

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580054

研究課題名(和文) 果実軟化機構の分子構造基盤研究：トマト果実をモデルとして

研究課題名(英文) Structural based fruit softening mechanism; the model of tomato fruit softening during maturation

研究代表者

石丸 恵 (ISHIMARU, Megumi)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：90326281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、トマト果実をモデルとして果実の発育・成熟過程における細胞壁分解酵素の一つであり、トマト果実の軟化に重要な役割を果たしていると考えられる β -ガラクトシダーゼについて、酵素特性や基質認識機構を明らかにすることを目的とした。

トマト β -ガラクトシダーゼ(TBG)4は果実軟化に重要な役割を果たしているため、酵母による発現系を構築し、X線結晶構造解析を行った。その結果、植物では初めて β -ガラクトシダーゼの構造を明らかにすることができた。また、TBG1の酵素特性も明らかにし、TBG4とは異なる基質特異性を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： In tomato fruit, beta-galactosidase 4 (TBG4) is an enzyme responsible for fruit softening through the degradation of beta-(1,4)-galactan in the pericarp cell wall. To gain structural insight into the substrate specificity, we determined the crystal structures of TBG4 and its complex with beta-D-galactose. TBG4 was composed of a catalytic TIM barrel domain followed by three beta-sandwich domains. This structure is similar to other beta-galactosidase belong to GH35 families.

In addition, we determined the enzymatic properties and substrate specificities of TBG1. TBG4 has substrate recognition to beta-(1,4)-linkage, however, TBG1 has beta-(1,3) and beta-(1,6)-likage substrate.

In these results, TBG's act on the tomato cell wall during fruits development and maturation, and seberal stage of tomato fruits cell walls construct/reconstruct to some components sugar as a substrate against TBG's.

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：果実軟化 細胞壁 トマト果実 β -ガラクトシダーゼ

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、トマト果実の細胞壁分解に関する報告をまとめると、Gross and Wallner (1979)とKim ら(1991)はトマト果実の成熟過程において細胞壁から顕著なガラクトース残基の減少を報告したことに始まる。そして、Redgwell ら(1997)は成熟段階ごとの細胞壁構成多糖類の構成多糖類の構成を調査し、果実の成熟に伴う軟化は細胞壁構成多糖類の中でもガラクトースの減少が関与していることを報告した。さらに、細胞壁分解関連酵素に関する研究では、Carey ら(1995)、Kim ら(1991)、Pressey ら(1983)や Smith ら(2002)がトマト果実の成熟過程においてエクソ型ガラクタナーゼ活性が4倍から5倍に増加することを報告している。

これらの結果、トマト果実の成熟過程における軟化は、細胞壁構成多糖類からガラクトースを遊離する β -ガラクトシダーゼが深く関与していると考えられた。これまでに少なくとも7種の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(TBG)がトマト果実から単離され(Smith ら, 2000)、それぞれが特異的な発現パターンを示した。その後、遺伝子組換え技術を用いて、これらの7つの β -ガラクトシダーゼ遺伝子がトマト果実の成熟に伴ってどのような役割を果たしているのかの機能解析の結果、TBG4のアンチセンス鎖を導入した形質転換体トマトにおいては、通常のトマト果実より1.4倍硬い硬度を維持した(Smith ら, 2002)。この結果は、人為的に果実の硬度を制御した初めての報告となった。しかしながら、TBG4以外のTBG1、TBG3、TBG6遺伝子の発現を抑制したトマト果実においては、果実硬度に顕著な差はみられなかった。そこで、トマト果実中の7種の β -ガラクトシダーゼが果実の成熟過程でどのような役割を果たしているのかを明らかにし、果実の成熟過程における細胞壁の分解メカニズムを明らかにする。つまり、トマト果実の細胞壁構成多糖類に対し、どの構造部分の分解や再構成に関与しているのかを明らかにすることでトマト果実の成熟を人為的に制御できる可能性を探る。また、植物細胞壁研究はまだまだ不明な点が多く、明らかにされていない。

本研究課題の結果は酵素の基質認識機構から細胞壁構造の一端を明らかにできる可能性もある。

2. 研究の目的

本研究課題は、トマト果実を用いて、その成熟過程における軟化機構を細胞壁分解酵素の一つである β -ガラクトシダーゼファミリーの酵素特性および基質認識機構について、分子レベルで解明する。本研究課題において、分子レベルとはトマト β -ガラクトシダーゼを異種発現系で単一の酵素タンパクとして産生し、酵素特性およびX線結晶構造解析により立体構造を明らかにし、さらに基質

複合体の構造解析を行うことによって、基質認識機構を明らかにすることである。

これにより、 β -ガラクトシダーゼファミリーの果実成熟段階におけるそれぞれの役割の一端を明らかにすることができる。そのため、以下の研究項目について研究を進める。

(1) β -ガラクトシダーゼ遺伝子の異種発現系の構築

トマト果実中には7つの β -ガラクトシダーゼ遺伝子(TBG)が存在するが、それらの転写産物である酵素を各々精製することは困難であるため、大腸菌または酵母による異種発現系を構築する。

本研究項目は本研究課題の基礎となるものであり、重要な位置を占める。しかし、研究代表者はすでに3つの β -ガラクトシダーゼ遺伝子の酵母における発現系の構築に成功しており、実験手法は確立している。

(2) 組換え酵素タンパクの酵素特性解析

現在までに7つのアイソザイムのうち、TBG4、TBG5の酵素特性はすでに報告している(Ishimaru ら, 2009)そして、現在TBG1およびTBG3について研究を進めているところである。

(3) X線結晶構造解析による立体構造解析

TBG4の組換えタンパクを精製し、結晶化まで成功している。現在は大型放射光施設において、データの収集を行っているところである。

3. 研究の方法

本研究課題の研究計画・方法の概要に従い、以下の項目について研究を行う。酵素タンパクの立体構造解析は、酵素タンパクの発現系を構築し、タンパクの産生後の精製、結晶化を行う。結晶化に成功したのちに、大型放射光施設でX線を照射し、データを収集する。このデータをもとに計算により構造が決定される。

(1) トマト β -ガラクトシダーゼ(TBG)4の基質複合体の構造解析

TBG4の酵素特性の結果(Ishimaru ら, 2009)から、TBG4は-1,4結合を特異的に認識し、強いガラクタナーゼ活性も有することが明らかになっており、さらに、アンチセンス鎖を導入した組換えトマトは対照果実と比較して1.4倍もの硬度を維持していたことから(Smith ら, 2002)、果実の成熟過程における軟化に重要な役割を果たしていると考えられる。このためTBG4の組換えタンパクの立体構造を明らかにし、糖鎖認識機構を特定することにより、TBG4の遺伝子発現時期における果実細胞壁の特徴的な構造が予測される。申請者らはTBG4の立体構造を明らかにするため、現在組換えTBG4の精製、結晶化を現在おこなっている。

(2) トマト β -ガラクトシダーゼ(TBG)1および3の酵素特性解析

これまでに、TBG1および3について、酵母系により組換えタンパクの産生は成功し

ている。また、酵素特性についても研究を進めているが、発現量が少なく、十分な酵素発現量を得られるまでには至っていない。

そこで、本項目は効率的で大量な組換えタンパクの産生を行い、TBG1 および 3 の酵素特性を調査する。TBG4 と同様に X 線結晶構造解析を行うには多量の酵素量を必要とするため、本項目は必須である。酵素特性については種々の合成基質および植物由来の基質を用い、さらにトマト果実から抽出した細胞壁画分との反応性についても調査する。

さらに、TBG ファミリーを順に発現系の構築、組換えタンパクの産生、酵素特性・基質特異性の検討、結晶化、構造解析を行う。

具体的には、酵素特性・基質特異性の調査を行った TBG1 および TBG3 について結晶化を行う。TBG4 における結晶化条件の検討の結果、ポリエチレングリコールを含む緩衝液が結晶化には適していることが明らかとなっているため、これらの条件を検討し結晶化を試みる。その後、X 線による構造解析を行う。また、TBG7 の組換えタンパクの産生に着手する。この TBG7 は TBG ファミリーのなかでも唯一、アミノ酸配列の N 末端配列のシグナルペプチドが葉緑体をターゲットとしており、葉緑体を構成する膜構造のガラクトリピッドを分解しているのではないかと推測されている。これまでに細胞壁の分解を担う TBG1,3,4,5 について種々の検討を行ったが、細胞内でしかも、葉緑体の分解に関わっていると考えられている TBG7 の機能を解析することは、細胞壁分解の機構との違いを探る上で重要な比較対象となりうる。

その後、TBG1 および 3 の構造解析を継続して行い、続いて TBG7 の酵素特性、基質特性などを調査し、構造解析に移る。TBG ファミリーの結晶化および構造解析は、TBG4 の構造解析までの流れを参考に行う予定であるが、TBG の組換えタンパクにはかなり高分子の多糖類が修飾していると考えられる。これは、酵母系の発現系ではよくあることであるが、これらの高分子多糖類の除去は非常に困難も予想される。そこで、基質認識機構の一端を担うと考えられる C 末端の CBM (Carbohydrate Binding Module) 領域を大腸菌系で発現させ、構造解析を行うことも視野に入れて、発現系の構築を進める。CBM は C 末端の 50~70 アミノ酸残基からなるタンパクで酵素活性を有していないことから、大腸菌系の発現が容易にできる。

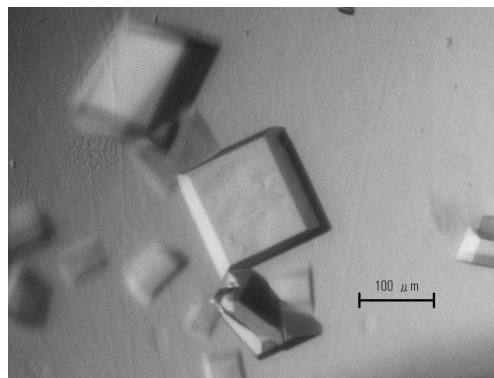
4. 研究成果

(1) トマト -ガラクトシダーゼ (TBG) 4 の基質複合体の構造解析

TBG4 を導入した pPICZa ベクターを用いて *Pichia pastoris* X-33 株を形質転換し、C 末端に His-tag を付加した TBG4 組換えタンパク質を産生した。培養上清を回収し、硫酸沈殿、HisTrap FF による精製を行った。N-結合型糖鎖切断酵素を加え、20 °C におい

て 48 時間静置した。その後、Superdex 200 を用いて精製を行った。得られた TBG4 溶液を 10 mg/ml まで濃縮し、シッティングドロップ蒸気拡散法によりタンパク質の結晶化を行った。沈殿剤溶液として 0.1 M tris(hydroxymethyl) aminomethane pH8.0, 20% (w/v) polyethylene glycol 10000 を用い、20 °C 下において約 1 ヶ月間静置した。

その結果、第 1 図に示す TBG4 の結晶が得られた。



第 1 図 TBG4 の結晶

次に、25% (v/v) PEG400 を含む沈殿剤溶液をクライオ溶液として用い、測定直前にこの溶液に結晶を数秒間浸漬した。波長 1.0 Å, 開始角 0°, 終了角 180°, 振動角 0.5° に設定し、100 K の窒素気流下において測定を行った。K2PtCl4 の結晶への導入は 2.5 mM K2PtCl4 を含む沈殿剤溶液に結晶をソーキングすることにより行った。Native と同様のクライオ溶液を用い、波長 1.0 Å, 開始角 0°, 終了角 180°, 振動角 1° に設定し、100 K の窒素気流下において測定を行った。得られたデータは HKL-2000 を用いて処理を行った。

その結果を第 1 表に示す。

第 1 表 Summary of data-collection statistics^a

	Native	K ₂ PtCl ₄
X-ray source	PF-AR NE3A	PF-AR NW12
Wavelength (nm)	1.00	1.00
Temperature (K)	100	100
Resolution (Å)	50 - 2.16 (2.20 - 2.16)	50 - 3.20 (3.31 - 3.20)
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 or P2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 or P2 ₁ 2 ₁
cell dimensions (Å)	a = 92.34 b = 95.73 c = 158.93	a = 90.09 b = 101.94 c = 159.15
R _{merge} (%) ^b	0.075 (0.45)	0.155 (0.258)
I / I ^c	33.65 (2.62)	5.77 (2.76)
Observed reflections	539358	72498
Unique reflections	76919	24742
Completeness (%)	98.9 (81.7)	91.7 (86.1)
Number of molecules per asymmetric unit	2	2
V _m (Å ³ /Da)	2.16	2.25

^aThe values for the highest resolution shell are given in parentheses.
^b $R_{merge} = \sum_h \sum_l |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_h \sum_l I_{hkl}$, where h represents a unique reflection and l represents symmetry-equivalent indices. I is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the mean value of I .

得られた結晶の回折 X 線測定の結果、2.2 Å 分解能データを得ることに成功したが、今回のデータでは、結晶の同型性が保たれておら

ず、構造を明らかにすることはできなかった。このため、次に種々の重原子置換結晶によるデータ解析を行った。

アミノ酸のメチオニンをセレンに置換するセレノメット法などを数種の方法を試みたが解析できなかった。硫黄を用いた S-SAD によるデータ解析 (第 2 表, 第 3 表) で構造を決定することができた

第 2 表 Summary of data-collection statistics

Dataset	Native-SAD
X-ray source	PF-BL17A
Wavelength (Å)	2.0000
Temperature (K)	90
Resolution (Å)	48.0 - 2.80 (2.95 - 2.80) ^a
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions (Å)	a = 92.90 b = 96.42 c = 159.44
R _{merge} ^b	0.100 (0.25) ^a
I/σI	145.6 (62.8) ^a
Observed reflections	12743381
Unique reflections	35852
Completeness (%)	99.6 (98.6) ^a
Redundancy	355.4 (360.5) ^a
V _m (Å ³ /Da)	2.18
Solvent content (%)	43.5
No. of molecules per asymmetric unit	2
Anomalous completeness	99.7 (99.1)
Anomalous multiplicity	186.5 (185.9)
DelAnom correlation between half-sets	0.741 (0.502)

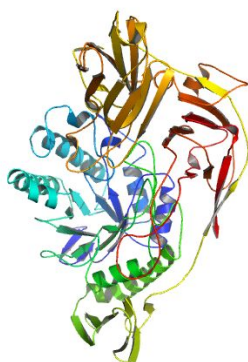
^a The values for the highest resolution shell are given in parentheses.

^b $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_{i,j} |I_{ij} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_{i,j} I_{ij}$, where h represents a unique reflection and j represents symmetry-equivalent indices. I is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the mean value of I .

第 3 表 Summary of refinement statistics

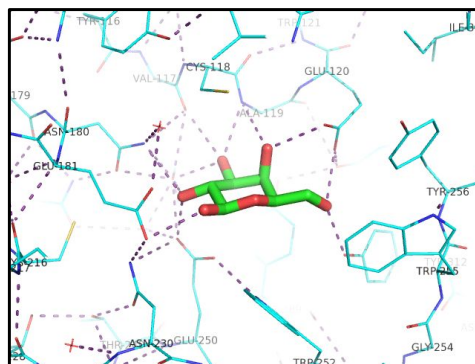
Dataset	Native	β-D-Galactose complex
Resolution (Å)	46.1 - 1.65	31.1 - 3.00
No. of reflections	170193	32721
R _{work} /R _{free} (%)	12.9/18.0	20.0/26.0
No. of atoms	13091	11428
No. of protein atoms	11006	11062
No. of heterogen atoms	179	166
No. of waters	1906	198
Wilson B (Å ²)	23.3	41.0
Mean B (Å ²)	17.8	47.3
R.m.s. deviations		
Bond length (Å)	0.007	0.006
Bond angles (°)	1.219	0.975
Ramachandran analysis (%)		
Favored region	89.2	88.1
Allowed region	10.6	11.8
Outliers	0.2	0.2

第 2 図に、今回の課題で成功し明らかにした TBG4 の構造を示す。TBG4 は、GH35 ファミリーに属し、その特徴的な構造を維持していた。



第 2 図 TBG4 の立体構造

次に TBG4 の基質認識機構を明らかにするため、ガラクトースとの複合体の回析を行い、TBG4 の活性ドメイン部分の構造についても明らかにした (第 3 図)。これらの結果、TBG4 は 4 つのドメインからなるタンパク質で、第一ドメインは TIM パレル構造をした GH35 ファミリーの触媒ドメインであった。第二ドメインは、β-サンドイッチ構造をしており、第一ドメインを安定化させる役割があると考えられる。第三ドメインは、長いループを有する β-サンドイッチ構造であり、この長いループは植物由来の β-ガラクトシダーゼに特有であり、基質認識部位に近いことから基質の結合に関与していると考えられる。第四ドメインは、同じく長いループを有する β-サンドイッチ構造をしており、このドメインの長いループは GH35 に属する酵素によく保存されており酵素活性に重要な役割を果たしていると考えられる。



第 3 図 TBG4 の活性ドメインの構造

しかし、TBG4 の基質となるガラクトオリゴ糖との構造は解析できず、詳細な基質認識部位の特定はできなかった。

(2) トマト β-ガラクトシダーゼ (TBG) 1 および 3 の酵素特性解析

TBG1 の酵素特性は、最適 pH が 4.0 であり、最適温度は 40-50 °C であった。また、β-(1,3)-, β-(1,4)- and β-(1,6)-galactobiose に対して酵素活性がみられ、トマト果実から調製したアルカリ可溶ペクチンに対しても酵素活性が確認された。ガラクトオリゴ糖については、methyl-β-(1,6)-galactohexaose に対しては活性がみられたが、β-(1,4)-galactohexaose に対しては活性は確認されなかった (第 4 表)。

TBG3 については、酵母での発現量が少なく、現在発現量の検討を行っている。

第4表

Release of galactose by recombinant TBG1 and negative control (FLAG1) acting on a range of oligosaccharides and plant-derived polysaccharides.

Compound	linkage position*	activity**	
		TBG1	FLAG1
Gal-β-(1,3)-Gal	1,3	3.3	n.d.
Gal-β-(1,4)-Gal	1,4	tr.	n.d.
Gal-β-(1,6)-Gal	1,6	2.5	n.d.
Gal-α-(1,3)-Gal	1,3	n.d.	n.d.
Gal-α-(1,3)-Gal-β-(1,4)-Gal	1,3	n.d.	n.d.
Gal-β-(1,4)-Glc (lactose)	1,4	2.0	n.d.
Gal-β-(1,3)-GlcNAc-β-(1,3)-Gal-β-(1,4)-Glc (lacto-N-tetraose)	1,3	n.d.	n.d.
Gal-β-(1,4)-GlcNAc-β-(1,3)-Gal-β-(1,4)-Glc (lacto-N-neotetraose)	1,4	n.d.	n.d.
lupin galactan	Gal-β-(1,4)-	1.4	n.d.
tomato fruit ASP	Gal-β-(1,4)-	2.6	n.d.
arabinogalactan	Gal-β-(1,3)-; Gal-β-(1,6)-	tr.	n.d.
gum arabic	Gal-β-(1,3)-; Gal-β-(1,6)-	tr.	n.d.
gum guar	Gal-α-(1,6)-; Man-β-(1,4)-	n.d.	n.d.
locus bean gum	Gal-α-(1,6)-; Man-β-(1,4)-	n.d.	n.d.

* Terminal residue on aglycon

** μg Gal released in 4 h; not detected (n.d.); trace (tr)

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)

Masahiro Eda, Megumi Ishimaru, Toshiji Tada, Tatsuji Sakamoto, Toshihisa Kotake, Yoichi Tsumuraya, Andrew J. Mort, Kenneth C. Gross. Enzymatic activity and substrate specificity of the recombinant tomato -galactosidase 1. J. Plant. Physiol. (in press) 査読有

[学会発表](計 5 件)

Megumi Ishimaru, Masahiro Eda, Toshiji Tada. Crystal structures of a glycoside hydrolase family 35 -galactosidase from *Solanum lycopersicum*. SEAsia 2013 平成 25 年 12 月 5 日 ラオス

石丸 恵, 枝 真広, 多田俊治. トマト -ガラクトシダーゼ 4 の結晶構造解析. 園芸学会平成 25 年度秋季大会 平成 25 年 9 月 21 日 岩手

招待講演

石丸 恵. Crystal structures of a glycoside hydrolase family 35 -galactosidase from *Solanum lycopersicum*

UK-Japan joint meeting on Plant Cell Biology ケンブリッジ大学 2013 年 7 月 15~17 日 イギリス(ケンブリッジ)

MEGUMI ISHIMARU, MASAHIRO EDA, HIDEMI IZUMI. Crystallization and preliminary

X-ray diffraction analysis of tomato -galactosidase 4. アメリカ園芸学会平成 23 年 9 月 27 日 アメリカ(ハワイ)

石丸 恵, 枝 真広, 多田俊治. トマト -ガラクトシダーゼ (TBG) 4 の結晶化. 日本食品保蔵科学会第 60 回大会 平成 23 年 6 月 18 日 北海道

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石丸 恵 (ISHIMARU, Megumi)
近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号: 90326281

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし