

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07669

研究課題名(和文) 良食味・高ポリフェノール含有トマト作出のための栽培環境と変動機構の解明

研究課題名(英文) Environmental factors and cultural practices to produce tomatoes with enhanced levels of polyphenol, and their mechanisms

研究代表者

園師 一文 (Zushi, Kazufumi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50435377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：トマトには機能性を持つポリフェノールが含まれている。本研究では、様々な栽培方法下におけるポリフェノール含量の変化および変動メカニズムを検討した。この結果、乾燥・塩ストレスおよび有機質肥料を用いることによってポリフェノール含量が上昇すること、塩ストレス下において、ストレス付与だけでなくその他の環境条件(温度)も含量上昇に重要であることが示唆された。ポリフェノール含量向上のメカニズムについては、ポリフェノール生合成酵素活性から含量の変化を説明できない場合があった。これらのことから、高ポリフェノール含有トマトの作出のための栽培方法および変動メカニズムが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Tomato contains a range of polyphenol, which are regarded as potentially useful compounds with respect to health benefits. However, little is known about cultural practices to produce tomatoes with enhanced levels of polyphenol. Therefore, the aim of this study was to elucidate the effect of cultural practices such as the application of stress (drought, salt stresses) organic fertilizer on polyphenol content. In our studies, polyphenol contents were increased by the application of stress and organic fertilizer, and their effects depend on cultivars and growing seasons. In addition, the stress-enhanced polyphenol content was resulted from the reduction of fruit water, but not net accumulation by up-regulation of biosynthesis. Furthermore, we suggest that salt-induced changes in polyphenol biosynthesis enzymes may not correlate the changes in the polyphenol content. Therefore, our studies conclude that polyphenol contents in tomato fruits enhanced by cultural practices.

研究分野：生物環境工学

キーワード：トマト ポリフェノール 塩ストレス 有機質肥料

1. 研究開始当初の背景

近年、野菜生産の現場では、食のグローバル化の進展に伴う国内外における競争激化により、競争力を高めるための高品質化・高付加価値化が強く求められている。例えば、トマトでは、かん水を抑える(乾燥ストレス)、塩を含んだ土壌・培養液で栽培する(塩ストレス)等の栽培が行われており、これらのトマトは糖、有機酸、アミノ酸含量が高く食味も良いことから、差別化・高値で販売されている。また、農業による環境負荷への懸念と、持続的な食糧生産を実現するために、アミノ酸やミネラルの豊富な有機質肥料を用いた栽培も試みられており、食味の向上が生産者の間で広く認められている。一方、品質として、味だけでなく健康に良い成分(機能性成分)を多く含むものが重要視されており、ストレス栽培や有機質栽培においても、両者を高めた栽培技術の確立が必要である。

トマトには、機能性成分としてよく知られているリコペンやアスコルビン酸だけでなく、ポリフェノール(フラボノイド、フェノール酸、アントシアニンなどの総称)も含まれている。トマトのポリフェノールは、がんや動脈硬化などの原因となる活性酸素を消去する働き(抗酸化作用)、肝機能保護、抗ウイルスなどの機能とともに、果皮のナリンゲニンカルコンには抗アレルギー作用のあることが知られている。トマトは日常的に食べることから、ポリフェノールの重要な摂取源である。また、近年の分析技術の発達により、トマトのポリフェノールには微量なものまで含めると100種以上の化合物が同定されている。

一般に、ポリフェノールは、品種、栽培時期(夏、冬)によって変動すること、植物が様々な環境ストレスにさらされた時に生じる酸化ストレスからの防御反応に利用されることが知られている。また、植物に環境ストレス(光、温度、養分等)を適度に与えると、機能性成分含量が増加することが知られている。これらのことから、トマトにおいても栽培方法や環境条件(温度や光)を変えることによって、ポリフェノール含量が大きく変動するかもしれない。申請者はこれまでの研究において、乾燥・塩ストレスがトマトのリコペンやアスコルビン酸含量を上昇させることを明らかにした。しかしながら、これまでの報告において、ストレス付与下や様々な栽培環境下で栽培したトマトのポリフェノール含量の変化を検討した報告はなく、ポリフェノール含量がどのような栽培方法あるいは環境下で増加するのかは未解明のみである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、トマトのポリフェノール含量の向上を目指し、様々な栽培環境下における含量の変化ならびにその変動メカニ

ズムを明らかにすることである。このことによって、良食味・高ポリフェノール含有トマト作出を試み、トマトのさらなる差別化のための基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

本課題では、良食味・高ポリフェノール含有トマトの作出を目指し、以下の3つの実験を行った。

- (1) 乾燥ストレスと塩ストレスがトマトのポリフェノール含量に及ぼす影響
- (2) 有機質肥料がトマトのポリフェノール含量に及ぼす影響
- (3) 異なる温度環境下における塩ストレスがポリフェノール含量の及ぼす影響と変動メカニズム

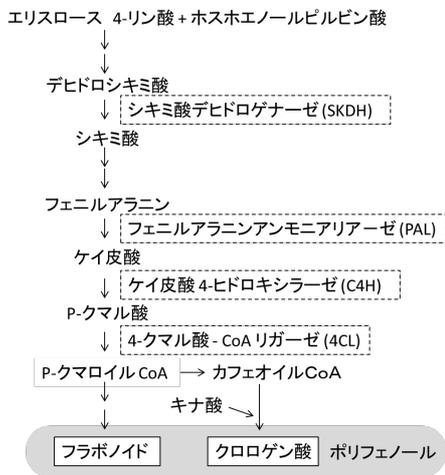
- (1) 乾燥ストレスと塩ストレスがトマトのポリフェノール含量の及ぼす影響

乾燥ストレスでは、供試品種として、中玉トマト(品種:シンディースイート)を用いた。処理区は、土壌水分量を36%(水充分区)および14%(低水分区)に維持する区を設け、収穫果実のポリフェノール含量を測定した。

塩ストレスでは、品種間差を明らかにするために、供試品種として、ティオクック(TC, 調理用中玉品種)、ハウス桃太郎(HM, 大玉系品種)、アイコ(AI, 小玉系品種)、トスカーナバイオレット(TV, 小果系品種)、シシリアンルージュ(SR, 調理用小玉品種)、シンディースイート(SS, 中玉系品種)、ミニキャロル(MC, 小玉系品種)の7品種を用いた。

栽培は、宮崎大学ガラス温室内に設置した循環型固形培地耕システム(培地:パミス)に株間20cmの1本仕立てで左右に振り分けて誘引し、各処理4株、2反復で行った。なお、栽培は2015年9月~2月(秋冬作)と2016年3月~7月(春夏作)に行った。栽培システムの培養液は、OATハウスA処方0.5単位(OTAアグリオ株式会社)を用い、1週間毎に交換した。塩ストレス処理は、培養液に100mM NaClを与えることで第1果房の開花期から実験終了時まで行い、対照区としてNaClを与えない処理を設けた。培養液のpHは、2日ごとに測定し6.0~6.5に調整した。

供試果実は、第2果房の完熟果とした。果実は収穫後、果実赤道面からコルクボーラー(直径1cm)を用いて果肉を取り出し、液体窒素で凍結した後、-80°Cで分析まで保存した。ポリフェノール含量の測定は80%メタノールで抽出後、フォーリンチオカルト法で行った。また、ポリフェノール生合成酵素として、ポリフェノールの前駆物質であるシキミ酸を生成するシキミ酸デヒドロゲナーゼ(SKDH)、フェニルアラニンからtrans-ケイ皮酸を生成するポリフェノール生成のキー酵素の一つであるフェニルアラニンアンモニリアーゼ(PAL)を測定した(第1図)。



第1図 ポリフェノール生合成経路の概略図

(2) 有機質肥料がトマトのポリフェノール含量に及ぼす影響

供試品種は、中玉トマト（品種：シンディースイート）を用いた。栽培は、宮崎大学ガラス温室内で、2015年春夏期（2015年3～7月）、2015年秋冬期（2015年9月～2016年2月）および2016年春夏（2016年3～7月）に行った。植物体は、宮崎焼土とボラ土を9:1に混合した培土をつめた栽培ベッド（1235mm×336mm×265mm, PSK-6000, 矢崎化工製）において、株間20cmの1本仕立てで左右に振り分けて誘引を行った。処理は、有機質肥料として、牛肉骨粉、魚粕、血粉、豚肉骨粉、蒸製毛粉（南国興産（株）、宮崎）を用いて栽培する区、慣行的な化成肥料を用いて栽培する区（化成区）を設けた。各区の施肥は、JA宮崎中央の基準に準じ、各処理区の窒素濃度を合わせた後、カリウム、リン酸を補った。

第2果房の完熟果を収穫後、ポリフェノール含量は80%メタノールで抽出後、フォーリンチオカルト法で測定した。また、同じ試料を用いて抗酸化活性を測定することでポリフェノール含量との関連性を検討した。

(3) 異なる温度環境下における塩ストレスがポリフェノール含量の及ぼす影響と変動メカニズム

供試植物はトマト矮性品種‘マイクロトム’を用いた。播種約1ヶ月後に人工気象器内の水耕装置に移し、一週間順化させた後、異なる温度条件下（20℃、25℃、30℃）で塩ストレス処理を行った。塩ストレスは、培養液に100mM NaClを加えることで、第1花の開花期から栽培終了時まで行った。対照区としてNaClを添加しない区も設けた。果実は、完熟果を収穫し、液体窒素で凍結した後、-80℃で分析まで保存した。実験は6個体ずつ2反復で行った。

ポリフェノール含量は、80%メタノールで

抽出後、フォーリンチオカルト法で測定した。ポリフェノール生合成酵素活性は、シキミ酸デヒドロゲナーゼ（SKDH）、およびフェニルアラニンアンモニアラーゼ（PAL）を測定した（第1図）。また、ポリフェノール含量と抗酸化システムとの関連性を検討するために、アスコルビン酸（ASA）含量およびアスコルビン酸-グルタチオン（ASA-GSH）サイクル関連酵素活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 乾燥ストレスと塩ストレスがトマトのポリフェノール含量の及ぼす影響

乾燥ストレスにおいて、低水分区で生体重量当たりのポリフェノール含量が水充分区より上昇した（データ省略）。しかしながら、真の生成量を示す乾物重量当たりでポリフェノール含量を算出したところ、土壌水分の違いによる含量の差異は認められなかったことから、低水分区におけるポリフェノール含量の上昇は果実内水分含量の低下に伴う濃縮効果であることが示唆された。

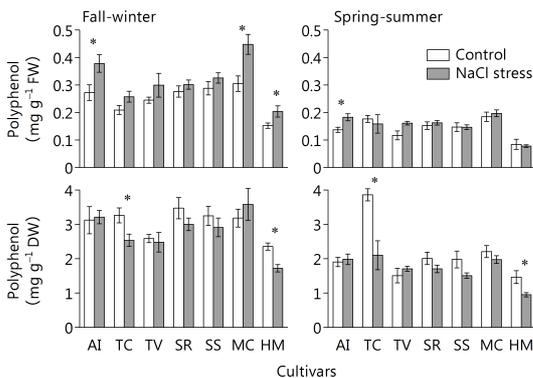
塩ストレスにおいて、本実験で供試したすべての品種において、栽培時期にかかわらず塩ストレスにより果実は小玉化し、食味、糖度および食味成分（糖、有機酸含量）は高かった（データ省略）。このことから、すべての品種が塩ストレスの影響を受け、高品質化したことがわかった。

しかしながら、塩ストレスがポリフェノール含量に及ぼす影響には品種や栽培時期による差異が認められた。例えば、生体重量当たりのポリフェノール含量は、秋冬作のAI、MCおよびHM、春夏作のAIで塩ストレス区の方が対照区より高かったが、他は処理間差がなかった（第2図）。一方、乾物重量当たりのポリフェノール含量は、秋冬作と春夏作ともにTCおよびHMで塩ストレス区の方が対照区より低かった。これらのことから、生体重量当たりのポリフェノール含量の上昇は、乾物重量当たりで示されるように生成量自体は低下するが、果実の小玉化が引き起こす濃縮効果によって生体重量当たりで上昇することが明らかになった（第3図）。

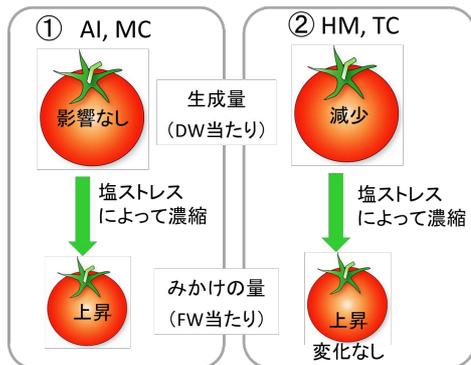
次に、塩ストレスが引き起こすポリフェノール含量の変化と生合成酵素活性との関連性を明らかにするために、生体重量と乾物重量当たりのどちらかで塩ストレスの影響が認められたAI、TC、MCおよびHMにおいてSKDH活性とPAL活性を測定した（第4図）。この結果、秋冬作では、AIのSKDHとHMのPAL活性が塩ストレスによって対照区より低下したが、春夏作では、MCのSKDH活性とAIのPAL活性が塩ストレスによって対照区より上昇した。これらの結果から、秋冬作のHMでは塩ストレスによるPAL活性の低下がポリフェノール含量の低下を引き起こしたと考えられた。一方、他の品種ではポリフェノール含量の変化と酵素活性に関連性が認め

められず、塩ストレス下のトマトにおけるポリフェノール含量の変化は生合成酵素活性の変化以外の要因に起因することが明らかになった。

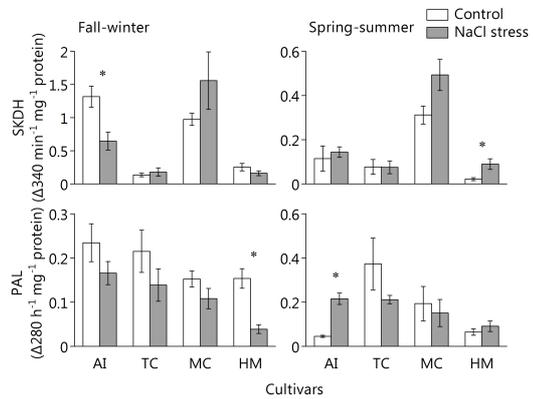
以上のことから、塩ストレスがポリフェノール含量に及ぼす影響には品種間差が認められ、その影響は栽培時期により異なることが明らかとなった。しかしながら、ポリフェノール生合成酵素活性 (SKDH, PAL) からポリフェノール含量の変化を説明できない場合があった。今後は、他の品種も供試しポリフェノール含量を高める品種の選抜を行う必要がある。



第2図 様々な品種における塩ストレスが生体重 (FW) 当たりおよび乾物重 (DW) 当たりの総ポリフェノール含量に及ぼす影響。値は平均 ± 標準誤差 ($n = 6-8$) で示した。図中のアスタリスクは処理間差が有ることを示す (Student's *t*-test, $P < 0.05$)。



第3図 ポリフェノール含量変動メカニズム。品種 AI, MC では乾物重当たりで示される生成量には影響がないが、濃縮効果によって見かけ上増加する。一方、品種 HM, TC では乾物重当たりで示されるように生成量自体は低下するが、果実の小玉化が引き起こす濃縮効果によって生体重当たりで上昇する。



第4図 様々な品種における塩ストレスがシキミ酸デヒドロゲナーゼ (SKDH) およびフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性に及ぼす影響。値は平均 ± 標準誤差 ($n = 6-8$) で示した。図中のアスタリスクは処理間差が有ることを示す (Student's *t*-test, $P < 0.05$)。

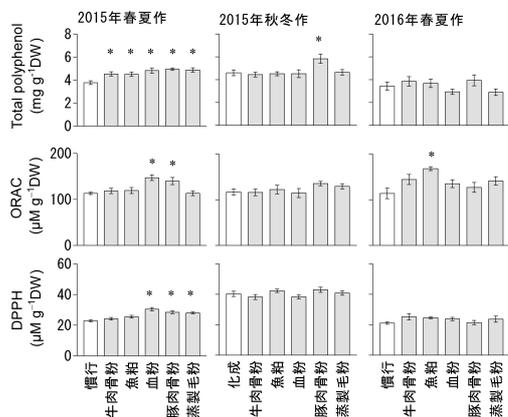
(2) 有機質肥料がトマトのポリフェノール含量に及ぼす影響

有機質肥料で栽培したトマトの生育は、化成区より葉色が薄くなる場合もあったが、生育遅延などは認められず、果重、果色においても顕著な差は認められなかった (データ省略)。

ポリフェノール含量は、2015 年春夏作のすべての区、2015 年秋冬作の豚肉骨粉区において化成区より高かった (第5図)。抗酸化活性において、ORAC ラジカル消去能は、牛肉骨粉区、血粉区、豚肉骨粉区、魚粉区において化成区より高まったが、その影響は栽培年および時期で異なった。DPPH ラジカル消去能は 2015 年春夏作の血粉区、豚肉骨粉区、蒸製毛粉区において化成区より高まった。一方、ポリフェノールが上昇する場合にも抗酸化活性に影響がない場合があり、両者の関連性は低かった。このことからポリフェノール以外の抗酸化成分も有機質肥料によって変動し抗酸化活性に影響を及ぼしていると示唆された。

以上のことから、有機質肥料の施用がトマトのポリフェノール含量および抗酸化活性を高めることが明らかになった。特に、時期によって異なるがポリフェノール含量は有機質肥料の施用によって比較的大きな影響を受けることが示唆された。

これまで様々な報告で有機質肥料の施用がポリフェノール含量に及ぼす影響について検討されてきたが、必ずしも一致した見解は得られていない。本研究において、有機質肥料の種類によって影響の有無が異なることから、今後はどのような有機質肥料がポリフェノール含量の向上に寄与するか明らかにするとともに、影響メカニズムについても検討する必要がある。



第5図 さまざまな有機質肥料がトマトのポリフェノール含量および抗酸化活性に及ぼす影響。値は平均 ± 標準誤差 ($n = 6-8$) で示した。*は化成区と比べて各有機質肥料区で統計的に有意な差があることを示す (Dunnnett の多重比較検定, $P < 0.05$)

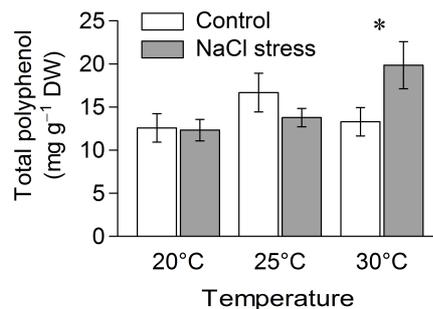
(3) 異なる温度環境下における塩ストレスがポリフェノール含量の及ぼす影響と変動メカニズム

これまでの実験において、栽培時期によって塩ストレスがポリフェノール含量に及ぼす影響が異なることが明らかになったので、栽培時期の差が栽培期間中の温度の差に起因するか明らかにするために、異なる温度環境下における塩ストレスがポリフェノール含量に及ぼす影響と変動メカニズムを検討した。

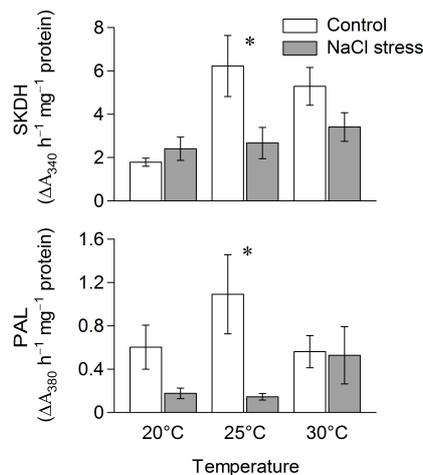
ポリフェノール含量は、30°C 下では塩ストレスによって上昇したが、他の温度条件下では影響がなかった (第6図)。ポリフェノール生成酵素活性において、ポリフェノールの前駆物質であるシキミ酸を生成する SKDH およびポリフェノール生成のキー酵素の一つである PAL は、25°C 下でのみで塩ストレスによって低下し、30°C 下では塩ストレスによってポリフェノール含量が上昇したにもかかわらず、PAL と SKDH には影響が認められなかった (第7図)。他のポリフェノール生成関連酵素においては、塩ストレスの影響は認められなかった。これらのことから、塩ストレスがポリフェノール生成酵素活性に及ぼす影響は温度条件によって異なることが明らかになった。しかしながら、30°C 下における塩ストレスによるポリフェノール含量の上昇は、生成酵素活性の変化から説明できなかったことから、生成酵素活性の変化はポリフェノール含量の増減に直接的に関わっておらず他の何らかのメカニズムが働いていることが示唆された。

これらのことから、塩ストレスが引き起こす活性酸素消去システムの変化とポリフェノール含量の変化の関連性を明らかにするために、ASA 含量および ASA-GSH サイクル関連酵素活性を測定した結果、ASA 含量は

30°C 下において塩ストレスによって低下し (データ省略)、ASA-GSH サイクルにおける ASA 再生酵素も低下した。これらの結果から、塩ストレスによるポリフェノール含量の上昇は、ASA 含量の低下による抗酸化システム低下を補足するために生じたと推察されるが、上昇メカニズムについては今後の検討課題である。



第6図 異なる温度条件下で栽培したトマト果実における塩ストレスが総ポリフェノール含量に及ぼす影響。値は平均 ± 標準誤差 ($n = 6-8$) で示した。図中のアスタリスクは各温度内で処理間差があることを示す (Student's t-test, $P < 0.05$)。



第7図 異なる温度条件下で栽培したトマト果実における塩ストレスがシキミ酸デヒドロゲナーゼ (SKDH) およびフェニルアラニンアンモニアラーゼ (PAL) に及ぼす影響。値は平均 ± 標準誤差 ($n = 6-8$) で示した。図中のアスタリスクは各温度内で処理間差があることを示す (Student's t-test, $P < 0.05$)。

(4) 研究のまとめ

本研究の結果から、これまで3年間に得られた結果を解析した結果、乾燥ストレス、塩ストレス及び有機質肥料を用いた栽培などの栽培方法によってトマトのポリフェノール含量向上の可能性が示された。また、栽培時期や生育時の異なる温度によって塩ストレスがポリフェノール含量に及ぼす影響が

異なっていたことから、ストレス付与だけでなくその他の環境条件もポリフェノール含量向上に重要であることが示唆された。ポリフェノール含量向上のメカニズムについては、生成量自体は低下するが、果実の小玉化が引き起こす濃縮効果によって生体重当たりで上昇する場合があります、ポリフェノール生合成酵素活性のポリフェノール生合成酵素活性 (SKDH, PAL) からポリフェノール含量の変化を説明できない場合があった。

これらのことから、良食味・高ポリフェノール含有トマトの作出のためには、品種によって異なるが塩ストレスおよび乾燥ストレスの付与、有機質肥料を用いた栽培が重要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Zushi, K., Matsuzoe, N., 2017. Using of chlorophyll a fluorescence OJIP transients for sensing salt stress in the leaves and fruits of tomato. Scientia Horticulturae 219, 216-221. 査読有, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.016>
- (2) Zushi, K., Matsuzoe, N., 2015. Metabolic profile of organoleptic and health-promoting qualities in two tomato cultivars subjected to salt stress and their interactions using correlation network analysis. Scientia Horticulturae 184, 8-17. 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.030>

〔学会発表〕(計10件)

- (1) 圖師一文, 今藤美沙希, 門脇瞭太, 2017. 塩ストレスがトマトのポリフェノール含量および関連酵素活性に及ぼす影響の品種間差, 日本生物環境工学会 2017年松山大会.
- (2) 圖師一文, 横山桃子, 平田絵理香, 東崎千草, 岸下友美, 道辻純一郎, 2017. 異なる原料由来の有機質肥料で栽培したトマトの機能性成分含量および抗酸化活性, 園芸学会平成29年度秋季大会.
- (3) 圖師一文, 門脇瞭太, 池田理奈, 登雄大, 2016. 異なる温度条件下での塩ストレスがトマト果実のポリフェノール代謝および抗酸化システムに及ぼす影響, 園芸学会平成28年度秋季大会.
- (4) 横山桃子, 平田絵理香, 友岡芳郎, 富永昇, 高吉謙吾, 門脇瞭太, 今藤美沙希, 東崎千草, 岸下友美, 道辻純一郎, 圖師一文, 2016. 異なる原料由来の有機質肥料で栽培したトマトの抗酸化成分含量, 日本生物環境工学会九州支部会.
- (5) 高吉謙吾, 富永昇, 横山桃子, 門脇瞭太, 今藤美沙希, 東崎千草, 岸下友美, 道辻純一郎, 大野慎一郎, 圖師一文, 2016. 有

機質肥料で栽培したトマトの貯蔵に伴う果実品質の変化, 日本生物環境工学会九州支部会.

- (6) 今藤美沙希, 門脇瞭太, 富永昇, 横山桃子, 高吉謙吾, 圖師一文, 2016. 塩ストレスがトマトの抗酸化成分含量に及ぼす影響の品種間差, 日本生物環境工学会九州支部会.
- (7) 富永昇, 友岡芳郎, 平田絵理香, 横山桃子, 高吉謙吾, 門脇瞭太, 今藤美沙希, 東崎千草, 岸下友美, 道辻純一郎, 圖師一文, 2016. 異なる原料由来の有機質肥料で栽培したトマトの官能特性と食味成分含量, 日本生物環境工学会九州支部会.
- (8) 門脇瞭太, 今藤美沙希, 富永昇, 横山桃子, 高吉謙吾, 圖師一文, 2016. 果実の光環境と塩ストレスがトマトの果実品質に及ぼす影響, 日本生物環境工学会九州支部会.
- (9) 橋本雄司, 吉村太志, 林田藍実, 圖師一文, 2015. 様々な特徴を持つトマト品種におけるネットワーク分析を用いた食味・機能性成分の評価, 日本生物環境工学会2015年宮崎大会.
- (10) 圖師一文, 池田理奈, 登雄大, 2015. 異なる温度条件下での塩ストレスがトマト果実のポリフェノール含量および生合成酵素活性に及ぼす影響, 日本生物環境工学会2015年宮崎大会.

〔図書〕(計1件)

- (1) 圖師一文, 2016. 塩ストレスによるトマト内ポリフェノール向上, 機能性成分が秘めるビジネスチャンス 各社事例から学ぶ成分向上手法/事業活用例. 情報機構, 東京, pp. 88-95.

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/zushimiyazakiu/>

6. 研究組織

研究代表者

圖師 一文 (ZUSHI, Kazufumi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 50435377