

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06023

研究課題名(和文) 果実軟化に関与するエクспанシンの機能解明と分子構造研究

研究課題名(英文) Research on the function and molecular structure of expansins involved in fruit softening.

研究代表者

石丸 恵 (ISHIAMRU, MEGUMI)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：90326281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モモ果実由来のPpEXP1は、モモ果実の軟化に深く関与していることが明らかにされているが、その詳細は不明であった。そこで、本課題によってPpEXP1はセルロースに対して加水分解活性を有することを明らかにした。さらに、セロオリゴ糖を基質にすると、2～4糖については加水分解活性を示さず、5糖を2糖と3糖に6糖を2糖と4糖にそれぞれ加水分解することを明らかにした。

また、果実軟化を高分子構造体の構造変化として細胞壁の構造変化を明らかにする目的で、X線小角散乱法を用いた。その結果、細胞壁の構造変化を観察することができ、さらには、PpEXP1の関与も明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モモ果実の軟化は、エクспанシンという糖加水分解酵素が深く関係していることを明らかにした。このエクспанシンは、モモ果実内のセルロースを規則的に分解しており、成熟に伴いセルロースが分解されることにより柔らかくなっていくことを明らかにしたものです。

また、モモ果実の内部の構造をX線で観察したところ、内部の繊維にそって構造が変化することが観察できた。これらの結果から、モモ果実の軟化は果実内部の繊維にそってセルロースが分解されることで起こることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：PpEXP1 from peach fruit has been clarified to be deeply involved in the softening of peach fruit, but the details have not been clarified. In this study, we found that PpEXP1 has hydrolytic activity against cellulose. Furthermore, when cellooligosaccharides were used as substrates, PpEXP1 hydrolyzed cellopentaose to cellobiose and cellotriose, and cellohexaose to cellobiose and cellotetraose, while it showed no hydrolytic activity for cellobiose to cellotetraose.

Small-angle X-ray scattering (SAXS) was also used to clarify the structural change of the cell wall as a structural change of the polymeric structure in fruit softening. The structural changes in the cell wall were observed, and the involvement of PpEXP1 was also clarified.

研究分野：園芸利用学

キーワード：果実軟化 細胞壁 糖加水分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクспанシンは、McQueen-Masonら (1992) によってキュウリ胚軸の酸性条件下で細胞伸長を促進するタンパク質として初めて報告されました。その後、植物だけでなく微生物 (糸状菌類、細菌および線虫) においても報告され、アミノ酸配列の相同性から α -エクспанシンと β -エクспанシンに分類されています (図1)。微生物から単離されたエクспанシンは、 β -エクспанシンに相同性が高く、この β -エクспанシンは多くの単子葉類の細胞伸長に関わっていると報告されています。 α -エクспанシンはトマト、メロン、ブドウ、リンゴおよびモモ果実などの成熟・追熟過程の軟化に関係すると考えられています。近年、Sekiら (2015) は、イネ由来のエクспанシンはセルラーゼとの協働により結晶性セルロースの分解促進効果があることを報告しています。また、

Georgelisら (2012) は、*Bacillus* 属菌由来のエクспанシンがセロオリゴ糖と相互作用している結晶構造解析により、エクспанシンとセルロースの強い結合が示唆されました。以上の結果から、エクспанシンは、植物細胞壁のセルロースに結合し、セルラーゼとの共発現でセルロース分解に関与しているタンパク質であると考えられています。しかしながら、エクспанシン単独の機能について詳細な機能は明らかにされていません。

また、シロイヌナズナのゲノム解析から、シロイヌナズナには36個のエクспанシン遺伝子が存在している (26個の α -エクспанシン、6個の β -エクспанシンと4個のエクспанシン様タンパク質) ことが明らかになっています。これだけの遺伝子ファミリーがそれぞれどのような役割を果たしているのかは不明です。

このように、エクспанシンは遺伝子レベルおよびアミノ酸レベルで多くの研究がなされているにもかかわらず、その機能が明らかにされていないことに焦点を当てて明らかにしていきたいと思います。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物が特徴的に有するエクспанシンの機能を明らかにすることにあります。特に、 α -エクспанシンは果実の発育・成熟過程の軟化時に顕著な遺伝子発現パターンを示すことが明らかにされています。しかしながら、これまでの結果はセルラーゼとの共発現によるセルロース分解やペクチンとの結合といった結果しか得られていません。そこで、本研究課題はエクспанシン単独の機能を明らかにすることによりセルロースの分解とヘミセルロースとの架橋構造へのエクспанシンの関与およびペクチンに及ぼす細胞壁構造変化の機構を詳細に明らかにできるものと考えています。

本研究の学術的独自性は、セルラーゼと α -エクспанシンの相互作用もしくは、各タンパク質の単独の作用機構が存在することを明らかにすることができます。また、 β -エクспанシンおよび微生物のエクспанシンとの機能性の相違を明らかにすることができますと考えられます。

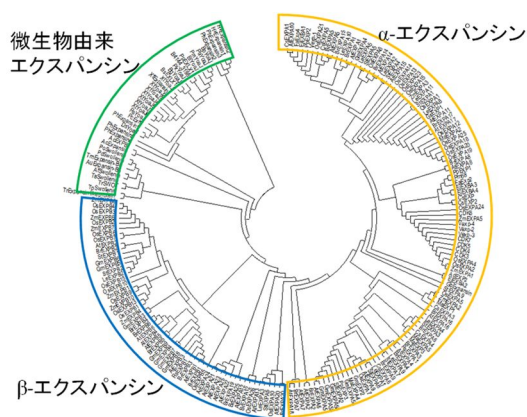


図1 植物および微生物由来エクспанシンの系統樹

3. 研究の方法

本研究期間内にモモ果実およびブドウ果実の軟化に関係しているエクспанシンについて、酵母を用いた組換えタンパク質を産生し、以下の3項目を明らかにしていきます。

1) セルロースおよびヘミセルロースに対する加水分解反応様式の解明

申請者は、モモ果実由来の α -エクспанシンであるPpEXP1について、セルロースおよびセロオリゴ糖に対する加水分解活性の有無について調査を行ってきました。これまでの結果は、2糖、3糖および4糖には反応せず、5糖および6糖のみに反応し、その分解産物は、5糖では2糖と3糖であり、6糖では、2糖と4糖が主であることを明らかにしてきました。さらに、その分解産物にはグルコース単糖が含まれないことも明らかにしてきました。

セルロースについては、CMCセルロース(カルボキシメチルセルロース)との反応により、CMCセルロースの粘度低下が起こることを明らかにし、セルラーゼ様の活性を有する可能性を示唆しました。

以上のことから、 α -エクспанシンであるPpEXP1が加水分解活性を有することは明らかではありますが、セロオリゴである5糖と6糖に対する反応性機構に違いがあるのか、またセルラーゼ様活性とは、セルラーゼとどのように異なるのかを明らかにする必要があります。さらに、セルロースと架橋構造をとるヘミセルロース(キシログルカン等)に対する加水分解活性についても調査し、エクспанシンの作用する細胞壁構造変化を特定することが必要になります。

2) セルロース分子間の水素結合切断活性の解明

本項目は、水素結合を切断する活性を有するタンパク質の活性測定方法の基礎的知見を得ることも目的としています。エクспанシンがセルロース分子鎖間の水素結合もしくは、セルロースとヘミセルロースの水素結合を切断する活性を有すると考えると、エクспанシンによって遊離した $[H^+]$ が上昇すると考え、 $[H^+]$ の上昇を活性評価とできるのではないかと考えています。具体的には、高感度信号累積型ISFETバイオセンサー(Accumulation Method Ion Sensor = AMISセンサー)を用いて H^+ 濃度の変化をモニターすることによりセルロース分子鎖間もしくはセルロースとヘミセルロースの架橋構造から遊離する $[H^+]$ を測定します。ただし、通常のセルロースの分子鎖間の水素結合(OH)では自然解離により $[H^+]$ の遊離等が正しく測定できないことが考えられるため、OHのHを重水素に置換し、自然解離を抑えた状態のセルロース分子鎖間の重水素(D)の遊離量を測定します。OHのHをDに変換することにより、 $[H^+]$ が電離しづらくなることから、OHをOD化した際の水素結合の切断をpHの上昇で説明できるのではないかと考えています。

本研究項目が困難である場合は、小角散乱(SAXS)によるセルロースの構造変化を調査することを予定しています。すでにSAXSによる植物細胞壁の構造変化の報告がなされている(Urakawaら2001, 200Yuguchiら2017)ことから、本項目の実施は可能です。

3) 立体構造解析による機能解明

α -エクспанシンは、そのアミノ酸配列からGH(グリコシルハイドロラーゼ・ファミリー)45と高い相同性を有しており、GH45には代表的なエンドグルカナーゼなどが属

しています。これらのことから、 α -エクспанシンは、GH45のendoglucanaseと立体構造が非常に類似しており、反応アミノ酸残基もアスパラギンとアスパラギン酸と類似しています。そこで、本項目は、モモ果実由来およびブドウ果実由来の α -エクспанシンの立体構造解析を行い、反応機構の詳細調査を行います。また、アミノ酸変異の導入により、加水分解反応の作用機作についても調査します。X線結晶構造解析が困難な場合は、GH45のエンドグルカナーゼの構造を用いたモデル構造の構築、もしくはNMRによる構造解析を行うことも想定します。

4. 研究成果

モモ果実由来の α -エクспанシン (PpEXP1, PpEXP2およびPpEXP3)の酵母による組換えタンパク質産生系は構築済みであり、精製条件を検討し精製した。それぞれのタンパク質の特性を検討した結果、PpEXP1については、セロオリゴ糖である5糖および6糖に対して反応することを確認しており、5糖は2糖と3糖に、6糖は2糖と4糖に加水分解されることを確認していました(図2)。また、この反応ではグル

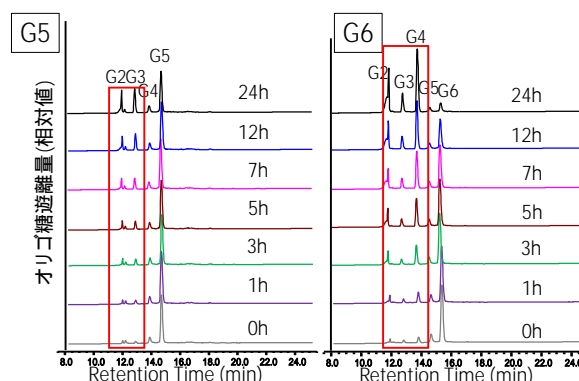


図2 G5およびG6とPpEXP1の反応産物の変化

ルコース単糖は遊離されないことも確認しています。さらに、リン酸膨潤セルロースであるPASCとPpEXP1の反応により、2糖から5糖のセロオリゴ糖が遊離することも確認し

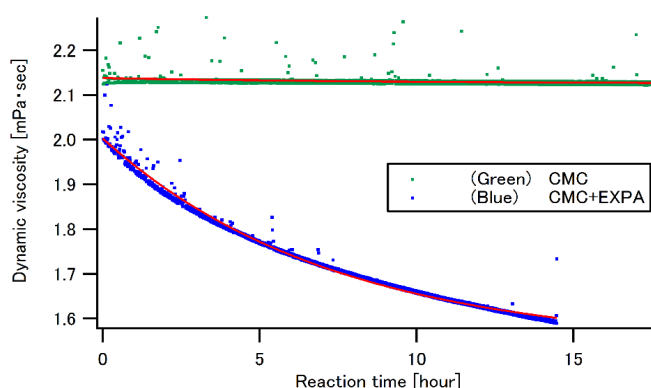


図3 CMCセルロースにPpEXP1を添加したCMCセルロースの粘度変化

ています。また、図3に示した落球式粘度計を用いたCMCセルロースの粘度低下の結果と併せ、PpEXP1がセルラーゼ様の糖加水分解活性を有する可能性を明らかにしていました。モモ果実由来のPpEXP2およびPpEXP3については、PpEXP1と同様の研究を進め、加水分解活性の検討を進めています。セルロース分子間の水素結合切断活性については、異なる成熟段階のモモ果実から抽出したセルロースを重水素化し、PpEXP1との反応性を調査したところ、果実が軟化する時期のセルロースとのみ $[H^+]$ の変化が観察され水素結合を切断する活性を有する可能性を見出しています。対照としてBSAやエンドグルカナーゼを反応させても変化が見られなかったことから、エクспанシンの新たな機能である可能性が示唆されました。

次にX線小角散乱法によるモモ果実内部の構造変化を観察した結果、図4のように未熟果実と成熟果実で配向性の違いが観察できた。その後、種々の品種を用いて、成熟によ

る構造変化を観察したところ、同様の結果を得ることができた。

さらに、種々の解析を行ったところ、高分子領域の散乱の寄与が未熟果実の方がより高いことが明らかとなり、未熟な果実ほど高分子構造体が多いという結果が得られた。

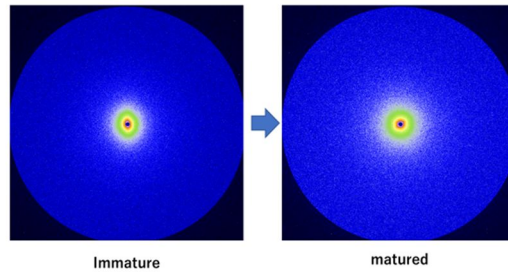


図4 SAXSによるモモ果実の構造変化

次に、これらの果実に PpEXP1 を添加し、経時的に構造変化を測定したところ、図5のようになった。これらは、高分子側において、エキスパンシン添加後の経過時間が経つにつれて散乱が減少し、低分子側においては散乱が上昇することを示している。

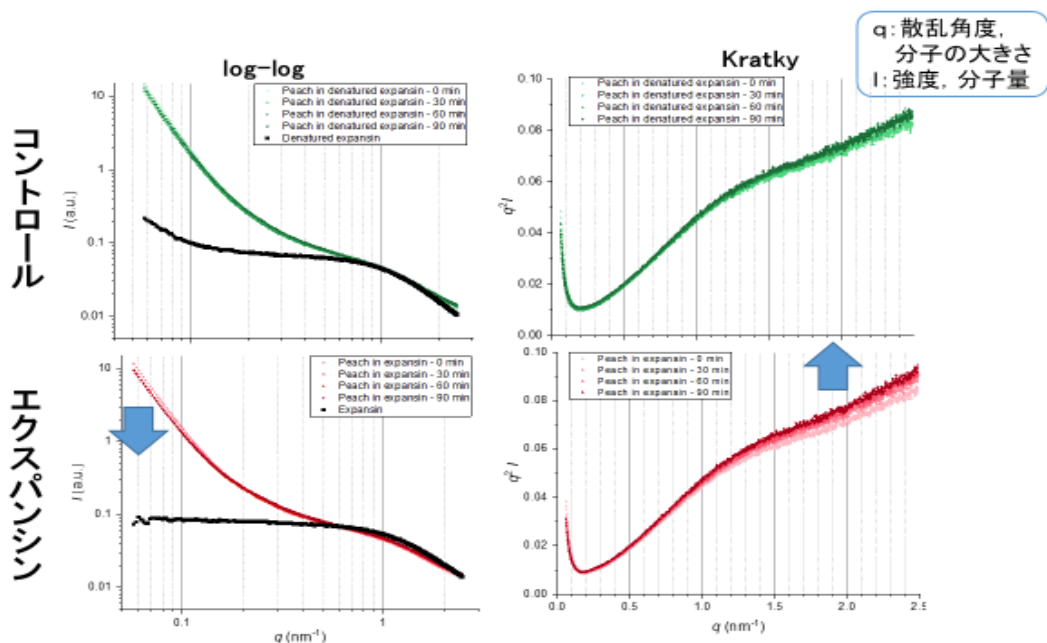


図5 SAXSによるモモ果実とエキスパンシン添加による構造変化

これらの結果から、SAXSによってモモ果実の成熟によって、内部の配向性が弱まり、高分子構造が減少すること、この高分子の現象はエキスパンシンの添加によっても観察されたことから、モモ果実の軟化を SAXS により説明できる可能性を示した。

PpEXP1 の立体構造解析については、タンパク質の結晶化条件の探索まで至っておらず、今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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