

PRESS RELEASE

令和3年8月6日
愛媛大学
農研機構
ブエノスアイレス大学1 細胞分析から、膨圧変化に伴う蜜入りリンゴの
新たな代謝メカニズムが明らかに！

| 概要

愛媛大学大学院農学研究科 和田博史教授、野並浩名誉教授、畠山友翔研究員、愛媛大学大学院連合農学研究科博士課程 中田佳佑、農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）基盤技術研究本部 高度分析研究センター 環境化学物質分析ユニット 田中福代ユニット長、同果樹茶業研究部門 果樹生産研究領域 果樹スマート生産グループ 立木美保上級研究員、ブエノスアイレス大学有機化学科・国家科学技術研究会議（CONICET）のロザ エラ・バルセルス教授の研究グループが、蜜入りリンゴ果実内の細胞レベルの代謝変化・水分の状態を空間的にとらえることに世界で初めて成功し、蜜入りのメカニズムの一端を明らかにしました。本研究成果は、2021年8月4日（水）に Springer Nature Group と南京農業大学が共同刊行する園芸学専門の学術誌「Horticulture Research」の電子版で公表されました。なお、本研究は、JSPS 科研費（20H02982 および 19J13330）の支援を受けて行われました。

| 発表雑誌

掲載誌：Horticulture Research

DOI 番号：10.1038/s41438-021-00603-1

題名：Direct evidence for dynamics of cell heterogeneity in watercored apples: Turgor-associated metabolic modifications and within-fruit water potential gradient unveiled by single-cell analyses

著者：和田博史^{1,2,*}, 中田佳佑^{2,†}, 野並浩¹, ロザ エラ・バルセルス³, 立木美保⁴, 畠山友翔¹, 田中福代^{5,*}¹ 愛媛大学大学院農学研究科² 愛媛大学大学院連合農学研究科³ ブエノスアイレス大学有機化学科・国家科学技術研究会議（CONICET）⁴ 農研機構 果樹茶業研究部門 果樹生産研究領域果樹スマート生産グループ⁵ 農研機構 基盤技術研究本部 高度分析研究センター 環境化学物質分析ユニット

*責任著者 †共同筆頭著者

論文 URL：https://doi.org/10.1038/s41438-021-00603-1

| 問い合わせ先

国立大学法人 愛媛大学 大学院農学研究科 食料生産学科 植物工場システム学コース
植物細胞システム計測学 教授 和田 博史（わだ ひろし）

Tel: 089-946-9824

Fax: 089-946-9867

Email: hwada@agr.ehime-u.ac.jp

国立研究開発法人 農研機構 高度分析研究センター

環境化学物質分析ユニット ユニット長 田中 福代（たなか ふくよ）

Tel: 029-838-7351

FAX : 029-838-7352

Email: fukuyot@affrc.go.jp

ポイント

- ・通常果とは対照的に、蜜果の外側の非蜜部分から内側の蜜部分にかけて、空間的に細胞膨圧（注1）が低下し、これに連動して蜜部分に向かって水の流れが生じている。
- ・膨圧低下に伴い、蜜部分で特異的に発酵代謝が進み、蜜独特の芳醇な香り成分である揮発性化合物が高濃度に蓄積している。
- ・これら部位特異的な反応により、蜜部分では本来細胞壁空間にあるべき空気層が消失し、水・揮発性物質が蓄積した結果、光の乱反射が起きず、外観上透明化する。
- ・本成果は、温暖化環境下での蜜入りリンゴの安定生産技術の開発につながる基礎知見である。

研究の背景と経緯

品種「ふじ」に代表される蜜入りリンゴは一般的には低温により蜜形成が誘導され、蜜入りリンゴは香しいフレーバーをもつ高付加価値果実として国内外で人気を博しています。しかし、温暖化に伴う秋の気温上昇から、果実内の蜜入りの不安定化が懸念されています。

蜜入りリンゴのメカニズムについては、果実内の細胞間隙への転流糖であるソルビトールの集積や、成熟に伴う細胞膜強度の低下を介する溶質蓄積に起因した水分の集積など、いくつかのメカニズムが提唱されてきました。しかし、これまで細胞レベルで水の動きと生理代謝に注目してそれらを同時に調べられた事例はなく、蜜部分において何が起こっているかは明らかにはなっていませんでした。

研究の内容

今回の実験では、蜜果と通常の果実を用いて、愛媛大学で開発された1細胞の水の動きと網羅的な代謝産物の同時計測が可能なピコリットル・プレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析法（注2）とともに、原理の異なる2つの浸透圧計測法（凝固点降下法（注3）、蒸気圧法（注4））を組み合わせることで解析を行いました。その結果、蜜果では通常の果実とは対照的な水分の動き・代謝の変化が起こり、それが原因となって蜜独特の香り・外観を持つに至っていることが明らかとなりました。

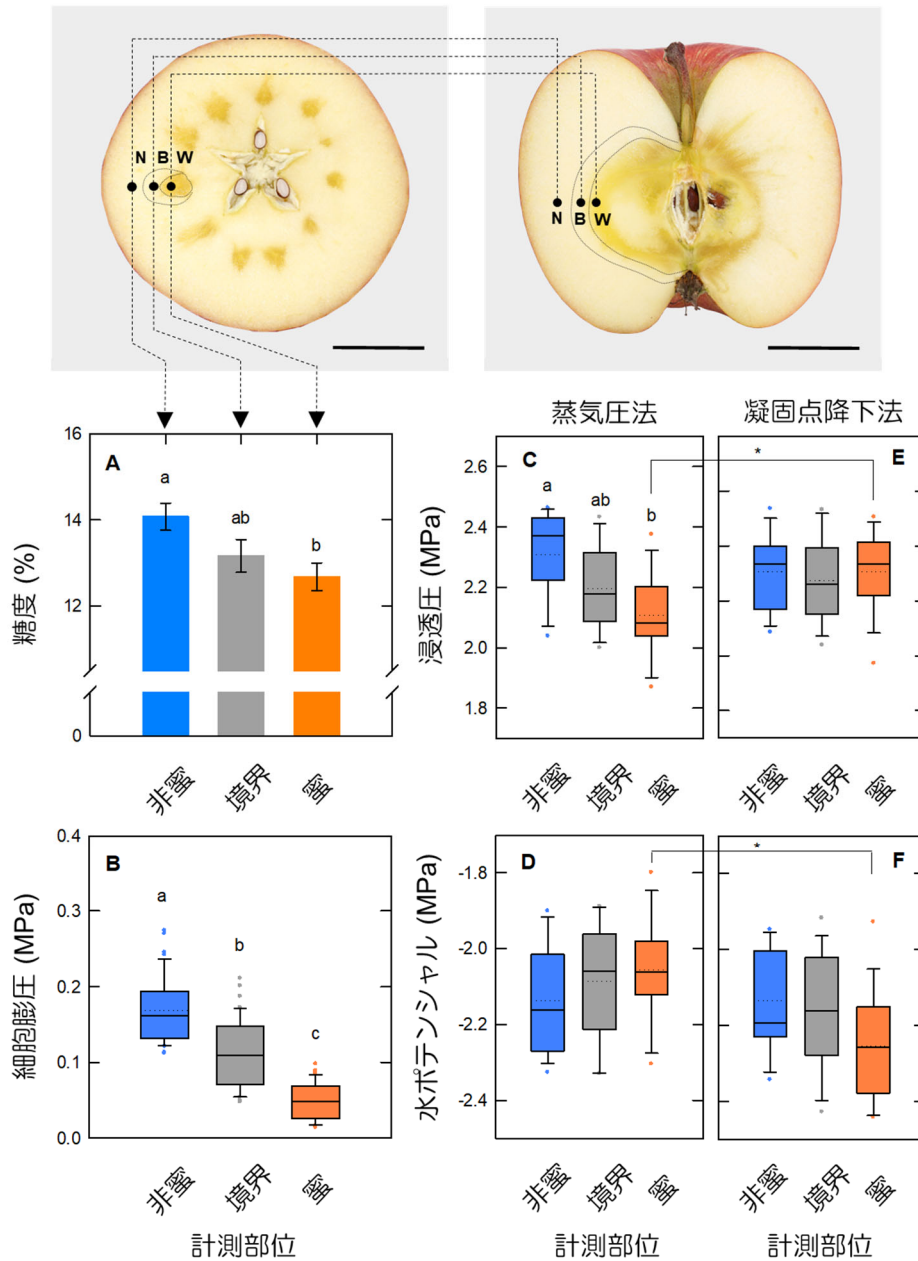


図 1. 蜜果リンゴの各計測部位（非蜜，境界，蜜部位）の水分状態計測
 図中の異なるアルファベット、星印は有意差があることを示す。

細胞レベルの詳細な解析から、蜜果の蜜部分では糖度が低く、細胞の膨圧が特異的に低く維持されていました（図 1 A&B）。また、膨圧低下に関連し、細胞内で発酵代謝が顕著に促進され、蜜の部分からその境界にかけて、アルコール類を主成分とする揮発性物質が高濃度に集積していることが明らかとなりました（図 2）。さらに、水の動きを示す水ポテンシャル（注 5）を求めたところ、外側の非蜜部分から内側の蜜部分に向かって水の流れが生じていることが強く示唆されました（図 1 E&F, 図 4）。

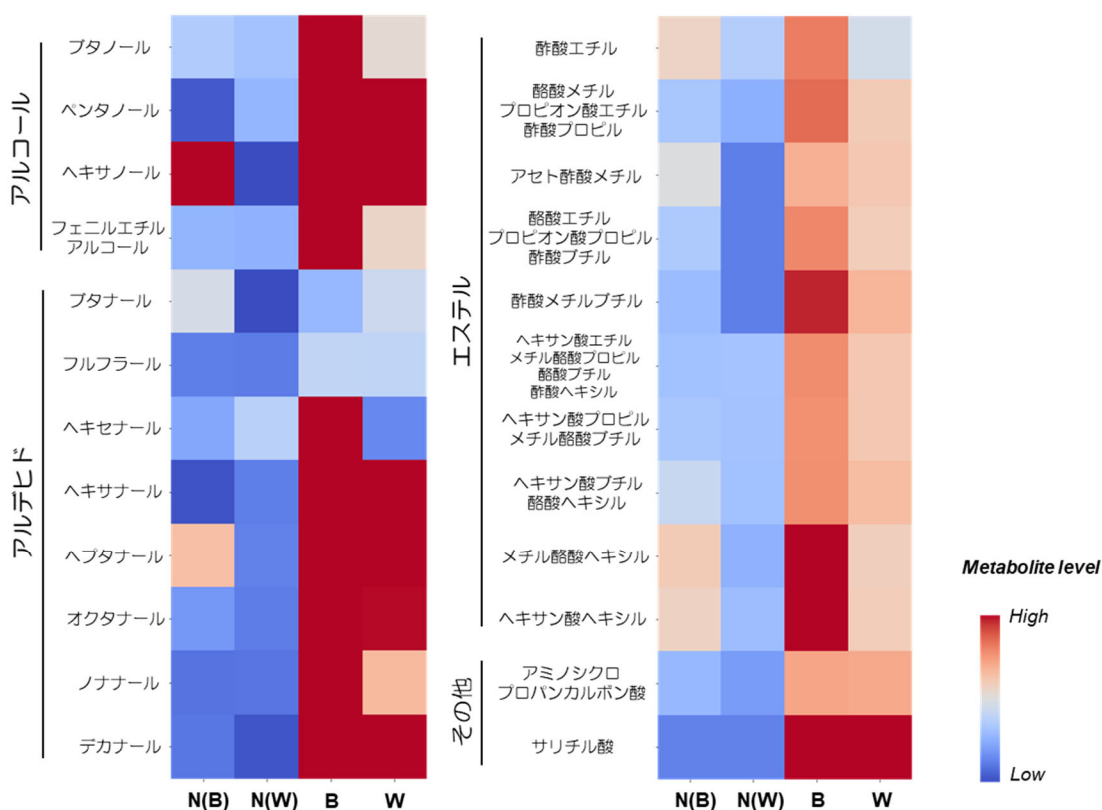


図 2. 非蜜果の各細胞（境界部(N(B))と蜜部(N(W))に相当する 2 領域）と蜜果の各細胞（境界部(B), 蜜部(W)）におけるヒートマップを用いた揮発性代謝物の比較

本研究では 2 つの原理の異なる浸透圧計を用いました。蒸気圧測定法は試料液中の不揮発性化合物のみの浸透圧を求めることができ、アルコールのような揮発性化合物の浸透圧は検出できません。一方、凝固点降下法は揮発性化合物を含むすべての溶質の浸透圧を検出できます。これまで、植物生理学の分野でこの違いに留意して研究された事例はありませんでした。特に、蜜形成に関する過去の研究において、浸透圧計測は蒸気圧法を用いて行われることが多く、蜜部位の浸透圧が過小評価されていた可能性があります。

そこで、2 つの浸透圧計を併用して、人為的にリンゴ果汁にアルコールの主成分であるエタノールのモル濃度が 50、100、150、200 mM になるように調整したモデル果汁液を用い、蒸気圧法による見かけの浸透圧と凝固点降下法による実際の浸透圧を測定、比較しています。蒸気圧法で求めた浸透圧は、エタノール濃度に関わらず、測定した範囲で浸透圧は同じ値でしたが、凝固点降下法で求めた浸透圧はエタノールの体積モル濃度と高い相関を示しました（図 3）。この結果から、揮発性物質の濃度が無視できない試料では、浸透圧測定値にずれが生じることが示されました。図 1 D&F に示した細胞の水分状態と水の流れの方向性を示す水ポテンシャルの値は、2 つの浸透圧計の結果を踏まえ、見かけ上と実際の水ポテンシャルとして、求められています。図 1 F に示すように、凝固点降下法による浸透圧計測を行ったことで、果実内の蜜部分に流れる真の水の流れを見出しています。

非蜜部分では細胞壁空間に空気層が残っているため果実の外観が不透明になっています。これに対して、蜜部分では上述のメカニズム（揮発性物質の細胞壁空間への蓄積と細胞壁を通る水の流れ）で空気層がなくなり、細胞壁空間にアルコール・水がたまった結果、光が乱反射せず、外観上、切断面が透明化することが明らかになりました（図4）。

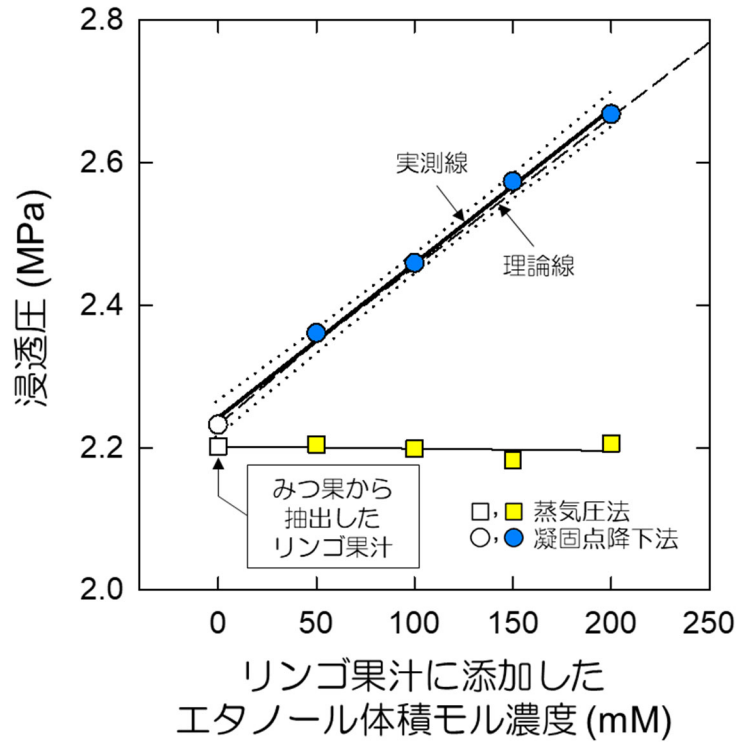


図3. リンゴ果汁に人為的に添加したエタノールの体積モル濃度に対する蒸気圧法および凝固点降下法で決定した溶液の浸透圧

今後の展開

本研究は、水の動き・代謝の同時計測という最新の1細胞計測技術を実際の果樹生産現場の課題である蜜入りリンゴの機構解明に応用し、その機構の一端を明らかにしました。本知見は温暖化環境下での蜜入りリンゴ安定生産のための技術開発につながる基礎的な知見です。今後、細胞の膨圧と発酵代謝の関係性に注目しながら、蜜形成に至る経時変化など、更なる研究データの蓄積が必要になります。

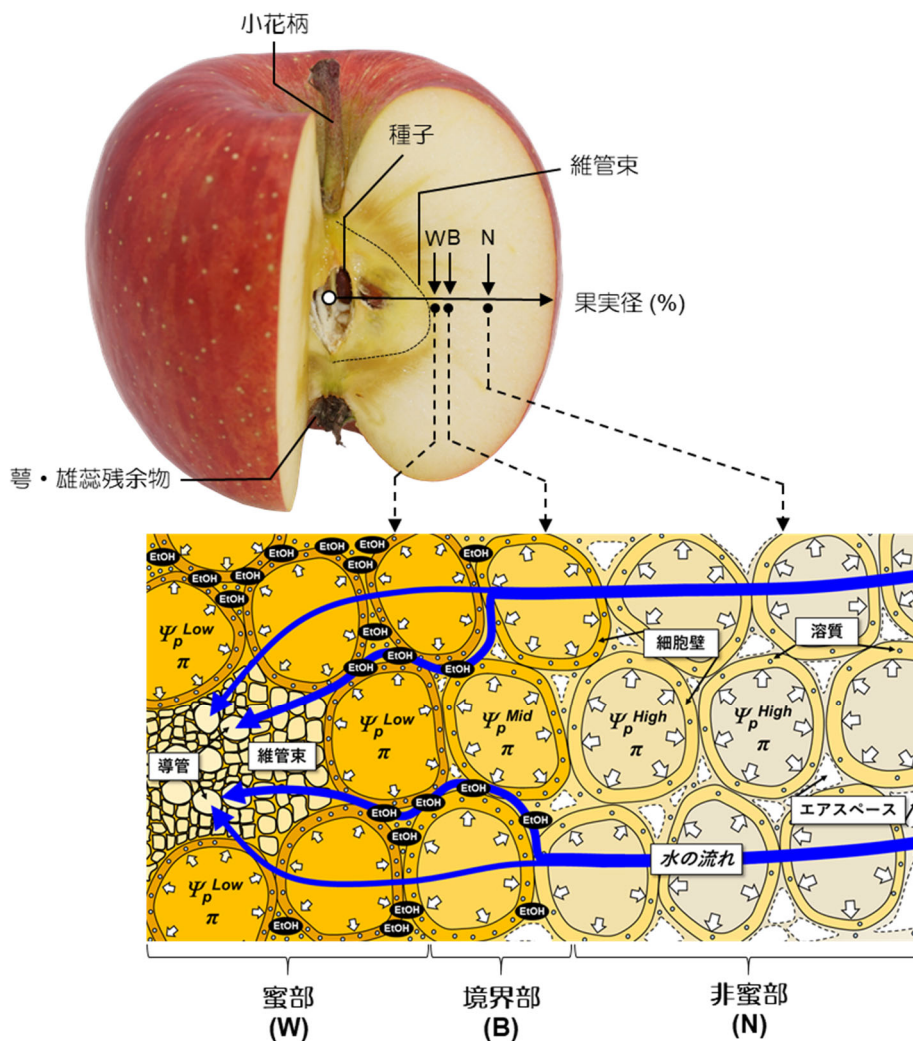


図 4 . 蜜症発生に伴うリンゴ果実内の細胞の膨圧の分布と水の流れ

Ψ_p は細胞膨圧、 π は浸透圧、VBは維管束、Xyは導管、EtOHはエタノール、青線は水の流れを示す。図中の細胞の膨圧 (Ψ_p) の上付き文字、Low、Mid、Highは膨圧の大きさを示し、凝固点降下法で測定した浸透圧には部位間で差がないものの、膨圧については「蜜部位<境界部<正常部位」の傾向があり、外側から蜜部位にかけて水の流れがあることを示す（本文参照）。

用語解説

注 1 細胞膨圧

植物の細胞において細胞壁に対して働く力（圧力）である。細胞膨圧は細胞拡大、気孔制御、果実軟化、代謝活性の維持等に密接に関わる生理学的に重要なパラメーターである。プレッシャープローブ計測では、シリコンオイルが充填されたキャピラリーの先端を1植物細胞に突き刺すことで、細胞の膨圧を計測することができる。

注2 ピコリットル・プレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析法

1 植物細胞における非破壊水分状態(膨圧)計測器であるプレッシャープローブと高感度かつ高精度な代謝プロファイリングが可能なエレクトロスプレーイオン化オービトラップ質量分析計を組み合わせた**1細胞生体計測法**である。プレッシャープローブを用いると、**植物細胞の水分状態を計測後、代謝産物を含むピコリットルレベルの超微量の細胞溶液を試料として採取することができる**。この採取した細胞溶液に高電圧を直接印加することにより、前処理の必要なく**リアルタイムに直接代謝産物分析**できる。本手法は愛媛大学の当グループで開発された手法（下記文献参照）である。

注3 凝固点降下法による溶液の浸透圧計測

希薄溶液の束一的性質のひとつである凝固点降下（試料溶液の凝固点降下度は重量モル濃度の総和に比例）に基づき、プレッシャープローブで採取した植物細胞溶液を凍結・解凍し、溶液中に含まれる**すべての溶質（不揮発性化合物+揮発性化合物）**を対象にその凝固点を計測することで浸透圧を求めることができる。本研究では計測器として、**ナノリッター浸透圧計**を用いた。

注4 蒸気圧法による溶液の浸透圧計測

希薄溶液の束一的性質のひとつである蒸気圧降下（試料溶液中の**不揮発性の溶質**のみの濃度に比例して、相平衡に達した際の気相の水蒸気圧が減少する性質；ラウールの法則）に基づき、定温定圧条件下で気相中の水蒸気分圧（湿度）を計測することにより浸透圧を求めることができる。本研究では計測器として、**等圧式サイクロメーター**を用いた。

注5 水ポテンシャル

水ポテンシャルは植物の水分の状態を示す指標として植物生理学分野で計測されるパラメーターである。水の化学ポテンシャルを水の部分モル体積で割った、水が持つエネルギー量を示し、純水を基準として、どれだけエネルギー的な化学ポテンシャル差があるかを量的に示すことができる。**植物細胞の水ポテンシャルは膨圧から浸透圧を差し引くことで求まり、値はマイナスの符号のついた負の圧力値として示される。**

参考文献

Nakashima, T. *et al.* Single-cell metabolite profiling of stalk and glandular cells of intact trichomes with internal electrode capillary pressure probe electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **88**, 3049-3057, doi:10.1021/acs.analchem.5b03366 (2016).