

## 塩ストレス下のトマト果実サイズ変化における細胞壁構築メカニズムの解析

板野 愛都 (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・目的

植物は動物と異なり移動できないため、様々な環境ストレスに適応しながら生活している。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。トマト果実では、塩ストレスによりグルコースやフルクトースなどの糖類や GABA 等のアミノ酸の蓄積が起こり商品価値の高い果実となる一方で、果実硬度の上昇、果実数および果実サイズの減少などのデメリットも報告されている。この果実サイズの変化には、細胞壁構造が大いに関わっている。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。受粉後数日後という極めて早期ステージでの果実発達への塩ストレス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ことが原因である。そこで当研究室では、各細胞壁成分と細胞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顕微鏡観察を行うことで、果実サイズの拡大に必須である細胞壁をやわらかくする酵素である XTH やエクспанシンが増加していないにもかかわらず、細胞壁の硬さの要であるセルロースが早期に蓄積し非常に早期に細胞壁が硬くなっていることが、果実サイズ減少のキーポイントである可能性を見出した。また、一般的に皮が硬くなると果実は大きくなりにくいと言われているが、クチクラ層にも大きな差は見られなかった。果実の外周りの皮が硬くなることが、果実のサイズ決定には重要ではないかと農業現場では考えられているが、実際には、果実内部が硬くなっていることが原因である可能性がある。そのため、果実内部の細胞壁代謝とリモデリングの調節が重要である可能性が高い。そこで本研究では、その細胞壁制御がどのようになっているのかについて明らかとするために、細胞壁合成・修飾酵素の変化について、遺伝子レベルでの解析を行うこととした。これらの実験を通して、塩ストレス条件での早期の果実サイズ減少を引き起こす機構について明らかとすることを目的としている。

## 方法

## 1. トマトの水耕栽培・塩ストレス処理

トマト(品種: Micro Tom)を Yin et al. 2010, JXB の方法を用いて、24°Cのインキュベーター内で水耕栽培を行った。水に濡らしたろ紙に滅菌した種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えた。塩ストレス処理は花が咲き始めた時点で開始し、徐々に濃度を上昇させることで馴化させ、最終的にNaCl濃度150 mMで栽培した。NaCl濃度の調節は電気伝導率測定器を用いた。

## 2. サンプルング

開花前日の子房および、開花前日に人工授粉してから 1, 3, 5, 15 DPA(Days Post Anthesis)の果実をサンプルングした。

## 3. 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 *XTH1* および、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。

## 結果・考察

塩ストレス条件では、-1 DPA の子房におけるセルロース合成酵素遺伝子の発現は、コントロール条件における細胞肥大が活発となる 5 DPA と同レベルの発現を示した。ペクチン合成酵素遺伝子は1~5 DPA において塩ストレス条件でわずかに発現の減少が見られた。キシログルカンの合成酵素遺伝子の発現は1~1 DPA では差は見られないものの、コントロールと比べて塩ストレス条件において開花後 3~5 日でわずかに減少していた。また、キシログルカン転移酵素加水分解酵素やエクспанシンの遺伝子発現に関しては *EXP2*, *EXP3* はコントロールと塩ストレスとの間で差が見られず、*XTH1*, *EXP4* では1 DPA において塩ストレスで有意に減少しており、1~5 DPA においても有意差はないものの塩ストレスで減少傾向が見られた。

これらの結果から、塩ストレス下のトマトでは、子房の段階から細胞壁合成に変化が起こっていることが示された。特にセルロース合成酵素の発現およびセルロースの蓄積は顕著に観察されており、塩ストレス果実の細胞壁がコントロールに比べて硬くなっていることが推測される。また、セルロースが増加した一方で、キシログルカンやペクチンは減少し、細胞壁を緩めることで細胞伸長に関わるキシログルカン転移酵素加水分解酵素やエクспанシンは変化しないまたは減少したために硬く膨らみにくくなり、早期において果実サイズが低下すると考えられる。

セルロース合成酵素は細胞膜上に存在するため、原形質分離を起こしやすい塩条件ではセルロースの供給は困難になると一般的に考えられているが、*CTL1* や *SOS5* など、細胞壁およびセルロース合成関連変異体では、塩ストレス感受性に変化が報告され、セルロースの塩ストレス耐性への関与が示唆されている。本研究においても、地上部の果実でセルロース合成が促進されたことから、早期果実形成においてもまた、塩ストレスに対する応答としてセルロースの蓄積が生じた可能性が考えられる。