

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 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580075

研究課題名（和文） 環境ストレスと果実糖代謝のシグナルクロストーク現象の実態解明

研究課題名（英文） Studies on the cross-talk between environmental stress and sugar metabolism in developing tomato fruits.

研究代表者

松倉 千昭 (MATSUKURA CHIAKI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60361309

研究成果の概要（和文）：トマトを材料に、果実内糖、有機酸、アミノ酸代謝と栽培環境ストレス（塩類ストレス）の相互作用の実態解明を行った。その結果、1) 果実の糖蓄積には果実発達初期における糖転流とデンプン蓄積制御が重要であり塩類ストレスはそれらを促進すること、2) 塩類ストレスはアミノ酸合成の過程に影響するが有機酸代謝には大きな影響を及ぼさないことを明らかにした。併せて、塩ストレス処理による種子発芽促進作用についても解明を行い、これらの現象にジベレリンの生合成促進が関わることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this research, a cross-interactions of environmental stress such a salinity and the primary metabolism was investigated in a developing fruit of tomato. It was revealed that i) salinity stress enhanced sugar accumulation by promoting carbon influx and starch accumulation in an immature fruit, ii) salinity stress enhanced amino-acid biosynthesis but it was not so effective on metabolism of organic acids. Additionally, the effect of salinity treatment on seed germination was also studied. The salinity stress significantly enhanced seed germination through activation of gibberellin biosynthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：糖、アミノ酸、有機酸、デンプン、ADP-glucose pyrophosphorylase、トマト、果実、塩類ストレス

1. 研究開始当初の背景

果実成分は果樹や果菜類など主要園芸作物において食味・消費者嗜好性を左右する最重要形質の一つである。開花後の栽培環

境ストレス（乾燥・塩類等）により糖度やγ-アミノ酪酸（GABA）などのアミノ酸含量が増加することが以前から知られている。この現象は環境ストレスが代謝制御に干渉し

た結果であると考えられるが、これまで専ら「水分ストレスにより果実肥大が抑制された果汁濃縮によるもの」と説明され、ストレス感受から成分蓄積に至る作用機序について分子レベルの解析は殆どなされてこなかった。従来、トマト果実の糖蓄積レベルは主として sucrose synthase や apoplastic invertase によって制御されるという考えが主流であった。研究代表者は自身の先行研究としてトマト果実における糖蓄積制御機構の解明に取り組み、果実発達初期のデンプン生合成が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。本研究では、植物におけるデンプン生合成の律速酵素である ADP-glucose pyrophosphorylase (以下 AGPase) の発現制御メカニズムに注目し、栽培環境ストレス(塩類ストレス)と糖代謝制御の相互作用実態の解明に取り組んだ。また、糖と並んでトマト果実における主要同化産物であるアミノ酸・有機酸の代謝制御についても塩類ストレスとの相互作用実態の解明を行った。従来、トマトのアミノ酸、有機酸に関する解析は、食味に影響するグルタミン酸や、抗酸化作用があるアスコルビン酸が主な解析対象とされてきた。本研究において研究代表者は、トマト果実に多量に含まれる健康機能性成分 γ -アミノ酪酸 (GABA) およびリンゴ酸に注目して解析を行った。上記に加え、本研究では塩ストレス処理による種子発芽促進現象にも注目し、その作用機構の解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究課題では、果実における栽培環境ストレス(塩類ストレス)と糖代謝のシグナルクロストークの実態を明らかにすることを主な目的とした。具体的にはデンプン生合成系に注目し(1)果実発達初期過程における AGPase 遺伝子群の発現制御・ストレス応答様式の解明、(2) AGPase 遺伝子群のうち果実において主に発現している *AgpL1* および *AgpS1* 遺伝子の転写因子単離と機能解析、(3) *AgpL1* および *AgpS1* RNAi 形質転換体におけるストレス応答、果実シンク強度、糖転流動態、ソース葉における光合成関連遺伝子発現への影響の解析、(4) ABA 生合成の初発酵素 9-cis-epoxycarotenoid di-oxygenase (NCED) 遺伝子の過剰発現形質転換体におけるストレス応答、糖代謝・糖転流動態、AGPase 遺伝子の発現解析を行うことを目的とした。

当該課題開始後、糖代謝系と密接に連動している有機酸・アミノ酸代謝と塩類ストレスの相互作用解明についても研究目的に加え、果実発達過程におけるアミノ酸、有機酸代謝の重要酵素遺伝子についてストレ

ス応答様式の解明を行った。また、同様に、塩類ストレスによる種子発芽促進現象についても解析対象に加え、その生起機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では矮性ミニトマト品種「マイクロトム」を研究材料に用いた。目的(1)の解析では、開花後10-14日前後の果実を用い、半切果実を糖、塩類、植物ホルモン等成分を含んだ培地上に一定時間置床した後、遺伝子発現を解析することにより AGPase 遺伝子群の発現制御・ストレス応答様式の解明を行った。

有機酸・アミノ酸代謝と塩類ストレスの相互作用解析においては、薄膜水耕法により育成した植物体を開花後、高塩ストレス条件(160mM NaCl)と対照区(0mM NaCl)で各々処理し、開花後日数に分けて果実をサンプリング後、遺伝子発現解析、果実成分分析(HPLC, GC-MS, 酵素化学的定量等)、トレーサー解析などを行った。

4. 研究成果

(1) 前述したように、研究代表者は、先行研究において果実におけるデンプン代謝・糖蓄積メカニズムについて解析を進め、果実糖蓄積には果実初期における果実への転流とデンプン蓄積が重要であること、デンプン蓄積制御には *AgpL1* ならびに *AgpS1* 遺伝子が関与することを明らかにしてきた。これら解析の発展として、本研究では ① *AgpL1* の発現は糖により特異的に促進されるが、ABA、浸透圧には応答しない、② *AgpS1* の発現は Na⁺ により促進されるが Cl⁻、糖、ABA、浸透圧には応答しない、③ トマト果実における AGPase の発現制御系がヘキソカイネースを介在する糖シグナリング依存経路 (*AgpL1*) と非依存経路 (*AgpS1*) の二系統存在する、④ *AgpL1* および *AgpS1* が塩類ストレスに転写レベルで応答していることから、塩類ストレスと糖蓄積の作用交叉が AGPase 転写制御過程で生じていることを明らかにした。

(2) AGPase 遺伝子群のうち、まだ未単離であった *AgpS1* 遺伝子のプロモーター領域 2 kbp を単離した。塩基配列を解読した結果、同プロモーター領域には多数のストレス応答性シス因子が存在することが明らかとなった。これらの配列に GUS 遺伝子を連結した過剰発現ベクターを作製し、アグロインジェクション法によりトマト果実へ導入したところ、同プロモーター配列が果実において発現誘導活性を有することを確認した。しかし、転写因子については *AgpS1*、*AgpL1*

ともに単離・同定には至らなかった。

(3) *AgpSI* について未熟果実特異的 phosphoenolpyruvate carboxylase2 (*PEPC2*) 遺伝子プロモーター および恒常的発現 35S プロモーターで駆動した RNAi 形質転換体を作成した。形質転換体において、標的遺伝子である *AgpSI* の発現を解析したところ、非形質転換体と比較して *Ppc2::AgpSI^{RNAi}* において 12~23%、*P35S::AgpSI^{RNAi}* において 10% 以下に抑制されていることが確認された。開花後 18 日目の緑熟期果実におけるデンプン含量を測定した結果、*Ppc2::AgpSI^{RNAi}* においては対照区の 10%、*P35S::AgpSI^{RNAi}* においては対照区のほぼ 0% にまで蓄積が抑えられている系統を各々 1 系統獲得した。これらの系統について生育調査を行なったところ、*P35S::AgpSI^{RNAi}* において、開花後草丈、新鮮重、乾物重が低下し生育が抑制されていることが確認された。この系統における赤熟果実（開花後 42 日目）の可溶性糖含量は、対照区と比較して約 40% 減少しており、その影響はスクロース > フルクトース > グルコースの順に大きかった。*Ppc2::AgpSI^{RNAi}* 系統については生育抑制は殆ど見られなかったものの、果実収量には減少が見られた。果実糖含量については、可溶性糖含量は対照区と同程度であったが、スクロース含量は約 3 割減少していた。これまで、トマトにおいて果実糖度に対するデンプンの具体的な貢献度は不明であったが、本研究により初めて 4 割前後であることを明らかにした。他方、*AgpL1* RNAi 形質転換系統については、*AgpSI* 同様 *PEPC2* プロモーター および 35S プロモーター駆動型の系統を作成したものの、標的遺伝子の発現抑制率は 7 割程度に留まり、果実内デンプン蓄積および糖含量への顕著な影響は見られなかった。これらの系統における塩類ストレス応答性や糖転流動態、ソース葉における光合成関連遺伝子発現への影響の解明は今後の課題である。

(4) *NCED* 遺伝子過剰発現形質転換体を用いたストレス応答、糖代謝・糖転流動態、*AGPase* 遺伝子発現の解析は、形質転換体の作出がうまくいかなかったことから、当研究では実施することはできなかった。

(5) 有機酸、アミノ酸代謝解析については、GABA、グルタミン/グルタミン酸、リンゴ酸の代謝動態に注目して解析を進めた。その結果、① 塩ストレス処理による果実 brix (%) 上昇の主要因子は糖、アミノ酸の蓄積であり、TCA 回路に関わる有機酸の寄与は低いこと、② 果実発達期に高蓄積する GABA は果実成熟期に分解されて TCA 回路に入りクエン酸として蓄積すること、③ その際、リンゴ酸からホスホエノールピルビン酸 (PEP) を経由する側路を通して TCA 回路に還

流する代謝経路が活性化すること、④ 分解された GABA が果実成熟時の呼吸基質として機能していることを明らかにした。GABA が緑熟期果実において総アミノ酸の 7 割近くを占め、成熟過程で分解されることは先行研究により報告されていたが、研究代表者はその生理的な役割を初めて解明した。また、定量的 RT-PCR により TCA 回路、アミノ酸代謝関連遺伝子の発現を解析した結果、代謝産物の動態と同様に、塩ストレスに応答しているのは主として解糖系とグルタミン合成酵素遺伝子群であり、有機酸代謝に関わる酵素遺伝子の応答性は乏しいことが明らかとなった。これらの結果は、塩ストレス応答下における C (炭素)/N (窒素) 代謝調節が解糖系とアミノ酸合成過程で行われており、TCA 回路は積極的な役割を果たしていないことを示唆している。

(6) 塩類ストレスによる種子発芽促進現象について、その生起機構を解明することを目的として、播種前のトマト種子に 300 mM の NaCl 処理を行い、発芽率、発芽後の生長、各種耐病性を評価した。その結果、① 発芽率、発芽後の初期生長が有意に促進されること、② 青枯病抵抗性が増進することを明らかにした。これらの発芽種子においてマイクロアレイ解析およびジベレリン、ABA 等の植物ホルモンの定量分析を行った結果、発芽時塩ストレス処理によって ③ オーキシン応答、細胞伸長及びストレス応答関連転写因子遺伝子群の発現に増加がみられ、発芽向上・生育促進、耐病性の獲得が遺伝子発現レベルで生起していること、④ プライミング処理により生起する発芽促進には GA_1 よりも GA_4 が主要な役割を果たしていることを明らかにした。

従来の当該分野の先行研究では、糖とアミノ酸は個別に解析されるのが常であったのに対し、本研究課題では有機酸を間に置いて三者を連携させつつ一括して解析を行ったところに特色がある。果実成熟期における GABA の代謝動態についてはこれまで報告がなく、発表論文③で明らかにした、果実成熟過程において GABA が呼吸基質として働いている、という結果は GABA の生理機能を理解する上で極めて重要な知見であると考えられる。さらに、果実発達過程において GABA が有機酸代謝と密接に関連し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (以下 PEPCK) を介在する、果実では未報告の代謝経路を経由してクエン酸に至ることを明らかにしたことは特筆に値すると考える。また、発表論文②で取り組んだ果実発達前期における炭素転流の動態やデンプン蓄積制御の解析についても、従来、果実

成熟期に集中しがちであった関連先行研究とは一線を画すものと考えられる。デンプン蓄積は液果型園芸作物の直接の育種目標ではないことからデンプン生合成制御に着目した研究報告は依然として少ないのが現状である。しかし、当該研究課題では植物におけるデンプン合成律速因子である AGPase に注目し、同遺伝子が塩ストレスによる糖蓄積促進の作用交叉点であることを示すとともに、従来報告されていない新たな発現制御様式を明らかにした。これらはトマト果実の糖蓄積制御において AGPase の重要性を示す新たな知見であり、インペルターゼが主要因と目されている関連研究分野に一石を投じるものである。

当該研究で得られる成果を活用することにより、塩ストレスに頼らずに糖・アミノ酸を高蓄積させる栽培法の開発や、良食味品種育成のための育種マーカーの開発を通して高付加価値品種の開発につなげることが期待できる。このことから本研究は農学的観点からも大きな意義を持つと考える。

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 3 件)

- ① Nakaune M., A. Hanada, Y-G. Yin, C. Matsukura, S. Yamaguchi, H. Ezura : Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* (査読有), Vol. 52, 2012, pp. 28-37.
- ② Yin Y.-G., Y. Kobayashi, A. Sanuki, S. Kondo, N. Fukuda, H. Ezura, S. Sugaya, and C. Matsukura : Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) fruits in ABA- and osmotic stress-independent manner. *Journal of Experimental Botany* (査読有), Vol. 61, 2010, pp. 563-574.
- ③ Yin Y.-G., T. Tominaga, Y. Iijima, K. Aoki, D. Shibata, H. Ashihara, S. Nishimura, H. Ezura and C. Matsukura : Metabolic Alterations in Organic Acids and γ -amino Butyric Acid in Developing Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Fruits. *Plant Cell Physiology* (査読有), Vol. 51, 2010, pp. 1300-1314.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 小岩央幸, 尹永根, 佐藤未来, Rothan C., 福田直也, 江面浩, 松倉千昭, トマト ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子 AgpS1 の発現制御様式と果実における生理機能の解明. 園芸学会平成 24 年度春季大会, 2012 年 3 月 28 日, 大阪府立大学.
- ② Matsukura C., Y-G. Yin, T. Koiwa, M. Sato, N. Fukuda, C. Rothan, H. Ezura, ADP-glucose pyrophosphorylase genes are regulated by sugars and sodium ion in immature fruit of tomato. 日本植物生理学会 2012 年年会, 2012 年 3 月 18 日, 京都産業大学.
- ③ Yin Y-G., M. Sato, T. Koiwa, N. Fukuda, C. Rothan, H. Ezura, C. Matsukura, ADP-glucose pyrophosphorylase genes are differentially regulated by sugar-dependent and -independent manners in early developing fruit of tomato. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Joint Conference, 2011 年 11 月 30 日, 神戸国際会議場.
- ④ 松倉千昭, 尹永根, 讃岐温子, 福田直也, 江面浩, トマト果実において ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子 AgpL1 および AgpS1 は異なる発現制御を受ける. 日本植物生理学会 2011 年年会, 2011 年 3 月 11 日, 東北大学 (東日本大震災発生により講演会中止. 講演要旨集の発行を以て大会成立).
- ⑤ 尹永根, 松倉千昭, 讃岐温子, 小岩央幸, 福田直也, 江面浩, トマト果実における ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子 AgpL1 の発現は糖シグナル伝達経路の制御を受ける. 日本育種学会第 119 回講演会, 2011 年 3 月 29 日, 横浜市立大学 (東日本大震災発生により講演会中止. 講演要旨集の発行を以て大会成立).
- ⑥ 松倉千昭, 尹永根, 讃岐温子, 福田直也, 近藤悟, 菅谷純子, 江面浩, トマト果実発達過程における ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子の発現制御解析. 園芸学会平成 21 年度秋季大会, 2009 年 9 月 26 日, 秋田大学.

[その他]

ホームページ等

<http://www.trios.tsukuba.ac.jp/Profiles/0005/0000922/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松倉 千昭 (MATSUKURA CHIAKI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号 : 60361309

(2)研究分担者

菅谷 純子 (SUGAYA SUMIKO)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：90301372