

カルシウム欠乏条件下のトマト果実形態変化における細胞壁構築制御機構の解析

曾山 紀瑛 (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】

トマト果実の尻腐れ病は、カルシウム (Ca) 不足により生じた栄養障害であることが知られている。その障害の発生は成長が急速な早期果実発達過程に原因があると考えられている。果実発達過程で起きた果実サイズや形態を決定する細胞増殖と細胞肥大には、細胞壁の合成や分解が大きく関係する。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ため 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、極めて早期ステージでの果実発達への Ca 不足による細胞壁の影響に関する報告はほとんどない。それはこの現象が、非常に小さな組織で行われ多くのサンプルを得るのが困難なため、生化学的な解析が事実上不可能であったためである。そこで当研究室では、免疫組織化学的アプローチによる、各細胞壁成分と細胞壁肥大関連酵素の変化の観察が行われた。その結果、受粉後 5 日間で果実は急激に肥大成長し、いびつな早期果実を形成する。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示された。以上のことから、Ca が直接結合するペクチンだけではなく細胞壁成分全般にわたって構築制御が行われている可能性が考えられた。そこで本研究では、急速に肥大成長する受粉後 5 日間の早期果実発達に着目し、Ca 欠乏条件下における果実形態およびペクチンを含めた細胞壁多糖類およびその関連酵素遺伝子の発現を調査した。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。本研究により尻腐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

材料: 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. サンプルング

開花直前の花を選びピンセットで軽くつまんで人工授粉を行った。-1, 1, 3, 5 DPA (Days post anthesis) のコントロール果実とカルシウム欠乏果実をサンプルングして、各実験を行った。

3. 多糖類合成酵素遺伝子と関連酵素遺伝子の発現解析

コントロール、Ca 欠乏条件のそれぞれのトマトサンプルを用い、細胞壁多糖類合成酵素遺伝子の発現を調査した。用いたのは、ペクチン合成酵素: *GAUT-1-Like*, *GAUT-1-family*, セルロース合成酵素: *SICESA1*, *SICESA2*, *SICESA3*, キシログルカン合成酵素: *XXT-Like*, キシラン合成酵素: *IRX9-Like1*, *IRX9-Like2* について RT-PCR により発現解析を行った。

【結果・考察】

1. ペクチン合成酵素遺伝子の発現解析

本実験では 2 つのペクチン合成酵素遺伝子である *GAUT-1-Family* および *GAUT-1-Like* の発現解析を行った。RT-PCR の結果により、*GAUT-1-Family* において、コントロールでは -1 DPA から 5 DPA にかけて発現量が徐々に上昇しているのが見られた。Ca 欠乏果実において、1 DPA と 5 DPA で発現量の減少が見られた。*GAUT-1-Like* も同様にコントロールにおいて果実の発達に伴い発現量の上昇が見られた。一方、Ca 欠乏果実では 1 DPA と 5 DPA で発現量の減少が見られた。

2. セルロース合成酵素遺伝子の発現解析

一次細胞壁のセルロース合成に関わる *SICESA1*, *SICESA2*, *SICESA3* の発現解析を行った。コントロールにおいて 3 つのセルロース合成酵素遺伝子で果実の発達に伴う発現量の上昇が見られた。Ca 欠乏果実において、*SICESA1* の発現量は -1 DPA が最も高く、果実の発達に連れ徐々に発現量が減少した。*SICESA2*, *SICESA3* では同じ発現パターンが見られ、3 DPA における発現量の減少が見られた。また、*SICESA3* の発現量が最も高いことが見られた。

3. ヘミセルロース合成酵素遺伝子の発現解析

キシログルカンの合成に関わる *XXT-Like* においてコントロールでは -1 DPA から 5 DPA にかけて発現量の変化が見られなかった。Ca 欠乏果実ではペクチン合成酵素遺伝子と同様に 1 DPA と 5 DPA で発現量の減少が見られた。

本実験では二次細胞壁ヘミセルロースの主成分であるグルクロノアラビノキシラン (GAX) の合成に関わる *IRX9-Like1*, *IRX9-Like2* にも着目し、発現解析を行った。コントロールでは *IRX9-Like1* は果実の発達に伴い発現量の上昇が見られた。Ca 欠乏果実では 1 DPA のみ減少が見られた。*IRX9-Like2* ではコントロールは -1 DPA と 1 DPA で高い発現量を示し、3 DPA と 5 DPA で発現量が減少した。Ca 欠乏果実では 3 DPA と 5 DPA で最も高い発現量を示した。

以上の結果から 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を与えた。ペクチンが少ないため細胞壁の粘性が低く、また -1 DPA での *SICESA1* の高い発現によってセルロースが早期に蓄積されたため硬度が上昇している可能性が高いと考えられる。キシログルカン合成酵素遺伝子の発現量の減少から細胞壁を繋ぎかえるための成分が低下し、また二次細胞壁ヘミセルロースの合成酵素が早期に高い発現を示した。以上の結果は、Ca 欠乏果実の細胞壁は緩みが生じにくくなっており、果実が膨らみにくくなっていることが、いびつな早期果実の形成につながったのではないかと考えられる。