

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：84410

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14761

研究課題名（和文）ナス科植物の「がく」に存在する新規栄養分配機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of a novel nutrient distribution mechanism in the "calyx" of Solanaceae plants.

研究代表者

荒川 竜太（Arakawa, Ryota）

地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所（環境研究部、食と農の研究部及び水産研究部）・その他部
局等・主任研究員

研究者番号：40761648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ナス科植物のがくにおけるカルシウムもしくはホウ素（またはその両方）の局在が、尻腐れ発生に密接に関連しているとの仮説を立て研究を実施したところ、がくへの元素の局在や輸送体の発現変動は認められなかった。その一方で、果皮において細胞壁の硬化/軟化に関わる酵素をコードする遺伝子発現と尻腐れ発症との関係性が示唆された。また、パプリカの尻腐れは果皮と胎座（隔壁）が接合する箇所から発症していることを見出し、隔壁にホウ素が分配されないことで、隣接した果皮の細胞壁の形成がうまくいかず、尻腐れが発生している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナス科植物における果皮の元素濃度と尻腐れ発症との関係性を調査した研究例はこれまで数多く存在するが、果実を構成する各部位の元素分配と尻腐れ発症との関係について調査した研究例はほとんどなく、さらに、胎座（隔壁）に分配されるホウ素と尻腐れ発症との関係性を見出した報告例もないため、方法論および得られた結果ともに学術的意義は高い。今後、得られた知見をもとに、尻腐れ発症を劇的に抑える技術の開発に繋がれば、ナス科作物の生産性向上に大きく寄与できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted based on the hypothesis that the localization of calcium and/or boron in the calyx of Solanaceae plants is closely related to the development of blossom-end rot, but no changes in the localization of the elements in the calyx or in the expression of transporters were observed. On the other hand, the expression of genes encoding enzymes involved in cell wall hardening/softening in the pericarp and their relationship to the incidence of blossom-end rot were suggested. The results also indicated that the incidence of blossom-end rot in paprika occurs at the junction of the pericarp and the septum, suggesting that the lack of boron distribution in the septum causes cell wall formation in the adjacent pericarp, resulting in the incidence of blossom-end rot.

研究分野：植物栄養学

キーワード：ホウ素 パプリカ 胎座 隔壁 細胞壁 マグネシウム カルシウム

1. 研究開始当初の背景

ナス科植物において、果皮に発生する生理障害は、品質低下の大きな要因となっている。代表的な生理障害の尻腐れは、高温もしくは N 過剰条件下において、果実への水および Ca 供給が不足することにより発症するという古い報告がある (Lyon et al., 1942; O' sullivan, 1979) もの、未だその詳細なメカニズムに関しては不明点が多い。このメカニズムを解明するにあたり、発症原因とされる Ca は細胞壁ペクチンを構成する重要な元素であるが、微量必須元素である B は Ca と同様に、細胞壁中のペクチン質の架橋構造を形成する元素であり、果皮における生理障害を論じる上で、Ca だけでなく B にも着目することは重要である。実際に、申請者はこれまでに、果実内の Ca 濃度だけでなく B 濃度と尻腐れとの間にも有意な負の相関があることを明らかにした。ここで、Ca と B の生体内動態として、主に導管を介して各器官に輸送されることが知られている。一般的に、この導管流は蒸散の影響が大きいとされており、葉での蒸散が活発な場合、葉への移動が増えるため果実方向への水の流れが抑制され、Ca および B の果実への供給も減少することから尻腐れが発生すると考えられる。しかしながら、オーキシン阻害剤をトマトに施用したところ、果実への水、K および Mg の流入量は変化しないものの、Ca の流入量のみが減少することが確認されている (Banuelos et al., 1987)。また、高 N かつ Ca 十分条件下で栽培したトマトにおいて、Ca が果実内部まで分配されずにくにたまる傾向が認められ、その植物体における果実の尻腐れ発生率が顕著に高いという報告があり (Ehart and Ho, 1986)、蒸散流だけでは説明できない現象も多い。

トマトやトウガラシ(ピーマン、パプリカ)の果実では、果柄から伸びた導管ががくで分岐し、その後果実基部で果皮と胎座(種子)に分岐する経路をとっている。ナス科植物(主にトマト)の果皮における Ca の局在に関する研究例は多数あるが、果実上部、特にがくにおける詳細な栄養分配機構は明らかになっておらず、果柄から流入した栄養ががくを介してどのように分配されていくかを調査した研究例はほとんどない。近年、イネの節に関する研究で、P および Si の分配を制御する輸送体が発見され、穂の発達に重要な関りをもつことが示唆されている (Yamaji et al., 2015; Yamaji et al., 2017)。また、双子葉類植物においても、P を導管から篩管へ移し替え、発達中の器官へ優先的に分配する輸送体が発見されている (Ding et al., 2019)。B に関して、シロイヌナズナにおいて、地上部の節の組織で強く発現しているホウ酸チャネルにより、B の一部が導管から篩管へ移動し、若い組織へ分配されているとの報告がある (Zimmermann et al., 2004)。仮に、ナス科植物でもがく内部の導管周辺において Ca もしくは B をがく組織へ積極的に取り込む輸送体が存在し、果実頂端部方向への Ca もしくは B 流入を抑制しているのであれば、その輸送体の発現の大小が尻腐れ発生と密接に関わっている可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、「①がくにおいて Ca もしくは B (またはその両方) を、がく組織内へ積極的に取り込む輸送体が存在し、果実方向への Ca もしくは B 流入を調整している。②高温や N 過剰ストレスによりその輸送体が過剰に発現し、尻腐れ発生に密接に関与している。」の2つの仮説を立て、Ca および B における、果柄からがく、果実頂端部方向への分配機構を明らかにすることで、尻腐れメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

尻腐れが実験的に発生させ易く、果実の(特に RNA 抽出での)ハンドリング性がよくロスが少ない、また、同じ *Capsicum annuum* (トウガラシ) の全ゲノムデータ (Kim et al., 2014) が活用できることから、パプリカ品種「アルテガ」を栽培作物として用いた。

i) 果実部位別の元素動態と尻腐れ果発症との関係

2021 年の 5-8 月に、大阪府立環境農林水産総合研究所(以下、環農水研)内ガラス温室で、Glodan 社製ロックウールを用いて養液栽培を行った。養液は大塚 A 処方 (N: 18.6 mM, P: 1.7 mM, K: 8.6 mM, Ca: 4.1 mM, Mg: 1.5 mM、鉄 (Fe): 48.4 μM、マンガン (Mn): 21.1 μM、亜鉛 (Zn): 1.4 μM、銅 (Cu): 0.47 μM, B: 21.6 μM およびモリブデン (Mo): 0.31 μM) を使用した。36 株のパプリカを栽培し、播種後 20 週目までに収穫された果実に対して、尻腐れ発生率を算出した。さらに、健全果を 12 個ランダムに選択(同一株から 2 個以上の果実は選択しない)し、果柄、がく、胎座、種子および果皮の 5 組織に分け、さらに果皮については果実基部から頂端部に向かって均等に 8 分割して(図 1)硝酸で分解した後に、ICP-MS により元素の網羅的分析を行った。得られた元素の定量値について、各部位の元素濃度を算出した。統計処理は、R (バージョン 4.3.0) を用いて行った。

ii) Ca および B の分配に関わる遺伝子の探索および定量

2022 年の 4-7 月に 1 と同条件で栽培し、開花後 14 日目 (14 day after flowering: 14 DAF) および 21 日目 (21 DAF) にサンプリングした。サンプリング後、果柄、がく、胎座、上皮(図

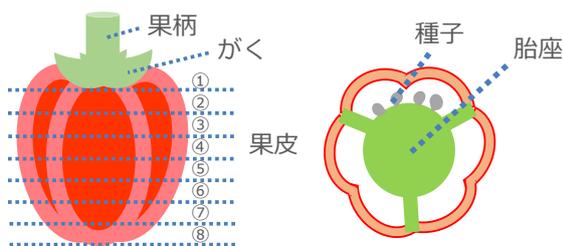


図 1 サンプリング概要

1の①-④)および下皮(図1の⑤-⑧)の5部位に切り分け、それぞれについてRNAを抽出した。抽出したRNAはIllumina社のHiSeqでシーケンスを行い、トウガラシ(*C. annuum* UCD10X)のリファレンスゲノムをもとにkallisto (Bray et al., 2016)を用いて発現定量を行った。発現変動遺伝子(differentially expressed genes: DEG)はRパッケージの sleuth を用いて、閾値 q value < 0.05 で検出した。各部位間および開花後日数間におけるDEGをもとに、共発現ネットワークをRパッケージのWGCNAを用いて構築し、複数のモジュールを検出した。さらに、各モジュール間におけるGene Ontology (GO) エンリッチメント解析で有意差 (p value < 0.05) が検出されたGOタームについて、RパッケージのREVIGOを用いてクラスター解析を行った。

4. 研究成果

i) 果実部位別の元素動態と尻腐れ果発症との関係

各処理区における部位別の6元素(B, Ca, Fe, K, MgおよびMn)の濃度を図2に示す。一元配置分散分析から、BおよびCaはがくで最も濃度が高く、Caは尻腐れが発生しやすい果実頂端部に向けて減少していく一方で、Bは果実中央部(果皮④)で最も減少し、頂端部に向けて増加していく傾向が認められた。胎座内の濃度は、Bではがくに次いで高く、Caでは果皮基部と同等レベルだった。Mg濃度はCaと逆の傾向が認められ、がくで最も低く、果皮では頂端部に向けて増加していく傾向が認められた。その他の元素(Fe, KおよびMn)の果皮中濃度はほぼ一定であった。次に、各元素濃度とその株の尻腐れ発生率で相関解析を行ったところ、胎座において、BおよびMgで有意な負の相関が認められた。がくにおいてはいずれの元素でも尻腐れ発生率との間に有意な相関は認められず、果皮では③のみでBとの間に有意な負の相関が認められた。

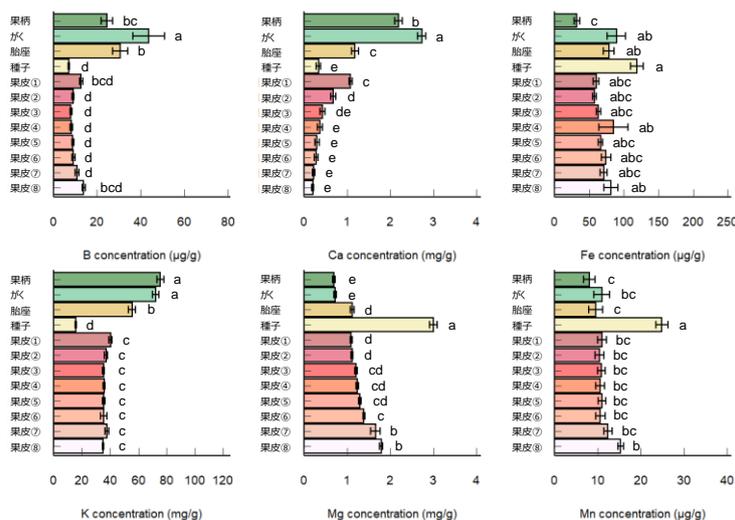


図2 パプリカ果実の各部位における元素濃度

エラーバーは標準誤差 ($n = 4$) を示し、異なる文字は Tukey 法による有意差 ($P < 0.05$) を示す。

ii) Ca および B の分配に関わる遺伝子の探索および定量

実験1と同様の栽培条件において、14DAFと21DAFの果実をサンプリングし、尻腐れが発症しやすい時期(開花後20日前後)を挟んで、どのように遺伝子発現が変動しているかについて調査を行った。各部位間および開花後日数間におけるDEGをもとに、共発現ネットワーク解析を行ったところ、8個のモジュールに分類された(図3)。各モジュールについてGOエンリッチメント解析を行ったところ、ほとんどのモジュールにおいて、尻腐れ発症に関係するようなGOタームは検出されず、がく、胎座および果皮において、BやMgの輸送に関わる遺伝子群も検出されなかった。その一方で、モジュール5に含まれる遺伝子群に、細胞壁の構成や生成に関わるGOタームが多数含まれていた。さらに、モジュール5を詳細に解析したところ、果皮において、Ca結合タンパク質をコードする遺伝子の発現量が14DAFに比べて21DAFで有意に低下していた(図4A)。また、ペクチンエステラーゼ(PE)をコードする遺伝子の発現量も、果柄、がくおよび果皮で14DAFに比べて21DAFで有意に減少していた(図4B)。一方で、ペクチン酸リアーゼ(PL)をコードする遺伝子が、果皮において21DAFで有意に増加していた(図4C)。

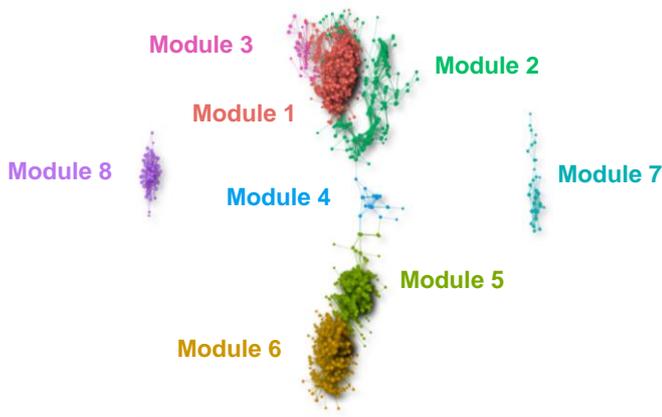


図3 各部位間および開花後日数間におけるDEGをもとにした共発現ネットワーク

本研究では、「がくにおいてCaもしくはB(またはその両方)を、がく組織内へ積極的に取り込む輸送体が存在し、尻腐れ発生に関与してい

る。」との仮説をもとに検証を行った。その結果、がく内における Ca および B（もしくは他の元素）に特異的に発現している輸送体は特定できず、さらにそれら元素分配と尻腐れ発症との関係は認められなかった。また、尻腐れ発症との関係が最も強く示唆されている Ca については、いずれの部位においても尻腐れ発症率との有意な相関が認められず、果皮における先行研究 (Arakawa et al., 2021) の結果とも一致した。一般的に、双子葉植物でペクチン内の Ca 含有率が高く、イネ科植物では低いと知られている。パプリカにおいては、トマトと比較してペクチン内の Ca 含有率が低く、B 含有率が多いため Ca の尻腐れ発症への寄与が低いのかかもしれない。その一方で、Ca 結合タンパク質をコードする遺伝子の発現量が、尻腐れが最も発症しやすい 21DAF で有意に低下していた。Ca 結合タンパク質の機能の一つとして、細胞質内の遊離 Ca²⁺を調節することが知られおり、トマトでは下皮内の遊離 Ca²⁺の量と尻腐れとの間に関連があることが示唆されている (Ho and White, 2005)。そのため、DAF14 および DAF21 の遊離 Ca²⁺を測定することで、パプリカにおける尻腐れ発症と遊離 Ca²⁺との関わりについて明らかにできるかもしれない。

果皮における B 濃度と尻腐れ発生率との関係性は判然としなかったが、胎座において B 濃度と尻腐れ発生率との間に有意な負の相関が認められ、同様の傾向が Mg でも認められた。Mg は果実肥大に関わる元素であり、欠乏状態では果実が硬化しやすくなる。果実肥大期における果皮の伸長が盛んな時期に、B 欠乏でペクチンを架橋できずに細胞壁の柔軟性が失われ、さらに Mg 欠乏で硬化してしまうことで物理的に組織が破壊され、その箇所から腐敗が生じて尻腐れが発症しているのかもしれない。また、本研究では、胎座と果皮を結合している隔壁について、胎座に含めて分析を行っていたが、尻腐れ発生箇所を詳細に観察すると、ほぼすべて尻腐れ果において、隔壁に接した果皮から発生していた。以上から、隔壁に B および Mg が分配されないことで、隣接した果皮の細胞壁の形成がうまくいかず、尻腐れが発生している可能性が示唆された。

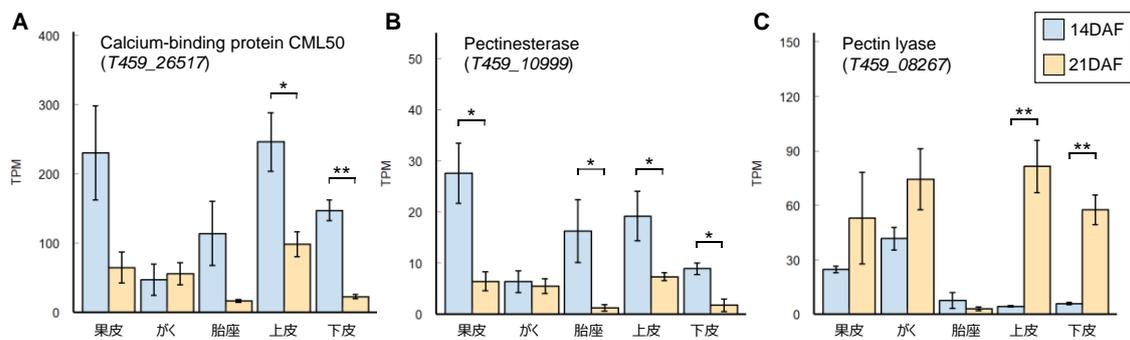


図4 パプリカの各部位および開花後日数の違いによるカルシウム結合タンパク質 (A)、ペクチンエステラーゼ (B) およびペクチン酸リアーゼ (C) をコードする遺伝子の発現パターン

カルシウム結合タンパク質およびペクチンエステラーゼはモジュール5に含まれる遺伝子。Y軸の「TPM」

(transcripts per million) は、各遺伝子のリード数を、総リード数および遺伝子長で補正した値。エラーバーは標準誤差 (n = 3) を示し、アスタリスクは t 検定での比較による有意差を示す。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryota Arakawa, Honami Akrich and Hayato Maruyama
2. 発表標題 Evaluation of gene expression changes related to blossom-end rot among fruit parts and days after flowering in Paprika (Capsicum annuum L.)
3. 学会等名 SOL2023 XVIII International Solanaceae Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒川竜太・鳥山星呂・アクリッシュ穂波・渡部敏裕・信濃卓郎・丸山隼人
2. 発表標題 パプリカ果実における部位別の元素動態と尻腐れ果発症との関係
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------