

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14845

研究課題名(和文)水分動態を基軸としたリンゴみつ症果発生機構の解明

研究課題名(英文) Approach to the mechanism of water core development in apple fruit associated with mobility of water

研究代表者

鈴木 卓 (SUZUKI, TAKASHI)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：30196836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：著者らは、リンゴ果実のみつ組織は、収穫直前に果梗部から過剰に流入した樹液が果肉細胞間隙にオーバーフローしてできるとの仮説を立てた。プレッシャーチャンバーで赤色染色液を果梗部から果実内に浸透させ、人為のみつ症果発生を試みた結果、果芯部、維管束および果皮内側が赤く染色した。一方、みつ組織は染色されなかったため、みつ組織形成と樹液のオーバーフローは関係がないという結論に至った。果肉組織中のソルビトールおよびショ糖の濃度分布をMALDI-TOF imaging MSで可視化した。ソルビトールは果芯部の周辺、ショ糖は果托の皮層部側ほど濃度が高かった。みつ組織とソルビトール分布は、必ずしも一致しなかった。

研究成果の概要(英文)：The authors hypothesized that the water core tissue could be formed by overflowed sorbitol-rich sap into the intercellular space which was translocated via peduncle just before maturing of the fruits according to the previous observations using Cryo-SEM. Pseudo water core tissue was formed artificially in maturing apple fruits by injecting red-dye solution via peduncle using pressure-chamber apparatus. After a treatment with 200 kPa for 24 h the center, vascular bundles in receptacle and inside of epidermis on horizontal section of the fruits were red-stained, but the original water core tissue was not. Thus, water core development would not be related to overflow of sap. Distribution of sorbitol and sucrose in apple fruit flesh was visualized utilizing MALDI-TOF imaging MS. Sorbitol accumulated around center of the fruit, but sucrose content became gradually higher in cortex side. Sorbitol distribution in a water core fruit did not entirely coincide with the water core tissue regions.

研究分野：園芸学

キーワード：Malus domestica 果実 みつ症 プレッシャーチャンバー 可溶性糖 含水率 MALDI-TOF imaging MS

1. 研究開始当初の背景

リンゴのみつ症果は、完熟の証あるいは高品質果実として消費者に好まれる反面、貯蔵性が悪く貯蔵果実に発生するゴム病(生理障害)との因果関係も指摘されている。従って、リンゴのみつ症果発生機構を解明することは、高品質果実生産および貯蔵果実の生理障害発生回避の両面からリンゴ産業にとって重要である。

みつ症果発生は、従来果肉組織のソルビトール代謝と関連があるといわれ、「みつ組織」にソルビトールが集積すると指摘されてきたが、両者の因果関係およびみつ症果発生機構の詳細は不明である。これまでに筆者らはみつ症果を発生することが多い「こうとく」および「レッドゴールド(RG)」並びに発生しない「陸奥」果実についてCryo-SEMによる観察を行い、「みつ組織」は細胞間隙が水溶液で満たされていることを明らかにした。この「みつ組織」は、収穫直前の果実内で発達し貯蔵期間中に消失することから、みつ症果発生は転流糖の主体であるソルビトールを多く含む樹液の流動と関連のあることが予想された。

2. 研究の目的

みつ症果発生には顕著な品種間差が認められている。そこで筆者らは、(1)果梗部を通した樹液流動の難易(篩部液が果実に流入する際の果梗部通導抵抗)または(2)果肉細胞間隙にオーバーフローした篩部液の果肉細胞内への取り込み能力に品種間差があり、この何れかがみつ症果発生の主要因であるという仮説を立てた。これらの仮説を検証するため、(1)プレッシャーチャンバーを用いて樹液に見立てた染色液を果梗部から果実内に浸透させ人為的にみつ症果発生の再現を試みるとともに、(2)みつ症果発生と関連して果実比重の経時変化を調査し果実への樹液流入量の変化を追跡しようと考えた。また、みつ症果発生との関連が指摘されているソルビトールの果実内部における分布をMALDI-TOF imaging MSを用いて視覚的に捉え、「みつ組織」の分布との関連を明らかにしようと考えた。本研究では、従来のみつ症果発生に対する考え方から一歩前進し、特に果実の水分動態を基軸としてリンゴのみつ症果発生メカニズム解明を目指し、高品質リンゴ果実生産および果実貯蔵技術へ応用する基盤の構築を目的とした。

3. 研究の方法

プレッシャーチャンバーを用いた人工的みつ症果発生の試み

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場余市果樹園で栽植しているリンゴ(*Malus domestica* Borkh.)「こうとく」(みつ症発生品種)および「王林」(みつ症非発生品種)の2品種を用い、2016および2017年に実験を行った。実験樹

の栽培管理は果樹園で通常行っている方法に準じた。果実は、収穫直前(「王林」が10月初旬「こうとく」が10月中旬)に採取し、乾燥を防ぐため果梗部を直ちにパラフィルムで被覆した後、実験に用いるまで4の冷蔵庫内で保管した。また、果実に流入させる染色液として切り花着色剤ファンタジー(パレス化学K.K.)のルビーを用いた。これは、細胞染色剤数種を試した結果最も染色性に優れていたためである。次に、加圧装置としてエアコンプレッサー(藤原産業)およびプレッシャーチャンバー(PMS Instrument Company)を用いた。これらを直列に繋ぎチャンバー内および装置と果柄を連結するシリコンチューブ内に染色液を充填した(図1)。また、この際果梗とシリコンチューブとの連結部の密閉性を高めるためProvil Novo Whash(Heraeus)を充填するとともに、テープを巻きつけて補強した。加圧条件は、予備実験に基づき200kPaで24時間とし、果実は維管束の通導性を上げるため下部を切断して供試した。処理後、果実の赤道面を切り出して観察した。これらの方法により、果実内部で篩部液のオーバーフローを再現するとともに、品種間差の有無を調査し自然に発生するみつ症果との類似性について考察した。

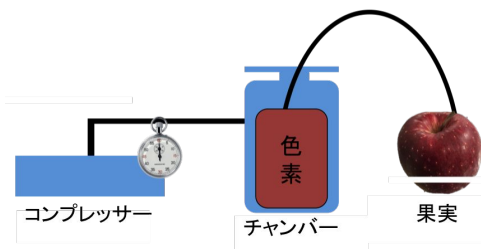


図1. プレッシャーチャンバーを用いた人工的みつ症果発生実験の概略。

みつ症果発生と関連した果実比重および含水率の経時変化

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター研究農場(札幌市)に栽植してあるリンゴ「ふじ」および「王林」から、2017年10月6日から11月1日にかけて1週間ごとに、各品種6果ずつ採取し、実験に供した。果実重量を自動上皿天秤で測定後、果実を水で満たした容器内に沈め、溢れ出た水の体積を測定する方法で果実体積を測定した。この場合、体積は1果実につき3回測定し、その平均値を測定結果とした。果実重を体積で除した値をリンゴ果実の密度とした。次に、上記6果のうち3果を赤道面で、残る3果を果軸に沿った縦断面で割断し「みつ組織」発生の有無を確認した。この場合、少しでも「みつ組織」が見られるものをみつ症果、そうでないものを非みつ症果と判定した。含水率は、リンゴ果実を赤道面上で厚さ約1センチに切り出し果芯部および果皮部の2か所から、径8mmのコルクボーラーで打ち抜いた果肉切片

(3片,約1.0g)を70の通風乾燥オープン内で3日間乾燥し,その後の乾燥重量を測定し,生重との差に基づき算出した.

MALDI-TOF imaging MSによるソルビトールおよびシヨ糖の果肉組織内局在性評価

1)MALDI-TOF imaging MSを用いた可溶性炭水化物の果肉組織内分布の可視化

通常収穫した'ふじ'果実を材料とし,生の果肉組織から維管束を含む横断組織片(縦2cm×横2cm×厚200μm)を滑走式マイクロトームで切り出し(図2),専用スライドグラスに伸展後,直ちに凍結乾燥した.次に,ImagePrep(Bruker Daltonics)を用いて,マトリックス溶液(2,5-dihydroxybenzoic acid 30g/1L MtOH)を試料面に散布し,MALDI-TOF imaging MS(ultrafleXtreme, Bruker Daltonics)を用いて分析した.試料面のレーザー照射間隔は500μmとした.また,組織片直下の果肉組織(厚さ約5mm)を16分割(5mm立方)し,凍結乾燥・粉末化後,

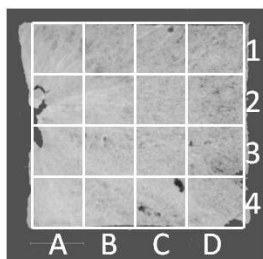


図2.リンゴ果実(果芯周辺)の横断切片.マイクロトームで切削後,スライドグラスに伸展し,凍結乾燥した.アルファベットおよび数字の16分割で表示.左側中央が果芯部.

糖質の分析を行った.抽出は,粉末50mgに80%エタノール0.8mLおよび20mMラクトース(内部標準)0.4mLを加え,70°Cの温水中で30分間行った.分析は,HPLCを用いて行い,フルクトース(Fru),グルコース(Glc),ソルビトール(Sor)およびスクロース(Suc)を分別定量した.

2)MALDI-TOF imaging MSを用いたみつ症果実内のソルビトール分布の可視化

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター余市果樹園に栽植されているリンゴのうち,みつ症果発生品種として'こうとく'および'レッドゴールド',並びにみつ症果を発生しない品種として'王林'を選び,2016年10月7日~11月4日にかけて1週間ごとに果実を採種した.なお,2016年の果実収穫日は,'レッドゴールド'および'王林'が10月21日,'こうとく'が11月4日である.果実は,採取後直ちに-30°Cで冷凍保存し,実験材料とした.冷凍果実の縦断組織切片(厚さ約70μm)を-35°Cに温度設定した凍結マイクロトームを用いて切り出し,専用スライドグラスに伸展後直ちに凍結乾燥し,エアブラシを用いて試料面にマトリックス溶液(2,5-dihydroxybenzoic

acid 50gを70%メタノール1Lに溶解)を散布したものを分析試料とした.分析は,前述と同じMALDI-TOF imaging MS装置を用いて行い,試料面へのレーザー照射間隔は400μmとした.得られたマススペクトラムのm/zをもとに,イオン強度の相対値からイメージング解析を行い,果実切断面におけるソルビトールおよびシヨ糖の濃度分布を画像化した.

4.研究成果

'こうとく'および'王林'の両果実の維管束周辺において,赤色素による染色を観察した(図3).これは本実験系において果柄の維管束を通じて染色液が果実に流入したことを示している.また赤道面を切り出した結果,'こうとく'および'王林'の両果実において果芯部,花弁および萼片維管束ならびに果皮周辺部が濃く染色され,同様に染色されることが確認された.従って,みつ症発生の難易と関係なく色素が維管束を通して流入するものと考えられる.この場合,みつ症を発生しやすい'こうとく'が,'王林'と比べ果肉の染色程度が顕著だったことから,果梗および維管束の通導性に違いがある可能性も否定できない.また,'こうとく'果実では果芯部にみつ症の発生が認められたにもかかわらず,その部位が色素で染色されなかった(図3).この事実は,収穫直前の果実に樹液が急速に流入することで,リンゴみつ症果が発生するという考えを否定している.

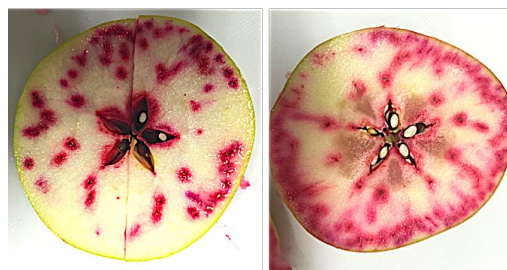


図3.リンゴ果実内部(横断面)の染色状況.(左:'王林',右:'こうとく')

'ふじ'果実では,10月20日からみつ症果の発生を確認した.しかし,果実密度にはみつ症果発生と連動する変化(統計的有意差は確認できなかった(図4).これは,'ふじ'の果実成熟期における樹液の流入量に,大きな偏りがなかったことを示している.従って,'ふじ'のみつ症果発生と樹液流入量の変化との関連は薄いものと考えられる.この点は,上記の実験結果を裏付けている.

一方,10月6日に採取した'王林'果実の果実密度は高く6果中1果に早期みつ症が確認された.みつ症発生には幾つかのパターンが確認されているので,その一部が樹液流入

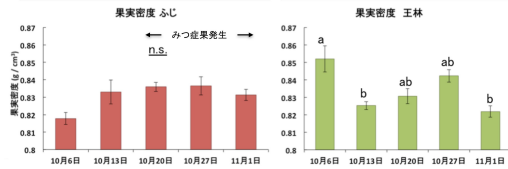


図4. 果実の成熟に伴う果実密度の推移．
 平均値 ± SE (n = 6). 同一英文字間に有意差
 無 (Tukey の多重比較検定, P < 0.05).

と関連していることも否定できない。

次に、含水率の推移をみると、'ふじ' において果芯部の含水率が 86%前後、果皮部の含水率が 84%前後と、果実採取時期を問わず果芯部が果皮部に比べて高い値を示し、両者に統計的有意差が認められた (図 5)。なお、'王林' の 10 月 6 日の果実で含水率が果芯部および果皮部ともに高かった理由は、前述のとおりである。

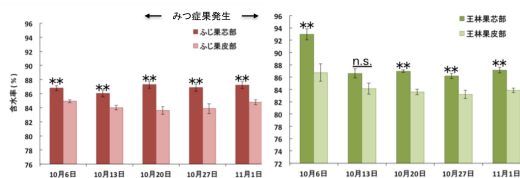


図5. 果実の成熟に伴う果実含水率の推移．
 平均値 ± SE (n = 6). P < 0.01 (t 検定).

-1)

MALDI-TOF MS により、[Fru & Glc + K]⁺ (219 m/z)、[Sor + K]⁺ (221 m/z) および [Suc + K]⁺ (381 m/z) の分子イオンピークが検出された。これらのデータに基づきイメージング解析したところ、各糖質は組織切片上で各々異なる濃度分布を示した。すなわち、単糖 (Fru & Glc) は切片全体に分布し、偏在は認められなかった。一方、Sor は果実中心部で濃度が高く、逆に Suc は果托の皮層部側ほど濃度が高くなる傾向を示した (図 6)。HPLC 分析に基づく Sor および Suc の濃度分布も、イメージング解析のそれと良く一致した (図 7)。

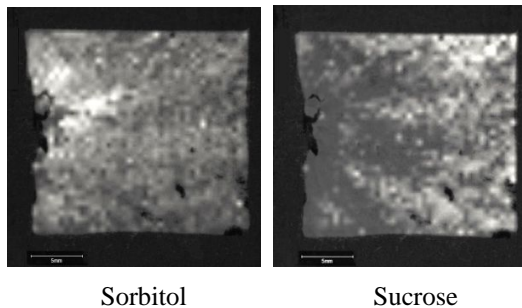


図6. MALDI-TOF imaging MS で可視化したソ
 ルビトールおよびショ糖のリンゴ果肉組織
 内濃度分布の差異。両図とも、白色が濃い部
 位ほど高濃度である。

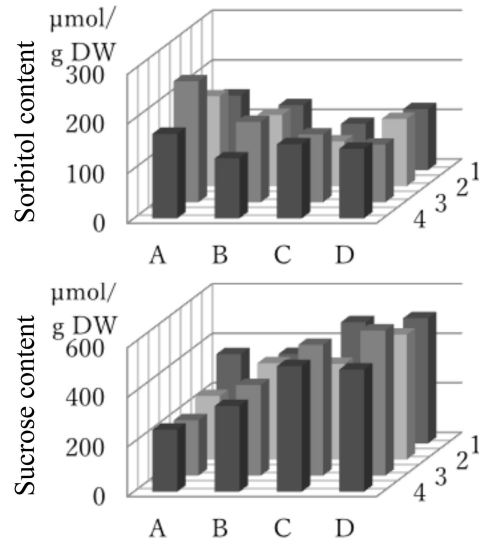


図7. HPLC で定量分析したリンゴ果肉組織内
 のソルビトールおよびショ糖含量の差異。アル
 ファベットおよび数字は、図2に対応して
 いる。

以上の結果は、MALDI-TOF imaging MS で、
 リンゴ果実内部の糖質分布 (Sor および Suc)
 の可視化が可能であることを示している。

-2)

-1) の結果に基づき [Sor + K]⁺ および [Suc + K]⁺ 分子イオンピークについて、各々の強度の違いをもとに果肉組織内分布を可視化した。その結果、品種および採種時期を問わず、Sor は果実の中心部に多く分布し、逆に Suc は皮層部側に多く分布することが確認された。また、Fru & Glc は、採種時期が早い果実で果肉組織全体の濃度分布に差は認められなかったのに対し、収穫日に近づく
 と皮層部側で濃度が低下した。これは成熟に伴う Suc 合成によって、基質である Fru および Glc が減少したことによるものと考えられる。みつ症果におけるみつ組織の分布と Sor の濃度分布は必ずしも一致しなかった (図 8)。

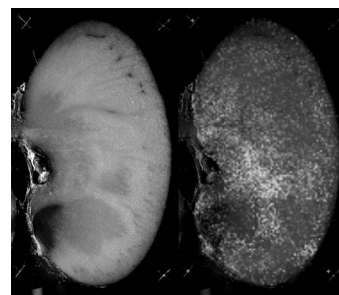


図8. リンゴみつ症果における果肉組織縦断切片
 (左図) および MALDI-TOF imaging MS に基づく
 ソルビトール濃度分布のイメージ (右図)。右図
 で、白色が濃い部位ほどソルビトール濃度が
 高いことを示す。品種は、10 月 14 日収穫の
 'レッドゴールド'。

さらに、みつ症果では皮層部の一部に Sor が集積していたのに対し、みつ症の発生しない‘王林’の皮層部に Sor の局在は確認されなかった。

今後は、リンゴ果実の成熟およびみつ症果発生に伴う Sor および Suc の果実内動態を、MALDI-TOF imaging MS を用いて経時的に追跡する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1) 平間琢也・堀川謙太郎・志村華子・実山豊・鈴木卓(2018)プレッシャーチャンバーを用いた人工的リンゴみつ症果発生を試み、園芸学研究, 17(別1):53。(査読無)

2) 堀川謙太郎・平間琢也・志村華子・実山豊・鈴木卓(2017)リンゴ果肉組織における成熟およびみつ症発生に伴う糖質分布の変化、園芸学研究, 16(別2):157。(査読無)

3) 堀川謙太郎・平間琢也・志村華子・実山豊・鈴木卓(2017)質量分析イメージング技術を用いたリンゴ果肉組織の糖質分布解析、北海道園芸研究談話会報, 50:10-11。(査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 卓 (SUZUKI, Takashi)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 30196836

(2)研究分担者

実山 豊 (JITSUYAMA, Yutaka)
北海道大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号: 90322841

志村 華子 (SHIMURA, Hanako)
北海道大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号: 20507230