

塩ストレスによるトマト果実一次代謝制御の分子メカニズム解明

松倉 千昭, 野中 聡子

筑波大学大学院生命環境科学研究科

概要 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。トマトでは乾燥・塩ストレスなどの栽培環境ストレスにより糖度や γ -アミノ酪酸(GABA)が増加することが以前から知られており、近年、“フルーツトマト”として消費者の人気を博している。この現象は環境ストレスが果実の一次代謝制御に干渉した結果であると考えられるが、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。これらの現象について基礎的知見を得るため、本研究は塩ストレスによって発現が変動することが明らかになっているデンブシ生合成律速酵素 ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) に注目し、これら酵素遺伝子 *AgpSI*、*AgpLI* の機能欠損形質転換体を利用して塩ストレス条件下における代謝動態への影響を解析した。また、果実において AGPase 遺伝子群の発現制御に関与する因子の探索を試みた。

デンブシ蓄積能力が顕著に低下した AGPase 遺伝子 RNAi 形質転換体を用いて塩ストレスに対する応答性を解析した結果、開花後 42 日目の赤熟果実において非形質転換体では塩ストレスにより糖含量が 2.4 倍増加しているのに対し、形質転換体で糖蓄積促進効果は殆ど認められないことが明らかになった。この結果は、塩ストレス条件下において増加する糖含量の大部分がデンブシ由来であることを示している。AGPase 遺伝子発現誘導因子の探索では、新たにプロリン、ポリアミン、GABA が AGPase 遺伝子の発現制御に関わることが明らかとなった。特にプロリンは *AgpSI*、*AgpLI* 両遺伝子の発現誘導因子として機能していることが明らかになった。他方、GABA とポリアミンについては *AgpSI* と *AgpLI* で応答性が異なっていることから、両遺伝子がアミノ酸やポリアミンに対して異なる発現制御を受けていると考えられる。

本研究により、塩ストレス栽培による果実への糖蓄積促進にデンブシが大きな役割を果たすことが明らかとなった。これらの結果はフルーツトマトの好適品種を育成する際、デンブシ蓄積レベルが有効な指標となることを示している。また、未熟期果実においてデンブシを高蓄積させることにより、収量の減少を伴わずに高糖度トマトの作出が可能であることを示している。

1. 研究目的

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。トマトでは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、近年、“フルーツトマト”として消費者の人気を博している(Adams 1991; Balibrea *et al.* 1996; Zushi *et al.* 2005; Saito *et al.* 2008a, 2008b; Yin *et al.* 2010a)。この現象は環境ストレスが果実の一次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(Ho *et al.* 1987)、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。研究代表者はこの現象の生起機構について、糖・有機酸・アミノ酸代謝制御に注目して研究を進め、これまでに 1) 塩ストレスにより促進される糖蓄積には果実発達初期における果実への糖転流とデンブシ蓄積が重要である、2) 果実におけるデンブシ蓄積促進過程には AGPase 遺伝子群の内 *AgpLI* ならびに *AgpSI* 遺伝子が特異的に関与している(Yin *et al.* 2010b)、3) *AgpLI* の発現

誘導がヘキソキナーゼを介在する糖シグナル伝達系により制御されている、4) *PEPCK* 遺伝子が果実成熟期に塩ストレスに応答して高発現する (Saito *et al.* 2008a)、5) 塩ストレスによりグルタミン酸の蓄積が促進される一方、GABAの分解が抑制される (Saito *et al.* 2008b) ことを明らかにしている。これらの結果は、塩ストレスによる成分蓄積の促進がいわゆる“果汁濃縮効果”だけではなく、一次代謝経路の活性化を伴っていることを示している。糖、有機酸、アミノ酸代謝系は解糖系やTCA回路を介在して相互に密接に連携している (Fig. 1)。しかし、塩ストレス環境下におけるこれら代謝経路の相互作用の実態や、ストレス感受から遺伝子発現制御に至るメカニズムについては依然として不明な点が多いのが現状である。

本研究は上記先行研究の発展として、トマトを材料に、塩ストレス条件下における糖、有機酸およびアミノ酸代謝の相互作用を分子レベルで解明する基礎的知見を得ることを目的とした。具体的には、デンプン生合成の律速酵素であるADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)、有機酸から糖を合成する糖新生の律速酵素であるphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)、トマト果実における主要アミノ酸であるγ-アミノ酪酸の代謝を制御するglutamate decarboxylase (GAD) に注目し、これら酵素の機能欠損形質転換トマトを活用して塩ストレス条件下にお

ける代謝動態への影響を詳細に解析した (代謝経路上の位置は Fig. 1 を参照)。また、Yin *et al.* (2010b) で実施した半切果実を用いた遺伝子発現解析系を活用し、塩ストレス条件下において、果実でAGPase遺伝子群の発現制御に関与する要素の探索を試みた。

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技術の開発や、良食味高付加価値品種の育成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られる。

2. 材料および手法

2.1 塩ストレス条件下におけるAGPase、PEPCK、GAD発現抑制形質転換体果実の代謝産物動態の解明

研究代表者らは果実発達過程においてデンプン蓄積、糖新生、GABA合成に機能する遺伝子として、*AgpL1*、*AgpS1*、*PEPCK*、*GAD3*の各遺伝子発現に注目し解析を進めている。本課題に先立ち、トマト (*Solanum lycopersicum* L., cv. Micro-tom) を用いてこれら遺伝子発現を抑制したRNAiシステムを作出済みであり、本研究ではこれら形質転換体を活用した。具体的には上記形質転換システムについて、標的遺伝子の顕著な発現抑制が

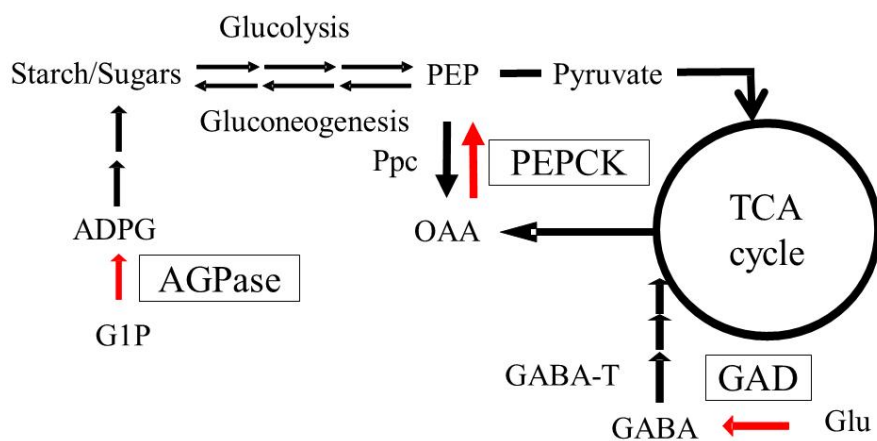


Fig. 1. Schematic illustration of primary metabolism pathway around TCA cycle. The RNAi transgenic plants targeting AGPase, PEPCK were used in the present experiment. The red arrows indicate a reaction catalyzed by the boxed enzymes. ADPG; ADP-glucose pyrophosphorylase, PEPCK; phosphoenolpyruvate carboxykinase, GAD; glutamate decarboxylase, GABA-T; GABA transaminase, Ppc; phosphoenolpyruvate carboxylase, G1P; glucose-1-phosphate, PEP; phosphoenolpyruvate, OAA; oxaloacetic acid, GABA; γ-aminobutyric acid.

確認されている $35S::AgpSI^{RNAi}$ 、 $35S::AgpLI^{RNAi}$ 、 $35S::PEPCK^{RNAi}$ 、 $35S::GAD3^{RNAi}$ の各系統を用いた。対照区として非形質転換体 (WT) の塩ストレス処理、無処理区果実を供試した。まず形質転換体および非形質転換体の種子を 0.5% 次亜塩素酸で殺菌後、蒸留水で洗浄し、ろ紙上に播種した。発芽後、双葉展開期に各系統 6 個体を $5 \times 5 \times 5$ cm サイズのロックウールに移植し、プラスチックトレイを用いて水耕栽培を行った。本葉展開後、これらの植物体を電気伝導度 (EC) 1.5 dS m^{-1} に調整した大塚 A 処方培養液に移し、2 日おきに培養液を交換しながら開花期まで育成を行った。塩ストレス処理は、第一花房開花後、培養液に NaCl を加えて 15.0 dS m^{-1} (約 160 mM NaCl に相当) に調整することで行った。ストレス処理開始時は、植物体の状態を観察しながら EC を 2 日おきに 1.5 dS m^{-1} から 5.0 dS m^{-1} 、 8.0 dS m^{-1} 、 12.0 dS m^{-1} 、 15.0 dS m^{-1} と徐々に上げていき、8 日程度かけて順化させた。開花後 10-14 日目の未熟期果実ならびに 42 日目の赤熟果実を収穫し果実成分の定量を行った。糖分析には HPLC (GL サイエンス, 東京) を用いた。また、デンプン抽出および定量は Raskin and Kende (1984) で述べられている手法に基づき酵素化学的手法により行った。

2. 2 塩ストレスによる AGPase 遺伝子発現誘導因子の探索

フルーツディスク法を用いた遺伝子発現解析は Yin *et*

al. (2010b) の手法に基づき行った (Fig. 2)。すなわち、非形質転換体の開花後 10-14 日目果実をサンプリングし、直ちに半切後、Fig. 2 に示した様々な化合物を加えた 1/2 MS 寒天培地上に置床した。25°C 明条件下で 24 時間培養後、果実をサンプリングし、RNeasy (Qiagen, CA, USA) を用いてトータル RNA を抽出した。これら RNA より SuperScript II (Invitrogen, CA, USA) を用いて cDNA 合成し、それらを鋳型として定量的 RT-PCR を行った。解析対象遺伝子は塩ストレスに応答して発現変動することが明らかになっている *AgpSI* および *AgpLI* とし、処理する化合物は塩ストレスにより含量が増加することが確認されている GABA、プロリン等のアミノ酸、塩ストレスにより植物組織で含量が上昇することが報告されている Na^+ 、 Cl^- 等のイオン類、その他、塩ストレス耐性の獲得に関わると考えられるポリアミンの一種であるスペルミジン (Neily *et al.* 2011)、スペルミンの効果を検討した。GABA 処理試験に関しては、先行研究によりトマト未熟果実中に GABA が多量に含まれることが明らかになっていることから (Rolin *et al.* 2000; Saito *et al.* 2008b; Akihiro *et al.* 2008)、果実 GABA 含量が顕著に減少することが確認されている $35S::GAD3^{RNAi}$ 形質転換体の果実を用いた。上記の解析を通して、塩ストレスによる果実一次代謝制御の作用機序を分子レベルで解明できると考えられる。

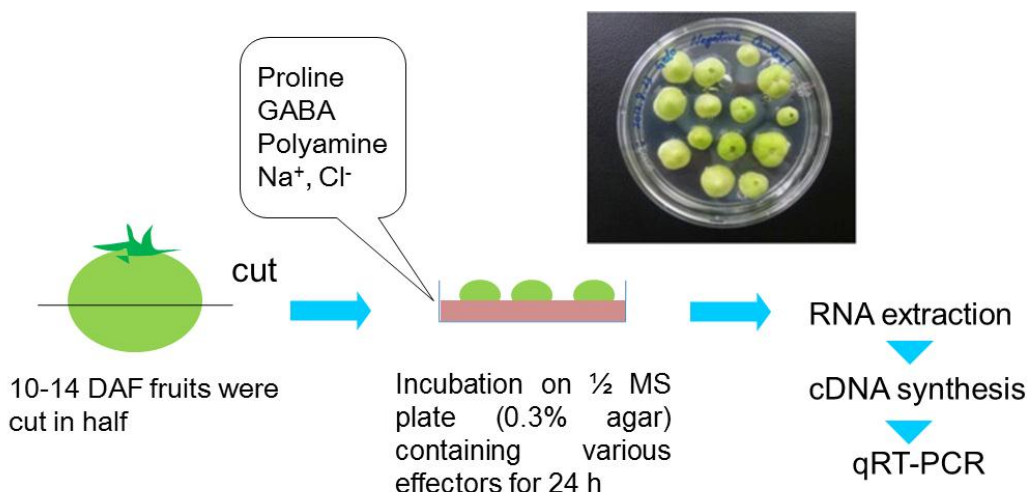


Fig. 2. Treatment with proline, GABA polyamine and ions derived from NaCl. Fruits at 10 days after flowering (DAF) of plants grown in control condition were cut in half and incubated for 24 h at 25°C on half-strength MS medium plate containing indicated effectors.

3. 研究結果

3.1 塩ストレス条件下における AGPase、PEPCK、GAD 発現抑制形質転換体果実の代謝産物動態の解明

本研究では $35S::AgpSI^{RNAi}$ 、 $35S::AgpLI^{RNAi}$ 、 $35S::PEPCK^{RNAi}$ 、 $35S::GAD3^{RNAi}$ の各系統ならびに非形質転換体について塩ストレス栽培を行い未熟期(開花後10-14日目)と赤熟期(開花後42日目)果実をサンプリングした。しかし、果実成分の解析については研究実施期間内に $35S::AgpSI^{RNAi}$ および $35S::AgpLI^{RNAi}$ のデンプン、糖含量を除き測定を完了できなかったため、得られているデータについてのみ詳述する。

$35S::AgpSI^{RNAi}$ 、 $35S::AgpLI^{RNAi}$ の未熟期果実におけるデンプン含量を測定した結果、非形質転換体では無処理区で $25.9 \mu\text{mol/gFW}$ 、塩ストレス処理区で $130.4 \mu\text{mol/gFW}$ と、塩ストレスにより約5倍蓄積が促進されていることが確認された。それに対し、塩ストレス処理区の RNAi 形質転換体においては、 $35S::AgpLI^{RNAi}$ で $51.3 \mu\text{mol/gFW}$ と非形質転換体の塩ストレス処理区と比較して顕著なデンプン蓄積の減少が見られ、 $35S::AgpSI^{RNAi}$ については先行実験同様殆どデンプン蓄積が見られなかった (Fig. 3)。緑熟果実における糖含量は、グルコースが $23.1 \mu\text{mol/gFW} \sim 34.6 \mu\text{mol/gFW}$ 、フルクトースが $29.9 \mu\text{mol/gFW} \sim 36.7 \mu\text{mol/gFW}$ 、スクロースが $19.9 \mu\text{mol/gFW} \sim 25.1 \mu\text{mol/gFW}$ であったが非形質転換体、各形質転換系統間で顕著な差は見られなかった (data not shown)。それに対し、赤熟果実における糖含量については、非形質転換体において無処理区でグルコース $28.3 \mu\text{mol/gFW}$ 、フルクトース $30.2 \mu\text{mol/gFW}$ 、スクロース $4.5 \mu\text{mol/gFW}$ であったのに対し、塩ストレス処理区ではグルコース $65.5 \mu\text{mol/gFW}$ 、フルクトース $63.5 \mu\text{mol/gFW}$ 、スクロース $19.0 \mu\text{mol/gFW}$ と各々約2.3倍、2.1倍、4.2倍の増加が認められた (Fig. 4)。それに対し、RNAi 形質転換体系統においては $35S::AgpSI^{RNAi}$ でグルコース $35.7 \mu\text{mol/gFW}$ 、フルクトース $40.7 \mu\text{mol/gFW}$ 、スクロース $4.0 \mu\text{mol/gFW}$ 、 $35S::AgpLI^{RNAi}$ でグルコース $24.5 \mu\text{mol/gFW}$ 、フルクトース $32.7 \mu\text{mol/gFW}$ 、スクロース $7.8 \mu\text{mol/gFW}$ であった (Fig. 4)。非形質転換体の無処理区と比較すると、 $35S::AgpSI^{RNAi}$ においてグルコース、フルクトースで各1.3倍、スクロースで0.9倍、 $35S::AgpLI^{RNAi}$ においてグルコー

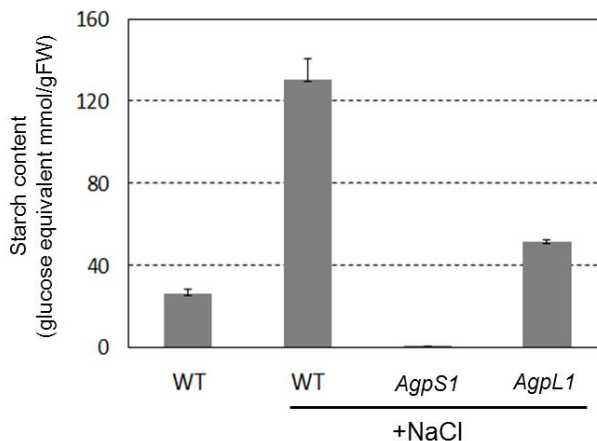


Fig. 3. Starch accumulation in 10 DAF fruits grown under control (without NaCl) and saline conditions (160 mM NaCl). WT; wild type, *AgpSI*; $35S::AgpSI^{RNAi}$, *AgpLI*; $35S::AgpLI^{RNAi}$ transgenic lines, respectively. Values are means \pm SD (n=5-11).

スで0.9倍、フルクトースで1.1倍、スクロースで1.8倍であった。フルクトース、グルコース、スクロースを合わせた総糖含量は対照区の非形質転換体で塩ストレスにより2.4倍促進されているのに対し、 $35S::AgpSI^{RNAi}$ では1.3倍、 $35S::AgpLI^{RNAi}$ では1.03倍と塩ストレスの効果は殆ど認められなかった (Fig. 4D)。

3.2 塩ストレスによる AGPase 遺伝子発現誘導因子の探索

開花後10-14日目の未熟期果実を半切し、塩ストレスに關与すると考えられる様々な化合物を加えた培地上で24時間培養した。その後、果実よりRNAを抽出し *AgpSI*、*AgpLI* 遺伝子の発現を解析した (Fig. 5-7)。その結果、*AgpSI* 発現はプロリンに対して10mM処理区で対照区比約1.5倍、150mM処理区で約2倍の発現上昇を示すことが明らかとなった (Fig. 5A)。また、GABA に対して100mM処理区で対照区比約1.3倍と弱い発現応答を示すことが明らかとなった (Fig. 7A)。他方、スペルミン、スペルミジンに対しては顕著な応答を示さなかった (Fig. 6A)。

AgpLI 発現は *AgpSI* 同様、プロリン処理に対して10mM処理区で1.9倍、150mM処理区で2.9倍と顕著な応答性を示した (Fig. 5B)。他方、スペルミン、スペルミジン処理区では *AgpSI* とは異なり、各々対照区比約1.3倍、1.5倍の発現上昇が見られた (Fig. 6B)。また、*AgpSI* で弱い応答性がみられた GABA については明確な応答性は

見られなかった (Fig. 7B)。

上記に加え NaCl の影響を直接解析するため Na⁺、Cl⁻ を含む Na₂CO₃、KCl についても各々処理を行ったが、

AgpS1、*AgpL1* のいずれにおいても明確な発現応答は見られなかった (data not shown)。

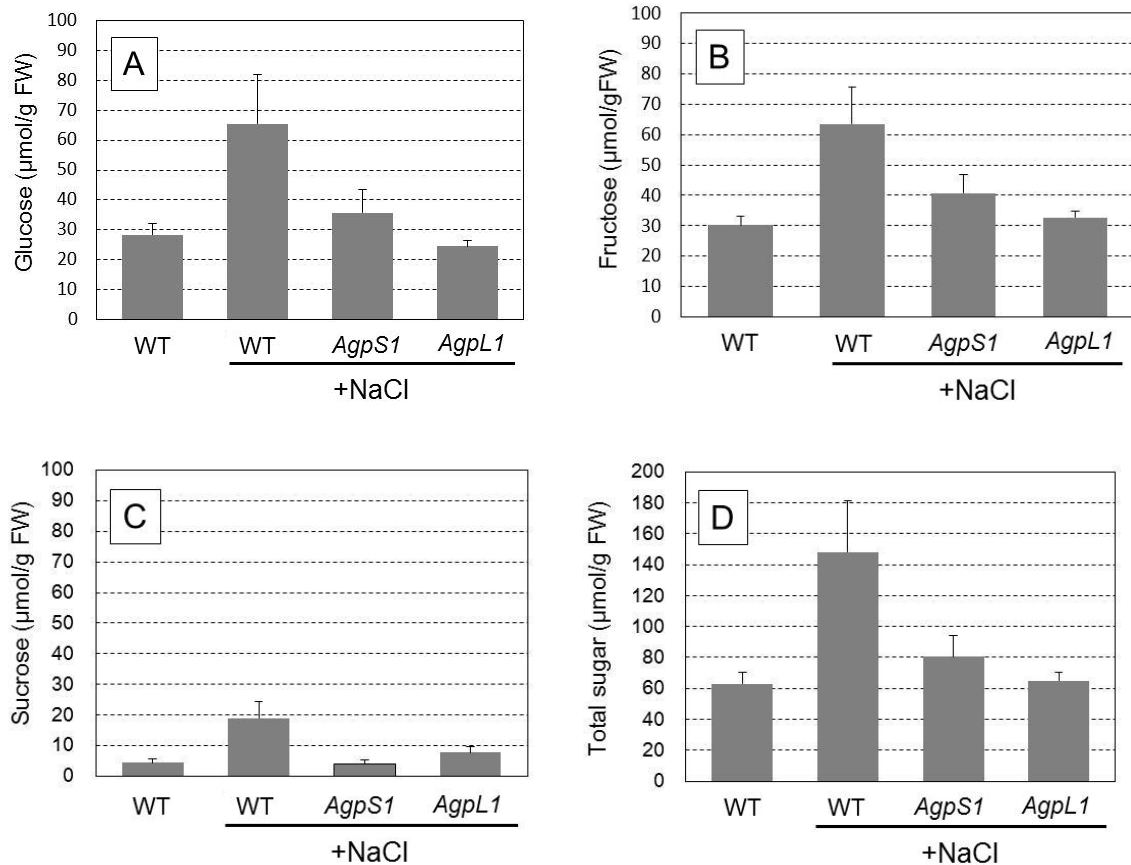


Fig. 4. Soluble sugar content in red-ripe fruits (42 DAF) grown under control and saline conditions (160 mM NaCl). **A**; Glucose, **B**; fructose, **C**; sucrose, **D**; total sugar. WT; wild type, *AgpS1*; 35S::*AgpS1*^{RNAi}, *AgpL1*; 35S::*AgpL1*^{RNAi} transgenic lines, respectively. Values are means ± SD (n=5).

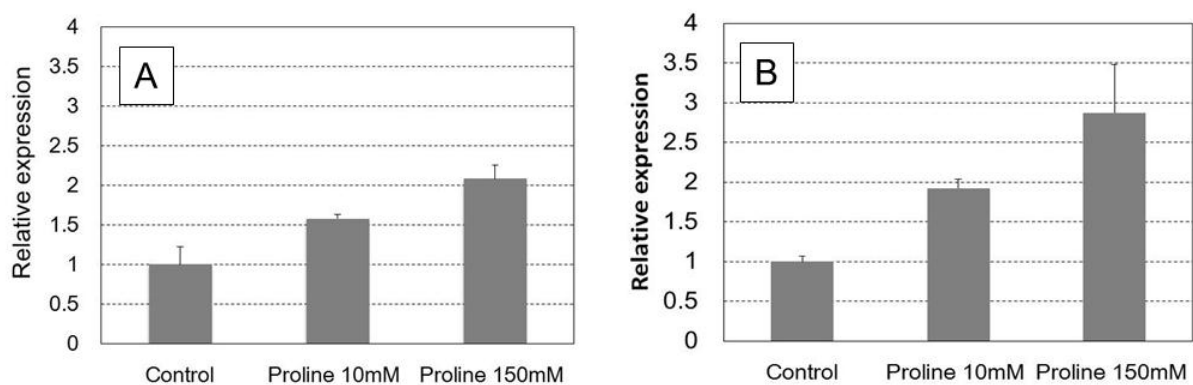


Fig. 5. Relative expression levels of AGPase genes in fruit treated with proline. **A**, *AgpS1*; **B**, *AgpL1*. Fruits at 10-14 DAF of plants grown in control condition were cut in half and incubated for 24 h on half-strength MS medium plate containing 10 mM and 150 mM of proline. Values are means ± SE (n=3).

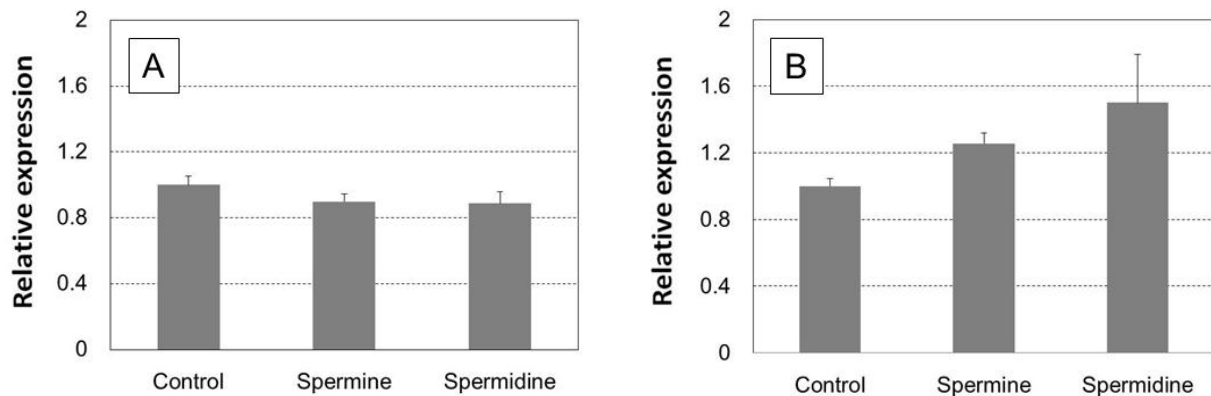


Fig. 6. Relative expression levels of AGPase genes in fruit treated with proline. **A**, *AgpSI*; **B**, *AgpLI*. Fruits at 10-14 DAF of plants grown in control condition were cut in half and incubated for 24 h on half-strength MS medium plate containing 5 mM of spermine and spermidine. Values are means \pm SE (n=3).

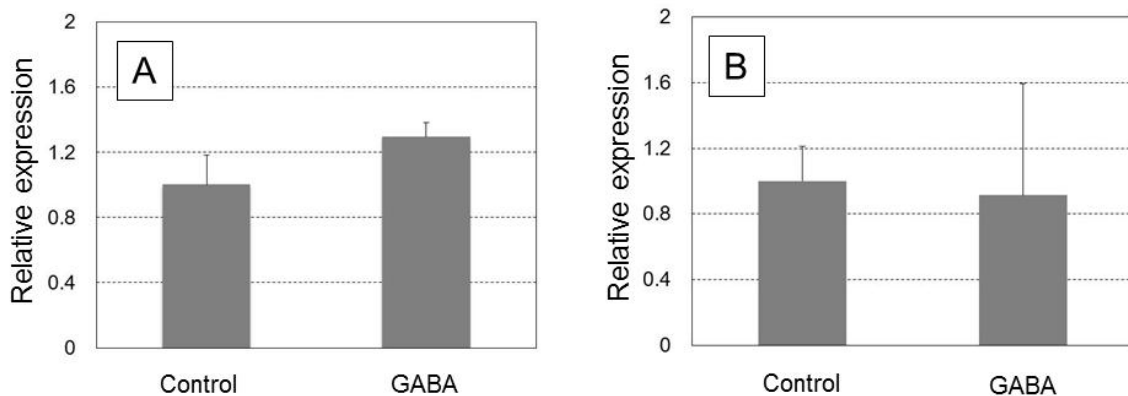


Fig. 7. Relative expression levels of AGPase genes in fruit treated with proline. **A**, *AgpSI*; **B**, *AgpLI*. Fruits at 10-14 DAF of plants grown in control condition were cut in half and incubated for 24 h on half-strength MS medium plate containing 100 mM of GABA. Values are means \pm SE (n=3).

4. 考 察

本研究では 1) 塩ストレス条件下における *AgpSI*、*AgpLI* 遺伝子発現抑制形質転換体果実の代謝産物動態変動の解明ならびに 2) 塩ストレスによる *AgpSI*、*AgpLI* 遺伝子の発現誘導因子の探索を行った。研究代表者らのグループはトマトを用いて塩ストレス処理による果実糖蓄積促進の分子メカニズム解明に取り組んでおり、前述したように、塩ストレスにより促進される糖蓄積には果実発達初期における果実へのデンプン蓄積が重要であることを明らかにしている (Yin *et al.* 2010b)。しかし、これらの研究はいわゆる correlation work であり、デンプン蓄積能力を欠損した変異体や形質転換体を用いた機能喪失実験が必須であった。本研究では、果実におけるデンプン蓄積促進過程に機能する *AgpSI* ならびに *AgpLI* の発現を抑制し、

デンプン蓄積能力が顕著に低下した RNAi 形質転換体を用いて、塩ストレスに対する応答性を解析した。非形質転換体では先行研究同様、塩ストレス処理によりデンプン蓄積が促進されていたが、RNAi 形質転換体ではデンプンの蓄積が顕著に抑制されていた (Fig. 3)。糖含量については、開花後 10-14 日目の未熟果では非形質転換体、形質転換体各系統間で顕著な差は見られなかったのに対し、開花後 42 日後の赤熟果実においては総糖含量で対照区の非形質転換体で塩ストレスにより 2.4 倍促進されているのに対し、35S::*AgpSI*^{RNAi}では 1.3 倍、35S::*AgpLI*^{RNAi}では 1.03 倍に留まった (Fig. 4D)。塩ストレス条件下における非形質転換体に対する各形質転換体系統の糖含量の割合は 35S::*AgpSI*^{RNAi}で 54%、35S::*AgpLI*^{RNAi}で 44%であり、差し引き 46%~56%の糖が未熟期に蓄積するデンプンに

由来していると考えられる。我々は、先行研究において塩ストレス無しの通常条件下で栽培した場合、赤熟果実糖含量に占めるデンプン由来の割合は2~3割程度であることを明らかにしているが、今回の結果は、塩ストレス条件下において増加する糖含量の大部分がデンプン由来であることを示している。これらの結果は、未熟期果実においてデンプンを高蓄積させることにより、高糖度果実トマトの作出が可能であることを示している。現在、*AgpSI*、*AgpLI* を過剰発現させた形質転換体の作出に取り組んでおり、これらの系統の特性解析を通して、デンプンの果実糖成分への影響を解明していく予定である。

AgpSI、*AgpLI* 遺伝子の発現誘導因子の探索では、新たにプロリンやポリアミン、GABA が AGPase 遺伝子群の発現制御に関わることが明らかとなった (Fig. 5-7)。他方、 Na^+ や Cl^- 等のイオンは直接的な発現誘導効果を示さなかった。我々は先行研究において *AgpLI* が糖により発現誘導を受け、その過程には糖シグナル伝達系が介在することを明らかにしている (Yin *et al.* 2010b)。しかし、*AgpSI* については糖には応答しないことが判っており、塩ストレス感受後の介在因子については不明であった。今回の解析で *AgpSI*、*AgpLI* の発現誘導に関わることが明らかになったプロリンについては、塩ストレスで果実への蓄積が促進されることが報告されている (Yin *et al.* 2010a)。すなわち、まず塩ストレスがプロリン蓄積を促進し、それらが *AgpSI*、*AgpLI* の発現を誘導していると考えられる。他方、GABA やポリアミンについては *AgpSI* と *AgpLI* で応答性が異なっていた。研究代表者らは先行研究において、両遺伝子が糖に対して異なる応答性を示すことを報告している (Yin *et al.* 2010b)、今回の結果は AGPase 遺伝子群がアミノ酸やポリアミンに対しても異なる様式の発現制御を受けていることを示している。また、我々はトマトにおいてスペルミジン合成酵素 (SPDS) 遺伝子高発現形質転換体が塩ストレス耐性を獲得することを報告している (Neily *et al.* 2011)、これらの現象にはデンプン/糖蓄積が何らかの役割を果たしている可能性がある。

5. 今後の課題

本研究により、塩ストレス栽培による果実への糖蓄積促進にデンプンが大きな役割を果たすことが明らかとなった。これらの結果はフルーツトマトの好適品種を育成する際、

デンプン蓄積レベルが有効な指標となることを示している。また、品種間で *AgpSI*、*AgpLI* 遺伝子のゲノム配列を比較することにより塩ストレスへの応答性の違いに連鎖した DNA マーカーの作成が可能になると考えられる。将来的には遺伝子組換え技術により両遺伝子を高発現させ、塩ストレスによる収量減少を伴わずに高糖度化を実現することも可能と考えられる。しかし、昨今の消費者意識の動向を勘案すると、デンプン高蓄積変異体の探索など、遺伝子組換え以外の手法を探る必要があると考えられる。

AGPase 遺伝子発現誘導因子の探索では、*AgpSI* および *AgpLI* 遺伝子の発現誘導にプロリンが関与することが明らかとなった。プロリンは果樹などの園芸品種で既に果実品質を向上させる葉面散布剤として使用されているが、フルーツトマトの生産にも有効である可能性がある。今後、栽培試験等で有効性を確認する必要がある。

最後に、本研究では、栽培スペースやマンパワーの問題から、当初計画していた *PEPCK* や *GAD* 発現抑制形質転換体を用いた解析を期間内に終えることが出来なかった。既に栽培・サンプリングは終了していることから、今後、速やかに代謝産物の測定を行い、早期に塩ストレス条件下における糖・アミノ酸・有機酸代謝の相互作用実態について知見を得る予定である。

謝辞

本研究の遂行に当たりご支援を頂いた公益財団法人ソルトサイエンス研究財団に心より感謝申し上げます。

文献等

- Adams P (1991) Effects of increasing the salinity of the nutrient solution with major nutrients or sodium chloride on the yield, quality and composition of tomatoes grown in rockwool. *J Hort Sci* 66: 201-207
- Akihiro T, Koike S, Tani R, Tominaga T, Watanabe S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Ashihara H, Matsukura C, Akama K, Fujimura T, Ezura H (2008) Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. *Plant Cell Physiol* 49: 1378-1389
- Balibrea M, Santa Cruz A, Bolarín M, Pérez-Alfocea F (1996) Sucrolytic activities in relation to sink strength and carbohydrate composition in tomato fruit growing

- under salinity. *Plant Science* 118: 47-55
- Ho LC, Grange RI, Picken AJ (1987) An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant Cell Environ* 10: 157-162
- Neily MH, Baldet P, Arfaoui I, Saito T, Li QL, Asamizu E, Matsukura C, Moriguchi T, Ezura H (2011) Overexpression of apple spermidine synthase 1 (*MdSPDS1*) leads to significant salt tolerance in tomato plants. *Plant Biotechnology* 28: 33-42
- Raskin I, Kende H (1984) Effect of submergence on translocation, starch content and amylolytic activity in deep-water rice. *Planta* 162: 556-559
- Rolin D, Baldet P, Just D, Chevalier C, Biran M, Raymond P (2000) NMR study of low subcellular pH during the development of cherry tomato fruit. *Aust. J. Plant. Physiol* 27: 61-69
- Saito T, Matsukura C, Ban Y, Shoji K, Sugiyama M, Fukuda N, Nishimura S (2008a) Salinity stress affects assimilate metabolism at the gene-expression level during fruit development and improves fruit quality in tomato (*Solanumlycopersicum* L.). *J Japan Soc Hort Sci* 77: 61-68
- Saito T, Matsukura C, Sugiyama M, Watahiki A, Ohshima I, Iijima Y, Konishi C, Fujii T, Inai S, Fukuda N, Nishimura S, Ezura H (2008b) Screening for γ -aminobutyric acid (GABA)-rich tomato varieties. *J Japan Soc Hort Sci* 77: 242-250
- Yin YG, Tominaga T, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Ashihara H, Nishimura S, Ezura H, Matsukura C (2010a) Metabolic alterations in organic acids and γ -amino butyric Acid in developing tomato (*Solanumlycopersicum* L.) fruits. *Plant Cell Physiol* 51: 1300-1314
- Yin YG, Kobayashi Y, Sanuki A, Kondo S, Fukuda N, Ezura H, Sugaya S, Matsukura C (2010b) Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanumlycopersicum* L. cv. Micro-Tom) fruits in ABA- and osmotic stress-independent manner. *J Exp Bot* 61: 563-574
- Zushi K, Matsuzoe N, Yoshida S, Chikushi J (2005) Comparison of chemical composition contents of tomato fruit grown under water and salinity stresses. *J Sci High Technol Agric* 17: 128-136 (In Japanese with English abstract)

Regulation Mechanism of Primary Metabolism in Tomato Fruit under Salt Stress

Chiaki MATSUKURA, Satoko NONAKA

Institute of Life and Environment Sciences, University of Tsukuba

Summary

Fruit composition largely affects fruit and consumers tastes. Salt stress improves the quality of tomato fruits with increased sugar and amino acid contents such fructose and GABA. However, regulation mechanisms how salt stress improves the fruit composition is not fully understood to date. In this study, to clarify the mechanism(s) underlying this phenomenon, we investigated metabolic alterations in transgenic tomato fruits with suppressed expression of ADP-glucose pyrophosphorylase genes under 160 mM of salt stress, focusing on sugar and starch. The transgenic tomato plants we submitted in the present study were generated by RNAi method in our previous research and designed *35S::AgpSI^{RNAi}* and *35S::AgpLI^{RNAi}*. The plants were raised by hydroponic culture and treated with the 160 mM salt stress by adding NaCl to the hydroponic culture medium after flowering period. Fruits were sampled at 10 days after flowering (DAF) as immature-green stage and at 42 DAF as mature-red stage. Quantification of starch content in immature-green fruit revealed that starch accumulation was 5-times enhanced by the salt stress in wild type plants as observed in our previous research. However, no or largely-reduced starch accumulation were observed in the *35S::AgpSI^{RNAi}* and the *35S::AgpLI^{RNAi}* fruits, respectively. Accumulation of soluble sugars such glucose, fructose and sucrose in red-ripe fruits were also 2.4-times enhanced by the salt stress in wild-type plants. However, such a promotion effect of salt-stress on the fruit sugar contents was not observed in the *35S::AgpSI^{RNAi}* and the *35S::AgpLI^{RNAi}* fruits, indicating the increased sugars in the salt-stressed fruit is caused by the increased starch in immature-green stage. In this study, to explore a factor regulating *AgpSI* and *AgpLI* genes in immature-green fruits, we also analyzed the effect of various fruit components such proline, GABA, polyamine and ions derived from NaCl on the expression of the genes. Quantitative RT-PCR analyses revealed that the both genes were strongly induced by proline treatment at transcriptional level. Interestingly, *AgpSI* only responded to GABA but not to polyamines. In contrast, *AgpLI* only responded to polyamines but not to GABA. Those results indicated two genes, *AgpSI* and *AgpLI*, are differentially regulated in immature-green fruits.