

収穫後のトマト果実におけるフィトエンシターゼ遺伝子の働き

野村裕也^{1,*}・小杉真由¹・高橋香里奈¹・西野由佳里¹・加藤那菜¹・桐山蘭¹・河村こはる¹・肥田侑奈¹・古市卓也²

¹岐阜女子大学家政学部健康栄養学科

²名古屋経済大学人間生活科学部管理栄養学科

* nomurah@gijodai.ac.jp

Key Words: トマト、収穫後、リコペン、フィトエンシターゼ遺伝子

名古屋経済大学自然科学研究会業績番号 第 388 号 (2019 年 8 月 30 日受理)

Analysis of *phytoene synthase* gene expressions in post-harvest tomato fruits

Hironari NOMURA¹, Mayu KOSUGI¹, Karina TAKAHASHI¹, Yukari NISHINO¹, Nana KATOH¹, Ran Kiriyama¹, Koharu KAWAMURA¹, Yuuna HIDA¹ and Takuya FURUICHI²

¹Department of Health and Nutrition, Gifu Women's University

²Department of Human Life Sciences, Nagoya University of Economics

1. 緒言

トマト (*Solanum lycopersicum*) は世界中で栽培される主要な作物の一つである。トマトには、カロテノイド色素のリコペン、ポリフェノール類、ビタミンCやビタミンEが多く含まれ、抗酸化作用や生理機能の調節の効果でヒトの健康に重要な役割を果たす¹。一方で、トマトの果実は腐りやすいため、品質を保持するために、収穫した後の輸送、保存、販売の過程で古くから様々な工夫が施されている。トマトの場合、長期品質保持のためのCA貯蔵 (Controlled Atmosphere Storage) の条件として、温度は6~8℃、酸素や二酸化炭素濃度は5~10%が推奨されている。さらには、品質保持や追熟の抑制に効果のある化学的処理も考案されている²。例えば、0.5~1.5%の塩化カルシウム溶液に数分間トマト果実を浸けることで、鮮度を保った状態で果物の貯蔵期間を延ばすことができる²。これは、塩化カルシウムに細胞の膨圧や組織の硬さを維持する効果があるためと考えられている³。このように、品質を保持するための様々な工夫がされている

が、トマト果実に含まれる栄養素への影響は避けられない。

収穫されたトマトを15~25℃の温度帯に保存すると、果実中のリコペン含有量は、保存温度に依存して増加することが知られている^{4,5}。しかし、0~12℃の温度帯に保存すると、低温障害が起き、リコペンが分解される^{6,7}。この低温障害は、まだ赤く色づいていない緑色段階の成熟トマトであれば、短時間の保温処理によって緩和されるが⁸、赤く色付いたトマトでは、リコペンの分解は避けられない。リコペンが分解される理由として、低温ストレスによって生成される活性酸素種 (ROS)⁹に起因するのではないかと考えられているが、詳細な分子機構は分かっていない。

リコペンは、カロテノイド代謝経路の中間体として、植物、藻類、光合成細菌で合成される。非メバロン酸経路を経て作られたゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) をもとに、カロテノイド代謝の起点となるフィトエンが合成される。この反応を触媒する酵素はフィトエンシン

ターゼと呼ばれ、カロテノイド代謝経路の律速酵素となる。そのため、リコペンの合成量は、フィトエンシターゼの働きによって大きく左右される^{10,11,12)}。トマトには、フィトエンシターゼをコードする遺伝子が3つ存在する (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*)。 *PSY1* と *PSY2* は、植物個体の成長・果実の成熟過程でのカロテノイド色素合成に関わる¹³⁾。また、この代謝経路では、リコペン以外にも、光合成に関わるβ-カロテンやキサントフィル類、そして、それをもとに植物ホルモンのアブジジン酸が合成される。この代謝は、植物の生存に必須な経路であるため、古くから多くの研究成果が積み重ねられ、分子レベルでの詳細な制御機構が解析されてきた^{10,14)}。しかし、それは、植物の成長・成熟過程を対象としたものばかりで、収穫後の果実については、実はあまり詳しくは調べられていない。

そこで、本研究では、カロテノイド代謝経路の鍵となるフィトエンシターゼに着目し、それをコードする3つの遺伝子、*PSY1*, *PSY2*, *PSY3* が、収穫後の果実のカロテノイド代謝制御にどのように関与しているかを調べることを目的とする。そして、今回の結果から、成長・成熟過程と収穫後の過程で、この経路の制御の仕組みが異なる可能性が示唆された。さらに研究を進め、栄養成分を損なわない品質保持の方法の開発に繋げていきたい。

2. 方法

試料

市販されているトマト(品種：桃太郎)を購入し、各条件で保存した。実験を行うに当たり、トマトの外果皮が薄い赤色をした桃熟段階の成熟ステージの果実を選別し使用した。保存条件は、購入したその日を0日とし、その後各温度条件で7日間保存した。

リコペン、および糖度の測定

トマトの中果皮を約 0.5g 採取し、抽出溶液 (アセトン：ヘキサンを 4:6 で混合) を 500 μl 加え、破砕機 (TAITEC 社、ビーズ破砕機、μT-12) によってホモジネートした。その破砕液を、15,000 rpm、10 分、遠心分離し、上清を回収した。その上清をさらに 15,000 rpm、10 分、遠心分離した。その上清を抽出溶液で 50 倍希釈し、永田ら¹⁵⁾の方法に従って、750nm、663nm、645nm、505nm、453nmの吸光度を測定した。

糖度については、リコペンの抽出に使用したトマト個体の別の部位から、中果皮を約 0.5g 採取し、蒸留水を 500 μl 加え、破砕機によってホモジネートした。その破

砕液を、15,000 rpm、10 分、遠心分離した。その上清について、簡易糖度計によって糖度を測定した。

リアルタイム PCR 法

トマトの中果皮を約 0.5g 採取し、RNA 抽出キット (Invitroge 社、PureLink RNA Mini Kit) を使って total RNA を抽出した。抽出の際に、DNase 処理 (Invitroge 社、PureLink DNase For Use with PureLink kit) を行った。そして、逆転写酵素 (TOYOBO 社、ReverTra Ace) を使って、抽出した total RNA から cDNA を合成した。

合成した cDNA をもとに、リアルタイム PCR を行った (Roche 社、LightCycler、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I)。 *Actin* (*ACT*)、*PSY1*、*PSY2*、*PSY3* のそれぞれの遺伝子を増幅するためのプライマーは、Fantini ら¹³⁾のものを参照した。結果は、*ACT* を内部標準として、 $\Delta\Delta Ct$ 法による相対値として算出し、各遺伝子の発現量を表した。

統計処理

各実験において、試料は3個体ずつ使用した。0日を対照区としたDunnettの多重比較によって、平均値に有意な差があるかどうかを検討した。また、重量変化については、Tukeyの多重比較を使用した。各グラフの誤差は、標準偏差を表す。

3. 結果および考察

保存温度によるトマト果実の形態的変化

トマトを購入後、4°C、10°C、25°C、40°Cに7日間保存した。保存温度の4°Cは、一般家庭で使用される冷蔵庫の温度、10°Cは、収穫後のトマトの追熟を抑え、輸送に適した温度である^{16,17)}。25°Cは、収穫後のトマト果実の追熟に適した温度、40°Cは夏場の室温を想定した温度として設定した¹⁶⁾。形態的な変化を観察すると、4°Cで7日間保存した場合、ヘタの周りに斑点が形成された。これは低温障害の一種で細胞の機能不全によるものと考えられる¹⁸⁾。25°Cで保存した場合、追熟によって表面の赤みが濃くなり、触ると軟らかくなった。40°Cで保存した場合、さらに表面の赤みが濃くなり、水分の揮発によって表面の張りが失われ、わずかに萎縮した様子であった。一方で、10°Cで保存した場合は、大きな形態的変化は観察されなかった。しかし、トマトの場合、形態的に大きな変化が見られなくても、保存温度の違いによって、水分や揮発性成分の消失、栄養成分の分解などが生じることも示唆されている¹⁹⁾。

重量変化

7 日間、各温度で保存することによって、果実の重量に変化が生じるかを調べた。その個体重量の変化量を図 1 に示す。40℃の条件で、他条件と比べて有意に減少することが分かった。これは、形態的変化でも観察された水分消失による萎縮が主な原因と考えられる。

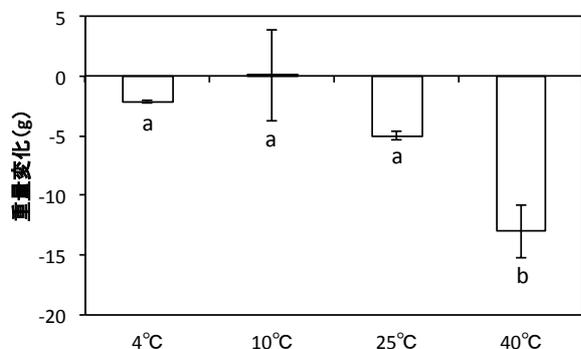


図 1. 7 日間保存後のトマトの重量変化 ($p < 0.05$)

成分変化

トマトを購入した日を 0 日とし、その後 4°C、10°C、25°C、40°C で 7 日間保存した。0 日のもも含め、各温度条件で保存したトマト果実の中果皮を使って、糖度 (図 1) とリコペン量 (図 2) を調べた。

糖度については、それぞれの条件間で有意な差は見られなかったが、平均値の値から、25°C、40°C で 7 日間保存すると、0 日からわずかに上昇した (図 2)。この糖度のわずかな上昇は、水分消失による成分の濃縮が一つの要因ではないかと考えられる。

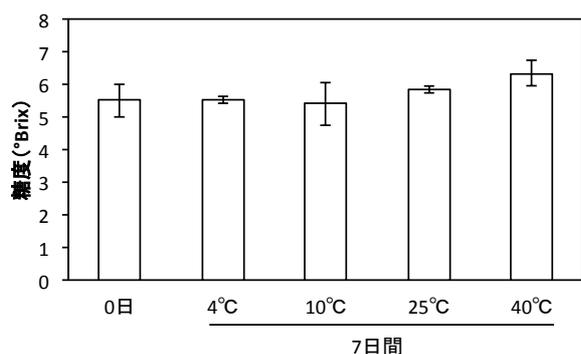


図 2. 保存による糖度の変化

リコペン量については、0 日と比較すると、4°C、10°C 保存でそれぞれ 0.42 倍、0.58 倍と有意に減少し、逆に、25°C 保存では、1.96 倍と有意に上昇した。収穫後のトマトを 15°C 以上で保存すると成熟が進み、それに伴ってリコペンの蓄積も促進することが分かっている⁴⁾。25°C 保

存では、効率的にリコペンの蓄積量が増加したが、一方で、40°C 保存では、熱ストレスの影響から、リコペン量の増加は見られなかった。一方、4°C、10°C 保存ではリコペン量が有意に減少した。この現象はミニトマトでは確認されていたが⁹⁾、今回の実験で用いた大型のトマトでも同様の傾向が見られた。トマトは、低温ストレスを受けることで ROS の生成が促されると言われている⁹⁾。抗酸化活性を持つリコペンなどのカロテノイド色素が ROS の除去に働き、その蓄積量が減少するのではないかと考えられる。また、一方で、ROS シグナルによる代謝関連遺伝子の発現抑制の可能性も考えられる。

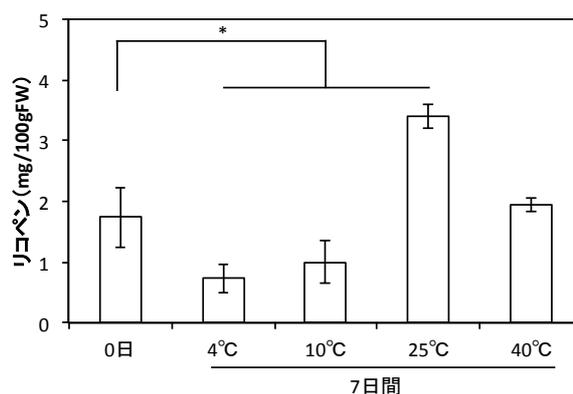


図 3. 保存によるリコペン量の変化 (* $p < 0.05$)

フィトエンシターゼ遺伝子 (PSY)

フィトエンシターゼは、カロテノイド代謝経路の律速酵素となり、リコペンの合成量に大きく影響する^{10,11,12)}。トマトには、フィトエンシターゼをコードする遺伝子は 3 つ存在する (*PSY1*: Solyc03g031860、*PSY2*: Solyc02g081330、*PSY3*: Solyc01g005940)¹³⁾。植物種によって遺伝子のコピー数が異なり、シロイヌナズナは 1 つ、オレンジは 2 つ、ブドウは 3 つ、インゲン豆は 4 つ、ダイズは 8 つ見つかっている。アミノ酸配列をもとにした系統解析から、高等植物において *PSY* 遺伝子群は 2 つのグループに分かれ、トマトの *PSY1* と *PSY2* はグループ I、*PSY3* はグループ II に属する²⁰⁾。植物個体の各生長過程における遺伝子発現解析から、*PSY1* と *PSY2* は、植物の成長・果実の成熟過程でのカロテノイド色素合成に大きく関わる事が示されたが、逆に *PSY3* は、この過程ではほとんど働いていない¹³⁾。このことから、*PSY1* と *PSY2* は働きが似ており、*PSY3* のみ別の役割があるのではないかと推測される。

フィトエンシターゼ遺伝子の発現解析

トマトには、3 つの *PSY* 遺伝子が存在する。収穫後の

保存過程におけるカロテノイド合成経路の調節に、どの遺伝子が関わっているかを調べるため、リアルタイム PCR 法による発現解析を行った。RNA サンプルは、0 日と、リコペン量が減少した 7 日間 4°C 保存条件、ならびにリコペン量が増加した 7 日間 25°C 保存条件のトマト中果皮から抽出した。各 *PSY* 遺伝子の発現解析の結果を図 4 に示す。グループ I に属する *PSY1* と *PSY2* は、0 日と比較すると、4°C ならびに 25°C 保存においてそれぞれ有意に発現量が減少した。一方、グループ II に属する *PSY3* は、有意な差は見られなかったが、平均値の値から、4°C 保存によって発現量が減少し、逆に 25°C 保存によって上昇した。

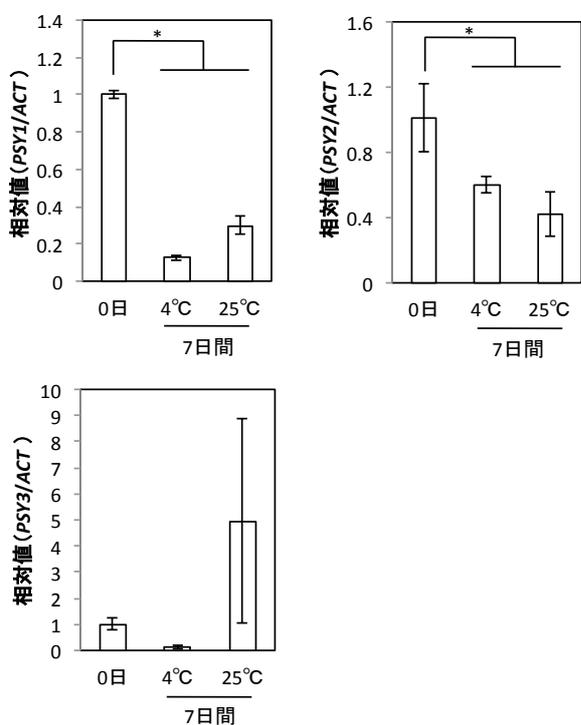


図 4. *PSY* 遺伝子の発現解析 (* $p < 0.05$)

これらの発現パターンとリコペン量との間で相関関係を調べたところ、最も相関が高かったのは、*PSY3* の遺伝子発現パターンであった ($r=0.978$) (表 1)。このことから、収穫後の保存過程におけるカロテノイド合成経路の調節には、グループ II に属する *PSY3* が大きく関与するものと考えられる。

表 1. *PSY* 遺伝子の発現パターンとリコペン量との相関

	<i>PSY1</i>	<i>PSY2</i>	<i>PSY3</i>
相関係数	0.046	-0.425	0.978

4. 総論

トマトを含めた野菜類は、収穫された後も生命活動を行っている。外部からの様々なストレスに対して、遺伝子の発現量、タンパク質量、代謝物の量を調節し、内部環境を維持しようとする。トマトのカロテノイド代謝経路の研究は、代謝物のヒトへの機能性 (例えば、抗酸化作用やビタミン A の前駆体) や、植物自身の生理的な役割 (例えば光合成や植物ホルモン合成) の重要性から、多くの成果が蓄積されている^{10, 21)}。しかし、それは果実の成長過程における生理的視点からのアプローチが多く、一方で収穫後の生理的調節機構については、現象論に留まっていることが多い。本研究では、収穫後のリコペン量の変化について、遺伝子の発現レベルでどのように制御されているかを明らかにしたものである。そして、今回の結果から、成熟過程と収穫後の過程では、遺伝子発現制御の仕組みが異なることが示唆された。

Fantini ら¹³⁾の報告によると、成長過程で果実成熟に伴ったカロテノイド色素合成に最も寄与する遺伝子は *PSY1* であることが示された。一方、同じグループ I に属する *PSY2* は、果実というよりも主に葉で発現量が多く、光合成に寄与する役割が大きい。また、それぞれの遺伝子を抑制したトマト植物体を作成したところ、*PSY1* 抑制植物体は、果実中のカロテノイド色素を合成することができなくなった。逆に、*PSY3* は、各組織・成長過程ではほとんど発現しないため、その役割は不明であった。これらの結果から、果実の成熟過程におけるカロテノイド代謝の制御には、*PSY1* が重要な働きをすると考えられる。本研究では、収穫後の果実の追熟過程においては、*PSY1* ではなく、*PSY3* がカロテノイド代謝制御に大きく関与することを示した。そして、成長過程と収穫後の過程では、遺伝子発現制御の仕組みが異なることを提唱する結果が得られた。また、低温保存によるリコペンの減少と ROS 生成との関わりについても、ROS シグナルによる発現制御の観点からアプローチすることもできるだろう。こうした分子レベルでの解析を進めることで、将来的には、品質を保持しつつ栄養成分の損失も抑制できるような保存方法や有効な薬剤開発などに貢献できると期待される。

参考文献

- 1) Khachik FI, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB. Chemistry, distribution and, metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med* 2002, 227: 845-851.
- 2) Pila N, Gol NB, Rao TVR. Effect of post harvest treatments on physicochemical characteristics and shelf life of tomato

- (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits during storage. American-Eurasian J Agric Environ Sci 2010, 9: 470-479.
- 3) Chaplin GR, Scott KJ. Association of calcium in chilling injury susceptibility of stored avocados. HortScience 1980, 15:514-515.
 - 4) 續順子, 筒井京子, 丹羽真清, 中島けい子. ファーストフーズ向け野菜の品質について I トマトの品質と保存期間. 相山女学園大学研究論集 2004, 35:143-150.
 - 5) Toor RK, Savage GP. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. Food Chem 2006, 99:724-727.
 - 6) Farnetia B, Schoutena RE, Wolteringa EJ. Low temperature-induced lycopene degradation in red ripe tomato evaluated by remittance spectroscopy. Postharvest Biol Technol 2012, 73:22-27.
 - 7) King MM, Ludford PM. Chilling injury and electrolyte leakage in fruit of different tomato cultivars. J Am Soc Hortic Sci 1983, 108:74-77.
 - 8) Luengwilai K, Beckles DM, Saltveit ME. Chilling-injury of harvested tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. micro-Tom fruit is reduced by temperature pre treatments. Postharvest Biol Technol 2012, 63:123-128.
 - 9) Suzuki N, Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signalling and destruction. Physiol Plant 2006, 126:45-51.
 - 10) Stanley L, Yuan YW. Transcriptional Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Plants: So Many Regulators, So Little Consensus. Front Plant Sci 2019, 10: 1017.
 - 11) Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. Plant J 1995, 8:693-701.
 - 12) Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. PNAS 2002, 99:1092-1097.
 - 13) Fantini E, Falcone G, Frusciante S, Giliberto L, Giuliano G. Dissection of tomato lycopene biosynthesis through Virus-Induced Gene Silencing. Plant Phys 2013, 163:986-998.
 - 14) Bartley GE, Scolnik PA. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. Plant Cell, 1995, 7:1027-1038.
 - 15) 永田雅靖, 山下市二. トマト果実に含まれるクロロフィルおよびカロテノイドの同時, 簡易測定. 日本食品工業学会 1992, 39:925-928
 - 16) Gharezi M, Joshi N, Sadeghian E. Effect of post harvest treatment on stored cherry tomatoes. J Nutr Food Sci 2012, 2:1000157.
 - 17) Roberts PK, Sargent SA, Fox AJ. Effect of storage temperature on ripening and postharvest quality of grape and mini-pear tomatoes. Proc Fla State Hort Soc 2002, 115: 80-84.
 - 18) Jackman RL, Yada RY, Marangoni A, Parkin KL, Stanley DW. Chilling injury. A review of quality aspects. J Food Quality 1988, 11:253-278.
 - 19) Maul F, Sargent SA, Sims CA, Baldwin EA, Balaban MO, et al. Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. J Food Sci 2000, 65:1228-1237.
 - 20) Han Y, Zheng QS, Wei YP, Chen J, Liu R, Wan HJ. In silico identification and analysis of phytoene synthase genes in plants. Genet Mol Res 2015, 14: 9412-9422.
 - 21) Lado J, Zacarías L, Rodrigo MJ. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit development. Subcell Biochem 2016, 79:161-98.