＜平成 30 年度助成＞

# ストレス条件下における鉄栄養制御によるトマトの生産性および鉄含量・機能性成分向上に関する研究

小郷　裕子
（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門）

## 1．背景と目的

鉄は不足しやすい栄養素であり、植物性の鉄は鉄の摂取源として大きな割合を占めるため、可食部に鉄を高蓄積する作物の開発が望まれている。鉄は植物にとっても必須栄養素であるが、土壌中で沈殿しやすいため吸収しにくい栄養素の一つである。そのため、鉄欠乏による作物生産性や品質の低下は世界的な農業問題である。鉄を土壌から吸収するために、イネ科以外の植物は、根の表層にある鉄還元酵素により三価鉄を二価鉄にして、二価鉄トランスポーターにより吸収する。根で吸収された鉄は、有機酸やニコチアナミンなどによりキレートされ葉や果実に運ばれると考えられている。一方、日本においては、酸性土壌が大部分を占めるため鉄欠乏はあまり注目されてこなかった。しかし近年、日本においても鉄欠乏によると思われる作物の生産性や品質の低下の事例が千葉県等で報告されている。その代表的な事例として、トマトにおいて着果負担が大きい時に低温や低日照ストレス条件下にあると、その時に鉄欠乏様の症状（新葉の黄化）を呈し（**図 1**）、成り疲れ（実がつきにくくなり収量が下がる）を起こすことが観察された。黄化による減収は、二価鉄を供給する鉄資材を投与することによりある程度回復した。着果負担による成り疲れには様々な原因があると考えられるが、低温低日照時の収量の制限因子になっているのは鉄栄養である可能性がある。近年、低温や低日照ストレス条件下では、根の鉄還元酵素活性が下がることがわかってきており、鉄吸収力の低下がトマトの収量低下につながった可能性がある。本研究では、トマト長期栽培において、低温低日照ストレス条件下における、鉄吸収および移行のメカニズムを解析する。これにより、これまでの慣行栽培では行われてこなかった鉄栄養を制御することによる、更なる生産性向上、および可食部の鉄含量と機能性成分増加による健康増進を目指す。

図 1　千葉県の農家で発生した黄化葉

## 2．研究方法

トマトの鉄欠乏と成り疲れは、低温低日照ストレスと着果負担の複合要因で発生したと考えられる。そこで、低温低日照ストレス、着果負担、鉄栄養が、植物の生育や鉄含量、遺伝子発現等へ及ぼす影響について解析する。以下の三つの実験を行った。

### 2.1　生殖成長が進んでいるトマトの鉄欠乏による発現変化の解析

トマトの鉄欠乏に関する研究は、根に関するものが多く、ほとんどが幼植物の植物体を用いている。しかし、相転換後は作物の収量と品質に直結する時

期であるため、この時期における鉄栄養と成長相転換および果実形成との相互作用を調べることは重要である。そこで、地上部や生殖成長が進んでいる時期のトマトの鉄欠乏に関する基礎的な知見を得るため、トマトについて比較的長期の水耕栽培で育成した後、鉄欠乏処理を行い、これらのサンプルを用いて RNA-seq 解析を行った。

### 2.2　農家におけるトマトのサンプリングと解析

トマトの新葉の黄化現象は全国的によく見られる現象である。低温低日照と着果負担によると思われる新葉の黄化と収量の低下については全国的には調べられていないが、千葉県全域では確認されている。これらの黄化が、鉄欠乏によるものかどうかを確認するため、3～6 件の大規模農家においてサンプリングを行い、無機栄養分析や遺伝子発現解析を行った。

### 2.3　遮光ハウスにおけるトマトの長期栽培と解析

人工的に低日照条件を作り出すため、遮光したビニールハウスを用いた。ここで、トマトを「着果中区（着果負担中程度）」、「着果多区（着果負担大きい）」、「着果多鉄追肥区」、を設けて土耕栽培にて育成した。「着果多鉄追肥区」では、二価鉄を安定的に供給する鉄資材を追肥した。着果数は、摘花処理によって調整した。8 月にハウスに定植し、翌年 6 月まで長期栽培を行った。このような条件の場合、着果多区では 12 月上旬に着果負担と低温低日照により新葉が黄化して収量が落ち、翌年 3 月には回復するはずである。サンプリングは、新葉が黄化する前の 10 月、黄化する予定の 1 月、黄化が回復した後の翌年 3 月、実験終了時の 6 月に行った。新葉、果実、下葉、根などをサンプリングした。これらについて、葉色（SPAD 値）・重量・着果数・果実重などの測定、ICP-MS による元素分析、RNA-seq による遺伝子発現解析等を行った。

## 3．研究結果

### 3.1　生殖成長が進んでいるトマトの鉄欠乏による発現変化の解析

相転換後におけるトマトの鉄欠乏における遺伝子発現変化を調べるため、トマトを鉄を含む水耕液で一か月程度育成し（花は咲いている）、その後鉄を抜

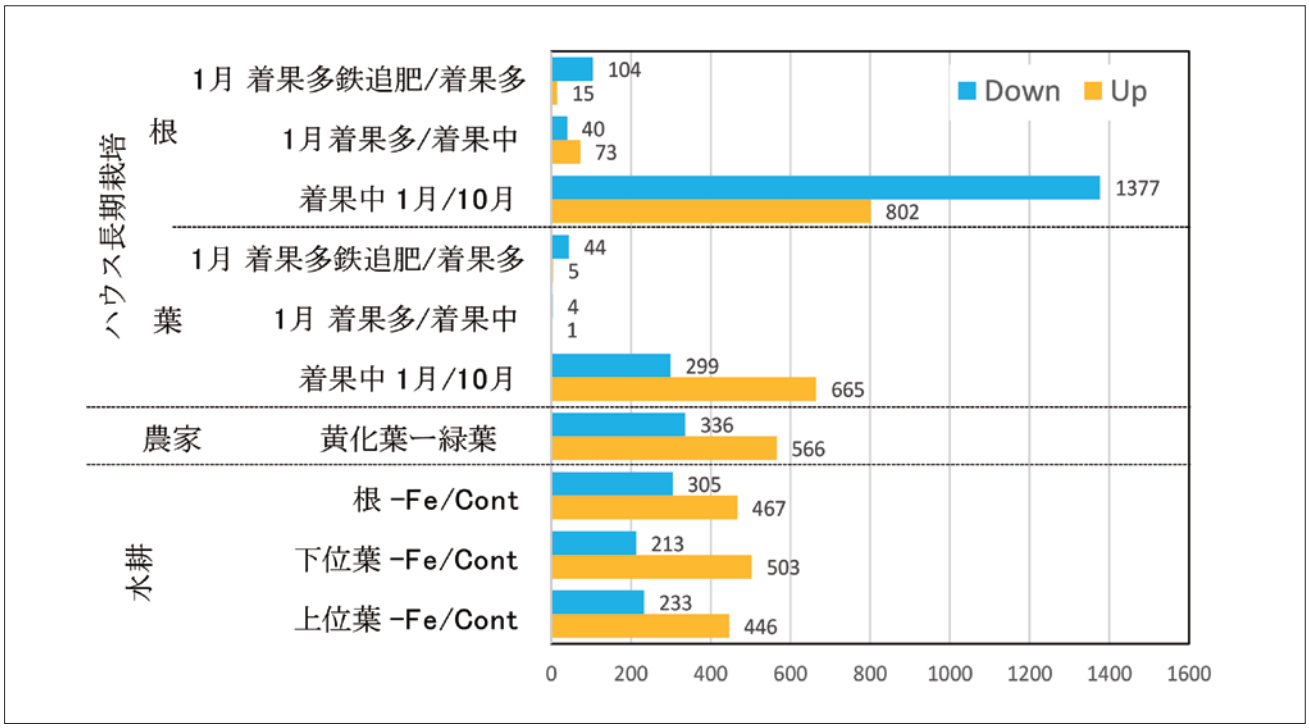


図 2　RNA-seq で 2 倍以上の発現誘導（Up）または抑制（Down）がある遺伝子数

いた水耕液で２週間栽培した。上位葉は葉脈間クロロシスを呈していた。上位葉、下位葉、根をサンプリングした。これらを用いて RNA-seq 解析を行った。根および葉ともに、数百の遺伝子が発現上昇または抑制されていた（**図 2**）。これまでの報告[1)]と一致して、二価鉄トランスポーター（IRT1）、ferric-chelate reductase（FRO1）、NRAMP1、NRAMP3、bHLH066、bHLH068 の発現が、葉や根で鉄欠乏により誘導されていた。その他にも数個の ZIP family transporter、一つの Major facilitator superfamily（MFS）の発現が誘導されていた。数個のフェリチン遺伝子とニコチアナミン合成酵素（NAS）の発現は抑制されていた。葉と根では誘導または抑制される遺伝子が大きく異なり、根で発現変化がある遺伝子のうち８割以上は葉では発現変化しなかった。根と葉で共通して発現誘導される遺伝子は、根や葉で誘導される遺伝子のうち１～２割程度であった。GO enrichment analysis によると、根では metal transport や oxidative stress に関する遺伝子がエンリッチされたが、葉では metal response に関する遺伝子の他に、光合成に関わる遺伝子が多くエンリッチされていた。光合成において、鉄はクロロフィル合成や光合成電子伝達系に必要であるため、鉄欠乏によって光合成に関わる多くの遺伝子が影響を受けたと考えられる。

### 3.2　農家におけるトマトのサンプリングと解析

千葉県の大規模農家で、黄化葉をサンプリングさせていただいた。この葉を用いて、元素分析を行ったところ、2015、2016、2018 年で黄化葉において鉄の濃度が低くなっていた（**図 3**）。遺伝子発現解析を行った結果、566、336 個の遺伝子が黄化していない葉と比較して発現がそれぞれ誘導、抑制されていた。そのうち３割近くの遺伝子が鉄欠乏の上位葉、下位葉で発現誘導または抑制されていた（**図 2**、**図 4**）。この中には NRAMP3 や bHLH068 が含まれていた。その他にも数件の農家で黄化葉をサンプリ

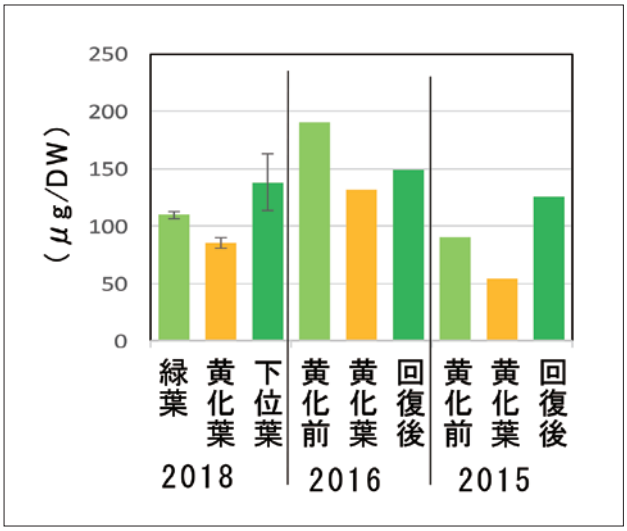


図 3　農家（千葉県）の黄化葉の鉄含量

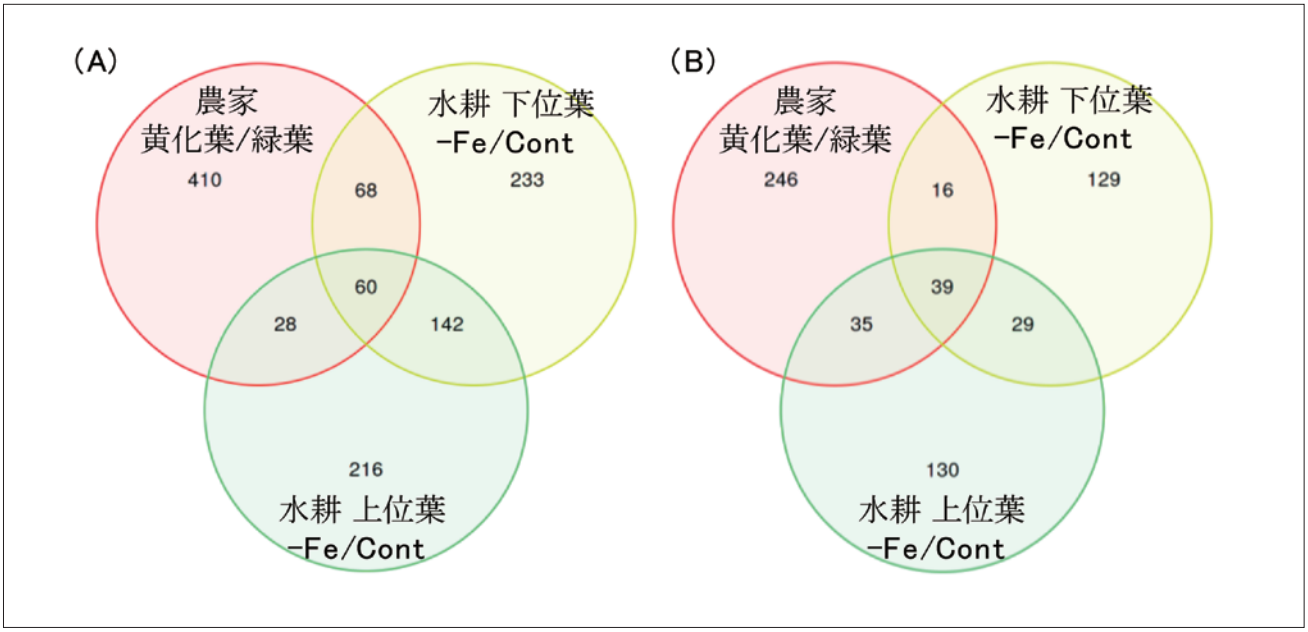


図 4　農家の黄化葉で発現誘導（A）または抑制（B）した遺伝子と水耕栽培した鉄欠乏トマトの葉で発現変化した遺伝子の venn 図

ングし、bHLH068 等の発現が上昇していることを確認した。これらの結果から、千葉県の農家で報告される黄化葉は鉄欠乏に近い状態であることがわかった。

### 3.3　遮光ハウスにおける、トマトの栽培と解析

栽培開始から、鉄欠乏の指標となる葉色（SPAD 値）を測定していったところ、どの区も冬場に顕著に SPAD 値が下がることなく、黄化葉は観察されなかった。これは、2018 年度の冬が暖冬だったためと考えられる。毎年、千葉県の農家から冬場にトマトの黄化葉の報告があるが、2018 年はほとんどなかった。しかし、葉が黄化するほどではなかったが、SPAD 値の違いが 12 月 21 日に観察され、着果中区＞着果多鉄追肥区＞着果多区となっており、着果多区が着果中区に比べて有意に低く、鉄資材施用によって SPAD 値が上がった（**図 5A**）。1 月と 6 月で、下位葉や茎の重さが、着果中区＞着果多鉄追肥区＞着果多区であった（**図 5B**）。着果数を多くすることで、SPAD 値が低くなり葉や茎の生育量が減少し、鉄資材の添加により回復したと考えられる。トマトの各組織の無機栄養を測定すると、上位葉では、全ての区において鉄濃度が 1 月に減少し 3 月以降上昇した（**図 6**）。区による差はなかった。この結果は前年度の実験（品種、日射量および施肥管理が異なる）と同様であった。その他の無機栄養については、区やサンプリング時期により濃度が異なるものもあったが、前年度と同じ傾向を示したのは鉄のみであった。

着果多区において黄化葉は観察されなかったものの、冬季に鉄濃度が下がることや、着果負担に関する分子機構についてはこれまでほとんど報告がないことから、これらの遺伝子発現について包括的に調べるため、本実験のサンプルを用いて RNA-seq 解析を行った。10 月と 1 月の上位葉と根のサンプルから RNA を抽出し RNA-seq に供した。10 月と 1 月の着果中区を比較すると、発現が 2 倍以上異なる遺伝子は上位葉で 1,000 個以上、根では 2,000 個以上あった（**図 2**）。上述したような栄養成分の違いもあるが、温度や日照時間、植物の年齢等も大きく異なるため、多くの遺伝子が異なる発現パターンを示したと考えられる。鉄栄養に関わる遺伝子は、根において IRT1、NRAMP1 の発現が 1 月に抑制されていた。低温低日照により ferric-chrate reductase の活性が落ちるという報告もあり、IRT1、NRAMP1 の発現抑

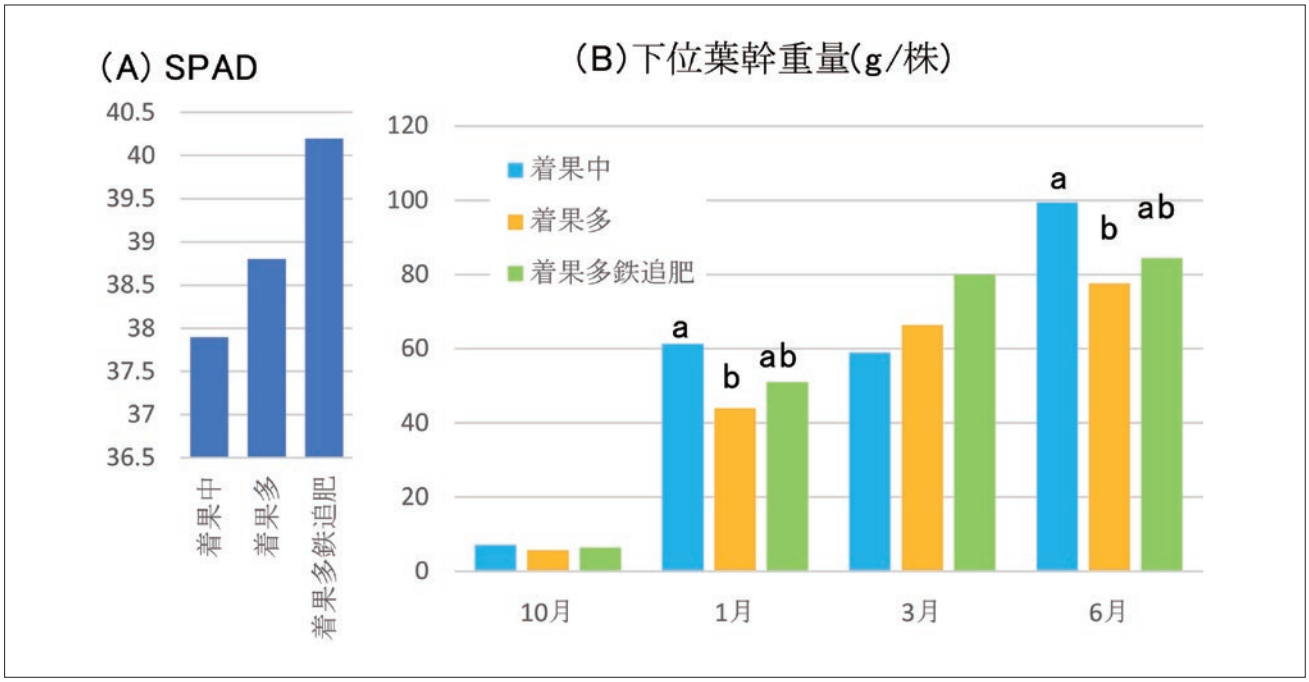


図 5　（A）12/21 の最新第 2 葉 SPAD 値（B）下位葉幹重量

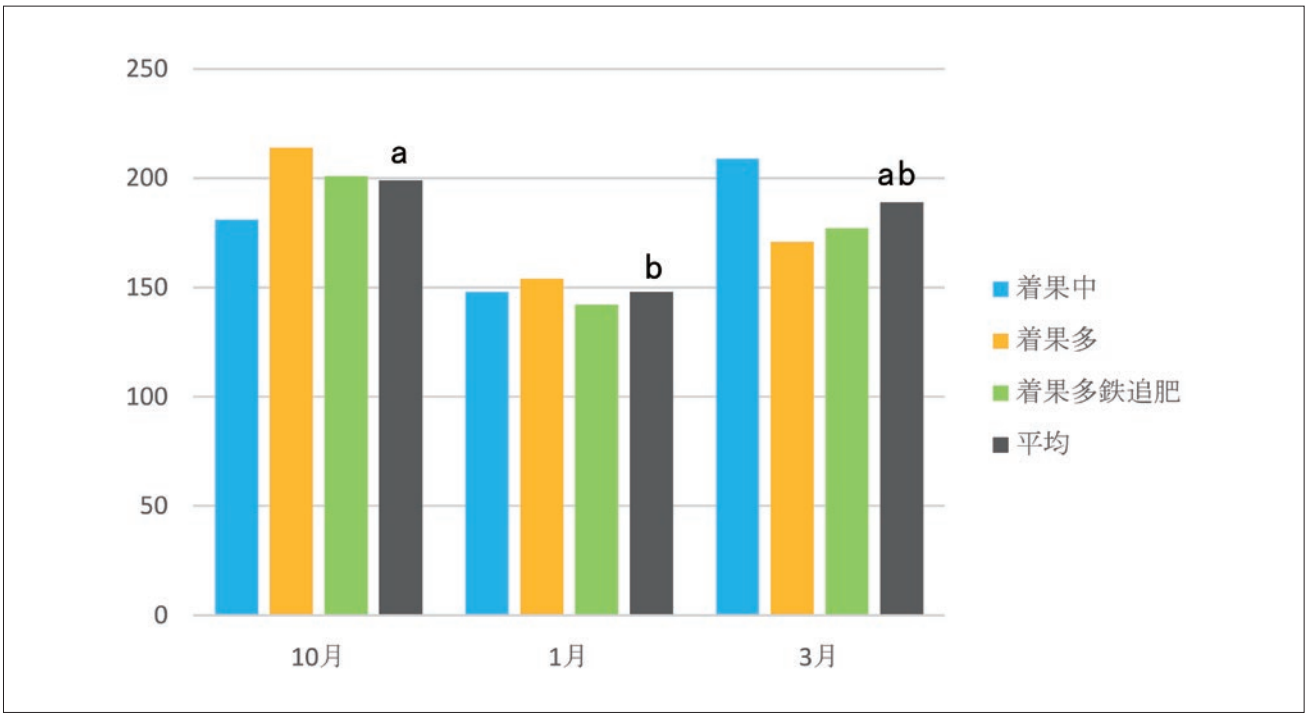


図 6　上位葉における鉄濃度（mg/kg D.W.）

制と合わせて冬季の鉄吸収量の減少の原因になっている可能性がある。

1 月の着果中区と着果多区で 2 倍以上発現が異なる遺伝子は、葉では 5 個しかなく、根では 100 個以上あった。着果負担が上位葉に与える影響は小さく、根への影響は比較的大きいと考えられる。着果負担が大きくなると光合成産物が優先的に果実に分配され、根への分配が低下し根の量が減るという報告があり [2)]、着果負担はある程度根へ影響を与えると考えられる。鉄栄養に関する遺伝子の発現は有意に変化しておらず、根の GO enrichment analysis を行うと、発現誘導される遺伝子では、細胞壁合成に関わる遺伝子がエンリッチされていた。

着果多区と着果多鉄追肥区を比べると、葉で 2 倍以上発現が異なる遺伝子は 49 個、根では 100 個以上あった。葉で発現が上昇する遺伝子に、ニコチアナミン合成酵素と Maijor facilitator superfamily（両者とも鉄欠乏で発現が抑制される）が含まれた。GO enrichment ではリン栄養に関する遺伝子が濃縮されていた。葉において着果多区に比べて着果多鉄追肥区で発現が誘導される傾向のある遺伝子の中には、鉄欠乏で発現が抑制される遺伝子が多く含まれており、鉄が十分に供給されているというような何らかの鉄栄養に関する影響が示唆された。しかしながら、total 鉄含量は着果多鉄資材添加区と他の区で有意な差はなかったため、total 鉄ではなく可溶性鉄など植物が利用しやすい鉄が増えたなどの可能性が考えられる。一方、根で発現が変化する遺伝子では鉄と関連が明確な遺伝子がほとんどなかった。

## 4．まとめ

千葉県の農家で観察された、冬季にしばしば観察されるトマトの黄化葉は、鉄含量が低下し鉄欠乏誘導性遺伝子が発現上昇していたことから、鉄欠乏に近い状態であることがわかった。着果数を変えたトマト長期多段栽培では、冬季に鉄濃度が下がることから、低温低日照で鉄が不足しやすい状況になることが示唆された。さらに強い低温、低日照等のストレスがかかると葉が黄化したり鉄欠乏応答性遺伝子の発現が上昇する可能性がある。冬季の根では鉄吸収に関わる遺伝子の発現が抑制されていたことが鉄濃度減少の一因であると考えられた。二価鉄を安定的に供給する鉄資材の施肥によって、葉での鉄栄養

状態が回復傾向にあることが遺伝子発現から推測され、冬季に二価鉄を安定的に供給する鉄資材を追肥することにより生産性を高めることができる可能性がある。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

**参考文献**

1) Bereczky Z, Wang HY, Schubert V, Ganal M, Bauer P Biol Chem. 2003 Jul 4;278(27):24697-704. doi: 10.1074/jbc.M301365200.
2) 玉越賢太郎，位田晴久．植物環境工学 (J.SHITA)28(2):104-112. 2016.

# Research on improving tomato productivity by controlling iron nutrition under low temperature and low sunshine conditions

**Yuko OGO**
*National Agriculture and Food Research Organization*

Recently, tomato interveinal chlorosis and yield decreases have been reported in Chiba Prefecture, when the fruit load is heavy in winter. In this study, we analyzed the underlying mechanism for this, with the aim of improving crop productivity in winter. The yellowed leaves of tomatoes observed by a farmer in Chiba Prefecture were found to be in a state near to iron deficiency, because the iron content had decreased and the expressions of the iron deficiency-inducible genes were upregulated. In the long-term cultivation of tomatoes with different numbers of fruits set in a shading green house, because the iron concentration of the leaves decreases in winter, it is easy for tomato to become iron deficient under low temperature and low sunshine conditions. The genes involved in iron absorption were downregulated in the roots in winter, and this is considered to be one of the causes for the decrease in iron concentration. It was speculated that the iron nutritional status in the leaves will tend to be improved by fertilization with an iron material that stably supplies ferrous iron, due to gene expression. It may be possible to increase productivity by adding fertilizer with iron materials that provide a stable supply of ferrous iron in winter.