

# 細胞壁再構成機構による塩ストレス下のトマト果実硬度変化調節のための基盤形成

岩井 宏暁

筑波大学生命環境系

**概要** 塩ストレスは浸透圧ストレス、イオン毒性を引き起こし、植物の生育や代謝に支障をきたす場合が多い。しかし、塩ストレス条件の下で栽培したトマトでは、グルコースやフルクトース等の糖類やプロリン、 $\gamma$  アミノ酪酸等のアミノ酸の蓄積が起きることで、商品価値の高い果実が生産できることが知られている。果実成分は、主要な園芸作物において、消費者の嗜好性を左右する差異重要形質の1つである。その一方で、塩ストレス条件下での栽培は、果実サイズの減少と果実数の減少、そして果実硬度が上昇するデメリットも生じている。この果実硬度の変化には、細胞壁の構造が大きく関わっている。本研究では、塩ストレス条件下の成熟過程におけるトマト硬度の変化において、細胞壁構造とその制御が組織ごとどのように変化しているかについて調査した。

天秤型食感測定装置を用いた力学的手法により果実硬度を測定した。その結果、塩ストレス条件下の果実は、果実全体は硬度上昇するが、組織ごとに軟化の程度は異なっていた。外果皮では顕著に硬いが、逆に果実内部の中内果皮は約 50%程度摩擦係数が減少し軟らかな性質を持っており軟化は促進されていることが示された。硬度の上昇が確認された塩ストレス条件果実の外果皮ではクチクラ層の厚さが 26%程度上昇しており、外果皮直下の 2~3 層のペクチン量の多い細胞層が形成されていた。一方、軟化が進行していた中内果皮では、細胞自体が破壊され軟化が進行している様子が観察された。軟化する Red ripe, Over ripe ステージにおけるペクチン分解酵素活性に大きな変化はなかったものの、ペクチンメチルエステラーゼ活性が約 115%程度上昇しており、ペクチンメチル化度による分解調節が行われていることが示唆された。

本研究により、塩ストレス条件下の果実は、果実全体は硬度上昇するが、組織ごとに軟化の程度は異なっていることが示された。また、その硬度変化を起こしている原因が、組織ごとに異なる細胞壁動態の変化を伴う細胞組織的な変化であることが示唆された。

## 1. 研究目的

果実成分は、主要な園芸作物において、食味や消費者の嗜好性を左右する差異重要形質の一つとされている。トマトは、開花後に塩ストレス条件下で栽培を行うことにより、グルコースやフルクトース等の糖類やプロリン、 $\gamma$  アミノ酪酸等のアミノ酸の蓄積が起きることで、商品価値の高い果実が生産できることが知られている (Adams 1991; Balibrea *et al.* 1996; Zushi *et al.* 2005; Saito *et al.* 2008a, 2008b; Yin *et al.* 2010)。果実成分は、主要な園芸作物において、消費者の嗜好性を左右する差異重要形質の1つである。その一方で、塩ストレス条件下での栽培は、果実

サイズの減少と果実数の減少、そして果実硬度が上昇するデメリットも生じている (Ho *et al.* 1987)。この果実硬度の変化には、細胞壁の構造が大きく関わっている。

現在までに本研究室では、トマト果実の成熟・軟化過程において、組織ごとに異なる細胞壁の分解と合成が起こり、それぞれ異なった性質の細胞壁を再構成していることを報告してきた (Hyodo *et al.* 2013, Takizawa *et al.* 2014)。しかしながら、トマト果実の成熟・軟化に対する塩ストレスの影響については、多くの研究が果実全体での反応を対象としており、組織ごとの詳細な研究はされていない。果実に硬度を寄与する細胞壁が、果実軟化において組織ごと

異なる性質の細胞壁を再構成している以上、塩ストレスの影響が組織ごとに異なる可能性は非常に高いと考えられる。

そこで本研究では、塩ストレス条件下におけるトマト果実において、実際に果実硬度が上昇しているのかどうか、そしてその硬度変化を起こしている原因はなにであるのかを、組織ごとに調査することで明らかにすることを目的としている。そのことを通して、塩ストレス条件栽培によってトマト果実の食感に変化が起こる仕組みの一端が明らかにできることを期待している。

## 2. 材料および手法

### 2.1 塩ストレス条件下におけるトマト果実の組織別硬度測定

トマト(*Solanum lycopersicum*: 品種 Micro-Tom)の塩ストレス処理、無処理区(コントロール)果実を試料として用いた。まずトマト種子を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 x 5 x 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<sup>-1</sup>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。生育条件は16時間明期(27°C)、8時間暗期(22°C)とした。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<sup>-1</sup>(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<sup>-1</sup>から5.0 dS m<sup>-1</sup>、8.0 dS m<sup>-1</sup>、12.0 dS m<sup>-1</sup>、15.0 dS m<sup>-1</sup>と徐々に上げていき、8日程度かけて順化させた。果実の成長・成熟ステージを以下に示す4段階に分けて、果実のサンプリングを行った。M: Mature green(30 day post anthesis (DPA)), B: Breaker(35 DPA), T: Turning(37 DPA), R: Red ripe(45 DPA)。また各段階の果実に対し、外果皮、中・内果皮、隔壁、子室組織の4組織に分けてサンプリングを行った。(Fig. 1)天秤型食感測定装置を用い、サンプルの部分にトマトをセットし、上から楔形のプローブを刺し測定を行った。この時プローブに取り付けたセンサーで振動を得て、突き刺すときの強さ、速度を測った。果実全体の硬度と外果皮のみの硬度を測定した(秋元 *et al.* 2014)。

### 2.2 塩ストレス条件下におけるトマト果実の組織化学的解析

Rステージのトマト果実をカミソリで半分切断し、2.5%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液(PBS)に入れ、24時間室温で脱気した。サンプルが沈んだことを確認し、エタノールシリーズにより脱水した。(30%;20分, 50%;一晩, 70%;20分, 80%;20分, 90%;20分, 95%;30分, 100%;30分3回)その後、テクノビット7100樹脂(Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany): EtOH = 1:1で6時間の樹脂置換後、さらにテクノビット7100のみに6時間つけ、再度交換してテクノビットのみに一晩つけた。このサンプルをテクノビット樹脂15 mlと硬化剤1 mlの混合液に包埋した。樹脂が固まり始め、粘性が増したことを確認し、樹脂のフタとなる3040樹脂を用いて密封した。これをタングステンナイフとミクロトーム(Reichert EM-ULTRACUT, Leica, Wetzlar, Germany)を用いて10 μmに切断し、組織切片を作成した。作成したテクノビット樹脂切片をスライドガラスに乗せ、1%ルテニウムレッドにより10分間染色しペクチンを染色した。

### 2.3 塩ストレス条件下におけるトマト果実のペクチン量およびペクチン分解酵素活性測定

細胞壁の調整:各サンプル生重量0.1 gずつを、乳鉢と

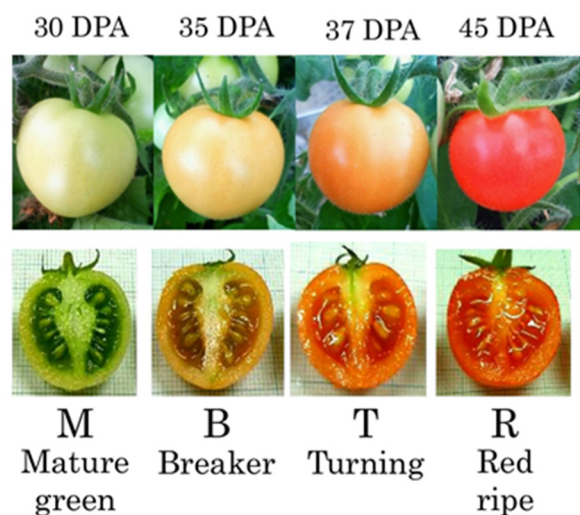


Fig. 1. Preparation for tissue-specific analysis

The fruit ripening stages of cv. Micro Tom. The four stages included mature green (M), breaker (B), turning (T) and red ripe (R).

乳棒を用いて液体窒素中で粉碎し、粉体を 80% EtOH 1 ml に懸濁し、15,000 rpm で 5 分遠心、上清を除いた。沈殿をクロロホルム:メタノール(1:1) 1 ml に懸濁し、15,000 rpm で 5 分遠心し上清を除いた。この操作を 3 回繰り返した。沈殿をフェノール:酢酸:DW(1:1:1) 1 ml に懸濁し、15,000 rpm で 5 分遠心し上清を除いた後、再度クロロホルム:メタノール(1:1) 1 ml に懸濁し、15,000 rpm で 5 分遠心し上清を除いた。さらにアセトン 1 ml に懸濁し、15,000 rpm で 5 分遠心し上清を除いた。この操作を 3 回繰り返した。また、B ステージ以降の外果皮のサンプルは色素が多く含まれるため、上記の操作を行った後に沈殿をジクロロメタン 1 ml に懸濁し、15,000 rpm で 5 分遠心し上清を除いた後、アセトン 1 ml に懸濁し、15,000 rpm で 5 分遠心し上清を除いた。全サンプルを真空乾燥させ、乾重量を測定し、細胞壁量とした。

ペクチンの抽出:各細胞壁サンプル 2 mg を 0.25 mM シュウ酸アンモニウム 500  $\mu$ l に溶かし、2 時間湯煎し、15,000 rpm で 5 分遠心し上清をペクチン画分とした。これをカルバゾール硫酸法によりガラクトuron 酸量を測定し、ペクチン量とした。

細胞壁分解酵素の調整:各サンプル 0.3 g に 20 mM の pH 7.5 の Tris-HCL buffer を 1.5 ml と石英砂を加え、氷上ですりつぶし、15,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清を除いた。さらに 20 mM の pH 7.5 の Tris-HCL buffer を 1.5 ml 加え、15,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清を除

いた後、この操作を繰り返した。そこに 10% の NaCl を含む 20 mM の pH7.5 の Tris-HCL buffer を 1.5 ml 加え、4  $^{\circ}$ C 条件下で 1 時間攪拌した。その後、15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を酵素液とした。

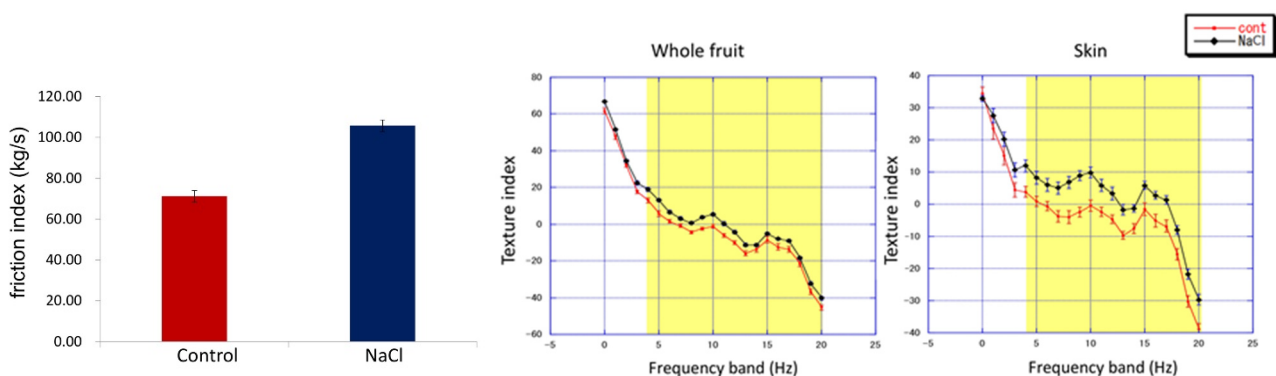
ペクチンメチルエステラーゼ活性の測定:基質には 0.3% のペクチン(89%メチル化) 1 ml, 0.01% BTB 溶液 0.5 ml, DW 1.2 ml を混合した溶液を用い、酵素液 0.3 ml を加え、 $A_{620}$  で 10 秒毎に 60 回測定し、吸光度の減少速度の傾きをペクチンメチルエステラーゼ活性とした。また、実験に用いた全ての果実サンプルに同様の処理を行い、活性を測定した。

ポリガラクトuronナーゼ活性の測定:ペクチンメチルエステラーゼ活性と同様の方法により抽出した酵素液の各サンプルから 100  $\mu$ l とり、Milner-Avigad 法(Majima M *et al.* 1984)により遊離ウロン酸選択的な還元糖量の測定を行った。単位時間当りに遊離したウロン酸量を酵素活性とした。

### 3. 研究結果

#### 3. 1 塩ストレス条件下におけるトマト果実の組織別硬度測定

天秤型食感測定装置を用いた力学的手法により果実硬度を測定した。その結果、塩ストレス条件下の果実は、果実全体での硬度が上昇していた(Fig. 2)。一方、外果皮のみでの測定では、さらに塩ストレス条件栽培でのトマ



**Fig. 2.** Measurements of fruit firmness by balance type device for the measurement of food texture of red ripe tomato fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Output voltage signals of vibration at probe penetration of tomato pericarp detected by the sensor. Right panel is food friction index of tomato pericarp that measure the probe speed after insertion.

トの硬度の上昇の差が顕著となった。一方、測定プローブの貫通速度を数値化した摩擦係数を用いた測定では、果実内部の中・内果皮は約 50%程度摩擦係数が変化していた (Fig. 2) ことから、軟らかな性質を持っており果実内部の軟化は促進されていることが示された。以上より、塩ストレス条件下のトマト果実は、コントロール条件と比較して、果実内部は軟らかな肉質をしているが果皮組織では硬度が顕著に上昇しており、結果的に果実全体の果実硬度が上昇していることが明らかになった。

### 3. 2 塩ストレス条件下におけるトマト果実の組織化学的解析

硬度の上昇が確認された塩ストレス条件果実の外果皮を、組織切片にしてワックスを染色して観察したところ、コントロールと比較してクチクラ層が厚くなっている様子が観察された。観察した 25 サンプルの顕微鏡画像より、クチクラ層の厚さを数値化したところ、塩ストレス条件果実の外果皮では、クチクラ層の厚さが 26%程度上昇していた。そのため、塩ストレス条件下のトマト果実で硬度が上昇した原因のひとつが、クチクラ層の厚さの増加であることが示唆された (Fig. 3)。

また、硬度の上昇が確認された塩ストレス条件果実の外果皮の組織切片を、ペクチンを特異的に染色するルテニウムレッドによって染色して観察を行った。その結果、塩ストレス条件のトマト果実では、クチクラ層の直下の3層から細胞層が、非常に整然と整列している様子が観察された。また、この細胞層ではペクチンの染色レベルが、コント

ロールと比較して非常に高い様子が観察された。ペクチンは細胞接着性に関わる細胞壁多糖類の一種である。一方、コントロールではこのような細胞層は存在せず、細胞同士の接着性も弱く細胞間隙が観察され、軟化が外果皮の領域でも進行していることが観察できる (Fig. 4)。

しかし、硬度の減少が確認された塩ストレス条件果実の果実内部の中内果皮では、害可否とは対症的に細胞が形を維持できずに崩壊している様子が確認された。コントロールでは、細胞間隙は観察されるものの、正常な細胞の形を保っていた (Fig. 4)。

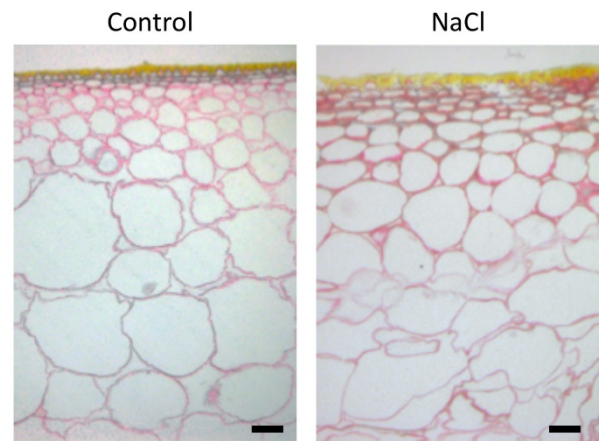


Fig. 4. Pectin staining in fruit pericarp tissues of red ripe tomato fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Scale bars means 50  $\mu$ m.

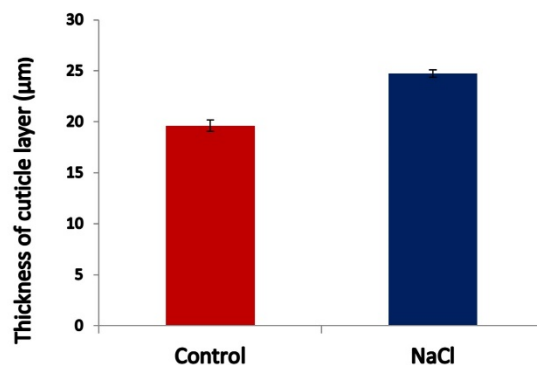
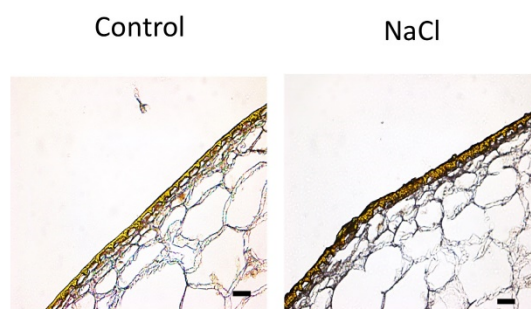


Fig. 3. Changes in the thickness of cuticle layer of red ripe tomato fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Scale bars means 50  $\mu$ m. Values are means  $\pm$ SD (n=25).

### 3.3 塩ストレス条件下におけるトマト果実のペクチン量およびペクチン分解酵素活性測定

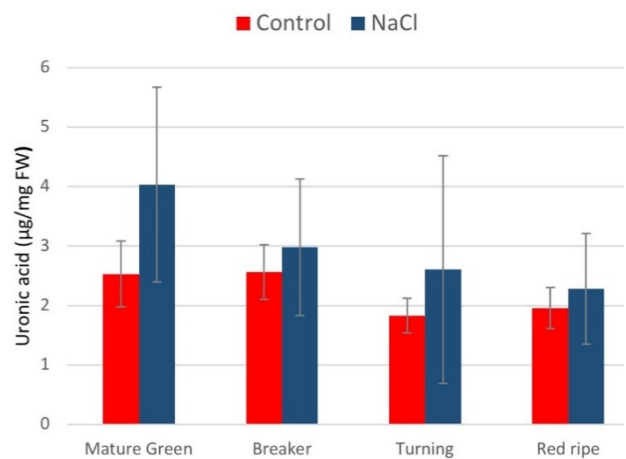
硬度の上昇が確認されペクチンの蓄積が組織レベルで観察された塩ストレス条件果実を用いて、細胞壁を調整しペクチン性画分を抽出した。そのペクチン性画分のペクチン量を、カルバゾール硫酸法を用いて定量を行った。その結果、red ripe においてペクチンの蓄積が確認された塩ストレス条件のトマト果実で、果実成熟初期の Mature Green におけるペクチン量が、コントロールと比べ高く、また、ステージを経るごとに減少していた (Fig. 5)。コントロールの果実では、ステージごとにペクチン量に大きな変動は観察されなかった。

一方、ペクチンの量を調節するペクチン分解酵素であるポリガラクトナーゼとペクチンメチルエステラーゼについて、その活性を測定した。その結果、軟化する Red ripe, Over ripe ステージにおけるペクチン分解酵素であるポリガラクトナーゼ活性に大きな変化はなかった。一方、ペクチンの脱メチル化を行うペクチンメチルエステラーゼでは、その活性が果実成熟初期から約 115%程度上昇していた (Fig. 6)。ポリガラクトナーゼは、脱メチル化ペクチンを基質としてペクチンを加水分解することが知られている。そのため、ペクチンメチルエステラーゼ活性が高かった塩ストレス条件下の果実では、ポリガラクトナーゼの基質として働きやすいペクチンを有していた可能性が高い。塩ストレス条件のトマト果実の中内果皮は、ペクチン量の大きな変化が原因で、力学的に柔らかな性質を持つに至った

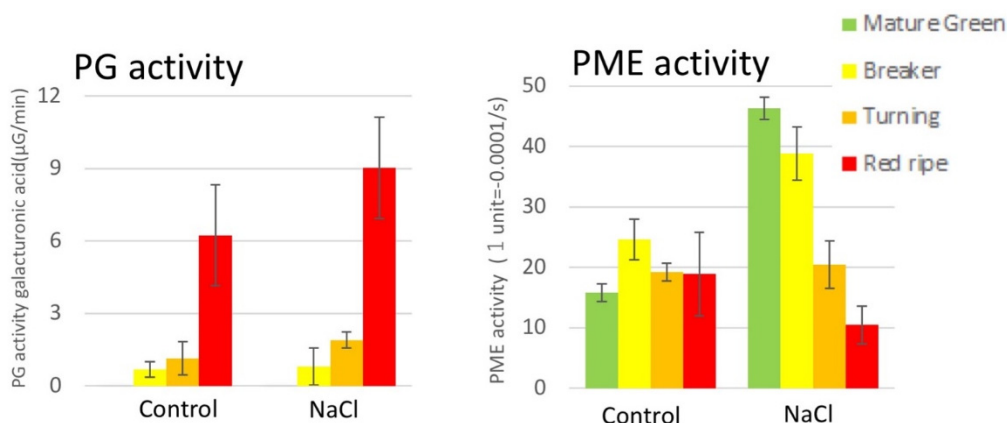
可能性が考えられた。

### 4. 考察

本研究では、1) 塩ストレス条件下におけるトマト果実の組織別硬度測定、2) 塩ストレス条件下におけるトマト果実の組織化学的解析、3) 塩ストレス条件下におけるトマト果実のペクチン量およびペクチン分解酵素活性測定を行なった。現在までに、塩ストレス条件下で栽培されたトマトは、硬度が上昇することが報告されているが、本研究でも、確



**Fig. 5.** Pectin content per 1 g fresh weight of tomato fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Sugar content in pectin fraction extracted from tomato fruit cell wall. Ripening stage: mature green, breaker, turning, red ripe.  $\pm$ SD of three independent replicates.



**Fig. 6.** Polygalacturonase and pectin methylesterase activity of tomato fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Ripening stage: mature green, breaker, turning, red ripe.  $\pm$ SD of nine independent replicates.

かに果実全体での硬度が上昇することが確認された (Fig. 2)。しかし、組織別の硬度測定を行ったところ、果実硬度に貢献しているのは、いわゆる皮である外果皮であり、内部である中内果皮組織は、むしろ硬度が低下していることが示された。また、組織化学的な解析により、外果皮の硬度が塩ストレス条件下で高い原因は、クチクラ層が対照区より厚く、また外果皮直下の2~3層の細胞層が強固であることである可能性が高いと考えられる。この細胞層では細胞接着の維持に重要なペクチンが多く蓄積していることが、この強固な細胞層の形成に貢献しているのではと考えられる。組織化学的な観察だけでなく、化学的な定量結果からも (Fig. 5) 塩ストレス条件下でペクチンが多く蓄積することを支持している。また、ペクチンの分解の実行役であるポリガラクトナーゼの活性は、塩ストレス条件下の方が高い傾向はあったものの、大きな違いはなかった。一方で、ペクチンの脱メチル化を促進するペクチンメチルエステラーゼに関しては、塩ストレス条件下で果実成熟の早期から非常に高い活性を示した。ポリガラクトナーゼは、メチル化したペクチンは分解しにくい、脱メチル化したペクチンの分解は容易に加水分解することが知られている。塩ストレス条件下の果実では、ペクチンのメチル化の状態を制御することで、ペクチンが分解されやすい状況を作り、果実軟化を調節していた可能性が考えられる。今後、ペクチン合成に塩ストレス条件下で違いがあるのかを調査するために、合成酵素の活性や遺伝子発現の調査を行う予定である。

本研究により、塩ストレス条件下の果実は、果実全体は硬度上昇するが、組織ごとに軟化の程度は異なっていることが示された。また、その硬度変化を起している原因が、組織ごとにことなる細胞壁動態の変化を伴う細胞組織的な変化であることが示唆された。

## 5. 今後の課題

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、当初計画していた細胞壁合成関連酵素遺伝子の発現解析と ICP および nanoSIMS を用いたカルシウム量と分布解析を期間内に終わ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

ける細胞壁合成とカルシウム動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

- 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
- Ehret, D., Ho, LC., 1986: The effects of salinity on dry matter partitioning and fruit growth in tomatoes grown in nutrient film culture. *J. Hort. Sci.* 61, 361-367.
- 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
- Hyodo H, Terao A, Furukawa J, Sakamoto, Yurimoto H, Satoh S, Iwai H (2013) Tissue Specific Localization of Pectin-Ca<sup>2+</sup> Cross-linkages and Pectin Methylesterification during Fruit Ripening in Tomato (*Solanum lycopersicum*) *PLoS One* 8: e78949
- 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 (*Solanum lycopersicum* 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  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-rich tomato varieties. *J Japan Soc Hort Sci* 77: 242-250
- Takizawa A, Hyodo H, Wada K, Ishii T, Satoh S, Iwai H (2014) Regulatory Specialization of Xyloglucan and Glucuronoarabinoxylan in Pericarp Cell Walls during Fruit Ripening in Tomato (*Solanum lycopersicum*) *PLoS One* 9: e89871
- Yin YG, Tominaga T, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Ashihara H, Nishimura S, Ezura H, Matsukura C (2010) Metabolic alterations in organic acids and  $\gamma$ -aminobutyric Acid in developing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. *Plant Cell Physiol* 51: 1300-1314
- 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)
- 秋元秀美, 山崎友, 櫻井直樹 (2014) 天秤型食感測定装置の開発と新しい食感指標の検証 日本食品科学工学会大会講演集 61, 125

## Basic Formation for Regulation of Tomato Fruit-Softening by Cell Wall Remodeling under the Salinity Condition

Hiroaki Iwai

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

### Summary

Abiotic stresses, such as drought, salinity, extreme temperatures, chemical toxicity and oxidative stress are serious threats to plants and the natural status of the environment. Especially, high salinity causes ionic and osmotic stress, affecting plant growth and metabolism. However, it is known that salinity stress improves the fruit quality of tomato (*Solanum lycopersicum*) by increasing the level of total soluble solids, including sugars, organic acids, and amino acids in fruits. However, it also causes negative aspects such as reduction of fruit size, number and increase of fruit firmness. This change of fruit firmness during ripening is mainly as a consequence of the disassembly of different cell wall components. These events are accompanied by increased expression of various cell-wall degradation enzymes such as pectin methylesterase and polygalacturonase. Although many reports of the effects of salinity stress to tomato fruit ripening and softening are focused on the whole tomato fruit, the changes in each tissues are not well known. In this study, we focused on the increase of fruit firmness. To understand the function and regulation of cell wall in fruit softening under salinity stress, we measured fruit firmness, cell wall contents and pectin-related enzymatic activities. We measured fruit firmness (skin and mesocarp) used by acoustic vibration method. High levels of firmness were observed in skin, on the other hand, mesocarp showed about half level of firmness compared with control condition. It suggests that insides of fruits would be promoted softening. Thickness of cuticle increased under salinity stress. Cell wall pectin contents and pectin-related enzyme activity increased under salinity stress. These results suggest that cuticle layers development is important for the maintenance of high levels of fruit firmness for whole fruit and skin, and the changes of pectin features regulated by related enzymes, might contribute to fruit softening of mesocarp in tomato fruits under the salinity stress.