

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780245

研究課題名(和文)環境ストレス下のトマトにおける高品質安定生産に向けたネットワーク分析の応用

研究課題名(英文)Application of network analysis for high quality tomato fruit production using environmental stress

研究代表者

圖師 一文(Zushi, Kazufumi)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：50435377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題の目的は、ネットワーク分析を用いることで、環境ストレス下のトマトにおける果実品質の相互作用の解明およびストレス指標から果実品質の変化を予測することである。まず、トマトのストレス指標としてクロロフィルa蛍光誘導期現象が利用できることを明らかにした。次に、さまざまな塩ストレス強度下でトマトを栽培し、塩ストレスによる食味および機能性成分の変化の可視化にネットワーク分析が利用できることを明らかにした。さらにストレス指標と果実品質の相関ネットワーク分析を行い、塩ストレスによる果実品質の変化を簡易に推測することができることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A purpose of this study is to elucidate the interaction of the fruit quality in the tomato under environmental stresses by using a correlation network analysis, and to predict a change of the fruit quality from a stress indicator. At first, I elucidated that a chlorophyll a fluorescence transient was one of simply and quickly stress indicators for tomato leaf and fruit under environmental stress. Next, using network visualizations of fruit organoleptic and health-promoting compounds, I indicated that the different connectivity and key components in network may lead to different metabolic changes under salt stress, and suggested the possibilities of correlation network analysis for the prediction of change in fruit quality grown under salt stress. Furthermore, a correlation network analysis between stress indicators and fruit qualities could predict a change of the fruit quality from several a stress indicators such as chlorophyll a fluorescence transient.

研究分野：生物環境工学

キーワード：トマト クロロフィルa蛍光 果実品質 塩ストレス ネットワーク分析 温度ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

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、食料生産の現場では、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。現在、トマトにおいては、水・塩ストレスを利用した高品質果実生産が試みられている。これまでの研究において、水・塩ストレスがトマトの果実品質に及ぼす影響とそのメカニズムの解明に取り組み、水・塩ストレス下のトマト果実の官能特性、食味成分(糖、有機酸、アミノ酸)、抗酸化成分などのさまざまな成分が変化すること、その変動メカニズムとして果実のストレス防御反応が関連していることが明らかにされている。

しかしながら、環境ストレス下のトマトの果実内成分がどのように相互作用しているかは明らかにされておらず、これらが明らかにできれば、果実品質の変化を予測し、それらに基づいた最適な環境調節技術の確立につながると考えられる。

また、応用への展開として、環境ストレス強度を適切に評価し、最適なレベルに制御することで収量低下や生理障害の発生を抑える必要がある。このためには、ストレス診断のためのさまざまな指標(水分状態、光合成機能、クロロフィル a 蛍光など)によって最適なストレス強度を把握し、それらが果実品質とどのように関連しているかを解明する必要がある。

近年、社会学や生物学分野では要因間の関連性を解明するためにネットワーク分析が行われている。ネットワーク分析は、人々の社会的なつながり、伝染病の感染、インターネット、生態系などにおいて、個々の要因を点で、つながりを線で示し、関連性を可視化する手法である。また、さまざまな指標を用いることで、異なるネットワーク間の構造や重要な要因などを比較できる。したがって、ネットワーク分析を用いることで、環境ストレス下のトマトにおける果実品質の相互作用の解明およびストレス指標から果実品質の変化を予測することが可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、環境ストレス下のトマトにおける高品質安定生産技術確立に向けた基盤技術を得るために、これまでにない新しいアプローチとしてネットワーク分析の応用を試み、以下の3点を明らかにすることを目的とした。

- (1) ネットワーク分析を用いて環境ストレス下のトマトにおける果実品質(食味成分、機能性成分)の相互作用を可視化する。
- (2) ネットワークの特徴量から、環境ストレスがネットワーク構造に及ぼす影響を調べ、果実品質におけるストレス適応のダイ

ナミクスを明らかにする。

- (3) ネットワーク上で果実品質とつながりが強いストレス指標を見つけ、ストレス指標を用いた果実品質予測技術の確立に向けた数理モデルを明らかにする。

## 3. 研究の方法

図1に従い、以下の4課題について研究を行った

### (1) ストレス指標としてのクロロフィル a 蛍光 OJIP 誘導期現象の解析

果実品質の予測技術を確立するためには、簡便かつ鋭敏なストレス指標の測定技術を確立する必要がある。そこで、高温(40°C)および低温(4°C)ストレスを短時間与えたトマト葉と果実のクロロフィル a 蛍光 OJIP 誘導期現象の変化とその変化から得られるパラメーター(JIP-パラメーター)を詳細に検討し、ストレス指標として利用できるかどうか検討した。このとき実験に供試した葉と果実は、植物体から切り離し、インキュベータ内で温度処理を1時間、24時間行った。

### (2) ネットワーク分析による塩ストレス下の果実内成分相互作用の可視化

トマトに環境ストレスを付与し、ストレス指標および収穫後の果実品質構成要素を測定後、ネットワーク分析を行うために、果実特性の異なるトマト品種(ハウス桃太郎、ミニキャロル)を用いさまざまな塩ストレス強度(25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM)下でトマトを栽培した。栽培は循環型養液栽培装置で行い、第1果房の開花期から実験終了時まで塩ストレスを与えた。完熟段階に達した果実を収穫後、高速液体クロマトグラフィーで糖、有機酸およびアミノ酸含量を測定した。また、機能性成分として、アスコルビン酸(ビタミンC)、ポリフェノール、リコペン、β-カロテン、抗酸化活性(ABTS法、DPPH法)を測定した。その後、成分間の相関分析を行い、有意差が認められ項目のみを用いてネットワーク分析を行った。ネットワーク分析には Pajek 2.0 (<http://mrvar.fdv.uni-lj.si/pajek/>)を用い、ネットワークを可視化するとともにネットワーク構造に関する指標を算出した。

### (3) ストレス指標を用いた果実品質予測技術の確立

上述した実験において、葉のストレス指標としてクロロフィル a 誘導期現象(OJIP)、水ポテンシャル、クロロフィル量の変化などを測定し、果重、糖度、酸度とともに相関分析を行い、有意差が認められ項目のみを用いてネットワーク分析を行った。

### (4) 異なる品種におけるストレス指標を用いた果実品質予測技術の確立

異なる品種におけるストレス指標を用いた果実品質予測技術を確立するために、果実特性の異なる品種を 100 mM NaCl 下で栽培

し、ストレス指標ならびに果実品質（糖度、酸度）を測定し、ストレス指標から品質を予測できるか検討した。

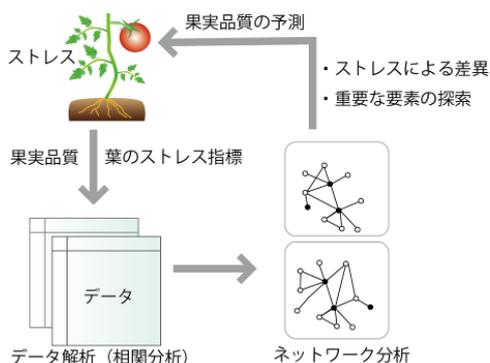


図1 研究概念図。

#### 4. 研究成果

##### (1) ストレス指標としてのクロロフィル a 蛍光 OJIP 誘導期現象の解析

高温 (40°C), 低温 (4°C) ストレスを与えたトマト葉と果実のクロロフィル a 蛍光 OJIP 誘導期現象の変化とその変化から得られる様々なパラメーターを詳細に検討した結果、ストレス処理後 1 時間後においてストレスに敏感に反応するパラメーターをみいだすことができるとともに、葉と果実の差異および低温ストレスと高温ストレスの反応の差異が明らかになった (図 2)。このことから、ストレス指標としてのクロロフィル a 蛍光 OJIP 誘導期現象の有用性の確認ならびにストレス指標を用いた果実品質の予測技術を確立するための基盤技術が確立できた。

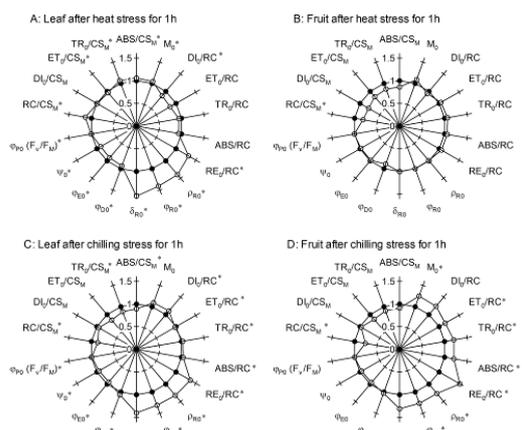


図 2 高温 (40°C) および低温 (4°C) ストレスを 1 時間与えたトマト葉と果実のクロロフィル a 蛍光 OJIP 誘導期現象から算出したさまざまなパラメーターの変化。

##### (2) ネットワーク分析による塩ストレス下の果実内成分相互作用の可視化

さまざまな塩ストレス強度下でトマトを栽培し、果実内成分を測定した結果、塩ストレス強度の増加に伴って増加する成分、ある

いは低下する成分および影響がない成分があった (図 3, 4)。また、これらの変化は品種によって異なった (データ省略)。

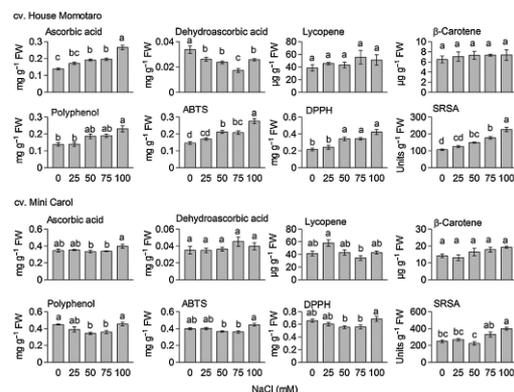


図 3 さまざまな塩ストレス強度下で栽培したトマト (品種: ハウス桃太郎) の糖, 有機酸およびアミノ酸含量の変化。

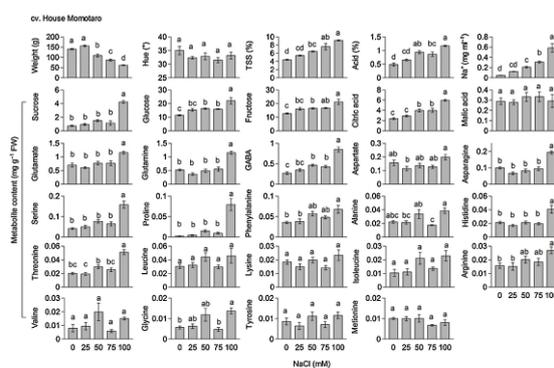


図 4 さまざまな塩ストレス強度下で栽培したトマト (品種: ハウス桃太郎, ミニキャロル) の機能性成分含量の変化。

これらのデータを元に相関分析した後、有意差が認められるものを抜き出しネットワーク分析を行った結果、1) 個々の成分の相互作用 (つながり具合)、2) ハブ (多くのつながりを持つ) となる果実品質の有無、3) ネットワーク構造の品種間差が明らかになった (図 5)。具体的には、1) においては、品種によって異なるが糖、有機酸などの食味成分とアスコルビン酸、ポリフェノール、抗酸化活性などの機能性とのつながり具合が高かった。2) においては、抗酸化活性、クエン酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸、アスコルビン酸がネットワーク上のハブとなり、塩ストレスによる品質の変化に重要な役割を果たすことが明らかになった。3) においてはネットワーク特性を算出することに大きな品種間差が認められることがより明らかになった。

これらのことから、ネットワーク分析を用いて塩ストレス下のトマトにおける果実品質 (食味成分、機能性成分) の相互作用を可視化でき、ネットワークの特徴量から、塩ストレスがネットワーク構造に及ぼす影響ならびにその品種間差を明らかにできた。

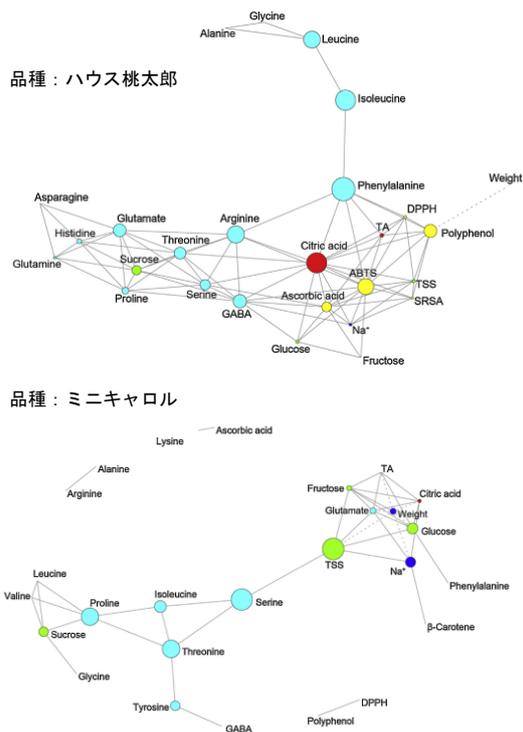


図 5 さまざまな塩ストレス強度下で栽培したトマト（品種：ハウス桃太郎，ミニキャロル）の果実内成分の相関ネットワーク分析。頂点の大きさは次数（他の頂点とのつながり具合）の数を示す。

### (3) ストレス指標を用いた果実品質予測技術の確立

さまざまな塩ストレス強度下でトマトを栽培し、葉のストレス指標を測定した結果、塩ストレス強度の増加に伴って増加（クロロフィル a 蛍光誘導期現象，イオン溶出量など）あるいは低下する指標（水ポテンシャルなど）があった（図 6，7）。

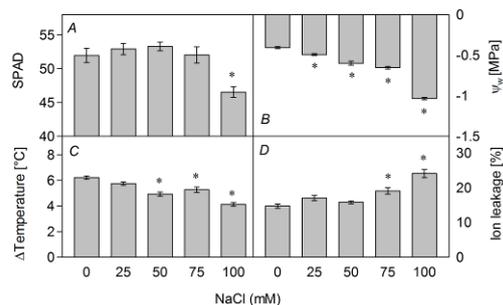
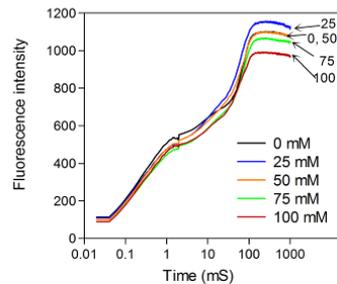


図 6 さまざまな塩ストレス強度下で栽培したトマトの葉のストレス指標の変化。A：クロロフィル量（SPAD 値），B：夜明け前の水ポテンシャル，C：葉温（葉温－気温），D：イオン溶出量（%）。

次にこれらのストレス指標と果実の糖度，酸度などの品質との相関関係から相関ネットワークを作成した。その結果，糖度は 10，酸度は 4 のストレス指標と相関関係があり，

クロロフィル a 蛍光誘導期現象から算出される Area（光化学系 II の電子供与体から電子の移動効率を示す指標）および水ポテンシャルが糖度と酸度ともに相関を持つストレス指標であった（図 8）。このことから，塩ストレスのストレス指標として水ポテンシャルやクロロフィル a 蛍光誘導期現象を測定し，その変化を可視化することで，糖度や酸度の変化を予測することができることが明らかになった。

A: OJIP curve



B: JIP test

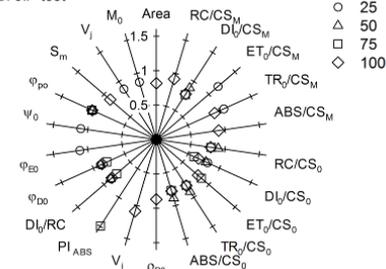


図 7 さまざまな塩ストレス強度下で栽培したトマトの葉のクロロフィル蛍光誘導期現象（OJIP）の変化。A は OJIP カーブ，B は OJIP カーブから算出したさまざまなパラメーターを示す（対照区を 1 で示し，処理間差が認められた指標のみ示した）。

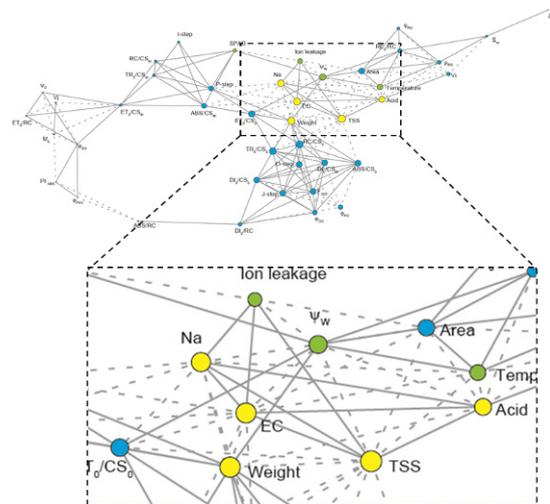


図 8 さまざまな塩ストレス強度下で栽培したトマトの葉のストレス指標と果実品質との相関ネットワーク。頂点の大きさは次数を示し，色はそれぞれの項目群（黄，果実品質；緑，ストレス指標；青，クロロフィル a 蛍光誘導期現象）を示す。

#### (4) 異なる品種におけるストレス指標を用いた果実品質予測技術の確立

葉の塩ストレス指標として水ポテンシャルとクロロフィル量 (SPAD 値) の結果を図 9 に示す. SPAD 値は, 品種 SS のみで塩ストレス区の方が対照区より高かったが, 他では影響がなかった. 葉の水ポテンシャルは, すべての品種で塩ストレスによって低下した. 葉の OJIP 曲線は, 品種 MC の O-, J-, I-step のみで塩ストレス区の方が対照区より高かったが, 他では影響がなかった (データ省略). これらの結果から, 葉の OJIP 曲線は, 水ポテンシャルと比べて品種によって影響が認められない場合があるので, 塩ストレスの品種間差を示す指標として充分でないことが明らかになった.

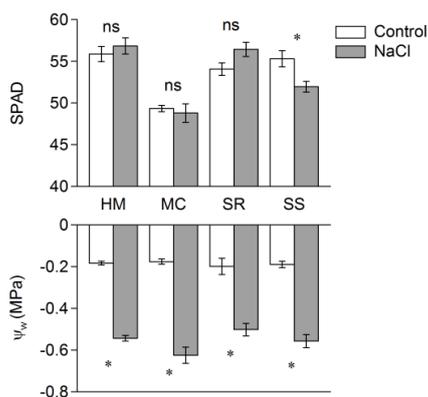


図 9 塩ストレスが葉のクロロフィル量 (SPAD) および水ポテンシャル ( $\Psi_w$ ) に及ぼす影響の品種間差.

一方, 果実の OJIP 曲線では, すべての品種で塩ストレス区の方が対照区より高かったが, その上昇の割合には品種間差が見られ, 上昇率は O-, J-, I-, P-step すべてで品種 HM が高く, 品種 SR で低かった (図 10). このことは, OJIP 曲線は, 葉と異なり果実では塩ストレスの指標および品種間差を明らかにするための指標として利用できることが明らかになった.

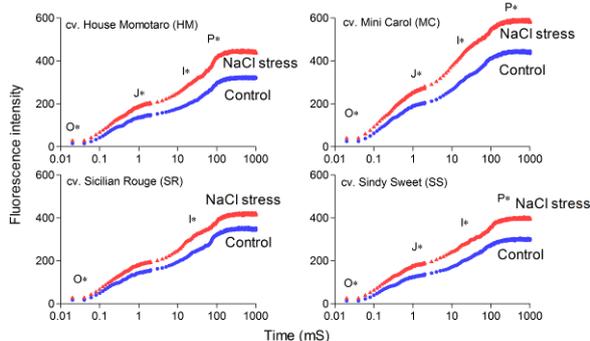


図 10 塩ストレス (100 mM NaCl) が果実のクロロフィル a 蛍光誘導期現象に及ぼす影響の品種間差.

次に, 果実のストレス指標から果実品質を予測するために, 塩ストレスと対照区の比を用いて相関分析を行った. この結果, 果実の糖度はクロロフィル蛍光誘導期現象の I-step と高い相関があり一次の回帰直線を用いることにより簡単に糖度の予測が可能であることが明らかになった (図 11).

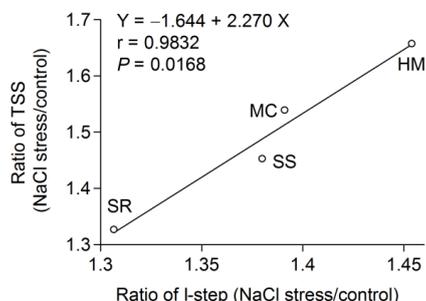


図 11 塩ストレス下で栽培したさまざまなトマト品種における果実のクロロフィル a 蛍光誘導期現象 (I-step) と糖度の相関関係.

#### (5) 研究のまとめ

本研究の結果から, ネットワーク分析を用いることで, 塩ストレス下のトマトにおける果実品質の相互作用ならびに塩ストレスがネットワーク構造に及ぼす品種間差が明らかになった. また, 簡易・迅速に測定出来るストレス指標としてクロロフィル a 蛍光誘導期現象を用いることによりストレス指標から果実品質の変化を予測することが出来た.

今後は, 本研究期間では塩ストレスにおける結果しか得ることができなかったため, 乾燥ストレスなどの他の環境ストレスについての研究を進めていきたい.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① [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. 査読有り](#)
- ② [Zushi, K., Ono, M., Matsuzoe, N., 2014. Light intensity modulates antioxidant systems in salt-stressed tomato \(\*Solanum lycopersicum\* L. cv. Micro-Tom\) fruits. Scientia Horticulturae 165, 384-391. 査読有り](#)
- ③ [Zushi, K., Kajiwara, S., Matsuzoe, N., 2012. Chlorophyll a fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. Scientia Horticulturae 148, 39-46. 査読有り](#)

〔学会発表〕(計5件)

- ① 圖師一文, 橋本雄司. トマトにおける塩ストレス指標としての OJIP クロロフィル a 蛍光誘導期現象の品種間差. 日本生物環境工学会九州支部会. 2014年11月20日~21日. 九州沖縄農業研究センター(熊本県).
- ② 圖師一文, 松添直隆. 塩ストレスがトマトの抗酸化成分および抗酸化能に及ぼす影響. 日本生物環境工学会. 2013年9月3日~5日. 香川大学(香川県).
- ③ 圖師一文. 環境ストレスによる品質の変化を予測するためのネットワーク分析の利用. 園芸学会平成25年度秋季大会シンポジウム. 2013年9月20日~22日. 岩手大学(岩手県).
- ④ 圖師一文, 梶原慎吾, 松原麻里子, 松添直隆. 塩ストレス下のミニトマトおよび大玉トマトにおけるストレス指標と果実内成分との関連性. 園芸学会平成24年度秋季大会. 2012年9月22日~24日. 福井県立大学(福井県).
- ⑤ 圖師一文, 梶原慎吾, 松原麻里子, 松添直隆. 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食味・機能性成分との関連を明らかにするためのネットワーク分析の利用. 日本生物環境工学会2012年全国大会. 2012年9月4日~7日東京大学(東京都).

〔その他〕

ホームページ等:

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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

圖師一文 (ZUSHI, Kazufumi)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号: 50435377