

イチゴヘタ離れ性と細胞壁特性の関連調査

阿部 竜也

Relationship of Cell Wall Properties and Capping Trait in Strawberry.

Tatsuya Abe

Our cross-bred cultivar, 'Benihibari', has a unique trait called 'capping trait'. The fruits of 'Benihibari' can be easily detached from calyx. To elucidate the mechanism of capping, the proteins involved in remove of the calyx had been explored by proteome analysis. It was suggested that calyx cell of capping strawberries was more abundant cellulose and water-insoluble pectin than non-capping strawberries.

This study investigated the difference of cell wall composition between 'Benihibari' as the capping cultivar and 'Hokowase' as the non-capping strawberry. Comparison of pectin content revealed that water-soluble pectin (WSP) content of 'Benihibari' was lower in calyx, conversely higher in fruit cell than 'Hokowase'. These data indicated that the difference of pectin content between calyx and fruit was extreme in capping strawberries. It was speculated that an imbalance of cell adhesion force at border area between both tissues result from the significant difference, the imbalance generated stress in the area at the time of picking. Cellulose content of 'Benihibari' was rich, but other capping strawberry did not show that tendency. X-ray CT scan techniques found that calyx of 'Benihibari' had larger cell and thinner cell wall than 'Hokowase'. These result suggested that the calyx cell of capping strawberry was more fragile than the cell of non-capping strawberry. It was surmised that calyx of 'Benihibari' was constructed with frail cells, and therefore calyx was easily removed from fruit by the stress at the picking.

Key words: イチゴ, 細胞壁, X線 CT スキャン, ヘタ離れ, ペクチン

当研究所で交配育種された加工用イチゴ品種「ベニヒバリ」は、ヘタ離れ性が高いという特性を持っている。ヘタ離れ性の高さは、収穫作業の省力化・軽減化、加工品への異物混入を阻止できることから、加工用品種において重要な形質である。2009年にアメリカ農務省 国立食糧農業研究所 (NIFA) が提唱した、RosBREED (<http://www.rosbreed.org/>) と呼ばれる、バラ科果実・野菜の有用形質を対象とした DNA マーカー育種の基盤整備プロジェクトでは、ヘタ離れ形質が農業的に重要な形質として位置づけられ、解析対象の1つとされている。この形質は、遺伝学的解析から遺伝率が高く、ヘタ離れを制御する遺伝子の存在が示唆されているが、明らかになっていなかった¹⁾。筆者等は、「ベニヒバリ」ヘタ部における発現タンパク質の網羅的解析から、細胞壁合成酵素遺伝子群やエチレン生合成酵素遺伝子群がヘタ離れ形質に関与する可能性を見出した。ヘタ離れ性の高い品種においては、セルロース生合成酵素タンパク質の蓄積量が増加しており、一方、リグニン生合成やペクチン分解に関連するタンパク質の蓄積量は減少していた。これらの結果から、ヘタ離れ性品種のヘタ部組織の細胞では、セルロースに富み、ペクチン組成比の異なる細胞壁が構築されていることが示唆された。伸展性に乏しい細胞壁のため、収穫時の応力によって細胞が破断し、ヘタ離れが起こることが推察された²⁾。そこで、本研究では、ヘタ離れ性の異なる品種を用いた細胞壁構成成分

の分析および X 線 CT スキャン装置によるヘタ部組織細胞の形状比較から、ヘタ離れ性と細胞壁特性の関連性を調査した。

材料および方法

材料および栽培条件

イチゴ (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) は、当所附属農場または人工気象室 (12 時間日長, 昼温 20℃ / 夜温 15℃, 湿度成行き) で栽培した「ベニヒバリ」と「ベニヒバリ」の雄親品種である「マーシャル」および雌親品種である「宝交早生」、10 倍体品種「桃薫」の 4 品種を供試した。ヘタ離れ性の高い試料として、「ベニヒバリ」、中程度のヘタ離れ性試料として「マーシャル」と「桃薫」、ヘタ離れ性の無い試料として「宝交早生」を用いた。収穫した果実は、ヘタ部と果実部に分け、液体窒素で急速冷凍した後、-80℃で保存した。本研究では、ヘタ離れの際に破断する領域 (萼と一部果実) をヘタ部と定義した。

RNA の抽出およびリアルタイム PCR による遺伝子発現解析

凍結試料を液体窒素と共に乳鉢・乳棒で粉末状に磨碎し、抽出試料とした。試料 1 g に 65℃ に加温した抽出緩衝液 (100 mM トリス - 塩酸緩衝液 : pH8.2, 1.4 M 塩化ナトリ

ウム, 20 mM EDTA-2Na: pH8.0, 2% CTAB) を 10 ml 添加し, ボルテックスミキサーで激しく攪拌し, 65°C で 1 時間静置した (15 分毎にボルテックスで攪拌). 室温まで放冷後, 等量のクロロホルム / イソアミルアルコール = 24 : 1 (CIA) を添加し, 転倒混和して均一なエマルジョンとした. 室温, 12,000 × g で 15 分遠心し, 上清を回収し, 等量の CIA を添加し転倒混和した. 室温, 12,000 × g で 15 分遠心し, 回収した上清に 1/3 倍量の 12 M 塩化カリウムを添加し, 4°C で一晩静置した. 4°C, 12,000 × g で 15 分遠心し, 残渣に 5 ml の超純水と 5 ml のフェノールを添加し, 4°C, 12,000 × g で 10 分遠心し, 水相を回収した. 等量のフェノール / クロロホルムを添加し, 4°C, 12,000 × g で 10 分遠心し水相を回収した. 等量のクロロホルムを添加し, 4°C, 12,000 × g で 10 分遠心し水相を回収した. 水相の 1/30 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 1/10 倍量のエタノールを添加・攪拌後, 氷上で 30 分静置した. 4°C, 12,000 × g で 25 分遠心後, 回収した上清に 1/30 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 3 倍量の 100 % エタノールを添加し, -70°C で 3 時間以上静置した. 4°C, 12,000 × g で 20 分遠心し, 沈殿を回収した. 70% エタノールで洗浄し, 任意量の超純水に溶解させた. 抽出した RNA は 260 nm の吸光度で濃度を測定し, 電気泳動法で精製度を調べた.

抽出した total RNA を鋳型とし, 1st strand cDNA synthesis Kit (タカラバイオ株) を用いた逆転写反応によって cDNA を合成した. リアルタイム PCR システム (Thermal Cycler Dice TP800, タカラバイオ株) で目的遺伝子の一部を増幅し発現量を測定した. 遺伝子断片の増幅, 標識には SYBR Remix Ex Taq (タカラバイオ株) を用いた. アクチン遺伝子の発現量を内部標準とし, 各遺伝子の発現量を補正した.

細胞壁構成成分の抽出および定量

アルコール不溶性固形物 (AIS) の調製

水野らの方法に従い, AIS を調製し, 各種細胞壁構成成分を抽出した³⁾. スライスした試料の 4 倍量のエタノールを添加し, 15 分間沸騰させた. 氷中で冷却した後, 吸引ろ過を行い, 残渣を乳鉢で磨砕した. 試料溶液の一部を回収し, 等量の 5% フェノールと 5 倍量の硫酸を添加し, 糖による変色が見られなくなるまで 70% エタノールでの洗浄を繰り返した. 洗浄後, 80, 90, 99% エタノールとジエチルエーテルで順次洗浄し, 乾燥後の固形物を AIS とした.

ペクチン酸 (WSP) の抽出

AIS 100 mg に対し, 150 ml の超純水を添加し, 30 分間攪拌後, 12 時間静置した. 静置後, 超純水で 250 ml に定容して吸引ろ過を行い, ろ液を WSP とした.

ペクチン酸 (HXSP) の抽出

WSP の残渣をビーカーに回収し, 100 ml の超純水を添加し, 5 分間静置した. 室温, 3,000 × g で 10 分遠心し, 沈殿を回収した. 遠心分離作業によって分画された上精画分の一部を回収し, 等量の 5% フェノールと 5 倍量の硫

酸を添加し, 糖による変色が見られなくなるまで沈殿を超純水で洗浄した. 洗浄後の沈殿に, 150 ml の 0.4% ヘキサメタリン酸ナトリウムを加え, 10 分間攪拌後, 2 時間静置した. 静置後, 250 ml に 0.4% ヘキサメタリン酸ナトリウムで定容して吸引ろ過を行い, ろ液を HXSP とした.

プロトペクチン (HSP) の抽出

HXSP の残渣をビーカーに回収し, 100 ml の超純水を添加し, 5 分間静置した. 室温, 3,000 × g で 10 分遠心し, 沈殿を回収した. 遠心分離作業によって分画された上精画分の一部を回収し, 等量の 5% フェノールと 5 倍量の硫酸を添加し, 糖による変色が見られなくなるまで沈殿を超純水で洗浄した. 洗浄後の沈殿に, 150 ml の 50 mM 塩酸を加え, 1 時間加熱した. 冷却後, 250 ml に 50 mM 塩酸で定容して吸引ろ過を行い, ろ液を HSP とした.

抽出したペクチンの定量は, ジメチルフェノール法により行った⁴⁾.

リグニン・ホロセルロースの抽出・定量

リグニンは, クラーソン法に従い, AIS 100 mg に対し, 0.7 ml の 72% 硫酸を添加し, 攪拌した後, 3 時間室温で静置した. 次いで超純水 7.3 mL を添加し, 1 M 硫酸条件下で 2.5 時間煮沸した後, 冷却し, 遠心分離を行った. 得られた固形分に超純水 10 ml を加えて遠心分離し, この洗浄を二度行った後, 洗浄済みの固形分を乾燥させた. 得られた乾燥物を硫酸リグニンとして秤量した⁵⁾.

セルロースは, AIS 500mg に対し, 150 ml の超純水, 亜塩素酸ナトリウム 1.0 g, 酢酸 0.2 ml を加え, 80°C の湯浴上で一時間加熱した. 加熱中に, 亜塩素酸ナトリウム 1.0 g および酢酸 0.2 ml を加える操作を, 3 回繰り返した. 吸引ろ過した後, 冷水およびアセトンで洗浄し, 乾燥させた. 得られた乾固物は, セルロースとヘミセルロースの混合物 (ホロセルロース) であるが, 本研究ではセルロースとして秤量した⁶⁾.

X 線 CT スキャンを用いた組織構造観察

莖部を含む組織をスライスカッターとコルクボーラーを用いて, 高さ 10 mm, 直径 5 mm または 10 mm の円柱状に切りだし, 凍結乾燥したものを試料とし, X 線 CT 装置 (TDM1000-IW, ヤマト科学 (株)) で組織構造を撮影した. 撮影はヘタ離れ部位を含むヘタ部を対象に軸位置 (焦点寸法) 15–50 mm の範囲で, 幹電圧 34–38 kV, 幹電流 21 μA の条件で行った.

撮影画像を基に画像解析ソフトウェア ImageJ (アメリカ国立衛生研究所) を用いて, 各細胞の面積を測定した. 莖部組織直下から幅 3 mm × 高さ 4 mm の領域内を柔組織と定義し測定した. また, 測定領域の上部 2 mm を柔組織上部, 下部 2 mm を柔組織下部とした. 画像を設定した閾値により, 白色または黒色のシグナルに分別する二値化処理を行い, 領域内に含まれる細胞を細胞壁 (細胞間隙) と細胞質に区別した. その後, 各細胞の細胞質面積を計測し細胞面積とした. また, 面積値が 2300 μm² に満たないシグナルは細胞と画像処理中にできるノイズとの区別ができ

ないため除外した。細胞壁面積の測定では、柔組織上部の一部（萼部直下細胞から1-2mm）、高さ1mm、幅2mmの領域を測定領域とし、測定領域中に含まれる全細胞の細胞壁面積値を二値化処理画像から算出し、その値を細胞数で割ることにより1細胞辺りの平均細胞壁面積を求めた。

本文の遺伝子およびタンパク質の記述は、シロイヌナズナの記述方法に準拠し、以下の例に倣い記載した（参考：<http://www.arabidopsis.org/portals/nomenclature/guidelines.jsp>）。

野生型遺伝子；正式名称：*Cellulose synthase A*

略式名称：*CESA*

変異型遺伝子；正式名称：*cellulose synthase A*

略式名称：*cesA*

タンパク質；正式名称：*CELLULOSE SYNTHASE A*

略式名称：*CESA*

結果と考察

遺伝子発現解析

ヘタ部のプロテオーム解析により、高ヘタ離れ性品種‘ベニヒバリ’とその雌親品種でヘタ離れ性を持たない‘宝交早生’のタンパク質蓄積量を比較した。‘ベニヒバリ’で蓄積量が増加していた細胞壁関連タンパク質として、セルロース生合成酵素タンパク質であるCELLULOSE SYNTHASE A (*CESA*) やヘミセルロース合成酵素タンパク質であるUDP-XYLOSE SYNTHASE (*UXS*) が選定された。一方で、蓄積量が低下していたタンパク質として、リグニン生合成タンパク質であるCINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (*CAD*) やO-METHYLTRANSFERASE 1 (*OMT1*)、ペクチン分解酵素タンパク質であるPOLYGALACTURONASE (*PG*)、セルロース合成に参与するREVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 3 (*RGP3*) が選定された²⁾。これらタンパク質の蓄積量差が、ヘタ離れ性と相関があるか確認するため、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行った。結果、*CESA*、*CAD* 遺伝子はヘタ離れ性の高い品種ほど発現量が増加し、*PG* 遺伝子は減少していた。また、*RGP* 遺伝子の発現量は品種間差が見られなかった（図1）。*UXS* や *OMT1* 遺伝子は、設計したプライマーで増幅が見られず解析できなかった。*CESA* 遺伝子および *PG* 遺伝子の発現様式は、プロテオーム解析結果と一致するものであり、発現量とヘタ離れ性の相関が示唆された。*CAD* 遺伝子はプロテオーム解析とは逆の発現様式を示し、ヘタ離れ性との相関性が低いことが示唆された。*CESA* と *PG* の遺伝子発現は、ヘタ離れ性との相関が示唆され、ヘタ離れ性が異なる品種では、セルロースおよびペクチン含量に差が生じていることが推察された。そこで、各品種のヘタ離れ領域におけるペクチン・セルロース・リグニン含量を調査した。

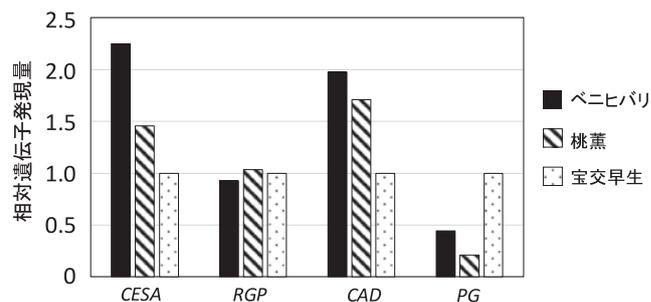


図1 ヘタ離れ性の異なる品種間での遺伝子発現量
ヘタ部領域での遺伝子発現量

細胞壁構成成分の特性調査

ヘタ離れ性の異なる‘ベニヒバリ’、‘マーシャル’、‘宝交早生’のヘタ部、およびヘタ部を除く果実部から調製したAISを用いて、ペクチニン酸、ペクチン酸、プロトペクチンを抽出し、ペクチン含量およびその組成を比較した。ペクチニン酸は水溶性ペクチンであり、ペクチン酸は二価の金属イオンと結合した不溶性ペクチン、プロトペクチンはヘミセルロースやセルロースと結合した不溶性ペクチンである（図2）。

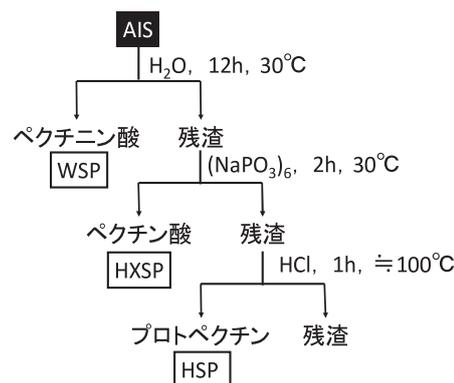


図2 各種ペクチンの抽出

各品種の平均果重および平均ヘタ部重から、個々の果実におけるペクチン含量を算出すると、果実全体では‘マーシャル’が16.22 mg/個で最も多かった。‘ベニヒバリ’と‘宝交早生’は、それぞれ13.57 mg/個、13.75 mg/個で差がみられなかった（表1）。一方、各種ペクチンの組成を比較すると、‘ベニヒバリ’は‘宝交早生’と比較して、全ペクチン質に占めるペクチニン酸の割合が、ヘタ部では少なく、果実部では多かった。また、‘マーシャル’のペクチン質組成は、果実部では‘ベニヒバリ’に、ヘタ部では‘宝交早生’に酷似していた（図3）。‘ベニヒバリ’において、ヘタ離れした果実としなかった果実でペクチン組成を比較したところ、ヘタ離れした果実ではペクチニン酸の割合が果実部で多く、ヘタ部では少なく、‘ベニヒバリ’全体の測定結果と同様の傾向を示していた（図4）。一方、ヘタ離れしなかった果実では、果実部・ヘタ部で水溶性ペクチンの割合に差がなく、果実部・ヘタ部における水溶性

ペクチンの割合がヘタ離れの有無に関わっていることを示唆するものであった(図4)。これらの結果から、ヘタ離れには、ヘタ部、果実部におけるペクチン質の組成比が関与していることが示唆された。一般的にペクチンは、細胞接着に重要な役割を持っていると考えられ、水溶性ペクチンの割合が増加すると細胞接着力が低下することが種々の果実で知られている。ヘタ離れ性の異なる品種では、ヘタ部と果実部の細胞接着力の差が大きいと考えられ、収穫時の応力が、この境界部にかかりやすいことが推察された。

ヘタ離れ/非ヘタ離れ果実の両方を含む‘ベニヒバリ’全体のペクチン組成比では、果実部とヘタ部のペクチニン酸含量比の差が30%であったのに対し、ヘタ離れした果実のみでは20%であった。また、中程度のヘタ離れ性を示す‘マーシャル’の果実部とヘタ部の含量比の差は17%であることから、果実部とヘタ部のペクチニン酸含量比に20%程度の違いが存在すると、ヘタ離れ形質が表れる可能性が考えられた。

表1 各品種の部位別ペクチン含量および割合

ペクチン種	組織	含量・割合 mg/個 (%)		
		ベニヒバリ	マーシャル	宝交早生
ペクチニン酸	果実部	6.18 (49.7)	7.34 (47.6)	5.10 (40.3)
	ヘタ部	0.23 (19.7)	0.25 (30.2)	0.33 (29.9)
	全体	6.40 (47.2)	7.58 (46.8)	5.43 (39.5)
ペクチン酸	果実部	2.90 (23.3)	3.75 (24.3)	3.23 (25.6)
	ヘタ部	0.43 (38.0)	0.26 (32.6)	0.37 (33.8)
	全体	3.33 (24.6)	4.01 (24.7)	3.61 (26.2)
プロトペクチン	果実部	3.35 (27.0)	4.32 (28.1)	4.31 (34.1)
	ヘタ部	0.48 (42.3)	0.30 (37.1)	0.40 (28.3)
	全体	3.84 (28.3)	4.62 (28.5)	4.17 (34.2)
総ペクチン	果実部	12.43 (100)	15.40 (100)	12.65 (100)
	ヘタ部	1.14 (100)	0.81 (100)	1.10 (100)
	全体	13.57 (100)	16.22 (100)	13.75 (100)

括弧内の数値は、割合を示している

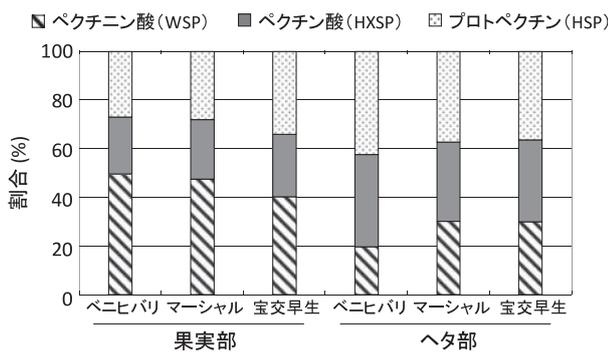


図3 各品種のペクチン割合

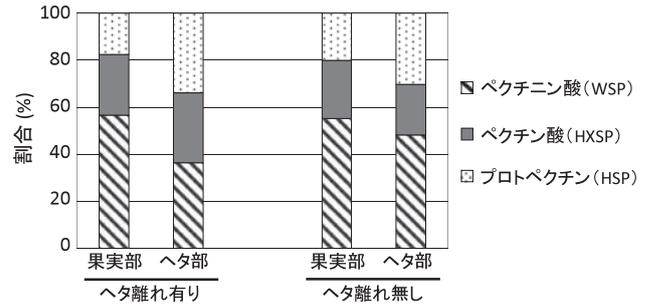


図4 ヘタ離れ性の異なる果実(‘ベニヒバリ’)でのペクチン割合

各品種のAISからリグニンを抽出し、定量した。果実部では、‘マーシャル’の含量が最も多く、次いで‘宝交早生’、‘ベニヒバリ’の順であった。一方、ヘタ部では、‘ベニヒバリ’が最も多く、‘宝交早生’、‘マーシャル’の順であり、果実部と逆の傾向が見られたが、今回の測定結果からはヘタ離れ性との関連は見出せなかった。その原因として、リグニンの回収量が微量であったため、実験区間のバラツキが大きく、測定誤差が結果に影響を与えたと推測された(図5A)。

AISの亜塩素酸処理によりリグニンを酸化分解し、得たホロセルロース(セルロースとヘミセルロースの混合物)を定量した。結果、果実部・ヘタ部共に‘ベニヒバリ’の方が、セルロース含量が増加していた(図5B)。しかし、中程度のヘタ離れ性を示す‘マーシャル’のセルロース含量は、果実部、ヘタ部とも‘宝交早生’と同等であった。

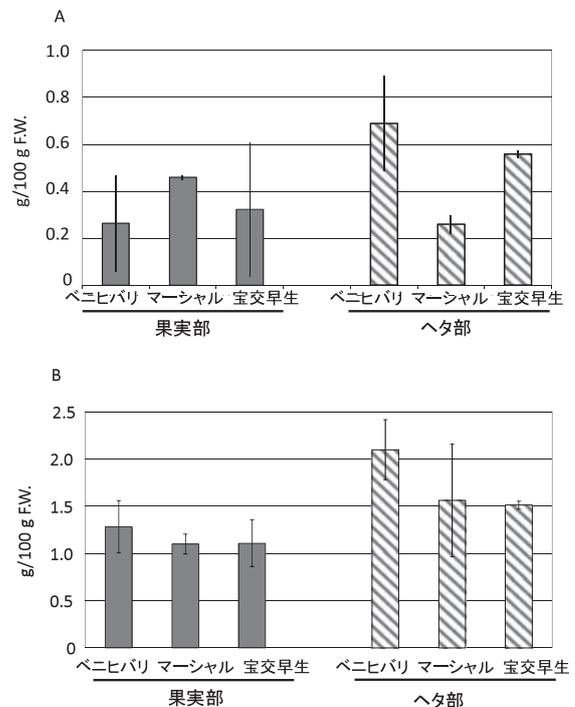


図5 各品種におけるリグニンおよびセルロース含量

A: リグニン含量
B: セルロース含量

ヘタ部の遺伝子発現解析では、セルロース合成酵素遺伝子 *CESA*、リグニン合成酵素遺伝子 *CAD* の発現量が、ヘタ離れ性の高い品種で増加していた。これらの遺伝子の発現量はセルロース含量やリグニン含量と相関性があることが報告されている^{7,8)}。この結果から、ヘタ離れ性品種のヘタ部細胞では、セルロース・リグニンに富んだ細胞壁が構築されているとの仮説が立てられた。セルロース・リグニン含量の測定では、‘ベニヒバリ’のヘタ部は‘宝交早生’より含量が多く、遺伝子発現の結果と一致し、仮説を支持するものであった。しかし、‘マーシャル’におけるこれら成分の含量は、‘宝交早生’のものと同様か、それ以下であり、仮説に対して矛盾が生じる結果であった。‘ベニヒバリ’のヘタ離れ性は‘マーシャル’からの遺伝と推定されることから、本仮説の確証性は低いと考えられ、プロテオーム解析や遺伝子発現解析の結果は、‘ベニヒバリ’の品種特性が反映された結果であると判断した。

X線CTスキャンを用いたイチゴヘタ離れ組織の観察及び測定

X線CTスキャン装置で、ヘタ離れ部付近の組織観察を行い、細胞壁の厚さおよび細胞間隙の測定、ヘタ離れ部組織構造の品種間差を調査した。焦点距離を50 mmとした中距離撮影では細胞壁や細胞間隙の寸法を測定できる解像度には満たなかったが、三次元画像構築は可能であった。近距離撮影（焦点寸法：20 mm）では、X線管と試料が非常に近いため、試料中心軸のずれにより生じる画像の乱れが大きく、三次元画像構築が不可能であったが、解像度の高い二次元画像の取得は可能であった。しかし、近距離撮影画像でも、細胞壁や細胞間隙の大きさを直接測定することは、不可能であった。一般に植物の細胞壁の厚さは0.1-1 μm であり⁹⁾、使用したX線CT装置（最大解像度1 μm ）で、測定するためには焦点寸法を最小距離である5 μm で撮影する必要があったが、試料の厚さ・形状から、最小距離で組織構造全体を撮影することは不可能であった。

中距離で撮影した二次元画像から細胞面積を測定した。萼部組織最下部と果実組織の接触面から高さ4 mm、果柄の中心軸を中心とした幅3 mmの領域を柔組織部と定義

し、その領域上部2 mmを柔組織上部、下部2 mmを柔組織下部として面積を測定した（図6）。

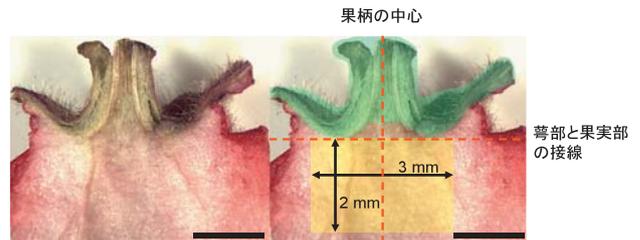


図6 面積を測定した領域の模式図

緑色領域：萼部組織、黄色領域：柔組織上部を示している
スケールバー：1.5 mm

柔組織上部の平均細胞面積を比較すると、‘ベニヒバリ’が6955.1 μm^2 であり、‘宝交早生’の5742.0 μm^2 より大きい傾向が見られた。‘桃薫’ではその傾向が特に顕著であったが、これは‘桃薫’が他のイチゴ品種（8倍体）と違い、10倍体品種であるためと考えられた。植物では倍数性が増加すると細胞が大きくなるのが一般的に知られており、イチゴも同様である可能性が高いといえる。また、細胞密度はどの品種でも約60個/ mm^2 であり、ほとんど差が見られなかった。このことは、‘宝交早生’では細胞質以外の部分が占める割合が大きいことを示しており、4品種の中で厚い細胞壁を有している可能性が示唆された（図7、表2）。一方、柔組織下部の細胞面積には品種による違いが見られなかったが、どの品種も上部より面積の大きい細胞で構成され、‘宝交早生’ではその違いが顕著であった。また、細胞の形を表す真円度（長径/短径の逆数）は、品種・部位に関わらず0.59-0.62であり、細胞の形は同等であった。スイカにおいて、果皮の硬さと果皮組織柔細胞の大きさは負の相関があり、物理的な衝撃により裂果しやすい品種の果皮組織は、表皮下の緑色組織および柔組織の細胞が大きく、形が長楕円型であることが報告されている¹⁰⁾。ヘタ離れ性品種の柔組織上部は、‘宝交早生’と比較して、細胞の形は同様であるが大きい柔組織細胞を持つため、物理的に裂果が起こりやすい果実である可能性が考えられた。

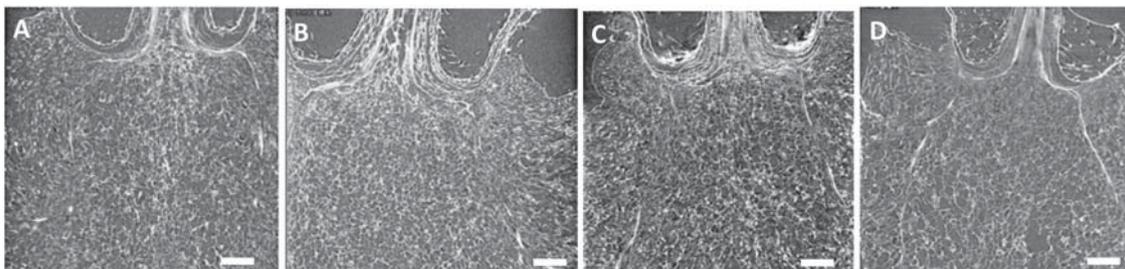


図8 高解像度画像による細胞壁の様子

A: ‘ベニヒバリ’, B: ‘宝交早生’, C: ‘マーシャル’, D: ‘桃薫’の組織構造
焦点距離：50 mm, スケールバー：0.8 mm

表2 X線CT画像解析による柔組織細胞測定結果

	品種	細胞数 (個)	細胞面積 (μm^2)	細胞密度 (個/ mm^2)	長径 (μm)	短径 (μm)	真円度
上部	ベニヒバリ	5,970	7,306.1 * ($\pm 6,054.5$)	47.4	122.1 (± 43.0)	70.5 (± 25.1)	0.60
	マーシャル	4,839	7,791.6 * ($\pm 5,550.2$)	44.8	126.0 (± 43.4)	72.9 (± 28.6)	0.60
	桃薫	3,534	8,977.8 * ($\pm 6,336.0$)	45.3	133.3 (± 45.8)	79.1 (± 28.6)	0.61
	宝交早生	5,061	5,642.2 * ($\pm 2,979.3$)	52.7	110.5 (± 32.1)	62.8 (± 18.4)	0.59
下部	ベニヒバリ	5,858	9,259.2 * ($\pm 6,954.1$)	46.5	136.7 (± 49.9)	79.1 (± 29.7)	0.60
	マーシャル	4,487	10,836.1 * ($\pm 8,226.3$)	41.6	145.4 (± 55.1)	85.7 (± 33.7)	0.61
	桃薫	2,865	12,123.5 * ($\pm 9,038.0$)	39.8	151.1 (± 55.6)	92.0 (± 36.1)	0.62
	宝交早生	4,997	8807.0 * (± 5967.3)	52.1	133.3 (± 46.6)	78.0 (± 27.7)	0.61

* : 有意水準 1 % で有意差有り

近距離撮影による高解像度画像を用いて、細胞壁の大きさを測定した。柔組織上部の(萼部直下細胞から1-2 mm)の高さ1 mm, 幅2 mmの領域を測定領域とした。測定領域中に含まれる全細胞の細胞壁面積値を求め、その値を細胞数で割ることにより1細胞辺りの平均細胞壁面積を求めたところ、ヘタ離れ性品種の細胞壁面積は、'宝交早生'のそれより小さかった(図8, 表3)。この結果より、ヘタ離れ性品種の細胞壁は薄いことが示唆された。イネのカマイラズ変異体は、セルロース合成量が低下したため細胞壁の厚さが低下し、弱い力でも茎が折れて千切れてしまう表現型を示す¹¹⁾。ヘタ離れ性品種の細胞壁も薄いため、カマイラズ変異体と似た特徴を有していることが考えられた。

'ベニヒバリ'のヘタ部では、セルロース含量が'宝交早生'の約1.4倍に増加しており、より厚い細胞壁が形成されていることが考えられたが、逆の傾向が観察された。本研究の発現量解析に用いたイチゴCESA遺伝子は、*Arabidopsis thaliana*のCESA遺伝子中では、CESA3(*AtCESA3*)に最も類似性が高い遺伝子であった。*AtCESA3*は、細胞壁の中でも一次壁のセルロース合成に関与していることが報告されており、本研究で解析したイチゴCESA遺伝子も一次壁への寄与が高い遺伝子であった可能性が高い¹²⁾。細胞壁は一次壁と二次壁で構成されており、一次壁は、細胞の伸長や分裂時に堆積されるものであり、二次壁は、細胞伸長が終了し形が定まった後に堆積され、積層、肥厚化していくものである。本研究で測定した細胞壁面積は、二次壁であったため、遺伝子発現解析結果と異なる傾向を示したと考えている。また、今回のセルロース測定では、セルロースとヘミセルロースを合わせたホロセルロースをセルロース含量として測定しているため、増加しているのはヘミセルロースだけであることも考えられた。上記のカマイラズ変異体では、減少したセルロース量を補償す

るため、ヘミセルロース含量が増加していることが報告されている¹¹⁾。'ベニヒバリ'では、ヘミセルロース合成タンパク質であるUXSの蓄積量も増加しており、今後は、セルロースとヘミセルロースを区別して測定する必要がある。

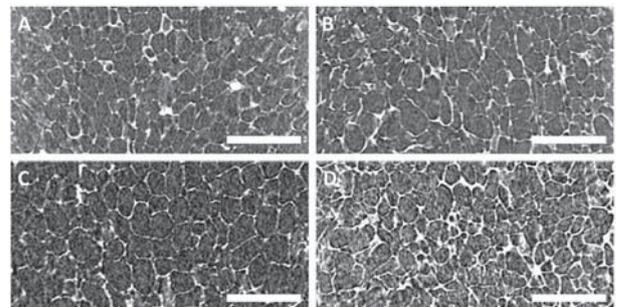


図8 高解像度画像による細胞壁の様子

A : ベニヒバリ, B : マーシャル, C : 桃薫, D : 宝交早生
各品種とも柔組織上部を示している
焦点距離 : 20 mm, スケールバー : 0.5 mm

表3 細胞壁面積測定結果

品種	細胞数 (個)	平均細胞壁面積 (μm^2 /個)
ベニヒバリ	718	1936.4 (± 530.0) ^a
マーシャル	689	1899.1 (± 260.9) ^b
桃薫	695	1955.4 (± 325.7) ^c
宝交早生	547	2517.5 (± 293.5) ^{abc}

a, b, c : 有意水準 5 % で有意差有り

X線CTスキャン装置を用いて、イチゴ果実内部の組織構造を観察した。X線CT装置での果実観察例は少なく、モ

モとリングで報告されているのみであったが、イチゴ果実においても撮影可能であった¹³⁾。X線CT装置では、撮影時に装置と干渉してしまう部位を切除するだけで内部構造が観察可能であり、従来の光学顕微鏡での組織構造観察に必要な観察用切片の作成技術が不要であるため、非常に効率的な観察方法であると考えられた。ヘタ離れ性の異なるイチゴ品種のヘタ部組織観察から、ヘタ離れ性品種の細胞は、細胞質は大きく、細胞壁が薄い構造であるため力学的に弱い細胞であることが推測された。

本研究では、ペクチン組成比の比較から、ヘタ離れ性品種の果実部・ヘタ部の水溶性ペクチンの割合差が大きいことを明らかにした。また、X線CTスキャン装置による組織構造観察から、ヘタ離れ性品種の細胞は大きく、細胞壁が薄いことを明らかにした。これらの特徴を合わせると、収穫時に果実部・ヘタ部の境界面に応力がかかりやすく、またその領域の細胞が力学的に弱いことから、細胞の破断を引き起こし、ヘタ離れが起こることが推察された。

文献

- 高橋 徹, 森 大蔵, 奥 正和, 後藤隆子, イチゴにおけるヘタ離れ性の遺伝子率, *東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書*, **24**, 9-17 (2002).
- 阿部竜也, 高橋 徹, プロテオーム解析によるイチゴヘタ離れ因子の探索 (2), *東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書*, **28**, 51-58 (2012).
- 水野由加里, 辻谷知子, 濱渦康範, 数種果実の細胞壁構成成分の特徴と食品機能性, *園学研*, **9**, 113-120 (2010).
- 伊藤弘一, 藤田 博, 平田恵子, 植松洋子, 鈴木公美, 飯田憲司, 斎藤和夫, 広門雅子, 安田和男, 天然保存料ペクチン分解物に関する衛星化学的研究, *東京衛研報*, **51**, 197-202 (2000).
- Peng M., Hudson H., Schofield A., Tsao R., Yang R., Gu H., Bi Y. M., Rothstein S. J., Adaptation of Arabidopsis to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene, *J. Exp. Bot.*, **59**, 2933-2944 (2008).
- 松下洋一, 菅本和寛, 日高健一, 松井隆尚, スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) 辺材およびその構成成分から調製した木酢液の分析, *日化*, **3**, 385-391 (2002).
- Taylor N. G., Scheible W., Cotler S., Somerville C. R., Turner S. R., The irregular xylem3 locus of arabidopsis encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis, *The Plant Cell*, **11**, 769-779 (1999).
- Kim S. J., Kim M. R., Bedgar D. R., Moinuddin S. G. A., Cardenas C. L., Davin L. B., Kang C.H., Lewis N. G., Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) multigene family in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 1455-1460 (2004).
- 保尊隆享, 微小重力環境における植物の成長と形態形成, *植物の化学調節*, **34**, 226-235 (1999).
- 杉山慶太, 菅野紹雄, 森下昌三, 岩永喜裕, スイカにおける果実の硬さと組織・細胞の構造, *園学雑*, 108-116, (1999).
- Kotake T., Aohara T., Hirano K., Sato A., Kaneko Y., Tsumuraya Y., Takatsuji H., Kawasaki S. Rice brittle culm 6 encodes a dominant-negative form of CesA protein that perturbs cellulose synthesis in secondary cell walls: *J. Exp. Bot.*, **62**, 2053-2062 (2011).
- 西谷和彦, 植物細胞壁の構造と機能 —比較ゲノムからのアプローチ—, *植物の生長調節*, **41**, 1-11 (2006).
- 小川雄一, 近藤 直, 澁澤 栄, X線CTによる果実の内部品質評価, *植物環境工学*, **17**, 75-83 (2005).