

(J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 29, 7~11 1994)

## ブドウ果実中の不溶性インベルターゼの発現と分布 — 活性染色を用いたインベルターゼ活性の検出 —

高柳 勉、ウィモンスリ・ポンタウィワット、横塚弘毅  
(山梨大学工学部発酵化学研究施設)

### Distribution and Change of Insoluble Invertase Activity in Grapes — Detection of Invertase Activity in Muscat Bailey A Grapes by Histochemical Staining —

TSUTOMU TAKAYANAGI, WIMOLSIRI PORNTAVEEWAT and KOKI YOKOTSUKA

*Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400, Japan*

#### Abstract

Distribution and change of invertase activity in Muscat Bailey A grapes were studied by histochemical staining. Discs cut from frozen grape berries were rinsed with water and were incubated in a solution containing sucrose, glucose oxidase, phenazine methosulfate, and a tetrazolium salt. Where insoluble invertase was active, the coupled oxidation-reduction system of these reagents formed a deep blue insoluble formazan. Histochemical staining showed that insoluble invertase appeared close to the skin and around the seed just before the accumulation of hexose sugars. These results suggest that invertase activity is important for unloading of sucrose from phloem to grape berries.

#### 緒 言

ブドウの葉において合成された糖はスクロースとして師管内を転流し<sup>1)</sup>、ブドウの各器官に運ばれる。特に成熟期のブドウ果実では多量のスクロースが師管から荷降ろし(unloading)されていると考えられるが、ほとんどのブドウ品種において果実内に蓄積する糖はグルコースとフルクトースであり、スクロースはまったく検出されないか、検出されたとしてもごく微量である<sup>2)</sup>。これは成熟期の果実に存在するインベルターゼによりスクロースがグルコースとフルクトースに分解されるためであると推測されている。糖の蓄積の起こる成熟期に果実内のインベルターゼ活性が増大するという報告はスクロースの分解がインベルターゼによって行われていることを支持している<sup>3)</sup>。さらに、細胞間マト

リックスに固定化されたインベルターゼ、すなわち不溶性インベルターゼによるスクロースの分解がunloadingに直接関わっていることを示唆する報告もある<sup>4)</sup>。しかし、ブドウ果実へ糖が蓄積する機構についてはいまだ不明な点が多く、インベルターゼの役割についても十分理解されているとは言いがたい。本研究では、成熟期のブドウ果実断片をスクロース、グルコースオキシダーゼ、フェナジンメソサルフェイト、ニトロブルーテトラゾリウムを含む染色液で組織化学染色し<sup>5)</sup>、ブドウ果実内のどの部位でどの時期に不溶性インベルターゼが強く発現しているかを検討した。さらに糖の蓄積と不溶性インベルターゼの発現時期を比較することによって、糖蓄積と不溶性インベルターゼ活性の関係について考察した。

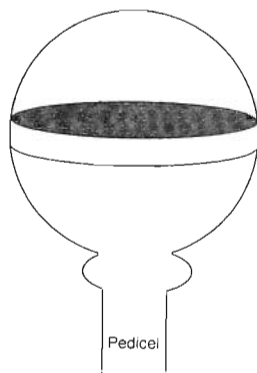


Fig. 1. Position of the cuts made to give a disc of grape tissue.

### 実験方法

1993年、山梨大学工学部附属発酵化学研究施設付設育種試験地において栽培されたマスカット・ベリーA果実を使用した。インペルターゼ活性の組織化学染色は、採集した果実を $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結したのちに厚さ約2mmのディスク状に切った果実切片(Fig. 1)を用いて行った。果皮部分を除去した果実切片を蒸留水で1時間洗浄し、可溶性成分を除去した。洗浄後の切片を4%ホルムアルデヒド溶液(pH 7.0)に20分間浸して固定化し、蒸留水で十分に洗浄した後に染色液(25units/mlグルコースオキシダーゼ、0.24mg/mlニトロブルーテトラゾリウム、0.14mg/mlフェナジンメソサルフェイト、5mg/mlスクロース)に浸し、 $25^{\circ}\text{C}$ で染色の様子を観察をした<sup>5)</sup>。最初に切片を水で十分に洗浄し、可溶性成分すなわちグルコース、フルクトース、可溶性インペルターゼなどを除去していることから、組織化学染色により検出できるインペルターゼ活性

は細胞間マトリックスに固定されている不溶性インペルターゼの活性のみである。染色の原理をFig. 2に示した。果実切片に存在するインペルターゼによりスクロースが分解され、生じたグルコースは速やかにグルコースオキシダーゼにより酸化される。この時グルコースオキシダーゼ自身は還元型となる。この還元型グルコースオキシダーゼはフェナジンメソサルフェイトを還元し、さらに還元型フェナジンメソサルフェイトがニトロブルーテトラゾリウムを還元して青い粒子を形成する<sup>6)</sup>。従って、インペルターゼ活性の強い部分は還元型ニトロブルーテトラゾリウムの青い粒子が沈着して青色を呈する。コントロールとしてスクロースを含まない染色液を用い、酵素反応によらない染色を観察した。

果実中の糖成分分析は、果実1gに対して5mlの蒸留水を加え、ホモジナイズした後に綿布で濾過し、濾液を遠心分離(20,000g, 20min)して固形物を除いた上清を用いて、グルコース、フルクトース、スクロースの量を測定した。グルコースとフルクトースはヘキソキナーゼ法<sup>7)</sup>を用いたグルコース/フルクトース測定キット(ペーリンガー・マンハイム)により測定した。スクロース量は試料液に酵母由来のインペルターゼを加え、スクロースを完全に分解した後に上記の方法でグルコースとフルクトースを測定し、それらの増加量から求めた。

### 実験結果

Fig. 3に8月11日に採集したブドウ果実切片の染色結果を示した。染色を開始してから4時間後に周辺部(果皮付近)が青色に染まっている(Fig. 3, A-2)。さらに染色時間を長くすると中心部分(種子の周辺)も染色された(Fig. 3, B-2)。果皮付近が先に染まり、次に種子の周辺が染まるこの傾向はすべての採集時期の果実切片において見られた。ス

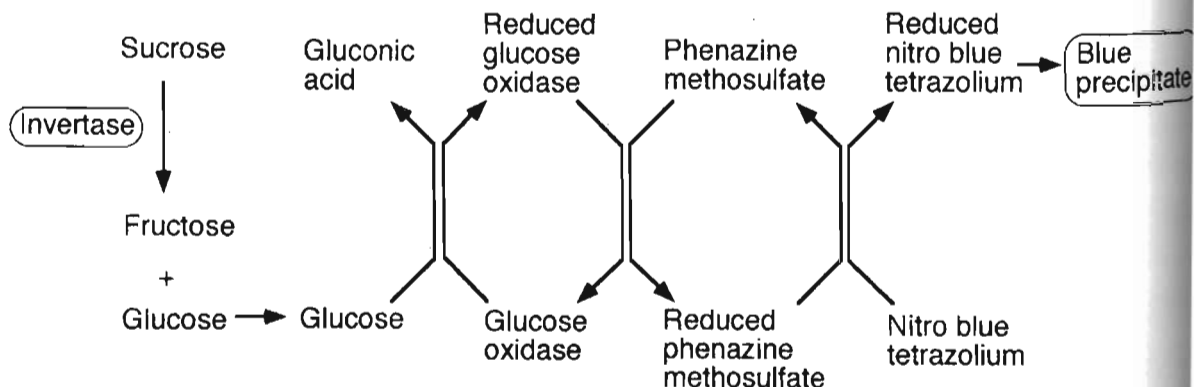


Fig. 2. Reaction sequence in the staining procedure for invertase activity.

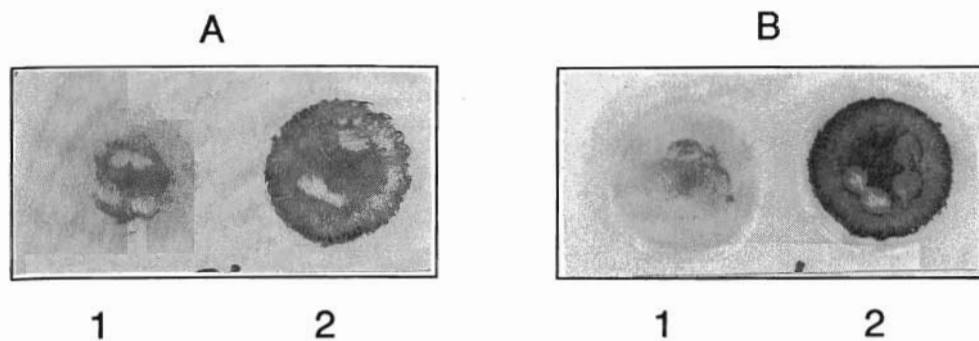


Fig. 3. Histochemical localization of invertase activity in discs of Muscat Bailey A grapes. Discs were stained for 4h(A) or 6h(B) in the presence of sucrose (1) or in its absence (2).

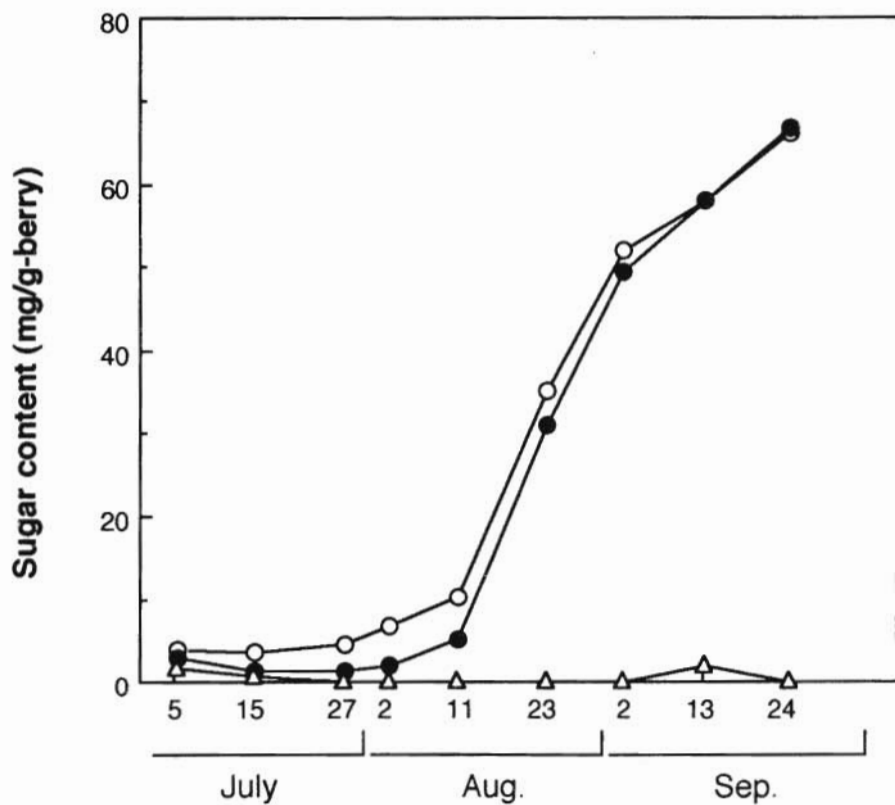


Fig. 4. Glucose, fructose, and sucrose contents of Muscat Bailey A grapes during development. —○—, Glucose content; —●—, fructose content; —△—, sucrose content.

Table 1. Intensity of insoluble invertase judged from histochemical staining.

	Outer flesh tissue	Central flesh tissue
July. 22	++	+
Aug. 2	+++	++
11	+++	++
23	++	+
Sep. 13	+	±
24	±	±

Invertase intensities were classified into four levels: +++, strong; ++, moderate; +, weak; ±, very weak.

クロースを添加していないコントロールではまったく染色が見られないことから (Fig. 3, 1) 果実切片に存在するインベルターゼ活性によって特異的に青色が生じていると考えられる。7月5日から9月24日に採集したブドウ果実について、糖の蓄積状況を見ると。8月11日から9月24日にかけて、果実の成熟にともなうグルコースとフルクトース量の急激な増加が見られた (Fig. 4)。スクロースは測定したすべての採取日において検出できなかった。一方、組織化学染色の染色の強さから判定した不溶性インベルターゼの発現状況は、測定をはじめた7月22日からインベルターゼ活性は見られ、8月2日と8月11日に最も強くなり、9月に入るとその活性は低下した (Table 1.)。糖の蓄積とインベルターゼ活性の発現時期を比較してみると、8月11日から糖の急激な蓄積が観察されているのに対して、不溶性インベルターゼはこれより少し早い時期 (8月2日、11日) に最も強く発現していた。発現部位はいずれの時期においても周辺部すなわち果皮周辺で最も強く、次に中心部すなわち種子周辺に強く発現していた。9月13日以降の果実では、インベルターゼ活性は弱く、長時間の染色によってのみ青色が確認された。

### 考 察

ブドウ果皮による糖の取り込み実験の結果から、果実への糖の輸送に関して、最近一つの仮説が提案されている。その仮説は、師管から果実内への糖の輸送は果皮を経由し、果皮細胞では糖の能動的輸送が行われているというものである<sup>8)</sup>。もしこの仮説が正しいとするならば、糖のunloadingは果皮周辺で盛んに起こっていることになり、この部分で不溶性インベルターゼも強く発現しているというこ

となる。さらに組織化学染色が果皮付近について種子の周辺部 (師管の末端) でも強く染まることは、unloadingが強く起こっている可能性の高いこの部分で、やはり不溶性インベルターゼの発現が強いことを示している。さらに、不溶性インベルターゼの発現が糖の蓄積より少し早い時期に始まることなど、これらすべての結果は、unloadingにおいてインベルターゼが糖の一方通行を作り出すキナーゼであるというEshrichらの報告<sup>4)</sup>を支持している。しかし、糖の蓄積がまだ続いている9月13日以降において、不溶性インベルターゼの活性は低下していた。中西らの報告<sup>9)</sup>によれば、9月24日とはほぼ同時期と考えられる成熟後期のマスカット・ベリーA果実からは多量の可溶性インベルターゼが確認されている。成熟初期に強く発現した不溶性インベルターゼが、成熟にともなう細胞壁成分の分解 (果実の硬度の低下をもたらすと考えられている)<sup>10)</sup>により可溶化して、成熟後期の多量の可溶性インベルターゼを生み出しているものと考えられ、さらに、可溶化した多量のインベルターゼが不溶性インベルターゼと同様の働きをしているとも推測される。

ブドウ果実への糖の蓄積にインベルターゼ活性が関与している可能性が高いことが本研究の結果より示された。しかし、インベルターゼによるスクロースの分解がunloadingにおいてどのような意味を持つかについての詳細は明らかになっていない。たとえば、インベルターゼによるスクロースの分解に連鎖して細胞膜に存在する単糖のキャリアータンパク質が能動的輸送を行っているとするれば合理的であるが、残念ながらそれを実証する実験データは得られていない。また、インベルターゼが発現する果実と発現しない果実における糖蓄積のメカニズムがどの

様に違うかなど、疑問点も多く残されている。

### 要 約

成熟期のマスカット・ベリーAブドウ果実切片を組織化学染色法により染色し、ブドウ果実内における不溶性インベルターゼの発現位置および発現時期を検討した。組織化学染色はブドウ果実切片をスクロース、グルコースオキシダーゼ、フェナジメソサルフェイト、ニトロブルーテトラゾリウムを含む染色液でインキュベートすることにより行った。すなわち、ブドウ果実切片に存在する不溶性インベルターゼにより染色液中のスクロースが分解され、分解生成物であるグルコースが染色液中の酸化還元試薬を順次還元し、最終的に還元型テトラゾリウムの青い粒子が沈着し、インベルターゼ活性の存在が示される。組織化学染色により、果皮付近および種子の周辺でインベルターゼ活性が強いことが示された。時期的に見ると、8月2日と11日の果皮付近に強いインベルターゼ活性が観察され、果実の成熟にともなうグルコースとフルクトース量の急激な増加開始(8月11日)より少し前に発現していた。これらの結果は、篩管から果実への糖の移動(nuload-ing)においてインベルターゼ活性が重要な役割を持つ可能性を示唆していた。

### 文 献

- (1) S. Lavee and G. Nir, CRC, in "Handbook of fruit set and development" CRC Press, Boca Raton, FL, 1986, pp.167-191.
- (2) R.V. Lott and H.C.Barrett, *Vitis*, 6, 257-268 (1967).
- (3) J.S.Hawker, *Phytochem.*, 8, 9-17 (1969).
- (4) W.Eschrich, *Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd.*, 93, 363-378 (1980).
- (5) D.C. Doehlert and F.C. Felker, *Physiol Plantarum*, 70, 51-57 (1987).
- (6) A.Dahlqvist and A.Bryn, *J.Histochem. Cytochem.*, 10, 294-302 (1962).
- (7) H.O.Beutler, in "Methods of Enzymatic Analysis" Vol. VI, 3rd Ed., 1984, pp.321-327.
- (8) B.G.Coombe, *Acta Hortic.*, 239, 149-158 (1989).
- (9) K.Nakanishi and K.Yokotsuka, *J.Ferment. Bioeng.*, 69, 16-22 (1990).
- (10) G.A.Tucker, in "Biochemistry of Fruit Ripening" ed. by G.B.Seymour, J.E.Taylor, and G.A.Tucker, Chapman & Hall, London, 1993, pp.22-24.