

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580040

研究課題名（和文） リンゴ果実の肉質形成とくに粉質化に関与する遺伝子群の解析

研究課題名（英文） Analysis of cell wall hydrolase genes involving to apple mealy texture

研究代表者

立石 亮 (TATEISHI AKIRA)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：30267041

研究成果の概要（和文）：粉質化を示したリンゴ果実から RNA の抽出を行った。RNA 抽出では多糖類の混入が問題であった。粉質化に α -アラビノフラノシダーゼと推定される酵素が関わっていると報告された。 α -アラビノフラノシダーゼ遺伝子を植物培養細胞に導入、発現させ、活性を持つタンパク質の誘導に成功した。人工基質ならびに生体基質（多糖類基質）の両方を用いてリコンビナントタンパク質の基質特異性を示した。

研究成果の概要（英文）：Total RNA was isolated from apple fruit, which showing mealy texture. Substantial amount of polysaccharides was contained in the RNA sample. A putative α -L-arabinofuranosidase gene associated with mealy apple was reported. Substrate specificities of α -L-arabinofuranosidases expressed in plant cultured cells were shown.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：多糖類、果実の軟化、細胞壁

1. 研究開始当初の背景

植物細胞を取り囲む細胞壁は植物の生長や分化あるいはその形を決定づけるという重要な役割の他に、果実においては、特有の肉質を形成し、過熟時においてはその構造変化により著しい品質の低下をもたらす原因となる。細胞壁の構造変化は構成多糖類の合成と分解のバランスの上に成り立ち、それには数多くの細胞壁代謝関連酵素が関与している。これまでの研究では、機械的強度の低下、すなわち果実の軟化と一部の酵素との関

係については明らかにされつつあるが、軟化現象と並行して起こる肉質の変化については、経験的にあるいは感覚的にはとらえられているものの、その形成メカニズムはよくわかっていない。

リンゴは軟化時に細胞壁を構成するペクチンの低分子化がみられず、可溶性のみが観察される。これにはグリコシダーゼ類(酵素の一種)の関与が示唆されている。軟化に伴って粉質性を示すリンゴでは、成熟時にペクチンを構成するアラビノースという糖の一種が

減少することから、この消失が粉質性に関与していると示唆されている。*Cnr* と呼ばれるトマトの成熟変異体では、軟化等の成熟現象が抑制されており、同時に果肉が粉質性を示す。このトマトではふつうのトマトに比べ、セルロースに強固に結合した形でアラビノースが存在することが示されている。また、培養細胞がカルスを形成する際に、その細胞同士の接着性にペクチンを構成するアラビノースの存在が重要であるとの知見が得られている。これらの結果はまだ限定的なものであるが、軟化に伴う細胞壁多糖類の構造変化のうち、多糖類間あるいは細胞間の接着性が粉質性に関与していることを示すものである。また、多糖類の強い結合は細胞壁そのものの機械的強度にも貢献している可能性がある。

2. 研究の目的

これまでの研究では、機械的強度の低下、すなわち果実の軟化と一部の酵素との関係については明らかにされつつあるが、軟化現象と並行して起こる肉質の変化については、経験的あるいは感覚的にはとらえられているものの、その形成メカニズムはよくわかっていない。細胞壁を構成する多糖類構造は非常に複雑で、個々の構成糖の分析は行われているものの、多糖類同士の結合やネットワークは未知の部分が多い。どのような酵素がどのようなタイミングで作用すると、あるいは欠失すると、実際の粉質性に結びつくのかという全体像を明らかにするには長期間を要する。本研究では、リンゴの成熟あるいは収穫後の肉質変化、とくにリンゴにおける食感低下の主要因ともいえる粉質性について、定量的な測定を行うとともに、粉質性に関与する酵素遺伝子群をスクリーニングし、その酵素の機能解析を行う。

3. 研究の方法

リンゴ果実の収穫後に発現が増大または低下する遺伝子群について、すなわち差別的発現を示す遺伝子群を Subtraction 法によって得る。細胞壁の代謝や生体成分の分解に関与する遺伝子群を既知のデータベースを利用して選抜し、リアルタイム RT-PCR 法により、発現動態の詳細について明らかにする。収穫後に異なる肉質を示すリンゴ品種を用いて、これらの遺伝子群の発現解析を行い、軟化現象だけではなく肉質、とくに粉質性に関連する遺伝子(群)の候補を絞る。また、機能、特に基質との反応性について十分な知見が得られていない酵素の場合は、異種細胞系でのタンパク質発現を試み、生体内基質についての知見を得る。

4. 研究成果

収穫後に粉質化を示すリンゴ品種を用いて、果肉ディスクを作成し、溶液中で振とうすることで、一定時間後の果肉崩壊量から粉質化の程度を測定した。その結果、明らかな果肉の崩壊の差異が数品種のリンゴ間でみられた。その特徴をもとにして、供試果実をサンプリングし、粉質化の前後におけるトータル RNA の抽出を行った。RNA 抽出では多糖類の混入が問題であった。Hot borate 法と市販の RNA 精製カラムを用いて、多糖類の混入が少ない RNA を得ることに成功した。

一方、研究実施期間の途中で、海外のグループが細胞壁を構成するアラビノースを遊離する α -アラビノフラノシダーゼがリンゴの粉質化に影響している可能性を示した。しかしながら、ここで示されたのは同酵素をコードしている可能性のある遺伝子情報であり、実際にこの遺伝子によってつくられるタンパク質が α -アラビノフラノシダーゼとして機能するかは明らかにされていない。高等植物から精製された α -アラビノフラノシダーゼはアミノ酸配列の相同性に基いて、グリコシドヒドロラーゼファミリー 3 と 51 に分類される。それらのうち果実由来の α -アラビノフラノシダーゼはそのほとんどがグリコシドヒドロラーゼファミリー 51 に属している。リンゴの粉質化との関わりで示された α -アラビノフラノシダーゼはグリコシドヒドロラーゼファミリー 3 に属していた。グリコシドヒドロラーゼファミリー 3 には α -アラビノフラノシダーゼの他に β -キシロシダーゼも分類されている。また、いくつかのタンパク質は α -アラビノフラノシダーゼと β -キシロシダーゼの両方の活性を示す。cDNA からの推定アミノ酸配列に基づき、グリコシドヒドロラーゼファミリー 3 には 100 以上の高等植物由来の α -アラビノフラノシダーゼ・ β -キシロシダーゼが登録されている。しかしながら、わずか 10 のタンパク質を除き、そのほとんどはアミノ酸配列の相同性に基づく分類であり、実際にその遺伝子産物がこれらの酵素活性を示すかどうかは明らかではない(表 1)。

表 1. グリコシドヒドロラーゼファミリー 3 に属する高等植物由来の α -アラビノフラノシダーゼ/ β -キシロシダーゼのうち基質特異性が確認されているもの

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabinofuranosidase/xylosidase (2) Xylosidase (1)
<i>Fragaria x ananassa</i>	Xylosidase (1)
<i>Hordeum vulgare</i>	Arabinofuranosidase/xylosidase (1) Xylosidase (1)
<i>Medicago sativa</i>	Arabinofuranosidase/xylosidase (1)
<i>Pyrus pyrifolia</i>	Arabinofuranosidase/xylosidase (1)
<i>Raphanus sativus</i>	Arabinofuranosidase/xylosidase (1)
<i>Zea mays</i>	Xylosidase (1)
No. of clone which characterized enzymatic activity	10

前述のように、本ファミリーに属する酵素は複雑な基質特異性を示す。基質特異性が明らかにされている 10 個の α -アラビノフラノシダーゼのアミノ酸配列の相同性に基づく系統樹解析でもその基質特異性を推定することはできなかった (図 1)。

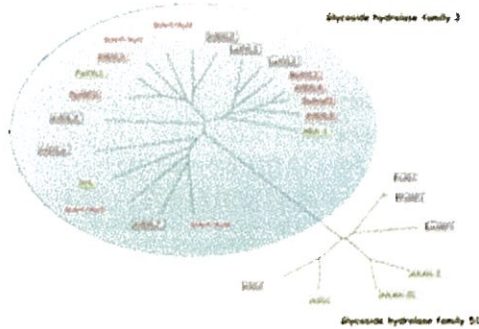


図 1. 高等植物由来の α -アラビノフラノシダーゼ/ β -キシロシダーゼのうち基質特異性が確認されているものの系統樹。ただしトマトは除く。AtBXLs、PpARF2、MsXyl1、ARA-I ならびに RsAraf1 は二機能性の α -アラビノフラノシダーゼ/ β -キシロシダーゼで、それぞれシロイヌナズナ、ニホンナシ、アルファルファ、オオムギならびにダイコン由来。FaXyl1 と XYL は β -キシロシダーゼでイチゴおよびオオムギ由来。LeXYL1、LeXYL2、SlArf/Xyl1、SlArf/Xyl2、SlArf/Xyl3、SlArf/Xyl4 ならびに LeArf1 はトマト由来。AXAH-I、AXAH-II、AtAsd1 はグリコシドハイドロラーゼファミリー-51 に属する α -アラビノフラノシダーゼで、オオムギとシロイヌナズナ由来。

そこで、トマト由来の本酵素遺伝子を異種細胞系でタンパク質の発現誘導を試みた。一般的によく使われている大腸菌や酵母では、活性を持つタンパク質の発現はみられなかった。これは高等植物由来の細胞壁分解酵素がこれらの微生物細胞系では効果的に発現できないことに起因すると考えられる。本研究では、植物由来のタバコ培養細胞 (BY-2、図 2) を用いて、タンパク質の発現を試みた。

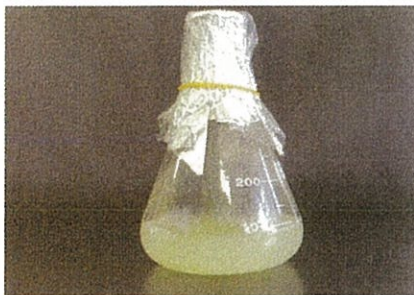


図 2. タバコ培養細胞 (BY-2)。

各クローンの ORF 領域を CaMV35S プロモーターを持つ pBI121 バイナリーベクターに導入し、BY-2 に形質転換しタンパク質誘導を行った (図 3)。



図 3. ベクターの構築図。

その結果、活性を持つタンパク質の誘導に成功した。人工基質に対する反応性だけでなく、多糖類基質に対してもアラビノース遊離活性を示すことが明らかとなり、細胞壁多糖類の分解に寄与していることが示された。これらの結果から、タバコ培養細胞が高等植物由来の多糖類分解酵素のタンパク質発現の系として有効であることが示された。また、果実由来の α -アラビノフラノシダーゼをリコンビナントタンパク質で得て、その基質特異性を明らかにした最初の報告である。今後は、リンゴの粉質化との関わりについて解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文] (計 1 件)

1. Akira Tateishi, Yusuke Kamiyoshihara, Junko Matsuno, Fumika Miyohashi, Hajime Shiba, Yoshinori Kanayama, Keiichi Watanabe, Kazunari Nomura, Hiroaki Inoue: "Heterologous expression of tomato glycoside hydrolase family 3 α -L-arabinofuranosidase/ β -xylosidases in tobacco suspension cultured cells and synergic action of a family 51 isozyme under antisense suppression of the enzyme" *Physiologia Plantarum* (2013) In press

[学会発表] (計 11 件)

1. 吉本圭吾、立石 亮、渡辺慶一、井上弘明: "花の開花ステージにおける α -アラビノフラノシダーゼ遺伝子の発現" 園芸学会. (20120922-20120924). 福井県立大学福井キャンパス

2. Akira Tateishi: "Availability of BY-2 as a heterologous expression system to obtain active recombinant proteins" 3rd Horticultural Physiology Workshop -International workshop on transgenic solanaceous plants-. (20111129). Kobe Convention Center
3. Tomohiro Nakajima, Akira Tateishi and Hiroaki Inoue: "Active tomato α -L-arabinofuranosidases expressed in a plant cultured cells and substrate specificity of the recombinant enzymes" 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference. (20111128-20111202). Kobe Convention Center
4. Akira Tateishi, Tomohiro Nakajima and Hiroaki Inoue: "Expression analysis and heterologous expression of α -L-arabinofuranosidase/ β -xylosidases" The 4th Conference on Biosynthesis of Plant Cell Wall. (20111001-20111005). Awaji Yumebutai International Conference Center
5. 中島智広、立石 亮、井上弘明: "異種細胞系で発現させたトマトの α -アラビノフラノシダーゼ/ β -キシロシダーゼにおける基質特異性の解析" 園芸学会. (20110924-20110925). 岡山大学津島キャンパス
6. Tomohiro Nakajima, Akira Tateishi and Hiroaki Inoue: "Expression analysis of glycoside hydrolase family 3 α -L-arabinofuranosidase/ β -xylosidase in tomato plant" Joint International Symposium on Japanese Solanaceae/Cucurbitaceae Genomics Initiatives. (20110305-20110306). 岡山大学
7. 高橋 翔、立石 亮、渡辺慶一、井上弘明: "トマトからの新奇糖質加水分解酵素遺伝子のクローニングと発現解析" 園芸学会. (20100919-20100920). 大分大学旦野原キャンパス
8. Sho Takahashi, Akira Tateishi, Keiichi Watanabe, Kazunari Nomura, Hiroaki Inoue: "Changes in α -L-arabinofuranosidase activity and isolation of related clone from ripening avocado fruit" 28th International Horticultural Congress. (20100822-20100827). Lisbon Congress

Center (Portugal)

9. Akira Tateishi, Kaoru Okada, Sho Takahashi, Keiichi Watanabe, Kazunari Nomura, Hiroaki Inoue: "Cloning and expression analysis of α -L-arabinofuranosidase/ β -xylosidase from tomato fruit" 28th International Horticultural Congress. (20100822-20100827). Lisbon Congress Center (Portugal)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石 亮 (TATEISHI AKIRA)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 30267041

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: