

トマトにおける抗酸化物質の蓄積促進と大腸がんの予防評価

三浦 謙治

筑波大学大学院生命環境科学研究科 助教

緒 言

生活習慣病に派生するメタボリックシンドロームやガンなどの一連の症状は、活性酸素の増加によって引き起こされることが多い。そのため、食品における抗酸化物質の蓄積は食品栄養学的に重要な意義がある。

通常植物は低温に曝されると氷の形成を妨げるため糖度を上昇させて氷点を下げる。また、代謝系酵素は低温によって活性が低下するため、光合成によって生じる過剰なエネルギーが活性酸素になり得る。それを防ぐ目的でビタミンCやカロテノイドといった抗酸化物質の蓄積が低温によって促進される¹⁾。これら代謝産物の蓄積は低温シグナルによって調節されることがこれまでの研究により明らかにされつつある。そこで本研究では低温シグナルの上位に位置する転写因子ICE1をトマトにおいて過剰発現させ、低温シグナルを活性化することで抗酸化物質を蓄積したトマトを作出することを目的とする。ICE1はこれまでに明らかにされている低温シグナルにおいて最上位に位置すると考えられる転写因子で低温応答に必要である²⁾。また、このICE1が低温で誘導される多くの遺伝子を調節していることが分かっている³⁾ことから、ICE1過剰発現により低温シグナルを活性化させ、通常条件でも低温応答状態を作り出せると考えられる。

実験方法

1. 糖及び抗酸化物質量の測定

糖含量に関してはデジタル糖度計 (Spitz) を用いて Brix 値を測定した。βカロテン及びリコペン量に関しては、トマトをアセトン—ヘキサン溶液でホモジナイズした後、上層の吸光度 (663nm, 645nm, 505nm, 453nm) を測定し、永田らの方法により算出した⁴⁾。ビタミンC量は RQ flex plus (Merck) を用いて測定した。

2. 抗酸化能の測定

0.5g トマトを 5mL の 80% エタノール中でホモジナイズした後、50μL のトマト抽出液に 450μL 80% エタノール、500μL 200μM DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) を添加した。30分放置後、517 nm の波長を吸光度計にて測定した。

O₂⁻ に対する抗酸化能の測定にはクレタ-S (アトー) を用いた。0.5g トマト果実を 2mL 80% エタノールでホモジナイズした後、Xanthine-Xanthine oxidase によって生成された O₂⁻ を MPEC (2-methyl-6-p-methoxyphenylethyl imidazopyrazinone) によって化学発光させ、その発光量をルミノメーターで測定した。

3. トマト果実によるメタボローム解析

野生型及びICE1過剰発現トマトを25℃、長日条件 (16 h light/8 h dark) で栽培した後、赤色に呈色した果実を採取し液体窒素で凍結させたサンプルを破碎した。クロロホルム及び Milli-Q 水を加え、攪拌、遠心分離後、水相を限外ろ過 (5kDa) 処理を行った。ろ液を乾固させ、再び Milli-Q 水に溶解して測定を行った。測定には CE-TOFMS のカチオンモード、アニオンモードにて行った (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社)。

結 果

1. トマト ICE1 による糖及び抗酸化物質の蓄積

シロイヌナズナ ICE1 の配列をもとにトマト EST 配列と比較して、野生型トマトから ICE1 ORF を単離した。まず、トマト ICE1 がシロイヌナズナ ICE1 と同様、転写活性化能を有するかについて一過的発現系を用いて検証を行った。するとトマト ICE1 を導入した場合、転写活性化能が上昇することが明らかとなった。

次にトマト ICE1 を 35S プロモータ制御下で発現させ

るコンストラクトを作製し、トマト Micro-Tom に形質転換を行った。そのうち発現量の多い植物3系統を本研究の解析に用いた。ICE1 形質転換トマトでは、低温耐性を示した。このことからトマト ICE1 はシロイヌナズナ ICE1 と同様、低温応答に関わると考えられる。

そこで、通常低温で誘導されてくる糖や抗酸化物質の蓄積を ICE1 過剰発現トマトにおいて測定した。その結果、通常条件においても糖度、βカロテン、リコペン、ビタミンC量ともに ICE1 過剰発現植物において、その蓄積量が増大していた (図1)。

これらの抗酸化物質の蓄積が上昇していたことから、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) をラジカル発生剤として、そのラジカル捕捉率を測定した。

すると、ICE1 過剰発現植物では野生株よりも多くの DPPH 由来ラジカルを捕捉することが明らかとなった (図2)。また別の活性酸素種での抗酸化作用を調べるため O_2^- を指標とした方法でも測定を行った。 O_2^- を生成した溶液に対して抗酸化能を調べたところ、DPPH 由来ラジカルと同様、ICE1 過剰発現トマトにおいて O_2^- をより多く捕捉することが明らかとなった (図2)。このことから、ICE1 過剰発現トマトでは抗酸化物質の蓄積により抗酸化能が上昇していることが明らかとなった。上記のように糖度の上昇、抗酸化物質の蓄積、抗酸化能の上昇が ICE1 過剰発現トマトで見られたことから、これらのトマトにおいて代謝産物の蓄積を包括的に調べるため、メタボローム解析を行った (図3)。その結果、糖

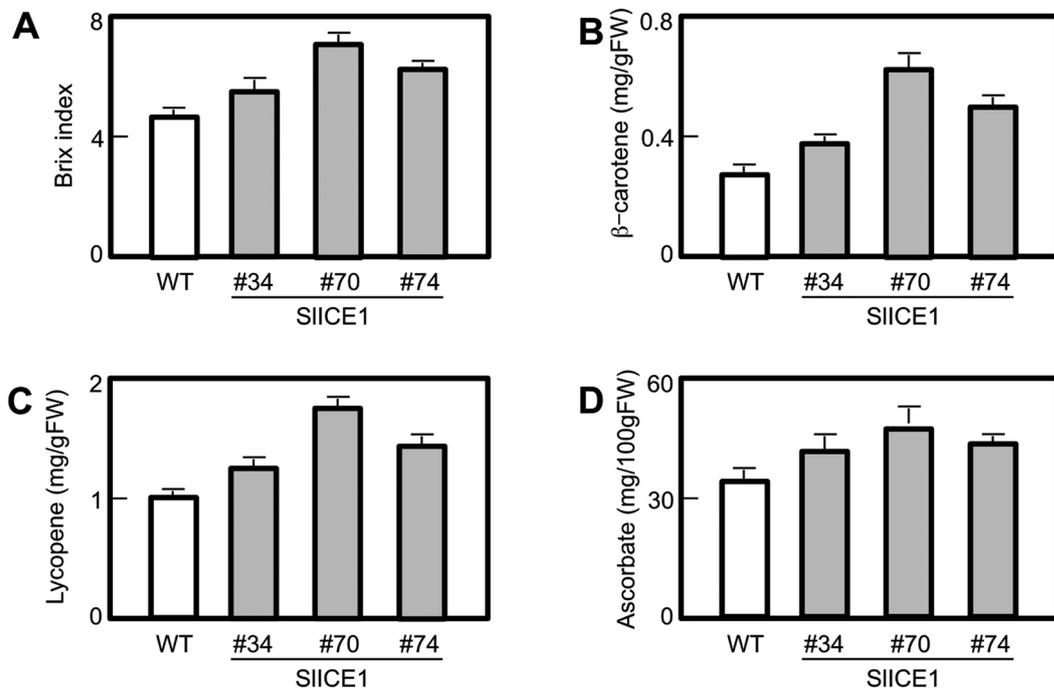


図1 野生株 (WT) と ICE1 過剰発現トマト (#34, #70, #74) 果実における糖度 (A)、β-カロテン (B)、リコペン (C)、ビタミンC (D) 蓄積量の比較

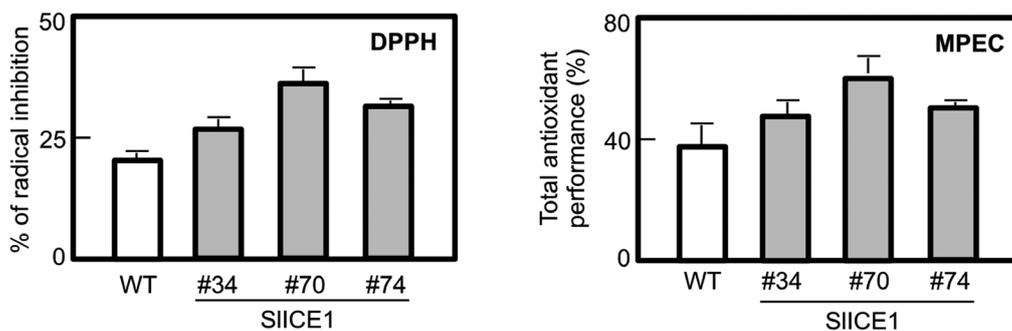


図2 野生株 (WT) と ICE1 過剰発現トマト (#34, #70, #74) 果実における抗酸化能の比較

度上昇で見られたように、グルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、フルクトース-1,6-リン酸といった糖の上昇が見られた。また適合溶質と考えられるグルタミン酸、プロリン、スペルミジンなどのアミノ酸、ポリアミン等が ICE1 過剰発現トマトにおいて、その蓄積が上昇した。抗酸化物質としてはグルタチオン、ビタミン C、ビタミン B6 等が ICE1 過剰発現トマトで上昇してい

ることが明らかとなった。一方で、野生株に比べて尿素・オルニチンといった尿酸回路、マレイン酸・フマル酸といったクエン酸回路における代謝産物の低下が見られた。これらの結果から、ICE1 過剰発現トマトでは、低温で誘導されると考えられる糖度、適合溶質の上昇、抗酸化物質の蓄積が見られた。

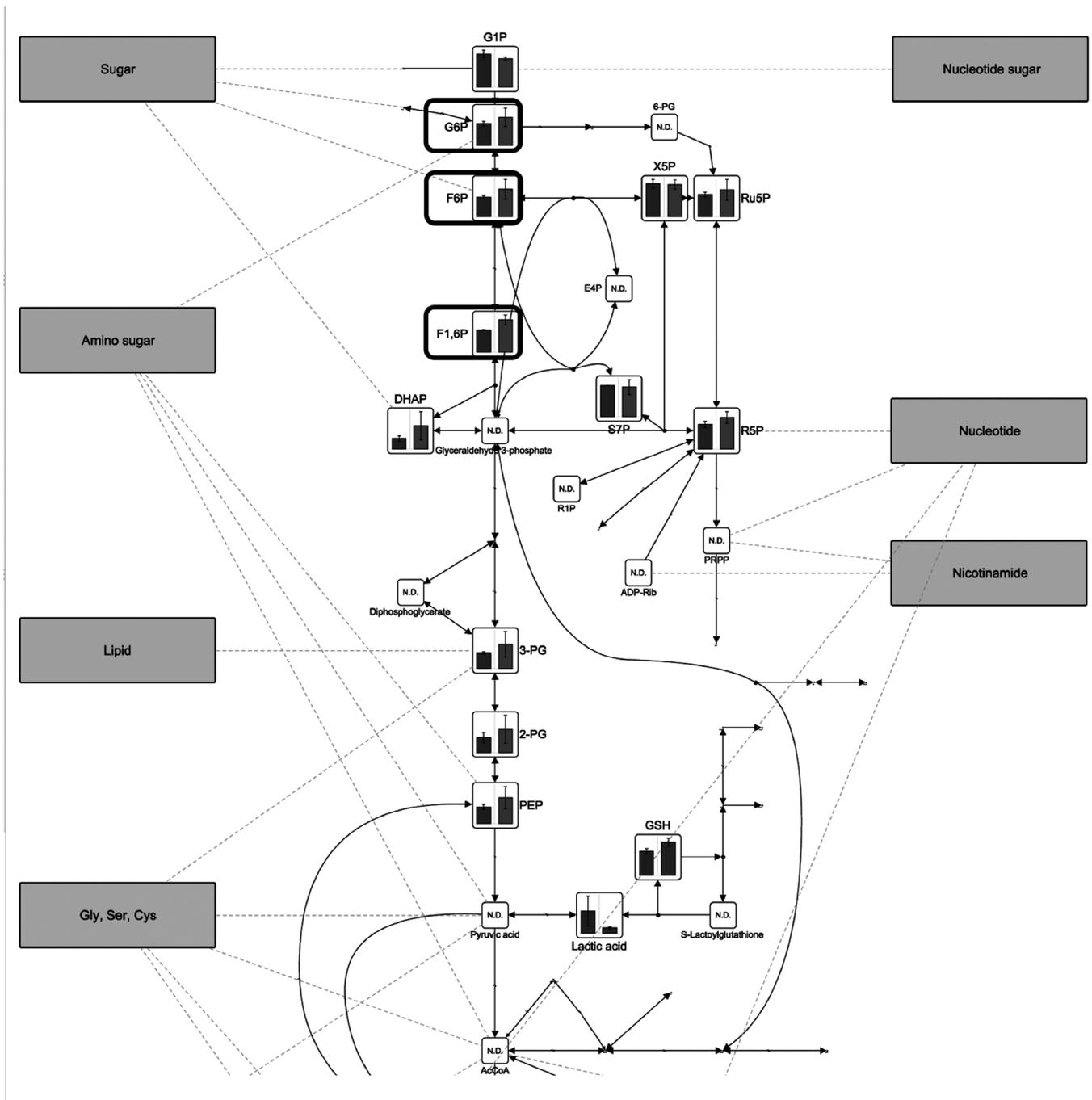


図3 野生株 (左) と ICE1 過剰発現トマト (#70, 右) 果実におけるメタボローム解析の一部 (解糖系)

考 察

本研究により、トマト ICE1 が単離され、ICE1 過剰発現トマトでは糖度、抗酸化物質の蓄積及び抗酸化能が上昇することが明らかとなった。

トマトにおける糖度の上昇は、食品としての価値を向上させる。実際、糖度の高いトマトは商品価値が増し、甘くておいしいトマトとして売りに出されている。一般的に糖度7~8以上のトマトをフルーツトマトと呼ぶが、ICE1 過剰発現トマトの中でも #70 ラインは糖度7程度の甘さがある。このトマトは通常に育てただけで、高い値を示している。今回用いた ICE1 過剰発現トマトでは抗酸化物質として知られているβカロテン、リコピン、ビタミンCの蓄積上昇が見られた(図1)。これらの抗酸化物質の上昇は、活性酸素除去に関わっていると考えられる。実際 DPPH ラジカル及び O₂⁻ に対する抗酸化活性は ICE1 過剰発現トマトで有意に上昇した(図2)。こうした食品による抗酸化作用は、活性酸素が原因で引き起こされる疾患に有効であると考えられる。活性酸素増加によって引き起こされる疾患としては、メタボリックシンドロームやガンなどがあげられる。特に多くの抗酸化物質は生体内で活性酸素除去に働き、炎症巣などに生じる活性酸素からゲノム DNA を防御する働きがあると考えられている。今後マウスによる生体内での効果の検証を行い、抗酸化物質の蓄積という食品としての有用性を明らかにしていく必要がある。

また、今回のメタボローム解析では一次代謝産物が中

心に行われる解析ではあったが、グルタミン酸やプロリンといったアミノ酸の蓄積や尿酸回路に由来する代謝産物の低下と新たな知見を得ることができた。植物において二次代謝産物が抗酸化物質として働くことが多いことから、今後は二次代謝産物をも調べることで新たな抗酸化物質を明らかにできる可能性が考えられる。

要 約

低温シグナル伝達因子 ICE1 によってトマトにおける低温耐性、糖度上昇、抗酸化物質の蓄積が促進された。抗酸化物質の蓄積促進は ICE1 過剰発現トマト果実における抗酸化能の上昇をもたらした。またメタボローム解析により、ビタミン類や種々のアミノ酸が ICE1 過剰発現トマトで上昇していることが明らかとなった。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より学術研究奨励金のご支援を賜りましたこと深謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、多大なご助言を頂きました筑波大学大学院生命環境科学研究科・江面浩教授、有泉亨助教に深く御礼申し上げます。

文 献 等

- 1) Kaplan F et al.: *Plant Physiol*, **136**, 4159-4168, 2004.
- 2) Chinnusamy V et al.: *Genes Dev*, **17**, 1043-1054, 2003.
- 3) Lee BH et al.: *Plant Cell* **17**, 3155-3175, 2005.
- 4) 永田雅靖ら：園芸学会雑誌、**61**, 686-687, 1992.