

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02180

研究課題名(和文)水分動態およびソルビトール代謝機能に着目したリンゴみつ症果発生要因の解明

研究課題名(英文)Clarification of the mechanism on watercourse development in apple fruits related to dynamics of water and sorbitol metabolism

研究代表者

鈴木 卓 (Suzuki, Takashi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：30196836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：みつ症果発生品種の主枝基部に針金リング処理を行うと、着生する果実のみつ症発生程度は顕著に増大した。この場合、針金区の果肉組織(髓部および皮層部の両方)でソルビトール(Sor)含量が対照区より増加しており、Sorを含む樹液が果梗部を介し、果実へ過剰流入したことが考えられる。13C-SorとMALDI-TOF MSIを用いた実験から、果実の皮層部に比べ髓部のショ糖(Suc)生合成活性が低いことを確認した。また、みつ組織発生時の'こうとく'果実皮層部でSDH活性が低く、みつ組織の拡大と関連する可能性がある。果肉組織のスクローストランスポーター(SUC3)活性は、みつ症果発生品種の方が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンゴのみつ症果は、日本国内やアジア圏の消費者に好まれ高級果実として流通する反面、貯蔵性を低下させる生理障害果という側面もあり、その発生機序解明および人為的制御法の開発が求められている。みつ症果の発生には品種間差が見られ、年次によっては発生しない場合もある。本研究では、みつ症果を発生しやすい品種の枝に針金リング処理を施すと果実のみつ面積比が増大し、確実にみつ症果が得られることを見出し、3か年を通して確認される再現性の高い現象であることを明らかにした。これは、みつ症果を安定的に生産する技術に応用できることから、リンゴ生産者および消費者に裨益するところが大きく、実用性が高い研究成果と言える。

研究成果の概要(英文)：The degree of watercore development in apple fruits was increased significantly by the strangulation treatment at the bottom of leader in tree, exclusively in cultivars which can set watercored fruits. Sorbitol content in both pith and cortex tissues of receptacles in the treated fruits was significantly higher than that of the control (not treated fruits). This fact indicates that sap over-flowed into the fruits via peduncle on the strangulated leader.

It was visualized utilizing MALDI-TOF MS imaging that concentration of sucrose biosynthesized from the external 13C-labelled sorbitol was high in the cortex, but low in the pith of fruit flesh which was cultured for three days on a 13C-sorbitol rich medium. Furthermore, the SDH activity in the cortex tissue was kept at lower level when the watercored tissue had appeared, which might lead to the development of watercore. Level of the sucrose transporter (SUC3) in the fruit flesh was higher in cultivars which can set watercored fruits.

研究分野：園芸科学

キーワード：リンゴ みつ症果 ソルビトール スクロース 安定同位体 質量分析 マルチ 針金リング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンゴのみつ症果は、日本ナシのそれとは異なり商品価値が高い。しかし、みつ症果の発生は品種間差および年次間差が大きいと、安定したみつ症果生産は現状では難しい。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との因果関係も指摘されている。みつ症果発生は、従来果肉組織のソルビトール (Sor) 代謝と関連があると言われていたが、その詳細は不明なままである。これまでに、研究代表者らは「みつ組織」が収穫直前の果実内で急速に発達後、貯蔵中に徐々に消失し、その細胞間隙に水溶液が充満していることを Cryo-SEM を用いた観察で明らかにした。すなわち、みつ症果発生は、Sor を含む樹液の流動と関連のあることが予想される。そこで、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、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を解明し、高品質リンゴ果実生産へ応用する基盤を構築しようと考えた。

### 2. 研究の目的

研究代表者らは、以前、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、果梗部を通じた樹液流動の難易 (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。

植物の篩部における物質輸送 (糖類などの転流) は、細胞内を通り原形質連絡を経由するシンプラストローディングと、細胞間隙を通るアポプラストローディングの2種類が知られている。この場合、輸送速度などに優るアポプラストローディングが篩部輸送の主体と考えられている。前述のとおり、リンゴのみつ症果のみつ組織では細胞間隙に水溶液が充満した状態を呈しており、これはアポプラストローディングによって運ばれた篩部液がオーバーフローしてできたものと理解できる。オーバーフローの原因は、流入量過多または果肉細胞における取り込み能力低下の何れかである。従って、みつ症果発生の難易 (品種間差) は、これら2つの能力の違いを反映している可能性があり、この点を実証できればみつ症果発生原因の解明に繋がる。

これらの仮説を検証するため、(1)圃場試験 (全面マルチと灌水制限および針金リング処理) を実施し、みつ症果発生に及ぼす影響を評価する、(2)プレッシャーチャンバーを用いて Sor 溶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、(3)みつ症果を発生しやすい品種と全く発生しない品種の間で、果梗部から果実に至る維管束組織の微細構造並びに aquaporin および Suc-transporter の果実内分布を比較する、(4)果肉組織における Sor を基質としたショ糖 (Suc) 生合成活性の部位間差を  $^{13}\text{C}$ -Sor および MALDI-TOF MS imaging (MSI) により特定し、(5)Sor から Suc 合成に至る第一段階の鍵酵素である NAD 依存 Sor dehydrogenase (NAD-SDH) に着目し、果実発育に伴う酵素活性の推移を品種間で比較する。そして、みつ症果発生を人為的に制御するための栽培技術へ応用することが目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 圃場試験：毎年必ずみつ症果を発生する「こうとく」および「RG」の成木 (北大余市果樹園栽植) を全面マルチし、無マルチ樹と比較する方法で、樹体への給水制限がみつ症果発生に及ぼす影響を調査した。同様に、通常どおりに栽培した各品種の成木主枝に、7月下旬から

針金リング処理を各々施し、みつ症果発生への影響を調べた。これにより、篩部液の転流量とみつ症果発生との因果関係を検証しようと考えた。この場合、果実のみつ症発生程度は、Rを用いた画像解析法（本研究で新たに構築）で得られる「みつ面積比（%）」を指標に評価した。

(2) みつ症果の人為的作出：プレッシャーチャンバーを用いて、成熟前の果実に Sor を含む人工篩部液（切り花染色剤添加）を果梗部から果実内へ浸透させる実験を行った。この場合、負荷圧力および溶液濃度を変え、溶液の果実内への浸透程度を、経過時間および品種間で比較することで、篩部液のオーバーフローとみつ症果発生との因果関係を検証しようとした。

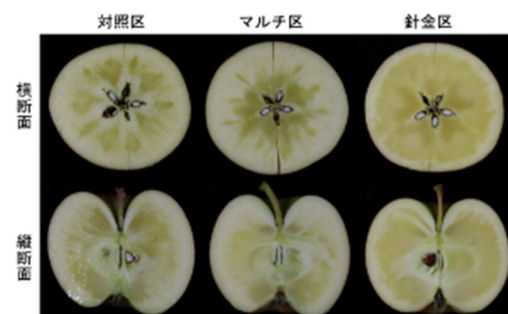
(3) 維管束組織の微細構造並びに aquaporin および Suc-transporter 果実内分布の品種間比較：みつ症果の発生に顕著な品種間差が認められており、果梗部から果実に至る維管束組織の構造的差異（いわゆる「軸太」や「軸細」）が、篩部液の果実内流入を制限している可能性がある。そこで、みつ症を発生する「こうとく」および「RG」と、発生しない「王林」の果梗部維管束組織の微細構造を顕微鏡観察により比較し、その相違点を探ろうとした。また、果肉組織細胞による篩部液取り込み能力の違いを上記の品種間で比較するため、果肉組織における aquaporin および Suc transporter の分布を市販の抗体（抗 PIP1 および抗 SUC3）を用いて免疫組織科学的手法で観察し、その発現量を Western blotting 法で調査した。

(4) MSI による果実内 Sor および Suc の局在性評価：7月26日に採取した「こうとく」の発育果を表面殺菌し、クリーンベンチ内で縦に2分割後、各々を縦または横（赤道面）に切断し、その一方を 0.5 M [1-<sup>13</sup>C]Sor（Sigma-Aldrich）を含む MS 培地に縦・横断面が培地に接するように置床し、25°C、1日16時間照明（白色LED、60 μmol/m<sup>2</sup>/s）で72時間培養した。凍結切片（100 μm 厚）はクライオミクロトームを用いて切削し、IOT スライドガラスに伸展・乾燥後、マトリックス溶液（2,5-dihydroxybenzoic acid 500 mg を 70%メタノール 10 mL に溶解）1 mL をエアブラシを用いて噴霧した。質量分析は、MALDI-TOF MS（ultrafleXtreme、Bruker Daltonics）を用いてレーザー照射間隔 400 μm で行い、マススペクトラムから [Sor + K]<sup>+</sup>+1、[Suc + K]<sup>+</sup>+1 および [Suc + K]<sup>+</sup>+2 の分子ピークのイオン強度をもとに、それぞれの物質の果実内における空間分布を可視化した。なお、隣接する切片の可溶性炭水化物含量を、HPLC を用いて定量した。また、先に実施した我々の実験において、培地に zeatin を添加すると、組織中の Sor 含量が高く、逆に Suc 含量が低くなり、<sup>13</sup>C 由来の Suc が生成しない現象を確認したため、Sor から Suc に至る代謝系のどこかが zeatin によって抑制されたものと推測した。そこで、<sup>13</sup>C-Sor に加え zeatin を添加した培地を用いて、上記と同様の実験を行い、Sor から Suc 生合成反応に及ぼす、zeatin の影響を明らかにしようとした。

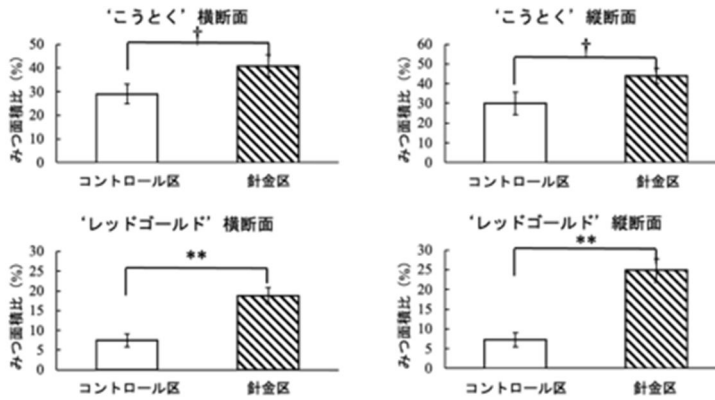
(5) Sor 代謝酵素活性の解析：果実に転流した Sor は、NAD-SDH および NADP-SOD の2段階の酵素反応を経て果糖（Fru）に転換され、ブドウ糖（Glc）を生じ、さらに SPS および SPP を介した2段階の酵素反応を経て Suc が生合成される。そこで、Sor 代謝の第一段階である NAD-SDH に着目し、果実発育に伴う酵素活性の変化を、みつ症を発生する「こうとく」と発生しない「王林」の間で比較した。

#### 4. 研究成果

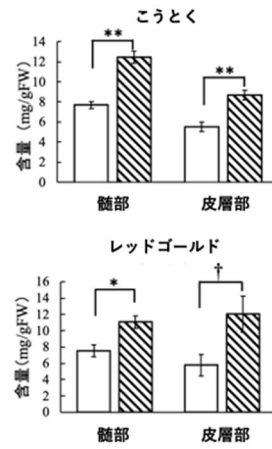
(1) 圃場試験：2021年の圃場試験で、マルチ区果実のみつ組織発生程度は、品種を問わず対照区のそれと同等で、両者に統計的差異は認められなかった。マルチ下 20 cm 深の土壌水分量はマルチ外 20 cm 深のそれよりも値が低く推移したが、50 cm 深で差が認められなかったことから、マルチによる給水制限の効



第1図 「こうとく」果実のみつ症発生程度に及ぼすマルチおよび針金リング処理の影響。



第 2 図 針金リング処理が‘RG’果肉組織におけるみつ症組織発生程度に及ぼす影響。平均値 ± SE (n = 5) . \*\* $P < 0.01$  , † $P < 0.10$  (Welch's t-test) .



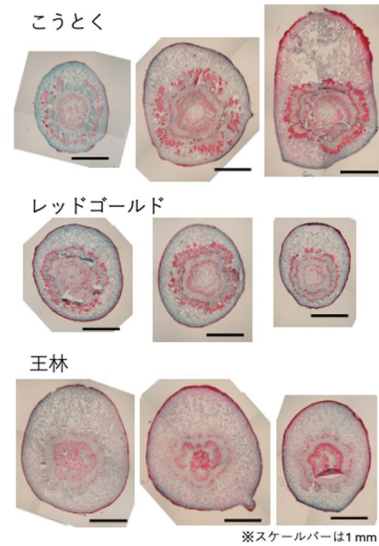
第 3 図 果肉組織の Sor 含量に及ぼす針金リング処理の影響。右が針金区。平均値 ± SE (n = 3) . \*\* $P < 0.01$  , \* $P < 0.05$  , † $P < 0.10$  (Welch's t-test) .

果が不十分であったことが考えられる。一方、針金区果実のみつ組織発生程度は、対照区に比べて高い傾向を示した(第 1 図)。この点を検証するため、2022 および 2023 年にも針金リング処理を行なった。その結果、いずれも針金区のみつ面積比が対照区に比べ高く(第 2 図)、果肉組織の Sor 濃度も、髓部および皮層部を問わず針金区で高くなった(第 3 図)。これらの結果は、Sor を含む篩部液の主幹方向への移動が針金リングで制限された結果、通常より多い篩部液が果実に流入したという仮説を支持している。

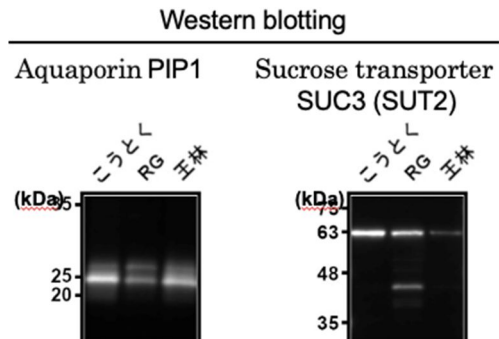
(2) みつ症果の人為的作出：成熟期の‘ふじ’果実に、プレッシャーチャンバーを用いて切り花染色剤添加 Sor 溶液を注入した結果、果托の維管束周辺組織が染色された。しかし、顕微鏡観察の結果、導管組織(螺旋状紋あり)が染色されていることが判明した。従って、篩部を介したアポプラストローディングを反映した結果ではないと判断し、この研究を中断した。

(3) 維管束組織の微細構造並びに Aquaporin および Suc-transporter 果実内分布の品種間比較：果梗部の構造的差異が篩部液の果実内流入を制限している可能性を想定し、果梗部横断切片を顕微鏡観察した結果、篩部/木部の面積比は‘RG’が小さく、みつ症発生と連動する品種間差は認められなかった(第 4 図)。

次に、2022 年 10 月 17 日に採取した各品種の果肉組織ミクロソーム画分について、抗 Aquaporin 抗体(PIP1)および抗 Suc-transporter 抗体(SUC3)を用いて、Western blotting を行った。PIP1 のバンドに品種間差は認められなかったのに対し、SUC3 のバンドは‘王林’、‘RG’、‘こうとく’の順に濃く検出された(第 5 図)。これは、みつ症果を発生しない品種で、Suc-transporter 活性が低い可能性を示している。



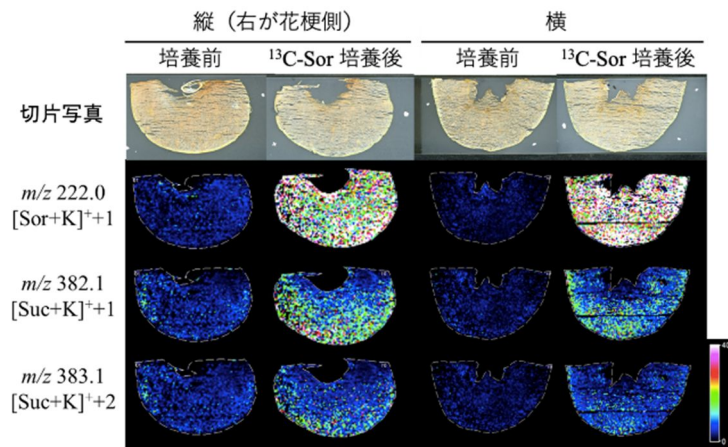
第 4 図 果梗横断切片の品種間差。



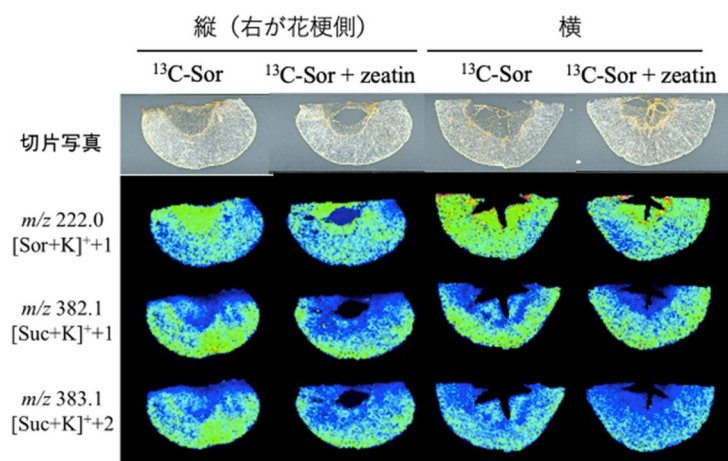
第 5 図 PIP1 および SUC3 発現量の差異。

#### (4) MALDI-TOF MSI による

果実内 Sor および Suc の局在性評価：切片の HPLC 分析で、培養後の Sor 含量が縦・横切片とも培養前の約 2 倍の値を示し、組織が培地から Sor を吸収したことを裏付けた。同時に Fru および Glc も増加しており、外与の Sor から生合成されたものと考えられる。MSI で  $^{13}\text{C}$ -Sor 分子イオンピーク ( $m/z$  222.0) は、いずれも切断面全体で均一に分布し、Sor の取り込みに偏りはなかった (第 6 図)。一方、 $^{13}\text{C}$  を 1 または 2 個内包する Suc ( $m/z$  382.1 および 383.1) 分子は、果托の髓部よりも皮層部に多く分布していたことから、発育果の果肉組織における Suc 生合成活性は、皮層部側で高いことが明らかになった。次に、Suc 生合成に及ぼす zeatin の影響を同様の方法で調べた結果、顕著な抑制作用は確認できなかつた (第 7 図)。この点については、先行実験との方法論の違いも考慮し、さらに検討する必要がある。ただ、この実験でも、皮層部側で Suc 生合成活性の高いことが再確認できた。



第 6 図 MALDI-TOF MSI により可視化した $[1-^{13}\text{C}]$ Sor 添加培地で培養した果実片における  $^{13}\text{C}$  を内包する Sor および Suc 分布。

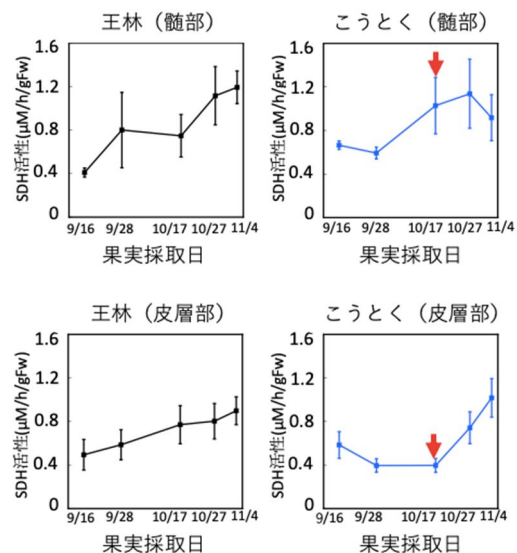


第 7 図  $^{13}\text{C}$ -Sor 添加培地で培養した果肉組織の  $^{13}\text{C}$  を内包する Suc の分布に及ぼす培地に添加した zeatin の影響。

きなかつた (第 7 図)。この点については、先行実験との方法論の違いも考慮し、さらに検討する必要がある。ただ、この実験でも、皮層部側で Suc 生合成活性の高いことが再確認できた。

(5) Sor 代謝酵素活性の解析：2022 年に採取した 'こうとく' (みつ症果発生品種) および '王林' (みつ症果非発生品種) 果実で、皮層部および髓部における SDH 活性を調べ比較したところ、みつ組織発生初期の 'こうとく' 皮層部で SDH 活性が低いことを確認した (第 8 図)。Sor を代謝しきれないことが皮層部へみつ組織が広がる要因の一つとなっている可能性がある。

実用化可能な成果：針金リング処理は、実験を行なった 3 か年とも、'こうとく' および 'RG' 果実のみつ面積比を増大させたことから、みつ症果を確実に作出する栽培技術に応用できるものと考えられる。



第 8 図 'こうとく' および '王林' 果実の発育・成熟に伴う果肉組織 SDH 活性の推移。矢印は、みつ組織の形成を最初に確認した果実採取日を示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山下瑠花・藤木卓巳・堀川謙太郎・春日 純・上野敬司・実山 豊・鈴木 卓	4. 巻 21巻別冊2
2. 論文標題 In vitroのリンゴ果肉組織で外与の[1-13C]ソルビトールから生合成されたスクロース分布のMALDI-TOF MSイメージングによる可視化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山下瑠花・藤木卓巳・遠藤綾乃・夏堀 優・春日 純・上野敬司・実山 豊・鈴木 卓	4. 巻 22巻別冊1
2. 論文標題 マルチおよび針金リング処理がリンゴのみつ症果発生に及ぼす影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 夏堀 優・山下瑠花・藤木卓・遠藤綾乃・春日 純・上野敬司・実山 豊・鈴木 卓	4. 巻 23巻別冊1
2. 論文標題 リンゴ果実のみつ症発達程度およびソルビトール含量に及ぼす針金リング処理の影響	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 遠藤綾乃・藤木卓巳・山下瑠花・夏堀 優・実山 豊・鈴木 卓	4. 巻 23巻別冊1
2. 論文標題 リンゴみつ症果の果肉組織におけるソルビトール分布の MALDI-TOF MS imaging による可視化	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤綾乃・藤木卓巳・山下瑠花・夏堀 優・実山 豊・鈴木 卓
2. 発表標題 リンゴ果実のみつ症発達と関連した果肉組織可溶性炭水化物分布の MALDI-TOF MS imaging による可視化
3. 学会等名 日本質量分析学会（第72回質量分析総合討論会）
4. 発表年 2024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
研究分担者	春日 純  (Kasuga Jun)  (40451421)	帯広畜産大学・畜産学部・准教授   (10105)	
研究分担者	実山 豊  (Jitsuyama Yutaka)  (90322841)	北海道大学・農学研究院・講師   (10101)	
研究分担者	上野 敬司  (Ueno Keiji)  (90441964)	酪農学園大学・農食環境学群・准教授   (30109)	

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
---------	---------