

令和元年6月20日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18776

研究課題名(和文) 青果物におけるADH遺伝子発現変動を利用した最適なMA包装設計条件の開発と実用化

研究課題名(英文) Development of optimum MA packaging design conditions for fresh produce by using ADH gene expression

研究代表者

タンマウォン マナスイカン (THAMMAWONG, MANASIKAN)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：90763673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：嫌気呼吸の主要酵素であるアルコール脱水素酵素をコードする遺伝子(ADH)の発現レベル変化を、青果物の低酸素耐性(あるいは障害発生)の評価手法として用いることの有用性を検証した。試料としてレタスとホウレンソウを用い、ADHの発現レベル、呼吸商(RQ)、エタノールとアセトアルデヒド含量を調査した。その結果、ADH発現レベルの変化から得られた好気呼吸と嫌気呼吸の転換点酸素濃度は、レタスで2%、ホウレンソウで1.5%であり、呼吸商転換点や発酵閾値よりも高かった。以上の結果から、ADH発現レベルは、青果物の低酸素耐性(障害)をより鋭敏に評価できる手法として有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物細胞におけるストレス応答のメカニズム解明や、青果物の生理代謝研究の発展を加速させることに貢献するものである。また、得られた成果から、青果物の適正保存条件を解明する研究手法の確立に寄与する。併せて、貯蔵中の青果物にガス障害の発生リスクを低減するとともに、さらなる高度品質保持効果を持ったMA包装を検討するための新規包装設計理論確立を強く支援するものである。これにより、高品質な青果物を安定的に提供可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Low O<sub>2</sub> is effective in quality preservation of fresh produce. The estimation of hypoxia tolerance for stored fresh produce is essential for designing MA packaging and CA storage. Hypoxia tolerance has been conventionally evaluated by a respiratory quotient breakpoint (RQB) and a fermentation threshold (FT). However, molecular analysis addressing hypoxia tolerance in fresh produce is yet to be done. Thus, an alcohol dehydrogenase-encoding gene (ADH) in lettuce and spinach stored under various O<sub>2</sub> concentrations was analyzed to evaluate the hypoxia tolerance. In this study, 2% O<sub>2</sub> at which the relative gene expression level of LsADH (lettuce) and that of SoADH3 (spinach) increased markedly was considered as the gene expression breakpoint (GEB). From this fact, the 'low O<sub>2</sub> limit', estimated based on GEB is relatively higher and more sensitive compared to RQB and FT methods. GEB is thought to be a useful indicator in determining the appropriate O<sub>2</sub> concentration for storing fresh produce.

研究分野：ポストハーベスト生理学

キーワード：ADH遺伝子発現レベル MA包装

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景：MA 包装 (Modified Atmosphere Packaging) においては、フィルムのガス透過性と青果物の呼吸作用によって、包装内に低酸素、高二酸化炭素環境が創出されることで、青果物の代謝活性が抑制され品質保持効果が得られる。しかし包装条件によっては、包装内の酸素濃度が限界酸素濃度を下回ることによって嫌気呼吸を誘発し、二酸化炭素の過度の蓄積に伴う障害発生等、逆に商品性を著しく低下させてしまう場合もある。MA 包装設計において、青果物の限界酸素濃度を定める方法として、呼吸商 (RQ) を用いる方法が採用されている。すなわち、RQ が 1.0 を超えた時点の酸素濃度 (好気性から嫌気呼吸への転換) を設計条件として、これを実現するための包装条件を、包装内ガス組成変化を数理モデル化することでシミュレーションにより推定する方法が検討されてきた。しかし、RQ は呼吸代謝の産物を用いて算出したもので、呼吸代謝変化メカニズムや嫌気呼吸開始に関連する遺伝子発現 (ADH をコードする ADH の発現変動) の情報は含まれていない。そこで、最適な MA 包装設計における青果物個々の特性に応じた確実な限界酸素濃度の判定方法を確立するには、限界酸素濃度 (ガス環境ストレス) と嫌気呼吸代謝開始の一つの指標となる ADH 遺伝子発現との関係を解明することが不可欠であると考えた。

2. 研究の目的：本研究は、TPP 等の自由貿易体制に対応して国内外の消費者に高品質な青果物を安定的に提供することに資するため、長期貯蔵・流通に効果的な MA 包装技術に着目し、最適な MA 包装設計に必要な限界酸素濃度の新たな判定方法の確立を目的とする。低酸素濃度による嫌気呼吸代謝開始について、Alcohol Dehydrogenase (ADH) のコード遺伝子を指標としてその発現解析を行い、呼吸商 (CO<sub>2</sub> 排出 / O<sub>2</sub> 吸収) に替わる新たな限界酸素濃度の規定法を開発することを目的とした。併せて、解析結果を用いて、数理モデルにより MA 包装フィルムを設計し、包装・貯蔵処理による青果物の品質変化結果を加味し、最適な MA 包装設計に必要な青果物の特性や温度に応じた確実な限界酸素濃度を解明し、そのデータベース化を図る。

### 3. 研究の方法：

#### (1) サーキュレーションシステムによる限界酸素濃度測定

サニーレタスをアクリル製チャンバー (外径 25 × 18 cm、厚さ 1 cm、容積 5 L) に入れて密封し、25 に制御したインキュベーター内に静置した。チャンバー内のガス濃度を計測するためのシステムを構築した。すなわち、チャンバーの出口に酸素センサー、二酸化炭素センサー、循環用ポンプをこの順に接続し、ポンプ出口をチャンバー入口に接続した。ガスセンサの出力をペーパーレスレコーダーに接続し、モニターから 5 分ごとの O<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> 濃度を取得した。実験開始時のチャンバー内のガス置換のために、窒素ボンベから窒素ガス (高純度窒素ガス) をチャンバーに流入させた後、直ちにサーキュレーションシステムを構築し、ガス濃度のモニタリングを行った。呼吸商変化点 (RQB) は、Fonseca らの式により算出する O<sub>2</sub> 消費速度、CO<sub>2</sub> 排出速度から、式 1 より呼吸商 (RQ) を算出し、RQ が急変する O<sub>2</sub> 濃度から求めた。O<sub>2</sub> 消費速度、CO<sub>2</sub> 排出速度の計算には式 2 を用い、表計算ソフト (Microsoft Excel、マイクロソフト) により算出した。ハウレンソウを用いた実験も同じ方法で実施した。

$$RQ = \frac{cCO_2}{cO_2} \quad \dots \text{式 1}$$

ここで、

RQ : 呼吸商  
cCO<sub>2</sub> : 二酸化炭素の変化量 (%/h)  
cO<sub>2</sub> : 酸素の変化量 (%/h)

である。

$$R = \frac{C \times V_f}{100 \times W} \quad \dots \text{式 2}$$

ここで、

R : 酸素消費量および二酸化炭素排出量 (mL/kg/h)  
C : 酸素濃度および二酸化炭素濃度の変化量 (%/h)  
V<sub>f</sub> : 容器内自由体積 (mL)  
W : 供試重量 (kg)

である。

#### (2) 通気法による酸素濃度制御

サニーレタスを 5 L アクリル製チャンバーに入れて密封し、25 の一定温度に設定したインキュベーター内に 24 時間静置した。実験には通常大気と混合ガスを用いた。通常大気は、室内大気をコンプレッサーで通気させ、流量は、マスフローコントローラを用いて、100 mL/min に制御した。混合ガスの作成には、純酸素と純窒素のガスボンベと、それぞれに接続したマスフローコントローラで流量制御した後、ガスブレンダーによりガスを混合し、マスフローコントローラで 100 mL/min に流量制御しチャンバーに供給した。チャンバー内の酸素濃度は、(1) と同様の方法で測定した。酸素濃度を 1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、10%、15%、20.9% になるようにガス割合を調整した。ハウレンソウを用いた実験も同じ方法で実施した。ただし、酸素濃度を 1.0%、1.5%、3.0%、20.9% になるようにガス割合を調整した。

### (3) 遺伝子発現解析

酸素濃度を制御したチャンバー内で 24 時間貯蔵したサニーレタスから、直ちに遺伝子発現解析用のサンプリングを行った。サニーレタスの中央の葉脈を軸に左右に分け、葉脈を避けた葉の中心部分を直径 20 mm のコルクボーラーで左右両側合わせて 2 枚くり抜いた。2 枚ともアルミホイルで包み、液体窒素で急速凍結し、-80 °C の冷凍庫で保存した。ハウレンソウのサンプリングは、3 枚目~5 枚目の葉を選び、中央の葉脈を軸に左右に分け、葉脈を避けた葉の中心部分を直径 15 mm のコルクボーラーで左右両側合わせて 2 枚くり抜いた。全 6 枚をアルミホイルで包み、液体窒素で急速凍結し、-80 °C の冷凍庫で保存した。

遺伝子発現解析は、保管サンプルを冷凍庫から取り出し、速やかに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。ADH を標的遺伝子とし、ハウスキーピング遺伝子には *Actin* を用いた。qRT-PCR による遺伝子発現解析は、Thammawong ら (2012) にしたがった。

### (4) 嫌気代謝産物の抽出定量による限界酸素濃度測定

酸素濃度を制御したチャンバー内で 24 時間貯蔵したサニーレタスから、直ちに嫌気代謝産物量測定用のサンプリングを行った。中央の葉脈を軸に左右に分け、葉脈を避けた葉の中心部分を直径 20 mm のコルクボーラーで左右両側合わせて 2 枚くり抜いた。その後、2 mL チューブに移し替え、アセトン 450  $\mu$ L と内部標準としてアセトニトリル 50  $\mu$ L を加え、測定まで -80 °C で保存した。測定時はサンプルを氷冷中に入れ、混合溶液の気化を防いだ。測定直前に破砕機 1500 rpm で攪拌した。混合溶液 1  $\mu$ L を採取し、ガスクロマトグラフ(島津製作所 GC-14B、検出器: FID、カラム: DB-WAX (長さ 30 m、口径 0.25 mm、膜厚 0.25  $\mu$ m)、キャリアーガス: He、恒温槽: 160 °C、検出器温度: 200 °C)により測定した。得られたピークを標準と比較することにより、サニーレタス 1 mL あたりに含まれるアセトアルデヒドとエタノールを算出した。

### (5) ハウレンソウを用いた包装処理による ADH 発現解析

ハウレンソウを低密度ポリエチレン製袋に入れて、ヒートシールによって MA 包装にしたもの(25 cm x 30 cm)と、しないもの(テープ止め)に分けて貯蔵した。貯蔵温度は 10 °C、25 °C に設定した。サンプリングは、貯蔵を始めた日を 0 日とし、25 °C では 1、2 日後、10 °C では 2、4、6 日後において行った。サンプリングの際にはガス測定装置 (Check Mate 3, DanSensor) を用いて、包装内の O<sub>2</sub> と CO<sub>2</sub> 濃度を測定した。サンプリング方法と遺伝子発現解析は、上記の 3) と同じ方法で実施した。

## 4. 研究成果:

低酸素は呼吸を抑えるため青果物の鮮度保持に効果的であり、低酸素環境の創出を基本原理とした MA 包装や CA 貯蔵などとして実用されている。こうした技術の設計や運用にあたっては青果物の低酸素耐性を評価する必要がある。低酸素耐性は、従来、呼吸商の変動に基づく呼吸商変化点(RQB)やエタノール等の嫌気代謝産物の生成量に基づく発酵閾値(FT)によって評価されてきた。しかし、更なる最適化のためには、貯蔵環境の酸素濃度に応じた呼吸代謝の応答を遺伝子レベルで議論する必要がある。

アルコール脱水素酵素(ADH)は、嫌気呼吸代謝の主要酵素である。サニーレタスの ADH をコードする *LsADH* 遺伝子について、低酸素濃度下における発現変動を調査し、低酸素耐性を評価するとともに、従来の RQ に基づいて規定される限界酸素濃度と比較した。加えて、種々の酸素濃度下における *LsADH* 発現レベル、RQ、エタノールとアセトアルデヒドから、低酸素耐性を評価した。RQ は、20.9%~0.3%の O<sub>2</sub> 濃度範囲において 1.1 前後で推移し、0.3%を下回ると急増した (Fig. 1A)。したがって、RQB は 0.3%であった。一方、*LsADH* 発現レベルは、対照区 (20.9% O<sub>2</sub>) と比較して 15%~3.5% O<sub>2</sub> 区では約 6 倍であったが、2%を境に著しく発現増加した (Fig. 1B)。嫌気代謝物であるエタノールとアセトアルデヒドの生成量は、1%より低 O<sub>2</sub> において著しく増大し、FT は 1%であった (Fig. 2)。このことから、*LsADH* 発現レベルが著しく増加する酸素濃度を遺伝子発現転換点(GEB)と定義すると、レタスの GEB は 2%であり、RQB や FT と比較すると高濃度側にあり、低酸素条件により敏感に応答していた。この GEB は、青果物の適正貯蔵酸素濃度を決定する上で、有益な指標になると考えられた。

ハウレンソウにおいては、RQ が 0.3%であることを明らかにした (Fig. 3A)。SoADH3 発現レベルは、対照区 (20.9% O<sub>2</sub>) と比較して 3.0% O<sub>2</sub> 区では約 2 倍であったが、1.5% O<sub>2</sub> を境に著しく発現上昇した (Fig. 3B)。さらに、ハウレンソウを用いて、10 °C と 25 °C において MA 包装の有り/無しの条件下における SoADH3 を測定した。25 °C 貯蔵区では、SoADH3 の発現レベルが低下したが、MA 包装の有無による SoADH3 発現レベルの差が見られなかった。一方、10 °C 貯蔵区では、SoADH3 発現レベルの上昇傾向が見られた。MA 包装の有無による SoADH3 発現レベルは、貯蔵 4 日後のみで差が見られた (Fig. 4)。MA 包装内のガス組成は、10 °C において O<sub>2</sub> 17.5%、CO<sub>2</sub> 1.0%程度、25 °C で O<sub>2</sub> 19%、CO<sub>2</sub> 0.5%程度であり、今回の実験では限界酸素濃度に近い低酸素濃度条件は得られなかった。このことが、SoADH3 遺伝子の発現レベルに MA 包装の有無による差が見られなかった原因と考えられた。なお、ハウレンソウの ADH

発現変化は、MA 包装の有無による影響だけでなく、貯蔵温度の影響も受けることから、温度の影響についても検討が必要である。

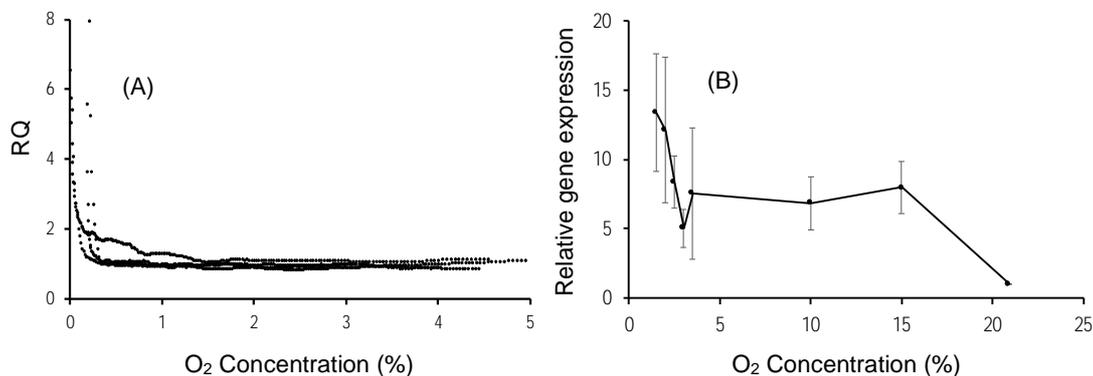


Fig. 1 Relationship of environmental O<sub>2</sub> concentrations and respiratory quotient (A) and relative expression of *LsADH* gene (B) of sunny lettuce stored at 25 °C.

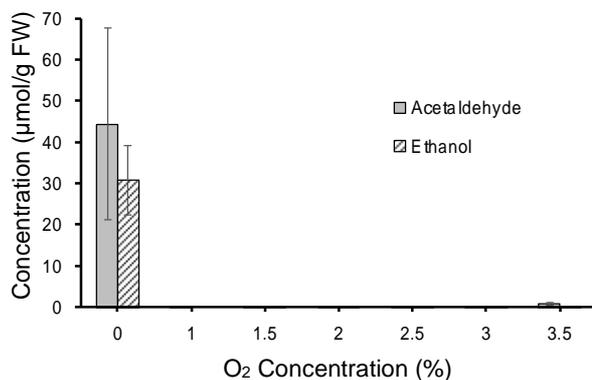


Fig. 2 Relationship of O<sub>2</sub> concentrations and fermentation threshold of sunny lettuce stored at 25 °C.

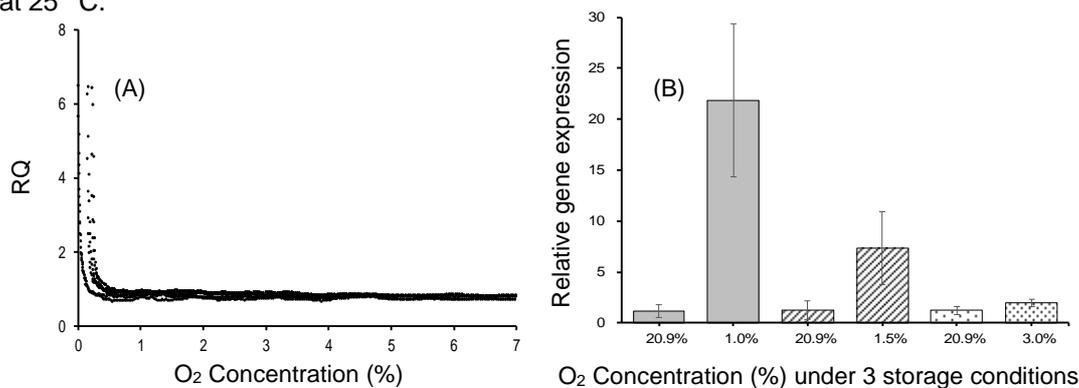


Fig. 3 Relationship of environmental O<sub>2</sub> concentrations and relative expression of *SoADH3* gene (A) and respiratory quotient (B) of spinach stored at 25 °C.

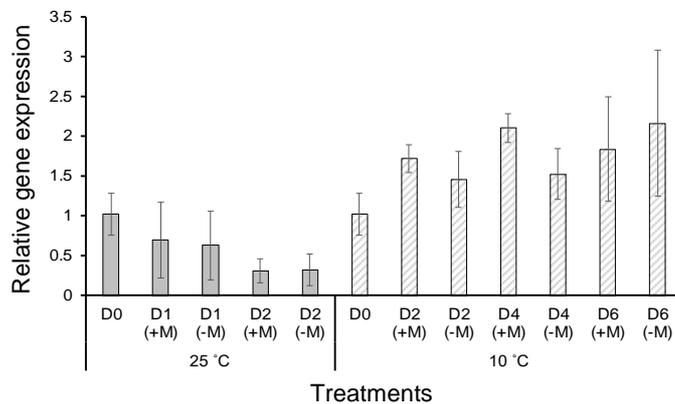


Fig.4 Changes of relative expression of *SoADH3* of spinach stored under various packaging conditions.

<引用文献>

THAMMAWONG Manasikan, HEWAJULIGE Ganga Namali Iimi, 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

[学会発表](計 2 件)

Mana KUMAZAWA, Manasikan THAMMAWONG, Hushna Ara NAZNIN, Kohei NAKANO, Hypoxia tolerance evaluation of red leaf lettuce by expression analysis of *LsADH* gene, The 9th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agricultural and Biosystems Engineering (ISMAB2018), 2018, Korea

熊澤真名、タンマウォン マナスィカン、中野浩平、ADH 遺伝子の発現解析によるサニーレタスの低酸素耐性の評価、農業食料工学会関西支部、第 138 回例会、2017

6 . 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。