

振動分光法によるトマト成熟過程のクチクラ 追跡評価

佐藤久子¹・小長谷圭志^{2,3,4}

¹ 愛媛大学理学部

² 愛媛大学社会共創学部、

³ 大学院農学研究科

⁴ 先端農業 R&D センター

Tracing study on the cuticles of tomatoes during their ripening via vibrational spectroscopies

Hisako SATO¹, Keiji KONAGAYA^{2,3,4}

¹ Faculty of Science, Ehime University

² Faculty of Collaborative Regional Innovation, Ehime University

³ Graduate School of Agriculture, Ehime University

⁴ Center for Advanced Agricultural Research and Development

Abstract

The cuticles of plants play a role of barriers against water, oxygen and light. In this study, the cuticles of tomatoes are traced along their ripening by means of several vibrational spectroscopies such as ATR (attenuated transmittance reflection), microscopic IR (infrared) and VCD (vibrational circular dichroism). The compositions of main components such as water, lipid, sugar and phenolic compounds were analyzed at each step of ripening. In particular, the chiral nature of water molecules was investigated from VCD spectra. It was suggested that water molecules acquired molecular chirality due to binding with sugars and other chiral substances at particular steps.

Keywords: ATR, microscopic IR, vibrational circular dichroism, tomato cuticle, chiral induction of water molecule

1. 緒言

生物の特徴の一つとして、単一の器官が同時にいくつかの異なる機能を果たすこと（多機能性）がある¹⁻⁵⁾。多機能性は進化の過程において、複雑かつ多様に変化する地球環境に対して限られた器官を用いて順応していくための生物戦略の一つと考えられる。この特性は生物模倣材料の分野でも、新規機能材料開発に多くのヒントを与えている。本研究では多機能性の典型例として、植物のクチクラを取り上げた^{6,7)}。クチクラは植物の細胞の外壁に生成され、水分の蒸発の調整、太陽光の遮蔽、撥水作用、病原体の侵入防止、環境ストレスへの適用の複数の機能を果たしている¹⁾。Fig.1にクチクラの模式図を示した。細胞膜と外界と隔てている脂肪酸ポリエステル層、その内側の結合水層、さらに内側の多糖類・ポリフェノールの複合体層がある。このような不均一構造のもとで多機能性がどのように発現されているかは興味ある課題である。

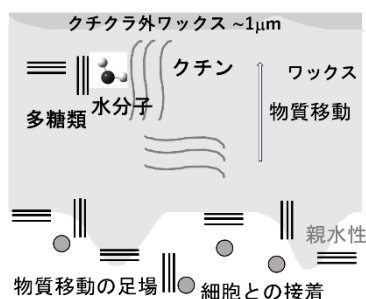


Fig. 1. Schematic drawing of the structure of a cuticle

これまで、小長谷らはクチクラの構造・機能を生物学的側面から研究してきた⁷⁾。その機能的役割についても考察されてきた。長谷川らによって植物クチクラの表面には一定配向した多糖類の存在していることが見いだされた⁶⁾。

このような背景を踏まえ、本研究ではミニトマトの成熟過程におけるクチクラ成分の分析を各種振動分光法（全反射型 IR (ATR)、顕微 IR 法、振動円二色性 (VCD) 法) を用いて行った、特に分子のキラリティを検出する VCD 法を用いることにより、本来アキラルである水分子がキラルな構成成分（ヒドロキシ脂肪酸、多糖、ポリフェノール等）との結合を通じてキラリティが誘導される可能性に着目した。これにより、植物内の普遍的成分である水分子の成熟度に応じた構造変化をより鮮明に明らかにすることを目指した。

赤外円二色性分光法 (VCD) は振動領域の左および右円偏光の差を検出し、糖、タンパク質など紫外可視部に吸収のない物質の不斉構造の解析に用いられる。今までに佐藤らは分子不斉に着目して分子構造や分子間相互作用の詳細を明らかにしてきた⁸⁾。顕著な成果としては、分子連結に基づくシグナル増強を見出し界面現象に VCD 法が有効であることを実証した⁹⁾。さらに顕微機能を付与した多次元 VCD 法を開発し、それを昆虫翅に適用した^{10,11)}。その結果昆虫翅においては、大きさ数百ミクロンのマイクロドメイ

ンが形成され、マイクロドメインごとに異なる二次構造のタンパク質からなっていることを明らかにした¹¹⁾。今回の植物組織への応用は、VCD 法としては初めての試みである。より広範囲の生物試料への展開を目指した。

2. 実験方法

2-1. サンプル調整

供試試料として熟度（緑色～赤色）の異なるミニトマトを用いた。クチクラの剥離は、すでに報告済みの手法を用いた¹²⁾。クチクラの大きさは直径 30 mm とした。試料に用いたクチクラの写真を Fig.2 に示す。成熟の各々の段階を、Green(G)、Yellow (Y)、Orange (O)、Red (R)と記載した。これらはミニトマトの着色度から名付けた。



Fig. 2. Photograph of tomato cuticle samples. The steps of ripening are indicated by G (green), Y (yellow), O (orange) and R (red), successively.

2-2. 測定装置と測定条件

ATR 測定には ATRPRO (FTIR-4600) (JASCO Co., Japan) を使用した。クチクラサンプルはそのまま基板に静置して測定した。顕微 IR 測定には IRTRON μ (JASCO Co., Japan) を使用した。この測定では、試料をフッ化カルシウム板に挟んだ。VCD 測定には、MultiD-VCD-2020 装置を FT-VCD あるいは QCL-VCD モードにして測定を行った。FT-VCD による測定においては、トマトの各成熟過程のクチクラ試料を乾燥 KBr 粉末に混合して KBr ペレット (5 mm ϕ あるいは 10 mm ϕ) に成型したものをを用いた。シグナルは 20000-30000 回積算して平均化した。最適なシグナルを得るために、IR 最大吸収強度が 0.5-1.0 になるように混合するクチクラ試料の量を調整した。

3. 結果と議論

3-1. ATR と顕微 IR 測定の結果

トマトは成熟に応じてクチクラの膜厚や弾性度を変え、それによって水の流動性や気孔からの水蒸発を制御している。この際に蒸発の潜熱により、太陽光照射のもとでの温度上昇を抑えている。そこで、トマト成熟段階に採取したクチクラ試料（緑 (G)、黄 (Y)、オレンジ (O)、および赤 (R)) の各々に対して、ATR と赤外顕微鏡による振動スペクトルを測定・比較した。スペクトルの解析では、特に試料中の水の構造変化に注目した。Fig. 3 に、緑 (G)、黄 (Y)、オレンジ (O)、赤 (R) のクチクラ試料の ATR スペクトルを示した。今まで報告されている結果を参考に各振動ピークの帰属を行った¹⁾。その結果を Table 1 に示す。

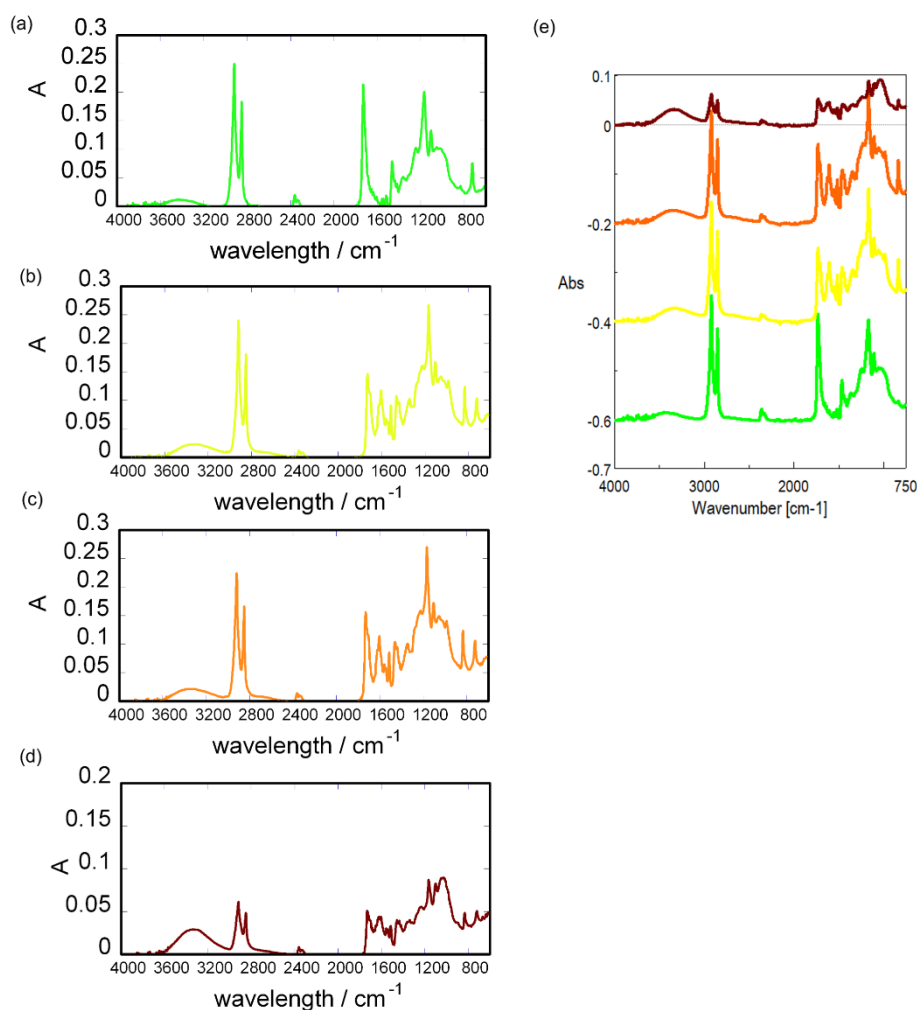


Fig. 3. ATR spectra for G (a), Y (b), O (c) and R (d) cuticle samples, respectively. (e) shows all samples plotted with an offset.

Table.1 Assignment of IR peaks

vibrational peak /cm ⁻¹	assignment
1730	C=O ester
1627	C=C phenolic acid
1551	C-C aromatic
1514	C-C aromatic conjugated with C=C

緑(G)では 1740 cm⁻¹ に単一ピークがみられる。緑から黄(Y)になるところで、1730 cm⁻¹ 付近に複数のピークが新たに現れた。これらのピークはエステル (ester) の C-O 伸縮振動に帰属される。したがって、この段階であらたにエステルが生成されると結論した。1730-1687 cm⁻¹ 付近は cutin (クチン) C-O---H 振動に帰属される。特に、黄(Y)においては2つの山が顕著であった。これらは水分子との相互作用の結果であると解釈した。すなわち、高波数が C-O との弱い水素結合の相互作用、低波数が強い相互作用を表して

振動分光法によるトマト成熟過程のクチクラ追跡評価

いる。黄(Y)とオレンジ(O)のクチクラでは 1700 cm^{-1} の肩のシグナルが顕著であった。クチン (cutin) と水との相互作用を示しているためと推測される²⁾。

水の伸縮振動に帰属される 3500 cm^{-1} 付近のピークは成熟の初期からみられる。赤(R)で顕著な強度の増大が観察された。このことより、この段階で水の役割が増大していることが推定された。また、水分子変角振動 (1640 cm^{-1}) およびフェノールの C=C 振動は黄(Y)以降のより成熟した段階で顕著に観察された。

1685 cm^{-1} は強い C=O 水素結合の振動に帰属される。 1650 と 1500 cm^{-1} ピークは cutin (クチン) が水と相互作用する (cutin matrix) ことによって現れると推定した。これらの段階を通して、糖と結合している水が存在していると考えられた。

同じ試料について顕微 IR 法によるスペクトル測定を行った。Fig. 4 に顕微 IR の結果を示した。全体としては、ATR 法と類似した結果となった。赤外吸収スペクトルからも緑(G)において、 1700 cm^{-1} 付近の肩スペクトルを観測した。黄(Y)、オレンジ(O)、赤(R)においては同じくらいの強度比の 1640 cm^{-1} および 1600 cm^{-1} に2つのピークを観測した。成熟が進むにつれて、フェノール成分の振動が観測されてきたと推定できる¹⁾。また、緑(G)では 2000 cm^{-1} 付近に水由来の束縛振動と変角振動のコンビネーションシグナルが観察された (Fig. 4a 矢印)。

クチクラの微細表面構造を比較するために、 $600\text{ }\mu\text{m} \times 400\text{ }\mu\text{m}$ の範囲での各成熟段階における顕微鏡像を得た (Fig. 5) 。いずれも、楕円状 (ca. $30\text{ }\mu\text{m}$) のドメインが配列していることが観察された。この IR スペクトルからドメインは cutin wax (クチンワックス) などを主成分とすると推定された¹⁾。

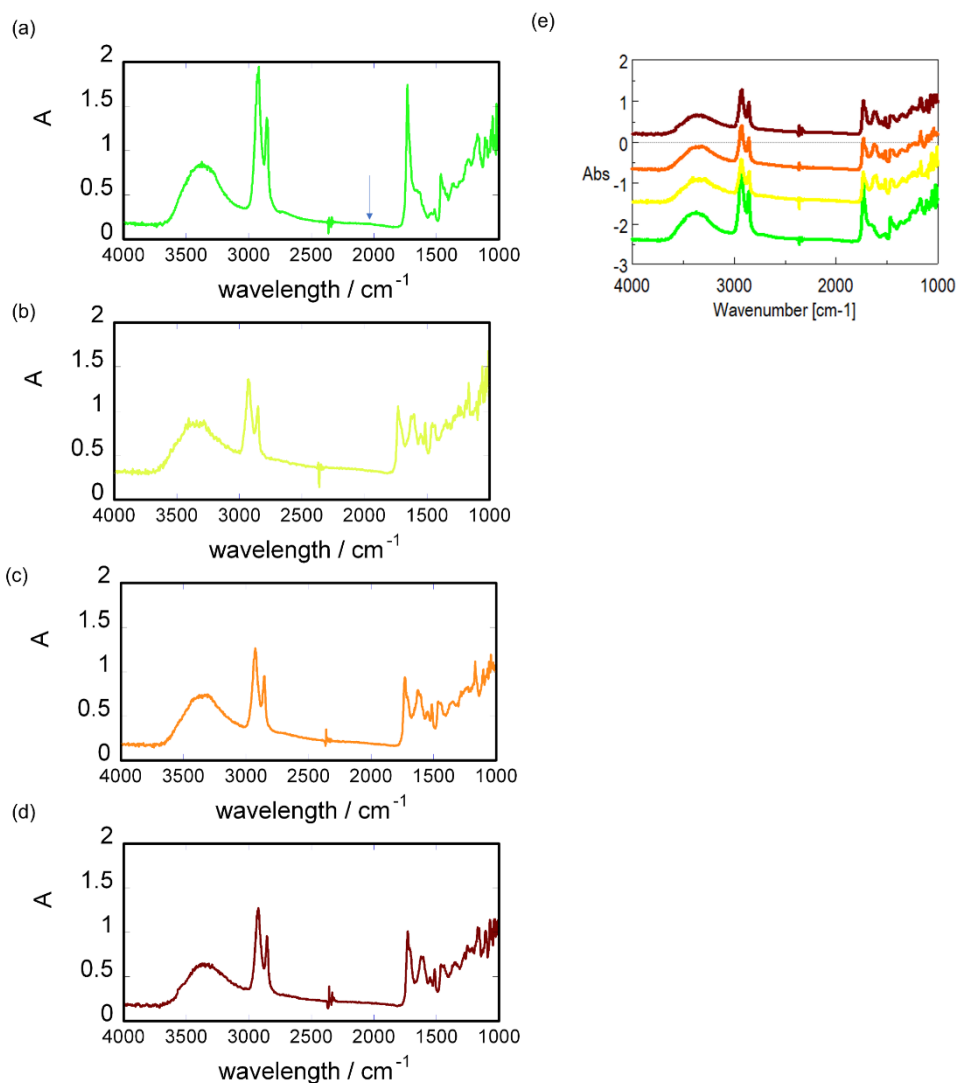


Fig. 4. Microscopic IR spectra for G (a), Y (b), O (c) and R (d) cuticles samples, respectively. (e) shows all samples plotted with an offset.

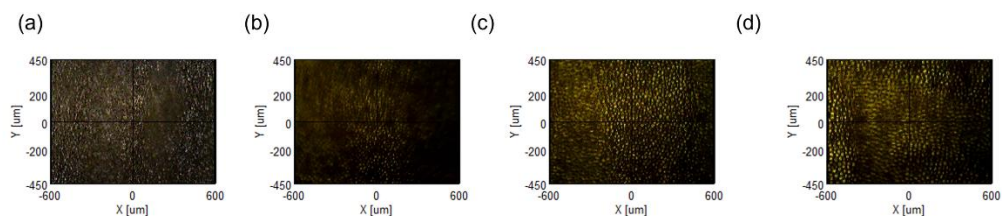


Fig. 5. Microscopic IR images for G (a), Y (b), O (c) and R (d) cuticle samples, respectively.

3-2. VCD 測定の結果

各成熟段階での試料に対して VCD 測定を行った。ここでは主として、ATR や顕微 IR スペクトルでは現れない成分化合物や水にキラリティが誘導される可能性に着目した。測

振動分光法によるトマト成熟過程のクチクラ追跡評価

定には通常の熱光源 VCD (FT-VCD)法と顕微 QCL-VCD 法を併用した。測定領域としては、水と糖分子の相互作用を調べるためにレーザー領域 ($1500\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$) に加えてより広い波長領域 ($1000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$) の測定を行った。

まず成熟初期の緑(G)を用いて QCL-VCD による顕微 VCD 測定を行った。Fig. 6 に緑クチクラ(G)の 1730 cm^{-1} における 2次元マッピング ($10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$) を示した。IR スペクトルはほぼ一定であったが VCD スペクトルにおいてはドメインごとのスポットが観察された。

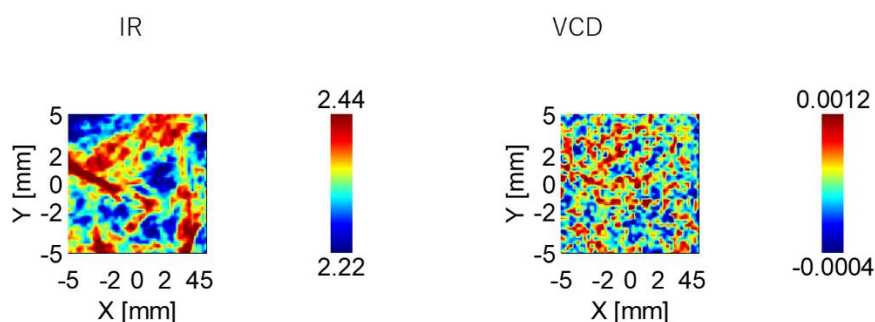


Fig. 6. Two-dimensional IR (left) and VCD (right) mapping in cuticle sample G at 1730 cm^{-1} .

次に $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ の範囲の微小領域を掃引し VCD スペクトルの二次元パターンを得た。試料の異なる二か所で測定した IR と VCD スペクトルを Fig. 7 に示した。両者ともアミド I に相当する 1650 cm^{-1} 付近のスペクトル形状から、 β シート系タンパク質が存在していることが導かれた。一方、水分子の変角振動に帰属される VCD シグナル (1630 cm^{-1} 付近)では、あるドメイン (濃緑色線) は上向きの符号のピークが観察され、別のドメイン (薄緑色線) では下向きの符号のピークが観察された (Fig. 7a の丸枠)。このように場所によって反転シグナルのあることから水分子にキラル誘導が起こっていることが示唆された。ただし、測定した試料はいずれも配向性が強く、直線二色性の影響が入ってくるために、真の VCD シグナルの観察は困難であった。先の ATR の結果の中で述べた黄(Y)における 1630 cm^{-1} 付近の 2つのピーク (Fig. 7b の黄色線の丸枠) については、それに相当する VCD シグナルは観察されなかった。

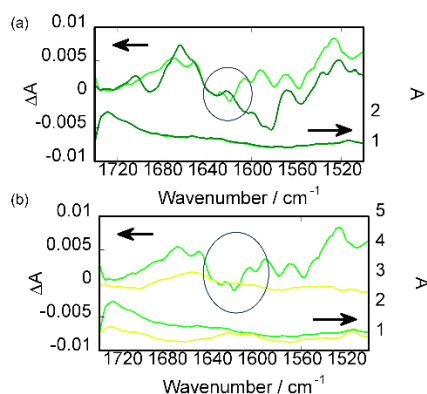


Fig. 7. (a) Microscopic VCD (upper) and IR (lower) spectra for G cuticle sample at two different domains. A circle indicates the related H₂O vibration. (b) Comparison of microscopic VCD (upper) and IR (lower) spectra of G (green line) and Y (yellow line) cuticle samples, respectively.

試料の配向性の影響を避けるために細かい粉末にして KBr ペレット中に混入させた試料について VCD 測定を行った。測定には FT-VCD 法を用いた。Fig. 8 に示すように緑 (G) の場合では、C-O stretching および RR'CO (ketones) に帰属される 1720 cm⁻¹ のピークが顕著に観察された。さらに興味あることに、水分子由来の VCD のシグナルが観察された。この成熟段階において、水分子と糖との水素結合によるキラル誘導の起こっていることが示唆された (Fig. 8a 丸枠)。黄 (Y) では、IR スペクトルにおいて水分子に関連していると思われる二つのピークが見られた。しかし、VCD シグナルでは相当するピークは見られなかった。この段階では、水分子のキラル誘導は起こっていないと推定される。この後のオレンジ (O)、赤 (R) においても明確な水分子由来のシグナルは同定できなかった。これより、水分子のキラル誘導は緑色クチクラ (G) 段階に特有の反応であることがわかった。VCD 法により、植物の成熟のある特定段階で水の構造変化が起こることが示されたのは興味深い。

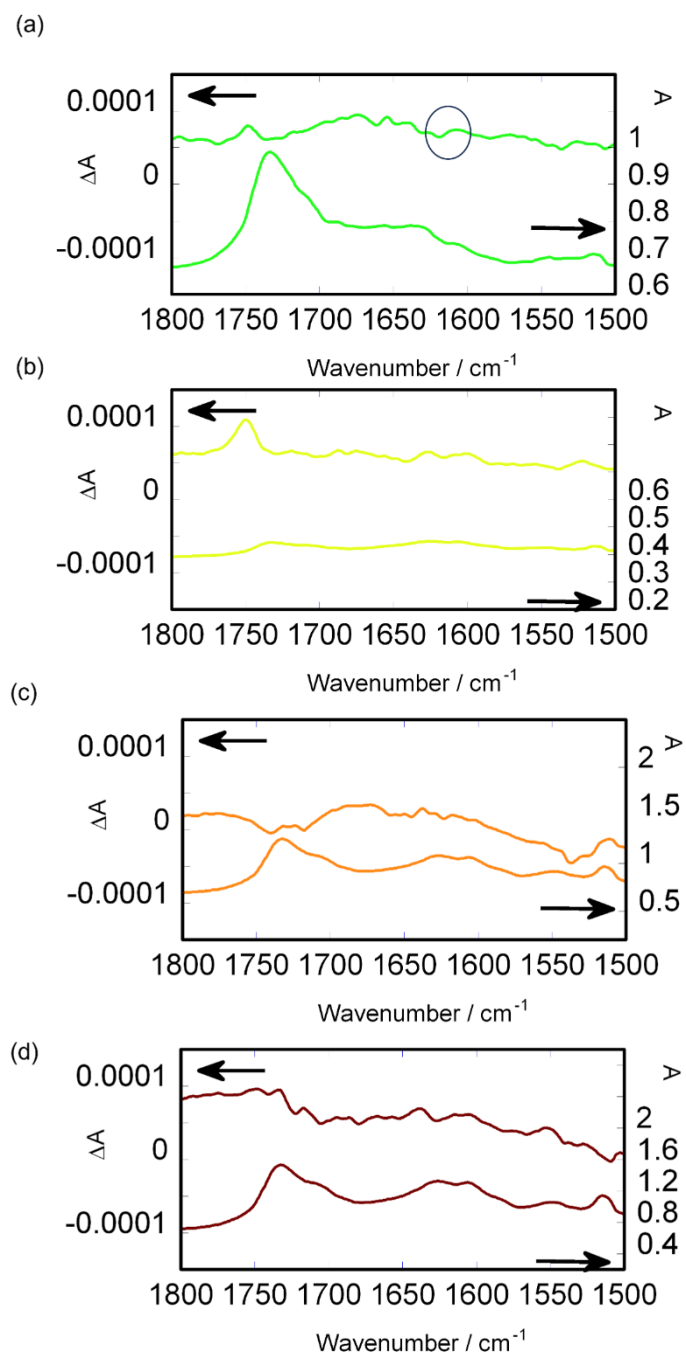


Fig. 8. FT-IR (lower) and VCD (upper) spectra for G (a), Y (b), O (c) and R (d) cuticle samples, respectively.

4. 結論

トマト成熟過程のクチクラに対して各種赤外分光法を（ATR 法、顕微 IR 法、VCD 法）を適用してその変化を調べた。植物の多機能性発現の中で、特に成熟過程における水の変化に着目した。IR スペクトルからは、成熟に伴い 1640 cm^{-1} 付近の水との相互作用の振動が2つのピークが観察され、黄(Y)、オレンジ(O)成熟段階サンプルにおいて顕著で

あった。初期の緑(G)の状態では C-O エステルの振動が顕著であった。さらに、VCD 測定においては、マクロスケールの配向の影響もあることがわかった。配向の影響を除くために KBr ペレットにして測定を行った。その結果、IR スペクトルでは観測できなかった緑(G)において水との相互作用に依存すると思われる VCD シグナルを観測した。成熟過程の緑段階でクチクラの水分子のキラル誘導の可能性が示唆された。今後、水分子の詳細測定には、VCD 装置の開発を含めて、さらに精密な検討が必要である。

謝辞

VCD サンプルづくりや IR 測定において瀧本和誉博士（現在、北里大学助教）におこなっていただきました。大変感謝いたします。この研究は JSPS 科研費 JP22H02033 によって行われました。

参考文献

- 1) J. A. Heredia-Guerrero, J. J. Benítez, E. Domínguez, I. S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou and A. Heredia, Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, article 305 (1-14).
- 2) V. Fernández, P. Guzmán-Delgado, J. Graça, S. Santos and L. Gill, Cuticle Structure in Relation to Chemical Composition: Re-assessing the Prevailing Model. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, Article 427 (1-14).
- 3) J. A. Heredia-Guerrero, J. J. Benítez, E. Domínguez, I. S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou and A. Heredia, Infrared spectroscopy as a tool to study plant cuticles. *Spectrosc. Eur.* **2016**, *28*, 10-13.
- 4) T. Shepherd and D. W. Griffiths, The effects of stress on plant cuticular Waxes. *New Phytologist* **2006**, *171*, 469-499.
- 5) C. Farber, R. Wang, R. Chemelewski, J. Mullet, and D. Kurouski, Nanoscale Structural Organization of Plant Epicuticular Wax Probed by Atomic Force Microscope Infrared Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2472-2479.
- 6) T. Hama, K. Seki, A. Ishibashi, A. Miyazaki, A. Kouchi, N. Watanabe, T. Shimoaka and T. Hasegawa, Probing the Molecular Structure and Orientation of the Leaf Surface of *Brassica oleracea* L. by Polarization Modulation-Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy. *Plant Cell Physiol.* **2019**, *60*, 1567-1580.
- 7) K. Konagaya, K. Abamba Omwange, D. F. A. Riza, A. Khaliduzzaman, A. M. Oliver, F. Rovira-Mas, H. Nagasato, K. Ninomiya and N. Kondo, Association of fruit, pericarp, and epidermis traits with surface autofluorescence in green pepper. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 1630-1635.
- 8) H. Sato, A new horizon for vibrational circular dichroism spectroscopy: a challenge for

- supramolecular chirality. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 7671-7679.
- 9) H. Sato, J. Yoshida, A. and Yamagishi, ‘Multi-dimensional vibrational circular dichroism’ Springer Nature, **2024**, ISBN978-981-97-0390-6.
- 10) H. Sato, M. Shimizu, K. Watanabe, J. Yoshida, I. Kawamura, and J. Koshoubu, Multidimensional Vibrational Circular Dichroism Apparatus Equipped with Quantum Cascade Laser and its Use for Investigating Some Peptide Systems Containing D-Amino Acids. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 2742-2748.
- 11) H. Sato, A. Yamagishi, M. Shimizu, K. Watanabe, J. Koshoubu, J. Yoshida, and I. Kawamura, Mapping of Supramolecular Chirality in Insect Wings by Microscopic Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy: Heterogeneity in Protein Distribution. *J. Phys. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 7733-7737.
- 12) K. Konagaya, D. F. A. Riza, Y. Ogawa, Y. Kohno, M. Kuramoto, N. Takahashi, T. Suzuki, and N. Kondo, Autofluorescence changes of tomato surface tissues during overripening. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 879-884.