

令和元年5月31日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07589

研究課題名(和文) リンゴ果実中に糖度分布が生じる内的原因を探る

研究課題名(英文) Internal cause of occurrence of sugar distribution in apple fruit during maturation

研究代表者

小原 均 (OHARA, Hitoshi)

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・教授

研究者番号：40160931

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)：リンゴ果実では糖度は果梗部より果頂部で高い。リンゴ果実中にこのような糖度分布が生じる内的原因を成熟期の‘ふじ’果実を用いて探った結果、果梗部に比べて果頂部では構成糖の一つであるスクロース(Suc)を合成するSucリン酸合成酵素(SPS)の活性が常に高い傾向にあり、また、遺伝子発現量が有意に高くなった後に活性が有意に高くなるなどによりSuc蓄積量が高まることが主因であることが明らかとなった。一方、Su蓄積促進にはアブシシン酸(ABA)に関わる可能性が示唆されたが、外生ABA処理によるSuc蓄積促進効果は見られなかったことから、ABAがSuc蓄積促進に関わるかどうかは明らかとならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果実中の糖度分布を明らかにしてきたこれまでの多くの研究は、果実の甘味評価法の改善を目的とするものがほとんどであり、糖度分布が生じる内的原因を探るといった目的で行われた研究は極めてわずかであった。また、その原因を探る対象は糖代謝関連酵素活性に限定されており、その対象を糖代謝関連酵素遺伝子および糖輸送体遺伝子の発現ならびに糖代謝との関連が示唆される成熟関連植物ホルモンの内生濃度および外生処理効果などに拡張、多面から探ったことに本研究成果の学術的意義があり、また、生産現場で常に希求されている高糖度果実生産の技術開発を考える上で参考となる一つの生理学的な知見となる得ることに社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In a mature apple fruit, soluble solids and total sugar contents are higher in the calyx end than in the stem end. The internal cause of occurrence of sugar distribution in an apple fruit was investigated during maturation period using ‘Fuji’ apple. The calyx end always contained higher content of sucrose (Su) which is one of the constitutive sugars. The activity of sucrose-phosphate synthase (SPS) tended to be always higher in the calyx end. Moreover the gene expression level of SPS was significantly higher as well in the calyx end. The relationships between Su accumulation and other related enzyme activities and gene expression levels were not found. On the other hand, endogenous abscisic acid (ABA) concentration increased temporarily only in the calyx end. However, Su accumulation was not promoted both in the calyx and the stem end of the fruit applied with exogenous ABA. Therefore, it was not clear whether ABA is related to the promotion of Su accumulation.

研究分野：農学

キーワード：リンゴ果実 糖度分布 スクロース蓄積 糖代謝関連酵素 スクロースリン酸合成酵素 酵素活性 遺伝子発現 アブシシン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

果実の品質は、大きさ、色、形などの外観、肉質、味、香気などの食味およびビタミン、ミネラルなどの栄養上の複数の要素が組み合わさって構成されている。しかし、近年の消費者嗜好はより甘みの強い果実を好む傾向にあり、果実の甘味は果実品質を決定付ける非常に重要な要因となっている。

果実中では、糖含量と有機酸含量との関係が微妙に甘味に影響するものの、甘味は主に糖による。甘味物質として最も重要なものはショ糖(スクロース、Suc)とされるが、果実の甘味は、簡易的に果汁の糖度を測定することによって表されることが多い。糖度は果汁中の可溶性固形物濃度を示すものであるが、レモンやウメのように糖含量より有機酸含量が多い果実を除いて、可溶性固形物のほとんどが糖であることから糖度は糖濃度に近い値となる。

果実の糖度を測定する場合、果実の一部分から果汁を採取し、その測定値を果実全体の数値とする方法が一般的である。しかし、果実の部位により糖度が異なることがリンゴ(Harding, 1936; 榎村・工藤, 1989; Martin, 1954)をはじめとして多くの果樹で知られている。そのため、果実の甘味を簡易的に正確かつ効率的に評価するにあたり、果実の糖度は果実のどの部位を測定すれば、果実全体の平均的な値になるかということも検討されてきた(稗圃ら, 1998; 梶浦ら, 1979; 白石ら, 1970)。しかし、果実の部位により糖度が異なることの内的原因については、糖代謝関連酵素活性が果頂部と果底部で異なるというオレンジでの報告(Songら, 1998)を除いてほとんど明らかにされていない。

果実に含まれる糖の種類およびその量は内的・外的要因によって異なるが、Suc、果糖(フルクトース、Fru)、ブドウ糖(グルコース、Glu)を含むものが多い。その組成比は果実の種類により一定ではなく、したがって同じ種類の果実を感じる甘味も多様である。

リンゴはバラ科の果樹であり、果実に含まれる糖の組成比は品種により異なるが、いずれの品種においても最も高いのはFruで、次いでSucかGluであり、ソルビトール(Sol)はわずかである。一般にバラ科の果樹ではSolが転流糖とされているが、リンゴの葉では光合成産物全体の60~70%はSolが、残りの30~40%はSucが合成され、両者が転流糖としてローディング〔篩管(篩要素)内に取り込む過程〕される(Liら, 2012)。ローディングされたSolおよびSucは果実へと運ばれ、両者ともにアポプラスティックアンローディング(細胞壁および細胞間隙の総体に取り出される過程)され(Zhangら, 2004)。Solはそのまま果肉柔細胞の細胞質基質へSolトランスポーター(輸送を媒介する内在性膜タンパク質)により取り込まれた後にSol脱水素酵素によりFruに変換され(Parkら, 2002)。一方、Sucはそのまま細胞質基質へSucトランスポーター(SUT)により取り込まれる場合とアポプラストに存在する細胞壁インペルターゼ〔CWINV(酸性インペルターゼ; AINV)]によりFruとGlu(いずれもヘキソース)に分解された後にそれぞれヘキソーストランスポーターにより取り込まれる2経路が存在するとされている(Fanら, 2009; Zhangら, 2004)。細胞質基質にそのまま取り込まれたSucは、細胞質インペルターゼ(中性インペルターゼ; NINV)によりFruとGluに分解されるかSuc合成酵素(SUSY)によりFruとUDP-Glu(UDPG)に分解される(Rolland, 2006)。細胞質基質内のGluおよびFruの一部は呼吸やデンプン合成をはじめとする果実の成長や品質形成に関わる代謝に利用される一方で、Fruの一部はFru 6-リン酸になった後、その一部はSucリン酸合成酵素(SPS)によりUDPGに結合され、さらに脱リン酸化されてSucが再合成される。しかし、代謝されないほとんどのFru、GluおよびSucは液胞膜トランスポーターにより液胞に取り込まれて蓄積され、液胞内では、Sucは液胞インペルターゼ〔vAINV(酸性インペルターゼ; AINV)]によりFruとGluに分解されて蓄積される。このように、リンゴ果実における糖の代謝と蓄積は独特であり、ほとんどすべてのSorはFruに、またSucの半分はFruに変換するため、FruはGluよりも非常に高いレベルで蓄積される(Liら, 2012)。

果実の大きさには果肉の細胞数と細胞の大きさの2つの要因が関与している。細胞の大きさを決定するのは大きさを支配する遺伝子があると考えられている(Tanksley, 2004)が、細胞肥大の推進力は主に液胞内に糖を蓄積することによる膨圧であるものの、リンゴでは、一般的には果肉細胞の大きさと糖組成が関連しているとは考えられていない。しかし、細胞の糖含量は細胞の大きさによって異なるのではないかと考えられるが明らかでない。

果実の成熟には植物ホルモンのエチレンおよびアブシシン酸(ABA)が関連深い。リンゴ果実はクライマクテリック型であり、クライマクテリック型果実ではエチレンが成熟への強い誘導物質となることが知られている。一方、リンゴ果実の内生ABA濃度は成熟期を通して上昇を続ける(Kondoら, 1991; Vendrell・Buesa, 1989)ことから、エチレン発生および代謝に及ぼすABAの影響が検討され(弦間ら, 1991; 平, 1990; Zhi・Thimann, 1989)それら結果からエチレン発生に及ぼす影響は発育ステージによって異なり、エチレンとともに果実成熟に相乗的に作用する面とエチレン代謝に抑制的に作用する面の両面を持っていると示唆されている(近藤, 1999)。

著者は果実中に糖度分布がなぜ生じているのかについて強い疑問を抱き、上述の学術的背景をもとに本研究を行うこととし、先行実験において、リンゴ果実中の糖度分布は成熟期のSuc蓄積量の差異が関係していることを明らかにした(小原, 2015)。

2. 研究の目的

1. を踏まえて本研究では、リンゴ果実中に糖度分布が生じる内的原因を解明することを目

的に、果実成熟期における果実の異なる部位における構成糖含量および全糖含量の推移と、(1) Suc 蓄積関連酵素の活性および遺伝子発現ならびに Suc トランスポーターの遺伝子発現との関係、(2) 果肉細胞の数および大きさならびに果肉組織内エチレンおよび内生 ABA 濃度の推移との関係、(3) ABA の外生処理効果との関係から検討した。

3. 研究の方法

実験材料には、本学環境健康フィールド科学センター森林環境園芸農場（群馬県沼田市、標高約 750 m）栽植の‘ふじ’（普通ふじ）成木（マルバカイドウ台）を供試した。一般に、リンゴ果実では無袋果であるか有袋果であるかのように太陽光の受光条件によって糖度に差異が生じることが知られているが、先行実験において、太陽光の受光条件は糖度分布には影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、無袋果では陽光面と陰光面とで糖度分布量に差異を生じることからどちらかの面を特定して実験を行わなければならない。そこで、本研究では太陽光の直射による影響を軽減し、陽光面と陰光面を特定する必要がないと判断した有袋果の果頂部と果梗部を比較対象として、実験を行った。また、供試樹の開花期は 4 月下旬から 5 月上旬で自然受粉とし、6 月から 7 月に粗摘果および仕上げ摘果を行い、その後直ちに‘ふじ’用果実袋（青二重袋）を被袋した。果実の採取は、成熟開始期の 9 月から収穫期の 11 月まで約 10 日間隔で行った。果実採取後は、果肉細胞の数および大きさならびに果肉組織内エチレン濃度測定用の果実以外は、-30 または -80 で凍結保存し、適宜取り出して実験に供した。

(1) 果実の果頂部および果梗部における構成糖および全糖含量の推移：構成糖および全糖含量の推移を確認するため、採取した果実の果頂部および果梗部の果肉を切り出し、糖を抽出後、高速液体クロマトグラフを用いて構成糖含量を測定した。

(2) 果実の果頂部および果梗部における Suc 蓄積関連酵素活性の推移：糖代謝関連酵素のうち、Suc 蓄積に関わる SPS、SUSY、AINV および NINV の活性の推移を明らかにするため、Kubo ら (2001) および Li ら (2012) などによる方法を参考にそれぞれの酵素を抽出後、分光光度計を用いて活性を測定した。

(3) 果実の果頂部および果梗部における Suc 蓄積関連酵素および SUT 遺伝子発現量の推移：Suc 蓄積に関わる SPS、SUSY、AINV および NINV ならびに SUT の遺伝子発現量の推移を明らかにするため、4 酵素遺伝子については Li ら (2012) が報告した活性との相関が高い 9 遺伝子 (*MdCWINV2*, *MdvAINV1*, *MdvAINV2*, *MdNINV2*, *MdNINV3*, *MdSUSY5*, *MdSPS2*, *MdSPS5*, *MdSPS6*) について、また、SUT 遺伝子については Zhen ら (2018) が報告した 2 遺伝子 (*MdSWEET9b*, *MdSWEET15a*) について、それぞれ総 RNA 抽出、cDNA 合成した後リアルタイム定量 PCR 法による遺伝子発現解析（相対定量）を行った。

(4) 果実の果頂部および果梗部における果肉細胞の数および大きさの比較：収穫期における果肉細胞の数と大きさを明らかにするため、果実を固定・保存した後、果実の中心から表皮に向けての放射線上に位置する約 1 cm³ の果肉を切り出し、パラフィン切片法により果肉切片を作成し、卓上型電子顕微鏡下で 2 mm の放射線状に位置する細胞数および細胞の大きさを測定した。

(5) 果実の果頂部および果梗部における果肉組織内エチレンおよび内生 ABA 濃度の推移：果肉組織内エチレンおよび内生 ABA 濃度の推移を明らかにするため、果肉組織内エチレン濃度は果実採取後 25 下で 12 時間静置した後果肉を切り出し、河野・下川 (1994) の方法に準じてガスクロマトグラフを用いて、また、内生 ABA 濃度は Kondo ら (2014) の方法に準じて抽出・精製を行い、ガスクロマトグラフ-質量分析計を用いて測定した。

(6) 果実の果頂部および果梗部における ABA の外生処理効果：ABA 処理液は 20% (S)-ABA (天然型 ABA) 粒剤 (ProTone® SG, Valent BioSciences LLC, USA) を用いて調製した。処理区として無処理区および ABA 区を設け、成熟期前半後期頃に除袋を行った後、ABA 区では展着剤として 0.1% アプローチ BI を含む 2000 ppm ABA 溶液に、無処理区では 0.1% アプローチ BI 溶液に果実をそれぞれ 30 秒間浸漬処理後、約 1 週間後に再び被袋した。処理後は約 10 日間隔で果実を採取し、(1) に準じて構成糖含量を、(5) に準じて ABA 濃度を測定し、また、(3) に準じて ABA 生合成の鍵酵素遺伝子 (*MdNCED1*, *MdNCED2*) の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 構成糖および全糖含量の推移：いずれの年度においても、全糖含量は果梗部に比べて果頂部で常に高い値を示して推移する傾向にあった。各構成糖含量の推移から含量のレベルは Fru、Suc、Glu、Sol の順であったが、Suc 含量は常に果頂部で高い値を示した。Fru および Sol 含量はいずれの時期においても両部位で有意な差は見られなかった。Glu 含量は果梗部で常に高い値を示して推移したが、全糖含量に占める割合は Fru および Suc に比べて低いいため、全糖含量に及ぼす影響は小さかった。これらの結果から、果梗部および果頂部の部位の違いによる全糖

含量の差異、すなわち糖度分布が生じる原因は Suc 蓄積量の差異によることが再確認された。

(2) Suc 蓄積関連酵素活性の推移: SPS の活性は果梗部より果頂部で常に高い値を示して推移する傾向にあり、特に果頂部で Suc 含量が他の時期に比べて急増した成熟期後半初期においては有意に高い値を示した。SUSY の活性は成熟期後半に果梗部で高い傾向が見られた。AINV および NINV の活性はいずれも両部位ではいずれの時期においてもほぼ同レベルで推移した。リンゴ果実では SUSY は Suc の分解方向に触媒するとされているが、SUSY の Suc 合成方向の活性を測定したところ、両部位ではほぼ同じレベルで推移した。これらの結果から、両部位における Suc 蓄積量の差異には SPS の活性の差異が深く関連していると考えられた。

(3) Suc 蓄積関連酵素および SUT 遺伝子発現量の推移: *MdCWINV2* の発現量は収穫期前に果梗部で有意に高い値を示したが、その他の時期では差はなかった。*MdvAINV1* および *MdvAINV2* の発現量はいずれも両部位ではいずれの時期においても有意な差を示さず推移した。*MdNINV2* および *MdNINV3* の発現量はいずれも果頂部で Suc 含量が急増した成熟期後半初期の 1 時期において有意に高い値を示した。*MdSUSY5* の発現量は両部位ではいずれの時期においても有意な差を示さず推移した。*MdSPS2* および *MdSPS5* の発現量はいずれも果頂部で Suc 含量が急増した 10 日前において有意に高い値を示した。*MdSPS6* の発現量は両部位ではいずれの時期においても有意な差を示さず推移したが、*MdSPS5* の発現量の推移と類似していた。これらの結果と(2)の結果から、Suc 蓄積量の差異に関連深い酵素は SPS のみであった。一方、両 SUT の発現量はいずれも両部位では成熟期前半は著しく低く推移し、成熟期後半になると一旦急増して減少する推移を示したがほとんど差が見られなかったことから、両部位において Suc が直接果肉細胞に取り込まれる量に差異はないと考えられ、Suc 蓄積量に差異を生じさせる要因とはならないと考えられた。

(4) 果肉細胞の数および大きさの比較: 細胞の大きさを 7 区分に分け、各区分に含まれる細胞数を全細胞数で割ることで各区分に含まれる細胞数の割合を算出して比較した結果、果頂部では 201~250 μm 以上の大きさの細胞が約 70% 存在していたのに対し、果梗部では 201~250 μm 以下の大きさの細胞が約 80% 存在していたことから、果頂部では比較的大きな細胞が、果梗部では比較的小さい細胞が多く分布していた。これらの結果から、両部位における果肉細胞の大きさの違いが Suc 蓄積量の差異と関係している可能性が示唆された。

(5) 果肉組織内エチレンおよび内生 ABA 濃度の推移: 果実からのエチレン発生量は量的には少ないものの成熟期後半に増加したが、果肉組織内エチレン濃度は両部位ではいずれの時期においてもほぼ同レベルで推移した。一方、内生 ABA 濃度は成熟期前半から後半初期にかけて果梗部ではほぼ一定で推移するのに対して、果頂部では成熟が進むに従って急増し、成熟期後半初期には有意に高い値を示した後に急減した。これらの結果から、両部位における Suc 蓄積量の差異を生じさせる植物ホルモンとしてエチレンは関係せず、ABA が関係する可能性が高いと考えられた。

(6) ABA の外生処理効果: (5) の結果から、ABA の外生処理により Suc 蓄積量が高まれば、ABA と Suc 蓄積との関係が明確になる。しかし、ABA 処理果の両部位における Suc 含量は無処理果と比べていずれの時期においても有意な差を示さず推移した。一方、外生処理した ABA は天然型であるため、ABA 処理果の ABA 濃度は外生処理され吸収された ABA 量と内生 ABA 含量との和で示される。無処理果の ABA (内生 ABA) 濃度は有意な差は見られなかったものの処理時には果梗部より果頂部が高く、果頂部ではその約 1 週間後に急減して果梗部と同レベルとなって推移した。ABA 処理果の ABA 濃度は果梗部では無処理果と同レベルで推移したが、果頂部では無処理果のような急減が見られず徐々に減少し、処理 2 週間後には果梗部より有意に高い値を示し、その後はそのレベルを維持して推移した。また、ABA 処理果の *MdNCED1* および *MdNCED2* の発現量は有意な差は見られなかったものの処理 2 週間後には果梗部に比べて果頂部で高い値を示した。これらの結果から、外生 ABA は果頂部で吸収されており、ABA 生合成促進効果を示すものの、Suc 蓄積量が高まらなかったことから、ABA が Suc 蓄積促進と関係するかどうかについては明らかとならなかった。

以上のことから、リンゴ果実の果頂部および果梗部では *MdSPS2* および *MdSPS5* の発現量が異なることにより SPS 活性に差異が生じ、その結果として Suc 蓄積量に差異が生じることが、リンゴ果実中に糖度分布が生じる主要な内的原因であることが明らかとなった。また、Suc 蓄積促進の誘導には ABA が関係する可能性が考えられたが、関係するかどうかについては明らかとならず、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

〔学会発表〕(計2件)

小原 均 他、リンゴ果実の異なる部位におけるスクロース蓄積とスクロース蓄積関連酵素活性および遺伝子発現との関係、園芸学会、2019

小原 均 他、リンゴ果実の異なる部位における糖蓄積と糖代謝関連酵素活性、果肉細胞の大きさおよび内生植物ホルモン濃度との関係、園芸学会、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。