

## 環境ストレス条件下における早期トマト果実の形態と細胞壁構造の変化

宮越 茜里 (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)

## 【背景と目的】

トマトを代表とする被子植物の果実の発達は、受粉をきっかけに果実形成が開始し、その後果実成熟が起こる。受粉を介した着果から Mature Green ステージまでを果実形成過程、Mature Green 以降を果実成熟過程と呼ぶ。トマト果実は果実成熟過程に入ると成長が止まり、サイズが変化しないことが知られている。すなわち、果実の大きさや形態は Mature Green までに決定し、この間に細胞増殖や急激な細胞肥大の変化が起こっていると予測される。この果実発達過程に伴う急激な変化には、細胞壁の合成や分解が大きく関わっている。また果実は、塩ストレスや Ca 欠乏条件などの環境ストレス条件において、果実のサイズ減少や栄養障害である尻ぐされとなることが知られている。本発表会では、特に Ca 欠乏に着目して報告する。

Ca は脱メチル化したペクチンに結合して架橋を形成し、細胞壁構造の保持に働く。これらのことから、Ca は果実形態や細胞壁構造に大きく関与していると考えられる。しかし、受粉後 5 日間で果実は急激に肥大成長し、それに伴い果皮で、Ca が直接結合するペクチンのみならず、ヘミセルロースであるキシログルカンも増加することがわかっている (Terao *et al.* J Plant Res 2013)。

そこで本研究では、果皮・胚珠・胎座に着目し、組織染色・免疫組織化学染色によって各因子の局在性を調査し、Ca 欠乏条件下における果実形態・細胞壁多糖類およびキシログルカン修飾関連酵素の動態を調査した。これにより、Ca 欠乏条件下での果実形態の変化における細胞壁制御の機構を明らかにすることを目的としている。本研究により尻ぐされ果実発生の原因の一端が解明されることも期待している。

## 【材料および方法】

## 1. トマトの水耕栽培および Ca 欠乏処理

試料: トマト(品種: Micro Tom)を 24°C のインキュベーター内で水耕栽培を行った(Yin *et al.* Plant Cell Physiol. 2010)。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。Ca 欠乏処理はつぼみが揃った後行った。

## 2. 実体顕微鏡による形態観察

1 によって育てた Mature Green 果実、人工授粉を行った 3, 5 DPA(Days post anthesis: 開葯後日数)果実を用いて、実体顕微鏡による形態観察を行った。

## 3. 果実真円度の測定

2 で観察した果実に関して、数値で果実形態の複雑さを示す果実真円度を測定した。果実の形態を手動で縁取り、真円度 =  $4\pi \times \text{面積} \div (\text{周囲の長さ})^2$  の式を用い、Image J によって計測した。なお、測定方法は東京大学の桧垣先生に提供していただいた。

## 4. テクノビット切片の作成 1

によって育てた -1, 1, 3, 5 DPA 果実を固定(4%パラホルムアルデヒド + Tween20 in 50 mM リン酸バッファー)し、テクノビット樹脂に包埋し、切片を作成した。

## 5. 組織染色・免疫組織化学染色

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。免疫組織化学染色としてはキシログルカンを標識する LM15、キシログルカン転移酵素/加水分解酵素(XTH)を標識する XET5、エクспанシンを標識する EXPB2 を用いた。

## 【結果】

## ●形態観察および果実真円度の測定

Ca 欠乏果実では、3 DPA 果実では円形の形態が観察されたが、5 DPA 果実では凸凹で先端部がくっつきにくい様子が観察された。しかし、その後発達が進んだ Mature Green 段階では再び果実形態は円形となった。また、果実の急激な肥大は 3 から 5 DPA にかけて起こっていた。果実真円度に関しても、5 DPA 果実のみでコントロール果実と比べ有意に低い値が計測され、5 DPA の Ca 欠乏果実で複雑な形態を示していたと言える。

## ●組織染色・免疫組織化学染色

ペクチンに関しては、Ca 欠乏で量が少なかった。セルロースに関しては、コントロールでは 3 DPA でピークを迎えたが、Ca 欠乏では 1 DPA でピークを迎えた。キシログルカンに関しては、コントロールでは徐々に量が増えていたが、Ca 欠乏では増加と減少を繰り返しており、全体的な量も Ca 欠乏で少なかった。XTH に関しては、コントロールでは 3 から 5 DPA にかけて増加したが、Ca 欠乏ではこの期間で変化はなく量も少なかった。エクспанシンに関しては、コントロール・Ca 欠乏果実ともに 3 から 5 DPA にかけての増加が観察された。

## 【考察】

Ca 欠乏果実では、ペクチンが少ないため粘性が低下する・骨格成分であるセルロースが早めにたまるため早めに硬くなる・キシログルカンと XTH が少ないため、細胞壁をつなぎかえるための成分と酵素が少ない、というような理由から 5 DPA の Ca 欠乏果実では膨らみにくくなっていると考えられる。しかし、細胞壁を緩め、細胞を伸長させる役割をもつ酵素であるエクспанシンは存在している。これらのことから、Ca 欠乏でも 3 から 5 DPA にかけて果実は膨らもうとしているにも関わらず、その際に適切な細胞壁蓄積と修飾が行われていないために膨らみきれず、凸凹の果実が生じていると考えられる。また、Ca 欠乏条件では、5 DPA で凸凹に膨らみ、先端が癒合しにくい果実が生じていた。こういった初期果実サイズ決定時における凸凹の形成が、尻ぐされ果の発生に寄与している可能性があると考えられる。

また、Ca 欠乏果実ではペクチンのみならず、セルロースやヘミセルロースの動態にも影響が生じていた。Ca 欠乏による初期果実サイズ決定時における、果実形態のいびつな成長は、Ca が直接結合するペクチンのみならず、細胞壁ネットワーク全体が変化することによって生じていると考えられる。