

トマト果実の成熟とエチレン

野菜・茶業試験場生理生態部輸送貯蔵研究室 永田 雅 靖

1. はじめに

トマトは、世界の国々で最も多く栽培される野菜のひとつで、世界における生産量は88,222千トン(1997年)である¹⁾。日本で生産されるトマトの大半は生食用であるが、欧米では生産されるトマトの多くがジュースやケチャップなどに加工され、トマトは産業的にも重要な野菜となっている。

野菜の種類と食用にされる生育ステージの関

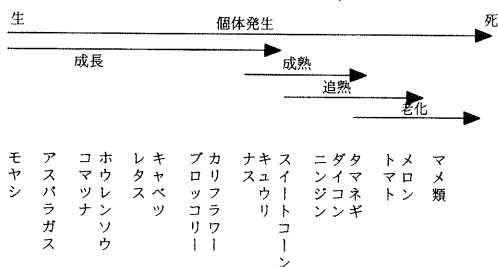


図-1 園芸作物の利用時期と生育ステージ (Watadaら, 1984. を改変)

係を見てみると(図-1)、トマト、メロンなどは、生育が進み、成熟した果実を食用とする一群に分類することができる²⁾。トマト果実の成熟に伴う変化は、植物の細胞あるいは器官の質的な変化であり、植物生理学や生化学の立場からも非常に興味ある現象として、多くの研究が行われてきた。さらに、果実の成熟現象は、遺伝子発現制御のモデルとして、分子生物学の領域からも注目されている³⁾。近年、トマトの遺

伝子組換えが比較的容易にできるようになり、遺伝子のレベルで果実の成熟現象の解明が急速に進んできた。

ここでは、トマト果実の成熟生理におけるエチレンの役割を中心に紹介する。

2. トマト果実の成熟とエチレン

トマトは、成熟に伴って呼吸速度が上昇するので、メロン、リンゴなどとともに「クライマクテリック果実」に分類される⁴⁾。これらの果実では呼吸の増加とほぼ同時にエチレン生成速度の急激な上昇も認められる(図-2)。トマト果実の成熟過程(図-3)では、呼吸速度の上昇やエチレン生成の急激な増加に伴って緑色色素

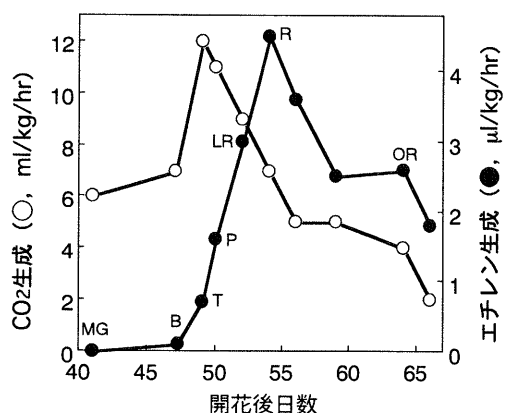


図-2 トマト果実の成熟に伴う呼吸及びエチレン生成の変化(永田原図)
トマト果実は開花後40日で収穫した。
開花後47日目に着色が開始した。

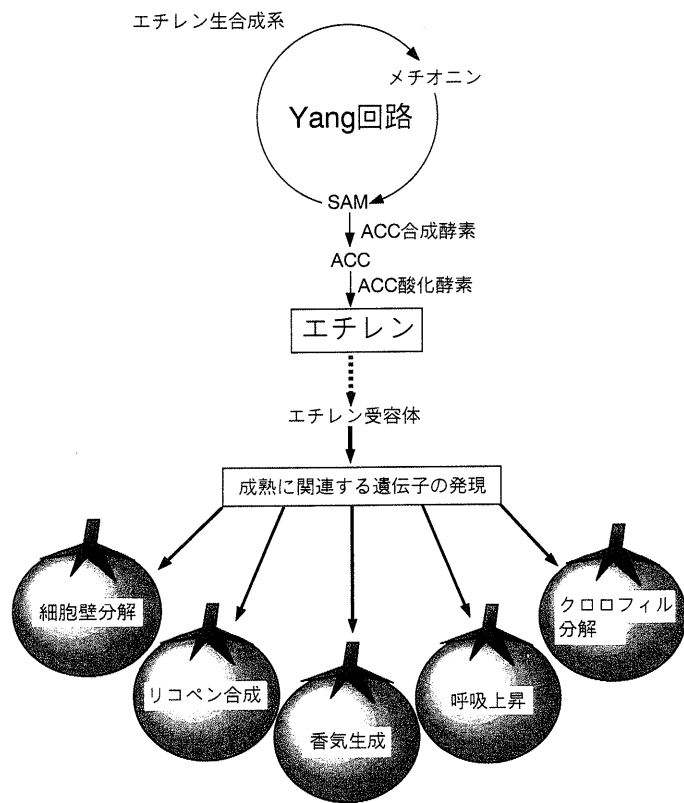


図-3 トマトの成熟とエチレン生合成との関係(Grayら, 1994. を改変)

であるクロロフィルの分解, 赤色色素であるリコペンの合成, ペクチンなど細胞壁多糖の分解, 果実の軟化, 成熟香気の生成, 内容成分含量の変化など種々の過程が非可逆的に進行し, 過熟・腐敗に至る⁵⁾。これら一連の成熟過程の進行にはエチレンが重要な役割を果たしていると考えられる⁶⁾。

エチレン (C_2H_4) は, 2 個の炭素原子と 4 個の水素原子からなる二重結合をもった単純な構造の植物ホルモンで, 常温ではガス状である^{7,8)}。エチレンは果実の成熟促進の他にも, 上偏生長, 伸長生長阻害, 組織肥大の三重反応(トリプルレスポンス)を引き起こしたり, 休眠打破, 雄花形成, 離層形成, 傷害反応, 老化促進など植物ホルモンとして多様な生理活性を示す⁹⁾。ト

マト果実から生成するエチレンは, 果実の成熟を促進する作用とともに, 過熟に至る老化過程も促進する。したがって, トマト果実の鮮度を保持するためには, 成熟に関連する個々の現象と, エチレン生成および作用性との関連を明らかにして, 生理機構に基づいた制御を行う必要がある⁴⁾。

これまでトマトの成熟過程は, エチレンの生合成阻害剤や作用性阻害剤を用いたり¹⁰⁾, 遺伝的に成熟が抑制された変異種のトマト, *never ripe* (*Nr*), *ripening inhibitor* (*rin*), *non-ripening* (*nor*) などを用いた研究が, さまざまな角度から行われてきた¹¹⁾。

トマトなどの高等植物のエチレン生合成経路では(図-4), アミノ酸の一種であるメチオニンからS-アデノシルメチオニン(SAM), 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)を経てエチレンが合成される^{10,12)}。この経路では, SAMからACCへの過程を触媒するACC合成酵素がエチレン生成の律速段階と考えられている。エチレン生成に必要なメチオニンは, ATPの供給によって再生され, 高いエチレン生成レベルが維持される。

3. 遺伝子組換えによるトマトの成熟制御

近年, 遺伝子組換えトマトを用いた果実の成熟機構の研究が急速に発達してきた。これにはアグロバクテリウムなどを用いて, トマトの遺伝子に任意のDNA配列を組み込む形質転換技術

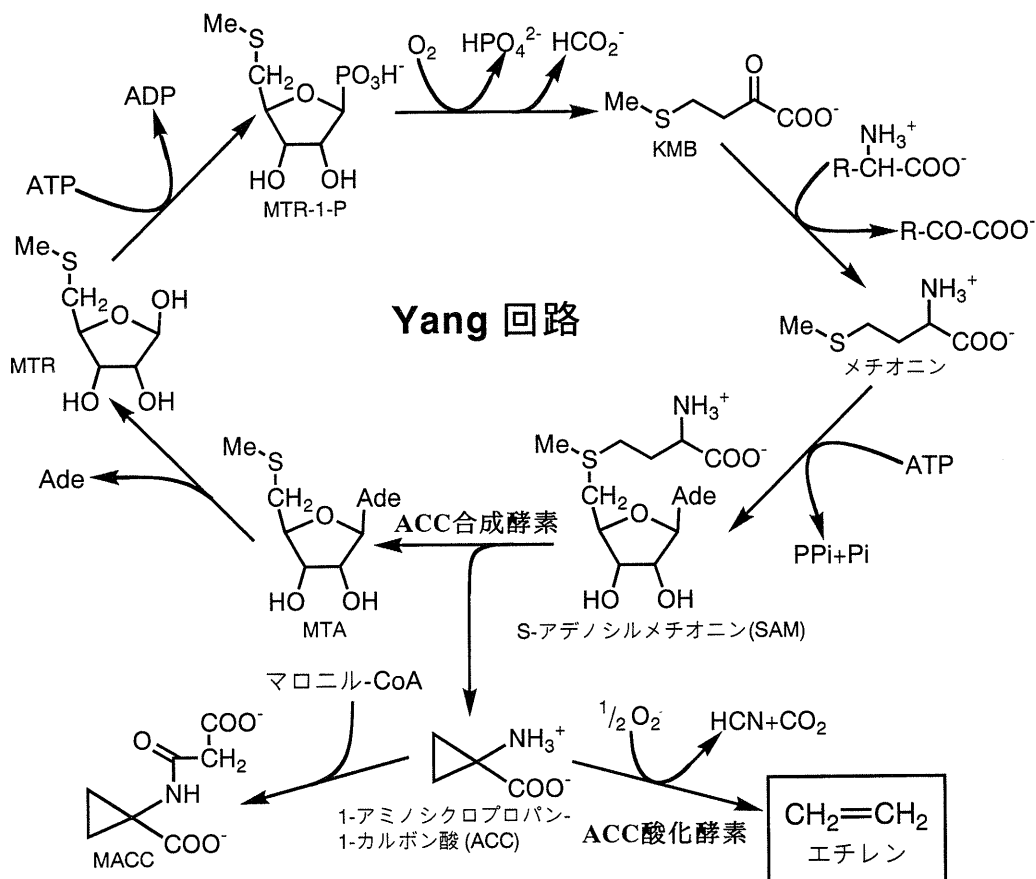


図-4 高等植物におけるエチレン生合成系路 (Theologis, 1992. を改変)

が一般の研究者にも利用できるようになったこと^[3]、アンチセンスRNAを利用して特定の遺伝子の発現を抑制する方法が考案されたことが大きく貢献している^[4, 15]。

アンチセンスRNAの技術は、遺伝子の発現プロモータの下流に、植物のもつ特定の遺伝子とは逆向きの配列(アンチセンス遺伝子)を付加して、植物の遺伝子の中に組み込み、アンチセンス遺伝子が発現することにより、もともと植物が持っていた相同な遺伝子の発現が特異的に抑制されるものである¹⁶⁾。また、特定の遺伝子と同じ向きの遺伝子(センス遺伝子)を組み込んだ場合にも同様な遺伝子の発現抑制(センスサプレッション)が起きることも知られている¹⁷⁻¹⁹⁾。

アンチセンスRNAによる遺伝子発現の抑制も、センスサプレッションによる遺伝子発現の抑制も、その詳細な機構は未解明な部分が多い²⁰⁻²²⁾。

数年前、アメリカではフレーバー・セーバー (FLAVR SAVR) と呼ばれる遺伝子組換えトマトが市場に出回るようになった。これは細胞壁の構成成分であるポリガラクトクロン酸 (ペクチン) を分解するポリガラクトクロナーゼ (PG) の遺伝子発現を、アンチセンスRNAによって抑制するものである。このトマトは、カビに対する抵抗性が増し、ジュースの粘度も高く、軟化速度が抑制されるために日持ち性も良いが、それ以外の性質はもとのトマトと同様であると報告されている²³⁻²⁵⁾。

一方、遺伝子組換えによりトマトのエチレン生合成系を制御する研究も、以下のように様々なアプローチで行われている。

(1) ACC合成酵素遺伝子組換えトマト

ACC合成酵素は、エチレン生合成系の律速酵素で、エチレンの生成速度は、この酵素の活性により左右される。1991年にOellerらは、ACC合成酵素のアンチセンス遺伝子を組み込んで、エチレン生成を抑制したトマトの性質を報告した²⁶⁾。このトマトの果実では、成熟に伴う着色の過程が強く抑制されたが、トマトにエチレンを与えると、果実は正常に追熟した。エチレン生成の抑制されたトマトは、成熟が抑制された結果として、品質の保持期間が延長するものと期待された。生理的な面からは、エチレンは成熟の引き金であって、成熟の結果生ずる副産物ではないことも間接的に確認された。

アンチセンス遺伝子だけでなく、センス遺伝子を導入した場合でも、エチレン生成が強く抑制された個体が得られている²⁷⁾。

(2) ACC酸化酵素遺伝子組換えトマト

1990年にHamiltonらによってpTOM13遺伝子がACC酸化酵素であることが示されるまでは、ACCからエチレンに至る過程や、その反応を触媒する酵素は知られておらず、エチレン生成酵素(EFE)と呼ばれてきた²⁸⁾。その酵素活性は、*in vivo*では測定することができたが、抽出には成功せず、長らく膜結合タンパクであると信じられてきた。

Griersonらは、過去20年あまりにわたるトマトの成熟生理に関する研究の中で、トマト果実の成熟に伴って特異的に発現する遺伝子のcDNAを数多く単離してきた²⁹⁾。その中でも、pTOM13と名付けられた遺伝子のアンチセンス配列を組み込んだトマトは、果実のエチレン生成が抑制

され、着色も遅くなった。さらに、いくつかの実験結果から、pTOM13はEFEそのものであり、触媒する反応の様式から正しくはACC酸化酵素と呼ばれる酵素であることがわかった²⁸⁾。この酵素は、フラバノン-3-水酸化酵素とアミノ酸配列の高い類似性を示した。Ververidisらは、フラバノン-3-水酸化酵素の単離法に従って、メロンから嫌気的条件下でEFEを抽出することに成功し、この酵素の活性発現のためには2価の鉄イオンとアスコルビン酸を必要とすることが明らかになった³⁰⁾。

これらpTOM13に関する一連の研究は、これまで未知とされてきた遺伝子の役割を特定するための研究の新しい方向性を示す先駆的な事例である^{31, 32)}。

(3) ACCデアミナーゼ遺伝子組換えトマト

Kleeらは、土壌細菌の一種からACCを α -ケト酪酸に分解するACCデアミナーゼの遺伝子を単離し、この遺伝子をトマトに導入して果実の中で発現させることに成功した^{33, 34)}。組換えトマトの中からは、エチレンの生成が普通のトマトの10%にまで抑制される個体を見いだした。これらの果実の成熟は非常に抑制されており、軟化も抑制された。

この研究では、異種の生物の遺伝子をトマトに導入し、エチレンの生合成を制御したことで、ひとつの新しい可能性を示している。

(4) エチレン受容体遺伝子組換えトマト

Changらが1993年にアラビドプシスの変異体からエチレン受容体の遺伝子を単離して以来³⁵⁾、エチレン受容体に関する研究が急速に進展し、多くの植物種からエチレン受容体遺伝子が単離された。

エチレン受容体は、微生物の二因子制御系と類似し、ヒスチジinkinナーゼ領域と、エチレン

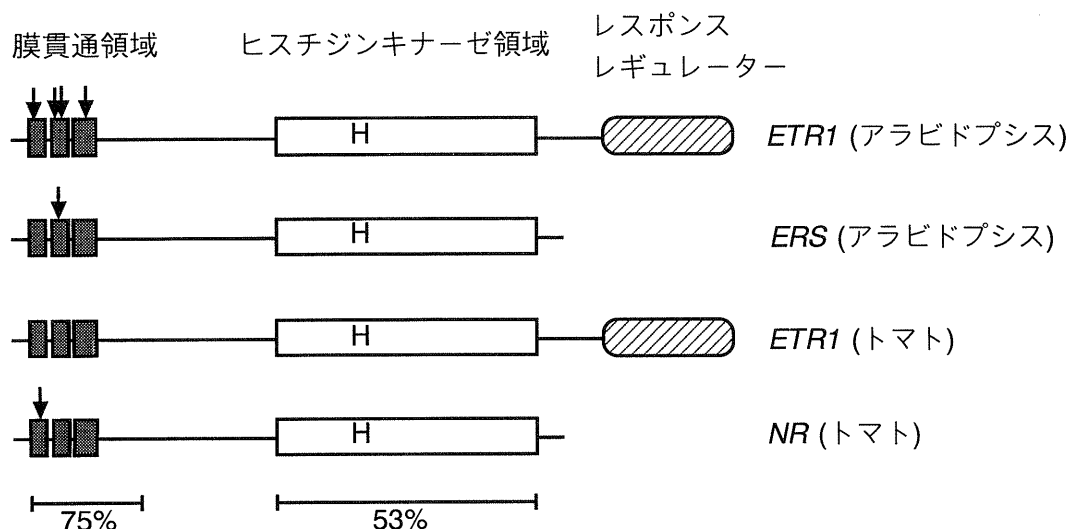


図-5 アラビドプシスおよびトマトのエチレン受容体遺伝子の構造 (Bleeckerら, 1996. を改変)
矢印は、エチレン非感受性となった変異体におけるアミノ酸の置換部位を示す。
下に示した数字は、4つの遺伝子のアミノ酸配列の各領域での類似性。

のセンサーとして働く膜貫通領域だけでなく、シグナルの伝達に関与するレスポンスレギュレーターをひとつの分子内に持つ特異な構造をしていた。その後の研究で、エチレン受容体遺伝子は、多重遺伝子族を形成しており、大きく分けてレスポンスレギュレーターを持つ*ETR1*タイプのものと、レスポンスレギュレーターを持たない*ERS*タイプのものがあることが明らかになってきた(図-5)³⁶⁾。

また、成熟が抑制されているトマト変異種の Nr は、エチレンに対して非感受性とされるが、その原因となるエチレン受容体遺伝子の塩基配列の変異も明らかにされた³⁷⁾。

エチレン非感受性のアラビドプシスに由来するエチレン受容体の変異遺伝子を導入したトマトは、エチレン感受性が失われ、果実の成熟が遅延した³⁸⁾。これらの変異は優性遺伝になることから、エチレン受容体の遺伝子は、エチレンの無い条件では下流の情報伝達を抑制しているが、エチレンと結合すると、抑制作用が解除さ

れ、MAPキナーゼカスケードを通じて情報が伝達されて、エチレン応答が起きるものと考えられた。一方、変異が起きた遺伝子では、エチレンが存在しても下流への抑制は解除されることが無いので、エチレンに対する反応は起きないものと考えられた³⁹⁾。エチレン非感受性遺伝子が優性遺伝することは、実際の品種育成においては重要な性質である。

4. 現状と将来展望

(1) 実験植物としてのトマト

これまで見てきたように、最近15年ほどのエチレンの生合成、感受性に関わる分子生物学的研究で、トマトの果たしてきた役割は非常に大きい。

実験植物のアラビドプシスは、果実の品質に関する研究には向いておらず、トマトを用いた研究は、農業上重要な果実のモデル系として今後も大きな役割を果たしていくものと考えられる。

(2) エチレンと老化の生理

野菜果実の成熟は、一種の老化現象であると考えることができる^{2,4)}。広い意味での青果物の品質の保持は、植物の老化の抑制に他ならない。植物の老化は、いくつかの反応が複雑に関与している現象である。そのうちの多くの反応は、エチレンと何らかの関連があると考えられる⁹⁾。

これまで園芸作物では、遺伝子組換えによってトマト^{26-28,33)}やメロン⁴⁰⁾などのエチレン生成の制御や、トマト³⁸⁾やカーネーション⁴¹⁾などのエチレン感受性の制御を行った例が報告されている。今後は、クロロフィルの分解、カロテノイドの合成あるいはアミノ酸など、成熟・老化に関連する個々の生理反応の機構が明らかにされ、植物の生理機構に基づいた青果物の鮮度保持技術の開発に結びつくものと期待している。

(3) 遺伝子組換えを利用した生理機構の解明

植物の遺伝子組換えは、組織培養技術、形質転換技術、遺伝子発現の解析技術、遺伝子のクローニング技術など多くの技術に支えられている⁴²⁾。野菜では、トマト、レタス、メロン、ブロッコリーなど一部の作物以外では形質転換が比較的困難であり、今後引き続いて形質転換効率を高める研究を進める必要がある。これらの問題が解決されれば、遺伝子組換えの技術は、植物の生理機構解明のための有力な手段として、さらに活用されるようになると考えられる^{43,44)}。

また、遺伝子組換えは、生理研究の手段にとどまらず、育種にもつながる可能性があり、今後、さまざまな新しい性質を持った作物が、周辺環境への影響評価、食品としての安全性評価などを経て市場に現れるものと思われる²⁵⁾。

しかし、その期待とは逆に、最近では、特定の除草剤に対する耐性遺伝子を組み込んだ作物など、企業の独占的利益につながるような組換

え作物が出てきたために、遺伝子組換え作物に対する消費者の不信感を増大させ、組換え作物の生産も減少傾向にあるとされる。

今後は、組換え作物の表示も含めたパブリックアクセプトランスを進めるとともに^{45,46)}、企業のためだけでなく、人類あるいは地球環境のためになる作物を作ることが今後の課題となろう。

参考文献

- 1) FAO (1992): *FAO yearbook, Production*, 46, 140-141.
- 2) Watada, A. E. et al. (1984): *HortScience*, 19(1), 20-21.
- 3) Grierson, D. and Schuch, W. (1993): *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 342, 241-250.
- 4) Brady, C. J. (1987): *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38, 155-178.
- 5) Fray, R. G. and Grierson, D. (1993): *Trends in Genetics*, 9, 438-443.
- 6) McGlasson, W. B. (1985): *HortScience*, 20, 51-54.
- 7) Imaseki, H. (1985): 249-264, In: Takahashi, N. (ed), *Chemistry of plant hormones*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 8) 兵藤宏・楊祥発 (1994): 161-201, 高橋信孝・増田芳雄編, 植物ホルモハンドブック, 培風館, 東京.
- 9) 下川敬之 (1988): エチレン, 東大出版会, 東京.
- 10) Yang, S. F. and Hoffman, N. E. (1984): *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 155-189.
- 11) Tigchelaar, E. C. et al. (1978): *HortScience*, 13, 508-513.
- 12) Theologis, A. (1992): *Cell*, 70, 181-184.
- 13) Potrykus, I. (1991): *Ann. Rev. Plant*

- Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 205-225.
- 14) Gray, J. *et al.* (1992): *Plant Mol. Biol.*, 19, 69-87.
- 15) Bourque, J. E. (1995): *Plant Sci.*, 105, 125-149.
- 16) Smith, C. J. S. *et al.* (1990): *Mol. Gen. Genet.*, 224, 477-481.
- 17) Tieman, D. M. *et al.* (1992): *Plant Cell*, 4, 667-679.
- 18) Seymour, G. B. *et al.* (1993): *Plant Mol. Biol.*, 23, 1-9.
- 19) Fray, R. G. and Grierson, D. (1993): *Plant Mol. Biol.*, 22, 589-602.
- 20) Jorgensen, R. (1990): *Trends Biotechnol.*, 8, 340-344.
- 21) Grierson, D. *et al.* (1991): *Trends Biotechnol.*, 9, 122-123.
- 22) Matzke, M. A. and Matzke, A. J. M. (1995): *Plant Physiol.*, 107, 679-685.
- 23) Smith, C. J. S. *et al.* (1990): *Plant Mol. Biol.*, 14, 369-379.
- 24) Kramer, M. *et al.* (1992): *Postharvest Biol. Technol.*, 1, 241-255.
- 25) Redenbaugh, K. *et al.* (1994): *Trends Food Sci. Technol.*, 5, 105-110.
- 26) Oeller, P. W. *et al.* (1991): *Science*, 254, 437-439.
- 27) Nagata, M. *et al.* (1995): *Acta Horticulturae*, 394, 213-218.
- 28) Hamilton, A. J. *et al.* (1990): *Nature*, 346, 284-287.
- 29) Grierson, D. *et al.* (1986): *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 314, 399-410.
- 30) Ververidis, P. and John, P. (1991): *Phytochemistry*, 30, 725-727.
- 31) Kende, H. (1993): *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44, 283-307.
- 32) 佐藤茂 (1993): 化学と生物, 31, 431-438.
- 33) Klee, H. *et al.* (1991): *Plant Cell*, 3, 1187-1193.
- 34) Klee, H. J. (1993): *Plant Physiol.*, 102, 911-916.
- 35) Chang, C. *et al.* (1993): *Science*, 262, 539-544.
- 36) Bleecker, A. B. and Schaller, G. E. (1996): *Plant Physiol.*, 111, 653-660.
- 37) Wilkinson, J. Q. *et al.* (1995): *Science*, 270, 1807-1809.
- 38) Wilkinson, J. Q. *et al.* (1997): *Nature Biotechnol.*, 15, 444-447.
- 39) Chang, C. *et al.* (1995): *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 4129-4133.
- 40) Ayub, R. *et al.* (1996): *Nature Biotechnol.*, 14, 862-866.
- 41) Bovy, A. G. *et al.* (1999): *Mol. Breeding*, 5, 301-308.
- 42) Schaff, D. A. (1991): *HortScience*, 26, 1021-1024.
- 43) Grierson, D. and Fray, R. (1994): *Euphytica*, 79, 251-263.
- 44) Gray, J. E. *et al.* (1994): *Plant Cell Environ.*, 17, 557-571.
- 45) 日野明寛編著 (1999): ぜひ知っておきたい遺伝子組換え作物, 幸書房, 東京.
- 46) 日本農芸化学会編 (2000): 遺伝子組換え食品, 学会出版センター, 東京.