59: s91-s102.
- 15) Ramesh SA, Choimes S, Schachtman DP (2004) Over-expression of an Arabidopsis zinc transporter in *hordeum vulgare* increases short-term zinc uptake after zinc deprivation and seed zinc content. *Plant Mol Biol* 54: 373-385.
- 16) Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14: 1347-1357.
- 17) 和田光生, 池田英男, 池田政文, 古川一 (1996) Ca 剤葉面散布がトマトの尻腐れ果発生に及ぼす影響. 園芸学会雑誌 : 553-558.
- 18) Zhou DM, Hao XZ, Wang YJ, Dong YH, Cang L (2005) Copper and Zn uptake by radish and pakchoi as affected by application of livestock and poultry manures. *Chemosphere.* 59: 167-175.