

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：47407

研究種目：若手（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780234

研究課題名（和文）トマトの抗酸化成分増加を目指した複合的環境ストレス下での活性酸素制御技術の開発

研究課題名（英文）The combined effects of environmental stresses on antioxidant systems for improving the health-promoting properties of tomato

研究代表者

圖師 一文（ZUSHI KAZUFUMI）

尚綱大学短期大学部・准教授

研究者番号：50435377

研究成果の概要（和文）：

トマトのアスコルビン酸（ASA、ビタミンC）および抗酸化システム（活性酸素消去システム）に及ぼす複合的環境ストレスの影響を検討した結果、強光と高温ストレスは塩ストレスと相互作用を示し、その相互作用はストレスの種類によって異なることを明らかにした。さらに、クロロフィル a 蛍光誘導期現象が簡便・迅速なストレス評価に利用できることを明らかにした。これらのことから、トマトの抗酸化成分増加を目指した複合的環境ストレスを適切に与え評価するための基礎的知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：We examined the combined effects of salt, light and high temperature stresses on ascorbic acid (ASA, vitamin C) and antioxidant system of tomato fruits. Here we show that the effect of salt stress on ASA content and antioxidant system interacted with the other environmental stress such as light and high temperature, and these interactions were different between stress types. In addition, chlorophyll a fluorescence transient can be available to as a simple and quick stress indicator in response to salt and temperature stresses in tomato leaf and fruit. In conclusion, our results provide the basic information for improving the health-promoting properties of tomato by the combined effects of environmental stresses on antioxidant systems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：トマト、アスコルビン酸、抗酸化システム、環境ストレス、クロロフィル a 蛍光

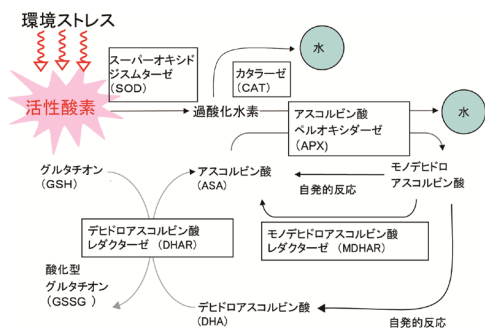
## 1. 研究開始当初の背景

近年、消費者の安全・安心・高品質志向によって、高品質・差別化された新たな特色を持つ食料生産が望まれている。このためには高品質・差別化を行うための新たな栽培技術の確立とそのメカニズム解明が急務である。

トマトは世界中で食される野菜の一つであり、我が国でも生産・消費ともに多い野菜である。近年、水・塩ストレス下で栽培したトマトでは食味成分（糖、有機酸）の増加が明らかになっており、これらを利用した高品質果実生産が試みられている。一方、近年消

費者の健康志向からトマトの抗酸化成分であるアスコルビン酸、グルタチオン、リコペンおよびβ-カロテン含量の多い果実も望まれている。しかしながら、これら抗酸化成分含量の増加を目指した栽培方法の確立は行われていない。

一方、植物は様々な環境ストレス下において、活性酸素の生成が引き起こす酸化ストレスが共通の反応として生じる。このとき、生成した活性酸素の害を消去するために活性酸素消去システムが働き、抗酸化成分含量の変化（増加あるいは減少）が引き起こされる（第1図）。同様に、トマト果実においても環境ストレスによる抗酸化成分含量の変動が報告されている。したがって、環境条件を適切に制御し適度な環境ストレスを付与できれば、トマトの食味成分含量の増加だけでなく抗酸化成分含量の増加も行えると考えられる。



第1図 植物の抗酸化システム

## 2. 研究の目的

本研究は、トマトの抗酸化成分増加を達成するための複合的環境ストレス下での活性酸素制御技術の開発（ストレス付与方法、栽培法）とそのメカニズムの解明を行うことを目的とした。具体的には、光、温度および土壌環境（塩ストレス）を組み合わせた複合的環境ストレスをトマトに与え、活性酸素消去システムの変化を明らかにするとともに、植物体のストレス程度を実際の栽培でも利用可能なクロロフィルa蛍光を用いてモニタリングする技術の確立を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 塩ストレスと光強度

トマトの生理学的研究におけるモデル品種として世界的に用いられているマイクロトム (*Solanum lycopersicum* L.) を供試品種とした。実験は、光強度をより厳密に果実のみ変化させるための果実培養実験系および植物体全体の光強度を変化するための intact 実験系で行った。

果実培養実験系では、培地に 100 mM NaCl を添加した果実を、光強度 3 段階 (0, 約 200, 約 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で培養することで行った。一方、intact 実験系では、人工気象器内で大

塚 A 処方 0.5 単位培養液を用いて水耕栽培した植物体に、開花期から栽培終了まで培養液に NaCl を 100 mM 加えると共に、植物体の光強度を 2 段階 (約 200, 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に調整し、それぞれ弱光および強光条件とすることで行った。

果実は完熟果を採取後、抗酸化物質および抗酸化酵素活性の測定を行った。

### (2) 塩ストレスと高温ストレス

熱ストレスとして、開花後約 3 週間の果実を用いて、培養液に 100 mM の NaCl を添加すると同時に栽培温度を 40°C (24 時間一定) に設定する処理を行った。

果実は完熟果を採取後、抗酸化物質および抗酸化酵素活性の測定を行った。

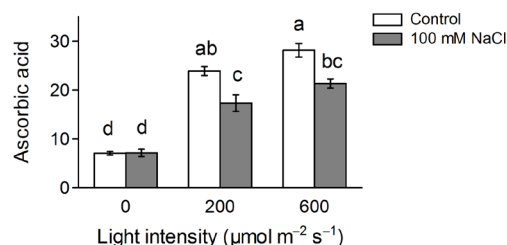
### (3) クロロフィルa蛍光 (OJIP) 誘導期現象によるトマト葉・果実のストレス評価

クロロフィルa蛍光 (OJIP) 誘導期現象がトマト葉・果実のストレス評価に利用できるかどうか検討した。温度ストレス (葉と果実を低温 4°C と高温 40°C に 24 時間保持) および塩ストレス (100 mM NaCl) を与えたトマト葉および果実の OJIP 誘導期現象の変化を携帯型蛍光測定装置 OS-30p (Opti-Science Inc, NH, USA) を用いて測定した。測定は 1 秒間行い、得られたデータを用いて光合成機能に関する指標を算出した。同時に、他のストレス指標 (水ポテンシャル, イオン溶出, 相対水分含量, 葉色, 葉温) を測定し、OJIP 誘導期現象と比較した。

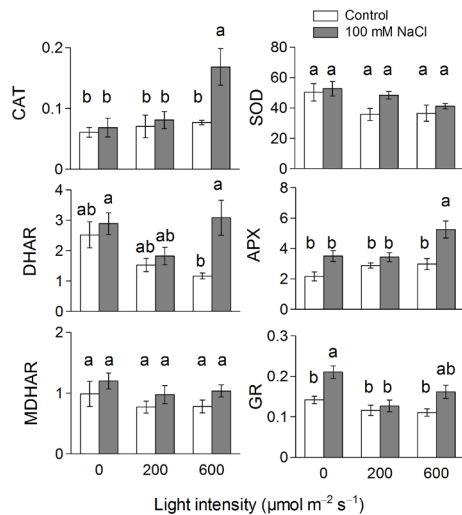
## 4. 研究成果

### (1) 塩ストレスと光強度

果実培養実験系において、トマト果実のアスコルビン酸 (ASA) 含量および APX, DHAR 活性は光強度の上昇に伴い塩ストレスによる影響を受けたことから、塩ストレスに光が加わることによって果実内で活性酸素の生成が高まり、この活性酸素消去のために ASA を用いた抗酸化システム (APX, DHAR) が活性化したと考えられる (第2, 3図)。



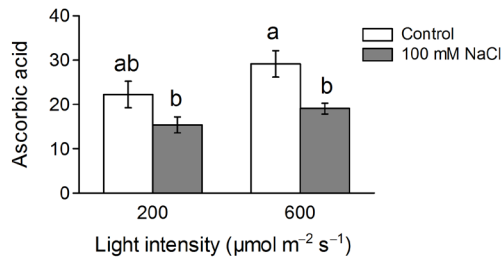
第2図 果実培養実験系における塩ストレスと光条件がアスコルビン酸含量 ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$ ) に及ぼす影響。異なるアルファベットは、Tukey-Kramer 検定により  $P < 0.05$  において有意差があることを示す。



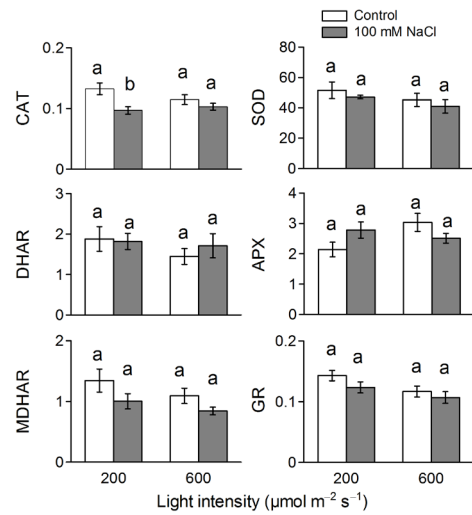
第3図 果実培養実験系における塩ストレスと光条件が抗酸化酵素活性 ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ , SOD ;  $\text{units g}^{-1} \text{protein}$ ) 活性に及ぼす影響. 異なるアルファベットは, Tukey-Kramer 検定により  $P < 0.05$  において有意差があることを示す.

一方, intact 実験系では, 強光と塩ストレスの複合ストレス下において ASA 含量の低下が認められたにも関わらず, 抗酸化酵素活性への影響は小さかった (第 4, 5 図). この原因として, 強光条件では, APX ではなく ASA を用いた非酵素的反応で活性酸素を消去したために, ASA 含量のみ低下したと推察される. また, CAT 活性は, 塩ストレスによって低下したことより, この低下を補う形で ASA 利用による活性酸素の非酵素的消去が行われたと考えられる.

さらに, 強光条件下の塩ストレスが抗酸化酵素活性に与える影響は, 果実培養実験系に比べて intact 実験系で少なかった. このことは, intact 実験系の果実においては, 根・茎・葉において塩ストレスの影響を緩和するメカニズムが備わっていることを示唆しており, 今後そのメカニズムについて詳細に検討していきたい.



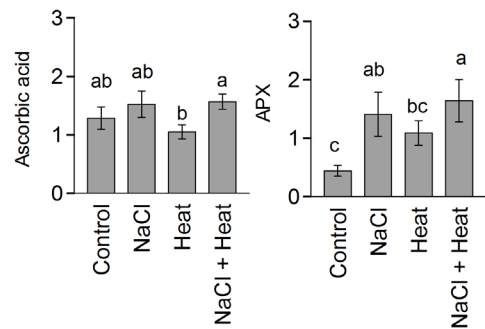
第4図 intact 実験系における塩ストレスと光条件がアスコルビン酸含量 ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$ ) に及ぼす影響. 異なるアルファベットは, Tukey-Kramer 検定により  $P < 0.05$  において有意差があることを示す.



第5図 intact 実験系における塩ストレスと光条件が抗酸化酵素活性 ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ , SOD ;  $\text{units g}^{-1} \text{protein}$ ) 活性に及ぼす影響. 異なるアルファベットは, Tukey-Kramer 検定により  $P < 0.05$  において有意差があることを示す.

## (2) 塩ストレスと高温ストレス

ASA 含量には塩ストレスと高温ストレスの複合的影響は認められなかったが, 抗酸化酵素活性 (APX) は塩ストレスと高温によって高まるものがあった (第 6 図). このことから, 塩ストレスと温度条件が組み合わせることにより果実内で活性酸素の生成が高まり, 抗酸化システムが活性化したためと考えられる. しかしながら, 塩ストレスと高温ストレスの相互作用は, 抗酸化システムと ASA 含量で異なっており, 抗酸化システムの変化には依存しない ASA 含量の制御機能が働くことが示唆された.



第6図 塩ストレスと温度ストレス ( $40^{\circ}\text{C}$ ) がアスコルビン酸含量 ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ ) およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性 (APX,  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) に及ぼす影響. 異なるアルファベットは, Tukey-Kramer 検定により  $P < 0.05$  において有意差があることを示す.

(3) クロロフィル a 蛍光 (OJIP) 誘導期現象を用いた葉・果実のストレス評価

OJIP 誘導期現象を測定することにより、温度ストレスおよび塩ストレスの影響を明らかにすることができた。すなわち、温度ストレスにおいては、トマト葉と果実では低温ストレスより高温ストレスにおいて影響が大きいこと、様々な指標を算出することにより温度ストレスの種類および葉と果実の差異が明確に現れることが明らかになった。また、塩ストレスにおいては、果実の OJIP 曲線は塩ストレスによって上昇し、電子伝達エネルギーが上昇することが明らかになった。

一方、一般的に用いられる従来のストレス指標では、ストレス指標の種類や品種によって変化にばらつきが見られ、OJIP 誘導期現象のような鋭敏な変化は認められなかった。このことから、OJIP クロロフィル蛍光を測定し様々なパラメーターを算出することによって、温度ストレスや塩ストレスがトマト葉および果実の光化学系 II に与える影響を、ストレスの種類あるいは葉と果実の差異も含めて、従来のストレス指標より細部まで状態を把握することができることが明らかになった。

(4) 研究のまとめ

トマトのアスコルビン酸 (ASA, ビタミン C) および抗酸化システム (活性酸素消去システム) に及ぼす複合的環境ストレスの影響を検討した結果、ASA 含量は光強度の増加に伴い上昇するが、強光下においては塩ストレスによって ASA を利用した抗酸化システムが活性化するために ASA 含量が低下することが明らかになった。また、塩と温度の複合的環境ストレスは、ASA 含量には影響が認められないが、抗酸化システムには相互作用が認められ、互いに独立したストレス応答を示すことが示された。これらのことから、強光と高温ストレスは塩ストレスと相互作用を示し、その相互作用はストレスの種類によって異なることが明らかになった。さらに、クロロフィル a 蛍光誘導期現象が簡便なストレス評価に利用できることが明らかになった。これらのことから、トマトの抗酸化成分増加を目指した複合的環境ストレスを適切に与え評価するための基礎的知見が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Zushi, K., Matsuzoe, N., 2012. Comparative analysis of oxidative parameters, antioxidant content and antioxidant enzyme activity during fruit ripening in tomato pericarp and

pulp. Journal of Japanese Society for Horticultural Science 81, 109-116. 査読有り, <http://dx.doi.org/10.2503/jjshs1.81.109>

- ② Zushi, K., Matsuzoe, N., 2011. Utilization of correlation network analysis to identify differences in sensory attributes and organoleptic compositions of tomato cultivars grown under salt stress. Scientia Horticulturae 129, 18-26. 査読有り, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.011>
- ③ Zushi, K., Matsuzoe, N., Kitano, M., 2009. Developmental and tissue-specific changes in oxidative parameters and antioxidant systems in tomato fruits grown under salt stress. Scientia Horticulturae 122, 362-368. 査読有り, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.06.001>
- ④ Zushi, K., Matsuzoe, N., 2009. Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. Scientia Horticulturae 120, 181-187. 査読有り, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.005>

[学会発表] (計 11 件)

- ① 圖師一文, 梶原慎吾, 松原麻里子, 松添直隆, 2011. 塩ストレス下で栽培したトマトにおけるストレス指標と果実品質とのネットワーク分析, 生物環境工学会 2011 年全国大会, 平成 24 年 3 月 28 日~29 日, 北海道大学.
- ② 圖師一文, 梶原真悟, 松原麻里子, 松添直隆, 2011. クロロフィル a 蛍光の誘導期現象(OJIP) を利用したトマト葉および果実の塩(NaCl)ストレスの評価, 生物環境工学会九州支部会, 平成 23 年 11 月 10 日~11 月 12 日, 久留米市.
- ③ 圖師一文, 小野麻貴子, 松添直隆, 2010. In vitro および intact 条件下で栽培したトマト果実 ('マイクロトム') における抗酸化システムに及ぼす塩ストレスと光条件の相互作用, 生物環境工学会 2010 年全国大会, 平成 22 年 9 月 8 日~10 日, 京都大学.
- ④ 梶原真悟, 圖師一文, 松添直隆, 2010. クロロフィル a 蛍光の誘導期現象 (OJIP) を利用したトマト葉および果実の塩ストレス応答の評価, 園芸学会平成 22 年度秋季大会, 平成 22 年 9 月 19 日~20 日, 大分大学.
- ⑤ 田中朋佳, 小野麻貴子, 圖師一文, 松添直隆, 2010. トマト果実の抗酸化システムおよびプロリン含量に及ぼす塩ストレスと光条件の相互作用, 園芸学会平成 22 年度秋季大会, 平成 22 年 9 月 19 日~20 日, 大分大学.

- ⑥ 圖師一文, 2010. 塩および水分ストレスとトマト果実の機能性成分ーリコペンとアスコルビン酸について, 園芸学会平成 22 年度秋季大会, 平成 22 年 9 月 19 日~20 日, 大分大学.
- ⑦ 圖師一文, 松添直隆, 2010. トマト果実の官能特性に影響する食味成分を明らかにするためのネットワーク分析の利用, 園芸学会平成 22 年度秋季大会, 平成 22 年 9 月 19 日~20 日, 大分大学.
- ⑧ 圖師一文, 梶原真悟, 佐藤和, 松添直隆, 2010. クロロフィル a 蛍光の誘導期現象 (OJIP) を利用したトマト葉および果実の温度ストレス応答の評価, 生物環境工学会九州支部会, 平成 22 年 11 月 12 日~13 日, 別府.
- ⑨ 圖師一文, 小野麻貴子, 松添直隆, 2009. 光強度が *in vitro* で培養したトマト果実のアスコルビン酸含量および抗酸化システムに与える影響, 園芸学会平成 21 年度秋季大会, 平成 21 年 9 月 26 日~28 日, 秋田大学.
- ⑩ 小野麻貴子, 圖師一文, 松添直隆, 2009. *In vitro* 培養トマト果実におけるアスコルビン酸および抗酸化システムに及ぼす光条件と塩ストレスの相互作用, 日本生物環境工学会 2009 年大会, 平成 21 年 9 月 5 日~8 日, 九州大学.
- ⑪ 小野麻貴子, 圖師一文, 松添直隆, 2009. トマト果実 ('マイクロトム') の抗酸化成分含量および抗酸化酵素活性に及ぼす塩ストレスと光条件の相互作用, 日本生物環境工学会九州支部会, 平成 21 年 11 月 28 日~29 日, 宮崎大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

圖師 一文 (ZUSHI KAZUFUMI)  
尚綱大学短期大学部・准教授

研究者番号 : 50435377