

果実の軟化・肉質形成におけるグリコシダーゼ類の役割

日本大学 生物資源科学部 植物資源科学科 果樹・蔬菜園芸学研究室 立石 亮

1. はじめに

高品質な果実の条件として、甘さや見た目という他に、果肉の食感(肉質)も重要な要素として挙げられる。ふつう、多くの果実は成熟期に入ると果肉組織が軟化する。また、収穫後に一定期間が経過すると軟化する果実もある。成長中の幼果は硬く、我々が果実を食べるためには、果肉組織が適度に軟化することが必要である。一方、収穫後の保存状態や流通過程においても、果実の軟化は進行し、過熟状態となり、品質は著しく低下する。すなわち、商品として適切な軟化状態を長く維持することは容易ではなく、栽培現場では流通過程における軟化の進行を防ぐために、いわゆる「早採り」が行われることもある。このような果実では、果実が本来持つ品質を十分に発揮しているとはいえない。したがって、果実の軟化機構を解明しそれを制御することは、果実品質を最適に保つ上での基礎的知見となる。また、軟化にともなって、食べたときの食感(肉質)が形成される。果実に求められる食感は果実種で各々異なり、例えば、セイヨウナシでは果肉がとろけるようなメルティング質が好まれ、リンゴではシャキシャキとした食感が要求される。この肉質も収穫後に変化し、リンゴのある品種ではボソボソとした粉っぽさ(粉質性)を感じるようになる。このような点から、果実の軟化機構、さらに、肉質・食感の形成

機構を理解することは高品質の果実を生産する上で重要である。

2. 細胞壁の構造変化とポリガラクトツロナーゼ

果実の軟化は、果実細胞を取り囲む細胞壁の構造変化によるとされる¹⁰⁾。細胞壁は多糖類、タンパク質、リグニン等から構成されるが、とくに多糖類が変化し、その機械的強度が低下する。細胞壁多糖類は、キレート剤やアルカリに対する可溶性の違いから、ペクチン、ヘミセルロース、セルロースに分画されるが、果実軟化時にはペクチンとヘミセルロースで変化がみられ、一部の果実を除くとセルロースはほとんど変化しない。果実を構成する多糖類としてはペクチンの割合が最も高く、また、その変化の大きいのもペクチンで、果実の軟化時に低分子化する^{2, 14)}。ペクチンはセルロース繊維とそれに付随すると考えられているヘミセルロースとの間を充填する物質であると教科書等では説明されている。高分子のペクチン分子が低分子化することで、細胞壁の強度が低下し、果実が軟化するという考えは受け入れやすい。ペクチンは酸性糖の一つであるガラクトツロン酸が α -1,4結合したホモガラクトツロン酸を主成分とする。このホモガラクトツロン酸を加水分解するのがポリガラクトツロナーゼである。1990年代はじめまでは、ポリガラクトツロナーゼが果実の軟化に関与

するキーエンザイムであると考えられていた。実際に、ポリガラクトツロナーゼ活性は未熟な果実からは検出されず、果実成熟に伴って上昇する。また、活性レベルだけではなく、そのタンパク質やmRNAも成熟に伴って検出される。その他の状況証拠もポリガラクトツロナーゼの果実軟化への関与を示唆するものが多かった。しかしながら、2つのグループによるトマト果実を用いた形質転換実験からポリガラクトツロナーゼの軟化への関与の否定的な結果が得られた。Smithら³⁵⁾は、ポリガラクトツロナーゼのアンチセンス形質転換体を作成した。このトマトではWild typeが有するポリガラクトツロナーゼ活性をわずか1%まで低下させるのに成功したが、果実の軟化は抑制することはできなかった。また、Giovannoniら¹¹⁾は、成熟現象が抑制されている*rin*と呼ばれるトマト(このトマトでは成熟期になってもポリガラクトツロナーゼ活性が上昇しない)にポリガラクトツロナーゼを発現させた。その活性は60%まで回復したものの、軟化現象は誘導できなかったのである。したがって、ポリガラクトツロナーゼは少なくとも単独で軟化を誘導しないことが明らかとなった(図-1)。

上述のアンチセンス形質転換体はフレーバーセーバーという名称で販売された遺伝子組み換え食品第1号である。一般的には、軟化しないトマトという認識もあるが、このトマトはポリガラクトツロン酸の低分子化が抑制され、果実の割れ(cracking)が抑制されたため、輸送に適したと言われている。また、果汁の粘性が上昇し、ペースト等への加工適正が増加した^{19, 20, 34)}。ポリガラクトツロナーゼは果実の機械的軟化よりもむしろ肉質の形成に貢献しているようである。ポリガラクトツロナーゼの果実軟化への否定的な結果から、どの細胞壁分解酵素が軟化に関与し

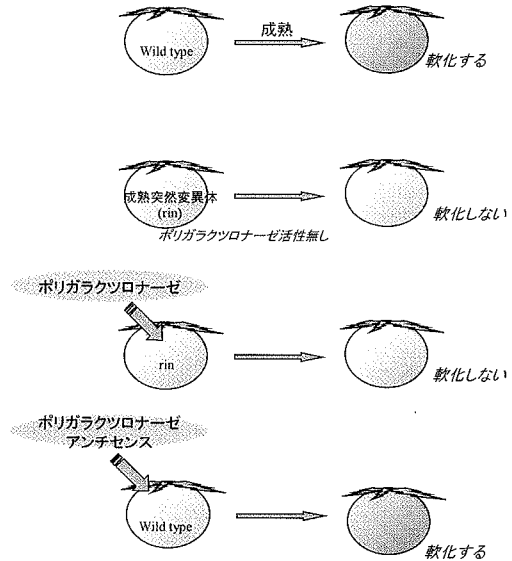


図-1 ポリガラクトツロナーゼと軟化との関係。形質転換によりポリガラクトツロナーゼは軟化の主要因ではないことが明らかとなった。

ているのかについて、多くの研究が試みられた(表-1)。ペクチンを構成するガラクトツロン酸を脱メチルエステル化するペクチンメチルエステラーゼや、双子葉植物のヘミセルロースの主成分であるキシログルカンの加水分解やつなぎかえを行うキシログルカン転移・加水分解酵素、 β -グルカナーゼ(セルラーゼ)について、ポリガラクトツロナーゼ同様に形質転換体を作成された。しかしながら、これらの形質転換体の果実では、いずれもWild typeとほとんど軟化パターンは変わらず、果実軟化へはほとんど影響していないことが示された^{1, 2, 3, 45)}。

3. グリコシダーゼ類の関与

前述の通り、果実成熟時にはペクチンの低分子化がみられるが、これは比較的成熟の後期に起こることから、過熟による細胞壁多糖類の崩壊や肉質の変化に関与していると考えの方が妥

表-1 代表的な細胞壁分解酵素の働き

酵素	ターゲット	果実軟化時の効果
ポリガラクトツロナーゼ ^{10, 34)}	ペクチン (ホモガラクトツロン酸)	低分子化
ペクチンメチルエステラーゼ ⁴⁴⁾	ペクチン (ホモガラクトツロン酸)	脱メチルエステル化
キシログルカン転移・加水分解酵素 ¹⁾	ヘミセルロース (キシログルカン)	低分子化、転移
β -グルカナーゼ (セルラーゼ) ²⁾	ヘミセルロース (キシログルカン) ? セルロース?	不明
エクスパンシン ⁴⁾	ヘミセルロースとセルロースの 水素結合部分	水素結合の破壊?
β -ガラクトシダーゼ ³⁷⁾	ペクチン、ヘミセルロース	可溶化?
α -アラビノフラノシダーゼ	ペクチン、ヘミセルロース	可溶化?

片括弧の数字は文献番号を示す。

当ともいえる。一方、ペクチンの低分子化に先立ち、可溶化という現象が観察される。可溶化はペクチン分子が水やある種の緩衝液に溶けやすい状態に変化することであり、このとき必ずしも低分子化は必要でない^{9, 31)}。また、可溶化とともに、多糖類を構成するガラクトースやアラビノースの遊離 (消失) がみられる¹²⁾。ガラクトースやアラビノースはペクチン側鎖やヘミセルロースを構成する中性糖で、とくに、ガラクトースの遊離は多くの種類の果実において観察される。これら中性糖の遊離にはグリコシダーゼ類が関与する。中性糖残基の遊離は多糖類の性質を変化させて、果実の軟化や肉質の変化に貢献している可能性や、あるいは、他の細胞壁分解酵素がその基質となる多糖類と反応しやすい環境を構築する可能性がある。すなわち、ガラクトースやアラビノースを遊離する β -ガラクトシダーゼや α -アラビノフラノシダーゼ

が果実の軟化や肉質の変化に貢献している可能性が考えられる。

(1) β -ガラクトシダーゼと果実の軟化

ガラクトースで構成される多糖類をガラクトンと呼ぶ。高等植物からはエンド型のガラクタナーゼ (ガラクトンを内部からランダムに切断する) が見つかっていないことから、 β -ガラクトシダーゼ (エキソ型 β -ガラクタナーゼ、ガラクトンを末端から切断する) がガラクトースの遊離に働いているとされる³⁶⁾。多くの果実で成熟に伴う β -ガラクトシダーゼ活性が測定されているが、クロマトグラフィーによって複数のアイソザイムに分けられ、成熟に伴うそれらの活性変動は異なっている。例えば、トマト果実からはタンパク質として3つのアイソザイムが分画されており、そのうちの1つ (β -galactosidase II) が果実成熟時に活性上昇を示す³⁰⁾。リンゴ、ニホンナシ、

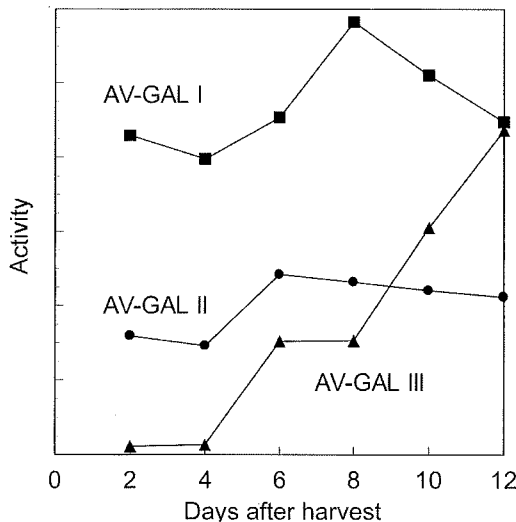


図-2 アボカド追熟時の β -ガラクトシダーゼアイソザイムの活性変動。AV-GAL IとIIは、追熟前の硬い果実でも活性が検出されるが、AV-GAL IIIは、追熟に伴って活性上昇を示し、果実の軟化パターンと一致する。また、成熟ホルモンのエチレンによって制御されている。

アボカド、パパイヤからもタンパク質レベルで β -ガラクトシダーゼは分画・精製されており、特定のアイソザイムが果実成熟時に活性上昇を示す^{17, 21, 39, 48)} (図-2)。

一般に、グリコシダーゼ類の活性測定には

-ニトロフェノールに糖を結合させた人工基質が用いられている。人工基質の結合様式は生体内のそれを反映しているわけではなく、生体基質への反応性と異なることが多い。トマトにおいて、成熟時に活性上昇を示すアイソザイムは生体基質であるガラクトサン分解活性も高いことが示されており、果実細胞壁の分解に関与している³⁰⁾。その他の果実でも各々のアイソザイムは活性の上昇時期や基質特異性（ガラクトースの結合様式に対する反応性）が異なることから区別することができ、それぞれ異なった役割を持つことが推測されている。リンゴ、トマト、ニホ

ンナシにおいては、成熟時に活性上昇を示し、細胞壁多糖類からのガラクトース遊離能力の高いアイソザイムのアミノ酸配列が解析され、それをコードする遺伝子が単離されている^{32, 36, 40)}。その発現は果実に特異的で、また、成熟時に新規にmRNAの蓄積がみられることから、エチレン生成を含む成熟シグナルによって果実で誘導されることが示された。さらに、トマトにおいては、形質転換によって上述の β -galactosidase IIをコードする遺伝子であるTBG4のアンチセンス形質転換体が作出された。その結果、軟化の進行を完全には抑制できないものの、軟化程度がWild typeと比較して抑制されることが示され³⁸⁾、 β -ガラクトシダーゼの果実軟化への貢献が明らかとなった。

(2) β -ガラクトシダーゼの果実成長における役割

遺伝子として β -ガラクトシダーゼを解析すると、ジーンファミリーを形成しており、トマト、イチゴ、ニホンナシ、アボカド、セイヨウナシ等で3～8つのアイソザイムが単離されている^{33, 37, 41, 43, 46)}。それぞれのアイソザイムは果実や植物体の成長、発達や成熟の様々なステージで互いにオーバーラップする形で発現しており、器官特異的な発現もみられる。植物の伸長といくつかの細胞壁分解酵素についての報告は古くからあるが、 β -ガラクトシダーゼについても、軟化に関与するアイソザイムの他に果実や植物体の肥大・成長に関与する可能性が示された。実際に、トマトの β -ガラクトシダーゼアイソザイムの一つであるTBG6の発現を抑制すると果実にクラックが入ることから、このアイソザイムは果実肥大時の細胞壁の弾力性に関与するとされている²⁴⁾。成長・肥大期に発現が

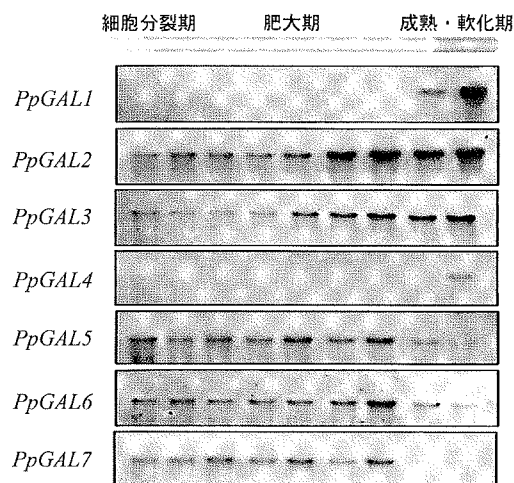


図-3 ニホンナシ果実の β -ガラクトシダーゼアイソザイムの遺伝子発現。少なくとも7つの遺伝子が果実の成長・成熟期間中に発現している。文献41より引用、一部改変。

増大するアイソザイムのいくつかは、成熟期に発現が低下し、一部は成熟ホルモンであるエチレンによって強く発現が抑制される^{24, 25, 41, 43)}(図-3)。

(3) α -アラビノフラノシダーゼ

ガラクトースの遊離に加えて、アラビノースの遊離も多く果実で観察される。アラビノースの遊離には α -アラビノフラノシダーゼが関与していると考えられ、リンゴ、ナシ、アボカド、カキ、モモなど数種の果実で、成熟時に活性上昇がみられる^{5, 39, 44, 47, 48)}。アラビノースは、アラビナン、アラビノガラクトン、アラビノキシラン等の多糖類を構成し、ペクチンやヘミセルロースに存在する。細胞壁多糖類を構成するアラビノースは、多糖類同士のあるいは細胞同士の接着性に重要であると考えられている。例えば、肉質が粉質性を示す変異体トマトでは、アラビノースを含む多糖類が他の多糖類と強固に結合していることが観察されている^{27, 28)}。同様

の結果はモモでも観察されている^{5, 6)}。また、収穫後のリンゴ果実では、比較的弱く結合している細胞壁多糖類からアラビノースの遊離がみられるが、その際に粉質性を示すリンゴではアラビノースの遊離が減少する^{26, 29)}。培養細胞を用いた実験から、カルスの細胞接着にもアラビナンの存在が重要であることが示されている^{15, 16)}。これらの結果は、多糖類を構成するアラビノースの存在が、果実では、肉質の形成に重要である可能性を示すものである。

一方、 β -ガラクトシダーゼと比較して、果実における α -アラビノフラノシダーゼに関する情報は少ない。果実由来としてはリンゴやニホンナシからそのタンパク質が精製され、実際に、人工基質だけではなく、細胞壁多糖類を分解することが示されている^{42, 48)}。最近、精製されたタンパク質の基質特異性について調べられ、本酵素は α -アラビノフラノシダーゼ活性の他に β -キシロシダーゼ活性をもつ二機能性の酵素であることが示された^{18, 22, 42)}。また、 β -ガラクトシダーゼと同じように発現パターンの異なるアイソザイムが存在する²³⁾。各々のアイソザイムは人工基質に対しては二機能性を示すが、生体内の基質(多糖類)に対する反応性は異なるようである。さらに、高等植物由来の 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づいて2つのグリコシダーゼファミリーに分類される。両ファミリー間では配列上の相同性はほとんどみられないが、基質特異性、特に多糖類に対する反応性については、類似していたり、異なっていたりと様々な結果が得られている。 α -アラビノフラノシダーゼについては、まだ、形質転換体が作出されておらず、果実の軟化、あるいは肥大・成長にどのような役割をもつのか興味深い。

4. おわりに

細胞壁は比較的少数の糖類から構成されているにもかかわらず、結合様式の多様性からその構造は非常に複雑である。また、細胞壁を分解する酵素にはアイソザイムが複数存在することから、一部の酵素についてはその詳細が明らかにされつつあるが、まだ全体像はよくわかっていない。軟化現象を大雑把にまとめると、成熟・軟化の初期段階でペクチンからガラクトースが遊離し、キシログルカンが低分子化する。また、アラビノースの消失がみられ、ペクチンは可溶化する。ホモガラクトuron酸は脱エステル化が進み、ポリガラクトuronナーゼによって加水分解され低分子化する。ペクチンの低分子化はおもに成熟後期に大きく起こる。これらの現象は単一の酵素によって説明できるものではなく、複数の酵素が互いに協力して、あるいは、ある特定の順序で作用して、その結果として果実軟化が誘導されると考えるべきである。グリコシダーゼ類による中性糖残基の遊離は、多糖類の構造や性質を変化させ、他の細胞壁分解酵素がその基質である多糖類を分解するのに貢献している可能性がある。一方、細胞壁の構造変化は軟化だけではなく、植物の成長や発達、あるいは細胞や植物自体の形を決定する。これらと細胞壁分解酵素との関係についても、明らかにしていく必要がある。

謝辞

本稿執筆の機会ならびに適切なご助言を賜りました日本大学教授腰岡政二先生に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Arrowsmith D. A. and J. de Silva. 1995.

- Plant Mol. Biol. 28: 391-403.
- 2) Brummell, D.A., B. D. Hall and A. B. Bennett. 1999. Plant Mol. Biol. 40: 615-622.
- 3) Brummell, D. A. and M. H. Harpster. 2001. Plant Mol. Biol. 47: 311-340.
- 4) Brummell, D. A., M. H. Harpster, P. M. Civello, J. M. Palys, A. B. Bennett and P. Dunsmuir. 1999. Plant Cell 11: 220-2216.
- 5) Brummell, D. A., V. D. Cin, C. H. Crisosto and J. M. Labavitch. 2004. J. Exp. Bot. 55: 2029-2039.
- 6) Brummell, D. A., V. D. Cin, S. Lurie, C. H. Crisosto and J. M. Labavitch. 2004b. J. Exp. Bot. 55: 2041-2052.
- 7) Cosgrove, D. J. 1999. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 391-417.
- 8) Cosgrove, D. J. 2000. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 73-78.
- 9) Dawson, D. M., L. D. Melton and C. B. Watkins. 1992. Plant Physiol. 100: 1203-1210.
- 10) Fischer, R.L. and A. B. Bennett. 1991. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 675-703.
- 11) Giovannoni, J. J., D. DellaPenna, A. B. Bennett and R. L. Fischer. 1989. Plant Cell 1: 53-63.
- 12) Gross, K. C. and C. E. Sams, C.E. 1984. Phytochemistry 23: 2457-2461.
- 13) Harpster, M. H., D. A. Brummell and P. Dunsmuir. 1992. Plant Mol. Biol. 50: 345-355.
- 14) Huber, D. J. and E. M. O' Donoghue. 1993. Plant Physiol. 102: 473-480.
- 15) Iwai, H., T. Ishii and S. Satoh. 2001. Planta

- 213: 907-915.
- 16) Iwai, H., N. Masaoka, T. Ishii and S. Satoh. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16319-16324.
 - 17) Kitagawa, Y., Y. Kanayama and S. Yamaki. 1995. *Physiol. Plant* 93: 545-550.
 - 18) Kotake, T., K. Tsuchiya, T. Aohara, T. Konishi, S. Kaneko, K. Igarashi, M. Samejima and Y. Tsumuraya. 2006. *J. Exp. Bot.* 57: 2353-2362.
 - 19) Kramer, M., R. Sanders, H. Bolkan, C. Waters, R. Sheehy and W. Hiatt. 1992. *Postharvest Biol. Technol.* 1: 241-255.
 - 20) Langley K.R., A. Martin, R. Stenning, A. J. Murray, G. E. Hobson, W. W. Schuch and C. R. Bird. 1994. *J. Sci. Food. Agric.* 66: 547-554.
 - 21) Lazan, H., S-Y. Ng, L-Y Goh and Z. M. Ali. 2004. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 847-853.
 - 22) Lee, R. C., M. Hrmova, R. A. Burton, J. Lahnstein and G. B. Fincher. 2003. *J. Biol. Chem.* 278: 5377-5387.
 - 23) Minic, Z., C. T. Do, C. Rihouey, H. Morin, P. Lerouge and L. Jouanin. 2006. *J. Exp. Bot.* 57: 2339-2351.
 - 24) Moctezuma, E., D. L. Smith and K. C. Gross. 2003. *J. Exp. Bot.* 54: 2025-2033.
 - 25) Mwaniki, M. W., F. M. Mathooko, M. Matsuzaki, K. Hiwasa, A. Tateishi, K. Ushijima, R. Nakano, A. Inaba and Y. Kubo. 2005. *Postharvest Biol. Technol.* 36: 253-263.
 - 26) Nara, K., Y. Kato and Y. Motomura. 2001. *Postharvest Biol. Tech.* 22: 141-150.
 - 27) Orfila, C., M. M. H. Huisman, W. G. T. Willats, G-J. W. M. van Alebeek, H. A. Schols, G. B. Seymour GB and J. P. Knox. 2002. *Planta* 215: 440-447.
 - 28) Orfila, C., G. B. Seymour, W. G. T. Willats, I. M. Huxham, M. C. Jarvis, C. J. Dover, A. J. Thompson and J. P. Knox. 2001. *Plant Physiol.* 126: 210-221.
 - 29) Peña, M. J. and N. C. Carpita. 2004. *Plant Physiol.* 135: 1305-1313.
 - 30) Pressey, R. 1983. *Plant Physiol.* 71: 132-135.
 - 31) Redgwell, R. J., L. D. Melton and D. J. Brasch. 1992. *Plant Physiol.* 98: 71-81.
 - 32) Ross, G.S., T. Wegrzyn, E. A. MacRae and R. J. Redgwell. 1994. *Plant Physiol.* 106: 521-528.
 - 33) Sekine, D., I. Munemura, M. Gao, W. Mitsuhashi, T. Toyomasu and H. Murayama. 2006. *Physiol. Plant* 126: 163-174.
 - 34) Schuch, W., J. Kanczler, D. Robertson, G. Hobson, G. Tucker, D. Grierson, S. W. J. Bright and C. Bird. 1991. *HortScience* 26: 1517-1520.
 - 35) Smith, C. J. S., C. F. S. Watson, J. Ray, C. R. Bird, P. C. Morris, W. Schuch and D. Grierson. 1988. *Nature* 334: 724-726.
 - 36) Smith, D.L., D. A. Starrett and K. C. Gross. 1998. *Plant Physiol.* 117: 417-423.
 - 37) Smith, D.L. and K. C. Gross. 2000. *Plant Physiol.* 123: 1173-1183.
 - 38) Smith, D.L., J. A. Abbott and K. C. Gross. 2002. *Plant Physiol.* 129: 1755-1762.
 - 39) Tateishi, A., H. Inoue and S. Yamaki. 2001a. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70: 586-592.
 - 40) Tateishi, A., H. Inoue, H. Shiba and S. Yamaki. 2001b. *Plant Cell Physiol.* 42: 492-

- 498.
- 41) Tateishi, A., K. Nagashima, F. M. Mathooko, M. W. Mwaniki, Y. Kubo, A. Inaba, S. Yamaki, H. Inoue. 2005a. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130: 819-829.
- 42) Tateishi, A., H. Mori, J. Watari, K. Nagashima, S. Yamaki and H. Inoue. 2005b. Plant Physiol. 138: 1653-1664.
- 43) Tateishi, A., H. Shiba, J. Ogiwara, K. Isobe, K. Nomura, K. Watanabe and H. Inoue. 2007. Postharvest Biol. Technol. 45: 56-65.
- 44) Tateishi, A., Y. Kanayama and S. Yamaki. 1996. Phytochemistry 42: 295-299.
- 45) Tieman D. M., R. W. Harriman, G. Ramamohan and A. K. Handa. 1992. Plant Cell 4: 667-679.
- 46) Trainotti, L., R. Spinello, A. Piovan, S. Spolaore and G. Casadoro. 2001. J. Exp. Bot. 52: 1635-1645.
- 47) Xu, C. G., A. Nakatsuka, H. Kano and H. Itamura. 2003. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 72: 460-462.
- 48) Yoshioka, H., Y. Kashimura and K. Kaneko. 1995. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63: 871-878.

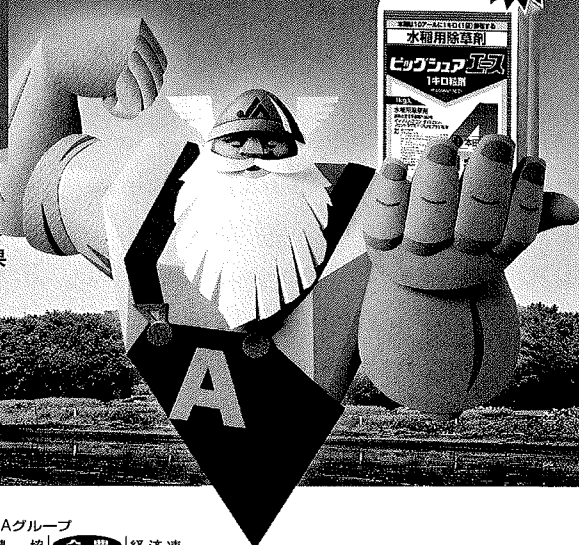


ビッグシュアース

1キロ粒剤

- ・SU抵抗性のホタルイ、アゼナ類、コナギに高い効果
- ・ノビエの2.5葉期まで防除が可能

田植同時の ビッグなエース。





JA
だけ!



Bayer CropScience
バイエルクロップサイエンス株式会社
www.bayercropscience.co.jp



JAグループ
農 協 | 全 農 | 経 済 連

®は登録商標