

[J.Inst.Enol.Vitic.Yamanashi Univ.32,1~ 4,1997]

## ブドウ果実の成熟にともなう各種グリコシダーゼ活性の変化

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)

### Changes in Glycosidase activity in Grapes During Development

TSUTOMU TAKAYANAGI, TOHRU OKUDA and KOKI YOKOTSUKA

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

#### Abstract

Changes in the activity of several glycosidases were studied in skin and flesh tissues of Semillon grapes during berry development. The activity of six glycosidases ( $\alpha$ - and  $\beta$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucosidase,  $\alpha$ -L-arabinopyranosidase,  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -D-mannosidase) was detected in developing grape berries. Beta-D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucosidase,  $\alpha$ -L-arabinopyranosidase,  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -D-mannosidase activity in the skin tissues began increasing prior to véraison and reached a maximum around véraison, whereas  $\alpha$ -D-galactosidase activity increased throughout development. Beta-D-galactosidase and  $\alpha$ -D-mannosidase activity was the highest of all the glycosidases tested. Glycosidase activity in the skin tended to be higher than in the flesh tissues. The possible role of glycosidase in grape berry softening is discussed.

#### 緒 論

植物細胞壁の主要骨格がセルロース、ポリガラクトン酸、アラビノガラクトンなどの多糖のネットワークから構成されていることから、これら多糖の酵素的分解が成熟期の果実の軟化に関与していると考えられている。植物細胞壁多糖の一つであるポリガラクトン酸を分解するポリガラクトナーゼは、*in vitro*の反応系において効果的に植物細胞壁を溶解して組織の崩壊を導くことから、成熟期の果実の軟化に関与する酵素として特に注目され、多くの果実で研究が進められてきた。トマトではポリガラクトナーゼ遺伝子がクローニングされ、アンチセンスRNA技術によりその発現を抑制する研究が行われた<sup>(1,2)</sup>。その結果、トマト果実のポリガラクトナーゼ発現量を大幅に低下させても果実の軟化や色素の蓄積は正常に進み、収穫後の果実組織の崩壊速度が低下することが明らかになった。この実験では、成熟期の果実組織

中のポリガラクトナーゼ活性の抑制率が70~90%であるため、ポリガラクトナーゼが果実の成熟に関係しないという結論を導くことはできないが、ポリガラクトナーゼが成熟期果実の軟化を引き起こすキー酵素であるという従来の考え方に問題を投げかける結果となった。複雑な構造をもつ植物細胞壁の分解がガラクトナーゼのみにより引き起こされているとは考えがたく、他の細胞壁多糖分解酵素、すなわち、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチンリアーゼ、ガラクタナーゼ、各種グリコシダーゼなどが関与している可能性は高い。

ブドウ果実はベレゾーンと呼ばれる時期を境に急激に軟化が進む。軟化にともなう果肉組織の崩壊は果皮の内側から始まり、種子周辺へと進行する<sup>(3)</sup>。この果実軟化の開始と同時期に果実内のポリガラクトナーゼ活性は上昇し、果肉中の可溶性多糖量も増大する。しかし、成熟期ブドウ果実において、ポリガラクトナーゼ以外の糖分解酵素の発現に関する知見は得られ

ていない。本研究では、成熟期のセミヨンブドウ果実を経時的にサンプリングし、その果皮及び果肉の各種グリコシダーゼの活性を測定した。そして、これらグリコシダーゼの発現と果実の軟化との関係を考察した。

### 実験材料および方法

#### 1. ブドウ試料

山梨大学発酵化学研究施設育種試験地において収穫されたセミヨンブドウ果実を使用した。同一の試験樹から日照条件の近い50房を選択し、マーキングを行った。セミヨン果実は開花日から10日おきに、各房から、2粒ずつ、合計100粒を採取し、果実の重量、糖度 (° Brix) および硬度 (kgw/cm<sup>2</sup>) を測定した。採取果実を果皮、果肉、種子に分離し、液体窒素で凍結後、乳鉢を用いて粉末化し、-80°Cで保存した。

#### 2. 酵素の抽出

凍結保存した果皮および果肉粉末1gに対して、2 mlの0.2 Mホウ酸緩衝液 pH 8.0 (0.5 M塩化ナトリウム, 0.2% システイン, 1% ポリエチレングリコール #4000を含む) を添加し、15,000 rpmで2分間ホモジナイズ (ホモジナイザー, Nihon Seiki Ltd.) した後に、4°Cで2時間攪拌抽出した。この抽出液を遠心分離し (27,000g, 10分間), 得られた上清をSephadex G-25を用いたMicro centrifuge desalting<sup>®</sup>によりゲル濾過し、低分子物質を除去した。

Micro centrifuge desaltingは次のように行った。ガラス製シリンジ (1.5 x 7 cm) の先端に綿を詰め、蒸留水で膨潤したSephadex G-25 (約7 ml) を流し込み、スイング型ローターで遠心分離した (1,400g, 2分間)。このカラムに、3 mlの50 mM酢酸緩衝液 pH 5.0 (0.5 M塩化ナトリウム, 0.2% システイン, 1% ポリエチレングリコール #4000を含む) を添加し、遠心分離した (1,400g, 2分間)。この操作を2回繰り返した後に、上清700 μlを添加し、遠心分離 (1,400g, 2分間) して、ゲル濾過液を得た。

#### 3. 各種グリコシダーゼ活性の測定

各糖のp-ニトロフェニル誘導体を基質として、反応により遊離するp-ニトロフェノール量を測定した。50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 100 μl, ゲル濾過により低分子物質を除去した酵素抽出液 50 μl, 10mM p-ニトロフェニル誘導糖 50 μlからなる反応液を37°Cで1時間インキュベートした後に1 mlの0.5 M 炭酸ナトリウム溶液

を添加して反応を止めた。遊離したp-ニトロフェノールを400nmの吸光度 (分子吸光係数: 18.1 cm<sup>2</sup> / μmol) を測定することにより定量した。p-ニトロフェニル (pNP) 誘導糖は、pNP-α-D-グルコシド, pNP-β-D-グルコシド, pNP-α-D-ガラクトシド, pNP-β-D-ガラクトシド, pNP-α-D-マンノシド, pNP-β-D-マンノシド, pNP-α-L-フコシド, pNP-β-L-フコシド, pNP-α-D-キシロシド, pNP-β-D-キシロシド, pNP-α-L-ラムノピラノシド, pNP-α-L-アラビノピラノシド, の計12種類を使用した。上記の反応条件下において1分間に1 μmolのp-ニトロフェノールを生成する酵素量を1ユニットとした。

### 実験結果

Fig. 1 にセミヨンブドウ果実の重量、糖度 (° Brix) および硬度の変化を示した。果実は順調に生長し、開花後50~60日でベレゾーンをむかえ、糖度の上昇と硬度の低下が開始した。

生長期の果実の果皮および果肉の各種グリコシダーゼ活性を12種類の基質を用いて測定したところ、6種類の基質 (pNP-α-D-ガラクトシド, pNP-β-D-ガラクトシド, pNP-β-D-グルコシド, pNP-α-L-アラビノピラノシド, pNP-β-D-キシロシド, pNP-α-D-マンノシド) において酵素活性が検出されたのに対して、それ以外の基質 (pNP-α-D-グルコシド, pNP-β-D-マンノシド, pNP-α-L-フコシド, pNP-β-L-フコシド, pNP-α-D-キシロシド, pNP-α-L-ラムノピラノシド) では酵素活性は検出限界以下であった (Fig. 2)。検出された6種類のグリコシダーゼ活性は、いずれも開花直後は微量

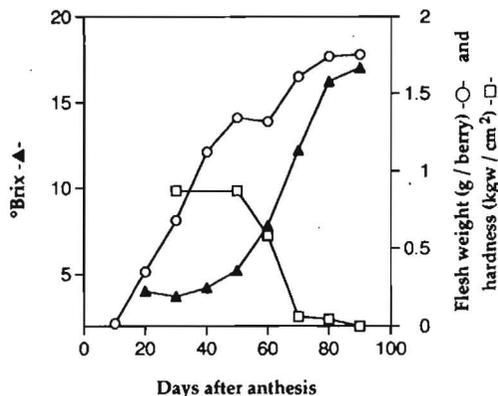


Fig. 1. Changes in fresh weight, rix and hardness of Semillon grape berries during development.

で、開花後20日以降に増加した。 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼは生長期を通じて増加を続けたのに対して、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ、 $\alpha$ -L-アラビノピラノシダーゼ、 $\beta$ -D-キシロシダーゼ、 $\alpha$ -D-マンノシダーゼは生長の途中で最大値を示し、それ以後減少した。酵素の発現量としては $\beta$ -D-ガラクトシダー

ゼと $\alpha$ -D-マンノシダーゼが最も大きく、最大活性は両者とも約 $70 \times 10^3$  (unit / g fresh weight) に達した。果皮と果肉の酵素活性を比較するといずれの酵素も果皮の酵素活性が高い傾向にあり、果肉では活性が全く検出されない酵素も存在した ( $\alpha$ -L-アラビノピラノシダーゼ、 $\beta$ -D-キシロシダーゼ)。

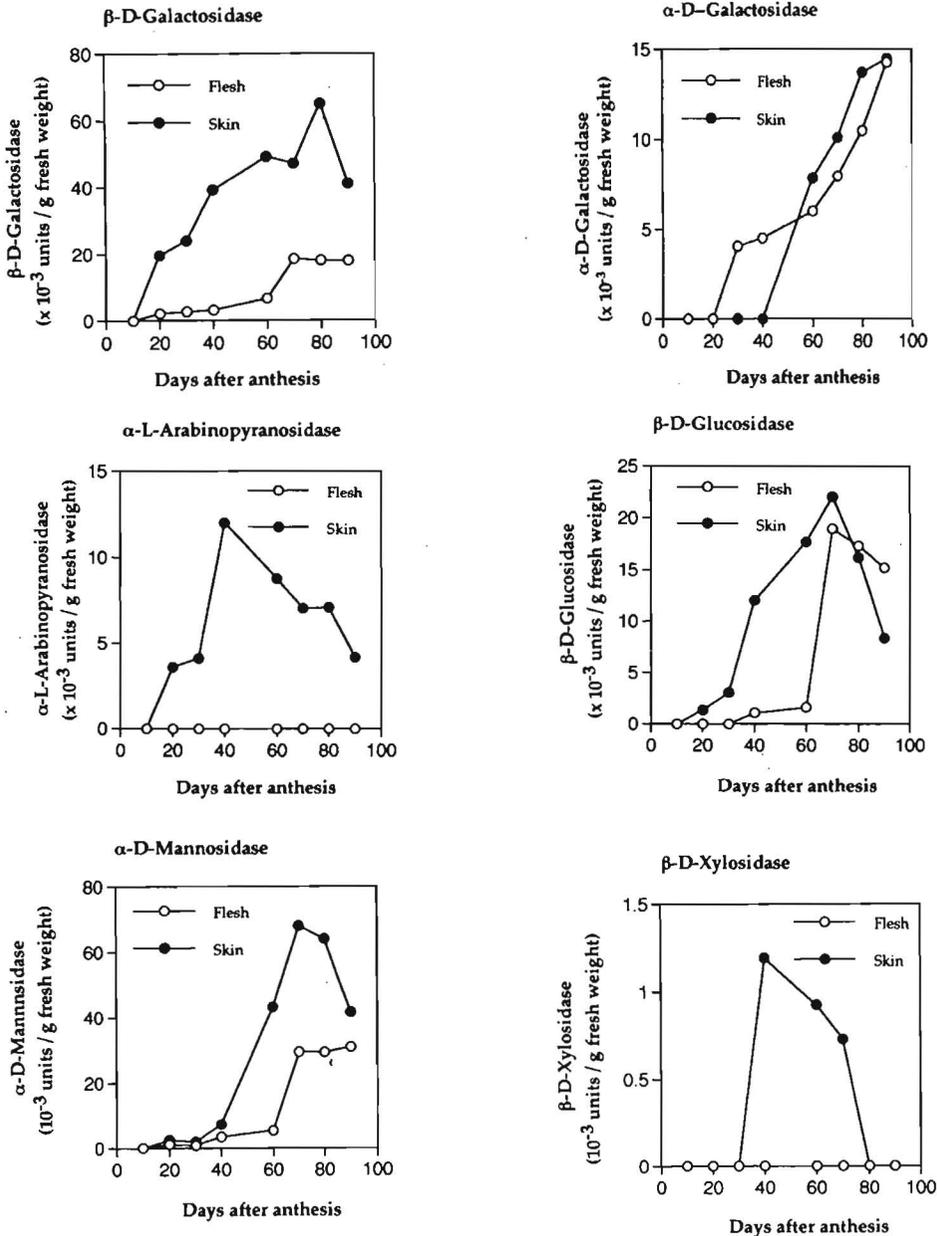


Fig. 2. Changes in glycosidase activity in Semillon grape berries during development.

## 考 察

植物の細胞壁は大きく分けて2つの網目構造により形成されている。一つは、直鎖状のセルロース分子が水素結合により束となったセルロースマイクロフィブリルとその表面に結合して多くの枝分かれによりマイクロフィブリル間を架橋しているヘミセルロースの網目構造。もう一つは、負電荷をもつガラクトロン酸を多く含むペクチンの網目構造である。セルロースの網目構造は細胞壁に引っ張り強度を与え、ペクチンの網目構造は隣接する細胞壁どうしを結合させるセメントの役を果たしていると考えられている<sup>8)</sup>。本研究で、成熟期のブドウ果実に検出されたグリコシダーゼ活性の中で、植物細胞壁を構成するこれら網目構造を分解する能力を持つものとしてはセルロースやヘミセルロースの分解に関与する $\beta$ -D-グルコシダーゼと $\beta$ -D-キシロシダーゼ、ペクチンの中性糖成分であるアラビノガラクトタンの分解に関与する $\beta$ -D-ガラクトシダーゼと $\alpha$ -L-アラビノピラノシダーゼがあげられる。活性発現量の大きい $\beta$ -D-グルコシダーゼと $\beta$ -D-ガラクトシダーゼに注目してみると、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性は、果皮で開花後30日から急激に増加し、果肉では少し遅れて、開花後60日から活性が上昇した。それに対して、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ活性は、果皮および果肉ともに開花直後から増加を続け、成熟後期に最大値を示した。 $\beta$ -D-グルコシダーゼはセルロースやヘミセルロースの主要構造であるD-グルコースの $\beta$ -1, 4結合を、そして $\beta$ -D-ガラクトシダーゼはアラビノガラクトタンの主鎖であるD-ガラクトースの $\beta$ -1, 3結合を分解する能力を持っている。果実の軟化が開花後60日前後に急激に進むのに対して、測定した各グリコシダーゼ活性の発現時期は、必ずしも果実の軟化時期と一致しなかった。多くのグリコシダーゼ活性は果実生長のかなり早い段階から増加する傾向にあり、果実の細胞壁多糖の分解は、ベレゾーン以前の早い時期から徐々に進行しているとも考えられる。各グリコシダーゼ活性がいずれも果肉に比べて果皮で強く、かつ早い時期に発現していることから、生理的にアクティブな果皮細胞で合成された各グリコシダーゼが果肉細胞に拡散している可能性が高い。 $\alpha$ -マンノシダーゼ活性は果実の軟化とほぼ同じ時期に増加し、その発現量も大きかった。 $\alpha$ -マンノシダーゼは植物細胞内の液胞に多く含まれることが知られており<sup>6,7)</sup>、この酵素の増加は、果実細胞壁

の分解ではなく、果実の軟化の際に見られる液胞の肥大化と関連しているものと推測される。

本研究で検出された各種グリコシダーゼのほとんどは、植物細胞壁を構成する多糖を分解する能力を有するが、ブドウ果実の軟化に関与しているという直接的な証拠は得られていない。しかし、他の幾つかの植物においては、成熟にともなう果実の軟化の際に、細胞壁部分に $\beta$ -ガラクトシダーゼなどのグリコシダーゼが発現し、細胞壁多糖を分解することが明らかにされている<sup>8,9)</sup>。今後、ブドウ果実組織内における各グリコシダーゼの発現位置を決定するとともに、遺伝子レベルでの各グリコシダーゼの発現制御実験が可能となれば、ブドウ果実の軟化における各グリコシダーゼの役割がより明確になると期待される。

## 引用文献

- (1) C. J. S. Smith, C.F. Watson, J. Ray, C.R. Bird, P.C. Morris, W. Schuch, and D. Grierson, *Nature*, **334**, 724-726 (1988).
- (2) R.E. Sheehy, M. Kramer, and W.R. Hiatt, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 8805-8809 (1988).
- (3) 元村佳恵, *J. ASEV Jpn.*, **7**, 214-215 (1996).
- (4) E. Helmerhorst and G. B. Stockes, *Anal. Biochem.*, **104**, 130-135 (1980).
- (5) G.P. Bolwell, *Int. Rev. Cytol.*, **146**, 261-324 (1993).
- (6) T. Boller and H. Kende, *Plant Physiol.*, **63**, 1123-32 (1979).
- (7) J.A. Saunders and E.E. Conn, *Plant Physiol.*, **76**, 885-888 (1984).
- (8) I.M. Bartley, *Phytochemistry*, **13**, 2107-2111 (1974).
- (9) R. Pressey, *Plant Physiol.*, **71**, 132-135 (1983).