

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850181

研究課題名(和文)植物生体内酸素濃度の3次元マッピングによる生理代謝モデルの開発

研究課題名(英文)Development of metabolism prediction model using 3D mapping of oxygen concentration in plant

研究代表者

中村 宣貴(Nobutaka, Nakamura)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門 食品加工流通研究領域・上級研究員

研究者番号：50353975

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)： トマト果実について、ニードル式の溶存酸素センサを用いて、周囲酸素濃度急減が内部酸素濃度に及ぼす影響を部位別に調査した。また、嫌気呼吸関連の遺伝子の発現についても同様に検討を行った。その結果、トマト果実は外側において低酸素状態であるため嫌気呼吸関連遺伝子の発現量が高いこと、酸素急減後は10-20分後で内部酸素濃度が0%になること、1時間経過後には果実内部において各種嫌気呼吸関連の遺伝子が発現することが明らかとなった。

これらの結果より、本手法は外部ガス環境変動から代謝変動を予測するために有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we observed distribution of internal oxygen concentration and of tomato fruits using needle type oxygen micro-sensor and fluctuation during ambient oxygen concentration change. In addition, hypoxia-responsive tomato genes (PDC, ADH, LDH, HSP17.7 and HSP21) were also analyzed. Tomato fruit showed that lower oxygen concentration and higher expression level of hypoxia responsive genes at surrounding part than central part. In addition, internal oxygen concentration decreased to 0% in 10%; 20 min, and hypoxia responsive genes showed highly induced within 1 hour after external oxygen decrease.

Results indicate that this method is useful to predict metabolism change of stored fruits and vegetables from external gas concentration information.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：生体内酸素濃度 ニードル式酸素センサ トマト 周囲ガス環境

### 1. 研究開始当初の背景

古くは青果物供給の量的安定性、近年では二次機能・三次機能を保持・向上させたより高品質な青果物の供給を目的として、鮮度保持技術は検討されてきた。収穫後の青果物には多くの品質変動要因が存在するが、その主要因は、温湿度、ガス環境である。これらを適切に組み合わせた貯蔵条件はCA条件、貯蔵方法は、CA貯蔵もしくはMA包装と呼ばれ、一部で実用化されている。

さて、多くの青果物、特に果菜類もしくは果実については、3次元の構造体であるため、内部に酸素濃度勾配および代謝速度勾配が生じ、さらに、それらが周囲環境変動により変化すると予測される。例えば、筆者らは、マンゴーについて、限界酸素濃度が保蔵温度により異なることを示している<sup>1)</sup>。これは周囲酸素濃度が同じでも品温により呼吸量が変化し、その結果、生体内酸素濃度が変化することに由来すると考えられる。生体内酸素濃度分布を、呼吸に関する酵素活性、遺伝子発現と関連づけて適切に把握・利用することで、より高度な流通技術の開発が期待される。

そこで、青果物生理の基づく高精度鮮度保持技術開発のためには、周囲環境条件(温度、酸素濃度)変動時の青果物の呼吸代謝変動に関する知見を得ることによる、生体内酸素濃度の把握およびその生理代謝変動、品質変動への影響解析が必須であると考えた。また、近年、低侵襲性の酸素濃度測定装置が利用可能となったことも、本課題着想のきっかけの一つである。

### 2. 研究の目的

植物生体内においては、その生命活動を維持するために、様々な代謝が行われている。酸素を用いた呼吸代謝は、最も重要な代謝系の一つであるが、呼吸代謝に直結すると考えられる生体内酸素濃度分布に関する情報は極めて限定的である。

そこで本研究では、収穫後の青果物を対象として、低侵襲性の酸素濃度センサを用いた植物生体内の酸素濃度分布モニタリング手法を確立する。また、周囲環境変動条件下における生体内酸素濃度予測手法を検討するとともに、生体内における呼吸関連の遺伝子発現変動(特に嫌気呼吸関連)の予測手法についても検討した。

### 3. 研究の方法

本研究課題の最大のポイントは、青果物生体内酸素濃度分布の測定・解析手法の確立である。これを最優先で解決するとともに、生理代謝(本課題では、呼吸代謝を対象とする)に関する各測定項目について検討を進めた。具体的には、以下の内容について検討を行った。

#### (1) 生体内酸素濃度モニタリング手法の確立

青果物は物理的損傷により呼吸活性の上昇、ガスバリア性の破断が生じるため、生体内の酸素濃度の連続計測には低侵襲性が求められる。そこで、生体組織の破壊が最小限に抑えることが可能な酸素濃度計(図1)を用いたモニタリング手法を確立する。対象品目として、トマト、レタス、キャベツ、ウンシュウミカン、メロンについて検討を行った。



図1 ニードル式のマイクロ酸素濃度計  
(タイテック社製、Microx TX-3, ニードル外径 0.4mm、センサ系 0.14mm)

#### (2) 青果物内の酸素濃度の部位別計測

前述の(1)により確立した生体内酸素濃度測定方法に基づき、生鮮青果物を対象として、生体内の酸素濃度分布について検討を行った。具体的には、以下の2つについて検討した。

##### ① ガス環境が安定な条件下における各青果物品目の溶存酸素分布特性の把握

温度及びガス濃度が安定な環境下において、中心部への深さが溶存酸素濃度に及ぼす影響について検討を行った。青果物対象品目はトマト、レタス、キャベツなどの球形の品目とした。各青果物は、小売店にて購入後、恒温恒室庫内で25℃に品温調整を行い、同庫内で生体内酸素濃度を計測した。

測定には、前述のニードル式マイクロ酸素濃度計を用いた。測定部位は、最外部から0.5, 1.5, 4.0 cmとし、測定開始から酸素濃度が安定するまで計測を実施した。

##### ② 周囲ガス環境が急変する場合のトマト果実内溶存酸素濃度変化特性

トマトについては、周囲ガス濃度が急変(21%→0%)時の内部溶存酸素濃度変動についても検討を行った。

(3) 青果物中の溶存酸素濃度と嫌気呼吸関連遺伝子発現の関係

完熟のトマト果実を対象として、通常の大気条件下および周囲の酸素濃度を0%に急減させて一定時間(0.5h、1h、2h後)経過時点での遺伝子の発現量を計測した。測定部位は果実の外側と内側とした。そして、無酸素環境下で所定の時間経過後、速やかにトマト果実をカットし、内側と外側に分離し、液体窒素にて迅速に凍結・冷凍保存し、後日に測定を行った。

測定対象遺伝子は、以下の通りである。

①pyruvate decarboxylase (PDC)

植物が嫌気呼吸を行う際には、ピルビン酸がアセトアルデヒドを経てエタノールが生成される。PDCは、ピルビン酸からアセトアルデヒドを生成する際に働く酵素である。

②alcohol dehydrogenase (ADH)

嫌気呼吸の際に、①で生成されたアセトアルデヒドからエタノールを生成する際に働く酵素である。

③lactate dehydrogenase (LDH)

植物が低酸素条件下に置かれると、①②のエタノール生成以外に、乳酸の蓄積が行われることが知られている。LDHは、ピルビン酸から乳酸への反応を触媒する酵素である。

④heat shock protein (HSP17.7 および HSP21)

ヒートショック時に働くタンパクであるが、植物の低酸素ストレスに関連することが示されている<sup>2)</sup>。

#### 4. 研究成果

(1) 生体内酸素濃度モニタリング手法の確立

青果物各品目について、ニードル式酸素濃度計を用いた計測について検討を実施した。

まず、ウンシュウミカンなどの柑橘およびメロンについては、本手法を用いた計測は不向きであった。ウンシュウミカンについては、センサ先端部の蛍光物質が1回の計測で剥離してしまう現象が観察された。詳細は不明であるが、果皮に含まれる精油成分が原因と推察された。メロンについては、シリンジの操作時に果皮破片がニードル内に混入し、結果としてセンサ先端の蛍光物質が剥離する頻度が高いことが理由に挙げられる。

トマト、レタス、キャベツについては、注意深く扱うことで測定が可能であった。一方、シリンジの挿入を行う場合、手持ちでは、ニードル部がまがり、故障の原因となることが懸念された。そこで、シリンジに負担無く対象物に挿入できるガイドを作成することで、安定的な測定が可能となった(図2)。

(2) 青果物内の酸素濃度の部位別計測

①ガス環境が安定な条件下における各青果物品目の溶存酸素分布特性の把握

生体内酸素濃度分布の傾向は、品目により

大きく異なった(図3)。トマトでは、果実の外側部で低く、中心部で高かった。これは、先行研究<sup>3)</sup>と同様な結果であった。一方、キャベツにおいては、外側部で高く、中心部で低い傾向が認められた。また、レタスでは、いずれの測定震度においても大気と大差なかった(データ省略)。これらの結果は、青果物の内部構造に由来する酸素供給経路および組織の酸素透過特性の違いの影響であると考えられる。



図2 ニードル式酸素センサを用いた青果物内溶存酸素計測風景

②周囲ガス環境が急変する場合のトマト果実内溶存酸素濃度変化特性

酸素濃度0%に急変させた場合のトマト果実内の生体内酸素濃度は、10-20min程度でほぼ $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ まで低下した。一方、大気環境下に戻った場合は、実験開始時の生体内酸素濃度に戻るには40-60min程度を要した。溶存酸素濃度が安定する時間が異なるのは、生体内において呼吸により酸素が消費されていることに起因すると考えられ、本計測手法が生体内酸素濃度の計測に適切であることを示唆するものである。

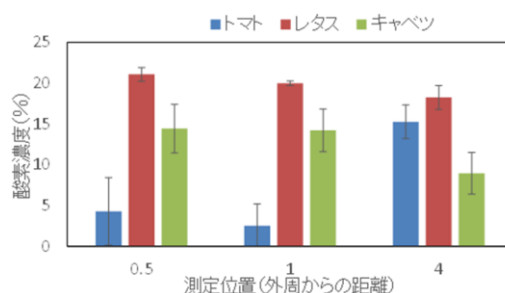


図3 青果物品目毎の部位別溶存酸素濃度の測定結果

(3) 青果物中の溶存酸素濃度と嫌気呼吸関連遺伝子発現の関係

①大気条件下での遺伝子発現量

低酸素条件に移行する前の大気条件下での遺伝子発現量について、外側、内側で測定を

行った。その結果、いずれの遺伝子についても、外側で高いことが明らかとなった。(2)の測定により、トマト果実は外側において酸素濃度が低く、内側で高いという部位ごとの特性がある。本測定結果は、これが反映されたものと考えられる。

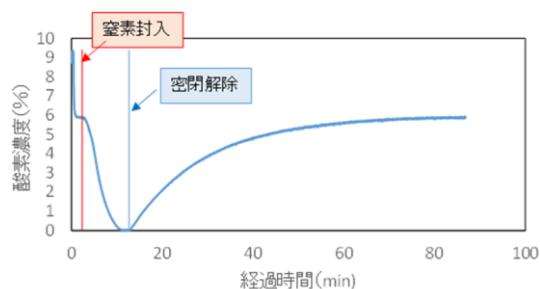


図 4 周囲酸素濃度を急減・急増時のトマト果実内の酸素濃度の経時変化（測定位置：外周から半径の 1/2）

#### ②無酸素条件下での遺伝子発現量

果実の外側については、PDC において無酸素区での経時的増加が若干認められた。一方、他の遺伝子については、概ね同程度であった。PDC はピルビン酸からアセトアルデヒド、エタノールを生成する最初の工程であることから、今回の短時間の低酸素処理でも影響が認められたと考えられる。

果実内部については、いずれに遺伝子についても無酸素区での経時的な増加が認められ、PDC および HSP21 でより顕著であった。なお、無酸素 2 時間経過時点でも、果実内部での嫌気呼吸関連遺伝子の発現量は、対照区の果実外側より低いことから、重篤な嫌気障害に至ったわけではないことが示唆された。

また、実験開始時と 0.5h 経過時で遺伝子の発現量には差が認められなかった。図 4 に示しているとおり、本実験系では無酸素処理により果実内部の酸素が消費されるには 10-20 分程度を要している。そのため、嫌気呼吸代謝が起こるまでにタイムラグが生じ、0.5h 経過時点では差が認められなかったと考えられた。

本結果は、外部ガス環境変動と植物生態内部における呼吸代謝変動を直接結びつけるための基礎的な知見として有用であると考えられる。

#### 引用文献

- 1) 中村宣貴ら、CA ガス環境下における樹上完熟マンゴーの呼吸特性、日本食品保蔵科学会誌、28(3)、111-117、2002
- 2) Loreti E. et al., Plant Physiology, 137, 1130-1138, 2005
- 3) Rezagah, M. E. et al., Environment Control in Biology. 51(4), 193-200, 2014

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

中村宣貴ら、ニードル式酸素センサを用いた青果物内部の酸素濃度分布に関する基礎的検討、農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会（2015）

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 宣貴 (NAKAMURA NOBUTAKA)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門・食品加工流通研究領域・上級研究員

研究者番号：50353975