

# 細胞壁リモデリング機構による塩水栽培下の果実サイズ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。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。この果実サイズの変化には、細胞壁の構造が大きく関わっている。しかしながら、このサイズ決定に対する塩の影響について、ほとんど研究報告がない。この子房から果実への変遷は、非常に小さな組織で行われているため、生化学的な解析が極めて困難である。本研究では各細胞壁成分と細胞壁肥大関連酵素に対するモノクローナル抗体による細胞壁ダイナミクスの顕微鏡解析と遺伝子発現解析により果実サイズ減少の原因の解明を行った。果実サイズの減少は、受粉後 3 および 5 日後という極めて早期に生じていた。また、クチクラ層の厚さは果実サイズの減少が確認された 5 日目では、対照区と塩水栽培処理とで差がなく、果実サイズの減少の原因はクチクラ層の発達の原因ではない可能性が高い。次に細胞や組織のサイズを規定する細胞壁およびその細胞壁の堅さを決定する細胞壁成分の分布とその合成関連酵素の動態に注目した。その結果、最も細胞壁の硬さに貢献するセルロースが、塩ストレス条件で早期に蓄積していた。また、セルロース合成酵素もそれを裏付ける結果となっていた。また細胞壁を緩めるエクспанシンの発現や蓄積は塩ストレスによる影響を受けないことがわかった。以上より、堅い細胞壁成分であるセルロースが早期に蓄積するため、早期に果実の細胞壁の特性は硬くなる。一方で、細胞壁を緩めるエクспанシンは変化しないため、細胞壁が軟化する方向にならず細胞が大きくなりにくい。これらの理由から、果実が膨らみにくく塩ストレス条件の早期果実のサイズが減少したと考えられる。本研究により、塩水栽培条件下の果実サイズの減少には、クチクラの発達は貢献せず、堅い細胞壁成分であるセルロースが受粉後の早期に蓄積するため細胞壁の特性が堅くなり、果実が膨らみにくくなるのが原因であることが示唆された。

## 1. 研究目的

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、塩ストレス条件の塩水栽培のトマトでは、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 (Ehret et al. 1986; Adams 1991; Balibrea et al. 1996; Zushi et al. 2005; Saito et al. 2008a, 2008b; Akihiro et al. 2008, Yin et al. 2010)。その一方で、塩水栽培

は、果実硬度の上昇と果実数の減少、そして果実サイズが減少するデメリットも生じている。この果実サイズの変化には、細胞壁の構造が大きく関わっている。しかしながら、トマト果実のサイズ決定に対する塩ストレスの影響については、ほとんど研究報告がないのが現状である。現在までに申請者は、トマト果実のサイズ決定及び成熟過程において、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リモデリングしていることを報告してきた (Hyodo et al. 2013, Takizawa et al. 2014)。

受粉をきっかけに果実形成過程に入った子房は果実へと変遷し、急激な細胞分裂と細胞肥大が生じた結果、果実のサイズを決定する。サイズが決定した緑色果実は、その後、成熟が進んでも大きさは変化しない(Figure 1)。この子房から果実への変遷は、非常に小さな組織で行われているため、生化学的な解析が極めて困難である。しかし、申請者は現在までに、各細胞壁成分と細胞壁肥大関連酵素に対するモノクローナル抗体をもとに、子房から果実への変遷過程における細胞壁ダイナミクスの観察に成功し、果実サイズ決定には特殊な細胞壁成分が関わっていることを明らかとした(Terao et al. 2013)。果実サイズを決定する細胞壁が、塩水栽培の影響でどのようにサイズ縮小を起したのか、何が原因であるのか、その謎の解明が本研究の目的の核心である。そのことを通して、塩水栽培によってトマト果実サイズに変化が起こる仕組みを明らかにすることで、商品価値の高い塩トマトの果実サイズ調節を行う基盤形成を目指す。

## 2. 材料および手法

### 2.1 塩水栽培(塩ストレス条件)における早期トマト果実の育成と果実真円度の測定

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。

開花前日の子房および、開花前日に人工授粉してから -1, 1, 3, 5, 15 DPA(Days Post Anthesis)の果実をサンプリングした(Figure 2)。Mature Green 果実、人工授粉を行っ

た 3,5 DPA(Days post anthesis:開花後日数)果実を用いて、実体顕微鏡による形態観察を行った。

### 2.2 塩水栽培(塩ストレス条件)における早期トマト果実の細胞壁関連組織化学的解析

-1, 1, 3, 5 DPA 果実をパラホルムアルデヒド + Tween20 in 50 mMリン酸バッファーに入れ、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マイクローム(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。組織染色としてはルテニウムレッドによるペクチン染色、カルコフロールホワイトによるセルロース染色を行った。免疫組織化学染色では、作成した切片に対して、TSATM Kit #12 with HRP-goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488 tyramide(Micro Probes/Invitrogen)を用いて免疫組織化学染色を行った。切片の上に数滴の Peroxidase quenching buffer(1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Phosphate Buffered Saline(PBS))を滴下し室温(以下同条件)で1時間静置した。Peroxidase quenching bufferを取り除き、PBSで3回洗浄した。1% blocking reagent を滴下し1時間静置した。1% blocking reagent を取り除き、PBSで3回洗浄した。本研究では一次抗体にキシログルカンを標識する LM15、エキSPANシンを標識する EXPB2 を用いた。一次抗体を滴下し1時間静置し、PBSで3回洗浄した。HRP conjugate working solution(HRP conjugateを1% blocking reagentで100倍希釈した溶液)を滴下し1時間静置した。HRP conjugate working solutionを取り除き、PBSで3回洗浄した。Tyramide working solutionを滴下し、遮光した状態で10 min 静置した。Tyramide working solutionを取り除き、PBSで3回洗浄した。PBSを滴下し、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で観察した。

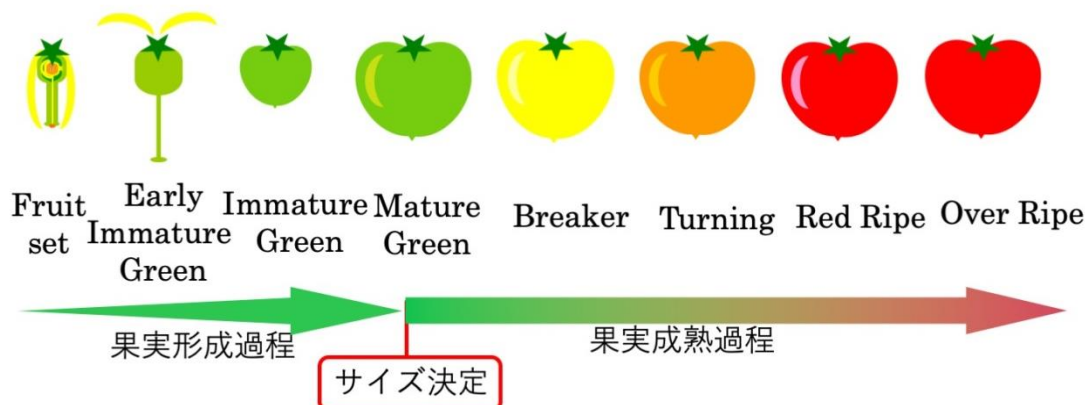


Figure 1. Fruit growth and ripening stages of tomato.

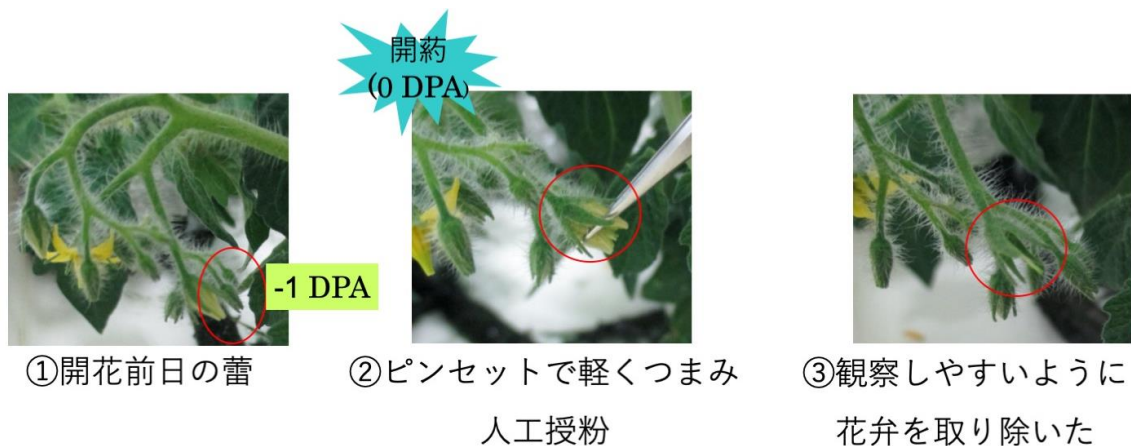


Figure 2. Preparation for artificial pollination

### 2. 3 塩水栽培(塩ストレス条件)における早期トマト果実の細胞壁関連遺伝子発現解析

トマト一次細胞壁のセルロース合成酵素遺伝子である CESA1, CESA2, CESA3, ペクチン合成酵素遺伝子である GAUT1-Like, GAUT1-Family, キシログルカン合成酵素遺伝子である XXT-Like, キシラン合成酵素遺伝子である IRX9-Like1, IRX9-Like2 について RT-PCR により発現解析を行った。また、キシログルカン転移酵素/加水分解酵素遺伝子であるエクспанシン遺伝子である EXP2, EXP3, EXP4 について qRT-PCR により発現解析を行った。

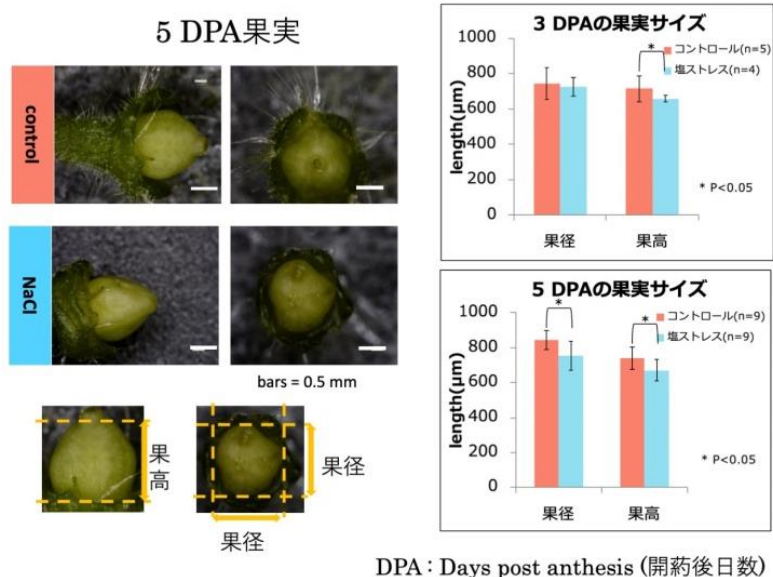
## 3. 研究結果

### 3. 1 塩水栽培(塩ストレス条件)における早期トマト果実サイズの測定と観察

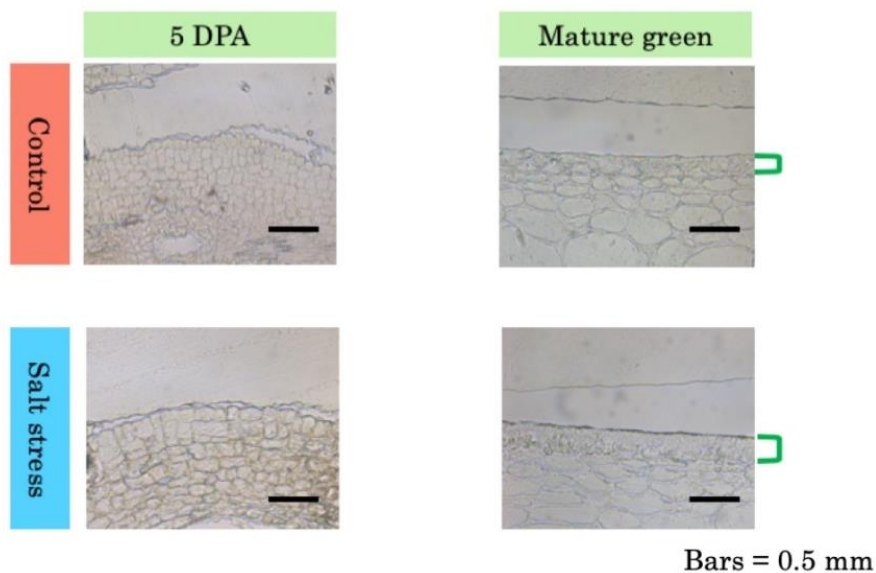
塩ストレス条件の果実では 3 DPA で果高の減少, 5 DPA で果実全体のサイズ減少が見られた (Figure 3)。主にサイズの減少がはっきり確認されるのは 5 DPA であることがわかった。また, サイズ減少が確認された塩ストレス条件果実の外果皮を, 組織切片にしてワックスを染色して観察したところ, 5 DPA 果実ではクチクラ層は未発達でコントロールと塩ストレス条件で差がなかった (Figure 4)。クチクラ層の形成異常は細胞伸長の抑制や果実サイズの減少を引き起こすと言われているが, 塩ストレスによる早期果実におけるサイズ減少にクチクラ層の厚さの変化は寄与していないことが示唆された。

### 3. 2 塩水栽培(塩ストレス条件)における早期トマト果実の細胞壁関連組織化学的解析

果実サイズの減少が確認された塩ストレス条件果実(-1, 1, 3, 5 DPA)を, 組織切片にしてセルロースを特異的に染



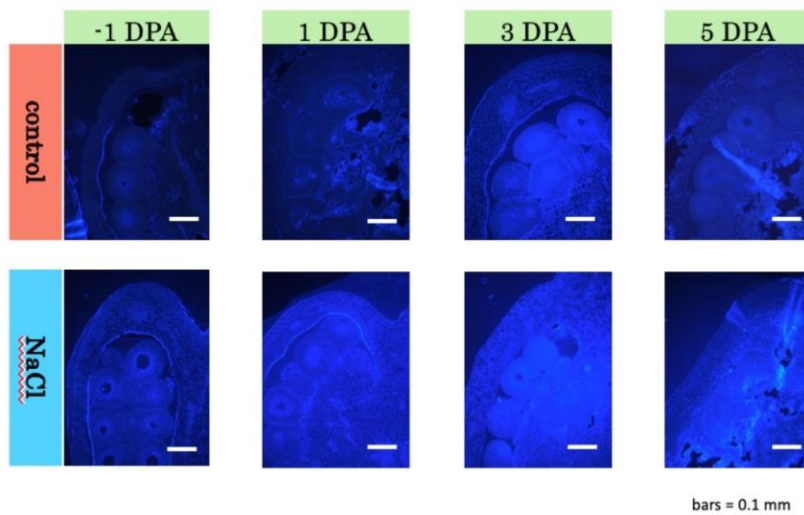
**Figure 3.** Measurements of fruit size in early stages fruit of tomato (3, 5 DPA) fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Scale bars means 0.5 mm.  $\pm$ SD of three independent replicates.



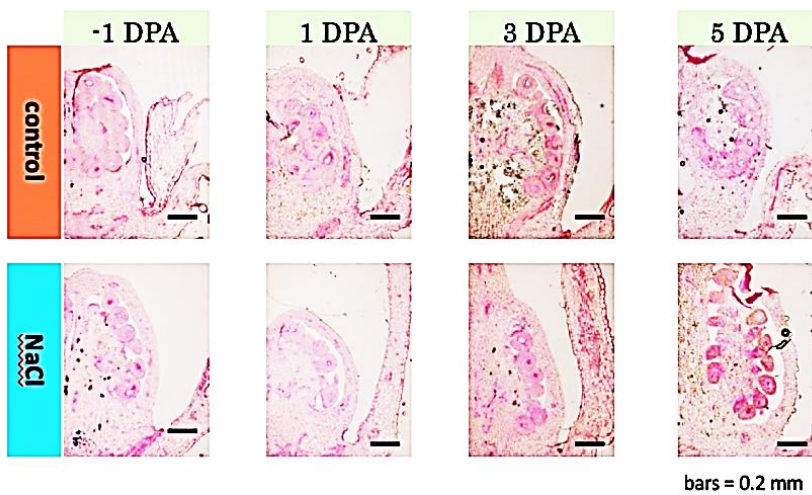
**Figure 4.** Observations of thickness of cuticle layer of 5 DPA stage tomato fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Scale bars means 0.5 mm.

色するカルコフロールホワイトによって染色して観察を行った。その結果、コントロールと比較して全ステージにおいて塩ストレス条件果実で染色レベルが高いことが確認された (**Figure 5**)。また同じく組織切片を、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結果、コントロールと比較して、塩ストレスで 5 DPA では胚

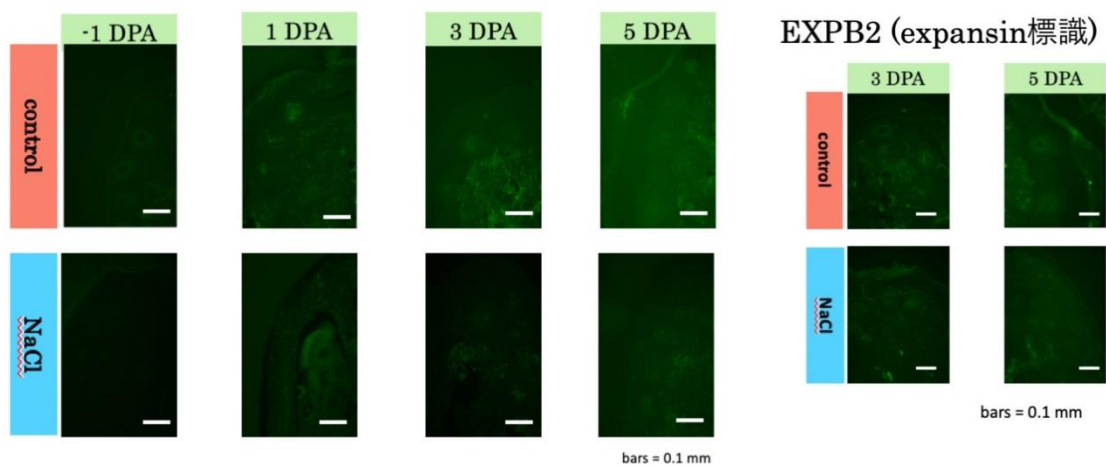
珠におけるペクチン染色レベルが高くなっていた (**Figure 6**)。キシログルカンのシグナルはコントロールでは徐々に増えていた一方で、塩ストレスでは 1-3 DPA で減少し、5 DPA で再び増加していた (**Figure 7**)。エクспанシンは、両者で大きな変化や違いは観察されなかった (**Figure 7**)。



**Figure 5.** Cellulose staining in early stages fruit of tomato (-1, 1, 3, 5 DPA) fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Scale bars means 0.2 mm.



**Figure 6.** Pectin staining in early stages fruit of tomato (-1, 1, 3, 5 DPA) fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Scale bars means 0.2 mm.



**Figure 7.** Immunolocalization of xyloglucan and expansin (EXPB2) in early stages fruit of tomato (-1, 1, 3, 5 DPA) fruit grown under control and saline conditions (160 mM). Scale bars means 0.1 mm.



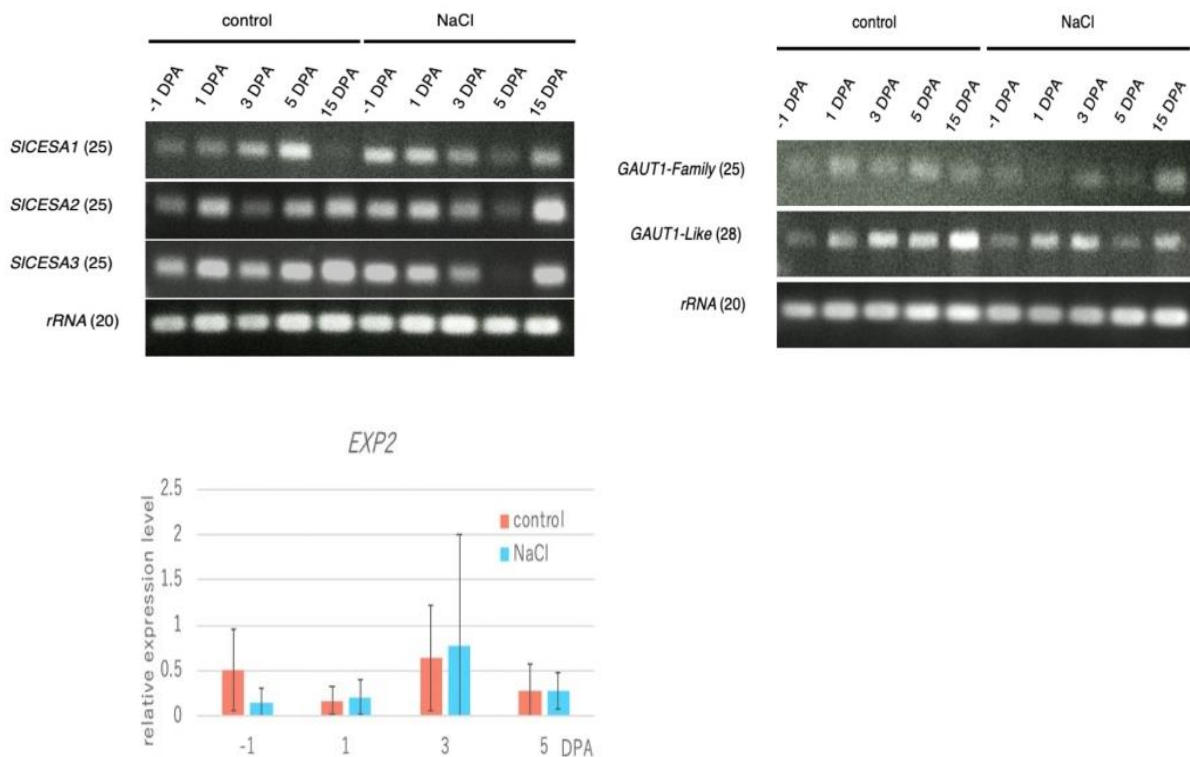
### 3.3 塩水栽培(塩ストレス条件)における早期トマト果実の細胞壁関連遺伝子発現解析

果実サイズの減少が確認された塩ストレス条件果実(-1, 1, 3, 5 DPA)における細胞壁関連遺伝子発現の調査を行った。セルロース合成酵素としては、トマトの一次細胞壁合成酵素として知られている *CesA1* ~ 3 について発現解析を行った。

セルロース合成酵素遺伝子は、コントロールでは開花後に発現が上昇して 5 DPA でピークに達するが、塩ストレス条件では-1 DPA をピークとして開花後に発現が低下し、15DPA までに発現が上昇していた。また、塩ストレス条件における-1 DPA での発現はコントロールでのピークである 5 DPA と同レベルに高かった。ペクチン合成酵素としては、シロイヌナズナの主なペクチン合成酵素である *GAUT1* のトマトでのホモログである *GAUT1* について発現解析を行った。ペクチン合成酵素遺伝子の発現は、コントロールでは開花後に発現が上昇していき、15 DPA でピークに達した。塩ストレス条件では、開花後の発現上昇が緩やかであり、5 DPA で発現がわずかに低下した。コントロールと比

べて塩ストレス条件では-1~15 DPA においてペクチン合成酵素遺伝子の発現が低下していた (**Figure 8**)。

エクспанシンの働きはいまだに明らかになっていない部分が多いが、セルロースとセルロースに関連したヘミセルロースとの間の水素結合を切断すると考えられている。これにより、セルロースマイクロフィブリルが動きやすくなり、細胞壁分解酵素のアクセシビリティを変化させることで、細胞壁伸長・分解に関与するとされている。果実発達に関わるとされるトマトエクспанシンの発現解析の先行研究から、初期果実形成に関わると考えられるエクспанシン遺伝子について発現解析を行った。EXP はコントロールと塩ストレスで違いは見られず有意差は見られなかった (**Figure 8**)。



**Figure 8.** Gene expression patterns of cellulose synthase, pectin synthase and expansin.  $\pm$ SD of three independent replicates.

#### 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サイズの測定、2) 塩ストレス条件下におけるトマト果実の細胞壁多糖類および細胞壁関連酵素の組織化学的解析、3) 塩ストレス条件下におけるトマト果実の細胞壁合成および関連酵素の遺伝子発言解析測定を行なった。現在までに、塩ストレス条件下で栽培されたトマトは、サイズが減少することが報告されているが、本研究でも、確かに果実サイズの減少が確認された。しかし、そのサイズの減少は、受粉後 3 および 5 日後という極めて早期に生じていることが明らかとなった。また、組織化学的解析により、クチクラ層の厚さは果実サイズの減少が確認された 5 日目では、対照区と塩水栽培処理とで差がなかったことから、果実サイズの減少の原因は、一般的に成熟果実で発達しているクチクラ層の発達が原因ではない可能性が高いことが考えられる。それでは何が原因であるかを明らかとするために、細胞や組織のサイズを規定する細胞壁およびその細胞壁の堅さを決定する細胞壁成分の分布とその合成関連酵素の動態に注目した。その結果、最も細胞壁の硬さに貢献するセルロースが、塩ストレス条件で早期に蓄積していた。また、セルロース合成酵素もそれを裏付ける結果となっていた。その他の成分に変化はあったが、機能の詳細は不明であった。また細胞壁を緩めるエクспанションの発現や蓄積は塩ストレスによる影響を受けないことがわかった。以上より、堅い細胞壁成分であるセルロースが早期

に蓄積するため、早期に果実の細胞壁の特性は硬くなる。一方で、細胞壁を緩めるエクспанションは変化しないため、細胞壁が軟化する方向にならず細胞が大きくなりにくい。これらの理由から、果実が膨らみにくく塩ストレス条件の早期果実のサイズが減少したと考えられる。

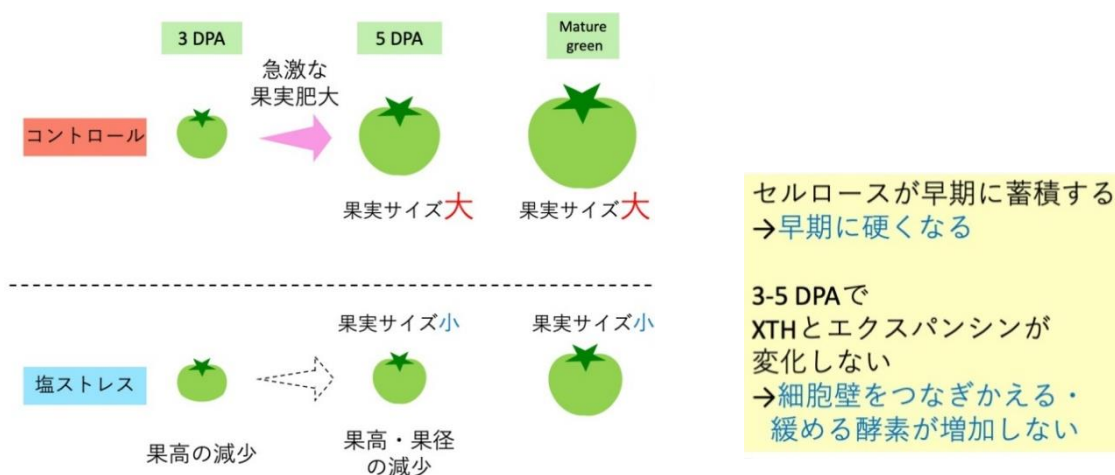
本研究により、塩水栽培条件下の果実サイズの減少には、クチクラの発達は貢献せず、堅い細胞壁成分であるセルロースが受粉後 3 日目という非常に早期に蓄積するため細胞壁の特性が堅くなり、果実が膨らみにくくなることが原因であることが示された。

#### 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、当初計画していたもう一つの主要な細胞壁を緩める酵素である XTH の発現解析と分布解析を期間内に終え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 XTH 動態について知見を得る予定である。

#### 6. 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。



## 7. 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
- Balíbreá 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.
- 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 Methyl-esterification 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 Glucuronarabinoxylan in Pericarp Cell Walls during Fruit Ripening in Tomato (*Solanum lycopersicum*) *PLoS One* 9: e89871
- Terao A, Satoh S, Iwai H (2013). Changes in the distribution of cell wall polysaccharides in early fruit pericarp and ovule, from fruit set to early fruit development, in tomato (*Solanum lycopersicum*) *J Plant Res* 126:719-728
- 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  $\gamma$ -amino butyric Acid in developing tomato (*Solanumlycopersicum* 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)



## Basic Formation for Regulation of Fruit Size 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 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. However, few studies have reported the effect of salt on this sizing. Biochemical analysis is quite difficult because the transition from ovary to fruit is performed in a very small tissue. In this study, to understand the mechanisms of fruit size reduction under the salinity conditions, we used the immunohistochemical method using by monoclonal antibodies against each cell wall component, and cell wall-related gene expression analysis. The reduction in fruit size occurred very early stage, 3 and 5 days after pollination. On the 5th day, when the cuticle layer thickness was confirmed to decrease in fruit size, there was no difference between the control and salinity treatment. Therefore, the cause of the fruit size reduction may not be due to the cuticle layer development. Immunohistochemical observations revealed that cellulose, which contributes most to the hardness of the cell wall, accumulated very early stages of fruit under salt stress conditions. In addition, gene expression levels of cellulose synthase were also high in the same stage. It was also found that the expression and accumulation of expansin, contributing to loosening the cell wall, was not affected by salinity conditions. Our results suggested that cuticle development did not contribute to the reduction of fruit size under salinity conditions, and cellulose, contributing to rigid cell wall property, accumulates very early stage of fruit development. Therefore, this study suggests that accumulation of cellulose strengthens cell wall properties and prevents increase of fruit size.