

塩ストレス条件下で栽培したトマト果実に発現するマイクロ RNA の解析

朝倉 富子

東京大学大学院農学生命科学研究科

概要 トマトはカロテン, リコペン, ポリフェノール, ビタミンCなどの機能性成分を含み, 生食だけではなく多くの加工品に利用される世界中で最も消費されている野菜のひとつである。トマトは, 甘味, 酸味, 旨味のバランスが特に重要とされ, トマト特有の匂いや味は品種を特徴付ける物質として解析されている。このように, 品種改良による品質の向上や目的に合った品種の作出が試みられている一方で, 栽培方法を工夫することで栄養価や食味を向上させる試みも行われている。トマトをストレス条件下(乾燥, 低栄養など)で栽培すると糖やアミノ酸, 有機酸の生産量が増加することが知られている。我々は塩水を与えることで低水分状態にしたトマトの登熟期における遺伝子の発現解析から, 脂肪酸の生合成およびアミノ酸の生合成に関連する分子の発現が有意に上昇することを見出した。果実の登熟期に植物体がストレスを受けると, そのストレスを解除するための代謝系が動く。ストレス応答ホルモンの一種であるアブシジン酸も増加するが, アブシジン酸は, 哺乳類の脂質代謝に関与する機能性成分の一つであることも報告されている。

これらの二次代謝産物以外に, 食品中の miRNA が, 摂取した生物の代謝制御に関与しているという報告もある。本研究では, 塩ストレス下で成熟したトマト果実中の miRNA を解析し, 機能性成分としての可能性を探ることとした。

実験用矮性品種であるマイクロトムを, 開花後から 0.4%の塩水を与え, 完熟まで塩ストレス条件下で栽培した。完熟果実から miRNA を抽出し, GeneChip miRNA に供した結果, 発現が 2 倍以上変動した miRNA として has-miR-3163-3p, has-miR-4481, has-miR-4468-5p, has-miR-548ac, has-miR-4701-3p の 4 種と HBII-85(核小体由来の small RNA) が抽出された。miRNA の標的遺伝子を, miRDB を用いて target score 90 以上の遺伝子を抽出し, これらの予測標的遺伝子が含まれるパスウェイを, IPA を用いて解析した結果, 28 のパスウェイが抽出され, 6 つのカテゴリ(免疫系, 神経系, MAPK ファミリー, 心臓疾患, 癌関連, その他)に分類された。一方, トマトの miRNA で 2 倍以上の変動があった遺伝子は, sly-miR399 と sly-miR395 であった。これらは, トマトの葉, 果実で発現する報告が既にあるが, 標的遺伝子などは解明されていない。特に sly-miR395 は, 発現量が 10 分の 1 以下になっており, 塩ストレス時の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている可能性が示された。

1. 研究目的

トマトはカロテン, リコペン, ポリフェノール, ビタミンCなどの機能性成分を含み, 生食だけではなく多くの加工品に利用される世界中で最も消費されている野菜のひとつである。栽培種は, 野生種に較べ形, 色, 味などが, 目的に合った形質を保有するように改良されている。トマトは, 甘味, 酸味, 旨味のバランスが特に重要とされ, トマト特有の匂いや味は品種を特徴付ける物質として同定されている。このように, 品種改良による品質の向上や目的に合っ

た品種の作出が試みられている一方で, 栽培方法を工夫することで栄養価や食味を向上させる試みも行われている^(1,2)。トマトを含めいくつかの作物が低栄養, 低水分条件下で, 栽培すると糖やアミノ酸, 有機酸の生産量が増加することが知られている。一般に, トマト果実の食味に影響する主な成分としては, フルクトースやグルコースを含む糖, クエン酸などの有機酸, そして旨味成分としてのアミノ酸があげられる。また, フレーバー成分が品質に関わっているという報告もある⁽³⁻⁶⁾。ストレス下で栽培したトマトはこれら

の成分含量が増加していることが報告されている⁽²⁾。さらにトマトには、抗酸化作用を持つリコペンやβ-カロテン、ビタミン、ミネラルなど様々な機能性成分が含まれている。よりメタボローム解析によってトマト果実中の成分の詳細が明らかになりつつある⁽⁷⁻¹⁰⁾。

しかし、これら有効成分の代謝に関与する遺伝子の調節については、まだ未解明の部分が多く残っており、また、どのような遺伝子発現変化を伴って、果実中の成分変化が起きているのかはまだ完全には解明されていない。我々は塩水を与えることで低水分状態にしたトマトの登熟期における遺伝子の発現を、水を与えたコントロール群と DNA マイクロアレイを用いて比較した結果、脂肪酸の生合成およびアミノ酸の生合成に関連する分子の発現が有意に上昇することを見出した。この結果は、塩ストレスが脂肪酸合成を誘導することを示唆する。脂肪酸はストレス応答ホルモンであるジャスモン酸の出発物質となる。果実の登熟期に植物体がストレスを受けると、そのストレスを解除するための代謝系が動く。近年、遺伝子の発現を制御する分子としてのマイクロ RNA が注目されている。ある種のマイクロ RNA (例えばコメの MIR168) は、ヒトの LDL 受容体に作用し、その発現を低下させることが知られている⁽¹¹⁾。塩水添加によって受けるストレスは、トマト果実中にマイク

ロ RNA の発現を上昇される可能性が高い。マイクロ RNA は血中に放出され、体内を循環することが知られていて、体内の様々な臓器で作用することが期待される。本研究では、塩ストレスを受けたトマト果実中のマイクロ RNA を解析し、機能性成分としての可能性を探ることを目的とする。

2. 研究方法

2.1 栽培方法とサンプルの採取

本研究には実験用矮性品種であるトマト (*Solanum lycopersicum* L, マイクロトム Micro-Tom) を用いた。フードがついた発芽用のポットに種まき用土(シャルカ社製)を入れて播種し、生育させる。鉢上げは本葉 1~2 枚が出た頃に直径 15 cm のビニールポットに日向土を入れて移植し、その後はそのまま育成した。培地には日向土を利用し、液肥(住友化学製)を週に 1 回与えた。トマトが開花するまでは蒸留水のみを、開花後コントロール区は蒸留水を、塩ストレス処理区では 0.4% の塩水を生育終了まで与えた。昼 25°C, 夜 20°C に制御した温室で生育し、冠水量は週に 2 回一株当たり 150 mL に設定し、開花後 30~40 日の完熟果実を収穫した (Fig. 1)。果実は採取後直ちに -80°C のディープフリーザーへ入れて保管し、RNA 抽出時に取り出して使用した。

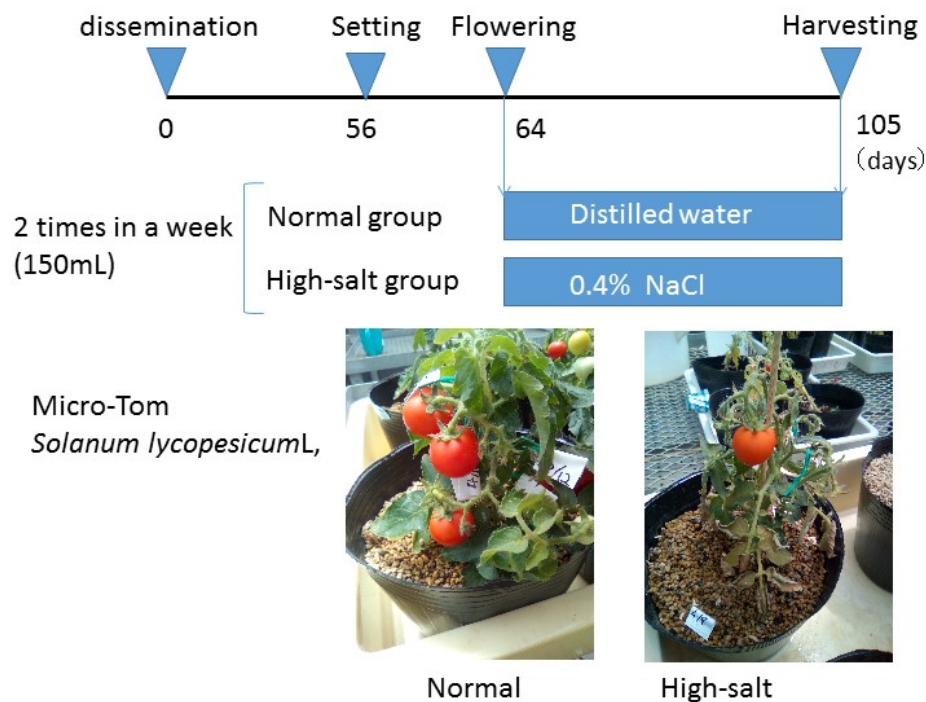


Fig. 1. Cultivation schedule

2. 2 small RNA を含む Total RNA の抽出

トマト 1.2-3.3 g を液体窒素により凍結粉砕し、そのうち 500 mg を用いた。

はじめに Fruit-mate for RNA Purification (TaKaRa 社 #9192) 5 ml にサンプルを懸濁し、遠心して上清を回収することで、トマトに含まれるポリフェノール類及び多糖類などの夾雑物を除去した。その後、TaKaRa 社のプロトコールに従い、RNAiso Plus (TaKaRa 社 #9108) を用いて small RNA を含む Total RNA を抽出した。さらに、small RNA を濃縮するため、NucleoSpin miRNA Plasma kit (MACHEREY-NAGEL 社 #740981.10) により濃縮を行った。

得られた small RNA はナドドロップ (Thermo Fisher 社) を用いて定量し、品質の検査はアガロース電気泳動および Agilent 2100 バイオアナライザ Small RNA kit (Agilent 社) により解析を行った。

2. 3 マイクロアレイ

Small RNA のビオチン標識には、FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Affymetrix 社 #703095) を使用した。方法は、Small RNA 900ng に Poly(A) tail を付加し、そこにビオチン標識した 3DNA を連結させることで標識を行った。

ビオチン標識 small RNA サンプルは、GeneChip miRNA 4.0 Array (Affymetrix 社 #902413) に 48°C で 16 時間ハイブリダイズした。その後、洗浄、染色は GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix 社 #900720) を用いて行い、シグナルの蛍光強度をスキャナーで取り込み解析を行った。これらマイクロアレイ一連の操作は、Affymetrix 社のプロトコールおよび、Affymetrix GeneChip System を用いて行った。

2. 4 マイクロアレイデータ解析

得られたマイクロアレイのデータは、Affymetrix Expression Console ソフトウェア上で、MicroRNA Arrays RMA+DABG Human Only を用いて正規化を行った。その後、Transcriptome Analysis Console 3.0 ソフトウェアを使用し、塩ストレス負荷サンプルとコントロールサンプルとの二群間比較を行った。このとき、Fold Change \geq 2.0/ANOVA P-value < 0.05 を満たす small RNA のみを抽出した。

得られた small RNA のうち miRNA は、miRDB データ

ベース (<http://mirdb.org/miRDB/>) を用いて miRNA と結合すると予測される遺伝子を検索した。このとき、target score 90 以上の遺伝子のみを抽出し、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて P-value < 0.01/Zscore \geq 2 を満たす canonical pathway に関わるパスウェイを抽出した。Small nucleolar RNA に関しては HBII-85 に着目し、過去の論文を検索することで機能を探索した。

3. 結果と考察

塩水で栽培した塩水群と通常群では、1 株当たりの収穫果実数は、通常群の方が多かったが、結実速度と果実重量には有意差はなかった。トマトの性状には差が認められ、塩水群では、果実の表面に細かい産毛が密集し、水分の蒸散を防止していると思われた (Fig. 1)。

Gene chip microRNA 4.0 array に搭載されている RNA (ヒト由来 6,631, トマト由来は 48) のうち、p-value < 0.05 かつ fold change の絶対値が 2 以上であった miRNA のリストを Table 1 に示す。この条件を満たすもので、ヒト miRNA に交差するものは 12 個、トマトでは 3 個であった。ヒトの miRNA では、12 個中、HBII-85 が 4 個含まれていた。HBII-85 は、核小体に存在する small RNA の一種であり、別名 SNORD166 である。SNORD166 は C/D box クラスに属する snoRNA で、Cボックス (UGAUGA) と Dボックス (CUGA) を有している。このファミリーに属する snoRNA は RNA の 2'-O-methylation を行う。SNORD116 は、28 の配列がタンデムに並び、それに続いて同じく C/D box 配列を持つ snoRNA である SNORD115 (47 コピー) が、15 番染色

Table 1. Significantly expressed miRNAs

Transcript ID	Fold Change	ANOVA p-value
HBII-85-26	12.95	0.004433
HBII-85-6	3.92	0.02778
ENSG00000238388	3.8	0.033607
HBII-85-26	3.74	0.048025
hsa-miR-3613-3p	3.69	0.049426
ENSG00000252277 (HBII-85-30)	3.13	0.029454
hsa-miR-4481	3.1	0.037899
ENSG00000238388	2.87	0.040104
hsa-miR-4668-5p	2.53	0.031483
ENSG00000201619	2.38	0.0235
hsa-miR-548ac	2.21	0.013118
hsa-miR-4701-3p	2.06	0.004358

体に配座している。SNORD116 の繰り返し配列に欠損が生じると、プラダー・ウィリー症候群 (Prader-will syndrome, PWS) を生じる。この疾患は、筋緊張低下、性腺発育不全、知的障害、肥満を主たる症状とするものであるが、分子レベルでの作用メカニズムについては不明な点が多い。SNORD116 と SNORD115 を過剰発現させた HEK 細胞の DNA マイクロアレイの結果から、SNORD116 の制御を受ける遺伝子として、ST6GAL NAC2, ACOXL, FRKCE, CYP11E1, PEX11A が抽出された⁽¹²⁾。これらの分子の中には、ST6GAL NAC2:シアル酸をタンパク質に転移させるシアル酸転移酵素, ACOXL:アシル CoA オキシダーゼ, CYP2E1:異物代謝に関わる酸化還元酵素, PEX11A:ペルオキシソームにおける長鎖脂肪酸のβ酸化, コレステロール, 胆汁酸の合成, アミノ酸やプリン代謝に関与する成長因子, MAP2:神経組織の発達段階において、樹状突起の形態を安定化させるための微小管成長を促進する分子, PEKCE (PKCε):特に虚血性疾患や心臓肥大から心臓を保護する作用を有する分子, などが含まれていた。一方で SNORD115 は、micRNA chip のハイブリダイゼーションの結果から chip に搭載されている 14 のサブタイプすべてにおいて、2 倍を超える発現量の変動は見られなかった。

miRNA で抽出されたものは、has-miR-3163-3p, has-miR-4481, has-miR-4468-5p, has-miR-548ac, has-miR-4701-3p の 5 種であった。これらの miRNA の標的遺伝子を抽出するために miRDB データベース (<http://mirdb.org/miRDB/>) を用いて個々の miRNA と結合すると予測される遺伝子を検索し、target score90 の遺伝子のみを抽出した結果、has-miR-3163-3p では 614, has-miR-4481;147, has-miR-4468-5p;233, has-miR-548ac; 180, has-miR-4701-3p;18 遺伝子が抽出された。これらの予測標的遺伝子が含まれるパスウェイを Ingenuity Pathway Analysis (IPA) にて解析した。この際、各遺伝子は、miRNA によって発現が抑制されると考えられることから、miRNA の発現が上昇した場合、標的遺伝子の発現は減少すると予測し、解析に供した。

IPA のパスウェイ解析の結果、p-value が 0.01 未満、且つ Z スコアの絶対値が 2 以上であるパスウェイが 28 存在した。ほぼすべてのパスウェイで低下すると予測されたが、PTEN signal は亢進すると予測された。28 のパスウェイは、

大きく6つのカテゴリーに分類された (Table 2)。Synaptic long term protection パスウェイに関与する遺伝子の一覧を Fig. 2 に Cardiac hypotrophy signaling を Fig. 3 に示す。Synaptic long Term Protection では、Glu の受容体である AMPAR, NMDAR, mGluR が変動し、その下流にある CaMK2, CaM, CaN, Ras なども変動する。cAMP response element binding protein である CREB, CREB のコアクチネーターの CBP の変動が予測され、長期記憶増強 (LTP) が抑制方向に向かう。Cardiac hypotrophy signaling は、心臓肥大と関連するパスウェイで、ノルアドレナリン受容経路に属する ADRβ, その下流にある CALM (calmodulin), calcineurin が変動した。また、TGF-β経路の TGF-β受容体、心筋細胞において重要な働きを担う TAK1 (TGF-β-activated kinase1) や MEKK1 (MAP3KK1) などの変動が示されていることから、心疾患との関連が予測される。以上、塩ストレス下で栽培したトマトで、発現が変動する micRNA は、体内を循環すると、様々な生理機能へ働きかける可能性が示されたが、これらが実際に機能を発揮するか否かは今後の研究課題である。

一方、塩ストレスを与えたトマトでは、2 種の miRNA の発現変動が認められた。sly-miR399 と sly-miR395 である。トマトのマイクロ RNA に関する情報はまだ少ないが、いずれも論文献^(14,15)に存在が報告されている。sly-miR399 も sly-miR395 も発現量は論文で取り上げられている他の miRNA に比べて低い。現在までのところ、これら2つの micRNA の標的分子は明らかになっていないが、今回塩水で栽培した果実では sly-miR395 は発現が 10 分の 1 以下に、sly-miR399 も 3 分の 1 以下にまで減少した。このことは、塩ストレスに関わる分子の発現に sly-miR395 が深く関与している可能性を示す。mRNA の発現データとゲノム配列との対応によって、標的分子を同定し、ストレス応答のメカニズムの一端を明らかにできる可能性がある。

4. 今後の課題

miRNA は、近年様々な生理機能調節に関与することが報告されており、注目を集めている分子群であるが、食品中に含まれる miRNA は、体内の遺伝子発現まで制御するという報告が出始めている^(11,13)。発揮する機能としては、骨代謝、免疫、コレステロール代謝と多岐に亘り、今後更に多くの miRNA の作用が解明されることと思われる

Table 2. Canonical pathways belonged to the putative target genes for tomato miRNAs

カテゴリー	Canonical Pathways	$-\log$ (p-value)	z-score	Molecules
免疫系	B Cell Receptor Signaling	5.16E+00	-4.379	GSK3B,KRAS,MAP3K7,CDC42,TCF3,CALM1 (includes others), AKT1, CREB1, EP300, CAMK2D, EGR1, PPP3CA, MAP3K13, MEF2C, CFL2, VAV2, NRAS, GAB2, MAP3K2, MAP3K1, CREBBP, MAPK8, NFAT5, RPS6KB1
	TGF- β Signaling	4.58E+00	-3.742	KRAS, MAP3K7, CDC42, SMAD2, EP300, TGF β 2, BMPR2, BMPR1A, NRAS, ACVR1C, SMAD1, TGIF1, CREBBP, TGFB1, MAPK8
	NF- κ B Signaling	3.82E+00	-4.583	FGFR2, GSK3B, FGFR1, KRAS, MAP3K7, MAP4K4, AKT1, CSNK2B, EP300, PELI1, TBK1, IRAK4, BMPR2, BMPR1A, NRAS, MAP3K1, FLT1, CREBBP, TGFB1, MAPK8, FGFR4
	STAT3 Pathway	3.00E+00	-2.714	FGFR2, BMPR1A, FGFR1, BMPR2, KRAS, NRAS, SOCS5, FLT1, TGFB1, MAPK8, FGFR4
神経系	Synaptic Long Term Potentiation	4.03E+00	-2.668	KRAS, GNA11, CALM1 (includes others), CREB1, GRIA1, PRKAR2B, EP300, PPP1R7, CAMK2D, PPP3CA, NRAS, GRIN2D, PPP1CB, GRM7, PDIA3, CREBBP, PPP1R3A
	NGF Signaling	3.53E+00	-3.873	KRAS, MAP3K7, CDC42, AKT1, CREB1, EP300, MAP3K13, RPS6KA6, NRAS, MAP3K2, MAP3K1, CREBBP, MAPK8, RPS6KB1, RPS6KA4
	Aggrin Interactions at Neuromuscular Junction	2.65E+00	-3	GABPB1, KRAS, NRAS, CDC42, PAK2, CTTN, ACTB, MAPK8, DAG1, GABA
	CREB Signaling in Neurons	2.61E+00	-3.742	KRAS, GNAZ, GNA11, CALM1 (includes others), AKT1, CREB1, GRIA1, PRKAR2B, POLR2A, EP300, CAMK2D, GNAI3, NRAS, GRIN2D, GRM7, PDIA3, CREBBP, GNG13
	Ephrin Receptor Signaling	3.32E+00	-3.606	KRAS, GNAZ, CDC42, PAK2, MAP4K4, GNA11, AKT1, CREB1, EPHA3, EP300, EFNA5, EPHA7, WASL, ADAM10, GNAI3, CFL2, NRAS, GRIN2D, CREBBP, GNG13
	Neurotrophin/TRK Signaling	2.21E+00	-2.828	KRAS, NRAS, CDC42, AKT1, CREB1, EP300, CREBBP, MAPK8, SORCS1
MAPKファミリー	ERK5 Signaling	8.08E+00	-3.742	KRAS, YWHAG, AKT1, CREB1, EP300, ELK4, YWHAH, RPS6KA6, MEF2C, NRAS, SGK1, MAP3K2, CREBBP, MEF2D, YWHAZ, RPS6KB1, RPS6KA4
	p38 MAPK Signaling	3.60E+00	-2.673	DUSP10, MAP3K7, CREB1, ATF1, EP300, TGF β 2, RPS6KA6, MEF2C, EEF2K, IRAK4, CREBBP, TGFB1, MEF2D, IRAK2, RPS6KB1, RPS6KA4
	GNRH Signaling	3.59E+00	-4.123	KRAS, MAP3K7, CDC42, PAK2, GNA11, CREB1, PRKAR2B, EP300, CAMK2D, EGR1, MAP3K13, GNAI3, NRAS, MAP3K2, MAP3K1, CREBBP, MAPK8
	SAPK/JNK Signaling	2.13E+00	-2.111	DUSP10, MAP3K7, KRAS, NRAS, DUSP8, CDC42, MAP4K4, MAP3K2, MAP3K1, MAPK8, MAP3K13
心臓疾患	Cardiac Hypertrophy Signaling	4.66E+00	-4.082	GSK3B, GNA11, AKT1, CREB1, CALM1 (includes others), PRKAR2B, MAP3K13, GNAI3, CREBBP, TGFB1, GNG13, MAPK8, MEF2D, RPS6KB1, KRAS, MAP3K7, GNAZ, ADRB3, EP300, TGF β 2, PPP3CA, MEF2C, NRAS, MAP3K2, MAP3K1, PDIA3, EIF4E
	Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	3.16E+00	-3.441	GSK3B, KRAS, MAP3K7, CALM1 (includes others), AKT1, PRKAR2B, EP300, SLC8A1, CAMK2D, TGF β 2, PPP3CA, MEF2C, GNAI3, NRAS, MAP3K1, PDIA3, TGFB1, MAPK8, GNG13, MEF2D
癌関連	PTEN Signaling	3.56E+00	2.84	FGFR2, GSK3B, FGFR1, KRAS, CDC42, AKT1, BCL2L11, CSNK2B, YWHAH, BMPR2, BMPR1A, NRAS, FLT1, TGFB1, FGFR4, RPS6KB1
	Renal Cell Carcinoma Signaling	2.05E+00	-2.236	KRAS, VHL, NRAS, CDC42, PAK2, AKT1, HIF1A, EP300, CREBBP
その他	PPAR α /RXR α Activation	4.55E+00	2.837	KRAS, MAP3K7, MAP4K4, GNA11, PRKAR2B, SMAD2, MED1, PRKAA1, EP300, TGF β 2, CLOCK, ADIPOQ, MEF2C, NCOA3, BMPR2, NRAS, ACVR1C, PRKAA2, PDIA3, CREBBP, TGFB1, MAPK8, NCOR1
	RhoGDI Signaling	3.35E+00	2.5	GNAZ, CDC42, PAK2, ARHGEF3, GNA11, ARHGAP5, EP300, ARHGAP35, CDH4, WASL, CDH3, CD44, WASF1, GNAI3, CFL2, ACTB, CREBBP, GNG13, ARHGAP12, ESR1
	AMPK Signaling	3.19E+00	-2.5	MAP3K7, PPM1A, AKT1, CREB1, PBRM1, SMARCD1, ADRB3, PRKAR2B, PFKFB2, PRKAA1, EP300, PPM1L, PPP2R3A, ADIPOQ, EEF2K, ACTB, ARID2, PRKAA2, CREBBP, RPS6KB1
	FLT3 Signaling in Hematopoietic Progenitor Cells	2.95E+00	-3.317	KRAS, NRAS, GAB2, AKT1, CREB1, EP300, CREBBP, EIF4E, RPS6KA6, RPS6KB1, RPS6KA4
	Wnt/Ca+ pathway	2.75E+00	-2.828	GSK3B, CREB1, WNT5A, EP300, FZD6, PDIA3, CREBBP, NFAT5, PPP3CA
	Rac Signaling	2.67E+00	-3.606	KRAS, CDC42, PAK2, MCF2L, SH3RF1, ELK4, CD44, WASF1, CFL2, NRAS, MAP3K1, MAPK8, RPS6KB1
	BMP signaling pathway	2.34E+00	-3.162	BMPR1A, MAP3K7, BMPR2, KRAS, NRAS, CREB1, PRKAR2B, SMAD1, CREBBP, MAPK8
	Integrin Signaling	2.08E+00	-2.183	GSK3B, KRAS, CDC42, PAK2, AKT1, CTTN, ARHGAP5, ITGA10, TSPAN7, WASL, DOCK1, NRAS, CAPN5, ACTB, PPP1CB, ARF3, MAPK8, ARHGAP26, ARF6
IGF-1 Signaling	2.03E+00	-2.121	KRAS, NRAS, SOCS5, AKT1, YWHAG, PRKAR2B, CSNK2B, MAPK8, YWHAZ, YWHAH, RPS6KB1	

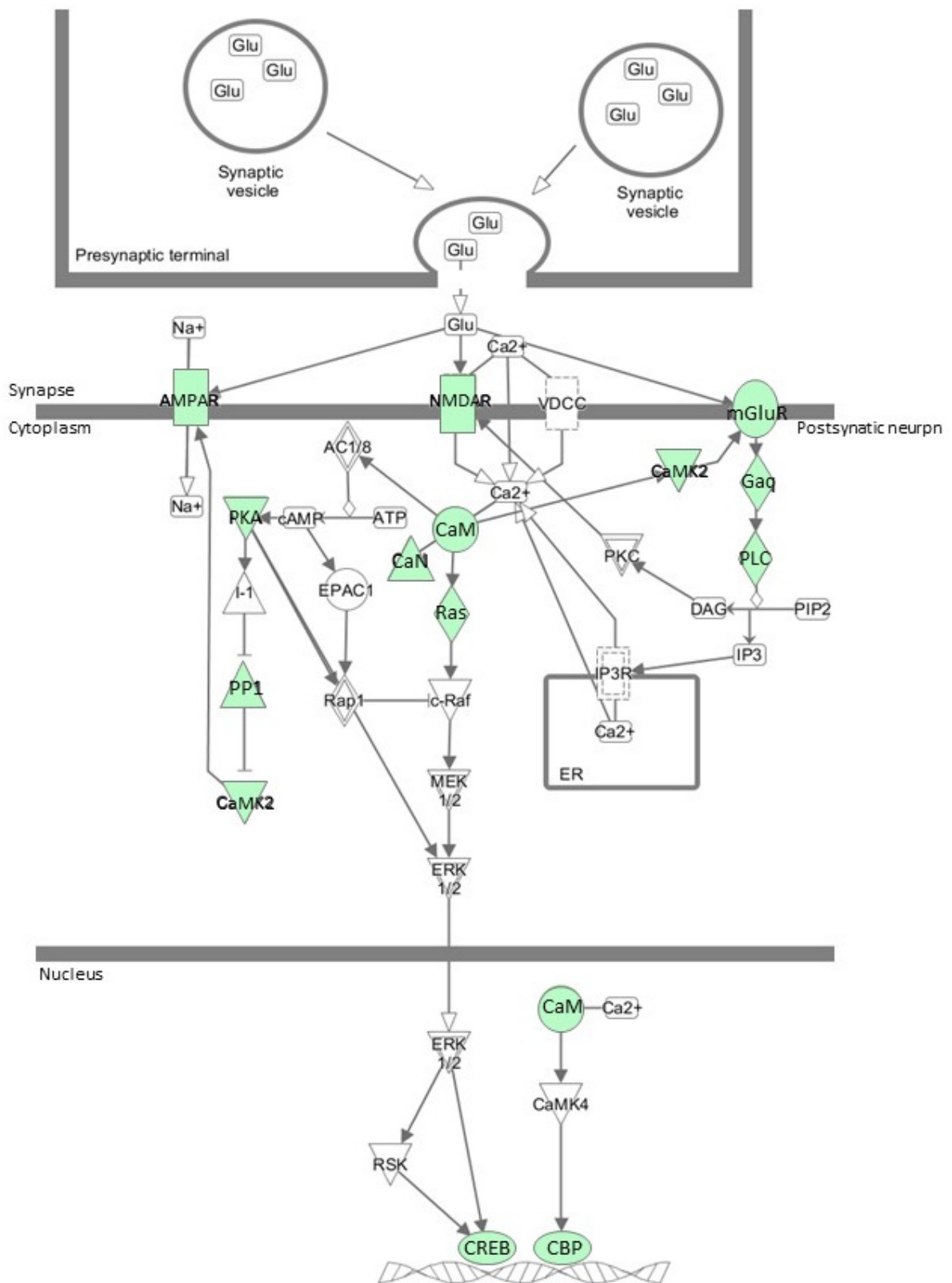


Fig. 2. Synaptic long term potentiation pathway
Putative downregulated genes are in green boxes.

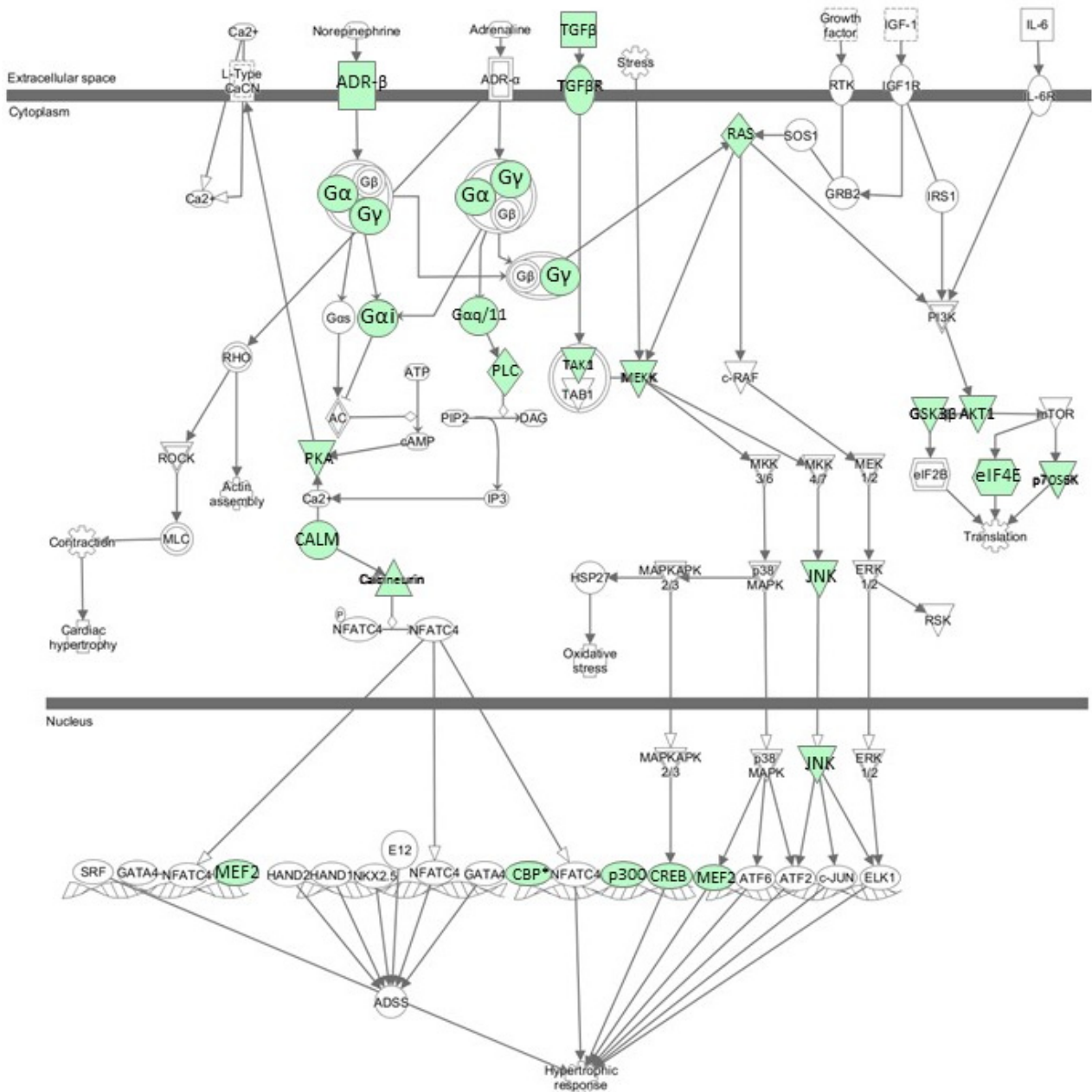


Fig. 3. Cardiac hypertrophy signaling
Putative downregulated genes are in green boxes.

る。食品中の miRNA のデータベースが充実することで、機能性食品成分としての植物 miRNA が注目されるであろう。

5. 文献

1. 世戸直明, 田中明, 1998, 塩水かんがいトマトの品質に及ぼす影響, 海と台地, 7, 33-41.

2. Takeshi Saito, Chiaki Matsukura, Yusuke Ban, et al., (2008), Salinity Stress Affects Assimilate Metabolism at the Gene-expression Level during Fruit Development and Improves Fruit Quality in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.), *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(1), 61-68.

3. Elizabeth A. Baldwin, Kevin Goodner, Anne Plotto,

- (2008), Interaction of volatiles, sugars, and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors, *J. Food Sci.*, 73(6), S294-S307
4. Elizabeth A. Baldwin, John W. Scott, Christine K. Shewmaker, et al., (2000), Flavor Trivia and Tomato Aroma: Biochemistry and Possible Mechanisms for Control of Important Aroma Components, *HortScience*, 35(6), 1013-1022
 5. Denise Tieman, Peter Bliss, Lauren M., et al., (2012), The Chemical Interactions Underlying Tomato Flavor Preferences, *Curr Biol.*, 22(11), 1035-1039
 6. Eugenia Ioannidi, Mary S. Kalamaki, Cawas Engineer, et al., (2009), Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions, *J. Exp. Bot.*, 60(2), 663-678.
 7. Young-il Kim, Shizuka Hirai, Tsuyoshi Goto, et al., (2012), Potent PPAR α Activator Derived from Tomato Juice, 13-oxo-9,11-Octadecadienoic Acid, Decreases Plasma and Hepatic Triglyceride in Obese Diabetic Mice, *PLOS ONE*, 7(2), 1-8
 8. Elsadig A. Eltayeb, James G. Roddic, (1985), Biosynthesis and degradation of α -tomatine in developing tomato fruits, *Phytochemistry*, 24(2), 253-257
 9. Yoko Iijima, Yukiko Nakamura, Yoshiyuki Ogata, et al., (2008), Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information, *the Plant Journal*, 54, 949-962
 10. Fernando Carrari, Alisdair R. Fernie, (2006), Metabolic regulation underlying tomato fruit development, *J. Exp. Bot.*, 57(9), 1883-1897.
 11. Lin Zhang, Dongxia Hou, Xi Chen, et al., (2012), Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA, *Cell research*, 22(1), 107-126.
 12. Marina Falaleevab, Justin Surfaceb, Manli Shenb, et al., (2015), SNORD116 and SNORD115 change expression of multiple genes and modify each other's activity. *Gene*, 572(2), 266-273.
 13. Janos Zemleni, Scott R. Baier, Katherine M. Howard, et al., (2015), Gene regulation by dietary microRNAs 1. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 93(12), 1097-1102.
 14. Simon Moxon, Runchun Jing, Gyorgy Szitty, et al., (2008), Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome research*, 18(10), 1602-1609.
 15. Jianguang Zhang, Rong Zeng, Jishuang Chen, et al., (2008), Identification of conserved microRNAs and their targets from *Solanum lycopersicum* Mill. *Gene*, 423(1), 1-7.

謝 辞

本研究を遂行する上で多大な研究助成金を賜りまし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の意を表します。

MicroRNA Analysis of Tomato Fruits Cultivated under a High-Salt Condition

Tomiko Asakura

University of Tokyo

Summary

Tomato is one of the most popular vegetable in the world. Recently, many tomato cultivars have been developed to improve tomato-specific flavor for increased palatability as well as nutritional quality. Comprehensive gene expression analysis revealed that fatty acid and amino acid synthesis-related genes were up-regulated under a low-water condition. In case the plants are exposed to an environmental stress, they change their own metabolism to eliminate the stress. Abscisic acid is increased under drought, which should in turn affects human lipid metabolism after ingestion. Some dietary miRNAs may also be involved in human physiology. The aim of this study is to find out whether miRNA in tomato influences human metabolism.

Micro-Tom was cultivated under a low-water condition after flowering, prior to harvesting mature fruits. miRNA expression analysis was performed using miRNA GeneChip 4.0. A total of 4 miRNA species were obtained with 2-times higher expression; these were, has-miR-3163-3p, has-miR-4481, has-miR-4468-5p, has-miR-548ac and has-miR-4701-3p. In addition, HBII-85, as a small RNA in nucleolus, was found. The target genes for these miRNAs were extracted from miRDB with the target score of more than 90. When the canonical pathway containing putative target genes were explored in Ingenuity Pathway Analysis (IPA), 28 pathways were extracted as significantly up- or down- regulated pathways and they were classified into the 6 categories: immune system, nervous system, MAPK family, cardiac hypertrophy, cancer and others.

Also, tomato miRNAs with more than 2-times increased expressions were sly-miR399 and sly-miR395, although such expressions in leaves and fruits have been already reported, but the target genes are still unknown. In particular, sly-miR395 decreased by 10 times less than expected under a normal condition. This result suggests that sly-miR395 is essentially involved in salt-stress response.