

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658214

研究課題名(和文) 青果物の各種ストレス応答予測モデルの開発：修正Weibullモデルの適用

研究課題名(英文) Development of stress response model for fresh fruits and vegetables: Utilization of novel modified Weibull distribution

研究代表者

椎名 武夫 (Shiina, Takeo)

千葉大学・園芸学研究科・教授

研究者番号：40353974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：青果物の各種ストレス応答のモデル化と、各種ストレスによる品質変化の予測手法の開発を目的として、製品の故障評価などに利用されてきた2つのパラメータからなるWeibull分布を、応答の絶対量の違いに対応できるように改良した、3パラメータ型の修正Weibull分布モデルを開発した。この修正Weibullモデルを用いて、キャベツ等への物理ストレス負荷時の遺伝子発現、呼吸速度(二酸化炭素排出速度)の変化について、非線形最小二乗法による回帰分析を行い、モデルへの適合性が高いことを確認した。また、応答遅れがある現象に関して、新たな修正Weibullモデルを考案し、その適用性についても検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Fresh fruits and vegetables are highly perishable because of their nature and the factors affecting their quality such as shock and vibration, temperature fluctuation, loss of water and gaseous composition during transportation process. A two parameters Weibull distribution is important probability density distribution which is used as the estimation of product failure during their life time. In this study, we have proposed a novel simulation model "modified Weibull distribution, MWD" for predicting the response behavior of fresh produces against the stresses which they perceive during distribution processes. Newly developed MWD was constructed to enable to deal with the magnitude of the response of fresh produce depending on the level and kind of the stresses. Nonlinear least square method was applied to fit the gene expression level and respiration rate against the physical stress. Results showed the very good agreement between the experimental result and the estimation obtained.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：ストレス応答 数理モデル Weibull分布 修正Weibull分布モデル 青果物 品質変化

1. 研究開始当初の背景

収穫後の青果物は、ハンドリング時の圧力や衝撃、静置時の積載荷重、輸送中の振動衝撃などの力学的な作用による物理的なストレスを受けるほか、温度、湿度、酸素・二酸化炭素等の無機ガス濃度の変動などの物理化学的ストレス、さらには微生物侵襲やエチレンガスの暴露などの生物活動に起因するストレスを受け、それらが原因となって品質が劣化するため、高品質維持のための物流環境条件の調整が品質保持上極めて重要である。

青果物のストレス応答には複数の要因が複合的に作用することから、個々の要因を個別に評価しているだけでは、ストレスを低減させる保存流通方法を最適化することは困難である。そのため、複数の要因を入力値としてストレス応答を説明可能とする数理モデルの開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

青果物は収穫後の生物的、非生物的(物理的・化学的)なストレスによって、その品質変化に大きく影響を及ぼされる。しかし、これまで、ストレスの特徴の解析(質的・量的な評価)とその定式化はほとんど行われていない。

本研究では、青果物のストレス応答を数理モデル化し、各モデルを特徴付けるパラメータの解析によって、ストレス応答の時間的、量的評価を行うことを目的とする。

本研究によって、ストレスの種類および強度とストレス応答の質的・量的特徴との関係を定量化する手法を開発する。開発した定量化手法を用いて、ストレスを軽減し品質維持を図るためのコスト、ならびに環境負荷の視点からの効率的なハンドリング方法が明らかになり、収穫後青果物の低コスト高品質維持と、より環境負荷の小さい物流方法の開発が可能となる。

3. 研究の方法

(1)修正 Weibull 分布モデルの開発

ストレス応答の絶対量の違いに対応できるように、2パラメータ型 Weibull 分布を修正した、修正 Weibull 分布を開発し、その有効性を確認する。

図1は、2パラメータ型 Weibull 分布について、パラメータ m、n の違いが確率分布形状に及ぼす影響を示したものである。式1は、有力な候補として考えている修正 Weibull 分布で、ストレス応答の絶対量の違いに対応できるように、2パラメータ型 Weibull 分布の式に対してパラメータ A が追加されている。

$$f(t) = A \cdot \frac{m}{n} \cdot \left(\frac{t}{n}\right)^{m-1} \cdot \exp\left\{-\left(\frac{t}{n}\right)^m\right\} \quad (1)$$

なお、2パラメータ型 Weibull 分布は、A=1.0を代入することで得られる。

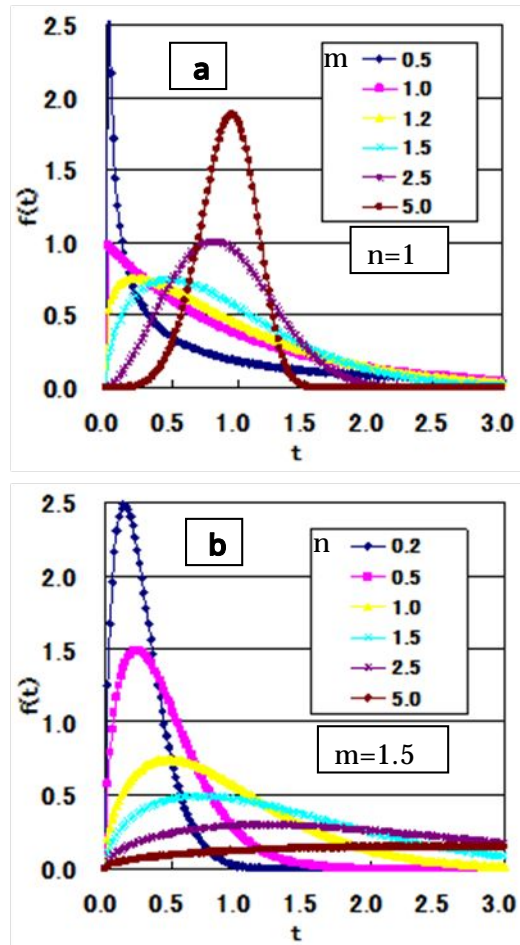
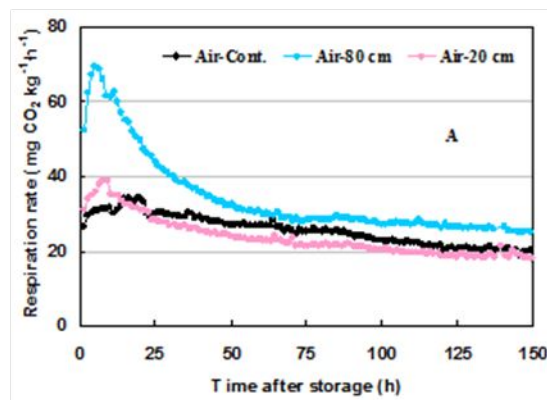


図1 2パラメータ型 Weibull 分布におけるパラメータm (a)、n (b)が確率分布形状に及ぼす影響

(2)青果物のストレス応答データの収集

キャベツの落下ストレスによる呼吸応答  
結球キャベツの頂部を下に向けて、0および20、80cmの高さからコンクリート床に自由落下させ、落下直後からの呼吸速度(二酸化炭素排出速度)を、自動ガス代謝解析装置を用いて測定した。

図2は、落下後の保存ガス組成を、大気とした場合(A)キャベツの最適CA条件とされる2.5%O<sub>2</sub>、4.5%CO<sub>2</sub>(B)としたときの、測定結果を示す(Thammawongら、2011)。解析での使用データは、0~72hとした。



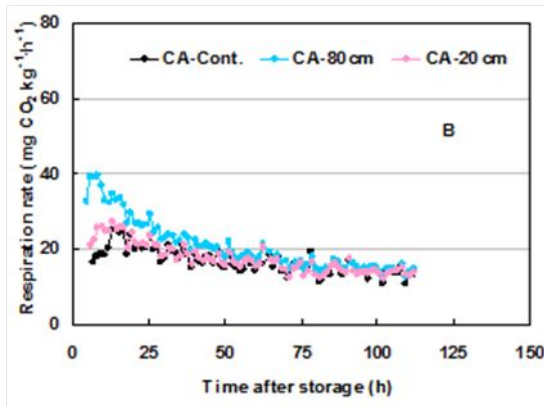


図2 落下処理によるキャベツの呼吸速度変化 (A:大気条件下、B:CA条件下)

#### 傷害ストレス応答遺伝子の発現解析

外葉を除去した結球キャベツの頂部を下に向けて40cmから2.0cmφのコルクに落下させて傷害を与え、傷害部位(試料サイズ:2.0cmφ)および、中心距離で5.5cm離れた周辺部位(試料サイズ:1.0cmφ)の試料をサンプリングした。サンプリングは、落下から0、15、30minおよび、1、2、3、4、5、24h後とした。サンプルは、液体窒素で急速凍結し、-80で保管した。

保管サンプルを冷凍庫から速やかに取り出し、液体窒素を満たした乳鉢に入れて乳棒で磨細し、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、全mRNAを抽出、精製した。得られた全mRNAから、逆転写によりcDNAを作成し、定量的RT-PCR用試料とした。キャベツ、ブロッコリーなどで得られたmRNA配列情報をもとに、ストレス応答関連の4遺伝子(*BoAPX*, *BoPAL*, *BoSAMS*, *BoACS2*)および基準遺伝子とした*BoGAPDH*について、プライマー設計ソフト(Primer Express, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて、RT-PCR用のプライマー(Forward、Reverse)を設計した。

RT-PCRによる遺伝子発現解析は、Thammawonら(2012)にしたがった。

#### (3)ストレス応答データの処理

(2)の実時間データを、横軸( $t$ )は、0~1.0とする値(単位なし)に変換するため、の経過時間を72hで、の経過時間を24hで、それぞれ除した。縦軸( $f(t)$ )は、処理前の状態を0とした相対値(単位なし)とするため、は呼吸速度を処理前のそれで除した値から、は相対遺伝子発現を処理前のそれで除した値から、それぞれ1.0を除算した。

0~1.0に規格化された $t$ および、0~相対値に変換された $f(t)$ を、(4)の非線形最小自乗法によるモデル解析で用いるデータとした。

#### (4)非線形最小二乗法の適用

非線形最小自乗法には、Deming法を用い

た。Visual Basic for Applications (VBA)により、Microsoft Excel上で、式(1)に基づく非線形最小自乗法解析プログラムを作成した。作成プログラムのデータ入力部分に(3)で得られた値を入力し、回帰計算を実施することで、修正Weibull分布の3つのパラメータ、 $A$ 、 $m$ 、 $n$ を求めた。

#### 4. 研究成果

##### (1)キャベツの落下ストレスによる呼吸応答

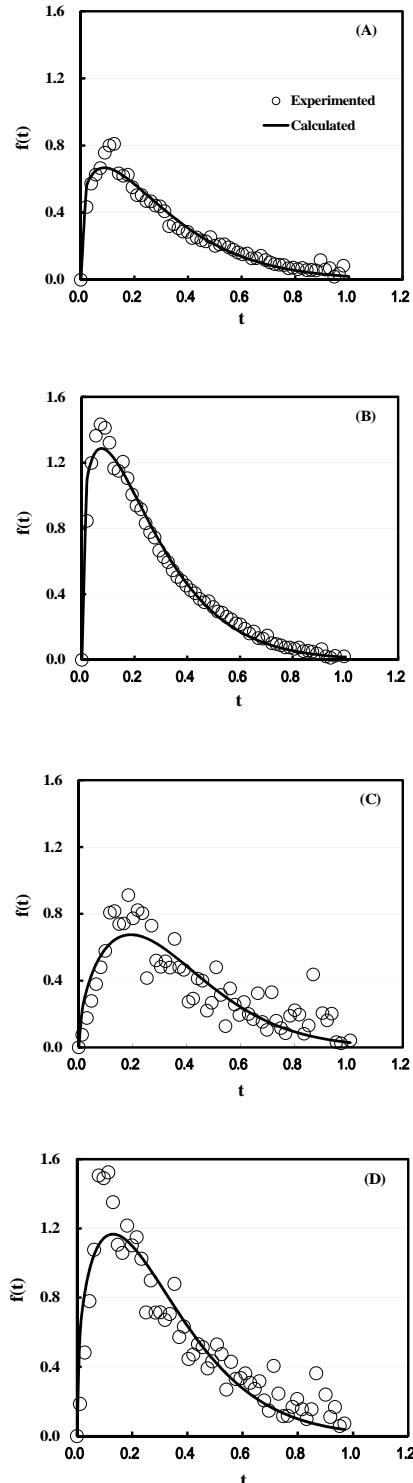


図3 落下ストレスによる呼吸速度変化の修正Weibullモデルによる回帰分析

図3に解析結果を示す。実測値が○で、計算値が実線である。Aは落下高さ20cm - 大気、Bは80cm落下 - 大気、Cは20cm落下 - CA、Dは80cm落下 - CAである。

図から、実測値と計算値は良い一致を示していることがわかる。また、AとB、CとDの比較から、落下高さの影響が呼吸速度に及ぼす影響が明らかで、落下による呼吸速度上昇をある範囲に抑えるための落下高さの限界値があることが示唆された。一方、AとC、BとDの比較から、落下による呼吸速度上昇がCA環境下で顕著に抑制されることが明らかで、CA環境は落下ストレスによる呼吸速度上昇の抑制、ひいては品質劣化防止に効果的であることが示唆された。

### (2) 傷害ストレス応答遺伝子の発現解析

図4-1、4-2に解析結果を示す。実測値が○で、計算値が実線である。A、B、C、Dは、それぞれ、BoAPX、BoPAL、BoSAMS、BoACS2の発現レベルで、-1は受傷部位、

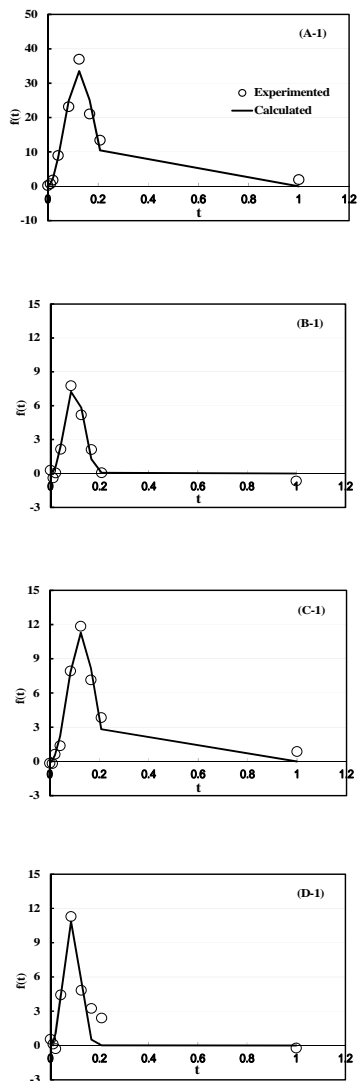


図4-1 傷害によるストレス応答遺伝子の発現変動の修正 Weibull モデルによる回帰分析

-2は周辺部位の結果である。A-1~D-1から、遺伝子の種類によってピークのレベルと、ピーク到達時間が異なることが分かる。A-1とA-2を比較すると、傷害部位だけでなく周辺部位でも、レベルは低いもののストレス応答が見られることが分かる。すなわち、部分的な傷害であっても、全体の品質低下を引き起こす可能性のあることが示唆される結果で、ハンドリングへの注意喚起の重要性を示す結果を言える。

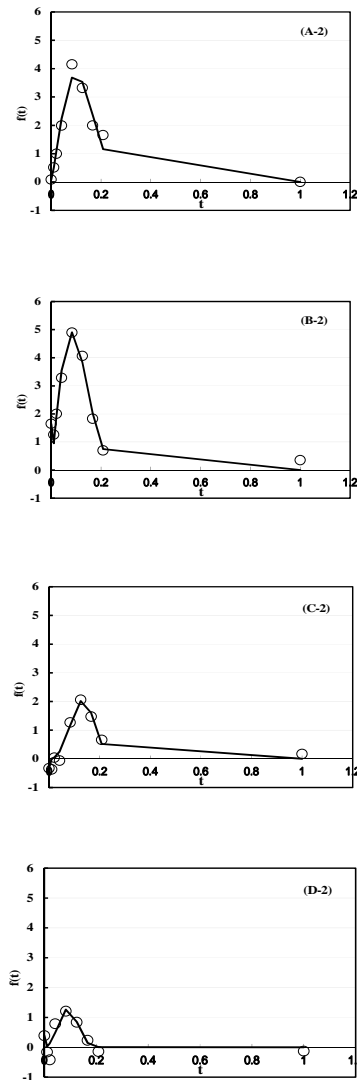


図4-2 傷害によるストレス応答遺伝子の発現変動の修正 Weibull モデルによる回帰分析

### (3) 実時間におけるストレス応答予測

回帰分析で得られたパラメータ A、m、n を用いて、実時間における呼吸速度変化の予測値、および遺伝子発現変化の予測値を算出した。すなわち、キャベツの平面への落下における呼吸応答、および突起物への落下におけるストレス関連遺伝子発現変動という、物理ストレスに対する応答の予測モデルを構築することができた。

次に、エチレングス暴露等、物理ストレス以外のストレス付加への生理応答について

も検討を行うとともに、応答遅れがある現象に関して、新たな修正 Weibull モデルを考案し、その適用性についても検討を行った。さらに、ストレス応答におけるピーク出現タイミングを評価するための手法開発についても検討を行った。

今後、与えられたストレスの種類・強さと、修正 Weibull 分布のパラメータとの関係を解析し、ストレスの種類ごとにストレス強度が品質変化へ及ぼす影響を定量的に予測するための、新たなモデル開発へと研究を進展させる予定である。

#### <引用文献>

Manasikan Thammawong, Tomoko Kaneta, Nobutaka Nakamura, Makoto Yoshida, Ayaka Soga, Takeo Shiina, Influence of Impact Stress on the Postharvest Physiological and Chemical Properties of Cabbage Heads, 日本食品保蔵科学会誌、37(6)、2011、273-282

DOI / URL: なし

THAMMAWONG Manasikan, HEWAJULIGE Ganga Namali Ilmi, KANETA Tomoko, NAKAMURA Nobutaka, ITO Yasuhiro, and SHIINA Takeo The Calmodulin-Encoding Gene BoCam1: A Sensitive Wound-Responsive Gene in Cabbage, 日本食品保蔵科学会誌、38(5)、2012、277-283

DOI / URL: なし

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Manasikan Thammawong, Takahiro Orikasa, Hitomi Umehara, Ilmi Ganga Namali Hewajulige, Tomoko Kaneta, Nobutaka Nakamura, Yasuhiro Ito, Kohei Nakano, and Takeo Shiina, Modeling of the Respiration Rate and Gene Expression Patterns of Cabbage in Response to Mechanical Impact Stress Using a Modified Weibull Distribution, Postharvest Biology and Technology, 査読あり, 96, 2014, 118-127

DOI: 10.1016/j.postharvbio.2014.05.014

[学会発表](計3件)

椎名武夫, THAMMAWONG Manasikan, 梅原仁美, 松山成江, 山本千尋, 田中敦, 中村宣貴, 低温とMA包装の組み合わせによるメロンの長期貯蔵, 2014年度日本冷凍空調学会年次大会, 2014年09月10日~2014年09月12日, 佐賀大学, 佐賀県, 佐賀市

Takeo Shiina, Nobutaka Nakamura, Manasikan Thammawong, Tomoko

Kaneta, Introduction of the newly developed bulk container to the distribution of fresh fruits and vegetables in Japan, The 29th International Horticultural Congress, 2014年08月17日~2014年08月22日, Brisbane Convention Centre (Australia)

Vanitha Thiraviam, Manasikan Thammawong, Hitomi Umehara, Nobutaka Nakamura, Takeo Shiina, Effect of packaging material on shelf life, quality and gene expression of 'KEK-I' tomatoes, IJFST 50th Celebration Conference, 2015年02月17日~2015年02月19日, Lincoln University (New Zealand)

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

椎名 武夫 (SHIINA, Takeo)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号: 40353974