

塩ストレス条件のトマト成熟過程におけるペクチン分解に伴うアスコルビン酸合成機構に関する研究

佐野 舞桜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は動物と異なり移動ができないため、多くの環境ストレスに適応しながら生活している。その中でも塩ストレスは、浸透圧ストレスやイオン毒性を引き起こすことで植物の生育や代謝に支障をきたす。トマト果実においては、果実サイズや数の減少、果実硬度の増加といった生育・代謝阻害がおこる。一方で、グルコースやフルクトース等の糖類や、プロリン、GABA等のアミノ酸、そして一般的にビタミン C として知られているアスコルビン酸 (AsA) などの栄養成分が多く蓄積し、商品価値の高いトマト果実がつくられることも知られている。

植物において AsA は、体内の活性酸素種を取り除いてストレス応答や防御に役立つ物質である。植物の AsA 合成経路はいくつか知られており、主経路である D-マンノース/L-ガラクトース (D-Man/L-Gal) 経路は、植物で最初にシロイヌナズナで報告された (Wheeler *et al.*, 1998)。さらに、緑藻類の AsA 合成経路と考えられていた D-ガラクトツロン酸 (D-GalA) 経路が、イチゴ果実で D-GalA 還元酵素遺伝子 *GalUR* (*AKR2*) が単離されたことによりその存在が証明された (Agius *et al.*, 2003)。GalA は細胞壁多糖類であるペクチンの分解物である。つまり GalA 酸経路とはペクチン分解物を用いた AsA 酸合成の代替経路と言える。先行研究では、緑色のトマト果実から赤色のトマト果実へ成熟すると、AsA 合成経路は D-Man/L-Gal 経路から GalA 経路に切り替わることが示唆されている (Badejo *et al.*, 2011)。また、これまでに本研究室では、塩ストレス条件下でのトマト果実の前期の成熟ステージでペクチンの含有量が増加し、後期では分解が促進されることが示されている。このことから、成熟後期ではペクチン分解物である GalA の含有量も増加すると考えられる。本研究では、塩ストレス下の成熟後期では、GalA 経路が活性化し、AsA の合成に寄与しているのではと考え、GalA 経路関連遺伝子の発現解析と、塩ストレス条件のトマト果実中の AsA の局在を調査することにより、塩ストレス条件のトマト成熟過程におけるペクチン分解に伴う AsA 合成機構を明らかにすることを目的に実験を行った。

【材料・方法】

1. トマトの水耕栽培・塩ストレス処理

トマト (*Solanum lycopersicum* cv. "Micro Tom") を Yin *et al.*, 2010 の方法を用いて、24°C のインキュベーター内で水耕栽培した。水で濡らした濾紙に滅菌した種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えた。塩ストレス処理は花が咲き始めた時点から開始し、NaCl 濃度を徐々に上昇させることで馴化させ、最終的に 150 mM になるように調整した。NaCl 濃度の調節は電気伝導率測定器を用いて行った。

2. サンプリング

トマト果実の成熟ステージのうち、緑色の Mature green、黄色の Breaker、オレンジ色の Turning、赤色の Red ripe の 4 ステージ別にサンプリングした。

3. 硝酸銀を用いたトマト果実の AsA 染色

Badejo *et al.*, 2012 と N.J. Chinoy, 1969 を参考に、コントロール、塩ストレス条件のトマト果実を 2-3 mm の切片にし、5% 硝酸銀溶液で AsA 染色した。

4. D-GalA 経路関連遺伝子の発現解析

コントロール、塩ストレス条件のトマト果実について、果実組織のうち、外果皮を用いて実験した。D-GalA 還元酵素遺伝子である *AKR* について、データベースより検索し、RT-PCR により発現解析を行った。

【結果・考察】

硝酸銀を用いたトマト果実の AsA 染色では、Mature green、Breaker、Turning、Red ripe 全てのステージで、塩ストレス条件下で生育させた果実が、より高いレベルで染色された。これは塩ストレス下では AsA が多く蓄積するという先行研究の結果と一致した。また、塩ストレス条件では、組織ごとに特徴的な AsA 染色性を示した。

トマトの発現データベースより検索した D-GalA 還元酵素遺伝子である *AKR* の発現解析では、コントロール、塩ストレスのどちらの条件でも、Breaker や Turning ステージで発現のピークを迎え、Red ripe ステージで発現が減少していく傾向が見られた。また、Turning ステージにおいて塩ストレス条件で発現が強くなっていた。このことから、塩ストレスを与えて成熟前期で合成が促進されたペクチンは、Turning ステージには GalA 経路の *AKR* 酵素と反応し、Red ripe ステージでは AsA が蓄積すると考えられる。

【今後の展望】

硝酸銀を用いたトマト果実の AsA 染色では、塩ストレス条件を与えた果実が高いレベルで特徴的に染色された。再現性を調査するためには、今後、サンプル数を増やす必要があると考えている。

今後は、塩ストレスに加え、水耕液中に GalA を処理し、その条件での AsA 量の測定や *AKR* の発現解析、AsA 染色を成熟ステージごとに行う予定である。