

# 第1章 トマトの果実および葉中の糖含量と酸性 インペルターゼ活性

## はじめに

*Lycopersicon* 属野生種 *L. chmielewskii*, *L. hirsutum* および *L. peruvianum* の果実を用いた生化学的分析により、*Lycopersicon* 属果実における糖蓄積パターンの違いが可溶性酸性インペルターゼ活性の違いに起因することが示唆されている (Manning and Maw, 1975; Yelle et al., 1988, 1991; Miron and Scaffer, 1991; Stommel, 1992)。しかし、果実中の酸性インペルターゼアイソザイムの活性と糖蓄積との関連、さらに、ソース器官 (成熟葉) における同酵素活性と糖含量との関連等についての研究は非常に限られている。

本章第1節では、果実中の糖蓄積パターンを異にするトマトおよびその野生種を材料として、シンク (果実)、ソース (成熟葉) 両器官における可溶性糖含量、可溶性および細胞壁結合型酸性インペルターゼ活性の測定を行った。その結果に基づき、可溶性酸性インペルターゼと果実糖組成との関係について改めて検証すると共に、トマト及び野生種におけるシンク、ソース器官中の可溶性糖類および酸性インペルターゼ活性に関する基礎的データを得た。第2節では、トマト果実を材料として可溶性酸性インペルターゼを精製し、遺伝子クローニングの際の重要なデータとなる N 末端アミノ酸配列の分析を行った。

## 第1節 トマトおよび近縁野生種 *L. peruvianum* の果実 ならびに葉の糖含量、インベルターゼ活性

果実での糖蓄積パターンの異なる2種、トマト *Lycopersicon esculentum* および近縁野生種 *L. peruvianum* (望月, 1987; 今田ら, 1990b; Stommel, 1992) を材料として、糖含量および細胞壁結合型および可溶性酸性インベルターゼ活性の測定を行い、果実、葉あるいは種間における糖含量、糖組成の差異と2種の酸性インベルターゼ活性との関連等について考察した。

### 1-1-1 材料および方法

#### 1-1-1-1 植物材料

温室で栽培したトマト品種「ハウスおどりこ」(サカタ交配)および近縁野生種 *Lycopersicon peruvianum* var. *glandulosum* ID 8314 (以後この論文では野生種と記載)の果実と成熟葉を材料として供試した。野生種の種子は、農林水産省、野菜・茶業試験場の石内傳治博士より分与された。野生種は自家不和合性であるので、受粉は株間交配により行った。果実は開花(受粉)後30-60日に採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で使用時まで保存した。糖分析用の葉は、液体窒素中で磨砕後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。酵素活性測定用の葉は、採取後直ちに分析に使用した。

#### 1-1-1-2 糖含量測定

葉および果実(50-100mg)は1.5mlの80%エタノールで磨砕し、得られた抽出液を $80^{\circ}\text{C}$ で15分間加熱後、微量高速遠心機で遠心(15,000 rpm, 3分間)した。上清にイオン交換樹脂(Bio-rad AG1-X8および50W-X8)および活性炭を加えて、1時間以上放置し、Sep-pak 1cc(100mg) C18 cartridges (for solid phase extraction, Waters 社)による精製を行った。精製した糖抽出液は減圧濃縮後、少

量の水に溶解し、Shim-pack SCR-101C カラム (Shimazu 社) を装着した HPLC により分析した。

### 1-1-1-3 酵素活性測定

果実は生重と等量の抽出緩衝液 (50mM HEPES-KOH, pH8.3, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub>, 2mM DTT) と共に磨砕し、4℃、31,000xg で 20 分間遠心した。葉の磨砕時には、上記抽出緩衝液中の DTT 濃度を 6mM とし、生重の 5 倍量の抽出緩衝液を使用した。遠心後得られた上清は、NAP 5 カラム (Pharmacia LKB Biotechnology 社) により脱塩し、可溶性酸性インベルターゼ活性測定に供した。沈殿は、抽出緩衝液で 2 回洗浄した後、1M NaCl を含む抽出緩衝液に再懸濁し、4℃で 3 時間以上振盪した。懸濁した沈殿は上記と同条件下で遠心し、得られた上清を細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性測定に使用した。

酸性インベルターゼ活性の測定は、Robinson et al. (1988) の方法に基づいて行った。すなわち、酵素液を 3% ショ糖を含む 0.5M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 中で、37℃、15 分間保温した後、85℃で 2 分間加熱し、反応を停止させた。反応液を 1N KOH で中和した後、生成したブドウ糖を酵素法 (F-kit D-glucose、ベーリンガー社) により定量した。蛋白質量は、Dye-binding 法 (Bradford, 1976) により、牛血清アルブミンを標準として定量した。

## 1-1-2 結果

### 1-1-2-1 果実および成熟葉中の可溶性糖濃度

トマトおよび野生種果実の糖組成は大きく異なり、トマトは還元糖、野生種はショ糖が主要糖類であった (図 1-1-1)。果実の発育初期においては野生種においてもかなりの比率の還元糖 (特に果糖) が認められたが、発育につれて減少し、開花後 55 日にはショ糖が 80% 以上を占めた (図 1-1-1)。トマト果

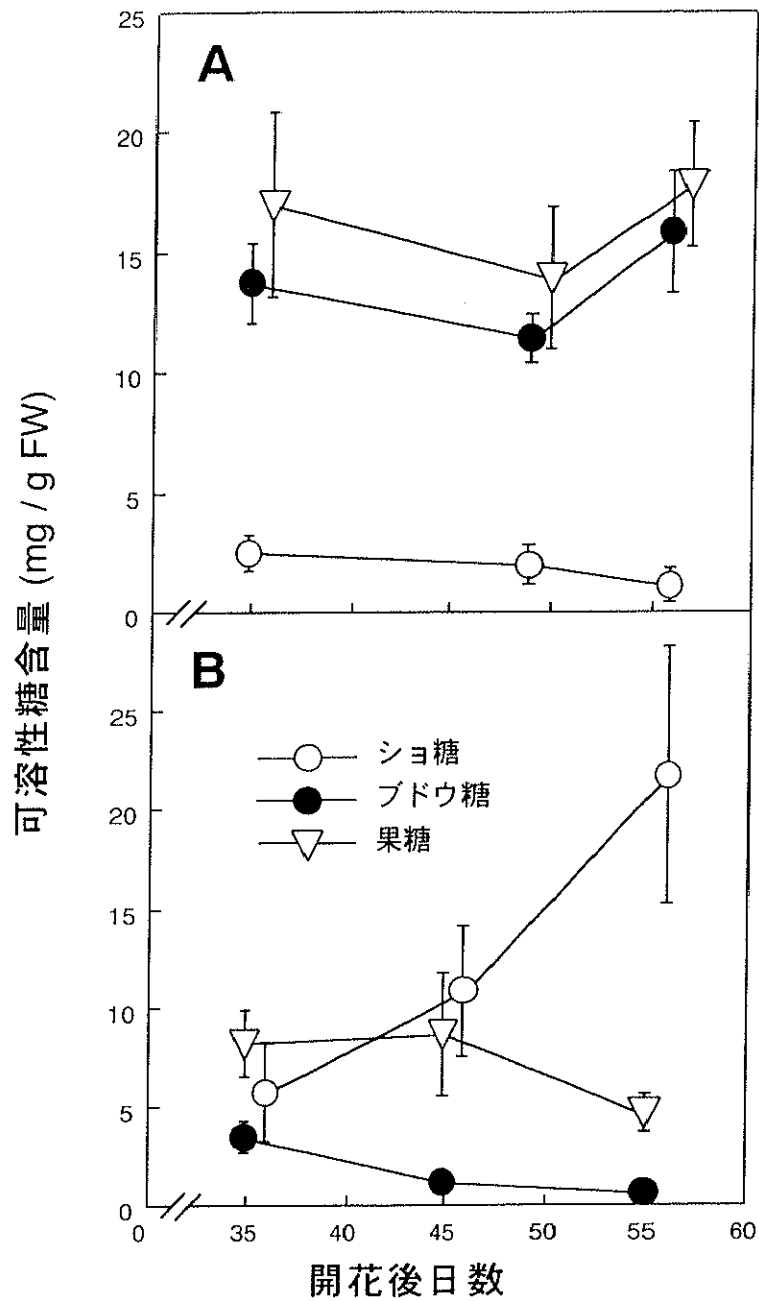


図1-1-1 発育肥大中の果実における可溶性糖含量

温室で栽培したトマト (*L. esculentum*, A) および野生種 (*L. peruvianum*, B) より開花後30~60日の果実を収穫し、糖含量を測定した。データは、3反復の試験の平均値および標準誤差を示す。

実においては、発育初期の段階において既に還元糖が主要な糖であった（図 1-1-1）。

トマトおよび野生種の成熟葉の糖組成はほぼ同じで、ショ糖およびブドウ糖の含量が少なく、主要な糖は果糖であった（表 1-1-1）。可溶性糖類に占めるショ糖の割合は、野生種の方がトマトをやや上回った（表 1-1-1）。また、可溶性糖含量、可溶性糖濃度は野生種の方が少なかった（表 1-1-1）。

### 1-1-2-2 果実および成熟葉におけるインベルターゼ活性

図 1-1-2 にトマトおよび野生種の果実形成期の可溶性酸性インベルターゼ活性と細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性の変化を示した。トマトおよび野生種のいずれも、可溶性酸性インベルターゼ活性が調査全期を通じて細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性を上回った（図 1-1-2）。また、トマト果実の可溶性酸性インベルターゼ活性は、調査した全区において野生種果実の同酵素活性を上回った（図 1-1-2）。細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性についても、可溶性酵素活性と同様の差異が2種の間で認められた（図 1-1-2）。可溶性および細胞壁結合型酵素活性は、野生種では果実発育全期を通じてほぼ一定だったが、トマトでは果実の発育に伴い増大した（図 1-1-2）。発育中のトマト果実における活性の増大は可溶性酵素において顕著であり、成熟期（開花後 50-60 日）に至って著しく増大した。

成熟葉における可溶性および細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、いずれもトマトの方が野生種よりも高い値を示した（表 1-1-2）。

## 1-1-3 考察

### 1-1-3-1 果実におけるインベルターゼ活性と糖組成との関係

トマト果実における可溶性糖類の貯蔵場所は液胞であり（金山・山木, 1993）、また、果実中の可溶性酸性インベルターゼは、大部分が液胞に局在す

表 1-1-1 トマトおよび野生種の成熟葉中の可溶性糖含量

種	可溶性糖含量 (μg (g FW) <sup>-1</sup> )			果糖 (%)	全可溶性糖類	全可溶性糖濃度 (μmol Glucose (g FW) <sup>-1</sup> )
	シヨ糖 (%)	ブドウ糖 (%)	全可溶性糖類			
<i>L. esculentum</i>	21.5 ± 2.87 (2.15)	51.9 ± 8.35 (5.19)	930 ± 40.0 (93.0)	1000 ± 49.8	5.57 ± 0.27	
<i>L. peruvianum</i>	11.9 ± 2.02 (3.88)	0.69 ± 0.13 (0.22)	294 ± 21.6 (95.8)	307 ± 21.7	1.71 ± 0.12	

データは3反復の試験の平均値および標準誤差で示す。括弧内%は全可溶性糖含量を100とした時の比率を表す。

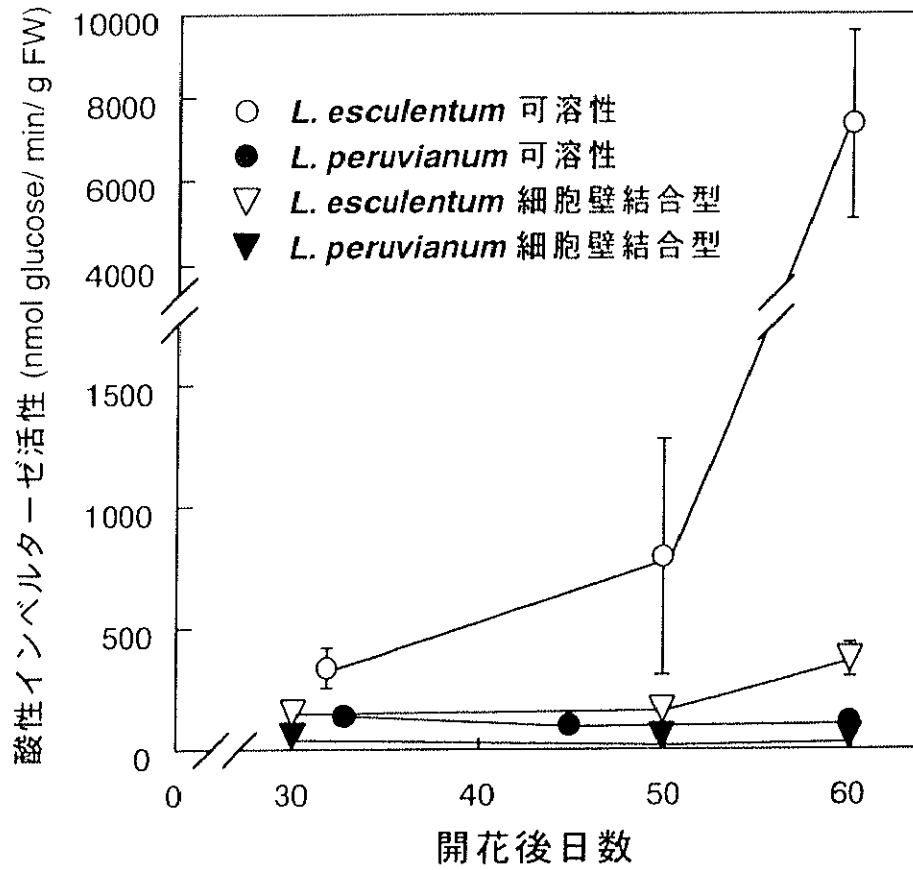


図1-1-2 発育中の果実における酸性インペルターゼ活性

温室で栽培したトマト (*L. esculentum*) および野生種 (*L. peruvianum*) より開花後30~60日の果実を収穫し、可溶性および細胞壁結合型酸性インペルターゼ活性を測定した。データは、3反復の試験の平均値および標準誤差を示す。

表 1-1-2 トマトおよび野生種の成熟葉中の酸性インベルターゼ活性

種	酸性インベルターゼ活性 (nmol min <sup>-1</sup> (g FW) <sup>-1</sup> )	
	可溶性画分 (%)	細胞壁画分 (%)
<i>L. esculentum</i>	1530 ± 159 (85.2)	265 ± 56.7 (14.8)
<i>L. peruvianum</i>	359 ± 141 (80.4)	87.6 ± 16.7 (19.6)

データは4反復の試験の平均値および標準誤差で示す。括弧内%は全酸性インベルターゼ活性を100とした時の比率を表す。



るものと考えられている (Konno et al., 1993)。トマト果実は、発育初期より還元糖が主成分であったが (図 1-1-1)、調査した全ての発育段階において、トマト果実中の可溶性酸性インベルターゼ活性がショ糖蓄積型である野生種果実中の活性を上回った (図 1-1-2)。この結果は、可溶性酸性インベルターゼ活性が果実における糖蓄積パターンを左右する主要因の一つであることを示唆するものである。

一方、細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は可溶性酸性インベルターゼに比べれば低いものの、トマトおよび野生種果実間において差が見いだされた (図 1-1-2)。トマト果実へのショ糖の流入は、主に原形質連絡を介したシンプラスト輸送によるものと考えられている (Damon et al., 1988; Dali et al., 1992)。しかし、近年、細胞壁結合型酸性インベルターゼ、Hexose transporter を介した還元糖のアポプラスト輸送 (Giaquinta, 1983) が、トマト果実への糖流入 (unloading) に関与することが示唆されている (Ruan and Patrick, 1995; Ho, 1996; Ruan et al., 1996; Brown et al., 1997)。もし *Lycopersicon* 属果実においてアポプラスト輸送機構が存在するならば、細胞壁結合型酸性インベルターゼの活性は、糖組成、糖含量およびシンク能等へ影響を及ぼす可能性がある。従って、果実中の細胞壁結合型酸性インベルターゼの Reverse genetics を用いた解析も今後必要になると思われる。

### 1-1-3-2 葉における酸性インベルターゼ活性と糖組成との関係

成熟葉中の酸性インベルターゼ活性には、トマトと野生種間で差が見いだされたが (表 1-1-2)、果実とは異なり、葉中の糖組成の違いは両種間で顕著ではなかった (表 1-1-1)。この理由としては、野生種の成熟葉で認められた可溶性酸性インベルターゼ活性のレベル (表 1-1-2) が、葉の液胞中に貯蔵されたショ糖の分解においては十分であるという可能性がまず考えられる。Goldschmidt and Huber (1992) は、トマトを含む各種作物の環状剥皮試験において、可溶性酸性インベルターゼ活性に閾値 (約 167 nmol/min/gFW) が存在し、

この値を下回る場合に葉でのショ糖含量が増大するとの仮説を提示している。本実験において野生種の葉中に認められた可溶性酸性インベルターゼ活性（表 1-1-2）は、 Goldschmidt and Huber（1992）により提示された閾値を上回っていた。従って、野生種の葉において可溶性酸性インベルターゼ活性がショ糖を分解する上で十分量存在しているという上記仮説と矛盾しない。

## 第2節 トマト果実の可溶性酸性インベルターゼの精製と N末端アミノ酸配列の決定

第1節において、トマトと野生種の果実間における糖蓄積パターンの差異が、主として可溶性酸性インベルターゼ活性の違いによることが示唆された。トマト果実酸性インベルターゼの精製に関する報告は幾つか知られているが (Nakagawa et al., 1971; Yelle et al., 1991; Endo et al., 1990)、全て部分精製であり、可溶性酵素のアミノ酸配列情報を得ることのできる精製法は確立されていなかった。効率的な酵素精製を行うためには、対象とする酵素の活性が最大となった時点の材料を使用する必要がある。本節では、可溶性酸性インベルターゼ活性の著しい上昇が認められたトマト赤熟果実(開花後55-60日)を材料として、同酵素の精製を試みた。さらに、得られた精製標品を用い、構成ポリペプチドの同定、部分アミノ酸配列分析等の生化学的解析を行った。

### 1-2-1 材料および方法

#### 1-2-1-1 植物材料

温室で栽培したトマト品種「ハウスおどりこ」の赤熟果実 (Red stage) を細断し、液体窒素で凍結後、-80℃で保存したものを材料とした。

#### 1-2-1-2 蛋白質の精製

果実500gを500mlの緩衝液A(100mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH6.5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF)と共にブレンダーで磨砕し、4重のガーゼで濾過した後、13,600xgで20分間遠心分離した。得られた上清には75%飽和分の硫酸アンモニウムを加え、5℃で一晩放置した。13,600xgで20分間遠心分離し、得られた沈殿は、25mlの緩衝液B(10mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH6.5,

1mM EDTA, 0.1mM DTT) に溶解し、約 6500ml の緩衝液 B に対して最低 6 時間以上透析し、39,800xg で 35 分間遠心後、上清を得た。緩衝液 B で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (2.6x28 cm、ファルマシア社) に流速 0.5ml/min でこの上清を添加し、カラムを 4 倍量の緩衝液 B で洗浄した後、50mM NaCl を含む緩衝液 B によりインベルターゼを溶出させ、8ml ずつ分画し、酵素活性を測定した。インベルターゼ活性を有する画分は一つにまとめた後、75%飽和硫酸アンモニウムにより沈殿、濃縮した。沈殿は 1ml の緩衝液 C (100mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH6.5, 1mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.5M NaCl) に懸濁し、緩衝液 C に対し一晩透析後、30,800xg で 35 分間遠心して不溶物を除き、上清を得た。緩衝液 C で平衡化した ConA-Sepharose カラム (0.8x4 cm、ファルマシア社) にこの上清を添加し、カラムを十分量の緩衝液 C で洗浄した後、50mM methyl  $\alpha$ -D mannopyranoside を含む緩衝液 C によりインベルターゼを溶出させた。活性を有する画分は硫酸アンモニウムにより濃縮し、沈殿を 1ml の緩衝液 D (50mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH6.5, 1mM DTT) に懸濁後、遠心し、上清を得た。緩衝液 D で平衡化した Bio-gel A-0.5m カラム (1.6x56 cm、バイオラッド社) にこの上清を添加し、3 cm/h の流速で分離させ、2.5ml ずつ分画した。活性を有する画分は、硫酸アンモニウムで濃縮し、沈殿の状態で-20℃に保存した。

### 1-2-1-3 蛋白質の分析

精製蛋白質は 10%SDS-PAGE (Laemmli, 1970) により分離後、CBB G-250 により染色、検出した。Non-denaturing PAGE および活性染色は、Krishnan and Pueppke (1990) の方法に準じて行った。ただし活性染色には、100mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) を使用した。蛋白質のプロットィングおよび気相シーケンサーによるアミノ酸配列分析は、平野 (1989) の方法により行った。

## 1-2-2 結果および考察

### 1-2-2-1 可溶性酸性インベルターゼの精製

DEAE、ConA、Bio-gel の 3 種のカラムを使用することにより、比活性は約 54 倍に増大した (表 1-2-1)。しかし、最終標品を SDS-PAGE により分析したところ、主要な 50 kDa バンドの他に、20-30 kDa 付近に数本のバンドが含まれており (図 1-2-1)、単一標品を得るには至らなかった。そこで最終標品を non-denaturing PAGE により展開後、活性染色および CBB 染色を行い、酸性インベルターゼに由来するバンドの同定を行った。その結果、活性染色により検出されたバンドの移動度は、CBB 染色における主要バンドの移動度とほぼ一致した (図 1-2-2A)。次に、non-denaturing gel 上の主要バンド (CBB 染色したもの) を切り出し、SDS-PAGE で再展開したところ、最終標品中の主成分である 50 kDa ポリペプチドにより構成されていることが明らかとなった (図 1-2-1, 1-2-2B)。なお、最終標品中に認められる 50 kDa 以下の低分子バンド (図 1-2-1) は、他の性質の異なる数種のカラムを使用した場合においても 50 kDa バンドと同一の挙動を示し、分離が困難であったため、Yelle et al. (1991) の示唆するように酸性インベルターゼの部分分解物であろうと考えられた。

Yelle et al. (1991) は、トマト果実中に、同一遺伝子由来で生化学的性質の極めて類似した 3 種類の酸性インベルターゼ isoform が存在することを示唆している。しかし、今回の可溶性画分からの酵素精製過程においては、複数の活性ピークの存在は確認できなかった。DEAE-Sepharose カラムの溶出緩衝液中の塩濃度を変えた場合も同様の結果であった。さらに、non-denaturing PAGE により最終精製標品を分離し、活性染色を行った際も複数のバンドは検出されなかった (図 1-2-2A)。これらの結果は、果実可溶性画分中の酸性インベルターゼの主要 isoform が 1 種類であることを示唆している。

表 1-2-1 トマト赤熟果実からの可溶性酸性インベルターゼの精製

精製段階	タンパク質	活性	比活性	回収率	精製倍率
	mg	units	units/mg protein	%	-fold
粗抽出液	378	3050	8.07	100	1.00
硫酸アンモニウム沈殿	125	2150	17.2	70.5	2.13
DEAE-Sepharose	10.8	970	89.8	31.8	11.1
ConA-Sepharose	1.12	254	227	8.33	28.1
Bio-gel A-0.5	0.32	141	441	4.62	54.6

インベルターゼ 1 unit は、1 分間に 1 $\mu$ mol のシヨ糖を分解しうる酵素活性と規定。

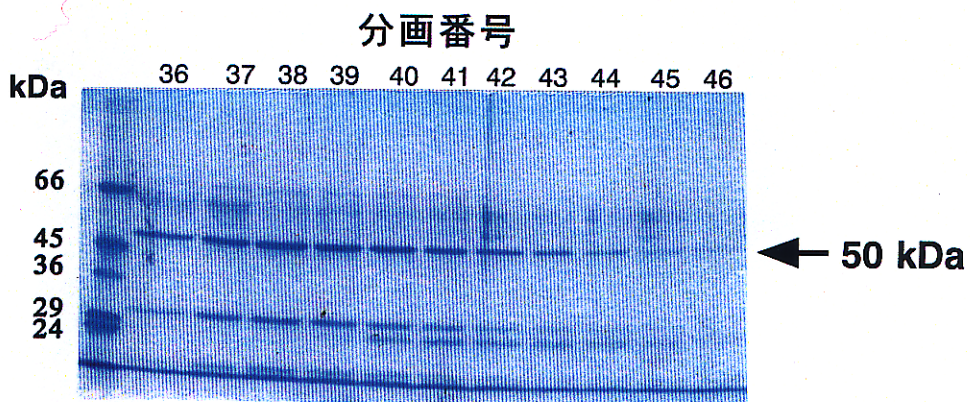


図1-2-1 Bio-gel A-0.5による分離後の各分画中の蛋白の10% SDS-PAGE分析

分画36~39は酸性インベルターゼ活性のピークと一致した。これら分画をまとめて最終標品とした。

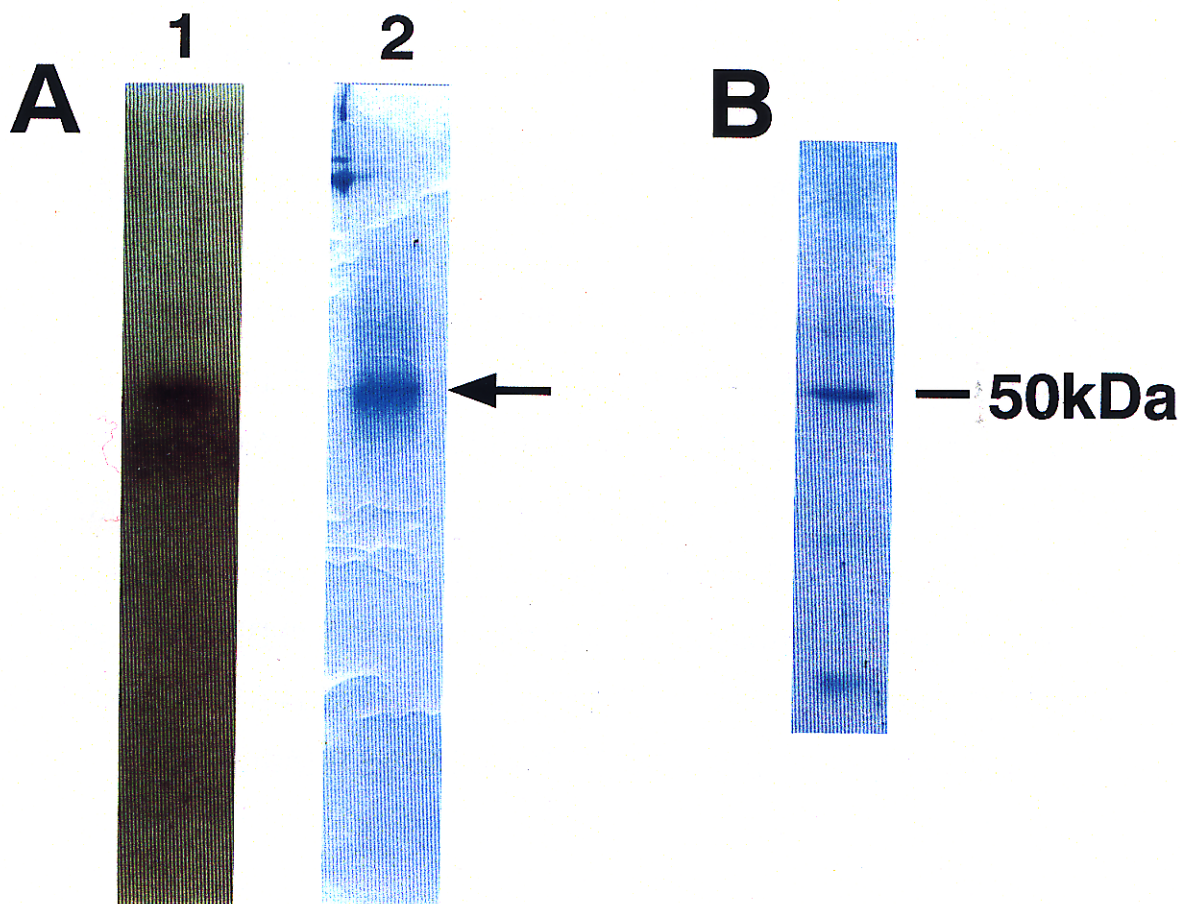


図1-2-2 可溶性酸性インベルターゼポリペプチドの同定

最終標品は、non-denaturing PAGEによる分離 (A) 後、3,3'-diaminobenzidine (活性染色、レーン1) あるいはCBB G250 (レーン2) により染色した。レーン1で検出されたバンドとレーン2における主要バンドの移動度 (矢印で表示) は一致していたため、レーン2上の主要バンドを切り取り、SDS-sample buffer (Laemmli, 1970) で平衡化した。これをSDS-PAGEで分離し、CBB G250により染色した (B)。



### 1-2-2-2 可溶性酸性インベルターゼポリペプチドの N 末端アミノ酸配列分析

最終精製酵素標品を SDS-PAGE により展開し、PVDF 膜（イモビロン-P、ミリポア社）に電氣的に転写し、CBB R250 で染色した。その後、可溶性酸性インベルターゼポリペプチドに相当する 50 kDa バンド（約 100pmol）を切り取り、気相シーケンサーによる N 末端アミノ酸配列分析に供した。分析時の流出によるロスさらにはバックグラウンドの上昇等のため、サイクル後半部にはやや不明瞭な箇所も存在したが、最終的に N 末端から 23 残基までのアミノ酸配列を決定した（図 1-2-3）。決定した配列の N 末端には開始メチオニンが存在せず、ニンジン細胞壁結合型酸性インベルターゼ（Sturm and Chrispeels, 1990）と同様、前駆体の存在が示唆された。しかしながら成熟型ニンジン細胞壁結合型酸性インベルターゼの N 末端配列との類似性は殆ど認められなかった（約 17%）。

**YAWSNAMLSAQWTAYDFQCQKMD . . .**

**図 1-2-3 トマト果実可溶性酸性インペルターゼの N 末端アミノ酸配列**

可溶性酸性インペルターゼ精製標品は、10% SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に電気的に転写した。CBB R250 で膜を染色後、50kDa バンドを切り取り（約 100pmol）、気相シーケンサー分析に供した。A: Alanine, C: Cysteine, D: Aspartic acid, F: Phenylalanine, K: Lysine, L: Leucine, M: Methionine, N: Asparagine, Q: Glutamine, S: Serine, T: Threonine, W: Tryptophan, Y: Tyrosine

## 摘要

果実における糖蓄積パターンの異なる2種、トマト (*Lycopersicon esculentum*) 品種「ハウスおどりこ」および近縁野生種 *Lycopersicon peruvianum* を材料として、果実、葉における糖含量および酸性インベルターゼ活性を測定した。また、トマト赤熟果実を材料として可溶性酸性インベルターゼを精製し、そのN末端アミノ酸配列等について解析した。

1) トマト果実は、発育初期から還元糖を多量に蓄積したが、野生種果実は発育に伴い還元糖量が減少し、ショ糖の蓄積量が増大する傾向を示した。調査した全ての発育段階において、トマト果実中の可溶性酸性インベルターゼ活性は、野生種果実中の活性を上回った。これらの結果は、可溶性酸性インベルターゼ活性が *Lycopersicon* 属果実における糖組成の制御に関与することを示唆している。

2) トマト成熟葉における可溶性および細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、野生種葉中の活性を上回った。しかし、両者の成熟葉の糖組成はほぼ同じであり、ショ糖含量は非常に少なかった。この理由としては、野生種の成熟葉中の可溶性酸性インベルターゼ活性のレベルが、葉の液胞中に貯蔵されたショ糖の分解においては十分であるという可能性が考えられる。

3) トマト赤熟果実を材料として可溶性酸性インベルターゼの精製を行った。最終的に得られた標品は、複数のポリペプチドにより構成されていたが、活性染色により、主要な成分である50 kDaのポリペプチドが可溶性酸性インベルターゼであると推定された。最終標品中の50 kDaポリペプチドを気相シーケンサー分析に供し、N末端から23残基のアミノ酸配列を決定した。