

氏名（本籍）	兵頭 洋美 （ 東京都 ）		
学位の種類	博 士（ 理 学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6918 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Tissue Specific Regulation of Cell Wall Polysaccharides during Fruit Ripening in Tomato (トマト果実成熟過程における組織特異的な細胞壁多糖代謝の調節機構に関する研究)		
主査	筑波大学講師	博士（理学）	岩井 宏暁
副査	筑波大学教授	理学博士	佐藤 忍
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（農学）	玉置 雅紀
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	三浦 謙治

論 文 の 要 旨

植物の細胞壁は植物細胞の最外層に存在し、環境の変化や成長、分化に伴い、細胞壁の構造は柔軟に変化することで、外界からの防御や細胞の大きさや形を調節、細胞間の接着、情報伝達、ストレス応答など、さまざまな役割を果たしている。細胞壁は、主要な細胞壁骨格成分であるセルロース、そのセルロース間を繋ぐ架橋性多糖のヘミセルロース、その間を充填する酸性糖のペクチンから主に構成されている。葉や茎などの栄養組織では細胞壁成分の約50%がセルロースであるのに対して、生殖組織である果実の多くでは、約50%がペクチンで構成されていることが知られている。果実の成熟・軟化過程については、モデル植物であるトマトを用い、特に可食部である果皮の細胞壁に豊富に含まれるペクチン成分の低分子化に着目されてきた。トマト果実の成熟に伴う軟化は、果実成熟初期に果実の中で合成される植物ホルモンのエチレンによって、細胞壁成分であるペクチンの分解酵素が誘導され、ペクチンの分解が進むことで、果実は柔らかくなることが知られている。ペクチンは、メチル化されたガラクトuron酸を主鎖としているが、この果実軟化にかかわるペクチンの分解酵素として、ペクチン主鎖であるメチル化されたホモガラクトuronanを脱メチル化する pectin methylesterase: PME と、脱メチル化されたホモガラクトuronanを分解する polygalacturonase: PG の二つの酵素が主に知られている。しかし、近年の研究から、これらの酵素を抑制した変異体においても、果実の軟化を完全に抑制することはできないことが報告され、果実成熟過程においてペクチンの担う機能は未解明である。

これまでの研究では、果実一つひとつの軟化に着目され、果実の細胞壁に多く含まれるペクチンの分解について、成熟段階を追ってみられてきた。しかし、果実は被子植物の生殖器官であり、果皮や種子のまわりのゼリー状の子室組織など、複数の組織からできている。また、果実は本来、種子散布だけではなく、その保護という目的を果たしているため、その発生過程で生じた種子をとりまく果実内を支える構造組織の細胞壁も軟化に重要であると考えられる。そこで、本論文では、トマト果実の成熟に伴うペクチンの変化を果実内の組織ごとに調査した。材料にはモデル植物であるトマト（品種 Micro Tom）を用いている。Micro Tom は矮性品種であり、果実サイズが小さく、ライフサイクルが短いという利点があり、近年ではデータベースも充実していることから、研究に適した材料である。果実内組織として、外果皮、中果皮・内果皮、隔壁、子室組織、種子の各組織における成熟に伴う細胞壁ペクチンの合成・分解の動態を、遺伝子発現レベルから酵素活性、糖の定量、定性解析により調査した。細胞壁ペクチンの分解・合成および架橋形成によるペクチン代謝の制御を組織ごとに調査することで、各組織のペクチン構造、組成の相違が果実の軟化だけでなく、果実の形や硬さにどのように関係しているのかについて明らかにすることを目的とした。

果実軟化にかかわるペクチンの分解酵素として、ペクチンのメチル化されたガラクトuron酸主鎖を脱メチ

ル化する PME と、脱メチル化された主鎖を分解する PG の二つの酵素が主に知られている。これら酵素と、ペクチン主鎖の合成酵素として報告されているシロイヌナズナの遺伝子 galacturonosyltransferase 1: GAUT1 のホモログ、GAUT1-like family 遺伝子を対象に組織別発現解析を行った。その結果、ペクチンの合成/分解関連遺伝子の発現パターンは組織特異的であった。特に PME の発現は果皮特異的にみられ、PME 活性、成熟に伴うペクチンの脱メチル化も同様に果皮特異的であった。一方、PG についてはどの組織においても成熟に伴い、発現、活性ともに増加しており、PME の動態と必ずしも一致しないことが示された。また、GAUT1-like family 遺伝子は外果皮、隔壁など、果実の構造維持に寄与すると考えられる組織で恒常的に発現していたこと、また成熟過程においてもペクチン量の増加がみられたことから、果実成熟過程においても分解のみでなく合成も行われていることが示された。

果皮特異的にみられたペクチンの脱メチル化は、PG によるペクチンの低分子化を促進するのみでなく、脱メチル化ペクチン間での Ca が結合することにより、ペクチン-Ca 架橋の形成を促進することで、結合強度の低下/強化の両方に寄与する。このことから、各組織中の Ca 量の違いに着目し、各組織の細胞壁結合性 Ca 量を測定したところ、果皮組織の中でも外果皮のみに顕著に多く存在していた。また、同位体顕微鏡により Ca 分布を画像化した結果からも、外果皮の表皮細胞直下の細胞層に顕著にペクチン-Ca 架橋が多く存在することが示された。このことから、ペクチンは分解酵素の活性のみでなく、存在する脱ペクチン量、Ca 量によってもその構造は異なり、成熟に伴うペクチン代謝は組織特異的に調節がなされていると考えられる。

これまで成熟過程にあるトマト果実は、内部の子室組織の液状化が進行することで、果皮と内部組織との物性が顕著に異なり、果実全体の切片を作成することは困難であった。しかし、組織の固定、脱水の過程を工夫することで、果実全体の切片作成が可能となり、成熟に伴う果実全体のペクチン分布を示した。ペクチンは生化学的分析の定量値と同様、子室組織と比較し果皮組織に多くみられ、特に外果皮に顕著に多く分布していた。また、特異的抗体を用いて、脱メチル化/メチル化ペクチンを区別して染色した結果、成熟初期まではメチル化ペクチンの方が多く存在するが、成熟に伴い脱メチル化ペクチンが増加しており、PME 活性の結果と一致していた。特に、脱メチル化ペクチンは成熟後期にかけて減少していくが、果実全体と比較すると、ペクチンの減少は果実の花頂部側からはじまり、基部側に向かって進行していた。果実成熟に伴うペクチン分布の変化は組織ごと、また基部側/花頂部側によっても異なることを示した。

本論文により、トマト果実成熟過程において、ペクチン代謝は組織ごとに異なる調節がなされていること、また、Ca がペクチンと他の細胞壁多糖との間の結合性に重要であることを示した。特に、分解活性が高く、Ca 架橋の少ない内果皮では果実を柔らかくする方向に、Ca 架橋や他の細胞壁多糖との架橋となる側鎖が成熟に伴い増加する外果皮では果実の縁取りを維持する方向に、それぞれの組織の役割にあわせたペクチンの分解、架橋形成の調節が果実の形、硬さの変化に重要であることが明らかとなった。

審 査 の 要 旨

本論文において、果実においてペクチンの合成・分解および Ca との架橋形成を伴う構築機構は、組織の担う役割に応じて独立に制御がなされていることが明らかとなったことは高く評価できる。今後、Ca 欠乏や塩処理などによって生じる細胞壁の変化を調査する等、さらなる研究の発展が期待される。本論文において、果実成熟における細胞壁構築機構の一端が解明されたことは果実発生と軟化の制御機構の解明に多大な貢献をすると考えられ、本論文は博士の学位を授与するに十分値すると判定される。

平成26年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。