

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Aiamla-or Sukanya
審査委員	主査 山内直樹 (印)
	副査 執行正義 (印)
	副査 板村裕之 (印)
	副査 伊藤真一 (印)
	副査 田村文男 (印)
題目	Postharvest changes in activities and gene expression on enzymes relating to chlorophyll degradation in broccoli florets and their control by UV-B treatment (ブロッコリー花蕾のクロロフィル分解に関与する酵素の活性および遺伝子発現における収穫後変化と UV-B 処理によるその制御)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>ブロッコリーは機能性成分を多く含み、また、花蕾の緑色が新鮮さや高品質を示すことから消費者に好まれている。しかしながら、常温下での流通・貯蔵はクロロフィル(Chl)分解による花蕾の黄化が生じ短期間で品質低下が生じる。本研究は、ブロッコリー花蕾の Chl 分解に関連した Chl 分解酵素の活性および遺伝子発現における収穫後変化について調べ、さらに、貯蔵中の品質保持を目的とし、UV 処理による花蕾の品質制御について検討した。</p> <p>UV-A および UV-B 処理された花蕾を暗所下、15℃で貯蔵したところ、UV-B 処理は UV-A 処理に比べ効果的に花蕾の緑色を保持した。19 kJ m<sup>-2</sup>以上の UV-B 照射量が、9.5 kJ m<sup>-2</sup>やコントロールに比較し表面色において高い hue angle 値を示した。この結果を踏まえ、以後 19 kJ m<sup>-2</sup>の UV-B 処理を行なった。花蕾の Chl 分解に伴う誘導体生成における UV-B 処理の影響について調べた。クロロフィリッド <i>a</i>、13<sup>2</sup>-ヒドロキシクロロフィル <i>a</i> およびフェオフィチン (Phy) <i>a</i> は、UV-B 処理により花蕾の老化に伴う分解が抑制された。一方、フェオホルビド <i>a</i> およびピロフェオホルビド <i>a</i> は、UV-B 処理により老化に伴う生成が抑制された。次に、Chl 分解酵素活性の貯蔵に伴う変化を調べたところ、Mg-脱離物質、クロロフィラーゼ (Chlase) および Chl 分解ペルオキシダーゼ (Chl-POX) の活性は、UV-B 処理により抑制が認められた。最近、Phy を加水分解するフェオフィチナーゼ(PPH)が Chl 分解に関与する重要な酵素として示唆されているが、Chlase が Chl <i>a</i> 同様に Phy <i>a</i> も基質として用いることから、PPH による正確な測定法が確立されていない。そこで、花蕾での PPH 測定法の確立を目指した。硫酸アンモニウム沈殿により PPH は Chlase から分離することがわかり、45~60%飽和硫酸アンモニウム画分が PPH 測定に最適であることを認めた。PPH 酵素活性を測定したところ、UV-B 処理により 15℃貯蔵 2 日まで活性が抑制されたが、その後、UV-B 処理およびコントロールとも貯蔵に伴い徐々に増大した。</p> <p>Chl 分解酵素の中で、特に Chl-POX は老化に伴う急増が認められたことから、Chl-POX の生理的役割を明らかにするため、酵素の精製を行い、その特性を調べた。イオン交換クロマトグラフィー (CM-セファロース) により、Chl-POX には3つのアイ</p>	

ソザイムの存在が認められた。Type 1 は新鮮な花蕾でも検出され、その活性は黄化に伴い増大した。しかしながら、Type 1 の活性は UV-B 処理によりほとんど抑制されなかった。Type 2 および Type 3, 特に Type 3 は貯蔵 4 日の花蕾で検出され、その活性は UV-B 処理により抑制がみられた。以上の結果から、Type 2 並びに Type 3, 特に Type 3 は Chl 分解に強く関与しているものと考えられた。Type 1 および Type 3 についてさらに精製を行ったところ、Type 1 は糖タンパク質であり、Type 1 と Type 3 の分子量はそれぞれ 43 KDa および 34 KDa であった。Type 3 は糖鎖を持たないことからクロロプラスト (Cht) に存在する可能性が示唆されたので、パーコール密度勾配遠心分離法により花蕾から無傷 Cht を分離し Chl-POX アイソザイムの存在を調べた。抗体を用い調べたところ、Type 3 は老化の進んだ緑黄色の花蕾からの無傷 Cht のみに存在していた。また、Type 1 および Type 3 は崩壊 Cht には存在しなかった。これらの結果は、Type 3 が Cht のストロマもしくは包膜に存在し、Cht での Chl 分解に関与することが示唆された。

Chl 分解酵素の遺伝子発現に及ぼす UV-B 処理の影響について調べた。花蕾の *BoCLH1* の発現量は貯蔵 4 日に減少し、*BoCLH2* と *BoCLH3* の発現量は UV-B 処理により増大した。高い *BoPAO* の発現量が老化した花蕾で見られ、一方、この遺伝子発現の増大が UV-B 処理により遅れた。*BoPPH* の高い発現量がコントロールで認められ、貯蔵 2 日でのその発現は UV-B 処理により明らかに抑制がみられた。このように、Chl 分解酵素遺伝子の発現増大は UV-B 処理により抑制がみられ、結果として貯蔵中の花蕾の老化抑制につながっているものと思われた。

以上、本研究はブロッコリー花蕾の Chl 分解に関わる酵素、特に Chl-POX の役割と UV-B 処理による制御を明確化し、Chl 分解の新たな酵素である PPH の活性測定法の確立を行い、さらに Chl 分解酵素遺伝子の発現と UV-B 処理との関連を明らかにしたことは、園芸生産物の老化制御に関する基礎的並びに応用的知見として高く評価できた。よって、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。