

植物組織のエンドポリガラクトー ナーゼ活性の検出法

淵上 倫子*・佐々木 敦子**・小沢 潤二郎

現在9あるいは10種のペクチン質分解酵素が知られているが、高等植物にはその中ペクチンエステラーゼ、エンドポリガラクトーナーゼ (endo-PG) およびエキソポリガラクトーナーゼ (exo-PG) が分布している。高等植物はペクチン質を分解するリアーゼはつくらないようである。ポリガラクトーナーゼ (PG) は植物界に広く分布していることが知られているが、エンド型であるか、エキソ型であるかの判別がなされていない場合が多い。Endo-PG は exo-PG に比べて反応液の粘度の下降/還元糖の増加が大きいこと、基質からオリゴガラクトーロン酸を多量に生成することで同定されている。

Exo-PG はペクチン酸を非還元性末端からガラクトーロン酸を遊離しながら分解し、ラムノシド結合その他の異常結合によって作用が阻止される。Exo-PG によるペクチン酸の分解が限度に達したとき、反応液に exo-PG を追加してもグリコシド結合の分解は起きないが、endo-PG を加えれば異常結合を越えて反応が進むはずである。これを基礎にして endo-PG を検出することが可能かどうかについて実験を行なったのでその結果を報告する。

実験の方法と結果

1. ペクチン酸の調製

市販カンキツ (レモン) ペクチンの2%溶液に0.1 Nカセイソーダ溶液をペクチン1に対して2 (容量比) 加え、0℃に90分間放置してペクチンをケン化し、塩酸溶液を加えてペクチン酸を沈澱させ、沈澱を0.02 N塩酸溶液でよく洗い、さらに80%、99%エタノールで洗浄、乾燥する。ペクチン酸は稀薄カセイソーダ溶液に溶かし pH を5.0に調節して使用する³⁾。

2. ニンジンの exo-PG およびトマトの酵素液の調製

市販の西洋ニンジンの根 (500 g) に食塩 (10%)-EDTA (1%) 混合液 (500 ml) を加えミキサーで破碎し、4℃に一夜放置後搾汁する。汁液を硫酸アンモニウムで飽和し、ハイフろスーパーセルをろ紙にしいてろ過して沈澱を集め、これを100 mlの水にけん濁し、0.02 Mの酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) に対して透析する。透析内液を遠心分離して上澄を exo-PG の酵素液として用いる⁴⁾。

昭和55年12月15日受理

* 岡山県立短期大学食物科

** 中国短期大学家政科

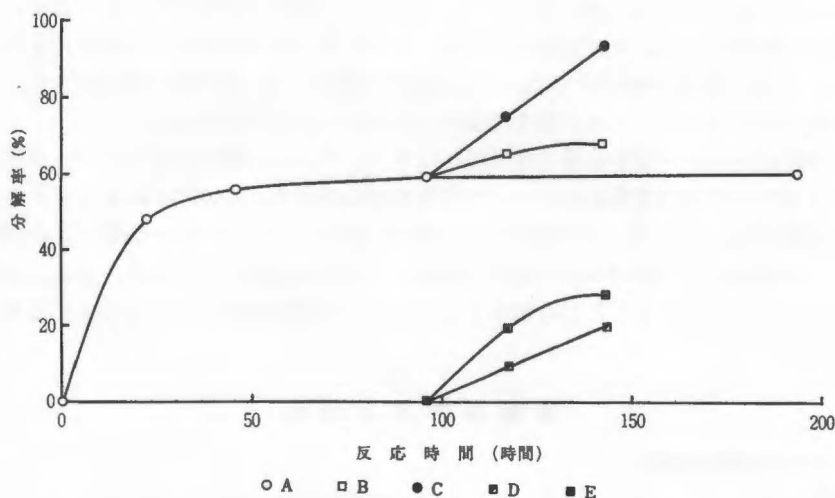
トマトの酵素液は赤く熟した市販のトマトから ニンジンの *exo*-PG と同じ方法で調製した。

3. 基質の分解率の測定

基質（ペクチン酸）の濃度をカルバゾール法⁷⁾で求め、反応液の還元糖の増加量を Willstätter-Schudel の変法⁸⁾で測定して基質の分解率を算出した。

4. *Exo*-PG によって限度まで分解したペクチン酸に対するトマト酵素の作用

0.5% ペクチン酸 2 ml, 0.4 M 酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) 1 ml に *exo*-PG 17 ml を加え、35°C で反応させ、*exo*-PG によるペクチン酸の分解率がほとんど一定になったとき (95時間)、反応液を A, B, C に3分する。A はそのまま、B, C にはトマト酵素液をそれぞれ B 1 に対して 0.12, C 1 に対して 0.6 容量加えて 35°C に保つ。第 1 図に示すよ



第 1 図 *Exo*-PG によって限度まで分解したペクチン酸に対するトマト酵素の作用

うにトマト酵素液は *endo*-PG を含んでいるのでこれを加えると *exo*-PG による分解限度を越えてペクチン酸の分解が進む。A の一部をとり未分解のペクチン酸を加えて 35°C に放置すると還元糖が生成するので、*exo*-PG によるペクチン酸の分解が限度を示すのは反応中に *exo*-PG が失活するためではない。また植物組織はガラクトキロン酸酸化酵素¹¹⁾を含んでいることがあるが、ニンジンの *exo*-PG またはトマト酵素液はガラクトキロン酸 (0.06%) と pH 5.0 で 35°C に保っても、Willstätter-Schudel 法の変法で測定した還元糖量は変化せず、これら酵素液にはガラクトキロン酸酸化酵素活性はないと考えられる。結局、第 1 図の結果はニンジンの *exo*-PG でペクチン酸を限度まで分解させ、これに酵素試料を加えてペクチン酸の分解がさらに進むか否かを調べることによって植物組織の *endo*-PG の検出が可能であることを示している。B, C のように *exo*-PG を含む反応液に *endo*-PG を加えた場合ペクチン酸の分解は *exo*-PG によって増幅されるはずである。ペクチン酸にトマトの酵素液のみを加えて作用させた場合 [第 1 図, D, E の反応液の組

成, 0.5%ペクチン酸・pH 5.0, 0.4Mの酢酸塩緩衝液・水・トマト酵素液(D)2:1:17:2.4(E)2:1:17:12] に比べてみるとB, Cでの exo-PG による増幅効果は顕著でないように思われる。基質(ペクチン酸)の分子構造のためであると推察される。

考 察

Endo-PG は果実が成熟するとき^{8,9)}あるいは種子が発芽して貯蔵物質を消費するとき⁹⁾生成することが知られているので、組織の老化に関係のある酵素であると考えられている。しかしトマトは endo-PG の急激な生成の前にかかなり柔らかくなり¹²⁾, 成熟したリソゴに exo-PG のみが検出され¹⁾, さらにカンキツの葉の離層の PG はエキソ型であることが報告されており¹¹⁾, endo-PG と老化との関係は必ずしも明確であるとは言えない。

Exo-PG はカラスミギ子葉鞘などで、細胞分裂の盛んなときに生成することが報告されている¹⁰⁾。しかし細胞分裂とは関係のない exo-PG も知られており⁹⁾, 特にニンジン¹⁾の exo-PG は他のものと異なり Ca^{2+} で活性化されない。

PG は活性度は高くない場合が多いようであるが植物に広く分布している。その植物生理学的な意義は推理しがたい。植物界における PG の分布を更に広く調査し、それらの作用形式すなわちエンドあるいはエキソ型であるかを判定することは PG の果たす植物生理的な役割を理解するためにぜひ必要であると思われる。

高等植物にはグリコシド分解酵素として endo-PG と exo-PG の2種のみが存在すると考えられるので、反応液の粘度の下降/還元力の増加およびオリゴガラクトuron酸の生成を調べて endo-PG の同定がなされている。この際共存する exo-PG の影響をなくするためある程度の精製が必要である。本報に記述した方法に従えば精製の必要なく、また活性度の低い試料についても endo-PG の検出が可能である。さらにニンジンには endo-PG 活性がなく、材料として用いる exo-PG が調製しやすいという利点もあり、高等植物の endo-PG には好適な検出法であると思われる。ただし基質として用いるペクチン酸の分子の構造は一定ではなく起源によって異なるのでそのために検出の感度が影響を受けると思われる。基質分子の構造の違いは exo-PG で限度まで分解されて残るペクチン酸の分子構造の違いとなり、endo-PG および exo-PG による分解の難易、検出の感度の差を生ずるが、好適な基質を選んで限定してそれを用いれば本法は endo-PG の優れた検出法になると思う。ただしほとんど精製されていない酵素試料を用いるためその中に含まれているガラクトuron酸酸化酵素によって検出が妨害される恐れがある。亜硫酸ナトリウムの使用¹¹⁾などこの酵素の影響をうけないための手段を講じなければならない。

摘 要

ニンジンの exo-PG でペクチン酸を限度まで分解した反応液に酵素試料(植物組織の抽出液より調製)を加え、還元糖がさらに生成するか否かを調べることによって植物組織中の endo-PG の有無を簡易に判定することができる。

文 献

1. Bartley, I. M. 1978. Exo-polygalacturonase of apple. *Phytochem.* 17: 213-216.
2. 畑中千歳. 1967. ヨウ素滴定法による微量のアルドースの定量. *農化誌* 41: 448-453.
3. 畑中千歳, 小沢潤二郎. 1966. 酵素によるペクチン酸の分解. (第4報) アルカリまたはペクチンエステラーゼでけん化してつくったペクチン酸に対するにんじんのエキソポリガラクトナーゼの作用. *農化誌* 40: 421-428.
4. Hobson, G. E. 1964. Polygalacturonase in normal and abnormal tomato fruit. *Biochem. J.* 92: 324-332.
5. Hunter, W. J. and Elkan, G. H. 1974. Endopolygalacturonase from tomato fruit. *Phytochem.* 13: 2725-2727.
6. Hunter, W. J. and Elkan, G. H. 1975. Pectic and cellulolytic enzymes in soybeans. *Phytochem.* 14: 107-110.
7. McComb, E. A. and McCready, R. M. 1952. Colorimetric determination of pectic substances. *Anal. Chem.* 24: 1630-1632.
8. Pressey, R. and Avants, J. K. 1973. Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiol.* 52: 252-256.
9. Pressey, R. and Avants, J. K. 1976. Pear polygalacturonases. *Phytochem.* 15: 1349-1351.
10. Pressey, R. and Avants, J. K. 1977. Occurrence and properties of polygalacturonase in *Avena* and other plants. *Plant Physiol.* 60: 548-553.
11. Rivo, J. 1974. A polygalacturonase from citrus leaf explants (Role in abscission). *Plant Physiol.* 53: 312-316.
12. Sawamura, M., Knecht, E. and Bruinsma, J. 1978. Level of endogenous ethylene, carbon dioxide and soluble pectin, and activities of pectin methylesterase and polygalacturonase in ripening tomato fruits. *Plant and Cell Physiol.* 19: 1061-1069.