

トマトの炭素代謝から見た C/N 分配における塩ストレスの影響

大河 浩

弘前大学農学生命科学部

概要 環境ストレスは、シンク・ソースバランスの変動を起こすと考えられることから、シンク器官を食用とする作物にとっては重要な案件である。アミノ酸合成のための炭素骨格供給源として解糖系や TCA 回路の中間代謝産物があげられ、個々の炭素骨格の供給の変動によって C/N バランスの調節の分岐点になる。トマト Micro-Tom 種を用いて、塩をはじめとする環境ストレスを与えることにより、ソース器官である葉およびシンク器官である果実で、炭素と窒素の分岐点に関わる解糖系酵素の応答を明らかにすることを目的とし、本研究では PEPC 遺伝子にターゲットを絞って、特にその器官特異性および、環境ストレス要因として塩ストレスおよび温度ストレスにより、どのような発現様式を示すのかを検討した。データベースよりトマト PEPC ホモログ候補遺伝子が少なくとも 3 種存在し、それぞれの塩基配列情報を元に特異的プライマーを設計し、それぞれの器官特異性遺伝子発現を RT-PCR により検証した。その結果、*Slppc1* 遺伝子および *Slppc2* 遺伝子が葉や根などで、*Slppc3* 遺伝子は果実で発現しており、それぞれの発現様式の違いが示された。塩ストレスを与えると、短時間処理ではソース器官の葉では *Slppc1* 遺伝子および *Slppc2* 遺伝子が誘導された。連続長時間処理では全ての遺伝子が誘導され、活性も遺伝子応答と同じく誘導されていた。これらのことから、塩ストレス時に葉での PEPC 誘導により、補充反応促進もしくは気孔閉鎖による CO₂ 不足を補うための CO₂ 供給促進をすることによって、ソース器官において塩ストレスに適応していると推測された。未成熟果実では遺伝子発現と酵素活性の挙動が一致しておらず、リン酸化などによる翻訳後制御が起こっている可能性が示された。一方で、成熟果実においては発現が緩やかに減少しており、活性も同様に減少傾向にあった。成熟果実時に反対の代謝方向になる糖新生促進がおこるため、その反応を補佐するために PEPC を介する補充反応が抑制されるように制御されていると考えられた。

1. 研究目的

食用植物の生産性の向上および高品質機能性の向上は農業上において大きな命題である。環境ストレスは、シンク・ソースバランスの変動を起こすと考えられることから、シンク器官を食用とする作物にとっては重要な案件であり、トマトはそのようなシンク・ソース解析に最適なモデル作物である。アミノ酸合成のための炭素骨格供給源として解糖系や TCA 回路の中間代謝産物があげられ、個々の炭素骨格の供給の変動によって C/N バランスの調節の分岐点になり、トマト果実の糖、有機酸、アミノ酸の割合を変え、食味の違いを与えると考えられる。分岐の例として、その生成物である 3-ホスホグリセリン酸はセリンなど、またホスホエノールピルビン酸は芳香族アミノ酸合成への分岐点で

もある。シロイヌナズナやイネの塩基配列のデータベースから、ホスホエノールピルビン酸生成までの解糖系酵素であるホスホグリセリン酸ムターゼおよびエノラーゼは、サイトゾル型の他にプラスチド型が存在しているが、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) はサイトゾル型のみであると考えられてきた (Chollet *et al.*, 1996)。最近イネにのみプラスチド型が存在することが明らかになっている (Masumoto *et al.*, 2010)。プラスチド内では糖等の炭素代謝ばかりでなく、脂肪やアミノ酸合成の場となっているが、アミノ酸合成経路の 1 つであるシキミ酸経路の初発物質はホスホエノールピルビン酸であり、その供給経路として、解糖系経路およびカルビン回路からの両方が考えられる。ヒマ植物種子の胚乳に存在する PEPC との

coimmunopurification 解析から、相互作用したのはプラスチド型ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体であることが報告された(Uhrig *et al.*, 2008)。これは PEPC がプラスチドに局在している可能性を示唆する結果であるが、*in vivo* で実際に局在しているのか明らかにされていない。シンク器官における C/N バランスの調節に重要な役割を担っていると考えられるが、不明な点は未だ多い。トマトにおいてはプラスチド局在性の特異的な PEPC の配列はデータベース情報からはまだ十分な判断は出来ないが、プラスチド内へホスホエノールピルビン酸を供給しなければならないので、解糖系の反応と密接にリンクして制御されていると推測される。そこで、トマトモデル品種であるマイクロトムを用いて、塩をはじめとする環境ストレスを与えることにより、ソース器官である葉およびシンク器官である果実でどのような応答機構があるのかを明らかにすることを目的とし、将来的に他品種における C/N 分配差異指標の探索へつなげることを目指すものとする。

そこでこれまでの成果をもとにして、トマトにおける炭素代謝の変動をシンクとソースの観点から明らかにすることを目標に、炭素と窒素の分岐点に関わる解糖系酵素のうち、PEPC、エノラーゼおよびホスホグリセリン酸ムターゼについて着目し、まず本研究では PEPC 遺伝子にターゲットを絞ってその発現様式、特にその器官特異性および、環境ストレス要因として塩ストレスおよび温度ストレスにより、どのような発現様式を示し、葉および果実において C/N 分配にどのように影響を及ぼす可能性があるのかを検討する。

2. 研究方法

2.1 SIPEPC候補遺伝子の発現解析

トマト(*Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom')は、25°C、12時間明期、12時間暗期の条件で栽培を行った。データベース MiBASE (<http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html>)よりトマトPEPCホモログ候補遺伝子が少なくとも3種存在し、それぞれの塩基配列情報を元に特異的プライマーを設計した。葉、開花前の花序、根、種子、成熟段階の異なる果実からそれぞれ抽出した全 RNA を用いて、半定量 RT-PCR によってその発現を解析した。器官特異性発現解析により、少なくともソース器官およびシンク器官で発現様式の違いが示されたので、次に塩ストレス

等のストレスによりどのような発現応答性を示すのかを同様の方法で検討を行った。塩ストレス処理は栽培溶液に NaCl を添加することによって行った。また塩ストレス処理は1時間の短時間処理(終濃度 250 mM NaCl)および連続長期間処理(終濃度 200 mM NaCl)を行った。

2.2 PEPC酵素活性および有機酸含量測定

それぞれサンプリングした葉、未成熟果実および成熟果実から可溶性タンパク質を抽出し、リンゴ酸デヒドロゲナーゼとカップリングさせて、NADH の 340 nm 吸光度の減少として測定を行った。今回はソース器官である葉においてのみ、過塩素酸による有機酸の抽出を行い、酵素法によってホスホエノールピルビン酸、オキサロ酢酸、ピルビン酸の有機酸含量の測定を行った。

3. 研究結果

3.1 SIPEPC 候補遺伝子の器官特異性発現解析および環境ストレス処理による発現応答

主なシンク器官となる果実以外の器官および果実で候補遺伝子の器官特異性発現解析を行った(Fig. 1, Fig. 2)。Slppc1 および Slppc2 は、花序、葉、根で発現しており、その発現量はほぼ一定であった。種子では、Slppc2 および Slppc3 の発現が確認された(Fig. 1)。果実においては、Slppc1 ~3 のいずれの遺伝子も発現していた。特に果実発達段階で強く発現している。また、これらの結果から、Slppc1 もしくは Slppc2 がどの器官においても恒常的に発現しているハウスキーピング遺伝子であると考えられた。イネの Osppc2 発現様式と類似しており、同等の役割をしていると推測される。また、Slppc3 遺伝子は種子および果実特異的に発現していることから、Slppc 遺伝子の発現様式はそれぞれ異なる様式を示すことが明らかとなった。シンク器官で発現が誘導される遺伝子の役割は、果実成熟過程において、オキサロ酢酸の供給を促進することにより TCA 回路を促進しているのかもしれない。イネで見られたようにソースとしての葉に特異的に発現するものは見られず、葉緑体局在性の PEPC は存在していないと考えられる。

次にストレス環境による Slppc 遺伝子の発現応答性を検証するためにソース器官である葉について検討した(Fig. 3)。環境ストレスとして、短時間の塩ストレス処理および低温ストレス処理により、どのような応答をするのか調べた。

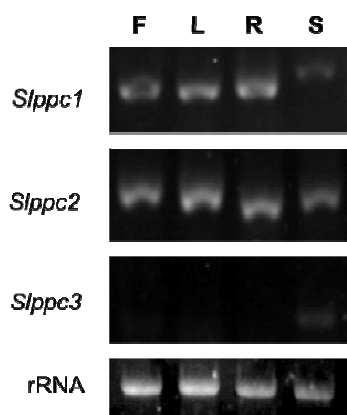


Fig. 1. Organ specific expression of *Slppc* genes. Flower (F), leaf (L), root (R), seed (S).

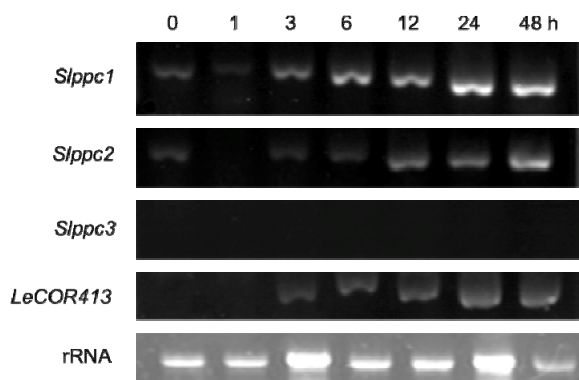


Fig. 3. Effect of short time salt stress on expression of *Slppc* genes.

その際に、葉でストレスにより発現誘導を示す *LeCOR* 遺伝子についての発現も同様に検証した。その結果、低温ストレスにおいては一過的に *Slppc* 遺伝子発現が抑制されるもののほとんど変動が確認されなかった(データ未掲載)。一方で塩ストレスを与えた場合、*Slppc1* および *Slppc2* のみ発現が誘導されることが明らかとなった。これらの条件の環境ストレスが与えられた場合、塩ストレス処理のみ *Slppc* 遺伝子の発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。

3. 2 塩ストレス処理によるソース器官およびシンク器官での *Slppc* 遺伝子発現に及ぼす影響

ソース器官(葉)およびシンク器官(未成熟果実および成熟果実)での発現応答性の比較を行うために、長期塩ストレス処理を行った。その結果、ソース器官である葉で

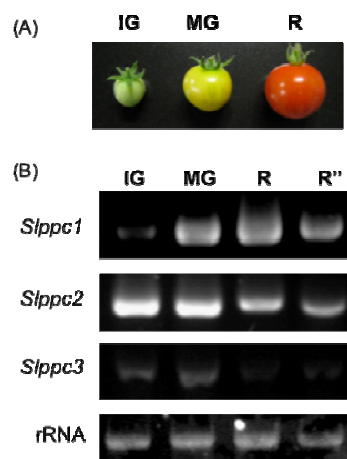


Fig. 2. (A) Fruit development stages of tomato. Immature green (IG), mature green (MG), mature red (R), and old mature red (R''). (B) Fruit-specific expression of *Slppc* genes.

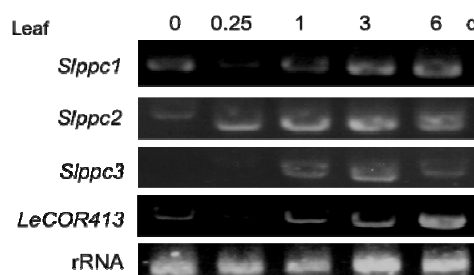


Fig. 4. Effect of continuous salt stress on expression of *Slppc* genes in leaves

は、短期塩ストレス処理と同様に *Slppc1* および *Slppc2* の発現誘導が見られたが、短期塩ストレス処理での結果と異なり *Slppc3* もその発現が誘導されることが認められた(**Fig. 4**)。塩ストレス強度の上昇に応じてその発現が誘導されたと考えられる。一方で果実での発現応答を見てみると、成熟果実(R)ではソース器官で見られたような発現誘導は起こらず、いずれの遺伝子も変化しないもしくは緩やかにわずかに減少していた(**Fig. 5**)。また、発達段階である未熟果実(IG)においては、いずれの遺伝子も強く発現していたが、*Slppc2* および *Slppc3* においては、塩ストレス処理によってもその発現量にほとんど変動は見られなかった。しかしながら、*Slppc1* のみが処理後1日目以降に減少し、そのまま10日後まで減少したままであった(**Fig. 5**)。この発現減少は、塩ストレス強度を下げた処理においても観

察された(データ未掲載)。このように、ソース器官である葉とシンク器官である果実との間で塩ストレス処理による PEPC 遺伝子の発現応答性が異なり、さらに成熟果実と果実発達段階である未熟果実との間においても異なることが示された。

3.3 塩ストレス処理による各器官におけるPEPC活性および葉における有機酸含量

各器官における塩ストレス処理によるそれぞれの *Slppc* 遺伝子の発現応答性を検証してきたが、PEPC 活性も同様に変動しているのかの検証を行った(Fig. 6)。葉においては、コントロールと比べ、塩ストレス処理後 6 日目で、約二倍程度の活性上昇が見られた。また成熟果実(Red)においては、コントロールと比べ、塩ストレス処理後で有意な差は認められなかったが活性は減少する傾向であった。これらは、それぞれの2つの器官における *Slppc* 遺伝子の発現応答性と一致している。一方、未成熟果実では、コントロールと比べ、塩ストレス処理 10 日目には約二倍に活性が上昇していた。しかしながら、*Slppc2* および *Slppc3* のいずれも発現誘導しておらず、さらには *Slppc1* の発現は減少していた(Fig. 7)。遺伝子発現と酵素活性の間に相関性が見られなかった。次に、PEPC の基質であるホスホエノールピルビン酸、その産物であるオキサロ酢酸、ピルビン酸キナーゼにより PEP からできるピルビン酸について新鮮重あたりの含有量について検証した。本研究では葉における上記 3 種類の有機酸量のみを測定した。その結果、塩ストレス処理により、ホスホエノールピルビン酸やオキサロ酢酸含量の変動はなかったが、コントロールと比較してピルビン酸含量が処理 6 日後に減少していた。

4. 考察

同じ C3 植物であるシロイヌナズナには PEPC をコードする遺伝子は植物タイプ3つ(*Atppc1*~3)およびバクテリアタイプ(*Atppc4*)が存在し(Sanchez *et al.* 2003)、その中でも *Atppc2* 器官特異性はなく恒常的に発現している。その他の遺伝子は器官特異的に発現するなどしており役割を分担している。トマトにおいても、その発現に器官特異性が観察され、葉で *Slppc1* の他に *Slppc2* も発現が確認された(Fig. 2)。一方、葉で発現が確認されなかった *Slppc3* は果実特異的に発現しており、果実形成時における炭素代謝の制御に関わっていると推測された。様々な環境変

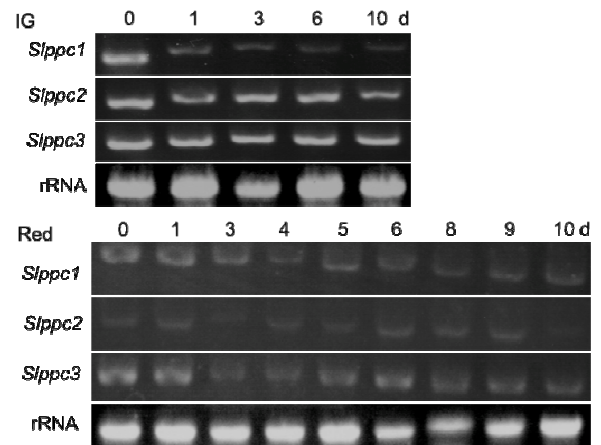


Fig 5. Effect of continuous salt stress on expression of *Slppc* genes in immature green fruit and mature red fruit

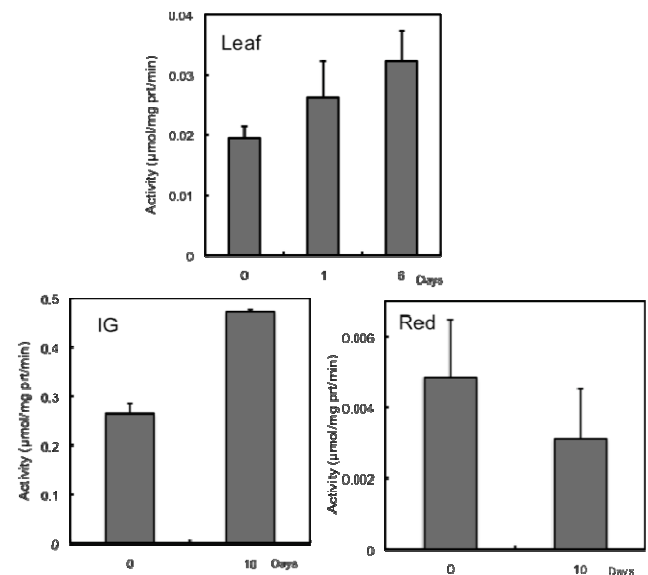


Fig. 6. PEP carboxylase activity in each organ under salt stress

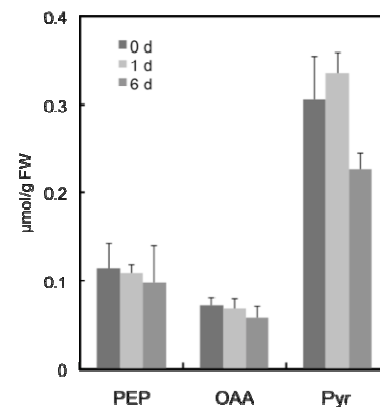


Fig. 7. Effect of salt stress on phosphoenolpyruvate (PEP), oxaloacetate (OAA) and pyruvate (Pyr) content in leaves

化により、PEPCの遺伝子発現や活性の変動が起こる事が知られている。例えば、PEPCはアンモニア同化における炭素骨格の供給をし、C/N分配にも寄与しているが、トウモロコシにおいて、低N状態から窒素源を与えるとPEPC活性の増加が見られている(Sugiharto and Sugiyama, 1992)。またコムギにおいて低温ストレスにより葉および根でPEPC遺伝子発現誘導が報告されている(Gonzalez et al., 2003)、今回トマトにおいて同様の発現誘導は確認されず、このような応答性の違いは植物種による温度感受性の違いによるのかもしれない。塩ストレスによる応答で代表的な例として、CAM型光合成をするアイスプラントではPEPCが強く誘導されることが古くから知られている。一方、C3植物であるシロイヌナズナの根において、*Atppc3* およびバクテリアタイプである *Atppc4* が塩ストレスにより発現が誘導されている(Sanchez et al., 2006)。短時間の塩ストレス処理では *Slppc1* および *Slppc2* のトマト葉における発現誘導が見られ、連続的な処理をすると検証した全ての遺伝子の発現が誘導された(Fig. 5)。根ばかりでなくトマト葉においても *Slppc* 遺伝子誘導および活性上昇が起こることが明らかとなった(Fig. 4, Fig. 7)。また、葉PEPC発現抑制形質転換シロイヌナズナは、塩に対して感受性が強くなることから(Lebouteiller et al., 2007)、塩ストレス時における葉でのPEPC誘導による補充反応促進もしくは塩ストレスによる気孔閉鎖によるCO₂不足を補うため、PEPCからMDHを介するCO₂供給の重要性を裏付けており、Fig. 4の結果のようにソース器官である葉において発現を上昇させることにより、塩ストレスに適応していると考えられる。塩ストレスによる葉のピルビン酸含量減少の原因として、PEPCと同じホスホエノールピルビン酸を基質とするピルビン酸を生成するピルビン酸キナーゼと拮抗した結果であるかもしれないが、その他にもリンゴ酸酵素の活性減少やピルビン酸を元とするクエン酸合成への代謝経路の活性化などの可能性も考えられる。未成熟果実での塩ストレス処理によりPEPC活性は約2倍に上昇していたにもかかわらず、*Slppc* 遺伝子発現誘導は見られなかった(Fig. 5, Fig. 6)。このことは正の翻訳後制御を受けている可能性を示しているのかもしれない。一方で果実発達段階におけるPEPC活性は受精後と比べ最大で約4倍程度上昇している(Guillet et al., 2002)。これらのことから、塩ストレス処理により未成熟果実においては、発達段階において活性を

上昇させるものの非ストレス条件と比べれば、その活性は抑制されることを示唆しているかもしれないが、今後さらに詳細な検証が必要であると思われる。塩ストレス処理により、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼは、トマト成熟果実において急速に増加することにより、オキサロ酢酸からホスホエノールピルビン酸に変換反応を促し、糖新生へと誘導する(Bahrami et al., 2001)。成熟果実においては、葉での現象とは反対に、すべての *Slppc* 遺伝子発現が塩ストレス処理により減少、活性も低下しており、さらにはコントロール条件においても活性そのものが他器官と比べてもかなり低い(Fig. 5, Fig. 6)。このようにして、より糖新生方向に促進するために、成熟果実ではPEPCを介する補充反応を抑制するように制御していると考えられる。

5. 今後の課題

炭素と窒素の分岐点に関わる解糖系酵素のうち重要な分岐点の1つであると考えられているPEPCについて着目し、塩ストレス環境との関係をソース・シンク器官において主にその遺伝子発現解析から明らかにすることを本研究では試みた。塩ストレスによりソース器官である葉においては明確にその発現誘導を受けるが、シンク器官となる成熟果実ではむしろその活性は下がり、シンク器官・ソース器官においてそれぞれ異なる応答性を示すことが明らかとなった。しかしながら、未成熟果実においては塩ストレスによる活性の上昇が見られたが、遺伝子応答の結果とは一致していない。果実発達過程における遺伝子応答性や活性の制御についてさらに検証していかなければならないと考えている。

謝辞

本研究にご支援いただきましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。

文献

- Chollet R, Vidal J, O'Leary MH (1996) PHOSPHOENOL-PYRUVATE CARBOXYLASE: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 273-298
- Bahrami AR, Chen ZH, Walker RP, Leegood RC, Gray JE (2001) Ripening-related occurrence of phosphoenol

- pyruvate carboxykinase in tomato fruit. *Plant Mol Biol* 47: 499-506
- Gonzalez MC, Sanchez R, Cejudo FJ (2003) Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta* 216: 985-992
- Guillet C, Just D, Benard N, Destrac-Irvine A, Baldet P, Hernould M, Causse M, Raymond P, Rothan C (2002) A fruit-specific phosphoenolpyruvate carboxylase is related to rapid growth of tomato fruit. *Planta* 214: 717-726
- Masumoto C, Miyazawa S, Ohkawa H, Fukuda T, Taniguchi Y, Murayama S, Kusano M, Saito K, Fukayama H, Miyao M (2010) Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5226-5231
- Lebouteiller B, Gousset-Dupont A, Pierre J-N, Bleton J, Tchaplal A, Maucourt M, Moing A, Rolin D, Vidal J (2007) Physiological impacts of modulating phosphoenolpyruvate carboxylase levels in leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 172: 265-272
- Sanchez R, Flores A, Cejudo FJ (2006) *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta* 223: 901-909
- Sanchez R, Cejudo FJ (2003) Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 132: 949-957
- Sugiharto B, Sugiyama T (1992) Effects of Nitrate and Ammonium on Gene Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Nitrogen Metabolism in Maize Leaf Tissue during Recovery from Nitrogen Stress. *Plant Physiol* 98: 1403-1408
- Uhrig RG, O'Leary B, Spang HE, MacDonald JA, She YM, Plaxton WC (2008) Coimmunopurification of phosphorylated bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylases with the plastidial pyruvate dehydrogenase complex from developing castor oil seeds. *Plant Physiol* 146: 1346-1357

Effect of Salt Stress on C/N Distribution and Carbon Metabolic Gene Expression in Tomato

Hiroshi Ohkawa

Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University

Summary

Salt stress is one of the factor affecting the growth and production of plant. To avoid salt stress, plants regulate the metabolic pathway in source and sink organ. In these processes, some metabolic pathways (glycolysis, TCA cycle etc.) are one of the distribution points between carbon and nitrogen. We focus on one of the related gene encoding phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in the dwarf tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom). A survey of the tomato database shows that the presence of three *ppc* genes (*Slppc*). We designed the gene specific primers to analyze organ specific expression of each *Slppc* gene by RT-PCR. The results indicated that *Slppc1* and *Slppc2* were expressed in leaf, root, seed, flower and fruit organ tested. On the other hand, *Slppc3* was only expressed in fruit. It looks like that *Slppc1* and *Slppc2* were expressed housekeeping, and *Slppc3* may participate in more specialized functions in fruit. Effect of salt stress on *Slppc* genes expression levels in leaves was analyzed. *Slppc1* and *Slppc2* transcripts was increased under short salt stress, although *Slppc3* was not inducible under this conditions. Continuous salt stress, All *Slppc* transcripts were increased within 6 days. PEPC enzymatic activity was also increased. These results show that inducible PEPC promoted the anaplerotic replenishment of TCA cycle intermediates and this pathway leading to amino acid synthesis. In mature red fruit, *ppc* transcripts level were gradually decreased and PEPC activity also tend to decrease lower activity than that in control fruit. Suppressed PEPC may support promotion of glyconeogenesis through enhancement phosphoenolpyruvate carboxykinase in ripening fruit.