

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2007 年度 ～ 2008 年度
 課題番号：19780081
 研究課題名 (和文) トマト果実の成熟に伴うステロイドアルカロイド代謝の解明
 研究課題名 (英文) Accumulation of steroidal alkaloids during fruit ripening of tomato.
 研究代表者 飯島 陽子 (財団法人かずさ DNA 研究所・産業基盤開発研究部・特任研究員)
 研究者番号：90415456

研究成果の概要： トマト果実の成熟に伴い、高蓄積がみられる主要なステロイドアルカロイド、esculeoside A の生成について調べた。Esculeoside A が、トマチンより生合成すると推測し、その中間体の存在を LC-MS および NMR により確認した。次に、エチレン受容・生成変異体の比較、およびトマトをエチレン暴露することにより、トマチンから esculeoside A への変換には、エチレンが関与していることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：物質生産・ステロイドアルカロイド・トマト・果実成熟

1. 研究開始当初の背景

(1) トマト果実のステロイドアルカロイド組成

トマトなどナス科の植物は、トマチンなどのステロイドアルカロイドを特有の代謝物として生成することが知られている。しかし、

その構造は分子量が 1000 を超える複雑な構造を持つ代謝物であるため、単離、構造決定に限った報告がほとんどであった。そのため、実際にトマト果実に何種類のステロイドアルカロイドがどのような組成で存在するのか不明で、今までにステロイドアルカロイド

を網羅的に調べた報告はなかった。

(2) 赤色成熟トマトの主要ステロイドアルカロイド (Esculeoside A) の生成について

成熟赤色トマト果実では主要なステロイドアルカロイドとして **esculeoside A** が蓄積することが最近分かった。また、**esculeoside A** のアグリコンは、抗動脈硬化や抗がん作用などの機能性を持つことが明らかになってきており、その生成、蓄積の解明は、付加価値の高いトマトの作成に繋がる。しかし、当時は **esculeoside A** が赤色果実から多く単離されたという、構造決定のみの報告しかなく、トマト中に含まれる絶対定量やどういった条件で生成されるのか全く分かっていなかった。特に、**esculeoside A** はその構造から、トマチンが修飾をうけて生成されることが推測されるが、その生成機構は分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、トマト果実のステロイドアルカロイドについて、分子レベルでの代謝機構の解明を最終目的とした。(1) そのためにデータ基盤として、まずトマトの構造未知のステロイドアルカロイドを質量分析計 (LC-MS) を用いて網羅的に分析し、その構造相関を調べ、代謝中間体の構造や代謝フローの予測を試みた。(2) 次に、多くの赤色トマトで主要なステロイドアルカロイドである **esculeoside A** に着目し、**esculeoside A** の品種による定量を行い、成熟段階、エチレン処理、成熟変異体株など、様々な比較解析により、**esculeoside A** が生成する条件を見出した。(3) 同時に、トマチンから **esculeoside A** への推定代謝における中間体の存在をMSにより推定し、単離構造決定した。(4) 成熟段階の異なる(4段階)果実を用いて、マイクロアレイを行い、**esculeoside A** の生成に関

与する候補遺伝子をスクリーニングし、機能同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 質量分析計を用いたステロイドアルカロイドの網羅的分析

ステロイドアルカロイドは UV 吸収が弱いので、通常 LC 分析では感度が悪くなる。本研究では、LC-ESI-MS を用い、分析した。特に、MS 部においては、組成式を得ることが可能な、精密 MS (LC-FTICR-MS) を用いて、構造を精査した。

(2) 品種による **esculeoside A** 含量の比較

esculeoside A の分析系を確立し、市販の赤色および黄色トマトを購入し、16 品種による **esculeoside A** 含量の比較を LC-MS により行った。

(3) 異なる成熟段階、エチレン処理、成熟変異体を用いた **esculeoside A** およびその中間体の比較分析

esculeoside A 生成の挙動を確認するため、①成熟緑色期から赤色期において 5 段階に分けて、**esculeoside A** およびともに変動する他のステロイドアルカロイドを確認した。②トマトはエチレン受容によって赤色することから、成熟緑色期の果実をエチレン暴露することによって、**esculeoside A** に対するエチレンの関与について調べた。③エチレン生成変異体 (**nor, rin**) および受容変異体 (**Nr**) を用いて、**esculeoside A** および他のステロイドアルカロイドの蓄積について調べた。

(4) **esculeoside A** 生成中間体の構造決定

(3)の実験により、**esculeoside A** の中間体と思われる成分が見出されたので、それらが一番蓄積すると考えられるブレイカー段階の果実を集め、中間体を各種クロマトグラフィにより分取、精製し、NMR により構造決定を行った。

(5) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現系を用いた *esculeoside A* 生成に関与する候補遺伝子のスクリーニング

成熟段階の異なるトマト果実から RNA を抽出し、マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現を調べ、成熟に伴って変動する遺伝子をスクリーニングした。また、トマト EST データベース等を用いて、果実特異的で成熟に伴って変動する遺伝子群から、*esculeoside A* の生成に関与すると思われる、配糖化酵素のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) ステロイドアルカロイドの網羅的分析

検出部に FTICR-MS を用いた LC-ESI-MS (positive mode) により、トマト果実を分析し (cv. Micro Tom)、49 種のステロイドアルカロイドを検出した。その組成は、果実の成熟に伴い、分子量が大きくなる傾向を示した。

(2) 品種による *esculeoside A* 含量の比較

16 種の市販のトマトから *esculeoside A* の量を定量した (図 1)。*esculeoside A* 量は色に関係なく約 50~500 $\mu\text{g/g}$ fresh weight 含み、果実のサイズが小さいほどその含量が多いことが分かった。

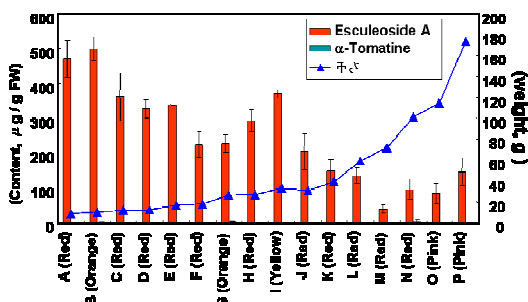


図 1. 市販トマト中の *esculeoside A* 含量

(3) 異なる成熟段階、エチレン処理、成熟変異体における *esculeoside A* の挙動

果実の緑色段階では存在しない *esculeoside A* がどのように赤色段階で蓄積

されるのかを知るため、まず異なる成熟段階における *esculeoside A* 量ならびに、トマチンの量を求めた (cv. Carol)。その結果、*esculeoside A* は、果実の成熟によって蓄積が増加し、赤色になる手前のオレンジ色の段階 (Turning) で最大となり、過成熟により減少する傾向を示した (図 2)。一方、トマチンは成熟に伴い減少し、赤色段階ではほとんど検出されず、量的な関係から *esculeoside A* は成熟に伴いトマチンから生成されることが推測できた。次に、トマトの成熟はエチレン受容により起こることを考慮し、緑色段階での果実に対し、エチレン処理を行った。コントロールとして空気暴露したものを用い比較したところ、エチレン処理をしたほうが有意に *esculeoside A* が増加し、トマチンは減少した。また、エチレン生成ならびに感受に変異のある成熟変異トマトを用いて *esculeoside A* の挙動を調べた。コントロールである野生種が赤色段階になった受粉後過日でもサンプリングし、比較したところ、いずれも *esculeoside A* はほとんど検出されなかった。以上の結果より、*esculeoside A* の蓄積はエチレンの作用を受けることが明らかとなった。

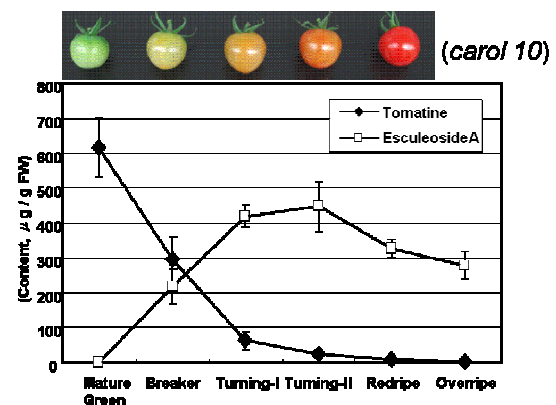


図 2. *esculeoside A* およびトマチンの果実成熟中の変化

(4) *esculeoside A* 生成中間体の探索と構造決定

トマチンから *esculeoside A* が生成すると

仮定した場合、異性化、二つの水酸化と配糖化、アセチル化反応が考えられる。これらの組み合わせにより、仮想中間体を推測し、それらが果実成熟中、成熟変異体等に存在するかどうかを MS により分析した。その結果、①23 位水酸基、②23 位水酸基+アセチル基、③23 位水酸化+アセチル基+水酸基の3種の存在が多段階 MS/MS による精査によって推測された (図3)。さらに、これらの成分は、esculeosideA が生成する前に蓄積し、esculeosideA 生成と共に消失することから、有力な中間体候補と考えた。また、これらの成分は成熟変異体には比較的多く検出され、①~③の生成までは、あまりエチレンの影響が大きいことを示唆した。次に、絶対構造の異性化を確認するため、ブレイカー段階のトマト 10kg から①~③に該当するピークを各種クロマトグラフィによって、分離・精製し、NMR により構造を確認した。その結果、トマチンは 23R 体であるが、①~③は 23S 体であり、始めの水酸化の段階で異性化が起こることが分かった (図3)。

(5) 網羅的遺伝子発現系を用いた esculeoside A 生成に関与する候補遺伝子のスクリーニング

esculeosideA の生成と中間体の挙動から、最終の配糖化段階が成熟の影響を受けやすいことを確認したことから、マイクロアレイおよびいくつかの公的 EST データベース検索により、候補配糖化酵素遺伝子として4種類をスクリーニングした。配列の比較によりそのうち二種類はフラボノイド配糖体に関与すると考えられ、残りの二種類について機能同定を進めている最中で、この結果は期間内に終結には至らなかった。

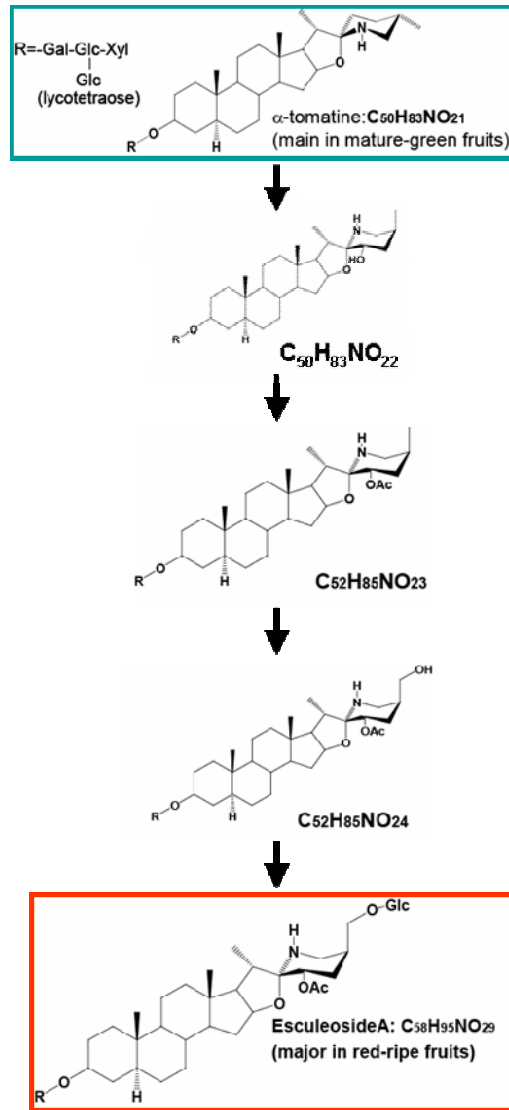


図3. MS、NMR による中間体の精査により考察したトマチンから esculeoside A への生成

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 1 件)

- ① Yoko Iijima, Yukio Fujiwara, Takeaki Tokita, Tsuyoshi Ikeda, Toshihiro Nohara, Koh Aoki, and Daisuke Shibata Involvement of Ethylene in the Accumulation of Esculeoside A during Fruit Ripening of Tomato (*Solanum lycopersicum*). J. Agric Food Chem., 57, 3247-2352, 2009, 査読あり

〔学会発表〕(計 2件)

- ① 飯島陽子、櫻井望、鈴木秀幸、青木考、柴田大輔
ライプニング変異体トマト果実の代謝プロファイル解析、第50回植物生理学会年会、2009年3月22日、名古屋大学(名古屋)
- ② 飯島陽子、藤原章雄、時田岳亮、池田剛、野原稔弘、青木考、柴田大輔
トマト果実の主要グリコアルカロイド分析とその生成における果実成熟の影響、日本農芸化学会2008年度大会、2008年3月28日、名城大学(名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 陽子 (かずさDNA研究所・産業基盤開発研究部・特任研究員)

研究者番号：90415456