

ミニトマト果実のポリガラクチュロナーゼ活性

稲荷妙子・竹内徳男・森本仁美

家政学部家政学科管理栄養士専攻

(2003年9月11日受理)

Polygalacturonase from Cherry tomato

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Home Economics,
Gifu Women's University, 80 Taromaru Gifu, Japan (〒501 - 2592)

Taeko INARI, Tokuo TAKEUCHI and Hitomi MORIMOTO

(Received September 11, 2003)

abstract

A Polygalacturonase (E. C. 3. 2. 1. 15, PG) activities from cherry tomato increased with fruit ripening, and agreed with the increase with the ripening of pectinesterase (PE) activity entirely. The molecular weight of PG was found to be 30,000 by gel filtration. The optimum activity was at pH 4.0 and at 48°C. PG was stable between pH 5.0 and 6.5 and at temperatures below 50°C. The Km value was estimated to be 0.26% for polygalacturonic acid as the substrate. Cations activated PG, and particularly Na⁺ may have a promotive effect on PG like PE. For the effect of some chemical reagents on PG activity, sodium citrate and EDTA activated it, but phenylhydrazine-HCl and semicarbazide-HCl inhibited it. So, it was guessed that the active site of PG was the acidic amino acid. And because sodium sulfite and cysteine-HCl inhibited PG activity, it became clear that PG was inhibited by reducing. It was suggested that the active site of PE and PG were different.

I. 緒言

トマトは世界中で最も食されている食物の1つであり、中でもミニトマト果実の消費は最近増加してきている。“ミニトマト”の名称は果実が普通トマトと比べ著しく小さいことに由来するもので、すでに一般的なものとなっているが、プチトマト、ペティトマト、チェリートマトなどと品種名がミニトマトを代表する名称として使われることもある。ミニトマトの人気が高まってきた理由として以下のようなことが挙げられる。

- ①新しい品目として興味がもたれる。
- ②まるごと食べられ、手軽である。
- ③糖度が高く、果物的色彩がある。

ミニトマトは、以前は機内食やパーティーのオードブル用など需要が特殊であったが、最近では食生活の洋風化、多様化に伴い、家庭においても使いやすい野菜として認められるようになってきている。消費形態としてはサラダの材料、弁当の添えものなど多様である。

ミニトマトの来歴はかなり複雑で、不明の部分もあるが、野生種に近いもの、野生種と

栽培種の交雑種、栽培種の野生化したものなどが起源となっていると推定されている。また、トマトの変種として扱われる極小果種のチェリートマトは大果系栽培トマトの先祖と考えられているが、これもミニトマトの範疇で育成栽培されている¹⁾。

このようにミニトマトは普通トマトおよび野生種の双方に深いつながりがあり、またミニトマトの需要が特殊なものから一般的なものへと変化してきたため、今後はさらに多様な品種・系統に分化して行くものと思われる。

また、ミニトマト果実の成分については、四訂日本食品成分表では報告がなかったが、2000年発表の五訂日本食品成分表ではミニトマトが一般に食されるようになったため、掲載されている²⁾。トマトに比べてミニトマトはビタミンA、Cを筆頭にビタミンなどの含有量が高いという特徴がある。

ところで果実や野菜などの細胞膜や細胞間充填物質の構成成分であるペクチン関連物質は、細胞を保護し、細胞の結合、組織の支持、保水性等に関与している³⁾。ペクチンの基本成分はDガラクトシロン酸が α 1,4結合で直鎖状に結びつきポリガラクトシロン酸となる酸性多糖体で、ガラクトシロン酸残基のカルボキシ基(-COOH)は部分的にメチル基によりエステル化(-COOCH₃)されている。一般の植物から抽出されるペクチンは、これら主鎖のなかにLラムノースを含むラムノガラクトシロナンで、側鎖としてLアラビノース、Dキシロース、Dガラクトース、Lフコースなどの中性糖が結びついたヘテロ多糖類である。ペクチンはCa²⁺が存在すると硬いゲルとなり、食品工業や飲料加工、製菓領域で広く利用され、近年食物繊維の摂取量が減少してきた日本人の食生活にとって注目されつつある。

果実や野菜の組織の軟化はペクチンを含ん

だ多糖成分の生理的变化によるとされ、未熟果実のペクチンは果実の発達と共に水溶性ペクチンに分解される水不溶性のプロトペクチンであると考えられている。現在はペクチン加水分解酵素、特にペクチンエステラーゼ pectinesterase (E. C. 3.1.1.11, pectin pectylhydrolase) とポリガラクトシロナーゼ polygalacturonase (E. C. 3.2.1.15, poly-(1,4- α -D-galacturonide)-glycanohydrolase) が、主に果実組織の軟化に寄与していると考えられているが、その機構はまだ明確にされていない。トマト果実についても軟化とペクチン加水分解酵素の関係の報告がある⁴⁻⁷⁾。ミニトマトのペクチン加水分解酵素もまた、果実の軟化に影響を及ぼす大切な要因と思われるが、未だ報告はされていない。そこで、我々はミニトマトのペクチン加水分解酵素の一つであるペクチンエステラーゼ(PE)について成熟による変化やその特性を明らかにした⁸⁾。また、ミニトマトの成熟に伴う軟化をペクチンの溶解性、糖組成、分子量の変化等から考察した⁹⁾。

今回はPE以外の代表的なペクチン加水分解酵素であるポリガラクトシロナーゼ(PG)の活性について検討したので報告する。PGは図1に示したようにペクチンの主鎖であるDガラクトシロン酸の α 1,4結合を加水分解する酵素である。

II. 実験方法

1. 試料

試料として、岐阜市内にて露地栽培されたミニトマト(品種ペベ)を用いた。果実は成熟度合によって、緑で果実が小さい未熟、緑で少し白くなり果実が大きくなった緑熟、赤く色付き食用適期となった成熟の3段階に果皮色に応じて分別収穫した。

PGの実験に用いたこれら果実の平均重量

は未熟果3.0g, 緑熟果8.6g, 成熟果9.7gであった。

2. PGの抽出

ミニトマト果実(300g)を2%ポリビニルピロリドンを含んだ蒸留水で摩砕した。その懸濁液を4℃で10分間20,000Gにて冷却遠心分離し、得られた残渣を1M NaCl溶液(NaOH溶液でpH6.0に調整)に再び懸濁させた。3時間抽出後、その懸濁液を再び10分間20,000Gで遠心分離し、その上澄液をPGの粗酵素液とした。

3. PGの活性

PGの活性単位は次のようにして求めた。すなわち、0.2%ポリガラクトクロン酸(Sigma chemical co.), 0.15M NaCl・0.05M 酢酸緩衝液(pH3.8)の基質溶液に酵素を加えて、20分間40℃に保持した。分解で生じるガラクトクロン酸量をソモギ・ネルソン法で測定し、1分間当たり1 μ molのガラクトクロン酸を遊離させる酵素量を1単位とした¹⁰⁾。なお、酵素反応液中には還元糖がもともとも含まれているので、この量を(同様にソモギ・ネルソン法で求め)測定値から減じて活性単位を計算した。以下、この方法をPG活性測定の標準法と表現する。

4. タンパク質の測定

タンパク質量は、標準にウシ血清アルブミンを用いてローリー法で決定した。また、カラムクロマトグラフィーの溶出液のタンパク質量は280nmにおける吸光度の値で表した。

5. PGの精製

(1) 硫酸アンモニウムによる塩析

粗酵素液を80%飽和硫酸アンモニウムで4℃にて塩析し、沈殿物を冷却遠心分離で集めた。この沈殿物を0.15M NaCl(pH6.0)溶液に溶解した後、同溶液に対して透析した。

(2) ゲルろ過による精製

硫酸塩析後の部分精製酵素液を凍結乾燥により濃縮した後、0.15M NaCl(pH6.0)溶液で平衡化させたCellulofine GCL-2000-mカラム(72x2.8cm, i.d.)を使用して流速1ml/minでゲルろ過を行った。なお溶出液は10mlずつ分画し、酵素活性とタンパク質量を測定した。

6. 分子量

分子量の測定は5(2)のゲルろ過による精製と併せて行った。

なお、分子量マーカーとして、ブルーデキストラン(Mw. 2,000,000), フェリチン(Mw. 450,000), カタラーゼ(Mw. 240,000), キモトリプシン(Mw. 25,000), ミオグロ

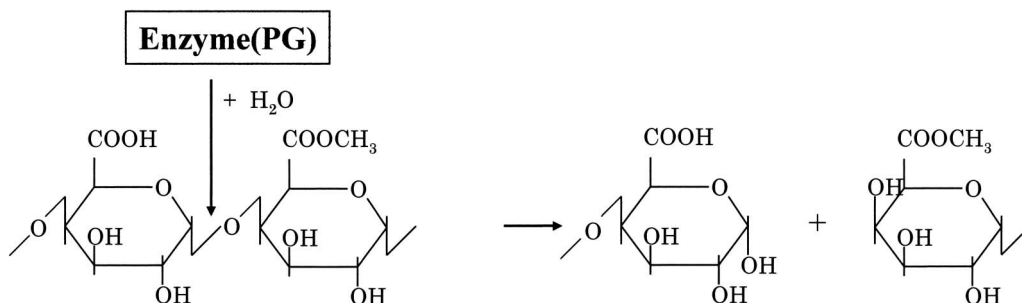


図1 PGのペクチンへの作用

ピン (Mw . 17 800) と チ ト ク ロ ー ム c (Mw . 12 400) を用いた (SERVA Electrophoresis GmbH)。

Ⅲ . 実験結果及び考察

1 . 果実成熟における PG の変化

図 2 に成熟中の 3 段階におけるミニトマト果実 1 個あたりの PG 活性を示した。PG 活性は果実の成熟に伴って顕著に増加し、1 個あたりの酵素活性は未熟果 0.12U、緑熟果 1.46 U、成熟果 2.37U と成熟果は未熟果の 20 倍も高かった。図には示さなかったが、果実 100g 中で見ても、成熟果の PG 活性は 24.47U と未熟果 (3.87U) の 6 倍高く、成熟による増加が大きいことが判明した。また、PE 活性と PG 活性は並行して成熟に伴い増加することが認められた⁹⁾。なお、PG 中のタンパク

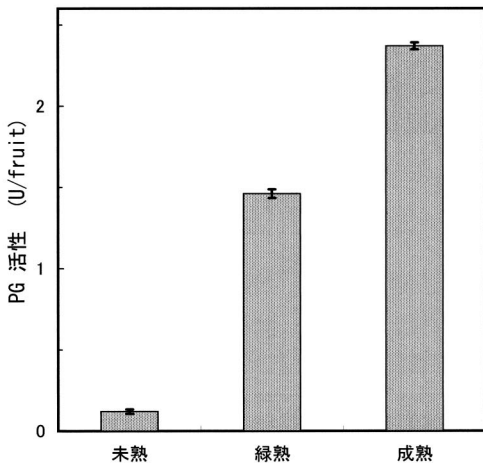


図 2 ミニトマト果実の成熟における PG 活性の変化

質量は果実 100 g あたり未熟果 56mg、緑熟果 68mg、成熟果 72mg と成熟するに従って増加したが、PG 活性の増加の方が高かった。そのことから、ミニトマトの PG 比活性も果実 100 g あたり未熟果 0.069U/mg、緑熟果 0.249U/mg、成熟果 0.340U/mg と成熟するに従って顕著に増加した。

ミニトマトは成熟することによってペクチン総量が激減し、ペクチンの低分子化が確認できた⁹⁾。これは成熟に伴う中性糖の減少と、PG 活性の増大によるポリガラクトuron酸の分解のためと思われる。また、成熟に伴う PE 活性の増大がメトキシル基の減少を促し、その結果 PG が作用しやすくなったと考えられる。すなわちミニトマト果実の軟化には、水溶性ペクチン量の増加、ペクチンの低分子化、ペクチン総量の減少が寄与していると考えた。

2 . PG の精製

ミニトマト成熟果から抽出された PG を 80%飽和硫酸塩析、及びゲルクロマトグラフィーにより精製した。

図 3 に PG のゲルクロマトグラムを示した。溶出液はフラクション毎に標準法にて酵素活性を測定した。タンパク質のピークは数個得られたが、PG 活性が認められたのはメインのピークのみであったことから、混在タンパク質が除去でき、ゲルクロマトグラフィーによる PG の精製は有効であった。

精製結果を表 1 に示した。PG は粗酵素に

表 1 ミニトマト PG の精製

精製段階	総活性 (units)	タンパク質 (mg)	比活性 (units/mg protein)	精製度 (fold)	回収率 (%)
粗酵素	72.4	218	0.33	1.0	100
0 - 80% (NH ₄) ₂ SO ₄ 塩析	52.0	75	0.69	2.1	72
ゲルろ過	51.4	24	2.15	6.5	71

対し最終的に71%の回収率で6.5倍に精製できたが、トマト Hikari の PG⁶⁾と比較して比活性も低いことから、イオン交換クロマトグラフィーやアフィニティクロマトグラフィー等により精製をさらに進めていく必要があると考えられる。

このゲルクロマトグラフィーまで精製した精製酵素を以下の実験に用いた。

3. PG の分子量

PG の分子量は精製を兼ねてゲルクロマトグラフィーで分析した。図3で示したようにフラクション No. 44が最も高い活性値であったため、図4に印で示し、その溶出位置から分子量を求めたところ30,000と算出された。今までに報告されたトマトの PG の分子量は、トマト Hikari 52,000⁶⁾である。他の起源の PG では *Aspergillus japonicus* 35,500¹¹⁾、イチゴ 52,000¹²⁾の報告がある。よって、ミニトマト PG の分子量は今までに報告された PG の分子量よりもやや小さいといえる。

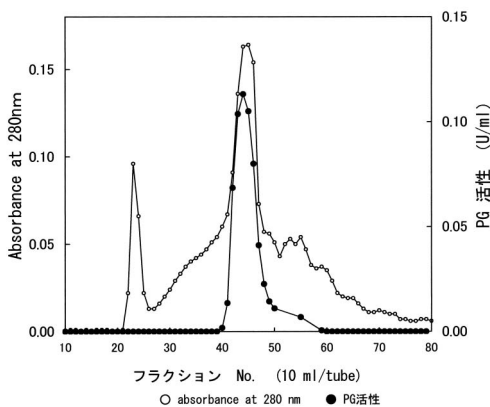


図3 ミニトマト PG のゲルクロマトグラム

4. PG の理化学的特性

精製酵素の理化学的特性を調べた。

(1) 至適 pH

図5AにPGの至適pHを示した。酵素反応系をpH3.0から9.0の範囲に各緩衝液で調整して酵素活性を求め、活性に対するpHの影響を調べた。pH4.0で最も高い酵素活性が得られた。PGの至適pH4.0は *Aspergillus japonicus* の pH4.5¹¹⁾、*Aspergillus awamori* IFO 4033の pH5.0¹³⁾やイチゴの pH5.5¹²⁾に比較してもさらに酸性側の至適pHであった。

(2) pH 安定性

酵素の安定性に対するpHの影響は図5Bに示した。0.15M NaCl溶液(pH6.0)に溶解した酵素を各pHの0.15M NaCl溶液で4, 20時間透析し、酵素のpHを確認後、PG活性を標準法で求めて、透析前の活性値に対する残存活性率で示した。酵素はpH5.0~6.5の間で活性を保持し、完全に安定していることが認められ、図には示していないが、4で1ヶ月以上これらのpHにおいて残存活性率は約100%を保持していた。*Aspergillus awa-*

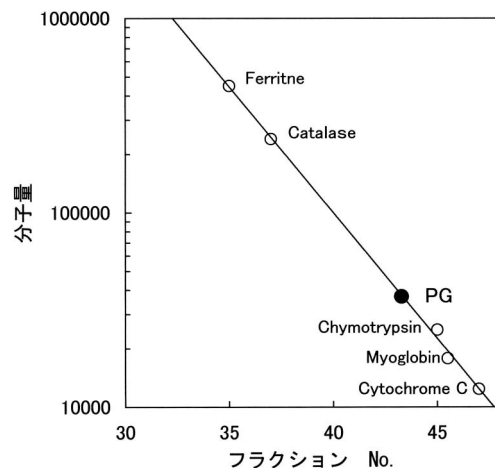


図4 ゲルクロマトグラフィーによる PG の分子量

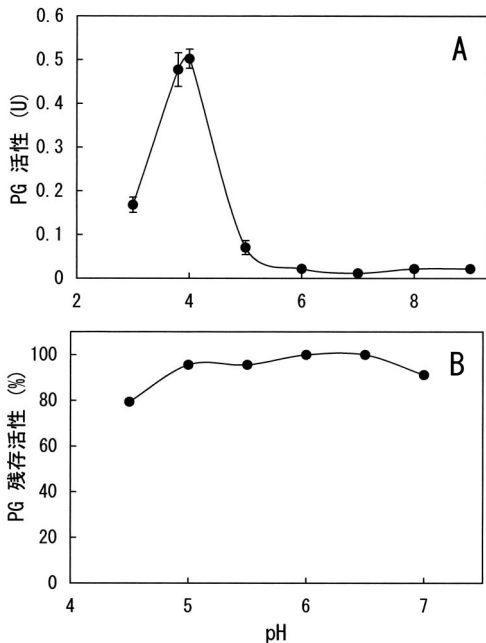


図5 PGの至適pH(A)とpH安定性(B)

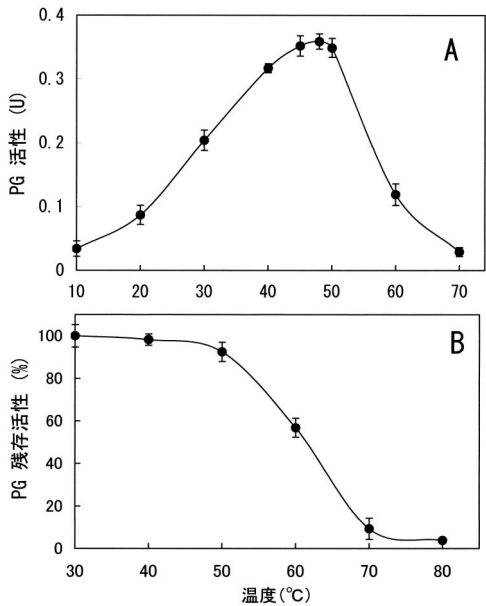


図6 PGの至適温度(A)と温度安定性(B)

mori IFO4033より抽出したPGのpH安定性はpH4.0~6.0であり¹³⁾, *Aspergillus japonicus*のPGではpH4.0~5.0である¹¹⁾ことが明らかにされている。ミニトマトPGはこれらよりも中性に近いpHでも安定といえた。

(3) 至適温度

各温度(10, 20, 30, 40, 50, 60, 70)において標準測定法と同様に20分間反応させて酵素活性を測定したところ, 40~50で活性が高かったことから, その間を詳細に調べた結果, 至適温度は48であった(図6A)。イチゴPGの至適温度は50と報告されており¹²⁾, ミニトマトPGと近似値である。

(4) 温度安定性

温度安定性は0.15M NaCl溶液(pH6.0)に溶解している酵素を各温度(30, 40, 50, 60, 70)に5分間保ち, 直ちに40にして, 標準法でPG活性を求め, 温度処理前の活性値に対する残存活性率で示した(図6B)。酵素は50までは安定であるが, 60で活性は半減, 70でほぼ失活した。

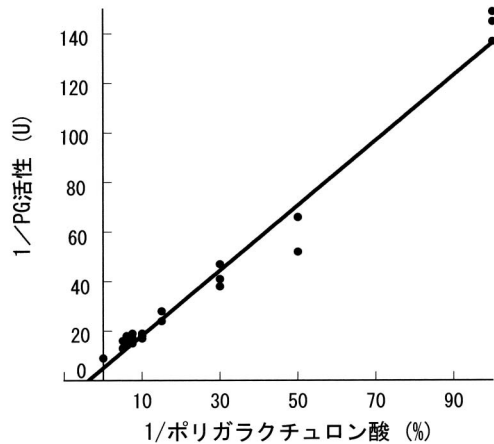


図7 基質濃度とPG活性のLineweaver-Burkのプロット

(5) ミカエリス定数

基質であるポリガラクトン酸濃度に対する酵素活性の影響を調べた。図7に示したように Lineweaver-Burk 法によって PG のミカエリス定数 (K_m) を求めたところ、0.26% ポリガラクトン酸であった。この値は竹花等の報告したトマト PG のポリガラクトン酸を基質とした場合の K_m 0.267%⁶⁾ と極めて類似していた。

(6) 陽イオンの影響

対イオンである陰イオンを塩素イオンに統一して種々の濃度の陽イオン (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Co^{2+}) の PG 活性に対する影響を調べた。標準法では、基質の0.2%ポリガラクトン酸、0.15M NaCl、0.05M 酢酸緩衝液 (pH3.8) を反応液組成としたが、ここではこの0.15M NaCl の代わりにこれら塩化物を添加して求めた。他の条件は標準の測定法と同じである。結果を図8に示した。塩類の代わりに蒸留水を加えた時の PG 活性は標準法の約1/12と低かった。ただし蒸留水を加えた場合でも酵素液の溶媒は0.15M NaCl であるため、加えた酵素液量から計算して、酵素反応液中の NaCl 濃度は0.03M である。どの塩類もそれらの濃度が0.03M 以下では、蒸留水のみを加えた時の活性 (ただし、NaCl 0.03M 濃度) よりも高い活性を示した。また、どの塩類も共通して、塩類濃度の上昇と共に活性が高くなり、固有の濃度でピークを示した後、活性が下がるという共通した傾向が認められた。したがって PG 活性発現には塩類が必要であること、そして活性の高さに塩濃度が影響していることが判明した。また、2価の塩類 (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+}) は0.01M ~ 0.03M 付近に最大活性が認められるのに対し、1価の塩類 (Na^+ , K^+) は0.1M ~ 0.15M に最大活性が見られた。そして最も PG 活性が高かったのは0.15M Na^+ であった。従っ

て PG 活性を促進するためには、塩類を添加した方が良く、酵素液に含まれている NaCl 量も考慮すると、特に0.18M Na^+ が最も活性を促進させることが分かった。また、 Co^{2+} は0.05M 以上の濃度では酵素活性がほとんど認められず、活性を阻害すると言える。

以前ミニトマト PE 活性は、①陽イオン濃度の上昇と共に増加し、ある濃度をピークに次第に活性は低下すること、②2価の陽イオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) においてはそのピークが1価の陽イオン (Na^+ , K^+) よりも低濃度側にあること、③0.05M ~ 0.2M NaCl 存在下で安定し、且つ他のイオンに比べて活性促進が認められること等を報告した。上述のように、ミニトマト PG は陽イオンについてミニトマト PE と極めて類似した傾向を有しているということは大変興味深い。

(7) 阻害剤と賦活剤 (化合物) の影響

次に10mM (ただし σ -フェナントロリンのみ溶解度の関係から1mM) 阻害剤と賦活剤を用いて活性に対する影響を調べた。活性は、ここでも前述同様0.15M NaCl を除いた反応液で測定した。得られた活性値の各化合物無添加時の活性に対する比率を図9に示した。

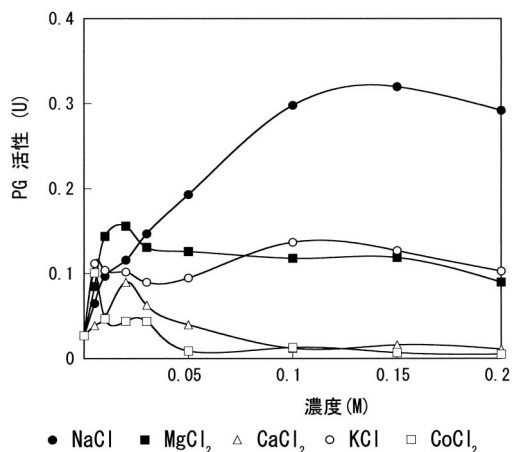


図8 PG 活性に対する陽イオンの影響

キレート試薬のEDTA, クエン酸ナトリウム並びにフッ化ナトリウムはPG活性を増大させた。酸性アミノ酸を活性中心にもつ酵素を阻害する塩酸フェニルヒドラジンと塩酸セミカルバジドはPG活性を阻害した。その他PG活性は亜硫酸ナトリウムとシステイン塩酸塩の添加によっても阻害されるのが認められた。これらの試薬は還元性が強いことから、酵素を還元することによって活性を阻害していると思われる。

興味あることに、PE活性に対して促進効果を示した塩酸フェニルヒドラジンと塩酸セミカルバジドがPG活性には阻害効果を、逆にPE活性に対して阻害効果を示したEDTA, クエン酸ナトリウムがPG活性には促進効果を示し、両ペクチン分解酵素では全く異なる結果が得られた。そのことから、両酵素の活性中心、活性発現等には著しい違いがあることが示唆された。

IV. 要約

ミニトマト果実について、ペクチンの主鎖

であるD-ガラクトクロロン酸の α 1,4結合を加水分解する酵素ポリガラクトクロナーゼ(PG)について調べた。その結果、PG活性は果実の成熟と共に顕著に増加し、PE活性の成熟による増加と全く一致した。PGの分子量は30,000, 至適温度48℃, 至適pH4.0, 耐熱温度50℃, pH安定性5.0~6.5で、ミカエリス定数は0.26%ポリガラクトクロロン酸であった。陽イオンのPG活性に対する影響として、Na⁺がPE活性と同様最も促進効果があった。EDTA, クエン酸ナトリウムはPGを賦活し、酸性アミノ酸を活性中心にもつ酵素を阻害する塩酸フェニルヒドラジンと塩酸セミカルバジドはPG活性を阻害させたことから、PGの活性中心となるアミノ酸は酸性アミノ酸であると考えられる。亜硫酸ナトリウム, システイン塩酸塩の添加によってPG活性は大きく阻害されたことから、PGは還元によって阻害されることがわかった。PEとPGは各種化合物による活性化が全く異なったことから、両酵素の活性中心や活性発現のメカニズムには著しい違いがあることが

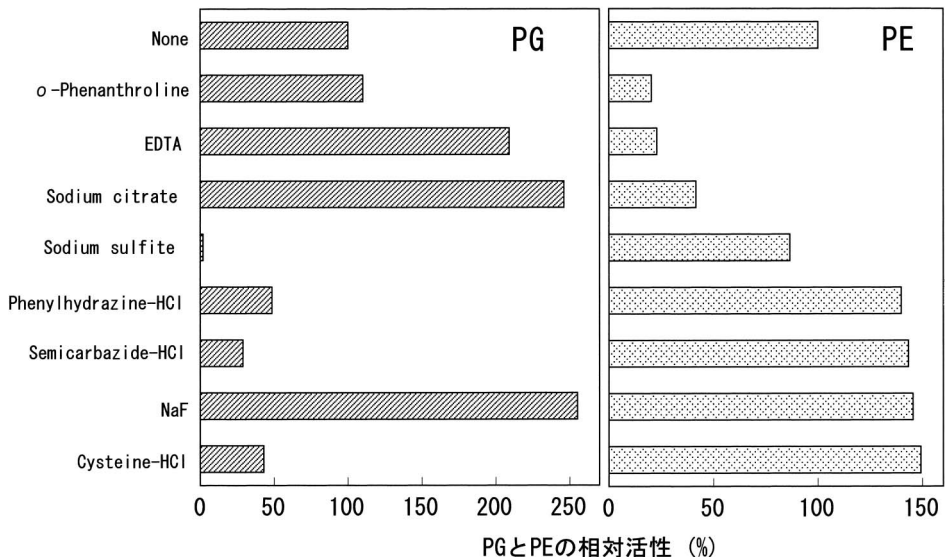


図9 PGとPE活性に及ぼす阻害剤と賦活剤の影響

示唆された。

V . 文献

- 1) 農山漁村文化協会編；野菜園芸大百科 2
トマト，農文協（1988）
- 2) 科学技術庁資源調査会編；五訂日本食品
標準成分表（2000）
- 3) 辻啓介，森文平；食物繊維の科学，朝倉
書店（1997）
- 4) Nakagawa, H. Yanagawa, Y. and Takenaka,
H.; Studies on the pectolytic enzyme (IV).
Agric. Biol. Chem., 34 , 991 - 997 (1970)
- 5) Nakagawa, H. Yanagawa, Y. and Takenaka,
H.; Studies on the pectolytic enzyme (V).
Agric. Biol. Chem., 34 , 998 - 1003 (1970)
- 6) Takehana, H., Shibuya, T. and Nakagawa, H.
; Purification and some properties of endo-
polygalacturonase from tomato pericarp , 千
葉大学園芸学部学術報告 , 23 , 29 - 34
(1977)
- 7) Inari, T. and Tomoeda, M.; Texture and
pectin-hydrolyzing enzymes in various fruits
and vegetables. *J. Home Economics of Ja-
pan*, 36 , 617 - 621 (1985)
- 8) Inari, T., Yamauchi, R., Kato, K. and
Takeuchi, T.; Purification and some proper-
ties of pectinesterase from fruits of a
miniature-fruited red type tomato. *Food Sci.
Thechnol. Res.*, 6 , 54 - 58 (2000)
- 9) Inari, T., Yamauchi, R., Kato, K. and
Takeuchi, T.; Changes in pectic polysaccha-
rides during the ripening of cherry tomato
fruits, *Food Sci. Thechnol. Res.*, 8 , 55 - 58
(2002)
- 10) Gregory, A. T., Neil. G. R. and Donald G.,
The conversion of tomato-fruit polygarac-
turonase isoenzyme 2 into isoenzyme 1 in
vitro. *Eur. J. Biochem.* 115 , 87 - 90(1981)
- 11) Ishii, S. and Yokotsuka T.; Purification and
Properties of Endo-polygalacturonase from
Aspergillus Japonicus. *Agr. Biol. Chem.*, 36 ,
1885 - 1893 (1972)
- 12) Nogata, Y., Ohta, H., and Voragen, A. G. J.;
Polygalacturonase in strawberry fruit, *Phyto-
chemistry*, 34 , 617 - 620 (1993)
- 13) Nagai, M., katuragi, T., Terashita, T.,
Yoshikawa, K. and Sakai, T.; Purification
and Characterization of an endo-polygalac-
turonase from *Aspergillus awamori*. *Biosci.
Biotechnol. Biochem.*, 64 , 1729 - 1732 (2000)