

塩ストレス条件下のトマト果実成熟過程におけるペクチン分解酵素の解析

高見 るり子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【背景及び目的】

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、塩ストレス条件下で栽培したトマトでは、グルコースやフルコース等の糖類やプロリン、 γ 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。しかしその一方で、塩ストレス条件下での栽培は、果実サイズの減少と硬度の上昇が見られ、また果実数が減少するデメリットも生じている。果実のサイズと硬度には、細胞壁の構造が大きく関わっていることが知られている。しかし、塩ストレス下における細胞壁構造に着目して研究された報告はほとんどない。

果実成熟過程における果実軟化は、果実細胞壁中に約50%と多く含まれることから、細胞壁成分の中でもペクチンの分解に注目した研究が行われてきた。ペクチンの分解はまずペクチンを脱メチル化するペクチンメチルエステラーゼ (PME) が働き、その次に脱メチル化ペクチンを分解し、ポリガラクトツロナーゼ (PG) が働くことで、ペクチンは低分子化が進行する。この PME は植物ホルモンであるエチレンによって誘導されることが知られている。現在までに私達の研究室では、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再構成が生じること (Hyodo H et al. 2013)、そして、果実サイズが決定する果実形成過程ではペクチンの蓄積と脱メチル化が重要であること

(Terao A et al. 2013) を報告してきた。そこで、これらを踏まえ本研究では、塩ストレス条件下におけるトマト果実の大きさと硬度の変化が、ペクチンのメチル化調節と分解とどのような関係にあるのかを明らかにすることを目的に研究を行った。そのことを通して、塩ストレス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。

【方法】

1. トマトの水耕栽培および塩ストレス処理

試料: トマト (品種: Micro Tom) を、25°C のインキュベーター内で Yin et al. 2010, JXB の方法を用いて水耕栽培を行った。水に濡らしたろ紙にトマト種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えを行った。塩ストレスは花が咲きそろった時点で行われ、NaCl 濃度の調節は電気伝導率測定器を用いて徐々に濃度を上昇させ最終的に 150 mM で栽培を行った。

2. サンプリング

1によって育てたトマト果実を成熟段階で6ステージ (Immature green, Mature green, Breaker, Turning, Red ripe, Over ripe)、果実の組織を5つ (外果皮、内果皮、隔壁、ローキュラー、種子) に分けて実験を行った。

3. 果実の生重量・果径・果高の測定

塩ストレス処理、コントロール条件下の Over ripe ステージの果実を無作為に複数個体について収穫し、その生重量、果径、そして果高の測定を行った。

4. PME 活性測定

酵素液として、89%メチル化ペクチンを基質とし10秒間あたりに低下する吸光度を PME 活性として測定した。

5. PG 活性測定

2のサンプルから抽出した細胞壁中のタンパク質を酵素液として、ペクチンを基質に用い1分間あたりに放出されるガラクトツロン酸量を PG 活性として測定を行った。

【結果と考察】

●果実の生重量・果径・果高の測定

コントロールと比較し、塩ストレス処理をした Over ripe ステージの果実では、生重量は約3.7%、果径は1.8%、果高は1.6%の減少が確認された。この特徴は、塩ストレス条件下で生育させた種々のトマト果実に共通に生じている表現型である。したがって本実験系のトマト果実が、確かに塩ストレスによる症状を示していることが示唆された。

●ペクチン分解酵素活性

コントロールと比較し、塩処理をした果実では、Immature green, Mature green といった果実の大きさを決定する成熟初期のステージにおいて、外果皮、内果皮、隔壁の PME 活性の上昇が見られた。活性のピークは Mature Green で観察され、特に外果皮においては、コントロールと比較し約15.5%上昇していた。ローキュラーと種子については、コントロールと塩ストレス処理のもので、ステージ全体を通して活性低く、大きな差は見られなかった。PG 活性については、現在進行中である。活性の上昇については、塩ストレスによるストレス応答でエチレンが多く発生し、このエチレンが PME を活性化させた可能性がある。

一方、特に果実の硬さの変化が生じ軟化が進行する Turning ステージ以降において、塩ストレス処理による組織におけるペクチン分解酵素活性の違いが見られた。外果皮においては、特に軟化が進行する Red ripe, Over ripe ステージにおける PME 活性が、塩ストレス処理により約50%減少していた。さらに、実際に低分子化を行う PG の活性も約40%程度減少していた。しかし、内果皮においては、PME、PG の両方のペクチン分解酵素活性が上昇する傾向が確認された。この結果から、果実成熟の後期では外果皮においては、ペクチンの分解および低分子化が抑制され、内果皮においては促進されていることが示唆された。外果皮は、フレームとして果実を支え、果実硬度に関連する組織であるため、塩ストレス条件下における果実硬度の上昇は、外果皮におけるペクチン分解の抑制が寄与している可能性が考えられる。一方、内果皮における軟化は、むしろ促進されている可能性が示された。