

平成21年 6月 5日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580037
 研究課題名（和文）ブドウ果実の成熟過程における果実軟化機構の分子細胞生物学的アプローチ
 研究課題名（英文）Molecular and cellular approach for fruit softening on grape berries during fruit development and maturation.
 研究代表者
 石丸 恵（ISHIMARU MEGUMI）
 大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教
 研究者番号：90326281

研究成果の概要：本研究は、ブドウ果実の成熟過程に起こる急速な軟化現象を細胞壁構造と細胞壁分解酵素遺伝子の発現から明らかにしようと試みたものである。その結果、ブドウ果実の内部の組織の違いにより軟化過程の速度もしくは構造変化が異なること、ベレゾーン期の急速な軟化は細胞壁のヘミセルロース、特にキシログルカンの低分子化によって起こるのであることが明らかとなった。今後組換えタンパクなどを用いて詳細に調査する必要がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：園芸利用

1. 研究開始当初の背景

果実の軟化に関する研究報告は数多いため、ブドウ果実についてまとめると、Silacci and Morri son(1990)は、ベレゾーン後の果実の軟化はペクチン質の可溶化に関係していると報告し、成熟果実の細胞壁成分の中でセルロースとペクチンの割合が30～40%を占めていることも明らかにされた(Nunanら, 1997)。さらにNunanら(1998)は、成熟果実の軟化において、タイプIのアラビノガラクトンが顕著な変化を示したことを報告している。その後、Yakushi jiら(2001)がブ

ドウ‘巨峰’果実を用いて、ベレゾーン期の果実軟化はヘミセルロース画分中のキシログルカンの低分子化によるものであることを明らかにした。そして、Ishimaru and Kobayashi(2002)は、ベレゾーン期に特異的に発現する遺伝子群をサブトラクション法によりライブラリー化し、その中で7種の細胞壁分解関連酵素タンパクの発現を調査したところ、キシログルカン・エンドトランスグリコシラーゼ(XET)がベレゾーン期に急激に発現することを明らかにし、Yakushi jiら(2001)の報告を遺伝子発現レベルで

裏付けした形となった。これらの結果からブドウ‘巨峰’果実のベレゾーン期に起こる果実軟化はヘミセルロース画分中のキシログルカンが低分子化または構造の変化に起因すると考えられ、これまでペクチンの分解によると考えられていたベレゾーン期の軟化とは異なる独創的で特色ある結果を出している。ここで、Ishimaru and Kobayashi(2002)が単離したXETは近年、キシログルカンハイドロラーゼとも考えられているが、明確な結論は出ていない。Saladie et al. (2006)

はトマト果実からXET遺伝子を単離し、組換えタンパクを産生する事に成功しているが、果実軟化に深く関与しているものではなく、XETのなかでも加水分解酵素活性を有するものもあることを明らかにしたにすぎない。

また、石丸らは果実内部組織の違いにより硬度低下の程度が異なることを見出しており、ブドウ果実のベレゾーン期の軟化が果実中のどの部分から始まり、どのように果実全体に広がっていくかということをも明らかにする基礎的知見となりうる。

2. 研究の目的

ブドウ果実の生長は、核果類やカキなどと同様に2重S字曲線を描き(中川, 1965), 果実の肥大期は3期に分かれる。まず、開花期以降の急速に果実肥大が見られる時期を第1期、途中の肥大停滞期を第2期、再び肥大して成熟するまでの期間を第3期と呼ぶ。第2期から第3期の境界を「ベレゾーン」と呼び、果実の軟化、減酸・増糖および着色が短期間に始まり成熟へと向かうブドウ果実特有の成熟の転換点の時期である。この時期の果実軟化は「水まわり」とも呼ばれ、硬い果肉から急激に水分がまわりはじめ、可食可能な状態となる。ベレゾーンは環境要因や植物ホルモンの作用によって制御されていると考えられているが、未解明な点が多い。このベレゾーンがどのようにして始まるのかを解明することにより、人為的にベレゾーンを制御しブドウ果実の熟期調節が可能になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 成熟過程における果実内部別細胞壁構成成分の構造変化

ブドウ果実は、その内部構造が果皮、外壁(果皮から周辺維管束)、内壁(維管束から胎座まで)、胎座組織からなっている。これ

までのブドウ果実の成熟に関する報告は一果粒の果実全体を捉えたものばかりであり、果実内部を部位別に調査し、一果粒内の成熟進行過程を調査した報告はない。また、伴ら(2006)は、ベレゾーン期の果実のMRIによる画像から、果実の内部構造が、まず維管束環から外壁の部分にかけて変化することを確認した(発表予定)。また、石丸ら(未発表)はベレゾーン期の軟化過程で内壁と外壁で硬度低下の程度が異なることを確認した。そこで、19年度はブドウ果実を外壁、内壁、胎座の3部位に分けて成熟段階ごとの細胞壁構成多糖類の構成変化を調査する。

(2) 細胞壁分解関連酵素遺伝子の発現解析および組換え酵素タンパクの産生

ブドウ‘巨峰’果実においてすでにベレゾーン期に特異的に発現する7種の細胞壁分解関連酵素遺伝子を単離しており、上述の項目と同様に果実を3部位に分け、これら7種の遺伝子についてRT-PCR法などにより発現解析を行う。

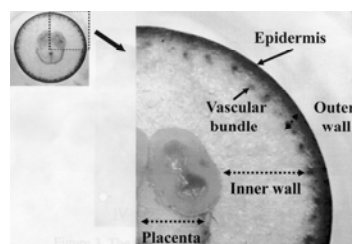
(3) ベレゾーン期の果実内組織の構造変化を可視化する

上述の1. 果実内部別細胞壁構成多糖類の構造変化で述べたように、ベレゾーン期の果実をMRIにより画像化したところ、維管束環から外壁の部分にかけて組織構造が変化し始めることを明らかにしている(伴ら, 発表予定)。そこで、ここでは組織の構造変化をさらに解析するため、経時的に外観および内部の写真撮影、*in situ*ハイブリダイゼーション法や、tissue print immunoblot法のための遺伝子、酵素タンパクの準備をはじめ。

4. 研究成果

(1) 成熟過程における果実内部別細胞壁構成成分の構造変化

ブドウ‘巨峰’果実は、第1図のように内壁、外壁、果皮に構造がわかえており、それぞれの部位で硬度、糖含量が異なっていた。



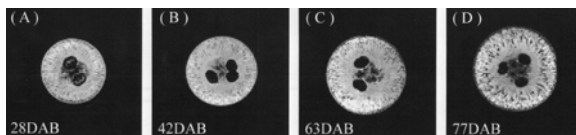
第1図 ブドウ‘巨峰’果実内の構造

内壁・外壁における可溶性固形物の含量は、ベレゾーン期において9.9, 11.0とわずかに外壁のほうが多かったが、成熟果実においてはどちらも25.5前後となり、内壁・外壁の差は見られなかった。

次に硬度を見てみると、未熟果実においては、内壁は外壁に比べ硬度が高く、約1.5倍程度の硬度差があった。ベレゾーン期には急激に減少し、成熟期になると逆に内壁より外壁のほうが硬度が高くなった。

内壁と外壁の糖成分の変化をフルクトース、グルコース、スクロースの量を測定し統計処理を行った。その結果、いずれの糖においても内壁より外壁の糖含量が高いということが明らかとなった。

硬度と糖含量の変化から果実内部の水分動態が内壁と外壁においては異なっていると考えられたため、MRI (Magnetic resonance imaging) をもちいて画像により判断を行った (第2図)。



第2図 巨峰果実のMRI画像
左より 開花後28日, 42日 (ベレゾーン), 63日, 77日 (成熟)

MRIの画像によると内壁より外壁のほうが早くに水分が回り始め、成熟果実においては維管束帯より外側の構造部分でより多くの水分が存在することが明らかとなった。これは内壁と外壁の糖含量の相違と一致していたが、細胞壁構造から考えると外壁のほうが硬度が高く、細胞壁構成糖の分解による糖含量の差ではないと思われた。

以上の結果から果実内部の部位によっても硬度、糖含量が異なり、さらに糖含量と硬度には関係がなく、細胞壁の構造を詳細に検討する必要がある。

(2) 細胞壁分解関連酵素遺伝子の発現解析および組換え酵素タンパクの産生

サブトラクトライブラリーから得られた7種類の細胞壁分解酵素遺伝子の発現を解析したところ、ベレゾーン期に急激な発現パターンを示したエクспанシンホモログについてcDNAライブラリーからスクリーニングを行った。

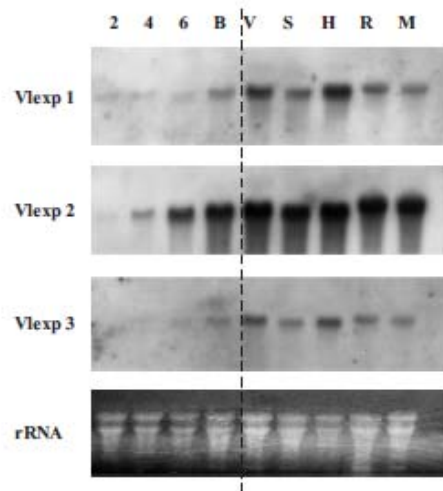
第1表 ‘巨峰’ cDNAライブラリーから単離したエクспанシン遺伝子のデータ

	Full length (bp)	ORF (amino acid)	M.W. (kDa)	pI	DBJ accession number
Vlexp-1	1245	246	26.42	9.15	AB104442
Vlexp-2	1280	252	26.72	8.02	AB104443
Vlexp-3	1175	252	26.86	7.46	AB104445

The theoretical molecular mass and pI were calculated using the ExPASy program.

第1表のように3種のエクспанシン遺伝子 (*Vlexp-1*, *Vlexp-2*, *Vlexp-3*) を単離した。アミノ酸配列から系統樹を作成したところ、エクспанシンは4つのグループに分けることができた。*Vlexp-2*と*Vlexp-3*はグループBで、成熟果実から単離された遺伝子群のグループに属していた。また*Vlexp-1*はグループCで、未熟果実、花、芽から単離された遺伝子群のグループに属していた。

次に発現解析をおこなった。



第3図 エクспанシン遺伝子の‘巨峰’果実の発育過程における遺伝子発現パターン

第3図のように、*Vlexp-1*と*Vlexp-3*がベレゾーン期から急激に発現が強くなっていることが明らかとなった。また、組織別の発現についても調査したところ、*Vlexp-1*は葉、巻きひげ、花で発現しており、*Vlexp-2*は葉、巻きひげ、根、花、種子のすべてにおいて発現が確認された。*Vlexp-3*は果実のみで発現しており、果実特異的エクспанシン遺伝子であることが明らかとなった。つまり、ブドウ‘巨峰’果実のベレゾーン期の軟化には*Vlexp-3*が深く関与していると考えられる。

次に、既に単離したVXET1について組換えタンパクを産生するため発現系の構築を行った。その結果、大腸菌系 (pET 15b, pET 23b) を用い、さらに宿主大腸菌系統を数種類変えて発現を試みたが、組換えタンパクの産生は確認できなかった。

さらに、酵母系 (*Pichia*) において発現を

試みたが、産生は確認できなかった。そこで、無細胞系を用いて産生を試みた。その結果、アミノ酸配列から推定される 53kDa 付近にタンパク質のバンドが確認され、組換えタンパクの産生に成功した。しかし得られた組換えタンパクは酵素活性を有しておらず、次の抗体作成に供試できるものではなかった。

さらに、大腸菌系で近年分子シャペロンとの共発現により可溶画分に酵素活性を有するタンパクが産生可能であるという報告がある。そこで、VXET1 についても同様にシャペロンとの共発現を試みた。しかし、活性を有する組換えタンパクの産生は確認できなかった。

植物細胞壁分解酵素の組換えタンパクの産生はこれまでに数例しか報告がなく、いずれも酵母系において成功している。そこで、今後さらに検討する必要がある。

(3) ベレゾーン期の果実内組織の構造変化を可視化する

in situ ハイブリダイゼーション法や、tissue print immunoblot 法のため、単離した遺伝子や組換えタンパクの産生をめざしたが、上述したように種々の組換えタンパク発現系を試みても産生はできなかった。

in situ ハイブリダイゼーション法については、現在進行中であり、結果が得られる予定。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1.Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries.

Ishimaru, M., David L. Smith, Kenneth C. Gross, Kobayashi, S.

Journal of Plant Physiology 164: 1675-1682 (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石丸 恵 (Megumi ISHIMARU)

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・助教

90326281