

氏 名(本籍)	お がき わら 小 笠 原	さとし 諭
学位の種類	博 士 (農 学)	
学位記番号	農 博 第 8 0 9 号	
学位授与年月日	平 成 1 7 年 3 月 2 5 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)	
学位論文題目	ピーマン (bell pepper : <i>Capsicum annuum</i>) 果実成熟過程 における β -ガラクトシダーゼの役割	
論文審査委員	(主 査)	教 授 中 島 佑
	(副 査)	教 授 山 谷 知 行
		助教授 金 山 喜 則

論文内容要旨

序論

植物細胞壁は主にセルロース、ヘミセルロース、ペクチンと呼ばれる多糖類から構成されている。植物細胞は細胞壁にとり囲まれていることから、細胞の肥大・成熟には細胞壁の構造変化が必須である。特に果実細胞では、大きさ・堅さが劇的に変化する事から、これに伴って細胞壁の構造も劇的に変化している事が考えられる。Table 1 に細胞壁の成長・成熟に関与するといわれる主な酵素・タンパク質を挙げた。これらのほとんどは細胞壁を構成する主要成分であるセルロース、ヘミセルロース(キシログルカン)、ペクチンに直接作用し、合成、転移、または分解などを引き起こすものである。細胞壁中のガラクトース含量は植物により異なるが、約数%とされている。しかし、細胞壁に占めるガラクトース含量の少なさに関らず、近年、いくつかの植物において発芽、根の伸長、開花、果実の成熟等の成長過程において β -ガラクトシダーゼ(EC.3.2.1.23)の酵素活性や β -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子の転写量の増加、細胞壁中のガラクトース量の減少などが報告されている。これらのことから、 β -ガラクトシダーゼは細胞壁の成長や成熟に関与することが示唆され始めている。

本研究ではピーマン (bell pepper, *Capsicum annuum*) を材料として用いた。ナス科植物の一種であるピーマン果実は成熟に伴い果色が緑から赤へと変化し、果肉の軟化が起こる (Fig. 1)。ピーマン各組織中のグリコシダーゼ活性を測定したところ、ピーマン果実の成熟に伴い β -ガラクトシダーゼ活性の上昇が確認された (Fig. 2)。さらに、Mature green および Red の果実の細胞壁糖組成を測定、比較したところ、ガラクトース含量だけが顕著に減少していた (Fig. 3)。これらのことからピーマン果実成熟において β -ガラクトシダーゼは細胞壁の加水分解に関与し、何らかの役割を有している事が示唆された。

そこでピーマン果実成熟における β -ガラクトシダーゼの生理的役割の解明するため、ピーマン果実から β -ガラクトシダーゼタンパク質、および遺伝子の単離を行って酵素学的性質の決定、および遺伝子の発現解析を試みた。さらに成熟過程における果実細胞壁の糖組成の変化、果実軟化に関与する遺伝子の発現パターンの解析を行ってピーマン果実細胞壁に存在するガラクトースの生理的意義を考察し、果実成熟における β -ガラクトシダーゼの役割を明らかにした。

第1章 ピーマン果実からのβ-ガラクトシダーゼの単離

Figure 2 および 3 からβ-ガラクトシダーゼがピーマン果実成熟において細胞壁へ関与していることが示唆された。そこで本章では果実成熟におけるβ-ガラクトシダーゼのより詳細な生理的役割を明らかにするため、β-ガラクトシダーゼの単離を目的とした。

タンパク質レベルで活性を有し、その活性の高いものが果実成熟に大きく寄与しているものと考え、成熟時期の異なる果実から *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside に対する活性を指標としてβ-ガラクトシダーゼの精製を行った。成熟段階 Red の果実から分子質量 77.5 kDa、成熟段階 Mature green の果実から分子質量 47.9 kDa の2種のβ-ガラクトシダーゼを精製した。N末端アミノ酸配列を決定したところ、これらは異なるアミノ酸配列を有していた (Fig. 4)。これらのβ-ガラクトシダーゼをコードする遺伝子を取得するため、決定したN末端アミノ酸配列、およびピーマンと相同性の高いトマト果実由来のβ-ガラクトシダーゼの配列情報からプライマーを設計した。精製に用いたものと同じ成熟段階の果実から total RNA を調製し、設計したプライマーを用いて、RT-PCR、および5'-RACEを行った。77.5 kDa β-ガラクトシダーゼの情報から open reading frame (ORF) 2175 bp、724 アミノ酸残基からなる配列を、47.9 kDa β-ガラクトシダーゼの情報から ORF 2544 bp、847 アミノ酸残基からなる配列をクローニングした。blast 検索の結果、これらの推定アミノ酸配列中には Glycosyl Hydrolases Family (GHF) 35 に属するβ-ガラクトシダーゼ II の保存領域である G-G-P-[LIVM]-x-Q-x-E-N-E-[FY] の配列が確認された。よってクローニングした配列はβ-ガラクトシダーゼをコードしていることが示唆され、前者の配列を pepper beta-galactosidase 1 (PBG1) とし (Fig. 5)、後者の配列を pepper beta-galactosidase 2 (PBG2) とした (Fig. 6)。

PBG1 の推定アミノ酸から一次構造から予想される分子質量は 77.6 kDa であり、精製の結果とほぼ一致していた。また、予想される成熟領域は決定したN末端アミノ酸配列と同じ24残基目から始まり、配列も一致していることから PBG1 が精製で得られた 77.5 kDa β-ガラクトシダーゼをコードしていることが示唆された。

PBG2 の推定アミノ酸から一次構造から予想される分子質量は 90.0 kDa であった。予想される成熟領域は決定したN末端アミノ酸配列と同じ25残基目から始まり、配列も一致していることから PBG2 が精製で得られた 47.9 kDa β-ガラクトシダーゼ

をコードしていることが示唆された。しかし、分子質量が精製のものとは異なることから細胞内プロテアーゼによりC末端領域が切断されている可能性が高いことが示された。PBG2の750アミノ酸残基以降からガラクトース結合レクチン領域の存在も確認された。

PBG1、PBG2、およびこれまでに報告のある植物由来β-ガラクトシダーゼの配列から系統樹を作成すると、植物のβ-ガラクトシダーゼは大きく3つのグループに大別された (Fig. 7)。PBG1が属するグループIIIのβ-ガラクトシダーゼは果実由来のものが多く、ガラクトース結合レクチン領域を配列に含まない特徴を有していた。またこのグループに属している果実は、成熟後期に果肉が非常に柔らかくなる特徴を有する植物が多く見られた。一方、PBG2はグループIIに属し、これらβ-ガラクトシダーゼの中には果実以外の組織由来のもの多く、ガラクトース結合レクチン領域を含むという特徴を有していた。

PBG1とPBG2の局在を調べるため、ピーマンの各組織からtotal RNAを調製し定量RT-PCRにより解析した (Fig. 8)。PBG1は成熟後期のRedの時期に発現量が劇的に多く、花での発現も比較的多かった。一方PBG2は全体的に発現量が低く、成熟前期の果実においてPBG1の発現量を上回るだけだった。成熟後期の発現量とFigure 2、および3の結果から、果実成熟にはβ-ガラクトシダーゼPBG1が最も関係していることが示唆された。

第2章 β-ガラクトシダーゼの性質決定

単離したβ-ガラクトシダーゼの基質特異性の決定は、β-ガラクトシダーゼがピーマン果実内でどのような働きを理解する上で非常に重要である。また、細胞壁の構造を知る手掛かりともなり得る。本章では単離した2つのβ-ガラクトシダーゼの酵素学的性質の決定を目的とした。

β-ガラクトシダーゼPBG1は果実からの精製により十分量のタンパク量が得られることから、精製酵素標品を用いて性質決定を行った。各*p*-nitrophenyl-グリコシドを基質とし、*p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideに対する活性を100%とした相対活性は、α-L-アラビノフラノシダーゼ活性の7%を最高にとっても低いものであった (Table 2)。β-ガラクトシド結合を含むオリゴ糖、及び多糖に対する活性では、

β -1,4-ガラクトシド結合を特異的に加水分解することが示された (Table 3)。さらに、高分子の β -1,4-ガラクトタンに対する活性を有する事から、 β -1,4-ガラクトタンを PBG1 により経時的に加水分解した分解産物を HPLC により解析したところ、時間の経過とともにガラクトースの遊離量の増加が確認された (Fig. 9)。よって β -ガラクトシダーゼ PBG1 は β -1,4-ガラクトシド結合を非還元末端から *exo* 型に加水分解する *exo*-1,4- β -ガラクタナーゼである事を明らかにした。

次に、Mature green、および Red のピーマン果実から細胞壁を調製し、さらにペクチン画分、ヘミセルロース画分、およびセルロース画分に分画し、これらが β -ガラクトシダーゼ PBG1 の基質になり得るかを検証した。これと並行してそれぞれの画分のガラクトース含量を測定、比較した。 β -ガラクトシダーゼ PBG1 によるガラクトースの遊離量は Mature green のペクチン画分、特に Covalently bound pectin において多かった。また、Mature green と Red の各画分のガラクトース量を比較すると Covalently bound pectin においてその減少が顕著であった。このことから細胞壁中の β -1,4-ガラクトタンはペクチン中に多数存在し、*in vivo* において β -ガラクトシダーゼ PBG1 の基質となり、果実の成熟とともに加水分解されることが示唆された。よって β -ガラクトシダーゼ PBG1 はペクチンの分解に関与するペクチン修飾酵素の一つであるといえる。一方、セルロース、ヘミセルロース画分に対して β -ガラクトシダーゼ PBG1 の反応性が悪いことから、これらの画分には β -1,4-ガラクトタンの存在量が少ない、あるいは β -ガラクトシダーゼ PBG1 の作用を受けにくい構造となっていることが考えられた。

β -ガラクトシダーゼ PBG2 は果実からの精製により十分量のタンパク量が得られないこと、精製過程でプロテアーゼによる切断を受けている可能性があることから PBG2 本来の性質を反映しないことを考慮し、酵母を宿主とした発現系の構築を行った。*Saccharomyces cerevisiae* を宿主とし、PBG2 全長、PBG2 のシグナルペプチドを除いた領域、および、*S. cerevisiae* の分泌シグナルである α -malting factor を成熟領域に付加した発現用プラスミドを作成したが発現は認められなかった。現在、*Pichia pastoris* を宿主とし、発現を行っている。

第3章 果実成熟における β -ガラクトシダーゼの生理的役割の解明

第2章の結果から、 β -ガラクトシダーゼ PBG1 は果実細胞壁ペクチン中の β -1,4-

ガラクトランを加水分解するペクチン修飾酵素であり、果実の成熟に関与することが強く示唆された。植物細胞壁中のペクチンは主にホモガラクチュロナン (HGA)、ラムノガラクチュロナン I (RG I)、およびラムノガラクチュロナン II (RG II) によって構成されている (Fig 10)。中でもペクチン中のガラクトースは主に RG I の側鎖のガラクトランとして存在していることが知られている。前章の結果から β -ガラクトシダーゼ PBG1 は RG I 中の側鎖の β -1,4-ガラクトランを分解していると考えられる。植物果実の軟化はペクチン中の HGA の *endo*-ポリガラクチュロナーゼによる *endo* 型の分解が最大の要因とされてきたが、これまでのトマト果実におけるペクチン修飾酵素の発現抑制の研究から、*endo*-ポリガラクチュロナーゼ以外に β -ガラクトシダーゼも果実の軟化に関わっている可能性が示唆されている。そこで本章では、成熟中のピーマン果実において β -ガラクトシダーゼと *endo*-ポリガラクチュロナーゼの関係を遺伝子の発現、および果実の細胞壁の糖含量の変化で明らかにすることを目的とした。

ピーマン果実中の *endo*-ポリガラクチュロナーゼ活性を見出すのが困難であったため、他の植物から報告されている *endo*-ポリガラクチュロナーゼ遺伝子の情報をもとに、ピーマン果実由来 *endo*-ポリガラクチュロナーゼ遺伝子のクローニングを試みた。果実の軟化が促進している Over ripening (OR) の果実から total RNA を調製し、RT-PCR を行って、935 bp、311 アミノ酸残基からなる配列を取得した。blast 検索の結果、GHF 28 に属するドメインを含む植物果実由来 *endo*-ポリガラクチュロナーゼと高い相同性が見られた。そこでこの遺伝子を pepper *endo*-polygalacturonase 1 (PPG1) とした。

成熟中のピーマン果実においてそれぞれの遺伝子の発現をみるため、開花後、一定期間ごとに果実をサンプリングして total RNA を調製し、定量 RT-PCR による PBG1、PBG2、および PPG1 の発現時期、および発現量の関係を調べた (Fig. 11)。PBG1 の発現量は、Turning (T) の時期に急激に増加し、成熟後期まで高い発現量を維持していた。一方、PPG1 は成熟前期の Mature green のころまで全く発現していないが、Turning の時期から発現が見られ、Red の時期に急激な発現量の増加が見られた。PBG2 の発現は各成熟段階において低く、成熟初期に発現のピークを迎え、その後減少していた。このことから β -ガラクトシダーゼ PBG2 は果実の軟化に関与していないことが示唆された。

次に果実細胞壁のガラクトース量、およびウロン酸量を測定した (Fig. 12)。細胞

壁中のガラクトース含量は PBG1 の発現と反比例するように Turning の時期から顕著に減少が見られた。一方、ウロン酸量は果実の成熟とともにその量は増加し、減少は見られなかった。このことから β -ガラクトシダーゼ PBG1 は成熟において細胞壁ペクチン中の β -1,4-ガラクトタンを加水分解し、果実軟化を促進することが示唆された。また、予想に反し果実の軟化に伴いウロン酸量の減少が起こらないのは *endo*-ポリガラクトチュロナーゼの加水分解様式が非常に高分子の単位で起こるため、オリゴガラクトチュロナンが細胞壁に留まり、細胞質へ溶出しにくいことが考えられた。

総合考察

本研究では、ピーマン果実から精製により 2 種の β -ガラクトシダーゼを見出し、それぞれ PBG1、PBG2 をクローニングした。この 2 つの β -ガラクトシダーゼの中で、果実の成熟後期に多量に発現している β -ガラクトシダーゼ PBG1 は基質特異性の決定から、本酵素は *exo*-1,4- β -ガラクトナーゼ活性を有する β -ガラクトシダーゼ II に分類されることを明らかにした。本酵素の基質特異性は他の植物果実から精製された β -ガラクトシダーゼと共通し、アミノ酸配列から作成した系統樹においても、共通のグループ III に属することから、グループ III の β -ガラクトシダーゼは果実の成熟に働いていることが推測された。また、 β -ガラクトシダーゼ PBG1 はピーマン果実細胞壁中のペクチンから多量のガラクトースを遊離することから、ペクチン中に β -1,4-ガラクトタンが大量に存在することを明らかにし、このガラクトースが成熟後期に著しく減少することを見出した。このことから β -ガラクトシダーゼ PBG1 はペクチン中の β -1,4-ガラクトタンを加水分解し、ピーマン果実の成熟に関与しているペクチン修飾酵素であることが強く示唆された。

β -ガラクトシダーゼ PBG1 の発現の上昇と反比例するように細胞壁中のガラクトース含量が減少していた。このことから β -ガラクトシダーゼ PBG1 がピーマン果実の成熟に関与していることを強く支持していた。また、 β -ガラクトシダーゼ PBG1 の発現は、果実軟化の最大要因として考えられている *endo*-ポリガラクトチュロナーゼ PPG1 の発現よりも先行して増加していた。よって β -ガラクトシダーゼ PBG1 の果実内での役割はペクチン側鎖の β -1,4-ガラクトタンの加水分解であり、果実軟化を誘引する先駆的役割を担っていることが示唆された。

以上の結果を踏まえ、Figure 13 のような果実の成熟における細胞壁軟化の機構を示すモデルを提唱した。Mature green から Turning の時期にかけて β -ガラクトシダーゼ PBG1 が劇的に発現し、RGI 中の側鎖の β -1,4-ガラクトンが加水分解される。ガラクトースの遊離により RGI あるいはペクチン全体の構造が変化し、果実の軟化が始まると考えられる。Red の時期にかけて *endo*-ポリガラクトチュロナーゼ PPG1 の発現量が増加し、HGA のランダムな加水分解が促進される。これによりペクチン構造の大規模な崩壊が起こり果実の軟化はさらに進むと考えられる。

要約

- 1) ピーマン果実から Glycosyl Hydrolases Family 35 に属する2つの β -ガラクトシダーゼ PBG1、PBG2 を単離しその性質を明らかにした。
- 2) β -ガラクトシダーゼ PBG1 の基質特異性の決定から、本酵素は *exo*-1,4- β -ガラクトナーゼであることを明らかにした。
- 3) β -ガラクトシダーゼ PBG1 は *in vivo* において細胞壁のペクチン中の β -1,4-ガラクトン残基を基質として加水分解し、果実の成熟に関与することが示唆された。
- 4) ピーマン果実において、 β -ガラクトシダーゼ PBG1 の発現は *endo*-ポリガラクトチュロナーゼに先だって増加していることから、PBG1 はピーマン果実軟化(ペクチン構造の崩壊)の引き金的な役割をしていることが示唆された。

原著論文

1. S. Ogasawara, K. Abe, and T. Nakajima : Pepper β -galactosidase 1 (PBG1) plays a significant role in fruit ripening and softening in bell pepper (*Capsicum annuum*). (Submitted to Plant and Cell Physiology)
2. S. Ogasawara, K. Abe, and T. Nakajima : Molecular cloning of pepper β -galactosidase 2 (PBG2) from bell pepper (*Capsicum annuum*) and its characterization and expression analysis. (Manuscript in preparation)

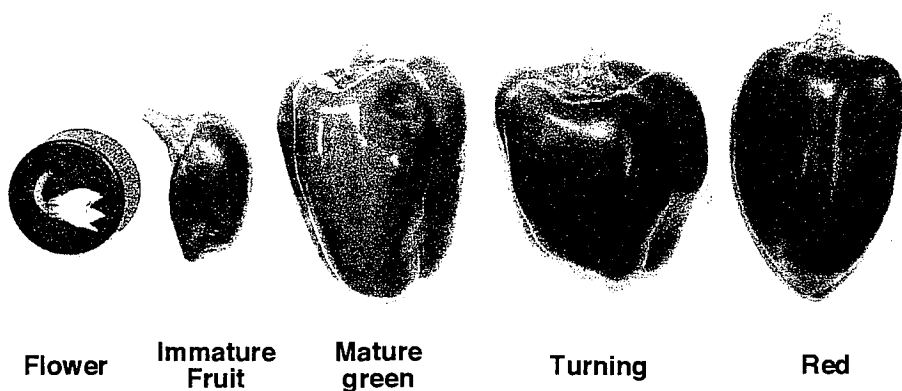


Figure 1. Temporal change of pepper fruit after anthesis

Table 1. Related proteins in cell wall development and maturation

	Protein	Role
Cellulose	Cellulose synthase	Cellulose expansion
	β -1,4-Glucanase	Hydrolysis of xyloglucan
Xyloglucan	Xyloglucan endotransglycosylase	Synthesis new xyloglucan polymer
	Expansin	Depolymerization of polysaccharides
	Polygalacturonase (pectinase)	Degradation of homogalacturonan
Pectin	Pectin methylesterase	De-esterification of pectin
	Pectin lyase	Depolymerization of pectins
	β -Galactosidase	???

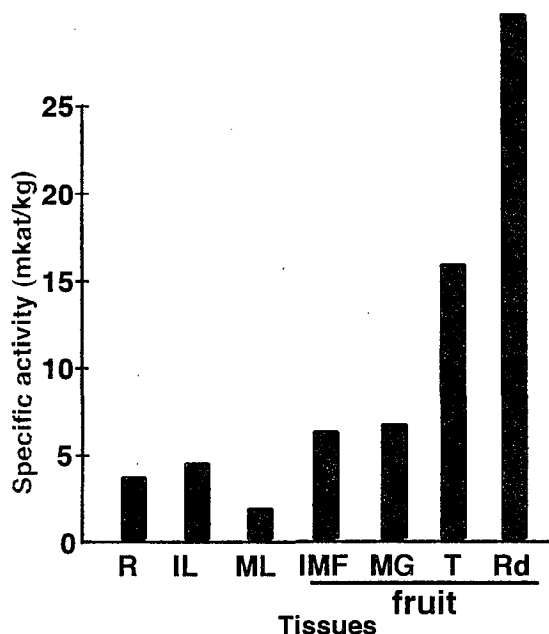


Figure 2. Specific activity of β -galactosidase in various pepper plant tissues

Crude enzyme was extracted from various bell pepper plant tissues. Tissues were harvested from root (R), immature leaf (IML), mature leaf (ML), immature fruit (IMF, dpp 15), mature green fruit (MG, dpp 40), turning (T), and red-stage fruit (Rd). One katal (kat) of activity is defined as the amount that releases 1 mol *p*-nitrophenol per second at 50 °C from *p*NP- β -galactopyranoside.

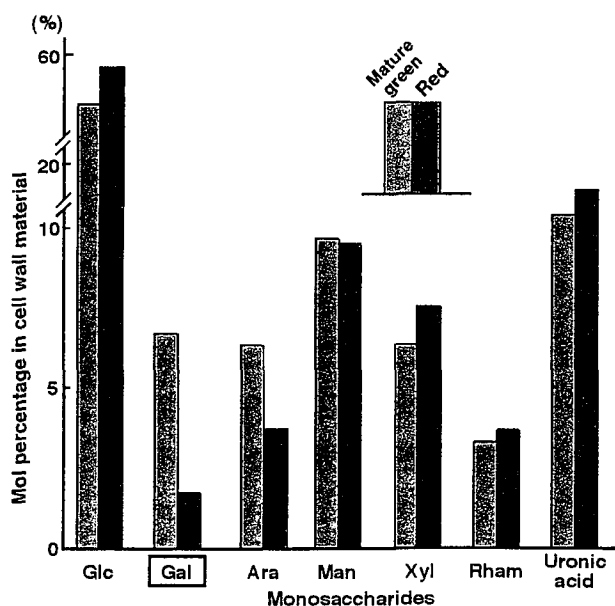
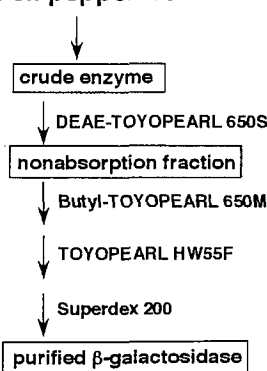


Figure 3. Sugar composition of cell wall material from mature green and red-stage fruits

Cell wall materials were extracted from mature green (green bars) and red-stage fruit (red bars). Values in the graph represent the percentage of each sugar in the total sugar content in the cell wall material. Glc, glucose; Gal, galactose; Ara, arabinose; Man, mannose; Xyl, xylose; Rham, rhamnose.

(A) Bell pepper fruit



(B)

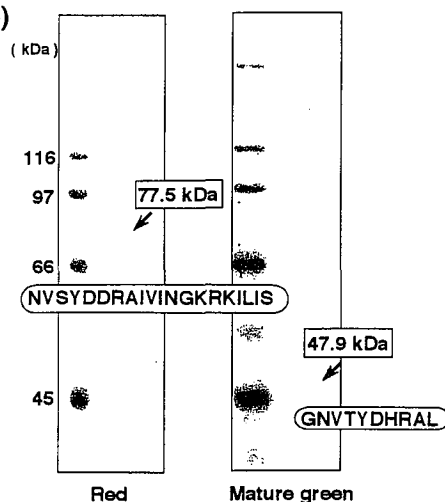


Figure 4. Purification of β -galactosidases from bell pepper fruit

(A) Scheme of purification for β -galactosidase from bell pepper fruit. (B) SDS-PAGE analysis of purified β -galactosidases and its N-terminal amino acid sequences. Left panel is 77.5 kDa β -galactosidase purified from red-stage bell pepper fruit. Right panel is 47.9 kDa β -galactosidase purified from mature green stage bell pepper fruit.

Table 2. Enzyme activities of the purified β -galactosidase PBG1 toward various *p*NP-glycosides

Substrate	Relative activity
<i>p</i> NP- β -D-galactopyranoside	100%
<i>p</i> NP- α -L-arabinofuranoside	7.0%
<i>p</i> NP- α -D-galactopyranoside	1.1%
<i>p</i> NP- β -D-xylopyranoside	1.0%
<i>p</i> NP- α -L-rhamnopyranoside	0.6%
<i>p</i> NP- α -L-fucopyranoside	0.5%
<i>p</i> NP- α -L-arabinopyranoside	0.4%
<i>p</i> NP- α -D-xylopyranoside	0.4%
<i>p</i> NP- β -L-fucopyranoside	0.2%
<i>p</i> NP- β -L-arabinopyranoside	N.D.
<i>p</i> NP- α -D-glucoopyranoside	N.D.
<i>p</i> NP- β -D-glucoopyranoside	N.D.
<i>p</i> NP- β -D-mannopyranoside	N.D.
<i>p</i> NP- β -D-mannopyranoside	N.D.

N.D.: not detected

*p*NP-glycoside substrate was incubated at 50°C for 20 min with 0.4 pkat of β -galactosidase activity against *p*NP- β -D-galactopyranoside.

Table 3. Enzyme activities of the purified β -galactosidase PBG1 toward various substrates

	structure	Gal release from 100 μ g substrate
Methyl- β -D-galactopyranoside	Gal-Me	N.D.
Galactobiose	Gal-1,4-Gal	4.7 μ g
	Gal-1,6-Gal	0.2 μ g
Lactose	Gal-1,4-Glc	4.8 μ g
Lactulose	Gal-1,4-Fru	3.3 μ g
Gum arabic galactan	1,3;1,6 polymer	N.D.
Larch arabinogalactan	1,3;1,6 polymer	N.D.
Rupin galactan	1,4 polymer	10.1 μ g

Substrate concentration is 0.5% N.D.: not detected

Substrate was incubated at 30°C for 1 hr with purified enzyme containing 1.0 nkat of β -galactosidase activity against *p*NP- β -D-galactopyranoside.

Table 4. Enzyme activities of the purified β -galactosidase PBG1 toward cell wall fractions from bell pepper fruit

fraction	Galactose content of 1 mg substrate (μ g)	Galactose release from 1 mg substrate (μ g)
Mature green fruit		
pepper cell wall material	29.75 \pm 8.23	3.43
Ionically-associated pectin	4.25 \pm 0.55	2.19
Covalently-bound pectin	57.26 \pm 7.27	14.1
Hemicellulosic fraction	16.32 \pm 1.35	2.74
Cellulosic fraction	17.98 \pm 1.93	0.23
Red fruit		
pepper cell wall material	2.22 \pm 1.01	0.30
Ionically-associated pectin	1.18 \pm 0.31	0.16
Covalently-bound pectin	3.88 \pm 0.30	1.10
Hemicellulosic fraction	4.34 \pm 1.44	2.52
Cellulosic fraction	3.34 \pm 0.48	0.14

One milligram of substrate was incubated at 30°C for 1 hr with purified enzyme containing 1.0 nkat of β -galactosidase activity against *p*NP- β -D-galactopyranoside.

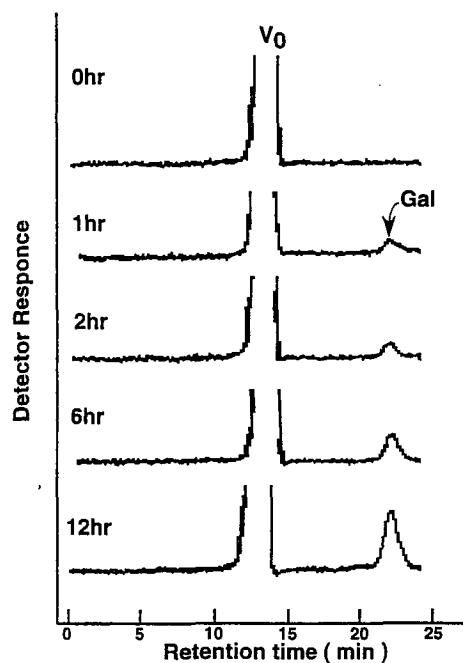


Figure 9. Time course of hydrolysis of Lupin 1,4- β -D-galactan by purified β -galactosidase PBG1 followed by separation on TSK gel G2000PW

Lupin 1,4- β -D-galactan was incubated at 30°C for 1, 2, 6, and 12 hr with purified enzyme containing 1.0 nkat of β -galactosidase activity against *p*NP- β -D-galactopyranoside. After incubation, products were analyzed by HPLC with TSK gel G2000PW column.

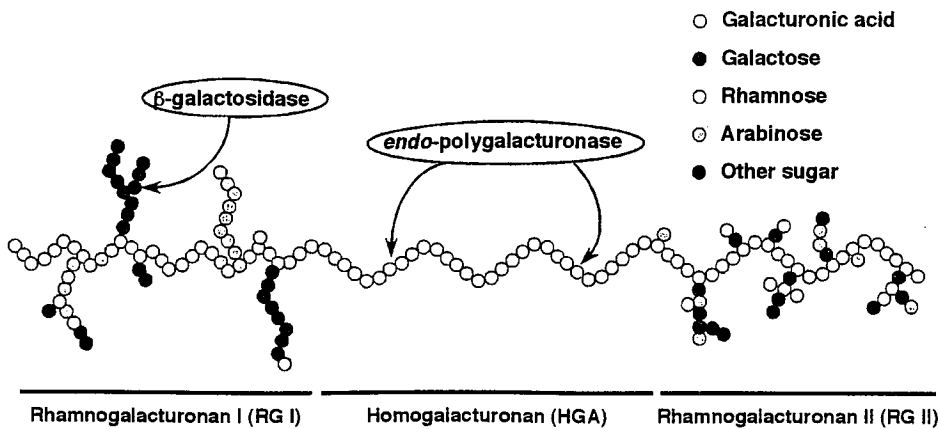


Figure 10. Structure of pectin
Average structure of pectin was pictured based on previous report (Ridley *et al.*, 2000, and Willats *et al.*, 2001).

Table 5. Suppressional effect of pectin-modifying enzyme on fruit maturing from previous reports

Enzyme	Role	Effect	Reference
Polygalacturonase	Degradation of homogalacturonan	Inhibiting fruit softening, but not stopping completely	Smith <i>et al.</i> , 1988
Pectin methylesterase	De-esterification of pectin	No effect on fruit softening	Tieman <i>et al.</i> , 1992
β -Galactosidase TBG1 (homologue yet discover in bell pepper)	Hydrolysis β -1,4-galactan	No effect on fruit softening	Carey <i>et al.</i> , 2001
β -Galactosidase TBG4 (PBG1 homologue)	Hydrolysis β -1,4-galactan	Decrease of fruit softening	Smith <i>et al.</i> , 2002
β -Galactosidase TBG6 (homologue yet discover in bell pepper)	Hydrolysis β -1,4-galactan	Increase of fruit cracking	Moctezuma <i>et al.</i> , 2003

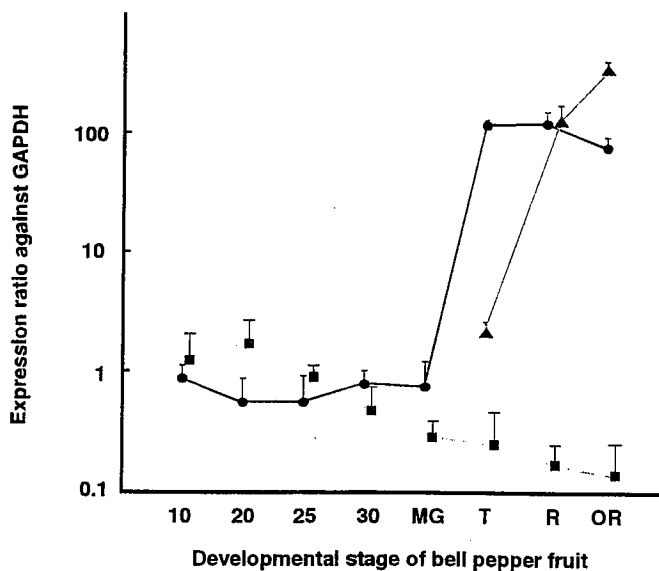


Figure 11. Quantitative RT-PCR analysis of PBG1, PBG2, and PPG1 temporal expression during fruit ripening
Total RNA extracted from all fruit tissues except seeds. Fruits were harvested at dpp 10, 20, 25, and 30, and at the mature green (MG), turning (T), red (R), and over-ripened stages (OR). Levels of PBG1 (circles and red line), PBG2 (box and blue line), and PPG1 (triangles and green line) transcripts are shown relative to GAPDH levels. Error bars represent the standard deviation.

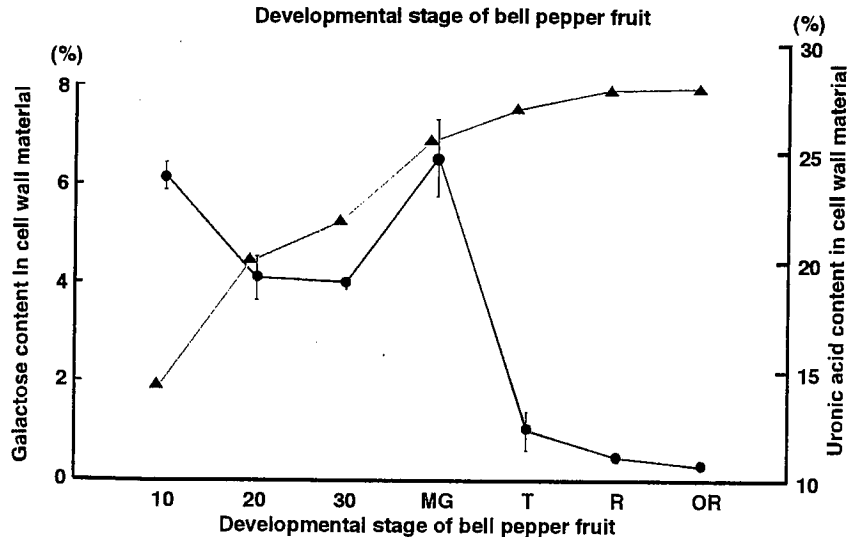


Figure 12. Quantitative analysis of galactose and uronic acid in cell wall material during fruit ripening
Cell wall material extracted from all fruit tissues except seeds. Fruits were harvested at dpp 10, 20, and 30, and at the mature green (MG), turning (T), red (R), and over-ripened stages (OR). Cell wall materials were hydrolyzed in 4 N trifluoro acetic acid (TFA) for 3 h at 100 °C, total sugar content was measured by the phenol-H₂SO₄ method, and the total galactose content were measured by the galactose-oxidase method. Values in the graph represent the percentage of galactose or uronic acid content in the total sugar content in the cell wall material.

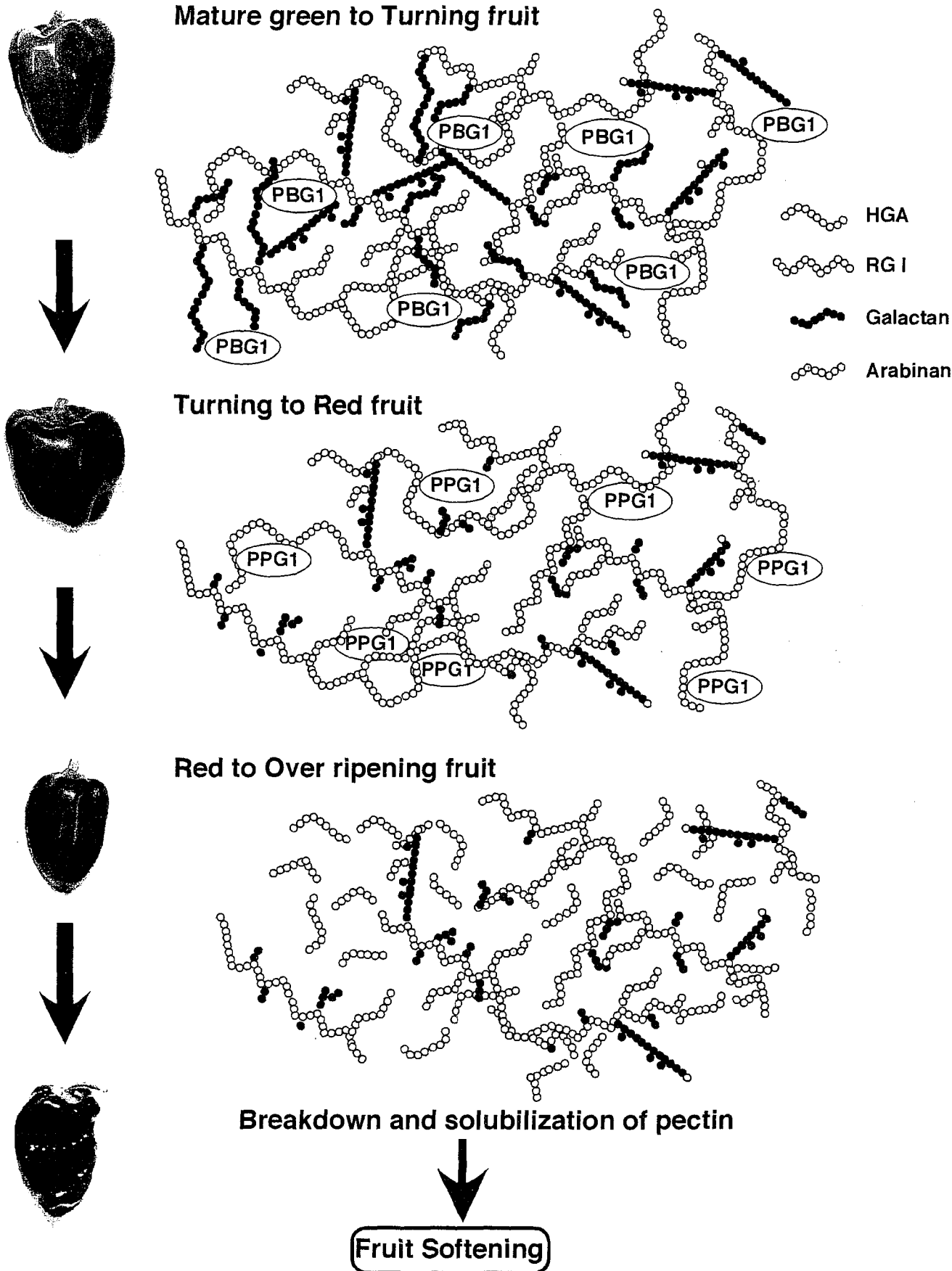


Figure 13. Cell wall model of bell pepper fruit softening

(Mature green to Turning fruit) As fruit goes from the turning to the red stage, the expression level of β -galactosidase PBG1 increases drastically. Oligo- β -1,4-galactosyl residues attached to RG I are hydrolyzed by PBG1. As a result, the side chain structures in the pectin complex are decomposed markedly and a considerable amount of space is generated in the matrix structure, with an increase of hydrolyzed free galactose residues in the cytosol fraction. These events may bring about changes in carbon metabolism, firmness of the fruit, and activity or expression of *endo*-polygalacturonase.

(Turning to Red fruit) As the fruit goes from the red to the over-ripened, the expression level of *endo*-polygalacturonase PPG1 increases drastically, and homogalacturonan (HGA) backbones are partially hydrolyzed by PPG1.

(Red to Over ripening fruit) As a result, breakdown and solubilization of pectin occurs, and fruit softening promotes further.

論文審査結果要旨

植物においては、細胞の肥大・成熟に伴い細胞壁の構造変化がともなう。特に果実細胞では、成長に伴い大きさ・硬さが劇的に変化している。

本学位論文ではナス科植物の一種であるピーマン (*bell pepper, Capsium annuum*) を用いて、果実の成熟過程でのグリコシダーゼの機能、特にベータ-ガラクトシダーゼの役割について明らかにする事を目的とした。

ピーマン果実は成熟に伴い、果色が緑色から赤色へと劇的に変化すると同時に果肉の軟化がおこる。候補者はピーマン各組織中のグリコシダーゼ活性を成長・成熟段階別に測定したところ、ピーマン果実が赤色に変化し組織が軟化する成熟段階でベータ-ガラクトシダーゼ活性が急激に上昇すること、さらに、緑色の果実と成熟後の赤色果実の細胞壁糖組成を測定比較した結果、ガラクトース含量だけが特異的に減少していることを見出した。この結果から、候補者はピーマン果実の成熟にベータ-ガラクトシダーゼが重要な役割を有していると考えた。

候補者は、ピーマン果実から2種類のベータ-ガラクトシダーゼ、PBG1, PBG2を単離精製しその性質を決定し、クローニングにも成功した。その中でPBG1は本研究の目的である、果実成熟後期に発現しているベータ-ガラクトシダーゼであることが証明された。PBG1の基質特異性が決定され、本酵素はエキソ-1,4-β-ガラクタナーゼであることが明らかになった。一方ピーマン果実細胞壁を構成する多糖類、セルロース画分、ヘミセルロース画分、ペクチン画分に分画し、各々に対しPBG1による加水分解を行うと、ペクチン画分から多量のガラクトースが遊離した。この結果よりPBG1が果実成熟時に細胞壁ペクチンを加水分解していることを証明した。果実の軟化に深く関係している酵素としてエンドポリガラクチュロナーゼが良く知られており、本研究で得られたベータ-ガラクトシダーゼと果実細胞の軟化過程においてどのような関わりを有しているかを、明らかにする目的で、エンドポリガラクチュロナーゼ遺伝子 (PPG1) をクローニングし、ベータ-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現パターンを比較した。その結果ベータ-ガラクトシダーゼはエンドポリガラクチュロナーゼに先行して発現していることが示された。以上の結果を踏まえて、候補者はピーマン果実におけるベータ-ガラクトシダーゼの役割について、果実成熟の引きがねとなるペクチン画分のガラクトンの分解を行い細胞壁の物理構造をルーズにすることで、後に起こるポリガラクチュロナーゼの細胞壁基質への加水分解を容易にし、細胞の軟化を促進するという新しい考え方を提唱した。

以上の候補者の研究成果は、果実の軟化過程においてベータ-ガラクトシダーゼによるペクチンの加水分解が引き金になるという新規なモデルを提唱するというもので、審査員一同、候補者は博士(農学)の学位を授与されるに充分の資格を有すると認定した。