

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 30, 1~8 1995]

ブドウ果汁沈殿中のインベルターゼの精製と性質

高柳 勉、奥田 徹、横塚弘毅
(山梨大学工学部附属発酵化学研究施設)

Purification and Properties of an Invertase from Grape Juice Precipitate

TSUTOMU TAKAYANAGI, TOHRU OKUDA, and KOKI YOKOTSUKA

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

Abstract

An invertase was purified from a juice precipitate of Muscat Bailey A grapes by successive column chromatographies on DEAE Sepharose Fast Flow and Sephadex G-100. The pH and temperature optima of the enzyme were 3.5 and 80 °C, respectively. The K_m and V values of the enzyme for sucrose at pH4.0 were 4.3 mM and 95.0 μ mol Glc \cdot min⁻¹ \cdot mg protein⁻¹, respectively. The kinetic characteristics, electrophoretic mobility and molecular weight of the invertase from the juice precipitate were the same as those of the invertase from the defecated juice. The two enzymes were therefore thought to be identical.

緒 言

インベルターゼはスクロースをグルコースとフルクトースに加水分解する反応を触媒する酵素で、植物および動物組織そして微生物に広く存在している。スクロースは多くの植物において篩管内を移動する転流糖であることから、その加水分解を触媒するインベルターゼは、特に植物糖代謝の研究において分布や発現が注目されてきた。一般的に植物インベルターゼは同一の組織中に2種類存在することが知られている。すなわち、細胞質や液胞内に溶解した状態で存在する可溶性インベルターゼと細胞壁に結合し、高塩濃度の抽出溶媒を用いることによってはじめて抽出される不溶性インベルターゼである⁽¹⁻³⁾。

既に我々は、成熟後期のマスカット・ベリーAブドウ果実から可溶性インベルターゼを精製し、性質を検討した結果、この酵素が反応最適pH3.5の酸性インベルターゼであることを明らかにしている^(4, 5)。本研究では、可溶性インベルターゼを精

製する過程で得られるブドウ果汁沈殿中にも強いインベルターゼ活性が存在することに着目した。果汁沈殿のインベルターゼはpH3.0の酒石酸溶液中では可溶化してこないのに対して、0.2Mホウ酸緩衝液によって可溶化される。この特徴は他の植物インベルターゼで報告されている不溶性インベルターゼの特徴と一致しており、果汁沈殿より得られるインベルターゼと可溶性インベルターゼが同一のものであるか否かに興味を持たれた。そこで、本研究ではこの果汁沈殿よりインベルターゼを精製してその反応特性や電気泳動的特徴を明らかにし、それらの性質を可溶性インベルターゼと比較することを目的とした。

実験材料および方法

1. 果汁沈殿の調製

ブドウ果実は、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1994年9月26日に収穫されたマスカット・ベリーAブドウ果実(19.3

°Brix)を使用した。このマスカット・ベリーA果実を水洗後、除梗・破砕し、バスラン型圧搾機で圧搾して得た果汁にメタ重亜硫酸カリウムを50ppm(果汁中の濃度)になるように加え、15°Cで一夜静置した。この果汁を遠心分離(12,000g、20分間)し、果汁沈殿を得た。

2. 果汁沈殿からのインペルターゼの精製

果汁沈殿50gを0.2%酒石酸水溶液(pH3.0)150mlに懸濁後、遠心分離(24,000g、10分)により沈殿を分離した。この操作を7回繰り返して得られた沈殿を0.2Mホウ酸緩衝液(pH8.5)150mlに溶解後、蒸留水600mlを加えた。この試料液を50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)で平衡化したDEAE Sepharose Fast Flowカラム(20x160mm)に添加した。50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)でカラムを洗浄後、塩化ナトリウムの直線濃度勾配(0から0.5M)をかけ、タンパク質を溶出させた。インペルターゼ活性の強い画分を集め、限外濾過膜(モルカットII、ミリポア)により濃縮後、0.2M塩化ナトリウムを含む20mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)で平衡化したSephadex G-100カラム(30x650mm)にアプライし、平衡化した同一の緩衝液によりタンパク質を分離した。インペルターゼ活性の強いフラクションを集め、果汁沈殿由来の精製インペルターゼ(以後、沈殿インペルターゼと呼ぶ)として以後の実験に使用した。遠心分離により清澄化された果汁由来のインペルターゼ(以後、上清インペルターゼと呼ぶ)は既報⁽⁴⁾の方法に従って精製した。

精製酵素のタンパク質量は280nmの吸光度から吸光係数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}=13.4$ を用いて計算した⁽⁴⁾。ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)とSDS-PAGEはLaemmliの方法⁽⁶⁾に従って行い、電気泳動後のゲルはクーマシーブリリアントブルーR-250により染色した。タンパク質バンドを電氣的にニトロセルロース膜へ転写し⁽⁷⁾、レクチンにより染色した。即ち、転写膜をConA-ペルオキシダーゼコンジュゲート溶液に浸し、糖鎖とConA-ペルオキシダーゼコンジュゲートを結合させた後に4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素を用いて発色させた。

3. 酵素活性の測定

50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)100 μ l、0.2Mスクロース水溶液50 μ l、酵素液50 μ lからなる反応液を30°Cで10分間反応させ、1mlの1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて反応を停止した。生成したグルコースはムタローターゼ-グルコースオキシダーゼ法⁽⁸⁾により測定した。この反応条件下で1分間に1 μ molのグルコースを生成する酵素量

を1ユニットと定めた。

K_m および V の測定は次のように行った。各濃度(13.3-80mM)のスクロース水溶液50 μ l、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)100 μ l、酵素液50 μ lからなる反応液を30°Cで10分間反応させ、1mlの1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて反応を停止した。以下はユニットの決定と同様の方法により反応速度 v ($\mu\text{mol Glc}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)を測定し、Lineweaver-Burkプロットにより K_m および V を決定した。

4. pHおよび温度の影響

(1) 反応最適pH: 各pHの0.2M MacIlvaine緩衝液(pH2.5-7.5)100 μ l、0.2Mスクロース水溶液50 μ l、酵素液50 μ lからなる反応液を30°Cで10分間反応させ、1mlの1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて反応を停止した。以下はユニットの決定と同様の方法により反応速度 v を測定した。(2) pH安定性: 各pHの0.2M MacIlvaine緩衝液(pH2.5-7.5)25 μ lに酵素液を加えて、50°Cで30分間保温した後に0.2M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)100 μ l、0.2Mスクロース水溶液50 μ lを加え30°Cで10分間反応させ、1mlの1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて反応を停止した。以下はユニットの決定と同様の方法により反応速度 v を測定した。(3) 反応最適温度: 50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)100 μ l、0.2Mスクロース水溶液50 μ l、酵素液50 μ lからなる反応液を30、40、50、60、70、80、90、100°Cの各温度で10分間反応させ、1mlの1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて反応を停止した。以下はユニットの決定と同様の方法により反応速度 v を決定した。(4) 温度安定性: 20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)に溶解した酵素液を30、40、50、60、70、80、90、100°Cの各温度で30分間保温した後に水浴中に急冷した。処理後の酵素液の残存活性はユニットの決定と同様の方法により測定した。

実験結果

1. 果汁沈殿からのインペルターゼの精製

マスカット・ベリーA果実50kgから得た果汁34lから果汁沈殿490g(湿潤重量)を得た。この沈殿中には総量152,400ユニットのインペルターゼ活性が見られ、同時に得られた果汁上清(30l)の2,100ユニットの72倍にもおよび、果実を圧搾して得られた果汁中でインペルターゼは主に沈殿として存在することが示された。

0.2%酒石酸水溶液(pH3.0)で洗浄後の沈殿をDEAE Sepharose Fast Flowカラムクロマトグラ

フィーにより分離した際の溶出パターンをFig.1に示した。溶出液の280nmの吸光値は二つのピーク (Peak IとPeak II) を示し、Peak Iにのみインベルターゼ活性が検出された。このPeak I画分をさらにSephadex G-100カラムクロマトグラフィーにより分離したところ、溶出液280nmの吸光値は二つのピーク (Peak I-aとPeak I-b) を示し、Peak I-bにインベルターゼ活性が見られた (Fig.2)。このPeak I-b画分を集め、PAGEにより分析したところ、単一のタンパク質染色バンドが示された (Fig.3)。このPeak I-b画分を果汁中の沈殿由来の沈殿インベルターゼとして以後の実験に用いた。

2. 沈殿インベルターゼと上清インベルターゼの比較

沈殿インベルターゼと上清インベルターゼをSephadex G-100カラムクロマトグラフィーにより分離したところ、同一の溶出位置に両者のピークが見られた (Fig.4)。さらに、SDS-PAGE (Fig.3) においても沈殿および上清インベルターゼのバンドの位置は一致し、両インベルターゼは同一の分

子量を有していた。PAGEにおけるバンドの位置も一致し (Fig.3)、ニトロセルロース膜に転写後のConAによる染色においても両者ともに強く染色され、糖タンパク質であることが示された。

沈殿インベルターゼのスクロースに対する加水分解作用の特性を検討した結果、反応最適pHは3.5、pH安定領域は5.5-7.0、反応最適温度は80℃、80℃ (10分間) 処理において80%の残存活性を示した。これらの値はすべて上清インベルターゼの値と一致し、両インベルターゼのpH-相対活性曲線 (Fig.5)、pH-残存活性曲線 (Fig.6)、温度-相対活性曲線 (Fig.7)、温度-残存活性曲線 (Fig.8) はいずれもほぼ一致した。 K_m および V は沈殿インベルターゼが4.3mMと94.7 $\mu\text{mol Glc}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ 、そして上清インベルターゼが4.4mMと95.0 $\mu\text{mol Glc}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ であり、ほぼ同一の値であった。

以上のすべての結果は沈殿インベルターゼと上清インベルターゼが同一の酵素であることを支持した。

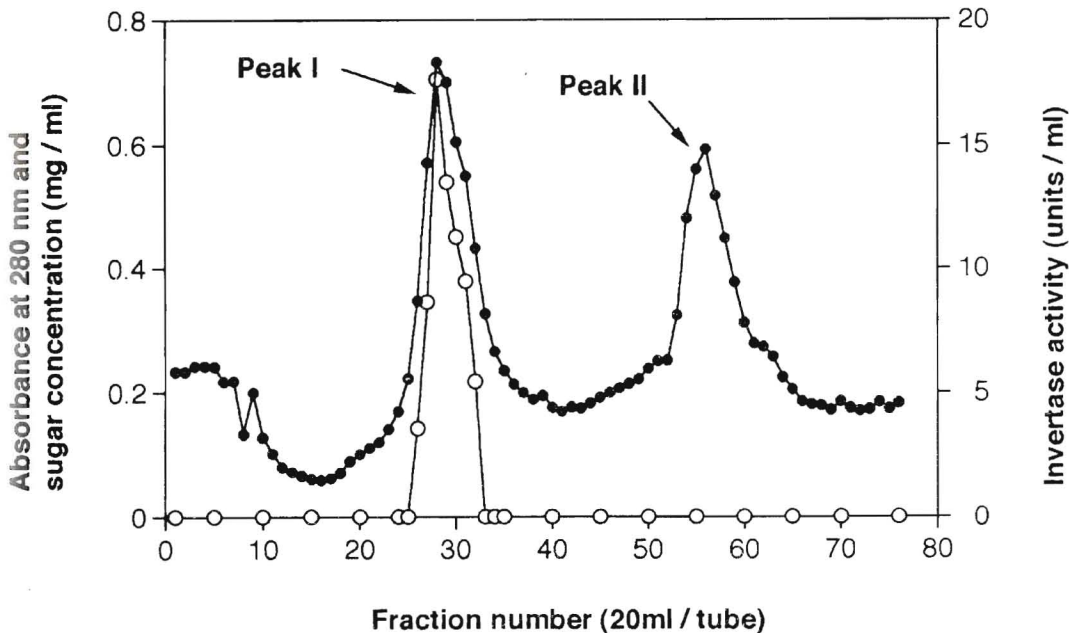


Fig. 1. DEAE Sepharose Fast Flow column chromatography of the precipitate obtained from Muscat Bailey A grape juice. The precipitate solubilized with 0.2M borate buffer (pH8.5) was diluted 5-fold with water and then applied onto a column of DEAE Sepharose Fast Flow (20x160mm), which had been equilibrated with 50mM potassium phosphate buffer (pH7.5). The invertase was eluted with a linear gradient of 0-0.5M sodium chloride in the same buffer. Symbols: ●, absorbance at 280nm; ○, invertase activity(units/ml).

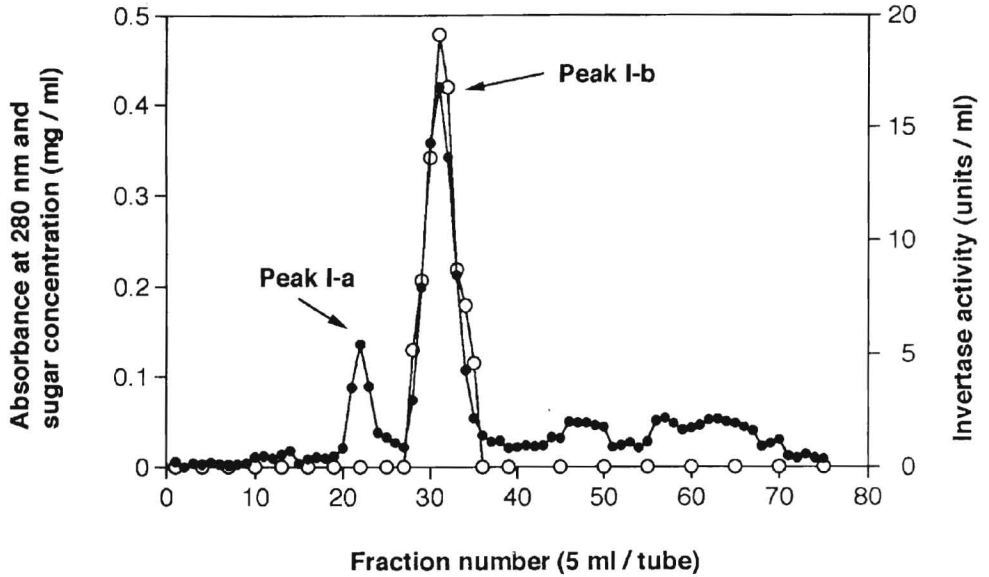


Fig. 2. Sephadex G-100 column chromatography of Peak I. The Peak-I fraction eluted from the DEAE Sepharose Fast Flow column was applied onto a Sephadex G-100 column (30x650 mm), which had been equilibrated with 20mM potassium phosphate buffer (pH6.0) containing 0.2M sodium chloride and then eluted with the same buffer. Symbols: ●, absorbance at 280nm; ○, invertase activity (units/ml).

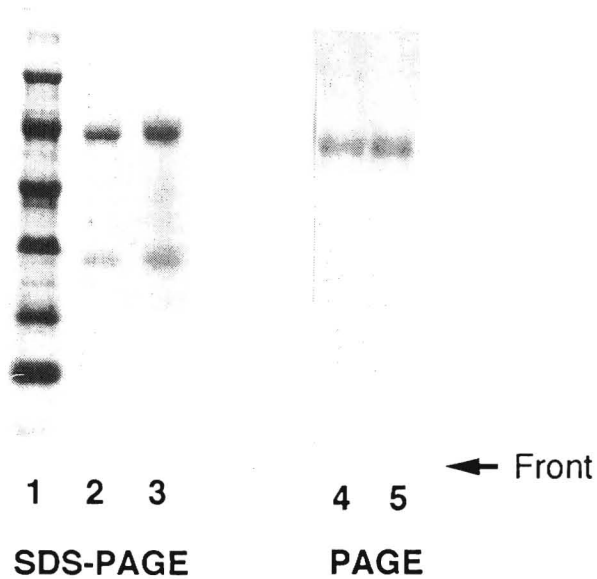


Fig. 3. PAGE and SDS-PAGE of the invertases from defecated juice and the juice precipitate. The following molecular weight marker proteins were electrophoresed in lane 1: phosphorylase b, 94.0 kDa; albumin, 67.0 kDa; ovalbumin, 43.0 kDa; carbonic anhydrase, 30.0 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa. Lanes 2 and 4 are the invertase from defecated juice, and lanes 3 and 5 that from the juice precipitate.

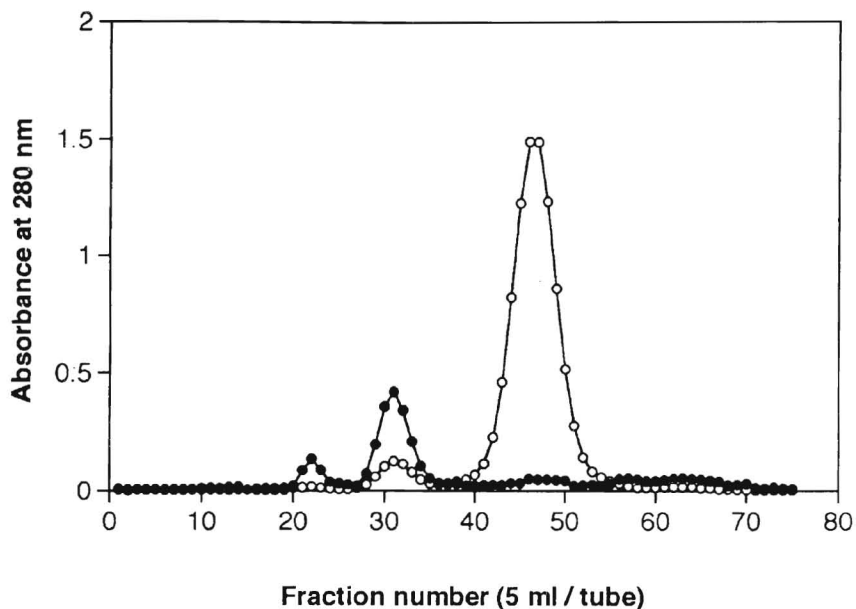


Fig. 4. Sephadex G-100 column chromatographies of Peak I and the salting-out precipitate from the juice. The salting-out precipitate was obtained from Muscat Bailey A grape juice by the addition of ammonium sulfate (80% saturation). The chromatographies were carried out according to the procedure in Fig. 2. Symbols: ●, Peak I fraction (protein fraction from the juice precipitate); ○, salting-out precipitate (protein fraction from defecated juice).

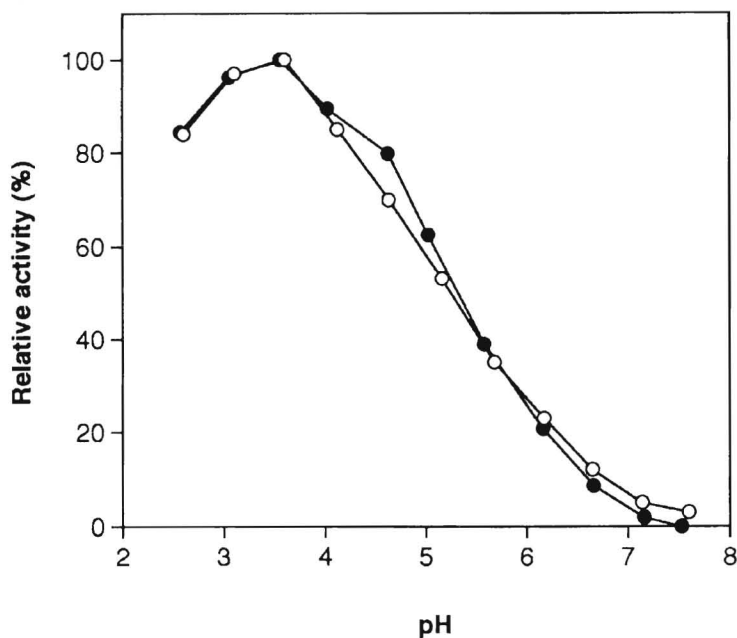


Fig. 5. Effect of pH on the activities of the invertases from defecated juice and the juice precipitate. The enzyme activities at various pHs were measured at 30°C using 0.2M McIlvaine buffer (pH 2.5-7.5). Symbols: ●, invertase from the juice precipitate; ○, invertase from defecated juice.

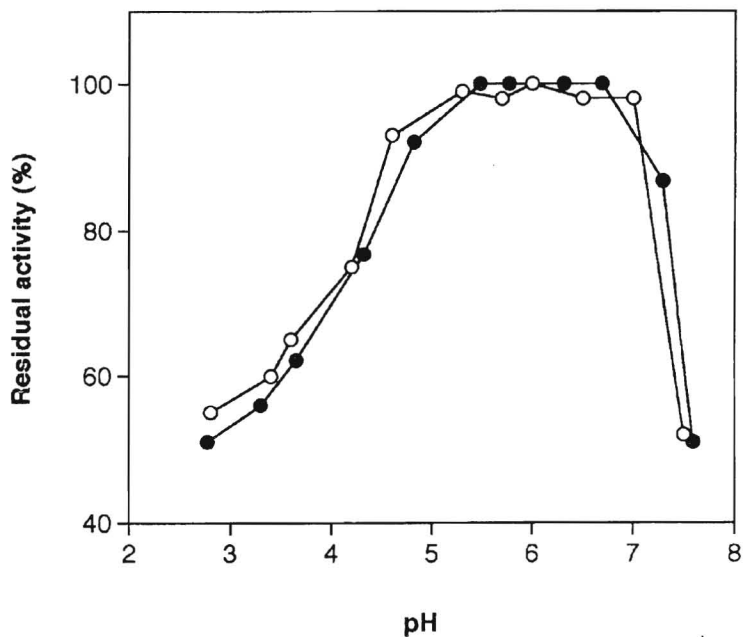


Fig. 6. Effect of pH on the stabilities of the invertases from defecated juice and the juice precipitate. The enzyme solutions were mixed with 0.2M McIlvaine buffer (pH2.5-7.5) and pre-incubated at 50°C for 30min. The residual activities of the treated enzymes were assayed under the standard conditions. Symbols: ●, invertase from the juice precipitate; ○, invertase from defecated juice.

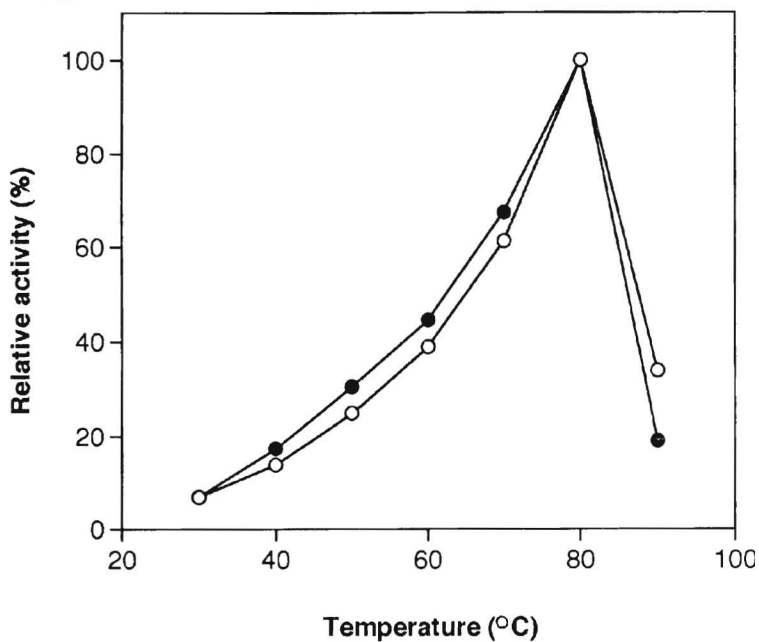


Fig. 7. Effect of temperature on the activities of the invertases from defecated juice and the juice precipitate. The enzyme activities at various temperatures (30-50°C) were measured at pH4.0. Symbols: ●, invertase from the juice precipitate; ○, invertase from defecated juice.

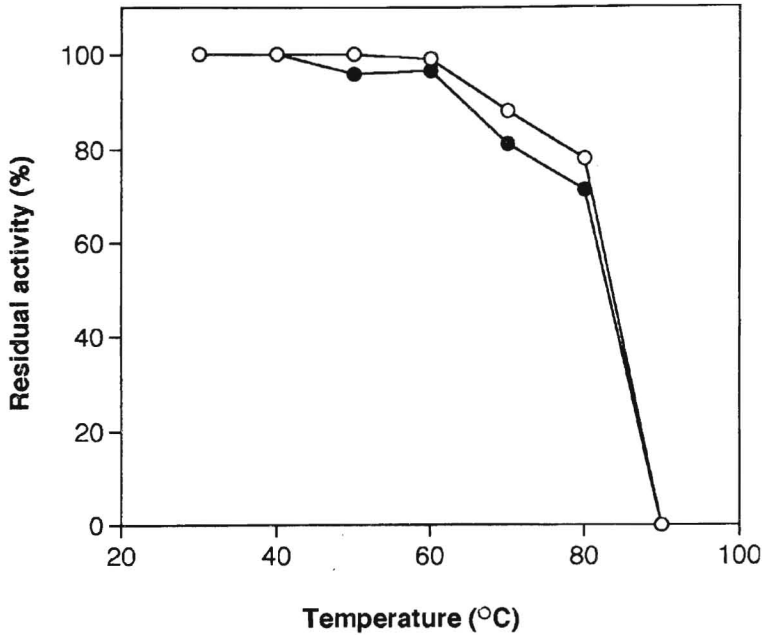


Fig. 8. Effect of temperature on the stabilities of the invertases from defecated juice and the juice precipitate. The enzyme solutions at various (pH4.0) were pre-incubated at various temperatures (30–50°C) for 30min and then cooled at 0°C. The residual activities of the treated enzymes were assayed under the standard conditions. Symbols: ●, invertase from the juice precipitate; ○, invertase from defecated juice.

考 察

植物インベルターゼの発現や精製実験において同一の植物組織中に2種類のインベルターゼが存在することが報告されている。すなわち、植物組織中に溶解している可溶性インベルターゼと高塩濃度の溶媒ではじめて抽出される不溶性インベルターゼである。この不溶性インベルターゼは細胞壁に結合したインベルターゼとして組織化学的染色法によりその細胞レベルでの分布が明らかになっている^(1, 9)。同一組織中の可溶性および不溶性インベルターゼを比較した結果は植物の種類によりかなり異なっている。たとえば、小麦種子インベルターゼでは可溶性および不溶性インベルターゼの加水分解特性そのものが異なること⁽¹⁾、ダイコンの実生インベルターゼでは両インベルターゼタンパク質に結合した糖鎖の違いにより、両インベルターゼの電荷の状態が異なる⁽²⁾ことなどが報告されている。一方、Hawkerは⁽¹⁰⁾ブドウ果実インベルターゼは細胞質や液胞に存在する可溶性インベルターゼがすべてで、不溶性インベルターゼは抽出の際にタンニンと複合体を形成してできる二次的産物であると報告している。

我々はブドウ果汁中に溶解している可溶性インベ

ルターゼを精製する際に得られる果汁沈殿中 (pH 3.0では可溶化しない沈殿)にも強いインベルターゼ活性を見出した。このインベルターゼ活性は0.2 Mホウ酸緩衝液 (pH8.5)によって可溶化され、果汁中に溶解しているインベルターゼに較べて量的には圧倒的に多かった。果汁沈殿中のインベルターゼは電気泳動による分析およびスクロース加水分解特性において果汁中に溶解している可溶性インベルターゼと同一であることが示された。果汁沈殿の成分としてはタンパク質11.3%、中性糖17.9%、酸性糖40.2%、フェノール1.7%であり、タンパク質以外の成分が多く存在した。これらの結果は、不溶性インベルターゼは果実を破碎した時に二次的に生ずる酵素タンパク質とタンニンの複合体であるというHawkerの提案⁽¹⁰⁾と一致している。しかし、組織化学的染色法によるマスカット・ベリーAブドウ果実成熟中の不溶性インベルターゼの検出実験では、不溶性インベルターゼが必ずしも二次的産物ではないことが示されている⁽¹¹⁾。すなわち、成熟途中のブドウ果実のディスク状切片の活性染色実験は、ベレーゾン直後のブドウ果実組織に水洗処理では除けない強いインベルターゼ活性が存在すること

を示し、さらにその活性の上昇は可溶性インベルターゼ活性の上昇時期よりも早かった。もし、活性染色により検出される不溶性インベルターゼが100%二次的産物であるならば、その活性の上昇時期は可溶性インベルターゼの上昇時期と一致するはずである。したがって、ブドウ果実中の不溶性インベルターゼには、生体内で組織に結合しているものと果汁を取る際に可溶性インベルターゼが不溶化してできる二次的なものがあると考えるのが妥当であろう。しかし、ブドウ果実のインベルターゼが本質的に1種類しか存在しないのかという疑問に対して答えを出すためには、成熟レベルの異なった果実から様々な抽出方法によりインベルターゼを抽出し、アイソザイムの有無を確認する必要がある。

引用文献

- (1) H.B.Krishnan, J.T.Blanchette, and T.W.Okita, *Plant Physiol.*, 78, 241-245 (1985).
- (2) L.Faye and A.Ghorbel, *Plant Sci. Lett.*, 29, 49-60 (1983).
- (3) W.N.Arnold, *Biochim. Biophys. Acta*, 128, 124-129 (1966).
- (4) W.Porntaveewat, T.Takayanagi, and K.Yokotsuka, *J.Ferment. Bioeng.*, 78, 288-292 (1994).
- (5) T.Takayanagi, W.Porntaveewat, and K.Yokotsuka, *J. Appl. Glycosci*, 42, 121-127 (1995).
- (6) U.K.Laemmli, *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- (7) W.N.Burnette, *Anal. Biochem.*, 112, 195-203 (1981).
- (8) I.Miwa, J.Okuda, K.Maeda, and G.Okuda, *Clin. Chim. Acta*, 37, 538-540 (1972).
- (9) D.C.Doehlert and F.C.Felker, *Physiol. Plantarum*, 70, 51-57 (1987).
- (10) J.S.Hawker, *Phytochemistry*, 8, 9-12 (1959).
- (11) 高柳勉、ウィンモンスリ・ポントウイワット、横塚弘毅：山梨大学発酵研究所報告、29、7-11 (1994).